

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER DAMGALANMIŞ BİYOMATERYALLER İLE İNSAN
PLAZMASINDAN BİLİRUBİN VE KOLESTEROL UZAKLAŞTIRILMASI

ARZU KAYA KOÇDOĞAN

TEMMUZ 2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürünün onayı

02/07/2009

Doç. Dr. Burak BİRGÖREN

Müdür V.

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.

Doç. Dr. Sema TAN

Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr Sema TAN

Doç. Dr. Aysun ERGENE

Yrd. Doç. Dr. Mustafa TÜRK

ÖZET

MOLEKÜLER DAMGALANMIŞ BİYOMATERYALLER İLE İNSAN PLAZMASINDAN BİLİRUBİN VE KOLESTEROL UZAKLAŞTIRILMASI

KAYA KOÇDOĞAN, Arzu

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Sema TAN

Temmuz 2009,73 Sayfa

Hiperbilirubinemi ve hiperkolesterolemi tedavisi için biyomateryallerde moleküler damgalama tekniği kullanılmıştır. Kitosan ve agaroz doğal polimerleri materyal olarak seçilmiştir. Bilirubin ve kolesterol damgalı kitosan-agaroz biyomateryalinin bilirubin ve kolesterol uzaklaştırma kapasitesinin belirlenmesi için insan plazması kullanılmıştır. Bilirubin uzaklaştırılması için pH 7.0, sıcaklık 37°C ve başlangıç bilirubin konsantrasyonu 40 mg/g optimum şartlar olarak belirlenmiştir. Kolesterol uzaklaştırılması için pH 6.0, sıcaklık 37 °C ve başlangıç konsantrasyonu 59.7 mg/g optimum şartlar olarak belirlenmiştir. NaCl konsantrasyonunun arttırılması ile bilirubin ve kolesterol için iyonik şiddetin azaldığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Moleküler damgalama, bilirubin, kolesterol, kitosan-agaroz, biyomateryal, uzaklaştırma

ABSTRACT

BILIRUBIN AND CHOLESTEROL REMOVAL FROM HUMAN PLASMA WITH MOLECULAR IMPRINTING BIOMATERIALS

KAYA KOÇDOĞAN, Arzu

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M.Sc.Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sema TAN

July 2009, 73 Pages

The molecular imprinting technique is used for treatment of hyperbilirubinemia and hypercholesterolemia in biomaterials. The natural polymers agarose and chitosan are chosen as a material. The human plasma is used for the detection of bilirubin and cholesterol remove capacity of bilirubin and cholesterol imprinted chitosan-agarose biomaterials. The optimum conditions are determined pH: 7.0, temperature 37 °C and initial bilirubin concentration is 40 mg/g for bilirubin removal. The optimum conditions are determined pH: 6.0, temperature 37 °C and initial cholesterol concentration is 59.7 mg/g for cholesterol removal. It is found out that while NaCl concentration is increasing, the ionic strength is decreasing for bilirubin and cholesterol.

Key Words: Molecular imprinting, bilirubin, cholesterol, agarose-chitosan ,
biomaterial, removal.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde her türlü yardım, öneri ve eleştirilerini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Sema TAN'a, deneylerim esnasında yorumlarıyla destek veren Sayın Doç. Dr. Aysun ERGENE'ye ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Emine YALÇIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında yardımlarını ve desteklerini gördüğüm aileme özellikle anneme ,babama ve eşime teşekkür ederim.

Bu tez, 2007/55 numaralı "Moleküler Damgalanmış Biyomateryaller İle İnsan Plazmasından Bilirubin Ve Kolesterol Uzaklaştırılması " isimli Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1.GİRİŞ	1
1.1. Kaynak Özetleri.....	4
1.1.1. Moleküler Damgalama.....	4
1.1.2. Moleküler Damgalamanın Kullanım Alanları.....	8
1.1.3. Bilirubin.....	12
1.1.3.1 Bilirubin Metabolizması.....	12
1.1.4. Bilirubin Toksisitesi.....	15
1.1.4.1. Hiperbilirubinemi	17
1.1.4.2. Hiperbilirubinemilerin sınıflandırılması.....	18
1.1.4.3. Hiperbilirubinemi Tedavisi.....	19
1.1.4.3.1. Fototerapi.....	19
1.1.4.3.2. Kan Değişimi.....	22
1.1.4.3.3. Farmakolojik Tedavi.....	23
1.1.5. Kolesterol ve Metabolizması.....	23

1.1.5.1. Kolesterol Sentezi.....	26
1.1.5.2. Hiperkolesterolemi.....	27
1.1.5.3. Hiperkolesteroleminin Sınıflandırılması.....	28
1.1.5.4. Hiperkolesterolemi Tedavisi.....	30
1.1.5.4.1. İlaçsız Tedavi.....	30
1.1.5.4.2. İlaç Tedavisi.....	32
1.1.6. Hiperbilirubinemi Ve Hiperkolesteroleminin Moleküler Damgalamanın Kullanım.....	33
1.2. Çalışmanın Amacı.....	34
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	36
2.1. Materyal.....	36
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	36
2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	36
2.2. Biyomateryallerin Hazırlanması.....	36
2.2.1. Doğal Kitosan-Agaroz Biyomateryali.....	36
2.2.2. Bilirubin Damgalı Kitosan-Agaroz Biyomateryali Sentezlanması.....	37
2.2.3. Kolesterol Damgalı Kitosan-Agaroz Biyomateryalinin Sentezlenmesi.....	37
2.3. Biyomateryallerin Karakterizasyonu.....	37
2.3.1. Denge Su içeriği.....	37
2.3.2. Yüzey Analizleri.....	38
2.3.3. Kan Uyumluluk Testleri	38
2.3.3.1. Hemoliz Testi.....	38
2.3.3.2. Platelet Adhezyon Testi.....	39
2.3.3.3. Kan Proteinleri Adhezyonu.....	39
2.4. Sulu Çözeltilerden Bilirubin Uzaklaştırılması.....	39

2.5. Sulu Çözeltilerden Kolesterol Uzaklaştırılması.....	40
2.6. İnsan Plazmasından Bilirubin Uzaklaştırılması.....	41
2.7. İnsan plazmasından Kolesterol Uzaklaştırılması.....	41
3. ARAŞTIRMA BULGULAR.....	42
3.1. Biyomateryal Karakterizasyonu.....	42
3.1.1. Denge Su içeriği.....	42
3.1.2. SEM Mikrografları.....	43
3.1.3. Bilirubin Damgalı Biyomateryaller İçin Kan Uyumluluk Parametreleri..	44
3.1.4. Kolesterol Damgalı Biyomateryaller İçin Kan uyumluluk Parametreleri.	45
3.2. Bilirubin Uzaklaştırma.....	46
3.2.1. pH Etkisi.....	46
3.2.2 Zamanın Etkisi.....	47
3.2.3. Başlangıç Bilirubin Derişiminin Etkisi	47
3.2.4. Biyomateryal Derişimin Etkisi.....	48
3.2.5. İyonik Şiddet Etkisi.....	49
3.2.6. Sıcaklığın Etkisi.....	50
3.3. İnsan Serumundan Bilirubin Adsorpsiyonu.....	51
3.4. Kolesterol Uzaklaştırma.....	52
3.4.1. pH Etkisi.....	52
3.4.2 Zamanın Etkisi.....	53
3.4.3. Başlangıç Kolesterol Derişimi Etkisi.....	54
3.4.4. Sıcaklığın Etkisi	55
3.4.5. İyonik Şiddet Etkisi.....	56
3.5. İnsan plazmasından Kolesterol Uzaklaştırılması.....	57

4. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
5. KAYNAKLAR.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
3.1. BD-KA Biyomateryalinin Kan Uyumluluk Parametreleri.....	44
3.2. KD-KA Biyomateryalinin Kan Uyumluluk Parametreleri	45
3.3. Moleküler Damgalı Kitosan-Agaroz Biyomateryali İle İnsan Plazmasından Bilirubin Uzaklaştırılması.....	52
3.4. Moleküler Damgalı Kitosan-Agaroz Biyomateryali İle İnsan Plazmasından Kolesterol Uzaklaştırılması.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1.1.Moleküler Damgalamanın Genel Mekanizması.....	5
1.2.Kitosanın Yapısı.....	10
1.3. Agaroz Polimer Yapısı ve Jel Oluşumu.....	11
1.4. Bilirubin.....	13
1.5.Hem'den Bilirubin Oluşumu.....	14
1.6. Bilirubin Fotokimyasal Reaksiyonları.....	21
1.7.Kolesterolün Yapısı.....	24
3.1. Kitosan-Agaroz Biyomateryalinin Denge Su İçeriği.....	43
3.2. KA ve BD-KA Materyallerinin SEM Mikrografları.....	43
3.3. Bilirubin Adsorsiyonu Üzerine pH'nın Etkisi.....	46
3.4. Bilirubin Adsorsiyonu Üzerine Zamanın Etkisi.....	47
3.5. Bilirubin Adsorsiyonu Üzerine Bilirubin Başlangıç Derişiminin Etkisi.....	48
3.6. Bilirubin Adsorsiyonu Üzerine Biyomateryal Derişiminin Etkisi.....	49
3.7. Bilirubin Adsorsiyonu Üzerine İyonik Şiddetin Etkisi.....	50
3.8. Bilirubin Adsorsiyonu Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	51
3.9. Kolesterol Adsorpsiyonu Üzerine pH'nın Ekisi.....	53
3.10. Kolesterol Adsorpsiyonu Üzerine Zamanın Etkisi.....	54
3.11. Kolesterol Adsorpsiyonu Üzerine Bşlangıç Drişim Etkisi.....	55
3.12. Kolesterol Asorpsiyonu Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	56
3.13. Kolesterol Asorsiyonu Üzerine İyonik Şiddetin Etkisi.....	57

KISALTMALAR DİZİNİ

KA	Kitosan-Agaroz
BD	Bilirubin Damgalı
BD-KA	Bilirubin Damgalı Kitosan-Agaroz
KD-KA	Kolesterol Damgalı Kitosan-Agaroz
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetikasit
SEM	Scanning Electron Microscope
UDPGT	Uridildifosfat Glukuronil Transferaz
HIV	Human Immunodeficiency Virus
CMV	Cytomegalovirus
Wd	Biyomateryalin Kuru Ağırlığını
Ws	Biyomateryalin Şişmiş Ağırlığını
q	Biyomateyallere Adsorplanan Bilirubin Miktarını
Co	Çözeltideki Başlangıç Bilirubin Konsantrasyonunu
Vs	Çözelti Hacmini
m	Biyomateyal Miktarını
z	Biyomateyallere Adsorplanan Kolesterol Miktarını
Xo	Çözeltideki Başlangıç Kolesterol Konsantrasyonunu
Vs	Çözelti Hacmi

1. GİRİŞ

Moleküler tanıma doğadaki temel reaksiyonlardan biridir ve bağlanma bölgeleri molekülün büyüklüğü, şekli ve kimyasal fonksiyonu ile ilişkilidir. Moleküler damgalama, çeşitli hedef molekülleri kullanarak polimerde spesifik tanıma bölgeleri oluşturan bir tekniktir. Kısaca moleküler damgalama işlemi, çözeltide uygun fonksiyonel monomerlerin hedef molekül etrafında toplanmasını (hedef molekül-fonksiyonel monomer kompleksinin oluşumu) ve üç boyutlu polimerik materyal içerisinde polimerizasyonun gerçekleştirilmesi, oluşan polimerden hedef molekülün uzaklaştırılmasıyla polimerik materyalde hedef molekülün kalıbının oluşması basamaklarını içermektedir ^(1,2). Bu materyaller yüksek seçicilikte hedef molekülün tekrar bağlanmasında kullanılabilir. Hedef molekülün bir karışımdan bilinen ayırma işlemlerine göre daha kısa sürede ve düşük maliyetle, aynı zamanda yüksek basınç ile sıcaklığa gerek duymadan güvenilir bir şekilde ayrılabilmesi moleküler damgalanmış materyallerin bilinen en önemli avantajları arasında sayılabilir. ^(1,3)

Moleküler damgalanmış materyaller olarak biyolojik reseptörler, saflaştırma, izolasyon, atık su arıtımında sıkça kullanılmaktadır. Son yıllarda biyolojik sıvılardan toksik maddelerin arıtımında da moleküler damgalanmış materyaller kullanılmaktadır. İlk göze çarpan çalışmalar, kandan bilirubin uzaklaştırılması

çalışmalarıdır. Bu çalışmada da hiperbilirubinemi tedavisine yeni bir yaklaşım olarak moleküler damgalı biyomateryallerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Karaciğer yetmezliği, eritrosit enzim bozuklukları, sepsis, eritrosit membran defektleri, ekstrasvaskular kan toplanması, polisitemi gibi nedenlerle plazmada bilirubin seviyeleri artmaktadır. Bu şekilde plazmadaki bilirubin seviyesinin artışı hiperbilirubinemi olarak adlandırılmaktadır. Bilirubin seviyesindeki bu artış sıkça rastlanan bir durum olmasın rağmen, kan-beyin bariyerini geçen bilirubinin beyin hücrelerinde birikmesi ile oluşan Kernikterus sendromu gibi ciddi rahatsızlıkların görülme olasılığını da arttırmaktadır ^(4,5). Bilirubin seviyesini kontrol etmek veya düşürmek için uygulanan fototerapi geleneksel yöntemlerdendir. Bu yöntemin deride kızarıklık, katarakt oluşumu ve deri kanseri riskini artırma gibi yan etkileri mevcuttur^(6,7). Hiperbilirubinemide uygulanan geleneksel tedavi yöntemlerinde rastlanılan olumsuzluklar alternatif yöntemlerin arayışını gündeme getirmiştir. Bu çalışmada da yeni ve alternatif bir yöntem olarak insan plazmasından bilirubin uzaklaştırılmasında moleküler damgalı biyomateryallerin kullanılabilirliği araştırılmıştır. Kitosan ve agaroz doğal polimerleri materyal olarak seçilmiştir.

Hidrojel yapıdaki kitosan, biyotıp uygulamalarında kullanılması düşünülen materyallerin sahip olması istenilen özelliklerin hemen hemen tamamını bünyesinde bulunduran doğal bir polimerdir. Agaroz ise nötral özellikte bir polisakarittir ve jel oluşturma özelliği ile farmakoloji ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Her iki polimerin olumlu özellikleri biraraya getirilerek oluşturulan materyale yüksek seçicilik özelliği kazandırmak amacı ile bilirubinin moleküler damgalanması gerçekleştirilmiştir. Çalışmada geliştirilen bu materyaller biyoyumluluk derecesi, SEM ve denge su içeriği çalışmaları ile karakterize

edilmiştir. Biyomateryallerin biyomedikal alanda uzun süreli kullanımında, kan ile biyomateryalin teması sonucu çok sayıda biyolojik reaksiyonlar oluşmaktadır. Bu tür reaksiyonlar ilk olarak biyomateryal yüzeyinde oluşmaktadır. Bu nedenle agaroz-kitosan biyomateryallerinin kan uyumluluk özellikleri plazma proteinleri ve platelet adhezyonu, hemoliz gibi testlerle belirlenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarının tamamlanması sonrasında biyomateryalin bilirubin uzaklaştırma kapasitesi sulu çözeltide değerlendirilmiştir ve pH, sıcaklık, başlangıç bilirubin konsantrasyonu ve iyonik şiddet gibi çeşitli sistem parametrelerinin etkisi de test edilmiştir. Bu yolla bilirubin uzaklaştırma prosesi için optimum koşullar belirlenmiştir. Çalışmamızın son aşamasında elde edilen optimum koşullar ile insan plazması modifiye edilmiş ve bilirubin damgalı kitosan-agaroz materyalleri ile plazmadan bilirubin giderimi çalışılmıştır.

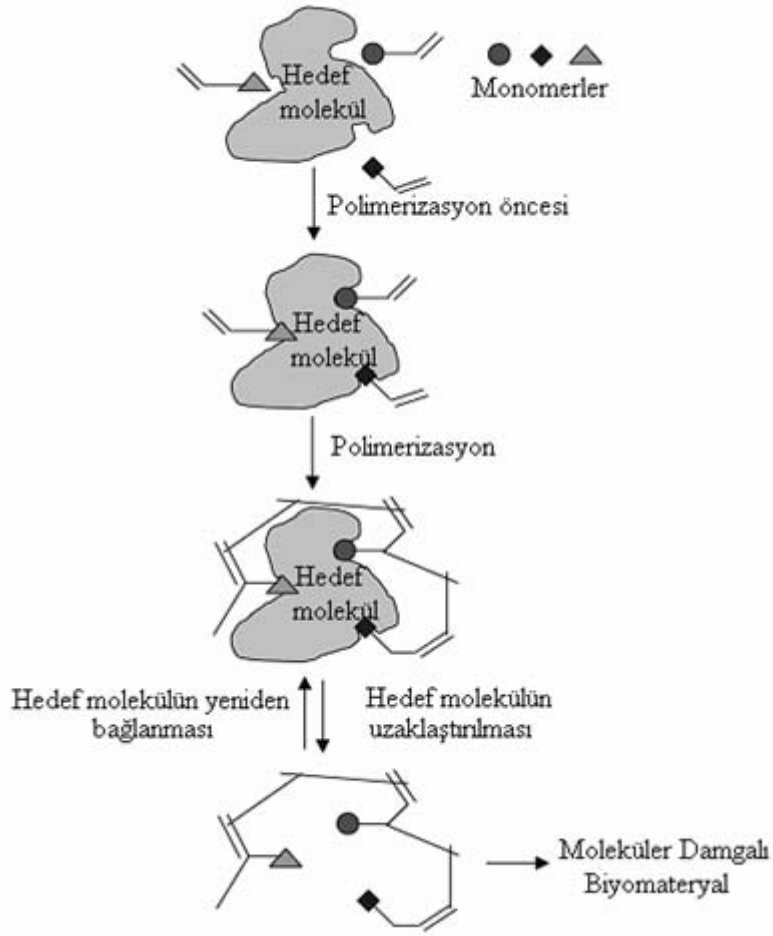
Kandan bilirubin uzaklaştırma konusunda yapılan çalışmaların çoğu ticari bilirubin çözeltisi ile oluşturulan adsorpsiyon işlemlerine dayanmaktadır. Çalışılan biyomateryaller de spesifik olmayan etkileşimlere açıktır. Yani bilirubin yanında bilirubin özelliklerine sahip (yük, büyüklük, polarite gibi) diğer moleküllerle de etkileşime girebilir. Bu nedenle bu tür çalışmalarda ilk olarak yüksek spesifiklik ve uygulanabilirlik aranmaktadır. Bu çalışmada geliştirdiğimiz moleküler damgalı biyomateryallerin bilirubin için yüksek spesifikliğe ve uygulanabilirliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Kandan molekül saflaştırma yada uzaklaştırma işlemlerinde biyomateryaller kan yada plazma gibi biyolojik sıvılarla mutlaka etkileştirilmelidirler. Çünkü bu tür sıvılar kompleks yapıda ve çok bileşenlidir. Sulu çözeltilerde elde edilen yüksek performans diğer moleküllerin varlığından dolayı biyolojik sıvılarla yapılan denemelerde elde edilemez. Bilirubinün plazmadaki yapısal

özelliği, yük durumu ve üç boyutlu yapısı biyomateryal ile etkileşiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle sulu çözeltiler sadece optimum koşulların araştırılması için yeterli olacaktır. Çalışmamızda sulu çözeltiden ve plazmadan bilirubin uzaklaştırılması test edilmiş ve yüksek performans elde edilmiştir.

