

**PROSTAT KANSERİNE ÖZGÜL GLİKOPROTEİNLERİN
TANIMLANMASI İÇİN LEKTİN AFİNİTE SORBENTLERİN
HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF LECTIN AFFINITY SORBENTS FOR
IDENTIFICATION OF SPECIFIC GLYCOPROTEINS IN
PROSTATE CANCER**

NESLİHAN İDİL

Prof. Dr. NİLÜFER AKSÖZ
Tez Danışmanı

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

2015

NESLİHAN İDİL'in hazırladığı '**Prostat Kanserine Özgül Glikoproteinlerin Tanımlanması için Lektin Afinite Sorbentlerin Hazırlanması**' adlı çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Başkan

.....

Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Danışman

.....

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Üye

.....

Prof. Dr. Handan YAVUZ

Üye

.....

Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY

Üye

.....

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

Prof. Dr. Fatma Sevin DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

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

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

beyan ederim.

27/03/2015

NESLİHAN İDİL

ÖZET

PROSTAT KANSERİNE ÖZGÜL GLİKOPROTEİNLERİN TANIMLANMASI İÇİN LEKTİN AFİNİTE SORBENTLERİN HAZIRLANMASI

NESLİHAN İDİL

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Mart 2015, 98 Sayfa

Prostat kanserinin (PCa) tanısı ve izleminde biyoişaret olarak kullanılan glikoprotein yapısındaki prostat spesifik antijenin (PSA) hastalık sürecinde değişen glikozillenme özelliği, patogenezin anlaşılabilmesi için yeni ve önemli bir bakış açısı kazandırmıştır. Bu çalışmada, Konkanavalin A (Con A) immobilize manyetik poli(glisidilmetakrilat) (mPGMA) mikroküreler hazırlandı ve lektin-glikoprotein etkileşimlerinden yararlanılarak bu mikrokürelerin PCa ve benign prostat hiperplazideki (BPH) PSA bağlama kapasiteleri karşılaştırıldı. Söz konusu mikrokürelere manyetik özellik kazandırmak amacıyla demir oksit (Fe_3O_4) nanopartiküller sentezlendi. Bu nanopartiküller kullanılarak dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile mPGMA mikroküreler hazırlandı. Karakterizasyon çalışmaları, taramalı elektron mikroskobu, elektron spin rezonans, termogravimetrik analiz, yüzey alanı analizi, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ve titreştirici örnek manyetometresi ile gerçekleştirildi. mPGMA mikrokürelerin PSA bağlama kapasitesine uzatıcı kolun etkisinin araştırılması amacıyla 1,6 diaminohekzan (HDMA) kullanıldı. Uzatıcı kol takılan mPGMA mikroküreler glutaraldehit ile aktive edildikten sonra kovalent bağlama ile Con A

immobilizasyonu gerçekleştirildi. Adsorpsiyon çalışmaları öncesinde, serumda yüksek derişimde bulunan albümin ve immunoglobulin-G, sırasıyla Cibacron mavisı-F3GA immobilize poli(hidroksietil metakrilat) (PHEMA) kriyojel diskler ve HiTrap rProtein A FF kolonu ile uzaklaştırıldı. PCa'lı ve BPH'lı bireylerden alınan serum örneklerinde uzatıcı kol takılan ve takılmayan mPGMA mikrokürelerin PSA bağlama kapasiteleri karşılaştırıldı. Serum örneklerindeki PSA miktarları CLIA (Kemilüminesans immunassay) ile ölçüldü. Uzatıcı kol takılı Con A immobilize mPGMA (mPGMA-HDMA-Con A) mikrokürelerin total PSA (tPSA) ve serbest PSA (fPSA) bağlama kapasitesi, uzatıcı kol takılı olmayan Con A immobilize mPGMA (mPGMA-Con A) mikroküreler ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulundu. Söz konusu mikrokürelerin PSA bağlama kapasitesi sıcaklık, başlangıç serum derişimi, ligand yükleme miktarı ve zaman parametreleri açısından incelendi. Elde edilen verilere adsorpsiyon modelleri ve kinetikleri uygulandı. Elüsyon ajanı olarak 0.1 M mannoz kullanıldı ve yaklaşık %85 oranında desorpsiyon gerçekleştiği belirlendi. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelerin bağlanma kapasitesinde önemli derecede bir kayıp olmaksızın ardışık kullanılabilceği gösterildi. Serum fraksiyonları SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile analiz edildi.

Çalışmamızda hazırlanan mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelerin serum gibi karmaşık bir ortamdan PSA gibi bir PCa biyoişaretini bağlama kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Söz konusu mikrokürelerin ticari kitlerin geliştirilmesinde yararlı araçlar olarak kullanılabilceği düşünülmektedir. Lektin immobilize mPGMA mikrokürelerin henüz keşfedilmemiş diğerklikoprotein yapısındaki biyoişaretler için model bir sistem olabileceği görüşüne varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: lektin, manyetik mikroküreler, prostat spesifik antijen, glikoprotein, prostat kanseri.

ABSTRACT

PREPARATION OF LECTIN AFFINITY SORBENTS FOR IDENTIFICATION OF SPECIFIC GLYCOPROTEINS IN PROSTATE CANCER

NESLİHAN İDİL

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. NİLÜFER AKSÖZ

MARCH 2015, 98 pages

Prostate specific antigen (PSA) is a glycoprotein and has been used as a biomarker in the prognosis and diagnosis of prostate cancer (PCa). The alterations in the glycosylation feature of PSA during disease processes have brought a new and important perspective in order to understand the pathogenesis. In this study, Concanavalin A (Con A) immobilized magnetic poly(glycidyl methacrylate) (mPGMA) beads were prepared and PSA binding capacities of these beads were compared in PCa and BPH using lectin-glycoprotein interactions. For generating a magnetic property, iron oxide nanoparticles were synthesized. Then, mPGMA beads were prepared by dispersion polymerization using these iron oxide nanoparticles. Characterization studies were performed with scanning electron microscopy, electron spin resonance, thermogravimetric analysis, surface area analysis, fourier transform infrared spectroscopy and vibrating sample magnetometer. Before adsorption studies, high abundant proteins in the serum such as albumin and immunoglobulin G were depleted with Cibacron blue-F3GA immobilized poly(hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) cryogel discs and HiTrap rProtein A FF column, respectively. In order to investigate the effect of spacer-arm

attachment to the PSA binding capacity of the beads, a spacer arm (1,6 diaminohexane-HDMA) was used. Following the spacer-arm attachment, mPGMA beads were activated with glutaraldehyde, then Con A immobilization was carried out by covalent binding. The PSA binding capacities of plain and spacer-arm attached mPGMA beads were compared in the serum samples of patients with PCa and BPH. The PSA concentrations in the serum samples were measured by CLIA (Chemiluminescent immunoassay). The total PSA (tPSA) and free PSA (fPSA) binding capacities of mPGMA-HDMA-Con A beads were found to be higher than that of mPGMA-Con A beads. PSA binding onto the mPGMA-HDMA-ConA beads was investigated in terms of temperature, initial serum concentration, ligand loading and time parameters. Adsorption models and kinetics were applied to the obtained data. Up to 85% of the bound PSA was eluted using 0.1 M mannose as an elution agent. It was observed that the mPGMA-HDMA-Con A beads could be appropriate for sequential use without a remarkable reduction in the binding capacities. Serum fractions are analyzed with SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

In our study, mPGMA-HDMA-ConA beads were shown to be capable of binding PCa biomarkers such as PSA from a complex media like serum. It is considered that these beads could be regarded as promising tools in the development of commercial kits. It can be suggested that lectin immobilized mPGMA-HDMA-ConA beads were expected to be a model system for other glycoprotein biomarkers which have not been discovered yet.

Keywords: lectin, magnetic beads, prostate specific antigen, glycoprotein, prostate cancer.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca, büyük ilgi ve anlayışla beni destekleyen, yol gösterici niteliği ile her zaman ışık tutan, bilimsel katkılarıyla yardımcı olan değerli hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ'e,

Tez çalışmam için bana projesinde çalışma imkanı sunan değerli hocam sayın Prof. Dr. Erol AKSÖZ'e,

Tez çalışmam boyunca laboratuvar imkanlarını bana sunan, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, bilimsel dünya görüşleriyle örnek aldığım değerli hocam sayın Prof. Dr. Adil DENİZLİ' ye,

Tez çalışmam boyunca katkı ve desteğini benden esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam sayın Prof. Dr. Handan YAVUZ'a,

Lisans eğitimimden bu yana, büyük yardımlarını gördüğüm değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR'e ve Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY'a,

Tez çalışmamda görüş ve önerilerini benimle paylaşan proje çalışma arkadaşım Arş. Gör. Dr. Işık Perçin DEMİRÇELİK'e,

Tüm deneysel çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarı'nda çalışan başta Veyis KARAKOÇ olmak üzere bütün arkadaşlarıma,

Bu uzun ve yorucu süreçte manevi destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. N. Hande AVCIOĞLU, Arş. Gör. Sinem DİKEN GÜR ve Arş. Gör. Sezen BİLEN ÖZYÜREK'e,

Hayatımın her anında ilgi ve şevkatlerini esirgemeyen, desteklerine ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan biricik annem Huriye SÜRÜCÜ ve babam Adnan SÜRÜCÜ'ye,

Tüm hayatım boyunca varlıklarını hep hissettiğim, her zaman yanlarında olacağım canım kardeşlerim Nagehan ÜNAL ve Sıla SÜRÜCÜ'ye, ailemize yeni katılan, bir gülüşü herşeye değer miniğim birtanecik yeğenim Derin ÜNAL'a, tez çalışmamda güzel çizimleri ile tezimi renklendiren birlikte büyüdüğüm canım kuzenim Sinem SÜRÜCÜ'ye,

Üniversite öğrenciliğimden bu yana, sonsuz sevgisi, anlayışı ve fedakarlığı ile yanımda olan sevgili eşim Övünç İDİL'e,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Genomik ve Proteomik.....	3
2.2. Proteom Teknolojisi.....	4
2.2.1. Proteom Analizinde Kullanılan Örnekler.....	4
2.2.2. Ön Ayırma Yöntemleri.....	5
2.2.3. Proteom Analizinde Kullanılan Yaklaşımlar ve Teknikler	6
2.3. Biyoafinite Kromatografisi	7
2.3.1. Lektin Afinite Adsorpsiyonu.....	11
2.3.1.1. Lektinler	13
2.3.1.2. Lektin-Glikoprotein Etkileşimleri.....	16
2.4. Kanser Tanısında Glikoproteinlerin Önemi	19
2.5. PCa.....	21
2.5.1. PSA.....	21
2.5.2. PCa Biyoişaretleri	23
2.5.3. PCa ile ilgili Proteomik Çalışmaları	24
2.6. Polimerler	26
2.6.1. Mikroküreler ve Kullanım Alanları	27
2.6.2. Manyetik Partiküller ve Polimerler.....	27
2.6.3. Demir Oksit Nanopartiküller	28
2.6.4. Glisidil Metakrilat (GMA)	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	30
3.2. Çalışmada Kullanılan Kan Örnekleri	30

3.3. Demir Oksit Partiküllerin Sentezi.....	30
3.4. mPGMA Mikrokürelerin Sentezlenmesi.....	31
3.5. m-PGMA Mikrokürelerin Karakterizasyonu	32
3.6. Mikrokürelerin Aktivasyonu	33
3.6.1. mPGMA-HMDA Mikrokürelerin Aktivasyonu	34
3.6.2. mPGMA Mikrokürelerin Aktivasyonu.....	34
3.7. mPGMA ve mPGMA-HMDA Mikrokürelere Ligand Bağlanması	35
3.8. Serumdan Yüksek Derişimde Bulunan Proteinlerin Uzaklaştırılması	35
3.8.1. Serumdan Albümin Uzaklaştırılması	35
3.8.2. Serumdan IgG Uzaklaştırılması	37
3.9. Adsorpsiyon Çalışmaları	37
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	41
4.1. Çalışmada Kullanılan Kan Örnekleri	41
4.2. Demir Oksit Partiküllerin Sentezi.....	42
4.3. mPGMA Mikrokürelerin Sentezlenmesi.....	43
4.4. mPGMA Mikrokürelerin Karakterizasyonu	46
4.4.1. mPGMA Mikrokürelerin SEM Analizi.....	46
4.4.2. mPGMA Mikrokürelerin Yüzey Alanı Analizi	46
4.4.3. mPGMA Mikrokürelerin FTIR Analizi	46
4.4.4. mPGMA Mikrokürelerin ESR Analizi	48
4.4.5. mPGMA Mikrokürelerin VSM Analizi.....	49
4.4.6. mPGMA Mikrokürelerin Termogravimetrik Analizi (TGA).....	50
4.5. mPGMA Mikrokürelerin Aktivasyonu.....	51
4.6. mPGMA Mikrokürelere Ligand İmmobilizasyonu.....	52
4.7. Serumdan Yüksek Derişimde Bulunan Proteinlerin Uzaklaştırılması	53
4.8. Adsorpsiyon Çalışmaları	56
4.8.1. mPGMA-ConA ve mPGMA-HDMA-ConA Mikrokürelere PSA Adsorpsiyonu	56
4.8.2. Sıcaklığın etkisi	57
4.8.3. Başlangıç Serum Derişiminin Etkisi	59
4.8.4. Adsorpsiyon Zamanı	60
4.9. Adsorpsiyon Kinetiği.....	61
4.10. Eşit Miktarda tPSA Derişimine Sahip Olan PCa'lı ve BPH'lı Serum Örneklerinden PSA Adsorpsiyonu.....	65

4.11. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	73
4.12. SDS-PAGE.....	74
5. YORUM.....	77
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ	97

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

k_1	pseudo-birinci derece adsorpsiyon hız sabiti (dk^{-1})
k_2	pseudo-ikinci derece hız sabiti ($gng^{-1}dk^{-1}$)
q_{eq}	Denge zamanında adsorplanan miktar (ng/g)
q_t	t anında adsorplanan miktar (ng/g)
Q	Mikrokürenin birim kütlesi başına adsorbe olan PSA miktarı (ng/g)
C_o	Başlangıç çözeltisindeki PSA derişimi (ng/mL)
C	Sonuç çözeltisindeki PSA derişimi (ng/mL)
$^{\circ}C$	Santigrat Derece
Å	Angström
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
g	Gram
mg	Miligram
ng	Nanogram
mM	Milimolar
M	Molar
mm	Milimetre
μm	Mikrometre
nm	Nanometre
m^2	Metrekare
cm	Santimetre
cm^3	Santimetreküp
dk	Dakika
%	Yüzde
rpm	Dakikadaki devir sayısı (rotation per minute)
kDa	Kilodalton
Da	Dalton
MA	Molekül ağırlığı

m _{kuru}	Mikrokürenin kuru ağırlığı
V	Volt
mA	Miliamper
A ₂₈₀	280 nm'deki absorbans
pI	İzoelektrik nokta
HCl	Hidroklorik asit

Kısaltmalar

WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FDA	Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç İdaresi (US Food and Drug Administration-FDA)
CLIA	Kemilüminesans immunassay
GMA	Glisidil metakrilat
PVP	Polivinilpirolidon
AIBN	Azobisizobütironitril
PHEMA	poli(hidroksietil metakrilat)
HEMA	Hidroksi etil metakrilat
MBAA	N,N'- metilenbisakrilamid
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen diamin
APS	Amonyum persülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
BET	Brunauer–Emmett–Teller
FTIR	Forier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi
ESR	Elektron Spin Rezonans
VSM	Titreşimli Örnek Magnetometresi
TGA	Termogravimetrik analiz
Con A	Konkanavalin A
DMF	Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTT	Ditiotreitol
[m-poly(EGDMA-MAH)]	Manyetik poli(etilen glikol dimetakrilat-N-metakriloil- (L)-histidin metilester

CB-nanoProA	Cibocron mavisi-nanoProtein A bağlı kriyojel
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
PSA	Prostat Spesifik Antijen
fPSA	Serbest PSA
tPSA	Total PSA
PCa	Prostat Kanseri
BPH	Benign Prostat Hiperplazi
2-DE	İki boyutlu jel elektroforezi
MS	Kütle spektrometresi
SELDI-TOF-MS	Yüzey etkisi artırılmış lazer desorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometresi
S-LAC	Seri Lektin Afinite Kromatografisi
M-LAC	Çoklu Lektin Afinite Kromatografisi
PSMA	Prostat-spesifik membran antijeni
PAP	Prostatik asit fosfataz
PCNA	Proliferasyon hücre nükleer antijeni
HSP	Isı şok proteini
GST-pi	Glutatyon-S-transferaz pi
PCA3	Prostat kanseri protein-3
AMACR	α -metil açıl KoA rasemaz
NIPA	N-izopropilakrilamid
IgG	İmmunoglobulin-G
mPGMA	Manyetik poli(glisidilmetakrilat) mikroküre
HDMA	1,6 diaminohekzan
mPGMA-ConA	Konkanavalin A bağlı manyetik poli(glisidilmetakrilat) mikroküre
mPGMA-HDMA	Uzaticı kol takılan manyetik poli(glisidilmetakrilat) mikroküre
mPGMA-HDMA- ConA	Uzaticı kol takılan Konkanavalin A bağlı manyetik poli(glisidilmetakrilat) mikroküre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Afinite kromatografisinin prensibi	8
Şekil 2.2. Uzatıcı kolların prensibi	10
Şekil 2.3. Afinite saflaştırma tekniklerinin liganda göre sınıflandırılması	11
Şekil 2.4. Glisidil metakrilatın yapısı	24
Şekil 3.1. Demir oksit sentezinin şematik gösterimi	31
Şekil 3.2. mPGMA mikrokürelerin sentezinde kullanılan polimerizasyon sisteminin şematik görüntüsü	32
Şekil 3.3. mPGMA mikrokürelerin manyetik seperatör kullanılarak ortamdandan ayrılması.....	34
Şekil 3.4. (a) Cibacron mavisi-F3GA bağlı PHEMA kriyojel diskler	37
Şekil 3.5. (a) Hitrap rProtein A Sepharose™ FF kolonu	38
Şekil 3.6. PSA adsorpsiyonunun gerçekleştirildiği kesikli sistem deney düzeneği.	38
Şekil 4.1. Demir oksit nanopartüküllerin sentezi	37
Şekil 4.2. mPGMA mikrokürelerin manyetik alana doğru hareketi	45
Şekil 4.3. mPGMA mikrokürelerin optik görüntüsü	45
Şekil 4.4. mPGMA mikrokürelerin SEM görüntüsü	46
Şekil 4.5. Sentezlenen (m-PGMA) mikrokürelerin FTIR spektrumu.....	47
Şekil 4.6 mPGMA mikrokürelerin ESR spektrumu.....	48
Şekil 4.7. mPGMA mikrokürelerin manyetizma eğrisi.....	49
Şekil 4.8. mPGMA mikrokürelerin TGA ve DTA grafikleri	50

Şekil 4.9. mPGMAve mPGMA-HDMA mikrokürelere ligand immobilizasyonuna ortamdaki ligand derişiminin etkisi.....	52
Şekil 4.10. a) mPGMA mikrokürelere Con A immobilizasyonu b) mPGMA-HDMA- mikrokürelere Con A immobilizasyonu.....	54
Şekil 4.11. Yüklenen ligand miktarının mPGMA-ConA mikrokürelere PSA adsorpsiyonuna etkisi	56
Şekil 4.12. Yüklenen ligand miktarının mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PSA adsorpsiyonuna etkisi	57
Şekil 4.13. Sıcaklığın mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA adsorpsiyonuna etkisi	58
Şekil 4.14. Sıcaklığın mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere fPSA adsorpsiyonuna etkisi	58
Şekil 4.15. Başlangıç serum derişiminin mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA adsorpsiyonuna etkisi	59
Şekil 4.16. Başlangıç serum derişiminin mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere fPSA adsorpsiyonuna etkisi	59
Şekil 4.17. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA adsorpsiyonunun zamana bağılı değişimi.....	60
Şekil 4.18. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere fPSA adsorpsiyonunun zamana bağılı değişimi.....	61
Şekil 4.19. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA adsorpsiyonu için pseudo- birinci derece adsorpsiyon kinetiği.....	63
Şekil 4.20. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA adsorpsiyonu için pseudo- ikinci derece adsorpsiyon kinetiği	63
Şekil 4.21. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere fPSA adsorpsiyonu için pseudo- birinci derece adsorpsiyon kinetiği.....	64

Şekil 4.22. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere fPSA adsorpsiyonu için pseudo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.....	64
Şekil 4.23. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneklerinden tPSA adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi.....	66
Şekil 4.24. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneklerinden fPSA adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi.....	66
Şekil 4.25. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneklerinden tPSA adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi.....	67
Şekil 4.26. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneklerinden fPSA adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi.....	67
Şekil 4.27. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneğinden tPSA adsorpsiyonu için pseudo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.....	68
Şekil 4.28. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneğinden tPSA adsorpsiyonu için pseudo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği	68
Şekil 4.29. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneğinden fPSA adsorpsiyonu için pseudo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.....	69
Şekil 4.30. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneğinden fPSA adsorpsiyonu için pseudo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği	69
Şekil 4.31. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere BPH'lı serum örneğinden tPSA adsorpsiyonu için pseudo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.....	70
Şekil 4.32. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere BPH'lı serum örneğinden tPSA adsorpsiyonu için pseudo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği	70
Şekil 4.33. mPGMA-HDMA-Con A mikrokürelere tekrar kullanılabilirliği ve % desorpsiyon oranları	74
Şekil 4.34. SDS-PAGE ile analiz edilen serum fraksiyonları	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Afinite kromatografisindeki biyolojik ilişkilere ait örnekler	8
Çizelge 2.2. Biyoafinite kromatografisinde kullanılan bazı katı destek malzemeleri.	9
Çizelge 2.3. Bazı bitkisel kaynaklı lektinlerin karakteristik özellikleri	17
Çizelge 2.4. FDA tarafından onaylanan bazı glikoprotein kanser biyoişaretleri	20
Çizelge 2.5. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) onaylı ve potansiyel PCa biyoişaretleri.	24
Çizelge 3.1. mPGMA mikrokürelerin sentezi için kullanılan reçete ve polimerizasyon koşulları	32
Çizelge 3.2. PHEMA kriyojelin hazırlanma koşulları	36
Çizelge 4.1. Çalışma kapsamına dahil edilecek örneklere ait fPSA, tPSA, fPSA/ tPSA ve Gleason skoru değerleri	43
Çizelge 4.2. Literatürde rapor edilen demir oksit FTIR spektrumları.....	47
Çizelge 4.3. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için birinci ve ikinci derece kinetik verileri	65
Çizelge 4.4. PCa'lı ve BPH'lı hasta serumlarından mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için adsorpsiyon kapasiteleri.....	65
Çizelge 4.5. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneğinden tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için birinci ve ikinci derece kinetik verileri	71
Çizelge 4.6. Literatürde lektinlerin kullanıldığı bazı çalışmalar.....	76

1. GİRİŞ

Kanser, tanı yöntemleri ve tedavideki yeniliklere rağmen günümüzün en önemli halk sağlığı sorunlarından birisi olarak görülmeye devam etmektedir. Kanser görülme sıklığının gün geçtikçe artması ve yüksek ölüm oranı gibi çeşitli nedenler kanserin günümüzdeki önemini daha da arttırmaktadır [1]. Hastalık sürecindeki kontrolün sağlanması için yapılan araştırmalar hız kazanmış ve özellikle son yıllarda proteomiks alanındaki çalışmalar yaygın bir uygulama alanı bulmuştur. Klinik proteomiks çalışmaları, hasta ve sağlıklı bireylerde farklı şekilde ifade olan proteinlerin belirlenmesi, araştırılması ve tanımlanması için çok geniş bir fırsat sunmaktadır. Söz konusu çalışmalar sayesinde daha iyi diagnostik ve prognostik işaretleyicilerin geliştirilmesi ile yeni tedavi hedeflerinin keşfi mümkün olacaktır [2].

Prostat kanseri (PCa) dünyada en yaygın beşinci, erkeklerde ise kanser ile ilişkili ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır [3, 4]. Özellikle 1980'li yılların ortalarından başlayarak PCa'nın tanı ve tedavisinde büyük ilerlemeler sağlanmıştır. Serumda bulunan prostat spesifik antijen (PSA), PCa'nın erken tanısında çığır açmış olup, en önemli klinik biyokimyasal biyoişaret olarak karşımıza çıkmaktadır [5]. Biyoişaretler, hastalık sürecinde teşhis, tanı, tedavi, diagnoz ve prognoz için önemli faktörler arasında yer alan, bu süreçte meydana gelen fizyolojik durum ve değişiklikleri gösteren biyolojik moleküllerdir. Biyoişaretler, hastalığın erken teşhis edilmesine ve ilerlemesinin izlenmesine yardımcı olan ölçülebilir faktörlerdir [2].

Güncel tanı stratejileri arasında yerini koruyan PSA, sadece PCa'da değil, prostat ile ilişkili diğer hastalıklarda da yükselbilmektedir. PSA'yı PCa'ya özel bir tanı yöntemi haline getirmek için yapılan girişimler sonucunda PSA velositesi, PSA dansitesi, yaşa göre değişen PSA referans aralıkları ve PSA formları ortaya çıkmıştır [2]. PSA ile ilişkili kısıtlamalar nedeniyle PCa'nın tanısı için daha etkili biyoişaretlerin keşfi gündeme gelmiştir. Kanser biyoişaretlerinin belirlenmesinde kullanılan lektinler, son yıllarda yüzyılın önemli buluşlarından biri olarak dikkat çekmektedir [6]. Lektin afinite adsorpsiyonu, örnek içindeki bileşenlerin ayrılmasında lektinlerin ligand olarak kullanıldığı bir afinite adsorpsiyonu tipidir. Lektinler, karbonhidratlara özgüllük göstermeleri nedeniyle kompleks ortamlardan glikoproteinleri ayırmada yaygın olarak kullanılırlar ve hastalık durumu ile ilişkili yeni biyoişaretlerin keşfine olanak sağlarlar. Kanser tanısında oldukça önemli olan

glikoproteinler ve hastalık sürecinde meydana gelen glikozilasyonların keşfedilmesi günümüzde klinik proteomikse ilişkin çalışmaların en önemli ilgi alanlarından birisidir. Malign hücrelerin kaybettikleri hücre özelliklerinin ve kazandıkları yeni özelliklerin birçoğunun hücre membranındaki çeşitli değişikliklere bağlı olduğu gerçeği, tümör belirteci çalışmalarını plazma membran komponentlerine, dolayısıyla glikoprotein ve glikolipidlere yöneltmiştir [7]. Ayrıca, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç İdaresi (US Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylanan tüm kanser biyoişaretlerinin de glikoprotein yapıda olduğu dikkat çekmektedir [4]. Glikoprotein yapısındaki kanser biyoişaretlerinin tanımlanması ve glikozilasyon değişimlerinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen araştırmalarda lektin-glikoprotein etkileşimlerinden yararlanıldığını gösteren kanıtlar mevcuttur. Başta PCa olmak üzere, karaciğer, meme, mesane, pankreas ve kalın bağırsak kanseri ile ilgili çalışmalarda çeşitli lektinlerin kullanıldığı gösterilmiştir [8]. Son yıllarda, serum veya plazma glikoproteomunun çalışılmasında glikoproteinlerin adsorpsiyonu amacıyla lektin immobilize polimerlerin kromatografik araçlar olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır [9]. Bu çalışmalarda kullanılan yüksek yüzey alanlı biyoafinite adsorbentlerin, hızlı bağlanma kinetiğiyle yüksek bağlanma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir [10-13]. Bu bağlamda, biyomoleküllerin ayrılmasında yüzey alanını artırmak için hazırlanan eş boyutlu partiküllerin kullanılması partikül difüzyon direncinin olmaması nedeniyle tercih edilmektedir [14]. Manyetik özellik taşıyan partiküller, hücreler, nükleik asit ve proteinler gibi biyomoleküller için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Manyetik taşıyıcıların biyolojik ortamdan filtrasyon veya santrifüjleme basamaklarına gerek duyulmadan hızlı bir şekilde ayrılması bu partikülleri özellikle kullanışlı hale getirmektedir. Ayrıca, manyetik ayırma yöntemleri, yıkama sırasında örnekte seyrelme ve taşıyıcı kaybı olmaması, kolay yönlendirme, otomasyon ve minyatürizasyon gibi avantajlar da sağlamaktadır. [15]. Bu çalışmada, PCa ve kontrol grubuna ait serum örneklerinde glikoprotein yapısında olan PSA'nın bağlanma kapasitesinin saptanması ve optimum PSA adsorpsiyon koşullarının belirlenmesi için lektin immobilize manyetik poli(glisidilmetakrilat) (mPGMA) mikrokürelerin hazırlanması amaçlanmıştır. Lektin immobilize mPGMA mikrokürelerin prostat ve diğer kanser türlerine özgü glikoprotein yapısındaki yeni biyoişaretlerin keşfi için model bir sistem olabileceği öngörülmüştür.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Genomik ve Proteomik

Genom, DNA'nın taşıdığı genetik bilgiyi ifade eder. Bu bilginin ortaya çıkarılması ile ilgili tüm çalışmalar genomik olarak adlandırılır. Bu çalışmalarda hastalık ya da farklı fizyolojik süreçler ile ilgili genler tanımlanmaya çalışılmaktadır. Ancak, bu tanımlanan genleri organizmanın hangi oranda kullandığı hakkında bilgi edinilememektedir. Genler, çeşitli biyolojik işlevlere sahip değişik proteinler kodlarlar ve bu proteinler ise sentezlendikten sonra değişimlere uğrarlar. Birçok durumda da sentez sonrası değişimler gen işlevinden bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Bu nedenlerden dolayı genomik çalışmalara dayanan teşhis yaklaşımları klinik uygulamalar için yeterli olmamaktadır. Gen ürünlerinin sentez sonrası değişimlerin anlaşılabilmesi için genomik sonrası bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada proteomik karşımıza çıkmaktadır. Proteom, bir hücrenin, organın ya da organizmanın belirli bir zamanda ve yerde sahip olduğu ve ifade ettiği tüm proteinlerin toplamıdır. Proteom, iç ve dış uyarılara yanıt olarak biyokimyasal etkileşimler aracılığı ile sürekli değişim halindedir. Bunun sebebi, protein ekspresyonlarının vücudun farklı bölgelerinde, hücre döngüsünün farklı evrelerinde ve farklı çevre koşullarında değişkenlik göstermesidir. Proteomik ise belirli bir zamanda ve yerde bulunan tüm proteinlerin yapılarını, yerleşimlerini, miktarlarını, translasyon sonrası modifikasyonlarını, doku ve hücredeki işlevlerini, diğer proteinlerle ve makromoleküllerle olan ilişkilerini aydınlatır. Proteomik, spesifik hastalıklar, enfeksiyonlar ve toksik ajanlar gibi dış faktör uyarıları ile oluşan proteinlerin seviyelerinin ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi, işlevlerinin aydınlatılması ve etkileşimlerinin saptanması bakımından oldukça önemlidir [16].

Genomik ve proteomik, hastalıklara özgü proteinlerin belirlenmesini amaçlayan iki önemli biyomoleküler disiplin olarak karşımıza çıkmaktadır [17]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, biyokimyada devrim sayılabilecek gelişmelerin daha iyi izlenebilmesi için yeni yaklaşımları da beraberinde getirmektedir. Tüm organizmalarda kompleks fonksiyonlar ve metabolik reaksiyonların çoğu proteinler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu bağlamda, farklı dinamik koşullar altında tüm proteomun protein ifadesi modelini çalışmak ve bu koşullar altında değişen özgül proteinleri tanımlamak gerekmektedir.

2.2. Proteom Teknolojisi

Tüm organizmalarda kompleks fonksiyonlar ve metabolik reaksiyonların çoğu proteinler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu proteinlerin sayısı ise fonksiyonların kompleksliği ile orantılıdır. Bu nedenle kompleks sistemlerde yüksek ayırım gücü olan yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Yapılan protein kimyası çalışmalarında kullanılan birçok teknik proteom analizlerini de mümkün kılmaktadır. Ancak proteom teknolojisi yeni bir bakış açısıyla temelde, fraksiyonlama, geniş skalada proteinlerin ayrılması ve translasyon sonrası modifikasyonların analizini de kapsayan protein tanımlamasına dayanmaktadır ve daha gelişmiş tekniklerin kullanımını gerektirmektedir [18].

Proteomik, fenotipin saptanmasında en doğru ve güvenilir yol olarak karşımıza çıkmaktadır. Tıp alanında; hastalıkların tanı ve takibi, teröpatik uygulamaların etkilerinin izlenmesi ve patojen mikroorganizmalara karşı etkin ilaç ve aşı geliştirilmesinde kullanılabilecek özgün proteinlerin yani biyoişaretlerin belirlenmesi gibi önemli uygulama alanları bulunmaktadır [19]. Proteom teknolojisi aracılığıyla kanser tanısı için yeni biyoişaretlerin tanımlanması ve bu moleküllerin analiz edilmesi ile erken kanser tanısında önemli adımlar atılmıştır [6]. Hücresel proteinlerin hasta ve normal bireylerdeki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması hastalık sürecinin destekleyici faktörlerini ortaya çıkarmaya yardımcı olmaktadır. Proteinlerin proteomik analizleri ile birlikte post-translasyonel modifikasyonlar da hastalıkla ilgili yapılan çalışmalar bakımından oldukça önemlidir. Asetilasyon, ubiquitinasyon, fosforilasyon ve glikozilasyonu içeren pek çok post-translasyonel modifikasyon bulunmaktadır. Her bir post-translasyonel modifikasyon protein fonksiyonunu etkilemektedir [20]. Yapılan araştırmalarda memeli hücrelerinin % 80'inde post-translasyonel modifikasyon bulunduğu gösterilmiştir [21].

2.2.1. Proteom Analizinde Kullanılan Örnekler

Proteom çalışmalarında beyin, kalp, karaciğer, akciğer, kas, pankreas, dalak, testis gibi insan dokularının yanı sıra beyin sıvısı, idrar, tükürük, hücreler arası sıvı, amniyotik sıvı, plazma ve serum gibi biyolojik sıvılar kullanılmaktadır. En çok çalışılan biyolojik sıvı plazma ve serumdur [17]. Hastalıklara özgül protein biyoişaretlerinin plazma ya da serumda belirlenmesi, hem tanı hem de hastalığın

ilerleyişinin izlenmesi bakımından tercih edilmektedir. Böylece tedaviye yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi mümkün olabilmektedir.

En çok çalışılan biyolojik sıvı olan ve hastalık teşhisinde kullanılan kan, yüksek derişimde protein (60-80 mg/mL) içermektedir. Farklı organ ve dokular ile temasta olması nedeniyle spesifik bir fizyolojik ve patolojik durumda değişime uğrayan proteinlerin modifikasyonlarının tanımlanmasına olanak sağlar. İnsan plazma proteinleri ile ilgili olarak yapılan son çalışmalar ana protein kategorilerinin büyük kısmının plazmada yer aldığını göstermektedir. Çok sayıda protein içeren plazma, hastalıklara özgü proteinlerin belirlenmesi için ideal bir kaynak olarak karşımıza çıkmaktadır [17].

2.2.2. Ön Ayırma Yöntemleri

Protein açısından zengin olan plazma ve serumun tanısal araçlar olarak yüzyıllardır kullanılmasına rağmen, hala az sayıda protein tanımlanmış olup, bu proteinlerin ise çok az bir kısmının tanısal potansiyeli olduğu gösterilmiştir [1, 22, 23]. Albümin, immunoglobulin-G (IgG), transferrin, antitripsin ve haptoglobin gibi plazma proteinleri total plazma proteinlerinin %85'ini oluşturmaktadır [24]. Plazmada yer alan bu proteinlerin geniş derişim aralığına sahip olması plazma proteomunu karmaşık hale getirmektedir. Serum veya plazmanın proteomik analizi, yüksek derişimdeki proteinlerin varlığı tarafından önemli derecede engellenmektedir. Örneğin, kandaki albümin 30-50 mg/mL gibi oldukça yüksek bir derişim değerinde iken, PSA gibi hastalıklara özgü proteinler ng/mL düzeyinde bulunmaktadır. Albümin ve IgG gibi plazmada fazla miktarda bulunan proteinlerin derişimi az olan diğer proteinleri maskelemeleri nedeniyle kromatografik çalışmalardan önce uzaklaştırılmaları gerekmektedir [17].

Ön ayırma yöntemleri, daha fazla proteini tanımlamak amacıyla proteomu daha küçük alt gruplara ayırmak için kullanılmaktadır. Böylece düşük derişimdeki hastalık biyoişaretlerinin belirlenmesi mümkün olabilmektedir [1, 25, 26]. Serum ve plazma analizinde genellikle ilk basamak, çok miktarda bulunan proteinlerin mümkün olduğunca uzaklaştırılmasıdır. Biyoişaretlerin tanımlanmasında da yüksek miktardaki proteinlerin uzaklaştırılması için birçok ön ayırma yöntemi geliştirilmiştir [1]. İmmobilize Cibacron mavisi-F3GA boyalı kolonların kullanıldığı uygulamalar [27], immuno-afinite tabanlı teknikler [28], katı faz fraksiyonlaması

[29], sıvı kromatografisi [18], düşük molekül ağırlıklı fraksiyon zenginleştirme [30, 31] söz konusu yöntemler arasında sayılabilir. Yirmi kDa'dan küçük molekül ağırlıklı analitlerin hızlı ve tek basamakta konsantre edilmesinde, umut vadeden bir yöntem olarak N-izopropilakrilamid (NIPA) nanopartüküllerin kullanılabilirliği araştırma konusudur [32, 33].

Klasik albümin uzaklaştırma yönteminde, albümin için yüksek afinite gösteren klorotriazin bir boya olan hidrofobik Cibacron mavisi boyası kullanılmaktadır [34, 35, 36]. Bu albümin uzaklaştırma yöntemi, göreceli olarak daha ucuz bir yöntem olması nedeniyle, proteomik analizlerinde günümüzde hala uygulanmaktadır [37, 38, 39]. Yüksek miktardaki proteinlerin uzaklaştırılması için kullanılan bir başka yöntem ise immunoglobulinlerin uzaklaştırılmasında kullanılan Protein A/G kolonlarıdır [40, 41]. Albümin [38], IgG [42] ve hem albümin hem de IgG [43] uzaklaştırılması amacıyla kullanılan sistemlere sırasıyla manyetik poli(etilen glikol dimetakrilat-N-metakriloil-(L)-histidin metilester mikroküre [m-poly(EGDMA-MAH)], poli(hidroksietil metakrilat) (PHEMA) kryojel kolon ve Cibacron mavisi-F3GA ve Protein A bağlı kryojel kolon (CB-nanoProA) örnek olarak verilebilir. Buna ek olarak, yüksek derişimli proteinlerin serumdan uzaklaştırılması için uygulanabilecek yöntemlerin sayısının artmasıyla birlikte ticari kitler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu durum, serum analizlerini daha rutin bir işlem haline getirmektedir [44, 45].

