

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİDROJEL PARTİKÜLLERİN (p(AAc-AA))
İNSAN SERUMUNDAN ALBUMİN VE İMMUNOGLOBULİN G
SAFLAŞTIRILMASINDA KULLANILMASI VE SAFLIK DERECELERİNİN
HPLC'DE TAYİNİ

FATMA UÇARSU

EYLÜL 2005

Fen Bilimleri Enstitüsü müdürünün onayı.

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

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Ana Bilim Dalı Başkanı

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

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Prof. Dr. M. Yakup ARICA

Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Doç. Dr. Yusuf MENEMEN

Yrd. Doç. Dr. İlhami TÜZÜN

ÖZET

HİDROJEL PARTİKÜLLERİN (p(AAc-AA))
İNSAN SERUMUNDAN ALBUMİN VE İMMUNOGLOBULİN G
SAFLAŞTIRILMASINDA KULLANILMASI VE SAFLIK DERECELERİNİN
HPLC'DE TAYİNİ

UÇARSU, Fatma

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. M. Yakup ARICA

Ortak Danışman: Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Eylül 2005, 47 sayfa

Afinite kromatografi uygulamalarında destek materyalinin seçimi ve hazırlanması kromatografik performansı etkileyen önemli faktörlerden birisini oluşturmaktadır ve özellikle hidrofilik karakterli hidrojellerin, bu alanda kullanılmaları oldukça önemlidir. Bu doğrultuda, tez kapsamında partikül formda hidrojel yapıda akrilat kökenli polimerik destek materyallinin hazırlanması ve sulu ortamdan ve insan serumundan albumin (HSA) ve immunoglobulin G (HIgG) ayrıştırılması ve saflaştırılması işleminde afinite sorbenti olarak kullanılması amaçlandı. Hidrofilik karakterli poli(akrilikasit-akrilamid); p(AAc-AA) afinite hidrojeli, akrilik asit (AAc) ve akrilamid (AA) monomerlerinden amonyum persülfat

başlatıcı varlığında UV fotopolimerizasyon yöntemi kullanılarak sentezlendi. Kromatografik alanda kullanmak amacı doğrultusunda geliştirdiğimiz serbest karboksil ve amin gruplarına sahip p(AAc-AA) afinite hidrojelini herhangi bir aktivasyon veya yüzey modifikasyon işlemine gerek kalmadan serum proteinlerine afinite gösterebilecek özellikte olması tasarlandı ve destek materyali olarak tek basamaklı bir yöntemle hazırlandı. Hidrojel yapıdaki p(AAc-AA) afinite partiküllerin pH ve sıcaklığa karşı duyarlılık gösterdi. Geliştirilen affinite hidrojelini sulu çözeltilerden ve insan serumundan HSA ve HIgG proteinlerini uzaklaştırılması çalışmaları farklı başlangıç protein konsantrasyonu, pH, iyonik şiddet, sıcaklık, adsorbent dozu gibi sistem parametreleri etkisi altında incelendi. Partikül yapıdaki afinite hidrojellerin sulu ortamdan maksimum HSA ve HIgG adsorpsiyon kapasiteleri sırası ile 93.35 ve 138.53 mg/g olarak bulundu. Hazırlanan afinite hidrojel ile sulu ortamdan HSA uzaklaştırılması işlemi Freundlich modeline uyarken, HIgG adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich izoterm modelinin her ikisi ile ifade edilebileceği belirlendi. Afinite partiküllerin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmaksızın adsorpsiyon-desorpsiyon işlemlerinde tekrar kullanılabilirdiği belirlendi. 2.0 M NaCl (pH 5.0) desorpsiyon ajanı kullanıldığında afinite partiküllerine adsorplanan HSA ve HIgG sırası ile yaklaşık %92 ve %88 oranında desorbe edildi. p(AAc-AA) partikülleri ile insan serumundan HSA ve HIgG'nin saflaştırma oranı HPLC yardımıyla sırası ile % 91.50 ve % 80.96 olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Afinite partikül, Akrlamit, Akrlık asit, Adsorpsiyon Albumin, İmmunoglobulin G, HPLC

ABSTRACT

UTILIZATION OF HYDROGEL PARTICULES (p(AAc-AA)) IN PURIFICATION
OF ALBUMINE AND IMMUNOGLOBULINE G FROM HUMAN SERUM AND
DETERMINATION OF PURITY OF HSA AND HIgG BY HPLC

UÇARSU, Fatma

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M.Sc.Thesis

Supervisor: Prof. Dr. M. Yakup ARICA

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

September 2005, 47 pages

In affinity chromatography applications, the choice of matrix and its preparation process are the important factors affecting the chromatographic performance. In particular, hydrophilic hydrogels are used widely in this area. An hydrophilic affinity sorbent in particule form based on acrylate was syntesized. Purification and separation of immunoglobulin G (HIgG) and Human Serum Albumine (HSA) onto these affinity membranes from aqueous solutions and human serum was investigated. Poly(acrylicacid-acrylamide), p(AAc-AA), hydrogels were prepared from acrylic acid and acrylamide monomers via UV initiated photo-polymerization, in the presence of an initiator ammonium persulphate. Free carboxyl and amine groups containing p(AAc-AA) hydrogels with high affinity to serum proteins were prepared in a single step without the necessity of activation and modification process. p(AAc-AA) hydrogel particules are sensitive to pH and temperature. The effect of system parameters such as initial protein concentration, pH, ionic strenght, temperature and

adsorbent dosage on the removal of IgG and HSA from human serum was investigated. The maximum HSA and HIgG adsorption capacity of p(AAc-AA) hydrogels were 93.35 and 138.53 mg/g, respectively. HSA removal from aqueous solution fitted to the Freundlich isotherm model while HIgG adsorption process fitted both to the Langmuir and Freundlich isotherm models. Affinity particles could be repeatedly used in adsorption-desorption cycles without detectable losses in their adsorption capacity. 92% of the adsorbed HSA and 88% of the adsorbed HIgG was desorbed by using 2.0 M NaCl (pH 5.0) as desorption agent. The purification rate of HSA and HIgG from human serum was determined by HPLC and 91.5% and 80.6%, respectively.

Keywords: Affinity particle, Acrylamide, Acrylic acid, Adsorption, Albumine, Immunoglobulin G, HPLC

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında bana yol gösteren, engin bilgisiyle bana ışık tutan, deneyimlerini esirgemeyen saygıdeğer Hocam Prof. Dr. Yakup ARICA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın, deneylerin gerçekleştirilmesi ve tez yazımı aşamalarında, özverili yardımlarını ve her türlü desteğini benden esirgemeyen saygıdeğer Hocam Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU'na teşekkür ederim.

Bütün çalışma arkadaşlarıma, yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Fatma UÇARSU

Kırıkkale, Eylül 2005

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER	
DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Polimerik Destek Materyalleri	5
2.1.1. Biyouyumlu Polimerler	6
2.1.2. Hidrojeller	7
2.1.3. Akrilat Kökenli Polimerik Materyaller.....	9
2.2. Kromatografi ve Temel Prensipleri	10
2.2.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	12
2.2.2. Afinite Kromatografisi.....	13
2.3. Adsorpsiyon ve Adsorpsiyon İzotermi	14
2.4. İmmunoglobulinler.....	15
3. MATERYAL ve METOT.....	17
3.1. Materyaller.....	18
3.1.1. Kimyasal Malzemeler.....	18
3.1.2. Cihazlar.....	18
3.1.2.1. UV-VIS Spektrofotometre.....	18
3.1.2.2. FTIR Spektrofotometre.....	18

3.1.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	19
3.1.2.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	19
3.1.2.5. Kullanılan Diğer Cihazlar.....	19
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Poli(Akrilik asit-Akrilamid) Partiküllerinin Sentezi.....	20
3.2.2. p(AAc-AA) Partiküllerinin Karakterizasyonu	20
3.2.3. HSA ve HlgG'nin Sulu Çözeltiden Adsorpsiyon Davranışının İncelenmesi.....	21
3.2.3.1. Adsorpsiyon Parametrelerinin Etkisi.....	22
3.2.3.2. Adsorpsiyon İzotermi.....	22
3.2.3.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	24
3.2.4. Afinite Partiküller ile İnsan Serumundan HSA ve HlgG Adsorpsiyonu.....	24
4. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME.....	26
4.1. Afinite Hidrojellerin Karakterizasyonu.....	27
4.2. HSA ve HlgG Adsorpsiyonu.....	32
4.2.1. pH Etkisi.....	32
4.2.2. Adsorbent Dozunun Etkisi.....	33
4.2.3. Adsorpsiyon Kinetiği.....	34
4.2.4. Başlangıç Protein Konsantrasyonunun Etkisi.....	36
4.2.5. İyonik Şiddetin Etkisi.....	37
4.2.6. Sıcaklığın Etkisi.....	38
4.2.7. Adsorpsiyon İzoterm Modeli ve İlgili Parametreler.....	39
4.2.8. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	41
4.2.9. İnsan Serumundan HSA ve HlgG Saflaştırılması.....	41

KAYNAKLAR.....	44
----------------	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

4.1. p(AAc-AA) afinite hidrojel ile sulu ortamdan HSA ve HlgG uzaklaştırılması işleminde adsorpsiyon izoterm modelleri sabitleri ve korelasyon katsayıları.....	40
---	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

4.1. Poli(akrilikasit-akrilamit) hidrojelinin kimyasal kompozisyonu.....	27
4.2. Partikül yapıdaki p(AAc-AA) afinite hidrojellerinin farklı sıcaklıklardaki denge su içeriği davranışı	29
4.3. Partikül yapıdaki p(AAc-AA) afinite hidrojelinin SEM mikrografı.....	30
4.4. p(AAc-AA) partiküllerin FTIR spektrumu.....	31
4.5. Partikül yapıdaki afinite hidrojel ile sulu ortamdan HSA ve HIgG adsorpsiyonunda pH etkisi.....	33
4.6. p(AAc-AA) afinite hidrojel ile sulu ortamdan protein uzaklaştırılmasında katı destek/ protein çözeltisi oranının etkisi.....	34
4.7. p(AAc-AA) afiinte hidrojele HSA adsorpsiyonunda denge zamanı.....	35
4.8. p(AAc-AA) afiinte hidrojele HIgG adsorpsiyonunda denge zamanı.....	36
4.9. Başlangıç protein konsantrasyonunun adsorpsiyon kapasitesine etkisi.....	37
4.10. Afinite hidrojel ile sulu ortamda protein adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi.....	38
4.11. Afinite hidrojele HSA ve HIgG adsorpsiyonu işleminde sıcaklığın etkisi.....	39
4.12. Ticari HSA ve HIgG protein çözelti karışımının kromatogramı.....	42
4.13. İnsan serum örneğinin adsorpsiyon öncesi kromatogramı.....	43
4.14. p(AAc-AA) afinite hidrojeli ile etkileştirilen serum örneğinin adsorpsiyon işlemi sonrası kromatogramı.....	43

1.GİRİŞ

Hidrojeller, suda şişebilen üç boyutlu ağ yapıya sahip hidrofilik polimerlerdir. Ağ yapılı hidrojellerin oluşumundan sorumlu olan moleküliçi ve moleküllerarası kuvvetler, tipik kovalent bağların yanısıra iyonik, hidrojen ve vander Waals etkileşimlerinin tümünü kapsamaktadır. Bir polimerin hidrojel yapıda özellik gösterebilmesi için ana zincir üzerinde veya yan dallarında hidroksil grubu ya da su molekülleri ile etkileşerek hidrojen bağı oluşturabilme özelliğine sahip karboksil ve amino gibi fonksiyonel grupların bulunması gereklidir. Hidrojeller, sulu ortamlarda şişme sırasında fiziksel ve kimyasal dengeye ulaşmıca kadar hacimlerini önemli ölçüde artırırken ağ yapılarını korurlar. Herhangi bir pH değışimine karşı proton veren veya alabilen asidik ve bazik gruplar içeren hidrojeller, genellikle farklı pH değerlerinde farklı denge-şişme değerlerine ulaşmaktadır. Bir hidrojelin şişme özelliği çapraz bağ derecesine, polimer zincirinin kimyasal yapısına ve bileşimine, polar grupların varlığına, ağ yapı ve sıvı çevresindeki etkileşimlere bağıdır (Kim ve Park, 2004; Arıca ve ark., 2001; Maolin ve ark., 2000).

Hidrojeller biyoteknoloji alanında organik ve inorganik kirleticilerin uzaklaştırılmasında, kromatografik tekniklerle biyolojik moleküllerin ayrıştırılması ve saflaştırılması işleminde, biyomedikal alanda kontak lens yapımında, tarım alanında kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır. Bunların yanında, gıda endüstrisinde, biyomedikal alanda ve su saflaştırma sistemlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde endüstriyel alanda geniş bir kullanım alanına sahip bulunan hidrojellerin uygulama alanı giderek genişlemekte ve bunun doğal bir sonucu olarak önemi daha da artmaktadır. Son yıllarda, araştırmacılar ve sanayi

kuruluşları zararlı atıkların uzaklaştırılması, tarımsal alanda yeni ilaç geliştirmek yerine var olan formülasyonların daha etkili bir şekilde kullanılması, biyolojik sıvılardan hedef molekülün ayrıştırılması ve saflaştırılması gibi işlemlerde destek materyali olarak yeni hidrojellerin geliştirilmesine yönelik araştırmalara hız vermişlerdir (Kim ve Park, 2004; Moradi ve ark., 2004; Maolin ve ark., 2000; Kaetsu, 1985).

