

**T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ROMATOİD ARTRİT TEDAVİSİNE YÖNELİK  
PROTEİN A-TAKILI POLİ(HEMA) KRİYOJELLERİN  
HAZIRLANMASI**

**Mehmet Hüseyin ALKAN**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN: Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DIYARBAKIR  
TEMMUZ 2009**

T.C  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
DİYARBAKIR

Mehmet Hüseyin ALKAN tarafından yapılan “Romatoid artrit tedavisine yönelik Protein A-takılı Poli(HEMA) kriyojellerin hazırlanması” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı      Adı Soyadı

Başkan                   : Prof. Dr. Çetin AYTEKİN  
Üye                         : Prof. Dr. Adil DENİZLİ  
Üye                         : Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL  
                                  (Danışman)  
Üye                         : Doç. Dr. Fikret UYAR  
Üye                         : Doç. Dr. Mehmet DOĞRU

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 03/07/2009

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

...../07/2009

Prof. Dr. Hamdi TEMEL  
ENSTİTÜ MÜDÜRÜ  
( MÜHÜR )

## ÖZET

Romatoid artrit (RA) vücudun kendi bağışıklık sisteminin sağlıklı hücrelere saldırdığı bir otoimmün bozukluktur. Dünya nüfusunun %1-3'ünde RA görülmektedir. Son yıllarda RA hastaları için tedavi yöntemlerinde oldukça yol katedilmiştir. Bu yöntemlerden biri olan immünoadsorpsiyon yöntemi ile, plazmadan sadece patojen antikolar uzaklaştırılmaktadır. Ligand olarak *Staphylococcal* Protein A ile afinite kromatografi uygulamaları, antikor saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Protein A, antikoların Fc kısımlarına spesifik olarak bağlanan bir proteindir.

Sunulan çalışmada, RA tedavisine yönelik protein A takılı-Poli(2-hidroksietil metakrilat) kriyojel hazırlanmıştır. İlk basamakta yığın polimerizasyon tekniği ile plastik şırıngada monomerin sulu çözeltide donmasıyla (donmuş-polimerizasyon) Poli(HEMA) kriyojel hazırlanmıştır. Buz eridikten sonra Poli(HEMA) kriyojelinde 10-200 µm gözenek boyutunda birbiriyle bağlantılı makrogözenekler oluşturulmuştur. Daha sonra CNBr ile aktive edilip spesifik ligand olarak protein A bağlanmıştır. Hazırlanan protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojel yüzey alan ölçümleri, şişme testleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve FTIR ile karakterize edilmiştir. Protein A takılı-poli (HEMA) kriyojelinde maksimum immüno globülin G (IgG) adsorpsiyonu pH 7.4' te 83.2 mg/g olarak bulunmuştur. İnsan plazmasından adsorpsiyon incelendiğinde ise daha da yüksek adsorpsiyon kapasitesi elde edilmiştir (98.7 mg/g). Poli(HEMA) kriyojelin spesifik olmayan IgG adsorpsiyonu ise 0.38 mg/g olarak belirlenmiştir. Adsorbe olan IgG 0.1 M Glisin-HCl (pH 3.5) tamponuyla % 85 saflıkta elüe edilmiştir. Sıcaklık deneylerinde 37°C' de maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesi (98.8 mg/g) gözlenmiştir.

İmmobilize edilen protein A miktarı artıkça adsorplanan romatoid faktörün de artığı gözlenmiştir. İnsan Serum Albumin (HSA) ve IgG protein karışımı ile insan plazması için hesaplanan  $R_s$  değerleri sırasıyla 2.28 ve 2.63 olarak bulunmuştur.

Kan uyuşabilirlik çalışmalarında pıhtılaşma zamanı (CT), aktive kısmi tromboplastin zamanı (APTT), protrombin zamanı (PT) ve fibrinojen zamanı (FT) tayin edilmiş, protein A takılı-Poli (HEMA) kriyojellere ait bütün pıhtılaşma zamanlarının poli (HEMA) kriyojele göre arttığı gözlenmiştir.

Protein A takılı- Poli(HEMA) kriyojel ile 10 kez adsorpsiyon/desorpsiyon yapıldığında IgG adsorpsiyon kapasitesinde belirli bir azalma olmadan tekrar kullanılabilir olduğu görülmüştür.

**ANAHTAR KELİMELER:** Romatoid Artrit, Kriyojeller, Antikor saflaştırma, Protein A, İmmünoglobülin G

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disorder in which the immune system of the body attacks healthy cells. RA prevails among 1-3 % of the world population. In recent years, the RA treatment methods have advanced greatly. One of the methods involving the removal of only pathogenic antibodies out of the plasma is immunoabsorption. Affinity chromatography applications utilizing *Staphylococcal* Protein A as the ligand have been widely used in antibody purification. Protein A is a protein which binds specifically to Fc domain of the antibodies.

In the present study, protein A immobilized poly(2-hydroxyethyl methacrylate) cryogel was prepared. Firstly, poly(HEMA) cryogel was prepared by bulk polymerization which involves freezing of the monomer in aqueous solution in a plastic syringe. After thawing, adjacent pores of 10-200  $\mu\text{m}$  in size formed in the matrix of poly(HEMA) cryogel. The cryogel was then activated by cyanogen bromide (CNBr) followed by immobilization of protein A. The protein A immobilized poly(HEMA) cryogel was characterized by surface area measurements, swelling tests, scanning electron microscopy (SEM) and FTIR. The maximum IgG adsorption by the immobilized cryogel was found to be 83.2 mg/g at pH 7.4. Higher adsorption capacity of IgG (as high as 98.7 mg/g) was reached by the cryogel when human plasma was used. The non-specific IgG adsorption onto the poly(HEMA) cryogel was about 0.38 mg/g. The IgG adsorbed was eluted using 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 3.5) with a purity of 85 %. Maximum IgG adsorption capacity was determined to be 98.8 mg/g at 37 °C in temperature experiments.

It was observed that the rheumatoid factor increased as the immobilized protein A in the cryogel was increased. The computed Rs values for a mixture of Human Serum Albumin (HSA) and Immunoglobulin G (IgG) proteins and human plasma were 2.28 and 2.63, respectively.

It was observed that the factors of Clotting Time (CT), Active Partial Thromboplastin Time (APTT), Prothrombin Time (PT) and Fibrinogen Time (FT)

increased with protein A immobilized poly(HEMA) cryogel as compared to poly(HEMA) cryogel.

Protein A immobilized poly(HEMA) cryogel used for repetitive adsorption/desorption of IgG without noticeable decrease in IgG adsorption capacity after ten cycles.

**KEY WORDS:** Rheumatoid arthritis, Cryogel, Antibody purification, Protein A, Immunoglobulin G

## TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam sırasında bilgi ve desteğiyle daima yanımda olup karşılaştığım tüm zorlukların aşılmasında sonsuz yardımlarını ve anlayışını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Zübeyde BAYSAL' a,

Çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Çetin AYTEKİN' e ,

Tezimin deneysel aşamasındaki zorlukları aşabilmem için bana laboratuvarlarını açan ve bilimsel tecrübelerinden yararlanmama izin veren Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Adil DENİZLİ' ye,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında karşılaştığım güçlükleri çözmemde bana yardımcı olup yol göstererek, bilgilerinden faydalanmamı sağlayan Sayın Doç. Dr. Handan Yavuz' a, Dr. Lokman UZUN' a, Arş. Gör. Deniz TÜRKMEN' e, Nilay BERELİ' ye,

Laboratuvar çalışmalarım süresince güler yüzleri ile bana destek olup, neşeli bir ortamda çalışmalarımı gerçekleştirmemi sağlayan Dicle Üniversitesi ve Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Finansal desteğinden dolayı Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (DÜBAP 07-01-31 nolu proje),

Hayatım boyunca desteklerini her zaman hissettiğim, çok değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

M. Hüseyin ALKAN

Temmuz, 2009

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
1.GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1.OTOİMMÜNİTE VE OTOİMMÜN HASTALIKLAR.....	4
2.1.1.Otoimmünite .....	4
2.1.2.Otoimmün Hastalıkların Oluşumunda Etkin Olan Faktörler .....	4
2.1.2.1.Genetik Faktörler .....	4
2.1.2.2.İmmünolojik Faktörler .....	4
2.1.3.Otoimmün Hastalıklar .....	5
2.1.3.1.Sistemik Lupus Eritematozus (SLE).....	6
2.1.3.2.Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM).....	7
2.1.3.3.Scleroderma veya Sistemik Sclerosis .....	7
2.1.3.4.Behçet Hastalığı.....	7
2.1.3.5. Sjögren Sendromu .....	8
2.1.4. Romatoid Artrit (RA) .....	8
2.1.4.1.Klinik Bulgular .....	12
2.1.4.1.1 Başlangıç Tipleri.....	13
2.1.4.2. Eklem Tutulumu .....	14
2.1.4.3.Eklem Dışı Tutulum.....	14
2.1.4.4.Tanı .....	14
2.1.4.5. Radyografik bulgular .....	16
2.1.4.6. Hastalığın Seyri ve Prognoz.....	16
2.1.4.7. Tedavi.....	17
2.1.4.8. Otoantikorlar .....	18
2.1.4.9.Romatoid Artrit Otoantikorları.....	20



2.2. İMMÜNOGLOBÜLİNLER .....	24
2.2.1. İmmünoglobülinlerin Yapısı .....	24
2.2.1.1. IgA .....	27
2.2.1.2. IgM.....	27
2.2.1.3. IgD .....	27
2.2.1.4. IgE.....	28
2.2.1.5. IgG .....	28
2.2.2. Teröpatik (İyileştirici) Antikorlar.....	30
2.2.3. Antikorların Üretilmesi ve Saflaştırılması.....	31
2.2.4. IgG' nin Tıp Uygulamaları .....	32
2.2.5. İnsan Plazmasından IgG Ayrılması .....	33
2.2.5.1. Cohn Metodu .....	33
2.2.5.2. IgG' nin Çok Basamaklı Ayrılması .....	35
2.3. AFİNİTE KROMATOGRAFİSİ .....	35
2.3.1. Matriks Seçimi .....	38
2.3.2. Afinite Ligandın Seçimi.....	39
2.3.3. Uzatıcı Kollar .....	41
2.3.4. Aktivasyon Yöntemleri.....	43
2.4. HEMOPERFÜZYON.....	44
2.5. BİYOMALZEMELER VE BİYOLOJİK UYUŞABİLİRLİK .....	47
2.5.1. Biyomalzeme-Kan-Doku Etkileşimi .....	47
2.5.2. Polimerik Biyomalzemeler .....	49
2.5.3. Modifiye ve Biyofonksiyonel Biyomalzemeler .....	50
2.5.4. Biyospesifik Sorbentler.....	51
2.6. KRİYOJELLER .....	52
2.6.1. Kriyojellerin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu.....	54
2.6.2. Hidrodinamik Özellikler .....	57
2.6.3. Gözenek Özelliklerinin Kontrolü .....	57
2.6.4. Değişik Enstrümental Teknikler Kullanarak Kriyojel Yapısının Analizi..	59
2.6.5. Kriyojellerin Yüzey Kimyası .....	60
2.6.6. Kriyojellerin Uygulamaları .....	61
2.7. PROTEİN A.....	61

2.8. İMMÜNOADSORPSİYON .....	63
2.8.1. Protein A İmmünoadsorpsiyonu.....	64
2.8.2. Romatoid Artrit Tedavisine Yönelik Protein A İmmünoadsorpsiyon.....	66
2.9. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	67
3. MATERYAL VE METOT.....	73
3.1. Kullanılan Kimyasallar .....	73
3.2. Süpermakrogözenekli Kriyojellerin Hazırlanması.....	73
3.3. CNBr Aktivasyonu .....	74
3.4. Protein A Bağlanması.....	74
3.5. Kriyojelin Karakterizasyonu .....	75
3.5.1. Şişme Deneyi .....	75
3.5.2. Yüzey Morfolojisi .....	76
3.5.3. Yüzey Alanı Ölçümleri.....	77
3.5.4. FTIR Çalışmaları .....	77
3.6. Kan Uyuşabilirlik Çalışmaları .....	77
3.6.1. Pıhtılaşma Zamanı (CT).....	77
3.6.2. Aktive Kısmi Tromboplastin Zamanı (APTT).....	78
3.6.3. Protrombin Zamanı (PT).....	78
3.6.4. Fibrinojen Zamanı (FT) .....	78
3.7. IgG Adsorpsiyon Dinamiklerinin Belirlenmesi .....	79
3.8. Kan Plazmasından IgG Saflaştırma.....	79
3.9. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	80
3.11. FPLC Çalışması .....	80
3.10. Romatoid Artritli Plazmadan Antikor Uzaklaştırma .....	81
3.12. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	82
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	83
4.1. Şişme Deneyi .....	83
4.2. Yüzey Morfolojisi .....	84
4.3. Yüzey Alanı Ölçümleri.....	87
4.4. FTIR Çalışmaları.....	87
4.5. Kan Uyuşabilirlik Çalışmaları .....	88
4.6. IgG Adsorpsiyonuna CNBr Derişiminin Etkisi .....	90

4.7. Protein A Derişiminin Etkisi.....	92
4.8. Basınç Azalması.....	93
4.9. Akış Hızının Etkisi.....	94
4.10. IgG Başlangıç Derişiminin Etkisi .....	95
4.11. Adsorpsiyon İzotermeleri .....	96
4.12. IgG Adsorpsiyonuna pH Etkisi.....	101
4.13. Sıcaklık Etkisi .....	102
4.15. FPLC Çalışması .....	105
4.16. Romatoid Artritli Plazmadan Antikor Uzaklaştırma.....	107
4.17. Kriyojelin Tekrar Kullanılabilirliği.....	109
5. SONUÇLAR.....	110
6. KAYNAKLAR.....	115
ÖZGEÇMİŞ.....	128

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. ACR tanı ölçütleri .....	15
Çizelge 2. 2. RF pozitifliği yapan durumlar.....	16
Çizelge 2. 3. Otoimmün hastalıklarında serum antikorlar .....	19
Çizelge 2. 4. Otoantikorların klinik yaygınlığı ve hastalıklarla olan ilişkileri .....	23
Çizelge 2. 5. İmmüoglobülinlerin özellikleri .....	26
Çizelge 2. 6. Cohn sisteminde plazma proteinlerini dağılımı .....	34
Çizelge 2. 7. Cohn fraksiyonlama sisteminin avantajları.....	34
Çizelge 2. 8. Cohn fraksiyonlama sisteminin dezavantajları .....	35
Çizelge 2. 9. Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler .....	36
Çizelge 2. 10. Afinite kromatografisinin alt başlıkları .....	37
Çizelge 2. 11. Afinite kromatografisi için bazı katı destek türleri .....	39
Çizelge 2. 12. Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligand sınıfları.....	40
Çizelge 2. 13. Polimerik biyomalzemelerin şekilleri, bileşimleri ve tıbbi kullanımları .....	50
Çizelge 2. 14. İmmobilize biyomoleküllerin ve hücrelerin uygulama alanları .....	50
Çizelge 2. 15. Biyomolekül immobilizasyon yöntemleri .....	51
Çizelge 2. 16. Ayırma teknolojileri .....	51
Çizelge 2. 17. Kromatografik teknikler .....	52
Çizelge 2. 18. Kriyojel sistemlerin potansiyel uygulamalarına bakış .....	53
Çizelge 2. 19. SPA' nın IgG bağlaması .....	62
Çizelge 4. 1. Pıhtılaşma süreleri (saniye).....	90
Çizelge 4. 2. IgG adsorpsiyonu üzerine protein A derişiminin etkisi: .....	93
Çizelge 4. 3. Langmuir ve Freundlich izotermelerinin adsorpsiyon katsayıları .....	99
Çizelge 4. 4. Değişik adsorbentlerin IgG' yi adsorplama kapasitelerinin karşılaştırılması.....	100
Çizelge 4. 5. İnsan plazmasından IgG adsorpsiyonu .....	103
Çizelge 4. 6. Kromatografik ayırma verileri .....	106

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. RA tarafından eklem bozulması .....	10
Şekil 2. 2.RA' nın aşamaları .....	11
Şekil 2. 3. RA' nın ileri aşamaları .....	11
Şekil 2. 4. ABD' de 1996' da en yaygın 10 otoimmün hastalığın görülme sıklığı ....	12
Şekil 2. 5. IgM' nin yapısı .....	27
Şekil 2. 6. IgG molekülünün şematik gösterimi .....	29
Şekil 2. 7. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.....	38
Şekil 2. 8. Uzatici kolun fonksiyonunun temeli .....	41
Şekil 2. 9. Afinite kromatografisinde kullanılan bazı uzatici kollar: .....	42
Şekil 2. 10. Değişik aktive taşıyıcılara ligand immobilizasyonu .....	43
Şekil 2. 11. Genel bir hemoperfüzyon şeması.....	45
Şekil 2. 12. Kan-biyomalzeme etkileşimi .....	48
Şekil 2. 13. Yabancı cisme doku cevabı .....	49
Şekil 2. 14. Kriyojelleşme olayı .....	55
Şekil 2. 15. Kriyojel ve jelin SEM fotoğrafı .....	55
Şekil 2. 16. Kriyojeller ve jellerin şişme dereceleri .....	56
Şekil 2. 17. Farklı enstrümental teknikleri kullanarak kriyojel gözenek yapıları .....	60
Şekil 2. 18. Staphylococcal protein A .....	62
Şekil 2. 19. İmmünoadsorpsiyon kolonu ve hücre seperatörü .....	64
Şekil 4. 1. Şişmiş ve kurutulmuş Poli(HEMA) kriyojel .....	84
Şekil 4. 2. Poli(HEMA) kriyojelin SEM mikrofotografı .....	85
Şekil 4. 3. Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin SEM mikrofotografı.....	86
Şekil 4. 4. Poli(HEMA) kriyojel ile protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin FTIR spektrumu .....	87
Şekil 4. 5. Kan-Biyomalzeme Etkileşimi.....	89
Şekil 4. 6. Poli(HEMA) kriyojele CNBr aktivasyonu ile ligand bağlanması .....	91
Şekil 4. 7. IgG adsorpsiyonuna CNBr derişiminin etkisi.....	92
Şekil 4. 8. Değişik akış hızlarındaki basınç azalması .....	94
Şekil 4. 9. IgG adsorpsiyonuna akış hızının etkisi.....	95
Şekil 4. 10. IgG adsorpsiyonuna IgG başlangıç derişiminin etkisi .....	96
Şekil 4. 11. IgG' nin Langmuir adsorpsiyon izotermini .....	97

Şekil 4. 12. IgG' nin Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	99
Şekil 4. 13. IgG adsorpsiyonuna pH etkisi.....	101
Şekil 4. 14. IgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi .....	102
Şekil 4. 15. SDS-PAGE ile saflaştırma.....	104
Şekil 4. 16. Kriyojel kolonundan tam kan geçişi.....	105
Şekil 4. 17. HSA ve IgG' nin protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelinde FPLC ile ayrılması.....	106
Şekil 4. 18. İnsan kan serumunda HSA ve IgG nin protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelinde FPLC ile ayrılması .....	107
Şekil 4. 19. RF başlangıç derişiminin etkisi .....	108
Şekil 4. 20. Bağlanan protein A miktarının adsorplanan romatoid faktöre etkisi ...	108
Şekil 4. 21. Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin tekrar kullanılabilirliği .....	109

## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

RA	Romatoid Artrit
IgG	İmmüoglobülin G
Poli(HEMA)	Poli(2-Hidroksietil Metakrilat)
RF	Romatoid Faktör
SPA	Staphylococcal Protein A
ACR	Amerikan Romatizma Derneği (American College Of Rheumatology)
HSA	İnsan Serum Albumin
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
SS	Sistemik Sclerosis
T1DM	Tip 1 Diabetes Mellitus
MHC	Major Histocompatibility Complex
HLA	Human Leucocyte Antigen
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
GAD	Glutamik Asit Dekarboksilaz
AGE	Advanced Glycation End
FPLC	Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FTIR	Fourier Transform Infrared
OM	Optik Mikroskop
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop
ESEM	Çevresel Taramalı Elektron Mikroskop
CM	Aynı Odaklı Mikroskop
FCR	Folin-Ciocalteu Reaktifi
CRP	C-Reaktif Protein
ANA	Antinükleer Antikor
Anti CCP	Anti Siklik Sütrilin Peptid
APF	Anti Perinükleer Faktör
AFA	Anti Filaggrin Antikorları
AKA	Anti Keratin Antikorları

TNF	Tümör Kangren Faktör (Tumor Necrosis Factor)
CT	Pıhtılaşma Zamanı
APTT	Aktive Kısmi Tromboplastin Zamanı
PT	Protrombin Zamanı
FT	Fibrinojen Zamanı
CHO	Chinese Hamster Ovary
NSO	Murine Myeloma
HCP	Konak Hücre Proteini
APS	Amonyum Persülfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin



## 1.GİRİŞ

Romatoid artrit (RA) eklemlerde ağrı, sertlik, şişme ve hareket zorluğu gibi rahatsızlıklara neden olan kronik bir hastalıktır. Aynı zamanda böbrek, sinir sistemi, kalp, akciğer, göz ve deri gibi diğer organlarda da etkisini gösterir<sup>1</sup>. Bu hastalık dünya popülasyonunun % 1-3' ünü oluşturur<sup>2</sup>. Daha önceleri RA, genel olarak çoğu hastada öldürücü olmadığı için önemsenmemiştir. Bununla birlikte yapılan araştırmalarla bu hastalığı taşıyan insanların ömrünün diğer insanlara göre 3-18 yıl daha kısa olduğu belirlenmiştir<sup>3,4</sup>.

RA tedavisinin başarılı olabilmesi için erken teşhis ve eklem hasarları oluşmadan önce etkili bir tedavi uygulanması gereklidir. Anti-enflamatuvar ilaçlar ilk tercih olabilir. Fakat eklemlerinde kalıcı ve uzun süreli şişlikler görülen hastalar için hastalığın seyrini değiştiren ilaçlar kullanılır. Düşük doz kortikosteroidler semptomların kontrol altına alınabilmesi, eklem işlevinin sağlanması ve hastalığın ilerleyişinin yavaşlatılması amacıyla kullanılabilir. Eklem dışı organ tutulumu da varsa yüksek doz kortikosteroidler ve diğer ilaçların kullanılabilmesi belirtilmektedir<sup>5</sup>.

Son yıllarda RA hastalarının tedavisinde yeni yöntemler geliştirilmiştir. Tedavinin ana amacı belirtilerin ortadan kaldırılması ve hastanın yaşam kalitesini iyi düzeyde koruyabilmektir. Tedavi amaçlı kullanılan yöntemlerden biri olan plazma değişimi uzun yıllar plazmadaki patojen maddelerin uzaklaştırılması için kullanılan tek yöntem olmuştur. Ancak fazla miktarda plazma değişimine ihtiyaç duyulduğundan pek seçici bir yöntem değildir. 1980' li yıllarda plazma değişimine alternatif olarak immünoadsorpsiyon yöntemi önerilmiştir<sup>6</sup>. İmmünoadsorpsiyon yönteminde, plazmadan sadece patojen antikorlar uzaklaştırılmaktadır. Böylelikle plazma değişiminde karşılaşılan bazı sorunlar (albümin takviyesinden kaynaklanan sorunlar gibi) ortadan kalkmaktadır. Ayrıca, immünoadsorpsiyon plazma proteinlerinde (albümin ve pıhtılaşma faktörleri gibi) kayıplara neden olmayan daha seçimli bir yöntem olarak büyük bir önem taşımaktadır<sup>7</sup>.

Antikorlar araştırma, tedavi ve klinik uygulamalarda proteinlerin en çok kullanılan sınıfıdır. Tüm memelilerin immün sistemlerinin regülasyonunda merkezi bir rol oynarlar<sup>8</sup>. Ligand olarak *Staphylococcal* Protein A ile afinite kromatografi uygulamaları, antikor saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>9</sup>. Protein A antikorların Fc kısımlarına spesifik olarak bağlanan bir proteindir. IgG<sub>3</sub> hariç insan IgG' lerinin hepsine kuvvetlice bağlanır. Buna ilaveten, antikorlar protein A' ya nötral koşullarda bağlanır ve düşük pH' da elue edilirler<sup>10</sup>.

Geçmişte protein A agaroz, polistiren, sefaroze gibi matrislerle kullanılmıştır. Ancak bu matrislerin çoğunun kanla uyuşabilirliğinin ve mekanik kararlılıklarının düşük olmasından dolayı uygulamalarda kullanılmaya elverişli olmadıkları belirtilmiştir<sup>11,12</sup>.

Monolitik kolonlar, kolon etkinliğinde azalma olmaksızın analitlerin yüksek hızda ayrılmasına olanak veren yeni nesil kromatografik ortam olarak tanımlanabilirler. Geleneksel kolonlara göre düşük akış direnci monolitik kolonların en önemli avantajlarından. Gözenekli monolitler protein saflaştırılması için önemli avantajlar sunmaktadır; geniş yüzey alanı, kısa difüzyon yolu, düşük basınç düşmesi ve hem adsorpsiyonda hem de elüsyonda kısa alıkonma zamanı potansiyel avantajları arasında sayılabilir. Monolitik kolonların uygulanabilirliğini belirleyen kritik faktörler gözenek yapısının homojenliği ve monolitik kolonların her seferinde aynı şekilde üretilmeleridir<sup>13</sup>.

Son zamanlarda biyolojik moleküllerin saflaştırılması için süpermakrogözenekli monolitik kolonların kromatografi ortamı olarak hazırlanmasına yönelik çalışmalar literatüre girmiştir. Süpermakrogözenekli monolitik kolonlar kısmen donmuş ortamda radikalik polimerizasyon ile hazırlanmaktadır. Kısmen donmuş ortamda oluşan buz kristalleri porojen olarak rol almakta ve bu ortamda monomerler ve başlatıcı, çözünmüş olarak küçük bir fraksiyonu oluşturmaktadır. Sistem donmuş bir buz kütesine benzemekle birlikte polimerizasyon işlemi donmamış kısımda etkin olarak gerçekleşmektedir. Eridikten sonra sürekli jel (kriyojel; kryos=buz) oluşmaktadır. Meydana gelen

süpermakrogözenekli kriyojeller, gözenek boyutları 5-100 µm arasında değişen birbirine bağlı gözenek ağı içermektedir. Geniş, bağlı gözenekler kriyojellere, özgün süngersi yapı özelliğini kazandırmaktadır. Süpermakrogözenekli monolitlerin süngersi morfolojisi onları, bilinen sert yapılı monolitlerden tamamen farklı yapmaktadır. Süpermakrogözenekli monolitlerin kontrollü üretimleri, farklı özelliklerde kriyojellerin üretimine olanak vermektedir. Polimerizasyon koşullarının değiştirilmesi (özellikle donma sıcaklığı, monomer derişimi, çapraz bağlayıcı oranı) monolitin özelliklerine önemli oranda yansımaktadır<sup>14-15</sup>. Poli(2-hidroksietil metakrilat) [Poli(HEMA)] yüksek biyolojik uyuşabilirliği nedeni ile biyolojik uygulamalarda en yaygın olarak kullanılan polimerlerdendir. Bu polimerlerin mekanik olarak dayanıklılığı ve kanla uyuşabilirlikleri oldukça yüksektir.

Bu çalışmada immünoadsorpsiyon tekniği için öncelikle Poli(HEMA) kriyojelleri hazırlanmış, CNBr ile aktive edilmiştir. Poli(HEMA) hidrofilik karakteri, iyi kan uyuşabilirliği, spesifik olmayan protein etkileşimleri, yüksek kimyasal ve mekanik direnci, mikrobiyal ve enzimatik ataklara direnci göz önüne alınarak temel matriks olarak seçilmiş ve daha sonra buna spesifik ligand olarak kullanılacak protein A molekülü bağlanmıştır. Kriyojellerin karakterizasyon çalışmaları olarak; FTIR ile yapı analizi, yüzey alanı ölçümleri, taramalı elektron mikroskop (SEM) fotoğrafları ve şişme davranışı belirlenmesi yapılmıştır. Bir sonraki aşamada, IgG adsorpsiyon dinamikleri (pH, akış hızı, sıcaklık, derişim etkisi vb.) belirlenmiştir. İnsan plazmasından Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin kan uyumluluk çalışmaları, romatoid artritli ve sağlıklı kandan Romatoid Faktör (RF) ve IgG adsorpsiyon çalışmaları yapılmıştır. IgG adsorpsiyonundan sonra sağlıklı kan plazması Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile test edilmiştir. Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC) ile HSA ve IgG çalışmaları yapılmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1.OTOİMMÜNİTE VE OTOİMMÜN HASTALIKLAR**

#### **2.1.1.Otoimmünite**

İmmün sistemin başlıca görevi bünyenin kendisine yabancı antijenleri tanıma ve onlara karşı immün cevap oluşturmaktır. B ve T tipi lenfositler ile makrofajlar immün cevap oluşumundan ve denetiminden sorumludur.<sup>16</sup> Canlılar normalde kendi doku antijenlerine karşı immün cevap vermemektedir. Ancak, bazı patolojik durumlara bağlı olarak hücre reseptörlerinin bozulması ile veya immün cevap ürünlerinden bazılarının değişik aktivite göstermesi ile, organizmada değişen doku antijenlerine karşı immün cevap oluşmaktadır. Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya “otoimmünite”, otoimmünizasyonun rol oynadığı hastalıklara da “otoimmün hastalıklar” denilmektedir.

#### **2.1.2.Otoimmün Hastalıkların Oluşumunda Etkin Olan Faktörler**

Otoimmün hastalıkların patogenezinde genetik, immünolojik ve viral faktörler rol oynamaktadır.

##### **2.1.2.1.Genetik Faktörler**

Ia (I region associated) antijenleri makrofaj ve lenfositlerde bulunan ve Major Histocompatibility Complex (MHC) genleri tarafından kontrol edilen antijenlerdir. Ayrıca otoimmünitenin patogenezinde Human Leucocyte Antigen (HLA)’ lerini yöneten gen lokuslarının rolü olduğu belirlenmiştir.

##### **2.1.2.2.İmmünolojik Faktörler**

Otoantijenler baskılandıkları veya fonksiyonları bozulduğu zaman otoimmün hastalık oluşmamaktadır. Yapısal olarak anomali kazanan otoantijenler veya ilaç gibi

yabancı bir madde ile birleşerek çarpaz reaksiyon verebilen otoantijenler, hücre membranında molekül yapısı değişen otoantijenler, Epstein-Barr virusu, bakteri lipopolisakkaridleri gibi poliklonal aktivatörlerin T veya B lenfositlerini doğrudan uyarmasıyla otoimmün hastalık oluşmaktadır<sup>17</sup>.

### **2.1.3.Otoimmün Hastalıklar**

Otoimmün hastalıklar iyi huylu otoimmüniteden patojenik otoimmüniteye doğru ilerlemenin meydana getirdiği hastalıklardır. Bu ilerleme hem genetik etkiler hem de çevresel etkiler tarafından belirlenir. Otoimmün tahribi patojen bazı hastalıklar ya da belirtilerin de otoantikolar tarafından ortaya çıkarılması yönünden otoimmün hastalıkları ayırır. Patojen genellikle otoimmün T lenfosit tarafından belirlenir. Hastalığın altında yatan mekanizma ne olursa olsun neredeyse tüm otoimmün hastalıklar proteine bağlanan otoantikolarla ilişkilidir. Ayrıca birçok hastalık için bu otoantikolar hastalık başlamadan yıllar önce serum numunelerinde bulunur.

Otoimmünite herkeste bir dereceye kadar vardır, ancak otoimmünite atağı dayanıklılık kaybıyla ilişkili olabilir. Bu genellikle zararsızdır ve tüm omurgalı yaşamın evrensel bir olgusudur. Otoimmünite otoimmün hastalıklar denilen bir çok hastalığın nedeni olabilir<sup>18</sup>.

Otoimmün hastalıklar klinik yönden hastalığın bulunduğu organlar bakımından 2 gruba ayrılır. Bunlardan bazılarında hastalık bir organda görülmektedir. Tiroid hastalıkları (Hashimoto Hst, graves hst), pernisiyöz anemi, adison, juvenil diabet gibi bu otoimmün hastalıklara “organa özgül otoimmün hastalıklar” denir. Birden fazla organ tutulumu varsa buna “organa özgül olmayan” veya “sistemik otoimmün hastalıklar” denir. Bunlara romatoid artrit, skleroderma ve SLE örnek olarak verilebilir.

Organa özgül otoimmün hastalıklar, kişide daha sıklıkla beraber görülebilmektedir. Örneğin, hashimoto tiroiditi ile pernisiyöz anemi, yine tiroidit hastalarla adison hastalığı normalde beklenenden daha sık olarak beraber

görülmektedir. Organa özgül otoimmün hastalıklarda, diğer organa özgül hastalıklarda bulunan otoantikolar hastalık olmadan da bulunabilmektedir. Örneğin hashimoto tiroiditinde tiroid antikorlarının yanında mide antikorlarının bulunması gibi<sup>17</sup>.

### **2.1.3.1.Sistemik Lupus Eritematozus (SLE)**

Sistemik lupus eritematozus (SLE), normalde vücudu enfeksiyonlara ve kansere karşı korumakla görevli olan bağışıklık sisteminin anormal çalışmasından kaynaklanan kronik iltihabi bir hastalıktır. Cilt döküntüleri, artrit, anemi, sara krizleri ya da psikiyatrik hastalıklara neden olabilir ve sıklıkla böbrek, akciğer ve kalp gibi iç organları etkiler. SLE'de bağışıklık sistemi aşırı çalışmaktadır ve çok miktarda anormal antikor üretmektedir. Bu anormal antikorlar da hastanın kendi dokularına saldırmaktadır. Lupusun nedeni tam olarak bilinmemektedir, fakat kalıtsal nedenler, çevre ve hormonal değişikliklerin rolünün olabileceği düşünülmektedir. SLE'nin görülme sıklığı 40-50:100.000 arasındadır. SLE hastalarının %80'den fazlası kadındır<sup>19,20</sup>.

Semptomlarının çok çeşitli olması nedeniyle, tanı genellikle zordur. SLE'nin tipik özellikleri şunlardır:

- ✓ Yanakların üzerinde kelebek şeklinde cilt lekesi
- ✓ Güneş gören cilt bölgelerinde beliren bir cilt lekesi
- ✓ Ağız ve burunda yaralar
- ✓ Bir ya da daha fazla eklemi tutan artrit
- ✓ Böbrek iltihabı
- ✓ Sara krizi gibi sinir sistemi bozuklukları, ruh hastalıkları ve inme
- ✓ Ateş, kilo kaybı, saç dökülmesi, el ve ayak parmaklarında dolaşım yetersizliği, derin nefes alınca göğüs ağrısı ve karın ağrısı sık görülen belirtilerdir.

Laboratuar testleri SLE tanısında çok önemlidir. Özellikle, antinükleer antikor (ANA) testi SLE'de daima pozitifdir. Hastalık kendini yavaş yavaş gösterebilir, bu nedenle kesin tanı genellikle gecikir<sup>21</sup>.

### **2.1.3.2. Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM)**

Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM) organ spesifik olan ve pankreatik iskelet hücreleri ve reaktif oksijen türleri (ROS) çevresinin T hücre aracılığıyla B hücre bozulması gösterdiği bir otoimmün hastalıktır. Glutamik asit dekarboksilaz (GAD) önemli ve iyi karakterize edilen otoantijenlerden biridir<sup>22</sup>.

### **2.1.3.3. Scleroderma veya Sistemik Sclerosis**

Sistemik sclerosis (SS) yaygın doku fibrozitine ve kan damarlarında bozukluğa yol açan, deri, akciğer ve böbrekler dahil bir çok organı etkileyen bir sistemik otoimmün hastalıktır. Genel olarak görülme sıklığı 30:100.000 kişidir. Kadınlar, erkeklere göre 4 kat daha fazla yakalanma riski taşırlar ve sıklıkla 30-50 yaş arası görülür. Sklerodermanın tanısı genellikle zordur ve uzun zaman alır, bunun nedeni hastalığın pek sık görülmemesidir<sup>23</sup>.

### **2.1.3.4. Behçet Hastalığı**

İlk kez 1937 yılında Türk dermatoloji profesörü Dr. Hulusi Behçet tarafından tarif edilen Behçet hastalığı, ağızda ve genital bölgelerde yaralara ve gözde iltihaba yol açan kronik bir hastalıktır. Bazı hastalarda artrite, damar iltihabı ve tıkanmalarına, sindirim kanalında, beyin ve omurilikte iltihaba da neden olmaktadır. Behçet hastalığının her hastadaki belirtileri farklıdır. Bazı hastalarda hastalık hafif seyreder ve sadece ağızda ve genital bölgede ülserler bulunur. Bazılarında ise daha şiddetlidir ve menenjitte neden olabilir. Kuvvetli bulgular genellikle ilk belirtiler başladıktan aylar, hatta yıllar sonra ortaya çıkar. Bulgular uzun bir süre devam edebileceği gibi, birkaç haftada da geçebilir. Tipik olarak bulgular görülür, kaybolur ve tekrar ortaya çıkar.

Behçet hastalığının nedeni tam olarak bilinmemektedir. Bulguların çoğunun nedeni kan damarlarının iltihaplanmasıdır. Kan damarlarındaki bu iltihaplanmaya

bağışıklık sisteminin neden olduğu düşünülmektedir, fakat bu reaksiyonu neyin başlattığı bilinmemektedir. Gelişmesinde bağışıklık sistemi bozukluğunun yanısıra, kalıtsal nedenlerin de etkili olabileceği sanılmaktadır. Çevresel faktörlerin de (virüs ya da bakteri gibi) duyarlı kişilerde hastalığı başlatabileceği sanılmaktadır<sup>24</sup>.

#### **2.1.3.5. Sjögren Sendromu**

Sjögren sendromu kuru göz ve kuru ağız bulguları gösteren kronik bir hastalıktır. Genellikle romatoid artrit, lupus eritematosus, skleroderma ve polimiyozit gibi romatizmal hastalıklarla birlikte bulunur. Hastalığın nedeni tam bilinmemektedir. Ancak hastalığın esas olarak immün sistemdeki bozukluktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bağışıklık sistemi, hastalıklara karşı vücudun korunma mekanizmasıdır. Sjögren sendromunda bağışıklık sisteminin normal kontrol mekanizmasında bir bozukluk vardır, bunun sonucu olarak aşırı miktarda beyaz kan hücreleri yapılır. Lenfosit adı verilen bu hücreler gözyaşı ve tükürük bezlerine giderek bu dokularda harabiyet yapar. Bu nedenle de hem tükürük bezlerinde hem de göz yaşı bezlerinde salgıda azalma yani kuruluk meydana gelir. Aynı zamanda bu hücreler otoantikorlar salgılar ve bunlar kanda tespit edilebilir. Bu otoantikorlar bağışıklık sisteminin düzgün çalışmadığının bir göstergesidir ve tükürük ile gözyaşı bezlerinde harabiyet yapma potansiyeline sahiptir. Sjögren sendromunda eklem, akciğer, böbrek, sinir, tiroid, karaciğer ve beyin gibi diğer organlarda da tutulum görülebilir.

Sjögren sendromu herhangi bir yaşta görülebilirse de en fazla 45 yaşın üzerindeki kadınlarda ortaya çıkmaktadır. 20 yaş altında ise çok nadirdir<sup>25</sup>.

#### **2.1.4. Romatoid Artrit (RA)**

RA hem eklemsele hem de sistemik belirtileri olan bir otoimmün rahatsızlıktır. Tam patojenisi hala bilinmemektedir ve tedavisi yoktur<sup>26,27</sup>. Romatoid artritinin sebebi bugün hala bilinmese de, uzunca bir süre enfeksiyondan şüphelenilmiştir. Gıda alerjileri veya dışarıdan organizmalar sebebiyle olabilir.



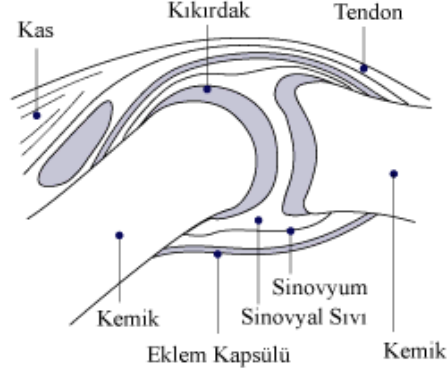
Önceleri *Mycoplasma*, *Erysipelothrix*, Epstein-Barr virüsü, parvovirüs B19 ve kızamıkçıkdan kuşkulandırmış fakat bunların hiçbiri epidemiyolojik araştırmalarda desteklenememiştir. Diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi, “hatalı kimlik” teorisi, zararlı bir organizmanın bağışıklık yanıtına yol ağtığını ve geride o organizmaya spesifik antikorlar bıraktığını varsayar. Bununla birlikte antikorlar yeterince spesifik değildirler. Antikorlar, bu durumda (RA’da), sinovyuma karşı bir bağışıklık saldırısına geğerler zira sinovyumdaki bazı moleküller en başta bağışıklık yanıtının oluşmasına yol açan zararlı organizmadaki bir moleküle ‘benzemektedir’ bu fenomene moleküler taklitçilik denir. Bununla birlikte fiziki veya duygusal etkiler, stres ve yetersiz beslenme hastalıkta rol oynayabilir.

Otoimmün bozukluklardan etkilenmiş bireyin, yabancı moleküllerden kendisini uzaklaştırabilecek yeteneğinde bir defekt olması gerekir. Birçok hücrede öz-tanım özelliğini sağlayacak markerler bulunur. Bununla birlikte, bazı marker sınıfları romatoid artrit oluşmasına izin verir (bunu engellemez). RA’ lı hastaların %90’ında HLA-DR4/DR1 grubu olarak bilinen marker grubu bulunurken, bu grup RA’ lı olmayan kontrollerin sadece %40’ında bulunur. Böylece, kuramsal olarak, RA, spesifik markerlarla genetik olanak ve otoimmün yanıtı tetikleyecek bir enfeksiyöz olay şeklinde bir (hastalığa karşı) duyarlılık (ağıklık) gerektirmektedir.

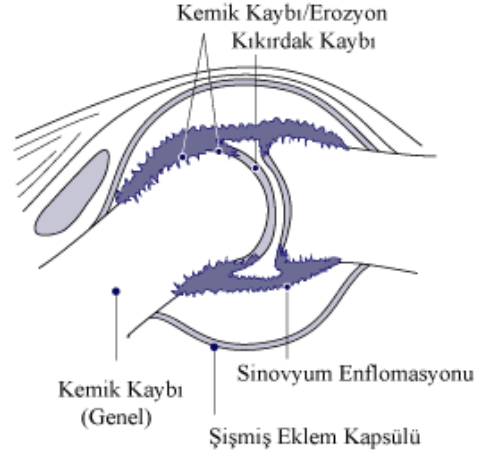
Bir kere tetiklendi mi bağışıklık yanıtı sinovyumun enflamasyonuna sebep olur. Enflamasyonun erken ve orta moleküler medyatörlerine (aracılarına), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-15 interlökinleri, değişebilir. Bunlara büyüme faktörü beta, fibroblast büyüme faktör ve trombosit-türevi büyüme faktörü dahildir. Romatoid artrit modern farmakolojik tedavileri bu medyatörleri hedef alır. Enflamatuvar reaksiyon oluştuktan sonra, sinovyum kalınlaşır, kıkırdak ve altta yatan kemik parçalanmaya başlar (şekil 2.1).

Hastalığın seyri hastadan hastaya büyük oranda çeşitlilik gösterir. Bazı hastalar orta seviyeli kısa-dönem semptomlara sahipken, çoğuunda hastalık hayat boyunca gelişim gösterir<sup>28</sup>.