2.2.3. Proteom Analizinde Kullanılan Yaklaşımlar ve Teknikler

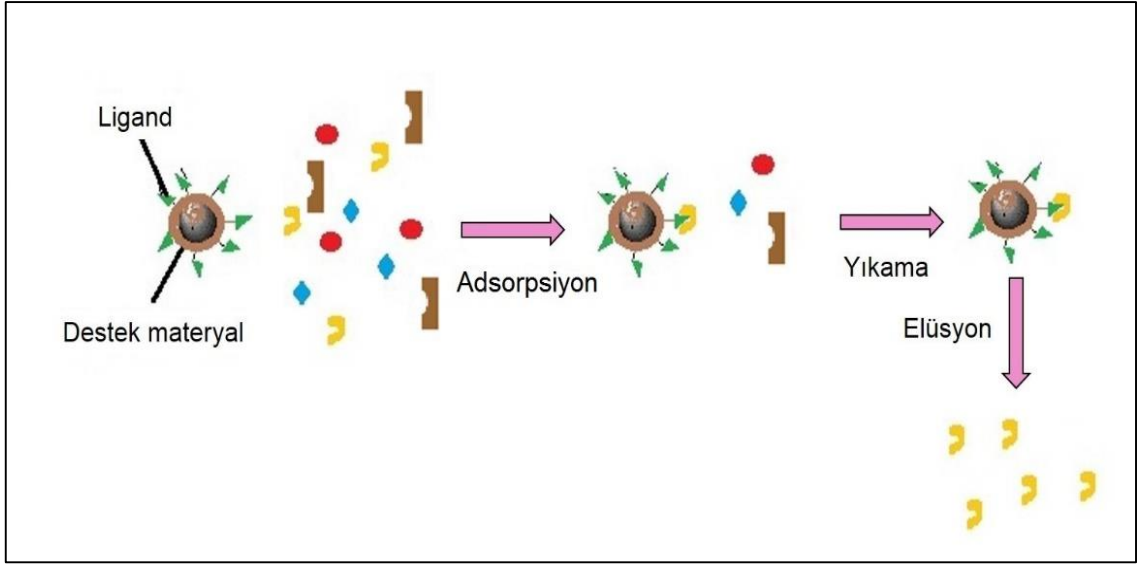
Genom analizi ile karşılaştırıldığında daha karmaşık olması nedeniyle proteom analizinde daha güçlü tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Tek ve iki boyutlu elektroforez, kapiller elektroforez, kromatografi (iyon değişimi, afinite vb.) ve ultrafiltrasyon proteom analizinde kullanılan teknikler arasında yer almaktadır. Proteom analizi ile hastalıkların gelişim süreçlerini de kapsayan birçok biyolojik olay ile proteinlerin yapısal ve işlevsel çeşitliliği arasında ilişki kurulması, hasta ve sağlıklı bireylerde farklılaşan proteinlerin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Böylece, kanser, kalp-damar hastalıkları ve hemofili gibi birçok hastalığa özgü proteinlerin belirlenmesi ile daha iyi sonuç veren teşhis yöntemleri ve tedavi edici ilaçların geliştirilmesi mümkün olacaktır [17].

2.3. Biyoafinite Kromatografisi

Proteomikte sıklıkla kullanılan deneysel yöntemler; proteinlerin ayrımını sağlayan sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE), iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) ve proteinlerin tanımlanmasını sağlayan kütle spektrometresi (MS) dir. Geleneksel 2-DE-MS sisteminin bir parçası olarak kullanılabilen biyoafinite kromatografisi, proteomikte oldukça önemli rol oynar [46]. Biyoafinite kromatografisi, biyolojik olarak aktif maddelerin komplementer bileşenlerini çok seçici ve tersinir olarak bağlama yeteneklerine dayalı bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir. Biyolojik ligand ya da sentetik analogu ile molekül üzerindeki komplementer bağlanma bölgesi arasında meydana gelen özgün etkileşimi esas alan bir yöntemdir [17].

Ligandın kovalent olarak bağlandığı katı destek, kromatografik kolonda sabit faz olarak kullanılır. Ayrılacak olan biyomolekülü içeren karışım kolondan geçirilir, belirlenen deneysel koşullarda immobilize olan afinite ligandı ile etkileşime girecek uygun grupları bulunmayan moleküller kolondan çıkarlar, afinitesi olanlar ise kolonda adsorplanırlar. Adsorplanan biyomolekül ortam koşulları (pH, iyonik şiddet, sıcaklık ya da üre ve guanidin gibi ayrıştırıcı ajanların eklenmesi) değiştirilerek veya yarışmacı ajan kullanılarak kolondan ayrılırlar. Ligand ile biyomolekül arasında gerçekleşen kompleks oluşumu, iyonik ve hidrofobik etkileşimler, dipol dipol-etkileşimi, yük aktarım etkileşimleri gibi moleküler kuvvetler ile gerçekleşir. Bu kuvvetlerin birkaçının aynı zamanda gerçekleşmesi biyospesifik bağın seçiciliğini ve etkinliğini belirleyen en temel etmendir [17]. Şekil 2.1’de afinite kromatografisinin prensibi gösterilmektedir.

Bu yöntem hemen hemen bütün biyomoleküllerin biyolojik fonksiyonları veya özel kimyasal yapıları esasına dayanarak saflaştırılmalarını sağlar. Enzimlerin inhibitörleri, substratları, kofaktörleri veya efektörleriyle, antikorların antijen veya haptentlerle, lektinlerin karbonhidratlar ile yaptığı kompleksler, nükleik asitlerin nükleotidlerle, hormon ve toksinlerin reseptörlerle oluşturduğu kompleksler, taşıyıcı proteinlerin vitaminler ve şekerlerle kurdukları kompleksler afinite kromatografisine örnek olarak gösterilebilir [17]. Afinite kromatografisindeki biyolojik ilişkilere ait örnekler Çizelge 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Afinite kromatografisinin prensibi.

Çizelge 2.1. Afinite kromatografisindeki biyolojik ilişkilere ait örnekler [47].

Ligand	Ligand ile etkileşen molekül
Antikor	Antijen, virüs, hücre
İnhibitör	Enzim (ligandlar genellikle substrat veya kofaktör analogu)
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzeyi reseptörü, membran proteini, hücre
Nükleik asit	Nükleik asit bağlayan protein (enzim veya histon)
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Şeker	Lektin, enzim veya diğer şeker bağlayan proteinler

Biyofinite adsorpsiyonunda istenilen özelliğe sahip katı destek malzemelerin geliştirilmesi önemli etkiye sahiptir. Bu ayırma yönteminde, kullanılacak katı destek malzemelerin doğru seçilmesi, matris ve ligand arasında kurulacak olan kovalent bağ üzerindeki etkisi nedeniyle en önemli basamaktır. Bu malzemeler, immobilize edilen ligand ve adsorplanacak biyomolekülün kararlılığını da etkilemektedir [17].

Farklı türde çok sayıda destek malzemesi, bu malzemelerin aktive edilmiş şekilleri ve kullanıma hazır hale getirilmiş ticari adsorbentler bulunmaktadır. Söz konusu adsorbentler amaca uygun olarak seçilip çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır [17]. Biyofinite kromatografisinde kullanılan bazı katı destek malzemeleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Biyoafinite kromatografisinde kullanılan bazı katı destek malzemeleri [17].

Tür	Kimyasal Yapı
Biyopolimerler	Agaroz, dekstran, selüloz
Yapay polimerler	Poliakrilamid, poli(hidroksietil metakrilat), polistren
İnorganik malzemeler	Gözenekli cam
Biyopolimer/Yapay polimer kompoziti	Agaroz/ Poliakrilamid
İnorganik malzeme/Polimer	Silika/Hidrofilik polimerler

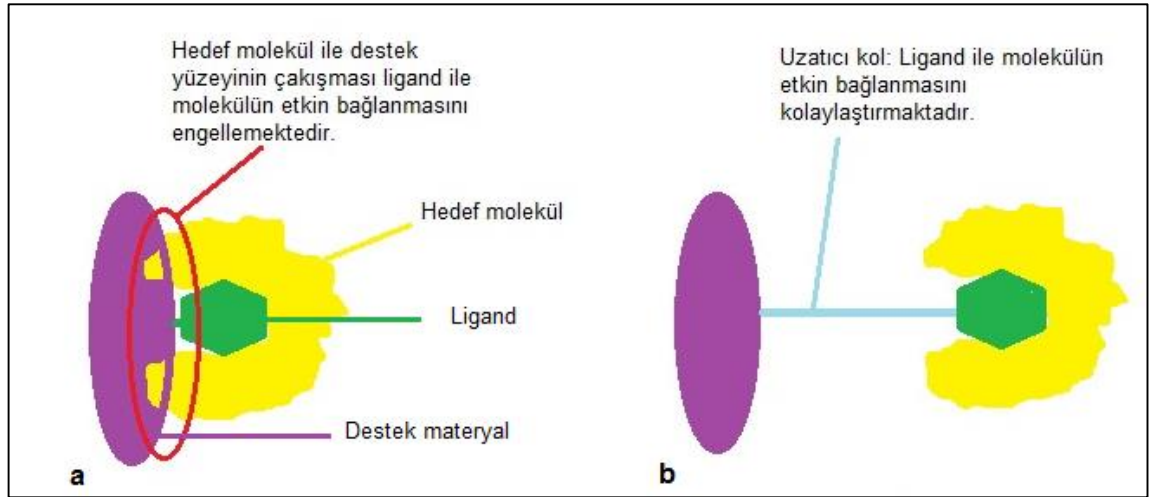
Biyoafinite kromatografisinde kullanılan katı destek malzemelerinin sahip olması gereken özellikler aşağıda verilmiştir:

- Çözünmemelidir.
- Uygun geçirgenliğe ve büyük iç yüzey alanına sahip olmalıdır.
- Uygun partikül şekline sahip olmalıdır.
- Özgül olmayan adsorpsiyon düşük olmalıdır.
- Ligandın bağlanması için fonksiyonel gruplar içermelidir.
- Ligand immobilizasyonu, adsorpsiyon, desorpsiyon ve rejenerasyon koşullarına karşı kimyasal olarak kararlı olmalıdır.
- Mikrobiyal ve enzimatik ataklara karşı kararlı olmalıdır.
- Hidrofilik karakterde olmalıdır [17].

Biyomoleküllerin aktif bölgeleri genellikle molekülün iç kısımlarında yer almaktadır. Bu nedenle, enzim kofaktörleri gibi küçük ligandların doğrudan matrikse bağlanması ile hazırlanan adsorbentler, matriks ile liganda bağlanacak olan makromolekül arasındaki yapısal (sterik) engellemeler nedeniyle düşük ayırma kapasitesi gösterebilmektedir. Bu gibi durumlarda ligandın makromolekülü etkili bir şekilde bağlanmasını kolaylaştırmak amacıyla ligandın matrikse bağlanması sırasında, ligand ile matriks arasına uzatıcı kol konulması avantajlı olmaktadır (Şekil 2.2). İlk basamakta taşıyıcı matriks seçilir ve aktive edilir. Eğer gerekiyorsa, taşıyıcının aktif bölgelerinden sterik engellemelerin giderilmesi amacıyla uzatıcı kol takılır. Uzatıcı kollar, genellikle düşük molekül ağırlıklı ligandların kullanıldığı durumlarda ($MA < 5000$) taşıyıcıya kovalent olarak bağlanan bileşiklerdir. Ligand adsorbent ile uzatıcı kol üzerinden tepkimeye girer. Bazı durumlarda ligand-uzatıcı

kol kombinasyonu ilk basamakta sentezlenir ve daha sonra taşıyıcıya tek basamakta immobilize edilir [17].

Uzatici kolların uzunlukları oldukça önemlidir. Uzatici kolun uzunluğu çok kısa ise, ligand örnek içerisindeki özgül makromolekülünü bağlayamayacaktır. Söz konusu kolun uzunluğu çok fazla ise, ligand ile makromoleküller arasında özgül-olmayan etkileşimler meydana gelmektedir. Bu durum da ayrıştırmanın seçiciliğini düşürmektedir. Sıklıkla kullanılmakta olan uzatici kollara verilebilecek bazı örnekler; 1,6–diaminohekzan, 6–aminohekzanoik asit ve 1,4–bis–(2,3–epoksi propoksi) bütan’dır. Bu kollar, ligandın bağlanabileceği ikinci bir fonksiyonel gruba sahip olmak zorundadırlar [17].



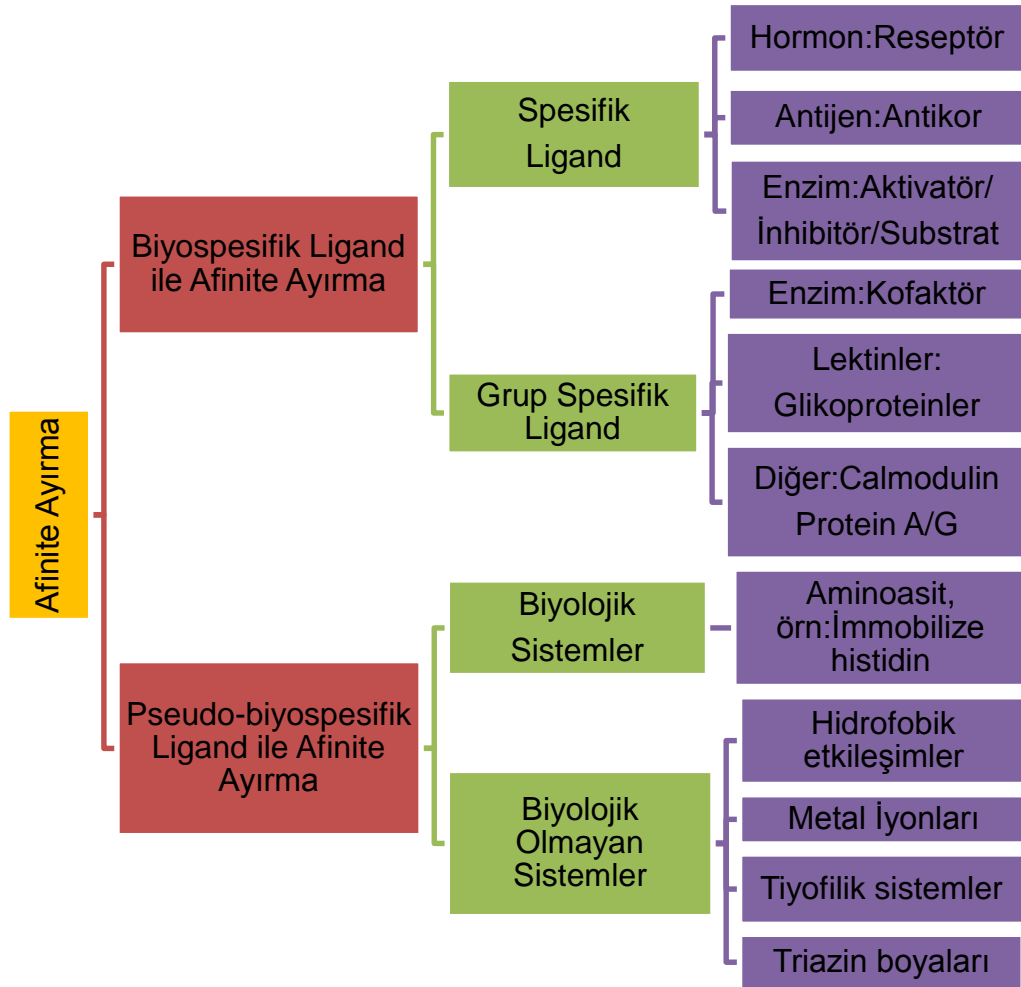
Şekil 2.2. Uzatici kolların prensibi (a) Ligand, doğrudan doğruya matrikse bağlanmıştır (b) Ligand, bir uzatici kol aracılığı ile matrikse bağlanmıştır.

Afinite adsorpsiyonu, jel elektroforezi çalışmalarından önce, seçici olarak, örneklerin konsantre edilmesinde kullanılabilir. Uygulamalar, jel elektroforezinin ayrıştırma kapasitesine engel olabilecek bir proteinin veya bir grup proteinin uzaklaştırılması, proteinlerin daha ileri aşamalarda analizleri için bir veya daha fazla gruba ayrılması şeklindedir. Afinite saflaştırma uygulamalarının çoğunda kompleks karışımlardan küçük bir grup protein uzaklaştırılmaktadır. Örneğin; ligand olarak *Artocarpus integer* bitkisine ait lektin-M kullanılarak insan serumundan N-bağlı oligosakkaritler ayrıştırılmıştır [48]. Başka bir çalışmada ise, monomerik aktin, ligand olarak kullanılarak insan iskelet kasından G-aktin bağlayıcı proteinler elde edilmiştir [49].

Afinite kromatografisi için ligandın seçilmesinde başlıca iki faktör etkili olmaktadır:

- Kullanılacak ligand saflaştırılacak olan moleküle özgül ve tersinir bağlanma özelliğine sahip olmalıdır.
- Ligandın katı destek malzemeye immobilize olabilmesi için kimyasal olarak modifiye edilebilir bazı gruplar içermelidir [49].

Afinite saflaştırma tekniklerinin liganda göre sınıflandırılması Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Afinite saflaştırma tekniklerinin liganda göre sınıflandırılması [49].

2.3.1. Lektin Afinite Adsorpsiyonu

Lektin afinite adsorpsiyonu, örnek içindeki bileşenlerin ayrılmasında lektinlerin ligand olarak kullanıldığı bir afinite adsorpsiyonu tipidir. Lektin afinite

adsorpsiyonunu kullanarak glikoproteinleri elde etmek proteom çalışmalarına büyük katkı sağlayan bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır [50].

Geleneksel saflaştırma yöntemleri kullanılarak tam olarak çözümlenemeyen problemlerden birisi, normal gelişim sürecinde veya patolojik durumlarda hücrel adaptasyon ve sinyal iletiminde çok önemli rolleri olan hücre yüzey glikokonjugatların yeterli miktarlarda elde edilememesidir. Lektin afinite kromatografisinin geliştirilmesi yeterli miktarda hücre yüzey glikokonjugatının saflaştırılmasına olanak sağlamış ve geleneksel yöntemlerin çok ötesinde glikoprotein karışımlarının tek bir bileşen seviyesine kadar ayrılıp çözümlenmesini de mümkün kılmıştır [51]. Ayrıca hücre farklılaşmasından kansere kadar birçok patolojik ve fizyolojik süreçte hücre yüzeyinde meydana gelen değişikliklerin araştırılmasında da lektinlerin kullanılabileceği gösterilmiştir [52]. İmmobilize formdaki lektinler karbonhidratların, glikokonjugatların, enzimlerin, immunoglobulinlerin, hücrelerin ayrılması ve saflaştırılması amacıyla kullanılmaktadır [53]. Bu yöntem hem yüksek derişimde bulunan proteinlerin uzaklaştırılması hem de hastalık biyoişaretlerinin keşfi için bir arada kullanılabilmektedir [54].

Glikoproteinlerin immobilize lektinler ile saflaştırılmasında yer alan basamaklar aşağıda verilmiştir:

- Uygun seçicilik özelliği olan lektin belirlendikten sonra, seçilen lektin kullanıma hazır hale getirilir.
- Lektin katı destek malzemelere kovalent olarak bağlandıktan sonra, heterojen glikoprotein karışımı lektinin immobilize olduğu matriks üzerinden geçirilir.
- Glikoprotein lektine bağlanması için optimum koşullar belirlenir. Lektine özgü şeker yapısına sahip olan glikoprotein matrikse adsorplanır. Diğer glikoproteinler ise tamponla yıkanarak uzaklaştırılır.
- Yıkama işlemine, kolonda protein kalmayana kadar ilgili dalga boyunda spektroskopik olarak izlenerek devam edilir. Adsorbe olan glikoprotein komplementer yapıda bir şeker kullanılarak kolonda süzülür.
- Elde edilen proteinin saflığı jel elektroforezi gibi yöntemlerle kontrol edilir [51].

2.3.1.1. Lektinler

Lektin, Latince “legere” kelimesinden gelir ve “seçmek” anlamını taşır [55]. Lektinler, karbonhidratlara özgüllük gösteren protein ya da glikoprotein yapısındaki biyomoleküllerdir. Molekül özellikleri bakımından farklılık göstermeleri nedeniyle heterojen bir protein sınıfını oluştururlar. Molekül ağırlıkları 8500-400000 Da arasında değişmektedir [17]. Doğada virüslerden bakterilere ve bitkilerden hayvanlara kadar birçok kaynaktan bulunurlar [54]. Karbonhidratlarla non-kovalent olarak etkileşimde bulunan lektinler, glikokonjugatların mono- ve oligosakkaritlerine geridönüşümlü olarak bağlanırlar [52]. Lektin molekülleri iki veya daha fazla karbonhidrat bağlayıcı bölge içerebilmektedir. Bu moleküller eritrosit gibi hücrelerle reaksiyona girdiklerinde hücre yüzeyindeki şekerlere bağlanırlar. Aynı zamanda hücrelerin de çapraz bağlanarak çökmelerine neden olurlar. Aglütinasyon olarak adlandırılan bu olay, hücre yüzeyinde bulunan şekerlerin lektin molekülleri üzerinde yer alan şeker bağlayıcı bölgelerle etkileşiminin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Söz konusu etkileşimler, Van der Waals ve hidrofobik etkileşimler ile hidrojen bağlarını kapsar. Non-kovalent olan bu etkileşimler, enzim-inhibitör ya da antijen-antikor arasındaki ilişkiye benzer şekilde geri dönüşümlüdür [17].

1888 yılında Peter Hermann Stillmark tarafından yapılan çalışmada, *Ricinus communis* tohumlarından elde edilen ekstraktın eritrositeri aglütine ettiği keşfedilmiştir. Eritrositlerin üzerindeki monosakkaritleri spesifik olarak tanıyıp bağlanabilen ve yüksek bir toksik etkiye sahip olan bu protein ‘Ricin’ olarak adlandırılmıştır [53].

1919 yılında James Sumner tarafından izole edilen ve 1936 yılında mannoz ve glukozla özgül olduğu gösterilen Konkanavalin A (Con A), *Canavalia ensiformis* bitkisinden ekstrakte edilmiştir [56]. Con A'nın eritrositleri aglütine ettiği gösterilmiş ve gerçekleşen hemaglütinasyonun lektinlerle kırmızı kan hücrelerinin yüzeyinde bulunan karbonhidratların etkileşiminin bir sonucu olabileceği öngörülmüştür. Baklagil lektinlerin ilk örneği olan Con A, tetramerik bir metalloprotein olup, α -D-mannopiranozil, α -D-glukopiranozil ve yapısal olarak benzer kalıntıları taşıyan molekülleri bağlamaktadır [57]. Con A'ya bağlanacak olan şeker moleküllerinin, bu moleküle bağlanabilmesi için C3, C4 ve C5 pozisyonlarında -OH gruplarını bulundurması gerekmektedir [58].

Baklagil lektinleri, şeker bağlayan proteinlerin en geniş ve en çok çalışılan ailesidir. Tipik olarak bu protein ailesi iki veya dört alt birimden oluşur. Her bir alt birim, aynı şeker özgüllüğüne sahip, tek, küçük bir karbonhidrat bağlama bölgesine sahiptir. Ayrıca bu alt birim, karbonhidrat bağlanması için gerekli kalsiyum (Ca^{+2}) ve mangan (Mn^{+2}) iyonlarını içerir [57]. Baklagil lektinlerin birçoğu karbonhidrat bağlayıcı bölgelerine ek olarak hidrofobik bölgelere de sahiptirler. Bu hidrofobik bölgeler adenin ve indol-asetik asit gibi nonpolar bileşikler bağlarlar [56].

1960'lı yılları takiben, pek çok proteinin eritrositler dışındaki hücre tiplerini de aglütine edebildiği ve bu proteinlerin birçoğunun şekerlere özgüllük gösterdiği saptanmaya başlamıştır. Lektinler ilk olarak 'aglütininler' olarak tanımlanmalarına rağmen, bugün hücreleri aglütine edici özelliklerinden çok afinite özellikleri daha ön planda olduğundan 'şeker bağlama proteinleri' olarak tanımlanmaktadır [17]. Lektinlerle ilgili çalışmalar, hücre yüzey karbonhidratlarındaki değişikliklerin tümör oluşumu ile ilişkili olduklarının gösterilmesiyle birlikte ivme kazanmaya başlamıştır. Daha sonra lektinlerin, kompleks karbonhidratların, özellikle glikoproteinlerin yapısal ve fonksiyonel incelemelerinde oldukça önemli araçlar oldukları gösterilmiştir [56]. Böylece lektinlerin hücre yüzeyindeki glikoproteinlerin saflaştırılmasında ve karakterizasyonunda kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

Lektinler, glikobiyoloji alanındaki çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Lektinlerin karbonhidratları seçici olarak bağlama özelliklerinden yararlanılarak lektinlerle işaretleme ve izleme yöntemleri uygulanmaktadır. Lektinlerin bazıları seçicilik özelliği bakımından zayıf iken, bazıları ise bir tek şekeri hatta bu şekerin bağını bile seçebilecek kadar özgül davranabilmektedir. Bu özelliklerinden yararlanılarak lektinler, oligosakkaritlerde monosakkarit bileşiminin, sıra analizinin ve bağlanma özelliğinin belirlenmesi amacıyla elektron mikroskobu çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolloidal altın taneciklerinin lektinleri de içeren çeşitli geleneksel biyolojik problemlere bağlanabilme özellikleri görüntüleme kolaylığı sağlamaktadır. Bu özellikleri nedeniyle, altın partikülleri bağlanmış lektinler elektron mikroskobu çalışmalarında geniş bir uygulama alanı bulmuştur [59].

Lektinler, hücrelerin bilinmezlerle dolu bir kara kutu gibi duran glikozilasyon makinesinin nasıl çalıştığının anlaşılmasında ve glikozilasyon ile meydana gelen değişikliklerin biyolojik ve fizyopatolojik sonuçlarının incelenmesinde umut vadeden araçlar olarak görülmektedir [59].

Glikobiyoloji çalışmalarında lektinler, şekerleri özgül olarak bağlama özelliklerinden yararlanılarak miktar tayini ve fenotipin saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Monomerik birimler, glikoprotein miktarlarının, hücrelerin fenotiplerinin, özel bir hücrenin farklı işlevsel ve metabolik durumunun ve farklı hücre popülasyonlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesine olanak sağlarlar [59].

Lektinlerin tıp alanında tedavi amaçlı kullanılacaklarına ilişkin araştırmalar ilgi odağı olmuştur. Lektinlerin kanser tedavisinde kullanılmasına yönelik araştırmalarda öne sürülen fikir, antikanser etkisi olan ilaçların tümörlü dokularda yoğunluğunun ve etki zamanının artırılması yönündedir. Günümüzde hala kullanılmakta olan bu ilaçların normal hücreler üzerinde de çok fazla yan etkileri bulunmaktadır. Hücreler için toksik olan bu ilaçların tümörlü dokular için özgül bir karbonhidrat ünitesi ile bağlandıktan sonra vücuda verilmesi, toksik maddenin tümör hücrelerinde lokalize olmasını ve normal somatik hücrelerdeki etkinin minimuma indirilmesini sağlamaktadır [59].

Lektinler, hücresel tanıma olaylarının incelenmesinde [59], hücre yüzeylerinin şeker gruplarında meydana gelen değişikliklerin gösterilmesinde [60] kullanılmaktadırlar. Ayrıca, mikroorganizmalara karşı savunmada, azot fikse eden bakteri ve bitki kökleri arasında gerçekleşen simbiyotik ilişkide, virüslerin konakçı hücreyi tanımalarında [61], hücre büyümesi ve farklılaşmasında da lektinlerin rolü büyüktür [62]. Biyolojik tanımda oldukça önemli olan rol oynayan hücre yüzey karbohidratlarına karşı özgülük göstermeleri nedeniyle, lektinler son zamanlarda hücrelerin ayırt edilmesi, kan gruplarının belirlenmesi, kanser tanısı konulması, hücre yüzey karbohidratlarının yapısının ve dinamiğinin açıklanması, glikokonjugatların saflaştırılması ve yapısal karakterizasyonu gibi oldukça geniş uygulama alanı bulmuşlardır. Lektinlerin bu kadar çok sayıda ve farklı uygulama alanlarında kullanılabilmesinin nedenleri, doğada dağılımlarının ve miktarlarının çok fazla olması, kolaylıkla yüksek homojenlikte saflaştırılabilmeleri ve karbohidrat bağlama kapasitelerinin geniş olmasıdır [17].

Sonuç olarak, lektinler çeşitli biyolojik sistemlerde yaşamın sürekliliği için vazgeçilmez olan hücre-molekül ve hücre-hücre etkileşimlerinde tanıma molekülleri olarak anahtar rol oynarlar. Bu nedenle biyolojik olayların şekillenmesi açısından büyük önem taşıyan lektinlerin, biyoloji ve tıp alanlarında geniş bir yelpazede pek çok uygulamada yer almaları şaşırtıcı değildir [63].

2.3.1.2. Lektin-Glikoprotein Etkileşimleri

Glikoproteinler, polipeptid iskeletlerine kovalent bağlı glikan zincirlerini içeren ve karbonhidratlara bağlanabilen proteinlerdir [64]. Kompleks karbonhidratlar, glikoproteinler, proteoglikanlar ve glikolipidler olmak üzere üç sınıftan oluşur ve genellikle “Glikokonjugat” olarak adlandırılırlar. Biyolojik olarak aktif doğal moleküllerin pek çoğu glikokonjugatlardır. Bu moleküllerdeki şekerler, söz konusu molekülün sentezlenmesi, parçalanması, kararlılığı ve aktifleşmesi üzerinde oldukça önemli etkilere sahiptir [7].

Glikoproteinlerde yer alan monosakkaritlerin farklı sıralama ve bağ yapıları ile birleşmesi sonucunda birçok karbonhidrat zincir yapısı ortaya çıkar. Glikoproteinlerin karbonhidrat kısmında bulunan 7 çeşit monosakkarit; glikoz, galaktoz, mannoz, fukoz, N-asetil glikozamin, N-asetil galaktozamin, N-asetilnöraminik asittir. Bunlardan başka daha az sıklıkla arabinoz ve ksiloz şekerlere de rastlanır. Oligosakkarit zincirleri glikoproteinlerin peptid omurgasına asparajin, serin, treonin, hidroksilizin veya hidroksiprolin olmak üzere 5 farklı aminoasitten biri üzerinden bağlanırlar [7]. Glikoproteinlerdeki glikanlar peptitlere N-bağlı ve O-bağlı olmak üzere iki farklı şekilde konjuge olurlar. Asparajin üzerinden N-tipi, serin ve treonin üzerinden ise O-tipi glikozillenme meydana gelmektedir [64].

Bakteriden insana kadar birçok canlıda bulunan ve farklı işlevlere sahip olan glikoproteinler kullanılan özgül lektin ile etkileşime girerler. Lektinler, monosakkaritlere olan özgüllükleri temel alınarak, yüksek afinite gösterdikleri gruplara göre; mannoz, galaktoz/N-asetilgalaktozamin (GalNAc), N-asetilglukozamin (GlcNAc), fukoz, and N-asetilmuramikasit olmak üzere beş farklı şekilde sınıflandırılırlar [56]. Ancak, bazı lektinler sadece oligosakkaritleri bağlayabilirler. Bazı bitkisel kaynaklı lektinlerin karakteristik özellikleri Çizelge 2.3’de gösterilmiştir.

Hücre yüzey membranlarında farklı birçok karbonhidrat bulunması, söz konusu hücre ile özgül ve seçici olarak etkileşime giren bir lektin kullanılarak ayırma yapmaya olanak sağlamaktadır. Bu etkileşim sırasında hücre yapısında herhangi bir değişikliğe neden olmadan, lektinlerin ligand olarak kullanıldığı taşıyıcılar hücre saflaştırılması için son derece uygun malzemelerdir [17].

Çizelge 2.3. Bazı bitkisel kaynaklı lektinlerin karakteristik özellikleri [17].

Lektin Adı	Kaynak	Monosakkarit	Anomer ^a	Oligosakkarit
<u>Mannoz/Glukoz Spesifik</u>				
Konkanavalin A (Con A)	<i>Canavalia ensiformis</i>	Mannoz	α	Man α 1,6(Man α 1,3) Man
Bezelye (PSL)	<i>Pisum sativum</i>	Mannoz	α	Glc α 1,2Glc
Kardelen	<i>Galanthus nivalis</i>	Mannoz ^b	α	Man α 1,6(Man α 1,3) Man α -O-Methyl
<u>GlcNAc Spesifik</u>				
Buğday tohumu aglütinin (WGA)	<i>Triticum vulgare</i>	N-asetil glukozamin	-	(GlcNAc β 1,4)
Soya fasülyesi (SBA)	<i>Glycine max</i>	N-asetil galaktozamin	α	GalNAc α 1,3Gal β 1,6Glc
Yerfıstığı (PNA)	<i>Arachis hypogaea</i>	Galaktoz ^c	β	Gal β 1,3GalNAc
<i>Ricinus communis</i> Aglütinin (RCA)	<i>Ricinus communis</i> agglutinin	Galaktoz ^c	β	Gal β 1,4Glc
<u>L-fukoz Spesifik</u>				
<i>Ulex europaeus</i> lektin	<i>Ulex europaeus</i>	Fukoz	α	L-Fuca α 1,2Gal β 1,4 GlcNAc β 1,6R
<u>Sialik asit Spesifik</u>				
<i>Sambucus nigra</i> (SNA)	<i>Sambucus nigra</i>	Galaktoz ^d	-	Neu5Ac α 2,6Gal
<u>Oligosakkarit Spesifik</u>				
L-PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	-	Gal β 1,4GlcNAc β 1,6 Gal β 1,4GlcNAc β 1,2
Patates	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-	(GlcNAc β 1,4) ₂₋₅

^a α ya da β glikozid ile reaksiyona girme yeteneği. ^b Bu kategorideki diğer lektinlerden farklı olarak GNA lektin Glc ya da GlcNAc 'e bağlanmaz. ^c GalNAc'e bağlanmaz. ^d Serbest Neu5Ac'e bağlanmaz, zayıf olarak galaktoza bağlanır.

Ligand-biyomolekül etkileşiminin benzersiz özgülüğünün glikoproteinler gibi özgül protein sınıflarını ayırmak amacıyla kullanılması afinite kromatografisinin en önemli uygulamalarından biri olarak kabul edilmektedir. Belirli glikoprotein sınıflarını hedef alan ligand özgülüğü, glikozilasyonda meydana gelen değişimin belirlenmesine olanak sağlar. Hem S-LAC (Serial Lectin Affinity Chromatography-Seri Lektin Afinite Kromatografisi) hem de M-LAC (Multi Lectin Affinity Chromatography-

Çoklu Lektin Afinite Kromatografisi) glikozilasyonda meydana gelen değişimin araştırılmasında kullanılan araçlar olarak karşımıza çıkmaktadır [54].

S-LAC yönteminde, heterojen glikoprotein karışımları fraksiyonlanırken, söz konusu karışım lektin immobilize bir kolondan geçirildikten sonra, bu kolondan çıkan karışım ikinci bir lektin immobilize kolona uygulanır. Farklı lektinler ile bu işlemin tekrarlanması, karışımdaki glikoproteinler için saflığa ulaşılmasını ve homojen bir glikoproteinin karbonhidrat kısmındaki mikroheterojenitenin belirlenmesini sağlar [17]. Örneğin; S-LAC yöntemi kullanılarak PCa sürecinde N-bağlı şeker zincirlerinde meydana gelen değişiklikler tanımlanmıştır [8].

Yang ve ark. [65] insan serumundan glikoproteinleri elde etmek amacıyla M-LAC yöntemini geliştirerek, bu yöntemin oldukça verimli ve tekrar kullanılabilir olduğunu göstermişlerdir. Söz konusu çalışmada, meme kanseri hastalarının serumlarından yüksek derişimde bulunan proteinler bu yöntem ile başarılı bir şekilde uzaklaştırılmış ve ng/mL gibi düşük derişimlerde bulunan proteinler tanımlanmıştır. M-LAC'da, farklı glikan özgülükleri göstermeleri nedeniyle birden çok immobilize lektin birarada kullanılır. 'Glikozit kümeleşme etkisi' temeline dayanan bu yaklaşım, hem lektin bağlanma bölgelerinin hem de doku ve hücre yüzeyindeki karbonhidrat tanıma ünitelerinin kümeleşmesi sonucunda bağlanma afinitesinin önemli derecede artması şeklinde açıklanabilir [8].

Post-translasyonel modifikasyonlar arasında en yaygın olanı glikozilasyondur ve ökaryotlarda bulunan proteinlerde % 50'nin üzerinde bulunduğu saptanmıştır [54, 66]. Bu nedenle glikozilasyonla oluşan post-translasyonel modifikasyonların çalışılması için proteomik yöntemlerin geliştirilmesi artan bir öneme sahiptir. Glikozilasyon ile proteinlere eklenen glikanlar, proteinlerin tanımlanması, hedeflenmesi, katlanması, hücre büyüme ve farklılaşması, hücre adezyonu, immünolojik cevabın değişimi gibi çok sayıda hücresel ve biyolojik fonksiyon üzerinde etkili olmaktadır [54]. Glikozilasyon mekanizmasındaki değişiklikler, çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında ve gelişiminde rol oynamaktadır. Bu bağlamda, glikozillenme ile meydana gelen translasyon sonrası modifikasyonların çalışılması için proteomik yöntemlerinin geliştirilmesi gittikçe daha da önem kazanmaktadır [67]. Kompleks karbonhidrat zincirlerine ait yapısal anormalliklerin araştırılması insan hastalıklarının etiyolojisini ve patogenezinin anlaşılabilmesi için yeni ve önemli bir bakış açısı kazandırmıştır.

N-tipi ve O-tipi glikozillenmenin tüm proteinlerin % 50'sinden daha fazlasında görülmesi, glikozilasyon üzerinde yapılan çalışmaların artan bir öneme sahip olduğuna işaret etmektedir [68]. Çok sayıda glikan yapısının bulunması ve glikozillenmedeki hataların farklı bölgelerde olabilmesi glikoproteomiği daha da karmaşık hale getirmektedir [69]. Yapılan araştırmalarda, Alzheimer hastalığı [70], bazı kalp hastalığı tipleri [71], solunum sistemi rahatsızlıkları [72], diyabet [73], stres [74], kistik fibrozis [75], bazı renal bozukluklar [76], artritis [77], kanser [72] ile ilgili hastalıkların glikozillenmedeki hatalar ile ilişkili olduğu saptanmıştır [78].

2.4. Kanser Tanısında Glikoproteinlerin Önemi

Serumda bulunan glikoproteinlerin şeker zincirlerinin, kan dolaşımında çeşitli fonksiyonları etkileyen sinyallerden sorumlu olduklarının keşfedilmesi bilim dünyasında büyük yankı uyandırmıştır. Artık şekerler, anlaşılması güç ancak ince bir seçicilik ile bilgi taşıyan moleküller olarak benimsenmiş ve son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı olmuşlardır. 1969 yılında Robbins ve ark. tarafından yapılan çalışmada, glikozilasyonun kanserle ilişkilendirilebileceği ilk kez gözlenmiştir. Radyoaktif bir belirleyici ile işaretlenen monosakkaritlerin varlığında kültürü yapılan kanser hücrelerinde, normal hücreler ile kıyaslandığında çok daha büyük moleküllü şeker zincirlerinin bulunduğu gösterilmiştir. 1960'lı yılların son çeyreğinde, normal hücre yüzeylerinden farklı olarak, kanser hücrelerinin yüzeyinde glikokonjugat şeker zincirlerinin bulunduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmaya başlamıştır [60].

Günümüzde kanser hastalarının sayısı hızla artmaktadır. Yapılan araştırmalarda ABD'de kanser sonucu ölümler tüm ölümlerin % 25'ini oluşturmaktadır. Yapılan tahmini hesaplamalar, her yıl doğan dört erkekte ve beş kadından birisinin kanser ve bu hastalığa bağlı gelişen komplikasyonlardan öleceğini göstermektedir [79]. Kanser tedavisinin başarılı olmasında temel ilke erken tanıdır. Kanser tanısında glikoproteinlerin öneminin farkına varılmasından bu yana, hastalık tanı ve tedavisi için kullanılan glikoprotein yapısındaki biyoişaretlerin keşfi önemli bir araştırma konusu olmuştur [54]. Pek çok malignitede, hücre yüzeyinde, tümör dokusunda ve serumda glikoprotein fraksiyonlarında meydana gelen değişiklikler bildirilmiştir [79-81]. Glikoprotein fonksiyonlarında belirleyici ve yardımcı rol oynayan oligosakkarit yan zincirlerinde yer alan çeşitli monosakkaritler araştırılmış, özellikle zincir

sonlarında yer alan fukozun ve sialik asitin pek çok malignitede serumda artmış olduğu tespit edilmiştir.

Günümüzde bazı istisnaları dışında en yaygın kullanılan ve üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülen yöntemler immünolojik ve biyokimyasal yöntemlerdir. Malign hücrelerin kaybettikleri matür hücre özelliklerinin ve kazandıkları yeni özelliklerin pek çoğunun hücre membranındaki çeşitli değişikliklere bağlı olduğu gerçeği, tümör belirteci çalışmalarını plazma membran komponentlerine, dolayısıyla glikoprotein ve glikolipidlere yöneltmiştir [7]. FDA tarafından onaylanan bazı glikoprotein kanser biyoişaretleri Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Söz konusu kanser biyoişaretlerinin tümünün glikoprotein yapıda olduğu dikkat çekmektedir. Günümüzün en yaygın hastalıklarından biri olan kanserin tanı ve tedavisindeki öneminden dolayı, glikoprotein yapıdaki kanser biyoişaretlerinin keşfi üzerinde daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çizelge 2.4. FDA tarafından onaylanan bazı glikoprotein kanser biyoişaretleri [82].

