

**TRANSFERRİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN
MANYETİK İMMÜNOAFİNİTE MİKROKÜRELERİN
HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF MAGNETIC
IMMUNOAFFINITY MICROBEADS FOR TRANSFERRIN
PURIFICATION**

DİLARA SAÇLIGİL

**PROF.DR. SERAP ŞENEL
PROF.DR. HANDAN YAVUZ ALAGÖZ
Tez Danışmanları**

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyokimya Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Dilara SAÇLIGİL' in hazırladığı “**Transferrin Saflaştırılması için Manyetik İmmünoafinite Mikrokürelerin Hazırlanması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan

.....

Prof. Dr. Serap ŞENEL

Danışman

.....

Prof. Dr. Serdar ABACI

Üye

.....

Doç. Dr. Lokman UZUN

Üye

.....

Yard. Doç. Dr. Fatma YILMAZ

Üye

.....

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Biricik aileme ve tüm sevdiklerime,

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 atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

27.08.2014

Dilara SAÇLIGİL

ÖZET

TRANSFERRİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN MANYETİK İMMÜNOAFİNİTE MİKROKÜRELERİN HAZIRLANMASI

Dilara SAÇLIGİL

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanları:

Prof. Dr. Serap ŞENEL

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Ağustos 2014, 90 sayfa

Hücre sel demir dengesini korumak amacıyla neredeyse tüm organizmalarda hücre içi demir alımını, saklanması ve taşınmasını sağlayan transferrin adı verilen taşıyıcılar bulunmaktadır. Transferrin protein ailesi, 670-700 aminoasitten oluşan tek polipeptid zincirli ve 80 kDa moleköl ağırlığına sahip monomerik bir glikoproteindir. Kötü huylu tümörler yüksek oranda transferrin reseptörü içerdiğinden anti-kanser ilaçlar, proteinler ve genler için hedef ligand olarak transferrin kullanımı oldukça yaygındır. Transferrinin proteinlerle, ilaçlarla, makromolekül içeren hibrid sistemlerle konjugasyonu bu durumu mümkün kılmaktadır.

Transferrinin anti-kanser ilaçlarla konjugasyonu ile seçicilik ve toksisite üzerinde olumlu gelişmeler sağlanmış ve ilaç direncini düşürmesinden dolayı daha etkin bir tedavi yöntemi oluşturulmuştur. Bu özelliklerinden dolayı transferrin saflaştırma çalışmaları önem kazanmıştır.

Manyetik ayırma, biyoayırma alanında kullanılmak üzere geliştirilmiş oldukça yeni bir tekniktir. Bu yöntemin prensibi bir ligand yardımıyla hedef moleküle bağlanan manyetik partikülün yığın çözeltilerden manyetik alan gradyenti uygulanarak ayrılmasıdır. Geleneksel ayırma ile karşılaştırıldığında, hız, kesinlik ve basitliği önemli avantajlarından. Bu tez çalışmasında dispersiyon polimerizasyonu tekniği ile Fe_3O_4 nanoparçacık varlığında sentezlenmiş eş boyutlu manyetik poligliseril metakrilat (m-PGMA) mikrokürelere anti-transferrin antibadi immobilize edilerek transferrin adsorpsiyonu için yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. Elde edilen mikrokürelere Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR-ATR), taramalı elektron mikroskobu (SEM), elektron spin rezonans (ESR), termogravimetrik analiz (TGA-DTA) ve zeta boyut analizi ile karakterize edilmiştir. Kürelerin şişme özellikleri incelenmiş ve maksimum şişme oranları %52 olarak hesaplanmıştır. Yoğunluk ölçümü ile mikroküre yoğunluğu 1.08 g/cm^3 'tür. Destek maddesi olarak sentezlenen m-PGMA mikrokürelere anti-transferrin immobilizasyonu, GMA epoksi gruplarına anti-transferrin amino gruplarının nükleofilik saldırısı ile gerçekleştirilmiştir. İmmobilize olan optimum anti-transferrin miktarını bulmak amacıyla derişim taraması yapılmış ve optimum immobilize anti-transferrin miktarı 2 mg/g olarak bulunmuştur. Transferrin adsorpsiyonu optimum şartların belirlenmesi için pH, derişim, sıcaklık ve zaman taramaları yapılmıştır. Maksimum transferrin adsorpsiyon kapasitesi pH 6'da 1.65 mg/g olarak bulunmuştur. Adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü tekrarlanarak m-PGMA mikrokürelere tekrar kullanılabilir oldukları bulunmuştur. Yapay plazmadan transferrin adsorpsiyonu manyetik ortamda incelenmiştir ve adsorpsiyon kapasitesi 0.12 mg/g bulunmuştur.

Desorpsiyon işleminin transferrinin yapısında herhangi bir denatürasyona neden olmadığını ve elüe edilen transferrinin saflığını göstermek üzere SDS-PAGE çalışmaları yapılmıştır.

Anahtar sözcükler: Glisidil metakrilat, transferrin saflaştırma, manyetik ayırma, manyetik mikroküre, immünoafinite kromatografisi.

ABSTRACT

PREPARATION OF MAGNETIC IMMUNOAFFINITY MICROBEADS FOR TRANSFERRIN PURIFICATION

Dilara SAÇLIGİL

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisors:

Prof. Dr. Serap ŞENEL

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

August 2014, 90 pages

In order to maintain cellular iron homeostasis, nearly all organisms have the iron transporters called transferrin that provide cellular iron uptake, storage and transportation. The transferrin protein family is 80kDA monomeric glycoprotein of 670-700 aminoacids with single polipeptid chain. As cancer cells include lots of transferrin receptor on their surface, transferrin is widely used as target ligand for anti-cancer drugs, proteins and genes. The conjugation of transferrin with proteins, drugs and hybrid systems containing macromolecule makes this situation possible. Positive developments on selectivity and toxicity are provided by conjugation of transferrin with anti-cancer drugs. Because of these properties, transferrin purification studies are imported. Magnetic separation is a novel method developed for using in bioseperaiton field.

The main principle of this method is separation of magnetic particles bonded to target molecules from bulk solution by magnetic field gradient. Compared to conventional separation, rapidity, precision and easiness are the main advantages. In this study, a new approach is developed for transferrin adsorption by immobilizing anti-transferrin antibody on monosize magnetic poly-glycidyl methacrylate microspheres with Fe₃O₄ nanopowder by dispersion polymerization. Synthesized microspheres are characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, scanning electron microscope (SEM), electron spin resonance (ESR), thermogravimetric analysis (TGA-DTA), zeta size analysis. Swelling ratio of microspheres is investigated and calculated as 52%. Microsphere density is calculated as 1.08 g/cm³ by density analysis. Immobilization of anti-transferrin antibody on m-PGMA microspheres as a matrix is done by nucleophilic attack on amino groups of anti-transferrin. Effect of concentration is investigated for determining the optimum immobilized anti-transferrin amount and is found as 2 mg/g. Effect of pH, concentration and temperature is investigated for determining the optimum conditions for transferrin adsorption. Maximum adsorption capacity is found as 1.65 mg/g at pH 6.0. m-PGMA microspheres are found to be reusable by repeating adsorption-desorption cycle. Transferrin adsorption from artificial plasma is studied in magnetic environment and adsorption capacity is calculated as 0.12 mg/g. In order to show that the desorption studies made no denaturation and to determine the purity of eluted transferrin, SDS-PAGE studies are performed.

Key words: Glycidyl methacrylate, transferrin purification, magnetic separation, magnetic microspheres, immunoaffinity chromatography.

TEŞEKKÜR

Derin bilgilerini ve tecrübelerini her fırsatta aktaran, yol gösteren, sevgi dolu yaklaşımıyla her zaman destek olan değerli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Engin tecrübelerini ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen, rehberliğiyle, önerileriyle çalışmama her daim katkı sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Serap Şenel'e,

Tüm gülüyüzü ve sıcaklığıyla her zaman yanımda olan, çalışmalarımdaya yönümü bulmamı sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e,

Çalışmalarım boyunca en başından beri destek olup yardımlarını ve birikimlerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Dr. A. Müge Andaç'a,

Her zaman desteğini hissettiğim ve her daim yardımcı olan değerli hocam Yard. Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a,

Yüksek lisansım boyunca pozitif yaklaşımlarıyla yanımda olan, her durumda yardımlarını ve desteklerini hissettiğim sevgili arkadaşlarım Mitra Jalilzade ve Türkan Mammadova'ya,

Çalışmalarıma yardımlarını ve katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Duygu Çimen ve Monir Bakhshpour'a,

Berber çalıştığımız, koşturduğumuz, bu sürece de keyif kattığımız, büyük destekçilerim, iki can arkadaşım Simge Tanrıkulu ve Aylin Aygan'a,

Tez çalışmalarımdaya yardımlarından dolayı sevgili hocam Doç. Dr. Lokman Uzun, Nilay Bereli, Deniz Türkmen, Gözde Baydemir Peşint, Bahar Ergün, Ali Derazshamshir, İlker Koç, Semra Akgönüllü, Ilgım Göktürk, Yeşeren Saylan, Mine Dursun, Recep Üzek, Kemal Çetin, Fatma Kartal, Canan Armutçu, M. Emin Çorman, Kadir Erol, Seda Atay, Işık Perçin Demirçelik, Ahmet Hamdi Demirçelik, Aykut Arif Topçu, Sevgi Aslıyüce Çoban, Gülsu Şener, Emel Tamahkar, Rabel Soomro, Sabina Hüseyinli'ye,

İstanbul'dan Ankara'ya olan serüvenimde, her günümde, her anımda, her koşulda tüm sevgisiyle, desteğiyle ve emeğiyle yanımda olan canım Aytaç Şengül'e,

Bugünüme gelene kadar her an, tüm sevgilerini, şefkatlerini, desteklerini ve özverilerini sonsuz hissettiğim sevgili annem Birsen Saçlıgil, sevgili babam Gürsoy Saçlıgil, sevgili kardeşim Murat Saçlıgil, sevgili anneannem Ayten Şendur ve sevgili dedem Lütfi Şendur'a,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELER.....	xi
ŞEKİLLER	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Transferrin Protein Ailesi.....	5
2.1.1. Serum Transferrin.....	8
2.1.2. Ovotransferrin.....	13
2.1.3. Laktoferrin	14
2.1.4. Melanotransferrin.....	15
2.1.5. Transferrin Benzeri Diğer Proteinler	16
2.2. Manyetik Mikroküreler.....	16
2.2.1. Polimer Çekirdek – Manyetik Kabuk Yapısındaki Küreler.....	18
2.2.2. Manyetik Çekirdek – Polimer Kabuk Yapısındaki Küreler.....	19
2.2.3. Homojen Dağılmış Manyetik Partiküller İçeren Manyetik Küreler	20
2.2.3.1. Emülsiyon Polimerizasyonu.....	21
2.2.3.2. Süspansiyon Polimerizasyonu.....	21
2.2.3.3. Dispersiyon Polimerizasyonu.....	22
2.2.3.4. Miniemülsiyon Polimerizasyonu.....	23
2.3. Manyetik Poli-Glisidil Metakrilat Mikroküreler.....	23
2.4. Manyetik Mikrokürelerin Kullanım Alanları	25
2.5. Manyetik Ayırma Teknikleri.....	26
2.5.1. Manyetik Ayırmada Kullanılan Sistemler.....	27
2.5.1.2. Sürekli Sistemler.....	28
2.5.1.3. Sabit Yataklar	28
2.5.1.4. Akışkan Yataklar.....	28
2.5.1.5. Manyetik Stabilize Akışkan Yataklar.....	28

2.6. İmmünoafinite Kromatografisi	30
2.6.1. Poliklonal Antiadiler.....	32
2.6.2. Monoklonal Antiadiler	32
2.6.3. Otoantiadiler ve Anti-idiotipik Antiadiler	33
2.6.4. İmmünoafinite Kromatografisinde Kullanılan Destek Malzemeleri ve Antiadı İmmobilizasyonu	34
2.6.5. İmmünoafinite Kromatografisinde Elüsyon Koşulları	35
2.6.6. İmmünoafinite Kromatografisinde Dedeksiyon Yöntemleri	35
2.6.6.1. Direkt Dedeksiyon	35
2.6.6.2. Dolaylı Dedeksiyon.....	36
2.7. Literatür Çalışmaları	38
3. MATERYAL VE YÖNTEM	40
3.1. Kimyasal Maddeler.....	40
3.2. Manyetik Poli(Glisidil Metakrilat) (m-PGMA) Mikrokürelere Sentezi	40
3.3. Manyetik Mikrokürelere Karakterizasyonu.....	40
3.3.1. FTIR Spektrofotometre Analizi	41
3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile Yüzey Morfolojisi.....	41
3.3.3. Termogravimetrik Analiz-Diferansiyel Termal Analiz (TGA-DTA)	41
3.3.4. Elektron Spin Rezonans (ESR) ile Manyetizma Ölçümü.....	41
3.3.5. Şişme Testi	41
3.3.6. Zeta Boyut Analizi.....	42
3.4. m-PGMA Mikrokürelere Anti-Transferrin Antiadı Bağlanması	42
3.5. Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Çalışmaları.....	43
3.5.1. Anti-Transferrin Antiadı İmmobilize m-PGMA Mikrokürelere Sulu Çözeltilerden Transferrin Adsorpsiyonu.....	43
3.5.2. Anti-Transferrin İmmobilize m-PGMA Mikrokürelere Yapay Plazmadan Transferrin Adsorpsiyonu	44
3.5.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları	44
4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME	45
4.1. M-PGMA Mikrokürelere Karakterizasyonu	45
4.1.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi.....	45
4.1.2. SEM ile Yüzey Morfolojisi Analizi.....	46
4.1.3. Mikrokürelere Şişme Özelliklerinin İncelenmesi.....	47

4.1.4. Zeta Boyut Analizi.....	47
4.1.5. Mikrokürelere Yoğunluğunun Belirlenmesi	47
4.1.6. Elektron Spin Rezonans (ESR) ile Manyetizma Ölçümü	48
4.1.7. Termogravimetrik Analiz Çalışmaları (TGA-DTA).....	50
4.2. m-PGMA Mikrokürelere Anti-Transferrin Antibadi Bağlanması	51
4.3. Sulu Çözeltilerden Transferrin Adsorpsiyon Çalışmaları.....	52
4.3.1. pH Etkisi	53
4.3.2. Transferrin Derişiminin Adsorpsiyona Etkisi	54
4.3.3. Sıcaklığın Adsorpsiyona Etkisi	55
4.3.4. Adsorpsiyon Zamanı.....	57
4.4. Adsorpsiyon Kinetiği	58
4.5. Yapay Plazmadan Transferrin Adsorpsiyonu.....	61
4.6. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	63
5. YORUMLAR.....	64
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ	73

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Transferrin türleri ve özellikleri.....	4
Çizelge 4.1. Anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikrokürelere transferrin adsorpsiyonu için pseudo-birinci ve ikinci derece kinetik verileri.....	60

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Holo-transferrin yapısı ve domain N1, N2, C1, C2 gösterimi	6
Şekil 2.2. Ovotransferrin N lobunun holo ve apo formları	7
Şekil 2.3. Ovotransferrin C lobunun holo ve apo formları	8
Şekil 2.4. (A) Serum transferinin X-ışınları yapısı (apo formda N lobu ve holo formda C lobu) (B) Transferrinin N lobunun demir bağlama bölgeleri	9
Şekil 2.5. Serum transferrin yapısı	10
Şekil 2.6. Transferrin-transferrin reseptörü kompleksi	11
Şekil 2.7. Reseptör varlığında endositosiz yoluyla demir taşınmasının ve salınımının şematik gösterimi	12
Şekil 2.8. Tavuk holo-ovotransferrin yapısı	13
Şekil 2.9. Laktoferrin yapısı	15
Şekil 2.10. Manyetik mikroküreler	17
Şekil 2.11. Polimer çekirdek – manyetik kabuk yapısı	19
Şekil 2.12. Manyetik Çekirdek – Polimer Kabuk Yapısı	19
Şekil 2.13. Manyetik çekirdek – polimer kabuk TEM görüntüsü	20
Şekil 2.14. Polimerik küre içerisinde homojen dağılmış manyetik partiküller	20
Şekil 2.15. GMA kimyasal yapısı	24
Şekil 2.16. GMA mikroküre yapısı	24
Şekil 2.17. Proteinleri ve peptidleri ayırmada kullanılan kesikli manyetik sistemler	27
Şekil 2.18. Manyetik stabilize akışkan yatak şeması	29
Şekil 2.19. Antibadi yapısı	31
Şekil 2.20. Direkt dedeksiyon şematik gösterimi	36
Şekil 4.2. m-PGMA mikrokürelerin SEM görüntüleri	47
Şekil 4.3. Manyetik PGMA mikrokürelerin ESR spektrumu	49
Şekil 4.4. m-PGMA mikrokürelerin TGA-DTA eğrisi	51
Şekil 4.5. Anti-transferrin antibadi immobilizasyonu için derişim taraması grafiği	52

Şekil 4.6. m-PGMA mikrokürelerin manyetik alanda adsorpsiyon ortamından ayrılması.....	53
Şekil 4.7. Transferrin adsorpsiyonuna pH etkisi	54
Şekil 4.8. Transferrin adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi.....	55
Şekil 4.9. Transferrin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.....	57
Şekil 4.10. Transferrin Adsorpsiyon Zamanı.....	58
Şekil 4.11. Anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikroküreler için pseudo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.....	60
Şekil 4.12. Anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikroküreler için pseudo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği	61
Şekil 4.13. Yapay plazmadan transferrin adsorpsiyonu için SDS-PAGE görüntüsü.	62

1. GİRİŞ

Demir; neredeyse tüm organizmalar için oksijen taşınması, depolanması, aktivasyonu, enerji üretimi, hücre çoğalması ve bazı katalik prosesler gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlar açısından oldukça büyük bir öneme sahiptir. Fakat yüksek miktarda demirin oksijenle tepkimeye girmesi halinde hücre zarına, proteinlere ve DNA'ya zarar verecek serbest radikaller oluşmaktadır. Bundan dolayı organizmaların vücut içi sıvılarında demir konsantrasyonunu her zaman kontrol altında tutan çeşitli sistemler ve yapılar vardır. Yetişkin bir insan vücudunda 25-35 mg/kg demir bulunmaktadır ve bunun dörtte üçü kırmızı kan hücrelerindeki hemoglobinin yapısına katılmıştır.

Vücuda demir alımı ve kullanımında sorunlar olması halinde demir eksikliği anemisi; karaciğer, kalp, pankreas gibi organlarda demir birikimine yol açan genetik bir rahatsızlık olan Hereditary hemokromatoz ve Halleroden Spartz Sendromu, Parkinson, Alzheimer, Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkmaktadır [1].

Gıdayla alınan ve geri kazanılan demir, Fe^{2+} halindedir. Serum içerisinde demir taşıyıcı bir protein olan transferrine bağlanıp Fe^{3+} 'e yükseltgenir ve bu şekilde taşınır. Taşınım boyunca her iki durumda da (Fe^{2+} ve Fe^{3+}) demir, toksik etkiler doğurabilecek şekilde biyolojik hiçbir etkileşime girmez [2]. Demir haricinde, terapötik ve diagnostik özellikteki diğer metal iyonları da transferrine, demir taşıyan bölgeleri üzerinden bağlanabilir. Bu transferrin kompleksleri birçok hücre tarafından tanınmaktadır. Kötü huylu tümörler yüksek oranda transferrin reseptörü içerdiğinden anti-kanser ilaçlar, proteinler ve genler için hedef ligand olarak transferrin kullanımı oldukça yaygındır. Transferrinin proteinlerle, ilaçlarla, makromolekül içeren hibrid sistemlerle konjugasyonu bu durumu mümkün kılmaktadır. Transferrinin anti-kanser ilaçlarla konjugasyonu ile seçicilik ve toksisite üzerinde olumlu gelişmeler sağlanmış ve ilaç direncini düşürmesinden dolayı daha etkin bir tedavi yöntemi oluşturulmuştur. Ayrıca poli-lizin ya da katyonik lipozom gibi bir polikasyon aracılığıyla transferrinin DNA ile eşlenmesi, kötü huylu hücrelerdeki DNA hedeflenmesini ve transferini mümkün kılmaktadır [1].

Transferrin protein ailesi; serum transferrin (TF), laktoferrin (LF), melanotransferrin (mTF) ve ovotransferrinden (oTF) oluşur [3]. Serum transferrin, demir metabolizmasından sorumludur ve serbest demirin hücrelere zarar verebilecek radikaller oluşturmasını önler. Demir haricinde terapötik metal iyonları, radyodiagnostik metal iyonları ve diğer bazı metal iyonları da transferrin tarafından taşınır.

Ovotransferrin ve laktoferrin antimikrobiyal etkiye sahiptir [1]. Melanotransferrin ise demir taşınması, anjiyogenez ve plazminojen aktivasyonu, hücre çoğalması, tümörojenez gibi sistemlerde görev alır. Melanoma tümörlerinin yüzeyinde oldukça yüksek oranda melanotransferrine rastlanmaktadır [4]. Kromatografik protein saflaştırma işlemi yüksek ayırım gücüne sahip bir tekniktir. Fakat koloidal yapılar içeren örnekler, dolgulu yatak içeren kolonları tıkayabilmektedir. Manyetik küreler ise santrifüj, filtrasyon ya da membran ayırma gibi ön işlemlere gerek duymaksızın ham hücre ekstratlarından veya hücre yoğunluğunca zengin diğer örneklerden hızlı ve verimli saflaştırma sağlar. Biyolojik bilimlerde manyetik taşıyıcıların oldukça geniş kullanım alanları vardır [5]. Özellikle son 10 yıl içerisinde, manyetik kürelerin sentezi ve çeşitli sistemlerde kullanımı üzerine oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Manyetik küreler, manyetik parçacıklar ve polimerden oluşan bir yapıdır. Dışsal bir manyetik alan varlığında kürelerin içerdiği manyetik parçacıklar oldukça hızlı ve kolay bir ayırım sağlar. Bunun yanında manyetik küreler, relaksasyon prosesi ve histerizis kaybı ile manyetik enerjiyi ısı enerjisine çevirerek ısı jeneratörleri olarak da kullanılabilir. Kürelerin içerdiği polimer, manyetik parçacıkları stabilize etmenin yanında kürelere şişme özelliği ve esneklik kazandırır. Ayrıca kürelerin kullanılacağı uygulamalar için gerekli fonksiyonel grup içeren yapılar oluşturur. Örneğin kürelerin yüzeyini belli ligandlar ile aktive ederek immunoassay teknikleri, nükleik asit dizilerinin izolasyonu, hücre ve mikroorganizma çalışmaları gerçekleştirilebilir. Kürelere manyetik özellik kazandırmak için oksidasyona karşı daha kararlı olmaları sebebiyle Fe, Co ve Ni gibi saf metallerin metal oksitleri tercih edilir. Metal oksitlerin manyetik özellikleri kimyasal bileşimlerine, şekillerine, büyüklüklerine, kristal yapılarına ve kristalinite derecelerine göre değişmektedir [6]. Manyetik ayırma teknikleri biyolojik bilimlerin farklı alanlarında uygulanmaktadır.

Son zamanlarda biyomolekül eşleştirme, protein ve nükleik asit saflaştırma çalışmalarında manyetik taşıyıcılar kullanılması oldukça yaygınlaşmıştır [7]. Manyetik malzemeler genellikle sabit veya akışkan yataklarda kullanılır [5]. En iyi bilinen teknik, manyetik stabilize akışkan yataklardır [8]. Bu sistem, manyetik küreleri içeren bir akışkan yatağa belli bir eksen doğrultusunda manyetik alan uygulanması ile elde edilir. Meydana gelen çekici ve itici kuvvetler, sıvı faz ve manyetik stabilize kürelerin yüzeyi arasında oldukça iyi bir kütle aktarımı oluşturur [9]. Bu sistemler hem sabit hem de akışkan yatakların tüm avantajlarını bir araya getirmektedir.

Bunların başlıcaları; yüksek kütle transfer özellikleri, partikül karışımlarının ayrılabilmesi, basınç kaybının az olması, katı fazın sisteme yüksek akışlı beslenebilmesi, sıvı-katı etkileşiminin iyi olması ve tıkanma olasılığının olmamasıdır.

Bu teknikle ayrılacak olan biyomolekül, yüzeyine ligand immobilize kürelere direkt olarak uygulanır. Özellikle kan gibi yüksek viskoziteye sahip yapılar ile manyetik stabilize akışkan yatak içerisindeki manyetik adsorbentın etkileşimi, hemoliz gibi hiçbir hücre hasarı olmadan yüksek kütle taşınımı göstermesi açısından oldukça dikkat çekicidir [8].

Bu çalışmada ticari olarak önemli kullanım alanlarına sahip bir protein olan transferrinin saflaştırılması için anti-transferrin antibadi ligand bağlı manyetik poligliseril metakrilat (PGMA) bazlı mikron boyutlarında manyetik mikroküreler dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Kürelerin yüzeyindeki epoksi grupları aktive edildikten sonra anti-transferrin antibadi kovalent bağlı olarak immobilize edilmiştir. Anti-transferrin antibadi immobilize PGMA mikroküreler ile transferrin çözeltilerinden ve kandan, ilk aşamada kesikli sistemde, ikinci aşamada ise manyetik ayırıcıda transferrin adsorpsiyonu incelenmiştir. Sentezlenen manyetik PGMA (m-PGMA) mikrokürelerin karakterizasyonu için FTIR, SEM, TGA-DTA, ESR, Zeta boyut dağılımı ve şişme testi verileri kullanılmıştır. Anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikrokürelerin kesikli sistemde transferrin adsorpsiyon kapasitesine pH, derişim, sıcaklık ve zaman faktörlerinin etkisi ayrıntılı olarak incelenmiştir ve optimum şartlar belirlendikten sonra yapay plazmadan transferrin adsorpsiyonu incelenmiştir.