Yaklaşık 46 kg/m^3 toplam protein konsantrasyonuna sahip insan plazmasında albumin (HSA), immunoglobulinler ve immunoglobulin G (HIgG) yüzdeleri sırası ile %70.00, %27.20 ve %21.70'dir (Ghosh, 2004; Salabe ve Corvo, 2003). İmmunoglobulin G'nin immunolojik tayin kitlerinde, immunolojik hastalıkların tedavisinde ve immunoafinite kromatografisi alanında kullanılması ve medikal alanda alternatif bir tedavi sistemi oluşturduğu için medikal alanda büyük öneme sahip HIgG saflaştırılması medikal biyoteknoloji alanında oldukça önem kazanmış bulunmaktadır. Ayrıca, immunoglobulin G'ler stokinler ve kan pıhtılaştırıcı faktörler gibi farmasotik öneme sahip proteinlerin saflaştırılmasında da biyoafinite ligandı olarak da kullanılmaktadır. Bir diğer plazma protein olan serum albumin (HSA), toplam molekül kütlesi ve plazma konsantrasyonu ile 25 mmHg'lik normal kolloid onkotik basınca %80 oranında katkıda bulunmaktadır. Ayrıca HSA, ilaçların bağlanması ve salınması, lipitler ve endojen maddelerin metabolizmasında görev alması, fizyolojik koşullar altında önemli antioksidan potansiyele sahip olması, endotelial hücrelerde apoptozisi önlemesi gibi birçok fonksiyonu ve insan plazmasındaki toplam konsantrasyonundan dolayı kan plazmasında çok önemli hayati bir görev üstlenmektedir. Bu nedenlerden dolayı, HSA'nın kan serumundan saflaştırılması önemli ölçüde ilgi çekmiştir. Klasik ayırma yöntemlerine kıyasla

afinite kromatografisi sağladığı avantajlardan dolayı, önemli serum proteinlerinin immunoglobulin G ve albumin saflaştırılması işleminde son yıllarda en çok tercih edilen yöntem olarak öne çıkmaktadır (Arıca ve ark., 2006; Belattar ve Mekhalif, 2004; Hu ve Su 2003; Arıca ve ark., 2004a; Bayramoğlu ve ark., 2005; Arıca ve ark., 2004b; Josic ve Lim 2001; Fassina ve ark., 1998; Sassi ve Lee, 1996).

Biyolojik sıvı veya fermentasyon ortamlarından hedeflenen molekülün tek basamakta ayrıştırılması ve saflaştırılması temeline dayanan afinite kromatografi teknikleri; moleküler biyoloji, biyoteknoloji, analitik biyokimya, klinik biyokimya ve farmasotik kimya alanlarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. İnsan plazması gibi biyolojik sıvılardan hedeflenen molekülün yüksek saflıkta ve tek basamakta ayrıştırılması işleminde kullanılan afinite kromatografisi tekniğinin diğer klasik kromatografik yöntemlere göre sağladığı avantajlar oldukça dikkat çekicidir (Arıca ve ark., 2004a).

Afinite kromatografisinde protein karışımından hedeflenen proteini saflaştırma işleminde en önemli parametrelerden birisi de destek materyalin seçimidir. Protein ayrıştırma ve saflaştırma işleminde destek materyali ile hedef protein arasında spesifik olmayan etkileşimlerin olmadığı veya minimum düzeyde oluşturulmasının yanında, hidrojel yapıdaki destek materyalinin gözenekliliği de bu ayırma yönteminin performansını etkileyen diğer bir önemli faktör olarak rapor edilmiştir. Afinite kromatografisi alanında kullanılmak üzere, farklı polimerizasyon teknikleri ile, hidrojel yapıdaki afinite destek materyallerinin farklı geometrik yapılarda örneğin membran, küre, çubuk veya partikül yapıda hazırlanması mümkündür. Partikül yapıdaki hidrojellerin kullanımı, gözenekli yapının yanısıra daha geniş bir yüzey alanı sağlayacağı için hedef molekülün ayrıştırılması işleminde daha az

materyal kullanımı sağlamasının yanında işlem sũresini de kısaltarak ˆnemli bir avantaj sağlayacaktır. Hidrojel yapıda hazırlanabilen akrilik ve metakrilik kˆkenli polimerik destek materyalleri, biyolojik ortamlardan hedef proteinin saflaştırılması, kontakt lens yapımı, kontrollũ ilaē salınım sistemleri geliştirilmesi ve yapay damar imalinde kullanılması gibi çok çeşitli tıbbi alan uygulamaları için geniş ˆlekli olarak kullanılmaktadır (Arıca ve ark., 2004b; Mahdovina ve ark., 2004; Nisisako ve ark., 2004; Nolan ve Sklar, 2002; Bayramoğlu ve Arıca, 2003; Zou ve ark., 2001; Arıca, 2000; Comiskey ve ark., 1998).

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Polimerik Destek Materyalleri

Polimerler, monomer olarak adlandırılan küçük moleküllü birimlerin birbirlerine kovalent bağlarla bağlanmaları sonucu oluşan yüksek molekül kütleli makromoleküllerdir. Bir polimer, çözücü içerisinde bekletildiğinde daha küçük olan çözücü molekülüleri polimer zincirleri arasına difüze olarak polimeri şişirir. Bu durumda polimerik yapı, çözücü ile etkileşim derecesine bağlı olarak belli miktarda çözücü absorbe eder. Polimerik yapının çözücü ile şişmiş bu haline jel adı denir. Polimerlerin çözünme veya şişme dereceleri; polimer ve çözücünün kimyasal yapılarındaki benzerlik, bir homolog grupta moleküler kütle (zincir uzunluğu), çapraz bağlanma derecesi, polimer zincirleri arasındaki ikincil bağ kuvvetlerinin varlığı ve etkisi, polimerik yapının kristalite derecesi gibi parametrelere bağlıdır (Duran ve ark., 1999; Zhou ve ark., 1996; Baker ve ark., 1995; Peppas ve Peppas, 1991).

Polimerler, biyolojik fonksiyonlu moleküllerle birlikte çok değişik uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Polimer ve biyolojik ajan sistemlerinde biyolojik ajan olarak antibiyotikler, antikoagulantlar (pıhtılaşmayı engelleyen), anti kanser ilaçlar, antikorlar, antagonistler, enzimler, kontrastifler (koruyucular), antibakteriyel ajanlar, hücreler, dokular ve doku bölümleri örnek olarak verilebilir. Kompozit sistemler aktif maddenin kontrollü olarak salınımını sağlayacak şekilde dizayn edilir. Bu fonksiyonu yerine getirmek üzere, difüzyon kontrollü polimerik membran içeren sistemler veya aktif maddeyi içinde tutarak dışarıya kontrollü olarak salan matriks

sistemleri dizayn edilebilir (Moradi ve ark., 2004; Hoffman, 2002; Brazel ve Peppas, 1999; Williams , 1990).

Kromatografi ve biyoteknoloji alanında kitin, kitosan, aljinat gibi doğal ve polikarbonat, polisülfon, polipropilen, düşük yoğunluklu polietilen, polistiren lateks, akrilat polimerler gibi sentetik kökenli polimerik yapılar kullanılmaktadır. Sentetik polimerler doğal materyallere kıyasla daha geniş kullanım alanına sahiptir. İstenilen geometrik formda hazırlanabilen sentetik kökenli materyallerin yüzey özellikleri fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal işlemlerle kolaylıkla ve istenilen özellikte modifiye edilmektedir. Son yıllarda sentetik polimerlerden hazırlanan destek materyalleri ile biyolojik moleküllerin ayrıştırılması ve saflaştırılması ilgi çeken bir araştırma alanı olmuş ve polimerik destek malzemeleri inorganik veya doğal destek malzemeler yerine kullanılmaya başlanmıştır (Hoffman, 2002; Arıca, 2000).

2.1.1. Biyouyumlu polimerler

Polimerik biyomateryaller çeşitli vücut hücreleri ve kanla temas eden materyallerdir. Bu nedenle doku ve kan ile uyuşabilir olmaları zorunludur. Biyolojik olarak parçalanabilen polimerlere poliamitler, polipeptidler, poliesterler, poliortoesterler, poliasetaller örnek olarak verilebilir (Sun ve ark., 2003; Hirotsu ve ark., 2002; Abriouel ve ark., 2001; Giacomelli ve Norde, 2001; Huang ve ark., 2000; Brazel ve Peppas, 1999; Dufrene ve ark., 1999).

2.1.2. Hidrojeller

Hidrojeller, genellikle üç boyutlu, ağ yapılı ve çapraz bağlı polimerlerdir. Hidrojeller, hidrofilitesi yüksek, suda çözünmeden önemli ölçüde şişebilen, esnek ve mekanik kararlılığı yüksek hidrofilik polimerlerdir. Hidrojellerin hidrofilite derecesi, yapılarındaki polar grupların varlığına bağlıdır ve aşağıda verilen özelliklerinden dolayı biyolojik uyumluluk göstermektedirler. i) Biyolojik sıvı ve dokularla çevrelenmiş jeller, protein adsorpsiyonu ve hücre adezyonu için akış gücünü azaltan düşük yüzey gerilimine sahiptirler. ii) Hidrojeller doğal biyolojik hücre ve dokuların bazı hidrodinamik özelliklerine sahiptirler. Hidrojel yüzeyindeki polimer zincirlerinin yüksek hareket yeteneği, protein adsorpsiyonu ve hücre adezyonunun engellenmesini sağlar. iii) Hidrojellerin yumuşak ve elastik özelliği biyolojik çevre ile sürtünmesi sonucu oluşan tahrişini azaltır (Kim ve Park, 2004; Moradi ve ark., 2004; Saraydın ve ark., 2004; Maolin ve ark., 2000; Duran ve ark., 1999).

Hidrojellerin yapılarındaki farklı fonksiyonel grupların varlığı ortam pH'sı ve sıcaklığına karşı farklı duyarlılık göstermelerine olanak sağlamaktadır. Hidrojellerin yapısına katılan iyonik monomerler jelin elektriksel yüklerini, pH duyarlılığını ve su alma kapasitesini etkilemektedir. Asidik fonksiyonel gruplara sahip olan hidrojeller yüksek pH'ta iyonize olurken düşük pH'ta iyonize olmazlar. Bu nedenle yüksek pH'ta jelin iyonize olması, jelin yüksek pH değerlerinde su alma kapasitesini artırmaktadır. Bir başka deyişle hidrojeller, pH değişimine karşı protone ve/veya deprotone olabilen gruplar içerdiğinden, ortam pH'sının değişmesi ile farklı denge şişme değerlerine ulaşmaktadır. pH'a duyarlı bu jeller karboksilik asit ve primer amino gibi zayıf asidik veya bazik grupları veya sülfonik asit ve amonyum tuzları gibi güçlü asit ve bazları içeren yapıya sahip oldukları için pH'taki değişim jelin

özelliklerini değiştirmektedir. Akrilik asit monomerinin pH'a duyarlı grubu -COOH grubudur. pH'a duyarlı bir hidrojinin denge-şişme değerini etkileyen faktörler: i) iyonize olabilen monomerlerin elektriksel yükü, ii) iyonik monomerlerin pKa değerleri ve iyonizasyonun derecesi, iii) iyonize olabilen monomerin konsantrasyonu, iv) çapraz bağ yoğunluğu, v) polimer iskeletin hidrofilitesi/hidrofobilitesi, vi) ortam pH ve iyonik şiddetine bağlı olacaktır. Bunların yanında, hidrojinlerin şişme kapasitesi ortamın artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir ve tuz konsantrasyonunun artması sonucunda şişme değeri azalmaktadır. Ayrıca, hidrojel yapıdaki polimerlerin sıcaklıkla değişimini ise hidrojel yapısını oluşturan monomerlerin kompozisyonu etkilemektedir. Hidrojinler, yüksek su alma özelliklerinden dolayı biyolojik moleküllerin saflaştırılması işlemi, immobilize edilmiş enzimlerin aktivitelerinin korunması, su saflaştırma, kontrollü ilaç salımı sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hirotsu ve Tagaki, 2004; Hoffman, 2002; Nagashima ve ark., 1999; Sahoo ve ark., 1998; Nagashima ve ark., 1998; Sassi ve ark., 1996; Khare ve Peppas, 1995; Peppas ve Peppas, 1991).

Hidrojinlerin yapısına önemli ölçüde su molekülü olarak şişmesini etkileyen bütün faktörler, polimerizasyon koşulları ve monomerlerin seçimi ile kontrol edilebilmektedir. Bu şekilde değişik gözenek çapına sahip afinite hidrojinleri hazırlamak mümkündür. Hidrojinlerin yapısında bulunan gözenekler, kısa işlem süresinde daha fazla su molekülünü tutabilmesi için geniş yüzey alanı sağlar. Gözenekli hidrojinler gözenek boyutuna göre; standart gözenek dağılımı 10-100 nm, 100-1000 nm, 1-100 µm ve 10-1000 µm olarak değişen mikro, mezo, makro ve süpergözenekli hidrojinler olarak sınıflandırılabilir. Hidrojel sentezinde kullanılan monomerler nötr, asidik, bazik ve çapraz bağlayıcı olarak dört sınıfta toplanmaktadır.

Çapraz bağı hidrojeller, saf halde monomerlerin veya çapraz bağlayıcı maddelerin kullanılmasıyla, radyasyon veya ısı etki ile başlatılan serbest radikal polimerizasyonu sonucunda kütle, süspansiyon, emülsiyon halinde elde edilebilmektedir. Çapraz bağlanma işleminde başlatıcı olarak γ radyasyonunun kullanımı, diğer başlatıcılara göre polimerizasyon işleminde önemli avantaj sağladığı çok sayıda araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Mikro, mezo ve makrogözenekli hidrojeller soğukta kurutma (freeze drying), gözenek yapıcı, mikroemülsiyon ve faz ayırımı metodları ile süpergözenekli hidrojeller ise jelleşme (gelation) reaksiyonu ile hazırlanmaktadır (Kim ve Park, 2004; Saraydın ve ark., 2004; Chen ve ark., 2000; Patel ve Amiji, 1996; Bennett ve ark., 1995; Bae ve Kim, 1993). Hidrojellerin sentez reaksiyonunda çözücü genellikle sudur fakat metanol, etanol, benzil alkol gibi alkoller polimerin yapımında faz ayrımını engellemek için kullanılmaktadır (Peppas ve Peppas, 1991).

