

MİKROKRİYOJELLER İLE TRANSFERRİN SAFLAŞTIRILMASI

PURIFICATION OF TRANSFERRIN BY MICROCRYOGELS

KEMAL ÇETİN

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

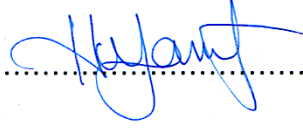
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

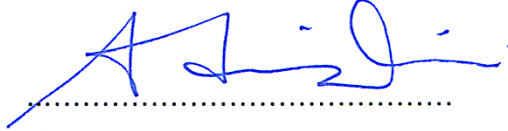
2018

KEMAL ÇETİN'in hazırladığı “**Mikrokriyojeller ile Transferrin Saflaştırılması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

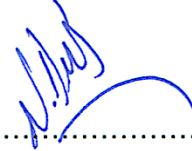
Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ
Başkan



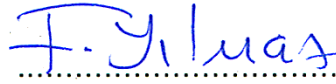
Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Danışman



Prof. Dr. Nalan Tüzmen
Üye



Doç. Dr. Fatma YILMAZ
Üye



Doç. Dr. Nilay BERELİ
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ Tezimin/Raporumun 05/07/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

09 / 07 / 2018



Kemal ÇETİN



Canım Eşime ve Değerli Aileme...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

09/07/2018



KEMAL ÇETİN

ÖZET

MİKROKRİYOJELLER İLE TRANSFERRİN SAFLAŞTIRILMASI

Kemal ÇETİN

Doktora, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Temmuz 2018, 137 sayfa

Sunulan tez kapsamında, plazmadan transferrin saflaştırılması amacıyla afinite kromatografisini temel alan, immünoafinite ve moleküler baskılanmış olmak üzere 2 farklı mikrokriyojel hazırlandı. İmmünoafinite mikrokriyojel için poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat) P(HEMA-GMA) taşıyıcı matris olarak seçildi ve mikrokriyojel yapısındaki epoksi grupları sayesinde herhangi bir aktivasyon ajanı kullanımına ihtiyaç olmadan anti-transferrin (anti-Tf) antibadiler çeşitli başlangıç derişimlerinde mikrokriyojellere immobilize edildi. Moleküler baskılanmış mikrokriyojel için ise poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan) P(HEMA-MATrp) matris olarak seçildi. Bunun için hidrofobik ligand olarak kullanılan L-triptofan amino asidinin polimerleşebilen türevi olan N-metakriloil-L-triptofan (MATrp) monomeri sentezlendi. Sentezlenen monomer nükleer manyetik rezonans, Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, Raman spektroskopi çalışmaları ile karakterize edildi. Ardından [P(HEMA-MATrp)] mikrokriyojeller 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve MATrp monomerlerinin N,N'-metilenbis(akrilamid) çapraz bağlayıcı ile insan serum transferrin (hsTf) varlığında (baskılanmış mikrokriyojel) ve yokluğunda (baskılanmamış mikrokriyojel) -16°C'da serbest radikal polimerizasyonu ile üretildi. Mikrokriyojeller şişme testleri, Brunauer–Emmett–Teller yöntemi ile yüzey alanı ölçümleri, FTIR spektroskopisi, Raman Spektroskopi,

helyum piknometre, optik mikroskop ve taramalı elektron mikroskobu ile karakterize edildi. Ardından mikrokriyojellerin optimum çalışma koşullarını saptamak amacıyla optimizasyon çalışmaları yürütüldü. Bu çalışmalar sonucunda her iki mikrokriyojel için en uygun pH değerinin 6.0 olduğu saptandı ve immünoafinite ve baskılanmış mikrokriyojel için bu pH değerinde maksimum adsorpsiyon kapasitesi sırasıyla 9.82 mg/g ve 2.11 mg/g olarak bulundu. Hem immünoafinite hem de baskılanmış mikrokriyojeller için Langmuir adsorpsiyon izotermi ve pseudo-ikinci-derece kinetik modelinin adsorpsiyon süreci ile uyumlu olduğu gözlemlendi, bu adsorpsiyonun tek tabakalı ve kimyasal kontrollü olduğu anlamına gelmektedir. Baskılanmamış mikrokriyojel ile kıyaslandığında baskılanmış mikrokriyojelin seçiciliğinin insan serum albümin (HSA) ve miyogloblin (MYB) için sırasıyla 2.10 ve 2.24 kat daha fazla olduğu bulundu. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel ve baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojel ile ayrı ayrı yapay plazmadan saflaştırılan hsTf'in saflığı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile incelendi. Mikrokriyojellerin tekrar kullanılabilirliklerinin incelendiği çalışma sonucu aynı mikrokriyojelin onuncu kullanımından sonra, maksimum hsTf adsorpsiyon kapasitelerinin immünoafinite mikrokriyojel ve baskılanmış mikrokriyojel için sırasıyla yaklaşık %20 ve %10 azaldığı hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: Afinite kromatografisi, İmmünoafinite, Mikrokriyojel, Moleküler Baskılama, Transferrin.

ABSTRACT

PURIFICATION OF TRANSFERRIN BY MICROCRYOGELS

Kemal ÇETİN

Doctor of Philosophy, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

July 2018, 137 pages

Within the scope of the thesis, two different, immunoaffinity and molecularly imprinted, microcryogels based on affinity chromatography in order to purify transferrin from plasma were prepared. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate-glycidyl methacrylate) [P(HEMA-GMA)] was selected as a matrix for immunoaffinity microcryogel, and anti-transferrin (anti-Tf) antibodies were immobilized to microcryogels at various initial concentrations through the epoxy groups in the microcryogel structure without the need for any activating agents. For the molecularly imprinted microcryogel, poly(2-hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-(L)-tryptophan) [P(HEMA-MATrp)] was chosen as a matrix. The N-methacryloyl-L-tryptophan (MATrp) monomer, the polymerizable derivative of the L-tryptophan amino acid used as a hydrophobic ligand, was synthesized. The synthesized monomer was characterized by nuclear magnetic resonance, Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy, Raman spectroscopy studies. Subsequently, P(HEMA-MATrp) microcryogels were produced by free radical polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and MATrp monomers at -16°C in the presence (imprinted microcryogel) and absence (non-imprinted microcryogel) of human serum transferrin (hsTf) using N,N'-

methylenebis(acrylamide) as a cross-linker. Microcryogels were characterized with swelling tests, surface area measurements with Brunauer–Emmett–Teller method, FTIR, Raman spectroscopy, helium pycnometer, optical microscope and scanning electron microscope. Optimization studies were then carried out to determine the optimal adsorption conditions of microcryogels. As a result of these studies, it was found that the optimum pH value for both microcryogels was 6.0 and the maximum adsorption capacities at this pH value for immunoaffinity and imprinted microcryogels were found to be 9.82 mg/g and 2.11 mg/g, respectively. Langmuir adsorption isotherms and pseudo-second-order kinetic models for both immunoaffinity and imprinted microcryogels are consistent with the adsorption process, which means that the favorable adsorption is monolayer and chemically controlled. The selectivity of imprinted microcryogel was found to be 2.10 and 2.24-fold higher for human serum albumin and myoglobin, respectively, when compared to non-imprinted microcryogel. The purities of hSTf purified from the artificial plasma with the immunoaffinity P(HEMA-GMA) microcryogel and the imprinted P(HEMA-MATrp) microcryogel were examined by Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). According to the results of reusability studies of the microcryogels, after the tenth use of the same microcryogel, the maximum hSTf adsorption capacities of immunoaffinity microcryogel and imprinted microcryogel have been calculated a decrease about 20% and 10%, respectively.

Keywords: Affinity chromatography, Immunoaffinity, Microcryogel, Molecular imprinting, Transferrin.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, bilime ve hayata dair engin tecrübeleriyle yol gösteren, güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen, disiplinli çalışmasıyla her zaman örnek alacağım, değerli bilim insanı, tez danışmanım, çok kıymetli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Biyokimya araştırma grubuna katıldığım günden itibaren bana her türlü desteği sağlayan, bilimsel tecrübelerinden yararlandığım, her başım sıkıştığında yanlarına koştuğum, önerileriyle katkılarda bulunan, kıymetli bilim insanları, hocalarım Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz, Doç. Dr. Lokman Uzun, Doç. Dr. Nilay Bereli, Doç. Dr. Deniz Türkmen ve Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a,

Bilimsel katkısı ve hoşgörüsü için kıymetli jüri üyesi değerli hocam Prof. Dr. Nalan Tüzmen'e,

Üyesi olmaktan mutluluk duyduğum, kendimi ikinci evimde hissettiren Biyokimya Araştırma Grubundaki tüm arkadaşlarıma,

Finansal olarak bu tezin tamamlanmasında "2211-E Doğrudan Yurt İçi Doktora Burs Programı" ile maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK'a),

Hayatım boyunca her koşulda bana destek veren ve sabır gösteren, bugünlere gelmemde en büyük katkıları olan, bu hayatta hiçbir şeye asla değişmeyeceğim canım aileme,

Tanıştığım günden itibaren her anımda yanımda olan, her türlü zorlukta bana güç veren, bu süreçteki en büyük destekçim, hayatım, sevgili eşim, Derya'ya

Sonsuz Teşekkürler...

Kemal Çetin

Temmuz 2018, Ankara

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	x
ŞEKİLLER	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Genomik ve Proteomik	3
2.2. Protein Saflaştırılması	3
2.3. Afinite Kromatografisi	5
2.3.1. İmmünoafinite Kromatografisi	11
2.3.1.1. Antiadilerin Yapıları ve Özellikleri	11
2.3.1.2. Antiad Üretimi	13
2.3.1.3. Antiad İmmobilizasyon Yöntemleri	15
2.3.1.4. Adsorpsiyon ve Elüsyon Koşulları	16
2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi	17
2.4.1. Moleküler Baskılamanın Tarihi Gelişimi	19
2.4.2. Moleküler Baskılamanın Temel Bileşenleri	22
2.4.2.1. Kalıp Molekül	22
2.4.2.2. Fonksiyonel Monomerler	22
2.4.2.3. Çapraz Bağlayıcılar	22
2.4.2.4. Çözücüler	23
2.4.2.5. Başlatıcılar	23
2.4.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Hazırlanma Yöntemleri	23
2.4.3.1. Kovalent Baskılama	23
2.4.3.2. Kovalent Olmayan Baskılama	24
2.4.3.3. Yarı-Kovalent Baskılama	24
2.4.3.4. Metal İyon Koordinasyonu ile Baskılama	24
2.4.4. Moleküler Baskılama Türleri	25
2.4.4.1. Yığın Baskılama	26

2.4.4.2. Yüzey Baskılama	26
2.4.4.3. Epitop Baskılama.....	27
2.5. Kriyojel.....	27
2.5.1. Kriyojellerin Hazırlanışı	28
2.5.2. Kriyojellerin Yapısını Etkileyen Parametreler	30
2.6. Transferrin	31
2.6.1. Transferrin Türleri.....	32
2.6.2. Transferrinin Yapısı ve İşlevi.....	33
2.6.2.1. Demir Bağlanma Bölgeleri	35
2.6.2.2. Transferrin/Transferrin Reseptörü (Tf/TfR) Sistemi ve Demir Salımı	38
2.6.3. Transferrinin Tedavi Amaçlı Kullanımı	41
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	43
3.1. Kimyasal Malzemeler.....	43
3.2. İmmünoafinite Mikrokriyojellerin (İM) Üretimi	43
3.2.1. P(HEMA-GMA) Mikrokriyojellerin Üretimi.....	43
3.2.2 P(HEMA-GMA) Mikrokriyojellere Anti-Tf Antibadisinin Kovalent İmmobilizasyonu.....	43
3.3. Moleküler Baskılanmış Mikrokriyojellerin Üretimi	44
3.3.1. N-Metakriloil-L-Triptofan (MATrp) Sentezi.....	44
3.3.2 Transferrin Baskılanmış P(HEMA-MATrp) Mikrokriyojellerin Üretimi ..	44
3.4. Karakterizasyon Çalışmaları	45
3.4.1. Jelleşme Verimleri.....	45
3.4.2. Şişme Davranışları.....	45
3.4.3. ¹ H-NMR, FTIR ve Raman ile Yapı Analizi	46
3.4.4. Yoğunluk Ölçümleri.....	46
3.4.5. Yüzey Alanı Ölçümleri.....	46
3.4.6. Yüzey Morfolojisi.....	46
3.4.6. Mikro bilgisayarlı tomografi (μCT) Analizi.....	47
3.5. Sulu Çözeltilerden hsTf Adsorpsiyon Çalışmaları	47
3.6. hsTf Baskılanmış P(HEMA-MATrp) Mikrokriyojeller İçin Seçicilik Çalışmaları.....	47
3.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları	48

3.8. Yapay Plazmadan hsTf Saflaştırma Çalışmaları ve SDS-PAGE	
Görüntüleme	48
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	50
4.1. MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	50
4.2. Mikrokriyojellerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	54
4.2.1. FTIR ve Raman ile Yapı Analizi	55
4.2.2. Şişme Özellikleri.....	59
4.2.3. Yüzey Alanı Ölçümleri.....	60
4.2.4. Yüzey Morfolojisi	61
4.3. P(HEMA-GMA) Mikrokriyojellere Anti-Tf Antibadi İmmobilizasyonu.....	64
4.4. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) Mikrokriyojeller	65
4.4.1. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) Mikrokriyojellerin Adsorpsiyon	
Çalışmaları	65
4.4.1.1. Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyon Çalışmaları	65
4.4.1.1.1. pH Etkisi	65
4.4.1.1.2. Adsorpsiyon Süresinin Etkisi	66
4.4.1.1.3. Başlangıç Derişiminin Etkisi	67
4.4.1.1.4. Adsorpsiyon İzotermi.....	68
4.4.1.1.5. Adsorpsiyon Kinetiği.....	72
4.4.2. Yapay Plazmadan hsTf Saflaştırma Çalışmaları ve SDS-PAGE	
Görüntüleme.....	77
4.4.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	78
4.5. hsTf Baskılanmış P(HEMA-MATrp) Mikrokriyojeller.....	79
4.5.1. hsTf Baskılanmış P(HEMA-MATrp) Mikrokriyojellerin Adsorpsiyon	
Çalışmaları	79
4.5.1.1. Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyon Çalışmaları	79
4.5.1.1.1. pH Etkisi	79
4.5.1.1.2. Adsorpsiyon Süresinin Etkisi	80
4.5.1.1.3. Başlangıç Derişiminin Etkisi	81
4.5.1.1.4. İyonik Şiddetin Etkisi	83
4.5.1.1.5. Sıcaklığın Etkisi	84
4.5.1.1.6. Adsorpsiyon İzotermi.....	85
4.5.1.1.7. Adsorpsiyon Kinetiği.....	87
4.5.2. Seçicilik Çalışmaları	90

4.5.3. Yapay Plazmadan hsTf Saflaştırma Çalışmaları ve SDS-PAGE	
Görüntüleme.....	92
4.5.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	93
4.6. Literatür Karşılaştırması.....	93
5. YORUM.....	96
KAYNAKLAR.....	98
ÖZGEÇMİŞ	116



ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Proteinlerin vücuttaki işlevleri.	4
Çizelge 4.1. Mikrokriyojellerin jelleşme verimi yüzdeleri ve yoğunluk değerleri. ...	55
Çizelge 4.2. Mikrokriyojellerin şişme dereceleri ve makrogözeneklilik değerleri...	60
Çizelge 4.3. Mikrokriyojellerin yüzey alanı değerleri.	61
Çizelge 4.4. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel için Langmuir ve Freundlich izoterm değerleri.	72
Çizelge 4.5. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin adsorpsiyonunda pseudo-birinci ve pseudo-ikinci derece kinetik sabitleri.	77
Çizelge 4.6. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin adsorpsiyonunda parçacık içi difüzyon kinetik modelinin sabitleri.	77
Çizelge 4.7. hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller için Langmuir ve Freundlich izotermi.	87
Çizelge 4.8. hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin adsorpsiyonunda pseudo-birinci ve pseudo-ikinci derece kinetik sabitleri.	89
Çizelge 4.9. hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin adsorpsiyonunda parçacık içi difüzyon kinetik modelinin sabitleri.	90
Çizelge 4.10. hsTf'e göre HSA ve MYB için K_d , k ve k' değerleri.....	91

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Afinite kromatografisinin genel şeması.	6
Şekil 2.2. Biyomoleküllerin ayrımında kullanılan afinite ligand türleri.....	9
Şekil 2.3. Afinite kromatografisinin alt dalları.	10
Şekil 2.4. İmmünoglobulin G'nin genel yapısı.....	12
Şekil 2.5. İmmünoglobulinin sınıfları.....	13
Şekil 2.6. İmmünoafinite kromatografisinde kullanılan antibadi türleri.	14
Şekil 2.7. Poliklonal antibadiler aynı antijende farklı epitoplara bağlanırken, monoklonal antibadiler aynı antijende aynı epitopa bağlanırlar.	15
Şekil 2.8. Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasının genel şeması.	19
Şekil 2.9. Moleküler baskılama türleri.....	25
Şekil 2.10. Kriyojellerin su tutma kapasitesi ve gözenekliliği.	28
Şekil 2.11. Kriyojel üretiminin genel basamakları.	29
Şekil 2.12. Kriyotropik jelleşmede oluşan buz kristallerinin sayısı ve boyutu soğutma hızına bağlıdır.	31
Şekil 2.13. İnsan apotransferrinin kristal yapısı [175].	34
Şekil 2.14. İnsan apotransferrinin iki lobu arasındaki arayüz loblar arası temasları göstermektedir [175].....	34
Şekil 2.15. İnsan laktoferrinin N-lobu bağlanma bölgesi [186] (a) tavuk serum transferrininin N-lobundaki metal-ligand koordinasyonu ve etrafındaki hidrojen bağları [187] (b). Fe^{3+} iyonu Tyr92, Tyr192, His253 ve Asp60'ın yan zincirleri ve iki dişli CO_3^{2-} iyonuna bağlıdır. CO_3^{2-} iyonunu ile Arg121 ve α -sarmalının N-ucundaki NH grupları arasında H-bağları vardır.	36
Şekil 2.16. Periyodik tabloda, transferrinlerin metal bağlama bölgelerinden birine veya her ikisine bağlanan elementler koyu renkle belirtilmektedir [197].	37
Şekil 2.17. Fe^{3+} , Cr^{3+} ve Ni^{2+} iyonlarının transferrine potansiyel bağlanma bölgeleri [194].	38
Şekil 2.18. Tf/TfR kompleksinin atomik modeli [212].	40
Şekil 2.19. Hücre içine TfR aracılı demir alım döngüsü. Tf molekül başına iki Fe^{3+} iyonu bağlar. Demir yüklü Tf daha sonra TfR ile bağlanır ve Tf/TfR kompleksi, klatriin kaplı çukurlarla hücre içine alınır. Demir asidik	

endozomal ortamda Tf'den salınır ve Tf/TfR, plazma membranına geri döner. Tf, TfR'den salınarak döngü tamamlanır.	40
Şekil 4.1. MATrp monomerinin sentez tepkimesi.....	50
Şekil 4.2. MATrp'ın sentez tepkimesinin mekanizması.....	51
Şekil 4.3. MATrp'ın ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O içinde).....	52
Şekil 4.4. MATrp'ın ¹³ C-NMR spektrumu (D ₂ O içinde).....	53
Şekil 4.5. MATrp'ın FTIR spektrumu.....	53
Şekil 4.6. Katı MATrp'ın Raman spektrumu.....	54
Şekil 4.7. PM (a) ve İM'in (b) FTIR spektrumları.....	56
Şekil 4.8. PM (a) ve İM'in (b) RAMAN spektrumları.....	57
Şekil 4.9. P(HEMA) (a), P(HEMA-MATrp) (b) mikrokriyojellerin FTIR spektrumları.....	58
Şekil 4.10. P(HEMA) (a), P(HEMA-MATrp) (b) mikrokriyojellerin ve MATrp monomerinin (c) RAMAN spektrumları.....	59
Şekil 4.11. P(HEMA-GMA) mikrokriyojellerin optik mikroskop görüntüleri.....	62
Şekil 4.12. P(HEMA-GMA) mikrokriyojellerin SEM görüntüleri.....	63
Şekil 4.13. P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellerin optik mikroskop (a) ve µCT (b) görüntüleri.....	63
Şekil 4.14. P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellerin SEM görüntüleri.....	63
Şekil 4.15. P(HEMA-GMA) mikrokriyojellere anti-transferrin antipadi immobilizasyonu için derişim taraması. Mikrokriyojel miktarı: 50 mg (kuru ağırlık), pH 8.0 fosfat tamponu içerisinde immobilizasyon süresi: 2 saat, T: 25°C.....	64
Şekil 4.16. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna pH'nın etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, T: 25°C, hsTf derişimi: 2.0 mg/mL, m _{kuru mikrokriyojel} : 40 mg.....	66
Şekil 4.17. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna sürenin etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 25°C, hsTf derişimi: 2.0 mg/mL, m _{kuru mikrokriyojel} : 40 mg.....	67
Şekil 4.18. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 25°C, m _{kuru mikrokriyojel} : 40 mg.....	68
Şekil 4.19. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel için Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	69

Şekil 4.20. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel için Freundlich adsorpsiyon izotermi.	71
Şekil 4.21. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun pseudo-birinci dereceden kinetiği.	75
Şekil 4.22. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun pseudo-ikinci dereceden kinetiği.	76
Şekil 4.23. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun parçacık içi difüzyon modeli.	76
Şekil 4.24. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel ile muamele öncesi ve sonrası yapay plazmanın SDS-PAGE analizi. Sıra 1. Biomarker (Fermentas), Sıra 2. Standart hsTf çözeltisi, Sıra 3. hsTf saflaştırılmadan önceki plazma, Sıra 4. hsTf saflaştırıldıktan sonraki plazma, Sıra 5. desorpsiyon edilen örnek.	78
Şekil 4.25. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin tekrar kullanılabilirliği. hsTf derişimi: 2.0 mg/mL; adsorpsiyon pH: 6.0; desorpsiyon ajanı: 0,1 M glisin-HCl (pH 2.8); T: 25°C.	79
Şekil 4.26. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna pH'nın etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, T: 37°C, hsTf derişimi: 1.5 mg/mL, $m_{kuru\ mikrokriyojel}$: 40 mg.	80
Şekil 4.27. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna sürenin etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 37°C, hsTf derişimi: 1.5 mg/mL, $m_{kuru\ mikrokriyojel}$: 40 mg.	81
Şekil 4.28. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 25°C, $m_{kuru\ mikrokriyojel}$: 40 mg.	82
Şekil 4.29. Baskılanmış P(HEMA-MATrp), baskılanmamış P(HEMA-MATrp) ve P(HEMA) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyon kapasiteleri. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 25°C, hsTf derişimi: 1.5 mg/mL, $m_{kuru\ mikrokriyojel}$: 40 mg.	83
Şekil 4.30. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 37°C, hsTf derişimi: 1.5 mg/mL, $m_{kuru\ mikrokriyojel}$: 40 mg.	84

Şekil 4.31. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, hsTf derişimi: 1.5 mg/mL, m _{kuru mikrokriyojel} : 40 mg.....	85
Şekil 4.32. HsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller için Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	86
Şekil 4.33. hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller için Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	86
Şekil 4.34. hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun pseudo-birinci dereceden kinetiği.	88
Şekil 4.35. hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun pseudo-ikinci dereceden kinetiği.....	88
Şekil 4.36. hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun parçacık içi difüzyon modeli.....	89
Şekil 4.37. hsTf baskılanmış ve baskılanmamış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellerin kalıp (hsTf) ve yarışmacı (HSA ve MYB) proteinleri adsorpsiyonu. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 37°C, protein derişimleri: 1.5 mg/mL, m _{kuru mikrokriyojel} : 40 mg.....	91
Şekil 4.38. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojel ile muamele öncesi ve sonrası yapay plazmanın SDS-PAGE analizi. Sıra 1. Biomarker (Fermentas), Sıra 2. Standart hsTf çözeltisi, Sıra 3. hsTf saflaştırılmadan önceki plazma, Sıra 4. hsTf saflaştırıldıktan sonraki plazma, Sıra 5. desorpsiyon edilen örnek.....	92
Şekil 4.39. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin tekrar kullanılabilirliği. hsTf derişimi: 1.5 mg/mL; adsorpsiyon pH: 6.0; desorpsiyon ajanı: %10 etilen glikol (pH 4.0) çözeltisi içeren 0.1 M asetat tamponu; T: 37°C...	93

KISALTMALAR DİZİNİ

Anti-Tf	İnsan Serum Transferrin Antibadisi
APS	Amonyum Persülfat
BET	Brunauer-Emmet-Teller yöntemi
DEAE	Dietil amino etan
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GMA	Glisidil Metakrilat
HEMA	2-Hidroksietil Metakrilat
HSA	İnsan Serum Albümin
hsTf	İnsan Serum Transferrin
İM	İmmünoafinite P(HEMA-GMA) Mikrokriyojel
KBR	Potasyum Bromür
M _A	Moleküler Ağırlık
MATrp	N-Metakriloil-L-Triptofan
MBAAm	N,N-metilen bisakrilamid
MIP	hsTf Baskılanmış P(HEMA-MATrp) Mikrokriyojel
MYB	Miyoglobin
NIP	Baskılanmamış P(HEMA-MATrp) Mikrokriyojel
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NP	Nanopartikül
P(HEMA)	Poli(2-hidroksietil etakrilat)
pI	İzoelektrik Nokta
PM	P(HEMA-GMA) Mikrokriyojel
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SLS	Sodyum Lauril Sülfat
T	Sıcaklık (°C)
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamin
TfR	Transferrin Reseptörü

1. GİRİŞ

Günlük demir ihtiyacı kişiden kişiye ve kişinin bulunduğu döneme göre değişkenlik gösterir. Örneğin büyüme dönemindeki çocuklarda demir ihtiyacı daha fazladır. Ayrıca menstrüasyon döneminde kadınların demir ihtiyacı artmakla birlikte hamilelik döneminde ise demir ihtiyacı menstrüasyon dönemine oranla 3 kat daha yüksektir [1]. Demir kırmızı kan hücresinde oksijenin taşınmasında göreve sahip önemli bir elementtir. Ayrıca DNA replikasyonunda görevli enzimlerden biri olan ribonükleotid redüktaz'ın kofaktörü olarak da görev yapar [2]. Vücuttaki demir taşınmasında önemli bir role sahip olan proteinlerden biri transferrin protein ailesidir. Transferrin protein ailesi molekül ağırlığı yaklaşık 80 kDa olan homolog monomerik bilobal glikoproteinlerdir. Transferrinler demiri bağlayarak hücre içi demir ihtiyacının karşılanmasını ve serbest demirin toksik etkilerinin en aza indirilmesini sağlar. Öte yandan transferrin reseptörü (TfR) neoplastik hücrelerin yüzeyinde normal hücrelere oranla aşırı miktarda bulunduğu için transferrin antineoplastik ilaçların kanser hücrelerine seçici olarak taşınmasında da kullanılabilir [3].

Afinite kromatografisi, hidrojen bağı, iyonik etkileşim, hidrofobik etkileşim, disülfid köprüler vb. etkileşimlerin kullanılarak bir karışım içerisindeki belirli bir molekülün veya bir grup molekülün ayrılması, uzaklaştırılması ve saflaştırılması yöntemidir. Antibadiler, enzimler, hormonlar, DNA, reseptörler ve vitaminler gibi birçok biyomolekülün ayrılması ve saflaştırılmasında başvurulmuş afinite kromatografisi klinik tahlillerde ve biyokimyasal ve biyoteknolojik süreçlerin incelenmesinde sıklıkla kullanılır. Afinite kromatografisinin bir alt dalı olan immünoafinite kromatografisi fonksiyonel proteinleri ayırmak ve saflaştırmak için yüksek özgüllüğe sahip antijen ve antibadi etkileşimlerinden faydalanan bir yöntemdir. Bu yöntemde, hedef antijene özgül antibadi katı desteğe immobilize edilir ve biyolojik örnekler geçirilerek hedef antijen immobilize antibadi tarafından yakalanır. Yıkama ve desorpsiyon basamakları ardından hedef antijen karışımdan ayrılmış olur.

Son zamanlarda, kromatografik sistemlerin maliyetini azaltmak, kullanım ve depolama ömrünü artırmak ve saflaştırılabilecek biyomoleküllerin çeşidini artırabilmek amacıyla biyolojik moleküllerin işleyiş mekanizmasında bulunan moleküler tanımayı taklit edebilen “*moleküler baskılanmış polimerler*” olarak adlandırılan sentetik ve yarı-sentetik polimerler geliştirilmektedir. Moleküler baskılama teknolojisi kullanılarak hazırlanan bu polimerler hedef analit molekülünü

tanıyabilen özgül belleklere sahiptir. Bu bellekler sayesinde amino asitler, nükleotid türevleri ve proteinler gibi biyolojik moleküllerin saflaştırılmasından ilaçlar, fenolik bileşikler ve ağır metaller gibi çevresel kirleticilerin uzaklaştırılmasına kadar geniş bir alanda kullanılabilmeyi vaat etmektedir.

Kromatografik sistemlerde ligandın tutunacağı katı destek malzemeleri fiziksel ve kimyasal açıdan geniş bir ürün çeşitliliğine sahiptir. Bu malzemelerden birisi olan kriyojeller çözücünün donma noktasının altındaki sıcaklıklarda sentezlenen hidrojeller olarak adlandırılabilir. Gözenek yapıcı olarak buz kristallerinin kullanıldığı kriyojeller geleneksel hidrojellerin aksine, büyük gözenek boyutuna, kısa difüzyon yoluna, iyi biyouyumluluğa ve yüksek mekanik ve fiziksel kararlılığa sahiptir [4]. Düşük geri basınç sergileme, adsorpsiyon ve elüsyon basamaklarında çok kısa alıkonma sürelerine sahip olma gibi üstün özellikleri sayesinde kriyojeller geleneksel kromatografi destek malzemelerine iyi bir alternatif olabilirler [5].

Sunulan çalışmada, transferrinin saflaştırılması amacıyla afinite kromatografisini temel alan, immünoafinite ve moleküler baskılanmış olmak üzere 2 farklı mikrokriyojel hazırlandı. Bu mikrokriyojellerin fiziksel ve kimyasal özellikleri karakterize edildi ve adsorpsiyon kapasiteleri, kinetik analizleri incelenerek birbirlerine olan üstünlükleri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genomik ve Proteomik

Genom ve proteom kelimelerindeki Yunanca –om (-ome) son eki kelimeye bütünlük, tümlük anlamı vermektedir; yani “genom”un tüm genleri ve “proteom”un belli bir yer ve zamandaki tüm proteinleri belirttikleri söylenebilir [6]. İlk kez 1920 yılında Alman botanikçi Hans Winkler tarafından tanımlanan genom, kromozomlardaki genetik şifrelerin tamamını temsil eder [7]. O tarihten çok sonra ise genetikçi Thomas Roderick tarafından 1986 yılında, “genomik”, genomun haritalanması, sekanslanması ve karşılaştırılmasını içeren bir terim olarak önerilmiştir [8].

Genomik çalışmalar ile hastalık gibi herhangi bir fizyolojik değişime neden olan gen saptanmaya ve bu durumun sebebi tanımlanmaya çalışılır. Ancak bir gen çeşitli biyolojik işlevlere sahip birden fazla protein kodlayabilir ve bu proteinler çoğunlukla sentez sonrası genden bağımsız olarak değişime uğrayabilirler. Bu sebeple hastalığın ve diğer değişimlerin takip edilebilmesi için genlerden ziyade genom tarafından sentezlenen proteinleri ve bu proteinlerin işlevlerini incelemek gerekir.

Proteomik, genlerin bir ürünü olan proteinlerin yapılarını ve işlevlerini inceler. Proteomik çalışmalar, post-translasyonel modifikasyonlar, protein-protein etkileşimleri, hastalık ve toksik etki gibi dış etmenler sonucu protein yapısı ve işlevi üzerindeki değişimler ve bağıl protein bolluğu hakkında aydınlatıcı bilgiler verebilir [9]. Proteom analizinde en önemli basamaklardan biri proteinlerin istenilen seviyede ayrılabilmesi ve saflaştırılabilmesidir.

2.2. Protein Saflaştırılması

Proteinler vücutta çok kritik rollere sahip biyolojik makromoleküllerdir. Genel olarak hücresel boyutta göreve sahip olan proteinler vücudun doku ve organlarının yapısı ve işlevlerinin düzenlenmesinde önemli görevlere sahiptirler. Proteinlerin vücuttaki işlevlerine örnekler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Proteinlerin vücuttaki işlevleri.

Tür	İşlev	Örnekler
Enzim	Hücrelerde gerçekleşen biyokimyasal tepkimelerde katalizör görevi görürler.	Pepsin, laktaz,
Antibadi	Vücudun yabancı olarak gördüğü, bakteriler, virüsler ve kandaki yabancı maddeler gibi maddelere birleşerek vücudu korumayı amaçlarlar.	İmmunoglobulin G (IgG)
Hormon	Hücreler, dokular ve organlar arasındaki çeşitli biyokimyasal süreçleri koordine etmede görevli haberci proteinlerdir.	İnsülin, oksitosin, büyüme hormonu (GH)
Yapısal bileşen	Lifli yapıları sayesinde vücudun çeşitli kısımlarına destek sağlarlar. Ayrıca vücudun hareketinde de görevlidirler.	Keratin, kolajen, elastin, aktin
Depo proteinleri	Vücudun daha sonra kullanacağı amino asitleri depolarlar.	Ferritin
Taşıma proteinleri	Molekülleri vücudun bir yerinden diğerine taşıyan proteinlerdir.	Hemoglobin

Proteinlerin doğal olarak vücutta görevleri olmasıyla birlikte sanayi ve ilaç sektöründe de kullanılmaktadırlar. Örneğin, biyoaktif peptitler yüksek biyolojik aktiviteleri ve hedefe özgüllükleri yanı sıra düşük toksisite seviyeleri gibi avantajlara sahip olmaları, onları geleneksel küçük moleküle sahip ilaçlara karşı üstün kılmaktadır [10]. Tedavide kullanılan peptit ve proteinler transgenik, rekombinant veya sentetik yöntemlerle üretilebildikleri gibi bitki, hayvan ve mantar gibi canlı organizmalardan saflaştırılarak da elde edilebilir.

Proteinlerin çeşitli derecelerde saf halde elde edilmeleri oldukça önemlidir. Proteinlerin amino asit dizilimini ve yapısını tayin etmek, işlevi hakkında bilgi sahibi olmak, endüstriyel ve farmasötik uygulamalar için proteinler saflaştırılmaktadır. Proteinleri ayırma ve saflaştırmada proteinlerin yükleri, molekül ağırlıkları, hidrofobiklikleri, çözünürlükleri ve kararlılıkları gibi kendilerine özgü özelliklerinden faydalanılır.

Özellikle son yıllarda biyoteknolojideki gelişmeler sayesinde proteinler gibi biyolojik makromoleküllerin adsorpsiyonu ve saflaştırılmasında kullanılan malzemelerde ve yöntemlerde de önemli gelişmeler sağlandı. Gerek bilgisayar programlarının kullanımı gerekse *in vivo* çalışmaların artması proteinlerin ayrılma durumlarını daha öngörülebilir ve kontrol edilebilir hale getirdi. Ancak halen her çeşit protein için kullanılabilecek tek ve basit bir saflaştırma yöntemi mevcut değildir. Bir proteinin saflaştırılması için kullanılan şartlar ve işlemler diğer bir proteinin aktivitesini kaybetmesine neden olabilir. Saflaştırma yöntemi seçilirken hedef proteinin nerede kullanılacağı da dikkate alınmalıdır. Örneğin, deterjan olarak kullanılacak bir enzim için temizliği engellemeyecek derecede safsızlıklar kabul edilebilirken tedavi amaçlı kullanılacak bir enzim ise son derece saf olmalıdır. Proteinin saflaştırılmasında kullanılacak yöntemi seçerken şunlar göz önünde bulundurulmalıdır:

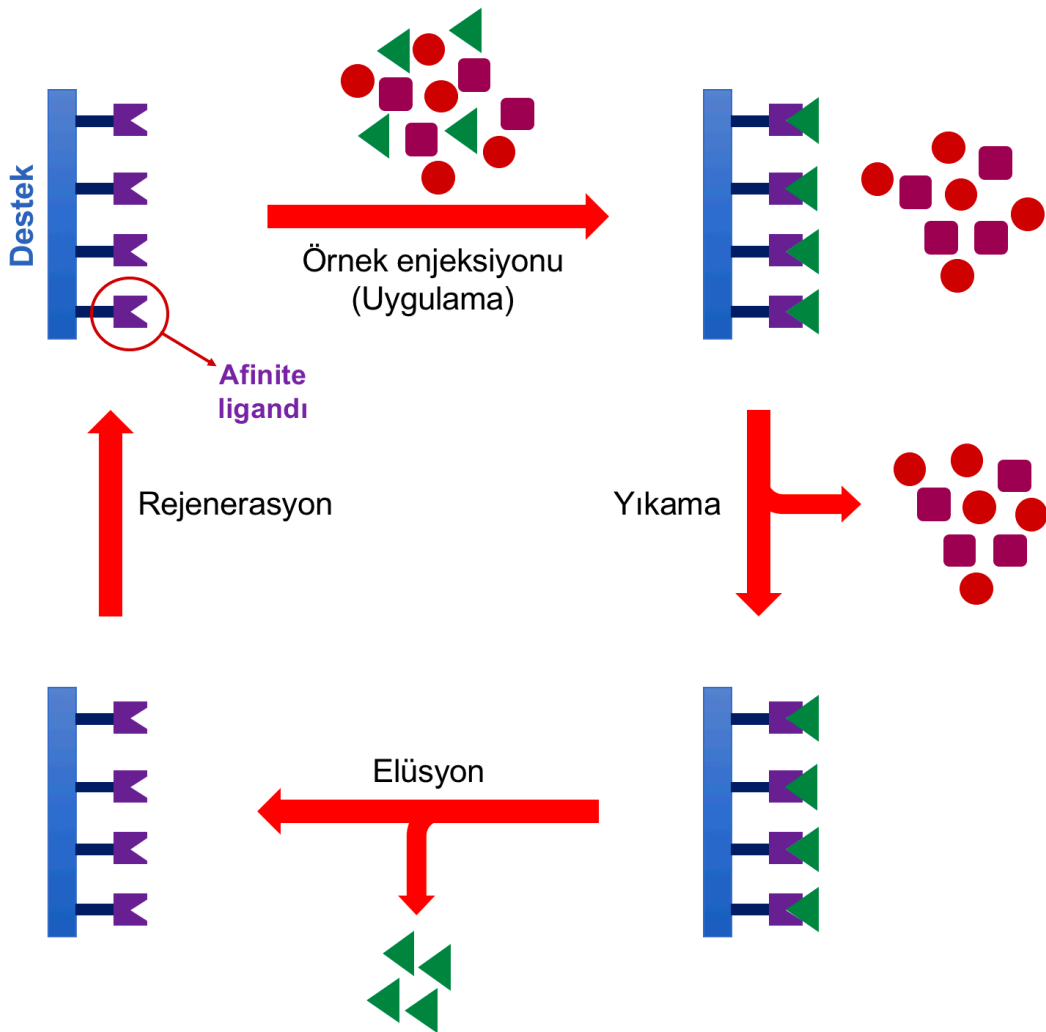
- İhtiyaç duyulan saf protein miktarı
- Proteinin biyolojik aktivitesinin korunmasının gerekli olup olmadığı
- İhtiyaç duyulan saflık derecesi
- Kullanılan protein kaynağı

Saflaştırma yöntemleri sadece safsızlıkları ortamdaki uzaklaştırmak için değil, istenen proteinin derişimini artırmak için de kullanılır. Biyomoleküllerin ham özütlerden veya diğer karışımlarından ayrılması, saflaştırılması ve tanımlanması elektroforez, çöktürme, santrifüj gibi tekniklerle birlikte boyut dışlama, jel filtrasyon, ters faz, iyon değişim ve afinite kromatografisi gibi çeşitli kromatografik yöntemlerle sağlanabilir [11].

2.3. Afinite Kromatografisi

Protein gibi biyolojik moleküller genellikle diğer biyolojik moleküllerle etkileşime girebilirler. Örneğin bir protein inhibitör veya substrat gibi moleküllerle etkileşime girebileceği gibi başka bir proteinle de etkileşime girebilir. Bu iki biyomolekül arasındaki etkileşim elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağı, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler gibi moleküller arası kovalent olmayan bağlarla gerçekleşeceği gibi bir metal iyonu aracılığıyla koordine kovalent bağ ile de gerçekleşebilir. Afinite kromatografisi de bu etkileşimleri temel alan bir kromatografi yöntemidir. Bu yöntemde matrise bağlı ligand ile hedef molekül arasındaki çeşitli özgül afiniteler sayesinde hedef molekülün adsorpsiyonu ve saflaştırılması sağlanır. Afinite kromatografisi genel olarak şu basamaklardan oluşur:

- Hedef moleküle özgül ligand matrise kovalent olarak bağlanır.
- Saflaştırılmak istenilen örnek, liganda özgül ve tersinir bağlanmayı destekleyen optimum koşullar altında özgül ligandı içeren matris ile uygulanır.
- Hedef maddeye özgül ligand sayesinde afinite matrisi tarafından hedef madde tutulur.
- Deneysel koşullar değiştirilerek hedef molekül-ligand etkileşimi bozulur ve böylece hedef molekülün destek maddesinden ayrılması sağlanır.



Şekil 2.1. Afinite kromatografisinin genel şeması.

Afinite ligandları kromatografide 100 yılı aşkın süre önce, Emil Starkenstein tarafından kullanılmıştır. Starkenstein, 1910 yılında nişasta içeren kolonun amilaz enzimini bağlamasını incelemiştir [12]. 1951 yılında anti-albümin antipadilerinin ayrılmasını sağlamak amacıyla serum albümin immobilize edilmiş selüloz kullanıldı [13]. Ancak modern afinite kromatografisinin asıl temeli 1960'lara dayanmaktadır. Bu yıllarda, kromatografi destek malzemesi olarak selüloz yerine agaroz küreler kullanıldı [14]. Ayrıca, günümüzde de halen sıklıkla kullanılan bir yöntem olan peptit ve proteinlerin destek malzemesine siyanojen bromür ile immobilize edilmesi bu yıllarda gerçekleştirilmiştir [15].

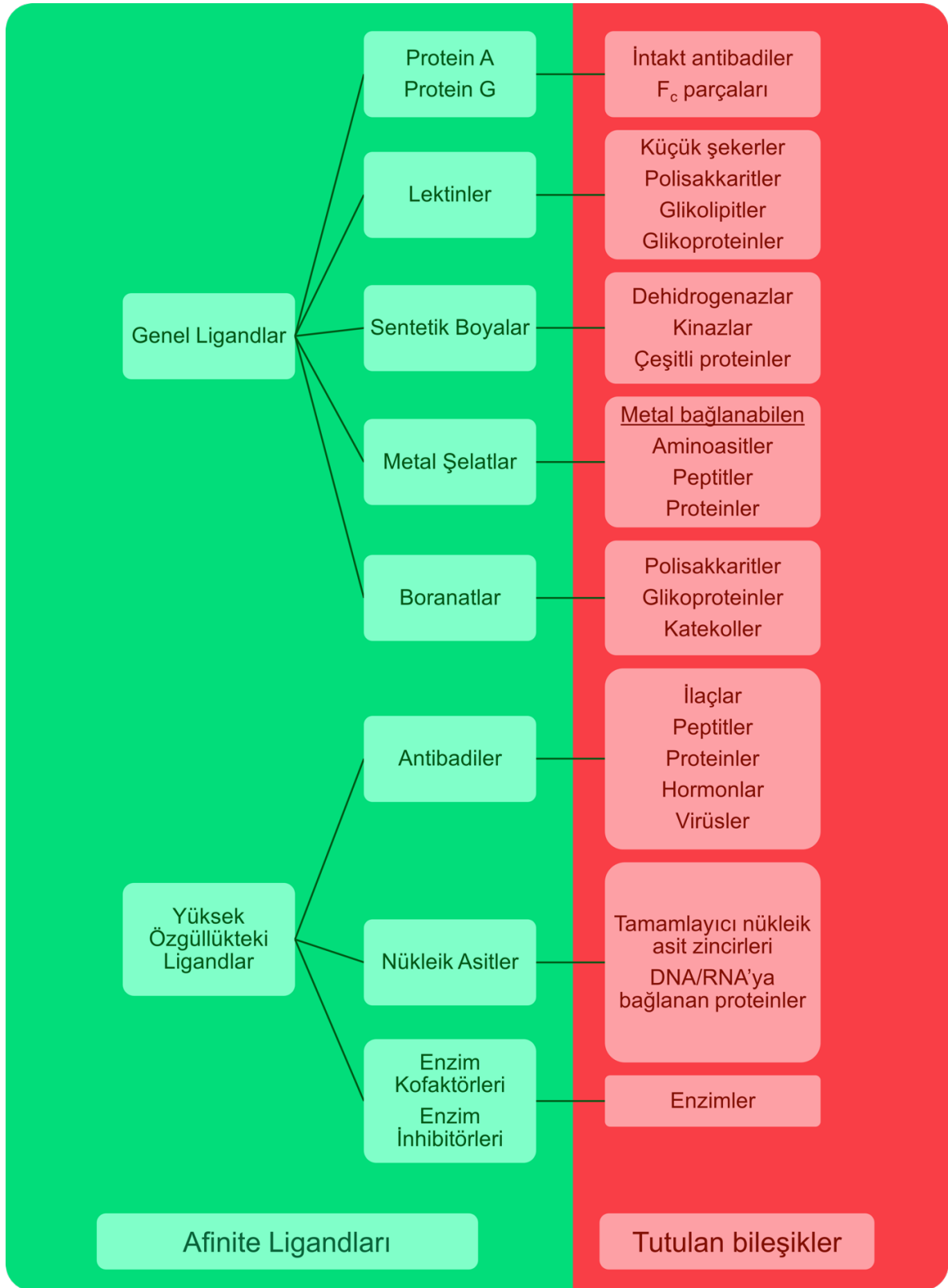
Afinite kromatografisi biyomoleküllerin ayrımı ve saflaştırılmasında, klinik tahlillerde, biyokimyasal ve biyoteknolojik süreçlerin incelenmesinde sıklıkla başvurulmuş bir yöntemdir [16-20]. Afinite kromatografisi, antipadiler, enzimler, hormonlar, DNA, reseptörler ve vitaminler gibi birçok biyomolekülün ayrılması ve saflaştırılması için kullanılabilir [21-23].

Afinite kromatografisinde destek malzemesi olarak kullanılacak matrisin çeşitli kriterleri sağlaması gerekmektedir. Öncelikle destek malzemesi kolondan geçen malzemelere karşı kimyasal olarak inert olmalıdır. Böylelikle özgül olmayan etkileşimler sebebiyle oluşacak istenmeyen adsorpsiyonun önüne geçilmiş olunur. Öte yandan, birçok afinite kromatografisi genel olarak sulu ortamda meydana geldiği için destek malzemesinin hidrofilik özellikte olması tercih edilir. Matrisin gözenekliliği de afinite kromatografisinde önemli bir parametredir. Destek malzemesi ayrıca yüksek basınç gibi etkilere karşı yeterli miktarda mekanik kararlılığa sahip olmalıdır [24]. Afinite kromatografisinde ligandın immobilize edileceği destek malzemesi olarak agaroz, silika, cam, polistiren gibi çok çeşitli malzemeler kullanılmakla birlikte bu malzemeler fiziksel olarak küre, membran, monolitik kolon gibi çeşitli yapılarda hazırlanabilmektedir [5, 25-33].

