

**DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİN TAKILI PHEMA
KRİYOJEL İLE KANDAN KOLESTEROL
UZAKLAŞTIRILMASI**

**REMOVAL OF CHOLESTEROL FROM BLOOD WITH LOW
MOLECULAR WEIGHT HEPARIN IMMOBILIZED PHEMA
CRYOGEL**

GİZEM UZUNOĞLU

Prof. Dr. ADİL DENİZLİ
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2013

GİZEM UZUNOĞLU'nun hazırladığı “**Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin Takılı PHEMA Kriyojel ile Kandan Kolesterol Uzaklaştırılması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof.Dr. Adil Denizli

Danışman

Prof.Dr. Adil Denizli

Üye

Prof.Dr. Zübeyde Baysal

Üye

Prof.Dr. Günay Kibarar

Üye

Doç.Dr. Handan Yavuz

Üye

Doç.Dr. Lokman Uzun

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

Prof.Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİN TAKILI PHEMA KRİYOJEL İLE KANDAN KOLESTEROL UZAKLAŞTIRILMASI

GİZEM UZUNOĞLU

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. ADİL DENİZLİ

Ağustos 2013, 82 sayfa

Hiperkolesterolemi kandaki düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)-kolesterol seviyesinin yüksek olması ile karakterize edilen ve ateroskleroz için doğrudan risk oluşturan bir hastalıktır. Kolesterol düzeyini kontrol etmek veya yüksek ise düşürmek için başlıca dört yaklaşım söz konusudur. Bunların başında diyet gelir. İkinci yaklaşım ilaçla tedavidir. Üçüncü yaklaşım kandaki kolesterolün bir ekstrakorporal sistemle uzaklaştırılması şeklindedir. Hastalığın oldukça ileri aşamalarında başvurulan son çözüm ise cerrahi işlemdir (bypass, vb.). LDL uzaklaştırılmasında, biyoafinite temeline dayanan ekstrakorporal tedavi son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Bu tez çalışmasında, afinite kromatografisi yöntemi ile LDL'nin kandan uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Yeni nesil polimerik sistemlerden biri olan poli(hidroksietil metakrilat) (PHEMA) kriyojel polimer destek olarak hazırlanmış ve ligand olarak LDL'ye yüksek afinite gösteren düşük molekül ağırlıklı heparin seçilmiştir. PHEMA kriyojelin hidroksil grupları Siyanojen bromür (CNBr) ile aktive edilmiş, daha sonra farklı miktarlarda düşük molekül ağırlıklı heparin immobilize edilmiştir. PHEMA kriyojel, taramalı elektron mikroskopisi (SEM), Fourier transform kızılötesi spektrofotometresi (FTIR), şişme

deneyleri ve yüzey alanı ölçümleri ile karakterize edilmiştir. PHEMA kriyojelin kan uyuşabilirliği pıhtılaşma testleri ile araştırılmıştır. Düşük molekül ağırlıklı heparin immobilize PHEMA kriyojele insan plazmasından LDL adsorpsiyonu ve rejenerasyonu incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hiperkolesterolemi, afinite kromatografisi, LDL adsorpsiyonu, PHEMA kriyojel.

ABSTRACT

REMOVAL OF CHOLESTEROL FROM BLOOD WITH LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN IMMOBILIZED PHEMA CRYOGEL

GİZEM UZUNOĞLU

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. ADİL DENİZLİ

August 2013, 82 pages

Hypercholesterolemia is characterized by high blood low density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels and is a risk factor for atherosclerosis disease directly. To control or to reduce the level of cholesterol if high, there are four main approaches. First of all approaches is diet. The second approach is drug treatment. The third approach is an extracorporeal system for removal of cholesterol from blood plasma. For quite advance stages of disease final solution is surgical procedure (bypass, etc.). Extracorporeal LDL removal treatment based on bioaffinity draws much attention in recent years. In this thesis, LDL was removed by heparin affinity chromatography. Poly(hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) cryogel which is one of the new generation polymeric systems was prepared as the polymer support and low molecular weight heparin, which has a high affinity for cholesterol was chosen as the ligand. PHEMA cryogel is characterized by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectrophotometry (FTIR), swelling experiments, and surface area measurements. Blood compatibility of PHEMA cryogel was investigated by coagulation tests. The hydroxyl groups of PHEMA cryogel was activated using Cyanogen bromide (CNBr), then different amounts of low

molecular weight heparin was immobilized. LDL adsorption from human plasma and regeneration was investigated using heparin immobilized PHEMA cryogel.

Keywords: Hypercholesterolemia, affinity chromatography, LDL adsorption, PHEMA cryogel.

TEŞEKKÜR

Değerli bilgilerini büyük bir alçak gönüllülikle paylaşan ve tez çalışmalarımın sonuçlanması için birçok olanağı seferber edip desteğini asla esirgemeyen kıymetli hocam

Prof. Dr. Adil Denizli'ye
Teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım boyunca; güler yüz ve sevgisiyle her zaman elinden gelen yardımı büyük bir hoşgörü ile sunan sevgili Hocam Doç. Dr. Handan Yavuz'a

Ve
Tez çalışmalarım da yardımcı olan değerli hocam Dr. Nilay Bereli, arkadaşlarım Duygu Çimen ve Monir'e,

Çalışma molalarımın kahkaha kaynakları canım arkadaşlarım Türkan ve Mitra'ya çok teşekkür ederim.

Değerli hocalarım
Doç. Dr. Lokman Uzun, Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz, Dr. Müge Andaç

Ve sevgili arkadaşım Ali Derazshamshir'e,
laboratuvardaki yardımlarından ve sağladıkları sıcak atmosferden dolayı teşekkür ederim.

Yanımda olup sunduğu emsalsiz sınırsız yürekle yüzümü gülümseten ve en zor engelleri bile aşmamdaki en büyük destekçim
Aileme sonsuz teşekkür ederim.
İyi ki varsınız....

Bütün yaşamım boyunca iyi ve kötü günlerimde hep yanımda olan Demet Dağdelen Sayın'a da ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Gizem Uzunoğlu
Ankara, 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT.....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1.BİYOAFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ.....	4
2.2.AFİNİTE ETKİLEŞİMLER.....	6
2.2.1. Ligandların sınıflandırılması	8
2.2.1.1.Mono spesifik düşük molekül ağırlıklı ligandlar	8
2.2.1.2.Grup spesifik düşük molekül ağırlıklı ligandlar	9
2.2.2. Uzaticı kol seçimi	10
2.3.İMMOBİLİZASYON TEKNİKLERİ.....	10
2.4.HEPARİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ.....	13

2.5.HEPARİN.....	14
2.6.KOLESTEROL.....	19
2.6.1. Kolesterol ve Ateroskleroz.....	20
2.6.2. Risk Faktörleri.....	21
2.6.3. Hiperkolesterolemi	21
2.6.4. Hiperlipoproteinemi.....	24
2.6.5. LDL'nin Vücut Dışı Uzaklaştırılması	27
2.7.KRİYOJELLER	29
2.8.POLİ(HİDROKSİETİL METAKRİLAT) (PHEMA)	32
3. DENEYSEL YÖNTEMLER.....	35
3.1.KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	35
3.2.PHEMA KRİYOJELİN HAZIRLANMASI	35
TABLO 3.1. PHEMA KRİYOJELİN HAZIRLANMA KOŞULLARI.....	35
3.3.PHEMA KRİYOJELİN KARAKTERİZASYONU.....	36
3.3.1. Şişme özelliğinin incelenmesi	36
3.3.2. Yüzey Alanı ve Gözeneklilik Ölçümleri.....	37
3.3.3. Yüzey Morfolojisi.....	37

3.4.HEPARİN İMMOBİLİZASYONU.....	37
3.4.1. CNBr Aktivasyonu.....	37
3.4.2. Heparin İmmobilizasyonu	38
3.5.KAN UYUMLULUĞU TESTLERİ.....	39
3.5.1. Pıhtılaşma Zamanı (CT)	39
3.5.2. Aktifleştirilmiş Kısmi Tromboplastin Zamanı (APTT).....	39
3.5.3. Protrombin Zamanı (PT).....	39
3.5.4. Hücre Yapışma Çalışmaları	40
3.6.İNSAN PLAZMASINDAN LDL-KOLESTEROL UZAKLAŞTIRILMASI.....	40
3.7.DESORPSİYON VE TEKRAR KULLANILABİLİRLİK	40
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	42
4.1.PHEMA KRİYOJELLERİN KARAKTERİZASYONU	42
ŞEKİL 4.1. PHEMA KRİYOJELLERİN SEM GÖRÜNTÜLERİ.	43
4.2.PHEMA KRİYOJELLERE HEPARİN İMMOBİLİZASYONU.....	43
4.2.1. CNBr derişiminin etkisi	44
4.2.2. pH'nın etkisi	46
4.2.3. Heparin başlangıç derişiminin etkisi	47

4.2.4. Sıcaklığın etkisi	48
4.2.5. İnkübasyon süresinin etkisi	49
4.3.KAN UYUMLULUĞU ÇALIŞMALARI	49
TABLO 4.1. PIHTILAŞMA ZAMANLARI.	51
TABLO 4.2. KRIYOJELLERE PLATELET VE LÖKOSIT YAPIŞMASI.	52
4.4.HİPERKOLESTEROLEMİK İNSAN PLAZMASINDAN LDL KOLESTEROLÜNÜN UZAKLAŞTIRILMASI.....	52
4.5.LİTERATÜR KARŞILAŞTIRMASI.....	54
4.6.DESORPSİYON VE TEKRAR KULLANILABİLİRLİK	55
5. SONUÇLAR.....	56
6. KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2.1. AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİNİN TEMEL İLKESİ.....	5
ŞEKİL 2.2. FARKLI AKTİFLEŞMİŞ TAŞIYICILARA LİGANDLARIN İMMOBİLİZASYONU. A) SİYANAT ESTER, İZOÜRE TÜREVİNE DÖNÜŞEN, SİYANOJEN BROMÜR ESTERİYLE AKTİVASYON SONUCU ELDE EDİLİR. (B) BİR AMİD ESTERİ VEREN N-HİDROKSİ SUKSİNİMİT ESTER; (C) VE (D) P-NİTRO-FENİL KLOROFORMAT VEYA DSC İLE AKTİVASYON İLE ELDE EDİLEN P-NİTRO-FENİL VE N-HİDROKSİSUKSİNİMT KARBONAT, KARBAMAT TÜREVLERİNİN OLUŞUMUNU VE AYRICA PROTEİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN MÜKEMMEL DERECEDE MUHAFAZA EDİLMESİNİ SAĞLAR [38].....	12
ŞEKİL 2.3. GLİKOZAMİNOGLİKANLARIN YAPISI (X = H OR SO ₃ ⁻ ; Y = AC VEYA SO ₃ ⁻).....	16
ŞEKİL 2.4. KOLESTEROL, KOLESTERİL ESTER, FOSFOLİPİD, TRİGLİSERİT VE POLAR LİPİD MOLEKÜLLERİN KİMYASAL YAPILARI.....	23
ŞEKİL 2.5. LİPOPROTEİN TÜRLERİNİN ELEKTRON MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ.....	24
ŞEKİL 2.6. PLAZMA LİPOPROTEİNLERİN ULTRASANTRİFÜJ ÖZELLİKLERİNİN ŞEMATİK GÖSTERİMİ.	25
ŞEKİL 2.7. LİPOSORBER SİSTEM.....	28
ŞEKİL 2.8.A. KRİYOJEL OLUŞUMU. 1) MAKRO MOLEKÜLLER, 2) ÇÖZELTİ, 3) ÇÖZÜCÜ, 4) DONMUŞ ÇÖZÜCÜNÜN POLİ KRİSTALLERİ, 5) DONMAMIŞ ÇÖZÜCÜ, 6) KRİYOJEL 7) MAKRO GÖZENEKLER, 8) ÇÖZÜCÜ.....	31
ŞEKİL 2.8.B. KRİYOJELLERİN FARKLI FORMLARI. KRİYOJELLER FARKLI FORMDALAR OLUŞTURABİLİRLER, BONCUKLAR, MONOLİTİK KOLONLAR, DİSKLER V.B.....	31
ŞEKİL 2.8.C. KRİYOJELLERİN SEM GÖRÜNTÜLERİ [104].....	32
ŞEKİL 2.9. PHEMA'NİN YAPISI.....	33

ŞEKİL 4.1. PHEMA KRİYOJELLERİN SEM GÖRÜNTÜLERİ.	43
ŞEKİL 4.2. HİDROKSİL GRUPLARININ CNBR AKTİVASYON MEKANİZMASI.	44
ŞEKİL 4.3. CNBR DERİŞİMİNİN HEPARİN BAĞLANMASINA ETKİSİ.	45
ŞEKİL 4.4. PH'NİN HEPARİN BAĞLANMASINA ETKİSİ.	46
ŞEKİL 4.5. HEPARİN DERİŞİMİNİN HEPARİN BAĞLANMASINA ETKİSİ.	47
ŞEKİL 4.6. HEPARİN BAĞLANMASINA SICAKLIĞIN ETKİSİ.	48
ŞEKİL 4.7. PHEMA KRİYOJELLERE HEPARİN BAĞLANMASINA İNKÜBASYON SÜRESİNİN ETKİSİ.	49
ŞEKİL 4.8. HİPERKOLESTEROLEMİK İNSAN PLAZMASINDAN KOLESTEROL UZAKLAŞTIRMA ETKİNLİĞİ.	52
ŞEKİL 4.9. BAĞLANAN HEPARİN MİKTARININ LDL KOLESTEROL ADSORPSİYONUNA ETKİSİ.	53
ŞEKİL 4.10. DİĞER LİPOPROTEİNLERİN VE TRİGLİSERİTLERİN KRİYOJELLERE ADSORPSİYONU.	54
ŞEKİL 4.11. HEPARİN BAĞLI PHEMA KRİYOJELLERİN TEKRAR KULLANILABİLİRLİĞİ.	56

TABLolar DİZİNİ

TABLO 2.1. AFİNİTE KROMATOGRAFİSİNDE KULLANILAN BİYOLOJİK ETKİLEŞİMLER.....	4
TABLO 2.2. LMWH'NİN AVANTAJLARI VE SONUÇLARI.....	17
TABLO 2.3. STANDART HEPARİN VE LMWH'İN BİYOKİMYASAL VE FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ	18
TABLO 2.4. KORONER ARTER HASTALIKLARIN TEDAVİ EDİLEBİLİR RİSK FAKTÖRLERİ	22
TABLO 2.5. BEŞ LİPOPROTEİN TÜRÜNÜN ÖZELLİKLERİ.....	26
TABLO 2.6. PHEMA KRİYOJELLERİN FİZİKO KİMYASAL ÖZELLİKLERİ [103]	30
TABLO 3.1. PHEMA KRİYOJELİN HAZIRLANMA KOŞULLARI.....	35
TABLO 4.1. PIHTILAŞMA ZAMANLARI*.....	51
TABLO 4.2. KRİYOJELLERE PLATELET VE LÖKOSİT YAPIŞMASI.	52

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji araştırmalarındaki son gelişmeler göz önüne alındığında, protein ayırma ve saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi gerekli olmuştur. Bir proteinin veya elde edilecek hedef molekülün saflığı, yapı ve fonksiyon çalışmaları veya potansiyel uygulamaları için bir ön koşuldur. Bugün, pek çok ve çeşitli protein saflaştırma teknikleri mevcuttur, ancak yüksek çözme gücüne sahip farklı kromatografi teknikleri diğerlerine baskın hale gelmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi, boya-afinite kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi tekniklerinde ayırma, moleküllerin molekül büyüklüğü, net yük, biyospesifik ve hidrofobik özellikler gibi biyolojik ve fiziko-kimyasal özelliklerine bağlıdır [1, 2]. Afinite kromatografisi teşhis, izolasyon, ayırma ve biyomoleküllerin saflaştırılması için köklü bir yöntemdir ve son derece spesifik moleküler tanıma temeline dayanmaktadır [3, 4, 5]. Bu yöntemde, özgül tanıma yeteneğine sahip bir molekül, genelde boncuk veya zar şeklindeki bir polimerik malzeme olan uygun bir çözünmez desteğe takılır. İzole edilecek molekülün bulunduğu bir çözelti, uygun koşullar altında, içinde hedef moleküle bağlanacak ligandların immobilize edildiği kromatografik kolondan geçirilir ya da kesikli sistemde hedef molekül seçici olarak ayrılır. pH, iyonik şiddet veya sıcaklık ayarlaması yapılarak ya da özel çözeltiler veya yarışmalı ligandlar kullanılarak ligand ve hedef molekül arasındaki bağın kırılmasıyla hedef molekül yıkanmış olur ve hedef moleküller saf halde edilir [5].

Heparin kromatografisi, çözünmeyen bir desteğe, heparinin takıldığı, biyomoleküllerin özel ve tersinir bir şekilde bağlandığı, bir adsorpsiyon kromatografisi yöntemidir. Bu kromatografi yönteminin avantajı, heparin bağlayıcı proteinlerin, derişim etkisi ile uygun bir şekilde zenginleştirilebilmesidir. Bu, iki boyutlu elektroforez (2DE) veya diğer proteomik yaklaşımlarla düşük miktardaki proteinlerin veya diğer biyomoleküllerin ayrılması ve analizi için özellikle önemlidir. Heparin kromatografisi yaygın olarak prokaryotik organizma veya ökaryotik hücre özlerinden proteinlerin elde edilmesinde kullanılan bir güçlü teknolojidir [6].

Kolesterol lipofilik moleküllerden oluşur ve kandaki derişimi periferik dokular ve karaciğer arasındaki lipoproteinlerin taşıma mekanizmaları ile kontrol edilmektedir [7, 8, 9]. Plazma lipoproteinleri, fosfolipid, serbest kolesterol ve gömülü proteinlerden (örneğin, apolipoprotein) oluşan bir yüzey tabakasına sahip küresel parçacıklardır. Çekirdek esterleşmiş kolesterol ve trigliserit molekülleri ile doldurulmuştur. Yoğunluğa, lipid protein arasındaki bağıl içeriğe ve elektroforetik mobilite özelliklerine göre sınıflandırılmış olan lipoproteinlerin 3 temel sınıfı çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL), düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL)'dir [10,11,12].

Kandaki LDL-kolesterol düzeyi, doymuş yağ ve kolesterol [9] bakımından yüksek içeriğe sahip diyetlerin neden olabildiği, karaciğerdeki LDL-araclı katabolizma azaldıkça artar. Bu durum, koroner kalp hastalığına [10, 13] yol açan, sonrasında aterosklerotik lezyonların oluşabildiği, kolesterol moleküllerinin arter duvarlarında birikebilmesiyle sonuçlanır. Öte yandan, LDL kolesterol fazlalığını ortadan kaldırır, HDL-kolesterol düzeyi ise koroner kalp hastalığının meydana gelmesiyle ters orantılıdır [14, 15, 16]. Koroner kalp hastalığı ve serebrovasküler hastalıklar şeklinde görülen ateroskleroz, tüm batı ülkelerinde morbidite ve ölümlerin başlıca sebebidir.

Yüksek LDL plazma düzeyleri ve artan ateroskleroz gelişimi riski arasındaki kuvvetli ilişki açık bir şekilde lipid metabolizmasındaki genetik bir bozukluktan kaynaklanmaktadır. Ailevi hiperkolesterolemi (FH), LDL düzeyleri, tendon ksantomlar ve erken koroner ateroskleroz ile karakterize edilen otozomal baskın bir bozukluktur [17, 18, 19]. Bu anormallik LDL'ye bağlanacak hücre yüzey reseptörlerinin eksikliği ve LDL'nin bu reseptörlere hatalı bağlanması ile sonuçlanan [20] eksik bir baskın özellik olarak miras alınır.

Son yıllarda biyolojik moleküllerin saflaştırılması veya ayrıştırılması amacıyla süpermakro gözenekli kriyojeller kromatografi ortamı olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Süpermakro gözenekli kriyojeller, gözenek boyutları 5-100 µm arasında değişen birbirine bağlı gözenek ağı içermektedir. Geniş, bağlı gözenekler kriyojellere, özgün süngersi yapı özelliğini kazandırmaktadır. Süpermakro

gözenekli kriyojellerin süngersi morfolojisi onları, bilinen sert yapılı monolitlerden tamamen farklı yapmaktadır. Kriyojellerin gözenek yoğunluğu ve geniş gözeneklere sahip olması, düşük akış direnci sağladığından kan gibi yoğun ortamlar ile çalışıldığında büyük avantaj sağlamaktadır [21, 22].

Kandaki LDL-kolesterol düzeyinin yükselmesiyle, ateroskleroz gibi hastalıkların ortaya çıkması ve ölümlere neden olması, bu durumun önemini ortaya koymuş ve kandan uzaklaştırılmasına yönelik çalışmaları artırmıştır. Bu nedenle kandan LDL-kolesterol uzaklaştırılmasına yönelik çalışmalar önem taşımaktadır. Bu çalışmada, PHEMA, hidrofilik olması, kan ile iyi uyuşabilir olması, özgül olmayan protein etkileşimlerini en az seviyede göstermesi, mekanik ve kimyasal olarak kararlı olması ve mikrobiyal ve enzimatik ataklara karşı dirençli olması gibi sebeplerden dolayı temel sabit faz olarak seçilmiştir [23]. PHEMA kriyojel hazırlandıktan sonra afinite ligandı olarak seçilen düşük molekül ağırlıklı heparin yüzeye immobilize edilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarının ardından heparin immobilize PHEMA kriyojelin kandan LDL-kolesterol uzaklaştırmasındaki etkinliği incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİ

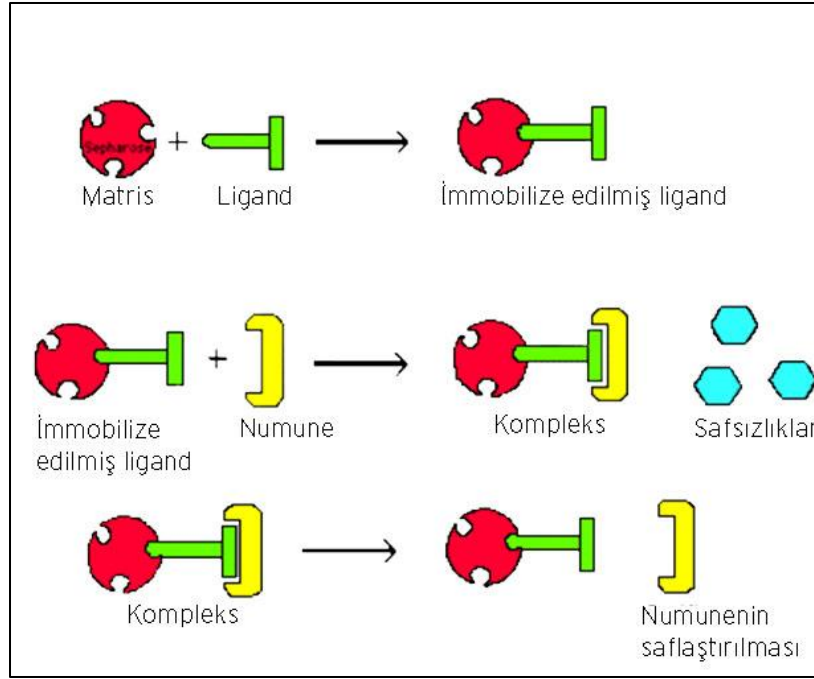
2.1. Biyoafinite Kromatografisi

Biyoafinite kromatografisi, diğer afinite tekniklerine göre, en yüksek seçicilik özelliğine sahiptir. Bu seçicilik, yüzey geometrisinin, ligandın özel düzenlenmesinin ve biyomolekülün bağlanma bölgesinin tamamlayıcı özelliğinden kaynaklanmaktadır. Tüm biyolojik işlemler, moleküller arasında özel etkileşimler sonucu gerçekleşir. Bu etkileşimler, proteinler ve düşük molekül ağırlıklı maddeler (örneğin, substratlar veya düzenleyici moleküller ve enzimler vb.) arasında gerçekleşir fakat biyospesifik etkileşimler sıkça iki veya daha fazla biyopolimer arasında ve özellikle de proteinler arasında gerçekleşir. Afinite ligandının biyomolekül ile etkileşimi, etkileşen grupların tamamlayıcılığıyla, doğru orantılı olarak artar.

