



# Mikroakışkan Platformda Proteine Bağlı Üremik Toksin Adsorpsiyonunun Modellenmesi

Esra İlhan-Ayışığı<sup>1,2</sup>, Şeyma Tırak<sup>3</sup>, Aylin Özünü<sup>4</sup>, Ece Yıldız-Öztürk<sup>5</sup>, Özlem Yeşil-Çeliktas<sup>5,6\*</sup>

<sup>1</sup> Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-1880-4261), [esrailhan01@gmail.com](mailto:esrailhan01@gmail.com)

<sup>2</sup> Ahi Evran Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Kırşehir, Türkiye

<sup>3</sup> Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye (ORCID: 0000-0002-1638-514X), [tirakseyma@gmail.com](mailto:tirakseyma@gmail.com)

<sup>4</sup> Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye (ORCID: 0000-0002-7094-3261), [aylinozunlu@gmail.com](mailto:aylinozunlu@gmail.com)

<sup>5</sup> Ege Üniversitesi, Solunum Araştırmaları Merkezi (ORCID: 0000-0003-2482-7371), [eceyildiz.bioeng@gmail.com](mailto:eceyildiz.bioeng@gmail.com)

<sup>6\*</sup> Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye (ORCID: 0000-0003-4509-2212), [ozlem.yesil.celiktas@ege.edu.tr](mailto:ozlem.yesil.celiktas@ege.edu.tr)

(İlk Geliş Tarihi 14 Temmuz 2021 ve Kabul Tarihi 9 Eylül 2021)

(DOI: 10.31590/ejosat.971386)

**ATIF/REFERENCE:** İlhan-Ayışığı, E., Tırak, Ş., Özünü, A., Yıldız-Öztürk, E. & Yeşil-Çeliktas, Ö. (2021). Mikroakışkan Platformda Proteine Bağlı Üremik Toksin Adsorpsiyonunun Modellenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (27), 354-361.

## Öz

Bu çalışmada kronik böbrek hastalarının üremik toksisite sorununa çözüm bulmak amacıyla hemodiyaliz sistemine entegre edilebilecek bir mikroakışkan çip geliştirilmesi hedeflenmiştir. Mikroakışkan çip içerisine Sol-Jel metodu ile Na-Y Zeolit ile fonksiyonelleştirilmiş TEOS-PEO hidrojel yüklenerek, kanda bulunan ve proteine bağlı üremik toksinlerden biri olan İndoksil Sülfat (IS) toksininin, çip içerisinde adsorbe edilerek hastaların kanlarından uzaklaştırılması hipotezi test edilmiştir. Solid Works programı ile S-şekilli bir mikrokanal tasarlanarak, Comsol Multiphysics programında simülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Simülasyon sonrasında taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve bilgisayarlı mikro-tomografi (mikro-CT) analizi ile karakterizasyonları gerçekleştirilen Na-Y Zeolit içerikli hidrojellerin hem kesikli deney koşullarında hem de geliştirilen mikroakışkan sistemde sürekli modda simüle kan sıvısı ile yapılan protein bağlı indoksil sülfat toksininin detoksifikasyonu incelenmiştir. Geliştirilen bu mikroakışkan tasarımın, klinikte kronik böbrek hastalarının kanında biriken proteine bağlı toksinlerin uzaklaştırılmasını sağlayabilecek yenilikçi yöntemler geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** İndoksil sülfat, Mikroakışkan platform, Adsorpsiyon, Simülasyon, Proteine bağlı üremik toksinler.

## Modeling of Protein-Bound Uremic Toxin Adsorption in a Microfluidic Platform

### Abstract

This study aims to develop a microfluidic platform that can be integrated into the hemodialysis system to find a solution to the uremic toxicity problem of chronic kidney patients. The hypothesis was tested which was the adsorption of one of the protein-bound uremic toxins in the blood, Indoxyl Sulfate (IS), can be achieved through the TEOS-PEO hydrogel, synthesized by sol-gel method and functionalized with Na-Y Zeolite, within the microfluidic chip. An S-shaped microchannel was designed with the Solidworks program, and simulation studies were carried out in the Comsol program. After the simulation studies, the detoxification of protein-bound indoxyl sulfate toxin from simulated blood fluid of Na-Y Zeolite-containing hydrogels, which were characterized by scanning electron microscopy and computerized micro-tomography analysis, was investigated both in batch conditions and in continuous mode in the developed microfluidic system. It is thought that this microfluidic design will contribute to the development of innovative methods that can remove protein-bound toxins that accumulate in the blood of chronic kidney patients in the clinic.

**Keywords:** Indoxyl sulfate, Microfluidic platform, Adsorption, Simulation, Protein-bound uremic toxins.

\* Sorumlu Yazar: [ozlem.yesil.celiktas@ege.edu.tr](mailto:ozlem.yesil.celiktas@ege.edu.tr)

## 1. Giriş

Küresel popülasyonun yüzde 10'unu etkileyen ve her yıl bir milyondan fazla ölümden sorumlu olan kronik böbrek hastalığı (KBH) ülkemizde ve dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. KBH, böbreklerin hasarlı olduğu veya sağlıklı böbreklerin kanı filtre edemediği glomerül filtrasyon hızının 60 mL/dak/1.73 m<sup>2</sup>'den düşük olduğu durumdur (Eyüpoğlu, 2020; Krieter ve diğerleri, 2010). Vücuttan atılması gereken çok sayıda toksik bileşikten bazıları biyolojik fonksiyonlarla negatif etkileşime girer ve bu maddeler üremik toksinler olarak adlandırılırlar (Vanholder ve diğerleri, 2014).

Üremik toksinler, boyutlarına veya özelliklerine göre genellikle üç ana gruba ayrılmaktadırlar. İlk grup 500 Da'dan daha düşük moleküler ağırlıklı (Mw), suda çözünür küçük moleküllerden oluşmaktadır. Bu gruptaki kreatinin ve üre gibi moleküller, geleneksel olarak "düşük-akılı" diyaliz membranları kullanılarak hemodiyaliz gibi difüzyon temelli membran tedavisi ile kandan iyi bir şekilde uzaklaştırılırlar. İkinci toksin grubu, moleküler ağırlığı daha yüksek olan orta moleküler ağırlıklı toksinlerden oluşurken, üremik toksinlerin üçüncü grubu ise insan kanındaki serum albüminine (HSA) bağlı çözünen maddelerden oluşan proteine bağlı toksinler, PBUT'dır. Hem yüksek-akılı hem de düşük-akılı diyaliz membranları albümini kan içerisinde tutmak için tasarlandığından, proteine bağlı toksinlerin sadece serbest kısmı (albümine bağlı olmayan) hemodiyaliz ve hemofiltrasyon ile giderilebilmektedirler (Vanholder ve diğerleri, 2012). PBUT'ların albümin'e yüksek bağlanma özellikleri nedeniyle difüzyonla uzaklaştırılması sağlanamamaktadır (Davenport, 2014).