Afinite kromatografisi ile biyomolekül ayrımının ve saflaştırılmasının gerçekleşmesini sağlayan en önemli noktalardan birisi de destek malzemesine immobilize edilen ligandlardır. Bu ligandların çoğu biyolojik kökenli olmaları yanı sıra biyolojik olmayan doğal ve sentetik ligandlar da kullanılmaktadır [34]. Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar Şekil 2.2'de belirtilmiştir. Afinite kromatografisi ile saflaştırmanın derecesi ligandların biyoözgüllükleri ile doğrudan ilişkilidir. Ligandlar son derece seçici özellikte olmalıdır, sadece bir veya birkaç

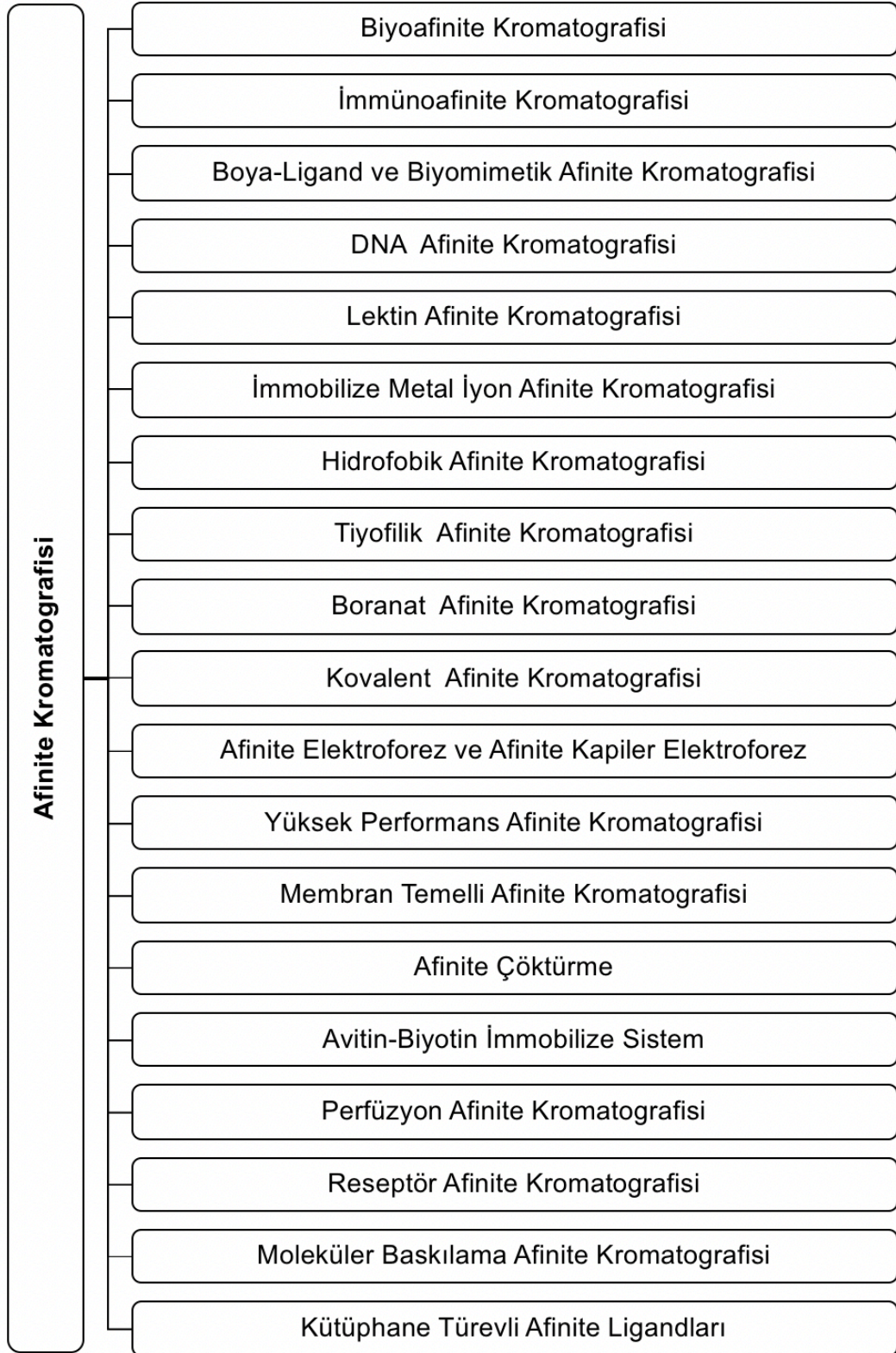
biyomolek le bağlanabilecek nitelikte olmalıdır. Antiadiler, protein reseptörleri, bazı enzim kofaktörleri ve inhibitörleri yüksek özgüllüğe sahip ligandlara örnek olarak verilebilir. Öte yandan protein A ve protein G gibi ligandlar ise grup seçici ligandlardır ve benzer kimyasal özelliklere sahip yakından iliğkili bileğik grubuna bağlanır [35, 36].

Kullanılan ligandda aranan bir diğer özellik de hedef protein ile tersinir etkileğimler sayesinde kompleksler oluğturabilmektir [37]. Ligand ile hedef protein arasında kurulan tersinir etkileğim karığım geğirilrken ve bağlanması istenilmeyen diğer biyomoleküller uzaklağtırılırken kopmayacak kadar; ve ligandın ve hedef proteinin bozulmadan elüsyon basamağında liganddan ayrılmasını sağlayacak kuvvette olmalıdır [38].



Şekil 2.2. Biyomoleküllerin ayırımında kullanılan afinite ligand türleri

Afinite kromatografisi kullanılan ligand, destek malzemesi veya uygulanan yöntem gibi çeşitler temel alınarak farklı alt dallara ayrılmıştır. Şekil 2.3'te bu alt dallardan bir kısmı gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Afinite kromatografisinin alt dalları.

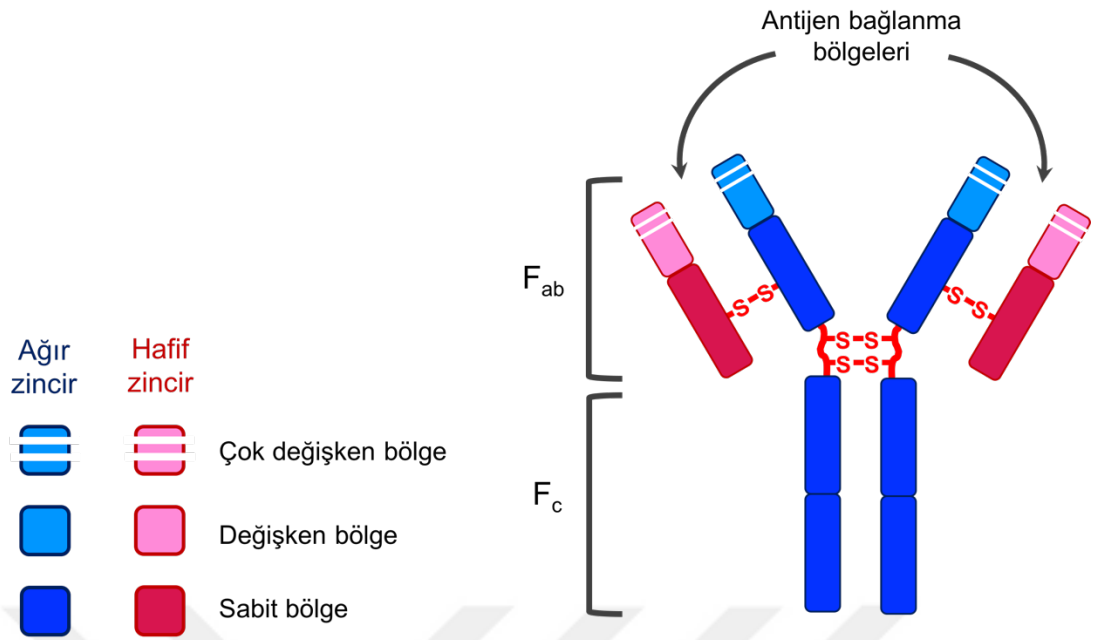
2.3.1. İmmünoafinite Kromatografisi

İmmünoafinite kromatografisi, fonksiyonel proteinleri ayırmak ve saflaştırmak için yüksek özgülükteki antijen ve antibadi etkileşimlerini kullanan bir afinite kromatografisi yöntemidir. Bu etkileşimler, iyonik etkileşimler, hidrojen bağları, van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler gibi moleküller arası kovalent olmayan etkileşimlerdir [39, 40]. İmmünoafinite kromatografisinde, hedef antijene özgül antibadi katı desteğe immobilize edilir ve biyolojik numuneler geçirilerek hedef antijen immobilize antibadi tarafından yakalanır. Özgül olmayan proteinler ve peptitler yıkanır ve daha sonra antijen uygun elüsyon ajanıyla toplanır. İmmünoafinite kromatografisi antibadileri saflaştırmak veya zenginleştirmek için de kullanılabilir. Bu durumda, bu kez hedef antibadiye özgül antijen destek malzemesine immobilize edilir ve ilgili antibadiyi içeren çözelti veya serum kolondan geçirilir. Yine benzer şekilde özgül olmayan biyomoleküller yıkanır ve hedef antibadi elüsyon çözeltisi yardımıyla toplanır.

İmmünoafinite kromatografisinin kullanımı yaklaşık yüz yıl öncesine dayanmaktadır. 1935 yılında d'Allesandro ve Sofia, sifiliz ve tüberküloz ile ilişkili antibadileri ayırmak için kaolin ve kömür üzerine immobilize ettikleri antijenleri kullandılar [41]. Bu çalışmadan bir yıl sonra ise Landsteiner ve van der Scheer tavuk eritrosit stromasına immobilize edilmiş haptenerleri kullanarak antibadileri izole ettiler [42]. İmmünoafinite kromatografisinin uygulamalarına bir diğer örnek olarak da Campbell ve arkadaşlarının 1951 yılında antibadi saflaştırılması amacıyla serum albümini, *p*-aminobenzilselüloz'a immobilize ettikleri çalışma gösterilebilir [13]. O yıllardan günümüze kadar proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin ayrımı ve saflaştırılması için çok çeşitli immünoafinite kromatografisi yöntemleri geliştirilmiştir [43-53].

2.3.1.1. Antibadilerin Yapıları ve Özellikleri

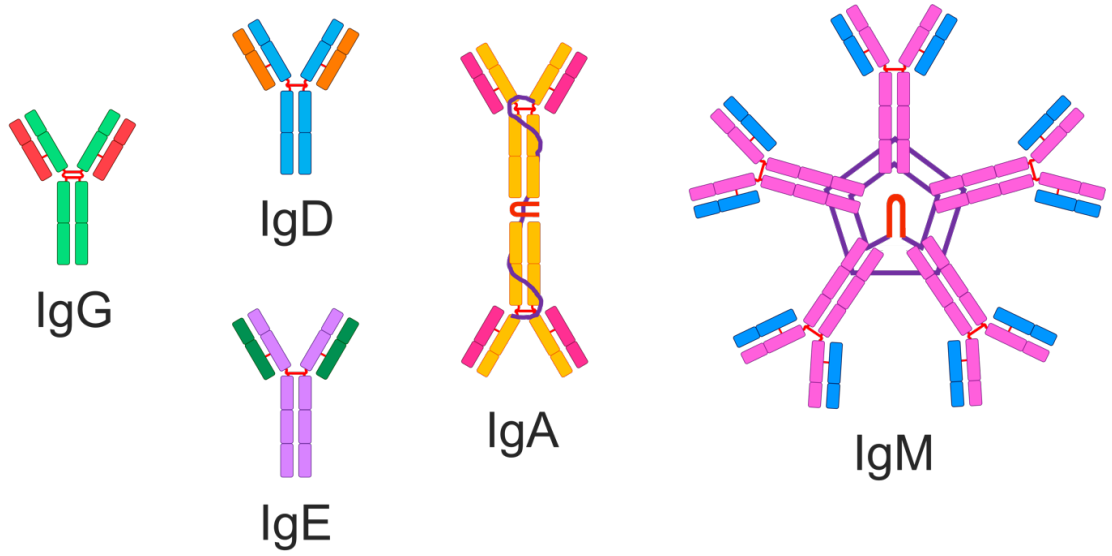
Bir antibadi olan IgG disülfür bağlarıyla bağlanan iki özdeş ağır zincir ve iki özdeş hafif zincir olmak üzere (sırasıyla her biri 50 kDa ve 25 kDa) dört polipeptit zincirinden oluşur ve Y şeklinde bir yapıya sahiptir (Şekil 2.4). Antibadinin alt kısmı F_c bölgesi olarak, üst kısmındaki kolları ise F_{ab} bölgeleri olarak adlandırılır. F_{ab} bölgelerindeki amino asit sekansları, tek bir tipte antibadi içinde özdeş olmasına rağmen farklı antibadiler arasında oldukça değişkendir. Bu değişkenlik sayesinde antibadiler çok çeşitli antijenlere bağlanabilmektedir.



Şekil 2.4. İmmünoglobulin G'nin genel yapısı.

Ağır zincirin sabit bölgesi esas alınarak yapılan sınıflandırmaya göre IgG, IgA, IgD, IgE ve IgM olmak üzere beş immünoglobülin sınıfı bulunmaktadır. Antibadilerin IgA, IgM, IgD ve IgE gibi diğer sınıfların yapıları IgG'nin yapısı ile temel olarak aynıdır (Şekil 2.5). IgG, IgA ve IgD'nin sabit bölgesi üç Ig alanına ve esneklik sağlamak için bir bağlantı (menteşe) bölgesine sahipken IgE ve IgM'nin sabit bölgeleri dört Ig alanına sahiptir. IgG dört izotipe (IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4); IgA ise 2 izotipe (IgA1 ve IgA2) sahiptir [54].

IgG diğer immünoglobülinlere karşı çeşitli üstünlüklerinden dolayı analiz geliştirme ve antibadi temelli tedavilerde en yaygın olarak kullanılan immünoglobülinidir. IgG en bol miktarda bulunan memeli immünoglobülin sınıfı ve insan serumundaki en bol bulunan proteinlerden birisidir (plazma proteinin %10-20'si) [55, 56]. Ayrıca diğer immünoglobülin sınıflarıyla karşılaştırıldığında, IgG daha küçük, sentez hızı daha yüksek olup yarılanma ömrü de daha uzundur [57].



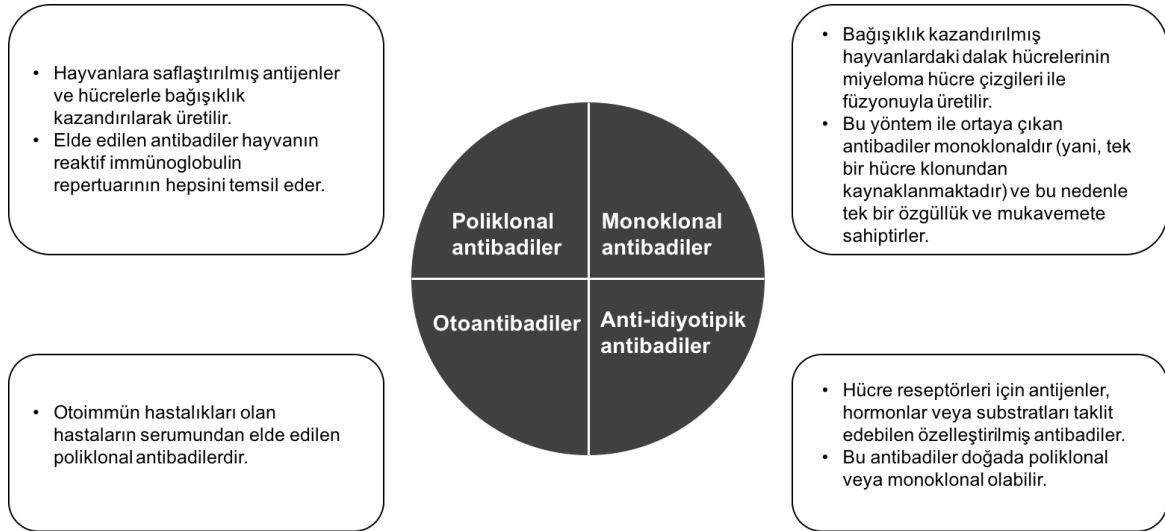
Şekil 2.5. İmmünoglobulinin sınıfları.

Genel olarak virüsler, bakteriler ve bir bağışıklık tepkisi üretebilen hayvan ve bitkilerden gelen yabancı proteinler vücutta antibadi üretimine neden olabilirler. Antibadi üretimine neden olan bu yabancı maddelere antijen adı verilir. Belirli bir antibadinin bağlanabildiği antijen üzerindeki her bir yere, epitop veya antijenik determinant; epitopun bağlandığı antibadi üzerindeki bölgeye ise paratop denir. Bir antijenin birden fazla epitop bölgesi olabilir.

2.3.1.2. Antibadi Üretimi

İmmünoafinite kromatografisinde katı desteğe immobilize edilerek ligand olarak kullanılacak antibadiler çeşitli yöntemler ile üretilir. Antibadi üretimi genel olarak dört gruba ayrılabilir:

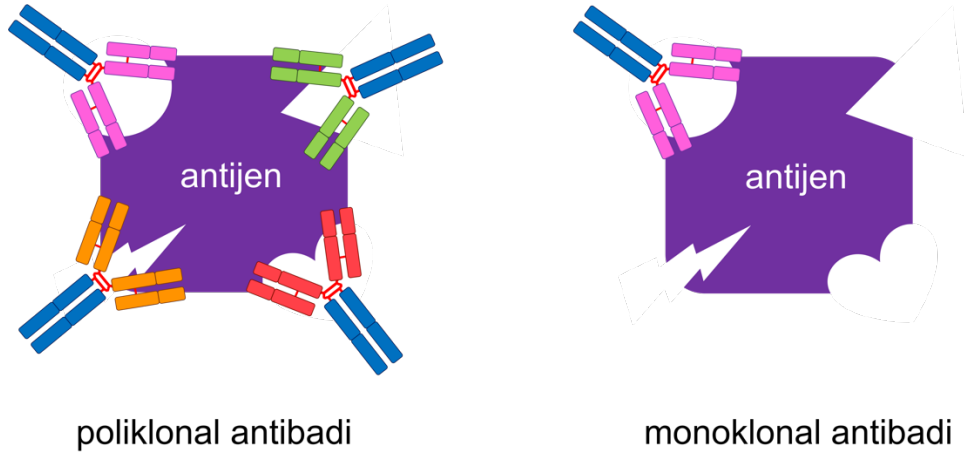
- Poliklonal antibadiler
- Monoklonal antibadiler
- Otoantibadiler
- Anti-idiotipik antibadiler



şekil 2.6. İmmünoafinite kromatografisinde kullanılan antبادi türleri.

Poliklonal antبادiler, aynı antijendeki çeşitli epitoplara yönelik üretilmiş heterojen bir antبادi karışımıdır. Poliklonal antبادiler hayvanın (fare, tavşan, keçi veya koyun) farklı B-hücresi klonları tarafından üretilir ve farklı özgüllükler ve afinitelere sahip olup sonuç olarak immünokimyasal yönden birbirlerinden farklıdırlar.

Antبادilerin gerçekten özgöl olarak hedefi yakalama kapasiteleri ilk kez Köhler ve Milstein'in 1975'te yaptıkları çalışma ile monoklonal antبادileri üretmeleri sayesinde ortaya çıkmıştır [58]. Monklonal antبادiler antبادi üreten fare dalak hücrelerinin uzun ömürlü fare miyelom hücre dizisi ile kaynaştırılmasıyla üretildi ve böylece bir hibridoma olarak bilinen ve bir antijende belirli bir epitop için özgüllüğü olan tek bir antبادiyi ifade eden uzun ömürlü hücre çizgisi oluşturuldu. Üretilen hibridomalar, büyük miktarlarda monoklonal antبادinin nispeten kolay saflaştırılmasına izin vererek *in vitro* ortamda kültürlenebilmesini sağlar. Poliklonal antبادi ile monoklonal antبادinin arasındaki genel fark şekil 2.7'de görülebilir.



Şekil 2.7. Poliklonal antitadiler aynı antijende farklı epitoplara bağlanırken, monoklonal antitadiler aynı antijende aynı epitopa bağlanırlar.

Diğer bir antitadi çeşidi ise otoantitadilerdir. Otoantitadiler, vücudun virüs veya bakteri gibi yabancı organizmalara karşı değil, bizzat kendi hücrelerine karşı geliştirdiği antitadilerdir. Bu antitadiler klinik hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanılabilir [59-62].

Anti-idiotipik antitadi, başka bir antitadinin antijen bağlama bölgesine bağlanabilen antitadi çeşididir. Anti-idiotipik antitadiler dört farklı yolla elde edilebilir [63]:

1. Orijinal idiyotiple aşılama
2. Orijinal idiyotipi üreten sabit hücrelere bağlanma
3. İdiyotip ve romatoid faktörü içeren bağışıklık kompleksleri ile aşılama
4. Uzun bir süre tekrar tekrar aşılanmış konakların serumunun taranması

Anti-idiotipik antitadiler genel olarak farmakokinetik testlerde veya bağışıklık tepkisi analizlerinde kullanıldığı gibi hem anti-idiotipik antitadiler hem de idiyotipler immünoafinite kromatografisinde ligand olarak kullanılabilmektedir [64-67].

2.3.1.3. Antitadi İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmünoafinite kromatografisinde önemli adımlardan birisi ligand olarak kullanılacak antitadinin destek malzemesine immobilizasyonudur. Bunun için çeşitli yöntemler mevcuttur. Antitadi immobilizasyonu için kullanılan en yaygın yöntemlerden biri antitadinin üzerindeki serbest amin gruplarıyla destek malzemesine doğrudan kovalent olarak bağlanmasıdır. Bunun için indirgeyici aminleme yöntemi (Schiff baz

yöntemi) kullanılabileceği gibi, destek malzemeleri siyonejen bromür, *N,N'*-karbonildiimidazol, *N*-hidroksisüksinimit, tresil klorür/tosil klorür gibi reaktiflerle aktive edildikten sonra antibadiler bu reaktifler aracılığı ile destek malzemesine kovalent olarak immobilize edilir [68-72]. Ayrıca antibadilerin amin grupları ile destek malzemesinin yüzeyindeki aldehit ve epoksi grupları arasında kovalent bağ oluşturularak da antibadiler immobilize edilebilir [72, 73].

Bu yöntemlerin yanı sıra antibadiler daha bölge-seçici yöntemler kullanılarak da immobilize edilebilir. Örneğin, antibadilerin F_{ab} kısımlarının sentezi esnasında oluşan serbest sülfhidril grupları ile destek malzemesindeki tiyol grupları ile tepkimeye sokularak antibadi immobilizasyonu gerçekleştirilebilir. Antibadiler ayrıca F_c bölgelerindeki karbohidrat kalıntıları ile de destek malzemesine immobilize edilebilir. Bunun için karbohidrat kalıntıları öncelikle hafif oksidasyona uğrarlar ve ardından destek malzemesinin amin ya da hidrazit içeren kısımları ile tepkimeye girerek destek malzemesine bağlanmış olurlar [74, 75].

Antibadilerin destek malzemesine seçici olarak immobilizasyonunda kovalent olmayan etkileşimler de kullanılabilir. Bakteriyel proteinlerin antibadilere karşı yüksek afiniteye sahip olmaları, onları antibadilerin tespiti ve saflaştırılmasında kullanılabilecek güçlü araçlar haline getirmiştir. Bakteri hücre duvarlarından izole edilen stafilokok protein A ve streptokok protein G antibadilerin saflaştırılması için en sık kullanılan ligandlardır. Protein A ve protein G birçok antibadi sınıfının F_c bölgesine bağlanabilen proteinlerdir [76-78]. Bu proteinler destek malzemesine bağlanabilir ve ardından ligand olarak kullanılacak antibadi F_c bölgesinden bu proteinlere tutturulur. Bu bağlanma fizyolojik koşullar altında oldukça güçlüdür, ancak ortamın pH değerini düşürerek bu bağlanma bozulabilir. Antibadileri destek malzemesine immobilize etmek için kullanılabilecek ligandlardan bir diğeri de avidin veya streptavidindir. Bu ligandlar biyotin etiketi bağlanmış antibadilere bağlanarak onların destek maddesine immobilizasyonunu sağlarlar [79, 80].

2.3.1.4. Adsorpsiyon ve Elüsyon Koşulları

İmmünoafinite kromatografisi için adsorpsiyon koşulları, analitin immobilize antibadi ligandlarına hızlı ve etkili bir şekilde bağlanmasını kolaylaştıracak şekilde seçilir. Bu hareketli faz genellikle antibadinin doğal çevresini taklit edecek şekilde (fizyolojik pH ve iyonik şiddete sahip bir tampon gibi) ayarlanır. Antibadi ve antijen arasındaki etkileşimi teşvik etmek için yavaş akış hızı kullanılabilir ve çözelti kolondan birkaç

kez geçirilebilir. Adsorpsiyon basamağından sonra uygulanacak yıkama basamağında özgöl olarak bağlanmamış biyomolekülleri uzaklaştırmak amacıyla Tween 80 veya Triton X-100 (%0.05 (v/v)) yıkama çözeltisine eklenebilir. Bu işlemten sonra elüsyon basamağından önce tampon çözeltisi ile yıkama yapılır. Adsorpsiyon için seçilen koşullar altında antibadi-antijen etkileşimleri için bağlanma denge sabitleri genellikle 10^6 - $10^{12} M^{-1}$ aralığındadır [81]. Bu durum adsorpsiyon uygulaması esnasında analit ve immünoafinite kolonu arasında son derece güçlü bir bağ oluşturur.

Antibadi-antijen arasındaki etkileşim bu denli güçlü olduğu için antibadi tarafından tutulan hedef biyomolekülü toplamak için sert elüsyon koşullarının uygulanması gerekebilir. Hedef biyomolekülün elüsyonu için genellikle 0.1 M glisin-HCl, pH 2.8 gibi bir asitli tampon (pH 1-3) veya sodyum tiosiyanat gibi kaotropik ajan içeren bir çözelti kullanılır [82]. Elüsyon basamağı esnasında toplanan, hedef biyomolekülü içeren çözeltiye az miktarda 1.0 M Tris, pH 8.5 gibi derişik tampon eklenilerek hedef proteinin düşük pH tamponunda harcadığı süre ve denatürasyon en aza indirilebilir. Öte yandan, elüsyon basamağının hemen ardından destek malzemesine immobilize antibadi ligandının denatürasyonunu önlemeye yardımcı olmak için kolon hızlı bir şekilde nötr bir pH tamponu içerisinde yıkanmalıdır.

Elüsyon çözeltisi olarak 2 M NaCl gibi tuz içeren 1 M NH_4OH veya 50 mM dietilamin gibi yüksek pH değerine sahip tamponlar da kullanılabilir. Ayrıca bu tamponlara deterjan (0.1–1% (w/v) SDS), kaotropik tuzlar (örn., 3.5 M $MgCl_2$, 3 M NaSCN veya 3 M KSCN) da eklenebilir [83].

2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskılama teknolojisi belirli bir analit için seçicilik ve özgüllüğe sahip yapay reseptörler tasarlamak için kullanılan bir yöntemdir [84]. Bu teknoloji kullanılarak üretilen polimerik matrisler olan “*moleküler baskılanmış polimerler*” antibadi-antijen etkileşimleri, sinyal iletimi, enzimatik kataliz, protein sentezi, DNA replikasyonu ve biyolojik reseptörlerin işleyiş mekanizmasında bulunan doğal tanımayı taklit edebilen sentetik veya yarı-sentetik moleküler tanıma elemanlarıdır [85, 86]. Moleküler baskılama teknolojisi ile amino asitler ve proteinler, nükleotid türevleri, ilaçlar, fenolik bileşikler ve ağır metaller gibi çevresel kirleticiler ve gıda gibi biyolojik ve kimyasal molekülleri tanıyabilen malzemeler üretilerek biyoteknoloji,

evre, gıda, kromatografi, sensör, katalizör, ilaç taşıma, sentetik antibadi ve reseptörler gibi alanlarda kullanılabilir [87-96].

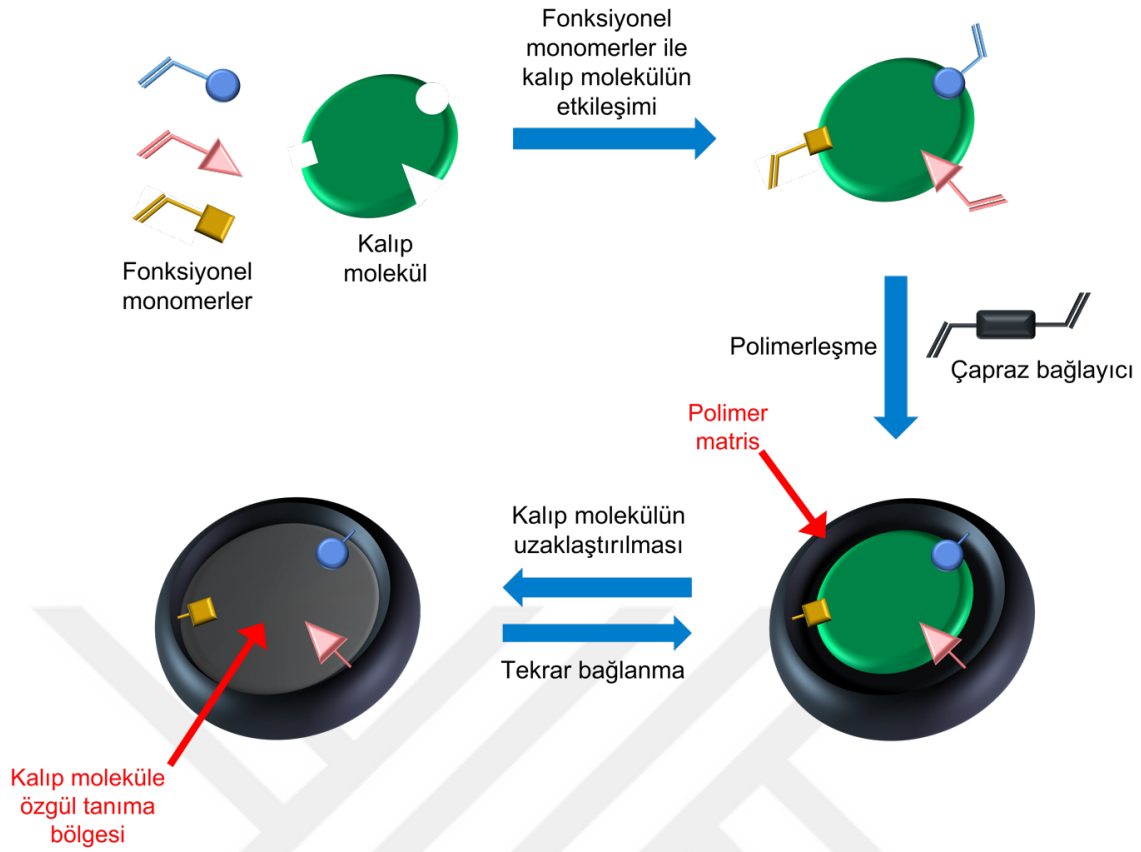
Doğal sistemleri taklit eden moleküler baskılanmış polimerlerin doğal sistemlere karşı üstünlükleri de bulunmaktadır. Bunlar daha yüksek fiziksel ve mekanik sağlamlık, kimyasal kararlılık, yüksek sıcaklık ve basınca karşı gösterilen daha yüksek dayanma gücü olarak sıralanabilir [97]. Ayrıca moleküler baskılamada kullanılacak fonksiyonel monomer ve diğer bileşenler için biyolojik veya sentetik olarak üretilen maddeler kullanılabileceği için biyolojik sistemlere göre daha geniş skalada, hedefe ve uygulama alanına uygun malzemeler üretilebilir. Öte yandan üretilmeleri biyolojik sistemlere kıyasla daha ucuz olup saklama şartları daha rahat ve raf ömürleri de daha uzundur [97].

Moleküler baskılama teknolojisi analiti (kalıp/hedef molekülü) çevreleyen fonksiyonel monomerler ile kalıp molekülün 3-boyutlu etkileşimlerini ve fonksiyonel monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların kopolimerizasyonunu içeren bir süreçtir. Moleküler baskılama üç genel basamaktan oluşur:

1) Ön-kompleksleşme: Kalıp molekülün fonksiyonel gruplarını fonksiyonel monomerlerin fonksiyonel grupları ile istenilen boyut ve bölgelerde bir araya getirmek için kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasında etkileşimler oluşmasına izin verilir.

2) Polimerleşme: Fonksiyonel monomerlerin kalıp molekül varlığında belli bir dizilime ve oryantasyona göre sabitlenmiş yapısı çapraz bağlayıcılar ve başlatıcılar varlığında foto-, termal- veya elektro-polimerizasyon gibi bir polimerleşme yöntemleri kullanılarak sabitlenir.

3) Elüsyon: Kalıp molekül polimer matristen çeşitli çözeltiler kullanılarak uzaklaştırılır ve ortaya kalıp molekülün şekil, boyut ve kimyasal işlevselliğini tamamlayıcı özel tanıma bölgelerine (yani oyuklara) sahip baskılanmış polimer üretilmiş olur.



Şekil 2.8. Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasının genel şeması.

2.4.1. Moleküler Baskılamanın Tarihi Gelişimi

Her ne kadar moleküler baskılama son zamanların ilgi çekici araştırma konularından biri olsa da bu yöntemin tarihsel kökeni 20. yüzyılın başlarına kadar uzamaktadır. Moleküler baskılamanın ilk örneği 1930'ların başlarında, kromatografide kullanılmak üzere silika üzerinde bir dizi araştırma yapmış olan Sovyet kimyacı M. V. Polyakov tarafından gözlenmiştir [98]. Bu çalışmada, sodyum silikat polimerleştirildi ve daha sonrasında katkı maddeleri (benzen, tolüen veya ksilen) ilave edildi. Ardından silika 20-30 gün kurumaya bırakıldı ve sonrasında katkı maddesi sıcak suda yoğun yıkama ile uzaklaştırıldı. Sonrasında yapılan adsorpsiyon çalışmalarında silikanın polimerleşmede eklenen katkı maddelerini daha yüksek kapasitede adsorbe ettiği gözlemlendi. Linus Pauling 1940'ta antijenin antibadi polipeptit zincirlerinin yeniden düzenlenmesinde bir kalıp olarak kullanılmasına dayanan antibadi oluşumu üzerine teorisini tanıttı [99]. Pauling'in teorisi bir antibadinin belirli bir antijene özgüllüğünün yapısal tamamlayıcılığa bağlı olduğu kavramına dayanır. Bu teori bir antijen kalıp molekülü etrafında antibadi polipeptit zincirinin üç boyutlu bir yapısını oluşturma

fikrine ilham kaynağı olmuştur. Pauling ve Campbell daha sonraki çalışmalarda antibadilerin sentetik analoglarının hedef molekülü seçici olarak tanıyabilen antibadi ve antijen arasındaki etkileşim noktalarına dayanarak hazırlanmasını araştırdı [100, 101]. Pauling'in öğrencisi Frank Dickey tarafından 1949 yılında dört farklı boya (metil, etil, n-propil ve n-butil oranj) varlığında sodyum silikatın polimerleşmesi bildirildi [102, 103]. Dickey, "kalıp" boyasının uzaklaştırılmasından sonra silikanın diğer boyaların varlığında aynı boyayı yeniden bağladığını gözlemledi. Kullanılan yöntem Polyakov'un yöntemine benzemesine rağmen en büyük fark bu yöntemde kalıp molekül tepkimesinin başlangıcından beri mevcuttu. Dickey'in bu çalışması günümüzdeki moleküler baskılama metodolojisine benzemektedir ve hatta bu silika malzeme ilk baskılanmış malzeme olarak kabul edilebilir.

1950'lerde ve 1960'larda moleküler baskılanmış çeşitli silika malzemeler literatürde yerini aldı. Curti ve ark. 1950'lerin başında, mandelik asit ve kamforsülfonik asit enantiyomerleri için kiral seçicilik kolon kromatografisinde sabit faz olarak baskılanmış silikaların kullanılmasını bildirdi [104-106]. Patrikeev ve ark. baskılamanın birleştirilmiş kolon formatında yan ürün uzaklaştırılmasında kullanılmasına yönelik araştırmalar yaptı [107]. Klabunovskii ve ark. da kolon kromatografisinde bütanolü kullanarak yaptıkları enantiyomerlerle ilgili çalışmalarını bildirdi [108]. Baskılanmış silika, kolon kromatografisi dışında ince tabaka kromatografisinde de çalışıldı [109, 110].

Patrikeev ve ark. bir bakteri türünü kurutma işlemi altında şelatlanmış silika ile inkübe edip kuruyana kadar ısıttılar. Bu baskılanmış silikanın, kalıp bakteri türlerinin çoğunun farklı referans silikalardan daha iyi gelişmesini desteklediğini gözlemlediler [111]. Patrikeev ve ark. diğer bir çalışmalarında ise bakteri baskılanmış silikanın enantiyoseçicilik sergilediğini belirttiler [112]. Bu grup aynı zamanda sentetik enzim baskılanmış bir polimeri de rapor etti [113]. Bu çalışmada, sırasıyla bir tripeptid veya diketopiperazin ile baskılanmış silikanın, baskılanmış türlerin oluşumunu desteklemek için amino asitlerin polikondensasyonu sırasında ürün oluşumunu yönlendirdiği görüldü. Bu yıllarda moleküler baskılamanın ticari ürünlerde de kullanılmasını amaçlayan girişimler oldu. Örneğin, nikotin baskılanmış silika içeren bir nikotin filtresi patentlendirildi [114]. Bu nikotin baskılanmış silika, baskılanmamış silikadan %10.7 daha fazla nikotin adsorplayabiliyordu.

Silika moleküler baskılamada birçok çalışmada kullanılmış olsa da kararlılık ve tekrarlanabilirlik gibi konularda kısıtlamalara sahip olması 1960'ların sonlarına doğru silikaya olan ilginin azalmasına neden oldu. 1970'lerde moleküler baskılamada kullanılabilecek çeşitli organik polimerler üzerinde araştırmalar başladı. 1972 yılında Wulff ve ark. ile Klotz ve ark. birbirlerinden bağımsız olarak moleküler baskılanmış organik polimerleri bildirerek günümüzdeki anlamıyla bilinen moleküler baskılamanın da ilk örneklerini sunmuş oldular [115, 116]. Klotz ve ark. polietilenimin ve bunun açıl türevlerin tiobutirolakton ile tiyolatladılar ve disülfid köprüleri ile sırasıyla metil oranj varlığında ve yokluğunda çapraz bağladılar. Polimerlerin çapraz bağlanmasından sonra, bağlı metil oranjı uzaklaştırdılar ve ortaya çıkan iki tür çapraz bağlanmış polimerin metil oranjı tekrar bağlama yeteneklerini incelediler. Metil oranj varlığında çapraz bağlanan polimer, metil oranjin yokluğunda çapraz bağlanan polimerden daha fazla bağlanma alanı ve daha güçlü bağlanma gösterdiğini rapor ettiler. Öte yandan, Wulff ve ark. polimere kovalent olarak bağlanan ve daha sonra hidrolize edilen D-gliserik asit-p(vinillanilid)-2,3-O-p(vinilfenilboronat) varlığında hazırlanan bir divinilbenzen polimerinin D-gliserik asidi kiral olarak tanıyabildiğini bildirdiler [117]. Wulf ve ark. tarafından yapılan bu çalışma, moleküler baskılamada tanıma için temel olarak geri dönüşümlü kovalent bağların kullanıldığı ilk örnek olarak bilinir. Bu çalışmanın sonrasında 1970'lerde ve 1980'lerin başlarında yoğun olmak üzere kovalent bağları temel alan birçok moleküler baskılanmış sistem literatüre kazandırıldı. Ancak kovalent bağların moleküler baskılamada getirdiği çeşitli kısıtlamalar sebebiyle kovalent olmayan etkileşimlerin baskılamada kullanılma fikri ortaya çıktı. Literatürde kovalent olmayan (non-kovalent) etkileşimleri moleküler baskılamada ilk kullananlar Arshady ve Mosbach'tır [118]. 1981 yılında yayınladıkları çalışmada, kalıp molekül olarak rodanil mavisi (rhodanile blue) ve safranin O ile fonksiyonel monomerler olarak ise N,N'-fenilendiakrilamid ve 3,5-bis(akrilomelamido) benzoik asidi seçtiler. Polimerleşmeden önce su/dimetilformamid (DMF) içerisinde kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasında elektrostatik etkileşimler oluşturdular. Ardından polimerleşme çözültisi olarak asetonitril, çapraz bağlayıcı olarak ise etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) kullanarak polimerleşmeyi gerçekleştirdiler. Yine ilk olarak 1980'lerde baskılama yöntemi olarak metal iyon koordinasyonunu kullanan çalışmalar da yayınlanmaya başladı [119-122]. Whitcombe ve ark. 1995 yılında yarı-kovalent baskılama yöntemini geliştirdiler [123]. Bu yöntem kovalent ve kovalent

olmayan baskılama yöntemlerinin melez bir şekli olarak ifade edilebilir. Çünkü polimer hazırlama sürecinde kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında kovalent bağ oluşturulurken, kalıp molekülün hidroliz ile uzaklaştırılması sonrasında kalıp (hedef) molekülün yeniden bağlanması kovalent olmayan etkileşimler sayesinde gerçekleşir.

2.4.2. Moleküler Baskılamanın Temel Bileşenleri

Kalıp molekülün niteliği, polimerleşmede kullanılan fonksiyonel monomerler, çapraz bağlayıcılar, başlatıcılar ve çözücüler gibi çeşitli bileşenler baskılanmış polimerin verimi ve performansı üzerinde etkilidir.

2.4.2.1. Kalıp Molekül

Moleküler baskılama teknolojisinde amino asitler, karbohidratlar, aminler, ilaçlar, metal iyonları, vitaminler, proteinler, hormonlar, hatta hücreler gibi çok sayıda madde kalıp olarak kullanılabilir [124]. Genellikle, kalıp moleküller fonksiyonel monomerler ile kararlı kompleksler oluşturmalarını uygun hale getiren karboksil ve amino gibi yüksek polar gruplar içerir [125]. Kalıp molekül polimerleşme esnasında kimyasal olarak inert olmalı, polimerleşme esnasında uygulanan sıcaklık ve basınç gibi şartlara karşı da yeterli miktarda fiziksel ve mekanik kararlılığa sahip olmalıdır [126].

2.4.2.2. Fonksiyonel Monomerler

Fonksiyonel monomerler moleküler baskılanmış polimerlerin hedef moleküle özgül ve seçici bölgelerini oluşturmaktan sorumludur. Kovalent olmayan etkileşimleri içeren baskılama modelinde fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasındaki etkileşimi artırmak için fazla miktarda fonksiyonel monomer kullanılır (genellikle kalıp molekül ile fonksiyonel monomer molar oranı 1:4 olarak seçilir) [97]. Ancak fonksiyonel monomerin gerektiğinden çok fazla miktarda kullanılması, kalıp molekül ile tepkimeye girmesine ve seçici olmayan bağlanma bölgelerinin oluşmasına yol açabilir. Kromatografi ve sensör uygulamalarında en yaygın kullanılan polimerler, poliakrilamit, poliakrilat, polimetakrilat, polimetilmetakrilat, siloksanlar ve poliüretandır.

2.4.2.3. Çapraz Bağlayıcılar

Moleküler baskılamanın bir diğer bileşeni de çapraz bağlayıcılardır. Çapraz bağlayıcıların görevi, doğrusal molekülleri kararlı bir ağ matrisine bağlayarak polimer zinciri tepkimesini desteklemek ve düzenlemektir. Dolayısıyla, gerekli

olandan daha düşük miktarda çapraz bağlayıcı kullanılması, moleküler baskılanmış polimerlerin tanıma yeteneği ve kararlılığı ile doğrudan ilişkili olan çapraz bağlanma alanlarının yetersiz ve verimsiz olmasına yol açabilir. Öte yandan, çapraz bağlayıcının aşırı miktarı birim kütledeki fonksiyonel monomer sayısını azaltarak tanıma bölgelerinin sayısının azalmasına neden olur. Ayrıca elüsyon basamağında kalıp molekülün oyuklardan sökülmesi de zorlaşabilir.

2.4.2.4. Çözücüler

Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında kullanılacak tüm maddeler karıştırılır ve kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimi destekleyen bir çözücü içerisinde çözünür. Çözücülerin bir işlevi de baskılanmış polimerlerin gözenekli yapıda olmasını sağlamak olduğu için “porojen” olarak da adlandırılırlar. Çözücü kalıp molekülün uzaklaştırılmasına ve yeniden bağlanmasına kolayca izin verebilecek derecede gözenekli bir matris inşa edilmesini sağlayacak düzeyde olmalıdır. Genellikle polar çözücüler, kalıp molekül ile fonksiyonel moleküllerin kompleks oluşturmasını sağlayacak hidrojen bağı gibi etkileşimleri bozarak baskılanmış polimerlerin verimini düşürebilir. Bu nedenle, toluen, benzen, kloroform, ksilen ve metilen klorür gibi düşük yüzey gerilimine sahip çözücüler moleküler baskılamada yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.4.2.5. Başlatıcılar

Başlatıcılar polimerleşmenin başlamasını sağlayan kimyasal maddelerdir. Başlatıcılar monomerlere oranla çok daha az miktarlarda (%1 civarında) kullanılırlar. Başlatıcı seçiminde polimerleşme türü ile kalıp molekülün ve fonksiyonel monomerlerin kimyasal yapısına dikkat edilmelidir.

2.4.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Hazırlanma Yöntemleri

Kalıp molekülü ile fonksiyonel monomerin fonksiyonel grupları arasındaki etkileşim türüne bağlı olarak moleküler baskılanmış polimerler çeşitli yöntemlerle hazırlanabilir:

2.4.3.1. Kovalent Baskılama

Kovalent baskılama yöntemi Wulff ve arkadaşları tarafından 1970'lerin başında tanımlanmıştır [115]. Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer borat esterleri, Schiff bazları ya da imin asetal türevlerini oluşturmak üzere kovalent olarak tepkimeye girer ve ardından polimerleşme sonucu çapraz bağlanmış polimerler sentezlenir [127]. Daha sonra tanıma bölgelerini elde etmek için kalıp molekül eluent varlığında

kovalent bağlar kırılarak uzaklaştırılır. Fonksiyonel monomer olarak daha çok küçük moleküllu bileşikler kullanılır. Kovalent baskılama yönteminde yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler, etilen içeren borik asit ve dioller ile borik asit esteri gibi esterler içeren silan karışımlarıdır. Bununla birlikte, bu yöntem kimyasal tepkime seçiminin kısıtlı olması nedeniyle nadiren kullanılır.

2.4.3.2. Kovalent Olmayan Baskılama

Moleküler baskılanmış polimerlerin geliştirilmesi için en yaygın olarak kullanılan kovalent olmayan baskılama yöntemi, 1980'lerin başında Mosbach ve Arshady tarafından önerildi [118]. Kovalent olmayan baskılama yönteminde hidrojen bağı, yük aktarımı, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşim, iyon-dipol ve dipol-dipol gibi elektrostatik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimler fonksiyonel monomerleri kalıp molekül etrafında düzenlemek için kullanılır. Kalıp molekül uygun çözücülerle polimerden uzaklaştırıldıktan sonra, polimer matrisi, kovalent baskılama yönteminin aksine, herhangi bir bağ kırılması olmadan korunur ve özgül tanıma bölgelerine yeniden bağlanma aynı kovalent olmayan etkileşimler yoluyla gerçekleşir.

2.4.3.3. Yarı-Kovalent Baskılama

Yarı-kovalent baskılama yöntemi, kovalent baskılama ile kovalent olmayan baskılama yöntemlerinin hibrit bir versiyonu olarak düşünülebilir. Bu yöntemde, kalıp molekül ile fonksiyonel monomer kovalent olarak bağlanır ve polimerleşme sonrası bu bağ kırılarak kalıp molekül uzaklaştırılır. Ardından kalıp (hedef) molekülün özgül tanıma bölgelerine tekrar bağlanması kovalent olarak değil kovalent olmayan etkileşimler aracılığı ile olur [128]. Yarı-kovalent baskılama için iki farklı yöntem mevcuttur [123, 129]:

1. Kalıp molekül ve fonksiyonel monomerin amit veya ester bağı ile doğrudan bağlanması

2. Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasına kalıp molekülle birlikte ortamdan uzaklaşan aracı gruplar eklenmesi

2.4.3.4. Metal İyon Koordinasyonu ile Baskılama

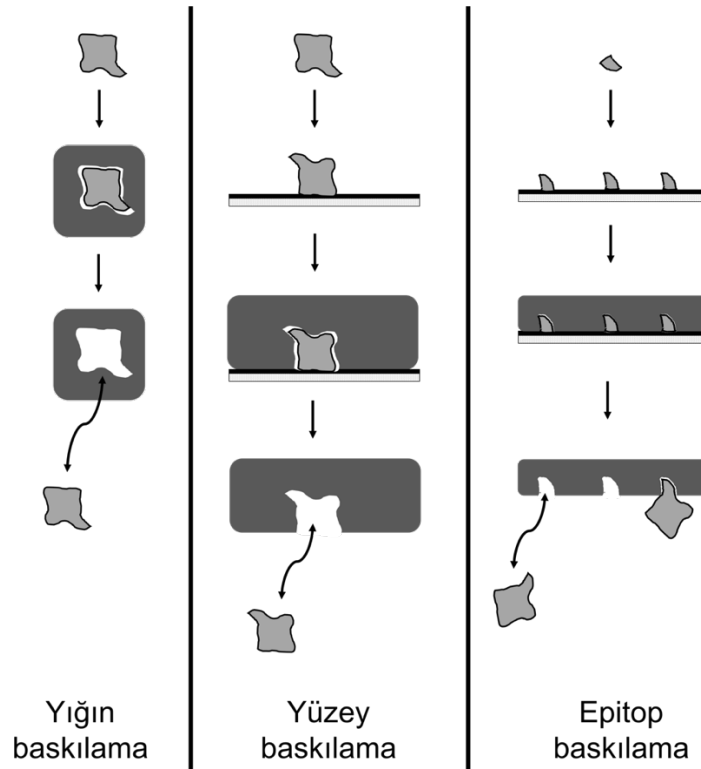
Bu baskılama yönteminde, metal iyonları ile ligandlar arasında kurulan koordine kovalent bağlar 3-boyutlu bir matris yapısı oluşturur. Birçok biyolojik reseptör hem yapısal hem de katalitik işlevlere ve dolayısıyla reaktif merkezin saptanmasına

yardımcı olan metal iyonları içerir. Doğadaki en bilinen örneklerden birisi olarak hemoglobinin oksijen atomlarını Fe^{2+} iyonu aracılığıyla bağlaması gösterilebilir.