Bununla birlikte, substrat analogları, yarışmalı inhibitörler, alosterik başlatıcılar ve koenzimler enzimler için en uygun biyoafinite ligandlarıdır. Afinite kromatografisinde kullanılan bu etkileşimlerle ilgili örnekler Tablo 2.1' de verilmiştir.

Tablo 2.1. Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler

Ligand	Etkileşen hedef
Antikor	Antijen, virüs, hücre
İnhibitor	Enzim (ligandlar sıklıkla substrat veya kofaktör
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, yüzey hücre reseptörü,
Nükleik asit	Nükleik asit bağlayıcı protein (enzim veya histon)
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Şeker	Lektin, enzim veya diğer şeker bağlayan proteinler



Şekil 2.1. Afinite kromatografisinin temel ilkesi

Afinite kromatografisinde dikkatle incelenmesi gereken en önemli özellik ise ligand ve hedef molekül arasındaki bağlanmanın kuvvetidir. Bu bağlanma çok zayıf olursa adsorpsiyon işlemi gerçekleşmeyecektir, aksi şekilde çok kuvvetli olursa da adsorbe edilen hedef molekül yıkama işleminde ligandan ayrılmayacaktır ve dolayısıyla yıkama işlemi verimli olmayacaktır. pH, tuz derişimi veya diğer deterjan vb. gibi aktif molekülü parçalamadan oluşan kompleksin ayrışmasını destekleyen maddelerin eklenmesi gibi uygun koşulları bulmak çok önemlidir. Afinite kromatografisinde sıklıkla karşılaşılan temel sorun uygun şartların bulunmasıdır. Ligand önemli derecede seçici olabilir fakat sadece bir gruba özgül olabilir. Bu gruptaki ligandlar glikoprotein-lectin etkileşimlerini, bazı boya-enzim etkileşimlerini ve immobilize kofaktörler ile olan etkileşimi yaparlar. Buna karşın bu özellikler pek çok ayırma işlemi probleminin çözülmesine de yardımcı olurlar. Bunlara en iyi örnek immuno globulinlere karşı olan grup seçici ligandlardır (örneğin: *staphylococcal* protein A veya *streptococcal* protein G) [24].

Afinite kromatografisinin başarılı bir şekilde uygulanmasını belirleyen ligand seçiciliği, geri kazanım, tekrar kullanılabilirlik, kararlılık, sürdürülebilirlik ve ekonomik sebepler gibi

bazı faktörler vardır. Ligand seçiciliği, belki de en önemli etkidir. Geri kazanım, yıkama işleminden sonra elde edilen saf, biyolojik olarak aktif, hedef molekülün miktarıyla ölçülür. Tekrar kullanılabilirlik, yöntemin geçerliliğini ve doğruluğunu belirlemek için bakılan bir kriterdir. Saflık derecesi ise, yöntemin etkinliğini belirler. Ligand kararlılığı ise, destek malzemenin dayanıklılığını belirler ve dolayısıyla ekonomik açıdan önemli bir etkidir [25]. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler için saflik çok önemli olmamasına karşın ilaç sanayinde kullanılan proteinler için saflik oldukça önemlidir (%99.9). Bu tür durumlarda saflaştırma basamağı, tüm giderin neredeyse %80'inini oluşturur. Maliyet, saflaştırma basamağının artmasıyla artar. Dolayısıyla en az işlem basamağında en fazla verimi ve saflığı elde etmek kromatografik ayırma yöntemlerinin hedefidir.

2.2. Afinite Etkileşimler

Biyolojik etkileşimler, hedef molekül ve ligand arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerdir. Afinite tepkimeleri, biyolojik moleküllerin özel üç boyutlu yapılarına, yüklerine ve hidrofobisite-hidrofilisite vb. özelliklerle kontrol edilirler. Bu kuvvetler, bütüncü olabilir. Afinite tepkimesi basitçe $K_d = \frac{[A][B]}{[AB]}$ denklemiyle ifade edilebilir. Burada A (örneğin) bir antikor, B bir antijen ve AB ise onların oluşturduğu kompleks olarak tanımlanabilir. Bağlanma afinitesi, ayrıca katı desteğin özelliklerine ve aktivitesine ve ayrıca katı destek ile hedef molekül arasında oluşacak katı fazın fonksiyonel olarak elde edilebilmesine de bağlıdır [26]. Bu yüzden de katı fazın kimyasal ve fiziksel özellikleri bu bağlamda önemlidir. Katı faz ve ligand arasında gerçekleşen spesifik olmayan etkileşimler değişkendir ve tahmin edilemez ve dolayısıyla yıkama profilini güçleştirir [27]. Diğer taraftan katı fazın fiziksel yapısı ligand ile hedef molekül arasındaki etkileşimi yüksek K_d değerleri elde edilse bile sterik olarak engelleyebilir. Bu problemler, uzatıcı kol kullanılarak ciddi oranda çözülmektedir. [3,28] Son olarak, belirli bir biyolojik etkileşimin K_d 'si uygun yıkama sisteminin geliştirilmesinde yüksek, hormon-reseptör (10^{-8} M), afinite monoklonal antibadi-hapten ve immobilize boya-ligand etkileşimleri için bir rehber olarak kullanılabilir [29]. Yıkama tamponu, önemli bir etkidir. Tampon kısmi bir bozulmaya [30] ve elde edilen hedef molekülün aktivitesinde düşüşe sebep olabilir. Alternatif olarak, bir avantaj gibi görünse de zayıf etkileşimler ise spesifik bağlanmada problem yaratabilir veya düşük saflaştırma faktörleriyle sonuçlanabilir.

Afinite kromatografisinde başarılı bir saflaştırma, uygun immobilize ligandın ve katı desteğin seçimine bağlıdır [31]. Afinite matris (ligandın immobilize olduğu katı destek) yüksek kimyasal ve fiziksel kararlılıkta, makro gözenekli olmalı ve aynı zamanda saflaştırma boyunca iyi akış özelliklerini korumalıdır. Hedef molekülü yüksek oranda elde edebilmek için, düşük nonspesifik etkileşimler göstermelidir. Tercih edilmelerinin sebepleri arasında düşük maliyet, kolay erişim ve kullanım kolaylığı verilebilir. Ticari olarak mevcut afinite matrisleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Matris, iyi akış özelliği gösterilebilen gözenek boyutuna ve tek tip makro gözeneklere sahip olmalıdır. Matrisin gözenek boyutu matrisin yüzey alanı ile ters orantılıdır ki bu immobilize ligandın miktarını direkt olarak etkiler; böylelikle adsorpsiyon kapasitesi de etkilenir. Gözenek boyutu, gözeneklere giremeyen proteinlerin boyut aralığı ya da moleküler ağırlığı (boyut) hariç tutma sınırı ile ilişkilidir. Büyük gözenekler, boyut dışlanışında problem yaratmaz ve büyük moleküllerin immobilize ligandlara doğru engellenemeyen girişine izin verir; ancak daha düşük kapasiteye sahip olması yüzey alanını ve ligand yoğunluğunu azaltır. Renkin'in denklemine göre [32] gözeneklerin büyüklüğü, biyomoleküllerin immobilize ligandlara kolayca erişebilmesi için biyomoleküllerin ortalama büyüklüğünden en az 5 kat daha büyük olmalıdır. Gözenek büyüklüğü, ortalama bir proteinin büyüklüğü 60 Å varsayarak, en az 300 Å veya daha fazla olmalıdır. Bazı yumuşak jel tabanlı matrisler, mekanik kararlılığı arttırmak için çapraz bağlanır, ancak bu işlem, poroziteyi (gözenek hacmini) azaltabilir, böylece bağlama kapasitesi ve bağlanan ligand miktarı azalır. Diğer önemli faktörler parçacıkların çapı ve parçacıkların boyut dağılımıdır. Teoride, küçük parçacıklar daha etkindir. Çünkü etkin afinite sağlarken, yüksek akış oranını mümkün kılarak, parçacığın içindeki ve dışındaki akış arasında daha hızlı kütleli transfere izin verirler. Bununla birlikte, daha yüksek akış direncine, parçacıkların bozulma olasılığının artmasına ve yüksek geri basınca yol açan, numunedeki bozunmuş hedef molekül ve parçacık gibi kirleticilere karşı duyarlılığının artmasına yol açar.

$$\frac{A}{\Delta x} = \frac{A_0}{\Delta x} \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \left[1 - 2,104 \left(\frac{a}{r}\right) + 2,09 \left(\frac{a}{r}\right)^3 + 0,95 \left(\frac{a}{r}\right)^5\right]$$

r : gözenek yarıçapı

a : mevcut alanda yayılan tarama (probing) molekül

$\frac{A_0}{\Delta x}$ = gözeneklerin toplam alanının ortalama uzunluğuna oranı

Afinite matrisin en önemli özelliklerinden biri; seçiciliğidir. Bu seçicilik, matrisle birleşen spesifik ligand tarafından belirlenen ilgili proteine özgü olmalıdır ve kompleks, numunede var olan diğer bütün bileşenlerden hedef molekülü ayırmalıdır. Çoğu uygulamalar, sulu çözeltilerde düşük iyonik güçte yapıldığından, matris istenmeyen iyonik etkileşime yol açan sınırlı yüke sahip ve hidrofilik olmalıdır. Ticari açıdan uygun olan çoğu matris ya doğal yapılarla ya da uygun materyallerle birleşerek bu gereklilikleri yerine getirirler. Afinite matris, işlem boyunca fiziksel ve kimyasal açıdan kararlı olmalıdır. İşlemden kullanılan çözücü, destek materyale bağlı olan ligandla etkileşime girmediği gibi, destek materyale de etkileşime girmemelidir. Destek materyal, örneklerde var olan mikroorganizmalar ve enzimler tarafından zarar görmemelidir. Ticari olarak uygun afinite matrislerin kimyasal uyumlulukları üretici tarafından sağlanır. Bu da, başarılı bir saflaştırma protokolü geliştirmek için rehber olma niteliğindedir. Matris aynı zamanda, basınç gibi, fiziksel gerilime dayanmalı ve saflaştırma işlemi sırasında bozulmadan kalmalıdır. Yüksek basınç matrisi sıkıştırabilir ve çökmeye neden olabilir.

2.2.1. Ligandların sınıflandırılması

Genelde ligandlar mono spesifik veya grup spesifik olarak sınıflandırılırlar.

2.2.1.1. Mono spesifik düşük molekül ağırlıklı ligandlar

Bu ligand grupları steroid hormonlar, vitaminler veya belirli enzim inhibitörleridir. Mono spesifik terimi, herhangi bir belirli hücre özütü veya vücut sıvısının çok küçük

miktarlarına bağlanabilen ligandlar anlamına gelir. Yüksek seçiciliğe rağmen spesifik olmayan etkileşimler meydana gelebilir. Bunun sebebi ligand veya immobilizasyon reaksiyonu veya uzatıcı koldaki kalıntılar ile etkileşimlerin sonucu olabilir. Bu problemle başa çıkabilmenin bir yolu da liganda sahip olmayan ikinci bir adsorbent meydana getirmek ve ligand içeren adsorbenti desorbe olan materyal ile özdeş koşullar altında muamele etmektir [33].

2.2.1.2. Grup spesifik düşük molekül ağırlıklı ligandlar

Bu ligand grubu ise geniş bir enzim, kofaktör ve bunların analoglarını içeren ligandlardır. Ayrıca bu grupta biyomimetik boyalar, boronik asit türevleri ve bir kısım amino asit ve vitaminlerdir. Bağlı olarak geniş özgüllüğe bağlı olarak, çözelti oluşturabilen kofaktörler veya kofaktör ve substrat kombinasyonu kullanarak üçlü kompleks oluşumlar kullanarak oldukça yüksek saflaştırma faktörleri elde edilebilir. Yüksek oranda uygun fonksiyonel gruplara sahip yüksek molekül ağırlıklı ligand tipleri (örneğin proteinler) yapıyı veya fonksiyonu aksi bir şekilde etkilemeden immobilize edilebilirler. Düşük molekül ağırlıklı ligandlarda normal (tabii) olan bir eşleşme molekülde büyük değişikliklere yol açar. Afinite etkileşimler düşerse, immobilizasyonu için gerekli uygun fonksiyonel grupları sağlamak için ligandın kimyasal modifikasyonu gerekebilir.

Kullanılan fonksiyonel grup, ligandın matristen ayrılmaması için kararlı kovalent bağların oluşmasına olanak sağlamalıdır. Bu, “tek nokta bağlantıları”nın gerçekleştiği durumlarda küçük ligandlar için kısmen önemlidir. Proteinler için, ligand ve matris için “çok noktadan bağlanma” oldukça yaygındır. Bu tür afinite adsorbentlerinde her bir bağın kararlılığı çok kritik bir durum değildir. Immobilizasyon süresince ligandın sağlam bir şekilde olması ve afinite kromatografisinin beklediği gibi yürümesi için yeterli derecede kararlı olması önemlidir. Bu durum proteinler yüksek pH’larda eşleştiğinde problem oluşturabilir. Ligand ajanı, mümkün olduğu kadar saf olmalı ve özellikle de immobilizasyonda yarışmacı olabilecek fonksiyonel gruplara sahip olmamalıdır. Proteinlere, amonyum sülfat gibi düşük molekül ağırlıklı maddelerin uzaklaştırılması için jel filtrasyon uygulanmalıdır [24].

2.2.2. Uzatici kol seçimi

Nadiren, afinite sorbenti, ligandın sterik uyumsuzluğundan dolayı zayıf bir etki gösterebilir. Bu durum yüksek molekül ağırlıklı ligandlar için pek fazla gözlenmezken düşük molekül ağırlıklı ligandlar için gözlenebilmektedir. “Uzatici kol” seçimi bu tür durumlarda çözüm olabilir. Genelde kullanılan uzatici kollar, alifatik, her bir zincirin sonunda iki fonksiyonel gruba sahip lineer hidrokarbon zincirleri olabilir. Graplardan biri (sıklıkla primer aminler, $-NH_2$) matrise eklenir, buna karşın diğeri uçtaki grup ligandın bağlanacağı bölge olarak belirlenir. Sondaki grup, terminal grup olarak da isimlendirilir, genellikle karboksil ($-COOH$) veya amino grubu, ($-NH_2$)’dur. En yaygın uzatici kollar 6-aminohekzanoic asit [$H_2N-(CH_2)_5-COOH$], hekza etilen diamin [$H_2N-(CH_2)_6-NH_2$], ve 1,7-diamino-4-azoheptan (3,3-diamino dipropilamin) bileşikleridir [34, 35]. Uzatici kolun asıl amacı; immobilize edilmiş ligand ile hedef molekül arasındaki sterik engeli ortadan kaldırmak ve etkileşimin daha iyi olmasını sağlamaktır. Dolayısıyla her duruma göre seçilen uzatici kolun uzunluğu önemli bir parametredir. Kısa uzatici kollar sterik etkiyi ortadan kaldırmazlarsa uzun olanları kullanılır fakat olanlar da özellikle hidrokarbon zincirleri hidrofobik karakterde ise spesifik olmayan etkilerin oluşmasına sebep oluşabilirler. Bu nedenle optimum uzunluk belirlenmeli ve ona göre bir uzatici kol seçilmelidir.

2.3. İmmobilizasyon teknikleri

Ligand molekülü matrise immobilize etmek için pek çok yöntem vardır ve bunlar da çeşitli ara basamaklara sahiptir [5, 36]. İmmobilizasyon işlemi 3 basamaktan oluşur;

- 1- Ligandın fonksiyonel grubuna karşı matrisin aktivasyonu,
- 2- Ligand eşleşmesi,
- 3- Etanolamin gibi düşük molekül ağırlıklı uygun maddelerin aşırı oranda kullanılmasıyla kalıntı aktif gruplarının etkisizleştirilmesi.

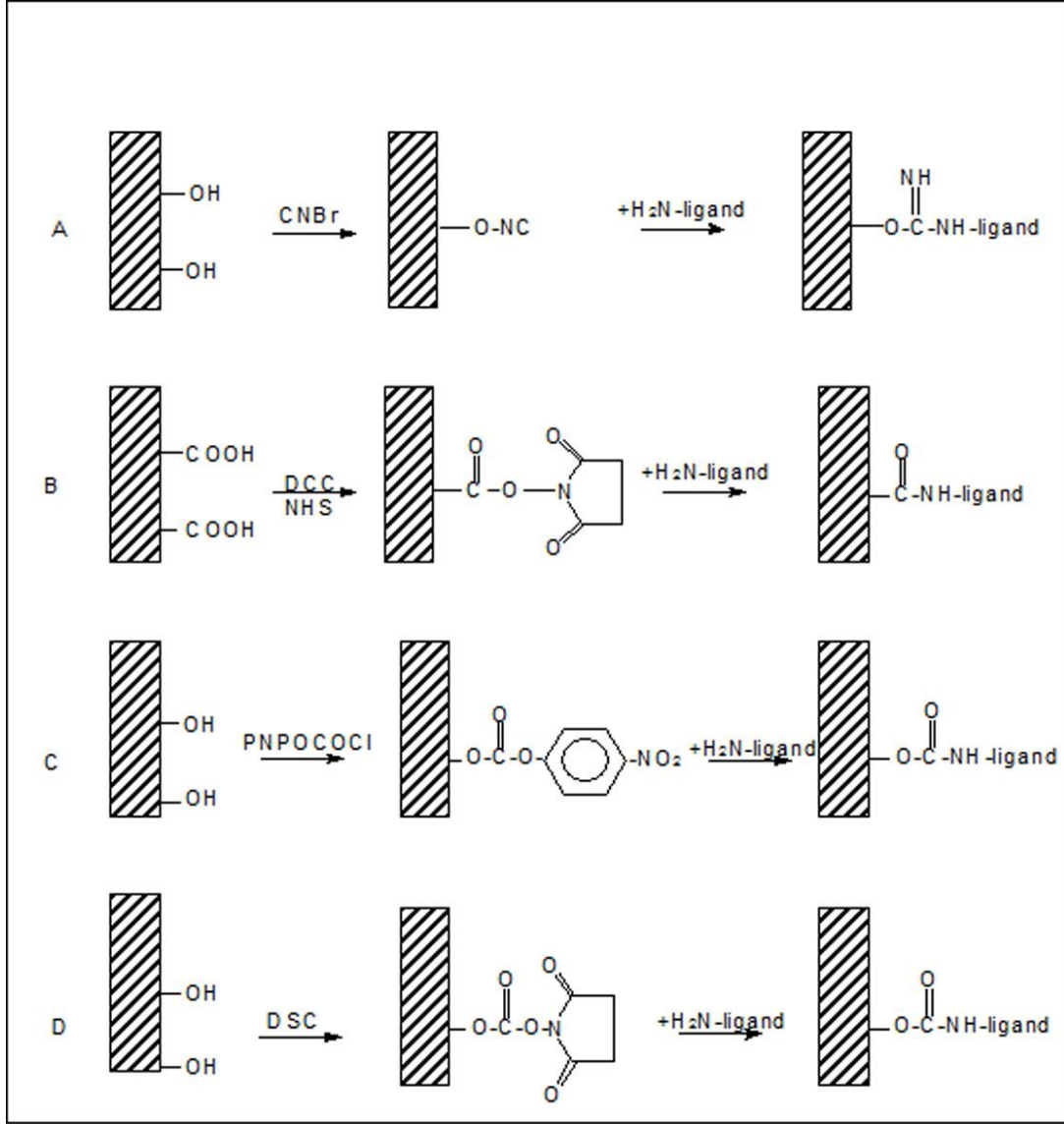
Başarılı bir immobilizasyon işlemi için 3 ana nokta verilmiştir. Doğru eşleştirme metodu ve şartlarının matris ve ligandın her ikisine de bağlı olduğuna dikkat çekmek gerekmektedir. Her şeyden önce immobilizasyon, immobilize edilen ligand ile hedef

moleküller [37] arasındaki spesifik etkileşim üzerinde çok az girişim yaptığına emin olmak için, ligand molekülüne ait en az kritik bölge (aktif bölgeden değil)'den yapılmalıdır. Aktivasyon normal olarak matris içine bir elektrofilik grubun girişinden ibarettir. Bu grup daha sonra liganda ait olan NH₂ (amino),-SH (tiyol) ve -OH (hidroksil) gibi nükleofilik gruplar ile reaksiyona girer. Bu tür bir yaklaşım daha az yaygın olmasına rağmen alternatif olarak, nükleofilik gruplar içeren bir matris, bir elektrofilik grup ihtiva eden bir ligandı immobilize etmek için kullanılabilir. Aktifleşmiş yapı bazen aktifleştirilmiş matris için yeteri kadar kararlıdır ve ligand eşleşmesi yapıldıkça kadar muhafaza edilebilir. Diğer durumlarda ise eşleşme işlemi aktivasyondan hemen sonra yapılmalıdır.

En sık kullanılan yöntem ise yüksek derecede reaktif siyanat ester oluşumuna yol açan siyanojen bromür aktivasyonudur (aktive edilmiş reçine ticari olarak temin edilebilir). Ligandların matrise sonraki eşleşmesi ise izoüre bağlantılarıdır. Bu yöntemin popülerliğine rağmen, ligand izoüre bağlantısı, izoüre bağ kararsızlığından dolayı ligandın yükü ve sızması sebebiyle, saflaştırma işlemi sırasında spesifik olmayan bağlanmayı da içeren bazı problemlere sebep olabilir.

Bu bazı durumlarda, yüksek derecede meydana gelen yer değiştirmenin spesifik olmayan adsorpsiyon lehine olabileceği unutulmamalıdır. Bir antijen molekülünün çoklu bağlanması antijen ve antikör aktif bölgesi arasındaki etkileşimlerin zayıflamasına neden olan konformasyondaki değişimlerle sonuçlanır.

Jel adsorpsiyon kapasitesi için hedef molekül ve ligand arasındaki molekül ağırlığı oranı etkileşim bire bir olduğundan birincil derecede önemlidir. İmmobilizasyon derecesi için ligand boyutu, ligand özgüllüğü ve jel porozitesi dikkate alınmalıdır. Ligand, eğer moleküler ağırlıklı bileşik ve hedef molekülün ayrılmasına olanak sağlarsa ve hedef molekül bir makro molekülse yer değiştirme derecesi oldukça düşüktür. Bu durumda, molekül ağırlıklarının oranı, ligand immobilize tekniğinin ve jel gözeneklilik derecesinin iyi seçilmiş olması koşuluyla, yüksek bir kapasite ile belirtilir.



