

ALİ DOĞAN

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT İNSAN İNTERFERON-
 α 'NIN AFİNİTE ADSORPSİYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALİ DOĞAN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS 2010

DANIŞMAN
YRD. DOÇ.DR. SERPİL ÖZKARA YAVUZ

MALATYA- 2010

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**REKOMBİNANT İNSAN
İNTERFERON- α 'NIN AFİNİTE
ADSORPSİYONU**

ALİ DOĞAN

**Danışman Öğretim Üyesi:
Yrd. Doç. Dr. Serpil Özkara Yavuz**

MALATYA-2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya(Ecz.Fak.)Anabilim Dalı Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı

Doç.Dr. Kadir BATÇIOĞLU



Danışman

Yrd.Doç.Dr.Serpil ÖZKARA YAVUZ



Üye

Yrd.Doç.Dr.S.Ebru BÜYÜKTUNCEL



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2010 tarih ve 2010/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali OTLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince ilgisi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, bana büyük bir hoşgörü ve anlayışla yaklaşan, gerek akademik gerekse sosyal yaşantımda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve çalışmalarımda yol gösterici olan danışmanım ve değerli hocam *Yrd. Doç. Dr. Serpil Özkara Yavuz* ve ailesine,

Özellikle tez çalışmalarım sırasında bölümde laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın *Prof. Dr. Adil Denizli* ve *Biyokimya Araştırma Grubu (BIOREG) Üyeleri*'ne,

Çalışmalarımız süresince sahip olduğu bilgi, deneyim ve imkânları benimle paylaşarak tez çalışmalarımın oluşmasında ve yönlendirmeleriyle başarıya ulaşmasında çok büyük katkısı bulunan, değerli görüşleri ve yardımları için Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nden Araştırma Görevlisi *Dr. Lokman Uzun*' a,

Deneysel çalışmalarım esnasında her türlü konuda yardımcı olan, bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nden *Uzman Nilay Bereli*' ye,

Ayrıca tüm hayatım boyunca inanç ve sabırla bana olan desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim...

Ali Doğan

Ocak 2010

ÖZET

İnterferonlar, lökositler, lenfoblastoid ve miyeloblastoid hücre hatları tarafından üretilen biyolojik aktif proteinlerdir. Özellikle böbrek kanseri, malignan melanom, multiple myeloma, karsinoid tümör, lenfoma ve lösemnin bazı tiplerini içeren hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Rekombinant interferon- α aynı zamanda AIDS, kronik hepatit B ve C tedavisinde de kullanılır. Kriyojeller, kısmen donmuş monomer veya polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan jel matrisleridir. Genel olarak kriyojeller birbirine bağlı makrogözeneklere sahiptir. Bu özellikleri kriyojellerin nano-mikro ölçek aralığında herhangi bir difüzyon sorunu olmaksızın kullanımına olanak sağlamaktadır.

Sunulan çalışmada, interferon- α saflaştırılması amacı ile boya bağlı monolitik kriyojel formunda biyoafinite kromatografi adsorbentleri hazırlanmıştır. İlk aşamasında; poli(2-hidroksietil metakrilat) kriyojeller hazırlanmıştır. Daha sonra, boya ligand Cibacron Blue F3GA immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kriyojeller, şişme testi, SEM, elementel analiz, yüzey alanı ölçümleri ve FTIR ile karakterize edilmiştir. Daha sonra, sulu çözeltiden ve doğal interferon kaynağından (insan gingival fibroblast) interferon adsorpsiyonu incelenmiştir. Optimum adsorpsiyon koşullarının belirlenmesi için pH, derişim, etkileşim süresi, iyonik şiddetin etkileri incelenmiştir. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 38.2 mg/g (pH 6.0 ve 2 saat) olarak bulunmuştur. Doğal kaynaktan interferon saflaştırılması hızlı protein sıvı kromatografisi sisteminde gerçekleştirilmiştir. Kromatografi parametreleri (kapasite ve ayırma faktörü, ayırma gücü ve teorik plaka sayısı) 7.79, 9.62, 4.23 ve 554 olarak bulunmuştur. Kriyojellerden interferon desorpsiyonu, 1M NaCl kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tekrarlanan 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucunda kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak; Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerin interferonun hızlı, ucuz ve spesifik saflaştırılması için uygun kullanım potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Cibacron Blue F3GA, poli(HEMA), kriyojel, interferon, saflaştırma.

ABSTRACT

Interferons are biological active proteins which are synthesized by leukocytes, lenfoblastoid and myeloblastoid cell lines. Especially, they have been used in treatments of kidney cancer, malignant melonoma, multiple myeloma, carsinoid, lymphoma and leukemia. In addition, they are also used in treatment AIDS, chronic hepatitis B and C. Cryogels are gel matrix which are prepared by using partially frozen monomer and polymer solutions. Generally, cryogels have interconnected macropores. Therefore, cryogels can be used in wide scale range from nano to micro without any diffusion problem.

In present study, dye attached monolithic cryogels, potential adsorbent for bioaffinity chromatography, were prepared for interferon- α purification, then, optimal purification conditions and interferon purification performance of the adsorbent were investigated. At first, poly(2-hydroxyethyl methacrylate) cryogels were prepared. Then, Cibacron Blue F3GA, dye ligand, was attached onto cryogels. Cryogels were characterized by swelling test, scanning electron microscopy, elemental analysis, surface area measurements and FTIR. After that, interferon adsorption studies were carried out from aqueous solutions and natural interferon source, human gingival fibroblast. In order to determine the optimal adsorption conditions, pH, concentration, interaction time, and ionic strength were investigated. The maximum adsorption capacity of Cibacron Blue F3GA attached poly(HEMA) cryogels was obtained as 38.2 mg/g at pH 6.0 and 2 h incubation. Interferon purification from natural source was carried out by using fast protein liquid chromatography system. The chromatography parameters, capacity and selectivity factors, resolution and theoretical plate number were found as 7.79, 9.62, 4.23 and 554, respectively. Interferon desorption from Cibacron Blue F3GA attached poly(HEMA) cryogels was done by using 1M NaCl solution. After ten times repeated adsorption-desorption cycles, no significant decrease could not be determined in adsorption capacity of cryogel. In result, Cibacron Blue F3GA attached poly(HEMA) cryogels have an application potential for rapid, cheap and specific purification of interferon.

Keywords: Cibacron Blue F3GA, poly (HEMA), cryogel, interferon, purification.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Afinite Kromatografisi	4
2.1.1. Afinite Kromatografi Türleri	6
2.1.2. Afinite Kromatografisi Uygulama Alanları.....	7
2.1.3. Destek (Matriks)	7
2.1.4. Ligand	9
2.2. Boya Ligand Afinite Kromatografisi	10
2.2.1. Boya Ligandlarının Kimyasal Yapısı	11
2.2.2. Kromatografik Matrikse Ligand İmmobilizasyonu.....	15
2.2.3. Boya Ligandlar ve Proteinler Arasındaki Etkileşimler.....	18
2.3. Makrogözenekli Kriyojeller	20
2.4. İnterferonlar ve Bağışıklık Sistemindeki Rolü.....	24
2.4.1. İnterferonun Tarihçesi.....	25
2.4.2. İnterferon Tipleri	27
2.4.2.1. İnterferon- α	28
2.4.2.2. İnterferon- β	28
2.4.2.3. İnterferon- γ	29

2.4.3. İnterferonların Etki Mekanizmaları	29
2.4.3.1. Antiviral Etkiler	31
2.4.3.2. Antiproliferatif Etkiler	31
2.4.3.3. Bağışıklık Düzenleyici Etkiler	31
2.4.4. İnterferonların Klinik Kullanım Dozları ve Toksisiteleri	32
2.4.5. İlaç Tipleri	33
2.4.6. İnterferonların Üretimi.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Kimyasal Maddeler	36
3.2. Poli(2-Hidroksietil Metakrilat) [poli(HEMA)] Kriyojellerin Hazırlanması....	36
3.3. Poli(HEMA) Kriyojellere Cibacron Blue F3GA Bağlanması.....	37
3.4. Poli(HEMA) Kriyojellerin Karakterizasyonu	37
3.4.1. Denge Şişme Oranının Belirlenmesi	37
3.4.2. Yüzey Morfolojisi.....	38
3.4.3. FTIR Çalışmaları	39
3.4.4. Elementel Analiz	39
3.4.5. Yüzey alanı Ölçümleri.....	40
3.5. Rekombinant İnterferon- α 'nın Adsorpsiyon Çalışmaları.....	40
3.6. Rekombinant İnterferon- α 'nın Desorpsiyon Çalışmaları	41
3.7. Doğal Kaynaktan İnterferon Saflaştırılması.....	41
4. BULGULAR	44
4.1. Kriyojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	44
4.2. Cibacron Blue F3GA İmmobilizasyonu.....	46
4.3. Sulu Çözeltilerden Rekombinant İnterferon- α Adsorpsiyonu.....	47
4.3.1. Başlangıç Derişiminin Etkisi	48
4.3.2. pH Etkisi	49
4.3.3. Adsorpsiyon Hızı	50

4.3.4. İyonik Şiddetinin Etkisi	51
4.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	52
4.5. Doğal Kaynaktan İnterferon Saflaştırılması	53
5.TARTIŞMA.....	57
5.1. Kriyojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	57
5.2. Cibacron Blue F3GA İmmobilizasyonu	57
5.3. Sulu Çözeltilerden Rekombinant İnterferon- α Adsorpsiyonu.....	58
5.3.1. Başlangıç Derişiminin Etkisi	58
5.3.2. pH Etkisi	58
5.3.3. Adsorpsiyon Hızı	59
5.3.4. İyon Şiddetinin Etkisi	59
5.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	60
5.5. Doğal Kaynaktan İnterferon Saflaştırılması	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
7. KAYNAKLAR	67
EKLER	73
ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1.** Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi..... 4
- Şekil 2.2.** Bazı reaktif boya moleküllerinin yapısı (a) siyanürik klorür, (b) Procion MX serisi, (c) Cibacron ve Procion H, (d) Procion H-E, (e) Monoflorotriazinil, Cibacron, (f) Trikloroprimidinil, Drimarene, (g) Difloro-kloro primidinil, Levafix, (h) Sülfatoetil sülfan, Remazol. 14
- Şekil 2.3.** Destek matriksine ligandın bağlanma teknikleri. (a) uzatıcı kolla bağlanma, (b) uzatıcı kol-ligand birleşimi ile bağlanma..... 15
- Şekil 2.4.** Hidroksil grupları üzerinden matrikse triazinil boyalarının bağlanması.. 17
- Şekil 2.5.** Kriyojel üretiminin şematik gösterimi: 1, çözeltideki makromolekül; 2, çözücü; 3, düşük molekül ağırlıklı çözünen molekülleri; 4, dondurulmuş çözücünün polikristalleri; 5, donmamış sıvı mikrofaz; 6, polimerik kriyojel; 7, makrogözenekler; 8, çözücü. 23
- Şekil 2.6.** İnterferon Beta'nın 3 boyutlu moleküler yapısı. 25
- Şekil 2.7.** İnterferonların etki mekanizmasının şematik gösterimi. (i) Virüs konakçı hedef hücreye gelerek genetik maddesiyle hücreyi enfekte eder. (ii) Enfeksiyon sonrasında, virüs konakçı hücrenin içinde çoğalır. (iii) Hücrede virüs varlığı nedeniyle, hücrenin kendi DNA'sı uyarılır ve interferon sentezinden sorumlu bölgeden mRNA oluşturulur. (iv) mRNA aracılığıyla sentezlenen interferon, hücre dışına salgılanır ve kan yoluyla taşınarak diğer hücreleri etkiler. (v) Etkilenen sağlıklı hücreler “vücutta virüs olduğu” uyarısını alarak, antiviral proteinleri sentezler (ya da benzeri korunma-savunma mekanizmalarını harekete geçirir). (vi) Böylece sağlıklı hücreler kendilerini korumayı başarır (58)..... 30
- Şekil 3.1.** Cibacron Blue F3GA'nın kimyasal yapısı (a) ve poli(HEMA) kriyojellere immobilizasyonu (b). 38

Şekil 4.1. Poli(HEMA) kriyojellerin SEM fotoğrafları.....	45
Şekil 4.2. FTIR spektrumları.....	47
Şekil 4.3. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellere rekombinant interferon- α adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi. pH: 6.0, sıcaklık: 25°C.....	48
Şekil 4.4. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellere rekombinant interferon- α adsorpsiyonuna pH'n etkisi. İnterferon- α derişimi: 1.0 mg/ml ve sıcaklık: 25°C.....	49
Şekil 4.5. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellere rekombinant interferon- α adsorpsiyonunun zamana bağılı değışimi. İnterferon- α derişimi: 0.1–2.0 mg/ml, pH: 6.0 ve sıcaklık: 25°C.	50
Şekil 4.6. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) temelli monolitik kriyojellere rekombinant interferon- α adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkileri. İnterferon- α derişimi: 1.0 mg/ml, pH: 6.0 ve sıcaklık: 25°C.	51
Şekil 4.7. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) monolitik kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğı. İnterferon- α 'nın derişimi: 1.0 mg/mL, pH: 6.0 ve sıcaklık: 25°C.....	52
Şekil 4.8. Fibroblast interferonu ayrılmasında kullanılan AKTA-FPLC sistemi. (a) Genel görünüm; (b) Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojel kolon.....	53
Şekil 4.9. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojelle interferon saflaştırılması. (a) Standart interferon çözeltilerine ait kromatogramlar; (b) elüsyon pik alanlarının derişimle değışimi.	54
Şekil 4.10. Doğal kaynaktan interferon saflaştırılması.	55
Şekil 4.11. Florimetre spektrumları.....	56

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Afinite kromatografisinde en çok kullanılan biyolojik sistemler.....	5
Tablo 2.2.	Afinite kromatografisinin alt dalları.....	6
Tablo 2.3.	Ticari olarak bulunan bazı afinite destek malzemeleri.	8
Tablo 2.4.	Polimerik jellerin sınıflandırılması ve üretim işlemleri.	21
Tablo 2.5.	Geleneksel insan interferonları ve ilk olarak elde edildikleri hücre kaynakları.	27
Tablo 2.6.	İnterferona bağlı yan etkiler ve görülme sıklığı.....	32
Tablo 2.7.	Rekombinant interferon- α ilaç çeşitleri.....	34
Tablo 4.1.	Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojelin kromatografik parametreleri.	55

1. GİRİŞ

Biyoafinite kromatografisi biyomoleküllerin ayrılması, arındırılması ve tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, spesifik moleküler tanımlama veya biyotanımlama temeline dayanmaktadır. Yöntemde spesifik moleküler tanımlama yeteneğinde olan molekül (ligand), genellikle membran veya küre formunda bir polimerik malzeme olan uygun çözünmeyen bir desteğe immobilize edilir. Oligonükleotidler, oligopeptidler, nükleik asitler, aminoasitler, antijenler, hormonlar, enzimler gibi proteinleri kapsayan biyofonksiyonel moleküller, yeni biyosorbentlerin tasarımında ligand olarak kullanılabilir. Bu ligandlar oldukça yüksek seçiciliğe sahiptirler. Bununla beraber üretimleri yüksek maliyetli ve/veya geniş arındırma basamaklarından oluşmaktadır. Buna bağlı olarak oldukça pahalıdır. Biyospesifik sorbent hazırlama işleminde, biyomolekülleri biyolojik aktivitelerini koruyarak destek matrisine immobilize etmek zordur. Ayrıca bu moleküllerin kullanımı ve depolanması esnasında geniş tedbirlerin alınması gereklidir.

Boya ligandlar, yukarıda dezavantajları sayılan biyoligandların doğal biyolojik eşdeğerlerinin önemli alternatiflerinden biri olarak düşünülmektedir. Boya ligandları, proteinlerin birçok türüne spesifik olarak bağlanabilmektedir. Bunlar ticari olarak elde edilebilir ve ucuzdur. Özellikle hidroksil grubu içeren matrislere kolayca immobilize olabilirler. Boyaların çoğu sentetik olarak üretilir. Ancak, biyomolekülleri, kofaktörleri ya da substratları taklit etmekte; enzimlerin ve çoğu proteinlerin aktif kısımlarıyla spesifik etkileşime girebildikleri için hala afinite ligandları olarak sınıflandırılırlar.

Kriyojeller, kısmen donmuş monomer veya polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan jel matrisleridir. Genel olarak kriyojeller birbirine bağlı makrogözeneklere (veya süpermakrogözeneklere) sahiptir. Bu özellikleri kriyojellerin nano-mikro ölçek aralığında herhangi bir difüzyon sorunu olmaksızın kullanımına olanak sağlamaktır. Kriyojellerin osmotik, kimyasal ve mekanik kararlılığının yanında eşsiz yapısal özellikleri sayesinde, biyolojik nanopartiküllerin (plasmidler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta tam hücrelerin (*E. coli*)

kromatografik ayrılmasında kullanılması mümkündür. Polimerik jeller, biyoteknolojide kromatografik malzeme, molekül ve hücrelerin immobilizasyonu için taşıyıcı, katı kültür ortamı ve elektroforez için matriks olarak kullanılmaktadır.

İnterferonlar, tüm memeli türlerinin somatik hücrelerince sentezlenip salgılanan biyolojik aktif proteinlerdir. İnterferon proteinleri, antijenik ve yapısal farklılıkları temel alınarak alfa (α), beta (β) ve gamma (γ) olarak sınıflandırılır. İnsan interferon- α (INF- α), antiviral, antiproliferatif ve immün-düzenleyici aktiviteli hücre dışı sinyal proteinlerinin bir ailesini kapsar. Bu proteinler, virüs ya da başka bir yabancı madde tarafından uyarılması sonucu lökositler, lenfoblastoid ve miyeloblastoid hücre hatları tarafından üretilir. Bazı kanser tiplerine karşı tıropatik etkisi bu proteine ilgiyi son yıllarda artırmıştır. Özellikle böbrek kanseri, malignant melanom, multipl miyeloma, karsinoid tümör, lenfoma ve lösemnin bazı tiplerini içeren hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Rekombinant IFN- α aynı zamanda AIDS'le ilgili hastalıklardan Kaposis Sarcoma (KS) ve kronik hepatit B ve C tedavisinde de kullanılır. İnterferonlar yıllarca çeşitli kaynaklardan, metal-şelat, çöktürme, katyon-değiştirme, anyon-değiştirme, jel filtrasyonu, hidrofobik ve immünoafinite kromatografiyi içeren çeşitli yöntemler ile saflaştırılmış ve homojen protein eldesine imkân veren bazı yöntemler sunulmuştur. Etkin ayırma ve saflaştırma teknikleri tıbbi saflıkta ürünlerin elde edilmesi için gereklidir. Tıbbi teşhis ve tedavi amacıyla kullanılan ürünlerin istenilen saflık derecesi % 99.99'dur ve bu amaçla üretilen proteinlerin hazırlanmasında toplam maliyetin önemli bir kısmını saflaştırma işlemleri oluşturur. Tıbbi amaçla kullanılacak protein için işlem süresinin ve maliyetinin azaltılması önemlidir.

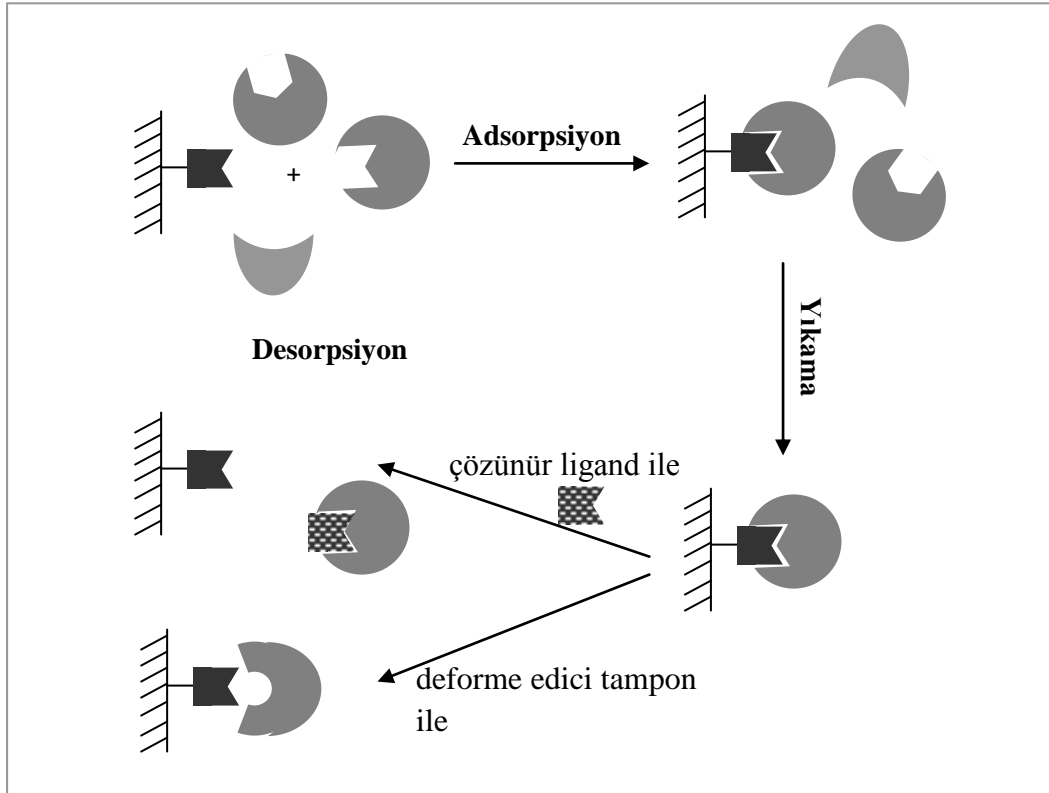
Bu çalışmada rekombinant insan interferon- α için Cibacron Blue F3GA bağlı poli(HEMA) temelli kriyojellerin hazırlanması ve hazırlanan adsorbentin interferon saflaştırılmasında kullanım potansiyeli incelenmiştir. Bir boya ligandı olan Cibacron Blue F3GA poli(HEMA) temelli kriyojellere kovalent olarak bağlanmış ve rekombinant insan interferon-alfanın adsorpsiyon-desorpsiyon davranışları incelenmiştir. Poli(HEMA) temelli kriyojellerin performansına olan etkilerinin

araştırılması için adsorpsiyon şartları (rekombinant interferon alfa derişimi, ortam pH'sı, iyonik gç ve sıcaklık) gibi sistem parametreleri değiştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Afinite Kromatografisi

Biyofinite kromatografisi biyolojik olarak aktif maddelerin eşlenik bileşenlerini çok seçici ve tersinir olarak bağlama yeteneklerine dayalı bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir. Bu maddeler genellikle ligand, afinite ligandı veya afinant olarak adlandırılır. Enzimlerin, inhibitörleri, substratları, kofaktörleri veya efektörleri ile aktif veya düzenleyici bölgeleri ile yaptığı kompleksler; antikorların, antijen veya haptenlerle yaptığı kompleksler; lektinlerin, karbonhidratlar ile yaptığı kompleksler; nükleik asitlerin nükleotidlerle yaptığı kompleksler; hormon ve toksinlerin; reseptörlerle oluşturduğu kompleksler; taşıyıcı proteinlerin, vitaminler ve şekerlerle yaptığı kompleksler biyofinite kromatografisine örnek olarak gösterilebilir.



Şekil 2.1. Biyofinite kromatografisinin şematik gösterimi.

Ligandın kovalent olarak bağlandığı katı destek, kromatografik kolonda sabit faz olarak kullanılır. Biyoafinite kromatografisinin şematik gösterimi Şekil 2.1’de verilmiştir. Ayrılacak olan biyomolekülü içeren ham karışım kolondan geçirilir, belirlenen deneysel koşullarda immobilize olan afinite ligandı ile etkileşime girecek uygun grupları bulunmayan moleküller kolondan alıkonmadan çıkarken, afinitesi olanlar, kolonda adsorplanırlar. Daha sonra adsorplanan biyomolekül ortam koşulları değiştirilerek (pH, iyonik şiddet, sıcaklık değişimi veya üre, guanidin gibi ayrıştırıcı ajanlar ile) veya ligandın çözeltisi kullanılarak kolondan ayrılırlar. Ligand ile saflaştırılan biyomolekül arasında kompleks oluşumu iyonik etkileşim, hidrofobik kuvvetler, London dispersiyon kuvveti, dipol-dipol etkileşimi veya yük-transfer etkileşimleri gibi genel moleküler kuvvetler ile gerçekleşir. Bu kuvvetlerden birkaçının aynı zamanda gerçekleşmesi biyospesifik bağın seçiciliği ve etkinliğini oluşturan en temel etmendir (1,2).

Afinite kromatografisi, enzim ve antikor gibi büyük moleküllerin saflaştırılmasında veya küçük moleküllerin araştırılmadan önce seçilip çıkarılmasında kullanılır. Ayrıca hücre ayırma işlemi de afinite kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilebilir. Tablo 2.1’de afinite kromatografisinin en çok kullanıldığı biyolojik sistemler gösterilmiştir (3).

Tablo 2.1. Afinite kromatografisinde en çok kullanılan biyolojik sistemler.

Saflaştırılacak madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkaritler, glikoproteinler, hücre yüzey reseptörleri, hücre
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein
Hormon	Reseptör protein
Vitamin	Taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik protein, lektin

2.1.1. Afinite Kromatografi Türleri

Orijinal “afinite kromatografisi” terimi, farklı spesifik etkileşim ve işlemlerinin çeşitlerini içeren geniş bir anlama sahiptir. Afinite uygulamalarının bu geniş kapsamın çoğu kendi sahip olduğu isimlendirme teknikleri ile tanımlandığı birçok alt dalların gelişmesini sağlamıştır. Bu alt dallardan bazıları Tablo 2.2’de verilmiştir. Tabloda görülen bu alt dallardan bazıları yararlı teknikler olarak kabul görmektedirler (4).