1.1. Kaynak Özetleri

1.1.1. Moleküler Damgalama

Moleküler damgalama işlemi, üzerinde hedef molekülü tanıma özelliği taşıyan merkezler içeren materyallerin sentezlenmesine dayanmaktadır. Bu işlem üç basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta baskılanacak molekül ile monomer etkileşerek bir bileşik oluştururlar. İkinci basamakta bu bileşik, işlevsel monomer üzerinden polimerleştirilir. Polimerleştirme gerçekleştikten sonra kalıplanan molekül, yıkama işlemiyle polimerik yapıdan uzaklaştırılır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Moleküler damgalamanın genel mekanizması⁽¹⁾

Böylelikle, hedef molekülün polimerik yapıdan uzaklaştırılmasından sonra geride damgalanmış bağlanma bölgelerine sahip bir polimer kalır. Artık bu polimer hedef molekül için yüksek seçicilik ve afiniteye sahiptir. Örneğin, hedef molekülü de içeren bir karışım, baskıladığımız polimer ile etkileşecek olursa, sahip olduğu bağlanma bölgeleri nedeniyle yalnızca hedef molekülü tanıyarak ona bağlanacak ve böylelikle hedef molekülün karışım ortamından uzaklaştırılması ya da saflaştırılması sağlanmış olacaktır^(1,4).

Moleküler damgalama son derece basit bir işlem olarak gözükyorsa da, yöntemin başarısı için dikkat edilmesi gereken noktalar vardır. En temel nokta, polimerleşme sırasında monomer ve hedef molekül etkileşimlerinin kararlı olmasıdır. Kararlılığı artırmak amacıyla pek çok uygulamada, su benzeri organik çözücüler kullanılmaktadır. Hazırlanan damgalanmış polimerlerin mekanik açıdan kararlı yapıda olması da damgalamanın başarısını etkileyen bir diğer noktadır^(3,8).

Moleküler damgalama alanında yapılan çalışmalarla, pek çok molekül başarılı bir şekilde damgalanmış durumdadır. Ancak bu konudaki en önemli kısıtlama, baskılanacak molekülün küçük olması gerekliliğidir. Baskılanan molekülün daha sonra polimerik yapıdan uzaklaşması gerektiğinden, polimerin gözeneklerinden geçebilecek kadar küçük olmak zorunludur. Şimdiye kadar damgalanmış moleküller arasında çeşitli ilaçlar, hormonlar, proteinler, aminoasitler, karbonhidratlar, boyalar, böcek ilaçları, nükleotidler, koenzimler ve kolesterol gibi steroidler sayılabilir^(3,9,10).

Moleküler olarak damgalanmış polimerlerin yüksek seçicilik göstermelerine rağmen değişik ortam koşullarına karşı (örneğin; pH ve sıcaklık) daha kararlı olmaları ve kolay elde edilebilmeleri, bu konuyu daha da ilgi çekici hale getirmektedir. Moleküler olarak damgalanmış polimerlerin en sık kullanıldığı alanlar saflaştırma ve giderim işlemleridir. Bu materyallerin, baskılanan molekülü, ona çok benzer birçok molekül arasından (hatta bazı moleküllerin L ve D formlarının ayrılması gibi) tanıyabilme özelliği, pek çok ayırma ve saflaştırma işlemi açısından ilgi çekici bulunmaktadır. Naproxen, Timoiol gibi ilaçların ayırma işlemleri, ilaçlarda molekülün tek bir formunun kullanılması gerektiğinden, en önemli ve kritik ayırma işlemlerinden biri olmasına rağmen damgalanmış polimerler kullanılarak yapılan ayırma işlemlerinde oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir^(1,11).

Moleküler damgalanmış materyaller, katalizör olarak da kullanılabilir. Bu tür uygulamalar için geliştirilmiş damgalanmış polimerler, plastik enzimler olarak adlandırılmaktadır. Plastik enzim, hedef molekülü tanıyarak ve ona bağlanarak kimyasal tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürmekte; böylece tepkimenin daha hızlı, daha düşük sıcaklıkta ve daha verimli bir şekilde gerçekleşmesini sağlamaktadır^(4,12).

Moleküler baskılanmış materyallerin su arıtımında, su içerisindeki istenmeyen molekülleri tutucu bir eleman olarak kullanılması mümkündür. Baskılanmış polimerler, çeşitli savunma sistemlerinde kimyasal ve biyolojik silah tehdidine karşıda kullanılabilirler. Bu sistemlerde polimerlerin tanıma özelliğinden yararlanılarak kimyasal veya biyolojik silah moleküllerinin polimer tarafından tespit edilmesi sağlanabilir ve erken uyarı sistemleri geliştirilebilir. Sulardan toksik bileşenlerin arıtılmasında kullanılabileceği gibi kandan toksik bileşenlerin uzaklaştırılmasında ya da önemli proteinlerin ve enzimlerin izolasyonunda da moleküler damgalanmış polimerlerden yararlanılabilmektedir. Literatürde bilirubin kandan gideriminde moleküler baskılanmış materyallerin kullanıldığına dair bilgiye rastlamak mümkündür^(1,8).

Doğal reseptörlere göre moleküler damgalanmış polimerin pek çok avantajları mevcuttur. Bunlar şöyle sıralanabilir;

- i. Moleküler damgalanmış materyallerin hazırlanması oldukça ekonomiktir.
- ii. Moleküler damgalanmış polimer hazırlanması daha pratiktir.
- iii. Moleküler damgalanmış polimerin afinitesi doğal biyomolekülüne benzer ve daha spesiftir.

iv. Moleküler damgalanmış polimer düşük pH, basınç ve sıcaklığa karşı oldukça dayanıklıdır.

Bütün bu bilgilerin ışığında moleküler damgalamada gelecekte önemli gelişmelerin yaşanacağını ve bu yöntemin birçok işlevin gerçekleştirilmesinde kullanılacağını söylemek mümkündür.

1.1.2. Moleküler Damgalamanın Kullanım Alanları

Moleküler damgalama pek çok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu alanlardan bazılarını şu şekilde özetlemek mümkündür:

- i. Kromatografi
- ii. Katı faz ekstrasyonu
- iii. Seçici geçirgen membran
- iv. İlaç salınım mekanizmaları
- v. Klinik ve çevresel uygulama alanlarının absorbantı için
- vi. Çevresel sensör, multisensörler için ve klinik sistem kontrolü

Kromatografi; Biyoteknoloji ve genetik mühendisliği alanlarındaki büyük ölçekte enzimlerin ve proteinlerin, endüstriyel ölçekte üretilmesi hızlandırıldı. Bu sıvı kültür ortamlarından protein, enzimlerin ve serum gibi biyolojik akışkanlardan toplanması basit kromatografik ayırma teknikleri ile olmaktadır.

Kromatografi karışımdaki maddelerin başlangıçta buldukları fazlardan ayrılmalarını sağlayan analitik bir tekniktir. hedef moleküllerin saflaştırılmasında ve karşılaştırmasında kullanılmaktadır. Kimyanın özellikle klinik kimya, biyokimya, farmosotik kimya, moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanlarında kullanılmaktadır.

Kromatografi ayırım farklı maddelerin, farklı derecelerde dağılması esasına dayanır. Ürünün geri kazanımı genellikle basittir ve kromatografik teknik genellikle laboratuvarından büyük ölçeğe taşınabilir.⁽¹⁾

Katı faz ekstraksiyonu; temel olarak küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kolon veya disklerine çeşitli tutucu maddelerin doldurulması ve sıvı örneklerini istenmeyen bileşenlerden ayırma (temizleme), yoğunlaştırma ve ileriki analiz aşamaları için, matriks yapısının değiştirilmesi amaçlanarak hazırlanmış olan kolon ve disklerden ekstraksiyonların geçirilmesi esasına dayanmaktadır. Sıvı örneğin kolondan geçirilmesi, yerçekimi vasıtasıyla (manual) gerçekleştirilebildiği gibi, zaman kaybının önüne geçmek amacıyla vakum manifoldları yardımıyla da yapılabilir. Son yıllarda aynı prensiple çok daha düşük miktarda örneğin uygulandığı katı faz ekstraksiyonu plakaları da kullanılmaktadır.⁽¹³⁾

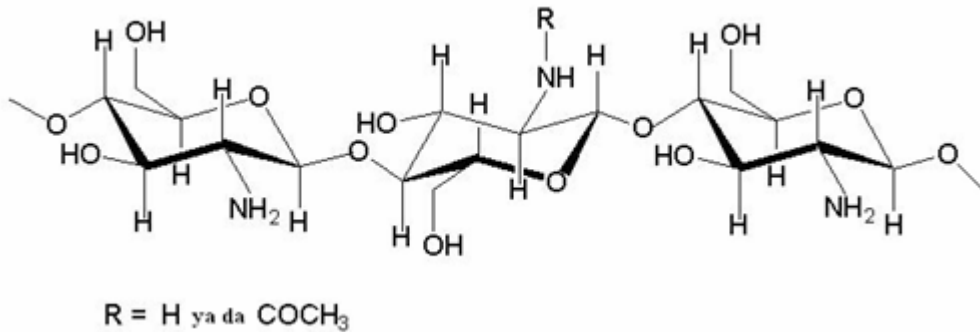
Seçici geçirgen membran; Saflaştırma ya da yalıtma işleminde kullanılır.⁽¹⁴⁾

İlaç salım mekanizmaları; İlaç salımında sıklıkla kullanılan klasik yöntemler, tablet ya da kapsüllerin ağızdan alımı ya da enjeksiyon şeklindedir; ve bu yöntemler sık ve tekrarlanan dozlarda ilaç alımını gerektirmektedir. Kandaki ilaç düzeyinin zamanla değişimini gösteren grafik düşünüldüğünde ilaç alımını takiben kandaki ilaç derişiminin başlangıçta bir süre arttığı, daha sonra çok kısa bir süre için sabit kalarak hızla azaldığı dikkati çeker. Derişimin düşme süresi, ilacın metabolize edilme, parçalanma ya da etki alanından uzaklaşma gibi yollarla sisteme yararsız hale gelme hızına bağlıdır. İlacın kan plazmasındaki derişimi, etkin düzeyin altına düşebilir ya da toksik bölgeye çıkabilir. Etkin düzeyin altındaki ve toksik düzeydeki bölgeler boşa harcanmış ilaç miktarlarını ifade eder. Ayrıca, ilaç derişiminin etkin düzeyin

altına düşmesi ya da toksik düzeyin üzerine çıkması hastada istenmeyen yan etkilere neden olabilir. ⁽¹⁵⁾

Moleküler damgalama tekniğinde kullanılan polimerik hidrojeller, separasyon teknikleri, yumuşak doku implantasyonları, salım sistemleri (hormon, protein ve ilaç), kontakt lens ve yapay damar yapımında biyomedikal ve biyoteknolojik açıdan büyük öneme sahiptir. Hidrojeller, yumuşak ve esnek yapıda olmaları, mukoza zarı ve dokular düşük oranda yapışmaları yüksek biyouyumluluk göstermeleri gibi avantajlara sahiptir. Çalışmam da kullandığım kitosan ve agaroz da hidrojel yapıdadır.

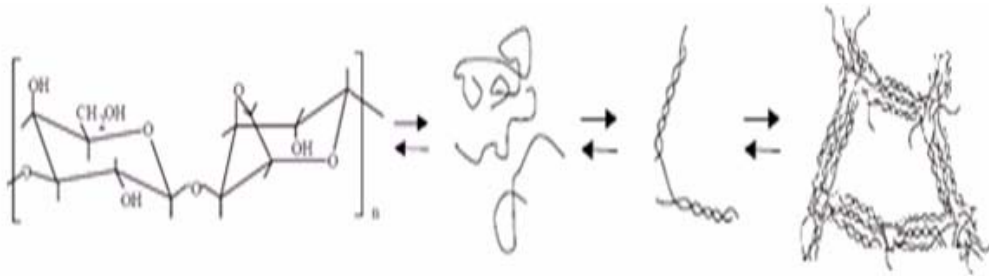
Hidrojel yapıdaki kitosan, biyotıp uygulamalarında kullanılması düşünülen materyallerin sahip olduğu bütün özelliklerin hemen hemen tamamını içeren doğal bir polimerdir. Lineer yapıda bir polisakkarittir olan kitosan, yüksek yük yoğunluğuna sahiptir ve reaktif fonksiyonel gruplar (-OH, -NH₂) taşımaktadır. Bu özelliklerinden dolayı kitosan tıbbi uygulamalarda, kişisel bakım ürünlerinin hazırlanmasında, tarımsal ilaç uygulamalarında, atık su arıtım sistemlerinde ve değişik biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. (Şekil 1.2.)



Şekil 1.2. Kitosanın yapısı

Selüloz yapısına benzemeyen kitosan farklı ligandlarla modifikasyona izin vererek çok sayıda reaktif gruba (kitinde $-CH_2OH$, kitosanda $-CH_2OH$ ve $-NH_2$) sahiptir. Alkali koşullarda, reaktif boyaların klor grupları ile kitinin $-CH_2OH$ grubu, kitosanın $-CH_2OH$ ve $-NH_2$ grupları arasında oluşan reaksiyonla, kitin ve kitosan üzerine boyaların tutuklanmasını gerçekleştirmiştir.

Agaroz nötral özellikte bir polisakkarit olup polimerizasyon sonrasında yüksek şişme özelliğine sahip olan hidrojelleri oluşturmaktadır. Hidrojel oluşturma özelliği ile farmakoloji ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan agaroz, *Rhodophyceae* sınıfına ait kırmızı alglerden elde edilmektedir⁽¹⁶⁾. Agaroz yüksek su tutma kapasitesine sahiptir ve bu özelliği ile medikal alanlarda da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.(Şekil 1.3.)



Şekil 1.3. Agarozun yapısı ve jel oluşumu⁽¹⁶⁾

Kromatografik çalışmalarla toksik materyallerin uzaklaştırma işlemleri de oldukça yaygındır. Bu kromatografik çalışmalara atık sulardan ağır metallerin, boya maddelerin ve fenol gibi toksik bileşiklerin uzaklaştırılması, kan gibi biyolojik sıvılardan proteinlerin ayrıştırılması, kanda oluşan toksik maddelerin uzaklaştırılması örnek verilebilir.

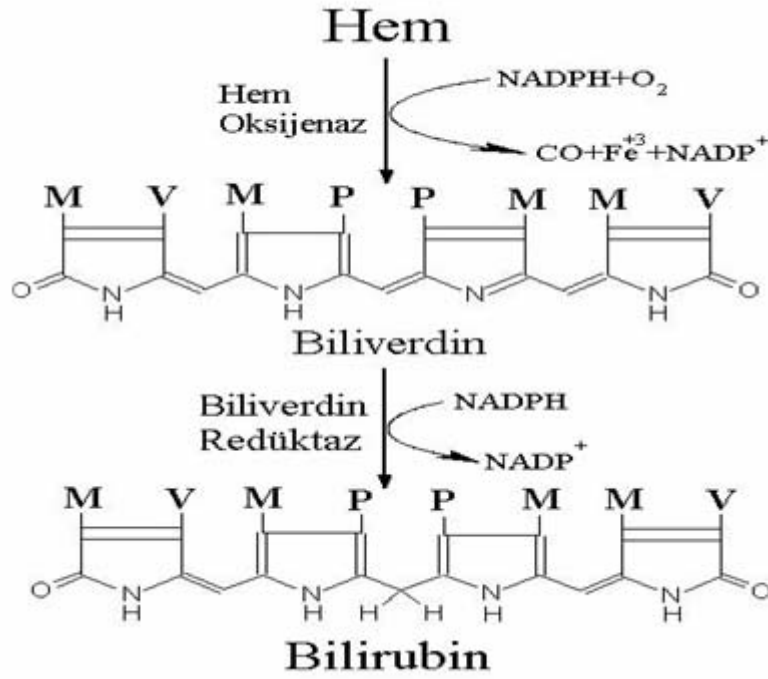
Kanda yüksek dozda bulunan bilirubin, hiperbilirubinemiye sebep olurken çeşitli rahatsızlıklarda yol açmaktadır. Kanda toksik düzeye ulaşan bilirubin, farmakolojik yöntemle ve fototerapi ile tedavi edilebilir. Ancak bu tür yöntemler beraberinde çeşitli yan etkilere yol açmaktadır.

Hiperbilirubinemi tedavisinde kromatografik yöntemlerin kullanımı son zamanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat moleküler damgalanmış yöntemlerle bilirubin giderimi konusunda çalışmalar yetersizdir.

1.1.3. Bilirubin

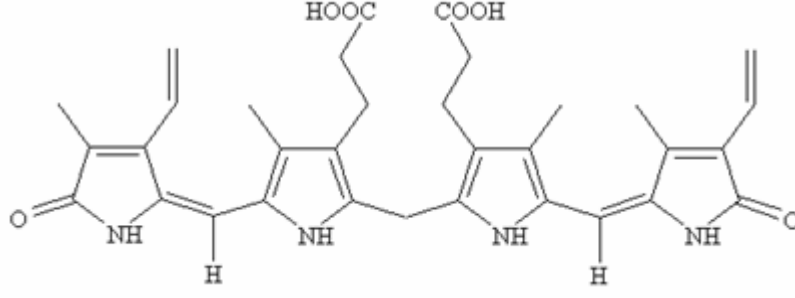
1.1.3.1. Bilirubin Metabolizması

Bilirubin, hemoglobin gibi hemoproteinlerin yıkımı sonucu meydana gelen bir üründür. Bilirubinün %75'i dolaşımdaki eritrositlerin yıkımından, % 25'i ise yetersiz eritropoez ile myoglobin, sitokrom, katalaz, siklooksijenaz, guanilsiklaz, nitrik oksit sentaz ve peroksidaz gibi diğer hemoproteinlerin yıkımından meydana gelir. Retikuloendotelial sistemde toplanan ve parçalanan eritrositlerden önce globin zincirleri ayrılır. Daha sonra hem oksijenaz enzimi aracılığıyla hem halkasındaki karbon atomu ayrılır ve karbonmonoksit (CO) olarak akciğerlerden atılır. Demir tekrar kullanıma girerken, hem önce biliverdine ve daha sonra biliverdin redüktaz enzimi aracılığıyla bilirubine dönüşür (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Hem'den bilirubin oluşumu⁽¹⁵⁾

Bilirubin, üç tek karbon köprüsüyle birbirine bağlanmış dört pirol halkasından oluşur. Ortadaki karbon köprüsü, orta 2 pirol halkasına tek olarak bağlanır, yanlardaki 2 karbon köprüsü ise diğer iki pirol halkasına çift bağla bağlanır. (Şekil 1.5.) Bilirubin molekülünde bütün polar gruplar molekül içinde bulunduğundan dolayı yapı, hidrofobik ve lipofilik bir özellik kazanır ⁽¹⁷⁾. Membranlardan geçişi kolaylaştıran lipofilik özellik, intramoleküler hidrojen bağları sayesinde ortaya çıkar. Lipofilik özellik intrauterin dönemde plasenta yoluyla temizlenmeyi sağlarken, postnatal dönemde kan-beyin bariyerini kolayca geçebilmesine ve zararlı etkilerin ortaya çıkmasına neden olur.