Biyoişaret	Glikozilasyon	Kaynak	Hastalık
CA15.3	+	Serum	Meme
CA27-29	+	Serum	Meme kanseri
HER2/NEU	+	Serum	Meme kanseri
Fibrin/FDP	+	İdrar	Mesane kanseri
CEA	+	Serum	Kolon, göğüs, akciğer, pankreas
EGFR	+	Doku	Kolon kanseri
CA19-9	+	Serum	Gastrointestinal
KIT	+	Doku	Gastrointestinal tümör
AFP	+	Serum	Karaciğer ve testis kanseri
hCG-β	+	Serum	Testis kanseri
Tiroglobulin	+	Serum	Troid kanseri
CA125	+	Serum	Ovaryum
PSA	+	Serum	Prostat kanseri

CA: Kanser antijeni, HER2/NEU: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2, FDP: Fibrin/Fibrinojen yıkım ürünleri, CEA: Karsino embriyonik antijen, EGFR: Epidermal büyüme faktör reseptörü, KIT: Gastrointestinal stromal tümör, AFP: α-fetoprotein, hCG-β: İnsan koryonik gonadotropin, PSA: Prostat spesifik antijen.

2.5. PCa

PCa, prostat bezinde çoğunlukla adenokarsinoma olarak ortaya çıkan, heterojen ve genellikle çok odaklı seyreden hastalıktır. Avrupa'da ve Amerika'da erkeklerde en yaygın görülen kanser tipi olup, tüm dünyada erkeklerde kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Amerika'da her yıl ortalama 200.000 erkeğe PCa teşhisi konulmakta ve yılda PCa sebebiyle 30.000 ölüm gerçekleşmektedir [83]. Avrupa'da ise 2012 yılında, erkeklerde 410.000'den fazla yeni PCa tanısı konulmuş ve 92.000'den fazla ölüm meydana gelmiştir. İnsidansın sürekli artmasına rağmen, PSA'nın klinik uygulamaya girmesiyle birlikte ölüm oranları hemen hemen aynı kalmıştır [84].

Gelişmiş ülkelerde en önemli risk faktörleri ırk, yaş, aile öyküsü, diyet ve kansere maruz kalma iken, az gelişmiş ülkelerde tanının doğru konulmaması ölümlerin esas nedenidir [84]. PCa'yı diğer üro-onkolojik hastalıklardan farklı kılan en önemli özellik, 1980'li yılların ikinci yarısında PSA'nın bir tümör belirteci olarak tanımlanıp kullanıma girmesi ile birlikte bu hastalığın biyokimyasal olarak taranabilir ve tanısı çok erken evrelerde konulabilir bir hastalık durumuna gelmiş olmasıdır [85]. Günümüzde tarama testi olarak kabul gören ve erken tümör tespiti için kullanılan tanı yöntemleri, serumda PSA düzeyinin belirlenmesi ve dijital rektal incelemedir [84].

2.5.1. PSA

PSA, 28.4 kDa ağırlığında, 237 aminoasitten oluşan, % 8 oranında karbohidrat (N-bağlı oligosakkarit yan zincir) içeren tek zincirli bir glikopeptid olup, kallikrein (3) gen ailesinden olan bir serin proteazdır [86].

PSA, ilk kez prostatta 1970 yılında [87], seminal plazmada ise 1971 yılında [88] tanımlanmıştır. Prostat dokusunda PSA saflaştırılması ise 1979'da gerçekleştirilmiştir [89]. Serumda PSA ölçümü 1980'de yapılmış [90] ve 1986'da ise PCa izleminde kullanılması için FDA onayını almıştır.

PSA ilk kez 1980'lerin sonunda PCa tanısında kullanılmaya başlamıştır [91, 92]. 1990'lı yılların başında PCa tanısı için 4 ng/mL sınır değer olarak kabul görmeye başlamıştır [93]. Catalona ve ark. [94] tarafından yapılan çalışmada, PSA değeri 4 ng/ml alındığı zaman biyopsi sonucu kanser tespit edilen hastalarda yaş grupları arasında fark saptanmamış, yaşlı hastalarda Benign Prostat Hiperplazi (BPH) ve

yaşa bağı bir etki görülmemiştir. Bu nedenle bütün yaş gruplarında biyopsi endikasyonu ve kanser saptanması açısından 4 ng/mL eşik değer olarak kabul edilmiştir. Daha sonraki yıllarda da PSA modifikasyonları olarak tanımlanan, yaşa özgü PSA değerleri (yaşa bağı prostat büyümesi ve okült prostatik hastalığın ayrımı için), PSA velositesi (zamana bağı PSA değışiklikleri), PSA dansitesi (prostat büyüklüğüne bağı seviyelerin standardizasyonu), PSA formları (PSA'nın serbest ve proteine bağı formları) gibi birçok kavram ortaya atılmıştır. Bu parametreler de PCa'nın tanısında ve biyopsi endikasyonunun konulmasında yardımcı parametreler olarak yıllardır kullanılmaktadır [95-97].

Biopside kanser teşhis edildikten sonra, biopsi örneklerindeki kanser hücrelerinin görünümü, içindeki çekirdeklerin büyüklüğü ve şekline bakarak üreme, yayılım hızı hakkında bilgi sahibi olunmasını sağılayan ve Gleason skoru olarak belirlenen bir derecelendirmeye tabii tutulur. Bu skor iki rakamın toplamı ile ifade edilir ve bu değer 10'a ne kadar yakın ise kanser o kadar saldırgan demektir; genellikle 7 ve üzeri çok daha tehlikelidir [98]. Örneğin; 3+3=6, 4+3=7, 4+5=9 gibi ifadelerle karşılaşılr; ilk yazılan rakam da ayrı bir önem taşır, nitekim 3+4=7 çıkmış bir kanserden 4+3=7 çıkan bir kanser tipi daha saldırgan ve tehlikelidir.

PSA, kan dolaşımında serbest PSA (fPSA) ve total PSA (tPSA) olmak üzere iki farklı şekilde bulunur. fPSA, kan dolaşımında proteinlere bağı olmadan serbest olarak dolaşır, tPSA ise proteinaz inhibitörleri ile kompleks oluşturur. Yakın tarihe kadar tPSA için üst sınır olarak 4.0 ng/mL benimsenmiş olmasına rağmen, Amerikan Kanser Cemiyeti tPSA üst sınırının 2.5 ng/mL olarak kabul edildiğini rapor etmiştir. Yapılan araştırmalarda tPSA seviyesi 2.5 ile 4.0 ng/mL olan vakaların %25'inde PCa bulunduğu saptanmıştır [99]. tPSA değeri 2.5 ng/mL'nin üzerinde olduğu durumlarda, fPSA ölçülerek elde edilen fPSA/tPSA oranı PCa tanısı konulmasına yardımcı olmaktadır. Bu oran, PCa ve BPH ayrımında kullanılmakta ve fPSA/tPSA oranı 0.20'den düşük olanlarda PCa ihtimali artmaktadır [98].

Prostat biyopsilerini değerlendirmede rutinde yardımcı olarak kullanılan biyoışaret PSA'dır. PCa'nın hem tanı hem de prognozunu tahmin etmede kullanılan PSA'nın, prostatik asit fosfataz (PAP) ile karşılaştırıldığında daha hassas ve spesifik olduğu gösterilmiştir [85]. PSA, PCa'nın erken tanısında, evrelemede ve tedavi sonrası izleminde yaygın olarak kullanılan en önemli tümör belirleyicisi

olarak karşımıza çıkmaktadır. PSA testi ve PSA modifikasyonları, PCa taramalarında “altın standard” olarak kabul edilmektedir. Ancak, bu testler düşük duyarlılık ve özgüllük göstermeleri nedeniyle, ölümcül formları iyi huylu (örneğin; prostatit ya da BPH) ya da latent asemptomatik kanserden ayırmada yetersiz kalmaktadır. PSA her ne kadar prostat organına özgü olsa da, PCa’ya özgü değildir. Malign transformasyon sırasında meydana gelen PSA glikozilasyonu ya da PSA şeker zincir yapısı değişimleri ile ilişkili çeşitli çalışmalar yapılmıştır [93].

Serum PSA düzeyi PCa dışında diğer prostatik hastalıklarda da yükselebilmektedir [84]. Bu nedenle PSA ile ilişkili söz konusu kısıtlamalar nedeniyle, PCa taraması için hücresel ve genetik biyoişaretleri içeren PCA3 (prostat kanseri protein-3) [100], AMACR (α -metil açil KoA rasemaz) [101], spesifik metaloproteinazlar [102] ve glikan profilleri [103] gibi yeni biyomoleküller önerilmektedir.

2.5.2. PCa Biyoişaretleri

PCa’nın tanı ve takibinde sınırlı role sahip olan PAP’ın tarama testi olarak PCa için duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça düşüktür. Daha önceki yıllarda, PCa’da klinik biyoişaret olarak PAP kullanılırken [104-107], günümüzde yerini PSA’ya bırakmıştır [107-109]. Literatürde diğer biyoişaretler rutin klinik uygulamalar için önerilmek üzere yeterli derecede desteklenememiştir [108]. BPH ve prostat infeksiyonlarında da serum PSA düzeylerinin yüksebilmesi nedeniyle, PCa ile ilgili yeni biomarkerların bulunması ve geçerliliklerinin kanıtlanması gerekmektedir.

Literatürde, PCa’da tarama ve biyoişaretler konusunda tartışmalar ve araştırmalar büyük bir hızla devam etmektedir. PSA’nın 1979’daki ilk yayınlarını ve hızla klinik uygulamaya girmesini takip eden yıllarda, biyoişaretler ile ilgili yayınların sayısı da artmaktadır. Bu durum da, konunun ilgi çekiciliğini açıkça kanıtlamaktadır.

PCa için serum biyoişaretlerinin tanımlanması pek çok araştırmanın konusu olmuştur. Yapılan bir çalışmada, kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (CK18-Asp396) invivo koşullarda tümör apoptozisinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır [110]. Başka bir çalışmada, prostat spesifik protein-94 ileri derecede PCa’lı hastaların tanımlanması amacıyla kullanılmıştır [111]. Buna ek olarak, serum hepatosit büyüme faktör aktivatörü ileri derecede PCa’lı hastaların belirlenmesini bir üst seviyeye çıkarmıştır, ancak klinik değeri açısından doğrulanması için ek çalışmalar gerekmektedir [112]. İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Bağlayıcı Protein-1 ve 3

prostat kanserinde hücre büyümesinin regülasyonunda önemli bir role sahiptir. İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Bağlayıcı Protein-3/PSA oranı ileri derecede PCa'lı hastalarda kullanılabilir bir prognostik işaret olarak önerilmektedir [113]. Diğer bir çalışmada ise, 80 kDa'luk e-kaderin fragmentinin PCa'nın ilerlemesini tespit etmek üzere kullanılabileceği gösterilmiştir [114]. Yapılan uygulamalarda α -metil açıl KoA rasemaza karşı oluşan immün cevap PCa'lı hastaların tanımlanmasında PSA için tamamlayıcı olarak önerilmektedir [115]. Çizelge 2.5'de Dünya Sağlık Örgütü onaylı ve potansiyel PCa biyoişaretleri verilmiştir.

Çizelge 2.5. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) onaylı ve potansiyel PCa biyoişaretleri.

Hastalık	WHO Onaylı Biyoişaretler	Potansiyel Biyoişaretler
PCa	PSA	Prostatik asit fosfataz, kaspazla kırılmış sitokeratin 18 (CK18-Asp396), prostat spesifik protein-94, hepatosit büyüme faktör aktivatörü, İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Bağlayıcı Protein-1 ve 3, e-kaderin, α -metil açıl KoA rasemaz

2.5.3. PCa ile ilgili Proteomik Çalışmaları

PCa'nın yüksek sıklıkta görülmesi, bu kanser türünün erken dönemde tespiti için yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesine neden olmuştur. PCa erken evrelerinde çok az belirti gösterdiğinden, genellikle ileri aşamalarında teşhis edilir. PSA'nın PCa ve BPH'yi ayırmada yetersiz olması nedeniyle biyoişaretlerin keşfine yönelik çalışmalara artan bir ilgi söz konusudur. Araştırmacılar yeni biyoişaretlerin keşfinde proteomik çalışmalarından yararlanmaktadır. Geleneksel 2-D jel elektroforezi tekniği, PCa'lı hastalardan alınan plazma, idrar, prostatik sıvı, nükleer matriks, hücre lizatları gibi örnekler üzerine uygulanmıştır. Prostatik sıvının izoelektrik noktası (pI) 4, molekül ağırlığı ise 22 kDa olarak tespit edilen ve 'protein D' olarak adlandırılan bir bileşen içerdiği saptanmıştır. Buna ek olarak, bu bileşenin PCa'lı hastalarda yaygın şekilde bulunduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise, idrarın klinikte potansiyel olarak kullanılabilecek birçok biyoişaret içerdiği rapor edilmiştir. Bu biyoişaretlerden bazılarının PCa'lı hastalarda baskılandığı, bazılarının ise fazla ifade olduğu gösterilmiştir [116]. PCa'nın erken tanısına yönelik pek çok proteomik çalışmaları bulunmaktadır. Örneğin; yapılan bir çalışmada BPH'li ve PCa'lı dokularından elde edilen nükleer matriks proteinlerinde

miktar açısından farklılık gösteren 14 farklı proteinin yer aldığı gösterilmiştir. Ancak, bu çalışmada MS tekniklerinin kullanılmaması bu proteinlerin tanımlanmasını engellemiştir [117]. Alaiya ve ark. [118] tarafından yapılan çalışmada, PCa'lı dokulardan alınan örneklerde proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA), kalretikulin, ısı şok proteini (HSP) 90, HSP 60, onkoprotein 18(v), uzama faktörü 2, glutatyon-S-transferaz pi (GST-pi), superoksit dismutaz ve trioz fosfat izomeraz protein seviyelerinde belirgin bir artış olduğu gösterilmiştir. 2-D temelli analizler kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmada ayrıca, tropomiyozin 1 ve 2 ve sitokeratin 18'in BPH'ya göre PCa'da daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır [118].

Son zamanlarda, jel temelli olmayan yaklaşımlar yeni biyoışaretlerin araştırılmasında büyük ilgi görmektedirler. Bu yaklaşımlardan biri olan SELDI-TOF-MS (Yüzey etkisi arttırılmış lazer desorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometresi) teknolojisi, biyoçip üzerinde kimyasal olarak modifiye edilmiş yüzeye, seçici olarak adsorbe edilen ilgili proteinlerin afinite temeline dayanarak kütle spektrometrik yöntemle analiz edilmesidir. Bu teknoloji, yüksek işlem hacmi ile duyarlı ve verimli bir şekilde çalışılmasına olanak sağlar. Kapsamlı analiz imkanı sunan bu teknoloji, kompleks biyolojik örneklerin protein profillerine ulaşılmasını mümkün kılar. Xiao ve ark. [119] yaptıkları çalışmada, PCa'nın tanımlanmasını sağlayan veri toplamışlardır. Söz konusu çalışmada, iyi ve kötü huylu prostat hastalıklarının ayırt edilmesi amacıyla prostat-spesifik membran antijeni (PSMA) ProteinChip immunoassay ile tayin edilmiştir [119].

Basu ve ark. [85] yaptıkları çalışmada, PCa ve BPH arasındaki farkı gözlemek amacıyla karbonhidrat ve Con A etkileşimini incelemişlerdir. PCa'lı hastada PSA-Con A etkileşiminin daha zayıf olduğunu gözlemişlerdir.

PCa'lı hasta serumundan elde edilen serum örneklerinin, SDS-PAGE, 2-D jel elektroforezi ve MS gibi ileri analizler öncesinde, lektinler aracılığı ile glikozillenme özelliklerinin belirlenmesi şüphesiz ki proteom analizlerine katkı sağlayacaktır. Böylece, PCa'nın seyri sırasında serum proteinlerinin glikozillenme profilleri aydınlatılabilecek ve hastalığın seyri ile ilişkilendirilebilecektir.

2.6. Polimerler

'Poli' Latince bir sözcük olup çok sayıda anlamına gelir. 'Monomer' adı verilen birimlerin bir araya gelmesiyle oluşan polimerlerin varlığı ilk kez 1920'li yıllarda Herrman Staudinger tarafından gösterilmiştir. Geçen yıllar içinde de polimerler kendine geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Biyoteknoloji, biyomühendislik, tıp, eczacılık, tarım, veterinerlik, çevre, gıda endüstrisi gibi alanlarda polimerik yapılar yaygın olarak kullanılmaktadır. Sağlık alanında, denetimli salınım ve enzim immobilizasyon sistemlerinde polimerik malzemelerden yararlanılmaktadır. Ayrıca söz konusu malzemeler, kemik hastalıklarının tedavisinde kullanılan malzeme, yapay organ, kontakt lens, yapay kornea ve yapay kıkırdak yapımında da biyomalzeme olarak kullanılmaktadır [17].

Polimerler, çok sayıda aynı ya da farklı atomik grupların kimyasal bağlar ile az ya da çok düzenli bir şekilde bağlanması ile meydana gelen uzun zincirli, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Tek bir polimer zincirinde çok sayıda monomer bulunur. Polimer zincirini meydana getiren monomerlerin özellikleri ve zincirlerin birbirleri ile olan etkileşimleri polimerin özelliği üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir. Polimer zincirleri doğrusal ya da dallanmış olabilir. Ana zincirden ayrılan yan dalların başka ana zincirlere bağlanması sonucunda 'çapraz bağlı polimerler' oluşur [17].

Polimer destek malzemeleri inorganik ya da organik olabilir. İnorganik destek malzemelerinin (silika ve gözenekli cam) dezavantajı, seçici bağlanma için fonksiyonel grup içermemeleridir. Bu nedenle, çok çeşitli fonksiyonel gruplar içeren, seçici özelliğe sahip küreler üretilmektedir [120].

Bir tek monomerden oluşan polimerlere homopolimer, birden fazla monomerden oluşan polimerlere ise kopolimer adı verilir. Monomer birimlerinden başlayarak polimer moleküllerinin elde edilmesine kadar olan reaksiyonlara polimerizasyon reaksiyonları denir. Polimerizasyon reaksiyonları laboratuvar ölçüsünde ya da endüstriyel amaçlı olarak büyük ölçeklerde çeşitli koşullarda gerçekleştirilebilmektedir [120]. Polimerler kullanım amacına göre, farklı şekil ve boy dağılımlarına sahip olarak üretilebilmektedirler. Bunlara örnek olarak mikroküreler, membranlar, nano yapılar, monolitler ve kriyojeller verilebilir [17].

2.6.1. Mikroküreler ve Kullanım Alanları

Birkaç mikrondan milimetre boyutlarına kadar değişik çap ve boy dağılımlarında, gözenekli ya da gözeneksiz, farklı yüzey ve yığın yapılarında hazırlanabilen malzemelerdir. Ayırma işlemlerinde, biyolojik etkinliğe sahip maddelerin immobilizasyonunda, biyoafinite kromatografisinde taşıyıcı olarak, kolon kromatografisinde ise kolon dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır [121, 122]. Afinite kromatografisinde yüksek adsorpsiyon kapasitesi elde etmek için afinite sorbentlerinin yüzey alanının büyük olması avantaj sağlar. Bu bağlamda, yüzey alanını artırmak için yüksek gözenekliliğe sahip malzemeler ya da mikron boyutundaki küreler kullanılmaktadır [123].

2.6.2. Manyetik Partiküller ve Polimerler

Manyetik partiküller, nano boyuttan mikron boyutuna kadar sentezlenebilmektedir. Endüstri alanında uzun yıllardır kullanılan bu partiküller biyotıpta da yaygın olarak kullanılmaktadır [17]. Manyetik partiküller, hücreler, nükleik asit ve proteinler gibi biyomoleküller için taşıyıcı olarak görev yaparlar. Manyetik taşıyıcıların özgül uygulamalarda kullanılmak üzere farklı yüzey fonksiyonel gruplarına sahip polimerler ile sentezlenmesi oldukça yaygındır. Bu amaçla literatürde farklı uygulamalar için poli(hidroksietil metakrilat) [124], poli(vinil alkol) [125], poliakrilamid [126], poli(vinil bütiral) [127], poli(metil metakrilat) [128], poli(stiren-divinilbenzen) [129] gibi taşıyıcı materyaller hazırlanmıştır.

Manyetik polimerler, manyetik çekirdek (inorganik nanopatiküller) ve polimer kabuğu (organik polimer matriksi) kısımlarından oluşur [121]. Çekirdek kabuk morfolojisi kürelerin modifikasyonuna olanak sağlamakla kalmaz, aynı zamanda spesifik olmayan bağlanmaları ve yığın oluşumunu da engeller. Polimerin kabuk kısmı ortama demirin sızmasını önleyerek toksisiteyi elimine eder. Ayrıca, biyolojik olarak bileşiklerin bağlanması için gerekli kimyasal modifikasyonlara imkan sağlar. Yüzey özellikleri ve boyutları ise in-vivo çalışmalarda oldukça önemlidir. Manyetik yakalama özelliğinin eşit olabilmesi için küre boyutlarının aynı olması gerekmektedir [122].

Manyetik ayırma teknikleri, manyetizmanın kullanıldığı eşsiz bir yöntemdir. Manyetik partiküllerin hücre izolasyonu [130], enzim saflaştırma [131] ve enzim immobilizasyonu [132, 133] çeşitli kromatografi yöntemleri [134], immunolojik tanı

ve test kitleri [135], ilaç hedefleme ve kontrollü salınım sistemleri [136], moleküler biyoloji [124] ve protein saflaştırma [137, 138] çalışmaları gibi uygulama alanları bulunmaktadır. Söz konusu partiküllerin uygulanan manyetik alana cevap vererek istenilen şekilde hareket ettirilebilmeleri birçok uygulamada avantaj sağlamaktadır. Manyetik taşıyıcılar, akışkan yatakların (düşük basınç düşmesi, yüksek besleme akımı) ve dolgu kolonların (karıştırmaya gerek olmaması, yüksek kütle transfer hızı, sıvı-katı temas imkanı sağlaması) önemli karakteristik özelliklerini birleştirmektedir.

Yıkama basamağında örnekte seyrelme ve taşıyıcı kaybı olmaması, kolay yönlendirme, otomasyon ve minyatürizasyon için uygun ve ölçeklendirilebilir olması manyetik ayırmanın avantajları arasında yer alır. Manyetik ayırma sistemlerinin zararlı kimyasal ve fiziksel etmenlere (santrifüjleme, kromatografi membranı gibi) maruz kalmadan minimum mekanik stres koşulları altında çalışmaya imkan sağlaması söz konusu sistemi özellikle kullanışlı hale getirmektedir. Manyetik taşıyıcıların biyolojik ortamdan filtrasyon veya santrifüjleme gereksiz basit, etkin ve hızlı bir şekilde ayrılmasını sağlayan ekonomik bir yöntemdir [15].

2.6.3. Demir Oksit Nanopartiküller

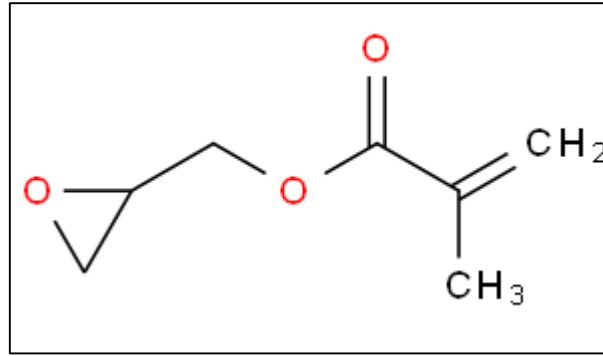
Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişmeler, nanopartiküllerin sentezine, karakterizasyonuna ve fonksiyonel hale getirilmesine imkan sağlar. Nano boyutlu demir oksit partikülleri yaklaşık 40 yıldır in vitro tanı amaçlı çalışmalarda kullanılmaktadır. Demir oksit nanopartiküller en çok tercih edilen manyetik partiküller arasındadır. Başta maghemit ve manyetit olmak üzere birçok demir oksit partikülü günümüzde farklı çalışmalarda kullanılmaktadır. Nano boyuttaki manyetik partiküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin anlaşılması ile ilgili yapılan çalışmalarda nano boyutta bu partiküllerin manyetik özelliğinin değiştiği ve süperparamagnetik karakter kazandığı saptanmıştır. Bu durum her bir manyetik partikülün kendi başına manyetik birim oluşturmasından kaynaklanmaktadır [17].

2.6.4. Glisidil Metakrilat (GMA)

GMA, pek çok endüstri alanında geniş bir kullanım alanına sahip olması nedeniyle ticari olarak ilgi gören bir monomerdur. Bu monomer homojen ve heterojen polimer ağ yapılarının hazırlanmasında kullanılır. Polimer kimyası ve teknolojide önemli rol

oyunan GMA bazlı polimer destek materyallerin en büyük avantajı kolaylıkla dönüştürülebilir oksiran gruplarına sahip olmasıdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu polimerlerin ilaç ve biyomolekül bağlama gibi özel uygulamalardaki üstün performansından dolayı oldukça fazla ilgi çektiğini göstermektedir [139].

GMA polimerleri, yüzeyinde bulunan epoksi grupları ile hazırlanan desteklere yeni fonksiyonellikler kazandırması nedeniyle ilgi çekici olmaktadır. Epoksi gruplarının reaktif karakteri ve çok sayıda reaksiyona girme yeteneği, poli(GMA) küreleri üzerine ligand bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Böylece birçok biyolojik uygulamada kolaylıkla modifiye edilerek kullanılabilir. Söz konusu küreler süspansiyon ve dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenebilmektedir. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar hazırlanan mikrokürelere manyetik özellikler kazandırılması ile protein saflaştırılması gibi önemli uygulamaların gerçekleştirilebileceğini göstermektedir [131]. Şekil 2.4'de glisidil metakrilatın yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Glisidil metakrilatın yapısı.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

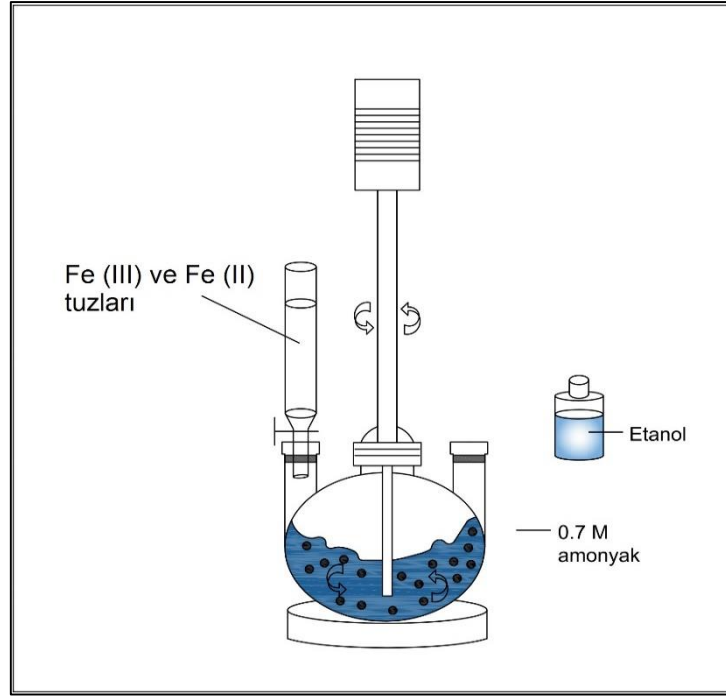
Ferrik klorür- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Con A, N,N'-metilen-bis(akrilamid) (MBAA), akrilamid, amonyum persülfat (APS), poli(vinil piroolidon) (PVP K-30), glutaraldehit çözeltisi (%25'lik sulu çözelti) Sigma (St Louis, ABD) firmasından sağlanmıştır. Ferröz klorür- $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve GMA Aldrich (ABD), 2,2'-azobisisobütironitril (AIBN), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) Fluka AG (İsviçre) firmalarından temin edilmiştir. Kullanılan diğer kimyasal maddeler ise analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. 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 saf suyun (deiyonize su) iletkenliği 18 M Ω /cm'dir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Kan Örnekleri

Bu çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvuran, yaşları 50-70 arasında değişen erkek bireylerin kan örnekleri dahil edildi. Hasta ve kontrol grubu olmak üzere toplam 20 kişinin kan örneği toplandı ve söz konusu örnekler 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra serumları ayrılarak -20°C'de saklandı. Toplanan kan örneklerinin fPSA ve tPSA değerleri CLIA (Kemilüminesans immünassay) ile ölçüldü (UniCel DxI 600 Access Immunoassay System, Beckman Coulter, USA).

3.3. Demir Oksit Partiküllerin Sentezi

Süperparamagnetik demir oksit (Fe_3O_4) nanopartiküllerinin sentezi ikili çöktürme yöntemi ile gerçekleştirildi [136, 140]. Amonyak çözeltisi (0.7 M, 500 mL) içerisine Fe^{+3} tuzu (40 mL distile su, 4.093 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ve Fe^{+2} tuzu (10 mL distile su, 2.595 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 M HCl) sulu çözeltileri eklendi. Mekanik karıştırma sistemi ile 2 saat süre boyunca karıştırıldı (25°C'de 400 rpm) ve oluşan Fe_3O_4 mıknatıs yardımıyla çözeltilerden izole edildi. Manyetit, su ile yıkandıktan sonra etanol içerisine alındı. Demir oksit sentezinin şematik gösterimi Şekil 3.1'de verilmiştir.



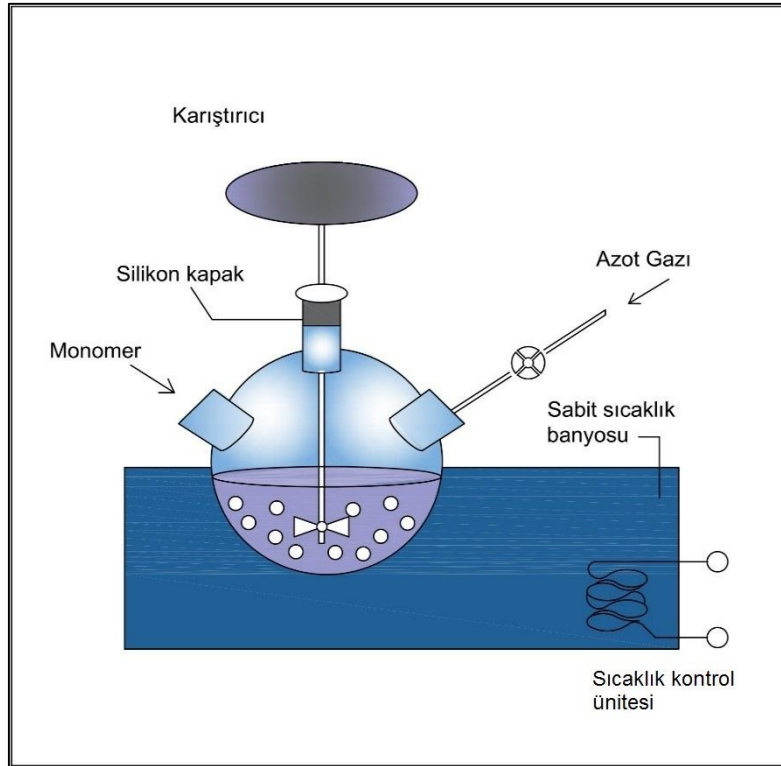
Şekil 3.1. Demir oksit sentezinin şematik gösterimi.

3.4. mPGMA Mikrokürelerin Sentezlenmesi

mPGMA mikrokürelerin sentezi dispersiyon polimerizasyon yöntemi ile sıcaklık kontrol sistemi ile donatılmış balon reaktörde gerçekleştirildi [122]. Önceden sentezlenmiş olan 0.05 g demir oksit nanopartikülleri etanol çözeltisi (% 96) içerisine eklendi ve ultrasonik su banyosunda 30 dk sonike edildi (Bandelin Sonorex, Almanya). Magnetit-etanol çözeltisinde 2.4 g PVP çözüldü. 12 g GMA içerisine 0.24 g AIBN eklendikten sonra reaktöre boşaltıldı. Daha sonra reaktörden 10 dk boyunca azot gazı geçirildi. Polimerizasyon 70°C'de, 550 rpm'de, 24 saat boyunca sürdürüldü (Şekil 3.2). Polimerizasyon zamanının tamamlanmasından sonra, reaktör içeriği oda sıcaklığına soğutuldu ve dağıtma ortamının uzaklaştırılması için 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. mPGMA mikroküreler 10 mL etanol içinde tekrar dağıtıldı ve benzer koşullarda tekrar santrifüj edildi. Reaksiyona girmemiş monomerlerin ve diğer bileşenlerin tamamen uzaklaştırılması için etanol-su ile yıkama işlemi 20 kez tekrarlandı [136]. Dispersiyon polimerizasyonu için kullanılan reçete ve polimerizasyon koşulları Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. mPGMA mikrokürelerin sentezi için kullanılan reçete ve polimerizasyon koşulları.

Dağıtma Fazı	Monomer Fazı
68.0 g Etanol	12.0 g GMA
2.4 g PVP	0.24 g AIBN
	0.05 g Fe ₃ O ₄
Polimerizasyon Koşulları	Reaktör Hacmi: 500 mL
	Karıştırma Hızı: 550 rpm
	Sıcaklık ve Zaman: 70 °C, 24 saat



Şekil 3.2. mPGMA mikrokürelerin sentezinde kullanılan polimerizasyon sisteminin şematik görüntüsü.

3.5. m-PGMA Mikrokürelerin Karakterizasyonu

mPGMA mikrokürelerin yüzey ve yığın yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi (JEOL, JEM 1200 EX, Tokyo, Japonya). SEM öncesi mPGMA mikroküreler 50°C'de etüv içinde kurutulduktan sonra SEM fotoğrafları alındı. Bu amaçla, söz konusu mikroküreler iletken bir yapıştırıcı ile SEM örnek plakası üzerine tutturuldu. Daha sonra örnek yüzeyi vakum altında 200 Å kalınlığında metalik altın ile kaplanarak yüzey iletken hale getirildi. Son olarak, SEM örnek yuvasına yerleştirilen mPGMA mikrokürelerin çeşitli büyütme oranlarında fotoğrafları çekildi [141].

mPGMA mikrokürelerin spesifik yüzey alanı Brunnauer-Emmett-Teller (BET) yöntemi ile ölçüldü. Söz konusu mikroküreler vakum altında 100°C'de bir gece kurutulduktan sonra ölçüm alındı [63]. mPGMA mikrokürelerin yüzey alanı hesabında 1 mL süspansiyondaki partikül sayısı bulunarak spesifik yüzey alanı, m²/g biriminde hesaplandı (NOVA 2200e, Quantachrome Instruments, ABD).

mPGMA mikrokürelerin kimyasal yapısı ve kompozisyonları FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi) analizi ile belirlendi (FTIR, 8000 Series, Shimadzu, Japonya). Söz konusu mikroküreler vakum altında KBr kullanılarak pelet haline getirildi ve normal transmisyon dedektöründe 4000-400 cm⁻¹ aralığında tarama yapıldı [123].

Polimerik yapıdaki manyetik partiküllerin varlığı elektron spin rezonans spektrofotometresi (ESR) ile araştırıldı (Bruker, EMX 113, X-BAND, Almanya). Elektron spin rezonans ile çiftleşmemiş elektronlara sahip olan molekül ya da molekül parçaları analiz edilmektedir. Çiftleşmemiş elektronlara sahip moleküllerin manyetik özellik göstermeleri nedeniyle bu yöntem ile maddelerin manyetik özellikte olup olmadığı belirlenebilmektedir [142].

mPGMA mikrokürelerin VSM (Vibrating Sample Magnetometer) analizinde, manyetiklik derecesi titreştirici örnek manyetometresi (Quantum Design, Physical Properties Measurement System (PPMS), ABD) kullanılarak manyetik alanda ölçüldü [142].

mPGMA mikrokürelerin manyetit içeriğini saptamak amacıyla termogravimetrik analiz cihazı (TGA 2950, Almanya) kullanıldı. Termogravimetrik analiz 50 cm³/dk hava akış hızı ve 10°C/dk ısıtma hızıyla 0°C'den 500°C'ye ısıtılarak gerçekleşen ağırlık kayıpları incelendi [143].

3.6. Mikrokürelerin Aktivasyonu

mPGMA mikroküreler ligand immobilizasyonundan önce aktive edildi. İlk aşamada, uzatıcı kolun PSA adsorpsiyonuna etkisinin araştırılması amacıyla, hazırlanan mikrokürelere uzatıcı kol takılarak aktivasyon gerçekleştirildi. İkinci aşamada ise uzatıcı kol takılmayan mPGMA mikrokürelerin aktivasyonu gerçekleştirildi. Uzatıcı kol takılan mPGMA (mPGMA-HDMA) ve uzatıcı kol takılmayan mPGMA (mPGMA) mikrokürelere Con A immobilizasyonunun ardından PSA adsorpsiyonu için kullanıldı.

Mikrokürelerin aktivasyonu, ligand immobilizasyonu ve PSA adsorpsiyon-desorpsiyonu çalışmalarında mPGMA mikrokürelerin ortamdaki ayrılması amacıyla, manyetik seperatör (DynaMag™-Spin, Life Technologies AS, İngiltere) kullanılarak santrifüj basamakları elimine edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. mPGMA mikrokürelerin manyetik seperatör kullanılarak ortamdaki ayrılması.

3.6.1. mPGMA-HMDA Mikrokürelerin Aktivasyonu

mPGMA mikrokürelerin epoksi grupları uzatıcı kol olarak 0.5 M 1,6-diaminohekzan (HMDA) ile amino gruplarına dönüştürüldü (65°C, 6 saat). Reaksiyon sonrası mikroküreler distile su ile yıkandı. mPGMA-HMDA mikroküreler 2 saat boyunca fosfat tamponu (10 mM, pH 7.4) ile dengeye getirildi. Katı destek malzemesi olarak hazırlanan bu mikrokürelerin yüzey modifikasyonu için aktivasyon ajanı olarak glutaraldehit (50 mL, % 0.25 v/v) kullanıldı. Aktivasyon 25°C'de 18 saat boyunca gerçekleştirildi ve sonrasında fazla glutaraldehit sırasıyla distile su ve fosfat tamponu ile yıkanarak uzaklaştırıldı [131].

3.6.2. mPGMA Mikrokürelerin Aktivasyonu

mPGMA mikrokürelerin epoksi grupları pH 10 karbonat tamponu ile açıldı. Reaksiyon mikrokürelerin rotatörde 25°C'de 18 saat boyunca çalkalanması ile gerçekleştirildi [144].

3.7. mPGMA ve mPGMA-HMDA Mikrokürelere Ligand Bağlanması

Çalışmanın bu kısmında sentezlenip aktive edilen mPGMA ve mPGMA-HMDA mikrokürelere yüzeyine ligand (Con A) immobilizasyonu kovalent bağlama yöntemiyle gerçekleştirildi. İki farklı şekilde aktive edilen mikrokürelere 4 saat fosfat tamponunda (10 mM, pH 7.4) dengeye getirildi. Söz konusu mikrokürelere 100 mM CaCl₂, 100 mM MnCl₂ ve % 2 glukoz içeren Con A çözeltisine transfer edildi [144]. Immobilizasyon 25°C'de 18 saat boyunca hazırlanan örneklerin rotatörde döndürülmesi ile gerçekleştirildi. Polimerik yapıya bağlanan optimum ligand (Con A) miktarını belirlemek üzere ligand derişimi 0.25-2.5 mg/mL arasında değiştirildi. Bağlanan ligand miktarının belirlenmesi için başlangıç Con A ve inkübasyon sonrası Con A miktarı spektrofotometrede A₂₈₀'de ölçüldü.