2.1.3. Akrilat kökenli polimerik materyaller

Akrilat kökenli monomerlerden sentezlenen polimerlerin genellikle biyolojik olarak uyumlu materyaller olduğu çok sayıda araştırmacı tarafında rapor edilmiştir. Bu polimerler sınıfında olan poli(akrilamid), biyouyumlu sentetik bir polimer olmasından dolayı biyomedikal ve biyoteknolojik alandaki çok sayıda uygulamada kullanılmaktadır. Akrilamid oldukça reaktif ortaklanmamış elektron çiftine ve bir amid grubuna sahip difonksiyonel bir monomerdir. Akrilamid zayıf asit ve bazik özellik gösterebilmektedir. Akrilamid ve akrilamid kökenli kopolimerlerin yüksek kapasitede su absorplama eğilimi, oksijen geçirgenliği ve gözenekliliği gibi özelliklerinden dolayı biyolojik olarak uyumlu materyallerdir. Akrilikasit gibi akrilik

türevleri, akrilamit monomeri ile kopolimerleştirildiğinde yapıya daha fazla hidrofilik özellik kazandırıldığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Akrilikasit iyonize olabilen bir monomer olarak bilinir ve bu nedenden dolayı polimeri pH ve sıcaklığa karşı duyarlıdır (Bradley ve ark., 2005; Arıca ve ark., 2004a; Moradi ve ark., 2004; Hoffman, 2002; Arıca, 2000; Sahoo ve ark., 1998).

Çapraz bağlı poliakrilamid sahip olduğu yüksek biyouyumluluk, ayarlanabilir gözenek yapısı, saflaştırma ve steril edilebilme kolaylığının yanında, yüzey özelliklerinin çeşitli yöntemlerle modifiye edilebilir oluşu gibi özelliklerinden dolayı çeşitli biyolojiktıb ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanı bulmaktadır. Polimerlerin fiziksel özelliklerinin canlı hücrelerle uyuşabilmesi ve benzer özellik gösterebilmesi, biyomateryal olarak kullanılmasının temel nedenidir. Yüksek su içeriği ve düşük ara yüzey gerilimine sahip polimer canlı hücreyle uyuşabilmektedir. Polimerik yapının yüksek su içeriğine sahip olması implante edilmeden önce yapıdaki safsızlıkların giderilmesi, invivo uygulamalarda biyomateryallerin canlı hücre tarafından kabul edilmesiyle avantaj sağlamaktadır(Moradi ve ark., 2004).

2.2. Kromatografi ve Temel Prensipleri

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını sağlayarak kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemdir. Günümüzde karışımları ayırmak için kullanılan farklı kromatografik uygulamalar önem kazanmıştır. Yeni geliştirilen yöntemlerle çok küçük farklılıklara dayanan moleküllerin ayırmaları yapılmaktadır. Kromatografik tekniklerin sınıflandırılması, hareketli ve durağan fazların yapısı ve ayırma prensipleri dikkate alınarak çeşitli şekillerde yapılır. Afinite kromatografisinde, alıkonma mekanizması maddeye özgün

olmakta ve anahtar kilit modeline uygun biyolojik moleküller ligand olarak kullanılmaktadır. Boyut dağılım (Size Exclusion) kromatografisinde analizi yapılacak moleküller boyutlarına göre ayrılmaktadır. Bu sistemde destek materyali üzerindeki farklı boyutlardaki gözenekler birer elek gibi davranarak maddeleri boyutlarına göre ayırtmaktadır. İyon değişim kromatografisinde ayırma tekniği, yüklü bir maddenin ters yükle yüklenmiş katı bir sabit fazla tutulması prensibine dayanır (Suen ve ark., 2000; Labrou ve Clonis, 1999).

Kromatografik yöntem kullanılarak örnek madde bileşenlerinin analizinin yapılmasında, kullanılan hareketli fazın seçiminde kullanılacak sabit faz ve dedektörün özellikleri gibi birçok parametreye dikkat edilmelidir. Kullanılacak kromatografi tekniğinin türüne göre tasarlanmış, çok sayıda farklı materyalden imal edilmiş ve “kolon” olarak adlandırılmış sabit fazlar mevcuttur. Yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) uygulamalarında daha çok, içerisi farklı yüzey özelliklerine sahip destek materyalleri ile doldurulabilen, 30-300 mm uzunluğunda yaklaşık 5 µm iç çapında paslanmaz çelikten kolonlar kullanılmaktadır.

Kromatografik işlemde hareketli faz, sabit fazdan basınç altında geçirilir. Burada moleküllerin hareketi, hareketli fazın itici gücü ve durağan fazın alıkoyucu gücü arasındaki dengeye bağlıdır. Bileşenler ortamda farklı hızlarda ilerlediklerinden kromatografik işlemin sonunda farklı zamanlarda sistemi terk ederler. Belirli koşullar altında, her molekül için parmak izi niteliği taşıyan alıkonma zamanı (retention time- t_R) tanımı türetilmiştir. Durağan fazın alıkoyma gücü, adsorpsiyon, çözünürlük, bağlanma, iyonik etkileşim gibi etkilere dayanmaktadır. Bileşenler, ortamlarda farklı hızlarda ilerlediklerinden, kromatografik işlemin sonunda sistemi farklı zamanlarda terk ederler. Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimleri uygun

bir biçimde ölçölür ve zamana veya hareketli fazın kullanılan hacmine karşı y-ekseninde işaretlenerek “kromatogram” denilen grafikler elde edilir (Yıldız ve Genç, 1993).

2.2.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC sistemi temel olarak pompa, enjektör, kolon (sabit faz) ve dedektör bileşenlerinden oluşan bir donanıma sahiptir. Basınç üretimi, 0.1-10 ml/dakika aralığındaki akış hızları yüksek basınç pompa sistemiyle sağlanmaktadır. Pompa sistemleri; akış hızına, pompanın yapımında kullanılan malzemeye ve pompanın mobil fazı iletme mekanizmasına göre farklı şekilde sınıflandırılabilir. Analitin mobil faza enjekte edilmesi için kullanılan enjektör elle veya bilgisayar ile kumanda edilebilir. Karmaşık örneklerde bileşenlerin birbirinden iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu sabit faz kolondur. Seçilecek kolonun HPLC uygulamasında kullanılacak akış hızı ve dolayısıyla oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Kolonda dolgu maddesi olarak kullanılan polimerik partiküllerin çapları 3-10 µm arasındadır. Partiküller silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçine veya bir iyon değiştirici reçineden oluşur. Sistemin dördüncü bileşenini oluşturan dedektör, kolonda ayrımı yapılan maddeye ait bileşenlerin alıkonma zamanlarına göre sırayla içerisinden geçerken kantitatif tayinlerinin yapıldığı donanımdır.

2.2.2. Afinite Kromatografisi

Klasik kromatografik tekniklerin biyolojik sıvılardan hedef proteinlerin ayrıştırılması veya saflaştırılması işlemlerinde yetersiz kalması verimliliği yüksek yeni alternatif yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmektedir. Kromatografik yöntemlerin arasında en önemli yeri alan afinite kromatografisi tekniğinde, uygun şartlar altında adsorpsiyon ortamında hedef biyolojik molekül afinite destek materyali tarafından kovalent olmayan spesifik etkileşime dayanan adsorpsiyon işlemi ile ayrıştırılır. Bu işlem hedef molekül içeren ortamın sürekli veya kesikli sistemlerde matriksle temasıyla sağlanır. Daha sonra adsorplanan molekül farklı pH, iyonik güçle ve uygun spesifik elüentler kullanılarak biyolojik molekül ile destek materyali arasındaki kovalent olmayan ilişkinin bozulması ile desorbe edilir (Arıca ve ark., 2006, Fitos ve ark., 2002; Matejtschuk, 1997).

Yeni ayrıştırma yöntemleri arasında yer alan afinite kromatografisi, çok çeşitli biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında kullanılan yöntemlerden birisidir. Makromoleküllerin teşhisi ve saflaştırılması için önemli bir metot olan afinite kromatografi yöntemi, 1968'de Cuetracasas ve arkadaşları tarafından ilk kez çalışıldığından beri, binlerce farklı molekülün (enzimlerin, antikorların, hormonların, vitaminlerin, reseptörlerin, çok sayıda farklı glikoproteinlerin, RNA'nın, DNA'nın), hatta bakterilerin, virüslerin ve hücrelerin, ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılmıştır (Cuetracasas ve ark., 1968; Garg ve ark., 1996; Camperi ve ark., 1996).

Afinite kromatografisi alanında yapılan araştırmaların çoğu, yeni afinite destek malzemeleri geliştirme üzerine odaklanmıştır. Destek materyali, yüzeyinde biyolojik moleküllerin spesifik tanınması için fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır. Bunun yanısıra hidrofilik ve gözenekli yapı, kimyasal, mekanik ve biyolojik

kararlılık ve sıcaklığa karşı dayanıklılık göstermelidir. Afinite destek malzemeleri membran, monolit, lif, küre, çubuk ve partikül gibi farklı geometrilerde tasarlanmakta ve farklı fonksiyonel gruplara sahip olacak şekilde monomerler kullanılarak hedef biyolojik molekülü seçimli ayırabilecek hale getirilmektedir. Partikül yapıdaki destek materyallerinin kullanılması hedef moleküllerin karışımdan direkt olarak izole edilmesi ve saflaştırılmasını sağlamasının yanında, işlem zamanını da önemli ölçüde kısaltmış olması önemli avantaj sağlar. Partikül geometrisi afinite destek materyaline geniş yüzey alanı sağlayacağından destek materyal ve protein arasındaki etkileşimi alanı artıracaktır. Partikül yapıda kullanılan destek materyalleri kolon uygulamalarında en az difüzyon sınırlaması ile daha iyi akış özelliği sağlar (Belattar ve Mekhalif, 2004; Alvarez ve ark., 2001; Gan ve ark., 2000).

Destek materyali; destek materyalinin sentezi, materyalin aktivasyonu ve materyale ligandın bağlanması aşamaları sonucunda hazırlanmaktadır. Ancak çoğu kez ayrıştırılacak moleküle karşı afinite gösterecek destek materyalinin hazırlanmasında herhangi bir aktivasyon işlemi ve ligand bağlanması işlemlerinin gerektirmeyebilir. Bu yöntemin önemli avantajlarından birisi, hedef biyolojik molekülü bulunduğu sıvı ortamından tek işlemle ayrıştırılabilmesidir (Arıca ve ark., 2004a).

2.3. Adsorpsiyon ve Adsorpsiyon İzotermi

Gaz, sıvı, buhar veya çözeltilerde bulunan çözünmüş taneciklerin katı yüzeyde tutulması olayına adsorpsiyon, tutunan taneciklerin yüzeyden ayrılmasına ise desorpsiyon denilmektedir. Bu olayda katıya adsorbent, yüzeye tutunan maddeye adsorplanan adı verilir. Proteinlerin adsorpsiyonları katı-sıvı ara yüzeylerinde

gerçekleşmektedir. Bu işlem, hedef protein molekülünün büyüklüğü, şekli, adsorpsiyon ortamının pH'ı, affinite sorbentin yüzey yükü, yüzey topolojisi, fonksiyonel grup bağlarının gücü, protein çözeltisinin başlangıç konsantrasyonu gibi sayısız faktörlerden etkilenmektedir. Protein adsorpsiyonunda etkin bir yöntem olan affinite kromatografisinde performansı belirleyen en önemli parametrelerden biriside destek materyalin seçimidir. Polimerik materyalin yüzeyinde hidroksil, karboksil, amino gibi fonksiyonel grupların bulunması biyolojik molekül ile destek materyali arasındaki iyonik ve/veya elektrostatik etkileşimin sağlanacağı bölgeleri oluşturacaktır. Çözelti fazından adsorpsiyon adsorblayıcı, adsorblanan ve ortam sıcaklığı sabit tutulduğunda, derişime bağılı olarak değişmektedir. Yüzeye adsorplanan madde miktarının, derişimle değişimini veren eğrilere adsorpsiyon izotermi denilmektedir. Tek ve/veya çok tabakalı olarak gerçekleşebilen adsorpsiyon işleminde deneysel yoldan elde edilen adsorpsiyon izotermelerini değerlendirmek için Langmuir, Freundlich, Redlich-Peterson, Temkin, Hill de Bear gibi çok sayıda teorik adsorpsiyon izoterm modelleri geliştirilmiştir (Ghosh, 2004; Bayramoğlu ve Arıca, 2002a; Bradley ve ark., 2005; Arıca ve ark., 2004a; Salnikow, 2000; Bayramoğlu ve ark, 2002b; Gan ve ark., 2000; Pitiot, 2000; Labrou ve Clonis, 1999; Scopes 1986).

2.4. İmmunoglobulinler

İmmunoglobulinler bağışıklık sisteminin yanıtı sonucunda kendilerinin oluşmasında etkin olan antijenlerle özgül olarak birleşip tepkimelere yol açabilen moleküllerdir. İmmunoglobulinler serumdaki protein miktarının %25'ini oluştururlar ve IgM, IgA, IgD, IgE ve IgG gibi beş grup altında tanımlanmıştır. İmmunoglobulin

sınıfları temel yapı bakımından benzerlik göstermektedir. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde IgG molekülü Y harfi biçiminde görülmektedir. IgG molekülü dört alt birimden oluşmaktadır. Bunlardan ikisi 20.000-25.000 molekül ağırlığına sahiptir. Bu zincirlere hafif zincirler denmektedir. Diğer iki polipeptid zinciri uzun ve 50.000-75.000 molekül ağırlığına sahiptir (Ghosh, 2004; Arıca ve ark., 2004a; Josic ve Lim, 2001).

IgG tedavisinin hedeflerinden biri hastanın enfeksiyonlara karşı direncini arttırmaktır. IgG bakteriyel patojenlere karşı işlev görür. Bazı durumlarda belirli bir patojen tanısı olmasa bile hastaların bakteriyel patojenlere karşı direncini artırmak için hastalara IgG tedavisi uygulanmaktadır. Tıbbi uygulamalar için immonoglobulinlerin saflaştırılması işlemi farklı birkaç fizikokimyasal yöntemleri içeren (genellikle çöktürme ve kromatografik yöntemler gibi) geleneksel yöntemlerin kullanılması ile yapılmaktadır. Doğuştan HIgG₂ eksikliği bakteriyel enfeksiyonlara karşı zayıf dirence sebep olmaktadır ve bu gibi durumlarda HIgG₂ zenginleştirilmiş HIgG çözeltileri verilmektedir (Arıca ve ark., 2004a; Josic ve Lim, 2001; Bassi ve ark., 2001; Fassina ve ark., 1998).