Mikroakışkan teknolojisindeki gelişmeler, giyilebilir diyalizerler olan giyilebilir yapay böbrek (Wearable Artificial Kidney: WAK), Vicenza giyilebilir yapay böbrek (ViWAK), otomatize giyilebilir yapay böbrek (Automated Wearable Artificial Kidney: AWAK) ve insan nefron filtresi (Human Nephron Filter: HNF) gibi çok çeşitli minyatür tıbbi cihazların keşfine olanak sağlamış (Armignacco ve diğerleri, 2015) ve ayrıca geleneksel hastane merkezli kan arıtımı ile ilgili bazı sorunların ele alınmasını teşvik etmiştir (Gura ve diğerleri, 2016). Mikroakışkan hemodiyaliz teknikleri, portatiflik ve giyilebilirlik avantajlarının yanı sıra klinik hastane merkezli kan saflaştırmayı ev içi hemodiyaliz ile değiştirebilme potansiyellerinden dolayı kronik böbrek hastalığı tedavisinde büyük ilgi görmektedirler. Bu sistemlerin hem serbest üremik toksinleri hem de proteine bağlı üremik toksinleri detoksifiye edebilmeleri için yeni çalışmalar yapılmaktadır.

Kanın diyaliz işlemi sırasında albüminin uzaklaştırılması, albümin sentez hızı ve katabolizması, intra ve ekstra vasküler kompartmanlar arasındaki albümin dağılımı ve patolojik koşullar altındaki eksternal kayıp gibi birçok faktörden etkilendiğinden, serum albümin konsantrasyonunda hafif bir azalmaya yol açmaktadır (Zweigart, Boschetti-de-Fierro, Neubauer, Storr, Böhrer ve Krause, 2017). Hasta toleransı açısından bir diyalizörden uzaklaştırılabilecek albümin sınırları hakkında, farklı tedavi modaliteleri için uzaklaştırılan albümin miktarlarına dair farklı açıklamalar mevcuttur. Örneğin, 24 aylık bir süre boyunca 17 stabil periton diyalizi hastasında serum albümin konsantrasyonunda günde 5-7 g civarında küçük ve anlamlı olmayan bir düşüş gözlemlenmiştir (Caravaca, Arrobas ve Dominguez, 2000). Konvansiyonel yüksek-akılı membranlarla yapılan hemodiyaliz işlemlerinde ise albümin kaybının,

genellikle membran malzemesi ve yüzey alanına bağlı olarak 4 saatlik işlem başına 0-2 g aralığında olduğu rapor edilmiştir (Zweigart ve diğerleri, 2017; Floege ve diğerleri, 1989). Online hemodiafiltrasyon modalitesinde, albümin giderimi işlem başına 1-3 g arasında değişirken (Zweigart ve diğerleri, 2017; Floege ve diğerleri, 1989), bu işlem sırasında değişen ultrafiltrasyon oranlarına veya geleneksel yüksek-akılı membranların kullanıldığı hemodiafiltrasyon sistemlerindeki "itme/çekme" modalitesine bağlı olarak albümin gideriminin işlem başına 2.2-7 g arasında değişebildiği bilinmektedir (Shinzato ve diğerleri, 1996; İkizler ve diğerleri, 1994; Zweigart ve diğerleri, 2017). Diyalizörlerin tekrarlı kullanımıyla da protein uzaklaştırma seviyeleri tedavi başına 10-12 g'a çıkarak serum albümin konsantrasyonunda önemli bir azalmayı işaret etmektedir (Kaplan ve diğerleri, 1995).

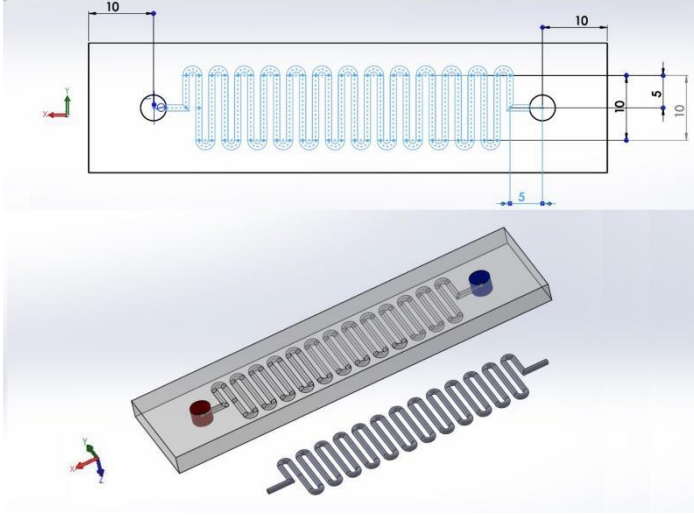
Hemodiafiltrasyon modlarında kullanılan farklı diyalizerler olan FDY 210 ve Evodial için 4 saatlik seans başına sırasıyla 2.2-15.5 g ve 0.48 g aralığında albümin kayıpları (Zweigart ve diğerleri, 2017) söz konusu iken, yaygın olarak kullanılan diyaliz sistemlerini inceleyen daha güncel bir çalışmada ise 3.0±2.4 - 4.3±3.5 g aralığında albüminin diyaliz sırasında kandan uzaklaştırılabildiğini ifade edilmiştir (Maduel ve diğerleri, 2014).

Bu çalışmada, kronik böbrek hastalarının kullanabileceği ve proteine bağlı üremik toksinlerin kandan detoksifikasyonunu sağlayabilecek zeolit içeren bir hidrojel ile yüklü bir mikroakışkan platformun geliştirilmesi hedeflenmiştir. Zeolitler kristalin yapıları aluminosilikat minerallerdir ve zeolit ile fonksiyonelleştirilen polimerik membran matrislerinin ayırma performanslarında artış sağlanabildiği bilinmektedir (Tırnakçı, Salt, Salt, ve Keyf, 2020). Geliştirilen mikroakışkan çipin bugün klinikte kullanılan diyaliz sistemlerinde entegre edilebileceği takdirde, kan dolaşımından uzaklaştırılmaları ve proteine-bağlı olmaları nedeniyle kısıtlı olan protein-bağlı üremik toksinlerin biosorpsiyonunun kandaki albümin protein miktarı korunarak sağlanabileceği düşünülmektedir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. 3D CAD Modeli Çalışmaları

İndoksil sülfat (IS) maddesinin mikroçip içerisinde adsorpsiyonunun simüle edilebilmesi için yapılan modelleme çalışmalarında S-şekilli mikro-akışkan sistem tasarlanmıştır. Bu sistemin avantajı, tasarımı sayesinde, mikroakışkanın kanallardaki kalış süresini arttırmasıdır. Suda çözünmeyen gözenekli bir yapı olan ve kan üremik toksinlerini adsorbe edebilen Na-Y Zeolit adsorbantı ile yüklenmiş S şekilli mikroakışkan sistemin tasarımı Solid Works programı (Dassault Systèmes, SOLIDWORKS Corp., Fransa) kullanılarak yapılmıştır. Toplam kanal hacmi ve kesit alanı sırasıyla 100 µL ve 0.25×10<sup>-6</sup> m<sup>2</sup> olarak hesaplanmıştır. Mikrokanallarda genişlik ve derinlik 500µm iken, üremik toksin ve adsorban madde arasındaki fiziksel etkileşimi arttırmak için çip içerisinde alıkonma süresinin daha uzun olması amaçlanmış, bu sebeple kanalın uzunluğu 40 cm olarak belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Platform iç tasarımı ve ölçüleri