Şekil 2.2. Farklı aktifleşmiş taşıyıcılara ligandların immobilizasyonu. A) siyanat ester, izoüre türevine dönüşen, siyanojen bromür esteriyile aktivasyon sonucu elde edilir. (B) bir amid esterini veren N-hidroksi suksinimit ester; (C) ve (D) p-nitro-fenil kloroformat veya DSC ile aktivasyon ile elde edilen p-nitro-fenil ve N-hidroksi suksinimit karbonat, karbamat türevlerinin oluşumunu ve ayrıca protein biyolojik aktivitelerinin mükemmel derecede muhafaza edilmesini sağlar [38].

İmmobilizasyon derecesi aktivasyona ve eşleşme işlemlerine bağlıdır:

- 1- Aktifleştirici ajanın miktarı
- 2- Tepkime süresi
- 3- Ortamın pH'ı
- 4- Tepkime sıcaklığı
- 5- Ligand derişimi

2.4. Heparin Afinite Kromatografisi

Heparin, oldukça fazla çeşitlilikteki biyomolekülleri bağlama yeteneğine sahip, yüksek oranda sülfatlanmış glikoz amino glikan molekülüdür. Heparin tarafından bağlanan moleküller enzimler (palamut hücre proteazları, lipoprotein lipaz, koagülasyon enzimleri süperoksid dismutaz), serin proteaz inhibitörleri (anti-trombin III, proteaz neksinler), büyüme faktörleri (fibroblast büyüme faktörü, Schwann hücre büyüme faktörü, endotelial hücre büyüme faktörü), ekstrasellüler matris proteinleri (fibronektin, vitronektin, laminin, trombospondin, kollojenler), nükleik asit-bağlama proteinleri (başlama (δ) faktörleri, uzama faktörleri, restriksiyon endonükleazlar, DNA ligaz, RNA polimeraz), hormon reseptörleri (östrojen ve androjen reseptörleri) ve lipoproteinlerdir. İmmobilize heparin, proteinlerle temel olarak iki şekilde etkileşime girer:

- i. Afinite ligandı olarak: Örneğin; heparinin, büyüme faktörleri ve anti-trombin III ile olan etkileşimi bu tiptedir.
- ii. Katyon-değişirici olarak: Örneğin; heparinin yüksek oranda anyonik sülfat gruplarına sahip olmasında dolayı, heparinin nükleik asit-bağlama proteinleri ile olan etkileşimi bu tiptedir. Bu etkileşimde heparin, polianyonik olan nükleik asitler gibi davranmaktadır.

Heparin Sepharose CL-6B, domuz intestinal mukozasından elde edilen heparinin, BrCN metodu ile çapraz-bağlı agarozla kovalent olarak bağlanması ile elde edilmiş bir

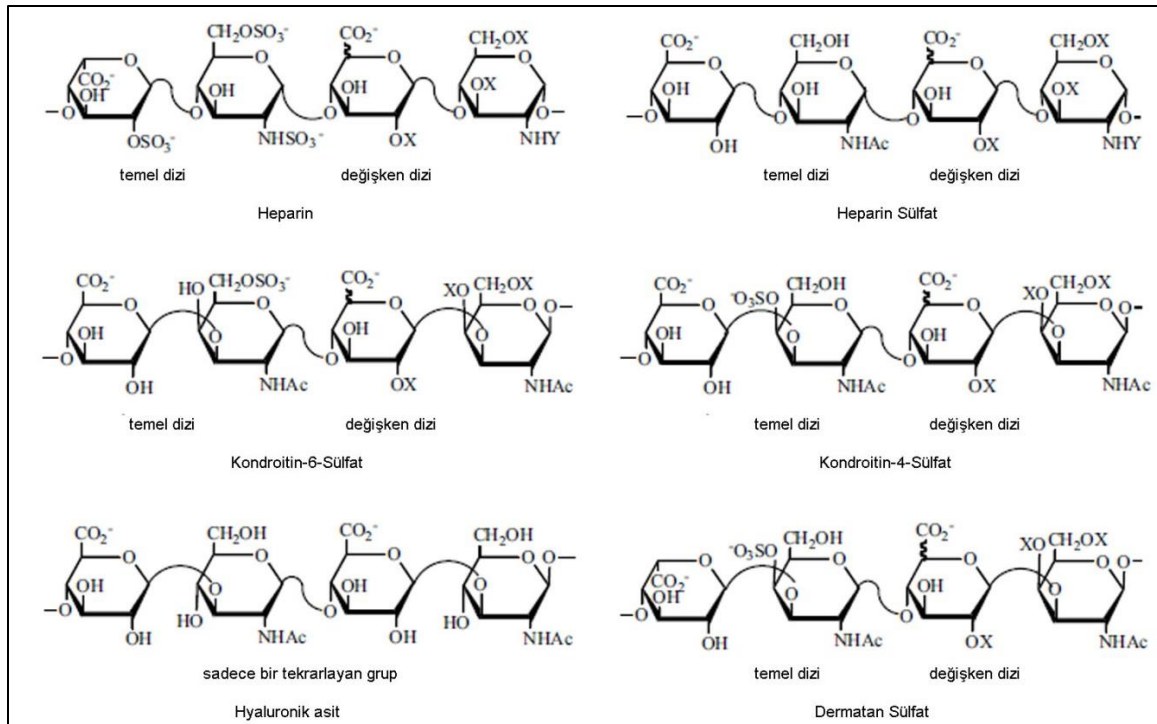
afinite kolon materyalidir. HiTrap Heparin ise heparinin, çapraz-bağlı matrise N-hidroksisüksinimid metodu kullanılarak kovalent olarak bağlanması ile elde edilmiş bir materyaldir. Ticari olarak toz halinde temin edilen Heparin Sepharose CL-6B, şişirildikten sonra kolona paketlenir ve 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,3) ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirilir. Şişirilmiş olan jel, 110–120°C, pH 7,0'de 30 dk otoklavlanabilir. Proteinlerin özgül olarak heparine bağlanması ise fizyolojik pH'da gerçekleşir. Özgül-olmayan iyonik etkileşimlerin önlenmesi için, örnek materyalinin kolona yüklenmesi esnasında kullanılan tamponun iyonik gücü en azından 150 mM olmalıdır (örneğin, 150 mM NaCl içeren 10 mM NaH₂PO₄, pH 7,3). Buna rağmen, şayet ayrıştırılmak istenen protein(ler) heparine katyon-değişimi ile bağlanıyorsa, bu durumda örnek materyalinin kolona yüklenmesi esnasında kullanılan tamponun iyonik gücünün düşük olması gerekebilir. Kolona bağlanmamış olan moleküllerin ve kirleticilerin yıkanarak uzaklaştırılmasından sonra, özgül olarak bağlanmış olan moleküllerin elüsyonu gerçekleştirilir. Şayet heparin, afinite ligandı olarak kullanılıyorsa, özgül olarak bağlanan moleküllerin elüsyonu, 1–5 mg mL⁻¹ heparin içeren başlangıç tamponu ile gerçekleştirilebilir. Şayet heparin, katyon-değiştirici olarak kullanılıyorsa elüsyon, NaCl, KCl veya (NH₄)₂SO₄ kullanılarak (maksimum 1,5–2 M) lineer veya basamaklı gradient uygulaması ile gerçekleştirilebilir.

2.5. Heparin

Heparin, mukopolisakkaritlerin bir sınıfıdır, glikozaminoglikanlar olarak adlandırılır [39]. Heparinin, alt birim yapısı glikozamine 1,4 glikozidik bağla bağlanan hekzuronic asit, D-glukuronik asit ya da L-iduronik asitten oluşan bir disakkarittir [40]. Heparinin serbest ve immobilize formların her ikisi de, biyomedikal uygulamaların çoğunda, antikoagülant olarak yaygın bir şekilde kullanılır [41, 42]. Heparinin, LDL kolesterol sistemiyle spesifik olarak etkileşebildiği iyi bilinir [43]. Heparinin kan uyumluluğu, hemoperfüzyon kolonlara doğrudan kan temasında, önemli bir avantaj olarak düşünülebilir. Bu nedenle heparin ilgili uygulamalarda cazip ligand olmuştur. Taşıyıcı sistemlerde kan uyumluluğunun sınırlanması sebebiyle, heparin immobilize afinite sorbentler, plazma ayırma sistemlerinin kombinasyonu ile uygulanmaktadır. Bu kısa bilgi, kolesterolün seçici olarak uzaklaştırılması için, heparin içeren biyoafinite sorbentlerin hazırlanmasındaki çabayı açıklar. Heparinler aslında antikoagülant aktiviteye sahip değildir [44]. Bunun yerine, antikoagülant etkilerini, antitrombine bağlanarak ve trombin

ve/veya faktör Xa'yı inhibe etmek için kapasitelerini artırarak ortaya çıkarırlar [45]. Heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparinin (LMWH) antitrombin ile etkileşimi, heparin ve LMWH zincirlerinin sırasıyla üçte biri, beşte biri üzerinde bulunan bir pentasakkarit dizisiyle sağlanmaktadır. Fondaparinuks, heparin ya da LMWH'de bulunan ve doğal olarak oluşan pentasakkaritin sentetik bir analogudur. Çoğu ticari heparin domuz bağırsak mukozasından türetilmiştir [45]. LMWH, heparinin kontrollü depolimerizasyonu sonucu daha küçük fragmanlarla sentezlenir, bu da heparinin ortalama molekül ağırlığının üçte birine denk gelmektedir [45; 46]. Hayvan doku kaynaklarından türetilmiş olduklarından dolayı, farklı uzunluk ve yapıda karbonhidrat zincirlerinin heterojen karışımından oluşurlar. Bunların aksine, Fondaparinuks tek bir yapıya sahip sentetik moleküldür [45].

Antikoagülant özelliklerin sonucu olarak, heparin, en yoğun çalışılan glikoz amino glikanlardan biridir [47]. Heparin, 2-o-sulfo-alfa-L-iduronik acid, 2-deoksi-2-sulfoamino-6-o-sulfo-alfa-D-glukoz, beta-D-glukuronik asit, 2-asetamido-2-deoksi-alfa-D-glukoz ve alfa-L-iduronik asit gibi büyük sakkarit birimleri içeren, lineer anyonik polisakkarit karışımıdır. Bu sakkarit birimlerinin yapısı ve sırası, doku kaynaklarından çıkartılmış heparinlerden çeşitlilik kazanmıştır.



Şekil 2.3. Glikozaminoglikanların yapısı (X = H or SO₃⁻; Y = Ac veya SO₃⁻).

Şekil 2.3' de diğer yaygın glikoaminoglikanların yapısı ile heparinin yapısı kıyaslanmaktadır. Heparinin yapısında, büyük ve küçük tekrar eden disakkarit birimlerinin bulunduğu görülmektedir. Heparin, ortalama 12000 D (ki bu 20 disakkarite karşılık gelmektedir) molekül ağırlığında, oldukça büyük bir polisakkarit olup, 1.2-1.4 aralığında polidispersiteye sahiptir ve molekül ağırlığı 5000-40000 D aralığında değişmektedir. Heparin geniş ölçüde venöz ve arteriyel trombozun önlenmesinde ve başlangıç tedavisinde kullanılır. Geçen 15 yıl içerisinde pek çok tayin işleminde fraksiyonlanmamış heparinden düşük molekül ağırlıklı heparine (LMWH) bir geçiş olmuştur. Heparin ailesine en son katılan üye Fondaparinux'tur ve LMWH'e göre avantajlı yönleri sahiptir. LMWH ve fondaparinux uygulamalarına rağmen bazı durumlar için daha iyi bir seçenek olabilir. Klinisyenler için heparini ne zaman ve nasıl kullanacaklarını ve ne zaman LMWH veya fondaparinux kullanmanın avantajlı olacağını bilmek önemlidir.

LMWH'nin, heparine göre bazı avantajlı yönleri vardır (Tablo 2.2). Deri altına enjekte edildikten sonra biyolojik açıdan verimlilikleri daha yüksektir, daha uzun ömürlüdür ve heparine göre daha iyi tahmin edilebilir antikoagulant cevap verir [48]. Sonuç olarak LMWH deri altına herhangi bir rutin pıhtılaşma kontrolü yapılmaksızın günde bir veya iki kez verilebilir. Bu durum LMWH'nin, genellikle damar içine infüzyon edilen heparine göre, ilaç olarak kullanımını kolaylaştırır [48]. Daha önemlisi, LMWH, tedavi ücretlerini azalttığından ve hastaları daha çok tatmin ettiği için, tedavisine hastane dışında devam edilen venöz tromboembolik hastaları için de idealdir [49].

Tablo 2.2. LMWH'nin avantajları ve sonuçları.

Avantajları	Sonuçları
Daha iyi biyo yararlanım	Deri altı tedavisi
Daha uzun yarı ömür	Bir veya iki kez günlük kullanım
Daha iyi tahmin edilebilir antikoagulant cevabı	Rutin koagülasyon takibine gerek kalmaması
Trombin faktör 4'e daha az bağlanma	Heparin bağlı trombositpenya riskinin azaltılması
Osteoblastlara daha az bağlanma	Uzun süreli tedaviler ile osteoporoz riskinin azaltılması

LMWH Avrupa'da kullanılan yeni bir antikoagulant çeşididir. Ayrıca son zamanlarda kullanımı, etkisi ve güvenliği ile ilgili çıkan raporlardan sonra Amerika'da da yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. LMWH kimyasal ve enzimatik depolarizasyon yöntemi ile heparinden elde edilir. Standart heparin 5.000'den 30.000 daltona kadar bir molekül kütesine sahipken, düşük molekül ağırlıklı heparinin molekül kütesi 1.000'den 10.000 daltona değişir. Böyle bir değişim beraberinde geleneksel heparinden daha farklı özellikleri de beraberinde getirir. Düşük molekül ağırlıklı heparin proteinlere daha az kuvvetle bağlanır, bu da biyo elverişliliği artırır, trombositlerle daha az etkileşir ve dolayısıyla daha tahmin edilebilir bir cevap oluşturur, aPPT (activated partial thromboplastin time) takibini yapmaya gerek kalmaz. Düşük molekül ağırlıklı heparin normal heparin gibi antitrombin III'e bağlanır fakat trombin standart heparine göre daha çok düşük derecelere inhibe eder ve Faktör Xa'yı da daha yüksek derecelere inhibe eder [50].

Heparinin, sistemik damar içi uygulanması, kan kaybı, nefes darlığı, boğaz tıkanması, dilin, dudağın ve yüzün şişmesi gibi ciddi yan etkilerle sonuçlanır. Ayrıca saç kaybı, hararet, bel ağrısı gibi daha hafif yan etkilerde görülebilir [47]. Yeni LMW heparinlerin

deri altı enjeksiyonları, antikoagülant terapi etkisi göstererek, ciddi venöz trombozların tedavisinde daha etkili ve daha kolay uygulanabilir. Yöntemin DVT Hastalarına uygulanması, hastanede tedavi olmaksızın, kanama ve tekrarlanan tromboembolizm riskini azaltmıştır [51]. Heparinin yüzeye immobilize edilmesi, yüzeye çeşitli özellikler kazandırır, yüzeyin kan uyumluluğunu ve biyouyumluluğunu artırır. Heparinlenmiş yüzeyler, platelet adhezyonunu ve kan hücre kayıplarını azaltır ve plazma rekalsifikasyon zamanı ve aktive edilmiş kısmi tromboplastin zamanını artırır. Bu durum trombo direnç özelliklerinde ödün vermeksizin biyouyumluluğunun geliştirmesiyle sonuçlanır [52].

Tablo 2. 3. Standart heparin ve LMWH'in biyokimyasal ve farmakolojik özellikleri

	Standart Heparin	LMWH
Ortalama molekül ağırlığı (dalton)	12000-15000	4000-6500
Ortalama sakkarit birimi	40-50	13-22
Anti-Xa/Anti IIa aktivitesi	1:1	2:1-4:1
Plazma protein bağlanmasına afinitesi	Yüksek	Düşük
Endotelyuma bağlanma	Evet	Zayıf
Doza bağlı arınım	Evet	Hayır
Düşük dozlarda etkisi	Zayıf	İyi
Platelet fonksiyonunu inhibe etme	Güçlü	Orta
Artırılmış vasküler geçirgenlik	Evet	Hayır

2.6. Kolesterol

Kalıtsal hiperkolesterolemi genetik bir bozukluktur ve genç erişkinlerde kalp, damarla ilgili ciddi komplikasyonlara yol açar [53]. Kalıtsal hiperkolesterolemi, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin, tendon ksantomların, prematüre koroner aterosklerozun seviyelerinin yükselmesiyle karakterize edilir [54,55]. Bu anormallik, LDL'ye duyarlı hücre yüzey reseptörlerinin eksiklikleri ve bu reseptörlerin LDL'ye bağlanma bozukluğu olarak sonuçlanan, tamamlanmayan baskın özellik olarak gelecek nesillere aktarılır [56]. Plazmadaki LDL seviyesinin yükselmesi, ateroskleroz riskinin artmasıyla doğrudan ilişkilidir [57]. Diyete ve ilaç tedavisine ek olarak, özellikle ilaç tedavisine direnç gösteren hastaların plazmasından LDL ve kolesterolün direk olarak uzaklaştırılması için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Plazmadan kolesterol ve LDL uzaklaştırmak için ilk yaklaşım olan plazma değişimi, belli dezavantajları olmasına rağmen kullanılmaya devam edilmektedir. Tüm plazma değişimi, çaba gerektirmesinden ve pahalı olmasından dolayı sınırlandırılmaktadır [58,59]. Kademeli ve çift tabakalı süzme plazmaforez, plazmadan kolesterol uzaklaştırılmasında, plazma değişiminden daha seçicidir. Moleküler ağırlığı 250 kd'dan daha büyük olan proteinlerin kaybı oldukça önemlidir [60]. Ayrıca yer değiştirme çözeltilerinin belirli miktarları gerekli olabilir. Bu iyileştirme metodu seçici tekniklere kıyasla kesin dezavantajlara sahiptir. Terapi çeşitleri başarısız olduktan sonra homozigot ya da ciddi heterozigot FH hastalarında LDL'nin etkili bir şekilde azaltılması için kullanılan metot vücuttan uzaklaştırmaktır [61]. Lupien afinite adsorbenti olarak heparin içeren agaroz küreler hazırlamıştır ve kolesterolün seçici olarak uzaklaştırılması klinik olarak uygulanmıştır [62]. Stoffel ve Demont hiperkolesteroleminin iyileştirilmesi için sefroz üzerine anti-apoprotein B antibody bağlı immunoadsorpsiyon sistemleri kullanmıştır [63]. Borberg tarafından klinik olarak uygulanan bu sistem, üç binden fazla başarılı iyileştirme gerçekleştirmiştir [64]. Behm, seçici olarak kolesterolün uzaklaştırılması için dekstran sülfat bağlı selüloz küreler kullanmıştır [65]. Poli akrilat kaplı fraktojel sistem ile ilgili gelecek vadede sonuçlar rapor edilmiştir [66]. Lopukhin, hiperkolesterolemik insan plazmasından kolesterol uzaklaştırılması için heparin ve sitozin sülfat içeren makrogözenekli silika adsorbentler hazırlamıştır [67]. Pokrovsky, insan plazmasından LDL'yi anti-LDL bağlı sefroz küreler kullanarak uzaklaştırmıştır [68]. Denizli ve Pişkin heparin bağlı poli(hidroksietil metakrilat) küreler kullanmıştır ve *in vitro* sistemde hiperkolesterolemik insan plazmasından etkili bir şekilde kolesterol uzaklaştırmıştır [69]. Örnek olarak

gösterilmiş afinite adsorbentlerin avantaj ve dezavantajları vardır. Hemoperfüzyon kolon etkilidir ve yaygın bir şekilde değişik uygulamalarda kullanılır. Hemoperfüzyon kolonun çeşitli dezavantajları vardır. Örneğin kolon malzemelerin sıkıştırılabilirliği, kirlenme, özellikle dolgulu yatak kolon boyunca düşük akış hızı [70]. Diğer dezavantajı plazmayı perfuse etmek için kandan plazmanın ayrılmasını gerektirmesidir [71]. Afinite membranların istenen özellikleri, yüksek gözeneklilik, yüksek kimyasal, biyolojik, mekanik kararlılık, hidrofilik, kan proteinlerinin düşük spesifik olmayan adsorpsiyonları ve türevlendirmek için işlevsel grupların varlığıdır [72].

2.6.1. Kolesterol ve Ateroskleroz

Batı ülkelerinde, damar hastalıkları arasından iskemik kalp hastalıkları dikkat çekmektedir. Ölüm oranı istatistiksel çalışmaları ve duyarlı patoloji çalışmaları, miyokardiyal damar tıkanıklığı olan hastalarının yaklaşık %80'inde her yıl akut kalp hastalığı ölümlerinin arttığını göstermektedir. Batı ülkelerinde geniş kapsamlı epidemiyolojik araştırmalar, serum kolesterol seviyeleri ve iskemik kalp hastalıklarının oranı arasında sıkı bir ilişki bulunduğunu açıklamaktadır. Kolesterolün azalmasıyla, iskemik kalp hastalıklarının önlenmesi hakkında pek çok rapor literatürde yayınlanmıştır. İskemik kalp hastalıklarının çoğu, trombüs ve iç zarda kolloidal madde oluşumu ve yağ birikimi sonucu lumen daralmasıyla karakterize edilen koroner ateroskleroza neden olmaktadır. Oldukça küçük ateromatöz lezyon, çok miktarda yağ ile dolu olan (özellikle kolesterol esterleriyle) köpük hücrelerinin birtakımını içeren yüksek kolesterol seviyelerinde genişler. Bu hücrelerin çoğu makrofajlar ve düz kas hücrelerinden meydana gelmiştir. Yağların, iç zardaki endotel hücre katmanının içine işleyen, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) serum denatürasyonu, ardından gelen makrofajlarla sağlanır. Makrofajlar alımı yapar ve denatüre olmuş LDL'yi bileşenlerine ayırıştırır ve sonra kendileri tarafından salgılanan ve dış ortamda alıcı olarak HDL'ye bağlanan Apolipoprotein (Apo E)'li kolesterolü boşaltırlar. Bu yüzden, iç zar ve makrofajdaki kolesterol birikimi, LDL ve HDL arasında sağlanan dengeye bağlıdır. İnsanlar, muhtemelen genetik sebeplerle, yüksek LDL seviyelerine sahiptirler. Yeni doğan çocuklar hariç, normal deneklerde, ortalama kolesterol seviyesi hayvan türlerinin çoğunun kolesterol seviyesiyle kıyaslandığında oldukça yüksektir. Yetişkinlerde ortalama LDL, kolesterol seviyeleri, 100-150 mg/dl aralığındadır ve bu 25-50 mg/dl aralığındaki insan bebekleriyle ve hayvanlarla kıyaslandığında oldukça

yüksektir. Makrofajlar, iç zarı işgal eder ve yağları depolamaya başlar sonra düz kas hücreleri için büyüme faktörü salgırlar. Makrofajlardan salgılanan kolesterol, düz kas hücrelerinin çoğalması için kullanılır ve aynı zamanda bu hücrelerde depolanır. Büyüme faktörleri, iç zar lezyon bölgesindeki, yapışık ya da kümelenmiş plateletlerden salgılanır. Yüksek derişimdeki LDL'nin endotel tabaka hücrelerine zarar verdiği bildirilmiştir. Bu bölümde, hiperkolesterolemiye eşlik eden aterosklerozun nasıl meydana geldiği, iskemik kalp hastalıklarının ve aterosklerotik bozuklukların tedavisi, önlenmesi açıklanmıştır [73].