Bunun ardından desorpsiyon işlemi ve mikroküreler için tekrar kullanılabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Son aşamada ise anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikroküreler ile manyetik ayırıcı içerisinde transferrin adsorpsiyonu incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

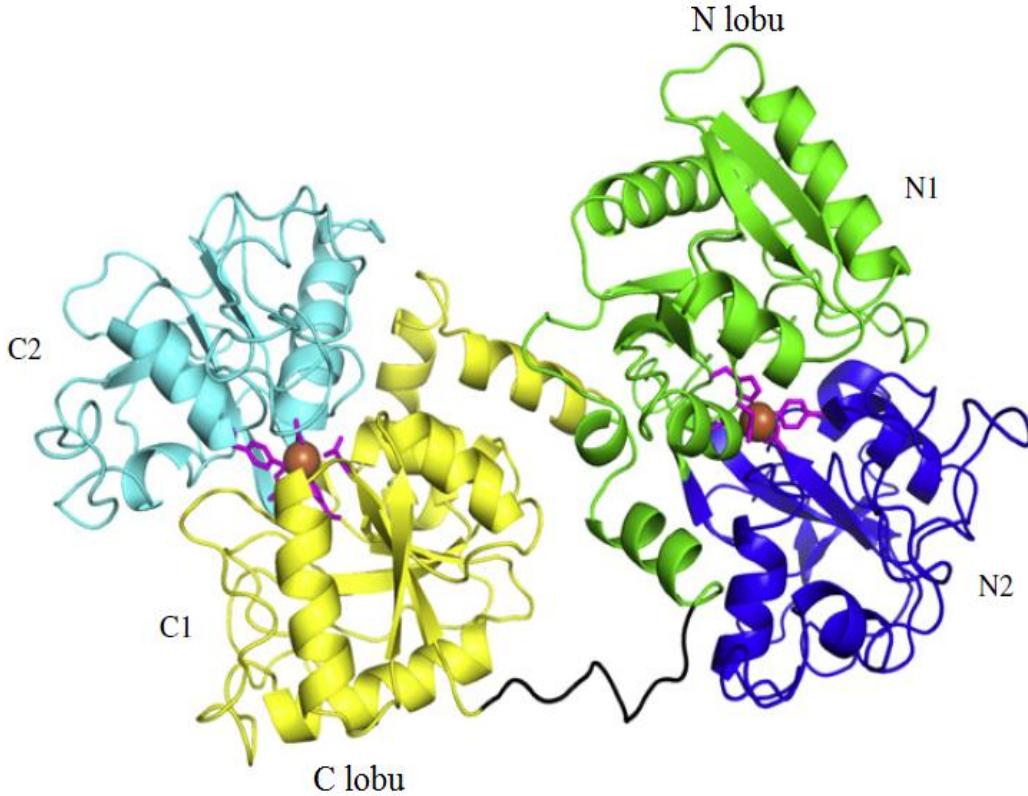
2.1. Transferrin Protein Ailesi

Demir, tüm ökaryotik organizmalar ve çoğu mikroorganizmalar tarafından solunumda, DNA sentezinde ve çeşitli metabolik sistemlerde kofaktör olarak kullanılan oldukça önemli bir elementtir. Hücrenel demir homeostazını korumak amacıyla neredeyse tüm organizmalarda hücre içi demir alımını, saklanmasını ve taşınmasını sağlayan transferrin adı verilen taşıyıcılar bulunmaktadır [3]. Transferrin protein ailesi, 670-700 aminoasitten oluşan tek polipeptid zincirli ve 80 kDa molekül ağırlığına sahip monomerik bir glikoproteindir. Bu ailenin en iyi bilinen türleri; kanda ve memelilerdeki amniyotik sıvı, safra, serebrospinal sıvı, lenf, kolostrum ve sütte bulunan serum transferrin (TF); memelilerin süt, gözyaşı, tükürük, mukus, pankreas sıvısı gibi hücre dışı salgılarında ve beyaz kan hücrelerinde bulunan laktoferrin (LF); melanositlerin yüzeyinde, karaciğerde, bağırsak epitelinde bulunan melanotransferrin (mTF) ve yumurta akı ile kuşların ve timsah, kaplumbağa gibi bazı sürüngenlerin yumurtalık salgılarında bulunan ovotransferrin (oTF) ve transferrin benzeri proteinlerdir [1,3].

Çizelge 2.1. Transferrin türleri ve özellikleri [10]

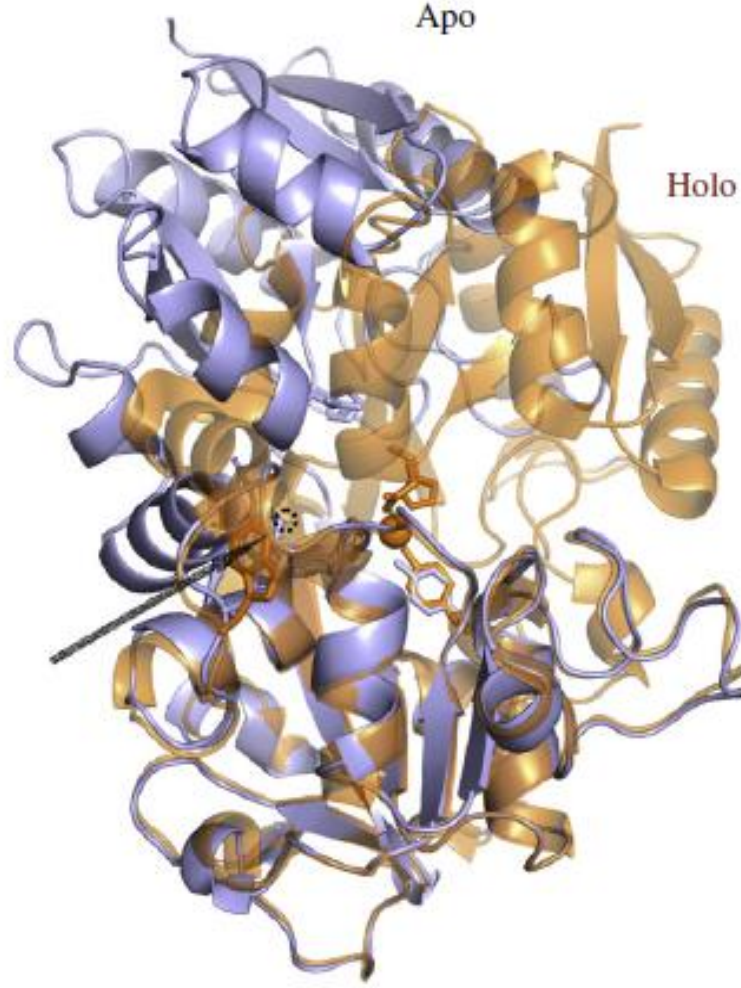
Protein	Dokular	Taksonomik Gruplar
Transferrin	Karaciğer, serum, beyin, kemik iliği	Memeliler
Ovotransferrin	Serum, yumurta akı	Kuşlar, sürüngenler
Laktoferrin	Süt, tükürük, gözyaşı, safra suyu	Memeliler
Melanotransferrin	Melanoma, tükürük, ter, karaciğer, bağırsak	Omurgalılar
Karbonikanhidraz inhibitörü	Serum (karaciğerde)	Memeliler
Saksifilin	Serum	<i>Rana</i> (iri kurbağa)
Topozom	Sindirim sistemi ve yumurtalıklar	Deniz kestanesi
<i>Ciona</i> transferrin (mono)	Plazma	Ürokordatlar
Böcek transferrin	Hemolenf (yağlı dokuda), yumurtalık	Böcekler
Üç katlı transferrin	Plazma membranı	Halotolerant alg
Otolit matrix protein 1	Otolit organ	Balıklar
Pasifastin	Hepatopankreas ve hemositler	Kabuklular

Transferrin türlerinin tümü demir miktarını kontrol altında tutabilse de hücre içine demir taşınımını yapabilen tek türünün serum transferrin olduğu bilinmektedir [3]. İnsan serumunda transferrin konsantrasyonu, %30 demir bağlı olarak 2.5 mg/ml (35 μ M)'dir [1]. Laktoferrin hariç diğer transferrin türleri asidiktir ve izoelektrik noktaları (pI) 5.6-5.8 arasındadır. Laktoferrin için ise bu değer 8.7'dir. Bu izoelektrik nokta, laktoferrinin diğer proteinlere ve hücre yüzeylerine bağlanabilmesini sağlamaktadır. Üç çeşit transferrin de yapısal olarak, demir bağlayıcı bölgeleri bulunan ve homolog olan N ve C lobunu içerir. Bu homolog loblar eş boyutlu iki domaine ayrılır. N lobundakiler domain N1 ve domain N2, C lobundakiler ise domain C1 ve domain C2 olarak adlandırılır ve demir bağlayıcı bölgenin bulunduğu derin bir yarıklık ile ayrılır. [3,11]. İki lob da yapısal olarak çok benzer olsalar da demir bağlama ve salınımı açısından farklılıklar göstermektedir. Bu farklılık, yapıdaki karbonhidrat zincirlerinin uzunluklarından ve pozisyonlarından kaynaklanmaktadır. Transferrinin metallere ve reseptörlere bağlanması açısından zincirler arasında bulunan disülfid bağları da oldukça önemlidir [12].

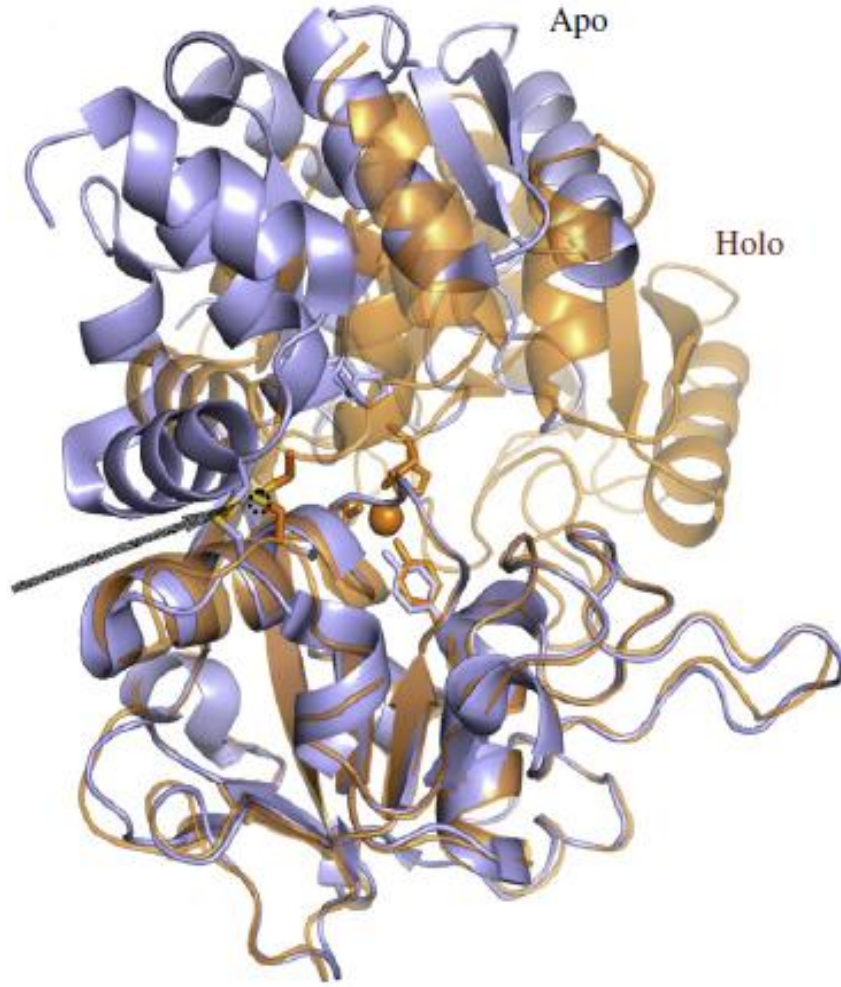


Şekil 2.1 Holo-transferrin yapısı ve domain N1, N2, C1, C2 gösterimi [11]

Transferrinin demir bağlayıcı bölgelerini; iki tirozin molekülünün iki fenolü, aspartat molekülünün karboksilatı, histidinin imidazolü ve arjinine komşu olan birbirine bağlı iki karbonat oluşturur. Transferrine demir bağlanmamış yani apo formda iken loblar birbirinden uzakta olacak şekilde açık konformasyondadır. Demir bağlı yani holo formda ise, iki lob da koordinasyon metalini kapsayacak şekilde kapalı konformasyona geçer [2].



Şekil 2.2. Ovotransferrin N lobunun holo ve apo formları [11]

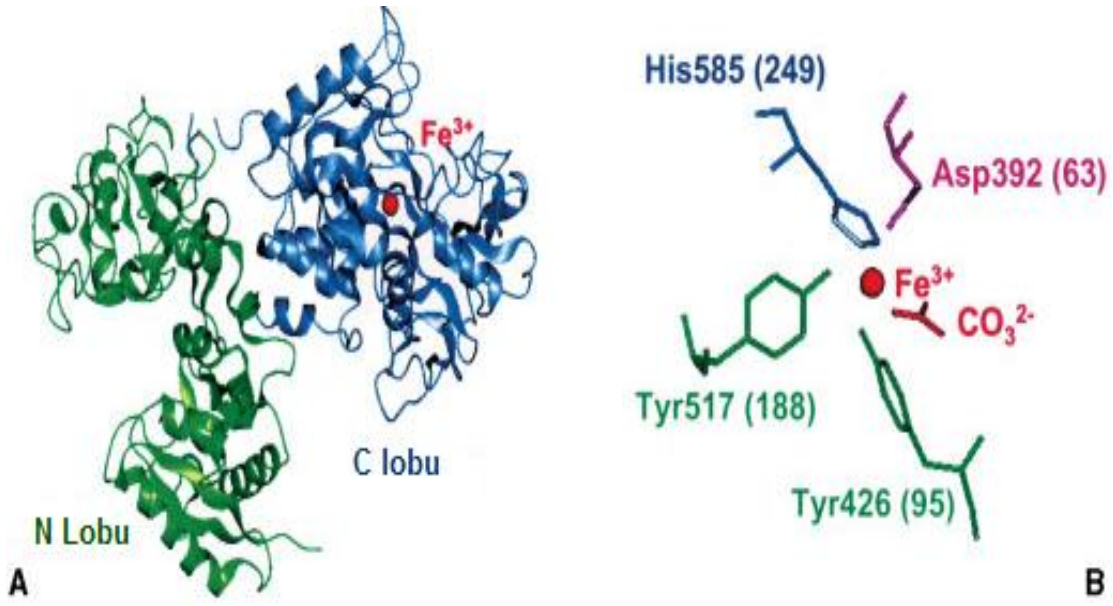


Şekil 2.3. Ovotransferrin C lobunun holo ve apo formları [11]

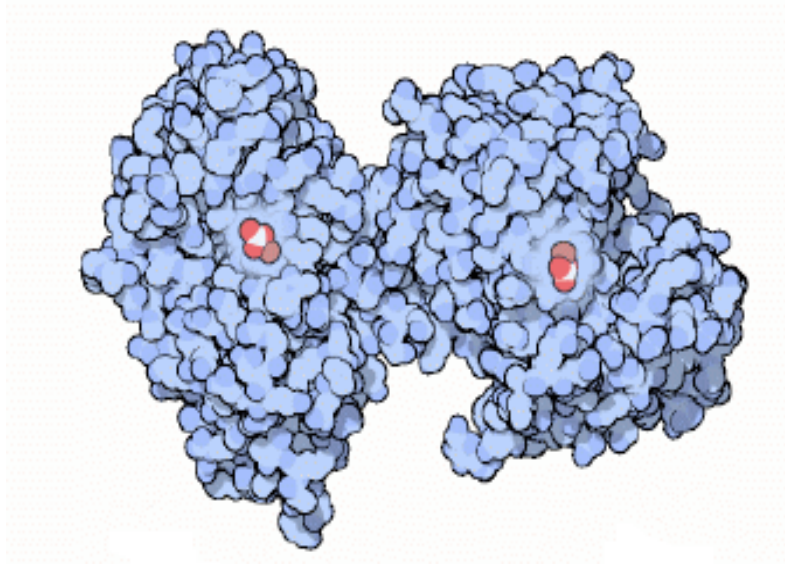
2.1.1. Serum Transferrin

1944 yılında Schade ve Caroline'in yaptığı bir çalışmada yumurta akındaki bir bileşenin demir bağlama yeteneği olduğu ve mikroorganizmaların gelişimini engellediği tespit edilmiştir. Bundan iki yıl sonra aynı grup tarafından bu yapının insan kanında da olup olmadığı araştırılmış ve kan serumunda da benzer özellikte bir proteine rastlanmıştır. O zamanki ismiyle bu protein "Siderofilin" olarak literatüre geçmiştir [10].

Transferrin ferrik demir taşınması için oldukça önemli bir serum proteindir [13]. Karaciğerden salgılanarak kana karışan transferrin miktarı, serumda yaklaşık 37 μM civarındadır [10,13]. Yapısında 630 civarında aminoasit bulunduran, 80 kDa molekül ağırlığında bir glikoprotein olan serum transferrin, N ve C olmak üzere iki özdeş lobdan oluşur. Demir atomu, iki tirozin kalıntısının fenolat oksijenleri, histidin kalıntısının imidazol azotu, aspartik asit kalıntısının karboksilat oksijeni ile olmak üzere dört protein ligandı ile koordine edilmektedir. Demirin etrafındaki *cis* pozisyonundaki altı adet oktahedral bağlanma bölgesinin dördü, bu protein ligandları tarafından kullanılır [14]. Her lob tersinir olarak Fe^{3+} bağlamanın yanında Bi^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} , Al^{3+} , Cu^{3+} , Mn^{3+} , Zn^{3+} , Ni^{3+} , Ru^{3+} gibi metal iyonlarını da bağlayabilir. Normal bir serumda, transferrinin toplam demir bağlama bölgelerinin %30'u demir içermektedir [13].

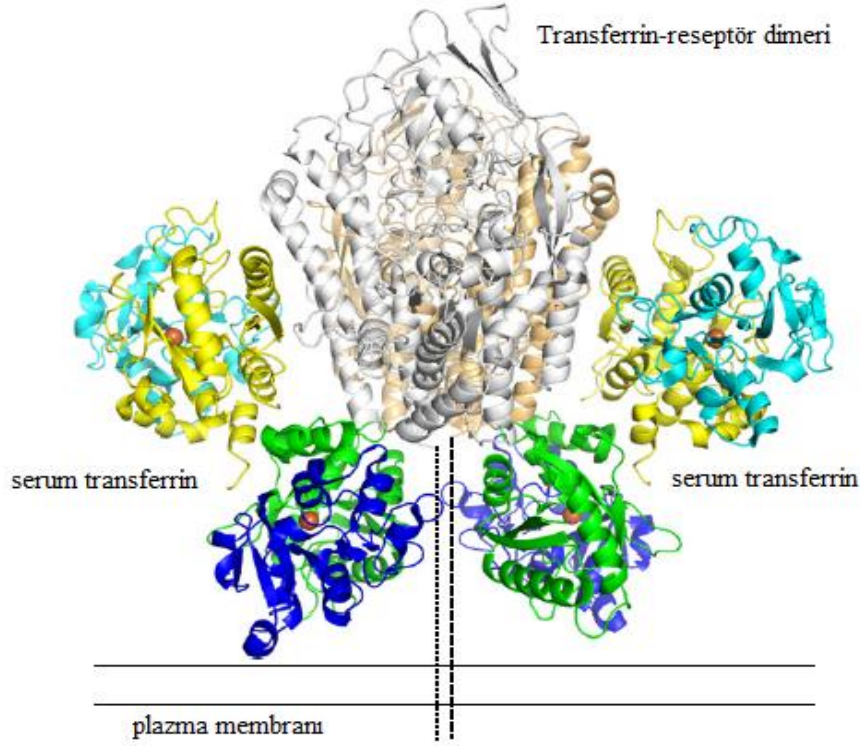


Şekil 2.4. (A) Serum transferrinin X-ışınları yapısı (apo formda N lobu ve holo formda C lobu) (B) Transferrinin N lobunun demir bağlama bölgeleri [1]



Şekil 2.5. Serum transferrin yapısı [15]

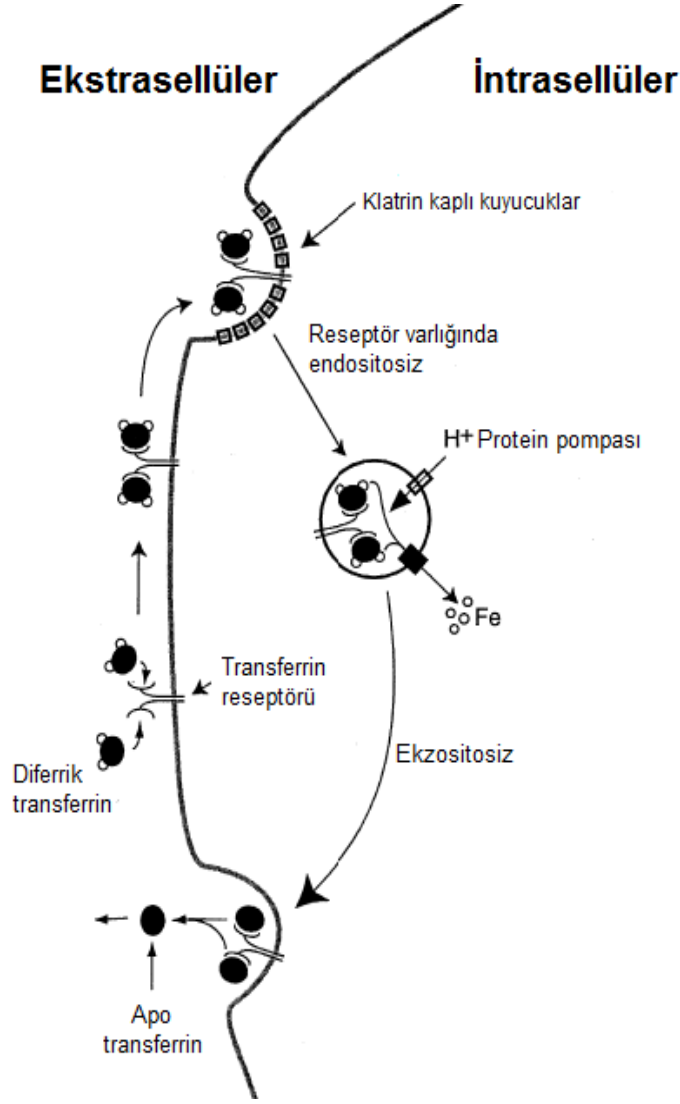
Hücresel demir alımı ve taşınması TF/TF reseptör varlığında endositotik proses ile gerçekleşir [3]. Transferrin reseptörü, 180 kDa molekül ağırlığında bir transmembran glikoprotein homodimeridir. Alt ünitelerinin her biri 90 kDa molekül ağırlığındadır ve birer transferrin molekülü bağlayabilmektedirler [14]. Transferrin kombinasyonlarının derecesi, hücre yüzeyindeki transferrin reseptörleri ve transferrin arasındaki afiniteyi etkilemektedir. Transferrin reseptörü ve *holo*-transferrin arasındaki moleküler kuvvet, *apo*-transferrin ile arasındaki kuvvetten onlarca kat büyüktür. Transferrin ve transferrin reseptörünün iki formunun arasındaki afinite farkı, proteinin fonksiyonlarını da etkilemektedir [16].



Şekil 2.6. Transferrin-transferrin reseptörü kompleksi [11]

Demir, nötral sıvılarda çeşitli demir hidroksitler oluşturur ve oluşan bu yapılar çözünmez. Fakat düşük molekül ağırlıklı şelatlar ve proteinler veya makromoleküllerle yaptığı kompleksler ile çözünebilir hale getirilebilir [2]. Apo formda iken her bir transferrin lobunun iki domaini de su dolu bir yarı oluşturacak şekilde birbirinden ayrı pozisyonadadır. Ekstraselüler ortamda pH 7.4'te apo-transferrin bir demir iyonu bağlayarak monoferrik forma, iki demir iyonu bağlayarak diferrik (holo-transferrin) formuna dönüşür. Ardından diferrik transferrin, hücre yüzeyindeki transferrin reseptörüne bağlanır. Diferrik transferrinin C lobu, dimerik transferrin reseptörü ektodomainin helikal domainine bağlanırken N lobu, transferrin reseptörünün tamamı ve hücre zarı arasında (sandviç pozisyonu) konumlanır. Oluşan bu kompleks, pH 5.5 olan endozoma taşınır. Ortamın asidik olması, protonasyon ve birbirine bağlı anyonların histidin ve tirozin ligandlarının protonasyonunu takiben ayrışmaları nedeniyle transferrin-transferrin reseptörü kompleksinde konformasyonel değişiklikler meydana getirir ve yapıdaki demir, kompleksten ayrılır. Böylece hücre içine demir salınımı gerçekleşmiş olur.

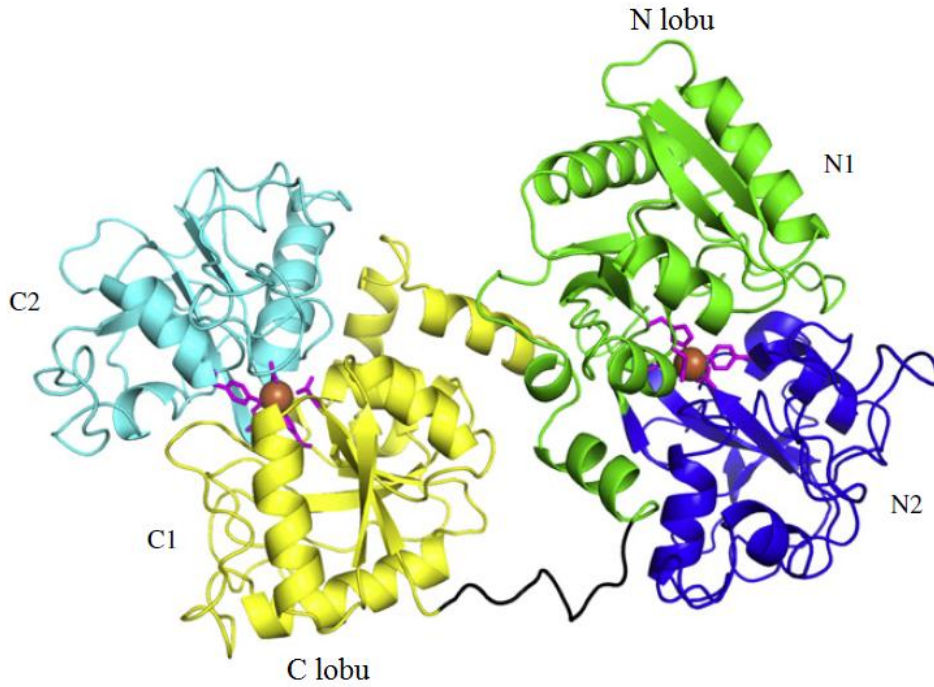
Apo-transferrin-transferrin reseptörü kompleksi tekrar hücre yüzeyine çıkar ve bu ekstrasellüler ortamdaki nötral pH'dan dolayı dissosiyasyon olarak transferrin serbest kalır ve yeni bir döngü için kullanıma hazır hale gelir [2].



