

**PROTEİN C SAFLAŞTIRILMASI İÇİN MOLEKÜLER  
BASKILANMIŞ ADSORBENTLER**

**MOLECULAR IMPRINTED ADSORBENTS FOR PROTEİN  
C PURIFICATION**

**BİNNAZ DEMİRCİ**

**Prof. Dr. ADİL DENİZLİ**

**Tez Danışmanı**

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

2013

## 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 tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

---/---/2013

Binnaz Demirci

## ÖZET

# PROTEİN C SAFLAŞTIRILMASI İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ ADSORBENTLER

**BİNNAZ DEMİRCİ**

**Yüksek Lisans, Kimya Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. ADİL DENİZLİ**

**Haziran 2013, 92 sayfa**

Protein C (PC), insan pıhtılaşma sistemi için önemli bir antikoagülant ve antitrombotiktir. Protein C, pıhtılaşma önleyici etkisini protein S (PS) ile birlikte FVa ve FVIIIa'yı inaktive ederek gösterir. Protein C, insan kanında 4 µg/mL derişiminde bulunur. Eksikliğinde damarlarda tromboz oluşma riski yüksektir. Bu kan pıhtıları (trombositler) damar yüzeyinden kopup kan akımına karıştığında felç, kalp krizi ve pulmoner emboli'ye neden olabilmektedir. Kan pıhtılaşması erken fark edilip tedavi edilmezse hayatı tehdit edici olabilir. Protein C eksikliği olan hastaların tedavisi için yaygın olarak heparin ve coumadin kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlar aşırı iç kanama, felç, organ yetmezliği gibi tehlikeli yan etkilere sahiptir. Buna karşılık, Protein C'nin herhangi bilinen bir yan etkisi yoktur; bu yüzden, protein C'nin tedavi olarak yerini alması çok ümit vericidir. Moleküler baskılama, moleküler kalıp kullanılarak polimerik matriksde tanıma bölgeleri oluşturan bir teknolojidir. Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanması kolay, dayanıklı, ucuz ve moleküler tanıma yeteneği olan polimerlerdir. MIP'ler yapay bir afinite ortamı olarak kabul edilebilir. Kriyojeller sıfırın altındaki sıcaklıklarda üretilen makrogözenekli polimerlerdir. Gözenekli kriyojeller geniş gözenekler, kısa difüzyon yolu ve düşük basınç düşmesi ve hem adsorpsiyon hem de elüsyon için çok kısa direnç zamanı gibi birçok avantajıyla geleneksel protein bağlama matrikslerine çok iyi bir alternatiftir.

Bu çalışmanın amacı, sulu çözülden Protein C saflaştırılması için kullanılacak Protein C baskılanmış poli(hidroksietilmetakrilat) süpermakrogözenekli kriyojeller hazırlamaktır. MIP kriyojeli hazırlamak için  $Cu^{2+}$  iyonları varlığında kalıp Protein C ile kompleks oluşturan metal şelat monomeri [N-metakriloil-(L)-histidinmetilester (MAH)], çapraz bağlayıcı olarak metilen-bis(akrilamid) (MBAAm) ve başlatıcı/aktivatör çifti olarak amonyum persülfat (APS)/N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) kullanılarak hidroksietil metakrilat (HEMA) ile kopolimerize olmuştur. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, kalıp protein C molekülleri 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılarak MIP kriyojelden uzaklaştırılmıştır. Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojele sulu çözülden Protein C adsorpsiyonu sürekli sistemde çalışılmıştır. Hazırlanan Protein C baskılanmış [P(HEMA-MAH/Cu(II))] kriyojeller spesifik yüzey alanı  $31.5 \text{ m}^2/\text{g}$ , şişme oranı ise % 88.4'dür. Maksimum Protein C adsorpsiyon kapasitesi  $30.4 \text{ mg Protein C/g kriyojel}$ 'dir. Seçici bağlama çalışmaları hemoglobin ve insan serum albumini varlığında yapılmıştır. Protein C/hemoglobin ve Protein C/insan serum albumini için MIP kriyojelin bağıl seçicilik katsayısı baskılanmamış PHEMA kriyojelinkine göre sırasıyla 2.37 ve 8.89 kat daha fazla görülmüştür. Protein C için MIP kriyojelinin seçiciliği protein sıvı kromatografisi ile doğrulanmıştır. MIP kriyojel, protein C bağlama kapasitesinde azalma olmaksızın birçok kez kullanılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Kriyojeller, Moleküler baskılama, Moleküler tanıma, Protein C, Protein adsorpsiyonu, Afinite bağlanma.

## **ABSTRACT**

### **MOLECULAR IMPRINTED ADSORBENTS FOR PROTEIN C PURIFICATION**

**BİNNAZ DEMİRCİ**

**Master of Science, Department of Chemistry**

**Supervisor: Prof. Dr. ADİL DENİZLİ**

**June 2013, 92 pages**

Protein C (PC) is the pivotal anticoagulant and antithrombotic in the human coagulation cascade. Protein C is showed its anticoagulant effect with Protein S (PS) by inactivating FVa and FVIIIa. PC is at a concentration of 4 µg/mL in human blood. In the absence of Protein C (Protein C deficiency) increases risk of generation thrombosis. When these blood clots break away from the surface of the vein and enter the blood stream, they will induce strokes, heart attacks and pulmonary embolisms. Blood clotting can be life threatening if it is not recognized early and treated. Heparin and coumadin are commonly used to the treatment for protein C deficient patients. However, these therapeutics have dangerous side effects as excessive bleeding, stroke, organ failure. In contrast, protein C has no known side effects; therefore, therapeutic replacement of protein C appears very promising. Molecular imprinting is a technology to create recognition sites in a polymeric matrix using a molecular template. Molecularly imprinted polymers (MIP) are easy to prepare, stable, inexpensive and capable of molecular recognition. MIPs can be considered as affinity separation media. Cryogels are macroporous polymer materials produced at sub-zero temperatures. Porous cryogels are a very good alternative to traditional protein-binding matrices many advantages like large pores, short diffusion path and low pressure drop, and very short residence times for both adsorption and elution.

The aim of this study is to prepare Protein C-imprinted poly(hydroxy ethylmethacrylate) based supermacroporous cryogels which can be used for the purification of Protein C from aqueous solution. A metal chelate monomer [N-methacryloyl-(L)-histidinemethylester (MAH)] forming coordination complex with the template Protein C in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  ions copolymerized with hydroxyethyl methacrylate (HEMA), using N,N'-methylene-bis(acrylamide) (MBAAm) as the cross-linker and ammonium persulfate (APS)/N,N,N',N'-tetramethylene diamine (TEMED) as initiator/activator pair to prepare the MIP cryogel. After polymerization is completed, the template Protein C molecules were removed from the MIP cryogel using 1.0 M NaCl solution. Adsorption of Protein C was performed from aqueous solution by Protein C imprinted P[HEMA-MAH/Cu(II)] cryogel in continuous system. The specific surface area of the Protein C imprinted cryogel was found to be  $31.5 \text{ m}^2/\text{g}$ , swelling ratio was % 88.4. The maximum Protein C adsorption capacity was 30.4 mg Protein C/g cryogel. Selective binding studies were performed in the presence of hemoglobin and human serum albumin. The relative selectivity coefficients of MIP cryogel for Protein C/hemoglobin and Protein C/human serum albumin were 2.37 and 8.89 times greater than those of the non-imprinted PHEMA cryogel, respectively. The selectivity of MIP cryogel for Protein C was also confirmed with fast protein liquid chromatography. The MIP cryogel could be used many times with no remarkable decrease in Protein C binding capacity.

**Key Words:** Cryogels, Molecular imprinting, Molecular recognition, Protein C, Protein adsorption, Affinity binding.

## TEŞEKKÜR

Bana bu çalışmayı gerçekleştirme fırsatı sunarak hayatıma yön veren, iyi ki de bu ailenin bir üyesiyim dememi sağlayan, karşılaştığım problemlerin çözümünde deneyimlerinden ve engin bilgisinden yararlandığım, desteklerini benden esirgemeyerek her zaman yanımda olduğunu hissettiren, örnek aldığım ve her zaman örnek alacağım, değerli bilim insanı, tez danışmanım, kıymetli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Her zaman güler yüzüyle pozitif enerji veren ve bilimsel katkı ve desteği için sevgili hocam Doç. Dr. Handan Yavuz'a,

Bilimsel katkıları ve destekleri için sevgili hocam Doç. Dr. Lokman Uzun'a,

Tez çalışmalarım boyunca bana her zaman destek olan, teorik ve pratik bilgilerini benimle paylaşarak çalışmamı tamamlamamda çok büyük katkısı olan, her anlamda yanımda olduğunu hissettiren, karşılaştığım zorlukların üstesinden gelmeme yardımcı olan, çok sevdiğim ablam Uzman Nilay Bereli'ye,

Sıkıntılarımı, endişelerimi ve sevinçlerimi hiç tereddüt etmeden paylaştığım, beni her zaman sabırla dinleyen, yanımda olduğunu hissettiren, çalışmalarım boyunca deneyimlerinden yararlandığım ve çalışmalarımın tamamlanmasında emeği olan, sevgili arkadaşım Sevgi Aslıyüce Çoban'a

Çalışmalarım boyunca bana destek olan, sıcak ve samimi bir ortamda çalışmamı sağlayan sevgili BİOREG üyeleri Canan Armutçu, Mitra Jalilzadeh, Duygu Çimen, Mehmet Emin Çorman, Müge Andaç, Fatma Yılmaz, Gizem Ertürk, TürkanMammadova, Gülsu Şener, Tuğba Doğan, Bahar Ergün, Ali Derazshamshir, İlker Koç, Gözde Baydemir Peşint, Kemal Çetin, Ilgım Göktürk, Yeşeren Saylan, Recep Üzek, Fatma Kartal, Mehmet Lütfi Yola, Deniz Türkmen, Emel Tamahkar, Semra Akgönüllü, Erdoğan Özgür, Işık Perçin, Esmâ Sari, Seda Atay, Daryoush Majidi, Kazım Köse ve Sabina Hüseyinli'ye

Her zaman yanımda olan, karşılaştığım her sıkıntıda bana destek olan, tez sürecindeki en büyük destekçim, yokluğunu asla düşünemediğim Serkan Karanfil'e

Hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyerek her zaman, her koşulda yanımda olan, fedakarlıklarını asla unutamayacağım her şeyim canım anneme ve kardeşime,

Sonsuz Teşekkürler...

Binnaz Demirci

Haziran, 2013



# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Protein C .....	4
2.1.1. Protein C'nin Sentezi .....	5
2.1.2. Protein C'nin Yapısal Özellikleri .....	5
2.1.3. Protein C Aktivasyonu.....	7
2.1.4. Protein C'nin Fizyolojik Rolü .....	9
2.1.5. Protein C Eksikliği .....	10
2.1.5.1. Kalıtsal Protein C Eksikliği .....	11
2.1.5.1.1. Tip I Protein C Eksikliği (Klasik Tip).....	12
2.1.5.1.2. Tip II Protein C Eksikliği.....	12
2.1.5.2. Edinsel Protein C Eksikliği .....	13
2.1.6. Protein C'nin Klinik Uygulamaları.....	15
2.2. Moleküler Baskılama Teknolojisi.....	15
2.2.1. Makromoleküler Kalıplar ile Baskılanmış Polimerler .....	18
2.2.2. Moleküler Baskılama Tekniği .....	19
2.2.2.1. Kalıp (Hedef) Molekül .....	21
2.2.2.2. Fonksiyonel Monomerler .....	21
2.2.2.3. Çapraz Bağlayıcılar .....	22
2.2.2.4. Çözücüler .....	22
2.2.2.5. Başlatıcılar .....	23
2.2.3. Moleküler Baskılama Yöntemleri .....	23

2.2.3.1. Kovalent Baskılama .....	23
2.2.3.2. Kovalent Olmayan Baskılama.....	24
2.2.3.3. Metal-Şelat Etkileşimlerine Dayalı Moleküler Baskılama .....	25
2.3. Kriyojeller .....	26
2.3.1. Kriyojel ve Kriyojelleşme .....	26
2.3.2. Kriyojellerin Oluşumu ve Özellikleri.....	27
2.3.3. Kriyojellerin Uygulamaları .....	30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	32
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....	32
3.2. N-metakriloil-(L)-Histidin Metil Ester (MAH) Monomerinin Sentezi.....	33
3.3. MAH-Cu(II) Kompleksinin Hazırlanması.....	33
3.4. Protein C Baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] Süpermakrogözenekli Kriyojellerin Hazırlanması .....	34
3.5. Kalıp Molekülün (Protein C) Uzaklaştırılması.....	35
3.6. Protein C Baskılanmış Kriyojellerin Karakterizasyonu .....	35
3.6.1. FTIR Çalışmaları.....	35
3.6.2. NMR Çalışmaları.....	36
3.6.3. Yüzey Alanı Ölçümleri.....	36
3.6.4. Şişme Deneyi.....	36
3.6.5. Yüzey Morfolojisi.....	37
3.7. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları .....	37
3.7.1. Protein C Adsorpsiyonu .....	37
3.7.2. Seçicilik Deneyleri.....	39
3.7.3. Desorpsiyon Çalışmaları .....	39
3.8. Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi (FPLC) Analizi .....	40
3.9. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	41
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	43
4.1. Protein C Baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] Kriyojeller .....	43
4.1.1. MAH ve MAH-Cu(II) Önkomplesinin Karakterizasyonu .....	43
4.1.2. Protein C Baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] Kriyojellerin Karakterizasyonu .....	45
4.1.2.1. Şişme Özellikleri .....	45

4.1.2.2. Yüzey Morfolojisi.....	46
4.1.2.3. Yüzey Alanı Ölçümleri .....	46
4.1.2.4. FTIR Çalışmaları.....	48
4.2. Sulu Çözeltilerden Protein C Adsorpsiyonu .....	49
4.2.1. pH Etkisi.....	49
4.2.2. Derişim Etkisi .....	50
4.2.3. Akış Hızının Etkisi .....	51
4.2.4. Sıcaklığın Etkisi .....	52
4.2.5. İyonik Şiddet Etkisi.....	53
4.2.6. Adsorpsiyon Hızının Etkisi .....	54
4.2.7. Adsorpsiyon İzotermleri .....	55
4.2.8. Adsorpsiyon Kinetiği .....	58
4.2.9. Seçicilik Deneyleri.....	61
4.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik .....	63
4.4. Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi (FPLC) Analizi .....	64
4.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) .....	65
5. YORUM.....	67
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ .....	80

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Protein C yapısı .....	6
Şekil 2.2. İnsan Protein C yapısı .....	7
Şekil 2.3. Aktive Protein C'nin oluşumu ve işlevi .....	9
Şekil 2.4. Protein C ve enflamasyon kaskadı. ....	10
Şekil 2.5. Protein C Eksikliğinin sınıflandırılması.....	11
Şekil 2.6. Tip I Protein C Eksikliği.....	12
Şekil 2.7. Tip II Protein C Eksikliği.....	13
Şekil 2.8. 1994-2010 yılları arasında yayınlanan makromoleküler baskılama ile ilgili yıl ve uygulamalarına göre makalelerin sayısı.....	19
Şekil 2.9. Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanması.....	20
Şekil 2.10. Kovalent Baskılama.....	24
Şekil 2.11. Kovalent Olmayan Baskılama.....	25
Şekil 2.12. Kriyojel hazırlama aşamaları .....	28
Şekil 3.1. N-metakriloil-(L)-histidin (MAH) monomerinin sentezi.....	33
Şekil 3.2. Protein C kalıp oluşumunun şematik gösterimi.....	35
Şekil 3.3. Sürekli sistem düzeneği.....	38
Şekil 3.4. FPLC sisteminin ve uygulanan kolonun fotoğrafı.....	40
Şekil 4.1. MAH monomerinin molekül formülü.....	43
Şekil 4.2. MAH monomerinin FTIR spektrumu.....	44
Şekil 4.3. MAH monomerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu .....	44
Şekil 4.4. MAH-Cu(II) monomerinin FTIR spektrumu .....	45
Şekil 4.5. P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin SEM fotoğrafları .....	47
Şekil 4.6. Protein C baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerinin FTIR spektrumları.....	48
Şekil 4.7. Protein C adsorpsiyonuna pH etkisi.....	50

Şekil 4.8. Protein C derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi .....	51
Şekil 4.9. Protein C adsorpsiyon kapasitesine akış hızı etkisi .....	52
Şekil 4.10. Protein C adsorpsiyon kapasitesine sıcaklığın etkisi .....	53
Şekil 4.11. Protein C adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi.....	54
Şekil 4.12. Sulu çözültiden Protein C adsorpsiyonunun zamanla değişimi.....	55
Şekil 4.13. Protein C baskılanmış kriyojeller için Langmuir adsorpsiyon izotermi..	57
Şekil 4.14. Protein C baskılanmış kriyojeller için Freunlich adsorpsiyon izotermi..	57
Şekil 4.15. Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel için birinci derece adsorpsiyon kinetiği.....	60
Şekil 4.16. Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel için ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.....	61
Şekil 4.17. Sulu çözültiden yarışmalı adsorpsiyon.....	62
Şekil 4.18. Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelinin tekrar kullanılabilirliği .....	63
Şekil 4.19. HSA ve Protein C'nin Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelinde FPLC ile ayrılması .....	64
Şekil 4.20. Hemoglobin (Hb) ve Protein C'nin Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelinde FPLC ile ayrılması .....	65
Şekil 4.21. SDS-PAGE görüntüsü .....	66

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Vitamin K'ya bağımlı proteinler .....	4
Çizelge 4.1. Poli(HEMA), NIP ve MIP için denge şişme ve makrogözenek oranları .....	46
Çizelge 4.2. MIP kriyojel için Langmuir ve Freundlich izotermi.....	58
Çizelge 4.3. Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel için birinci ve ikinci derece kinetik verileri.....	61
Çizelge 4.4. Protein C'ye göre HSA ve Hb için $K_d$ ve $k_{değerleri}$ .....	62
Çizelge 4.5. Kromatografik ayırma verileri.....	65

# 1. GİRİŞ

Protein C (PC), insan kan pıhtılaşma sisteminin önemli bir doğal inhibitörüdür. Protein C, molekül ağırlığı 62.000 Dalton olan vitamin K'ya bağımlı bir glikoproteindir. Protein C, hem antikoagülan hem de kan pıhtılaşma basamaklarında antitrombotik fonksiyonları olan özel bir proteindir. İnsan Protein C'si karaciğerde tek zincirli protein öncülü olarak sentezlenir ve proteolitik olarak parçalanıp aktifleşene kadar kanda inaktif zimojen olarak bulunur [1].

Protein C, sadece gerektiği yerde ve gerektiği zamanda aktive olmaktadır. Protein C'nin aktive olabilmesi için, trombinin endotel hücre yüzeyinde yer alan trombomodulin (TM) reseptörü ile birleşmesi gerekir. Endotel hücre yüzeyinde oluşan trombin-trombomodulin kompleksi inaktif haldeki Protein C'ye bağlanır. Trombin-Protein C etkileşimi sonucu Protein C aktif hale gelir. Aktive protein C daha sonra vitamin K'ya bağımlı bir kofaktör olan protein S ile kompleks oluşturur. Bu kompleks Faktör Va ve VIIIa'yı inaktive ederek kanın pıhtılaşmasını düzene sokar, böylece enzim faktörleri Xa ve trombin üretimi önlenir.

Yarılanma ömrü 6 saat olan Protein C kanda 4 µg/mL seviyesinde bulunur. Kanda Protein C seviyesi azaldığında ciddi problemler ortaya çıkabilmektedir. Eksikliğinde damarlarda tromboz oluşma riski yüksektir. Bu kan pıhtıları (trombositler) damar yüzeyinden kopup kan akımına karıştığında felç, kalp krizi ve pulmoner emboli'ye neden olabilir. Kan pıhtılaşması erken fark edilip tedavi edilmezse hayati tehlikeye sebep olabilir [2].

Protein C eksikliğinin (kalıtsal ya da sonradan kazanılan/edinsel) genel dünya nüfusu içindeki vaka oranı oldukça yüksektir. Yıllardır protein C eksikliği olan hastalar, hepsinin klinik olarak dezavantajları olan soğuk donmuş plazma, protrombin kompleks konsantresi, heparin ya da oral pıhtı önleyicilerle tedavi edilmiştir [3]. Büyük bir problem olan aşırı iç kanamaya, deri nekrozuna inme (felç) ya da organ yetmezliklerine bu ilaçların kullanımı neden olabilir. Buna karşılık, Protein C'nin herhangi bilinen bir yan etkisinin olmaması bu proteinin tedavi edici olarak kullanılmasında ümit vericidir [1].

Yapılan bu çalışma Protein C'nin ortamdan ayrılması ve saflaştırılmasına yönelik, biyolojik sistemlerle uyumlu, ilgili molekül için yüksek seçiciliğe sahip ve düşük

maliyetli, yeni nesil molekül bellekli polimerlerin (MIP) hazırlanması ve biyokromatografik amaçlı kullanılmasını içermektedir.

Moleküler baskılama yöntemi, çeşitli ortamlardan çeşitli iyonların ve moleküllerin yüksek seçicilikle ayrılmaları için akıllı polimerler elde edilmesi ve bunun farklı uygulamalarda kullanılmasını yaygınlaştıran yeni bir kromatografik malzeme geliştirme metodudur. Moleküler baskılamada, hedef molekül, çevresi ile etkileşen bir kalıp olarak davranır, çapraz bağlı monomerler hedef molekül çevresinde düzenlenir ve kalıp benzeri bir tabaka oluşturmak üzere birlikte polimerleşirler. Polimerizasyondan sonra hedef molekül uzaklaştırılır ve hedef moleküle büyüklük, şekil ve fonksiyonel grupların yerleşimi olarak tamamlayıcı bağlanma bölgeleri oluşur. Bu yöntemde, hedef molekül ve fonksiyonel monomerler arasında kovalent [4,5,6], kovalent olmayan [7,8] veya metal-şelat etkileşimleri [9,10,11] söz konusudur. Bu tez kapsamında metal-şelat etkileşimlerinin gerçekleştiği türden MIP'ler sentezlenmiştir. Metal-şelat etkileşimleri, bağlanma gücü, seçiciliği ve yönlenme açısından sulu çözeltilerdeki elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarıyla kıyaslandığında kovalent etkileşimlere daha çok benzemektedir. Bununla birlikte hedef molekülün yapıdan uzaklaştırılması kovalent baskılamada olduğu kadar güç değildir [9].

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) hazırlanması kolay, kararlı, ucuz ve moleküler tanıma yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, MIP'ler yapay afinite ortamı olarak kabul edilebilir. Moleküler tanıma temelli ayırma teknikleri, hedef moleküllere karşı yüksek seçiciliğinden dolayı çeşitli alanlarda çok fazla dikkat çekmiştir [12].

Kriyojeller, kısmen donmuş monomer veya polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan jel matrikslerdir. Kriyojellerin yüksek gözenekliliği onları süpermakrogözenekli kromatografik materyal olarak uygun hale getirmektedir. Süpermakrogözenekliliğe ve bağlantılı gözenek yapısına sahip olan bu tür kromatografik matriks çok düşük akış direncine sahiptir [13]. Süpermakrogözenekli kriyojeller esneklik, biyoyumluluk, fiziksel ve kimyasal kararlılık ve kolay hazırlanma gibi birçok avantajla protein saflaştırmak için iyi bir alternatiftir. Polimerik jeller, biyoteknolojide kromatografik malzeme, molekül ve hücrelerin



immobilizasyonu için taşıyıcı, katı kültür ortamı ve elektroforez için matriks olarak kullanılmaktadır.

Sunulan tezin amacı, sulu çözeltilerden Protein C saflaştırılması için kullanılacak Protein C baskılanmış poli(hidroksietilmetakrilat) süpermakrogözenekli kriyojellerin hazırlanması ve sürekli sistemde bu kriyojellerin Protein C saflaştırılmasında kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Bu çalışma kapsamında fonksiyonel monomer olarak N-metakrilolil-(L)-histidin (MAH) ve kalıp molekül olarak Protein C kullanılmış ve moleküler baskılama tekniği kullanılarak Protein C tanınması için Protein C baskılanmış kriyojeller hazırlanmıştır. Sentezlenen bu adsorbentin optimum adsorpsiyon koşullarının belirlenmesi amacıyla başlangıç Protein C derişiminin, pH'nın, sıcaklığın, akış hızının, zamanın ve iyonik şiddetin adsorpsiyon hızı ve kapasitesine etkisi sürekli sistemde incelenmiştir. Son olarak Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] (MIP) kriyojellerin Protein C'ye karşı seçiciliğinin göstermek üzere insan serum albumin (HSA) ve hemoglobin ile adsorpsiyon deneyleri yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Protein C

İlk kez 1960'da antikoagülan etkisi tanımlanan Protein C (PC), insan kan pıhtılaşma sisteminin önemli bir doğal inhibitörüdür [14]. Protein C, normal biyosentezi için Vitamin K gerektiren bir serin proteazdır. Pıhtılaşma protein faktörleri VII, IX, X, S ve Z proteinleri ve protrombinin de yer aldığı Vitamin K'ya bağımlı bir ailenin üyesidir [15,2]. Bu protein grubu kanın pıhtılaşmasında önemli bir rol oynamaktadır [16].

Çizelge 2.1. Vitamin K'ya bağımlı proteinler

Protein	Molekül ağırlığı (Da)	Polipeptit zincir sayısı	Gla- bölgelerinin sayısı	Karbohidrat içeriği (%)	Plazma derişimi (µg/mL)
Faktör II	72 000	1	10	8	80-90
Faktör VII	50 000	1	10	9-10	0.47
Faktör IX	57 000	1	12	17	4
Faktör X	59 000	2	11	15	6.4
Protein C	62 000	2	9	23	4
Protein S	71 000	1	11	7-8	25-35

Protein C, 1976 yılında Johan Stenflo tarafından sığır plazmasından izole edilmiştir ve DEAE-Sepharose ile saflaştırılan üçüncü protein olduğu için "Protein C" adını almıştır. Ancak pıhtılaşmanın fizyolojik düzenlemesinde Protein C'nin fonksiyonu bundan sonraki birkaç yıl boyunca açıklığa kavuşturulamamıştır. İnsan plazma Protein C'si ise 1979'da Kisiel tarafından saflaştırılmıştır. Düşük miktarlardaki plazma Protein C'si ilk 1982'de Griffin ve arkadaşları tarafından bir aile üzerinde çalışılarak venöz tromboz ile ilişkili bulunmuştur. Homozigot Protein C eksikliği ve buna bağlı olarak yenidoğanlarda doğum saatleri içerisinde ortaya çıkan ciddi sağlık sorunları (purpura fulminans, yaygın damar içi pıhtılaşma) 1984 yılında birçok bilim adamı tarafından tanımlanmıştır. Bu yenidoğanların ve sonradan tanımlananların, saptanamayan Protein C miktarı ile ilişkili olarak koagülasyon sisteminde bozukluğa sahip olduğu belirlenmiştir. Etkilenen bebekler

sürekli plazma enfüzyonuna (aşılama) rağmen genellikle ölmüştür. Protein C'nin moleküler biyolojisi ve hücre biyolojisi ile ilgili bilgiler sonraki yıllarda ortaya konulmuştur [17,18].

İnsan Protein C'si plazmada zimojen olarak dolaşır ve endotel hücrelerin membranları üzerindeki trombin bağlı trombomodulin tarafından spesifik kırılmayla aktive Protein C'ye (APC) dönüştürülür [16] ve trombinin işleyişini düzenlemede kritik bir rol oynar [17].

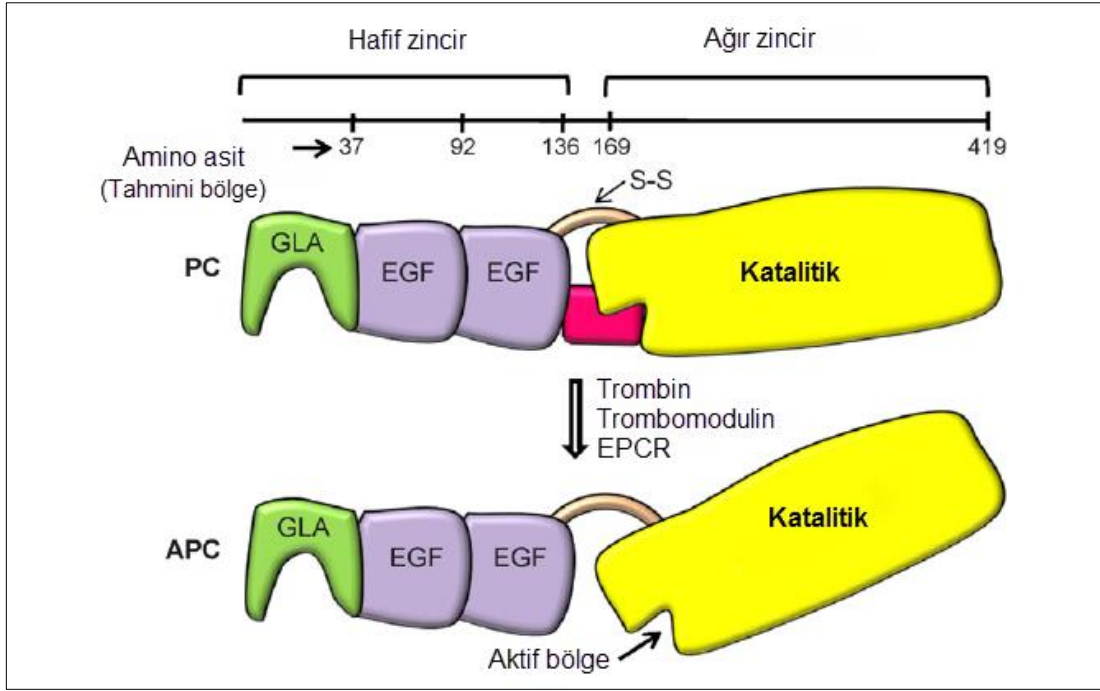
### **2.1.1. Protein C'nin Sentezi**

Protein C, pıhtılaşma basamaklarında rol oynayan Vitamin K'ya bağımlı tüm proteinler gibi karaciğerde sentezlenir [16,19]. Bu protein 461 amino asitten oluşan uzun tek zincirli protein öncülü olarak sentezlenir [20] ve proteolitik olarak parçalanıp aktiveleşene kadar kanda iki zincirli inaktif zimojen olarak bulunur [2].