Tablo 2.2. Afinite kromatografisinin alt dalları.

Afinite Kromatografisi	Hidrofobik Kromatografi
	İmmünoafinite Kromatografisi
	Kovalent Afinite Kromatografisi
	Metal Şelat Afinite Kromatografisi
	Moleküler Baskılanmış Polimerler
	Membran Afinite Kromatografisi
	Afinite Kuyruk Kromatografisi
	Lektin Afinite Kromatografisi
	Boya-Ligand Afinite Kromatografisi
	Reseptör Afinite Kromatografisi
	Zayıf Afinite Kromatografisi
	Perfüzyon Afinite Kromatografisi
	Tiyofilik Afinite Kromatografisi
	Yüksek Performans Afinite Kromatografisi
	Afinite Yoğunluk Kromatografisi
	Kütüphane Türevli Afinite Kromatografisi
	Afinite Çöktürme
	Afinite Kapiler Elektroforez
Afinite Elektroforez	
Santrifüj Afinite Kromatografisi	
Afinite İtme Kromatografisi	

2.1.2. Afinite Kromatografisi Uygulama Alanları

Biyoafinite kromatografisinin başlıca amacı biyomoleküllerin saflaştırılması ve ayrıştırılmasıdır. Son yıllarda biyoafinite kromatografisi sadece proteinlerin değil, aynı zamanda nükleik asitler ve hücrelerin de ayrılmasında başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Protein saflaştırılması afinite kromatografisinin ana amacıdır. Bu tekniğin geliştirilmesi (matriks seçimi, yöntem geliştirilmesi) gerçekte protein saflaştırmanın bir fonksiyonu olarak yapılmıştır. Bu alanda, proteinlerin saflaştırılması ya gerçek afinite ya da yalancı spesifik afinite kromatografisi ile yapılır. İlk durumda ligand, bir substrat, kofaktör, veya antikor olabilir. İkinci durumda ligand, basit (aromatik, hidrofobik vb.) ya da kompleks etkileşimde bulunan sentetik ya da doğal bir moleküldür. Örnek olarak albümin, dehidrojenazlar, kinaz gibi pek çok proteine afinite gösteren Cibacron Blue F3GA verilebilir.

2.1.3. Destek (Matriks)

Matriks, biyospesifik ligandın üzerine kovalent olarak bağlandığı malzemedir. Matriks seçiminde dikkat edilmesi gereken ilk husus matriksin fiziksel ve kimyasal olarak kararlı olmasıdır. Bunun yanı sıra yüksek akış hızına da dayanıklı olmalıdır. Matriks tek başına ayrılması istenen biyomolekül ile hiçbir etkileşime girmeyecek şekilde inert ve saf olmalıdır. Matriksin gözenek yapısının biyomolekülün gözeneklere girmesine ve liganda bağlanmasına olanak sağlayacak şekilde büyük olması gerekir. Ayrıca matriks ucuz olmalı ve tekrar kullanılabilirdir.

Destek malzemesi olarak agaroz, selüloz, silika ve değişik organik polimerler kullanılabilirler. Afinite kromatografi ayırımı için kullanılan bazı ticari polimerik destek malzemeleri Tablo 2.3'de verilmiştir (5).

Yüksek biouyumluluğu olan hidroksialkilmetakrilatlar, medikal uygulamalarda en uygun biyomalzemelerden biri olarak düşünülmüştür. Bu tür matrikslerin en iyi bilineni Spheron ve Separon ticari adıyla satılmaktadır. Hidroksietilmetakrilat ve

etilendimetakrilatların inert solventler varlığında sulu çözeltilerde heterojen süspansiyon kopolimerizasyonu ile sentezlenirler. Bu işlem sonucu nötral, mikrogözenekli ve yüksek derecede çapraz bağlanmış makropartiküller elde edilir. İç yapı, gözenek boyutu ve dağılımı, yüzey özellikleri, reaktif -OH gruplarının sayısı ve moleküler ağırlık geçirgenlik limiti 20.000'den 20.000.000'a kadar değişebilir.

Tablo 2.3. Ticari olarak bulunan bazı afinite destek malzemeleri.

Destek Malzemesi	Üretici	Ticari Marka
Geleneksel Afinite Kromatografisi		
Agaroz	Pharmacia LKB, İsveç	Sepharose
	Bio-Rad, ABD	Bio-gel
	Bio-Rad	Affi-gel blue
Selüloz	Amicon, ABD	Matrex Cellufine
Dekstran	Pharmacia LKB	Sephadex
Agaroz/Poliakrilamid	IBF, Fransa	Ultrogel
Poliakrilamid/Dekstran	Pharmacia LKB	Sephacryl
Poliakrilamid	Röhm Pharma, Almanya	Eupergit C
	IBF	Trisacryl
	Bio-Rad	Affi-gel
PHEMA	Tessek, Çek Cumhuriyeti	Separon H 1000
Metakrilat	Merck, Almanya	TSK-Gel Toyopearl
	Alltech, ABD	Separon
Kontrollü Gözenekli Cam	Pierce, ABD	CPG
Yüksek Performans Sıvı Afinite Kromatografisi		
Polimer Kaplı Silika	J.T. Baker, ABD	Prepscale
Silika	Dupont, ABD	Zorbax
	Shandon, İngiltere	Hypersil WP300
	Merck	Lichrosphere
	Beckman, ABD	Ultrasphere
	Waters, ABD	Spheron
Metakrilat	Alltech	Eupergit
Sentetik Polimer	Dyno Particles, Norveç	Dynospheres
Vinil Polimer	Merck	Toyopearl
Polistiren	PerSeptivebiosytems, ABD	Poros-50
Membran Afinite Kromatografisi		
Silika-PVA	FMC, ABD	Acti-Disk
Cam	Schott Glass, Almanya	Bioran-M

Diğer hidrofilik matriks türlerinin aksine, makrogözenekli yapı kuru halde de korunur. Jel hacmi pH değişimiyle veya organik çözücülerde değişmez ve diğer sentetik polimerler gibi mikrobiyal ataklara dayanıklıdır. Organik çözücülerden etkilenmemesi matriksin modifikasyonu için önemli bir avantajdır. Akrilik asit ve türevi olan matrikslere göre mekanik ve kimyasal kararlılığı daha yüksektir. Yüksek yapısal kararlılık nedeniyle matriks mükemmel akış karakteristikleri gösterir. Isısal bozunma sadece 250°C üzerinde gözlenir. α -Atomuna bağlı CH_3 grubu, sterik faktörler nedeniyle ester grubunu hidrolize karşı korur.

Ligand bağlanması için gerekli reaktif grup yan zincirlerdeki $-\text{OH}$ 'lardır. Agaroz ile karşılaştırıldığında non-spesifik adsorpsiyon çoğunlukla hidrofobik etkileşimler nedeniyle hidroksietilmetakrilatlarda daha büyüktür. Bu hidrofobik özellik protein ve peptidlerin hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılabilir (6- 11).

2.1.4. Ligand

Matrikse kovalent olarak bağlanan ve ayrılması veya saflaştırılması istenen biyomoleküle özel, seçimli afinite gösteren ve onu spesifik olarak tanıyıp bağlayan maddelerdir.

Ligandı matrikse bağlamak için genelde kimyasal immobilizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Birçok durumda ligandın matrikse bağlanması için bağlayıcı malzemeler kullanılır. En çok kullanılan grup metil (CH_3) grubudur. Matriksleri kimyasal olarak kararsız duruma getirmek ve ligand ile bağlanmasını sağlamak için birçok aktivasyon yöntemi kullanılmaktadır. En çok kullanılan aktivasyon yöntemi siyanojen bromür (CNBr) aktivasyonudur. Ligandın amino grubu içermediği, matriks ve ligand arasına değişen uzunlukta hidrokarbon zincir konması gerektiği durumlarda siyanojen bromür ile aktive edilmiş taşıyıcı alifatik diamin bileşikler reaksiyona girerek ω -alkil türevleri elde edilir. İyi bir ligand ilk olarak saflaştırılacak madde için özgün ve dönüşümlü bağlanma özelliklerine sahip olmalıdır. Ayrıca matrikse bağlama aktivitesini bozmayacak şekilde tutunmasını sağlayacak kimyasal olarak modifiye edilebilir gruplara sahip olmalıdır.

Biyomoleküllerin saflaştırılmasında birçok ligand kullanılmaktadır. İmmobilize edilmiş lektin birçok glikoproteinin saflaştırılmasında kullanılır. Hormon-reseptör kompleksinde reseptörler hormonların, hormonlar da reseptörlerin saflaştırılmasında kullanılır.

Afinite kromatografisi temelde üç adımda incelenebilir.

1. Kullanılacak ligandın seçimi
2. Kullanılacak destek matriksinin seçimi
3. Uygulanacak kimyasal yöntemin seçimi

Kullanılacak ligandın seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli nokta ligandın proteine karşı spesifikliğinin fazla olması ve bağlanmanın geri dönüşümlü olmasıdır. Kromatografi sırasında uygulanacak kimyasal işlemlere karşı ligandın kararlı olması da gerekir.

2.2. Boya Ligand Afinite Kromatografisi

Oligonükleotidler, nükleik asitleri, proteinleri, oligopeptidleri, aminoasitleri, antijenleri, kofaktörleri, koenzimleri ve enzimleri içeren fonksiyonel moleküllerin geniş bir çeşidi yeni afinite sorbentlerinin tasarımında ligand olarak kullanılabilir. Bu ligandlar çoğu durumda aşırı derece spesifiktirler. Bununla beraber hem yüksek üretim maliyetinden hem de geniş saflaştırma basamaklarından dolayı pahalıdır. Spesifik adsorbentlerin hazırlanma sürecinde bu biyoligandları destek matriksinde orjinal biyolojik aktivitesinde immobilize etmek zordur. Bir de kullanımı (adsorpsiyon ve elüsyon basamaklarında) ve depolanması sırasında geniş önlemler alınmalıdır (12-14).

Boya ligandlar, yukarıda dezavantajlarını verilen biyoligandların doğal biyolojik eşdeğerlerinin önemli alternatiflerinden biri olarak düşünülmektedir. Boya ligandlar, yüksek spesifite ile birçok protein tipine bağlanabilmektedir. Bunlar ticari olarak elde edilebilir, ucuz ve özellikle hidroksil grubu içeren matrikslere kolayca immobilize olabilirler. Kullanılan boya moleküllerinin hemen hepsi sentetiktir.

Ancak; biyomolekülleri, kofaktörleri ya da substratları taklit ettikleri; enzimlerin ve çoğu proteinlerin aktif kısımlarıyla spesifik ve tersinir etkileşimlere girebildikleri için hala afinite ligandları olarak sınıflandırılırlar.

Boya afinite kromatografisi, kinazlar ve Blue dekstran (büyüklüğüne göre ayırma kromatografisinde bir boşluk işaretleyicisi olarak kullanılan Cibacron Blue ve Dekstran karışımı) arasındaki beklenmeyen ilişkilerin gözlemlenmesi ile başlamıştır (15). İlk çalışmalarda, eritrosit piruvat kinaz, fosfofruktokinaz, glutatyon redüktaz ve bazı pıhtılaşma faktör proteinleri gibi birkaç protein Blue Dextran'lı molekül büyüklüğüne göre ayırma kromatografisi ile saflaştırılmıştır (16-18). Bu çalışmalar, reaktif boyaların ligand olarak davrandığını ve Cibacron Blue F3GA'nın proteinlerin bağlanmasından sorumlu olduğunu göstermiştir. Roschlau ve Hess ilk olarak maya piruvat kinazı saflaştırmak için Cibacron Blue F3GA boyasını kovalent olarak Sephadex G-200 üzerine doğrudan immobilize etmiştir (19). Bu çalışma Cibacron Blue F3GA immobilize edilmiş farklı adsorbentlerin birçok proteinin saflaştırılmasında kullanımının yolunu açmıştır (20-22).

2.2.1. Boya Ligandlarının Kimyasal Yapısı

Reaktif boyalar olarak bilinen tekstil boyalarının bir grubu, seçici ve tersinir bir şekilde çeşitli proteinlere bağlanabildiğinin belirlenmesinden sonra afinite kromatografisinde protein saflaştırma için kullanılmaya başlanmıştır. Boya afinite sistemlerinde kullanılan boyaların çoğu, bir reaktif gruba (genelde mono veya diklorotriazin halkası) bağlanan bir kromofor (azo boyalar, antrakuinon veya fitalosiyenin) grubundan oluşmaktadır. Bu gruplara ek olarak, sulu ortamlarda molekülün iyi çözünebilirliğinin sağlanması için sülfonik asit grupları vardır. Bu gruplar bütün pH değerlerinde negatif olarak yüklenmiştir. Bazı boyalar karboksil, amino, klorür, veya metal karışımı gruplardan oluşmaktadırlar. Boyaların çoğu aromatik halka üzerinde molekülün içinde veya dışında azot grubu içermektedir.

Bugün triazinil bazlı reaktif boyalar, yaygın olarak protein saflaştırmasında kullanılmaktadır. Siyanurik klorür (1,3,5-trikloro-sym-triazin) bu boyaların

sentezinde kullanılan temel bileşiktir (Şekil 2.2a). Elektronegatif atomlarının varlığı, yüksek ölçüde üç karbon atomunu pozitif yapar ve nükleofilik saldırılara karşı bu yüzden çok hassasdırlar. Kromofor molekülleri diklorotriazin boyalarındaki şekliyle bu moleküllere kolayca bağlanmaktadırlar. Procion serisi (İmperial kimya sanayisinden elde edilen) boyaların bu türlerine tipik bir örnektir (Şekil 2.2b). Bu moleküllerle anilin ve sülfanilitler gibi diğer nükleofilik yapıların yapıya eklenmesiyle ile monoklorotriazinil boyalar sentezlenmektedirler. Şekil 2.2c’de gösterilen Cibacron (Ciba-Geigy) ve Procion H monoklorotriazinil boyalarına iki örnektir. Cibacron ve Procion H serileri arasındaki tek fark, Procion H serisinde *meta-* ve *para-* konumda; Cibacron serisinde *orto-* konumunda bulunan sülfonat gruplarının konumlarıdır.

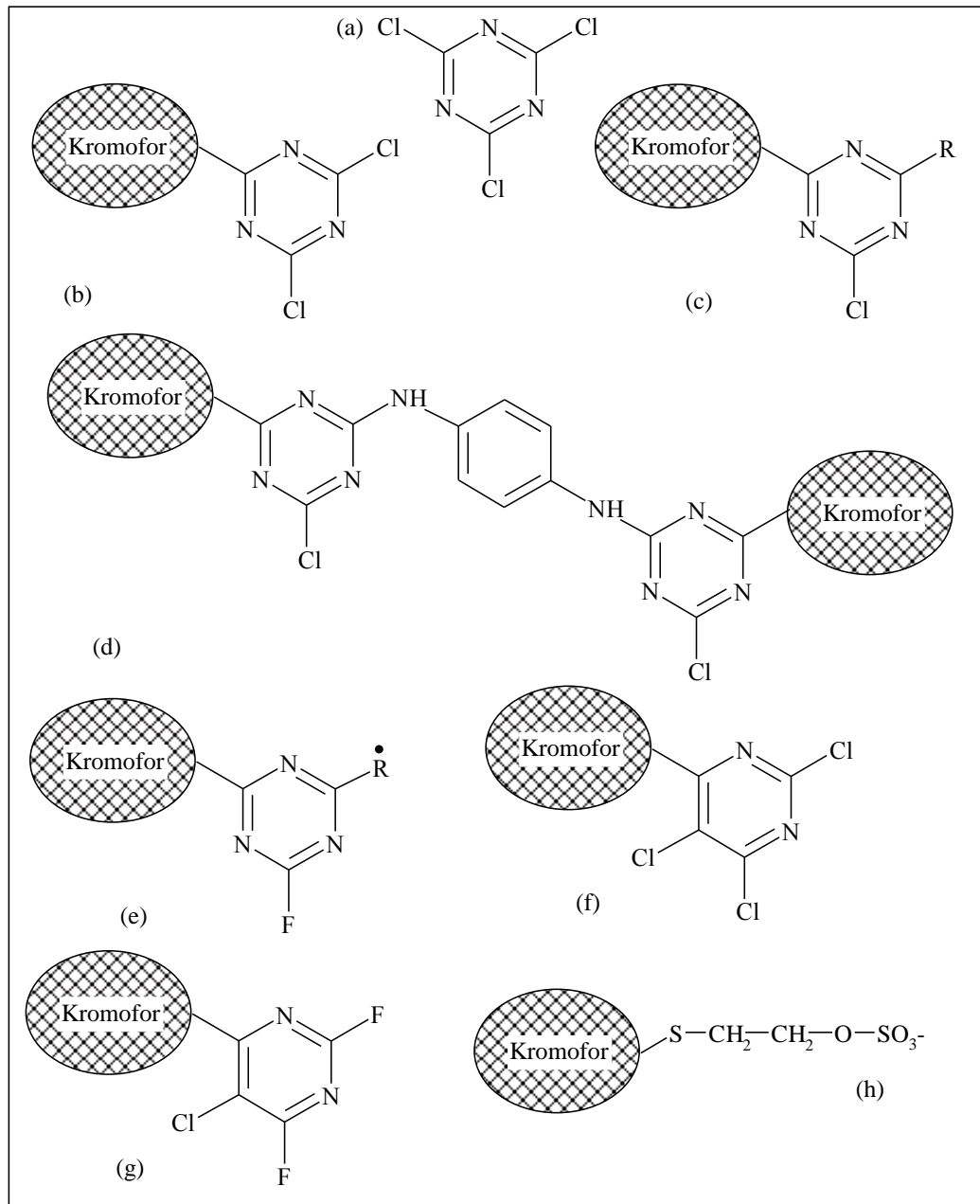
İki diklorotriazinil molekülleri bifonksiyonel triazinil boyaları şeklinde bir fonksiyonel molekül (diaminobenzen gibi) birleştirilebilir. Bu tür boyaların bir örneği Şekil 2.2d’de verilmiş olan Procion H-E’dir. Triazinil boyalarının diğer örnekleri Şekil 2.2e-g şeklinde sıralanmış olarak gösterilen trikloroprimidinil (Drimarene, Sandoz), diflorokloroprimidinil (Lavafix, Bayer ve Drimarene, Sandoz) ve monoflorotriazinil (Cibacron, Ciba-Geigy)’dir. Triazinil halkası üzerindeki klorür atomlarının diğer gruplarla yer değiştirdiğinde boyanın reaktifliğinin çok fazla miktarda azalmakta olduğu belirtilmelidir. Birkaç klorür veya florür gruplarına sahip olan boya molekülleri, ligand bağlanma basamağında matriks üzerindeki nükleofilik gruplarla kolayca reaksiyona girebilmektedir. Hoechst firmasının Remazol serisinden olan ve matrikse vinilsülfon aktif grubu ile bağlanan, triazinil grupları üzerinden bağlanmayan boyaların bir ilginç grubu protein saflaştırmada boya ligandları olarak kullanımını bulmuştur.

Hedef proteinler için tekstil boyalarının spesifitesini artırmak için önemli stratejilerden biri, boya yapısının yeniden düzenlenmesi veya yeni bir biçim verilmesidir. Ligandların bu yeni düzenlenmiş hali “biyomimetik boyalar” olarak adlandırılmaktadır. Bunlar yüksek spesifikliğı de içeren temel (modifiye edilmemiş) boyaların bütün avantajlarını taşımaktadır. Bu şekilde üretilen biyomimetik boyalar ilk olarak Lowe ve arkadaşları tarafından 1980’lerin başlarında kullanılmıştır. Daha

sonra birçok araştırmacı tarafından spesifik enzim saflaştırılması için başarılı bir Şekilde kullanılmıştır (23- 25).

İlk biyomimetik boya, bir diaminometilbenzen grubu yoluyla reaktif klorotriazin halkasına benzamidin baēlanması ile hazırlanmıştır. Bu boya, kemotripsinden tripsinin spesifik saflaştırılması için kullanılmıştır (26). Triazin halkasında iki tanınma bōlgelerine sahip boya ligandları, ham pankreasa ait bir parçadan kallikreini izole etmek için tasarlanmıştır (25). p-Aminobenzenil halkasından fosfatlanmış olan biyomimetik Cibacron Blue boyası, inorganik fosfatlı spesifik elüsyondan sonra bir kromatografi basamaēı ile buzaēı baēırsak atıklarından alkalen fosfatazları 280-330 kat fazla saflaştırmayı mümkün hale getirilmiştir (27). Diaminohekzan uzatıcı kolu kullanılarak hazırlanan benzer bir biyomimetik boya, aynı enzimi aynı kaynaktan 120-140 kat fazla saflaştırmak için kullanılmıştır (28). Benzer bir başarı, uç halka yapısı olarak trimetil amonyum, amido, alkol, fosfanat, karboksilat, sūlfonat gruplarından baēlanılarak modifiye edilen Cibacron Blue F3GA ile at karaciēerinden alkol dehidrojenazın biyomimetik boya ligand afinite sisteminde ayrılabil-diēi rapor edilmiştir (29).

Ölçümleme teknolojisindeki gelişmeler, özellikle çağdaş moleküler modelleme ve biyoinformatikte, çokça biyomimetik boya ligandlarının yeni dizilerinin tasarımında kullanılmaktadır. Birkaç proteinin nükleotid baēlayan kısmına spesifik olarak baēlanmayı ve anyonik koenzimlerde (NADH, FAD gibi) doēal olarak meydana gelen baēlanmayı taklit etmeyi başaran Cibacron Blue F3GA, Procion Blue H-B ve MX-R ve Vilmafix Blue A-R gibi boya ligandlarda, bu baēlanmadan sorumlu olan grupların aromatik sūlfonat ve antrakınon gruplarının olduēu belirlenmiştir (30,31). LDH'nin 3-boyutlu (3B) yapısının taslak olarak kullanılmasıyla L-LDH'nin afinite saflaştırılması için biyomimetik boyalar sentezlenmiştir (32). Bu boya ligandı kullanılarak L-LDH'nin kiral ayrılması gerçekleştirilmiştir. Biyomimetik yapının uçtaki bōlümü, bir ketoasit veya bir karboksi grubu taşımaktadır. Bu sayede L-LDH'nin doēal ligandlarını taklit eder ve enzimin afinite saflaştırmasında yüksek spesifiteye sahiptirler (33,34).



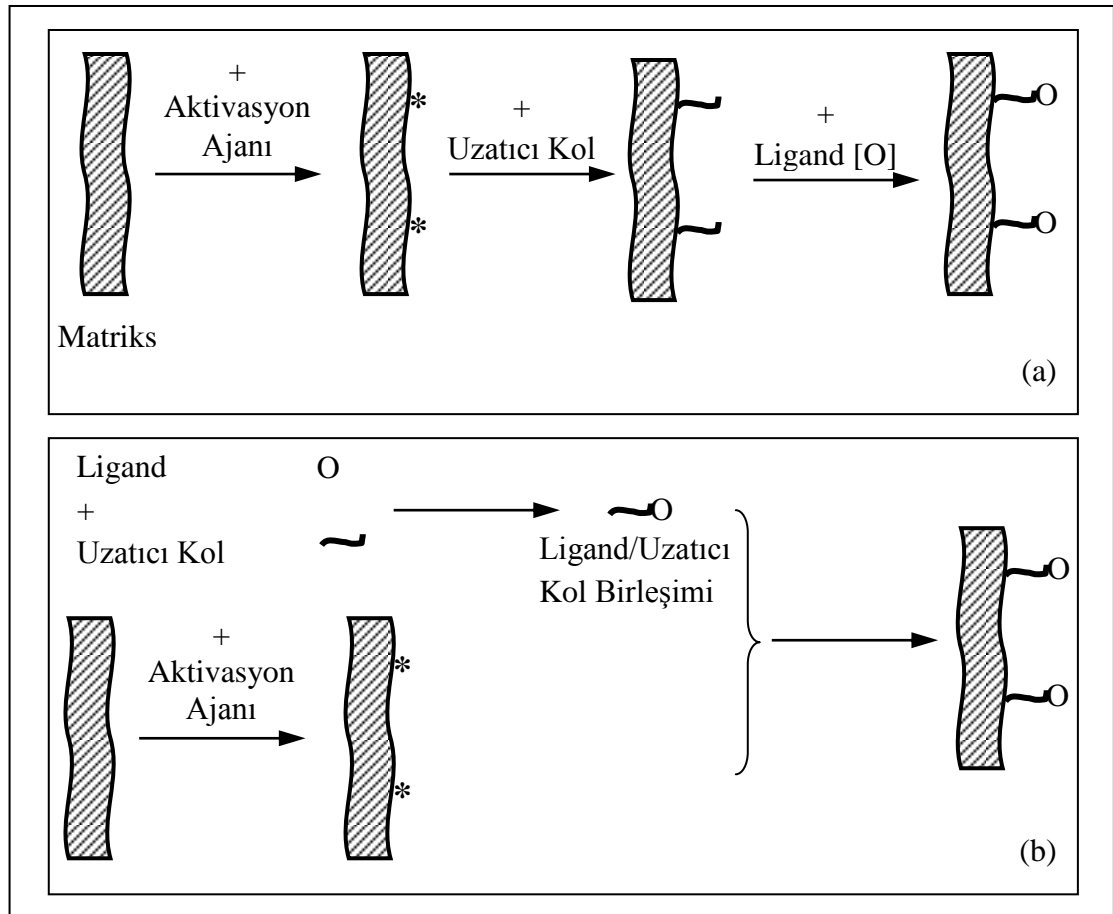
Şekil 2.2. Bazı reaktif boya moleküllerinin yapısı (a) siyanürik klorür, (b) Procion MX serisi, (c) Cibacron ve Procion H, (d) Procion H-E, (e) Monoflorotriazinil, Cibacron, (f) Triklorprimidinil, Drimarene, (g) Difloro-kloro primidinil, Levafix, (h) Sülfatoetil sülfan, Remazol.