Şekil 2.7. Reseptör varlığında endositosiz yoluyla demir taşınmasının ve salınımının şematik gösterimi [14]

2.1.2. Ovotransferrin

Ovotransferrin, 686 aminoasit içeren 77.7 kDa molekül ağırlığında monomerik bir glikoproteindir [17]. İzoelektrik noktası 6.0 olan ovotransferrin kuşların ve sürüngenlerin yumurta akınının yaklaşık % 12-13'ünü oluşturmaktadır. İlk kez Schade ve Caroline tarafından 1944 yılında keşfedilmiş ve 'konalbumin' olarak adlandırılmıştır. Ardından 1968 yılında Williams tarafından demir bağlayabildiği ve transferrin ailesine ait bir protein olduğu keşfedilerek ismi 'ovotransferrin' olarak değiştirilmiştir. Ovotransferrin, dokuz aminoasit kalıntısının oluşturduğu bir zincirle birbirine bağlı iki globuler lobdan (N ve C) oluşmaktadır. Her lob ikişer adet alt domaine (N1, N2, C1, C2) ayrılmaktadır. Bu iki lobun içerisindeki boşluklar demir bağlayan bölgeleri oluşturmaktadır. Bu bölgelerde demir bağlanması, serum transferrindeki aynı ligandlar (iki tirozin, bir aspartik asit, bir histidin, iki oksijen kalıntısı) ile gerçekleşmektedir [18].



Şekil 2.8. Tavuk holo-ovotransferrin yapısı [11]

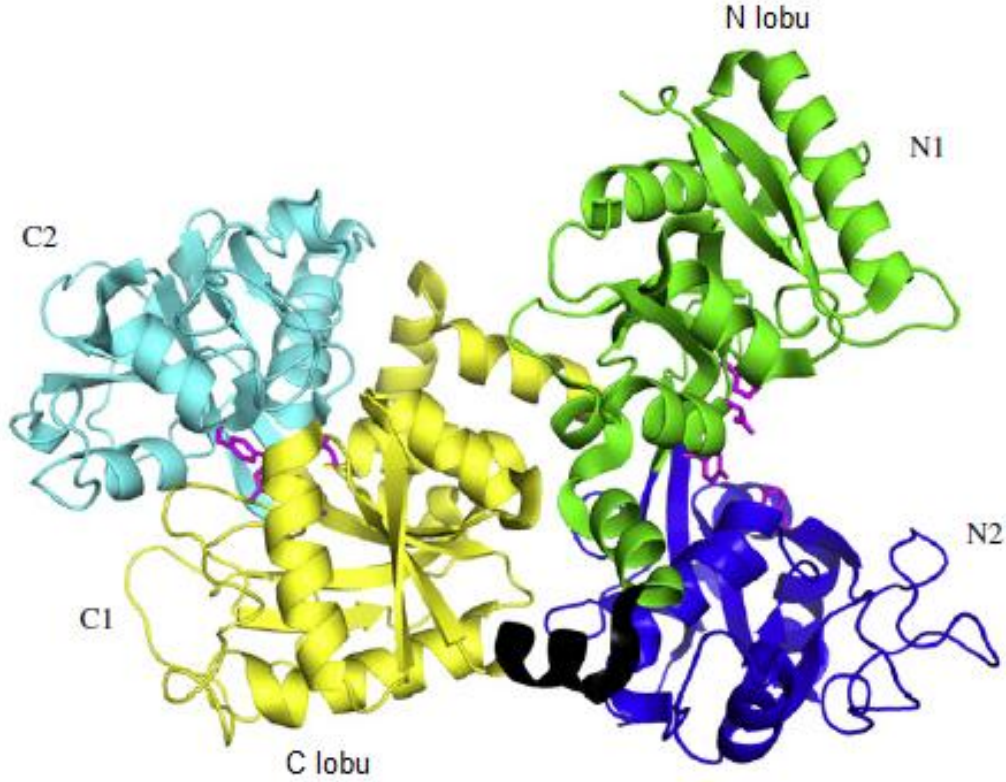
Tavuk ovotransferrin güçlü bir antimikrobiyal etkiye sahiptir. Ovotransferrin demir bağlayan bir protein olduğundan mikroorganizmaların gelişmesi için gerekli olan demiri tutarak gelişimlerini inhibe eder. Ovotransferrinin çok çeşitli bakteri türleri üzerinde etkili olduğu bilinmektedir.

Bunlar içinden ovotransferrine en duyarlı olanları, *Pseudomonas sp*, *E. Coli* ve *S. Mutans* türleridir; en dirençli olanları ise *S. Aureus*, *Proteus sp* ve *Klebsiella*'dır [18]. Ovotransferrin bu özelliğinden dolayı günümüzde gitgide önem kazanan doğal gıda koruyucu ajan olarak kullanılabilir [19]. Bunun yanında *Candida spp* ve ovotransferrinin direkt etkileşimleri, antifungal etki yaparak aktivite inhibisyonunu gerçekleştirmektedir. Fakat *Candida spp* içerisinde bir tür olan *C. krusei*'nin ovotransferrine dirençli olduğu bulunmuştur [17]. Tüm bunların yanında ovotransferrinin antikanser, antioksidan ve bağışıklık sistemi düzenleyici fonksiyonları da büyük önem taşımaktadır [18].

2.1.3. Laktoferrin

Laktoferrin, birçok memelinin sütünde, dış salgılarında ve mukozalarında bulunan, yaklaşık 80 kDa molekül ağırlığına sahip demir bağlayan bir glikoproteindir [20,21]. Laktoferrin iki demir iyonu bağlayabilir. Bu demir bağlama kapasitesinden dolayı antibakteriyel, antioksidan, antitümöral ve immün düzenleyici fonksiyonları bulunmaktadır. İnsan beynindeki mikrovasküler endotial hücrelerinde bulunan laktoferrin reseptörleri, reseptör varlığında transitosiz ile laktoferrin endositosizine ve laktoferrinin kan beyin bariyerini geçmesine katkıda bulunur. Bunun yanında Parkinson ve Alzheimer hastalıklarında, nöronlardaki laktoferrin reseptörleri laktoferrin taşınımına katkı sağlayarak iyileşme sağlayabilir [22].

Neredeyse tüm bakterilerin gelişimi için demire gereksinimleri vardır ve laktoferrinin demir bağlama özelliği birçok Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etki göstermektedir. Laktoferrinin demir bağlamasının dışında mikrobiyal karbonhidrat metabolizmasını bozması yada bakterilerin hücre duvarlarının yıkımı ile de antibakteriyel etkilerini gösterdikleri bulunmuştur [20]. 1995 yılında McIntosh ve arkadaşları sığır sütündeki laktoferrinin sıçanlarda mide ve bağırsak kanserine karşı koruyucu etki gösterdiğini bulmuşlardır [21].



Şekil 2.9. Laktoferrin yapısı [11]

2.1.4. Melanotransferrin

Melanotransferrin ilk olarak 1980 yılında Woodbury ve arkadaşları tarafından melanoma için hücre yüzey işaretleyicisi olarak keşfedilmiştir ve *melanoma tümör antijen p97* olarak adlandırılmıştır. Ardından 1996 yılında Rothenberger ve arkadaşları tarafından karaciğerde, ince bağırsakta, göbek kordonunda, plasentada, ter bezlerinde olduğu keşfedilmiş ve 2005 yılında Sekyere ve arkadaşları tarafından insan beyin zarında da bulunduğu saptanmıştır.

Transferrin protein ailesine ait olan melanotransferrin, çeşitli omurgalı ve omurgasızlarda bulunan demir bağlayan bir proteindir [23]. Glikozil fosfatidilinositol tarafından hücre zarına bağlı olarak bulunur. Transferrin ailesinin diğer üyeleri olan serum transferrin, ovotransferrin ve laktoferrin ile dizilim açısından yaklaşık % 37-39 oranında homolog proteinlerdir.

Melanotransferrin ve serum transferrin, kromozom 3'te bulunmaları, aynı disülfid bağlarına sahip olmaları ve N terminallerinde özdeş demir bağlama bölgeleri bulundurmaları gibi önemli benzerlikler göstermektedirler.

Melanotransferrin, kan-beyin bariyerinden demir taşınması, melanoma hücrelerinin çoğalması ve tümörleşmesi, Alzheimer hastalığı, özonofil farklılaşması, kıkırdak oluşumu ve artrit gibi durumlarda fizyolojik ve patolojik olarak oldukça önemli rol oynar [24].

Melanotransferrinin çözünür formu hücre kültürlerinin süpernatantında ve melanoma, Alzheimer, artrit gibi hastaların kan serumunda bulunur. Son çalışmalar göstermektedir ki melanotransferrin, serum transferrinin homolog proteini olmasına rağmen hücrelerden demir alımında transferrin reseptörü 1'e ya da herhangi başka bir reseptöre yüksek afinite göstermemektedir. Çözünür melanotransferrin de hücre zarına bağlı melanotransferrin gibi 80 kDa molekül ağırlığına sahiptir [25].

2.1.5. Transferrin Benzeri Diğer Proteinler

Transferrin ailesindeki proteinler ile homolog primer yapıya sahip bazı proteinler bulunmaktadır. Bu proteinler, domuzlarda bulunan karboksianhidraz inhibitörü, kurbaçalarda bulunan saksifilin, balıklarda denge taşı (otolit) olarak bilinen yapıdaki OMP ve ilkel deniz hayvanlarında bulunan nicaTf'dir. Bu proteinler, primer yapıları açısından transferine benzese de demir bağlama özellikleri ya çok zayıftır ya da yoktur ve yapıları henüz aydınlatılamamıştır. Böceklerde bulunan transferrin de omurgalılardaki serum transferrin gibi iki loba sahip olsa da bir lobun demir bağlama özelliği olmadığı bulunmuştur [4].

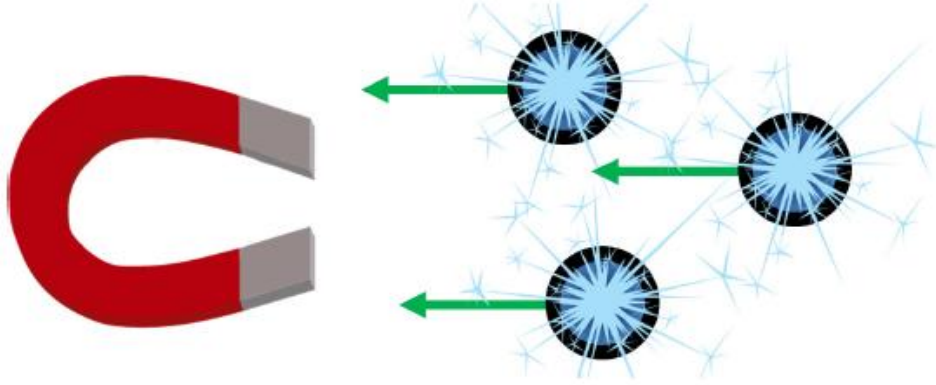
2.2. Manyetik Mikroküreler

Boyutları 1-20 µm arasında değişen polimer mikroküreler biyoloji ve tıpta; ilaç taşıma sistemleri, sensörler, tanı koyma ve hücre saflaştırma gibi oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Bu kürelerden hem iyon değişim kromatografisi gibi eski tekniklerde hem de afinite kromatografisi gibi gelişmiş tekniklerde yararlanılmaktadır.

Oldukça küçük partikül boyut dağılımına ve düzgün bir küresel şekle sahip olmaları her bir kürenin aynı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikte olmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda küresel olmaları akış özelliklerinin iyi olmasına, yüzey enerjisinin azalıp yüzey alanının artmasına da katkıda bulunmaktadır.

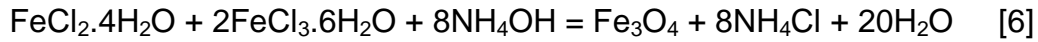
Tüm bunların yanında mikrokürelerin optimum konsantrasyonda istenilen molekülü bağlayabilmesi açısından ulaşılabilir ve istenmeyen etkileşimler yapmayan reaktif gruplar içermesi gerekmektedir.

Mükrokürelerin sentezinde süperparamanyetik nanopartiküller kullanılarak manyetik özellik de kazandırılabilir [26]. Manyetik mikroküreler genellikle Fe, Co, Cu, Mn tuzlarının çöktürülmesiyle elde edilen ferritler veya Fe_3O_4 (magnetit), Fe_2O_3 (maghemit) gibi demir oksitler kullanılarak sentezlenir [27].



Şekil 2.10. Manyetik mikroküreler [28]

Metal oksit nanopartiküller (özellikle magnetit ve maghemit) ferrik ya da ferro tuzların çöktürülmesiyle elde edilir [6]:



Mikroküre sentezinde birçok farklı yöntem kullanılabilir. İlk kez mikroküre sentezi yapıldığında süspansiyon polimerizasyonu kullanılmıştır. Bu yöntemle elde edilen mikrokürelerin boyutu mikrometre ve milimetre arasında olup geniş boyut dağılımına sahiplerdir.

İyon değiştirici, su arıtımı için sorbent ya da adsorbent olarak kullanılan polivinilklorür, polimetilmetakrilat, şişebilen polistren, polistren-akrilonitril kopolimerlerinin ticari üretimi için süspansiyon polimerizasyonu kullanılmaktadır.

Çöktürme ya da dispersiyon polimerizasyonu ile çapı 1-8 µm arasında değişen küreler elde edilmektedir.

Çöktürme ile elde edilen küreler dispersiyon yöntemi ile elde edilenden daha büyük ve daha düzensiz partiküller oluşturmaktadır. Boyutları 100-600 nm arasında değişen partiküller elde etmek için en çok kullanılan yöntem emülsiyon polimerizasyonudur [29].

Manyetik mikroküre sentezinde ise polimer matrikste mikro ya da nano boyutta manyetik partiküller bulunur. Manyetik mikroküre sentezi üç genel yöntem ile gerçekleştirilir:

- Manyetik partiküllerin polimer matriksin içinde sentezlenmesi
- Manyetik partikül varlığında polimer sentezi
- Önceden hazırlanmış polimer ve manyetik partikül ile küre sentezi

Bunlara ek olarak çekirdek-kabuk yapısındaki partiküllerin polimer matrikste homojen dağıldığı karışık sistemler de bulunmaktadır.

Manyetik küreler; polistren, poliakrilamid, triblok polimer olan poli-izopropen-blok-poli(2-sinamoiletıl metakrilat)-blok-poli(*tert*-bütil akrilat), dekstran, aljinat, polivinilalkol, asetoasetoksietil metakrilat kopolimerleri, *N*-vinilkaprolaktam, *N*-izopropilakrilamid kopolimerleri de glisidilmetakrilat gibi polimerler kullanılarak sentezlenebilir.

2.2.1. Polimer Çekirdek – Manyetik Kabuk Yapısındaki Küreler

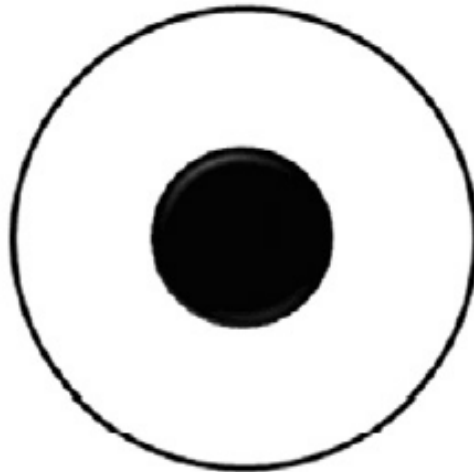
Bu yapıdaki küreler Pickering emülsiyonunda stabilize olarak bulunan monomer damlacıklarının polimerize olmasıyla elde edilir. Katı partiküller, sıvı-sıvı yüzeyinde kendiliğinden bir araya gelerek polimerizasyon süresince stabilizatör gibi davranırlar. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra bu partiküller, oluşan kürelerin dış yüzeyini kaplayarak kabuk kısmını oluşturur.



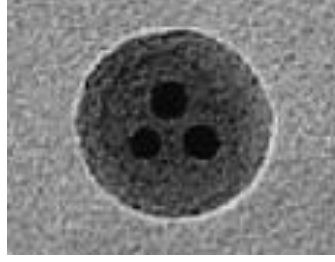
Şekil 2.11. Polimer çekirdek – manyetik kabuk yapısı [6]

2.2.2. Manyetik Çekirdek – Polimer Kabuk Yapısındaki Küreler

Bu küreler, manyetik partiküllerin yüzeyinde bir çapraz bağlayıcı ile monomerin üç boyutlu polimerleşmesi yada blok polimer miseller içerisinde manyetik partiküllerin enkapsülasyonu sonucu elde edilirler. Yeni bir yaklaşım olarak yüzey-başlatıcılı polimerizasyon ile bu küreler sentezlenebilmektedir. Bu yöntemde yüzey graftlı başlatıcı ile polimer oluşumuna dayanır ve manyetik çekirdeğe kovalent bağlı olarak polimerik bir kabuk oluşumu ile sonuçlanır.



Şekil 2.12. Manyetik Çekirdek – Polimer Kabuk Yapısı [6]



Şekil 2.13. Manyetik çekirdek – polimer kabuk TEM görüntüsü [6]

Bu yapıdaki küreler biyoyumlu olmaları, yüksek bağlama kapasitesine sahip olmaları ve tekrar kullanılabilir olmalarından dolayı oldukça fazla kullanım alanına sahiptirler. Kolay hazırlanabildiklerinden ve modifikasyona elverişli olduklarından çekirdeği oluşturacak inorganik madde olarak demir oksit partiküller tercih edilmektedir.

2.2.3. Homojen Dağılmış Manyetik Partiküller İçeren Manyetik Küreler

Bu yapıdaki kürelerin sentezinde emülsiyon polimerizasyonu, süspansiyon polimerizasyonu, dispersiyon polimerizasyonu, mikroemülsiyon polimerizasyonu, miniemülsiyon polimerizasyonu kullanılır [6, 30-36].



Şekil 2.14. Polimerik küre içerisinde homojen dağılmış manyetik partiküller [6]

2.2.3.1. Emülsiyon Polimerizasyonu

Polimerizasyon, emülsifiye edici maddelerin oluşturduğu miseller içerisinde gerçekleşir. Monomer molekülleri dağıtma fazından misel içerisine difüze olur. Bunu takiben dağıtma fazında çözülmüş halde bulunan ve sıcaklığın artmasıyla misel içine giren başlatıcı moleküllerin etkisiyle polimerleşme başlar. Tüm monomerler polimerleşene kadar devam eder. Elde edilen polimer, emülsiyon oluşturucu reaktifler tarafından yüzdürülen bir polimer lateksidir. Bu yöntem kullanılarak elde edilen kürelerin boy ve boyut dağılımı; emülsiyon oluşturucu reaktif türü, derişimi ve ortama verilmiş biçimi, uygulanan sıcaklık, monomer/su oranı, katkı maddelerinin türü ve miktarı, başlatıcı türü ve derişimi gibi parametreler ile yakından ilişkilidir [37].

2.2.3.2. Süspansiyon Polimerizasyonu

Suda çözünmeyen bir monomerin uygun bir dağıtma ortamında (genellikle su) karıştırılarak sıvı damlacıklar haline getirilerek dağıtılmış katı faz olarak polimerik partiküller elde edilmesine dayanan bir tekniktir. Sonunda bu dağıtılmış damlacıkların boyut spektrumunda dinamik bir dengeye ulaşılması halinde kararlı bir ortalama damlacık boyutu oluşur [38]. Polimerik yapı bu damlacıkların içerisinde oluşmaktadır [39].

Bu yöntemle 10 µm - 10 mm boyut aralığında mikroküreler sentezlenebilir. Yöntemin en önemli avantajı mükemmel boyut kontrolüne olanak sağlamadır [37]. Partikül boyutu polimerizasyon reaktörünün şekli, karıştırma hızı gibi parametrelerden etkilenebilir [39].

Süspansiyon polimerizasyonu üç adımda gerçekleşir. İlk adım sıvı-sıvı dispersiyon oluşumu, ikinci adım damlacıkların polimeri partikülü oluşturacak şekilde bir araya gelmesini sağlayan reaksiyonlar ve son adım da partikül boyutunda bir değişim olmaksızın %80-90 arasında bir dönüşüm oluşmasıdır [40]. Bu yöntemle polivinilklorür, polimetilmetakrilat ve polistren gibi polimerlerin ticari üretimleri yapılmaktadır [39].

2.2.3.3. Dispersiyon Polimerizasyonu

Dispersiyon polimerizasyonu, mikron büyüklüğünde ve dar bir boyut dağılım aralığında mikroküre oluşturan tek basamaklı bir yöntemdir [41]. Emülsiyon veya mikroemülsiyon polimerizasyonu gibi heterojen polimerizasyon teknikleri ile bu partikül boyutlarına inilememektedir.

Dispersiyon polimerizasyonunda başlangıç fazında monomer, başlatıcı, stabilizatör ve çözücü homojen bir halde bulunmaktadır. Oluşan polimer polar veya apolar olup çözünmeyen bir yapıdadır [42].

Sentez esnasında polimerizasyon karışımının ısıtılmasıyla başlatıcı, oligomer radikalleri oluşturacak şekilde bozunur. Bu oligomerik zincirler ortamda çözülmüş halde kalamazlar, kritik zincir uzunluğuna ulaştıklarında çökerler. Bu çökeltiler, polimer çekirdeğini oluşturacak yapılardır ve aynı zamanda stabilizatörü adsorplayarak manyetik çekirdeğe sahip ilk partiküllerin oluşmasını sağlarlar. Yeni çekirdek oluşumu olmadığı sürece partiküller olgunlaşır ve eş boyuta ulaşırlar. [41].

Bu yöntemde her ne kadar eş boyut dağılımına ulaşılabilirse de boyut kontrolü oldukça zordur. Monomer, başlatıcı, stabilizatör konsantrasyonu, ortamın polaritesi, sıcaklık, karıştırma hızı gibi faktörler partikül boyutunu doğrudan etkilemektedir [42].

Monomer konsantrasyonu; oligomer zincirlerinin çözünürlüğünü etkileyerek, polimerizasyon hızını yani çekirdek oluşumunu etkileyerek ya da stabilizatörün çözücülük gücünü etkileyerek partikül boyutunu belirler.

Başlatıcı konsantrasyonunun artması radikal konsantrasyonunu artırır, bu da çöken oligomer zinciri konsantrasyonunu artırır.

Bu durumda düşük molekül ağırlığına sahip partiküller polimerizasyonun erken basamaklarında oluşur ve böylece büyük boyutlu partiküllerin oluşumuna fazla rastlanmaz. Başlatıcı konsantrasyonu, stabilizatörün adsorpsiyon hızını ve devamlı fazın viskozitesini de etkiler. Bunun yanında düşük başlatıcı konsantrasyonu ve yüksek stabilizatör konsantrasyonu kombinasyonu da geniş boyut dağılımına sebep olur. Tüm bunlar göstermektedir ki eş boyutlu küreler oluşması için başlatıcı ve stabilizatör dengesi oldukça önemlidir [43].

Stabilizatör konsantrasyonu oldukça önemlidir. Çünkü bu madde, küre kararlılığını ve çözelti viskozitesini belirler. Artan stabilizatör konsantrasyonu ve molekül ağırlığı viskoziteyi de artırır. Bu da patikül boyutu ile doğrudan bağlantılıdır. Poliglisidilmetakrilat manyetik mikroküre sentezinde stabilizatör olarak kullanılan polivinilpirolidonun (PVP) üç çeşidi de farklı sonuçlar vermektedir. PVP-K15 (molekül ağırlığı 15 kDa) kullanıldığında en küçük, PVP-K90 kullanıldığında ise en büyük mikroküreler sentezlenmektedir.

Uygun polarite, başlangıç bileşenlerinin çözünür halde kalıp sadece polimerleşen maddelerin çökmesini sağlar.

Oligomer zincirlerinin çözünürlüğü, kritik zincir uzunluğu, çöken zincirlerin konsantrasyonu, kürelerin oluşum hızı sıcaklık ile artmakta ve devamlı fazın viskozitesi ise azalmaktadır. Bunların sonucu olarak artan sıcaklıkla küre boyutu artmaktadır [44].

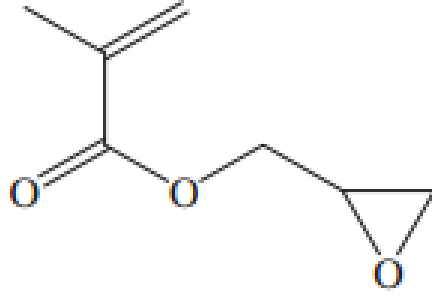
2.2.3.4. Miniemülsiyon Polimerizasyonu

Miniemülsiyonlar, damlacık boyutu 50-500 nm arasında olan kararlı yağ damlacıklarının akışkan dispersiyonlarıdır. Hidrofobisiteleri çok yüksek monomerlerin polimerleştirilmesi için oldukça uygun bir yöntemdir. Yağ, su, sürfaktant ve suda çözünmeyen bir hidrofob içerirler. Bu hidrofob ko-stabilizatör olarak adlandırılır ve küçük damlacıklardan büyük damlacıklara kadar monomerin degradasyonunu önlerler. Ko-stabilizatörler genellikle düşük molekül ağırlığına sahiptir, sıklıkla setil alkol veya heksadekan tercih edilir [45,46].