3. MATERYAL VE METOT

Yüzey modifikasyon yöntemleri kullanılarak çeşitli biyomoleküllere karşı afinite gösterebilecek şekilde tasarlanan polimerik destek malzemeleri, afinite kromatografisi alanında kullanılmaktadır. Sunulan tez kapsamında, herhangi bir yüzey modifikasyonu gerekmeksizin, hedef biyomolekül (HIgG ve/veya HSA) için hidrojel yapıda afinite poli(akrilikasit-akrilamit) polimerik destek materyalinin hazırlanması planlandı. Bu doğrultuda çalışmamızda, mekanik gücü yüksek, biyolojik ve kimyasal degradasyona karşı dirençli, farklı partikül geometrisine sahip hidrojel yapıdaki akrilat kökenli polimerik destek materyalinin hazırlanması, sulu ortamlardan ve insan serumundan HIgG ve HSA ayrıştırılması/saflaştırılması işleminde afinite sorbenti olarak kullanılması amaçlandı. Afinite kromatografisi alanında kullanmak üzere geliştirdiğimiz serbest karboksil ve amin gruplarına sahip poli(akrilikasit-akrilamid; p(AAc-AA) hidrojel yüksek oranda su tutma kapasitesine sahiptir. Tezde, afinite partiküllerin karakterizasyon çalışmaları (yüzey alanı, partikül boyu ve boyut dağılımı, şişme oranı, SEM mikrografı, FTIR spektrumu) tamamlanarak sulu çözeltilerden ticari açıdan büyük bir öneme sahip olan HSA ve HIgG proteinlerinin adsorpsiyon davranışları ve insan serumundan saflaştırılmaları çalışmalarında kullanılmıştır. p(AAc-AA) afinite partiküllerinin HSA ve HIgG proteinlerini adsorpsiyon çalışmaları kesikli sistem içerisinde çalışıldı. p(AAc-AA) partiküllerinin HSA ve HIgG'ye gösterdiği adsorpsiyon kapasitesiteleri, farklı adsorpsiyon parametreleri altında (pH, adsorpsiyon denge süresi, iyonik şiddet, sıcaklık, başlangıç protein konsantrasyonu gibi) etkileri incelendi. Bunların yanında, adsorpsiyon ve desorpsiyon kinetiği, adsorpsiyon izoterm modeli ve afinite

partiküllerin yeniden kullanılabilirliği gibi parametreler de belirlendi. Hazırlanan hidrojel yapıdaki afinite partiküllerin HSA ve HlgG'ye karşı gösterdiği seçicilik HPLC yardımı ile belirlendi.

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

İnsan serum albumini (HSA), insan immunoglobulin-G (HlgG, cohn fraction II, III) ve başlatıcı olarak kullanılan amonyum persülfat Sigma Chem. Co. (St.Louis. MO, ABD) firmasından temin edildi. Akrilik Asit, akrilamid ve N,N-metilen-bis-akrilamid monomerleri ise Fluka AG (İsviçre) firmasından alındı. Diğer tüm analitik derecede saflıkta olan kimyasallar, Merck AG (Darmstadt,Almanya) firmasından temin edildi.

3.1.2. Cihazlar

3.1.2.1. UV-VIS Spektrofotometre

Sulu ortamdan HlgG ve HSA adsorpsiyonu çalışmalarında deney ortamındaki başlangıç ve bakiye protein miktarları, UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) ile 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlendi.

3.1.2.2 FTIR Spektrofotometre

p(AAc-AA) partiküllerinin FTIR spektrumları, FTIR spektrometre (Mattson 1000 FTIR, İngiltere) kullanılarak elde edildi. Burada kullanılacak tabletler

0.1 g kuru partikül parçası ve 0.1 g KBr karıştırılarak elde edildi ve spektrumları alındı.

3.1.2.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

150-400 µm boyut dağılımına sahip vakum etüvünde kurutulmuş p(AAc-AA) partikülleri, azaltılmış basınç altında altın ile kaplandı ve membranların elektron mikrografları JEOL (JSM 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

3.1.2.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografik çalışmalarda, Bölüm 2.2.1.1 de belirtildiği gibi pompa, enjektör, kolon ve dedektör ünitelerinden oluşan HPLC sistemi (Dionex Co., Germering, Germany) kullanıldı. Dedektör olarak UV-VIS diyot dizi dedektörü (Model 340 S) ve serumdan hedeflenen moleküllerin karışımının ayrıştırılmasında da protein kolonu (VYDAC 259 VHP 5415) kullanıldı. Kromatografik çalışmalarda kullanılan bütün protein çözeltileri membran fitler (0.2 µm, Milipore) ile filtre edildi. Bütün sistem CHROMELLEON veri programı ile Windows işletim sistemi altında otomatik olarak kontrol edildi.

3.1.2.5. Kullanılan Diğer Cihazlar

pH metre (Nel Elektronik, Türkiye), manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, İtalya), vakum etüvü (Nüve EV018, Türkiye), santrifüj (Nüve, Türkiye), su banyosu

(Nüve ST402, Türkiye), sirkülatörlü ısıtıcı soğutulucu su banyosu (Labcon LTB12140, Güney Afrika).

3.2. Yöntem

3.2.1. Poli(Akrilik asit-Akrilamid) Partiküllerinin Sentezi

Partikül geometrisine sahip poli(Akrilik asit-Akrilamid), p(AAc-AA), afinite hidrojel başlatıcı olarak amonyum persülfatın (APS) kullanıldığı UV fotopolimerizasyon yöntemi ile sentezlendi. Akrilik asit (0.5 ml), akrilamid (52.4 mg) N,N-metilen-bis-akrilamid (2.2 mg) monomer karışımına başlatıcı (APS), fosfat tamponu (1.5 ml, 0.1 M pH 7.0) ve hızlandırıcı olarak da TEMED (% 10'luk) ilave edilerek 2 dakika azot gazı geçirildi ve silindir cam reaktörlere aktarıldı. Reaksiyon karışımı, UV ışığı altında oda sıcaklığında 1 saat süre bekletilerek polimerizasyon tamamlandı (Arıca, 2000). Sentezlenen p(AAc-AA) silindirik hidrojeller damıtık su ile yıkandı ve üre içerisinde 3 gün bekletildi. p(AAc-AA) hidrojelleri sırasıyla 1.0 M NaCl, dH₂O ve 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile yıkandı. p(AAc-AA) hidrojelleri vakum etüvünde 40 °C'de kurutulduktan sonra öğütülerek moleküler elek ile elendi ve boyut dağılımı belirlendi.

3.2.2. p(AAc-AA) Partiküllerinin Karakterizasyonu

p(AAc-AA) partiküllerinin farklı sıcaklıklardaki denge su içeriği, oda sıcaklığında gravimetrik yöntemle distile su kullanılarak tayin edildi. p(AAc-AA) partiküllerinin denge su içerikleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Arıca, 2000)

$$\% \text{ Denge su içeriği (w/w) } = [(W_s - W_k) / W_k] \times 100 \quad (3.1)$$

Burada, W_k kuru partikülün ağırlığı, W_s ise denge su içeriğine ulaşmış partiküllerin ağırlığıdır.

Vakum etüvünde kurutulmuş p(AAc-AA) partiküllerin elektron mikrografları taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi. Afinite partiküllerin spektrumları, FTIR spektrofotometre kullanılarak elde edildi.

3.2.3. HSA ve HlgG'nin Sulu Çözeltiden Adsorpsiyon Davranışının İncelenmesi

p(AAc-AA) partiküllerine, sulu ortamdan HSA ve HlgG adsorpsiyonu kesikli sistemde çalışıldı. Deneyler, 1.0 mg/ml başlangıç protein konsantrasyonu içeren, 50 mM, 7.5 ml tampon içeren adsorpsiyon ortamında, 25 °C sıcaklıkta, 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirildi.

Hidrojel yapıdaki afinite partiküllere adsorplanan HSA ve HlgG miktarları, deney ortamındaki başlangıç ve bakiye HSA ve HlgG miktarlarının 280 nm dalga boyunda spektrometrik yöntem kullanılarak belirlendi. Başlangıç HSA ve HlgG konsantrasyonu 0.05 – 2.0 mg/ml aralığında tutularak kalibrasyon grafiği elde edildi. Deney sonucunda partiküller adsorpsiyon ortamından uzaklaştırıldı ve adsorplanan protein miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı (Arıca ve ark., 2004b)

$$q = [(C_o - C) V_s] / m \quad (3.2)$$

Burada q; afinite partiküller üzerine adsorplanan HSA ve HlgG miktarlarını (mg/g), C_o ve C sırası ile başlangıç ve adsorpsiyon işleminden sonra ortamda kalan bakiye

HSA ve HlgG konsantrasyonlarını (mg/ml), V_s ; adsorpsiyon çözeltisinin hacmini (ml) ve m; adsorpsiyon ortamındaki adsorbent miktarını (g) göstermektedir.

3.2.3.1. Adsorpsiyon Parametrelerinin Etkisi

Afinite hidrojelinde HSA ve HlgG karşı adsorpsiyonun kapasitesi pH, adsorbent dozu, sıcaklık, başlangıç protein konsantrasyonu ve iyonik şiddet gibi parametrelerin etkisi araştırılarak tayin edildi. Adsorpsiyon ortam pH'sının, HSA ve HlgG adsorpsiyonuna etkisi, pH 4.0 ile 9.0 aralığında farklı tampon sistemleri kullanılarak araştırıldı. pH 4.0-5.0 aralığında asetat tamponu (0.1 M $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$) ve pH 6.0-8.0 aralığında fosfat tamponu (0.1 M $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) kullanıldı.

Afinite partiküllerin adsorpsiyon hızı ve kapasitesine başlangıç HSA ve HlgG miktarlarının etkisi, HSA ve HlgG başlangıç konsantrasyonları 0.05-3.0 mg/ml aralığında tutularak araştırıldı. Destek materyali miktarının protein adsorpsiyonuna etkisi, sorbent miktarı 25-150 mg aralığında değiştirilerek incelendi. Bu şekilde katı/sıvı oranının adsorpsiyon kapasitesine etkisi belirlendi. Sıcaklığın HSA ve HlgG adsorpsiyonlarına etkisi, 1.0 mg protein/ml içeren tampon sisteminde beş ayrı sıcaklıkta (4, 15, 25, 37 ve 45°C) çalışıldı. p(AAc-AA) afinite partiküllerine protein adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi, 0.0-1.0 M konsantrasyon aralığında NaCl içeren ortamda araştırıldı.

3.2.3.2. Adsorpsiyon İzotermi

p(AAc-AA) partiküllerinin adsorpsiyon hız ve kapasitesine başlangıç HSA ve HlgG konsantrasyonlarının etkisi ve adsorplanan protein miktarı (3.2) eşitliği

kullanılarak hesaplandı (Bayramoğlu ve ark., 2002b). p(AAc-AA) afinite hidrojelleri ile sulu ortamdan HSA ve HIgG adsorpsiyonunda belirlenen deneysel verilerin teorik olarak türetilen Langmiur ve Freundlich izoterm modellerine uygunluğu incelendi.

Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli, moleküllerin her biri sadece bir molekülü tutabilen iyi tanımlanmış sabit sayıdaki bölgelere adsorplandığını öngörür (Bayramoğlu ve Arıca, 2002a; Arıca ve ark., 2004a). Langmuir adsorpsiyon izotermi aşağıdaki eşitlikle belirlenmektedir.

$$q_{den} = q_m C_{den} / (K_d + C_{den}) \quad (3.3)$$

Yukarıdaki eşitlikte; q_m , partikülün maksimum adsorpsiyon kapasitesini (mg/g adsorbent); C_{den} , sulu ortamdaki denge konsantrasyonunu (mg/ml); q_{den} membranı dengede adsorpsiyon kapasitesini (mg/g adsorbent); ve K_d ayrışma sabitini (mg/ml) göstermektedir.

Heterojen adsorpsiyonlar için, Alman fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich (1880-1941) tarafından Langmuir denkleminde türetilen, Freundlich adsorpsiyon izotermi kullanılır.

$$q_{den} = K_F (C_{den})^n \quad (3.4)$$

Burada. K_F , adsorpsiyon kapasite parametresi (mg/g adsorbent) ve n adsorpsiyon yoğunluğunu gösteren üssel parametredir (Arıca ve ark., 2004b).

Bu doğrultuda, deneysel verilerden elde edilen C_{den} ve q_{den} değerleri kullanılarak 3.3 ve 3.4 eşitliklerine göre çizilen grafiklerin eğim ve kaymasından bu izoterm modellerinin sabitleri belirlendi.

3.2.3.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

p(AAc-AA) afinite hidrojellere adsorplanan proteinlerin elüsyonları, NaCl (2.0 M, pH 5.0) ile gerçekleştirildi. Desorpsiyon, desorbe edilen protein miktarının afinite partiküllere adsorplanan protein miktarına oranlanarak belirlendi (Arıca ve ark., 2004b; Bayramoğlu ve Arıca, 2003). p(AAc-AA) afinite partiküllerinin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek üzere adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı afinite partiküller kullanılarak 6 kez tekrar edildi.

3.2.4. Afinite Partiküller ile İnsan Serumundan HSA ve HlgG Adsorpsiyonu

Karakterizasyonu ve optimum adsorpsiyon koşulları belirlenen p(AAc-AA) afinite partikülleri ile kesikli sistemde insan serumundan adsorplanan ve elüe edilen HSA ve HlgG miktarları HPLC ile belirlendi. İnsan serumundan HSA ve HlgG saflaştırma çalışmaları için, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesinden alınan insan serumu 0.1 M, pH 5.0 Asetat tamponu ile 1:5 oranında seyreltilti. Adsorpsiyon işlemi toplam 7.5 ml hacimde, 50 mg afinite partikülleri kullanılarak, 25°C’de ve 4 saat süre ile 100 rpm hızda devamlı karıştırılarak gerçekleştirildi. Proteinlerin ayrıştırılmasında taşıyıcı faz olarak A hattında; ultra saf su içerisinde % 0,1 trifluoroasetik asit (TFA) ve B hattında ise % 95 asetonitril (AcN) ve % 5 ultra saf su içerisinde % 0,1 oranında TFA’nın kullanıldı. Dedektör dalga boyunun 220 nm ve hareketli faz akış hızının 1 ml/dk olduğu sistemde B hattının % 25’ten % 60’a

ıkarıldığı gradient program kullanıldı. Numune enjeksiyonları 20 µl olarak yapıldı
(Arıca ve ark., 2004a).

4. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME

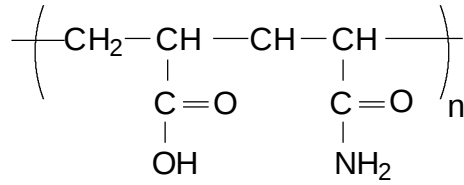
Afinite kromatografisi tekniği kullanılarak çok çeşitli biyolojik moleküllerin hızlı ve büyük miktarlarda saflaştırılmasının mümkün olması diğer klasik ayırma yöntemlerine göre önemli avantajlar sağlamaktadır. Biyolojik bir molekülün taşıyıcı materyal üzerine bağlanması kovalent, iyonik veya adsorpsiyon şeklinde olmaktadır. Proteinlerin adsorpsiyonları katı-sıvı ara yüzeylerinde gerçekleşmektedir. Bu işlem sırasında, hedef protein molekülünün büyüklüğü, şekli, adsorpsiyon ortamının pH'sı, affinite sorbentin yüzey yükü, yüzey topolojisi, fonksiyonel grup bağlarının gücü, protein çözeltisinin başlangıç derişimi gibi sayısız faktörlerden etkilenmektedir. Karışımdan hedeflenen biyolojik molekülün yüzeye bağlanan madde miktarı taşıyıcı materyalin kimyasal bileşimi ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle affinite kromatografi alanında kullanılacak materyallerin seçiminde destek materyalinin gözenekliliği ve/veya toplam yüzey alanı yanında yapıdaki hidrofilik ve hidrofobik grupların yani polar grupların varlığı da önemlidir. Yapılarındaki bu farklı fonksiyonel grupların ortam pH ve sıcaklığına karşı duyarlılığının farklı olması hidrojellerin özelliklerini değişik yönlerde etkilemektedir. Bu bağlamda, hidrofilik karakterli hidrojeller, kromatografi ve biyomateryal alanındaki uygulamalarda önemli bir yer teşkil etmektedir (Bradley ve ark, 2005; Arıca ve ark., 2004a; Bayramoğlu ve Arıca, 2002a).

Sunulan çalışmada, affinite kromatografisi alanında kullanılmak üzere, herhangi bir aktivasyon ve/veya modifikasyon işlemi gerektirmeden insan serumundan tek basamakta albumin ve immunoglobulin G uzaklaştırılması ve

saflaştırılması işleminde kullanılmak üzere hidrojel yapıda yeni bir destek materyali geliştirildi.

4.1. Afinite Hidrojellerin Karakterizasyonu

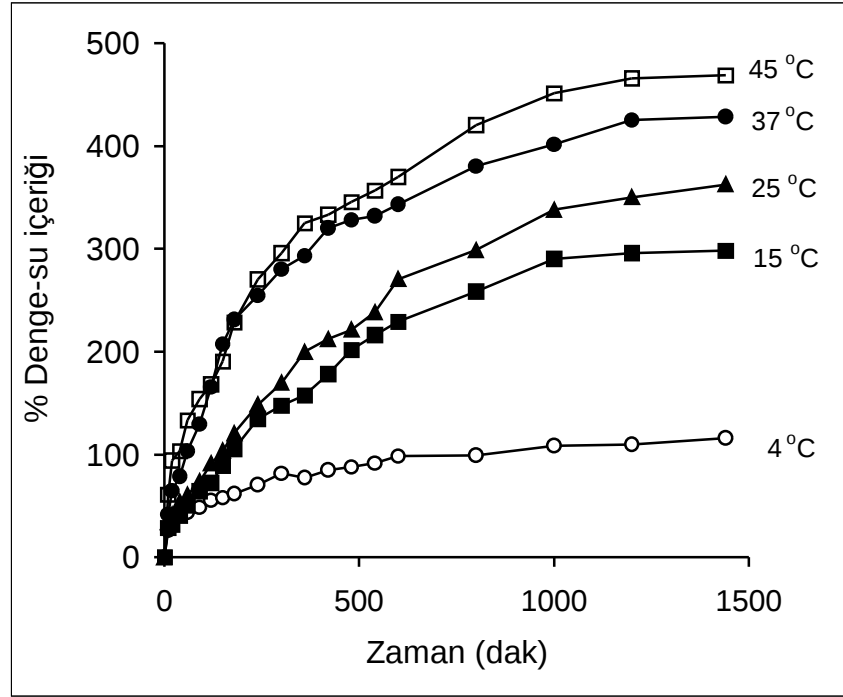
Akrilik asit ve akrilamid monomerleri amonyum persülfat başlatıcı varlığında UV fotopolimerizasyon yöntemi ile hidrojel yapıda kopolimer olarak sentezlendi (Şekil 4.1). Sentezlenen p(AAc-AA) hidrojelini öğütüldü ve belirli gözenek çapına sahip moleküler elekler kullanılarak boy ve boyut dağılımı belirlendi. 150-400 µm boyut aralığına sahip partiküller sulu ortamdan HSA ve HIgG adsorpsiyonu çalışmalarında kullanıldı.



Şekil 4.1. poli(akrilikasit-akrilamid) hidrojelinin kimyasal kompozisyonu

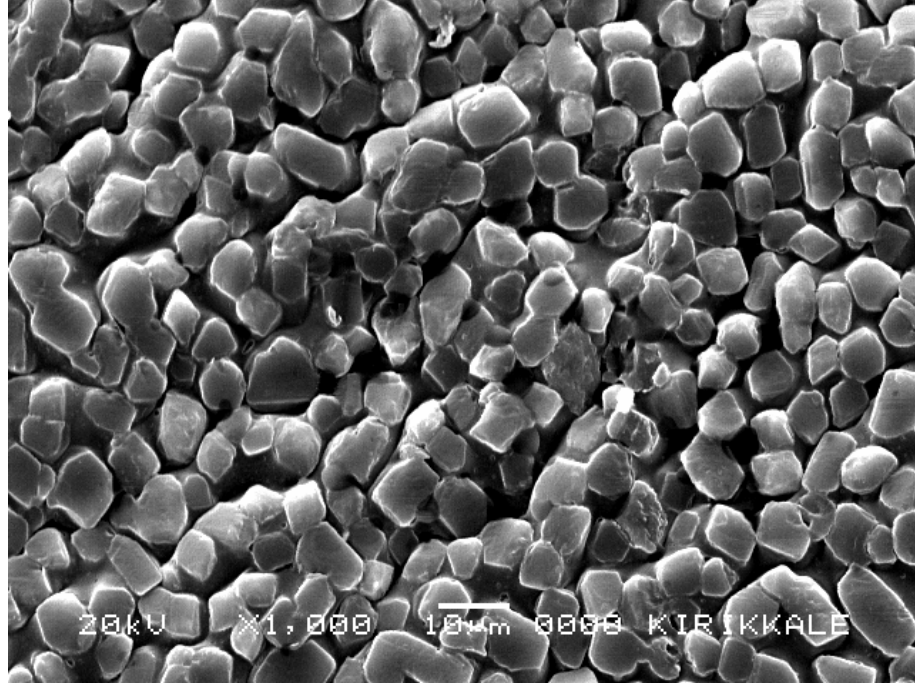
Protein adsorpsiyonu çalışmalarında, destek materyalin su içeriği önemlidir (Kim ve ark., 2004; Arıca ve ark., 2004a). Partikül yapıda hazırlanan poli(akrilikasit-akrilamid) afinite hidrojelinin, yapısındaki COOH ve NH₂ gruplarının varlığından dolayı, hidrofilite derecesi yüksektir ve bu nedenle ağ yapısına oldukça fazla miktarda su absorplarlar. p(AAc-AA) partikülleri suda şişerken çözünmeme özelliğine sahip, yumuşak ve elastik üç boyutlu çapraz bağlı ağ yapıda hidrofilik bir hidrojelidir. Şişme sırasında fiziksel ve kimyasal dengeye ulaşıncaya kadar hacimleri artmaktadır. Bu sırada hidrojellerin hacimleri artsa da geometrik şekilleri korunmaktadır. Su absorplama miktarları yani denge-su içeriği, hidrojellerin

gözenekliliğine ve gözenek boyutuna bağlıdır. Hidrojellerin gözenek boyutu da ortam pH'sına göre değişmektedir. Düşük pH ortamlarında gözenek boyutu veya çapı küçülmekte ve hidrojelün üç boyutlu ağı yapısına alabildiği su molekülü de azalmaktadır. p(AAc-AA) afinite partiküllere su difüzyonunun hızlı olduğu, sıcaklığın artması ile denge-su içeriğinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.2). Akrilamid monomeri bulunan polimer çözeltisine akrilik asit gibi iyonik bir monomer ilave edilerek sıcaklığa ve pH'a duyarlı destek materyali elde edilmiştir. Afinite partiküllerin pH'a bağımlılığı yapısındaki iyonize olabilen gruplara bağlı olarak açıklanabilir. Akrilikasitin pK_a değeri 4.3 dür ve bu pK_a değerinden daha küçük pH değerlerinde akrilikasitin iyonizasyon derecesi de küçüktür. Bu koşullarda, akrilamidin yan grubu olarak bulunan NH_2 grubu ile akrilikasitin genel olarak $COOH$ yapısında bulunan yan grupları arasında kuvvetli hidrojen bağlarının oluşumuna neden olacaktır. Bunun sonucunda da hidrojel su kaybı sonucunda büzülür ve oda sıcaklığında opak bir görünüm alır. pH değerinin pK_a değerinden daha büyük olduğu durumlarda, akrilikasit polimer zincirlerinin yan grupları arasındaki elektrostatik itme ve ağ yapısındaki yüklü iyonların hareketliliğinin engellenmesi sonucunda oluşan iyonik ozmotik basınç etkilerinin ortak sonucu olarak polimer zincirleri uzama eğilimine girecektir (Kim ve ark., 2004; Maolin ve ark., 2000; Zhou ve ark., 1996). Bu nedenle çalışmamızda kullandığımız p(AAc-AA) afinite hidrojelinin denge su içeriğinin artan pH ile artması literatürdeki çalışmalarla uyumlu olduğu söylenebilir.



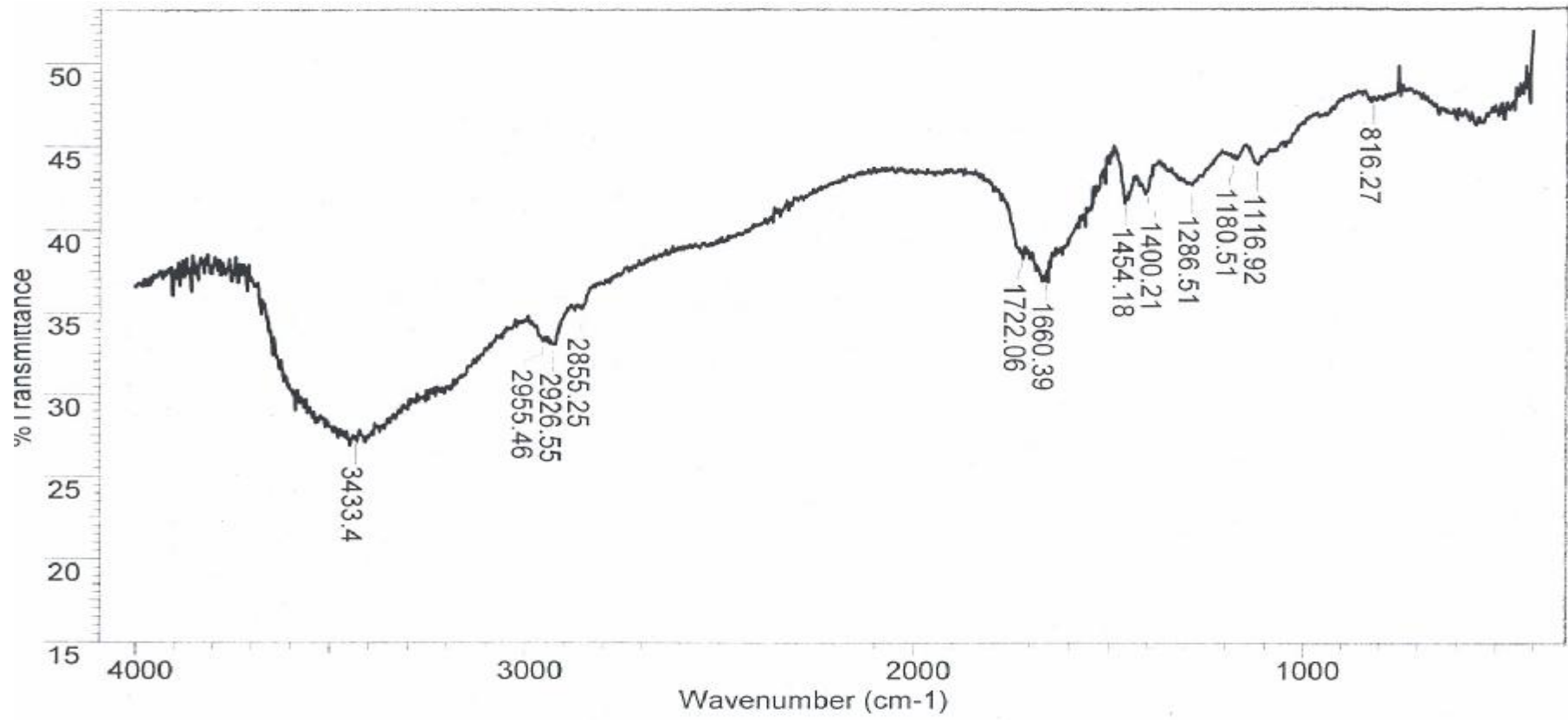
Şekil 4.2. Partikül yapıdaki p(AAc-AA) afinite hidrojenlerinin farklı sıcaklıklardaki denge su içeriği davranışı

Kromatografik destek materyalinin gözenekli yapıda olması hedef molekül için yüksek erişim bölgeleri sağlayacağından, daha fazla afinite göstermesi ile adsorpsiyon eğilimi ve kapasitesini arttırarak önemli bir avantaj sağlar. Gözenekli bir yapıya sahip olduğu SEM mikrografı ile belirlenen p(AAc-AA) hidrojeninin partikül yapıda kullanılması, protein adsorpsiyon çalışmasında daha geniş yüzey alanı sağlamıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Partikül yapıdaki p(AAc-AA) afinite hidrojelinin SEM mikrografı

Partikül yapıdaki afinite hidrojin elde edilen FTIR spektrumu Şekil 4.4’te verildi. Spektrumdaki yaklaşık 1668 cm^{-1} civarındaki absorpsiyon piki akrilamidin amino gruplarının varlığından kaynaklanmaktadır. Akrilikasitin karbonil gruplarından ileri gelen absorpsiyon pikleri ise yaklaşık 1722 cm^{-1} de gözlemlendi. 3441 , 1714.3 , 1668 cm^{-1} deki kuvvetli absorpsiyon bantları C=O piki, 1179 cm^{-1} deki C-O karakteristik piki, 2932 ve 1456 ’deki C-H gerilim ve titreşim bantlarına ait pikler ve 2864 cm^{-1} ’den 2550 cm^{-1} ’e uzanan O-H pikine ait band akrilikasit ve akrilamit monomerlerinin kopolimer yapıda olduğunun bir göstergesidir.