2.6.2. Risk Faktörleri

Çoğu insanın ölmesi ya da sakat kalmasına neden olan ateroskleroz bir ya da birden fazla teşhis edilebilen özellik sergiler ve bu özellikler risk faktörleri olarak adlandırılır. Genel popülasyona göre, ateroskleroz hastalığı gelişen insanlarda, risk faktörleri daha sık olur. Aterosklerozlu bireylerde büyük risk faktörlerinin meydana gelme olasılıkları, %50'den %80'e değişkenlik göstermektedir. Eğer bir kişide risk faktörleri varsa, o kişide aterosklerozun klinik belirtilerinin ortaya çıkması daha muhtemeldir ve risk faktörleri olmayan insanlardan çok daha erken görülür [74]. Risk faktörleri doğrulanmış olsa bile, eğer bu hipotezler geçerliyse aterosklerozun komplikasyonlarının azaltılabileceği ümit edilebilir. Bu varsayım yine de bilimsel olarak kanıtlanmamıştır. Sakatlık ya da erken ölümden bireyi koruyan risk faktörlerinin doğrulanıp doğrulanmamasının saptanması için gelişen çeşitli ulusal çalışmalar vardır. Aterosklerozun risk faktörleri, koroner arter ve serebrovasküler hastalıklar açısından oldukça iyi tanımlanmıştır (Tablo 2.4). Hiperkolesterolemi, hipertansiyon ve sigara, prematüre koroner hastalıklar için tanımlanmış üç temel risk faktörüdür.

2.6.3. Hiperkolesterolemi

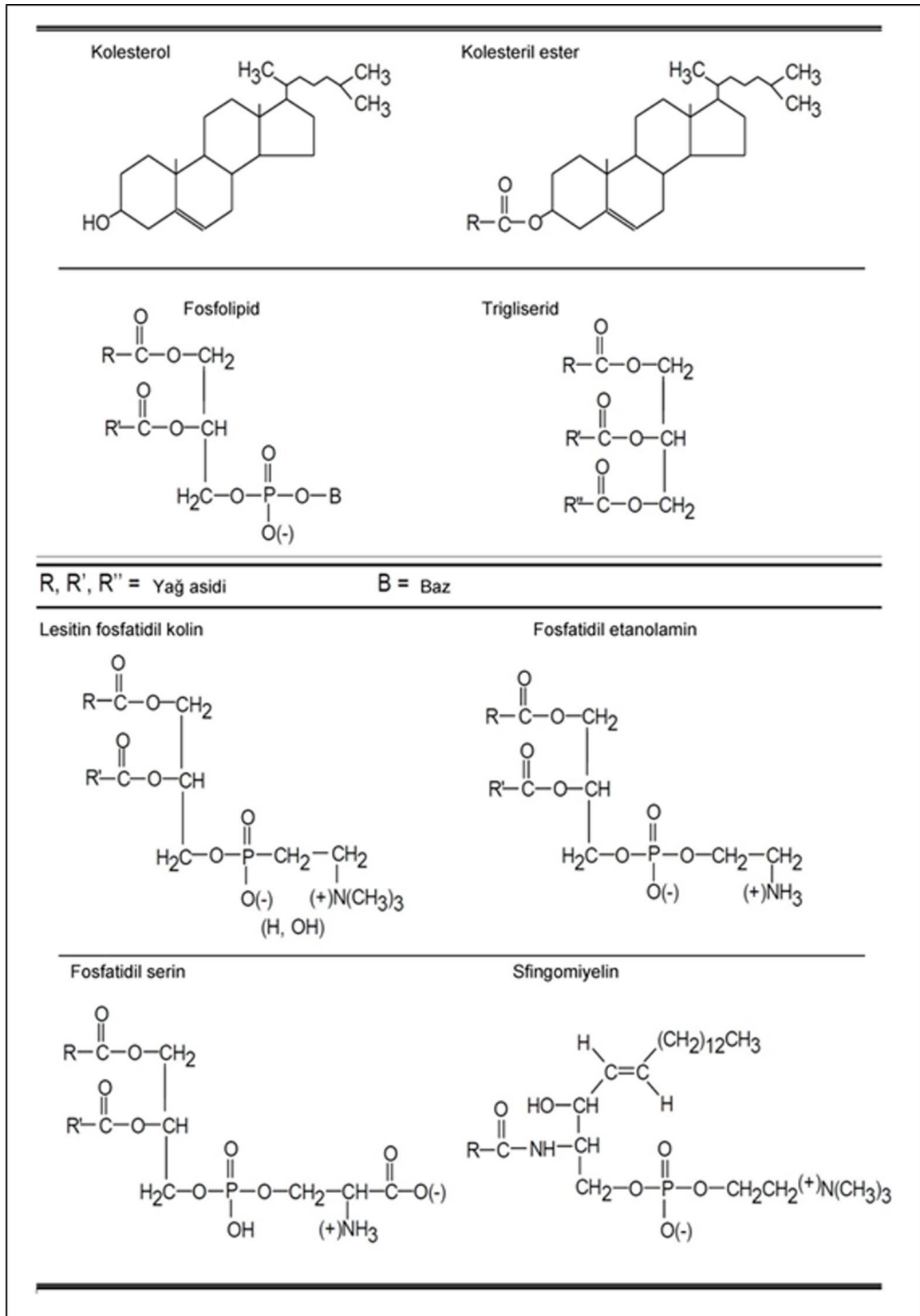
Hiperkolesterolemi, hiperlipideminin bir formudur. Hiperlipidemi, plazma kolesterol seviyelerinin yükselmesi ya trigliserit derişiminin yükselmesi ya da her ikisinin yükselmesi olarak tanımlanır. Kolesterol, lipid olarak bilinen madde sınıfları içerisinde dir. Kolesterol, kompleks halka yapısındadır ve steroid olarak bilinen maddeler içerir ya da sterol olarak serbest alkol içerir (Şekil 2.4). Yetişkinlerde, ortalama kolesterol derişimi 100 mL'de 205-225 mg aralığındadır. Bu değer, hem

esterleştirilmiş, hem de esterleştirilmemiş (serbest), toplam kolesterol derişimi içermektedir. Yaklaşık olarak serum ya da plazmadaki toplam kolesterolün üçte ikisi ester formundadır (Şekil 2.4).

Tablo 2.4. Koroner arter hastalıkların tedavi edilebilir risk faktörleri

Birincil	Yükselmiş serum kolesterolü
	Yükselmiş kan basıncı
	Sigara içmek
İkincil	Yükselmiş serum ya da plazma trigliseritleri
	Şişmanlık
	Fiziksel aktivitenin eksikliği
	Stres tip A kişilik

Kanda emülsiyon halinde taşınan kolesterol ve diğer plazma lipitlerinin suda çözülmüş halleri, plazma lipoproteinleri olarak adlandırılır. Bunlar, kolesterol, kolesterol esterleri, trigliserit ve fosfolipid içeren makromoleküllerdir (Şekil 2.4). Lipoproteinler, apoproteinler ya da apolipoproteinler olarak bilinen protein bileşenleri içerir. Bütün lipid bileşenleri suda çözünemez. Yalnız proteinle kompleks oluşturduğunda suda çözünür hale gelir. Kolesterol esterleri ve trigliseritler, suda en az çözünen lipid bileşenleriyken, fosfolipid en iyi çözünür, kolesterol orta derecede çözünür. Apoprotein ve fosfolipid bileşenleri diğer bileşenler için deterjanlar ve çözügen olarak işlev görmektedir (Şekil 2.4).

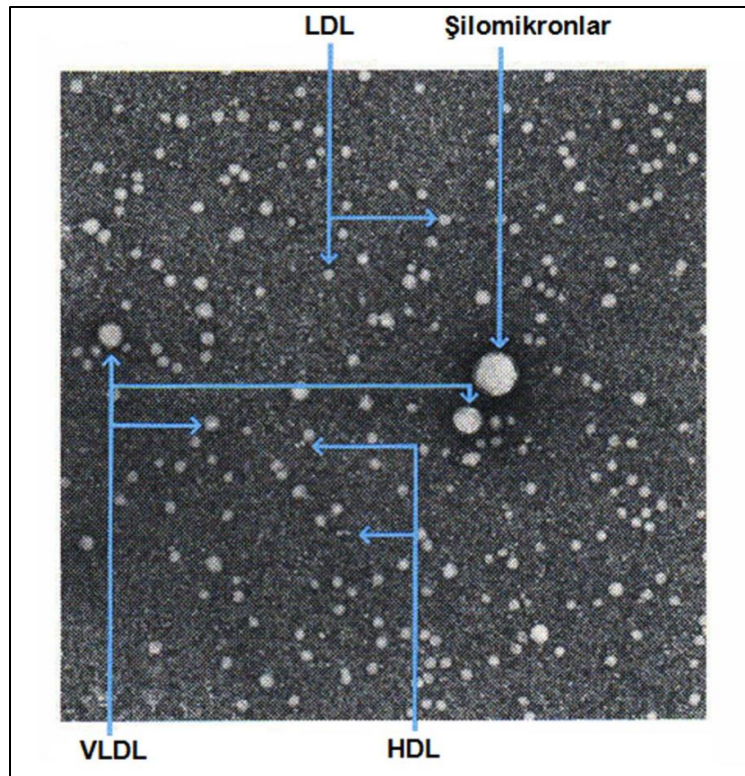


Şekil 2.4. Kolesterol, kolesterol ester, fosfolipid, trigliserit ve polar lipid moleküllerin kimyasal yapıları.

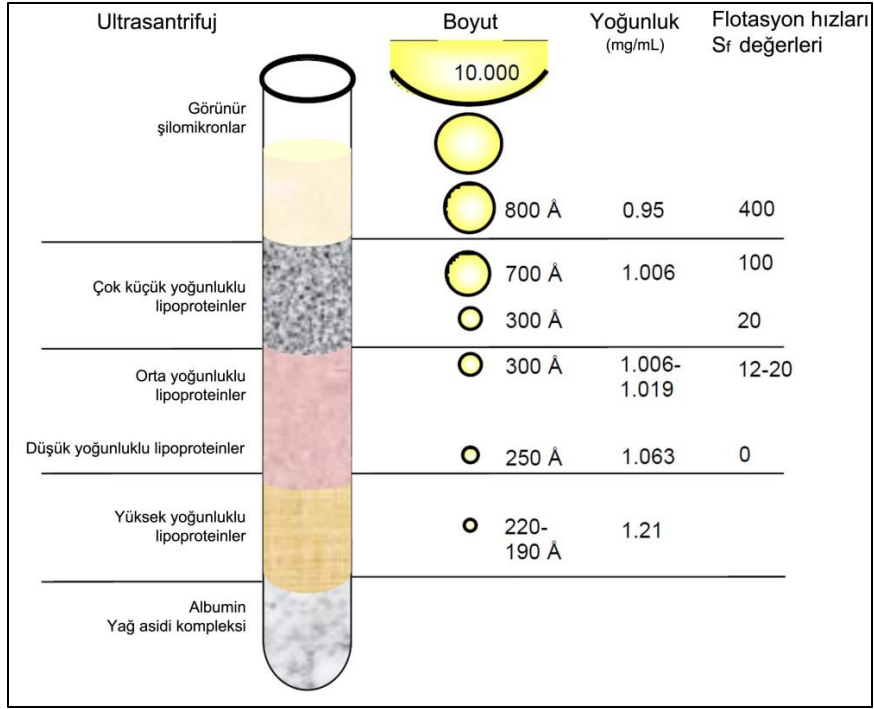
2.6.4. Hiperlipoproteinemi

Gofman ve arkadaşları, plazma lipoproteinlerin yüksek seviyeleri ve klinik ateroskleroz oranının artması arasındaki ilişkiye dikkati çeken ilker arasındadır [75]. Hiperlipidemi, başlı başına lipoprotein türlerinin temeli olarak sınıflandırıldığında, hiperlipoproteinemi olarak adlandırılır. Plazma lipoprotein grafiği temel alınan ateroskleroz indeksi bu araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Çoğu, çalışmasında analitik ultra santrifüj kullanımı üzerine yoğunlaşmışlardır. Ultra santrifüj özellikler ve elektroforetik göç, farklı türlerin (plazma lipoprotein türleri) sınıflandırılması ve ayırmaları için kullanılan başlıca yöntemlerdir. Her lipoprotein sınıfı, kararsız lipid protein bileşimine rağmen, belirli partikül özelliklerinden oluşur. Bu partiküller, elektron mikroskopuyla incelendiğinde, küre biçiminde görünür (Şekil 2.5).

Beş türü belirlenmiştir. 1-Şilomikron, 2-Çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), 3-Orta yoğunluklu lipoprotein (IDL), 4-Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), 5-Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) (Tablo 2.5).



Şekil 2.5. Lipoprotein türlerinin elektron mikroskopik görüntüsü.



Şekil 2.6. Plazma lipoproteinlerin ultra santrifüj özelliklerinin şematik gösterimi.

Tablo 2.5. Beş lipoprotein türünün özellikleri.

Lipoprotein Türü	ELEKTROFOREZ (kâğıt ya da agaroz jel)	ULTRASANTRİFÜGASYON
Şilomikronlar	Göç etmeyen	0.95 mg/mL'den daha az yoğunlukta
VLDL	ön-β-hareketliliği	Yoğunluğu 0.95-1.006 mg/mL Sf 20-400
IDL	ön-β 'dan β hareketliliğine	Yoğunluğu 1.006-1.019 mg/mL Sf 12-20
LDL	β hareketliliği	Yoğunluğu 1.019-1.063 mg/mL Sf 0-12
HDL	α hareketliliği	Yoğunluğu 1.063-1.210 mg/mL
HDL2		
HDL3		

Lipoproteinlerin boyutları, yoğunlukları, ultrasantrifüj özellikleri ve elektroforetik karakteristikleri birbirinden farklılık göstermektedir (Şekil 2.6). Lipoprotein küçükse, protein içeriği ve yoğunluğu daha büyüktür. Bu nedenle şilomikronların ultrasantrifüj hızı en yüksektir, HDL'nin ise en düşüktür. Kâğıt ve jel elektroforezinde, VLDL, beta globulinlerin ötesine göç ederken, şilomikronlar, merkezden ayrılmaz. IDL, LDL ve VLDL arasında aracı fazdır. HDL'ye, alfa globulin türünün göçmesinden dolayı, alfa lipoprotein adı verilir. Yağ içeriklerinden dolayı, lipoproteinler, diğer plazma proteinlerinden daha düşük yoğunlukludur. Bu nedenle, lipoproteinler, su üzerinde durur. 1.210 mg/mL den daha az yoğunlukta olan diğer plazma proteinleri çöker ya da batar. Flotasyon oranı, belli standart koşullar altında ölçüldüğünde, değer Sf olarak verilir.

Lipoproteinlerin her türü vücutta farklı işlevler yerine getirmektedir. Örneğin, VLDL, trigliseritleri taşıırken, şilomikronlar, besinsel bileşenleri taşır. Yaklaşık olarak, plazma kolesterolün %60'ı LDL tarafından taşınır. HDL, trigliserit taşınımı gerektiren küçük apolipoproteinler için depo görevi görür. Aynı zamanda kolesterolün esterleşmesini gerektiren apoprotein aktivatörünün plazma kaynağının çoğunu oluşturur. Bazı nedenlerle kadınların HDL seviyelerinin erkeklerden daha yüksek olma eğilimi vardır. Muhtemelen, HDL, ateroskleroz gelişimine karşı kadınları koruyan, dokulardan karaciğere kolesterolü geri taşıyan bir vasıta olarak davranıyor olabilir. Bu teori için kesin bir kanıt yoktur. Epidemiyolojik kanıtlar, HDL'nin yüksek seviyelerinin koroner arter hastalıklarından koruduğunu ileri sürmektedir.

2.6.5. LDL'nin Vücut Dışı Uzaklaştırılması

Diyet ve ilaç tedavisine ek olarak, plazmadan LDL ve kolesterol uzaklaştırılması yoluyla, yüksek LDL ve kolesterol seviyesi bozukluklarını tedavi etmek için girişimlerde bulunulmuştur. Plazmanın kısımlara ayrılması için dekstran sülfat [76] veya heparin [77] vasıtasıyla filtrasyon veya özel filtre [78] yöntemleri geliştirilmiştir.

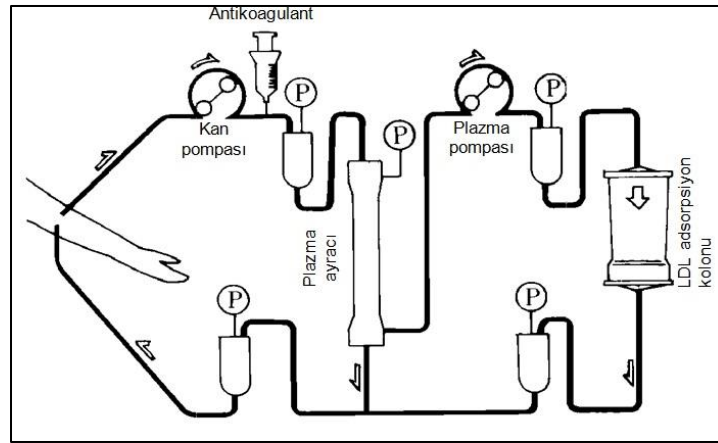
Günümüzde adsorpsiyonla LDL'nin uzaklaştırılması için iki yöntem mevcuttur:

- 1) Spesifik veya immünoadsorpsiyon [79, 80]
- 2) Polianyonik grupların, taşıyıcılar vasıtasıyla, seçici olarak bağlanması.

LDL adsorbanların birinci tipini içeren sefroz küreler, LDL apoproteine karşı koyun antikoruna bağlanmıştır. Bu adsorbanlar özellikle, sadece spesifik apoprotein taşıyan LDL ve VLDL'nin plazmadan uzaklaştırılması için çalışırlar. İmmünosorbent-kolonlar çoğu kez yeniden oluşturabilir ve tekrar kullanılabilir. Bir hasta için, iki kolon, en az altı ay veya daha uzun süreler için her 10 günde bir kullanılabilir. Yan etkiler nadirdir. Ancak bu immünosorbentin üretimi oldukça karmaşıktır ve kolonların kullanılmadan önce sterillik için kontrol edilmesi gerekmektedir. Son yıllarda araştırmacılar bu tür adsorbanlar kullanarak tedavi edilen hastaların tedavi sonuçlarını bildirmiştir [81,82]. LDL adsorpsiyonu [83] için de monoklonal antikorların üretimi ve kullanımı rapor

edilmiştir. LDL için seçici adsorbanlar, polianyonik grup olarak heparin, dekstran sülfat veya poliakrilik asite bağlı polimer taşıyıcı maddeler, (örneğin agaroz, selüloz ya da polivinilalkol küreleri) içerir [84,85]. LDL'nin polianyonik grupları ile etkileşmesiyle, LDL plazmadan seçici bir şekilde uzaklaştırılır. Adsorbanların her iki türü de klinik uygulamalar için zaten bilinmektedir. Ancak, çalışmalar, üretimi olabildiğince kolay, etkili, biyouyumlu, işlenebilir ve düşük maliyetli malzemelerin sentezi için sürdürülmektedir.

Liposorber sistemi, plazmaferez tedavisinin veya LDL aferezin bir türü olarak bu gibi durumlarda iyileştirme tedavisi olarak geliştirilmiştir. Şekil 2.7de gösterildiği gibi, bu yöntemde, kan sürekli olarak hastadan pompalanır ve hollow fiber membran plazma ayırıcı ile plazma ve kan hücresi açısından zengin kısım ayrılır. Daha sonra ayrılan plazma LDL adsorpsiyon kolonundan, yani Liposorber'den, geçirilir. Plazma LDL, seçici olarak bir hastanın plazmasından adsorbe edilir ve geriye kalan plazma kan hücresi açısından zengin kısım ile birlikte hastaya geri verilir.



Şekil 2.7. Liposorber sistem

Bu sistemin en önemli özelliği, diğer kan bileşenlerini ve yararlı HDL'nin miktarını azaltmaksızın, zararlı LDL'nin seçici olarak uzaklaştırılmasıdır. Ayrıca, ilaçların aksine, Liposorber sistemi, belirli bir kısım hasta için kolesterol seviyesini olması gereken normal seviyesinin daha da altına düşürebilir. Bu, aterosklerozun gerilemesi [86] açısından çok önemlidir.

2.7. Kriyojeller

Günümüzde, polimerik jeller, kromatografik malzemeler, molekül ve hücrelerin immobilizasyon için taşıyıcılar, elektroforez ve immunodifüzyon için matrisler ve katı kültür ortamları için jel olarak kullanımı da içeren biyoteknolojinin çok farklı alanlarında uygulamalara sahiptir. Biyolojik olarak malzemelerde karşılaşılan geniş çaplı sorunların yanı sıra, polimer jellerin kullanımıyla ilgili karşılan bazı sorunlar yeni jellerin tasarımını gerektirmektedir. Bu gereksinimler biyolojik uygulamalar için yeni jel materyallerin geliştirilmesini ve ticari piyasaya çıkmasını tetiklemektedir.

Biyoteknolojide önemli bir potansiyele sahip polimerik jellerin yeni tiplerinden birisi de 'kriyojeller' (don veya buz anlamına gelen Yunanca Kryos kelimesinden gelen) 'dir [86]. Kriyojellerin ilk olarak yaklaşık 40 yıl önce keşfedildiler ama oldukça sıra dışı özellikleri kısa süre bir önce dikkat çekmeye başladı. Bu materyallerin biyomedikal ve biyoteknolojik özellikleri şimdilerde iyi bilinmektedir [87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94]. Hatta son yıllarda kriyojellerin eşsiz gözenekli yapısının esneklik ve yüksek mekanik dayanıklılıklarıyla birleştirilmesi, hücre immobilizasyonunda kullanılmasını sağlamıştır [70].

Konvansiyonel dolgulu yatak kolonları düşük difüzyon kütle transferi ve yataklar arasında büyük hacim boşlukları gibi doğasında var olan bazı sınırlamalara sahiptir [95]. Gözenekli olmayan polimerik boncuklar [96] ve perfüzyon kromatografisi dolguları gibi yeni sabit fazlar bu sorunları çözmek için tasarlanmış olsa da, bu sınırlamalar gerçekte üstesinden gelinemez problemlerdir [97]. Son zamanlarda, kriyojel materyaller, kolay hazırlanabilmeleri, mükemmel akış özellikleri ve yüksek performansları nedeniyle biyomoleküllerin ayrılmasında kullanılan geleneksel boncuklarla karşılaştırıldığında yeni nesil durgun fazlar olarak kabul edilirler [87, 98, 99, 100, 101, 102]. Bereli ve arkadaşları, PHEMA ve anti-LDL immobilize edilmiş PHEMA kriyojeller geliştirmişler ve hiperkolesterolemik insan kan plazmasından LDL uzaklaştırılmasında seçici ve etkin sonuçlar elde etmişlerdir [103].