## 2.2. Simülasyon Çalışmaları

Modelin simülasyonu için Comsol programı kullanılmıştır. Comsol programındaki “Transport of diluted species in porous media” modeli üzerinden çipe giren simüle kandaki IS maddesi miktarının zamana bağlı olarak değişimi modellenmiştir. Simülasyon parametreleri kan akış hızı, kanın viskozitesi, kanın zeolit içerisindeki difüzyon katsayısı, IS konsantrasyonu ve zeolit adsorbanının porozitesidir. Platforma giren simüle kan sıvısının akış hızı 2-10  $\mu\text{L}/\text{dk}$  arasında; 4, 7 ve 10  $\mu\text{L}/\text{dk}$  olarak uygulanmıştır. Bu değerler sisteme 6.66e-8 m/s, 1.16e-7 m/s ve 1.66e-7 m/s olarak girilmiştir. Ayrıca IS konsantrasyonu 3, 1.55 ve 0.1 mg/dL olarak uygulanmıştır. Akışkanların platformdan çıkış yaptığı bölgelerde basınç değeri program aracılığıyla 101325 Pa olarak girilmiştir. Simüle edilecek kan sıvısının (IS ve 50 mg/mL albümin içeren pH 7.4 0.01M fosfat tamponlu salin: PBS) viskozitesi 0.003 Pa·s ve yoğunluğu ise 1025  $\text{kg}/\text{m}^3$ ; IS’in molekül ağırlığı 0.21321  $\text{kg}/\text{mol}$  ve difüzyon katsayısı  $1.6 \cdot 10^{-9}$ ; mikroakışkan kanala yüklenen hidrojeldeki Na-Y Zeolit (CBV-100) materyalinin porozitesi 0.48 ve yoğunluğu ise 1.01  $\text{g}/\text{cm}^3$  olarak kabul edilmiştir. Adsorpsiyon izotermi (1) için de dağılım katsayısı ( $K_D$ ) 0.16  $\text{m}^3/\text{kg}$  ve dispersiyon katsayısı (E) 4.11e-6  $\text{m}^2/\text{s}$  olarak kabul edilmiştir. Genel anlamda ise “c” konsantrasyonu, “L” kanal uzunluğunu ve “t” zamanı simgelemektedir.

$$\left(1 + \frac{K_D \rho}{\eta}\right) \frac{dc}{dt} = -u_L \frac{dc}{dL} + E \frac{d^2c}{dL^2} + r \quad u_L \text{ in } \frac{m}{\text{time}} \quad (1)$$

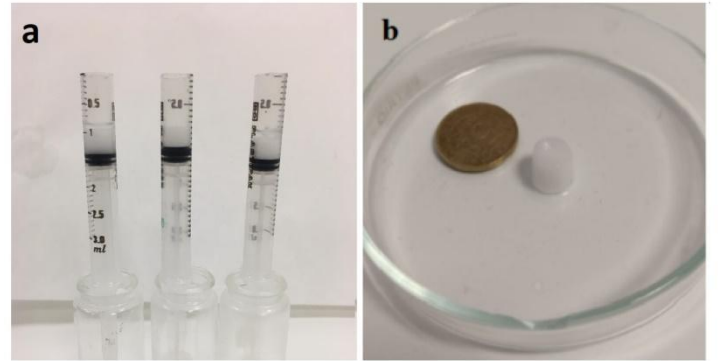
$K_D$ : Dağılım katsayısı  
 E: Dispersiyon katsayısı  
 $u_L$ : Hacimsel akış hızı  
 $\rho$ : Adsorban yoğunluğu  
 $\eta$ : Adsorban viskozitesi

## 2.3. Na-Y zeolit içerikli hidrojinin hazırlanması

Sol-Jel metodu ile sentezlenen TEOS (tetraethoxysilane) - PEO (polyethylene oxide) hidrojel, 0-50-100 mg zeolit içerecek şekilde her bir parti için 0.125 mL TEOS hidrolizati ve 0.250 mL PEO solüsyonu Şekil 2’de görülen Luer Lock şırıngalar içerisinde birkaç dakika vorteksenerek karıştırılmış ve ardından dik konumda 45 dk jelleşmeye bırakılarak hazırlanmıştır. Mikrokanala yüklenecek hidrojel de aynı şekilde

hazırlanmış ve 45 dk boyunca şırıngada jelleşmeye bırakıldıktan sonra homojen form gözlemlendiğinde mikrokanala enjektör yardımıyla transfer edilerek mikroakışkan çip içerisine yüklenmiştir.

TEOS hidrolizasyonu için, silan prekürsörü olan TEOS (tetraetoksisilan), Ultrasaf su ve HCl (%0.1, v/v) hacimce 5.58/1.9/1 oranında 2.5 saat süresince oda sıcaklığında karıştırılmıştır (Yesil-Celiktas, Cumana ve Smirnova, 2013). PEO (polietilen oksit) solüsyonu ise Na-Ca asetat tamponu (pH 4.8) içerisinde 80 mg/mL konsantrasyonda PEO çözülmesi ile elde edilmiştir. Jelleşme sonrası Şekil 2’de görüldüğü gibi şırınga ağızları kesilmiş ve üzeri saf TEOS ile kaplanarak +4°C’de 24 saat yaşlandırmaya bırakılmıştır. Ardından şırınga pistonu itilerek kesikli adsorpsiyon denemelerinde kullanılacak monolitler elde edilmiştir. Mikrokanaldaki jelin yaşlandırılması ise mikrokanal giriş ve çıkış kısımlarının saf TEOS ile kaplanması ve aynı şekilde +4°C’de 24 saat muhafaza edilmesi sonrasında gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen hidrojel, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve bilgisayar destekli mikro tomografi (mikro-CT) ile karakterize edilmiştir.



Şekil 2. Luer Lock şırıngalar içerisinde Zeolit-Jel monolitlerinin hazırlanması (a) ve Zeolit içeren jel monolitinin yaşlandırma sonrası görüntüsü (b)

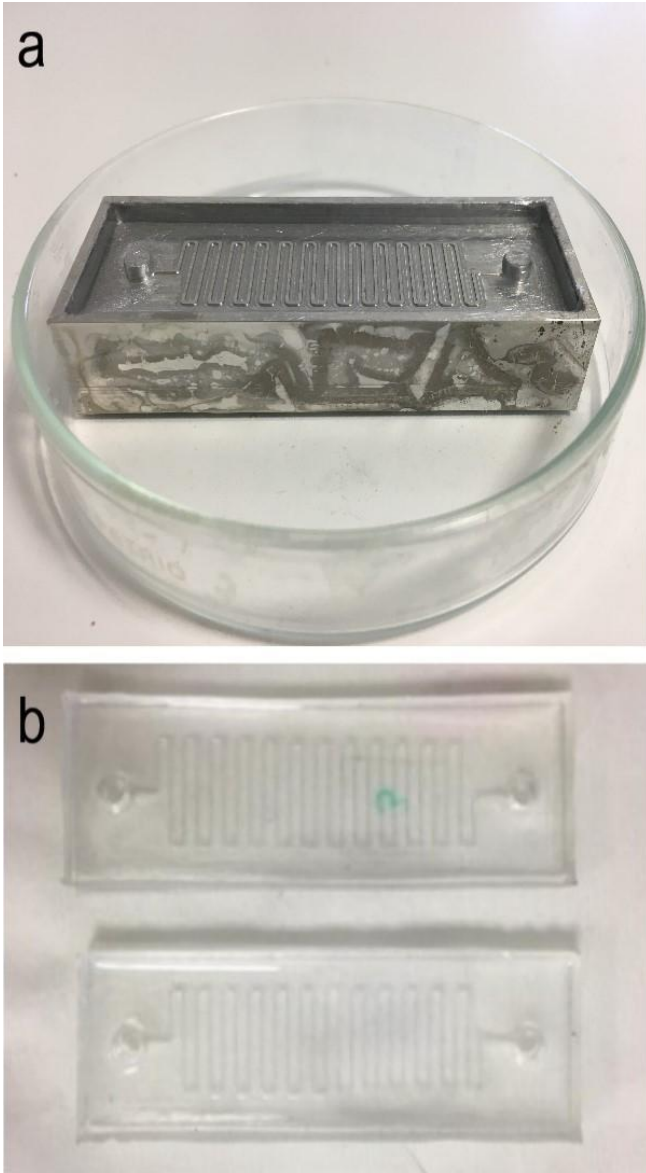
## 2.4. Mikroakışkan Platformun Hazırlanması