Kalibrasyon eğrisi derişimi bilinen Con A çözeltisi ile yapıldı. Bağlanan Con A miktarı, başlangıç ve inkübasyon sonrası çözeltilerdeki Con A derişimlerinin farkından yararlanılarak Eş. 3.1'e göre hesaplandı.

$$Q = [(C_0 - C) V] / m \quad (\text{Eş. 3.1})$$

Bu formülde Q, mPGMA ve mPGMA-HMDA mikrokürelere birim kütlesi başına immobilize olan Con A miktarını (mg/g); C₀ ve C, sırası ile başlangıç ve inkübasyon sonrası çözeltilerdeki Con A derişimlerini (mg/mL); V, çözeltinin hacmini ve m, mPGMA ve mPGMA-HMDA mikrokürelere kuru ağırlığını ifade eder.

İnkübasyondan sonra Con A immobilize mikrokürelere distile su ile yıkandı. Fiziksel olarak bağlanan Con A moleküllerini uzaklaştırmak için fosfat tamponu ile birkaç defa yıkandı. Süzüntüdeki miktarlar tekrar ölçüm alınarak önceki ölçümlerden çıkarıldı.

3.8. Serumdan Yüksek Derişimde Bulunan Proteinlerin Uzaklaştırılması

3.8.1. Serumdan Albümin Uzaklaştırılması

Serumdan albümin uzaklaştırılması için Cibacron mavisini-F3GA bağlı PHEMA kriyojel kullanıldı. PHEMA kriyojel, monomer olarak HEMA ve çapraz bağlayıcı olarak MBAA kullanılarak en son monomer derişimi %10 olacak şekilde hazırlandı [141] (Şekil 3.4a). Kullanılan HEMA ve MBAA miktarları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. PHEMA kriyojelin hazırlanma koşulları.

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

PHEMA kriyojel disklerin hazırlanmasında aşağıda verilen yöntem uygulandı:

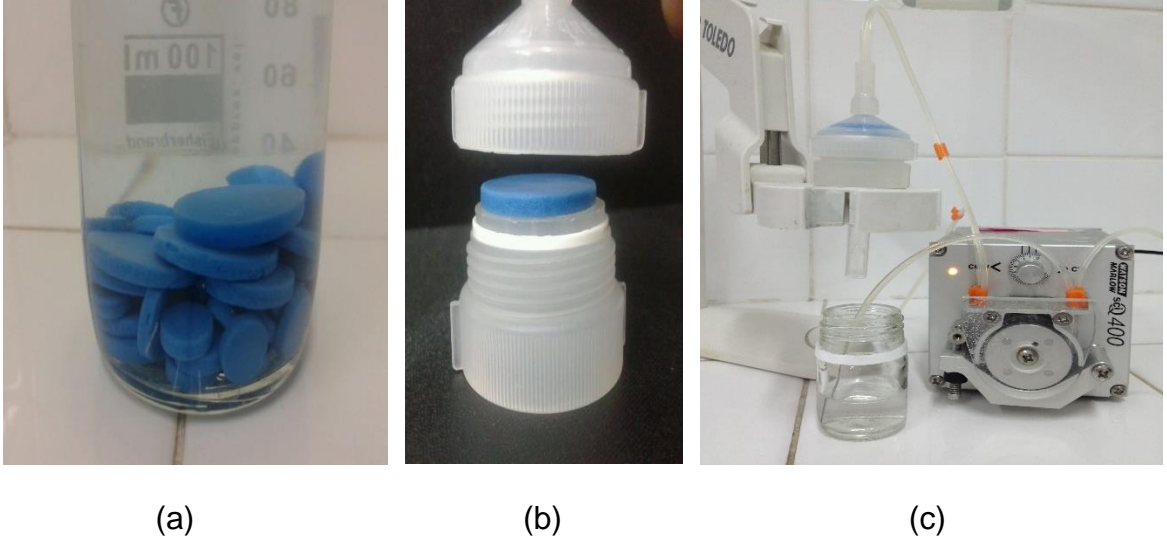
- Çizelge 3.2'de verilen miktarlara göre; HEMA 10 mL, MBAA ise 5 mL saf suda buz banyosu içerisinde manyetik karıştırıcıda çözüldükten sonra bu iki çözelti karıştırıldı.
- Polimerizasyonda, başlatıcı olarak TEMED (25 µL) ve APS (0.02 g) çifti kullanıldı.
- Polimer şurubu hazırlandıktan sonra 1.5 mm kalınlıktaki spacer kullanılarak iki cam plaka arasına döküldü. Hemen ardından polimerizasyonun gerçekleşmesi için -18°C 'deki dondurucuda 24 saat bekletildi.
- Kriyojeller dondurucudan çıkartılıp oda sıcaklığına getirildikten sonra 1.5 cm çapında dairesel parçalar şeklinde kesildi. (Oda sıcaklığında kriyojellerin içerisinde donmuş olarak bulunan su erir ve böylece kriyojellerin yapısında birbiriyle bağlantılı gözenekler oluşur.)
- Kriyojeller, yapıya girmeyen monomerlerin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla önce etanol/su (50/50 v/v) karışımı ve daha sonra saf su ile defalarca yıkandı.
- Yapıya girmeyen monomerlerin tamamen uzaklaştırıldığından emin olmak için yıkama çözeltilisinin 280 nm'de verdiği absorbans sıfır olana kadar yıkama işlemine devam edildi [141].

Hazırlanan PHEMA kriyojel disklere Cibacron mavisi-F3GA bağlanması:

- Hazırlanan PHEMA kriyojeller 500 mL distile su ile yıkandı. 100 g Cibacron mavisi F3GA 30 mL suda çözüldükten sonra PHEMA kriyojeller ile 60°C 'de 30 dk inkübe edildi.
- Daha sonra 1.5 g NaCl eklenerek 60°C 'de 1 saat inkübe edildi.
- Sıcaklık 70°C 'ye getirilerek 0.15 g Na_2CO_3 eklendikten sonra 1 saat karıştırıldı.

- Membranlar renk vermeyene kadar yıkama yapıldı. Kriyojeller kullanılıncaya kadar +4°C'de %0.02 sodyum azid çözeltisi içerisinde saklandı [145].

Hazırlanan PHEMA kriyojel disklere Cibacron mavisi-F3GA bağlandıktan sonra kartuş içine yerleştirildi. Albümin uzaklaştırma işlemi peristaltik pompa yardımıyla sürekli sistemde 2 saat boyunca gerçekleştirildi (Şekil 3.4b-c).



Şekil 3.4. (a) Cibacron mavisi-F3GA bağlı PHEMA kriyojel diskler (b) Cibacron mavisi-F3GA bağlı PHEMA kriyojel diskin kartuş içine yerleştirilmesi (c) Serumdan albümin uzaklaştırılmasında kullanılan deney düzeneği.

3.8.2. Serumdan IgG Uzaklaştırılması

Serumdan IgG uzaklaştırılması için GE Healthcare firmasından temin edilen Hitrap Protein A Fast Flow (FF) kolonu kullanıldı (Şekil 3.5a). Bu kolon ligand olarak rekombinant *Escherichia coli* Protein A içeren 90 µm çapında çapraz bağlı agaroz kürelerden oluşmaktadır. Kolonun bağlama kapasitesi 50 mg IgG/mL'dir. IgG uzaklaştırma işlemi peristaltik pompa yardımıyla sürekli sistemde 2 saat boyunca gerçekleştirildi (Şekil 3.5b).

3.9. Adsorpsiyon Çalışmaları

Adsorpsiyon çalışmaları, Con A bağlanmış mPGMA (mPGMA-ConA) ve Con A bağlanmış mPGMA-HMDA (mPGMA-HMDA-ConA) olmak üzere iki farklı şekilde ligand bağlanan mikroküreler ile gerçekleştirildi.



Şekil 3.5. (a) Hitrap rProtein A Sepharose™ FF kolonu (b) Serumdan Ig G uzaklaştırılmasında kullanılan deney düzeneği.

3.9.1. mPGMA-ConA ve mPGMA-HMDA-ConA Mikrokürelere PSA Adsorpsiyonu

mPGMA-ConA ve mPGMA-HMDA-ConA mikrokürelere fPSA ve tPSA adsorpsiyon kapasitesi kesikli sistemde incelendi (Şekil 3.6). Bu aşamada, 0.25-2.5 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda Con A içeren mPGMA-ConA ve mPGMA-HMDA-ConA mikrokürelere serumdan PSA adsorpsiyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, serum örnekleri 1/20 oranında 0.1 M pH 7.4 fosfat tamponu ile seyreltildi. Adsorpsiyon, 10 mg mPGMA-ConA ve mPGMA-HMDA-ConA mikroküre kullanılarak rotatörde 2 saat süre ile gerçekleştirildi.



Şekil 3.6. PSA adsorpsiyonunun gerçekleştirildiği kesikli sistem deney düzeneği.

Serum örneklerindeki fPSA ve tPSA miktarlarının belirlenmesi için CLIA kullanıldı. Ölçümler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Kuru polimer başına adsorplanan PSA miktarı başlangıç ve inkübasyon sonrası çözeltilerdeki PSA derişimlerinin farkından yararlanılarak Eş. 3.1' e göre hesaplanmıştır.

$$Q = [(C_0 - C) V] / m$$

Bu formülde bu kere Q, mPGMA-ConA ve mPGMA-HMDA-ConA mikrokürelerin birim kütlesi başına adsorbe olan PSA miktarını (ng/g); C_0 ve C, sırası ile başlangıç ve inkübasyon sonrası çözeltilerdeki PSA derişimlerini (ng/mL); V, çözeltinin hacmini ve m, mPGMA-ConA ve mPGMA-HMDA-ConA mikrokürelerin kuru ağırlığını ifade etmektedir.

3.9.2. Sıcaklığın Etkisi

mPGMA-HMDA-ConA mikrokürelerin fPSA ve tPSA adsorpsiyon kapasitesine sıcaklığın etkisi deney sisteminin bulunduğu ortam sıcaklığı 4, 25 ve 37°C'ye ayarlanarak belirlendi. Serum örnekleri 0.1 M pH 7.4 fosfat tamponu ile 1/20 oranında seyreltildi. Adsorpsiyon, 10 mg mPGMA-HMDA-ConA mikroküre kullanılarak rotatörde 2 saat süre ile gerçekleştirildi.

3.9.3. Başlangıç Serum Derişiminin Etkisi

mPGMA-HMDA-ConA mikrokürelerin fPSA ve tPSA adsorpsiyon kapasitesine başlangıç serum derişiminin etkisi 0.1 M pH 7.4 fosfat tamponu ile 1/5, 1/10 ve 1/20 oranında seyreltilen serum örnekleri kullanılarak belirlendi. Adsorpsiyon, 10 mg mPGMA-HMDA-ConA mikroküre kullanılarak rotatörde 2 saat süre ile gerçekleştirildi.

3.9.4. Adsorpsiyon Zamanı

fPSA ve tPSA'nın mPGMA-HMDA-ConA mikrokürelere adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi de incelenen parametreler arasındadır. Adsorpsiyon ortamından 2 saat boyunca düzenli aralıkla örnekler alınarak PSA'nın mPGMA-HMDA-ConA mikrokürelere adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi incelendi.

3.9.5. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

PSA adsorplanmış mPGMA-HMDA-ConA mikrokürelere desorpsiyon, kesikli sistemde 0.1 M mannoz, 0.5 M NaCl, 1 M NaCl ve 0.5 M NaCl içeren pH 8 fosfat

tamponu ile 25°C'de rotatörde 2 saat boyunca gerçekleştirildi. Desorpsiyon ortamındaki PSA miktarı CLIA yöntemi ile ölçülerek hesaplandı. PSA için desorpsiyon oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Eş. 3.2).

$$\% \text{ desorbsiyon} = \frac{(\text{Desorbe olan PSA (ng)})}{(\text{Adsorbe olan PSA (ng)})} \times 100 \quad (\text{Eş. 3.2})$$

mPGMA-HMDA-ConA mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliğini göstermek amacıyla adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrar edildi. Söz konusu mikroküreler rejenerasyon amacıyla 50 mM NaOH çözeltisi ile yıkandı.

3.10. SDS-PAGE

Serumdan Cibacron mavisi-F3GA bağlı kriyojel diskler ile uzaklaştırılan albüminin, ticari Protein A kolonu ile uzaklaştırılan IgG'nin ve mPGMA-HMDA-ConA mikrokürelere adsorbe olan PSA'nın molekül ağırlıklarına göre belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE yöntemi uygulandı. SDS-PAGE, protein moleküllerini molekül ağırlıklarına göre ayıran bir yöntemdir. SDS-PAGE'de kullanılan SDS, anyonik bir deterjan olup iki amino asitte bir peptid zincirine bağlanarak protein yapısındaki hidrofobik etkileşimleri çözer ve polipeptit zincirlerinin açılmasına neden olmaktadır. Ayrıca (-) yük taşıması nedeniyle etrafını sardığı protein molekülüne de yüksek oranda (-) yük kazandırmaktadır. Bu yük normalde proteinler üzerinde bulunan yükleri maskeler ve proteinler jel üzerinde yüklerine göre değil molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. Ayrıca disülfid köprüleri 2-merkaptotanol veya DTT (ditiotreitol) ile kırılarak proteinlerin alt birimlerine ayrılmaları sağlanmaktadır. Böylece lineer yapı kazanan proteinler elektriksel ortamda sadece büyüklüklerine göre ayırt edilirler [146].

SDS-PAGE, dikey elektroforez sisteminde (BioRad MiniProtean II) gerçekleştirildi. 6x8 cm boyutlarında %12'lik jel kullanıldı. Serum örnekleri 3:1 (v/v) oranında yükleme tamponu ile seyreltilerek 95°C'de 5 dk boyunca merkaptotanol varlığında denatüre edildi. Daha sonra jele yüklenen örnekler 200V gerilim altında (maksimum 80 mA) 1 saat yürütüldü. Elektroforez jeli gümüş nitrat yöntemi [147] ile boyandıktan sonra fotoğrafı çekildi (Image Quant 300, GE Healthcare, ABD).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Günümüzde biyolojik malzemelerin üretiminde önemli teknolojik ilerlemeler kaydedilmektedir. Bu bağlamda, tanısal ve terapötik proteinlerin de içinde bulunduğu çeşitli hedef moleküllerin bağlanma ve saflaştırma aşamaları tekrar tekrar gösterilmiştir. Ancak genellikle karşılaşılan çeşitli zorluklar ve ihtiyaç duyulan pahalı ekipmanlar bu aşamaları olumsuz yönde etkilemektedir. Bu zorluklara karşı, son zamanlarda kromatografik destek malzemeleri tasarımı alanında bir dizi yenilik ileri sürülmüştür. Bu yeniliklerden biri de, hızlı bağlanma kinetiğiyle yüksek bağlanma kapasitesine sahip yüksek yüzey alanlı biyoafinite adsorbentlerin kullanılmasıdır. Yüzey alanını 100 m²/g düzeyinde arttırmak amacıyla büyük gözenekli malzemeler veya mikron boyutlu küreler sentezlenmektedir. Eş boyutlu partiküllerin kullanılmasının en önemli avantajı partikül difüzyon direncinin olmamasıdır. Buna ek olarak, polimerlerin manyetik karakterli olması, söz konusu malzemelere manyetizmaya karşı bir tepki özelliği kazandırarak örnekleme ve toplama basamaklarının daha kolay ve hızlı olmasını sağlamaktadır [123]. Sunulan tezde mPGMA afinite adsorbentler hazırlanmış ve söz konusu destek malzemenin serumdan PSA adsorpsiyonunda kullanılabilirliği araştırılmıştır.

4.1. Çalışmada Kullanılan Kan Örnekleri

Daha önceki bölümde belirtildiği gibi, fPSA/tPSA oranları BPH gözlenen hastalarda 0.20'nin üstünde, PCa gözlenen hastalarda ise 0.20'nin altında olmaktadır. Çalışmada kullanılan serum örneklerine ait fPSA/tPSA oranları incelendiğinde, BPH grubuna dahil olan örneklerde bu oranların 0.20'nin üstünde, PK grubuna dahil olan örneklerde ise 0.20'nin altında olduğu bulundu. Bu veriler toplanan kan örneklerinin bu çalışma için uygun olduğunu göstermektedir. Kan örneklerinin Gleason skorları incelenerek farklı kanser derecelerine sahip örnekler kullanıldı. Bu çalışma kapsamına dahil edilen örneklere ait fPSA, tPSA, fPSA/tPSA ve Gleason skoru değerleri (GS) Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışma kapsamına dahil edilen örneklere ait fPSA, tPSA, fPSA/tPSA ve Gleason skoru değerleri.

Örnek No	Yaş	fPSA	tPSA	fPSA /tPSA	Gleason Skor
BPH1	56	5.09	10.92	0.47	–
BPH2	51	2.28	8.32	0.27	–
BPH3	54	6.66	12.39	0.53	–
BPH4	67	1.53	7.2	0.21	–
BPH5	65	1.2	5.12	0.23	–
BPH6	68	1.33	6.19	0.21	–
BPH7	53	0.1	0.17	0.58	–
BPH8	63	0.97	4.16	0.23	–
BPH9	54	1.63	4.59	0.35	–
BPH10	69	0.71	2.74	0.26	–
PK1	66	2.26	12.59	0.17	3+3
PK2	65	0.68	4.69	0.14	4+4
PK3	70	0.49	4.38	0.11	6+3
PK4	61	0.44	2.88	0.15	4+4
PK5	68	0.48	5.41	0.08	3+3
PK6	61	6.66	34.32	0.19	5+5
PK7	64	1.88	10.8	0.17	3+3
PK8	70	1.75	9	0.19	3+3
PK9	72	0.77	8.29	0.09	4+4
PK10	63	0.74	6.8	0.10	3+3

4.2. Demir Oksit Partiküllerin Sentezi

Bu çalışmada, demir oksit nanopartiküllerin sentezi için kimyasal ikili çöktürme yöntemi tercih edildi. Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuz çözeltilerinin birlikte çöktürülmesi esasına dayanan bu yöntem, hem basit uygulanabilir olması hem de fazla hacimde çalışılabilmesi nedeniyle manyetit nanopartikül sentezinde yaygın olarak kullanılmaktadır [148]. Genel olarak, demir oksit nanopartikülleri ortama 1:2 oranında Fe^{2+} and Fe^{3+} klorür içeren çözeltiye baz eklenmesi ile hazırlanır ve

Çöken nanopartiküller siyah renktedir. Fe₃O₄ sentezinde meydana gelen reaksiyon Eş. 4.1'de verilmiştir.



Bu reaksiyonun termodinamiğine göre, Fe²⁺: Fe³⁺ oranı (1:2) korunarak pH:9- pH:14 arasında demir oksit çökelmesinin tamamlandığı rapor edilmiştir [149]. Bu bilgiler doğrultusunda, ikili çöktürme işlemi için küçük partiküller oluşturmak amacıyla baz olarak amonyak çözeltisi kullanıldı [148, 150]. Demir oksit nanopartiküller sentezlenirken ikili çöktürme işleminde küçük partiküllerin oluşabilmesi için düşük sıcaklık gerektiğinden sıcaklık uygulaması yapılmadı [151]. Sentez 0.7 M amonyak çözeltisine oda sıcaklığında Fe²⁺ ve Fe³⁺ tuz çözeltilerinin eklenmesiyle tamamlandı (Şekil 4.1). Şekil 4.1'den de görüldüğü gibi Fe³⁺ tuzlarının berrak amonyak çözeltisine eklenmesiyle çözeltinin rengi kahverengine dönmüştür. Kahverengi özeltiye Fe²⁺ tuzlarının da ilave edilmesi sonucu hemen demir oksit nanopartiküllerin çökmesi başlamıştır. Söz konusu partiküller uygun bir miktanıs yardımıyla çöktürüldükten sonra distile su ile birçok kez yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur.



(a)

(b)

(c)

Şekil 4.1. Demir oksit nanopartiküllerin sentezi. (a) 0.7 M amonyak çözeltisi. (b) Fe³⁺ tuzlarının amonyak çözeltisine eklenmesi. (c) Fe²⁺ tuzlarının ilave edilmesi sonucu demir oksit nanopartiküllerin çökmesi.

4.3. mPGMA Mikrokürelerin Sentezlenmesi

mPGMA mikrokürelerin sentezi dispersiyon polimerizasyon yöntemi ile sıcaklık kontrol sistemi ile donatılmış balon reaktörde gerçekleştirildi [152]. Dispersiyon

polimerizasyonu, geleneksel polimerizasyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında, uygun koşullar altında, 0.1–15 µm çapında sıklıkla eşboyutlu polimer partikül sentezine tek basamakta olanak sağlaması nedeniyle tercih edildi. Bu yöntemin özelliği, monomer fazın dağıtma fazında çözünmesi, buna karşın polimerizasyon işlemi sonucunda oluşan polimerin ise çözünmemesidir. Çözücü, polimerizasyona giren monomer, stabilizör ve başlatıcı için iyi bir çözücü iken, oluşturulan polimer için çözücü değildir. Böylece, oluşan polimer partikülleri kararlı halde reaksiyon ortamında bulunur [148].

Dispersiyon polimerizasyonunun ilk basamağında, tüm bileşenler reaksiyon başlangıcında çözünmüş durumdadır. Bu homojen reaksiyon karışımı ısıtıldığında başlatıcı bozularak serbest radikaller oluşmasına neden olur. Oluşan serbest radikaller, monomerler ile oligomerik radikalleri oluştururlar. Kritik zincir uzunluğuna gelindiğinde oligomerler homojen çözeltilerden çöker ve kararlı çekirdek oluşturur. Ancak kararlı hale gelmek için oluşan partiküllerin yüzeyine bir kararlaştırıcı adsorplanır ve böylece partiküller kararlı hale gelir. Dispersiyon polimerizasyonunun en önemli özelliği, oluşan bu çekirdeğin homojen çözelti ile karışmaması ve çökerek yeni faz oluşturmasıdır. Yeteri kadar mikropartikül oluştuğunda, yani ortamda tepkimeye girecek radikal ve çekirdek kalmadığında, yeni mikropartikül oluşmaz ve mikropartikül oluşumu tamamlanmış olur [153]. Dispersiyon polimerizasyonunun anahtar özelliklerinden birisi de kopolimer kararlaştırıcısıdır. Kararlaştırıcı, partiküller oluşurken flokulasyon ve agregasyon sağlar. Eş boy dağılımına ulaşmak için kullanılan yardımcı kararlaştırıcı, mikropartiküllerin daha fazla büyümesine izin vermez. Oysa partiküllerin büyümeye devam etmesi ortamda farklı çapta mikropartiküllerin olmasına neden olur. Kararlı mikropartikül oluşma basamağı daha da kısalmış, böylece çekirdekleşme zamanı azalır ve bu da farklı boy dağılımlı örnekler oluşturur [148].

Sistem çözücüsü ise, başlatıcı, monomer ve kararlaştırıcının karışmamasını sağlar. Çözücü ortamının polaritesi Horak ve Shavopa'a [153] göre, mikropartikülün boyut ve dağılımında polimer çözücüsünün üzerindeki kritik mol kütlesinin kontrolünü sağlayarak anahtar rol oynar.

Dispersiyon polimerizasyonu genellikle alkol, sikloheksan gibi organik çözücüler ya da 2-butanol-toluen, DMF-toluen, DMF-metanol, etanol-DMSO gibi çözücü karışımlar içinde gerçekleştirilir. Horak ve ark. [154] yaptıkları çalışmada 0.8–2.3

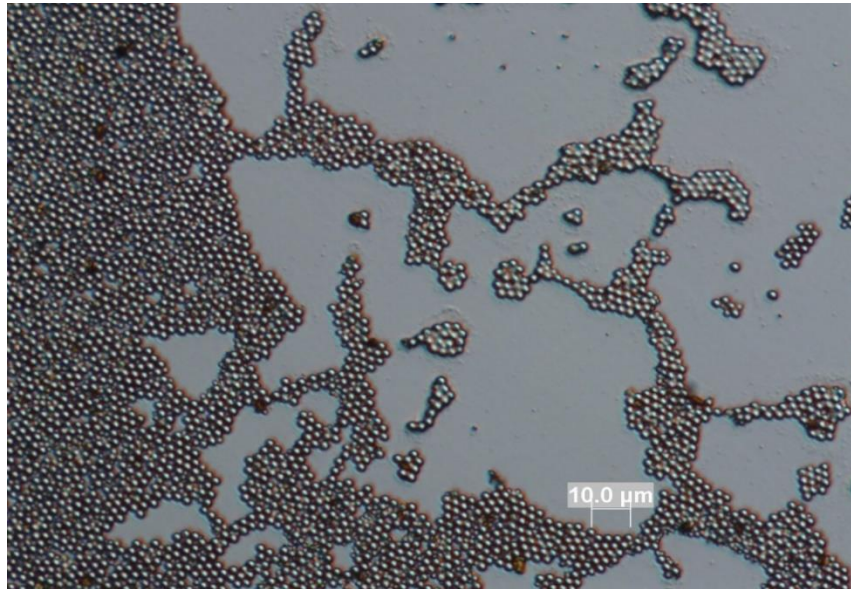
μm çapında eŖ boy dağıllım özelliğine sahip poli(GMA) mikroküreleri dağıtıcı ortam olarak etanol kullanarak elde etmiŖlerdir. Bu nedenle, bu alıŖmada da dispersiyon polimerizasyonunda dağıtıcı ortam olarak etanol kullanılması tercih edilmiŖtir.

DŖk molekül ağırlıklı PVP ($MA < 10,000$), özelikle dŖk deriŖimlerde partikül yüzeyini etkin bir Ŗekilde kaplayamaz. Yüksek molekül ağırlıklı PVP'nin ($MA \sim 360,000$) polimerizasyon ortamında znmesi zordur ve bu PVP'nin kullanılması partikül büyüklük aralığının geniŖ olmasına neden olur. Bu nedenle, PVP'nin ($MA = 40,000$) kullanılması tercih edilmiŖtir [148].

mPGMA mikrokürelerin manyetik alana doğru hareketi ve mikroskopik görünütüsü (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japonya) sırasıyla Ŗekil 4.2 ve Ŗekil 4.3' de verilmiŖtir.



Ŗekil 4.2. mPGMA mikrokürelerin manyetik alana doğru hareketi.

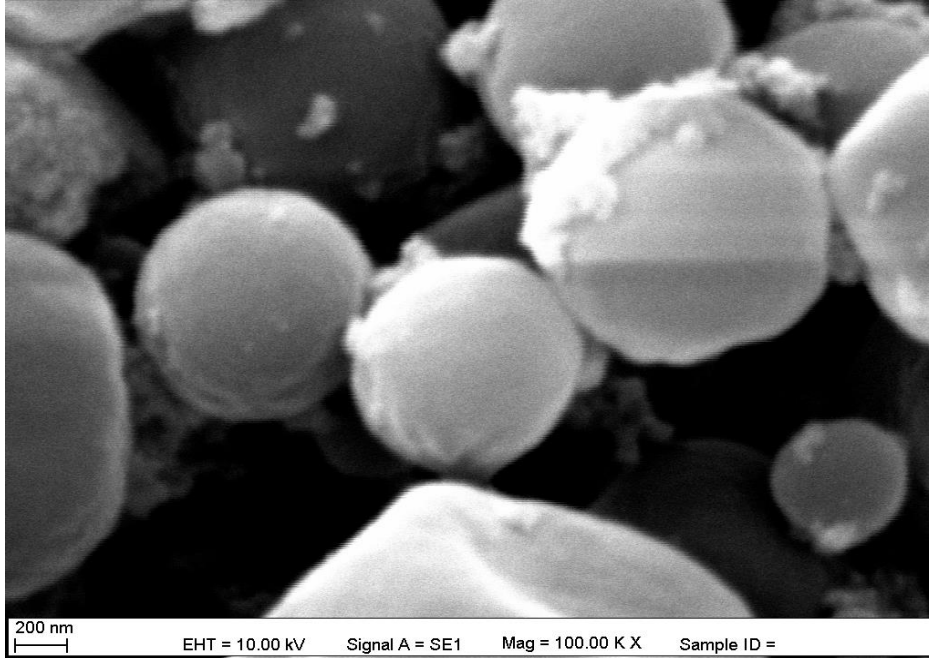


Ŗekil 4.3. mPGMA mikrokürelerin optik görünütüsü.

4.4. mPGMA Mikrokürelerin Karakterizasyonu

4.4.1. mPGMA Mikrokürelerin SEM Analizi

Şekil 4.4'de mPGMA mikrokürelerin SEM fotoğrafları görülmektedir. mPGMA mikroküreler 1.6 μm çapındadır. Daha önce yapılan çalışmalarda sentezlenen mPGMA mikrokürelerin çapı sırasıyla 1.7 μm [63], 2 μm [148], 1.6 μm [123], olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. mPGMA mikrokürelerin SEM görüntüsü.

4.4.2. mPGMA Mikrokürelerin Yüzey Alanı Analizi

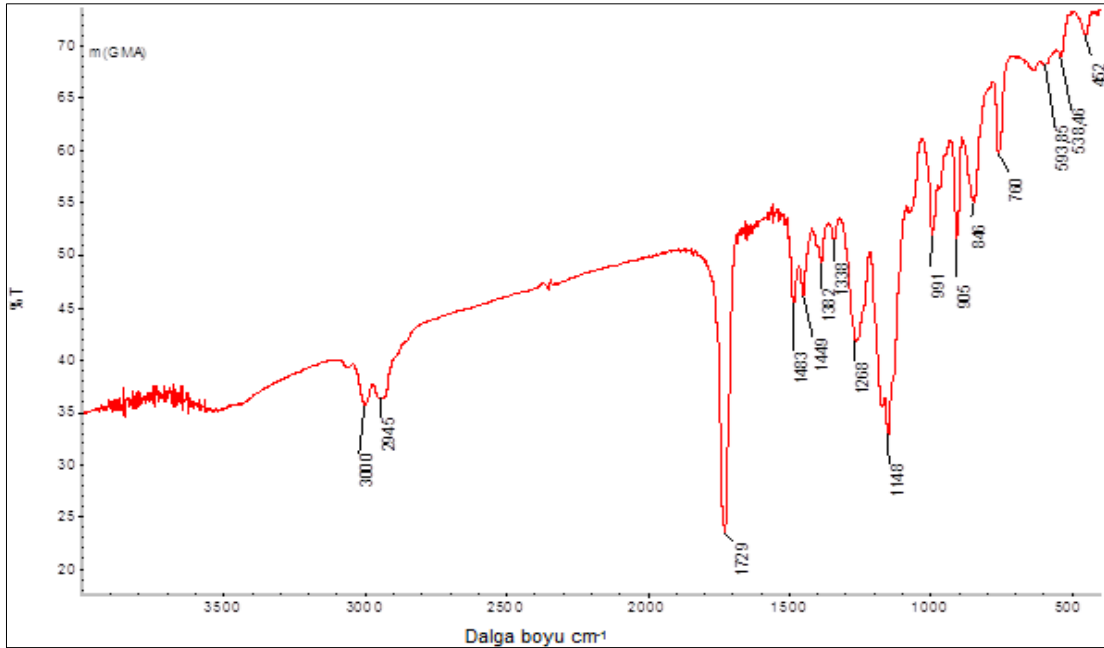
mPGMA mikrokürelerin özgül yüzey alanları (Brunauer-Emmett-Teller) (BET) yöntemi ile belirlendi. BET teorisi katı bir yüzeye gaz moleküllerinin fiziksel adsorpsiyonunu açıklar ve malzemelerin yüzey alanının ölçülmesinde kullanılan önemli bir analiz tekniğidir. Yüzey alanı hesabında 1 mL süspansiyondaki partikül sayısı bulunarak spesifik yüzey alanı, m^2/g biriminde hesaplandı (NOVA 2200e, Quantachrome Instruments, ABD). mPGMA mikrokürelerin spesifik yüzey alanı 5 m^2/g olarak bulundu. Birnur ve ark. [63] yaptıkları çalışmada mPGMA mikrokürelerin spesifik yüzey alanını 3.2 m^2/g olarak bulmuşlardır.

4.4.3. mPGMA Mikrokürelerin FTIR Analizi

FTIR analizinde Şekil 4.5'de görüldüğü gibi karakteristik pikler elde edilmiştir. 846 ve 905 cm^{-1} 'de gösterilen ayrı pikler m-PGMA mikrokürelerdeki epoksi gruplarının

varlığını doğrulamaktadır [155]. Ester gruplarının ($-\text{COO}-$) varlığını gösteren 1729 cm^{-1} 'de $-\text{C}=\text{O}$ gerilmesi ve 1148 cm^{-1} 'de $-\text{C}-\text{O}-$ gerilmesi gösterilmiştir [156]. 700 cm^{-1} altındaki dalga boylarında elde edilen pikler ise demir oksitteki $\text{Fe}-\text{O}$ bağlarından kaynaklanmaktadır.

Daha önce yapılan bir çalışmada yığın şeklinde bulunan demir oksitteki $\text{Fe}-\text{O}$ bağlarının 375 ve 570 cm^{-1} 'de görüldüğü rapor edilmiştir [157]. Bununla birlikte, demir oksit nanopartiküllerin boyutu nano ölçekli boyutlara getirilerek, nanopartiküllerin son boyutunun etkisiyle yüzey bağ kuvveti sabiti artar. Çok sayıda bağın kırılması partikül yüzeyinde lokalize olmayan elektronların yeniden düzenlenmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, $\text{Fe}-\text{O}$ bağının karakteristik absorpsiyon bandı 432.1 ve 563.3 cm^{-1} aralığına kaymıştır. Şekil 4.5'de 594 , 538 ve 452 cm^{-1} dalga boylarında gösterilen pikler demir oksit nanopartiküllerinden kaynaklanmaktadır. Literatürde rapor edilen demir oksit FTIR spektrumları Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Sentezlenen (m-PGMA) mikrokürelerin FTIR spektrumu.

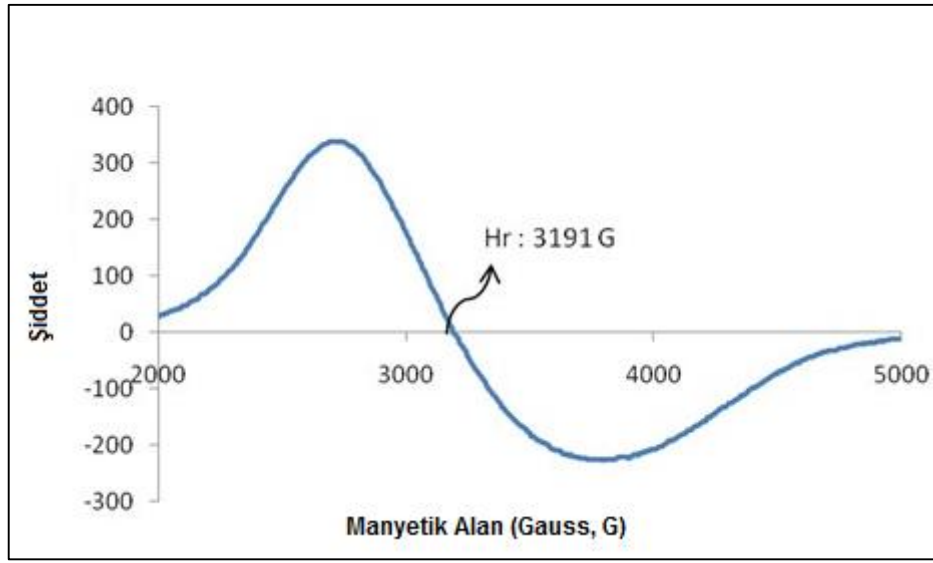
Çizelge 4.2. Literatürde rapor edilen demir oksit FTIR spektrumları.

Karakteristik pikler	Dalga Boyları (cm^{-1})	Referanslar
Fe-O	628.27, 584.8, 440.87	[158]
Fe-O	575, 580	[159]
Fe-O	580, 434	[160]
Fe-O	574, 447.5	[161]

Çizelge 4.2'den de görüldüğü gibi, çalışmamızda gösterilen demir oksit FTIR spektrumu literatürde elde edilen bulgular ile uyumluluk göstermektedir.

4.4.4. mPGMA Mikrokürelerin ESR Analizi

Manyetik partiküllerin pratik uygulamalardaki önemli parametresi magnetizasyondur. Şekil 4.6'da manyetik alana (Gauss) karşı manyetit pikinin şiddeti görülmektedir. Elektron spin rezonans ile manyetik mikrokürelerin geniş ve asimetrik bir rezonans eğrisine sahip olduğu belirlenmiş ve polimerik yapı içinde manyetit partiküllerin varlığı gözlenmiştir.



Şekil 4.6 mPGMA mikrokürelerin ESR spektrumu

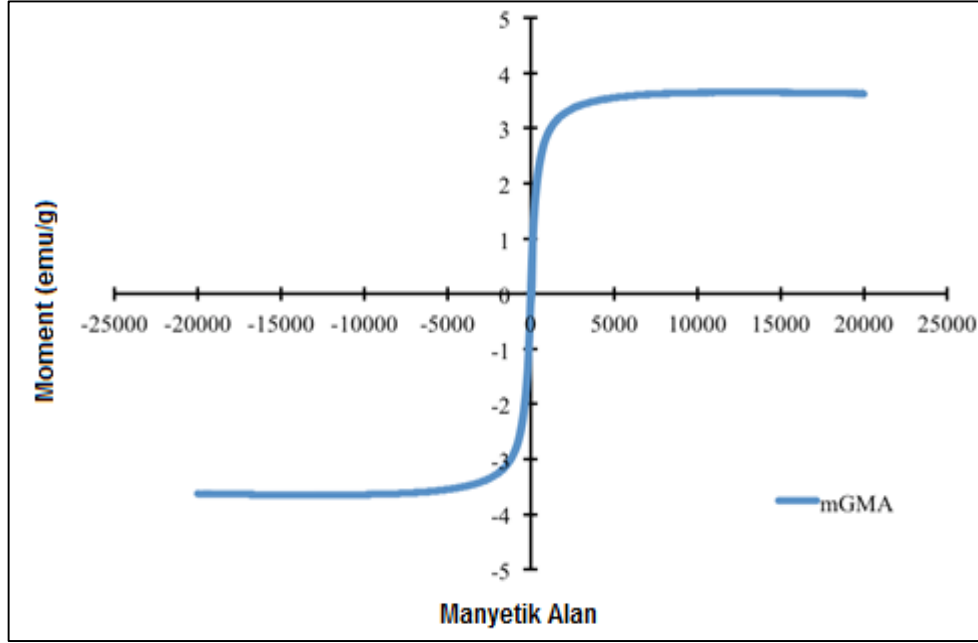
Şekil 4.6'da verilen Hr değeri ortaklanmamış elektronları içeren moleküllerin kantitatif karakteristiği olarak ele alınabilir. Bilinmeyen bir sinyal için g faktörünün hesaplanması sinyalin kaynağının belirlenmesi bakımından önemlidir. Literatürde Fe³⁺ için (düşük ve yüksek spin kompleksleri) g faktörü değerleri sırasıyla 1.4-3.1 ve 2.0-9.7 aralıklarında belirlenmiştir [162]. Bu çalışmada aşağıdaki eşitlik kullanılarak mPGMA mikroküreler için g faktörü 2.17 olarak hesaplanmıştır (Eş. 4.2).

$$g = h \cdot \nu / \beta \cdot H_r \quad (\text{Eş. 4.2})$$

Bu eşitlikte, h; Planck sabiti (6.626×10^{-27} erg.s⁻¹); β ; evrensel sabit (9.274×10^{-21} erg/G); ν ; frekans (9.707×10^9 Hz) ve Hr manyetik alan rezonansıdır (G).

4.4.5. mPGMA Mikrokürelerin VSM Analizi

mPGMA mikrokürelerin manyetiklik derecesi, titreştirici örnek manyetometresi (Quantum Design, Physical Properties Measurement System (PPMS), ABD) kullanılarak manyetik alanda ölçüldü. Polimerik yapının manyetik özellikleri elektromanyetik ünite kullanılarak (EMU) gösterildi. Şekil 4.7’de VSM ile elde edilen manyetizma eğrisi gösterilmektedir.



Şekil 4.7. mPGMA mikrokürelerin manyetizma eğrisi.