Ketoasit gruplu bilinen enzimler (format dehidrojenaz, oksaloasetat dekarboksilaz ve okzalot oksidaz gibi), biyomimetik ligandlar (merkaptoprivük, m-aminobenzoik, aminoetiloksamik gibi biyomimetik boya ligandlar) kullanılarak

saflaştırılmıştır (35,36). Moleküler modelleme, insan IgG, insülin öncüleri ve protein A için boya ligandı olmayan triazinin tasarımı için çalışmalar devam etmektedir (37).

2.2.2. Kromatografik Matrikse Ligand İmmobilizasyonu

Destek matriksinde ligand immobilizasyonu için genellikle takip edilen birkaç ara adım ve yöntem vardır (38-40). Başarılı bir ligand immobilizasyonu için ana noktalar aşağıda verilmiştir. Hem matrikse hem de ligand'a bağlı olan koşullar ve immobilizasyon yönteminin doğru seçilmesine dikkat edilmelidir.



Şekil 2.3. Destek matriksine ligandın bağlanma teknikleri. (a) uzatıcı kolla bağlanma, (b) uzatıcı kol-ligand birleşimi ile bağlanma.

Her şeyden önce immobilizasyon, immobilize ligand ve hedef moleküllerini arasındaki özel etkileşimi garanti etmek için, ligand molekülünün aktif bölgesinin

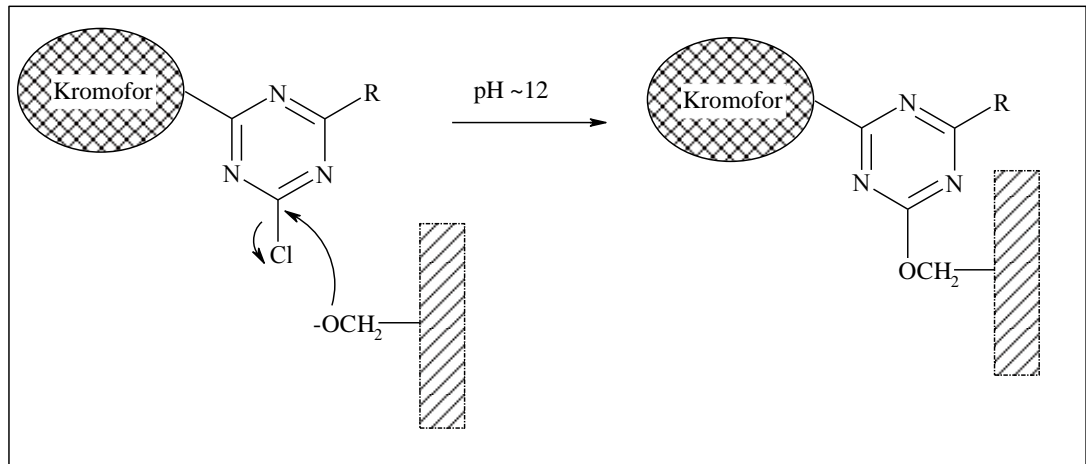
uzağında bulunan en az kritik bölge boyunca çalışılmalıdır. Kimyasalların ve uygulanan deneysel koşulların aktivasyon ve bağlanma basamakları sırasında ligand moleküllerine zarar vermemesine (aktivitesini ve fonksiyonunu kaybetmek anlamında) dikkat edilmelidir. Bu yüzden en uygun koşullar belirlenmeli ve uygulanmalıdır.

Biyolojik moleküllerin aktif bölgeleri çoğunlukla molekülün üç boyutlu yapısının içinde yer almaktadır. Bu bölgeler ligand ve hedef molekülleri arasındaki tamamlayıcılığa önemli bir sterik engellemeye sebep olabilen derin bölgelerdedir. Bu durumlarda genellikle kısa alkil zincirlerinden oluşan uzatıcı kollar sık sık matriks ve ligandın arasında hedefe erişilebilirliğini garanti etmek için kullanılmaktadır. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi, iki alternatif işlem izlenebilir. Matriks, bir aktive edici ajanla muamele edilerek aktifleştirilir. Daha sonra uzatıcı kolu, aktif noktalar boyunca matrikse kovalent olarak bağlanır. Bu aşamadan sonra ligand, uzatıcı kolun diğer ucuna bağlanır. İkinci yöntemde; önce ligand-uzatıcı kol birleşimi sentezle birleştirilir ve sonra bir aktive edilmiş taşıyıcıya bağlanır.

Matriks ve ligand arasındaki bağlantı, adsorpsiyon ve elüsyon adımları esnasında adsorbentin beklenen tekrar kullanımı için kararlı olmalıdır. Reaktif boyaların birçoğu, boya moleküllerinin triazinil gruplarından (klorür ve florür atomları) matriks üzerindeki reaktif gruplar (genellikle hidroksil grubu) arasındaki doğrudan etkileşimle matriks üzerine immobilize edilmektedir. Reaktif olmayan boyalar, genel aktif hale getirme işlemleri ile matriksle birleştirilebilir (41).

Hidroksil gruplarının modifikasyonu ile reaktif triazinil boyalarının matrikslere doğrudan bağlanması basit, ucuz ve güvenilir bir yöntemdir (42,43). Bağlanma işlemi, boya molekülü üzerindeki reaktif klorür ile hidroksil gruplarının nükleofilik yer değiştirmesiyle bazik şartlarda gerçekleşmektedir (Şekil 2.4). Nükleofiller matriks hidroksil gruplarının iyonizasyonunu arttıran yüksek pH'da üretilmektedirler. Yüksek pH'nın (genellikle 12'nin üstü) sulu ortamda klorotriazinlerin hidrolizine sebep olabileceğine dikkat edilmelidir. Bu yüzden çok yüksek pH değerinden kaçınılmalıdır. Matriks hidroksil grupları ve reaktif boyaların

birleşmesi için matriks, pH 10-11'de yaklaşık % 0.2 boya içeren sulu ortamda (0.1 M NaHCO₃, % 1 Na₂CO₃ veya 0.1 M NaOH eklenmesiyle) bekletilmektedir. Bir tuz (%2'lik NaCl gibi), hem matriks yüzeyine boya moleküllerinin adsorbe olmasını ve tuzu dışarı atan bekleme ortamında eklenmektedir. Böylelikle hidroliz ve immobilizasyon kolaylıkla gerçekleşebilmektedir. Birleşme monoklorotriazinil (Cibacron ve Procion H gibi) boyaları ile yaklaşık 2 veya 3 günde 10-12 pH'ta oda sıcaklığında başarılabilir. Bununla beraber yüksek reaktivliklerinden dolayı 1-2 saat aynı şartlarda diklorotriazinil boyaları (Procion MX gibi) için yeterli olabilmektedir. Monoklorotriazinil boyalarda benzer yer değiştirme reaksiyon hızlarına ulaşabilmek için daha yüksek sıcaklıkların (80-90 gibi) uygulanması gerekir.



Şekil 2.4. Hidroksil grupları üzerinden matrikse triazinil boyalarının bağlanması.

İmmobilizasyondan sonra fiziksel olarak bağlanmış boya moleküllerinin uzaklaştırılması ve/veya adsorpsiyon işlemi sonrasında bağlanan bütün protein moleküllerinin desorpsiyonu için adsorbentler, ilk önce su ve daha sonra farklı tuz/deforme edici ajan çözeltileriyle yıkanmalıdır. Desorpsiyon ajanı olarak su içerisinde 1-2 M tuz, 0.5 M NaOH'de 6 M üre, 8 M üre, dimetilsülfoksit, 1-10 mg/ml BSA, etilen glikol ve % 20'lik etanol kullanılabilir. Boya immobilize adsorbentler, pH 8-9'da seyreltilmiş bakteriyel hücrelerin gelişimini önlemek amacıyla uygun bir tampon çözeltisinde (% 25 etanol veya % 0.02 sodyum azür gibi) saklanmalıdır.

Triazinil boyalar, sülfidril veya amino grupları içeren adsorbentlere daha hızlı immobilize edilebilmektedir. Örneğin epiklorohidrin ile aktive edilmiş olan agaroz yüzeyinde amino grubu oluşturmak için amonyakla muamele edilebilmektedir. Amonyak yerine sodyum sülfid kullanılarak tiyol grubu içeren matrikse dönüştürülebilmektedir. Azot bağlı boyalar geleneksel boyalardan daha kararlıdır. Bununla beraber; bu adsorbentlerden proteinleri elüe etmek zordur. Şunu not etmek gerekir: kükürt bağlı boyaların NaOH'le yıkanamayacağına dikkat edilmelidir.

Daha önce yukarıda bahsedildiği gibi; hedef protein molekülü ve immobilize ligand arasındaki etkileşimlerde olası sterik engellemeleri azaltmak için uzatıcı kollar, immobilizasyon aşamasında ligand ve matriks yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasına eklenmektedir. Poli(etilenimin), dekstran ve diaminoalkan uzatıcı kollar kullanılarak seçiciliğin artırılması mümkündür (44,45).

Alternatif olarak triazinil boyaları farklı aktifleştirici ajanlar ve uzatıcı kol molekülleri kullanılarak antrakuinonun amino gruplarından agaroz adsorbentlere immobilize edilmiştir. Bu adsorbente Cibacron Blue ve Procion H-B immobilize edilmiş ve at karaciğer alkol dehidrojenazın saflaştırılmasında kullanılmıştır (46). Boya-ligand immobilizasyonunda dikkate alınması gereken önemli noktalardan biri de kullanılan boyanın saflığıdır. Tekstil boyaları çoğunlukla stabilize edici ajanlar (fosfat tamponu gibi), dilüentler (NaCl gibi) ve boyaların tutunma özelliklerini artıran toz uzaklaştırıcı ajanları (dodesilbenzen gibi) ve bir de ana komponentin izomerleri gibi türlü küçük bileşenler içerir. Bu kontaminantlar, afinite ligandları olarak kullanımında boyaların özelliklerine ters etki yapmakta ve bu yüzden kullanımdan önce uygun teknikler uygulanarak uzaklaştırılmalıdır (47).

2.2.3. Boya Ligandlar ve Proteinler Arasındaki Etkileşimler

Bir proteinin aktif bağlanma bölgesi, iyonik, polar ve hidrofobik grupların üç boyutlu yapı içinde yalnız bir stereokimyasal düzenlenmenin olduğu ve belki de polipeptid zincirlerinin en geniş esneklik göstermekte olduğu kısmıdır. Boya ligand molekülleri, proteinlerle kuvvetli ve spesifik bağlanmayı sağlamak için bu

bölgelerden kovalent olmayan etkileşimlere girmektedirler.

Bazı kinetik çalışmalar, triazinil boyalarının doğal ligandlar bağlanmasını diye enzimlerin doğal biyolojik ligandları (NADH, NADPH, NAD⁺, NADP⁺, GTP, IMP, ATP, HMG-KoA, folat v.b.) için sahip oldukları spesifik bağlanma bölgelerinden (substrat veya koenzim bağlanan bölge, veya enzimin aktif bölgesi) enzimlerle etkileşmekte olduğunu göstermektedir (48,49). Bu etkileşimlerde yarışmalı, yarışmasız ve karışık inhibisyonun bazı çeşitleri gözlemlenmektedir.

Triazinil boyaları (aromatik kromoforla sülfatlanmış olan) mono, di, ve trifosfatlı nükleotidler, NAD, NADH, flavinler, asetil KoA ve folik asit gibi heterosiklik molekülleri doğal olarak taklit etmekte ve tipik nükleotid bağlayan enzimleri farklı etkilerle inaktive etmektedirler (50). Böylece bu boyalar glikoziltransferazlar için afinite ligandları olarak kullanılabilirler.

UV-görünür, FTIR, NMR, ESR ve yuvarlak dikroizm'i (polarize ışığı sağa veya sola çevirmesine göre çalışan spektrofotometre) içeren birkaç spektrofotometrik teknikler, yarışmalı ligandların (substrat, koenzim gibi) ve tuz ve organik çözücüler varlığında boya-protein etkileşimlerini açıklamak için kullanılmaktadır (51,52). Bu çalışmalar boyanın ve enzimin her ikisinin de birlikte önemli olduğunu ve bu etkileşimlerin elektrostatik ve hidrofobik etkilerin bir karışımı olabileceği ve düşünülen aksine rastgele olmadığını açığa çıkarmıştır.

Temel boyaların (özellikle Cibacron Blue F3GA), ATPaz, fosfokinaz ve oksidoredüktaz ile etkileşimleri incelenmektedir (53,54). Bu çalışmalar boyalar üzerindeki antrakinon ve komşu benzen sülfonat halkalarının her ikisinin de enzimleri bağlamada önemli olduklarını göstermiştir. Ayrıca, koenzimin AMP parçasına benzer bir yoldan ve benzer bir pozisyonda enzim moleküllerine bağlandıkları belirlenmiştir. Moleküler modeller, Cibacron Blue F3GA ve NAD⁺ arasında sıkı bir benzerlik olduğunu göstermektedir. En önemli benzerlikler negatif yüklü gruplar ve düz halka yapısıdır. Bu mavi boyanın karaciğer alkol dehidrojenaz'a NAD⁺ kısmında nikotinamidin değil de adenin ve riboz halkaları

uyuşması ile bağlandığı X ışın kristalografisi ile belirlenmiştir. Böylece boyaların ADP-riboz analogu olduğu tahmin edilmekte ve uygun enzimlerin bağlanan kısmındaki CTP, NADP⁺, NAD⁺, ATP, IMP ve AMP'lerdeki nükleotid kısımları ile etkileştiği düşünölmektedir. Cibacron Blue F3GA özellikle nükleotid bağlayan enzimler için ideal bir boya ligandı olmuştur.

Monoklorotriazinil boyaları (Cibacron Blue F3GA, Procion Blue H-B) tersinmez inaktive etmek için yeterince reaktif değillerdir. Fakat bazı istisnalar vardır (55). Divalent metal (Zn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ gibi) iyonlarının bu boyaların hem substrat hem de koenzim bağlanan kısmına birlikte bağlandığı; enzimlerin inhibisyonunu önemli ölçüde artırabilmekte olduğu gözlemlenmiştir. Diklorotriazinil boyaları (Procion Blue MX-R gibi) daha fazla reaktiviteye sahiptir ve koenzim bağlanan kısımdaki enzimleri (alkol dehidrojenaz gibi) geri dönüşümsüz olarak inaktive etmektedir (56).

Boya ligandları ve proteinler arasındaki etkileşimler kısaca şöyle özetlenebilmektedir: Boya molekülleri doğal ligandları taklit eder ve bazı protein moleküllerinin aktif merkezlerine çok spesifik olarak bağlanırlar. Bununla beraber bazı koşullar altında bütün proteinler boya ligand afinite adsorbentlerine adsorplanabilirler. Bir başka deyişle, proteinlerin diğer kısımları için bu ligandların büyük avantaj sağladığı anlamına gelmektedir. Çoğu proteinler elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağlanma ve yük transfer etkilerinin karmaşık bir kombinasyonu ile bağlanırlar ve bu bağlanmaların hepsi de boyaların doğal yapısı dikkate alındığında mümkün olmaktadır.

2.3. Makrogözenekli Kriyojeller

“Jel” adı altında toplanan polimerik malzemeler polimer-immobilize çözöcü sistemleridir. Bu malzemelerde makromoleküller 3B ağ yapısı oluşturacak şekilde birbirine bağlanmış durumdadır. Jel morfolojisi (homo- veya heterofaz) jel hazırlama yöntemine; bağların yapısı ise polimerlerin kimyasal özelliğine bağlıdır. 3B-ağ yapısı içerisinde immobilize olan çözöcünün rolü çok önemlidir.

Tablo 2.4. Polimerik jellerin sınıflandırılması ve üretim işlemleri.

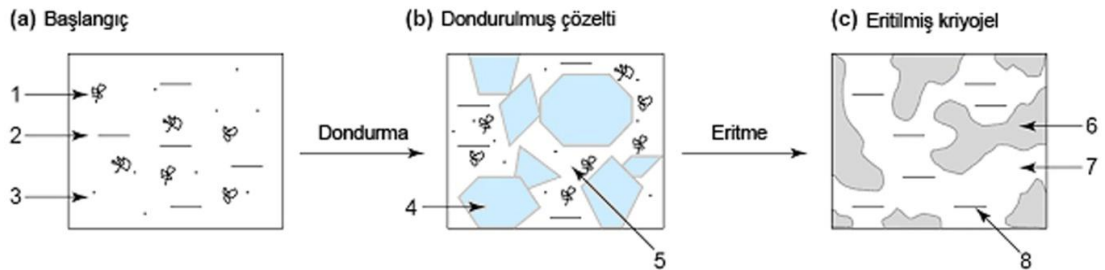
Polimerik jeller			
Tür	Jel oluşumu	Örnekler	Yorumlar
Kemotropik jeller	Moleküller arası kimyasal bağlar sonucu oluşan 3 boyutlu kovalent örgü	Poliakrilamid jeller Polistiren temelli iyon değişim reçineleri veya poliakrilat matriksler Sephadexler olarak bilinen çapraz bağlı dekstran	Büyük bir jel grubudur. Monomerik öncüllerin dallanmış polimerizasyonu sırasında ya da polimerik öncüllerin çapraz bağlanmasıyla oluşur. Biyoteknoloji alanında yaygın kullanılır.
İyonotropik jeller	Moleküller arası iyonik bağlara (tuzlar) kararlılık veren iyon değişim tepkimeleri	Aljinat-polilisın veya kitosan-polifosfat karışımı matriksler gibi polielektrolit kompleksler	Bu jeller belli kompozisyona sahip ortamda kararlıyken sıvı ortamın pH veya iyonik bileşeni değiştirildiğinde kolaylıkla çözünürler. İmmobilize mikrobiyel, bitki veya hayvan hücresi taşıyıcıları olarak kullanılırlar
Şelatotropik jeller	Moleküller arası koordinasyon bağlarına kararlılık veren şelatlanma tepkimeleri	Jel oluşumu çok dişli güçlü koordinasyon yapan metal iyonlarının eklenmesiyle sağlanır. Cu(II) veya Co(II) ile kitosan çözeltileri, Cr(III) ile karboksimetil selüloz çözeltileri veya Ca iyonları ile çapraz bağlanmış aljinat jelleri,	Ca-aljinat jeller hücre immobilizasyonu için kullanılırlar diğer şelatotropik jeller için henüz biyoteknolojik uygulamalar bulunmamıştır.
Solvatotropik jeller	Çözücü bileşenin değiştirilmesiyle oluşan jeller	Koaservasyon olgusu diye bilinen olay sonucu oluşur. Bu tür jelleşme filmlerin veya fiberlerin ıslak oluşumu sırasında bir ara basamaktır. Örn selüloz nitratlardan ve selüloz asetatlardan	Çözücü olmayan bir madde polimer çözeltisi ortamına eklendiğinde ortama olan polimer afinitesini düşürülerek ve kovalent olmayan polimer-polimer etkileşimleri oluşturularak jel oluşumunu sağlarlar.
Termotropik jeller	Başlangıç polimer sisteminin ısıtılmasıyla elde edilirler	Hidrofobik olarak modifiye edilmiş hidroksietil selüloz Ovalbümin ve yumurta beyazı jelleri Jelatin jeller Nişasta jelleri Agaroz ve agar agar jelleri Carrageenan jelleri	Moleküller arası hidrofobik etkileşimler jel oluşumunda önemli yere sahiptir.
Psikrotropik jeller	Jelleşme başlangıç polimer sisteminin soğutulmasıyla elde edilir		Biyoteknolojide kromatografik malzemeler ve elektroforez matriksleri olarak kullanıldığı gibi hücre kültürlemesi için katı ortam olarak da sıkça kullanılır.
Kryotropik jeller	Başlangıç sisteminin dondurulmasıyla elde edilir.	Bu çalışmanın içeriğini oluşturmaktadır.	

Çözücü sıkı polimer yapısının oluşmasına izin vermemekte ve sistemin çökmesini önlemektedir. Jeller, akış ve yıkılma olmaksızın tersinir deformasyonlara dayanabilen fiziksel malzemelerdir. Polimerik ağ yapısında bulunan moleküllerarası bağların yapısına göre jeller iki gruba ayrılır: kimyasal ve fiziksel jeller. Tablo 2.4’de jellerin daha detaylı bir sınıflandırılması özetlenmiştir.

Kriyojeller, kısmen donmuş monomer veya polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan jel matriksleridir. Genel olarak kriyojeller birbirine bağlı makrogözeneklere (veya süpermakrogözeneklere) sahiptir. Bu özellikleri kriyojellerin nano-mikro ölçek aralığında herhangi bir difüzyon sorunu olmaksızın kullanımına olanak sağlamaktadır. Kriyojellerin osmotik, kimyasal ve mekanik kararlılığının yanında eşsiz yapısal özellikleri sayesinde, biyolojik nanopartiküllerin (plasmidler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta tam hücrelerin (*E. coli*) kromatografik ayrılmasında kullanılması mümkündür. Polimerik jeller, biyoteknolojide kromatografik malzeme, molekül ve hücrelerin immobilizasyonu için taşıyıcı, katı kültür ortamı ve elektroforez için matriks olarak kullanılmaktadır. Polimerik jellerin geniş spektrumda kullanım olanağı bazı gereksinimlere sebep olmaktadır. Bu gereksinimler, biyolojik uygulamalar için yeni nesil jel malzemelerin geliştirilmesini ve üretimini tetiklemektedir. Biyoteknolojide uygulanma potansiyeli olan polimerik jellerden biri de kriyojellerdir. Kriyojeller, düşük veya yüksek molekül ağırlığına sahip monomer çözeltilerinin donma noktaları altında gerçekleştirilen kriyojenik uygulama yöntemi ile hazırlanmaktadır. Kriyojeller, ilk olarak 1960’lı yıllarda rapor edilmiş ve büyük ilgi görmüştür. Bu malzemelerin biyomedikal ve biyoteknoloji potansiyelleri ise yeni keşfedilmiştir (57).

Şekil 2.5’de kriyojellerin üretiminin şematik gösterimi verilmiştir. Kriyotropik jelleşme ile elde edilen polimerik malzemelerin morfolojisi donmamış sistemde üretilen jellere göre önemli farklılıklar göstermektedir. Kriyojeller, diğer kimyasal jeller sınıflarına (kovalent, iyonik, non-kovalent) göre farklıdır. Özellikle ısıl başlatıcılı jeller (termotropik) kriyojel hazırlanmasında kullanılamazlar. Bazı istinalar dışında, donma-kurutma yöntemiyle hazırlanan polimerik malzemeler, kriyojellerle benzer özellik göstermektedir. Çözücünün dondurulması ve çözücü

kristallerinin süblimleştirilmesiyle hazırlanan polimerik malzemelerde birbirine bağlı gözenekler içeren bir ağ sistemi elde edilmektedir. Fakat, donmamış sıvı fazda herhangi bir jel oluşumu gözlenmemektedir. Donma-kurutma yöntemiyle sadece ince filmler, plakalar veya küçük partiküller hazırlanabilmektedir. Donma-kurutma yöntemiyle silindir veya ince blokların hazırlanması teknik olarak mümkün değildir. Fakat, kriyojeller istenilen şekil ve boyutta bloklar, silindirler, granüller ve diskler halinde hazırlanabilmektedir. Ayrıca, kriyojellerin üretiminde çözücünün düşük basınçta uzaklaştırılmasına gerek olmadığı için donma-kurutma yönteminden daha kolaydır. Geniş birbirine bağlı gözenekli ağ yapısı, kriyojellerin temel yapısal karakteridir. Süngerimsi yapı içerisindeki gözenek sistemi analit moleküllerinin aktırımıyla taşınmasını kısıtlamamaktadır. Kriyojel içerisinde oluşturulan makrogözeneklerin boyutları 10-250 μm aralığında değişim göstermektedir. Geniş gözeneklerin oluşturduğu ağ yapısı kriyojeller nano-mikro aralığında ölçüğe sahip birçok biyomolekülün ayrılmasında destek malzemesi olma potansiyeli kazandırmaktadır.



Şekil 2.5. Kriyojel üretiminin şematik gösterimi:1,çözültideki makromolekül; 2, çözücü; 3, düşük molekül ağırlıklı çözünen molekülleri; 4, dondurulmuş çözücünün polikristalleri; 5, donmamış sıvı mikrofaz; 6, polimerik kriyojel; 7, makrogözenekler; 8, çözücü.

Kriyotropik jelleşme işleminin temel karakteristik özellikleri;

1) Jel oluşum ajanlarını içeren reaksiyon karışımı, çözücünün donma noktasının bir kaç derece altında dondurulur. Donmuş haldeki sistem, tek parça katı blok gibi görünmesine rağmen donmamış sıvı mikrofaz (UFLMP) içeren heterojen bir karışımdır.

2) UFLMP içerisindeki jel oluşum ajanlarının derişimi çözücünün donmasının etkisiyle yükselmiştir. Kriyoderişme olarak adlandırılan bu olay, donmuş sistemlerde jel oluşumunun hızlanmasına sebep olmaktadır. Aynı derişime sahip sıvı monomer çözeltilerine göre jelleşme oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir.

3) Çözücü kristalleri, gözenek oluşturucu ajan olarak işlev görmektedir. Çözücü eritildiğinde, boşluklar oluşmakta, makrogözenekler çözücü ile dolmaktadır. Çözücü ve jel faz arasındaki yüzey gerilimi, gözeneklerin yapısının yuvarlaklaşmasına ve gözenek yüzeylerinin daha düzenli olmasına sebep olmaktadır. Donma işlemi gerçekleştiğinde, çözücü kristalleri diğer kristallerle birleşene kadar büyümektedir. Eritme işleminden sonra jel içerisinde birbirine bağlı gözeneklerden oluşan bir ağ sistemi oluşmaktadır. Gözeneklerin şekil ve boyutları, birçok faktöre bağlıdır; monomer derişimi ve kriyotropik uygulama sıcaklığı en önemli etki eden faktörlerdir.