Mikroakışkan çipin kalıp bazlı yöntem ile fabrikasyonunun gerçekleştirilebilmesi için polidimetilsiloksan (PDMS) polimeri kullanılmıştır. S-şekilli kanalları oluşturmak için kullanılacak kalıbın üzerine PDMS polimeri ve aktifleştiricisi üretici firmanın önerdiği şekilde karıştırılarak paslanmaz çelik kalıplara dökülmüştür (Şekil 3a). Daha sonra polimer karışımında oluşan kabarcıkların yok edilmesi için karışım vakum altında 15 dk bekletilmiş ve kabarcıkları uzaklaştırılmış PDMS jeller 80°C’de 2 saat bekletilerek sertleştirilmiştir. Kalıptan çıkarılan sertleşmiş PDMS polimer mikrokanalların Plasma Cleaner cihazı yardımıyla yüzeyleri aktifleştirildikten sonra lamalar ile birleştirilmiş (Şekil 3b) ve akışa bağlanmaya hazır hale gelmiştir.

## 2.5. Kesikli Adsorpsiyon Denemeleri

Çip denemelerine geçilmeden önce uygun parametrelerin belirlenmesi için öncesinde kesikli koşullarda adsorpsiyon denemeleri yapılmıştır. PBS içerisine kronik böbrek hastalarının kanında bulunan konsantrasyonda (50 mg/mL) sığır serum albümini ve 0.03 mg/mL konsantrasyonda IS eklenerek gece boyu karıştırıcı (200 rpm) üzerinde 37°C’de inkübe edilmiş ve böylelikle toksinlerin albümine bağlanmaları sağlanmıştır. Bu

şekilde hazırlanan simüle kan sıvısının 2.4 mL'si bir behere alınarak içerisine şırıngadan alınan monolit eklenmiş ve 4 saat boyunca manyetik karıştırıcıda (200 rpm) karıştırılmıştır. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde, albümine bağlı IS toksini ile serbest halde bulunan IS'ın ayrılması için 100 000 rpm hıza çıkabilen ultrasantrifüj kullanılmıştır. 100 000 rpm de 2 saat süresince ultrasantrifüjün ardından üstte kalan fazda serbest IS, altta kalan pellet kısmında proteine bağlı olan IS molekülleri bulunmaktadır. Üst fazdaki süpernatantın 30 µL'sinde bulunan serbest IS konsantrasyonu nanodrop ile ölçülmüştür.

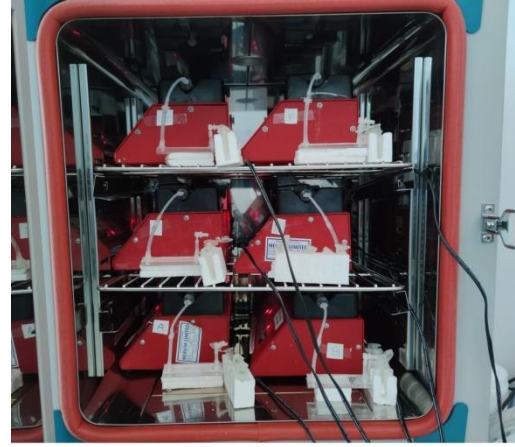


Şekil 3. Kalıba dökülmüş PDMS polimeri (a) ve PDMS polimerinden hazırlanmış, lamalar ile kapatılmış mikroçipler (b)

## 2.6. Mikroakışkan Platformda Adsorpsiyon Denemeleri

Mikrokanala yüklenen farklı miktarda zeolit içeren hidrojelere yaşlandırılmalarını takiben, mikroçip giriş ve çıkış kısımlarına sıcak silikon yardımı ile bağlantı boruları takılmış ve bu boruların diğer uçları ise şırınga pompalarındaki simüle kan içeren şırıngalara bağlanmıştır. Mikrokanaldaki akış hızı 10 µL/dk ve akış süresi 4 saat olacak şekilde ayarlanarak akış e-ISSN: 2148-2683

başlatılmıştır. İnsan vücudu simüle edilmek istendiğinden mikroakışkan çipler ile sürekli modda gerçekleştirilen adsorpsiyon denemeleri 37°C sıcaklıktaki etüv içerisinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4). Mikroçiplerin çıkış kanallarından toplanan simüle kan sıvısı ependorflarda toplanmıştır.

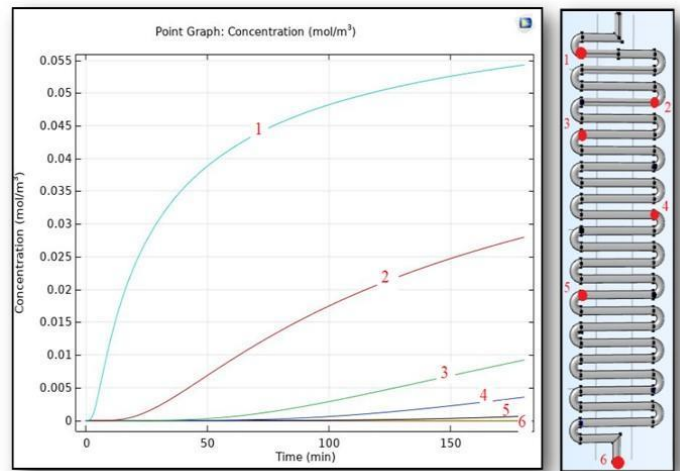


Şekil 4. İnkübatör içerisine yerleştirilmiş şırınga pompalarına bağlanmış mikroakışkan çiplerde gerçekleştirilen adsorpsiyon denemeleri