### **2.1.2. Protein C'nin Yapısal Özellikleri**

İnsan Protein C'si (hPC) için cDNA, 461 amino asitten oluşan bir protein kodlamaktadır [21]. Gen yapısına ve diğer proteinlerle homolog olan amino asit dizisine dayanan bilgiye göre Protein C'nin farklı yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahip çeşitli bölgeler içerdiği açıktır [20,18]. Protein C'nin birincil dizisi ya doğrudan tespit edilmektedir ya da cDNAs sıralamasından anlaşılmaktadır [14].

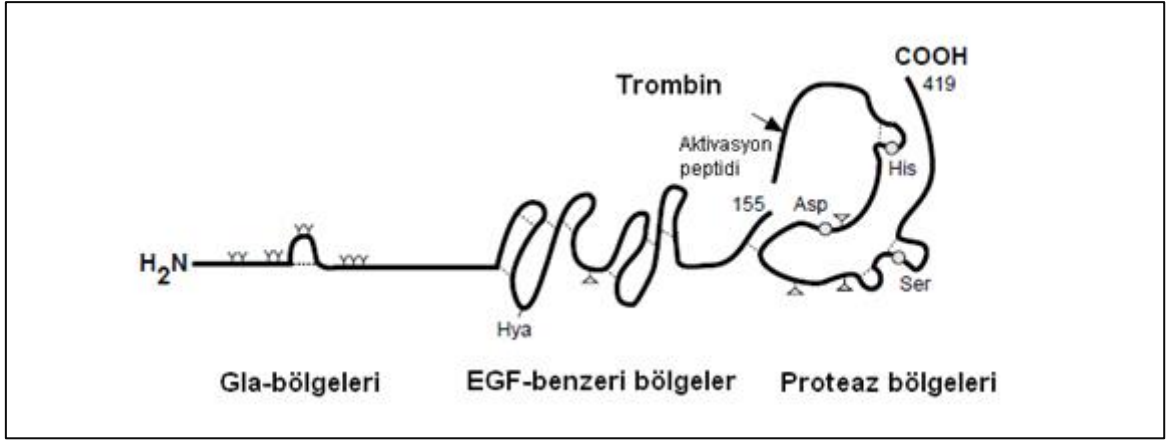
Protein C, molekül ağırlığı 62000 Da olan bir glikoproteindir [1,22]. Protein C % 23 oranında karbonhidrat içerir ve birbirine disülfid bağıyla bağlı biri hafif (21 kDa) ve diğeri ağır zincir (41 kDa) olmak üzere 2 zincirden oluşmaktadır. Hafif zincir (155 amino asit) Ala-Asn-Ser-Phe-Leu- ve ağır zincir (262 amino asit) Asp-Pro-Glu-Asp-Gln amino asit dizisine sahiptir [23,24].



Şekil 2.1. Protein C yapısı. GLA: karboksi-glutamik asit bakımından zengin bölge; EGF: epidermal büyüme faktörü-benzeri kısım; S-S: disülfid bağı. Kırmızı kısım aktivasyon peptidini temsil etmektedir. Çizgi tahmini amino asit diziliş sırasını göstermektedir.

Protein C, birden fazla bölümden oluşmaktadır; hafif zincir,  $\gamma$ -karboksiglutamik asit (Gla) bölümleri içeren Vitamin K'ya bağımlı bir kısımdan ve 2 epidermal büyüme faktörü (EGF)-benzeri kısımdan oluşurken, ağır zincir kısa aktivasyon peptidi ve histidin, aspartik asit ve serinden oluşan katalitik üçlüyesahip bir serin proteaz bölümü içerir (Şekil 2.2) [25,18].

Protein C, hafif zincirde 2 değerlikli metal iyonlarının çoğunu bağlayabilen 9 Gla bölgesine sahiptir. Biyolojik aktivitesi olan  $\gamma$ -karboksiglutamik asit (Gla) bölgeleri  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu bağlamaya yüksek afinite gösterir. Ayrıca Protein C önemli metal bağlayıcı gruplar olan yüzeyde ulaşılabilir 12 histidine sahiptir [1]. Protein C'nin sahip olduğu bu yapılar Protein C'nin saflaştırılması ve uzaklaştırılmasında önemli rol oynamaktadır.



Şekil 2.2. İnsan Protein C yapısı. Semboller: Y=Gla-bölgeleri, Hya=erito- $\beta$ -hidroksiaspartik asit, O=katalitik bölgeler,  $\Delta$ = N-bağlı glikosilasyon/glikolizlenme bölgeleri

APC'nin Gla yapısı,  $Ca^{2+}$ 'ya bağımlı membran yüzeyindeki kofaktör Protein S ve endotel hücre Protein C reseptörü (EPCR) ile proteazın etkileşimini içermektedir [26]. Glutamik asit, Vitamin K'ya bağlı olarak karaciğerde reaksiyona girerek karboksillenir. Bu bölge kalsiyum iyonları varlığında negatif yüklü fosfolipit ile etkileşime girer ve bu, APC'nin antikoagülan etkisi için gereken ön koşuldur [20,18].

Gla-bölgesini EGF benzeri 2 yapı/bölge takip eder. Bu bölgeler Protein S ile etkileşime girer. Gla-bölgesiyle birlikte bu bölgeler, Protein C'nin trombin-trombomodulin kompleksine bağlanması için önemlidir [20].

APC'nin katalitik fonksiyonunda EGF bölgesinin rolü iyi bilinmemektedir. Ancak N-terminal EGF bölgesinin APC'nin Protein S'e bağımlı antikoagülan fonksiyonu için gerekli olduğuna inanılır. Protein S kofaktör olarak, APC'nin antikoagülan fonksiyonunu düzenleme işlevi görür [26].

### 2.1.3. Protein C Aktivasyonu

Protein C, kanda zimojen (inaktif) olarak dolaşmakta ve sadece gerektiği yerde ve gerektiği zamanda aktive olmaktadır [2]. Protein C'nin fizyolojik olarak işlevsel olabilmesi için aktif bir serin proteaza dönüştürülmesi gerekmektedir. İnsan Protein

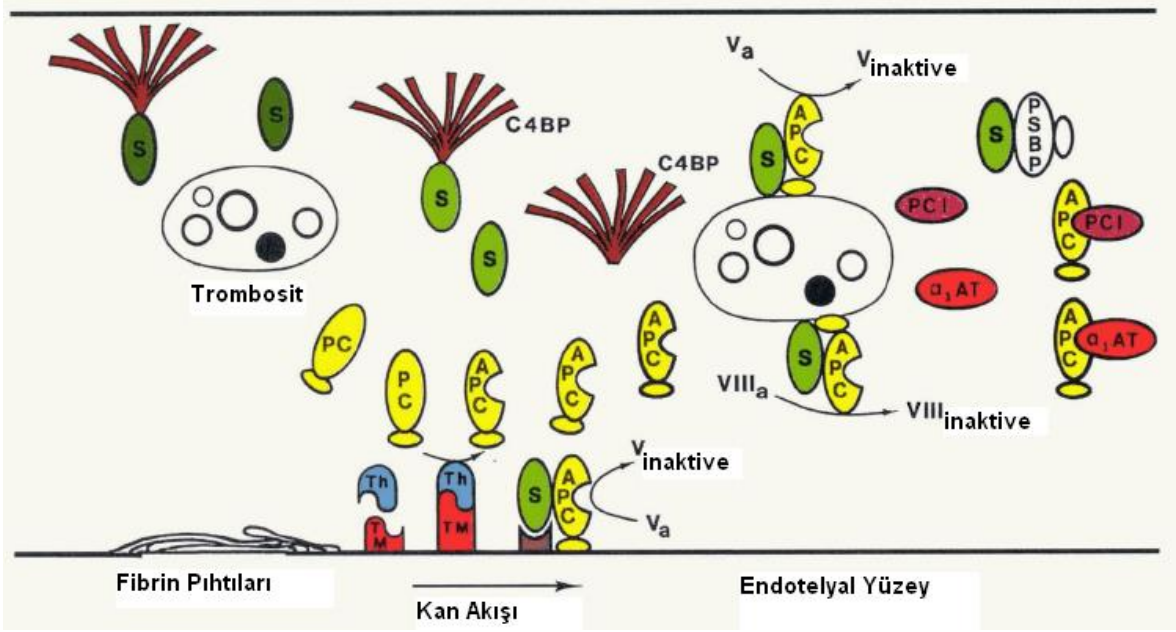
C aktivasyonu ağır zincirdeki amino asit ucundan küçük bir aktivasyon peptidinin (dodecapeptidinin) enzimatik uzaklaştırılmasıyla meydana gelmektedir [23].

Protein C'nin aktive olabilmesi için, trombinin endotel hücre yüzeyinde yer alan trombomodulin (TM) reseptörü ile birleşmesi gerekir [2]. Trombomodulin (TM), trombine yüksek afinite gösteren multi-modüler membran proteindir. Bağlı trombin, Protein C'yi aktive etmede bağlanmayan trombinden en az 20.000 kat daha etkilidir [14,27].

Kılcal damarlarda birim kan hacmi başına düşen endotel hücre yüzey alanı büyük damarlardakine göre daha geniştir, mikrosirkülasyondaki (küçük kan dolaşımı) TM derişimi büyük damarlarınkinden 1000 kat daha fazladır. Büyük damarlarda trombin bağlanmamış durumda serbest bulunur. Fakat Trombin mikrosirkülasyona (küçük kan dolaşımına) girer girmez TM'e maruz kalır ve bağlanır [27]. TM'e bağlanan trombinde konformasyonel değişiklik meydana gelir [28].

Normalde trombinin Protein C'ye etkisi sınırlıdır. Trombin-trombomodulin kompleksinin ise Protein C'yi aktiveleme gücü, tek olarak trombinin etkisinden 1000 kat yüksektir. Trombomodulinin yakınında yer alan endotel hücre Protein C reseptörü (EPCR), inaktif haldeki Protein C'ye bağlanır. Trombin-Protein C etkileşimi sonucu Protein C aktif hale gelir (Şekil 2.3). Aktifleşme ağır zincirdeki 169. pozisyondaki arjininin koparılmasıyla sağlanır.

Trombin-TM kompleksi ile Protein C aktivasyonu  $Ca^{2+}$  ya bağımlı bir reaksiyondur. Bu reaksiyon endotel hücre yüzeyindeki endotel hücre Protein C reseptörü ile zimojenin kompleks oluşturmasıyla uyarılır.  $Ca^{2+}$  Protein C'nin zimojenik özelliklerinde önemli rol oynamaktadır, çünkü  $Ca^{2+}$  sadece TM varlığında trombin ile zimojen aktivasyonunu uyarmaz aynı zamanda potansiyel olarak TM yokluğunda da trombin ile aktivasyonunu inhibe eder [29].



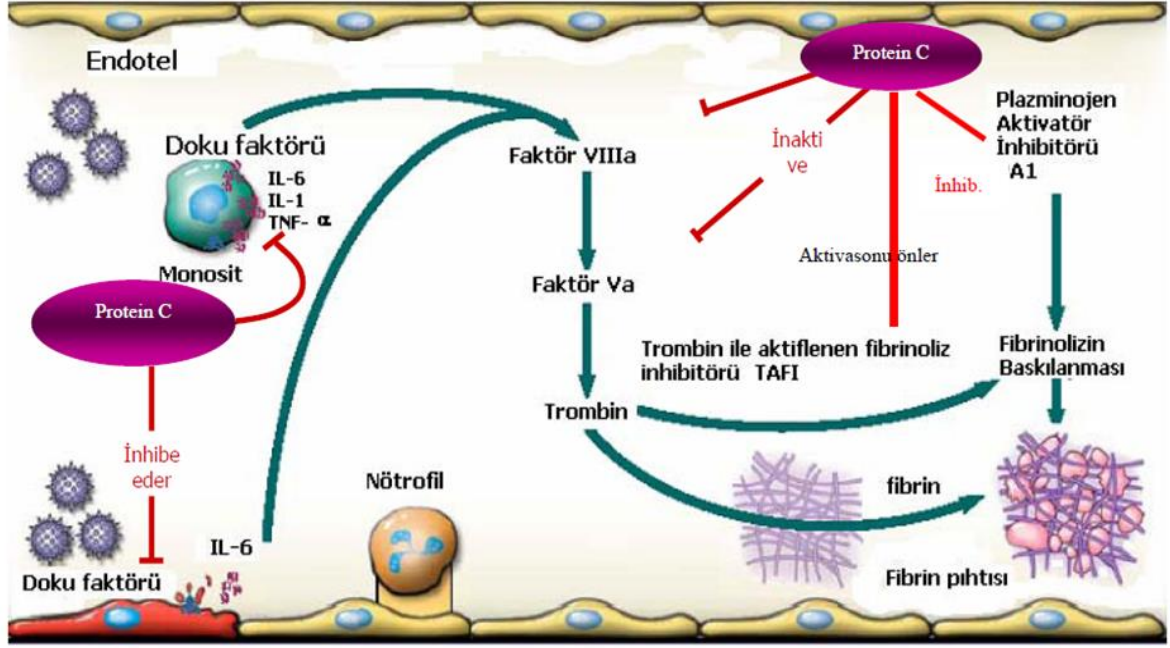
Şekil 2.3. Aktive Protein C'nin oluşumu ve işlevi

Aktive Protein C (APC) güçlü bir serin proteazdır. Aktive Protein C daha sonra endotel hücre yüzeyinden salınır ve K vitaminine bağlı diğer bir faktör olan Protein S'ye bağlanır. Protein S, endotel hücresi veya trombositlerin fosfolipid yüzeyinde bulunur. Protein C, pıhtılaşma önleyici etkisini Protein S (PS) ile birlikte Faktör Va (FVa) ve Faktör VIIIa'yı (FVIIIa) inaktive ederek gösterir. Kofaktörü Protein S tarafından aktive edilmiş Protein C, kanın pıhtılaşmasını düzenler ve böylece daha fazla trombosit oluşumu engellenmiş olur [30,28].

#### 2.1.4. Protein C'nin Fizyolojik Rolü

Vitamin K'ya bağımlı tüm proteinlerin şimdiye kadar pıhtılaşmayla ilgili bir aktiviteye sahip olduğu ifade edilmiştir. Bunun aksine, Protein C pıhtılaşma inhibitörüdür [16] ve trombinin işleyişini düzenlemede kritik bir rol oynamaktadır [31,17].

Pıhtılaşma sürecinin yayılmasını engelleyen birçok mekanizma endotel hücre yüzeyinde betimlenmiştir. Pıhtı önleyici mekanizmalardan biri olan antikoagülan Protein C kaskadı, Faktör VIIIa ve Va'nın inaktivasyonu ve fibrinolitik aktivitenin artmasıyla kan pıhtılaşmasını düzenler [32,33].



Şekil 2.4. Protein C ve enflamasyon kaskadı.

Onun antikoagülan fonksiyonuna ek olarak aktive Protein C (APC) güçlü profibrinolitik ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir [26]. Protein C'nin pıhtılaşmayı önleyici ve hücre koruyucu etkileri gibi farklı biyolojik etkilerinin olması nedeniyle, günümüzde üzerinde çok çalışılan bir protein haline gelmiştir.

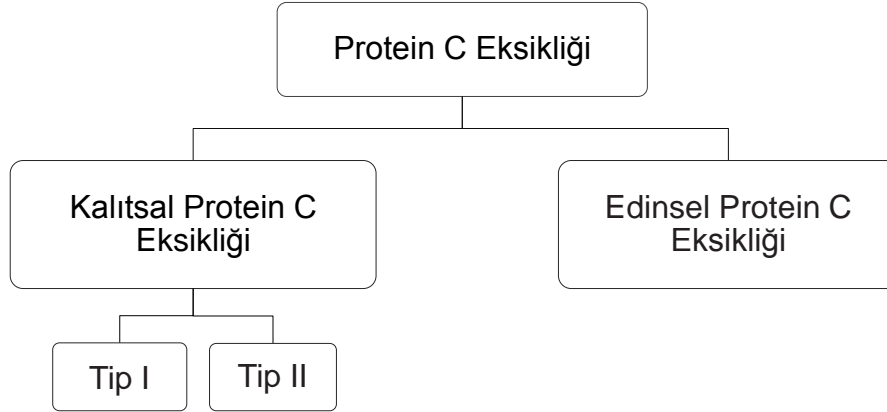
### 2.1.5. Protein C Eksikliği

Yarılanma ömrü 6 saat olan Protein C insan kanında 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  derişiminde bulunan bir iz proteindir [1,2]. Kandaki Protein C miktarı düştüğü zaman ciddi problemler ortaya çıkar. Protein C eksikliği olan hastalarda doku oksijeni yoksunluğu sonucunda derin ven trombozu (DVT) ve diğer pıhtılaşma komplikasyonları riski vardır; bazıları hayatı tehdit edici olabilir.

Bu kan pıhtıları (trombositler) damar (ven) yüzeyinden kopup kan dolaşımına karıştığında felç, kalp krizi ve pulmoner emboli'ye (akciğer embolisine) neden olmaktadır [2]. Kan pıhtılaşması erken fark edilip tedavi edilmezse hayatı tehdit edici sonuçlar ortaya çıkabilir.



Protein C eksikliği kalıtsal veya edinsel nedenlere bağı olarak gelişebilmektedir [34].



Şekil 2.5. Protein C Eksikliğinin sınıflandırılması.

#### 2.1.5.1. Kalıtsal Protein C Eksikliği

Kalıtsal Protein C eksikliği otozomal dominant bir özellik olarak aktarılır [35]. Medikal ve farmakolojik nedenler dışlandıktan sonra, Protein C düzeyi, normal değerlerin % 55'inin altında bulunan kişilerde kalıtsal Protein C eksikliği düşünülmelidir. % 55-65 arasındaki değerler kalıtsal eksikliği gösterebileceği gibi normalin alt sınırı da olabilir [36].

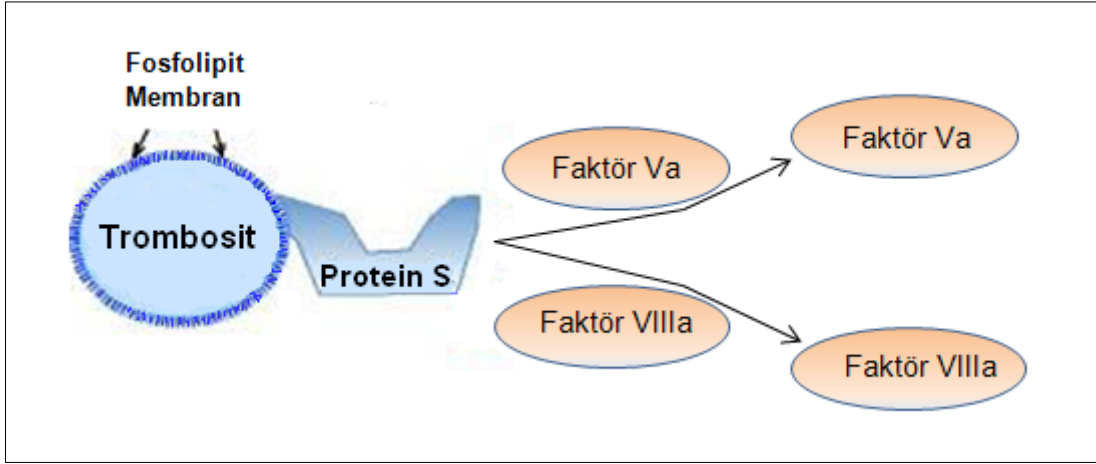
Homozigot Protein C ve Heterozigot Protein C bileşenleri doğumdan sonra neonatal purpura fulminansla ya da birçok tromboembolik komplikasyonlarla ilişkilendirilir. Nadir olarak trombotik ataklar çocuklukta ya da yetişkinlikte gelişir [35].

Birçok kusura neden olan homozigot Protein C eksikliği (veya bileşik heterozigot) %1'in altındaki miktarlara sahipken, heterozigot Protein C eksikliği, % 30 ile % 70 normal Protein C aktivitesine ya da antijen miktarlarına sahiptir. Hafif kusura sahip homozigot Protein C eksikliği % 10-24 Protein C miktarlarıyla bilinir. Yetişkinlerdeki Protein C'nin normal aralığı normal bir plazma kaynağının (% 100 olarak adlandırılır) % 70'i ile % 130'udur [25].

Heterozigot Protein C eksikliğinin immunolojik ve fonksiyonel ölçümlerle tespit edilen iki tipi vardır: Tip I ve Tip II [17]. Bu 2 tip Protein C eksikliği arasında tromboz riski açısından hiç bir fark yoktur [37].

### 2.1.5.1.1. Tip I Protein C Eksikliği (Klasik Tip)

Tip I Protein C eksikliği, Protein C miktarının yetersiz olmasından kaynaklanır. Protein C'nin fonksiyonu normaldir, fakat Protein C miktarı pıhtılaşma basamaklarını düzenlemek için yeterli değildir. Hastaların çoğu Tip I'dir [33].

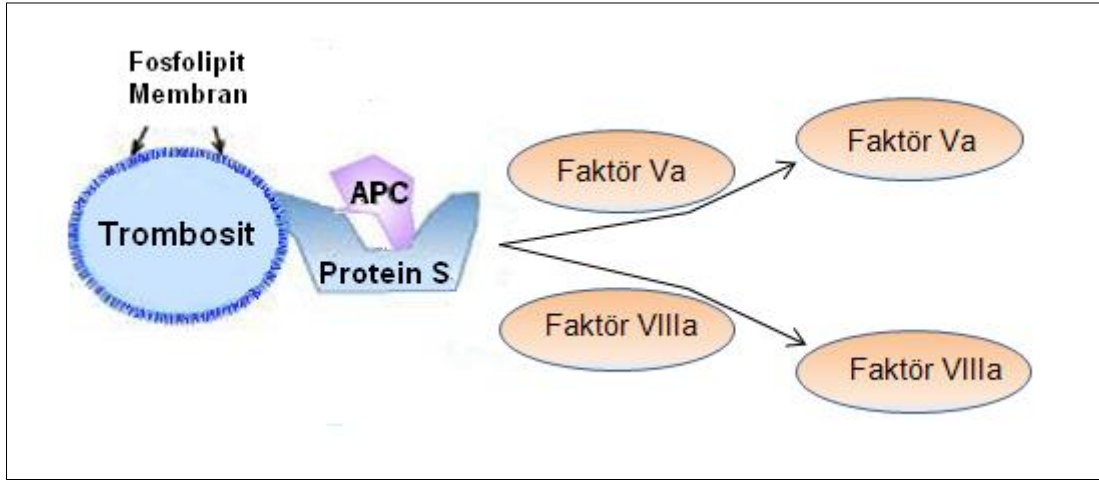


Şekil 2.6. Tip I Protein C Eksikliği. Ortamda yeterince Protein C bulunmamaktadır, bu yüzden APC miktarı yetersizdir. Bunun sonucunda, kanda bulunan Faktör Va ve Faktör VIIIa miktarı artmaktadır.

### 2.1.5.1.2. Tip II Protein C Eksikliği

Tip II Protein C eksikliği hatalı Protein C molekülü ile tanımlanır. Mevcut Protein C miktarı normaldir, fakat Protein C işlevini yerine getirmek için koagülasyonda bulunan diğer moleküllerle genellikle etkileşime giremez.

Protein C molekülündeki birçok kusurun diğerlerinin yanı sıra trombomodulinle, fosfolipitlerle, Faktör Va ve Faktör VIIIa ile etkileşimini değiştirdiği ifade edilmiştir. % 65 ve % 150 arasındaki konsantrasyonlar normal aralığa karşılık gelirken, % 20 ve % 70 arasındaki konsantrasyonlar artan tromboemboli riski anlamına gelmektedir [33].



Şekil 2.7. Tip II Protein C Eksikliği. Yeterli miktarda Protein C bulunmaktadır, fakat işlevini yerine getirememektedir (APC, Protein S ile etkileşime giremez).

### 2.1.5.2. Edinsel Protein C Eksikliği

Sentezi karaciğerde K vitaminine bağlı olduğu için, K vitamini eksikliğinde, karaciğer hastalığında edinsel Protein C eksikliği ortaya çıkar. Akut yaygın damar içi pıhtılaşma, yaygın derin ven trombozu, ağır enfeksiyonlar, sepsis ve kronik böbrek yetmezliği de Protein C eksikliğine neden olur.

Protein C değerlerinin azalması tromboz, derin ven trombozu (DVT), pulmoner emboli, tromboflebit, neonatal purpura fulminans (homozigot temelli) ve yaygın damar içi pıhtılaşması (DIC) ile ilişkilidir. Protein C eksikliği, doğuştan biyokimyasal bozuklukların sonucunda olabilen ya da diğer trombotik hastalıklarla ilişkili olan pretrombotik bir hastalıktır. Doğuştan olan biyokimyasal bozukluklar, vakaların % 35-60'ından sorumludur ve DVT'ye, pulmoner emboliye (Akciğer embolisi, akciğer atardamarı veya onun dallarından bir ya da birkaçının kan pıhtısı ile tıkanması sonucu ortaya çıkan klinik tablo) ya da tromboflebite (toplardamarların iltihaplanması) neden olabilir.

Protein C eksikliğinin diğer nedenleri siroz gibi hastalıklar, varfarin türevi ilaçların kullanımı ve Vitamin K eksikliğidir. Risk faktörleri obezite, doğum kontrol hapı kullanımı, varisli damarlar, enfeksiyon, travma, ameliyat, hareketsizlik ve konjestif kalp yetmezliğini içerir. Protein C eksikliği olan hastaların aile üyelerinde genetik

bozukluğun varlığı araştırılmalıdır. Bu şekilde onların artan tromboz riski fark edilebilir ve buna göre Protein C eksikliği izlenebilir [33].

Plazma miktarıyla tanımlanan Protein C eksikliğinin yaygınlığı sağlıklı nüfusun % 0,2'si ile % 0,5'i arasındadır. Etkilenen bireylerin çoğu hayatları boyunca asemptomatik kalabilir ve klinik olarak % 2-5 olan semptomatik Protein C eksikliği, Protein C eksikliğinin sadece tromboz için düşük bir risk faktörü olduğunu gösterir [35].

Kalıtsal ya da sonradan kazanılan (edinsel) Protein C eksikliğinin genel dünya nüfusu içindeki vaka oranı yüksektir. Yıllardır Protein C eksikliği olan hastalar soğuk donmuş plazma, protrombin kompleks konsantresi, heparin ya da oral pıhtı önleyicilerle tedavi edilmiştir [3].

Protein C eksikliği olan hastaların tedavisi için yaygın olarak heparin ve kumadin kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçların her ikisi de tehlikeli yan etkilere sahiptir. Bu ilaçların kullanımı aşırı iç kanamaya, felç ya da organ yetmezliklerine de neden olabilir. Ayrıca, kumadin ile uyarılmış cilt nekrozu ve heparin ile indüklenmiş cilt nekrozu kol ve bacakların kesilmesine ya da ölüme yol açabilir. Ayrıca hamile kadınlar kumadin kullanamazlar.

Buna karşılık, Protein C'nin herhangi bilinen bir yan etkisi yoktur. Önceki hayvan testleri ve klinik denemeler; yan etkisi olmaksızın Protein C'nin birçok medikal endikasyonlar için etkili bir antikoagülan/antitrombotik olduğunu göstermektedir. Bu eşsiz özellik, vücut içindeki Protein C'nin mekanik davranışının bir fonksiyonudur. Diğer tüm antikoagülanlardan farklı olarak, Protein C inaktif formda (zimojen) kanda dolaşır ve sadece gerektiği yer ve zamanda aktive olmaktadır. Aynı zamanda, Protein C herhangi bir kanama komplikasyonuna neden olmaksızın kanda normalden daha fazla bulunabilmektedir [2]. Bu özelliklerinden dolayı, Protein C kullanımının tedavi olarak yerini alması ümit vericidir [1].

Protein C, insan kan plazmasından, hücre kültüründen ve transgenik hayvan sütünden elde edilebilir [2].