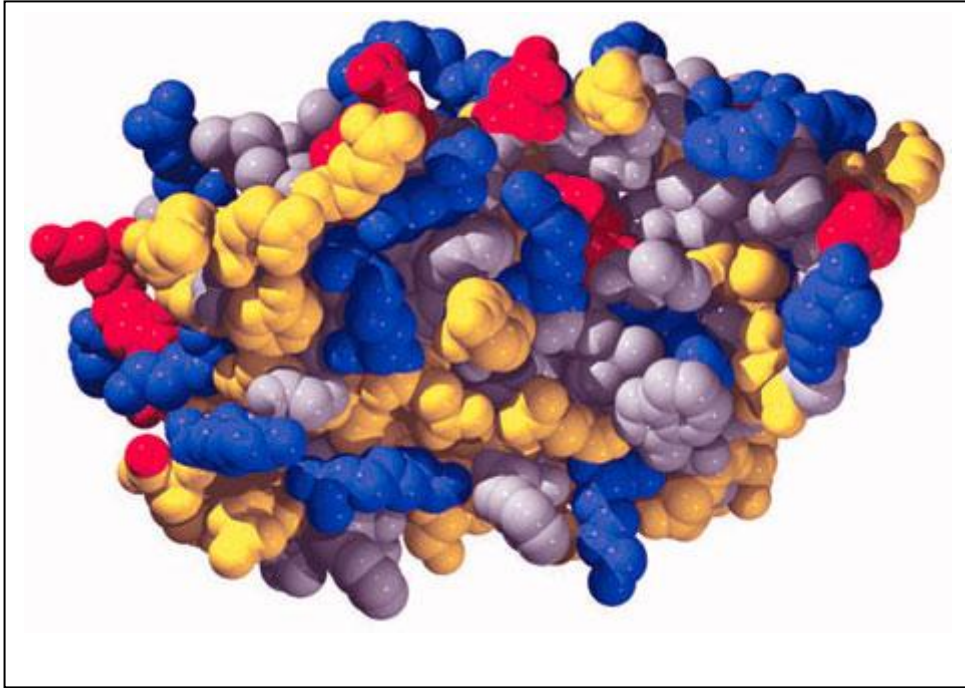
4) Kriyojellerin polimerik fazında mikrogözenek oluşumları gözlenmektedir. Bundan dolayı, kriyojeller hem heterofaz hem de heterogözenekli bir yapıya sahiptirler (Şekil 2.5).

2.4. İnterferonlar ve Bağışıklık Sistemindeki Rolü

Bağışıklık sistemimizin en önemli görevi, vücudumuzca “yabancı” olarak tanımlanan maddelere karşı doğal denetleme ve tepki etkileşimlerini sürdürmektir. Bu yabancı maddeler, dışarıdan vücudumuza giren istilacı mikroorganizmalar ya da kimyasallar olabileceği gibi, vücudun hasar görmüş ya da aksaklık gösteren kendi hücreleri de olabilir. Bunların başında da virüs etkisiyle enfeksiyon kapmış hücreler ve olağan hücre döngüleri bozulmuş olan kanserli hücreler gelmektedir.

Vücutta bu gibi "yabancılaşmış" hücreler, bağışıklık sisteminin belirli elemanlarınca tespit edilir ve bir dizi etkileşim sonucunda yok edilirler. Bağışıklık sistemi, enfeksiyonu yok etmek için işbirliği içinde çalışan organların, dokuların ve

hücrelerin karmaşık bir ağından meydana gelmektedir. İnterferonlar, yabancı patojenlerin saldırısına karşı bağışıklık sistemini başlatabilen çeşitli ve etkili kimyasal mesajcı proteinler olan sitokinlerin bir türüdür. İnterferon, etkileşimde olan komşu hücrelere sinyal vermekte ve yabancı hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını engellemektir (58). İnterferon ayrıca yabancı ajanları tanımlamada bağışıklık sistemin yeteneklerini artırabilmektedir. Bundan dolayı, sağlıklı bir yaşam için temel unsurlardan biri olarak değerlendirilmektedir. İnterferonun, birçok farklı hastalıkların tedavisinde antiviral ajan olarak ilaç şeklinde kullanılabilirliği, bu özel rolüne dayanmaktadır. Ayrıca, araştırmacılar günlük dozda burun spreyi olarak verilen interferonun, hastalıklardan ve enfeksiyondan koruyabileceğini göstermiştir. Fakat, interferonun farmakolojik şekli burun kanaması, yorgunluk, ağrılara ve baş ağrısı gibi yan etkilere sebep olmakta ve sadece belirlenmiş olan soğuk algınlığının tedavisinde kullanımı tavsiye edilmektedir (58).



Şekil 2.6. İnterferon Beta'nın 3 boyutlu moleküler yapısı.

2.4.1. İnterferonun Tarihçesi

Virüslerin sebep olduğu bulaşıcı hastalıkların yarısından fazlası insanlara zarar vermeye başladığından beri bilim adamları 1950'lerde virüslere karşı vücudun

nasıl savunduğunun ipuçlarını (interferonun keşfine yol açan) araştırmaya başlamıştır. Viral replikasyon üzerindeki çalışmalar esnasında, dünyanın farklı bölgesinden iki araştırmacı ayrı ayrı olarak interferonu keşfetmiştir. Birinci keşfe 1954'te Tokyo Üniversitesindeki araştırmacıların tavşanlarda virüslerin etkileri üzerinde yaptıkları çalışmada ulaşılmıştır. İlk enfeksiyon sonrasında gerçekleşen viral enfeksiyona tavşanlarda direnci sağlayan doğal bir protein belirlenmiştir. Bundan sonra 1957'de İskoçyalı virolog Alick Issaacs ve İsviçreli bilim adamı Jean Lindenmann, tavuk embriyolarını influenza virüsü ile enfekte ettikleri zaman, virüsleri yok eden hücreler tarafından üretilen ve embriyolarda herhangi bir diğer virüsün büyümesini yavaşlatan proteinlerin olduğunu bulmuşlardır. Issaacs ve Lindenmann bu proteini virüs replikasyonunu önleme kabiliyetinden dolayı interferon olarak adlandırmışlardır (59).

Daha sonraki araştırmalarda interferonun viral enfeksiyonlarda saatler içerisinde üretilmekte olduğu (antikorlar şekillenmek için birkaç gün alırken) ve bitkileri de içine alan canlıların çoğunluğunda koruyucu protein olarak görev aldığını belirlenmiştir. İnterferon viral enfeksiyona karşı hücrenin birinci savunma hattında görev alırlar. Vücut interferonu az miktarda üretildiğinden dolayı; bu proteinin spesifik olduğu (yani insan interferonunun sadece insanlarda işe yaracağı) düşünülmüştür.

Daha sonra 1960'ların sonunda Ion Gresser, Paris'te çalışan bir Amerikalı araştırmacı ve Finli virolog Kari Cantell, insan kan hücrelerinden kullanılabilir miktarda interferon yapmak için yeni bir yöntem geliştirmiştir. Monoklonal antikorlar, ilk olarak 1975'te üretilmiş ve interferon saflaştırılması daha büyük miktar aralığına gelmiştir. Daha sonraki yıllarda (1980'in ortalarında) genetik olarak düzenlenen interferonu üretimi başlamıştır. Aynı periyotta bilim adamları interferonun 3 sınıf olduğunu göstermiş ve bu spesifik olmayan interferonların diğer türlerde de bir yanıt üretebildiği belirlenmiştir.

Bu gelişmeler meydana gelirken Japon araştırmacılar, Çin bitkisel tıbbında kullanılan interferon üretimini arttıran bitkiler üzerine çalışmalar yapmaktaydılar.

Çalışma kapsamında interferon üretimi hızlandıran 200'den fazla bitki incelenmiş ve uygun kombinasyonlarda interferon üretimi hızlandıran dört farklı bitkiden etkin maddeler izole edilmiştir.

Bu geniş araştırmanın sonucu olarak interferon bugün ilaç şeklinde kuduz, herpes enfeksiyonu ve hepatit gibi viral hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Sağlıklı yetişkinlerde de bağışıklık sistemini güçlendirmek amacıyla interferon üretimini artırmak için doğal tedavi destek yöntemleri konusunda araştırmalar devam etmektedir (60).

2.4.2. İnterferon Tipleri

İnterferonlar genellikle tür spesifiktir ve çoğu omurgalı türü en az 3 tip interferon üretmektedir. Bunlar; interferon- α , interferon- β ve interferon- γ 'dır. İnsanlar interferon- α 'nın 16 tane yakın ilişkili tipini üretirken, interferon- β ve γ 'nın sadece bir tipini üretmektedir.

İnterferon- α ve interferon- β , aynı hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar ve aside dayanıklıdırlar. Bunlar tip I interferonlar olarak sınıflandırılırlar. İnterferon- γ ise aside dayanıksızdır ve farklı reseptörlere bağlanır. Bundan dolayı, tip II interferon olarak sınıflandırılmaktadır. Aşağıdaki tabloda interferonların biyolojisinin bir özeti sunulmaktadır.

Tablo 2.5. Geleneksel insan interferonları ve ilk olarak elde edildikleri hücre kaynakları.

İnterferon tipleri	Diğer ismi	İlk izole edildiği hücre tipi
İnterferon- α	Lökosit interferon veya lenfoblastoid interferon	Lökosit, lenfoblastoid hücreler
İnterferon- β	Fibroblast interferonu	Fibroblast hücreler
İnterferon- γ	Bağışıklık interferonu	Aktive olmuş T lenfositlerinden

2.4.2.1. İnterferon- α

İnterferon- α başlangıçta bu hücre tiplerinden elde edildiklerinden dolayı lökosit interferonu veya lenfoblastoid interferon olarak adlandırılmaktadır. İnsanlarda interferon- α 'nın en az 16 farklı çeşidi bilinmektedir. Bunların amino asit dizisi mükemmel bir şekilde benzemesine rağmen; birincil yapıları farklıdır ve birbiriyle ilişkili genlerin bir ailesi tarafından kodlanmıştır. İnsan interferon- α 'ların çoğu 165-166 amino asitten oluşan ve lözin, glutamik asit ve glutamince zengin tek zincir polipeptidlerdir. Bunların genellikle pI değerleri 5.5-6.5 arasında değişmektedir. İnterferon- α 'ların çoğu karbonhidrat yan zincirlerinden yoksun olmasına rağmen sadece birkaç tanesi glikoproteindirler ve çeşitli derecede glikoksilasyon gösterirler. İnterferon- α 'ların moleküler kütlesi 16 kDa'dur. Ancak, molekülün karbonhidrat içeriğine bağlı olarak 26 kDa'dan çok daha fazla olabilmektedir. Karbonhidrat bileşimlerinin enzimatik veya kimyasal olarak yerini değiştirmek bunların biyoaktivitesi üzerinde küçük yan etkiler göstermektedir.

İnterferon- α 'lar antiviral, antiproliferal, ağrı kesici ve bağışıklık sistem düzenleyici etkilerini spesifik yüzey reseptörlerine bağlanarak başlatırlar. Bu özelliklere sahip iki tane reseptör izole edilmiş ve klonlanmıştır. İnterferon- α B reseptörleri sadece bir tane spesifik (interferon- α B veya interferon- α 8 diye adlandırılan) interferon- α türünü bağladığı görülmektedir. İnterferon- α /B reseptörleri diye sınıflandırılan diğer reseptörler ise tip I interferonların hemen hemen bütün çeşitlerinin biyolojik etkilerinde görev almaktadır. İnterferon- α reseptörleri çoğu hücre tipinde hazır olarak bulunmaktadır. Bu reseptörlerin sayısı genelde oldukça azdır; fakat, ligandlarına karşı yüksek oranda bağlanma afinitesi gösterirler (65-67).

2.4.2.2. İnterferon- β

İnsan interferon- β veya fibroblast interferonu, başlangıçta ilk olarak viral partiküllerin veya polinükleotidlerin ortaya çıkardığı fibroblastlardan elde edilmiştir. İnsan interferon- β homojen olarak saflaştırılmış ilk interferon molekülüdür. 166 aminoasitten oluşan glikoprotein yapısında ve yaklaşık 20 kDa moleküler kütleye sahiptir. Yaklaşık olarak pI değeri 8'dir. Moleküller arası disülfid bağı içermektedir.

İnsan genomu, bir tek interferon- β genine sahiptir. Gen ürünleri interferon- α 'ların amino asit sırasında yaklaşık % 30 benzerlik göstermektedir. Doğal interferon- β , çeşitli kromatografik tekniklerin bir karışımı kullanılarak saflaştırılmaktadır. Tek basamaklı saflaştırma yöntemi, boya afinite kromatografisi kullanılarak geliştirilmiştir. İnterferon ailesinin diğer üyeleriyle benzer biyolojik etkisini tip I interferon hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak göstermektedir.

2.4.2.3. İnterferon- γ

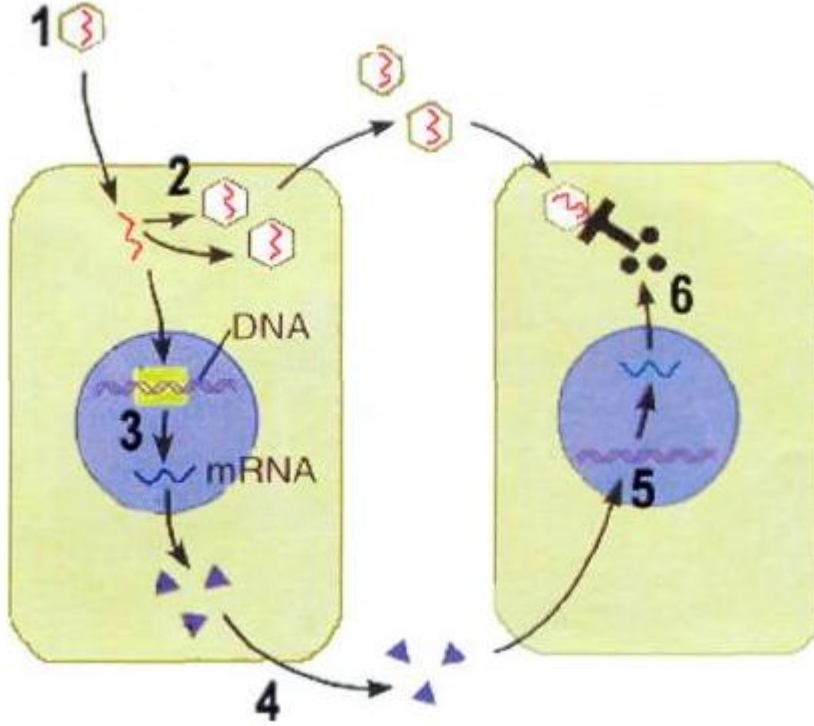
İnterferon- γ , bağışıklık interferonu da denmektedir, geniş miktarda aktive edilmiş T lenfositleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler tarafından üretilmektedir. İnsan interferon- γ , 143 amino asit içeren tek zincir glikoprotein yapıdadır. Moleküler kütlesi 15–25 kDa arasında glikoksilasyonun derecesine bağlı olarak değişir. Moleküler yapısı iki tane potansiyel glikoksilasyon kısımlarına sahiptir. İnterferon- γ fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik aktivitelerine göre tip I interferonlardan önemli ölçüde farklılık göstermektedirler. Bu interferonlar, makrofaj ve NK hücreleri, B ve T lenfositlerin aktivasyonu ve farklılaşmasını içeren bağışıklık ve ağrı kesici yanıtların hemen hemen hepsini düzenlemektedirler. Ayrıca, endotelial hücre ve fibroblastlar gibi lökosit olmayan hücrelerin aktivasyonunu ve büyümesini kontrol etmektedir. Tip I interferonlara göre dezavantajı ise; interferon- γ 'nın en zayıf antiviral ve antiproliferatif aktivite göstermesidir.

Biyolojik olarak aktif interferon- γ , iki interferon- γ monomerinin antiparalel ve non-kovalent bağlanmasıyla şekillenmiş bir homodimerdir. Her bir alt birim 6 büyük alfa heliks bölgeden oluşmaktadır ve toplam olarak β konformasyonu içermemektedir. Birçok lökosit türünde interferon- γ reseptörleri bulunmaktadır. Eritrositlerde bu reseptörler yoktur.

2.4.3. İnterferonların Etki Mekanizmaları

İnterferonlar etkilerini gösterebilmeleri için spesifik reseptörler ile birleşmek zorundadırlar. Vücutta yaygın şekilde birbirinden farklı iki tip interferon reseptörü

vardır. İnterferon- α ve interferon- β reseptörleri aynıdır. İnterferon- γ ise farklı reseptörlere bağlanmaktadır. Reseptöre bağlandıktan sonraki olaylar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.



Şekil 2.7. İnterferonların etki mekanizmasının şematik gösterimi. (i) Virüs konakçı hedef hücreye gelerek genetik maddesiyle hücreyi enfekte eder. (ii) Enfeksiyon sonrasında, virüs konakçı hücrenin içinde çoğalır. (iii) Hücrede virüs varlığı nedeniyle, hücrenin kendi DNA'sı uyarılır ve interferon sentezinden sorumlu bölgeden mRNA oluşturulur. (iv) mRNA aracılığıyla sentezlenen interferon, hücre dışına salgılanır ve kan yoluyla taşınarak diğer hücreleri etkiler. (v) Etkilenen sağlıklı hücreler “vücutta virüs olduğu” uyarısını alarak, antiviral proteinleri sentezler (ya da benzeri korunma-savunma mekanizmalarını harekete geçirir). (vi) Böylece sağlıklı hücreler kendilerini korumayı başarır (58).

İnterferonların biyolojik etkileri beş grupta incelenebilir: 1. Antiviral etkiler; 2. Antiproliferatif etkiler; 3. İmmunmodiilatör etkiler; 4. Onkogen ekspresyonu üzerine etkileri; 5. Fenotipik ekspresyon üzerine etkilerdir.

2.4.3.1. Antiviral Etkiler

Yapılan çalışmalarda daha önce infekte olmamış bir hücrenin, interferon varlığında, virüslere maruz kaldığında asla infekte olmayacağı gösterilmiştir. Hücre infekte olduğunda bir takım interferon genleri aktive olur. İnterferon üretimi yapılır ve interferon komşu hücredeki reseptöre bağlanır. Böylece bu hücrelerde virüs proteinlerinin ve genetik malzemesinin sentezi önlenir (61,62).

2.4.3.2. Antiproliferatif Etkiler

İnterferonlar hem normal, hem de malign hücrelerde antiproliferatif etki gösterirler. G1 fazında RNA sentezini baskırlar. Antiproliferatif etkileri interferon kullanımı kesilince ortadan kalkar (63,64).

2.4.3.3. Bağışıklık Düzenleyici Etkiler

İnterferonların bağışıklık sisteminin fonksiyonunu değiştirmede önemli rolleri vardır. İnterferonlar, NK hücrelerinin sitotoksik aktivitelerini arttırlar. Sitotoksik olmayan ön-NK hücreleri interferon aracılığı ile aktive olur ve sitotoksik hale geçer. Bu etki interferon kesilince ortadan kalkar. İnterferonun bu etkisi NK hücrelerince salınan interferon ve interlökin I-III ile de artış gösterir (65,66).

Sonuçta antikora bağımlı hücrel sitotoksite (ADCC) artmış olur. İnterferonlar uygun şartlar altında antikor yapan hücrelerin oluşumunu ve immunglobulin yapımını arttırlar. Ancak tümör rejeksiyonunda antikorların doğrudan etkisi önemsiz olduğundan bu konu üzerinde fazla durulmamaktadır (67).

Ayrıca interferonlar tümör hücresi membran antijenlerinin ve/veya HLA'nın ekspresyonunu arttırlar. Böylece yabancı hücrenin tanınması ve yok edilmesi kolaylaşır (68,69).

2.4.4. İnterferonların Klinik Kullanım Dozları ve Toksisiteleri

İnterferon, 1957 yılında bulunmasına karşın üretimi ile ilgili sorunlar 1980'li yılların başında aşıldığından, faz I ve II çalışmaları da ancak 80'li yıllarda başlamıştır. Başlangıçta doğal bir molekül olması nedeniyle toksik olmadığı düşünülmüştür. Ancak bugün tedavi edici dozlarda verilen interferon molekülünün toksik olduğu bilinmektedir. Bir interferon preparatının 867 hastada çeşitli sürelerde kullanılması sonucunda görülen yan etkiler Tablo 2.6'da gösterilmiştir. Gerçekte interferon- α verilen hastaların hemen tamamında değişik şiddette, değişik zamanlarda bazı yan etkiler oluşmaktadır. Bu yan etkiler, çoğunlukla doza bağlıdır. Kolaylıkla ortadan kaybolan ve takiflaksi nedeniyle tolere edilebilen yan etkilerdir. Ateş, titreme, halsizlik, bulantı, kusma gibi belirtilerin olduğu "grip benzeri sendrom" doza bağlı, 4-12 saat süreli erken dönemde görülen bir yan etkidir. Semptomlar asetaminofen tedavisi ile kolaylıkla kontrol altına alınabilir. Geç dönemde (tedavinin 2-6. haftaları arası) görülen yan etkiler ise halsizlik, yorgunluk, anoreksi, kas ağrıları, baş ağrısı ve alopesidir.

Tablo 2.6. İnterferona bağlı yan etkiler ve görülme sıklığı.

Yan Etkiler	Sıklık (%)
Grip benzeri semptomlar	98
Bulantı	46
Kusma	29
Merkezi periferik sinir sistemi bozuklukları	34
Gastrointestinal belirtiler	27
Kardiyovasküler bozukluklar	14
Deri belirtileri	12
Enfeksiyonlar	7
Alopesi	4
Solunum sistemi bozuklukları	7
Kilo kaybı	4
Pıhtılaşma bozuklukları	3
Slomatit	3

Ayrıca interferon- α 'nın hafif miyelobaskılama etkisi vardır. Nadir olmakla beraber nötrofil lökositlerdeki azalmaya bağlı olarak bakteriyel infeksiyonlar artabilir. İnterferon- α tedavisi sırasında otoantikolar ortaya çıkabilir. Fakat rapor edilen otoimmün hastalıkların sayısı oldukça azdır. Otoimmün hastalıklar arasında en sık olarak tiroidit görülür. İnterferon tedavisi sırasında düşük doz kullananların % 2-5'inde, yüksek doz kullananların % 10-20'sinde karaciğer enzimleri yükselir. İnterferon- α tedavisinde görülebilen psikiyatrik yan etkiler ise irritabilite, anksiyete, depresyon ve deliryumdur. Yan etkilerin çoğunda tedavinin kesilme indikasyonu yoktur. Doz azaltılması çoğunlukla yeterlidir (70,71).

2.4.5. İlaç Tipleri

İnterferon ilaçlarını birkaç farklı tipi günümüzde insanlarda kullanılmak için onaylanmıştır. Bazı örnekleri aşağıda verilmiştir.

Yakın zamanda piyasaya verilen yeni bir tip interferon da, P.E.G. (poli-etilen glikol) olarak bilinen jelâtinimsi bir molekülün eklenmiş olduğu interferon alfa-2a ve-2b türevleri de vardır. PEG eklenmiş interferon, vücutta daha uzun süre dayanmakta ve haftada bir kullanımı yeterli olmaktadır. Bu yeni türevin virüslere karşı etkinliği de daha yüksektir.

Önümüzdeki yıllarda yan etkisi neredeyse hiç olmayan, en kısa zamanda en etkili tedaviyi olası hale getirebilen yeni interferon türevlerinin geliştirilmesi konusunda çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Gen mühendisleri, kanser türlerinin tedavisinde de kullanılabilecek olan interferonların geliştirilmesi konusunda çalışmaktadır (58). Sonuç olarak interferonlar 1980'lerde rekombinant DNA teknolojisi ile üretilene kadar çok zor bulunan ve pahalı ilaçlar olarak değerlendirilmekteydiler. Günümüzde ise; küresel satış pazarı yaklaşık olarak 5 milyar doları bulan yaygın bir ilaç olmuştur.

Tablo 2.7. Rekombinant interferon- α ilaç çeşitleri.

Tür	İlaç Adı
<i>Rekombinant İnterferon-α</i>	
Alfa-2a	Roferon
Alfa-2b	Intron A
Alfa-n1	Wellferon
Alfa-n3	AlferonN
Alfa-com	Infergen
<i>Rekombinant İnterferon-β</i>	
Beta-1a	Avonex
Beta-1b	Betaseron
<i>Rekombinant İnterferon-γ</i>	
Gama-1b	Acimmune

2.4.6. İnterferonların Üretimi

İnterferonlar yıllarca çeşitli kaynaklardan, metal-şelat, çöktürme, katyon-değiştirme, anyon-değiştirme, jel filtrasyonu, hidrofobik ve immünoafinite kromatografisi içeren çeşitli yöntemler ile saflaştırılmış ve homojen protein eldesine imkan veren bazı yöntemler sunulmuştur (72-77).

İnterferonlar, insan kanı lenfositlerinden elde edilen iki litre kandan 1/1000000 gram kadar interferon elde edilirken; günümüzde klonlanmış bakterilerden çok daha fazla miktarda elde edilir.

İnterferon geni, diğer birçok genin klonlanmasında kullanılan cDNA yöntemi ile çoğaltılmıştır. cDNA, dG/dC kuyruklama yöntemi ile pBR322 'nin pst I noktasına klonlanmıştır.