## 3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

### 3.1. Simülasyon Çıktıları

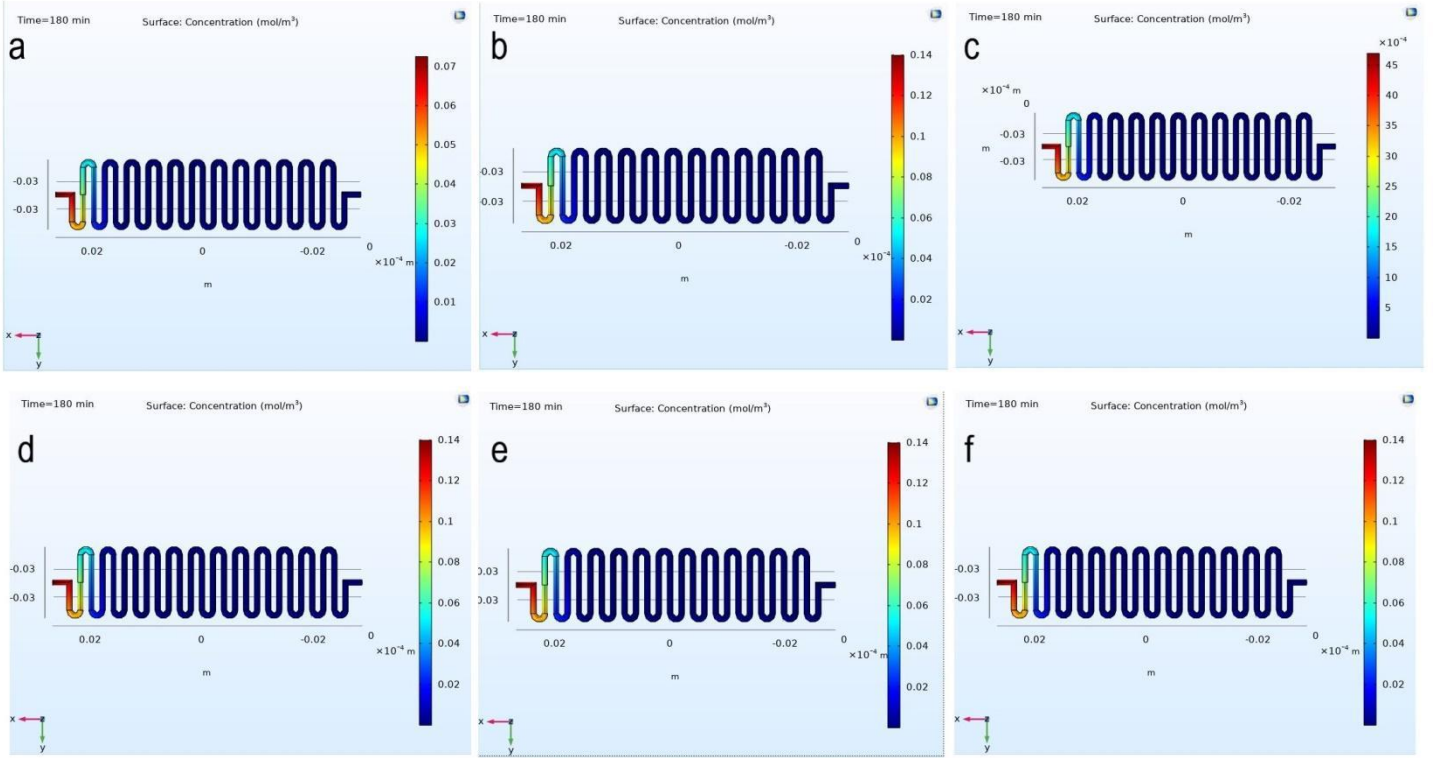
Yapılan simülasyon çalışmasında çipin farklı noktalarındaki konsantrasyon değişiminin zamana bağlı grafiği Comsol Multiphysics programı aracılığıyla çizilmiştir. Çipin altı farklı noktasında IS konsantrasyonunun incelendiği grafikte (Şekil 5), IS içeren simüle kan sıvısı mikrokanala girdikten hemen sonra kanal içerisindeki zeolit ile fonksiyonelleştirilmiş TEOS-PEO hidrojeline IS toksininin adsorpsiyonlanması sebebiyle 1 numaralı noktada IS konsantrasyonunda çok hızlı artış gözlemlenmektedir. Kanalda ilerleyen simüle kan sıvısındaki IS'ın adsorpsiyonlanarak konsantrasyonunun düşmesi nedeniyle, çipin orta noktaları olan 2, 3, 4 ve 5 numaralı noktadaki adsorplanmış IS konsantrasyonları da giriş noktasına olan uzaklıkları ile orantılı olarak düşmektedir.



Şekil 5. Simülasyon sonucunda programdan elde edilen mikroçipin farklı noktalarına ait zamana bağlı IS konsantrasyonu değişimi (sol) ve çip üzerinde seçilen noktalar (sağ)

Comsol programında yapılan simülasyon çalışmalarında farklı akış hızları ve farklı IS konsantrasyonları denenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (3.0, 1.55 ve 0.1 mg/dL) IS içeren hidrojeller için 10  $\mu$ L/dk sabit akış ile gerçekleşen simülasyonlar sonucunda belirlenen akış hızları aralığında IS adsorpsiyon miktarında bir değişim gerçekleşmediği görülmüştür (Şekil 6 a, b, c). Ayrıca simüle kan sıvısının 40 cm toplam uzunluktaki mikrokanala girmesinden çok kısa bir süre

sonra henüz kanalın girişine yakın bölgede IS konsantrasyonunun sifira yaklaştığı görülmüştür (Şekil 6). IS konsantrasyonu sabit tutularak (3 mg/dL) farklı akış hızlarında (4, 7 ve 10  $\mu$ L/dk) gerçekleştirilen denemelerde de benzer şekilde henüz kanalın girişine çok yakın bir bölgede IS konsantrasyonunun sifira yaklaştığı görülmüştür (Şekil 6 d, e, f).

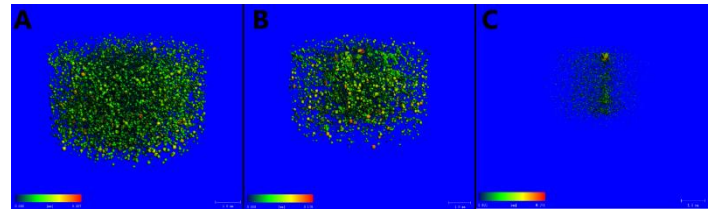


Şekil 6. Comsol programında 10 $\mu$ L/dk sabit hızda ve 3 mg/dL (a), 1.55 mg/dL (b) ve 0.1 mg/dL (c) konsantrasyonlarda elde edilen simülasyonlar ile 3 mg/dL sabit IS konsantrasyonunda simüle kan sıvısının kullanıldığı 10 $\mu$ L/dk (d) 7  $\mu$ L/dk (e) ve 4 $\mu$ L/dk (f) akış hızında elde edilen simülasyonlar.