Bu yöntemde polimerleşme öncesi koordine kovalent bağlar sayesinde kalıp molekül-metal iyonu-fonksiyonel monomer kompleksi oluşturulur. Metal iyonlarının fonksiyonel gruplara gösterdikleri afinite değişkendir. Örneğin, Ni^{2+} ve Zn^{2+} iyonları fosforil gruplarına afinite gösterirken, Cu^{2+} ve Fe^{2+} iyonları imidazol gruplarına yüksek afinite gösterir [130]. Böylece bu yöntemde aşırı miktarda fonksiyonel monomer kullanmaya gerek kalmadığı için özgül olmayan bağlanma riski düşer. Ayrıca koordine kovalent bağlar sayesinde tanıma bölgelerinin üç boyutlu oryantasyonu optimize edilmiş olur. Bu sayede hedef molekül dışındaki moleküllerin bu bağlanma bölgelerine bağlanması zorlaştığı için metal iyon koordinasyonu ile baskılamada seçicilik de yüksek seviyede olur.

2.4.4. Moleküler Baskılama Türleri

Moleküler baskılama teknolojisinin türleri yığın baskılama, yüzey baskılama ve epitop baskılama olarak üç ana kategoride sınıflandırılabilir. Şekil 2.9'da bu baskılama türlerinin hazırlanma basamakları gösterilmektedir.



Şekil 2.9. Moleküler baskılama türleri.

2.4.4.1. Yığın Baskılama

Yığın baskılamada kalıp molekül polimer matrisi tarafından tamamen kaplanacak şekilde baskılanır ve fonksiyonel monomerler tarafından bir bütün molekül olarak tanınır ve bağlanır [131]. Küçük molekül ağırlığına sahip kalıp moleküller için çok başarılı standart bir yöntem olan yığın baskılama, protein gibi makromoleküller için belli başlı dezavantajlara sahip en basit yaklaşımdır. Örneğin, kalıp molekül olarak nispeten küçük bir protein bile kullanılsa polimer matris ile bağlanma özgülüğünü azaltabilen özgül olmayan etkileşimler oluşabilir. Moleküler baskılamada polimerleşme basamağından sonra kalıp molekülün matristen uzaklaştırılması ve hedef molekülün baskılanan tanıma bölgelerine erişmesini sağlamak önemlidir. Moleküler baskılamada kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra oluşan oyuklara tekrar bağlama polimer matristeki gözeneklerle difüzyon yoluyla gerçekleşir. Ancak baskılanan molekülün boyutu arttıkça polimer matrisin içerisindeki oyuklara ulaşmak zorlaşır [132]. Bu sorunu en aza indirmek için polimerdeki gözenek boyutunu ve sağlamlığı etkileyen çapraz bağlamanın derecesi en uygun şekilde ayarlanmalıdır. Ancak çapraz bağlanma ve matris yoğunluğu düştükçe, genel olarak baskılanmış polimerlerinin kararlılığında da azalma gözlenir. Makromoleküllerin baskılanmasında yığın baskılama yönteminin bu tür dezavantajlarından dolayı bilim insanları tarafından farklı baskılama türleri araştırılmış olup, yüzey baskılama ve epitop baskılama yığın baskılamaya karşı iki büyük alternatiftir.

2.4.4.2. Yüzey Baskılama

Yüzey baskılamada kalıp molekül polimer matrisinin içine kısmen baskılanır, böylece tanıma ve bağlanma bölgeleri polimerin yüzeyine veya yüzeye yakın bölgesine yerleştirilir [131, 133]. Tanıma bölgeleri baskılanmış polimerin yüzeyinde olduğu için hedef molekülün oyuklara ulaşımı difüzyon kısıtlamasından bağımsızdır [134]. Böylece elüsyon ve tekrar bağlanma basamaklarında bu bölgelere ulaşım yığın baskılama esnasında içte kalan tanıma bölgelerine ulaşımına göre çok daha kolaydır. Bu avantajından dolayı yüzey baskılama özellikle protein gibi makromoleküllerin baskılanmasında sık başvurulmuş bir yöntem olmuştur. Öte yandan, bu yöntemde kalıp molekül sadece yüzeye baskılandığı için, yığın baskılamaya oranla çok daha az miktarda kalıp molekül kullanılır. Bu sebeple, baskılanmış polimerdeki tanıma bölge oranı yüzey baskılamada daha az olduğu için saflaştırma esnasında polimer daha çabuk doygunluğa ulaşabilir.

2.4.4.3. Epitop Baskılama

Epitop baskılamada baskılanacak molekülün sadece küçük bir epitop kısmı kalıp olarak baskılanır, üretilen moleküler baskılanmış polimer bu epitop kısım sayesinde tüm proteini tanıyabilir [135, 136]. Bu yöntemde hedef molekülün terminal zincirlerinden biri ile aynı sekansa sahip bir bölge kalıp olarak kullanılmaktadır. Nishino ve arkadaşları, hedef proteinin tanıma bölgelerine özgül olarak bağlanma olasılığını artırmak için benzersiz bir sekansın en az 9 amino asit kalıntısı içeren bir epitop gerektirdiğini ve C-ucu temsil eden bir sekansın N-ucu içeren sekanstan daha çok tercih edildiğini bildirdiler [135]. Epitop seçimi, tüm hedef proteini özgül olarak niteleyen amino asit sekansının benzersizliğine bağlıdır ve hedef proteinlere ve amaçlanan uygulamaların karmaşıklığına bağlı olarak epitop boyutu 15-16'dan 35 amino aside kadar gidebilir. Epitop baskılamada, makromolekülün küçük bir parçası kullanıldığı için özgül olmayan etkileşimler en aza iner ve böylece özgüllük daha yüksek olur [137-140]. Birçok proteinin fiyatı düşünüldüğünde kalıp olarak pahalı protein yerine küçük amino asit dizisi kullanıldığı epitop baskılama sayesinde daha düşük maliyetle baskılanmış polimer üretilebilir.

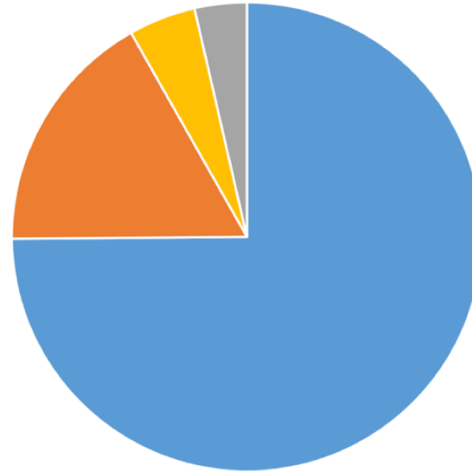
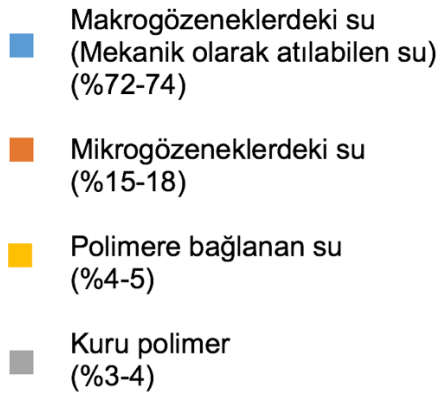
2.5. Kriyojel

Kriyojeller çözücünün donma noktasının altındaki sıcaklıklarda sentezlenen hidrojjeller olarak adlandırılabilir. "Kriyojel" terimi dondurulmuş ortamda oluşan polimerik jelleri tanımlamak amacıyla ilk olarak 1980'lerin başında Vladimir I. Lozinsky tarafından kullanılmıştır [141]. Kriyojel kelimesi "kriyo" [don veya buz anlamına gelen Yunanca "κρυος (kryos)"] ve "jel" kelimelerinin birleştirilmesiyle türetilmiş olup bu polimerik jellerin nasıl oluşturulduğuna vurgu yapılmaktadır [142]. Literatürde dondurulmuş sistemler ile oluşturulan jeller için kriyokoagulatlar (cryocoagulates), kriyokoaservatlar (cryocoacervates), kriyo-deriştirilmiş jel ve donma-çözülme jelleri gibi çeşitli terimler kullanılmasına rağmen bunların arasında kriyojel terimi en bilindik ve tutulan terimdir [143].

Kriyojellerde gözenek yapıcı (porojen) olarak buz kristalleri kullanılır. Donma noktasının altındaki sıcaklıklarda gerçekleşen polimerleşmenin ardından kriyojeller oda sıcaklığına getirildiğinde buzlar erir ve birbirine bağlı makrogözenekler meydana gelir. Geleneksel hidrojjellerin aksine, kriyojeller büyük gözenek boyutuna, kısa difüzyon yoluna, iyi biyouyumluluğa ve yüksek mekanik ve fiziksel kararlılığa sahiptir [4]. Monolitik kolon, membran-disk, küre şekillerinde üretilebilen kriyojeller

biyosensörlerde, kromatografide destek malzemesi, doku mühendisliğinde doku iskelesi, ilaç ve protein gibi terapötik ajan taşıma sistemi ve kontrollü salım sistemi olarak kullanılabilir. Kriyojeller yalıtım, çevre, gıda, sağlık ve biyoteknoloji alanlarını kapsayan geniş bir uygulama alanına sahiptir. Kriyojeller monolitik olarak kullanılacakları gibi mikro veya nanoküreler kriyojel matrisine gömülerek yüzey alanını artırma gibi avantajlar sağlayan kompozit malzemeler de üretilir. Kriyojellerin özellikleri arasında makromoleküler çözeltilerin ve hücrelerin etkin bir şekilde taşınması, yüksek biyouyumluluk, güçlü mekanik özellikler ve dokuya benzeyen su tutma sayılabilir. Kriyojeller makrogözenekler, kısa difüzyon yolu, düşük basınç düşmesi (düşük geri basınç) ve adsorpsiyon ve elüsyon basamaklarında çok kısa alıkonma süreleri sayesinde geleneksel kromatografi destek malzemelerine iyi bir alternatif olabilirler [5]. Ayrıca kriyojel üretiminin sıfırın altındaki sıcaklıklarda gerçekleşmesi proteinleri konformasyonel değişimlerden korurken; gözenek yapıcı olarak zararlı organik çözücüler yerine doğal buz kristalleri kullanıldığı için gıda ve terapötik ajanların saflaştırılmasında ve taşınmasında oluşabilecek sağlığa zarar veren durumlar en aza indirgenir.

Şişmiş Kriyojel (%100)

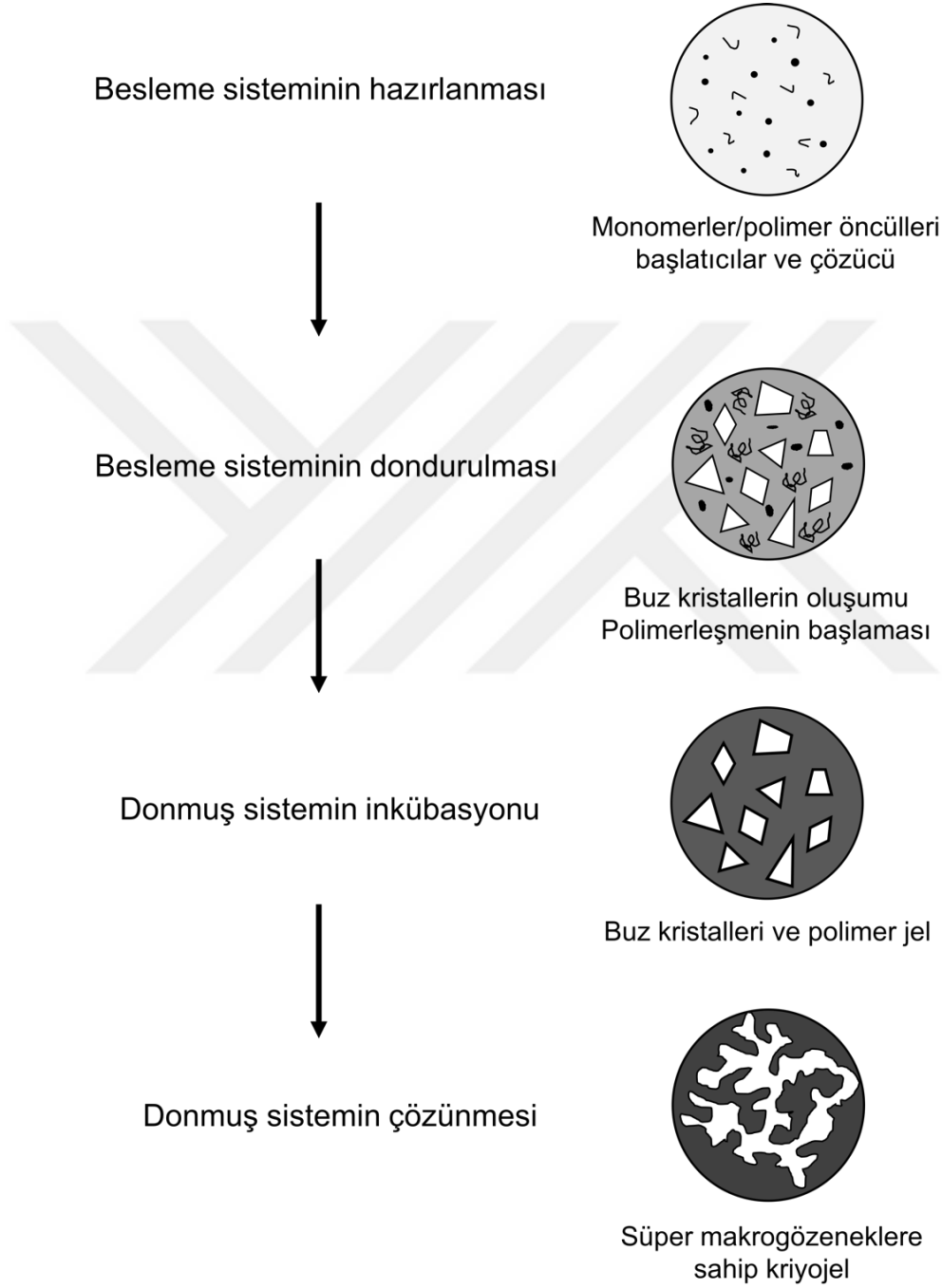


Şekil 2.10. Kriyojellerin su tutma kapasitesi ve gözenekliliği.

2.5.1. Kriyojellerin Hazırlanışı

Kriyojeller çözücünün (genel olarak su) donma noktası altındaki sıcaklıklardaki ortamda, su donup buz kristalleri oluştururken bu esnada monomerler/polimer öncülleri ve çapraz bağlayıcıların kimyasal veya radyasyon ile başlatılan polimerleşmesi ile oluşur. Bu sürece “kriyotropik jelleşme” veya “kriyojelleşme” adı

verilir [144-146]. Kriyojel üretiminde başvurulanan kriyotropik jelleşmenin genel hatları Şekil 2.11’de verilmiştir. Kriyojeller hazırlanırken monomerler, polimer öncülleri, proteinler, polisakkaritler kullanılarak çeşitli çapraz bağlayıcılar yardımıyla polimer ağı oluşturulur. Genel olarak kriyojel üretiminde izlenen yöntemler şunlardır:



Şekil 2.11. Kriyojel üretiminin genel basamakları.

Monomerik öncüllerin çözeltileri: En sık kullanılan kriyojel üretme yöntemlerinden birisidir. Bu yöntemde monomer çözeltileri, çapraz bağlayıcılar ve başlatıcı-aktive ediciler sulu çözeltiye eklenir. Ardından çözelti çözücünün donma noktası altındaki sıcaklıklardaki ortama konur. Böylece kısmen donmuş çözelti ortamında kimyasal veya radyasyonla başlatılan polimerleşme meydana gelir. Bir taraftan sulu çözelti buz kristalleri oluştururken diğer taraftan monomerler ve çapraz bağlayıcılarla birlikte polimerik jel oluşur. Polimerleşme sonunda oluşan jel oda sıcaklığına getirilir, buzlar erir ve yerlerini makrogözeneklere bırakır. Oluşan polimer süngerimsi bir yapıya sahip olan kovalent olarak çapraz bağlanmış kriyojellerdir [147, 148].

Yüksek molekül ağırlıklı öncüllerin çözeltileri: Bu yöntemde polivinil alkol gibi makromoleküller kısmen donmuş ortamda kimyasal ajanlar ve radyasyon ile başlatılan tepkime aracılığı ile çapraz bağlanarak kriyojeller üretilir. Kriyojellerin gözenekliliği, esnekliği gibi özellikleri kullanılan polimer öncülleri, polimerleşme esnasında donma derecesi, çözücü ve gözenek yapıcı gibi parametrelere bağlıdır [149, 150].

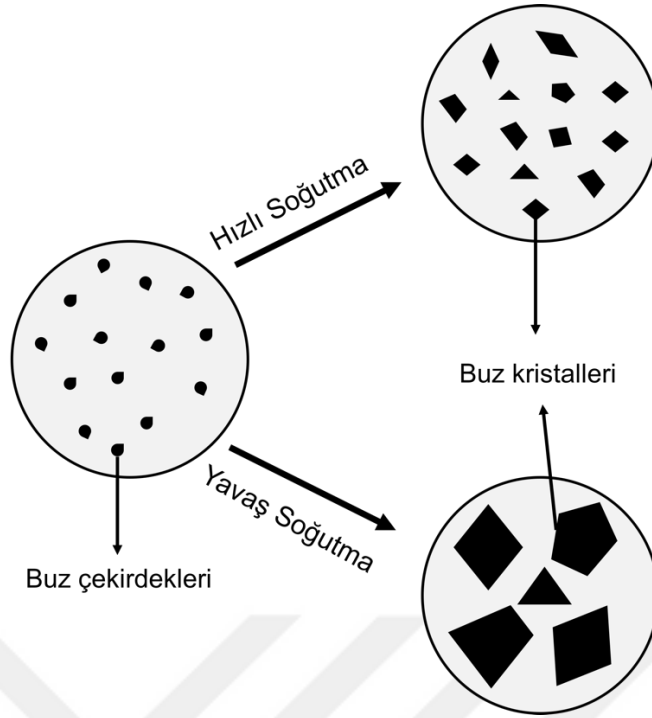
Kolloidal dispersiyonlar: Bu yöntemde kriyojeller kolloid sistemlerin donma-çözülme yöntemi ile jelleşmesi sayesinde üretilir. Kolloid sistemlerde donma sonucu tanecikler arası mesafe kısalır ve hatta tanecikler birbirine sıkı sıkıya temas eder. Bu temas kohezyon kuvvetleri veya tanecikler arası kimyasal bağlantılar oluşturularak dengelenir [151].

Bu yöntemlerden başka kendiliğinden jelleşen polimerlerin çözeltileri ve polielektrolit çözeltiler kullanılarak da kriyojeller hazırlanabilir.

2.5.2. Kriyojellerin Yapısını Etkileyen Parametreler

Kriyojellerin genel yapısının oluşumunda çok çeşitli parametreler rol oynar. Monomer, polimer öncülleri, çapraz-bağlayıcı, çözücü miktarı, çözeltinin iyonik şiddeti ve pH'sı, ortamı soğutma oranı ve hızındaki değişim kriyojellerin gözenek boyutu ve gözenek duvarı kalınlığı dağılımındaki farklılıklara neden olur [152].

Donma esnasında suyun kristalleşmesi içim çekirdeklenmeye ihtiyaç duyulur. Oluşan buz kristallerinin boyutu, kriyojelleşme için seçilen donma sıcaklığına ve ısı aktarımının hızına bağlıdır. Yavaş soğutma ile az sayıda büyük buz kristaller oluşurken hızlı soğutma ile oluşan buz kristalleri çok sayıda olup daha küçük boyuttadır (Şekil 2.12) [153].



Şekil 2.12. Kriyotropik jelleşmede oluşan buz kristallerinin sayısı ve boyutu soğutma hızına bağlıdır.

Kriyojel hazırlanacak çözeltiye NaCl veya CaCl_2 eklenmesi kriyojellerin daha düşük gözenek hacmine sahip olmasına neden olur. Bunun sebebi çözünen madde eklenmesinin donmamış fazı artırmasıdır. Bu tuzların eklenmesi ayrıca gözenek duvarlarının daha kalın olmasına neden olur. Metanol veya aseton eklendiğinde ise duvarlar gözenekli bir yapıya sahip olur [152].

2.6. Transferrin

Demir canlı vücudu için önemli rollere sahip bir metaldir. Hücrel demir eksikliği sebebiyle hücre çoğalmasının durduğu ve sonuç olarak da hücre ölümünün gerçekleştiği bilinmektedir [154]. Demirin vücut için önemi nedeniyle, yaşamsal faaliyetler için gerekli olan miktarı sağlanırken, aynı zamanda toksik etkisinin de en aza indirgenmesi için organizmalar gelişmiş mekanizmalara sahiptirler. Bu mekanizmalarda önemli rollere sahip bir biyomolekül de transferrin glikoproteinidir.

Transferrinler molekül ağırlığı yaklaşık 80 kDa olan homolog monomerik bilobal glikoproteinlerin bir ailesidir. Diğer adı "demir seven" anlamında siderofilin olan transferrin (Tf) demiri tersinir olarak bağlayabilen ve biyolojik sıvılarda bulunan proteinlerdir. Transferrin protein ailesinin bir üyesi olan ovotransferinin ilk izolasyonu

1900 yılında Osborne ve Campbell tarafından yapılmıştır [155]. Ancak işlevi bundan tam 44 yıl sonra Schade ve Caroline tarafından açıklanmıştır [156]. Schade ve Caroline bu proteinin insan kanında varlığını araştırmışlar ve 1946 yılında günümüzde serum transferrin (sTf) olarak bilinen biyomolekülü bulmuşlar ve “siderofilin” olarak adlandırmışlardır [157]. Transferrinin üretimi başta karaciğer hepatositlerinde olur, ancak transferrin türüne göre diğer bölgeler de yerel transferrin üretir.

2.6.1. Transferrin Türleri

Transferrin protein ailesinin dört ana üyeden oluştuğu bilinmektedir. Bunlar:

Serum transferrin (sTf): Demiri absorpsiyon bölgesinden kullanma veya depolanma bölgesine taşır. Kanda bulunan serum transferrin demiri vücut dokularının çoğuna iletmeye rağmen demiri plazmanın kısıtlandığı bölgelere taşıyan diğer transferrin şekilleri de mevcuttur. Bunlardan bazıları mukozal transferrin (serum transferrinin safra salgılarından türetilir), testiküler transferrin ve merkezi sinir sistemindeki transferrindir [158].

Laktoferrin (Lf): Antimikrobiyal özelliklere sahip olan laktoferrin sütte ve kolostrum, gözyaşı, pankreatik sıvı ve gastrointestinal salgılar gibi diğer hücre dışı salgılarda bulunur [159]. Serum transferrinden farklı olarak, laktoferrin eritrositlere demir katkısı oluşturmaz ve retikülo-endotel sistemi ile temizlenir [160]. Demirin bir bakteriyostatik ajan gibi davranmasını sağlayan ve sızmasını engelleyen bir demir şelat ajanı olarak davranır [161].

Ovotransferrin (conalbumin, oTf): Yumurta akının demir bağlama ve antibakteriyel özellikleri, yumurta akı için önemli bir protein olan ovotransferrin sayesinde olur [162]. Ayrıca kuş ve sürüngen yumurta kanalı salgılarında da bulunur [163].

Melanotransferrin (p97, mTf): Serum transferrin homoloğu olan melanotransferrin hücre yüzeyi glikoproteini ve malign melanom ile ilişkili bir antijendir [164]. Demirin transferrin reseptörüne özgül hücresel alımıyla ilgisi yoktur denilebilir [165]. Hatta önceki çalışmalarda melanotransferrinin normal dokularda ya az bulunduğu ya da hiç bulunmadığı; neoplastik hücrelerde (özellikle malign melanom hücrelerde) ve fetal dokularda ise bol miktarda bulunduğu belirtilmişti. Ancak daha sonraki çalışmalarda melanotransferrinin çeşitli normal dokularda da bulunabildiği rapor

edilmiştir [165, 166]. Melanotransferrin demiri ortalıktan kaldırma ile lipid peroksidasyonunun önlenmesi ve hızlı hücre çoğalmasında etkin rol oynadığı düşünülmektedir [166].

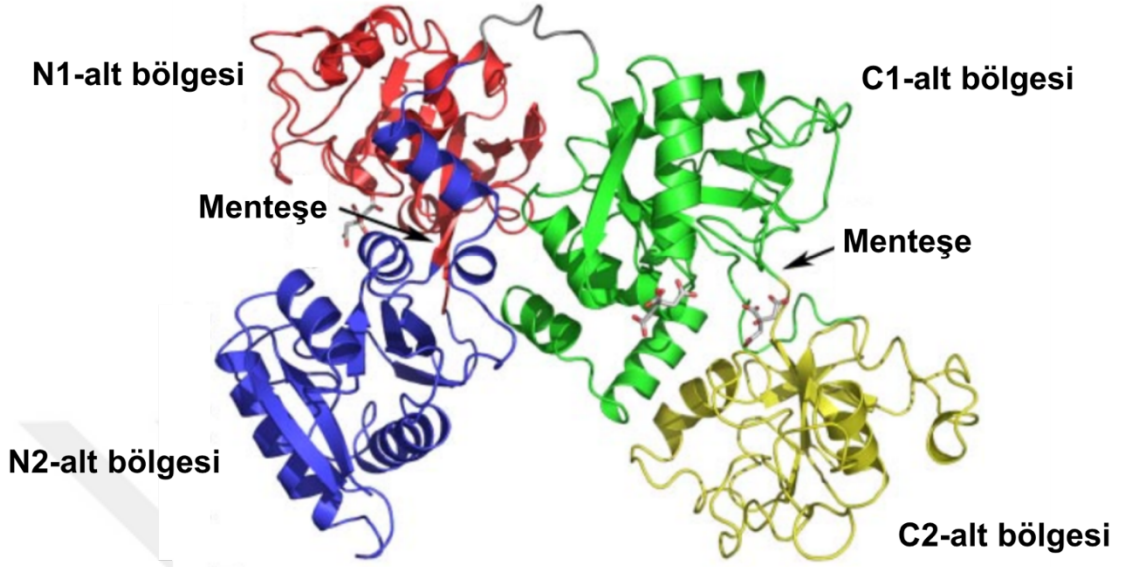
2.6.2. Transferrinin Yapısı ve İşlevi

İnsan serum transferrinin molekül ağırlığı 79570 Da olarak hesaplanmasına rağmen genellikle 80 kDa olarak belirtilir [167]. Transferrin ailesinin bütün üyelerinin molekül ağırlıkları 77-82 kDa arasında değişmektedir [168]. Yaklaşık 670 amino asit uzunluğunda olan transferrin, 336 amino asite sahip amino ucu lobu (N-lobu) ve 336 amino asite sahip karboksi ucu lobu (C-lobu) adında yüksek benzerlik seviyelerine sahip iki globüler lob içine katlanmış şekildedir [169]. İnsan serum transferrinin iki lobu %48 benzerdir [170]. Domuz ve tavşan serum transferrinleri için bu değerler sırasıyla %45.5 ve %42.9'dur [171]. Bu yüksek benzerlik derecesi, her iki lobun da bir gen çoğaltma sürecinden kaynaklandığı teorisiyle tutarlıdır [172]. İki demir bağlama bölgesi içeren transferrin, tek bir demir bağlama bölgesine sahip olan ve yaklaşık 340 amino asit kalıntısı içeren bir atadan geldiği düşünülmektedir. Öte yandan, bu iki bölge ilginç farklılıklar da göstermektedir. Bu farklılıklara örnek olarak COOH-ucu bölgesinde 413 ve 610 konumlarında N-bağlı glikan parçalarının varlığı ve COOH-ucu bölgesinde daha fazla disülfür bağının bulunması (8'e karşı 11) olarak gösterilebilir [173]. Demir taşıyan üç transferrin şekli vardır [174]:

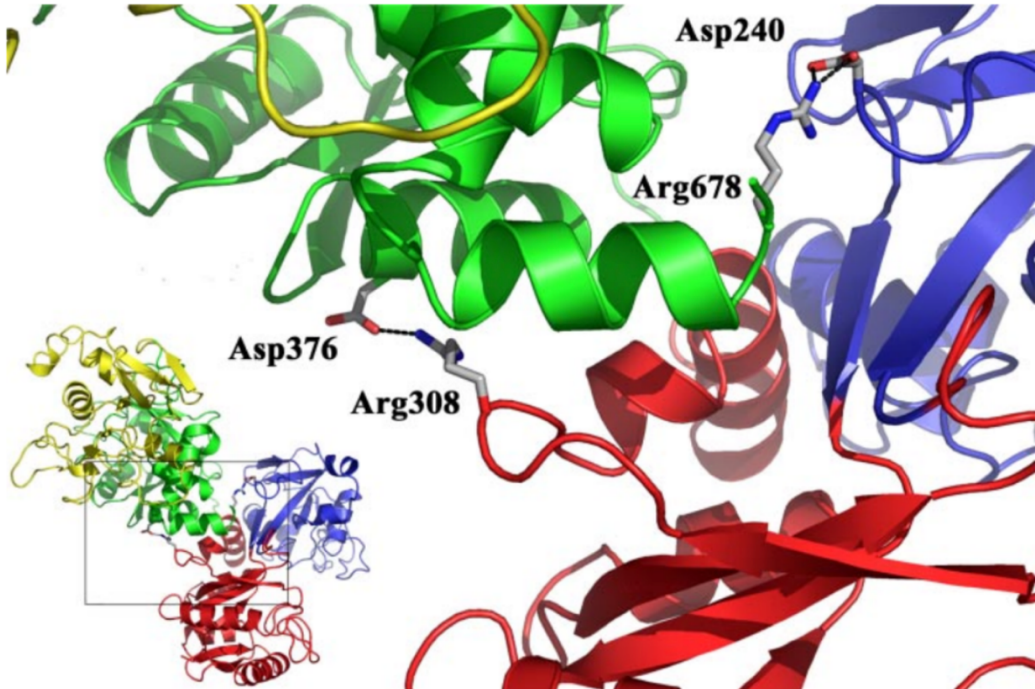
- Diferrik Tf (Holo-transferrin, Holo-Tf): Her iki bağlama bölgesi de Fe ile dolmuştur.
- Monoferrik A Tf (C-ucu Tf): Bir tane demir atomu C-lobundaki bölgeye bağlanmıştır.
- Monoferrik B Tf (N-ucu Tf): Bir tane demir atomu N-lobundaki bölgeye bağlanmıştır.
- Transferrinin her iki bağlama bölgesinin de boş olduğu durumda ise apotransferrin (apo-Tf) olarak bilinir.

N-lobu N1(1-92, 247-331) ve N2 (93-246); C-lobu ise C1 (339-425, 573-679) ve C2 (426-572) olmak üzere α -sarmal ve β -tabaka yapılarından oluşan ikişer alt bölgeye daha ayrılır (Şekil 2.13). Loblar, birbirine kısa bir doğrusal peptit bölgesi ile bağlanır (insan transferrindeki kalıntılar 323-338) [175]. Loblar arasında gevşek, çoğunlukla hidrofobik bir arayüz vardır. Buna ek olarak, C1 alt bölgesi ve N-lobu arasında tuz köprüleri bulunmaktadır (Şekil 2.14). Bu tuz köprüleri sayesinde N1 alt bölgesindeki

Arg308 amino asidi ile C1 alt bölgesindeki Asp376 amino asidi; N2 alt bölgesindeki Asp240 amino asidi ile ise C1 alt bölgesindeki Arg678 amino asidi etkileşimdedir [175].



Şekil 2.13. İnsan apotransferrinin kristal yapısı [175].



Şekil 2.14. İnsan apotransferrinin iki lobu arasındaki arayüz loblar arası temasları göstermektedir [175].

2.6.2.1. Demir Bağlanma Bölgeleri

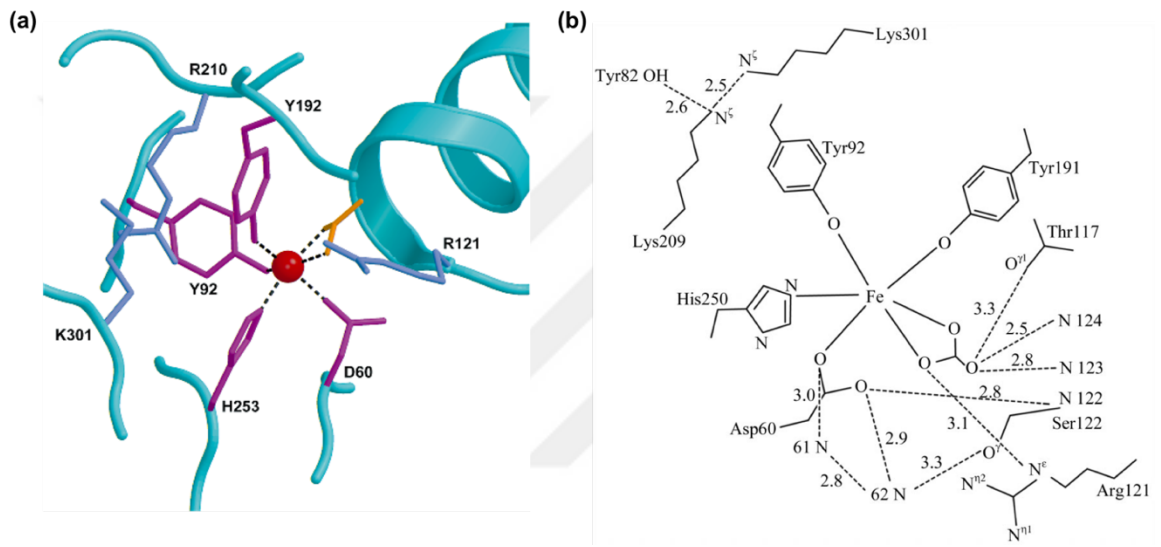
Günlük demir ihtiyacı bireyden bireye değişmekte olup, büyüme dönemindeki çocuklarda ve menstrüasyon dönemindeki kadınlarda daha fazladır. Ayrıca hamile kadınların demir ihtiyacı menstrüasyon dönemindeki kadınlardan 3 kat daha fazladır [1]. Toplam vücut demirinin %60-70'i dolaşımdaki eritrositlerdeki hemoglobinde, %10'u miyoglobin, sitokromlar ve demir içeren enzimlerde bulunurken kalan %20-30'u ferritinler ve hemosiderinler'de depolanmaktadır [176-178]. Demir kırmızı kan hücresinde oksijenin taşınmasını sağlayan hem grubu için hayati elementtir. Demir ayrıca DNA replikasyonunda da önemli göreve sahiptir. Replikasyonda görevli enzimlerden biri olan ribonükleotid redüktaz'ın kofaktörü olarak görev yapar [2]. Ancak serbest demir çeşitli toksik etkilere de sahiptir. Örneğin, serbest radikal oluşumunu artırarak oksidatif stresi yükseltip dokulara zarar verebilir [179].

Vücutta demir taşınmasında en büyük rol transferrine bağlanarak taşıma olduğu için ortamdaki serbest demir transferrin tarafından tutularak serbest demirin toksik etkileri de en aza indirilmiş olur. Demir hücre çoğalmasında ihtiyaç duyulduğu için hızlı çoğalmaya yatkın olan neoplastik hücrelerin yüzeyinde transferrin reseptörü (TfR) aşırı miktarda üretilir [180]. Böylece transferrin antineoplastik ilaçların kanser hücrelerine seçici olarak taşınmasında da kullanılabilir.

Vücutta ferrik demir (Fe^{3+}) ferröz demire (Fe^{2+}) baskındır ve demir transferrine Fe^{3+} formunda bağlanır. Transferrin nötral pH'da Fe^{3+} 'e çok yüksek afiniteyle (ayırışma sabiti, $K_d \sim 10^{-20}$ M) bağlanabilir [181]. Demirin transferrine verimli bağlanabilmesi için bikarbonat anyonu gereklidir [182]. Vücutta demir emilimi temelde duodenumda ve proksimal jejunumda olur [183]. Demirin depolanması ferritin proteinleri ile olurken taşınması genel olarak transferrin proteinleri ile sağlanır.

Transferrin her lobda bir ferrik iyonu olmak üzere iki ferrik iyonunu tersinir olarak bağlayabilme özelliğine sahiptir. Baker ve çalışma arkadaşları insan laktoferrinin X-ışını kristalografisi ile 3-boyutlu yapısını incelediklerinde demir bağlanma bölgelerinin her bir lob için yarıklardaki protein yüzeyinden oldukça derin bir şekilde (10 Å) gömülmüş olduğu sonucuna vardılar [184]. Bunun Fe-Tf kompleksinin güçlü kararlılığında pay sahibi olduğu düşünülmektedir. Fe^{3+} iyonu 3d orbitalinde beş tane eşleşmemiş elektron ve boş bir 4s orbitaline sahiptir ve böylece altı ligand ile bağlanarak oktahedral bir yapı oluşturabilir. Transferinin her iki lobundaki demir bağlama bölgeleri birbirine çok benzemekte ve dört protein ligandı ve iki dışlı

sinerjistik karbonat anyonu içeren çarpık (distorted) bir oktahedral yapısı oluşmaktadır [171]. Fe^{3+} , transferrin ile bağlandığında, yarı boş olan 3d ve boş olan 4s orbitalleri bir karboksilat oksijenden (aspartat) gelen bir elektron, iki fenolat oksijenin her birinden bir elektron (iki tirozin), imidazol azotundan (histidin) gelen bir elektron ve karbonat anyonundaki iki oksijenin her birinden bir elektron ile dolduğu öngörülmektedir (Şekil 2.15). Bununla birlikte Fe^{3+} 'ün üç pozitif yükü aspartatın ve iki tirozinin 3 negatif yükü ile eşleşerek yük dengesi sağlanır. Ayrıca, anyon üzerindeki yük, pozitif yüklü arginin yan zinciri ve bir α -sarmalının N-ucunda pozitif yük ile dengelenir [185].



Şekil 2.15. İnsan laktoferrinin N-lobu bağlanma bölgesi [186] (a) tavuk serum transferrininin N-lobundaki metal-ligand koordinasyonu ve etrafındaki hidrojen bağları [187] (b). Fe^{3+} iyonu Tyr92, Tyr192, His253 ve Asp60'ın yan zincirleri ve iki dişli CO_3^{2-} iyonuna bağlıdır. CO_3^{2-} iyonunu ile Arg121 ve α -sarmalının N-ucundaki NH grupları arasında H-bağları vardır.

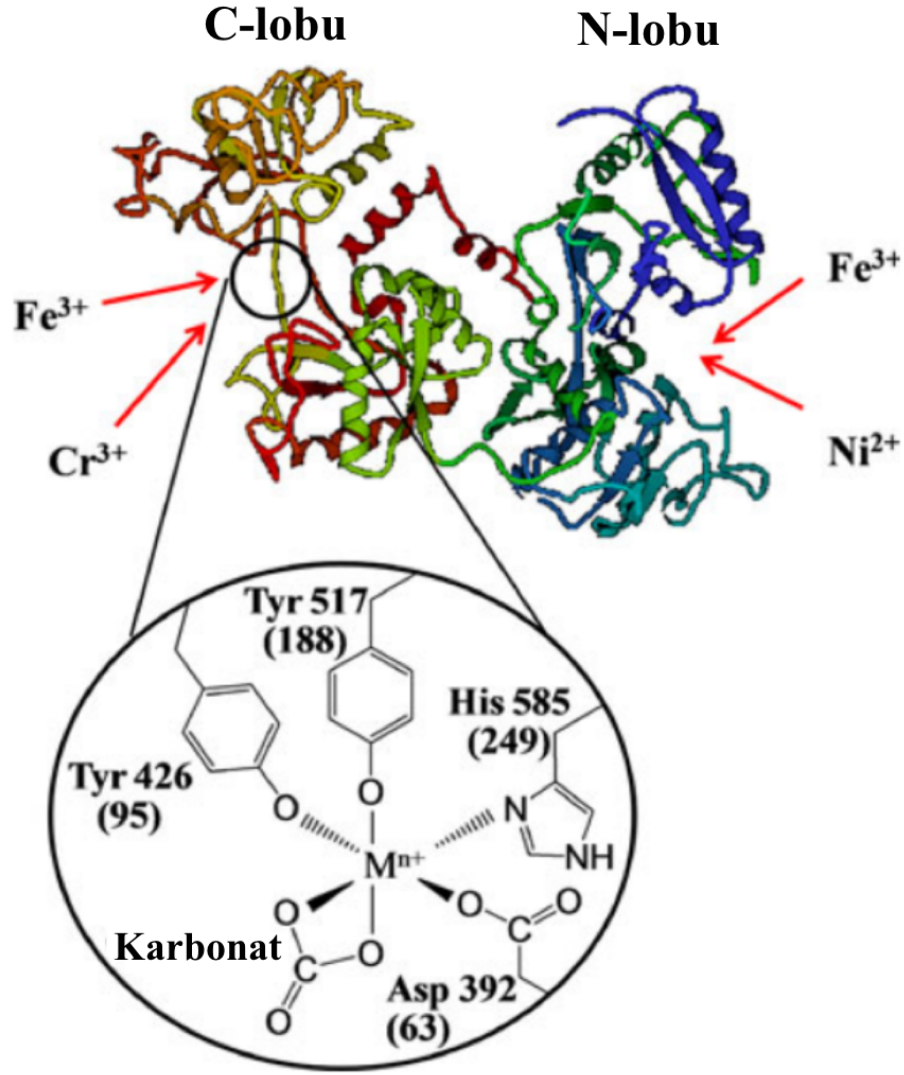
In vitro olarak transferrinin Fe^{3+} yüklenmesi için pH 7.4'te bağlanma sabitleri sırasıyla C-lobu ve N-lobu için $K_{\text{C-lobu}} = 4.7 \times 10^{20} \text{ M}^{-1}$ ve $K_{\text{N-lobu}} = 2.4 \times 10^{19} \text{ M}^{-1}$ 'dir. Görüldüğü üzere, Fe^{3+} iyonunun C-lobuna bağlanması, N-lobuna bağlanmasından yaklaşık 20 kat daha güçlüdür [188]. Bu değerlerle uyumlu olarak, Fe^{3+} ilk önce C-lobuna, ardından N-lobuna bağlanır [189]. Bağlanma bölgesine metal bağlandığında ilgili lob, açıktan kapalıya bir konformasyon değişimi geçirir [190]. Transferrin her iki lobu da kapalı konformasyonda iken hücre yüzeylerinde bulunan transferrin reseptörüne (TfR) bağlanma için en yüksek afiniteye sahiptir. Reseptör

bağlandıktan sonra Tf-demir kompleksi, reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınır [191].

Normal koşullar altında, transferrindeki potansiyel Fe^{3+} bağlanma alanlarının sadece yaklaşık %30'u doludur ve potansiyel olarak diğer metal iyonlarını bağlamak için C-lobu veya N-lobunda boşta kalan bağlanma yerleri vardır [192]. Özellikle $3+$ değerlikli metallerin birçoğunu bağlama yeteneğine sahiptir. Transferrinin bağlayabildiği metaller Şekil 2.16'da gösterilmektedir. Cr^{3+} , ve Ni^{2+} iyonları da Fe^{3+} 'unun bağlandığı bölgelere bağlanabilir ancak bu iki metal iyonunun bağlanma katsayıları Fe^{3+} ile kıyaslandığında oldukça düşüktür (Cr^{3+} için $K_{C-lobu} = 1.41 \times 10^{10} M^{-1}$ ve $K_{N-lobu} = 2.04 \times 10^5 M^{-1}$ ve Ni^{2+} için $K_{C-lobu} = 1.70 \times 10^3 M^{-1}$ ve $K_{N-lobu} = 1.26 \times 10^4 M^{-1}$) (Şekil 2.17) [189, 193, 194]. Diğer metallerin transferrine bağlanması çeşitli tıbbi araştırmalarda kullanılmaktadır. Örneğin, ^{111}In metabolik süreçleri izlemede, ^{67}Ga 'un ise tümör görüntüleme ajanı olarak kullanılabilirliği incelenmiştir [195, 196].

1 H Hydrogen 1.00794																	2 He Helium 4.003						
3 Li Lithium 6.941	4 Be Beryllium 9.012182															5 B Boron 10.811	6 C Carbon 12.0107	7 N Nitrogen 14.00674	8 O Oxygen 15.9994	9 F Fluorine 18.9984032	10 Ne Neon 20.1797		
11 Na Sodium 22.989770	12 Mg Magnesium 24.3050															13 Al Aluminum 26.981538	14 Si Silicon 28.0855	15 P Phosphorus 30.973761	16 S Sulfur 32.066	17 Cl Chlorine 35.4527	18 Ar Argon 39.948		
19 K Potassium 39.0983	20 Ca Calcium 40.078	21 Sc Scandium 44.955910	22 Ti Titanium 47.867	23 V Vanadium 50.9415	24 Cr Chromium 51.9961	25 Mn Manganese 54.938049	26 Fe Iron 55.845	27 Co Cobalt 58.933200	28 Ni Nickel 58.6934	29 Cu Copper 63.546	30 Zn Zinc 65.39	31 Ga Gallium 69.723	32 Ge Germanium 72.61	33 As Arsenic 74.92160	34 Se Selenium 78.96	35 Br Bromine 79.904	36 Kr Krypton 83.80						
37 Rb Rubidium 85.4678	38 Sr Strontium 87.62	39 Y Yttrium 88.90585	40 Zr Zirconium 91.224	41 Nb Niobium 92.90638	42 Mo Molybdenum 95.94	43 Tc Technetium (98)	44 Ru Ruthenium 101.07	45 Rh Rhodium 102.90550	46 Pd Palladium 106.42	47 Ag Silver 107.8682	48 Cd Cadmium 112.411	49 In Indium 114.818	50 Sn Tin 118.710	51 Sb Antimony 121.760	52 Te Tellurium 127.60	53 I Iodine 126.90447	54 Xe Xenon 131.29						
55 Cs Cesium 132.90545	56 Ba Barium 137.327	57 La Lanthanum 138.9055	72 Hf Hafnium 178.49	73 Ta Tantalum 180.9479	74 W Tungsten 183.84	75 Re Rhenium 186.207	76 Os Osmium 190.23	77 Ir Iridium 192.217	78 Pt Platinum 195.078	79 Au Gold 196.96655	80 Hg Mercury 200.59	81 Tl Thallium 204.3833	82 Pb Lead 207.2	83 Bi Bismuth 208.98038	84 Po Polonium (209)	85 At Astatine (210)	86 Rn Radon (222)						
87 Fr Francium (223)	88 Ra Radium (226)	89 Ac Actinium (227)	104 Rf Rutherfordium (261)	105 Db Dubnium (262)	106 Sg Seaborgium (263)	107 Bh Bohrium (262)	108 Hs Hassium (265)	109 Mt Meitnerium (266)	110 (269)	111 (272)	112 (277)												
58 Ce Cerium 140.116	59 Pr Praseodymium 140.90765	60 Nd Neodymium 144.24	61 Pm Promethium (145)	62 Sm Samarium 150.36	63 Eu Europium 151.964	64 Gd Gadolinium 157.25	65 Tb Terbium 158.92534	66 Dy Dysprosium 162.50	67 Ho Holmium 164.93032	68 Er Erbium 167.26	69 Tm Thulium 168.93421	70 Yb Ytterbium 173.04	71 Lu Lutetium 174.967										
90 Th Thorium 232.0381	91 Pa Protactinium 231.03588	92 U Uranium 238.0289	93 Np Neptunium (237)	94 Pu Plutonium (244)	95 Am Americium (243)	96 Cm Curium (247)	97 Bk Berkelium (247)	98 Cf Californium (251)	99 Es Einsteinium (252)	100 Fm Fermium (257)	101 Md Mendelevium (258)	102 No Nobelium (259)	103 Lr Lawrencium (262)										

Şekil 2.16. Periyodik tabloda, transferrinlerin metal bağlama bölgelerinden birine veya her ikisine bağlanan elementler koyu renkle belirtilmektedir [197].

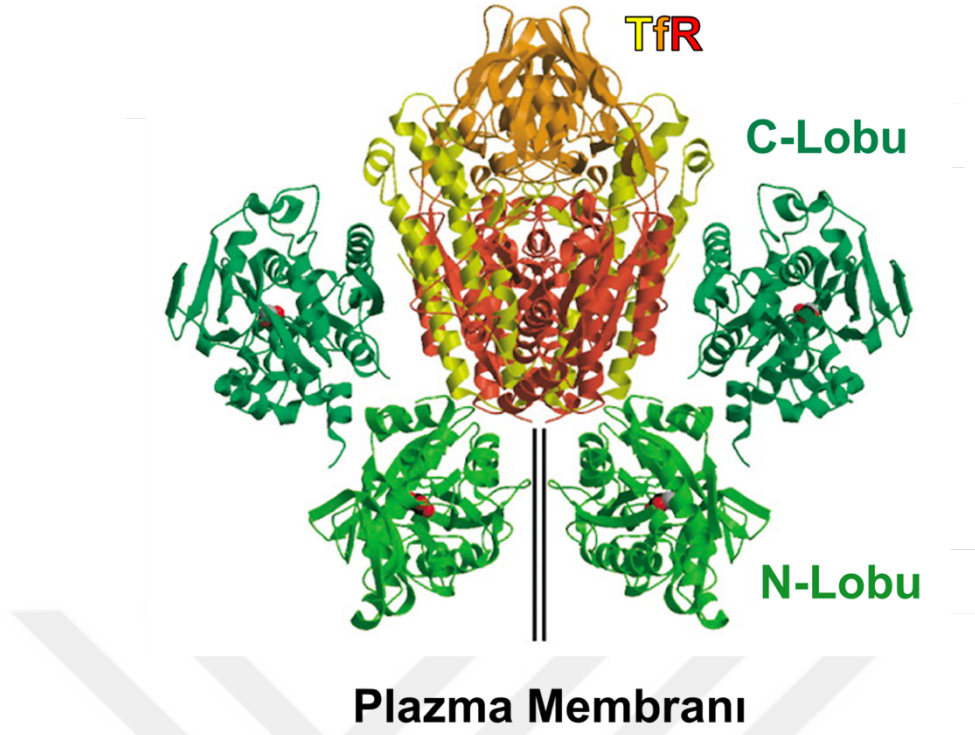


Şekil 2.17. Fe^{3+} , Cr^{3+} ve Ni^{2+} iyonlarının transferrine potansiyel bağlanma bölgeleri [194].