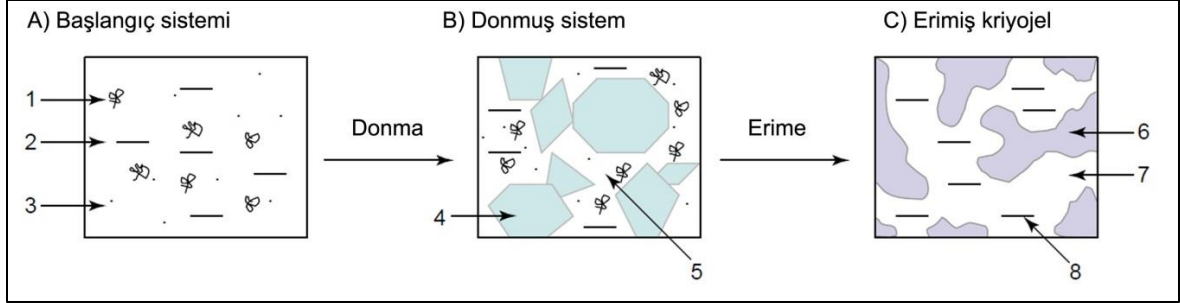
Tablo 2.6. PHEMA kriyojellerin fiziko kimyasal özellikleri [103].

Spesifik yüzey alanı	20.2 m ² /g
Gözenek boyutu çapı	10–200 µm
Gözeneklilik	67%
Şişme derecesi	8.89 g H ₂ O/g kriyojel
Geri basınç	0.28 Mpa

Gözenekli kriyojeller, biyomoleküllerin ayrılmasında birçok avantajlara sahiptir, oldukça iyi bir alternatif ayırma tekniğidir. Kriyojellerin birçok potansiyel avantajları arasında geniş gözenekleri, kısa difüzyon yolu, düşük basınç düşüşü ve adsorpsiyon ve elüsyon için çok kısa alıkonma süresi sayılabilir.

Kriyojeller, monomerik veya polimerik öncülerin olduğu orta derecede dondurulmuş çözeltilerde oluşturulan bir jel matristir. Kriyojeller tipik olarak hemen hemen her boyuttaki çözünenin engelsiz difüzyona ve aynı zamanda nano ve hatta mikropartiküllerin kütle transferine de olanak sağlayan birbirine bağlı makroporlar (ya da süper makroporlar)'dır. Kriyojellerin benzersiz yapısı, osmotik, kimyasal ve mekanik kararlılık ile birleştirildiğinde, onları, biyolojik nanopartiküller (plazmidler, virüsler, hücre organelleri) ve hatta bütün hücrelerin kromatografisi için cazip matrisler yapar. Polimerik kriyojeller biyomoleküllerin ve hücrelerin immobilizasyonu için etkili taşıyıcılardır. Kriyojeller, düşük ya da yüksek molekül ağırlıklı öncülerin kriyojenik muamelesi (dondurma, belirli bir süre için donmuş halde bekletme ve çözme) sonucu oluşurlar. Üretim, buz kristallerinin gözenek-oluşturucu malzeme (porogen) olarak görev yapması ve görünüşte dondurulmuş tepkime sistemine ait dondurulmamış mikrofaz içinde jelleşmenin ilerlemesiyle gerçekleştirilir. Şekil 2.8a'da kriyojel oluşumu gösterilmektedir. Mikrofaz içinde jelleşme tamamlandığında, tepkime sisteminin erimesi, dondurulmamış mikrofaz içinde oluşan yoğun hidrojel duvarları ile çevrelenmiş büyük gözenekler (daha önce buz kristalleri tarafından işgal edilen alan) sistemiyle

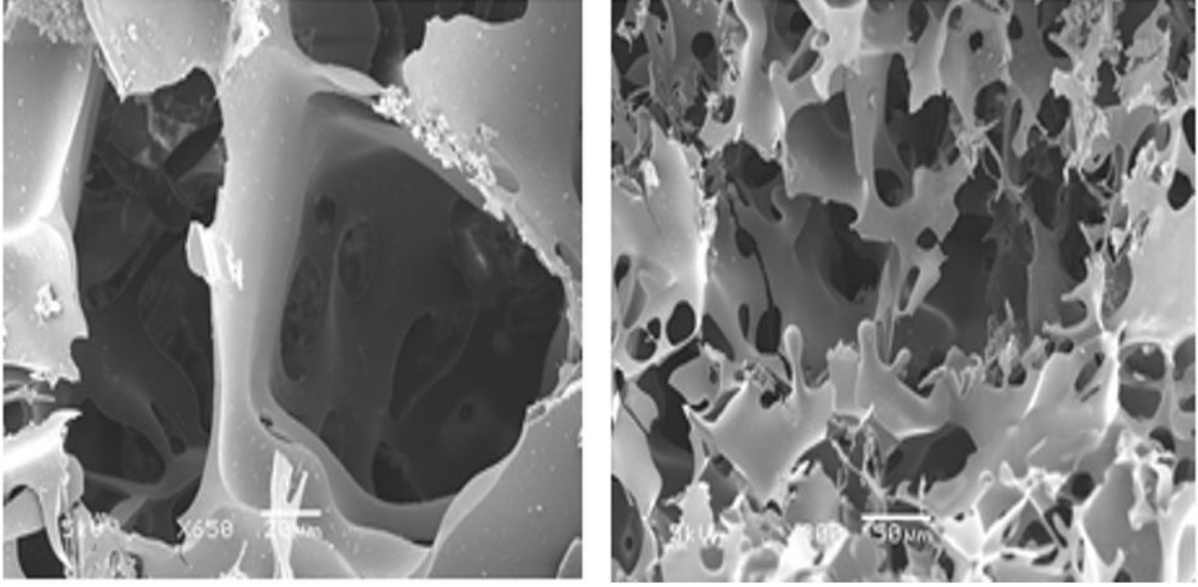
sonuçlanır. Şekil 2.8.b'de kriyojellerin farklı şekilleri görülebilir. Şekil 2.8c'de ise bazı kriyojellerin SEM fotoğrafları görülebilir.



Şekil 2.8.a. Kriyojel oluşumu. 1) Makro moleküller, 2) Çözelti, 3) Çözücü, 4) Donmuş çözücünün poli kristalleri, 5) Donmamış çözücü, 6) Kriyojel 7) Makro gözenekler, 8) Çözücü.



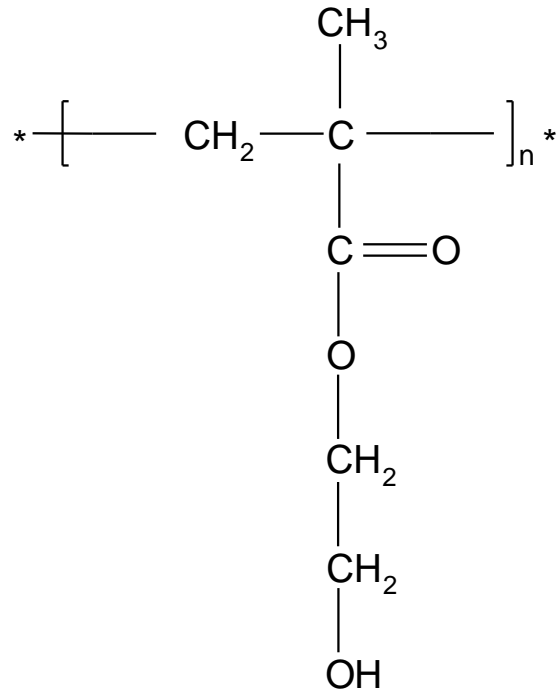
Şekil 2.8.b. Kriyojellerin farklı formları. Kriyojeller farklı formlar oluşturabilirler, boncuklar, monolitik kolonlar, diskler v.b.



Şekil 2.8.c. Kriyojellerin SEM görüntüleri [104]

2.8. Poli(hidroksietil metakrilat) (PHEMA)

PHEMA hidrofilik karakterde bir polimerdir (Şekil 2.9). Bu çalışma kapsamında PHEMA kriyojelin seçilmesindeki temel sebep, PHEMA'nın fizyolojik uyumu, mekanik dayanıklılığı, kimyasal ve biyolojik kararlılığı, minimum düzeyde özgül olmayan protein etkileşimleri göstermesi ve kan ile olan uyumluluğudur [105]. PHEMA tüm bu özellikleri ve kolay şekil alabilmesi sebebiyle kontakt lens yapımında, protezlerde ve implant cerrahisinde kullanılmaktadır [106]. Buna ilaveten, PHEMA temelli matrisler kandan proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. PHEMA'nın kan ile olan uyumu sayesinde proteinlerin doğal konformasyonunda saflaştırılması mümkün olmaktadır [107].



Şekil 2.9. PHEMA'nın yapısı

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) ve N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) Fluka (Buchs, İsviçre) firmasından, N,N'-metilen-bis(akrilamid) (MBAA), akrilamid, amonyum persulfat (APS), ve siyanojen bromür (CNBr) ise Sigma (St Louis, ABD) firmasından alınmıştır. Düşük molekül ağırlıklı heparin (LMWH) (Liquemine, 5000 IU/mL) Roche (İsviçre) firmasından satın alınmıştır. Kullanılan diğer kimyasal maddeler ise analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) iletkenliği 18 MΩ/cm'dir. Deneylerde kullanılacak cam malzemeler bir gece boyunca 4 M nitrik asitte bekletilmiş ve saf sudan geçirilmiştir.

3.2. PHEMA Kriyojelin Hazırlanması

PHEMA kriyojel monomer olarak HEMA ve çapraz bağlayıcı olarak MBAA kullanılarak ve en son monomer derişimi % 10 olacak şekilde hazırlanmıştır. Kullanılan HEMA ve MBAA miktarları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. PHEMA kriyojelin hazırlanma koşulları

	HEMA (mol)	MBAA (mol)	Monomer(mol)/çapraz bağlayıcı(mol)	Monomer derişimi (%)
PHEMA	1.07×10^{-2}	0.183×10^{-2}	6	10

PHEMA kriyojelin hazırlanmasında aşağıda verilen yöntem uygulanmıştır:

- Tablo 3.1’de verilen miktarlara göre; HEMA 10 mL saf suda, MBAA ise 5 mL saf suda buz banyosu içerisinde manyetik karıştırıcıda çözülmüştür ve iki çözelti daha sonra birbiri ile karıştırılmıştır.
- Polimerizasyonda başlatıcı olarak TEMED (25 µL) ve APS (0.02 g) çifti kullanılmıştır.
- Polimer şurubu hazırlandıktan sonra uçları kapalı ve buz içerisine yerleştirilmiş şırıngalara, her birine 3.75 mL olacak şekilde, dağıtılmıştır. Hemen ardından şırıngalar, polimerizasyonun gerçekleşmesi için -18°C’deki dondurucuya kaldırılmış ve burada 24 saat bekletilmiştir.
- 24 saat sonunda dondurucudan çıkarılan kriyojellerin oda sıcaklığına gelmeleri sağlanmıştır. Oda sıcaklığında kriyojellerin içerisinde donmuş olarak bulunan su erir ve böylece kriyojellerin yapısında birbiriyle bağlantılı gözenekler oluşur.
- Kriyojeller oda sıcaklığına getirildikten sonra yapıya girmeyen monomerlerin ortamdan uzaklaştırılması için önce etanol/su (v/v; 50/50) karışımı ile daha sonra saf su ile defalarca yıkanmıştır.
- Yapıya girmeyen monomerlerin tamamen uzaklaştırıldığından emin olmak için yıkama çözeltisinin 280 nm’de verdiği absorbans sıfır olana kadar yıkama işlemine devam edilmiştir.
- Kriyojeller kullanılmadıkları zaman +4°C’de % 0.02 sodyum azid çözeltisi içerisinde saklanmıştır.

3.3. PHEMA Kriyojelin karakterizasyonu

Tez çalışmasında kullanılan PHEMA kriyojelin karakterize edilebilmesi için şişme özellikleri, yüzey özellikleri ve yapısal özellikleri incelenmiştir.

3.3.1. Şişme özelliğinin incelenmesi

PHEMA kriyojelin şişme testleri de iyonize su kullanılarak yapılmıştır. İlk olarak kuru kriyojel dikkatli bir şekilde tartılmış ve daha sonra 50 mL de iyonize su bulunan küçük şişeler içine koyulmuştur. Şişe izotermal su banyosu içerisinde sabit sıcaklıkta (25 ± 0.5°C) 2 saat süreyle bekletilmiştir. Polimer numunesi periyodik olarak su içerisinden

alınmış ve dikkatli bir şekilde tartılmıştır. Şişmiş kriyojelin su içeriği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

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

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

3.3.2. Yüzey Alanı ve Gözeneklilik Ölçümleri

Gözenek hacimleri ve 20Å üzerindeki ortalama gözenek boyutları civa porozimetresi ile Carlo Erba model 200 (İtalya) kullanılarak 2000 kg/cm² 'ye kadar ölçülmüştür. Kriyojelin özgül yüzey alanı (Brunauer-Emmett-Teller) (BET) yöntemi ile belirlenmiştir.

3.3.3. Yüzey Morfolojisi

Kriyojelin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve optik kullanılarak ölçülmüştür. Numuneler ilk olarak 25°C'de normal atmosfer altında 7 gün boyunca kurutulmuşlardır. Kuruyan kriyojellerden alınan bir parça SEM numune haznesine koyulmuş ve 2 dakika boyunca püskürtmeli kaplama metodu uygulanmıştır. Daha sonra numune SEM içerisine yerleştirilmiştir (Model: Raster Electron Microscopy, Leitz-AMR-1000, Almanya). Sentezlenen PHEMA kriyojelin yüzey morfolojisi istenilen büyütme oranlarında incelenmiştir. Optik mikroskop fotoğrafları Olympus System Microscope (CH 40 Series, Japonya) kullanılarak elde edilmiştir.

3.4. Heparin İmmobilizasyonu

PHEMA kriyojele düşük molekül ağırlıklı heparin immobilizasyonu iki basamaktan oluşmaktadır.

1. CNBr aktivasyonu
2. Heparin immobilizasyonu

3.4.1. CNBr Aktivasyonu

PHEMA kriyojelin aktivasyonunda, aktivasyon ajanı olarak CNBr kullanılmıştır. CNBr aktivasyonunda izlenen yöntem kısaca şöyledir: Aktivasyon işlemi için, farklı derişimlerde CNBr çözeltisi hazırlanarak (5-75 mg/mL; 100 mL), çözelti pH'ı, 2M NaCO₃ ile pH 9.0-10.0 aralığında ayarlanmıştır. PHEMA kriyojel'den bu çözelti

geçirilerek aktivasyon işlemi başlatılmıştır. Aktivasyon +4°C'de 60 dakika sürdürülmüştür. Aktivasyon işlemi sonunda, tepkimeye girmeyen CNBr ve tepkime yan ürünlerinin (siyanidler) zararsız ferrosiyanatlar olarak polimerik yapıdan uzaklaştırılması için, PHEMA kriyojel önce %5 lik (w/v) FeCl₃ (50 mL) ve 1 M etanol amin (pH 8.0; 50 mL) ile, daha sonra soğuk su ve 0.1 M NaHCO₃ (100 mL) ile yıkanmıştır.

3.4.2. Heparin İmmobilizasyonu

CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojelle heparin bağlanması oda sıcaklığında 2 saat süre ile sürekli sistemde incelenmiştir. Aktive edilmiş PHEMA kriyojel farklı pH, derişim, sıcaklık ve zaman aralığında heparin çözeltileri ile tepkimeye sokularak ligand bağlanması için optimum koşulların belirlenmesi için çalışılmıştır. Aktive edilmiş PHEMA kriyojellere heparin bağlanmasının pH etkisi 4.0-8.0 aralığında değiştirilerek, derişim etkisi pH'ı 7.0 olan sulu çözeltilerde heparin derişimi 1.0-8.0 mg/mL aralığında değiştirilerek, sıcaklık etkisi 5.0-25.0°C aralığında değiştirilerek ve inkübasyon zamanı etkisi 0-90 dk aralığında incelenmiştir.

CNBr ile aktifleştirilmiş PHEMA kriyojelle tutuklanan heparin miktarı azalan heparin derişiminden toluidin mavisi ile kolorimetrik yöntemle ölçülerek bulunmuştur (Shimadzu spektrofotometre, UV-Mini 1240, UV-Vis Spectrophotometer, Japonya) [108]. Kalibrasyon eğrisi derişimi bilinen heparin çözeltisi kullanılarak çözeltideki heparin derişimiyle numunenin derişimini karşılaştırabilmek için elde edilmiştir. Aktive edilmiş PHEMA kriyojelle tutuklanan heparin miktarı aşağıdaki formül kullanılarak bulunmuştur:

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

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

3.5. Kan Uyumluluğu Testleri

3.5.1. Pıhtılaşma Zamanı (CT)

PHEMA kriyojel 0.1 M fosfat tamponu (pH: 7.4) ile 24 saat oda sıcaklığında muamele edilmiş cam filtrede 0.5 M NaCl çözeltisi ve saf su kullanılarak yıkanmıştır. Yeni alınmış donmuş insan plazması havuzundan (0.1 mL) 37°C'de 2 dakika ön ısıtmaya tabi tutulmuş ve daha sonra kriyojel ile etkileşmesi sağlanmıştır. Pıhtılaşma zamanı fibrometre metodu kullanılarak ölçölmüştür [109].

3.5.2. Aktifleştirilmif Kısmi Tromboplastin Zamanı (APTT)

PHEMA kriyojel 0.1 M fosfat tampon çözeltisinde (pH: 7.4) 24 saat oda sıcaklığında muamele edilmiş ve cam filtre üzerinde 0.5 M NaCl çözeltisi ve saf su ile yıkanmıştır. Yeni alınmış donmuş insan plazması havuzundan (0.1 mL) 37°C'de 2 dakika ön ısıtmaya tabi tutulmuştur. Kısmi tromboplastin (0.3 mL, bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) de ayrıca 37°C 'de 2 dakika ön ısıtmaya tabi tutulmuş ve ön ısıtmaya tabi tutulmuş insan plazmasına eklenmiştir. Daha sonra kriyojel ile etkileşmesi sağlanmıştır. 30 saniye sonra CaCl₂ (0.1 mL, 0.025 M) eklenmiş ve daha sonra aktif tromboplastin zamanı (APTT) fibrometre metodu kullanılarak belirlenmiştir [110].

3.5.3. Protrombin Zamanı (PT)

Protrombin zamanını (PT) ölçebilmek için tek aşamalı protrombin metodu uygulanmıştır [111]. PHEMA kriyojel 0.1 M fosfat tampon çözeltisi (pH: 7.4) ile oda sıcaklığında 24 saat muamele edilmiştir. Yeni alınmış donmuş insan plazması havuzundan (0.1 mL) 37°C'de 2 dakika ön ısıtmaya tabi tutulmuştur. Kısmi tromboplastin (0.2 mL, bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Fransa) de ayrıca 37°C 'de 2 dakika ön ısıtmaya tabi tutulmuş ve ön ısıtmaya tabi tutulmuş insan plazmasına eklenmiştir. Daha sonra kriyojel ile etkileşmesi sağlanmıştır. 30 saniye sonra CaCl₂ (0.1 mL, 0.025 M) eklenmiş ve daha sonra protrombin zamanı (APTT) fibrometre yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [112].

3.5.4. Hücre Yapışma Çalışmaları

İnsan kanı (heparinlenmiş, 500 IU/kg), poli(HEMA-Heparin) kriyojeller ile yapay ortam etkileştirilmiştir. Kan ile etkileşim sağlanmadan önce yıkama çözeltisinde daha ileri safsızlıklara (280 nm'de elde edilen absorbans ile tespit edilebilir) sebep olmaması için polimerik malzemenin 0.1 M KCl ile tampon çözeltisi içerisinde yıkanması gerektiğine dikkat edilmelidir. PHEMA kriyojel kan ile 1 saat boyunca etkileştirilmiştir. Kan numuneleri işlemin başında ve sonunda ortamdan geri çekilmiş ve mikroskop kullanılarak numunelerin platelet ve lökosit sayımı yapılmıştır.

3.6. İnsan Plazmasından LDL-Kolesterol Uzaklaştırılması

İnsan plazmasında kolesterol uzaklaştırılması için heparin immobilize PHEMA (PHEMA-heparin) kriyojel kesikli sistemde çalışılmıştır. 320.5 mg/dL ortalama LDL-kolesterol başlangıç derişimlerine sahip olan numuneler hiperkolesterolemi hastalarından elde edilmiştir. Üniversite Hastaneleri'ndeki (Hacettepe Üniversitesi, Ankara ve Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak) tarafından bağışlanan yeni donmuş plazmalar kullanılmıştır. Kan numuneleri 500 g'de 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Plazma 0.45 µm enjektör filtre (Model 245-0045 Nalge Co., Rochester, ABD) kullanılarak filtre edilmiş ve 4°C'de muhafaza edilmiştir. Bakteri üremesini engellemek için sodyum azid (0.1% w/v) eklenmiştir. 5 mL plazma hastadan taze olarak alınmış ve PHEMA-heparin ile 4 saat boyunca oda sıcaklığında etkileştirilmiştir. Değişik oranlarda heparin içeren PHEMA-heparin kriyojeller kullanılmıştır. Uzaklaştırılan LDL-kolesterol miktarı plazma numunesindeki kolesterol miktarındaki düşüşün ölçülmesiyle kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Adsorbe edilen LDL-kolesterol miktarı Eşitlik 3.2'ye göre hesaplanmaktadır.