### **2.1.6. Protein C'nin Klinik Uygulamaları**

Protein C'nin birçok klinik uygulaması vardır. Sadece genetik olarak eksikliği olan hastaları tedavi etmek için kullanılmaz, aynı zamanda septik şok, kalça ve diz protezi takılan hastalarda, kumadin indüklenmiş deri nekroz hastalarında, heparin indüklenmiş trombositopeni hastalarında, fibrinolitik terapi gören hastalarda ve kararsız anginadan muzdarip hastalarda da kullanılabilir. Buna ek olarak; güncel araştırmalar, güvenli antikagülantların kullanımının ABD'deki felç oranlarını yılda 80.000'den 40.000'e düşürebileceğini ve medikal sektörden yılda tahminen 600 milyon dolar tasarruf edilebileceğini göstermiştir.

Protein C konsantresinin, kalıtsal ve edinsel Protein C eksikliği olan kişilerdeki trombozun önlenmesi ve tedavisi için başarıyla kullanıldığı ve taze donmuş plazma yöntemiyle birlikte ortaya çıkan problemleri engellediği gösterilmiştir. Ancak ticari olarak satılan Protein C konsantresinin çok küçük miktarları bile oldukça yüksek bir fiyata sahiptir (100 µg Protein C konsantresi yaklaşık 2500 TL'dir). Protein C eksikliği 300 kişide bir görüldüğünden, medikal hastalar için kullanılabilir ucuz Protein C olmasının faydası çok büyüktür [2].

### **2.2. Moleküler Baskılama Teknolojisi**

“Moleküler baskılama” antibadi/antijen veya enzim/substrat gibi biyolojik sistemlerin tanıma mekanizmasını polimerik yapılara aktaran yöntemdir [38].

Moleküler tanıma, doğada her yerde var olan temel biyolojik bir mekanizmadır. Bu mükemmel fakat basit olan mekanizma bağışıklık sisteminde antibadi/antijen tanımasını, enzimatik katalizi, sinyal iletimini ve replikasyon, transkripsiyon ve translasyon gibi nükleik asit etkileşimlerini içeren çeşitli biyolojik süreçlerde bulunmaktadır. Moleküler tanıma, reseptör ve substrat arasındaki komplekse dayanmaktadır. Emil Fischer bunu ilk kez yüz yıl kadar önce “anahtar-kilit modeli” olarak tanımlamıştır. Bu mükemmel kavram kompleks oluşumunun kilit veya reseptör (protein/enzim) ve istenen anahtar veya substrat (analit) üzerindeki tamamlayıcı fonksiyonel gruplar arasındaki moleküller arası etkileşimler sonucu olduğunu savunmaktadır. Diğer bir deyişle, iki molekül hem boyut hem de kimyasal olarak uygun olmalıdır. Doğada spesifik tanımadan sorumlu asıl

reseptörler antibadiler (immünoglobulinler), enzimler, nükleik asitler ve hücrelerdir. En çok çalışılan antikorlar 10-40 nm çapında büyük Y-şeklindeki glikoproteinlerdir [39].

Baskılanmış moleküllerin oluşumunu açıklayan ilk makale 1931 yılında yayınlanmasına rağmen, moleküler baskılama ile ilgili araştırmalar 1980'lere kadar oldukça azdır. Bu alanda yapılan çalışmalar son yirmi yıldır giderek artmaktadır [40].

İlk defa 1972'de Günter Wulff ve çalışma grubu tarafından tanımlanan moleküler baskılama yöntemi, sentetik polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle, oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla kullanılmıştır [41]. Antikor gibi biyoreseptörler, yüksek seçicilikleri nedeniyle özgül antijenlerini saflaştırmada popüler ligandlardır. Fakat yüksek seçiciliği olan bu biyolojik moleküller ortam şartlarından kolay etkilenirler ve protein yapıları asidik şartlarda, yüksek sıcaklıklarda ya da proteolitik aktivite sonucunda denatüre olur[38].Moleküler baskılanmış malzemeler “antikor taklitçileri” olarak adlandırılmıştır, çünkü bu sistemler onların doğal karşıtlarıyla etkileşimlerini taklit etmektedir [39].

Moleküler baskılama, bir polimerizasyon işlemi içerir ve bu teknikle yapay ligand bölgeleri işlevi gören son derece spesifik boşluklar üretilir. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), kalıp molekül varlığında hazırlanan malzemelerdir. Moleküler baskılama sırasında fonksiyonel monomerlerin kalıp molekülle etkileşime girmesine izin verilir. MIP'lerin özel tanıma bölgeleri, analitler (kalıp) ve fonksiyonel monomerlerin kombinasyonuna dayanmaktadır [42,43].

MIP'lerin oluşumu tipik olarak birbiriyle kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle kalıp molekül ve fonksiyonel monomerin oluşturduğu kompleks ile uygun porojenik çözücünün varlığında çapraz bağlayıcı ajanın kopolimerizasyonunu içerir [43]. Kalıp molekül elde edilen polimer matriksten uzaklaştırıldıktan sonra kalıp molekülü tamamlayıcı boyut ve şekle sahip olan bağlanma bölgeleri elde edilir [44]. Böylece moleküler baskılanmış polimerler biyolojik reseptörlerin en önemli özelliğine yani tanıma yeteneği ve spesifik hedef molekülleri bağlama yeteneğine sahip olurlar.

Fakat moleküler baskılanmış polimerler biyolojik reseptörlerden şu açılardan farklıdır.

- Moleküler baskılanmış polimerler çok büyük, katı ve çözünmezdir. Buna karşın bunların doğal karşıtları daha küçük, esnek ve çoğu durumlarda çözünürdürler.
- Büyüklüklerine bağlı olarak moleküler baskılanmış polimerler binlerce veya milyonlarca bağlanma bölgelerine sahiptirler. Buna karşın biyolojik reseptörler çok az veya sadece bir tane bağlanma bölgesine sahiptirler [45]. Bu yüzden, MIP'ler çok çeşitli kalıp molekülleri tanımak için poliklonal ve monoklonal antikörlara göre genellikle daha yüksek afinite ve seçicilikle oluşturulabilmektedir [43].

Bağlanma bölgeleri özellikle kalıp molekölü ve hidrojen bağlarıyla, iyon değişimiyle ve elektrostatik etkileşimlerle onun yapısal analoglarını tanıyabilir. Bu yüzden, çoğu MIP yaygın olarak kromatografide, katı faz ekstraksiyonunda ve mikroekstraksiyede, kirleticilerin adsorpsiyon uzaklaştırılmasında ayırma amacı ile kullanılmıştır [44].

Sentetik polimerlerin moleküler baskılanması, yapay makromoleküler reseptörlerinin oluşumu için kabul edilen bir tekniktir [42]. Bu teknik ayırma alanındaki küçük kalıp moleküller için, yapay enzimlerde, kimyasal sensörler ve tıbbi ilaçlarda başarıyla uygulanmıştır. Küçük moleküllerin baskılanması iyi bir şekilde geliştirilmektedir ve özel olarak yapılmış moleküler baskılama şu an ticari olarak mevcuttur [39].

Doğal reseptörlere benzer nitelikte yüksek afinite ve seçicilik, doğal biyomoleküllere nazaran gösterdikleri üstün kararlılık, düşük maliyet, kolay hazırlanma ve farklı pratik uygulamalara kolay adaptasyon gibi özellikleri moleküler baskılanmış polimerlere olan ilgiyi artırmıştır [46,47]. Ayrıca moleküler baskılanmış polimerler, yüksek mekanik özellikleri, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel dayanıklılıkları, asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücüler gibi ortamlardaki yüksek kararlılıkları sebebiyle tercih edilmektedirler. Birkaç yıl boyunca performansında bir azalma olmaksızın saklanabilirler [46,48,49].

Bu avantajlarından dolayı MIP'ler yaygın bir şekilde moleküler tanıma ve ayırma malzemeleri olarak farklı alanlarda (örneğin; sensörler, ilaç salınımı, kromatografi, protein tanıma, kiral ayırma vs.) kullanılmaktadır [43].

### **2.2.1. Makromoleküler Kalıplar ile Baskılanmış Polimerler**

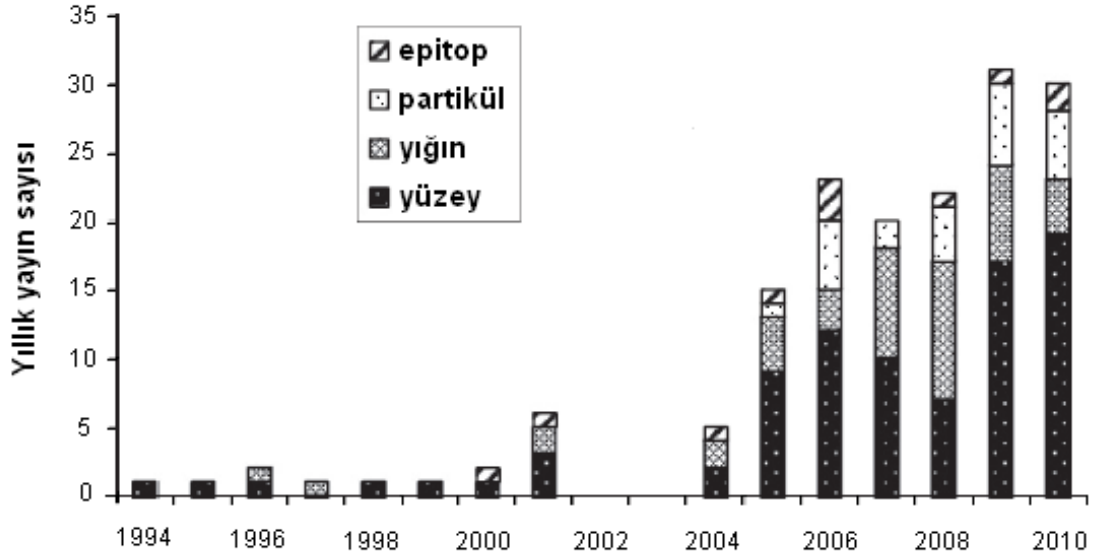
Makromoleküler kalıpların (>1500 Da) varlığında sentezlenen makromoleküler baskılanmış polimerler, MIP'ler, son birkaç yılda özellikle 2005'den bu yana bilim dünyası tarafından oldukça ilgi görmektedir (Şekil 2.8). Taşıdıkları önemden dolayı proteinler makromoleküler baskılamada en çok çalışılan kalıptır [39].

Moleküler baskılamanın özellikle düşük molekül ağırlıklı bileşikler için başarılı olduğu kanıtlanmıştır [40]. Geleneksel baskılama yöntemi kolay olmasına ve metal iyonları, ilaçlar ya da peptitler gibi küçük moleküllerin başarı ile baskılanmasına rağmen, bu uygulama proteinlerin baskılanmasında bazı kısıtlamalara sahiptir [50]. Bu kısıtlamalar proteinlerin esnek yapısı, kolay denatürasyonu, büyük boyutlarının onlara ulaşmada ve bağlanma bölgelerinden ayrılmada engel olması ve moleküllerin karmaşıklığıdır [47,51]. Buna rağmen, DNA ve proteinler gibi makromoleküllerin tanınması için talepler son yıllarda sürekli olarak artmaktadır [51]. Bu malzemelerin (makromoleküllerin) ilk uygulaması afinite kromatografisi alanındadır ve bunlar kiral sabit faz olarak yaygın olarak incelenmiştir [42].

Makromoleküler MIP'ler biyosensörlerde, vücuttaki toksik biyomakromoleküllerin uzaklaştırılması veya nötralizasyonunda uygulanmaktadır. Protein MIP'lerin özellikle gelişmekte olan ülkelerde ya da doğal afet sonrası bulaşıcı hastalıkların belirlenmesi gibi tıbbi altyapının yetersiz olduğu yerlerde tanı araçları olarak kullanılması uygundur [39].

Protein baskılama işlemi sırasında, genellikle metakrilik asit (MAA) ve akrilamid (AAM) fonksiyonel monomer olarak kullanılır, çünkü bunların 'yumuşak' karakteri baskılanmış hidrojel matrikslerin proteine konformasyon uyumunu sağlamaktadır [51].





Şekil 2.8. 1994-2010 yılları arasında yayınlanan makromoleküler baskılama ile ilgili yıl ve uygulamalarına göre makalelerin sayısı.

### 2.2.2. Moleküler Baskılama Tekniği

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.9):

#### I. Ön kompleksleşme

Fonksiyonel gruplar içeren polimerleşebilen uygun monomerler, kalıp ya da başka bir deyişle hedef moleküle kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanarak kompleks oluşturur.

Ön-polimer karışımında hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve elektrostatik etkileşimler gibi çeşitli olası etkileşimler kalıp etrafında monomerlerin uzaysal dizilişini belirler [40].

Bu basamakta kalıp etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir yapı oluşumu söz konusudur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemli bir yer tutar.

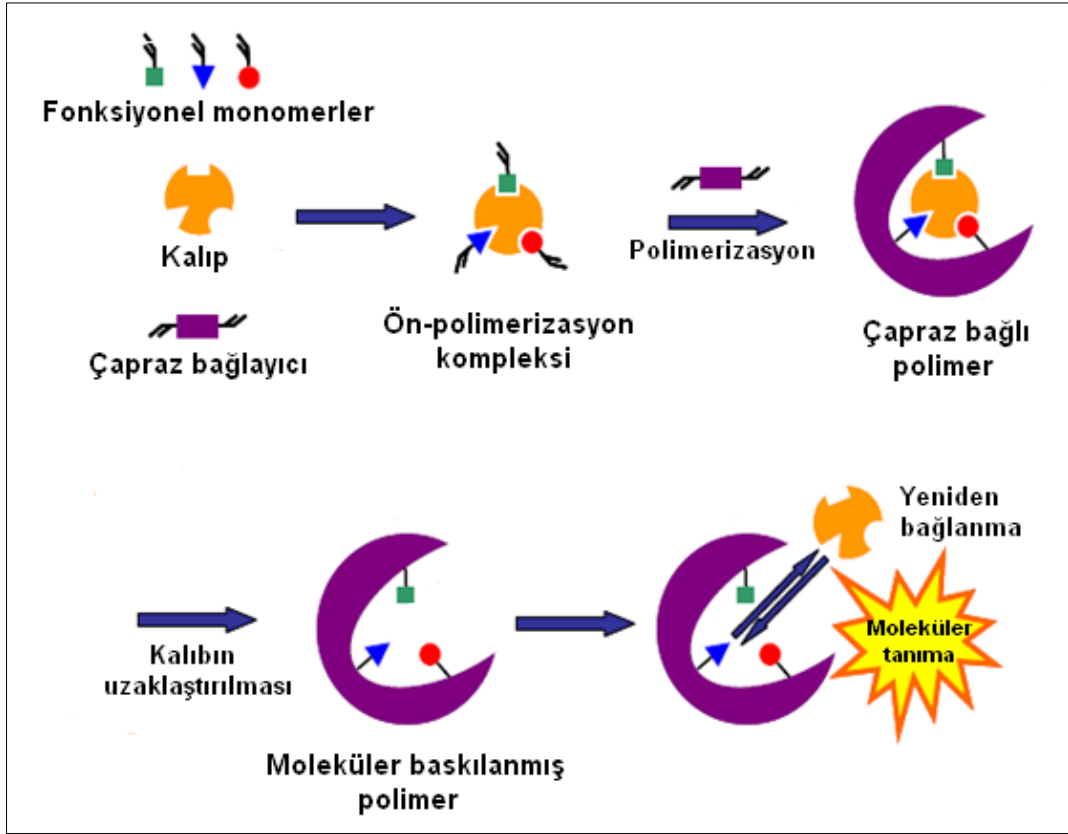
#### II. Polimerizasyon

Fonksiyonel monomer-kalıp kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcının da kullanılmasıyla fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

Polimerizasyon gözenek oluşumunu sağlayan çözücü varlığında gerçekleştirilir, böylece analitlerin baskılanmış bölgelere daha iyi ulaşması sağlanır [42].

### III. Kalıp (hedef) molekülün uzaklaştırılması

Yapıda hedef molekülün yerini alacak boşlukların oluşturulması amacıyla, kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Uygun koşullar altında, bu boşluklar kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanır, seçici ve etkin olarak kalıp molekülü bağlar.



Şekil 2.9. Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanması.

Etkin bir moleküler baskılama için; (1) Kalıp molekülün, (2) fonksiyonel monomerin, (3) çapraz bağlayıcının, (4) polimerizasyon için çözücünün ve (5) başlatıcının seçimi önemlidir.

### **2.2.2.1. Kalıp (Hedef) Molekül**

Baskılanan kalıp molekülün fonksiyonel monomerle kompleks yapacak fonksiyonel grupları içermesi en önemli parametrelerden biridir. Kalıp molekülün hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim (karboksil, amino, hidroksil ve amid grupları) yapabilecek bölgeleri kompleks oluşumu için en çok tercih edilen bölgeleridir. Kalıp molekül kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği koşullar altında kararlı kalmalıdır [52]. Baskılanacak molekül olarak ilaçlar, amino asitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler ve iyonlar kullanılabilir [53].

### **2.2.2.2. Fonksiyonel Monomerler**

Monomerler, MIP işleminin gerçekleşmesi için anahtar bileşiklerdir. Fonksiyonel monomerler baskılanmış bağlanma bölgelerinde meydana gelecek bağlanma etkileşimlerinden sorumludur. Baskılama işlemi esnasında monomer-kalıp kompleksinin kararlı olması için fonksiyonel monomer seçimi ve ayrıca kalıp molekülün ve fonksiyonel monomerin fonksiyonel grupları da oldukça önemlidir. Fonksiyonel monomerin ve kalıp molekülün fonksiyonel gruplarının uyumu baskılama etkinliğinin artırılması ve kompleks oluşumu için önem taşımaktadır. Genellikle moleküler baskılama çalışmalarında tek fonksiyonel monomer seçilmesine rağmen iki veya daha fazla fonksiyonel monomerin aynı anda kullanımı da tanıma kapasitesinin geliştirilmesi için kullanılmaktadır. İki veya daha fazla fonksiyonel monomerin bir arada kullanıldığı çalışmalarda, monomer-monomer etkileşimini minimuma indirmek için akrilamit ve polihidroksietil metakrilat (PHEMA) gibi nötral fonksiyonel komonomerler kullanılmaktadır [54]. Polihidroksietil metakrilat (PHEMA), hidrofilik karakterde, minimum düzeyde spesifik olmayan protein etkileşimleri sağlayan, yüksek kimyasal ve mekanik kararlılığı ve mikrobiyal ve enzimatik saldırılara karşı dayanıklı olan bir polimerdir [55,56,57]. Asidik, bazik ve nötral özelliklere sahip yaygın olarak kullanılan bazı fonksiyonel monomerlerin yanında metal-şelat etkileşimini ön plana çıkaran monomerler de kullanılmaktadır. Asidik yapıya sahip olan fonksiyonel monomerlere örnek olarak metakrilik asit (MAA), p-vinilbenzoik asit, akrilik asit (AA), 2-(triflorometil)-akrilik asit (TFMAA), akriloamido-(2-metil)-propan sülfonik asit (AMPASA) verilebilir. Bazik monomerlere 4-vinil piridin (4-VP), 2-vinil piridin (2-VP), 4-(5)-vinil imidazol, allilamin, N,N'-dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM)

verilirken; akrilamit, metakrilamit, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), akrilonitril (AN), metilmetakrilat (MMA), stiren, etilstiren ise nötral özelliğe sahip fonksiyonel monomerlerdir. Metal-şelat içeren monomerler ise metakroilamidohistidin-Cu<sup>2+</sup> (MAH-Cu<sup>2+</sup>), metakroilamidosisistein-Hg<sup>2+</sup> (MAC-Hg<sup>2+</sup>), metakroilamidoglutamik asit-Th<sup>4+</sup> (MAGA-Th<sup>4+</sup>), MAH-Ni<sup>2+</sup>, dir [58].

### 2.2.2.3. Çapraz Bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcıların temel görevi kalıp molekül etrafında sabit bir yapı oluşturmaktır. Ayrıca yapının morfolojisini kontrol etmek, baskılanmış kalıp moleküle özgü bağlanma bölgelerinin kararlı olmasının sağlamak, polimer matrikse mekanik kararlılık kazandırmak için kullanılmaktadır [58]. Bunlara ek olarak çapraz bağlayıcılar, baskılanmış polimerlerin çözücülerde çözünmesini engellemektedirler. Değişik çapraz bağlayıcıların kullanılması, hem kalıp molekülün bağlanma bölgelerinin yapısının korunmasını hem de kimyasal çevreden korunmasını sağlamaktadır. Etkin bir baskılama işlemi için, çapraz bağlayıcılarla fonksiyonel monomerler uyum içinde olmalıdır. Aksi takdirde fonksiyonel monomerden veya çapraz bağlayıcıdan biri polimerizasyon sırasında baskın çıkar ve homojen kopolimerizasyon gerçekleşmez. Çapraz bağlayıcı ajanın fonksiyonel monomere oranı da önemlidir. Çapraz bağlayıcı/fonksiyonel monomer derişim oranları moleküler baskılanmış polimerlerdeki farklı sayıda bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olur ve bu da seçiciliği etkiler [59]. Eğer çapraz bağlayıcı/fonksiyonel monomer mol oranları çok küçükse, kalıp moleküllerin bağlanma bölgeleri birbirlerine çok yaklaşır, hedef molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından kapatılır ve etkin bir sonuç elde edilemez. Çok büyük mol oranlarında da, çapraz bağlayıcılar fonksiyonel monomerlere veya kalıp moleküle kovalent olmayan etkileşimler göstermesi sonucu baskılamanın etkinliği yine azalmaktadır [53,58]. Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve divinilbenzen (DVB) en sık kullanılan çapraz bağlayıcılardır.

### 2.2.2.4. Çözücüler

Çözücüler, polimerizasyonda baskılanacak molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı gibi tüm bileşenlerin tek fazda bulunmasını ve polimerde

gözeneklerin oluşmasını sağlar. Bu nedenle çözücüye genellikle “gözenek oluşturucu” da denir. Çözücüler, ayrıca hedef molekülün bağlanma hızını arttırmasını da sağlar. Bağlanan hedef molekülün polimerden salınmasını da yapının gözenekliliği sağlar. Makrogözenekli polimerin hazırlanması aşamasında; çözücü, gözeneklerin yapısı ve seviyesi, morfolojisi ve toplam gözenek hacmini kontrol etmek için önemli bir unsurdur. Polimerizasyonda çözücü molekülleri polimerin içine dahil edilir ve son bir işlemle uzaklaştırılır [60]. Polimerde gözenek oluşturucu çözücünün miktarının artması, gözenek hacmini artırır. Polimerizasyon sırasında reaksiyon sıcaklığı artar ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna neden olur. Çözücünün diğer bir rolü ise, polimerizasyon sırasında artan reaksiyon sıcaklığını eşit olarak dağıtmaktır. Çözücünün seçimi baskılamanın türüne bağlıdır. Kovalent baskılamada tüm bileşenleri iyi bir şekilde çözdüğü sürece birçok çözücü kullanılabilir. Kovalent olmayan baskılamada ise, fonksiyonel monomer ile baskılanacak molekül arasındaki kovalent olmayan etkileşimin oluşumunu ve baskılama etkisini attırmak için çözücü seçimi daha önemlidir [58].

#### **2.2.2.5. Başlatıcılar**

Radikal polimerizasyon, radikal başlatıcıların ısıl bozunmasıyla başlatılabilir. Başlatıcılar, monomere göre oldukça az miktarlarda (yaklaşık olarak % 1) kullanılırlar [61]. Genellikle 2,2'-azobis(izobütironitril) (AIBN) ve 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (ADVN) kullanılır. Monomer ile kalıp molekül arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin çok zayıf olduğu durumlarda çok yüksek sıcaklıklara çıkılmaz. Bu koşullarda, ısıl bozunma yerine UV bozunma tercih edilmektedir.

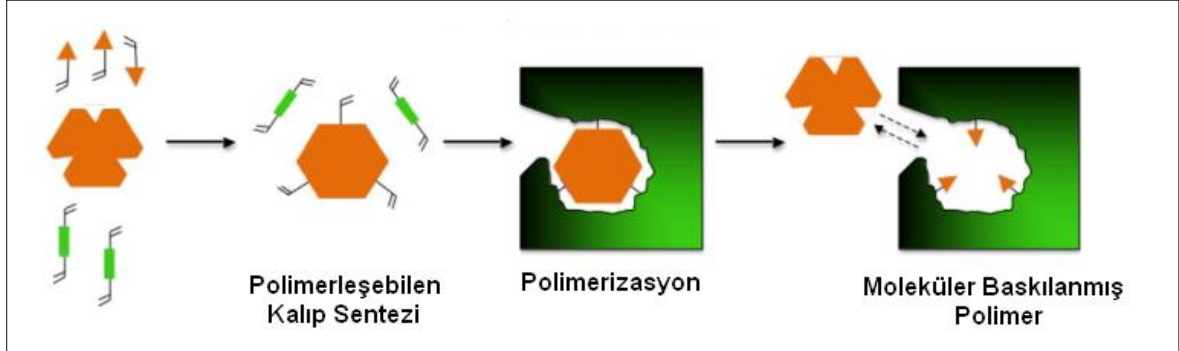
#### **2.2.3. Moleküler Baskılama Yöntemleri**

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak, fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında oluşan bağın çeşidine göre iki ana gruba ayrılır: Kovalent baskılama ve kovalent olmayan baskılama.

##### **2.2.3.1. Kovalent Baskılama**

Kovalent baskılama ilk olarak Wulff ve Sarhan tarafından geliştirilmiştir [42]. Bu yaklaşımda, polimerizasyon işleminden önce kalıp molekül ve fonksiyonel

monomer birbirine kovalent bağlarla bağlanır. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp molekül polimerik yapı içerisinde seçici boşluklar oluşturmak amacıyla polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül, baskılanmış polimerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağlar yeniden oluşur (Şekil 2.10) [62].



Şekil 2.10. Kovalent Baskılama

Fonksiyonel monomer ve kalıp molekül polimerizasyondan önce kovalent bağ ile birbirine bağlanmıştır. Bu yöntemde, monomer-kalıp konjugatları (çiftleri) o kadar kararlıdır ki çok çeşitli polimerizasyon şartlarında (örneğin; yüksek sıcaklık, düşük veya yüksek pH) uygulanabilir. Fakat sadece birkaç tersinir kovalent bağ mevcuttur ve sentezi genellikle zahmetli ve daha az ekonomiktir [43].

Kovalent bağ oluşumu nedeniyle bağlanma kinetiğinin yavaş olması bu yöntemin bir dezavantajıdır. Diğer taraftan bu kovalent bağların kararlılığı polimerdeki bağlanma bölgelerinin daha homojen dağılmasını sağlamaktadır. Ayrıca kullanılan kalıp molekülün miktarına bağlı olarak bağlanma bölgelerindeki verim, kovalent olmayan baskılamaya göre bu uygulamada daha yüksektir [42].

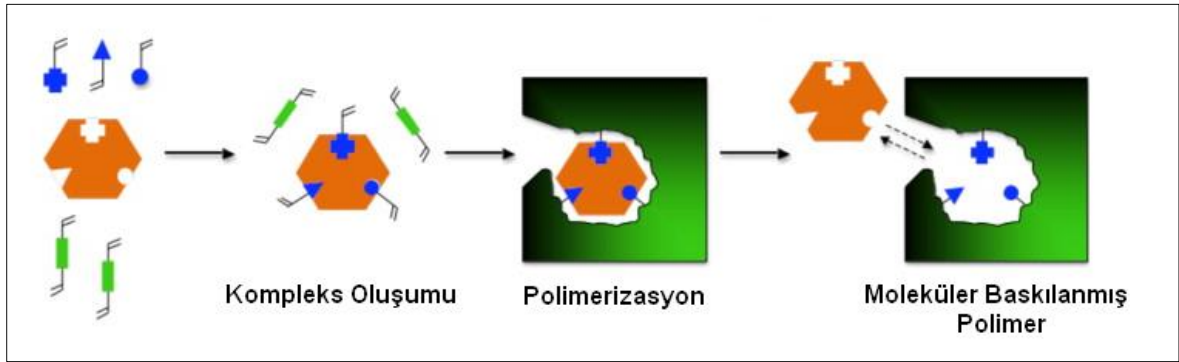
### 2.2.3.2. Kovalent Olmayan Baskılama

Kovalent olmayan baskılamada fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması kovalent olmayan etkileşimlerle (hidrojen bağı,  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri) gerçekleşir [63].

Arshady ve Mosbach'ın öncülük ettiği kovalent olmayan uygulama fonksiyonel monomerlerin, hedef moleküllerin seçimi ve baskılanacak malzemenin kullanımında daha esneklerdir.

Bu yöntemle gerçekleşen polimerizasyondan sonra baskılanan molekül basit çözücü ekstraksiyonuyla uzaklaştırılabilir. Ancak, bu uygulamada ön polimerizasyon kompleksinin kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasında oluşan afiniteye bağlı olan kararlılıkla dengedeki tersinir bir sistem olduğu belirtilmelidir. Bu baskılanmış bağlanma bölgelerinde bazı heterojenliklere neden olabilir ve bu da özgül olmayan bağlanmalara ve kalıp molekülün zayıf moleküler tanınmasına neden olur [42].

Polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül ile baskılanmış polimerler kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır [63].



Şekil 2.11. Kovalent Olmayan Baskılama

Hedef molekülün bağlanma kinetiği kovalent baskılamaya kıyasla daha hızlıdır [42]. Bu yöntem kolay hazırlanması ve fonksiyonel monomerlerin seçimindeki esneklikten dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır [43].