### Normal Eklem



### Romatoidal Artrit Eklem Üzerindeki Etkisi



Şekil 2. 1. RA tarafından eklem bozulması<sup>28</sup>

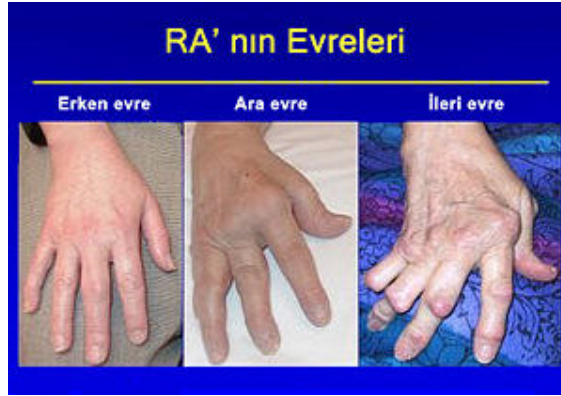
HLA-DRB zinciri üzerindeki ortak epitop QKRAA' nın varlığı ve romatoid faktörün bulunması RA' nın uzun vadeli sonuçları hakkında bir öngörü sağlar. RA' nın diğer potansiyel katkı yapan faktörleri dolaşım yapan IgM anti IgG Advanced Glycation End (AGE) ürünlerinin varlığıdır<sup>29-32</sup>.

Enflamasyon eklem kısmının kalınlaşmasına neden olur ve aşırı sinoviyal sıvı oluşturur. Sinoviyal sıvı hareket sırasında eklemleri rahatlatan ve koruyan bir yağlayıcıdır. Doku enflamasyonu ve sinoviyal sıvı toplanması eklem ağrısı, bükülmezlik ve şişmeye neden olur. İltihaplı sinoviyal, sinoviyal sıvı içinde ilerleyerek kemik ve kıkırdağa atak yapabilecek enzimleri oluşturur. Diğer artrit (eklem) türlerinin aksine RA' nın etkisi sadece eklemlerle sınırlı değildir ve tüm

vücutta problemler oluşturabilir. Zamanla eklem acısı artar ve eklemler deforme olabilir. Erken tedavi dejenerasyonu yavaşlatabilir ve acının hafifletilmesini sağlayabilir<sup>18</sup>.

RA üç aşamada ilerler:

1. İlk aşamada sinoviyal zarın şişmesiyle eklem etrafında acı, sıcaklık, bükülmezlik, kızarıklık ve şişme meydana gelir.
2. İkinci aşamada hücrelerin hızlı bölünmesi ve gelişmesiyle sinoviyal kalınlaşması oluşur.
3. Üçüncü aşamada iltihaplı hücreler kemiği ve kıkırdağı sindirebilen enzimler salgılar, çoğu zaman eklem yeri şekil değiştirir, acı artar, hareket kaybolur.<sup>18</sup>

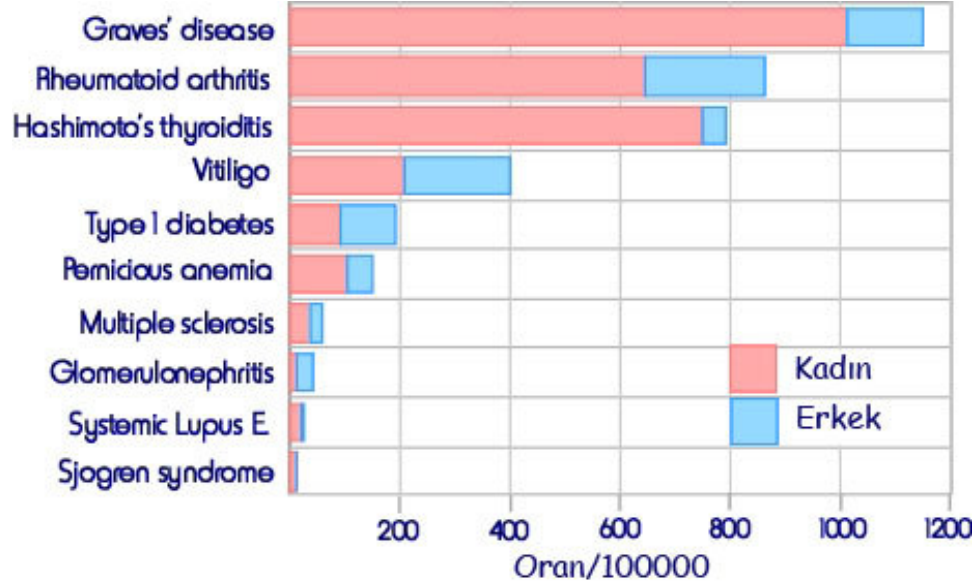


Şekil 2. 2.RA' nın aşamaları<sup>28</sup>



Şekil 2. 3. RA' nın ileri aşamaları<sup>18</sup>

Otoimmün hastalıklar kadınlarda erkeklerden daha yaygındır (Şekil 2.4). Kadınlarda bulunan östrojen hormonunun bazı otoimmün hastalıklarına neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bir otoimmün hastalığın varlığı başka bir otoimmün hastalığın gelişme ihtimalini artırmaktadır<sup>33</sup>.



Şekil 2. 4. ABD' de 1996' da en yaygın 10 otoimmün hastalığın görülme sıklığı<sup>34</sup>

Coğrafi yerleşime ve ırka bakılmaksızın RA' nın tüm dünyada ortalama görülme sıklığı yaklaşık %1 (%0,3-2,1) civarında iken Sahra altı Afrika kırsalında yaşayanlarda ve Karayipli siyahlarda daha az görülür. Hastalık herhangi bir yaşta ortaya çıkabilirse de hastaların %80' inde 35-50 yaş arasında ortaya çıkmaktadır. Kadınlarda, erkeklere oranla 2-3 kat daha fazla görülür ve yaş ilerledikçe cinsiyet farkı kaybolur<sup>35</sup>. Cinsiyet farklılığının temel nedeni bilinmemekle birlikte, muhtemel hormonal durumun immün fonksiyon üzerine olan etkileri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir<sup>36</sup>.

#### 2.1.4.1.Klinik Bulgular

RA başlangıçta el, el bilekleri ve ayakları daha sonra ise tüm sinoviyal eklemleri simetrik olarak tutabilen kronik, poliartiküler bir hastalıktır. Asıl tutulum yeri sinoviyum olmakla birlikte hastaların hemen tamamında sistemik belirtiler de görülür. Hastalığın ilk yıllarında klinik çizelgeye ağrı, şişlik, ısı artışı, hareket kaybı gibi inflamasyon bulguları hâkimken ileri dönemde, hastalığın kontrol altına alınamadığı kişilerde deformiteler ve eklem instabilitesi fonksiyon kaybına yol açar<sup>37</sup>.

#### 2.1.4.1.1 Başlangıç Tipleri

**Sinsi başlangıç:** Çoğu hastada (yaklaşık %55-65) başlangıç sinsi olup halsizlik, yorgunluk, hafif ateş gibi sistemik bulgular eklem bulgularından önce görülebilir<sup>38</sup>. Semptomlar haftalar, aylar boyunca gelişir. Hasta sıklıkla ilk olarak bir eklem tutulduğunu daha sonra diğer eklemlerin tutulduğunu ifade edebilir. Asimetrik tutulum nadir değildir ancak hastalığın ilerleyen evrelerinde simetrik tutulum daha belirgin hale gelir. Sabah tutukluğu ağrıdan bile önce başlayabilir. Sebebi uyku sırasında inflame dokular içerisinde ödem sıvısının birikmesidir. Eklem inflamasyonuna spesifik olarak sabah tutukluğu en az 30-45 dakika kadar devam eder.

**Akut veya subakut başlangıç:** Hastaların %8-15' inde akut başlangıç görülür. Sinsi başlangıca göre daha az simetri vardır. Diğer eklemlerde ağrı ortaya çıkarken semptomlar artış gösterir. Hastaların %15-20' sinde ise subakut başlangıç vardır. Semptomlar günler veya haftalar içinde ortaya çıkar<sup>39</sup>.

**Tek veya az sayıda eklemi tutan başlangıç:** Nadir görülen başlangıç şekillerinden biridir. Bu tür başlangıç daha çok genç kadın hastalarda görülür. Diz veya dirsek gibi bir veya birkaç eklem kronik veya aralıklı tutulumu vardır. Genellikle akut faz yanıtı yoktur ve Romatoid Faktör (RF) negatiftir. Diğer hastalıkları dışlamak için sinoviyal biyopsi gerekebilir<sup>40</sup>.

**Sistemik başlangıç:** Daha çok orta yaşlı erkeklerde görülen bir başlangıç şeklidir. Ağırlıklı bulgular eklem dışındadır ve ateş, anemi, kilo kaybı, halsizlik, kas ağrıları, plörezi, perikardit, döküntü ve organ büyümeleri görülür. Teşhis poliartritin yerleşmesi ve malignite dahil diğer nedenlerin dışlanması ile konulur<sup>40</sup>.

**Palindromik başlangıç:** Ortalama iki-üç gün süren, düzensiz aralıklar ile tekrarlayan akut mono veya oligoartiküler artrit ile karakterizedir. Tutulan eklemler genellikle eritemlidir ve bu da gut tanısına yol açar. Ataklar sırasında akut faz yanıtı vardır ancak ataklar arasında normal bulunur. Bu tür başlangıç gösteren hastaların

yarısında bir kaç aydan 20 yıla kadar değişen süre içinde klasik RA tablosunun oluştuğu bildirilmiştir<sup>40</sup>.

**Polimiyaljik başlangıç:** İleri yaştaki kişilerde görülür. Sabah tutukluğu ile omuz ve kalça çevrelerinde ağrı ön plandadır. Zaman içinde eklem bulgularının yerleşmesi ile tanı konur<sup>40</sup>.

#### **2.1.4.2. Eklem Tutulumu**

Eklem ağrısı hastaların çoğunda ana sorundur ve hastalığın seyrini belirlemede ve tedavinin etkinliğini değerlendirmede önemli bir parametredir<sup>41</sup>. RA'da eklem tutulumunu gösteren fizik muayene bulguları şişlik, hassasiyet ve işlev kaybıdır. Bu bulgular RA tanısı koymak için kullanıldığı gibi şiş ve hassas eklem sayıları hastalığın aktivitesini değerlendirmede ve klinik çalışmalarda tedavi etkinliğini değerlendirmede kullanılır.

#### **2.1.4.3. Eklem Dışı Tutulum**

RA hastalarının yaklaşık %40' ında hayatlarının bir döneminde eklem dışı tutulum bulguları görülür. Eklem dışı tutulum RF pozitifliği ve bazı populasyonlarda HLA-DR1 ve DR4 genleriyle ilişkili bulunmuştur. Ayrıca eklem dışı tutulum olanlarda mortalite 5 kat artmıştır<sup>42</sup>.

#### **2.1.4.4. Tanı**

RA tanısı dikkatli anamnez, fizik muayene bulguları ve laboratuvar testler temelinde dayanan kriterlere ve ayırıcı tanıya göre konulmalıdır. Amerikan Romatizma Derneği (American College of Rheumatology, ACR) tarafından 1987 yılında yeniden gözden geçirilmiş olan tanı ltleri bireysel vakaların tanısından ziyade bilimsel çalışmalar için tanı ölçütü olarak kullanılmaktadır (izelge 2.1)<sup>43</sup>.

**Çizelge 2. 1.** ACR tanı ölçütleri <sup>43</sup>

<b>Kriter</b>	<b>Tanımlama</b>
1.Sabah Tutukluğu	Eklem ve çevresinde en az bir saat süren sabah sertliği
2. Üç veya daha fazla eklem bölgesinde artrit	Doktor tarafından gözlenen en az üç eklem bölgesinde yumuşak doku şişliği veya sıvı
3. El eklemlerinde artrit	El bilekleri, metakarpofalangeal veya proksimal interfalangeal eklemlerinden en az birinde şişlik
4. Simetrik artrit	Vücudun iki yanında aynı eklem bölgelerinin aynı anda tutulması.
5. Romatoid nodüller	Doktor tarafından belirlenen kemik veya ekstansör yüzeyler veya jukstaartiküler bölgelerde subkutan nodüller
6. Serum romatoid faktör pozitifliği	Herhangi bir metodla gösterilen anormal miktarda serum romatoid faktörü. Normal kişilerin %5'inden azında pozitif olabilir.
7. Radyolojik değişiklikler	Posterioanterior el ve el bilek grafilerinde RA için tipik değişiklik olarak kabul edilen erozyon veya eşit olmayan dekalsifikasyon bulguları

Bu kriterlere göre bir hastanın RA olduğunu söyleyebilmek için yedi kriterden en az dördü bulunmalıdır. İlk dört kriter en az altı hafta boyunca mevcut olmalıdır.

Laboratuar testlerinden tam kan sayımında hafif lökositozla beraber normal beyaz küre dağılımı vardır. Trombositoz, normokrom normositer veya normokrom mikrositer hafif anemi olabilir. İdrar testleri genellikle normaldir. Eritrosit sedimentasyon hızı 30 mm/saat veya daha üzerinde ve C-reaktif protein (CRP) 0.7 pg/ml üzerindedir,  $\alpha$ -1 ve  $\alpha$ -2 globülin seviyelerinde artış saptanabilir. Antinükleer antikor (ANA) %25 hastada pozitif bulunabilir. Kompleman seviyeleri normal veya yüksektir. RF RA'lı hastaların %70-80' inde pozitif olarak saptanabilir. Serumda RF negatifliği hastalığın erken evrelerinde %30 civarındadır. Seropozitif hastalar ve bazı

seronegatif hastalarda anti siklik sitr lin peptid (anti-CCP) pozitif olabilir. RF pozitifliği yapabilecek RA dışı hastalıklar izelge 2.2’ de özetlenmiştir<sup>44,45</sup>.

### **Çizelge 2. 2. RF pozitifliği yapan durumlar**

Romatizmal hastalıklar	RA, SLE, skleroderma, karıŐık bağ dokusu hastalıkları, Sjögren sendromu, juvenil RA, psöriatik artrit, gut
Viral enfeksiyonlar	AIDS, enfeksiyöz mononükleoz, hepatit B ve C , influenza, aŐılama
Paraziter enfeksiyonlar	Tripanozomiazis, malarya, Őistozomiazis, filariazis
Kronik bakteriyel enfeksiyonlar	Tüberküloz, lepra, sifiliz, brusella, subakut bakteriyel endokardit, salmonella
Kanserler	Lenfoma, lösemi, myelom, kemoterapi ve radyoterapi sonrası
Diğer hiperglobulinemik durumlar	Kriyoglobulinemi, karaciğer hastalığı, sarkoidoz
Sağlıklı bireyler	60 yaş üzerinde %5-25, genel popülasyonda %1,3-4

#### **2.1.4.5. Radyografik bulgular**

RA'da radyolojik bulgular erken ve geç evre bulguları olarak ikiye ayrılabilir. Erken evrede; yumuşak doku Şişliği (en çok proksimal interfalangeal eklemleri ve ulnanın stiloid çıkıntısı üzerinde gözlenir), periartiküler osteopeni (subkondral olarak gözükür), eklem aralığında daralma (tüm eklem yüzeyi boyunca) ve eklem yüzeyinden ziyade eklem kenarlarında görülen erozyonlardır. Geç evrede ise tanıdan yıllar sonra ortaya çıkan bulgular vardır. Subluksasyon ve luksasyonlar bu dönem için tipiktir. En sık görülen deformasyon parmakların ulnar deviasyonudur<sup>46</sup>.

#### **2.1.4.6. Hastalığın Seyri ve Prognoz**

RA' nın seyri oldukça deđiŐkendir ve her hasta için tahmin yapmak güçtür. Yapılan çalışmalarda hastaların %30' unda uzun süredir devam eden hastalığa rağmen erozyon geliŐmezken, %30' unda ilk 1 yıl içinde kemik erozyonları geliŐtiđi gösterilmiŐ ve bu oran 3 yıllık takipte %70' e çıkmıştır<sup>47</sup>.



RA' da

- ✓ kadın cinsiyet,
- ✓ sinsi başlangıç,
- ✓ simetrik hastalık çizelgesi,
- ✓ başlangıçtaki hastalık aktivitesinin uzun olması,
- ✓ erken dönemde birçok eklemden sıvı toplanması,
- ✓ kilo kaybı ve iştahsızlık gibi genel semptomların varlığı,
- ✓ romatoid nodüllerin erken ortaya çıkması ve tekrarlaması,
- ✓ eklem dışı bulguların varlığı,
- ✓ radyolojide erozyonların erken ortaya çıkması,
- ✓ RF' nin erken pozitifleşmesi ve yüksek titrelerde olması,
- ✓ kriyoglobulinemi, HLA-DR4 ve DR-1'in pozitif olması,
- ✓ yüksek eritrosit sedimentasyon hızı,
- ✓ trombositoz, eozinofili,
- ✓ Anti-R33 ve APF pozitifliği,
- ✓ hastanın kendine yardımı reddetmesi ve negatif tutumda olması,
- ✓ doğru ve uzun süreli temel tedavi verilmemesi,
- ✓ özellikle uzun etkili ilaçlara olumlu cevap alınmaması  
kötü prognoz göstergeleridir<sup>35,39,40</sup>.

#### 2.1.4.7. Tedavi

RA tedavisinde amaç; eklem yapılarının korunması ve hasarın önlenmesi, yaşam kalitesinin ve fonksiyonların korunması, ağrı ve inflamasyonun en aza indirilmesini hedeflemektir. Hastalara medikal tedavi yanında yaşam tarzı modifikasyonu, uygun egzersiz, eğitim gibi konularda da destek olunmalıdır. RA tedavisinde kullanılan ilaçların hiçbiri hastalığı tamamen ortadan kaldıramamaktadır. Yine de son yıllarda RA' nın tedavisinde çok olumlu değişiklikler olmuştur. Bunlar, hastalığın erken tanı ve tedavisinin uzun vadedeki prognoza olumlu katkısı, özellikle erken hastalıkta ilaçların kombine kullanılmasının tek tek kullanılmasından daha etkili olduklarının gösterilmesi ve biyolojik etkili ilaçların kullanıma girmesidir.

Tedavide kullanılan ilaçlar; Nonsteroid Anti-Inflammatuar ilaçlar (NSAID), hastalığı modifiye edici ilaçlar ve kortikosteroidlerdir<sup>35</sup>.

**Nonsteroid Anti-Inflammatuar İlaçlar (NSAID):** Siklooksijenaz enzimini inhibe ederek teröpatik etkilerini gösterirler. Hem analjezik hem de anti-inflamatuvar etki göstererek eklem ağrısını ve sabah tutukluğunu azaltırlar. Ancak hastalığın seyrini değiştirebildikleri ya da eklem hasarını önleyebildikleri gösterilememiştir. Bu yüzden uzun dönem tedavide hastalığı modifiye edici ilaçlarla birlikte kullanılmalıdırlar<sup>48</sup>.

**Hastalığı modifiye edici ilaçlar (DMARD):** Bu grup ilaçlar yavaş etkilidir, etkileri haftalar, aylar sonra ortaya çıkar, inflamasyonu baskıladıklarından akut faz göstergeleri olan CRP ve sedimantasyon hızında düşüş sağlarlar. Hastalığı baskıladıklarından fonksiyonel kapasitede iyileşme sağlarlar ve radyolojik olarak erozyon gelişimini ve radyolojik kötüleşmeyi önlerler. Bu ilaçlar; antimalaryaller (klorokin ve hidroklorokin), altın tuzları, D-penisilamin, sülfasalazin ve immüsupresiflerdir (azatioprin, siklofosamid, metotreksat ve leflunomid). Son zamanlarda geliştirilmiş biyolojik ajanlar da (TNF- $\alpha$  bloleden) bu grupta yer almaktadır<sup>35</sup>.

**Kortikosteroidler:** Düşük doz, nabız ve intraartiküler olarak kullanılır. NSAID 'ye göre daha potent antiinflamatuvar olmalarının yanında düşük dozda hastalığı modifiye edici etkileri de mevcuttur<sup>49</sup>.

#### **2.1.4.8. Otoantikorlar**

Aynı otoimmün hastalıkların oluşma sıklığı yüksek değilse de hastalığın popülasyonu büyüktür<sup>34</sup>. Klinik hastalığın ortaya çıkmasından çok önce görülen serum otoantikorları otoimmün hastalıkların karakteristik bir özelliğidir (Çizelge 2.3.). Nielen ve ark.<sup>50</sup> RA hastaları üzerinde yaptıkları çalışmada hastalık başlamadan ortalama 4-5 yıl önce alınan serum numunelerinde romatoid faktör yada anti siklik sitrülin peptid (anti-CCP) antikorları bulmuşlardır. Bu testlerin negatif

tahmini değeri % 75, pozitif tahmini değeri % 100 dür. Bu nedenle sağlıklı insanlarda otoantikörlerin bulunması otoimmün hastalığın işareti olabilir veya belirli otoantikörler hasta bir insandaki hastalığın derecesini gösterebilir<sup>50</sup>.

**Çizelge 2. 3.** Otoimmün hastalıklarında serum antikörler <sup>50</sup>

<b>Organ spesifik hastalıklar</b>	<b>Bilinen antijenler</b>
Adison hastalığı	21-hidroksilaz
Karın hastalığı	Doku transglutaminaz
Tip 1 diyabet	GAD-65, insülin, 1A-2A
Graves hipotroidi	Tiroidi uyaran hormon reseptörü
Hashimoto tiroidi	Tiroid peroksidaz, tiroglobülin
Myasthenia gravis	Asetilkolin reseptörü
Goodpasture sendromu	Tip IV kollajen
Pemphigus vulgaris	Desmoglein 3
Pernicious anemi	H/KATPaz, intrinsic faktör
Primary biliary cirrhosis	E2 PDC
Vitiligo	Tirozinaz, SOX-10
Multiple sclerosis	Miyelin basic protein, myelin oligodendrik glikoprotein
<b>Sistemik hastalıklar</b>	<b>Bilinen antijenler</b>
Sistemik lupus eritematozus	Spliceosomal snRNP, Ro/La (SSA/SSB) partikül, histon ve ana DNA
Sjögren sendromu	Ro/La ribonükleer partikül, muskarinik reseptör
Romatoid artrit	Citrullinated siklik peptit, IgM
Dermatomyozis/polimiyozitis	t-RNA sentetaz
Yaygın sistemik sclerosis	Topoizomeraz
Limited Sistemik sclerosis (CREST)	Sentromer protein

(CREST)= calcinosis, Raynaud's phenomenon oesophageal dysmotility sclerodactyly and telangiectasia

### 2.1.4.9. Romatoid Artrit Otoantikoları

RF hastanın kendi IgG moleküllerinin Fc kısmına doğru yönelen bir IgM antikordur. RF' ler klasik olarak denatüre IgG kaplı jelatin parçacıklara sahip bir agglutination assay kullanılarak belirlenir, ancak ELISA' lar giderek daha çok kullanılmaktadır<sup>18</sup>. RF varlığı hala RA için önemli bir marker olarak kullanılmaktadır. RF çok hassas bir marker olmasına karşın spesifitesi düşüktür.<sup>51</sup> RA hastaların % 80' i RF pozitif ise de bu antikolar spesifik değildir ve bir çok otoimmün romatoidik hastalıklar ve enfeksiyonlarda oluşur<sup>18</sup>. Her ne kadar RF' nin hastalık için spesifitesi orta derecede ise de, hala RA tanısı için önemlidir ve ACR tarafından tanısal kabul edilen tek serolojik markerdir<sup>52</sup>.

Son yıllarda RA tanısında kullanılabilen bazı umut verici otoantikolar tanımlanmaya başlanmıştır. Bazıları RA için spesifik olmayıp, başka birçok hastalıkta da görülebilirken; bazıları RA için çok spesifiktir ve sadece RA varlığında tespit edilebilir. Anti perinükleer faktör (APF), diferansiye yanak mukoza hücrelerinin sitoplazmasındaki granüllerin protein kısmına karşı oluşan antikolardır. Antikolun düzeyleri indirekt immün floresans yöntemiyle ölçülmektedir. APF ölçümü teknik olarak güç olması nedeniyle, rutin tanı kriteri olarak tercih edilmemektedir.

Anti filaggrin antikoları (AFA), profilaggrin, yanak mukoza hücrelerinin keratohyalin granüllerinde bulunur. Hücre farklılaşması sırasında filaggrin alt birimlerine parçalanır. Daha sonra filaggrin yapısındaki arginin aminoasit kalıntıları enzimatik olarak modifikasyona uğrayarak sitrülün amino asidi oluşur. Filaggrin' in otoantijenik yapısı için sitrülün mutlaka gereklidir. APF ve AFA testlerinde filaggrin antijenine karşı otoantikolar tespit edilir. AFA' da tıpkı APF gibi analiz yöntemindeki teknik zorluklardan dolayı yaygın olarak tercih edilmemektedir.

Anti keratin antikoları (AKA), bir epitel proteini olan filaggrin'e karşı oluşan antikolardır. AKA' da APF antikoları gibi aynı antijene karşı oluşur. AKA, indirekt immünfloresans yöntemi ile tayin edilir. APF' de olduğu gibi bu antikoların

tayininde de benzer zorluklarla karşılaşıldığından RA için potansiyel tanı markerı olabilmelerine rağmen teknik güçlüklerden dolayı tercih edilmemektedir.

Kalpain, kalsiyum bağımlı bir nötral sistein proteinazdır. Romatoidli sinoviyal dokuda fazlaca görülen bir proteazdır ve kırıkta yıkımında temel rol oynamaktadır. Sinovyum inflamasyonunda kalpain düzeyleri artar. Kalpastatin, kalpain'in doğal bir inhibitörüdür. RA' lı olguların serumunda kalpastatin' e karşı otoantikolar saptanabilmektedir.

Antinükleer antikolar (ANA), hücresele proteinlere ya da nükleik asitlere karşı yönelmiş otoantikolarlardır. Adına rağmen bu antijenlerden birçoğu kısmen yada tamamen hücre sitoplazmasında bulunur. En sık oluşan ANA, DNA-protein yada RNA-protein kompleksiyle reaksiyona girer. Genellikle IgG antikolarına yüksek afinitesi olan bu otoantikolar otoantijen tarafından yürütölen bir T-hücre sine bağımlı işlem tarafından üretilir.

Anti-p68 (BİP) (ağır zincire bağlanan protein) antikoları denilen antijen 68 endoplazmik retikulumun bir matris proteinidir (endoplazmik retikulum moleküler şaperon) ve immünoglobülinlerin hafif zincirine bağlanır. RA' lı hastalarda BİP' e yanıt olarak artan bir T-hücre si artışı gözlenir.

RA33, 33 kDa moleköl ağırlıklı bir antijendir. Anti-RA33 antikoları RA' lı hastaların serumlarında saptanabilmektedir.

Sa proteini, bir lif proteini olan vimentin'in sitrölin içeren formudur. Bu açıdan Sa, filaggrin/ siklik sitrölin peptid (CCP) otoantijen ailesinin içerisinde yer alabilir. Hastalığın erken döneminde Sa antijenine rastlanabilir.

Anti-CCP antikoları, sitrölin peptidlerine karşı oluşan otoantikolarlardır. Anti-CCP diğere parametrelere göre birkaç nedenden dolayı daha avantajlıdır.

Anti-CCP, APF ve AKA kadar özgül bir testtir. Diğer parametrelere göre analiz kolaylığı avantajı vardır. İmmünofloresans metoduna bağlı teknik zorluklar anti-CCP için ELISA yöntemi ile aşılmıştır. Anti-CCP antikoru, RA' da çok erken evrede serumda saptanabilmektedir. Bu otoantikorlar, RA için prognoz takibinde kullanılabilecek iyi bir parametre olarak gözükmektedir. RA' lı hastaların % 80' ninde anti-CCP antikoru bulunmaktadır. Spesifikliğı yaklaşık % 95-98, duyarlılığı % 65' tir. Ayrıca erozif RA' nın gelişmesini tahmin etmek için pozitif bir anti-CCP testi kullanılmaktadır ve bu tahmini değer RF' yi tamamlar.

Anti-CCP antikoru erozif ve erozif olmayan RA ayırıcı tanısında çok güçlü bir parametredir. RA' da anti-CCP, RF ile birlikte bakıldığında prognoz takibi açısından çok daha etkili olabilir. Anti-CCP pozitif olan RA' lı olgularda radyolojik olarak eklem hasarı, negatif olanlara göre daha belirgindir. Bu, anti-CCP antikoruunun prognoz açısından önemli olduğunu göstermektedir. Bu antikoruun belirli aralıklarla tayini klinik takipte faydalı olabilir<sup>53</sup>.

Özellikle sitriline hedeflere karşı oluşan antikoru (anti-keratin veya anti-filaggrin antikoru, sentetik sitrulin peptidlerine karşı oluşan antikoru) RA için yüksek spesifiteye sahiptir.<sup>52</sup> Bir seri kıkırdak proteininden biri olan gp39, tam olarak tanımlanamamakla beraber, son günlerin ilgi konusudur<sup>54</sup>. Üstelik ümit verici tanısal marker olmanın ötesinde, bu otoantikoru veya altta yatan otoimmün reaksiyonlar, RA' nın patogenezi hakkında da bize bilgi verirler<sup>52</sup>.

Hastalık tanı ve izleminde en sık kullanılan otoantikoru, çift sarmal DNA' ya karşı (anti-dsDNA), anti-Ro/SSA (SS; Sjögren sendromu), anti-La/SSB, anti-Sm (smooth muscle), anti-RNP (ribonükleoprotein), anti histon, anti sentromer, anti-Jo-1 (anti histidil tRNA), anti Scl-70 (sistemik skleroz-70kDa/anti topoizomeraz-1) olarak sayılabilir. Bu otoantikoruun klinik yaygınlığı ve hastalıklarla olan ilişkileri Çizelge 2.4' de özetlenmiştir<sup>55</sup>.

Otoantikoru çeşitli otoimmün romatizmal hastalıklarda tanı koydurucu olduğu kanıtlanmış araçlardır. Bununla birlikte, RA için spesifikliğı yüksek bir otoantikoru henüz tanımlanmamıştır. Otoimmünite ve otoantikoru RA gelişiminde

önemli olayları yansıtmaktadır; ancak patogenezi tam olarak anlayabilmek için ve tanısal olarak bu serolojik markerlardan faydalanabilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Çizelge 2. 4.** Otoantikörlerin klinik yaygınlığı ve hastalıklarla olan ilişkileri <sup>55</sup>

Otoantikör	İlişkili Hastalık	İlgili Hastalıkta Saptanma Sıklığı (%) <sup>56,57</sup>
<b>ANA</b>	Sistemik Lupus SLE etkin dönem	95-100
	SLE durgun dönem	80-100
	İlaçla uyarılmış SLE	100
	Mikst bağ dokusu hastalığı(MBDH)	100
	Romatoid artrit (RA)	20-40
	Progresif sistemik skleroz	85-95
	Polimiyozit, Dermatomyozit	30-50
	Sjögren sendromu	70-80
	Kronik Aktif hepatit	30-40
	Ülseratif kolit	25
	Diğer romatizmal hastalıklar	20-50
<b>ds DNA</b>	SLE	50-60
	RA, MBDH	5
<b>SSA (Ro)</b>	SLE	15-30
	Sjögren sendromu	60
	Yeni doğan lupusu	100
	Sjögren sendromu	30
<b>SSB (La)</b>	SLE	30-50
<b>Sm</b>	SLE	25-30
<b>RNP</b>	MBDH	95-100
	Sistemik skleroz	20
	SLE	25-40
<b>Scl-70</b>	Skleroderma	20-30
<b>Jo-1</b>	Polimiyozit	25-45
<b>Sentromer</b>	CREST sendromu (skleroderma)	80
<b>Histon</b>	İlaçla uyarılmış SLE	90

## 2.2. İMMÜNOGLOBÜLİNLER

### 2.2.1. İmmüoglobülinlerin Yapısı

İmmüoglobülinler de denilen antikorlar yabancı bir madde yani bir antijen varlığına karşılık olarak bağışıklık sisteminin ürettiği proteinlerdir. Antikorların antijenlere spesifik bağlanması yabancı işgalinin varlığını gösterir ve bu işgalci patojenin aktivitesini yok etmeden sorumlu olan bağışıklık sistemini harekete geçirir.<sup>58</sup> Antikorlar, antijenlerle uyarılan B lenfositlerin başkalaşımı ile ortaya çıkan plazma hücreleri (plazmosit) tarafından oluşturulurlar. Antikorlar bir erişkin serumundaki protein miktarının % 25'ini oluştururlar<sup>59</sup>.

Glikoprotein yapısındaki immüoglobülinlerin biyolojik özelliklerinin hemen hepsi yapılarındaki polipeptit birimlerine bağlıdır. İmmüoglobülinlerin iki temel işlevi vardır. Bunlardan birincisi spesifik antijenlerine bağlanmaktır. İkinci grup işlevi arasında komplemanı aktive etmek, opsonizasyon, sinyal iletimi gibi işlevler vardır. Bu işlevlerin herbirisi immüoglobülinin değişik bölgeleri ile ilişkilidir<sup>60</sup>.

İnsan serumunda değişik biyolojik özelliklere sahip beş değişik antikor sınıfı vardır. En yüksek derişimde bulunan antikor IgG' dir. Diğer antikor sınıfları IgA, IgM, IgD ve IgE' dir. Bütün antikorlar, molekül ağırlığı 25 kDa olan hafif (L) bir zincir ve molekül ağırlığı 50-77 kDa olan bir ağır (H) zincir olmak üzere iki değişik türdeki polipeptit zincirlerinden oluşur. Hafif zincir  $\kappa$  ve  $\lambda$  olmak üzere iki değişik türde bulunabilir ve antikorların bütün sınıflarında vardır. Diğer yandan ağır zincir türü bir immüoglobülinin sınıfını belirleyen zincirdir. IgG' nin ağır zinciri  $\gamma$  olarak adlandırılırken IgA, IgM, IgD ve IgE immüoglobülinlerin ağır zinciri sırasıyla  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  ve  $\epsilon$  olarak adlandırılır<sup>58-61</sup>.

IgG, IgA ve IgD sınıfı globülinlerde Y molekülünün gövde kısmında  $C_{H2}$  ve  $C_{H3}$  olmak üzere iki adet ( $C_{H1}$  ile birlikte 3 adet), IgM ve IgE globülinlerin gövde kısmında ise  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  ve  $C_{H4}$  olmak üzere üç adet, ( $C_{H1}$  ile birlikte 4 adet) sabit kıvrım bulunur<sup>59</sup>.



L polipeptit zincirleri üzerinde bir değişken  $V_L$  bir de değişmez  $C_L$  bölgesi bulunur. L zincirleri, üzerindeki  $C_L$  bölgelerinde görülen kimyasal yapı değişikliklerine bağlı olarak iki tipe ayrılır. Bunlardan birisi  $\lambda$  (lamda) diğeri  $\kappa$  (kappa) tipleridir. Bu yapı değişiklikleri antijenik ayırım sağlar.

Bir immüoglobülin molekülündeki L polipeptit zincirleri ya  $\lambda$  ya da  $\kappa$  tipi zincirlerden oluşmuştur. Aynı immüoglobülin molekülü üzerinde hem  $\lambda$  hem de  $\kappa$  tipi zincirler bir arada bulunamazlar. Bir hayvandaki  $\kappa$  tipi zincir taşıyan immüoglobülinlerin sayısının,  $\lambda$  tipi zincir taşıyan immüoglobülinlerin sayısına oranı her tür canlı için değişmezdir. Bu oran insanlarda 2:1' dir.

İmmüoglobülinlerdeki H zincirlerinde, H zincirlerinin C bölgeleri arasındaki stereokimyasal ve serolojik ayırmalara göre 5 ayrı yapı saptanmıştır. Bunlar  $\gamma$  (gama),  $\alpha$  (alfa),  $\mu$  (mü),  $\delta$  (delta) ve  $\epsilon$  (epsilon) olarak adlandırılmaktadır. İmmüoglobülinlerdeki H zincirlerinin yapısı o immüoglobülinin sınıfını belirler. IgG'de  $\gamma$ , IgA'da  $\alpha$ , IgM'de  $\mu$ , IgD'de  $\delta$  ve IgE'de ise  $\epsilon$  ağır zinciri bulunur. İmmüoglobülinlerin tüm yapısında bulunan kısımlar şunlardır:

IgG'de H zincirleri olarak 2 adet  $\gamma$  zincirleri ve bir de iki adet L zincirleri bulunur. Bu L zincirleri de bir IgG molekülünde ya  $\lambda$  ya da  $\kappa$  yapısındadır. Buna benzer şekilde monomer yapısındaki IgE'de iki adet  $\epsilon$ , IgD'de iki adet  $\delta$  yapılarında H zincirleri ile her birinde ya  $\lambda$  ya da  $\kappa$  yapısında ikişer adet L zincirleri bulunur. Polimer yapısındaki IgM ve dimer yapısındaki IgA immüoglobülinlerindeki H ve L zincirleri daha çok sayıdadır.

H zincirleri arasında ve H zincirleriyle L zincirleri arasındaki bağlantıyı oluşturan disülfid bağlarının sayısı ve bağlantı yerlerinin gösterdiği değişikliklere göre IgG sınıfında 4 alt sınıf vardır: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>. Bu alt sınıfları oluşturan ağır zincirler de  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ 'dür. IgG sınıfını oluşturan IgG alt sınıfları şu oranda bulunur: IgG<sub>1</sub> % 66, IgG<sub>2</sub> % 23, IgG<sub>3</sub> % 7 ve IgG<sub>4</sub> % 4.

IgA sınıfından da IgA<sub>1</sub> ve IgA<sub>2</sub> olarak iki alt sınıf tanımlanmıştır. İmmüoglobülinlerin çeşitli özellikleri Çizelge 2.5.'de görülmektedir<sup>59</sup>.

**Çizelge 2. 5.** İmmüoglobülinlerin özellikleri <sup>59</sup>

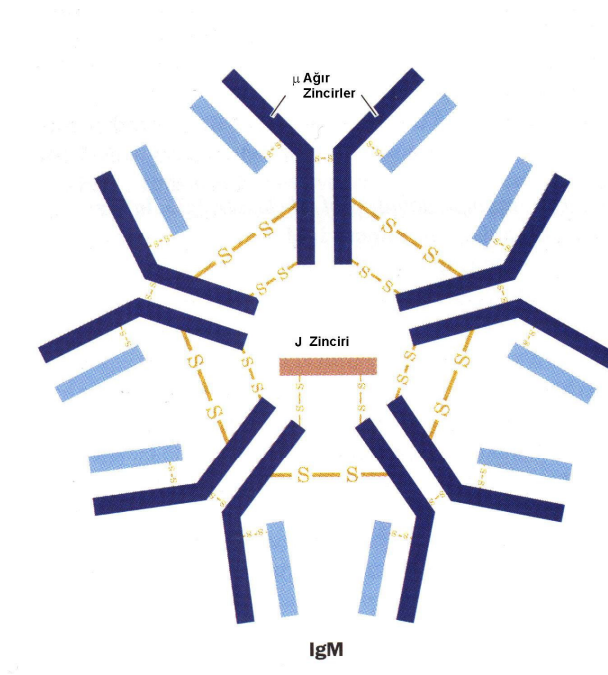
<b>Özellikler</b>	<b>IgG<sub>1</sub></b>	<b>IgG<sub>2</sub></b>	<b>IgG<sub>3</sub></b>	<b>IgG<sub>4</sub></b>	<b>IgM</b>	<b>IgA</b>	<b>IgD</b>	<b>IgE</b>
Molekül ağırlığı	150.000				900.000	170.000 / 400.000	180.000	200.000
Normal serumdaki Yoğunluk (mg/100ml)	1000-1500				60-180	100-4000	3-5	0.01
Serumdaki yarı ömür (Gün)	23				5	6	3	2.5
Salgılarda bulunma	-	-	-	-	-	++	-	-
Plasentadan geçme	+	+	+	+	-	-	-	?
Komplemanı bağlama	2+	1+	3+	-	+	-	-	-
Hücrelere bağlanma	+	-	+	-	-	-	-	?
Mononükleerlere bağlanma								
Nötrofillere bağlanma	+	-	+	+	-	+	-	-
Mast ve Bazofillere bağlanma	-	-	-	?	-	-	-	+++
T ve B lenfositlere b.	+	+	+	+	(+)	(+)	-	(+)
Plaketlere b.	+	+	+	+	-	-	-	?
<b>AÇIKLAMA</b>	Enfeksiyonlara karşı geç oluşur, uzun süreli kalır.				Enfeksiyonlara karşı erken oluşur. Kısa süreli kalır.	Mukozalarda salgılanan Ig'dir.	Antikor özelliği saptanamamıştır. Yeni doğan ve lenfoblastik lösemide lenfosit yüzeylelerinde saptanır.	Allerjide deri ve diğer dokuları duyarlılaştırır. Allerjide miktar artar.

### 2.2.1.1. IgA

Serumdaki immüoglobülinlerin %15-20'sini oluşturur. İnsan serumundaki IgA' ların %80'i monomer şeklindedir. Tükürük, kolostrum, süt, trakebronşial ve genitoüriner seromüköz salgılarda bulunan immüoglobülinlerin çoğunu oluşturur<sup>62</sup>.

### 2.2.1.2. IgM

Serumdaki immüoglobülinlerin %10'unu oluşturur. Pentamer şeklinde beş alt üiteden oluşur. Büyük kısmı primer immün yanıtta oluşur (Şekil 2.5)<sup>62</sup>.



Şekil 2.5. IgM' nin yapısı<sup>62</sup>

### 2.2.1.3. IgD

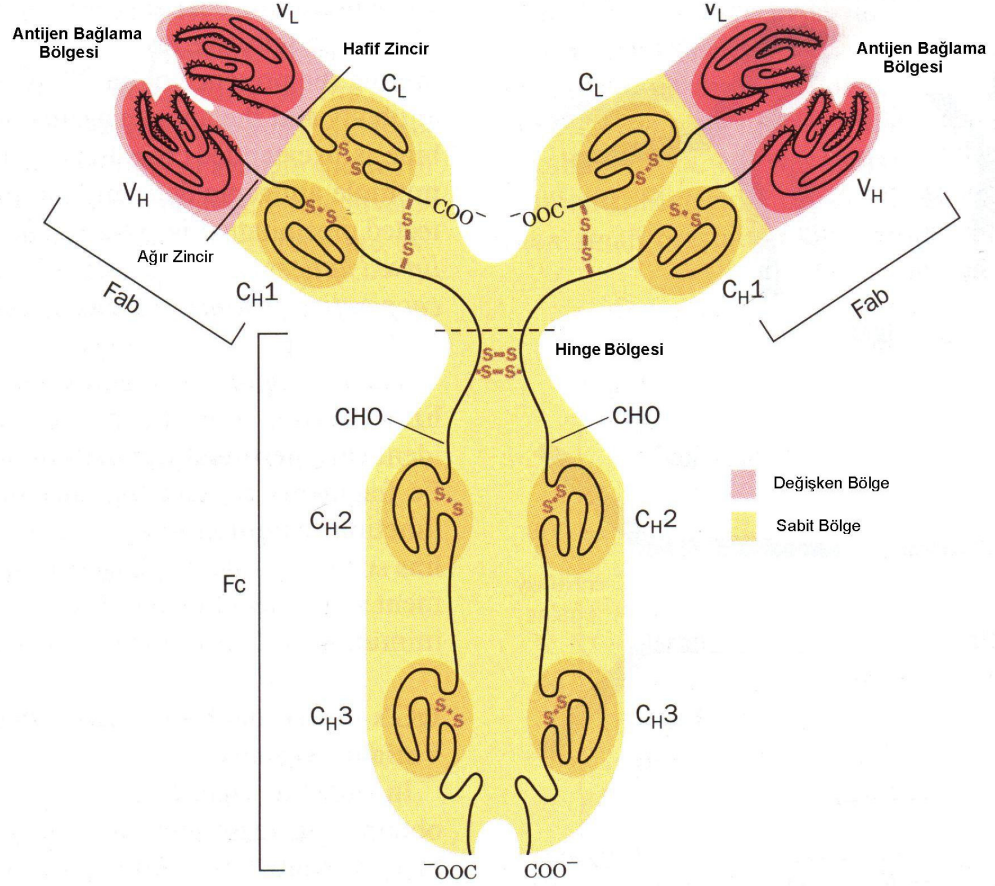
Serumda eser miktarda bulunur. Total plazma immüoglobülinlerinin %1'den daha azını oluşturur. Dolaşımdaki B lenfositlerinin yüzeyinde bulunur. Antijen uyarımıyla meydana gelen B hücre farklılaşmasında rol aldığı sanılmaktadır<sup>62</sup>.