3.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

LDL moleküllerinin heparin bağlı PHEMA kriyojellerden desorpsiyonu sürekli sistemde 0.04 M sitrik asit ve 0.02 M dibazik sodyum fosfat (pH 3.0) çözeltisi 1 saat süre ile kolondan geçirilerek yapılmıştır. Desorpsiyon ortamının hacmi 15 mL'dir. Sulu çözeltideki son durumdaki LDL derişimi önceki bölümde anlatılan metot kullanılarak yapılmıştır. Desorpsiyon oranı kriyojellere adsorplanan LDL miktarı ve desorpsiyon

oranındaki son deşim kullanılarak hesaplanmıştır. Bu işlem için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır:

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \frac{\text{Yıkama ortamına salınan LDL miktarı}}{\text{kriyojele adsorbe olan LDL miktarı}} \times 100 \quad (3.3)$$

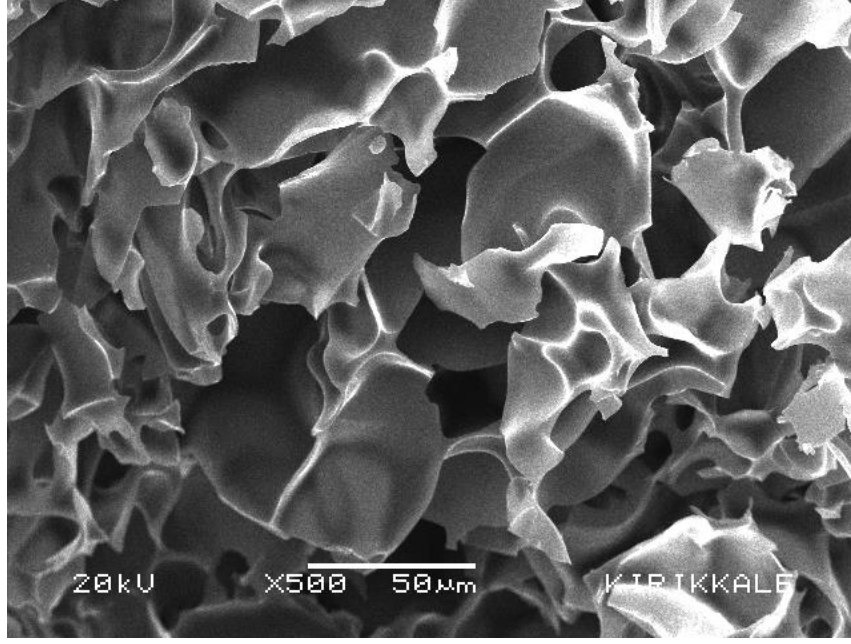
PHEMA-heparin kriyojelin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için kolesterol adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı kriyojelle 10 kez kullanılarak tekrarlanmıştır. Rejenerasyon ve sterilizasyon amacı ile PHEMA-Heparin kriyojel, desorpsiyon işleminin ardından 50mM NaOH özeltisi ve deiyonize su ile yıkanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, hiperkolesterolemik insan plazmasından LDL kolesterolünün uzaklaştırılması için düşük molekül ağırlıklı heparin immobilize edilmiş kan ile uyumlu PHEMA kriyojeller hazırlanmıştır. PHEMA fizyolojik uyumluluğu, mekanik direnci, kimyasal ve biyolojik olarak kararlılığı nedeniyle seçilmiştir. Hazırlanan PHEMA kriyojeller şişme testleri, taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve yüzey alanı ve gözeneklilik ölçümleri ile karakterize edilmiştir. PHEMA ve heparin-bağlı PHEMA kriyojellerin kan-uyumluluk testleri yapılmıştır. Daha sonra PHEMA kriyojellerin hidroksil fonksiyonel grupları farklı koşullarda CNBr ile aktive edilmiş ve düşük molekül ağırlıklı heparin, aktive edilmiş kriyojellere kovalent olarak bağlanmıştır. Hazırlanan heparin bağlı PHEMA kriyojellerin insan plazmasından LDL kolesterolünü uzaklaştırma etkinliği belirlenmiş ve son aşamada kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda rapor edilmiştir.

4.1. PHEMA Kriyojellerin Karakterizasyonu

Süpermakro gözenekli PHEMA kriyojeller HEMA ve MBAAm'nin APS/TEMED varlığında donmuş ortamda kopolimerizasyonu ile hazırlanmıştır. Kriyojelin gözenek yapısını gösteren SEM görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi PHEMA kriyojeller gözeneksiz ve ince polimer duvarlarına ve hareketli fazın akışına olanak sağlayan geniş ve sürekli birbiriyle bağlantılı gözenek ağına (10 -100 µm çapında) sahiptir. Matrisin gözenek boyutu protein moleküllerine göre oldukça büyüktür ve kolaylıkla geçmelerine olanak verir. Hareketli fazın gözeneklerden konvektif akışının bir sonucu olarak kütle transfer direnci ihmal edilebilir düzeydedir. PHEMA kriyojelin denge şişme değeri 8.52 g H₂O/g kriyojel, gözeneklilik oranı ise %74.6' dır.



Şekil 4.1. PHEMA kriyojellerin SEM görüntüleri.

PHEMA kriyojel opak, süngerimsi ve elastik bir yapıya sahiptir. Gözeneklerde bulunan su kriyojel elle sıkıştırıldığında kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedir. Sıkıştırılmış bir parça kriyojel tekrar suya atıldığında şişmekte ve orijinal boyutunu ve yapısını 1, 2 saniye içerisinde tekrar kazanmaktadır.

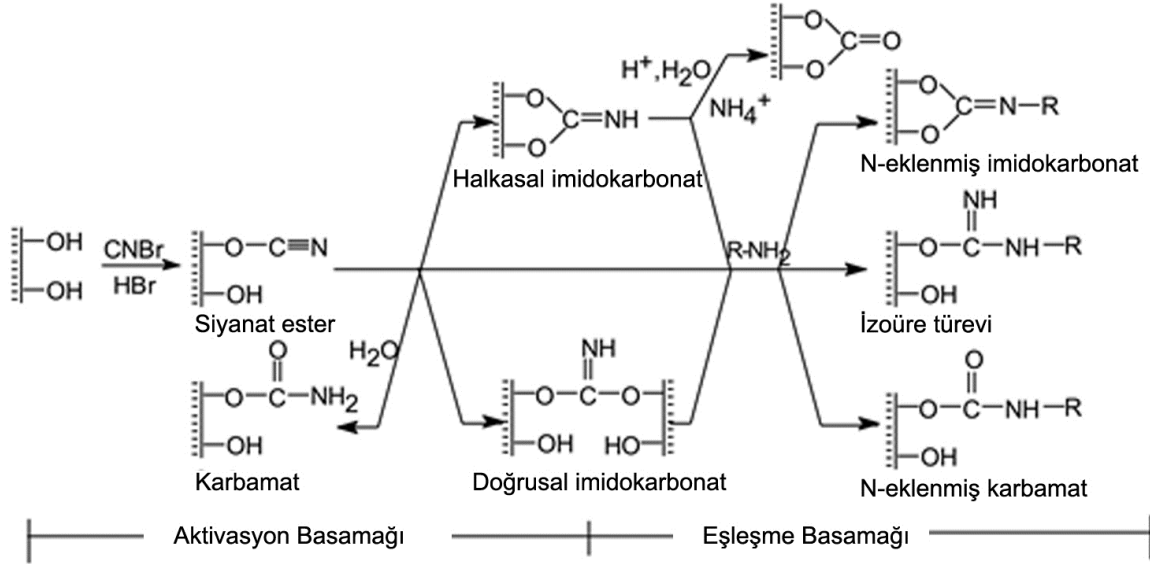
PHEMA kriyojelin spesifik yüzey alanı çok noktalı BET yöntemi ile ortalama $25 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Gözenek boyutu (BJH cihazı ile) belirlenmiştir. Gözeneklerin çapı $20 - 245 \text{ \AA}$ aralığında değişmektedir ve ortalama çap 78.2 \AA 'dür. Bu da PHEMA kriyojellerdeki makro gözeneklerin varlığını onaylamaktadır ve bu gözenek çapı kan gibi viskozitesi yüksek sıvıların kolondan akışı için uygundur.

4.2. PHEMA Kriyojellere Heparin İmmobilizasyonu

Hiperkolesterolemik insan plazmasından LDL-kolesterolünün seçimli olarak uzaklaştırılması için biyoafinite ligandı olarak düşük molekül ağırlıklı heparin kullanılmıştır. PHEMA kriyojellere heparinin kovalent olarak bağlanması için optimum koşulları belirlemek üzere gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları aşağıda rapor edilmiştir.

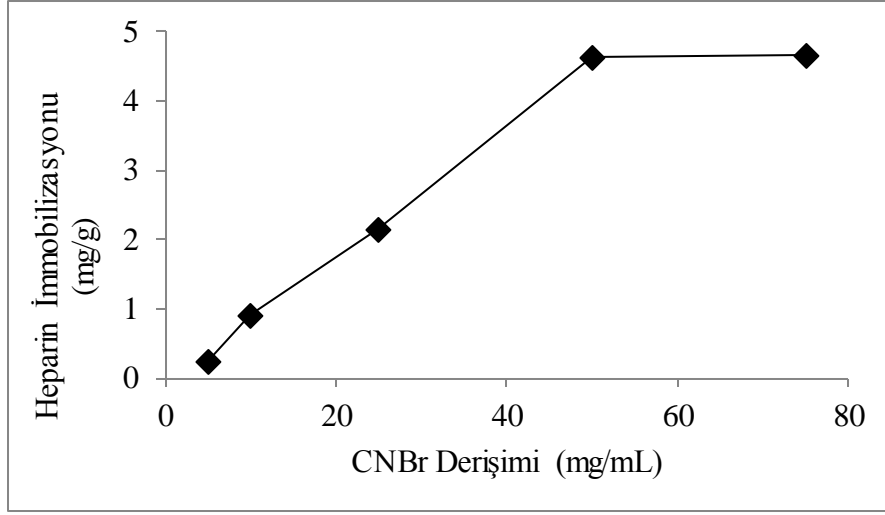
4.2.1. CNBr derişiminin etkisi

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



Şekil 4.2. Hidroksil gruplarının CNBr aktivasyon mekanizması.

En uygun aktivasyon ajanı derişiminin belirlenmesi için aktivasyon ortamındaki CNBr derişimi 5-75 mg/mL arasında değiştirilmiştir. Daha sonra farklı aktivasyon derecelerine sahip PHEMA kriyojeller pH 7.0 fosfat tamponunda heparinin sulu çözeltileri ile (1.0 mg/mL) etkileştirilmiştir. Şekil 4.3' te görüldüğü gibi kriyojellere bağlanan heparin miktarı CNBr derişiminin artması ile artmakta ve 50 mg/mL değerinden itibaren sabit kalmaktadır. Yüksek aktivasyon ajanı derişimi taşıyıcı üzerinde daha fazla sayıda aktif bölgenin oluşmasını sağlamaktadır. Dolayısıyla bağlanan heparin miktarının CNBr derişimi ile artması beklenen bir durumdur. Ancak taşıyıcı matris üzerindeki aktif grup sayısı ve ligand molekülün boyutuna bağlı olarak değişen bir doyum kapasitesi her zaman mevcuttur. Bununla birlikte, taşıyıcıya bağlanan ligandların performansını etkileyen en önemli faktör ligandın bağlandıktan sonraki serbestliğidir. Yüze çok yoğun bir şekilde immobilize edilmesi durumunda heparin moleküllerinin etkin bağlama bölgelerinin ulaşılabilirliği kısıtlanmış olacaktır. Buna göre optimum CNBr derişimi 50 mg/mL olarak belirlenmiş ve sonraki aşamalarda heparin bağlanması bu aktivasyon ajanı derişiminde çalışılmıştır.

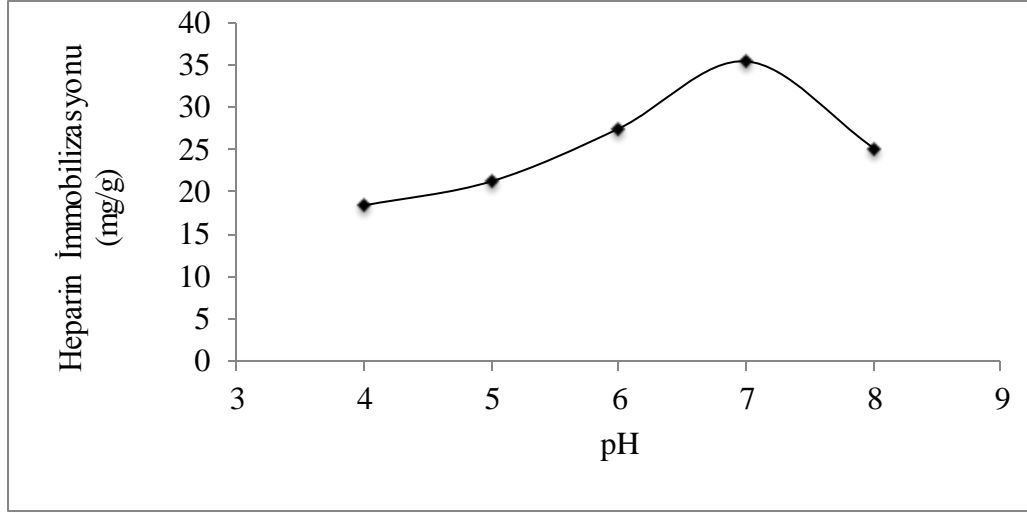


Şekil 4.3. CNBr derişiminin heparin bağlanmasına etkisi.

(T: 25°C, pH=7, fosfat tamponu)

4.2.2. pH'nın etkisi

CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojellere heparin bağlanması pH 4-8 arasında incelenmiştir. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi en yüksek heparin bağlanması pH 7'de gözlenmiştir. Bu pH'da heparin immobilizasyonu miktarı 35 mg/g 'dır.



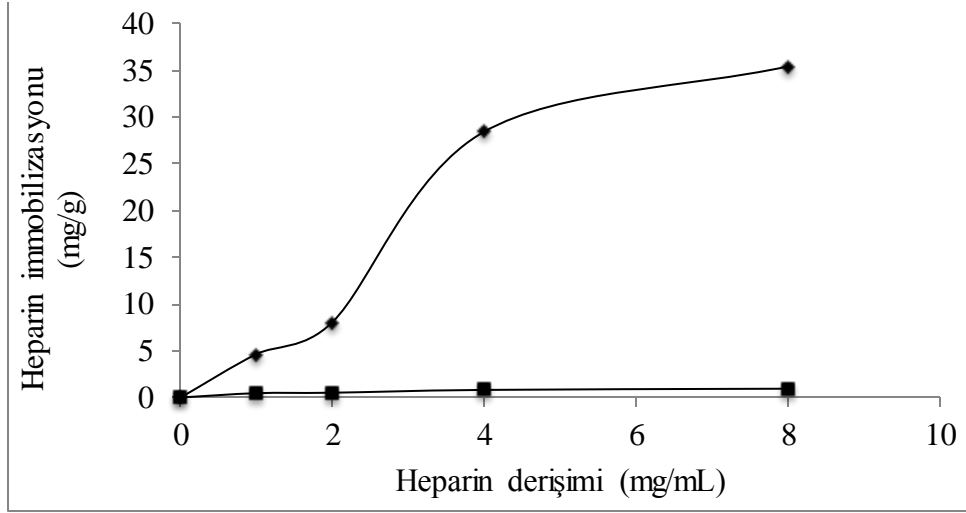
Şekil 4.4. pH'nın heparin bağlanmasına etkisi.

(T: 25°C, C_{heparin}=4 mg/mL, t_{immobilizasyon}=2 saat)

İzoüre türevlerinin pK değerleri yaklaşık 9.5'tir ve dolayısıyla nötral pH'ta pozitif yüklüdür. Dolayısıyla negatif yüklü heparin molekülleri ile etkileşmek için uygun pH değeridir.

4.2.3. Heparin başlangıç derişiminin etkisi

CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojellere heparin immobilizasyonu pH'sı 7.0 olan sulu çözeltilerde heparin derişimi 1-8 mg/mL arasında değiştirilerek incelenmiştir. Şekil 4.5'te heparin derişiminin bağlanmaya etkisi ve aktive edilmemiş PHEMA kriyojeller üzerine özgün olmayan heparin bağlanması verilmiştir.



Şekil 4.5. Heparin derişiminin heparin bağlanmasına etkisi.

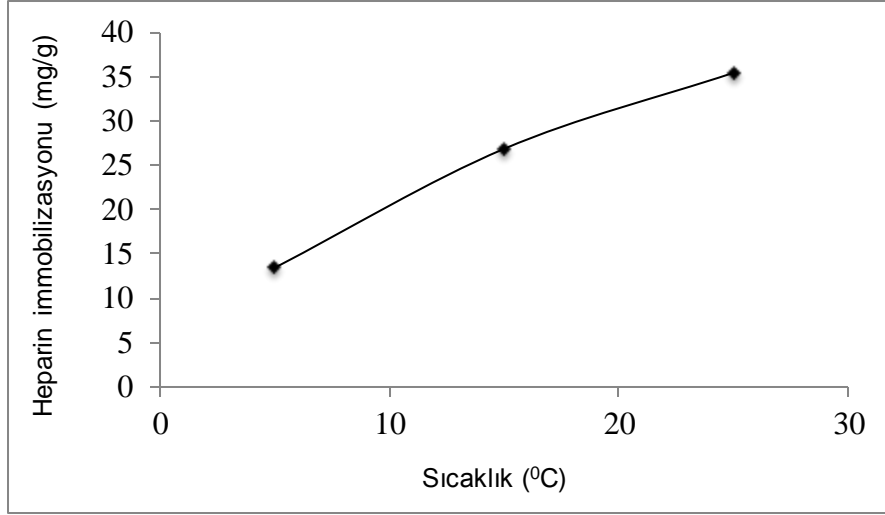
(T: 25°C, pH=7, fosfat tamponu, immobilizasyon=2 saat)

Şekilde görüldüğü gibi aynı aktivasyon derecesine sahip PHEMA kriyojellere heparin bağlanması inkübasyon ortamındaki heparin derişiminin artması ile artış göstermektedir. 4.0 mg/mL heparin derişiminin üzerinde ise bu artış daha az belirgindir.

İstenmeyen yan etkileri göz önüne alındığında ligand sızması biyomedikal uygulamalarda önemli bir problemdir. PHEMA kriyojellerden heparin sızıntısı, sodyum hidroksit ile pH'sı 7.4'e ayarlanmış 150 mM sodyum klorür, 3 mM monobazik sodyum fosfat, 7 mM dibazik potasyum fosfat ve %0.01 sodyum azid içeren tuz çözeltilerinde belirlenmiştir ve yapıdan herhangi bir heparin sızıntısı gözlenmemiştir.

4.2.4. Sıcaklığın etkisi

CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojellere heparin bağlanması 5-25°C sıcaklıkları arasında incelenmiştir. Şekil 4.6' de görüldüğü gibi heparin bağlanması sıcaklık arttıkça artmaktadır. Bu da heparin bağlanmasının hidrofobik olduğunu göstermektedir.



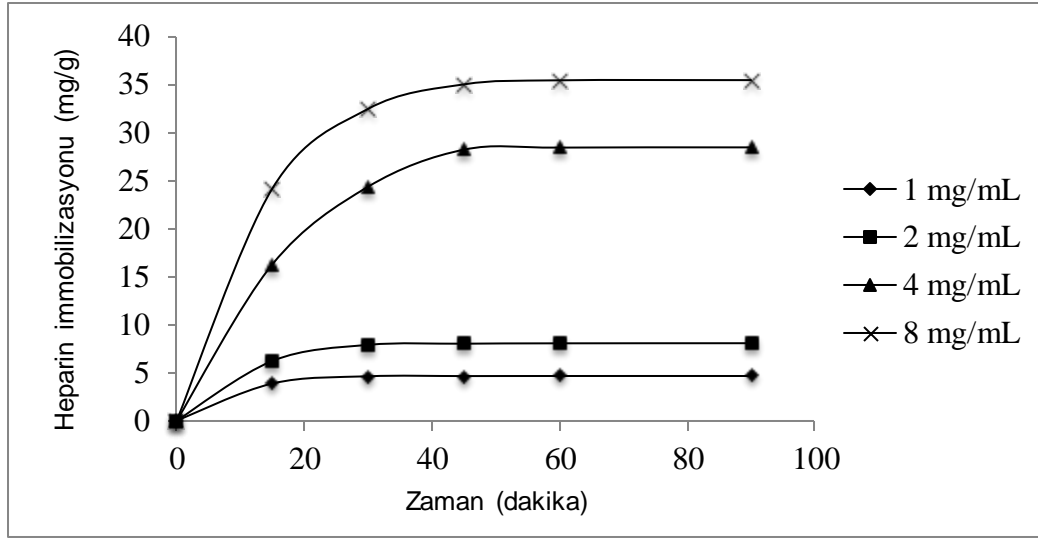
Şekil 4.6. Heparin bağlanmasına sıcaklığın etkisi.

(pH=7, fosfat tamponu, immobilizasyon=2 saat)

Şekilden de görüldüğü gibi sıcaklığın artması ile birlikte heparin adsorpsiyon kapasitesi artmış ve en yüksek heparin adsorpsiyonu 25°C' de gözlemlenmiştir.

4.2.5. İnkübasyon süresinin etkisi

Heparin moleküllerinin CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojellere bağlanması ilk dakikalarda oldukça hızlı gerçekleşmiş ve 45 dakika içerisinde dengeye ulaşılmıştır (Şekil 4.7). Şekilden de görüldüğü gibi, ortama eklenen heparin derişiminin artmasına bağlı olarak, immobilize olan heparin miktarı da artmıştır. Bunun nedeni adsorpsiyon ortamındaki heparin derişimi ile (sıvı faz) kriyojel üzerindeki (katı faz) derişimi arasındaki farkın kütle transferi için itici güç olmasıdır.



Şekil 4.7. PHEMA kriyojellere heparin bağlanmasına inkübasyon süresinin etkisi.

(T: 25°C, pH=7, fosfat tamponu)

4 mg/mL değerinin üzerindeki heparin derişimlerinde, immobilize olan heparin miktarındaki artış daha az belirgindir. Bu durum PHEMA kriyojel yüzeyinde heparin moleküllerinin yerleşeceği aktif grup kalmadığının ve dolayısıyla sterik engellemelerinin başladığının bir göstergesidir.

4.3. Kan Uyumluluğu Çalışmaları

Biyomalzeme, tıbbi cihazlarda kullanılan ve istenen bir zaman aralığında istenen bir uygulama yöntemi için canlı sistemle temas halinde kullanılmak üzere tasarlanan malzemedir [113]. Tüm biyomalzemeler tıbbi uygulamalarda kullanılmadan önce, bazı

kriterleri karşılamak zorundadırlar. İstenilen son kullanım amacına bağlı olarak, biyomalzeme, kan uyuşabilirliği, doku uyuşabilirliği, kanserojenlik, sitotoksisite, mutajenisite, biyodegradasyon ve mekanik kararlılık gibi bazı testlere tabi tutulmalıdır [111].

Biyomalzeme kan ile temas ettiğinde, yüzeye ilk önce küçük moleküller gelir (su ve iyonlar gibi). Bu olayı plazma proteinlerinin adsorpsiyonu takip eder. Biyomalzeme yüzeyine ilk adsorplanan protein molekülünün miktarı ve türü ardından gelecek olan pıhtılaşma basamaklarını (intrinsik yol üzerinden) ve komplement aktivasyonunu (intrinsik ve ekstrinsik yol üzerinden) belirler [114]. Bu nedenle bir biyomalzemenin kan uyuşabilirliğini belirlemek için yapılması gereken öncelikli işlemler pıhtılaşma zamanları ve hücre yapışması testleridir.

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

Tablo 4.1. Pıhtılaşma zamanları*.

Malzeme	Test		
	APTT (saniye)	PT (saniye)	CT (saniye)
Kontrol Plazma	71.0	40.2	278
PHEMA	67.8	34.9	270
PHEMA-Heparin	69.7	36.8	274

* Her bir sonuç 3 paralel çalışmanın ortalamasıdır.