Görüldüğü gibi her iki yönteminde birbirlerine göre üstünlükleri vardır. Yöntemin seçimi hedef molekülün çeşidine, yapısına, seçiciliğin derecesine, zamanına ve maliyetine göre değişmektedir.

### 2.2.3.3. Metal-Şelat Etkileşimlerine Dayalı Moleküler Baskılama

Diğer iki yöneme alternatif olarak karşımıza çıkan teknik metal-şelat etkileşimlerine dayalı moleküler baskılama tekniğidir. Metal şelat etkileşimleri, bağlanma gücü ve seçiciliği açısından sulu çözeltilerdeki elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarıyla karşılaştırıldığında kovalent etkileşimlere daha çok

benzemektedir. Bununla birlikte hedef molekülün yapıdan uzaklaştırılması kovalent baskılamada olduğu kadar güç değildir. Özellikle hidrojen bağlarının etkin olduğu baskılama sistemlerine göre çözücülerin su da dahil olmak üzere geniş sınırlarda kullanılabilmesi ve baskılanacak tamamlayıcı ligandın geometrik yönelmesinin seçiciliğe getirdiği avantaj nedeniyle metal-şelat etkileşimlerine dayanan bu teknik daha çok tercih edilmektedir [64].

Bu teknikte kullanılan metal iyonları ve biyolojik ligandlar arasındaki etkileşimler oldukça spesifiktir. Elektrostatik ve hidrojen bağlanma etkileşimleri sulu ortamda zayıftır ancak metal koordinasyon etkileşimi çözücü ortamından etkilenmez. Metal şelat etkileşimli baskılamada ortama fazla monomer eklenmesi tercih edilmemektedir, böylece spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin oluşumunun en aza inmesi sağlanır. Bağlanma kinetikleri ise kovalent baskılamaya göre daha hızlıdır [9].

Moleküler baskılamanın her üç tipinde de kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra kalıp molekülü boyut, büyüklük ve fonksiyonel grubuyla tanıyan üç boyutlu bir malzeme oluşur.

## **2.3. Kriyojeller**

### **2.3.1. Kriyojel ve Kriyojelleşme**

Kriyojeller, kısmen donma koşullarında monomerik ya da polimerik öncüllerin bulunduğu çözeltilerin dondurulmasıyla hazırlanan jel matrislerdir [65]. Kriyojel yunanca κρυος (kryos) kelimesinden gelir ve anlamı buz veya don'dur [66].

Kriyojelleri üretmek için, birbirine bağlı büyük gözeneklere sahip makrogözenekli polimer yapıyı oluşturan polimerizasyon düşük sıcaklıklarda başlatılır. Kriyojeller sulu çözelti içerisinde bulunan düşük derişimli monomerlerin (<%10 (w/v)) polimerizasyonu ile oluşturulmaktadır [67]. Bu kriyojelleşme polimerizasyonun sonucunda sürekli birbirine bağlı gözenekler ile üç boyutlu polimerik ağ oluşur [68,69].

Sulu ortamda (ya da başka bir sıvı ortamında) saf bir sıvının donma noktasından daha düşük sıcaklıklarda organik ya da inorganik maddelerin sentezinde kullanılan bu teknik "kriyojelleşme" veya "kriyotropik jelleşme" olarak adlandırılmıştır. Yığın



çözeltinin donma noktasının altındaki sıcaklıklarda kriyojel sentezi için kullanılan kriyojelleşme büyük ilgi görmüştür; çünkü kriyojelleşme, toksik organik çözeltiler kullanmaksızın neredeyse her organik ya da inorganik öncülden kontrollü dokusal, yapısal ve adsorpsiyon özellikleri ile mikro- ve makrogözenekli maddelerin üretimine izin vermektedir [70].

Kriyotropik jelleşme tekniklerinin ve jel malzemelerinin uygulama alanları oldukça geniştir. Polimer jellerin geniş bir alanda kullanılması çeşitli problemler ile birlikte bazı gereksinimlere neden olmaktadır. Bu gereksinimler, biyolojik uygulamalar için yeni nesil jel malzemelerin geliştirilmesini ve üretimini teşvik etmektedir.

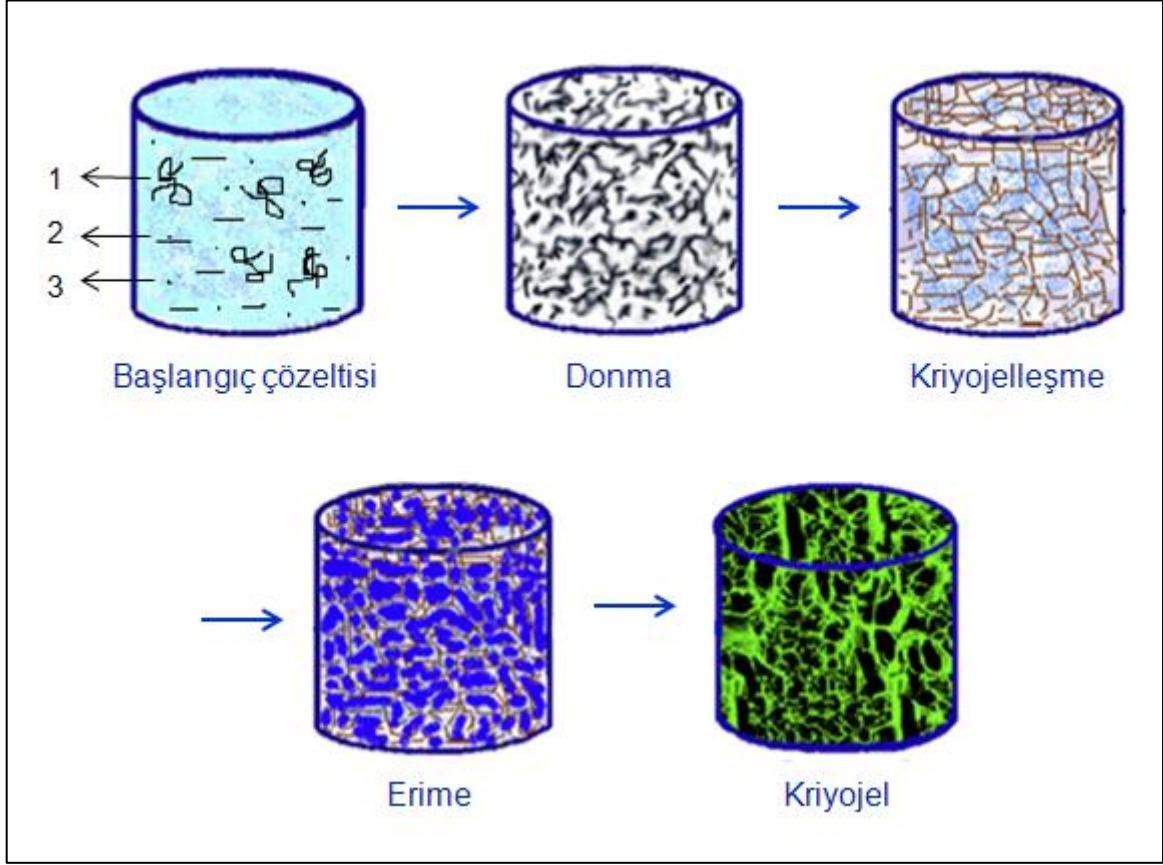
1980'li yıllarda birçok özelliği bilinmesine rağmen biyoayırma özellikleri son yıllarda fark edilen kriyojeller; disk, monolitik kolon ve tabaka şeklinde tasarlanabilmektedir [65].

### **2.3.2. Kriyojellerin Oluşumu ve Özellikleri**

Kriyojel oluşturmak için sadece sulu sistemler değil dioksan, formamid gibi organik çözücü içeren sistemler de kullanılabilir [71].

Başlangıç sisteminde monomerler veya polimerik öncüller ve çapraz bağlayıcılar çözücü içinde karıştırılır (genellikle sıvı ortamda) ve ılıman donma koşullarında bekletilir. Jelleşme hızının çok yüksek olmaması önemlidir, aksi takdirde sıvı örnek (çözücü) donmadan önce jelleşme gerçekleşecektir [72]. Polimerleşme hızı reaksiyon karışımındaki başlatıcı sistemin miktarı tarafından kontrol edilir. Böylece reaksiyon karışımındaki başlatıcı, sistemin miktarı değiştirilerek büyük ve birbirine oldukça bağlı gözenekli kriyojeller ve birbirine az bağlanmış (kapalı) ve büyük gözenekli kriyojeller hazırlanır [73]. Çözücü madde donarken çözünmüş maddeler "sıvı mikrofaz" olarak adlandırılan donmamış mikrobölgelerde toplanır ve kimyasal reaksiyon (polimerizasyon) bu donmamış mikrobölgelerde ilerlerken buz kristalleri oluşur. Dondurulmuş sistem heterojendir, katı faz (donmuş çözücünün kristalleri) ve donmamış sıvı mikrofazdan oluşur. Mikrofaz hacmi çözücünün yapısına, çözünmüş maddelerin ilk derişimine, donma sırasında örneğin termal geçmişine, çözünür ve çözünmez karışımın varlığına vb. bağlıdır. Donmamış kısım genellikle toplam örneğin % 0.1-10'unu oluşturur. Çözücünden oluşan buz kristalleri gözenek oluşturucu olarak davranır. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra erime ile

kolaylıkla polimerik ağdan ayrılabilir ve gözenekli yapıya neden olan boşlukları oluşturur. Bu şekilde, sürekli birbirine bağlı büyük gözeneklere sahip kriyojeller üretilir [72,74]. Kriyojel üretimi Şekil 2.12’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Kriyojel hazırlama aşamaları (1) Polimer öncülleri, (2) Çözelti, (3) Düşük molekül ağırlıklı çözünen moleküller veya monomer öncülleri.

Geniş birbirine bağlı gözenekli ağ yapısı kriyojellerin temel karakteristik özelliğidir. Kriyojel içerisindeki makrogözeneklerin boyutu onlarca hatta yüzlerce mikrometreden birkaç mikrometreye kadar değişir [65].

Genellikle kriyojeller birkaç mikrometre kalınlığındaki gözenek duvarları ile mikro/makrogözenekli maddelerdir (ortalama gözenek çapı  $1 < d < 300 \mu\text{m}$ ). Canlı bilimi sınıflamasına göre olan bilgide,  $d_{\text{nano}} < 0.1 \mu\text{m}$ ,  $0.1 < d_{\text{mikro}} < 100 \mu\text{m}$  ve  $d_{\text{makro}} > 100 \mu\text{m}$  çapındaki gözenek boyutları sırasıyla nano- mikro-, ve makrogözeneklere karşılık gelir. İkincisindeki  $d > 50 \text{ nm}$  çapındaki tüm gözenekler makrogözenekler olarak tanımlandığı için bu gözenek sınıflaması IUPAC gözenek sınıflamasına göre makrogözenekli kriyojeller için daha çok uygundur.

Buz kristallerinin büyüklüğü, gözenek duvarlarının oluşumunda önemli bir basınca neden olabilir. Bu yüzden bu makropor duvarları genellikle azdır ve düşük nano/mikrogözenekliliğe sahiptir. Su miktarı diğer öncüllerin miktarından daha fazlaysa, elde edilen kriyojel makrogözenekli ya da süpermakrogözenekli (% 99'dan fazla) olabilir. Bu, gözenek oluşturan mikropartiküller gibi büyük buz kristallerinin ve nispeten ince gözenek duvarlarının oluşumuna bağlıdır.

Su ve organik eş-çözücülerin miktarlarındaki değişimler, iyonik güç, pH, soğutma hızı, sıcaklık değişimi, çözünen derişimleri, öncü karışım, diğer monomer ya da oligomer polimerizasyon şartları veya polimerin çapraz bağlayıcısı kriyojellerin diğer özelliklerinin yanı sıra gözenek dağılımları ve gözenek duvar kalınlığı gibi yapısal özelliklerinde önemli farklılıklara neden olmaktadır [70].

Kriyojeller süngerimsi morfolojiye sahiptir [65]. Kriyojellerin süngersi yapıları poliakrilamid (pAAM), polihidroksimetakrilat (pHEMA), polietilenglikol (PEG), dekstranmetakrilat, polivinilalkol (PVA) temeline dayanmaktadır [75]. Kriyojeller süngersi morfolojisi ve makrogözenekli yapısından dolayı çok düşük akış direnci gösterir ve pratik olarak her boyutta çözünen maddenin difüzyonuna engellemeden izin verir [76].

Son zamanlarda kriyojeller ayırma tekniğinde yeni nesil sabit faz olarak kabul edilmektedir [77,78]. Makrogözenekli maddeler olarak kriyojeller, sadece küçük molekül ağırlıklı çözünenlerin değil aynı zamanda makromoleküllerin ve hücrelerin de difüzyonuna engellemeden izin verdiği için matriks olarak kullanılır. Bu, makrogözeneklerin birbirine bağlı yapısına ve bir bütün olarak kriyojellerin süngerimsi ve elastik morfolojisine bağlıdır. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) ile kombinasyonunda bu özellikler, çeşitli biyoteknolojik ve çevresel uygulamalar için yeni bir yaklaşım sağlar [70]. Ayrıca birçok avantaja sahip olan kriyojeller protein saflaştırma için de çok iyi bir seçenektir [47,78].

MIP tekniği, spesifik bileşikler için adsorban olarak kullanılan kriyojellerin seçiciliğini önemli derecede arttırmak için basit bir yol sağlar. Moleküler baskılanmış polimerler kriyojel sentezinin çapraz bağlama aşaması sırasında uzaklaştırılır. Birçok uygulamada kriyojeller, jel materyalleri işlevselleştirmek için alternatif olarak kullanılabilir. Buna ek olarak, kriyojeller onların yapısal, mekanik, dokusal ve adsorpsiyon özelliklerini değiştirmek için katı gözenekli mikro- ya da

nanopartiküller ile doldurulabilir. Tüm kriyojel partikülleri, onların çözünen maddeler ile etkileşimlerini kontrol etmek için fonksiyonelleştirilebilir. Organik kriyojellerin yanı sıra inorganik kriyojeller de oksitler, karbonlar ve diğer maddelerle sentezlenebilir [70].

Ucuz malzemeler olan kriyojeller geniş gözenekli yapısı, kısa difüzyon yolu, düşük basınç alçalması ve hem bağlanma hem de elüsyon için çok kısa alıkonma süresi gibi birçok avantajla geleneksel matrislere iyi bir alternatiftir [47,79,80].

### **2.3.3. Kriyojellerin Uygulamaları**

Kriyotropik jelleşme tekniklerinin ve jel malzemelerinin uygulama alanları oldukça geniştir [81]. Bio(ayırma), (bio)kataliz ve afinite kromatografisi kriyojellerin en yaygın uygulama alanlarıdır [69].

1990'larda monolitik kolonlar (yani tek parça olarak hazırlanan kolonlar) büyük moleküller için uygun ayırma ortamı olarak kullanılmaya başlanmıştır [82].

Kriyojellerin ozmotik, kimyasal ve mekanik kararlılığı ile birleşen benzersiz yapısı kriyojelleri biyolojik nanopartiküllerin (plazmidler, virüsler, hücre organeller) ve hatta tam hücrelerin kromatografisi için matris olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır.

Polimerik jellerin, biyoteknolojinin birçok farklı alanında kromatografik malzeme, molekül ve hücrelerin immobilizasyonu için taşıyıcı, elektroforez ve immünodifüzyon için matris ve katı kültür ortamı için jel kaynağı olarak kullanılmaktadır [65].

Süpermakrogözenekli kriyojeller insan kan lenfositlerinin fraksiyonu için, mikrobiyal hücrelerin kromatografisi ve ham hücre homojenatlarından doğrudan ürünü ayırmak için başarıyla kullanılmıştır [76].

Kriyojeller biyoayırma tekniklerindeki gibi çeşitli biyoteknoloji ve biyotıp uygulamalarında doğrudan fermantasyon ortamından ürün kazanımında, insan kan lenfositlerinin ve insan tümör hücrelerinin ayrılmasında ve hücre immobilizasyonunda kullanılmaktadır [83].

Kriyojeller, yüksek biyolojik uyumluluğu ve doğal yumuşak dokulara benzer lastiksi yapısından dolayı birçok biyomedikal, kozmetik ve farmasötik (eczacılık) uygulamalarda kullanılır [70].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında yapılan deneysel çalışmaları aşağıdaki başlıklar altında toplamak mümkündür:

- Fonksiyonel monomer N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) sentezi,
- MAH-Cu(II) önkomplesinin hazırlanması,
- Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] (MIP), baskılanmamış P[(HEMA-MAH/Cu(II)] (NIP) ve PHEMA kriyojellerin hazırlanması,
- MAH, MAH-Cu(II) önkomplesinin ve polimerik kriyojellerin karakterizasyonu,
- Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin Protein C adsorpsiyonu,
- Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel kolonlarda seçiciliğin incelenmesi,
- Protein karışımından protein C ayırımının FPLC (Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi) ile incelenmesi,
- Protein C'nin saflığının Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) ile belirlenmesi.
- Protein C desorpsiyonu ve kriyojel kolonun tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi,

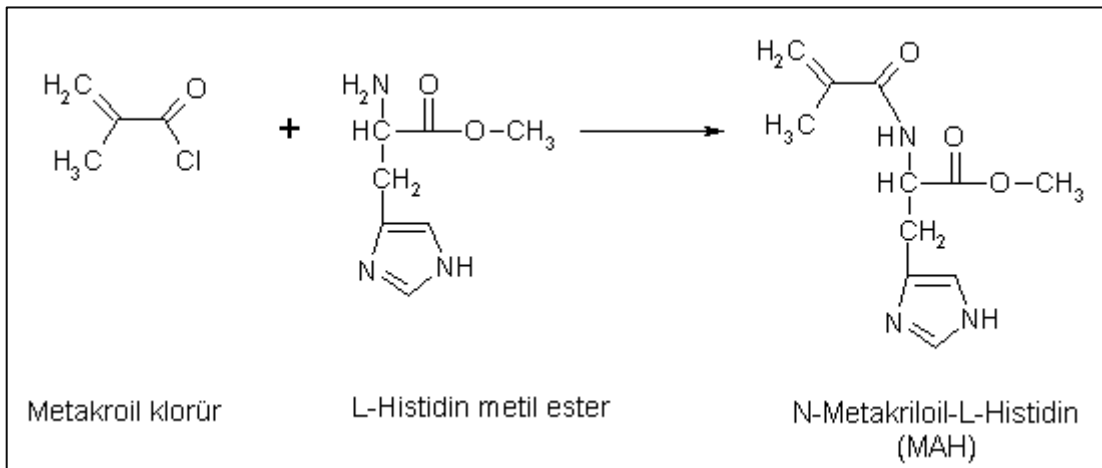
#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin hazırlanmasında temel bileşen 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), N,N-metilen bisakrilamid (MBAAM), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED), amonyum persülfat (APS) ve N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) sentezinde kullanılan L-histidin metilester ve metakroil klorür, kalıp molekül olarak kullanılan Protein C ve seçicilik çalışmalarında kullanılan insan serum albumini ve hemoglobin Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Reaktifler kullanılabildiği kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer kimyasalların hepsi Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir ve analitik saflıktadır.

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 değıştirci dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir. Deneylerde kullanılan cam malzemeler bir gece boyunca 4.0 M nitrik asitte bekletilerek temizlenmiştir.

### 3.2. N-metakriloil-(L)-Histidin Metil Ester (MAH) Monomerinin Sentezi

N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomerinin sentezi için uygulanan yöntem kısaca şöyledir: L-histidin metil ester (5.0 g) ve hidrokinon (0.2 g) diklorometan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (100 mL) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C'a soğutulmuştur. Trietilamin (12.7 g) bu çözeltiye ilave edilmiştir. Metakroil klorür (5.0 mL) yavaşça bu çözeltinin üzerine dökülmüştür. Reaksiyon karışımı azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda, reaksiyona girmeyen metakroil klorür, %10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAH) etanolde çözülmüştür [84].



şekil 3.1. N-metakriloil-(L)-histidin (MAH) monomerinin sentezi

### 3.3. MAH-Cu(II) Kompleksinin Hazırlanması

MAH-Cu(II) kompleksinin hazırlanması için ilk olarak MAH monomeri (1.0 mmol, 0.223 g) etanol (15 mL) içine yavaş yavaş ilave edilmiştir ve daha sonra oda sıcaklığında bakır nitrat (Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O) (1.0 mmol, 0.232 g) ile muamele

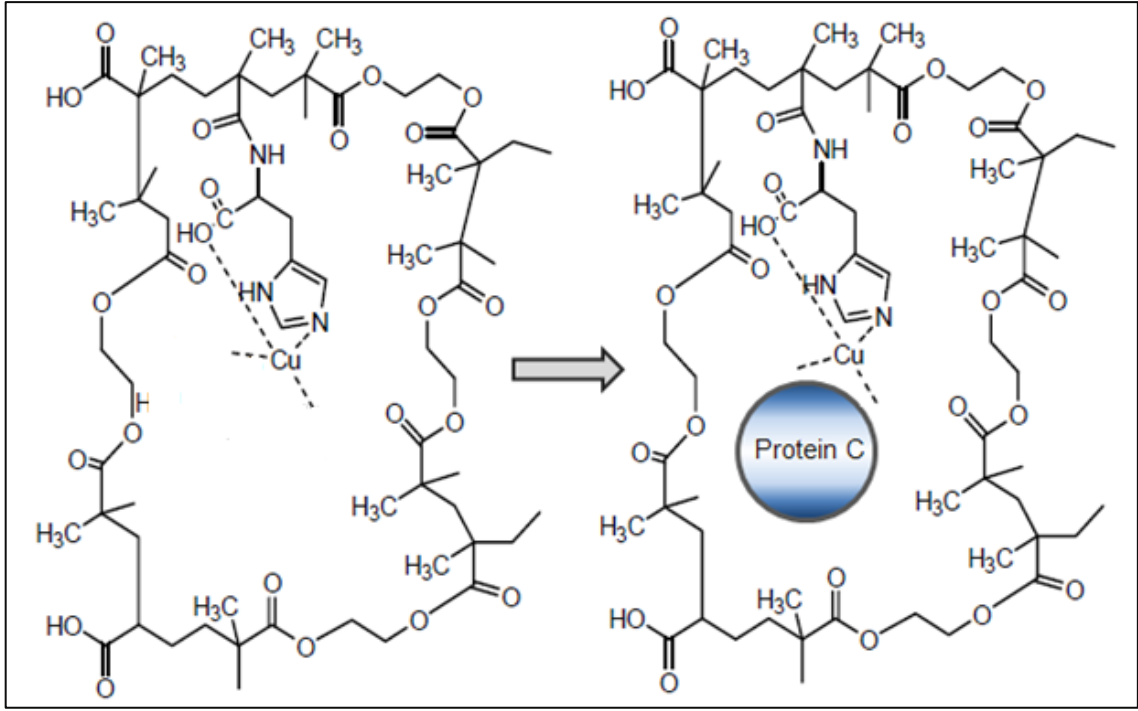
edilmiştir. Çözelti, açık maviye dönünceye kadar 3 saat boyunca sürekli olarak manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Etanol daha sonra, mavi renkte bir katı vermesi için döner buharlaştırıcı üzerinden uzaklaştırılmıştır. MAH-Cu(II) kompleksi (0.276 g, % 68.4) mavi kristal katıyı vermesi için etanol/asetonitriden yeniden kristalize edilmiştir.

Kalıp molekül olan protein C (15.0 mg) MAH-Cu<sup>2+</sup> (5.0 mg) içeren distile su (1 mL) ile çözülmüş ve Protein C-MAH-Cu<sup>2+</sup> kompleksinin ön-organizasyonu manyetik karıştırıcıda 4 saat boyunca karıştırılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.4. Protein C Baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] Süpermakrogözenekli Kriyojellerin Hazırlanması**

Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin hazırlanmasında izlenen yol şu şekildedir: Polimerizasyon sistemi iki fazın karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Faz I'de N,N-Metilen bisakrilamid (0.1425 g), 5 mL suda çözülmüştür. Faz II'de ise 650 µL HEMA, MAH-Cu(II)-Protein C kompleksi (1 mL) ile manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Oluşan karışım (faz II) 1.85 mL suda çözümlenerek MBAAM çözeltisine (faz I) eklenmiştir. Polimerleşme için serbest radikal oluşumuna sebep olan amonyum persülfat (APS) reaksiyon başlatıcı olarak, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) ise katalizör olarak kullanılmıştır. Homojen çözeltiye 0.01 g APS ve 12.5 µL TEMED eklenmiştir. Buz kalıbı içerisine yerleştirilen şırıngalara eşit oranlarda polimer karışımı aktarıldıktan sonra ağızları sıkıca kapatılarak -12°C'da 24 saat süre ile polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda oluşan kriyojeller oda sıcaklığına getirilmiştir. Reaksiyona girmemiş monomerlerin ve diğer artıkların polimerik yapıdan uzaklaştırılması için sürekli olarak su ile yıkanarak Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] süpermakrogözenekli kriyojeller (MIP) sentezlenmiştir. Baskılanmamış (NIP) süpermakrogözenekli P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojeller ise ortama kalıp molekül olan Protein C eklenmeksizin aynı yöntemle sentezlenmiştir. Kullanılmadığında kriyojeller mikrobiyal kirlenmeyi önlemek için % 0.02 sodyum azür içeren çözeltide buzdolabında saklanmıştır.





Şekil 3.2. Protein C kalıp oluşumunun şematik gösterimi

### 3.5. Kalıp Molekülün (Protein C) Uzaklaştırılması

Oluşan kriyojellerden kalıp Protein C molekülünün uzaklaştırılması için 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Protein baskılanmış kriyojeller oda sıcaklığında 48 saat süre ile 1.0 M NaCl çözeltisi ile yıkanmıştır. Bu işlem kalıp molekül Protein C molekülleri 280 nm'de UV spektrofotometresi ile tayin edilmeyene kadar birkaç kez tekrarlanmıştır.

### 3.6. Protein C Baskılanmış Kriyojellerin Karakterizasyonu

#### 3.6.1. FTIR Çalışmaları

MAH-Cu(II) ön kompleksi ile MIP ve NIP kriyojellerin yığın yapısı FTIR (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) ile incelenmiştir. Analizden önce kriyojeller vakum etüvünde 24 saat kurutulmuştur. FTIR spektrumlarının elde edilmesi amacıyla 2 mg polimer örneği 98 mg KBr ile karıştırılarak havanda dövülmüş ve hidrolik preste 600 kg/cm<sup>2</sup> basınçta 10 dakika bekletilerek ince bir tablet haline getirilmiştir. Hazırlanan tabletin 4600-400 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında spektrumu FTIR cihazında alınmıştır.

### 3.6.2. NMR Çalışmaları

MAH monomerinin proton NMR spektrumu,  $CDCl_3$  içerisinde JEOL GX-400 300 MHz (Japonya) NMR cihazı kullanılarak alınmıştır. Kimyasal kaymalar ( $\delta$ ) ppm cinsinden  $CHCl_3$  referans alınarak rapor edilmiştir.

### 3.6.3. Yüzey Alanı Ölçümleri

MIP ve NIP kriyojellerin gözenek hacmi ve ortalama gözenek çapı civa porozimetresi ile belirlenmiştir. MIP ve NIP kriyojellerin spesifik yüzey alanı BET cihazı (Quantochrome SI, Automated Surface Area and Pore Size Analyzer, Quantochrome, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Kriyojel örnekleri dikkatlice tartılmış ve örnek haznesine yerleştirilmiştir. Daha sonra, örneklerin azot atmosferinde  $150^\circ C$ 'de 1 saat gazı alınmıştır. Gaz adsorpsiyonu  $-210^\circ C$ 'de ve desorpsiyonu oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon basamağında elde edilen sonuçlar, spesifik yüzey alanı hesaplamalarında kullanılmıştır.

### 3.6.4. Şişme Deneyi

MIP ve NIP kriyojellerin denge şişme oranının belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Kuru kriyojeller  $\pm 0.0001$  duyarlılıkla tartılmış ve 50 mL saf su içeren behere konulmuştur. Farklı zaman aralığında (1-120 dakika) ve 24 saat sonunda kriyojeller sudan alınmış ve süzgeç kağıdı yardımı ile yüzeydeki su uzaklaştırılarak tartılmıştır. Aşağıdaki eşitlik yardımı ile MIP ve NIP kriyojellerin su içeriği belirlenmiştir.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_0) / W_0] \times 100 \quad (3.1)$$

$W_0$  ve  $W_s$  sırası ile kriyojellerin şişmeden önceki ve sonraki ağırlıklarını (g) ifade etmektedir.

MIP ve NIP kriyojellerin makrogözeneklerinin miktarının belirlenmesi için ise aşağıda verilen yöntem uygulanmıştır. İlk olarak denge şişme oranına ulaşmış olan kriyojel örnekleri tartılmıştır. Daha sonra şişmiş kriyojel örneği bir enjektör içerisine alınarak, kriyojellerin makrogözeneklerinde bulunan suyun uzaklaştırılması için kriyojel enjektör yardımıyla sıkıştırılmış ve tartılmıştır.