#### 2.2.1.4. IgE

Serumda çok az miktarda bulunur, genellikle mast hücresi ve bazofil yüzeyinde bulunur. Bu immünoglobülin helmitlere karşı aktif bağışıklıkta ve astım, saman nezlesi gibi çabuk tip aşırı duyarlılıkta etkilidir<sup>62</sup>.

#### 2.2.1.5. IgG

Elektron mikroskopu ile incelendiğinde IgG molekülü Y harfi biçiminde görülür. İkişer ikişer aynı yapıda olmak üzere IgG molekülü dört adet polipeptit zincirinden oluşur (Şekil 2.6). Bütün antikolar, molekül ağırlığı 25 kDa olan hafif (L) bir zincir ve molekül ağırlığı 50 kDa olan bir ağır (H) zincir olmak üzere iki değişik türdeki polipeptit zincirlerinden oluşur<sup>58</sup>. IgG molekülünde L zincirler Y harfinin kollarında, H zincirler ise hem kollarında hem de gövdesinde bulunurlar. Kollardaki hafif ve ağır zincirler arasında ve gövdedeki iki ağır zincir arasında bulunan disülfid bağları polipeptit zincirlerini birbirlerine bağlarlar. IgG molekülünde 1320 adet aminoasit bulunur. Ağır zincirde 446, hafif zincirde ise 214 aminoasit saptanmıştır<sup>60</sup>. Kollardaki hem L hem de H zincirlerinin bir uçları  $-NH_2$  ile sonlandıklarından dolayı bu uçlara amino terminal uçlar, zincirlerin diğer uçları ise  $-COOH$  ile sonlandıklarından bu uçlara da karboksil terminal uçlar adı verilir. Her polipeptit zincirinin amino terminal uca yakın kısımları özgül antijene bağlanma bölgesi olup buna bağlı olarak aminoasit sırasında, diğer bölgelere göre çok değişiklikler görülür. Bu nedenle bu bölgelere değişken bölge (V) denir. Polipeptit zincirlerinin geri kısmı nispeten değişmez durum gösterdiğinden değişmez bölge (C) adını alır. Her polipeptit zincirinin üzerinde disülfid bağlarıyla bağlanmak suretiyle oluşturulan kıvrım alanları bulunur. Değişken bölgede bulunan kıvrım alanlarına V kıvrımları denir. Bunlardan H zinciri üzerindeki  $V_H$ , L zincirleri üzerindeki  $V_L$  kıvrımları adı verilir. Değişmez bölgedeki kıvrım alanlarına C kıvrımları denir. Y biçimindeki immünoglobülin molekülünün kollarında, V bölgesinin hemen altında, sabit bölgedeki H zinciri üzerindeki kıvrıma  $C_{H1}$ , aynı bölgede L zinciri üzerindeki kıvrıma  $C_L$  kıvrımları adı verilir<sup>59</sup>.



**Şekil 2. 6.** IgG molekülünün şematik gösterimi <sup>62</sup>

İmmüoglobülinlerin fonksiyonlarının incelenmesi için IgG molekülünü, Y'nin kollarının, gövdeyle birleştiği yerden üç parçaya ayıran papain enzimi ile yapılan çalışmalarda molekülün kollarına isabet eden, antijenin bağlandığı değişken bölge ve amino terminal uçlarının bulunduğu parçalara (iki adet) Fab parçaları (antijen bağlayan fragman) adı verilir. Y şeklindeki molekülün biyolojik aktivite gösteren efektör kıvrımlarını taşıyan gövde kısmına Fc parçası (kristalize olabilen fragman) adı verilir. Fab parçasında hem H hem de L polipeptit zincirleri, Fc parçasında yalnız H zincirleri bulunur.

Pepsin enziminin etkisinde ise Y molekülü kolların hemen altından ayrılarak bir tarafta kalan iki kol ve kısa bir parça gövdeden oluşan parçaya F(ab) parçası denir. Pepsinin etkili olduğu bölge çok esnek bir bölge olup bağlantı (menteşe: hinge) bölgesi adı verilir (Şekil 2.6).

İmmünoglobülin G'nin alt sınıflarının serum düzeyleri (mg/ml), IgG<sub>1</sub> için 5-12, IgG<sub>2</sub> için 2-6, IgG<sub>3</sub> için 0.5-1, IgG<sub>4</sub> için 0.2-1'dir. Serumdaki toplam IgG miktarı,

- ✓ kronik granülom özelliği gösteren enfeksiyonlarda
- ✓ tüm enfeksiyonlarda
- ✓ hiperimmünizasyonda
- ✓ yetersiz ve dengesiz beslenmede (ciddi)
- ✓ serum proteinleri arasındaki normal dengenin bozulmasında (dysproteinemia)
- ✓ aşırı duyarlılık, granülomlar, deri hastalıkları ve IgG miyelomu ile bağlantılı hastalıklarda ve
- ✓ romatoid artrit'te **artarken**;
- ✓ kanda IgG yokluğu ile belirgin genetik hastalıkta (agammaglobülinemia)
- ✓ lenfoid aplasia'da
- ✓ seçici IgG, IgA eksikliğinde
- ✓ IgA miyelom'da
- ✓ Bence Jones proteinemia'da (Başta multiple myeloma olmak üzere bazı kemik iliği hastalıklarında idrarda görülen protein cisimcikleri)
- ✓ kronik lenfoblastik lösemi'de **azalır**.

IgG alt gruplarının eksikliklerinde, IgG düzeyi normal sınırlarda olup alt grup yetmezliği vardır. Ciddi vakalarda IgG alt gruplarını içeren immünoglobülin tedavisi kullanılır<sup>59</sup>.

Antikorlar, ya monoklonal (mAbs) ya da poliklonal (pAbs) olarak üretilir. Hücrenin klonları tarafından tek bir antikor üreten ve bu nedenle aynı olan antikorlara mAbs denir. Değişik hücre dizileri tarafından üretilen antikorlar pAbs değişik antijen bağlama özelliklerine sahip heterojen bir antikor karışımı oluşturur<sup>58</sup>.

### 2.2.2. Teröpatik (İyileştirici) Antikorlar

Günümüzde monoklonal antikorlar aşılarından sonra ikinci büyük biyofarmosotik ürün kategorisini oluşturur. Klinik deneme aşamasında olan

biyofarmosotiklerin % 20' si bu ürün grubuna aittir<sup>63</sup>. Bugün piyasada yaklaşık 20 monoklonal antikorun çoğu kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Diğer ana hedef göstergeler arasında immün ve iltihaplı rahatsızlıklar vardır<sup>64</sup>. Monoklonal antikorların geliştirilmesi sırasında yukarıda anlatılanlar gibi hastalık tedavisindeki hedef spesifikliğı daha uygulanabilir bir hale getirmektedir. Antikora dayalı olan terapilerin amacı patojenik enfeksiyonu ya da hedef hastalığı elimine etmek ya da nötralize etmektir.

Teröpatik antikorlar etkilerini üç farklı şekilde gösterebilir; Birinci alternatif, antikorun belli bir molekülün etkisini, örneğın büyüme faktörü ya da herhangi bir diğer aracın etkisini bloke etmesidir. Buna antikorun, faktörün kendisine yada faktörün reseptörüne bağlanmasıyla ulaşılır. İkinci alternatif, hedef molekülü elemine edebilecek bir molekülü taşıyacak şekilde antikorun belli hücre gruplarına, örneğın kanser hücresine karşı yönlendirilmesinin hedeflenmesidir. Üçüncü alternatif, antikorun örnek olarak hücre bölünmesi yada hücre ölümüne (apoptosise) neden olabilen bir sinyal molekülü olarak davranmasıdır<sup>63</sup>. Teröpatik antikorlar dışında teröpatik kullanım alanı olan bir çok füzyon proteini vardır. Romatoid artritın tedavisinde kullanılan Enbrel bunlara bir örnektir. Bu molekül bir antikorun Fc bölgesinden oluşuyorken Fab bölgeleri iki tümör kangren faktör (Tumor necrosis factor, TNF) reseptörleriyle yer değıştirir<sup>65</sup>.

### **2.2.3. Antikorların Üretilmesi ve Saflaştırılması**

Teröpatik antikorların güçleri nispeten düşüktür ve bu nedenle yüksek dozlarda verilmelidir. Ayrıca tedavi çoğtu kez kronik hastalıklar için kullanılır. Bu nedenle piyasa talebini karşılamak amacıyla her yıl 10-100 kg gibi büyük miktarlarda saflaştırılmış ürün üretilmelidir. Her hasta için çok miktarda ürünün gerekli olması monoklonal antikorların en pahalı ilaçlar arasında yer almasına neden olur. Bir hasta için yıllık maliyet 35.000 dolara ulaşabilir<sup>66</sup>.

Antikor üretimi talebini karşılamak için oldukça verimli ve tutarlı üretim işlemlerine başvurmak gerekir. Günümüzde piyasada bulunan monoklonal antikorlar

büyük oranda benzer işlemlerle üretilir ve çoğu kez iki ana aşamada gerçekleştirilir: yukarı doğru hücre yetiştirilmesi ve aşağı doğru saflaştırma işlemleri.

Monoklonal antikorlar için en popüler üretim sistemi rekombinant memeli hücre kültürüdür. Bu amaçla en çok kullanılan hücre türleri Chinese hamster ovary (CHO) ve murine myeloma (NSO) dır. Aşağı doğru işlemler üründeki safsızlıkları elemine etmek amacıyla yapılır. Bu safsızlıklar dimerler, agregatlar ve ürünün değişik izoformları gibi ürün ilişkili ya da konak hücre proteini (HCP), nükleik asitler (DNA, RNA), tutuklama basamağından liç edilen protein A ve hücre kültürü ortam bileşenleri gibi işlem ilişkili olabilir<sup>64</sup>. Aşağı doğru işlemler ya santrifüjle ya da mikrofiltrasyon yoluyla hücre uzaklaştırmasıyla başlar. Sonraki basamak normalde protein A' nın ligand olduğu afinite kromatografisiyle tutuklama basamağıdır. Geriye kalan safsızlıkları uzaklaştırmak için iyon değiştirme kromatografisi gibi ek kromatografi basamakları çoğunlukla kullanılır. Üretim işlemlerinde kromatografi basamaklarının dışında filtrasyonun ara operasyonu olan viral temizlik de vardır<sup>64</sup>.

#### **2.2.4. IgG' nin Tıp Uygulamaları**

1940` larda Cohn ve arkadaşlarının, insan kanını fraksiyonlayarak önemli proteinlerin eldesini sağlayan kimyasal prosesi geliştirmeleriyle ilk immünoglobülin çözeltileri (sadece intramuskular kullanıma uygun olan) elde edilmiştir<sup>67</sup>. Bu gelişmeyi takip eden on yıl içinde, çeşitli primer immün yetmezliklerin genetik temeli tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu buluşlar insan immünoglobülinlerin düzenli olarak hastaların tedavisinde kullanılabilmelerini sağlamış, böylece hastaların yaşam kalitesi yükseltilmiş ve yaşam süreleri arttırılmıştır. Takip eden çalışmalarda, tedavi amaçlı spesifik immünoglobülin preparatları ve profilaksiye karşı spesifik patojenler (hepatit B, tetanoz ve boğmaca) üretilmiştir. Bütün bu hiperimmünoglobülinler kas içi yolla uygulanmışlardır.

Enjeksiyonların acı verici, dozların sınırlı ve tekrarının zor oluşu, enjekte edilen immünoglobülinlerin kas içerisindeki proteazlar tarafından parçalanması, geriye kalan immünoglobülinlerin, enjeksiyondan hemen sonra kan dolaşımına girmesinden dolayı bu



tür uygulamalar, hem hasta hem de tedaviyi uygulayan kişi için bazı zorluklar oluşturmuştur. IgG'nin çökmesi nedeniyle immüoglobülinlerin doğrudan kana enjeksiyonunun, tehlikeli sonuçlara yol açtığı görülmüştür. Takip eden ilk çalışmalar kısmi enzimatik (pepsin ve papain proteazları) sindirim ile immüoglobülinlerin doğrudan intravenöz uygulamalarına olanak sağlamıştır.

1970` li yılların sonlarına doğru bu preparatlar kolaylıkla uygulanmaya başlamıştır. 1980` li yılların başında Barandun ve arkadaşları, genç bir otoimmün trombositopeni ve hipergammaglobülinemi hastasında intravenöz immüoglobülin tedavisini uygulamış ve farklı bir uygulama alanı açmışlardır<sup>68</sup>. Son yıllarda yapılan çalışmalarda intravenöz immüoglobülinler, çeşitli primer ve sekonder immün yetmezliklerin, AIDS hastalarının, prematüre, kemik iliği kanseri, kronik lenfotik lösemi hastalarında, ilik ve karaciğer nakillerinde, riskli karın bölgesi cerrahi operasyonlarından sonra ve yanıkların tedavisinde kullanılmaya başlamıştır<sup>69</sup>.

## **2.2.5. İnsan Plazmasından IgG Ayrılması**

### **2.2.5.1. Cohn Metodu**

Proteinlerin etanol-su karışımlarındaki çözünürlüklerinin farkına dayalı tüm plazma protein fraksiyonlanması için Cohn yönteminin geliştirilmesi ayırma işlemleri için gerçekleştirilen en büyük başarılarından birisidir<sup>67</sup>. Bu yöntem üzerinde çok küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilen fraksiyon IV-4 + V çökeleğini veren yöntem,<sup>70</sup> daha kolay bir fraksiyonlama için Fraksiyon IV'ün elimine edildiği ve etanol kullanımının azaltıldığı Kistler ve Nitschmann metodu,<sup>71,72</sup> Fraksiyon II üzerine yapılan çalışma,<sup>73</sup> diğer plazma proteinlerinin denatüre edilerek albüminin daha hızlı saflaştırılmasına olanak veren ısı-etanol yöntemi<sup>74</sup> kayda değer çalışmalar arasındadır. Etanol/pH değişimi ile her basamakta elde edilen protein grupları, Çizelge 2.6.' da verilmiştir.

**Çizelge 2. 6.** Cohn sisteminde plazma proteinlerini dağılımı

<b>Fraksiyon</b>	<b>%Etanol</b>	<b>pH</b>	<b>Proteinler</b>
I	8-10	7.2	Fibrinojen, Faktör VIII, Fibronektin, C1q, C1r, C1s
II + III	25	6.9	IgG, IgA, IgM, Faktör II, VII, IX, X ve globülinler
IV-1	18	5.2	$\alpha$ - ve $\beta$ -globülinler, AT-III, $\alpha_1$ -antitripsin, IgM, komplement bileşenleri
IV-4	40	5.8	$\alpha$ - ve $\beta$ -globülinler, transferrin, serüloplazmin, Haptoglobülin
V	40	4.8	Albümin, $\alpha$ - ve $\beta$ -globülinler

Cohn fraksiyonlama sisteminin avantajları yöntemin esasının basitliğine dayalıdır. Basit reaktifler kullanılması, büyük ölçekte etanol fraksiyonlamasının olumlu geçmişi ve ürünleri, yöntemin kullanımının halen devam etmesinin en temel nedenleridir. Yöntemin avantajları Çizelge.2.7' de özetlenmiştir.

**Çizelge 2. 7.** Cohn fraksiyonlama sisteminin avantajları

Etanol ucuzdur ve kolaylıkla temin edilebilir
İşlem ve ürünler kabul edilmiştir
Ürünlerin teröpatik kullanım için güvenli olduğu kabul edilebilir
Bakteriostatik koşullarda fraksiyonlama yapılır
Kesikli/sürekli sistemlerde kolaylıkla uygulanabilir
Büyük ölçekli kesikli üretime uygundur
Yaygın kullanımı olan bir yöntemdir

Cohn yöntemi, işlem süreci, ürün gereksinimleri, ürün spesifikasyonları ve fabrikanın üretimi devam ettirmesi için gerekli servis ve bakımdan kaynaklanan dezavantajlara da sahiptir. Bu faktörler endüstrisi iyi gelişmiş ülkelerde probleme neden olmazken diğerlerinde Cohn yönteminin sürekli devam ettirilmesi sorun oluşturabilir. Yöntemin dezavantajları Çizelge 2.8' de özetlenmiştir.

## **Çizelge 2. 8.** Cohn fraksiyonlama sisteminin dezavantajları

---

Bir litre plazmaya karşılık iki litre etanol kullanılmalıdır

Soğutma sistemi gereklidir

Soğuk alanlar ve soğutmalı tanklar gereklidir

Sıvı/katı ayırma el kontrollü, süreksiz sistemde gerçekleştirilmektedir

Protein denatürasyonu gerçekleşir

Sıvı fazda protein kayıpları gerçekleşir (%60-%70'i çökelekte)

Küçük ölçekli üretime uygun değildir

Yüksek kalitede başlangıç materyaline gerek vardır

---

### **2.2.5.2. IgG' nin Çok Basamaklı Ayrılması**

Yöntem 1983 yılında Berglöf, Eriksson ve Curling tarafından soğuk etanol yöntemiyle elde edilene eşdeğer veya ondan daha iyi özellikte albümin ve immünoglobülin G ayırma için geliştirilmiştir<sup>75</sup>. Bu yöntemde başlangıç materyali olarak kryosüpernatant kullanılmaktadır. Plazma -20 °C'de depo edilir ve kullanılmadan önce 4 °C'de normal olarak eritilir. Şayet plazma IgG saflaştırmak için kullanılıyorsa, pH 7.0'de DEAE-Sepharose CL-6B kolonondan 0.02 M fosfat tamponu ile IgG' nin elüsyonunun ardından pH 4.5'de 25 mM asetat tamponu ile albümin içeren fraksiyon elde edilir. Desorbe edilen IgG 0.02 M fosfat tamponu ile, (pH 5.8) SP-Sephadex C-50 üzerine adsorbe olur ve 0.15 M glisin ile (pH 9.0) desorbe edilir.

## **2.3. AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ**

Modern biyoteknolojide karşılaşılan en önemli sorunlardan biri de biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, hormonlar, antikorlar ve antijenler gibi) buldukları çok bileşenli karmaşık ortamlardan (kan, vücut sıvıları ve mikrobiyal kültür ortamları gibi) seçici olarak kazanılması ya da saflaştırılmasıdır. Bu moleküllerin elde edilmesinde tüm maliyetin % 50-80' ini ayırma ve saflaştırma işlemleri oluşturmaktadır. Günümüzde laboratuvar ya da endüstriyel ölçekli yaklaşımlarda boyut, elektriksel yük, yoğunluk gibi ayırt edici özelliklerden

yararlanılarak biyomoleküller saflaştırılmaktadırlar. Bu amaçla çok değişik yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen halen konuyla ilgili yoğun araştırmalar devam etmektedir. Klasik ayırma yöntemlerinde “seçicilik”ten, bir başka deyişle “moleküler tanıma” kavramlarından bahsetmek güçtür.

Proteinler, antikor ve antijenler, ilaçlar ve hücreler gibi birçok biyolojik yapının biyolojik ve kimyasal özelliklerinden yararlanarak izole edilmesinde ve saflaştırılmasında kullanılan “afinite kromatografisi”, saflaştırma teknikleri arasında seçiciliği ve duyarlılığı ile eşsiz bir yer tutmaktadır. Klasik yöntemlerden farklı olarak, bu teknikte biyolojik moleküller çok seçici olarak “Biyolojik Tanıma” yeteneğine sahip “ligandlar” kullanılarak saflaştırılmaktadır<sup>76</sup>.

Afinite kromatografi bir biyolojik ligand (örneğin: substrat, enzim yada hormon) ya da onun sentetik bir analogu ile protein molekülü üzerindeki komplementer bağlanma bölgesi arasında olan özgün etkileşimi esas alan güçlü bir protein saflaştırma yöntemidir. Burada söz konusu etkileşim antikorların antijenlerle, enzimlerin substrat analoglarıyla ve de hormonların reseptörleri ile olan etkileşimleri türündendir. Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler Çizelge 2.9’ da verilmiştir.

**Çizelge 2. 9.** Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler

<b>Ligand</b>	<b>Ligandla Etkileşen Protein</b>
Antikor	Antijen, virüs, hücre
İnhibitör	Enzim (ligandlar genellikle substrat veya kofaktör çeşitleridir)
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörleri, zar proteini, hücre
Nükleik asit	Nükleik asite bağlı protein (enzim veya histon)
Hormon, Vitamin	Reseptör, Taşıyıcı protein
Şeker	Lektin, enzim veya diğer şeker bağlı proteinler

Afinitenin geniş alanda değişik uygulamaları nedeniyle alt afinite teknikleri ortaya çıkmış ve bazıları kendilerine özel isimler almışlardır. Çizelge 2. 10' da bu tekniklerden bazıları verilmiştir.

**Çizelge 2. 10.** Afinite kromatografisinin alt başlıkları



Bu yöntemde ayrılacak olan molekülü içeren ham karışım kolondan geçirilir. Belirlenen deneysel koşullarda immobilize olan afinite ligandı ile etkileşime girecek uygun grupları bulunmayan moleküller kolondan alıkonmadan çıkarlar, afinitesi olanlar ise kolonda adsorbe olurlar. Daha sonra adsorplanan moleküllerin, ortam koşullarının değiştirilmesi ile (pH, iyonik kuvvet, sıcaklık değişimi veya üre, guanidin gibi ayrıştırıcı ajanlar ile) veya ligand çözeltisinin kullanılması ile kolondan ayrılması sağlanır. Ligand ile saflaştırılan molekül arasında kompleks oluşumu iyonik etkileşim, hidrofobik kuvvetler, London dispersiyon kuvveti, dipol dipol etkileşimi veya yük-transfer etkileşimleri gibi



**Çizelge 2. 11.**Afinite kromatografisi için bazı katı destek türleri

<b>Tür</b>	<b>Kimyasal Yapı</b>
Biyopolimerler	Agaroz, Dekstran, Selüloz
Sentetik kopolimerler	Poliakrilamid, poli (HEMA), polistiren
İnorganik malzemeler	Gözenekli cam, demir oksit (magneto jeller)
Biyopolimer/sentetik kopolimerler	Agaroz, poliakrilamid
İnorganik malzemeler/organik kopolimerler	Silika/hidrofilik kopolimerler

Katı destek aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmalıdır:

1. Çözünmemelidir.
2. Uygun geçirgenliğe ve büyük iç yüzey alanına sahip olmalıdır.
3. Yüksek sertliğe ve uygun partikül formuna sahip olmalıdır.
4. Non-spesifik adsorpsiyon düşük olmalıdır.
5. Afinite ligandının bağlanması için fonksiyonel gruplar içermelidir.
6. Ligand immobilizasyonu, adsorpsiyon, desorpsiyon ve rejenerasyon koşullarına karşı kimyasal olarak kararlı olmalıdır.
7. Mikrobiyal ve enzimatik ataklara karşı dayanıklı olmalıdır.
8. Hidrofilik karakterde olmalıdır.

### **2.3.2.Afinite Ligandın Seçimi**

Afinite kromatografisinde kullanılacak bir ligandın iki koşulu sağlaması gereklidir;

- 1- Saflaştırılacak madde ile spesifik ve tersinir bir kompleks oluşturmalıdır.
- 2- Bileşik, matriksle kovalent olarak bağlanmasına olanak verecek fonksiyonel gruplar içermelidir.

Bu iki koşulu sağlayan çok sayıda bileşik mevcuttur. Afinite kromatografisi prensiplerinin pratiğe uygulanmasında kullanılacak büyük çeşitlilik, yöntemin etkinliğini belirler.

Bu etkinliği sağlayan faktörler şunlardır:

- ✓ İstenilen amaca göre özel olarak uyarlanarak kullanılabilen ligandların çeşitliliği,
- ✓ Grup-spesifik ligandların kullanımı,
- ✓ Bir maddenin saflaştırılması için kullanılabilen ligandların çeşitliliği.

Ligandlara örnekler Çizelge 2.12' de verilmiştir. Afinite ligandları oldukça farklı türlerde kimyasal bileşikler olabilir. Proteinler ve antikorlar gibi yüksek molekül ağırlıklı moleküllerin yanısıra substratlar gibi basit, düşük molekül ağırlıklı bileşikler de afinite ligandı olarak kullanılabilir. Ayrıca herhangi bir biyolojik fonksiyonu olmayan basit moleküllerin de kullanımı mümkündür. Hemoglobin saflaştırılması için katı desteğe bağlı imidazol ve grup-spesifik ligand olarak geniş uygulama alanı bulan reaktif boyalar bu tür ligandlara örnek olarak verilebilir<sup>77-82</sup>.

**Çizelge 2. 12.** Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligand sınıfları

Uygulama alanı	Ligand
Enzimoloji (enzimler, inhibitörler, kofaktörler)	Enzimler, substratlar ve analogları, ürünleri, inhibitörleri, allosterik efektörleri, kofaktörler, antikorlar, biyolojik fonksiyonu olmayan maddeler
Peptitler	Enzimler, antikorlar
İmmünoloji	Haptenler, antijenler, antikorlar
Protein Kimyası (reseptörler, taşıma proteinleri, glikoproteinler)	Hormonlar, vitaminler, steroidler, lektinler, lipidler, antikorlar, mono- ve polisakkaritler
Nükleik asitler, nükleotidler	Nükleik asit bazları, nükleozidler, oligonükleozidler, dihidroksiboril türevleri
Hücre ve virüslerin fraksiyonlanması ve izolasyonu	Antijenler, antikorlar, lektinler, hormonlar.

Afinite ligandları spesifite ve kapasite bakımından oldukça geniş bir dağılıma sahiptirler. Antijen-antikor etkileşimi gibi yüksek afiniteli etkileşimler ve enzim-



substrat etkileşimleri gibi daha düşük afiniteli etkileşimler afinite kromatografisinde kullanılabilir.

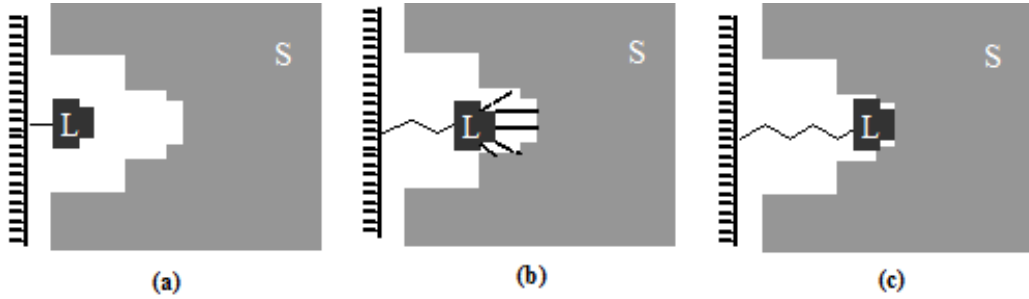
Dar bir seçicilik aralığına sahip veya monospesifik bir ligandın kullanılması yüksek bir etkinlik ve saflıkta tek bir bileşiğin saflaştırılmasına olanak verir. Ancak, bu aynı zamanda saflaştırılacak her madde için özel bir ligand-matriks kombinasyonu gerektireceğinden bir dezavantajdır. Dolayısıyla grup-spesifik ligandlar çok daha büyük pratik öneme sahiptir<sup>83</sup>. Tek bir afinite matriksi ile çok çeşitli maddelerin saflaştırılmasına olanak verirler.

### 2.3.3.Uzatici Kollar

Genellikle düşük molekül ağırlıklı ligandların kullanıldığı durumlarda (MA<5000) sterik engellemelerin giderilmesi amacıyla taşıyıcıya bağlanan bileşikler uzatici olarak adlandırılır (Şekil 2. 8).

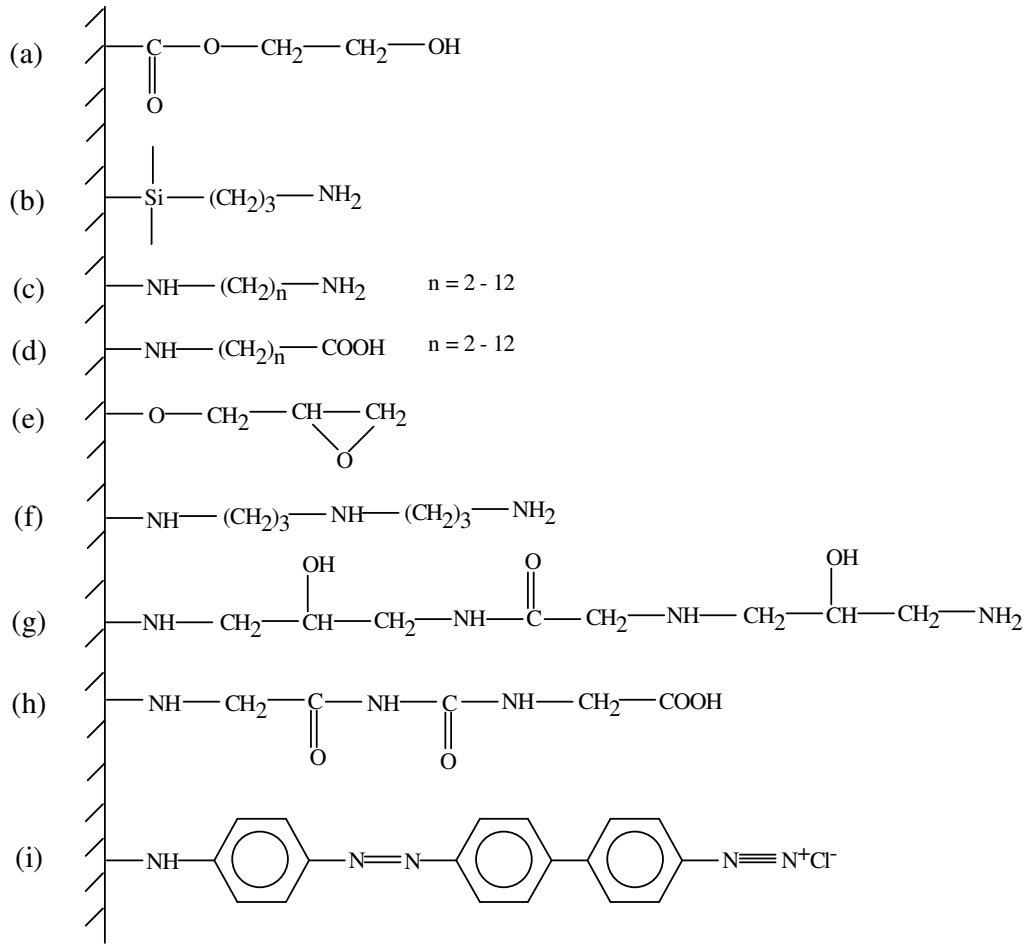
Bu tür taşıyıcıların sentezi için iki yöntem vardır;

1. Uzatici taşıyıcıya bağlanır ve aktivasyon ile uzaticının uç grubuna ligand bağlanır.
2. Sentezin ilk basamağında uzatici süstituent olarak bağlanır. İkinci basamakta yan zincir üzerinden matriks aktivasyonu gerçekleştirilir.



**Şekil 2. 8.** Uzatici kolun fonksiyonunun temeli (a) bağlanmama, (b) zayıf etkileşim, (c) ligand ve substrat arasında optimum etkileşim

Her iki yöntemin de avantajları ve dezavantajları vardır. Basit olması nedeniyle daha çok ilk yöntem kullanılır. Dezavantajı sentezlenen matriksin heterojenliğidir. Polimer analogu reaksiyon üzerinden basamaklı sentez sonucu, matrikste kalan sübtütüye olmamış uzatıcılar hidrofobik veya iyonik etkileşimlere girerek non-spesifik bağlanmaya neden olurlar. Spesifik olmayan etkileşimler uzatıcının zincir uzunluğuna ve yapısına bağlıdır. Ayrıca pozitif yüklü amin azotunun oluşması etkileşimin bozulma olasılığını artırır. Çok sayıda uzatıcı kol ve bunların değişik matrikslere bağlanması araştırılmıştır. Bazı karakteristik örnekler Şekil 2.9`da özetlenmiştir.

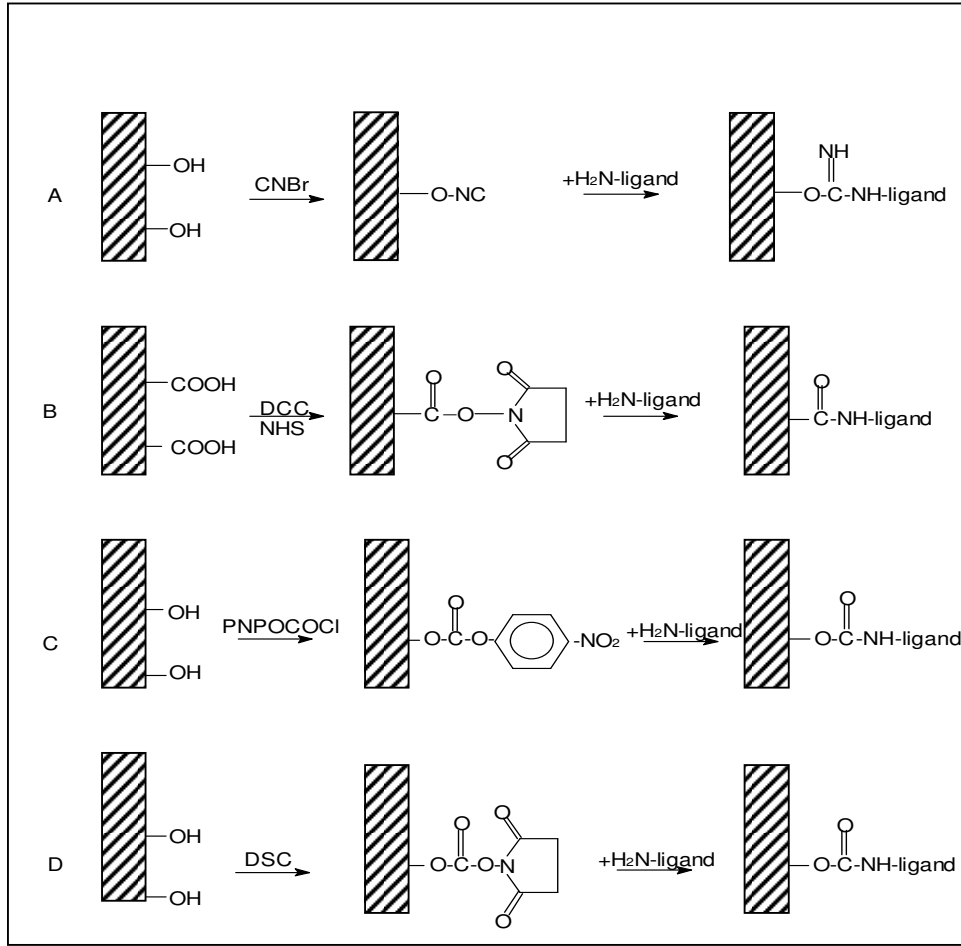


**Şekil 2. 9.** Afinite kromatografisinde kullanılan bazı uzatıcı kollar:

- (a) Hidroksialkilmetakrilat; (b) 3-aminopropilsilan; (c) w,w'-diaminokarbonikasit;  
(d) w-aminokarbonikasit; (e) bisokziran; (f) 3,3'-diaminopropilamin;  
(g) 1,3-diamino-2-propanol; (h) oligopeptitler; (i) diazonyum tuzları.

### 2.3.4. Aktivasyon Yöntemleri

Ligandların destek materyallerine immobilizasyonu için çok çeşitli yöntemler bulunmaktadır. En sık kullanılan yöntem, agarozun siyanojen bromür ile aktivasyonudur. Bu yöntem çok yaygın kullanılmasına rağmen, ligandın izoüre üzerinden bağlanması, saflaştırma işlemi sırasında bazı problemlere neden olmaktadır. Bu problemler; yükten dolayı non-spesifik bağlanma ve izoüre bağının kararsızlığından dolayı, ligand sızmasıdır<sup>84</sup>.



**Şekil 2. 10.** Değişik aktive taşıyıcılara ligand immobilizasyonu:

- (A) siyanat ester, siyanojen bromür aktivasyonu ile elde edilen izoüre türevi;
- (B) amid türevi ile sonuçlanan N-hidroksi süksinimit asit esteri;
- (C) ve (D) p-nitro-fenilkloroformat aktivasyonu sonucu elde edilen p-nitro-fenil ve N-hidroksi süksinimit karbamat türevleri

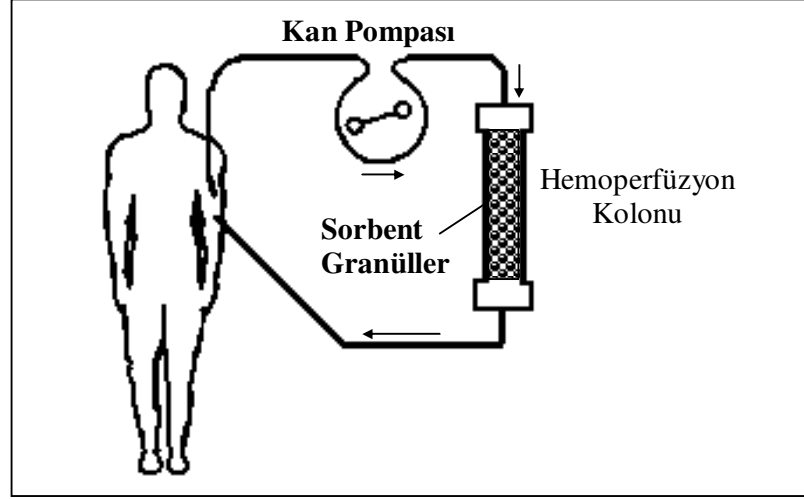
Afinite kromatografisinin ilk uygulanmaya başladığı zamanlarda en çok kullanılan aktivasyon yöntemlerinden biri de, ligandın matrikse N-hidroksi süksinimid gibi aktif esterler üzerinden bağlanmasını sağlayan yöntemlerdir<sup>85</sup>. Aktif esterlerin hazırlanabilmesi için matriksin karboksil grupları içermesi gerekmektedir. Bu matriksler, kolaylıkla agaroz üzerindeki hidroksil gruplarının, siyanojen bromür, aktif karbonatlar ve istenen uzatıcı kol uzunluğuna göre  $\omega$ -amino asitlerle aktive edilmesiyle hazırlanabilirler (Şekil 2.10).

Bu yöntemlerin kararlılık problemleri nedeniyle,<sup>86</sup> N,N,N,N-tetrametil(süksinimid) uronyum tetrafloroborata dayalı yeni bir yöntem geliştirilmiştir<sup>87</sup>. Bu tür aktive edilmiş matrikslere kovalent olarak bağlanmış ligandlar kararlı amid bağları oluştururlar.

Diğer bir aktivasyon yöntemi, polisakkaritlerin de aktivasyonunda kullanılan, hidroksil fonksiyonel gruplarına sahip polimerlerin N-N disüksinimidilkarbamatla (DSC) aktivasyonudur. Bu türevler fizyolojik pH'da nükleofillerle reaksiyona girmekte ve ligand kararlı karbamat bağı ile matrikse bağlanmaktadır. Çeşitli ligandların (enzimler, enzim inhibitörleri, antijenler, ve antikorlar) biyolojik aktivitelerini kaybetmeden immobilizasyonu aktive karbonat taşıyıcılarla mümkün olmaktadır<sup>88</sup>.

## 2.4. HEMOPERFÜZYON

Hemoperfüzyon ilaç zehirlenmeleri ve kronik böbrek yetmezliklerinde başarıyla kullanılan bir tedavi yöntemidir. Bu uygulamaların yanısıra karaciğer yetmezliği, şizofreni, siroz, vb. gibi metabolik kökenli ve nedeni tam olarak bilinmeyen hastalıkların tedavisinde ve özellikle son yıllarda kanser ve benzeri hastalıklarda patojenik antikorların kandan uzaklaştırılmasında da yaygın olarak uygulanmaktadır (Şekil 2.11).



Şekil 2. 11. Genel bir hemoperfüzyon şeması

Hemoperfüzyonun temel prensibi, kandaki hücre içi veya hücre dışı zehirli veya zararlı metabolik atıkların aktif karbon, iyon değiştirici reçineler, polialdehitler, silika jel, vb. gibi adsorbanlara adsorplanarak ekstrakorporal dolaşım sisteminde uzaklaştırılması esasına dayanır.

Hemoperfüzyon ilk kez 1964 yılında Yatzidis tarafından uygulanmıştır<sup>89</sup>. Daha sonra Dunea ve Kolff, hemoperfüzyonu üreli hastalarda kullanmışlardır<sup>90</sup>. Bu çalışmalarda sorbent olarak aktif karbon kullanılmıştır. Aktif karbonun klinik uygulamalarda gösterdiği ince partikül salımı gibi sorunların önüne geçmek için yine ilk kez Yatzidis tarafından aktif karbon granüller selüloz asetat ile kaplanmış ve bu partiküller ile doldurulmuş hemoperfüzyon kolonları akut ve kronik böbrek hastalarına uygulanmıştır.<sup>91</sup> Daha sonra yürütülen çalışmalarda aktif karbon ve diğer sorbentler hem sorbentin kan ile uyuşabilirliğini arttırmak hem de pratik uygulamalardaki salım sorunlarının önüne geçebilmek için çok değişik malzemelerle (akrilik polimerler, kollodion, naylon, polietilenglikol, jelatin, vb.) kaplanmışır<sup>92-94</sup>. Bu bilgilerin ışığı altında piyasada hemoperfüzyon için uygun çok sayıda sistemin olduğu görülmektedir. Fakat bu çalışmaların hepsinde kullanılan sorbentler nonspesifik sorbentlerdir. Yani spesifik olarak kandan istenilen malzemeyi uzaklaştırma yeteneğine sahip değildirler.

Hemoperfüzyon tedavisinde günümüzde klasik sorbentlerin yerini biyolojik ve/veya kimyasal olarak modifiye edilen spesifik sorbentler almaktadır. Bu spesifik sorbentler kanser ve benzeri hastalıkların tedavisine yönelik patojen antikorların kandan uzaklaştırılmasında uygulanmaktadır<sup>95-100</sup>. Kanserli hasta serumunda bulunan bağışıklık sistemini baskılayıcı patojenik antikorlar antitümör aktivitesini inhibe ederek, ilaç ile tedaviye karşı direnç oluştururlar<sup>101</sup>. Bu nedenle kanser tedavisi gören hastalardan, bağışıklık sistemini baskılayıcı ve çok güçlü inhibisyon aktivitesine sahip bu patojen antikorların uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Bu amaçla spesifik sorbentlerin kullanıldığı ve patojenik antikorların uzaklaştırılmasının amaçlandığı hemoperfüzyon yöntemleri önem kazanmaktadır<sup>102</sup>. Özellikle 1958'de, protein-A'nın Jensen tarafından "*Staphylococcus aureus*" bakteri hücrelerinden izole edilmesi ve yapısal analizleri sonucu, bu proteinin immüoglobulinlere ilgisinin çok yüksek olduğunun gösterilmesinden sonra, çalışmalar "Protein-A immobilize" sorbentler üzerinde yoğunlaşmıştır.

Hemoperfüzyon tedavisinde spesifik sorbentlerin kullanıldığı bir başka uygulama SLE hastalığının tedavisidir. Bu hastalığın en önemli klinik göstergeleri, deri ve böbreklerde neden olduğu bozukluklardır. Tedavide geç kalırsa hemolitik anemiye ve merkezi sinir sisteminde de önemli tahribata neden olmaktadır<sup>103,104</sup>.

SLE hastalığının temel nedeni, vücudun bağışıklık sisteminin henüz tam olarak bilinmeyen sorunlar yüzünden kendi DNA'sına karşı patojen antikorlar oluşturmasıdır<sup>105-107</sup>. SLE hastalığının tedavisi için hasta plazmasındaki anti-DNA antikorlarının uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Bu amaçla, DNA immobilize spesifik sorbentlerin kullanıldığı ekstrakorporeal hemoperfüzyon sistemleri ile patojen anti-DNA antikorlarının vücuttan uzaklaştırılmaları, alternatif ve etkin bir hemoperfüzyon tedavi yöntemi olarak önem kazanmaktadır<sup>108</sup>.