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

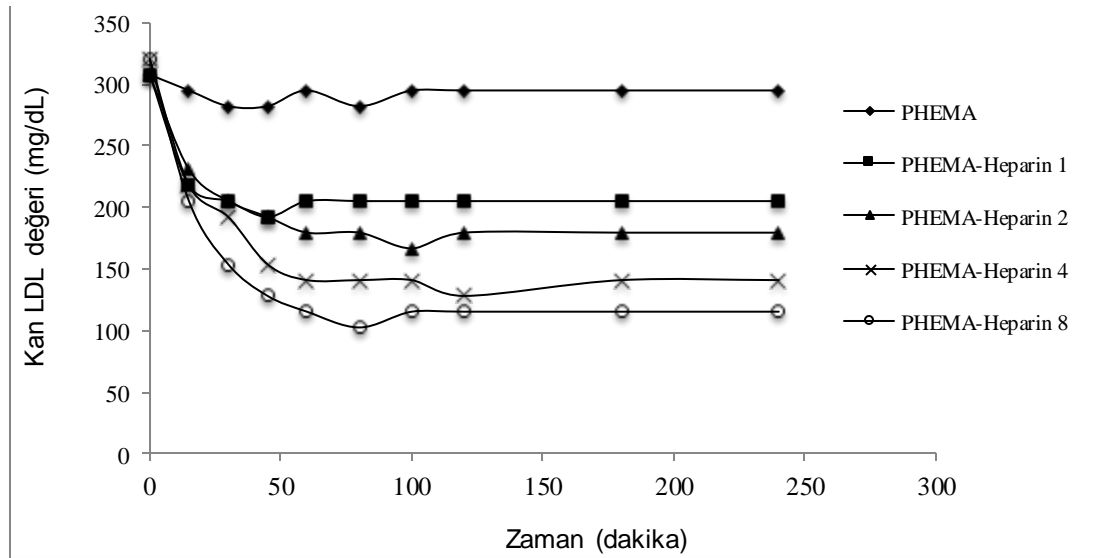
Tablo 4.2. in-vitro kan deneylerinde elde edilen hematolojik parametreleri özetlemektedir. Heparin bağlı PHEMA kriyojeller kullanılarak elde edilen platelet kaybı % 2.95, lökosit kaybı 4.91'dir. Bu sonuçlara göre kriyojeller üzerine belirgin bir hücre yapışmasının olmadığı söylenebilir.

Tablo 4.2. Kriyojellere platelet ve lökosit yapışması.

	Platelet ($\times 10^{-3}/\text{mm}^3$)		Lökosit ($\times 10^{-3}/\text{mm}^3$)	
	Başlangıç/Son	Kayıp (%)	Başlangıç/Son	Kayıp (%)
Malzeme	440/420			
PHEMA	440/420	4.54	6.1/5.6	8.19
PHEMA-Heparin	440/427	2.95	6.1/5.8	4.91

4.4. Hiperkolesterolemik İnsan Plazmasından LDL Kolesterolünün Uzaklaştırılması

Bu çalışmada LDL-kolesterol derişimi 320.5 mg/dL olan bir hiperkolesterolemik hastadan elde edilen taze plazma kullanılmıştır. Farklı miktarlarda heparin içeren PHEMA kriyojeller alınan kan örnekleriyle 4 saat boyunca oda sıcaklığında etkileştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.8' de verilmiştir.

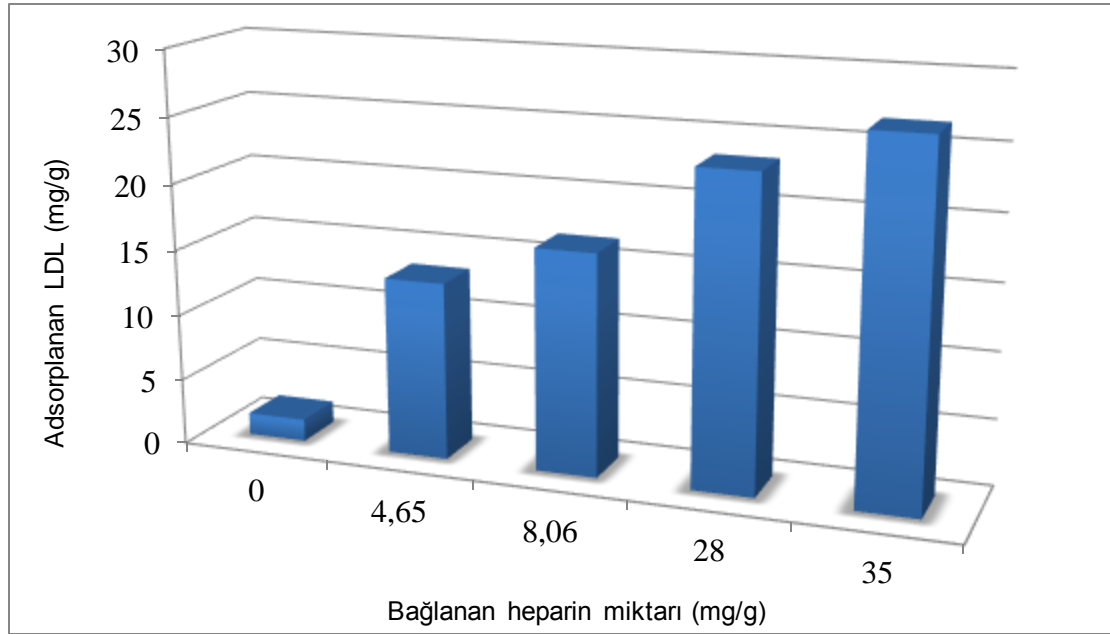


Şekil 4.8. Hiperkolesterolemik insan plazmasından kolesterol uzaklaştırma etkinliği.

(T: 25°C, , tadsorpsiyon=4 saat, C_{LDL-kolesterol}=320.5 mg/dL, C_{heparin}=4 mg/mL)

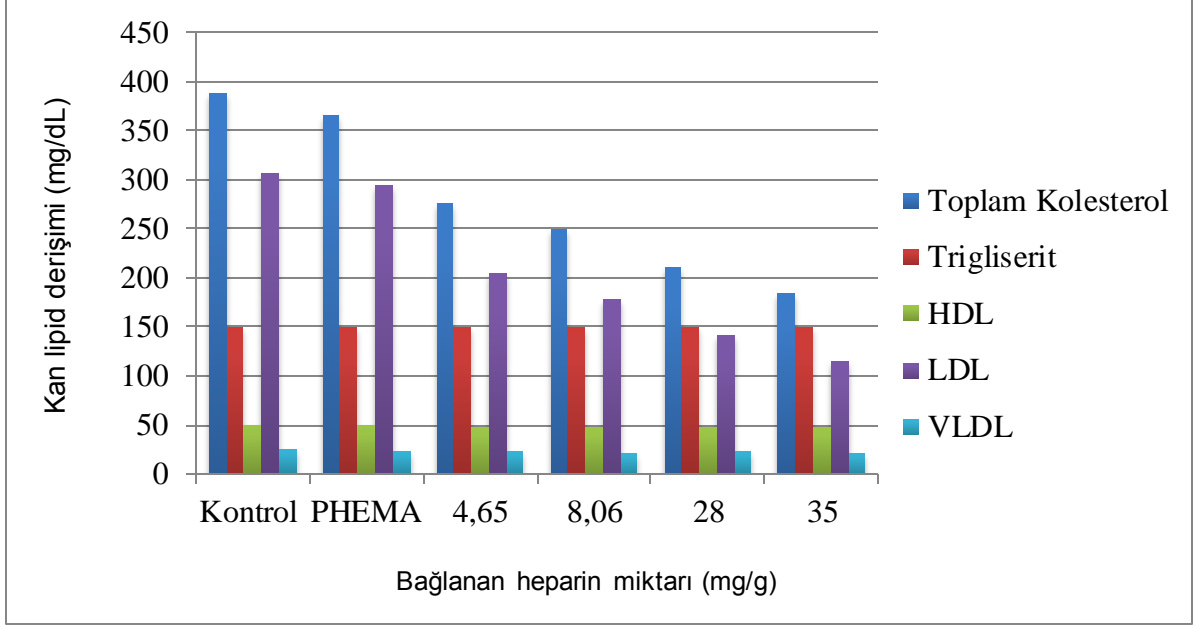
Şekilde etkileşim süresince plazmadaki LDL kolesterol derişimindeki değişim gözlenmektedir. 4 saatlik etkileşim süresi sonrasında PHEMA kriyojellerin yüzeyine yaklaşık olarak 1.67 mg spesifik olmayan LDL adsorpsiyonu gerçekleşmiştir. Öte yandan, plazmadaki toplam kolesterol düzeyi heparin bağlı PHEMA kriyojeller kullanıldığında önemli oranda düşmüştür. LDL adsorpsiyonu oldukça hızlı gerçekleşmekte ve ilk bir saatin sonunda heparin bağlı PHEMA kriyojeller uzaklaştırma etkinliklerini büyük oranda ortaya koymaktadırlar. 4 saat sonunda ise plazmadaki toplam LDL kolesterolü sınır değer olan 200 mg/dL değerine ve altına indirilebilmektedir.

PHEMA kriyojellere bağlanan heparin miktarının artması ile plazmadan uzaklaştırılan LDL kolesterol miktarı artmaktadır. Şekil 4.9'da görüleceği gibi PHEMA kriyojellere bağlanan heparin miktarı 4.65 mg/g değerinden 35 mg/g değerine yükseldiğinde LDL uzaklaştırma etkinliği sırası ile %33'den %64'e yükselmektedir. Elde edilen değerler literatürle karşılaştırıldığında oldukça umut verici değerlerdir [115, 116].



Şekil 4.9. Bağlanan heparin miktarının LDL kolesterol adsorpsiyonuna etkisi.

Bu çalışmada, özellikle koruyucu HDL gibi diğer lipoproteinlere düşük afinite gösteren fakat LDL kolesterolüne seçici ilgisi olan ve etkin bir malzemenin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Hazırlanan kriyojellere HDL ve diğer lipoproteinlerin ve trigliseritlerin adsorpsiyonu çalışılmış ve sonuçlar Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Diğer lipoproteinlerin ve trigliseritlerin kriyojellere adsorpsiyonu.

Bu şekilden de görüleceği gibi heparin bağlı PHEMA kriyojellere daha az miktarlarda HDL, VLDL ve trigliserit adsorpsiyonu gerçekleşmiş ve tüm kandan seçici ve tatmin edici miktarda LDL adsorpsiyonu gözlenmiştir.

4.5. Literatür Karşılaştırması

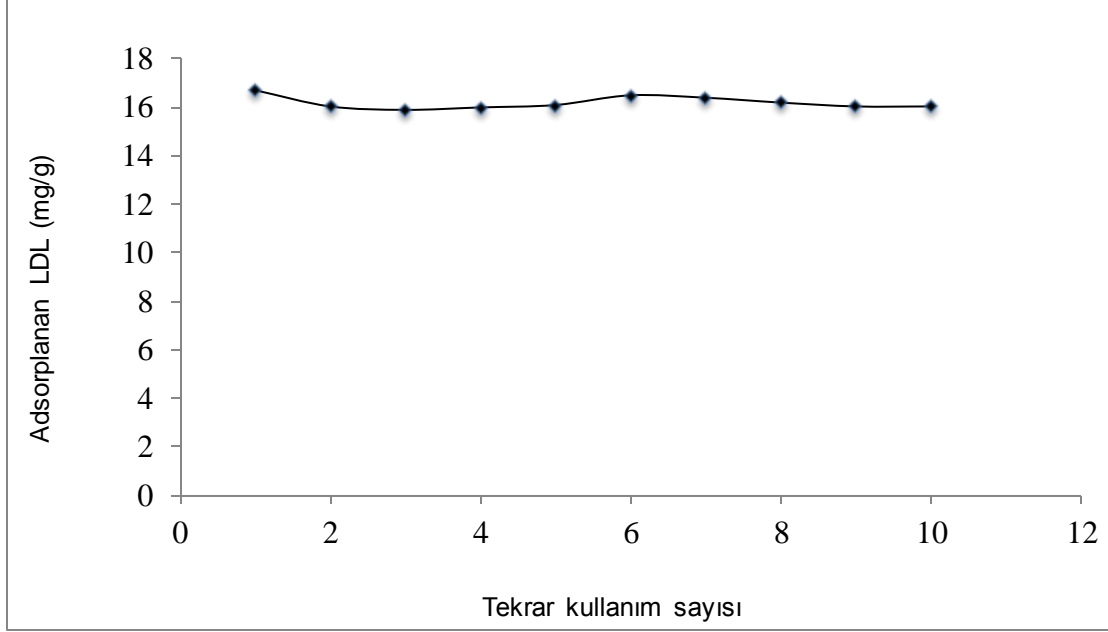
Şu ana kadar yapılan çalışmalarda farklı afinite adsorbentleri ile farklı adsorpsiyon kapasitelerine ulaşılmış ve bunlar literatürde rapor edilmiştir. Tabak ve ark. heparin immobilize edilmiş agaroz boncuklar kullanmış ve sağlıklı insan plazmasından 1.2-3.0 mg/g aralığında kolesterol adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır [117]. Ostlund ticari agaroz boncuklara tutturulmuş anti-LDL antibadi kullanarak insan plazmasından 6-8 mg/mL LDL kolesterol uzaklaştırmışlardır [118]. Smolik ve ark. dekstran sülfat immobilize edilmiş selüloz afinite boncuklar kullanarak tam kandan seçici LDL

adsorpsiyonu çalışmışlardır. Oldukça iyi bir seçicilik elde etmişler ve 5-10 mg/mL jel miktarında LDL kolesterol adsorpsiyon kapasitesi rapor etmişlerdir [119]. Schmidt yüzeyi muamele edilmiş poliakrilat matris kullanmış ve gram polimer başına 8-10 mg LDL-kolesterol sonucunu elde etmişlerdir [120]. Lopukhin ve ark. taşıyıcı matris olarak makro gözenekli silika boncuklar kullanmışlar ve fonksiyonel ligand olarak heparin ve kitosan sülfat kullanmış ve 14.8-15.2 mg/g civarında kolesterol adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır [115]. Pokrovsky ve ark. polimerik taşıyıcı olarak ticari Sepharose ve fonksiyonel ligand olarak monoklonal ve poliklonal antibadiler kullanmışlardır [116]. Elde ettikleri maksimum LDL bağlanma kapasitesi 0.6-2.5 mg LDL/mL adsorbent aralığındadır. Sinitsyn ve ark. heparin taşıyan Sepharose boncuklar kullanmış ve 12 mg kolesterol/gram polimer maksimum adsorpsiyon kapasitesi elde etmişlerdir [121]. Denizli ve Pişkin hiperkolesterolemik insan plazmasından kolesterol uzaklaştırılması çalışmışlar ve düşük molekül ağırlıklı heparin immobilize edilmiş poli(HEMA) mikroküreler kullanarak 4.7 mg kolesterol/g maksimum adsorpsiyon kapasitesi elde etmişlerdir. [69]. Denizli poli(HEMA-MAPA) membranlar kullanarak 13.3-16.0 mg kolesterol/g maksimum adsorpsiyon kapasitesi rapor etmiştir [122]. Yavuz ve Denizli PHEMA mikrokürelere gelişigüzel ve Protein A üzerinden yönlendirilerek immobilize edilmiş anti-LDL antibadilerle hiperkolesterolemik insan plazmasından sırasıyla 3.67 ve 4.52 mg/g LDL adsorpsiyon kapasitesi rapor etmişlerdir [123]. Bu çalışmada heparin immobilize edilmiş PHEMA kriyojeller kullanarak literatürle karşılaştırılabilir düzeyde LDL-kolesterol adsorpsiyon kapasitesi elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında ise 11 mg/g LDL-kolesterol uzaklaştırılmıştır.

4.6. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

LDL moleküllerinin heparin bağlı PHEMA kriyojellerden desorpsiyonu sürekli sistemde 0.04 M sitrik asit ve 0.02 M dibazik sodyum fosfat (pH 3.0) çözeltisi 1 saat süre ile kolondan geçirilerek yapılmıştır. Adsorplanan LDL kolesterolünün yaklaşık %96'sı desorplanmıştır. Ligand moleküllerin PHEMA katı desteğe kovalent olarak bağlandığının bir göstergesi olarak bu basamakta heparin sızıntısı gözlenmemiştir. Dolayısıyla bu deneyde desorpsiyon ajanının sadece heparin ile LDL molekülleri arasındaki tersinir bağları kopardığı söylenebilir. Desorpsiyon ajanı olarak sitrik asit kullanıldığında, heparin molekülleri 3 boyutlu yapılarını değiştirmektedir ve etkileşim kuvvetleri azaldığından LDL molekülleriyle yaptığı bağın kırılmasıyla LDL moleküllerini salmaktadır. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı kriyojeller ile 10 kez tekrarlanmıştır.

Kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesinde gözle görülür bir düşüş gözlenmemiştir (Şekil 4.11). Desorpsiyon verilerine göre sitrik asidin uygun bir desorpsiyon ajanı olduğu ve bu çalışmada kullanılan heparin bağlı PHEMA kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğine olanak sağladığı söylenebilir.



Şekil 4.11. Heparin bağlı PHEMA kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği.

(T: 25°C, $t_{\text{desorpsiyon}}=1$ saat, $C_{\text{LDL-kolesterol}}=320.5$ mg/dL, $C_{\text{heparin}}=4$ mg/mL)

5. SONUÇLAR

- ✓ PHEMA kriyojeller, hareketli fazın akışına olanak sağlayan, geniş ve kesintisiz olarak bir biriyle bağlantılı bir gözenek ağına sahiptir.
- ✓ Fizyolojik uyumluluğu, mekanik direnci, kimyasal ve biyolojik kararlılığı nedeniyle taşıyıcı matris olarak PHEMA seçilmiştir.
- ✓ PHEMA kriyojellerin denge şişme değeri 8.52 g H₂O/g kriyojel olarak bulunmuştur.
- ✓ PHEMA kriyojellerine sahip olduğu gözeneklilik oranı %74.6' dır.
- ✓ PHEMA kriyojellerin spesifik yüzey alanı BET yöntemi ile ortalama 25 m²/g olarak bulunmuştur.
- ✓ Gözeneklerin çapı 20-245 Å aralığında değişmektedir ve ortalama çap 78.2 Å' dur. Bu değerler kan gibi viskozitesi yüksek sıvıların kolondan akışı için uygundur.
- ✓ Hiperkolesterolemik insan plazmasından LDL kolesterolünün seçimli olarak uzaklaştırılması için biyoafinite ligandı olarak düşük molekül ağırlıklı heparin kullanılmıştır. PHEMA kriyojellere heparinin kovalent olarak bağlanması için gerekli optimum koşulların belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.
- ✓ Aktivasyon için gerekli optimum CNBr derişimi 50 mg/mL olarak belirlenmiş ve sonraki aşamalarda bu derişimde çalışılmıştır.
- ✓ PHEMA kriyojellere bağlanan heparin en yüksek miktarı pH=7' de gözlenmiştir.
- ✓ PHEMA kriyojellere heparin bağlanması, inkübasyon ortamındaki heparin derişiminin artması ile artış göstermektedir. 4 mg/mL heparin derişiminin üzerinde ise bu artış daha az belirgindir.
- ✓ Heparin bağlanması sıcaklık arttıkça artmaktadır. Bu da heparin bağlanmasının hidrofobik olduğunu göstermektedir.
- ✓ Heparin moleküllerinin CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojellere bağlanması ilk dakikalarda oldukça hızlı gerçekleşmiş ve 45 dakika içerisinde dengeye ulaşılmıştır.
- ✓ PHEMA ve heparin bağlı PHEMA kriyojellerin pıhtılaşma süreleri kontrol plazma ile karşılaştırıldığında düşük değerlere sahiptir. Ancak bu azalma vücut tarafından tolere edilebilir orandadır. Bu nedenle heparin bağlı PHEMA kriyojellerin kan uyumluluğunun oldukça iyi olduğu sonucuna varılmıştır.

- ✓ Heparin bağlı PHEMA kriyojeller kullanılarak elde edilen platelet kaybı % 2.95, lökosit kaybı % 4.91'dir. Bu sonuçlara göre kriyojeller üzerine belirgin bir hücre yapışmasının olmadığı söylenebilir.
- ✓ 4 Saatlik etkileşim süresi sonrasında PHEMA kriyojellerin yüzeyine yaklaşık olarak 1.67 mg spesifik olmayan LDL adsorpsiyonu gerçekleşmiştir. Plazmadaki toplam kolesterol düzeyi heparin bağlı PHEMA kriyojeller kullanıldığında önemli oranda düşmüştür. LDL Adsorpsiyonu oldukça hızlı gerçekleşmekte ve ilk bir saatin sonunda heparin bağlı PHEMA kriyojeller uzaklaştırma etkinliklerini büyük oranda ortaya koymaktadırlar. 4 saat sonunda ise plazmadaki toplam LDL kolesterolü sınır değer olan 200 mg/dl değerine ulaşmakta ve bu değerin altına indirilebilmektedir.
- ✓ PHEMA kriyojellere bağlanan heparin miktarının artması ile plazmadan uzaklaştırılan LDL kolesterol miktarı artmaktadır. PHEMA kriyojellere bağlanan heparin miktarı 4.65 mg/g değerinden 35 mg/g değerine yükseldiğinde LDL uzaklaştırma etkinliği sırası ile yüzde 33 den yüzde 64'ee yükselmektedir. Elde edilen değerler literatürle karşılaştırıldığında oldukça umut vericidir.
- ✓ Koruyucu HDL gibi diğer lipoproteinlere düşük afinite gösteren fakat LDL kolesterolüne seçici ilgisi olan etkin bir malzemenin geliştirilmesi amaçlandığından hazırlanan kriyojellere HDL ve diğer lipoproteinlerin ve trigliseritlerin adsorpsiyonu koşulları çalışılmıştır.
- ✓ Heparin bağlı kriyojellere daha az miktarlarda HDL, VLDL ve trigliserit adsorpsiyonu gerçekleşmiş ve tüm kandan seçici ve tatmin edici miktarda LDL adsorpsiyonu gözlenmiştir.
- ✓ LDL molekülerinin Heparin bağlı PHEMA kriyojellerden desorpsiyonu sürekli sistemde çalışılmış ve adsorplanan LDL kolesterolün yaklaşık yüzde 96'sı desorplanmıştır.
- ✓ Ligand molekülerinin PHEMA katı desteğe kovalent olarak bağlandığının bir göstergesi olarak desorpsiyon basamağında heparin sızıntısı gözlenmemiştir. Dolayısıyla bu deneyde desorpsiyon ajanının sadece heparin ile LDL molekülleri arasındaki tersinir bağları kırdığı söylenebilir. Desorpsiyon ajanı olarak sitrik asit kullanıldığında heparin molekülerinin 3 boyutlu yapılarını değiştirmektedir ve etkileşim kuvvetleri azaldığından LDL molekülleriyle yaptığı bağın kırılmasıyla LDL Moleküllerini salmaktadır.