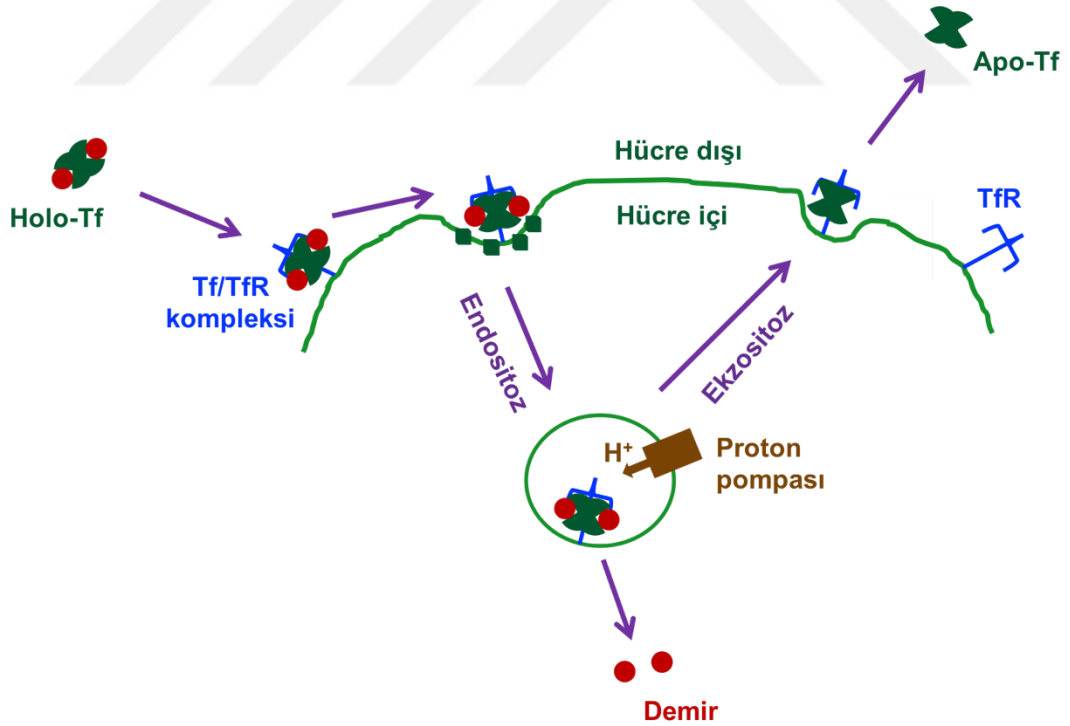
2.6.2.2. Transferrin/Transferrin Reseptörü (Tf/TfR) Sistemi ve Demir Salımı

Transferrin duodenal enterositlerden emilen demiri veya yaşlanmış eritrositleri tüketen makrofajlardaki demiri alır. Bu demir başlangıçta ferröz (Fe^{2+}) formundadır. Enterosit proteini hephaestin ve plazma proteini seruloplasmin, demirin ferrik formuna (Fe^{3+}) yükseltgenmesini sağlar ve böylece demir transferrine bağlanabilir [198, 199]. Serum transferrin, iki lobunun her birine demiri tersinir olarak bağlar ve reseptör aracılı, pH'ya bağlı bir işlemle hücrelere taşır. Demirin bağlanması ve salınması her lobaındaki iki alt bölgenin bir menteşe etrafında sert bir büküm hareketi ile kapanması veya açılması şeklinde geniş bir konformasyonel değişikliğe neden

olur Tf/TfR kompleksinin atomik modeli Şekil 2.18'de verilmiştir. Her bir demir molekülü transferrine bağlandığında kademeli olarak ortaya çıkan bu konformasyonel değişiklik, transferrinin transferrin reseptörüne bağlanma afinitesini etkiler. Holo-Tf transferrin reseptörüne mono-transferrine (mono-Tf'ye) ve apo-Tf'ye kıyasla daha yüksek afiniteyle bağlanır [200, 201]. Demirin transferrin molekülüne bağlanması aynı zamanda transferrin molekülünün kararlılığını da artırır. Yani holo-Tf, apo-Tf'ye göre termal ve proteolitik bozunmaya karşı daha yüksek bir direnç sergiler [202, 203]. Fizyolojik pH (~7.4) altında, holo-Tf, hücre yüzeyi üzerindeki transferrin reseptörüne bağlanabilir ve Tf/TfR kompleksi daha sonra, klatrin-aracılı endositoz ile hücre içine alınır. Tf/TfR kompleksi daha sonra pH düzeyi 5.5 olan endozoma taşınır. Endozomdaki asidik ortam, holo-Tf'nin konformasyonel değişimini indükler ve bu da demirin salınmasına neden olur [204]. Demir salımından sonra apo-Tf/TfR kompleksi hücre zarına ulaşır ve apo-Tf'nin TfR'ye karşı hücre dışı pH'daki düşük afinitesi, apo-Tf'nin TfR'den serbest bırakılmasına neden olur [205-207]. Böylece apo-Tf, serbest demir elde etmek için dışarı salınmış olur ve TfR aracılı endositoz döngüsü devam eder (Şekil 2.19) [208]. Bu döngü sayesinde hücre içi gerekli demir alımı sağlanırken Tf molekülünün miktarı da korunmuş olur [209]. Bir Tf molekülünün bu döngü işlemine yaklaşık 100 kez katılabileceği tahmin edilmektedir [210]. Demirin transferrine bağlanması için ortamda bikarbonat anyonlarının olması gerekli olduğu gibi, bikarbonat anyonları transferrinin demiri düzgün bir şekilde salma yeteneğini de artırır [206, 211].



Şekil 2.18. Tf/TfR kompleksinin atomik modeli [212].



Şekil 2.19. Hücre içine TfR aracılı demir alım döngüsü. Tf molekül başına iki Fe^{3+} iyonu bağlar. Demir yüklü Tf daha sonra TfR ile bağlanır ve Tf/TfR kompleksi, klatrin kaplı çukurlarla hücre içine alınır. Demir asidik endozomal ortamda Tf'den salınır ve Tf/TfR, plazma membranına geri döner. Tf, TfR'den salınarak döngü tamamlanır.

2.6.3. Transferrinin Tedavi Amaçlı Kullanımı

Bazı tümör hücre türlerinde normal hücrelere kıyasla transferrin reseptörünün aşırı üretildiği bilindiğinden, kanser tedavisi için aktif hedeflemede transferrinin kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Aktif hedefleme için transferrin ilaçlar, proteinler ve genlerle konjuge edilmektedir (birleştirilmektedir) [213]. Transferrin konjuge proteinler için örneklerden biri difteri toksinidir [214]. Bu konjuge, Tf-CRM107 olarak bilinir ve beyin tümörü çeken hastaya intra-tümöral olarak uygulanır. Faz I ve Faz II klinik çalışmalarda malign beyin tümörüne karşı Tf-CRM107'nin olumlu etkisinin kanıtlanması cesaret verici sonuçlar vermiştir. Malign beyin tümörü olan hastalara Tf-CRM107 intra-tümöral olarak verildiğinde hastaların %60'ından fazlasında tümör hacminde bir azalma gözlemlendi [215]. Ayrıca, HepG2 tümör kütlesi taşıyan bağışıklığı yetersiz farelere (immune-deficient mice) doksorubisin (DOX) içeren Tf-konjuge lipozomun intravenöz olarak verilmesiyle tümör kütlesinde daha yüksek ilaç birikimi görüldü ve böylece tümör büyümesi azaldı [216].

İlgi çeken bir diğer konjuge sistem ise transferrin konjuge nanopartiküllerdir. Meme kanserine karşı etkinliğini ölçmek için oluşturulan bir çalışmada paklitaksel (PTX) yüklü ve transferrin konjuge nanopartiküllerin (NP'lerin) etkinliği üzerinde çalışıldı. Tf-konjuge NP'ler, ilacın doz bazında ve zamana bağlı çalışmalarında normal (MCF-7) ve ilaca dirençli (MCF-7/Adr) meme kanseri hücrelerinde çözelti içindeki veya konjuge olmayan NP'ler ile karşılaştırıldığında ilacın daha büyük ve devamlı antiproliferatif aktivite göstermesini sağladı [3]. Beyin glioma tedavisi için DOX ve PTX ile yüklü transferrin-konjuge manyetik silika-poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküller (NP'ler) üretilmiştir [217]. Hem hücre kültü çalışmaları hem de *in vivo* olarak fareler üzerinde yapılan çalışmalar sayesinde beyin gliomasının etkin tedavisi için ikili ilaçların verilmesinde manyetik alanlı silika-PLGA-Tf NP'lerin taşıyıcı olarak kullanımda umut verici sonuçlara ulaşıldı. Transferrin konjuge nanopartiküller ayrıca görüntülemeye de kullanılmaktadır. Örneğin bir çalışmada, altın nanopartiküller meme kanseri hücrelerinin (Hs578T, ATCC) hedeflenmesi, görüntülenmesi ve tedavisi için transferrin molekülleri ile konjuge edildi [218]. Sonuçlar, altın NP'lerin Tf/TfR aracılı hücre alımının, konjuge olmayan NP'lerinkinden altı kat daha fazla olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, kanser hücrelerinin foto-termal tedavisinde etkili olan lazer gücü, iki basamak daha düşük olan değerlere düşürüldü. Seçici olarak kanser hücrelerini hedefleyen konjuge altın

NP'lerin verimliliğini göstermek için, kanserli hücreler (3T3, ATCC) ile altın NP'lerin hücresel alımı da araştırıldı. Normal hücrelerin hücresel alımı, kanserli hücrelerinkinin sadece dörtte biri olması, altın NP'lerin hücresel alımı kontrolünde Tf/TfR etkileşiminin önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir. Transferrin reseptörü aynı zamanda kan-beyin bariyeri yüzeyinde yaygın olarak üretilir. Bu nedenle, transferrin veya transferrin reseptörü antibadisi ile konjuge terapötik maddeler, nöronal hastalıkları tedavi etmek için kan-beyin bariyerini geçebilir. TfR antibadisi ile konjuge olan ve lipofilik ilaç taşıyan lipozomlar, TfR antibadisi barındırmayan, lipofilik ilaç taşıyan lipozomlarla kıyaslandığında intravenöz olarak vücuda verildikten sonra lipofilik ilaç derişiminin beyinde birikmesinin sağlandığı rapor edildi [219].

Transferrin konjuge birçok terapötik madde geliştirilmiş olmasına rağmen transferrinin hücre içerisinde nispeten kısa kalış süresi ve hızlı döngüsü tedavi verimini artırmada büyük bir sorundur. Bu sorunu aşmak için de çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bunlardan birisi de transferrinin oligomer formunu hazırlamaktır. Bir anti-kanser ilacı olan ve hücre içi olarak aktive edilmesi gereken metotreksat, transferrin oligomeriyle konjuge edilmiştir. Bu konjugasyonun kanser hücrelerinin öldürülmesinde transferrin monomeriyle konjuge metotreksat'tan daha etkili olduğu bildirildi. Bunun sebebinin transferrinin oligomer formu sayesinde ilacın daha uzun süre içeride kalabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir [220].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

hsTf, keçi anti-Tf, HEMA, GMA, EGDMA, MBAAm, TEMED, APS, L-triptofan, metakriloil klorür Sigma (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan tüm su Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® ters ozmoz ünitesi kullanılarak saflaştırılmıştır. Tampon ve numune çözeltileri 0.2-µm membran (Sartorius, Göttingen, Almanya) ile kullanmadan önce filtrelenmiştir. Tüm cam eşyalar kullanımdan önce seyreltik nitrik asitle yıkanmıştır.

3.2. İmmünoafinite Mikrokriyojellerin (İM) Üretimi

3.2.1. P(HEMA-GMA) Mikrokriyojellerin Üretimi

700 µL HEMA ve 185 uL GMA, 1.1 mL deiyonize su içerisinde çözüldü. Bu arada, 0.4 mL EGDMA ve 0.167 g sodyum lauril sülfat (SLS), 4.6 mL deiyonize suya eklendi. İkinci çözelti bir önceki çözeltiyle karıştırıldı. Daha sonra karışım manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve bir buz banyosu içinde 15 dakika soğutuldu. 5 mg APS ve 20 µL TEMED ilave edildikten sonra karışım, 600 µm çapında ve 500 µm kalınlığındaki mikrooyuklara sahip kalıp üzerine aktarıldı. Karışım, mikrooyukları doldurmak için lam yardımı ile kalıp üzerine yayıldı ve kalıp iki cam levha ile kaplanarak kriyotropik jelleşmenin oluşacağı ortama kondu. Kriyojelleşme -16°C'da 24 saat sürdürüldü. Daha sonra cam tabakalar çıkarıldı ve kalıp bir liyofilizasyon ünitesine (Christ Freeze Dryer - Alpha 1-2 LD, Maryland, ABD) yerleştirildi ve 2 saat süreyle 0.0010 mbar ve -52°C'da işlem gördü. Ardından mikrokriyojeller toplandı.

3.2.2 P(HEMA-GMA) Mikrokriyojellere Anti-Tf Antibadisinin Kovalent İmmobilizasyonu

P(HEMA-GMA) mikrokriyojellere antibadi bağlanmasında daha önceki çalışmadan faydalanıldı [221]. Fonksiyonel epoksi gruplarına sahip mikrokriyojeller önce NaOH çözeltisi (1.0 M, 1 mL) ile 6 saat süreyle geçirildi ve daha sonra fosfat tamponu (50 mM, pH 8.0) içinde 2 saat boyunca dengeye getirildi. Mikrokriyojeller, fosfat tamponu (50 mM, pH 8.0) içinde 0.1-1.0 mg/mL arasında çeşitli derişimlerde 1.0 mL anti-Tf çözeltisine aktarıldı ve belirli bir süre boyunca oda sıcaklığında rotatörde hafifçe karıştırıldı. İmmobilizasyondan sonra, mikrokriyojeller, fiziksel olarak bağlı anti-Tf moleküllerini uzaklaştırmak için dengeleme tamponu ile yıkandı. Mikrokriyojellere anti-Tf bağlı olmayan epoksi gruplarının deaktivasyonu için etanolamin (10 M) ile muamele edildi ve ardından mikrokriyojeller deiyonize su ile

yıkandı. Böylelikle immünoafinite mikrokriyojeller (İM) hazırlanmış oldu. Mikrokriyojeller üzerinde immobilize edilen anti-Tf antipadisinin miktarı, UV-vis spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Tokyo, Japonya) kullanılarak Bradford yöntemi ile 595 nm'de immobilizasyon öncesi ve sonrasında anti-TF derişimindeki düşüşün ölçülmesi ile tespit edildi [222]. Özgöl olarak adsorbe edilmemiş anti-TF molekülleri de göz önüne alındı. İmmobilize edilen anti-Tf miktarı şu eşitlik ile hesaplandı:

$$Q = \frac{(C_0 - C) V}{m} \quad (3.1)$$

Burada Q, mikrokriyojelin birim kütlesi üzerine immobilize edilen anti-Tf'nin miktarı (mg/g); C_0 ve C sırasıyla başlangıç çözeltisindeki ve belirli bir süre sonrası sulu fazdaki anti-Tf derişimleri (mg/mL); V sulu fazın hacmi (mL); ve m kullanılan mikrokriyojel kütlesidir (g).

3.3. Moleküler Baskılanmış Mikrokriyojellerin Üretimi

3.3.1. N-Metakriloil-L-Triptofan (MATrp) Sentezi

Hidrofobik amino asidin polimerize olabilen bir türevi olan MATrp, polimerik yapıya hidrofobiklik eklemek için şu şekilde sentezlendi [5]: L-triptofan (5.0 g) ve hidrokuinon (0.2 g), 100 mL CH_2Cl_2 çözeltisinde çözüldü ve bu çözelti 0°C'a soğutuldu. Çözeltiye trietilamin (12.74 g) eklendi. Metakriloil klorür (5.0 mL) azot atmosferi altında bu çözeltiye yavaşça ilave edildi ve daha sonra bu çözelti oda sıcaklığında 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu kimyasal tepkime süresinin sonunda tepkimeye girmemiş metakriloil klorür %10'luk NaOH ile uzaklaştırıldı. Sulu faz bir döner buharlaştırıcı kullanılarak buharlaştırıldıktan sonra, ürün, MATrp, etanol içerisinde de tekrar kristalleştirilerek elde edildi.

3.3.2 Transferrin Baskılanmış P(HEMA-MATrp) Mikrokriyojellerin Üretimi

İnsan serum transferrini (hsTf) (0.2 mmol) ve MaTrp (2 mmol), 2 mL 10 mM fosfat tamponu (pH 6.0) içinde çözülmüş ve elde edilen çözeltinin, MaTrp ve hsTf'in organizasyonu (yani MaTrp-BSA kompleksi oluşması) için 3 saat boyunca karıştırıldı. Belirli miktarlarda MaTrp-BSA kompleksi bir behere alındı ve bu behere (0.9 mL) HEMA eklendi. Daha sonra (0.16 g) MBAAm deiyonize su içinde çözülüp önceki çözelti ile karıştırıldı ve toplam deiyonize su hacmi 8.0 mL'de sabitlendi. 5 mg APS ve 20 µL TEMED ilave edildikten sonra karışım, 600 µm çapında ve 500 µm kalınlığındaki mikrooyuklara sahip kalıp üzerine aktarıldı. Karışım, mikrooyukları

doldurmak için lam yardımı ile kalıp üzerine yayıldı ve kalıp iki cam levha ile kaplanarak kriyotropik jelleşmenin oluşacağı ortama kondu. Kriyojelleşme -16°C'da 24 saat sürdürüldü. Daha sonra cam tabakalar çıkarıldı ve kalıp bir liyofilizasyon ünitesine (Christ Freeze Dryer - Alpha 1-2 LD, Maryland, ABD) yerleştirildi ve 2 saat süreyle 0.0010 mbar ve -52°C'da işlem gördü. Ardından baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller toplandı. Baskılanmamış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller de aynı prosedürle üretildi, ancak bunlara kalıp molekül olan hsTf eklenmedi.

3.4. Karakterizasyon Çalışmaları

3.4.1. Jelleşme Verimleri

Mikrokriyojellerin jelleşme verimi (G) şu şekilde belirlendi: Şişmiş mikrokriyojel numunesi 60°C'da etüve konularak kurutuldu. Sabit ağırlığa kadar kurutulduktan sonra numunenin kütlesi belirlendi (W_K) ve jelleşme verimi şu eşitlikle hesaplandı:

$$G (\%) = \frac{W_K}{W_T} \times 100 \quad (3.2)$$

Burada W_T , besleme karışımındaki monomerlerin toplam kütlesini ifade etmektedir.

3.4.2. Şişme Davranışları

Mikrokriyojel numunelerinin denge şişme derecesi (S) aşağıdaki şekilde incelendi: Her numune sabit ağırlığa (W_0 , g) kadar kurutuldu ve daha sonra deiyonize su içeren behere konulup $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'da 2 saat süreyle bekletildi. Şişen mikrokriyojel numuneleri beherden alındı ve tartıldı (W_s , g). Mikrokriyojellerin denge şişme dereceleri aşağıdaki eşitlik ile belirlendi:

$$S = \frac{W_s - W_0}{W_0} \quad (3.3)$$

Mikrokriyojellerin sahip olduğu makrogözeneklilik (M) şu şekilde incelendi: 20 mL deiyonize su içeren bir beherde denge şişme oranına ulaşan mikrokriyojeller tartıldı (W_1 , g). Ardından şişmiş mikrokriyojeller hassas bir şekilde sıkılarak mikrokriyojellerin makrogözeneklerinde bulunan su uzaklaştırılarak mikrokriyojeller tekrar tartıldı (W_2 , g). Şişmiş mikrokriyojel matristeki makrogözeneklilik aşağıdaki eşitlik ile hesaplandı:

$$M (\%) = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (3.4)$$

3.4.3. ¹H-NMR, FTIR ve Raman ile Yapı Analizi

MATrp monomerinin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları, JEOL GX-400 300 MHz (Japonya) NMR cihazı kullanılarak elde edildi ve kimyasal kaymalar (δ) ppm cinsinden çıktı alındı.

MATrp monomerin ve mikrokriyojellerin FTIR spektrumları bir FTIR-ATR spektrofotometre (Nicolet iS5 ATR-FTIR, Thermo Scientific, Madison, WI, ABD) kullanılarak elde edildi. Liyofilizasyon işlemi ile kurutulan numuneler ATR probuna kondu ve daha sonra FTIR spektrumu kaydedildi.

MATrp monomerinin ve mikrokriyojellerin spektrumlarını elde etmek için DXR mikroskobu Raman spektrometresi (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, ABD) kullanıldı. 780 nm lazer kaynağı, 10x mikroskop objektifi kullanılarak elde edilen ölçümler $200 \times 2400 \text{ cm}^{-1}$ saptama aralığında alındı.

3.4.4. Yoğunluk Ölçümleri

Yoğunluk (g/cm^3) değerleri bir helyum piknometre (Micromeritics AccuPyc II 1340) kullanılarak ölçüldü. Liyofilizatör kullanılarak kurutulan mikrokriyojel numuneleri tartıldıktan sonra test kabına yerleştirildi ve ardından 10 kez pompalama ve helyum boşaltımı değerleri 10 kez alındı.

3.4.5. Yüzey Alanı Ölçümleri

Mikrokriyojel numuneleri öncelikle tartılıp azot ortamında 100°C 'da gazı alındı ve tekrar tartılıp örnek haznesine yerleştirildi. Daha sonra numunelerin gaz adsorpsiyonu -210°C 'da ve desorpsiyonu oda sıcaklığında yüzey alanı ölçüm cihazı (Quantachrome NOVA 2000, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon basamağında elde edilen sonuçlar özgül yüzey alanı hesaplamalarında kullanıldı.

3.4.6. Yüzey Morfolojisi

Mikrokriyojellerin genel şekli ve boyutu optik mikroskop (Olympus CH40, Japonya) kullanılarak görüntülendi. Mikrokriyojellerin morfolojisi ise taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Jeol Ltd., JSM 5600, Tokyo, Japonya) kullanılarak incelendi. Dondurulmuş mikrokriyojel numuneleri önce liyofilize edildi (Liyofilizatör, Christ Alpha 1-2 LD plus, Almanya). Ardından SEM numune tutacağı üzerine tutturuldu ve 2 dakika boyunca moleküler altın tabakasıyla kaplandı. Mikrokriyojellerin duvar

morfolojisini gözlemlemek için numunelerin yüzeyleri istenilen büyütmelede tarandı.

3.4.6. Mikro bilgisayarlı tomografi (μCT) Analizi

Mikrokriyojel numuneleri önce donduruldu ve liyofilize edildi (Liyofilizatör, Christ Alpha 1-2 LD plus, Almanya). Ardından mikrokriyojellerin sahip olduğu gözenekleri, bu gözeneklerin dağılımını ve akış kanallarını görüntülemek için mikro bilgisayarlı tomografi (micro-computed tomography, μCT) (Skyscan 1172, ABD) cihazı kullanılarak incelendi.

3.5. Sulu Çözeltilerden hsTf Adsorpsiyon Çalışmaları

Adsorpsiyon süresinin, ortam pH'sının ve başlangıç hsTf derişiminin hsTf'in mikrokriyojellere adsorpsiyonu üzerindeki etkileri kesikli sistem ile incelendi. Adsorpsiyon çalışmaları oda sıcaklığında 2 saat boyunca rotator (Stuart rotator SB3, İngiltere) ile gerçekleştirildi. Mikrokriyojellerin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki pH etkisini incelemek için pH 4.0 ve 5.0 için 20 mM asetat tampon çözeltileri; pH 6.0, 7.0 ve 8.0 için ise 20 mM fosfat tampon çözeltileri kullanıldı. hsTf derişimi ise 0.05-1.0 mg/mL aralığında değıştirildi. Mikrokriyojeller üzerindeki hsTf adsorpsiyon miktarı 595 nm'de Bradford yöntemi ile UV-VIS spektrofotometre (UV-mini 1240, Shimadzu, Tokyo, Japonya) kullanılarak adsorpsiyon öncesi ve sonrasında hsTf derişimindeki düşüşün ölçülmesi ile bulundu. Adsorbe edilen hsTf miktarı şu eşitlik ile hesaplandı:

$$Q = \frac{(C_0 - C) V}{m} \quad (3.5)$$

Burada Q, mikrokriyojelin birim kütlesi üzerine adsorbe edilen hsTf'in miktarı (mg/g); C_0 ve C sırasıyla başlangıç çözeltilisindeki ve belirli bir süre sonrası sulu fazdaki hsTf derişimleri (mg/mL); V sulu fazın hacmi (mL); ve m, kullanılan mikrokriyojel kütlesidir (g).

3.6. hsTf Baskılanmış P(HEMA-MATrp) Mikrokriyojeller İçin Seçicilik Çalışmaları

Sulu çözeltilerdeki adsorpsiyon çalışmalarının optimizasyonu sonrasında hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellerin seçicilik performansları incelendi. Bunun için, HSA (M_A : 67.0 kDa, pl: 4.9) ve MYB (M_A : 17.0 kDa, pl: 6.8-7.2) yarışmacı proteinler olarak seçildi. Seçilen proteinlerin 1.5 mg/ml derişimlerine sahip sulu çözeltileri ayrı ayrı hazırlandı ve kesikli sistemde 2 saat boyunca 15 rpm hızda hsTf

baskılanmış ve baskılanmamış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellerle etkileştirildi. Adsorplanan protein miktarları 595 nm'de Bradford yöntemi ile UV-VIS spektrofotometre (UV-mini 1240, Shimadzu, Tokyo, Japonya) kullanılarak Eşitlik 3.5 ile hesaplandı.

HSA ve MYB için hsTf'e göre dağılım katsayıları (K_d) aşağıdaki eşitlik ile hesaplandı:

$$K_d = \frac{C_i - C_f}{C_f} \times \frac{V}{m} \quad (3.6)$$

burada K_d proteinin dağılım katsayısını (mL/g); C_i ve C_f sırasıyla proteinlerin başlangıç ve sonuç derişimlerini (mg/mL); V , çözeltinin hacmini (mL) ve m , mikrokriyojel ağırlığını (g) ifade eder.

Yarışmacı türler varlığında hsTf'in bağlanması için seçicilik katsayısı (k) aşağıdaki eşitliğe göre belirlendi:

$$k = \frac{K_d (\text{kalıp protein})}{K_d (\text{yarışmacı protein})} \quad (3.7)$$

burada kalıp proteininin (hsTf) dağılım katsayısı $K_d (\text{kalıp protein})$ ve yarışmacı proteinlerin dağılım katsayısı ise $K_d (\text{yarışmacı protein})$ 'dir.

Baskılamanın protein seçiciliğine etkisi hakkında fikir yürütmek için kullanılan bağıl seçicilik katsayısı (k') aşağıdaki eşitlikle tanımlanabilir:

$$k' = \frac{k_{\text{baskılanmış}}}{k_{\text{baskılanmamış}}} \quad (3.8)$$

3.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları

Mikrokriyojellere adsorbe olan hsTf'in desorpsiyonu kesikli sistem ile incelendi. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojellerden hsTf desorpsiyonu 0,1 M glisin-HCl (pH 2.8) çözeltisi ile rotatörde gerçekleştirildi. hsTf adsorbe edilmiş baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller, %10 etilen glikol (pH 4.0) çözeltisi içeren 0.1 M asetat tamponu ile desorbe edildi. Her iki mikrokriyojel için desorpsiyon oda sıcaklığında 2 saat boyunca gerçekleştirildi.

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \frac{\text{Salınan hsTf miktarı}}{\text{Adsorplanan hsTf miktarı}} \times 100 \quad (3.9)$$

3.8. Yapay Plazmadan hsTf Saflaştırma Çalışmaları ve SDS-PAGE Görüntüleme

Bu çalışmada yapay plazma olarak kan proteinlerini içeren liyofilize Coagulation Control II Plasma (Tokra Medikal, Ankara, Türkiye) kullanıldı. Bu plazmanın

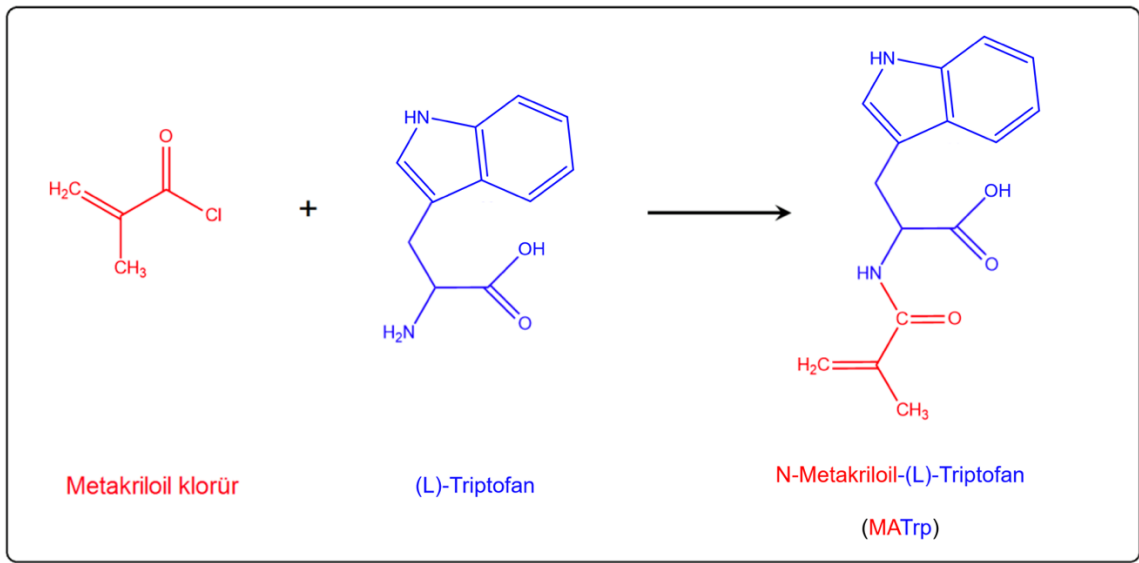
içerisine 1:5 oranında 1.0 mg/mL standart hsTf çözeltisinden eklendi. Plazma çözeltisi 2 saat süre ile immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojeller ve baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller ile etkileştirildi. Ardından desorpsiyon çözeltisi ile etkileştirildi ve ilk, son ve desorpsiyon çözeltileri jel elektroforez için kullanıldı.

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) %12 akrilamid jeli (1.5 M Tris-HCl pH 8.8 içinde) ile hazırlandı. İlk, son ve desorbe edilen numuneler (20 µL) alındı ve 20 µL bromofenol (%1 sulu metaminoetanol içeren %50 sulu gliserol içinde %0.002 bromofenol mavisi) ile karıştırıldı. Her bir kuyucuğa 10'ar µL hazırlanan çözeltilerden yüklendi. Protein standardı olarak, geniş spektrumlu Prestained protein marker (10-170 kDa) kullanıldı. Elektroforez jeli % 0.1 SDS içeren yürütme tamponu (Tris-glisin, pH 8.3) varlığında yaklaşık 2 saat boyunca 120 V güç uygulanarak yürütüldü. Yürütme işleminin ardından Coomassie Blue G-250 içeren çözeltiye (%0.2 Coomassie Blue G-250, %4 metanol ve %10 asetik asit) alınarak bu çözelti içerisinde 6 saat bekletildi. Jeldeki fazla boya, 1:4 etanol:su içeren çözelti ile, her 20 dakikada bir çözelti değiştirilerek, 6 saat boyunca yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

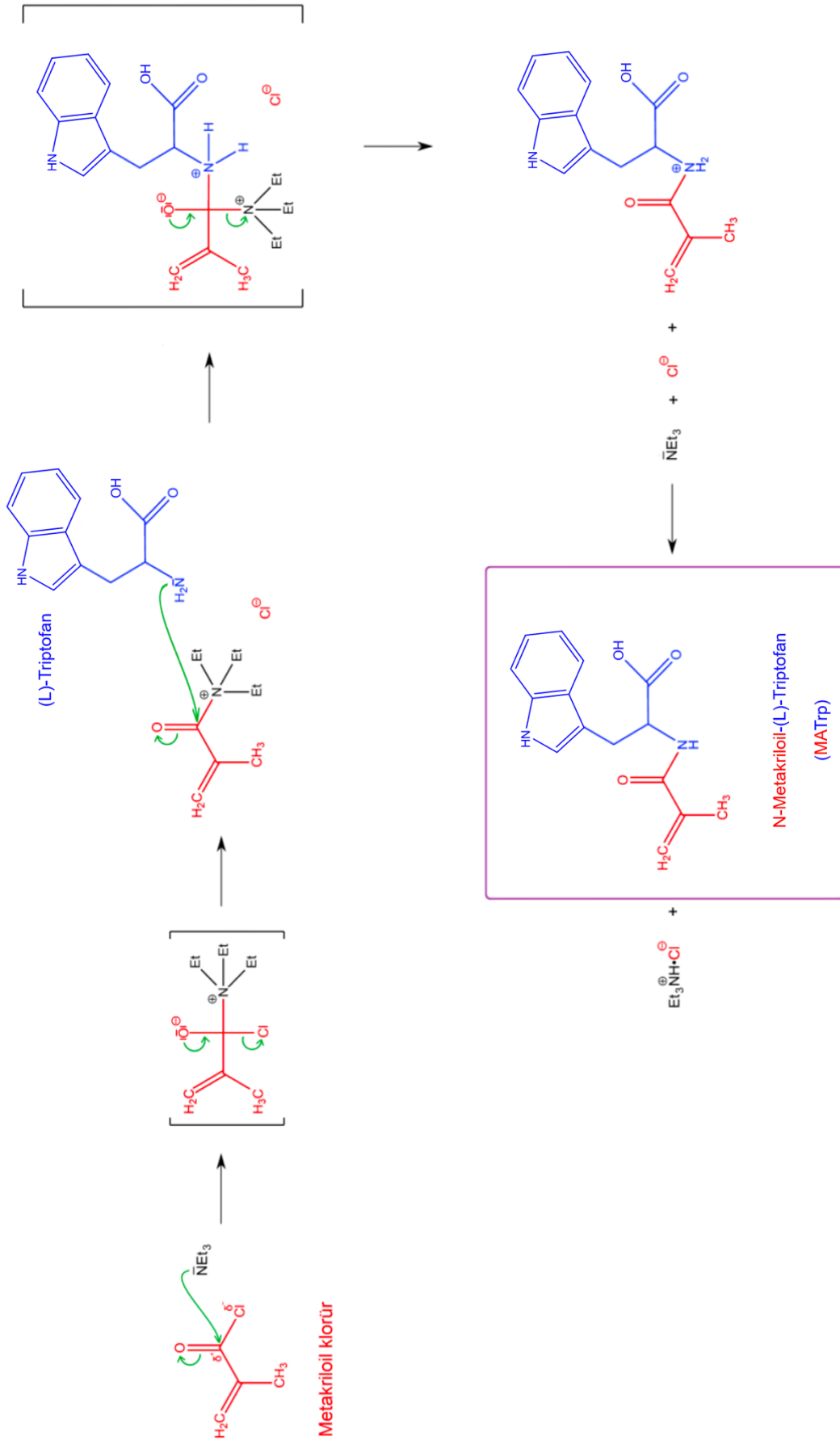
4.1. MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Araştırma grubumuzda kromatografi, biyosensör ve ilaç taşıyıcı sistemler dahil olmak üzere geniş bir yelpazede kullanılabilen moleküler baskılanmış polimerlerin özgüllüğünü ve seçiciliğini arttırmak için amino asit temelli monomerler sentezlenmekte ve 2-hidroksietil metakrilat ile kopolimerleştirilmektedir [5, 21, 22, 38]. Bu monomerlerden biri olan N-metakriloil-L-triptofan (MATrp), hsTf'in sulu çözeltilerden adsorpsiyonunu ve plazmadan saflaştırılmasını sağlamak amacıyla hsTf ile etkileşecek fonksiyonel bir ligand olarak sentezlendi.



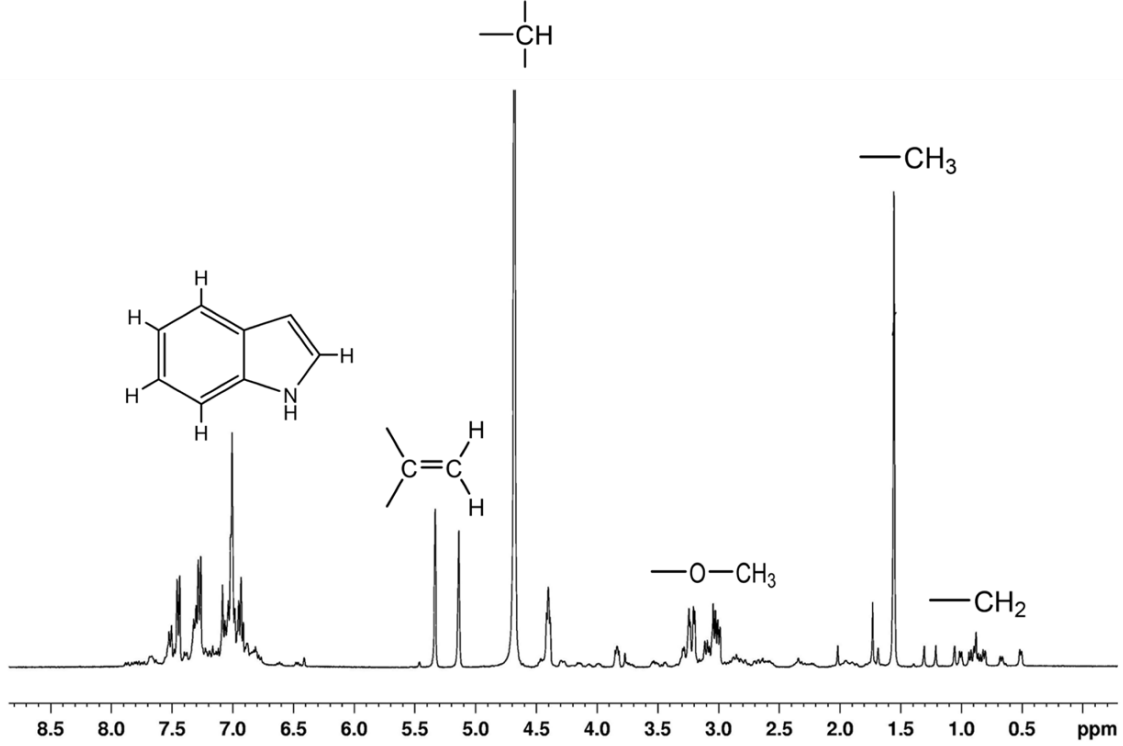
Şekil 4.1. MATrp monomerinin sentez tepkimesi.

MATrp'ın sentezlenmesinde gerçekleşen tepkime mekanizması Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Buna göre, tepkime trietilaminin (NEt₃) metakriloil klorüre saldırmasıyla başlar. NEt₃, tepkime esnasında oluşan hidroklorik asidin (HCl), triptofan ile amin tuzu oluşturmasının da önüne geçmiş olur. NEt₃'in diğer bir avantajı ise tepkime süresince bazik pH koşulu sağlamasıdır.



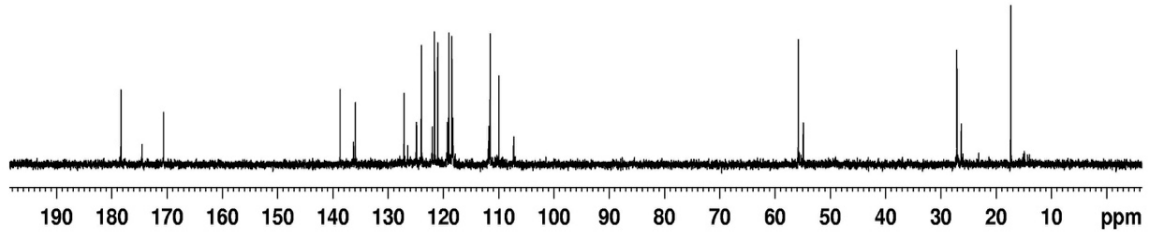
Şekil 4.2. MATrp'in sentez tepkimesinin mekanizması

MATrp'ın yapısını belirlemek için ^1H -NMR yöntemi kullanıldı. Şekil 4.3'te ^1H -NMR spektrumu MATrp'ın gruplarına özgül pikleri göstermektedir.



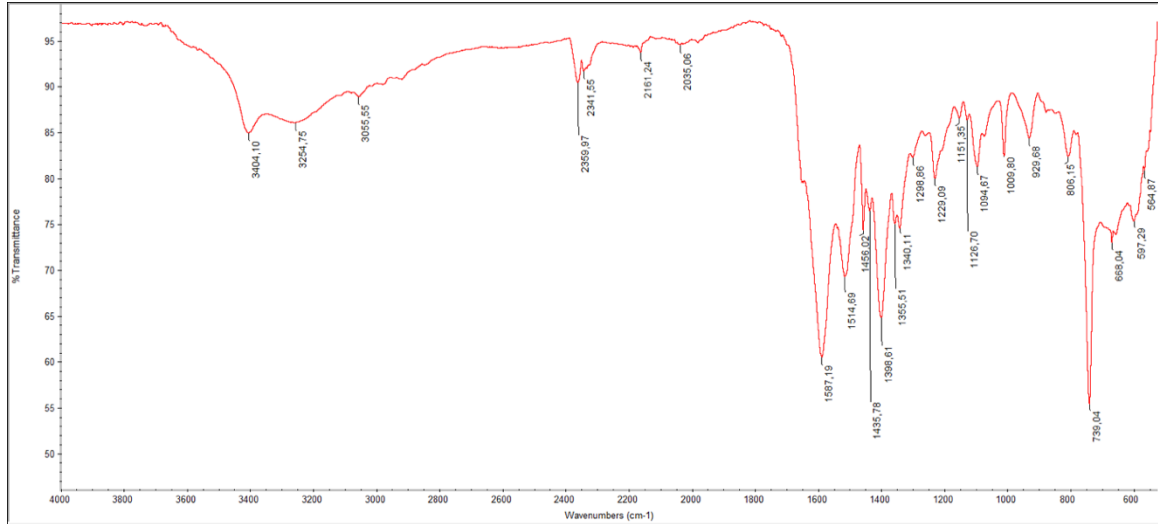
Şekil 4.3. MATrp'ın ^1H -NMR spektrumu (D_2O içinde).

Şekil 4.4'te MATrp monomerine ait ^{13}C -NMR spektrumu verilmiştir. Buna göre, C (vinil) 111.7 ppm; CH, 55.5 ppm; CH_2 , 26.3 ppm; CH_3 , 55.7 ppm; CH (indol), 111.9 ppm; CH (benzen halkası), 118.5 ppm; CH (benzen halkası), 121.1 ppm; C (indol), 127.1 ppm; C=O (amit), 170.6 ppm; CH (benzen halkası), 118.7 ppm; CH (benzen halkası), 138.6 ppm; CH_2 (vinil), 121.6 ppm; C=O (asit), 174.5 ppm ve C (benzen halkası), 135.8 ppm şeklindedir.



Şekil 4.4. MATrp'ın ^{13}C -NMR spektrumu (D_2O içinde).

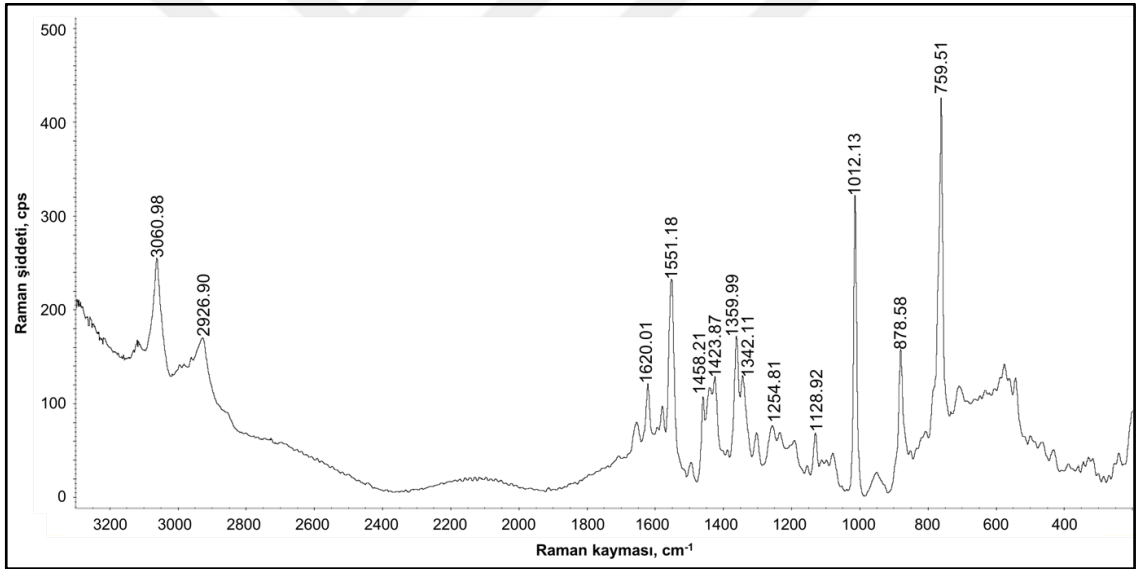
Şekil 4.5'de MATrp monomerine ait FTIR spektrumunu göstermektedir. 3404.10 cm^{-1} deki bant N-H gerilmeye ait, 3055.55 cm^{-1} 'deki bant ise aromatik C-H gerilmeye aittir. C=C gerilme bandı 1651.55 cm^{-1} 'de, N-H eğilme bandı 1514.69 cm^{-1} 'de, C-N aromatik gerilme bandı 1456.02 cm^{-1} 'de görülmektedir. 1229.09 cm^{-1} 'deki bant ise asidin C=O grubunun eğilme bandına aittir.



Şekil 4.5. MATrp'ın FTIR spektrumu.

Katı MATrp'ın Raman spektrumu Şekil 4.6'da gösterilmiştir. MATrp spektrumunda 759.51 cm^{-1} ve 1012.13 cm^{-1} 'de yüksek pik şiddetine sahip olan bantlar indol

halkasının içe ve dışa doğru hareketleriyle oluşan nefes alma (breathing) titreşimlerine dayanır. 849.72, 878.58 ve 948.90 cm^{-1} 'deki bantlar sırasıyla pirol halkasındaki H-eğilmeye (bending), indol halkasındaki H-makaslamasına (scissoring) ve benzen halkası üzerindeki H-eğilmeye (bending) karşılık gelmektedir. Benzer şekilde, 1359.99 cm^{-1} ve 1458.21 cm^{-1} 'deki bantlar, CH_2 ile ilgili titreşimler ile ilişkiliyken, 1423.87 ve 1551.18 cm^{-1} 'deki bantlar, indol halkasının gerilmesinden (stretching) kaynaklanmaktadır. 1077.40, 1128.92, 1254.81 ve 1342.11 cm^{-1} 'deki nispeten zayıf bantlar, pirolün H-makaslaması, benzenin H-makaslaması, benzenin H-düzlem içi sallanması (rocking) ve C-H-eğilmesidir. 759.51 cm^{-1} 'nin altındaki spektral bölgede, zayıf bantların çoğu, benzen halkasının deformasyonları gibi, düşük dalga boyundaki titreşimlere aittir [223]. Alifatik CH_2 ve CH için 2926 cm^{-1} frekans civarında ve aromatik CH grubu için ise 3060.98 cm^{-1} frekansında birkaç C-H gerilme titreşimi görülmektedir [224].



Şekil 4.6. Katı MATrp'ın Raman spektrumu.