Şekil 4.4. p(AAc-AA) partiküllerin FTIR spektrumu

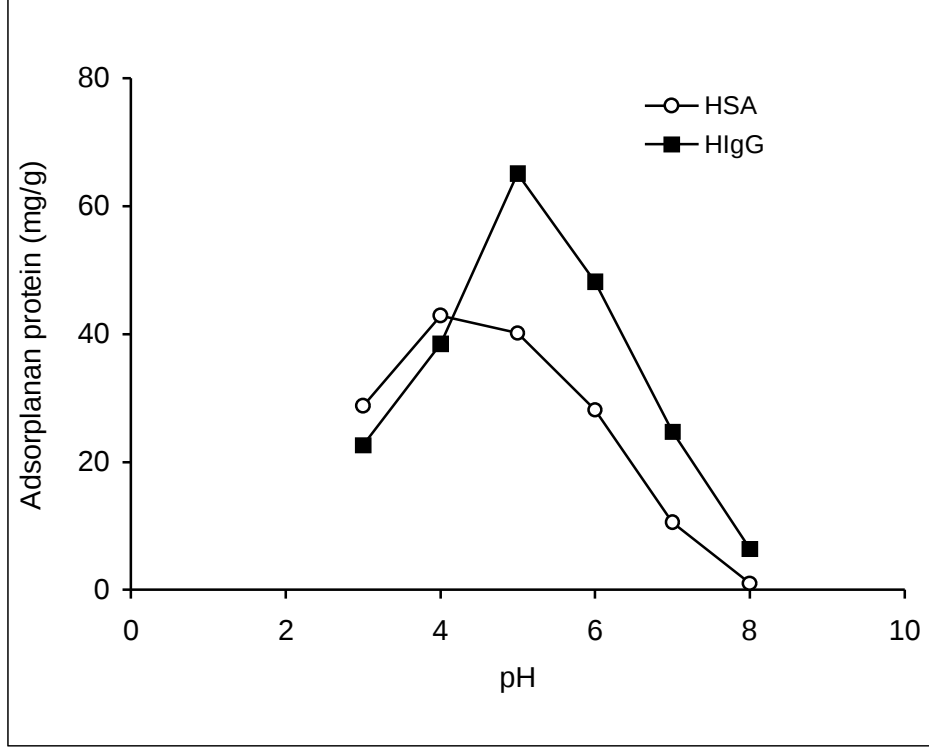
4.2. HSA ve HlgG Adsorpsiyonu

4.2.1. pH etkisi

Afinite kromatografisinde afinite destek materyalleri ile protein saflaştırma çalışmalarında, ortam pH'sı oldukça önemlidir. Partikül yapıdaki p(AAc-AA) afinite hidrojeller ile HSA ve HlgG adsorpsiyonu üzerine pH etkisi Şekil 4.5'de verildi. Maksimum albumin adsorpsiyunu pH 4.0'da elde edilirken immünoglobulin G için optimum pH değeri 5.0 olarak belirlendi. Proteinler amfoterik bir yapıdadır ve yüzey yüklerinin baskın türü (pozitif/negatif) ve sayısı ortam pH'sından etkilenmektedir. İnsan serum albumini ve immünoglobulin G'nin izoelektrik noktaları sırası ile 4.8 ve 6.95'dir ve bu değer altındaki pH noktalarında katyonik, üzerindeki pH noktalarında ise anyonik özelliktedir (Ghosh, 2004). Daha asidik bölgelerde hidrojelin gözenek ve gözenek boyutunun azalması ve daha bazik bölgelerde de aynı yük yoğunluğuna sahip ara yüzeydeki itme kuvvetlerinin baskın olması sonucunda adsorpsiyon kapasitesi önemli derecede azalmıştır. pH 7.0 ve üzerindeki değerlerde afinite hidrojeli kopolimer yapısındaki pKa değeri 4.3 olan akrilikasitin karbonil grubu iyonizasyondan dolayı ($-COO^-$ grupları) negatif yüklüdür. Bu pH değerlerinde negatif yüzey yüküne sahip olan HlgG ile afinite hidrojeli arasında aynı yüklerin elektrostatik olarak birbirini itmesinden dolayı adsorpsiyon kapasitesinde oldukça azalma gözlenmiştir (Hirotzu ve Tagaki, 2004).

Proteinlerin izoelektrik noktalarında net yük taşımadıkları bilinmektedir ve dolayısıyla sulu çözeltilerden maksimum adsorpsiyon genellikle izoelektrik noktalarında gerçekleşmektedir (Yılmaz ve ark., 2005). p(AAc-AA) afinite hidrojeli ile sulu ortamdan HSA uzaklaştırılması işleminde maksimum adsorpsiyon HSA'nın izoelektrik noktasına yakın olan pH 4.0 değerinde gözlenmiştir. Bu spesifik etkileşim HSA'nın bu pH'daki konformasyonel durumundan ve dolayısı ile yapısındaki aminoasit yan zincirlerinin

iyonizasyon derecesinden ve akrilamid komonomeri ile protein yüzeyindeki negatif yük yoğunluğuna sahip bölgeler arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklanmaktadır.

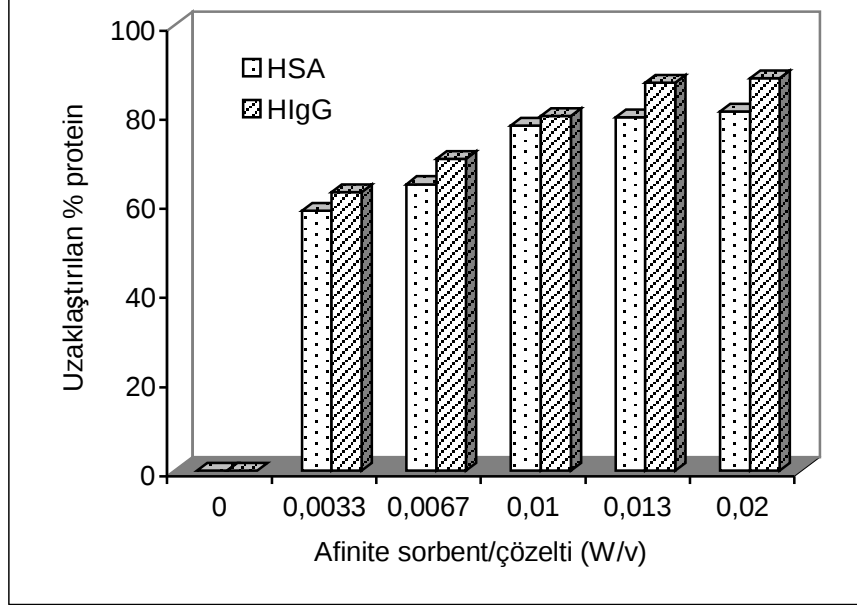


Şekil 4.5. Partikül yapıdaki afinite hidrojel ile sulu ortamdan HSA ve HlgG adsorpsiyonunda pH etkisi

4.2.2. Adsorbent dozunun etkisi

7.5 ml toplam deney hacminde katı afinite sorbent miktarına (25, 50, 75, 100, 150 mg) HSA ve HlgG adsorpsiyon kapasitesine katı/sıvı oranının etkisi araştırıldı (Şekil 4.6). Adsorpsiyon kapasitesinin HSA ve HlgG ile etkileşimde bulunan adsorbent miktarının artması ile arttığı ve belirli bir dozda doygunluğa ulaştığı görüldü. Adsorbent dozunun 100

mg'a kadar artırılması ile adsorpsiyon kapasitesinde bir artış gözlenirken bu değerin üstünde sabit kaldığı belirlendi (Şekil 4.6).

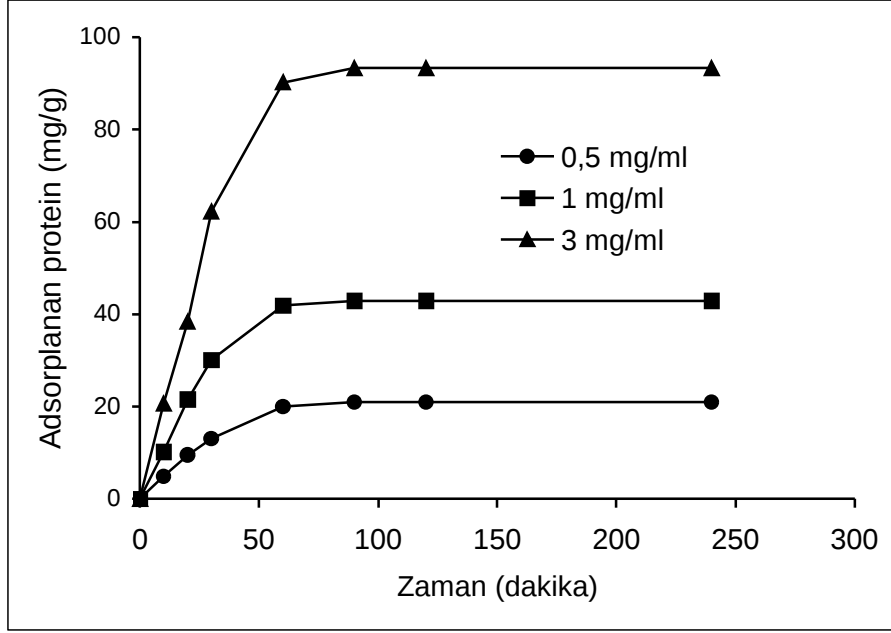


Şekil 4.6. p(AAc-AA) afinite hidrojel ile sulu ortamdan protein uzaklaştırılmasında katı destek/ protein çözeltisi oranının etkisi

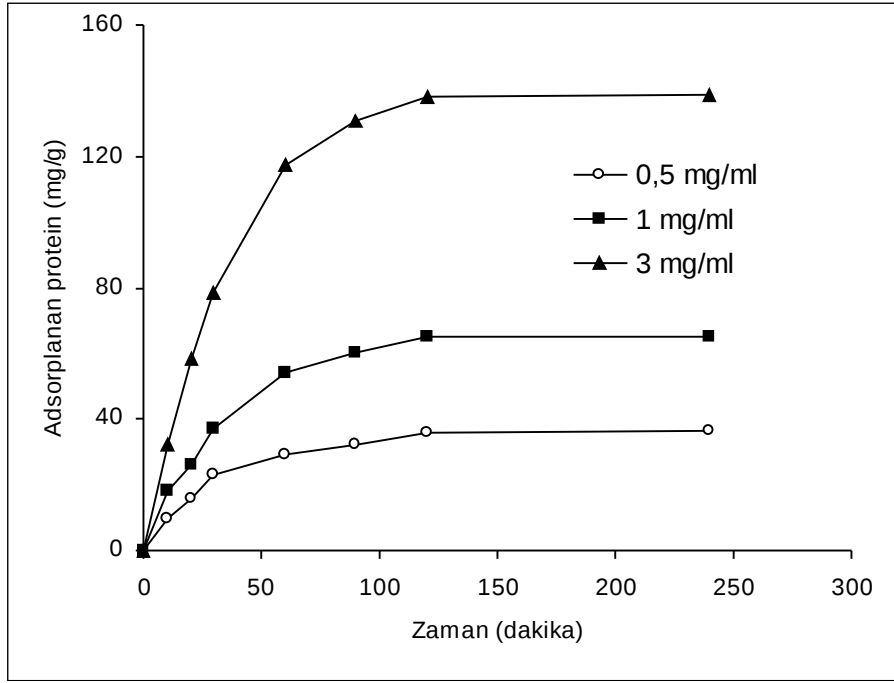
4.2.3. Adsorpsiyon Kinetiği

p(AAc-AA) afinite hidrojel ile sulu ortamdan HSA ve HlgG saflaştırılması işleminde adsorpsiyon hızına denge-zamanın etkisi araştırıldı. Farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki HSA ve HlgG proteinleri için adsorpsiyon işleminin başlangıcında yüksek adsorpsiyon hızı olduğu, 130 dakika içerisinde dengeye ulaştığı ve 240 dakika boyunca sabit kaldığı gözlemlendi (Şekil 4.7, 4.8). Adsorpsiyon ortamındaki başlangıç HSA ve HlgG konsantrasyonlarındaki artış adsorpsiyon hızı ve kapasitesinde de artışa neden oldu. Bu nedenle çeşitli koşullar

altındaki (farklı adsorpsiyon parametreleri) adsorpsiyon verileri, dengeye ulaşılan 4 saatlik adsorpsiyon işlemi sũreci uygulanarak elde edildi.