Şekil 1.5.Bilirubin⁽¹⁸⁾

Retiküloendotelial sistemde meydana gelen bilirubin albumine bağlanarak karaciğere taşınır. Her bir albumin molekülüne 2 bilirubin molekülü bağlanabilir. 1g albuminin teorik olarak bilirubin bağlama kapasitesi 8,5 mg dır. ⁽¹⁹⁾. Bilirubin serumda 4 değişik halde bulunabilir:

- i. Albumine bağlı konjuge olmamış bilirubin,
- ii. Albumine bağlanmamış serbest bilirubin,
- iii. Konjuge bilirubin (Safra ve böbrek yoluyla atılabilir),
- iv. Albumine kovalent bağlı konjuge bilirubin (Delta bilirubin) ⁽²⁰⁾

Serumda bilirubin analizi sırasında delta bilirubin ölçülemez. Konjuge bilirubin direkt bilirubin olarak ölçülürken, albumine bağlı ve serbest olan konjuge olmamış bilirubinin tamamı indirekt bilirubin olarak ölçülür. Karaciğere gelen albumine bağlı bilirubin, karaciğer hücre yüzeyinde albuminden ayrılır ve membran reseptörlerine bağlanır. Hepatosit bağırsaklardan emilen besin maddelerini hücrelerine getiren ve atık maddeleri karaciğerden uzaklaştıran safra sıvılarını salgılayan yapıdır.⁽²¹⁾ Hepatosit içine geçen bilirubin, sitozolde bulunan ligandin veya Y protein (glutasyon S-transferaz B) adı verilen reseptöre bağlanarak düz endoplasmik retikuluma taşınır. Hepatosit içindeki bir diğer reseptör olan Z

proteininin (yağ asidi bağlayıcı protein) bilirubin afinitesi zayıftır. Bilirubin bu sitozolik proteinlere bağlanması, bilirubin hücre dışına çıkışını önler. Bilirubin safra içerisine salgılanması ve vücuttan atılımı için daha suda çözünür halde olması gerekmektedir. Düz endoplasmik retikuluma gelen bilirubin, uridildifosfat glukuronil transferaz (UDPGT) enzimi yardımıyla suda eriyen iki glukuronil grubunun bilirubin bir veya iki propiyonik ucuna eklenmesi ile mono ve diglukuronid şekline dönüşür. Enzimle oluşturulan bu glukuronidasyon, vücuttaki en önemli detoksifikasyon mekanizmalarından biridir ⁽²⁰⁾. Glukuronidle konjugasyon, bilirubin atılımının % 90'ını oluşturur. Kalan bilirubin ise glukoz, ksiloz, taurin gibi başka maddelerle konjuge olarak ya da oksidasyon, hidroksilasyon, veya indirgenme reaksiyonlarına girerek suda erir hale gelir ve atılır. Konjuge edilen bilirubin enerji harcayan bir taşıyıcı sistem aracılığıyla kanaliküler membrandan safra içine atılır. Safra kanalındaki bilirubin konsantrasyonu hepatositteğine kıyasla 100 kat daha fazladır.

1.1.4. Bilirubin Toksisitesi

Yüksek konsantrasyonlardaki bilirubin, başta sinir hücreleri olmak üzere birçok değişik hücrede metabolik fonksiyonları bozmasına rağmen bu etkilerin gerçek mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Bilirubin konjuge olmamış ve bağlanmamış formu toksik olan kısımdır. Albuminle bağlanma toksisiteyi azaltır. Kan beyin bariyerinin hasarı, plazma proteinlerinin bağlama kapasitesini aşan aşırı miktardaki konjuge olmamış bilirubin yükü ve albumine bağlanan diğer küçük moleküllü maddelerin artışı ile düşük bilirubin düzeylerinde bile çeşitli toksik etkiler gösterebilir.

Bilirubin, albumine 1:1 molar oranında bağlanır. Her bir gram albuminin 8,3 mg bilirubin bağladığı bilindiğine göre, plazma albumini 3 g olan yenidoğan bir bebekte 24,9 mg bilirubinin albumine bağlanabileceği anlaşılır. Bilirubin:albumin oranının 1'in üzerine çıkması , albuminin bağlanma bölgelerinin başka moleküller tarafından doldurulmuş olması ve albumin düzeyinin düşük olması durumunda bilirubinin albumine bağlanma ihtimali azdır. Bir miktar bilirubin eritrositlere ve dokulara bağlansa bile bu bağlanmaların klinik bir önemi yoktur.

Bilirubin, hücre membranına, lipozomlara, Sinaptozomlara ve membranöz veziküllerdeki fosfolipidlere bağlanır. Nöronlarda ise önce distal aksonlara bağlanır ve hücre gövdesine ulaşır. Bilirubinin bazal ganglionlara olan afinitesinin nedeni tam bilinmemekle beraber, bu bölgenin vaskularitesi ve lipid yapısı bilirubinin taşınması, alınması ve bağlanmasını etkileyebilir. Ancak klinik bulgulara yol açabilecek bilirubinin hangi düzeyde ne kadar süre kalması gerektiği bilinmemektedir. Bilirubin, hem ekstraselüler hemde membrana bağlanarak ortamda birçok hücre fonksiyonu bozar. Membrana bağlanan bilirubin, surfaktan etkisi göstererek yüzey gerilimini ve membran polaritesini azaltır ve membrandaki iyon transport kanallarını etkileyerek iyon değişimine yol açar. Bilirubin, su ve sodyum transportunu inhibe ederek kernikterus sonrası görülen nöronal şişme ve piknosis ile uyumluluk gösterir. Hücre içi metabolizmada bilirubinin inhibe ettiği özel bir enzim yoktur. Bilirubin in vitro ve in vivo olarak proteinlerin fosforilasyonunu ve protein kinazların aktivasyonunu önler. Diğer yandan mitokondrilerin fonksiyonlarını bozar, Na-K-ATPaz aktivitesini, sinoptozomlarda, tirozin alımını ve dopamin sentezini azaltır. Bazı hücrelerde ise metiyonin ve timidin alımını azaltarak mitokondri ve hücre viabilitesini bozar. Bilirubin toksisitesinin erken dönemlerinde membran potansiyellerinin azalması, hücreler arası iletiyi de azaltır. Bu azalma, bilirubinin deterjan etkisine bağlanmıştır.

Beyin sapındaki işitsel uyarılmış potansiyellerin azalması ve uzun dönemde görülen işitme kayıplarının ortaya çıkması da, bilirubine bağlı bu etkilerin geçici veya kalıcı olmasıyla açıklanmaktadır. Sinaptozomlarda tirozin alımının, dolayısıyla dopamin sentezinin azalması da bilirubin konsantrasyonu ile orantılı olarak sinir iletimini azaltır. Değişik beyin bölgelerinin fonksiyonel durumları farklı olduğu gibi nöronların bilirubine karşı duyarlılıkları da gestasyon yaşı ve postnatal yaşa bağlı olarak farklılıklar gösterir. ⁽²²⁾

Serumdaki yüksek indirekt bilirubin seviyeleri bilirubin ensefalopatisi ve kernikterusa da yol açabilir. Bilirubin ensefalopatisi doğumu takip eden ilk hafta içerisinde bilirubin toksisitesine bağlı olarak meydana gelen akut merkezi sinir sistemi bulgularıdır. Kernikterus ise bazal ganglionlar ve çeşitli beyin sapı nükleuslarında bilirubinle seviyelerinin artmasına bağlı olarak oluşan kronik ve kalıcı hastalıktır. ⁽²³⁾ Yüksek bilirubin seviyesine maruz kalma süresi ve beyin bariyerini geçen bilirubin konsantrasyonu nörotoksisite oluşumu için önemli faktörlerdir.

1.1.4.1. Hiperbilirubinemi

Kanda bilirubin düzeyinin artması hiperbilirubinemi olarak adlandırılmakta ve birçok nedene bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Hemolitik anemiler, polisitemi, immaturite veya transfuzyona bağlı olarak eritrositlerin ömürlerinin kısa olması, artmış enterohepatik dolaşım, genetik yetersizlikler, hipoksi, infeksiyon ve tiroid bezi yetersizliği bu nedenlerden bazılarıdır. ⁽²⁴⁾

Pilor stenozu olan hastalarda karaciğer glukronil transferaz aktivitesi ve karaciğer kan akımı azalmış bulunur. Bağırsak geçiş zamanının uzaması da enterohepatik dolaşımı artırarak hiperbilirubinemiye yol açar. Hipotiroidili hastaların

%10'unda sarılık görülebilir ve hatta bu sarılık, hipotroididen şüphelenmek için ilk bulgu olabilir. Bu hastalarda UDPGT aktivitesi azaldığından dolayı bilirubin karaciğere geçişi artmaktadır. Otozomal resesif geçen Crigler-Najjar Sendromunda UDPGT enzimi bulunmamaktadır. Hastalarda ilk 3 gün içinde bilirubin hızla yükselir ve 25-35mg/dl düzeyine kadar ulaşabilir ve yoğun tedavi yapılmazsa kernikterus gelişebilir.

Eritrositlerde enerji üretimi, glikolize bağlı olup oksidatif fosforilasyon kullanılmaz. Bu nedenle, glikoliz sürecinde meydana gelen aksaklıklar eritrosit fonksiyonlarını ve ömrünü etkiler. Glikoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve Piruvat kinaz eksikliği de hiperbilirubinemi sebepleri arasında sayılabilir ⁽²²⁾

1.1.4.2. Hiperbilirubinemilerin sınıflandırılması

Bilirubin metabolizmasındaki bozukluğun meydana geldiği yere göre kanda indirekt bilirubin veya direkt bilirubin artar. Hiperbilirubinemiler, kanda artan bilirubin seviyesine göre indirekt bilirubin veya direkt bilirubin olarak iki ana sınıfa ayrılır. İndirekt hiperbilirubinemi aşırı bilirubin yapımına, hepatik alım bozukluğuna ve bilirubin konjugasyonunda bozukluğa bağlı olarak gelişebilmektedir. İndirekt hiperbilirubinemi bazı ırklarda (Çinli, Japon, Koreli ve Amerika Yerlileri) daha fazla görülmektedir.⁽²⁴⁾ Direkt hiperbilirubinemi ise hepatositlerden atılım bozukluğuna, intrahepatik kolestaza ve ekstrahepatik kolestaza bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir. ⁽²²⁾

1.1.4.3.Hiperbilirubinemi Tedavisi

Bilirubin toksisitesinin geçici ve kalıcı etkilerinin ortadan kaldırılması için hiperbilirubineminin tedavisi büyük önem taşımaktadır. Ancak bilirubin miktarlarına göre hangi tedavilerin uygulanması gerektiği konusu son yıllarda büyük tartışmalara neden olmuştur. Hiperbilirubinemi tedavisinde fototerapi, kan değişimi ve farmakolojik tedavi olmak üzere farklı yöntemler kullanılmaktadır.⁽²¹⁾

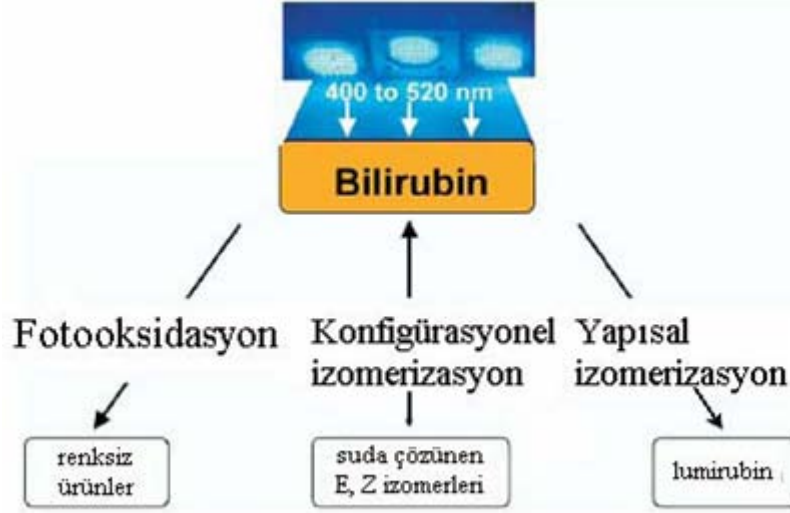
1.1.4.3.1. Fototerapi

Fototerapinin hiperbilirubinemi üzerine etkisi ilk olarak 1956 yılında İngiltere’de Miss. J. Ward tarafından tesadüfen bulunmuştur. Miss. J. Ward, sorumlu hemşire olarak çalıştığı premature servisindeki bebeklerin açık havada güneşe maruz kalmalarını takiben vücudun güneş ışınlarıyla temas eden yerlerinde sarılığın azaldığını ve o bölgelerin beyazlaştığını farketmiştir. Bu konudaki ilk tıbbi yayın ise 1958 yılında Cremer ve arkadaşları tarafından yapılmıştır⁽²⁴⁾. Cremer ve arkadaşları kan değişimi yapmadan önce aldıkları kan örneğini güneş ışığı alan bir pencerenin önünde bıraktıklarında bilirubin düzeyinin önemli derecede azaldığını görerek, ışığın bilirubin üzerine etkisi olabileceğini düşünmüş ve hiperbilirubinemi tedavisinde ilk defa fototerapiyi kullanmaya başlamışlardır. Ancak fototerapinin yaygın olarak kullanılması, 1968 yılında Lucey ve arkadaşları tarafından fototerapinin yenidoğan sarılığı tedavisindeki etkinliği ve güvenilirliği konusunda yaptıkları yayından sonra başlamıştır⁽²⁵⁾. Tüm bu gelişmelere rağmen günümüzde hala standart bir fototerapi yöntemi oluşturulabilmiş değildir.

Fototerapi, yenidoğan bebeklerde bilirubin toksisitesine bağlı olarak gelişebilecek akut ve geri dönüşümlü ‘akut bilirubin ensefalopatisi’ ve kalıcı ‘kernikterus’

oluşmasını engellemede kullanılan bir tedavi yöntemidir ⁽²³⁾ . Fototerapi hemen hemen tüm yenidoğanlarda bilirubin konsantrasyonunun yükselmesini durdurur veya azaltır. Bunu hemoliz varlığından, maturiteden veya derinin pigmentasyon derecesinden bağımsız olarak gerçekleştirir.⁽²⁷⁾Günümüzde fototerapi uygulanmasına yönelik standart bir yöntem yoktur.⁽²³⁾ Vücuttaki bilirubinin uzaklaştırılması amacıyla kullanılan ışığın dalga boyunun 460 ± 10 nm olması, en yüksek verimliliği sağlar. 450 nm dalga boyundaki mavi fotonlar bilirubin tarafından en fazla absorbe edilen fotonlardır. Mavi ışığın ardından en etkili diğer ışık, 510 nm dalga boyundaki yeşil ışıktır. Gün ışığının dalga boyu 550-600 nm arasında olduğundan etkisi daha azdır ⁽¹⁷⁾. Fototerapi, hızlı oksidatif reaksiyonlara neden olarak ve bilirubinin moleküller arası yeniden düzenlenmesini sağlayarak mutant bilirubin izomerlerinin oluşumu gerçekleştirir. Bu izomerler daha polar yapıdadırlar ve konjugasyona ihtiyaç duymadan safra ve idrar ile atılabilirler. İndirekt bilirubinin fototerapi ile vücuttan uzaklaştırılması, birbirleriyle ilişkili 3 mekanizma ile meydana gelir. Bunlar;

- 1) Bilirubinin ışık etkisiyle fotodeğişimi,
- 2) Ciltte oluşan fotoürünlerin kan dolaşımına geçmesi,
- 3) Kan dolaşımındaki foto ürünlerin karaciğer ve böbrekler aracılığıyla vücuttan uzaklaştırılmasıdır.



Şekil 1.6. Bilirubinun fotokimyasal reaksiyonları⁽²⁸⁾

Fototerapinin yaygın bir şekilde kullanılması ile birlikte bu yöntemin yan etkileri de artmıştır ve retina hasarı bu yan etkilerden en önemlileri arasındadır. Mavi ışık retinada fotokimyasal hasara neden olmaktadır.⁽²⁹⁾ Erişkinlerde retinanın mavi ışığa maruz kalmasını takiben renkli görmenin bozulduğu, ileri vakalarda prematur makuler dejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir⁽³⁰⁾. Fototerapi sırasında gözlerin korunması için göz bantları kullanılmalıdır. Bu bantların kullanımı huzursuzluğa, nadiren yenidoğanlarda solunum sıkıntısına neden olmaktadır.

Dehidratasyon ve ishal de fototerapinin diğer yan etkileridir. Fototerapi sırasında bağırsak geçiş süresi yarıya düşer, sulu, yumuşak ve yeşil dışkı gözlenir. Nitrojen, sodyum ve potasyumun fekal atılımı artar. Dışkıyla kaybedilen sıvı miktarı normale göre 2-3 kat artar⁽³¹⁾. Fototerapi alan bebeklerde bağırsaklarda geçici laktaz eksikliği gözlenmiştir. Artan indirekt bilirubin bağırsak epitelinin fırçamsı kenarında laktaz aktivitesini kısıtlar ve sonuçta laktoz hidrolize edilemez ve emilimi azaldığı için ishale neden olur⁽³²⁾.

Fototerapi uygulaması ile bireylerde deri döküntüsü, hemoliz, trombosit yıkımının artması, kemik iliği kompensasyonunun yetersiz olduğu durumlarda da trombositopeni gelişebilir ⁽³³⁾ . Ayrıca ultraviyole filtrelerinin zamanında değiştirilmemesine bağlı olarak cilt yanıklarının geliştiği görülmüş ve rapor edilmiştir.

Fototerapinin ile uyarılan pineal bezden melatonin salgılanmasının azalması ile hipokalsemi gelişebilmektedir. Fototerapi önemli yan etkilerinden biri de oksidatif hasar oluşma durumudur. Oksidasyon ve serbest radikallerin, fototerapi alan kilosuz az olan yenidoğmuş bebeklerde bronkopulmoner displazi, premature retinopatisi, nekrotizan enterokolit ve PDA gelişimine altyapı hazırladığı öne sürülmektedir. Fototerapi, yenidoğan bebeklerde gerekli olan antioksidanların, kan dolaşımı ve dokulardan uzaklaştırılmasına neden olabilir. İn vitro olarak klinikte kullanılan fototerapi dozlarıyla aynı seviyede kullanılan ışınlar hücrelerde DNA hasarı oluşturulabilmiştir ⁽³⁴⁾. Ancak yenidoğan döneminde fototerapi alan ve uzun süreyle takip edilen vakalarda büyüme, gelişme veya davranışsal açıdan herhangi bir komplikasyon gelişimi izlenmemiştir ⁽³⁵⁾ .

1.1.4.3.2. Kan değişimi

Hiperbilirubinemiye bağlı rahatsızlıkların önlenmesi için yapılacak ilk kan değişimidir. Kan değişimi ile bebeğin eritrositlerinin %85'den fazlası yenilenirken, serum bilirubin değerleri de yaklaşık %50 düşürülmüş olur. İlk kez 1946'da Wallerstein tarafından ortaya konan ve 1951 yılında Diamond ve arkadaşları tarafından geliştirilen kan değişim tekniği, yenidoğan ünitelerinin vazgeçilmez uygulamalarından biri haline gelmiştir.

Kan değişimi sırasında ciddi komplikasyonlar oluşabilir. Hemoliz, hiperpotasemi ve aritmi, hipoglisemi, hipokalsemi ve tetani, trombositopeni, infeksiyon bulaşması (hepatit, CMV, HIV, bakteriler vb) ve emboli bu komplikasyonlardan bazılarıdır.