Bir başka hemoperfüzyon uygulaması koroner kalp hastalıklarının (ateroskleroz) tedavisinde, hastalarda lipoprotein düzeyini düşürmektir. Kandaki yüksek kolesterol seviyesinin kalp damarlarını özellikle ana damarları daralttığı uzun süredir bilinmektedir. Kolesterol, steroid hormonlar ve hücre membranının yapısında

yer alan ve acıcılığını düzenleyen, vücut işlevleri için az miktarlarda ihtiyaç duyulan lipid sınıfı bir maddedir. Vücudun kendisi tarafından üretildiği gibi besinler aracılığıyla da vücuda alınır. Hidrofobik karakteri yüksek bir madde olan kolesterol, kanda lipoproteinler tarafından taşınır. Bu amaçla, düşük molekül ağırlıklı heparin immobilize spesifik sorbentlerin kullanıldığı ekstrakorporeal hemoperfüzyon sistemleri ile kolesterolün vücuttan uzaklaştırılması, etkin bir tedavi yöntemi olarak değerlendirilmektedir.

## **2.5. BİYOMALZEMELER VE BİYOLOJİK UYUŞABİLİRLİK**

### **2.5.1. Biyomalzeme-Kan-Doku Etkileşimi**

Biyomalzeme, biyolojik sistemle kısa-uzun süreli etkileşen materyalleri tanımlayan bir sözcüktür. Bir kalp kapakçığı, hemodiyaliz membranı, kontak lens, kan torbası, hatta hastanelerde kullanılan test tüpleri biyomalzeme olarak değerlendirilebilir. Polimerler başta olmak üzere, metaller, seramikler, doğal doku bölümleri, vb. birçok değişik uygulamada biyomalzeme olarak uygulanmaktadır.

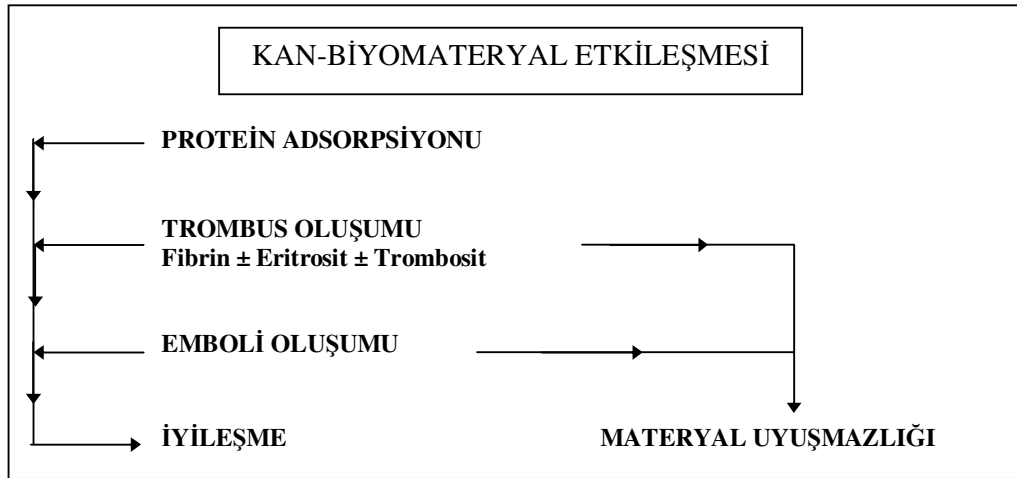
Bir malzemenin biyolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için, kullanılacağı yere bağlı olmakla birlikte şu özellikleri taşıması gerekir:

- ✓ Biyolojik sistemle uyuşabilir olmalıdır.
- ✓ Toksik, alerjik, kanserojen, vb. yan etkiler yapmamalıdır.
- ✓ Kullanılacağı amaca göre istenilen fonksiyonel, mekanik ve diğer özelliklere sahip olmalı ve bunları yeteri süre korumalıdır.
- ✓ Kolaylıkla saflaştırılabilmeli, şekillendirilebilmeli ve steril edilebilmelidir.

Biyomalzemenin biyolojik çevreyle uyumunu ifade eden “biyolojik uyuşabilirlik”, şüphesiz, biyomalzeme uygulamalarında ilk aranan özelliktir. Biyomalzeme yalnızca dokularla temas ediyorsa “Doku Uyuşabilirliği”, kan ile temas ediyorsa “Kan Uyuşabilirliği” ön planda değerlendirilir. Birçok durumda hem

doku hem de kanla temas söz konusudur. Örneğin, yapay damar protezlerinde, damarın içinden kan akarken, dış tarafı ise dokuyla temastadır.

Biyomalzemelerin kanla temas ettiği durumlarda biyolojik sistemin (kanın) cevabı Şekil 2.12’de verilmektedir. Kanla yabancı cisim (biyomalzeme) temas edince, yüzeye önce iyonlar ve proteinler, daha sonra kan hücreleri (trombositler) gider. Materyal kanla uyuşabilir ise genellikle albümin moleküllerinin yüzeye tercihli olarak yapışmasıyla yüzey pasifize edilir. Sonradan gelen trombositler yüzeyde önemli bir morfolojik değişime uğramadan otururlar. Bu durumda materyal vücut tarafından kabul edilmiştir. Kanla uyuşmayan durumda ise, yüzeydeki trombositler hızla morfolojik değişime uğrarlar, yüzeyde yayılır ve içlerindeki aktif kimyasalları salar. Bu diğer hücreleri çağırır ve pıhtılaşma mekanizmasını harekete geçirir. Yüzeyde çok sayıda hücreyi hapsetmiş olan kan pıhtısı yığını (trombus) oluşur. Trombusların yüzeyden kopması emboli ile kan damarlarının tıkanması ve ölüme kadar giden olaylar zincirini başlatır. Bu yabancı materyalin vücut tarafından reddedilmesidir.

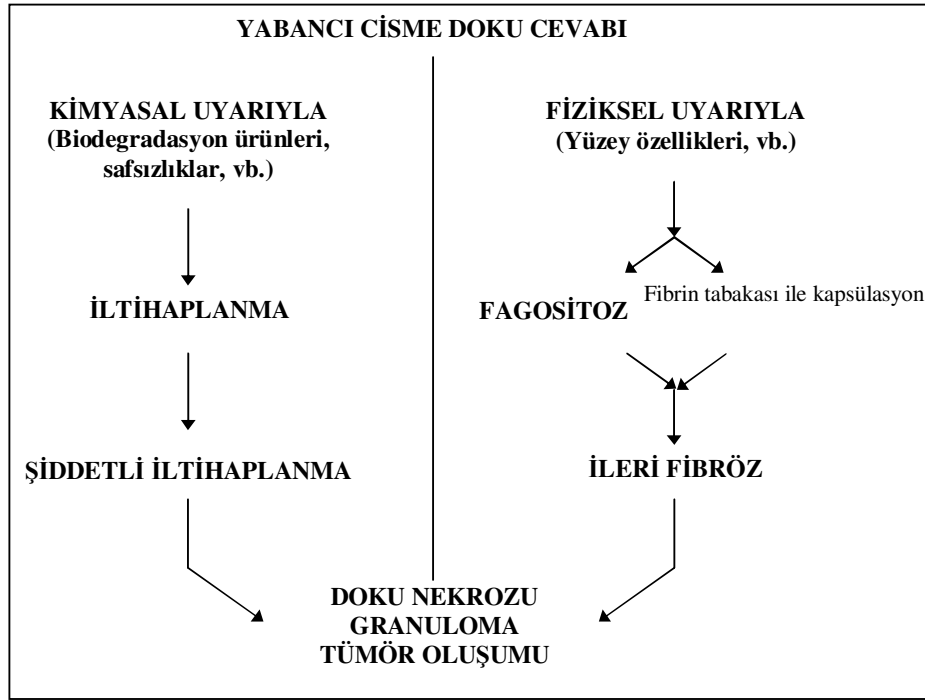


Şekil 2. 12. Kan-biyomalzeme etkileşimi

Yabancı cismin (biyomalzeme, mikroorganizma, vb.) dokuyla teması ise Şekil 2.13’de şematize edilen olaylara yol açar. Dokunun yabancı cisme cevabı fiziksel (yüzey alanı, şekil, hareket, vb. gibi) ve/veya kimyasal (dışarı sızan kimyasal bileşenleri, biyodegradasyon ürünleri, vb. gibi) nedenlerden ortaya çıkabilir. Uyarı



çeşitli yollarla vücudun koruma sistemlerine iletilir. Bölgede kan akış miktarı artar, kan akışı ile bölgeye gelen koruyucu hücreler hızla göreve başlar. Yabancı cisim küçük ise (örneğin bir mikroorganizma) vücut savunmasında görevli lökositler, makrofajlar, vb. yabancı cisimi yutup enzimleri ile yok etmeye çalışırlar. Cisim fagosite edilemiyorsa, etrafı fibröz bir dokuyla enkapsüle edilir veya içinde fibröz doku büyümesi gözlenir. Bu uzun zamanda, vücudun enzim sistemleri ile ortadan kaldırılabilir. Şiddetli uyuşmazlık durumu doku nekrozu, tümör oluşumu, vb. gibi önemli sonuçlara yol açar.



**Şekil 2. 13.** Yabancı cisme doku cevabı

### 2.5.2. Polimerik Biyomalzemeler

Biyomalzemeler arasında en yaygın olarak kullanılan grubu polimerik biyomalzemeler oluşturur. Polimerik biyomalzemelerin en önemli avantajı kimyasal yapıları nedeniyle çok değişik bileşim ve özellikte, karmaşık geometrik şekillerde ve yapılarda hazırlanması ve biyolojik sistemlere uygulanmasıdır (Çizelge 2.13).

**Çizelge 2. 13.** Polimerik biyomalzemelerin şekilleri, bileşimleri ve tıbbi kullanımları

Özellikleri	Örnekler	Kullanımları
a) Yumuşak		
Düşük su sorpsiyonu	SR, PU, PVC	Tüpler, Diyaframlar, Kaplamalar, Kalp Pilleri, Kan Torbaları
Yüksek su sorpsiyonu	Poli(HEMA)	Kontak Lens, Kaplamalar
b) Amorf, sert	PMMA	Kontak Lens, Yapay Diş ve Ortopedik Malzemeler
c) Yarı Kristalin	PET, PP, PTFE Naylon, PGA, PE	Ameliyat İplikleri, Yapay Damar Biyolojik Parçalanabilir Ameliyat İplikleri

### 2.5.3. Modifiye ve Biyofonksiyonel Biyomalzemeler

Polimerik biyomalzemelerin kullanım amacına göre çok değişik yüzey özelliklerine sahip olması gerekir. Bu nedenle polimerik biyomalzeme yüzeylerine fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle çok sayıda biyomolekül bağlanabilir. Bu amaçla kullanılan biyomoleküller ve immobilize sorbentlerin başlıca uygulama alanları Çizelge 2.14' te topluca verilmiştir.

**Çizelge 2. 14.** Immobilize biyomoleküllerin ve hücrelerin uygulama alanları

Enzimler	Biyoreaktörler (Endüstriyel, Biyotıbbi), Biyoayırma, Biyosensörler, Teşhis Kitleri, Biyolojik Uyuşabilir Yüzeyler
İlaçlar	Tromborezistan Yüzeyler, İlaç Dağıtım Sistemleri
Antikorlar ve Diğer	Biyosensörler, Teşhis Kitleri
Afinite Ligandları	Afinite Ayırımı (proteinler, hücreler), Hedeflenmiş İlaç Dağıtım Sistemleri
Nükleik Asitler	DNA Probları
Hücreler	Biyoreaktörler (endüstriyel), Yapay Organlar, Biyosensörler

Polimerik biyomalzemelerin yüzey modifikasyonunda kullanılan başlıca immobilizasyon yöntemleri ise Çizelge 2.15.'de topluca sunulmuştur.

## **Çizelge 2. 15.** Biyomolekül immobilizasyon yöntemleri

---

### **1.** Fiziksel Adsorpsiyon

- a) Van der Waals
- b) Elektrostatik
- c) Afinit
- d) Adsorpsiyon ve Çapraz Bağlanma

### **2.** Fiziksel Hapsetme

- a) Bariyer Sistem
- b) Hidrojeller
- c) Dispers (matriks) Sistemler

### **3.** Kovalent Bağlanma

- a) Çözünabilir Polimer Konjugeler
  - b) Katı Yüzeyler
  - c) Hidrojeller
- 

## **2.5.4. Biyospesifik Sorbentler**

Modern biyoteknolojide karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi de biyomoleküllerin (protein, hücre, enzim vb.) spesifik olarak buldukları ortamdan kazanılması veya saflaştırılmasıdır. Bu amaçla çok değişik yöntemler ileriye sürülmüş olmasına rağmen halen konuyla ilgili yoğun araştırmalar devam etmektedir. Günümüzde en yaygın kullanılan ayırma yöntemleri Çizelge 2.16.' da verilmiştir.

## **Çizelge 2. 16.** Ayırma teknolojileri

---

<b>Temel</b>	<b>Yaygın Örnekler</b>
Boyut	Filtreler, Membranlar, Partiküller, Jeller
Yoğunluk	Sedimentasyon, Santrifüjleme, Yüzdürme
Yük	İyon Değiştirme Reçineleri, Elektrokinetik Sistemler
Biyospesifik	Partiküller veya Makromoleküller ile Ligandlar Arası
Afinite	Etkileşim

---

Çeşitli maddelerin teşhisi, saflaştırılması, izolasyonu amacı ile kullanılan kromatografik yöntemler ve ayırma prensipleri Çizelge 2.17' de özetlenmiştir<sup>12</sup>.

**Çizelge 2. 17.** Kromatografik teknikler

Yöntem	Temel
Biyofinite Kromatografisi	Biyolojik Seçimlilik
İyon Değişirme Kromatografisi	Yük
Jel Geçirgenlik Kromatografisi	Boyut
İzoelektrik Odaklama Kromatografisi	İzoelektrik Nokta
Hidrofobik Kromatografisi	Hidrofobik Etkileşim
Sıvı Kromatografi	Çözünürlük

## 2.6. KRİYOJELLER

Makrogözenekli polimerik materyaller biyoteknolojide, biyomedikalde ve eczacılık biliminde büyük ilgi görmektedir<sup>109-111</sup>. Makrogözenekli polimerik materyallerin sentezine klasik yaklaşımlar, indüklenmiş faz dağılmasını, gaz veya sıvı porojenlerin kullanımı, süper kritik uygulamalar veya kalıp sentezlerini içerir<sup>111-115</sup>. Son zamanlarda kriyotropik jelleşme tekniği negatif sıcaklıklarda hidrofilik makrogözenekli materyallerin hazırlanmasında kullanılır<sup>116-118</sup>. Bu polimerik gözenekli materyaller **kriyojeller** olarak bilinirler. Kriyojeller pratik olarak bir jel oluşturan öncüllerden üretilir ve birçok değişik morfoloji ve gözeneklere sahiptirler.

Kritropik jelleşme (kriyoyapılanma) potansiyel olarak jelleşme kapasitesi olan sistemlerin kriyojenik işleme sokulmasıyla meydana gelen spesifik türdeki jel oluşumudur. Kriyojelin temel özelliği; sıcaklığın düşürülmesiyle jelleşme meydana geldiğinde, kriyojelleşmeyi soğutmayla oluşan jelleşmeden ayırt eden çözücünün zorunlu kristallenmesidir (örneğin çözücünün herhangi bir faz geçişi olmadan meydana gelen agaroz ya da jelatin çözücüsünün jelleşmesi).

Kriyojellerin (makrogözenekli jeller olarak tanımlanabilir) oluşumunda yarı donmuş sulu ortamda buz kristalleri gözenekli bir yapı oluşturur. Kalıp buz

kristallerin erimesinden sonra gözenekler birbiriyle bağlanmış olur. Sistemin büyük çoğunluğunda gözenekler birbiriyle bağlantılı ve yüksek esnekliğe sahiptir. Klasik jellerin (çözeltileri homofaz sistemler iken) aksine kriyojeller heterofaz sistemde polimerleşir. Kriyojellerde makro ve mikrogözenekli yapılar da olabilir<sup>119</sup>.

**Çizelge 2. 18.** Kriyojel sistemlerin potansiyel uygulamalarına bakış<sup>119</sup>

Monomer/Polimer Öncülleri	Gösterim	Por Boyutu (µm)	Morfoloji	Kullanım İşlemleri
Akrilamid	pAAm	1-200	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçaçık içeren sıvıların kromatografisi; hücre kültürü için kalıplar
Akrilamid	Aşı-pAAm	1-100	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçaçık içeren sıvıların kromatografisi
Dimetilakrilamid	pDMAA	1-120	Süngerimsi ve elastik	Küçük parçaçık içeren sıvıların kromatografisi; hücre kültürü için kalıplar
Polivinilalkol	m-PVA	1-80	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için bozulmayan veya monolitik kromatografi ortamı için kalıplar
Polivinilalkol	b-PVA	0.1-1	Elastik	Mekanik olarak kafesleme yoluyla hücrenin immobilizasyonu. Enzimlerin kimyasal olarak immobilizasyonu
Hidroksietilmetakrilat	HEMA	1-200	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Dekstran metakrilat	Dex-MA	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Hidroksietilmetakrilat	HEMA-	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için bozulabilen kalıplar
LL-asetat-Dekstran	LLA-D	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Dekstran Agaroz	Ags-MG	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
Polietilenglikol	PEG	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar
N-izopropil akrilamid	NIPAAM	1-100	Süngerimsi ve elastik	Hücre kültürü için kalıplar

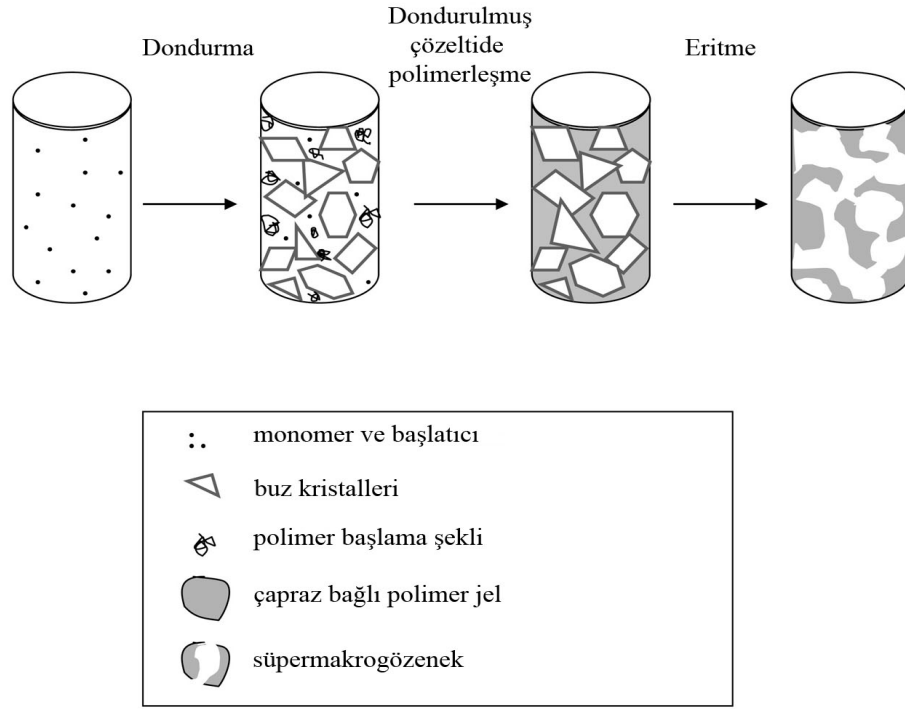
Kriyojeller yüksek esneklik ve süngersi morfolojisiyle, yüksek ve düşük molekül ağırlıklı öncüllerle hazırlanan ve sulu ortamda serbest radikal, polimerizasyon ile negatif sıcaklıkta üretilir<sup>117,118,120,121</sup>. Kriyojellerin süngersi yapıları poliakrilamid (pAAM), polihidroksimetakrilat (pHEMA), polietilenglikol (PEG), dextranmetakrilat, polivinilalkol (PVA) temeline dayanır (Çizelge 2.18)<sup>117,121-124</sup>.

1980' li yıllarda bilinmesine rağmen biyoayırma özellikleri son zamanlarda fark edilen kriyojeller disk, monolitik kolon ve tabaka şeklinde dizayn edilir<sup>116, 125</sup>.

### **2.6.1. Kriyojellerin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu**

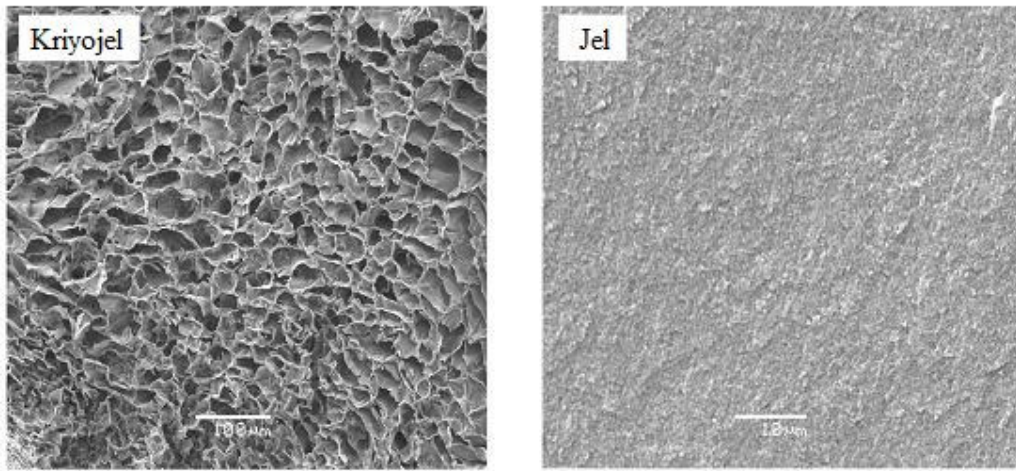
Çözücünün kristallenme hızı ve kimyasal reaksiyon (kriyojelleşme) hızının uygun bir şekilde kontrol edilmesi uygun özelliklere sahip kriyojellerin hazırlanmasına olanak sağlar. Kriyojel sistemde, büyüyen buz kristalleri porojen olarak ve erimesinden sonra birbirine bağlı gözenekler için kalıp olarak davrandıklarından dolayı tipik olarak kriyojeller, -10 ile -20 °C gibi düşük sıcaklıklarda sulu ortamda üretilir. Reaksiyon karışımı soğutulduğunda donmuş monolitik blok iki ana parçadan oluşur. Kimyasal reaksiyon donmamış sıvı mikrofaz içinde gerçekleşir. Reaktif içermeyen çözücünün kristalleri donma sırasında büyür, donmuş çerçevenin sürekli bir sistemi oluşana kadar diğer kristallerle birleşir. Kimyasal reaksiyonlar bittikten sonra erime ile birlikte sistem sıvı çözücü ile dondurulmuş sürekli makrogözenekli kanallar içeren bir matriksten oluşur (Şekil 2.14.)<sup>119</sup>.

Yarıdonmuş reaksiyon ortamında çözülmüş reaktifler (jel öncülleri) kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği donmamış sıvı mikrofaz içinde yoğunlaşır. Böylece polimer zincirleri gözeneklerden gözenek duvarlarına taşınarak kriyojeller oluşturulur. Klasik bir jel içindeki polimer derişimi ile karşılaştırıldığında gözenek duvarları daha yüksek bir polimer konsantrasyonuna sahip olur. Gözenek duvarları içindeki artan polimer konsantrasyonu kriyojelin mekanik sertliğinin yeterli olmasını sağlar<sup>117, 122, 124</sup>.



**Şekil 2. 14.** Kriyojelleşme olayı <sup>119</sup>

-20 °C' de sulu ortamda serbest radikal polimerleşmesi ile hazırlanan kriyojel monolitlerinin tipik gözenekli yapıları ve aynı yolla ama atmosfer sıcaklığında (20 °C) hazırlanan klasik bir jelin yapısı Şekil 2.15. 'de gösterilmiştir<sup>119</sup>.

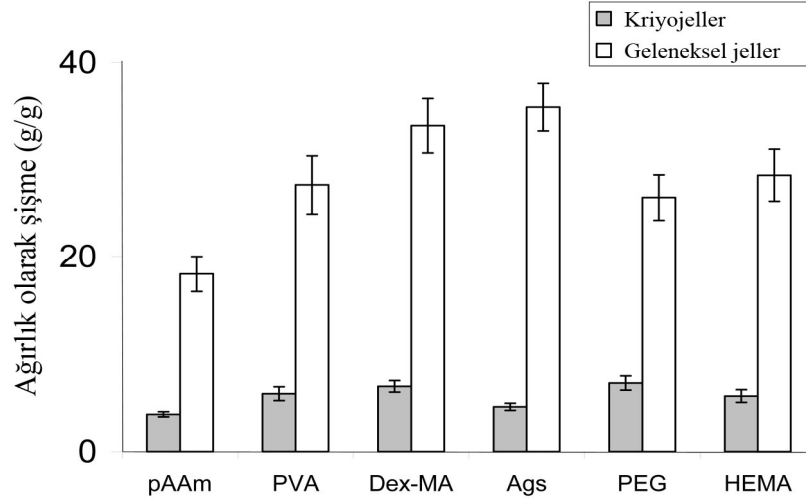


**Şekil 2. 15.** Kriyojel ve jelin SEM fotoğrafı <sup>119</sup>

Kriyojelin gözenek yapısı 100  $\mu\text{m}$ ' ye kadar büyüklüğü olan geniş, birbirine bağlı makrogözeneklerden oluşurken, klasik jel homojen ve mikrogözeneklidir. Değişik jel öncüllerinden hazırlanan kriyojellerin şişme derecesi aynı koşullarda ama yüksek sıcaklıkta hazırlanan jellerin şişme derecesinden en az 3-6 kez daha azdır (Şekil 2.16.)<sup>119</sup>.

Negatif sıcaklıklarda jelleşmeyle hazırlanan değişik kriyojeller Çizelge 2.18' de verilmiştir. Hazırlanan kriyojellerin çoğu esnektir, süngersi yapıdadır ve negatif sıcaklıklarda sulu ortamda serbest radikal polimerleşme reaksiyonuyla uygun bir şekilde kontrol altında tutularak kriyojeller istenen özellikte üretilebilir<sup>118, 120</sup>.

Büyük (kapiler boyutta) ve birbirine oldukça bağlı gözeneklerin varlığından dolayı kriyojellerin çoğu gözenekli yapıya zarar vermeden kurutulabilir ve sonra hızla tekrar şişirilebilirler. Kriyojellerin kurutularak saklanabilmesi en önemli özelliklerini oluşturur<sup>119</sup>.



Şekil 2. 16. Kriyojeller ve jellerin şişme dereceleri<sup>119</sup>

Kriyojeller oldukça elastik maddelerdir. Esnek ve süngersi yapılarından dolayı pAAM kriyojeller büyük deformasyonlara dayanabilirler ve mekanik olarak zarar görmeden % 80' e kadar kolayca sıkıştırılabilirler. Ancak klasik pAA jeller %



30' dan az sıkıştırıldıklarında kolayca tahrip olurlar. Sıkıştırılma kalktığında kriyojeller hemen eski şekline geri dönerler<sup>118,119</sup>.

### **2.6.2. Hidrodinamik Özellikler**

Bir sistem içinde sıvıyı yürütmek için gereken basınç olabildiğince az olmalıdır. Sabit bir ortamdan düşük akış direncini sürdürmek için en az 1.5-2 µm boyutlarında gözeneklerden akış olması gereklidir. 0.3 µm'den daha küçük yarıçaplı ortalama gözeneği olan kromatografik ortam olarak kullanılan maddeler için düşük bir akış hızını bile durdurmak için çok yüksek bir basınç uygulanmaktadır<sup>126,127</sup>.

Tipik olarak monolitler, küçük gözenekler (gerekli etkileşimler için belirli yüzey alanı sağlayan) ile gözeneklerdeki akış (sıvının akmasını sağlayan) arasında uygun bir denge olan sert yapılardır. Yüzlerce mikrometreyi bulan birbirine bağlı gözeneklere sahip olan elastik ve süngersi kriyojel monolitler sert yapılara sahip olan diğer monolitik sistemlerle (polimetilmetakrilat monolitleri) karşılaştırıldığında temel olarak farklı gözenekli bir yapıya sahiptirler. Büyük ve oldukça birbirine bağlı makrogözeneklerin varlığından dolayı kriyojel monolitik kolonların sıvı akış direnci çok düşüktür. pAAM kriyojel monolitik kolonların geri basıncı kriyojellerin gözeneklerine bağlıdır. Kriyojellerin gözenek büyüklüğü, gözeneklerin birbirine bağlanması, gözenek duvarlarının kalınlığı ile birlikte kriyojel monolitlerin akış direncini kontrol eder<sup>126,128-130</sup>.

### **2.6.3. Gözenek Özelliklerinin Kontrolü**

Kriyojellerin gözenekli yapısı özellikle pAAM kriyojellerin donma sıcaklığı (Td), çözülmüş monomerlerin derişimi, başlangıç reaksiyon karışım içeriği (amonyumpersülfat, TEMED) ve kullanılan çözücü ile kontrol edilir.<sup>118</sup> Donma sıcaklığı, Td (düşük sıcaklıktaki termostat içinde kurulan sıcaklık olarak tanımlanır) ve kullanılan çözücü, gözenekli yapıyı etkiler. pAAM kriyojellerinin hazırlanması sırasında donma sıcaklığını -10 °C ile -30 °C' ye düşürmek bu kriyojel monolitlerin akış yolu özelliklerini ve jelleşme verimini azaltır. -20 °C' ye kadar olan düşük

sıcaklıklarda kriyojel oluşumu sırasında kriyojellerin monomer dönüşüm oranı (jelleşme verimi) % 70-90 civarındadır.<sup>118,120,131,132</sup> İki türlü gözenek boyutu dağılımına sahip olan pAAM kriyojellerin oluşması 2 işlemin birleşimi yani donmamış sıvı mikrofaz içindeki makrogözeneklerin oluşması (çözücü kristalleri gözenek olarak davrandıklarında) ve donmamış sıvı fazda sentezlenen polimerin faz ayrımının birleşmesiyle meydana gelir<sup>118,133</sup>.

Serbest radikal polimerleşme reaksiyonlarında başlatıcı amonyum persülfat (APS) ve aktifleştirici TEMED' in derişimleri, polimerleşme hızı ve oluşan polimerin molekül ağırlığı üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Polimerleşme reaksiyonu monomerlerin polimer zincirlerini çapraz bağlamak için serbest radikaller oluşturmak üzere APS ve TEMED arasındaki reaksiyonla başlar. Serbest radikal polimerleşme reaksiyonu yoluyla negatif sıcaklıklarda kriyojeller hazırlanırken 2 olası durumu göz ardı etmemek gerekir:

- 1) Jelleşme meydana gelmeden önce çözeltinin donması
- 2) Önceden jelleşmiş karışımın donması

Polimerleşme hızı reaksiyon karışımındaki başlatıcı sistemin miktarı tarafından kontrol edilir. Böylece reaksiyon karışımındaki başlatıcı sistemin miktarı değiştirilerek büyük ve birbirine oldukça bağlı gözenekli pAAM kriyojeller ve birbirine az bağlanmış (kapalı) ve büyük gözenekli pAAM kriyojeller hazırlanır. İlk durumda kopolimerleşme işlemi reaksiyon ortamının donmasından sonra geriye kalan donmamış mikrofazın içinde gerçekleşir ve birbirine oldukça bağlı bir makrogözenekli yapının oluşmasını sağlar. Bu yapılar partikül içeren sıvıların, mikrobiyal hücrelerin veya hücre kültür reaktörlerin kromatografik monolitik sorbentleri olarak başarıyla kullanılmaktadır<sup>118</sup>.

pAAM kriyojellerin hazırlanması sırasında monomerlerin konsantrasyonunu % 6' dan % 15' e çıkarmak pAAM kriyojeller içindeki gözenek hacmini % 90' dan % 80' e düşürür. pAAM kriyojellerin hazırlanması sırasında başlangıç reaksiyonu içindeki monomer konsantrasyonunu % 6' dan % 20' ye çıkarmak gözenek duvarının

kalınlığını artırır ve gözeneklerin birbirine bağlanmasını azaltır. Gözenek duvarının kalınlığı yoğunluklarıyla birlikte pAAM kriyojellerin makroskopik mekanik özelliklerini belirlerken gözenek boyutu ve gözenek duvarının yoğunluğu polimer gövdesine kimyasal olarak bağlanan ligantların ulaşabilmesini etkiler.<sup>117</sup>

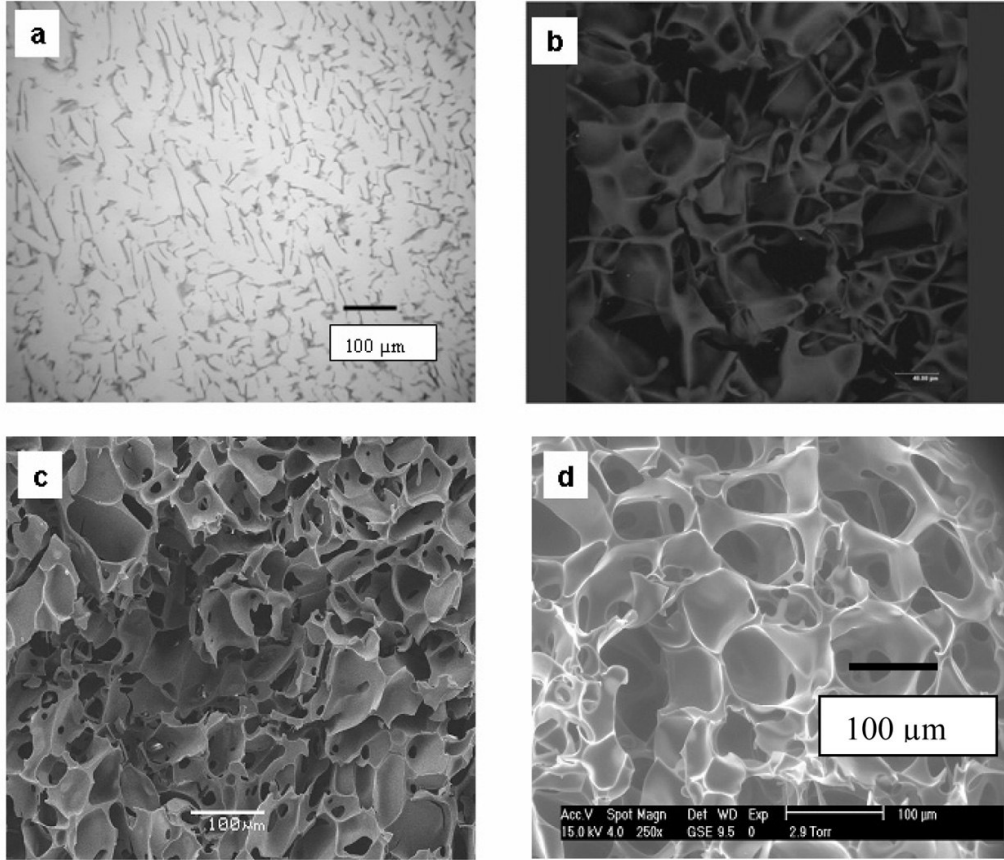
pAAM kriyojellerin gözenek özellikleri kriyojellerin hazırlanması için kullanılan çapraz bağlayıcının içeriğine ve türüne bağlıdır. Hidrofobik MBAAM' nın daha hidrofilik dialiltartaramit (DATAm) ile yer değiştirmesi şişme yeteneği daha yüksek olan ve daha yüksek akış direncine sahip olan elastik ve süngerimsi pAAM kriyojellerin oluşmasına neden olur. Bu durum daha kalın ama daha az yoğun gözenek yapılarının oluşmasından dolayı olabilir<sup>117</sup>.

#### **2.6.4. Değişik Enstrümental Teknikler Kullanarak Kriyojel Yapısının Analizi**

Değişik gözenekli kriyojel dizayn ederken kriyojellerin gözenekli yapısı ve gözenek boyutu dağılımı üzerinde çalışmak için uygun teknikler bulmak önemlidir. Hidrofilik maddelerin gözenekli yapısını analiz etmek için yaygın teknikler yoktur. Kriyojellerin gözenekli yapısı optik mikroskop (OM), taramalı elektron mikroskop (SEM), çevresel taramalı elektron mikroskop (ESEM) ve aynı odaklı mikroskop (CM) gibi değişik enstrümental teknikler kullanılarak tayin edilir. OM ve CM' de kriyojelin görünür olması için, kriyojel bir boya ya da floresan bir prob ile renklendirilmelidir.

SEM tekniği kriyojellerin gözenekli yapısının analizi için uygun bir metottur. Numuneleri SEM analizi için kullanırken, meydana gelen kriyojellerin gözenekli yapısının bozulması önemli değildir ve kriyojellerdeki gözenek duvarlarının mekanik kararlılığından dolayı ince gözenekli yapı korunmaktadır. pAAM kriyojellerin SEM analizi kriyojellerin tipik yapısının yoğun ve gözenekli olmayan duvarlarla çevrili mikrometre boyutundaki birbirine bağlı gözeneklerden oluştuğunu göstermektedir (Şekil 2.17).

ESEM teknolojisinin önemli avantajı ise numunenin yavaş yavaş dehidre olmasını sağlarken maddenin yapısında meydana gelen değişiklikleri gözlemleyebilmektedir. pAAm kriyojelleri için yüksek dehidrasyon derecelerinde elde edilen ESEM görüntüleri, yüzlerce mikrometre boyutunda birbirine bağlı ve ince yoğun gözenek duvarlarına sahip olan makrogözenekli yapıyı gösteren SEM görüntülerine benzerdir (Şekil 2.17) <sup>117,118,120,122</sup>.



**Şekil 2. 17.** Farklı enstrümental teknikleri kullanarak kriyojel gözenek yapıları: **a)** Optik Mikroskop (OM), **b)** Odaklı Mikroskop (CM), **c)**Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) ve **d)** Çevresel Taramalı Elektron Mikroskop (ESEM) <sup>119</sup>

### 2.6.5. Kriyojellerin Yüzey Kimyası

Biyoparçacıkların kromatografisi için dizayn edilen pAAm kriyojellerin toplam hacminin yaklaşık % 90-93' ünü oluşturan büyük gözenek hacmi ve büyük

gözenek boyutu, hedef moleküllere bağlanacak yüzey alanının sınırlı olmasına neden olur. Ayrıca pAAm kriyojellere dayalı olan kromatografik matrislerin kapasitesi, genellikle AAm ile kopolimerize olan fonksiyonel monomerin derişimine bağlıdır. Ko-monomerin derişiminin fonksiyonel grupla artması çoğu kez kırılğan ve esnek olmayan kriyojellerin oluşmasına neden olur. Esnek ve süngerimsi yapıda kriyojel hazırlamak için ko-monomerin derişimi % 0.08-0.20 mol arasında tutulur. Ancak fonksiyonel grupların çoğu hedef substrat ile etkileşemez ve 0.02-0.08 mmol/ml' lik iyon değiştirme kapasitesi protein bağlanma kapasitelerinin 0.1-0.4 mg/ml'yi aşmamasına neden olur<sup>133</sup>.

Kriyojellerin yüzeyine fonksiyonel bir ligand takmak için değişik yollar bulunmaktadır. Ligand, pAAm kriyojellerde bulunan reaktif gruba ya oluşum sırasında doğrudan ya da bir uzatıcı kol (spacer) yoluyla fonksiyonel grup üzerinden bağlanır<sup>119</sup>.

#### **2.6.6. Kriyojellerin Uygulamaları**

Temel olarak immobilize hücreler ve enzimlerle yapılan biyokatalizde, partikül içeren akışkanlardan hedef moleküllerin ayrılmasında, hücre organellerinin, virüslerin, mikrobiyal ve memeli hücrelerinin kromatografisinde ve memeli hücre kültürleri için üç boyutlu matriks olarak biyomedikal uygulamaları bulunmaktadır. Mikroküre formunda hazırlanan kriyojeller ise özellikle mikrobiyal hücrelerin ve enzimlerin immobilizasyonu için kullanılmaktadır. Makrogözenekli monolitler (1-100µm' lik gözenekli) virüslerin, hücre organellerinin, mikrobiyal ve memeli hücrelerinin ayrılmasında kalıp olarak kullanılmaktadır<sup>119</sup>.

#### **2.7. PROTEİN A**

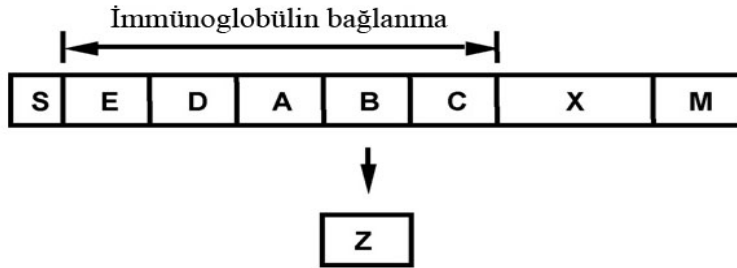
Staphylococcal Protein A (SPA), Gram pozitif bakteri *Staphylococcus aureus*' un yüzeyinde bulunan ve hücre duvarıyla ilişkili olan bir protein bölgesidir. SPA insan, tavşan ve kobay gibi değişik türlerdeki IgG' ye karşı yüksek afinite gösterirken inek ve fare gibi türlerin IgG' siyle zayıf etkileşir (Çizelge 2.19)<sup>134,135</sup>.

SPA' yı kodlayan gen Uhlen ve çalışma arkadaşları tarafından belirlenmiştir. <sup>136</sup> SPA Şekil 2.18' de gösterildiği gibi üç değişik bölgeden oluşur. 5 bölgesi bağlanma sırasında işlem gören sinyal dizisidir; beş homolog IgG bağlanma alanları E, D, A, B ve C; bir hücre duvarına tutunma bölgesi XM' dir<sup>136-139</sup>.

**Çizelge 2. 19.** SPA' nın IgG bağlaması <sup>140</sup>

Tür	Altsınıflar	Protein A
İnsan	IgG <sub>1</sub>	++
	IgG <sub>2</sub>	++
	IgG <sub>3</sub>	-
	IgG <sub>4</sub>	++
	IgA	Değişken
	IgD	-
	IgM	Değişken
	Tavşan	Fark yok
Kobay	IgG <sub>1</sub>	++
	IgG <sub>2</sub>	++
Sığır		+
Fare	IgG <sub>1</sub>	+
	IgG <sub>2a</sub>	++
	IgG <sub>2b</sub>	+
	IgG <sub>3</sub>	+
	IgGM	Değişken
Tavuk	IgY	-

Güçlü bağlanma ++, orta etkileşim +, zayıf veya etkileşim yok -.



**Şekil 2. 18.** Staphylococcal protein A <sup>141</sup>

SPA' daki beş alandan her biri yaklaşık olarak 58 aa olan anti paralel üç  $\alpha$ -sarmal demet şeklinde dizilmiştir ve üç boyutlu yapı hidrofobik bir çekirdek yoluyla kararlı hale gelmiştir. Alanlar tahmini  $10^8$ ' lik ( $M^{-1}$ ) afinite sabitiyle ( $K_A$ ) birbirinden bağımsız olarak IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> ve IgG<sub>4</sub>' ün Fc kısımlarına bağlanabilirken IgG<sub>3</sub> ile zayıf olarak etkileşebilirler<sup>142</sup>. Ayrıca her alan belirli antikorların Fab kısımlarına karşı

yüksek afinite gösterir<sup>143</sup>. IgG molekülünün Fc kısmının bağlanma merkezi B alanı ile ilgili bir çalışmada belirlenmiş ve sarmal 1 ve sarmal 2' nin 11 artık içerdikleri gösterilmiştir<sup>144</sup>. Ayrıca D alanı üzerinde yapılan başka bir çalışmada Fab bağlanma kısmının Fc bağlanma kısmından farklı bir yerde olduğu gösterilmiştir<sup>145</sup>.