2.3. Manyetik Poli-Glisidil Metakrilat Mikroküreler

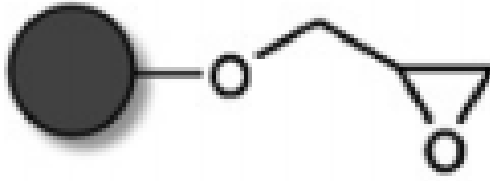
Glisidil metakrilat (GMA), diğer akrilik monomere kıyasla düşük toksisiteye ve maliyete sahip hidrofilik bir vinil monomerdir. Yapısında epoksi ve akrilik olmak üzere iki önemli fonksiyonel grup bulundurur [47,48].

Epoksi grubu, GMA'nın aminler, karboksilik asitler, anhidritler ve hidroksil içeren yapılar ile çapraz bağlanma reaksiyonları vermesini sağlarken; akrilik grubu, diğer vinil monomerlerle sulu ya da susuz sistemlerde kopolimerizasyonunu sağlamaktadır [49].



Şekil 2.15. GMA kimyasal yapısı [50]

Horak ve arkadaşları tarafından, polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR), immünomanyetik ayırmalarda, *Salmonella* hücrelerinin saptanmasında, DNA diyagnostiklerinde ve genomik DNA izolasyonunda kullanılmak üzere dispersiyon polimerizasyonu ile manyetik poligliseril metakrilat mikroküreler hazırlanmıştır [51].



Şekil 2.16. GMA mikroküre yapısı [52]

GMA mikroküreler çeşitli maddelerle doğrudan reaksiyona girebilirler veya modifiye edilerek farklı uygulamalarda kullanılabilirler [53]. GMA'da bulunan epoksi grupları; amin, tiyol ve fenolik gruplarla kolayca reaksiyona girerek kararlı kovalent bağlar oluşturur. GMA polimerize olduğu zaman reaktif oksiran halkası ve aldehit grubu sayesinde, proteinler veya enzimlerle doğrudan bağ oluşturabilir [51].

2.4. Manyetik Mikrokürelerin Kullanım Alanları

Manyetik polimerler genellikle iyi kütle aktarımı ve seçici ayırma gibi başlıca iki özellikten dolayı tercih edilmektedir [54]. Son yıllarda biyoteknoloji ve biyomedikal alanlarda manyetik mikrokürelerin kullanımında önemli bir artış olmuştur [55].

Bu kapsamda medikal teşhis ve tedavi, kanser tedavisinde hedefli ilaç taşınımı, basit moleküllerden hücrelere, antibadilere, nükleik asitlere, polimeraz zincir reaksiyonlarındaki reaktiflere, proteinlere, HIV-1 proteaz enzimine, hormonlara ve antijenlere kadar uzanan geniş bir yelpazede hedef molekülü ayırma, analiz ve teşhisi, immunoassayler, manyetik hipertermi, tümörlerin manyetik rezonans görüntülenmesinde kullanılan kontrast ajanlar, yüzeylerine antibadi immobilize edilerek gıda veya benzeri maddelerdeki mikroorganizma kontaminasyonlarının belirlenmesi sayılabilir [55-57].

Manyetik mikrokürelere, ilgili reseptöre karşı protein veya monoklonal antibadi ile kaplayarak DNA fragmentlerini, hedef enzimleri, spesifik kanser hücrelerini, T- ve B- lenfositleri, granülositleri, lökositleri, monositleri, dendritik hücreleri, vücut sıvılarındaki (kemik iliği, dalak ve idrar) doğal koruyucu yapıları tutma ya da ayırma özellikleri kazandırılabilir [57].

Bu ve bunlara benzer uygulamalarda kullanılacak manyetik mikroküreler kararlı, süperparamanyetik, eş boyutlu, dar boyut dağılım aralığına, eşit oranda manyetik içeriğine ve yüzeylerinde uygun fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır [51].

Manyetik mikroküreler, gözenekli ve gözeneksiz olabildikleri gibi inorganik maddeler veya çeşitli sentetik ve doğal polimerler kullanılarak sentezlenebilir. İnorganik maddeler ile sentezlenen kürelerin çözünmemeleri, yüksek mekanik kararlılığa sahip olmaları ve uzun süre bozunmadan saklanabilmeleri başlıca avantajları iken, ligand immobilizasyonu için kısıtlı fonksiyonel gruplar içermeleri ise önemli bir dezavantajdır. Polimer kullanılarak poli(hidroksietil metakrilat), poli(vinil alkol), poliakrilamid, poli(vinil bütiral), poli(metil metakrilat), poli(glisidil metakrilat), süperparamanyetik poli(vinil asetat-divinil benzen), agaroz, metakriloil-amidohistidin içeren poli(etilenglikol dimetakrilat), poli(stren-divinilbenzen) ve aljinat mikroküreler elde edilir. Bu mikrokürelerin çapları 50-300 µm aralığındadır [48].

2.5. Manyetik Ayırma Teknikleri

Manyetik maddeler (magnetler), milattan önce altıncı yüzyılın başlarında keşfedilmiştir. Fakat on sekizinci yüzyılın sonlarına kadar magnetlerin diğer bazı maddeler üzerinde etkili olabildikleri bilinmemiştir. Gauss, Helmholtz ve diğerleri tarafından elektrik, manyetizma ve magnetlerin diğer maddeler üzerindeki etkileri ile ilgili bir çalışma hazırlanmış ve 'mıknatıs taşı' keşfedilmiştir. Bu malzeme gelişmekte olan kimya ve maden endüstrisinde kullanılmaya başlanmıştır. 1792'de William Fullarton tarafından bir magnet ile demir minerallerini ayırma işleminin patenti alınmıştır ve bu ilk manyetik ayırma yöntemi olarak literatüre geçmiştir [58]. Biyoteknolojideki uygulamalar ise daha yakın zamana rastlamaktadır. 1940'ların başında atık sularda çözünmüş ve koloidal halde bulunan biyolojik maddelerin arıtılması için saf manyetik demir oksitler kullanılmıştır.

1950'lerde ise daha büyük ölçekte manyetik ayırma yöntemleri tasarlanmış ve manyetik partiküllerin biyoteknolojide kullanılması gündeme gelmeye başlamıştır. Fakat 1970'lere kadar manyetik partiküller ile kaydadeğer herhangi bir biyomolekül ayırma işlemi yapılmamıştır [59-60].

Günümüzde biyoteknoloji ve tıp alanında çeşitli hücre, virüs ve virüs benzeri yapıların ayrımı, protein, DNA, RNA saflaştırma veya işaretleme, gıda analizleri, ilaç taşınımı, biyokataliz ve teşhis amaçlı çalışmalarda manyetik ayırma yöntemlerinden faydalanılmaktadır [58, 61].

Manyetik ayırma oldukça basit bir işlemdir. Hedef moleküle afinite gösteren bir ligand immobilize edilmiş mikroküreler analit çözeltisi ile doğrudan karıştırılır. Bekleme süresi içerisinde hedef molekül, kürelere bağlanır. Bu manyetik kompleks, uygun bir manyetik ayırıcı kullanılarak kolay ve hızlı bir şekilde ayrılır. Kirleticiler yıkandıktan sonra hedef molekül kürelerden desorbe edilir.

Manyetik ayırma işleminin kromatografi veya santrifüj gibi diğer tekniklere kıyasla birçok avantajı vardır. Bunlardan başlıcaları; kolay, hızlı ve kan, kemik iliği, doku homojenizasyonu, kültür ortamı, su, gıda, toprak gibi örnekler için hiçbir ön işleme gerek duyulmadan doğrudan uygulanabilmesidir. Tüm saflaştırma işlemi için tek bir analiz ekipmanı (örneğin deney tüpü) yeterli olmaktadır. Sıvı kromatografisi, santrifüj veya diğer yöntemlere kıyasla maliyeti oldukça düşüktür. [61-63].

2.5.1. Manyetik Ayırmada Kullanılan Sistemler

2.5.1.1. Kesikli Sistemler

Kesikli ayırma oldukça basit bir yöntemdir. İmmobilize afinite veya hidrofobik liganda sahip bir manyetik taşıyıcının, iyon-değiştirici grubun veya tek bir yapıya afinite gösteren manyetik biyopolimer partiküller, direkt olarak hedef molekülü içeren çözelti ile karıştırılır. Örnekler, genellikle ham hücre lizatları, tüm kan, plazma, süt, idrar, kültür ortamı, fermantasyon veya gıda endüstrisinin atıkları olabilir. Hedef molekül ve manyetik partiküller etkileşime girip manyetik bir kompleks oluştururlar. Bu kompleks uygun bir manyetik ayırıcı kullanılarak hızlı ve kolay bir şekilde örnekten ayrılabilir.



Şekil 2.17. Proteinleri ve peptidleri ayırmada kullanılan kesikli manyetik sistemler

2.5.1.2. Sürekli Sistemler

Bu sistemler, bir sıvı ve ayırma sisteminde bulunan hedef molekülleri içerir. Kesikli sistemlere kıyasla daha yüksek maliyetli ve karmaşıktır. Manyetik paslanmaz çelik yünü veya küçük çelik küreler ile doldurulmuş küçük kolonlar, magnetlerin arasına yerleştirilir. Hedef molekülü içeren çözelti kolona verildiğinde manyetik matris hedef molekülleri tutar. Magnetler kaldırılır ve tutulan hedef moleküller akış ile veya hafif titreşim verilerek sökülür.

Ferrografi, bir cam kesiti üzerinde dışasal manyetik alan ve serbest akışlı açık bir sistemdeki partüküllerin manyetik momentleri arasındaki etkileşime dayanan bir tekniktir [62,64].

2.5.1.3. Sabit Yataklar

Düşük akış hızlarında verilen analit çözeltisi, durgun parçacıkların arasındaki boşluklardan geçer. Bu sistemde kolon, dolgu maddesiyle doldurulmuştur. Akış hızının artması ile kolondaki partiküller biraz hareket ederler ve bir titreşim görülür. Daha az madde aşınması, iki malzeme arasında iyi bir temas sağlanabilmesi ve sıvı fazın tıpa akışlı olması gibi avantajları varken; sınırlı sıcaklık kontrolü yapılması, kanallaşma olasılığı, basınç farkını düşürmek için büyük partikül gerekliliği gibi dezavantajları vardır.

2.5.1.4. Akışkan Yataklar

Akışkan yatak terimi, manyetik partiküllerin sıvı içerisinde asılı durma halini tanımlamak için kullanılır. Bu sistemler; kan, idrar gibi fizyolojik sıvılardan özgül moleküllerin ayrılması, tanınması ve saflaştırılmasında, petrokimya endüstrisinde, atık arıtımında, çimento sanayide kullanılmaktadır.

Büyük ölçekteki işlemler için uygun olması, akışkan ve partikül arasındaki ısı ve kütle aktarımının yüksek olması gibi avantajlarının yanında kabarcık oluşumu ve katı geri alınması gibi problemlerle de karşılaşılabilir [54].

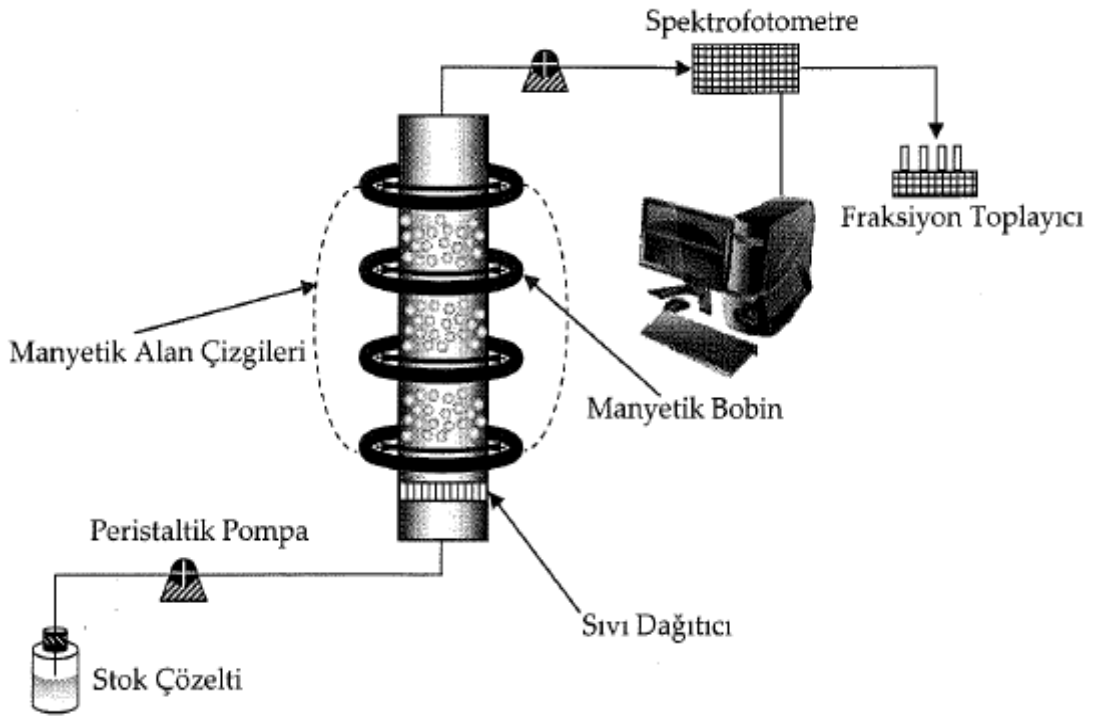
2.5.1.5. Manyetik Stabilize Akışkan Yataklar

Akışkan yataklar uzun yıllardır kimyasal çalışmalarda kullanılmaktadır. Akışkanlığın temelinde partikül yatağından sıvı geçtiği sırada ortaya çıkan kuvvetlerin (partiküllerde yerçekimine zıt oluşan direnç kuvveti) dengesi vardır [65].

Manyetik partiküller içeren bu akışkan yatağa manyetik alan uygulandığında, bu partiküller etkilenecek ve yatağın hidrodinamik özellikleri, uygulanan manyetik alan şiddetine ve partiküllerin özelliklerine bağlı olarak değişecektir [66]. Bu esnada akışkan yatağın manyetik stabilizasyonu katı fazdaki hareketlerin baskısı sonucunda oluşmaktadır [67].

Manyetik stabilize akışkan yataklar, sabit dolgulu kolonlar ve akışkan yatakların avantajlarını bir araya getiren sistemlerdir [68]. Bunlardan başlıcaları; partikül karışması, iyi katı-sıvı teması, yüksek kütle transfer hızı, yatak boyunca düşük oranda basınç kaybı ve katı iletiminin kolaylığıdır [54,69]. Özellikle bu sistemde atık sular gibi yüksek viskoziteye sahip karışımlarla çalışıldığında herhangi bir tıkanma meydana gelmeden yüksek taşınım değerlerine ulaşılabilir [70].

Manyetik akışkan yatakların sürekli sistemde çalışmaları diğerlerine göre daha kolaydır. Düzgün bir manyetik alan elde edebilmek için doğru akım kullanan, düşük voltajlı, kolon etrafına yerleştirilen bir sarım kullanılır. Analit çözeltisi peristaltik pompa veya hidrolik taşıma sistemi ile kolon içine gönderilir [54].



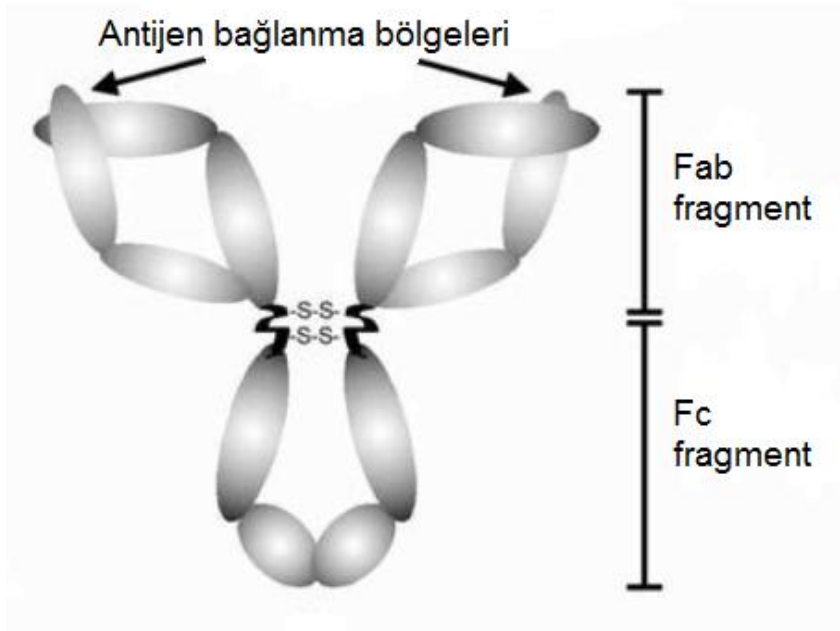
Şekil 2.18. Manyetik stabilize akışkan yatak şeması [54]

Bu sistemde kullanılan partiküllerin manyetik özelliklerinin fazla olmaması gerekmektedir. Aksi takdirde partiküller birbirlerine yapışıp kümeleşebilirler. Böyle bir durumda kolon çevresindeki sarımdan geçen akım miktarı ayarlanarak, manyetik alan şiddeti değiştirilebilir ve kümeleşme önlenir.

Son zamanlarda manyetik stabilize akışkan yataklardan biyoteknoloji ve tıp alanında oldukça fazla kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları, protein ve peptid saflaştırma, DNA/RNA izolasyonu, immünitler, ilaç taşınımı ve ilaç hedeflemedir [54, 71, 72]

2.6. İmmünoafinite Kromatografisi

İmmünoafinite kromatografisi, protein saflaştırmada kullanılan en önemli tekniklerden biridir [73]. Günümüzde; antikorların, hormonların, peptidlerin, enzimlerin, rekombinant proteinlerin, reseptörlerin, virüslerin ve hücre içi bileşenlerin izolasyonu için geliştirilmiş binlerce immünoafinite kromatografisi yöntemi mevcuttur [74]. Bu yöntemin temelini, antibadi ve antijen arasındaki spesifik etkileşimler oluşturur [75]. Antibadiler, vücutta yabancı bir ajan olarak algılanan antijenlere (bakteriler, viral partiküller ve yabancı proteinler yani hayvanlardan, bitkilerden veya yiyeceklerden gelen ve alerjik yanıt oluşturan proteinler) karşı oluşturulan glikoprotein yapılı proteinlerdir. Antijenler üzerinde antibadiye bağlanan bölgelere epitop adı verilir. Tipik bir antibadi (immunoglobulin G – Ig G) disülfid bağıyla bağlanmış dört polipeptid zincirinden (iki özdeş ağır zincir ve iki özdeş hafif zincir) oluşmaktadır. Bu polipeptid zincirleri Y veya T şeklindedir. Alt kısımdaki sap bölgesinin aminoasit içeriği, aynı gruptaki antibadilerde farklılık göstermez. Antibadinin iki üst noktasında eşdeğer iki antijen-bağlama bölgesi bulunur. Bu bağlama bölgelerinin içindeki ya da yakınlarındaki aminoasit içeriği antibadiler arasında çeşitlilik gösterir. Bu çeşitlilik vücuda giren yabancı ajanlara karşı farklı spesifikliğe sahip antikorların üretilmesini sağlar [74].



Şekil 2.19. Antibadi yapısı [74]

Antibadi-antijen etkileşimlerinde rol oynayan etkileşim vardır. Bunlar; iyonik etkileşimler, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleridir. Antibadi ve antijen yakın temasa geçtiğinde bu zayıf kuvvetlerin hepsi etkinleştikten aralarında güçlü bir çekim oluşturur [74].

İmmünoafinite kromatografisinin genel uygulama prensibi, antibadi immobilize edilmiş destek maddesini bulunduran bir kolondan analit çözeltisi geçirildiğinde, immobilize antibadilerin spesifik olarak hedef molekülü tutmasına dayanır. Antibadiye bağlanmayan ya da zayıf olarak bağlanan maddeler ise uygun bir çözelti ile yıkanarak uzaklaştırılır. Ardından uygun bir desorpsiyon ajanı ile antibadi-antijen arasındaki bağ koparılarak antijen saflaştırılır [75]. Bu sistemdeki en önemli nokta durgun faz olarak kullanılacak antibadilerin hazırlanmasıdır [76]. En yaygın olarak poliklonal ve monoklonal antibadiler kullanılmaktadır. Bunların yanında oto-antibadiler ve anti-idiotipik antibadiler de tercih edilebilmektedir [74].

2.6.1. Poliklonal Antivadiler

Bu tür antivadiler, test ajanının fare, tavşan, koyun yada keçi gibi bir deney hayvanına enjekte edilmesiyle elde edilir [74,76]. Bu hayvanların kan örnekleri enjeksiyondan birkaç hafta veya ay sonra alınır. Enjekte edilen ajana karşı oluşturulmuş tüm antivadiler serumdan alınır. Bu antivadiler birkaç farklı hücre kanalı tarafından üretildikleri için *poliklonal antivadi* olarak bilinirler [76].

Enjeksiyon yapılan deney hayvanlarında ilk olarak üretilen antivadiler immunoglobulin M (Ig M) sınıfı antivadilerdir. Daha uzun süre test ajanına maruz kaldıklarında immunoglobulin-G (Ig G) sınıfı antivadiler üretilmeye başlanır. Oluşan bu Ig G'ler afinite ve diğer özellikleri açısından immünoafinite kromatografisi için daha kullanışlı antivadilerin üretilmesini sağlar.

Sadece saf antijene ve birkaç deney hayvanına ihtiyaç duyularak üretilmesinin kolaylığı, monoklonale oranla daha fazla antijenik yapıya karşı üretilmiş antivadilerin toplanabilmesi önemli avantajları olmasına rağmen immünoafinite kromatografisi uygulamalarında çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; bağlanma özellikleri ve epitop spesifitesi olarak heterojen özellik göstermeleridir. Bu durum ilgili proteinin farklı formlarıyla da (aktif veya inaktif) etkileşime girmelerine neden olabilir [74].

2.6.2. Monoklonal Antivadiler

Son yirmi sene içerisinde, tek çeşit antivadi üreten hücrelerin izolasyonunu ve bunların uzun süreli antivadi üretiminde kullanımının daha kolay olduğu hücre kanalları oluşturması için kanser hücreleriyle kombinasyonunu sağlayan teknikler geliştirilmiştir. Antivadi üreten–uzun ömürlü hücre kanalları “hibridoma” olarak bilinir ve bu hibridomaların ürettiği antivadilere *monoklonal antivadi* denir [76]. Monoklonal antivadiler; spesifik membran proteinlerinin (özellikle adrenerjik reseptörlerin), viral reseptörlerin ve kompleman reseptörlerinin immünoafinite yöntemleri ile izolasyonu için kullanılmaktadır. İmmünoafinite kromatografisi için hazırlanacak kolonlarda monoklonal antivadiler nonspesifiteleri nedeniyle oldukça kullanışlıdır. Sınırlı seçicilik ve bu antivadilerin klonal özellikleri poliklonal antivadi hazırlamak için gerekli olan fazladan temizleme prosedürlerine duyulan ihtiyacı ortadan kaldırmaktadır [74].

2.6.3. Otoantibadiler ve Anti-idiyotipik Antibadiler

Konağın kendi vücut bileşenlerine karşı ürettiği antibadilere *otoantibadi* denir. Birçok durumda, bu antibadiler klinik hastalıklar için biiyoışaretçiler olarak kullanılmaktadır. Otoantibadilerin poliklonal ve monoklonal antibadilere kıyasla daha fazla avantajı vardır. Bunun nedeni ise diğer iki yöntemdeki gibi yapay olarak izole edilmiş antijenlerin değil, konakçı tarafından seçilmiş reaktif ve otoimmun hastalıkta bulunan gerçek antijenlerin kullanılmasıdır. Dezavantajları ise ulaşılabilirliklerinin, izolasyonunun ve saflaştırılmasının zorluğudur. Örneğin, spesifik bir otoantibadinin elde edilmesi için organizmanın belirli bir hastalığa sahip olması ve bu hastalığın bir kere aşılmış olması gerekmektedir. Bu özellikleri taşıyan hasta plazmalarına veya serumlarına ulaşmak oldukça zordur.

En önemli otoantibadiler, insan hücrelerinden reseptörlerin izolasyonu için kullanılabilir olan hücre membran reseptörlerine karşı üretilenlerdir.

Reseptör substratlarını taklit ederek membran reseptörlerine bağlanabilen antibadilere *anti-idiyotipik antibadi* (anti-id) denir. Anti-id'ler immunoafinite kromatografisinde dokudan reseptörlerin izolasyonunda kullanılmaktadır.

Anti-id antikorları dört farklı yollarla elde edilebilir. Bunlar; orjinal idiyotipin immunizasyonu, orjinal idiyotip üreten sabit hücrelerle immunizasyonu, idiyotip ve romatoid faktör 12 içeren immun komplekslerle immunizasyonu ve art arda uzun bir süre boyunca aşılanmış konağın serum taramasıdır.

Hedef immunoglobulin üzerinde bulunan tanımlanmış epitoplara için eşsiz özgüllüğünün olması ve immun yanıtları işleyebilecek yeteneklerinin olması anti-idlerin en önemli avantajlarındanıdır. Ancak antijenlerin antibadi bağlama bölgelerindeki epitoplara eşleştirilmesinde veya idiyotipik antibadilerle reaktif epitoplara incelenmesinde kullanılmadığı sürece bu metod afinite kromatografide kullanışlı değildir. Bu nedenle bu antibadiler membran reseptörlerinin ve etiketlenmiş antibadilerin izolasyonu gibi özel durumlar haricinde immunoafinite kromatografisinde çok sınırlı bir uygulama alanına sahiptir [74].