1.1.4.3.3. Farmakolojik Tedavi

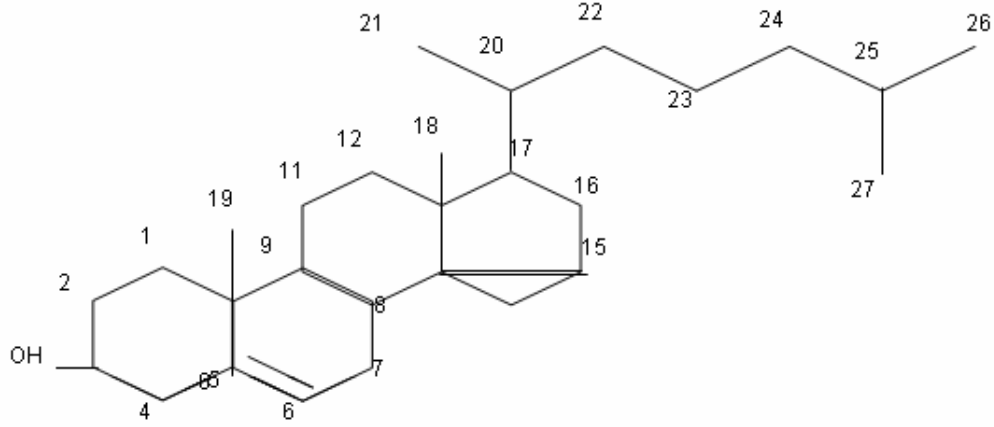
Hiperbilirubinemi tedavisinde kullanılan farmakolojik ajanlar, bilirubin atılımını hızlandırıcı (enterohepatik dolaşımı azaltıcı) veya bilirubin oluşmasını engelleyici etki gösterebilirler. Bilirubin atılımını hızlandıran fenobarbital, etanol, klorokin, antihistaminikler; bilirubin oluşumunu engelleyen kalay protoporfirin ve mezoporfirin, çinko protoporfirin ve mezoporfirin ve enterohepatik dolaşımı engelleyen agar, aktif kömür, kolestramin, polivinil pirolidin, bilirubin oksidaz tedavide kullanılan farmakolojik ajanlardandır.⁽²²⁾

1.1.5.Kolesterol ve Metabolizması

Kolesterol, yaşam için gerekli olan mum kıvamında yağımsı bir maddedir. Beyin, sinirler, kalp, bağırsaklar, kaslar, karaciğer başta olmak üzere tüm vücutta yaygın olarak bulunur.⁽³⁶⁾ Hayvanların vücut dokularındaki hücre zarlarında bulunan ve kan plazmasında taşınan sterol olup bir steroid ve alkol birleşiminden meydana gelmektedir. Daha düşük miktarlarda bitkilerde de bulunur. İlk defa 1754'te safra taşlarında kolesterol bulunduğu için bu maddenin ismi Yunanca *chole-* (safra) ve *steros* (katı) sözcükleri ile kimyadaki *-ol* ekinden türetilmiştir.⁽³⁷⁾

Steroidler perhidrosiklopentanofenantren halka sisteminin deriveleridir. 4 halkadan oluşur, halkalardan 3' 6 C'lu, 1 tanesi 5 C'ludur.

Steroller steroidlerin bir sınıfı olup, C3'de bir OH grubu, C17'de 8-10 C'lu bir hidrokarbon yan zincir içerirler. Kolesterol insandaki başlıca steroldür(Şekil 1.7.)



Şekil 1.7.Kolesterolün yapısı

Kolesterol, özellikle hayvan plazmada kolesterolün çoğu esterleşmiş haldedir. Yani C3'deki OH grubuna ester bağı ile 1 yağ asidi bağlanmıştır. Esterleşme yapısı daha hidrofobik yapar. Bu nedenle kolesterol, ya bir lipoprotein molekülünün bileşeni olarak proteinlerle beraber veya safradaki PL ve safra tuzları tarafından çözülmüş halde taşınmalıdır.⁽³⁸⁾

Hayvansal gıdalarda bulunur ama vücuttaki kolesterolün az bir kısmı da gıda kaynaklıdır; çoğu vücut tarafından sentezlenir. Vücudun her hücresinde bulunmakla beraber, vücudun sentezlendiği veya hücre zarlarının daha çok olduğu organ ve dokularda, örneğin karaciğer, omurilik ve beyinde, ayrıca ateromlarda, kolesterolün yoğun olduğu bilinmektedir. Kolesterol kanda normalden fazla bulunması halinde damarlarda birikerek damar sertleşmesine (ateroskleroz) yol açar. Bazen de safra

pigmentleri ile birleşerek safra taşlarının oluşumunda rol oynar. Kolesterol pek çok biyokimyasal reaksiyonda yer almasına rağmen özellikle lipoproteinlerin kolesterolü taşıma biçimleri, kandaki kolesterol düzeyleriyle kalp hastalıkları arasındaki bağlantıdan dolayı bilinir. Vücut, kolesterolü kullanarak hormonlar (kortizol, üreme hormonları), D vitamini ve yağları sindiren safra asitlerini üretir. Bu işlemler için kanda çok az miktarda kolesterol bulunması yeterlidir. Eğer kanda fazla miktarda kolesterol varsa kan damarlarında birikir, sertleşmeye ve daralmaya (ateroskleroz veya arteriyoskleroz) yol açar. Aterosklerozda damar duvarında biriken tek madde kolesterol değildir; akyuvarlar, kan pıhtısı, kalsiyum gibi maddeler de birikir. Ateroskleroza halk arasında damar sertliği, damar kireçlenmesi de denir. Kolesterol, hangi organın damarında birikirse o organa ait hastalıklar ortaya çıkar. Örneğin, kalbi besleyen atardamarlarda (koroner arterler) kolesterol birikimi olursa, göğüs ağrısı, kalp krizi gibi sorunlar oluşur. Böbrek damarlarında kolesterol birikimi ise, yüksek tansiyon ve böbrek yetmezliğine yol açabilir.

Kolesterol, yağlı bir maddedir. Normal koşullarda, yağ suyun içinde çözünmez. Kolesterol de su özelliklerini taşıyan kanda normal koşullarda çözünmez. Kolesterol, kanda çözünmesi ve taşınması için karaciğerde bir protein ile birleştirilir. Bu kolesterol ile protein birleşimine lipoprotein adı verilir.

Değişik tipte lipoproteinler vardır:

- LDL (Low Density Lipoprotein, düşük yoğunluklu lipoprotein): Kötü huylu kolesteroldür.
- HDL (High Density Lipoprotein, yüksek yoğunluklu lipoprotein): İyi huylu kolesteroldür.
- VLDL, IDL ve şilomikronlar.

Yağ metabolizması bozukluğu olan hastaların yaptırdığı diğer bir kan incelemesi de trigliserid ölçümüdür. Trigliserid de kolesterol gibi kanda çözünen bir yağdır. Kan trigliserid düzeyi ile arteriyoskleroz arasındaki ilişki, kolesterol kadar belirgin değildir. Kanda kolesterol ve LDL-kolesterolün yüksek olması, hasta için risk taşır. HDL-kolesterolün düşük olması da bir risktir. Bu riske sahip hastalarda, kalp krizi, damar tıkanması, böbrek yetmezliği gibi hastalıkların ortaya çıkma olasılığı daha fazladır

Kolesterol > 200 mg/dl veya

LDL-kolesterol > 130 mg/dl veya

HDL-kolesterol < 35 mg/dl ise risk fazladır. ⁽³⁶⁾

1.1.5.1. Kolesterol Sentezi

Kolesteroldeki tüm karbonlar (27 Karbon) asetat'tan (Asetil KoA'dan) gelir. NADPH indirgeyici ekivalanları sağlar. Sentez hem sitozol hem de ER'da bulunan enzimlerle beraber sitozolde gerçekleşir. Kolesterol biyosentezi 6 evreye bölünür;

1. Asetil KoA'nın HMG KoA'ya çevrilmesi
2. 6 C'lu bir bileşik olan mevalonatın HMG KoA'dan sentezlenmesi (NADPH kullanılır) (Hız kısıtlayıcı basamaktır).
3. Mevalonattan CO₂ kaybedilmesi ile izoprenoid birimlerin (isopentenil pirofosfat) oluşumu (Mg, ATP kullanılır).
4. Altı tane izoprenoid birimin bir ara ürün olan skualen yapmak üzere kondansasyona uğraması.
5. Skualen, ata steroid olan lanosterole çevrilmesi (NADPH, FADH₂ ve O₂ kullanılır ve lanosterol kolesterol sentezinde ilk ortaya çıkan steroid bileşiktir)

6.Lanosterolün üç metil grubunun yitirilmesi dahil daha ileri bir çok basamaktan geçmesiyle kolesterolün oluşması NADPH kullanılır. ⁽³⁸⁾

1.1.5.2. Hiperkolesterolemi

Hiperkolesterolemi, kandaki lipitlerin özellikle kolesterolün yükselmesine çeşitli iç ve dış faktörler sebep olur. Hastaların bir kısmında yağ metabolizmasında bir bozukluk vardır. Bunların birçoğu genetik nedenlere bağlıdır. Hiperkolesterolemi bu gruptandır. Ayrıca şeker hastalığında ve tiroit bezi bozukluğunda, nefrotik sendromla lipit metabolizması bozulur. Dış faktörlerin en önemlisi diyetle alınan yağ miktarının fazlalığıdır. Diyetle alınan kolesterol ve doymuş yağların fazlalığı kandaki kolesterol ve lipit seviyelerinin yüksekliğine sebep olur. Diyetle alınan yağın miktarı gibi yağın kalitesi de çok önemlidir. Doymuş yağ asitlerini içeren yağlar (hayvansal yağlar), tereyağı, yemeklik yağlar, margarinler zararlıdır. Zeytinyağında bulunan oleik asit de kısmen doymuş yağdır. Doymamış yağ asitlerini içeren yağlar ise kandaki kolesterol ve lipit seviyesini diğerleri gibi artırmazlar. Kandaki kolesterol miktarı normalde 200-250 mg/ml olmalıdır. Koroner kalp hastalığı olanların %80'inde kolesterol yüksek bulunurken %20'sinde ise normal bulunmuştur. Kolesterol yüksek olanların bir kısmında ise hastalık meydana gelmemektedir. Bu takım hastalığın ortaya çıkışında kolesterolün damar duvarına yapışmasını sağlayan ve henüz iyi aydınlatılmamış diğer bazı faktörlerin de rol oynadığını gösterir. Kandaki yağların çeşitli formları tespit edilmiştir. Bunların bazılarının hastalığı koruyuculuğu yanında diğerlerinin de hızlandırıcı etkileri olduğu bildirilmiştir. Mesela HDL kolesterolün önemli bir koruyucu olduğu LDL veya VLDL kolesterolün ise hazırlayıcı bir faktör olduğu çeşitli araştırmalarda ispatlanmıştır. ⁽³⁹⁾

1.1.5.3.Hiperkolesteroleminin Sınıflandırılması

Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler (İngilizce *High Density Lipoprotein*'in kısaltması olan HDL olarak da bilinirler.) HDL, vücuttaki dokulardan karaciğere kolesterol taşıyan bir lipoprotein sınıfıdır. Yapısında %50 protein, %24 fosfolipid, %2 kolesterol, %4 yağ ve %20 kolesterol ester bulunur. HDL, karaciğerde üretilir. HDL arterlerde oluşan ateromlardaki kolesterolü alıp vücuttan atılmak üzere karaciğere taşıdığı için bu lipoproteinde bulunan kolesterol "iyi kolesterol" olarak anılır. (Buna karşın ateromalarda kolesterol birikmesine yol açan LDL'deki kolesterol "kötü kolesterol" olarak adlanır.)HDL lipoproteinlerin en küçükleridir. Yüksek oranda protein içermelerinden dolayı yoğundurlar. Başlıca apolipoprotein A-I (apoA-I) ve apoA-II proteinlerini içerirler. Bu lipoproteinler karaciğerde fosfolipidler eşliğinde bileşikler olarak sentezlendiğinde madenî para gibi yassı bir görünümüleri olur. Bu yeni oluşmuş tanecikler yakınından geçtikleri hücrelerin membranlarından kolesterol molekülleri absorblayabilirler. Plazmada bulunan Lesitin Kolesterol Asil Transferaz (İngilizce *Lecithin Cholesterol Acyl Transferase*, LCAT) adlı enzim bu kolesterolü kolesterol estere dönüştürür. Kolesterol esterler, kolesterolde daha hidrofobik lipitler olduğundan dolayı HDL'in ortasında birikirler ve bu birikmenin sonunda HDL küresel bir biçim alır. HDL dolaşım sırasında hücrelerde kolesterol absorblamaya devam eder ve büyür. Bu yüzden HDL'nin koruyucu özelliği taşıdığı kolesterol miktarı ile değil, büyük HDL taneciklerinin sayısı ile ilişkilidir. Erkeklerde HDL düzeyleri kadınlardakinden daha düşüktür, ayrıca tanecik sayıları ve içerdikleri kolesterol miktarı da daha azdır.Epidemiyolojik çalışmalarda 60 mg/dL üstünde HDL düzeyinin kardiyovasküler hastalıklara (

koroner arter hastalığı ve akut inme gibi) karşı koruyucu bir etkisi olduğu görülmüştür. Düşük HDL düzeylerinin ise (erkeklerde 40 mg/dL altında, kadınlarda 50 mg/dL altında) aterosklerotik hastalıklar için pozitif risk faktörüdür. Her HDL taneciği aynı derecede koruyucu değildir. Kolesterol absorblama kapasitesi daha fazla olan büyük HDL tanecikleri asıl koruyucudurlar ve bunların miktarı ile toplam HDL arasında bir bağlantı yoktur. Büyük HDL'nin toplam HDL'ye oranının hesaplanabilmesi için elektroforez veya NMR spektroskopisi teknikleri gerekmektedir.⁽⁴⁰⁾

Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (İngilizce karşılığı olan *Low Density Lipoprotein*'den LDL olarak kısaltılır) kanda kolesterol taşıyan ve yoğunluğu 1,019-1,063 g/mL arasında olan lipoprotein sınıfına karşılık gelir. Karaciğerde üretilen çok düşük yoğunluklu lipoprotein (İngilizce *Very Low Density Lipoprotein*, VLDL) metabolizması sonucu oluşur. LDL tanecikleri 18-25 nm çapındadır, taşıdığı lipitlerin yanısıra apolipoprotein B-100 (apoB-100) ve apoE proteinlerini içerir. LDL seviyesi ile kalp hastalıkları arasındaki bağlantıdan dolayı sıkça "kötü" kolesterol olarak anılır. LDL'in başlıca işlevi, kolesterol ve trigliserit üreten hücre ve dokulardan bu molekülleri alıp bunlara gereksinimi olan hücre ve dokulara taşımaktır. Yapısında %21 protein, %11 trigliserit, %22 fosfolipid, %37 kolesterol ester, %8 serbest kolesterol ve %1 serbest yağ asitleri bulunur. Vücuttaki toplam kolesterolün %70'i LDL'de bulunmaktadır.⁽⁴¹⁾

Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (İngilizce *Very Low Density Lipoprotein*'den VLDL olarak kısaltılırlar) plazma lipoproteinlerinin yoğunluğu 0,95-1,006 g/mL arasında olan bir alt grubudur. VLDL, karaciğerde oluştuktan sonra

taşıdıkları trigliseritleri vücuttaki çeşitli dokulara aktarırlar, bu sürecin sonunda LDL'ye dönüşürler.⁽⁴²⁾

1.1.5.4. Hiperkolesterolemi Tedavisi

Yüksek kolesterolün kontrol altına alınması ile yaşam süresinin uzadığı, kalp ve damar hastalıklarına bağlı ölümlerin azaldığı ve kalıcı sakatlıkların önlendiği bilinmektedir. Kolesterol yüksekliğine ilaveten şişmanlık, yüksek tansiyon, şeker hastalığı, sigara gibi diğer kardiyovasküler risk faktörlerinin tedavisi de yapılmaktadır. Tedavi iki aşamada gerçekleştirilir:

1. İlaçsız tedavi

2. İlaç tedavisi

Her hasta için farklı tedavi uygulanabilir. İlaçsız tedaviler kesinlikle ihmal edilmemeli ve özenle sürdürülmelidir. İlaç tedavisi ise kesinlikle doktor denetiminde olmalıdır.

1.1.5.4.1. İlaçsız Tedavi

İlaçsız tedaviler alışılmış yaşam düzeninin değiştirilmesi olarak da düşünülebilir.

Sağlıklı beslenerek kolesterol düzeyini kontrol altında tutmak mümkündür. Sağlıklı beslenmenin en önemli kurallarından biri düşük miktarda doymuş yağ tüketimidir. Doymuş yağların yerini, tekli veya çoklu doymamış yağların alması gerekir. Aynı zamanda, bitki sterollerini veya stenol içeren margarin ve diğer yiyecekler de, kolesterolü düşürmede yardımcı olur. Bunun yanında, kilo verme, düzenli fiziksel

aktivite ve sigarayı bırakma gibi yaşam biçimi değişiklikleri de kolesterolü düşürmede yardımcı olur. Kolesterol düşürmek için yararlı öneriler;

-Sağlıklı beslenme daha az hayvansal (doymuş) yağ tüketilmesi ve alabileceği en ince et dilimlerini satın alınmalıdır.

-Etten gözle görülebilen tüm yağlar ve tavuğun derisi ayrılmalıdır.

-Daha az hazır bisküvi, pastane ürünü ve kek tüketilmelidir.

-Çoklu veya tekli doymamış yağlar açısından zengin yağ ve margarinleri tercih edilmelidir.

- Yemek pişirirken katı yağlar yerine ayçiçek yağı, mısırözü veya zeytinyağı gibi bitkisel yağlar kullanılmalıdır.

- Bitki sterollerini açısından zengin yağlar tercih edilmelidir.

- Yağsız veya yarım yağlı süt, az yağlı yoğurt ve az yağlı peynir gibi, düşük yağ içeren günlük ürünler tercih edilmelidir.

- Haftada en az bir kez yağlı balık (örneğin somon, sardalya, ton - konserve şeklinde de olabilir) tüketmeye özen gösterilmelidir.

- Bol bol meyve, sebze ve baklagil tüketilmelidir. (mercimek ve fasulye gibi).

- Günde toplam en az 5 porsiyon tüketilmeli ve bir porsiyon, 2-3 kaşık sebze, bir adet meyve (muz) veya - 2-3 adet küçük boy meyve (erik) tüketilmelidir.

- Makarna, pirinç, ekmek, buğday, patates ve mısır gevreğinden oluşan nişastalı yiyecekler öğünlerimizde düzenli olarak tüketilmelidir.

- Alkol tüketimini azaltılmalı ve bu ölçü, kadınlarda günde bir birim, erkeklerde ise iki birimi geçmemelidir.

- Sigara kullanmamalıdır.

- Vücutta fazla kilolar atılmalıdır.

- Her gün 30 dakikalık fiziksel aktivite hedeflenmelidir. (bu süreç, üç adet 10'ar dakikalık seanslardan oluşabilir. ⁽⁴³⁾)

1.1.5.4.2.İlaç Tedavisi

Kalp hastalığı riski taşıyan ve diyetle yaşam stili önlemleri almalarına rağmen kandaki kolesterolü kabul edilebilir düzeye düşüremeyen kişilerde ilaç tedavisi gerekebilir. Hiperkolesterolemi, çeşitli kolesterol dengeleme ilaçları kullanılarak başarıyla tedavi edilebilir. Bu ilaçlar reçeteye satılır. Aşağıdaki ilaç türleri, hiperkolesterolemide yaygın olarak kullanılır.

Statinler; Statinler tablet halinde olup karaciğerdeki kolesterol üretimini düşürürler. Kalp hastalığı riskini azaltarak yaşam süresini uzatırlar. Yan etkilere nadiren rastlanmakla beraber kas ağrıları olduğu takdirde hekime bildirilmelidir. Statinler çocuklarda, gebe veya gebe kalma ihtimali olan kadınlarda, karaciğer veya böbrek rahatsızlığı olan kişilerde kullanılmaz.

Reçineler; Reçineler toz halindedir. Bu ilaçlar, karbonatlı içeceklerle, meyve sularıyla veya yoğurtla karıştırılarak alınır. Reçinelerin çocuklar tarafından kullanımı güvenlidir, çünkü bağırsaktan geçer ve vücut tarafından emilmezler. Kolesterolün bir kısmı reçinelere yapışarak bağırsak hareketleriyle sindirim sisteminden atılır. Reçine alan hastaların folik asit almaları doktorlar tarafından tavsiye ederler. Pek çok kişide mide gazı ve bağırsak hareketinde yavaşlama gibi yan etkiler görülür. Bu durum, reçinelerin kullanımını kısıtlar.

Fibratlar; Fibratlar tablet halindedir. Bu ilaçlar kanda hem kolesterol, hem de trigliserid düzeyi yüksek olan kişiler için uygundur ve yan etkileri yoktur.

Fibratlar gebelik dönemindeki kadınlara veya karaciğer ve böbrek rahatsızlığı olan kişilere verilmemelidir.