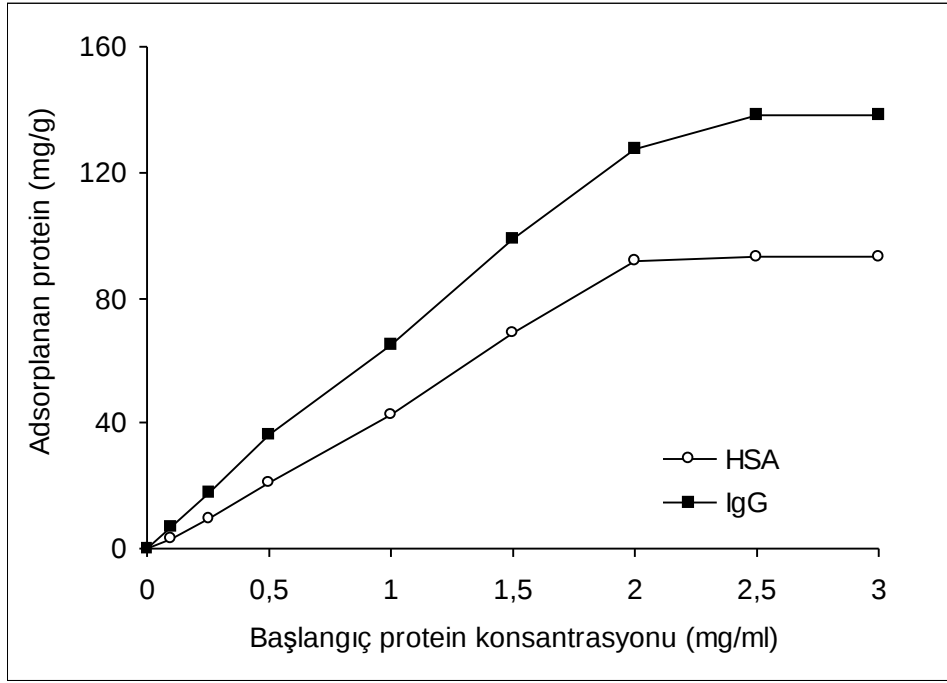
şekil 4.7. p(AAc-AA) afinite hidrojele HSA adsorpsiyonunda denge zamanı



Şekil 4.8. p(AAc-AA) afinite hidrojele HIgG adsorpsiyonunda denge zamanı

4.2.4. Başlangıç Protein Konsantrasyonunun Etkisi

Afinite sorbentin adsorpsiyon hız ve kapasitesine başlangıç HSA ve HIgG konsantrasyonlarının etkisi 0.125-3.0 mg/ml aralığında çalışılarak belirlendi. Partikül yapıdaki p(AAc-AA) afinite hidrojel kullanılarak elde edilen adsorpsiyon izotermleri Şekil 4.9’da verildi. HSA ve HIgG konsantrasyonunun sırası ile 2.0 ve 2.5 mg/ml değerine kadar adsorpsiyon ortamında protein derişiminin artması ile adsorpsiyon kapasitesinin lineer bir şekilde arttığı gözlemlendi. Bu, afinite partiküllerin etkileşim gruplarının, adsorbe olmuş HSA ve HIgG molekülleri ile doygun hale gelmiş olmasıyla açıklanmaktadır.

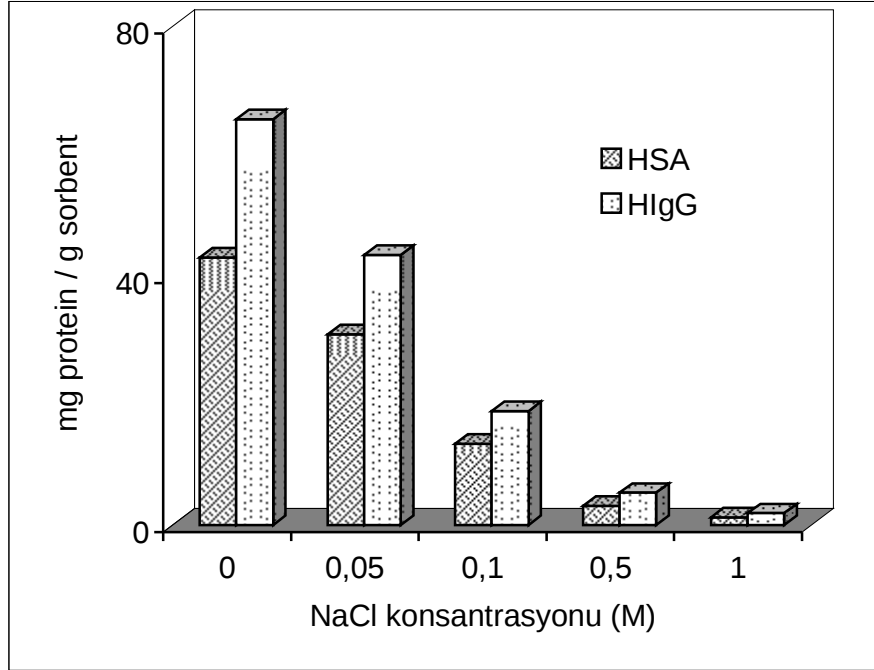


Şekil 4.9. Başlangıç protein konsantrasyonunun adsorpsiyon kapasitesine etkisi

4.2.5. İyonik Şiddetin Etkisi

p(AAc-AA) afinite hidrojele sulu ortamdan HSA ve HlgG adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisini NaCl varlığına bağlı olarak incelendi. İyonik şiddetin artması ile afinite membranların adsorpsiyon kapasitesinde azalma gözlemlendi (Şekil 4.10). Adsorpsiyon ortamında iyonik şiddet artırılması ile katı-sıvı ara yüzeyi çevresindeki elektriksel çift tabakanın elektriksel yük yoğunluğunun değişebileceği ve bunun sonucunda adsorpsiyon eğiliminde azalma gözlenebileceği, adsorpsiyon ortamında elektrolit konsantrasyonu artması ile protein yüzey yükünün perdeleneyeceği van Oss tarafından belirtilmiştir (Arıca ve ark., 2004a; Sun ve ark., 2003; Suen ve ark., 2000). Adsorpsiyon ortamında tuz konsantrasyonu artması ile adsorpsiyonun azalması, konformasyonel değişiklikler sonucu HSA ve HlgG moleküllerinin daha sıkı yapılar oluşturmasıyla da açıklanabilir. Bu sıkı yapılar HSA ve HlgG

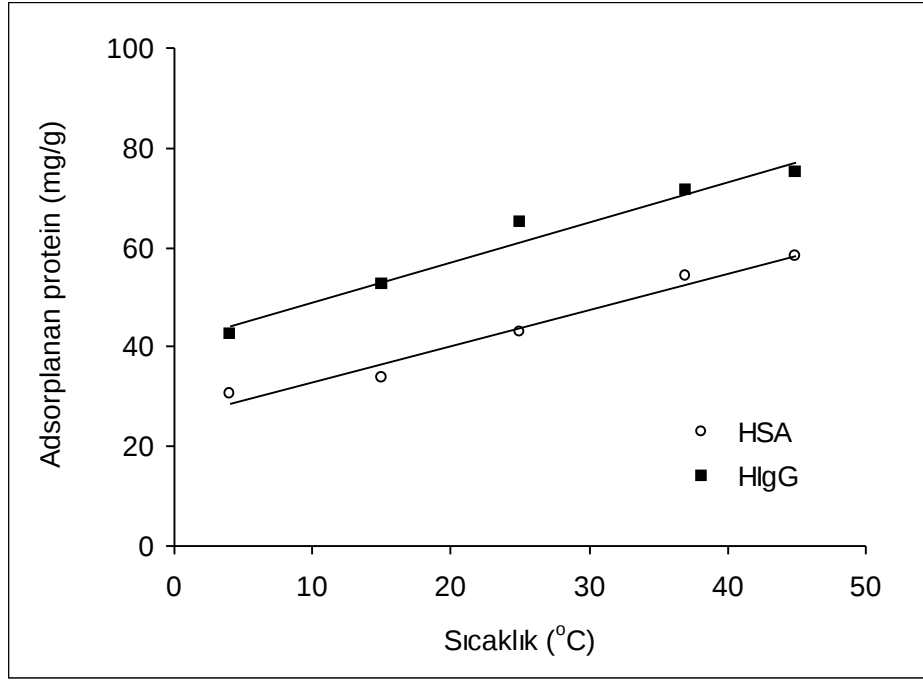
molekülleri üzerindeki bağlanma bölgelerinin molekülün içerisinde kalarak adsorpsiyonun azalmasına sebep olmaktadır.



Şekil 4.10. Afinite hidrojel ile sulu ortamdan protein adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi

4.2.6. Sıcaklığın Etkisi

Afinite partiküllere HSA ve HIgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 4-45 °C sıcaklıkları arasında araştırıldı (Şekil 4.11). Sıcaklığın 4°C'den 45°C'ye çıkartılması ile afinite hidrojel ile HSA ve/veya HIgG proteini arasındaki etkileşim alanının artması sonucunda adsorpsiyon kapasitesinde artış gözlemlendi. p(AAc-AA) afinite hidrojinin adsorpsiyonunun sıcaklıkla artması HSA ve HIgG moleküllerinin üç boyutlu konformasyonu ile ilgili olduğu düşünüldü.



Şekil 4.11. Afinite hidrojele HSA ve HIgG adsorpsiyonu işleminde sıcaklığın etkisi

4.2.7. Adsorpsiyon İzoterm Modeli ve İlgili Parametreler

Adsorpsiyon izotermi, çözeltideki protein derişimi ile afinite sorbente adsorplanmış protein arasındaki ilişkiyi açıklamakla birlikte proteinin matriksle etkileşimini karakterize etmek için kullanılır. Adsorpsiyon özelliklerinin değerlendirilmesi için sulu çözeltiden HSA ve HIgG adsorpsiyonu çalışmalarında, bu proteinlerin matriksle ilişkisini açıklamak amacıyla kesikli sistem deneyleri sırasında elde edilen deneysel değerlerin, teorik adsorpsiyon izoterm modellerine uygunluğu araştırıldı. Afinite hidrojinin kullanılması ile sulu ortamdan HIgG uzaklaştırılması işleminde farklı başlangıç protein derişimleri için belirlenen deneysel verilerin Langmuir adsorsiyon izoterm eşitliğine uygulanması ile elde edilen 0.995 korelasyon katsayısına sahip doğrusal grafik bu adsorpsiyon işleminin Langmuir adsorpsiyon modeli ile açıklanabileceğini göstermektedir. Ayrıca teorik olarak belirlenen maksimum adsorpsiyon kapasitenin, q_m , deneysel adsorpsiyon kapasitelerine, $q_{m(\text{deneysel})}$, yakın olması, afinite hidrojel ile sulu çözeltiden HIgG adsorpsiyonunda bu modelin uygunluğunun bir başka göstergesidir

(Çizelge 4.1). Langmuir modelinde K_d değeri protein ve sorbentten oluşan kompleksin kararlılığının göstergesidir. K_d değerinin 5.23×10^{-7} olması, proteinin sorbente karşı yüksek bağlanma afinitesi olduğunu göstermektedir (Zhang ve ark., 2000).

Afinite partiküllerle sulu çözeltiden HSA adsorpsiyonundan elde edilen (Şekil 4.9) değerler Langmuir izoterm modeline uygulandığında bir doğru elde edilemedi ve Lagmuir izoterm parametreleri hesaplanamadı. Homojen adsorpsiyon olgusunu ifade eden Langmuir modeline göre bir doğru elde edilememesi adsorpsiyonun doğasının heterojen olduğunu bir göstergesidir. Her iki protein için de K_F ve n değerlerinin yüksek olması p(AAc-AA) afinite hidrojelın yüksek adsorpsiyon kapasitesi ile sulu ortamdan HSA ve HIgG uzaklaştırılması işleminin kolay olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1. p(AAc-AA) afinite hidrojel ile sulu ortamdan HSA ve HIgG uzaklaştırılması işleminde adsorpsiyon izoterm modelleri sabitleri ve korelasyon katsayıları

		Langmuir İzoterm Parametreleri				Freundlich İzoterm Parametreleri		
	$q_{m(deney)}$	q_m	$K_d \times 10^7$	$K_a \times 10^6$	R^2	n	K_F	R^2
Protein	(mg/g)	(mg/g)	(M)	(M ⁻¹)				
HSA	93.35	—	—	—	—	0.98	85.85	0.970
HIgG	138.53	142.86	5.23	1.91	0.995	2.01	184.39	0.967

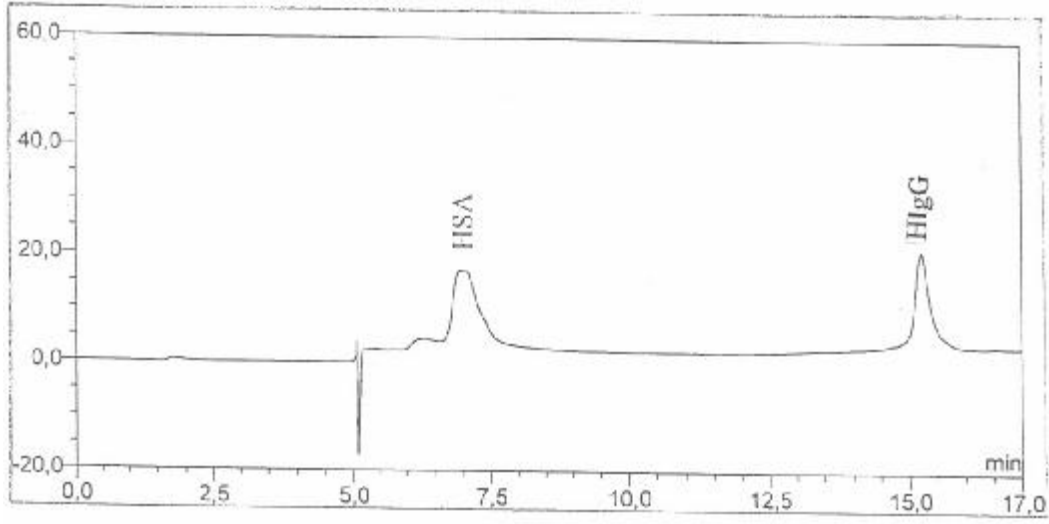
4.2.8. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

p(AAc-AA) partiküllerin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için aynı afinite partikülleri kullanılarak 6 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işleminden sonra, HSA ve HIgG adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir derece azalma olmadığı gözlemlendi.