4.2. Mikrokriyojellerin Karakterizasyon Çalışmaları

Mikrokriyojeller donma noktası altındaki sıcaklarda jelleşme ile, yani kriyotropik jelleşme (kriyojelleşme) yöntemi ile üretildiler. Kriyotropik jelleşmede monomer çözeltisinde porojen olarak davranan buz kristalleri büyürken, polimerleşme çözeltinin donmamış veya orta derecede donmuş sulu fazında ilerler. Bu tezde, transferrinin saflaştırılması amacıyla afinite kromatografisini temel alan, immünoafinite ve moleküler baskılanmış olmak üzere 2 farklı tür mikrokriyojel

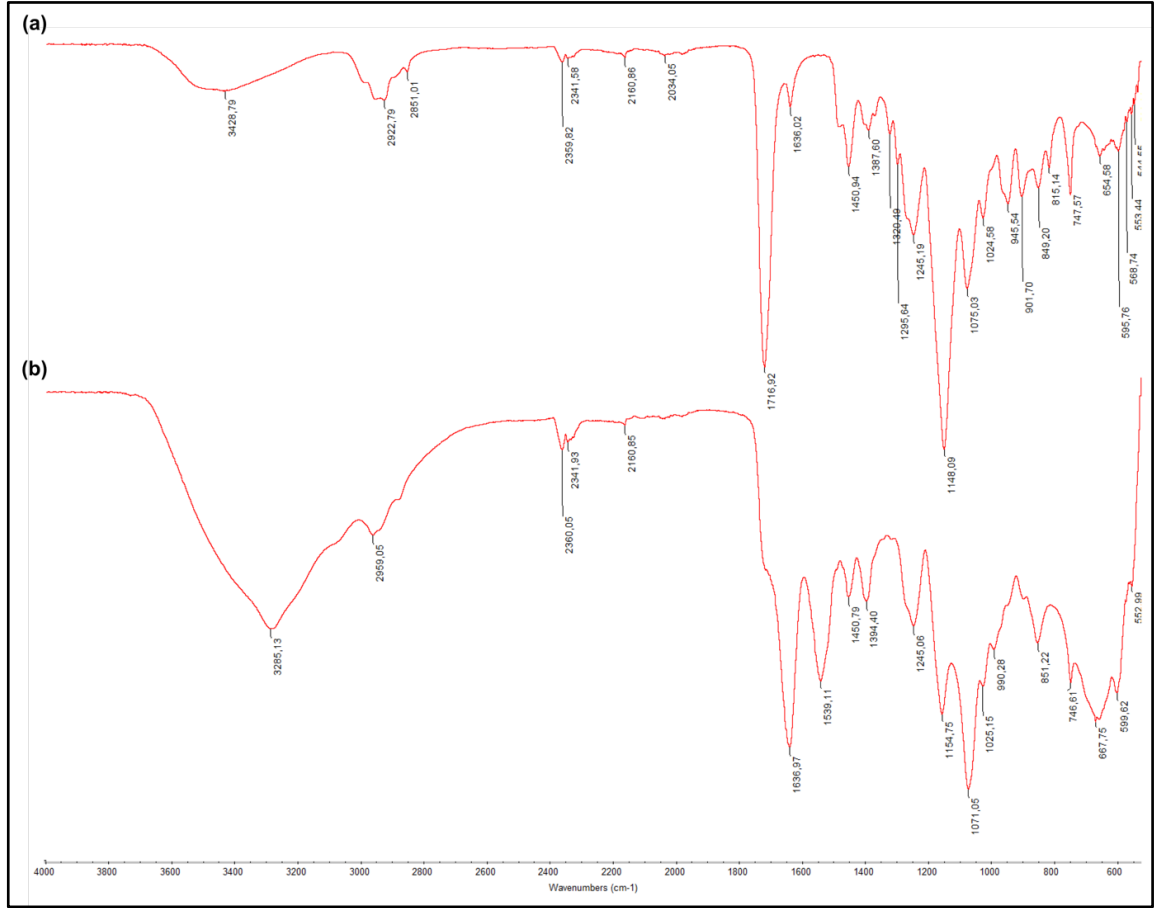
hazırlandı. İlk mikrokriyojel HEMA ve GMA monomerlerinin EGDMA çapraz bağlayıcı varlığında -16°C 'da serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlendi. Ardından çeşitli derişimlerde bu mikrokriyojellere anti-Tf bağlanarak immünoafinite mikrokriyojel elde edildi. İkinci tür mikrokriyojel ise HEMA ve MATrp monomerlerinin MBAAm çapraz bağlayıcı ile hsTf varlığında (baskılanmış mikrokriyojel), MIP, ve yokluğunda (baskılanmamış mikrokriyojel), NIP, -16°C 'da serbest radikal polimerizasyonu ile üretildi. Bu mikrokriyojeller şişme testleri, BET yöntemi ile yüzey alanı ölçümleri, FTIR, RAMAN, helyum piknometre, optik mikroskop ve SEM ile karakterize edildi. Mikrokriyojellerin jelleşme verimi yüzdelere ait veriler ve helyum piknometre ile ölçülen yoğunlukları Çizelge 4.1'de belirtildi.

Çizelge 4.1. Mikrokriyojellerin jelleşme verimi yüzdeleri ve yoğunluk değerleri.

Mikrokriyojel	Jelleşme verimi (%)	Yoğunluk (g/cm^3)
P(HEMA-GMA) (PM)	89.12 ± 0.68	2.04 ± 0.04
MIP	95.22 ± 0.86	1.79 ± 0.04
NIP	95.16 ± 0.76	1.79 ± 0.05
P(HEMA)	96.28 ± 0.69	1.78 ± 0.05

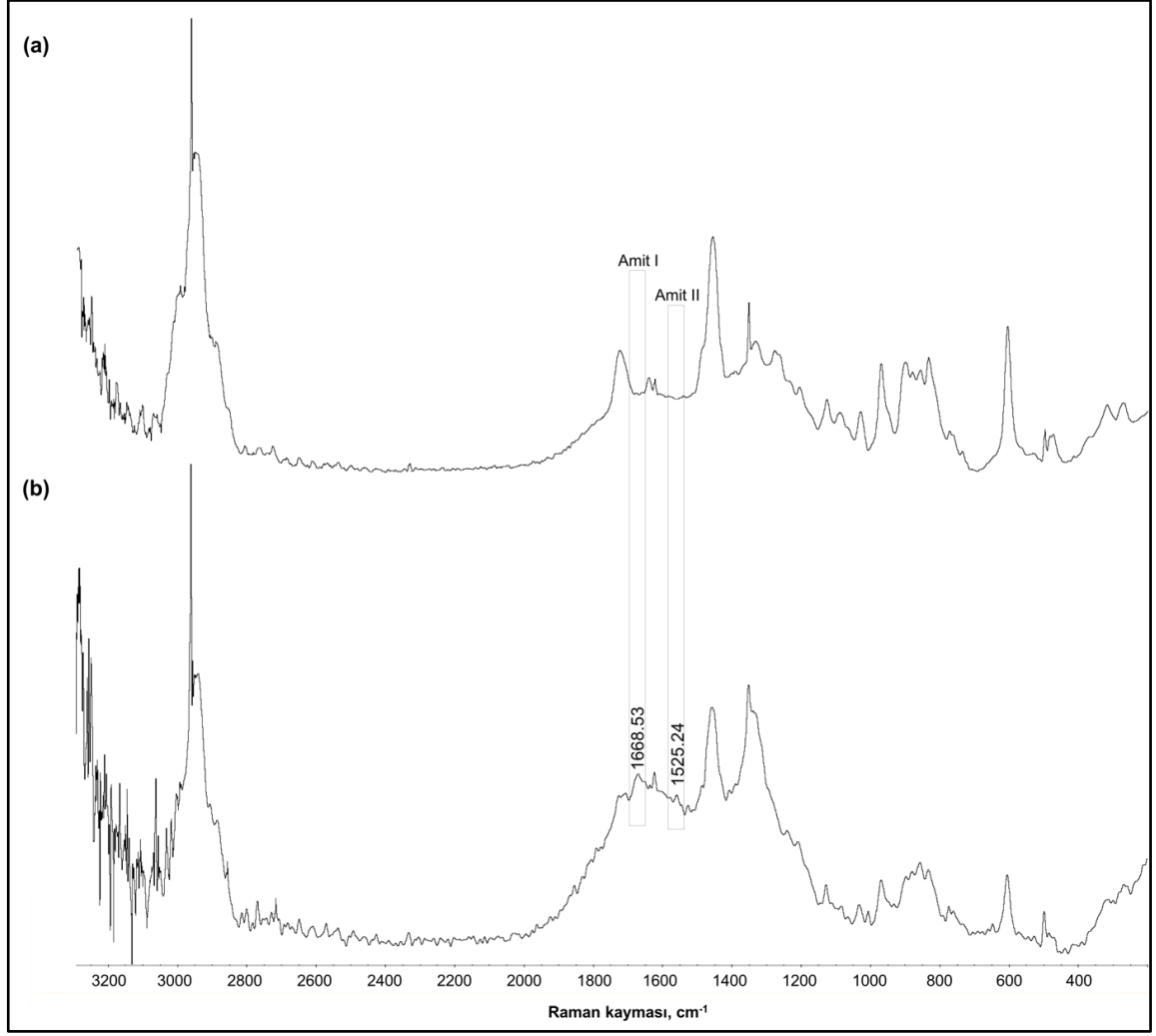
4.2.1. FTIR ve Raman ile Yapı Analizi

PM ve İM'in FTIR spektrumları Şekil 4.7'de verilmiştir. FTIR spektrumlarında görüldüğü üzere her iki mikrokriyojel de hemen hemen aynı spektruma sahiptir. Ortak ilgili bantlar, sırasıyla $3200\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$, 1710 cm^{-1} ve 2980 cm^{-1} 'de atanan -OH, C=O ve C-H (alifatik) gerilme bantlarıdır. Bu bantlara ek olarak, immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel, anti-Tf'nin sahip olduğu sırasıyla amit I ve amit II bağlarından kaynaklanan 1636 cm^{-1} ve 1539 cm^{-1} 'de ekstra bantlara sahiptir.



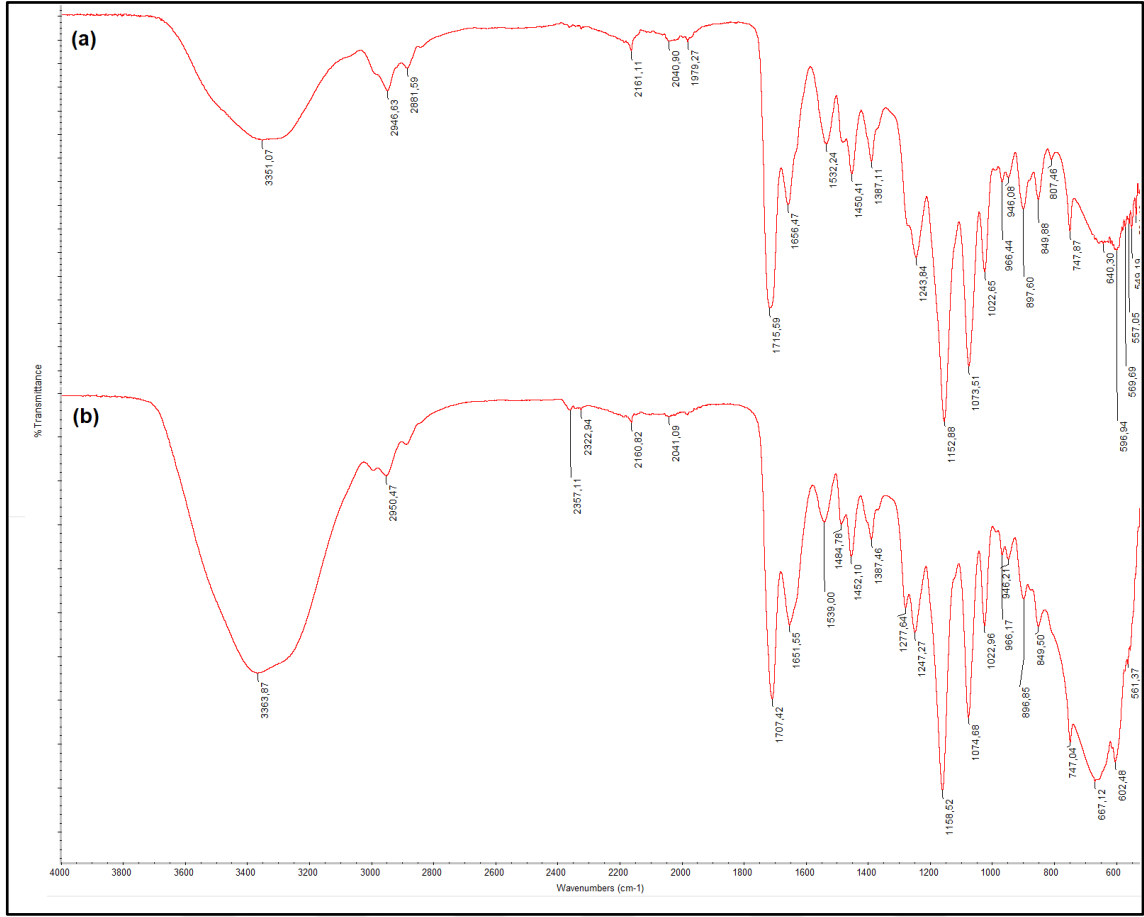
Şekil 4.7. PM (a) ve İM'in (b) FTIR spektrumları.

Proteinlerin Raman spektrumu incelendiğinde genel olarak üç adet amit bandı verirler. Bunlar 1650 cm^{-1} civarında C=O gerilmeden kaynaklı amit I bandı, 1550 cm^{-1} civarında N-H eğilme ve C-N gerilmeden kaynaklı amit II bandı ve 1300 cm^{-1} civarında C-N gerilme ve N-H eğilmeden kaynaklı amit III bandıdır. Şekil 4.8'de İM ve PM'in Raman spektrumları incelendiğinde İM'in spektrumunda 1668.53 cm^{-1} 'de amit I ve 1525.24 'te ise amit II bantları gözükmemektedir. Bu durum anti-Tf'in P(HEMA-GMA) mikrokriyojele immobilize olduğunu kanıtlamaktadır.



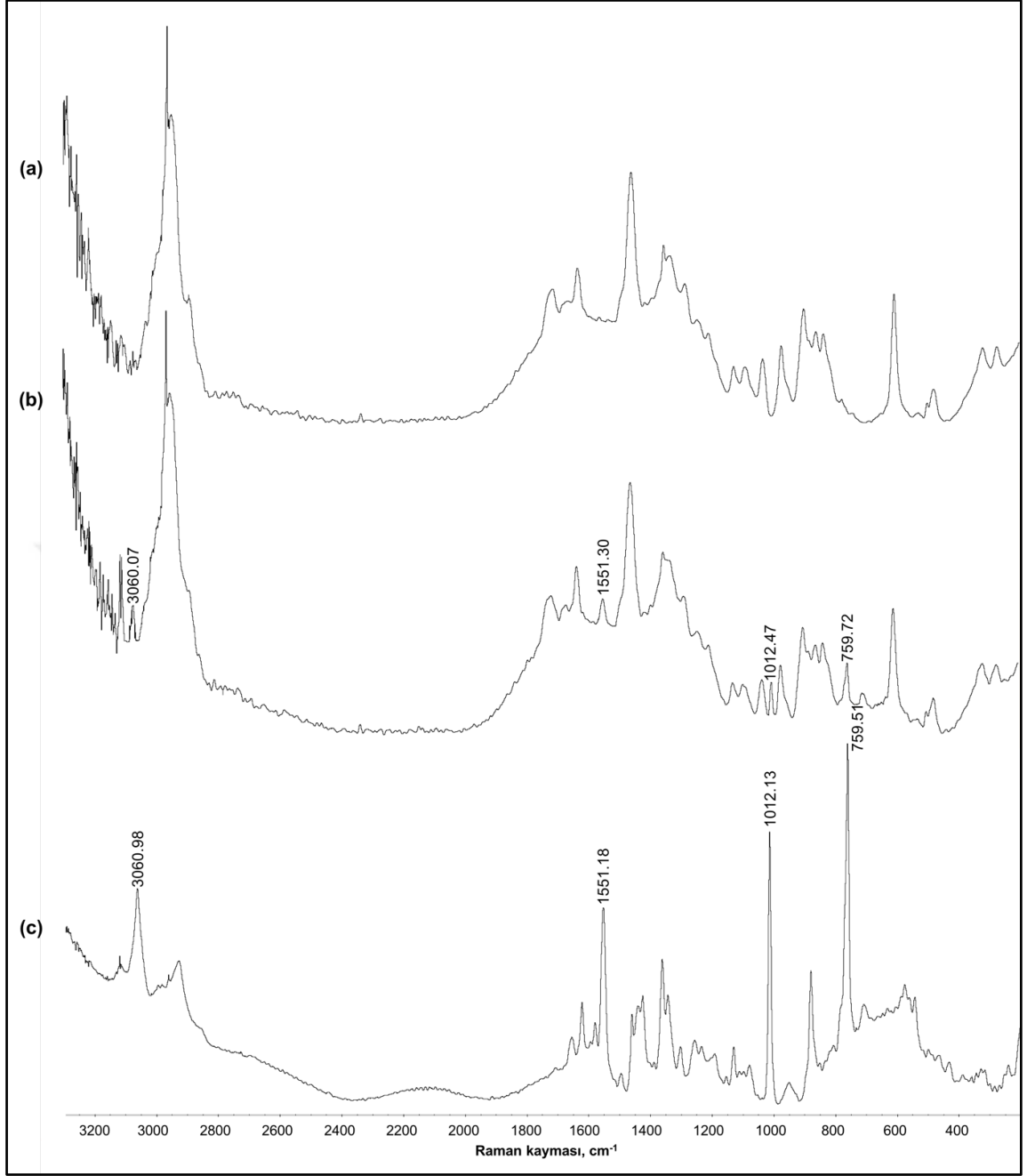
Şekil 4.8. PM (a) ve İM'in (b) RAMAN spektrumları.

P(HEMA) ve P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellerin FTIR spektrumları Şekil 4.9'da verilmiştir. P(HEMA) (a), P(HEMA-MATrp) (b) mikrokriyojeller için sırasıyla O-H gerilme pikleri 3300 cm^{-1} civarında, alifatik C-H gerilme 2946 cm^{-1} ve 2950 cm^{-1} civarlarında, asit (C=O) gerilme 1715 cm^{-1} ve 1707 cm^{-1} 'de, C=C gerilmesi (1659 cm^{-1}), asimetrik CH_2 bükülmesi 1532 cm^{-1} ve 1539 cm^{-1} 'de, CH_3 bükülmesi 1450 cm^{-1} ve 1452 cm^{-1} 'de, düzlem içi C-H bükülmesi 1387 cm^{-1} 'de, eter (COC) asimetrik gerilme 1243 ile 1152 cm^{-1} ve 1247 ile 1158 cm^{-1} ve düzlem dışı C-H bükülmesi 1073 cm^{-1} ve 1022 cm^{-1} 'de görülmektedir.



Şekil 4.9. P(HEMA) (a), P(HEMA-MATrp) (b) mikrokriyojellerin FTIR spektrumları.

P(HEMA) ve P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellerin Raman spektrumları MATrp monomerinin RAMAN spektrumu ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.10'da verilmiştir. P(HEMA)'nın spektrumu ile karşılaştırdığımız zaman P(HEMA-MATrp)'nin spektrumunda MATrp monomerine ait çeşitli karakteristik pikler gözükmemektedir. Örneğin 759.72 cm^{-1} ve 1012.47 cm^{-1} 'deki pikler MATrp'nin indol halkasına ait içe ve dışa doğru nefes alma (breathing) titreşimlerine aittir. 1551.18 'deki bant ise yine MATrp'nin indol halkasının gerilmesinden (stretching) kaynaklanmaktadır. Şekilden görüldüğü üzere, P(HEMA)'da bulunmayan ancak P(HEMA-MATrp)'de gözlenen bu MATrp'ye ait özgül pikler MATrp'nin polimer yapısına katıldığını kanıtlamaktadır.



Şekil 4.10. P(HEMA) (a), P(HEMA-MATrp) (b) mikrokriyojellerin ve MATrp monomerinin (c) RAMAN spektrumları.

4.2.2. Şişme Özellikleri

P(HEMA-GMA) ve P(HEMA-MATrp) ve P(HEMA) temelli mikrokriyojellerin şişme dereceleri ve makrogözeneklilik değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Öncelikle P(HEMA-GMA) temelli polimerler kendi aralarında karşılaştırıldığında anti-Tf immobilize edilmiş mikrokriyojelin, yani immünoafinite mikrokriyojelin (İM), hem şişme derecesi hem de makrogözeneklilik derecesi anti-Tf immobilize edilmemiş,

boş mikrokriyojele (PM) göre daha yüksektir. İmmünoafinite mikrokriyojelin şişme ve makrogözeneklilik oranlarındaki hafif artış, immobilize edilen biyomolekülün su uyumluluğuna bağlı olduğunu göstermektedir [221]. Öte yandan P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller P(HEMA) mikrokriyojel ile karşılaştırıldığında yapıya MATrp girmesi ile şişme derecesinin ve makrogözeneklilik yüzdesinin azaldığı gözlenmektedir. Bunun nedeni P(HEMA-MATrp) yapısındaki triptofanın hidrofobik yapıda bir amino asit olmasıdır [5]. Ayrıca baskılanmış mikrokriyojelin (MIP) şişme derecesi ve makrogözeneklilik oranı baskılanmamış mikrokriyojelden (NIP) daha yüksek olduğu bulundu. Bunun nedeni şu şekilde açıklanabilir: Baskılanmış mikrokriyojelin yapısında moleküler oyukların (kavitelerin) oluşumu polimer zincirine daha fazla hidrodinamik hacim kazandırır, böylece polimer matrisine daha fazla su molekülü adsorbe edilir [225].

Çizelge 4.2. Mikrokriyojellerin şişme dereceleri ve makrogözeneklilik değerleri.

Mikrokriyojel	Şişme derecesi (g H ₂ O/g mikrokriyojel)	Makrogözeneklilik (%)
P(HEMA-GMA) (PM)	6.28 ± 0.13	60.26 ± 0.56
İM	6.54 ± 0.11	62.48 ± 0.78
MIP	8.46 ± 0.14	73.28 ± 0.45
NIP	8.07 ± 0.17	70.12 ± 0.63
P(HEMA)	9.18 ± 0.16	78.75 ± 0.72

4.2.3. Yüzey Alanı Ölçümleri

Çizelge 4.3'te görüldüğü üzere baskılama işlemi özgül yüzey alanında artışa neden oldu. Bu durumun ana nedeni kriyojelleşme esnasında ortamda hsTf moleküllerinin bulunmasıdır. Baskılanmış mikrokriyojel matrisinde hsTF'ye özgül kavitelerin varlığı yüzey alanında artışa neden olmaktadır. Öte yandan P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin yüzey alanı en yüksek olarak bulundu. Bunun ana nedeninin kullanılan çapraz bağlayıcıdan kaynakladığı düşünülmektedir. EGDMA'nın suda çözünürlüğü düşüktür (bu sebeple SLS kullanıldı). Mikrokriyojellerin yüzey morfolojisinin incelendiği bölümde görülebileceği üzere, SEM görüntülerine göre, P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin polimerik duvarı granüller tarafından yapılmış gibi görünmektedir. Polimerizasyon esnasında EGDMA'nın bir kısmı kendi başına polimerleşmiş olabilir.

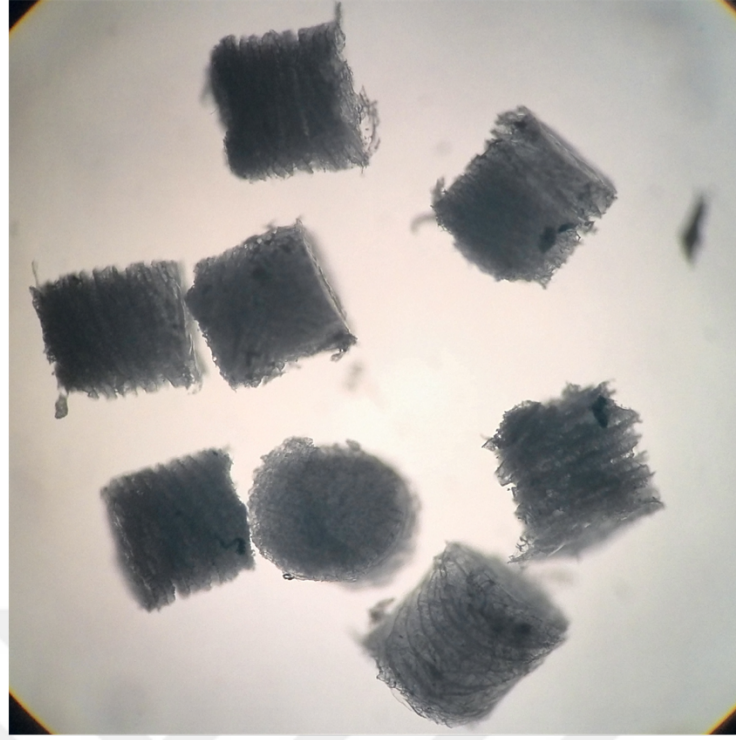
Bu işlem sonucunda, P(HEMA-GMA) mikrokriyojellerin yüzey alanı, çapraz bağlayıcı olarak MBAAm kullanılan mikrokriyojellerinkinden daha yüksektir [226].

Çizelge 4.3. Mikrokriyojellerin yüzey alanı değerleri.

Mikrokriyojel	Yüzey alanı (m ² /g)
P(HEMA-GMA) (PM)	16.8 ± 0.86
MIP	14.2 ± 0.72
NIP	12.6 ± 0.48
P(HEMA)	11.45 ± 0.26

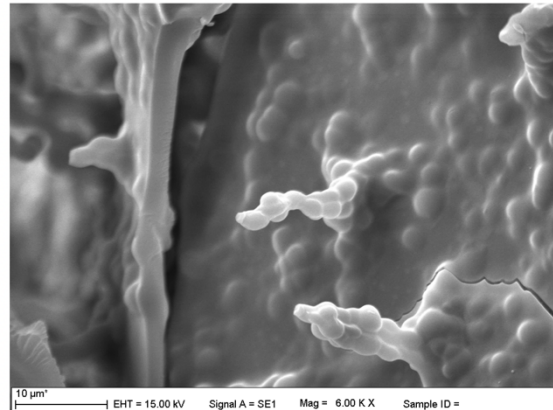
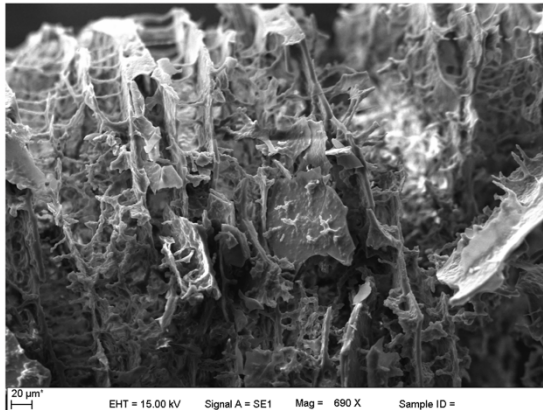
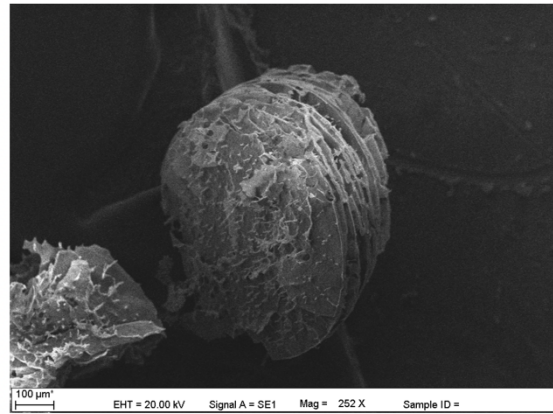
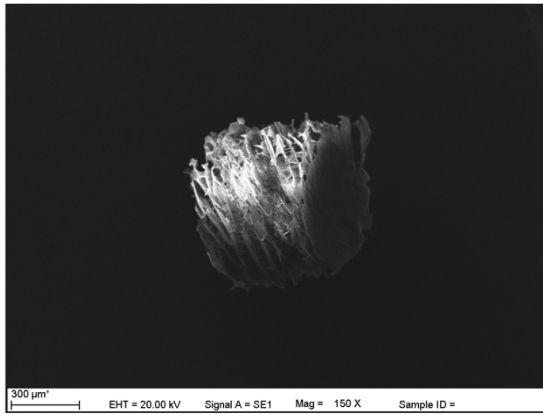
4.2.4. Yüzey Morfolojisi

P(HEMA-GMA) ve P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellerin optik mikroskop ve SEM görüntüleri sırası ile Şekil 4.11, 4.12 4.13 ve Şekil 4.14’de verilmiştir. Optik mikroskop görüntüleri incelendiğinde mikrokriyojellerin en uzun boyutu yaklaşık olarak 400 - 500 µm olan silindir şeklinde bir yapıya sahip olduğu gözükmemektedir. Yine optik görüntülerden görüldüğü üzere her iki mikrokriyojel türü de “eş boyutlu” yapıdadır. SEM ve µCT görüntülerinden de görüldüğü üzere gözenek çapları çok geniş ve 2-20 µm aralığındadır. Mikrokriyojel yapının mimarisi, hsTf’nin boyutundan çok daha büyük olan akış kanalları işlevi gören makrogözeneklere sahiptir. Böylelikle, hsTf gibi makromoleküller mikrokriyojelin gözeneklerinden herhangi bir tıkanmaya sebebiyet vermeden rahatça geçebilirler. Bunun yanı sıra, hidrojelde mobil fazın akışı esas olarak difüzyon yoluyla iken kriyojellerde akış konvektif taşıma ile sağlanır. Böylece kütle aktarım direnci neredeyse göz ardı edilebilecek seviyededir [148].

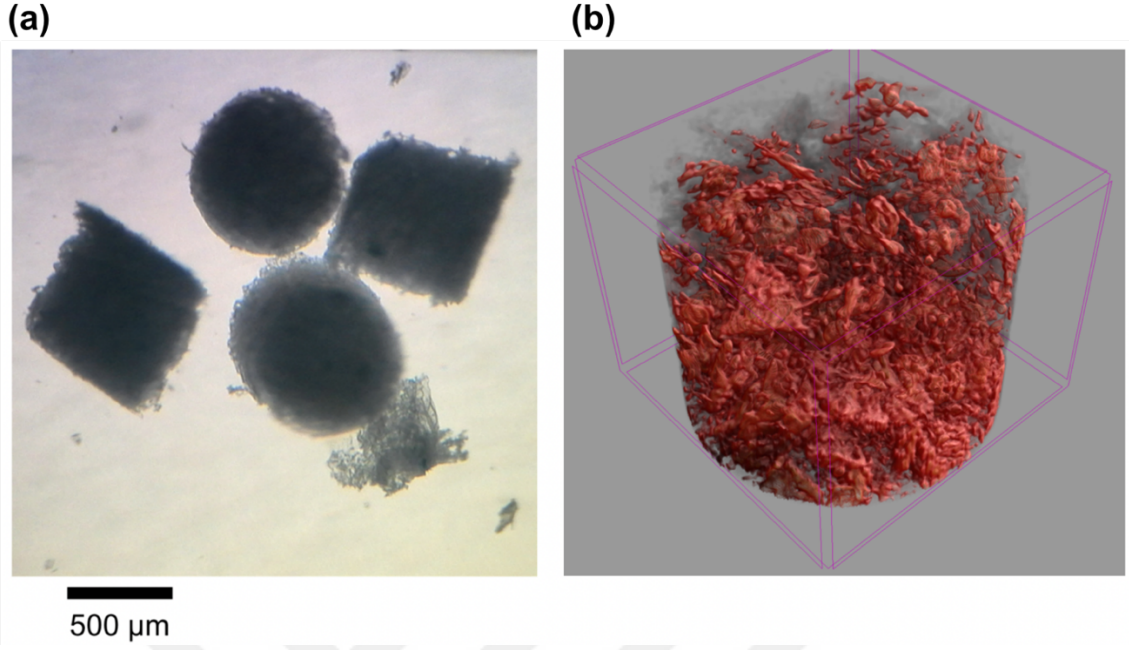


500 µm

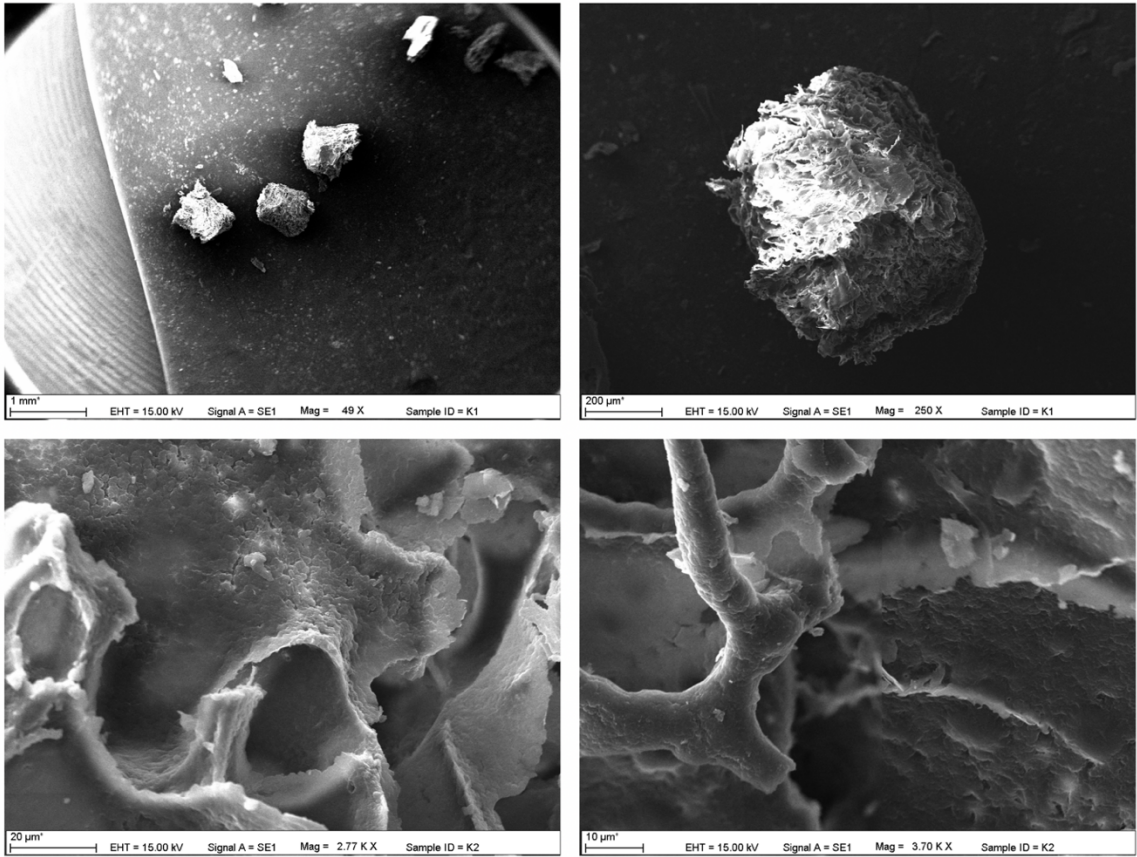
Şekil 4.11. P(HEMA-GMA) mikrokrijojellerin optik mikroskop görüntüleri.



Şekil 4.12. P(HEMA-GMA) mikrokriyojellerin SEM görüntüleri.



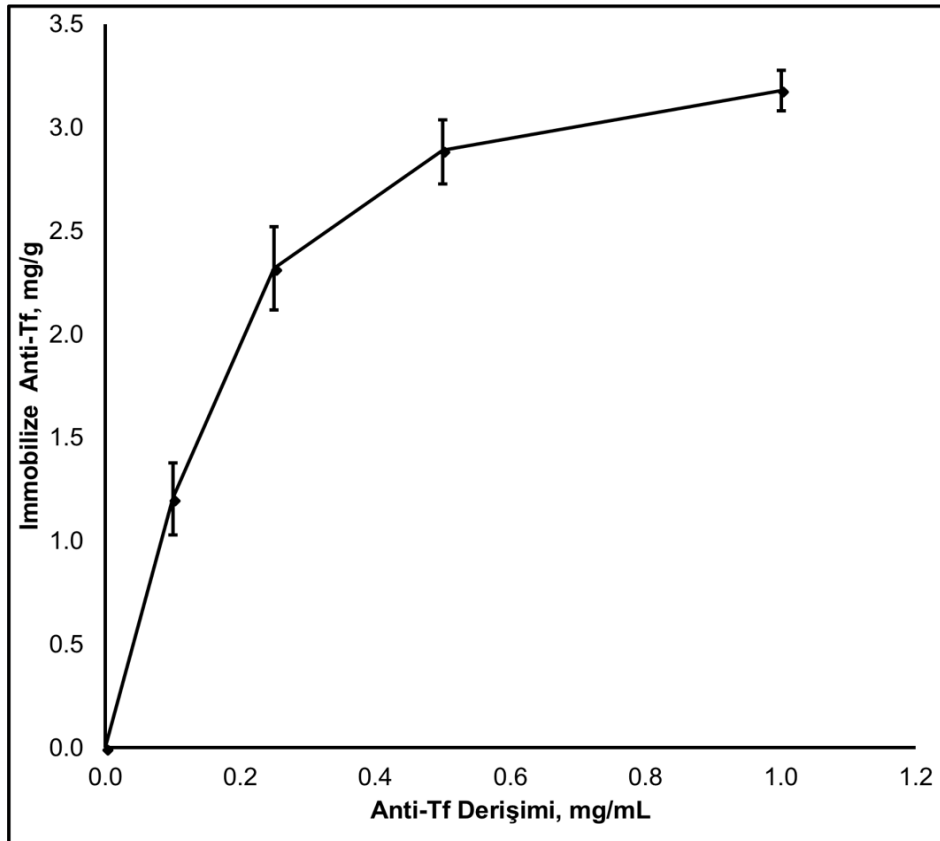
Şekil 4.13. P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellerin optik mikroskop (a) ve μ CT (b) görüntüleri.



Şekil 4.14. P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellerin SEM görüntüleri.

4.3. P(HEMA-GMA) Mikrokriyojellere Anti-Tf Antibadi İmmobilizasyonu

hsTf moleküllerinin immünoafinite tanıma için bir biyo-ligand olarak kullanılan anti-Tf antibadi molekülleri, mikrokriyojellere immobilize edildi. İmmobilizasyon işlemi antibadi moleküllerinin amin grubu ile P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin epoksi fonksiyonel grupları arasındaki tepkime yoluyla gerçekleşti. Şekil 4.15 P(HEMA-GMA) mikrokriyojellere anti-Tf'nin çeşitli derişimlerinde P(HEMA-GMA) mikrokriyojellere immobilize olan anti-Tf antibadi miktarını göstermektedir. 1.0 mg/mL anti-Tf başlangıç derişiminde bağlanan antibadi miktarı 3.18 mg/g olarak bulundu ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında bu immünoafinite mikrokriyojelleri kullanıldı.



Şekil 4.15. P(HEMA-GMA) mikrokriyojellere anti-transferrin antibadi immobilizasyonu için derişim taraması. Mikrokriyojel miktarı: 50 mg (kuru ağırlık), pH 8.0 fosfat tamponu içerisinde immobilizasyon süresi: 2 saat, T: 25°C.

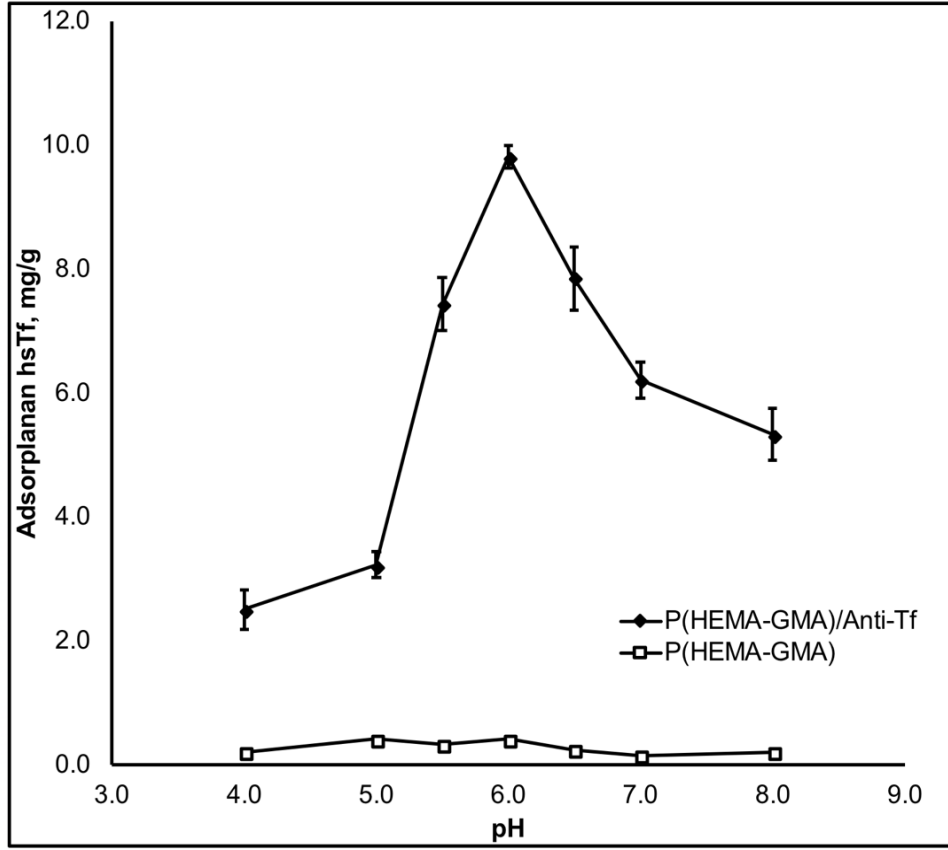
4.4. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) Mikrokriyojeller

4.4.1. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) Mikrokriyojellerin Adsorpsiyon Çalışmaları

4.4.1.1. Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyon Çalışmaları

4.4.1.1.1. pH Etkisi

pH'nın immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojele hsTf'in adsorpsiyonu üzerindeki etkisi Şekil 4.16'te gösterilmektedir. Apotransferrinin izoelektrik noktası 5.9 iken keçi IgG'lerin izoelektrik noktası ise 6.3'tür [227, 228]. hsTf'in maksimum adsorpsiyonu, hsTf'in izoelektrik noktasına yakın değer olan pH 6.0'da gözlenmiştir. hsTf adsorpsiyon kapasitesi, pH 6.0'nın üstünde ve altında azalmıştır. hsTf adsorpsiyon kapasitesindeki azalma, aynı yüklü gruplar arasındaki elektrostatik itme etkilerinden dolayı olduğu söylenebilir. İzoelektrik noktada, proteinlerin net yükleri yoktur ve bu nedenle sulu çözeltiden maksimum protein adsorpsiyonu genellikle bu noktada gözlenir [229]. Ayrıca anti-Tf bağlı olmayan P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonun pH etkisi de incelenmiştir. Sonuçlardan görüldüğü üzere, özgül olmayan adsorpsiyonun pH'dan bağımsız olduğu ve tüm pH değerlerinde aynı olduğu gözlenmiştir.

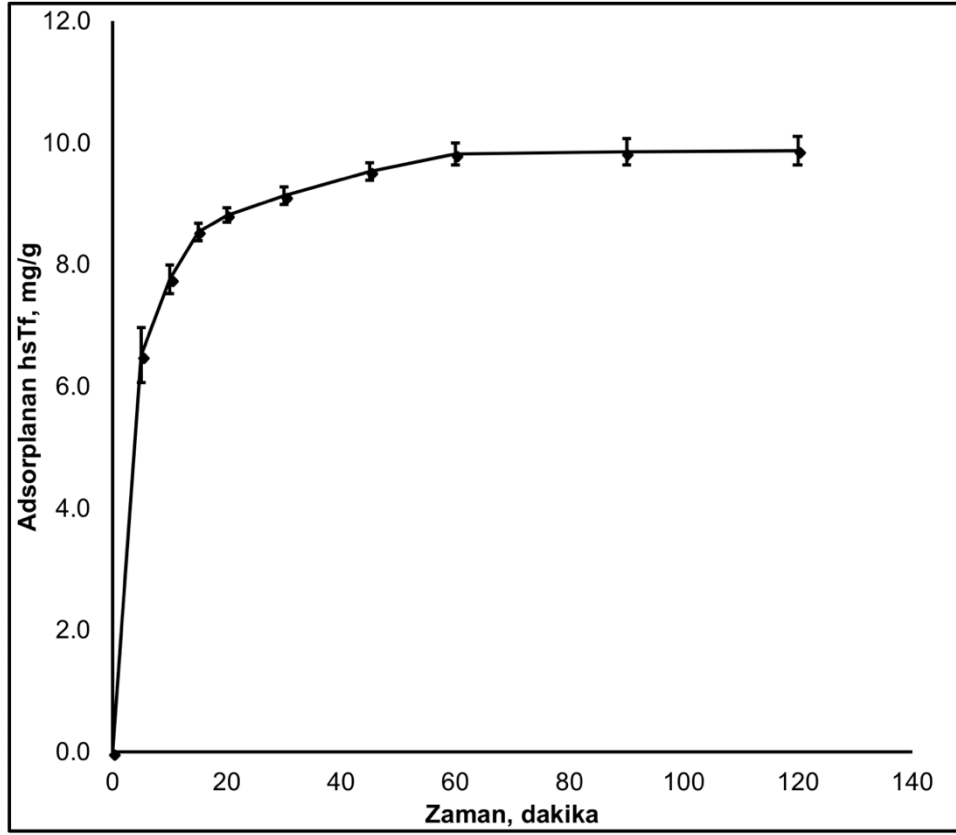


Şekil 4.16. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna pH'nın etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, T: 25°C, hsTf derişimi: 2.0 mg/mL, m_{kuru mikrokriyojel}: 40 mg.

4.4.1.1.2. Adsorpsiyon Süresinin Etkisi

Adsorpsiyon süresinin immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyon değerlerinin üzerindeki etkisi önemli bir parametredir, çünkü adsorpsiyon hızı tepkime kinetiği düzenini kontrol eder [230]. Şekil 4.17, immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojellere hsTf'in adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimini göstermektedir. Şekilde görüldüğü üzere, ilk 20 dakika içinde adsorpsiyon hızı yüksek iken 20 dakikadan sonra adsorpsiyon yavaşladı ve ardından 60 dakikasında doygunluğa ulaştı. Adsorpsiyon hızının zamanla azalması beklenen bir durumdur. Çünkü zamanla çözeltideki hsTf derişiminin azalması nedeniyle adsorpsiyon hızı da azalır. Ayrıca hsTf moleküllerinin mikrokriyojel matrisindeki bağlanabileceği tüm aktif anti-Tf ligandlara bağlanması nedeniyle doygunluk değerlerine ulaşılmış olur. Mikrokriyojellere hsTf adsorpsiyonunun hızlı bir şekilde gerçekleşmiş olması antijen-antibadi arasında yüksek afinite ile mikrokriyojellerin büyük gözenekleri sayesinde difüzyon sorununun olmadığını ve

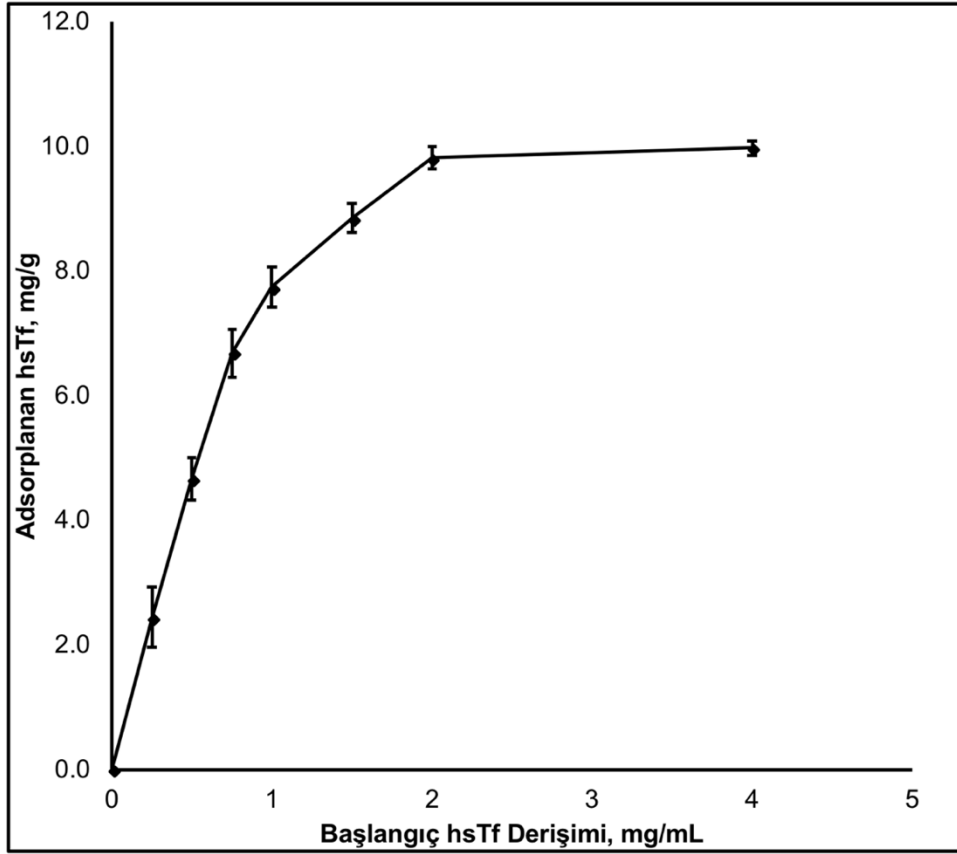
ağırlıklı olarak konveksiyon yoluyla elde edilen kütle taşınımını göstermektedir [221].



Şekil 4.17. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna sürenin etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 25°C, hsTf derişimi: 2.0 mg/mL, $m_{\text{kuru mikrokriyojel}}$: 40 mg.