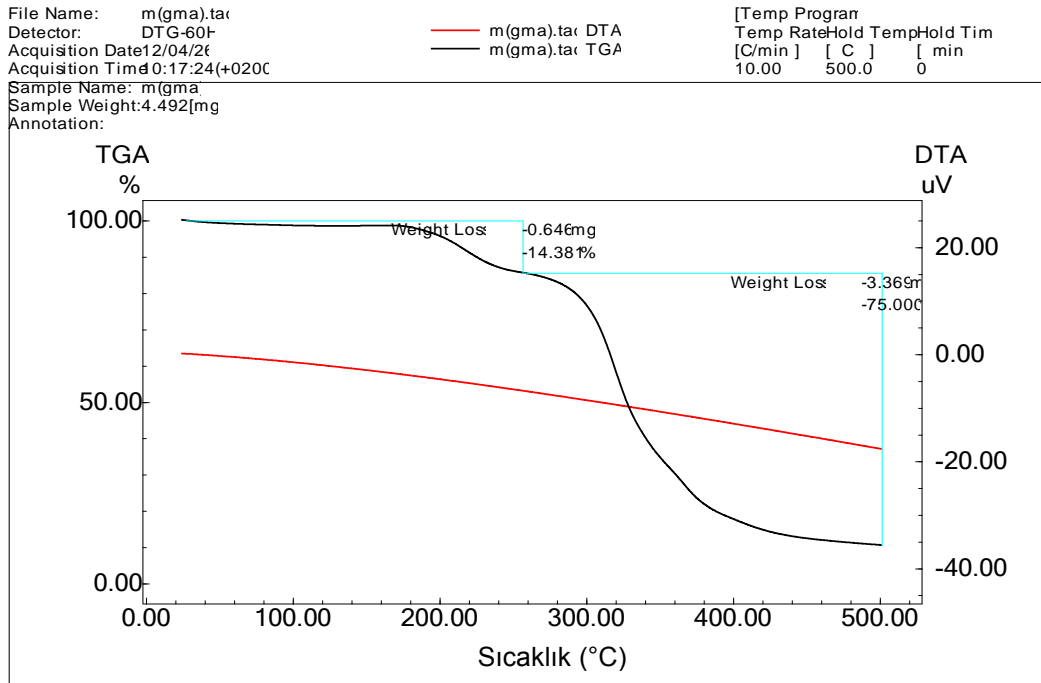
Manyetik histerezis eğrisinin ‘S’ şeklinde olması, sentezlenen mPGMA mikrokürelerin superparamanyetik özellik gösterdiğini açıklamaktadır. Manyetik ayırma proteinleri ya da diğer biyomolekülleri yakalamak için kullanılan hızlı ve basit bir yöntemdir. Bu işlem için süperparamanyetik partiküller kullanılması tercih edilmektedir. Çünkü partiküller dış manyetik alan uygulandığında hemen mıknatıslanırlar ve manyetik alan kaldırıldığında hemen tekrar dispers olabilirler. Literatürde yer alan birçok çalışmada manyetik partiküller hazırlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, silika kaplı nanopartiküller hazırlanmış ve doyum magnetizasyon değeri 2 emu/g olarak bulunmuştur [163]. Diğer bir çalışmada, m-PGMA partiküller için doyum magnetizasyon değeri 13 emu/g olarak rapor edilmiştir [164]. Manyetik polimerik kompozit partiküller için doyum magnetizasyon değeri 2.47 emu/g olarak belirlenmiştir [165]. Bao ve ark. [166] tarafından yapılan çalışmada mPGMA nanopartiküller sentezlenmiş ve doyum magnetizasyon değeri 1.19 emu/g olarak bulunmuştur. Çalışmamızda sentezlenen mPGMA mikrokürelerin doyum

magnetizasyon değeri ise 3.65 emu/g olarak bulunmuştur. Bu değeri, literatürde yapılan diğeri çalışmalar ile uygunluk göstermektedir.

Elde edilen mPGMA mikrokürelerin karakterizasyon sonuçları incelendiğinde, çalışmanın amacına uygun özellikte mikroküreler elde edildiği görülmektedir.

4.4.6. mPGMA Mikrokürelerin Termogravimetrik Analizi (TGA)

şekil 4.8'de görünen değeri, mPGMA mikrokürelerin yapılarında inorganik manyetit varlığını kanıtlamaktadır. Termogravimetrik analiz 50 cm³/dk hava akış hızı ve 10°C/dk ısıtma hızıyla 0°C'den 500°C'ye ısıtılarak gerçekteşirilmiş ve ağırlık kayıpları incelenmiştir.



şekil 4.8. mPGMA mikrokürelerin TGA ve DTA grafikleri.

şekildeki siyah eğri termogravimetrik analiz (TGA) grafiği olup sıcaklık değişimine bağlı ağırlık kaybını verir, kırmızı eğri ise diferansiyel termal analiz grafiği olup (DTA) endotermik veya ekzotermik reaksiyonların izlenmesini sağlar. Burada ilk olarak fiziksel olarak adsorplanmış su yapıdan ayrılır. Daha sonra polimer erimeye başlar ve sıcaklık artışı ile birlikte polimer artık termal bozunmaya uğramış durumdadır. Yapıdan geriye sadece yüksek sıcaklıklara dayanabilen inorganik bir madde türü olan manyetit kalmıştır. şekil 4.8'de mPGMA mikrokürelerin yapılarında % 25 oranında inorganik manyetit olduğunu göstermektedir. Polimerik partiküllerin yüksek manyetit içeriği, bir dış manyetik alan içerisinde kuvvetli bir

manyetik duyarlılığa sahip olduklarının kanıtıdır. Böylece manyetik polimerler dış manyetik alana doğru çok hızlı bir şekilde hareket edip, çok kısa bir sürede de sudan tamamen ayrıştırılabilirler [167]. Sonuç olarak sentezlenen mPGMA mikrokürelerin manyetizma özelliklerinin manyetik ayırma işlemleri için yeterince kuvvetli olduğu tespit edilmiştir.

4.5. mPGMA Mikrokürelerin Aktivasyonu

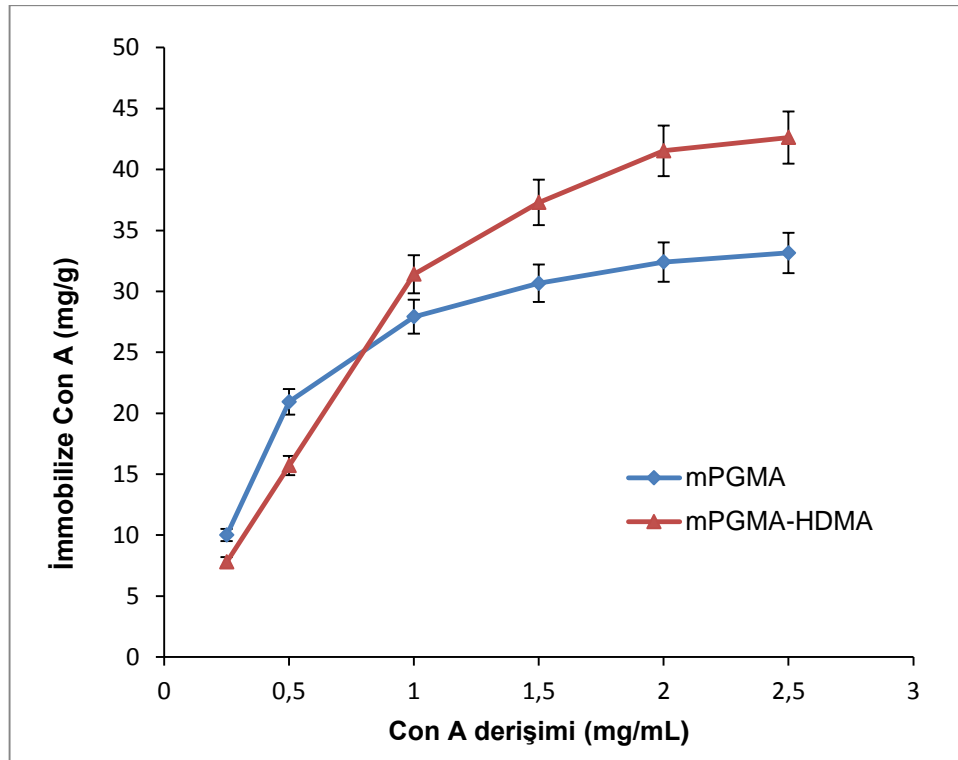
GMA, fonksiyonel grupları kolaylıkla modifiye edilebilen bir monomerdur. GMA polimerize olduğunda epoksi grupları, aminler, alkoller, fosforik asitler, proteinler gibi grupların yapıya sokulması için elverişli hale gelmektedir. Epoksit ara maddeler üzerinden afinite desteklerin hazırlanmasında ilgi çeken faktörler arasında reaksiyon özgüllüğü, aktive edilen destek materyalin depolama kararlılığı ve bağların kararlılığı sayılabilir. PGMA'nın kimyasal modifikasyonu genellikle epoksi halkasının açılması yoluyla β -karbon atomundaki hidroksil grubu oluşması ile gerçekleşmektedir [148]. Ligand immobilizasyonundan önce, mPGMA mikrokürelerin epoksi gruplarının aktivasyonu için alkali hidroliz yöntemi uygulanmaktadır [144]. Literatürde epoksi halkasının açılması için pH 10 karbonat tamponu veya 4 M NaOH kullanıldığı görülmektedir. Bu amaçla çalışmamızda da Con A immobilizasyonu öncesinde, mPGMA mikroküreler pH 10 karbonat tamponu ile muamele edilmiştir.

Glutaraldehit, biyofonksiyonel çapraz bağlayıcı özelliğine sahip, beş karbonlu bir alifatik dialdehittir. Reaktif oksiran halkası ve aldehit grubu destek materyal yüzeyine enzim ve proteinlerin bağlanmasına olanak sağlar. Glutaraldehit aktivasyonu ile amino grubu içeren destek materyallere enzim immobilizasyonu ve protein saflaştırılması kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir [148]. Bu amaçla literatürde daha önce yapılan çalışmalarda çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanıldığı görülmektedir.

Altıntaş ve ark. [131] tarafından yapılan çalışmada, kesikli sistemde lizozim saflaştırılması için mPGMA mikroküreler sentezlenmiştir. Buna ek olarak, çalışmamız ile benzer olarak uzatıcı kol olarak HDMA kullanılmış ve glutaraldehit aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan başka çalışmalarda ise invertaz [169] ve inülinaz [170] enzimlerinin immobilizasyonu için Con A immobilize poly(EGDMA) (etilen glikol dimetakrilat) kriyojel hazırlanmış ve glutaraldehit ile aktive edilmiştir.

4.6. mPGMA Mikrokürelere Ligand İmmobilizasyonu

Çalışmamızda mPGMA ve mPGMA-HDMA mikrokürelere adsorpsiyon öncesinde Con A immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.9'da görüldüğü üzere ortamda ligand derişiminin artması ile bağlanan ligand miktarı başlangıçta doğrusal olarak artmıştır. mPGMA ve mPGMA-HDMA mikrokürelere için 2 mg/mL ligand derişiminden sonra bağlanan ligand miktarında kayda değer bir artış olmadığı görülmektedir. Bu durum polimer yüzeyinde, GMA monomerince yapıya kazandırılan epoksi gruplarının ligand moleküllerince sterik engellemelerin söz konusu olmayacağı noktaya kadar tamamen doldurulduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9. mPGMA ve mPGMA-HDMA mikrokürelere ligand immobilizasyonuna ortamdaki ligand derişiminin etkisi.

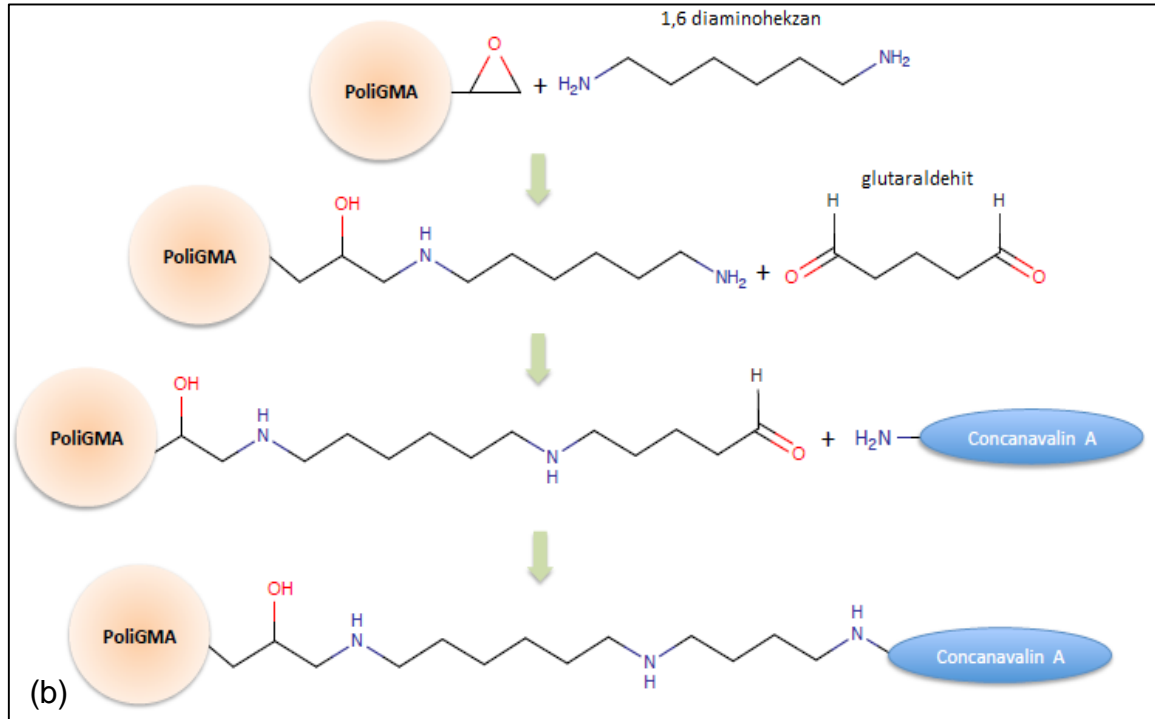
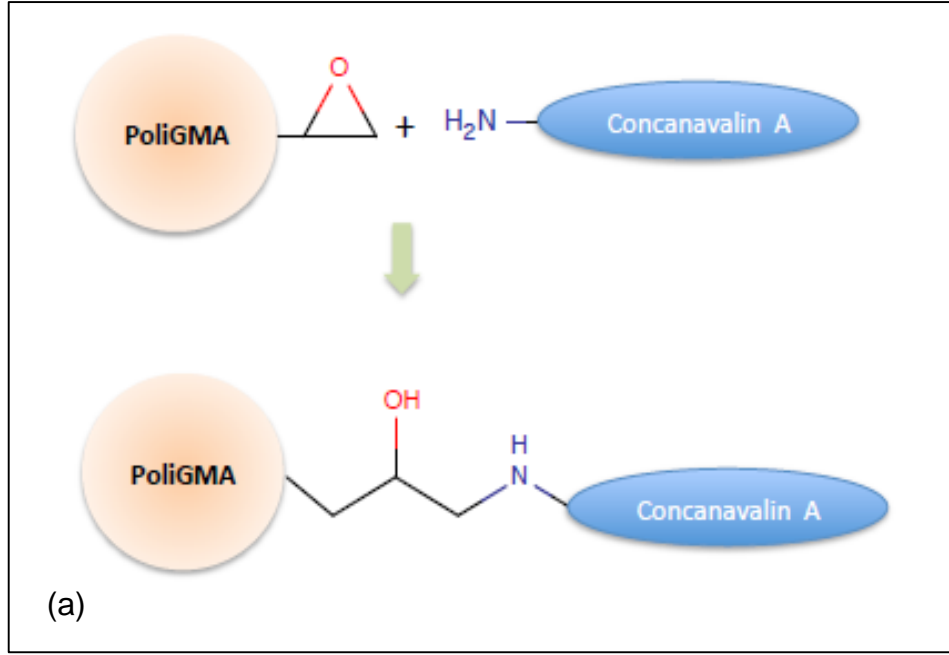
Bu çalışmada, 2 mg/mL Con A derişiminde, gram mPGMA mikroküre başına 32.4 mg ligand bağlandığı ve maksimum 2.5 mg/mL Con A derişiminde, immobilizasyonun gram partikül başına 33.1 mg değerinde platoya ulaştığı görülmüştür. Ayrıca mikrokürelere takılan uzatıcı kolun ligand bağlanması üzerine etkisi de araştırılmıştır. Bunun sonucunda, 2 mg/mL Con A derişiminde, gram mPGMA-HDMA mikroküre başına 41.5 mg ligand bağlandığı ve maksimum 2.5 mg/mL Con A derişiminde, immobilizasyonun gram partikül başına 42.6 mg değerinde platoya ulaştığı görülmüştür. Birnur ve ark. [168] yaptıkları çalışmada 2

mg/mL Con A derişiminde, gram mPGMA mikroküre başına 6 mg ligand bağlandığı ve maksimum 4.0 mg/mL Con A derişiminde, immobilizasyonun gram partikül başına 12.5 mg değerinde platoya ulaştığı görülmüştür. Diğer bir çalışmada invertaz adsorpsiyonu amacıyla hazırlanan PHEMA mikroküreler için maksimum Con A immobilizasyonu 10 mg/g olarak bulunmuştur. Literatürde daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada mPGMA mikrokürelere Con A immobilizasyonunun oldukça başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği saptanmıştır.

mPGMA mikrokürelerin epoksi grupları pH 10 karbonat tamponu ile açıldıktan sonra ligand bağlanmıştır. mPGMA-HDMA mikrokürelere ise uzatıcı kol takıldıktan sonra, çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak ligand bağlanması gerçekleştirilmiştir. Ligand bağlanması, Con A molekülündeki serbest amin grupları ile mPGMA mikrokürelerdeki hidroksil grupları arasında meydana gelen etkileşim ile mümkün olmaktadır (Şekil 4.10).

4.7. Serumdan Yüksek Derişimde Bulunan Proteinlerin Uzaklaştırılması

Hastalıklara özgü biyoişaretlerin tanımlanması için serum oldukça zengin bir kaynak olması nedeniyle proteom çalışmaları açısından çok önemlidir. Bununla beraber, serumda bulunan proteinlerin eşit oranda bulunmaması analizleri karmaşık hale getirmektedir. Yüksek derişimde bulunan proteinler düşük derişimde bulunan proteinleri maskeleymektedir. Özellikle insan plazmasında bulunan toplam proteinlerin yaklaşık % 60'ını oluşturan albümin, serum proteomu çalışmalarında engel teşkil etmektedir. Hastalıklara özgü proteinlerin analizlerini kolaylaştırmak amacıyla yüksek derişimde bulunan serum proteinlerinin uzaklaştırılması gerekmektedir [145]. Son yıllarda, yeni nesil polimerik sistemler olarak kriyojeller kolay hazırlanabilmeleri ve mükemmel akış özellikleri nedeniyle biyomoleküllerin ayrılmasında kullanılmaktadırlar. Kriyojellerin geniş gözeneklere sahip olması ve kolonda yüksek basınç oluşmaması, kan gibi viskoz ortamlarda çalışıldığında çok büyük kolaylık sağlamaktadır. PHEMA temelli makrogözenekli polimerik kriyojeller vücut sıvısı, hücre ve proteinleriyle biyouyumluluk göstermekle beraber, fizyolojik koşullarda da oldukça kararlıdırlar [131]. Serumdan yüksek derişimde bulunan proteinlerin uzaklaştırılması için çeşitli ticari kitler geliştirilmiştir [45].



Şekil 4.10. a) mPGMA mikrokürelere Con A immobilizasyonu b) mPGMA-HDMA-mikrokürelere Con A immobilizasyonu.

Ancak, pek çok medikal uygulamada kullanılan bu kitlerin satış fiyatları oldukça yüksektir. Protein çalışmalarında hem uygulanabilirliği kolay olan hem de zaman-maliyet açısından ekonomik çalışma imkanı sunan yöntemler ve malzemeler tercih

edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan PHEMA kriyojel bu özelliklere sahip bir sistemdir.

Boya afinite kromatografisi, plazmadan albümin uzaklaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemin dikkat çekici yanı doğal moleküllerin alternatifi olarak ligand olarak boya kullanılmasıdır. Boya ligandlar birçok proteine, doğal moleküllerde olduğu gibi özgül olarak bağlanabilmektedir. Söz konusu ligandlar, kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyetli olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Kullanılan boyalar tekstil boyası olarak bilinen oldukça ucuz ve uygun çalışma imkanı sağlayan malzemelerdir [17]. Literatürde albümin uzaklaştırmak amacıyla pek çok çalışma yapılmış ve ligand olarak Cibacron mavisi-F3GA bağlı farklı destek malzemeleri kullanılmıştır. Zhang ve ark. [172] Cibacron mavisi-F3GA bağlı aminli kitosan mikroküreler ile yaptıkları çalışmada 108.7 mg/g albümin adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır. Gu ve ark. [173] Cibacron mavisi-F3GA bağlı mikrogözenekli politetrafloroetilen kapiler membran çalışması yapmışlar ve 198.5 mg/g albümin adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır. Öznur ve ark. [174] Cibacron mavisi-F3GA/m-PHEMA nanoküreler ile insan serum albümininin plazmadan tek adımda % 42.35 verimle ayrıldığını göstermişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise, Cibacron mavisi-F3GA-PGMA mikroküreler ile albümin etkin bir şekilde uzaklaştırılmış ve % 99.3 oranında verim elde edilmiştir [175]. Cibacron mavisi-F3GA'nın ligand olarak kullanıldığı Aurum Serum Protein Minikit (Bio-Rad, ABD) için de albümin uzaklaştırma oranı % 96.3 olarak bildirilmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda hasta ve sağlıklı bireylerin serumlarından albümin uzaklaştırılması amacıyla Cibacron mavisi-F3GA bağlı PHEMA kriyojel kullanılması tercih edilmiştir.

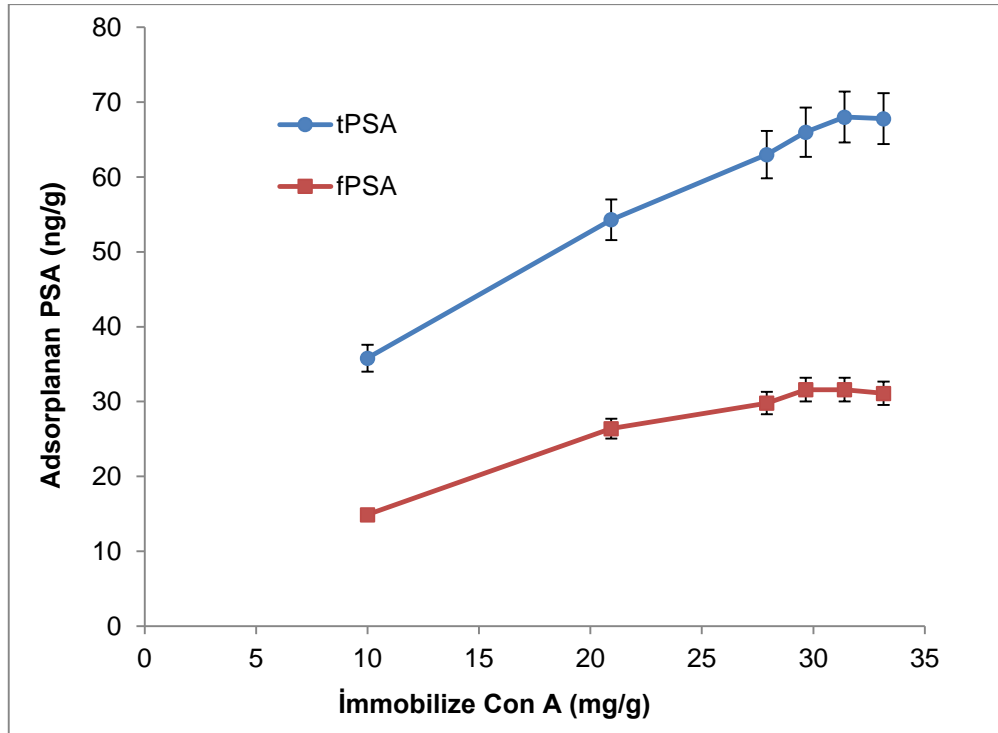
Literatürde IgG adsorpsiyonuna ilişkin yapılan çalışmalarda yüksek afinite ve özgüllük göstermeleri nedeniyle [176] özellikle protein A ya da protein G immobilize kolonların kullanıldığı görülmektedir [177]. Uzun ve ark. [43] nanoProA gömülmüş kriyojel ile IgG uzaklaştırmada % 99.3 oranında verim elde etmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda, serumdan IgG uzaklaştırılması amacıyla GE Healthcare firmasından temin edilen Hitrap Protein A FF kolonu kullanılmıştır. Şekil 4.34'de serumdan uzaklaştırılan albümin ve IgG gösterilmiştir.

4.8. Adsorpsiyon Çalışmaları

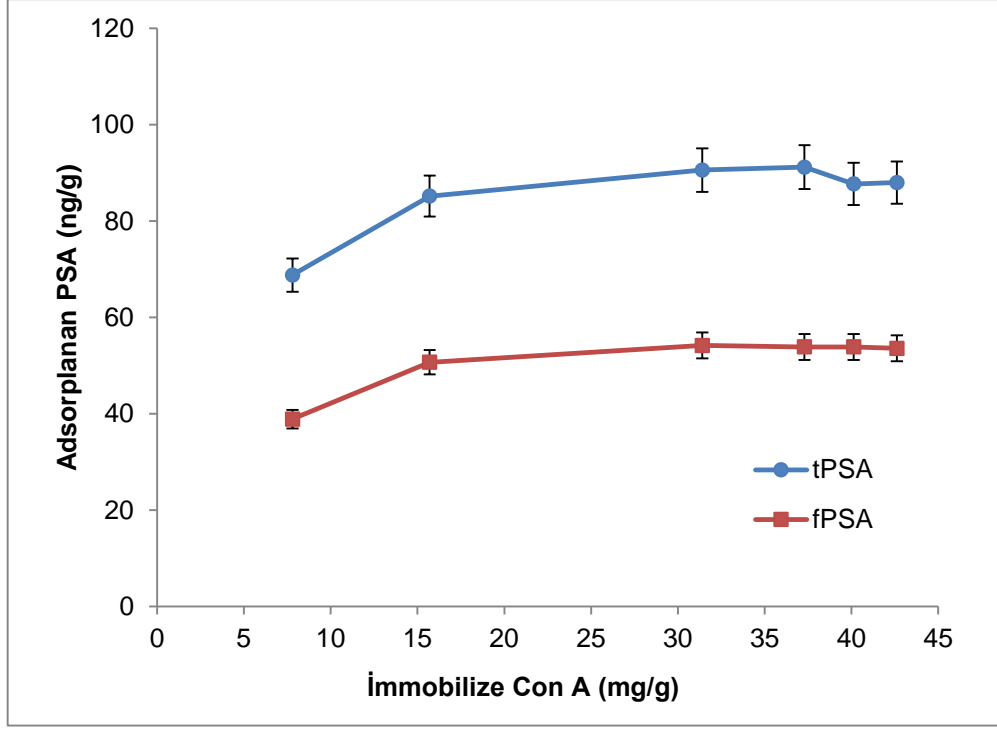
4.8.1. mPGMA-ConA ve mPGMA-HDMA-ConA Mikrokürelere PSA Adsorpsiyonu

mPGMA-ConA ve mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere serumdan PSA adsorpsiyonu kesikli sistemde çalışıldı. Yüklenen ligand miktarının fPSA ve tPSA adsorpsiyonuna etkisi mPGMA-ConA mikrokürelere için Şekil 4.11’de, mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere için Şekil 4.12’de verilmiştir.

Şekil 4.11’de görüldüğü gibi, mPGMA-ConA mikrokürelere için maksimum tPSA adsorpsiyonu 68 ng/g ve fPSA adsorpsiyonu 31.6 ng/g, Şekil 4.12’de görüldüğü gibi mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere için ise tPSA adsorpsiyonu 91.2 ng/g ve fPSA adsorpsiyonu 53.9 ng/g olarak bulundu. Elde edilen bulgular incelendiğinde, mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere kullanılarak gerçekleştirilen fPSA ve tPSA adsorpsiyonunun mPGMA-ConA mikrokürelere göre daha fazla olduğu belirlendi. Bu nedenle tPSA adsorpsiyonu için bulunan değer (91.2 ng/g) göz önünde bulundurulduğunda çalışmanın devamında 37.3 mg/g ligand yüklü mPGMA-HDMA mikrokürelere (10 mg) kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.11. Yüklenen ligand miktarının mPGMA-ConA mikrokürelere PSA adsorpsiyonuna etkisi. Hareketli faz: pH 7.4 fosfat tamponu, örnek hacmi: 1 mL serum (1/20), m_{kuru} : 10 mg, T: 25°C.

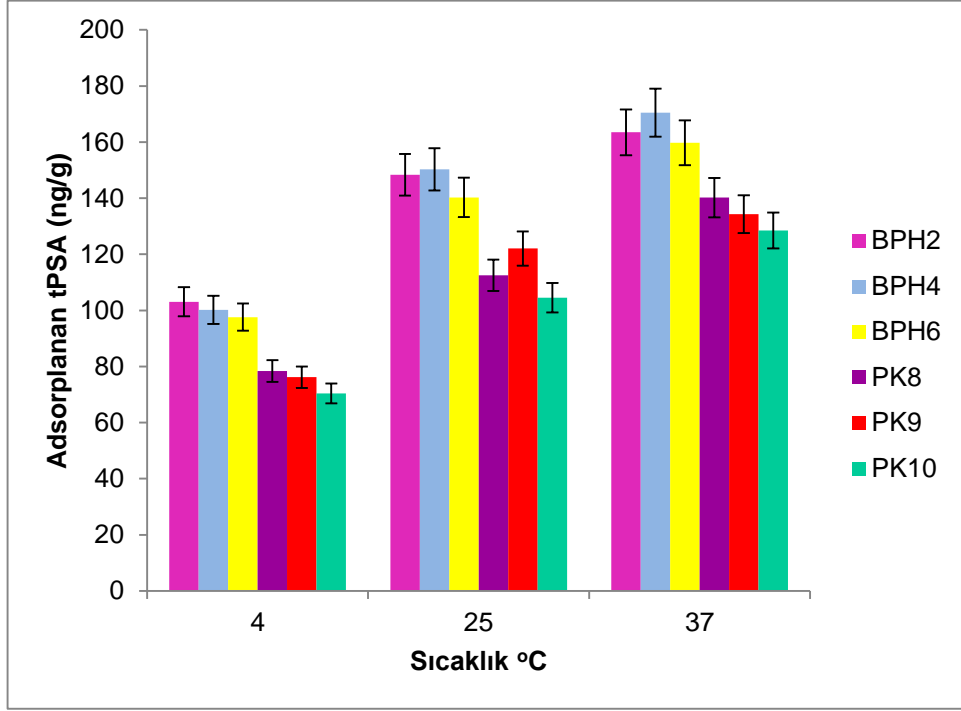


Şekil 4.12. Yüklene ligand miktarının mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PSA adsorpsiyonuna etkisi. Hareketli faz: pH 7.4 fosfat tamponu, örnek hacmi: 1 mL serum (1/20), m_{kuru}: 10 mg, T: 25°C.

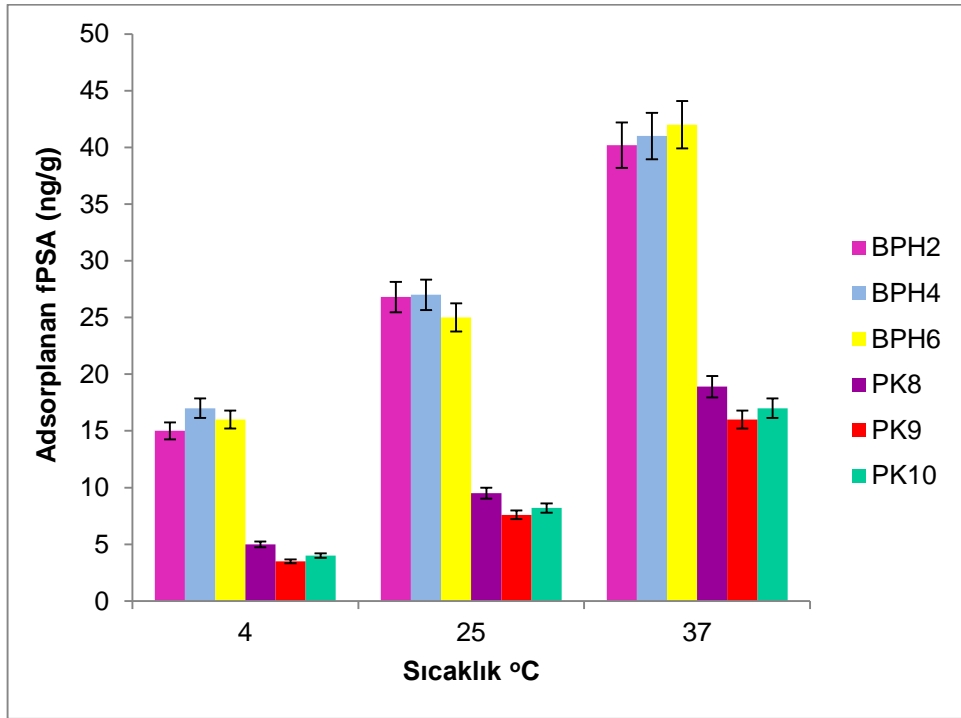
4.8.2. Sıcaklığın etkisi

mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA ve fPSA adsorpsiyon kapasitesindeki sıcaklığa bağlı değişim sırasıyla Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de verilmiştir. Bu grup deneylerde üç farklı sıcaklığın (4, 25, 37°C) etkisi incelendi. PSA'nın yüksek sıcaklıklarda konformasyonel yapısı bozulabileceğinden bu çalışmada insan vücut sıcaklığının (37°C) üzerine çıkılmadı. Görüldüğü gibi sıcaklığın artması ile birlikte adsorpsiyon kapasitesi artmış ve en yüksek tPSA ve fPSA adsorpsiyonu sırasıyla 170.5 ng/g - 42 ng/g olarak 37°C'de gözlemlendi. PSA adsorpsiyonunun 37 °C'de daha yüksek olması bu sıcaklıkta hem Con A hem de PSA'nın birbirleri ile en iyi şekilde etkileşebilecek uygun konformasyonlarda olduklarını göstermektedir. Ayrıca sıcaklığın 4°C'den 37°C'ye çıkması ile birlikte adsorpsiyon kapasitesinin artması PSA'nın Con A'ya bağlanmasında hidrofobik etkileşimlerin de var olduğunu göstermektedir. Sıcaklığın artması dengeyi düzenli su formundan serbest su formuna kaydırmakta, böylece suya maruz kalan hidrofobik yüzeyler azalmaktadır. Bu durum hidrofobik yüzeylerin biraraya gelerek daha kolay etkileşmelerini sağlamaktadır [178]. Böylece hidrofobik etkileşimler PSA adsorpsiyonunda etkili olmaktadır. Ayrıca sıcaklığın artması ile birlikte van der

Waals çekim kuvvetleri de artmaktadır [179]. Bu durum çalışmamızda sıcaklığın artması ile birlikte PSA adsorpsiyon kapasitesinin de artmasını açıklamaktadır.



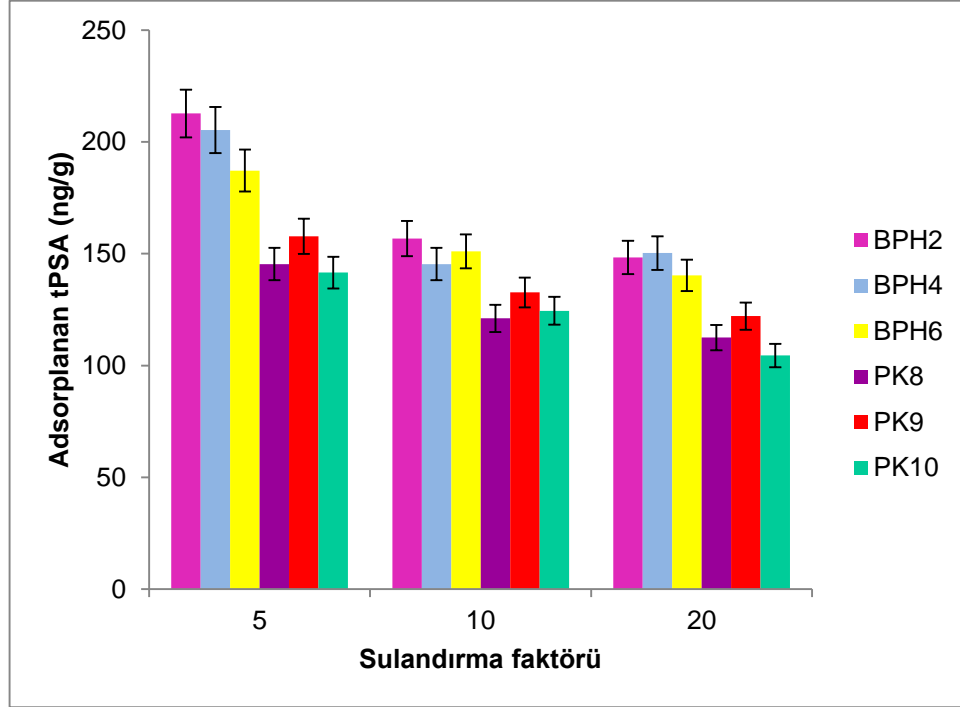
Şekil 4.13. Sıcaklığın mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA adsorpsiyonuna etkisi. Hareketli faz: pH 7.4 fosfat tamponu, örnek hacmi: 1 mL serum (1/20), m_{kuru}: 10 mg.



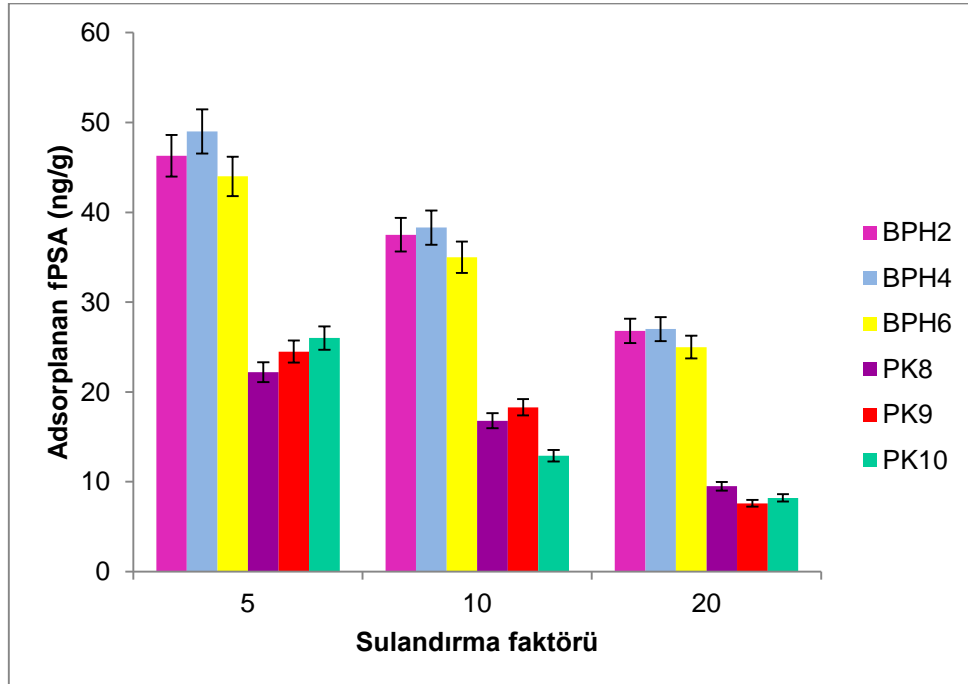
Şekil 4.14. Sıcaklığın mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere fPSA adsorpsiyonuna etkisi. Hareketli faz: pH 7.4 fosfat tamponu, örnek hacmi: 1 ml serum (1/20), m_{kuru}: 10 mg.