Kriyojellerin sahip olduğu makrogözenek miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = [(W_1 - W_2) / W_1] \times 100 \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte  $W_1$  denge şişme oranına ulaşmış kriyojellerin ağırlığını (g) ifade ederken,  $W_2$  denge şişme oranına ulaşmış kriyojellerin sıkıldıktan sonraki ağırlığını (g) ifade etmektedir.

### **3.6.5. Yüzey Morfolojisi**

MIP ve NIP kriyojellerin yüzey ve yığın yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL, JEM 1200EX, Tokyo, Japonya) ile incelenmiştir. Bu amaçla ilk basamakta kriyojel kesitleri iletken bir yapıştırıcıyla SEM örnek plakası üzerine tutturulmuştur. Daha sonra örnek yüzeyi vakum altında 200 Å kalınlığında metalik altın ile kaplanarak yüzey iletken hale getirilmiştir. Hazırlanan örnekler SEM örnek yuvasına yerleştirilerek çeşitli büyütme oranlarında fotoğrafları çekilmiştir.

## **3.7. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları**

### **3.7.1. Protein C Adsorpsiyonu**

Sulu çözeltiden Protein C adsorpsiyonu deneyleri sürekli sistemde gerçeleştirilmiştir. Protein C baskılanmış kriyojeller (MIP), 5 mL Protein C çözeltisi ile 2 saat 130 rpm karıştırma hızında etkileştirilmiştir. Başlangıç Protein C derişiminin (0.1-4.0 mg/mL), pH'nın (4.0-8.0), sıcaklığın (4°C-45°C), akış hızının (0.5-2.0 mL/dk) ve iyonik şiddetin (0.1-1.0 M NaCl) adsorpsiyon hızı ve kapasitesine etkisi incelenmiştir. şekil 3.1'de deneylerde kullanılan sürekli sistem şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Sürekli sistem düzeneği. a: peristaltik pompa, b: kolon, c: çözelti, d: manyetik karıştırıcı, e: silikon boru.

Çözeltideki Protein C derişimleri, 280 nm'de spektrofotometrik (Shimadzu UV-1601, Japonya) olarak belirlenmiştir. Cihazın duyarlılığı periyodik olarak standart Protein C çözeltisi ile kontrol edilmiştir. Deneyler ve ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır. Gram polimer başına adsorplanan Protein C miktarı (mg/g polimer) aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$M_g = C_o \cdot q \cdot t \quad (3.3)$$

$$M_c = C \cdot V \quad (3.4)$$

Bu eşitliklerde;  $M_g$ : kolona giren Protein C miktarı (mg);  $C_o$ : Protein C başlangıç derişimi (mg/mL);  $q$ : akış hızı (mL/dk);  $t$ : zaman (dk);  $M_c$ : kolondan çıkan Protein C miktarı (mg);  $C$ : adsorpsiyon sonrası Protein C derişimi (mg/mL);  $V$ : kolon çıkışında toplanan çözelti hacmi (mL)'dir.

Polimerlerin Protein C adsorpsiyon kapasitesi ise;

$$Q = [M_g - M_c] / m \quad (3.5)$$

eşitliği kullanılarak belirlenmiştir. Burada;  $m$ : Kolondaki kriyojel ağırlığı (g)'dir.

### 3.7.2. Seçicilik Deneyleleri

Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin seçiciliğini göstermek için albumin ve hemoglobin yarışmacı proteinler olarak seçilmiştir. Seçilen proteinlerin 0.5 mg/mL derişimindeki sulu çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmış ve sürekli sistemde 2 saat boyunca 1 mL/dk akış hızıyla Protein C baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) kriyojel kolonlardan geçirilmiştir. Adsorplanan protein miktarları 280 nm'de UV spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri ile belirlenmiştir.

Albumin ve hemoglobin için Protein C'ye göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (3.6)$$

Eşitlikte  $K_d$  dağılma katsayısını (mL/g);  $C_i$  ve  $C_f$  protein başlangıç ve sonuç derişimlerini (mg/mL),  $V$  kullanılan sulu çözelti hacmini (mL) ve  $m$  kriyojelin ağırlığını (g) ifade etmektedir.

Yarışmacı türler varlığında bir proteinin bağlanması için seçicilik katsayısı Eşitlik 3.7'ye göre denge bağlanma verilerinden elde edilebilir.

$$K = K_{\text{kalıp protein}}/K_{\text{girişimci protein}} \quad (3.7)$$

Baskılanmış adsorbentle diğer protein moleküllerinin  $k$  değerleri baskılama seçiciliği hakkında yorum yapılmasına olanak verir. Bağlı seçicilik katsayısı ( $k'$ ) aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır;

$$k' = k_{\text{baskılanmış}}/k_{\text{kontrol}} \quad (3.8)$$

### 3.7.3. Desorpsiyon Çalışmaları

Protein C desorpsiyonu 1.0 M NaCl desorsiyon ajanı ile gerçekleştirilmiştir. Protein C adsorplanmış MIP kriyojelden 1 mL/dk akış hızında oda sıcaklığında 2 saat süre ile desorpsiyon çözeltisi (10 mL) geçirilmiştir. Desorpsiyon ortamındaki Protein C derişimi 280 nm'de UV spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Desorpsiyon oranı

kriyojellere adsorplanan ve kriyojelden desorbe olan Protein C miktarından aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan Protein C miktarı}}{\text{Kriyojele adsorplanan Protein C miktarı}} \times 100 \quad (3.9)$$

Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek üzere adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı kolon kullanılarak on kez tekrar edilmiştir. Rejenerasyon ve sterilizasyon amacı ile kolon, desorpsiyon işleminin ardından 50 mM NaOH çözeltisi ve deiyonize su ile yıkanmıştır.

### 3.8. Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi (FPLC) Analizi

Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelin (yarıçap:1.0 cm, uzunluk: 5.0 cm) yarışmalı proteinlere karşı seçiciliği FPLC ile test edilmiştir. Ayırma işlemi Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel sentezlenmiş GE Healthcare (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) kolonu (10/10, 19-5001-01) ile yapılmıştır. FPLC'de ayırma UV dedektör sistemi içeren AKTA-FPLC (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan FPLC cihazı M-925 karıştırıcısı, P-920 pompası, UPC-900 monitörü, INV-907 enjeksiyon valfi ve Frac920 fraksiyon kolektörü içermektedir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. FPLC sisteminin ve uygulanan kolonun fotoğrafı.

Protein C adsorpsiyonu MIP kriyojellerle gerçekleştirilen, farklı derişimlerde hazırlanan örnekler kolona uygulanmıştır. FPLC'nin A ve B hareketli fazları sırasıyla Asetat tamponu (pH 5.0) ve 1M NaCl içeren elüsyon çözeltisidir (pH 5.0). Kromatografik ayırma doğrusal gradiyenti 3 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. % 100'lük A hareketli fazı ile 5 dakikalık başlangıç periyodunun ardından, B hareketli fazının miktarı % 0'dan % 100'e kadar 2 dakika içerisinde doğrusal gradiyentli olarak artırılmıştır. % 100'lük B hareketli fazı 5 dakika süreyle uygulandıktan sonra kolondan 6 dakika boyunca % 100'lük A hareketli fazı geçirilmiştir. Tüm tamponlar ve karışımlar kullanılmadan önce filtre edilmiştir. 2 mL protein karışımı kolona uygulanarak sistemin absorbansı 280 nm'de kaydedilmiştir. Ayırma işlemi ise oda sıcaklığında yapılmıştır.  $t_0$ , belirleyici olarak KBr kullanılmıştır. Kapasite ( $k'$ ) ve ayırma ( $\alpha$ ) faktörleri

$$k' = (t_R - t_0)/t_0, \alpha = k_2'/k_1' \quad (3.10)$$

eşitlikleri kullanılarak hesaplanmıştır. Bu eşitliklerde  $t_R$  proteinin alıkonma zamanı  $t_0$  ise belirleyicinin (KBr) alıkonma zamanı,  $k_2'$  Protein C için kapasite faktörü ve  $k_1'$  ise Albumin gibi bir yarışmalı proteinin kapasite faktörünü belirtmektedir.  $R_S$  ayırım gücü ve teorik plaka sayısı (N) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$N = 5.54 (t_R / w_{0.5})^2 \quad (3.11)$$

$$R_S = 2 (t_{R,2} - t_{R,1}) / (w_2 + w_1) \quad (3.12)$$

$w_{0.5}$  karşılık gelen pikin taban yarı uzaklığı,  $t_{R,1}$  ve  $t_{R,2}$  bitişik iki yakın pikin alıkonma zamanları,  $w_1$  ve  $w_2$  ise bitişikteki iki yakın pikin taban çizgisindeki genişliğidir.

### 3.9. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Bu yöntemde proteinler SDS varlığında jel üzerinde yürütülürler. Her bir proteini ve proteinlerin alt birimlerini jel üzerinde tek bant oluşturacak şekilde ayırt etmek mümkündür. Bu yöntem proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemede kullanıldığı gibi saflaştırılmış proteinlerin saflık derecelerinin tayininde de sıkça kullanılmaktadır.

Sulu çözülden saflaştırılan Protein C ve desorplanan Protein C'nin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE kullanılmıştır. SDS-PAGE, % 10'luk akrilamid ayırma jeli (1.0 mm) ile gerçekleştirilmiştir. Protein C çözeltisinin adsorpsiyon öncesi, sonrası ve desorpsiyon örnekleri yine aynı oranda numune % 20 gliserol, % 20 merkaptoetanol, % 4 sodyum dodesil sülfat (SDS), % 0.02 bromfenol blue (BPB) içeren tamponuyla karıştırılarak jele yüklenmiştir. Jel, numune yükleme tamponu ile karıştırılmış ve her bir örnek için protein derişimleri 20 µg/mL'ye ayarlanmıştır. Jel, yüklenen örneklerle ve % 0.1 SDS içeren yürütme tamponu (Tris-glisin, pH 8.3) varlığında 5 saat 120 V'ta yürümeye bırakılmıştır. Yürütme işleminden sonra Coomassie Blue G-250 boyasına alınarak çözeltiyle birlikte gece boyunca bekletilmiştir. Çalışmada kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının aktif grubu olan SO<sub>3</sub>H asidik ortamda proteinlerin serbest amino grubuna bağlanır. Jeldeki fazla boya, % 20 metanol ve % 10 asetik asit içeren çözelti ile her 20 dakikada bir çözelti değiştirilmek suretiyle, iki saat boyunca yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Elektroforez uygulamasında protein standardı olarak, geniş spektrumlu Prestained protein marker (10-170 kDa) kullanılmıştır.

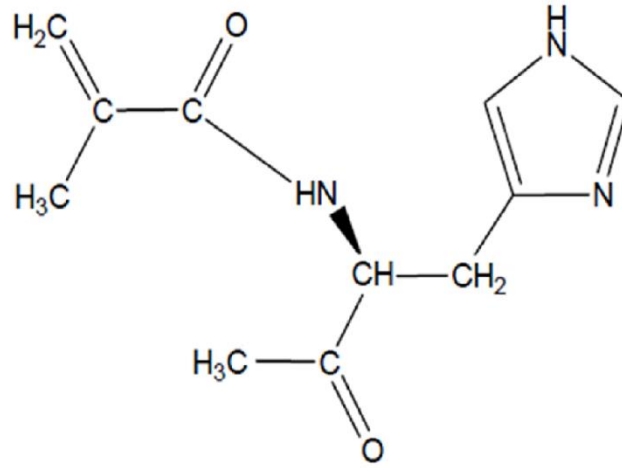


## 4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Protein C Baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] Kriyojeller

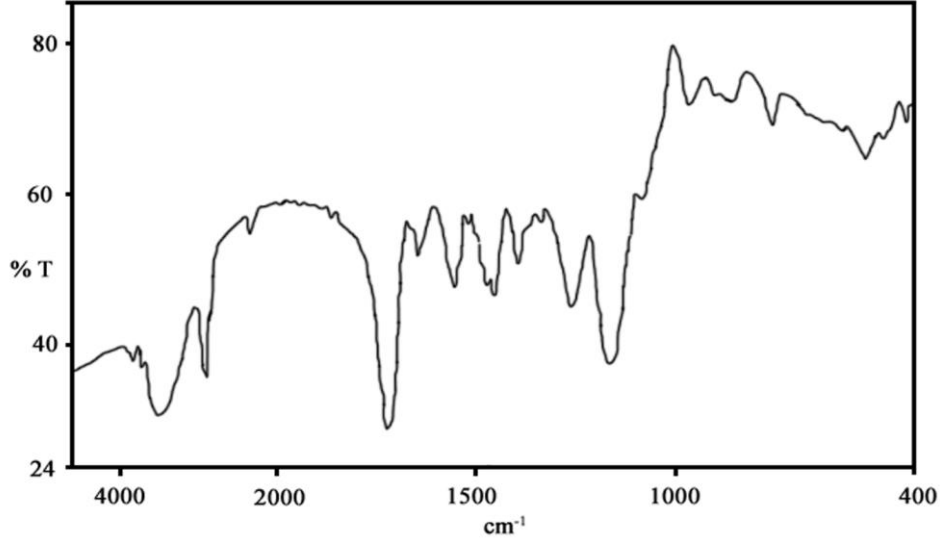
#### 4.1.1. MAH ve MAH-Cu(II) Önkomplesinin Karakterizasyonu

N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH), Protein C moleküllerinin ortamdaki seçimli uzaklaştırılması için fonksiyonel komonomer olarak seçilmiştir. MAH-Cu(II) hazırlanmasının ilk basamağında histidin ve metakroil klorür kullanılarak MAH monomeri sentezlenmiştir. Daha sonra sentezlenen fonksiyonel MAH monomeri Cu(II) ile 1:1 mol oranında kompleksleştirilmiştir. Şekil 4.1'de açık yapısı verilen MAH monomerinin yapısının belirlenmesinde <sup>1</sup>H-NMR kullanılmıştır.

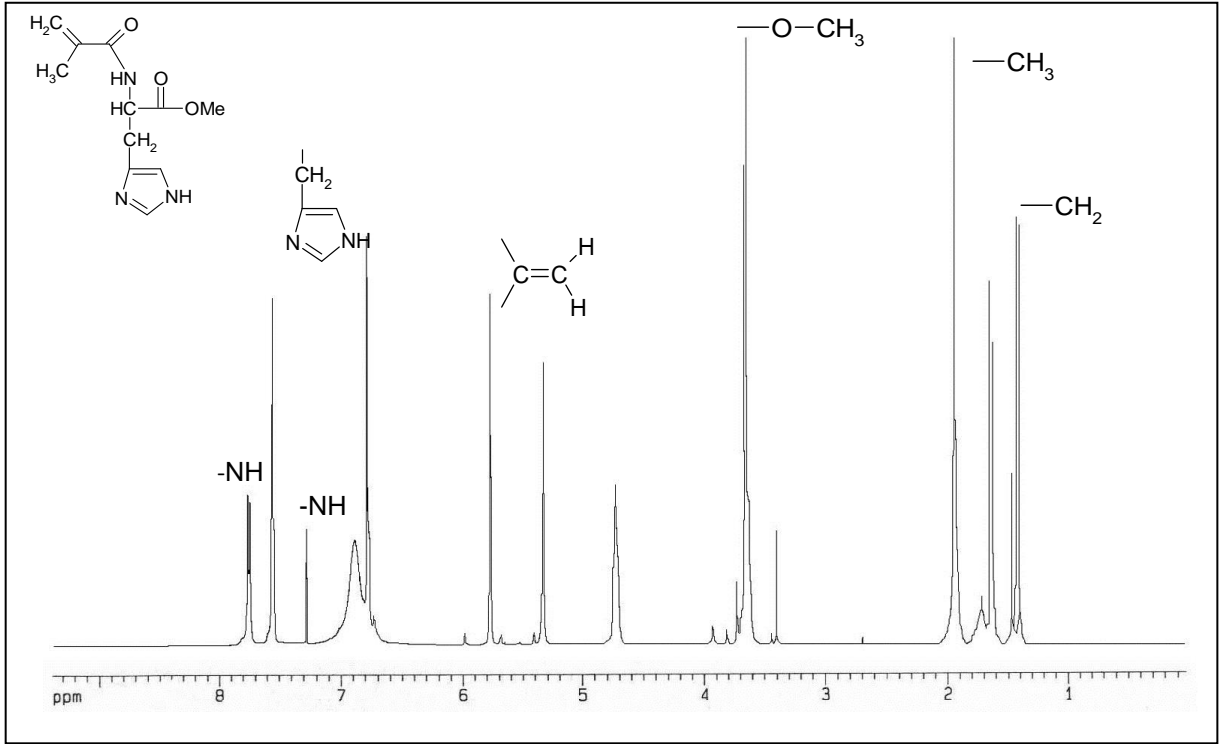


Şekil 4.1. MAH monomerinin molekül formülü.

MAH monomerinin kimyasal yapısının karakterizasyonu için FTIR spektrumu alınmıştır. Şekil 4.2'de verilen FTIR spektrumunda MAH monomerine ait karakteristik  $1651\text{ cm}^{-1}$  karbonil ve  $1558\text{ cm}^{-1}$  amid II gerilme titreşim bantları,  $1724\text{ cm}^{-1}$ 'de ester bantı görülmektedir. MAH monomerinin kimyasal yapısının belirlenmesinde <sup>1</sup>H-NMR kullanılmıştır. <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda MAH'da bulunan gruplara ait karakteristik pikler görülmektedir (Şekil 4.3). Bu karakteristik pikler: <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.99 (t; 3H, J=7.08 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.42 (m; 2H, CH<sub>2</sub>), 3.56 (t; 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.82-4.87 (m; 1H, metin), 5.26 (s; 1H, vinil H), 5.58 (s; 1H, vinil), 6.86 (δ; 1H, J=7.4 Hz, NH), 7.82 (δ; 1H, J=8.4 Hz, NH), 6.86-7.52 (m; 5H, aromatik) olarak bulunmuştur.



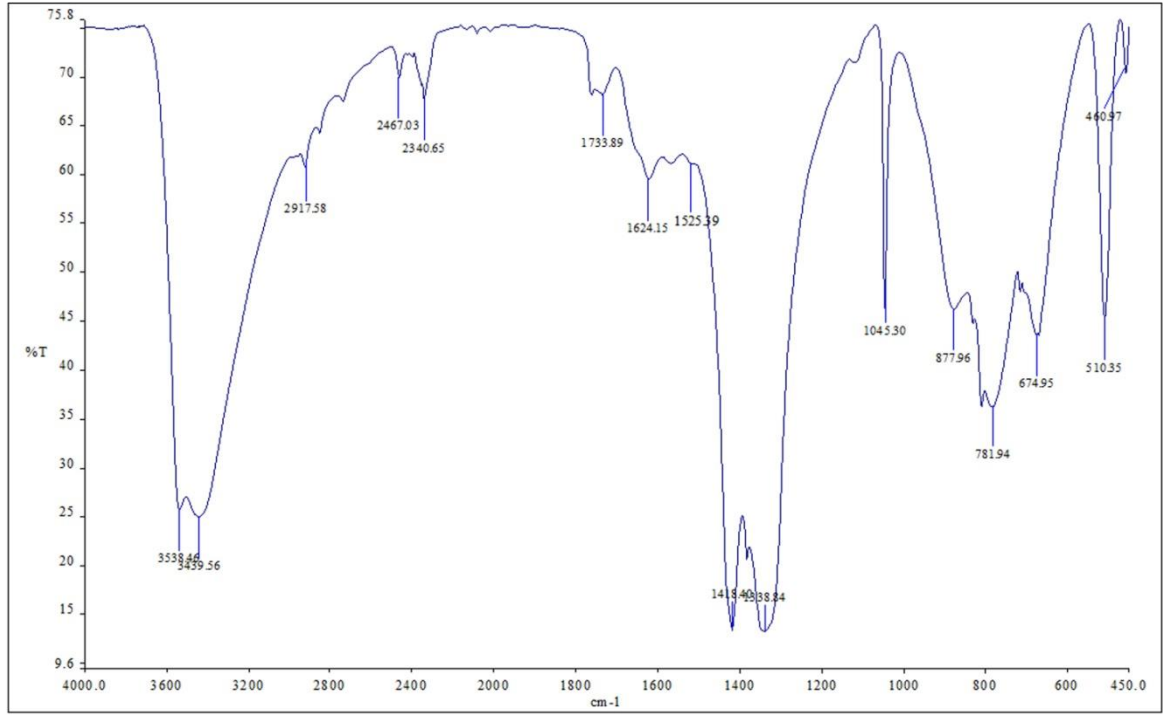
Şekil 4.2. MAH monomerinin FTIR spektrumu.



Şekil 4.3. MAH monomerinin 1H-NMR spektrumu.

MAH-Cu(II) monomeri FTIR ile karakterize edilmiştir. Şekil 4.4'de FTIR spektrumu incelendiğinde MAH yapısına ait karakteristik karbonil bandları 1733 ve 1624  $\text{cm}^{-1}$ 'de, amid II gerilme titreşim bandı ise 1525  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülmektedir. Ayrıca Cu-N titreşimine ait bandlar 510 ve 460  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülmektedir ki bu Cu(II)

iyonlarının MAH yapısına koordine olduğunu göstermektedir. Bu spektrum hedef metal-şelat monomer yapısının başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.4. MAH-Cu(II) monomerinin FTIR spektrumu.

#### 4.1.2. Protein C Baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] Kriyojellerin Karakterizasyonu

Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojeller, kriyopolimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Sentezlenen kriyojeller, şişme özellikleri, yüzey alanı ölçümleri, FTIR ve SEM ile karakterize edilmiştir.

##### 4.1.2.1. Şişme Özellikleri

Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojeller, çapraz bağlı hidrofilik yapıda matrislerdir. Suda çözünmez fakat çapraz-bağ derecesine ve matrisin hidrofilik özelliğine bağlı olarak yapılarına su alarak şişerler. Bu çalışmada hazırlanmış poli(HEMA), baskılanmamış P[HEMA-MAH/Cu(II)] ve Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin denge şişme oranları sırasıyla % 79.6, % 85.0 ve % 88.4'dür (Çizelge 4.1). Makrogözenek oranları ise sırasıyla % 69.5, % 73.1 ve % 74.8'dir. PHEMA kriyojellerle karşılaştırıldığında yapıya

MAHgirmesi ile denge şişme oranının arttığı görülmektedir. Bu sonuç iki şekilde yorumlanabilir. Birincisi, MAH'ın polimerik yapıya ilavesiyle polimer zincirindeki hidrofilik fonksiyonel grup sayısının artması, matriksin daha fazla su molekülü ile etkileşmesine neden olmaktadır. İkincisi ise, MAH'ın HEMA ile reaksiyonu polimerin molekül ağırlığının azalmasına, bu da su moleküllerinin polimer zincirleri içerisine daha kolay girmesi ve daha fazla şişmesine yol açar.

Baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin şişme oranları karşılaştırıldığında; baskılama işleminin şişme oranını arttırdığı görülmektedir. Bu durum; baskılama ile birlikte artan spesifik yüzey alanı ile açıklanabilir.

Çizelge 4.1. Poli(HEMA), NIP ve MIP için denge şişme ve makrogözenek oranları.

Polimer kodu	Şişme oranı %	Makrogözenek oranı %
MIP	88.4	74.8
NIP	85.0	73.1
poli(HEMA)	79.6	69.5

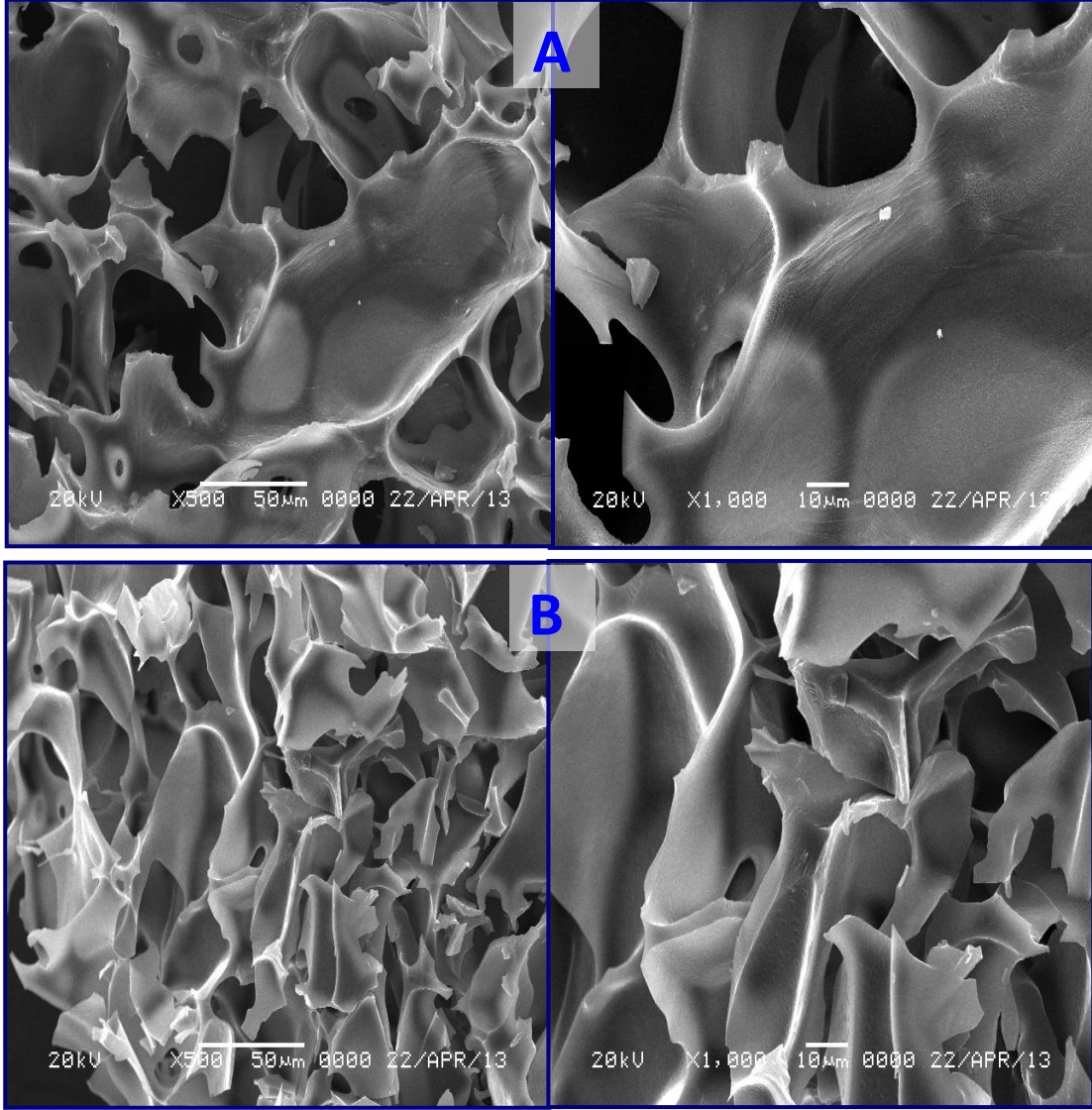
#### 4.1.2.2. Yüzey Morfolojisi

Protein C baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel kolonların yüzey morfolojisi ve iç yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin SEM fotoğrafları Şekil 4.5'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, kriyojeller birbiriyle bağlantılı süpermakrogözenekli akış kanallarına sahiptir. Gözeneklerin boyutu 40 µm'ye kadar ulaşmaktadır. Bu gözenekli yapı, kalıp molekül Protein C'nin kriyojel içerisine kolayca difüze olmasına olanak sağlamaktadır.

#### 4.1.2.3. Yüzey Alanı Ölçümleri

Yüzey alanı ve gözenek boyutu dağılımı moleküler baskılanmış polimerlerde önemli özelliklerdir. Bu özellikler sıvı azot sıcaklığında azot adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi ve 0.05-1.0 arası bağıl basınçları ( $P/P_0$ ) ile ölçülmüştür.