Protein ligandları matrikslere bağlanırken, doğrudan ya da dolaylı immobilizasyon ve ligand yoğunluğu gibi bazı konular dikkate alınmalıdır. Bir proteinin reçineye immobilizasyonu -NHS, tiyol ve epoksi gibi değişik gruplar üzerinden yapılabilir. Dolaylı bir immobilizasyon hem ligand kararlılığı hem de ligand sızıntısı minimizasyonu için yararlı olabilecek çoklu bağlanma noktaları sağlayabilir. Ancak bu yaklaşımın bir dezavantajı çoklu bağlanma noktalarının proteinin fonksiyonel gruplarıyla karışabilmesidir. Bu sorunun üstesinden gelmek için kullanılan bir strateji, örneğin; proteine tiyol grubu takarak yönlendirilmeli daha sonra immobilizasyon yapılmalıdır. Reçinenin kapasitesi ligand yoğunluğuna bağlıdır, ancak sterik etkiler de önemlidir. Daha önce bir matriksin dinamik kapasitesinin ligandın yönelmesine çok bağlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bazı çalışmacılar protein ligandlarının mono ve dimerinin hedef proteinlere karşı benzer bağlanma kapasiteleri gösterdiğini belirtmişlerdir<sup>146-151</sup>.

## 2.8. İMMÜNOADSORPSİYON

İmmünoadsorpsiyon bir hastanın kan plazmasındaki patolojik maddeleri seçici olarak uzaklaştırmak için aferez ile birlikte kullanılan bir ekstrakorporal (vücudun dışında kalan) kan prosedürüdür ve patojenlerin seçici olarak uzaklaştırılmasını sağlar (Şekil 2.19). Plazma değiştirilmesi seçici olmayan bir metottur ve birkaç litre plazmanın (ortalama 60 ml/kg) uzaklaştırılmasını ve bunun yerine albumin gibi eşdeğer miktarda plazma bileşenlerinin kullanılmasını gerektirir. İmmünoadsorpsiyonda normal plazma proteinleri seyreltilmez, bu nedenle daha yüksek plazma hacmi işlem görebilir. Böylelikle patojen miktarı hızla azaltılır, hatta bazı rahatsızlıklarda deteksiyon limitinin altına düşer<sup>150</sup>.

Ekstrakorporal immünoadsorpsiyon yaklaşık yirmi yıldır bilinmektedir, ama sadece yakın zamanda hekimlerin dikkatini çekmiştir. Çünkü plazmaferez birçok otoimmün hastalığında etkisini gösterememiştir. Bu nedenle araştırmalar patojenik antikorların ve dolaşım yapan immün komplekslerinin eliminasyonu için kullanılabilecek diğer araçlar üzerine odaklanmıştır<sup>18</sup>.

İmmünoadsorpsiyon, plazmaferez için bilinen yan etkileri en azıyla hastanın dolaşımındaki büyük miktarlardaki immüoglobülinleri elemine edebilir. Buna karşın, klasik plazma değiştirilmesi antikorları ve diğer plazmatik faktörleri % 50-75 uzaklaştırır<sup>151</sup>.



Şekil 2. 19. İmmünoadsorpsiyon kolonu ve hücre seperatörü<sup>18</sup>

### 2.8.1. Protein A İmmünoadsorpsiyonu

İmmünoadsorpsiyon tekniği, afinite kromatografisinin çalışma prensibine dayanır<sup>152</sup>. Uzaklaştırılacak madde, matriks denilen ve çözünür olmayan bir katı faza bağlı olan ligand tarafından spesifik olarak ve tersinir bir şekilde adsorbe edilir. Kolonun istenilen maddeyi tutmasını garantilemek için seçici immünolojik afinite kullanılır. Bu spesifiklik uzaklaştırılacak maddeyle etkileşimi ya güçlü afinite (protein A veya sentetik peptit) ya da bir antijen-antikor reaksiyonuna yol açan (insan immüoglobülinlerine karşı koyun immüoglobülinleri) yüksek spesifikte



karakterize edilen ligandın doğasına bağlıdır. Protein A molekül ağırlığı yaklaşık 42.000 Da olan ve beş immünoglobulin bağlanma merkezi taşıyan bir *Staphylococcus aureus* membran proteinidir. Protein A' nın herhangi bir kaynaktan elde edilen immünoglobülinlerin Fc kısımların güçlü afinite göstermesi önemli bir özelliğidir ve immünoglobülinlerin Fab kısımların ise afinitesi zayıftır. Protein A' ya bağlanmaları yetersiz (% 30-80) olsa da ve bireyden bireye değişse de protein A IgG<sub>3</sub>, IgM ve IgA dahil tüm immünoglobülinlerle etkileşir. Protein A dolaşım yapan immün komplekslere karşı da güçlü bir afinite gösterir<sup>153</sup>.

Fransa' da etki mekanizmaları ve kullanma şekli farklı olan iki protein A immünoadsorpsiyon sistemi vardır. İmmünoadsorba® sisteminde protein A otomatik rejenerasyona uğrayan ve verilen bir hastada tekrar tekrar kullanılabilen iki safaroz kolonuna bağlanır. Dönemleri görüntülemek için özel bir elektronik cihaz kullanılmaktadır. İmmünosorba® terapisiyle oluşan büyük immünoglobülin azalması (IgG' ler için % 90' a kadar) nedeniyle yararlı etkinin meydana geldiği düşünülmektedir.

Prosorba® sisteminde protein A, rejenerasyona uğramadığından sadece bir kez kullanılan bir silika kolonuna bağlanır. Kan bir hücre seperatörüyle pompalanır ve bu şekilde elde edilen plazma, kan hücreleriyle bir araya gelmeden ve vücuda geri dönmeye önce silika protein A kolonundan geçilir. Her bir dönemde işlem gören plazma miktarı yaklaşık 1250 ml' gibi küçük bir değerdir.

RA' lı hastaların Prosorba® ile tedavisinin etki mekanizması bilinmemektedir. IgG' nin ve dolaşım yapan immün kompleksinin büyük miktarlarda azalması mümkün değildir, çünkü işlem gören plazma hacmi küçüktür. Kolon doyması dolaşım yapan immünoglobülinlerin yaklaşık % 1.5' ine karşılık gelen sadece 462 mg immünoglobülin tutulduktan sonra meydana gelir. Ayrıca, Prosorba® kolonundan geçtikten sonra IgG ya da dolaşım yapan immün kompleks seviyelerinde önemli düşüşler meydana gelmemektedir. Ancak az miktarda IgG ve dolaşım yapan immün komplekslerinin ekstraksiyonu yararlı immünodüzenleyici etki gösterebilir<sup>153,154</sup>.

## 2.8.2. Romatoid Artrit Tedavisine Yönelik Protein A İmmünoadsorpsiyon

RA tedavisi için yeni patofizyolojik kavramlar ortaya çıkmıştır. Tumor necrosis factor (tümör kangren faktör) alfa (TNF $\alpha$ )'nın romatizmal sinovyum (eklem sıvısı) iltihabında anahtar rol oynadığını saptamasına yönelik çalışmalar, sonradan etkili oldukları kanıtlanan anti TNF $\alpha$  maddelerin geliştirilmesine yol açmıştır<sup>155-156</sup>. Ancak, TNF $\alpha$  inaktivasyonu bağışıklık sistemini çökerterek enfeksiyon riskini artırır. Anti-filaggrin otoantikör üretimine yapılan son vurgularla birlikte bu dezavantaj RA'lı hastaların tedavisinde alternatif bir tedavi olarak plazma değişimine olan ilgiyi artırabilir<sup>157</sup>.

Uzun yıllar boyunca plazma değişimi patojenik etkilere sahip maddelerin plazmasının uzaklaştırılmasını sağlayan tek teknik olarak kabul edilmekteydi. Ancak plazma değişimi RA'lı hastalarda kısmi ya da hayal kırıcı sonuçlar vermiştir.<sup>158,159</sup> Plazma değişimi seçici olmayan bir metottur ve birkaç litre (ortalama 60 ml/kg) plazmanın uzaklaştırılmasını ve bunun yerine aynı hacimde albumin gibi bir plazma proteini konulmasını gerektirir. 1980'lerde immünoadsorpsiyon otoimmün hastalığı olan hastaların plazmalarındaki zararlı maddeleri uzaklaştırmada plazma değiştirilmesine bir alternatif olarak önerildi. İmmünoadsorpsiyonun neden olduğu olası hastalıklar mysothenra, otoimmün trombositopenik purpura, pıhtılaşma faktörü inhibitör üretimi, SLE ve idyopatik dilated cardiomyopathy gibi fiziksel, kimyasal ya da immünolojik tekniklerle uzaklaştırılabilen faktörlerden kaynaklanan otoimmün koşullardır<sup>160-165</sup>. Albümin ya da pıhtılaşma faktörleri gibi plazma proteinleri uzaklaştırılmadığından immünoadsorpsiyon, plazma değiştirilmesinden daha seçicidir.

İmmünoadsorpsiyon kronik ve şiddetli RA olan kişilerdeki semptomları iyileştirir. İmmünoadsorpsiyon sırasında hastanın kolundan kan çekilir ve kan hücrelerini plazmadan ayıran bir hücre ayırıcı makineden geçirilir. Ayrılan plazma daha sonra protein A'nın plazma içindeki antikörlere bağlanarak onları etkili bir şekilde uzaklaştıran immünoadsorpsiyon kolonundan geçirilir. Sonra antikörlardan

temizlenen plazma, ayrılan kan hücreleriyle tekrar birleştirilir ve hastanın diğer kolundan vücuda geri verilir. RA olan hastalar bu teknikten faydalanır, çünkü enflamasyona neden olan antikorlar sistemden uzaklaştırılır. Ancak prosedür hem pahalı hem de zaman alıcıdır. Dolaşımdan immüoglobülinlerin basitçe uzaklaştırılmalarının immün işlemin durdurulmasını sağlaması zorunlu değildir. Patolojik otoantikorların yeniden dağılmasının üstesinden gelmek için yeterince işlem görmüş plazma hacimleriyle tekrarlı tedavi döngüleri kullanılmalıdır. Oniki hafta boyunca haftada bir iki saat süren bir tedavi süreci bulunmaktadır<sup>18</sup>.

## 2.9. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

**Li ve arkadaşları (1998)** Protein A ile IgG arasındaki doğal bağlanma yüzeyini dikkatlice analiz ederek IgG' ye karşı afinite gösteren bir ligand dizayn etmişler. Bu molekülü protein A' nın anahtar dipeptidi Phe-132; Tyr-133' ü taklit ederek yapmışlar. Oluşan molekülün insan IgG' sini seçici olarak tutabildiğini göstermişlerdir<sup>166</sup>. Bu çalışmayı takiben, **Teng ve arkadaşları (2000)** sonraki bir çalışmada ligandı daha da saflaştırmış, oluşan öncü ligandın insan IgG' sine karşı  $1.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  lık bir afinite sabitiyle bağlandığını bulmuşlardır. Üretilen matriksin 51.9 mg IgG/g nemli ağırlık kapasitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir<sup>167</sup>.

**Palombo ve arkadaşları (1998)** SPA' nın IgG' nin bağlanan domainini taklit etmesi amacıyla bir peptit kütüphanesi üretmişlerdir. Peptidleri katı faz ile etkileştirerek yeni peptidlerden birinin (TG19318) IgG saflaştırması için afinite ligandı olarak davrandığını göstermiş, ayrıca peptidin diğer immüoglobülinlere karşı da afinite gösterdiğini belirlemişlerdir<sup>168</sup>.

**McCue ve arkadaşları (2003)** Gözenek büyüklüğü 700 °A ile 1000 °A olan iki değişik protein A ortamı incelemişlerdir. Bu ortamlardaki IgG' lerin adsorpsiyon denge verileri batch tekniği ile ölçülüp, Langmuir izoterm modeli kullanılarak ilişkilendirilmiştir. Daha küçük por çapına sahip olan materyal için daha yüksek bir statik kapasite bulmuşlardır<sup>169</sup>.

**Girov ve arkadaşları (2004)** Kromatografik yöntemle, ligand olarak 2-merkaptto-5-benzimidazolsülfonik asit (MBISA) kullanarak antikorların ayrılmasını çalışmışlardır. İyon şiddeti, pH ve sıcaklık koşullarında antikor adsorpsiyonuyla ilgili bazı karakterizasyon işlemleri yapmışlardır. Bu ligandın pH 5.2 ve 5.5 arasında antikorları çok kolay adsorbe ettiğini, desorpsiyonun ise pH 8.5-9.5 arasında gerçekleştiğini, pH 8.5'in üzerinde %100 antikor desorpsiyonunun gerçekleştiğini belirtmişlerdir<sup>170</sup>.

**Newcombe ve arkadaşları (2005)** Sentetik kromatografinin uygulanabilirliğini koyun serumundan büyük ölçekli poliklonal IgG saflaştırarak araştırmışlardır. Optimize şartlar altında MA-sorbent® A2P ile, seyreltilmemiş koyun serumundan IgG bağlamayı ~27 mg/ml, IgG saflaştırmayı % 95' in üstünde albümini ise ~ %1 olarak gözlemlenmişlerdir. Elde edilen sonuçlara dayanarak MA-sorbent® A2P' nin, protein A kromatografisi ve sodyum sülfat çöktürmesine alternatif olarak uygulanabileceğini göstermişlerdir<sup>171</sup>.

**Katoh ve arkadaşları (2007)** Protein A afinite kromatografisi ile antikor saflaştırma için ortamda silika da kullanarak etkili ve büyük ölçekli saflaştırma amacıyla gözenek boyutu, gözenek hacmi ve silika ortamının bağlama yoğunluğunu optimize etmişlerdir. Gözenek boyutunu 70-140 nm arasında, yüzey alanını ise 26-67 m<sup>2</sup>/g olarak bulmuşlar. Bovin ve insan IgG adsorpsiyon kapasitesini ve dinamik bağlanma kapasitesini sırasıyla 94, 720 cm/s olarak bulmuşlardır.

Gözenek boyutu 110 nm olan silikalı protein A ortamının kütle aktarım hacim katsayısını çapraz bağlı agaroz ortamlarının katsayılarından dört kat daha büyük olarak bulmuşlardır. Bu yüzden yüksek yüzeysel sıvı hızlarında yüksek dinamik bağlanma kapasitesi bulmuşlardır<sup>172</sup>.

**Ghose ve arkadaşları (2007)** Protein A kromatografisi ile, değişik antikorlarda ve Fc-füzyon proteinlerinde gözlenen dinamik bağlanma kapasitelerinin farklı olmasının nedenini araştırmak için bir dizi çalışma yapmışlardır. Bu biyomoleküllerin dinamik bağlanma kapasiteleri değişik protein A faz materyalleri

kullanılarak belirlenmiştir. Protein A' nın değişik domainlerine bağlanması sırasında protein A içi sterik etkileri tahmin etmek için bağlanma stokiyometri çalışmalarını yapmışlardır.

Çalışmada kromatografik yüzey üzerindeki bitişik ve takılı olan protein A ligandları arasında sterik engel olduğu bulunmuştur. Çalışmacılar protein A içi ve arası sterik engellerin gerekçesini çeşitli antikor ve Fc füzyon proteinleri arasında gözlenen bağlanma kapasitelerindeki farklılık ile açıklamışlardır<sup>173</sup>.

**Cao ve arkadaşları (2007)** Selüloza bağlı domain-protein A(CBD-ProA) kullanarak manyetik selüloz mikroküreler (MCMS) üzerine antikorları tutuklamak için yeni bir metot geliştirmişlerdir. Antikorlar ile MCMS arasındaki biyospesifik bağlantı kimyasal bağ ile karşılaştırıldığında kolay ve basit hazırlama, toksik bileşiklerin eliminasyonu ve oldukça etkili antikor kullanımı gibi önemli avantajlara sahiptir. Bu metodun uygulamasını değerlendirmek amacıyla protein adsorpsiyonu, antikor etkinliği ve matriksin tekrar kullanılabilirliği gibi parametrelerin ayrıntılı analizi için interferon  $\alpha$ -26' yı (INF $\alpha$ -26) bir model hedef olarak seçmişlerdir. Optimizasyon ve karakterizasyondan sonra INF $\alpha$ -26 ham hücre lizatından tek basamakta çapraz bağlı anti INF $\alpha$ -26' yı IgG protein A-CBD-MCMS ile başarıyla saflaştırmışlardır. Bu yöntemle izole edilen INF $\alpha$ -26' nın toplam saflığını % 95.5 immünolojik ve biyolojik numunelerin aktivite kazanımını % 91.9, spesifik antiviral aktiviteyi ise  $2.67 \times 10^8$  IU/mg olarak bulmuşlardır<sup>174</sup>.

**Shukla ve arkadaşları (2007)** Düşük pH koşullarında agregat oluşumuna karşı oldukça duyarlı olan bir Fc füzyon proteinin agregasyon kinetiğini çalışmışlardır. Ayrıca çalışmada protein A kromatografisinin monoklonal antikorların ve Fc füzyon proteinlerinin büyük ölçekli saflaştırılması için uygunluğunu tartışmışlardır. Genellikle beklenenin aksine bu proteinde birçok farklı koşullar altında birinci dereceden agregasyon kinetiği gözlemişler. Agregasyon hız sabitlerinin karşılaştırılmasıyla elüsyon tamponuna çeşitli katkı maddelerinin etkisi olabileceğini göstermişlerdir. Elüsyon tamponuna uygun derişimlerde (<2M)

üre katılması ve protein A kolonunun düşük sıcaklıkta çalışmasının agragasyon sorununa etkili çözümler sağladığını bulmuşlardır<sup>175</sup>.

**Nilsang ve arkadaşları (2007)** Monoklonal antikorların (mAb) üretimi için hibridoma hücreleri kültürlemek amacıyla süpermakrogözenekli bir kriyojel biyoreaktör geliştirmişlerdir. J1 epitopuna (GERGAAGIAGPK; aminoasitler, 551-564) karşı antikor salgılayan hibridoma kolonun gözenekli yatak matriksinde (10 ml yatak hacmi) monoklonal antikorları immobilize etmişlerdir. 48 saat inkübasyondan sonra hücreleri matrikse bağlayıp kriyojel içinde yetiştirerek, hücreler 15 gün boyunca lag fazında bekletilerek sürkülasyon ortamına mAb' nin salgılanması sağlanmış. Bu arada glukoz tüketimi ve laktik asit üretimini de takip etmişlerdir. Ekspansiyonel faz sırasında (~20 gün) hücrelerin günlük 0.75 mM glukoz tüketip, 2.48 mM laktik asit ve 6.5 µg/ml mAb ürettiğini belirtmişlerdir. Kriyojel kolonun 36 gün boyunca sürekli çalıştırılmasından sonra mAb derişiminin 130 µg/ml' ye ulaştığını tespit ederek, saflaştırmadan sonraki mAb verimini ise 67.5 µg/ml olarak bulmuşlardır.

Ortam değiştirildikten sonra bile kriyojel kolonundaki hücrelerin aktifliğini hala koruduğunu ve uzun süre mAb üretiminin nispeten kararlı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle süpermakrogözenekli kriyojellerin üretken hibridoma hücre kültürü için bir destek malzemesi olarak yararlı olabileceği sonucuna varmışlardır<sup>176</sup>.

**Schubert ve Freitag (2007)** Çin Hamster Ovary (CHO) hücrelerinde bir rekombinant insan antikor (IgG<sub>1</sub>-alt türü) üreterek, antikor saflaştırması için protein A/G kromatografisini kullanmışlardır. Tek bir kromatografik basamakla %90 verimle saflık elde ederek, alternatif bir elüsyon maddesi olan arginin ve afinite ligandı olan protein G' nin verimi ve saflığı arttırmadığını tespit etmişlerdir.

Daha sonra yeni bir seramik floroapatiti sabit fazlar için denemişler. Hidroksiapatit kullanıldığında ve pH 6.0' dan 8.2' ye (antikorun izoelektrik noktası (pI) 8.3) çıkarıldığında antikorun tutulma zamanı azalırken verimi %71' e kadar çıkmıştır. Floroapatite ise hareketli fazın pH' ı artıkça tutulma miktarı artmış ve pH 7.0' da bir maksimuma ulaşmıştır. Jelde herhangi bir kontaminasyon eseri

gözlememişlerdir. Yaptıkları çalışmada, afinite (protein A) ya da apatit kromatografisiyle bir antikorun tek bir kromatografik adımda yüksek bir verimle elde edilebileceğini belirtmişlerdir<sup>177</sup>.

**Agostino ve arkadaşları (2008)** Ticari protein A sorbentlerle, protein A taklitli sentetik peptitler (D-PAM) kullanarak bu peptitlerin karın boşluğu sıvıları ve hücre üst sıvılardan IgG' yi yakalama kapasitesini ve monoklonal antikor saflaştırmada uygulanabilirliğini çalışmışlardır. Ayrıca D-PAM ile immüno globülinler arasındaki etkileşimi karakterize ederek termodinamik parametreleri (denge ayrışma sabiti  $K_A$  ve entalpi değişimi  $\Delta H$ ) izotermal titrasyon kalorimetri (ITC) yöntemi ile belirlemişlerdir.

Hazırlanan afinite kolonlarda tek bir kromatografik adımda % 90' dan fazla antikor aktivitesi tamamen geri kazanılarak monoklonal antikorlar tutulmuştur. Kullanılan peptitlerin eş zamanlı olarak IgG molekülüne sırasıyla 3.4, 6.2 ve  $3.4 \times 10^4$   $M^{-1}$  lik denge bağlanma sabiti ile ( $K_A$ ) ve -1.3, -4.2 ve -4.1 kcal/mol entalpi değişimi ile ( $\Delta H$ ) bağlandığını göstermişlerdir<sup>178</sup>.

**Ma ve Ramakrishna (2008)** Çalışmalarında protein A/G takılı elektrospun regenerated cellulose (RC) nanofiber membranı fiziksel yapısı, yüzey kimyası ve IgG saflaştırma kapasitesine bağlı olarak karakterize etmişlerdir. Membran üzerine immobilize edilen ligand (protein A/G) miktarını 9. saatte 30  $\mu\text{g}/\text{mg}$  ve membranın IgG bağlama kapasitesini 18  $\mu\text{g}/\text{mg}$  olarak ölçmüşlerdir. BSA' lı ortamda da, afinite membranından IgG saflaştırması yaparak IgG/BSA karışımından BSA' nın tamamen uzaklaştırıldığını SDS-PAGE ile analiz etmişlerdir<sup>179</sup>.

**Ribeiro ve arkadaşları (2008)** Nikel immobilize edilmiş polietilen vinil alkol (PEVA) hollow fiber membran kromatografisi ile insan IgG saflaştırılması iminodiasetik asit (IDA), (Tris (2-aminoetil)amin) (TREN) gibi şelatörler ile MOPS-asetat ve Tris-HCl tampon sistemlerinin etkisini incelemişlerdir. Bağlanma çalışmaları farklı sıcaklıklarda çalışılmış, adsorpsiyon izotermi ise Langmuir modeline göre analiz edilmiştir. Ni (II)-TREN-PEVA hollow fiber membranın insan

IgG' si için Ni (II)-IDA-PEVA kompleksinden daha düşük kapasiteye ancak benzer seçiciliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. Tris-HCl ile (100-700 mM) pH 7.0' da %98 saflığa ulaşılmış, maksimum kapasite ise 25 °C' de 204.6 mg IgG/ kuru membran olarak hesaplanmıştır. Sıcaklığın artmasıyla  $K_d$  azalmış ( $1.7 \times 10^{-5}$ ' ten  $5.3 \times 10^{-6}$ ) ve bu azalmayı da artan sıcaklığa bağlı olarak afinitenin de arttığı şeklinde açıklamışlardır. Entalpi değişiminin pozitif değerinde (26.2 kJ/mol) olmasını ise afinite membranındaki IgG adsorpsiyonunun endotermik bir reaksiyon olduğu şeklinde açıklamışlardır<sup>180</sup>.

**Boi ve arkadaşları (2008)** Monoklonal antikor üretimi için insan IgG' sine karşı değişik bir bağlanma kapasitesi gösteren yeni afinite membranları incelemişlerdir. Membranları saf IgG çözeltileri ve IgG<sub>1</sub> içeren hücre kültürü sıvısıyla test ederek, ayırma kapasitesi üzerine akış hızı ve IgG derişiminin etkisini incelemişlerdir. Bu yeni yüksek kapasiteli afinite membranlarının klasik, boncuk dayalı kromatografik kolonların dezavantajlarından kaçınmak için alternatif bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir<sup>181</sup>.



### 3. MATERYAL VE METOT

Araştırma kapsamında yapılan deneysel çalışmaları beş ana grup altında toplamak mümkündür. Bu ana gruplar:

- ✓ Poli(2-hidroksietil metakrilat) [Poli(HEMA)] kriyojellerin hazırlanması,
- ✓ Poli(HEMA) kriyojellerin CNBr aktivasyonu ve protein A ligand bağlanması,
- ✓ Poli(HEMA) kriyojellerin karakterizasyonu,
- ✓ RA hasta plazmasından antikor uzaklaştırma davranışının incelenmesi,
- ✓ Adsorbentin adsorpsiyon ve desorpsiyon kapasitesinin incelenmesidir.

#### 3.1. Kullanılan Kimyasallar

Protein A (*Staphylococcus aureus*' dan, Cowan Strain I; Ürün No: P-6031), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), insan serum albumini (HSA), sığır serum albumin (BSA), İmmünoglobülin-G, anti-IgG Sigma (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiş ve kullanıma kadar 4°C' de muhafaza edilmiştir. N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) Fluka AG (İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer kimyasalların hepsi Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir ve analitik saflıktadır. Deneysel çalışmada 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 dolgu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir. Deneysel çalışmada kullanılacak cam malzemeler bir gece boyunca 4 M nitrik asitte bekletilmiştir.

#### 3.2. Süpermakrogözenekli Kriyojellerin Hazırlanması

Poli(HEMA) kriyojelin hazırlanması aşağıda açıklanmaktadır:

Monomerler (1.6 ml HEMA ve 0.3 g N,N'-metilen-bisakrilamid (MBAAm)) diiyonize suda (5 ml) çözülmüştür. Çözülmüş oksijeni elimine etmek için bu

karişim 5 dakika vakumda bırakılmıştır. Monomerlerin toplam derişimi % 12 (w/v) olmuştur. Serbest radikal polimerleşmesi amonyumpersulfat (APS)-TEMED çifti ile oluşturulmuştur. APS ( 25 mg, toplam monomerlerin % 1' i (w/v)) eklendikten sonra çözelti bir buz banyosunda 2-3 dakika soğutulmuştur. TEMED ( 20 µl, toplam monomerlerin % 1' i (w/v)) eklenip reaksiyon karişımı 1 saat kariştırılmıştır. Sonra reaksiyon karişımı altında kapalı bir çıkış olan plastik şiringaya ( 5 ml, i çapı 0.8 cm ) bırakılmıştır. Polimerleşme çözeltisi 24 saat -16° C' de dondurulup sonra oda sıcaklığına getirilmiştir. 200 ml suda yıkandıktan sonra kriyojel kullanılıncaya kadar % 0.02 sodyum azid (NaN<sub>3</sub>) içeren tampon içinde saklanmıştır.

### **3.3. CNBr Aktivasyonu**

Protein A için aktif bağlanma merkezleri hazırlamak amacıyla Poli(HEMA) kriyojel siyanojen bromür (CNBr) ile aktive edilmiştir. Aktivasyon işleminden önce, Poli(HEMA) kriyojel yaklaşık 24 saat destillenmiş su içinde bırakılıp 0.5 M NaCl çözeltisi ve su ile yıkanmıştır. 2 ml 0.5 M sodyum karbonat (NaHCO<sub>3</sub>) tamponu (pH 10.5) eklenip yavaşça kariştırılmıştır. Karişim eker ocağa konulup pH elektrodu bu çözeltiye daldırılmıştır. CNBr özenle tartılıp çözeltiye eklenmiştir. Bu çözeltinin pH' sı 4 M NaOH ile 11.5' e hızla ayarlanıp aktivasyon reaksiyonu boyunca pH 10.5-11.5 arasında tutulmuştur. CNBr çözeltisi kolondan 1.0 ml/dak hızla oda sıcaklığında (25°C) geçirilip aktivasyon işlemi 60 dakika sürdürölmüştür. Aktivasyon işleminden sonra aşırı aktivasyon maddesini uzaklaştırmak için Poli(HEMA) kriyojel 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> ile yıkanıp kriyojel yüzeyinde kalan aktif gruplar (örn. izoüre) 1 saat etanol amin (pH 9.1) ve FeCl<sub>3</sub> çözeltisiyle etkileştirilerek bloke edilmiştir. Sonra CNBr ile aktive edilmiş Poli(HEMA) kriyojel 0.5 M NaCl çözeltisiyle dört kez yıkanmıştır. Son basamakta kriyojel soğuk sodyum sitrat tamponuyla (0.1 M; pH 6.5) yıkanmıştır.

### **3.4. Protein A Bağlanması**

Protein A bağlanmasında sıcaklık kontrolü için su ceketli cam kolon içeren bir sürekli sistem kullanılmıştır. Kriyojel 100 ml su ile yıkandıktan sonra 50 ml karbonat tamponuyla (pH 10) 1.0 ml/dak akış hızında 1 saat etkileştirilmiştir. Sonra 50 ml

protein A çözeltisi (2.0 mg/ml, pH 6.5) 1.0 ml/dak akış hızında 2 saat kriyojel kolonundan geçirilmiştir. Kriyojela bağlanan protein A miktarı, protein A derişimindeki azalma ölçülerek ve bunun adsorbe olduğu düşünülerek (Poli(HEMA) kriyojeline adsorbe olmuş protein A miktarı) Lowry Metodu<sup>182</sup> ile ölçülerek hesaplanmıştır. Protein örneği (200–400 µl) fosfat tamponuyla (25 mM; pH 7.4) 1.0 ml' ye seyreltilmiştir. Sonra 1 ml taze hazırlanmış Lowry reaktifi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dak inkübasyondan sonra 500 µl taze hazırlanmış Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) eklenip vorteks ile karıştırılmıştır.

Aynı şekilde kör olarak protein yerine, kullanılan protein kadar 200–400 µl %3 sodyum dodesilsülfat (SDS) çözeltisi fosfat tamponuyla (25 mM; pH 7.4) hazırlanmıştır. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 730 nm' de absorbans okunmuştur. Bilinen protein A derişimiyle kalibrasyon eğrisi hesaplanmıştır. Kriyojelden protein A sızıntısı için 24 saat fosfat tamponu kriyojel kolonundan geçirilmiştir. Bu işlemde sonra bırakılan protein A sıvı fazda spektrofotometrik olarak 280 nm' de ölçülmüştür.

### **3.5. Kriyojelin Karakterizasyonu**

#### **3.5.1. Şişme Deneyi**

Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin şişme davranışları, deiyonize su içerisindeki denge şişme oranlarının belirlenmesi ile hesaplanmıştır. Denge şişme oranının belirlenmesinde uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir:

Başlangıçta kuru olan kriyojel dikkatlice tartıldıktan sonra, 50 ml damıtık su içeren bir behere konulmuştur. Sabit sıcaklıkta  $25 \pm 0.5$  °C'de 2 saat bekletildikten sonra, kriyojeller ortamdaki alınmış ve SCALTEC marka terazi (Almanya) ile ( $1 \times 10^{-4}$  hassasiyetli) tartılmıştır. Kuru ve şişmiş kriyojellerin ağırlıkları kaydedilmiştir. Polimerik kriyojellerin su içeriği aşağıda verilen denklem ile hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme oranı} = (W_s - W_o) / W_o \quad (3.1)$$

Burada;  $W_0$ : kriyojelin kuru ağırlığı (g)  $W_s$ : kriyojelin şiştikten sonraki ağırlığı (g).

Kriyojellerin makrogözeneklilik yüzdesinin belirlenmesi için uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir:

Denge şişme oranına ulaşmış olan kriyojel örnekleri ( $W_1$ ) tartılmıştır. Daha sonra şişmiş kriyojel örneği bir enjektör içerisine alınmıştır. Kriyojellerin makrogözeneklerinde bulunan suyun uzaklaştırılması için kriyojel enjektör yardımıyla sıkılmış ve kriyojeller ( $W_2$ ) tartılmıştır. Aşağıda verilen eşitlik kullanılarak kriyojellerin sahip olduğu makrogözeneklerin yüzdesi hesaplanmıştır.

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = [(W_1 - W_2) / W_1] \times 100 \quad (3.2)$$

### 3.5.2. Yüzey Morfolojisi

Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin kesit yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL, JSM 5600, Tokyo, Japonya) kullanılarak incelenmiştir. İlk olarak, kriyojellerin gözenek yapısının korunması için kriyojeller kararlı hale getirilmiştir. Bu amaç için, kriyojel örnekleri gece boyu 0.15 M sodyum kokadilat çözeltisi içerisinde (% 2.5 glutaraldehit içeren) bekletilmiştir. % 1'lik osmiyum tetraoksit içerisinde 1 saat bekletildikten sonra, kriyojel örnekleri kademeli olarak etanol içerisinde dehidrate edilmiş ve kritik sıcaklık kurutucusunda +10°C'de ısıtılmıştır. Bu aşama, geçiş sıvısı olan etanolün sıvı karbondioksit ile değişimi için yapılmıştır. Sıcaklık daha sonra, +40°C' ye (100 atm basınç altında) yükseltilmiştir. Bu işlem sırasında; sıvı karbon dioksit doğrudan gaz formuna geçirilmiş ve örneğin buharlaşma ısısı veya yüzey gerilim kuvvetleri dolayısıyla zarar görmesi önlenmiştir. Basıncın 1 atm'ye yükseltilmesi ile birlikte kuru kriyojel örnekleri elde edilmiştir. Son aşama olarak, kriyojel örnekleri ince altın tabaka ile kaplanmış ve SEM görüntüleri alınmıştır.

### 3.5.3. Yüzey Alanı Ölçümleri

Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin spesifik yüzey alanı BET cihazı (Quantochrome SI, Automated Surface Area and Pore Size Analyzer, Quantochrome, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Kriyojel örnekleri dikkatlice tartılmış ve örnek haznesine yerleştirilmiştir. Daha sonra, örneklerin azot atmosferinde 150°C'de 1 saat gazı alınmıştır. Gaz adsorpsiyonu -196°C' de ve desorpsiyonu oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon basamağında elde edilen sonuçlar, spesifik yüzey alanı hesaplamalarında kullanılmıştır. Kriyojellerin sahip olduğu gözenek hacmi ve ortalama gözenek çapı Barrett, Joyner, Halenda (BJH) modeli<sup>183</sup> uygulanarak belirlenmiştir.

### 3.5.4. FTIR Çalışmaları

Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin yapı analizi FTIR spektrofotometresi (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kriyojel örnekleri oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra, kriyojel örnekleri havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnek (2 mg) potasyum bromür (KBr, 98 mg, IR Grade) ile karıştırılmış ve pelet haline getirilmiştir. Peletlerin FTIR spektrumu 450-4000 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında çekilmiştir.

## 3.6. Kan Uyuşabilirlik Çalışmaları

### 3.6.1. Pıhtılaşma Zamanı (CT)

Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojeller, oda sıcaklığında 0.1 M sodyum fosfat tamponuyla (pH 7.4) dengeye getirilmiş, daha sonra 0.5 M NaCl çözeltisi ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Taze donmuş plazmanın (0.1 ml), 2 dakika süreyle 37 °C' de ısıtılmasının ardından ortama polimer konularak karıştırılmıştır. Pıhtılaşma zamanı fibrometre yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir<sup>184</sup>.

### **3.6.2. Aktive Kısmi Tromboplastin Zamanı (APTT)**

Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojeller, oda sıcaklığında 0.1 M sodyum fosfat tamponuyla (pH 7.4) dengeye getirilmiş, daha sonra 0.5 M NaCl çözeltisi ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Taze donmuş plazmanın (0.1 ml), 2 dakika süreyle 37 °C' de ısıtılmasının ardından, öğütülerek toz haline getirilen polimer ortama konulmuştur. Kısmi tromboplastin (0.3 ml, bioMerieux, Marcy-ΓEtoile, Fransa), aynı şekilde 2 dakika süreyle 37 °C' de ısıtmadan sonra plazma içerisine ilave edilmiş, daha sonra kriyojel ile etkileştirilmiştir. 30 saniye sonra bu ortama CaCl<sub>2</sub> çözeltisi (0.1 ml, 0.025 M) ilave edilmiş ve aktive kısmi tromboplastin zamanı (APTT) fibrometre yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir<sup>185</sup>.

### **3.6.3. Protrombin Zamanı (PT)**

Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojeller, oda sıcaklığında 0.1 M sodyum fosfat tamponuyla (pH 7.4) dengeye getirilmiş, daha sonra 0.5 M NaCl çözeltisi ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Taze donmuş plazmanın (0.1 ml), 2 dakika süreyle 37 °C' de ısıtılmasının ardından ortama kriyojel eklenmiştir. Tromboplastin (0.2 ml, bioMerieux, Marcy-ΓEtoile, Fransa), aynı şekilde 2 dakika süreyle 37 °C' de ısıtmadan sonra plazma içerisine ilave edilmiş, daha sonra polimer ile etkileştirilmiştir. 30 saniye sonra bu ortama CaCl<sub>2</sub> çözeltisi (0.1 ml, 0.025 M) ilave edilmiştir. Protrombin zamanı fibrometre yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir<sup>186</sup>.

### **3.6.4. Fibrinojen Zamanı (FT)**

Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojeller, oda sıcaklığında 0.1 M sodyum fosfat tamponuyla (pH 7.4) dengeye getirilmiş, daha sonra 0.5 M NaCl çözeltisi ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Taze donmuş plazmanın (0.1 ml), 2 dakika süreyle 37 °C' de ısıtılmasının ardından ortama kriyojel eklenmiştir. Fibrinojen zamanı fibrometre yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir<sup>184</sup>.

### 3.7. IgG Adsorpsiyon Dinamiklerinin Belirlenmesi

Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojele sulu çözültiden IgG (ticari olarak temin edildi) adsorpsiyonu sürekli sistemde çalışılmıştır. Kriyojel, 30 ml su ile yıkandıktan sonra 0.1 M NaCl içeren 25 mM fosfat tamponu (pH 7.4) ile 30 dakika dengeye getirilmiştir. Daha sonra hazırlanan IgG çözültisi 2 saat kolondan geçirilmiştir. Adsorplanan IgG miktarı 280 nm’de UV-absorbansdaki düşüş izlenerek belirlenmiştir. Akış hızı (0.5-4.0 ml/dak), başlangıç IgG derişimi (0.1-2.0 mg/ml), ortam pH’ ı (4.0-9.0) ve sıcaklık (4-37°C) parametrelerinin IgG adsorpsiyonuna etkileri incelenmiştir.

### 3.8. Kan Plazmasından IgG Saflaştırma

Hepatit B, HIV I, II ve hepatit C’ nin negatif olduğu kan örnekleri kan vericisinden alınmıştır. Kan örnekleri EDTA içerikli tüplerde -20°C de saklanmıştır. Kan örnekleri 0.1 M NaCl içeren 25 mM fosfat tamponunda (pH 7.4) seyreltilip kullanılmıştır. Seyreltme oranları 1/2 ve 1/10 dur. 14.8 mg/ml IgG içeren 50 ml kan 1 saat süreyle 1.0 ml/dak akış hızıyla kriyojel kolonundan geçirilmiştir. Protein A takılı Poli(HEMA) kriyojele adsorplanan IgG miktarı ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla insan anti-IgG’ si (Sigma, I-9384) 50 mM NaHCO<sub>3</sub> çözültisi (pH 9.6) ile 1000 kez seyreltilmiş ve 12 saat boyunca 40 °C’ de polivinilklorür (PVC) mikrotitre plakalarına adsorbe edilmiştir. Plakalar % 0.05 Tween 20 (yıkama tamponu) içeren 25 mM fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkanmış ve % 0.05 Tween 20, % 1.5 sığır serum albumin (BSA) ve % 0.1 sodyum azid içeren fosfat tamponu (pH 7.4) ile bloke edilmiştir. Örnekler (2.5 ml, 0.5 ml 1 M trisodyum sitrat çözültisi ile nötralize edilmiş) ve belirli miktarlarda IgG içeren kontrol örnekleri ortama ilave edilmiş ve 1 saat 37 °C’ de bekletilmiştir. Bağlanan IgG, biotin ile işaretlenmiş anti-insan IgG ve bunu takiben peroksidaz konjuge streptavidin ve o-fenilendiamin kullanılarak belirlenmiştir. Absorbans 492 nm’de ölçülmüştür.

### **3.9. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE jeli düzgün bir yüzey oluşması amacıyla iki elektrofrez camının arasına dökülmüştür. Jel iki cam arasına dökülmeden önce camlar iyice temizlenmiştir. Bu amaçla, camlar yıkandıktan sonra etanol ile silinmiştir.

Jeli hazırlama aşamasında (% 5) paketleyici (stacking) jel hazırlanıp iki cam arasına dökülmüştür. Dökme işleminden sonra jelde örneklerin yüklenebileceği boşluklar yaratmak amacıyla tarak yerleştirilmiştir. Jel dökülürken hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilmiştir. Jelin polimerleşmesi için bir saat beklenmiştir. Jel polimerleştikten sonra tarak dikkatlice çıkarılmış ve iki cam arasındaki jel elektrofrez tankına yerleştirilmiştir. Kuyucuklar içinde kalan jel artıkları yürütme tamponu ile temizlenmiştir.

Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelinden geçen kan örnekleri jele yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra, örnekler 120 V' de yürümeye bırakılmıştır. 2 saat sonunda yürütme durdurularak, jel boyanmadan önce uygun çözeltiliye alınmıştır. SDS-PAGE jeli asetik asit-metanol-su (1:5:5, v/v/v) karışımında Coomassie Brilliant Blue R 250 boyası ile boyanmıştır. Yürütme işleminden sonra jel Coomassie Blue boyasına alınarak bu çözeltide gece boyu bekletilmiştir. Daha sonra boyayı uzaklaştırmak amacıyla jel, etanol-asetik asit-su (1:4:6, v/v/v) karışımından meydana gelen boya çıkarma çözeltisi ile iki kez 15'er dakika yıkanmıştır. SDS-PAGE jeli saklamak amacıyla gece boyu saklama çözeltisine alınmıştır. SDS-PAGE jeli Shimadzu dual-wavelength flying spot scanning densitometer (Shimadzu, Tokyo, Japan) kullanılarak taranmıştır.