Klonlanan interferon geninin ifadesinde triptofan (Trp) operonundan bir serbest başlatıcı gen kullanılmaktadır. Klonlanmış triptofan operonu EcoRI ile kesildiğinde 300 bp'lik bir DNA parçası elde edilmekte ve bu parça üzerinde başlatıcı gen, operatör ve Shine-Dalgarno ribozom bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bazı işlemlerden daha geçirilen bu DNA parçası, ifade vektörü haline dönüştürülmek için pBR322 plasmidi, EcoRI + pst I ile kesilmiş ve *E. coli*'ye sokulabilecek duruma getirilmiştir.

İfade vektörünü alan *E. coli* hücrelerinin seçiminden sonra; hücre üretildiğinde 1 litre kültürden yaklaşık olarak 2.5×10^8 ünite kadar interferon elde edilmektedir (78).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler

2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA), N,N'-metilen bisakrilamid (MBAAm) ve amonyum persülfat (APS) Sigma (St Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Başlatıcı N,N,N,N'-tetrametilen etilendaimin (TEMED) Fluka AG (Buch, İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Cibacron Blue F3GA Polyscience (Warrington, ABD) firmasından temin edilmiştir ve herhangi bir saflaştırma işlemi olmadan kullanılmıştır. Diğer kimyasallar analitik kalitede olup Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deneylede kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters osmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpureLP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştiricili dolgu sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun direnci 18 mS'dir.

3.2. Poli(2-Hidroksietil Metakrilat) [poli(HEMA)] Kriyojellerin Hazırlanması

Poli(HEMA) kriyojel hazırlanmasında uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir: monomerler (10 mL HEMA) deiyonize su içerisinde çözülmüştür ve çözelti içerisinde çözünmüş haldeki oksijenin uzaklaştırılması için vakum altında (100 mmHg) 5 dakika azot gazı geçirilmiştir. Toplam monomer derişimi %6 (w/v)'dir. Kriyojel, TEMED (120 µL) ve APS (100 mg) başlatıcı sisteminin kullanıldığı serbet radikal polimerizasyon ile üretilmiştir. APS'nin eklenmesinden (toplam monomer miktarının % 1 (w/v)) sonra çözelti buz banyosu içerisinde 2-3 dakika soğutulmuştur. TEMED ilave edilmiş (toplam monomer miktarının % 1 (w/v)) ve reaksiyon karışımı 1 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra, reaksiyon karışımı, alt çıkışı iyice kapatılmış plastik bir enjektörün (5 mL, 0.8 cm i.ç.) içerisinde doldurulmuştur. Enjektör içerisindeki polimerizasyon çözeltisi -12°C'da dondurulmuş ve 24 saat bu sıcaklıkta bekletilmiştir. Daha sonra, donmuş haldeki polimerik kriyojel oda sıcaklığında eritilmiştir. Reaksiyona girmeyen monomer ve başlatıcının uzaklaştırılması için uzun bir yıkama işlemi uygulanmıştır. Yıkama çözeltisi olarak seyreltik HCl çözeltisi ve su-etanol karışımı, monolitik kriyojel

kolondan geçirilmiştir. Kriyojelin temiz olduğu tesbit edilene kadar yıkama işlemi devam ettirilmiştir. Yıkama işleminden sonra monolitik kriyojel %0.02 sodyum azür içeren çözelti içerisinde +4°C’da saklanmıştır.

3.3. Poli(HEMA) Kriyojellere Cibacron Blue F3GA Bağlanması

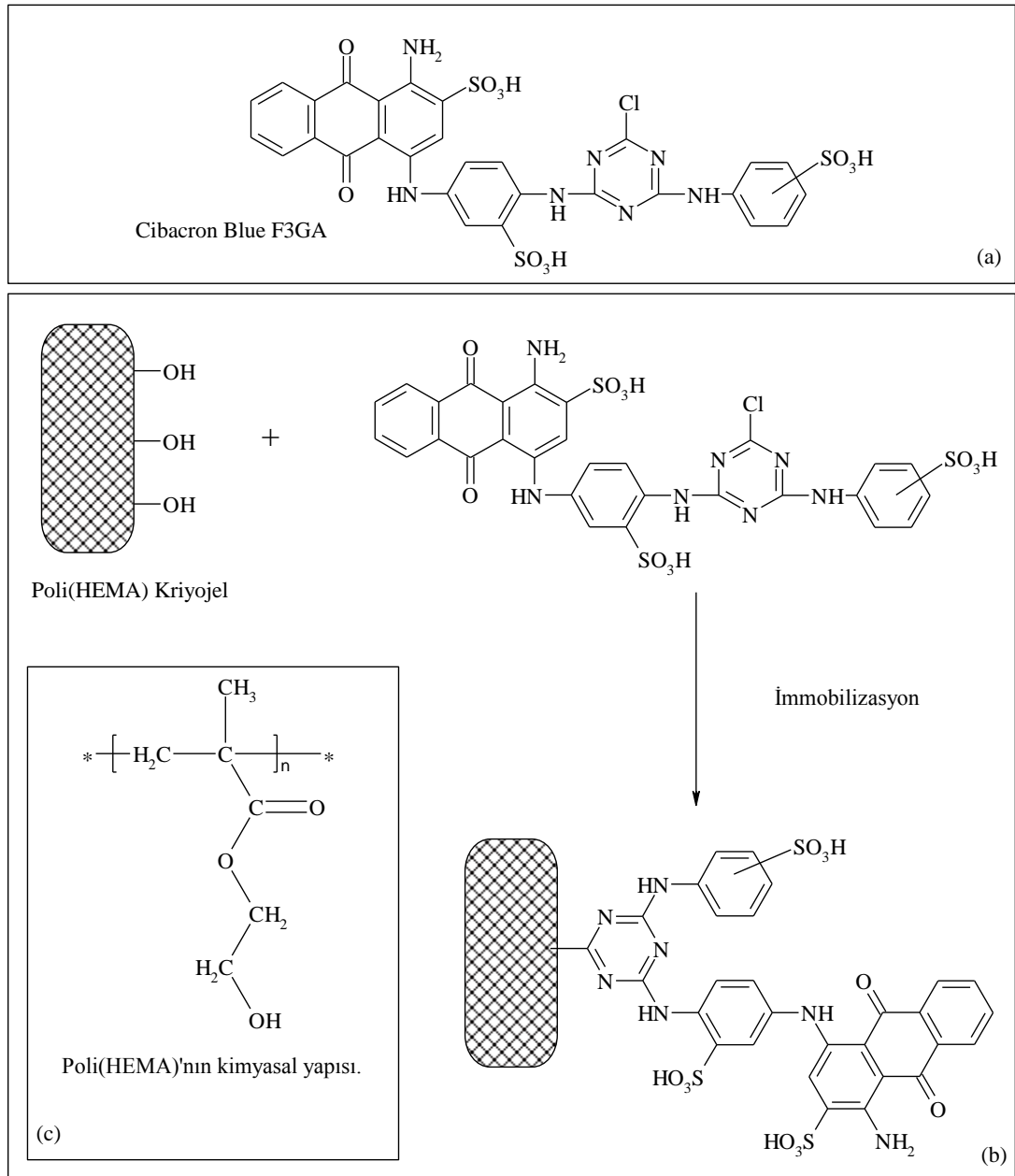
Boya afinite ligandı Cibacron Blue F3GA (Şekil 3.1a), poli(HEMA) kriyojellerin yapısındaki -OH grupları ile boya moleküllerin triazin grupları arasındaki nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu ile immobilize edilmiştir (Şekil 3.1b). Ligand immobilizasyonu için uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir: Cibacron Blue F3GA immobilizasyonu çalışmaları, sıcaklık kontrollü su banyosunda gerçekleştirilmiştir. İlk önce kriyojeller distile su (30 mL) ile birkaç defa yıkanmıştır. Daha sonra, kriyojeller NaOH (5 g) içeren 100 mL Cibacron Blue F3GA çözeltisinde (5 mg/mL) 6 saat karıştırılmıştır (80°C). Uygulanan deney koşullarında, immobilizasyon 630 nm dalga boyundaki (Cibacron Blue F3GA’nın en yüksek absorbans verdiği dalga boyu) absorbans düşüşü ile takip edilmiştir. Boyama işleminden sonra, Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojel fiziksel olarak adsorbe olmuş Cibacron Blue F3GA’nın uzaklaştırılması için damıtık su ve metanol ile yıkanmıştır. Modifiye edilmiş kriyojel mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için % 0.02 sodyum azür içeren çözelti içerisinde +4°C’da saklanmıştır.

3.4. Poli(HEMA) Kriyojellerin Karakterizasyonu

3.4.1. Denge Şişme Oranının Belirlenmesi

Poli(HEMA) kriyojelin denge şişme oranının (S) belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Kriyojel gözenekli filtre üzerinde temizlenene kadar yıkanmıştır. Daha sonra vakum da havası alınmış ve darası alınan tartım kabına yerleştirilmiştir. Şişmiş kriyojelin kütlesi tartılmıştır (m_{Islak}). Daha sonra kriyojel 60°C’da sabit tartıma gelene kadar kurutulmuş ve kuru örneğin kütlesi belirlenmiştir (m_{kuru}). Denge şişme oranı aşağıdaki eşitlikle belirlenmiştir:

$$S = (m_{\text{Islak}} - m_{\text{kuru}}) / m_{\text{kuru}} \quad (3.1)$$



Şekil 3.1. Cibacron Blue F3GA'nın kimyasal yapısı (a) ve poli(HEMA) kriyojellere immobilizasyonu (b).

3.4.2. Yüzey Morfolojisi

Poli(HEMA) kriyojelin kesit alanının yüzey ve yığın yapıları yüksek büyütme sağlamaları nedeniyle taramalı elektron mikroskobu (JEOL, JSM 5600, Tokyo, Japonya) ile incelenmiştir. Örnek % 2.5 gluteraldehit içeren 0.15 M sodyum

kakodilat tamponunda gece boyu bekletilerek yapısı sabitlenmiştir. Daha sonra % 1'lik osmiyum tetraoksit ile 1 saat muamele edilerek ileri sabitleme yapılmıştır. Daha sonra örnek, basamak basamak etanol içerisinde dehidrate edilmiş ve etanolün sıvı karbon dioksitle değiştirileceği sıcaklık olan kritik nokta sıcaklığına (+10°C) transfer edilmiştir. Daha sonra sıcaklık +40°C'a çıkarılmış ve basınç 100 bara yükseltilmiştir. Bu sıcaklık değişimi sonucunda sıvı karbondioksit doğrudan gaz formuna geçmektedir. Bu faz değişimi sırasında buharlaşma ısı ve yüzey gerilim kuvvetleri olmadığından monolitik kriyojelin yapısında herhangi bir hasar oluşmamaktadır. Sabit sıcaklıkta (+40°C) basıncın düşürülmesiyle kuru kriyojel örnekleri elde edilmektedir. Elde edilen kriyojel örnekleri altın:paladyum (40:60) ile kaplanmış ve SEM örnek yuvasına yerleştirilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.4.3. FTIR Çalışmaları

Cibacron Blue F3GA, poli(HEMA) kriyojel ve Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojelin FTIR spektrumları Shimadzu marka FTIR spektrofotometre ile alınmıştır (FTIR 8000 Series, Tokyo, Japonya). Analizden önce örnekler 48 saat kurutulmuştur. Kurutulan monolitik kriyojeller öğütülmüştür. FTIR spektrumlarının elde edilmesi amacıyla 2 mg öğütülmüş kriyojel örneği 98 mg KBr ile karıştırılarak havanda dövülmüş ve hidrolük preste 600 kg/cm² basınçta 10 dakika bekletilerek ince bir tablet haline getirilmiştir. Hazırlanan tabletin 4000-500 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında spektrumu alınmıştır. Alınan bütün spektrumlara 5 noktalı temel çizgi düzeltilmesi uygulanmıştır.

3.4.4. Elementel Analiz

Poli(HEMA) kriyojele immobilize edilen Cibacron Blue F3GA miktarı elementel analiz ile belirlenmiştir. Elementel analiz deneylerinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Örnek (1.0 mg) elementel analiz cihazının (Leco, CHNS-932, ABD) alüminyum hücre sine yerleştirilerek ± 0.0001 g duyarlılıkla tartılmıştır. Örnek içeren bu hücre cihaza yerleştirilmiş ve yakma işlemi sonucunda örneğin karbon (C),

hidrojen (H), azot (N) ve kükürt (S) miktarları belirlenmiştir. Örneğin oksijen (O) miktarı ise farktan bulunmuştur.

3.4.5. Yüzey alanı Ölçümleri

Poli(HEMA) kriyojellerin gözenekliliği azot adsorpsiyon tekniği ile ölçülmüştür (Flowsorb II, Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, ABD). Kriyojellerin spesifik yüzey alanı çok noktalı Brunauer-Emmett-Teller (BET) yöntemi ile belirlenmiştir (Quantachrome, Nova 2200E, ABD). Uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir: 0.5 g kurutulmuş kriyojel örnek haznesine yerleştirilmiş ve azot atmosferinde 150°C'da 1 saat gazı alınmıştır. Gaz adsorpsiyonu -210°C'da ve desorpsiyonu oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon basamağında elde edilen sonuçlar, spesifik yüzey alanı hesaplamalarında kullanılmıştır. Kriyojelin sahip olduğu gözenek hacmi ve ortalama gözenek çapı Barrett, Joyner, Halenda (BJH) modeli uygulanarak belirlenmiştir.

3.5. Rekombinant İnterferon- α 'nın Adsorpsiyon Çalışmaları

Rekombinant interferon- α adsorpsiyon çalışmaları için bir model protein olarak seçilmiştir. Cibacron Blue F3GA bağlanmış olan kriyojellerin rekombinant interferon- α adsorpsiyonları çeşitli pH'larda çalışılmıştır. Adsorpsiyon ortamının pH'sı farklı tampon sistemleri (pH 4.0-6.0 için asetat ve pH 7.0-8.0 için fosfat tamponları) kullanılarak 4.0-8.0 arasında değiştirilmiştir. Bütün pH ölçümler bir dijital pH/mV metre (Fischer Scientific model 15, Almanya) ile yapılmıştır. Rekombinant interferon- α 'nın başlangıç derişimi 0.25-2.0 mg/ml arasında değiştirilmiştir. Tipik bir adsorpsiyon deneyinde rekombinant interferon- α tampon çözeltisinde 30 rpm sabit hızlı bir karıştırıcıda berrak çözelti olana kadar karıştırılmıştır (yaklaşık 5 dakika). Elde edilen çözeltiden başlangıç derişiminin belirlenmesi amacıyla 0.5 ml'lik örnek alınmıştır. Daha sonra poli(HEMA) kriyojeller ortama bırakılmış ve 30 rpm 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Adsorpsiyon süresi sonunda; kriyojelle çözeltiden uzaklaştırılmış ve sonuç çözeltiden 0.5 ml'lik örnek alınarak son derişim belirlenmiştir. Kriyojellerin adsorbe ettiği rekombinant interferon- α miktarı adsorpsiyon ortamındaki interferon- α derişimindeki azalmanın

spektrofotometrik (Shimadzu 1601, Tokyo, Japonya) olarak 280 nm'de ölçümüyle tespit edilmiştir. Adsorbe edilen rekombinant interferon- α miktarı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Q = [(C_o - C) \cdot V]/m \quad (3.2)$$

Burada; Q, poli(HEMA) kriyojellerin adsorbe ettiği rekombinant interferon- α miktarı (mg/g); C_o ve C ise sırasıyla adsorpsiyon ortamındaki başlangıç ve son rekombinant interferon- α derişimleri (mg/ml); V, çözelti hacmi (ml) ve m ise kullanılan poli(HEMA) kriyojellerin ortalama kütlesidir (g).

3.6. Rekombinant İnterferon- α 'nın Desorpsiyon Çalışmaları

Rekombinant interferon- α desorpsiyon deneyleri 1,0 M NaCl içeren tampon çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Rekombinant interferon- α adsorplanmış olan kriyojeller desorpsiyon ortamına bırakılmış ve yaklaşık 30 rpm sabit bir karıştırıcı da 25°C'de 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Desorpsiyon ortamındaki son rekombinant interferon- α derişimi spektrofotometrik belirlenmiştir. Cibacron Blue F3GA takılı-kriyojelin tekrar kullanılabilirliğini göstermek için adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı kriyojel kullanılarak 10 kere tekrarlanmıştır.

3.7. Doğal Kaynaktan İnterferon Saflaştırılması

Çalışmanın bu aşamasında; doğal kaynaktan (insan gingival fibroblast kültürü) interferon saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla doğal kaynak olarak insan gingival fibroblast hücre kültürlerinden ekstrakte edilen interferon örneği kullanılmıştır. İnsan gingival fibroblast kültürü, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Fizyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir. Hücre kültürü için uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir: gingival hücre çizgisi (GV1) T-150 kaplarda (2.3×10^6 hücre/kap) tripsinle muamele edilmiştir. Daha sonra yaklaşık 107 hücre, yığın besi ortamına alınmış ve 7 gün boyunca 37°C'da kültür edilmiştir. Besi ortamı olarak 50 RU/ml interferon primeri, 50 μ g/ml poliriboinosik-poliribositidilik asit, 10 μ g/ml sikloheksan içermektedir. Hücre kültür ortamında

yetiştirilen insan gingival fibroblast hücreler, kültür işleminden sonra 2 M NaCl (100 ml) içerisine eklenmiş ve 2 saat oda sıcaklığında karıştırılarak parçalanmıştır. Hücre parçalarının uzaklaştırılması amacıyla karışım 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant çözelti ayrılmış ve 24 saat Servapor® diyaliz tüpü (çap: 29 mm; gözenek boyutu: 12,000 kDa) diyaliz edilmiştir (Serva Electrophoresis GmbH, Heideberg, Almanya). Daha sonra, diyalizata sodyum azür eklenmiş (% 0.02) ve kullanılana kadar +4°C'da saklanmıştır.

Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojelin (yarıçap: 1.0 cm, uzunluk: 5.0 cm) doğal kaynaktan interferon saflaştırma performansı UV dedektör sistemi ile donatılmış AKTA-FPLC (Amersham Bioscience, Uppsala, İsveç) ile test edilmiştir. FPLC(Hızlı Protein Sıvı Kromatografi) cihazı M-925 karıştırıcısı, P-920 pompası, UPC-900 monitörü, INV-907 enjeksiyon valfi ve Frac920 fraksiyon kolektörü içermektedir. Ayırma işlemi GE Healthcare (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) kolonda (10/10, 19-5001-01) sentezlenen Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojel konularak yapılmıştır. FPLC'nin A ve B hareketli fazları sırasıyla, 20 mM fosfat tamponu (pH 6.0) ve 1 M NaCl içeren 20 mM fosfat tamponu (pH 6.0) ile hazırlanmıştır. Kromatografik ayırma doğrusal gradiyenti 2 mL/dak akış hızı ile gerçekleştirilmiştir. % 100' lük A hareketli fazı ile 6 dak'lık başlama süresinden sonra, B hareketli fazının miktarı % 0'dan % 100'e kadar 1 dak içerisinde doğrusal gradiyentli olarak artırılmıştır. % 100'lük B hareketli fazı 7 dak süreyle uyguladıktan sonra kolondan 8 dak boyunca % 100'lük A hareketli fazı geçirilmiştir. Tüm tamponlar ve karışımlar kullanılmadan önce 0.45 µm çaplı membrandan filtre edilmiştir. 2 mL fibroblast ekstraktı kolona uygulanarak sistemin absorbansı 280 nm'de kaydedilmiştir. Ayırma işlemi ise oda sıcaklığında yapılmıştır. t_0 , belirleyici olarak KBr kullanılmıştır. Kapasite (k') ve ayırma (α) faktörleri

$$k' = (t_R - t_0)/t_0, \alpha = k_2'/k_1' \quad (3.3)$$

denklemini kullanılarak hesaplanmıştır. Bu denkleminde t_R , fibroblast interferonu alıkonma zamanı; t_0 , KBr in alıkonma zamanı; k_2' , fibroblast interferonu için kapasite faktörü ve k_1' ise fibroblast ekstraktındaki diğer moleküller gibi bir

yarıřmalđ proteinin kapasite faktörünü belirtmektedir. R_S ayırım gücü ve teorik plaka sayısı (N) aşağıdaki eşitlik kullanarak hesaplanmıştır.

$$N = 5.54 (t_R / w_{0.5})^2 \quad (3.4)$$

$$R_S = 2 (t_{R,2} - t_{R,1}) / (w_2 + w_1) \quad (3.5)$$

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

Saflaştırılan interferonun yapısal analizi ve denatüre olup/olmadığının belirlenmesi amacıyla spektroflorimetre ölçümleri (Shimadzu RF 5301 PC, Tokyo, Japonya) ile gerçekteştirilmiştir. Uygulanan ölçüm parametreleri şunlardır: Uyarma dalga boyu: 350 nm; slit genişliğı: 5 nm; spektrum türü: emisyon; tarama hızı: süper; duyarlılık: yüksek; cevap süresi: otomatik'tir. Florimetre ölçümü için alınan örnekler, örnek yuvasına konulmuş ve 350-550 nm dalga boyu aralığında ölçümler alınmıştır.

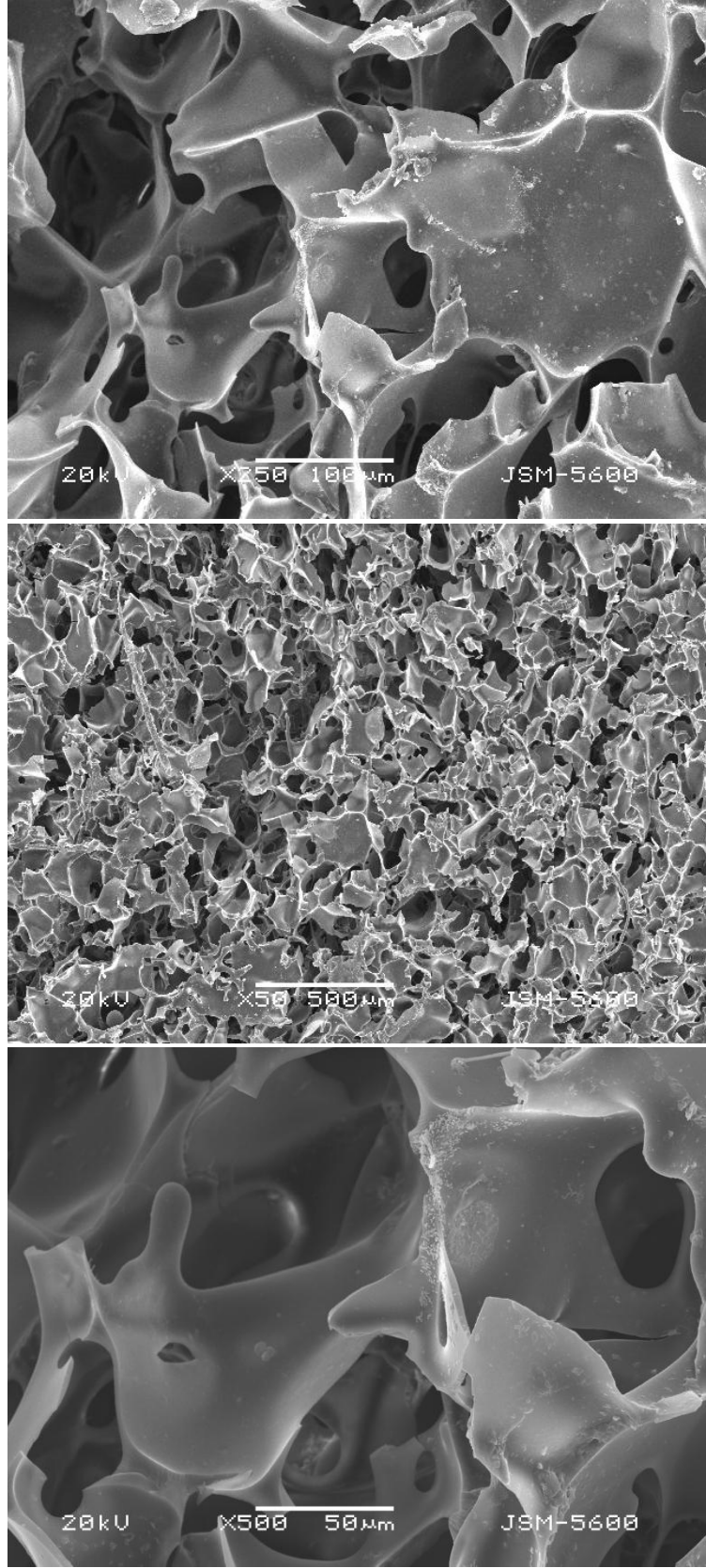
4. BULGULAR

4.1. Kriyojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Süper makrogözenekli monolitik poli(HEMA) kriyojeller, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerinin donmuş fazda kriyo-polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. N,N'-metilen bis(akrilamid) (MBAAm) çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Amonyum persülfat/N,N,N,N'-tetrametilen diamin başlatıcı/aktive edici çift olarak kullanılmıştır. Monolitik kriyojellerde fonksiyonel olarak bulunan hidroksil (-OH) grupları, ligand modifikasyonuna (Cibacron Blue F3GA immobilizasyonuna) izin vermektedir. Monolitik kriyojelin içyapısının taramalı elektron mikroskop görüntüleri "Şekil 4.1'de verilmiştir".

Poli(HEMA) kriyojelin denge şişme oranı 7.14 g H₂O/g kuru kriyojeldir. Poli(HEMA) kriyojel, opak, süngerimsi ve elastiktir. Bu kriyojellerin gözenekleri içerisindeki su elle kolaylıkla sıkılabilmektedir. Sıkılan kriyojel parçası suya daldırıldığı zaman 1-2 saniye içerisinde orijinal boyut ve şekline tekrar dönebilmektedir.