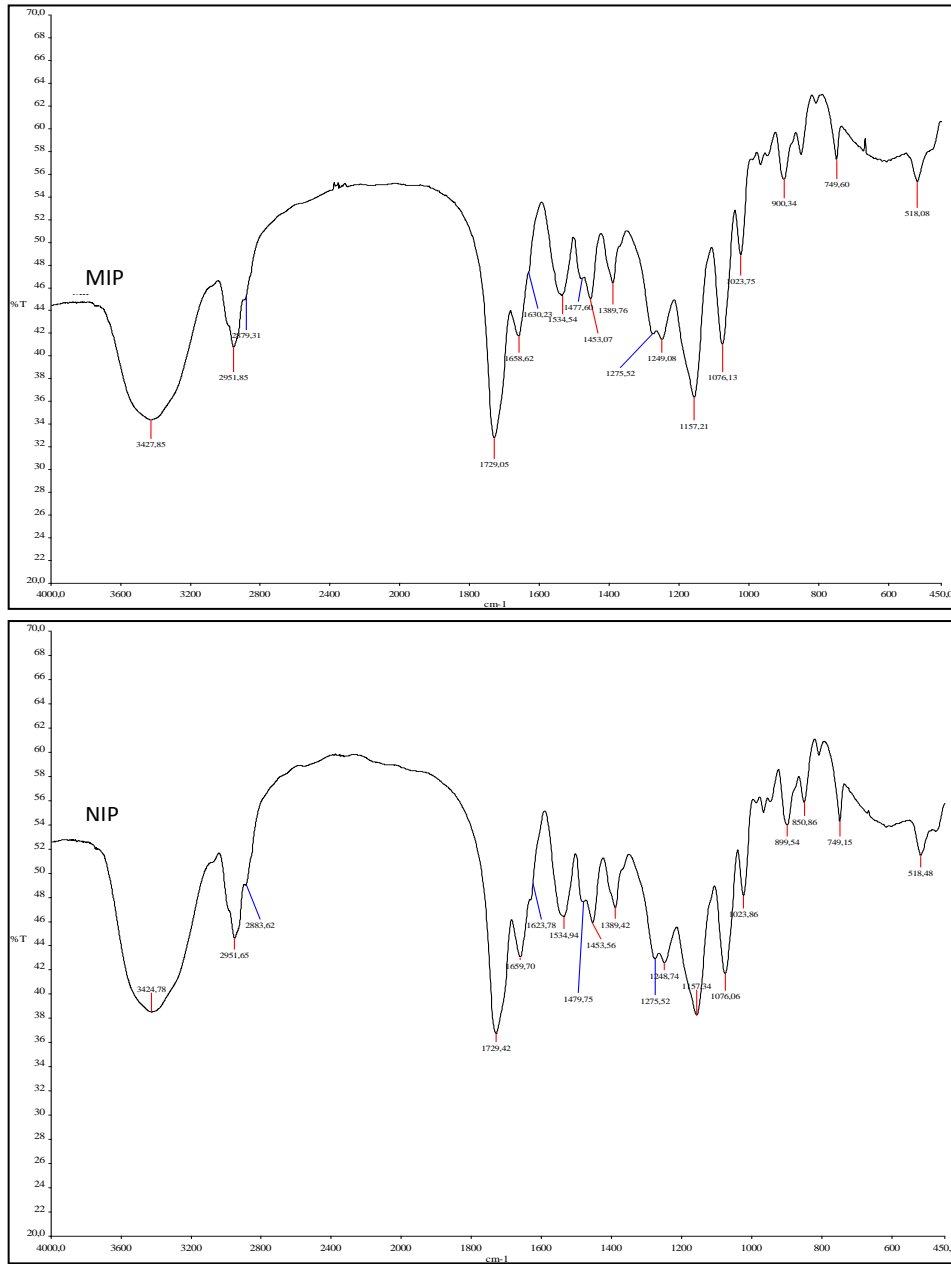
Protein C baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin spesifik yüzey alanları sırasıyla 31.5 m<sup>2</sup>/g ve 28.6 m<sup>2</sup>/g olarak bulunmuştur. Baskılama işlemi, spesifik yüzey alanının artmasına sebep olmuştur. Bu durumun temel sebebi; kriyopolimerizasyon sırasında Protein C moleküllerinin varlığıdır. Baskılanmış kriyojelde Protein C'ye spesifik kavitelerin oluşumu gözenek alanının artmasına neden olmuştur.



Şekil 4.5. P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin SEM fotoğrafları. (A) Protein C baskılanmış kriyojel (MIP); (B) Protein C baskılanmamış kriyojel (NIP).

#### 4.1.2.4. FTIR Çalışmaları

Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin karakterizasyonu için FTIR spektrofotometresi kullanılmıştır. Kriyojeller, kurutulduktan sonra KBr ile pelet haline getirilerek  $450\text{ cm}^{-1}$ - $4000\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında FTIR spektrumları alınmıştır. Baskılanmış kriyojel (MIP), MAH-Cu(II)-Protein C kompleksi; baskılanmamış kriyojel (NIP) ise sadece MAH-Cu(II) kompleksi kullanılarak sentezlenmiştir. Hazırlanan kriyojellerin fonksiyonel grupları aynı olduğu için elde edilen FTIR spektrumlarının da benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Protein C baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerinin FTIR spektrumları.

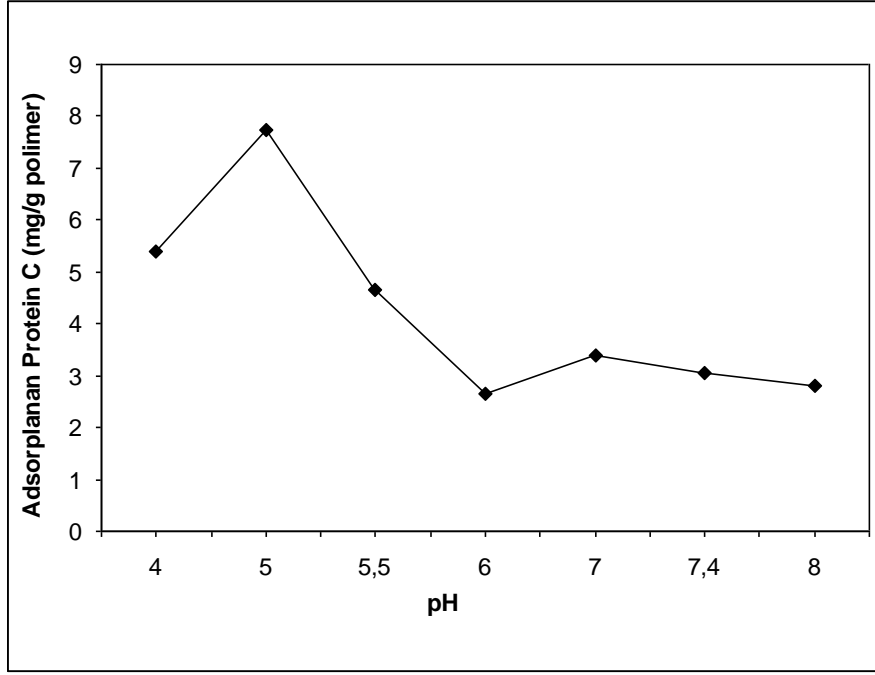
Kriyojellerin FTIR spektrumlarında, -OH bandı  $3424\text{ cm}^{-1}$  civarında (geniş band), alifatik CH gerilme bandı  $2951\text{ cm}^{-1}$  civarında, karbonil bandı  $1729\text{ cm}^{-1}$ 'de, amid bandları  $1658\text{ cm}^{-1}$  ve  $1534\text{ cm}^{-1}$  civarında görülmüştür. FTIR spektrumlarından görüldüğü gibi, polimerik kriyojel hem temel monomer bileşeni olan HEMA'ya hem de fonksiyonel monomer MAH'a ait grupları içermektedir. Ayrıca MIP kriyojelde  $1658\text{ cm}^{-1}$ 'deki amid I gerilme titreşim bandının şiddetinin NIP kriyojelden daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuç olarak; P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerinin başarı ile sentezlendiği belirlenmiştir.

## **4.2. Sulu Çözeltilerden Protein C Adsorpsiyonu**

Bu bölümde; kriyojellerin optimum adsorpsiyon koşulları incelenmiş ve sulu çözeltiden Protein C adsorpsiyonuna ait sonuçlara yer verilmiştir. Bu aşamada; ortam pH'sının, Protein C derişiminin, akış hızının, adsorpsiyon hızının, sıcaklığın, tuz derişiminin etkisi incelenmiş ve yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere, Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi uygulanarak uygun adsorpsiyon modeli belirlenmiştir. Protein C moleküllerinin adsorpsiyon işlemini kontrol eden mekanizmanın belirlenmesi için deneysel verilere yalancı birinci ve ikinci derece kinetik denklemler uygulanmıştır. Kriyojellerin tekrar tekrar kullanım olanağı, aynı kriyojelin 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi ile gösterilmiştir. Baskılama işleminin seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmacı proteinlere karşı dağılma ve seçicilik kat sayıları hesaplanmıştır. Ayrıca Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelin yarışmalı proteinlere karşı seçiciliği FPLC ile test edilmiştir. Son olarak sulu çözeltiden saflaştırılan Protein C ve desorplanan Protein C'nin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE kullanılmıştır.

### **4.2.1. pH Etkisi**

Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin Protein C adsorpsiyonuna pH'nın etkisi Şekil 4.7'de verilmiştir. Protein C adsorpsiyonu farklı pH aralıklarında (pH 4.0-8.0) incelenmiştir. MIP kriyojellere maksimum Protein C adsorpsiyonu pH 5.0 asetat tamponunda gözlenmiş ve bu pH'daki maksimum adsorpsiyon miktarı  $7.75\text{ mg Protein C/g}$  olarak bulunmuştur. Bu verilere göre çalışma ortamı olarak pH 5.0 asetat tamponu seçilmiştir.

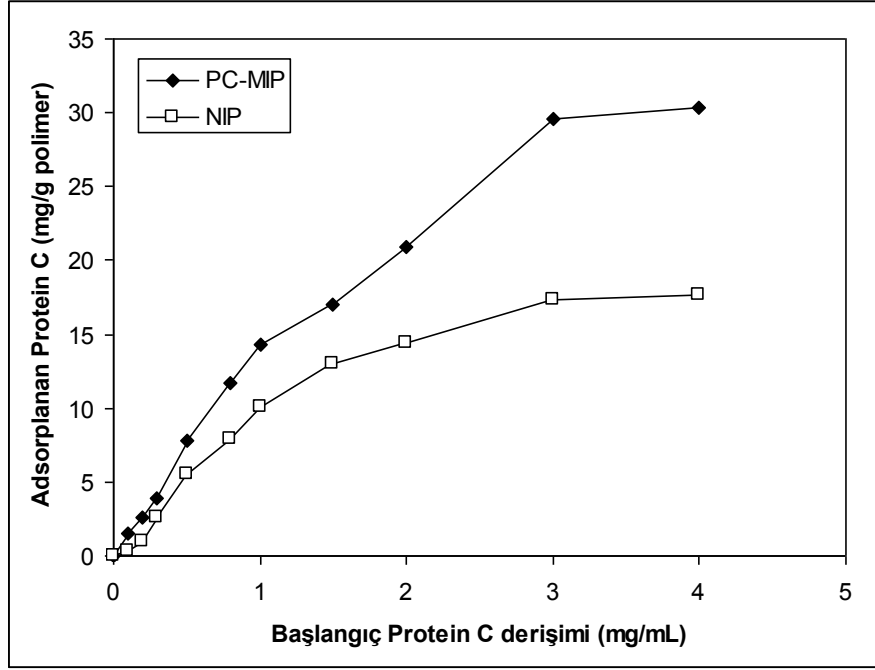


Şekil 4.7. Protein C adsorpsiyonuna pH etkisi; Protein C derişimi: 0.5 mg/mL; akış hızı:1.0 mL/dk; zaman: 120 dk; T: 25°C.

#### 4.2.2. Derişim Etkisi

Protein C derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisini belirlemek amacıyla hem baskılanmamış hem de baskılanmış kriyojeller kullanılmıştır. Farklı derişimlerde (0.1-4.0 mg/mL) hazırlanan Protein C çözeltisi 1.0 mL/dk akış hızında kriyojel kolondan geçirilmiştir. Şekil 4.8'de Protein C derişiminin Protein C adsorpsiyonuna etkisi gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi Protein C derişiminin artmasıyla birlikte birim kriyojel başına adsorplanan Protein C miktarı artmakta ve yaklaşık 3.0 mg/mL Protein C derişiminden sonra denge değerine ulaşmaktadır. Bu derişim değerinden sonra önemli bir artış gözlenmemiştir. Özellikle baskılanmış kriyojelin adsorpsiyon izoterminin başlangıcındaki keskin eğim, baskılama yöntemiyle MIP kriyojellik yapıda oluşturulan Protein C için spesifik boşluklarla açıklanabilir. Baskılanmış ve baskılanmamış kriyojeller için maksimum adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 30.4 mg/g ve 17.7 mg/g'dır.

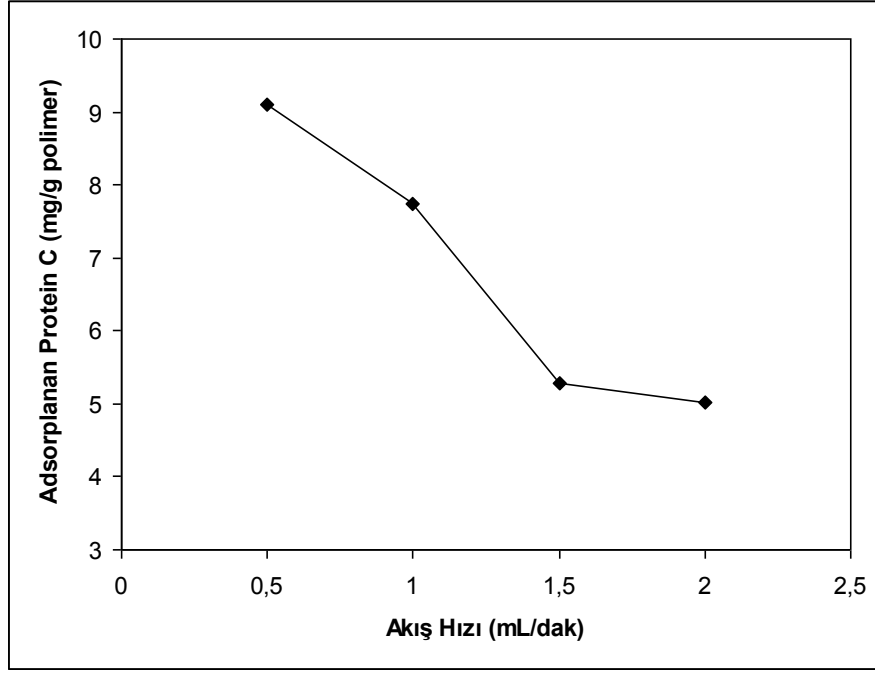




Şekil 4.8. Protein C derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi; pH: 5.0; akış hızı: 1.0 mL/dk; zaman: 120 dk; T: 25°C.

#### 4.2.3. Akış Hızının Etkisi

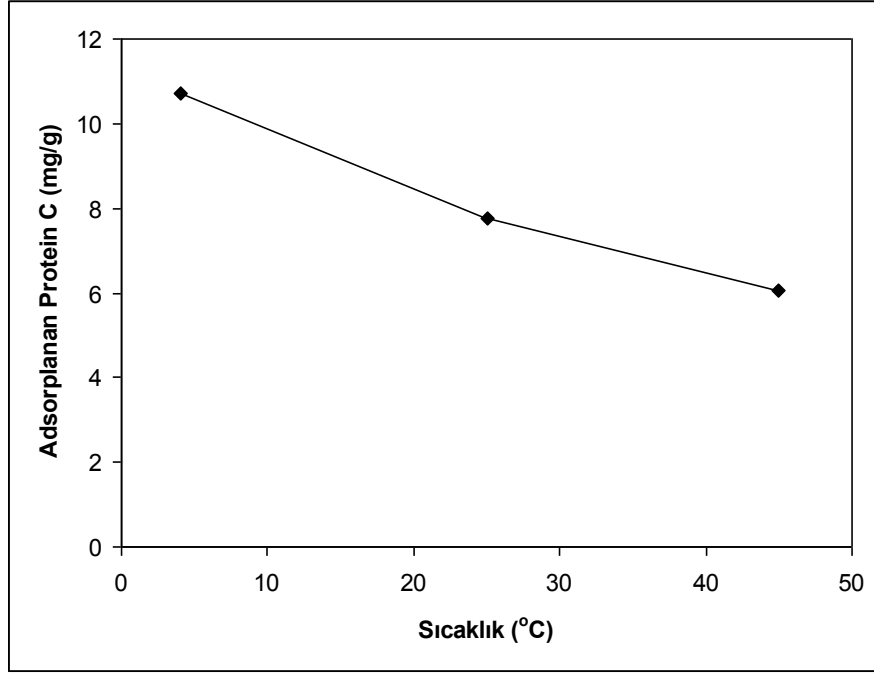
Bu grup deneylerde, Protein C çözeltisinin Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelden hacimsel akış hızı 0.5-2.0 mL/dk arasında değiştirilmiş, diğer deneysel parametreler sabit tutulmuştur. Protein C adsorpsiyon kapasitesine akış hızının etkisi Şekil 4.9'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi akış hızının artması ile adsorplanan Protein C miktarı azalmıştır. Çalışılan en düşük akış hızı değeri olan 0.5 mL/dk'da 9.1 mg Protein C/g kriyojel kapasitesi gözlenirken; akış hızının 2.0 mL/dk akış hızına yükselmesi ile adsorpsiyon kapasitesi % 45 azalarak 5.0 mg Protein C/g değerine düştüğü gözlenmiştir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: akış hızının artması ile Protein C moleküllerinin kolondaki alıkonma zamanı azalır. Bunun sonucunda Protein C moleküllerinin MIP kriyojel ile etkileşim süresi ve olasılığı azalacağından adsorpsiyon kapasitesinde bir düşme gözlenir.



Şekil 4.9. Protein C adsorpsiyon kapasitesine akış hızı etkisi; Protein C derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 5.0; zaman: 120 dk; T: 25°C.

#### 4.2.4. Sıcaklığın Etkisi

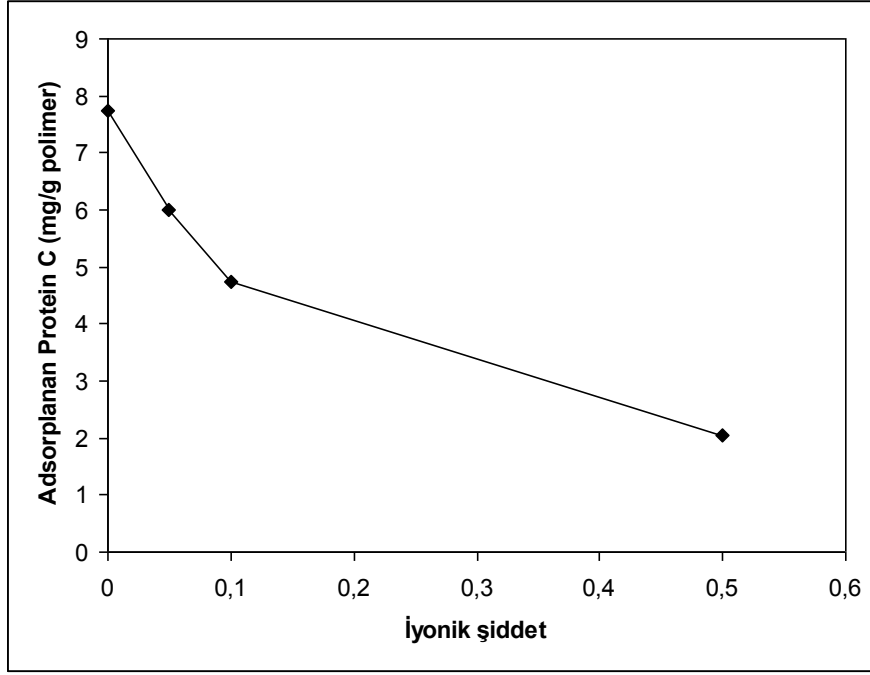
Kriyojel kolonda Protein C adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla Protein C adsorpsiyon deneyleri farklı sıcaklıklardaki ortamlarda (4-45°C) gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi artan sıcaklıkla beraber Protein C baskılanmış kriyojel kolonda Protein C adsorpsiyon kapasitesi önemli oranlarda azalmıştır. Protein C baskılanmış kriyojel kolonda 4°C'de 10.72 mg/g, 25°C'de 7.74 mg/g ve 45°C'de 6.05 mg/g Protein C adsorpsiyonu sağlanmıştır. Sıcaklık ile Protein C adsorpsiyon ilişkisi, adsorpsiyon işleminde etkin olan temel etkileşimlerin belirlenmesi için önemli veriler sunmaktadır. Hidrojen bağları ve iyonik etkileşimlerinin baskın olduğu durumlarda adsorpsiyon kapasitesindeki değişimler sıcaklıkla ters orantılıdır [85,86]. Van der Waals ve hidrofobik etkileşimlerinin baskın olduğu durumlarda ise adsorpsiyon kapasitesi sıcaklıkla doğru orantılı olarak değişmektedir [87]. Sıcaklık artışı ile birlikte adsorpsiyon kapasitesindeki azalmalar; Protein C ile kolon arasındaki baskın etkileşim türlerinin H-bağları ve elektrostatik (iyonik) etkileşimler olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.10. Protein C adsorpsiyon kapasitesine sıcaklığın etkisi; Protein C derişimi: 0.5 mg/mL; akış hızı: 1.0 mL/dk; pH: 5.0; zaman: 120 dk.

#### 4.2.5. İyonik Şiddet Etkisi

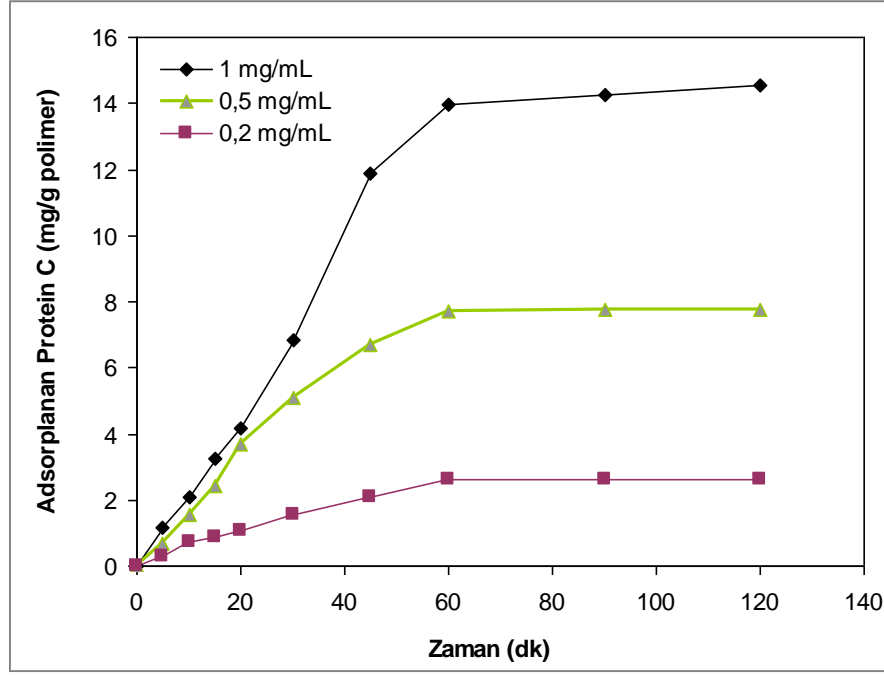
Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel kolonlara Protein C adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacıyla; adsorpsiyon deneyleri farklı derişimlerde (0-1.0 M aralığında) sodyum klorür (NaCl) içeren Protein C çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.11’de görüldüğü gibi, Protein C adsorpsiyon kapasitesi artan tuz derişimiyle azalmaktadır. İyonik şiddetin artmasıyla adsorpsiyon kapasitesindeki azalma, kriyojel kolon ve protein molekülleri arasındaki elektrostatik itme kuvvetleriyle açıklanabilir. Adsorpsiyon ortamında tuz derişimi artması, deprotone olmuş histidinin amino grubunun tuzun kasyonu tarafından koordine edilmesine sebep olur. Bu durumda düşük protein adsorpsiyonu elde edilir [88,89]. Tuz varlığında protein molekülü ile MAH-Cu<sup>2+</sup> molekülleri arasındamevcut olan tuz köprüleri tahrip olmaktadır. Tuz köprülerinin bozulması yüksek iyonik şiddette düşük protein adsorpsiyonuna sebep olmaktadır.



Şekil 4.11. Protein C adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi; Protein C derişimi: 0.5 mg/mL; akış hızı: 1.0 mL/dk; pH: 5.0; zaman: 120 dk; T: 25°C.

#### 4.2.6. Adsorpsiyon Hızının Etkisi

Protein C moleküllerinin Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojele adsorpsiyonunun zamana bağlı fonksiyonu Şekil 4.12'de verilmiştir. Adsorpsiyon başlangıçta oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Protein C moleküllerinin polimer yüzeyindeki bağlanabileceği tüm aktif bölgelere bağlanması nedeni ile yaklaşık 60 dakikada adsorpsiyon kapasitesi denge değerine ulaşmaktadır. Bu süreden sonra adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim görülmemektedir. Artan Protein C miktarıyla birlikte adsorpsiyon kapasitesinin arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.12. Sulu çözülden Protein C adsorpsiyonunun zamanla değişimi; akış hızı: 1.0 mL/dk; pH: 5.0; T: 25°C.

#### 4.2.7. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi, her bir protein molekülünün adsorbentle etkileşimini karakterize etmek için kullanılmaktadır. Moleküllerin adsorbentle etkileşimini karakterize etmek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri uygulanmıştır. Adsorpsiyon izotermi iki faz dengede olduğu zaman çözümlerdeki protein derişimi ile katı fazda adsorplanan protein miktarı arasında bir ilişki kurulmasını sağlar.

Langmuir adsorpsiyon modeli, her biri yalnızca bir molekül bağlayabilecek kapasitede olan belli sayıda tanımlanmış bölgeye adsorpsiyon olduğunu varsayar. Bu bölgelerin enerji düzeyi olarak eşdeğer olduğu ve komşu bölgelerde adsorplanan moleküller arasında etkileşim olmadığı kabul edilir. Langmuir adsorpsiyon izotermi Eşitlik 4.1 ile tanımlanır. Denge verilerinin eşitliğe uygulanmasıyla doğrusal bir grafik elde edilmesi, aşağıdaki eşitlikle tanımlanan Langmuir modelinin bu sistemlere uygulanabileceğini göstermektedir:

$$1/Q_e = 1/Q_{max} + 1/Q_{max} \cdot b \cdot C_{eq} \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte;  $Q_e$ : kriyojele bağlanan protein miktarı (mg/g),  $C_{eq}$ : çözültideki denge protein derişimi (mg/mL),  $b$ : Langmuir sabiti (mL/g) ve  $Q_{max}$ : maksimum protein adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) göstermektedir.

$(1/C_{eq})$ 'ya karşılık  $(1/Q)$  grafiğe geçirildiğinde doğrunun y eksenini kesim noktası  $(1/Q_{max})$  değerini, doğrunun eğimi ise  $1/Q_{max}.b$  değerini vermektedir. Protein C adsorpsiyonu için deneysel verilere Langmuir izotermini uygulanması ile elde edilen grafik Şekil 4.13'de verilmiştir.

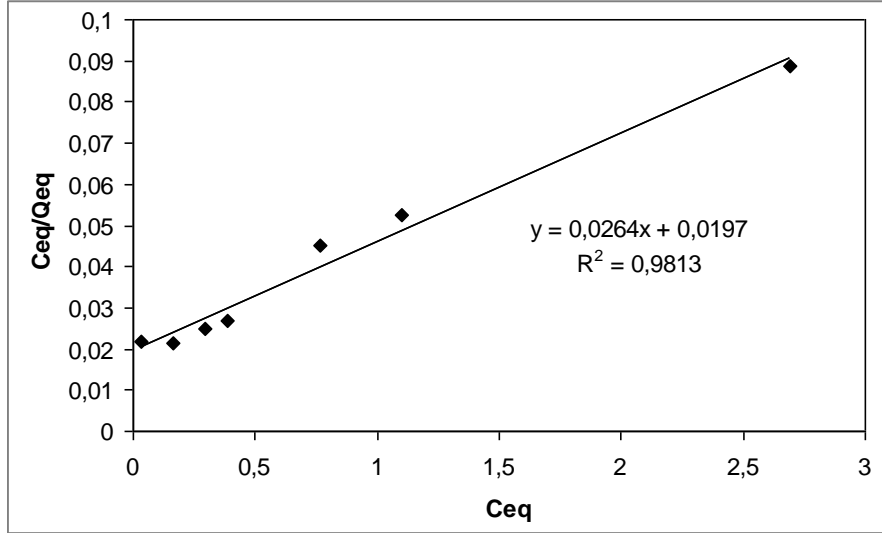
Freundlich adsorpsiyon modeli, adsorbente metal adsorpsiyon enerjisinin komşu bağlanma bölgelerinin dolu olup olmadığına bağlı olarak değiştiğini varsayar. Freundlich adsorpsiyon modeli aşağıdaki eşitlikle tanımlanmaktadır:

$$Q_e = K_F \cdot C_{eq}^{(1/n)} \quad (4.2)$$

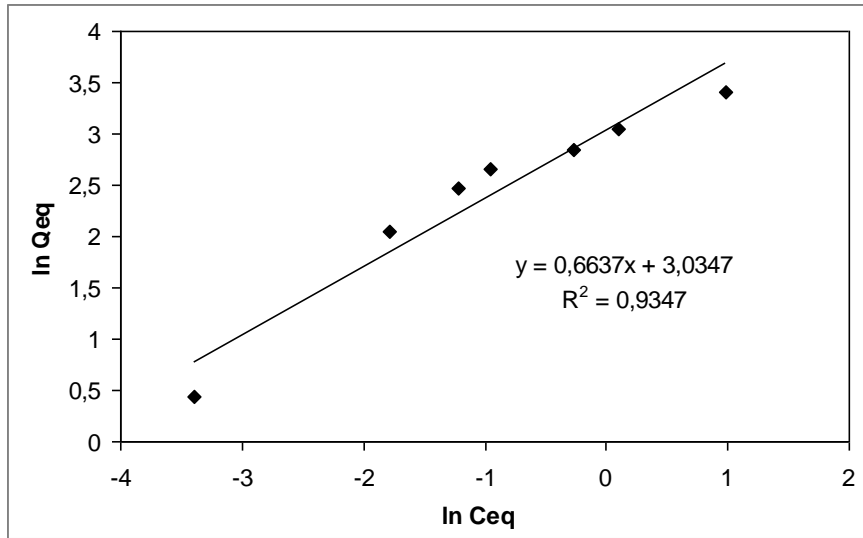
Bu eşitlikte;  $Q_e$ : adsorpsiyon miktarı (mg/g),  $C_{eq}$ : çözültideki adsorbent derişimi (mg/mL)'dir.  $K_F$  ve  $1/n$ , sırasıyla adsorpsiyon kapasitesini ve adsorpsiyon şiddetini gösteren Freundlich sabitleridir. Bu eşitlik her iki tarafın logaritması alınarak daha kullanışlı hale getirilebilir:

$$\ln Q_e = \ln K_F + (1/n) \ln C_{eq} \quad (4.3)$$

Deneysel verilerin Freundlich modeline uygunluğu da incelenmiştir. Bu amaçla  $\ln C_e$ 'nin  $\ln Q_e$ 'ye karşı grafiği çizilmiştir (Şekil 4.14). Grafiğin doğrusal çıkması Freundlich adsorpsiyon izoterminin uygulanabilirliğini gösterir. Adsorpsiyon sabitleri kesim noktası ve eğimden hesaplanabilir.  $K_F$  ve  $1/n$  çeşitli çevresel faktörlere bağlı olarak değişen deneysel sabitlerdir ve  $1/n$ , sıfır ile 1 aralığında değişmektedir.