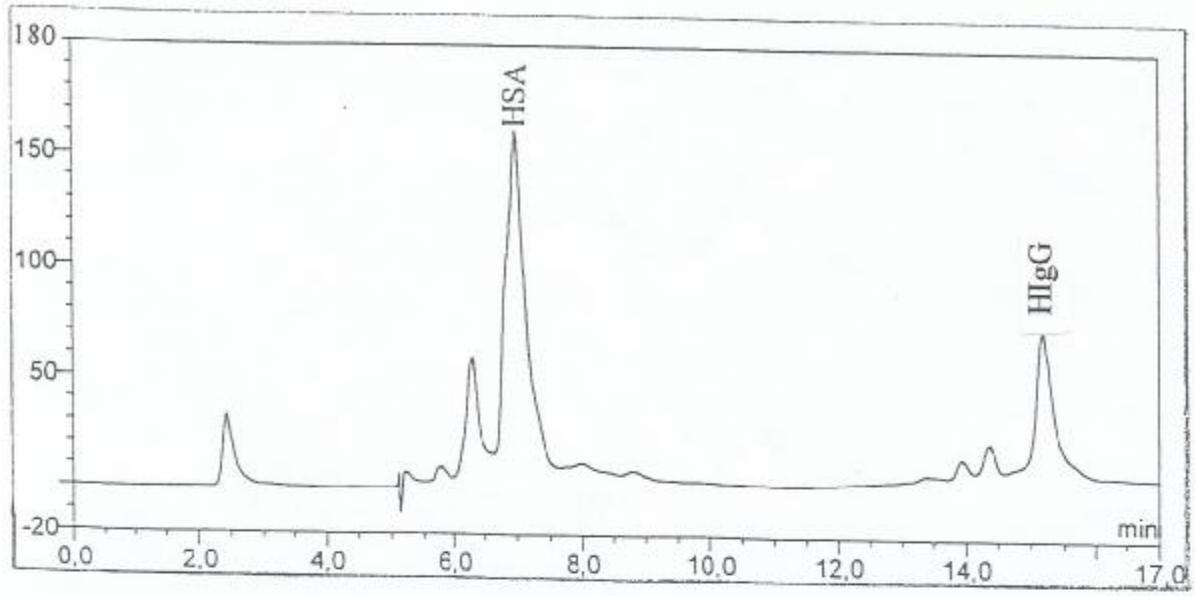
p(AAc-AA) afinite hidrojele adsorplanan HSA ve HIgG desorpsiyonu, pH'sı 5.0 olan 2.0 M NaCl içerisinde gerçekleştirildi. Afinite sorbenti ilk olarak 1.0 mg/ml başlangıç protein konsantrasyonu içeren adsorpsiyon ortamına yerleştirildi. Adsorpsiyon işlemi tamamlandıktan sonra partiküller desorpsiyon ortamına aktarıldı. Bu şekilde katı sorbente adsorplanan proteinin afinite hidrojelden ayrılması sağlandı. Adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri aynı afinite hidrojinin kullanılması ile 6 kez devam ettirildi. Adsorplanan HSA ve HIgG'nin sırası ile yaklaşık %92 ve %88'nin desorbe edildiği belirlendi. Afinite hidrojel yüksek şişme özelliği ve yapıda bulunan iyonize $-COO^-$ grubu nedeni ile ikinci ve üçüncü döngülerde biraz daha yüksek adsorpsiyon kapasitesine ulaşıldı. Fakat üçüncü döngü sonrasında aynı miktarda protein adsorpsiyonu elde edildi.

4.2.9. İnsan Serumundan HSA ve IgG Saflaştırılması

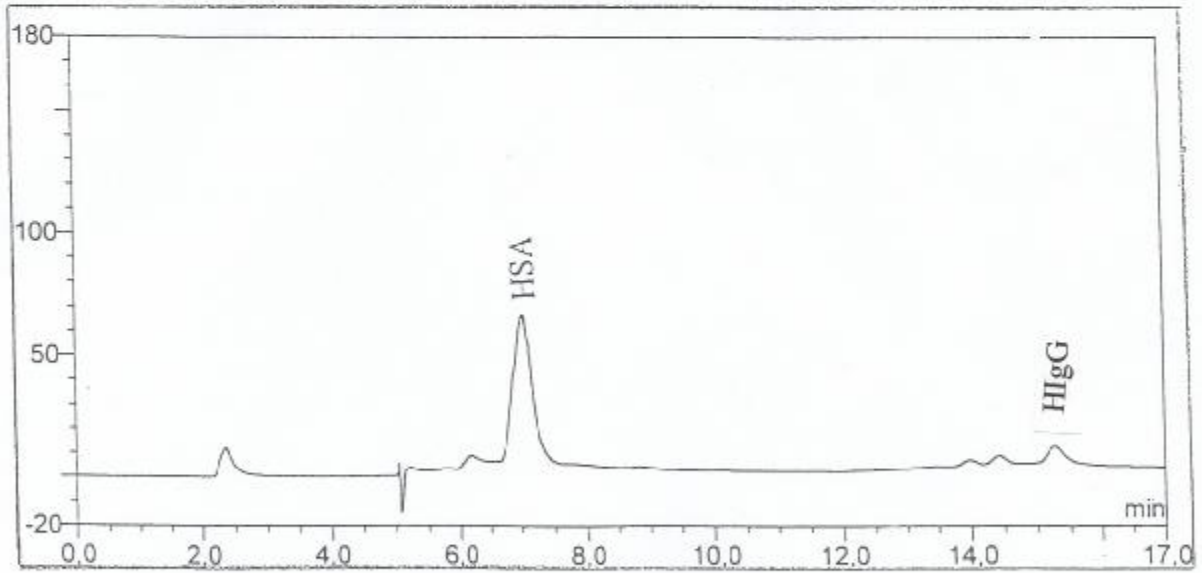
Belirlenen optimum koşullarda, kesikli sistemde insan serumundan HSA ve HIgG saflaştırılması çalışmaları gerçekleştirildi. 1:5 oranında tampon çözelti ile seyreltilen 7.5 ml serum örneği, 100 mg p(AAc-AA) afinite hidrojel ile 25 °C'de 4 saat boyunca inkübe edildi. Adsorpsiyon öncesi ve sonrasında alınan örnekler, HPLC'ye yüklendi. Standart HSA ve HIgG protein çözeltisi, serumun adsorpsiyon öncesi ve sonrasında elde edilen kromatogramlar Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13'de gösterilmiştir. Bu yöntem ile serum örneğinin başlangıç ve adsorpsiyon sonucunda bakiye HSA, HIgG ve toplam protein miktarı belirlendi. p(AAc-AA) afinite hidrojel ile serum örneğindeki HSA ve HIgG'nin sırası ile % 91.5 ve % 80.96 oranında uzaklaştırılmasının mümkün olduğu görüldü.



Şekil 4.12. Ticari HSA ve HIgG protein çözelti karışımının kromatogramı



Şekil 4.13. İnsan serum örneğinin adsorpsiyon öncesi kromatogramı



Şekil 4.14. p(AAc-AA) afinite hidrojel ile etkileştirilen serum örneğinin adsorpsiyon işlemi sonrası kromatogramı

KAYNAKLAR

- Abriouel, H., Gonzalez, J.S., Maqueda, M., Galvez, A., Valdiva, E., Ruiz, J., J. Colloid Interface Sci.,**233**, 306-312, (2001).
- Alvarez,C., Strumia, M., Bertorello, H., J. Biochem. Biophys. Methods,**49**, 649-656, (2001).
- Arıca, M.Y., J.Appl, Polym. Sci.,**77**, 2000, (2000).
- Arıca, M.Y., Öktem, G., Denizli, A., Colloids and Surfaces B. Biointerfaces,**21**, 273-283, (2001).
- Arıca, M.Y., Yalçın, E, Bayramoğlu, G., Journal of Chromatog. B,**807**, 315-325, (2004a).
- Arıca, M.Y., Yılmaz, M., Yalçın, E. ve Bayramoğlu, G., Journal of Memb. Sciences,**240**, 167-178, (2004b).
- Arıca, M.Y., Bayramoğlu G., Şenel A.Ü. ve Yalcin E., Poly. Int., Inpres, (2006).
- Bae, Y.H., Kim, S.W., Adv. Drug Delivery Rev.,**11**, 109, (1993).
- Baker, J.P, Blanch, H.W., Prausnitz, J.M., Polymer,**36**, 1061-1069, (1995).
- Bassi, Q., Zhu, A.S., Margaritis, A., Chem. Eng. J.,**81**, 179-186, (2001).
- Bayramoğlu, G. ve Arıca, M.Y., Colloid and Surface A: Physicochem. and Eng. Aspects., **202**, 41-52, (2002a).
- Bayramoğlu, G., Kaya, B. ve Arıca, MY., Chemical Engineering Science, **57**, 2323-2334, (2002b).
- Bayramoğlu, G. ve Arıca, M.Y. , Macromol. Symposia, **203**, 207-212,(2003).
- Bayramoğlu, G., Yalcin, E. ve Arıca, M.Y., Process Biochemistry,**40**, 1433-1442 (2005).
- Belattar, N., Mekhalif, T., Materials Science and Eng. C.,**24**,507-511, (2004).
- Bennett, D.J., Burford, R.P, Davis, T.P., Tilley, H.J., Polymer Int.,**36**, 219-26, (1995).
- Bradley, M., Ramos, J., Vincent, B., Langmuir, **21**, 1209-1215, (2005).
- Brazel, C., Peppas, N., Polymer, **40**, 3383-3398, (1999).

- Camperi, S.A., Grasselli, M., Cascone, O., *Biotechnol Tech.*,**10**, 211, (1996).
- Chen, J., Blevins, W.E., Park,H., Park, K., *J.Controlled Release*,**64**, 39-51, (2000).
- Chomiskey, B., Albert, J.D., Yoshizawa, H., Jacobsan, J., *Nature*,**394**, 253, (1998).
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., Anfinsen, C.B., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **61**, 636 (1968).
- Dufrene, Y.F., Marchal, T.G., Rouxhet, P.G., *Appl. Surf. Sci.*,**638**, 144-115, (1999).
- Duran, S., Şolpan, D., Güven, O., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*,**151**, 196-199, (1999).
- Fassina, G., Verdoliva, A., Palombo,G., Ruva, M., Cassani, G., *Journal of Molecular Recognition*,**11**, 128-133, (1998).
- Fitos, I., Visy, J., Simonyi, M., *J. Biochem. Biophys. Methods*,**54**, 71-84, (2002).
- Gan, H.Y., Shang, Z.H., Wang, J.D., *Journal of Chromatog. A*,**867**, 161-168, (2000).
- Garg, N., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., *J. Mol Recognit*, **9**, 259, (1996).
- Ghosh, R., *Journal of Membrane Science*,**237**, 109-117, (2004).
- Giacomelli, C.E., Norde,W., *J.Colloid Interface Sci.*,**233**, 234-240, (2001).
- Hirotsu, T., Tagaki, C., *Thin Solid Films*,**457**, 20-25, (2004).
- Hirotsu,T., Tagaki, C., Partridge, A., *Plasmas Polym.*,**353**, 7, (2002).
- Hoffman, A.S., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **43**, 3-12, (2002).
- Hu, T., Su , Z., *Journal of Biotech.*,**100**, 267-275, (2003).
- Huang, H.M., Liu, F.Y., Chen, W.Y., Ruaan, C., *J.Colloid Interface Sci.*,**229**, 600-606, (2000).
- Josic, D. ve Lim Y.P., *Food Technol. Biotechnol.*,**39**, 215-226, (2001).
- Kaetsu, L., *Radiat. Phys. Chem.*,**25**, 517, (1985).
- Khare, A., Peppas N.A., *Biomaterials*,**16**, 559-567, (1995).
- Kim, D., Park,K., *Polymer*,**45**, 189-196, (2004).
- Labrou, N.E., Clonis, Y.D., *Arch. Biochem. Biophys.*,**365**, 17, (1999).

Mahdovina, G.R., Pourjavadi, A., Hosseinzadeh, H., Zohuriaan, M.J., European Polymer Journal,**40**, 1399-1407, (2004).

Maolin, Z., Jun, L., Min, Y., Hongfei, H., Radiation Physics and Chemistry,**58**, 397-400, (2000).

Matejtschuk, P., editor. Affinity separations, a practical approach. Oxford: IRL Press, (1997).

Moradi, O., Modarress, H., Noroozi, M., Journal of Colloid and Interface Science,**271**, 16-19, (2004).

Nagashima, S., Ando, S., Tsukamoto, T., Ohshima, H., Makino, K., Colloids and Surface B. Biointerfaces,**11**, 47-56, (1998).

Nagashima, S., Koide, M., Ando, S., Makino, K., Tsukamoto, T., Ohshima, H., Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects,**153**, 221-227, (1999).

Nisisako T., Torii T., Higuchi T., Chem. Eng. Journal,**101**, 23-29 (2004).

Nolan, J.P., Sklar, L.A., Trends Biotechnol.,**20**, 9, (2002).

Patel, V.R., Amiji, M.M., Pharm Res., **13**, 588-93, (1996).

Peppas, L.B., Peppas, N.A., Chemical Engineering Science,**46**, 715-722, (1991).

Pitiot, O., Legallais, C., Darnige, L., Vijayalakshmi, M.A., J. Membr. Sci.,**166**, 221-227, (2000).

Sahoo, S.K., De, T.K., Ghosh, P.K., Maitra, A., Journal of Colloid and Interface Science,**206**, 361-368, (1998).

Salabe, G., Corvo, L. Biotechnol. Bioeng.,**81**, 149-157, (2003).

Salnikow, J., Biyokimya da Temel ve Modern Teknikler, s.194, Kuşadası, Türkiye, (2000).

Sassi, A.P., Shaw, A.J., Han, S.M., Blanch, H.W., Prausnitz J.M., Polymer, **37**, 2151-2164, (1996).

Sassi, A., Lee, S., J. Appl. Polym. Sci.,**60**, 225-234, (1996).

Scopes, R.K., J. Chromatogr.,**376**, 131, (1986).

- Saraydın, D., Saraydın, S.Ü., Karadağ, E., Koptagel, E., Güven, O., Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, **217**, 281-292, (2004).
- Suen, S.Y., Chen, R.L., Ytsai, Y.D., J. Liq. Chromatog. Relat. Technol.,**23**, 223, (2000).
- Sun, S., Yue, Y., Huang, X., Meng, D., Journal of Memb. Science, **222**, 3-18, (2003).
- Williams, D., Comcise Emcyclopedia of Medical and Dental Materials, Pergamon, Oxford, (1990).
- Yıldız, A.; Genç, Ö. Genç, Enstrümental Analiz, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 421-438, (1993).
- Yılmaz, M., Bayramoğlu, G. ve Arıca, M.Y., Food Chemistry, **89**, 11-18, (2005).
- Zhang, Y. Xie, Q., Xhou, A., Yao, S., Anal. Sci.,**799**, 16, (2000).
- Zhou, W., Yao, K.,Kurth, M.J., Journal of Applied Polymer Science,**62**, 911-915, (1996).
- Zou, H., Luo, Q., Zhou, D., Journal of Biochem. Biophys. Methods,**49**, 199-240, (2001).