4.4.1.1.3. Başlangıç Derişiminin Etkisi

hsTf'in başlangıç derişiminin immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi Şekil 4.18'te gösterilmektedir. Adsorbe edilen hsTf miktarının hsTf derişiminin artmasıyla arttığı görülmektedir. Bunun sebebi yüksek hsTf derişiminde, sıvı (yani, protein çözeltisi) ile katı (yani mikrokriyojel matrisi) fazları arasındaki derişim farkı yüksek olduğu için yüksek sürücü kuvvet oluşur. Şekilde doymuşluk değeri 2.0 mg/mL hsTf derişiminde elde edildiği görülmektedir. Yani bu değerde immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel üzerindeki anti-Tf ligandlarının ulaşılabilir bağlanma bölgelerinin doymuşluğa ulaştığı söylenebilir. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel için maksimum adsorpsiyon kapasitesi 9.82 mg/g polimer olarak bulundu.



Şekil 4.18. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 25°C, m_{kuru} mikrokriyojel: 40 mg.

4.4.1.1.4. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi, adsorbe edilen analitin her bir molekülünün adsorban ile etkileşimini incelemek ve belirlemek için kullanılmaktadır. Adsorpsiyon izotermi sayesinde analit derişimi ve fazlar dengedeyken katı faz tarafından adsorplanan analit miktarı arasındaki ilişki karakterize edilebilmektedir. En yaygın kullanılan izotermi Langmuir izotermi ve Freundlich izotermidir.

Langmuir izotermi, tek katmanlı adsorpsiyonun ve eşdeğer yüzey bağlama bölgelerinin varsayıldığı homojen bölgedeki adsorpsiyona dayanır. Yüzey kimyası ile ilgili çalışmaları nedeniyle 1932'de Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülen Irving Langmuir, 1916 yılında moleküllerin basit yüzeylere adsorpsiyonu hakkında bilgi vermesi için bu modeli öngörmüştür [231]. Langmuir izotermi modelinde homojen bir yüzey varsayıldığı ve adsorplanan komşu moleküllerle olan etkileşimin ihmal

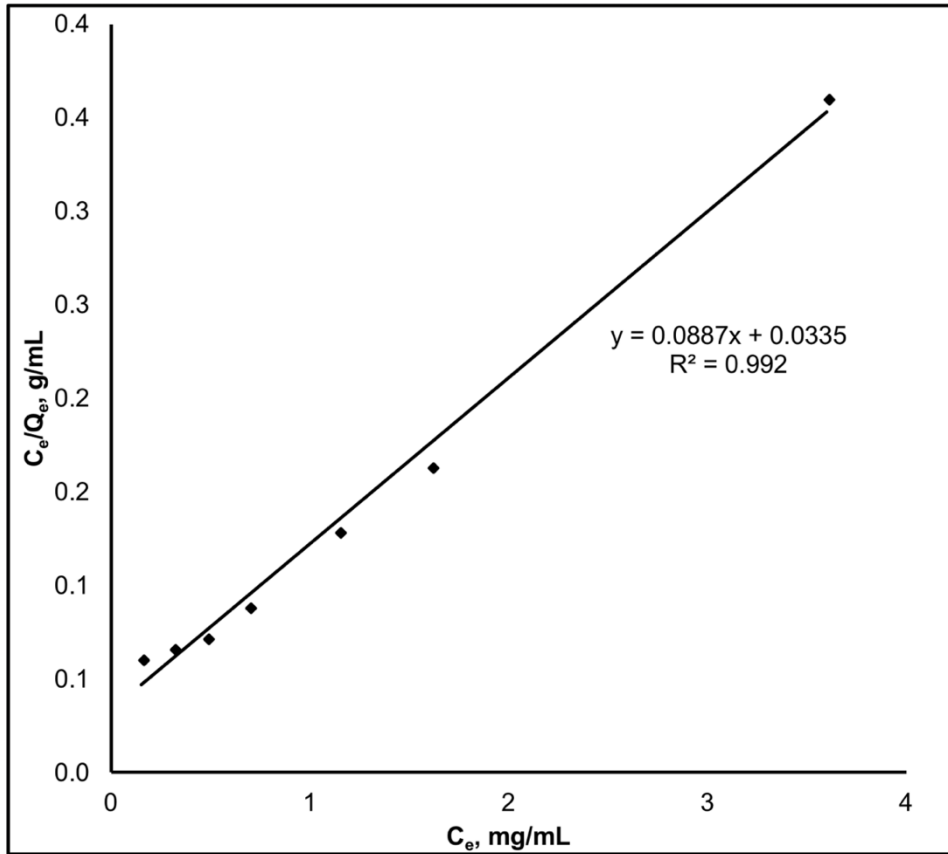
edildiği için enerji dağılımı sabittir [231, 232]. Langmuir adsorpsiyon modeli aşağıdaki verilen eşitliğe göre tanımlanır:

$$Q_e = \frac{Q_{max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte, Q_e , mikrokriyojeller tarafından adsorplanan hsTf miktarı (mg/g); C_e , denge hsTf derişimi (mg/L); K_L , Langmuir sabiti (mL/mg); Q_{max} ise maksimum HsTf adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)'dir. Bu eşitlik doğrusallaştırıldığında şu şekli alır:

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_{max}} C_e + \frac{1}{Q_{max} K_L} \quad (4.2)$$

C_e 'ye karşı (C_e/Q_e) grafiği çizildiğinde doğrunun eğimi $1/Q_{max}$ değerini; doğrunun y ekseninin kesim noktası ise $1/(Q_{max} \cdot K_L)$ değerini verir.



Şekil 4.19. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel için Langmuir adsorpsiyon izotermi.

Bir adsorpsiyon sisteminin “elverişli” veya “elverişsiz” olduğunu tahmin etmede izoterm şeklinin etkisinin olduğu bildirilmiştir [229]. Bir Langmuir izoterminin temel

özellikleri boyutsuz bir sabit ayırma faktörü veya denge parametresi, R_L cinsinden ifade edilebilir [233, 234]:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \quad (4.3)$$

Bu eşitlikte C_0 , başlangıç hsTf derişimini (mg/mL) ve K_L , Langmuir adsorpsiyon denge sabitini (mL/mg) ifade eder. R_L değerleri elverişsiz (unfavorable) ($R_L > 1$), doğrusal ($R_L = 1$), elverişli (favorable) ($0 < R_L < 1$) ve tersinmez ($R_L = 0$) durumlara göre izoterm şeklini gösterir [229, 234].

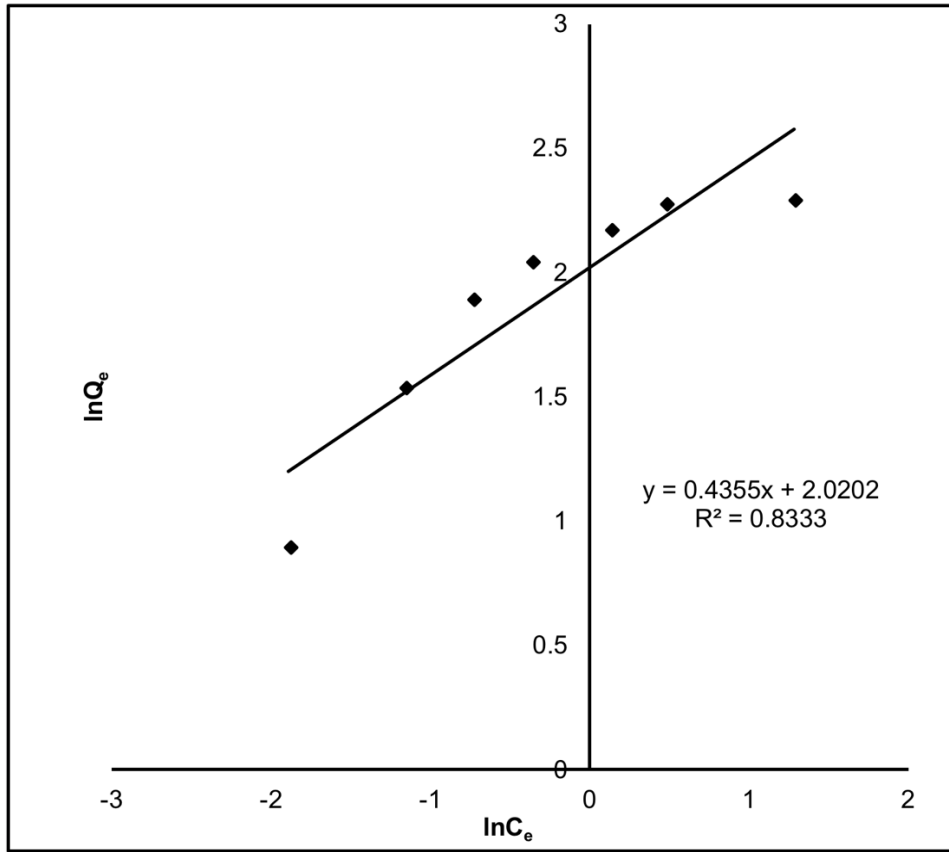
Adsorpsiyon davranışını tanımlamak için sıklıkla kullanılan diğer iyi bilinen model ise Freundlich adsorpsiyon modelidir. Bu adsorpsiyon modeli heterojen yüzey enerjileri için özel bir durumu ifade eder [235]. Tek katman oluşumuyla sınırlı olmayan Freundlich izotermine göre analit molekülleri adsorbanın yüzeyine adsorplanmalarının sonrasında kümeleme (kondenzasyon) etkisi ile kuvvetli çözünen-çözünen etkileşimi gösterirler [236, 237]. Freundlich adsorpsiyon modeli şu eşitlikle tanımlanır:

$$Q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (4.4)$$

Bu eşitlikte, K_F , kabaca adsorpsiyon kapasitesinin bir göstergesidir; $1/n$, sistemin heterojenliğini temsil eden Freundlich üssüdür. Spesifik olarak, K_F değeri arttıkça daha yüksek bir adsorpsiyon kapasitesine işaret eder ve daha düşük bir $1/n$ değeri ise daha güçlü adsorpsiyon mukavemeti anlamına gelir [238]. Bu eşitlik doğrusallaştırıldığında şu şekli alır:

$$\ln Q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (4.5)$$

ln C_e 'ye karşı $\ln Q_e$ grafiği çizildiğinde doğrunun eğimi $1/n$ değerini; doğrunun y ekseninin kesim noktası ise $\ln K_F$ değerini verir.



Şekil 4.20. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel için Freundlich adsorpsiyon izotermi.

Grafiklerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir. Regresyon analizi belirlenen değerlerin standart sapmalarının oldukça düşük olduğu görülmektedir. Regresyon katsayıları incelendiğinde, adsorpsiyon sisteminin Langmuir modeline Freundlich modelinden daha fazla uyduğunu görünmektedir. Ayrıca Langmuir izoterminden hesaplanan teorik maksimum adsorpsiyon kapasitesi değeri deneysel olarak bulunan maksimum adsorpsiyon değerine hemen hemen yakındır. R_L değerleri, hstT'in immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel üzerinde "elverişli" adsorpsiyonunun gerçekleştiğini göstermektedir; bu nedenle immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel, elverişli bir adsorbandır [229].

Çizelge 4.4. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel için Langmuir ve Freundlich izoterm değerleri.

Deneyssel		Langmuir			Freundlich		
Q_e	Q_{max}	K_L	R_L^*	R^2	K_F	n	R^2
(mg/g)	(mg/g)	(mL/mg)					
9.82	11.27	2.65	0.16	0.992	7.64	2.30	0.833

* $C_0 = 2.0$ mg/mL değeri için.

4.4.1.1.5. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon, analit moleküllerinin sulu fazdan adsorbanın katı parçacıklarının yüzeyine taşınmasını ve ardından bu analit moleküllerinin gözeneklerin iç kısmına difüzyonunu içeren çok aşamalı bir süreçtir [239]. Adsorpsiyon kinetiğinin anlaşılması sayesinde etkin analit-adsorban etkileşiminin süresi belirlenebilir. Etkileşim süresi, adsorpsiyon sürecinin hızını etkileyen adsorpsiyon adımlarının anlaşılması açısından önemli bir veridir. Adsorpsiyondaki üç ardışık adım şunlardır [240]:

- (i) Adsorbat iyonlarının adsorbanın dış yüzeyine doğru hareket ettiği film difüzyonu.
- (ii) Adsorbat iyonlarının, adsorbanın dış yüzeyinde meydana gelen az miktarda adsorpsiyon hariç, adsorban gözenekleri içinde hareket ettiği parçacık difüzyonu.
- (iii) Adsorbat iyonlarının adsorbanın iç yüzeyine adsorpsiyonu.

Yukarıdaki üçüncü adımın çok hızlı olduğu düşünülür ve bu nedenle hız sınırlama adımı olarak ele alınamaz. Diğer iki şu bilgileri sağlar [241]:

- Dış taşıma > iç taşıma ise, hız parçacık difüzyonuna bağlıdır.
- Dış taşıma < iç taşıma ise, hız film difüzyonuna bağlıdır.
- Dış taşıma $\approx$ iç taşıma ise, adsorbat iyonların sınırlara taşınması, önemli bir oranda mümkün olmayabilir; böylece, adsorban parçacıklarını çevreleyen bir sıvı film oluşumu uygun derişim gradyanı boyunca gerçekleşir [240, 241]

Kütle aktarımının difüzyon ya da kimyasal tepkime yoluyla yürüdüğü belirlenmesi ve adsorpsiyon sürecini kontrol eden mekanizmaların saptanması amacıyla pseudo (yalancı) birinci dereceden kinetik model, pseudo (yalancı) ikinci dereceden kinetik model ve parçacık içi difüzyon modelinden faydalanılmıştır. Bu

kinetik modeller ölçülen derişimlerin adsorbanın yüzey derişimine eşit olduğu varsayımına dayanmaktadır. Lagergren'in birinci dereceden hız eşitliği, bir sıvı çözeltiden çözünen maddenin adsorpsiyonu için en yaygın kullanılan modellerden biridir. Bu eşitlik şu şekilde ifade edilir:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (4.6)$$

Bu eşitlikte, k_1 , pseudo -birinci derece adsorpsiyon hız sabiti (dk^{-1}); q_e ve q_t sırasıyla denge zamanında ve herhangi bir t anında adsorplanan HsTf miktarıdır (mg/g). Sınır koşullarda integral alınmasıyla ($t = 0$ anında $q_t = 0$ ve $t = t$ anında $q_t = q_t$) aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$\log \frac{q_e}{q_e - q_t} = \frac{k_1 t}{2.303} \quad (4.7)$$

Eşitlik doğrusal şekle dönüştürölmek için tekrar düzenlendiğinde şu şekilde ifade edilir:

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1 t}{2.303} \quad (4.8)$$

t 'ye karşı $\log(q_e - q_t)$ grafiğı çizildiğinde elde edilen doğrunun eğimi $k_1/2.303$ değerini; y ekseninin kesim noktası ise $\log(q_e)$ değerini verir.

Adsorpsiyon denge kapasitesine dayanan pseudo-ikinci dereceden eşitlik şu şekilde ifade edilebilir:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (4.9)$$

Bu eşitlikte, k_2 , pseudo-ikinci derece hız sabitini ($g.mg^{-1}.dk^{-1}$) ifade eder. Sınır koşullarda integral alınmasıyla ($t = 0$ anında $q_t = 0$ ve $t = t$ anında $q_t = q_t$) aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$\frac{1}{q_e - q_t} = \frac{1}{q_e} + k_2 t \quad (4.10)$$

Eşitlik doğrusal şekle dönüştürölmek için tekrar düzenlendiğinde şu şekilde ifade edilir:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (4.11)$$

t 'ye karşı t/q_t grafiğı çizildiğinde elde edilen doğrunun eğimi $1/q_e$ değerini; y ekseninin kesim noktası ise $1/[k_2(q_e)^2]$ değerini verir.

Herhangi bir adsorpsiyon çalışmasında en uygun kinetik model şu durumlar değerlendirilerek belirlenir: Model kullanılarak bulunan q_e değeri deneysel q_e ile makul olarak eşleşmelidir ve regresyon katsayısı (R^2) maksimum değerde olmalıdır [242]. Buna göre, Çizelge 4.5 incelendiğinde immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonu pseudo-ikinci derece modele uyduğu görülmektedir. Çünkü ikinci derece kinetik modelin regresyon katsayısı, birinci derece kinetik modelinkinden çok daha yüksektir. Ayrıca, ikinci derece kinetik modelin q_e hesaplanmış q_e değeri, q_e 'nin deneysel değeri ile örtüşmektedir.

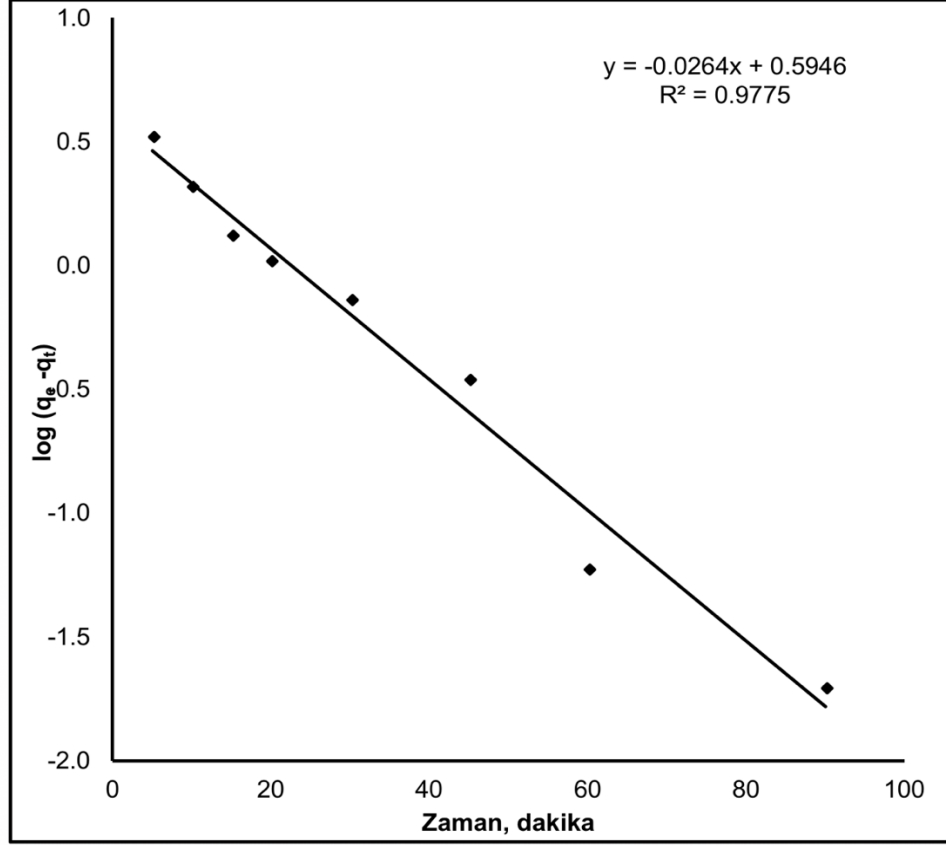
Parçacık içi difüzyon modeli ise şu şekilde tanımlanır:

$$q_t = k_p t^{1/2} + C \quad (4.12)$$

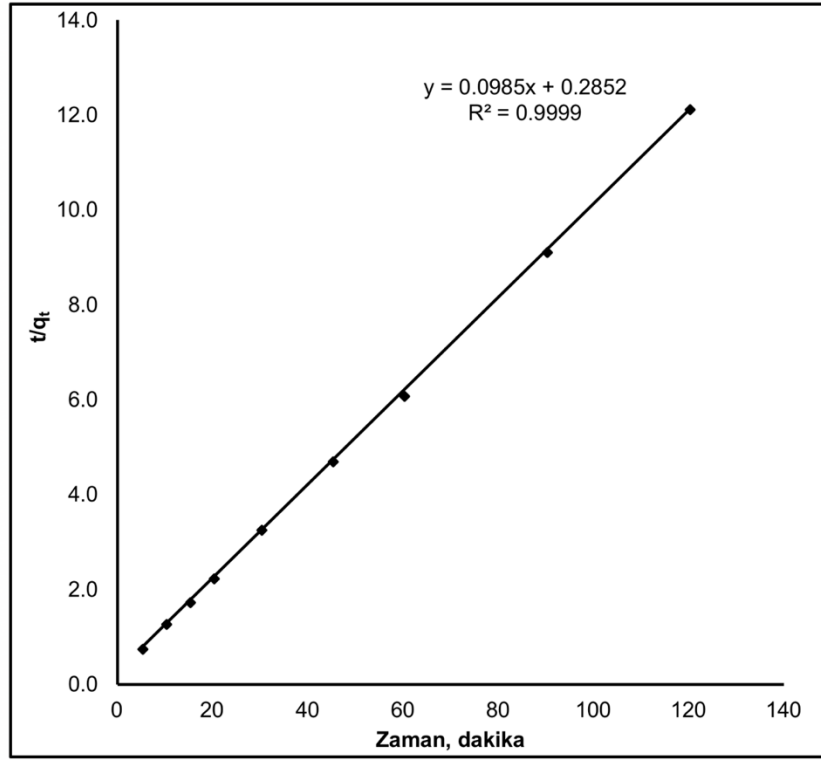
Bu eşitlikte, k_p parçacık içi difüzyon hız sabiti ve C , dış sıvı filmdeki kütle transferine karşı direnci temsil eden y eksenini kesen noktadır. $t^{1/2}$ 'e karşı q_t grafiği çizildiğinde elde edilen doğrunun eğimi k_p değerini; y ekseninin kesim noktası ise C sabitini verir. Bu modelde, adsorpsiyon sürecinde parçacık içi difüzyon dahil edilirse, grafik doğrusal olmalıdır. Eğer parçacık içi difüzyon meydana gelirse, $t^{1/2}$ 'e karşı q_t grafiği doğrusal olacaktır ve eğer doğru orijinden geçerse hız sınırlayıcı işlem sadece parçacık içi difüzyonundan kaynaklanıyor demektir. Aksi halde, parçacık içi difüzyonu ile birlikte başka bir mekanizma da söz konusudur [240]. Bu tür durumda grafik iki ya da daha fazla adımın gerçekleştiğini belirten, çoklu-doğrusallığa sahip olabilir. İlk, daha keskin bölüm, dış yüzey adsorpsiyonu veya anlık adsorpsiyon aşamasıdır. İkinci bölüm, parçacık içi difüzyonunun hız kontrollü olduğu kademeli adsorpsiyon aşamasıdır. Bazı durumlarda üçüncü bölüm de bulunur ve bu bölüm çözeltideki aşırı düşük derişimler nedeniyle parçacık içi difüzyonun yavaşlamaya başladığı son denge aşamasıdır [243].

Şekil 4.23'den görüldüğü üzere, immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun parçacık içi difüzyon modeline ait grafik adsorpsiyon işlemi sırasında üç bölümün (fazın) meydana geldiğini gösteren çoklu doğrusal bir korelasyon göstermektedir. İlk keskin kısım, hsTf moleküllerinin yığın çözeltiden (bulk solution) adsorbanın dış yüzeyine sınır tabaka boyunca difüzyon yoluyla taşınmasıdır (film difüzyonu). İkinci bölüm, hsTf moleküllerinin dış yüzeyden adsorbanın gözeneklerine difüzyonudur. Üçüncü bölüm ise hsTf moleküllerinin

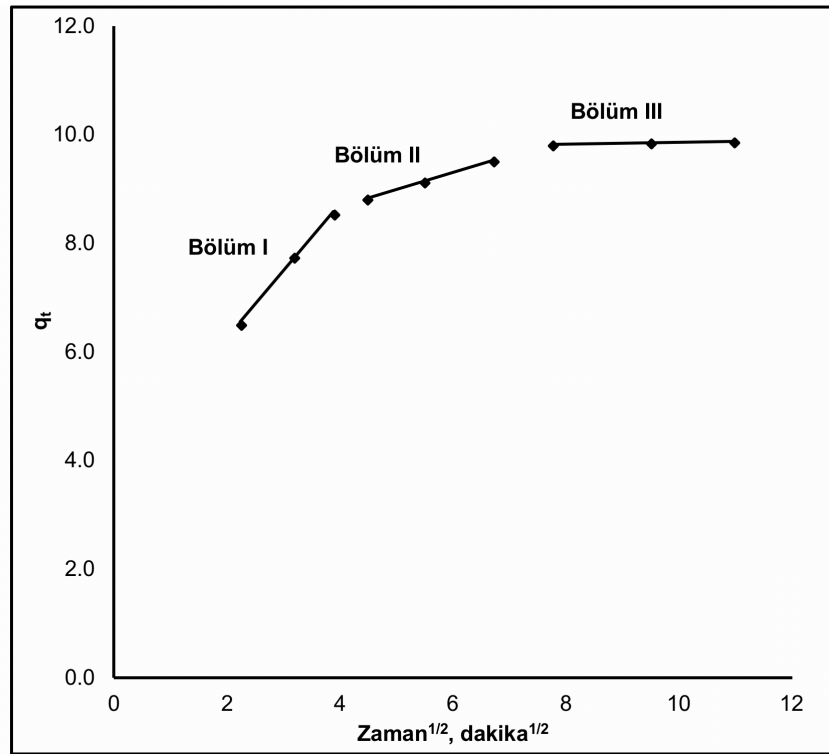
gözeneklerin iç yüzeyindeki aktif bölgelere adsorbe edildiği ve çözelti içinde analit derişiminin gittikçe düşmesine bağılı olarak parçacık içi difüzyonun yavaşlamaya başladığı son denge aşamasıdır [239].



Şekil 4.21. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun pseudo-birinci dereceden kinetiği.



Şekil 4.22. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun pseudo-ikinci dereceden kinetiği.



Şekil 4.23. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun parçacık içi difüzyon modeli.

Çizelge 4.5. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin adsorpsiyonunda pseudo-birinci ve pseudo-ikinci derece kinetik sabitleri.

Başlangıç HsTf Derişimi (mg/mL)	Deneysel	Pseudo Birinci-Derece Kinetik Modeli			Pseudo İkinci-Derece Kinetik Modeli		
	Q_e	k_1	q_e	R^2	k_2	q_e	R^2
	(mg/g)	(dk ⁻¹)	(mg/mL)		(g/mg.dk)	(mg/mL)	
2.0	9.82	0.061	3.93	0.978	0.034	10.15	0.999

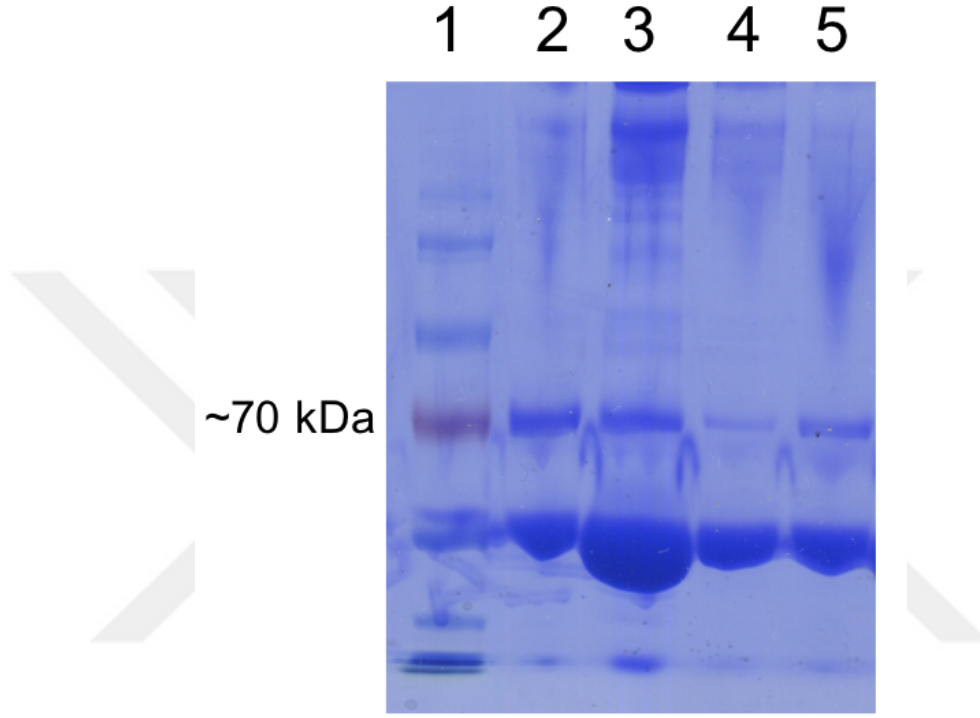
Çizelge 4.6. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin adsorpsiyonunda parçacık içi difüzyon kinetik modelinin sabitleri.

Başlangıç HsTf Derişimi (mg/mL)	2.0
k_{p1} (mg/g.dk ^{1/2})	1.240
C_1 (mg/g)	3.777
$(R_1)^2$	0.997
k_{p2} (mg/g.dk ^{1/2})	0.318
C_2 (mg/g)	7.400
$(R_2)^2$	0.999
k_{p3} (mg/g.dk ^{1/2})	0.019
C_3 (mg/g)	9.676
$(R_3)^2$	0.980

4.4.2. Yapay Plazmadan hsTf Saflaştırma Çalışmaları ve SDS-PAGE Görüntüleme

Elektroforez ile bir karışıma elektrik alanı uygulanarak yüklü moleküllerin çözelti içerisinde yüklerine, şekillerine ve boyutlarına bağlı bir hız ile hareket etmeleri, dolayısıyla birbirlerinden ayrılmaları sağlanır. SDS-PAGE yürütme sonrası Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası ile muamele edildi. Bu boyadaki –SO₃H grubu asidik ortamda proteinlerin serbest amino grubuna bağlanarak proteinlerin bantlarının görünür olmasını sağladı. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojeller ile yapay plazmadan saflaştırılan hsTf'nin molekül ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi (Şekil 4.24). Şekilden görüldüğü üzere, hsTf bandının şiddeti, adsorpsiyon işleminden sonra önemli ölçüde azaldı. Desorpsiyondan sonra elde

edilen bantta ise hsTf'e ait yoğun bant bariz bir şekilde görünmektedir. Ancak bu bandın yanı sıra daha düşük molekül ağırlıklarında tipik bant şeklinden de belli olduğu üzere albümine ait bant da gözükmemektedir. Bu durumun sebebi olarak HSA ve hsTf proteinlerinin plazma derişimleri arasındaki yüksek fark gösterilebilir. Bilindiği üzere HSA'nın plazma derişimi %50'den daha yüksektir.

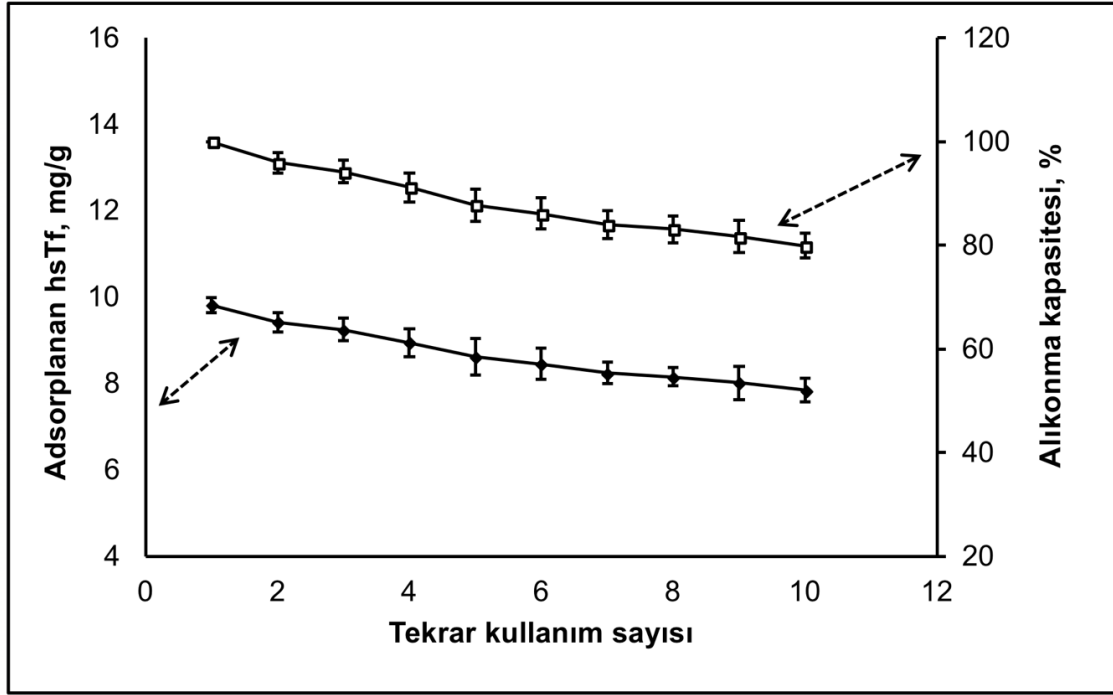


Şekil 4.24. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel ile muamele öncesi ve sonrası yapay plazmanın SDS-PAGE analizi. Sıra 1. Biomarker (Fermentas), Sıra 2. Standart hsTf çözeltisi, Sıra 3. hsTf saflaştırılmadan önceki plazma, Sıra 4. hsTf saflaştırdıktan sonraki plazma, Sıra 5. desorpsiyon edilen örnek.

4.4.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik çalışmaları, üretilen adsorbanın kararlılığını kanıtlamak ve tasarlanan sürecin maliyetini kontrol etmek açısından önemli bir role sahiptir. Desorpsiyon adımı kısa sürede gerçekleşebilmeli ve analit mümkün olduğunca yüksek miktarda desorbe edilebilmelidir. 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü ile desorpsiyon verimliliği ve immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin tekrar kullanılabilirliği incelendi. Desorpsiyon verimliliği, her döngü için %88'den fazla bulundu. Aynı immünoafinite mikrokriyojelin onuncu kullanımından sonra, maksimum hsTf adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık %20 azaldı.

Bu sonuç, immünoafinite mikrokriyojelin belli bir kararlılığa sahip olduğunu gösterir ve afinite adsorbanı olarak bir işlem birkaç kez kullanılabilir.



Şekil 4.25. İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojelin tekrar kullanılabilirliği. hsTf derişimi: 2.0 mg/mL; adsorpsiyon pH: 6.0; desorpsiyon ajanı: 0,1 M glisin-HCl (pH 2.8); T: 25°C.

4.5. hsTf Baskılanmış P(HEMA-MATrp) Mikrokriyojeller

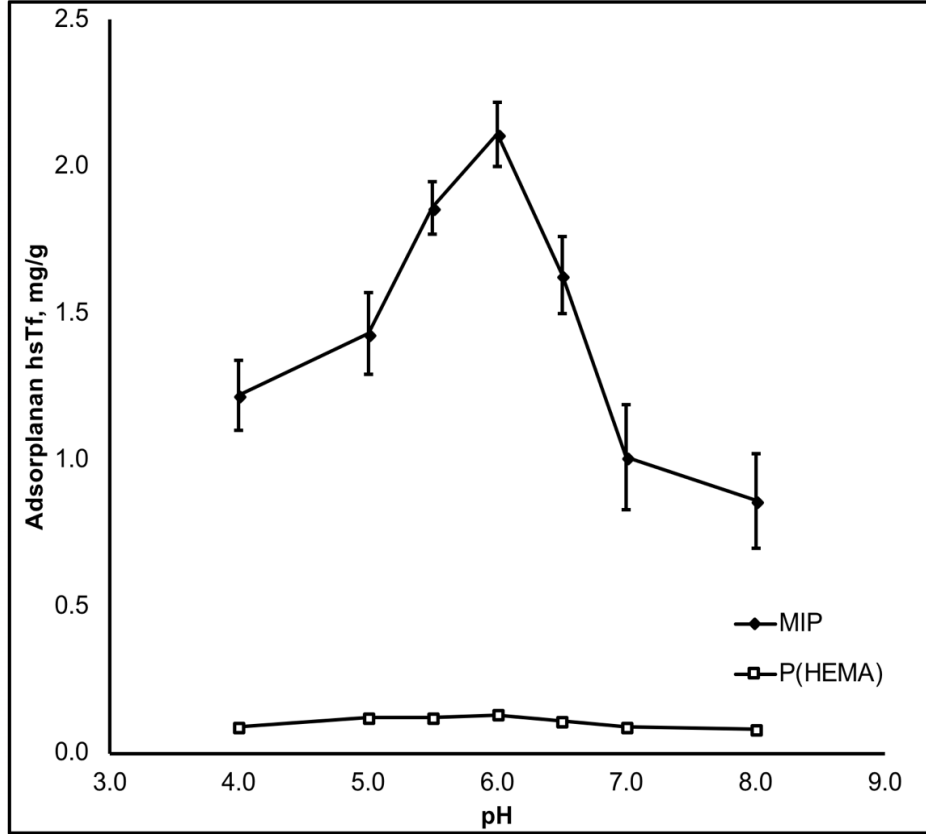
4.5.1. hsTf Baskılanmış P(HEMA-MATrp) Mikrokriyojellerin Adsorpsiyon Çalışmaları

4.5.1.1. Sulu Çözeltilerden Adsorpsiyon Çalışmaları

4.5.1.1.1. pH Etkisi

Şekil 4.26, farklı pH değerlerinde fosfat tamponundaki hsTf adsorpsiyonunu göstermektedir. Bu pH aralığında, maksimum adsorpsiyon miktarı pH 6.0'da 2.11 mg hsTf/g kuru mikrokriyojel olarak gözlenmiştir. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi, daha asidik ve daha alkalın pH değerlerinde önemli ölçüde azalmıştır. Bu davranışın muhtemel nedeni, mikrokriyojel üretiminde kullanılan MATrp-hsTf kompleksinin sahip olduğu pH belleğidir. Moleküler baskılama işlemi için kalıp molekül hsTf ile fonksiyonel monomer MATrp'nın ön kompleksleşmesi pH 6.0 fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Öte yandan pH 6.0 hem MATrp monomerinin (MATrp izoelektrik noktası (pI) 5.88) hem de hsTf'in (apotransferrin için pI 5.9) pI

değerlerine yakındır [228]. Dolayısıyla, hsTf'in pH 6'daki moleküler konformasyonu hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller tarafından daha iyi tanınmakta ve böylece hsTf mikrokriyojellere daha yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Bu verilerden yola çıkarak diğer çalışma şartları incelenirken ortam pH'sı pH 6.0 fosfat tamponu olarak seçilmiştir.

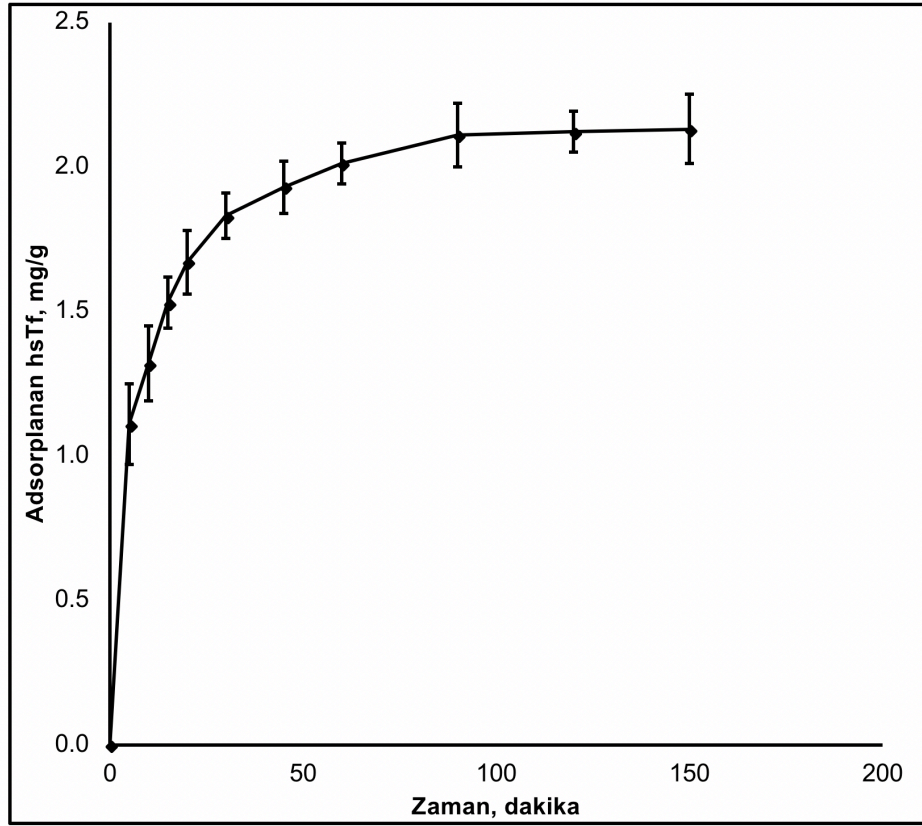


Şekil 4.26. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna pH'nın etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, T: 37°C, hsTf derişimi: 1.5 mg/mL, $m_{\text{kuru mikrokriyojel}}$: 40 mg.

4.5.1.1.2. Adsorpsiyon Süresinin Etkisi

Şekil 4.27, hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellere hsTf'in adsorpsiyon değerlerinin zamana bağımlılığını göstermektedir. Adsorpsiyon başlangıcında daha yüksek adsorpsiyon hızı gözlemlendi ve zamanla çözeltideki hsTf derişiminin azalması nedeniyle azaldı. Yaklaşık 90 dakika içinde hsTf moleküllerinin mikrokriyojel matrisindeki bağlanabileceği tüm aktif bölgelere bağlanması nedeniyle doygunluk değerlerine ulaşıldı. Beklendiği gibi, mobil fazdaki (yani, protein çözeltisi) hsTf derişimi düştükçe durgun fazda artışa (yani, mikrokriyojel matrisi) karşılık

geldiğinden, itici güç (yani, iki faz arasındaki derişim farkı) azalır ve bu da adsorpsiyon hızında düşüşe neden olur [244].

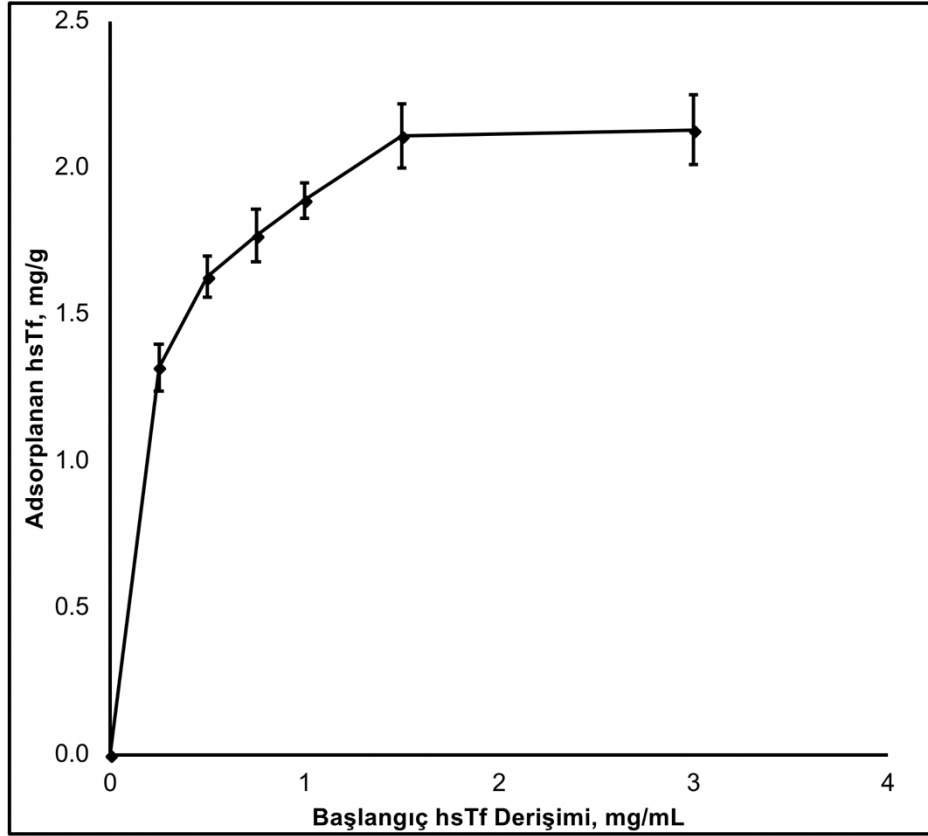


Şekil 4.27. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna sürenin etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 37°C, hsTf derişimi: 1.5 mg/mL, $m_{\text{kuru mikrokriyojel}}$: 40 mg.

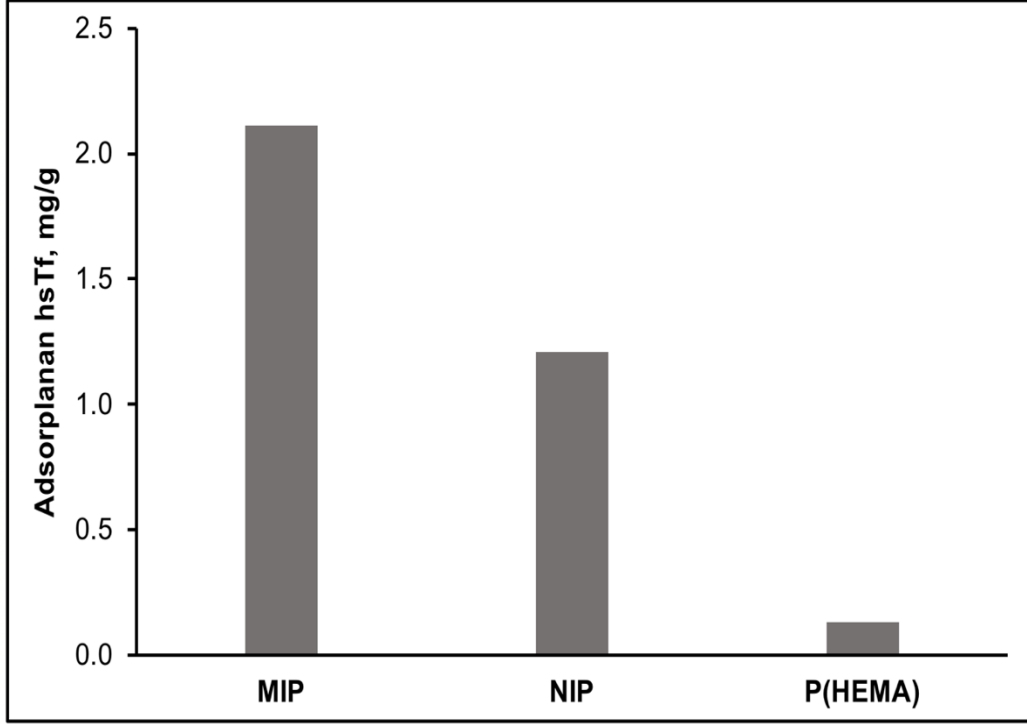
4.5.1.1.3. Başlangıç Derişiminin Etkisi

hsTf'in denge adsorpsiyonu, tampon çözeltideki hsTf derişiminin artmasıyla arttı ve sistem 1.5 mg/mL'nin üzerindeki hsTf derişim değerlerinde doygunluğa ulaştı. hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin maksimum hsTf adsorpsiyon kapasitesi ortalama olarak 2.11 mg/g polimer olarak bulunmuştur (Şekil 4.28). Bu derişim değerinden sonra adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir artış gözlenmemiştir. Bu değer P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin aktif bağlanma yerlerinin doymuşluğunu temsil etmektedir. Aynı şartlarda, hsTf baskılanmamış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojel üzerindeki hsTf adsorpsiyonunun baskılanmış mikrokriyojele oranla 1.74 kat daha düşük olduğu görülmektedir (1.21 mg/g). hsTf baskılanmamış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojel üzerindeki reaktif bağlayıcı gruplar, hsTf molekülleri ile özgül olmayan etkileşimler sayesinde etkileşime girebilir. hsTf baskılanmış

P(HEMA-MATrp) mikrokriyojel için, kriyotropik jelleşme öncesi fonksiyonel monomer olan MATrp ve kalıp molekül olan hsTf arasındaki ön organizasyon ve kompleks oluşumu sayesinde polimerleşme ve hsTf'in uzaklaştırılmasından sonra çoklu noktasal etkileşimlere sahip tamamlayıcı oyuklar (kaviteler) oluşur. Oysaki, baskılanmamış mikrokriyojeller kalıp molekül eklenmeden üretilmişlerdir ve kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında ön organizasyon ve kompleks oluşmadığı için MATrp'deki fonksiyonel gruplar polimer ağında rastgele dağılır ve birbirlerinden ayrı kalır. Bu yüzden baskılanmamış polimerde çoklu nokta etkileşimleri çok daha az olur ve hsTf adsorpsiyonu da azalır. P(HEMA) mikrokriyojel üzerindeki hsTf adsorpsiyonunun çok daha düşük olduğu görülmektedir (0.13 mg/g). Bu mikrokriyojelde fonksiyonel monomer olarak kullanılan MATrp bulunmamakta ve hsTf'in polimer matrisi ile etkileşimi düşmektedir.



