T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LANTANİD İÇERİKLİ MOLEKÜLER BASKILI KRİYOJEL POLİMERLER KULLANILARAK KAN SERUMUNDA BULUNAN HEMOGLOBİN, MYOGLOBİN VE SİTOKROM-C PROTEİNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Ruken ONAT

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Ocak 2019

T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Ruken ONAT tarafından yapılan "LANTANİD İÇERİKLİ MOLEKÜLER BASKILI KRİYOJEL POLİMERLER KULLANILARAK KAN SERUMUNDA BULUNAN HEMOGLOBİN, MYOGLOBİN VE SİTOKROM-C PROTEİNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Berrin Ziyadanoğulları (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Fırat Aydın

Üye : Prof. Dr. Kemal Güven

Üye : Prof. Dr. Orhan Acar

Üye : Prof. Dr. Abdulkadir Levent

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 18/01/2019

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

/ /2019

Prof. Dr.Sevtap Sümer Eker

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim esnasında tez konusu önererek yardım ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Berrin ZİYADANOĞULLARI'na teşekkürlerimi saygılarımla sunarım.

Doktora tez çalışmamda her türlü malzeme desteğini esirgemeyen ve çalışmanın her aşamasında desteklerini gördüğüm Prof. Dr. Rıdvan SAY ve Prof. Dr. Arzu ERSÖZ hocalarıma teşekkürlerimi minnetle sunarım.

Doktora tez çalışmam süresince her aşamada yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi İbrahim DOLAK hocama ayrıca teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen Kimya Anabilim Dalındaki tüm hocalarımateşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımızı destekleyen DÜBAP'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, her türlü desteğini esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim. İyi ki varsınız…

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
TEŞEKKÜR……		**I**
İÇİNDEKİLER……..		**II**
ÖZET……..		**VII**
ABSTRACT……		**IX**
ÇİZELGE LİSTESİ…….....		**XI**
ŞEKİL LİSTESİ……..……		**XII**
KISALTMA VE SİMGELER…….…...		**XV**
1.	**GİRİŞ……...**	1
2.	**KAYNAK ÖZETLERİ**…….	3
2.1.	Moleküler Baskılama Teknolojisi…….....	3
2.1.1.	Kovalent Baskılama Tekniği……	4
2.1.1.1.	Boronat Esterleri ile Kovalent Baskılama Tekniği……...	4
2.1.1.2.	Schiff Bazları ile Kovalent Baskılama Tekniği……	5
2.1.2	Kovalent Olmayan Baskılama Tekniği……	5
2.1.3.	Moleküler Baskılanmış Polimerlerin (MIP) Sentezinde Kullanılan Bileşenler……..	7
2.1.3.1	Hedef Molekül…….	8
2.1.3.2.	Fonksiyonel Monomer(ler)……...	8
2.1.3.3.	Çapraz Bağlayıcı……..	9
2.1.3.4.	Gözenek Oluşturucu…….	10
2.1.3.5.	Başlatıcı (Radikal Oluşturucu……	10
2.1.4.	Molekül Baskılı Polimerlerin Sentezleme Teknikleri……..	11
2.1.4.1.	Serbest Radikal Polimerizasyonu…….	11
2.1.5.	Baskılı Polimerlerin Hazırlanması…….....	12
2.1.6.	Baskılı Polimerlerin Karakterizasyonu……...	12