4.8.3. Başlangıç Serum Derişiminin Etkisi

mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA ve fPSA adsorpsiyon kapasitesine başlangıç serum derişiminin etkisi sırasıyla Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.15. Başlangıç serum derişiminin mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA adsorpsiyonuna etkisi. Hareketli faz: pH 7.4 fosfat tamponu, örnek hacmi: 1 mL serum, m_{kuru} : 10 mg, T: 25°C.

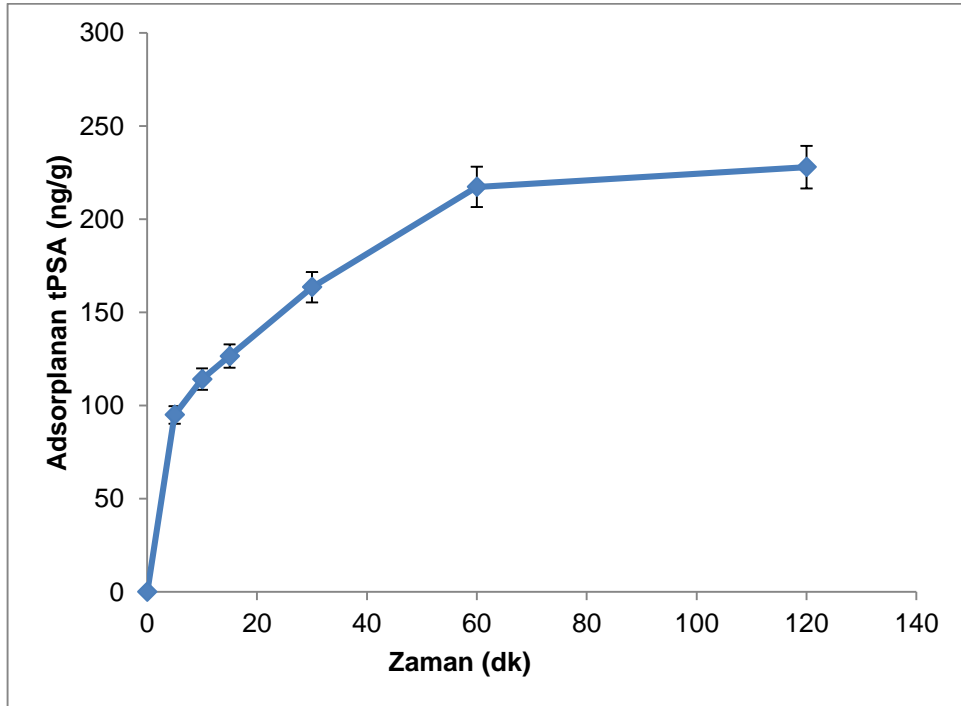


Şekil 4.16. Başlangıç serum derişiminin mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere fPSA adsorpsiyonuna etkisi. Hareketli faz: pH 7.4 fosfat tamponu, örnek hacmi: 1 mL serum, m_{kuru} 10 mg, T: 25°C.

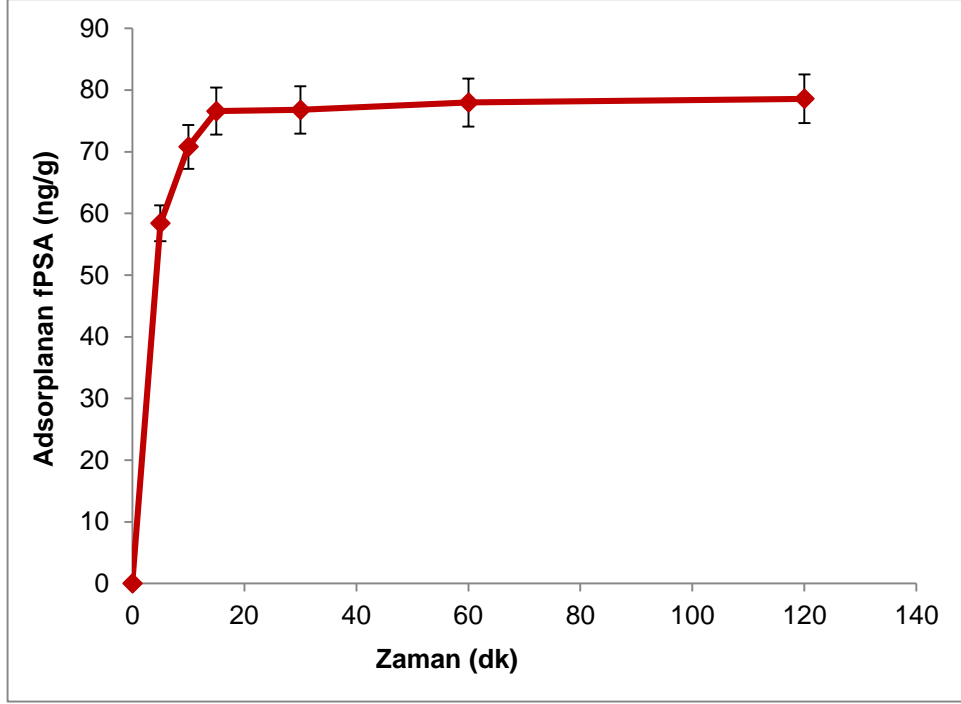
Şekil 4.15 ve 4.16'da görüldüğü gibi, başlangıç serum derişiminin azalması ile birlikte tPSA ve fPSA adsorpsiyonu da azalmıştır. Elde edilen sonuçlar Con A'nın ligand olarak işlevini etkin bir şekilde yerine getirdiğini göstermektedir.

4.8.4. Adsorpsiyon Zamanı

Şekil 4.17 ve 4.18'de sırasıyla fPSA ve tPSA'nın mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi verilmektedir. tPSA adsorpsiyonu ilk 5 dakikada oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşmiş, 60. dakikadan sonra platoya erişmiştir. 1/20 oranında seyreltilmiş serum ile çalışılmış ve 1 g kuru polimer başına adsorplanan PSA miktarı 228 ng olarak bulunmuştur. fPSA adsorpsiyonu ise yine ilk 5 dakikada oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşmiş, 15. dakikadan sonra platoya erişmiştir. 1/20 oranında seyreltilmiş serum ile çalışılmış ve 1 g kuru polimer başına adsorplanan PSA miktarı 78.6 ng olarak bulunmuştur. Şekil 4.17 ve 4.18'den de görüldüğü gibi, ilk 5 dakikada hem tPSA hem de fPSA adsorpsiyonunun hızlı bir şekilde gerçekleşmesi, mPGMA mikrokürelere immobilize olmuş Con A ile PSA arasındaki birbirini tamamlayan şekil uyumu ve ikincil etkileşimlerle sağlanan bağlanma ile ilgili olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.17. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi. Hareketli faz: pH 7.4 fosfat tamponu, örnek hacmi: 1 mL serum (1/20), m_{kuru} : 10 mg, T: 25°C, çalışılan örnek no:PK6.



Şekil 4.18. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere fPSA adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi. Hareketli faz: pH 7.4 fosfat tamponu, örnek hacmi: 1 mL serum (1/20), m_{kuru} : 10 mg, T: 25°C, çalışılan örnek no:PK6.

4.9. Adsorpsiyon Kinetiği

Kütle aktarımı ve kimyasal reaksiyon gibi adsorpsiyon işlemi kontrol eden mekanizmaların belirlenmesi için deneysel verilere birinci ve ikinci derece kinetik modeller uygulanmıştır. Ölçülen derişimlerin adsorbent yüzey derişimine eşit olduğu varsayılmıştır. Lagergren'in birinci derece hız eşitliği (Eş. 4.3) sıvı çözülden çözünenin adsorpsiyonunda en çok kullanılan eşitliktir [180].

$$dq_t/dt = k_1(q_{eq} - q_t) \quad (\text{Eş. 4.3})$$

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

$$\log[q_{eq}/(q_{eq} - q_t)] = (k_1 t)/2.303 \quad (\text{Eş. 4.4})$$

eşitliğini vermektedir. Eş. 4.4 tekrar düzenlenerek doğrusallaştırılabilir:

$$\log(q_{eq} - q_t) = \log(q_{eq}) - (k_1 t)/2.303 \quad (\text{Eş. 4.5})$$

$\log(q_{eq})$ '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:

$$dq_t/dt = k_2 (q_{eq}-q_t)^2 \quad (\text{Eş. 4.6})$$

Eşitlikte k_2 pseudo-ikinci derece hız sabitidir ($\text{gng}^{-1}\text{dk}^{-1}$). 4.4 eşitliğine $t = 0$ da $q_t = 0$ ve $t = t'$ 'de $q_t = q_t$ sınır koşullarının uygulanması ile;

$$1/(q_{eq}-q_t)] = (1/q_{eq}) + k_2 t \quad (\text{Eş. 4.7})$$

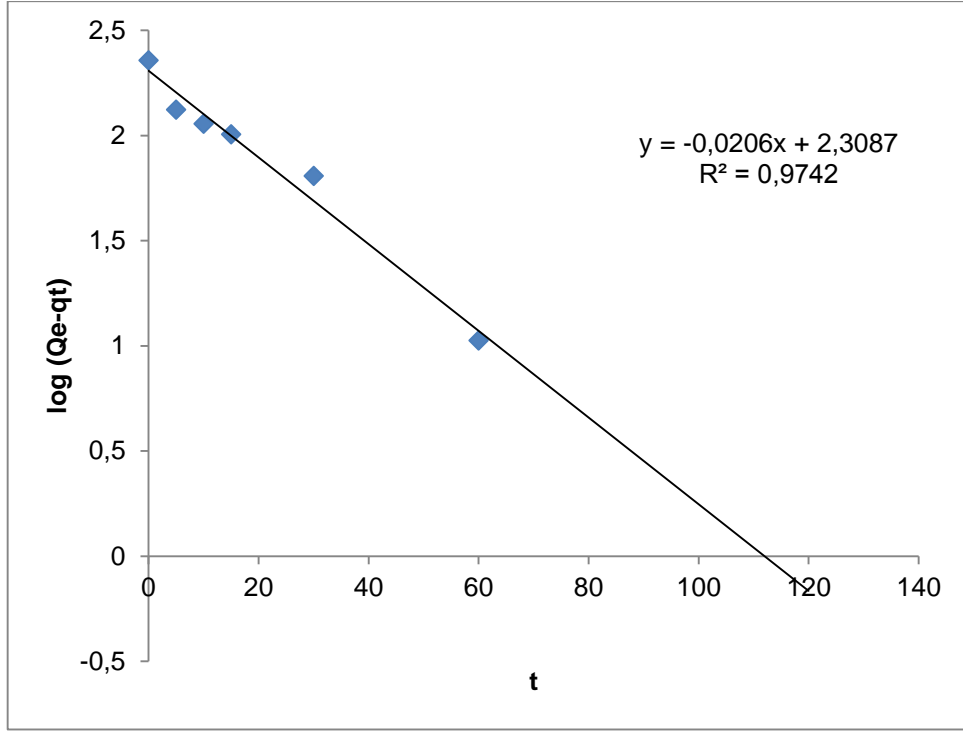
eşitliği elde edilir. Bu eşitliğin doğrusal hali:

$$(t/q_t) = (1/k_2 q_{eq}^2) + (1/q_{eq}) t \quad (\text{Eş. 4.8})$$

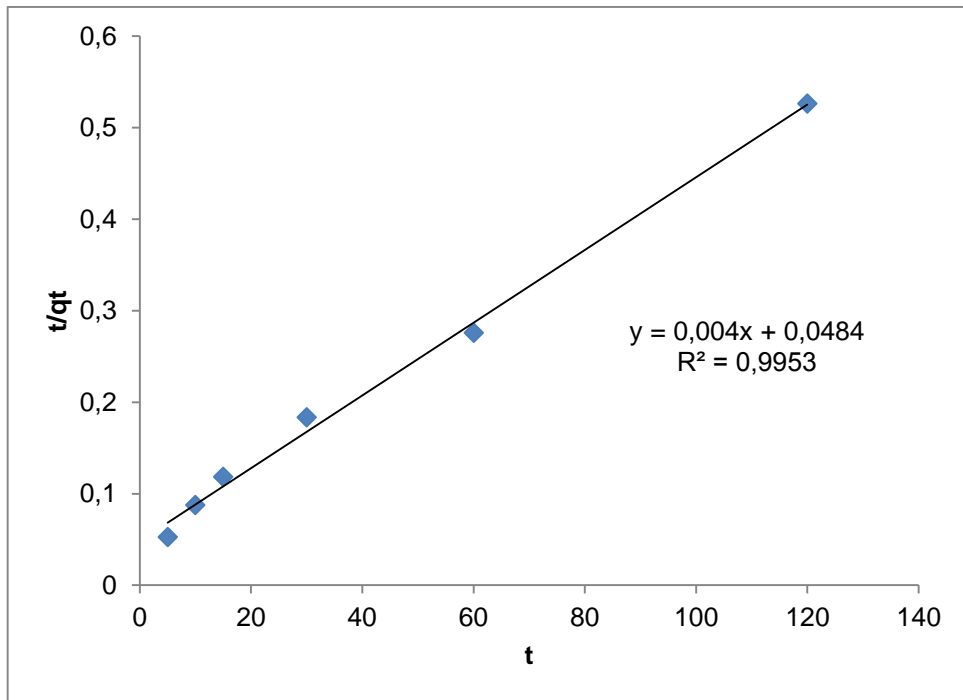
İkinci derece kinetiğin uygulanabilir olması için t/q_t ye karşı t grafiğinin doğrusal olması gereklidir. Hız sabiti (k_2) ve denge adsorpsiyonu (q_{eq}) sırasıyla kesim noktası ve eğimden elde edilebilir.

mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için birinci ve ikinci derece kinetik verileri Şekil 4.19-22'de gösterilmiştir.

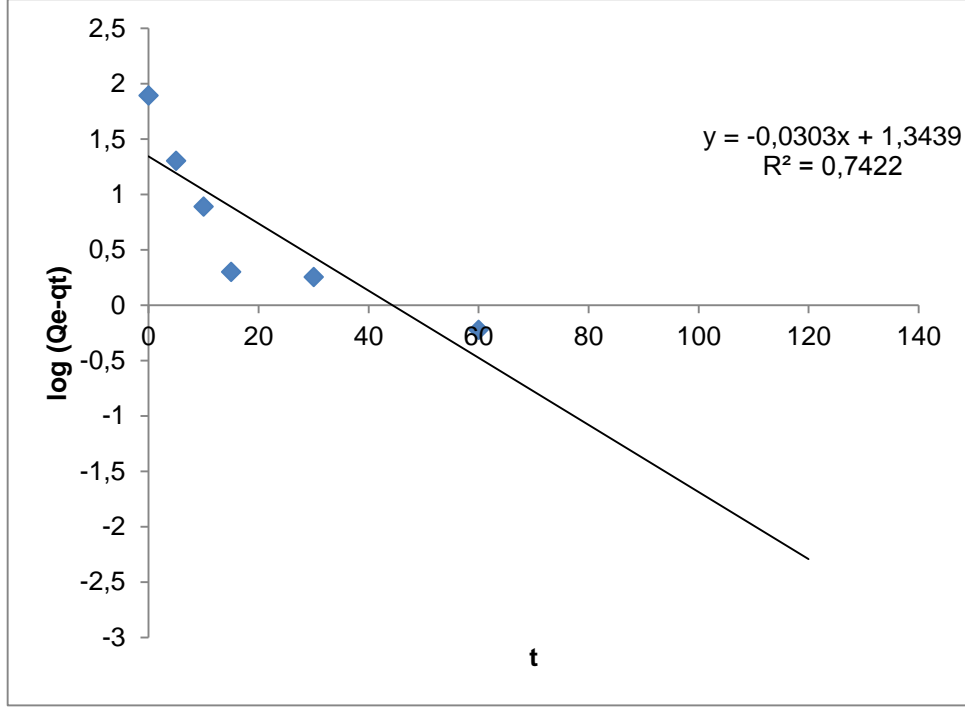
Birinci ve ikinci derece kinetik verileri karşılaştırıldığında, ikinci derece kinetik verilerden elde edilen Q_{eq} değerlerinin (tPSA için $Q=228$ ng/g; fPSA için $Q=78,6$ ng/g) deneysel verilere oldukça yakın olduğu ve korelasyon katsayısının daha yüksek olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar bu deneysel sistemin ikinci derece kinetik model ile açıklanabileceğini göstermektedir. Buna göre PSA'nın mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere adsorpsiyonunda difüzyon kısıtlamaları ihmal edilebilir düzeydedir. Sonuç olarak PSA ile Con A arasında gerçekleşen bağlanma reaksiyonunun kinetik davranışı kontrol ettiği gösterilmiştir.



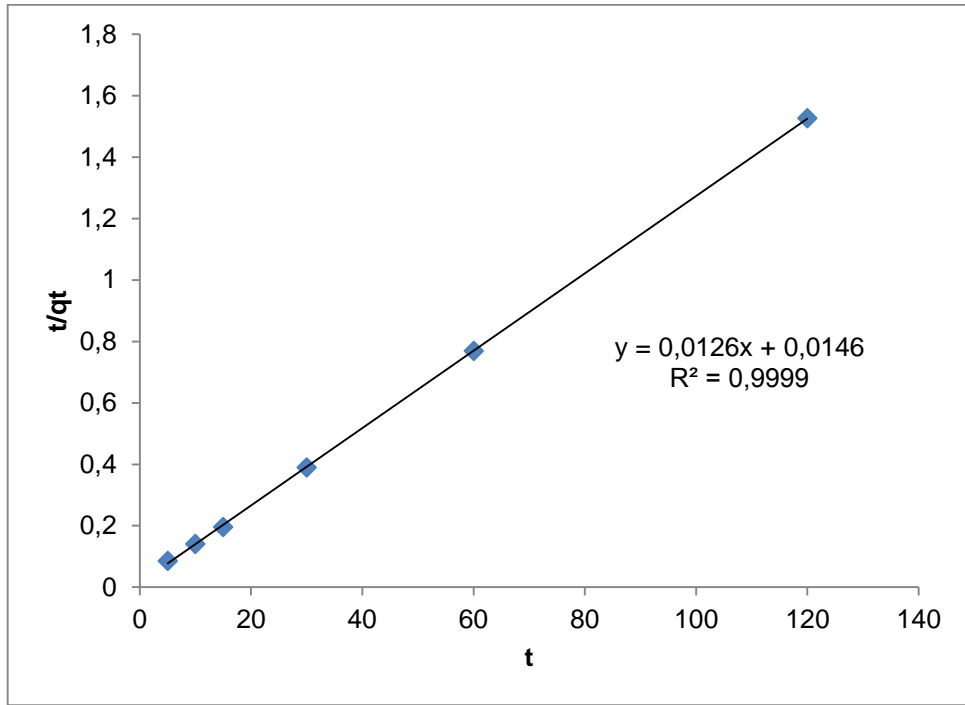
Şekil 4.19. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA adsorpsiyonu için pseudo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.



Şekil 4.20. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA adsorpsiyonu için pseudo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.



Şekil 4.21. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere fPSA adsorpsiyonu için pseudo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.



Şekil 4.22. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere fPSA adsorpsiyonu için pseudo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.

Çizelge 4.3' de mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için birinci ve ikinci derece kinetik verileri özetlenmiştir.

Çizelge 4.3. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için birinci ve ikinci derece kinetik verileri.

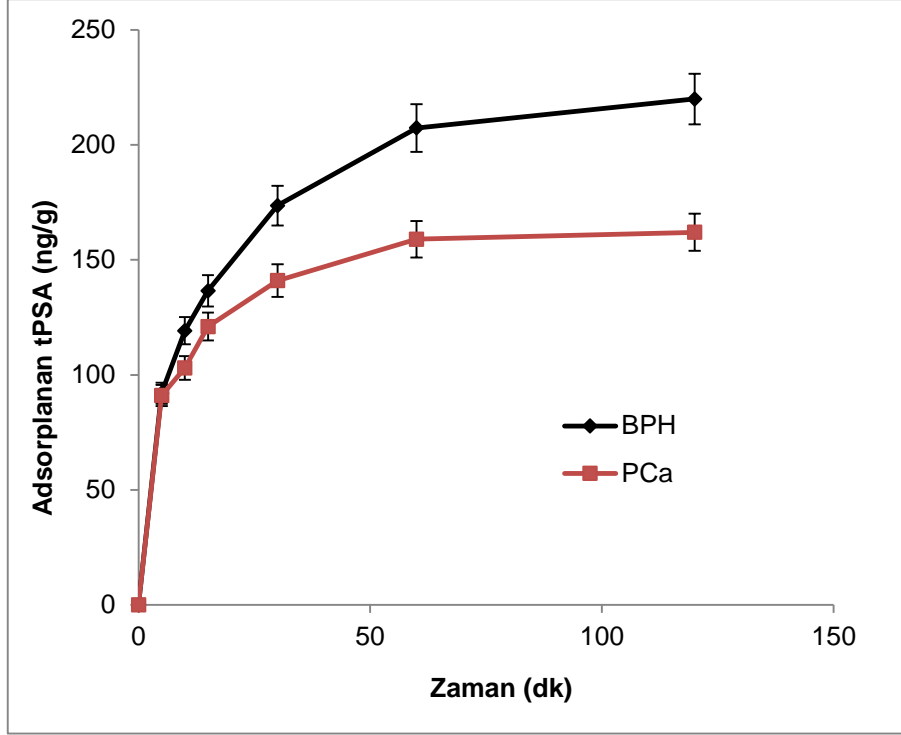
Birinci derece kinetik verileri		İkinci derece kinetik verileri	
tPSA	fPSA	tPSA	fPSA
$k_1 = 0.047$ 1/dk	$k_1 = 0.069$ 1/dk	$k_2 = 0.00033$ g/ng.dk	$k_2 = 0.010874$ g/ng.dk
$q_{eq} = 203$ ng/g	$q_{eq} = 22.074$ ng/g	$q_{eq} = 250$ ng/g	$q_{eq} = 79.365$ ng/g
$R^2 = 0.97$	$R^2 = 0.74$	$R^2 = 0.99$	$R^2 = 0.99$

4.10. Eşit Miktarda tPSA Derişimine Sahip Olan PCa'lı ve BPH'lı Serum Örneklerinden PSA Adsorpsiyonu

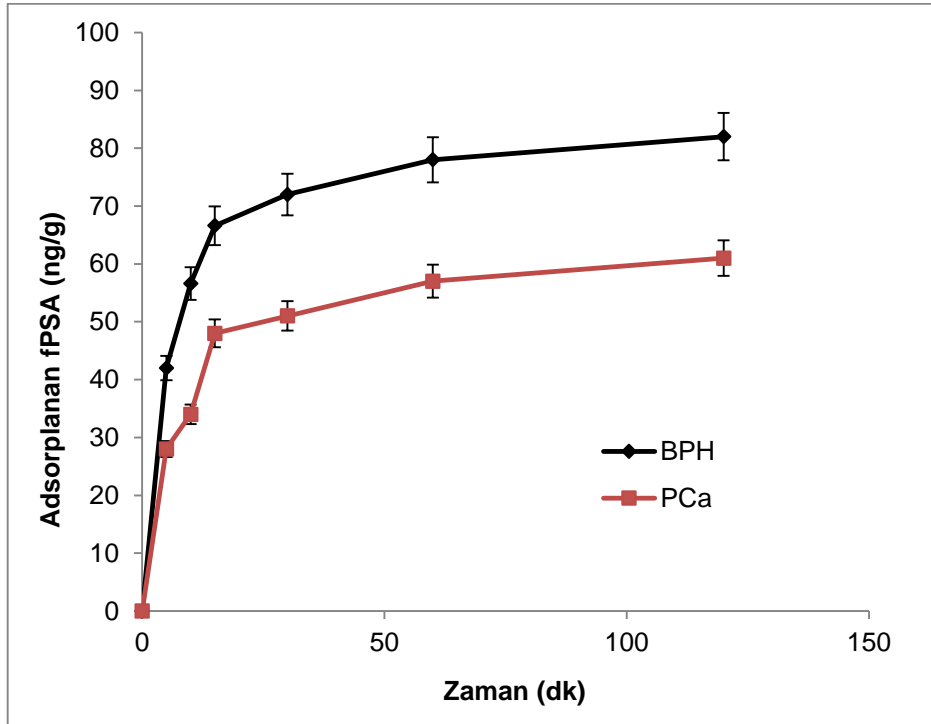
PCa'lı ve BPH'lı serum örneklerinden gerçekleştirilen PSA adsorpsiyonu çalışmalarından elde edilen sonuçlar, BPH'lı örneklerde daha fazla PSA adsorpsiyonu olduğunu göstermektedir. Ancak, kullanılan serum örneklerindeki PSA değerlerinin BPH'da PCa ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmektedir. BPH'da gözlenen yüksek PSA adsorpsiyon kapasitesinin ortamda başlangıçta bulunan PSA miktarı ya da kansere bağlı değişen glikozilasyondan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, eşit miktarda tPSA konsantrasyonuna sahip olan PCa'lı (PK1, tPSA:12.59) ve BPH'lı (BPH3, tPSA:12.39) serum örnekleri kullanılarak mPGMA-HDMA-ConA PSA adsorpsiyonu kesikli sistemde incelenmiştir. BPH'lı hasta serumundan gerçekleştirilen çalışmada adsorpsiyon kapasitesinin daha fazla olduğu görülmüştür. PCa'lı ve BPH'lı hasta serumlarından mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA ve fPSA adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi Şekil 4.23 ve 4.24'de görülmektedir. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı ve BPH'lı serum örneklerinden tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için adsorpsiyon kapasiteleri Çizelge 4.4'de, pseudo-birinci ve ikinci derece adsorpsiyon kinetik verileri ise Şekil 4.25-32'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. PCa'lı ve BPH'lı hasta serumlarından mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için adsorpsiyon kapasiteleri.

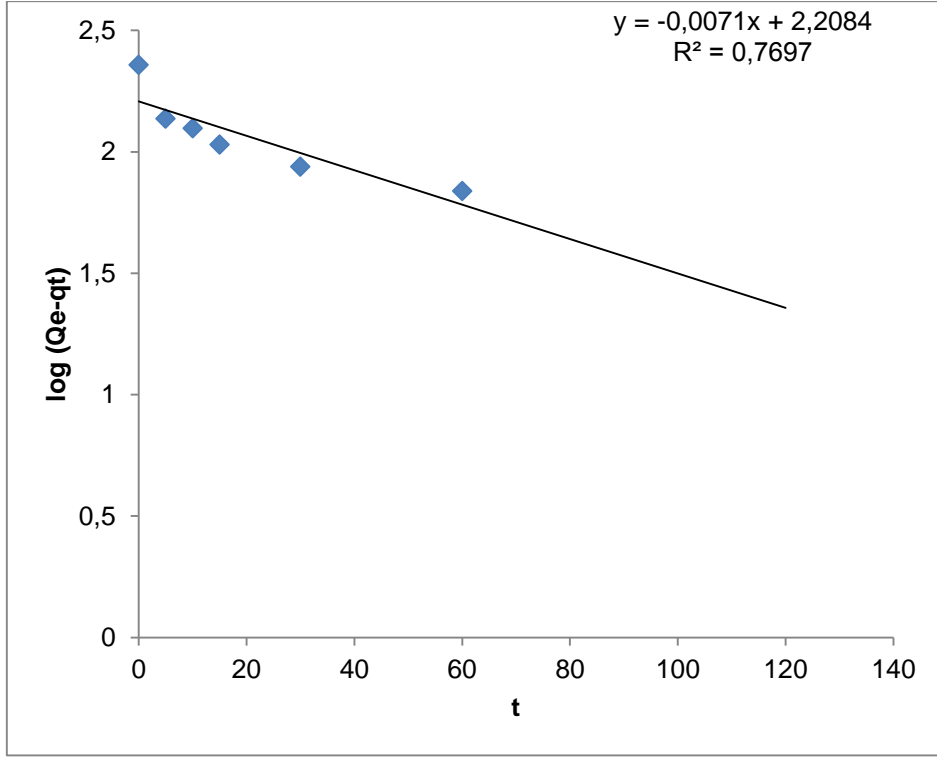
	PCa		BPH	
	tPSA	fPSA	tPSA	fPSA
Adsorpsiyon Kapasitesi (Q)	162 ng/g	61 ng/g	220 ng/g	82 ng/g



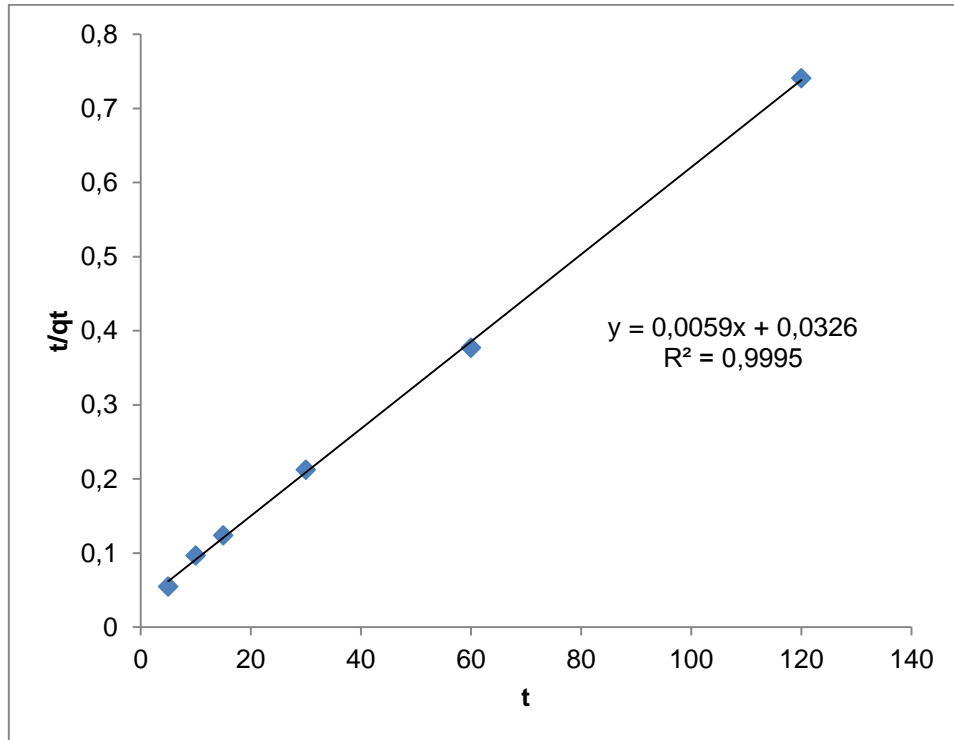
Şekil 4.23. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere BPH'lı ve PCa'lı serum örneklerinden tPSA adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi. Hareketli faz: pH 7.4 fosfat tamponu, örnek hacmi: 1 mL serum (1/20), m_{kuru} : 10 mg, T: 25°C.



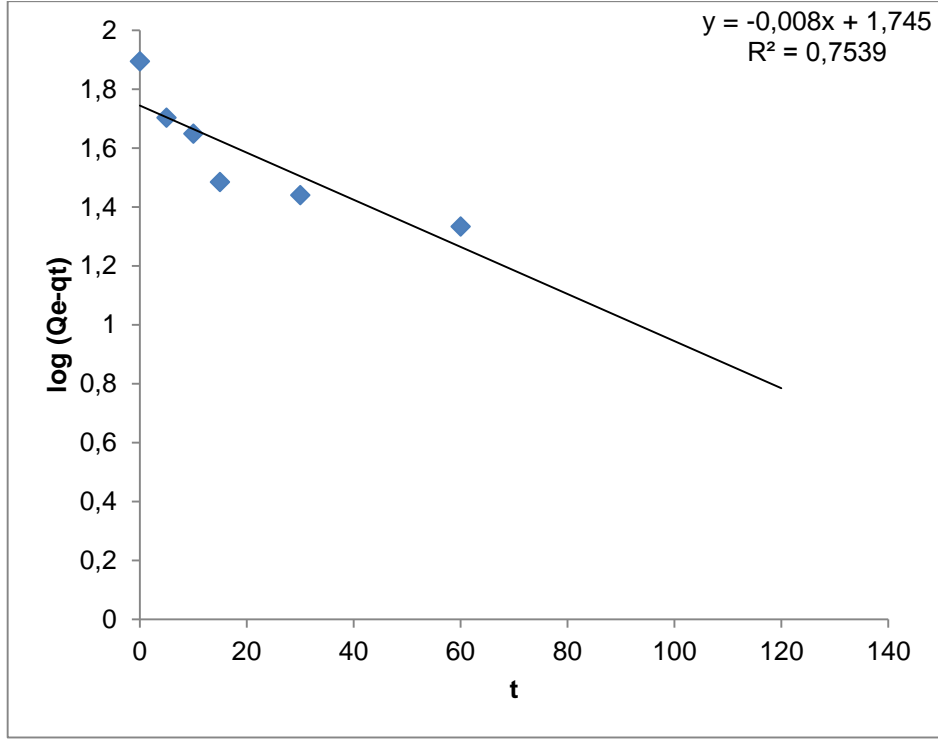
Şekil 4.24. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere BPH'lı ve PCa'lı serum örneklerinden fPSA adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi. Hareketli faz: pH 7.4 fosfat tamponu, örnek hacmi: 1 mL serum (1/20), m_{kuru} : 10 mg, T: 25°C.



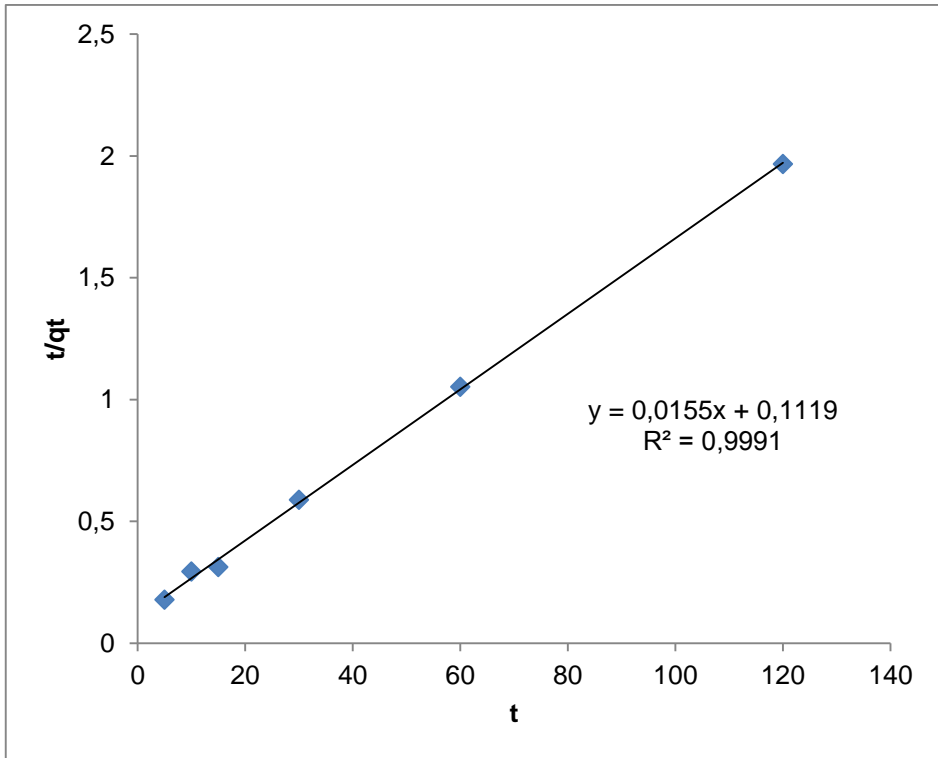
Şekil 4.25. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneğinden tPSA adsorpsiyonu için pseudo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.



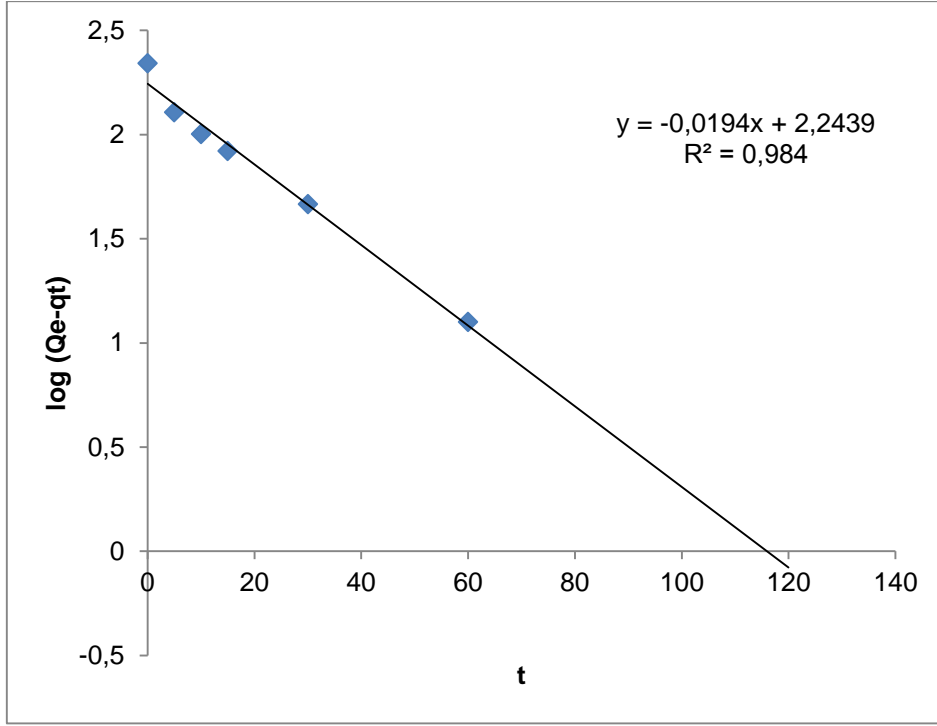
Şekil 4.26. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneğinden tPSA adsorpsiyonu için pseudo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.



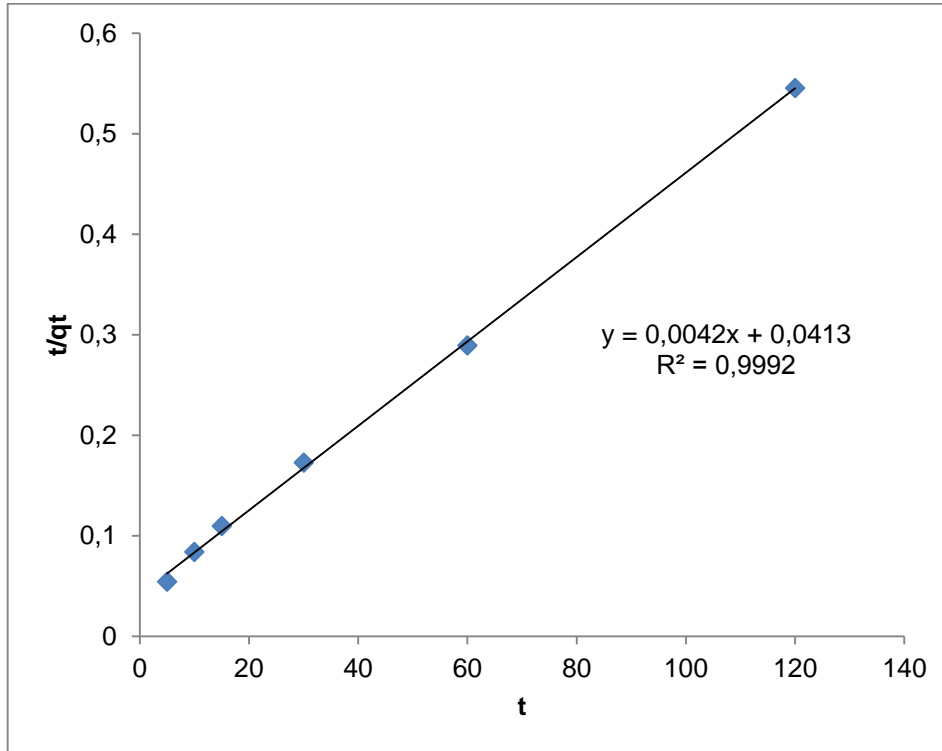
Şekil 4.27. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneğinden fPSA adsorpsiyonu için pseudo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.