2.6.4. İmmunoafinite Kromatografisinde Kullanılan Destek Malzemeleri ve Antibadi İmmobilizasyonu

İmmunoafinite kromatografisinde genellikle selüloz, agaroz gibi karbonhidrat yapıları destek malzemeleri veya akrilamid polimerler, kopolimer ve türevleri, polimetakrilat türevleri ve polietersülfon gibi sentetik organik destek malzemeleri tercih edilir. Affinica Agarose/Polymeric Supports (Schleicher and Schuell), AvidGel (BioProbe), Bio-Gel/Affi-Gel (BioRad), Fractogel (EM Separations), HEMA-AFC (Alltech), Reacti-Gel (Pierce), Sepharose/Superose/Sephacryl (Pharmacia), Trisacryl/Ultrogel (IBF) ve TSK Gel Toyopearl (TosoHaas) gibi ticari destek malzemeleri de bulunmaktadır. Bu malzemelerin en büyük dezavantajları düşük kütle transfer özellikleri ve yüksek akış hızında ve basınçta kararsız olmalarıdır.

Düşük ve yüksek performanslı desteklere uygulanan çok sayıda antibadi immobilizasyonu yöntemi vardır. En sık kullanılan, antibadilerin direkt kovalent bağlanmasıdır. Bu yöntemin genel prensibi; *N,N'*-karbonil diimidazol, siyanojen bromür, *N*-hidroksisüksinimit, tresil klorür/tosil klorür veya destek maddesinin yüzeyinde aktif epoksi veya aldehit grubu oluşturabilecek başka herhangi bir ajan ile aktive edilmiş destek malzemesi ile antibadinin serbest amin grubu arasındaki etkileşimlere dayanır.

Bu yöntemin dışında, antibadiler bölge seçimli olarak da immobilize edilebilirler [76]. Fab bölgesinin üretimi sırasında oluşan serbest sülfidril grupları, antibadilerin desteklere bağlanması için kullanılabilir. Bunun için divinilsülfon, epoksi, iyodoasetil/bromoasetil, maleimid, TNB tiyol ve tresil klorür/tosil klorür gibi metotları içeren çeşitli teknikler kullanılır.

Bölge seçimli immobilizasyon için bir diğer yöntem ise antibadilerin karbohidrat kalıntıları vasıtasıyla bağlanmasıdır. Bu aldehit kalıntılarını üretmek için periyodat ya da enzimatik sistemlerle ılıman koşullarda oksidasyon gerçekleştirilir. Bu aldehit grupları antibadi immobilizasyonu için hidrazid ya da amin içeren destekle reaksiyona sokulabilir [74].

2.6.5. İmmunoafinite Kromatografisinde Elüsyon Koşulları

İmmunoafinite kromatografisinin analitik uygulamalarında uygun elüsyon tamponunun ve elüsyon koşullarının seçilmesi oldukça önemlidir. Çünkü analitin mümkün olan en kısa sürede elüe edilmesi ve immobilize antibadinin dönüşümsüz bir hasar almasını önlemek gerekmektedir. En sık başvurulan yöntemler pH değişimi ile elüsyon ve kaotropik ajanlarla elüsyondur.

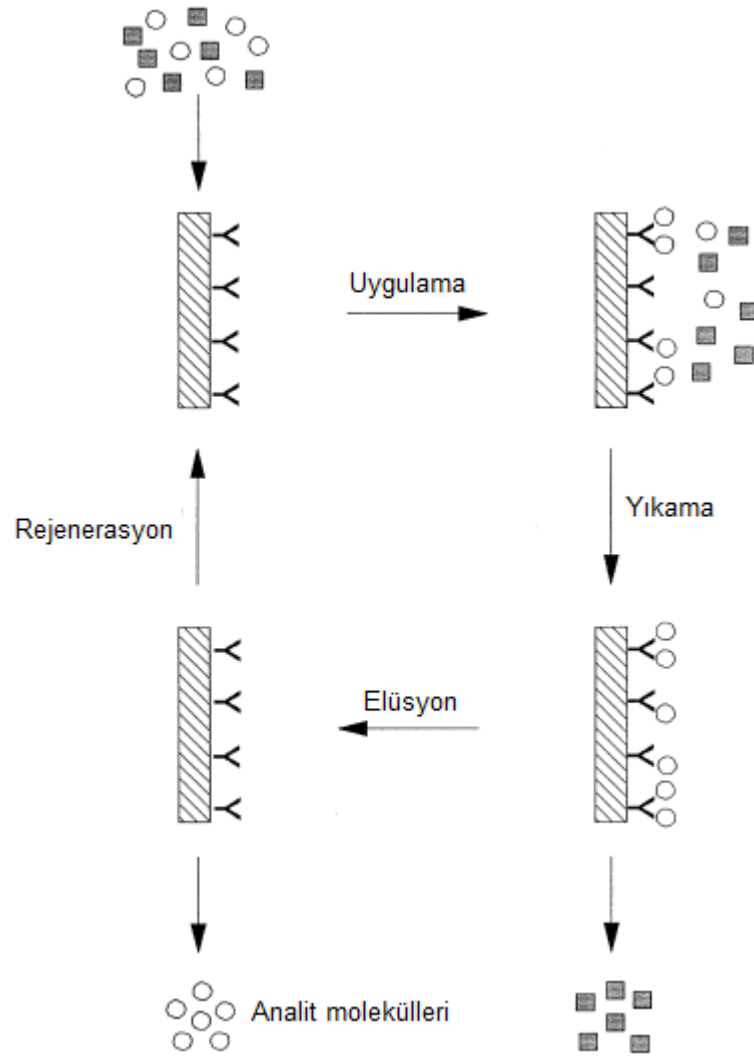
İmmunoafinite kromatografisi nötralden asidik pH'a kadar bir aralıkta gerçekleştirilir. Elüsyon için genellikle pH 1 – 2.5 kullanılmaktadır. Sıklıkla kullanılan elüsyon ajanları fosfat, sitrik, formik yada asetik asittir. Bunların yanında tris ve HCl de etkili ajanlardır. Alkali elüsyon koşulları düşük performanslı immünoafinite kromatografisinde iyi sonuçlar verebilmektedir. Fakat yüksek pH proteinleri denatüre edebilir.

Denatürasyona rastlanmamasından dolayı kaotropik ajanlarla elüsyon immünoafinite kromatografisinde tercih sebebidir. Bu yöntemde iyodür (I^-), klorür (Cl^-), tiyosiyanat (SCN^-), trifloroasetat (CF_3COO^-) ve perklorat (ClO_4^-) içeren tuzlar, kaotropik özellik gösteren tuzlar kullanılmaktadır. Bu tuzlar analit veya antibadinin etrafındaki suyun yapısını değiştirip hidrofobik etkileşimleri azaltarak elüsyonu gerçekleştirir.

2.6.6. İmmunoafinite Kromatografisinde Dedeksiyon Yöntemleri

2.6.6.1. Direkt Dedeksiyon

Test çözeltisi, antibadi immobilize kolona direkt olarak uygulanır. Kolonda tutulmayan bileşenler uzaklaştırıldıktan sonra, elüsyon ajanı kolondan geçirilir ve analitin antibadiyle kurduğu bağlar koparılır. Özellikle HPLC sisteminin bir parçası olarak gerçekleştirildiğinde bu yaklaşımın hızlı ve basit olması avantaj sağlamaktadır [74,76].



Şekil 2.20. Direkt dedeksiyon şematik gösterimi [76]

Bu yöntem vücut sıvıları, hücre ve doku ekstraktları gibi örneklerle çalışmak için oldukça uygundur [76].

2.6.6.2. Dolaylı Dedeksiyon

Bu yöntem kromatografik immunoassay olarak bilinmektedir. İmmünoafinite kromatografisinin immunoassay çalışmalarında kullanımı, sinyalleri kolayca tespit edilemeyen iz elementlerin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Bu problem kromatografik etiketlenmiş antibadinin ya da dolaylı analit dedeksiyonu için kullanılan etiketlenmiş analit analoglarının immunoassaylerde kullanımı ile aşılabilir.

Bu gibi çalışmalarda kullanılacak etiketleme haricinde başvurulabilecek birkaç yöntem mevcuttur. Yarışmalı-bağlanma immunoassay, tabakalı immunoassay ve tek bölgeli immunometrik testler bu yöntemlere örneklerdir.

Yarışmalı bağlanma immunoassayin temel prensibi; hem doğal analite hem de etiketlenmiş türlere bağlanan sınırlı miktarda antibadinin, belirli bir miktarda etiketlenmiş analit ile örnekteki analitin inkübasyonunu içermektedir. Ortamda çok az miktarda antibadi olduğu için örnek ve etiketlenmiş analit molekülleri bu antibadilerin bağlanma bölgeleri için yarışır. Bu yarışmadan sonra, çözeltide serbest kalmış etiketli analog moleküllerinin yanı sıra etiketlenmiş analog bağlı antibadiler de analitten ayrılır.

Tabakalı immunoassay yada iki-bölgeli immunometrik assay ise ilgilenilen analiti bağlayan iki farklı antibadi türünün kullanıldığı çalışmalardır. Bu iki antibadinin ilki durgun faz desteğine bağlanır ve analitin örnekten ayrılmasında kullanılır. Daha sonra ayırıştırmadan önce yada sonra kolay ölçülebilir bir etiketi (bir enzimi yada fluorescent etiketi) içeren ikinci antibadi analit çözeltisine eklenir. Bu ikinci antibadi, analit üzerindeki etiketin yerleşmesine olanak tanır böylece immunoafinite destek üzerindeki analit miktarı belirlenebilir. Tabakalı immunoassaylerin en önemli avantajı, analitin miktarı ile orantılı etiketler için sinyal üretmeleridir. Bu teknikte iki tür antibadi kullanılması, tekniğe yarışmalı-bağlanma immunoassaylerden daha yüksek bir seçicilik kazandırır.

Kullanılan bir diğer yöntem ise tek-bölgeli immunometrik assay'dir. Bu yöntemde ilk olarak örnekler etiketlenmiş antibadi ile ya da ilgili analit için spesifik Fab fragmentleri ile inkübe edilir. Örnek analit ve antibadiler arasındaki bağlanmalar gerçekleştikten sonra karışım, analit immobilize kolona uygulanır. Bu kolon, örnekteki bağlanmamış tüm antibadilerin ya da Fab fragmentlerinin ayrılması için kullanılır. Bu arada analit içerisinde bulunan antibadiler yada Fab fragmentleri kolondan doğrudan geçer ve bağlı olmayan bölgelerde pik verir. Yarışmalı-bağlanma immunoassayler gibi bu yöntemde de hem az hem de çok miktardaki çözünenlerin tespit edilmesi mümkündür. Ayrıca tabakalı immunoassayde olduğu gibi bu yöntemde de orjinal örnekteki analitin miktarıyla orantılı bağlı etiketlenmiş fraksiyonlar için sinyal elde edilmektedir [74].

2.7. Literatür Çalışmaları

- Zhang ve ark. tarafından transferrin saflaştırılması için hidrofobik etkileşim kromatografisi ve anyon değişim kromatografisi kullanılmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde *Phenyl Sepharose 6 FF* kolonu ve anyon değişim kromatografisinde *Q (kuarter amin) ve DEAE (dietyl amino etan) Sepharose FF* kolon kullanarak saflaştırma yapmışlardır. Tek basamakta gerçekleştirdikleri anyon değişim kromatografisinde %95, hidrofobik etkileşim kromatografisi ile % 90 saflıkta transferrin elde edilmiştir. [3]
- Szwed ve ark. tarafından serum transferrin, ilaç taşıyıcı bir protein olarak kullanılmış ve lösemi tedavisi için doksorubisin ile konjuge edilmiştir. Doksorubisin tek başına kullanıldığında kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelerde de yıkım meydana getirirken, transferrin-doksorubisin konjugatının sadece kanserli hücrelere yüksek afinite gösterdiği bulunmuştur [80].
- Barroso ve ark. tarafından iki farklı kolon hazırlanarak immünoafinite kromatografisi ile serum transferrin saflaştırılması yapılmıştır. İlk yöntemde, silika kolon, hidrazid gruplarıyla türevlendirilerek *silika-hidrazid kolon* hazırlanmıştır. İkinci yöntemde ise sefaroj jel, siyanojen bromür gruplarıyla türevlendirilerek *Sefaroz-CNBr kolon* hazırlanmıştır. Hazırlanan bu iki kolona da anti-transferrin antibadi immobilize edilerek insan serum örneklerinden transferrin saflaştırılmıştır. Bu çalışmada adsorpsiyon kapasiteleri Sefaroz-CNBr kolon ile 51 mg/L ve silika-hidrazid kolon ile 19 mg/L olarak saptanmıştır [81].
- Awade ve ark. tarafından yumurta akından ovotransferrin saflaştırma için jel filtrasyon–hızlı protein sıvı kromatografisi, ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve anyon değişim yüksek performanslı sıvı kromatografisi teknikleri karşılaştırılmıştır. Kolon olarak; jel filtrasyon–hızlı protein sıvı kromatografisinde *Superose 12 HR 10/30*, ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatografisinde *Supelcosil LC-304* ve anyon değişim yüksek performanslı sıvı kromatografisinde *Mono Q HR 5/5* kolonu kullanılmıştır. En iyi sonuç ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisinde alınmıştır [82].

- Van Gelder ve ark. tarafından Bio-Gel A (agaroz jel) destek materyalinin üzerine Cibacron Blue 3GA reaktif boyasını immobilize ederek serum transferrin saflaştırma işlemi için boya afinite kromatografisini kullanmışlardır. Yaklaşık %99 saflıkta transferrin elde edilmiştir [83].
- Horak ve ark. tarafından çok adımlı şişme polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanan ve ortalama partikül boyutu 4.2 µm olan makrogözenekli manyetik poli-glisidil metakrilat mikrokürelere insan anti-CD133 antibadisi immobilize edilmiştir. CD133; beyin, kolon ve karaciğer kanserleri için bir biyoişaretçidir. Manyetik mikrokürelere, hücre süspansiyonu ile etkileştirildikten sonra ortamdaki CD133 hücrelerinin %54.55'inin antibadi immobilize mikrokürelere tarafında adsorbe olduğu görülmüştür [84].
- Çakmak ve ark. tarafından dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile eş boyutlu manyetik poli-glisidil metakrilat mikrokürelere sentezlenmiştir. Bu mikrokürelere Protein A kovalent olarak immobilize edilmiş ve L929 fare fibroblast hücreleri ile etkileştirilmiştir. Ortamdaki hücrelerin %84'ü mikrokürelere tarafında adsorbe edilmiştir [51].
- Altıntaş ve ark. tarafından dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile eş boyutlu manyetik poli-glisidil metakrilat mikrokürelere sentezlenmiştir. Bu mikrokürelere L-triptofan immobilize edilmiştir ve lizozim saflaştırmak için hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılmıştır. L-triptofan immobilize poli-glisidil metakrilat mikrokürelere lizozim için adsorpsiyon kapasitesi 259.6 mg/g bulunmuştur [85].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler

İnsan serum transferrin, tavuk serum anti-transferrin antibadi, poli(vinilpirolidon) (PVP K-30), Fe (II,III) oksit nanotoz, etilenglikoldimetakrilat (EGDMA), L-sistein hidroklorür anhidrit, glisin-hidroklorik asit Sigma-Aldrich firmasından (St. Louis, ABD); glisidil metakrilat (GMA), α,α' -azobisisobütironitril (AIBN), toluen Fluka A.G. (Buchs, İsviçre) firmalarından sağlanmıştır. Kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıktadır ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmişlerdir.

Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen deiyonize suyun iletkenliği 18.2 M Ω /cm'dir.

3.2. Manyetik Poli(Glisidil Metakrilat) (m-PGMA) Mikrokürelerin Sentezi

Manyetik poli(glisidil metakrilat) (m-PGMA) mikrokürelerin sentezi için 9.5 mL glisidilmetakrilat (GMA), 0.1 mL etilen etilenglikoldimetakrilat (EGDMA), 9.0 mL toluen karışımı monomer fazı olarak hazırlanmıştır. 4.0 g PVP K-30, 84 mL etanol içinde çözülerek sulu faz hazırlanmıştır. Bu iki faz birbirine eklenerek yavaşça karıştırılmış, iyice karıştıktan sonra 0.2 g AIBN eklenmiştir. Tamamen çözüldükten sonra 50 mg Fe (II,III) oksit nanotoz eklenerek 20 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Bu karışım cam polimerizasyon reaktörüne alınmıştır. Çalkalamalı su banyosunda sıcaklık 70°C olarak ayarlanarak 4 saat boyunca sabit hızda karıştırma ile polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen manyetik mikroküreler sulu etanol çözeltisi ile toluenden arınana kadar yıkanmıştır.

3.3. Manyetik Mikrokürelerin Karakterizasyonu

M-PGMA kürelerin hidrate yoğunluğu manyetik partiküller etanol içerisinde dağıtılarak 25 mL piknometre ile ölçülmüştür.

Epoksi grup miktarı perklorik asit titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir.

M-PGMA küreler asetik asit çözeltisinde 0.1 M tetraetilamonyum bromürde dağıtılmış ve kristal-mor renk, mavi-yeşile dönüşene kadar 0.1 M perklorik asit çözeltisi ile titre edilmiştir.

3.3.1. FTIR Spektrofotometre Analizi

M-PGMA mikrokürelerin FTIR spektrumlarının alınması için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet IS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Spektrum Şekil 4.1.'de verilmiştir.

3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Morfolojisi

Sentezlenen m-PGMA mikrokürelerin yüzey yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir (LEOL, JEM 1200 EX, Tokyo, Japonya). Oda sıcaklığında kurutulan mikroküreler, alüminyumdan yapılmış SEM numune plakası üzerine iletken bir yapıştırıcıyla tutturulmuştur. Daha sonra örnek yüzeyleri vakum altında iken 200 Å kalınlığında metalik altın ile kaplanarak yüzey iletken hale getirilmiştir. Ardından hazırlanan numunelerin x10000 büyütme oranında fotoğrafları çekilmiştir.

3.3.3. Termogravimetrik Analiz-Diferansiyel Termal Analiz (TGA-DTA)

Belirli miktarda manyetit içeren m-PGMA mikrokürelerin termogravimetrik ve diferansiyel termal analizi (TGA-DTA) Shimadzu DTG-60H cihazı ile azot atmosferi altında (sıcaklık artışı: 20°C/dak) gerçekleştirilmiştir. Örneklerin 0-1000°C sıcaklık aralığındaki termal bozunma ve kütle kaybı değerleri termogravimetri (TG), ekzotermik ya da endotermik reaksiyonlar sonucu meydana gelen sıcaklık değişimleri diferansiyel termal analiz (DTA) ile tespit edilmiştir.

3.3.4. Elektron Spin Rezonans (ESR) ile Manyetizma Ölçümü

Polimer yapıdaki magnetit varlığı elektron spin rezonans spektrofotometresi (ESR) ile gösterilmiştir (EL9, Varian, ABD).

3.3.5. Şişme Testi

M-PGMA mikrokürelerin şişme özellikleri saf su içerisinde incelenmiştir. Kuru haldeki mikroküreler istenen miktarda tartılarak 50 mL saf su içeren vial içerisine konulmuştur. Bu vial, 25 °C ± 0.5 sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda 2 saat bekletilmiştir.

Ardından küreler vial içerisinden alınarak süzgeç kağıdı ile süzölmüş ve ıslak ağırlıkları tartılmıştır. Eşitlik 3.1 kullanılarak kürelerin denge şişme oranı bulunmuştur.

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

Eşitlikte W_o ve W_s kürelerin sırasıyla şişmeden önceki ve sonraki ağırlıklarıdır.

3.3.6. Zeta Boyut Analizi

Zeta potansiyeli (ζ), süspansiyon halindeki bir çözeltide bulunan taneler arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür. Sentezlenen m-PGMA mikrokürelerin boyut ve yüzey yük analizi Nano Zeta sizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Zeta boyut ölçümleri için cihazın hücresine 1.5 mL süspansiyon halindeki m-PGMA mikroküreler konulmuş ve elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

3.4. m-PGMA Mikrokürelere Anti-Transferrin Antibadi Bağlanması

M-PGMA mikroküreler epoksi gruplarının açılması için 0.1 M Na_2CO_3 çözeltisi ile (pH 9.0) 24 saat oda sıcaklığında rotatörde (22) etkileştirilmiştir.

Daha sonra mikrokürelerin üzerine belirli derişimlerde (0.1-1.0 mg/mL) pH 6.5 sitrat tamponu içerisinde hazırlanmış anti-transferrin antibadi çözeltisi eklenip rotatörde 2 saat karıştırılarak kovalent bağlanma gerçekleştirilmiştir.

Bağ yapmayan epoksi gruplarının inaktifleştirilmesi için 50 mM L-sistein hidroklorür anhidrit çözeltisi antibadi bağlı mikrokürelerin üzerine eklenmiş ve 30 dakika boyunca rotatörde tutulmuştur.

Ardından saf su ile yıkama yapılmıştır. İmmobilizasyon tamamlandıktan sonra karışım, 9000 rpm hızında (25°C, 20 dakika) santrifüjlenmiştir. Bağlanan anti-transferrin antibadi miktarı başlangıç ve sonuç derişimleri arasındaki farktan Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır. Protein derişimleri 595 nm'de Bradford yöntemiyle UV-VIS spektrofotometresi (UV-mini 1240, Shimadzu, Tokyo, Japonya) kullanılarak ölçölmüş ve bağlanan protein miktarı Eşitlik 3.2 ile hesaplanmıştır.

$$Q = [(C_o - C) V] / m \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

Bu eşitlikte; Q, mikrokürelere birim kütlesi başına immobilize antibadi miktarı (mg/g); C_o ve C, adsorpsiyon öncesi ve sonrası anti-transferrin çözeltisinin derişimi (mg/mL); V çözelti hacmi (mL) ve m ise kullanılan mikrokürenin ağırlığıdır (g).

3.5. Adsorpsiyon ve Desorpsiyon Çalışmaları

3.5.1. Anti-Transferrin Antibadi İmmobilize m-PGMA Mikrokürelere Sulu Çözeltilerden Transferrin Adsorpsiyonu

M-PGMA mikrokürelere sulu çözeltilerden transferrin adsorpsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Anti-transferrin immobilize m-PGMA mikrokürelere iki defa saf su ile 15 dakika şartlandırılmıştır. Santrifüjlenip süpernatant dekante edildikten sonra adsorpsiyon tamponu ile 30 dakika boyunca şartlanmıştır. Karışım tekrar santrifüjlenip süpernatant dekante edildikten sonra anti-transferrin immobilize m-PGMA mikrokürelere farklı pH (4.0 – 8.0), transferrin derişimi (0.05 – 0.75) ve sıcaklık (4 - 37°C) koşullarında hazırlanan transferrin çözeltileri eklenmiş ve 2 saat boyunca 250 rpm dönüş hızında rotatörde karıştırılmıştır.

Anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikrokürelere transferrin adsorpsiyon işleminin tamamlanmasının ardından m-PGMA mikrokürelere manyetik ayırıcı (DynaL MPC-L, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norveç) kullanılarak çöktürülmüştür. Transferrin çözeltisi içerisindeki kürelere ependorflar içerisinde manyetik ayırıcıdaki bölmelere konulmuş ve çökme işlemi yaklaşık 1 dakika içerisinde gerçekleşmiştir.

Başlangıç çözeltisi ve süpernatanttaki transferrin derişimi 595 nm'de Bradford yöntemiyle UV-VIS spektrofotometresi (UV-mini 1240, Shimadzu, Tokyo, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikrokürelere bağlanan transferrin miktarı, transferrinin başlangıç ve sonuç derişimleri farkından, Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.2. Anti-Transferrin İmmobilize m-PGMA Mikrokürelere Yapay Plazmadan Transferrin Adsorpsiyonu

Çalışmanın bu aşamasında transferrin kaynağı olarak yapay olarak hazırlanmış liyofilize kan proteinlerini içeren ve koagülasyon zamanını ölçme amaçlı kullanılan Coagulation Control Plasma (Tokra Medikal, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. 1.5 mL serum fizyolojik içerisinde çözülen plazma örneği 2 saat süre ile anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikrokürelere etkileştirilmiştir.

Başlangıç ve sonuç örneklerindeki transferrin miktarı immünokimyasal yöntemle turbidimetrik olarak tayin edilerek bağlanan transferrin miktarı hesaplanmıştır.

Plazmadan ayrılan transferrinin saflığı %10 ayırma jeli (9 cm x 7.5 cm) ve %6 yükleme jeli kullanılan sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile izlenmiştir. Jeller asetik asit-metanol-su çözeltilisinde (1:5:5, v/v/v) %0.25 (w/v) Coomassie Brilliant R 250 ile boyanmış ve etanol-asetik asit-su (1:4:6, v/v/v) karışımında yıkanmıştır. Elektroforez işlemi 110 V'da 4 saat sürdürülmüştür.

3.5.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları

Manyetik PGMA mikrokürelere transferrin desorpsiyonu 0,1 M glisin-HCl (pH 2.8) çözeltilisi ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca rotatörde etkileştirilerek yapılmış ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

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

Hazırlanan mikrokürelere tekrar kullanılabilirliğini saptamak amacıyla aynı mikrokürelere kullanılarak 5 kez adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü tekrarlanmıştır.