Ezetimib; Ezetimib, kolesterolün sindirim sistemine girişini engelleyen tablet biçiminde yeni bir ilaçtır. Bu ilaç, aynı zamanda statin alan kişilere de verilir. Ezetimib kullanımı, 10 yaşın altındaki çocuklar için uygun değildir. ⁽⁴⁴⁾

1.1.6.Hiperbilirubinemi Ve Hiperkolesterolemide Moleküler Damgalamanın Kullanımı

Hiperbilirubinemide ve hiperkolesterolemide kullanılan yöntemler ciddi yan etkileri de beraberinde getirmektedir. Bu nedenle yeni yöntemlerin geliştirilmesi konusunda çalışmalar devam etmektedir. Bilirubin ve kolesterol uzaklaştırılması konusunda son yıllarda kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Çeşitli boya bağlı materyaller, albumin tutuklanmış yapılar, sentetik malzemeler, kompozit yapılar bilirubin ve kolesterol gideriminde kullanılmaktadır. Bilirubin ve kolesterol gideriminde kullanılan sentetik yapılar ciddi toksik etkilere sebep olabilir. Boya bağlı materyallerden boya sızıntısı olması durumunda, boyaların kanserojenik etkileri ortaya çıkabildiği gibi albumin bağlanmış materyallerde de, albuminin afinitesi olan diğer moleküllerle birlikte de bilirubin ve kolesterol uzaklaştırılabilir. Bilindiği gibi albumin bilirubine ve kolesterole afinitesi olan bir ligandır. Fakat bilirubin ve kolesterolle birlikte plazma içerisinde bulunan yağ asitleri, demir ve çeşitli ilaçlar bilirubin ve kolesterolle yarışmalı olarak yüzeylere bağlanacak ve adsorpsiyon kapasitesini azaltacaktır. Kromatografide kullanılan pek çok materyal bu şekilde dezavantajları da beraberinde getirmektedir. Yüksek seçicilik sağlayan yapılar toksik özelliğe sahip olabilir ya da albumin gibi yapılara bağlanarak toksik özelliği azaltıp,

hidrofilik özelliği arttırarak yapılarındaki spesifiteyi azaltmaktadır. Bu noktada moleküler damgalama, yüksek avantajlar sağlamaktadır. Materyal üzerinde oluşan kalıp, sadece hedef molekülü bağlamaktadır. Moleküler damgalamada kullanılan materyalin canlı dokulardaki etkileşimi de oldukça önemlidir, bu nedenle toksik özelliği olmayan, inert ve biyouyumlu yapılar kullanılmalıdır. Bu çalışmada geliştirilen moleküler damgalı materyaller ile daha spesifik bir bağlanma gelişip bilirubin ve kolesterol gideriminde yüksek performans elde edilecektir.

1.2. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, hiperbilirubinemi ve hiperkolesterolemi tedavisine yeni bir yaklaşım olarak moleküler damgalı biyomateryallerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bilirubin ve kolesterol damgalı biyomateryallerle, etkili ve tek basamakta bir tedavi sağlanmış olacaktır. Çalışmamızın ilk aşamasında kitosan ve agaroz polimerlerinden biyomateryal geliştirilmiş ve biyomateryalin yüzey analizleri, denge su içeriği ve kan uyumluluk parametreleri test edilmiştir. Biyomateryallerin biyomedikal alanda uzun süreli kullanımında, kan ile biyomateryalin teması sonucu çok sayıda biyolojik reaksiyon oluşmaktadır. Bu tür reaksiyonlar ilk olarak biyomateryal yüzeyinde olduğu için agaroz-kitosan biyomateryallerinin kan uyumluluk özellikleri, plazma proteinleri, platelet adhezyonu ve hemoliz gibi testlerle belirlenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarının tamamlandıktan sonra biyomateryalin bilirubin uzaklaştırma kapasitesi, sulu çözeltide değerlendirilmiş, pH, sıcaklık, başlangıç bilirubin konsantrasyonu ve iyonik şiddet gibi çeşitli sistem parametrelerinin etkisi deneyerek test edilmiştir. Bu yolla bilirubin ve kolesterol uzaklaştırma prosesi için optimum koşullar belirlenmiştir. Çalışmamızın son aşamasında ise bilirubince ve

kolesterolce zengin insan plazmasından bilirubin ve kolesterol uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir.

Literatürde kan bileşenlerinin saflaştırılmasında ya da kandan toksik bileşiklerin uzaklaştırılmasında çeşitli malzemeler kullanılmaktadır. Bu malzemeler sentetik, doğal ya da kompozit olabilmektedir. Çalışmamızda doğal biyomateryal kullanımı ile oluşabilecek toksik etkinin engellenebileceği düşünülmektedir. Ayrıca kullanılan materyali hedef molekül dışında kandaki başka bileşenlerle de etkileşebileceği düşünüldüğünde moleküler damgalı materyalle, üzerinde taşıdıkları kalıp ile yüksek spesifite sağlamak ve sadece hedef molekül ile etkileşmektedir.

Kandan bilirubin ve kolesterol uzaklaştırma konusunda yapılan çalışmaların çoğu ticari bilirubin ve kolesterol çözeltisi ile oluşturulan adsorpsiyon işlemlerine dayanmaktadır. Bu tür çalışmalarda geliştirilen biyomateryal ile plazmadan bilirubin ve kolesterol uzaklaştırılması mutlaka test edilmelidir. Çünkü kan çok bileşenli bir yapıdadır ve bilirubinin, kolesterolün kandaki yapısal özelliği, yük durumu ve üç boyutlu yapısı biyomateryal ile etkileşiminde önemli bir role sahiptir. Bu nedenle sulu çözeltiler sadece optimum koşulların araştırılması için yeterli olacaktır. Çalışmamızda sulu çözeltiden ve plazmadan bilirubin ve kolesterol uzaklaştırılması test edilmiş ve yüksek performans elde edilmiştir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bilirubin ve Kitosan (Fluka), Kolesterol (Sigma), Agaroz, NaOH, Etanol, Metanol ve Asetik asit (Merck) firmasından; çalışmalarımızda kullanılan tüm kimyasallar, analitik saflıkta elde edildi.

2.1.2 Kullanılan Cihazlar

Konelab60i (Otoanalizör), HECO (Tam Kan Sayım Cihazı), Çalkalamalı İnkübatör (Heidolp, Unimax 1010) , pH metre (Hana, pH 211), Elektronik terazi (AND GR-200), Spektrofotometre (SP 2000 UA), Etüv (Nüve İnkübatör), Manyetik karıştırıcı (WiseStir) , JEOL (JSM 5600) Taramalı Elektron Mikroskobu kullanıldı.

2.2. Biyomateryallerin Hazırlanması

2.2.1.Doğal Kitosan-Agaroz Biyomateryali

%1 oranında agaroz ve %1 oranında kitosan (%2 (v/v) asetik asit içerisinde) ısıtılarak çözüldü ve karıştırılarak cam bir kalıp içerisine aktarıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra perforator ile materyal, diskler halinde kesildi. Reaksiyona girmemiş monomerlerin uzaklaştırılması amacı ile tüm biyomateryaller etanol:su karışımı (70/30, v/v) ile yıkandı ve +4 °C'de saklandı.

2.2.2. Bilirubin Damgalı Kitosan-Agaroz Biyomateryalinin Sentezlenmesi

%1 oranında agaroz ve %1 oranında kitosan (%2 (v/v) asetik asit içerisinde) ısıtılarak çözüldü ve karışım sıcaklığı 25°C'ye kadar soğutuldu. Karışım soğuduktan sonra hedef molekül olan bilirubin 20mg/L oranında karışıma ilave edildi. Polimerizasyonun tamamlanması için karışım cam bir kalıba aktarıldı ve materyal perfaratör yardımıyla diskler halinde kesildi. Kitosan-agaroz materyalinden bilirubin uzaklaştırılması için materyaller 1N NaOH ile 24 saat süre ile yıkandı. Uzaklaştırma işlemleri sonrasında polimerik materyaller etanol: su serilerinde yıkandı ve +4 °C'de saklandı.

2.2.3. Kolesterol Damgalı Kitosan-Agaroz Biyomateryalinin Sentezlenmesi

%1 oranında agaroz ve %1 oranında kitosan (%2 (v/v) asetik asit içerisinde) ısıtılarak çözüldü ve karışım sıcaklığı 25°C'ye kadar soğutuldu. Karışım soğuduktan sonra hedef molekül olan kolesterol 20mg/L oranında karışıma ilave edildi. Polimerizasyonun tamamlanması için karışım cam bir kalıba aktarıldı ve materyal perfaratör yardımıyla diskler halinde kesildi. Sentezlenen biyomateryallerden kolesterol uzaklaştırılması, biyomateryaller metanol:su karışımı (70/30, v/v) ile yıkandı ve +4 °C'de saklandı.

2.3. Biyomateryallerin Karakterizasyonu

2.3.1. Denge Su İçeriği

Kitosan-agaroz biyomateryalinin su içeriği gravimetrik yöntem kullanılarak belirlendi ve su alma kapasiteleri 1 no'lu eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Denge Su İçeriği \%} = [(W_s - W_d) / W_d] \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

Wd, biyomateryalin kuru ağırlığını; Ws, biyomateryalin şişmiş ağırlığını ifade etmektedir.

2.3.2. Yüzey Analizleri

Biyomateryallerin moleküler damgalama öncesinde ve sonrasındaki yüzey analizlerini belirlemek için SEM mikrografları alındı. Azaltılmış basınç altında altın ile kaplanan biyomateryallerin SEM mikrografları Kırıkkale Üniversitesi bünyesinde bulunan JEOL (JSM 5600) Taramalı Elektron Mikroskopi kullanılarak elde edildi.

2.3.3. Kan Uyumluluk Testleri

BD-KA hidrojellerinin protein adsorpsiyonuna direnç gösterme özelliğini belirlemek için, insan serum proteinlerinin (HSA, γ -globulin, fibrinojen) adsorpsiyonu çalışıldı. Bu amaçla biyomateryaller ile insan serumu 5 saat etkileştirildi.

2.3.3.1. Hemoliz Testi

Hemolitik aktivite, hemoglobin salımı ile belirlendi. Bu amaçla 4.0 ml insan kanı 5.0 ml fizyolojik çözelti ile seyreltildi. Biyomateryaller insan kanı ile 37°C'de 12 saat etkileştirildi. İnkübasyon sonrasında insan kanı 750 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi ve elde edilen süpernatantta hemoglobin analizi yapıldı.

2.3.3.2. Platelet Adhezyon Testi

Platelet adhezyonu, biyomateryallerin kan uyumluluğunun değerlendirilmesinde önemli bir parametredir. Platelet sayısı kanın pıhtılaşmasında önemli bir role sahiptir. Biyomateryal ile kanın etkileşimi yüzeyde gerçekleşmektedir. Biyomateryal yüzeyinde gözlenebilecek pıhtılaşma, kanda platelet sayısının azalmasına neden olacaktır. Bu amaçla tüm biyomateryallerde platelet adhezyon testi uygulanmıştır. Sağlıklı vericilerden elde edilen plateletce zengin plazma (30 ml) ile biyomateryaller 37°C’de 12 saat inkübe edildi. İnkübasyon öncesinde ve sonrasında kan platelet düzeyi HECO (tam kan sayım cihazı) ile belirlendi.

2.3.3.3. Kan Proteinleri Adhezyonu

Biyomateryaller ile etkileştirilen kanda fibrinojen miktarı Fibri – Prest 2 (ST4, Diagnostica Stago, France) kiti ile, albumin ve globulin miktarı Thermo kiti kullanılarak belirlendi.

2.4. Sulu Çözeltilerden Bilirubin Uzaklaştırılması

Hazırladığımız biyomateryallerin insan plazmasından bilirubin uzaklaştırma çalışmaları için gerekli olan optimum koşullar statik çalışmalar ile belirlendi. Biyomateryallerin bilirubin uzaklaştırma kapasitesi 2 no’lu eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$q = [(Co - C) Vs] / m.....(2)$$

Eşitlikte q , biyomateyallere adsorplanan bilirubin miktarını; C_0 , çözeltildeki başlangıç bilirubin konsantrasyonunu (mg/ml); C , adsorpsiyon sonrası çözeltildeki bilirubin konsantrasyonunu (mg/ml), V_s , çözelti hacmini (ml); m , biyomateyal miktarını (g) ifade etmektedir.

Bilirubin, 10mM NaOH içerisinde çözülerek son konsantrasyon 5-40mg/L olacak şekilde hazırlandı. Bilirubin çözeltisi ile biyomateryaller 37oC’de 4 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında bilirubin damgalı biyomateryallere adsorplanan bilirubin miktarı 428 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlendi. Bilirubin adsorpsiyonu üzerine pH, başlangıç bilirubin konsantrasyonu, sıcaklık, biyomateryal dozu ve iyonik şiddet gibi sistem parametrelerinin etkisi incelendi.

2.5. Sulu Çözeltilerden Kolesterol Uzaklaştırılması

Hazırladığımız biyomateryallerin insan plazmasından kolesterol uzaklaştırma çalışmaları için gerekli olan optimum koşullar statik çalışmalar ile belirlendi. Biyomateryallerin bilirubin uzaklaştırma kapasitesi 3 no’lu eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$z = [(X_0 - X) V_s] / m \dots \dots \dots (3)$$

Eşitlikte z , biyomateyallere adsorplanan kolesterol miktarını; X_0 , çözeltildeki başlangıç kolesterol konsantrasyonunu (mg/ml); X , adsorpsiyon sonrası çözeltildeki kolesterol konsantrasyonunu (mg/ml), V_s , çözelti hacmini (ml); m , biyomateyal miktarını (g) ifade etmektedir.

Kolesterol, 10mM metanol de çözülerek son konsantrasyon 5-40mg/L olacak şekilde hazırlandı. Kolesterol biyomateryaller 37°C'de 4 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında kolesterol damgalı biyomateryallere adsorplanan kolesterol miktarı 428 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlendi. Kolesterol adsorpsiyonu üzerine pH, başlangıç kolesterol konsantrasyonu, sıcaklık, biyomateryal dozu ve iyonik şiddet gibi sistem parametrelerinin etkisi incelendi.

2.6. İnsan Plazmasından Bilirubin Uzaklaştırılması

Biyomateryaller (0.5g) Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesinden temin edilen hiperbilirubinemik plazma ile 37°C'de 4 saat süre ile etkileştirildi. Etkileşim öncesi ve sonrasında plazma içerisindeki bilirubin seviyesi otoanalizör (Konelab60i) ile belirlendi.

2.7. İnsan plazmasından Kolesterol Uzaklaştırılması

Biyomateryaller (0.5g) Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesinden temin edilen hiperkolesterolemik plazma ile 37°C'de 4 saat etkileştirildi. Etkileşim öncesi ve sonrasında plazma içerisindeki kolesterol seviyesi otoanalizör (Konelab60i) ile belirlendi.

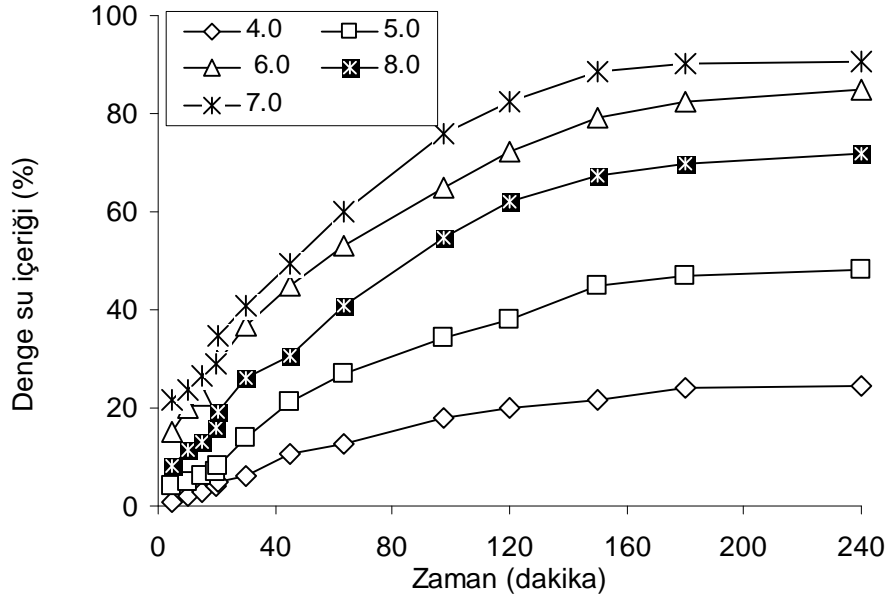
3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Biyomateryal Karakterizasyonu

Kitosan-agaroz biyomateryalleri ile bilirubin adsorpsiyonu öncesi biyomateryallerin denge su içeriği, SEM mikrografları ve kan uyumluluk parametreleri ile karakterizasyon çalışmaları gerçekteşirilmifitir.

3.1.1. Denge Su İçeriği

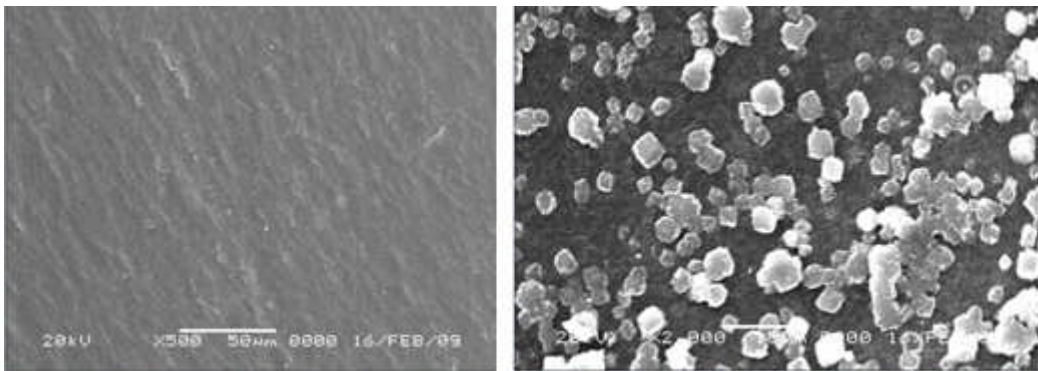
Son yıllarda bilimsel ve teknolojik açıdan önemi gittikçe artan hidrojeller, suda şişebilen, üç boyutlu hidrofilik ağ yapılarıdır. Hidrojeller, yapılarında fazla miktarda su içermeleri, yumuşak ve esnek yapıda olmaları bakımından canlı dokularla büyük benzerlik göstermektedirler(1-3). Kitosan ve agaroz kullanılarak sentezlenen kitosan-agaroz materyalleri hidrofilik yapıdadır ve sulu çözeltilerde yüksek derecede şişme özelliği gösteren hidrojellerdir. Kitosan-agaroz hidrojellerinin denge su içeriği gravimetrik yöntemle farklı pH ortamlarında belirlendi (Şekil 3.1). Ortam pH'sı nötrleştikçe su alma kapasitesinin de arttığı tespit edildi. Kitosan-agaroz hidrojellerinin su alma kapasitesi pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'de sırası ile %24.3, %48, %84.9, %90 ve %72 olarak bulundu.



Şekil 3.1. Farklı pHlarda (4.0-8.0) Kitosan-agaroz biyomateryalinin denge su içeriği

3.1.2. SEM Mikrografları

Kitosan-Agaroz (KA) biyomateryalleri ile bilirubin damgalı kitosan-agaroz (BD-KA) biyomateryallerinin SEM mikrografları Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. KA ve BD-KA materyallerinin SEM mikrografları

3.1.3. Bilirubin Damgalı Biyomateryaller İçin Kan Uyumluluk Parametreleri

Biyomateryal ile 5 saat etkileştirilen insan serumunda albumin, globulin ve fibrinojen adsorpsiyon değerleri Çizelge 3.1’de verildi. Çizelgeden de görüldüğü gibi biyomateryel ile serum proteinleri adsorpsiyonu oldukça düşüktür.