2.1.7.	Baskılı Polimerlerin Kullanım Alanları……..	13
2.1.8.	Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Biyolojik Reseptörlere Göre Avantaj ve Dezavantajları……	13
2.1.9.	Protein Baskılama……	14
2.1.9.1.	Protein Baskılama Teknikleri……	15
2.2.	Kriyojeller……...	16
2.2.1.	Kriyojellerin Oluşumu ve Özellikleri…….....	17
2.2.2.	Kriyojellerin Kullanım Alanları…….....	18
2.3.	.Hemoglobin (Hb)……	18
2.3.1.	Hemoglobin (Hb) Molekülünün Yapısı…….....	18
2.3.1.1.	.Hem- Grubu…….	19
2.3.2.	Hemoglobin (Hb) Molekülünde Bozulmalar (Mutasyon……	20
2.4.	Miyoglobin (Mb)……..	20
2.4.1.	Kalp Krizi…….	21
2.4.1.1.	Miyoglobin (Mb) Molekülünün Kalp Krizi Erken Teşhisindeki Rolü…	22
2.5.	Sitokromlar……...	23
2.5.1.	Sitokromların Yapıları…….	24
2.6.	Önceki Çalışmalar……	25
2.6.1.	Metametakrioil klorür (MA-) Kökenli Fonksiyonel Monomerler Kullanılarak Yapılan Çalışmala…..……	25
2.6.2.	MetakrioilAmidoAntipirin Fonksiyonel Monomeri Kullanılarak Yapılan Çalışmalar……..	26
2.6.3.	Moleküler Baskılı Polimerler Kullanılarak Hemoglobin Ayrılması ve Analizi ile İlgili Yapılan Çalışmalar……	28
2.6.4.	Moleküler Baskılı Polimerler Kullanılarak Myoglobin Ayrılması ve Analizi ile İlgili Yapılan Çalışmalar……	31
2.6.5.	Moleküler Baskılı Polimerler Kullanılarak Sitokrom-C Ayrılması ve Analizi ile İlgili Yapılan Çalışmalar……	32

3. MATERYAL VE METOT 35

3.1. .Materyal…….. 35

3.1.1. Kullanılan Kimyasal, Çözeltiler ve Standart Maddeler…….. 35

3.1.1.1. Fonksiyonel Monomer (Metakrioilamidoantipirin) Sentezinde Kullanılan Kimyasallar……. 35

3.1.1.2. Baskılı ve Baskısız Polimerlerin (p-HEMA-MAAP) Sentezinde Kullanılan Kimyasallar……..... 35

3.1.1.3. Deneysel çalışmalarda Kullanılan Proteinler……... 35

3.1.1.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan pH ayarlayıcılar ve Desorbsiyon Ajanları…… 35

3.1.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Malzemeler……... 36

3.2. Metot…… 37

4. BULGULAR VE TARTIŞMA……. 43

4.1. Fonksiyonel Monomer (Metakrioilamidoantipirin (MAAP)) Sentezi ve Karakterizasyonu…… 43

4.2. Kompleks Monomer [$(MAAP)_2$-Ce(III)] Sentezi ve Karakterizasyonu 43

4.3. Hemoglobin (Hb) Baskılama……... 45

4.3.1. $(MAAP)_2$Ce(III)-Hb Kompleks Yapısının Hazırlanması ve Karakterizasyonu……. 45

4.3.2. p-HEMA-MAAP-Ce(III) Kriyojel Polimerlerin Hazırlanması…….. 46

4.3.2.1. .Hemoglobin Baskılı (MIP) Kriyojel Polimerin Hazırlanması…… 46

4.3.2.2. Hemoglobin Baskılanmamış (NIP) Kriyojel Polimerin Hazırlanması… 47

4.4. Baskılı ve Baskısız Kriyojel Polimerler ile Hemoglobinin Bağlanma Veriminde Optimizasyon Çalışmaları……. 47

4.4.1. Optimum pH Tespiti……... 48

4.4.2. Optimum Akış Hızı Tespiti…… 49

4.4.3. Başlangıç Hemoglobin Derişimi Etkisi ve Maksimum Bağlanma Kapasitesi Tespiti…… 49

4.4.4. Bağlanma Verimine Elektrolit (Tuz) Etkisi……. 50

4.4.5. Sıcaklık Etkisi……..... 51

4.4.6. Hazırlanan Hemoglobin Baskılı Kriyojel Kolonun Tekrar Kullanım Sayısı Tespiti…… 52

4.4.7. Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları…….. 52

4.4.8. Gerçek Numune Çalışmaları (Kan Serumundan Hemoglobin Ayrılması……. 53

4.4.9. Şişme ve Makrogözenek Miktarı Deneyleri…… 54

4.5. Myoglobin (Mb) Baskılama…… 55

4.5.1. $(MAAP)_2Ce(III)$-Mb Kompleks Yapısının Hazırlanması ve Karakterizasyonu…… 55