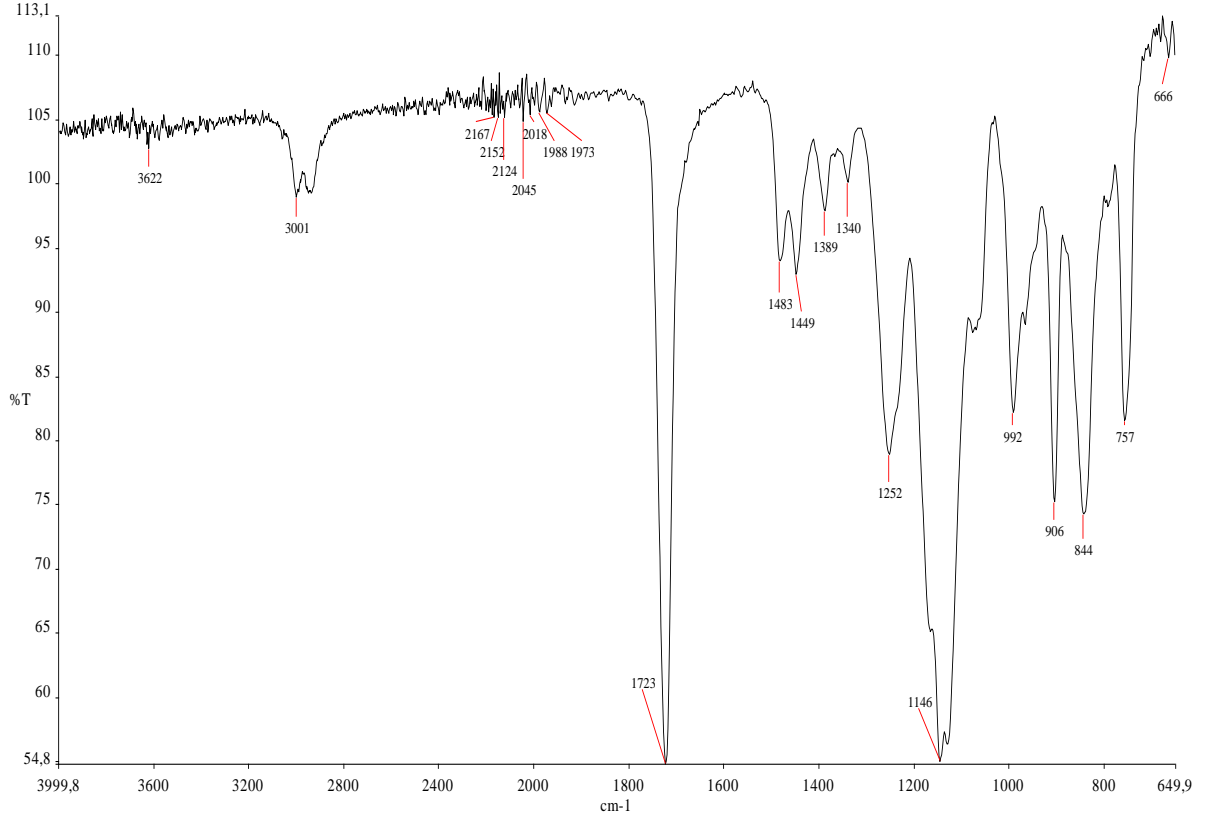
4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

4.1. M-PGMA Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Bu çalışmada sentezlenen m-PGMA mikroküreler Altıntaş ve arkadaşlarının (2007) rapor ettikleri yöntemle göre hazırlanmıştır [48]. Düzenli monomer damlacıklarının oluşumu için çalkalama hızı optimize edilmiştir. Reaksiyon sıcaklığının artırılması ile damlacıkların viskozitesi azalmaktadır. Küçük damlacıkların oluşması için işlem sıcaklığının kontrol altında tutulması kritik öneme sahiptir. Dar bir boy dağılımı aralığına sahip kararlı damlacıkların oluşumu için ortama yüksek miktarda stabilizör PVP (monomer oranının kütlece %10'undan fazla) eklenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarına ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.1.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi

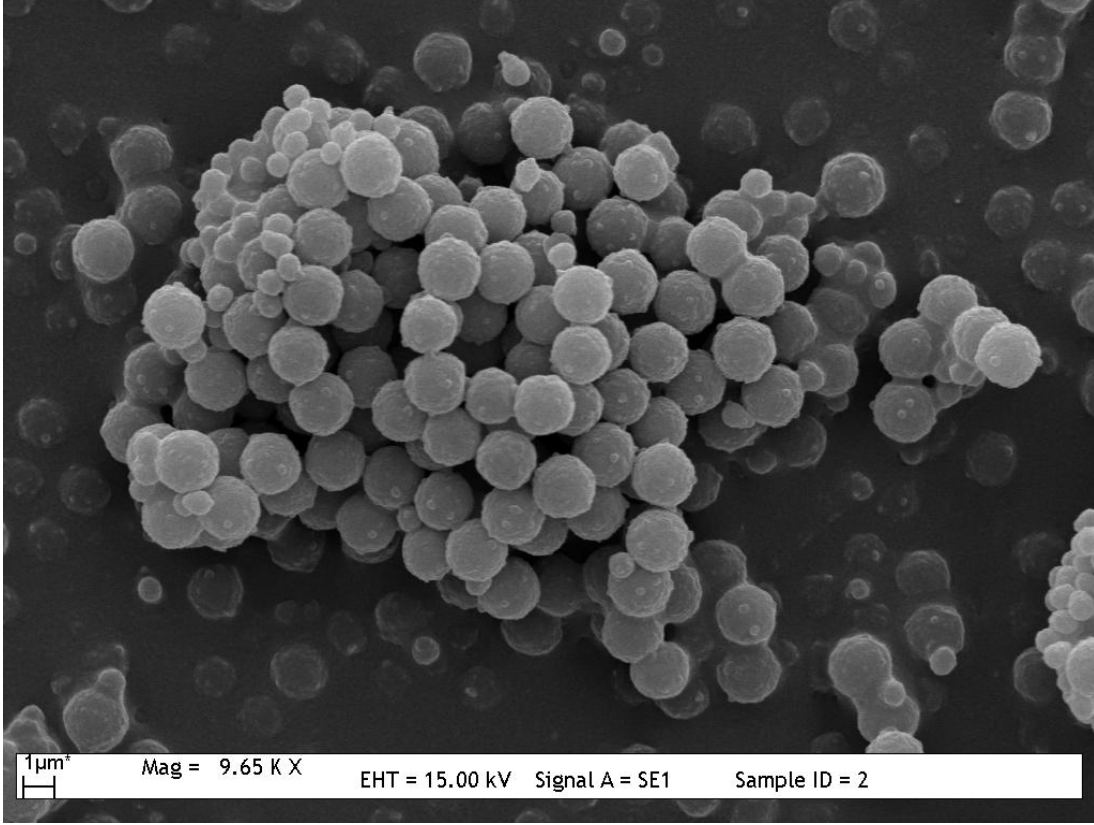
M-PGMA mikrokürelerin yığın yapısı FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir (Şekil 4.2). PGMA'nın karakteristik piklerinden birisi 3000 cm^{-1} civarında gözlenen metilen grubu için, 1723 cm^{-1} 'de gözlenen pik ise GMA'nın ester konfigürasyonuna aittir. Epoksi halkasına ait 844 ve 906 cm^{-1} 'de gözlenen pikler, m-PGMA mikrokürelerdeki oksiran gruplarının varlığını göstermektedir. Perklorik asit titrasyonu ile m-PGMA kürelerin epoksi grup içeriği 3.46 mmol/g olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1 m-PGMA mikrokürlere ait FTIR-ATR spektrumu

4.1.2. SEM ile Yüzey Morfolojisi Analizi

M-PGMA mikrokürelere yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile incelenmiştir. Şekil 4.2’de kürelere eş boyutlu, gözeneksiz ve ortalama 2 µm büyüklüğünde oldukları görülmektedir. Gözeneksiz mikrokürelere en büyük avantajı partikül içi difüzyon direncinin olmamasıdır. Bu durum adsorpsiyon kapasitesinin yüksek olmasına katkı sağlamaktadır.



Şekil 4.2. m-PGMA mikrokürelerin SEM görüntüleri

4.1.3. Mikrokürelerin Şişme Özelliklerinin İncelenmesi

M-PGMA küreler oldukça hidrofilik bir yapıya sahiptir. Su içerisinde şişme oldukça hızlı gerçekleşmiş ve yaklaşık 15 dakika içerisinde denge şişme değerine ulaşılmıştır. Maksimum şişme oranı yaklaşık %52'dir.

4.1.4. Zeta Boyut Analizi

Dispersiyon polimerizasyonu işlemi ile dar bir boyut aralığına sahip (R.S.D < 1%, 2.0 μm çapında) m-PGMA küreler elde edilmiştir. Polidispersite indeksi (PDI) 0.999 olarak hesaplanmıştır

4.1.5. Mikrokürelerin Yoğunluğunun Belirlenmesi

M-PGMA kürelerin 25°C'de hidrate yoğunluğu 1.14 g/cm^3 'tür. Aynı yöntemle manyetik Fe_3O_4 nanotozun yoğunluğu 25°C'de 1.97 g/cm^3 olarak bulunmuştur. Manyetik olmayan PGMA mikrokürelerin yoğunluğu 1.08 g/cm^3 'tür. m-PGMA mikrokürelerdeki magnetit nanotoz fraksiyonu Eşitlik 4.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\phi = (\rho_C - \rho_M) / (\rho_C - \rho_A) \quad (\text{Eşitlik 4.1})$$

Eşitlikte ρ_A , ρ_C ve ρ_M sırasıyla manyetik olmayan PGMA, magnetit Fe_3O_4 ve m-PGMA mikrokürelerin yoğunluklarıdır.

Dolayısıyla bu verilere göre m-PGMA mikrokürelerdeki jel hacim fraksiyonu 0.955, diğer bir deyişle magnetit nanotoz fraksiyonu 0.045 olarak saptanmıştır.

Magnetit (Fe_3O_4) düşük toksisite ve yüksek manyetik özelliklere sahip biyouyumlu bir süperparamanyetik malzemedir [77]. Mikrokürelerden magnetit sızmasının gerçekleşip gerçekleşmediği asetik asit çözeltisi (%50 v/v, pH 2.0), fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) ve sodyum sitrat/NaOH tamponundan (pH 12.0) oluşan üç farklı ortamda test edilmiştir. Bu deneyler sonucunda yapıdan ölçülebilir bir magnetit sızması gözlenmemiştir.

4.1.6. Elektron Spin Rezonans (ESR) ile Manyetizma Ölçümü

Manyetik küreler için diğer bir önemli parametre kürelerin magnetizasyonudur. Polimer yapıdaki magnetit nanotoz varlığı ESR ile doğrulanmıştır. Manyetik alana (Gauss) karşı magnetit pik şiddeti Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Magnetit piki ESR spektrumunda görülmektedir. Manyetik olmayan PGMA mikroküreler bu spektrumda pik vermemektedir. Dış manyetik alan uygulaması örnekte dış manyetik alana ek veya eksi yönde bir iç manyetik alan oluşturur. Elektronik momentle oluşan bölgesel manyetik alan, vektörel olarak dış manyetik alana (H_{ext}) eklenerek etkin alan (H_{eff}) elde edilir.

$$H_{\text{eff}} = H_{\text{ext}} + H_{\text{local}} \quad (\text{Eşitlik 4.2})$$

Dışsal manyetik alan varlığı, eksensel karışımı büyük ölçüde azaltmıştır. Bundan dolayı kürelerin manyetik ayırma işlemlerinde kullanımının uygun olduğu söylenebilir.

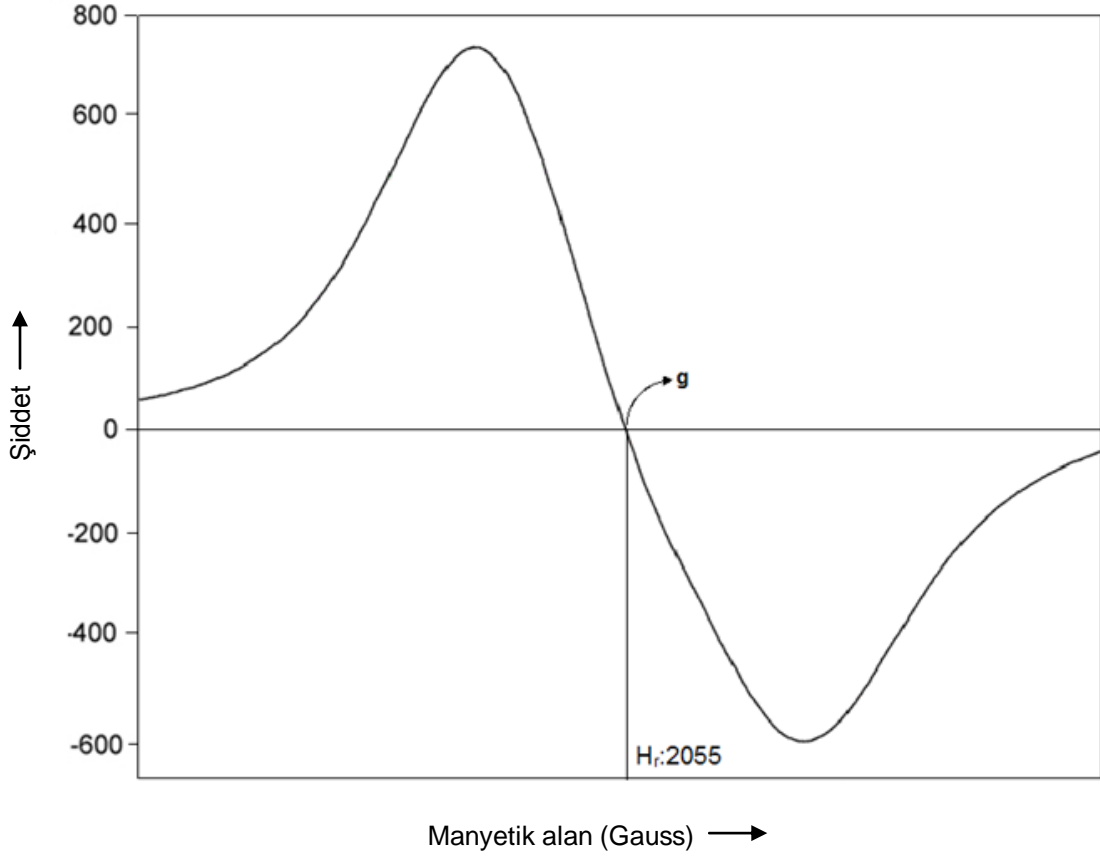
Şekil 4.3'te görüldüğü gibi m-PGMA mikrokürelerin bağıl şiddeti 125'tir. Bu değer polimerik yapının içerdiği magnetitten dolayı lokal bir manyetik alana sahip olduğunu göstermektedir.

Şekilde verilen g faktörü eşleşmemiş elektronların bulunduğu moleküllerin sayısal bir karakteristiği olarak değerlendirilebilir ve aşağıdaki eşitlikten hesaplanır:

$$g = h\nu / \beta H_r$$

(Eşitlik 4.3)

Eşitlikte h Planck sabiti (6.626×10^{-27} erg.s), β evrensel sabit (9.274×10^{-21} erg/Gs); ν frekans (9.707×10^9 Hz) ve H_r manyetik alan rezonansıdır (Gs). Literatürde Fe^{3+} için g faktörü düşük spin için 1.4-3.1, yüksek spin kompleksler için 2.0-9.7 olarak rapor edilmektedir [78]. Bu çalışmada m-PGMA için g faktörü Eşitlik 4.3. kullanılarak 2.28 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. Manyetik PGMA mikrokürelerin ESR spektrumu

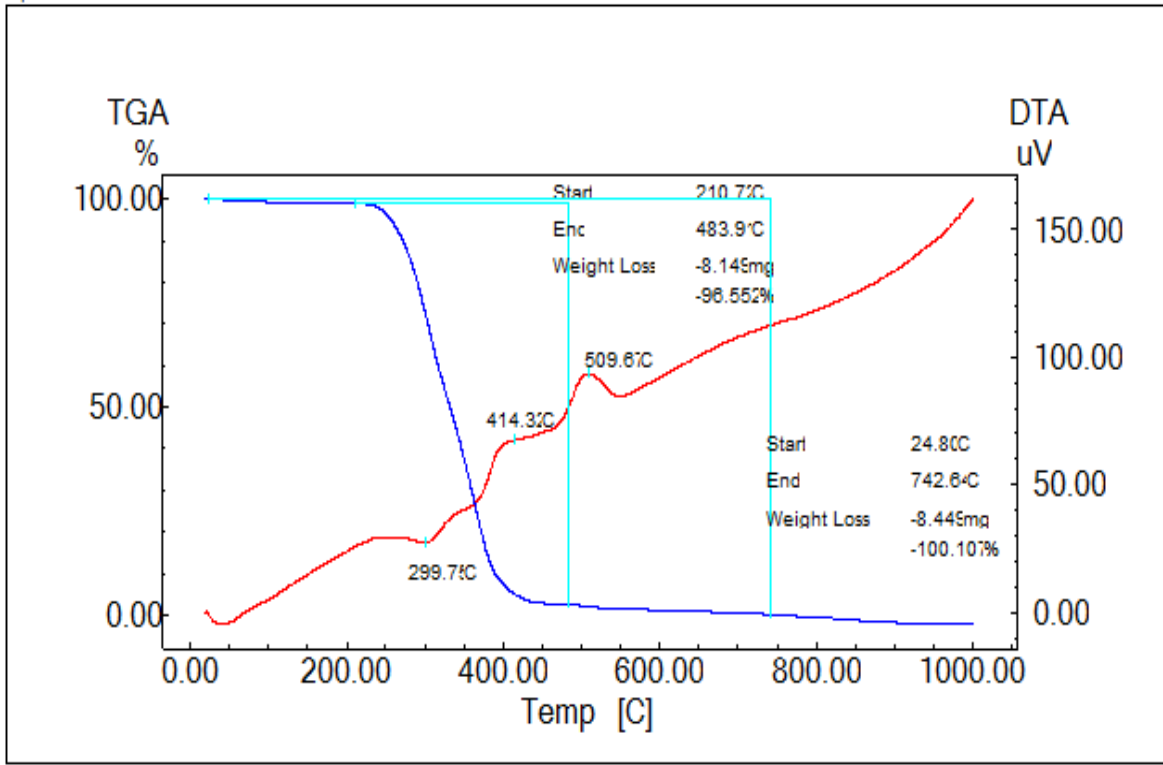
4.1.7. Termogravimetrik Analiz Çalışmaları (TGA-DTA)

Fe_3O_4 manyetit içeren m-PGMA mikrokürelere termogravimetrik analizleri (Diferansiyel Termal Analiz (DTA)-Termogravimetrik analiz (TGA)) Shimadzu DTG-60H cihazı ile (sıcaklık artışı: $20^{\circ}C/dk$) azot atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. Örneğin $0-1000^{\circ}C$ sıcaklık aralığında termal bozunma ve kütle kaybı değerleri termogravimetri (TG), ekzotermik ya da endotermik reaksiyonlar sonucu meydana gelen sıcaklık değişimleri diferansiyel termal analiz (DTA) cihazı ile tespit edilmiştir.

Fe_3O_4 içeren m-PGMA mikrokürelere ait TGA termogramları Şekil 4.4.'te verilmektedir.

m-PGMA mikrokürelere TGA'sı $10-1000^{\circ}C$ sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiş ve demir oksidasyonu ile meydana gelebilecek kütle artışını azaltmak için azot atmosferi altında gerçekleştirilen TGA ile mPGMA mikrokürelere Fe_3O_4 içeriği belirlenmiştir.

Polimerler $450^{\circ}C$ 'ın üzerindeki sıcaklıklarda tamamen bozunmuştur. 0.050 gram Fe(II,III) oksit nano toz ile hazırlanan m-PGMA mikrokürelere sırasıyla manyetit içeriği toplam kütlenin % 3.5'i olarak bulunmuştur.



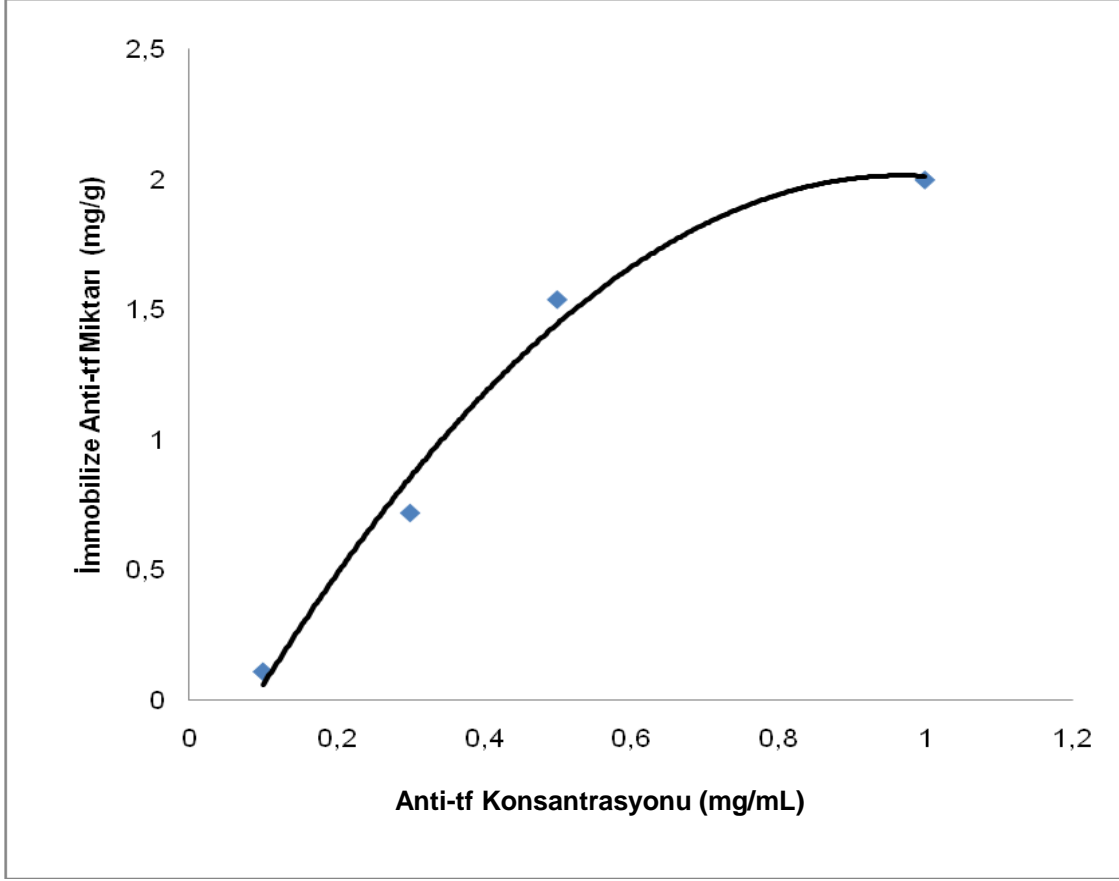
Şekil 4.4. m-PGMA mikrokürelere ait TGA-DTA eğrisi

M-PGMA mikrokürelere ait termogram incelendiğinde 4 tane endotermik pik görülmektedir (Şekil 4.4). Bu piklerde düşük sıcaklıkta görülen pik yapıda absorplanmış nemin uzaklaşmasına, daha yüksek sıcaklıkta görülen pikler ise yapıda oluşan bozunmaları göstermektedir.

4.2. m-PGMA Mikrokürelere Anti-Transferrin Antibadi Bağlanması

M-PGMA mikrokürelere immobilize olan anti-transferrin antibadi miktarının belirlenmesi için immobilizasyon işlemi öncesinde ve sonrasında alınan protein örneklerinin derişimi Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir. Antibadi bağlanmasına anti-transferrin antibadi derişiminin etkisini belirlemek üzere 0.1 – 1 mg/ml aralığında farklı derişimlerde anti-transferrin antibadi çözeltileri kullanılmış ve en fazla immobilizasyonun 1 mg/ml antibadi çözeltisi ile gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.5).

Bu başlangıç derişiminde bağlanan antibadi miktarı 2.0 mg/g'dır ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında bu mikrokürelere kullanılmıştır.



Şekil 4.5. Anti-transferrin antibadi immobilizasyonu için derişim taraması grafiği
 Polimer miktarı: 0.1 g (kuru ağırlık), pH:6.0 fosfat tamponu içerisinde
 İmmobilizasyon süresi: 2 saat, Sıcaklık: 25°C

4.3. Sulu Çözeltilerden Transferrin Adsorpsiyon Çalışmaları

M-PGMA mikrokürelere anti-transferrin antibadilerin kovalent olarak bağlanması ile hazırlanan immünoafinite adsorbente transferrin adsorpsiyonu farklı pH, transferrin derişimi, etkileşim süresi ve sıcaklık koşullarında gerçekleştirilerek bağlanma koşulları optimize edilmiştir. Manyetik mikrokürelere transferrin çözeltilerinden ayrılması manyetik ayırıcı ile sağlanmıştır.

Şekil 4.6'da görüldüğü gibi ependorf tüpleri içerisinde manyetik ayırıcıya yerleştirilen adsorpsiyon ortamından kısa bir süre içerisinde küreler manyetik alan etkisi ile çökerek ayrılmıştır. Adsorpsiyon deneylerinde elde edilen sonuçlar aşağıda rapor edilmiştir.



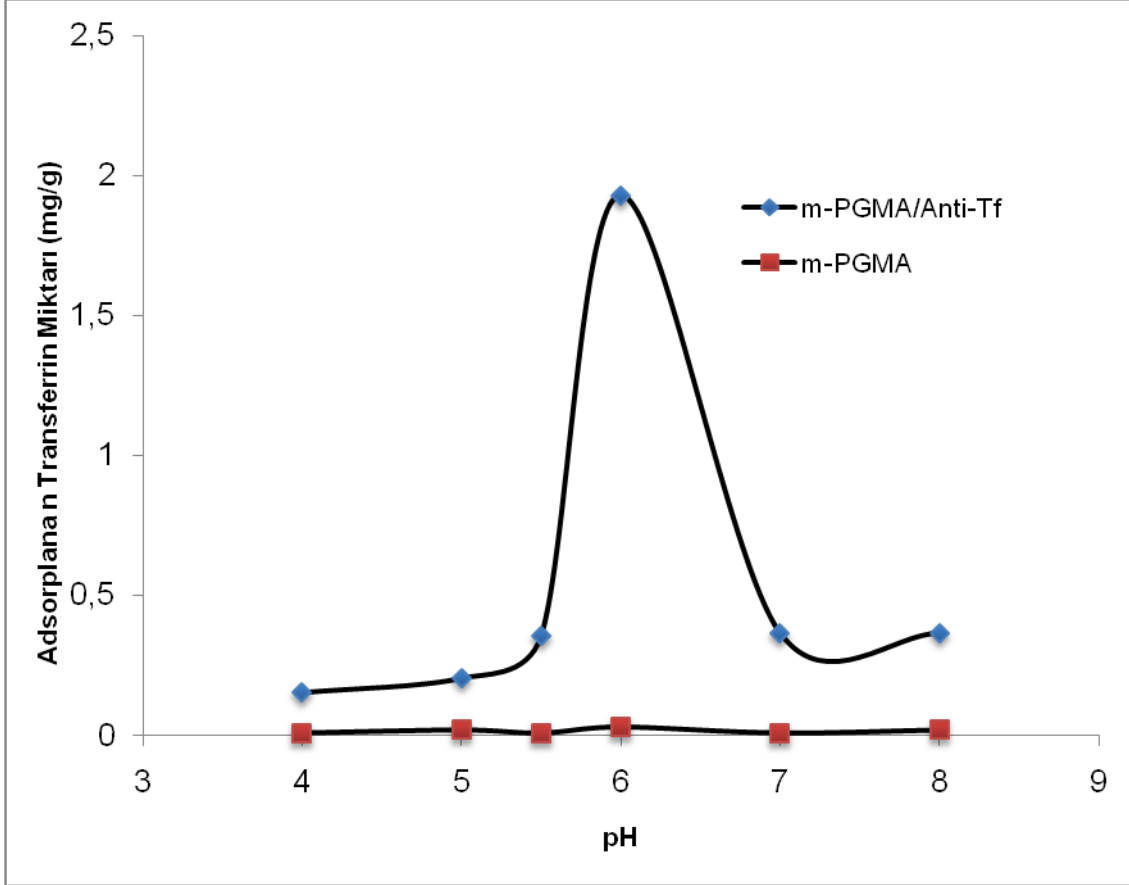
Şekil 4.6. m-PGMA mikrokürelere manyetik alanda adsorpsiyon ortamından ayrılması

4.3.1. pH Etkisi

Anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikrokürelere transferrin adsorpsiyonuna ortam pH'ının etkisi pH 4.0-8.0 arasında incelenmiş ve Şekil 4.7'de görüldüğü gibi en yüksek adsorpsiyon pH 6.0'da gözlenmiştir. Bu pH'dan daha yüksek ve daha düşük pH değerlerinde adsorpsiyonda belirgin bir düşüş olmaktadır.