Poli(HEMA) kriyojellerin karakterizasyonu için uygulanan bir diğer yöntem yüzey alanı ölçümüdür. Yüzey alanı ve gözenek boyutu dağılımı kromatografik destek malzemeleri için önemli parametrelerdir. Bu özellikler sıvı azot sıcaklığında azot absorpsiyon/desorpsiyon izotermi ve 0.05-1.0 arası bağıl basınçları (P/P₀) ile ölçülmüştür. Poli(HEMA) kriyojellerin spesifik yüzey alanı 37.4 m²/g olarak bulunmuştur.



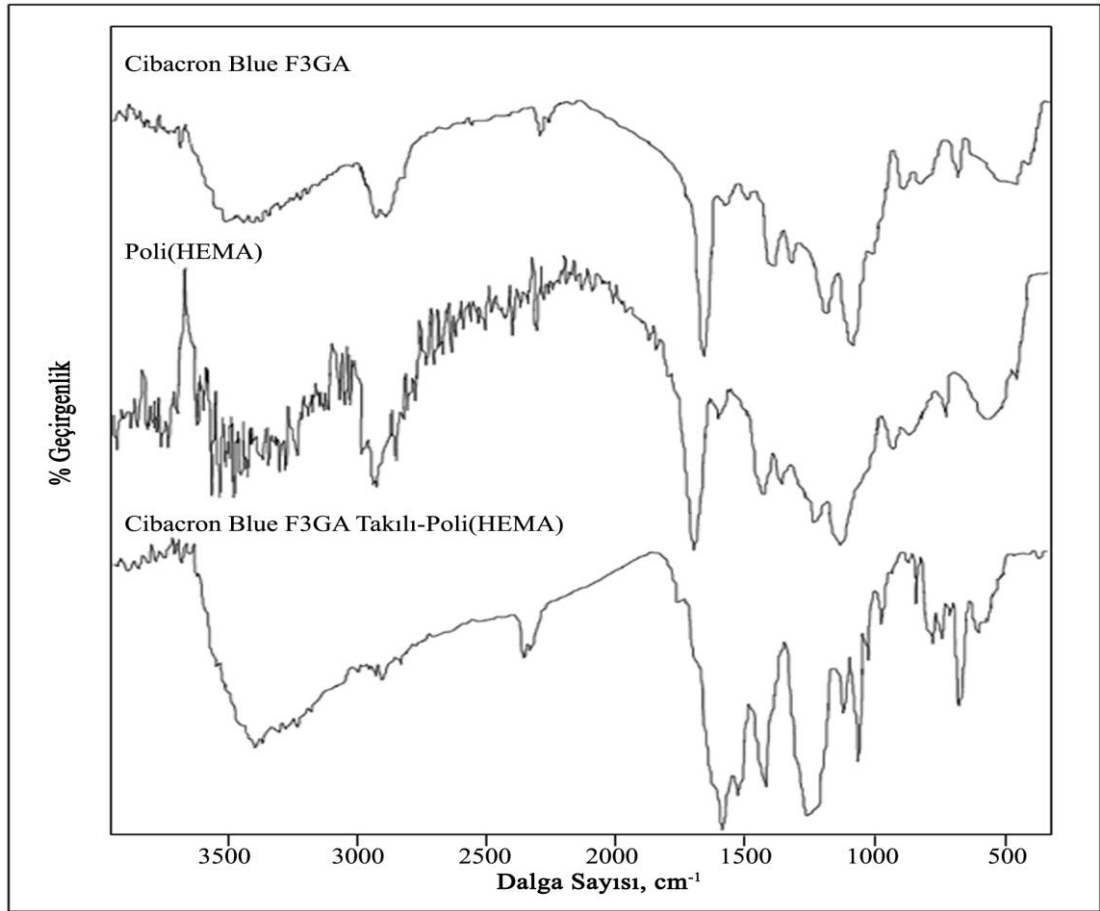
Şekil 4.1. Poli(HEMA) kriyojellerin SEM fotoğrafları.

4.2. Cibacron Blue F3GA İmmobilizasyonu

Cibacron Blue F3GA rekombinant interferon- α 'nın spesifik bağlanması için boya ligandı olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1). Şekilden görüldüğü gibi Cibacron Blue F3GA 3 tane sülfonik asit grubu, 4 temel primer ve sekonder amino grubu içeren bir monoklorotriazinil boyasıdır.

Bu çalışmada Cibacron Blue F3GA, poli(HEMA) kriyojellere kriyojellerin hidroksil grupları ile reaktif boya molekülünün klor gruplarının nükleofilik yer değiştirmesi reaksiyonu sonucu kovalent olarak bağlanmıştır.

Poli(HEMA) kriyojellere immobilize edilen boya miktarının belirlenmesi amacıyla elementel analizleri yapılmıştır. Elementel analiz sonuçlarına göre birim kriyojel kütlesi başına 74.7 μmol Cibacron Blue F3GA immobilize edilmiştir. Cibacron Blue F3GA immobilizasyonunun karakterizasyonu için uygulanan bir diğer yöntem, Fourier dönüşümlü infrared (FTIR) spektrofotometresidir. Şekil 4.2'de Cibacron Blue F3GA, poli(HEMA) ve Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojellerin FTIR spektrumları verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, Cibacron Blue F3GA, 3433 cm^{-1} civarında -NH titreşimlerine, 1226 cm^{-1} civarında -S=O titreşimlerine, 1085 cm^{-1} 'de -C-Cl titreşimine ve 1022 cm^{-1} 'de S-O titreşimlerine sahiptir. Poli(HEMA) kriyojellere ait olan spektrumda; 3400 cm^{-1} civarında geniş -OH titreşimleri, 1727 cm^{-1} 'de -C=O titreşimleri, 1244 cm^{-1} ve 1164 cm^{-1} 'de -C-O titreşimleri görülmektedir.



Şekil 4.2. FTIR spektrumları.

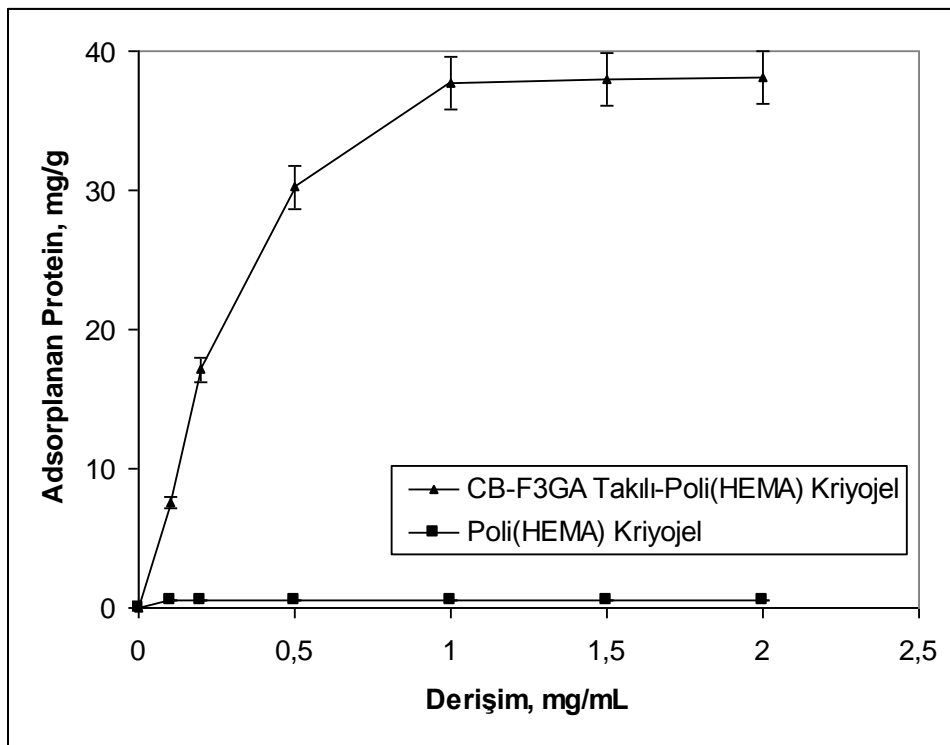
4.3. Sulu Çözeltilerden Rekombinant İnterferon- α Adsorpsiyonu

Poli(HEMA) kriyojellerin sentezi ve karakterizasyonundan sonra boya afinite ligandı Cibacron Blue F3GA immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hazırlanan boya afinite kriyojeller, sulu çözeltilerden interferon- α adsorpsiyonu amacıyla kullanılmıştır. Çalışmanın bu aşamasında; Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojellerin interferon adsorpsiyonuna etki eden faktörler belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla; başlangıç interferon- α derişiminin, çözelti pH'sının, etkileşim süresinin ve iyonik şiddetin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkileri incelenerek optimum adsorpsiyon koşulları belirlenmiştir.

4.3.1. Başlangıç Derişiminin Etkisi

Başlangıç interferon- α derişiminin etkisini belirlemek amacıyla, farklı derişimlerdeki (0-2.0 mg/ml) interferon- α çözeltileri (pH: 6.0 ve sıcaklık: 25°C), Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojellerle 2 saat etkileştirilmiştir.

Şekil 4.3, Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerin insan rekombinant interferon- α adsorpsiyon kapasiteleri üzerine başlangıç derişiminin etkisini göstermektedir.

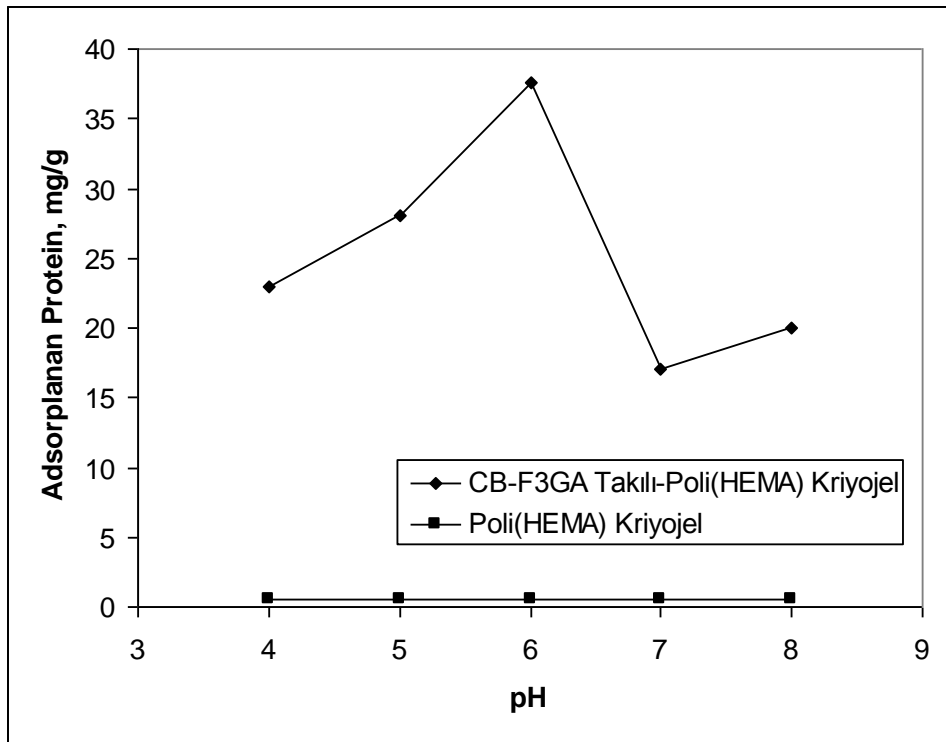


Şekil 4.3. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellere rekombinant interferon- α adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi. pH: 6.0, sıcaklık: 25°C.

4.3.2. pH Etkisi

Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojellere interferon- α adsorpsiyonuna pH'nın etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, farklı tampon sistemleri (4.0-6.0 asetat ve 7.0-8.0 fosfat) kullanılarak çözeltiler hazırlanmıştır. Başlangıç interferon- α sabit tutulduğu (1.0 mg/ml) bu aşamada elde edilen veriler Şekil 4.4'de verilmiştir.

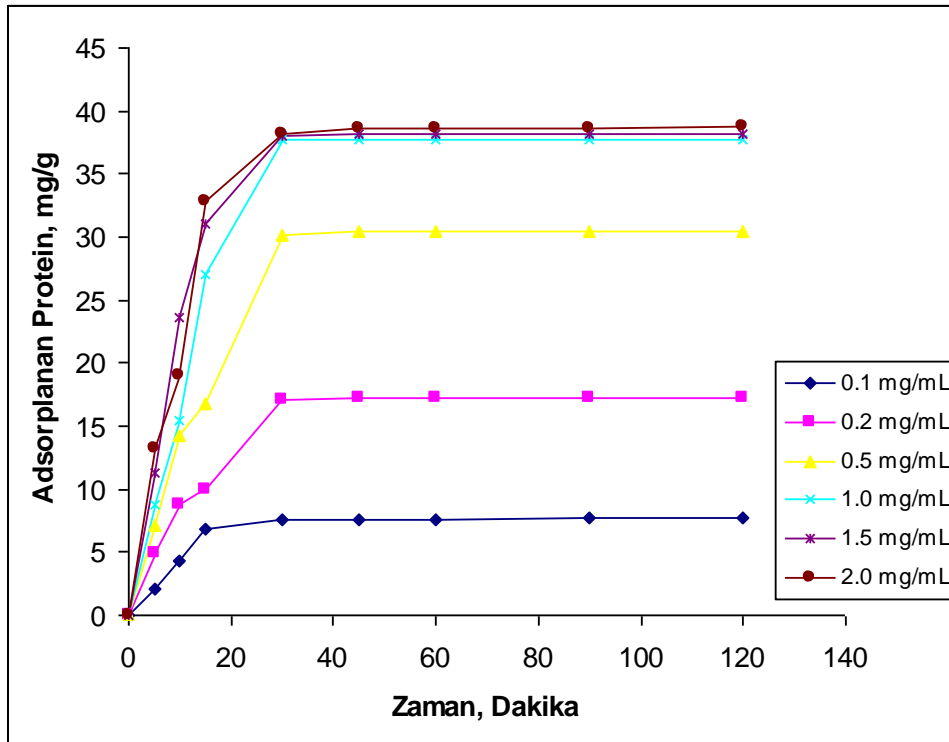
Şekil 4.4, Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerin rekombinant interferon- α adsorpsiyon kapasitesi üzerine pH'nın etkisini göstermektedir. Bütün durumlarda rekombinant interferon- α 'nın maksimum adsorpsiyonu pH: 6.0'da gözlenmiştir.



Şekil 4.4. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellere rekombinant interferon- α adsorpsiyonuna pH'ın etkisi. İnterferon- α derişimi: 1.0 mg/ml ve sıcaklık: 25°C.

4.3.3. Adsorpsiyon Hızı

Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojellere interferon- α adsorpsiyon kinetiğinin analizi için ineterferon-adsorbent arasındaki etkileşim süresinin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, farklı adsorpsiyon sürelerinde işlem durdurulmuş ve adsorpsiyon çözeltilerinden örnekler alınmıştır. Bu aşama için pH 6.0 (asetat tamponu) ve sıcaklık 25°C’da sabit tutulmuştur. İnterferon- α derişimi ise 0.1 mg/ml-2.0 mg/ml aralığında değiştirilmiştir. Adsorpsiyon hızının belirlendiği parametrede elde edilen veriler Şekil 4.5’de verilmiştir.



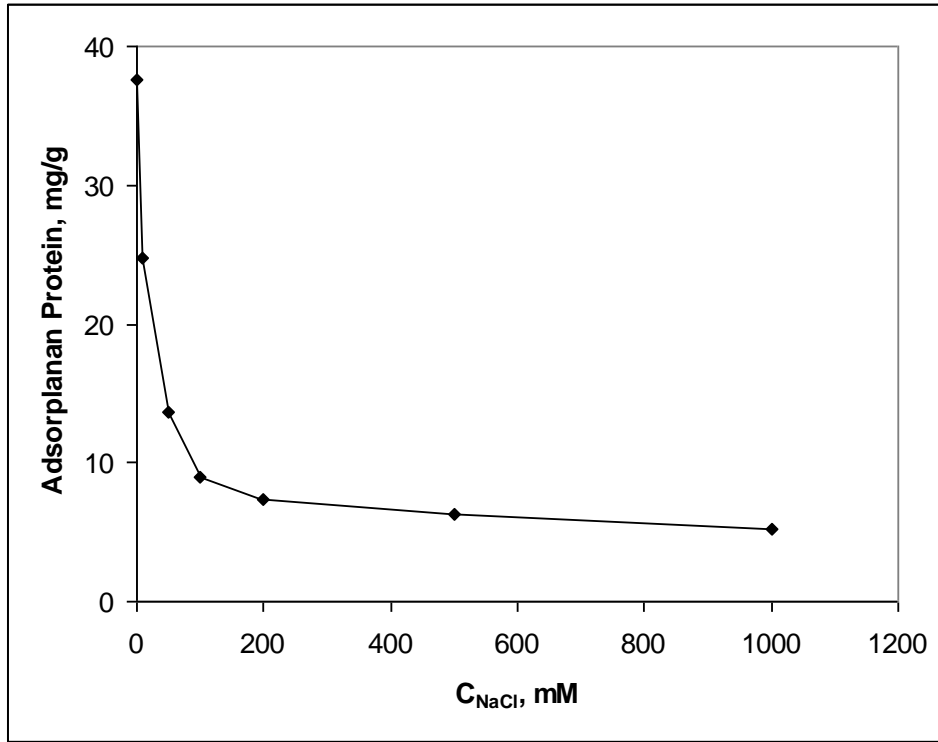
Şekil 4.5. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellere rekombinant interferon- α adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi. İnterferon- α derişimi: 0.1–2.0 mg/ml, pH: 6.0 ve sıcaklık: 25°C.

Şekil 4.5’de değişik derişimlerdeki rekombinant interferon- α ’nın Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellere adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimini göstermektedir. Boya ligand bağlı P(HEMA) kriyojellere maksimum interferon adsorpsiyon kapasitesi, başlangıç interferon derişimi 1mg/ml den daha yüksek derişimler içinde aynı olup yaklaşık olarak 38.2 mg/g’dir.

4.3.4. İyonik Şiddetinin Etkisi

Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellere interferon- α adsorpsiyonuna iyonik şiddetin (bir başka tanımla tuz varlığının) etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, farklı adsorpsiyon çözeltisinin iyonik şiddeti sodyum klorür (NaCl) kullanılarak 0.0-1.0 M aralığında değiştirilmiştir. Bu aşama için pH 6.0 (asetat tamponu), başlangıç interferon- α derişimi 1.0 mg/ml ve sıcaklık 25°C'da sabit tutulmuştur. İyonik şiddetin etkisinin belirlenmesinde ulaşılan veriler Şekil 4.6'da verilmiştir.

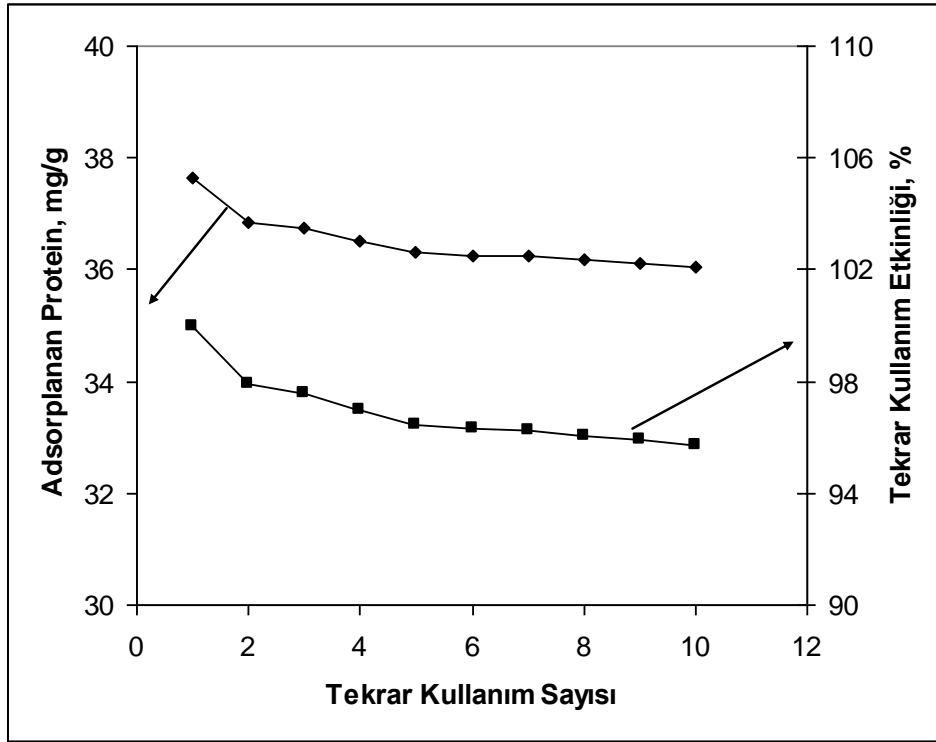
Cibacron Blue F3GA takılı kriyojellere rekombinant interferon- α adsorpsiyonu üzerinde iyonik gücün etkisi (NaCl eklenmesiyle) şekilde görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi iyonik gücün artmasıyla adsorpsiyon kapasitesi önemli ölçüde azalmaktadır. NaCl derişimi 0.001-1.0 M arasında değiştirilmiştir.



Şekil 4.6. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) temelli monolitik kriyojellere rekombinant interferon- α adsorpsiyonuna iyon şiddetinin etkileri. İnterferon- α derişimi: 1.0 mg/ml, pH: 6.0 ve sıcaklık: 25°C.

4.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

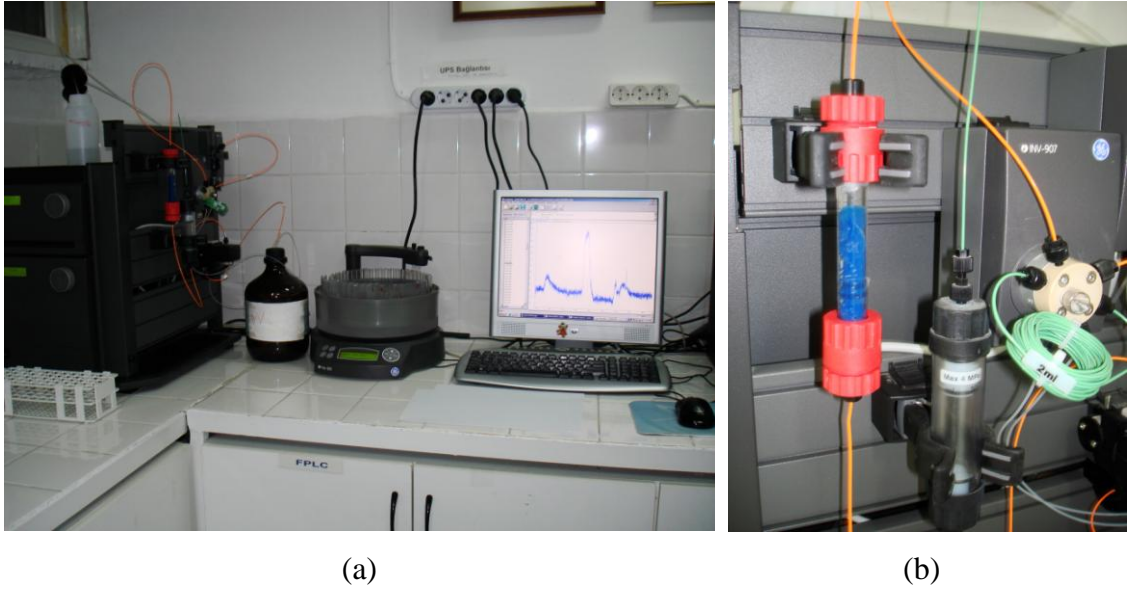
Bu aşama için pH 6.0 (asetat tamponu), başlangıç interferon- α derişimi 1.0 mg/ml ve sıcaklık 25°C'da sabit tutulmuştur. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsüne ait veriler Şekil 4.7'de verilmiştir. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğini göstermek için aynı kriyojeller kullanılarak adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri 10 defa tekrar edilmiştir.



Şekil 4.7. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) monolitik kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği. İnterferon- α 'nın derişimi: 1.0 mg/mL, pH: 6.0 ve sıcaklık: 25°C.

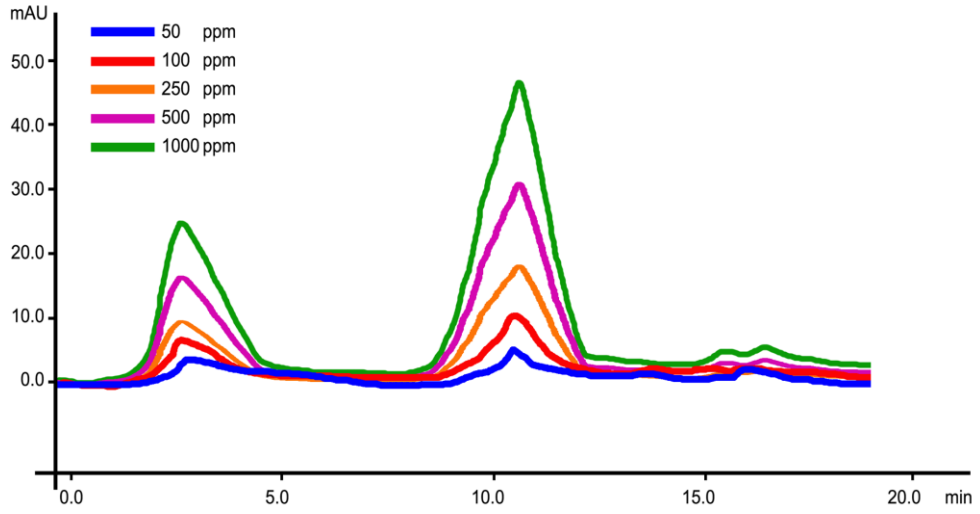
4.5. Doğal Kaynaktan İnterferon Saflaştırılması

Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerin interferon saflaştırma performansının belirlenmesi için insan gingival fibroblast kültüründen interferon saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojel (yarıçap: 1.0 cm, uzunluk: 5.0 cm), AKTA-FPLC sistemine bağlanarak kromatogramlar elde edilmiştir. Kullanılan FPLC sisteminin optik fotoğrafı Şekil 4.8’ de verilmiştir. FPLC sistemi kullanılarak önce standart interferon çözeltileri (50 ppm-1000 ppm) sisteme enjekte edilerek kalibrasyon kromatogramları oluşturulmuştur (Şekil 4.9a).