4.5.2. p-HEMA-MAAP-Ce(III) Kriyojel Polimerlerin Hazırlanması…….. 55

4.5.2.1. Myoglobin Baskılı (MIP) Kriyojel Polimerin Hazırlanması……... 55

4.5.2.2. Myoglobin Baskılanmamış (NIP) Kriyojel Polimerin Hazırlanması….. 56

4.6. Baskılı ve Baskısız Kriyojel Polimerler ile Myoglobinin Bağlanma Veriminde Optimizasyon Çalışmaları……. 57

4.6.1. Optimum pH Tespiti…… 57

4.6.2. Optimum Akış Hızı Tespiti……. 58

4.6.3. Başlangıç Myoglobin Derişimi Etkisi ve Maksimum Bağlanma Kapasitesi Tespiti……. 59

4.6.4. Bağlanma Verimine Elektrolit (Tuz) Etkisi……. 60

4.6.5. Sıcaklık Etkisi……. 61

4.6.6. Hazırlanan Hemoglobin Baskılı Kriyojel Kolonun Tekrar Kullanım Sayısı Tespiti…… 61

4.6.7. .Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları……... 62

4.6.8.	Gerçek Numune Çalışmaları (Kan Serumundan Myoglobin Ayrılması)…….	63
4.6.9.	Şişme ve Makrogözenek Miktarı Deneyleri……..	64
4.7.	Sitokrom-C (Sit-C) Baskılama……	64
4.7.1.	$(MAAP)_2Ce(III)$-Sit-C Kompleks Yapısının Hazırlanması ve Karakterizasyonu…….	64
4.7.2.	p-HEMA-MAAP-Ce(III) Kriyojel Polimerlerin Hazırlanması……..	65
4.7.2.1.	Sitokrom-C Baskılı (MIP) Kriyojel Polimerin Hazırlanması……..	65
4.7.2.2.	Sitokrom-C Baskılanmamış (NIP) Kriyojel Polimerin Hazırlanması….	66
4.8.	Baskılı ve Baskısız Kriyojel Polimerler ile Sitokrom-C'nin Bağlanma Veriminde Optimizasyon Çalışmaları…….	67
4.8.1.	Optimum pH Tespiti……	67
4.8.2.	Optimum Akış Hızı Tespiti…….	68
4.8.3.	Başlangıç Sitokrom-C Derişimi Etkisi ve Maksimum Bağlanma Kapasitesi Tespiti……	69
4.8.4.	Bağlanma Verimine Elektrolit (Tuz) Etkisi…….	70
4.8.5.	Sıcaklık Etkisi……..	70
4.8.6.	Hazırlanan Sitokrom-C Baskılı Kriyojel Kolonun Tekrar Kullanım Sayısı Tespiti……..	71
4.8.7.	Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları……..	72
4.8.8.	Gerçek Numune Çalışmaları (Kan Serumundan Sitokrom-C Ayrılması)……...	73
4.8.9.	Şişme ve Makrogözenek Miktarı Deneyleri……	73
5.	**SONUÇ VE ÖNERİLER…….**	75
6.	**KAYNAKLAR……...**	79
	ÖZGEÇMİŞ…….	89

ÖZET

LANTANİD İÇERİKLİ MOLEKÜLER BASKILI KRİYOJEL POLİMERLER KULLANILARAK KAN SERUMUNDA BULUNAN HEMOGLOBİN, MYOGLOBİN VE SİTOKROM-C PROTEİNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Ruken ONAT

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2018

Hemoglobin analizi özellikle anemik hastalıkların teşhisinde, myoglobin analizi özellikle kalp krizi, kas-doku ve böbrek rahatsızlıklarının teşhisinde, sitokrom-C analizi ise kan yapısında ve hücre dokularında bulunan iyonların miktar tayininde ve buna bağlı oluşabilecek hastalıkların teşhisinde kullanılabileceği düşünüldüğünde, belirtilen proteinlerin analizinin önemi ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmada, Lantanid içerikli yeni bir polimer olan p-HEMA-MAAP-Ce(III) kullanılarak sulu çözeltide ve kan serumunda bulunan hemoglobin (Hb), myoglobin (Mb) ve sitokrom-C (Sit-C) proteinlerinin çeşitli proteinlerin varlığında sulu çözeltilerinden ve kan serumundan yüksek seçicilik ile ayrılmaları sağlanmıştır. Bu amaçla kullanılan protein baskılı polimer serbest radikal polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanmıştır. Fonksiyonel Monomer olarak MAAP (metakrioilamidoantipirin) kullanılmış, bağlanma etkinliğini arttırmak amacıyla yüksek sayıda koordinasyon bağı yapabilen lantanid grubu elementlerinden Ce(III) iyonu ile kompleksleştirilmiş ve MAAP-Ce(III) kompleksmonomeri oluşturulmuştur. Hazırlanan MAAP-Ce(III) kompleksmonomeri, p-HEMA (poli-2-hidroksietilmetakrilat) ve ayrı ayrı her bir protein ile etkileştirilerek baskılı kriyojel polimerler hazırlanmış daha sonra polimer içerisindeki baskılanmış proteinler 0,1 M NaCI-Na_2SO_4 ile desorbe edilerek sırasıyla Hb, Mb ve Sit-C baskılı lantanid içerikli p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan kompleksmonomerlerin, baskılı ve baskısız polimerlerin karakterizasyonları FT-IR, Near-IR ve SEM ile yapılmıştır. Bağlanma çalışmalarında optimum koşulları belirlemek