### **3.11. FPLC Çalışması**

Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin (yarıçap:1.0 cm, uzunluk: 5.0 cm) yarışmalı proteinlere karşı seçiciliği FPLC ile test edilmiştir. FPLC' de ayırma UV dedektör sistemi donatılmış ile AKTA-FPLC (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan FPLC cihazı M-925 karıştırıcısı, P-920



pompası, UPC-900 monitörü, INV-907 enjeksiyon valfi ve Frac920 fraksiyon kolektörü içermektedir. Ayırma işlemi protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelli GE Healthcare (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) kolonu (10/10, 19-5001-01) ile yapılmıştır. FPLC' nin A ve B hareketli fazları sırasıyla 0.1 M NaCl içeren 25 mM fosfat tamponu (pH 7.4) ve 0.1 M glisin-HCl tamponları (pH 3.5) ile hazırlanmıştır. Kromatografik ayırma doğrusal gradienti 3 ml/dak akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. % 100' lük A hareketli fazı ile 7 dak' lık başlama süresinden sonra, B hareketli fazının miktarı % 0' dan % 100' e kadar 1 dak içerisinde doğrusal gradientli olarak artırılmıştır. % 100' lük B hareketli fazı 5 dak süreyle uygulandıktan sonra kolondan 8 dak boyunca % 100' lük A hareketli fazı geçirilmiştir. Tüm tamponlar ve karışımlar kullanılmadan önce filtre edilmiştir. 2 ml protein karışımı kolona uygulanarak sistemin absorbanansı 280 nm' de kaydedilmiştir. Ayırma işlemi ise oda sıcaklığında yapılmıştır.  $t_0$ , belirleyici olarak KBr kullanılmıştır. Kapasite ( $k'$ ) ve ayırma ( $\alpha$ ) faktörleri

$$k' = (t_R - t_0)/t_0, \quad (3.3)$$

$$\alpha = k_2'/k_1' \quad (3.4)$$

denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır.  $t_R$  proteinin alıkonma zamanı  $t_0$  ise belirtecin (KBr) alıkonma zamanı,  $k_2'$  IgG için kapasite faktörü ve  $k_1'$  ise HSA gibi bir yarışmalı proteinin kapasite faktörünü belirtmektedir.  $R_S$  ayırım gücü ve teorik plaka sayısı (N) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$N = 5.54 (t_R/w_{0.5})^2 \quad (3.5)$$

$$R_S = 2 (t_{R,2} - t_{R,1})/(w_2 + w_1) \quad (3.6)$$

$w_{0.5}$  karşılık gelen pikin taban yarı uzaklığı,  $t_{R,1}$  ve  $t_{R,2}$  bitişik iki pikin alıkonma zamanları,  $w_1$  ve  $w_2$  iki yakın pikin taban çizgisindeki genişliğidir.

### 3.10. Romatoid Artritli Plazmadan Antikor Uzaklaştırma

Romatoid artritli hastadan alınan kan örnekleri alınıp 1/1, 1/2, 1/4, 1/10 ve 1/20 oranlarında fizyolojik çözelti (% 0.9 NaCl) ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş ve

seyreltilmemiş kan Poli(HEMA) ve farklı miktarlarda protein A yüklü protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojel kolonundan 25°C’da 2 saat süreyle 1 ml/dk akış hızında geçirilmiştir. Adsorplanan antikor miktarı ELISA yöntemi ile belirlenmiştir.

### **3.12. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik**

IgG desorpsiyonu için 0.1 M glisin-HCl tamponu (pH 3.5) desorpsiyon ajanı olarak kullanılmıştır. IgG adsorplanmış protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin desorpsiyon ajanı 1 ml/dk akış hızında 1 saat süreyle kolondan geçirilmiştir. Desorpsiyon ortamındaki IgG miktarı 280 nm’ de spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. Desorpsiyondan sonra kriyojel 50 mM NaOH ile yıkanmış, 0.1 M NaCl içeren 25 mM fosfat tamponu (pH 7.4) ile dengeye getirilmiştir. Desorpsiyon ortamındaki IgG konsantrasyonu ile kriyojeldeki adsorbe olmuş IgG miktarından desorpsiyon oranı hesaplanmıştır.

Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için aynı adsorbentle adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 10 kez tekrarlanmıştır. Her desorpsiyon işlemi sonrasında, protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojel, rejenerasyon ve sterilizasyon için 50 mM NaOH çözeltisi ile yıkanmıştır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Şişme Deneyi

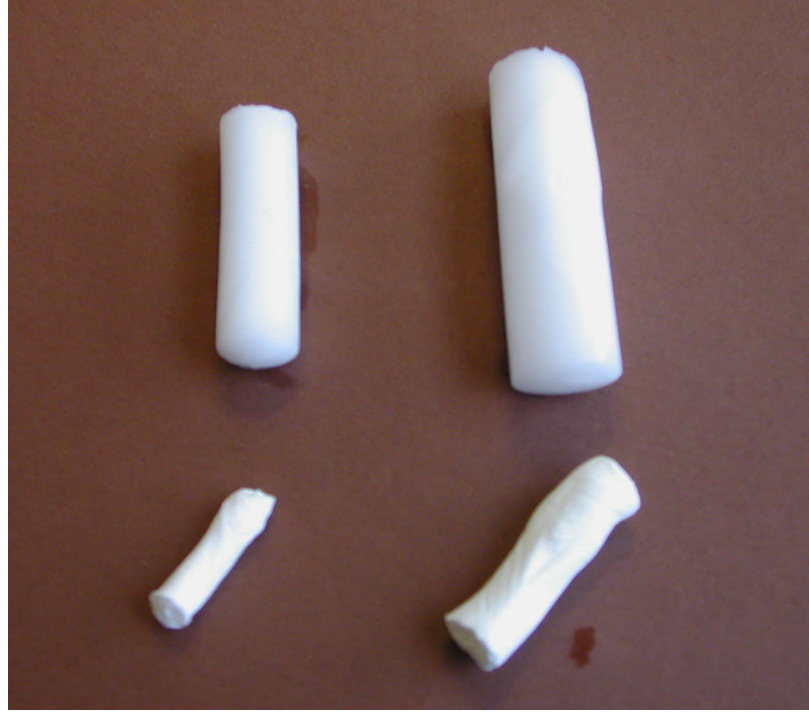
Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojeller, çapraz-bağlı ve hidrofilik yapıda matrikslerdir. Çapraz-bağ derecesine ve matriksin hidrofilitesine bağlı olarak yapılarına su alarak şişerler.

Yapılan çalışmalarda Poli(HEMA) kriyojeli için makrogözenek miktarı % 71.6 olarak bulunmuştur. Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojel için ise makrogözenek miktarının % 64.8 olduğu bulunmuştur. Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin denge şişme oranı ise sırasıyla 8.56 ve 7.74 g H<sub>2</sub>O/ g polimer olarak bulunmuştur.

Makrogözenek miktarındaki bu azalma iki şekilde açıklanabilir:

- i.* Protein A *Staphylococcus aureus* bakterisinin hücre duvar proteinidir. Protein A'nın hidrofobik karakterde olduğu bilinmektedir<sup>187</sup>. Polimerik kriyojelin yapısına hidrofobik bir proteinin immobilizasyonu, kriyojelin hidrofilitesini azaltmış ve denge şişme oranı düşmüştür.
- ii.* Polimerik kriyojellere protein A immobilizasyonu sonucunda kriyojelin gözenekliliğinin azalması denge şişme oranının düşmesine sebep olmuştur.

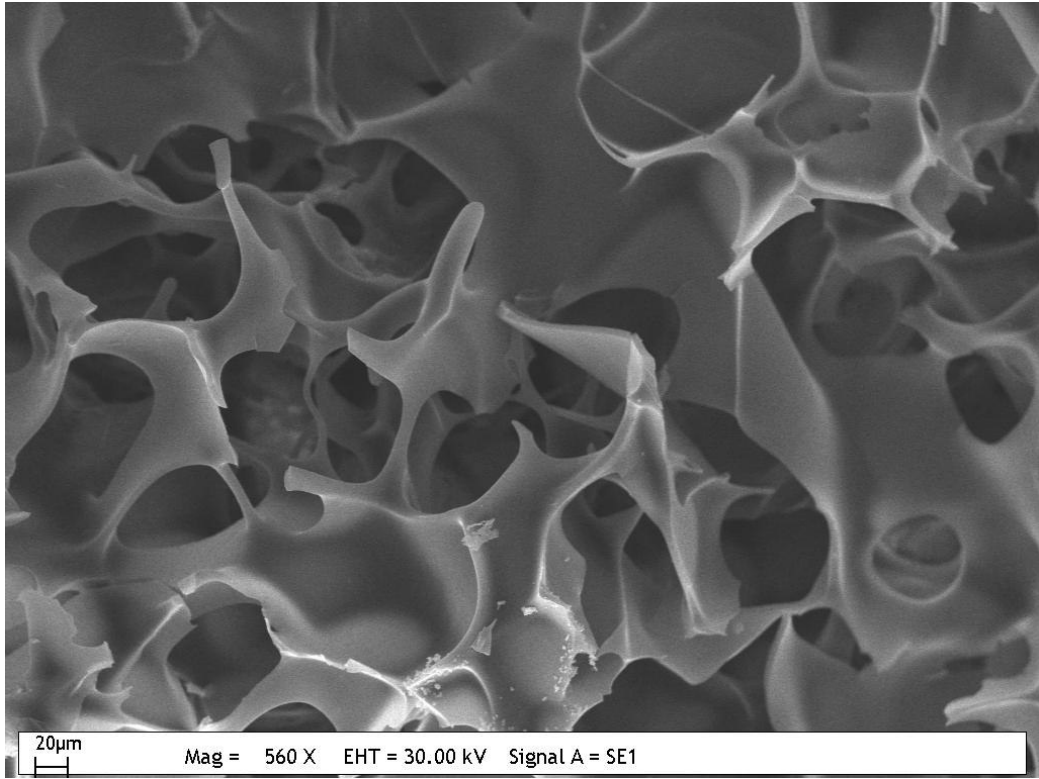
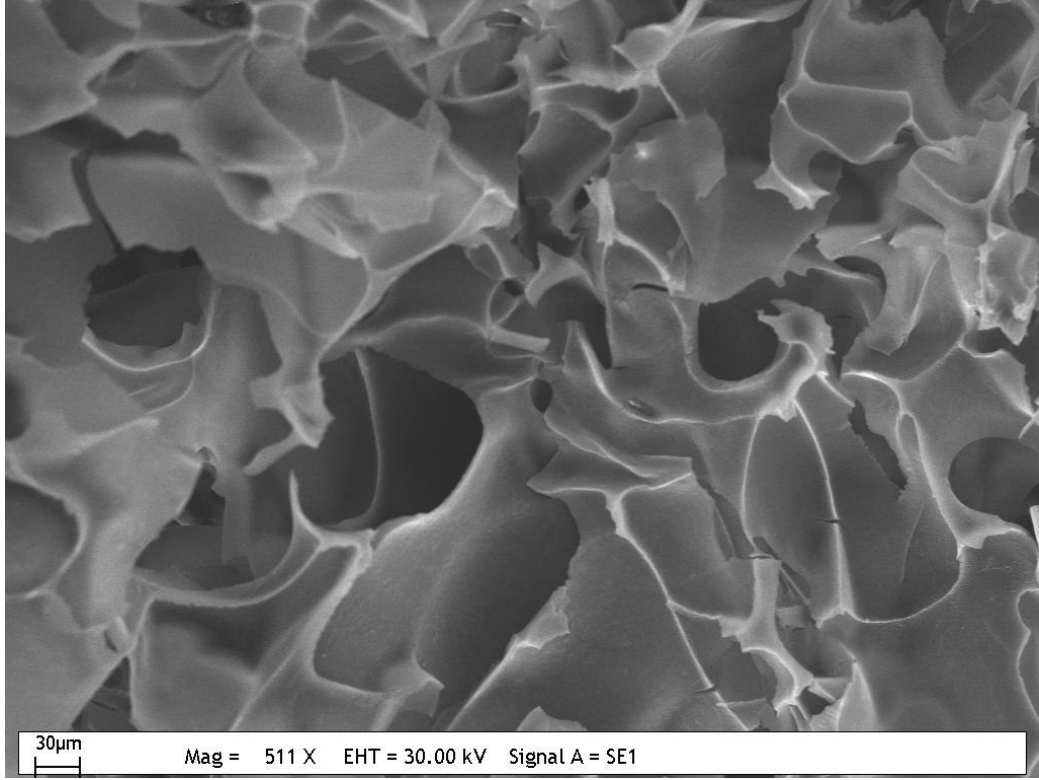
Poli(HEMA) kriyojel opak, süngerimsi ve esnek bir yapıya sahiptir. Gözeneklerin içinde biriken suyu uzaklaştırmak için kriyojel el ile kolaylıkla sıkıştırılabilir. Kurutulmuş kriyojel parçası suya daldırıldığında suda ıslanır ve 1-2 saniye içinde orijinal büyüklük ve şeklini alır (Şekil 4.1).



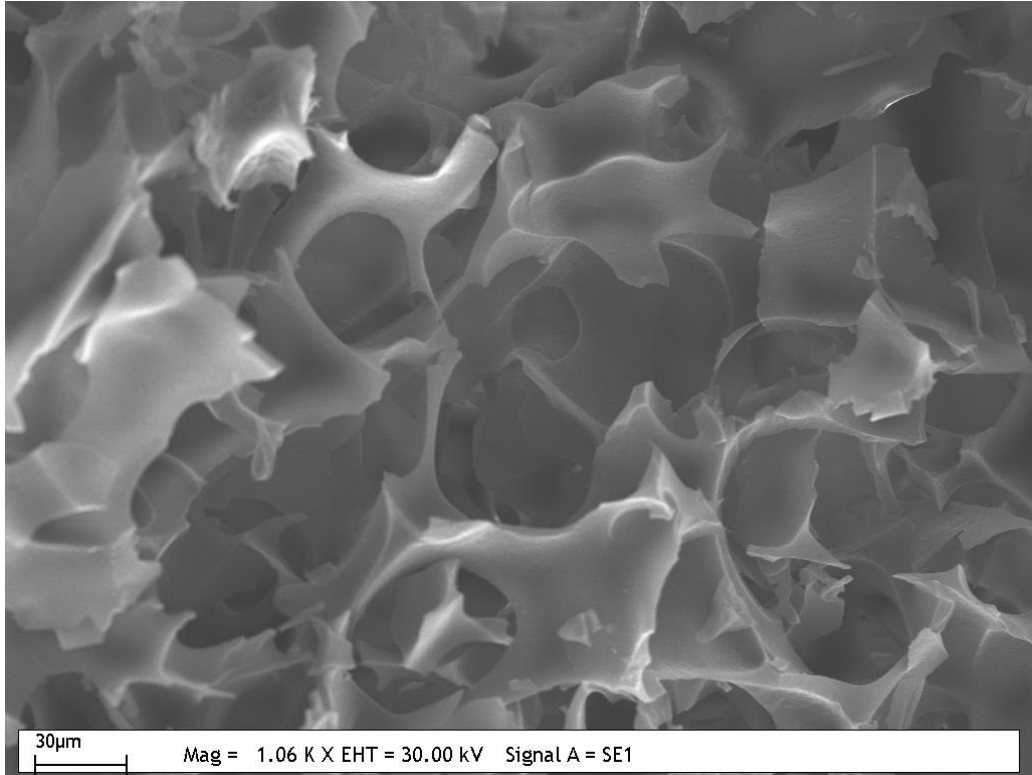
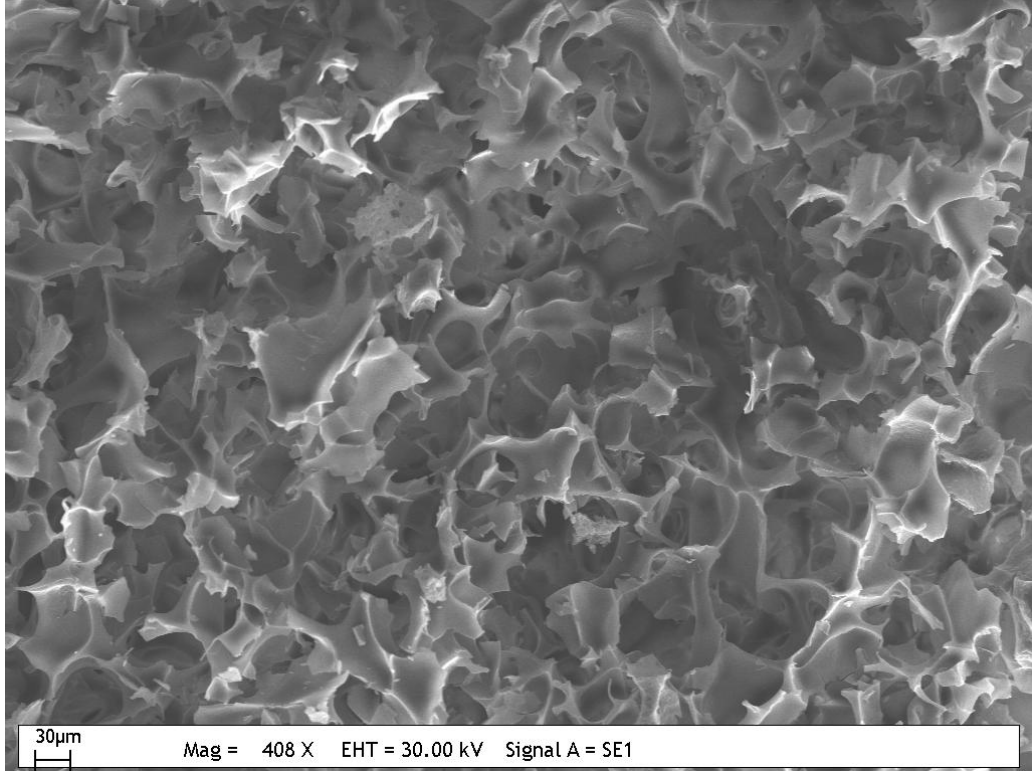
**Şekil 4. 1.** Şişmiş ve kurutulmuş Poli(HEMA) kriyojel

#### **4.2. Yüzey Morfolojisi**

Süpermakrogözenekli Poli(HEMA) kriyojel APS/TEMED varlığında MBAAm' nin donmuş haldeki kopolimerleşmesiyle üretilmiştir. Poli(HEMA) kriyojelin üzerindeki hidroksil grupları protein A ile modifiye edilmiştir. Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin gözenek yapısının SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de verilmiştir. Poli(HEMA) kriyojel, gözenekli olmayan ve ince polimer duvarlara ve hareketli fazın akması için kanal oluşturan büyük, sürekli ve birbirine bağlı (10-200  $\mu\text{m}$  çapındaki) gözeneklere sahiptir. Matriksin gözenek boyutunun protein moleküllerinden çok büyük olması proteinlerin kolaylıkla geçmesini sağlar. Hareketli fazın gözeneklerde konvektif akışı nedeniyle kütle aktarım direnci pratik olarak ihmal edilebilir derecededir.



**Şekil 4. 2.** Poli(HEMA) kriyojelin SEM mikrofotografı



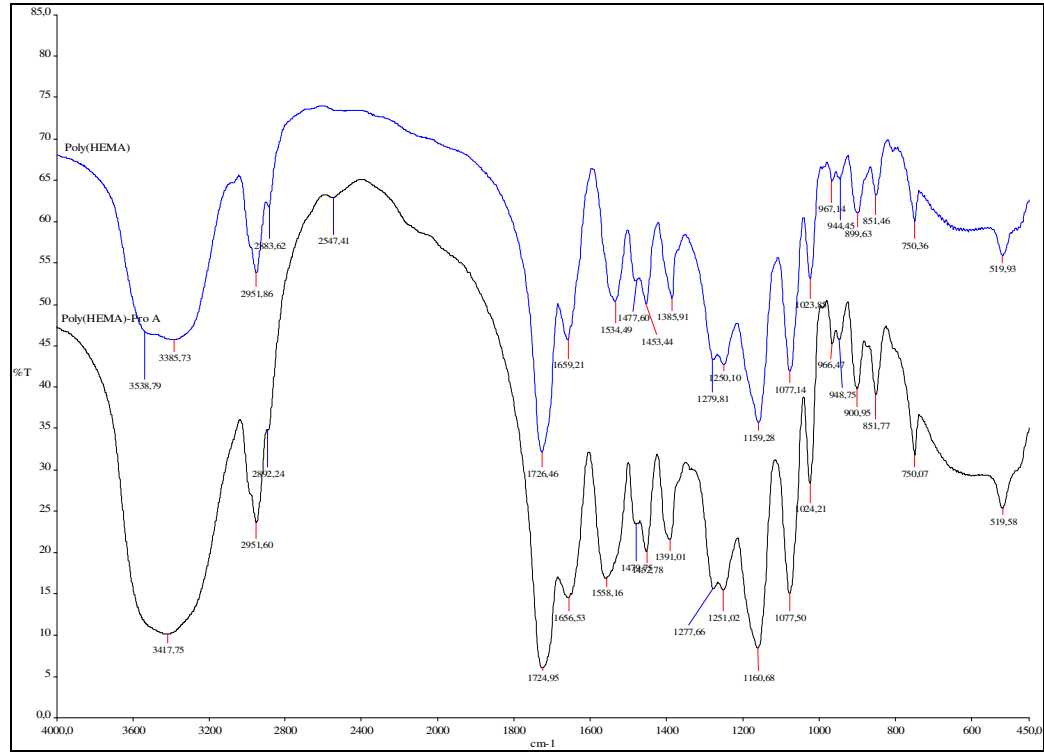
**Şekil 4. 3.** Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin SEM mikrofotografı

### 4.3. Yüzey Alanı Ölçümleri

Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin spesifik yüzey alanı BET yöntemi ile sırasıyla 11.98 m<sup>2</sup>/g ve 20.18 m<sup>2</sup>/g bulunmuştur. Bu artış polimerik kriyojellere protein A immobilizasyonu sonucunda kriyojelin yüzey alanının artması ile açıklanabilir.

### 4.4. FTIR Çalışmaları

Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellere ait FTIR spektrumları Şekil 4.4' te verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, protein A takılı Poli(HEMA) kriyojeller 1558 cm<sup>-1</sup> ve 1656 cm<sup>-1</sup> de amid bandlarına (-CONH) sahiptir. Poli(HEMA) kriyojellerle karşılaştırıldığında bu bandların hem şiddeti artmış hemde genişlemiştir. Bu durum kriyojel yapısındaki protein A'nın varlığını göstermektedir. Ayrıca hidroksil bandında da (-OH) yayvanlaşma görülmektedir.



Şekil 4. 4. Poli(HEMA) kriyojel ile protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin FTIR spektrumu

#### 4.5. Kan Uyuşabilirlik Çalışmaları

Bir biyomalzeme, tıbbi cihazlarda kullanılan veya istenen bir zaman aralığında istenen bir uygulama yöntemi için canlı sistemle temas halinde kullanılmak üzere tasarlanan bir malzemedir. Polimerik biyomalzemeler tıp ve eczacılık alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır.<sup>188,189</sup> Bu uygulamalar arasında, çok sayıda değişik implantlar (vida, çivi, plaka gibi ortopedik malzemeler) veya diğer destek malzemeler (örneğin damar graftlar, yapay kalpler, intraoküler lensler, eklem ve göğüs protezleri), ekstrakorporal tedavi ve diğer klinik destek araçları (örneğin hemodiyaliz setleri, hemoperfüzyon kolonları, kan oksijenlendirilmesinde kullanılan membranlar), kontrollü ilaç salım sistemleri (örneğin deri altı ilaç salım sistemleri, mikroküreler, membranlar ve kapsüller) ve klinik teşhis kitleri (genellikle taşıyıcı olarak) sayılabilir<sup>190</sup>.

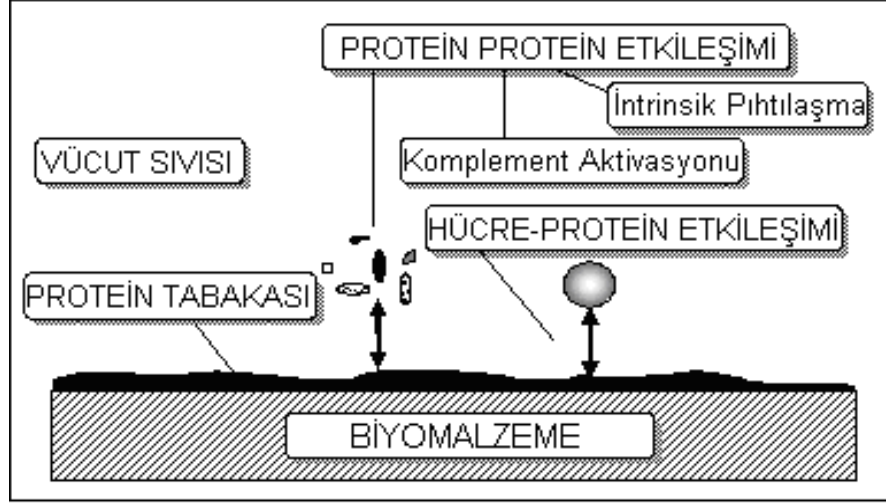
Biyomalzemelerin, medikal uygulamalarda kullanılabilmesi için belirli bazı kriterleri sağlamaları gerekmektedir. Kullanım süresi ve yerine göre biyomalzemelere kan ve doku ile uyuşabilirlik, karsinojenisite, mutajenisite, biyodegradasyon ve mekanik kararlılık gibi bazı test yöntemleri uygulanır<sup>191</sup>.

Biyomalzeme kan ile temas ettiğinde, yüzeye ilk önce küçük moleküller (su ve iyonlar gibi) gelir. Bu olayı plazma proteinlerinin adsorpsiyonu takip eder (Şekil 4.5). 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<sup>192-194</sup>. Bu nedenle bir biyomalzemenin kan uyuşabilirliğini belirlemek için yapılması gereken öncelikli işlemler pıhtılaşma zamanları testleridir.

Biyomalzemelerin biyouyumluluğunu arttırmak için çok yoğun çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bunlar arasında;

- i) iyi yıkama etkisine sahip alet tasarımı
- ii) düzenlenmiş fabrikasyon tekniği
- iii) kan ile uyumlu yeni nesil polimerlerin geliştirilmesi sayılabilir.





Şekil 4. 5. Kan-Biyomalzeme Etkileşimi<sup>195</sup>

Son zamanlarda, biyotıp alanında kullanılacak polimerlerin biyouyumluluğunu arttırmak ve bozunma sonucu açığa çıkacak bileşiklerin toksisitesini azaltmak üzere kullanılan bir yöntem polimer yapı iskeletine biyolojik molekül aminoasit segmentleri takılmasıdır<sup>196</sup>.

Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin kan uyusabilirliklerini belirlemek için in-vitro pıhtılaşma zamanı (CT), aktive kısmi tromboplastin zamanı (APTT), fibrinojen zamanı (FT) ve protrombin zamanı (PT) deneyleri yapılmıştır. Kontrol amacıyla aynı deneyler Poli(HEMA) kriyojeli için de yapılmıştır.

APTT intrinsik kan pıhtılaşma faktörlerinin biyoaktivitesini gösterir. PT biyomalzeme yüzeyindeki ekstrinsik kan pıhtılaşma faktörleri ile ilgilidir. CT ile in-vitro pıhtılaşma zamanı belirlenir.

Çizelge 4.1' de bu deneyler sonucunda elde edilen pıhtılaşma değerleri verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojeli Poli(HEMA) kriyojel ile karşılaştırıldığında PT ve CT değerleri biraz azalırken APTT ve FT değerleri biraz artmıştır. Pıhtılaşma zamanları kontrol plazma ile karşılaştırıldığında ise artma gözlenmiştir. Fakat bu azalma vücut tarafından tolere edilebilir bir düzeydedir. Bu sonuçlar, yeni sentezlenen protein A takılı-Poli(HEMA)

kriyojellerin kan uyuşabilirliklerinin iyi olması ve literatürle karşılaştırıldığında benzer sonuçların elde edilebilmesi ile açıklanabilir<sup>197</sup>.

Sonuç olarak afinite adsorbentinin hazırlanması için Poli(HEMA) yapısına ligand olarak bağlanan protein A' nın iki önemli özelliği görülmektedir:

**İlk olarak;** Protein A ilavesinin Poli(HEMA) kriyojellere göre kan uyuşabilirliğini arttırdığı görülmektedir. Kan uyuşabilirliğinin artması sonucunda bu kriyojellerle, herhangi bir medikal uygulamada (örneğin kanser destek tedavi sistemlerinde), vücut tarafından gösterilen olası istenmeyen reaksiyonların azalması,

**İkinci olarak;** Spesifik olmayan protein adsorpsiyonunun düşük olmasından dolayı uygulama sırasında protein kaybının az olmasıdır.

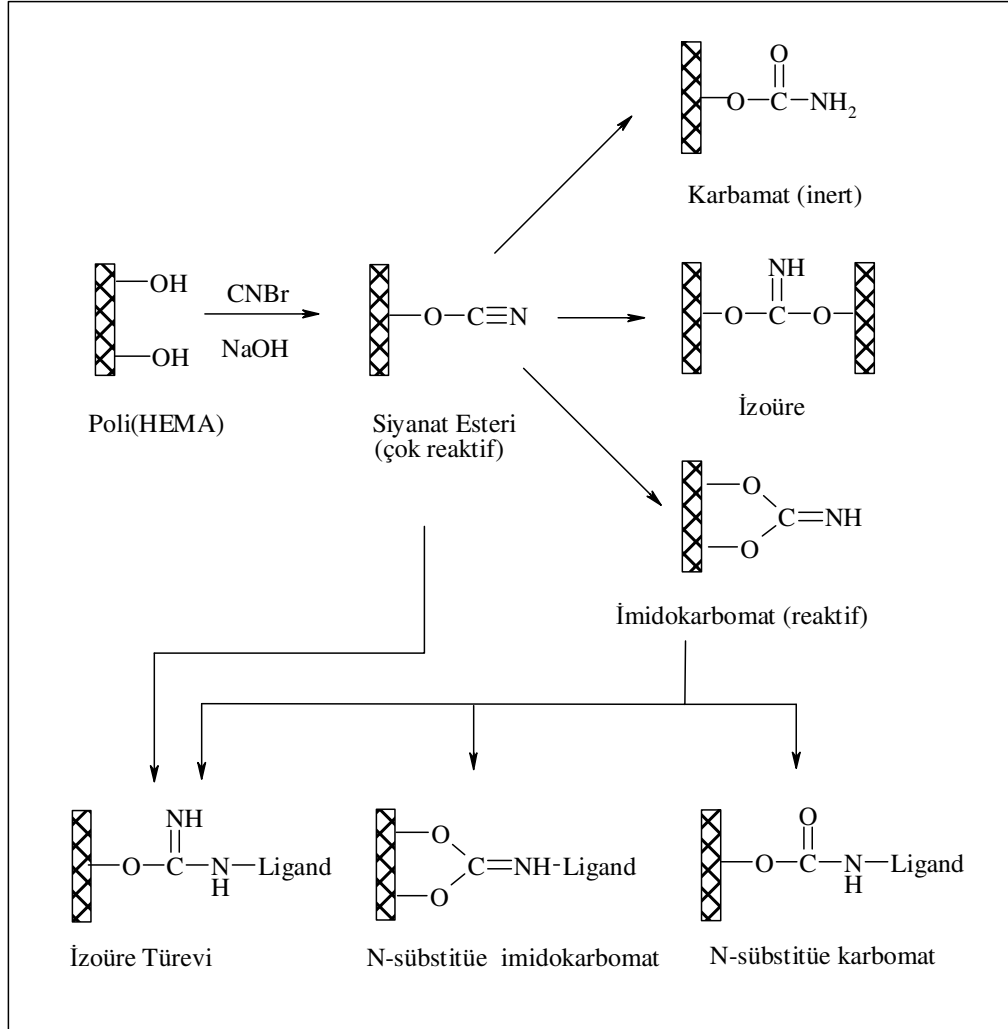
**Çizelge 4. 1.**Pıhtılaşma süreleri (saniye)

Deney	APTT	PT	CT	FT
Kontrol Plazma	27.8	12.2	15	14.1
Poli(HEMA)	26.2	12.5	16.6	12.1
Protein A takılı-Poli(HEMA)	29.3	12.4	16.4	18.3

#### 4.6. IgG Adsorpsiyonuna CNBr Derişiminin Etkisi

Poli(HEMA) kriyojelin hidroksil gruplarına protein A' yı kovalent olarak bağlamak amacıyla, aktivasyon ajanı olarak CNBr kullanılmıştır. Şekil 4.6' da Poli(HEMA)' nın CNBr ile aktivasyonu ve ligand bağlanması şematik olarak gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi aktivasyon sırasında önce ara ürün siyanat esterleri, daha sonra aktivasyon koşullarına göre son ürün olarak değişik oranlarda başlıca imidokarbomat, izoüre ve karbamat türevleri oluşur. Bu türevlerden karbamat inert olup bu grup üzerinden polimere ligand bağlanması mümkün değildir. Karbamat gibi izoürenin de yüzeyde varlığı istenmez. Çünkü izoüre kararsız bir yapıdır. Yüzeyin elektrostatik olarak yüklenmesine, iyon değiştirici gibi

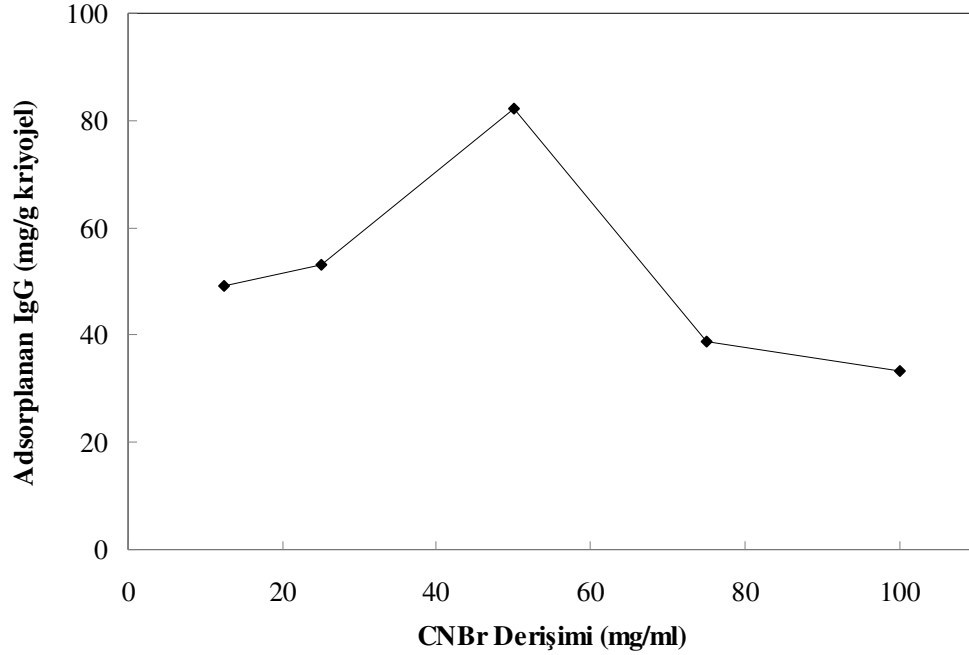
davranmasına yol açar. Bu da özellikle yüzeyin nonspesifik adsorpsiyonunu artırıcı bir unsurdur, istenmez. İmidokarbomat grubu ise reaktiftir ve ligand bağlanması bu grup üzerinden olur<sup>12</sup>.



**Şekil 4. 6.** Poli(HEMA) kriyojele CNBr aktivasyonu ile ligand bağlanması<sup>12</sup>

IgG adsorpsiyonuna CNBr derişiminin etkisini belirlemek için CNBr derişimi 10-100 mg/ml aralığında değiştirilmiştir. Şekil 4.7' de görüldüğü gibi artan CNBr derişimi ile IgG adsorpsiyon kapasitesi 50 mg/ml' ye kadar önce artmakta, daha sonra adsorpsiyon kapasitesi önemli miktarda azalmaktadır. Aktivasyon ajanının derişiminin artması, kriyojel üzerindeki ligand yoğunluğunu arttırmaktadır. Yüzeydeki ligand miktarı adsorpsiyon kapasitesi ile doğru orantılıdır. Ancak

yüzeydeki ligand miktarının aşırısı sterik engel ve liganda erişim problemlerine sebep olmaktadır.



**Şekil 4. 7.** IgG adsorpsiyonuna CNBr derişiminin etkisi. Protein A yükleme: 56 mg/g; Akış hızı: 0.5 ml/dk; IgG derişimi: 1.5 mg/ml; pH 7.4 fosfat tamponu; T: 25°C

Adsorpsiyon kapasitesi değerleri incelendiğinde maksimum IgG adsorpsiyonu 50 mg/ml CNBr derişiminde elde edilmiştir. Bu değer optimum CNBr derişim değeri olarak kabul edilmiş ve IgG adsorpsiyon dinamiklerinin belirlenmesinde 50 mg/ml CNBr derişimi ile aktive edilmiş kriyojeller kullanılmıştır.

#### **4.7. Protein A Derişiminin Etkisi**

Çizelge 4.2. Poli(HEMA) kriyojelde IgG adsorpsiyonu üzerine protein A derişiminin etkisini göstermektedir. Kriyojel yapısındaki süpermakrogözeneklerden ileri gelen yüzey alanı azalması ligand yoğunluğunun artmasıyla telafi edilmektedir. Protein A yüzey yoğunluğu yani birim kütledeki protein A molekülleri sayısı arttığında Poli(HEMA) kriyojel üzerine adsorplanan IgG miktarı önce artmakta, sonra neredeyse en yüksek değere ulaşmaktadır. Maksimum IgG adsorpsiyon

kapasitesi ise 83.2 mg/g dir. Protein A derişiminin artmasının IgG adsorpsiyonunu arttırması beklenir. Ancak olası geometrik (yani sterik) etkiden dolayı bu durum her zaman avantajlı olmayabilir.

Protein A her biri değişik, memelilerin immünoglobülinlerin Fc bölgesine bağlanabilen beş benzer domain içerir. Her bir çözünür protein A molekülü 2 molekül IgG ye bağlanabilir. Sterik engel ikiden fazla IgG molekülünün immobilize protein A molekülüne bağlanmasını engeller. Protein A yoğunluğu daha çok olursa sterik engel nedeniyle IgG molekülleri bu reseptörlere ulaşamaz. Çizelge 4.2. ayrıca farklı protein A derişimine sahip Poli(HEMA) kriyojel üzerine adsorplanan IgG/protein A ağırlık oranını göstermektedir. Çalışan tüm protein A yüzey yoğunluğu için bu oran 2.0 civarındadır. Bu aralık literatürlerle uyumludur. Sedimentasyon verileri ve yüzey gerilim ölçümleri kullanılarak 1:2 protein A-IgG bağlanma stokiyometrisi elde edilmiştir<sup>198,199</sup>. Ayrıca insan IgG' sinin protein A' ya bağlanma oranı 3.3: 1 olarak bildirilmiştir<sup>200</sup>.

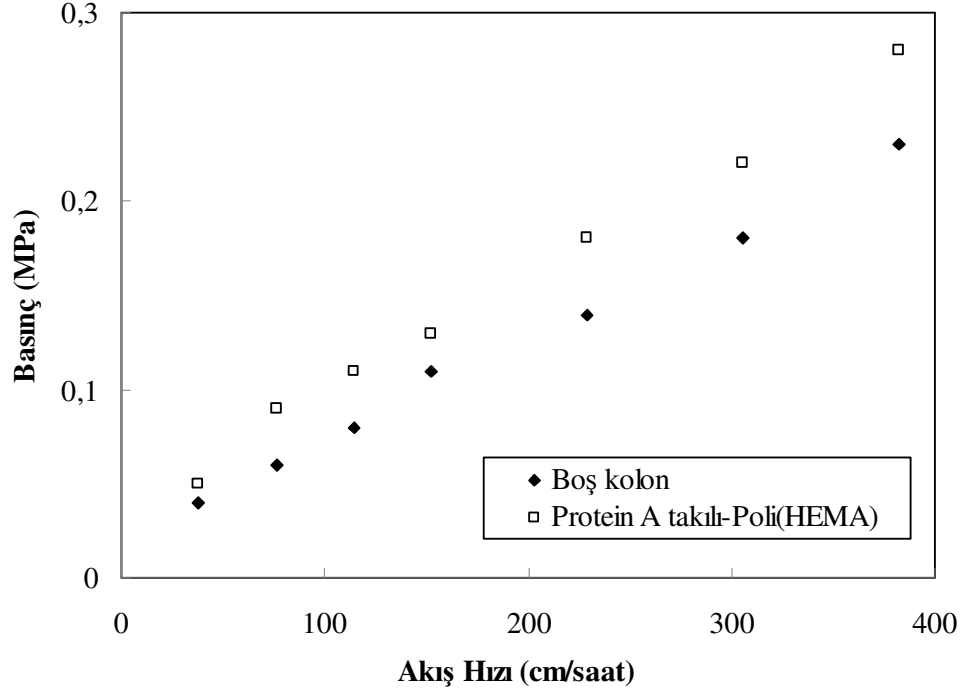
**Çizelge 4. 2.** IgG adsorpsiyonu üzerine protein A derişiminin etkisi: IgG derişimi; 2.0 mg/ml; fosfat tamponu (pH 7.4); T: 25°C.

Yüklenen protein A miktarı (mg/g)	Adsorbe olmuş IgG miktarı (mg/g)	IgG/protein A ağırlık oranı
25.2	33.5	1.32
26.9	38.9	1.44
28.7	49.3	1.72
29.8	52.9	1.77
56.0	83.2	1.49

#### 4.8. Basınç Azalması

Bir sistemdeki sıvıyı sürüklemek için gereken basınç azalması olabildiğince az olmalıdır. Poli(HEMA) kriyojel kolonuyla geri basınç deneyleri denge ortamı olarak su içinde yapılmıştır. Lineer akış hızları 40-382 cm/saat arasında bulunmuştur (Şekil 4.8). Her bir akış hızı için 1 dakikalığına kolondan su geçirilmiştir. Büyük ve

birbirine oldukça bağımlı makrogözeneklerin varlığından dolayı poli(HEMA) kriyojelin sıvı akış direnci çok düşüktür. Poli(HEMA) kriyojel kolonun geri basıncının düşük olması gözenekli yapıda birbirine bağımlı makrogözeneklerin büyük olduğunu göstermektedir.

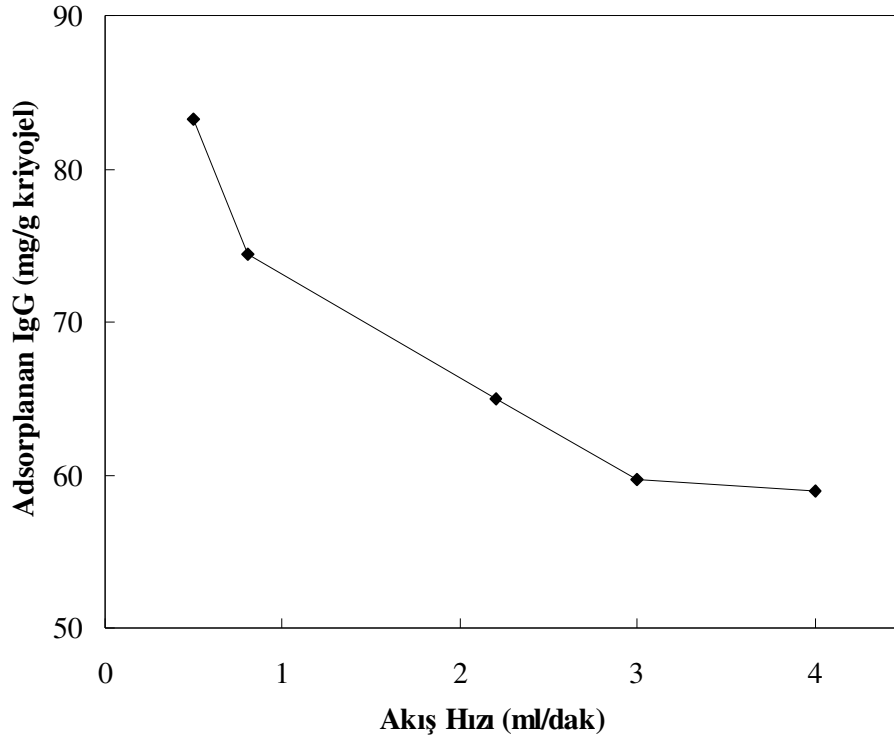


Şekil 4. 8. Değişik akış hızlarındaki basınç azalması

#### 4.9. Akış Hızının Etkisi

Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojel kolonunda akış hızının artmasıyla adsorbe olmuş IgG miktarı azalması Şekil 4.9'da verilmiştir. Akış hızının 0.5 ml/dak' dan 4 ml/dak' ya artmasıyla adsorpsiyon kapasitesi 83.2 mg/g' den 58.9 mg/g' ye düşmektedir. Akış hızının artması ile kolondan geçen protein çözelti hacmi artmakta ve bundan dolayı proteinin kriyojel kolonundan alıkonma zamanı azalmaktadır. Akış hızı azaldığında kolonun temas süresi uzar. Bu nedenle IgG moleküllerinin kriyojel gözenek duvarlarına yayılması için ve protein A' ya bağlanmak için daha çok zaman alacağından daha iyi bir IgG adsorpsiyon kapasitesi elde edilir. Ayrıca kolonun çalışması için kriyojel sürekli olarak taze bir IgG çözeltisiyle temastadır. Sonuç olarak kolon içindeki protein A takılı-Poli(HEMA)

kriyojeli tabakasıyla temasta olan çözelti içindeki IgG derişimi nispeten sabittir. Ayrıca kriyojel yapısı içindeki makrogözenekler açık, birbirine bağı ve geniş bir kanal oluşturacak şekildedir. Hareketli IgG fazı bu kanallardan geçerek IgG moleküllerini konveksiyon yoluyla aktif bağlanma merkezlerine (yani protein A moleküllerine) taşır. Bu sonuç geleneksel dolgulu kolonlarından çok daha hızlı bir şekilde hareketli IgG fazı ile sabit Poli(HEMA) kriyojel fazı arasında kütle aktarılmasını sağlar<sup>201,202</sup>.