Şekil 4.13. Protein C baskılanmış kriyojeller için Langmuir adsorpsiyon izotermi.



Şekil 4.14. Protein C baskılanmış kriyojeller için Freundlich adsorpsiyon izotermi.

Langmuir ve Freundlich izotermi için hesaplanan değerler Çizelge 4.2'de verilmiştir. Korelasyon katsayılarından adsorpsiyon sisteminin Langmuir modeline ( $R^2$ : 0.9813) Freundlich modelinden ( $R^2$ : 0.9347) daha fazla uyduğunu göstermektedir. Langmuir sabiti değeri ( $Q_{max}$ ) deneysel verilerle uyushmaktadır. Diğer taraftan  $K_F$  ve  $1/n$  değerleri, sulu ortamdan Protein C'nin kolayca ayrilabildigini ve dolayısıyla tercihli adsorpsiyonu gösterir.  $K_F$  değeri adsorbentin adsorpsiyon kapasitesinin bir göstergesidir; eğim,  $1/n$ , adsorpsiyon kapasitesine

derişimin etkisini göstermektedir ve adsorpsiyon şiddetini ifade eder. Çizelgeden görüldüğü üzere 1/n değerleri adsorpsiyon işlemleri için yeterince düşüktür.

Çizelge 4.2. MIP kriyojel için Langmuir ve Freundlich izotermeleri.

Polimer	Deneysel Q (mg/g)	Langmuir sabitleri			Freundlich sabitleri		
		Q <sub>max</sub> (mg/g)	b (mL/mg)	R <sup>2</sup>	K <sub>F</sub>	1/n	R <sup>2</sup>
MIP	30.4	37,878	0,009	0,981	20,73	0,663	0,934

#### 4.2.8. Adsorpsiyon Kinetiği

Kütle transferi ve kimyasal reaksiyon gibi adsorpsiyon işlemlerini 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 çözümlenenden adsorpsiyonunda en çok kullanılan eşitliktir. Birinci dereceden hız eşitliği aşağıdaki şekilde tanımlanır:

$$dq_t/dt = k_1(q_{eq}-q_t) \quad (4.4)$$

Eşitlikte; k<sub>1</sub>: pseudo-birinci derece adsorpsiyon hız sabiti (dk<sup>-1</sup>), q<sub>eq</sub> ve q<sub>t</sub> sırasıyla: denge zamanında ve herhangi bir t anında adsorplanan protein miktarı (mg/g) göstermektedir. t = 0'da q<sub>t</sub> = 0 ve t = t anında q<sub>t</sub> = q<sub>t</sub> sınır koşulların uygulanıp integralinin alınması;

$$\log[q_{eq}/(q_{eq}-q_t)] = (k_1t) / 2.303 \quad (4.5)$$

eşitliğini vermektedir. Eşitlik 4.5'in tekrar düzenlenmesiyle,

$$\log(q_{eq} - q_t) = \log(q_{eq}) - (k_1t)/2.303 \quad (4.6)$$



eşitlik 4.6 elde edilir.  $\log(q_{eq}-q_t)$ 'ye karşılık  $t$  grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrunun  $y$  eksenini kesim noktasından  $\log(q_{eq})$  ve eğiminden  $k_1/2.303$  değeri hesaplanabilmektedir.

Adsorpsiyon denge kapasitesine dayalı pseudo-ikinci derece denklem ise aşağıdaki şekilde tanımlanır:

$$q_t/d_t = k_2(q_{eq}-q_t)^2 \quad (4.7)$$

Bu eşitlikte,  $k_2$  pseudo-ikinci derece hız sabitidir (g/mg.dakika). Eşitlik 4.7'nin sınır koşullarda integrali alınarak ( $t = 0$ 'da  $q_t = 0$  ve  $t = t$  anında  $q_t = q_t$ ),

$$[1/(q_{eq}-q_t)] = (1/q_{eq}) + k_2t \quad (4.8)$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitliğin doğrusal hali,

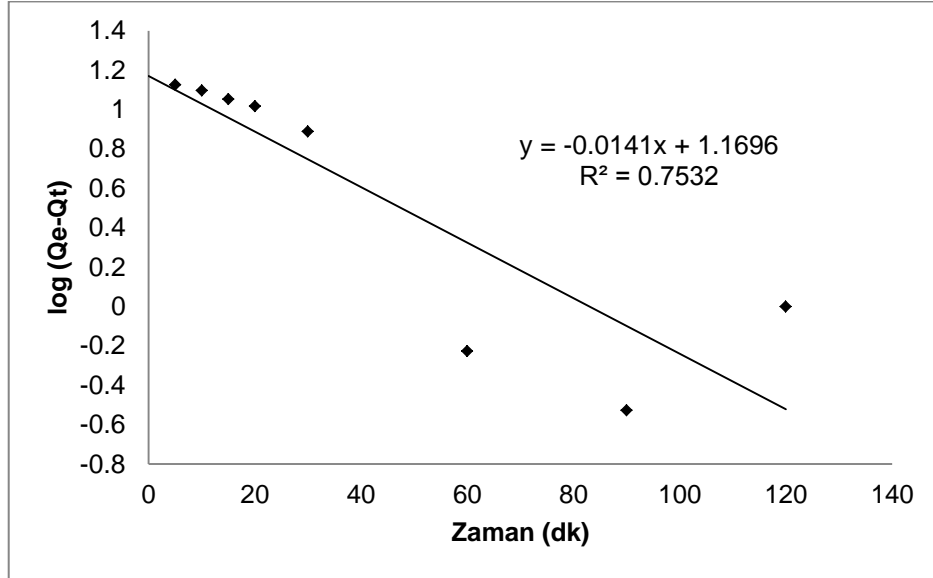
$$(t/q_t) = (1/k_2q_{eq}^2) + (1/q_{eq})t \quad (4.9)$$

şeklindedir. İkinci derece kinetiğin uygulanabilir olması için  $t/q_t$ 'ye karşı  $t$  grafiğinin doğrusal olması gereklidir. Hız sabiti ( $k_2$ ) ve denge adsorpsiyon miktarı ( $q_{eq}$ )  $y$  eksenini kesim noktasından ve eğimden hesaplanabilmektedir. Deneysel verilerin kinetik analizi sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da verilmiştir.

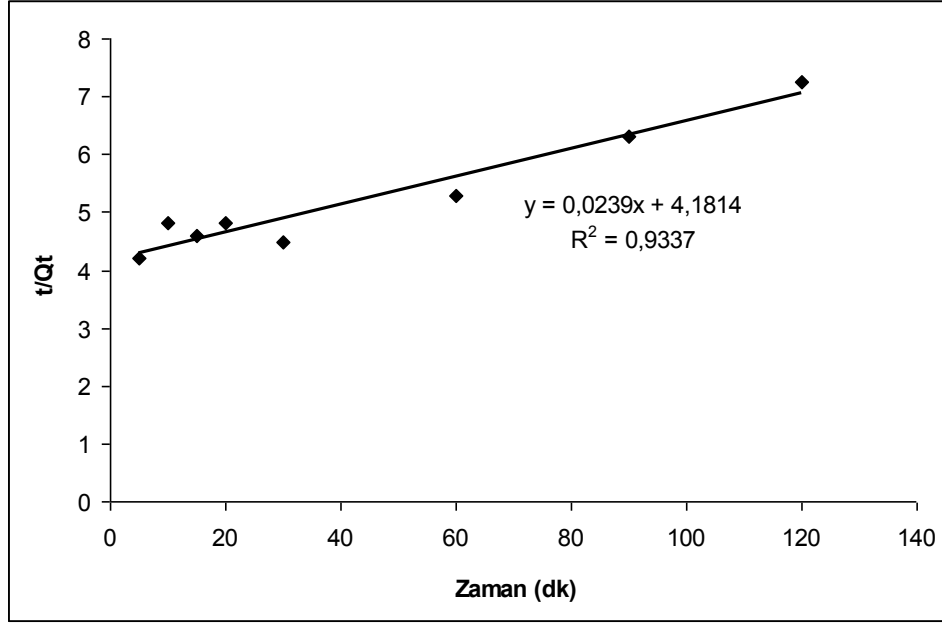
Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellere ait kinetik analiz verilerinden hesaplanan birinci ve ikinci derece kinetik parametreleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelgedeki korelasyon katsayıları incelendiğinde; protein baskılanmış kriyojellere ikinci derece kinetik modelinin daha uygun olduğu görülmektedir. Elde edilen teorik  $q_{eq}$  değerleri de deneysel değerlere oldukça yakındır.

Hız kontrol mekanizması, adsorpsiyon işlemi sırasında üç olası mekanizmaya göre değişebilmektedir (1) Adsorpsiyon işleminin ilk aşamalarında dış yüzey kütle transferi veya film difüzyon işlemi. (2) Bu aşamaya reaksiyon veya sabit hız basamağı takip etmektedir. (3) Son aşamada ise adsorpsiyon işleminin önemli bir miktarda azaldığı gözenek içi difüzyon basamağı gerçekleşmektedir [90]. Bu hız

kontrol mekanizmaları, pseudo birinci derece kinetik model (difüzyon kontrollü) ve pseudo ikinci derece kinetik model (kimyasal kontrollü) ile açıklanmaktadır. Adsorpsiyon hızını belirleyen basamak analitin adsorbent yüzeyine difüzyonu ise; adsorpsiyon işlemi pseudo birinci derece adsorpsiyon modeli ile uyumluluk göstermektedir. Adsorpsiyon hızını belirleyen basamak analit ile adsorbent arasındaki etkileşim olduğu koşullarda ise; adsorpsiyon işlemi pseudo ikinci derece kinetik model ile uyumluluk göstermektedir. Birinci durumda adsorpsiyon işlemi difüzyon kontrollü; ikinci durumda ise kimyasal kontrollü olarak adlandırılmaktadır. Sonuç olarak; Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellere Protein C adsorpsiyonunda herhangi bir difüzyon kısıtlaması olmaksızın; adsorpsiyon işlemi kimyasal kontrollü olarak gerçekleştiği belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel için birinci derece adsorpsiyon kinetiği.



Şekil 4.16. Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel için ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.

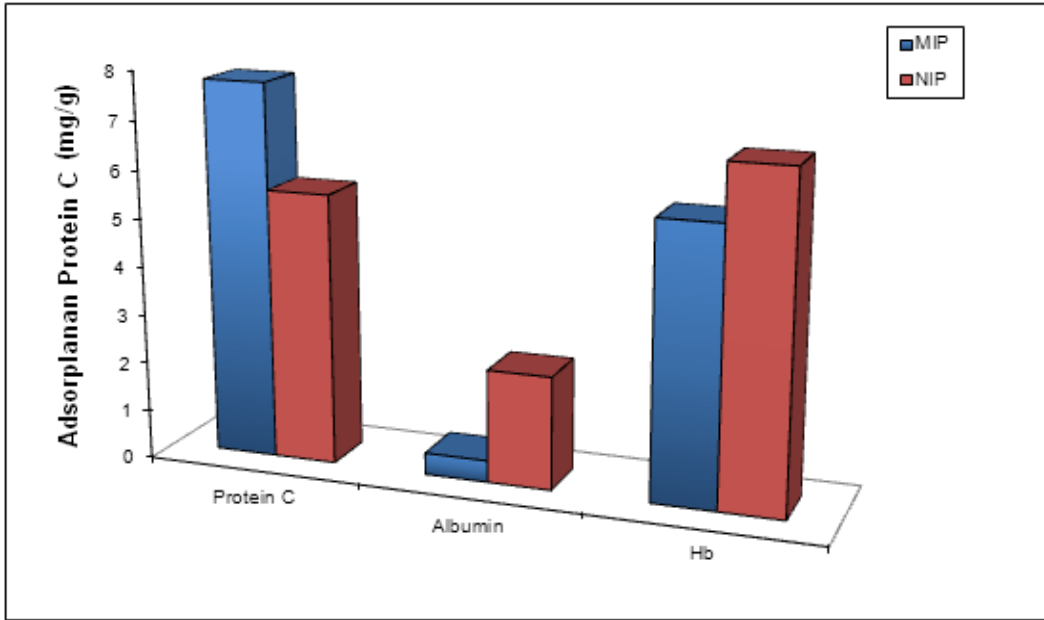
Çizelge 4.3. Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel için birinci ve ikinci derece kinetik verileri.

Polimer	Başlangıç Der. (mg/mL)	Deneysel	Birinci Derece Kinetik			İkinci Derece Kinetik		
		q <sub>eq</sub> (mg/g)	k <sub>1</sub> (1/dk)	q <sub>eq</sub> (mg/g)	R <sup>2</sup>	k <sub>2</sub> (g/mg.dk)	q <sub>eq</sub> (mg/g)	R <sup>2</sup>
MIP	1.0	14.3	0.032	14.78	0.75	1.37x10 <sup>-4</sup>	41.84	0.93

#### 4.2.9. Seçicilik Deneyleri

Protein C baskılanmış ve baskılanmamış kriyojel kolonlar ile seçicilik deneyleri insan serum albumini (HSA) ve hemoglobin (Hb) ile yapılmıştır. Her bir protein MIP ve NIP kriyojel kolonlarla sürekli sistemde etkileştirilmiş ve alınan başlangıç ve sonuç çözeltileri ile adsorplanan derişim miktarları belirlenmiştir. Her üç proteinin de 0.5 mg/mL derişiminde çözeltileri hazırlanmış ve yarışmalı adsorpsiyon deneyleri 25°C'de 2 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.17'de yarışmalı adsorpsiyon sonuçları görülmektedir. Protein C'ye göre albumin ve hemoglobin

için  $K_d$  ve  $k$  değerleri, Çizelge 4.4’de verilmiştir. Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin  $K_d$  değerleri, kontrol (baskılanmamış) örnekleri ile karşılaştırıldığında her durumda Protein C için yarışmacı protein moleküllerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bağlı seçicilik katsayısı Protein C baskılanmış tanıma bölgelerinin afinitesini göstermektedir. Sonuçlar, Protein C baskılanmış polimerin Protein C moleküllerine albumin moleküllerine göre 8.89 kat, hemoglobin moleküllerine göre 2.37 kat daha seçici olduğunu göstermektedir. Sonuçlardan görüldüğü gibi baskılanmış kriyojelin seçiciliği molekül ağırlığı olarak Protein C molekülüne en yakın olan hemoglobin için en düşüktür. Bu sonuç; kriyojel ile molekül etkileşiminde, baskılama yöntemi ile oluşturulan moleküler boşlukların büyüklüğünün önemli etkisini göstermektedir.



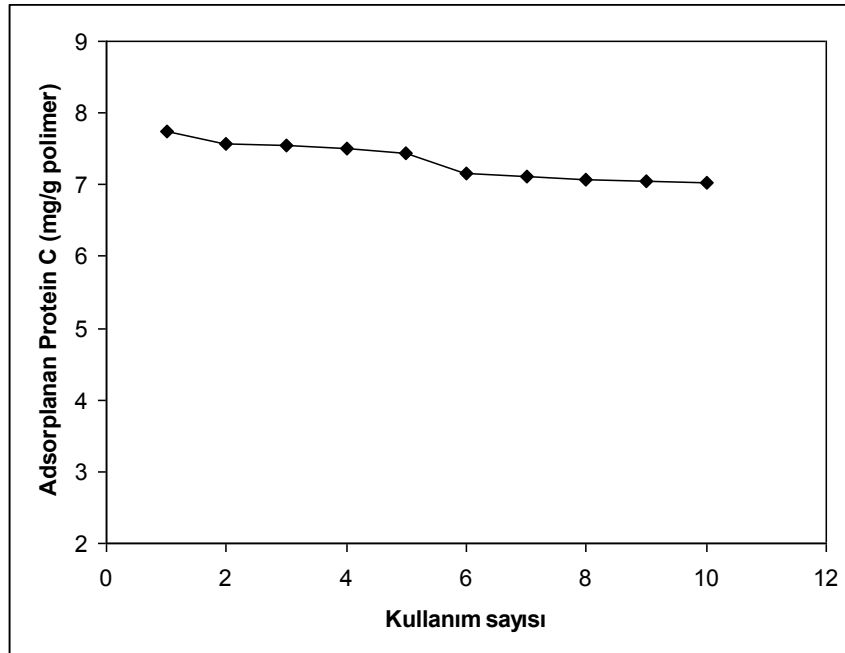
Şekil 4.17. Sulu çözeltiden yarışmalı adsorpsiyon. Protein C derişimi: 0.5 mg/mL; HSA derişimi: 0.5 mg/mL; Hb derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 5.0; Akış hızı: 1mL/dk; T: 25°C.

Çizelge 4.4. Protein C'ye 1göre HSA ve Hb için  $K_d$  ve  $k$  değerleri.

Protein	NIP		MIP		$k'$
	$K_d$ (mL/g)	$k$	$K_d$	$k$	
PC (62000 Da)	20,251	-	33,368	-	-
HSA (67000 Da)	5,049	4,011	0,936	35,656	8,8905
Hb (64500 Da)	31,035	0,653	21,535	1,550	2,3747

### 4.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

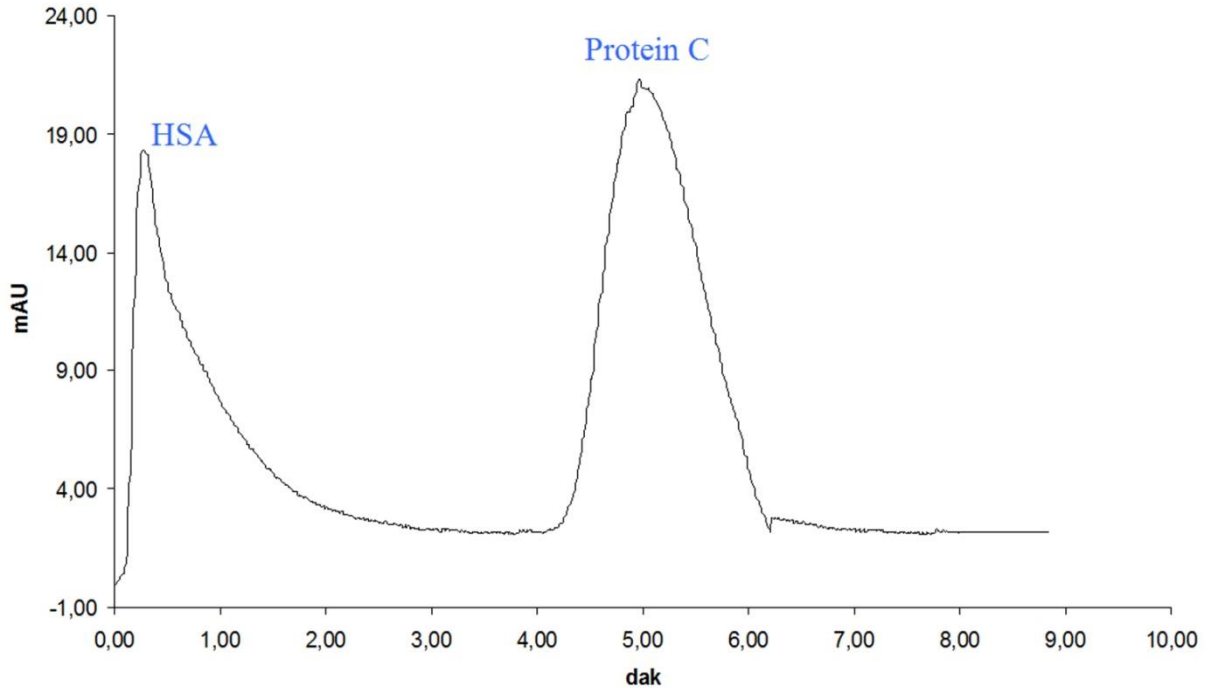
Bir biyoafinite adsorbentinde aranılan önemli özelliklerden biri de, bu malzemelerin defalarca tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Rejenerasyon veya tekrar kullanılabilirlik olarak tanımlanan bu özellik ayırma işleminin maliyetini önemli ölçüde azaltan bir etmendir. Bu amaçla desorpsiyon deneyleri adsorpsiyon amacıyla kullanılan kriyojel kolon sisteminde incelenmiştir. Protein C adsorplanmış MIP kriyojellerin bulunduğu kolondan desorpsiyon çözeltisi 1.0 mL/dk akış hızında 2 saat süreyle geçirilmiştir. Desorpsiyon 1.0 M NaCl çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek üzere adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı kriyojel kolonlar kullanılarak on kez tekrarlanmıştır. Desorpsiyon oranı Protein C baskılanmış için % 91.6 olup, oldukça yüksektir. Bu verilere dayanarak tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucunda kriyojelin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmaksızın tekrar tekrar kullanılacağı söylenebilir (Şekil 4.18). Bu sonuçlara göre 1.0 M NaCl çözeltisinin uygun bir desorpsiyon ajanı olduğu ve kriyojelin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmaksızın tekrar tekrar kullanılacağı söylenebilir.



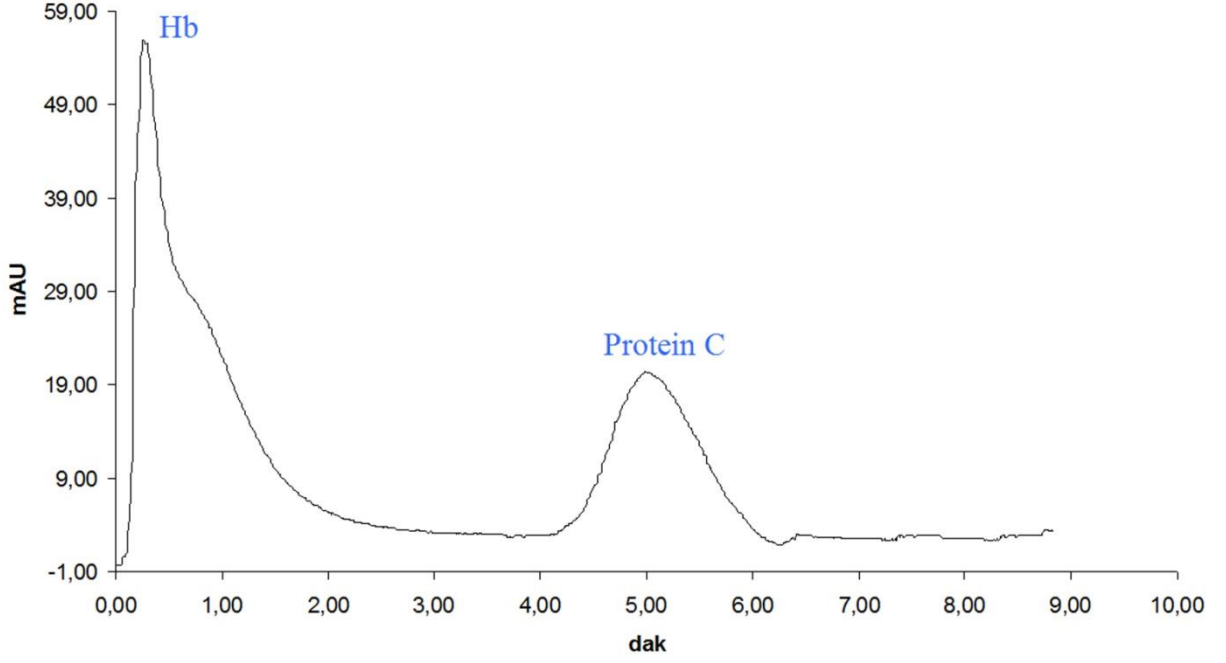
Şekil 4.18. Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelinin tekrar kullanılabilirliği. Protein derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 5.0; Akış hızı: 1 mL/dk; T: 25°C, desorpsiyon ajanı: 1M NaCl.

#### 4.4. Hızlı Performans Sıvı Kromatografisi (FPLC) Analizi

Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelin yarışmalı proteinlere karşı seçiciliği FPLC ile test edilmiştir. Ayırma işlemi Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel sentezlenmiş GE Healthcare kolonu (10/10, 19-5001-01) ile yapılmıştır. Protein C adsorpsiyonu MIP kriyojellerle gerçekleştirilen, farklı derişimlerde hazırlanan örnekler kolona uygulanmıştır. Protein karışımından HSA/Protein C ve Hb/Protein C ayrılmasına ait kromatogramlar sırası ile Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de verilmiştir. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi protein karışımından HSA/Protein C ayrılması sırasıyla 0.31 dk ve 4.97 dk olarak bulunmuştur. Şekil 4.20'de görüldüğü gibi protein karışımından Hb/Protein C ayrılması ise sırasıyla 0.30 dk ve 5.06 dk olarak bulunmuştur.  $t_R$ ,  $N$ ,  $k'$ ,  $\alpha$ ,  $R_S$  değerleri Çizelge 4.5'de verilmiştir. İkili protein karışımları için hesaplanan  $R_S$  değerleri sırasıyla 2.34 ve 2.17 olarak hesaplanmıştır. Bir kromatografi sistemindeki iki pikin birbirinden iyice ayrılması için  $R_S$  değerinin 1'den yüksek olması gerektiğinden HSA/Protein C ve Hb/Protein C ayırma değerleri sonuçlarının iyi olduğu kabul edilebilir.



Şekil 4.19. HSA ve Protein C'nin Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelinde FPLC ile ayrılması. Akış hızı: 3.0 mL/dk; Protein derişimi: 0.5 mg/mL; Dalga boyu: 280 nm.



Şekil 4.20. Hemoglobin (Hb) ve Protein C'nin Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelinde FPLC ile ayrılması. Akış hızı: 3.0 mL/dk; Protein derişimi: 0.5 mg/mL; Dalga boyu: 280 nm.

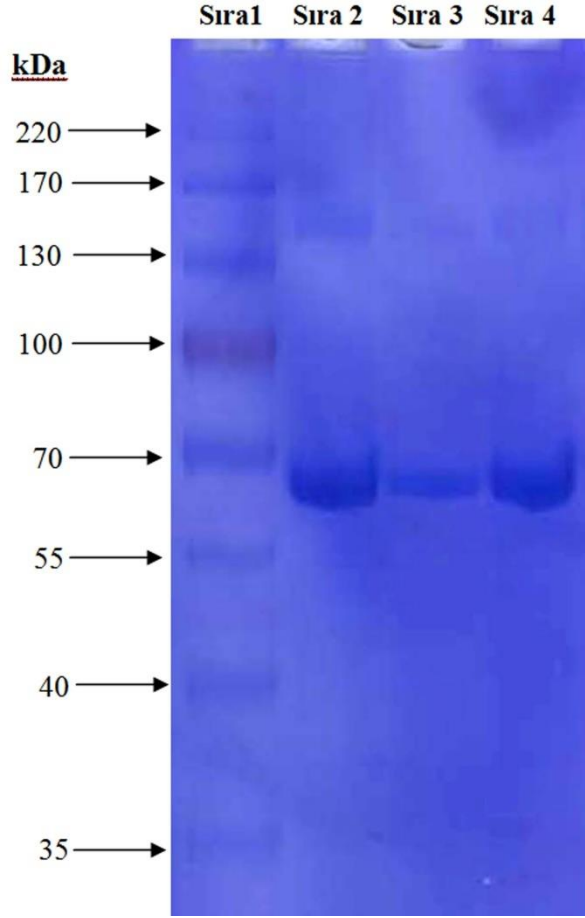
Çizelge 4.5. Kromatografik ayırma verileri

	$t_R$ (dak)	N (plaka)	$k'$	$\alpha$	$R_s$
<b>Protein C</b>	4.97	131.53	40.42	-	-
<b>Albumin</b>	0.31	0.57	1.58	25.58	2.34
<b>Protein C</b>	5.06	125.06	41.17	-	-
<b>Hemoglobin</b>	0.30	0.40	1.50	27.44	2.17

#### 4.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)

Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerle, sulu çözültiden saflaştırılan Protein C'nin moleküler ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.21). Şekilden de görüldüğü gibi, Protein C moleküllerine ait bantların şiddetleri adsorpsiyon işlemi sonrasında önemli miktarda azalmaktadır

(62 kDa, Sıra3). Sıra 4'te ise saflaştırılan Protein C görülmektedir. Saflaştırılan Protein C'nin saflığı % 95.3 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.21. SDS-PAGE görüntüsü, Sıra 1. Biomarker (Fermentas), Sıra 2. Protein C saflaştırılmadan önceki çözelti (0.5 mg/mL), Sıra 3. Protein C saflaştırıldıktan sonraki çözelti, Sıra 4. Desorbe edilen örnek.