### 3.2. Na-Y Zeolit İçerikli TEOS-PEO Hidrojelin Karakterizasyon Çalışmaları

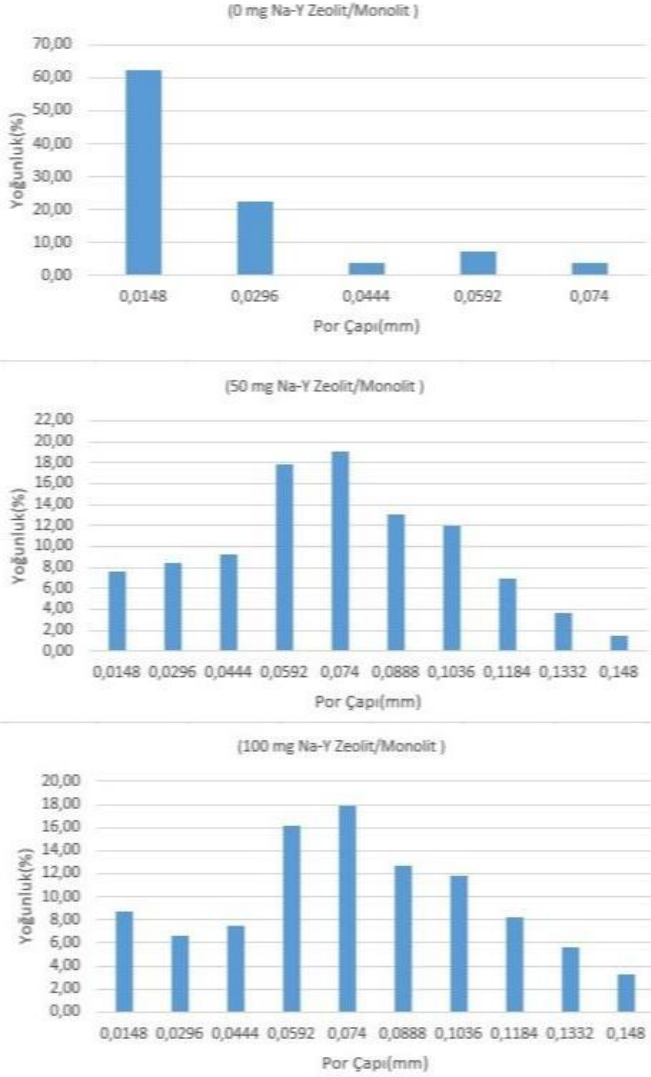
Sentezlenen zeolit içeren/içermeyen TEOS-PEO hidrojjellerinin yüzey morfolojisini görmek ve por çaplarının boyutlarını belirleyebilmek için SEM ve micro-CT görüntüleri incelenmiştir. Jel içerisinde 500°C’de gece boyu kalsinize edilmiş zeolit bulunmaktadır ve Şekil 7’de görüldüğü gibi adsorbsiyon için avantaj sağlayabilecek por yapılarına sahip olduğu görülmektedir. 100 mg Na-Y Zeolit içeren jellerde (Şekil 7A), 50 mg Na-Y Zeolit içeren jellere (Şekil 7B) göre porları temsil eden kırmızı-yeşil aralığındaki renklerde artış meydana gelmesi, artan zeolit miktarının poroziteye olumlu yönde katkı sağladığını ortaya çıkarmıştır. TEOS-PEO hidrojjellerinin içerisine eklenen Na-Y Zeolit konsantrasyonu artışının hidro-

jeldeki por yapısını olumlu etkilediği ve daha porlu bir yapıya olanak sağladığı görülmektedir ve gelişmiş por yapısı da PBUT (IS toksini) adsorbsiyonu açısından avantaj sağlamaktadır.



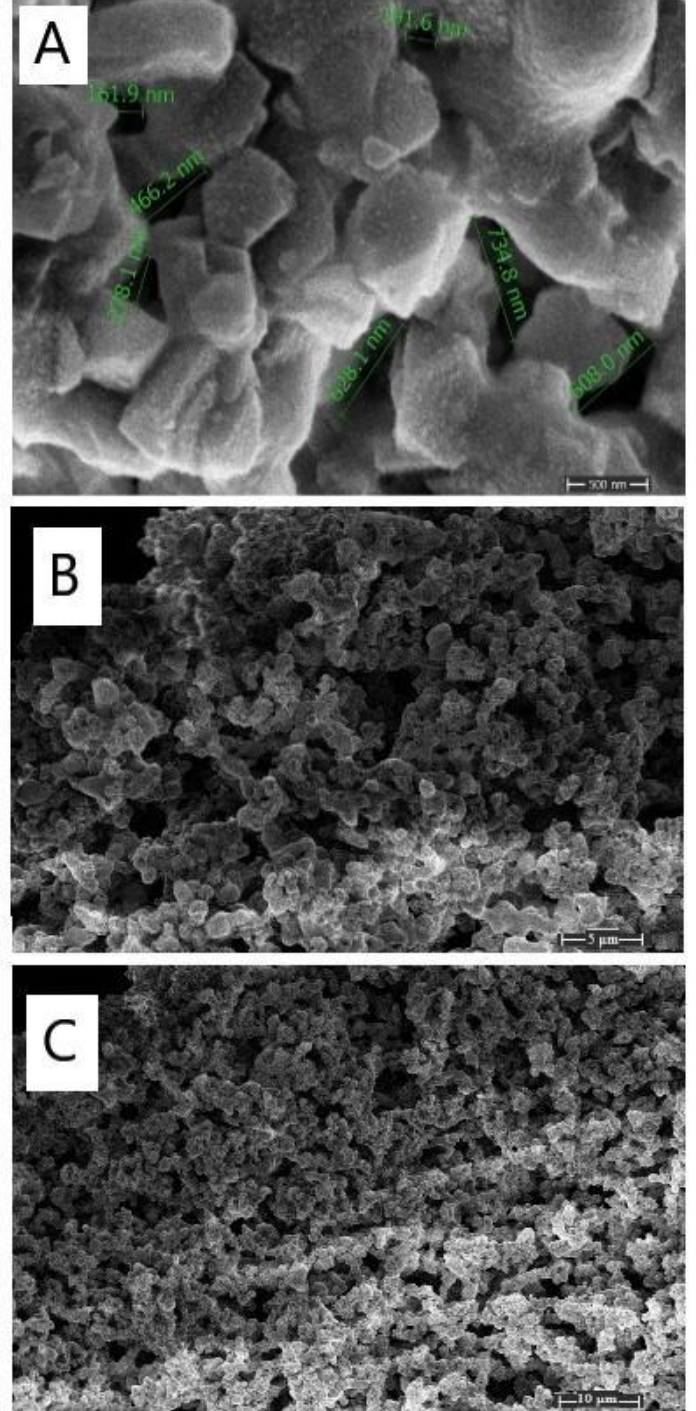
Şekil 7. Micro-CT por dağılımı görüntüleri 100 mg Na-Y Zeolit içeren hidrojel (A), 50 mg Na-Y Zeolit içeren hidrojel (B) ve Na-Y Zeolit içermeyen hidrojel (C)

Mikro-CT analizi ile elde edilen kantitatif por dağılımı sonuçları Şekil 8’de görülmektedir. Zeolit katkısı olmaksızın sentezlenen TEOS-PEO hidrojelindeki porların yaklaşık olarak %60’ı 0.0148 mm çapındayken, monolit başına 50 mg zeolit ile fonksiyonelleştirilmiş hidrojellerde por çaplarının genişleyerek %19’nun 0.074 mm, %18’nin 0.0592 mm ve %13’nün de 0.0888 mm ortalama çapa sahip oldukları görülmektedir (Şekil 8). Ayrıca Şekil 7 ile benzer olarak, monolit başına 100 mg’a artan Zeolit konsantrasyonunda 50 mg Zeolit içerenlere göre en yüksek por dağılım çubukları olan 0.1184 mm, 0.1332 mm ve 0.148 mm bölgelerinde % por yoğunlukları daha yüksektir.