Transferrin, izoelektrik noktası 5.8 olan, 80 kDa molekül ağırlığına sahip bir proteindir.

Bu pH değerindeki transferrinin konformasyonel yapısından dolayı anti-transferrin ile arasındaki hidrofobik, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları adsorpsiyonun yüksek olmasını sağlamıştır. pH 6.0 değeri optimum pH olarak kabul edilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu pH değerinde çalışılmıştır. Çalışılan diğer pH değerlerinde m-PGMA yüzeyine kayda değer transferrin adsorpsiyonu olmamıştır.



Şekil 4.7. Transferrin adsorpsiyonuna pH etkisi

Polimer miktarı: 0.1 g (kuru ağırlık), Transferrin derişimi: 0.5 mg/ml,

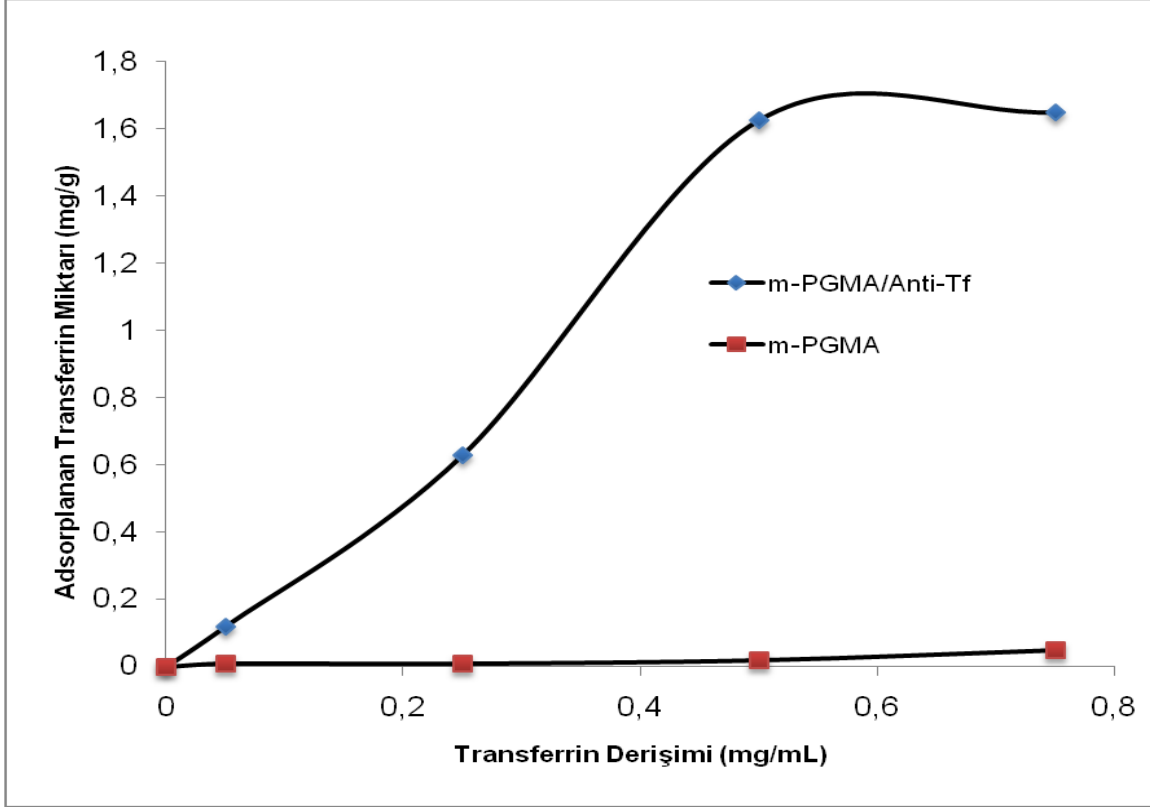
Adsorpsiyon süresi: 2 saat, Sıcaklık: 25°C

4.3.2. Transferrin Derişiminin Adsorpsiyona Etkisi

Başlangıç transferrin derişiminin transferrin adsorpsiyonuna etkisi 0.05-0.75 mg/mL derişim aralığında incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Adsorpsiyon kapasitesi, başlangıç transferrin derişiminin artmasına paralel olarak artmaktadır.

Manyetik PGMA küreler üzerindeki aktif bölgelerin transferrin adsorpsiyonu nedeniyle doyunluğa erişmesinden ötürü adsorpsiyon kapasitesi belli bir değerde (0.50 mg/mL) sabit kalmıştır ve bağlanan transferrin miktarı 1.65 mg/g olarak hesaplanmıştır.

Optimum transferrin derişimi 0.5 mg/mL olarak kabul edilmiş ve sonraki deneyler bu protein derişiminde çalışılmıştır.



Şekil 4.8. Transferrin adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi

Polimer miktarı: 0.1 g (kuru ağırlık), pH:6.0 fosfat tamponu içerisinde,

Adsorpsiyon süresi: 2 saat, Sıcaklık: 25°C

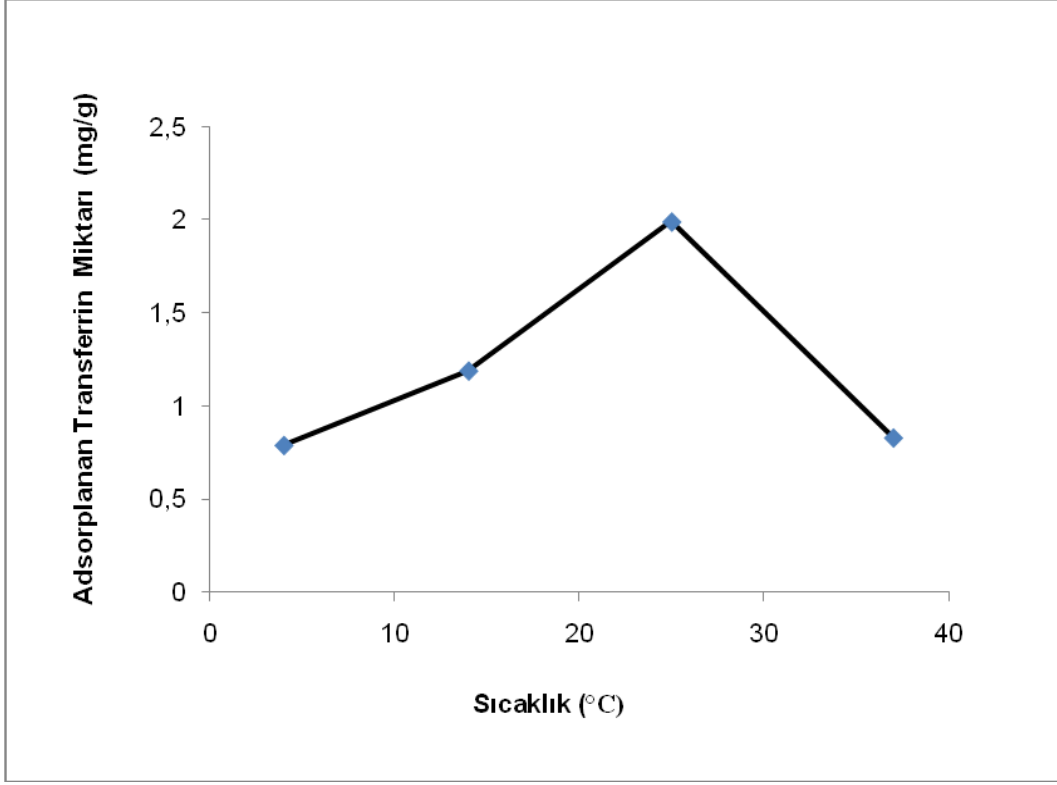
4.3.3. Sıcaklığın Adsorpsiyona Etkisi

Anti-transferrin andibadi immobilize m-PGMA mikrokürelere transferrin bağlanmasına ortam sıcaklığının etkisi 4-37°C aralığında incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça immünoafinite mikrokürelere transferrin adsorpsiyon kapasitesinde artış gözlenmektedir, 25°C'nin üzerinde ise azalma gözlenmektedir.

Bilindiği gibi antijen ve antibadilerin bağlanma b6lgeleri arasında molek6ler seviyede gerçekleşen hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimlerin oluşturduğu bir seçici bağlanma s6z konusudur.

Etkileşime girecek b6lgeler birbirlerine birkaç nanometre mertebesinde yaklaştıklarında iyonik ve hidrofobik etkileşimler gibi uzun mesafelerde etkili olan kuvvetler tarafından çekilirler. Bu mertebede van der Waals kuvvetleri etkisiz hale gelirken iyonik gruplar hala 6nemli rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra t6m bağlanma işleminin kuvveti, iki y6zey arasındaki uyuma ve etkileştikleri b6lgenin toplam temas alanına bağlıdır. Hidrojen bağları oluşumu ile ısı enerjisi ortaya çıkar.

Dolayısıyla bağlanma serbest enerji değişimi eşitliğinde hidrojen bağları entalpi fakt6r6 ile ilişkilidir. Hidrofobik etkileşimler ise endotermiktir ve entropi fakt6r6 ile bağlantılıdır [79]. Dolayısıyla Şekil 4.9'da g6zlenen davranış, transferrin ve anti transferrin antibadileri arasında gerçekleşen etkileşimlerin hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimlerin ortak etkisinden kaynaklandığını ve 25°C'de grupların birbiri ile etkileşmek için en uygun konformasyonda olduklarını g6stermektedir.



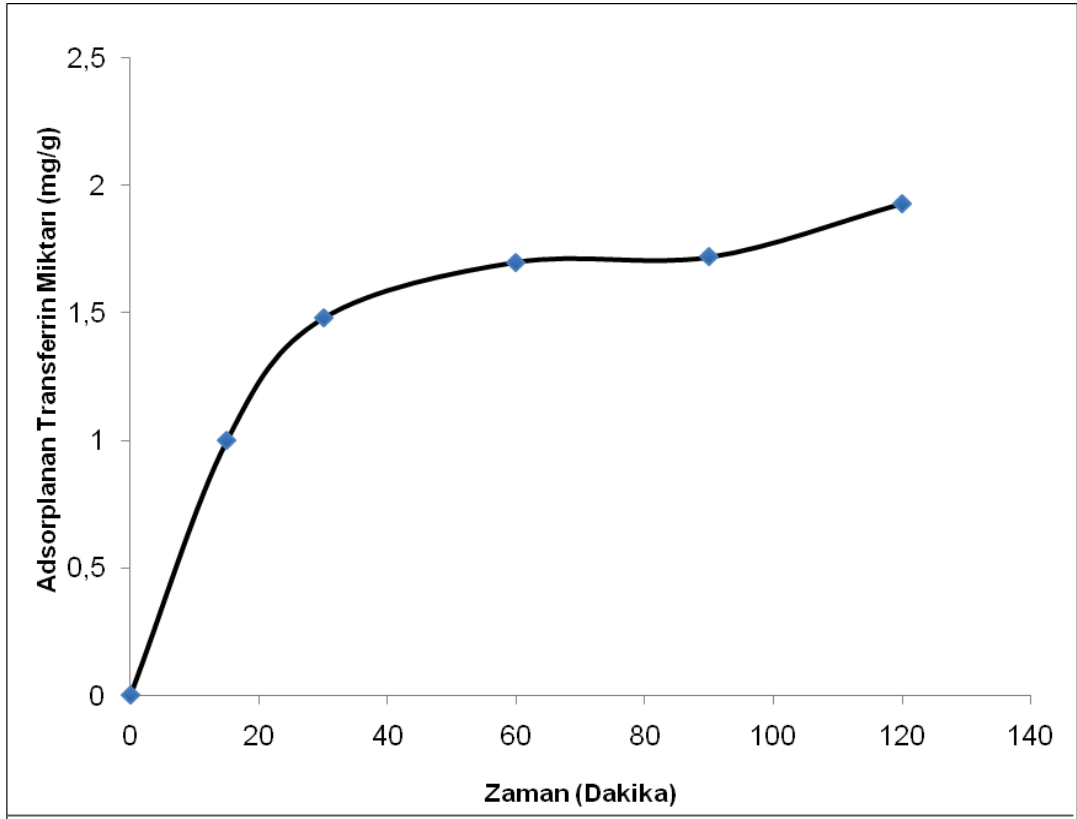
Şekil 4.9. Transferrin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi

Polimer miktarı: 0.1 g (kuru ağırlık), Transferrin konsantrasyonu: 0.5 mg/ml,
pH:6.0 fosfat tamponu içerisinde, Adsorpsiyon süresi: 2 saat

4.3.4. Adsorpsiyon Zamanı

Adsorpsiyon zamanını belirlemek üzere manyetik immünoafinite mikrokürelere ile etkileştirilen transferrin çözeltisinden 0-120 dakika içerisinde belirli aralıklarda örnekler alınmış ve bağlanan protein miktarı hesaplanmıştır. Buna göre mikrokürelere transferrin adsorpsiyonunun ilk yarım saat içerisinde hızlı bir şekilde gerçekleştiği ve bir saatin sonunda hemen hemen dengeye ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.10).

Bu sonuçlar antijen andibadi arasındaki yüksek afinitenin göstergesi olduğu gibi mikrokürelere difüzyon sorunu olmadığını da göstermektedir.



Şekil 4.10. Transferrin Adsorpsiyon Zamanı

Polimer miktarı: 0.1 g (kuru ağırlık), Transferrin konsantrasyonu: 0.5 mg/ml,
pH:6.0 fosfat tamponu içerisinde

4.4. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon kinetiğinin anlaşılması ile etkin adsorbent-adsorban temas süresi yani alıkonma süresi bulunur. Adsorpsiyon işleminin hızına etki eden adsorpsiyon basamaklarının anlaşılması için önemli bir adımdır. Kütle transferi ve kimyasal reaksiyon gibi adsorpsiyon işlemini kontrol eden mekanizmaların belirlenmesi için deneysel verilere pseudo birinci ve ikinci derece kinetik modeller uygulanmıştır. Ölçülen derişimlerin adsorbentın yüzey derişimine eşit olduğu varsayılmıştır.

Lagergren'in birinci derece hız eşitliği sıvı çözülden çözünenin adsorpsiyonunda en çok kullanılan eşitlik ve şu şekilde ifade edilir;

$$dq_t/dt = k_1(q_{eq} - q_t)$$

(Eşitlik 4.4)

Eşitlikte k_1 pseudo-birinci derece adsorpsiyon hız sabiti (dk^{-1}), q_{eq} ve q_t sırasıyla denge zamanında ve herhangi bir t anında adsorplanan miktarı (mg/g) göstermektedir. $t = 0$ 'da $q_t = 0$ ve $t = t$ anında $q_t = q_t$ sınır koşulların uygulanıp integralinin alınması;

$$\log[q_{eq}/(q_{eq}-q_t)] = (k_1 t)/2.303 \quad (\text{Eşitlik 4.5})$$

eşitliğini vermektedir. Eşitlik 4.5 tekrar düzenlenerek doğrusallaştırılabilir:

$$\log(q_{eq}-q_t) = \log(q_{eq}) - (k_1 t)/2.303 \quad (\text{Eşitlik 4.6})$$

$\log(q_{eq})$ 'e karşı t grafiğinin doğrusallığı kinetik modelin uygulanabilirliğini göstermektedir. Gerçek birinci-derece işlemde $\log(q_{eq})$, t 'ye karşı $\log(q_{eq}-q_t)$ grafiğinin kesim noktasına eşit olmalıdır.

Adsorpsiyon denge kapasitesine dayalı pseudo-ikinci derece eşitlik aşağıdaki şekilde verilebilir:

$$dq_t/dt = k_2 (q_{eq}-q_t)^2 \quad (\text{Eşitlik 4.7})$$

Eşitlikte k_2 pseudo-ikinci derece hız sabitidir ($g.mg^{-1}.dak^{-1}$). Eşitlik 4.7 ye $t = 0$ da $q_t = 0$ ve $t = t$ 'de $q_t = q_t$ sınır koşullarının uygulanması ile;

$$1/(q_{eq}-q_t) = (1/q_{eq}) + k_2 t \quad (\text{Eşitlik 4.8})$$

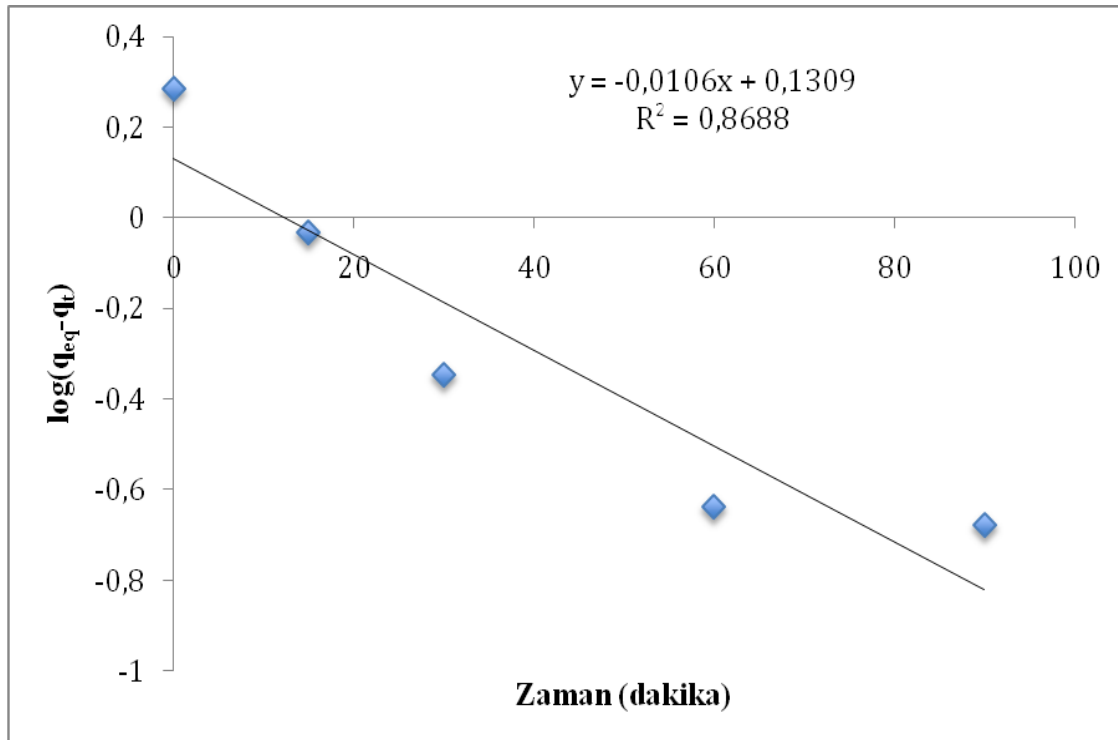
eşitliği elde edilir. Bu eşitliğin doğrusal hali:

$$(t/q_t) = (1/k_2 q_{eq}^2) + (1/q_{eq}) t \quad (\text{Eşitlik 4.9})$$

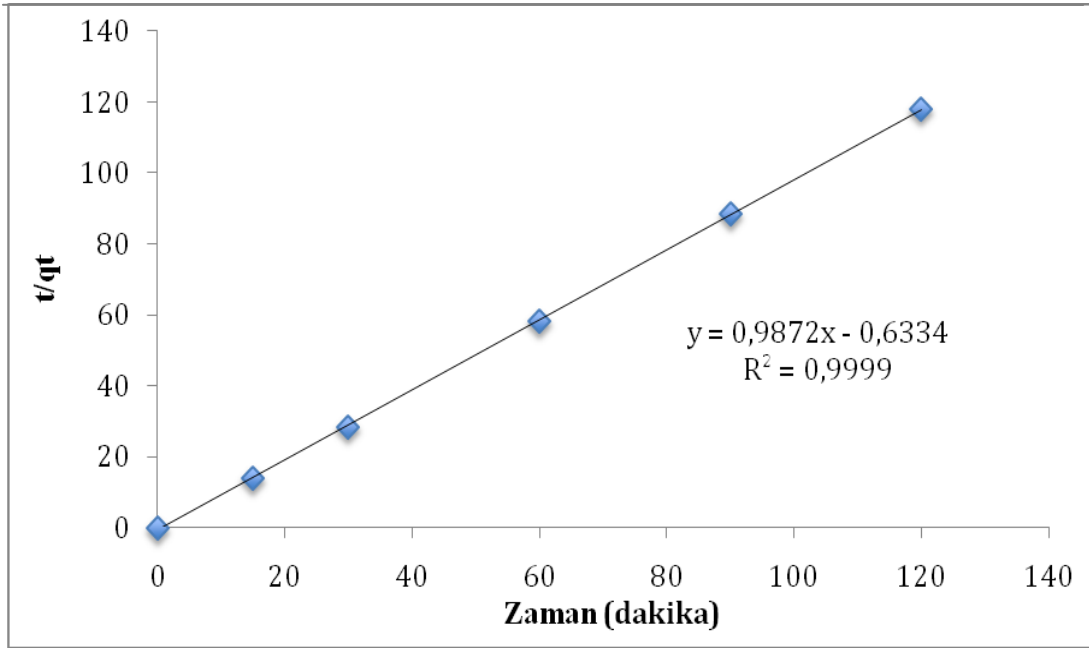
ile verilir.

İkinci derece kinetiğin uygulanabilir olması için t/q_t ye karşı t grafiğinin doğrusal olması gereklidir. Hız sabiti (k_2) ve denge adsorpsiyonu (q_{eq}) sırasıyla kesim noktası ve eğimden elde edilebilir.

Anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikrokürelere transferrin adsorpsiyonu için deneysel verilere uygulanan pseudo birinci ve ikinci derece kinetik sonuçları Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de verilmiştir. Deneysel ve kinetik verilerin karşılaştırılması Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında adsorpsiyonun ikinci derece kinetik modele uyduğu görülmektedir. Gözeneksiz eşboyutlu mikrokürelere beklediği gibi difüzyon kısıtlamaları olmaksızın adsorpsiyon işlemi kimyasal olarak kontrol edilmektedir.



Şekil 4.11 Anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikrokürelere için pseudo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.



Şekil 4.12. Anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikrokürelere için pseudo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği

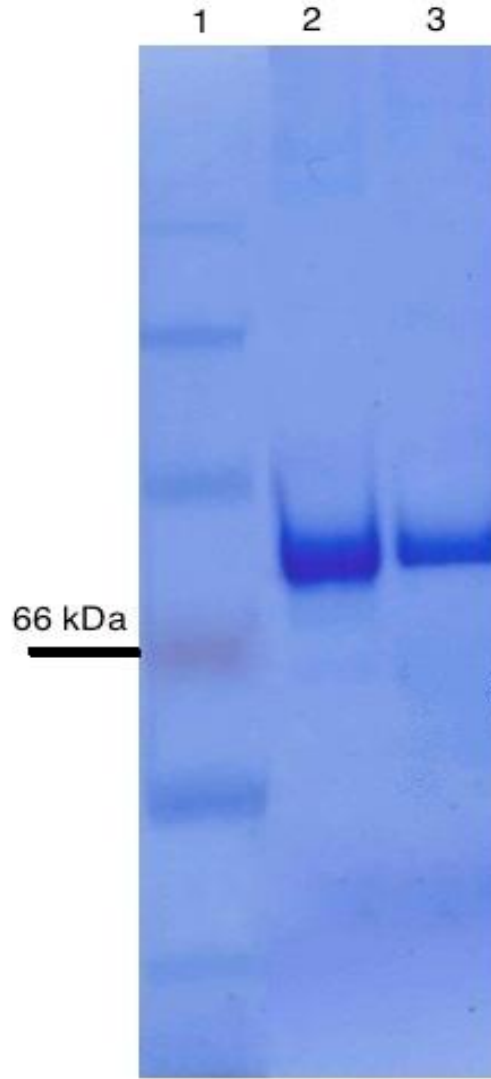
Çizelge 4.1. Anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikrokürelere transferrin adsorpsiyonu için pseudo-birinci ve ikinci derece kinetik verileri.

[Tf] (mg/mL)	Deneysel	Pseudo 1°			Pseudo 2°		
		Q_{eq} (mg/g)	k_1	q_{eq}	R^2	k_2	q_{eq}
0.5	1.92	0.024	1.352	0.869	1,54	1.01	0.999

4.5. Yapay Plazmadan Transferrin Adsorpsiyonu

Anti-transferrin antibadi immobilize m-PGMA mikrokürelere yapay plazmadan transferrin adsorpsiyonu 0.12 mg/g olarak saptanmıştır. Kullanılan yapay plazmadaki transferrin derişimi yaklaşık 2.30 mg/dL'dir. Adsorpsiyon miktarının düşük olması kullanılan yapay plazmadaki transferrin derişiminin düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Bilindiği gibi derişim adsorpsiyon için sürücü kuvvettir ve normal plasma transferrin derişiminde (yaklaşık 300 mg/dL) çalışılması durumunda adsorpsiyon kapasitesinde artış beklenen bir durumdur.

Desorpsiyon işleminin transferrinin yapısında herhangi bir denatürasyona neden olmadığını ve elüe edilen transferrinin saflığını göstermek üzere SDS-PAGE çalışmaları yapılmıştır. Standart transferrin çözeltisi (Bant 2) ve elüe edilen transferrin (Bant 3) jel elektroforezinde, referans protein karışımı ile (Bant 1) yürütülmüştür ve jelin görüntüsü Şekil 4.13’de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi elüsyon çözeltisi standart transferrin çözeltisi ile aynı yerde tek bant içermektedir. Bu da elüe edilen transferrinin saflığını ve herhangi bir denatürasyonun söz konusu olmadığını göstermektedir.



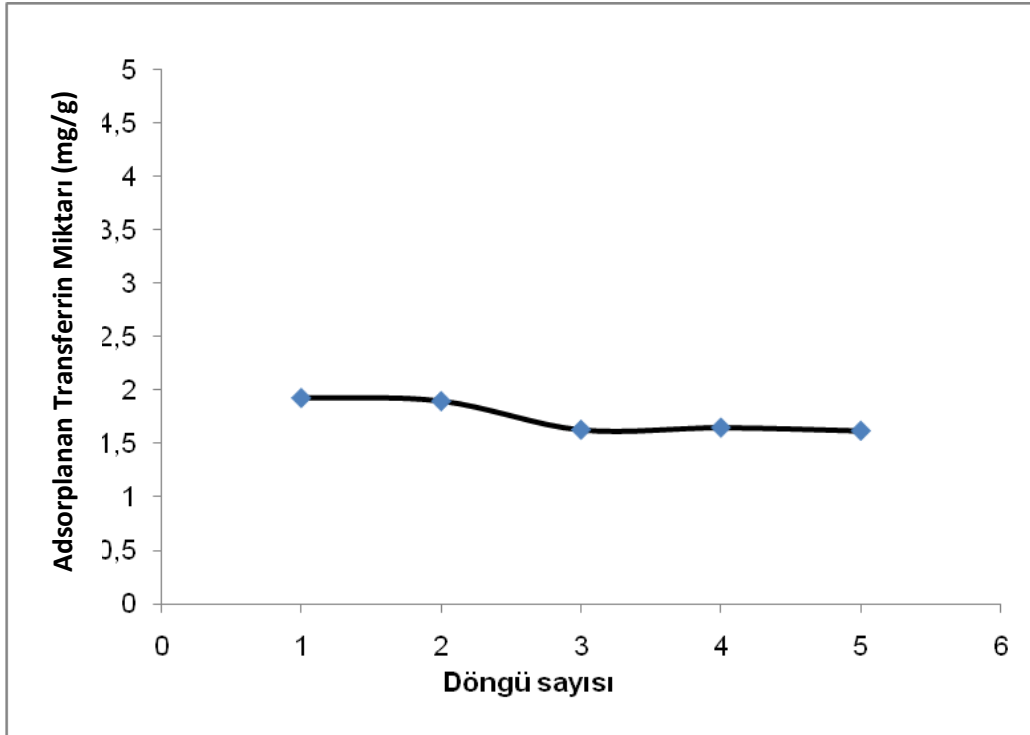
Şekil 4.13. Yapay plazmadan transferrin adsorpsiyonu için SDS-PAGE görüntüsü.

Bant 1: Referans protein karışımı, Bant 2: Standart transferrin çözeltisi,

Bant 3: Elüe edilen transferrin çözeltisi.

4.6. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Adsorbent geliştirme stratejisini belirlerken hazırlanan adsorbentin tekrar kullanılabilirlik özelliklerinin iyi olması işlemin toplam maliyeti açısından büyük önem taşımaktadır. Hem bağlanan transferrin moleküllerinin yapıdan denatüre edilmeksizin yüksek geri kazanımla desorbe edilmesini, hem de polimer yapıda immobilize anti transferrin antibadi ligandın bağlama etkinliğinin korunmasını sağlayacak desorpsiyon ajanının belirlenmesi sonrasında aynı mikroküreler kullanılarak adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri 5 kez tekrar edilmiştir. Mikrokürelerin desorpsiyonu için 0.1 M glisin-HCl çözeltisi (pH 2.8) kullanılmıştır. Desorpsiyon işleminden sonra alınan örneklerde protein miktarı saptanmıştır. Desorpsiyon ajanı kullanılarak yapılan işlemde adsorplanan proteinin %86'sının desorbe edilebildiği görülmüştür. Bu desorpsiyon oranından anlaşılmaktadır ki sürekli kullanımda transferrin adsorpsiyon kapasitesinde ciddi bir azalma görülmemektedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Adsorbentin tekrar kullanılabilirliği.

5. YORUMLAR

Bu çalışmada transferrin safaştırılması amacıyla anti-transferrin antبادilerin ligand olarak kullanıldığı manyetik PGMA mikroküreler hazırlanarak transferrin bağlama özellikleri sulu çözeltilerde mikroçevre koşulları değiştirilerek incelenmiştir. Daha sonra yapay plazmadan transferrin adsorpsiyonu incelenmiştir. Hazırlanan manyetik PGMA mikroküreler yaklaşık 2 µm çapında, eşboyutlu ve gözeneksizdir.

Mikrokürelerin sulu ortamda şişme oranı %52'dir.

Yapıdaki epoksi gruplarının varlığı FTIR-ATR ile gösterilmiştir. Epoksi grupları aktivasyon ajanı kullanılması gereksinimini ortadan kaldırarak anti-transferrin antبادilerin doğrudan yapıya kovalent olarak bağlanmasına olanak vermektedir. Perklorik asit titrasyonu ile yapıdaki epoksi grup içeriği 3.46 mmol/g olarak belirlenmiştir.

m-PGMA mikrokürelerin hidrate yoğunluğu 1.14 g/cm³, polimer yapıdaki nanotoz fraksiyonu 0.045'dir. Hazırlanan manyetik PGMA yapısından magnetit sızmasının olmadığı gösterilmiştir.

ESR spektrumu yapıdaki nanotoz magnetit varlığını doğrulamaktadır. M-PGMA mikrokürelerin g faktörü 2.28 olarak bulunmuştur.

DSC ve TGA çalışmalarından m-PGMA mikrokürelerin manyetit içeriğinin toplam kütleinin %3.5'i olduğu belirlenmiştir.

Manyetik mikrokürelere anti transferrin antبادi bağlanması farklı antبادi derişimlerinde incelenmiş ve 1 mg/mL antبادi derişiminde bağlanan antبادi miktarının 2.0 mg/g olduğu belirlenmiştir.

Sulu çözeltide yapılan çalışmalardan transferrin adsorpsiyonunun en yüksek izlendiği pH değeri 6.0 olarak belirlenmiştir. Adsorpsiyon işlemi yaklaşık 0.5 mg/g transferrin başlangıç derişiminde dengeye ulaşmaktadır. Adsorpsiyon işlemleri en yüksek bağlanmanın gözleendiği 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda antبادi immobilize edilmemiş m-PGMA yüzeyine transferrin adsorpsiyonu ihmal edilebilecek düzeydedir.

Kinetik modellerin uygulanması sonucu adsorpsiyon işleminin pseodu-ikinci derece kinetik modele uyduğu belirlenmiştir.

Yapay plazmadan transferrin adsorpsiyon kapasitesi 0.12 mg/g olarak saptanmıştır ve elüe edilen transferrinin saflığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir.

Arka arkaya tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmaları manyetik mikrokürelerin transferrin bağlama kapasitesinde önemli bir azalma olmaksızın defalarca kullanılabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak hazırlanan adsorbentin protein karışımlarından tek basamakta ve spesifik olarak transferrin ayrılmasını sağlayabildiği, manyetik özelliklerinin manyetik ayırıcıda kullanıma olanak verdiği ve sonrasında manyetik akışkan yataklarda transferrin saflaştırma konusunda umut verdiği, işlemin ekonomisi açısından tekrar kullanıma uygun olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Li, H., Qian, Z. M., Transferrin/Transferrin receptor – Mediated drug delivery, *Medicinal Research Review*, 22, 225-250, **2002**
- [2] Eid, C., Hemadi, M., Ha-Duong N., Chahine, J. E.H., Iron uptake and transfer from ceruloplasmin to transferrin, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1840, 1771-1781, **2014**
- [3] 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**
- [4] Rahmato, Y.S., Bal, S., Loh, K.H., Yu, Y., Richardson, D. R., Melanotransferrin; Search for a function, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1820, 237-243, **2012**
- [5] Tüzmen, N., Akdoğan, F., Kalburcu, T., Akgöl, S., Denizli, A., Development of the magnetic beads for dye chromatography and application to magnetically stabilized fluidized bed system, *Process Biochemistry*, 45, 556-562, **2010**
- [6] Philippova, O., Barabanova, A., Molchanov, V., Khokhlov, A., Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications, *European Polymer Journal*, 47, 542-559, **2011**
- [7] Başar, N., Uzun, L., Güner, A., Denizli, A., Lysozyme purification with dye-affinity beads under magnetic field, *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 234-242, **2007**
- [8] Odabaşı, M., Özkayar, N., Özkara, S., Ünal, S., Denizli, A., Pathogenic antibody removal using magnetically stabilized fluidized bed systems, *Journal Chromatography B*, 826, 50-57, **2005**
- [9] Bayramoğlu, G., Özalp, V. C., Altıntaş, B., Arıca, Y., Preparation and characterization of mixed-mode adsorbent with p-amino-benzamidine ligand: Operated in a magnetically stabilized fluidized bed reactor for purification of trypsin from bovine pancreas, *Process Biochemistry*, 49, 520-528, **2014**
- [10] Lambert, L., Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820, 244-255, **2012**
- [11] Mizutani, K., Toyoda, M., Mikami, B., X-ray structures of transferrins and related proteins, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820, 203-211, **2012**
- [12] Gao, J., Ding, S., Huang, X., Shi, X., Cloning and expression characterization of the serum transferrin gene in the Chinese black sleeper (*Bostrichthys sinensis*), *Gene*, 515, 89-98, **2013**
- [13] Pessoa J.C., Gonçalves, G., Roy, S., Correia, I., Mehtab, S., Santos, M. F.A., Santos-Silva, T., New sights on vanadium binding to human serum transferrin, *Inorganica Chimica Acta*, 420, 60-68, **2014**

- [14] 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**
- [15] Goodsell, D., Ferritin and transferrin, rcb.org/pdb/101/motm.do?momID=35, (Haziran, **2014**)
- [16] Zheng Z., Yang P., Zeng G., Cai J., Probing molecular interaction between transferrin and *anti*-transferrin by atomic force microscope, *Chinese Science Bulletin*, 51, 405-408, **2006**
- [17] Giansanti, F., Leboffe, L., Pitari, G., Ippoliti, R., Antonini, G., Physiological roles of ovotransferrin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820, 218-225, **2012**
- [18] Wu, J., Acero-Lopez, A., Ovotransferrin: Structure, bioactivities and preparation, *Food Research International*, 46, 480-487, **2012**
- [19] Varon, O., Allen, K. J., Bennett, D C., Mesak, L. R., Scaman, C. H., Purification and characterization of tinamou egg white ovotransferrin as an antimicrobial agent against foodborne pathogenic bacteria, *Food Research International*, 54, 1836-1842, **2013**
- [20] Harouna, S., Carraminana, J.J., Navarro F., Perez M.D., Calvo M., Sanchez L., Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin on the emerging foodborne pathogen *Cronobacter sakazakii*: effect of media and heat treatment, *Food Control*, **2014**
- [21] Alexander, D. B., Iigo, M., Hamano, H., Kozu, T., Saito, Y., Sito, D., Kakazioe, T., Xu, J., Yamauchi, K., Takase, M., Suzui, M., Tsuda, H., An ancillary study of participants in a randomized, placebo-controlled trial suggests that ingestion of bovine lactoferrin promotes expression of interferon alpha in the human colon, *Journal of Functional Foods*, 10, 305-317, **2014**
- [22] Kuo, Y., Wang C., Protection of SK-N-M5 cells against β -amyloid peptide-induced degeneration using neuron growth factor-loaded liposomes with surface lactoferrin, *Biomaterials*, 35, 5954-5964, **2014**
- [23] Farnaud, S., Amini, M., Rapisarda, C., Cammack, R., Bui, T., Drake, A., Evans, R. W., Rahmanto, Y. S., Richardson, D. R., Biochemical and spectroscopic studies of human melanotransferrin (MTf): Electron-paramagnetic resonance evidence for a difference between the iron-binding site of MTf and other transferrins, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40, 2739-2745, **2008**
- [24] Rahmanto, Y. S., Richardson, D. R., Generation and characterization of transgenic mice hyper-expressing melanoma tumour antigen p97 (Melanotransferrin): No overt alteration in phenotype, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 1210-1217, **2009**

- [25] Sekyere, E. O., Dunn, L. L., Richardson, D. R., Examination of the distribution of the transferrin homologue, melanotransferrin (tumour antigen p97), in 68ort and human, *Biocihimica et Biophysica Acta*, 1722, 131-142, **2005**
- [26] Grama, S., Boiko,N., Bilyy, R., Klyuchivska, O., Antonyuk, V., Stoika,R., Horak, D., Novel fluorescent poly(glycidyl methacrylate) – Silica microspheres, *European Polymer Journal*, 56, 92-104, **2014**
- [27] Rittich, B., Spanova, A., Horak, D., Functionalised magnetic microspheres with hydrophilic properties for molecular diagnostic applications, *Food Research International*, 42, 493-498, **2009**
- [28] Glowala, P., Budniak, A., Krug, P., Wysocka, B.,Berbec,S., Dec, R., Dolega, I.,Kacprzak, K., Wojciechowski J., Kawalko, J., Kepka, P., Kepinska, D., Kijewska, K., Mazur, M.,Incorporation of pyrene in polypyrrole/polystyrene magnetic beads, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 131, 667-673, **2014**
- [29] Grama, S., Plichta, Z., Trchova, M., Kovarova, J., Benes, M., Horak, D., Monodisperse macroporous poly(glycidyl methacrylate) microspheres coated with silica: Design, preparation and characterization, *Reactive & Functional Polymers*, 77, 11-17, **2014**
- [30] Özer, E. T., Osman, B., Kara, A., Beşirli, N., Gücer, Ş., Sözeri, H., Removal of diethyl phthalate from aqueous phase using magnetic poly(EGDMA-VP) beads, *Journal of Hazardous Materials*, 229-230, 20-28, **2012**
- [31] Obeid, L., Kolli, N. E., Dali, N., Talbot, D., Abramson, S., Welschbillig, M., Cabuil, V., Bee, A., Adsorption of a cationic surfactant by a magsorbent based on magnetic alginate beads, *Journal of Colloid and Interface Science*, 432, 182-189, **2014**
- [32] Rotkova, J., Sulakova, R., Korecka, L., Zdrzilova, P., Jandova, M., Lenfeld, J., Horak, D., Bilkova, Z., Laccase immobilized on magnetic carriers for biotechnology applilcations, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 1335-1340, **2009**
- [33] Kuan, W., Horak, D., Plichta, Z., Lee, W.,Immunocapture of CD133-poistive cells from human cancer cell lines by using monodisperse magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres containing amino groups, *Materials Science and Engineering C*, 34, 193-200, **2014**
- [34] Horak, D., Babi, M., Jendelova, P., Herynek, V., Trchova, M., Likavcanova, K., Kapcalova, M., Hajek, M., Sykova, E., Effect of different magnetic nanoparticle coatings on the efficiency of stem cell labeling, *Journal of Magnetism and Magnetic Material*, 321, 1539-1547, **2009**
- [35] Erdem, A., Congur, G., Voltammetric aptasensor combined with magnetic beads assay developed for detection of human activated protein C, *Talanta*, 128, 428-433, **2014**

- [36] Zhao, M., Xie, Y., Demng, C., Zhang, X., Recent advances in the applicaiton of core-shell structured magnetic materials for the separation and enrichment of proteins and peptides, *Journal of Chromatography A*, 1357, 182-193, **2014**
- [37] Gürsoy, A., Dortunç, B., Pişkin, E., Peppas, N. A., *Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler*, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, İstanbul, **1989**
- [38] Rodrigo, R., Toro, C. A., Cuellar, J., Morphological characteristics of poly(styrene-co-divinylbenzene) microparticles synthesized by suspension polymerization, *Powder Technology*, 247, 279-288, **2013**
- [39] Barkanyi, A., Nemeth, S., Lakatos, B. G., Modelling and simulation of suspension polymerization of vinyl chloride via population balance model, *Computers and Chemical Engineering*, 59, 211-218, **2013**
- [40] Lobry, E., Lasuye, T., Gourdon, C., Xuereb, C., Liquid-liquid dispersion in a continuous oscillatory baffled reactor – applicaiton to suspension polymerization (Accepted Manuscript), *Chemical Engineering Journal*, **2014**
- [41] Oh, J. K., Park, J. M., Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical applicaiton, *Progress in Polymer Science*, 36, 168-189, **2011**
- [42] Pu, D. W., Devitt, M. P., Thickett, S. C., Lucien, F. P., Zetterlund, P. B., Dispersion polymerization of styrene in CO₂-expanded ethanol, *Polymer*, 54, 6689-6694, **2013**
- [43] Altıntaş, E. B., *Micronsize Magnetic Beads for Lysozyme Purification*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2008**
- [44] Shen, S., Sudol, E. D., El-Aasser, M. S., Dispersion polymerization of methyl methacrylate: Mechanism of particle formation, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 32, 1087-1100, **1994**
- [45] Chakrabarty, A., Singha, N. K., Tailor-made polyfluoroacrylate and its block copolymer by RAFT polymerization in miniemulsion; improved hydrophobicity in the core-shell block polymer, *Journal of Colloid and Interface Science*, 408, 66-74, **2013**
- [46] Zhang, Z., Ji, X., Wang, P., Preparation of polystyrene latex particles by miniemulsion polymerization using a predissolved fluorinated block copolymer as the sole co-stabilizer, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 441, 510-516, **2014**
- [47] Lungu, M., Popa, M., Desbrieres, J., Racovita, S., Vasiliu, S., Complex microparticulate systems based on glycidyl methacrylate and xanthan, *Carbohydrate Polymers*, 104, 213-222, **2014**
- [48] Altıntaş, E. B., Uzun, L., Denizli, A., Synthesis and characterization of monosize magnetic poly(glycidyl methacrylate) beads, *China Particuology*, 5, 174-179, **2007**

- [49] Perez, J. P. H., Lopez-Cabaras, E., Lopez-Ruis, B., The application of methacrylate-based polymers to enzyme biosensors, *Biomolecular Engineering*, 23, 233-245, **2006**
- [50] Sun, X., Yang, L., Xing, H., Zhao, J., Li, X., Huangi Y., Liu, H., Synthesis of polyethylenimine-functionalized poly(glycidyl methacrylate) magnetic microspheres and their excellent Cr(VI) ion removal properties, *Chemical Engineering Journal*, 234, 338-345, **2013**
- [51] Çakmak, S., Gümüşderelioğlu, M., Denizli, A., Biofunctionalization of magnetic poly (glycidyl methacrylate) microspheres with protein A: Characterization and cellular interactions, *Reactive & Functional Polymers*, 69, 586-593, **2009**
- [52] Altıntaş, E. B., Türkmen, D., Karakoç, V., Denizli, A., Hemoglobin binding from human blood hemolysate with poly(glycidyl methacrylate) beads, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85, 235-240, **2011**
- [53] Horak, D., Magnetic Polyglycidylmethacrylate Microspheres by Dispersion Polymerization, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 39, 3707-3715, **2001**
- [54] Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö. İ., *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, ISBN: 978-605-88783-0-3, Ankara, **2010**
- [55] Ma, Z., Guan, Y., Liu, X., Liu, H., Covalent immobilization of albumin on micron-sized magnetic poly(methyl methacrylate-divinylbenzene-glycidyl methacrylate) microspheres prepared by modified suspension polymerization, *Polymers For Advanced Technologies*, 16, 554-558, **2005**
- [56] Esseghaier, C., Ng, A., Zourob, M., A novel and rapid assay for HIV-1 protease detection using magnetic bead mediation, *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 335-341, **2013**
- [57] Horak, D., Semenyuk, N., Lednicky, F., Effect of the Reaction Parameters on the Particle Size in the Dispersion Polymerization of 2-Hydroxyethyl and Glycidyl Methacrylate in the Presence of a Ferrofluid, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 41, 1848-1863, **2003**
- [58] Yavuz, C. T., Prakash, A., Mayo, J. T., Colvin, V. L., Magnetic separations: From steel plants to biotechnology, *Chemical Engineering Science*, 64, 2510-2521, **2009**
- [59] Svoboda, J., Fujita, T., Recent developments in magnetic methods of material separation, *Minerals Engineering*, 16, 785-792, **2003**
- [60] Borlido, L., Azevedo, A. M., Roque, A. C. A., Aires-Barros, M. R., Magnetic separations in biotechnology, *Biotechnology Advances*, 31, 1374-1385, **2013**
- [61] Ma, Z., Liu, H. Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine, *China Particuology*, 5, 1-10, **2007**
- [62] Safarik, I., Safarikova, M., Use of magnetic techniques for the isolation of cells, *Journal of Chromatography B*, 722, 33-53, **1999**

- [63] Safarik, I., Safarikova, M., Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides, *BioMagnetic Research and Technology*, 2:7, 1-17, **2004**
- [64] Watson, J. H. P., Younas, I., Superconducting discs as permanent magnets for magnetic separation, *Materials Science and Engineering*, B53, 220-224, **1998**
- [65] Webb, C., Kang, H., Moffat, G., Williams, R. A., Estevez, A., Cuellar, J., Jaraiz, E., Galan, M., The magnetically stabilized fluidized bed bioreactor: a tool for improved mass transfer in immobilized enzyme systems, *Chemical Engineering Journal*, 6, 241-246, **1996**
- [66] Bahar, T., Çelebi, S. S., Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFB), *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 28-33, **2000**
- [67] Al-Qodah, Z., Al-Busoul, M., Al-Hassan, M., Hydro-thermal behavior of magnetically stabilized fluidized beds, *Powder Technology*, 115, 58-67, **2001**
- [68] Hausmann, R., Hoffman, C., Franzeb, M., Höll, W. H., Mass transfer rates in a liquid magnetically stabilized fluidized bed of magnetic ion-exchange particles, *Chemical Engineering Science*, 55, 1477-1482, **2000**
- [69] Liu, C., Wang, F., Ou-Yang, F., Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles, *Biosource Technology*, 100, 878-882, **2009**
- [70] Yavuz, H., Denizli, A., Güngüneş, H., Safarikova, M., Safarik, I., Biosorption of mercury on magnetically modified yeast cells, *Separation and Purification Technology*, 52, 253-260, **2006**
- [71] Ganzha, V. L., Saxena, S. C., Heat-transfer rate variations from the surface of a heater probe in a magnetofluidized bed, *International Journal of Heat Mass Transfer*, 41, 203-208, **1998**
- [72] Liu, Y. A., Hamby, R. K., Colberg, R. D., Fundamental and practical developments of magnetofluidized beds: a review, *Powder Technology*, 64, 3-41, **1991**
- [73] Burgess, R. R., Thompson, N. E., Advances in gentle immunoaffinity chromatography, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 304-308, **2002**
- [74] Hage, D. S., Cazes, J., *Handbook of Affinity Chromatography*, Taylor & Francis Group, Oxford, **2006**
- [75] Wang, Y., Zhang, Q., Li, P., Zhang, W., Li, Y., Ding, X., Selective sample cleanup by immunoaffinity chromatography for determination of fenvalerate in vegetables, *Journal of Chromatography B*, 879, 3531-3537, **2011**
- [76] Hage, S. D., Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography, *Journal of Chromatography B*, 715, 3-28, **1998**

- [77] Huang, S. H., Liao, M. H., Chen, D. H., Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles, *Biotechnology Progress*, 19 (3), 1095-1100, **2003**
- [78] Swartz, H. M., Bolton, J. R., Borg D. C., *Biological applications of electron spin resonance*, Wiley, New York, **1972**
- [79] Reverberi R., Leverberi L., Factors affecting the antigen-antibody reaction, *Blood Transfus*, 5(4), 227-240, **2007**
- [80] 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**
- [81] Barroso, A., Gimenez, 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**
- [82] Awade, A. C., Efstathiou, T., Comparison of three liquid chromatographic methods for egg-white protein analysis, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 723(1-2), 69-74, **1999**
- [83] 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(2), 171-179, **1995**
- [84] Kuan, W., Horak, D., Plichta, Z., Lee, W., Immunocapture of CD133-positive cells from human cancer cell lines by using monodisperse magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres containing amino groups, *Materials Science and Engineering C*, 34, 193-200, **2014**
- [85] Altıntaş, E. B., Tüzmen, N., Candan, N., Denizli, A., Use of magnetic poly(glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozymw in batch system, *Journal of Chromatography B*, 853, 105-113, **2007**

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Dilara SAÇLIGİL
Doğum Yeri : İstanbul
Medeni Hali : Bekar
E-posta : dsacligil@hacettepe.edu.tr
Adresi : Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü
Kimya Bölümü 06800 Çankaya – ANKARA

Eğitim

Lise : 50. Yıl Tahran Anadolu Lisesi, 2008
Lisans : Marmara Üniversitesi, 2012
Nottingham Trent University, 2010-2011
(Öğrenci Değişim Programı)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, 2014

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce (Çok iyi)

İş Deneyimi

Novartis Türkiye (İstanbul)
08.2010 - 09.2010

Deneyim Alanları

İlaç stabilite ve kalite kontrol – kalite güvence sistemleri, HPLC
Deniz suyu kimyasal, mikrobiyolojik, jeolojik ve oşinografik testleri
Polimerik desteklerin sentezi ve bu desteklerin biyoayırma alanında kullanımı

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Ulusal Kromatografi Kongresi - Ege Üniversitesi (İzmir), 12-15 Mayıs 2014