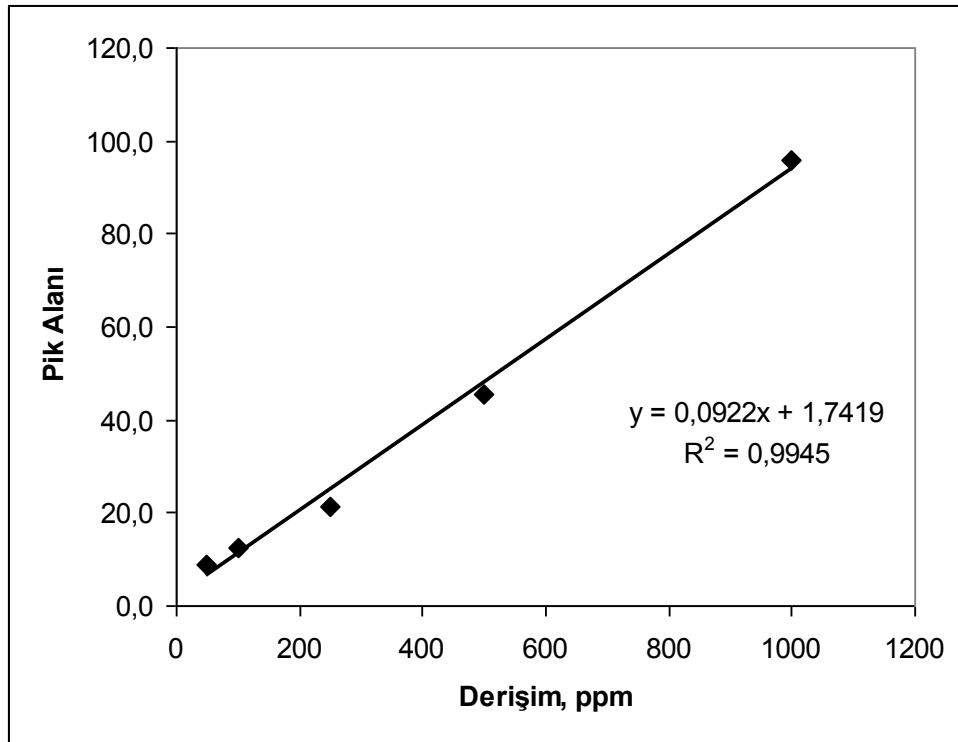


Şekil 4.8. Fibroblast interferonu ayrılmasında kullanılan AKTA-FPLC sistemi. (a) Genel görünüm; (b) Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojel kolon.

Şekilden de görüldüğü gibi spesifik etkileşime girmeyen fazla interferon kolondan tutunmadan çıkmaktadır. Kolona bağlanan interferon molekülleri, desorpsiyon çözeltilisinin gradiyent uygulanmasıyla (6. dakikadan sonra) kolondan ayrılmaktadır. Elüsyon piklerinin alanları, derişimle doğrusal olarak artmaktadır (Şekil 4.9b). Fibroblast interferonuna ait kromatogram, ekstraktın daha kompleks bir çözelti olmasına bağlı olarak biraz gürültü elde edilmiştir(şekil 4.10). Alıkonma süreleri hem standart interferon hem de fibroblast interferonu için 11 dakika civarındadır.



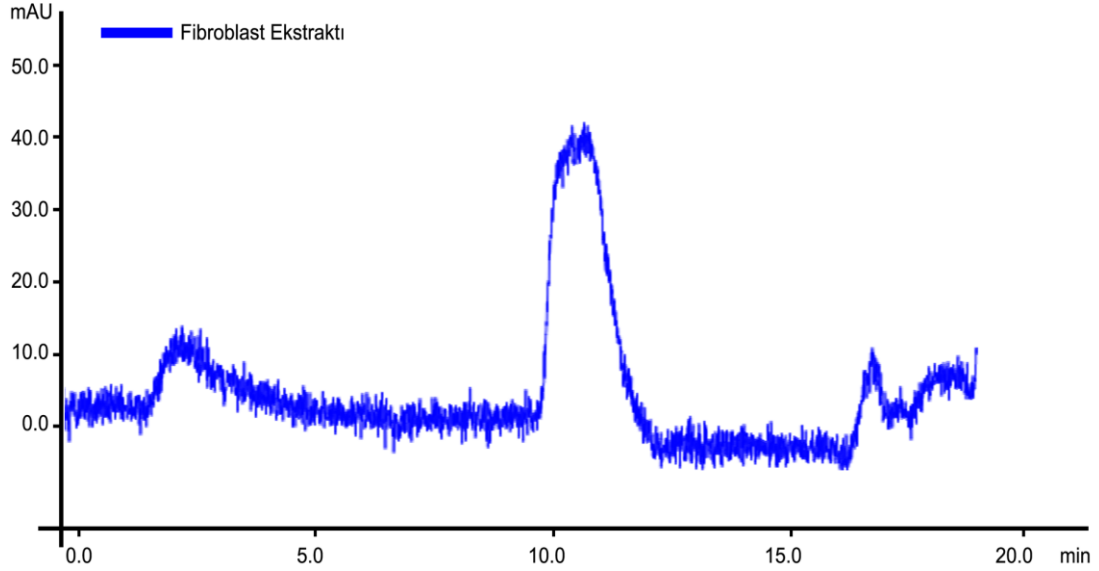
(a)



(b)

Şekil 4.9. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojelle interferon saflaştırılması. (a) Standart interferon çözeltilerine ait kromatogramlar; (b) elüsyon pik alanlarının derişimle değişimi.

Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojel için hesaplanan kapasite faktörü, ayırma faktörü, ayırma gücü ve teorik plaka sayısı değerleri sırasıyla 7.79, 9.62, 4.23 ve 554 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1).



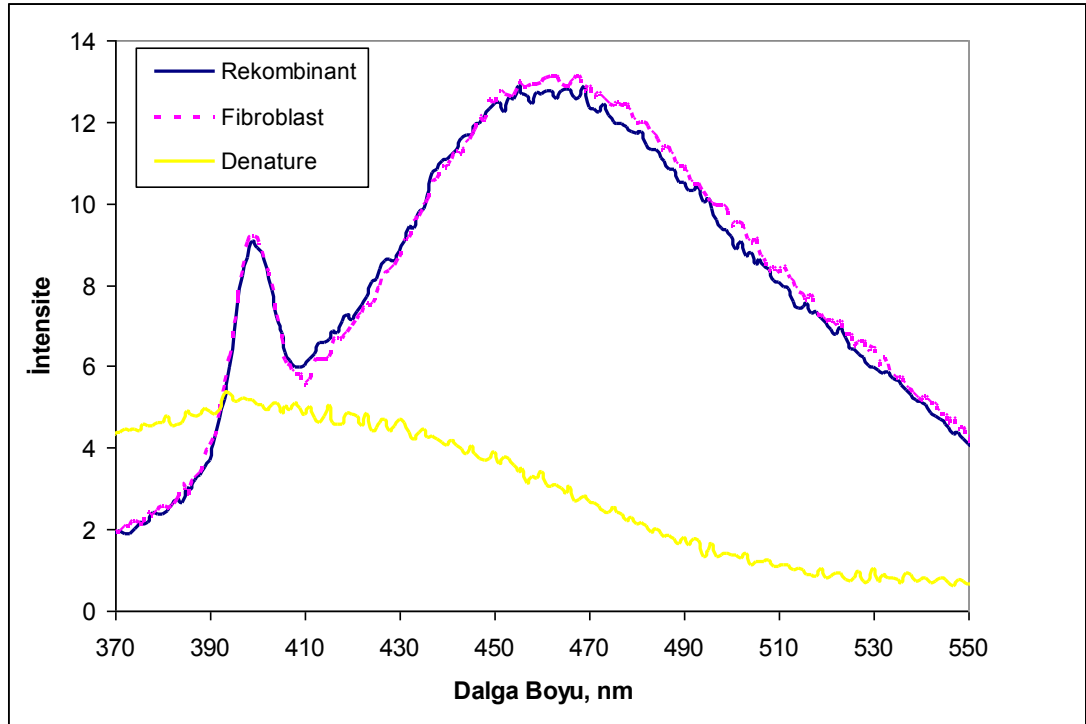
Şekil 4.10. Doğal kaynaktan interferon saflaştırılması.

Tablo 4.1. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojelin kromatografik parametreleri.

	t_R	N	k'	α	R_s
Fibroblast	10.64	554	7.79	-	-
Diğer içerik	2.19	30	0.81	9.62	4.23

Elüsyon işleminin interferon molekülleri üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olup olmadığını (denatürasyon vb) ve fibroblasttan saflaştırılan interferon ile standart'ının yapılarının karşılaştırılması amacıyla florimetrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için, rekombinant interferon- α , elüsyon fraksiyonu ve ısısal olarak denatüre edilmiş interferon örnekleri kullanılmıştır. Elüsyon fraksiyonu, FPLC sistemine ait fraksiyon toplayıcı (9-12. dakikalar arasında) kullanılarak alınmıştır. Rekombinant interferon- α çözeltisi kaynamakta olan su banyosunda (yaklaşık 96°C) 2 saat bekletilerek ısısal bozunma gerçekleştirilmiştir.

Rekombinant interferon- α , elüsyon fraksiyonu ve ısısal olarak denatüre edilmiş interferon örneklerinin florimetre spektrumları şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Florimetre spektrumları.

5.TARTIŞMA

5.1. Kriyojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Şekil 4.1’de SEM fotoğraflarında görüldüğü gibi, poli(HEMA) kriyojeller, geniş akış kanallarına ve 200 μm ’yi bulan geniş süpermakrogözeneklere sahiptir. Bağlantılı akış kanalları ve süpermakrogözenekler, interferon moleküllerinin kolay difüzyonuna ve boya afinite ligandıyla etkileşimine olanak sağlamaktadır. Ayrıca, çok düşük kolon geri basıncı düşmesi özelliği dolayısıyla kromatografik uygulamalarda yüksek akış hızlarında çalışılmasını mümkün kılmaktadır.

Protein saflaştırma için ideal bir adsorbent, yüksek hidrofilitte, düşük non-spesifik adsorpsiyon, oldukça geniş gözenek boyutu, düz bir gözenek yüzey dağılımı ve en az reaktif gruplar kadar kimyasal ve mekanik dirence sahip olmalıdır. Poli(HEMA) kriyojeller bu gereksinimlerin çoğunu karşılamaktadır. Bu kriyojeller gözenekli ve ince polimerik duvarlara ve hareketli fazın kolaylıkla akabildiği bağlantılı geniş gözeneklere (10-100 μm çap aralığında) sahiptirler. Matriksin gözenek boyutu, interferon- α ’nın boyutundan büyüktür ve moleküller kolaylıkla gözeneklerden geçebilmektedir.

5.2. Cibacron Blue F3GA İmmobilizasyonu

Boya ligandlarına proteinin güçlü bağlanması boya ligandı üzerindeki asidik grupların ve aromatik yapıların ve de protein molekülü üzerindeki aminoasitlerin yan zincirlerinin neden olduğu hidrofobik ve/veya iyon değişim etkileşimleri gibi farklı mekanizmaların ortak çalışması sonucu olmaktadır. Boya ligandları çok hidrofobik değildir, fakat proteinlerin hidrofobik kısımlarıyla etkileşimi tercih eden düz aromatik yüzeylere sahiptirler.

Cibacron Blue F3GA geniş bir kullanım alanına sahip olan ticari adsorbentler olarak bulunabilen grup spesifik boya ligandlarıdır. Kriyojellerin rengindeki görsel değişim boya molekülünün poli(HEMA) kriyojellere bağlandığını göstermektedir. Şekil 4.2’de FTIR spektrumunda Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojellerin spektrumunda; 3400 cm^{-1} civarında geniş -OH titreşimleri, 1727 cm^{-1} ’de -C=O titreşimleri, 1158 cm^{-1} ’de -C-O titreşimleri, boyadan

kaynaklanan 1262 cm^{-1} 'de -S=O titreşimleri, 1081 cm^{-1} 'de -C-Cl titreşimleri (ufak bir omuz şeklinde) ve $500\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ aralığında Cibacron Blue F3GA'nın spektrumunda görülen titreşim bandları görülmektedir. Karakterizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlara göre boya afinite ligandı poli(HEMA) kriyojellere başarıyla immobilize edildiği görülmektedir.

5.3. Sulu Çözeltilerden Rekombinant İnterferon- α Adsorpsiyonu

5.3.1. Başlangıç Derişiminin Etkisi

Şekil 4.3'de görüldüğü gibi, adsorpsiyon kapasitesi miktarı artan rekombinant interferon- α derişimi ile artmaktadır. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojeller tarafından adsorbe edilen rekombinant interferon- α 0.5 mg/ml 'nin altındaki düşük derişimlerde doğrusal bir şekilde orantılı olarak artmaktadır. Artan derişimle birlikte adsorpsiyon kapasitesinin artması beklenen bir durumdur. Çünkü adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim gradiyenti artan interferon derişimi ile birlikte artmaktadır. Bu derişim değerinden sonra adsorpsiyon hızı giderek azalmakta ve yaklaşık 1.0 mg/ml 'de doygunluğa ulaşmaktadır. Bu başlangıç derişimindeki hızlı artış (bir başka deyişle dik eğim), rekombinant interferon- α ve Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojeller arasındaki yüksek afiniteyi göstermektedir. Bu hızlı adsorpsiyon sonrasında; poli(HEMA) kriyojellerin yüzeyindeki spesifik etkileşim bölgelerinin (Cibacron Blue F3GA moleküllerinin) dolması sonucunda 1.0 mg/ml 'den sonra sabit kalmıştır. Boya takılı olmayan kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesi ihmal edilebilecek düzeydedir (0.5 mg/g civarında). Bu durum, Cibacron Blue F3GA molekülleri ile interferon arasında spesifik bir etkileşim olduğunu ve boya takılı kriyojellerin seçici olarak interferon molekülleri ile etkileştiğini göstermektedir.

5.3.2. pH Etkisi

Şekil 4.4'de görüldüğü gibi bütün durumlarda rekombinant interferon- α 'nın maksimum adsorpsiyonu pH: 6.0'da gözlenmiştir. Daha asidik ve daha bazik pH bölgelerinde Cibacron Blue F3GA takılı kriyojellere önemli miktarda daha düşük rekombinant interferon- α adsorpsiyonu görülmüştür. Bu pH bölgelerindeki

rekombinant interferon- α adsorpsiyonundaki bu azalma zıt yüklü gruplar arasındaki elektrostatik etkileşimlere bağlıdır.

Rekombinant interferon- α 'nın izoelektrik nokta pH'sının 5.9 olduğuna dikkat edilmelidir. Proteinlerin izoelektrik noktalarında net yüklerinin olmadığı gösterilmiş ve bu yüzden sulu çözeltilerde maksimum adsorpsiyon genellikle proteinlerin izoelektrik noktalarının pH bölgelerinde gözlemlenmektedir. Boya takılı olmayan kriyojellere gerçekleşen adsorpsiyon pH ile bir değişim göstermemiştir. Bu durum, etkileşim non spesifik olduğunu göstermektedir.

5.3.3. Adsorpsiyon Hızı

Şekil 4.5'de görüldüğü gibi adsorpsiyon oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Bu durum interferon moleküllerin geniş akış kanallarından kolaylıkla geçebildiğini ve boya ligand Cibacron Blue F3GA ile etkileşebildiğini göstermektedir. Beklediğimiz gibi rekombinant interferon- α moleküllerinin polimer yüzeyindeki bağlanabileceği aktif bölgelerin dolması nedeniyle 30. dakikaya kadar hızla gerçekleşmiş sonra adsorpsiyon miktarı azalmıştır. Başlangıçtaki hızlı adsorpsiyon interferon moleküllerinin geniş akış kanallarından kolaylıkla geçebildiğini ve boya ligand Cibacron Blue F3GA ile etkileşebildiğini göstermektedir.

5.3.4. İyonik Şiddetinin Etkisi

İyonik güç artarken rekombinant interferon- α adsorpsiyonunun azalması; Cibacron Blue F3GA takılı kriyojeller ve rekombinant interferon- α molekülleri arasındaki tersinir elektrostatik etkileşimlere bağlıdır. Adsorpsiyon ortamındaki tuz derişiminin artmasıyla NaCl tuzunun Na^+ iyonu ile boya moleküllerinin deprotone olmuş sülfonik asit gruplarının koordinasyonu artar. Oluşan bu koordinasyon, interferon- α moleküllerinin adsorplanmak için yüzeye yaklaşmasını engeller. Bundan dolayı artan tuz derişimi ile birlikte adsorpsiyon kapasitesi azalmaktadır. Bu sonucun bir diğer anlamı; yüksek tuz derişiminde adsorplanan interferon- α molekülleri, çözeltiye geçerek desorbe olma eğilimindedir. Buna bağlı olarak 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılmasıyla; adsorbe olan moleküllerin büyük oranda (% 98'lere varan) desorbe edilmesi mümkündür.

5.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Afinite kromatografisinde karşılaşılan en önemli sorun hem kullanılacak biyoligandın hem de hazırlanan kolon dolgu malzemelerinin yüksek maliyetidir. Bundan dolayı, biyoligandların yerine alternatif biyomimetik ligandların (reaktif boyalar gibi) kullanımı önerilmektedir. Maliyetin düşürülmesindeki diğer yaklaşım ise, tekrar kullanım potansiyelleri olan adsorbentlerin geliştirilmesidir. Bu amaçla; Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerin tekrar kullanım potansiyelleri incelenmiştir.

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri sırasında kriyojellerin adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir değişim gözlemlenmemiştir. Boya bağlı P(HEMA) kriyojellerin adsorpsiyon kapasiteleri azalmadan tekrar tekrar interferon saflaştırma işleminde kullanılabilir olması protein saflaştırması için maliyeti düşüren önemli bir özelliktir.

5.5. Doğal Kaynaktan İnterferon Saflaştırılması

Standart interferon çözeltilerinin kromatogramlarından elde edilen verilerin ışığı altında insan gingavil fibroblast interferon ekstraktı FPLC sistemine enjekte edilmiştir. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi, fibroblast interferonu, Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerden başarılı bir şekilde elüe edilmiştir.

Ayırma faktörü, bir kromatogramdaki iki komşu pikin ayrılma seçiciliğini gösteren bir parametredir. Bu değer 1 ise başarılı bir ayırmanın gerçekleştiği kabul edilir. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojelin ayırma faktörü değeri 9.62 gibi oldukça yüksek bir değere sahiptir.

Şekil 4.11'de görüldüğü gibi, rekombinant interferon- α , 399 nm ve 469 nm'de iki adet emisyon bandına sahiptir. Fibroblast hücre kültüründen saflaştırılan interferon çözeltilisinin de aynı bölgelerde emisyon bandları mevcuttur. Emisyon spektrumunda 399 nm'deki band 401 nm'ye; 469 nm'deki band ise 463 nm'ye kaymıştır. Denature interferon örneğinin emisyon spektrumu incelendiğinde 399 nm'deki band intensite kaybederken; 469 nm'deki band tamamen kaybolmuştur. Bu durum; ısıtma işlemi sonucunda interferon moleküllerinin denature olduğu anlamında gelmektedir. Denatürasyon sonrası; bu bölgelerde emisyon veren grup

veya grupların yıkılmış ve bandlar yok olmuştur. Florimetre ölçümlerin elde edilen bir diğer önemli çıkarım şudur: Desorpsiyon çözeltisi (1 M NaCl), Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojelde adsorbe olan interferon moleküllerinin denature edilmeden elüe edilmesi için uygundur. Bu nedenle elüsyon çözeltisinde elde edilen interferon moleküllerinin 3 boyutlu yapısı hasar görmemiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Süper makrogözenekli monolitik poli(HEMA) kriyojeller, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerinin donmuş fazda kriyo-polimerizasyonu ile hazırlanmıştır.

Monolitik kriyojelin içyapısının taramalı elektron mikroskop görüntüleri şekilde verilmiştir. Poli(HEMA) kriyojeller, geniş akış kanallarına ve 200 µm'yi bulan geniş süpermakrogözeneklere sahiptir. Bağlantılı akış kanalları ve süpermakrogözenekler, interferon moleküllerinin kolay difüzyona ve boya afinite ligandıyla etkileşime olanak sağlamaktadır. Ayrıca, düşük basınç düşmesi özelliği dolayısıyla kromatografik uygulamalarda yüksek akış hızlarında çalışılmasını mümkün kılmaktadır.

Poli(HEMA) kriyojelin denge şişme oranı 7.14 g H₂O/g kuru kriyojeldir. Poli(HEMA) kriyojel, opak, süngerimsi ve elastiktir. Bu kriyojellerin gözenekleri içerisindeki su elle kolaylıkla sıkılabilmektedir. Sıkılan kriyojel parçası suya daldırıldığı zaman 1-2 saniye içerisinde orijinal boyut ve şekline tekrar dönebilmektedir.

Poli(HEMA) kriyojellerin karakterizasyonu için uygulanan bir diğer yöntem yüzey alanı ölçümüdür. Yüzey alanı ve gözenek boyutu dağılımı kromatografik destek malzemeleri için önemli parametrelerdir. Bu özellikler sıvı azot sıcaklığında azot absorpsiyon/desorpsiyon izotermi ve 0.05-1.0 arası bağıl basınçları (P/P₀) ile ölçülmüştür. Poli(HEMA) kriyojellerin spesifik yüzey alanı 37.4 m²/g olarak bulunmuştur.

Cibacron Blue F3GA, poli(HEMA) kriyojellere kriyojellerin hidroksil grupları ile reaktif boya molekülünün klor gruplarının nükleofilik yer değiştirmesi reaksiyonu sonucu kovalent olarak bağlanmıştır. Cibacron Blue F3GA geniş bir kullanım alanına sahip olan ticari adsorbentler olarak bulunabilen grup spesifik boya ligandlarıdır. Kriyojellerin rengindeki görsel değişim boya molekülünün poli(HEMA) kriyojellere bağlandığını göstermektedir.

Poli(HEMA) kriyojellere immobilize edilen boya miktarının belirlenmesi amacıyla elementel analizleri yapılmıştır. Elementel analiz sonuçlarına göre birim kriyojel kütlesi başına 74.7 μmol Cibacron Blue F3GA immobilize edilmiştir.

Cibacron Blue F3GA, poli(HEMA) ve Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojellerin FTIR spektrumları alınmıştır. Cibacron Blue F3GA, 3433 cm^{-1} civarında -NH titreşimlerine, 1226 cm^{-1} civarında -S=O titreşimlerine, 1085 cm^{-1} 'de -C-Cl titreşimine ve 1022 cm^{-1} 'de S-O titreşimlerine sahiptir. Poli(HEMA) kriyojellere ait olan spektrumda; 3400 cm^{-1} civarında geniş -OH titreşimleri, 1727 cm^{-1} 'de -C=O titreşimleri, 1244 cm^{-1} ve 1164 cm^{-1} 'de -C-O titreşimleri görülmektedir. Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojellerin spektrumunda; 3400 cm^{-1} civarında geniş -OH titreşimleri, 1727 cm^{-1} 'de -C=O titreşimleri, 1158 cm^{-1} 'de -C-O titreşimleri, boyadan kaynaklanan 1262 cm^{-1} 'de -S=O titreşimleri, 1081 cm^{-1} 'de -C-Cl titreşimleri (ufak bir omuz şeklinde) ve 500-700 cm^{-1} aralığında Cibacron Blue F3GA'nın spektrumunda görülen titreşim bandları görülmektedir. Bu sonuçlar, boya afinite ligandının poli(HEMA) kriyojellere başarıyla immobilize edildiğini göstermektedir.

Başlangıç interferon- α derişiminin etkisini belirlemek amacıyla, farklı derişimlerdeki (0-2.0 mg/ml) interferon- α çözeltileri (pH: 6.0 ve sıcaklık: 25°C), Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojellerle 2 saat etkileştirilmiştir. Adsorpsiyon kapasitesi miktarı artan rekombinant interferon- α derişimi ile artmaktadır. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojeller tarafından adsorbe edilen rekombinant interferon- α 0.5 mg/ml'nin altındaki düşük derişimlerde doğrusal bir şekilde orantılı olarak artmaktadır. Bu derişim değerinden sonra adsorpsiyon hızı giderek azalmakta ve yaklaşık 1.0 mg/ml'de doygunluğa ulaşmaktadır.

Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojellere interferon- α adsorpsiyonuna pH'nın etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, farklı tampon sistemleri (4.0-6.0 asetat ve 7.0-8.0 fosfat) kullanılarak çözeltiler hazırlanmıştır. Bütün pH'larda rekombinant interferon- α 'nın maksimum adsorpsiyonu pH: 6.0'da gözlenmiştir. Rekombinant interferon- α 'nın izoelektrik nokta pH'sının 5.9 olduğuna dikkat edilmelidir. Daha asidik ve daha bazik pH bölgelerinde Cibacron Blue F3GA takılı

kriyojellere önemli miktarda daha düşük rekombinant interferon- α adsorpsiyonu görülmüştür. Bu pH bölgelerindeki rekombinant interferon- α adsorpsiyonundaki bu azalma zıt yüklü gruplar arasındaki elektrostatik etkileşimlere bağlıdır.