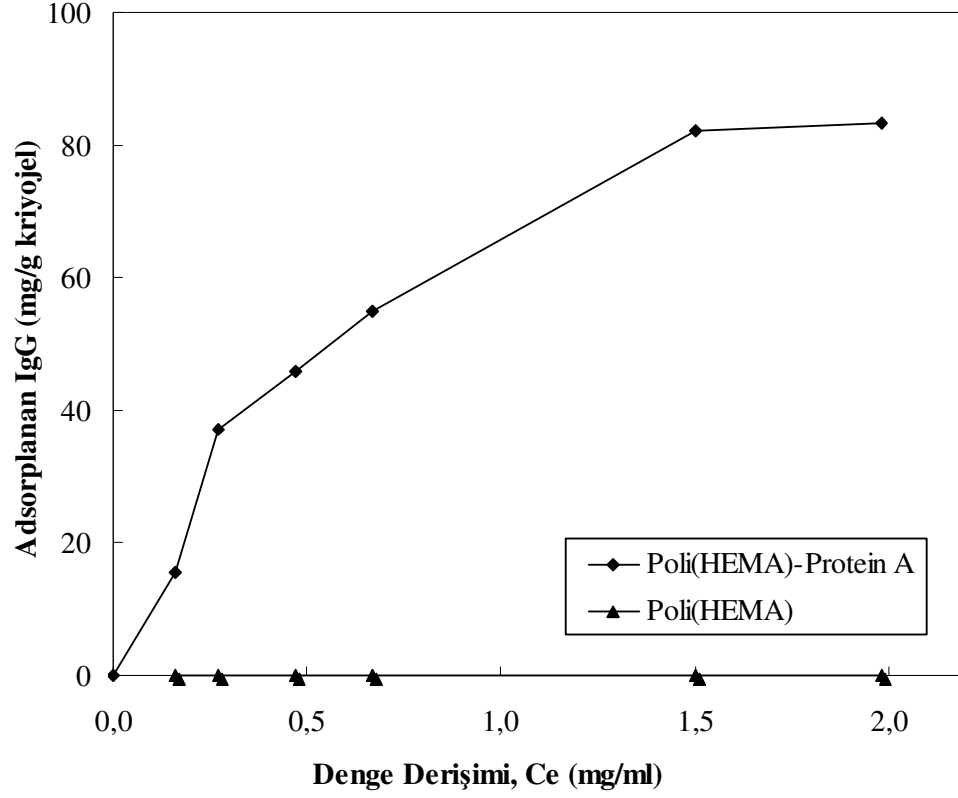


**Şekil 4. 9.** IgG adsorpsiyonuna akış hızının etkisi. Protein A yükleme: 56 mg/g; IgG derişimi: 1.5 mg/ml; pH 7.4 fosfat tamponu; T: 25°C

#### 4.10. IgG Başlangıç Derişiminin Etkisi

IgG derişiminin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, çözeltideki IgG derişimi 0.1-2.0 mg/ml aralığında değiştirilmiştir (Şekil 4.10). Şekilde görüldüğü gibi, çözeltideki IgG derişiminin artmasıyla, birim kriyojel başına adsorplanan IgG miktarı artmaktadır. Maksimum IgG adsorpsiyonu 1.5 mg/ml derişimde gerçekleşmiştir. Artan IgG derişimi çözelti ile kriyojel arasındaki sürücü

kuvveti (derişim gradyentini) artırmaktadır. Bundan dolayı artan IgG derişimi ile birlikte adsorpsiyon kapasitesi artmaktadır. Daha sonra yüzeydeki aktif bölgelerin dolmasıyla birlikte dengeye ulaşmaktadır.



**Şekil 4. 10.** IgG adsorpsiyonuna IgG başlangıç derişiminin etkisi. Protein A yüklemesi: 56 mg/g; Akış hızı: 0.5 ml/dk; pH 7.4 fosfat tamponu; T: 25°C

#### 4.11. Adsorpsiyon İzotermi

Moleküllerin adsorbentle etkileşimini karakterize etmek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri uygulanmıştır. Adsorpsiyon izotermi denge halinde çözeltideki iyonların derişimi ile katı faza adsorplanan iyonların miktarı arasındaki bağlantıyı tanımlar<sup>203</sup>.

Langmuir adsorpsiyon modeli moleküllerin belirli sayıda, her biri yalnızca tek molekül bağlayabilen bölgelere bağlandığını varsayar. Bu noktaların enerji



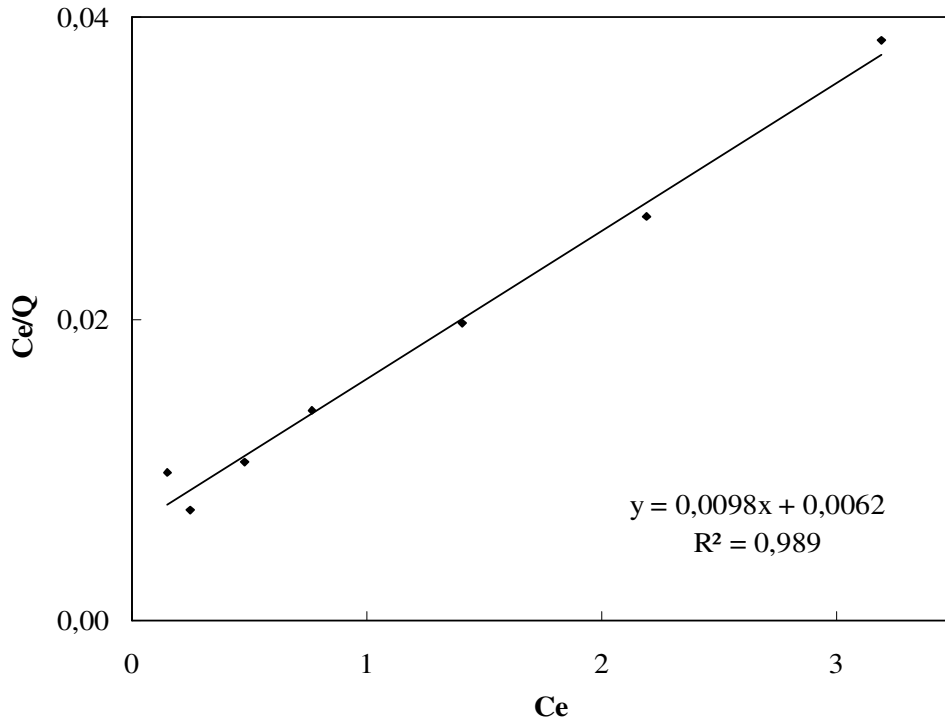
bakımından da eşdeğer olduğu ve komşu bölgelerle adsorplanan moleküller arasında etkileşim olmadığı varsayılır<sup>204</sup>. Langmuir adsorpsiyon izotermi Eşitlik 4.1. ile tanımlanır. Denge verilerinin eşitliğe uygulanmasıyla doğrusal bir grafik elde edilmesi, aşağıdaki eşitlikle tanımlanan Langmuir modelinin bu sistemlere uygulanabileceğini göstermektedir:

$$Q=Q_{\max} \cdot b \cdot C_{eq} / (1+bC_{eq}) \quad (4.1)$$

Eşitlikte Q, adsorbente bağlanan IgG miktarı (mg/g); C<sub>eq</sub>, çözültedeki denge IgG derişimi (mg/ml); b, Langmuir sabiti (ml/mg) ve Q<sub>max</sub>, adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) göstermektedir. Eşitlik doğrusallaştırılırsa aşağıdaki denklem elde edilir.

$$C_{eq}/Q = 1/(Q_{\max} \cdot b) + C_{eq}/Q_{\max} \quad (4.2)$$

IgG adsorpsiyonu için deneysel verilerin grafiğı Şekil 4.11’de verilmiştir.



**Şekil 4. 11.** IgG'nin Langmuir adsorpsiyon izotermi. Protein A yükleme: 56 mg/g; Akış hızı: 0.5 ml/dk; IgG derişimi: 1.5 mg/ml; pH 7.4 fosfat tamponu; T: 25°C

Elde edilen korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0.989 olarak bulunmuştur. Langmuir adsorpsiyon modelinin bu afinite adsorbent sistemine uygulanabilir olduğu görülmüştür. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi ( $Q_{max}$ ) ve Langmuir sabiti sırasıyla 102.1 mg/g, 1.58 ml/mg olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3).

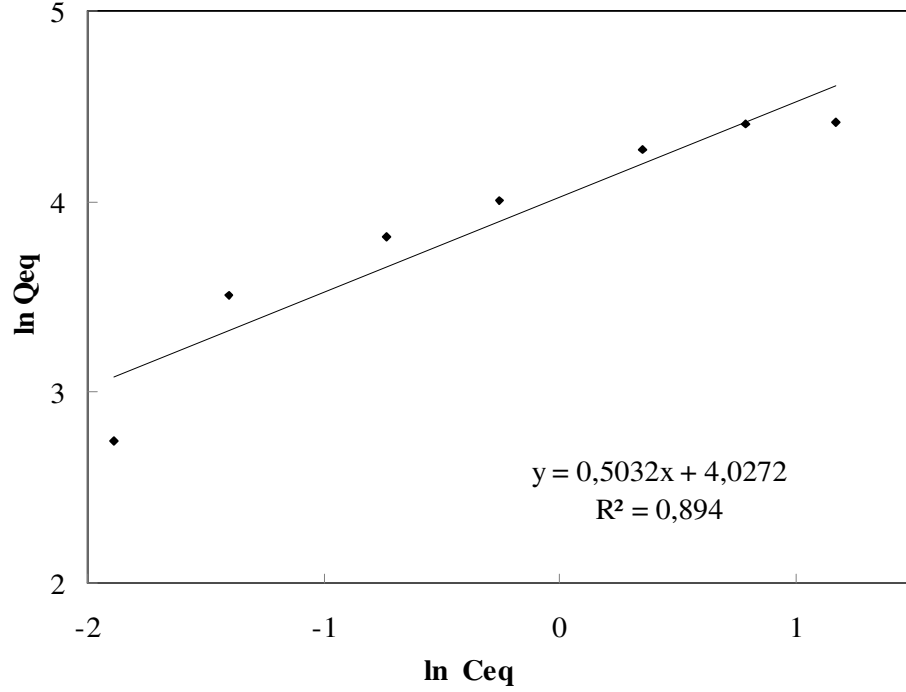
Freundlich izotermi adsorpsiyon dengesini tanımlayan eşitliklerdendir<sup>205</sup>. Freundlich eşitliği adsorbente tanecik adsorpsiyon enerjisinin komşu bağlanma bölgelerinin dolu olup olmadığına bağlı olarak değiştiğini varsayar. Deneysel eşitlik aşağıdaki şekildedir;

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

Bu eşitlikte  $Q_{eq}$  adsorpsiyon miktarı (mg/g),  $C_{eq}$  çözeltideki adsorbent derişimi (mg/l) dir.  $K_F$  ve  $1/n$  sırasıyla adsorpsiyon kapasitesini ve adsorpsiyon şiddetini gösteren Freundlich sabitleridir. Bu eşitlik her iki tarafın logaritması alınarak daha kullanışlı hale getirilebilir:

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

Deneysel verilerin Freundlich modeline uygunluğu da incelenmiştir. Bu amaçla  $\ln C_{eq}$ 'nin  $\ln Q_{eq}$ 'ye karşı grafiği çizilmiştir (Şekil 4.12). Grafiğin doğrusal çıkması Freundlich adsorpsiyon izoterminin uygulanabilirliğini gösterir. Adsorpsiyon sabitleri kesim noktası ve eğimden hesaplanabilir. Freundlich sabitleri  $K_F$  değeri 56.1 ve  $n$  değeri 1.98 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3).  $K_F$  ve  $n$  değerleri sulu ortamdan IgG' nin kolayca ayrılabilirdiğini ve dolayısıyla tercihli adsorpsiyonu gösterir.  $K_F$  değeri adsorbentin adsorpsiyon kapasitesinin bir göstergesidir; eğim,  $1/n$ , adsorpsiyon kapasitesine derişimin etkisini göstermektedir ve adsorpsiyon şiddetini ifade eder. Görüldüğü üzere  $n$  değerleri adsorpsiyon işlemi için yeterince yüksektir.



**Şekil 4. 12.** IgG'nin Freundlich adsorpsiyon izotermi. Protein A yükleme: 56 mg/g; Akış hızı: 0.5 ml/dk; IgG derişimi: 1.5 mg/ml; pH 7.4 fosfat tamponu; T: 25°C

Langmuir ve Freundlich izotermi için hesaplanan değerler, Çizelge 4.3' te verilmiştir. Korelasyon katsayıları, adsorpsiyon işleminin Langmuir modeli ile tanımlanabileceğini göstermektedir.

**Çizelge 4. 3.** Langmuir ve Freundlich izotermi adsorpsiyon katsayıları

Langmuir Adsorpsiyon İzotermi	Freundlich Adsorpsiyon İzotermi
$Q_{\max} = 102.1 \text{ mg/g}$	$K_F = 56.1$
$b = 1.58 \text{ ml/mg}$	$n = 1.98$
$R^2 = 0.989$	$R^2 = 0.894$

Çizelge 4.4' te Poli(HEMA) kriyojelin maksimum adsorpsiyon kapasitesi ( $Q_{\max}$ ) ile ticari olarak bulunan adsorbentler gibi bazı diğer afinite adsorbentlerin maksimum adsorpsiyon kapasitelerinin bir karşılaştırılması verilmiştir. Protein A takılı-Poli(HEMA)'nın adsorpsiyon kapasitesi diğer adsorbentlerle karşılaştırılabilir düzeydedir. IgG adsorpsiyon kapasitelerinin farklı olması yapı, reaktif fonksiyonel

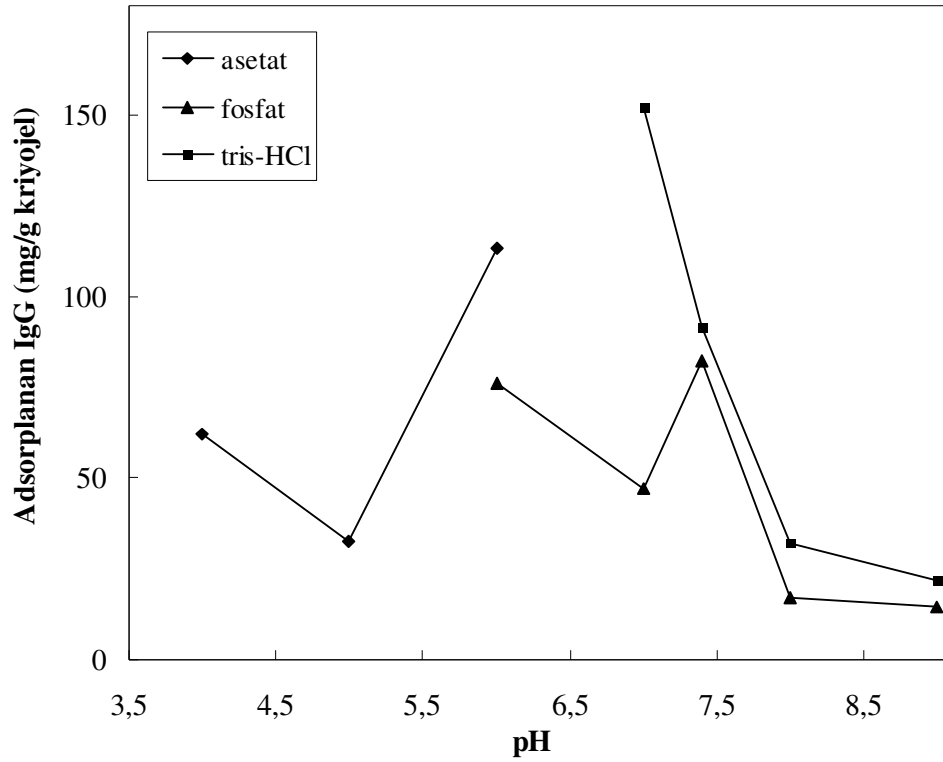
grupları, ligand miktarı, gözeneklik, gözenek boyutu, gözenek boyutu dağılımı ve erişilebilir yüzey alanı gibi adsorbent özelliklerinden ileri gelmektedir.

**Çizelge 4. 4.** Değişik adsorbentlerin IgG'yi adsorplama kapasitelerinin karşılaştırılması

Adsorbent	Ligand	Q <sub>max</sub> (mg/g)	Kaynak
Selüloz	Protein A	11.7	206
Selüloz nanofiber	Protein A	18.0	207
Polimetilmetakrilat	Cu <sup>2+</sup>	54.3	208
Poli(HEMA)	L-histidin	44.8	209
Poli(HEMA)	Metakriolamidohistidin	73.8	210
Eupergit, Affigel	Protein A	20.1	211
Poli(HEMA)	Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	79.6	212
Poli(HEMA)	Protein A	24.0	213
Poli(kaprolaktam)	Protein A	28.3	214
Poli(etilen)	Fenilalanin	50.0	215
Sepharose 4B	L-Histidin	0.23	216
Poli(etilen vinil alkol)	L-Histidin	77.7	217
Polisülfon	Protein A	8.8	218
Sartobind	Protein A	0.51	219
Polimetilmetakrilat	Protein A/G	6.6	220
Poli(vinil alkol)	Protein A	13.2	221
Sepharose 6B	3-Aminofenol 4-Amino-1-naftol	52.0	222
Poli(HEMA)	Concanavalin A	69.4	223
Sepharose CL 6B	Biomimetik ligand	7.0	224
Sepharose 4B	Biomimetik ligand	25.0	225
Selüloz	4-Merkapto etil pridin	30	226
Poli(etilen vinil alkol)	Merkapto metil imidazol	16	227
Selüloz	4-Merkapto etil pridin sulfonik asit	30	228
Poli(AAm-AGE)	Concanavalin A	25.6	229
Agaroz	Bisiklik heteroatomik ligand	29.2	230
<b>Poli(HEMA)</b>	<b>Protein A</b>	<b>88.1</b>	<b>Bu çalışma</b>

#### 4.12. IgG Adsorpsiyonuna pH Etkisi

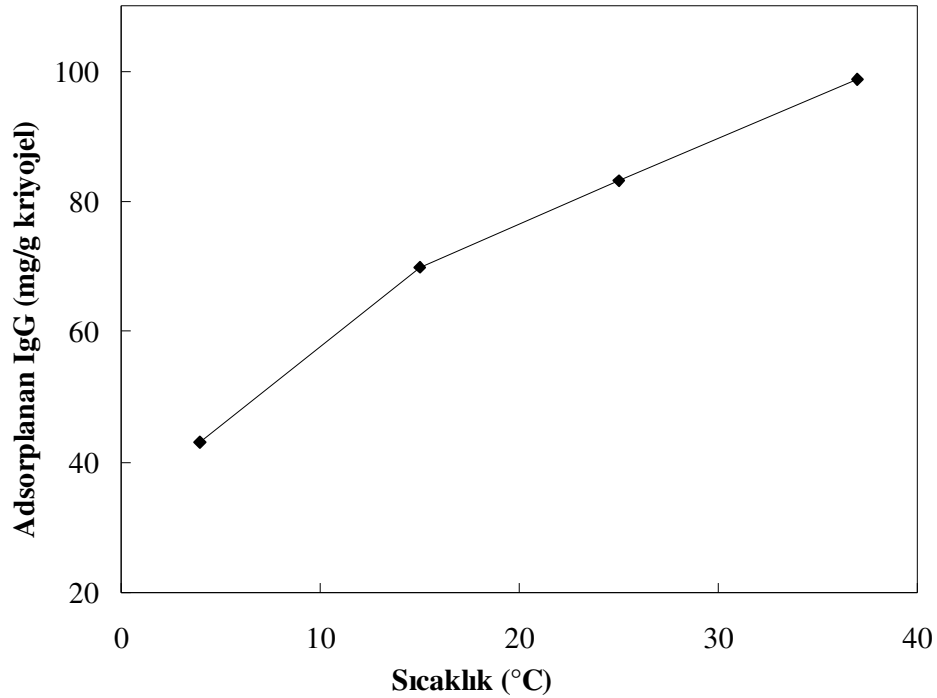
IgG adsorpsiyon kapasitesine pH'nın etkisini belirlemek amacıyla çözelti pH'sı 4.0-9.0 aralığında farklı tampon çözeltileri kullanılarak değiştirilmiştir. Çözelti pH'sı pH 4.0-6.0 için 25 mM asetat, 6.0-9.0 için 25 mM fosfat ve 7.0-9.0 için 25 mM Tris-HCl tamponları kullanılmıştır. IgG adsorpsiyonunun pH ile değişimi Şekil 4.13'te verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi, maksimum IgG adsorpsiyonu pH 7.0 Tris-HCl tamponunda gözlenmiştir. Bu durum, IgG molekülünün protein A ligand ile etkileşimi için en uygun konformasyonuna Tris-HCl tamponunda (pH 7.0) sahip olması ile açıklanabilir.



Şekil 4. 13. IgG adsorpsiyonuna pH etkisi. Protein A yükleme: 56 mg/g; Akış hızı: 0.5 ml/dk; IgG derişimi: 1.5 mg/ml; T: 25°C.

#### 4.13. Sıcaklık Etkisi

Sıcaklığın IgG adsorpsiyon kapasitesine etkisi Şekil 4.14' te verilmiştir. Tüm sıcaklıklarda Van der Waals kuvvetinin etkisiyle oluşan ve spesifik olmayan IgG adsorpsiyonu (0.38 mg/g) çok düşüktür. Poli(HEMA) kriyojelin üstüne IgG' nin fiziksel adsorpsiyonunda önemli bir sıcaklık etkisi görülmemiştir. Ancak, protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin denge adsorpsiyonu sıcaklıktan oldukça etkilenmiş ve 37°C' de (98.8 mg/g) maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesi gözlenmiştir. Sıcaklığın 4 °C' den 37 °C' ye artmasıyla birlikte adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık % 125 artmıştır. Bu durum protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelinin IgG bağlanma etkileşiminin hidrofobik etkileşimlerde beklediği gibi entropi tarafından oluşturulmadığını ve önceki sonuçlarla uyumlu olduğunu gösterir<sup>231</sup>. Protein A-IgG etkileşimlerinde hidrofobik kuvvetler baskın olmaktadır. Dolayısıyla sıcaklığın artmasıyla IgG adsorpsiyonunun artması ve genellikle sıcaklığın düşmesiyle protein elüsyonu artmaktadır. Hidrofobik etkileşimler üzerinden oluşan Van der Waals çekme kuvveti, sıcaklığın artmasıyla etkili olmaktadır.



**Şekil 4. 14.** IgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Protein A yükleme: 56 mg/g; Akış hızı: 0.5 ml/dk; IgG derişimi: 1.5 mg/ml; pH 7.4 fosfat tamponu

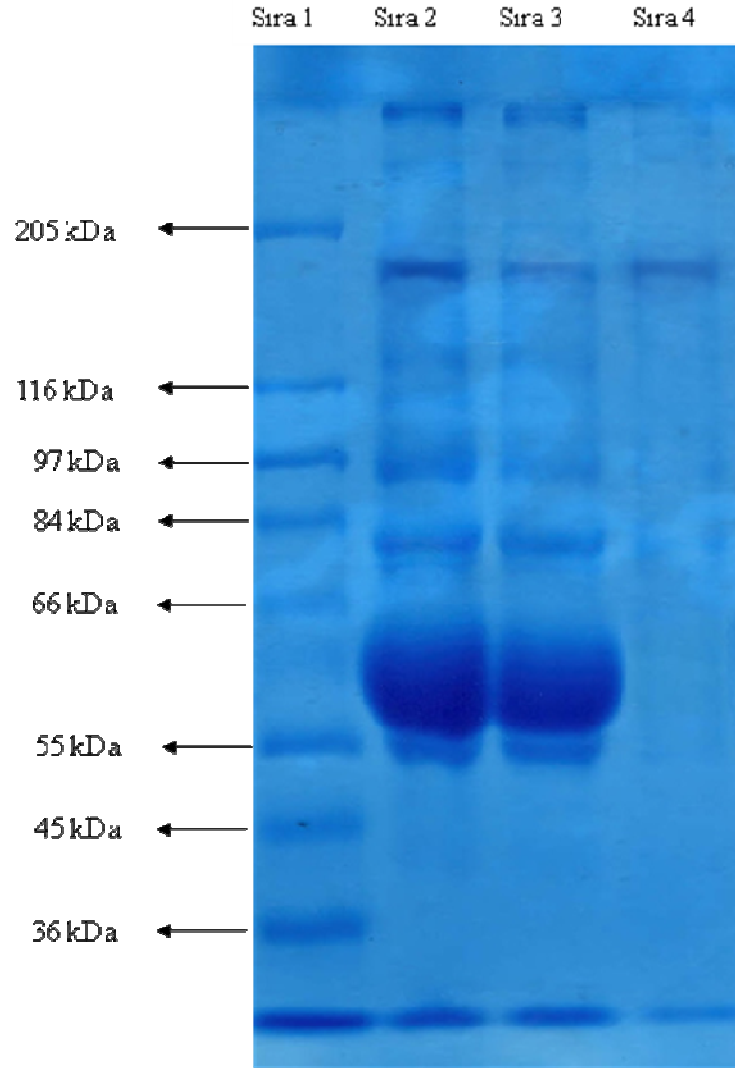
#### 4.14. Kan Plazmasından IgG Saflaştırma

İnsan plazmasından IgG adsorpsiyon değerleri Çizelge 4.5' te gösterilmiştir. Görüldüğü gibi fosfat tamponuyla seyreltilen insan kanından elde edilen IgG adsorpsiyon kapasitesi düşüktür. Fakat seyreltilmemiş kan için protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelinin IgG adsorpsiyonu yüksektir (88.1 mg/g' a kadar). Bağlanan ve elue edilen proteinin bileşimi SDS-PAGE ile ölçülmüştür. Proteinin yaklaşık % 85' nin IgG olması albumin gibi diğer proteinlerin çok miktarda varlığına rağmen makrogözenekli adsorbentin spesifikliğin yüksek olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4. 5.** İnsan plazmasından IgG adsorpsiyonu: Seyrelmeden önce IgG konsantrasyonu: 14.8 mg/ml

Seyrelme Ajanı	Adsorpsiyon Kapasitesi (mg/g)
Seyreltilmemiş plazma	88.1 ± 0.97
Seyreltilmiş plazma (seyreltme oranı: 1/2, fosfat tamponu, pH 7.4)	63.9 ± 1.20
Seyreltilmiş plazma (seyreltme oranı: 1/10, fosfat tamponu, pH 7.4)	9.4 ± 0.45

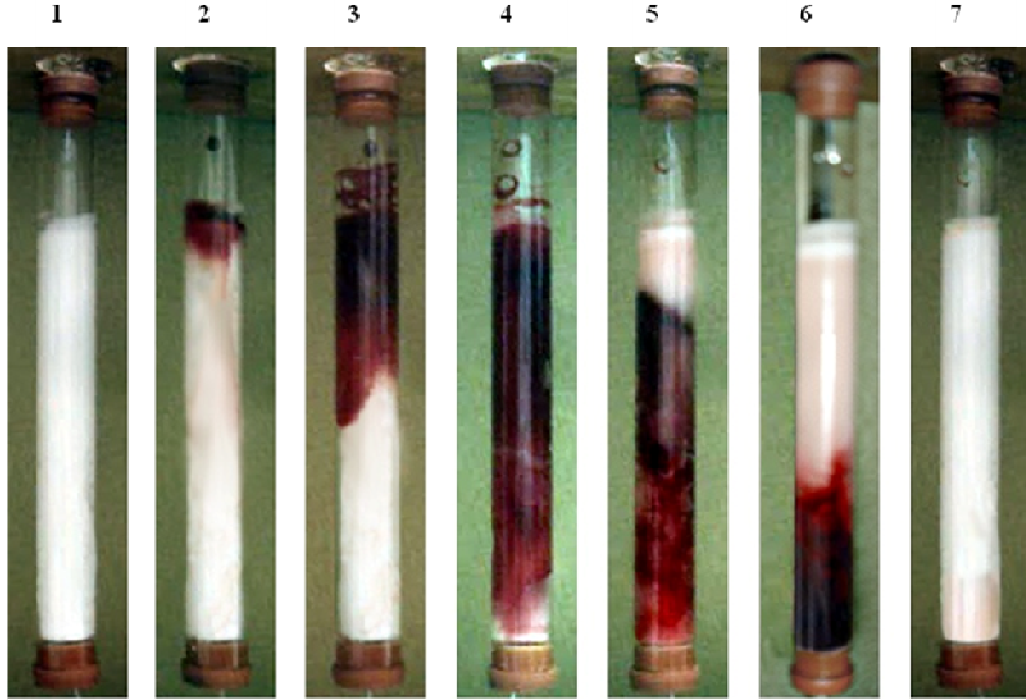
Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelden elue edilen IgG' nin saflığı SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Şekil 4.15' te görüldüğü gibi Sıra 2' de görülen IgG, Sıra 3' te protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelinden geçtikten sonra hemen hemen kaybolmuştur. Sıra 4' te ise saflaştırılan IgG görülmektedir. Saflaştırılan IgG' nin saflığı % 95.3-% 96.7 aralığında bulunmuştur. İnsan plazmasından IgG' nin geri kazanılması % 80.7 olarak bulunmuştur.



**Şekil 4. 15.** SDS-PAGE ile saflaştırma, Sıra 1. Biomarker (Sigma), Sıra 2. IgG saflaştırılmadan önceki 1/10 serum, Sıra 3. IgG saflaştırıldıktan sonraki 1/10 serum, Sıra 4. Desorpsiyon edilen örnek. Her sırada uygulanan örnek miktarı eşittir.

Afinite saflaştırmada kriyojel kolonun üstünlüğünü göstermek için, kan direk protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelinden geçirilmiştir. Bu işlem için kan EDTA-antikuagulan tüplerinde toplanmıştır. Pıhtılaşmamış kan (2 ml) 1 ml/dak akış hızıyla kolondan geçirilmiş ve 50 ml izotonik tampon ile yıkanmıştır. Kanın protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelden geçişi sırasındaki işlemin fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.16).





**Şekil 4. 16.** Kriyojel kolonundan tam kan geçişi. Kolon 1: uygulamadan önceki kolon; Kolon 2-6: işlem esnasındaki kolon; Kolon 7: uygulamadan sonraki kolon; Kan miktarı: 2 ml; Akış hızı: 1.0 ml/dak

Kan 2  $\mu\text{m}$ ' den 20  $\mu\text{m}$ ' ye kadar farklı boyutları olan hücrelerden meydana gelmektedir. Bu yüzden kan akışının protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelinden tıkanmaya sebep olmadan homojen bir şekilde izotonik şartlarda kolona uygulandığı gözlenmiştir.

Kriyojellerin süpermakrogözenekli yapısı kanın içerdiği tüm kan hücrelerinin doğrudan ilerlemesine olanak sağlamaktadır<sup>232</sup>. Kriyojelin makrogözenekli boyutu kan hücrelerinin kolonda engellenmeden ilerlemesine olanaklı kılmaktadır.

#### 4.15. FPLC Çalışması

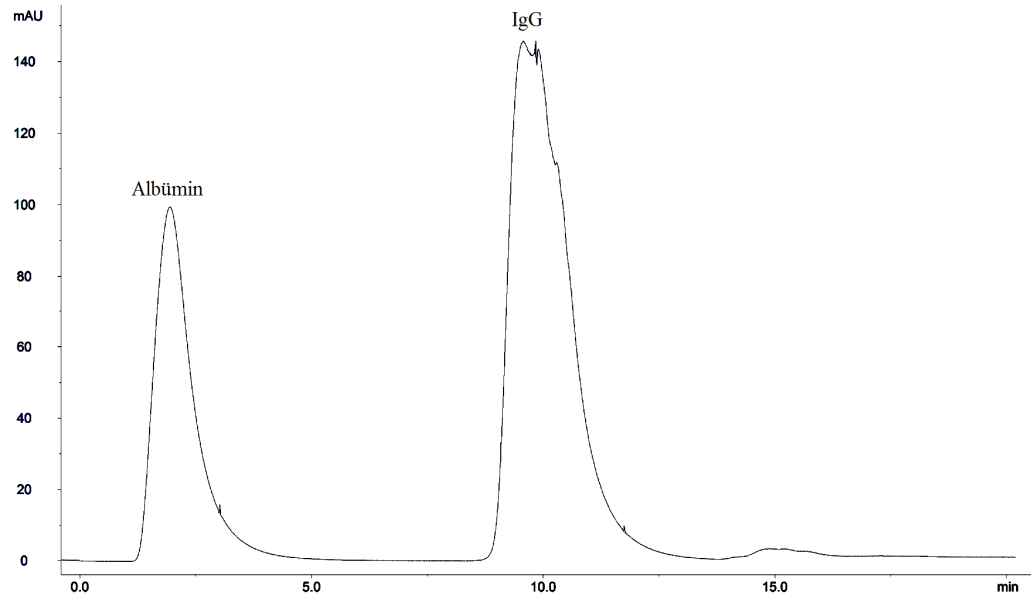
Şekil 4.17' de görüldüğü gibi protein karışımından HSA ve IgG ayrılması sırasıyla 1.94 dak ve 9.58 dak olarak bulunmuştur. Şekil 4.18' de görüldüğü gibi insan plazmasından HSA ve IgG ayrılması ise sırasıyla 1.84 dak ve 9.54 dak olarak

bulunmuştur.  $t_R$ ,  $N$ ,  $k'$ ,  $\alpha$ ,  $R_S$  değerleri Çizelge 4.6' da verilmiştir. İkili protein karışımı ve insan plazması için hesaplanan  $R_S$  değerleri sırasıyla 2.28 ve 2.63 olarak hesaplanmıştır.

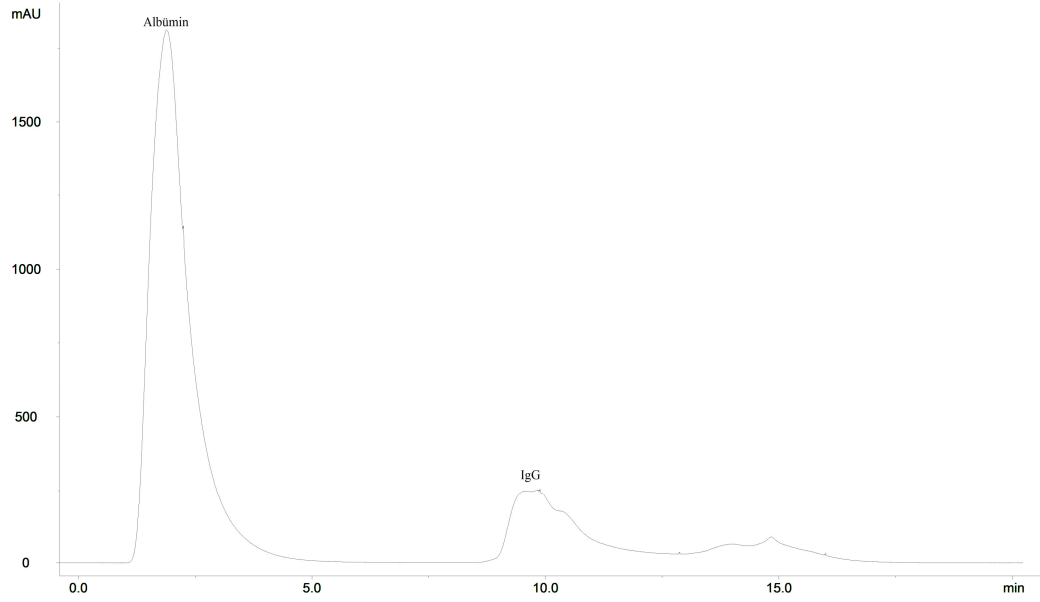
Bir kromatografi sistemindeki iki pikin birbirinden iyice ayrılması için  $R_S$  değerinin 1'den yüksek olması gerektiğinden HSA ve IgG ayırma değerleri sonuçlarının iyi olduğu kabul edilebilir.

**Çizelge 4. 6.** Kromatografik ayırma verileri

		$t_R$	$N$	$k'$	$\alpha$	$R_S$
Protein karışımından	IgG	9.58	130.35	6.85	-	-
	HSA	1.94	10.95	0.59	11.61	2.28
İnsan kan serumundan	IgG	9.54	164.64	6.82	-	-
	HSA	1.89	14.71	0.55	12.4	2.63



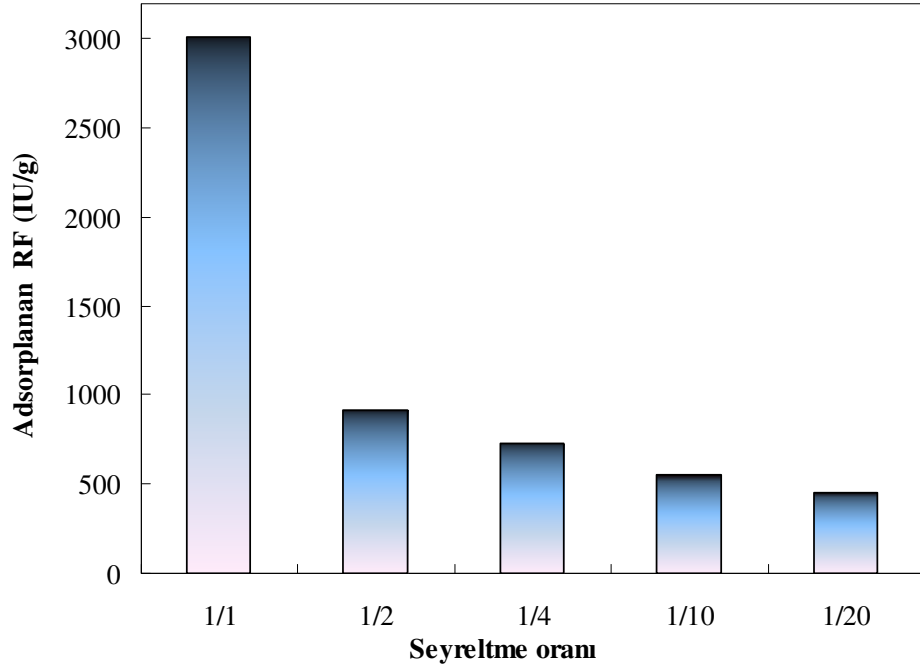
**Şekil 4. 17.** HSA ve IgG' nin protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelinde FPLC ile ayrılması. Akış hızı: 3.0 ml/dak; Protein konsantrasyonu; 0.5 mg/ml; Dalga boyu; 280 nm



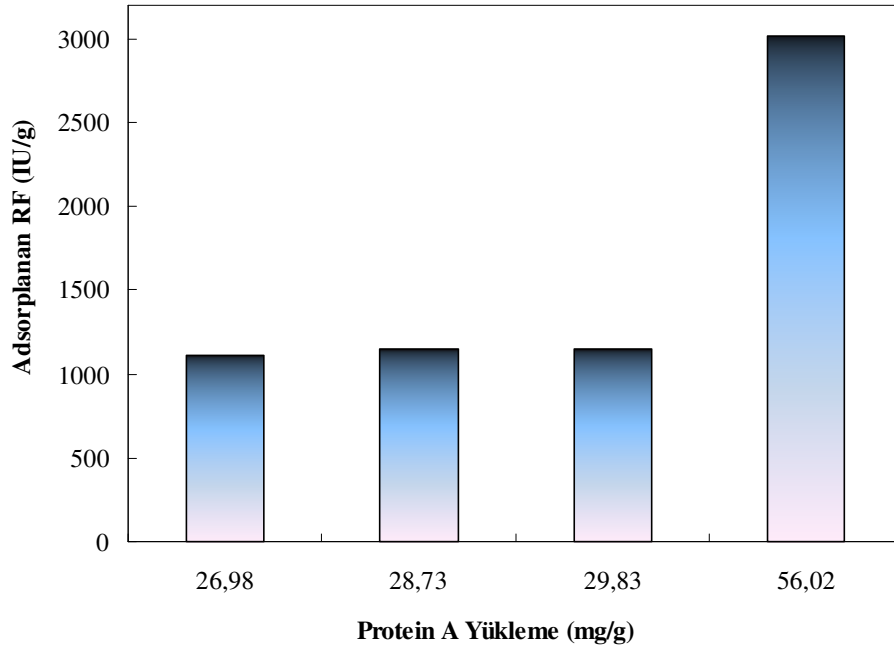
**Şekil 4. 18.** İnsan kan serumunda HSA ve IgG nin protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelinde FPLC ile ayrılması. Akış hızı: 3.0 ml/dak; Dalga boyu: 280 nm

#### **4.16. Romatoid Artritli Plazmadan Antikor Uzaklaştırma**

Romatoid artritli kanda romatoid faktör değişimi Şekil 4.19' da gösterilmiştir. Görüldüğü gibi adsorplanan romatoid faktör seyreltilmemiş kanda gözlenmiştir. Şekil 4.20' de ise farklı derişimlerde immobilize olan protein A miktarının adsorplanan romatoid faktöre etkisi verilmektedir. İmmobilize olan protein A miktarı artıkça adsorplanan romatoid faktörün de artığı gözlenmiştir.



**Şekil 4. 19.** RF başlangıç derişiminin etkisi. Protein A immobilizasyonu: 5.6 mg/g; hacim: 10 ml; polimer: 0.11 g

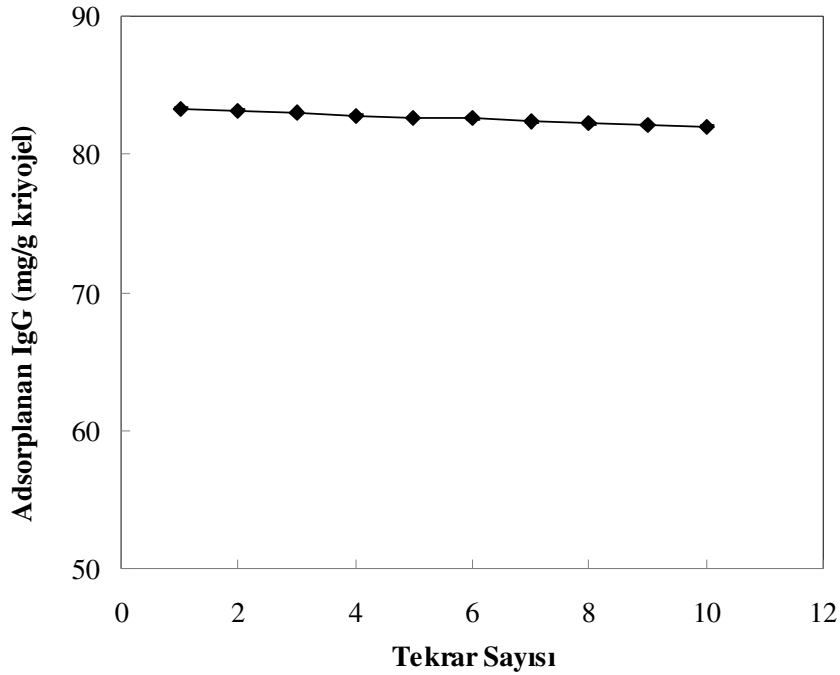


**Şekil 4. 20.** Bağlanan protein A miktarının adsorplanan romatoid faktöre etkisi. Hacim: 10 ml; polimer: 0.11 g

#### 4.17. Kriyojelin Tekrar Kullanılabilirliği

Tekrar kullanılabilirlik afinite adsorbentleri için çok önemlidir. Bir test sisteminin dizaynında afinite adsorbentin kimyasal kararlılığına dikkat edilmelidir<sup>233</sup>. Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin kararlılığını ve tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için kriyojel kolonu 10 kez kullanılmıştır. Sterilizasyondan sonra bir adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünde kriyojel 50 mM NaOH çözeltisi ile 30 dakika yıkanmıştır. Daha sonra kriyojel saf su ile 30 dakika yıkanıp, sonraki adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü için 25 mM fosfat tamponu (pH 7.4) ile dengeye getirilmiştir. Sonuçlardan görüldüğü gibi adsorbe olmuş IgG' nin yaklaşık % 95'i desorbe olmaktadır. Şekil 4.21' de görüldüğü gibi kriyojelin adsorpsiyon kapasite değerleri hemen hemen sabit kalmış ve değişmemiştir.

Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojeli tekrar kullanılabilirlik ve kararlılığıyla iyi bir performans göstermiştir.



**Şekil 4. 21.** Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin tekrar kullanılabilirliği. Protein A yüklemesi: 56 mg/g; Akış hızı: 0.5 ml/dk; IgG derişimi: 1.5 mg/ml; pH 7.4 fosfat tamponu; T: 25°C

## 5. SONUÇLAR

- ✓ Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojeller, çapraz-bağlı ve hidrofilik yapıda matrislerdir. Poli(HEMA) kriyojeli için makrogözenek miktarı % 71.6 olarak bulunmuştur. Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojel için ise makrogözenek miktarının % 64.8 olduğu bulunmuştur.
- ✓ Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin denge şişme oranı ise sırasıyla 8.56 ve 7.74 g H<sub>2</sub>O/g polimer olarak bulunmuştur.
- ✓ Poli(HEMA) kriyojel opak, süngerimsi ve esnek bir yapıya sahiptir. Gözeneklerin içinde biriken suyu uzaklaştırmak için kriyojel el ile kolaylıkla sıkıştırılabilir. Kriyojelin sıkıştırılmış parçası suya daldırıldığında suda ıslanır ve 1-2 saniye içinde orijinal büyüklük ve şeklini alır.
- ✓ SEM görüntülerinden görüldüğü gibi Poli(HEMA) kriyojel, gözenekli olmayan ve ince polimer duvarlara ve hareketli fazın akması için kanal oluşturan büyük, sürekli ve birbirine bağlı (10-200 µm çapındaki) gözeneklere sahiptir. Bu gözenekler nedeniyle kriyojel oldukça büyük yüzey alanına sahiptir. Ayrıca, bu gözenekler difüzyon direncini azaltmakta ve yüksek iç yüzey alanı nedeni ile kütle transferini kolaylaştırmaktadır.
- ✓ Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin spesifik yüzey alanı BET yöntemi ile sırasıyla 11.98 m<sup>2</sup>/g ve 20.18 m<sup>2</sup>/g bulunmuştur.
- ✓ Poli(HEMA) ve protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin yapısı FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir. Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojeller 1558 cm<sup>-1</sup> ve 1656 cm<sup>-1</sup>, de amid bandlarına (-CONH) sahiptir. Poli(HEMA) kriyojellerle karşılaştırıldığında bu bandların hem şiddeti artmış hemde genişlemiştir. Bu durum kriyojel yapısındaki Protein A'nın varlığını göstermektedir. Ayrıca hidroksil bandında da (-OH) yayvanlaşma görülmektedir.

- ✓ Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin pıhtılaşma zamanları Poli(HEMA) kriyojel ile karşılaştırıldığında PT ve CT değerleri biraz azalırken APTT ve FT değerleri artmıştır. Pıhtılaşma zamanları kontrol plazma ile karşılaştırıldığında ise biraz artma gözlenmiştir. Fakat bu azalma vücut tarafından tolere edilebilir bir düzeydedir. Bu sonuçlar, yeni sentezlenen protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin kan uyusabilirliklerinin iyi olması ve literatürle karşılaştırıldığında benzer sonuçların elde edilmesi ile açıklanabilir.
- ✓ Sentezlenen polimerik adsorbentlere önemli derecede hücre yapışması gözlenmemiştir. Bu durum protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin kan hücre yapışmasına dirençli olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, iyi nontrombojenik özellikleri nedeniyle, protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojellerin ekstrakorporal tedavi amaçlı biyomedikal uygulamalarda kullanımı için umut vericidir.
- ✓ IgG adsorpsiyonuna CNBr derişiminin etkisini belirlemek için CNBr derişimi 10-100 mg/ml aralığında değiştirilmiştir. CNBr derişimi ile IgG adsorpsiyon kapasitesi 50 mg/ml' ye kadar önce artmakta, daha sonra adsorpsiyon kapasitesi önemli miktarda azalmaktadır.
- ✓ Poli(HEMA) kriyojelde IgG adsorpsiyonu üzerine protein A yoğunluğunun etkisi incelendiğinde protein A yüzey yoğunluğu (yani birim kütledeki protein A molekülleri sayısı) artığında Poli(HEMA) kriyojel üzerine adsorplanan IgG miktarı önce artmakta, sonra neredeyse en yüksek değere ulaşmaktadır. Maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesi 83.2 mg/g dir.
- ✓ Bir sistemdeki sıvıyı sürüklemek için gereken basınç azalması olabildiğince az olmalıdır. Lineer akış hızları 40-382 cm/saat arasında bulunmuştur. Poli(HEMA) kriyojel kolonun geri basıncının düşük olması gözenekli yapının birbirine bağlı makrogözeneklerin büyük olduğunu göstermektedir.

- ✓ Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojel kolonunda akış hızının artmasıyla adsorbe olmuş IgG miktarı azalmıştır. Akış hızının 0.5 ml/dak' dan 4 ml/dak' ya artmasıyla adsorpsiyon kapasitesi 83.2 mg/g' den 58.9 mg/g' ye düşmektedir.
- ✓ IgG derişiminin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, çözeltideki IgG derişimi 0-2.0 mg/ml aralığında değiştirilmiştir. Çözeltideki IgG derişiminin artmasıyla, birim kriyojel başına adsorplanan IgG miktarı artmaktadır. Maksimum IgG adsorpsiyonu 1.5 mg/ml derişimde gerçekleşmiştir.
- ✓ Maksimum adsorpsiyon kapasitesi ( $Q_{max}$ ) deneysel verilerden protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojel için 83.2 mg/g olarak bulunmuştur. Langmuir adsorpsiyon modeli ile  $Q_{max}$  ve Langmuir sabiti sırasıyla 102.1 mg/g, 1.58 ml/mg olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0.989' dır. Korelasyon katsayısı Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sisteme uygun olduğunu göstermektedir. Freundlich modeline uygunluğuna bakıldığında ise Freundlich sabitleri  $K_f$  değeri 56.1 ve n değeri 1.98 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0.894' dur.
- ✓ Poli(HEMA) kriyojelin maksimum adsorpsiyon kapasitesi ( $Q_{max}$ ) ile ticari olarak bulunan adsorbentler gibi bazı diğer afinite adsorbentlerin maksimum adsorpsiyon kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Protein A takılı-Poli(HEMA)' nın adsorpsiyon kapasitesi diğer adsorbentlerle karşılaştırılabilir düzeydedir. IgG adsorpsiyon kapasitelerinin farklı olması yapı, reaktif fonksiyonel grupları, ligand miktarı, gözeneklik, gözenek boyutu, gözenek boyutu dağılımı ve erişilebilir yüzey alanı gibi adsorbent özelliklerinden ileri gelmektedir.
- ✓ Adsorpsiyon kapasitesine pH etkisini göstermek için farklı tampon sistemleri kullanılmış ve pH 4.0-9.0 arasında çalışılmıştır (4.0-6.0 için 50 mM asetat, 6.0-9.0 için 50 mM fosfat ve 7.0-9.0 için 50 mM Tris-HCl). Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin maksimum IgG adsorpsiyonu pH 7.0 Tris-HCl tamponunda gözlenmiştir.



- ✓ Poli(HEMA) kriyojelin spesifik olmayan IgG adsorpsiyonu (0.38 mg/g), çalışılan bütün sıcaklık değerlerinde çok düşüktür. Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin denge adsorpsiyonu sıcaklıktan oldukça etkilenmiş ve 37°C' de (98.8 mg/g) maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesi gözlenmiştir. Sıcaklığın 4 °C'den 37 °C' ye artmasıyla birlikte adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık % 125 artmıştır.
- ✓ Fosfat tamponuyla (pH 7.4) seyreltilen insan kanından elde edilen IgG adsorpsiyon kapasitesi düşüktür. Fakat seyreltilmemiş kan için protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelinin IgG adsorpsiyonu (88.1 mg/g' a kadar) yüksektir.
- ✓ Bağlanan ve elue edilen proteinin bileşimi SDS-PAGE ile ölçülmüştür. Proteinin yaklaşık % 85' nin IgG olması albumin gibi diğer proteinlerin çok miktarda varlığına rağmen makrogözenekli adsorbentin spesifikliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Saflaştırılan IgG' nin saflığı % 95.3-% 96.7 aralığında bulunmuştur. İnsan plazmasından IgG' nin geri kazanılması % 80.7 olarak bulunmuştur.
- ✓ Afinite saflaştırmada kriyojel kolonun üstünlüğünü göstermek için, kan direk protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelinden geçirilmiştir. Kriyojelin makrogözenekli boyutu kan hücrelerinin kolonda engellenmeden ilerlemesini olanaklı kılmaktadır.
- ✓ Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin yarışmalı proteinlere karşı seçiciliği FPLC ile test edilmiştir. Protein karışımından HSA ve IgG ayrılması sırasıyla 1.94 dak ve 9.58 dak olarak bulunmuştur. İnsan plazmasından HSA ve IgG ayırması ise sırasıyla 1.84 dak ve 9.54 dak olarak bulunmuştur. İkili protein karışımı ve insan plazması için hesaplanan  $R_s$  değerleri sırasıyla 2.28 ve 2.63 olarak hesaplanmıştır. Bir kromatografi sistemindeki iki pikin birbirinden iyice ayrılması için  $R_s$  değerinin 1'den yüksek olması gerektiğinden HSA ve IgG ayırma değerleri sonuçlarının iyi olduğu kabul edilebilir.

- ✓ omatoid artritli kanda romatoid faktör değişimi seyreltilmemiş kanda gözlenmiştir. Farklı derişimlerde immobilize olan protein A miktarının adsorplanan romatoid faktör üzerine etkisine bakıldığında immobilize olan protein A miktarı artıkça adsorplanan romatoid faktörün de artığı gözlenmiştir.
- ✓ Tekrar kullanılabilirlik afinite adsorbentleri için çok önemlidir. Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojelin kararlılığını ve tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için kriyojel kolonu 10 kez kullanılmıştır. Adsorbe olmuş IgG' nin yaklaşık %95'i desorbe olmaktadır. Protein A takılı-Poli(HEMA)kriyojelin adsorpsiyon kapasite değerleri hemen hemen sabit kalmış ve değişmemiştir. Protein A takılı-Poli(HEMA) kriyojeli tekrar kullanılabilirlik ve kararlılığıyla iyi bir performans göstermiştir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Gindzienska-Sieskiewicz, E., Klimiuk, PA., Kisiel, DG., Gindzienski, A., Sierakowski. S. *Clin.Rheumatol.* **2007**, 26, 685-690.
2. Strand. V. *Office Rheumatol.* **2001**, 2, 38-50
3. Pincus, T., Brooks, RH., Callahan. LF. *Ann. Intern. Med.* **1994**,120, 26-34.
4. Pincus, T., Callahan. LF. *J. Rheumatol.* **1986**, 13, 841.
5. Strand V., *Clinical Cornerstone.* **1999**, 2, (2) 38-50.
6. Seror, R., Pagnoux, C., Guillevin. L. *Transfusion and Apheresis Science.* **2007**, 36, 195-199.
7. Bornouf, T., Goubramm, H., Radosevic, M. *J. of Chromtog. B*, **1998**, 715, 65-80.
8. Verdoliva, A., Marasco, B., De Capua, A., Saporito, A., Bellofiore, P., Manfredi, V., Fattorusso, R., Pedone, C., Ruvo, M. *Chembiochem.* **2005**, 6, 1242-1253.
9. Hober, S., Nord, K., Linhult. M. *J of Chromatog. B.* **2007**, 848, 40-47.
10. Ghose, S., Allen, M., Hubbard, B., Brooks, C., Cramer. S.M. *Biotechnol and Bioeng.* **2005**, 92, 665-673.
11. Hahn, R., Bauerhansl, P., Shimara, K., Wizniewski, C., Tscheliessnig, A., Jungbauer. A. *J. of Chromatog A.* **2005**, 1093, 98-110.
12. Denizli. A. **1992**. *Doktora Tezi.* Hacettepe Üniv. Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, ANKARA.
13. Plieva, F., Andersson, M., Galaev, J., Mattiasson, I.Y. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 828-836
14. Lozinsky, VI. *Russian Chemical Reviews.* **2002**, 17 (6), 489-511.
15. Plieva, FM., Galaev, I., Matiasson, B. *J. Sep. Sci.* **2007**, 30,1657-1671.
16. Ian, R., Mackay, M.D., Fred, S., Rosen, M.D. *N Engl J Med.* **2001**, 345, 5-9.
17. <http://www.infeksiyon.com/Detail.asp?ctg=10&Article=256> 12 Aralık 2008.
18. Yılmaz, E. **2007**. *Yüksek Lisans Tezi* . Hacettepe Üniv. Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, ANKARA.

19. Cervera, R., Khamashta, M.A., Font, J., Sebastiani, G.D., Gil, A., Lavilla, P., Domenech, I., Aydintug, A.O., Jedryka-Goral, A., *The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus Medicine*. **1993**, 72, 113-124.
20. Jacobsen, S., Petersen, J., Ullman, S., Junker, P., Voss, A., Rasmussen, J.M., Tarp, U., Poulsen, L.H., van Overeem Hansen, G., Skaarup, B., Hansen, T.M., Podenphant, J., Halberg, P.I. *Clin Rheumatol*. **1988**, 17, 468-477.
21. <http://www.romatizmam.com/sle.htm> 24 Ocak 2009
22. Trigwell, S., Radford, M., Page, P.M., Loweth, S. R., James, A. C., Morgan, R. F., Todd, N. G. *Clin. Exp. Immunol*. **2001**, 126, 242–249.
23. Rosen, A., Casciola-Rosen, L., Wigley, F. *Curr. Opin. Rheumatol*. **1997**, 9, 538–543.
24. [http://www.romatizmam.com/pdf/Behcet\\_hastaligi.pdf](http://www.romatizmam.com/pdf/Behcet_hastaligi.pdf) 24 Ocak 2009.
25. <http://www.romatizmam.com/sjs.htm> 27 Ocak 2009.
26. Wagner, U., Kaltenhauser, S., Sauer, H., Arnold, S., Seidel, W., Hantzschel, H., Kalden, J. R., Wassmuth, R. *Arthritis Rheum*. **1997**, 40, 341–351.
27. Weyand, C. M., Hicok, K. C., Conn, D. L., Goronzy, J. *Ann. Intern. Med*. **1992**, 117, 801–806.
28. [http://tr.wikidoc.org/index.php/Romatoid\\_artrit](http://tr.wikidoc.org/index.php/Romatoid_artrit) 29 Ocak 2009
29. Ligier, S., Fortin, P. R., Newkirk, M. *J. Rheumatol*. **1998**, 37, 1307–1314.
30. Scofield, R. H., Tardibono, G., Ogden S. B., Harley, J. B., Reichlin, M., Kurien, B. T. *Semin. Arthritis Rheum*. **1998**, 27, 382–391.
31. Eberhardt, K.B., Truedsson, L., Pettersson, H., Svensson, B., Stigsson, L., Eberhardt, J.L., Wollheim, F. *Ann. Rheum. Dis*. **1990**, 49, 906–909.
32. Lucey, M.D., Newkirk, M.M., Neville, C., Lepage, K., Fortin, P.R. *J. Rheumatol*. **2000**, 27, 319–323.
33. Zandman-Goddard, G. *AutoImmün Rev*. **2007**, 6(6), 366-372.
34. Jacobson, D.L., Gange, S.J., Rose, N.R., Graham, N.M. *Clin Immunol Immunopathol*. **1997**, 84, 223–243.
35. Lipsky, P., *Rheumatoid arthritis*. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, Braunwald E, Fauci A, Isslebacher K, Kasper D, Hauser S, Longo D; 16th ed., McGraw-Hill, **2004**, 1968-1977.
36. Persellin, R.H. *Bull Rheum Dis*. **1997**, 27, 922-927.

37. Akil, M., Amos, R.S., *ABC of rheumatology. Rheumatoid arthritis--I: Clinical features and diagnosis. BMJ.* **1995**, 310(6979), 587-590.
38. Fleming, A., Crown, J.M., Corbett, M., *Onset, I. Ann Rheum Dis.* **1976**, 35(4), 357-360.
39. Edward, D., Harris, Jr. *Clinical Features of Rheumatoid Arthritis. In: Kelly's Textbook of Rheumatology*, Ruddy S, Harris E, Sledge C; 6th ed., W. B. Saunders, Philadelphia, PA, **2001**, 967-1000.
40. İliçin, G., Biberoglu, K., Süleymanlar, G., *Temel İç Hastalıkları, Romatoid Artrit*, Ertem Matbaası. **2003**, 2702-2713.
41. Soka, T., Pincus, T., *Clin Exp Rheumatol.* **2005**, 23(39), 58-62.
42. Liang, K.P., Liang, K.V., Matteson, E.L., Mc Clelland, R.L., Christianson, T.J., Turesson, C. *Arthritis Rheum.* **2006**, 54(2), 642-648.
43. Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., McShane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S. *Arthritis Rheum.* **1988**, 31, 315-324.
44. Issacs J.D., Moreland, L.W. (eds). *Romatoid artrit 1.Baskı*, AND Danışmanlık, Eğitim, Yayıncılık ve Organizasyon Ltd.Şti. İstanbul, **2003**
45. Shmerling, R.H., *Am J Med.* **1991**, 91(5), 528-534.
46. Gümüşdis, G. *Romatolojik hastalıklarda radyoloji Üstün E. Klinik Romatoloji*, Deniz Matbaası. **1999**. 170-174.
47. Van der Heijde, D.M., Van Leeuwen, M.A., Van Riel, P.L., Van de Putte, L.B. *J Rheumatol.* **1995**, 22(9), 1792-1796.
48. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum.* **2002**, 46(2):328-346
49. Smolen, J.S., Aletaha, D., Machold, K.P. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* **2005**, 19(1), 163-177.
50. Nielen, M.M., van Schaardenburg, D., Reesink, H.W. *Arthritis Rheum.* **2004**, 50, 380-386.
51. Staikova, N.D., Kuzmanova, S.I., Solakov, P.T. *Folia Med (Plovdiv).* **2003**, 45(3), 35-42.
52. Steiner, G., Smolen, J.S. *Z Rheumatol.* **2002**, 61(6), 667-673.

53. Yanik, B., Geler Külçü, D. *Romatizma*. **2008**, 23, 97-99.
54. Smolen, J.S., Steiner, G. *Curr Opin Rheumatol*. **1998**, 10(3), 201-206.
55. Wiik, A.S. *Scand JRheumatol*. 2005, 34, 260-2688.
56. Von Venrooij, W.J., Charles, P., Maini, R.N. *J Immunol Meth*. **1991**, 140, 181-189.
57. Davidson, A., Diamond, B. *N Engl J Med*. **2001**, 345, 340-350.
58. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company **2002**.
59. Özkara, S., **2002**. *Yüksek Lisans Tezi* . Hacettepe Üniv. Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, ANKARA.
60. Neyzi, O., Ertuğrul, T. *Pediatrici*, Nobel, İstanbul. **2002**.
61. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York and London: Garland Science. **2002**.
62. Alkan, M.C. **2002**. *Yüksek Lisans Tezi*. Hacettepe Üniv. Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, ANKARA.
63. Brekke, O. H., Sandlie, I. *Nature Reviews, Drug Discovery*. **2003**, 2(1), 52-62.
64. Sommerfeld, S., Strube, J. *Chemical Engineering and Processing*. **2005**, (44), 1123-1137.
65. Catrina, A.I., Lampa, J., Ernestam, S., af Klint, E., Bratt, J., Klareskog, L., Ulfgren, A. K. *Rheumatology (Oxford)*. **2002**, 41(5), 484-489.
66. Farid, S.S. *Journal of Chromatography B*. **2007**, 848(1), 8-18.
67. Cohn, E.J., Strong, L.E., Hughes, Jr., W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M., Taylor, H.L. *J. Am. Chem. Soc*. **1946**, 68, 459-475.
68. Barandun, S., Kistler, P., Jeunet, F., Isliker, H. *Vox Sang*. **1962**, 7, 157-174.
69. Lee, M.L., Strand, V. *Marcel Dekker*, USA. **1997**
70. Hink, J.H., Hidago, J.J, Seeberg, V.P., Johnson, F.F. *Vox Sang*. **1957**, 2, 174-186.
71. Kistler, P., Nitschmann, H. *Vox Sang*, **1962**, 7, 414-424.

72. Nitschmann, H., Kistler, P., Lergier, W. *Helv. Chim. Acta.* **1954**, 37, 866-873.
73. Björling, H. *Vox Sang.* **1972**, 23, 18-25.
74. Schneider, W., Lefevre, H., Friedler, H., McCarty, L.J. *Blut.* **1975**, 30, 121-134.
75. Berglöf, J.H., Eriksson, S., Curling, J.M. *J. of Appl. Biochem.* **1983**, 5, 282-292.
76. Denizli, A. *Popüler Bilim.* **2002**, 50-54.
77. Pommerening, K., Kuhn, M., Jung, W., Buttgerit, K., Mohr, P., Stamberg, J., Benes, M. *Int. J. Biol. Macromol.* **1979**, 1, 79-88.
78. Scouten, W.H. *John Wiley and Sons*, New York. **1981**
79. Dean, P.D.G., Johnson, W.S., Middle, F.A. *Affinity Chromatography*, Oxford, IRL Press. **1985**
80. Lowe, C., Clonis, Y.D. *Bioactive Polymeric Systems*, Gebelein, C.E., Carraher, C.E. (eds.), Plenum Press, New York. **1985**, 203-222,
81. Clonis, YD., Lowe, C. *Scientific Foundations in Clinical Biochemistry*, Marks, V., Williams, D.L. (eds.), 2<sup>nd</sup> edn, , Heinenmann Medical, London. **1987**, 1
82. Denizli, A., Pişkin, E. *J. Biochemical and Biophysical Systems.* **2001**
83. Mosbach, K. *Methods Enzymol.* **1974**, 34, 229-242.
84. Wilchek, M., Miron, T., Kohn, J. *Methods in Enzymol.* W.B.Jacoby, Ed., Academic Press, New York, USA, **1984**, 3-55.
85. Cuatrecasas, P., Parikh, I. *Biochemistry.* **1972**, 11, 2291-2295.
86. Wilchek, M., Miron, T., Kohn, J. *Trends Biotechnol.* **1987**, 5, 220-224.
87. Wilchek, M., Miron, T., Knudsen, K.I. *Bioconjugate Chem.* **1994**, 5, 491-492.
88. Wilchek, M., Miron, T. *React. Funct. Polymers.* **1999**, 41, 263-268.
89. Yatzidis, H. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.* **1964**, 1, 83-87.
90. Dunea, G., Kolff, W.I. *Trans. Am. Artif. Inter. Organs.* **1965**, 11, 78-86.
91. Yatzidis, H. *Paper Presented at Cleveland Clinic, Cleveland, Ohi.* **1966**.
92. Rosenbaum, J.L. *J. Albert Einstein Med.* **1968**, 16,67-71.
93. Andrade, J.D., Van Wagenen, R., Chen, C., Kopp, K., Kolff, W.J. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.* **1972**, 9, 210-216.

- 94.** Amono, I. *Proc. Eur. Dial. Transplan. Assoc.* **1976**, 13, 262-272.
- 95.** Faradji, A., Bohbot, A., Schmitt-Goguel, M., Siffert, J.C. *Plasm. Ther. Trans. Technol.* **1985**, 6, 465-484.
- 96.** Shiozaki, S., Sakagami, K., Miyazaki, M. *The Int. J. Artif. Organs.* **1989**, 12, 400-404.
- 97.** Palmer, A., Welsh, K., Gjorstrup, P., Taube, D., Bewich, M. *Lancet.* 10. **1989**.
- 98.** Margel, S., Marcus, L. *Appl. Biochem. Biotech.* **1986**, 12, 37-66.
- 99.** Faradji, A., Bohbot, A., Schmitt-Goguel, M., Dumont, S., Eischen, A., Wiesel, M.L., Stierle, A., Follea, G., Eber, M., Bergerat, J.P. *The Int. J. Artif. Organs.* **1991**, 14(5), 304-312
- 100.** Nathan, I., Aharon, M., Reisenfeld, G., Duilansky, A. *Biomat. Artif. Cells & Immob. Tech.* **1992**, 20, 23.
- 101.** Miyazaki, M., Sakagami, K., Matsuoka, j., Nishioka, Y., Fuchimoto, S., Orita, K., **1984**. *ISAO Press*.
- 102.** Yamazaki, Z., Fujimori, Y., Takahama, T., Wada, T., Kasama, M., Morioka, M., Abe, T., Yamawaki, N. *Trans. Am. Soc. Artif. Inter. Organs.* **1982**, 28, 318-323
- 103.** Lambert, P.H., Dixon, F.J. *J. Exp. Med.* **1986**, 127, 507-521.
- 104.** Koffler, D., Suchur, P.H., Kunken, H.G. *J. Exp. Med.* **1968**, 126, 637-642.
- 105.** Schwartz, R.S., Stollar, B.D. *J. Clin. Invest.* **1985**, 75, 321-327.
- 106.** Emlen, W., Pisetsky, D.S., Taylor, R.P. *Arthritis Rheum.* **1986**, 29, 1417-1426.
- 107.** Minitzer, M.F., Stollar, B.D., Agnello, V. *Arthritis Rheum.* **1979**, 29, 959-968.
- 108.** Odabaşı, M., Özkayar, N., Özkara, S., Ünal, S., Denizli, A. *J. Chromatogr. B.* **2005**, 826, 50-57.
- 109.** Chen, J., Jo, S., Park, K. *Carboh. Polym.* **1995**, 28, 69-76.
- 110.** Peppas, N. A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J. H., Zhang, J. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* **2000**, 2, 9-29.
- 111.** Hentze, H.-P., Antonietti, M. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, 90, 27- 53.



112. Hjerten, S., Liao, J.-L., Zhang, R. *J. Chromatogr.* **1989**, 473, 273-275.
113. Nam, Y. S., Park, T. G. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 47, 8-17.
114. Wood, C. D., Cooper, A. I. *Macromolecules* **2001**, 34, 5-8.
115. Kabiri, K., Omidian, H., Zohuriaan-Mehr, M. J. *Polymer Int.* **2003**, 52, 1158-1164.
116. Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *Bioseparation.* **2002**, 10, 163-188.
117. Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhailovsky, S., Galaev, I. Y. *Soft Matter* **2005**, 1, 303-309.
118. Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I. Y., Bergensthl, B., Mattiasson, B. *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 4065-4073.
119. Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 1657-1671
120. Plieva, F. , Andersson, J., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 828-836.
121. Plieva, F., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *Langmuir*, **2007**, 23(1), 35-40
122. Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhailovsky, S., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, 100, 1057-1066.
123. Plieva, F., Oknianska, A., Degerman, E., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **2006**, 17, 1075-1092.
124. Arvidsson, P., Plieva, F. M., Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 986, 275-290.
125. Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H., Mattiasson, B. *Trends Biotechnol.* **2003**, 21, 445-451.
126. Svec, F., Frechet, J.M. J. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1999**, 38, 34-48.
127. Svec, F. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 747-766.
128. Svec, F., Frechet, J. M. *Science.* **1996**, 273, 205-211.
129. Strancar, A., Podgornik, A., Barut, M. *BIOforum Int.* **2002**, 3, 152-153.
130. Josic, D., Buchacher, A. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **2001**, 49, 153-174.
131. Lozinsky, V. I. *Russ. Chem. Rev.* **2002**, 71, 489-511.

- 132.** Plieva, F. M., Savina, I. N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I. Y. Mattiasson, B. *J. Chromatogr. B.* **2004**, 807, 129- 137.
- 133.** Plieva, F., Bober, B., Dainiak, M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *J.Mol. Recogn.* **2006**, 19, 305- 312.
- 134.** Richman, D.D., Cleveland, P.H., Oxman, M.N., Johnson, K.M. *J. Immunol.* **1982**, 128, 2300-2305.
- 135.** Amersham Pharmacia Biotech, Handbook, Antibody Purification, **2000**.
- 136.** Uhlen, M., Guss, B., Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L., Lindberg, M. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 1695-1702.
- 137.** Abrahmsen, L., Moks, T., Nilsson, B., Hellman, U., Uhlen, M. *EMBO J.* **1985**, 4, 3901-3906.
- 138.** Moks, T., Abrahmsen, L., Nilsson, B., Hellman, U., Sjoquist, J., Uhlen, M. *Eur. J. Biochem.* **1986**, 156, 637-643.
- 139.** Guss, B., Uhlen, M., Nilsson, B., Lindberg, M., Sjoquist, J. *Eur.J. Biochem.* **1984**, 138, 413-420.
- 140.** Hober, S., Nord, K., Linhult, M. *Journal of Chromatography B.* **2007**, 848, 40–47
- 141.** Nilsson, B., Moks, T., Jansson, B., Abrahmsen, L., Elmblad, A., Holmgren, E., Henrichson, C., Jones, T.A., Uhlen, M. *Protein Eng.* **1987**, 1, 107-113.
- 142.** Jendeberg, L., Nilsson, P., Larsson, A., Denker, P., Uhlen, M., Nilsson, B., Nygren, P.A. *J. Immunol. Methods* **1997**, 201, 25-34.
- 143.** Jansson, B., Uhle'n, M., Nygren, P.A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1998**, 20, 69-78.
- 144.** Deisenhofer, J. *Biochemistry* **1981**, 20, 2361-2370.
- 145.** Graille, M., Stura, E.A., Corper, A.L., Sutton, B.J., Taussig, M.J., Charbonnier, J.B., Silverman, G.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 5399-5404.
- 146.** Ljungquist, C., Jansson, B., Moks, T., Uhlen, M. *Eur. J. Biochem.* **1989**, 186, 557-561.
- 147.** Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen M., Nygren, P.A. *Nat. Biotechnol.* **1997**, 15, 772-777.

- 148.** Gulich, S. Uhlen, M., Hober, S. *J. Biotechnol.* **2000**, 76, 233-244.
- 149.** Linhult, M., Gulich, S., Graslund, T., Nygren, P.A., Hober S. *Protein Eng.* **2003**, 16, 1147-1152.
- 150.** Ullrich, H., Kuehnl, P. *Transfusion and Apheresis Science* **2004**, 30, 223–231
- 151.** Keller, F., Wagner, K., Faber, U., Scholle, J., Neumayer, H.H., Maiga, M., Schultze, G., Offermann, G., Molzahn, M. *Klin.Wochenschr.* **1983**, 61, 1115-1122.
- 152.** Schooneman, F. *AnnMed Interne* **1994**, 145,316–318.
- 153.** Protein A-Immünoadsorption (Prosorba® column) in the treatment of rheumatoid arthritis *Joint Bone Spine* **2005**,72, 101–103
- 154.** Sasso, E.H., Merrill, C., Furst, T.E. *Ther Apher* **2001**, 5,84–91.
- 155.** Weinblatt, M.E., Kremer, J.M., Bankhurst, A.D., Bulpitt, K.J., Fleischmann, R.M., Fox, R.I. *N Engl J Med.* **1999**, 340, 253–259.
- 156.** Maini, R., St Clair, E.W., Breedveld, F., Furst, D., Kalden, J., Weisman, M. *Lancet.* **1999**, 354,1932–1939.
- 157.** Masson-Bessiere, C., Sebbag, M., Girbal-Neuhauser, E., Nogueira, L., Vincent, C., Senshu, T. *J Immunol.* **2001**, 166,4177–4184.
- 158.** Dwosh, I.L., Giles, A.R., Ford, P.M., Pater, J.L., *N Engl J Med* **1983**, 308, 1124–1129.
- 159.** Rothwell ,R.S., Davis, P., Gordon, P.A., Dasgupta, M.K., Johny, K.V., Russell, A.S. *Arthritis Rheum* **1980**, 23, 785–790.
- 160.** Benny, W.B., Sutton, D.M., Oger, J., Bril, V., McAteer, M.J., Rock, G. *Transfusion* **1999**, 39, 682–687.
- 161.** Haas, M., Mayr, N., Zeithofer, J., Goldammer, A., Derfler, K. *J Clin Apher* **2002**, 17, 84–87.
- 162.** Snyder Jr, H.W., Cochran, S.K., Balint Jr, J.P., Bertram, J.H., Mittelman, A., Guthrie Jr, T.H. *Blood* **1992**, 79, 2237–2245.
- 163.** Jansen, M., Schmaldienst, S., Banyai, S., Quehenberger, P., Pabinger, I., Derfler, K. *Br J Haematol* **2001**, 112, 91–97.
- 164.** Braun, N., Erley, C., Klein, R., Kotter, I., Saal, J., Risler, T. *Nephrol Dial Transplant* **2000**, 15, 1367–1372.

165. Muller, J., Wallukat, G., Dandel, M., Bieda, H., Brandes, K., Spiegelsberger, S. *Circulation* **2000**, 101, 385–391.
166. Li, R., Dowd, V., Stewart, D.J., Burton, S.J., Lowe, C.R. *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 190-195.
167. Teng, S.F., Sproule, K., Husain, A., Lowe, C.R., *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2000**. 740, 1-15.
168. Palombo, G., Rossi, M., Cassani, G., Fassina, G., *J. Mol. Recognit.* **1998**. 11, 247-249.
169. McCue, J.T., Kemp, G., Low, D., Quinones-García, I. *Journal of Chromatography A*, **2003**. 989, 139–153
170. Girot, P., Averty, E., Flayeux, I., Boschetti, E. *Journal of Chromatography B*, **2004**. 808, 25–33
171. Newcombe, A. R., Cresswell, C., Davies, S., Watson, K., Harris, G., O'Donovan, K., Francis, R. *Journal of Chromatography B*, **2005**. 814, 209–215
172. Katoh, S., Imada, M., Takeda, N., Katsuda, T., Miyahara, H., Inoue, M., Nakamura, S. *Journal of Chromatography A*, **2007**. 1161, 36–40
173. Ghose, S., Hubbard, B., Cramer, S. M. *Biotechnology and Bioengineering*, **2007**. 96, 4, 768-779.
174. Cao, Y., Zhang, Q., Wang, C., Zhu, Y., Bai, G. *Journal of Chromatography A*, **2007**. 1149, 228–235
175. Shukla, A.A., Gupta, P., Han, X. *Journal of Chromatography A*, **2007**. 1171, 22–28
176. Nilsang, S., Nandakumar, K., Galaev, I., Rakshit S., Holmdahl, R., Mattiasson, B., Kumar, A. *Biotechnol Prog.* **2007**. 23, 4, 932-939
177. Schubert, S., Freitag, R. *Journal of Chromatography A*, **2007**. 1142, 106–113
178. Agostino, D.B., Bellofiore, P., Martino, T.D., Punzo, C., Riviaccio, V., Verdoliva, A. *Journal of Immunological Methods*, **2008**. 333, 126–138
179. Ma Z., Ramakrishna, S. *Journal of Membrane Science*, **2008**. 319, 23–28
180. Ribeiro, M.B., Vijayalakshmi, M., Todorova-Balvay, D., Bueno, S.M. A. *Journal of Chromatography B*, **2008**. 861, 64–73

- 181.** Boi, C., Dimartino, S., Sarti, G.C. *Biotechnol. Prog.* **2008**, 24, 640-647
- 182.** Lowry Oliver, H., Nira, J., Rosebrough, A., Farr L., Randall, R.J. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265-275
- 183.** Barrett, E. P. Joyner, L. G. Halenda, P. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 373.
- 184.** Doumas, B.R., Watson, W., Biggs, H. *Clin. Chim. Acta*, **1971**, 31, 87-96.
- 185.** Lagergren, M., Olsson, P., Swedenborg, J. *Surgery*, **1974**, 75, 643-647.
- 186.** Doumas, B.R., Biggs, H. *Standart Methods of Clinical Chemistry.* **1972**, 7, 175.
- 187.** Reifsteck, F., Wee, S., Wilkinson, B. J. *J Med Microbiol.* **1987**, 24 (1),65-73
- 188.** Cooper, S.L., Bamford, C.H., Tsuturu, T., (Ed), *Polymer biomaterials in solution as interfaces and as Solids*, VSP, Utrecht, The Netherlands. **1995**
- 189.** Eagan, M.A., Norris, J.M., Cooper, B.C., Glick, G.D. *Bioorganic Chemistry* **1995**, 23, 482-498.
- 190.** Pişkin, E., Hoffman, A. *Polymeric Biomaterials*, Dordrecht, The Netherlands, Martinus Nijhoff Pupl. Co. **1986**
- 191.** Brash, J.L. *Modern Aspects of Protein Adsorption on Biomaterials.* **1991**
- 192.** Denizli, A. *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, 74, 655-658.
- 193.** Odabaşı, M., Denizli, A. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **2001**, 760, 137-148.
- 194.** Denizli, A., Köktürk, G., Yavuz, H., Pişkin, E. *Reactive and Functional Polymers* **1999**, 40, 195-203.
- 195.** Özkara S. **2006.** *Doktora Tezi Hacettepe Üniv. Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, ANKARA.*
- 196.** Denizli, A. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2002**, 772, 357-367.
- 197.** Kim, S.W., Jacops, H., *Blood Purification*, **1996**, 14, 357-372.
- 198.** Hanson, D.C., Schumaker, V. *J. Immunol.* **1984**, 132, 1397-1409.
- 199.** Yang, L., Biswas, M.E., Chen, P. *Biophys. J.* **2003**, 84, 509-522.

200. Jungbauer, A., Hahn, R. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **2004**, 7, 248-256.
201. Barut, M., Podgornik, A., Bryne, P., Strancar, A., *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 1876-1892.
202. Yilmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A. *Biochem. Eng. J.* **2009**, 43, 272-279.
203. Labrou, N.E., Clonis, Y.D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1995**, 316(1), 169-178.
204. Zhu, X., Alexandratos, S. D. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, 44, 8605-8610.
205. Kerrigan, D.C., Roth, R.S., Riley, P.O. *Gait & Posture*, **1997**, 5(2), 140-141.
206. Boi, C., Dimartino, S., Sarti, G.C. *Biotechnol. Prog.* **2008**, 24, 640-647.
207. Ma, Z., Ramakrishna, S. *J. Membr. Sci.* **2008**, 319, 23-28.
208. Denizli, A., Alkan, M., Garipcan, B., Özkara, S., Pişkin, E., *J. Chromatogr. B.* **2003**, 795, 93-99.
209. Özkara, S., Yavuz, H., Patır, S., Arıca, M.Y., Denizli, A. *Sep. Sci. Technol.* **2002**, 37, 717-721.
210. Garipcan, B., Denizli, A. *Macromol. Biosci.* **2002**, 2, 135-144.
211. Füglistaller, P., *J. Immunol. Methods*, **1989**, 124, 171-177.
212. Özkara, S., Yavuz, H., Denizli, A. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, 89, 1576.
213. Denizli, A., Pişkin, E. *J. Chromatogr. B.* **1995**, 668, 13-19.
214. Klein, E., Yeager, D., Seshadri, R., Baurmeister, U. *J. Membr. Sci.* **1997**, 129, 31-46.
215. Kim, M., Saito, K., Furusaki, S., Sugo, T., Ishigaki, I. *J. Chromatogr.* **1991**, 586, 27-33.
216. Müller-Schulte, D., Manjini, S., Vijayalakshmi, M.A. *J. Chromatogr.* **1991**, 539, 307-314.
217. Bueno, S.M.A., Haupt, K., Vijayalakshmi, M.A. *J. Chromatogr. B.* **1995**, 667, 57-67.
218. Charcosset, C., Su, Z., Karoor, S., Daun, G., Colton, C.K. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, 48, 415-427.
219. Langlotz, P., Kroner, K.H. *J. Chromatogr.* **1992**, 591, 107-113.

220. Dancette, O.P., Taboureau, K.L., Tournier, E., Charcosset, C., Blond, P. *J. Chromatogr. B.* **1999**, 723, 61.
221. Castilho, L.R., Deckwer, W.D., Anspach, F.B. *J. Membr. Sci.* **2000**, 172, 269-277.
222. Teng, S.F., Sproule, K., Husain, A., Lowe, C.R. *J. Chromatogr. B.* **2000**, 740, 1-15.
223. Bereli, N., Akgöl, S., Yavuz, H., Denizli, A. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, 97, 1202-1208.
224. Teng, S.F., Sproule, K., Hussain, A., Lowe, C.R. *J. Mol. Recog.* **1999**, 12, 67.
225. Fassina, G., Verdoliva, A., Palombo, G., Ruvo, M., Cassani, G. *J. Mol. Recog.* **1998**, 11, 128-133.
226. Boschetti, E *Trends in Biotechnol.* **2002**, 20, 333-337
227. Coffinier, Y., Vijayalakshmi, M.A. *J. Chromatogr. B.* **2004**, 808, 51-56.
228. Girot, P., Averty, E., Flayez, I., Boschetti, E. *J. Chromatogr. B.* **2004**, 808, 25-33.
229. Babaç, C., Yavuz, H., Galaev, I.Y., Pişkin, E., Denizli, A. *React. Funct. Polym.* **2006**, 66, 1263-1271.
230. Chhatre, S., Francis, R., Titchener-Hooker, N.J., Newcombe, A. R., Keshavarz, E. *J. Chromatogr. A.*, **2007**, 860, 209-217.
231. Hahn, R., Schlegel, R., Jungbauer, A. *J. Chromatogr. B.* **2003**, 790, 35-51.
232. Noppe, W., Plieva, F.M., Vanhoorelbeke, K., Deckmey, H., Tuncel, M., Tuncel, A., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. *J. Biotechnol.* **2007**, 131, 293-299.
233. Sun, H., Ge, B., Liu, S., Chen, H. *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 1201-1206.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Mehmet Hüseyin ALKAN

**Doğum Yeri** : Diyarbakır

**Doğum Tarihi:** 30.03.1979

**Medeni Hali** : Bekar

**Yabancı Dili** : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Yunus Emre Lisesi, 1994-1996

Lisans : Dicle Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü,  
1998-2002

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim  
Dalı, 2003-2005

Doktora : Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim  
Dalı, 2005-2009

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Araştırma Görevlisi, Dicle Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü,  
Biyokimya Anabilim Dalı, 2005- ----

### Yayımları (SCI ve diğer):

1. Hüseyin Alkan, Zübeyde Baysal, Fikret Uyar, Mehmet Doğru. Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2007**, 136, 183-192.



2. Zübeyde Baysal, Fikret Uyar, Mehmet Doğru, Hüseyin Alkan. Production of extracellular alkaline  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation with a newly isolated *Bacillus* sp., *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, **2008**, 38, 2, 184-190.
3. Zübeyde Baysal, Ercan Çınar, Yasemin Bulut, Hüseyin Alkan, Mehmet Doğru. Equilibrium and thermodynamic studies on biosorption of Pb(II) onto *Candida albicans* biomass, *Journal of Hazardous Materials*, **2009**, 161, 1, 62-67.
4. Hüseyin Alkan, Nilay Bereli, Zübeyde Baysal, Adil Denizli. Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel, *Biochemical Engineering Journal*, **2009**, 45, 3, 201-208.