Lökosit ve eritrosit adhezyonunun ise sırası ile 0.1 K/uL ve 0.14M/uL seviyelerinde olduğu belirlendi. Biyomateryal yüzeyine kan hücreleri adhezyonunun oldukça düşük seviyelerde kaldığı ve ihmal edilebilir derecede olduğu belirlendi.

Biyomateryallerin kan ile etkileşerek hemolize sebep olmaları istenmeyen bir durumdur. BD-KA biyomateryalinin hemoliz özelliğine sahip olup olmadığı araştırıldı ve kan ile etkileşim sonrasında çok düşük miktarda (0.2g/dL) hemoglobinin seruma geçtiği tespit edildi.

Çizelge 3.1. BD-KA biyomateryalinin kan uyumluluk parametreleri

	Referans	Başlangıç	Final
Platelet	150-400	296	326
Lökosit (K/uL)	4.0-11.0	5.3	5.2
Eritrosit M/uL	3.8-5.8	4.99	4.85
Hemoglobin g/dL	11.4-16.5	9.4	9.2
Total Protein g/dL	6.4-8.3	6.8	6.6
Albumin g/dL	3.5-5.5	4.2	4.3
Fibrinojen g/dL	3.02 ± 0.05	3.13	3.09

3.1.4.Kolesterol Damgalı Biyomateryaller İçin Kan Uyumluluk Parametreleri

Biyomateryal ile 5 saat etkileştirilen insan serumunda albumin, globulin ve fibrinojen adsorpsiyon değerleri Çizelge 3.2’de verildi. Çizelgeden de görüldüğü gibi biyomateryel ile serum proteinleri adsorpsiyonu oldukça düşüktür.

Lökosit ve eritrosit adhezyonunun ise sırası ile 0.2 K/uL ve 0.08 M/uL seviyelerinde olduğu belirlendi. Biyomateryal yüzeyine kan hücreleri adhezyonunun oldukça düşük seviyelerde kaldığı ve ihmal edilebilir derecede olduğu belirlendi.

Biyomateryallerin kan ile etkileşerek hemolize sebep olmaları istenmeyen bir durumdur. KD-KA biyomateryalinin hemoliz özelliğine sahip olup olmadığı araştırıldı ve kan ile etkileşim sonrasında çok düşük miktarda (0.2g/dL) hemoglobinin seruma geçtiği tespit edildi.

Çizelge 3.2. KD-KA biyomateryalinin kan uyumluluk parametreleri

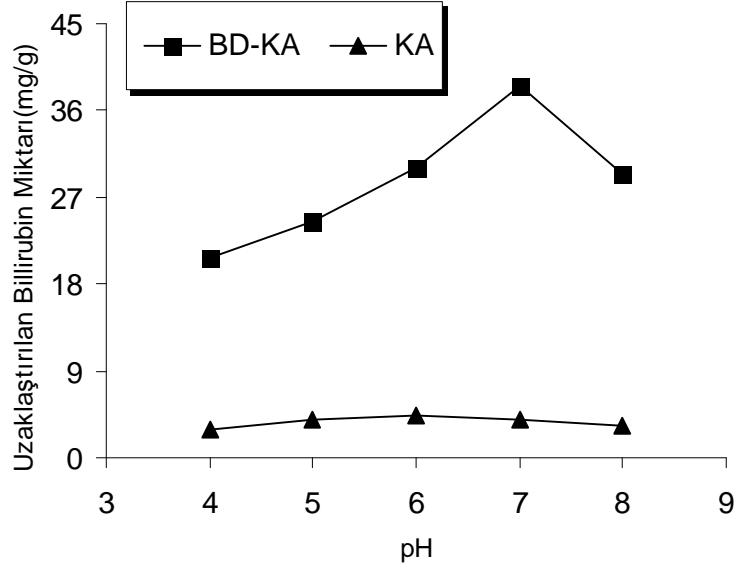
	Referans	Başlangıç	Final
Platelet	150-400	387	395
Lökosit (K/uL)	4.0-11.0	6.4	6.6
Eritrosit M/uL	3.8-5.8	3.87	3.95
Hemoglobin g/dL	11.4-16.5	10.1	10.3
Total Protein g/dL	6.4-8.3	7.1	7.3
Albumin g/dL	3.5-5.5	4.8	5.0
Fibrinojen g/dL	3.02 ± 0.05	3.27	3.19

3.2. Bilirubinün Uzaklaştırılması

3.2.1. pH Etkisi

pH adsorpsiyon ya da giderim çalışmalarında adsorpsiyon kapasitesini etkileyen önemli bir parametredir. Moleküllerin ve kullanılan materyallerin yüzey yükleri ve konformasyonları ortam pH'ı ile önemli ölçüde değişmektedir. Bilirubin molekülünün çözünürlüğünde ve konformasyonunda da pH'ın rolü önemlidir. Çalışmalarımız boyunca bilirubin molekülünün özellikle nötr ve bazik ortamlarda kolaylıkla çözündüğü belirlendi. KA ve BD-KA biyomateryalleri üzerine bilirubin adsorpsiyon çalışmaları pH 4.0-8.0 aralığında incelendi ve pH 7.0 noktasında maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşıldı (Şekil 3.3). KA ve BD-KA biyomateryalleri bilirubin giderimi açısından kıyaslandığında, moleküler damgalamanın performansı 5.7 kat arttırdığı belirlendi. Doğal biyomateryal ile 6.7 mg/g, moleküler damgalanmış biyomateryal ile 38.55 mg/g bilirubin giderimine ulaşıldı. Bilirubin uzaklaştırılmasında pH etkisi için SPSS 15.0 programında istatistiksel analizleri yapıldı.

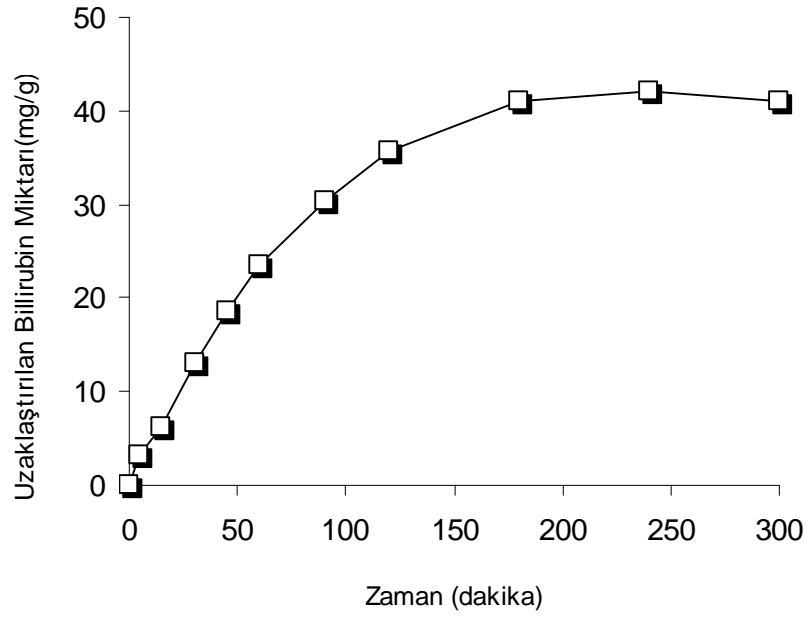
(absorbans t:9.548 , df: 4, p> .001 ; Derişim t:9.550 , df:4 , p>001)



Şekil 3.3. Bilirubin adsorpsiyonu üzerine pH'ın etkisi

3.2.2. Zamanın Etkisi

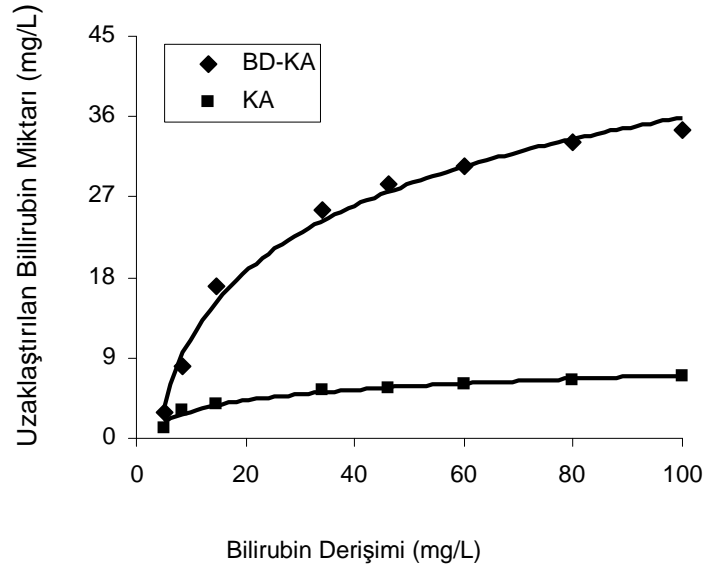
Adsorpsiyon zamanı da adsorpsiyon kapasitesini etkileyen önemli bir parametredir. Moleküler damgalanmış KA biyomateryalleri üzerine bilirubin adsorpsiyonu 300 dakika takip edildi ve adsorpsiyonun başlangıçta hızlı olduğu ve 180 dakika içerisinde ise dengeye ulaştığı belirlendi. (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Bilirubin adsorpsiyonu üzerine zamanın etkisi

3.2.3. Başlangıç Bilirubin Derişiminin Etkisi

Adsorpsiyon ortamlarında hedef molekülün derişiminin artırılması adsorpsiyon kapasitesinin artması ile sonuçlanmaktadır. Pek çok çalışmada rastlanan bu bulgu materyal ve hedef molekül arasındaki sürtünme kuvvetinin artması ile açıklanabilmektedir. Çalışmamızda KA ile BD-KA biyomateryalleri üzerine başlangıç bilirubin derişiminin etkisi 5.0-100 mg/L aralığında ile incelendi ve 40 mg/L başlangıç konsantrasyonunda bilirubin gideriminin maksimuma ulaştığı belirlendi. Ortamdaki bilirubin konsantrasyonunun artırılması ile bilirubin gideriminin arttığı ve 40 mg/L değerinin üzerindeki başlangıç bilirubin konsantrasyonlarında doygunluk noktasına ulaşıldığı belirlendi (Şekil 3.5). Bilirubin uzaklaştırılmasında bilirubin derişiminin etkisi için SPSS 15.0 programında istatistiksel analizleri yapıldı. ($t:2.547$, $df:6$, $p>0.044$)

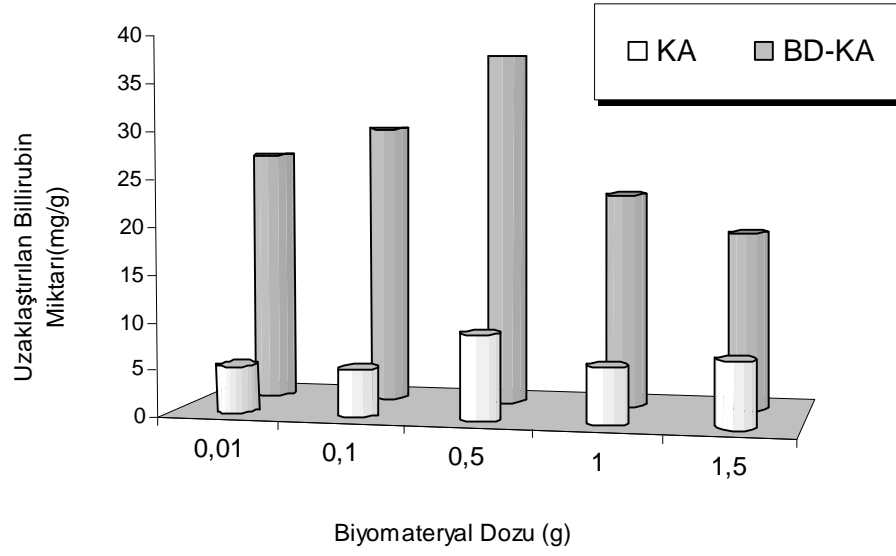


Şekil 3.5. Bilirubin adsorpsiyonu üzerine bilirubin başlangıç derişiminin etkisi

3.2.4. Biyomateryal Derişiminin Etkisi

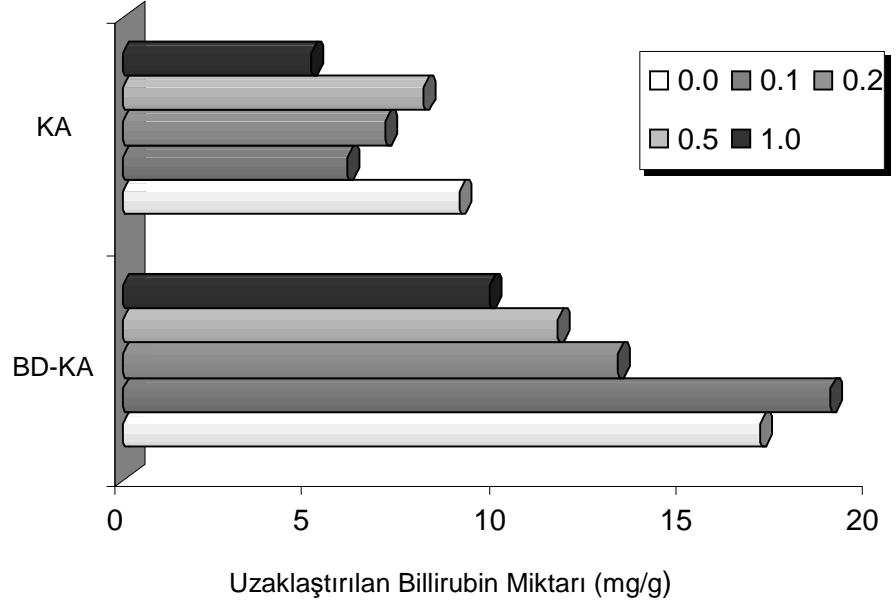
Adsorpsiyon çalışmalarında katı ve sıvı faz arasındaki oran oldukça önemlidir. Çalışmamızda katı fazı temsil eden kitosan-agaroz biyomateryalleri 0.01-1.5g aralığında tutularak bilirubin adsorpsiyonu üzerine biyomateryal derişiminin etkisi incelendi ve biyomateryal miktarının artması ile adsorpsiyon kapasitesinin arttığı, 0.5g'lık biyomateryal derişiminin seviyesinde maksimum bilirubin adsorpsiyonuna ulaşıldığı tespit edildi. (Şekil 3.6). Bilirubin uzaklaştırılmasında başlangıç derişim etkisi için SPSS 15.0 programında istatistiksel analizleri yapıldı.

(t:11.245 , df:4 , p.000)



3.2.5. İyonik Şiddet Etkisi

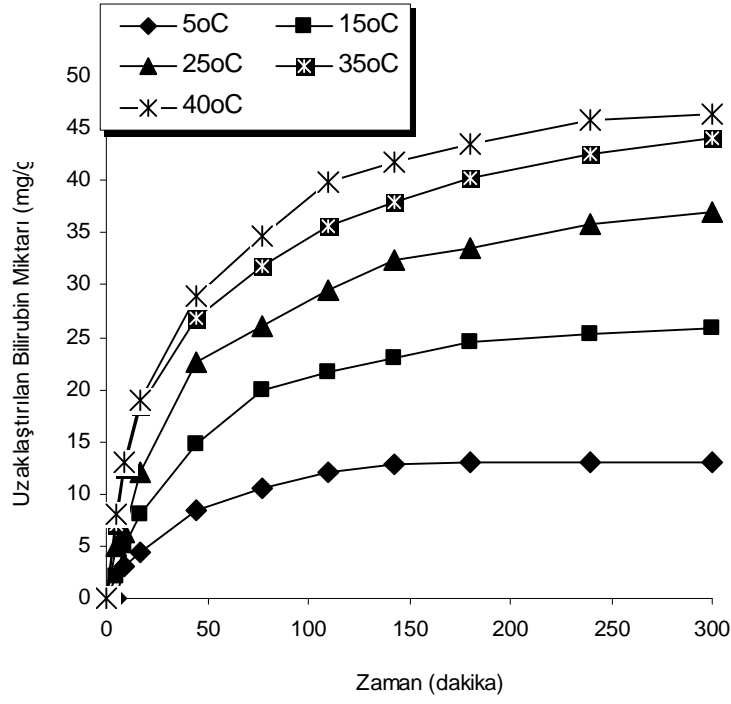
İyonik şiddet etkisi pekçok adsorpsiyon ve uzaklaştırma çalışmalarında performansı etkileyen önemli bir parametredir. Çalışmamızda iyonik şiddet etkisi 0.0-1.0 M NaCl varlığı ile test edildi ve her iki materyal için iyonik şiddetin artması ile bilirubin uzaklaştırma oranının azaldığı belirlendi (Şekil 3.7). Bilirubin uzaklaştırılmasında iyonik şiddet etkisi için SPSS 15.0 programında istatistiksel analizleri yapıldı. ($t:8.351$, $df:4$, $p>0.001$)



Şekil 3.7. Bilirubin adsorpsiyonu üzerine iyonik şiddetin etkisi

3.2.6. Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık moleküllerin hızını ve hareketliliğini arttıran önemli bir faktördür. Sıcaklığın moleküler damgalı KA biyomateryallerinin bilirubin uzaklaştırma performansı üzerine etkisi 5-40°C aralığında incelendi. Ortam sıcaklığının 5°C'den 35°C'ye artırılması ile adsorpsiyon kapasitesinin 3.79 kat arttığı belirlendi ve en yüksek uzaklaştırma verimi 35°C'de elde edildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Bilirubin adsorsiyonu üzerine sıcaklığın etkisi

3.3. İnsan Serumundan Bilirubin Adsorpsiyonu

Moleküler damgalı KA biyomateryalleri ile sulu çözeltilerden bilirubin uzaklaştırma çalışmalarında elde edilen optimum koşullar ile insan serumundan bilirubin uzaklaştırılması çalışıldı. Bu amaçla en yüksek giderimin sağlandığı 0.5 g biyomateryal dozu ile pH 7.0'da insan serumu ve biyomateryaller etkileştirildi. Etkileşim öncesi ve sonrasında alınan serum örneklerinde bilirubin analizi gerçekleştirildi ve moleküler damgalı kitosan-agaroz biyomateryalleri ile %87'lik bir uzaklaştırma oranı elde edildi.

Sulu bilirubin çözeltisinde elde edilen uzaklaştırma kapasitesi %96 olarak bulundu ve aynı koşullar plazma üzerine uygulandığında adsorpsiyon kapasitesinin sulu çözelti uygulamalarına kıyasla 1.1 kat azaldığı belirlendi.