Cibacron Blue F3GA takılı-poli(HEMA) kriyojellere interferon- α adsorpsiyon kinetiğinin analizi için interferon-adsorbent arasındaki etkileşim süresinin etkisi incelenmiştir. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellere interferon- α adsorpsiyonu oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Bu durum interferon moleküllerinin geniş akış kanalarından kolaylık geçebildiğini ve boya ligand Cibacron Blue F3GA ile etkileşebildiğini göstermektedir. Rekombinant interferon- α moleküllerinin polimer yüzeyindeki bağlanabileceği aktif bölgelerin dolması nedeniyle 30 dakikadan sonra maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşılarak denge adsorpsiyonu gözlenmektedir.

Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellere interferon- α adsorpsiyonuna iyonik şiddetin (bir başka tanımla tuz varlığının) etkisi incelenmiştir. İyonik gücün artmasıyla adsorpsiyon kapasitesi önemli ölçüde azalmaktadır. İyonik güç artarken rekombinant interferon- α adsorpsiyonunun azalması; Cibacron Blue F3GA takılı kriyojeller ve rekombinant interferon- α molekülleri arasındaki tersinir elektrostatik etkileşimlere bağlıdır. Adsorpsiyon ortamındaki tuz derişiminin artmasıyla NaCl tuzunun Na^+ iyonu ile boya moleküllerinin deprotone olmuş sülfonik asit gruplarının koordinasyonu artar. Oluşan bu koordinasyon, interferon- α moleküllerinin adsorplanmak için yüzeye yaklaşmasını engeller. Bundan dolayı artan tuz derişimi ile birlikte adsorpsiyon kapasitesi azalmaktadır.

Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerin tekrar kullanım potansiyelleri incelenmiştir. Bu aşama için pH 6.0 (asetat tamponu), başlangıç interferon- α derişimi 1.0 mg/ml ve sıcaklık 25°C'da sabit tutulmuştur. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerin adsorpsiyon-desorpsiyon döngülerine ait veriler Şekil 4.7'de verilmiştir. Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğini göstermek için aynı kriyojeller kullanılarak adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri 10 defa tekrar edilmiştir. Tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri

sırasında kriyojellerin adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir değişim gözlemlenmemiştir.

Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerin interferon saflaştırma performansının belirlenmesi için insan gingival fibroblast kültüründen interferon saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Spesifik etkileşime girmeyen fazla interferon kolondan tutunmadan çıkmaktadır. Kolona bağlanan interferon molekülleri, desorpsiyon çözeltisinin gradiyent uygulanmasıyla (6. dakikadan sonra) kolondan ayrılmaktadır. Elüsyon piklerinin alanları, derişimle doğrusal olarak artmaktadır.

Standart interferon çözeltilerinin kromatogramlarından elde edilen verilerin ışığı altında insan gingival fibroblast interferon ekstraktı FPLC sistemine enjekte edilmiştir. Fibroblast interferonu, Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojellerden başarılı bir şekilde elüe edilmiştir. Fibroblast interferonuna ait kromatogram, ekstraktın daha kompleks bir çözelti olmasına bağlı olarak biraz gürültü elde edilmiştir. Alıkonma süreleri hem standart interferon hem de fibroblast interferonu için 11 dakika civarındadır.

Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojel için hesaplanan kapasite faktörü, ayırma faktörü, ayırım gücü ve teorik plaka sayısı değerleri sırasıyla 7.79, 9.62, 4.23 ve 554 olarak hesaplanmıştır.

Elüsyon işleminin interferon molekülleri üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olup olmadığının (denatürasyon vb) ve fibroblasttan saflaştırılan interferon ile standart'ının yapılarının karşılaştırılması amacıyla florimetrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için, rekombinant interferon- α , elüsyon fraksiyonu ve ısısal olarak denatüre edilmiş interferon örnekleri kullanılmıştır.

Elüsyon fraksiyonu, FPLC sistemine ait fraksiyon toplayıcı (9-12. dakikalar arasında) kullanılarak alınmıştır. Rekombinant interferon- α çözeltisi kaynamakta olan su banyosunda (yaklaşık 96°C) 2 saat bekletilerek ısısal bozunma gerçekleştirilmiştir. Rekombinant interferon- α , 399 nm ve 469 nm'de iki adet emisyon bandına sahiptir.

Fibroblast hücre kültüründen saflaştırılan interferon çözeltisinin de aynı bölgelerde emisyon bandları mevcuttur. Emisyon spektrumunda 399 nm'deki band 401 nm'ye; 469 nm'deki band ise 463 nm'ye kaymıştır.

Denature interferon örneğinin emisyon spektrumu incelendiğinde 399 nm'deki band intensite kaybederken; 469 nm'deki band tamamen kaybolmuştur. Bu durum; ısıtma işlemi sonucunda interferon moleküllerinin denature olduğu anlamında gelmektedir. Denatürasyon sonrası; bu bölgelerde emisyon veren grupların yapısı bozulmuş ve bandlar yok olmuştur.

Florimetre ölçümlerin elde edilen bir diğer önemli çıkarım şudur: Desorpsiyon çözeltisi (1 M NaCl), Cibacron Blue F3GA takılı poli(HEMA) kriyojelden adsorbe olan interferon moleküllerinin denature edilmeden elüe edilmesi için uygundur. Bu nedenle, kromatografi sistemimizde desorpsiyon işlemi sonucu elde edilen interferon moleküllerinin 3 boyutlu yapısı hasar görmemiştir.

6. KAYNAKLAR

- 1) Cuatrecasas, P., Wilchek, M., Anfinsen, C.B. (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61, 636-643.
- 2) Deutscher, M.P. (1990). Guide to protein purification. *Methods in enzymology.*, San Diego:Academic Pres, vol. 182.
- 3) Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö. (2000)., *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum*, 85-95.
- 4) Wilchek, M., Miron, T. (1999). Thirty years of affinity chromatography, *React. Funcl. Polym.*, 41, 263-268.
- 5) Denizli, A., Piskin, E. (2001). Dye-ligand affinity systems, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49, 391-416.
- 6) Dean, P.D.G., Johnson, W.S., Middle, F.A. (1985). A practical approach to affinity chromatography. Oxford, UK: IRL Press.
- 7) Denizli, A., Köktürk, G., Yavuz, H., Pişkin, E. (1999). Albümin adsorption from aqueous solutions and human plasma in a packed-bed column with Cibacron blue F3GA-Zn(II) attached PHEMA microbeads, *React. Funcl. Polym.*, 40, 195-203
- 8) Denizli, A. (1999). Heparin immobilized poly(2-hydroxyethylmethacrylate) based microspheres, *J. Appl. Polym. Sci.*, 74, 655-62.
- 9) Denizli, A., Piskin, E. (1995) DNA immobilized polyhydroxyethylmethacrylate microbeads for affinity sorption of human immunoglobulin-G and anti-DNA antibodies, *J. Chromatogr. B.* 666, 215-222.
- 10) Denizli, A., Rad, A.Y., Piskin, E. (1995). Protein A immobilized polyhydroxyethyl methacrylate beads for affinity sorption of human immunoglobulin-G, *J. Chromatogr. B.*, 668, 13-19.
- 11) Kocakulak, M., Denizli, A., Rad, A., Pişkin, E. (1997). A New sorbent for bilirubin removal from human plasma: Cibacron blue F3GA-immobilized PHEMA microbeads, *J. Chromatogr. B.*, 693, 271-276.
- 12) Chase, H.A. (1988). Adsorption separation processes for protein purification. Mizrahi, A. (ed). *Downstream processes: equipment and techniques*. London: Alan R. Liss, p. 159-204.
- 13) Denizli, A., Pişkin, E. (1995). Heparin Immobilized Polyhydroxyethyl methacrylate microbeads for cholesterol removal: A Preliminary Report, *J. Chromatogr. B.*, 670, 157-161.

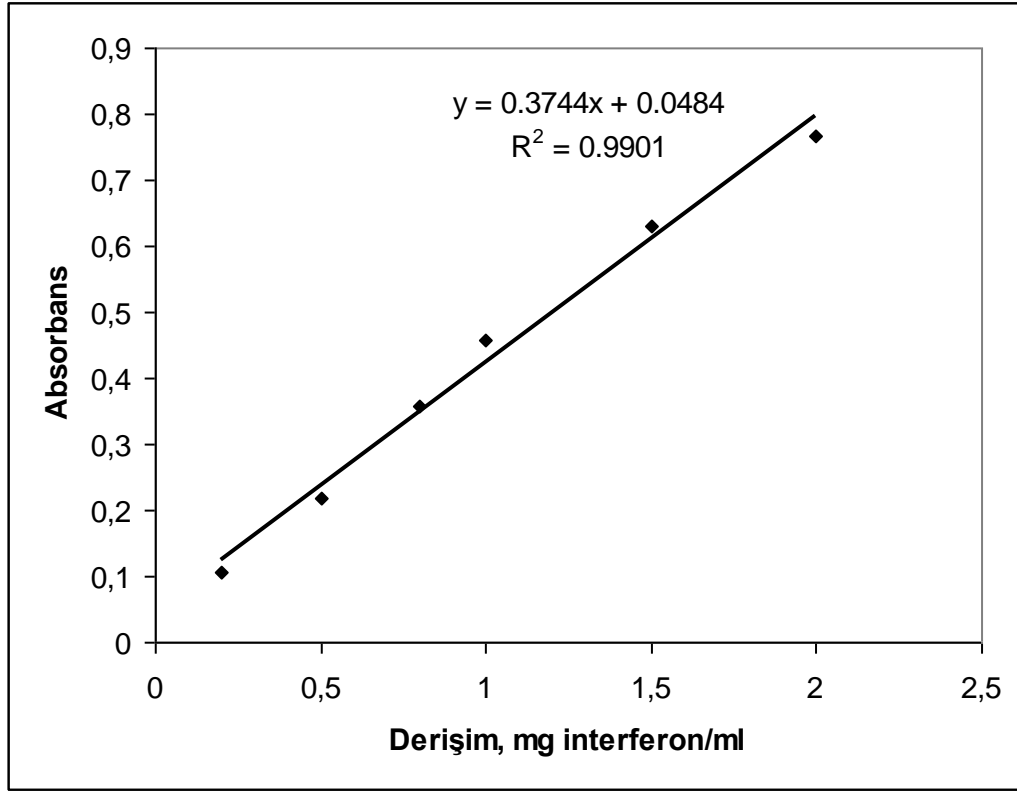
- 14) Lillehoj, E.P., Malik, V.S. (1982). Protein purification. In: Fiechter, A. (ed). *Advances in biochemical engineering biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag, p. 20-65.
- 15) Bajpai K. ve Shrivastava M., *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 2002, 13, 237–256.
- 16) Bohme, H.J., Schulz, G., Hofmann, E. (1972) Affinity chromatography of phosphofructokinase using Cibacron Blue F3GA. *J. Chromatogr.*, 69, 209-214.
- 17) Kopperschlager, G., Diezel, W., Freyer, R., Liebe, S., Hofmann, E. (1971). Wechselwirkungen der hefe-phosphofructokinase mit dextranblau 200. *Eur. J. Biochem.*, 22, 40-45.
- 18) Kopperschlager, G., Freyer, R., Diezel, W., Hofmann, E. (1968). Some kinetic and molecular properties of yeast phosphofructokinase. *FEBS Lett.*, 1, 137-140.
- 19) Roschlau, P., Hess, B. (1972). Affinity chromatography of yeast pyruvatekinase with Cibacron blue bound to Sephadex G-200 Hoppe-Seyler's. *Z. Physiol. Chem*, 353, 441-443.
- 20) Clonis, Y.D., Stead, C.V., Lowe, C.R. (1987). Novel cationic dyes for protein purification. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 621.
- 21) Fulton, S. (1980). Marios, M. (ed.). *Dye-ligand chromatography*. Lexington: Amicon.
- 22) Lowe, C.R., Small, D.A.P., Atkinson, A. (1981). Some preparative and analytical applications of triazine dyes. *Int. J. Biochem.*, 13, 33-40.
- 23) Clonis, Y.D., Labrou, N.E., Kotsira, V.Ph., Mazitsos, C., Melissis, S., Gogolas, G. (2000). Biomimetic dyes as affinity purification tools in enzyme purification. *J. Chromatogr.*, 891, 33-44.
- 24) Dean, P.D.G., Watson, D.H. (1969). Protein purification using immobilised triazine dyes. *J. Chromatogr.*, 165, 310-319.
- 25) Lindner, N., Jeffcoat, R., Lowe, C.R. (1987). Design of applications of biomimetic anthraquinone dyes. Purification of calf intestinal alkaline phosphatase with immobilised terminal ring analogues of C.I. Reactive Blue 2. *J. Chromatogr.*, 473, 227-240.
- 26) Clonis, Y.D., Goldfinch, M., Lowe, C.R. (1981). The interaction of yeast hexokinase with Procion Green H-4G. *Biochem. J.*, 197, 203-211.

- 27) Bode, W., Schwager, P. (1975). The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. *J. Mol. Biol.* 98, 693.
- 28) Burton, N., Lowe, C.R. (1993). Design of novel cationic ligands for the purification of trypsin-like proteases by affinity chromatography. *J. Mol. Recognit.*, 6, 31.
- 29) Clonis, Y.D., Lowe, C.R. (1991). Monosized adsorbents for high performance affinity chromatography: applications to the purification of calf intertinal alkaline phosphatase and human urokinase. *J. Chromatogr.*, 540, 103-111.
- 30) Labrou, N.E., Clonis, Y.D. (1995). Biomimetic dye affinity chromatography for the purification of bovine heart lactate dehydrogenase. *J. Chromatogr.*, 718, 35-44.
- 31) Lowe, C.R., Burton, S.J., Pearson, J., Clonis, Y.D., Stead, C.V. (1986). Design and application of biomimetic dyes in biotechnology. *J. Chromatogr.*, 376, 121-126.
- 32) Clonis, Y.D., Lowe, C.R. (1980). Triazine dyes: a new class of affinity labels for nucleotide-dependent enzymes. *Biochem. J.*, 191, 247-251.
- 33) Labrou, N.E., Eliopoulos, E., Clonis, Y.D. (1999). Molecular modeling for the design of a biomimetic chiremic ligand: application to the purification of bovine heart L-lactide dehydrogenase. *Biotechnol. Bioeng.*, 63, 322.
- 34) Labrou, N.E., Eliopoulos, E., Clonis, Y.D. (1996). Dye affinity labelling of bovine heart mitochondrial malate dehydrogenase and study of the NADH-binding site. *Biochem. J.*, 315, 687-694.
- 35) Labrou, N.E., Eliopoulos, E., Clonis, Y.D. (1996). Molecular modelling for the design of chimeric biomimetic dye ligands and their interaction with bovine heart mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochem. J.*, 315, 695-702.
- 36) Labrou, N.E., Karagouni, A., Clonis, Y.D. (1995). Biomimetic dye affinity adsorbents for enzyme purification: application to the one step purification of candida boidini formate dehydrogenase. *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 278-286.
- 37) Kotsira, V.Ph., Clonis, Y.D. (1979). Oxalate oxidase from Barley roots: purification to homogeneity and study of some molecular, catalytic, and binding properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 340, 239-244.
- 38) Li, R., Dowd, V., Stewart, D.J., Burton, S.J., Lowe, C.R. (1988). *Nat. Biotechnol.* 16, 190.

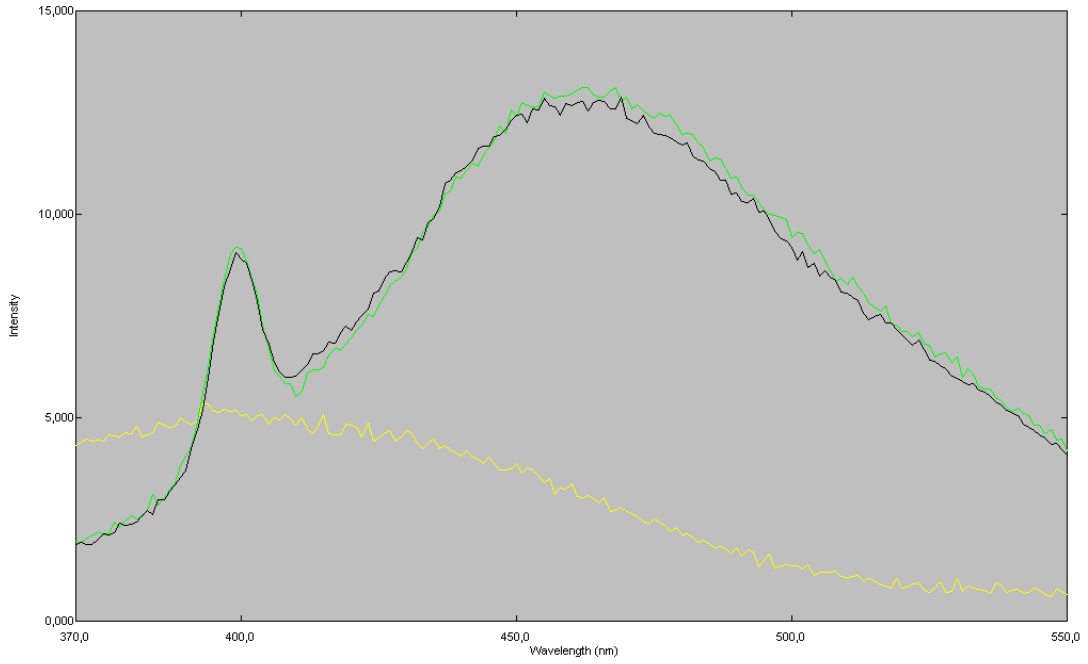
- 39) Matejtschuk, P. (1997). Affinity separations, a practical approach. Oxford: IRL Pres.
- 40) Scouten, W.H. (1981). Affinity chromatography, bioselective adsorption on inert matrices. New York: Wiley.
- 41) Turkova, J. (1993). Bioaffinity chromatography. Amsterdam: Elsevier.
- 42) Burton, S.J., McLoughlin, S.B., Stead, C.V., Lowe, C.R. (1988). Design and applications of biomimetic anthraquinone dyes. *J. Chromatogr.*, 435, 127-137.
- 43) Clonis, Y.D., Atkinson, T., Bruton, C.J., Lowe, C.R. (1987). Reactive dyes in protein and enzyme technology. London: Stockton Press.
- 44) Apps, D.K., Glead, C.D. (1976). Interaction of pigeon liver nicotinamide adenine dinucleotide kinase with Cibacron Blue F3GA. *Biochem. J.*, 159, 441.
- 45) Baird, J., Sherwood, R., Carr, R.J.G., Atkinson, A. (1976). Enzyme purification by substrate elution chromatography from Procion dye-polysaccharide matrices. *FEBS Lett.*, 70, 61-66.
- 46) Larsson, P.O. (1984) High performance liquid affinity chromatography. *Method. Enzymol.*, 104, 212-224.
- 47) Jankowski, W.I., Muenchhausen, W., Sulkowski, E., Carter, W.A. (1976) Binding of human interferons to immobilized Cibacron Blue F3GA: the nature of molecular interaction. *Biochem.*, 15, 5182-5187.
- 48) Half, L.A., Easterday, R.L. (1978). In: Sundaram, P.V., Eckstein, F. (eds). Theory and practice in affinity techniques. London: Academic Pres, UK.
- 49) Wilson, J.E. (1976). Applications of Blue dextran and Cibacron Blue F3GA in purification and structural studies of nucleotide requiring enzymes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72, 816-820.
- 50) Thompson, S.T., Cass, K.H., Stellwagen, E. (1975). Blue-Dextran-Sepharose: an affinity column for the dinucleotide folding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72, 669.
- 51) Kaminska, J., Dzieciol, J., Koscielak, J. (1999). Triazine dyes as inhibitors and affinity ligands of glycosyltransferases. *Glycoconj. J.*, 16, 719-723.
- 52) Lascu, L., Porumb, H., Porumb, T., Abrudan, I., Tarmure, C., Petrescu, I. (1984). Ion-exchange properties of Cibacron Blue 3G-A Sepharose and the interaction of proteins with Cibacron Blue 3G-A. *J. Chromatogr.*, 283, 199-210.

- 53) Bollin, E., Vastola, K., Olezsak, P., Sulkowski, E. (1978). The interaction of mammalian interferons with immobilized Cibacron Blue F3GA: modulation of binding strength. *Prep. Biochem.*, 8, 259-264.
- 54) Subramanian, S. (1984). Dye-ligand chromatography: the interaction of Cibacron Blue F3GA with proteins and enzymes. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 16, 169-205.
- 55) Biellman, J.F., Sama, J.P., Branden, C.I., Eklund, H. (1979) X-ray studies of the binding of Cibacron Blue F3GA to liver alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 102, 107.
- 56) Witt, J.J., Roskoski, R. (1980). Adenosine cyclic 3X,5X-monophosphate dependent protein kinase: active site directed inhibition by Cibacron BLue F3GA. *Biochem.* 19, 143-147.
- 57) Hughes, P., Lowe, C.R., Sherwood, R.F. (1982). Metal-ion promoted binding of triazine dyes to proteins: the interaction of Cibacron Blue F3GA with yeast hexokinase. *Biochem. J.*, 205, 453-460.
- 58) Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H., Mattiasson, B. (2003). Polymeric Cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trend. Biotechnol.*, 21, 10.
- 59) Candaş, D. (2004). İnterferon Tedavisi, *Bilim ve Teknik*, 441, 68-69.
- 60) Cesario, T.C. (1983). The clinical implications of human interferons. *Med. Clin. North Am.*, 67, 1147.
- 61) Balkwill, P.R. (1989). Interferon. *Lancet*, 33,1060-1063.
- 62) Ilouglum, J.F. (1983). Interferon: Mechanisms of action and clinical value. *Clin. Pharmacol.*, 2, 20.
- 63) Kirkpatrick, D.V. (1984). Interferon: Current clinical trials, *Hosp. Phys.* 20, 16.
- 64) Kirkwood, J.M., Hmsloff, M.S. (1984). Interferons in the treatment of human cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2, 33d.
- 65) Bloom, Br. (1980). Interferon and the immun system. *Nature*, 284, :593.
- 66) Borden, H.C., Ball, L.A. (1981). Interferons: Biochemical, cell growth, inhibitory, and immunological effects. *Prog. Hematol.*, 12, 299.
- 67) Saksela, E., Tinmen, T., Cantell, K. (1979). Human natural killer cell activity is augmented by interferon via recruiniel of "pre-NK" cells. *Scand. Immunol.* 10, 257.

- 68) Janeway, C.A. Jr, Bottomly, K., Babich, II. (1984). Quantitative Variation in Ia antigen expression plays a central role in immune regulation, *Immun. Today*, 5, 99.
- 69) Harias, B., Ihuddlestone, J.R., Casali, P. (1981). Interferon acts directly on human B lymphocytes to modulate immunoglobines synthesis. *J. Immunol.* 127, 2146.
- 70) Anonymous. (1986). A Product Monograph Data on file, Scliering-Plough Corporation Kcuilworth, Nj.
- 71) Sliver, H.K.B, Salinas, F.A., Kong, S. (1986). Immun Effects. Role of interferons in imniun regulation. Silver, H.K.B. (ed). Interferons in Cancer Treatment. MES Medical Education Services, pp. 1.
- 72) Cho, J.M., Park, Y.W., Park, S.J., Bae, T.O., Chang, H.J. (1993) Recombinant gene coding for human alpha interferon and expression vector thereof, ETC. *Euro. Patent App.* No. 0 553 494 A1
- 73) Ettlin, U., Hochuli, E., Schacher, A., and Weyer, K. (1995) Process for producing alpha-interferon. *Eur. Patent App.* No. 0 679 718 A2.
- 74) Tarnowski, S.J., Roy, S.K., Liptak, R.A., Lee, D.K., Ning, R.Y. (1986) Large-scale purification of recombinant human leukocyte interferons. *Method. Enzymol.* 119, 153-165.
- 75) Thatcher, D.R., Panayotatos, N. (1986) Purification of recombinant human IFN- α 2. *Method. Enzymol.* 119, 166-177..
- 76) Sathyamangalam, S., Navin, K. (1999). Affinity purification of recombinant interferon- α on a mimetic ligand adsorbent, *Protein Exp. Pur.* 15, 236-242.
- 77) Spiegel, R.J. (1986). Dosage and toxicity. Alpha interferon: dosage, toxicity and antibody formation. Silver, H.K.B. (ed) Interferons in Cancer Treatment. MES Medical Education Services, pp. 17.
- 78) Bahçeci, Z. (1999). Moleküler Biyoloji, Öğrenci Kitabevi Yayınları, Kırşehir, s. 255.

EKLER

EK 1. Rekombinant interferon- α için hazırlanan kalibrasyon eğrisi. Cihaz: Shimadzu 1601 Spektrofotometre; Dalga Boyu: 280 nm.



EK 2. Florimetre Spektrumları. Siyah: Rekombinant interferon- α ; Yeşil: Fibroblast interferonu ve Sarı: Isısal denature interferon- α . Cihaz: Shimadzu RF-5301PC; spektrum türü: emisyon; tarama alanı: 350-550 nm; uyarma dalga boyu: 350 nm; slit genişliği: 5.0 nm; tarama hızı: süper; duyarlılık: yüksek; cevap süresi: otomatik.

ÖZGEÇMİŞ

ALİ DOĞAN

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi : 01.01.1978
Doğum Yeri : Gaziantep
Cinsiyeti : Erkek
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dil : İngilizce
Çalıştığı Kuruluşlar : 2000–2001 İzmit Özel Marmara Polikliniği Körfez/İZMİT,
2004- Karakoçan Devlet Hastanesi, Karakoçan/ELAZIĞ
Telefon : (0424) 7112502
Eposta : doganali91@yahoo.com

EĞİTİM/KARİYER

Lise : Mehmet Akif Ersoy Anadolu Teknik, Teknik Lise ve Endüstri
Meslek Lisesi, 1994-1998.
Önlisans : Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek
Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Bölümü, 1998-2000.
Lisans : Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
2001-2004.
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya
Anabilim Dalı, 2007-2010.