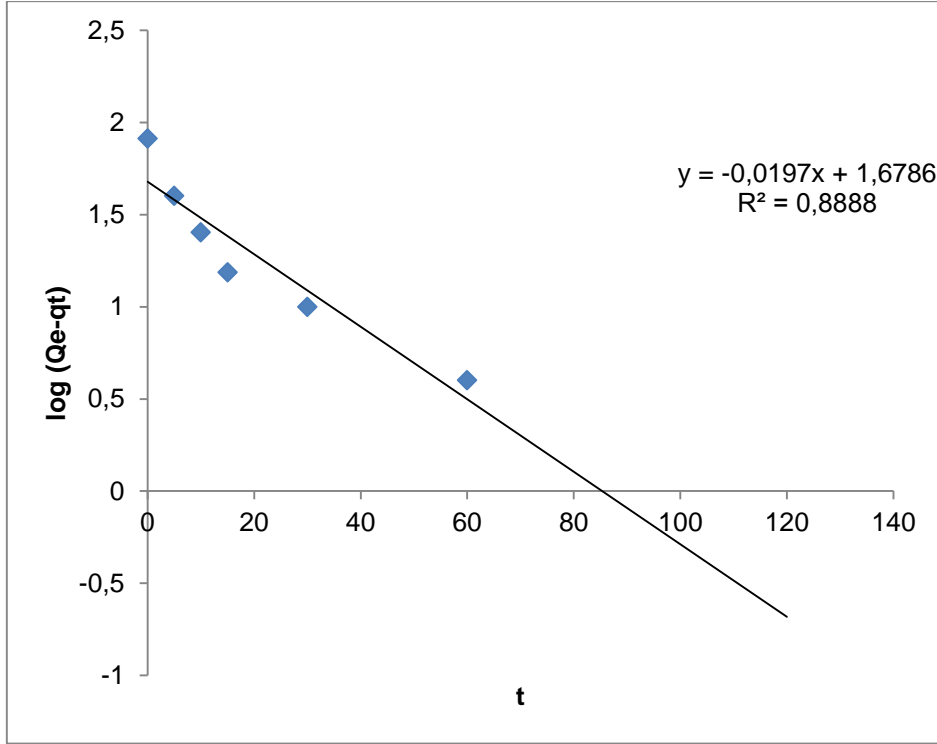
Şekil 4.28. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneğinden fPSA adsorpsiyonu için pseudo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.



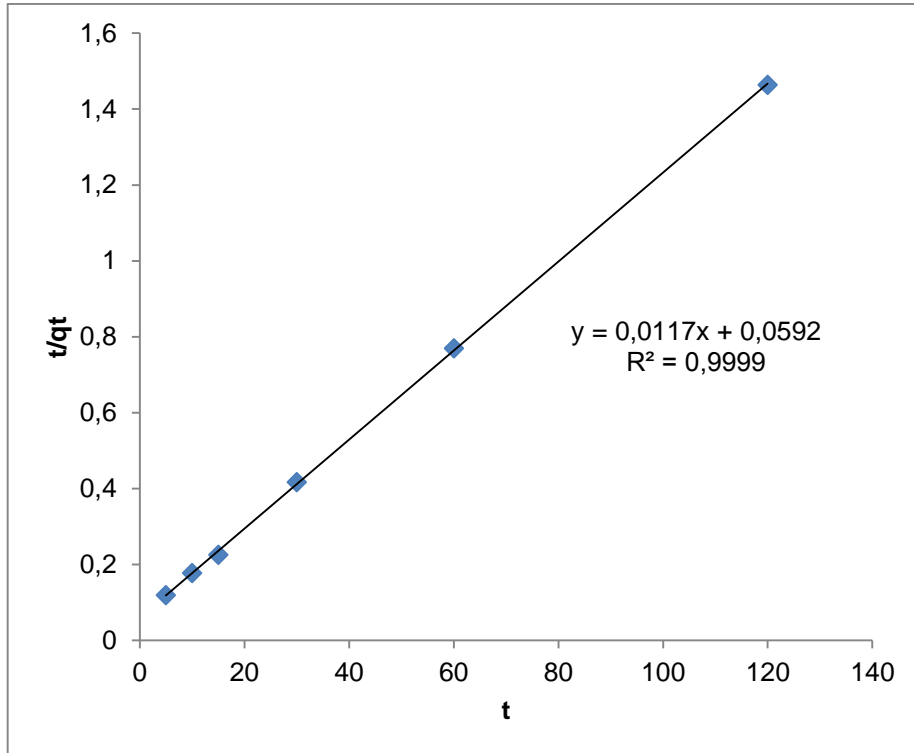
Şekil 4.29. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere BPH'lı serum örneğinden tPSA adsorpsiyonu için pseudo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.



Şekil 4.30. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere BPH'lı serum örneğinden tPSA adsorpsiyonu için pseudo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.



Şekil 4.31. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere BPH'lı serum örneğinden fPSA adsorpsiyonu için pseudo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.



Şekil 4.32. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere BPH'lı serum örneğinden fPSA adsorpsiyonu için pseudo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.

Çizelge 4.5 ve 4.6'da sırasıyla PCa'lı ve BPH'lı serum örneklerinden mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için birinci ve ikinci derece kinetik verileri özetlenmiştir.

Çizelge 4.5. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PCa'lı serum örneğinden tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için birinci ve ikinci derece kinetik verileri.

Birinci derece kinetik verileri		İkinci derece kinetik verileri	
tPSA	fPSA	tPSA	fPSA
$k_1 = 0.016$ 1/dk	$k_1 = 0.0184$ 1/dk	$k_2 = 0.0011$ g/ng.dk	$k_2 = 0.0021$ g/ng.dk
$q_{eq} = 158$ ng/g	$q_{eq} = 56.23$ ng/g	$q_{eq} = 169$ ng/g	$q_{eq} = 64.50$ ng/g
$R^2 = 0.76$	$R^2 = 0.75$	$R^2 = 0.99$	$R^2 = 0.99$

Çizelge 4.6. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere BPH'lı serum örneğinden tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için birinci ve ikinci derece kinetik verileri.

Birinci derece kinetik verileri		İkinci derece kinetik verileri	
tPSA	fPSA	tPSA	fPSA
$k_1 = 0.045$ 1/dk	$k_1 = 0.45$ 1/dk	$k_2 = 0.00039$ g/ng.dk	$k_2 = 0.0023$ g/ng.dk
$q_{eq} = 173$ ng/g	$q_{eq} = 47.86$ ng/g	$q_{eq} = 250$ ng/g	$q_{eq} = 85.47$ ng/g
$R^2 = 0.98$	$R^2 = 0.88$	$R^2 = 0.99$	$R^2 = 0.99$

Birinci ve ikinci derece kinetik verileri karşılaştırıldığında, hem PCa hem de BPH için ikinci derece kinetik verilerden elde edilen Q_{eq} değerlerinin (PCa; tPSA için $Q=162$ ng/g, fPSA için $Q=61$ ng/g) (BPH; tPSA için $Q=220$ ng/g, fPSA için $Q=82$ ng/g) deneysel verilere oldukça yakın olduğu ve korelasyon katsayısının daha yüksek olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar bu deneysel sistemin ikinci derece kinetik model ile açıklanabileceğini göstermektedir.

Lektinlerin glikoproteinlere afinite göstermeleri nedeniyle PCa ve BPH ayrımında lektin-PSA etkileşimlerinin araştırıldığı çalışmalar büyük ilgi görmektedir. PCa ve BPH ayrımı için PSA-Con A etkileşimlerine odaklanan bir kaç çalışma mevcuttur. Basu ve ark. [85] PCa ve BPH arasındaki farkı gözlemek amacıyla serum PSA ve Con A etkileşimini hem PCa'da hem de BPH'da incelemişlerdir. PCa'lı hastada PSA-Con A etkileşiminin daha zayıf olduğunu gözlemişlerdir. Bu çalışma ile benzer olarak presipitasyon yöntemiyle karbohidrat içeriğinin belirlenmesi esasına dayanan bir diğer çalışmada serum PSA-Con A etkileşimlerinin PCa'da BPH'ye göre daha düşük olduğu belirlenmiştir [181]. Çalışmamızda ise hazırlanan

mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PSA adsorpsiyonu gerçekleştirilmiş ve söz konusu önceki çalışmalar ile uyumlu olarak PSA-Con A etkileşimlerinin PCa'da BPH'ya göre daha düşük olduğu gösterilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, PCa'lı ve BPH'lı hasta serumlarındaki PSA glikozilasyonu Con A'ya afinite açısından karşılaştırıldığında farklı PSA-Con A bağlanma oranları rapor edilmiştir [182]. Benzer metodoloji ile diğer araştırmacılar benign ve malign prostat hastalarında PSA glikozilasyon paternleri arasında farklılık tespit etmemişlerdir ve PSA-Con A bağlanma oranının ayırt edici bir özellik olmadığını belirtmişlerdir [183, 184]. Yapılan diğer bir çalışmada ise, PCa'lı ve BPH'lı hasta serumlarındaki fPSA'nın MAA (*Maackia amurensis* agglutinin) lektine bağlanma oranlarında farklılık gözlenmesi ile lektinlerin PCa tanısına potansiyel bir yaklaşım olabileceği önerilmiştir [185].

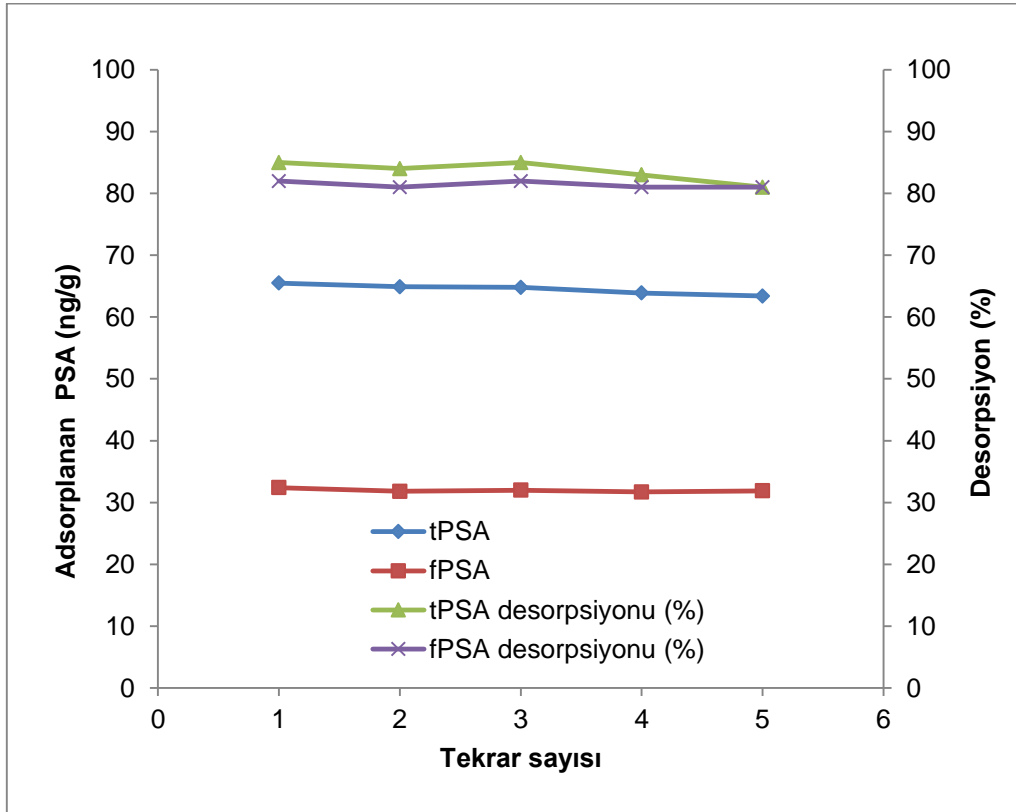
Literatürde PCa ve BPH ayırımında lektin-serum PSA etkileşimini göstermek amacıyla ligand olarak Con A dışında farklı lektinlerin de kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Bu amaçla *Ulex europaeus* (UEA-1) ile gerçekleştirilen bir çalışmada, PCa'lı bireylerde bulunan fPSA'da BPH'lı bireylere kıyasla artan oranda fukozilasyon rapor edilmiştir [186]. Diğer çalışmalarda ise PCa'lı ve BPH'lı hasta serumlarında bulunan PSA'ya karşı farklı bağlanma kapasitesi gösteren *Maackia amurensis* (MAL) lektin, PCa tanısında kullanılabilecek muhtemel bir araç olarak önerilmektedir [3, 185]. Fukushima ve ark. [187] yaptıkları çalışmada, *Trichosanthes japonica* agglutinin-II (TJA-II) ile serum PSA bağlanma oranının PCa için ayırt edici olduğu gösterilmiştir. Ancak yine bu çalışmada PCa'lı ve BPH'lı hasta serumlarında bulunan PSA ile *Aleuria aurantia* agglutinin (AAA) ve *Lens culinaris* lektinleri etkileşimi ile oluşan lektin-PSA fraksiyonlarında önemli derecede bir fark olmadığı belirtilmiştir [185].

Son bulgular lektin kolonlar üzerindeki bazı davranışların sadece değişen N-glikan yapısı ile ilişkili olmadığını, aynı zamanda PSA'nın primer yapısındaki farklılıkların da önemli olduğunu göstermektedir. PSA'nın kanser olan ve kanser olmayan kaynaklarda glikozillenmiş ya da glikozillenmemiş bir şekilde bulunabileceği gösterilmiştir [188]. Bu durum alternatif splicing ile üretilen PSA transkriptinin glikozilasyon bölgesinden yoksun olması ile açıklanmaktadır [189].

4.11. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Afinite adsorpsiyonunda son basamak, bağılı olan proteinlerin elüsyonudur. En kısa sürede ve en yüksek miktarda elüsyonun sağlanması bu yöntemin önemli noktalarından birisidir. Ayrıca her döngüden sonra destek malzemelerinin rejenerasyon etkinliğinin belirlenmesi gereklidir.

mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelerin tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için tekrar kullanılabilirliği adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünün 5 kez tekrarlanmasıyla test edildi. tPSA ve fPSA desorpsiyonu 0.1 M mannoz ile gerçekleştirildi ve %85 oranında desorpsiyon sağlandı. Kromatografide kullanılan destek malzemelerinin kapasitesinde düşüş olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilmesi ekonomik açıdan önemli bir özelliktir. Böylece hedef moleküllerin çok daha ucuza ayrılması mümkün olmaktadır. Şekil 4.33'de mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği ve % desorpsiyon oranları gösterilmiştir. Söz konusu destek malzemesinin adsorpsiyon kapasitesinde dikkate değer bir azalma olmadan yeniden kullanılabilirliğinin mümkün olduğu görülmektedir.



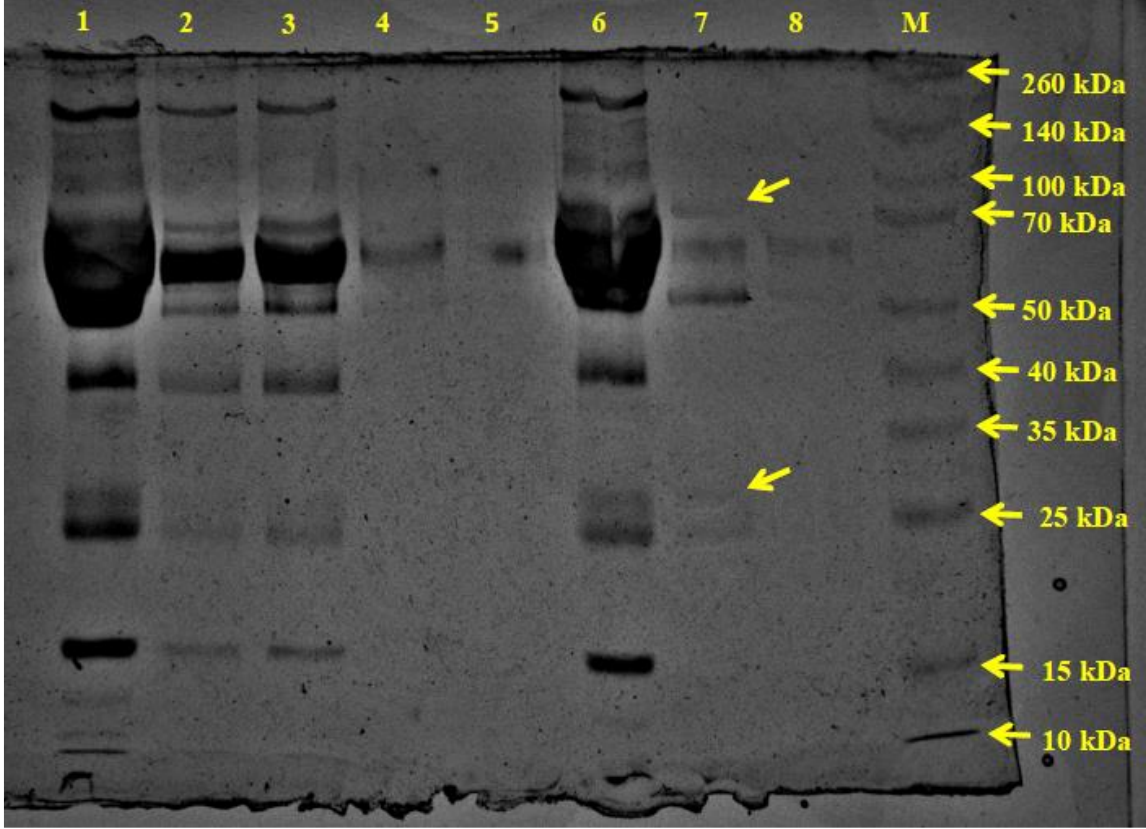
Şekil 4.33. mPGMA-HDMA-Con A mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği ve % desorpsiyon oranları. Hareketli faz: pH 7.4 fosfat tamponu örnek hacmi: 1 mL serum (1/20), m_{kuru}: 10 mg, Con A yükleme: 37.3 mg/g, T: 25°C.

4.12. SDS-PAGE

Serumdan albümin ve IgG uzaklaştırılması ile birlikte tPSA ve fPSA adsorpsiyonunu göstermek amacıyla SDS-PAGE yöntemi uygulanmıştır. SDS-PAGE analizi ile elde edilen serum fraksiyonları Şekil 4.34'de gösterilmiştir. mPGMA-HDMA-ConA mikroküreler tPSA ve fPSA adsorpsiyonu için kullanıldı. 1. kuyucukta adsorpsiyon öncesi 1/10 oranında seyreltilmiş serum örneği yer almaktadır. 2. ve 3. kuyucuklarda albümin ve IgG uzaklaştırılması sonrası serum örnekleri bulunmaktadır.

Bant yoğunlukları karşılaştırıldığında, Cibacron mavisi-F3GA bağlı PHEMA kriyojel diskler ve Hitrap Protein A FF kolon ile albumin ve IgG'nin çoğunun uzaklaştırıldığı görülmektedir. Buna ek olarak, 6. kuyucukta albümin ve IgG'nin desorpsiyon fraksiyonu uzaklaştırma işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.

PSA, 28.4 kDa ağırlığında, 237 aminoasitten oluşan, % 8 oranında karbohidrat içeren bir glikoproteindir. Kanda proteinlere bağlı olmadan serbest halde bulunan fPSA'nın molekül ağırlığı 28.4 kDa, α_1 -antikimotripsin ya da α_2 -makroglobulin ile kompleks oluşturan tPSA'nın molekül ağırlığı ise 80-90 kDa'dur [26, 37]. Yedinci kuyucukta mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelerden desorpsiyon sonrasında elde edilen bantlar görülmektedir. Bu kuyucukta oklar ile gösterilen bantlardan 28 kDa civarındaki bantın fPSA'ya ve 80-90 kDa civarındaki bantın ise tPSA'ya ait olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yine bu kuyucukta IgG'ye ait iki bant (50 kDa-ağır zincir ve 25 kDa-hafif zincir) ve albümine ait bant (66 kDa) da görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, fPSA ve tPSA bir miktar IgG ve albümin ile birlikte desorbe edilmiştir. mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelerden farklı desorpsiyon ajanları kullanılarak desorbe edilen diğer fraksiyonlarda PSA bantları gözlenmemiştir. Burada mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelerin PSA adsorpsiyonu için uygun malzemeler olduğu ve söz konusu mikrokürelerden 0.1 M mannoz kullanılması ile başarılı şekilde PSA desorpsiyonu gerçekleştirildiği gösterilmiştir.



Şekil 4.34. SDS-PAGE ile analiz edilen serum fraksiyonları. **1.** Başlangıç serum örneği (1/10 seyreltilmiş); **2 ve 3.** mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere PSA adsorpsiyonu sonrası serum örneği; **4.** mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere 1 M NaCl ile elde edilen desorpsiyon fraksiyonu; **5.** mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere 0.5 M NaCl ile elde edilen desorpsiyon fraksiyonu; **6.** Cibacron mavis F3GA bağlı PHEMA kriyojel diskler ve Hitrap Protein A FF kolondan desorbe edilen fraksiyon. **7.** mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere 0.1 M mannoz ile elde edilen desorpsiyon fraksiyonu; **8.** mPGMA-HDMA-ConA mikrokürelere 0.5 M NaCl içeren fosfat tamponu (pH 8.0) ile elde edilen desorpsiyon fraksiyonu; **M.** Protein marker (10-260 kDa).

Lektin afinite adsorpsiyonu daha önceki bölümlerde de açıklandığı üzere, çeşitli kombinasyonlar ile birlikte uygulandığında glikokonjugatları saflaştırmak ve karakterize etmek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Söz konusu yöntem, hem N- hem de O-bağlı glikoproteinleri içeren pekçok glikoprotein tipini hedef alacak şekilde uyarlanabilir. Bu özellikleri glikoproteomik çalışmalarda uygulama açısından esneklik sağlar. Lektinlerin, lektin microarray, lektin temelli immunosorbent assay, lektin immobilize kolonların kullanıldığı sistemler, tek bir lektin ile hazırlanan kromatografik destek malzemelerinin kullanıldığı sistemler, S-LAC ve M-LAC gibi çeşitli kombinasyonları bulunur. Literatürde glikoproteinlerin araştırılması amacıyla lektinlerin kullanıldığı kanser hastalığı ile ilişkili pekçok

çalışma mevcuttur. Çeşitli kanser tipleri için glikoprotein yapıdaki biyoişaretlerin ve glikozilasyon değişikliklerinin tanımlanması için lektinlerin kullanıldığı bazı çalışmalar Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Literatürde lektinlerin kullanıldığı bazı çalışmalar

Lektin	Kanser	Gözlem	Referanslar
LCA	Hepatoselüler karsinoma (HCC)	HCC ile siroz kıyaslandığında serum glikoproteinlerinde artan fukozilasyon	[191]
SNA, AAL, PHA-L, MAA, GNA, DSA	Melanoma	İnsan melanoma hücrelerinde α -3 β -1 integrinde değişen glikozilasyon profili	[192]
SNA, MAL, AAL, ECL	Prostat kanseri	Kontrol grubu ile kıyaslandığında kanserli hasta serumlarındaki total glikoproteinlerden salınan glikanlarda sialil Lewis-X oranının artması	[86]
Con A, WGA, JAC	Meme Kanseri	HER-2 gibi düşük derişimde bulunan biyoişaretin zenginleştirilmesi	[193]
WGA, Con A, SNA, PNA, MAL, AAL	Pankreas Kanseri	Artan sialilasyon ve fukozilasyon	[194]
Con A	Mesane Kanseri	Mesane Kanserinin onaylı ve potansiyel biyoişaretinin tanımlanması	[195]
Con A, SNA, PNA, MAL, AAL	Kolorektal Kanseri	Kompleman C3, kininojen-1 ve histidine zengin glikoproteinlerde artan sialilasyon ve fukozilasyon	[196]
Lektin Mikroarray	Hepatoselüler karsinoma (HCC)	Artan fukozilasyon	[197]

AAL: *Aleuria aurantia* lektin, Con A: Konkanavalin A, DSA: *Datura stramonium* aglütinin, ECL: *Erithrina cristagalli* lektin, GNA: *Galanthus nivalis* aglütinin, JAC: Jakalin, LCA: *Lens culinaris* aglütinin, MAL: *Maackia amurensis* lektin, PHA: Fitohemaglütinin, PNA: Yer fıstığı aglütinin, SNA: *Sambucus nigra* aglütinin, WGA: Buğday tohumu aglütinin.

Hedef glikoproteinlerin zenginleştirilmesi amacıyla lektinlerin kullanılması gittikçe önem kazanmakta ve son yıllarda araştırmacılar tarafından kabul görmektedir. Günümüzde glikoproteom analizi için lektin-afinite temelli yöntemlerin MS ile birlikte uygulanması geleneksel biyokimyasal ayırma yöntemleri ve enzimatik prosedürler ile yer değiştirmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, lektin-afinite temelli yöntemlerin hastalık ile ilişkili glikozilasyon profilini açıkça ortaya koyan, hastalığın tanımlanması ve hasta bireyler için uygun tedavi yönteminin belirlenmesi için umut vadeden bir teknoloji olduğu açıkça görülmektedir.

5. YORUM

Günümüzde tanı ve tedavi amaçlı protein biyoişaretlerinin keşfedilmesi klinik proteomikse ilişkin klinik çalışmaların en önemli ilgi alanlarından birisidir. Özellikle patolojik süreçte doğru ve hızlı tanı konulması uygun tedavi yönteminin seçimini etkileyen faktörler arasındadır. Tanı amaçlı kullanılacak olan bir biyon, normal biyolojik veya hastalık sürecinde objektif olarak ölçülebilen ve değerlendirilen bir işaretleyicidir. Biyoişaretleyicilerin patolojik duruma bağlı olarak değişimleri gözlenebilmektedir. Klinikte kullanılacak ideal bir biyoişaretleyicinin genel olarak sahip olması beklenen özellikler şu şekilde sıralanabilir:

- Belirli bir hastalık için ileri derecede özgül olmalıdır.
- Yüksek hassasiyete sahip olmalı ve standart sonuç vermelidir.
- Kullanımı ve tekrarı kolay olmalıdır.
- Kullanılacak örnek mümkün olduğunca kolay elde edilmelidir.

Teorik olarak her bir hastalık, kendine özgü biyoişaretleyici ile belirlenebilir ve tanımlanabilir olmalıdır. Fakat çoğu hastalık durumu için biyoişaretleyiciler, artan ya da azalan proteinlere bakılarak veya değişen translasyon sonrası modifikasyonların özellikleri araştırılarak bulunmaya çalışılmaktadır [190].

PSA, erkeklerde bulunan prostatın epitel hücrelerinde mevcut olan bir glikoproteindir. Günümüzde PCa izleminde ve taramasında yaygın olarak kullanılan bir biyoişarettir. PSA, proteinlere bağlı olmadan serbest halde (fPSA) bulunabileceği gibi, α_1 -antikimotripsin ya da α_2 -makroglobulin gibi proteaz inhibitörlerine bağlı olarak (tPSA) serumda iki kararlı kompleks de oluşturabilir. PSA'nın α_1 -antikimotripsin ile oluşturduğu kompleks baskın olan fraksiyonudur. Serum içindeki PSA'nın küçük bir kısmı (toplam serum PSA'sının % 10-30'u kadar) proteaz inhibitörleri ile ilişkili değildir. Bu moleküler farklılıklar tPSA ve fPSA ayrımını açıklar. fPSA, PCa'lı bireylerde BPH'lı bireylere göre anlamlı derecede daha düşüktür. Bu nedenle, PCa'da ortalama fPSA/tPSA oranı da BPH'ya göre daha düşüktür ve bu değer özellikle gri zonda (tPSA:4-10 ng/ml) PCa ve BPH ayrımının sağlanması bakımından oldukça önemlidir. PCa'lı hastalarda tPSA'nın yükselme sebebi tam olarak bilinmese de, α_1 -antikimotripsinin bağlanması için malign prostat dokusu tarafından enzimatik olarak aktive PSA salınması gereksinimi ile açıklanabilir. Malign transformasyonlar sırasında meydana gelen

değişimlerden bir diğeri ise PSA glikozilasyonudur [93]. Glikozilasyon özelliği, bir hastalığın varlığı gibi pek çok fizyolojik değişiklikten etkilenmektedir. Bu bağlamda, glikozilasyon patern değişiklikleri özellikle kanser ve diğer birçok hastalık süreci ile ilişkilendirilebilmektedir. Böylece değişen glikoform yapısı bu değişime sebep olan hastalığın tanısında bir araç olarak kullanılabilir. PCa'da da erken evrede tanı konulması amacıyla PSA glikozillenmesindeki değişimden yararlanılabilir. Ancak literatürde PCa sırasında oluşan PSA glikozilasyon paternleri ile ilgili bazı anlaşmazlıklar bulunmaktadır [85].

Plazma ve serum glikoproteinlerinin ayrılması ve saflaştırılması için iyi karakterize edilmiş lektin-afinite destek malzemelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Polimerik destek malzemeleri yüksek protein korunumlu ve düşük reaktivite ile kararlı yüzey sağlayarak iyi bir alternatif sunmaktadır [54]. Bu çalışma kapsamında da model bir glikoprotein olarak seçilen PSA'nın adsorpsiyonuna yönelik mPGMA-HDMA-ConA mikroküreler hazırlanmıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen diğer çalışmalar incelendiğinde, ticari destek malzemeleri dışında PSA adsorpsiyonu için polimerik sistemlerin hazırlandığı buna benzer bir çalışmanın olmadığı görülmektedir.

Silika ve gözenekli cam gibi inorganik destek malzemelerinin temel dezavantajı, seçici olarak bağlanmayı sağlayan fonksiyonel gruplara sahip olmamalarıdır. Bu nedenle, yüksek seçicilik gösteren çeşitli fonksiyonel gruplar içeren polimerik destek malzemelerinin sentezlenmesi gerekmektedir. PGMA kolay fonksiyonlanabilir reaktif bir polimer olup, sahip olduğu epoksi gruplarının halka açılma reaksiyonu ile kolaylıkla modifiye edilebilmesi bu polimerlerin en çarpıcı özelliğidir [123]. Bu bağlamda, epoksi grubunun yüksek reaksiyon kabiliyetinden dolayı çalışmamızda mPGMA mikroküreler kullanılmıştır.

Lektin afinite adsorpsiyonu, ligand olarak lektinlerin kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntem, lektinlerin yüksek özgüllük göstermeleri nedeniyle glikan yapılarındaki değişiklikleri belirlemek amacıyla tercih edilmektedir. *Canavalia ensiformis* aglutinin (Con A), *Triticum vulgare* agglutinin (WGA) and *Phaseolus vulgaris* eritroaglutinin (PHA-E), *Ulex europaeus* (UEA), *Aleuria aurantia* lektin (AAL), *Maackia amurensis* lökoaglutinin (MAL), *Maackia amurensis* hemaglutinin (MAH) gibi lektinler kromatografik destek malzemelere immobilize edilerek lektin afinite kromatografisinde ligand olarak kullanılabilirler [17].

Lektin afinite adsorpsiyonu glikoprotein zenginleştirilmesi amacıyla kullanılan yöntemler arasında yer alır. Bu yöntemin klinik uygulamalarda glikoprotein zenginleştirilmesinde tercih edilmesinin nedeni, hücre, tümörlü doku, serum ya da plazma gibi pekçok biyolojik kaynak ile çalışılmasına imkan sağlamasıdır. Uzaklaştırma ve MS teknolojilerinin birarada kullanılması, lektin afinite adsorpsiyonunu kanser de dahil olmak üzere birçok hastalık biyoişaretinin keşfinde sıklıkla uygulanan bir yöntem haline getirmiştir [8].

Son yıllarda, hastalık profillerinin belirlenmesinde çok umut verici araçlar olmalarından dolayı glikoprotein zenginleştirilmesine karşı artan bir ilgi söz konusudur [198]. Glikoproteinlere artan ilgi sonucunda etkili ayırma ve saflaştırma teknikleri daha da gerekli hale gelmiştir. Bu gereksinimler doğrultusunda, glikoprotein zenginleştirilmesi için lektinlerin manyetik destek malzemelerine immobilizasyonu, yüksek verimli ve otomatize bir sistem geliştirilmesi bakımından avantajlı bir uygulama şekli sunmaktadır. Manyetik özellik taşıyan malzemeler yüksek performanslı malzemeler olarak dikkat çekmektedirler.

Glikoprotein zenginleştirme çalışmalarında lektin afinite adsorpsiyonu dışında antikör temelli yaklaşımlar da ilgi görmektedir. Hedef molekülü yakalama prensibine dayanan bu yaklaşımlar, kompleks ortamdan glikoprotein zenginleştirilmesi için iyi bir alternatif sunarlar. Bu strateji, farklı hastalıklarda gözlenen glikan zincirlerinde meydana gelen değişikliklerin ve normal olmayan glikan immunojenitesinin anlaşılmasını mümkün kılar. Böylece, hastalık ile ilişkili glikoprotein biyoişaretlerinin izolasyonuna ve tanımlanmasına olanak sağlar [8]. Ancak antikör temelli yöntemlerin pahalı olmalarının yanısıra, genellikle post-translasyonel modifikasyonlara özgül olmamaları ve ardışık kullanılamamaları gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Lektinlerin doğada dağılımlarının ve miktarlarının çok fazla olması, lektin temelli yöntemlerin antikör temelli yöntemlerin aksine son derece ucuz sistemler olduğunu göstermektedir. Şekerlerin lektinlere olan afinitesinin (10^2 - 10^6 M^{-1}) karbonhidrat spesifik antikörler (10^4 - 10^8 M^{-1}) kadar yüksek olmaması saflaştırma stratejilerinin geliştirilmesinde pratik açıdan büyük önem taşımaktadır. Afinite ligand olarak karbonhidrat spesifik antikörlerin kullanılması durumunda son basamakta glikokonjugatı adsorbe olduğu matriksten uzaklaştırmak için fizyolojik olmayan şiddetli koşullar gerekmektedir. Bu koşullarda saflaştırılan proteinin biyolojik aktivitesi çoğunlukla korunamamaktadır. Söz

konusu durumun aksine, afinite ligand olarak lektinlerin kullanılması durumunda ise protein desorpsiyonu oldukça ılımlı koşullarda gerçekleştirilebilmektedir. Tüm bu özellikleri nedeniyle, lektin afinite adsorpsiyonu glikokonjugat türlerinin yeterli miktarda elde edilmesinde etkili yöntemler olarak oldukça geniş skalada kullanılmaktadırlar [8, 17].

Çalışmamızda, uzatıcı kol takılı lektin immobilize mPGMA mikrokürelerin PSA bağlanmasında etkin araçlar olduğu gösterilmiştir. PSA'nın şeker zincir yapısında malign transformasyonlar sırasında değişiklik meydana gelmesi nedeniyle PSA-lektin etkileşimlerinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar halen güncelliğini korumaktadır. Söz konusu özellik dikkate alındığında, bu malzemelerin hazırlanması PSA bağlanmasını temel alan ticari kitlerin geliştirilmesi çalışmalarına da katkı sağlayacaktır. Buna ek olarak, WHO tarafından onaylanan tüm kanser biyoişaretlerinin glikoprotein yapısında olduğu göz önünde bulundurulduğunda, hazırlanan malzemeler sadece PCa için değil, diğer kanser tipleri için de biyoişaret keşfine imkan sağlayabilecek model bir sistem olarak önerilmektedir. Bu bağlamda, klinik uygulamalarda hastalıklar için diğer tanı sistemlerine alternatif olarak lektin-glikoprotein etkileşimlerinden yararlanılabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışmada mPGMA mikrokürelerin PSA bağlama kapasitesi, sıcaklık, başlangıç serum derişimi, ligand yükleme miktarı ve zaman parametreleri açısından incelenmiş ve böylece çalışmanın PSA-Con A etkileşimlerinin anlaşılmasına katkı sağlaması amaçlanmıştır. Elde edilen bulgulardan PSA'nın Con A'ya bağlanmasında hidrofobik ve van der Waals etkileşimlerinin rol aldığı sonucuna varılabilir. PSA-Con A etkileşimlerinin anlaşılması prostat sağlığının klinik olarak değerlendirilmesi açısından yarar sağlayacaktır.

Serumda yüksek derişimde bulunan proteinlerinden albüminin ve IgG'nin sırasıyla Cibacron mavisi F3GA bağlı PHEMA kriyojel diskler ve Hitrap Protein A FF kolon kullanılarak uzaklaştırılması sağlanmıştır. Serum fraksiyonlarını göstermek amacıyla gerçekleştirilen SDS-PAGE analizi, uygulanan her iki sistemin de başarılı olduğunu ve uzaklaştırma işleminde etkin olarak kullanılabileceklerini kanıtlamaktadır.

Sonuç olarak, PCa'lı hasta serumundan elde edilen serum rneklerinin, SDS-PAGE, iki boyutlu jel elektroforezi ve kütle spektrometresi gibi analizler öncesinde, lektinler aracılığı ile glikozillenme özelliklerinin belirlenmesi Şüphesiz ki proteom analizlerine büyük katkı sağlayacaktır. Böylece, PCa'nın seyri sırasında serum proteinlerinin glikozillenme profilleri aydınlatılabilecek ve hastalığın seyri ile ilişkilendirilebilecektir.

KAYNAKLAR

- [1] Tessitore, A., Gaggiano, A., Cicciarelli, G., Verzella, D., Capece, D., Fischietti, M., Zazzeroni, F., Alesse, E., Serum biomarkers identification by mass spectrometry in high-mortality tumors. *International Journal of Proteomics*, 1-15, **2003**.
- [2] Srinivas, P.R., Verma, M., Zhao, Y., Srivastava, S., Proteomics for cancer biomarker discovery. *Clinical chemistry*, 48 (8), 1160-1169, **2002**.
- [3] Meany, D.L., Zhang, Z., Sokoll, L.J., Zhang, H., Chan, D.W., Glycoproteomics for prostate cancer detection: changes in serum PSA glycosylation patterns. *Journal of Proteome Research*, 8 (2), 613-619, **2009**.
- [4] Badr, H.A., Alsadek, D.M., Darwish, A.A., Elsayed, A.I., Bekmanov, B.O., Khussainova, E.M., Zhang, X., Cho, W.C., Djansugurova, L.B., Li, C.Z., Lectin approaches for glycoproteomics in FDA-approved cancer biomarkers. *Expert Review of Proteomics*, 11(2), 227-36, **2014**.
- [5] McLaughlin, J. R. ve Dryer, D., National Cancer Institute of Canada: Canadian Cancer Statistics: ISSN 0835-2976. Toronto, Canada, **2000**.
- [6] Jayapalan, J.J., Ng, K.L., Razack, A.H., Hashim, O.H., Identification of potential complementary serum biomarkers to differentiate prostate cancer from benign prostatic hyperplasia using gel- and lectin-based proteomics analyses. *Electrophoresis*, 33 (12), 1855-1862, **2012**.
- [7] Aypak, S. ve Uysal, H., Glikoproteinlerin Yapısı ve Fonksiyonları. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 24 (2), 107-114, **2010**.
- [8] Fanayan, S., Hincapie, M., Hancock, W.S., Using lectins to harvest the plasma/serum glycoproteome. *Electrophoresis*, 33 (12), 1746–1754, **2012**.
- [9] Pan, Y., Bai, H., Ma, C., Deng, Y., Qin, W., Qian, X., Brush polymer modified and lectin immobilized core-shell microparticle for highly efficient glycoprotein/glycopeptide enrichment. *Talanta*, 115, 842-848, **2013**.
- [10] Ma, Z.Y., Guan, Y.P., ve Liu, H.Z., Synthesis of monodisperse nonporous crosslinked poly(glycidyl methacrylate) particles with metal affinity ligands for protein adsorption. *Polymer International*, 54 (11), 1502-1507, **2005**.
- [11] Ma, Z.Y., Guan, Y.P. ve Liu, X. Q., Synthesis of magnetic chelator for high-capacity immobilized metal affinity adsorption of protein by cerium initiated graft polymerization, *Reactive and Functional Polymers*, 21 (15), 6987-6994, **2005**.
- [12] Ma, Z. Y., Guan, Y.P. ve Liu, H.Z., Affinity adsorption of albumin on Cibacron Blue F3GA-coupled non-porous micrometer-sized magnetic polymer microspheres. *Reactive and Functional Polymers*, 66 (6), 618-624, **2006**.
- [13] Tuncel, A., Denizli, A., Purvis, D., Liwe, C.R., ve Pişkin, E., Cibacron Blue F3g-A-Attached Monosize Poly(Vinyl Alcohol)-Coated Polystyrene Microspheres For Specific Albumin Adsorption. *Journal of Chromatography A*, 634 (2), 161-168, **1993**.