- ✓ Adsorpsiyon-Desorpsiyon işlemi aynı kriyojeller ile 10 kez tekrarlanmıştır. Kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesinde gözle görülür bir düşüş gözlenmemiştir. Desorpsiyon verilerine göre sitrik asidin uygun bir desorpsiyon ajanı olduğu ve bu çalışmada kullanılan heparin bağlı PHEMA kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğine olanak sağladığı söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Kennedy, R.M., Hydrophobic Chromatography, *Methods in Enzymology*, 182, 339-343, **1991**.
- [2] Garcia, F.A.P., Pires, E.M.V., Recovery Processes for Biological Materials, Chromatography. In: Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. (Eds.), Wiley, London, 415–451, **1993**.
- [3] Scouten, W.H., Affinity Chromatography, New York: John Wiley and Sons, **1981**.
- [4] Scopes. R.K.. Stoter, A., Purification of all glycolytic enzymes from one muscle extract, *Methods in Enzymology*, 90, 479-490, **1982**.
- [5] Turkova, J., Bioaffinity. and Chromatography. Second. Completely Revised Edition. Journal of Chromatography Library. Vol. 55. 800 Seiten, zahlr. Abb. und Tab. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, **1993**.
- [6] Xiong, S., Zhang, L., He, Q.Y., Fractionation of proteins by heparin chromatography, *Methods Mol. Biol.*, Jinan University, Guangzhou, China; 424,213-21, **2008**.
- [7] Gotto, A. M., Pownall, H. J., Havel, R. J., Introduction to the plasma lipoproteins, *Methods in Enzymology*, 128, 3-41, **1986**.
- [8] Johnson, W. J., Mahlberg, F. H., Rothblat, G.H., Philips, M.C., Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1085, 273-298, **1991**.
- [9] Schaefer EJ, "Overview of the Diagnosis and Treatment of Lipid Disorders, Methods for Clinical Laboratory Measurement of Lipid and Lipoprotein Risk Factors," N. Rifai, and G.R. Warnick (eds.), AACC Press, Washington DC, **1991**.
- [10] Bachorik, P.S., Albers, J.J., Precipitation methods for quantification of lipoproteins, *Methods in Enzymology*, 129, 78-100, **1986**.
- [11] Bachoric, P.S., Ross, J.W., National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary, *Clin. Chem.*, 41,1414-1420, **1995**.
- [12] Nauck, M., Winkler, K., Marz, W., Wieland, H., Quantitative determination of high-, low-, and very-low-density lipoproteins and lipoprotein(a) by agarose gel electrophoresis and enzymatic cholesterol staining, *Clin. Chem.*, 47, 1761-1767, **1995**.

- [13] Ross, R., The Pathogenesis of Atherosclerosis — An Update, *New England J. Medicine*, 314, 488-500, **1986**.
- [14] Gordon, D.J., Rifkind, B.M., High-Density Lipoprotein — The Clinical Implications of Recent Studies, *New England J. Med.*, 321, 1311-1316, **1989**.
- [15] Johnson, W. J., Mahlberg, F. H., Rothblat, G. H., Philips, M. C., Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1085, 273-298, **1991**.
- [16] Kennel, W.B., Castelli, W.P., Gordon, T., Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study, *Ann. Intern. Med.*, 90, 85-91, **1979**.
- [17] Mabuchi, H., Miyamoto, S., Ueda, K., Oota, M., Takegoshi, T., Wakasugi, T., Takeda, R., Causes of death in patients with familial hypercholesterolemia, *Atherosclerosis*, 61, 1-6, **1986**.
- [18] Mabuchi, H., *J. Japan Atherosclerosis Soc.*, 16, 299, **1988**.
- [19] Mabuchi, H., *Progress in Medicine*, 7, 2549, **1987**.
- [20] Goldstein, J.L., Dank, K.S.E., Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two different mutations affecting functions of low-density lipoprotein receptor, *Proc. Nat. Academy of Sciences of the USA*, 72, 1092-1096, **1975**.
- [21] Lozinskiv. V.I. *et al.*. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends Biotechnol.*, 21, 445–451, **2003**.
- [22] Dainiak, M.B., Kumar, A., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Integrated isolation of antibody fragments from microbial cell culture fluids using supermacroporous cryogels, *J Chromatogr A*, 1045 (1–2): 93–98, **2004**.
- [23] Denizli, A., Salih, B., Pişkin, E., Congo-Red And Cu(II) Carrying Poly(Ethylene-Glycol Dimethacrylate Hydroxyethyl Methacrylate) Microbeads As Specific Sorbents - Albumin Adsorption Desorption, *J. Chromatogr. A*, 731, 57-63, **1996**.
- [24] Janson, J.C., Ryden, L., *Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Application*, John Wiley and Sons, Second Edi., New York, USA, 375-442, **1998**.
- [25] Lowe, C.R., Combinatorial approaches to affinity chromatography, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 248-256, **2001**.

- [26] Cuatrecasas, P., Affinity chromatography of macromolecules, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 36, 29-89, **1972**.
- [27] Fleminger, G., Solomon, B., Wolf, T., Hadas, E., Single step oxidative binding of antibodies to hydrazide modified Eupergit C, *Appl. Biochem. And Biotech*, 26(3), 231-238, **1990**.
- [28] Soltys, P. J., Etzel, M.R, Equilibrium adsorption of LDL and gold immunoconjugates to affinity membranes containing PEG spacers., *Biomaterials*, 21(1), 37-48, **2000**.
- [29] Cochet, S., Hasnaoui, M., Debbia, M., Kroviarski, Y., Lambin, P., Cartron, J.P., Bertrand, O., Chromatography of human immunoglobulin G on immobilized drimarene rubine R/K-5BL. Study of mild, efficient elution procedures., *J. of Chromatog. A*, 663 (2), 175-186, **1994**.
- [30] Narhi, L. O., Caughey, D. J, Horan, T. Kita, Y., Arakawa, T., Effect of three elution buffers on the recovery and structure of monoclonal antibodies, *Anal. Biochem.*, 253, 236-245, **1997**.
- [31] Marjeta Urh, Dan Simpson and Kate Zhao, *Affinity Chromatography: General Methods, Methods in Enzymology*, Volume 463, Pages 417–438, **2009**.
- [32] Renkin, E. M., Filtration, Diffusion, and Molecular Sieving Through Porous Cellulose Membrane, *J. gen. Physiol.*, 38, 225-243, **1954**.
- [33] Kula, M.R., Johansson G, Bückmann A.F., Large-scale isolation of enzymes., *Biochemical Soc. Trans.*, 7, 1-5, **1979**.
- [34] Cuatrecasas, P., Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads, *J. of Bio. Chem.*, 245 (12), 3059-3065, **1970**.
- [35] Lowe, C. R., Harvey, M.J., Dean, P.D.G., Affinity Chromatography on Immobilised Adenosine 5'-monophosphate, *European J. of Biochem*, 42 (1), 1-6, **1974**.
- [36] Matejtschuk, P., (Ed), *Affinity Separations, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, **1997**.
- [37] Denizli, A., Pişkin, E., Dye-ligand affinity systems, *Journal of Biochemical and Biophysical Method*, 49 (1-3), 391-416, **2001**.
- [38] Wilchek, M., Miron, T., Thirty years of affinity chromatography, *React. And Func. Polymers*, 41, 263-268, **1999**.

- [39] Denizli A, Pişkin E, Heparin-Immobilized Polyhydroxyethyl methacrylate Microbeads For Cholesterol Removal - A Preliminary-Report, *Journal of Chromatography B*, 670, 157, **1995**.
- [40] Lindahl, U., *Heparin: Structure, Cellular Functions and Clinical Applications* (Mc. Duffie N. M., Ed.), Academic Press, New York, NY, 167, **1979**.
- [41] Jacques, L.B., Heparin: an old drug with a new paradigm, *Science*, 206 (4418), 528–533, **1979**.
- [42] Hennink, W.E., Kim, S.W., and Feijen, J., Inhibition of surface induced coagulation by preadsorption of albumin-heparin conjugates, *J. Biomed, Mater. Res.*, 18, 911, **1984**.
- [43] Tabak, A., Lotan, N., Sideman, S., Tzipiniuk, A., Bleiberg, B., and Brook, G., Cholesterol removal by haemoperfusion of whole blood in vivo., *Life Support Syst.*, 4, 355, **1986**.
- [44] Daniel S. Weitz, Jeffrey I. Weitz, J Thromb, Update on heparin: what do we need to know?, *Thrombolysis*, 29, 199–207, **2010**.
- [45] Parenteral Anticoagulants: American College of Chest Physicians Evidence-Based Practice Guidelines (8th Edition), *Chest*, 133,141S–159S, **2008**.
- [46] Weitz, J.I., Low-molecular-weight heparins, *N. Engl. J. Med.*, 337,688–698, **1997**.
- [47] Murugesan, S., X., Jin., and Linhardt R. J., Immobilization of Heparin: Approaches and Applications, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8, 80-100, **2008**.
- [48] Carter, C.J., The natural history and epidemiology of venous thrombosis., *Prog Cardiovasc Dis.*, 36,423–38, **1994**.
- [49] Clagett GP, Anderson FA Jr, Heit J, Levine M, Wheeler HB., Prevention of venous thromboembolism, *Chest*. 108 (4suppl):312–34, **1995**.
- [50] Hirsch, J., Raschke, R., Warkentin, T.E., Dalen, J.E., Deykin, D., Poller, L., Heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety, *Chest.*; 108 (4suppl), 258–75, **1995**.
- [51] Rydberg, E., Westfall, M.J., Nicholas, R.A., Low Molecular weight heparin in preventing and treating DVT, *Am. Fam. Physician*, 1607, **1999**.

- [52] Sanchez, J., Elgue, G., Riesenfeld, J., Olsson, P., Studies of adsorption, activation, and inhibition of factor XII on immobilized heparin, *Thromb. Res.*, 89, 41-50, **1998**.
- [53] Blaha, M., Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia, *Acta Med.*, 46, 3, **2003**.
- [54] Mabuchi, H., Mabuchi H, Miyamoto S, Ueda K, Oota M, Takegoshi T, Wakasugi T, Takeda R., Causes of death in patients with familial hypercholesterolemia, *Atherosclerosis*, 61, 1, **1986**.
- [55] Mabuchi, H., *J. Japan Atherosclerosis Soc.*, 16, 299, **1988**.
- [56] Goldstein, J.L. and Dank, K.S.E., Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two different mutations affecting functions of low-density lipoprotein receptor, *Proc. Natl. Acad.Sci.*, 72, 1092, **1975**.
- [57] Koga, N. and Iwata, Y., Pathological and angiographic regression of coronary atherosclerosis by LDL-apheresis in a patient with familial hypercholesterolemia, *Atherosclerosis*, 90,168, **1991**.
- [58] Eriksson, M., Lantz, B., Berlund, L., Angelin, B., Plasma exchange in a patient with heterozygous familial hypercholesterolaemia resistant to drug therapy, *Acta Med, Scand*, 221, 317, **1987**.
- [59] Thompson, G.R., *Lancet*, 1, 1246, **1987**.
- [60] Wang, W., Xie, H., Sun, L., Qu, L., Wang, L., Yu, Y., Kong, D., Macroporous poly(vinyl alcohol) microspheres bearing phosphate groups as a new adsorbent for low-density lipoprotein apheresis, *Bimed. Mater.*, 4, 1, **2009**.
- [61] Thompson, G.R., LDL apheresis, *Atherosclerosis*, 167, 1, **2003**.
- [62] Lupien, P.J., Moorjani, S., Lou, M., Brun, D., Gagne, C., Removal of cholesterol from blood by affinity binding to heparin-agarose: evaluation on treatment in homozygous familial hypercholesterolemia, *Pediat. Res.*, 14, 113, **1980**.
- [63] Toffel, W. and Demant, T., Selective removal of apolipoprotein B-containing serum lipoproteins from blood plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, 611, **1981**.
- [64] Borbera. H., Stoffel. W., Oett, K., The development of specific plasma immunoadsorption, *Plasma Ther. Transfus., Technol.*, 4, 459, **1983**.

- [65] Behm, E., Kuroda, T., Yamawaki, N., In vitro investigations with selective adsorbents for IgE and IgM, *Biomat. Artif. Cells, Artif. Organs*, 15,101, **1987**.
- [66] Thies, K., Prigent, S. A., Heuck, C.C., Selective removal of low-density lipoproteins from plasma by polyacrylate-coated Fractogel in vitro and in experimental extracorporeal perfusion, *Artif. Organs*, 12, 320, **1988**.
- [67] Lopukhin, Y.M., Zuevsky, V.Y., Markin, S.S., Nalivaiko, E.S., Rabovsky, A.N., LDL-apheresis on affine haemosorbents, *Biomat. Artif. Cells and Artificial Organs*, 18, 571, **1990**.
- [68] Pokrovsky, S.N., Adamova, I.Y., Benelovenskaya, G.F., Immunosorbents for LDL-apheresis, *Biomat. Artif. Cells and Artif. Organs*, 18, 623-628, **1990**.
- [69] Denizli, A., Pişkin, E., Heparin-immobilized polyhydroxyethyl methacrylate microbeads for cholesterol removal: a preliminary report, *J. Chromatogr. B*, 670, 157, **1995**.
- [70] Plieva, F.M., Mattiasson, B., Macroporous gel particles as novel sorption medium: rational design, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 47(12), 4131, **2008**.
- [71] Nachman, M., Kinetic aspects of membrane-based immunoaffinity chromatography, *J. Chromatogr.*, 597, 167, **1992**.
- [72] Charcosset, C., Purification of Proteins By Membrane Chromatography, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 71, 95, **1998**.
- [73] Yavuz, H., Hiperkolesterolemik İnsan Plazmasından Kolesterol Uzaklaştırılması İçin İmmünoafinite Mikrokürelerin Hazırlanması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2003**.
- [74] Gotto, A.M., Dphil M.D., Grossed, H., Upjohn, Michigan, USA, 10-26, **1983**.
- [75] Gofman, John W., Hanig, M., Jones, H.B., et.al. Evaluation of Serum Lipoprotein and Cholesterol Measurements as Predictors of Clinical Complications of Atherosclerosis: Report of a Cooperative Study of Lipoproteins and Atherosclerosis, *Circulation*, 14, 689-741, 1956.
- [76] Antwiler, G. D., Dau, P. C., Lobdell, D.D., 1st World Apheresis Ass. Congr. Tokyo, Japan, May 20-23, **1986**.

- [77] Eisenhauer, T., Armstrong, V. W., Wiel and, H., Fuchs, C., Scheler, F., Seidel, D., Selective removal of low density lipoproteins (LDL) by precipitation at low pH: first clinical application of the HELP system, *Klin. Wschr*, 65, 161-8, **1987**.
- [78] Schwerdtfeger, R., Baeyer, H.K., Nose, Y., Malchesky, P.S., Smth, J. W. eds., Cleveland, ISAO Pres, 236-40, **1984**.
- [79] Borberg, H., Stoffel, W. and Oett, K., The development of specific plasma immunoadsorption, *Plasma Ther. Transfus. Technol.*, 4, 459, **1983**.
- [80] Stoffel, W., Bode, C., Mount Kisco, New York, Futura Publ. Co, 1-22, **1984**.
- [81] Saal, S.D., Parker, T.S., Gordon, B.R., Studebaker, J., Hudgins, L., Ahrens, E.H. Jr., Rubin, A.L., Removal of low-density lipoproteins in patients by extracorporeal immunoadsorption, *Am J Med.*, 80, 583-9, **1986**.
- [82] Riesen, W.F., Imhof, C., Sturzenegger, E., Descoedres, C., Mordasini, R., Oetliker, O.H., Management of hypercholesteremia by extracorporeal immune adsorption, *Schweiz Med. Wschr*, 116, 8-11, **1986**.
- [83] Koren, E., Solter, D., Lee, D.M., Characterization of a monoclonal antibody that binds equally to all apolipoprotein and lipoprotein forms of human plasma apolipoprotein B. I. Specificity and binding studies, *Biochim. Biophys. Acta*, 876, 91-100, **1986**.
- [84] Homma, Y., Mikami, Y., Tamachi, H., Nakaya, N., Nakamura, H., Goto, Y., Comparison of selectivity of LDL removal by double filtration and dextran-sulfate cellulose column plasmapheresis, and changes of subfractionated plasma lipoproteins after plasmapheresis in heterozygous familial hypercholesterolemia, *Metabolism*, 36, 419-25, **1987**.
- [85] Odaka, M., Kobayashi, H., Soeda, K., Long term result of LDL selective plasma adsorption therapy on familial hypercholesterolemia, *Biomat. Artif. Cells Artif. Organs*, 15, 113-24, **1987**.
- [86] Yamamoto, A., Cholesterol and the latest treatment for atherosclerosis, **1988**.
- [87] Lozinsky, V.I., Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application, *Russ. Chem. Rev.*, 71, 489-511, **2002**.

- [88] Nambu, M., Rubber-like poly(vinyl alcohol) gel, *Kobunshi Ronbunshu*, 47, 695-703, **1990**.
- [89] Kaetsu, I., Radiation synthesis of polymeric materials for biomedical and biochemical applications, *Adv. Polym. Sci.*, 105, 81-97, **1993**.
- [90] Suzuki, M., Hirasa, O., An approach to artificial muscle using polymer gels formed by micro-phase separation, *Adv. Polym. Sci.*, 110, 241-261, **1993**.
- [91] Lozinsky, V.I., Cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol) solutions, *Russ. Chem. Rev.*, 67, 573-586, **1998**.
- [92] Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments - Basics and Applications, *Enzyme Microb. Technol.*, 23, 227-242, **1998**.
- [93] Hassan, C.M., Peppas, N.A., Pure PVA Hydrogels Using Freezing/Thawing Techniques as Carriers for Drug Delivery, *Proceedings of the Controlled Release Society*, 25, 50-51, **1998**.
- [94] Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation*, 10, (4-5), 163-188, **2001**.
- [95] McCoy, K., Kalghatgi, F.E., Regnier, N., Afeyan, Perfusion chromatography-characterization of column packings for chromatography of proteins, *J. Chromatogr. A.*, 743, 221, **1996**.
- [96] Denizli, A., Yavuz, H., Garipcan, B., Arica, M.Y., Non-porous monosize polymeric sorbents: dye-and-metalchelate affinity separation of Lysozyme, *J. Appl. Polym. Sci.*, 76, (2), 115-224, **2000**.
- [97] Özkara, S., Garipcan, B., Pişkin, E., Denizli, A., N-methacryloyl-(L)-histidinomethyl ester carrying a pseudospecific affinity sorbent for immunoglobulin-G isolation from human plasma in a column system, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 14(8), 761-76, **2003**.
- [98] Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H., B. Mattiasson, Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends in Biotechnol.*, 21, 445-451, **2003**.
- [99] Arvidsson, P., Plieva, F.M., Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent, *J. Chromatogr. A.*, 986, 275-290, **2003**.

- [100] Arvidsson, P., Plieva, F.M., Savina, I.N., Lozinsky, V.I., Fexby, S., Bülow, L., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns, *J. Chromatogr. A.*, 977, 27-38, **2002**.
- [101] Babaç, C., Yavuz, H., Galaev, I.Y., Pişkin, E., Denizli, A., Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel, *Reactive and Functional Polymers*, 66, 1263-1271, **2006**.
- [102] Hanora, A., Savina, I., Plieva, F.M., Izumrudov, V.A., Mattiasson, B., Galaev, I.Y., Direct capture of plasmid DNA from non-clarified bacterial lysate using polycation-grafted monoliths, *J. Biotechnol.*, 123 (3), 343-55, **2006**.
- [103] Bereli, N., Şener, G., Yavuz, H., Denizli, A., Oriented immobilized anti-LDL antibody carrying poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel for cholesterol removal from human plasma, *Materials Science and Engineering: C*, 31 (5), 1078–1083, **2011**.
- [104] Galaev I.Y., *Journal of Immunological Methods*, 283, 185-194, **2003**
- [105] Denizli A. , Preparation of immuno-affinity membranes for cholesterol removal from human plasma, *J. Chromatogr. B.*; 772, 357-367, **2002**.
- [106] Horak D, Jayakrishnan A, Arshady R. Preparation and properties of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) in *Polymers in Medicine and Biology*, Arshady R. (ed). Vol. 1, *Citus Books*, London, pp. 80-107, **2003**.
- [107] Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A., Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography, *Biochem. Eng. J.*, 43, 272-279, **2009**.
- [108] Smith, P. K., Mallie, A. K., Hermanson, G. T., Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations, *Anal Biochem*, 109, 466-473, **1980**.
- [109] Doumas, B.T., Watson, W.A. and Biggs, H.C., Albumin standards and Management of serum albumin with bromocresol green, *Chin. Chim. Acta.*, 31, 87-96, **1971**.
- [110] Lagergren, H., Olsson, P., Swedenborg, J., Inhibited platelet adhesion: A non-thrombogenic characteristic of a heparin coated surface, *Surgery*, 75, 643–650, **1974**.
- [111] Brash, J.L., *Modern Aspects of Protein Adsorption on Biomaterials*, Missirlis, Y.F., Lemm, W. Eds., Kluwer Academic Publishers, 39-47, **1991**.

- [112] Dumas, B.R., Biggs, H., , Determination of serum albumin. In *Standart methods of Clin. Chem.*, 7, 175, **1972**.
- [113] Pişkin, E., Hoffmann, A., *Polymeric biomaterials*, Dordrecht, The Netherlands, Martinus Nijhoff Publ. Co., **1986**.
- [114] Denizli, A., Heparin-immobilized poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based microspheres, *J. Appl. Polym. Sci.*, 74, 655-662, **1999**.
- [115] Lopukhin, Y.M., Zuevsky, V.V., Markin, S.S., Nalivaiko, E.S., Rabovsky, A.N., LDL-apheresis on affine haemosorbents, *Biomat. Artif. Cells and Artif. Organs*, 18, 571-578, **1990**.
- [116] Pokrovsky, S.N., Adamova, I.Y., Benelovenskaya, G.F., Immunosorbents for LDL-apheresis, *Biomat. Artif. Cells and Artif. Organs*, 18, 623-628, **1990**.
- [117] Tabak, A., Lotan, L., Sideman, S., Tzipiniuk, A., Bleiberg B and Brook G., Cholesterol removal by haemoperfusion of whole blood in vivo, *Life Support Systems*, 4, 355-365, **1986**.
- [118] Ostlund, R.E. Jr, Immunosorbent chemistry: a study of agarose-based column sorbents for the removal of low-density lipoprotein (LDL) from blood, *Artif. Organs*, 11, 366-374, **1987**.
- [119] Smolik, G., Schmidt, B., Baurmeister, U., Gurland, H.J., *Artif. Organs*, 13, 368, **1988**.
- [120] Schmidt, B., Ex-vivo evaluation of biocompatibility, Presentation at the Xth Int. Symp. on Hemoperfusion and Immobilized Reactants, Rome, **1990**.
- [121] Sinitsyn, V.V., Metlitscaya, L.M., Mamontova, A.G., Konovalov, G.A., Kukharchuk, V.V., Heparin-sorbent for low density lipoproteins removal in hypercholesterolemia, *Biomat. Artif. Cells. Artif. Organs*, 18, 629-635, **1990**.
- [122] Yavuz, H., Denizli, A., Immunoaffinity beads for selective removal of cholesterol from human plasma., *J Biomater Sci Polym Ed.*, 14 (5), 395-409, **2003**.
- [123] Yavuz, H., Denizli, A., Immunoabsorption of cholesterol on protein A oriented beads, *Macromolecular Bioscience*, 5, 39-48, **2005**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Gizem UZUNOĞLU
Doğum Yeri : Denizli
Medeni Hali : Bekâr
E-posta : uzunoglu_gizem@hotmail.com
Adresi : Servergazi Mahallesi, Ergin Evler A Blok Kat: 3
Denizli / TÜRKİYE

Eğitim

Lise : 2002-2006 Denizli Anadolu Lisesi, Denizli
Lisans : 2006-2010 Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü, Ankara
Yüksek Lisans : 2010-2013 Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Ankara

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İyi düzeyde

İş Deneyimi

Deneyim Alanları

Kriyojeller, moleküler baskılama, afinite kromatografisi,

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar