

**İNSAN SERUM ALBUMİN BASKILANMIŞ
EŞ BOYUTLU MANYETİK
POLİ(GLİSİDİL METAKRİLAT) PARTİKÜLLER**

**HUMAN SERUM ALBUMIN IMPRINTED
MONODISPERSE MAGNETIC
POLY(GLYCIDYL METHACRYLATE) BEADS**

FATMA KARTAL

Prof. Dr. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

FATMA KARTAL'ın hazırladığı '**İnsan Serum Albümin Baskılanmış Eş Boyutlu Manyetik Poli(Glisidil Metakrilat) Partiküller**' adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan (Danışman)

(Prof. Dr. Adil DENİZLİ)

Üye

(Prof. Dr. Serap ŞENEL)

Üye

(Doç. Dr. Handan YAVUZ)

Üye

(Doç. Dr. Ali KARA)

Üye

(Doç. Dr. Lokman UZUN)

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sana...

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.

01/08/2013

Fatma KARTAL

ÖZET

İNSAN SERUM ALBUMİN BASKILANMIŞ EŞ BOYUTLU MANYETİK POLİ(GLİSİDİL METAKRİLAT) PARTİKÜLLER

FATMA KARTAL

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Ağustos 2013, 72 sayfa

Bu tez çalışmasında, protein-afinite malzemeler hazırlamak için metal-koordinasyon ile moleküler baskılama teknolojisinin birleştirilmesiyle yeni bir yaklaşım geliştirildi. Eş boyutlu manyetik poli(glisidilmetakrilat) (m-PGMA) (1.7 µm boyutunda) küreleri hedef proteini spesifik tanıma için kullanıldı. m-PGMA küreleri Fe₃O₄ nano parçacık varlığında dispersiyon polimerizasyon yöntemiyle hazırlandı. Metal koordinasyona dayalı yüzey baskılı m-PGMA hazırlandı ve insan serum albuminin (HSA) spesifik tanınması için kullanıldı. İminodiasetik asit (IDA) metal koordinasyon monomeri olarak kullanıldı ve HSA molekülü metal koordinasyonu yoluyla m-PGMA yüzeyine bakır iyonları yardımıyla tutturuldu. m-PGMA, tetraetilortosilikat (TEOS) ve aminopropiltrimetoksisilan (3-APTMS) arasındaki kondenzasyon reaksiyonuyla oluşturulan polimerle kaplanmıştır. Elde edilen HSA baskılı mikroküreler taramalı elektron mikroskopu (SEM), enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi (EDX), termal gravimetrik analiz (TGA), diferansiyel termal analiz (DTA), fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR-ATR) ve zeta potansiyel analizi ile karakterize edilmiştir. m-PGMA kürelerinin şişme oranı % 34 olarak hesaplanmıştır. Maksimum HSA adsorpsiyon kapasitesi pH 6'da 37.64 mg/g polimerdir. Bağlı seçicilik katsayılarını (K') hesaplamak için farklı derişimlerde hazırlanmış MIP'in seçicilik deneyleri lizozim, sığır serum albumini ve sitokrom C proteinlerinin varlığında gerçekleştirilmiştir. HSA baskılı m-PGMA mikroküreleri tekrarlanabilirlik deneyleri için birden fazla kullanılmış ve sonuçlar adsorpsiyon kapasitesinde ihmal edilebilecek bir azalma olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: HSA, moleküler baskılama, karakterizasyon, seçicilik, mikroküre.

ABSTRACT

HUMAN SERUM ALBUMIN IMPRINTED MONODISPERSE MAGNETIC POLY(GLYCIDYL METHACRYLATE) BEADS

FATMA KARTAL

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

August 2013, 72 pages

In this thesis, a new approach, combining metal-coordination with molecular imprinting technology, was developed to prepare protein affinity materials. Magnetic poly(glycidylmethacrylate) (m-PGMA) beads in monosize form (1.7 μm in diameter) were used for specific recognition towards the target protein. The m-PGMA beads were prepared by dispersion polymerization in the presence of Fe_3O_4 nano-powder. Surface imprinted m-PGMA based on metal coordination was prepared and used for the selective recognition of human serum albumin (HSA). Iminodiacetic acid (IDA) was used as metal coordinating monomer and HSA molecule was anchored by Cu^{2+} on the surface of m-PGMA by metal coordination. The m-PGMA was coated with a polymer formed by condensation of tetraethylorthosilicate (TEOS) and aminopropyltrimethoxysilane (3-APTMS). The obtained HSA imprinted microspheres were characterized by scanning electron microscope (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), thermal gravimetric analysis (TGA), differential thermal analysis (DTA), fourier transform infrared spectroscopy (FTIR-ATR) and zeta potential analysis. The swelling ratio of m-PGMA microspheres was calculated as 34%. The maximum HSA adsorption capacity of MIP was 37.64 mg/g polymer at pH 6.0. The selectivity experiments of MIP prepared with different concentrations in the presence of lysozyme, bovine serum albumin and cytochrome C proteins were performed in order to determine the relative selectivity coefficients (K'). HSA imprinted m-PGMA microspheres were used many times for the reusability experiments and the findings showed that there was a negligible decrease in adsorption capacity.

Keywords: HSA, molecular imprinting, characterization, selectivity, microsphere.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans döneminden itibaren beni hep destekleyen, engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan kıymetli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye

Güleryüzleriyle bana hep destek olan değerli hocalarım Doç. Dr. Handan Yavuz ve Doç. Dr. Lokman Uzun'a

Tez çalışmalarım boyunca bana destek olup yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Ayőe Müge Andaç'a

Çalışmalarımda sorularımı karşılıksız bırakmayan, her türlü destek ve yardımı benden esirgemeyen, Dr. Nilay Bereli ve Dr. Deniz Türkmen'e

Tez çalışmalarım boyunca bana destek olan sevgili arkadaşlarım Canan Armutçu, Mitra Jalilzadeh, Kemal Çetin ve Tuğba Doğan'a

Çalışmalarım boyunca bana hep destek olan bu güzel ortamı paylaştığım Biyokimya Araştırma grubunun değerli üyelerine

En büyük destekçim Mehmet Lütfi Yola'ya

Her türlü desteğiyle hep yanımda olan canım aileme ve ablama,

Sonsuz Teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi	4
2.1.1. Moleküler Baskılama Reaktifleri	9
2.1.2. Moleküler Baskılama Teknolojisinin Zorlukları	13
2.2. Protein Baskılama Yöntemi	14
2.3. Yüzey Baskılama	17
2.4. Manyetik Polimer Küreler	18
2.5. Albumin	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Kimyasal Maddeler	26
3.2. Mikrokürelerin Hazırlanması	26
3.2.1. Manyetik Poli(Glisidil Metakrilat) [m-PGMA] Mikrokürelerinin Sentezi	26
3.2.2. İminodiasetik Asit (İDA) Ligandının m-PGMA Mikrokürelerin Yüzeyine İmmobilizasyonu	27
3.2.3. Cu ²⁺ İyonlarının m-PGMA-İDA Mikrokürelerine Bağlanması	27
3.2.4. HSA Baskılanmış (MIP) ve Baskılanmamış (NIP) Manyetik Mikrokürelerin Hazırlanması	27

3.2.5. MIP'den HSA'nın Uzaklaştırılması	28
3.2.6. Karakterizasyon Çalışmaları	28
3.2.6.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi	28
3.2.6.2. SEM ile Yüzey Analizi	28
3.2.6.3. Termogravimetrik Analiz (TGA-DTA)	29
3.2.6.4. Şişme Testi	30
3.2.6.5. Zeta Boyut ve Yük Analizi	30
3.2.6.6. İmmobilize Bakır İyonu Miktarının Belirlenmesi	30
3.2.7. Adsorpsiyon Deneyleri	31
3.2.8. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	32
3.2.9. Seçicilik Çalışmaları	32
4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME	34
4.1. Albumin Baskılanmış Manyetik Poli(Glisidil Metakrilat) Mikrokürelerin Hazırlanması	34
4.2. Karakterizasyon Çalışmaları	36
4.2.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi	36
4.2.2. SEM ile Yüzey Analizi	37
4.2.3. TGA-DTA Termal Analiz Çalışmaları	41
4.2.4. Zeta Boyut ve Yük Analizi	44
4.2.5. İmmobilize Bakır İyonunun Miktarının Belirlenmesi.....	45
4.2.6. Mikrokürenin Şişme Özelliklerinin İncelenmesi	45
4.2.7. HSA Yükleme Miktarının Uzaklaştırma Oranına Etkisi	45
4.3. Adsorpsiyon Çalışmaları	46
4.3.1. pH'nın Etkisi	46
4.3.2. Sıcaklığın Etkisi	47
4.3.3. Başlangıç Derişimlerinin Etkisi	48
4.3.4. Adsorpsiyona Zamanın Etkisi	49

4.4. HSA Baskılı Mikrokürelerin HSA Adsorpsiyonuna İlişkin Adsorpsiyon İzotermi	50
4.5. Adsorpsiyon Kinetiği	54
4.6. Seçicilik Deneyleri	57
4.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	59
4.8. Literatür ile Karşılaştırma	60
5. YORUMLAR	63
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Moleküler tanıma sürecinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2. Moleküler baskılanmış polimer (MIP) için hazırlama ve tanıma süreci	8
Şekil 2.3. Moleküler baskılamada sıkça kullanılan fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcıların yapıları	11
Şekil 2.4. Yığın polimerizasyonu için moleküler baskılama sürecinin şematik diyagramı	13
Şekil 2.5. Protein immobilize edilmiş yüzey baskılama yönteminin şematik gösterimi	16
Şekil 2.6. Manyetik polimer kürelerin farklı yapılarının şematik gösterimi .	19
Şekil 2.7. Albuminin kalp şeklindeki üç boyutlu yapısı	21
Şekil.2.8. Çözeltideki albuminin elipsoid yapısı	22
Şekil 2.9. HSA'nın üç boyutlu yapısı .	23
Şekil 2.10. Onkotik basınç	24
Şekil 3.1. Metal koordinasyonu ile yüzey baskılanmış MIP'nin hazırlanması ...	29
Şekil 4.1. Metal koordinasyonu ile desteklenmiş yüzey protein baskılanmış m-PGMA mikrokürelerinin hazırlanması.....	35
Şekil 4.2. (a) MIP ve (b) NIP üzerine kalıp proteinin adsorpsiyonun şematik gösterimi.....	35
Şekil 4.3. (a) Saf İDA (b) m-PGMA, (c) m-PGMA-İDA mikrokürelerine ait FTIR- ATR spektrumları	36
Şekil 4.4. m-PGMA ve m-PGMA-İDA mikrokürelerine ait FTIR-ATR fark spektrumları	37
Şekil 4.5. (a) MIP ve (b) NIP mikrokürelerinin sem görüntüleri.....	38
Şekil 4.5. (a) MIP ve (b) NIP mikrokürelerinin sem görüntüleri (devamı).....	39

Şekil 4.6. m-PGMA'nın EDX spektrumu.....	39
Şekil 4.7. MIP'nin EDX spektrumu	40
Şekil 4.8. NIP'nin EDX spektrumu.....	40
Şekil 4.9. (a) 0.025 ve (b) 0.050 (c) 0.010 g Fe(II,III) oksit nano parçacıklar ile hazırlanan m-PGMA'nın TGA-DTA eğrisi.....	41
Şekil 4.10. Farklı miktarlardaki Fe'nin polimerdeki manyetit içeriğine etkisi	43
Şekil 4.11. m-PGMA kürelerin boyut dağılımı.....	44
Şekil 4.12. m-PGMA kürelerin zeta potansiyel grafiği	45
Şekil 4.13. m-PGMA kürelere HSA yüklenmesi ve uzaklaştırılma oranı.....	46
Şekil 4.14. HSA adsorpsiyonuna pH'nın etkisi..	47
Şekil 4.15. HSA'nın adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.....	48
Şekil 4.16. HSA başlangıç derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi.	49
Şekil 4.17. Zamanın HSA adsorpsiyon kapasitesine etkisi.....	50
Şekil 4.18. HSA baskılanmış mikrokürelerin HSA adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izotermi	52
Şekil 4.19. HSA baskılanmış mikrokürelerin HSA adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon izotermi	53
Şekil 4.20. HSA baskılanmış mikrokürelerin deneysel adsorpsiyon kapasitesi	53
Şekil 4.21. HSA baskılanmış mikrokürelerin yalancı birinci derece grafikleri ...	55
Şekil 4.22. HSA baskılanmış mikrokürelerin yalancı ikinci derece grafikleri	56
Şekil 4.23. 0.1 ve 0.5 mg/ml HSA baskılanmış ve baskılanmamış mikrokürelere farklı derişimlerdeki yarışmacı proteinlerin adsorplanan madde miktarları	58
Şekil 4.24. HSA baskılanmış mikrokürelerin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1: MIP'lerin sorunlarına olası çözüm yolları [10]	14
Çizelge 4.1: m-PGMA, MIP ve NIP'nin EDX spektrumlarından elde edilen kütle değerleri.	41
Çizelge 4.2: HSA baskılı mikroküreler için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması	54
Çizelge 4.3: HSA baskılanmış mikrokürelerin için yalancı birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri.....	56
Çizelge 4.4: Proteinlerin molekül ağırlığı ve izoelektrik noktaları.....	58
Çizelge 4.5: HSA baskılanmış ve baskılanmamış manyetik mikroküreler için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.....	59

1. GİRİŞ

İnsan serumu, enfeksiyon, inflamasyon, kanser, diyabet, malnütrisyon, kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer ve diğer otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığın belirteçlerinin tanımlanması ile fizyolojik durumların izlenmesi ve teşhisi için bir araçtır [1].

Bu nedenle plazma proteinin belirlenmesi ilgili hastalıkların erken tanısında önemli bilgiler sağlar. İnsan serumunun karmaşık yapısından dolayı olağan laboratuvar ölçümlerinin çoğundan farklı olarak serum proteinlerinin analizi oldukça zordur. Plazma proteomları yaklaşık bir milyondan fazla farklı protein içerir. Plazmadaki toplam kütleinin %99'u en bol bulunan 30 proteinden oluşmaktadır. Serum albumin yüksek miktarda bulunan proteinlerin %55-60'ını oluşturmaktadır. IgG, IgA, transferrin, haptoglobulin ve antitripsin yüksek miktardaki diğer beş proteindir [2].

Albümin 585 amino asit kalıntısından oluşmaktadır ve ağırlıklı olarak 17 disülfid köprüsüyle bir arada tutulan α -heliks içine düzenlenmiştir. HSA üç bölgeden oluşur. Yapısının dışı bir silindire benzer ve polardır, orta kısmı ise apolardır ve hidrofobik substratların bağlanmasını sağlar [3].

İnsan serum albumini (HSA), birçok endojen ve eksojen ligandların taşınması ve düzenlemesi için oldukça önemli bir proteindir. HSA ilaçlar, yağ asitleri, bilirubin, triptofan ve hormonlar olmak üzere birçok kimyasala tersinir olarak bağlanabilir ve onları taşıyabilir ayrıca organik / dolaşım ara yüzeyleri boyunca ligandların transferini kolaylaştırır [4].

Plazmada yüksek miktarda bulunan proteinlerin uzaklaştırılması ile serum karmaşıklığı azaltılarak onların biyobelirteçler üzerindeki maskeleyen etkisi en aza indirilebilir [5]. Bu nedenle, yüksek miktarda proteinlerin uzaklaştırılması için ucuz ve son derece etkili teknikleri kullanmak önemlidir [6].

Albumin uzaklaştırılması için çeşitli stratejiler vardır. Genel olarak albümin çözücü ekstraksiyonu ile ya da sulu çözeltiden çökeltme ile hayvan dokusundan izole edilir. Bununla birlikte albüminin çok saf olması isteniyorsa, izole edilmiş tek bir proteinin ekstraksiyonu zordur ve jel filtrasyonu, preparatif elektroforez ve preparatif kromatografi gibi özel yöntemler gerekir. Günümüzde proteinlerin

ayrılması çeşitli kromatografik yöntemlerle, seçimli adsorpsiyonla ve soft gels uygulamaları ile gerçekleştirilir [7].

Moleküler baskılama kalıp molekül varlığında monomerlerin polimerizasyonu ile kalıp molekül için spesifik bağlanma bölgelerine sahip polimerlerin sentezi için kullanılan modern bir tekniktir [8].

Moleküler baskılanmış polimerler moleküler tanıma özelliklerinin bir sonucu olarak araştırma odağı olmuştur ve spesifik moleküler türlerin bağlanması ve ayrılmasını gerektiren uygulamalar için oldukça ilgi çekmektedir. Bu polimerler kısmi olarak kolay hazırlanabilir, kimyasal bileşenlerin büyük bir kısmı baskılanabilir ve bu polimerlerin mekanik ve kimyasal kararlılığı kromatografiden, tahliller, sensör teknolojisi, kataliz ve kontrollü salınım sistemlerine kadar uzanan birçok alanda onları son derece önemli kılmıştır [9].

Şimdiye kadar kalıp molekül olarak polipeptitler, proteinler, bakteriler ve özellikle düşük molekül ağırlıklı bileşikler kullanılmıştır. Fakat moleküler baskılama alanında, suda çözülebilir biyolojik makromoleküllerin baskılanması oldukça zordur çünkü onların konformasyonel bütünlüğünün sağlanması için doğal ortamlarına uygun şartlarda baskılanmaları gerekir. Ayrıca proteinlerin oldukça esnek konformasyonu, yüzey yapılarının karmaşıklığı ve protein dizilerinin çeşitliliği gibi başlıca problemler nedeniyle proteinlerin bu tür baskılanmasında sınırlı bir başarı elde edilmiştir. Bunun dışında, biyolojik makromoleküllerin büyük yapıları çapraz bağlı polimer ağ içerisinde hareket kısıtlaması ve yeniden bağlanma veriminin azalmasına neden olur [8].

Biyolojik makromolekül baskılanmış polimerleri hazırlamak için yüzey baskılama, epitop aracılı baskılama, mikrokontakt baskılama, metal koordinasyon yöntemi ve protein baskılanmış hidrojel gibi özellikle protein baskılanmış polimerleri hazırlamak için birçok strateji ileri sürülmüştür. Protein baskılama için kullanılan bu teknikler arasından yüzey baskılama şu anda proteinin büyük bir molekül olmasından kaynaklanan difüzyon kısıtlaması sorununu çözmek için en popüler ve genel bir yöntemdir [10].

Manyetik ayırma santrifüj ve filtrasyon gibi herhangi bir ön işlem gerektirmeden bir karışımdan ürünün doğrudan saflaştırılmasında kullanılan kolay, yüksek verimli ve düşük maliyetli bir yöntem olduğu için son zamanlarda biyolojik

uygulamalarda oldukça ilgi uyandırmıştır. Manyetik ayırma baskılanmış polimer ile birleştirildiğinde manyetik baskılanmış polimerler sadece hedef proteinleri seçimli olarak tanımayı sağlamaz aynı zamanda dış manyetik alan ile kolay bir şekilde toplanıp ayrılabilir [11].

Bu çalışmada metal koordinasyon ve yüzey moleküler baskılama tekniğinin birleştirilmesi ile HSA'nın spesifik tanınması için yeni tür manyetik afinite malzemeler sentezlendi.

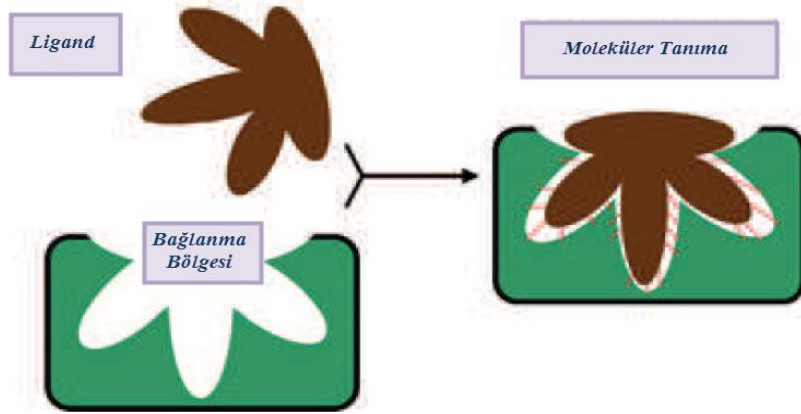
Protein afinite malzemesi hazırlamak için metal koordinasyonuna dayalı yüzey baskılanmış manyetik poli(glisidilmetakrilat) (m-PGMA) mikroküreleri hazırlandı. Çalışmanın ilk aşamasında, epoksi grubu taşıyan m-PGMA mikroküreleri dispersiyon polimerizasyon yöntemi ile sentezlendi. İkinci aşamada, üç dişli bir şelatör olan iminodiasetikasit (İDA) mikroküre yüzeyindeki erişilebilir reaktif epoksi gruplarına kovalent olarak bağlandı ve sonrasında Cu^{2+} metal iyonu yüklenerek mikroküreye bağlı olan ligand (İDA) ile geçiş metal iyonu Cu^{2+} arasındaki etkileşim sonucunda koordinasyon kompleksi oluşumu sağlandı. Son aşamada m-PGMA-İDA- Cu^{2+} destek malzemesine insan serum albümin (HSA) immobilize edildi ve yüzey silan polimerizasyonu ile da HSA'ya spesifik metal koordinasyonuna dayalı yüzey baskılanmış m-PGMA biyomalzemesi hazırlandı.

Elde edilen HSA baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış m-PGMA (NIP) mikroküreler FTIR, SEM, EDX, DTA, TGA, boyut dağılım analizi ve zeta potansiyeli ile karakterize edildi. MIP ve NIP'nin kesikli sistemde adsorpsiyon kapasitesine pH, sıcaklık, derişim ve zaman faktörlerinin etkisi ayrıntılı olarak incelenerek adsorpsiyon çalışmaları optimize edilmiştir ve farklı derişimlerde HSA baskılanmış mikrokürelerin sığır serum albümin (BSA), lizozim (Liz), sitokrom C'ye (Cyt C) karşı seçicilik çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskılama, umut verici ve hızla gelişen bir teknolojidir [12]. Moleküler baskılama teknolojisi (MIT) doğal moleküler tanımayı taklit etmek için dikkat çeken sentetik bir yaklaşımdır [13]. Hedef moleküle benzer moleküller olduğunda, hedef molekülü seçimli tanıma yeteneği, biyolojik ve kimyasal işlemler için gereklidir. Moleküler tanıma, doğada her yerde meydana gelen bir olaydır. Moleküler tanıma, iki molekül hem kimyasal hem geometrik olarak birbirini tamamladığı zaman yani iki molekül birbirine hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, zayıf metal koordinasyonu gibi kovalent olmayan bağlarla bağlandığında ya da uzaysal olarak birbirine uygun olduğu zaman meydana gelir. Bu sürece, bir enzimin bir substrata, bir ilacın biyolojik bir hedefe bağlanmasını, immün sistemdeki antijen/antibadi tanımasını, DNA kalıp moleküllerinden haberci RNA'nın oluşumunu örnek olarak verebiliriz. Bu nedenle moleküler tanıma tüm yaşam süreçlerinde itici güç olarak düşünülebilir [14].



Şekil 2.1. Moleküler tanıma sürecinin şematik gösterimi [15]

Moleküler baskılama teknolojisi (MIT) bir kalıbın belleğine sahip bir polimer matrikste seçici bölgelerin oluşumuna dayanır [10]. Moleküler baskılama özellikle MIP denilen 'Molekül Baskılanmış Polimer' için bir polimerik malzeme içinde, kalıp denilen bir hedef molekülü, spesifik olarak bağlamak için boşlukların olası şeklini oluşturan bir teknolojidir. Bu boşluklar hedef molekül

çevresinde, çapraz bağlayıcı ve fonksiyonel monomerin polimerizasyonu ile oluşur. Elde edilen polimerden hedef molekül uzaklaştırılır [16] ve bağlanma bölgeleri hedef moleküle büyüklük, şekil ve fonksiyonel grupların yerleşimi olarak tamamlayıcıdır. Böylece hedef molekülü seçimli olarak tekrar bağlayabilen polimer üzerine, bir moleküler 'bellek' baskılanmış olur (Şekil 2.1) [17].

MIP'ler, diğer tanıma sistemleri ile karşılaştırıldığında, düşük maliyet, kolay sentez, sert kimyasal ve fiziksel koşullar için yüksek kararlılık ve tekrar kullanılabilirlik gibi özelliklere sahip oldukları için MIP'ler özellikle katı faz ekstraksiyonu için seçici adsorban (SPE), kromatografik ayırma ve kimyasal sensörler gibi birçok alanda giderek daha cazip hale gelmiştir [10].

MIP'ler dört farklı yaklaşımla baskılanabilir;

1. Kovalent Olmayan Baskılama

Deneysel olarak nispeten basit olduğu için en yaygın kullanılan prosedürdür. Sentez sırasında kompleksleşme basamağında uygun bir porojende (çözücü) uygun bir monomerin ya da monomerlerin kalıp molekül ile karıştırılmasıyla gerçekleşir. Sentez sonrasında kalıp molekül, bir çözücü ya da çözücü karışımı ile yıkanarak basit bir şekilde elde edilen polimerden uzaklaştırılır. Daha sonra MIP ile kalıp molekülün yeniden bağlanması kovalent olmayan etkileşimlerle gerçekleşir [18].

Baskılanmış moleküller hem baskılama süreci hem de yeniden bağlanma sırasında iyonik, hidrofobik ve hidrojen bağları gibi kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla polimerle etkileşir. Hidrojen bağı moleküler baskılanmış polimerin moleküler tanıma etkileşimi olarak sıkça kullanılır. Bu açıdan akrilik asit ve metakrilik asit genellikle, karboksil grubunun aynı anda bir hidrojen verici ve bir hidrojen alıcısı olarak işlev görmesinden dolayı fonksiyonel monomerler olarak kabul edilirler. Kovalent olmayan etkileşimler, asit ve bazların sulu çözeltileri ya da metanolle muamele ile kolay bir şekilde ortadan kaldırılır. Böylece polimerizasyon sonrasında ağdan kalıp molekül uzaklaştırılabilir. Ayrıca kovalent olmayan yaklaşım kalıp molekülün hızlı ve tersinir olarak bağlanmasını sağlar [19].

2. Kovalent Baskılama

Polimerizasyon işleminden önce kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında kovalent bağların oluşumuyla gerçekleşir. Sentez sonrasında kalıp molekülün polimer matriksinden uzaklaştırılması için kovalent bağlar kırılır [18]. Bu yöntemde boronik asit esterleri, ketaller, disülfid bağları, asetaller ve shiff bazları monomer olarak kullanılmaktadır [14].

Kovalent baskılama yönteminde, kovalent bağların yüksek kararlılığı, bağlanma bölgelerinin daha homojen bir şekilde dağılımını sağlar. Özdeş yeniden bağlanma bölgelerinin oluşumu fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasında hızlı ve tersinir kovalent bağlar gerektirdiğinden kovalent baskılama için uygun kalıp molekül sınırlıdır. Ayrıca kuvvetli kovalent bağlardan dolayı yavaş bağlanma ve ayrılma termodinamik dengeye ulaşmayı zorlaştırır [18].

3. Yarı-Kovalent Baskılama

Kovalent ve kovalent olmayan baskılama yöntemlerinin birleştirilmesi ile ortaya çıkmıştır. Polimerizasyondan önce kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasında kovalent bağ oluşurken polimer matriksinden kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra analitin MIP'e yeniden bağlanması kovalent olmayan baskılama protokolünde olduğu gibi kovalent olmayan etkileşimlerle olur [18].

Yarı-kovalent yaklaşım, kovalent baskılama ile homojen bağlanma bölgeleri oluşumu ve kovalent olmayan baskılama ile de hızlı yeniden bağlanma kinetiği gibi avantajlar sağlar [20].

4. Metal-Şelat Etkileşimli Baskılama

Yüksek seçicilikle tanıma özelliklere sahip özel tasarlanmış sentetik bir polimer olan moleküler baskılanmış polimerler, bugüne kadar daha çok kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında bağlayıcı kuvvet olarak tanımlanan kovalent olmayan etkileşimler (elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri gibi) kullanılarak hazırlandı.

Kovalent olmayan etkileşimler, polimerlere hızlı ve tekrarlanabilir bağlanma kinetikleri sağlamasına rağmen tanıma yeteneği, her bir etkileşimin zayıf doğası ile sınırlıdır.

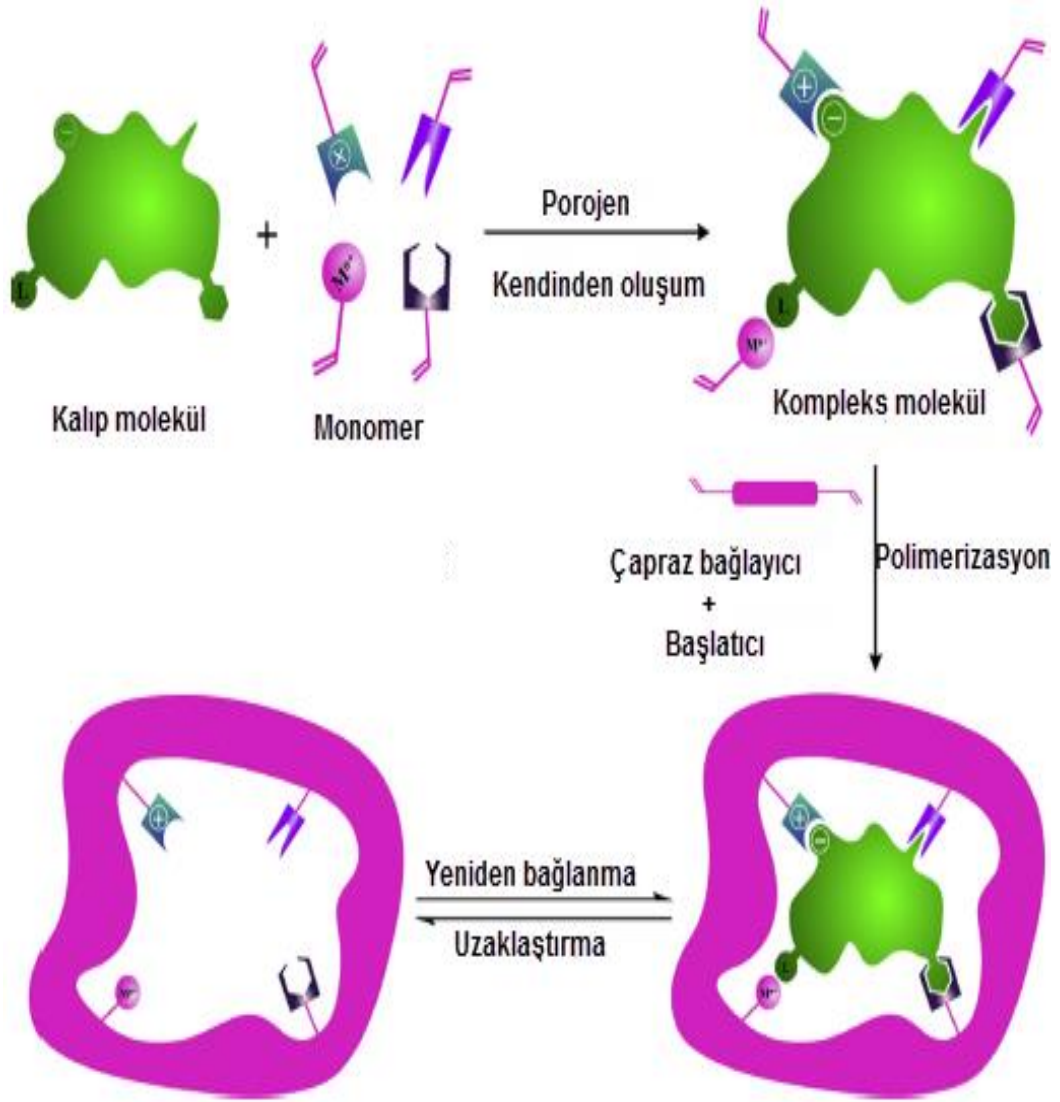
Moleküler tanıma için oldukça uygun olan metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimleri moleküler baskılama için diğer etkileşimlere göre daha önemli avantajlar sağlar: 1) Metal şelat etkileşimleri genellikle hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimlerinden daha kuvvetli olduğu için fonksiyonel monomerlerin gelişigüzel birleşmesini önemli ölçüde azaltır; 2) Bu etkileşim su-alkol sisteminde kararlıdır; 3) Kovalent olmayan bir güce sahiptir [12].

Özellikle hidrojen bağlarının etkin olduğu baskılama sistemlerine göre, çözücü profilinin su da dahil olmak üzere geniş sınırlarda kullanılabilmesi ve baskılanacak tamamlayıcı ligandın geometrik yönelmesinin seçiciliğe getirdiği avantaj nedeniyle metal-şelat etkileşimlerine dayanan baskılama sistemlerinin daha çok tercih edilmesiyle birlikte, bağlanma kuvveti ve bağlanma kinetiği metal iyonu seçimiyle ayarlanabilir [11].

Metal-kompleks yapıcı baskılanmış polimerin kalıp molekülü tanımasında önemli bir rol oynayan metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimleri iki kısımdan oluşur:

- 1- Baskılama etkisi ile üretilen baskılama boşluğu ve substrat arasındaki spesifik metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimleri
- 2- Spesifik olmayan metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimleri

Metal-kompleks yapıcı baskılanmış polimerin substratı tanıması spesifik metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimlerine ve baskılama etkisi ile üretilen baskılama boşluğu ve substrat arasındaki spesifik hidrofobik etkileşimlere dayanır. Spesifik olmayan metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimlerinin seçimli tanımaya katkısı yoktur. Spesifik olmayan metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimleri ve spesifik olmayan hidrofobik etkileşimleri sadece metal-kompleks yapıcı baskılanmış polimerde substratın daha iyi tutunmasını sağlar [12].



Şekil 2.2. Moleküler baskılanmış polimer (MIP) için hazırlama ve tanıma süreci [21]

Moleküler baskılanmış polimerler yüksek fiziksel dayanıklılık, yüksek sıcaklığa ve basınca karşı dirençlilik, asitlere, bazlara, metal iyonlarına ve organik çözücülere karşı kararlılık, düşük maliyetle, kolay bir şekilde hazırlanabilme gibi avantajlara sahipken geleneksel yöntemlerle hazırlanan MIP'lerin bazı uygulamalarda düşük verimli kütle aktarımı, hedef molekülün ulaşabileceği zayıf bölgeler ve bağlanma bölgelerinin heterojen dağılımı gibi bir takım dezavantajları vardır. Ayrıca polimerizasyon sistemlerinin çoğu suyla uyumlu değildir. Bu problemler için ideal bir çözüm sol-jel yöntemi ile moleküler yüzey baskılama tekniğinin gelişmesidir [20, 22].

2.1.1. Moleküler Baskılama Reaktifleri

Polimerizasyon tepkimesi, monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcının konsantrasyonu ve türü, polimerizasyon sıcaklığı ve süresi, manyetik alan polimerizasyon karışımının hacmi gibi bazı faktörlerin etkilediği oldukça kompleks bir süreçtir. İdeal bir baskılanmış polimer elde etmek için çeşitli faktörler optimize edilmelidir. Bu nedenle MIP'lerin sentezi zaman alıcı bir süreçtir. Mükemmel özelliklere sahip MIP'ler hazırlamak için polimerik materyallerin tanıma özelliklerinin üzerine bazı etkileri incelemek için sayısız girişimler olmuştur. Moleküler baskılama sürecinde, uygun reaktiflerin seçimi önemli bir adımdır.

Genel olarak analitik işlemlerde, kalıp moleküller hedef bileşikleridir. İdeal bir kalıp molekülün aşağıdaki üç gereksinimi karşılaması gerekir.

1. Kalıp molekül polimerizasyon tepkimesini engelleyecek gruplar içermemelidir.
2. Kalıp molekül polimerizasyon tepkimesi sırasında mükemmel bir kimyasal kararlılık göstermelidir
3. Kalıp molekülü, fonksiyonel monomerlerle birleştirmek için uyumlu fonksiyonel grupları içermelidir.

Moleküler baskılamada kullanılan çoğu kalıp moleküller çevre kirleticilerden türetilen, endokrin bozucu kimyasallar (EDCs), ilaç (farmasötikler) ve toksik metal iyonlar olmak üzere üç geniş kategoride gruplandırılırlar.

Monomerin rolünü, kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle kalıp molekülle bir kompleks oluşturabilen fonksiyonel gruplar sağlamaktadır [23, 24]. Kalıp molekül ve monomer arasındaki etkileşimlerin gücü, MIP'lerin afinitesini ve tanıma bölgelerinin doğruluğunu ve seçiciliğini etkiler [25]. Daha güçlü bir etkileşim ile daha kararlı kompleks elde edilir ve MIP'lerin daha yüksek bağlama kapasitesiyle sonuçlanır. Bu nedenle, fonksiyonel monomerlerin doğru seçimi oldukça önemlidir. Uygun bir monomerin seçimi için genellikle uğraştırıcı deneme - yanılma testleri kullanılır. MIP'leri uygun bir şekilde sentezlemek ve rasyonel tasarımını gerçekleştirmek için spektroskopik ölçümler (nükleer manyetik rezonans, UV-vis, Fourier-transform infrared spektroskopisi v.b.), bilgisayar simülasyonu ve izotermal titrasyon kalorimetrisi gibi çeşitli stratejiler

kalıp moleküle daha kararlı bir kompleks oluşturabilecek en uygun fonksiyonel monomeri seçmek için kullanılmıştır.

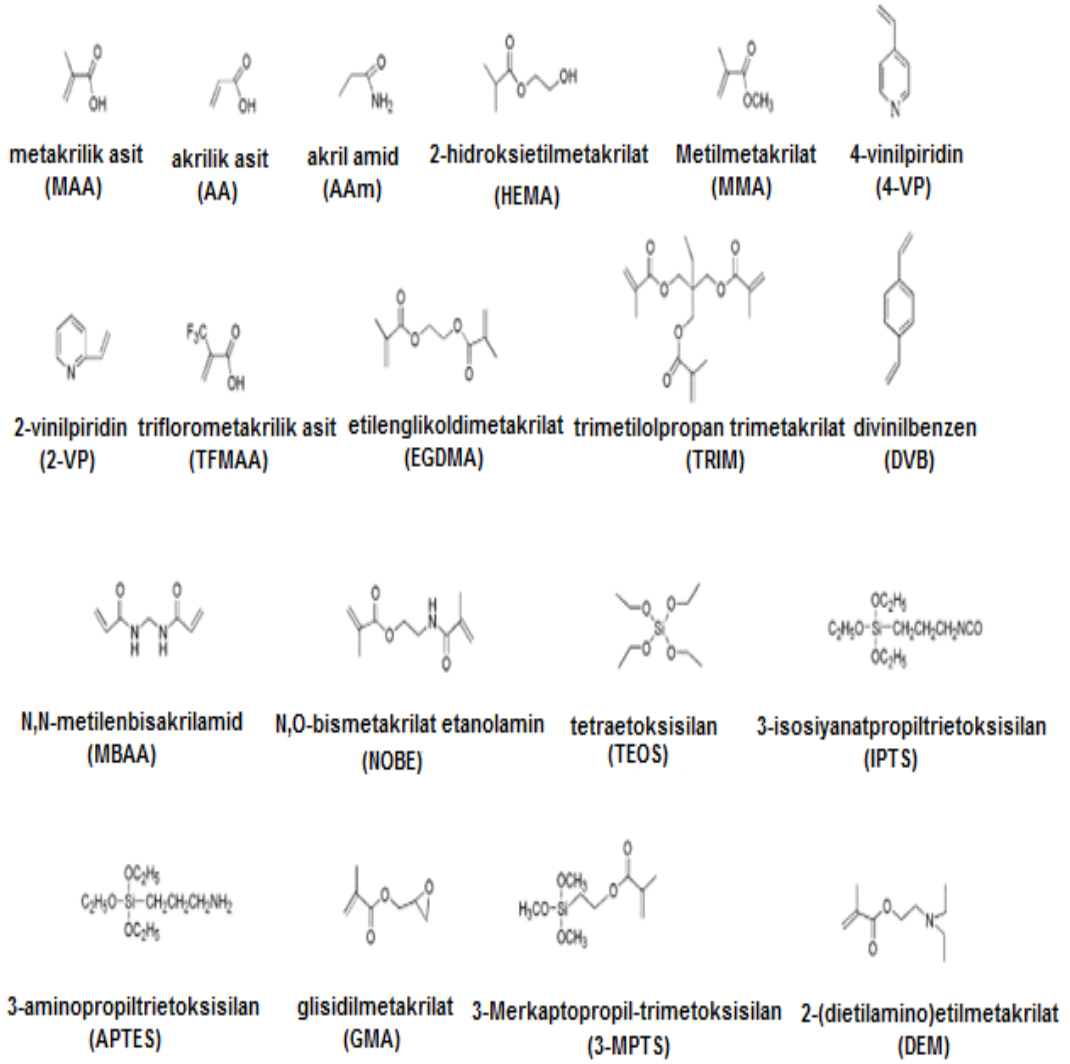
Moleküler baskılama için metakrilik asit (MAA), glisidilmetakrilat (GMA), akrilik asit (AA), 2- ya da 4 vinilpiridin (2- ya da 4-VP), akrilamid, triflorometakrilik asit (TFM) ve 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomerleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Şekil 2.3'te çeşitli monomerlerin yapıları gösterilmektedir. MAA'nın bir hidrojen bağı vericisi ve alıcısı olarak hareket etme yeteneğine sahip olması ve iyonik etkileşimler için uygunluğunu gösteren, kendine özgü özellikleri nedeniyle "evrensel" fonksiyonel monomer olarak kullanılmaktadır [26].

Genellikle sentez aşamasında, monomer ve kalıp molekül arasındaki molar oran MIP'lerin baskılama verimini ve afinitesini etkiler. Düşük molar oranları, daha az miktarda kalıp-monomer kompleksinden dolayı polimerde daha az bağlanma bölgesi oluşturur ama oldukça yüksek molar oranlar daha fazla spesifik olmayan bağlanma kapasitesi oluşturmasına rağmen bağlanma seçiciliği azalır. Bu nedenle yüksek verimlilikte baskılama verimi elde etmek için, kalıbın monomere molar oranı optimize edilmelidir.

Çapraz bağlayıcı, baskılanmış moleküllerin çevresindeki fonksiyonel monomerlerin fonksiyonel gruplarını sabitlet ve böylece yüksek derecede çapraz bağlı rijit polimer oluşur. Kalıp moleküllerin uzaklaştırılmasından sonra oluşan boşluklar tamamen hedef molekülün şeklini ve fonksiyonel gruplarını tamamlayıcı şekilde olmalıdır. Çapraz bağlayıcı türleri ve miktarları, MIP'lerin bağlama kapasitesi ve seçiciliği üzerinde oldukça etkilidir. Çapraz bağlayıcılar oldukça düşük miktarda olduğunda, MIP'ler düşük çapraz bağlanma derecesinden dolayı kararlı boşluk konfigürasyonlarını koruyamaz. Ancak oldukça yüksek miktardaki çapraz bağlayıcılar, MIP'lerin kütle birimi başına tanıma bölgelerinin sayısını azaltacaktır. Şekil 2.3'te etilenglikoldimetakrilat (EGDMA), trimetilolpropantrimetakrilat (TRIM), N,N-metilenbisakrilamid (MBAA) ve divinilbenzen (DVB) gibi yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcıların yapıları gösterilmektedir.

Porojenik çözücü, polimerizasyonda oldukça önemlidir. Porojenik çözücü sadece porojen gibi değil aynı zamanda hazırlama sürecinde çözücüdür. Ayrıca

porojenik çözücü özellikle kovalent olmayan etkileşim sistemi içinde fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasındaki bağlanma kuvvetini, polimerin özelliğini ve morfolojisini etkiler. Toluen, asetonitril ve kloroform gibi aprotik ve düşük polar organik çözücüler, iyi bir baskılama verimi elde etmek için, genellikle kovalent olmayan polimerizasyon işlemlerinde kullanılır. Bu MIP'lerin "çözücü belleği" nedeniyle sulu ortamda zayıf organik çözücü çalışmalarıyla hazırlanmış olması dikkat çekicidir. Son zamanlarda su uyumlu MIP'lerin gelişimi oldukça ilgi çekici bir alandır [10].



Şekil 2.3. Moleküler baskılamada sıkça kullanılan fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcıların yapıları [10]

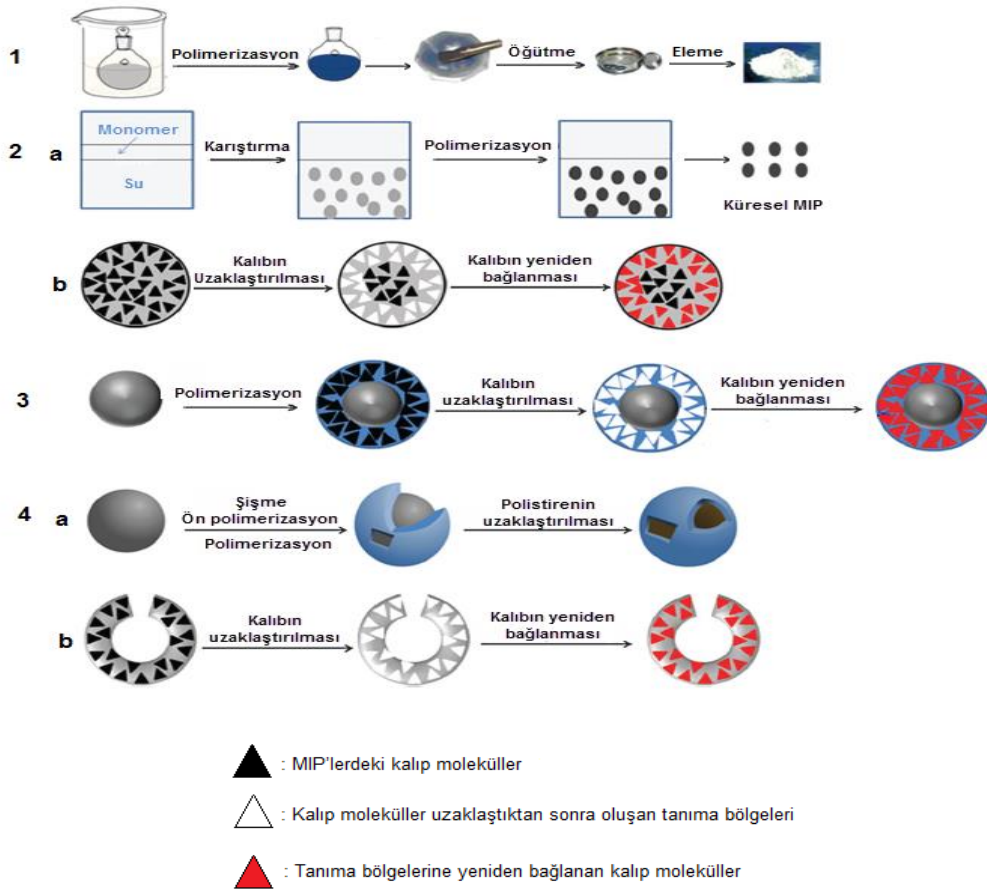
MIP hazırlama yöntemleri

Molekül baskılanmış polimer hazırlama yöntemi olarak aşağıdaki yöntemler verilebilir:

1. Yığın (Bulk) polimerizasyonu
2. Süspansiyon polimerizasyonu
3. Dispersiyon polimerizasyonu
4. Kimyasal bağlanma
5. Yumuşak litografi
6. Moleküler kendiliğinden oluşum yaklaşımı
7. Elektropolimerizasyon

Moleküler baskılamada genel olarak yığın polimerizasyonu yöntemi kullanılmasına rağmen bu yöntem elde edilen katı polimerin parçalanıp uygun boyutlara öğütülmesiyle kullanıldığı için ekstra bir işlem gerektiren zaman alıcı bir yöntemdir [27].

Şekil 2.4'te farklı yöntemlerle moleküler baskılama süreci gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Yiğın polimerizasyonu için moleküler baskılama sürecinin şematik diyagramı (1); süspansiyon polimerizasyon ya da emülsiyon polimerizasyon (2a); yüzey baskılama (3); hollow baskılanmış polimerler (4a). Katı küresel MIP'lerde kalıp molekülün uzaklaştırılması ve yeniden bağlanması, çekirdek-kabuk yapısındaki MIP'ler ve hollow MIP'ler sırasıyla 2b, 3 ve 4b'de gösterilmiştir [10].

2.1.2. Moleküler Baskılama Teknolojisinin Zorlukları

Yukarıda belirtildiği gibi, MIP'lerin özellikleri daha kararlı, üretimi kolay ve daha düşük maliyetli olma gibi bazı yararlar sağlarken, antibadilerin, enzimlerin ya da biyolojik reseptörlerin seçimliliğini ve afinitesini korur [28]. Bu arada günümüzde MIT hala biyolojik makromoleküllerin baskılması, kalıp molekül sızması, düşük bağlama kapasitesi ve sulu ortamla uyumsuzluk gibi ciddi zorluklarla karşı karşıyadır. MIP'lerin mevcut problemleri için muhtemel çözüm yolları Çizelge 2.1'de özetlenmiştir. MIT'de mevcut sorunlardan bahsetmek ve MIP'lerin performanslarını arttırmak için son yıllarda önemli girişimler yapılmıştır [10].

Çizelge 2.1: MIP'lerin sorunlarına olası çözüm yolları [10]

Problem	Çözüm
Protein baskılama	(1) Yüzey baskılama (2) Epitop aracılı baskılama (3) Metal koordinasyon yöntemi (4) Poliakrilamid soft jel baskılama
Sulu ortam ile uyumsuzluk	(1) İki basamaklı ekstraksiyon (2) Sulu fazda hidrofilik monomer kullanılan ya da hidrojen bağı etkileşimi içermeyen (metal-şelat ya da hidrofobik etkileşimler) polimerizasyon (3) MIP'lerin yüzey modifikasyonları (RAM-MIP)
Kalıp molekülün sızması	(1) Dummy moleküler baskılama (2) Nano yapı baskılanmış polimer (3) Gözenekli baskılanmış polimer
Heterojen bağlanma bölgeleri	(1) Yarı kovalent baskılama ya da kovalent baskılama (2) Düşük afiniteli bölgelerin seçimli kimyasal modifikasyonu
Hidrofilik bileşik baskılama	(1) Dummy moleküler baskılama (Kalıp olarak iyon çifti) (2) Sulu ortamda baskılama

2.2. Protein Baskılama Yöntemi

Moleküler baskılama teknolojisinde 40 yıl boyunca kalıp molekül olarak en önemli biyolojik makromoleküllerden biri olan proteinlerin baskılanması üzerine yoğun bir şekilde araştırmalar yapılmış fakat bu konudaki ilerleme yavaş olmuştur [29, 30]. 2007'den önce protein baskılamada elde edilen ilerleme Bossi [30], Janiak [31], Turner [32], ve Hansen [18] tarafından özetlenmiştir [10, 33].

Moleküler baskılamada, küçük moleküllerin baskılanması basitken, proteinler gibi biyomakromoleküllere dayalı MIP'nin hazırlanması bir sorun olmaya devam etmektedir.

Moleküler baskılama alanında, suda çözülebilir biyolojik makromolekülerin baskılanması oldukça zordur. Çünkü onların konformasyonel bütünlüğünün sağlanması için doğal ortamlarına uygun şartlarda baskılanmaları gerekir. Bunun dışında, proteinlere özgü özellikler bu teknoloji için engel oluşturmaktadır. Proteinler, molekül ağırlıkları 6000 Da'dan birkaç milyon Da arasında değişen biyomakromoleküllerdir. Proteinlerin büyük boyutlarda olması, yüksek derecede çapraz bağlı polimer ağlarının içerisine proteinlerin sınırlı transferi ve proteinlerin yapay bağlanma bölgelerine ulaşmasını ve ayrılmasını engelleyerek yeniden bağlanma veriminin azalmasına neden olabilir [10, 33, 34].

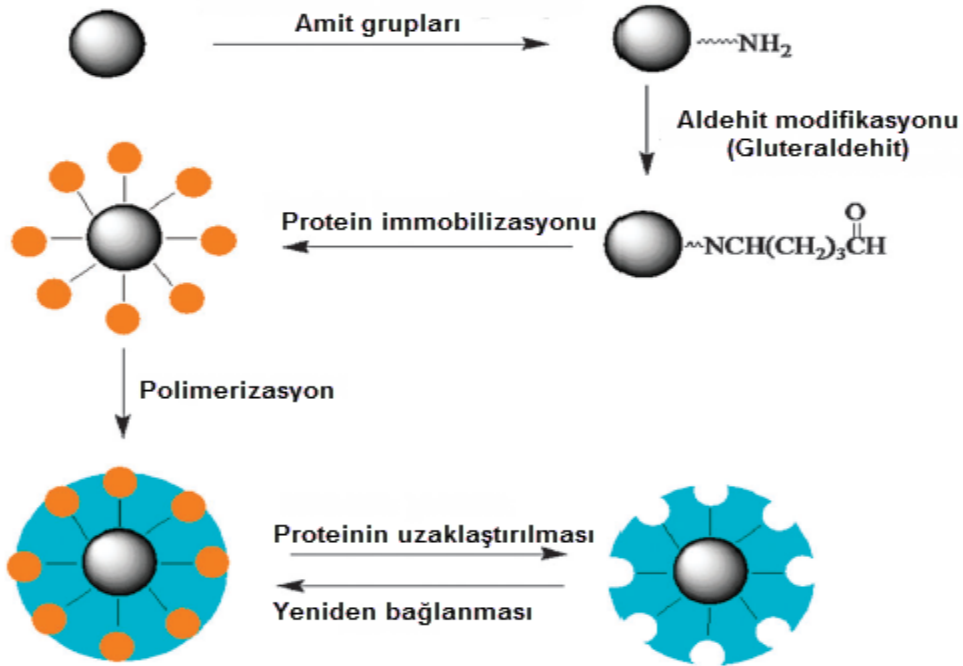
Proteinlerin yüzeyinde çok sayıda fonksiyonel grup ve potansiyel bağlanma bölgeleri vardır ve bu karmaşıklık, MIP'ler ve proteinler arasında oluşacak spesifik olmayan etkileşimlerle artar. Bu durum kötü seçimliliğe ve çapraz reaktiviteye neden olur.

Daha da önemlisi, proteinler genellikle MIP'lerin sentezinde kullanılan organik çözücüler ile uyumlu değildir. Moleküler baskılama işlemi için sulu çözelti kullanımı, büyük ölçüde reaktif fonksiyonel monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların seçimini büyük ölçüde kısıtlar.

Ayrıca su yarışmacı molekül olarak davranır ve kalıp molekülle fonksiyonel monomerler arasındaki herhangi bir hidrojen bağı bozabilir. En çok kullanılan ve pratik bir yaklaşım olan kovalent olmayan moleküler baskılamada hidrojen bağlarının önemli bir rol oynadığını göz önüne alındığında, su ideal bir çözücü değildir. Çözücüler ile uyumsuz olmasına ek olarak, proteinler sıcaklık, pH ve iyonik kuvvetlere duyarlıdır ve bunların aşırısı denatürasyona, konformasyonel değişikliklere ya da agregasyona neden olabilir. Yukarıdaki tüm faktörlerle birlikte bazı saf proteinlerin sentezlenmesindeki yüksek maliyet, pratik ve etkili bir protein baskılamayı zorlaştırır. Protein baskılama yaklaşımları genel olarak yığın baskılama, yüzey baskılama ve epitop baskılama olmak üzere üç kategoride sınıflandırılabilir. Bu baskılanmış protein kalıbının baskılanmış kısmına ya da parçasına bağlıdır (yani proteinin tamamı, proteinin bir kısmı veya proteinin küçük bir epitop parçası) [33].

Protein baskılama için kullanılan bu teknikler arasından yüzey baskılama şu anda proteinin büyük bir molekül olmasından kaynaklanan difüzyon kısıtlaması sorununu çözmek için en popüler ve genel bir yöntemdir. Kalıp moleküllerin, baskılanmış proteinlerin, yüzeydeki yerleşimlerinin kontrolü katı substratların yüzeyine kalıp moleküllerin kovalent immobilizasyonu ile gerçekleşir. Örneğin; kalıp moleküllerin agregasyonu (kümeleşmesi) azaltılarak bağlanma bölgeleri daha homojen olur ve böylece ön polimerizasyon karışımındaki çözünmez kalıp molekülleri bu yöntemle kolayca baskılanabilir.

Şekil 2.5'te gösterildiği gibi genellikle protein immobilize baskılama işlemi ardışık beş aşamada gerçekleşir. İlk olarak destek yüzeyindeki amino gruplarındaki, amino ve glutaraldehidin tepkimesi ile aldehyd grupları oluşur ve kovalent bağla kalıp molekülün destek yüzeyine immobilizasyonundan sonra polimerizasyon gerçekleşir. Kalıp molekülün uzaklaştırılmasından sonra ise yüzey baskılanmış materyallerde protein için spesifik bağlanma bölgeleri oluşur [10].



Şekil 2.5. Protein immobilize edilmiş yüzey baskılama yönteminin şematik gösterimi [10].

2.3. Yüzey Baskılama

Moleküler baskılanmış polimerler genellikle bir organik çözücü içerisinde hazırlanır. Bu nedenle moleküler baskılanmış polimerler, geleneksel moleküler baskılama teknikleriyle (peptitler, oligonükleotitler gibi biyomoleküller) metal iyonları gibi suda-çözünür hedef moleküller için doğrudan uygulanamazlar. Bu sorunu aşmak için, "yüzeyde moleküler baskılama" olarak adlandırılan gelişmiş bir moleküler baskılama tekniği geliştirildi [35]

Yüzey baskılama tekniğinin temeli, baskılanan molekülün tanıma bölgelerinin polimerin yüzeyine ya da polimer yüzeyinin çok yakınına yerleştirmeye dayanmaktadır [36]. Yüzey baskılama yaklaşımı kullanılmasıdaki en önemli etken, MIP'lerin yüksek çapraz bağlı doğalarından dolayı bulk materyallerinin iç kısmında bulunan orijinal kalıpların ekstraksiyonun oldukça zor olması ve bu durumun kalıp molekülün tamamen uzaklaştırılmamasına, düşük bağlanma kapasitesine ve yavaş kütle aktarımına neden olmasıdır. Neyse ki bu problemler MIP'lerin performansını geliştirmek için yaygın bir şekilde çalışılan yüzey baskılama ile çözülebilir [10]. Yüzey baskılamada baskılanmış kalıp molekül malzemenin yüzeyine ya da yüzeyine yakın yerde yer alır ve böylece hedef moleküle erişim çok daha kolay olur [37]. Geleneksel MIP'lerle karşılaştırıldığında, yüzey baskılanmış polimerler sadece yüksek bağlanma kapasitesine değil aynı zamanda daha hızlı kütle aktarımı ve bağlanma kinetiğine sahiptir [10].

En yaygın protein MIP stratejisi olan yüzey baskılamada bağlanma bölgeleri, polimer yüzeyinde veya polimer yüzeyinin çok yakınında bulunur. Bu yığın baskılama ince bir polimer filmi sentezleyerek ya da polimerizasyonla meydana gelen bir substratın yüzeyine (düz ya da küresel) kalıp proteini tutturarak gerçekleştirilir. Bu yöntem büyük moleküllerin ağ içine ya da dışına difüzyonunu kolaylaştırır [36]. Makromoleküllerin baskılanmasında difüzyon kısıtlaması oldukça önemli bir konu olduğu için, makromoleküllerin baskılanmasında bu gelişme oldukça önemlidir. Yüzey baskılama için, altın ve karbon gibi uygun malzemelerin üzerine ince MIP filmlerin yaratılması da oldukça yaygın bir yaklaşımdır ve bu yaklaşımın kuartz kristal mikroterazi (QCM), yüzey plasmon rezonans (SPR) gibi tekniklerle sensör elektrotlarda doğrudan oluşturulan bu ince filme uygulanabilmesi oldukça avantaj sağlar.

Yüzey baskılama özellikle biyoanalitik kimya alanında olmak üzere uygulama alanını genişletmekteyken, morfolojisi kontrol edilebilen MIP'lerin endüstriyel seri üretim için kullanılma olasılığını ve ayırma için moleküler baskılamanın uygulanabilirliğini arttırır. Bu nedenle yüzey baskılanmış MIP kürelerini geliştirmek için iki yaklaşımın avantajları birleştirilmiştir [20].

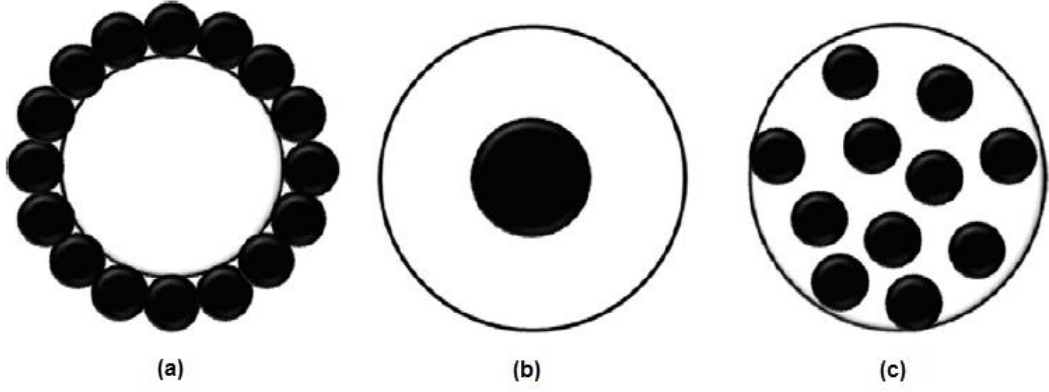
2.4. Manyetik Polimer Küreler

Yeni gelişen bir teknoloji olan manyetik ayırma çoğunlukla biyoayırma alanında kullanılmaktadır [38]. Manyetik ayırma tekniklerinde yüksek manyetik cevaplılığa, çeşitli aktif fonksiyonel gruplara, kararlı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip iyi dağılmış manyetik ortamın hazırlanması önemlidir [39]. Manyetik ayırma teknikleri ile küre şekilli fonksiyonel manyetik adsorbentlerin uygulamaları son yıllarda dikkat çekici hale gelmiştir [40, 41]. Bu yöntem manyetik alan gradyanıyla bulk çözeltisinden kompleks oluşturmak için ligand vasıtasıyla hedef molekülleri bağlamada manyetik partikülleri kullanmaya dayanmaktadır [38].

Manyetik polimer küreler, manyetik nano ya da mikro partiküllerin polimer matrikse gömülmesi ile oluşur. Kürelerin boyutu 100 nm'den birkaç milimetreye kadar değişebilir. Manyetik polimer kürelerin sentezi üç genel yolla gerçekleştirilir;

- i) Manyetik partiküller polimer matriks içinde sentezlenir.
- ii) Polimer, manyetik partiküllerin varlığında sentezlenir.
- iii) Küreler önceden oluşturulmuş polimer ve manyetik partiküllerden hazırlanabilir.

Küreler farklı yapılaraya sahip olabilir (Şekil 2.6). Kürelerin bazılarında manyetik partiküller polimer matrikste homojen bir şekilde dağılır (Şekil 2.6.(c)). Bazı kürelerde de çekirdek-kabuk yapısındadır (polimer çekirdek, manyetik kabuk) (Şekil 2.6.(a)) ya da manyetik çekirdek, polimer kabuk (Şekil 2.6.(b)) yapısındadır.



Şekil 2.6. Manyetik polimer kürelerin farklı yapılarının şematik gösterimi: (a).polimer çekirdek-manyetik kabuk, (b) manyetik çekirdek-polimer kabuk, (c) polimer küredeki manyetik partiküllerin homojen olarak dağılımı [42].

Ayrıca çekirdek-kabuk partiküllerin, polimer matrikste homojen olarak dağıldığı karma sistemlerde hazırlanabilir.

Manyetik polimer küreler, doğrudan polimer matrikste demir tuzlarının birlikte çöktürülmesiyle elde edilebilir. Bu durumda polimer matriks manyetik partiküllerin büyümesini sınırlar ve sonuç olarak onların boyutu polimerin olmadığı durumdaki boyutundan daha küçük olur. Demir tuzlarının birlikte çöktürülmesiyle polistiren (PS), poliakrilamid, dekstran, aljinat, poli(vinilalkol) (PVA), asetoasetoksietilmetakrilat, N-vinilkaprolaktam, izopropilakrilamid (NIPA) ve glisidilmetakrilat kopolimerleri gibi polimerler esaslı manyetik küreler hazırlanır.

Bu şekilde hazırlanan manyetik küreler Şekil 2.6'da gösterilen tüm olası yapılarla sahip olabilir. Gözenekli polimer küreler (örneğin PS küreler) manyetik partiküllerin oluşumu için matriks olarak kullanıldığında Şekil 2.6.(c) tipinde yapılar oluşur. Demir tuzlarının kürelerin yüzeyine birlikte çöktüğü ve iç kısmına nüfus etmediği durumda polimer çekirdek manyetik kabuk yapısı oluşur (Şekil 2.6.(a)). Manyetik partiküller polimer çözeltisinde sentezlendiğinde manyetik çekirdek polimer kabuk türündeki yapıları (Şekil 2.6.(b)) oluşturur ki manyetik partiküller sentezlendikten sonra polimerle kaplanır [42].

Manyetik polimer mikroküreler polimer kaplı manyetik bir çekirdekten oluşur. Bu mikroküreler çözücü buharlaşması yoluyla magnemit (γ - Fe_2O_3) ya da magnetit (Fe_3O_4) partiküllerin kaplanması [43], polimer mikrokürelerin üzerine demir oksit çöktürülmesi veya kolloid demir oksit varlığında emülsiyon, miniemülsiyon, dispersiyon, süspansiyon polimerizasyonunu içeren heterojen polimerizasyon yöntemleri gibi çeşitli teknikler kullanılarak elde edilirler. Polimer kabuk, partiküllerin kümelenmesini önler ve hedef moleküllerin (ilaç, protein, antibiyotik v.b.) kovalent bağlanmasını sağlar [44].

Polimer kürelerin manyetik özellikleri gömülü manyetik partiküller kullanılarak belirlenir. Bu partiküllerin içinde, Fe, Ni, Co gibi saf metallerin oksitleri yükseltgenmeye karşı kararlı oldukları için daha fazla tercih edilmektedir. Metal oksitlerin manyetik özellikleri bunların kimyasal bileşenlerine, çaplarına, şekillerine, kristal yapılarına ve kristallenme derecelerine bağlıdır [42].

Manyetik taşıyıcılar inorganik malzemelerden ya da birçok doğal ve sentetik polimerden elde edilirler. İnorganik malzemelerle karşılaştırıldığında manyetik polimer mikroküreler spesifik uygulamalara ve kovalent immobilizasyon için yüzey fonksiyonel gruplarına sahiptir [45].

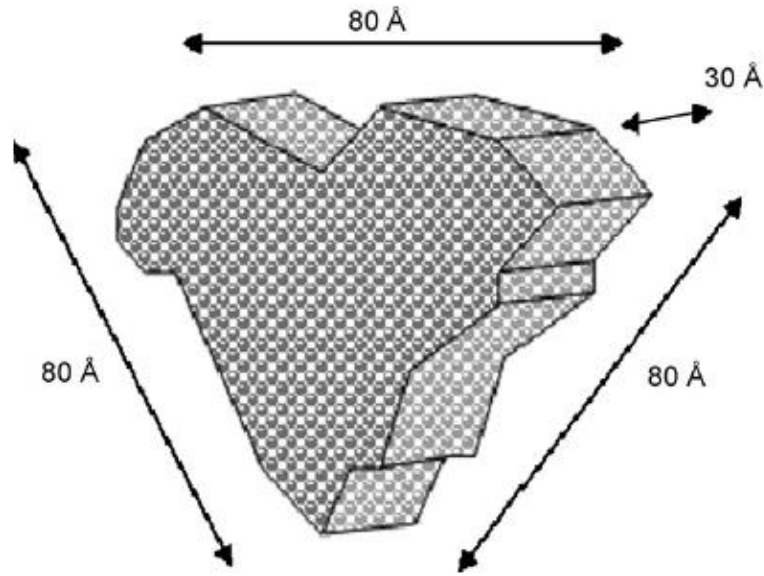
Manyetik polimer mikroküreler, çevre korunması (toksik ve radyoaktif atıkların uzaklaştırılması), hem iyileştirici (kontrollü ilaç salınımı, hipertermi) hem de teşhis edici (ELISA, NMR görüntülenmesi) biyomedikal uygulamalar ve biyomühendislik uygulamalar gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [46, 47]. Manyetik polimer mikroküreler, kompleks biyolojik malzemelerden biyomoleküllerin (enzimler, antibiyotikler, peptitler ve nükleik asitler), hücrelerin, bakteri ve virüslerin izolasyonu ve saflaştırılması, küfteki patojen tayini ve mikroçip DNA hazırlanmasında önemli bir role sahiptir [44].

Geleneksel ayırma yöntemleri ile karşılaştırıldığında manyetik ayırmanın avantajları hızlı, kesin ve kullanışlı olmasıdır [38]. Manyetiklik ile örnek alma ve toplama daha kolay ve hızlıdır ama manyetik alan kaldırıldığında onların manyetizasyonu kaybolur. Ayrıca manyetik küreler, dolgulu ya da akışkan yataklı sistemlerde kromatografik ayırma ile ilgili birçok problemi ortadan kaldırmaktadır [48].

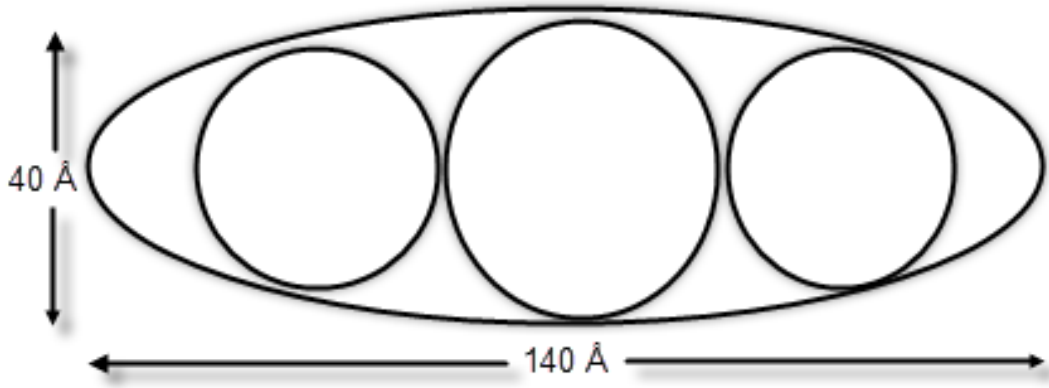
2.5. Albumin

İnsan kan plazmasının en bol proteini olan albumin serum proteinlerinin %55-60'nı oluşturur [49]. Kandaki derişimi 5g/100mL'dir [50]. HSA, 17 disülfid köprüsü ve bir serbest sistein içeren 585 aminoasit kalıntısından oluşan bir makromoleküldür [4, 49]. Tek zincirli bir protein olan ve molekül ağırlığı 66 500 Da olan insan serum albümini (HSA) karaciğer hücrelerinden sentezlenir ve salgılanır [51].

Son 20-30 yıldır HSA'nın fizyolojik ve farmakolojik özellikleri incelenmektedir [50]. İnsan albümin, kristal üçüncül yapısı x-ışını kristalografisi ile izole edilmiştir [49] ve yaklaşık olarak 80×80×30 Å boyutları ile kalp şekline benzer bir molekül olarak görülmektedir (Şekil2.7) [50]. Albuminin çözeltideki şekli oldukça farklı olup moleküle düşük viskozite sağlayan, elips şeklinde düzenlenmiş olduğu görülmektedir (Şekil 2.8) [52].



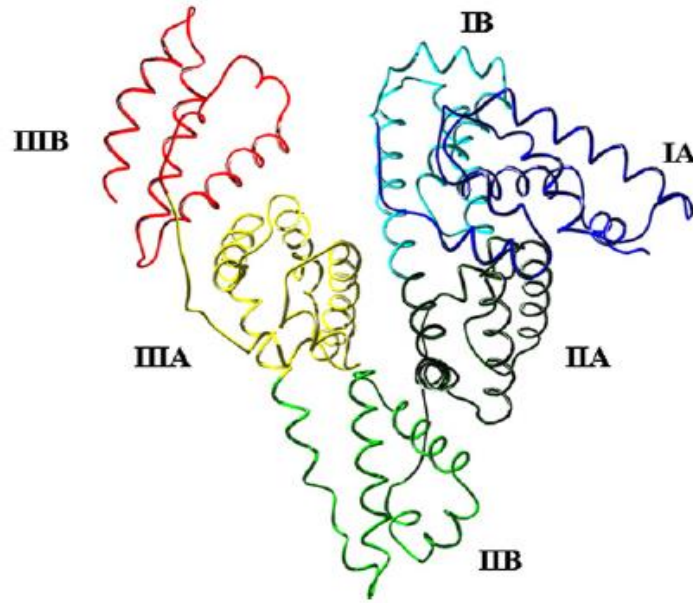
Şekil 2.7. Albuminin kalp şeklindeki üç boyutlu yapısı [52].



Şekil.2.8. Çözeltideki albuminin elipsoid yapısı [49].

HSA üç homolog sarmal bölgeden oluşur; bölge I, bölge II, bölge III ve bunların her biri iki alt bölgeden (A ve B) oluşur [17]. Yapısının dışı bir silindire benzer ve polardır, orta kısmı ise apolardır ve hidrofobik substratların bağlanmasını sağlar [3].

Bu bölgeler topolojik olarak özdeş ve üç boyutlu yapısı da oldukça benzerdir. HSA molekülü her üç bölgede de benzer üç boyutlu yapılara sahip olmasına rağmen bu üç bölge oldukça asimetriktir (Şekil 2.9). Bölge I ve II T şekli oluşturur ve birbirine göre hemen hemen diktir. IIa alt bölgesinin uç kısmı, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağlarıyla Ia ve Ib alt bölgeleri arasındaki ara bölgeye bağlıdır. Buna karşılık yaklaşık 45°'lik açıyla bölge II ve bölge III, Y şeklini oluşturur. Bölge III sadece alt bölge IIb ile etkileşimdedir. Bu özellikler HSA molekülüne kalp şeklini kazandırır. Alt bölgeler Ib, IIIa ve IIIb'nin oluşturduğu geniş bir kanaldan dolayı bölge I ve III arasındaki etkileşim çok azdır.



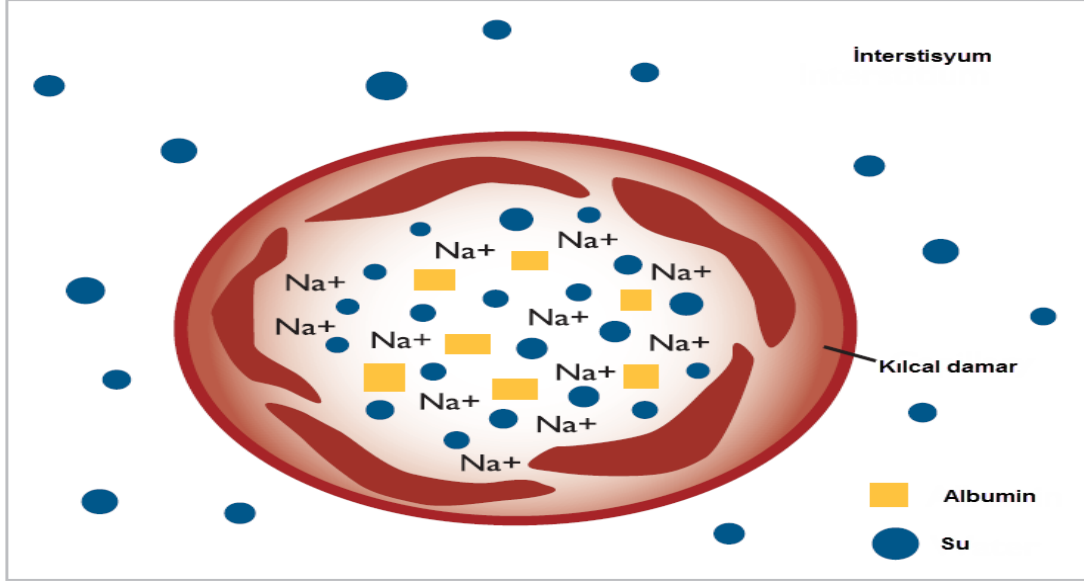
Şekil 2.9. HSA'nın üç boyutlu yapısı [53].

Fizikokimyasal çalışmalar esnek bir protein olan HSA'nın kolayca şekil değiştirebildiği göstermektedir [50]. Molekül oldukça esnektir ve ligandların bağlanması ile ve çevre koşullarındaki değişmelerle şekli hızlı bir şekilde değişir. Fizyolojik koşullar altında yapıya dayanıklılık sağlayan disülfid köprüleri sayesinde şeklini kolayca geri kazanır. Denatürasyon sadece sıcaklık, pH, iyonik veya kimyasal ortamdaki fizyolojik olmayan değişikliklerle meydana gelir [49].

İnsan serum albumini (HSA), birçok endojen ve eksojen ligandların taşınması ve düzenlemesi için oldukça önemli bir proteindir. HSA ilaçlar, yağ asitleri, bilirubin, triptofan ve hormonlar olmak üzere birçok kimyasala tersinir olarak bağlanabilir ve onları taşıyabilir. Ayrıca organik/dolaşım ara yüzeyleri arasında ligandların transferini kolaylaştırır [4].

Albuminin onkotik basıncı koruma ve çeşitli molekülleri bağlama gibi vücut için önemli birçok rolü vardır. Albumin ayrıca protein sentezi için kullanılacak amino asitleri bir araya getirir, ekstravasküler sıvıları korur (tamponlar), patolojik trombüs oluşumunu önler ve normal mikrovasküler geçirgenliğini korumaya yardımcı olur.

Kolloid onkotik basınç makromoleküller tarafından oluşturulan bir güçtür. Makromoleküller damar boşluklarında bulunarak damar içi boşluklardan suyun kaçmasını önlerler (Şekil 2.10) [54].



Şekil 2.10. Onkotik basınç [54].

Sağlıklı kişilerde normal kolloid onkotik basıncın (COP) korunmasındaki albuminin rolü bilinmektedir ama ağır hastalardaki kolloid onkotik basınç ve albumin arasında çok az bir ilişki olduğu görülmüştür. Sağlıklı durumlardaki albuminin plazmadaki derişiminin ve molekül ağırlığının yüksek olmasından dolayı albumin normal COP' nin %80'ne katkı sağlar.

Plazmada albumin diğer plazma proteinlerinden daha yüksek derişimde bulunur. 66.5 kDa moleküler ağırlığı serum globulinler (yaklaşık 147 kDa) için ortalama molekül ağırlığından daha az olmasına rağmen, albumin en büyük ozmotik öneme sahiptir. Bu doğrudan ozmotik etki albuminin onkotik basıncının %60'nı sağlar. Kalan %40 pozitif olarak yüklü çözünebilir partiküllerin intravasküler tutulması için çekici bir güç sağlayan albuminin negatif yükünün bir sonucudur. (Gibbs-Donnan etkisi) Ayrıca büyük ekstravasküler albumin havuzu, suda çözünebilirliği ve onun negatif yükünden dolayı albumin dokular arası sıvı dağılımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar [49].

HSA, kanser, romatoid artrit (romatizmal eklem iltihabı), iskemi, menopoz sonrası obezite, akut Graft-versus-Host Hastalığı (GVHH) ve glisemik kontrolün

izlenmesi gereken hastalıklar dahil birçok hastalık için değerli bir biyobelirteçtir. HSA hipovolemi, şok, yanık, cerrahi kan kaybı, travma, kanama, kardiyopulmoner baypas, akut solunum sıkıntısı sendromu, hemodiyaliz, akut karaciğer yetmezliği, kronik karaciğer hastalığı, beslenme desteği, resüsitasyon ve hipoalbuminemi dahil olmak üzere çeşitli hastalıkları tedavi etmek için yaygın bir şekilde klinik açıdan kullanılır. Son zamanlarda vücuda yerleştirilebilir biyomalzemeler, cerrahi yapıştırıcılar ve sızdırmazlık ürünleri, biyokromatografi, ligand yakalama ve füzyon proteinlerini içeren HSA'nın biyoteknolojik uygulamaları bulunmaktadır [53].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal maddeler

İnsan serum albümin (HSA), lizozim (Liz), sığır serum albümin (BSA), sitokrom C (Cyt C), poli(vinilpirolidon) (PVP K-30), Fe(II,III) oksit nanopowder, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit (HEPES), Morfolinpropansülfonik asit (MOPS), etilenglikoldimetakrilat (EGDMA), 3-Aminopropiltrimetoksisilan (3-APTMS), tetraetilortosilikat (TEOS) Sigma firmasından (St. Louis, ABD), toluen Fluka firmasından (Riedel-de Haen, Almanya) ve α,α' -azoisobutironitril (AIBN), glisidilmetakrilat (GMA) Fluka A. G. Firmasından (Buchs, İsviçre) temin edilmiştir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan diğer kimyasal maddeler analitik saflıktadır ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen deiyonize suyun iletkenliği 18.2 M Ω /cm'dir.

3.2. Mikrokürelerin Hazırlanması

3.2.1. Manyetik Poli(Glisidil Metakrilat) [m-PGMA] Mikrokürelerinin Sentezi

m-PGMA mikrokürelerinin sentezi için 0.2 g AIBN, 0.025 g Fe(II,III) oksit nano parçacıklar, 9.0 mL toluen, 0.1 mL EGDMA ve 9.5 mL GMA çözeltisi ile karıştırılarak monomer faz elde edilir. Bununla birlikte 4.0 g PVP-K30 stabilizatörü 84 mL etil alkol çözeltisi içerisinde çözülür ve yavaşça monomer faza ilave edilir. Karışımdaki fazların birbiri içerisinde iyi bir şekilde dağılması sağlanarak elde edilen karışım 10 dakika azot gazından geçirilir. Polimerizasyon çalkalamalı su banyosunda 70°C'da, 4 saat sürede gerçekleşir. Tepkime tamamlandığında polimer partiküller santrifüjle ayrılır ve toluen uzaklaşmaya kadar % 20 etil alkol-su karışımıyla yıkanır.

3.2.2. İminodiasetik Asit (İDA) Ligandının m-PGMA Mikrokürelerin Yüzeyine İmmobilizasyonu

m-PGMA mikrokürelere protein baskılama için yüzey modifikasyonu işleminde öncelikle m-PGMA mikrokürelere 0.6 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile oda sıcaklığında, 210 rpm karıştırma hızında, 24 saat etkileştirilir. Daha sonra NaOH çözeltisi ile epoksi grupları açılan mikrokürelerin yüzeyine üç dişli bir ligand olan İDA'nın kovalent olarak bağlanması için tepkime karışımı (12.5 g İDA/100 g polimer + 100 mL pH 11.0, 2.0 M Na₂CO₃) ve m-PGMA mikroküreler çalkalamalı su banyosunda 70°C'da 24 saat boyunca etkileştirilir. Tepkime sonunda m-PGMA mikrokürelere spesifik olmayan etkileşimlerle bağlanmış İDA moleküllerini uzaklaştırmak için mikroküreler birkaç kez saf su ile yıkanmıştır. Böylece mikrokürelerin üzerindeki epoksi grubu açılarak amin grubunun (-NH₂) yerleştirilmesi sağlanmıştır.

3.2.3. Cu²⁺ İyonlarının m-PGMA-İDA Mikrokürelere Bağlanması

Şelatlayıcı grup olan İDA'nın yapısındaki karboksil grupları ile geçiş metal iyonu olan Cu(II) iyonu arasında koordinasyon bileşiği oluşumuyla manyetik destek malzemesi hazırlandı.

Bakır iyonları immobilizasyonu için şelatlayıcı ajan bağlı m-PGMA-İDA mikrokürelere, 50.0 mM NaCl içeren 10.0 mM, pH 7.5 HEPES tampon çözeltisi (Tampon A) ile şartlandırılmıştır. Daha sonra tampon A çözeltisinde hazırlanan 1.0 mg/mL CuCl₂.2H₂O çözeltisi ile oda sıcaklığında 6 saat süreyle 190 rpm karıştırma hızında etkileştirildi. İnkübasyon sonrasında şelatlanmamış metali uzaklaştırmak için mikroküreler birkaç kez distile su ile yıkandı.

3.2.4. HSA baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) manyetik mikrokürelerin hazırlanması

m-PGMA-İDA-Cu²⁺ mikrokürelere (0.36 g) 5.0 mM fosfat tamponunda (pH 6.0) şartlandırıldıktan sonra 20.0 mL fosfat tamponunda hazırlanmış (5.0 mM, pH 6.0) 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 mg/mL derişimlerdeki HSA çözeltileri ile 4°C'da 2 saat süreyle etkileştirildi ve yüzey silan polimerizasyonu için hedef molekül olarak HSA immobilize edilmiş m-PGMA-İDA-Cu²⁺ mikroküreler 10.0 mM MOPS tamponuyla (pH 7.0) dengeye getirildikten sonra 3-APTMS ve TEOS (1:1) ilave

edilerek 16 saat boyunca oda sıcaklığında polimerizasyon gerçekleştirilerek MIP'ler hazırlandı.

m-PGMA-İDA-Cu²⁺ mikroküreler 10.0 mM MOPS tamponuyla (pH 7.0) dengeye getirildikten sonra 3-APTMS ve TEOS (1:1) ilave edilerek 16 saat boyunca oda sıcaklığında polimerizasyon gerçekleştirilerek NIP'ler hazırlandı.

Sentezlenen mikroküreler %0.02'lik sodyum azid (NaN₃) çözeltisi içerisinde 4°C'da muhafaza edilmiştir.

3.2.5. MIP'den HSA'nın Uzaklaştırılması

HSA baskılanmış mikroküreler (MIP) 1.0 M NaCl içeren 10.0 mM, pH 4.0 asetat tamponu ile muamele edilerek mikroküreden HSA uzaklaştırılır. Böylece HSA'ya özgü moleküler tanıma boşlukları elde edilir. Sentezlenen mikroküreler %0.02'lik NaN₃ çözeltisi içerisinde 4°C'da muhafaza edilir.

HSA'ya spesifik metal koordinasyonuna dayalı yüzey baskılanmış m-PGMA mikrokürelerin hazırlanması Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

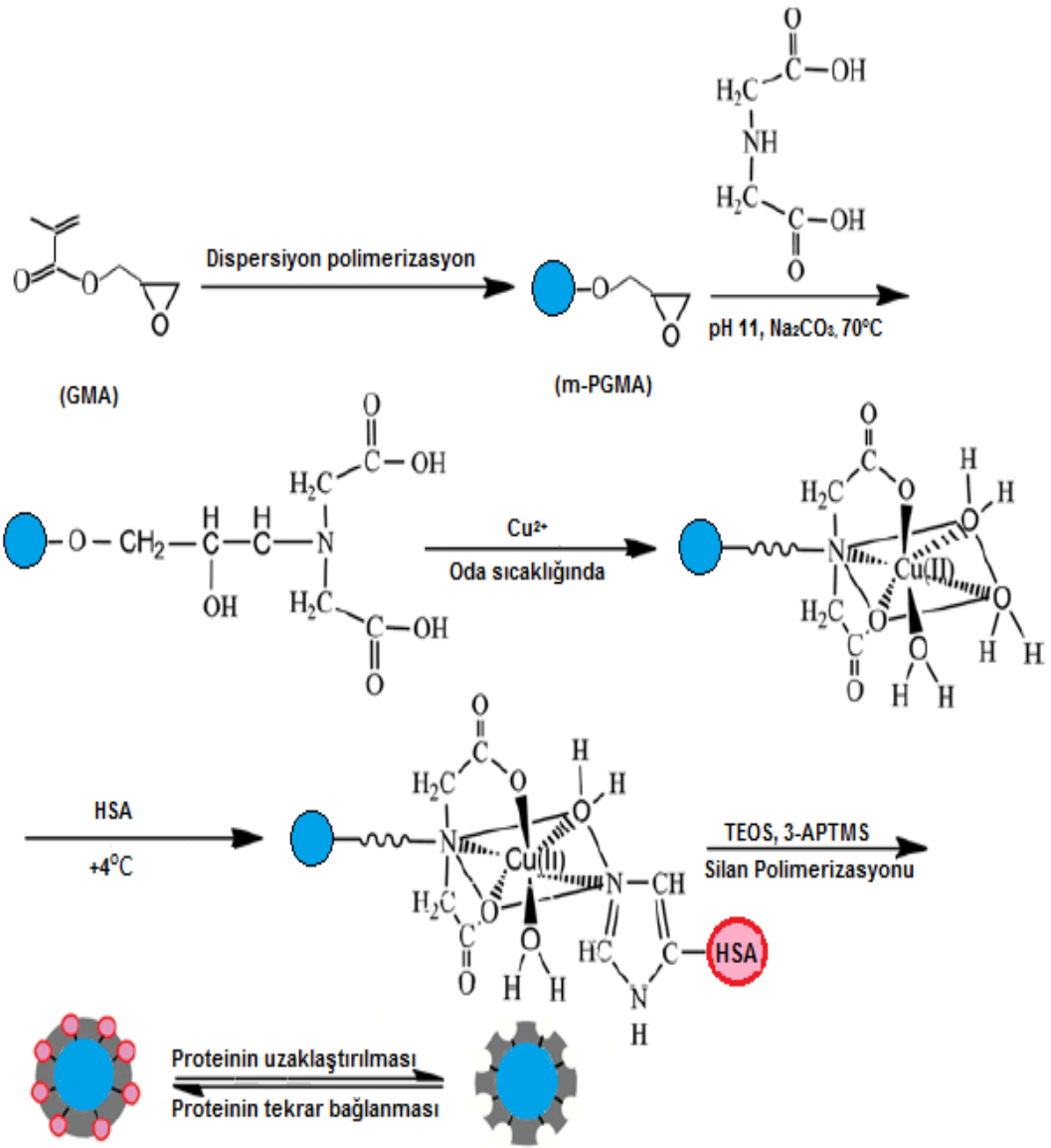
3.2.6. Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.6.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi

Saf İDA, m-PGMA ve İDA bağlı m-PGMA mikrokürelerin FTIR-ATR spektrumları Şekil 4.3'te gösterilmiştir. m-PGMA mikrokürelere İDA'nın bağlandığını doğrulamak için m-PGMA ve İDA bağlı m-PGMA mikrokürelere ait fark spektrumları Şekil 4.4'te verilmiştir.

3.2.6.2. SEM ile Yüzey Analizi

HSA baskılanmış ve baskılanmamış manyetik mikrokürelerin yüzey morfolojileri ve yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL, JEM 1200 EX, Tokyo, Japonya) kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla mikroküreler iletken bir yapıştırıcıyla alüminyumdan yapılmış SEM numune plakası üzerine tutturulmuştur. Daha sonra örnek yüzeyleri vakum altında 200 Å kalınlığında metalik altın ile kaplanarak yüzey iletken hale getirilmiştir. Hazırlanan numuneler SEM numune yuvasına yerleştirilerek çeşitli büyütme oranlarında fotoğrafları çekilmiştir. Aynı cihazda enerji dağılımlı x-ışınları spektroskopisi (EDX) yöntemi kullanılarak yüzeyinde silan polimerizasyonu gerçekleştirilen manyetik mikrokürelerin yüzeyindeki silisyum (Si) oranı belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Metal koordinasyonu ile yüzey baskılanmış MIP'nin hazırlanması

3.2.6.3. Termogravimetrik Analiz (TGA-DTA)

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

3.2.6.4. Şişme Testi

m-PGMA mikrokürelerin şişme oranı saf su içerisinde gravimetrik yöntem kullanılarak belirlendi. Bunun için kuru küreler (0.1 g) silindirik bir cam tüpe (uzunluk: 30 cm; çap: 6.0 mm) konuldu. Şişmemiş kürelerin yüksekliği ölçüldü. Daha sonra tüpe 0.5 mL deiyonize su eklenerek 2 saat boyunca oda sıcaklığında şişmesi sağlandı ve şişmiş kürelerin yüksekliği ölçüldü. Denge şişme oranı Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplandı.

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

H_s : Şişmiş kürelerin yüksekliği (mm) ve H_o : Kuru kürelerin yüksekliği (mm).

3.2.6.5. Zeta Boyut ve Yük Analizi

Zeta Potansiyeli (ζ), bir sıvı çözelti içerisindeki mineral parçacıkların ölçülebilen yüzey potansiyelidir. Çözelti içerisinde adsorplayıcı ile adsorplanan madde arasındaki elektrostatik etkileşimlerin belirlenmesi katı parçacıkların zeta potansiyel ölçümleri ile gerçekleştirilmektedir.

Sentezlenen m-PGMA mikrokürelerin boyut ve yüzey yük analizi Nano Zeta sizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) cihazı ile elde edilmiştir. Zeta boyut ölçümleri cihazın hücreğine 1.5 mL süspansiyon halindeki m-PGMA mikroküreler konularak gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyel ölçümleri ise farklı pH'lardaki (3.0-8.0) su çözeltilerine m-PGMA kürelerin (Islak ağırlığı: 11.0 mg) ilavesiyle gerçekleştirilmiş ve analiz sonrasında elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

3.2.6.6. İmmobilize Bakır İyonu Miktarının Belirlenmesi

Cu^{2+} iyonlarının m-PGMA-İDA mikroküreleriyle tepkimesi için öncelikle 50.0 mM NaCl içeren 10.0 mM HEPES (pH 7.5) çözeltisinde (Tampon A) çözeltisinde hazırlanan 1.0 mg/mL $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri mikroküreler ile etkileştirildi. Etkileşim öncesi ve sonrasında alınan örneklerdeki Cu^{2+} iyonları derişimi atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS) (Analyst 800/Perkin Elmer ABD) kullanılarak belirlendi. Ölçüm için tampon A'da farklı derişimlerde bakır çözeltileri hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. İmmobilize olan bakır iyonu miktarı tepkime öncesi ve sonrasında alınan örnek çözeltideki bakır iyonlarının derişimi kullanılarak belirlendi.

3.2.7. Adsorpsiyon Deneyleri

Manyetik MIP ve NIP mikroküreleri üzerine sulu çözeltilerden HSA adsorpsiyonu çalışmaları kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalardan önce mikroküreler 5.0 mM'lık fosfat tamponu (pH 6.0) ile 1 saat boyunca şartlandırılmış ve çalışma boyunca mikroküreler buldukları çözeltilerden 8000 rpm hızında (25°C, 30 dakika) santrifüj edilerek ayrılmıştır. Tüm adsorpsiyon deneyleri şartlandırılmış mikroküreler (Islak ağırlığı 0.1 g) kullanılarak 5.0 mM'lık fosfat tamponunda (pH 6.0) hazırlanmış farklı derişimlerdeki HSA çözeltileri (5.0 mL) ile gerçekleştirilmiştir (2 saat, 4°C, 190 rpm). Bu süre sonrasında mikroküreler adsorpsiyon ortamından uzaklaştırılmıştır.

MIP ve NIP mikroküreleri üzerine adsorplanan proteinin absorbans değerleri, adsorpsiyon öncesi ve sonrasında alınan çözeltilerin 595 nm'de Bradford yöntemiyle UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) kullanılarak ölçülmüştür. Daha sonra HSA'nın 0.1-1.0 mg/mL derişim aralığında hazırlanan çözeltilerinin adsorpsiyon miktarı ile kalibrasyon eğrisi oluşturularak protein miktarı hesaplandı (Eşitlik 3.2).

$$Q = [(C_0 - C) V] / m \quad (3.2)$$

Burada, Q mikrokürelerin birim miktarı başına adsorplanan madde miktarı (mg/g); C_0 ve C, adsorpsiyon öncesi ve sonrası HSA çözeltilisinin derişimi (mg/L); V çözelti hacmi (mL) ve m ise kullanılan mikrokürenin ağırlığıdır (g).

Adsorpsiyon kapasitesine başlangıç HSA derişiminin, ortam pH'sının, sıcaklığın ve adsorpsiyon süresinin etkisi incelenmiştir. Başlangıç HSA derişiminin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi, HSA derişimi 0.05-1 mg/mL arasında değiştirilerek, pH'nın adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi, pH 4.0-8.0 arasında değiştirilerek, sıcaklığın adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi sıcaklığın 4-45 °C arasında değiştirilerek incelenmiştir.

Zamanın adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi 120 dakika boyunca belli aralıklarla alınan protein çözeltilerindeki adsorplanan HSA miktarları hesaplanarak incelenmiştir. Bu verilerden yararlanılarak mikrokürelerin HSA adsorpsiyonunun birinci ve ikinci dereceden kinetik bağıntıları türetilerek grafikleri çizilmiştir.

3.2.8. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

HSA baskılanmış mikrokürelerden HSA'nın desorpsiyonu 1.0 M NaCl içeren 10.0 mM asetat tamponu (pH 4.0) ile gerçekleştirilmiştir. HSA desorpsiyon oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

Desorpsiyon oranı (%) = [salınan HSA miktarıx100] / [adsorplanan HSA miktarı]

Hazırlanan mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için adsorpsiyon-desorpsiyon döngüleri aynı mikroküreler kullanılarak 10 kez tekrar edilmiştir.

3.2.9. Seçicilik Çalışmaları

HSA baskılanmış m-PGMA mikrokürelerin seçiciliğini göstermek için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri 5.0 mM fosfat tamponunda (pH 6.0) ve kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Yarışmacı protein olarak lizozim, sığır serum albümin (BSA) ve sitokrom C kullanılmıştır. Seçicilik deneyleri üç farklı derişimde HSA baskılanmış ve HSA baskılanmamış mikroküreler için gerçekleştirilmiştir (2 saat, 4°C, 190rpm).

HSA baskılanmış ve baskılanmamış m-PGMA mikrokürelere adsorplanan protein miktarı adsorpsiyon öncesi ve sonrasında alınan çözeltilerin 595 nm'de Bradford yöntemiyle UV-VIS spektrofotometresi (Shimadzu, Tokyo, Japonya, Model 1601) kullanılarak tayin edilmiştir.

HSA'nın yarışmacı proteinlere göre dağılıma ve seçicilik katsayıları Eşitlik 3.3'e göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f) / C_f]. V/m \quad (3.3)$$

Yukarıdaki eşitlikte, K_d dağılıma katsayısını; C_i ve C_f protein çözeltilerinin başlangıç ve son derişimlerini (mg/L), V kullanılan çözelti hacmini (mL) ve m ise kullanılan mikrokürenin ıslak ağırlığını (g) ifade etmektedir.

Yarışmacı proteinler varlığında HSA'nın bağlanması için seçicilik katsayısı Eşitlik 3.4'e göre denge bağlanma verilerinden elde edilir.

$$k = k_{kalıp} / k_{yarışmacı} \quad (3.4)$$

HSA baskılanmış m-PGMA ile yapılan adsorpsiyon çalışmalarının, kontrol olarak ifade edilen NIP adsorpsiyon çalışmalarına oranı HSA baskılanmış m-

PGMA'nın bağıl seçicilik katsayısı hakkında yorum yapılmasına olanak sağlar.
Bağıl seçicilik katsayısı ise Eşitlik 3.5;

$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad (3.5)$$

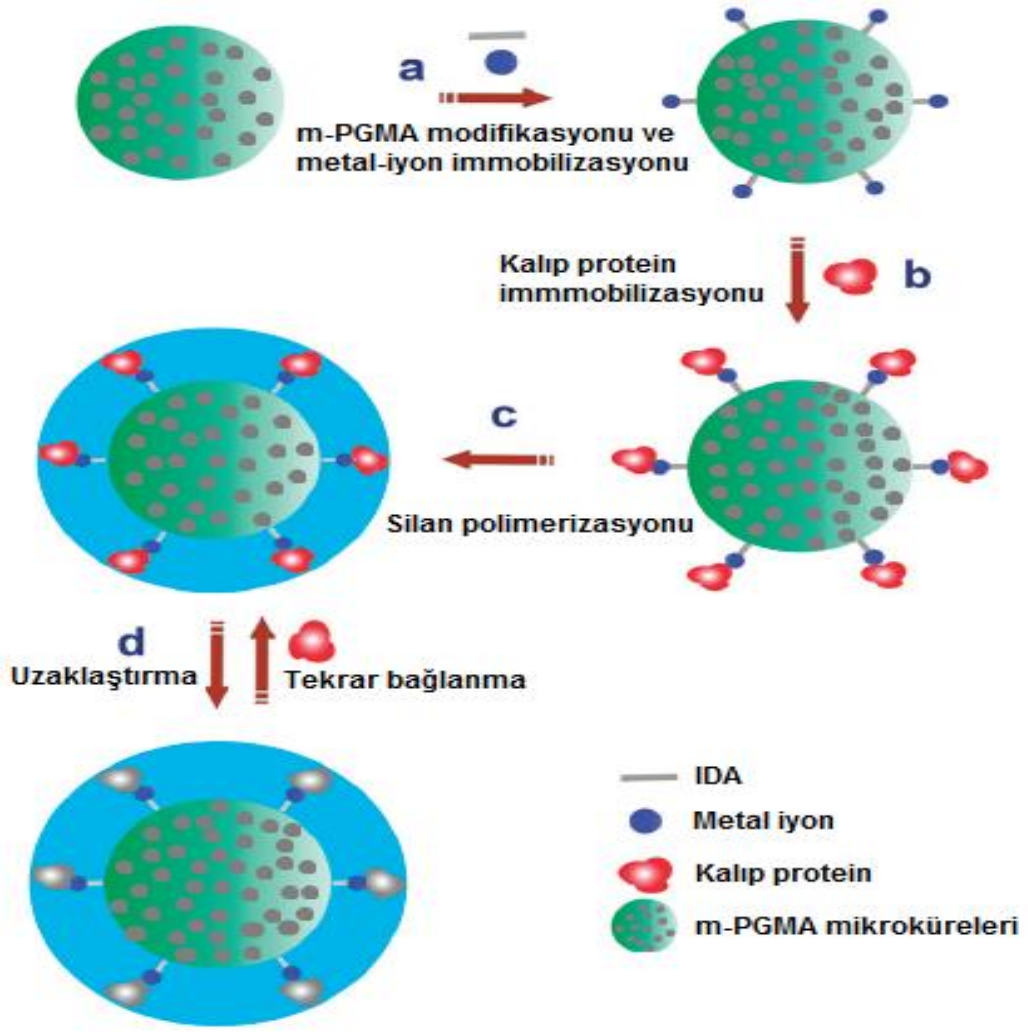
ile ifade edilir.

4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

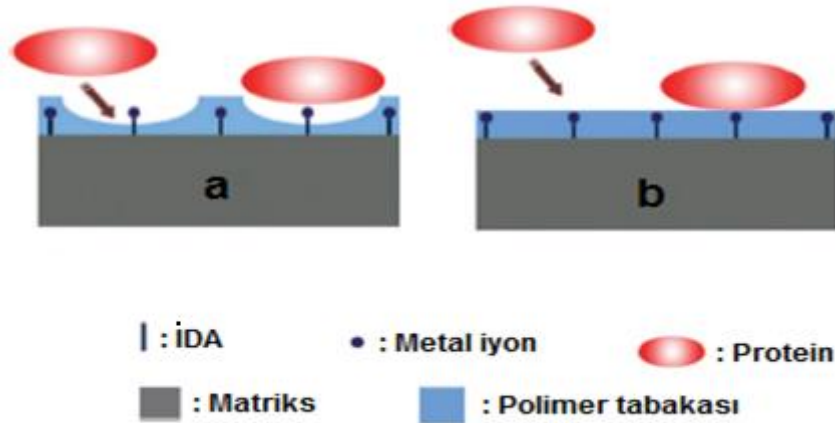
4.1. Albumin Baskılanmış Manyetik Poli(Glisidil Metakrilat) Mikrokürelerinin Hazırlanması

Manyetik partiküllerin polimer matrikste homojen bir şekilde dağılmasıyla elde edilen m-PGMA mikrokürelerin yüzey modifikasyonu şelatlayıcı grup olan İDA ve geçiş metal iyonu olan Cu(II) iyonu arasında koordinasyon bileşiği oluşumuyla sağlandı. Metal koordinasyonuna dayalı yüzey baskılanmış mikrokürenin eldesi için hedef molekül olarak HSA immobilize edildi ve mikrokürenin yüzeyi silan polimerizasyonu ile kaplandı. Sonrasında desorpsiyon ajanı kullanılarak mikrokürenin yüzeyinde HSA'ya spesifik tanıma boşlukları oluşturulmasıyla HSA'ya yüksek seçicilikte metal koordinasyonuna dayalı yüzey baskılanmış mikroküreler elde edildi (Şekil 4.1).

HSA baskılanmış ve baskılanmamış mikrokürelerin yüzeyine HSA'nın adsorpsiyonu Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Metal koordinasyonu ile desteklenmiş yüzey protein baskılanmış m-PGMA mikrokürelere hazırlanması [55]

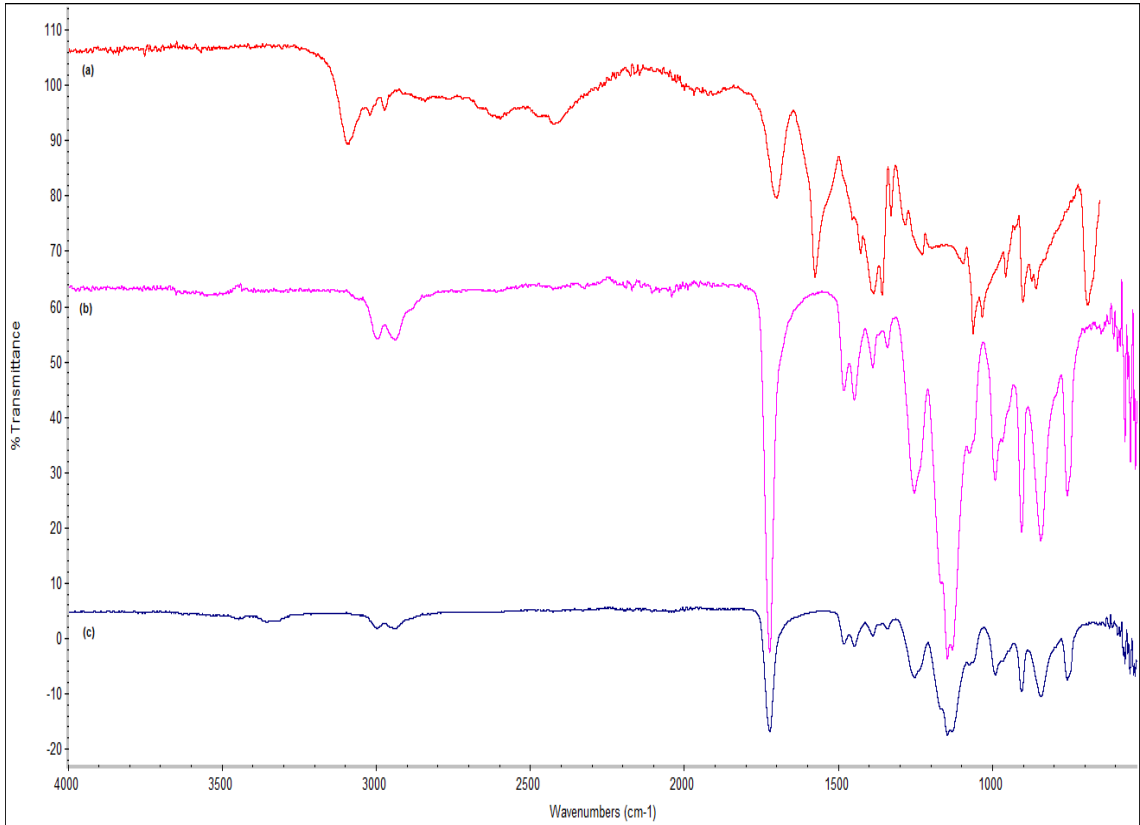


Şekil 4.2. (a) MIP ve (b) NIP üzerine kalıp proteinin adsorpsiyonun şematik gösterimi [55]

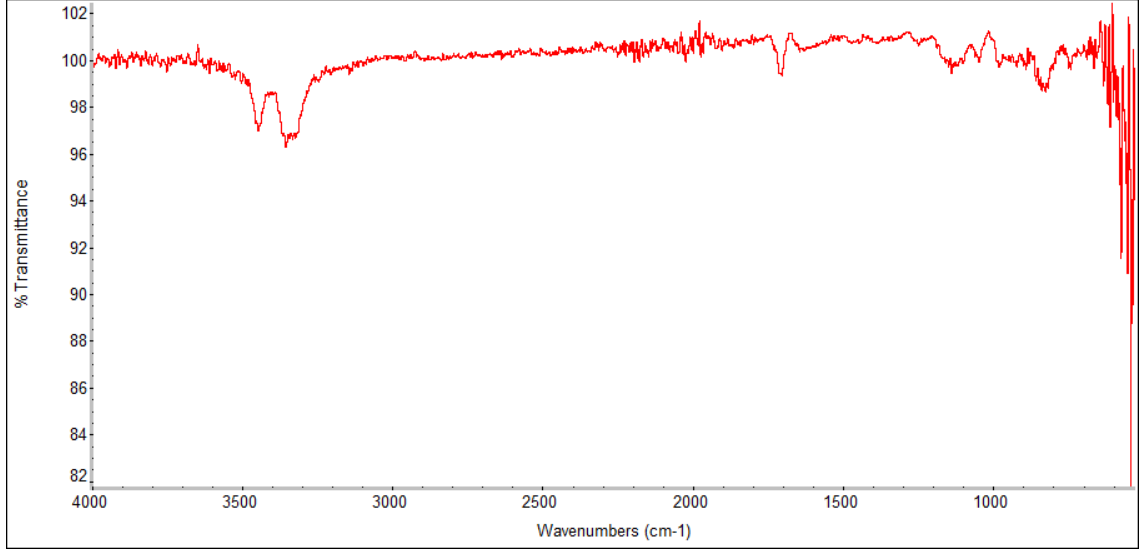
4.2. Karakterizasyon Çalışmaları

4.2.1. FTIR-ATR ile Yapı Analizi

Saf İDA, m-PGMA, m-PGMA-İDA mikroküreleri için elde edilen FTIR-ATR spektrumları ile m-PGMA, m-PGMA-İDA mikrokürelerine ait fark spektrumları Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Spektrumdan görüldüğü gibi 3441 cm^{-1} 'de geniş bir bant şeklinde görülen -OH gerilim ve titreşim bantlarına ait piklerdir. $\sim 2933\text{-}3005\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen metilen titreşimleri glisidilmetakrilatın karakteristik titreşimleridir. $\sim 3342, 1702\text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bantları -C=O piki ve $\sim 1150\text{ cm}^{-1}$ 'deki -C-O- karakteristik piki glisidilmetakrilatın $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen -COO- ester grubuna ait karakteristik piki doğrulamaktadır. ~ 2933 ve 1438 cm^{-1} 'deki C-H gerilim ve titreşim bantlarına ait piklerdir. Epoksi grubuna ait ~ 847 ve 907 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bantları yapıdaki oksiran grubundan kaynaklanmaktadır. $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ 'de bulunan C-N gerilme bandının Şekil 4.4'te de bulunması İDA'nın m-PGMA'nın yapısına girdiğini göstermektedir.



Şekil 4.3. (a) Saf İDA (b) m-PGMA, (c) m-PGMA-İDA mikrokürelerine ait FTIR-ATR spektrumları

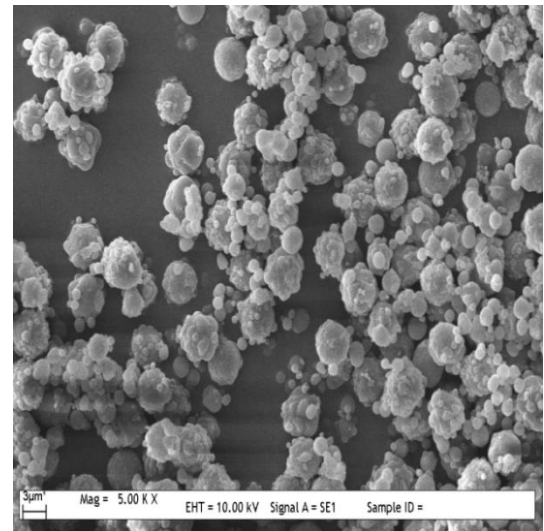
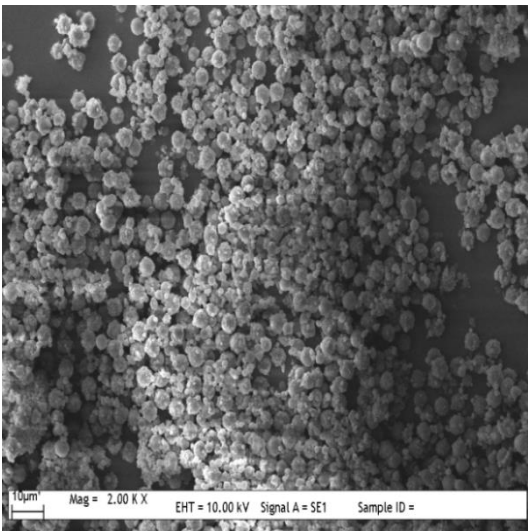
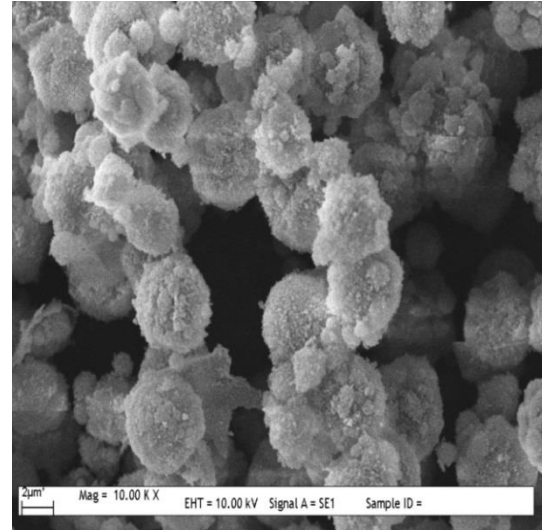
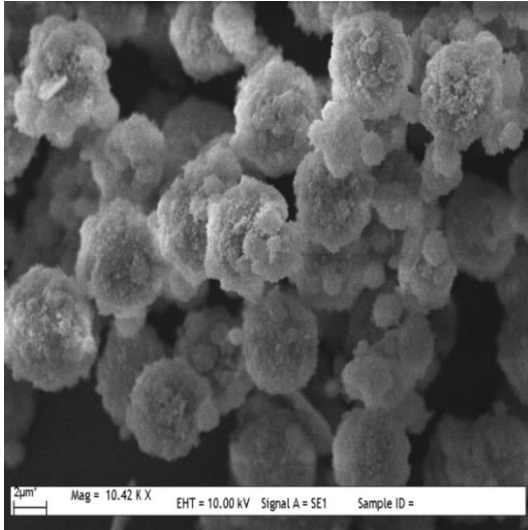
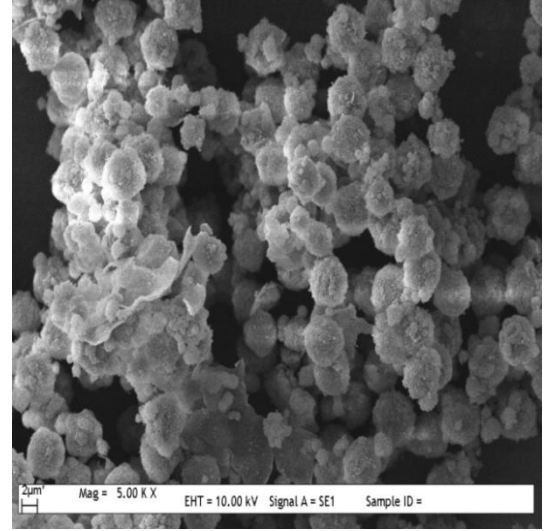
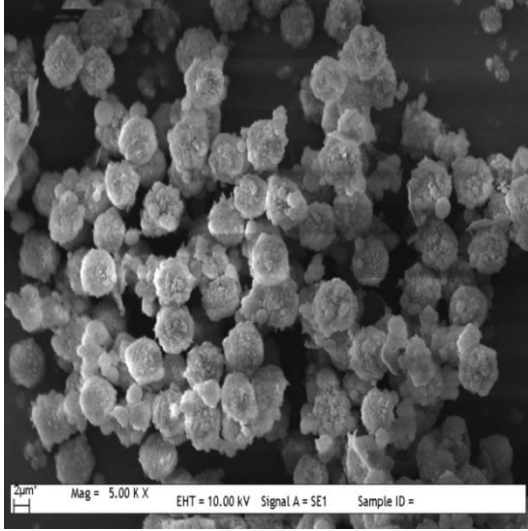


Şekil 4.4. m-PGMA ve m-PGMA-İDA mikrokürelere ait FTIR-ATR fark spektrumları

4.2.2. SEM ile Yüzey Analizi

HSA baskılanmış ve baskılanmamış m-PGMA mikrokürelere dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle elde edildi. Sentezlenen mikrokürelere yüzey morfolojileri ve yapısı SEM ile aydınlatılmıştır (Şekil 4.5). HSA baskılanmış m-PGMA mikrokürelere SEM görüntülerinde görüldüğü gibi partiküller 1-4 µm boyutlarında küresel bir şekle sahiptirler. SEM görüntüleri ile mikrokürelere hem küresel hem de yüksek monodispersiteye sahip olduğu görülmüştür. Bu görüntülerde kürelere yüzeyindeki gözenekler açık bir şekilde görülmektedir ve HSA baskılanmış mikrokürelere iç kısmındaki gözenekler pürüzlü bir yüzey ile çevrilmiştir. Yüzeyin pürüzlülüğü yüzey alanını artırıcı bir faktör olmakla birlikte gözenekler iç yüzey alanının yüksek olmasından dolayı difüzyon direncini azaltarak kütle transferini kolaylaştırır. Bu aynı zamanda daha yüksek protein adsorpsiyon kapasitesini sağlar.

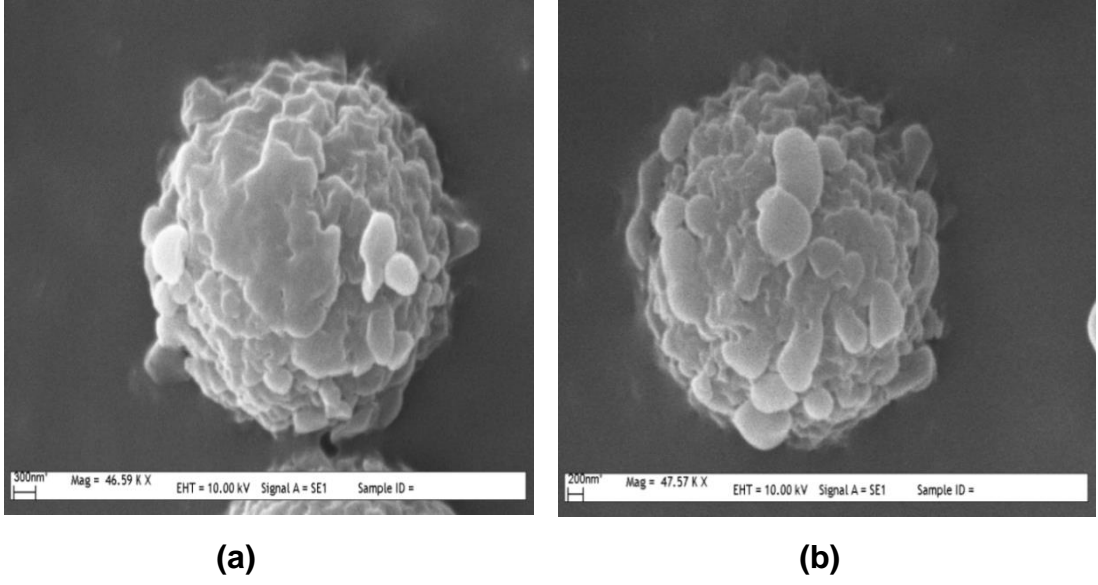
Silisyum varlığının tespiti için EDX analizi yapılmıştır. EDX spektrumlarından elde edilen verilere göre silan polimerizasyonu yapılmamış mikrokürelere (m-PGMA) yapısında silisyum bulunmazken MIP ve NIP için kütlece silisyum oranı sırasıyla %24.21 ve %32.79'dir. m-PGMA kürelere yapısındaki silisyum, silan polimerizasyonu ile kaplanan m-PGMA kürelere yapısının başarıyla sentezlendiğini göstermektedir. Şekil 4.7 ve 4.8'de gösterilmiş olan EDX spektrumunda silisyum varlığının yanında bakırda yapıda görülmektedir.



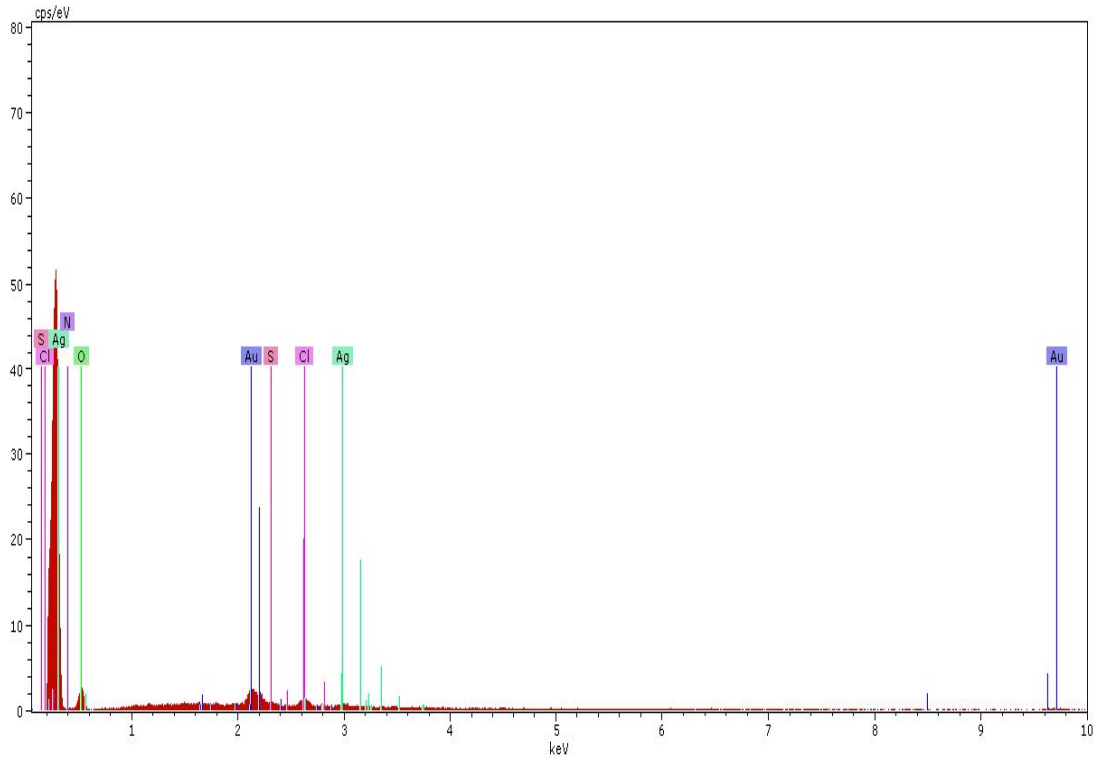
(a)

(b)

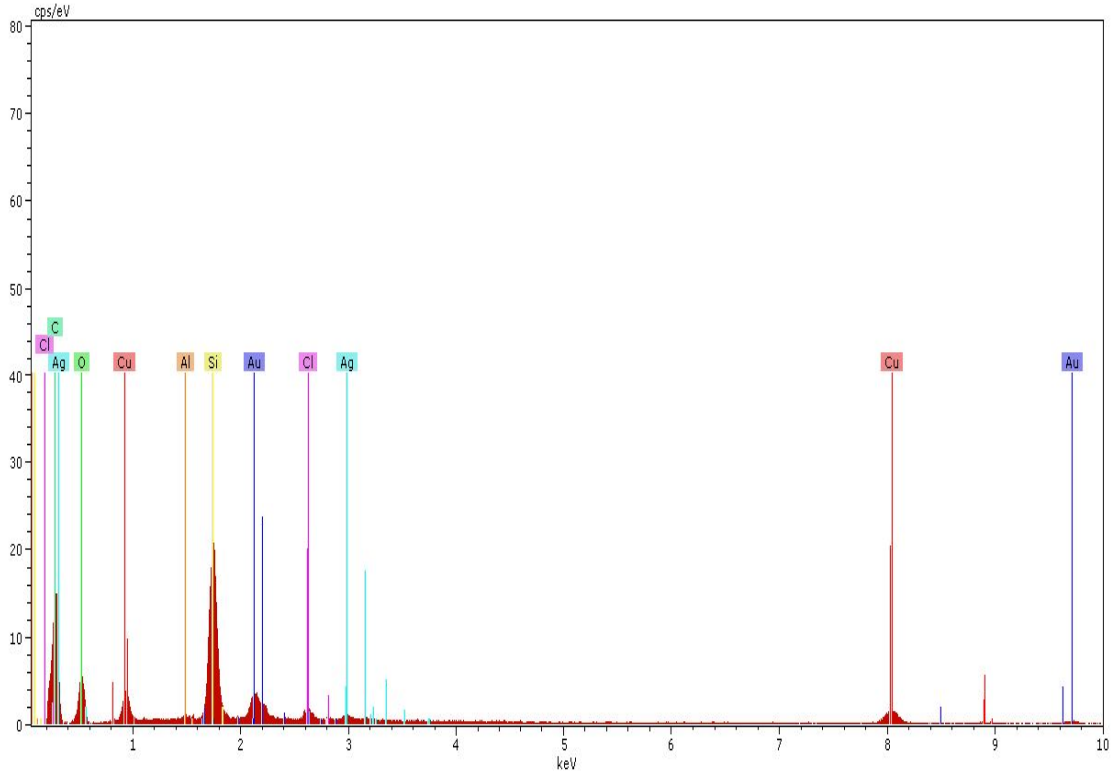
Şekil 4.5. (a) MIP ve (b) NIP mikrokürelerinin SEM görüntüleri



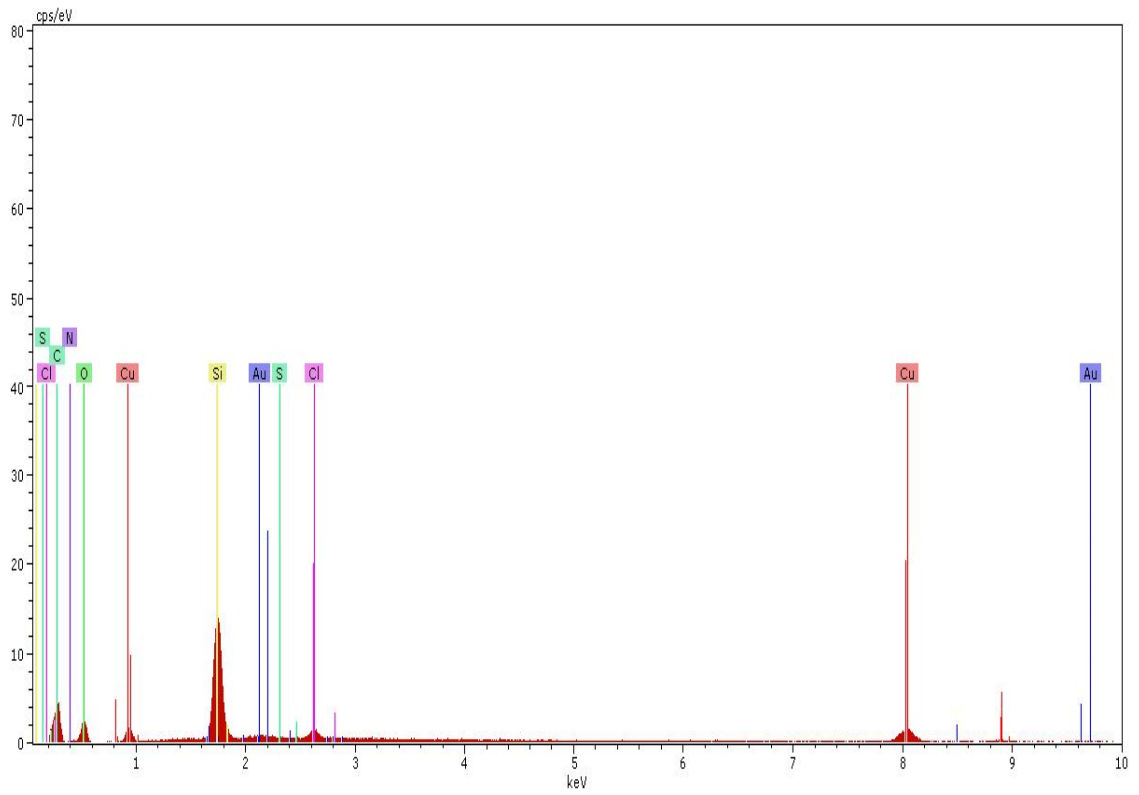
Şekil 4.5. (a) MIP ve (b) NIP mikrokürelerinin SEM görüntüleri (devamı)



Şekil 4.6. m-PGMA'nın EDX spektrumu



Şekil 4.7. MIP'nin EDX spektrumu



Şekil 4.8. NIP'nin EDX spektrumu

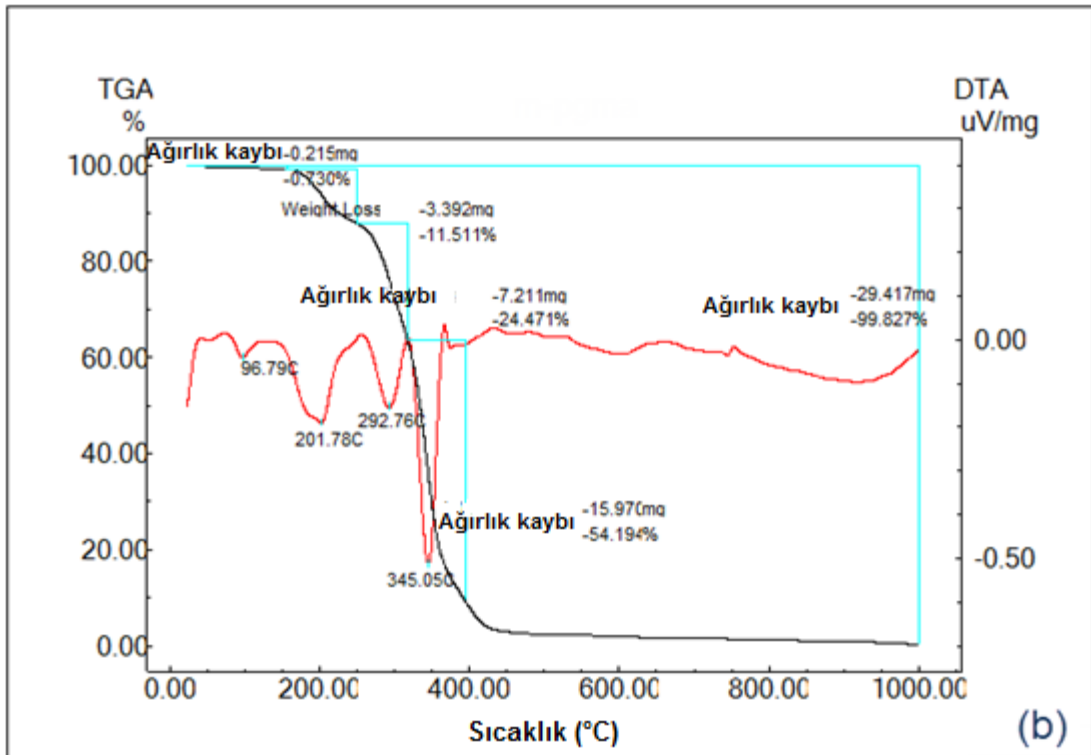
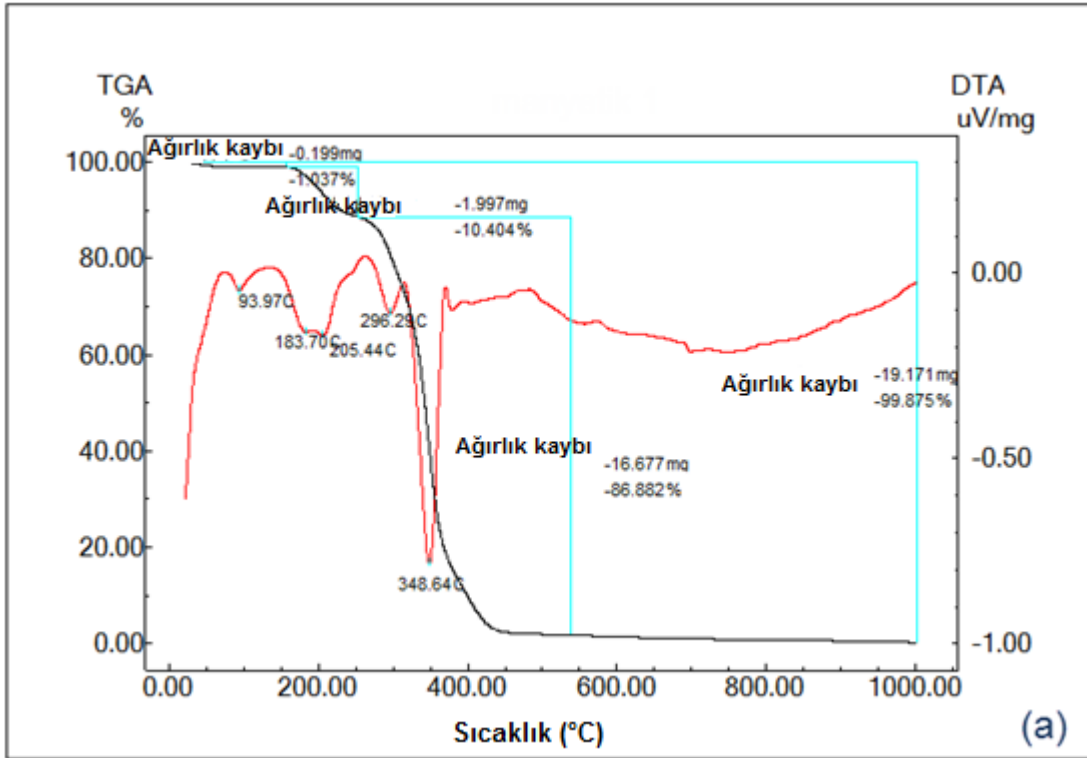
Çizelge 4.1: m-PGMA, MIP ve NIP'nin EDX spektrumlarından elde edilen kütle değerleri.

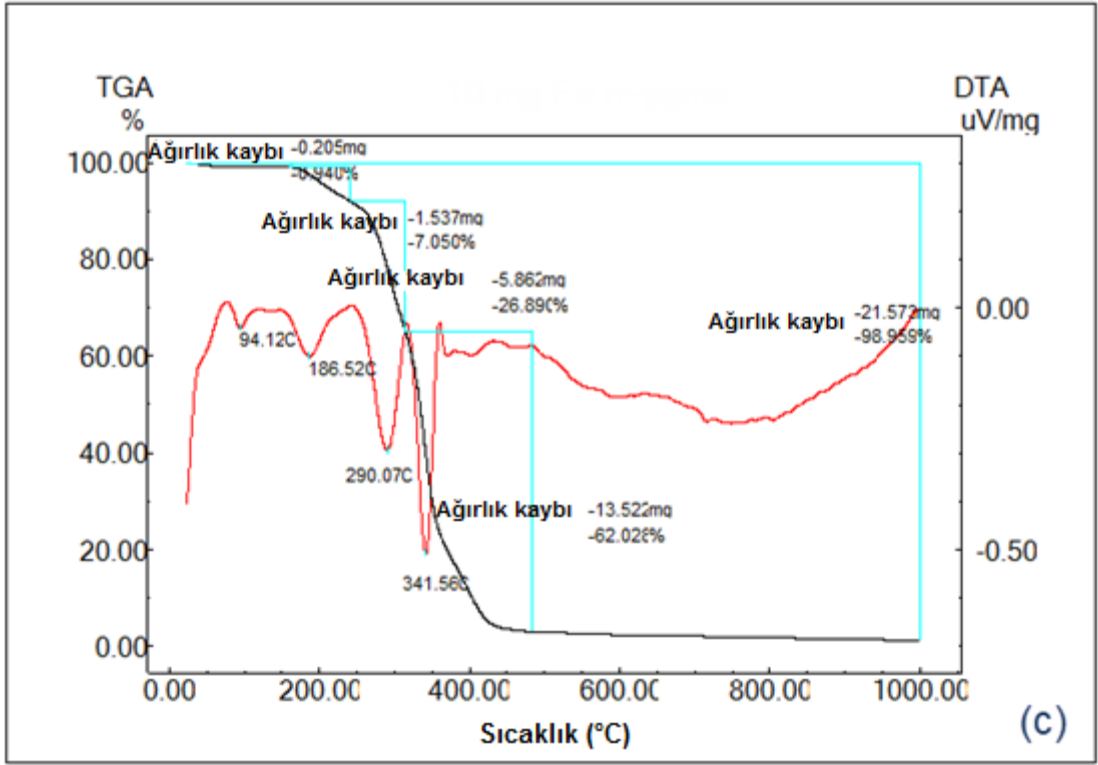
Spektrum	Azot (%)	Gümüş (%)	Altın (%)	Oksijen (%)	Silisyum (%)	Klorür (%)	Bakır (%)
m-PGMA		9.38	21.23	42.09			
MIP	7.19	2.79	13.59	17.88	24.21	2.13	39.40
NIP				21.86	32.79	2.82	35.34

4.2.3. TGA-DTA Termal Analiz Çalışmaları

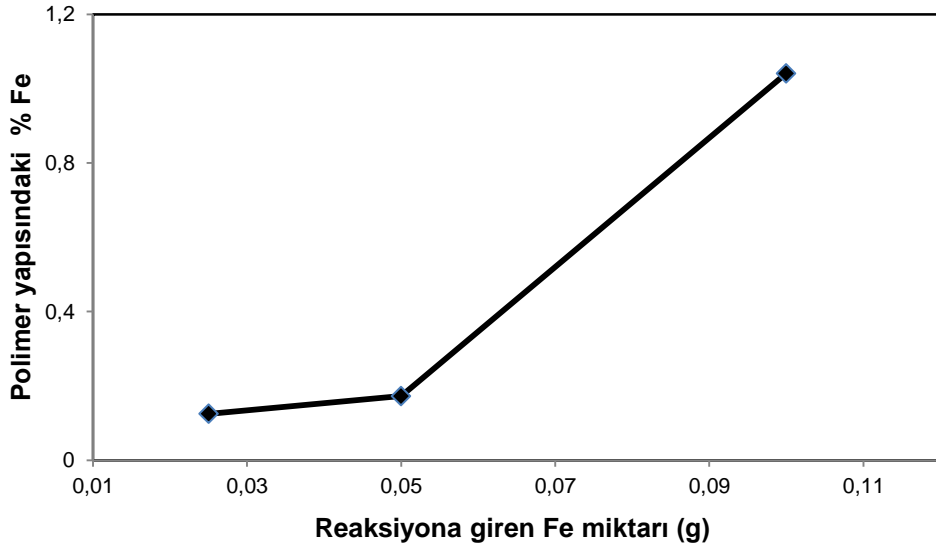
Farklı miktarlarda Fe içeriğine sahip m-PGMA mikrokürelere ait TGA termogramları Şekil 4.9'da verilmektedir. Mikrokürelere ait TGA'sı 10-1000°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiş ve Fe oksidasyonu ile meydana gelebilecek kütle artışını azaltmak için azot atmosferi altında gerçekleştirilen TGA ile m-PGMA mikrokürelere ait FeO içeriği belirlenmiştir. Polimerler 450°C'ın üzerindeki sıcaklıklarda tamamen bozunmuştur. 0.025, 0.050 ve 0.010 g Fe(II,III) oksit nano parçacık ile hazırlanan m-PGMA mikrokürelere ait sırasıyla manyetit içeriği toplam kütle için % 0.125, % 0.173, % 1.041'i olarak bulunmuştur.

Mikrokürelere ait herbir termogram incelendiğinde 4 tane endotermik pik görülmektedir (Şekil 4.9). Bu piklerde düşük sıcaklıkta görülen pik yapıda absorplanmış nemi uzaklaşmasına, daha yüksek sıcaklıkta görülen pikler ise yapıda oluşan bozunmaları göstermektedir.





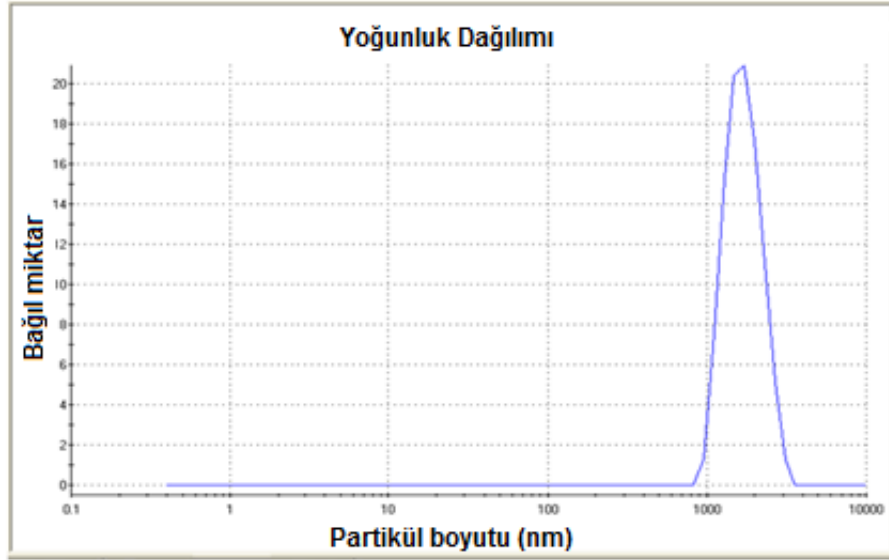
Şekil 4.9. (a) 0.025 ve (b) 0.050 (c) 0.010 g Fe(II,III) oksit nano parçacıklar ile hazırlanan m-PGMA'nın TGA-DTA eğrisi



Şekil 4.10. Farklı miktarlardaki Fe'nin polimerdeki manyetit içeriğine etkisi

4.2.4. Zeta Boyut ve Yük Analizi

Şekil 4.11'de m-PGMA mikrokürelerin zeta boyut analizi sonuçları görülmektedir. m-PGMA mikrokürelerin ortalama boyutu 1,7 µm ve eş boyut dağılım aralığına sahiptir.



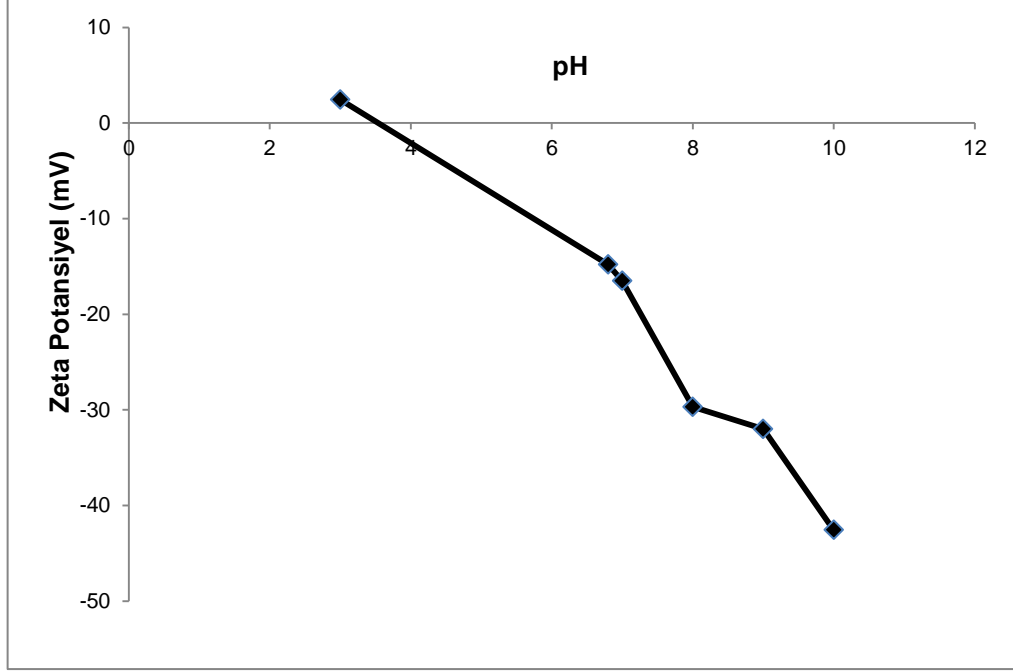
Şekil 4.11. m-PGMA kürelerin boyut dağılımı

Zeta potansiyeli süspansiyondaki herhangi bir parçacığın gösterdiği fiziksel bir özelliktir. Sulu ortamlarda pH, zeta potansiyelini etkileyen en önemli faktördür. pH değişimi kararlı ya da kararsız sistemlere neden olur. Zeta potansiyel değerinin büyüklüğü kolloidal sistemin kararlılığını gösterir. Zeta potansiyel değeri negatif/pozitif çok büyükse partiküller birbirini iter. Zeta potansiyel değeri -30 ve +30 arasında ise parçacıklar bir araya gelme eğilimi gösterirler ve bu durum parçacıkların topaklaşmasına neden olur.

Zeta potansiyel ölçümleri parçacığın yüzey özelliğini ve yüzeyinde meydana gelen süreçleri (adsorpsiyon, iyon değişimi, modifikasyon) tahmin etmemizi sağlar.

Zeta potansiyel ölçümler için mikrokürelerin değişen pH'larda çözetileri hazırlanmıştır. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi parçacıkların yüzey yükünün nötr olduğu pH 3.83 mikrokürelerin sıfır yük noktasıdır. pH 3.0-3.83 arasında ortamdaki H⁺ iyonlarının artması ile zeta potansiyel değeri +2.45 mV'a kadar artmaktadır. pH 4.0'dan pH 10.0'a negatif potansiyel değeri artmaktadır. pH 9.0-

10.0 arasında zeta potansiyel değeri -30mV'un üstünde negatif potansiyele sahip olduğu için sistemdeki parçacıkların kararlı olduğu pH 3.0 ve pH 8.0 arasında ise parçacıkların kararsız olduğu söylenebilir.



Şekil 4.12. m-PGMA kürelerin zeta potansiyel grafiği

4.2.5. İmmobilize Bakır İyonunun Miktarının Belirlenmesi

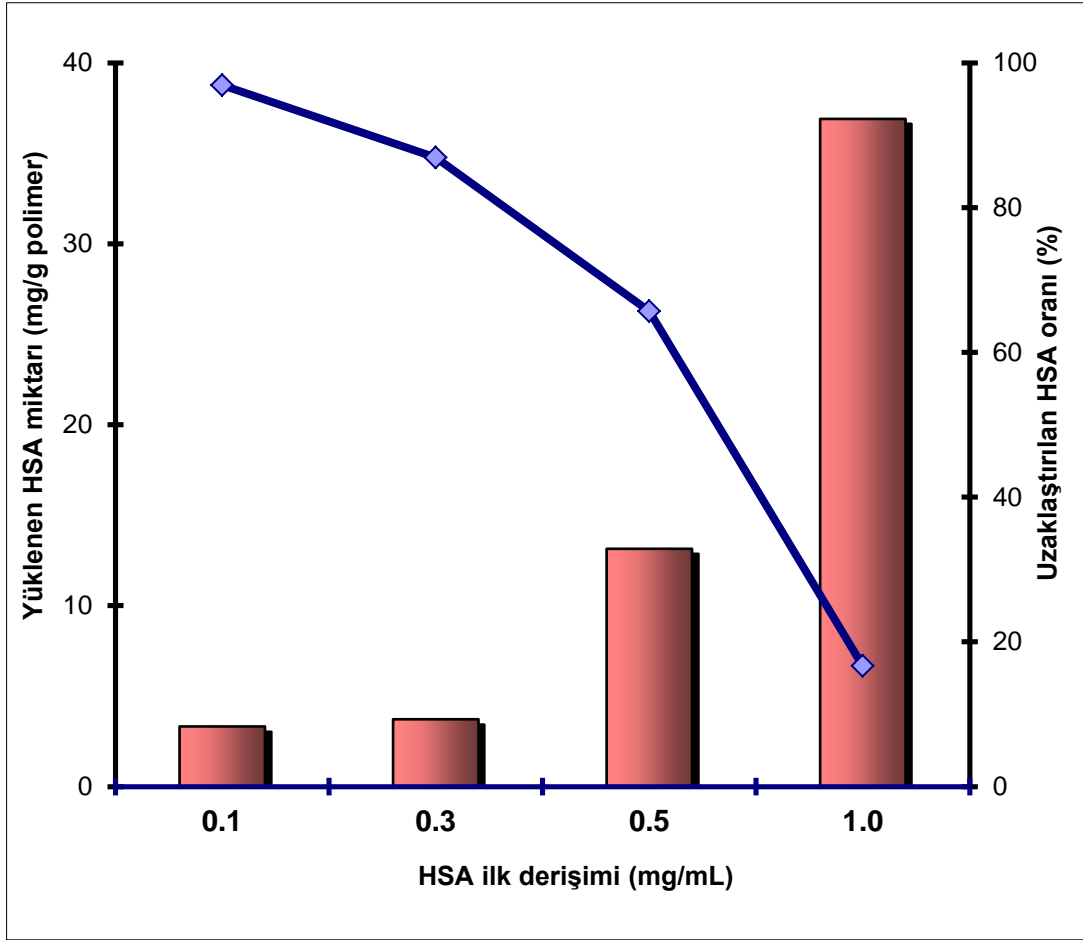
Manyetik PGMA-İDA mikrokürelere bağlanan Cu(II) iyonu miktarının belirlenmesi için immobilizasyon işlemi öncesi ve sonrasında ortamdaki alınan çözelti örnekleri, AAS ile analiz edildi. İDA şelatörü için 23.46 $\mu\text{mol/g}$ bakır iyon kapasitesine ulaşıldığı bulunmuştur.

4.2.6. Mikrokürenin Şişme Özelliklerinin İncelenmesi

m-PGMA mikrokürelere denge şişme oranı, gravimetrik yöntem kullanılarak, % 34 olarak bulunmuştur.

4.2.7. HSA Yükleme Miktarının Uzaklaştırma Oranına Etkisi

Şekil 4.13'te farklı derişimlerde HSA yüklenmiş m-PGMA mikrokürelere ait uzaklaştırma oranları görülmektedir. Bu verilere göre en yüksek uzaklaştırma değeri 0.1 mg/mL HSA yüklenmiş mikrokürelere %96.93 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.13. m-PGMA kürelere HSA yüklenmesi ve uzaklaştırılma oranı

4.3. ADSORPSİYON ÇALIŞMALARI

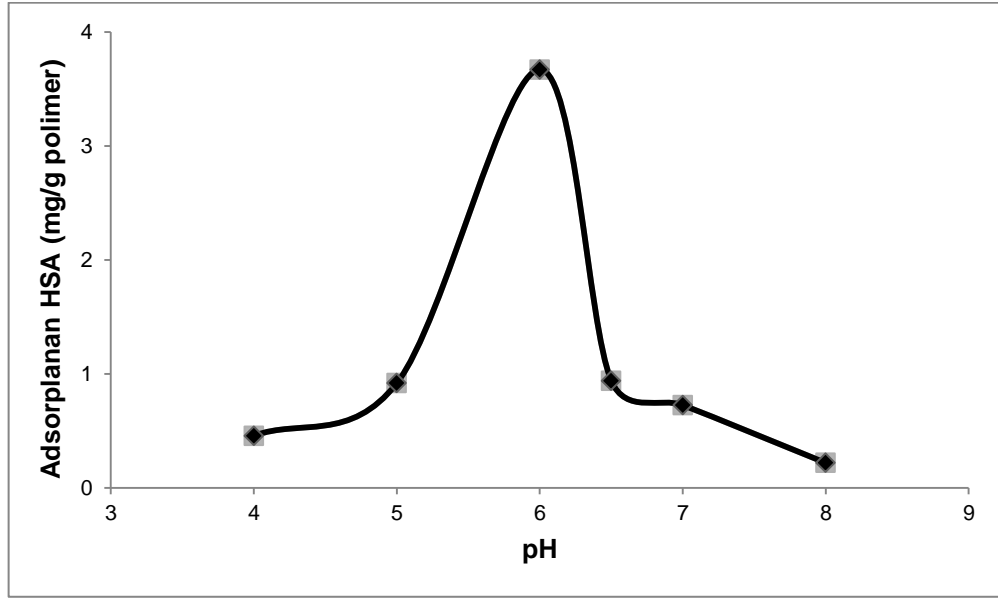
4.3.1. pH'nın Etkisi

HSA baskılanmış m-PGMA mikrokürelere üzerine protein adsorpsiyonu için farklı pH değerlerinde kesikli sistemde 5.0 mM'lık 0.3 mg/mL'lık HSA çözeltileri hazırlanarak MIP ile etkileştirilmiştir. Yapılan tüm adsorpsiyon işlemlerinde adsorplanan madde miktarları Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Q = [(C_0 - C) V] / m \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte Q mikrokürelere birim miktarı başına adsorplanan madde miktarını (mg/g); C_0 ve C sırasıyla adsorpsiyon öncesi ve sonrasında HSA çözeltisinin derişimi (mg/L); V sulu faz hacmi (mL) ve m'de kullanılan MIP ağırlığını (g) göstermektedir.

Sulu çözeltilerden HSA adsorpsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Deneyle en az üç kez tekrar edilmiştir. Her bir veri seti için ortalama değerler kullanılmıştır. Sonuç olarak Şekil 4.14'te görüldüğü gibi en yüksek adsorpsiyon kapasitesinin, pH 6.0'da fosfat tamponuyla sağlandığı bulunmuştur. HSA molekülü pH 6.0'da negatif yüklüdür (pI 4.7). HSA molekülü ile MIP arasındaki etkileşimler HSA'nın konformasyonundan kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.14. HSA adsorpsiyonuna pH'nın etkisi

Deneysel koşullar: HSA derişimi: 0.3 mg/mL, çözelti: 5.0 mM, 5.0 mL, adsorpsiyon süresi: 2 saat, ıslak mikrokürenin ağırlığı: 0.10 g.

4.3.2. Sıcaklığın Etkisi

HSA adsorpsiyonuna 4-45°C aralığında sıcaklığın etkisi incelenmiştir. HSA baskılanmış mikrokürelere HSA adsorpsiyonunun, farklı sıcaklıklardaki etkisi Şekil 4.15'te verilmiştir. HSA'nın MIP üzerine denge adsorpsiyonu sıcaklığın artmasıyla azalmıştır ve maksimum adsorpsiyon miktarı 4°C'da gerçekleşmiştir (Şekil 4.15). HSA baskılanmış manyetik mikrokürelerin adsorpsiyon sürecinin ekzotermik olmasından dolayı 4°C'tan 45°C'a adsorpsiyon kapasiteleri %30.5 azalmıştır. Sıcaklık artışı ile birlikte adsorpsiyon kapasitesindeki azalmalar

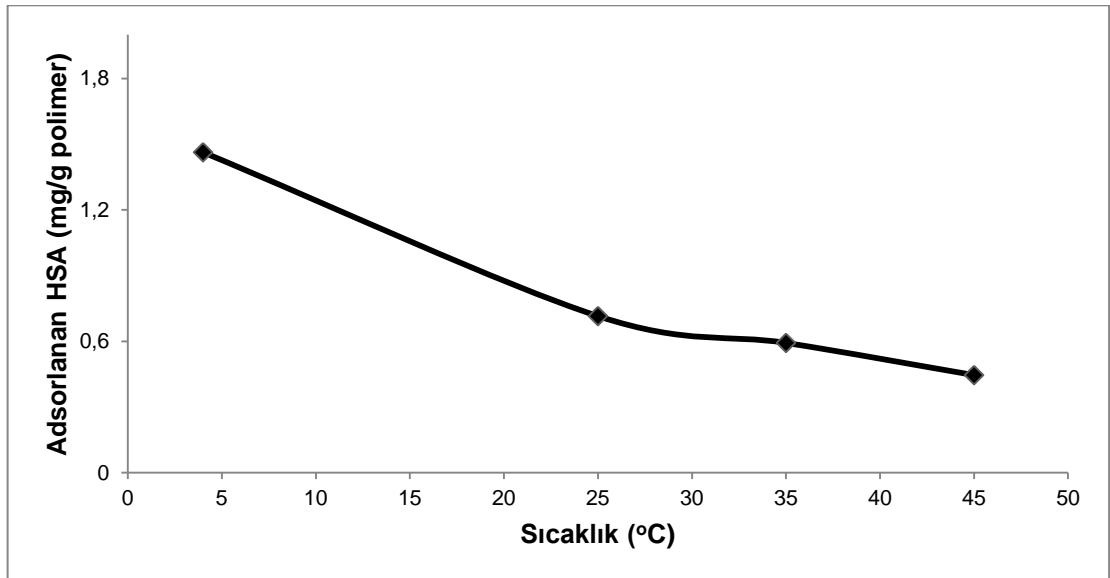
baskın etkileşim türlerinin hidrojen bağları ve elektrostatik (iyonik) etkileşimler olduğunu göstermektedir.

4.3.3. Başlangıç Derişimlerinin Etkisi

HSA başlangıç derişimlerinin adsorpsiyon kapasitesine etkisini gözlemek amacıyla 5.0 mM pH 6 fosfat tamponu kullanarak 0.01 ile 1.0 mM arasında çeşitli derişimlerde HSA çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerden 5.0 mL alınarak 0.10 g HSA baskılanmış ve baskılanmamış mikrokürelerin üzerine 4°C'da ilave edilmiştir. 2 saat sonra süzütülerdeki madde miktarları HSA için UV-Vis cihazı kullanılarak 595 nm'de bradford yöntemiyle tayin edilmiştir.

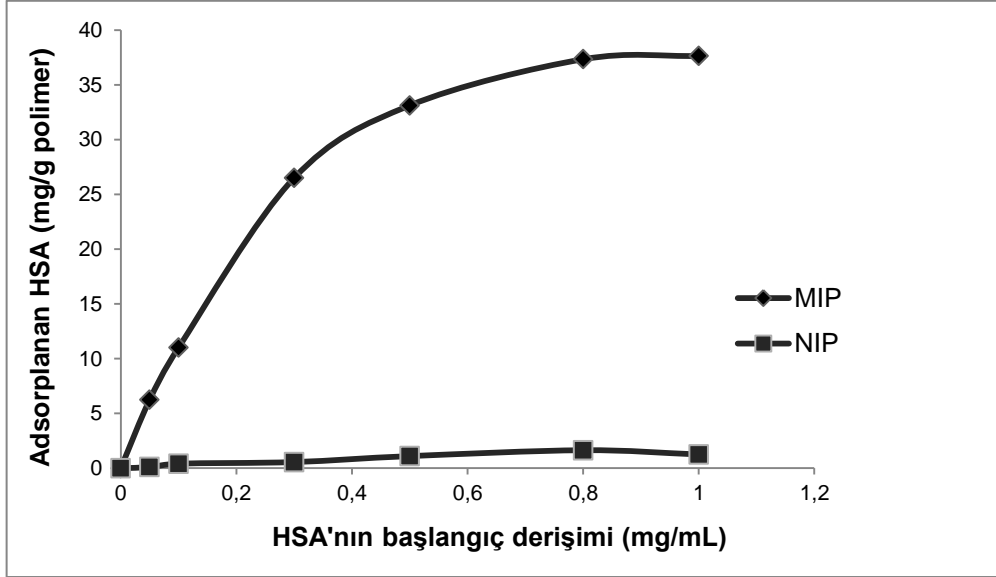
Başlangıç HSA derişiminin, HSA adsorpsiyonuna etkisi Şekil 4.16'da görülmektedir. Şekil 4.16'dan görüldüğü gibi birim manyetik mikroküre başına düşen HSA adsorpsiyon miktarı düşük derişimlerden HSA derişimi arttıkça doğrusal olarak hızla artmaktadır ve oldukça çabuk doygunluğa ulaşmaktadır. HSA baskılanmış mikrokürelerin HSA için maksimum adsorpsiyon kapasitesi 37.65 mg/g olarak bulunmuştur. Bu değere 1 mg/mL HSA başlangıç derişimi kullanılarak ulaşılmıştır.

Elde edilen adsorpsiyon izotermindeki bu dik eğim HSA ile Cu^{2+} - şelat grupları arasındaki yüksek afinitenin bir göstergesidir.



Şekil 4.15. HSA'nın adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi

Deneyisel koşullar: HSA derişimi: 0.3mg/mL, çözeltili: 5.0 mM, pH: 6.0, 5.0 mL, fosfat tamponu, adsorpsiyon süresi: 2 saat, ıslak mikrokürenin ağırlığı: 0.10 g

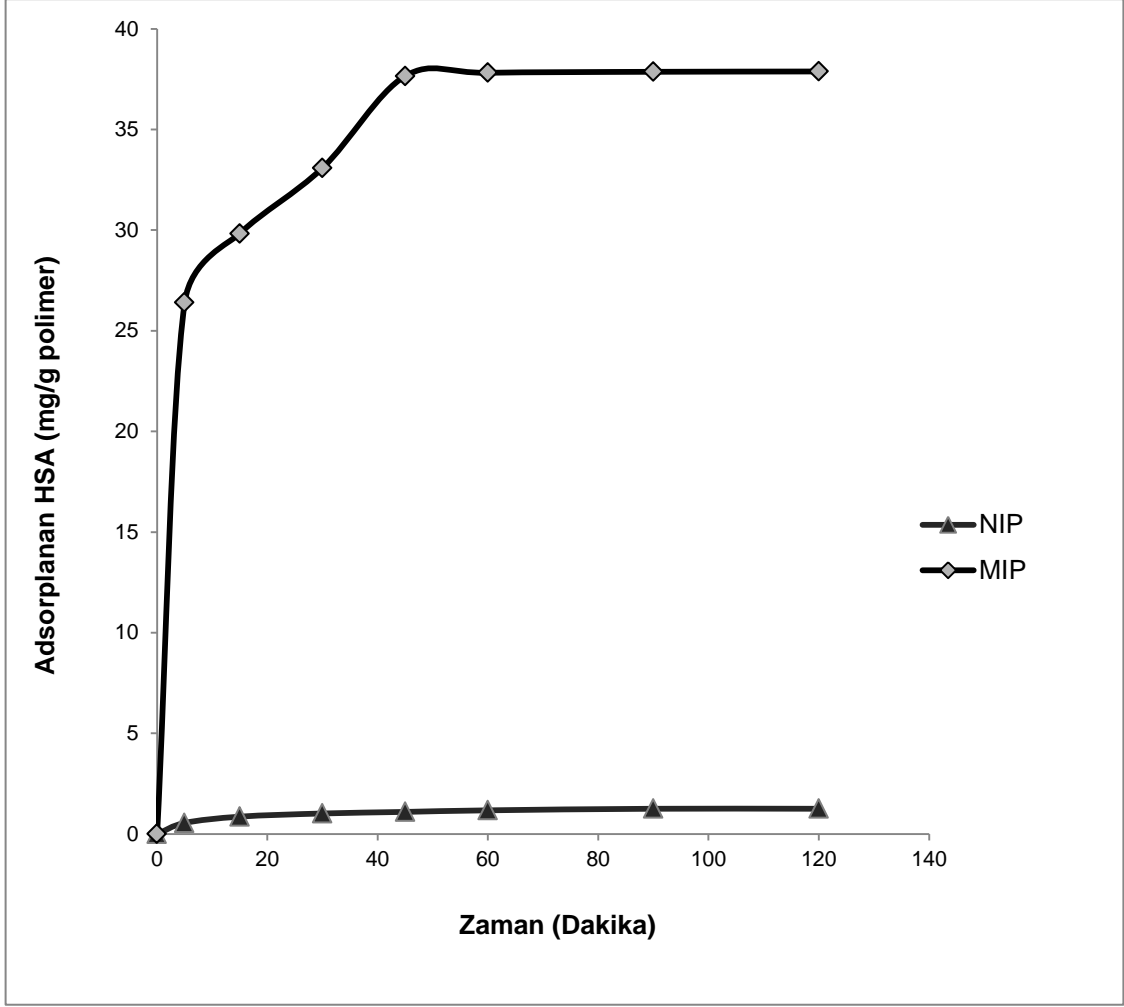


Şekil 4.16. HSA başlangıç derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi

Deneyisel koşullar: Çözeltili: 5.0 mM, pH 6.0, 5.0 mL fosfat tamponu, adsorpsiyon süresi: 2 saat, ıslak mikrokürenin ağırlığı: 0.10 g.

4.3.4. Adsorpsiyona Zamanın Etkisi

Şekil 4.17'de HSA adsorpsiyonunun zamana bağlı olarak değişimi gözlenmektedir. Adsorpsiyon oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Beklendiği gibi HSA'nın adsorbent yüzeyinde bağlanabileceği kendine özgü moleküler olarak kalıplanmış boşlukların dolması nedeni ile 45 dakikada adsorpsiyon doygunluğa erişmiştir. Bu sürede, HSA için maksimum adsorpsiyon miktarı 37.65 mg/g polimerdir. Baskılama işlemi ile m-PGMA mikroküre yapısında HSA molekülleri için spesifik moleküler boşluklar oluşmuştur. m-PGMA mikroküredeki bu HSA boşlukları, çözeltideki HSA için yüksek geometrik afiniteye sahiptir.



Şekil 4.17. Zamanın HSA adsorpsiyon kapasitesine etkisi

Deneysel koşullar: Çözelti: 5.0 mM, pH 6.0, 5.0 mL fosfat tamponu, ıslak mikrokürenin ağırlığı: 0.10 g.

4.4. HSA Baskılı Mikrokürelerin HSA Adsorpsiyonuna İlişkin Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi, her bir molekülün adsorbanlarla etkileşimlerinin karakterizasyonu için kullanılır. Adsorpsiyon izotermi, iki faz dengede iken katı faza adsorbe olan iyon miktarı ve çözeltideki moleküllerin derişimi arasında ilişki kurulmasını sağlar. Langmuir adsorpsiyon modeli, her biri yalnız bir molekülü tutmaya elverişli belirli sayıdaki tanımlanmış bölümlere moleküllerin adsorbe olduğunu varsayar. Bu bölümlerin enerji olarak eşdeğer olduğu ve yakın bölümlerdeki adsorbe olmuş moleküllerle arasında hiçbir etkileşim olmayacak

kadar birbirinden uzak olduğu varsayılır. Langmuir denklemi aşağıdaki gibi gösterilebilir.

$$Q=Q_{\max}bC_{\text{eq}}/(1 + b C_{\text{eq}}) \quad (4.2)$$

Bu eşitlikte;

Q = Adsorbana adsorplanmış HSA derişimi (mg/g)

C_{eq} = Çözeltideki HSA denge derişimi (mg/L)

b = Langmuir sabiti (L/mg)

Q_{\max} = Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mmol/g) dir.

Bu denklem aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir.

$$1/Q = [1/(Q_{\max}b)][1/C_e] + [1/Q_{\max}] \quad (4.3)$$

$1/Q$ 'ya karşı $1/C_e$ grafiğe geçirildiğinde; kesim $1/Q_{\max}$, eğim ise $1/Q_{\max}b$ 'yi verir.

şekil 4.18'de HSA adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.

Sisteme uygulanan diğer bir adsorpsiyon modeli ise Freundlich izotermidir. Freundlich denklemi ideal olarak temiz ve homojen olmayan katı yzeylerdeki adsorpsiyonlar için Alman fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich tarafından deneysel çalışmalara bağlı olarak türetilmiştir [56].

$$\ln Q = \ln K_f + n \ln C_e \quad (4.4)$$

Bu eşitlikte;

Q = Adsorbana adsorplanmış HSA derişimi (mg/g)

C_e = Çözeltideki HSA denge derişimi (mg/L)

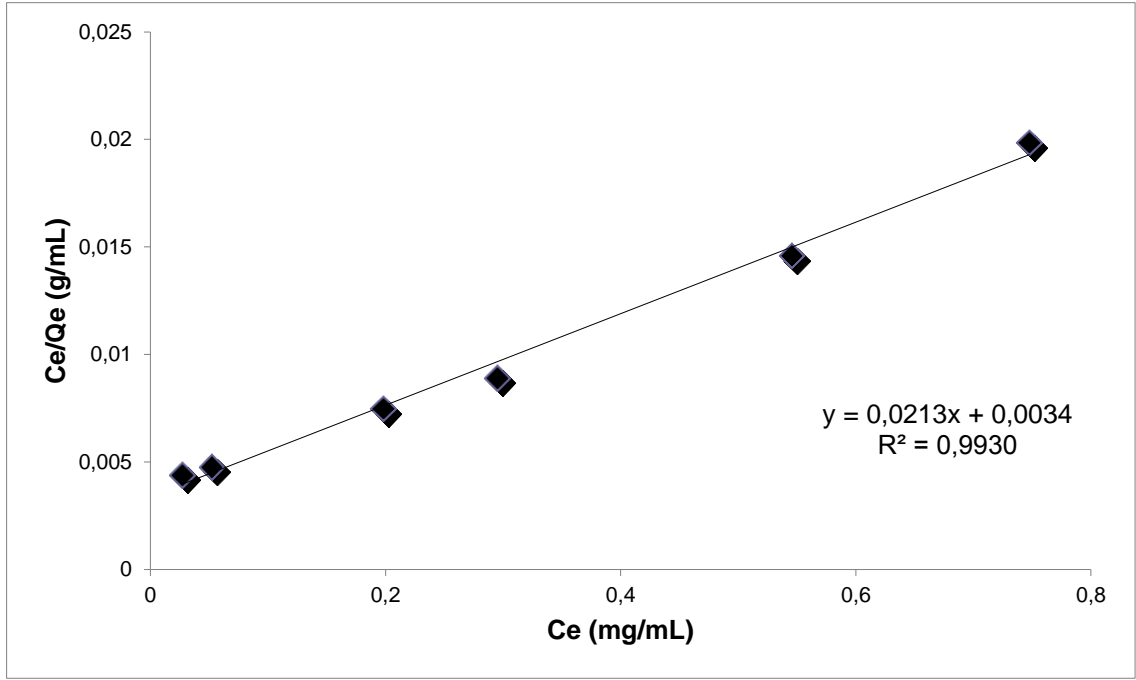
n = Freundlich sabiti

K_f = Freundlich sabiti

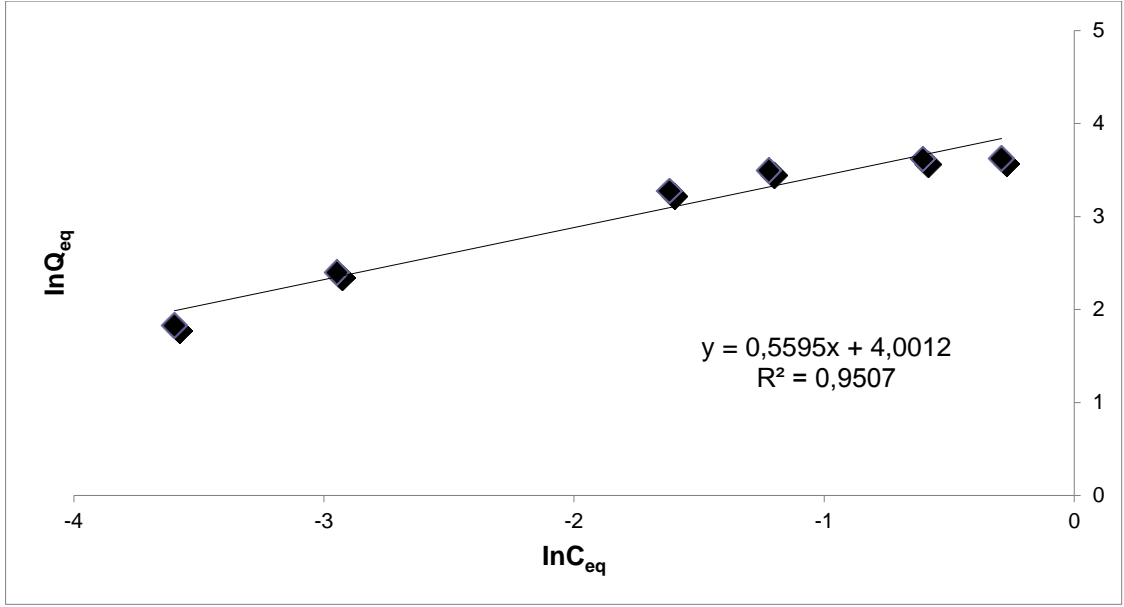
$\ln Q$ 'ya karşı $\ln C_{\text{eq}}$ grafiğe geçirildiğinde kesimden K_f ve eğimden n sabitleri bulunabilir. şekil 4.19'da HSA adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.

HSA adsorpsiyon verileri sırasıyla Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermine uygulandığında HSA adsorpsiyonunun Langmuir izotermine

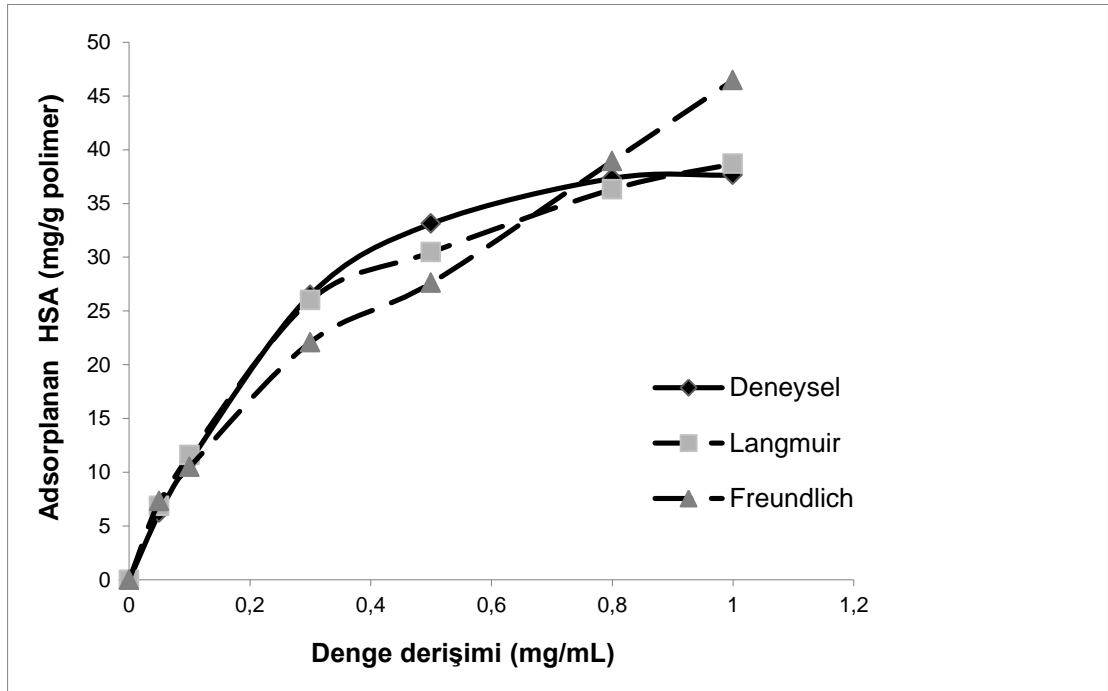
uyduğu bulunmuştur. Çünkü elde edilen grafiklerin regresyon sabitlerine (R^2) bakıldığında Langmuir için hesaplanan değer (0.9930), Freundlich için hesaplanan değerden (0.9507) daha yüksek çıkmıştır. Dolayısıyla sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği söylenebilir. Bu izotermiler ile ilgili elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.18. HSA baskılanmış mikrokürelerin HSA adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izotermi



Şekil 4.19. HSA baskılanmış mikrokürelerin HSA adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon izotermi



Şekil 4.20. HSA baskılanmış mikrokürelerin deneysel adsorpsiyon kapasitesi (mg/g) ile Langmuir ve Freundlich ile modellenen adsorpsiyon kapasitesi

Çizelge 4.2: HSA baskılı mikroküreler için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması

	Deneysel	Langmuir Sabitleri			Freundlich Sabitleri		
	Q_{deneysel} (mg/g)	Q_L (mg/g)	b (mL/mg)	R^2	Q_F (mg/g)	n	R^2
MIP	37.64	46.95	6.26	0.993	54.66	1.79	0.9507

4.5. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon kinetiği ile etkin adsorbent-çözünen temas süresi yani alıkonma süresi bulunur. Adsorpsiyon işleminin hızına etki eden adsorpsiyon basamaklarının anlaşılması için önemli bir adımdır. Kütle aktarımı ve kimyasal tepkime gibi adsorpsiyon işlemi kontrol eden mekanizmaların belirlenmesi için deneysel verilere birinci ve ikinci derece kinetik modeller uygulanmıştır. Ölçülen derişimlerin adsorbentin yüzey derişimine eşit olduğu varsayılmıştır. Lagergren'in birinci derece hız eşitliği çözümlenenden adsorpsiyonunda en çok kullanılan eşitlik [57]. Eşitlik 4.5 ile gösterilir;

$$\Delta Q_t/dt = k_1(Q_e - Q_t) \quad (4.5)$$

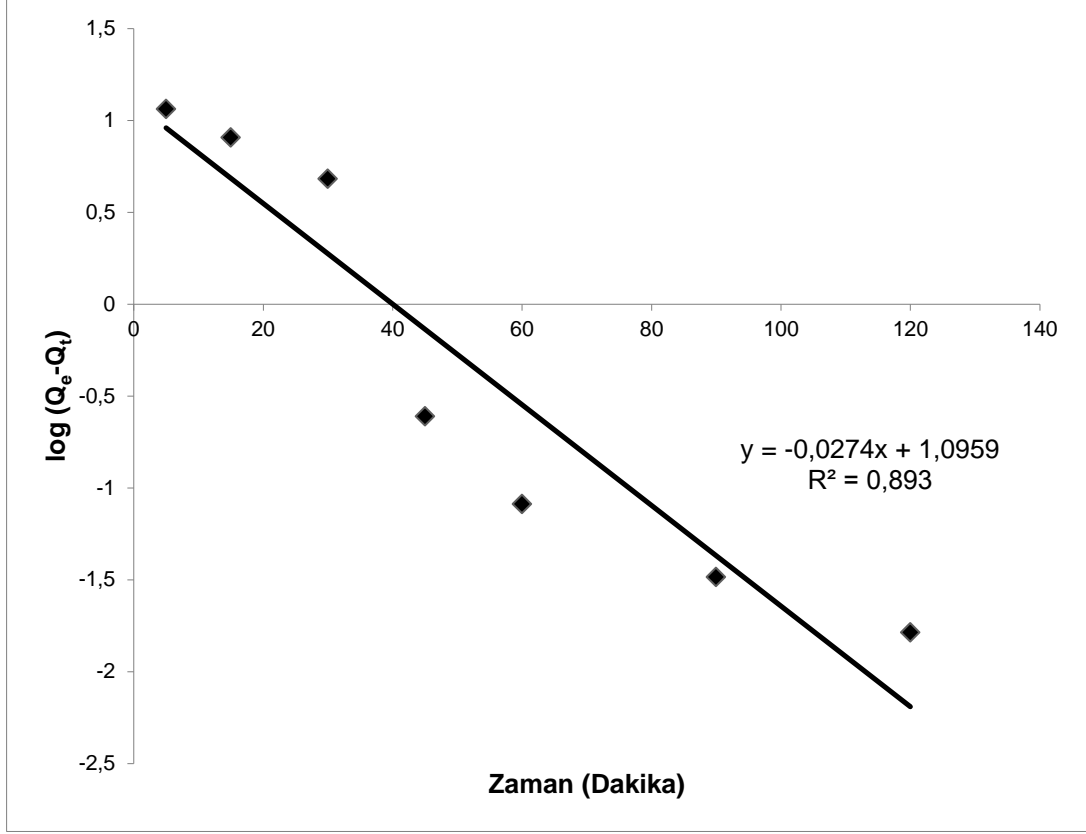
Eşitlikte, k_1 yalancı birinci derece adsorpsiyon hız sabitini (d_k^{-1}), Q_e ve Q_t sırasıyla denge zamanında ve herhangi bir t anında adsorplanan HSA miktarını (mg/g) ifade etmektedir. $t=0$ 'da $Q_t=0$ ve $t=t$ anında $Q_t=Q_t$ sınır koşulların uygulanıp integralinin alınması;

$$\log[Q_e/(Q_e - Q_t)] = (k_1 t)/2.303 \quad (4.6)$$

eşitliğini vermektedir. Eşitlik 4.6 tekrar düzenlenerek doğrusallaştırılırsa:

$$\log(Q_e - Q_t) = \log(Q_e) - (k_1 t)/2.303 \quad (4.7)$$

$\log(Q_e)$ 'ye karşı t grafiğinin doğrusallığı kinetik modelin uygulanabilirliğini göstermektedir. Gerçek birinci-derece işlemde $\log(Q_e)$, $\log(Q_e - Q_t)$ 'ye karşı t grafiğinin kesim noktasına eşit olmalıdır. Şekil 4.21 HSA baskılanmış mikrokürelerine ait yalancı birinci derece lineer grafikleri göstermektedir.



Şekil 4.21. HSA baskılanmış mikrokürelerin yalancı birinci derece grafikleri

Buna ek olarak, adsorpsiyon denge kapasitesine dayalı yalancı ikinci derece eşitlik aşağıdaki şekilde verilebilir:

$$\Delta Q_t/dt = k_2(Q_e - Q_t)^2 \quad (4.8)$$

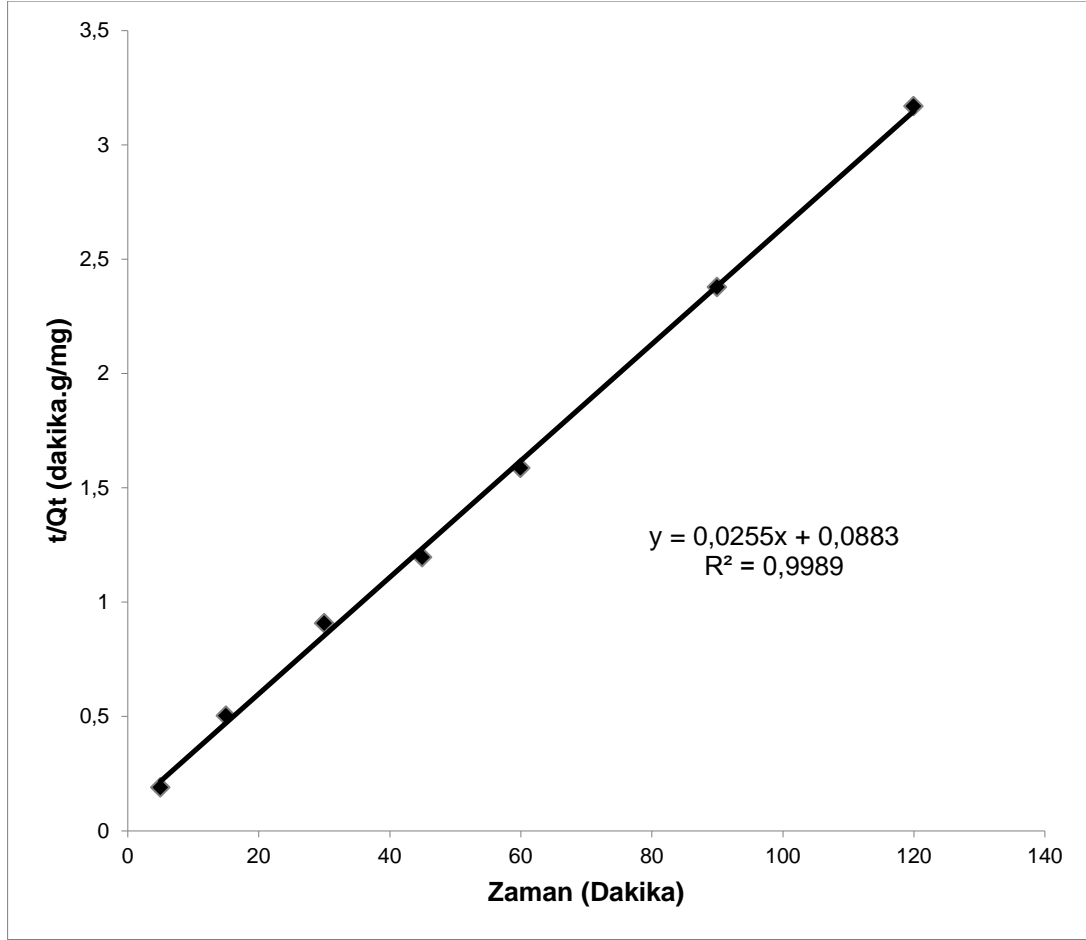
Eşitlikte k_2 pseudo-ikinci derece hız sabitidir ($g \cdot mg^{-1} \cdot dak^{-1}$). Eşitlik 4.8'e $t=0$ da $Q_t=0$ ve $t=t'$ 'de $q_t=q_t$ sınır koşullarının uygulanması ile;

$$1/(Q_e - Q_t)] = (1/Q_e) + k_2 t \quad (4.9)$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitliğin doğrusal halı:

$$(t/Q_t) = (1/k_2 Q_e^2) + (1/Q_e) t \quad (4.10)$$

ile ifade edilir. İkinci derece kinetiğin uygulanabilir olması için t/q_t 'ye karşı t grafiğinin doğrusal olması gereklidir. Hız sabiti (k_2) ve denge adsorpsiyonu (Q_e) sırasıyla kesim noktası ve eğimden elde edilebilir. Şekil 4.22 HSA baskılanmış mikrokürelere ait yalancı ikinci derece lineer grafikleri göstermektedir.



Şekil 4.22. HSA baskılanmış mikrokürelerin yalancı ikinci derece grafikleri

Çizelge 4.3: HSA baskılanmış mikrokürelerin için yalancı birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri

	Denge	Deneysel	Yalancı birinci derece kinetik			Yalancı ikinci derece kinetik		
	Derişim (mg/mL)	Q_e (mg/g)	k_1 (1/dak)	Q_e (mg/g)	R^2	k_2 (g/mg.dak)	Q_e (mg/g)	R^2
MIP	1.0	37.6	6.3×10^{-2}	2,99	0.893	7.3×10^{-3}	39.21	0.998

HSA baskılanmış mikrokürelerin yalancı birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. Hesaplamalar sonucunda, HSA baskılanmış

mikrokürelerinin sulu çözeltilerde HSA için ikinci derece kinetik modelin daha uygun olduğu görülmektedir. İkinci derece kinetik hesaplamalarda elde edilen teorik Q_e değerleri, deneysel Q_e değerlerine oldukça yakındır. Bu sonuçlar HSA baskılanmış mikrokürelerinde sulu çözeltilerde HSA için, adsorpsiyonun kimyasal kontrollü gerçekleştiğini göstermektedir. Yani, yalancı ikinci derece kinetik modele uyan adsorpsiyon davranışı difüzyon kısıtlamalarının ihmal edilebilir düzeyde olduğunu, dolayısıyla kimyasal adsorpsiyonun yani HSA baskılanmış mikroküreler ile HSA arasındaki spesifik bağlanma tepkimesinin kinetik davranışı kontrol ettiğini göstermektedir.

4.6. Seçicilik Deneyleri

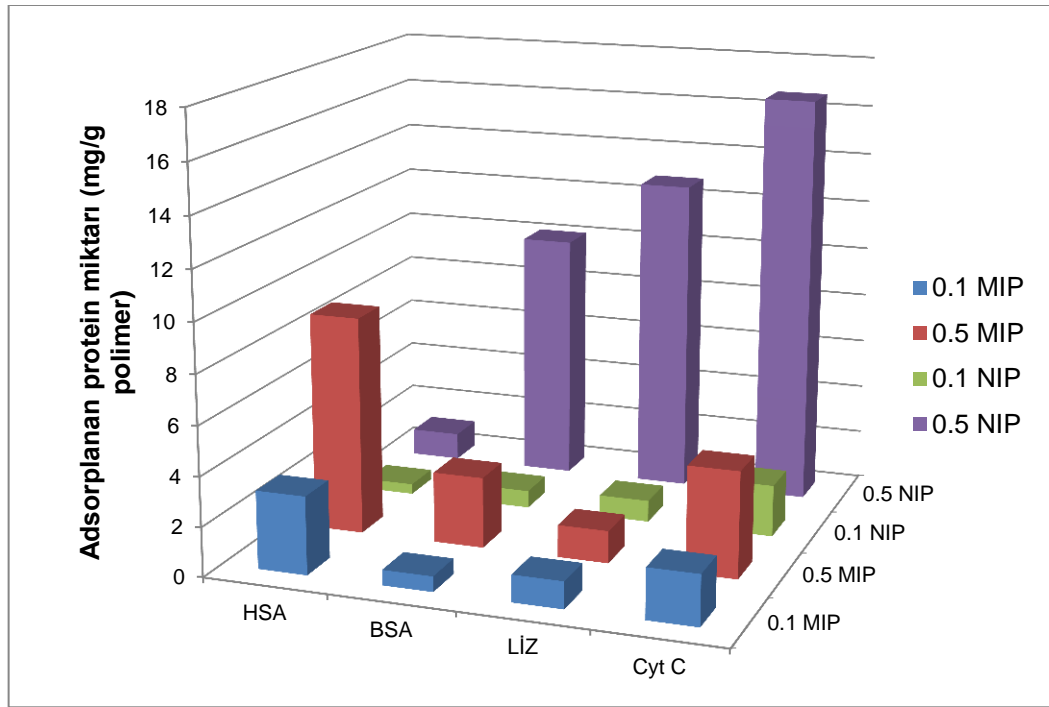
HSA baskılanmış m-PGMA mikrokürelerin seçiciliğini göstermek üzere yarışmalı adsorpsiyon deneyleri 5.0 mM, pH 6.0 fosfat tamponunda ve kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Yarışmacı protein olarak lizozim, sığır serum albümin (BSA) ve sitokrom C (Cyt C) kullanılmıştır. Çizelge 4.4'te kullanılan proteinlerin molekül kütleleri ve izoelektrik noktaları verilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda, HSA baskılanmış mikrokürelerin, tekli yarışmacı protein çözeltisindeki K değerlerinin, NIP mikrokürelerin K değerlerinden daha yüksek olduğu hesaplanmıştır. Bağlı seçicilik katsayısı (K' değeri) HSA baskılanmış mikrokürelerin aktif bağlanma bölgelerinin HSA baskılanmamış mikrokürelere göre seçiciliğini göstermektedir. Çizelge 4.5'te 0.1 ve 0.5 mg/mL HSA baskılanmış mikrokürelerin K' değerleri incelendiğinde, başlangıç derişimleri 0.1 ve 0.5 mg/mL olan protein çözeltileri için HSA'nın yarışmacı proteinlere göre daha seçici olduğu görülmektedir.

HSA baskılanmış manyetik mikrokürelerin seçicilik çalışmalarında, HSA ve yarışmacı proteinlerin başlangıç derişimleri 0.1 ve 0.5 mg/mL'dir. Tekli protein çözeltileri varlığında adsorplanan protein miktarları Şekil 4.23'te görülmektedir. Bu sonuçlar incelendiğinde, HSA baskılanmış mikroküreler, HSA'ya yüksek seçicilik gösterirken, NIP manyetik mikroküreler HSA'ya belirgin bir seçicilik göstermemektedir. Bu sonuçlar, HSA baskılanmış mikrokürelerin diğer yarışmacı proteinlere göre HSA için daha yüksek seçicilik göstermesinden dolayı HSA için oluşturulan aktif tanıma bölgelerinin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.

Çizelge 4.4: Proteinlerin molekül ağırlığı ve izoelektrik noktaları

Protein	Molekül Ağırlığı (kDa)	İzoelektrik nokta
HSA	67	4.7
BSA	67	4.7
Lizozim	14.6	10.8
Sitokrom C	12.3	10.2



Şekil 4.23. 0.1 ve 0.5 mg/mL HSA baskılanmış ve baskılanmamış mikrokürelere farklı derişimlerdeki yarışmacı proteinlerin adsorplanan madde miktarları (mg/g). Başlangıç derişimleri: 0.1 ve 0.5 mg/mL. Adsorpsiyon koşulları; pH: 6.0 çözelti hacmi: 5.0 mL, 4°C, adsorpsiyon süresi: 2 saat, mikrokürenin ıslak ağırlığı: 0.10 g.

Çizelge 4.5: HSA baskılanmış ve baskılanmamış manyetik mikroküreler için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları

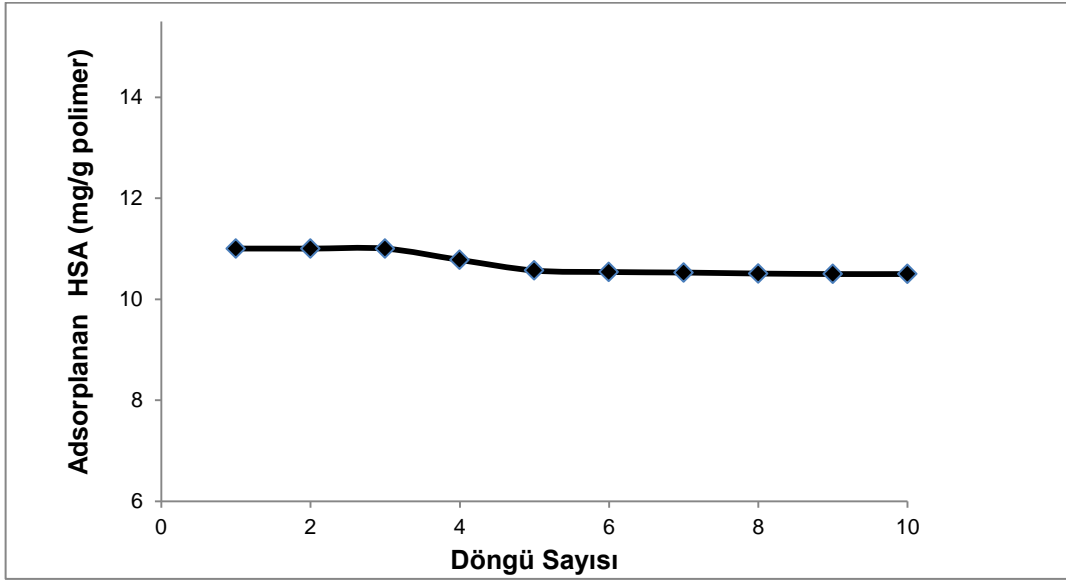
	MIP		NIP		k'
	k _d	k	k _d	k	
0.1 mg/mL HSA	15.62		1.63		
0.1 mg/mL BSA	10.59	1.47	14.68	0.11	13.31
0.1 mg/mL Lizozim	13.86	1.13	11.43	0.14	7.92
0.1 mg/mL Cyt C	37.95	0.41	38.26	0.043	9.68

	MIP		NIP		k'
	k _d	k	k _d	k	
0.5 mg/mL HSA	5.08		0.59		
0.5 mg/mL BSA	8.97	0.57	6.18	0.0961	5.90
0.5 mg/mL Lizozim	2.74	1.86	5.90	0.101	18.43
0.5 mg/mL Cyt C	11.30	0.45	9.57	0.062	7.24

4.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

HSA baskılanmış mikrokürelere adsorplanan HSA'nın desorpsiyonu için 10.0 mM asetat tamponunda hazırlanmış 1.0 M NaCl (pH 4.0) çözeltisi desorpsiyon ajanı olarak kullanılmıştır. HSA baskılanmış mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı mikroküreler kullanılarak 10 kez tekrar edilmiştir. Toplanan desorpsiyon

örnekleri bölüm 3.2.7'de verilen analiz yöntemiyle tayin edilmiştir. HSA baskılanmış mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliğini gösteren adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü Şekil 4.24'te verilmiştir. HSA baskılanmış mikrokürelerin 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon çalışmasında desorpsiyon oranı %95 olarak kaydedilmiştir. Desorpsiyon oranı, bu mikroküreler için oldukça yüksektir ve HSA adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma görülmemiştir.



Şekil 4.24. HSA baskılanmış mikrokürelerin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü

4.8. Literatür ile Karşılaştırma

Aşağıda HSA'nın spesifik olarak tanınması için protein afinite malzemelerin kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar özetlenmiştir:

- Bonini ve arkadaşları protein HSA'nın uzaklaştırılması için poli-aminofenilboronik asit (ABPA) baskılı küreler sentezlemişler. Ticari olarak geçerli afinite malzemelerle karşılaştırma yapılarak HSA bağlanma kapasitesini 1.4 mg/g olarak bulmuşlardır [58].
- Okutucu ve arkadaşları albümin baskılanmış kitosan kürelerinin adsorpsiyon kapasitesini incelemişler ve adsorpsiyon kapasitesini 0.4 mg/g olarak bulmuşlardır [59].
- Andaç ve arkadaşları poli(hidroksietilmetakrilat) temelli moleküler baskılanmış kriyojeller hazırlamışlar. Seçici bağlama deneylerini insan

transferrin (HTR) ve miyoglobin (MYB) yarışmacı proteinleri varlığında gerçekleştirerek MIP kompozit kriyojelin HSA için bağlanma kapasitesi 722,1 mg/dL olarak bulmuşlardır [60].

- Garipcan ve arkadaşları poli(hidroksietil metakrilat- metakrioloamidosistein [poli-(HEMA-MAC)] kürelerini sentezleyerek sulu çözeltilerden HSA adsorpsiyonu çalışmalarını yapmışlardır. Cu şelatlanmış kürelerin HSA için maksimum adsorpsiyon kapasitesini (193 mg/g) [poli-(HEMA-MAC)] kürelerin adsorpsiyon kapasitesinden (37 mg/g) daha yüksek olduğunu bulmuşlardır [61].
- Ma ve arkadaşları dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle ortalama boyutu 2.2 µm olan monodispers çapraz bağlı poligliseridimetakrilat (PGMA) partiküllerini sentezlemişlerdir [62].
- Shiomi ve arkadaşları moleküler baskılama tekniğini kullanarak silika üzerinde hemoglobine özgü tanıma boşlukları oluşturmak için poroz silika yüzeyinde iki organik silanın [3-aminopropiltrimetoksisilan (APTMS) ve trimetoksipropilsilan (TMPS)] polimerizasyonunu sağlayarak silan miktarının protein baskılama üzerinde önemli rol oynadığını bulmuşlardır [63].
- Lin ve arkadaşları 3-dimetilaminopropilmetakrilamid-akrilat ile albüminin baskılanmasıyla albümin derişimini hassas bir şekilde belirleyebilen MIP-QCM sensör hazırlamışlardır. QCM'in altın elektrodu albümin MIP ile kaplanarak hazırlanan sensörü klinik örneklere uygulamışlardır [64].
- Hu ve arkadaşları 3-dimetilaminopropilmetakrilat ve tetraetilen glikoldimetakrilatın molce 1:8 oranında kullanılarak çözelti ortamında albüminin proteinlerden ayrılması için bu albümin baskılanmış polimeri sentezlemişlerdir. Albumin baskılanmış polimerin adsorpsiyon kapasitesini ve seçiciliğini sırasıyla $6.02 \times 10^{-3} \text{ g g}^{-1}$ polimer ve %98.7 olarak bulmuşlardır [7].
- Hu ve arkadaşları 3-dimetilaminopropilmetakrilat ve pentaeritritoltetraakrilatı molce 1:11 oranında kullanarak albümin baskılanmış polimer sentezlemişler. Sentezledikleri albümin baskılanmış polimerler için monomerin, çapraz bağlayıcıya mol oranının etkisi ile polimerizasyon sıcaklığının ve zamanının etkisini incelemişlerdir. Elde

ettikleri verilere göre MIP için polimerizasyon sıcaklığının ve zamanının oldukça önemli olduğunu bulmuşlardır [65].

- Ghasemzadeh ve arkadaşları moleküler baskılama tekniğini kullanarak klinik örneklerdeki albüminin derişiminin kolay ve hızlı bir şekilde belirlenmesi için albümine karşı yapay jel antibadileri sentezlererek serebrospinal sıvı (CSF) ve insan plazmasındaki albüminin kantitatif analizi için kullanmışlardır. Bu tekniğin bu vücut sıvılarındaki albümini yüksek kesinlikle belirlediğini göstermişlerdir [66].

5. YORUMLAR

- Gerçekleştirilen bu tez çalışması kapsamında, metal koordinasyon ve yüzey moleküler baskılama tekniğinin birleştirilmesiyle insan serum albüminin (HSA) spesifik tanınması için yeni manyetik afinite malzeme sentezlenmiştir.
- Bunun için manyetik PGMA mikrokürelerin reaktif epoksi grupları kullanılarak, üç dişli bir ligand olan iminodiasetikasit (İDA) ile metal iyonunun şelatlanmasının sağlanması için kovalent olarak bağlandı ve sonrasında Cu^{2+} metal iyonunu içeren çözelti ile etkileştirilmesiyle, İDA ve Cu^{2+} arasında koordinasyon kompleksi oluşumu sağlandı ve hazırlanan Cu^{2+} takılı m-PGMA mikrokürelere HSA immobilize edilerek yüzey silan polimerizasyonu yoluyla HSA'ya spesifik metal koordinasyonuna dayalı yüzey baskılanmış m-PGMA biyomalzemesi hazırlanmıştır.
- Metal iyonları polimerizasyon sonrasında kalıp molekülün uzaklaştırılmasını sağlayan çapraz bağlı baskılanmış tabakanın oluşumu sırasında HSA'nın immobilizasyonu için bağlanma noktalarını oluşturur ve baskılama boşlukları ile birlikte hedef proteinlerin tekrar bağlanması için tanıma elementleri olarak davranır. Bağlanma noktaları olarak metal iyonları kullanılması sadece kalıp proteinin uzaklaştırılması ve tekrar bağlanma kapasitesini önemli ölçüde arttırmaz aynı zamanda kalıp proteinler için moleküler baskılanmış proteinin afinitesini güçlendirmek için ek bir mekanizma sağlar. Böylece metal koordinasyonu ve yüzey moleküler baskılama teknolojisinin birleştirilmesi tek bir mekanizmayla hedef protein için seçimliliğin artmasını sağlar.
- Yaklaşık 1,7 μm boyutlarında düzenli küresel şekilli mikroküreler elde edilmiştir.
- m-PGMA mikrokürelerin şişme oranı % 34 olarak bulunmuştur.
- Elde edilen mikroküreler FTIR-ATR analizi ile karakterize edilmiştir. m-PGMA mikrokürelere İDA'nın bağlandığı saf İDA, m-PGMA ve İDA bağlı m-PGMA mikrokürelerin FTIR-ATR spektrumları ile doğrulanmıştır.

- Hazırlanan m-PGMA, MIP ve NIP mikrokürelerin yapısı FTIR-ATR, zeta boyut ve yük analizi, SEM, EDX, DTA ve TGA gibi çeşitli yöntemlerle karakterize edilerek m-PGMA, MIP ve NIP mikrokürelerin başarıyla sentezlendiği sonucuna varılmıştır.
- HSA baskılanmış ve baskılanmamış manyetik PGMA mikrokürelerin karakterizasyonu tamamlandıktan sonra HSA adsorpsiyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve adsorpsiyon ortamının pH'nın HSA adsorpsiyonuna etkisi araştırılmış olup, maksimum HSA adsorpsiyonu pH 6.0 fosfat tamponunda elde edilmiştir.
- MIP ve NIP mikrokürelere HSA bağlanma kapasitesini incelemek için MIP'nin doyumluk adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bağlanan kalıp proteinin miktarının çözeltideki protein derişiminin doğrusal olarak artmasıyla başlangıçta doyumluk eğrisinin eğimi hızlı bir şekilde artmıştır. Daha sonra baskılanmış partiküller yüksek derişimde HSA çözeltisi ile inkübe ettiğinde baskılanmış bölgelerin doyumluğa ulaşmasıyla doyumluk eğrisi kararlı hale geçmiştir. MIP ve NIP için 1.0 mg/mL'de maksimum HSA adsorpsiyonu sırasıyla 37.64 ve 1.26 mg/g polimer olarak bulunmuştur. Metal koordinasyonunun yanısıra MIP üzerindeki baskılama boşlukları NIP'nin MIP'den oldukça düşük bağlanma kapasitesi göstermesine neden olmaktadır. Elde edilen veriler yüzey baskılama tekniği ile mikrokürelerin yüzey alanının ve dolayısı ile adsorpsiyon kapasitesinin arttığını göstermektedir.
- Langmuir adsorpsiyon modeli ile teorik adsorpsiyon kapasitesi 46.95 mg HSA/g polimer olarak hesaplanmıştır ve deneysel verilerle uyumaktadır. Langmuir korelasyon katsayısı (0.99) Freundlich korelasyon katsayısına göre daha yüksek olması Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sisteme daha (0.95) uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca doyumluk eğrisi de Langmuir adsorpsiyon modeline uyar. Böylece hazırlanan MIP'de sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.
- HSA baskılanmış mikroküreler için yalancı birinci derece ve yalancı ikinci derece R^2 değerleri sırasıyla 0.893, 0.998'dir. İkinci derece kinetik

hesaplamalarda elde edilen teorik Q_e değerleri, deneysel Q_e değerlerine oldukça yakın olması ve R^2 değerleri dikkate alındığında, yalancı ikinci derece reaksiyonların baskın olduğu görölmektedir. Bu da adsorpsiyon sürecini kontrol eden hız sınırlayıcı basamağın kimyasal adsorpsiyon olabileceğini önermektedir. Bu da MIP ile HSA arasındaki spesifik bağlanma tepkimesinin kinetik davranışı kontrol ettiğini göstermektedir.

- MIP'lerin HSA adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 4-50°C arasında incelenmiştir. MIP'lerin denge adsorpsiyonu sıcaklığın artmasıyla önemli derecede azalmıştır ve maksimum adsorpsiyona 4°C'da ulaşılmıştır.
- HSA baskılanmış mikrokürelerin 10 kez tekrarlanan adsorpsiyon çalışmasında tekrar kullanılabilirliğinin yüksek olması ve HSA'nın desorpsiyonun yüksek oranda (%95) olması mikrokürelerin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmadığını göstermektedir.
- HSA'nın sahip olduğu imidazol halkası, geçiş metalleriyle şelat oluşturma özelliğine sahiptir ve metal-şelat etkileşimleriyle hazırlanan MIP'ler kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlere dayalı MIP'lere göre bir takım avantajlara sahiptir. Bu avantajlardan biri; kullanılan metal iyonu, HSA ile şelat oluşturduktan sonra bir Lewis asidi gibi davranarak hedef molekülde yer alan elektron verici bir grupta koordinasyonunu tamamlamaktadır. Bu nedenle oluşan bağlanma oldukça seçici ve kovalent olmayan etkileşimlere göre çok daha güçlüdür.
- Yapılan analizler sonucunda, tekli yarışmacı protein çözeltisindeki HSA baskılanmış mikrokürelerin, K değerlerinin, NIP mikrokürelerin K değerlerinden daha yüksek olduğu ve NIP manyetik mikrokürelerin HSA'ya belirgin bir seçicilik göstermediği halde HSA baskılanmış m-PGMA mikrokürelerin HSA'ya yüksek seçicilik gösterdiği bulunmuştur.
- 0.1 ve 0.5 mg/mL HSA baskılanmış m-PGMA mikrokürelerin K' değerleri incelendiğinde, başlangıç derişimleri 0.1 ve 0.5 mg/mL olan protein çözeltileri için model protein HSA'nın yarışmacı proteinlere göre daha seçici olduğu görölmektedir. Bu sonuçlar, HSA baskılanmış m-PGMA mikrokürelerin diğer yarışmacı proteinlere göre HSA için daha yüksek

seçicilik göstermesinden dolayı HSA için oluşturulan aktif tanıma bölgelerinin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.

- NIP için m-PGMA üzerinde tanıma boşlukları olmayan bir polimer tabaka oluşturulması metal iyonları ve proteinler arasındaki etkileşimin zayıflamasına ve dolayısıyla da bağlanan HSA miktarının azalarak hedef proteine seçicilik göstermemesine neden oldu.

Sonuç olarak, bu çalışmada metal koordinasyon ve yüzey moleküler baskılama tekniğinin birleştirilmesiyle sentezlenen HSA baskılanmış manyetik mikroküreler HSA'nın yüksek seçicilikle tanınması için oldukça etkin bir manyetik afinite malzeme olarak başarıyla sentezlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Jacobs, J.M., Adkins, J.N., Qian, W.J., Liu, T., Shen, Y., Camp, D.G., Smith, R.D., Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery, *Journal of proteome research*, 4, 1073-85, **2005**
- [2] Bereli, N., Şener, G., Altıntaş, E.B., Yavuz, H., Denizli, A., Poly(glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albumin and immunoglobulin G, *Materials Science and Engineering: C*, 30, 323-9, **2010**
- [3] Hülshoff, A., Schrickler, T., Elgendy, H., Hatzakorzian, R., Lattermann, R., *Albumin synthesis in surgical patients*, *Nutrition*, 29, 703-7, **2013**
- [4] Heli, H., Sattarahmady, N., Jabbari, A., Moosavi-Movahedi, A.A., Hakimelahi, G.H., Tsai, F.Y., Adsorption of human serum albumin onto glassy carbon surface – Applied to albumin-modified electrode: Mode of protein–ligand interactions, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 610, 67-74, **2007**
- [5] Brgles, M., Clifton, J., Walsh, R., Huang, F., Rucevic, M., Cao, L., Hixson, D., Müller, E., Josic, Dj., Selectivity of monolithic supports under overloading conditions and their use for separation of human plasma and isolation of low abundance proteins, *Journal of chromatography A*, 1218, 2389-95, **2011**
- [6] Wang, Y.Y., Cheng, P., Chan, D.W., A simple affinity spin tube filter method for removing high-abundant common proteins or enriching low-abundant biomarkers for serum proteomic analysis, *PROTEOMICS*, 3, 243-8, **2003**
- [7] Hu, C.H., Chou, T.C., Albumin molecularly imprinted polymer with high template affinity — Prepared by systematic optimization in mixed organic/aqueous media, *Microchemical Journal*, 91, 53-8, **2009**.
- [8] Shiomi, T., Matsui, M., Mizukami, F., Sakaguchi, K., A method for the molecular imprinting of hemoglobin on silica surfaces using silanes, *Biomaterials*, 26, 5564-71, **2005**
- [9] Cela-Pérez, M.C., Lasagabáster-Latorre, A., Abad-López, M.J., López-Vilariño, J.M., González-Rodríguez, M.V., A study of competitive molecular interaction effects on imprinting of molecularly imprinted polymers, *Vibrational Spectroscopy*, 65, 74-83, **2013**
- [10] Chen, L., Xu, S., Li, J., Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications, *Chemical Society Reviews*, 40, 2922–42, **2011**
- [11] Gai, Q.Q., Qu, F., Zhang, T., Zhang, Y.K., The preparation of bovine serum albumin surface-imprinted superparamagnetic polymer with the assistance of basic functional monomer and its application for protein separation, *Journal of Chromatography A*, 1218, 3489-95, **2011**
- [12] Verheyen, E., Schillemans, J.P., van Wijk, M., Demeniex, M.A., Hennink, W.E., van Nostrum, C.F., Challenges for the effective molecular imprinting of proteins, *Biomaterials*, 32, 3008-20, **2011**
- [13] Ramström, O., Ansell, R.J., Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future, *Chirality*, 10, 195-209, **1998**

- [14] Bergmann, N.M., Peppas, N.A., Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins, *Progress in Polymer Science*, 33, 271-88, **2008**
- [15] Hillberg, A.L., Tabrizian, M., Biomolecule imprinting: Developments in mimicking dynamic natural recognition systems, *IRBM*, 29, 89-104, **2008**
- [16] Singabrava, D., Bultel, L., Siñeriz, F., Mothéré, M., Lesur, D., Kovensky, J., Papy-Garcia, D., Molecular imprinting technology for specific recognition of heparan sulfate like disaccharides, *Talanta*, 99, 833-9, **2012**
- [17] Andersson, L.I., Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 745, 3-13, **2000**
- [18] Hansen, D.E., Recent developments in the molecular imprinting of proteins, *Biomaterials*, 28, 4178-91, **2007**
- [19] Yan, H., Row, K., Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, *International journal of molecular sciences*, 7, 155-78, **2006**
- [20] Tan, C.J., Tong, Y.W., Molecularly imprinted beads by surface imprinting, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389, 369-76, **2007**
- [21] Hu, Y., Pan, J., Zhang, K., Lian, H., Li, G., Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43, 37-52, **2013**
- [22] Chen, D., Deng, J., Liang, J., Xie, J., Huang, K., Hu, C., Core-shell magnetic nanoparticles with surface-imprinted polymer coating as a new adsorbent for solid phase extraction of metronidazole, *Analytical Methods*, 5, 722-8, **2013**
- [23] Shamsipur, M., Fasihi, J., Khanchi, A., Hassani, R., Alizadeh, K., Shamsipur, H., A stoichiometric imprinted chelating resin for selective recognition of copper(II) ions in aqueous media, *Analytica Chimica Acta*, 599, 294-301, **2007**
- [24] Koohpaei, A.R., Shahtaheri, S.J., Ganjali, M.R., Forushani, A.R., Golbabaie, F., Application of multivariate analysis to the screening of molecularly imprinted polymers (MIPs) for ametryn, *Talanta*, 75, 978-86, **2008**
- [25] Zhang, H., Song, T., Zong, F., Chen, T., Pan, C., Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for phenoxyacetic acids, *International journal of molecular sciences*, 9, 98-106, **2008**
- [26] Feás, X., Seijas, J.A., Vázquez-Tato, M.P., Regal, P., Cepeda, A., Fente, C., Syntheses of molecularly imprinted polymers: Molecular recognition of cyproheptadine using original print molecules and azatadine as dummy templates, *Analytica Chimica Acta*, 631, 237-44, **2009**
- [27] Wulff, G., Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers, *Chemical Reviews*, 102, 1-28, **2001**
- [28] Zimmerman, S.C., Lemcoff, N.G., Synthetic hosts via molecular imprinting- are universal synthetic antibodies realistically possible, *Chemical communications*, Cambridge, England, 5-14, **2004**

- [29] Hilt, J.Z., Byrne, M.E., Configurational biomimesis in drug delivery: molecular imprinting of biologically significant molecules, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56,1599-620, **2004**
- [30] Bossi, A., Bonini, F., Turner, A.P.F., Piletsky, S.A., Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art, *Biosensors and Bioelectronics*,22, 1131-7, **2007**
- [31] Janiak, D.S., Kofinas, P., Molecular imprinting of peptides and proteins in aqueous media, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389, 399-404, **2007**
- [32] Turner, N.W., Jeans, C.W., Brain, K.R., Allender, C.J., Hlady, V., Britt, D.W., From 3D to 2D: a review of the molecular imprinting of proteins, *Biotechnol Progress*, 22,1474-89, **2006**
- [33] Ge, Y., Turner, A.P.F., Too large to fit? Recent developments in macromolecular imprinting, *Trends in Biotechnology* ,26,218-24, **2008**
- [34] Lv, Y., Tan, T., Svec, F.. Molecular imprinting of proteins in polymers attached to the surface of nanomaterials for selective recognition of biomacromolecules, *Biotechnology Advances*, **2013**
- [35] Araki, K., Goto, M., Furusaki, S., Enantioselective polymer prepared by surface imprinting technique using a bifunctional molecule, *Analytica Chimica Acta*, 469, 173-81, **2002**
- [36] Kryscio, D.R., Peppas, N.A., Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, *Acta biomaterialia*, 8, 461-73, **2012**
- [37] Gao, D., Zhang, Z., Wu, M., Xie, C., Guan, G., Wang, D., A surface functional monomer-directing strategy for highly dense imprinting of TNT at surface of silica nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 7859-66, **2007**
- [38] Peng, Z.G., Hidajat, K., Uddin, M.S., Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 271, 277-83, **2004**
- [39] Zhang, H.P., Bai, S., Xu, L., Sun, Y., Fabrication of mono-sized magnetic anion exchange beads for plasmid DNA purification, *Journal of Chromatography B*, 877, 127-33, **2009**
- [40] Franzreb, M., Siemann-Herzberg, M., Holey, T.J., Thomas, O.R.T., Protein purification using magnetic adsorbent particles, *Applied Microbiology and Biotechnology*,70, 505–16, **2006**
- [41] Safarik, I., Safarikova, M., Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides, *BioMagnetic Research and Technology*, 2, **2004**
- [42] Philippova, O., Barabanova, A., Molchanov, V., Khokhlov, A., Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications, *European Polymer Journal*, 47, 542-59, **2011**
- [43] Ramanujan, R.V., Chong, W.T., The synthesis and characterization of polymer coated iron oxide microspheres, *Journal of materials science Materials in medicine*, 15, 901-8, **2004**

- [44] Pollert, E., Knížek, K., Maryško, M., Závěta, K., Lančok, A., Boháček, J., Horák, D., Babič, M., Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres containing maghemite prepared by emulsion polymerization, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 306, 241-7, **2006**
- [45] Ma, Z., Guan, Y., Liu, X., Liu, H., Covalent immobilization of albumin on micron-sized magnetic poly(methyl methacrylate-divinylbenzene-glycidyl methacrylate) microspheres prepared by modified suspension polymerization, *Polymers for Advanced Technologies*, 16, 554-8, **2005**
- [46] Neuberger, T., Schöpf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., von Rechenberg, B., Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, 483-96, **2005**
- [47] Mornet, S., Vasseur, S., Grasset, F., Duguet, E., Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy, *Journal of Materials Chemistry*, 14, 2161-75, **2004**
- [48] Horák, D., Petrovský, E., Kapička, A., Frederichs, T., Synthesis and characterization of magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311, 500-6, **2007**
- [49] Nicholson, J.P., Wolmarans, W.M., Park, G.R., The role of albumin in critical illness, *British Journal of Anaesthesia*, 85, 599-610, **2000**
- [50] Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K., Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution, *Protein Engineering*, 12, 439-46, **1999**
- [51] Chuang, V.T.G., Otagiri, M., Stereoselective binding of human serum albumin, *Chirality*, 18, 159-66, **2006**
- [52] Luensmann, D., Jones, L., Albumin adsorption to contact lens materials: A review, *Contact Lens and Anterior Eye*, 31, 179-87, **2008**
- [53] Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., Ascenzi, P., Human serum albumin: From bench to bedside, *Molecular Aspects of Medicine*, 33, 209-90, **2012**
- [54] Juliene, L., Throop, M.E.K., Leah, A., Cohn. Albumin in Health and Disease: Protein Metabolism and Function, *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 26, 932-9, **2004**
- [55] Liu, J., Yang, K., Deng, Q., Li, Q., Zhang, L., Liang, Z., Zhang, Y., Preparation of a new type of affinity materials combining metal coordination with molecular imprinting, *Chemical Communications*, 47, 3969-71, **2011**
- [56] Sarıkaya, Y., *Fizikokimya*, 4. Baskı, Gazi Kitabevi, **2003**
- [57] Cheung, C.W., Porter, J.F., McKay, G., Sorption kinetic analysis for the removal of cadmium ions from effluents using bone char, *Water Research*, 35, 605-12, **2001**
- [58] Bonini, F., Piletsky, S., Turner, A.P.F., Speghini, A., Bossi, A., Surface imprinted beads for the recognition of human serum albumin, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2322-8, **2007**

- [59] Okutucu, B., Zihnioglu, F., Telefoncu, A., Shell-core imprinted polyacrylamide crosslinked chitosan for albumin removal from plasma, *Journal of biomedical materials research Part A*, 84, 842-5, **2008**
- [60] Andaç, M., Baydemir, G., Yavuz, H., Denizli, A., Molecularly imprinted composite cryogel for albumin depletion from human serum, *Journal of Molecular Recognition*, 25, 555-63, **2012**
- [61] Garipcan, B., Andaç, M., Uzun, L., Denizli, A., Methacryloylamidocysteine functionalized poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads and its design as a metal-chelate affinity support for human serum albumin adsorption, *Reactive and Functional Polymers*, 59,119-28, **2004**
- [62] Ma, Z.Y., Guan, Y.P., Liu, H.Z., Synthesis of monodisperse nonporous crosslinked poly(glycidyl methacrylate) particles with metal affinity ligands for protein adsorption, *Polymer International*, 54,1502-7, **2005**
- [63] Shiomi, T., Matsui, M., Mizukami, F., Sakaguchi, K., A method for the molecular imprinting of hemoglobin on silica surfaces using silanes, *Biomaterials*, 26, 5564-71, **2005**
- [64] Lin, T.Y., Hu, C.H., Chou, T.C., Determination of albumin concentration by MIP-QCM sensor, *Biosensors and Bioelectronics*,20,75-81, **2004**
- [65] Hu, C.H., Chou, T.C., Albumin molecularly imprinted polymer prepared with a semi-rigid crosslinker in mixed organic/aqueous media, *Microchimica Acta*,165,399-405, **2009**
- [66] Ghasemzadeh, N., Nyberg, F., Hjerten, S., Highly selective artificial gel antibodies for detection and quantification of biomarkers in clinical samples. II. Albumin in body fluids of patients with neurological disorders, *Journal of separation science*, 31, 3954-8, **2008**

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Fatma KARTAL
Doğum Yeri : Muğla
Medeni Hali : Bekar
E- Posta : fatmakartal@yandex.com
Adresi : Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü
Beytepe/Ankara

Eğitim

Lise (1998-2002) : Muğla Anadolu Lisesi
Lisans (2004-2008) : Muğla Üniversitesi, Kimya Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : Intermediate

İş Deneyimi

Araştırma Görevlisi Muğla Üniversitesi 2009-2011
Muğla / TÜRKİYE
Hacettepe Üniversitesi 2011-
Ankara / TÜRKİYE

Deneyim Alanları

Sütunlu kil sentezi, kataliz karakterizasyon çalışmaları ve katalitik uygulamalar

Farklı yüzey özellikleri şekil ve geometrilerde polimerik biyomateryallerin üretimi ve bu polimerlerin tıbbi ve biyolojik uygulamaları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi –

Tezden Üretilmiş Yayınlar –

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- Kromatografi 2012 Kongresi TOKAT (6-9 Haziran 2012)
- Kromatografi 2013 Kongresi BURSA (19-22 Haziran 2013)