- [14] Takafuji, M., Ide, S., Ihara, H., Xu, Z., Preparation of poly(1-vinylimidazole)-grafted magnetic nanoparticles and their application for removal of metal ions. *Chemistry of Materials*, 16, 1977-1983, **2004**.
- [15] Chung, T.H., Lee, W.C., Preparation of styrene-based, magnetic polymer microspheres. *Reactive and Functional Polymers*, 68, 1441-1447, **2008**.
- [16] Kurban, S., Mehmetoğlu, İ., Proteomik. *Yeni Tıp Dergisi*, 27, 70-75, **2010**.
- [17] Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, Pozitif Matabaacılık, Ankara, **2010**.
- [18] Wilkins, M.R., Williams, K.L., Appel R.D., Hochstrasse, D.F., Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics (eds: Wilkins, M.R., Williams, K.L., Appel, R.D., Hochstrasser, D.F.), Springer Verlag, Berlin, 1-232, **1997**.
- [19] Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., ve digerleri. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology And Genetic Engineering Reviews*, 13, 41–50, **1996**.
- [20] Gudepu, R., Wold, F., in Proteins: Analysis and Design, (eds: Angeletti R. H.) Academics, San Diego, 121–207, **1998**.
- [21] Kornfeld, R., Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*, 54, 631-664, **1985**.
- [22] Lathrop, J.T., Anderson, N.L., Anderson, N.G., Hammond, D.J. Therapeutic potential of the plasma proteome. *Current Opinion Molecular Therapeutics*, 5, 250-257, **2003**.
- [23] Pieper, R., Su, Q., Gatlin, C. L., Huang, S. T., Anderson, N. L., Steiner, S. Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: an innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome. *Proteomics*, 3, 422-432, **2003**.
- [24] Olver, C.S., Webb, T.L., Long, L.J., Scherman, H., Prenni, J.E. Comparison of methods for depletion of albumin and IgG from equine serum. *Veterinary Clinical Pathology*, 39 (3),337-45, **2010**.
- [25] Adam, B.L., Vlahou, A., Semmes, O.J., Wright, GL. Proteomic approaches to biomarker discovery in prostate and bladder cancers. *Proteomics*, 1 (10), 1264-70, **2001**.
- [26] Chertov, O., Biragyn, A., Kwak, L.W., Simpson, J.T., Boronina, T., Hoang, V.M., Prieto, D.A., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Fisher, R.J. Organic solvent extraction of proteins and peptides from serum as an effective sample preparation for detection and identification of biomarkers by mass spectrometry. *Proteomics*, 4 (4), 1195-1203, **2004**.
- [27] Leatherbarrow, R. J., Dean, P. D., Studies on the mechanism of binding of serum albumins to immobilized cibacron blue F3G A. *Biochemical Journal*, 189 (1), 27-34, **1980**.
- [28] Seam, N., Gonzales, D. A., Kern, S. J., Hortin, G. L., Hoehn, G. T., Suffredini, A. F., Quality control of serum albumin depletion for proteomic Analysis. *Clinical Chemistry*, 53 (11), 1915-1920, **2007**.

- [29] Guerrier, L., Fortis, F., ve Boschetti, E., Solid-phase fractionation strategies applied to proteomics investigations. *Methods in Molecular Biology*, 818, 11-33, **2011**.
- [30] Camerini, S. , Polci, M. L., Liotta, L. A., Petricoin, E. F., Zhou, W., A method for the selective isolation and enrichment of carrier protein-bound low-molecular weight proteins and peptides in the blood. *Proteomics-Clinical Applications*, 1 (2), 176-184, **2007**.
- [31] Van Meter, A. J., Camerini, S., Polci, M. L., Tessitore, A., Trivedi, N., Heiby, M., Kamal, Y., Hansen, J., Zhou, W., Serum low-molecular-weight protein fractionation for biomarker discovery. *Methods in Molecular Biology*, 823, 237-249, **2012**.
- [32] Luchini, A., Geho, D. H., Bishops, B., digerleri., Smart hydrogel particles: biomarker harvesting: one-step affinity purification, size exclusion, and protection against degradation. *Nano Letters*, vol. 8, no. 1, pp. 350–361, **2008**.
- [33] Luchini, A., Longo, C., Espina, V., Petricoin, E. F., Liotta, L. A., Nanoparticle technology: addressing the fundamental roadblocks to protein biomarker discovery. *Journal of Materials Chemistry*, 19 (29), 5071-5077, **2009**.
- [34] Travis, J., Bowen, J., Tewksbury, D., Johnson, D., Pannell, R., Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. *Biochemical Journal*, 157, 301-306, **1976**.
- [35] Travis, J., Pannell, R., Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography. *Clinica Chimica Acta*, 49, 49-52, **1973**.
- [36] Gianazza, E., Arnaud, P., A general method for fractionation of plasma proteins. Dye-ligand affinity chromatography on immobilized Cibacron blue F3-GA. *Biochemical Journal*, 201, 129-136, **1982**.
- [37] Andaç, M., Baydemir G., Yavuz H. , Denizli A., Molecularly imprinted composite cryogel for albumin depletion from human serum. 25 (11), 555-563, **2012**.
- [38] Andaç, M., Galaev, I., Denizli, A., Dye attached poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel for albumin depletion from human serum. *Journal of Separation Science* , 35 (9), 1173-1182, **2012**.
- [39] Kubo, K., Honda, M., Imoto, M., Morishima, Y., Capillary zone electrophoresis of albumin-depleted human serum using a linear polyacrylamide-coated capillary: Separation of serum α - and β -globulins into individual components. *Electrophoresis*, 21, 396-402, **2000**.
- [40] Greenough, C, Jenkins, R.E., Kitteringham, N.R., Pirmohamed, M, Park, B.K., Pennington, S.R., A method for the rapid depletion of albumin and immunoglobulin from human plasma. *Proteomics*, 4 (10), 3107-3111, **2004**.
- [41] Wang, Y.Y., Cheng, P., Chan, D.W., A simple affinity spin tube filter method for removing high-abundant common proteins or enriching low-abundant biomarkers for serum proteomic analysis. *Proteomics* , 3, 243-248, **2003**.

- [42] Akgöl, S., Özkara, S., Uzun, L., Yılmaz, F., Denizli, A., Pseudospecific Magnetic Affinity Beads for Immunoglobulin-G Depletion from Human Serum. *Journal of Applied Polymer Science*, 106, 2405-2412, **2007**.
- [43] Uzun, L., Armutcu, C., Biçen, Ö., Ersöz, A., Say, R., Denizli, A., Simultaneous depletion of immunoglobulin G and albumin from human plasma using novel monolithic cryogel columns. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1 (112),1-8, **2013**.
- [44] Zhang, K., Zolotarjova, N., Nicol, G., Martosella, J., Yang, L.S., Szafranski, C., Bailey, J., Boyes, B., Agilent Multiple Affinity Removal System for the depletion of high abundant proteins from human serum – a new technology from Agilent. *Agilent Application Note*, 5988-9813EN, **2003**.
- [45] Liu, B., Qiu ,F.H., Voss, C., Xu, Y., Zhao, M.Z., Wu, Y.X., Nie, J., Wang, Z.L., Evaluation of three high abundance protein depletion kits for umbilical cord serum proteomics. *Proteome Science*, 9 (1), 24, **2011**.
- [46] Figeys, D., McBroom, L.D., Moran, M.F., Mass spectrometry for the study of protein-protein interactions. *Methods*, 24, 230-239, **2001**.
- [47] Öncel, S., *Fenilalanin çeren Hidrofobik Etkilesim Kromatografi Sorbentlerinin Sentezlenmesi ve Lizozim Saflastırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, **2004**.
- [48] Hashim, O.H., Ahmad, F.,Shuib, A.S., The application of Artocarpus integer seed lectin-M in the detection and isolation of selective human serum acute-phase proteins and immunoglobulins. *Immunological Investigations*, 30, 131-141, **2001**.
- [49] Vijayalakshmi, M. A., Pseudobiospecific ligand affinity-chromatography. *Trends in Biotechnology*, 7, 71-76, **1989**.
- [50] Yang, Z.P., Hancock, W.S., Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *Journal of Chromatography A*, 1053, 79-88 , **2004**.
- [51] Satish, P. R., Surolia, A., Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49 (1-3), 625-640, **2001**.
- [52] Sharon, N., ve Lis, H., The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 491, 1-16, **2001**.
- [53] Lis, H., Sharon, N., Lectins as molecules and as tools. *The Annual Review of Biochemistry*, 55, 35-67, **1986**.
- [54] Kullolli, M., Hancock, W.S. , Hincapie, M., Preparation of a high-performance multi-lectin affinity chromatography (HP-M-LAC) adsorbent for the analysis of human plasma glycoproteins. *Journal of Separation Science*, 31, 2733-2739, **2008**.
- [55] Cummings, R.D. Lectins as a tool for glycoconjugate purification and characterization. *Glycosciences Status and Perspectives*, (eds: Gabius, H.J. and Gabius, S.), Chapman & Hall, London,191-199, **1997**.
- [56] Sharon, N., Lis, H., Legume lectins--a large family of homologous proteins, *The FASEB Journal*, 4, 3198-3208, **1998**.

- [57] Emmerich, C., Helliwell, J. R., Redshaw, M., Naismith, J. H., Harrop, S. J., Raftery, J.; Kalb (Gilboa), J. A., Yariv, J., Dauter, Z., Wilson, K. S., High-resolution structures of single-metal-substituted concanavalin A: The Co, Ca-protein at 1.6 Å and the Ni, Ca-protein at 2.0 Å, *Acta Crystallographica*, 749-756, **1994**.
- [58] Becker, J.W., Cunningham, B.A., Beke, G.N., Wang, J.L., Edelman, G.M. The Molecular Structure of Concanavalin A. *Concanavalin A as a tool* (eds: Bittiger, H. and Schnebli, H.P.), John Wiley and Sons Ltd., London, 33-52, **1976**.
- [59] McEver, R.P., Moore, K.L., Cummings, R.D., Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 11025-8, **1995**.
- [60] Karaçalı, S., Deveci, R., Protorasik Bezlerdeki Hemosit Reseptörünün Belirlenmesi, Tübitak Projesi, TBAG-AY/214, 16, **2001**.
- [61] Suguna, K., Surolia, A., Vijayan, M., Structural diversity and carbohydrate specificity of plant lectins. *Perspectives in structural biology* (eds: Vijayan, M., Yathindra, N., Kosalkar, A.S.), Hyderabad: Universities Pres., **1999**.
- [62] Vijayan, M. ve Chandra, N. Lectins, *Current Opinion in Structural Biology*, 9,707-14, **1999**.
- [63] Akkaya, B., *Lektin Afinitive Kromatografisi İle Antikor Safılaştırılması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı, Ankara, **2009**.
- [64] Kishino, S., Miyazaki, K. Separation methods for glycoprotein analysis and preparation. *Journal of Chromatography B*, 699, 371-381, **1997**.
- [65] Yang, Z., Hancock, W.S., Monitoring glycosylation pattern changes of glycoproteins using multi-lectin affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1070, 57-64, **2005**.
- [66] Apweiler, R., Hermjakob, H., and Sharon, N., "On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1473, 1, 4-8, **1999**.
- [67] Wells, L., Vosselle, K., Cole, R., Cronshaw, J., Matunis, M., Hart, G., Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1, 791, **2002**.
- [68] Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J., Essential of Glycobiology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*, 125, **1999**.
- [69] Xiong, L., Regnier, F.E., Use of a lectin affinity selector in the search for unusual glycosylation in proteomics. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 782, 405-418, **2002**.
- [70] Ahmed, N., Argirov, O., Minhas, H., Cordeiro, C., Thornalley, P., Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-

hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin, *Biochemical Journal*, 364, **2002**.

- [71] Spinale, F., Coker, M., Heung, L., Bond, B., Gunasinghe, H., Etoh, T., Goldberg, A., Zellner, J., Crumbley, A., A matrix metalloproteinase induction/ activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure, *Circulation*, 102, 1944-1949, **2000**.
- [72] Puchelle, E., de Bentzmann, S. Zahm, J., Physical and functional properties of airway secretions in cystic fibrosis--therapeutic approaches, *Respiration*, 62, Supplement, 1, 2-12, **1995**.
- [73] Vlassara, H., Palace, M., Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of Internal Medicine*, 251, 87, **2002**.
- [74] Matis, W., Lavker, R., Murphy, G., Substance P induces the expression of an endothelial-leukocyte adhesion molecule by microvascular endothelium. *Journal of Investigative Dermatology*, 94, 492-495, **1990**.
- [75] Kirkham, S., Sheehan, J., Knight, D., Richardson, P., Thornton, D., Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochemical Journal*, 361, 537-546, **2002**.
- [76] Sebekova, K., Blazicek, P., Syrova, D., Krivosikova, Z., Spustova, V., Heidland, A., Schinzel, R., Circulating advanced glycation end product levels in rats rapidly increase with acute renal failure, *Kidney International*, 59, 58-62, **2001**.
- [77] Reddy, K.G., Dhar, S.C., Studies on carbohydrate moieties of glycoproteins in established adjuvant induced arthritis, *Agents Actions*, 25, 63-70, **1988**.
- [78] Jaradat, M.I., Schnitzlein-Bick, C.T., Singh, G.K., Moe, S.M., beta-2-Microglobulin increases the expression of vascular cell adhesion molecule on human synovial fibroblasts. *Kidney International*, 59, 1951-9, **2001**.
- [79] Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes P.A., Rodwell, V.W., Harper'in Biyokimyası. (eds: Dikmen, N., Özgüven, T.) Barış Kitabevi, 24. Baskı, İstanbul, **1998**.
- [80] Allen, H.J., Kisailus, E.C. Glycoconjugates: Composition, Structure and Function. *Marcell Dekker, New York*, 167-202, **1992**.
- [81] Champe, P.C., Harvey, R.A., Lippincott's illustrated Review's Serisinden Biyokimya. (eds: Tokullugil, A.). 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, **1994**.
- [82] Kim, E. H., Misek, E. D., Glycoproteomics-Based Identification of Cancer Biomarkers. *International Journal of Proteomics*, DOI:10.1155/2011/601937, **2011**.
- [83] Jemal, A., Murray, T., Samuels, A., Ghafoor, A., Ward, E., Thun, M.J., CA Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*, 53, 5-26, **2003**
- [84] Fania, C., Sogno, I., Vasso, M., Torretta, E., Leone, R., Bruno, A., Consonni, P., Albini, A., Gelfi, C., A PSA-guided approach for a better

- diagnosis of prostatic adenocarcinoma based on MALDI profiling and peptide identification. *Clinica Chimica Acta*, 439, 42–49, **2015**.
- [85] Basu, P.S., Ramdhan, M., and Batabyal, S.K., Lectin and serum– PSA interaction as a screening test for prostate cancer. *Clinical Biochemistry*, 36, 373–376, **2003**.
- [86] Tabarés, G, Radcliffe, C.M., Barrabes, S., Ramirez, M., Aleixandre, R.N., Hoesel, W., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Peracaula, R., de Llorens, R., Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA, *Glycobiology*, 16, 132-45, **2006**.
- [87] Ablin, R.J., Soanes, W.A., Bronson, P., Witebsky, E., Precipitating antigen of the normal human prostate, *Journal of Reproduction and Fertility*, 22,573-574, **1970**.
- [88] Hara, M., Koyanagi, Y., Inoue, T., Fukuyama, T., Some physicochemical characteristics of gamma seminoprotein, an antigenic component specific for human seminal plasma: forensic immunological study of body fluids and secretion, *Nippon Hoigaku Zasshi*, 25, 322-324, **1971**.
- [89] Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., Chu, T.M., Purification of a human prostate specific antigen, *Investigative urology*, 17, 159–163, **1979**.
- [90] Kuriyama, M., Wang, M.C., Papsidero, L.D., Killian, C.S., Shimano, T., Valenzuela, L., Nishiura, T., Murphy, G.P., Chu, T.M., Quantitation of prostate-specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay, *Cancer Research*, 40 (12), 4658-62, **1980**.
- [91] Stamey, T.A., Yang, N., Hay, A.R., McNeal, J.E., Freiha, F.S., Redwine, E., Prostatespecific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate, *The New England Journal of Medicine*, 317,909- 916, **1987**.
- [92] Stamey, T.A., Kabalin, J. N. Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. I. untreated patients, *Journal of Urology*, 141, 1070-1074, **1989**.
- [93] Catalona, W.J., Smith, D.S., Ratliff, T.L., Dodds, K.M., Coplen, D.E., Yuan, J.J., Petros, J.A., Andriole GL., Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer, *The New England Journal of Medicine*, 324, 1156-1161, **1991**.
- [94] Catalona, W.J., Hudson, M.A., Scardino, P.T. et al., Selection of optimal prostate specific antigen cutoffs for early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves, *Journal of Urology*, 2037-2042, **1994**.
- [95] Benson, MC., Whang, IS., Pantuck, A., Ring, K., Kaplan, SA., Olsson, CA., Cooner, WH., Prostatespecific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer, *Journal of Urology* 147: 815-816, **1992**.
- [96] Carter, H.B., Pearson, J.D., PSA velocity for the diagnosis of early prostate cancer. *A new concept. Urologic Clinics of North America*, 20, 665-670, **1993**.
- [97] Catalona, W.J., Beiser, J.A., Smith, D.S., Serum free prostate specific antigen and prostate specific antigen density measurements for predicting

- cancer in men with prior negative prostatic biopsies, *Journal of Urology*, 158, 2180-1, **1997**.
- [98] <http://www.leonsaporta.com/hastaliklar/prostat/prostat-kanseri/>
- [99] Wolff, A.M., Wender, R.C., Etzioni, R.B., vd., American cancer society guideline for the early detection of prostate cancer, *Cancer Journal for Clinicians*, 60 (2), 70-98, **2010**.
- [100] de Kok, J.B., Verhaegh, G.W., Roelofs, R.W., vd., DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors, *Cancer Research*, 62,2695–8, **2002**.
- [101] Rubin, M.A., Zhou, M., Dhanasekaran, S.M., digerleri, alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer, *JAMA*, 287,1662–70, **2002**.
- [102] Egeblad, M., Werb, Z., New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*,2,161–74, **2002**.
- [103] Vermassen, T., Van Praet, C., Vanderschaeghe, D., digerleri, Capillary electrophoresis of urinary prostate glycoproteins assists in the diagnosis of prostate cancer. *Electrophoresis*, 35,1017–24, **2014**.
- [104] Gutman, E.B., Sproul, E.E., and Gutman, A.B., Significance of increased phosphatase activity of bone at the site of osteoplastic metastases secondary to carcinoma of the prostate gland. *The American Journal of Cancer*, 28, 485–95, **1936**.
- [105] Yam, L.T., Clinical significance of the human acid phosphatases. *American Journal of Medicine*, 56,604–16, **1974**.
- [106] Vihko, P., Human Prostatic Acid-Phosphatases-Purification of a Minor Enzyme and Comparisons of the Enzymes, *Investigative Urology*, 16,349–52, **1979**.
- [107] Veeramani, S., Yuan, T.C., Chen, S.J., ve digerleri, Cellular prostatic acid phosphatase: a protein tyrosine phosphatase involved in androgenindependent proliferation of prostate cancer, *Endocrine-Related Cancer*, 12,805–22, **2005**.
- [108] Grignon, D.J., and Hammond, E.H., 1995. College of American Pathologists Conference XXVI on clinical relevance of prognostic markers in solid tumors. Report of the Prostate Cancer Working Group. Archives of pathology and laboratory medicine FIELD Publication Date:1995, 119:1122–6. FIELD Reference Number: 79 FIELD Journal Code: 7607091.
- [109] Schrohl, A. S., Holten-Andersen, M., Sweep, F., ve digerleri, Tumor markers-From laboratory to clinical utility, *Molecular and Cellular Proteomics*, 2,378–87, **2003**.
- [110] Kramer, G., Schwarz, S., Hagg, M., ve digerleri, Docetaxel induces apoptosis in hormone refractory prostate carcinomas during multiple treatment cycles, *British Journal of Cancer*, 94, 1592–8, **2006**.
- [111] Nam, R.K., Reeves, J.R., Toi, A., ve digerleri, A novel serum marker, total prostate secretory protein of 94 amino acids, improves prostate cancer

- detection and helps identify high grade cancers at diagnosis, *Journal of Urology*, 175, 1291–7, **2006**.
- [112] Nagakawa, O., Yamagishi, T., Fujiuchi, Y., ve digerleri, Serum hepatocyte growth factor activator (HGFA) in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer, *European Urology*, 48, 686–90, **2005**.
- [113] Miyata, Y., Sakai, H., Hayashi, T., Serum insulin-like growth factor binding protein-3/prostate-specific antigen ratio is a useful predictive marker in patients with advanced prostate cancer, *Prostate*, 54, 125–32, **2003**.
- [114] Kuefer, R., Hofer, M.D., Zorn, C.S.M., ve digerleri, Assessment of a fragment of e-cadherin as a serum biomarker with predictive value for prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 92, 2018–23, **2005**.
- [115] Sreekumar, A., Laxman, B., Rhodes, D.R., ve digerleri, Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96,834–43, **2004**.
- [116] Grover, P.K., Resnick, M.I., High resolution two-dimensional electrophoretic analysis of urinary proteins of patients with prostatic cancer. *Electrophoresis*, 18: 814–818, **1997**.
- [117] Partin, A.W., Getzenberg, R.H., CarMichael, M.J., Vindivich, D., Yoo, J., Epstein J.I., ve digerleri, Nuclear matrix protein patterns in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Cancer Research*, 53, 744–746, **2004**.
- [118] Alaiya, A., Roblick, U., Egevad, L., Carlsson, A., Franzén, B., Volz, D., Huwendiek, S., Linder, S., Auer, G., Polypeptide expression in prostate hyperplasia and prostate adenocarcinoma, *Analytical Cellular Pathology*, 21 (1), 1-9, **2000**.
- [119] Xiao, Z., Adam, B.L., Cazares, L.H., Clements, M.A., Davis, J.W., Schellhammer, P.F., Dalmasso, E.A., Wright, G.L., Quantitation of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease, *Cancer Research*, 61, 6029–6033, **2001**.
- [120] Vettese-Dadey, M., Going their separate ways: a profile of products for cell separation. *Scientist*,13,21, **1999**.
- [121] Huang, H., Kowalewski, T., Wooley, K. L., Nanodroplets of polyisoprene fluid contained within poly(acrylic acid-co-acrylamide) shells. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41, 1659-1668, **2003**.
- [122] Horák D., Benedyk, N., Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 22, 5827–5837, **2004**.
- [123] Altıntaş, E.B., *Lizozim saflaştırılması için mikron boyutlu manyetik partiküller*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, **2008**.
- [124] Odabasi, M., Denizli, A., Polyhydroxyethylmethacrylate based magnetic DNA-affinity beads for anti-DNA antibody removal from systemic lupus

- erythematosus patient plasma. *Journal of Chromatography B*, 760, 137-148, **2001**.
- [125] Oster, J., Parker, J., Brassard, L. A., Polyvinyl-alcohol-based magnetic beads for rapid and efficient separation of specific or unspecific nucleic acid sequences. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225 (1–2), 145, **2001**.
- [126] Cocker, T.M., Fee, C.J., Evans, R.A., Preparation of magnetically susceptible polyacrylamide/magnetite beads for use in magnetically stabilized fluidized bed chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*, 5, 53 (1), 79-87, **1997**.
- [127] Denizli, A., Tanyolaç, D., Salih, B., Özdural, A.R. Cibacrob blue F3GA-attached polyvinylbutyral microbeads as novel magnetic sorbents for removal of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) ions. *Journal of Chromatography A*, 793, 47-56, **1998**.
- [128] Denizli, A., Özkan, G., Arıca, M.Y., Preparation and characterization of magnetic polymethylmethacrylate microbeads carrying ethylene diamine for removal of Cu(II), Cd(II), Pb(II), and Hg(II) from aqueous solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, 78 (1), 81–89, **2000**.
- [129] Martin, C., Cuellar, J., Synthesis of a novel magnetic resin and the study of equilibrium in cation exchange with amino acids. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43 (2), 475–485, **2004**.
- [130] Konishi, Y., Lindholm, K., Yang, L.B, Li, R., Shen, Y., Isolation of living neurons from human elderly brains using the immunomagnetic sorting DNA-linker system. *American Journal of Pathology*, 161, 1567–1576, **2002**.
- [131] Altıntaş, E.B., Tuzmen, N., Candan, N., Denizli, A., Use of magnetic poly(glycidyl methacrylate) monosize beads for the purification of lysozyme in batch system. *Journal of Chromatography B*, 853, 105-113, **2007**.
- [132] Çorman, E.M., Öztürk, N., Tüzmen, N., Akgöl, S., Denizli, A., Magnetic polymeric nanospheres as an immobilized metal affinity chromatography (IMAC) support for catalase. *Biochemical Engineering Journal*, 49 (2), 159-164, 2010.
- [133] Pieters, B.R., Bardeletti, G., Coulet, P.R., Glucoamylase immobilization on a magnetic microparticle for the continuous hydrolysis of maltodextrin in a fluidized bed reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 32, 37-53, **1992**.
- [134] Burns, M.A., Kvesitadze, G.I., Graves, D.J., Dried calcium alginate/magnetite spheres: a new support for chromatographic separations and enzyme immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, 27, 137-145, **1985**.
- [135] Patolsky, F., Weizmann, Y., Katz, E., Willner, I., Magnetically Amplified DNA Assays (MADA): Sensing of Viral DNA and Single-Base Mismatches by Using Nucleic Acid Modified Magnetic Particles. *Angewandte Chemie International Edition*, 42 (21), 2372–2376, **2003**.
- [136] Çakmak, S., Gümüşderelioğlu, M., Denizli, A., Biofunctionalization of magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres with protein A:

- Characterization and cellular interactions. *Reactive and Functional Polymers*, 69 (8), 586-593, **2009**.
- [137] Akgöl, S., Denizli, A., Novel metal-chelate affinity sorbents for reversible use in catalase adsorption. *Journal of Molecular Catalysis B*, 28, 7-14, 2004.
- [138] Özkara, S., Akgöl, S., Çanak, Y., Denizli, A., A novel magnetic adsorbent for immunoglobulin-G purification in magnetically stabilized fluidized bed, *Biotechnology Progress*, 20 (4), 1169-75, **2004**.
- [139] Cañamero, P. F., de la Fuente, J. L., Madruga, E. L., Fernández. G., Atom Transfer Radical Polymerization of Glycidyl Methacrylate: A Functional Monomer. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 205, 16, 2221-2228, **2004**.
- [140] Massart, R., Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media, *IEEE Transactions on Magnetics*, 17, 1247–1248, **1981**.
- [141] Demirçelik, I., *Fibronektin Saflaştırılması İçin Kriyojel Monolitik Kolonların Hazırlanması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, **2012**.
- [142] Bereli, N., *Monoklonal Antibadi Saflaştırılması İçin Eşboyutlu Manyetik Partiküllerin Hazırlanması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı, **2010**.
- [143] Köse K., *Lizozim Saflaştırılmasına Yönelik Hidrofobik Manyetik Nanopartiküller*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı, **2011**.
- [144] Babaç, C., Yavuz, H., Galaev, I.Y., Pişkin, E., Denizli A., Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel, *Reactive and Functional Polymers*, 66, 1263-1271, **2006**.
- [145] Andaç, M., *İnsan serumundan albumin uzaklaştırılması için makrogözenekli poli(hidroksietil-metakrilat) kriyojeller*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı, **2009**.
- [146] Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.V., Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28, 815-822, **1967**.
- [147] http://proteomics.rockefeller.edu/ms_silverStaining
- [148] Çakmak, S., *Manyetik Poli(Glisidil Metakrilat) Mikrokürelerin İmmünofonksiyonalizasyonu ve Hayvansal Hücre Saflaştırılmasındaki Etkinliğinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyomühendislik Anabilim Dalı Doktora Tezi, **2008**.
- [149] Gupta, A. K., Gupta, M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26, 3995–4021, **2005**.
- [150] Hyeon, T., Chemical synthesis of magnetic nanoparticles, *Chemical Communications*, 927–934, **2003**.

- [151] Tang, J., Myers, M., Bosnick, K. A., Brus, L. E., Magnetite Fe₃O₄ nanocrystals: spectroscopic observation of aqueous oxidation kinetics, *Journal of Physical Chemistry B*, 107, 7501–7506, **2003**.
- [152] Horak, D., Benedyk, N., Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluid,. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 42, 5827–5837, **2004**.
- [153] Horak, D., Shapoval, P., Reactive poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 38, 3855-63, **2000**.
- [154] Horak, D., Magnetic polyglycidylmethacrylate microspheres by dispersion polymerization. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 39, 3707–3715, **2001**.
- [155] 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**.
- [156] Liu, X., Guan, Y., Yang, Y., Ma, Z., Wu, X., Liu, H., Preparation of superparamagnetic immunomicrospheres and application for antibody purification. *Journal of Applied Polymer Science*, 94, 2205–2211, **2004**.
- [157] Waldron, R. D., Infrared spectra of ferrites, *Physical Review*, 99, 1727-1735, **1955**.
- [158] Maity, D., Agrawal, D. C., Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 308, 46–55, **2007**.
- [159] Donadel, K., Felisberto, M. D. V., Favere, V. T., Rigoni, M., Batistela, N. J., Laranjeira, M. C. M., Synthesis and characterization of the iron oxide magnetic particles coated with chitosan biopolymer, 28, 509–514, **2008**.
- [160] Gu, S., Onishi, J., Kobayashi, Y., Nagao, D., Konno, M., Preparation and colloidal stability of monodisperse magnetic polymer particles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 289, 419–426, **2005**.
- [161] Hong, R., Li, J., Wang, J., Li, H., Comparison of schemes for preparing magnetic Fe₃O₄ nanoparticles, *China Particuology*, 5, 186–191, **2007**.
- [162] Swartz, H. M., Bolton, J. R., Borg, D. C., Biological applications of electron spin resonance. Wiley, New York, **1972**.
- [163] Kim, H., Kwon, H.S., Ahn, J., Lee, C.H., Ahn, I.S., Evaluation of a silica-coated magnetic nanoparticle for the immobilization of a His-tagged lipase, *Biocatalysis and Biotransformation*, 27 (4), 246–253, **2009**.
- [164] Jiang, X.Y., Bai, S., Sun, Y., Fabrication and characterization of rigid magnetic monodisperse microspheres for protein adsorption, *Journal of Chromatography B*, 852 62–68, **2007**.
- [165] Lu, S., Forcada, J., Preparation and characterization of magnetic polymeric composite particles by miniemulsion polymerization, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 44 (13), 4187–4203, **2006**.

- [166] Bao, H., Chen, Z. Kang, L., , Wu, P., Liu, J., Preparation of magnetic nanoparticles modified by amphiphilic copolymers, *Materials Letters*, 60, 2167–2170, **2006**.
- [167] Zheng, W., Gao, F., Gu H., Magnetic polymer nanospheres with high and uniform magnetite content, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 288, 403–410, **2005**.
- [168] Akkaya, B., Uzun, L., Altintas, E.B., Candan, F., Denizli, A., Concanavalin a Immobilized Monosize and Magnetic Poly(glycidyl Methacrylate) Beads for Use in Yeast Invertase Adsorption, *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 46, 232–239, **2009**.
- [169] Uygun, M., Uygun, D.A., Ozçalışkan, E., Akgöl, S., Denizli, A., Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 887-888, 73-78, **2012**.
- [170] Altunbaş, C., Uygun M., Uygun, D.A., Akgöl, S., Denizli, A., Immobilization of Inulinase on Concanavalin A-Attached Super Macroporous Cryogel for Production of High-Fructose Syrup, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170, 1909–1921, **2013**.
- [171] Yavuz, H., Akgöl, S., Arica, Y., Denizli, A., Concanavalin a immobilized affinity adsorbents for reversible use in yeast invertase adsorption, *Macromolecular Bioscience*, 14, 4 (7), 674-9, **2004**.
- [172] Zhang, J., Zhang, Z., Song, Y., Cai, H., Bovine serum albumin (BSA) adsorption with Cibacron Blue F3GA attached chitosan microspheres. *Reactive and Functional Polymers*, 66, 916-923, **2006**.
- [173] Gu, J., Lei, Z., Qizhi, Y., Novel Method for Human Serum Albumin Adsorption/Separation From Aqueous Solutions and Human Plasma With Cibacron Blue F3GA-Zn(II) Attached Microporous Affinity Membranous Capillaries, *Journal of Membrane Science*, 287, 271, **2007**.
- [174] Saka, Ö., Boya takılı manyetik poli(hidroksietil-metakrilat) nanoküreler ile kandan albümin azaltılması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı, **2011**.
- [175] Altıntaş, E.B., Denizli, A., Efficient Removal of Albumin from Human Serum by Monosize Dye Affinity Beads, *Journal of Chromatography B*, 832, 216-223, **2006**.
- [176] Govorukhina, N.I., Keizer-Gunnink, A., van der Zee, A.G.J., de Jong, S., de Bruijn, H.W.A., Bischoff, R., Sample preparation of human serum for the analysis of tumormarkers: a comparison of different approaches for albumin and γ -globulin-depletion, *Journal of Chromatography A*, 1009, 171-178, **2003**.
- [177] Castilho, L.R., Deckwer, W.D., Anspach, F.B., Influence of matrix activation and polymer coating on the purification of human IgG with protein A affinity membranes, *Journal of Membrane Science*, 172, 269, **2000**.

- [178] Hjertén, S., Hydrophobic interaction chromatography of proteins on neutral adsorbents, in: *Methods of protein separation*, (eds: Catsimpoolas, N.) Plenum Publishing Corporation, New York, **1976**.
- [179] Parsegian, V.A., Ninham, B.W., Temperature-dependent van der Waals forces, *Biophysical Letters*, 10, 664-674, **1970**.
- [180] Cheung, C.W., Porter, J.F., McKay, G., Sorption kinetic analysis for the removal of cadmium ions from effluents using bone char, *Water Research*, 35, 605-612, **2001**.
- [181] Drake, P.M., Cho, W., Li, B., Prakobphol, A., Johansen, E., Anderson, N.L., Regnier, F.E., Gibson, B.W., Fisher, S.J., Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation, *Clinical Chemistry*, 56 (2), 223-36, **2010**.
- [182] Barak, M., Mecz, Y., Lurie, A., and Gruener, N., Binding of serum prostate specific antigen to concanavalin A in patients with cancer or hyperplasia of the prostate, *Oncology*, 46, 375–377, **1989**.
- [183] Marrink, J., Klip, H., ve de Jong, R., Prostate-specific antigen- Con-A binding ratio in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Lancet*, 339, 619–620, **1992**.
- [184] van Pelt, J., van Dieijen-Visser, M.P., PSA-con-A binding ratio in benign prostate hyperplasia and prostate cancer, *Lancet*, 18, 340 (8812), 174-5. 1992.
- [185] Ohyama, C., Hosono, M., Nitta, K., Oh-eda, M., Yoshikawa, K., Habuchi, T., Arai, Y., ve Fukuda, M., Carbohydrate structure and differential binding of prostate specific antigen to Maackia amurensis lectin between prostate cancer and benign prostate hypertrophy, *Glycobiology*, 14 (8), 671-9, **2004**.
- [186] Dwek, M.V., Jenks, A., Leatham, A.J., A sensitive assay to measure biomarker glycosylation demonstrates increased fucosylation of prostate specific antigen (PSA) in patients with prostate cancer compared with benign prostatic hyperplasia, *Clinica Chimica Acta*, 14, 411(23-24),1935-9, **2010**.
- [187] Fukushima, K., Satoh, T., Baba, S., Yamashita, K., alpha1,2-Fucosylated and beta-N-acetylgalactosaminylated prostate-specific antigen as an efficient marker of prostatic cancer, *Glycobiology*, 20, 452–460, **2010**.
- [188] Isono, T., Tanaka, T., Kageyama, S., Yoshiki, T., Structural diversity of cancer-related and non-cancer related prostate-specific antigen, *Clinical Chemistry*, 48, 2187–94, **2002**.
- [189] Tanaka, T., Isono, T., Yoshiki, T., Yuasa, T., Okada, Y., A novel form of prostate-specific antigen transcript produced by alternative splicing, *Cancer Research*, 60 (1), 56-9, **2000**.
- [190] Boja, E., Hiltke, T., Rivers, R., digerleri, Evolution of clinical proteomics and its role in medicine. *Journal of Proteome Research*, 10 (1),66-84, **2011**.
- [191] Naitoh, A., Aoyagi, Y., Asakura, H., Highly enhanced fucosylation of serum glycoproteins in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14 (5), 436-45, **1999**.

- [192] Pocheć, E., Lityńska, A., Amoresano, A., Casbarra, A., Glycosylation profile of integrin alpha 3 beta 1 changes with melanoma progression. *Biochim Biophys Acta*, 7, 1643(1-3), 113-23, **2003**.
- [193] Zhao, J., Patwa, T.H., Qiu, W., Shedden, K., Hinderer, R., Misek, D.E., ve diğerleri, Glycoprotein microarrays with multi-lectin detection: unique lectin binding patterns as a tool for classifying normal, chronic pancreatitis and pancreatic cancer sera. *Journal of Proteome Research*, 6, 1864–74, **2010**.
- [194] Kreunin, P., Zhao, J., Rosser, C., Urquidi, V., Lubman, D.M., Goodison, S., Bladder cancer associated glycoprotein signatures revealed by urinary proteomic profiling. *Journal of Proteome Research*, 6 (7), 2631-9, **2007**.
- [195] Yang, N., Feng, S., Shedden, K., Xie, X., Liu, Y., Rosser, C.J., Lubman, D.M., Goodison, S., Urinary glycoprotein biomarker discovery for bladder cancer detection using LC/MS-MS and label-free quantification. *Clinical Cancer Research*, 15, 17 (10), 3349-59, **2011**.
- [196] Qiu, Y., Patwa, T.H., Xu, L., Shedden, K., Misek, D.E., Tuck, M., Jin, G., Ruffin, M.T., Turgeon, D.K., Synal, S., Bresalier, R., ve diğerleri, Plasma glycoprotein profiling for colorectal cancer biomarker identification by lectin glycoarray and lectin blot. *Journal of Proteome Research*, 7 (4), 1693–1703, **2008**.
- [197] Liu, Y., He, J., Li, C., Benitez, R., Fu, S., Marrero, J., Lubman, D. M. Identification and confirmation of biomarkers using an integrated platform for quantitative analysis of glycoproteins and their glycosylations., *Journal of Proteome Research*, 9 (2), 798-805, **2010**.
- [198] Janković, M.M., Kosanović, M.M., Glycosylation of urinary prostate-specific antigen in benign hyperplasia and cancer: assessment by lectin-binding patterns, *Clinical Biochemistry*, 38 (1), 58-65, **2005**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Neslihan İDİL

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Evli

E-posta: nsurucu@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı,
Beytepe Kampüsü ANKARA

Eğitim

Lise: Özel Bilim Fen Lisesi

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Tezsiz Yüksek Lisans: Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Doktora: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- ÜDS (85.00)

İş Deneyimi

04.12.2006 - ... : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Deneyim Alanları

Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından bütçesi
101.000 TL olan 0801601012 no' lu proje ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

(-)

Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Idil N., Perçin I., Karakoç V., Yavuz H., Özdemir B., Kara Ö., Özen H., Aksöz N., Aksöz E., Denizli A. "Prostat spesifik antijenin adsorbsiyonu için lektin immobilize manyetik poli(glisidilmetakrilat) mikrokürelerin hazırlanması". 7. Ulusal Afinité Teknikleri Kongresi 13-15 Eylül 2013, Çeşme (Poster Sunumu)

Idil N., Perçin I., Yavuz H., Aksöz N., Denizli A. "Investigation of lectin and serum-PSA interaction using magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres". 15. European Biotechnology Congress 15-18 Mayıs 2014 (Sözlü Sunum)