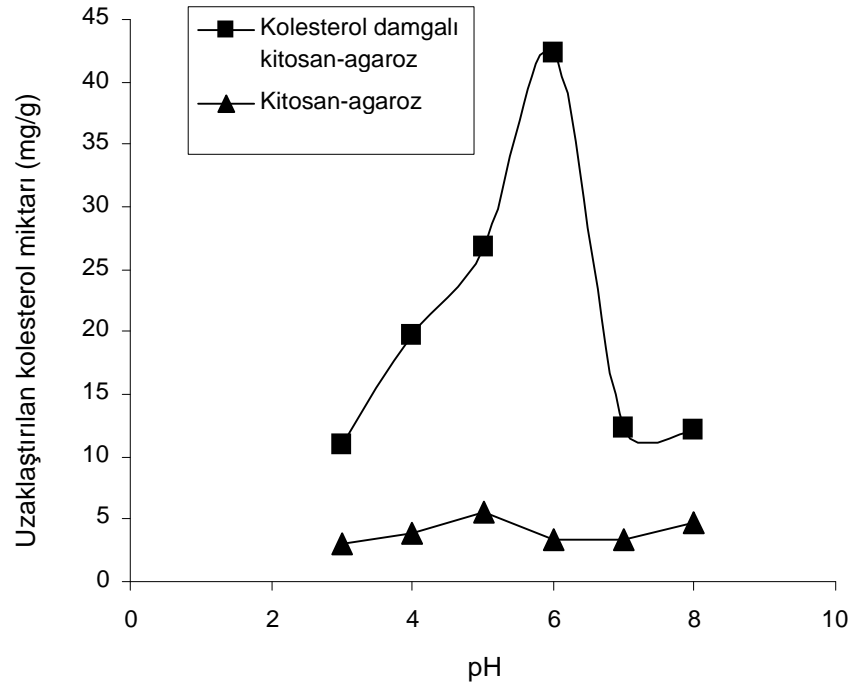
Çizelge 3.3. Moleküler damgalı kitosan-agaroz biyomateryali ile insan plazmasından bilirubin uzaklaştırılması

	Referans	Başlangıç	Final
T BIL	0.2-1.3 mg/dL	15.0 mg/dL	1.6 mg/dL
D BIL	0-0.4 mg/dL	1.8 mg/dL	0.9 mg/dL

3.4.Kolesterol Uzaklaştırma

3.4.1.pH Etkisi

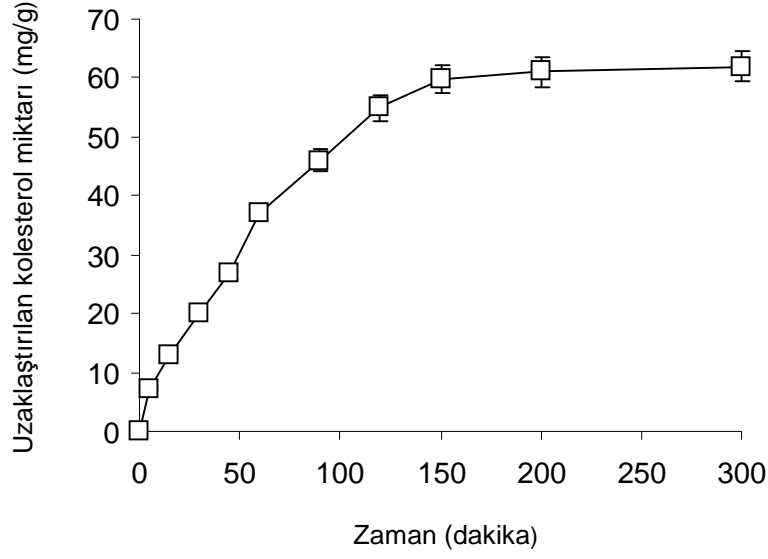
Biyomateryaller üzerine kolesterol adsorpsiyon çalışmaları pH 4.0-8.0 aralığında incelenmiş ve pH 6.0 noktasında maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşılmıştır. (Şekil 3.9.). Kolesterol uzaklaştırılmasında pH etkisi için SPSS 15.0 programında istatistiksel analizleri yapıldı. ($t:4.075$, $df:4$, $p>0.015$)



Şekil 3.9. Kolesterol adsorpsiyonu üzerine pH'nın etkisi

3.4.2. Zamanın Etkisi

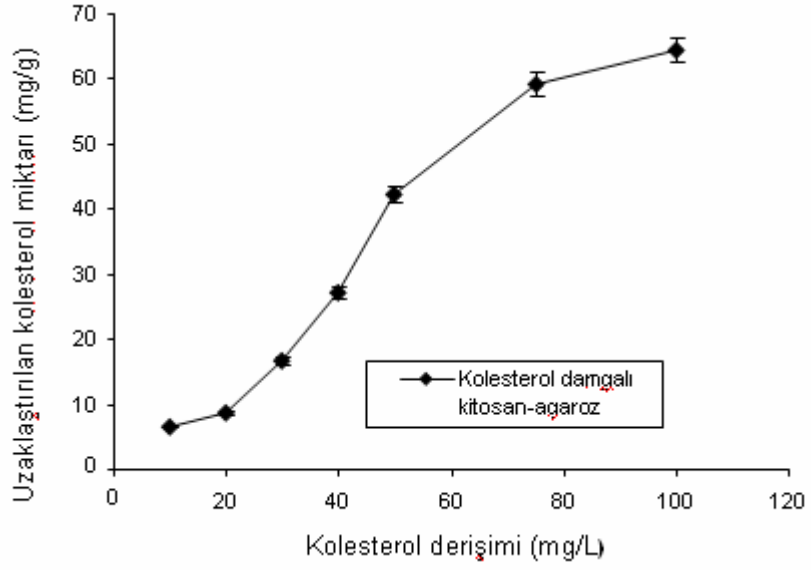
Moleküler damgalanmış KA biyomateryalleri üzerine kolesterol adsorpsiyonu 300 dakika takip edildi ve adsorpsiyonun başlangıçta hızlı olduğu ve 150 dakika içerisinde ise dengeye ulaştığı belirlendi.(Şekil 3.10.)



Şekil 3.10. Kolesterol adsorpsiyonu üzerine zamanın etkisi

3.4.3. Başlangıç Kolesterol Derişiminin Etkisi

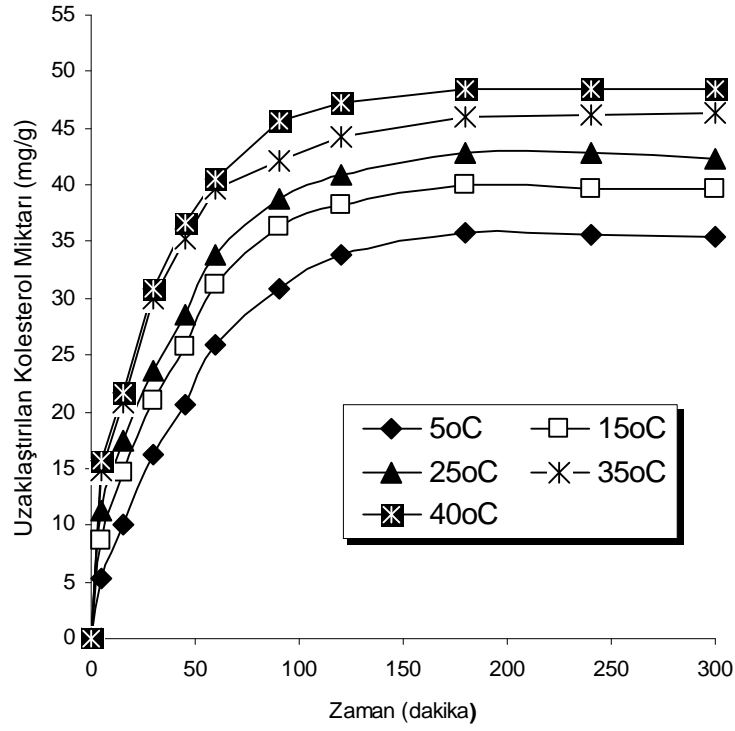
Biyomateryaller üzerine başlangıç kolesterol derişim etkisi 10-100 mg/L aralığında incelenmiş ve 80 mg/L kolesterol başlangıç konsantrasyonunda damgalı biyomateryaller için 59.7 mg/L adsorpsiyon kapasitesine ulaşılmıştır.(Şekil 3.11.) Kolesterol uzaklaştırılmasında başlangıç kolesterol derişim etkisi için SPSS 15.0 programında istatistiksel analizleri yapıldı.(t:3.601 , df:6 , p>0.011)



Şekil 3.11. Kolesterol adsorpsiyonu üzerine başlangıç derişim etkisi

3.4.4 Sıcaklık Etkisi

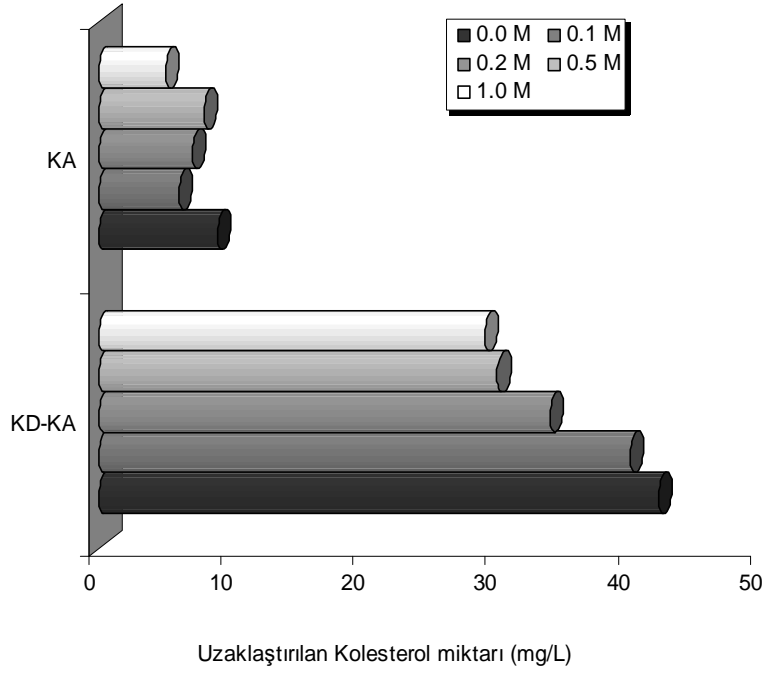
Sıcaklığın, moleküler damgalı biyomateryallerin kolesterol uzaklaştırma performansı üzerine etkisi 5-40°C aralığında incelenmiş ve en yüksek uzaklaştırma verimi 37°C’de elde edilmiştir. (Şekil 3.12.). Bu sonuç, sıcaklığın artması ile birlikte moleküllerin hareketinin ve çarpışma oranlarının artması ile açıklanabilir.



Şekil 3.12. Kolesterol adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisi

3.4.5. İyonik Şiddet Etkisi

Çalışmamızda iyonik şiddet etkisi 0.0-1.0 M NaCl varlığı ile test edildi ve her iki materyal için iyonik şiddetin artması ile kolesterol uzaklaştırma oranının azaldığı belirlendi ve her 1.0 M NaCl arttığında kolesterol absorbansının 1.45 kat azaldığı belirlendi.(Şekil 3.13.). Kolesterol uzaklaştırılmasında iyonik şiddet etkisi için SPSS 15.0 programında istatistiksel analizleri yapıldı. ($t:14.046$, $df:4$, $p:0.000$)



Şekil 3.13. Kolesterol adsorsiyonu üzerine iyonik şiddetin etkisi

3.5. İnsan Plazmasından Kolesterol Uzaklaştırılması

Moleküler damgalı biyomateryaller ile sulu çözeltilerden kolesterol uzaklaştırma çalışmalarında elde edilen optimum koşullar ile insan plazmasından kolesterol uzaklaştırılması çalışıldı. Bu amaçla 0.5 g biyomateryal dozu ile pH 6.0'da insan plazması ve biyomateryaller etkileştirildi. Etkileşim öncesi ve sonrasında alınan plazma örneklerinde kolesterol analizi gerçekleştirildi ve moleküler damgalı biyomateryaller ile %75'lik bir uzaklaştırma oranı elde edildi (çizelge3.3.)

Çizelge 3.4. Moleküler damgalı kitosan-agaroz biyomateryali ile insan plazmasından kolesterol uzaklaştırılması

	Referans	Başlangıç	Final
Kolesterol	150-200 mg/dl	264.7mg/dl	153.8 mg/dl

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde büyük ilerlemelerin gerçekleştiği bilim dallarından biri olan biyomalzeme bilimde, biyolojik sistemlerle etkileştiğinde uyum sağlayabilecek yeni malzemelerin geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır. Biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılmaktadır. Son yıllarda hem bilimsel, hem de teknolojik açıdan önemi gittikçe artan hidrojellerin biyomalzeme olarak kullanımı pek çok çalışmada rapor edilmektedir. Hidrojeller, çözünmeyen ancak şişebilen yapıda olup tıbbi uygulamalar açısından sahip oldukları üstün özellikler bakımından son 30 yıldır dikkat çeken biyomalzemelerdir. Hidrojeller, yapılarında çok fazla miktarda su içermeleri, yumuşak ve esnek yapıda olmaları gibi taşıdıkları birçok fiziksel özellik açısından canlı dokularla karşılaştırıldıklarında büyük benzerlik göstermektedirler^(33,46). Bu çalışmada kullanılan kitosan ve agaroz doğal polimerleri de hidrofilik yapıdadır ve sulu çözeltilerde yüksek derecede şişme özelliğine sahip hidrojellerdir. Kitosan, kitinin alkalın deasetilasyonu ile elde edilen amorf yapıda bir poliaminosakkarit ve doğal olarak meydana gelebilen birkaç katyonik polielektrolitten biridir. Jel oluşturma özelliği ile farmakoloji ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan agaroz, *Rhodophyceae* sınıfına ait kırmızı alglerden elde edilmektedir⁽⁴⁷⁾. Agaroz yüksek su tutma kapasitesine sahiptir ve bu özelliği ile medikal alanlarda da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kitosan-agaroz hidrojellerinin denge su içeriği gravimetrik yöntemle farklı pH ortamlarında belirlendi. Ortam pH'sının nötrale yaklaştıkça su alma kapasitesinin de arttığı tespit edildi. KA hidrojellerinin su alma kapasitesi pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'da sırası ile %24.3, %48, %84.9, %90 ve %72 olarak bulundu. Tüm pH değerlerinde 150.

dakikaya kadar hızlı bir şişme eğilimi gösteren hidrojellerin bu seviyeden sonra sabit bir şişme kapasitesi sergilediği belirlendi.

Bilirubin damgalama çalışmalarında çok çeşitli materyaller kullanılmıştır. Altıntaş ve arkadaşları (2006) ⁽⁴⁸⁾, poli(glisidil metakrilat) partiküllere bilirubinin adsorpsiyonu üzerine çalışmışlardır. Deng ve arkadaşları (2003) ⁽⁴⁹⁾, poli metakrilik asit üzerine bilirubin baskılamışlar ve yüksek giderim sağlamışlardır. Syu ve arkadaşları(2005) ⁽⁵⁰⁾, poli metakrilik asit-ko-etilenglikoldimetakrilat polimeri üzerine alfa bilirubin damgalaması çalışmışlar ve iki saat içerisinde maksimum giderim elde etmişlerdir. Kolesterol damgalama çalışmalarında ise Yavuz ve arkadaşları (2007), Methacryloyl-(1)-tyrosinemetylester materyal olarak seçmişlerdir. ⁽⁵¹⁾ Genellikle kullanılan materyaller sentetik yapıdadır. Bu çalışmada ise tamamen doğal malzemeler kullanılmıştır. Biyomalzeme alanının vazgeçilmez öğeleri olan doğal polimerlerdir, biyolojik ortamdaki makromoleküllerle benzer yapıda olduklarından, canlı dokularla temas ettiklerinde toksik etki, iltihaplanma gibi istenmeyen reaksiyonlar oluşmamaktadır. Bununla birlikte doğal polimerler de çeşitli dezavantajlara sahiptir. Yüksek sıcaklıklarda bozunmaları ve bundan dolayı şekillendirilmelerindeki güçlük, önemli dezavantajlar arasında söylenebilir. Fakat bu çalışmada kullanılan kitosan ve agarozun yüksek sıcaklıklarda da dayanıklı oldukları belirlenmiştir.

Polimerik materyaller günümüzde kontakt lens üretimi, ultrafiltrasyon, biyosensör sistemlerin tasarımı, biyoteknolojik ayırım ve salım sistemleri gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyoteknoloji ve biyomedikal alanlarda kullanılan biyomateryallerin, biyolojik çevreyle iyi uyumu, doku ile temas ettiğinde enfeksiyona yol açmaması, kanserojenik etki göstermemesi gibi başlıca

temel özelliklere sahip olması gerekmektedir. Ayrıca biyomateryal yüzeyinin protein adsorpsiyonu ve hücre adhezyonuna dirençli olması, kan uyumlu implantların geliştirilmesinde önemli bir parametredir ^(52,53,54) . Biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemeler olup, sürekli olarak veya belli aralıklarla vücut akışkanlarıyla (örneğin kan) temas ederler. Bu amaçla biyomalzeme olarak kullanılacak yapıların biyoyumluluk özelliklerinin test edilmesi gerekmektedir. Kan proteinleriyle ve hücrelerinin adhezyonu ve hemoliz bu testlerin başında gelmektedir. Agaroz-kitosan hidrojellerinin protein adsorpsiyonuna direnç gösterme özelliğini belirlemek için, insan serum proteinleri (HSA, γ -globulin, fibrinojen) ile biyomateryaller 5 saat etkileştirildi. Biyomateryeller üzerine adsorplanan serum proteinleri oranının çok düşük olduğu ve istatistiksel olarak önem arz etmediği belirlendi ($p>0.05$). Biyomalzeme yapısında hidrofilik fonksiyonel gruplar yüzeyde bulunma eğilimindedirler ve böylece yüzeyde yoğun Lewis bazı ile örtülü tabaka oluşmaktadır. Biyomalzeme yüzeyinde gözlenen düşük protein adhezyonu yüzeydeki Lewis baz bileşenleri ile protein molekülleri arasında oluşan itme kuvvetleri ile açıklanabilir. Kan proteinleri adhezyonu çalışmalarında fibrinojen ile elde edilen düşük adhezyon oranları biyomalzenin kullanılabilirliği açısından oldukça ümit verici bir sonuçtur. Çünkü fibrinojenin biyomalzemelerin vücut tarafından kabulünde pıhtılaşmada önemli bir rolü vardır. Çalışmamızda geliştirilen biyomalzemelerin düşük fibrinojen adhezyonu göstermesi literatür açısından da oldukça önemlidir çünkü biyoyumlu malzeme tasarımında henüz istenilen noktaya ulaşılamamıştır.

Sandeman ve arkadaşları (2005) ⁽⁵⁵⁾, karbon yapıda geliştirdikleri materyalin biyoyumluluk özelliğini granulosit ve platelet adhezyonu ile test etmişlerdir.

Desai ve arkadaşları (1989) ⁽⁵⁶⁾, ise polihidroksietil metakrilat-ko-metilmatakrilat polimerinin biyoyumluluk özelliğini, trombus oluşumu ve platelet adhezyonu ile değerlendirmişlerdir. Hsu ve arkadaşları da (2004) ⁽⁵⁷⁾, geliştirdikleri polikaprolakton/polietilenglikol materyallerinin biyoyumluluk özelliğini kan proteinleri ve platelet adhezyonu ile değerlendirmiş ve olumlu sonuçlar aldıklarını rapor etmişlerdir.

Bir biyomateryal kan ile temas ettirildiğinde ilk olarak proteinler yüzeye yapışmakta ve denatüre olmaktadır. Deforme olan protein ile plateletler etkileşmekte ve platelet hücreleri yüzeyde birikmektedir. Plateletler bu görevleri ile trombus oluşumunda önemli bir role sahiptir. Bu nedenle geliştirdiğimiz biyomateryalin biyoyumluluk özelliğini değerlendirirken, platelet ve diğer kan hücreleri adhezyonu çalışmalarına da yer verilmiştir. Bu amaçla, kitosan-agaroz biyomateryali insan kanı ile inkübe edilerek inkübasyon öncesi ve sonrasında hematolojik veriler elde edildi. Biyomateryal yüzeyine platelet adhezyonunun oldukça düşük seviyelerde kaldığı ve ihmal edilebilir derecede olduğu belirlendi. Lökosit ve eritrosit adhezyonunun ise sırası ile 0.1 K/uL ve 0.14M/uL seviyelerinde olduğu belirlendi. Hidrofilik agaroz ve kitosan zincirlerine ait yüzeyde bulunan ve protein adhezyonunu azaltan tabakanın, negatif yüklü kan hücreleri adhezyonunu azalttığı söylenebilir.