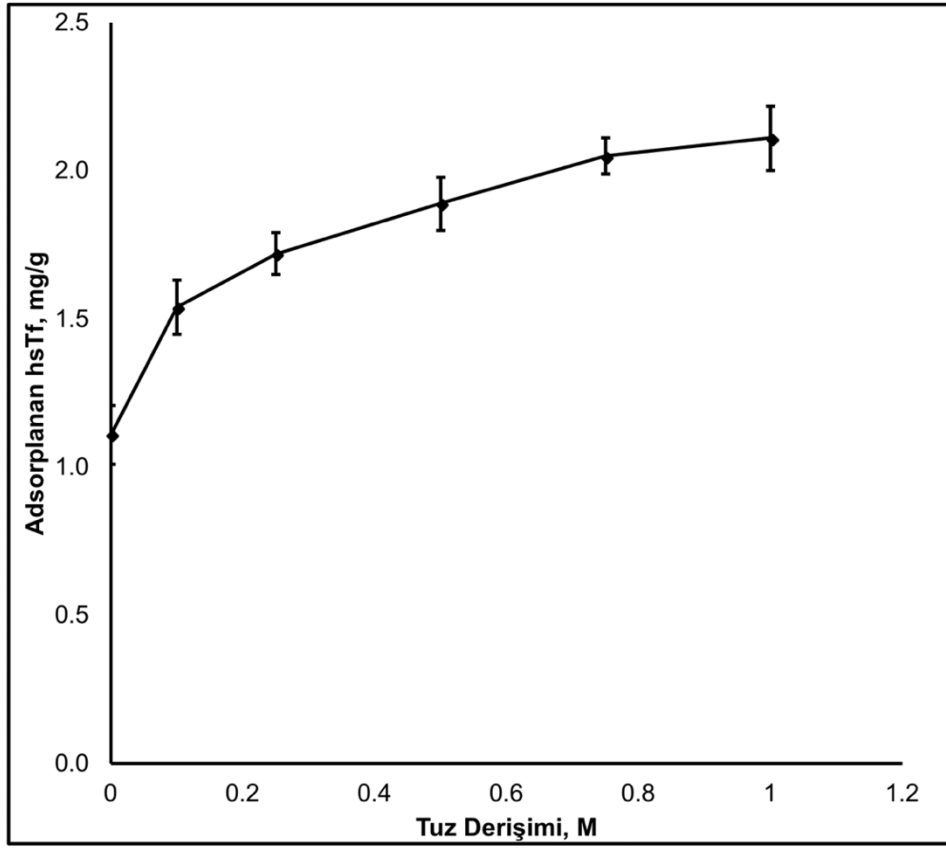
Şekil 4.28. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 25°C, $m_{\text{kuru mikrokriyojel}}$: 40 mg.



Şekil 4.29. Baskılanmış P(HEMA-MATrp), baskılanmamış P(HEMA-MATrp) ve P(HEMA) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyon kapasiteleri. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 25°C, hsTf derişimi: 1.5 mg/mL, $m_{\text{kuru mikrokriyojel}}$: 40 mg.

4.5.1.1.4. İyonik Şiddetin Etkisi

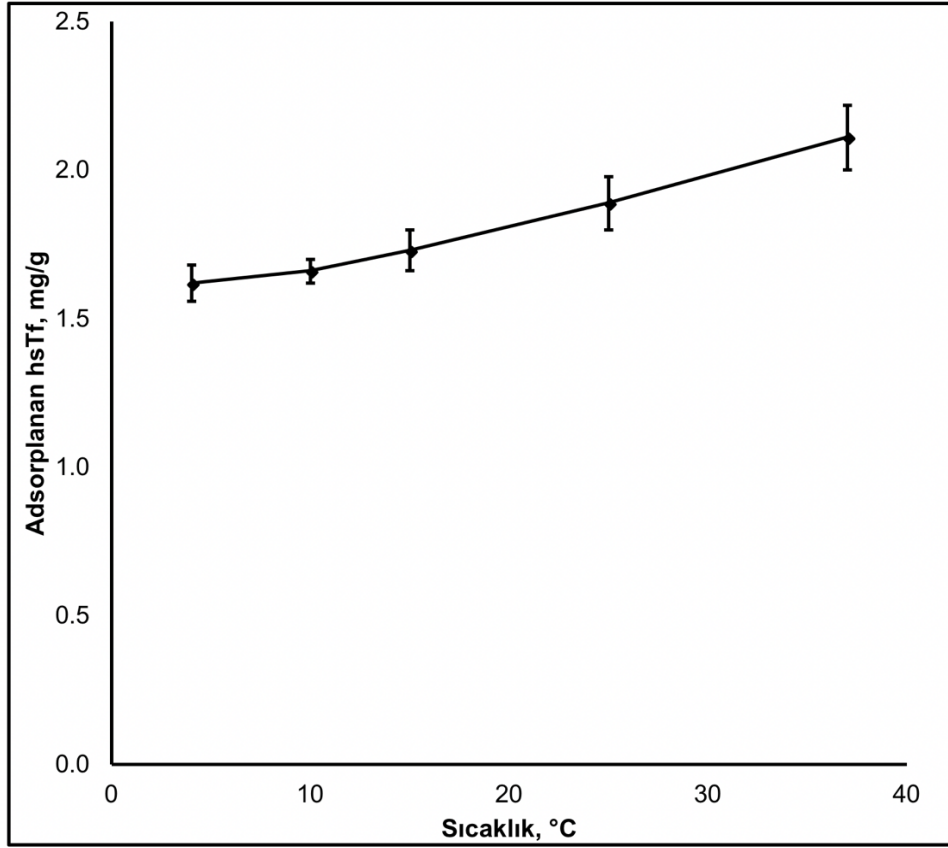
hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellerin hsTf adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi; farklı derişimlerde (0-1.0 M aralığında) sodyum klorür (NaCl) içeren 50 mM pH 6.0 fosfat tamponunda hazırlanan hsTf çözeltileri ile incelendi. Proteinin serbest enerjisi, tuz eklenmesi ile artar ve bu olumsuz (unfavorable) serbest enerji, çözücüyle muhatap oldukları yüzey alanların daha küçük olması nedeniyle adsorbana bağlanan proteinler için daha küçüktür. Bu yüzden proteinlerin adsorbana bağlı olmaları serbest olmalarından termodinamik olarak daha kararlıdır [5]. Ayrıca analitin ve adsorbanın apolar grupları etrafındaki su moleküllerinin yönelimleri tuz iyonları tarafından bozulur ve böylece apolar grupların tercihen etkileşime girmesine izin verilmiş olur [245].



Şekil 4.30. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 37°C, hsTf derişimi: 1.5 mg/mL, m_{kuru mikrokriyojel}: 40 mg.

4.5.1.1.5. Sıcaklığın Etkisi

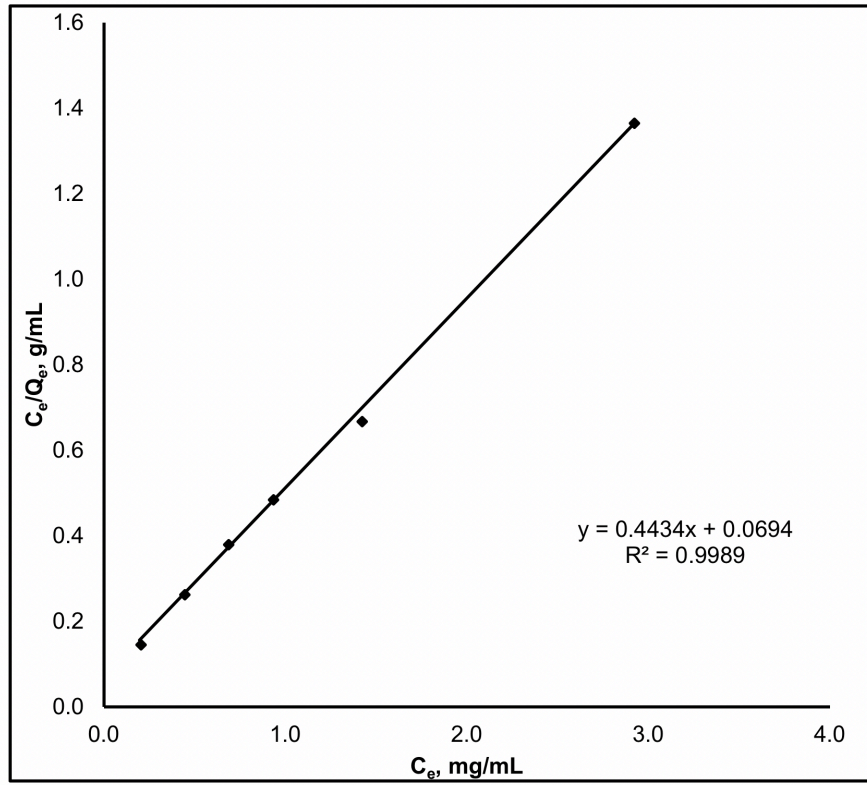
Sıcaklığın P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonu üzerine etkisi 4.0-37°C aralığında incelenmiştir. Sıcaklık 4°C'dan 37°C'a yükseltildiğinde hsTf adsorpsiyonu da 1.62 mg/g polimerden 2.11 mg/g polimere yükseldi (Şekil 4.X). Görüldüğü üzere, P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyon kapasitesi sıcaklık arttıkça belirgin şekilde arttı. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde, sıcaklığın artırılması, proteinin alıkonmasını artırır ve sıcaklığın düşürülmesi genellikle protein elüsyonunu teşvik eder. Aslında, hidrofobik etkileşim kromatografisi entropi odaklı bir süreçtir. ΔH (entalpi değişimi) küçük bir pozitif veya negatif değer olabileceğinden, ΔG (serbest enerji değişimi) pozitif bir entropi değişikliği ile kontrol edilir ve bu nedenle sıcaklık ile artar. Hidrofobik etkileşimlerde çalışan Van der Waals çekim kuvvetleri sıcaklık arttıkça artar [5].



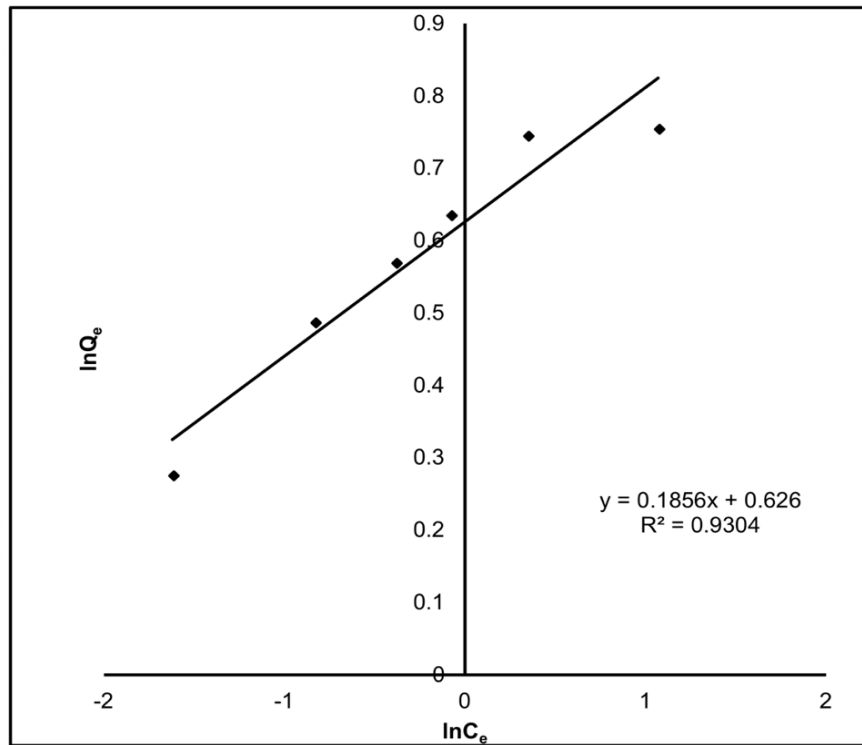
Şekil 4.31. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, hsTf derişimi: 1.5 mg/mL, $m_{\text{kuru mikrokriyojel}}$: 40 mg.

4.5.1.1.6. Adsorpsiyon İzotermi

Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojel tarafından adsorplanan hsTf miktarı arasındaki ilişkiyi karakterize edebilmek için Langmuir izotermi ve Freundlich izoterminden faydalanıldı. Grafiklerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmektedir. Regresyon analizi belirlenen değerlerin standart sapmalarının oldukça düşük olduğu görülmektedir. Regresyon katsayıları incelendiğinde, adsorpsiyon sisteminin Langmuir modeline Freundlich modelinden daha çok uyduğu görünmektedir. Ayrıca Langmuir izoterminden hesaplanan teorik maksimum adsorpsiyon kapasitesi değeri deneysel olarak bulunan maksimum adsorpsiyon değerine hemen hemen yakındır. R_L değerleri, hsTf'in immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel üzerinde "elverişli" adsorpsiyonunun gerçekleştiğini göstermektedir; bu nedenle baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojel, elverişli bir adsorbandır [229].



Şekil 4.32. HsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller için Langmuir adsorpsiyon izotermi.



Şekil 4.33. HsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller için Freundlich adsorpsiyon izotermi.

Çizelge 4.7. hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller için Langmuir ve Freundlich izotermi.

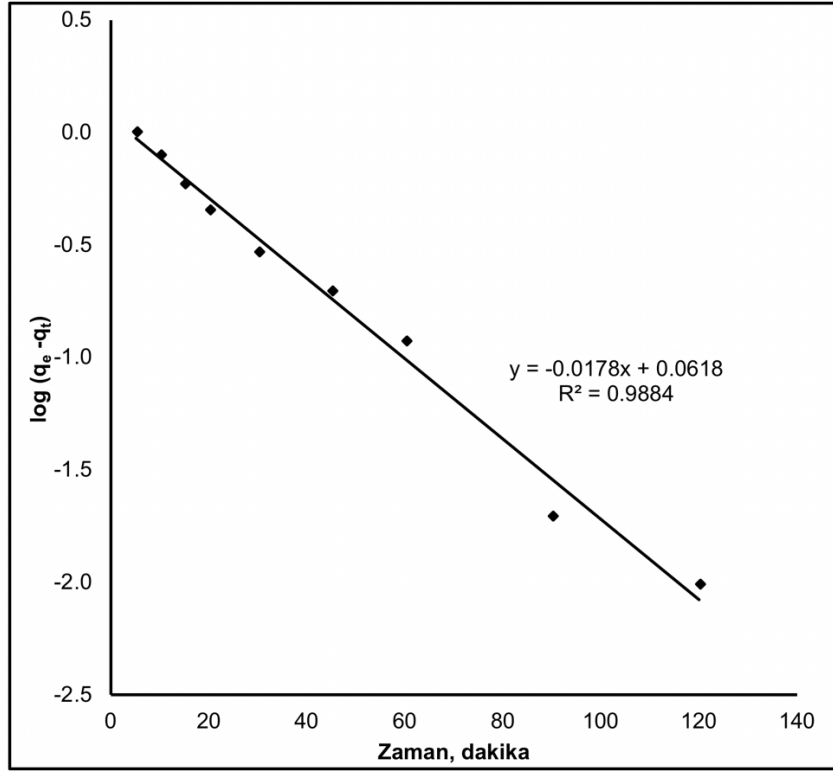
Deneyssel		Langmuir			Feundlich		
Q_e (mg/g)	Q_{max} (mg/g)	K_L (mL/mg)	R_L^*	R^2	K_F (mg/g)	n	R^2
2.11	2.26	6.39	0.09	0.999	1.87	5.39	0.930

* $C_0 = 1.5$ mg/mL değeri için.

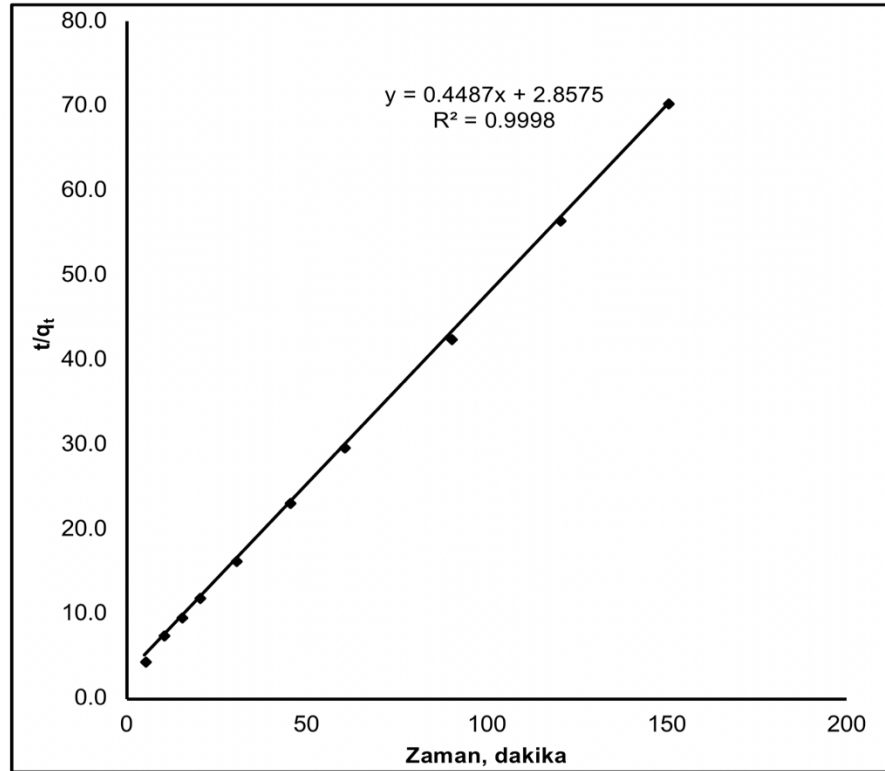
4.5.1.1.7. Adsorpsiyon Kinetiği

Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonunda kütle aktarımının difüzyon ya da kimyasal tepkime yoluyla yürüdüğü belirlenmesi ve adsorpsiyon sürecini kontrol eden mekanizmaların saptanması amacıyla pseudo (yalancı) birinci dereceden kinetik model, pseudo (yalancı) ikinci dereceden kinetik model ve parçacık içi difüzyon modelinden faydalanılmıştır. Çizelge 4.8 incelendiğinde baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyonu pseudo-ikinci derece modele uyduğu görülmektedir. Çünkü ikinci derece kinetik modelin regresyon katsayısı, birinci derece kinetik modelinkinden çok daha yüksektir. Ayrıca, ikinci derece kinetik modelin q_e hesaplanmış q_e değeri, q_e 'nin deneysel değeri ile örtüşmektedir.

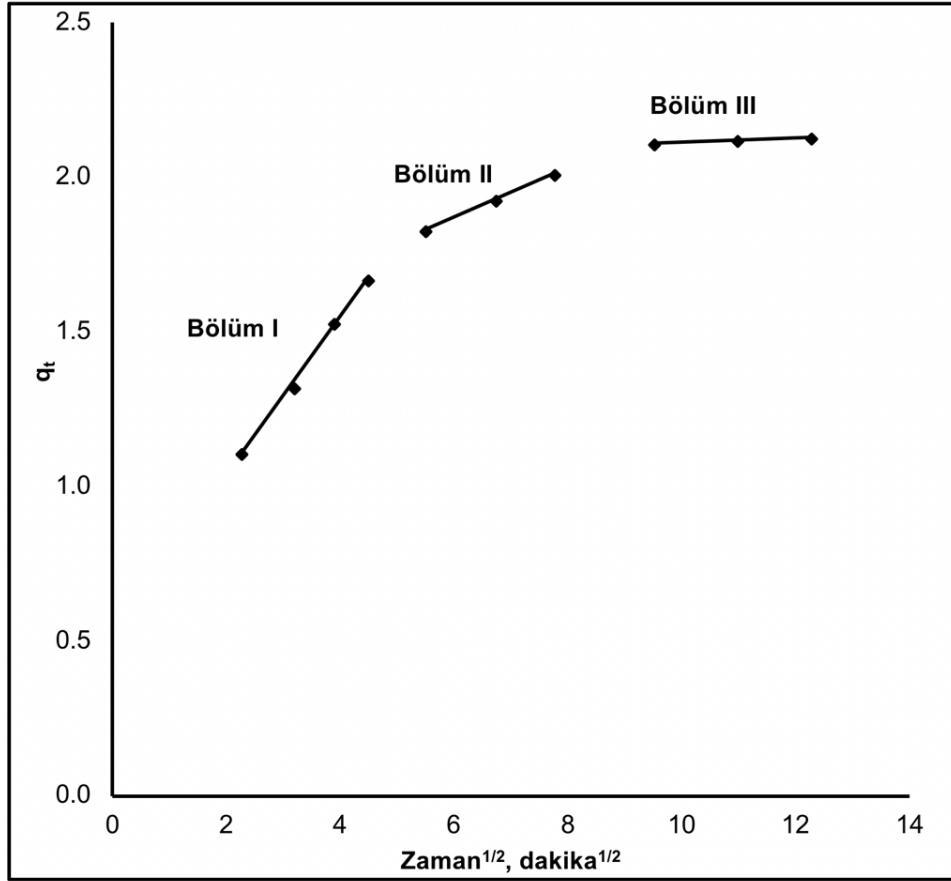
Parçacık içi difüzyon modeline ait veriler Çizelge 4.9'da verilmiştir. Şekil 4.36'dan görüldüğü üzere, baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun parçacık içi difüzyon modeline ait grafik adsorpsiyon işlemi sırasında üç bölümün meydana geldiğini gösteren çoklu doğrusal bir korelasyon bulunmaktadır. İlk keskin bölüm, hsTf moleküllerinin yığın çözeltiden (bulk solution) adsorbanın dış yüzeyine sınır tabaka boyunca difüzyon yoluyla taşınmasıdır (film difüzyonu). İkinci bölüm, hsTf moleküllerinin dış yüzeyden adsorbanın gözeneklerine difüzyonudur. Üçüncü bölüm ise hsTf moleküllerinin gözeneklerin iç yüzeyindeki aktif bölgelere adsorbe edildiği ve çözelti içinde analit derişiminin gittikçe düşmesine bağlı olarak parçacık içi difüzyonun yavaşlamaya başladığı son denge aşamasıdır [239].



Şekil 4.34. hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun pseudo-birinci dereceden kinetiği.



Şekil 4.35. hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun pseudo-ikinci dereceden kinetiği.



Şekil 4.36. hTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin adsorpsiyonunun parçacık içi difüzyon modeli.

Çizelge 4.8. hTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin adsorpsiyonunda pseudo-birinci ve pseudo-ikinci derece kinetik sabitleri.

Başlangıç HsTf Derişimi (mg/mL)	Pseudo Birinci-Derece				Pseudo İkinci-Derece		
	Deneysel	Kinetik Modeli			Kinetik Modeli		
	Q _e (mg/g)	k ₁ (dk ⁻¹)	q _e (mg/mL)	R ²	k ₂ (g/mg.dk)	q _e (mg/mL)	R ²
1.5	2.11	0.041	1.15	0.988	0.071	2.23	0.999

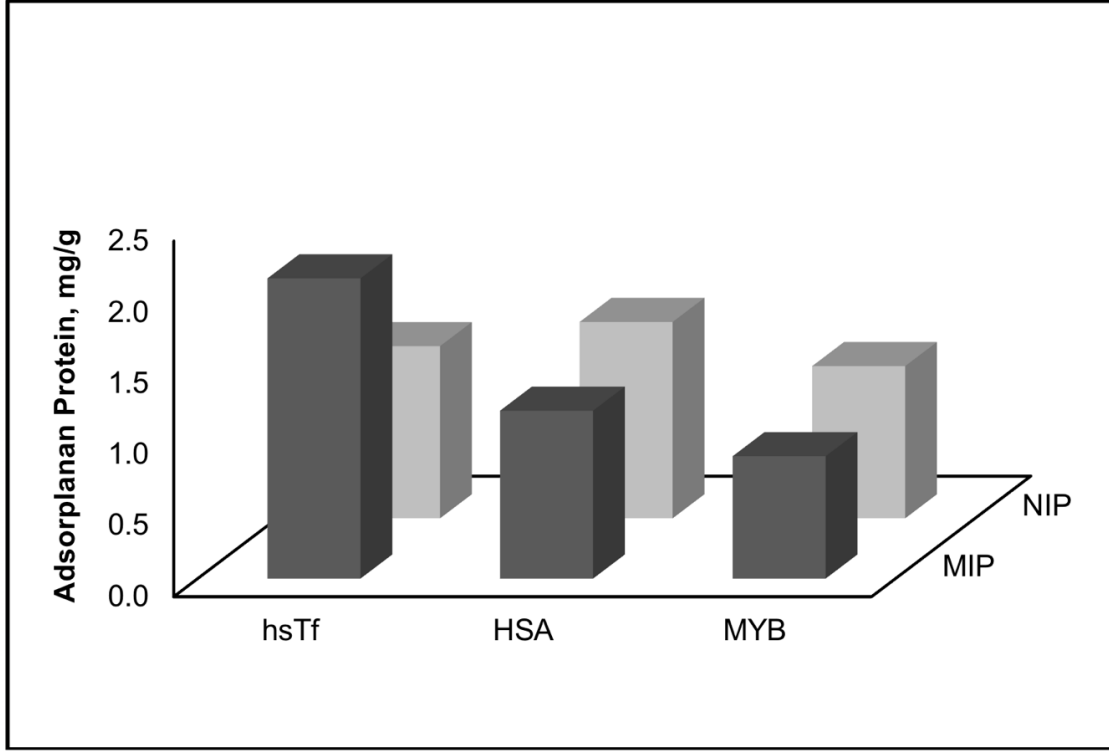
Çizelge 4.9. hsTf baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin adsorpsiyonunda parçacık içi difüzyon kinetik modelinin sabitleri.

Başlangıç HsTf Derişimi (mg/mL)	1.5
k_{p1} (mg/g.dk ^{1/2})	0.254
C_1 (mg/g)	0.534
$(R_1)^2$	0.997
k_{p2} (mg/g.dk ^{1/2})	0.079
C_2 (mg/g)	1.396
$(R_2)^2$	0.999
k_{p3} (mg/g.dk ^{1/2})	0.007
C_3 (mg/g)	2.041
$(R_3)^2$	0.998

4.5.2. Seçicilik Çalışmaları

Moleküler tanıma seçiciliği, moleküler baskılanmış polimerlerin karakterizasyonunda en önemli parametrelerden biridir. Çünkü moleküler tanıma, baskılanmış polimerlerin en temel karakteristik özelliğidir. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin hsTf bağlanmasına yönelik seçiciliği, fosfat tamponunda (50 mM, pH 6.0) yarışmacı olarak HSA ve MYB kullanılarak incelendi. Yarışmacıların ayrı ayrı uygulandığı çalışmada çözeltilerin derişimleri UV spektrofotometre ile ölçüldü. HSA ve MYB boyutları ve yük özelliklerinden dolayı yarışmacı olarak seçildi. HSA molekül ağırlığı (M_A : 67.0 kDa) ile hsTf'e yakın iken MYB'in ise izoelektrik noktası (pI: 6.8-7.2) hsTf'in izoelektrik noktasına yakındır. Çizelge 4.10, hsTf'e göre HSA ve MYB için K_d , k ve k' değerlerini özetlemektedir. Baskılanmış ve baskılanmamış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller için K_d değerleri karşılaştırıldığında, baskılanmış mikrokriyojelin kalıp protein için K_d değeri daha yüksek iken yarışmacı proteinler için daha düşük olarak bulundu. hsTf'in seçicilik katsayısı (k) yarışmacı proteinlerinki ile karşılaştırıldığında, baskılanmış mikrokriyojelin seçiciliği hakkında önemli bilgilere ulaşılabilir. Çünkü seçicilik katsayısı baskılanmış mikrokriyojelin tanıma bölgelerinin özgüllüğünün bir göstergesidir. Baskılanmış mikrokriyojel tarafından hsTf'in benzer molekül ağırlığına sahip HSA ile karşılaştırıldığında bağlanma tercihi, baskılanmamış mikrokriyojelden 2.10 kat daha fazladır. Öte yandan benzer pI değerine sahip MYB ile

karşılaştırıldığında ise baskılanmış mikrokriyojelin baskılanmamışa göre bağıl seçicilik katsayısı 2.24'tür. hsTf'in molekül ağırlığı (67.0 kDa) MYB'den (17.0 kDa) daha büyüktür. Küçük moleküllerin, baskılanmış kavitelelerin içine daha kolay erişmesi beklenirken, hsTf seçici olarak baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojele adsorplandı. Buradan seçiciliğin baskılanmış kavitelelerin şekline ve boyutuna bağlı olduğu sonucuna varılabilir.



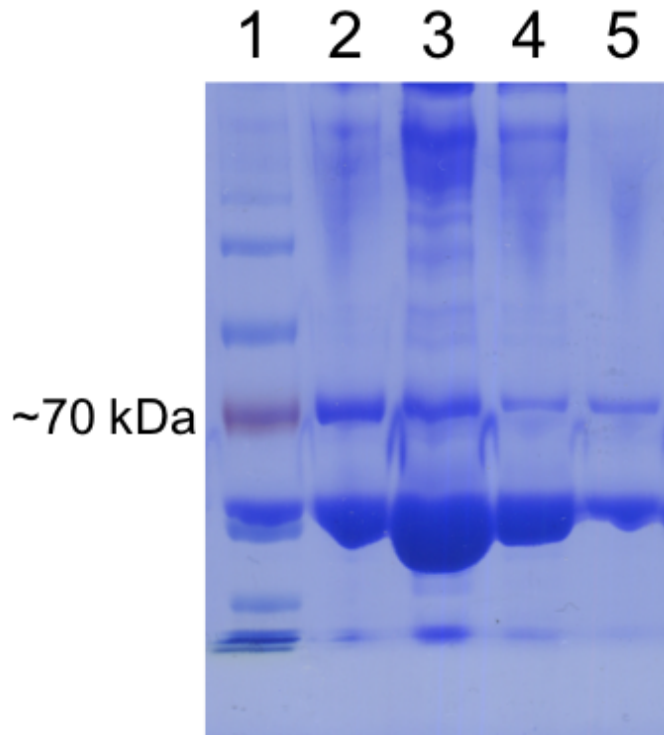
Şekil 4.37. hsTf baskılanmış ve baskılanmamış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojellerin kalıp (hsTf) ve yarışmacı (HSA ve MYB) proteinleri adsorpsiyonu. Çalışma tamponu: 50 mM fosfat tamponu, pH 6.0, T: 37°C, protein derişimleri: 1.5 mg/mL, m_{kuru} mikrokriyojel: 40 mg.

Çizelge 4.10. hsTf'e göre HSA ve MYB için K_d , k ve k' değerleri.

Protein	MIP		NIP		k'
	K_d (mL/g)	k	K_d (mL/g)	k	
hsTf	1.49	—	0.83	—	—
HSA	0.81	1.84	0.96	0.87	2.10
MYB	0.59	2.54	0.73	1.14	2.24

4.5.3. Yapay Plazmadan hsTf Saflaştırma Çalışmaları ve SDS-PAGE Görüntüleme

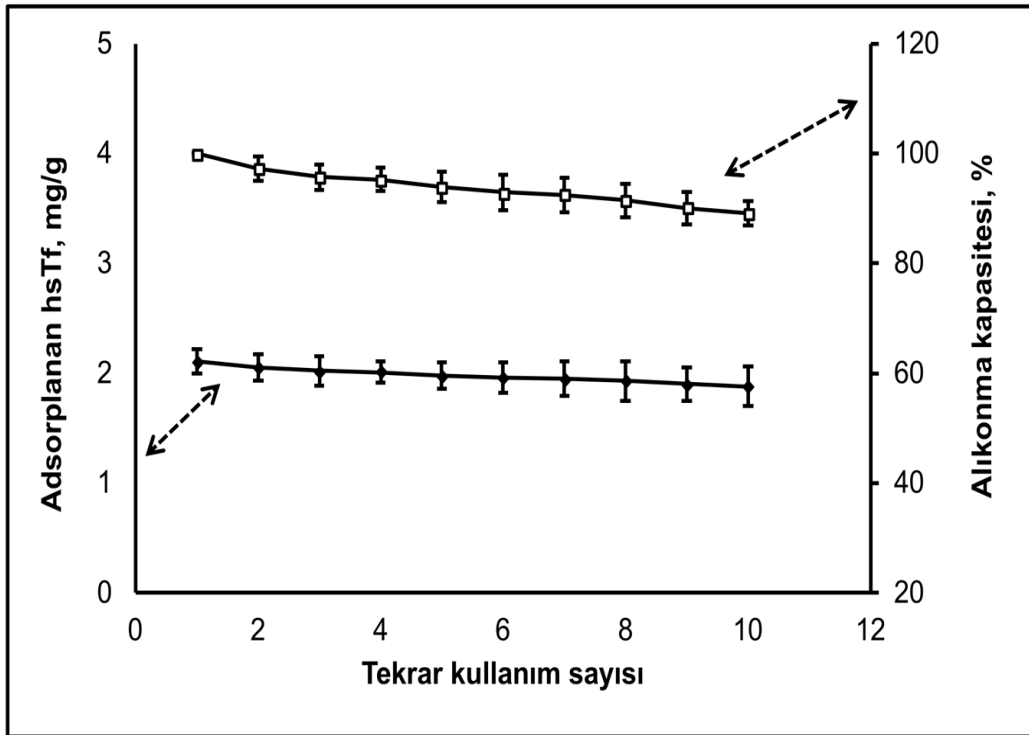
Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojeller ile yapay plazmadan saflaştırılan hsTf'in molekül ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE ile analiz edildi Şekil 4.38'de hsTf bandının şiddeti, adsorpsiyon sürecinden sonra büyük ölçüde azaldığı görülmektedir. Desorpsiyondan sonra elde edilen bantta ise hsTf'e ait yoğun bant bariz bir şekilde görünmektedir. Ancak bu bandın yanı sıra daha düşük molekül ağırlıklarında tipik bant şeklinden de belli olduğu üzere albümine ait bant da gözükmemektedir. Bu durumun sebebi olarak HSA ve hsTf proteinlerinin plazma derişimleri arasındaki yüksek fark gösterilebilir. Bilindiği üzere HSA'nın plazma derişimi %50'den daha yüksektir. Ayrıca baskılanmış mikrokriyojel ile immünoafinite mikrokriyojelin SDS-PAGE görüntüleri kıyaslandığında İM'in MIP'ye göre desorpsiyon sonrası hsTf pikinin daha şiddetli olduğu da görünmektedir. Bu durum her iki tür mikrokriyojelin sulu çözeltilerden hsTf adsorpsiyon kapasiteleri ile de desteklenmektedir. İM'in adsorpsiyon kapasitesi MIP'ye göre yaklaşık 4.5 kat daha yüksektir.



Şekil 4.38. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojel ile muamele öncesi ve sonrası yapay plazmanın SDS-PAGE analizi. Sıra 1. Biomarker (Fermentas), Sıra 2. Standart hsTf çözeltisi, Sıra 3. hsTf saflaştırılmadan önceki plazma, Sıra 4. hsTf saflaştırdıktan sonraki plazma, Sıra 5. desorpsiyon edilen örnek.

4.5.4. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Genel olarak, adsorbanların rejenerasyon verimliliğinin artırılması bu adsorbanların gerek laboratuvar çalışmaları gerekse ticari uygulamalar için daha uygun hale getirilmesi için çok önemli bir adımdır. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojel ile %96'a kadar yüksek desorpsiyon oranları elde edildi ve 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrasında baskılanmış mikrokriyojel başlangıçtaki bağlama kapasitesinin yaklaşık %89'unu korudu. Bu değer immünoafinite mikrokriyojel ile kıyaslandığında daha yüksektir. İmmünoafinite mikrokriyojelin hsTf adsorpsiyon kapasitesi baskılanmış mikrokriyojele kıyasla çok daha fazla olmasına rağmen tekrar kullanılabilirlik de baskılanmış mikrokriyojeller daha yüksek performans gösterdi. Ayrıca baskılanmış mikrokriyojeller maliyet yönünden de daha verimlidir. Bu avantajları sayesinde baskılanmış mikrokriyojel hsTf için immünoafiniteye alternatif bir plastik antibadi olarak kullanılabilir.



Şekil 4.39. Baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojelin tekrar kullanılabilirliği. hsTf derişimi: 1.5 mg/mL; adsorpsiyon pH: 6.0; desorpsiyon ajanı: %10 etilen glikol (pH 4.0) çözeltisi içeren 0.1 M asetat tamponu; T: 37°C.

4.6. Literatür Karşılaştırması

Literatürde transferrin saflaştırılması için geliştirilen sistemlerin sayısı albümin ve diğer bilindik proteinler için geliştirilen sistemlerin sayısıyla kıyaslandığında oldukça

azdır. Transferrin hem nispeten pahalı hem de kanser tedavisinde özgül tedavide kullanılma potansiyeli ile önemli bir proteindir. Örneğin Szwed ve ark. lösemnin tedavisinde kullanılma potansiyeline sahip ilaç taşıma sistemleri geliştirdiler [246]. Bu amaçla doksorubisin ile transferrini konjuge ettiler ve tek başına doksorubisin ile transferrin-doksorubisin eşleniğinin (konjuge) insan lösemi hücreleri üzerine sitotoksitelerini, hücresel alımlarını ve taşıma kinetiklerini araştırdılar. Konjuge doksorubisinin lösemi hücrelerine serbest doksorubisine oranla daha sitotoksik olduğunu buldular. Ayrıca normal hücrelerin serbest doksorubisinle karşılaştırıldığında konjugeye daha dirençli olduğunu bildirdiler.

Barroso ve ark. çalışmalarında kütle spektrometresine bağlı kapiler elektroforez ve kapiler sıvı kromatografisini, (CE-TOF-MS ve μ LC-TOF-MS), triptik sindirim ile elde edilen insan transferrin glikopeptid glikoformlarını tespit etmek ve tanımlamak için kullandı [247]. Bunun için aynı antibadinin (transferrin için keçi poliklonal antibadi) farklı bağlanma yöntemi kullanılarak bağlandığı iki farklı immünoafinite kolonu (silika hidrazid ve siyonejen bromür bağlı sefaroze, sefaroze-CNBr, kolonları) kullandılar. Transferrin geri kazanımlarını değerlendirmek için, her iki kolondan 1.5 mg/mL transferrin standart çözeltisi geçirildi ve elüe transferrin sindirildi, ardından μ LC-TOF-MS ile analiz edildi. İmmünoafinite silika hidrazid kolonu ve immünoafinite sefaroze-CNBr kolonu sırasıyla %13 ve %34 geri kazanım sergilediler. Rivat ve ark. ticari DEAE-SpheroDEX kolonu kullanarak insan serum transferrini saflaştırmak için yöntem geliştirdiler [248]. Bu çalışmaları sonucunda %97 saflıktaki transferrini %75 verimle elde ettiler. Skinner ve ark. sıçan sertoli hücreleri tarafından sentezlenen testiküler transferini saflaştırıp ve karakterize ettiler ve serum transferrin ile karşılaştırdılar [249]. Her iki transferrin de önce fenil-sefaroze hidrofobik kromatografi, ardından transferrin immünoafinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. İmmünoafinite kolonu tavşan anti-(sıçan transferrin) IgG'in, siyonejen bromür ile aktive edilmiş sefaroze 4B'ye bağlanması ile elde edildi. 4 mL antisera ile yapılan 10 mL immünoadsorbentin bağlanma kapasitesi 2 mg transferrin olarak bulundu. Afinite kolonunun bağlanma kapasitesinin NaSCN ile elüsyon sonrası her seferinde %25 azaldığı belirtildi. Nynca ve ark. gökkuşağı alabalığı transferrinin saflaştırılması için hidrofobik etkileşim kromatografisi, jel filtrasyonu ve preparatif elektroforezden oluşan üç aşamalı izolasyon prosedürü geliştirdiler [250]. Zhang ve ark. piriçten rekombinant insan transferrin ekspresyon sonrasında saflaştırıp

karakterize ettiler [251]. Transferrinin saflaştırılması, sırasıyla hidrofobik etkileşim kromatografisi orta fenil sefaroze 6FF, anyon değişim kromatografisi ortamı Q (dörtlü amin) ve DEAE sefaroze FF (GE, Piscataway, NJ) kullanılarak test edildi. Transferrini hidrofobik etkileşim kromatografisi ile %90'lık, anyon değişim kromatografisi ile ise %95'ten daha fazla bir saflıkta elde etmeyi başardılar. Gelder ve ark. domuz serum transferrin saflaştırmada boya ligand afinite kromatografisinden faydalandılar [252]. Ön işlemler sonrasında Cibacron Blue 3GA reaktif boyasını Bio-Gel A 1.5 M (Bio-Rad, Hollanda) immobilize ederek saflaştırmada kullandılar ve transferrini %99'dan yüksek saflıkta elde ettiler. Winzerling ve ark. transferrini immobilize metal iyon afinite kromatografisinden faydalanarak saflaştırdılar [253]. Bunun için Novarose-SE1000/40 destek malzemesine dipikolilamin (DPA) ligandı bağlandı ve nikel ile şelatlandı. Transferrinin geri eldesinin %52 değerinde bulunduğunu bildirdiler.

5. YORUM

- Bu tezde transferrinin saflaştırılması amacıyla afinite kromatografisini temel alan, immünoafinite ve moleküler baskılanmış olmak üzere 2 farklı mikrokriyojel hazırlandı. Bu mikrokriyojellerin karakteristik özellikleri, adsorpsiyon kapasiteleri ve kinetik analizleri incelendi.
- İlk mikrokriyojel HEMA ve GMA monomerlerinin EGDMA çapraz bağlayıcı varlığında -16°C'da serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlendi. Ardından çeşitli derişimlerde bu mikrokriyojellere anti-Tf bağlanarak immünoafinite mikrokriyojel elde edildi. Mikrokriyojelin yapısındaki epoksi grupları sayesinde herhangi bir aktivasyon ajanı kullanımına ihtiyaç olmadan anti-TF antibadiler mikrokriyojellere immobilize edilebildi.
- Bir diğer mikrokriyojel olan baskılanmış mikrokriyojelde fonksiyonel monomer olarak kullanılmak üzere MATrp, L-triptofan ile metakriloil klorür ile tepkimesiyle sentezlendi. Sentezlenen monomer NMR, FTIR, Raman spektrometreleri ile karakterize edildi. Ardından mikrokriyojel HEMA ve MATrp monomerlerinin MBAAm çapraz bağlayıcı ile hsTf varlığında (baskılanmış mikrokriyojel) ve yokluğunda (baskılanmamış mikrokriyojel) -16°C'da serbest radikal polimerizasyonu ile üretildi.
- Mikrokriyojellerin maksimum hsTf adsorpsiyon kapasitelerini elde etmek için optimum şartların belirlenebilmesi için çeşitli ortam koşullarında sulu çözeltilerden hsTf adsorpsiyon çalışmaları yürütüldü. Buna göre pH 6.0'da maksimum hsTf adsorpsiyon kapasitesi immünoafinite mikrokriyojel ve baskılanmış mikrokriyojel için sırasıyla 9.82 ve 2.11 olarak bulundu. Bu değerlerden görüldüğü üzere immünoafinite mikrokriyojelin adsorpsiyon kapasitesi baskılanmış mikrokriyojele göre yaklaşık 4.5 kat daha yüksektir.
- Mikrokriyojeller ile adsorplanan hsTf miktarı arasındaki ilişkiyi karakterize edebilmek için Langmuir izotermi ve Freundlich izoterminden faydalanıldı. Regresyon katsayıları incelendiğinde hem immünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel için hem de baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojel için uygun bir model olduğu gözlemlendi. Ayrıca Langmuir izoterminden hesaplanan teorik maksimum adsorpsiyon kapasitesi değerleri deneysel olarak elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi değerlerine hemen hemen yakın olarak bulundu.

- Seçicilik çalışmaları baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojel kullanılarak fosfat tamponunda (pH 6.0) kesikli sistem ile gerçekleştirildi. Yarışmacı protein olarak HSA ve MYB seçildi. hsTf'in seçicilik katsayısı (k) yarışmacılar ile karşılaştırıldığında k değeri BSA'dan 1.84, MYB'den ise 2.54 kat daha yüksek adsorbe ettiği bulundu. Ayrıca baskılanmış mikrokriyojel, baskılanmamış mikrokriyojel ile kıyaslandığında bağıl seçicilik katsayısı (k') HSA için 2.10, MYB için ise 2.24 kat olarak hesaplandı. Bu değerler baskılamanın verimli bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.
- İmmünoafinite P(HEMA-GMA) mikrokriyojel ve baskılanmış P(HEMA-MATrp) mikrokriyojel ile ayrı ayrı yapay plazmadan saflaştırılan hsTf'in molekül ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE incelendi. Bantların şiddeti incelendiğinde immünoafinite mikrokriyojele ait bandın şiddetinin baskılanmış mikrokriyojele oranla daha yüksek olduğu gözlemlendi.
- Hem immünoafinite hem de baskılanmış mikrokriyojeller için desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik çalışmaları yürütüldü. Aynı mikrokriyojelin onuncu kullanımından sonra, maksimum hsTf adsorpsiyon kapasitesi immünoafinite mikrokriyojel ve baskılanmış mikrokriyojel için sırasıyla yaklaşık %20 ve %10 azaldı. Bu sonuç, baskılanmış mikrokriyojelin daha düşük adsorpsiyon kapasitesine rağmen daha kararlı ve tekrar kullanılabilirliğinin daha yüksek olduğunu gösterdi. Böylelikle hem üretimde hem de tekrar kullanılabilirlik verimiyle immünoafiniteye alternatif plastik antibadi olarak kullanılabilecek olan baskılanmış mikrokriyojel maliyeti de düşürmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Tapiero, H., Gaté, L., Tew, K., Iron: Deficiencies and requirements, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 55, 324-332, **2001**.
- [2] Li, H., Qian, Z. M. Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery, *Medicinal Research Reviews*, 22, 225-250, **2002**.
- [3] Sahoo, S.K., Labhasetwar, V., Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention, *Molecular Pharmaceutics*, 2, 373-383, **2005**.
- [4] Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications, *Journal of Separation Science*, 30, 1657-1671, **2007**.
- [5] Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A., Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography, *Biochemical Engineering Journal*, 43, 272-279, **2009**.
- [6] Haldun B., S., Budak, F., Genomik, proteomik kavramlarına genel bakış ve uygulama alanları, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* **2013**, 39, 65-69, **2009**.
- [7] Winkler, H., Verbreitung und ursache der parthenogenesis im pflanzen- und tierreiche, **1920**.
- [8] Kuska, B., Beer, Bethesda, and biology: How “genomics” came into being, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 90, 93-93, **1988**.
- [9] McGuire, J.F., Casado, B., Proteomics: A primer for otologists, *Otology & Neurotology*, 25, 842-849, **2004**.
- [10] Agyei, D., Danquah, M.K., Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides, *Biotechnology Advances*, 29, 272-277, **2011**.
- [11] Denizli, A., Pişkin, E., DNA-immobilized polyhydroxyethylmethacrylate microbeads for affinity sorption of human immunoglobulin G and anti-DNA antibodies, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 666, 215-222, **1995**.
- [12] Starkenstein, E., Enzyme action and its influence through neutral salts, *Biochemische Zeitschrift*, 24, 210-218, **1910**.
- [13] Campbell, D.H., Luescher, E., Lerman, L.S. Immunologic adsorbents. I. Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 37, 575-578, **1951**.
- [14] Hjertén, S., The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles, *Biochimica et Biophysica Acta*, 79, 393-398.
- [15] Axén, R., Porath, J., Ernback, S., Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides, *Nature*, 214, 1302-1304, **1967**.
- [16] Qian, W.-J., Jacobs, J.M., Liu, T., Camp, D.G., Smith, R.D., Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics

- profiling for clinical applications, *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 5, 1727-44, **2006**.
- [17] Segura, M.M., Garnier, A., Durocher, Y., Coelho, H., Kamen, A., Production of lentiviral vectors by large-scale transient transfection of suspension cultures and affinity chromatography purification, *Biotechnology and Bioengineering*, 98, 789-799, **2007**.
 - [18] Bueno, S.M.A., Haupt, K., Vijayalakshmi, M.A., Separation of immunoglobulin G from human serum by pseudobioaffinity chromatography using immobilized L-histidine in hollow fibre membranes, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 667, 57-67, **1995**.
 - [19] Vassilyeva, M.N., Klyuyev, S., Vassilyev, A.D., Wesson, H., Zhang, Z., Renfrow, M. B., Wang, H., Higgins, N. P., Chow, L. T., Vassilyev, D.G., Efficient, ultra-high-affinity chromatography in a one-step purification of complex proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, E5138-E5147, **2017**.
 - [20] Nagendra Reddy, C., Ye, Q., Patel, P., Sivendran, S., Chourey, S., Wang, R., Anumolu, J.R., Grant, G.E., Powell, W.S., Rokach, J., Design and synthesis of affinity chromatography ligands for the purification of 5-hydroxyeicosanoid dehydrogenase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25, 116-125, **2017**.
 - [21] Andaç, M., Galaev, I.Y., Denizli, A., Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification, *Journal of Chromatography B*, 1021, 69-80, **2016**.
 - [22] Perçin, I., Sağlar, E., Yavuz, H., Aksöz, E., Denizli, A., Poly(hydroxyethyl methacrylate) based affinity cryogel for plasmid DNA purification, *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 577-582, **2011**.
 - [23] Bereli, N., Akgöl, S., Yavuz, H., Denizli, A., Antibody purification by concanavalin A affinity chromatography, *Journal of Applied Polymer Science*, 97, 1202-1208, **2005**.
 - [24] Gustavsson, P.-E. and Larsson, P.-O. Support materials for affinity chromatography. *Handbook of Affinity Chromatography*, (eds: Hage, D.S.), CRC press/Taylor and Francis Group, Boca Raton, 15-34, **2006**.
 - [25] Cuatrecasas, P. Protein purification by affinity chromatography: Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads, *Journal of Biological Chemistry*, 245, 3059-3065, **1970**.
 - [26] March, S.C., Parikh, I., Cuatrecasas, P., A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography, *Analytical Biochemistry*, 60, 149-152, **1974**.
 - [27] Kusamoto, H., Shiba, A., Koretake, N., Fujioka, H., Hieda, Y., Kinoshita-Kikuta, E., Kinoshita, E., Koike, T., A novel thiol-affinity micropipette tip method using zinc(II)-cyclen-attached agarose beads for enrichment of cysteine-containing molecules, *Journal of Chromatography B*, 1031, 195-201, **2016**.
 - [28] Shi, Q.-H., Tian, Y., Dong, X.-Y., Bai, S., Sun, Y., Chitosan-coated silica beads as immobilized metal affinity support for protein adsorption.