## 5. YORUM

- MAH monomeri, L-histidin metil ester ile metakroil klorür arasındaki tepkime ile sentezlenmiştir. Elde edilen monomer NMR ve FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir.
- MAH monomerinin yapısının belirlenmesinde <sup>1</sup>H-NMR kullanılmıştır. <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda MAH'da bulunan gruplara ait karakteristik pikler şunlardır: <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.99 (t; 3H, J=7.08 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.42 (m; 2H, CH<sub>2</sub>), 3.56 (t; 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.82-4.87 (m; 1H, metin), 5.26 (s; 1H, vinil H), 5.58 (s; 1H, vinil), 6.86 (δ; 1H, J=7.4 Hz, NH), 7.82 (δ; 1H, J=8.4 Hz, NH), 6.86-7.52 (m; 5H, aromatik).
- MAH ve MAH-Cu(II) monomerinin kimyasal yapısının karakterizasyonu için FTIR spektrumu alınmıştır. FTIR spektrumunda MAH monomerine ait karakteristik 1651 cm<sup>-1</sup> karbonil ve 1558 cm<sup>-1</sup> amid II gerilme titreşim bantları, 1724 cm<sup>-1</sup>'de ester bantı görülmektedir. MAH-Cu(II) monomeri için FTIR spektrumu incelendiğinde MAH yapısına ait karakteristik karbonil bantları 1733 ve 1624 cm<sup>-1</sup>'de, amid II gerilme titreşim bandı ise 1525 cm<sup>-1</sup>'de görülmektedir. Ayrıca Cu-N titreşimine ait bandlar 510 ve 460 cm<sup>-1</sup>'de görülmektedir. Bu spektrum hedef metal-şelat monomer yapısının başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.
- Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojeller, çapraz bağlı hidrofilik yapıda matrislerdir. Bu çalışmada hazırlanmış poli(HEMA), baskılanmamış P[HEMA-MAH/Cu(II)] ve Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin denge şişme oranları sırasıyla % 79.6, % 85.0 ve % 88.4'dür. Makrogözenek oranları ise sırasıyla % 69.5, % 73.1 ve % 74.8'dir. PHEMA kriyojellerle karşılaştırıldığında yapıya MAH girmesi ile denge şişme oranının arttığı görülmektedir.
- Protein C baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel kolonların yüzey morfolojisi ve iç yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Taramalı elektron mikroskop (SEM)

incelemeleri ile kriyojellerin birbiriyle bağlantılı geniş akış kanallarıyla sahip olduğu ve gözenek boyutlarının 40 µm'ye kadar ulaştığı gözlenmiştir.

- HEMA ve MAH-Cu(II)'in çapraz bağlayıcı ve kalıp molekül Protein C varlığında kriyopolimerizasyonu yöntemi ile elde edilen P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin spesifik yüzey alanı 31.5 m<sup>2</sup>/g olarak bulunmuştur. Baskılanmamış kriyojellerin spesifik yüzey alanı ise 28.6 m<sup>2</sup>/g olarak bulunmuştur. Yüzey alanı baskılama işlemi ile oluşan boşluklar nedeniyle artmıştır.
- Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin karakterizasyonu için FTIR spektrofotometresi kullanılmıştır. Kriyojeller, kurutulduktan sonra KBr ile pelet haline getirilerek 450 cm<sup>-1</sup>-4000 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında FTIR spektrumları alınmıştır. Baskılanmış kriyojel (MIP), MAH-Cu(II)-Protein C kompleksi; baskılanmamış kriyojel (NIP) ise sadece MAH-Cu(II) kompleksi kullanılarak sentezlenmiştir. Hazırlanan kriyojellerin fonksiyonel grupları aynı olduğu için elde edilen FTIR spektrumlarının da benzer olduğu görülmüştür (Şekil 4.6). Kriyojellerin FTIR spektrumlarında, -OH bandı 3424 cm<sup>-1</sup> civarında (geniş band), alifatik CH gerilme bandı 2951 cm<sup>-1</sup> civarında, karbonil bandı 1729 cm<sup>-1</sup>'de, amid bandları 1658 cm<sup>-1</sup> ve 1534 cm<sup>-1</sup> civarında görülmüştür. FTIR spektrumlarından görüldüğü gibi, polimerik kriyojel hem temel monomer bileşeni olan HEMA'ya hem de fonksiyonel monomer MAH'a ait grupları içermektedir. Ayrıca MIP kriyojelde 1658 cm<sup>-1</sup>'deki amid I gerilme titreşim bandının intensitesinin NIP kriyojelden daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuç olarak; P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerinin başarı ile sentezlendiği belirlenmiştir.
- Protein C adsorpsiyonu farklı pH aralıklarında (pH 4.0-8.0) incelenmiştir. MIP kriyojellere maksimum Protein C adsorpsiyonu pH 5.0 asetat tamponunda gözlenmiş ve bu pH'daki maksimum adsorpsiyon miktarı 7.75 mg Protein C/g olarak bulunmuştur. Bu verilere göre çalışma ortamı olarak pH 5.0 asetat tamponu seçilmiştir.

- Protein C derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisini belirlemek amacıyla hem baskılanmamış hem de baskılanmış kriyojeller kullanılmıştır. Protein C derişiminin artmasıyla birlikte birim kriyojel başına adsorplanan Protein C miktarı artmakta ve yaklaşık 3.0 mg/mL Protein C derişiminden sonra denge değerine ulaşmaktadır. Bu derişim değerinden sonra önemli bir artış gözlenmemiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış kriyojeller için maksimum adsorpsiyon kapasiteleri sırasıyla 30.4 mg/g ve 17.7 mg/g'dır.
- Protein C çözeltisinin Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelden hacimsel akış hızı 0.5-2.0 mL/dk arasında değiştirilmiş, diğer deneysel parametreler sabit tutulmuştur. Çalışılan en düşük akış hızı değeri olan 0.5 mL/dk'da 9.1 mg Protein C/g kriyojel kapasitesi gözlenirken; akış hızının 2.0 mL/dk akış hızına yükselmesi ile adsorpsiyon kapasitesi % 45 azalarak 5.0 mg Protein C/g kriyojel değerine düştüğü gözlenmiştir. Bu durum, akış hızının artması ile Protein C moleküllerinin kolondaki alıkonma zamanının azalmasıyla açıklanabilir. Bunun sonucunda Protein C moleküllerinin MIP kriyojel ile etkileşim süresi ve olasılığının azalacağından adsorpsiyon kapasitesinde bir düşme gözlenir.
- Kriyojel kolonda Protein C adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla Protein C adsorpsiyon deneyleri farklı sıcaklıklardaki ortamlarda (4-45°C) gerçekleştirilmiştir. Artan sıcaklıkla beraber Protein C baskılanmış kriyojel kolonda Protein C adsorpsiyon kapasitesi önemli oranlarda azalmıştır. Protein C baskılanmış kriyojel kolonda 4°C'de 10.72 mg/g, 25°C'de 7.74 mg/g ve 45°C'de 6.05 mg/g Protein C adsorpsiyonu sağlanmıştır. Sıcaklık artışı ile birlikte adsorpsiyon kapasitesindeki azalmalar; Protein C ile kolon arasındaki baskın etkileşim türlerinin H-bağları ve elektrostatik (iyonik) etkileşimler olduğunu göstermektedir.
- Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel kolonlara Protein C adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisini belirlemek amacıyla; adsorpsiyon deneyleri farklı derişimlerde (0-1.0 M aralığında) sodyum klorür (NaCl) içeren Protein C çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Protein C adsorpsiyon

kapasitesi artan tuz derişimiyle azalmaktadır. Protein C adsorpsiyon kapasitesi artan tuz derişimiyle azalmaktadır.

- Adsorpsiyon başlangıçta oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Protein C moleküllerinin polimer yüzeyindeki bağlanabileceği tüm aktif bölgelere bağlanması nedeni ile yaklaşık 60 dakikada adsorpsiyon kapasitesi denge değerine ulaşmaktadır. Bu süreden sonra adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim görülmemektedir. Artan Protein C miktarıyla birlikte adsorpsiyon kapasitesinin arttığı belirlenmiştir.
- Maksimum adsorpsiyon kapasitesi ( $Q_{max}$ ) deneysel verilerden Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel için 30.4 mg Protein C/g kriyojel bulunmuştur. Teorik adsorpsiyon kapasitesi baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel için 37,8788 mg Protein C/g kriyojel bulunmuştur. Langmuir sabiti 0,00874 mL/mg, korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0.9813'dür. Korelasyon katsayısı Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sisteme uygun olduğunu göstermektedir.
- Protein baskılanmış kriyojellere ikinci derece kinetik modelinin daha uygun olduğu görülmektedir. Elde edilen teorik  $q_{eq}$  değerleri de deneysel değerlere oldukça yakındır. Sonuç olarak; Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellere Protein C adsorpsiyonunda herhangi bir difüzyon kısıtlaması olmaksızın; adsorpsiyon işlemi kimyasal kontrollü olarak gerçekleştiği belirlenmiştir.
- Protein C baskılanmış ve baskılanmamış kriyojel kolonlar ile seçicilik deneyleri insan serum albumini (HSA) ve hemoglobin (Hb) ile yapılmıştır. Sonuçlar Protein C baskılanmış polimerin Protein C moleküllerine albumin moleküllerine göre 8.89 kat, hemoglobin moleküllerine göre 2.37 kat daha seçici olduğunu göstermektedir. Sonuçlardan görüldüğü gibi baskılanmış kriyojelin seçiciliği molekül ağırlığı olarak Protein C molekülüne en yakın olan hemoglobin için en düşüktür. Bu sonuç; kriyojel ile molekül etkileşiminde, baskılama yöntemi ile oluşturulan moleküler boşlukların büyüklüğünün önemli etkisini göstermektedir.

- P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğinin gösterilmesi için, adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü, aynı kriyojeller kullanılarak 10 kez tekrarlanmıştır. Desorpsiyon oranı Protein C baskılanmış için % 91.6 olup, oldukça yüksektir. Bu verilere dayanarak tekrarlanan adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonucunda kriyojelin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilceği söylenebilir.
- Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojelin yarışmalı proteinlere karşı seçiciliği FPLC ile test edilmiştir. Ayırma işlemi Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojel sentezlenmiş GE Healthcare kolonu (10/10, 19-5001-01) ile yapılmıştır. Protein C adsorpsiyonu MIP kriyojellerle gerçekleştirilen, farklı derişimlerde hazırlanan örnekler kolona uygulanmıştır. İkili protein karışımları için hesaplanan  $R_S$  değerleri sırasıyla 2.34 ve 2.17 olarak hesaplanmıştır. İkili protein karışımları için hesaplanan  $R_S$  değerleri sırasıyla 2.34 ve 2.17 olarak hesaplanmıştır. Bir kromatografi sistemindeki iki pikin birbirinden iyice ayrılması için  $R_S$  değerinin 1'den yüksek olması gerektiğinden HSA/Protein C ve Hb/Protein C ayırma değerleri sonuçlarının iyi olduğu kabul edilebilir.
- Protein C baskılanmış P[HEMA-MAH/Cu(II)] kriyojellerle, sulu çözeltiden saflaştırılan Protein C'nin moleküler ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. SDS-PAGE, % 12'lik akrilamid ayırma jeli ile gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan Protein C'nin saflığı % 95.3 olarak bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- [1] Wu, H., Bruley, D., Homologous Human Blood Protein Separation Using Immobilized Metal Affinity Chromatography: Protein C Separation from Prothrombin with Application to the Separation of Factor IX and Prothrombin, *Biotechnology Progress*, 15, 928-931, **1999**.
- [2] Wu, H., Bruley, D., Chelator, metal ion and buffer studies for protein C separation, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 132, 213–220, **2002**.
- [3] Radosevich, M., Zhou, F., Huart, J., Burnouf, T., Chromatographic purification and properties of a therapeutic human protein C concentrate, *Journal of Chromatography B*, 790, 199-207, **2003**.
- [4] Wulff, G., Grobe-Einsler, R., Vesper, W., Sahran A., Enzymeanalogue built polymers, 5. On the specificity distribution of chiral cavities prepared in synthetic polymers, *Makromolekular Chemistry*, 178, 2799-2817, **1977**.
- [5] Sellergren, B., Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer, *Analytical Chemistry*, 66, 1578, **1994**.
- [6] Whitcombe, M.J., Rodriguez, M.E., Villar, P., Vulfson, E.N., A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol, *Journal of the American Chemical Society*, 117, 7105, **1995**.
- [7] Ramström, O., Andersson, L.I., Mosbach, K., Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting, *Journal of Organic Chemistry*, 58, 7562, **1993**.
- [8] Spivak, D.A., Shea, K.J., Binding of Nucleotide Bases by Imprinted Polymers, *Macromolecules*, 31, 216, **1998**.
- [9] Dhal, P.K., Arnhold, F.H., Metal-coordinated interactions in the template-mediated synthesis of substrate-selective polymers: Recognition bis(imidazole) substrates by copper(II) iminodiacetate containing polymers, *Macromolecules*, 25, 7051-7059, **1992**.
- [10] Say, R., Ersöz, A., Denizli, A., Selective separation of uranium containing glutamic acid molecular imprinted polymeric microbeads, *Separation Science and Technology*, 38(14), 3429, **2003**.
- [11] Say, R., Birlik, E., Ersöz, A., Yılmaz, F., Gedikbey, T., Denizli, A., Preconcentration of copper on ion-selective imprinted polymer microbeads, *Analytica Chimica Acta*, 480(2), 251-256, **2003**.
- [12] Odabaşı, M., Say, R., Denizli, A., Molecular imprinted particles for lysozyme purification, *Materials Science and Engineering C*, 27, 90-99, **2007**.

- [13] Baydemir, G., Bereli, N., Andaç, M., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A., Bilirubin recognition via molecularly imprinted supermacroporous cryogels, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68, 33-38, **2009**.
- [14] Esmon, C.T., The Roles of Protein C and Thrombomodulin in the Regulation of Blood Coagulation, *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (9), 4743-4746, **1989**.
- [15] Castellino, F.J., Human protein C and activated protein C: Components of the human anticoagulation system, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 5(2), 55-62, **1995**.
- [16] Josic, D., Hoffer, L., Buchacher, A., Preparation of vitamin K-dependent proteins, such as clotting factors II, VII, IX and X and clotting inhibitor Protein C, *Journal of Chromatography B*, 790, 183-197, **2003**.
- [17] Goldenberg, N., Manco-Johnson, M., Protein C deficiency, *Hemophilia and Thrombosis Center*, 14, 1214-1221, **2008**.
- [18] Shen, L., Dahlbäck, B., Chapter 644: Protein C, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3, 2932-2938, **2013**.
- [19] Sahud M. A., Strom, C., Chapter 13: Thrombophilia, *Molecular Diagnostics*, 127-148, **2010**.
- [20] Dahlbäck, B., The protein C anticoagulant system: Inherited defects as basis for venous thrombosis, *Thrombosis Research*, 77, 1-43, **1995**.
- [21] O'Brien, L., Gupta, A., Grinnell, B., Activated protein C and sepsis, *Frontiers in Bioscience*, 11, 676-698, **2006**.
- [22] Zambaux, M.F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., Vigneron, C., Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 60, 179-188, **1999**.
- [23] Kisiel, W., Human Plasma Protein C: Isolation, Characterization, and Mechanism of Activation by  $\alpha$ -Thrombin, *The Journal of Clinical Investigation*, 64, 761 -769, **1979**.
- [24] Van Cott, K. E., Williams, B., Velandar, W. H., Gwazdauskas, F., Lee, T., Lubon, H., Drohan, W. N., Affinity Purification of Biologically Active and Inactive Forms of Recombinant Human Protein C Produced in Porcine Mammary Gland, *Journal of Molecular Recognition*, 9, 407-414, **1996**.
- [25] Dahlbäck, B., Villoutreix, B., The anticoagulant protein C pathway, *Federation of European Biochemical Societies*, 579, 3310-3316, **2005**.
- [26] Rezaie, A., Exosite-Dependent Regulation of the Protein C Anticoagulant Pathway, *Trends Cardiovascular Medicine*, 13, 8-15, **2003**.

- [27] Dahlbäck, B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism, *Blood Journal*, 85: 607-614, **1995**.
- [28] Ermiş, T., Turgan, N., Ersöz, B., Trombomodulin, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 4(1): 39-48, **2006**.
- [29] Yang, L., Manithody, C., Rezaie, A., The functional significance of the autolysis loop in protein C and activated protein C, *The Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 94(1), 60-68, **2005**.
- [30] Xu, H., Bush, L., Pineda, A., Caccia, S., Di Cera, E., Trombomodulin Changes the Molecular Surface of Interaction and the Rate of Complex Formation between Thrombin and Protein C, *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7956-7961, **2005**.
- [31] Esmon, C. T., Gu, J.-M., Xu, J., Qu, D., Stearns-Kurosawa, D. J., Kurosawa, S., Regulation and functions of the protein C anticoagulant pathway, *Trends in Hematology*, 84:363-368, **1999**.
- [32] Esmon, C.T., Protein S and protein C: Biochemistry, physiology, and clinical manifestation of deficiencies, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2(6), 214-219, **1992**.
- [33] Gempeler-Messina, P., Müller, C., Diagnostic Use of the Protein C activator from Agkistrodon Contortrix: The Protein C System and Thrombophilia, *Toxin Reviews*, 25, 335-349, **2006**.
- [34] Bick, R.L., Prothrombin G20210A mutation, antithrombin, heparin cofactor II, protein C, and protein S defects, *Hematology Oncology Clinics of North America*, 17, 9-36, **2003**.
- [35] Ding, Q., Shen, W., Ye, X., Wu, Y., Wang, X., Wang, H., Clinical and genetic features of protein C deficiency in 23 unrelated Chinese patients; *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 50, 53-58, **2013**.
- [36] Yamanouchi, J., Hato, T., Niiya, T., Hayashi, T., Yasukawa, M., Novel causative and neutral mutations in a patient with protein C deficiency, *Thrombosis Research*, **2013**.
- [37] Chandler, W., La Spada, A., *Handbook of Diagnostic Hemostasis and Thrombosis Tests*, 3. Baskı, 2005.
- [38] Mosbach, K., Ramström, O., The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, *Nature Biotechnology*, 14, 163-170, **1996**.
- [39] Kryscio, D.R., Peppas, N.A., Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, *Acta Biomaterialia*, 8, 461-473, **2012**.



- [40] Verheyen, E., Schillemans, J. P., Wijk, M., Demeniex, M-A., Hennink, W. E., Nostrum, C. F., Challenges for the effective molecular imprinting of proteins, *Biomaterials*, 32, 3008-3020, **2011**.
- [41] Wulf, G., Poll, H. G., Enzyme-analog built polymers. 23. Influence of the structure of the binding sites on the selectivity for racemic resolution, *Macromolecular Chemistry*, 188, 741-748, **1987**.
- [42] Cazes, J., *Handbook of Affinity Chromatography*, Taylor & Francis Group, 2.Baskı,**2006**.
- [43] Hu, Y., Pan, J., Zhang, K., Lian, H., Li, G., Novel applications of molecularly imprinted polymers in sample preparation, *Trends in Analytical Chemistry*, 43, 37-52, **2013**.
- [44] Tan, F., Sun, D., Gao, J., Zhao, Q., Wang, X., Teng, F., Quan, X., Chen, J., Preparation of molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective removal of fluoroquinolone antibiotics in aqueous solution, *Journal of Hazardous Materials*, 244-245, 750-757, **2013**.
- [45] Özcan, A., *Biyomoleküller için Molekül Baskılanmış Polimerik Yapay Reseptör Geliştirilmesi ve Biyokromatografi Uygulamaları*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, **2007**.
- [46] Piletsky, S.A., Alcock, S., Turner, A. P. F., Molecular imprinting: at the edge of the third millennium, *Trends Biotechnology*, 19, 9-12, **2001**.
- [47] Bereli, N., Andaç, M., Baydemir, G., Say, R., Galaev, I. Y., Denizli, A., Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels, *Journal of Chromatography A*, 1190, 18-26, **2008**.
- [48] Rao, T.P., Daniel, S., Gladis, J. M., Tailored materials for preconcentration or separation of metals by ion-imprinted polymers for solid-phase extraction (IIP-SPE), *Trends Analytical Chemistry*, 23(1), 28-35, **2004**.
- [49] Haupt, K., Ye, L., Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1887-1897, **2004**.
- [50] Andaç, M., Baydemir, G., Yavuz, H., Denizli, A., Molecularly imprinted composite cryogel for albumin depletion from human serum, *Journal Molecular Recognition*, 25, 555-563, **2012**.
- [51] Liu, S., Zhou, D., Guo, T., Construction of a novel macroporous imprinted biosensor based on quartz crystal microbalance for ribonuclease A detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 42, 80-86, **2013**.
- [52] Davies, M. P., De Biasi, V., Perrett, D., Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta*, 504, 7-14, **2004**.

- [53] Cormack, P. A. G., Mosbach, K., Molecular imprinting: recent developments and the road ahead, *Reactive and Functional Polymers*, 41, 115-124, **1999**.
- [54] Tunç, Y., Hasırcı, N., Yeşilada, A., Ulubayram, K., Comonomer Effects on Binding Performances and Morphology of Acrylate-Based Imprinted Polymers, *Polymer*, 47, 6931-6940, **2006**.
- [55] Denizli, A., Kocakulak, M., Piskin, E., Bilirubin Removal from Human Plasma in a Packed Bed Column System with Dye-Affinity Microbeads, *Journal of Chromatography B*, 707, 25-31, **1998**.
- [56] Odabaşı, 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**.
- [57] Denizli, A., Preparation of Immuno-Affinity Membranes for Cholesterol Removal from Human Plasma, *Journal of Chromatography B*, 772, 357-367, **2002**.
- [58] Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H., Molecular Imprinting (From Fundamentals To Applications), *Wiley-VCH Verlag*, **2003**.
- [59] Dickert, F.L., Hayden, O., Imprinting with sensor development on the way to synthetic antibodies, *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, 364, 506-511, **1999**.
- [60] Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z., Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation *Journal of Chromatography B*, 804, 173-182, **2004**.
- [61] Yan, H., Row, K.H., Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, *International Journal of Molecular Sciences*, 7, 155-178, **2006**.
- [62] Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L.I., Ansell, R.J., Kirsch, N., Nicholls I.A., O'Mahony, J., Whitcombe, M.J. , Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, in *Journal Molecular Recognition*, 19, 106-180, **2006**.
- [63] Ersöz, A., Denizli, A., Özcan, A., Say, R., Molecularly imprinted ligand exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2197-2202, **2005**.
- [64] Say, R., Ersöz, A., Türk H., Denizli, A., Selective separation and preconcentration of cyanide by a column packed with cyanide-imprinted polymeric microbeads, *Separation and Purification Technology*, 40, 9-14, **2004**.

- [65] Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Savina, I. N., Jungyid, H., Mattiasson, B., Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends in Biotechnology*, 21, 445-451, **2003**.
- [66] Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation*, 10, 163-188, **2002**.
- [67] Önnby, L., Pakade, V., Mattiasson, B., Kirsebom, H., Polymer composite adsorbents using particles of molecularly imprinted polymers or aluminium oxide nanoparticles for treatment of arsenic contaminated waters, *water research*, 46, 4111-4120, **2012**.
- [68] Hajizadeh, S., Xu, C., Kirsebom, H., Ye, L., Mattiasson, B., Cryogelation of molecularly imprinted nanoparticles: A macroporous structure as affinity chromatography column for removal of  $\beta$ -blockers from complex samples, *Journal of Chromatography A*, 1274, 6-12, **2013**.
- [69] Dispinar, T., Camp, W.V., De Cock, L.J., De Geest, B.G., Du Prez, F.E., Redox-Responsive Degradable PEG Cryogels as Potential Cell Scaffolds in Tissue Engineering, *Macromolecular Bioscience*, 12, 383-394, **2012**.
- [70] Gun'ko, V.M., Savina, I.N., Mikhalovsky, S.V., Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation, *Advances in Colloid and Interface Science*, 187-188, 1-46, **2013**.
- [71] Kirsebom, H., Mattiasson, B., Cryostructuration as a tool for preparing highly porous polymer materials, *Polymer Chemistry*, 2, 1059-1062, **2011**.
- [72] Lozinsky, V.I., *Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: Preparation, properties and application. Russian Chemical Reviews*, 71(6), 489-511, **2002**.
- [73] Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I.Y., Bergensthl, B., Mattiasson, B., Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: Control of porous structure, *Journal of Materials Chemistry*, 16, 4065, **2006**.
- [74] Tripathi, M.P., Baranwal, V.K., Pandey, R.K., Singh, O.P., A new numerical algorithm to solve fractional differential equations based on operational matrix of generalized hat functions, *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*, 18, 1327-1340, **2013**.
- [75] Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate containing fluids and cell culture applications, *Journal of Separation Science*, 30(11), 1657, **2007**.

- [76] Kumar, A., Bansal, V., Andersson, J., Roychoudhury, P. K., Mattiasson, B., Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation Immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line, *Journal of Chromatography A*, 1103, 35-42, **2006**.
- [77] Erzenin, M., Ünlü, N., Odabaşı, M., A novel adsorbent for protein chromatography: supermacroporous monolithic cryogel embedded with Cu<sup>2+</sup>-attached sporopollenin particles, *Journal of Chromatography A*, 1218, 484-490, **2011**.
- [78] Yavuz, M., Baysal Z., Preparation and Use of Poly(hydroxyethyl methacrylate) Cryogels Containing L-Histidine for  $\beta$ -Casein Adsorption, *Journal of Food Science*, 78(2), 238-243, **2013**.
- [79] Tamahkar, E., Bereli, N., Say, R., Denizli, A., Molecularly imprinted supermacroporous cryogels for cytochrome C recognition, *Journal of Separation Science*, 34, 3433-3440, **2011**.
- [80] 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**.
- [81] Zhang, H., Zhang, F., Wu, J., Physically crosslinked hydrogels from polysaccharides prepared by freeze-thaw technique, *Reactive and Functional Polymers*, **2013**.
- [82] Plieva, F.M., Seta, E.D., Galaev, I.Yu., Mattiasson, B., Macroporous elastic polyacrylamide monolith columns: Processing under compression and scale-up, *Separation and Purification Technology*, 65, 110-116, **2009**.
- [83] Tripathi, A., Kathuria, N., Kumar, A., Elastic and macroporous agarose-gelatin cryogels with isotropic and anisotropic porosity for tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90(3), 680-694, **2009**.
- [84] Garipcan, B., Denizli, A., A Novel Affinity Support Material for the Separation of Immunoglobulin G from Human Plasma, *Macromolecular Bioscience*, 2(3), 135-144, **2002**.
- [85] Uzun, L., Say, R., Denizli, A., *Porous poly(hydroxyethyl methacrylate) based monolith as a new adsorbent for affinity chromatography*, *Reactive and Functional Polymers*, 64(2), 93-102, **2005**.
- [86] Bereli, N., Uzun, L., Yavuz, H., Elkak, A., Denizli, A., Antibody purification using porous metal chelated monolithic columns, *Journal of Applied Polymer Science*, 101(1), 395-404, **2006**.

- [87] Öncel, Ş., Uzun, L., Garipcan, B., Denizli, A., Synthesis of Phenylalanine-Containing Hydrophobic Beads for Lysozyme Adsorption, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44(18), 7049-7056, **2005**.
- [88] Bereli, N., *Monoklonal antibadi saflaştırılması için eşboyutlu manyetik partiküllerin hazırlanması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010**.
- [89] Özkara, S., Garipcan, B., Pişkin, E., Denizli, A., N-methacryloyl-(L) histinemethylester Carrying a Pseudospecific Affinity Sorbent for Immunoglobulin-G Isolation from Human Plasma in a Column System, *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, 14(8), 761-776, **2003**.
- [90] Valdman, E., Erijman, L., Pessoa, F.L., Leite, S.G., Continuous biosorption of Cu and Zn by immobilized waste biomass *Sargassum* sp., *Process Biochemistry*, 36, 869-873, **2001**.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Binnaz DEMİRCİ  
Doğum Yeri : Yozgat  
Medeni Hali : Bekar  
E-posta : binnaz04@hacettepe.edu.tr  
Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya ABD,  
06800, Beytepe, Ankara/TÜRKİYE

### Eğitim

Lise : 1999-2003 Bornova Anadolu Lisesi, İzmir  
Lisans : 2004-2010 Hacettepe Üniversitesi, Kimya Öğretmenliği,  
Ankara  
Yüksek Lisans : 2010-2013 Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Ankara

### Yabancı Dil ve Düzeyi

Almanca : İyi düzeyde  
İngilizce : Orta düzeyde  
Fransızca : Başlangıç düzeyinde

### İş Deneyimi

#### Deneyim Alanları

Kriyojeller, moleküler baskılama, afinite kromatografisi,

#### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

#### Tezden Üretilmiş Yayınlar

#### Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Kromatografi 2013 Kongresi, Bursa