Biyomateryallerin kan ile etkileşiminde hemolize sebep olmaları, istenmeyen bir durumdur. Biyomalzemelerin kan hücreleri ile etkileşimi yapısal özellik, konsantrasyon ve saturasyon gibi çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Biyomalzemeler, hücre zarında hasara yol açarak litik etki gösterebilmektedir. Lipid yapıdaki nanopartiküler malzemeler membran yapısına katılarak membran

büyükliğini arttırmakta ve baloncuk oluşumuna neden olabilmektedir. Hücre zarında oluşabilecek böyle bir değişiklik hücre zarı, iskeleti ve stoplazma arasındaki etkileşimde aksamalara neden olmaktadır⁽⁵⁸⁾. Çalışmamızda KA biyomateryalinin hemoliz özelliğine sahip olup olmadığı da araştırıldı ve kan ile etkileşim sonrasında çok düşük miktarda (0.2g/dL) hemoglobinin seruma geçtiği tespit edildi. Bu sonuçlara dayanarak çalışmamızda geliştirilen biyomalzemelerin düşük ve ihmal edilebilir derecede hemolitik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Zhang ve arkadaşları (2009) ⁽⁵⁹⁾, bilirubin adsorpsiyonunda polytetrafluoroethylene kullanarak malzemelerin yüksek hemolitik aktivite sergilediklerini, bu problemi materyal yüzeyine albumin tutuklayarak giderdiklerini ve albumin tutuklanmış yüzeyde %0.24 lük bir hemoliz oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Benzer şekilde platelet adhezyonunun da yüksek oranda olduğunu ve albumin modifikasyonu sonrasında adhezyon oranının azaldığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda diğer önemli bir parametre ise pH etkisidir. Bilirubin damgalı KA biyomateryalleri üzerine bilirubin adsorpsiyon çalışmaları pH 4.0-8.0 aralığında incelendi ve pH 7.0 noktasında maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşıldı. Kolesterol damgalı KA biyomateryelde ise maksimum adsorpsiyon pH 6.0 elde edildi. pH 7.0 ve 6.0 'da biyomateryal hem maksimum su alma kapasitesi göstermiş hemde üç boyutlu ağ yapı üzerindeki hedef bölgelerin ulaşılabilirliğini arttırmıştır. Doğal KA biyomateryali ise bilirubin ve kolesterol adsorpsiyonunda maksimum verim pH 6.0'da elde edilmiştir. Bu sonuç moleküler damgalamanın biyomateryal yüzeyinde varyasyonlara sebep olduğunu, bilirubin ve kolesterol ile etkileşimin nötr pH'ya kaydığını göstermektedir. Zhang ve arkadaşları (2009) ⁽⁵⁹⁾, pH 6.0-7.0 aralığında bilirubin maksimum adsorpsiyon gösterdiğini bulmuşlardır. Yang ve arkadaşları ⁽⁷⁾ pH 4.0'dan pH 8.0'a doğru arttıkça bilirubin adsorpsiyon miktarının

da arttığını göstermişlerdir. Literatürde gözlenen bu sonuçlar çalışmamızda elde ettiğimiz nötr pH'da maksimum adsorpsiyonu desteklemektedir.

Moleküler damgalama işlemi biyomateryal yüzeyinde kalıp oluşturarak hedef molekül için spesifikliği arttırmaktadır. Doğal biyomateryal ile 6.7 mg/g bilirubin giderimine ulaşılrken, moleküler damgalanmış biyomateryal ile 38.55 mg/g seviyelerine ulaşılmıştır. Doğal biyomateryal ile kolesterol ve bilirubin damgalı kitosan-agaroz biyomateryali bilirubin ve kolesterol giderimi açısından kıyaslandığında, moleküler damgalamanın performansı 5.7 kat arttırdığı belirlendi. Zhang ve Jin (2009) ⁽⁵⁹⁾, polivinilalkol kullanarak 76mg/g maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır. Zhang ve jin (2009) ⁽⁵⁹⁾, politetrafloroetilen kullanarak (MPTFE) insan plazmasından bilirubin uzaklaştırmışlardır ve 53.8 mg/g bilirubin adsorpsiyonu elde etmişlerdir. Avramescu ve arkadaşları da(2004) ⁽⁵⁾, albumin tutuklanmış etilen vinil alkol membranları ile 25 mg/g bilirubin adsorpsiyonu elde etmişlerir. Tong ve arkadaşları (2005) ⁽⁶⁰⁾, O,O-dipalmitoyl kitosan matrikslerine kolesterol adsorpsiyonu çalışmışlardır ve etkili bir kolesterol adsorpsiyonunu rapor etmişlerdir. Liu ve arkadaşları (2006) ⁽⁶¹⁾,kolesterol modifiye edilmiş dekstran materyallerine 329.6 ng/cm² LDL adsorpsiyonunu rapor etmişlerdir. Yavuz ve arkadaşları (2007) ⁽⁵¹⁾,poly(2-hidroksietil metakrilat -N-methacryloyl-(1)-tyrosine metilester) sentetik partiküllere kolesterol damgalamasını çalışmışlar ve 16.23 mg/g adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır.

Moleküler damgalanmış KA biyomateryalleri üzerine bilirubin ve kolesterol adsorpsiyonu 300 dakika takip edildi ve adsorpsiyonun başlangıçta hızlı olduğu ve 120 dakika içerisinde dengeye ulaştığı belirlendi. Kitosan-agaroz biyomateryalleri üzerine başlangıç bilirubin derişimi etkisi 5-100 mg/L aralığında incelendi ve 40

mg/L başlangıç konsantrasyonunda bilirubin gideriminin maksimuma ulaştığı ve bu değerin üzerindeki başlangıç bilirubin konsantrasyonlarında doygunluk noktasına ulaşıldığı belirlendi. Bu nedenle bundan sonraki tüm çalışmalar 40 mg/L bilirubin başlangıç konsantrasyonunda gerçekleştirildi. 40 mg/L değerinin üzerinde bilirubin adsorpsiyonunun doygunluğa ulaşması, biyomateryal yüzeyindeki hedef bölgelerin büyük bir çoğunluğunun bilirubin ile kaplanmasıyla açıklanabilir. Kitosan-agaroz biyomateryalleri üzerine başlangıç kolesterol derişimi etkisi ise 10-100 mg/L aralığında incelendi 80 mg/L kolesterol başlangıç konsantrasyonunda damgalı biyomateryaller için 59.7 mg/g adsorpsiyon kapasitelerine ulaşılmıştır. Bu yolla ortamdaki bilirubin ve kolesterol molekülleri biyomateryal yüzeyinde az sayıda kalan bağlanma bölgeleri ile yarışacak ve adsorpsiyon kapasiti de buna bağlı olarak azalacaktır.

Adsorpsiyon çalışmalarında katı ve sıvı faz arasındaki oran oldukça önemlidir. Bu çalışmada katı fazı temsil eden biyomateryalleri 0.01-1.5 g aralığında tutularak bilirubin adsorpsiyonu üzerine doz etkisi incelendi ve biyomateryal miktarının artması ile adsorpsiyon kapasitesinin arttığı ve 0.5 g'lık doz seviyesinde maksimum bilirubin ve kolesterol adsorpsiyonuna ulaştığı belirlendi.

İyonik şiddet etkisi, pek çok adsorpsiyon ve uzaklaştırma çalışmalarında performansı etkileyen önemli bir parametredir. Bu çalışmada iyonik şiddet etkisi 0.1-1.0 M NaCl varlığı ile test edildi ve her iki materyal için iyonik şiddetin artması ile bilirubin ve kolesterol uzaklaştırma oranının azaldığı belirlendi. Bilirubin damgalı biyomateryallerin adsorplama kapasitesinin, iyonik şiddet etkisinin 1.0 M NaCl'ye arttırılması ile 2.1 kat azaldığı belirlendi. Kolesterol damgalı biyomateryallerin adsorplama kapasitesi ise iyonik şiddet etkisinde 1.0 M NaCl'ye arttırılmasıyla 1.45

kat azaldığı belirlendi. Benzer şekilde Zhang ve arkadaşları(2009) ⁽⁵⁹⁾, bilirubin adsorsiyonunun 0.005-0.5 aralığında NaCl konsantrasyonundaki değişikliklerde yaklaşık % 15.8 azaldığını rapor etmişlerdir. Yang ve arkadaşları (2007) ⁽⁷⁾ iyonik gücün titanyum oksit nanopartikülleri ile bilirubin arasındaki etkileşimi incelemiş ve bu etkileşimin iyonik gücü azalttığını ya da önlediğini rapor etmişlerdir. Xia ve arkadaşları (2005) ⁽⁶⁾ 0.067 M NaCl' nin Cibacron Blue F3G A (CB F3GA) bağlı nylon membranları üzerine bilirubin adsorsiyonunu azalttığını belirtmişlerdir.

Sıcaklık moleküllerin hızını ve hareketliliğini arttıran bir faktördür. Sıcaklığın moleküler damgalı kitosan-agaroz biyomateryallerinin bilirubin uzaklaştırma performansı üzerine etkisi 5-35°C aralığında incelendi ve en yüksek uzaklaştırma verimi 37°C'de elde edildi. Bilirubin damgalı biyomateryallerin adsorplama kapasitesinin iyonik şiddet etkisinin 5°C 'den 35°C'ye artırılması ile 3.38 kat arttığı, kolesterol damgalı biyomateryal içinse 2.33 kat arttığı belirlendi. Sıcaklığın artması, moleküllerin hareket hızlarını, materyal ile bilirubin ve kolesterolün çarpışma oranlarını arttıracığından adsorplama kapasitesinin artması beklenen bir sonuçtur. Zhang ve arkadaşları (2009) ⁽⁵⁹⁾ 4, 25ve 37°C'lerde bilirubin adsorpsiyonu çalışmışlardır ve maksimum adsorpsiyon kapasitesine 37°C'de ulaşmışlardır. Xia ve arkadaşları (2005) ⁽⁶⁾ ortam sıcaklığının artmasıyla bilirubin adsorsiyon kapasitesinin doğru orantılı bir biçimde arttığını gözlemişlerdir.

Moleküler damgalı kitosan-agaroz biyomateryalleri ile sulu çözeltilerden bilirubin ve kolesterol uzaklaştırma çalışmalarında elde edilen optimum koşullar ile insan serumundan bilirubin ve kolesterol uzaklaştırılması çalışıldı. Bu amaçla en yüksek giderimin sağlandığı 0.5 g biyomateryal dozu ile pH 7.0'da insan serumu ve biyomateryaller etkileştirildi. Etkileşim öncesi ve sonrasında alınan serum

örneklerinde bilirubin ve kolesterol analizi gerçekleştirildi ve moleküler damgalı kitosan-agaroz biyomateryalleri ile %87'lik bir uzaklaştırma oranı elde edildi. Sulu çözeltilerden bilirubin ve kolesterol adsorpsiyonu ile insan plazmasından bilirubin ve kolesterol adsorpsiyonu kıyaslandığında, plazmada adsorpsiyon kapasitesinin çok az miktarda azaldığı gözlemlendi. Bu sonuç, plazma içerisindeki diğer bileşenlerin varlığı ile açıklanabilir. Plazma içerisindeki proteinler, iyonlar, enzimler, materyal ile bilirubin ve kolesterol etkileşimini maskeleyebilir, bilirubin ve kolesterol materyal üzerindeki kalıba bağlanmasında engel oluşturabilir ve bu yolla adsorpsiyon kapasitesinin azalmasına yol açabilir. Benzer şekilde Avramescu ve arkadaşları⁽⁵⁾ bilirubin adsorpsiyonunda statik çalışmada elde ettikleri verimin çalışmalarda 2 kat azaldığını rapor etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. M.E. Bryne and K.Park, *Advanced Drug Delivery*, **54**, 149-161, (2002).
2. Piletsky, S. Alcock and A. P. F. Turner, *Trends in Biotchnology*, **19**, 9-12, (2001).
3. A.J. Hall , M. Emgenbroich and B. Sellergren , *Templates in Chemistry II Topics in Current Chemistry*, C.A. Schalley, K.-H. Dötz, F. Vögtle (Eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, **249**, 317-349, (2005).
4. M. Yazar, F. Yur, *Yyü Vet Fak Derg* **14** (2):83-85, (2003).
5. M.E. Avramescu, W.F.C. Sager¹, Z. Borneman and M. Wessling , *Journal of Chromatography B*, **803** 215–223, (2004)
6. B. Xia, G. Zhang and F. Zhang, *Journal of Chromatography B*, **821**, 112–121, (2005).
7. Z. Yang, S. Si and Y. Fung, *Thin Solid Films*, **515**, 3344–3351, (2007).
8. LI Andersson , *J Chromatogr B Biomed Sci Appl. Feb* **28**, (1):163-73, (2000).
9. M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, and H. Asanuma, *Molecular Imprinting, From Fundamentals to Applications*, (2003).
10. C. Wang, Y. Li and Z. Hu, *Macromolecules*, **30**, 4727–4732, (1997).
11. .Sudipto K. De, N. R. Aluru, Member, Ieee, B. Johnson, W. C. Crone, David J. Bebe and J. Moore, *Experiments, And Simulations Journal Of Microelectromechanical Systems*, **11**, 5, (2002).
12. . N. W. Turner, C. W. Jeans, K.R. Brain, C. J. Allender, V. Hlady and D.W. Britt, *Biotechnol. Prog.*, **22** (6), 1474 -1489, (2006).
13. www.fusabil.org/pdf.php3?id=445 (Erişim Tarihi 12.4.2009)
14. http://tr.wikipedia.org/wiki/H%C3%BCcre_zar%C4%B1 (Erişim Tarihi:20.5.2009)

15. <http://www.odevsel.com/saglik/5108/kontrollu-ilac-salimi.html> (Erişim Tarihi 27.4.2009)
16. E. Yalçın, K. Çavuşoğlu, M. Maraş **20**, (2), 217-222, (2008).
17. T. Dağoğlu, F. Ovalı İndirekt hiperbilirubinemi. Dağoğlu T. Neonatoloji İstanbul,Nobel Tıp Kitabevleri Ltd, (2000).
18. http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/str_gif/bilirubin(Erişim Tarihi 15.3.2009)
19. A.Çoban, O. Neyzi ,T. Ertuğrul, Yenidoğanda Sarılık: Pediatri, (ed) 3.baskı; 402-421, 2002
20. <http://www.emedicine.com/med/topic227.htm> (Erişim Tarihi 26.4.2009).
21. <http://www.uludagsozluk.com/k/hepatosit/> (Erişim Tarihi 27.01.2009).
22. www.med.gazi.edu.tr/egitim/donem4/pediatri/sarilikyatalay.htm - 179k -(Erişim Tarihi 27.1.2009)
23. . American Academy of Pediatrics: Management of hyperbilirubinemia in the newborninfant 35 or more weeks of gestation. Pediatrics 114:297-316, (2004)
24. B.J. Stoll, R.M. Kliegman ,Jaundice and hyperbilirubinemia in the newborn. Saunders Comp,17th edition, 592-596. (2003)
25. R.J. Cremer, P.W. Perryman and D.H. Richards, Lancet ,1:1094, 1958
- 26.J. Lucey, M. Ferreiro and J.Hewitt Prevention of hyperbilirubinemia of prematurity by phototherapy. Pediatrics,**41**:1047, (1968)
27. L.P. Halomek and D.K. Stevenson and R.J. Martin, Neonatal-Perinatal Medicine, **2**, Disease of the fetus and infant 6th ed.
28. UğUR DEMİRSOY İndirekt Hiperbilirubinemi Nedeniyle Fototerapi Alan Term Yenidoğanlarda İntravenöz Sıvı Desteğinin Bilirubin Seviyesi Üzerine Etkisi, T.C.

Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve
Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi (2008)

29. W.T. Ham, H.A. Mueller and D.H. Sliney ,Retinal sensitivity to damage from short wavelength light, Nature **260**,153-5, (1976).
30. G.B. Arden, T. Berninger, C.R. Hogg, and S.A. Perry, Ophtalmology **98**, 567-75, (1991).
31. P.Y. Wu, A. Moosa, Pediatrics.,**61**(2):193-8, (1978)
32. A.F. Bakken, Acta Paediatr, **66**,91, (1977).
33. M. Yurdakök, Katkı Pediatri Dergisi. Ankara,**5**, 725-733, (1995)
34. W.T. Speck, Pediatr Res **10**,553-555, (1976).
35. H.J. Vreman, R.J. Wong and D.K. Stevenson, Seminars In Perinatolog **28**,5,:326-33, (2004).
36. <http://homepage.uludag.edu.tr/~mtayar/kolestrol.htm> (Erişim Tarihi 17.5.2009)
37. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kolesterol> (Erişim Tarihi 30.3.2009)
38. www.mustafaaltinisik.org.uk/s-0a-Kolesterol.ppt (Erişim Tarihi 12.12009)
39. www.genelsaglikbilgileri.com/hiperkolesterolemi/ - 29k Erişim Tarihi 4.2.2009)
40. tr.wikipedia.org/wiki/Yüksek_yoğunluklu_lipoprotein - 24k (Erişim Tarihi 22.4.2009)
41. wikipedia.org/wiki/LDL - 25k Erişim Tarihi (04.4.2009)
42. wikipedia.org/wiki/Çok_düşük_yoğunluklu_lipoprotein - 25k (Erişim Tarihi 12.3.2009)
43. almanhastanesi.com.tr/makale/makaleler/kolestrol.htm - 16k (Erişim Tarihi 13.1.2009)
44. www.gig.org.uk/docs/translations/turkish/26-fh-t-turkish(Erişim Tarihi 18.2.2009)

45. F-Q.Nie, Z-K.Xu, P.Y.J.Wu,and,P.Seta, *Polymer*, **45**, 399, (2004).
46. . F.Trotta, E.Drioli, C.Beaggiani, D.Lacopo and J.Membr, *Sci.* **201**, 77, (2002).
47. B. Rosangela, R. L Garcia and M. R.Vidale, *Tecnologia*, **10**, 155, (2000).
48. E. B. Altıntas, H. Yavuz, M. Andaç, D.Türkmen, A.Denizli, *Boya Takılı ve Es Boyutlu Manyetik Poli(Glisidil Metakrilat) Partiküllere Bilirubin Adsorpsiyonu*,6. Ulusal Kromotograf Kongresi ,(2006)
49. J.H. Deng, Y. Ming and M.J.Syu, *Investigation of Binding Specificity of Imprinted PMAA toward a-Bilirubin*, The 1st International Meeting on Microsensors and Microsystems, 2003.
- 50.M.J. Syu, J.H. Deng, Y.M. Nian and T.C. Chiu , *Biomaterials*, **26**,4684-92, (2005).
51. H. Yavuz, V. Karakoc, D. T`urkmen, R. Say, A. Denizli **41**, 8–15, (2007)
52. A. Y. Kwok, G. G. Qiao and D. H. Solomon, *Polymer* **45**, 4017, (2004).
- 53.V. L. Zvetkov, *Macromol. Chem. Phys.*, **203**, 467, (2002).
- 54.S. Asayama, *Poly. Adv. Technol*,**439**, 444, (2004).
55. S. R. Sandeman, C. A. Howell, G.J. Phillips and A. W. Lloyd, *Biomaterials*, **34**, 7124-7131, (2005).
56. N. P, Desai ans J. A. Hubbell, *Polymer edition*,**1**, 2, 23-46, (1989).
57. S.H. Hsu, C.M. Tang and C.C.Lin, , *Biomaterials*, **25**, , 5593-5601, (2004).
58. D. C. McClure and N. L. Schiller, *Journal of Leukocyte Biology*, **51**, 23,(1992).
- 59.L.Zhang and G.Jin, *Jounrnal of Catalysis*, **302**, 107-101(2009)
60. Y.Tong, S. Wang, J. Xu, B. Chua, C. He, *Synthesis of O,O-dipalmitoyl chitosan and its amphiphilic properties and capability of cholesterol absorption*, *Carbohydrate Polymers* **60**, 229–233, (2005)
61. D. Liu, B. He, S. Han, S. Wang, Q. Liu, A. Jun-ichi, T. Osa, Q. Chen, *An*

adsorption behavior of low-density lipoprotein onto cholesterol-modified dextran
studied by a quartz crystal microbalance, Materials Science and Engineering C,
(2006)