Şekil 8. Zeolit içermeyen ve farklı konsantrasyonlarda zeolit içeren hidrojellerde ortalama por çapı (mm) dağılım grafikleri

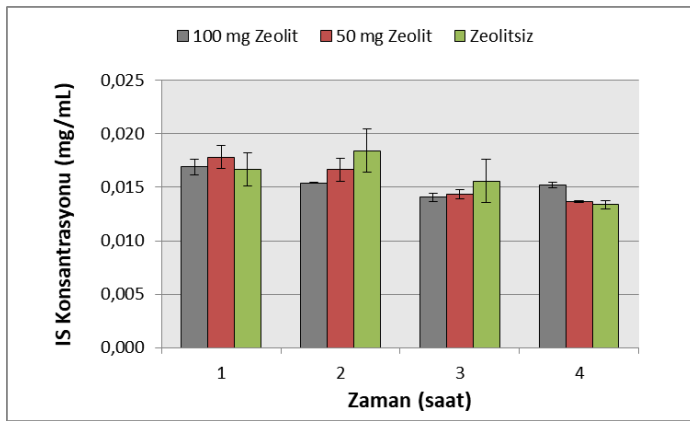
Örneklerin yüzey morfolojilerinin incelenmesi için Quanta 200 FEI SEM-EDX elektron mikroskobu kullanılmıştır. Açıkça görülebilen kristallerden ayrı olarak neredeyse homojen bir matris, mikrokristalin fazlar ve amorf kütlelerin bir karışımı olduğu gözlenmektedir (Şekil 9).



Şekil 9. Na-Y Zeolit-Jel Monolitleri SEM görüntüleri ölçek 500 nm (a), 5 µm (b) ve 10 µm (c)

### 3.3. Monolitlerle Yapılan Kesikli Adsorpsiyon Denemeleri

Albümine bağlı üremik toksinlerin kesikli koşullarda adsorpsiyonlarının belirlenebilmesi için manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılabilir olarak monolit hidrojellerle adsorpsiyon denemeleri gerçekleştirilmiş ve simüle kan sıvısındaki IS konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi spektroskopik bir yöntem olan nanodrop cihazı ile analiz edilmiştir. Böylelikle, mikroakışkan çip sistemi içerisinde gerçekleştirilmesi planlanan detoksifikasyon işlemi hakkında ön fikir edinilmesi sağlanmıştır. Başlangıç IS konsantrasyonu 0.03 mg/mL olarak belirlenmiş ve 4 saatin (ortalama bir diyaliz muamelesi süresi) sonunda 100 mg ve 50 mg Zeolit içeren hidrojel ile Zeolit içermeyen TEOS-PEO monolit hidrojellerin denendiği kesikli adsorpsiyon denemelerinde simüle kan sıvısında kalan IS konsantrasyonları sırasıyla 0.0152, 0.0137 ve 0.0134 mg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 10). Monolit başına 100 mg Zeolit içeren jellerle yapılan denemelerde, 2. ve 3. saatlerde simüle kan sıvısında adsorplanmadan kalan IS konsantrasyonları, zeolit içermeyen veya 50 mg konsantrasyonda Zeolit içeren jellerden daha düşük olarak ölçülmüştür. Ayrıca, 50 mg konsantrasyonda Zeolit içeren jellerde adsorplanmadan kalan IS konsantrasyonunun zeolit içermeyen jellerden daha düşük olması da hedeflendiği üzere Zeolit katkısının IS adsorpsiyonunu olumlu yönde etkilediğini ortaya çıkarmıştır. 4 saatlik denemenin sonunda bu yönelimin tersine dönerek zeolitsiz jelde adsorpsiyon devam ederken, zeolit katkılı monolit jellerin muamele edildiği simüle kan sıvısında adsorplanmadan kalan IS konsantrasyonunda ise hafif bir artış meydana gelmiştir. Bu durum, bu monolitlerdeki zeolit katkısının jellerin dayanımını muhtemelen olumsuz etkilediğini ve bozulmaya başlayan jellerden adsorplanmış IS moleküllerinin kaçışına olanak sağladığını düşündürmüştür.

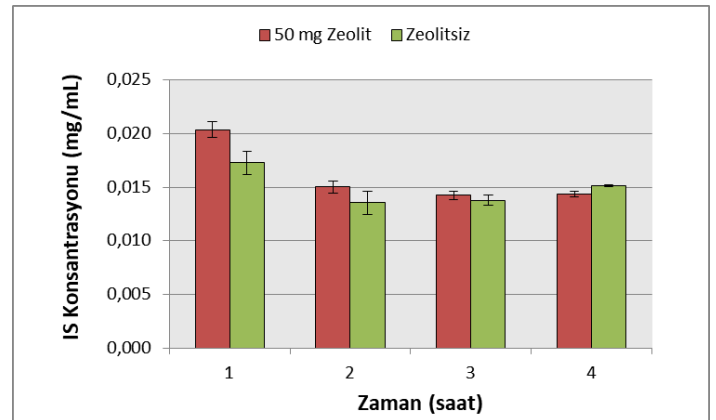


Şekil 10. Kesikli adsorpsiyon denemeleri sonrasında IS molekülünün simüle kan içerisinde zamana bağlı konsantrasyon grafiği

### 3.4. Mikroakışkan Platformda Adsorpsiyon Denemeleri

Albümine bağlı üremik toksinlerin adsorpsiyon miktarının belirlenebilmesi için gerçekleştirilen kesikli adsorpsiyon denemelerinin ardından mikroakışkan çip denemeleri gerçekleştirilerek geliştirilen sistemin adsorpsiyon sonuçları elde edilmiştir. Saatte 600 µL örnek toplanmış ve 4 saatin sonunda her bir çip için 2400 µL örnek elde edilmiştir. Ependorflarda toplanan simüle kan sıvısı örnekleri, ultrantrifüjde fraksiyonlanarak, süpernatantın en üstten alınan 30 µL'sinde

bulunan serbest IS konsantrasyonu nanodrop ile ölçülmüştür (Şekil 11). Zeolit içeren hidrojellerle yüklü mikroakışkan çiplerde adsorplanmadan kanalı terk eden IS konsantrasyonu, zeolit içermeyen jellerle yüklenen mikroakışkan çiplere göre özellikle ilk saatlerde daha yüksek olarak belirlenmiştir. Beherlerdeki simüle kan sıvısı içerisinde, monolit halindeki zeolit katkılı jellerin manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldığı kesikli adsorpsiyon denemelerinde elde edilenin aksine, mikroakışkan çiplerde gerçekleştirilen adsorpsiyon denemelerinde zeolit katkılı jeller zeolit içermeyenlere göre IS adsorpsiyonunda olumlu bir artış sağlayamamıştır. Beherlerde gerçekleşen çok yönlü karışmanın aksine, mikroakışkan çiplerde tek yönlü ilerleyen simüle kan sıvısının özellikle kanalın ilk girişinde yarattığı yüksek basınç nedeniyle, dayanımlarının daha düşük olduğu düşünülen zeolit içerikli jeller ile mikrokanal iç yüzeyinin temas ettiği alandan bu sıvının sızarak çipi terk ettiği, dolayısıyla da porlara yeterince difüze olmadan sistemi terk eden simüle kan sıvısından adsorplanabilen IS konsantrasyonunun daha düşük olmasına sebep olduğu sonucuna varılmıştır. Mikroakışkan çiplerden 3 saatlik süre sonunda zeolit içeren jellerle yüklü çipi terk eden simüle kan sıvısı numunelerinde adsorplanmadan kalan IS konsantrasyonunun düşmesi, ilerleyen saatlerde porlar içerisine difüze olan simüle kan sıvısı nedeniyle adsorplanabilen IS konsantrasyonunun da arttığını düşündürerek bu hipotezi desteklemiştir. 4. saatin sonunda zeolit içeren ve içermeyen jeller ile yüklü çiplerde adsorplanan IS miktarlarında önemli bir fark görülmemiştir.