Biochemical Engineering Journal, 16, 317-322, **2003**.

- [29] Robinson, P.J., Dunnill, P., Lilly, M.D., Porous glass as a solid support for immobilisation or affinity chromatography of enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 242, 659-661, **1971**.
- [30] Zhou, H., Ye, M., Dong, J., Corradini, E., Cristobal, A., Heck, A. J. R., Zou, H., Mohammed, S., Robust phosphoproteome enrichment using monodisperse microsphere-based immobilized titanium (IV) ion affinity chromatography, *Nature Protocols*, 8, 461-480, **2013**.
- [31] Martinović, T., Andjelković, U., Klobučar, M., Černigoj, U., Vidič, J., Lučić, M., Pavelić, K., Josić, D., Affinity chromatography on monolithic supports for simultaneous and high-throughput isolation of immunoglobulins from human serum, *Electrophoresis*, 38, 2909-2913, **2017**.
- [32] Saeed, A., Maya, F., Xiao, D.J., Najam-ul-Haq, M., Svec, F., Britt, D.K., Growth of a highly porous coordination polymer on a macroporous polymer monolith support for enhanced immobilized metal ion affinity chromatographic enrichment of phosphopeptides, *Advanced Functional Materials*, 24, 5790-5797, **2014**.
- [33] Gonçalves, G.R.F., Gandolfi, O.R.R., Santos, L.S., Bonomo, R.C.F., Veloso, C.M., Veríssimo, L.A.A., and Fontan, R.D.C.I., Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography, *Journal of Chromatography B*, 1068-1069, 71-77, **2017**.
- [34] Hage, D. S., Affinity chromatography: A review of clinical applications, *Clinical Chemistry*, 45, 593-615, **1999**.
- [35] Yavuz, H., Denizli, A. Immunoabsorption of cholesterol on Protein A oriented beads, *Macromolecular Bioscience*, 5, 39-48, **2005**.
- [36] El Khoury, G., Lowe, C. R., A biomimetic Protein G affinity adsorbent: An Ugi ligand for immunoglobulins and Fab fragments based on the third IgG-binding domain of Protein G, *Journal of Molecular Recognition*, 26, 190-200, **2013**.
- [37] Denizli, A., Pişkin, E., Dye-ligand affinity systems, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 391-416, **2001**.
- [38] Denizli, A., Purification of antibodies by affinity chromatography, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 39, 1-18, **2011**.
- [39] Van Oss, C.J., Good, R.J., Chaudhury, M.K., Nature of the antigen-antibody interaction: Primary and secondary bonds: Optimal conditions for association and dissociation, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 376, 111-119, **1986**.
- [40] Tsumoto, K., Caaveiro, J. M., Tsumoto, K., Caaveiro, J.M., Antigen-antibody binding. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK **2016**.
- [41] D'Alessandro, G., Sofia, F., The adsorption of antibodies from the sera of syphilitics and tuberculosis patients, *Z Immunitats*, 84, 237-250, **1935**.
- [42] Landsteiner, K., Scheer, Van Der, J., On cross reactions of immune sera to azoproteins, *The Journal of Experimental Medicine*, 63, 325-39, **1936**.
- [43] Thompson, N. E., Aronson, D. B., and Burgess, R. R. Purification of

- eukaryotic RNA polymerase II by immunoaffinity chromatography, Elution of active enzyme with protein stabilizing agents from a polyol-responsive monoclonal antibody, *Journal of Biological Chemistry*, 265, 7069-7077, **1990**.
- [44] Denizli, A., Preparation of immuno-affinity membranes for cholesterol removal from human plasma, *Journal of Chromatography B*, 772, 357-367, **2002**.
 - [45] Yin, B., Whyatt, R.M., Perera, F.P., Randall, M.C., Cooper, T.B., Santella, R. M., Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA, *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 1023-1032, **1995**.
 - [46] Burgess, R.R., Thompson, N.E., Advances in gentle immunoaffinity chromatography, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 304-308, **2002**.
 - [47] Kang, L., Camacho, R.C., Li, W., D'Aquino, K., You, S., Chuo, V., Weng L., Jian, W., Simultaneous catabolite identification and quantitation of large therapeutic protein at the intact level by immunoaffinity capture liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 89, 6065-6075, **2017**.
 - [48] Birnbaum, S., Udén, C., Magnusson, C.G.M., Nilsson, S., Latex-based thin-layer immunoaffinity chromatography for quantitation of protein analytes, *Analytical Biochemistry*, 206, 168-171, **1992**.
 - [49] Wu, C., Duan, J., Liu, T., Smith, R.D., Qian, W.-J., Contributions of immunoaffinity chromatography to deep proteome profiling of human biofluids, *Journal of Chromatography B*, 1021, 57-68, **2016**.
 - [50] Brgles, M., Sviben, D., Forčić, D., Halassy, B., Nonspecific native elution of proteins and mumps virus in immunoaffinity chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1447, 107-114, **2016**.
 - [51] Chang, W.-F., Wang, S.-J., Lai, S.-F., Shieh, C.-J., Hsiung, K.-P., Liu, Y.-C., Evaluation on the use of reactive dye-modified polylysine as the biomarker in immunochromatographic test application, *Analytical Biochemistry*, 411, 236-240, **2011**.
 - [52] Sonker, M., Parker, E.K., Nielsen, A.V., Sahore, V., Woolley, A.T., Electrokinetically operated microfluidic devices for integrated immunoaffinity monolith extraction and electrophoretic separation of preterm birth biomarkers, *The Analyst*, 143, 224-231, **2018**.
 - [53] Ok, H.E., Lee, S.Y., Chun, H.S., Occurrence and simultaneous determination of nivalenol and deoxynivalenol in rice and bran by HPLC-UV detection and immunoaffinity cleanup, *Food Control*, 87, 53-59, **2018**.
 - [54] Salfeld, J.G., Isotype selection in antibody engineering, *Nature Biotechnology*, 25, 1369-1372, **2007**.
 - [55] Salmon, S.E., and Smith, B.A., Immunoglobulin synthesis and total body tumor cell number in IgG multiple myeloma, *The Journal of clinical investigation*, 49, 1114-21, **1970**.
 - [56] Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispens, T., IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions, *Frontiers in immunology*, 5, 520, **2014**.

- [57] Ayyar, B.V., Arora, S., Murphy, C., O'Kennedy, R., Affinity chromatography as a tool for antibody purification, *Methods*, 56, 116-129, **2012**.
- [58] Köhler, G., Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256, 495-497, **1975**.
- [59] Dumstrei, K., Chen, H., Brenner, H., A systematic review of serum autoantibodies as biomarkers for pancreatic cancer detection, *Oncotarget*, 7, 11151-64, **2016**.
- [60] Tan, H.T., Low, J., Lim, S.G., Chung, M.C.M., Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection, *FEBS Journal*, 276, 6880-6904, **2009**.
- [61] Wang, X., Yu, J., Sreekumar, A., Varambally, S., Shen, R., Giacherio, D., Mehra, R., Montie, J.E., Pienta, K.J., Sanda, M.G., Kantoff, P.W., Rubin, M.A., Wei, J.T., Ghosh, D., Chinnaiyan, A.M., Autoantibody signatures in prostate cancer, *New England Journal of Medicine*, 353, 1224-1235, **2005**.
- [62] Anderson, K. S., Sibani, S., Wallstrom, G., Qiu, J., Mendoza, E.A., Raphael, J., Hainsworth, E., Montor, W.R., Wong, J., Park, J.G., Lokko, N., Logvinenko, T., Ramachandran, N., Godwin, A.K., Marks, J., Engstrom, P., and LaBaer, J., Protein microarray signature of autoantibody biomarkers for the early detection of breast cancer, *Journal of Proteome Research*, 10, 85-96, **2011**.
- [63] Hage, D.S., Phillips, T.M., Immunoaffinity chromatography. *Handbook of Affinity Chromatography*, (eds: Hage, D.S.), CRC press/Taylor and Francis Group, Boca Raton, 127-172, **2006**.
- [64] Sege, K., Peterson, P.A., Use of anti-idiotypic antibodies as cell-surface receptor probes (retinol-binding protein/insulin receptor/insulin effect), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75, 2443-2447, **1978**.
- [65] Wållberg, H., Löfdahl, P.-Å., Tschapalda, K., Uhlén, M., Tolmachev, V., Nygren, P.-Å., Ståhl, S., Affinity recovery of eight HER2-binding affibody variants using an anti-idiotypic affibody molecule as capture ligand, *Protein Expression and Purification*, 76, 127-135, **2011**.
- [66] Heller, M., von der Ohe, M., Kleene, R., Mohajeri, M. H., Schachner, M., The immunoglobulin-superfamily molecule basigin is a binding protein for oligomannosidic carbohydrates: An anti-idiotypic approach, *Journal of Neurochemistry*, 84, 557-565, **2003**.
- [67] Routsias, J.G., Touloupi, E., Dotsika, E., Moulia, A., Tsikaris, V., Sakarellos, C., Sakarellos-Daitsiotis, M., Moutsopoulos, H.M., Tzioufas, A.G., Unmasking the anti-La/SSB response in sera from patients with Sjogren's syndrome by specific blocking of anti-idiotypic antibodies to La/SSB antigenic determinants, *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 8, 293-305, **2002**.
- [68] Clarke, W., Beckwith, J.D., Jackson, A., Reynolds, B., Karle, E.M., Hage, D. S., Antibody immobilization to high-performance liquid chromatography supports: Characterization of maximum loading capacity for intact immunoglobulin G and Fab fragments, *Journal of Chromatography A*, 888, 13-22, **2000**.
- [69] Sakhnini, L.I., Pedersen, A.K., Ahmadian, H., Hansen, J.-J., Bülow, L., Dainiak, M., Designing monoclonal antibody fragment-based affinity resins

- with high binding capacity by thiol-directed immobilisation and optimisation of pore/ligand size ratio, *Journal of Chromatography A*, 1468, 143-153, **2016**.
- [70] Delaunay, N., Pichon, V., Hennion, M.-C., Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 745, 15-37, **2000**.
- [71] Sakamoto, S., Nagamitsu, R., Yusakul, G., Miyamoto, T., Tanaka, H., Morimoto, S., Ultrasensitive immunoassay for monocrotaline using monoclonal antibody produced by N, N'-carbonyldiimidazole mediated hapten-carrier protein conjugates, *Talanta*, 168, 67-72, **2017**.
- [72] Nisnevitch, M., Firer, M.A., The solid phase in affinity chromatography: Strategies for antibody attachment, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 467-480, **2001**.
- [73] Berruex, L.G., Freitag, R., Tennikova, T.B., Comparison of antibody binding to immobilized group specific affinity ligands in high performance monolith affinity chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 95-104, **2000**.
- [74] Johnsson, B., Löfås, S., Lindquist, G., Edström, Å., Hillgren, R.-M.M., Hansson, A., Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies, *Journal of Molecular Recognition*, 8, 125-131, **1995**.
- [75] Lu, B., Smyth, M.R., O'Kennedy, R., Tutorial review. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors, *The Analyst*, 121, 29R, **1996**.
- [76] Ingavle, G.C., Baillie, L.W.J., Zheng, Y., Lis, E.K., Savina, I.N., Howell, C.A., Mikhalovsky, S.V., Sandeman, S.R., Affinity binding of antibodies to supermacroporous cryogel adsorbents with immobilized protein A for removal of anthrax toxin protective antigen, *Biomaterials*, 50, 140-153, **2015**.
- [77] 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, 1078-1083, **2011**.
- [78] Alkan, H., Bereli, N., Baysal, Z., Denizli, A. Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel, *Biochemical Engineering Journal*, 45, 201-208, **2009**.
- [79] Gretch, D.R., Suter, M., Stinski, M.F., The use of biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin affinity chromatography to isolate herpesvirus hydrophobic proteins or glycoproteins, *Analytical Biochemistry*, 163, 270-277, **1987**.
- [80] Davenport, K. R., Smith, C. A., Hofstetter, H., Horn, J. R., Hofstetter, O., Site-directed immobilization of a genetically engineered anti-methotrexate antibody via an enzymatically introduced biotin label significantly increases the binding capacity of immunoaffinity columns, *Journal of Chromatography B*, 1021, 114-121, **2016**.
- [81] Gerdon, A. E., *Peptide Epitope Functionalized Monolayer-Protected Clusters*

For Life Science Applications, Doktora Tezi, Vanderbilt Üniversitesi, Nashville, Tennessee **2006**.

- [82] Mukherjee, P., Roy, P., Purification and identification of trichloroethylene induced proteins from *Stenotrophomonas maltophilia* PM102 by immunoaffinity-chromatography and MALDI-TOF Mass spectrometry, *SpringerPlus*, 2, 207, **2013**.
- [83] Subramanian, A., Immunoaffinity Chromatography, *Molecular Biotechnology*, 20, 041-048, **2002**.
- [84] Chen, L., Xu, S., Li, J., Recent advances in molecular imprinting technology: Current status, challenges and highlighted applications, *Chemical Society Reviews*, 40, 2922, **2011**.
- [85] Sellergren, B., Noncovalent molecular imprinting: Antibody-like molecular recognition in polymeric network materials, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 16, 310-320, **1997**.
- [86] Holliger, P., Hoogenboom, H.R., Artificial antibodies and enzymes: Mimicking nature and beyond, *Trends in Biotechnology*, 13, 7-9, **1995**.
- [87] Wackerlig, J., Schirhagl, R., Applications of molecularly imprinted polymer nanoparticles and their advances toward industrial use: A review, *Analytical Chemistry*, 88, 250-261, **2016**.
- [88] Kuwata, T., Uchida, A., Takano, E., Kitayama, Y., Takeuchi, T., Molecularly imprinted polymer arrays as synthetic protein chips prepared by transcription-type molecular imprinting by use of protein-immobilized dots as stamps, *Analytical Chemistry*, 87, 11784-11791, **2015**.
- [89] Zhang, Z., Zhang, X., Liu, B., Liu, J., Molecular Imprinting on inorganic nanozymes for hundred-fold enzyme specificity, *Journal of the American Chemical Society*, 139, 5412-5419, **2017**.
- [90] Czulak, J., Guerreiro, A., Metran, K., Canfarotta, F., Goddard, A., Cowan, R. H., Trochimczuk, A. W., Piletsky, S., Formation of target-specific binding sites in enzymes: Solid-phase molecular imprinting of HRP, *Nanoscale*, 8, 11060-11066, **2016**.
- [91] Mourão, C.A., Bokeloh, F., Xu, J., Prost, E., Duma, L., Merlier, F., Bueno, S. M. A., Haupt, K., Tse Sum Bui, B. Dual-oriented solid-phase molecular imprinting: Toward selective artificial receptors for recognition of nucleotides in water, *Macromolecules*, 50, 7484-7490, **2017**.
- [92] Cieplak, M., Kutner, W., Artificial biosensors: How can molecular imprinting mimic biorecognition?, *Trends in Biotechnology*, 34, 922-941, **2016**.
- [93] Cieplak, M., Szwabinska, K., Sosnowska, M., Chandra, B.K.C., Borowicz, P., Noworyta, K., D'Souza, F., Kutner, W., Selective electrochemical sensing of human serum albumin by semi-covalent molecular imprinting, *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 960-966, **2015**.
- [94] Shrivastav, A.M., Usha, S.P., Gupta, B.D., Fiber optic profenofos sensor based on surface plasmon resonance technique and molecular imprinting, *Biosensors Bioelectronics*, 79, 150-157, **2016**.
- [95] Zhang, L.-P., Tang, S.-H., Mo, C.-E., Wang, C., Huang, Y.-P., Liu, Z.-S.,

- Synergistic effect of liquid crystal and polyhedral oligomeric silsesquioxane to prepare molecularly imprinted polymer for paclitaxel delivery, *European Polymer Journal*, 98, 226-236, **2018**.
- [96] Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., Li, J. Molecular imprinting: Perspectives and applications, *Chemical Society Reviews*, 45, 2137-2211, **2016**.
- [97] Vasapollo, G., Sole, R. Del , Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scorrano, S., Mele, G., Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5908-5945, **2011**.
- [98] Polyakov, M.V., Adsorption properties and structure of silica gel, *Zhurnal Fizicheskoi Khimii*, 2, 799-805, **1931**.
- [99] Pauling, L., A Theory of the structure and process of formation of antibodies*, *Journal of the American Chemical Society*, 62, 2643-2657, **1940**.
- [100] Pauling, L., Campbell, D.H., The manufacture of antibodies *in vitro*, *The Journal of Experimental Medicine*, 76, 211-220, **1942**.
- [101] Pauling, L., Campbell, D.H., The production of antibodies *in vitro*, *Science*, 95, 440-441, **1942**.
- [102] Dickey, F.H., The preparation of specific adsorbents, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 35, 227-229 **1949**.
- [103] Dickey, F.H., Specific adsorption, *The Journal of Physical Chemistry*, 59, 695-707, **1955**.
- [104] Curti, R., Colombo, U., Separazione degli antipodi ottici dell'acido canfosolfonico mediante cromatografia su assorbenti specifici, *La Chimica e l'Industria*, 23, 103, **1951**.
- [105] Curti, R., Colombo, U., Clerici, F., Cromatografia con adsorbenti specifici, *Gazzetta Chimica Italiana*, 82, 491-502, **1952**.
- [106] Curti, R. Colombo, U., Chromatography of stereoisomers with "tailor made" compounds, *Journal of the American Chemical Society*, 74, 3961-3961, **1952**.
- [107] Patrikeev, V.V., Sholin, A.F., Nikiforova, I.A., Specifically formed silica gels and a method of separating complex mixtures of organic substances, *Bulletin of the Academy of Sciences, USSR Division of Chemical Science* , 12, 938-941, **1963**.
- [108] Klabunovskii, E.I., Agronomov, A.E., Volkova, L.M., Balandin, A.A., Adsorption of the racemic mixture and the (+) isomer of butanol-2 on stereospecific silica gel, *Bulletin of the Academy of Sciences, USSR Division of Chemical Science*, 12, 208-213, **1963**.
- [109] Kosmatyi, E.S., Chebot'ko, K.A., Galinskaya, V.I., Strelko, V.V., Determination of dikvat and parakvat in a mixture by method of thin-layer chromatography with use of a specific silica-gel, *Zhurnal Analiticheskoi Khimii*, 29, 168-170, **1974**.
- [110] Erlenmeyer, H., Bartels, H., Über das Problem der Ähnlichkeit in der Chemie Dünnschichtchromatographie mit spezifisch adsorbierenden Silikagelen I,

Helvetica Chimica Acta, 47, 46-51, **1964**.

- [111] Patrikeev, V., Smirnova, Z., Maksimova, G., Some biological properties of specifically formed silica, *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 146, 707-709 **1962**.
- [112] Patrikeev, V., Balandin, A., Klabunovskii, E., Mardaszew, J., Maksimova, G., Selectivity of an adsorbent produced in the presence of bacteria with respect to optical isomers, *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 132, 850-852, **1960**.
- [113] Patrikeev, V., Kozarenko, T., Balandin, A., On the specific polycondensation of amino acid esters, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Otd. Khim. Nauk*, 170-171, **1962**.
- [114] Samarth, N.B., Kamble, V., Mahanwar, P.A., Rane, A.V., Abitha, V.K., A historical perspective and the development of molecular imprinting polymer-A review, *Chemistry International*, 1, 202-210, **2015**.
- [115] Wulff, G., Sarhan, A., The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 11, 341-344, **1972**.
- [116] Takagishi, T., Klotz, I.M., Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages, *Biopolymers*, 11, 483-491, **1972**.
- [117] Wulff, G., Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates—a way towards artificial antibodies, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34, 1812-1832, **1995**.
- [118] Arshady, R., Mosbach, K., Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization, *Die Makromolekulare Chemie*, 182, 687-692, **1981**.
- [119] Fujii, Y., Matsutani, K., Kikuchi, K., Formation of a specific co-ordination cavity for a chiral amino acid by template synthesis of a polymer Schiff base cobalt(III) complex, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 7, 415-417, **1985**.
- [120] Dhal, P.K., Arnold, F.H., Template-mediated synthesis of metal-complexing polymers for molecular recognition, *Journal of the American Chemical Society*, 113, 7417-7418, **1991**.
- [121] Dhal, P.K., Arnold, F.H., Metal-coordination interactions in the template-mediated synthesis of substrate-selective polymers: Recognition of bis(imidazole) substrates by copper(II) iminodiacetate containing polymers, *Macromolecules*, 25, 7051-7059, **1992**.
- [122] Matsui, J., Nicholls, I.A., Takeuchi, T., Mosbach, K., Karube, I., Metal ion mediated recognition in molecularly imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta*, 335, 71-77, **1996**.
- [123] Whitcombe, M.J., Rodriguez, M.E., Villar, P., Vulfson, E.N., A New method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: Synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol, *Journal of the American Chemical Society*, 117, 7105-7111, **1995**.
- [124] Turner, N.W., Jeans, C.W., Brain, K.R., Allender, C.J., Hlady, V., Britt, D.W., From 3D to 2D: A review of the molecular imprinting of proteins,

Biotechnology progress, 22, 1474-89, **2006**.

- [125] Ertürk, G., Mattiasson, B., Molecular imprinting techniques used for the preparation of biosensors, *Sensors*, 17, 288, **2017**.
- [126] Yan, H., Row, K., Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer, *International Journal of Molecular Sciences*, 7, 155-178, **2006**.
- [127] Wulff, G., Grobe-Einsler, R., Vesper, W., Sarhan, A., Enzyme-analogue built polymers, 5. On the specificity distribution of chiral cavities prepared in synthetic polymers, *Die Makromolekulare Chemie*, 178, 2817-2825, **1977**.
- [128] Caro, E., Masqué, N., Marcé, R. M., Borrull, F., Cormack, P.A., Sherrington, D.C., Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples, *Journal of Chromatography A*, 963, 169-178, **2002**.
- [129] Qi, P., Wang, J., Wang, L., Li, Y., Jin, J., Su, F., Tian, Y., Chen, J., Molecularly imprinted polymers synthesized via semi-covalent imprinting with sacrificial spacer for imprinting phenols, *Polymer*, 51, 5417-5423, **2010**.
- [130] Hancock, R.D., Martell, A.E., Ligand design for selective complexation of metal ions in aqueous solution. *Chemical Reviews*, 89, 1875-1914, **1989**.
- [131] Lv, Y., Tan, T., Svec, F., Molecular imprinting of proteins in polymers attached to the surface of nanomaterials for selective recognition of biomacromolecules, *Biotechnology Advances*, 31, 1172-1186, **2013**.
- [132] Ge, Y., Turner, A.P.F., Too large to fit? Recent developments in macromolecular imprinting, *Trends in Biotechnology*, 26, 218-224, **2008**.
- [133] Xing, R., Wang, S., Bie, Z., He, H., Liu, Z., Preparation of molecularly imprinted polymers specific to glycoproteins, glycans and monosaccharides via boronate affinity controllable-oriented surface imprinting, *Nature Protocols*, 12, 964-987, **2017**.
- [134] Abdollahi, E., Abdouss, M., Salami-Kalajahi, M., Mohammadi, A., Molecular recognition ability of molecularly imprinted polymer nano- and micro-particles by reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization, *Polymer Reviews*, 56, 557-583, **2016**.
- [135] Nishino, H., Huang, C.-S., Shea, K.J., Selective protein capture by epitope imprinting, *Angewandte Chemie International Edition*, 45, 2392-2396, **2006**.
- [136] Rachkov, A. Minoura, N. Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1544, 255-266, **2001**.
- [137] Tai, D.-F., Lin, C.-Y., Wu, T.-Z., Chen, L.-K. Recognition of dengue virus protein using epitope-mediated molecularly imprinted film, *Analytical Chemistry*, 77, 5140-5143, **2005**.
- [138] Tai, D.-F., Lin, C.-Y., Wu, T.-Z., Huang, J.-H., Shu, P.-Y. Artificial receptors in serologic tests for the early diagnosis of dengue virus infection, *Clinical chemistry*, 52, 1486-91, **2006**.
- [139] Brown, M.E., Puleo, D.A., Protein binding to peptide-imprinted porous silica

- scaffolds, *Chemical Engineering Journal*, 137, 97-101, **2008**.
- [140] Lu, C.-H., Zhang, Y., Tang, S.-F., Fang, Z.-B., Yang, H.-H., Chen, X., Chen, G.-N., Sensing HIV related protein using epitope imprinted hydrophilic polymer coated quartz crystal microbalance, *Biosensors and Bioelectronics*, 31, 439-444, **2012**.
 - [141] Lozinsky, V.I., Vainerman, E.S., Titova, E.F., Belavtseva, E.M., Rogozhin, S.V., Study of cryostructurization of polymer systems, *Colloid & Polymer Science*, 262, 769-774, **1984**.
 - [142] Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H., Mattiasson, B., Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends in Biotechnology*, 21, 445-451, **2003**.
 - [143] Lozinsky, V.I., A brief history of polymeric cryogels. *Polymeric Cryogels. Advances in Polymer Science*, (eds: Okay, O.), Springer, Cham, 1-48, **2014**.
 - [144] Lozinsky, V.I., Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application, *Russian Chemical Reviews*, 71, 489-511, **2002**.
 - [145] Volkmer, T., Magalhães, J., Sousa, V., Santos, L., Burguera, E., Blanco, F., Román, J., Rodríguez-Lorenzo, L., 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate/(2-hydroxyethyl) methacrylate/ α -tricalcium phosphate cryogels for bone repair, preparation and evaluation of the biological response of human trabecular bone-derived cells and mesenchymal stem cells, *Polymers*, 6, 2510-2525, **2014**.
 - [146] Kumar, A., Mishra, R., Reinwald, Y., Bhat, S., Cryogels: Freezing unveiled by thawing, *Materials Today*, 13, 42-44, **2010**.
 - [147] Yang, C., Zhang, Y., Cao, W.-Q., Yan, Y.-N., Wang, J., Ji, X.-F., Zhong, T.-L., Wang, Y., Ice squeezing induced multicolor fluorescence emissions from polyacrylamide cryogels, *Journal of Fluorescence*, 28, 337-345, **2018**.
 - [148] Çetin, K., Perçin, I., Denizli, F., Denizli, A., Tentacle-type immobilized metal affinity cryogel for invertase purification from *Saccharomyces cerevisiae*, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45, 1431-1439, **2017**.
 - [149] Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhlovsky, S., Galaev, I.Y., Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Soft Matter*, 1, 303, **2005**.
 - [150] Çetin, K., Alkan, H., Bereli, N., Denizli, A., Molecularly imprinted cryogel as a pH-responsive delivery system for doxorubicin, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 54, 502-508, **2017**.
 - [151] Stejskal, J., Bober, P., Conducting polymer colloids, hydrogels, and cryogels: Common start to various destinations, *Colloid and Polymer Science*, 296, 989-994, **2018**.
 - [152] Kirsebom, H., Topgaard, D., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., Modulating the porosity of cryogels by influencing the nonfrozen liquid phase through the addition of inert solutes, *Langmuir*, 26, 16129-16133, **2010**.
 - [153] Okay, O., Lozinsky, V.I., Synthesis and structure-property relationships of cryogels. *Polymeric Cryogels. Advances in Polymer Science* (eds: Okay, O.),

- Springer, Cham, 103-158, **2014**.
- [154] Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Andrews, N.C., Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism, *Cell*, 117, 285-297, **2004**.
 - [155] Osborne, T.B., Campbell, G.F., The protein constituents of egg white, *Journal of the American Chemical Society*, 22, 422-450, **1900**.
 - [156] Schade, A.L., Caroline, L., Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Science (Washington)*, 100, 14-15, **1880**.
 - [157] Schade, A.L., Caroline, L., An Iron-binding component in human blood plasma, *Science (Washington)*, 104, 340-341, **1946**.
 - [158] Huebers, H.A., Finch, C.A., The physiology of transferrin and transferrin receptors, *Physiological reviews*, 67, 520-582, **1987**.
 - [159] Aisen, P., Listowsky, I., Iron transport and storage proteins, *Annual Review of Biochemistry*, 49, 357-393, **1980**.
 - [160] Brock, J.H., Esparza, I., Failure of reticulocytes to take up iron from lactoferrin saturated by various methods, *British Journal of Haematology*, 42, 481-483, **1979**.
 - [161] Lönnerdal, B., Iyer, S., Lactoferrin: Molecular structure and biological function, *Annual Review of Nutrition*, 15, 93-110, **1995**.
 - [162] Valenti, P., Antonini, G., Fanelli, M.R., Orsi, N., Antonini, E., Antibacterial activity of matrix-bound ovotransferrin, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 21, 840-841, **1982**.
 - [163] Alderton, G., Ward, W.H., Fevold, H.L., Identification of the bacteria-inhibiting, iron binding protein of egg white as conalbumin, *Archives of Biochemistry*, 11, 9-13, **1946**.
 - [164] Brown, J.P., Hewick, R.M., Hellström, I., Hellström, K. E., Doolittle, R.F., Dreyer, W.J., Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin, *Nature*, 296, 171-173, **1982**.
 - [165] Food, M.R., Sekyere, E.O., Richardson, D.R., The soluble form of the membrane-bound transferrin homologue, melanotransferrin, inefficiently donates iron to cells via nonspecific internalization and degradation of the protein, *European Journal of Biochemistry*, 269, 4435-4445, **2002**.
 - [166] Kwok, J.C., Richardson, D.R., The iron metabolism of neoplastic cells: Alterations that facilitate proliferation?, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42, 65-78, **2002**.
 - [167] Amani, S., Naeem, A., Transition of transferrin from native to fibrillar state: An implication for amyloid-linked diseases, *Biochemical Engineering Journal*, 91, 120-128, **2014**.
 - [168] Welch, S., A comparison of the structure and properties of serum transferrin from 17 animal species, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 97, 417-427, **1990**.
 - [169] Gomme, P.T., McCann, K.B., Bertolini, J., Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions, *Drug Discovery Today*, 10, 267-273, **2005**.

- [170] Baldwin, G.S., Comparison of transferrin sequences from different species, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 106, 203-218, **1993**.
- [171] Hall, D.R., Hadden, J.M., Leonard, G.A., Bailey, S., Neu, M., Winn, M., Lindley, P.F., The crystal and molecular structures of diferric porcine and rabbit serum transferrins at resolutions of 2.15 and 2.60 Å, respectively, *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 58, 70-80, **2002**.
- [172] Williams, J., The evolution of transferrin, *Trends in Biochemical Sciences*, 7, 394-397, **1982**.
- [173] Macgillivray, R.T.A., Mendezt, E., Sinha, S.K., Suttont, M.R., Lineback-Zins, J., Brew, K., The complete amino acid sequence of human serum transferrin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 2504-2508, **1982**.
- [174] Sipe, D.M., Murphy, R.F., Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH, *Journal of Biological Chemistry*, 266, 8002-8007, **1991**.
- [175] Wally, J., Halbrooks, P. J., Vonnrhein, C., Rould, M. A., Everse, S. J., Mason, A. B., Buchanan, S. K. The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding, *Journal of biological chemistry*, 281, 24934-24944, **2006**.
- [176] Munro, H.N., Linder, M.C., Ferritin: Structure, biosynthesis, and role in iron metabolism, *Physiological reviews*, 58, 317-96, **1978**.
- [177] Conrad, M.E., Umbreit, J.N., Moore, E.G., Iron absorption and transport, *The American Journal of the Medical Sciences*, 318, 213-229, **1999**.
- [178] Quintana, C., Bellefqih, S., Laval, J. Y., Guerquin-Kern, J.L., Wu, T. D., Avila, J., Ferrer, I., Arranz, R., Patiño, C., Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level, *Journal of Structural Biology*, 153, 42-54, **2006**.
- [179] Van Campenhout, A., Van Campenhout, C.M., Lagrou, A.R., Manuel-y-Keenoy, B., Transferrin modifications and lipid peroxidation: Implications in diabetes mellitus, *Free Radical Research*, 37, 1069-1077, **2003**.
- [180] Le, N.T.V., Richardson, D.R., The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1603, 31-46, **2002**.
- [181] Baker, H.M., Baker, E.N., Lactoferrin and Iron: Structural and dynamic aspects of binding and release, *BioMetals*, 17, 209-216, **2004**.
- [182] Aisen, P., Aasa, R., Malmström, B.G., Vännngård, T., Bicarbonate and the binding of iron to transferrin, *Journal of Biological Chemistry*, 242, 2484-2490, **1967**.
- [183] Mackenzie, B., Garrick, M.D., Iron imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289, G981-G986, **2005**.
- [184] Baker, E.N., Rumball, S.V., Anderson, B.F., Transferrins: Insights into

- structure and function from studies on lactoferrin, *Trends in Biochemical Sciences*, 12, 350-353, **1987**.
- [185] Baker, H.M., Anderson, B.F., Baker, E.N., Dealing with iron: Common structural principles in proteins that transport iron and heme, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 3579-3583, **2003**.
 - [186] Baker, E.N., Baker, H.M., Kidd, R.D., Lactoferrin and transferrin: Functional variations on a common structural framework, *Biochemistry and Cell Biology*, 80, 27-34, **2002**.
 - [187] Guha Thakurta, P., Choudhury, D., Dasgupta, R., Dattagupta, J. K., IUCr Structure of diferric hen serum transferrin at 2.8 Å resolution, *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 59, 1773-1781, **2003**.
 - [188] Aisen, P., Leibman, A., Zweier, J., Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin, *Journal of Biological Chemistry*, 253, 1930-1937, **1978**.
 - [189] Sun, H., Cox, M.C., Li, H., Sadler, P.J., Rationalisation of metal binding to transferrin: Prediction of metal-protein stability constants. *Metal Sites in Proteins And Models*, (eds: Hill, H. A. O., Sadler, P.J., Thomson, A.J.), Springer, Berlin, Heidelberg, 71-102, **1997**.
 - [190] Grossmann, J.G., Neu, M., Evans, R.W., Lindley, P.F., Appel, H., Hasnain, S.S., Metal-induced Conformational Changes in Transferrins, *Journal of Molecular Biology*, 229, 585-590, **1993**.
 - [191] Nakase, I., Lai, H., Singh, N.P., Sasaki, T., Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation, *International Journal of Pharmaceutics*, 354, 28-33, **2008**.
 - [192] Sun, H., Li, H., Sadler, P. J., Transferrin as a metal ion mediator, *Chemical Reviews*, 99, 2817-2842, **1999**.
 - [193] Harris, W.R., Estimation of the ferrous—transferrin binding constants based on thermodynamic studies of nickel(II)—transferrin, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 27, 41-52, **1986**.
 - [194] Quarles, C.D., Marcus, R.K., Brumaghim, J. L. Competitive binding of Fe^{3+} , Cr^{3+} , and Ni^{2+} to transferrin, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2011**, 16, 913-921.
 - [195] Beamish, M.R., Brown, E.B., A Comparison of the Behavior of ^{111}In and ^{59}Fe -labeled Transferrin on Incubation With Human and Rat Reticulocytes, *Blood*, 43, 703-711, **1974**.
 - [196] Larson, S.M., Mechanisms of localization of gallium-67 in tumors, *Seminars in Nuclear Medicine*, 8, 193-203, **1978**.
 - [197] Sargent, P.J., Farnaud, S., Evans, R.W. Structure/function overview of proteins involved in iron storage and transport, *Current Medicinal Chemistry*, 12, 2683-2693, **2005**.
 - [198] Petrak, J., Vyoral, D. Hephaestin—a ferroxidase of cellular iron export, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 1173-1178, **2005**.

- [199] Osski, S., Johnson, D.A., Frieden, E. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum, *Journal of Biological Chemistry*, 241, 2746-2751, **1966**.
- [200] Young, S.P., Bomford, A., Williams, R. The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes, *Biochemical Journal*, 219, 505-10, **1984**.
- [201] Huebers, H.A., Csiba, E., Huebers, E., Finch, C.A., Competitive advantage of diferric transferrin in delivering iron to reticulocytes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, 300-304, **1983**.
- [202] Yeh, Y., Iwai, S., Feeney, R.E., Conformations of denatured and renatured ovotransferrin, *Biochemistry*, 18, 882-889, **1979**.
- [203] Palmour, R.M., Sutton, H.E., Vertebrate transferrins. Molecular weights, chemical compositions, and iron-binding studies, *Biochemistry*, 10, 4026-4032, **1971**.
- [204] Paterson, S., Armstrong, N.J., Iacopetta, B.J., McArdle, H.J., Morgan, E.H., Intravesicular pH and iron uptake by immature erythroid cells, *Journal of Cellular Physiology*, 120, 225-232, **1984**.
- [205] Grossmann, J.G., Mason, A.B., Woodworth, R.C., Neu, M., Lindley, P.F., Hasnain, S.S., Asp ligand provides the trigger for closure of transferrin molecules: direct evidence from X-ray scattering studies of site-specific mutants of the N-terminal half-molecule of human transferrin, *Journal of Molecular Biology*, 231, 554-558, **1993**.
- [206] Schulman, H.M., Martinez-Medellin, J., Sidloi, R. The reticulocyte-mediated release of iron and bicarbonate from transferrin: Effect of metabolic inhibitors, *Biochimica et Biophysica Acta*, 343, 529-534, **1974**.
- [207] He, Q.-Y., Mason, A.B., Tam, B.M., MacGillivray, R.T.A., Woodworth, R.C., Dual role of Lys206–Lys296 interaction in human transferrin N-lobe: iron-release trigger and anion-binding site, *Biochemistry*, 38, 9704-9711, **1999**.
- [208] Hémadi, M., Kahn, P.H., Miquel, G., Chahine, J.-M.E.H., Transferrin's mechanism of interaction with receptor 1, *Biochemistry*, 43, 1736-1745, **2004**.
- [209] Widera, A., Norouziyan, F., Shen, W.-C. Mechanisms of TfR-mediated transcytosis and sorting in epithelial cells and applications toward drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 1439-1466, **2003**.
- [210] Richardson, D.R., Ponka, P., The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1331, 1-40, **1997**.
- [211] Egyed, A., The significance of transferrin-bound bicarbonate in the uptake of iron by reticulocytes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 304, 805-813, **1973**.
- [212] Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S.C., Walz, T., Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex, *Cell*, 116, 565-576, **2004**.
- [213] Ming Qian, Z., Li, H., Sun, H., Ho, K., Targeted drug delivery via the transferrin receptor- Mediated Endocytosis Pathway, *Pharmacological Reviews*, 54, 561-587, **2002**.

- [214] Laske, D.W., Ilercil, O., Akbasak, A., Youle, R.J., Oldfield, E.H., Efficacy of direct intratumoral therapy with targeted protein toxins for solid human gliomas in nude mice, *Journal of Neurosurgery*, 80, 520-526, **1994**.
- [215] Laske, D.W., Youle, R.J., Oldfield, E.H., Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors, *Nature Medicine*, 3, 1362-1368, **1997**.
- [216] Li, X., Ding, L., Xu, Y., Wang, Y., Ping, Q., Targeted delivery of doxorubicin using stealth liposomes modified with transferrin, *International Journal of Pharmaceutics*, 373, 116-123, **2009**.
- [217] Cui, Y., Xu, Q., Chow, P. K.-H., Wang, D., Wang, C.-H. Transferrin-conjugated magnetic silica PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin and paclitaxel for brain glioma treatment, *Biomaterials*, 34, 8511-8520, **2013**.
- [218] Li, J.-L., Wang, L., Liu, X.-Y., Zhang, Z.-P., Guo, H.-C., Liu, W.-M., Tang, S.-H., *In vitro* cancer cell imaging and therapy using transferrin-conjugated gold nanoparticles, *Cancer Letters*, 274, 319-326, **2009**.
- [219] Dufès, C., Al Robaian, M., Somani, S., Transferrin and the transferrin receptor for the targeted delivery of therapeutic agents to the brain and cancer cells, *Therapeutic Delivery*, 4, 629-640, **2013**.
- [220] Lim, C.-J., Shen, W.-C., Transferrin-oligomers as potential carriers in anticancer drug delivery, *Pharmaceutical Research*, 21, 1985-1992, **2004**.
- [221] Memmedova, T., Armutcu, C., Uzun, L., Denizli, A., Polyglycidyl methacrylate based immunoaffinity cryogels for insulin adsorption, *Materials Science and Engineering: C*, 52, 178-185, **2015**.
- [222] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254, **1976**.
- [223] Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., Wan, X., Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78, 1187-1195, **2011**.
- [224] Hussain, S., Pang, Y., Surface geometry of tryptophan adsorbed on gold colloidal nanoparticles, *Journal of Molecular Structure*, 1096, 121-128, **2015**.
- [225] Bereli, N., Andaç, M., Baydemir, G., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A., Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels, *Journal of Chromatography A*, 1190, 18-26, **2008**.
- [226] Baydemir, G., Denizli, A. Heparin removal from human plasma using molecular imprinted cryogels, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 43, 403-412, **2015**.
- [227] Welch, S., *Transferrin: The Iron Carrier*, CRC Press, Boca Raton, Florida **1992**.
- [228] Dorvel, B., Reddy, B., Bashir, R., Bashir, R. Effect of biointerfacing linker chemistries on the sensitivity of silicon nanowires for protein detection, *Analytical chemistry*, 85, 9493-9500, **2013**.
- [229] Andac, M., Galaev, I., Denizli, A., Dye attached poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel for albumin depletion from human serum, *Journal of*

- Separation Science*, 35, 1173-1182, **2012**.
- [230] Esen, C., Andac, M., Bereli, N., Say, R., Henden, E., Denizli, A., Highly selective ion-imprinted particles for solid-phase extraction of Pb²⁺ ions, *Materials Science and Engineering: C*, 29, 2464-2470, **2009**.
- [231] Langmuir, I., The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids, *Journal of the American Chemical Society*, 38, 2221-2295, **1916**.
- [232] Langmuir, I., The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum, *Journal of the American Chemical Society*, 40, 1361-1403, **1918**.
- [233] Wan Ngah, W.S., Endud, C.S., Mayanar, R., Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads, *Reactive and Functional Polymers*, 50, 181-190, **2002**.
- [234] Weber, T.W., Chakravorti, R. K., Pore and solid diffusion models for fixed-bed adsorbers, *AIChE Journal*, 20, 228-238, **1974**.
- [235] Freundlich, H., Über die adsorption in lösungen, *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 57U, 385-470, **1907**.
- [236] Al-Qodah, Z., Lafi, W.K., Al-Anber, Z., Al-Shannag, M., Harahsheh, A. Adsorption of methylene blue by acid and heat treated diatomaceous silica, *Desalination*, 217, 212-224, **2007**.
- [237] Garg, U., Kaur, M.P., Jawa, G.K., Sud, D., Garg, V.K., Removal of cadmium (II) from aqueous solutions by adsorption on agricultural waste biomass, *Journal of Hazardous Materials*, 154, 1149-1157, **2008**.
- [238] Nassar, N.N., Rapid removal and recovery of Pb(II) from wastewater by magnetic nanoadsorbents, *Journal of Hazardous Materials*, 184, 538-546, **2010**.
- [239] Tang, H., Zhou, W., Zhang, L., Adsorption isotherms and kinetics studies of malachite green on chitin hydrogels, *Journal of Hazardous Materials*, 209-210, 218-225, **2012**.
- [240] Hameed, B.H., Tan, I.A.W., Ahmad, A.L., Adsorption isotherm, kinetic modeling and mechanism of 2,4,6-trichlorophenol on coconut husk-based activated carbon, *Chemical Engineering Journal*, 144, 235-244, **2008**.
- [241] Mittal, A., Gajbe, V., Mittal, J., Removal and recovery of hazardous triphenylmethane dye, methyl violet through adsorption over granulated waste materials, *Journal of Hazardous Materials*, 150, 364-375, **2008**.
- [242] Markandeya, Shukla, S.P., Kisku, G.C., Linear and non-linear kinetic modeling for adsorption of disperse dye in batch process, *Research Journal of Environmental Toxicology*, 9, 320-331, **2015**.
- [243] Wu, F.-C., Tseng, R.-L., Juang, R.-S., Comparisons of porous and adsorption properties of carbons activated by steam and KOH, *Journal of Colloid and Interface Science*, 283, 49-56, **2005**.
- [244] Denizli, A., Köktürk, G., Yavuz, H., Pişkin, E., Albumin adsorption from aqueous solutions and human plasma in a packed-bed column with Cibacron Blue F3GA-Zn(II) attached poly(EGDMA-HEMA) microbeads, *Reactive and Functional Polymers*, 40, 195-203, **1999**.

- [245] Çorman, M.E., Armutcu, C., Özkara, S., Uzun, L., Denizli, A., Molecularly imprinted cryogel cartridges for the specific filtration and rapid separation of interferon alpha, *RSC Advances*, 5, 45015-45026, **2015**.
- [246] Szwed, M., Matusiak, A., Laroche-Clary, A., Robert, J., Marszalek, I., Jozwiak, Z., Transferrin as a drug carrier: Cytotoxicity, cellular uptake and transport kinetics of doxorubicin transferrin conjugate in the human leukemia cells, *Toxicology in Vitro*, 28, 187-197, **2014**.
- [247] Barroso, A., Giménez, E., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., Analysis of human transferrin glycopeptides by capillary electrophoresis and capillary liquid chromatography-mass spectrometry. Application to diagnosis of alcohol dependence, *Analytica Chimica Acta*, 804, 167-175, **2013**.
- [248] Rivat, C., Sertillanges, P., Patin, E., Stoltz, J.F., Single-step method for purification of human transferrin from a by-product of chromatographic fractionation of plasma, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 576, 71-77, **1992**.
- [249] Skinner, M.K., Cosand, W.L., Griswold, M.D., Purification and characterization of testicular transferrin secreted by rat Sertoli cells, *The Biochemical journal*, 218, 313-320, **1984**.
- [250] Nynca, J., Dietrich, M. A., Adamek, M., Steinhagen, D., Bilińska, B., Hejmej, A., Ciereszko, A. Purification, characterization and expression of transferrin from rainbow trout seminal plasma, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 208, 38-46, **2017**.
- [251] Zhang, D., Nandi, S., Bryan, P., Pettit, S., Nguyen, D., Santos, M. A., Huang, N., Expression, purification, and characterization of recombinant human transferrin from rice (*Oryza sativa* L.), *Protein Expression and Purification*, 74, 69-79, **2010**.
- [252] Van Gelder, W., Huijskes-Heins, M.I.E., Hukshorn, C.J., de Jeu-Jaspars, C.M.H., Van Noort, W.L., Van Eijk, H.G., Isolation, purification and characterization of porcine serum transferrin and hemopexin, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 111, 171-179, **1995**.
- [253] Winzerling, J.J., Nez, P., Porath, J., Law, J.H., Rapid and efficient isolation of transferrin and ferritin from *Manduca sexta*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25, 217-224, **1995**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Ad Soyadı : Kemal Çetin
Doğum Yeri : Konya
Doğum Tarihi : 23.12.1988
Medeni Hali : Evli
E-posta : kemalcetin@hacettepe.edu.tr
Adresi : Hacı Hasan mah. Hacı Hasanbaşı cd. No: 109/8
Karatay/Konya

Eğitim

Lise : Karatay Süleyman Demirel Milli Piyango Anadolu Lisesi,
Konya
Lisans : Fatih Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü,
İstanbul
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara
Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İyi düzeyde

İş Deneyimi

2011 - : Araştırma Görevlisi, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen
Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı
2012 - 2018 : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri
Enstitüsü, Kimya Bölümü

Deneyim Alanları

Polimer, kriyojeller, moleküler baskılama, afinite kromatografisi, kontrollü salım sistemleri, ilaç teslim sistemleri, kütle spektrometresi,

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 09/07/2018

Tez Başlığı / Konusu: Mikrokriyojeller ile Transferrin Saflaştırılması

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 107 sayfalık kısmına ilişkin, 09/07/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

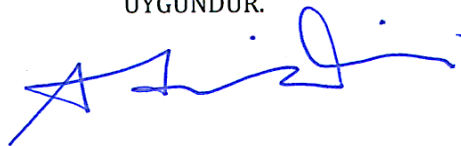
Gereğini saygılarımla arz ederim.


09/07/2018

Adı Soyadı: Kemal ÇETİN
Öğrenci No: N13141241
Anabilim Dalı: Kimya
Programı: Doktora
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.



(Prof. Dr. Adil DENİZLİ)