Şekil 11. Mikroakışkan çiplerle gerçekleştirilen adsorpsiyon denemeleri sonrasında IS molekülünün simüle kan içerisinde zamana bağlı konsantrasyon grafiği

Proteine-bağlı bir diğer toksin olan p-cresol'ün *in vitro* koşullarda MFI tipi zeolit parçacıkları ile %80-85 oranında elimine edilebildiği bildirilmiştir (Bergé-Lefranc ve diğerleri, 2012). Ancak insan serum albümini ile birlikte iken p-cresol toksinin proteine bağlanma isteği nedeniyle zeolite afinitesinin düştüğü, dolayısıyla zeolitlerin ancak serum albümini içermeyen kan ultra-filtratı için adsorbent olarak kullanılması önerilmiştir. BSA içeren simüle kan sıvısı ile gerçekleştirilen bu çalışmada ise IS adsorpsiyon verimleri Zeolit içeren ve içermeyen hidrojellerle yüklü mikroakışkan çipler için sırasıyla %53.27 ve %49.78 olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla Zeolit ile fonksiyonelleştirilen TEOS-PEO hidrojel ile yüklü mikroakışkan çiplerin, diyaliz sistemlerine entegrasyona çok daha uygun olduğu kanaatine varılmıştır.

## 4. Sonuç

Bu çalışmada, kan temsili toksin içeren tampon çözeltinin (simüle kan sıvısı) platform içerisinde kalış süresini arttırmak ve yüzey alanını genişletmek amacıyla Solid Works çizim programı kullanılarak S-şekilli bir mikroakışkan çip tasarlanmıştır. Tasarımın optimum deneme koşullarını belirleyebilmek için, Comsol programında simülasyon yapılarak, simüle kan sıvısının kullanıldığı detoksifikasyon denemelerine uygunluğu analiz edilmiştir. Daha sonra mikroakışkan sistem içerisine yerleştirilen Na-Y Zeolit içeren adsorban hidrojel aracılığı ile proteine bağlı bir üremik toksin (PBUT) olan indoksil sülfat adsorpsiyonunun incelenmesi öncesinde, mikrosistem ile karşılaştırma amaçlı *in vitro* kesikli adsorpsiyon denemeleri kurulmuştur. Belirlenen süre boyunca, simüle kan sıvısı örnekleri toplanmış ve indoksil sülfat içerikleri, UV spektrometre ve nanodrop ile analiz edilmiştir. Diyaliz hastalarının kanında bulunan konsantrasyonda indoksil sülfat (PBUT) içeren simüle kanın geliştirilen mikrosistemden geçirilmesi ile indoksil sülfat adsorpsiyonunun incelendiği bu çalışmanın, klinikte KBH hastalarının kanında dolaşan PBUT'lerin uzaklaştırılmasını sağlayabilecek yenilikçi yöntemler geliştirilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

## 5. Teşekkür

Bu çalışma "Proteine Bağlı Üremik Toksinlerin In Vitro Adsorpsiyonunun Mikroakışkan Platformda Modellemesi" başlıklı 2209/A projesi kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

## Kaynakça

- Armignacco P., Garzotto F., Neri M., Lorenzin A., Ronco C. (2015). Wak engineering evolution. *Blood Purification*, 39(1-3), 110-114.
- Bergé-Lefranc, D., Vagner, C., Calaf, R., Pizzala, H., Denoyel, R., Brunet, P., ... Schäfer, O. (2012). *In vitro* elimination of protein bound uremic toxin p-cresol by MFI-type zeolites. *Microporous and Mesoporous Materials*, 153, 288–293.
- Caravaca, F., Arrobas, M. ve Dominguez, C. (2000). Serum Albumin and Other Serum Protein Fractions in Stable Patients on Peritoneal Dialysis. *Peritoneal Dialysis International*, 20, 703–707.
- Davenport, A. (2014). How can dialyzer designs improve solute clearances for hemodialysis patients?. *Hemodialysis International*, 18(1), 43–47.
- Eyüpoğlu, C. (2020). Kronik Böbrek Hastalığının Erken Tanısı için Yeni Bir Klinik Karar Destek Sistemi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 20, 448-455.
- Floege, J., Granolleras, C., Deschodt, G., Heck, M., Baudin, G., Branger, B., Tournier, O., Reinhard, B., Eisenbach, G.M., Smeby, L.C., et al. (1989). High-flux synthetic versus cellulosic membranes for beta 2-microglobulin removal during hemodialysis, hemodiafiltration and hemofiltration. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 4(7), 653-657.
- Gura, V., Rivara, M. B., Bieber, S., Munshi, R., Smith, N. C., Linke, L., et al. (2016). A wearable artificial kidney for patients with end-stage renal disease. *JCI Insight*, 1(8), e86397.
- Ikizler, T. A., Flakoll, P.J., Parker, R.A., Hakim, R.M. (1994) Amino Acid and Albumin Losses During Hemodialysis. *Kidney Internationale*, 46(3), 830–837.

- Kaplan, A.A., Halley, S.E., Lapkin, R.A., Graeber, C.W. (1995) Dialysate Protein Losses with Bleach Processed Polysulphone Dialyzers. *Kidney Internationale*, 47(2), 573–578.
- Krieter, D.H., Hackl, A., Rodriguez, A., Chenine, L., Moragues, H.L., Lemke, H.-D., et al. (2010). Protein-bound uraemic toxin removal in haemodialysis and post-dilution haemodiafiltration. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25(1), 212-218.
- Maduell, F., Arias-Guillen, M., Fontseré, N., Ojeda, R., Rico, N., Vera, M., Elena, M., Bedini, J.L., Wieneke, P., Campistol, J.M. (2014) Elimination of Large Uremic Toxins by a Dialyzer Specifically Designed for High-Volume Convective Therapies. *Blood Purification*, 37(2), 125–130.
- Shinzato, T., Miwa, M., Nakai, S., Takai, I., Matsumoto, Y., Morita, H., Miyata, T., Maeda, K. (1996) Alternate Repetition of Short Fore- and Back filtrations Reduces Convective Albumin Loss. *Kidney Internationale*, 50(2), 432–435.
- Tırnakçı, B. Salt, Y., Salt, İ., Keyf, S. (2020). Klinoptilolit Dolgulu PVA Membranların Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Pervaporasyon ile Desalinasyon Çalışmaları. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 18, 711-718.
- Vanholder, R., Schepers, E., Pletinck, A., Neiryck, N. ve Glorieux, G. (2012). An Update on Protein-Bound Uremic Retention Solutes. *Journal of Renal Nutrition*, 22(1), 90–94.
- Vanholder, R., Schepers, E., Pletinck, A., Nagler, E. V., & Glorieux, G. (2014). The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: A systematic review. *Journal of American Society of Nephrology*, 25(9), 1897-1907.
- Yesil-Celiktas, O., Cumana, S., Smirnova, I. (2013). Silica-based monoliths for enzyme catalyzed reactions in microfluidic systems with an emphasis on glucose 6-phosphate dehydrogenase and cellulase. *Chemical Engineering Journal*, 234, 166-172.
- Zweigart, C., Boschetti-de-Fierro, M., Neubauer, M., Storr, M., Böhrer, T. ve Krause, B. (2017) Progress in the Development of Membranes for Kidney-Replacement Therapy. *Comprehensive Membrane Science and Engineering (Second Edition) içinde (2. bs. Cilt 4, 214-247. ss.)*. Amsterdam: Elsevier B.V.