amacıyla yapılan deneylerde, pH, akış hızı, başlangıç protein konsantrasyonu, tuz etkisi, tekrarlanabilirlik sayısı gibi parametreler incelenmiş ve optimum koşullar tespit edilmiştir. Tespit edilen optimum koşullarda hazırlanan baskılı polimerlerin (MIP), baskısız polimerlere (NIP) göre oldukça yüksek seçicilik ve bağlanma etkinliği gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca belirlenen optimum koşullarda, hazırlanan baskılı polimerlerin kan serumunda belirtilen proteinlerin bağlanma etkinlikleri incelenmiş ve hedef proteinlerine karşı oldukça yüksek seçicilik gösterdikleri tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lantanid İçerikli MAAP Monomer, Hemoglobin, Myoglobin, Sitokrom-C, Baskılı Kriyojel Polimer, Ayırma, Saflaştırma

ABSTRACT

PURIFICATION OF HEMOGLOBIN, MYOGLOBINE AND SYTOCROM-C PROTEINS IN THE BLOOD SERUM BY USING LANTANIDE CONTAİNİNG MOLECULAR IMPRINTED CRYOGEL POLYMERS

PhD THESİS

Ruken ONAT

DICLE UNIVERSITY
INSTUTUE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

2018

Hemoglobin analysis is particularly important in the diagnosis of anemic diseases, in that theanalysis of myoglobinanalysis is particularly important in the diagnosis of heart attacks, muscle-tissue and kidney disorders, and in cytochrome-C analysis it is thoughtto be used in blood formation and quantification of ions in celltissues.In thi sstudy, hemoglobin (Hb), myoglobin (Mb) and cytochrome-C (Sit-C) proteins in aqueous solution and blood serum were detected in the presence of various protein using a new lanthanide –containing polymer, p-HEMA-MAAP- aqueous solutions and with high selectivity from the blood serum.The protein imprinted polymers used for this purpose was prepared by the freeradica lpolymerisati on method.MAAP (methacryoylamidoantipyrine) wasused as the functional monomerand MAAPCe(III) complexmonomers were complexed with theCe(III) ion from the lanthanide groupelements capable of coordination bondin high number in order to increase the binding activity.The prepared MAAP-Ce(III) complexmonomer, p-HEMA (poly-2-hydroxyethylmethacrylate) and thein dividual cured proteins were prepared by interaction with each protein and then ther pressed proteins in the polymer were desorbed with0.1 M NaCl-Na_2SO_4, Hb, Mband Sit-C imprinted lanthanide-containing p-HEMA-MAAP-Ce(III) cryogel polymers were prepared. Characterization of the prepared complex monomers, imprinted and no nimprinted polymers were performed by FT-IR, Near-IR and SEM. Parameterssuch as pH, flow rate, initial protein

concentration, salt effect, number of reproducibility were investigated and optimum conditions were determined in experiments to determine optimum conditions in binding studies.It has been found tha ttheimprinte dpolymers (MIP) prepared under optimum conditions have a high selectivity and binding activity compared to then on imprinted polymers (NIP).Furthermore, in the determined optimumconditions, the bindin gactivities of the protein smentioned in the blood serum of the prepare dimprinted polymers were xamined and foundto be highly selectiv again the target proteins.

Keywords: MAAP Monomerwithlanthanide, Hemoglobin, Myoglobin, Cytochrome-C, İmprintedCryogelPolymer, Separation, Purification

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 4.1.	Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları (Hemoglobin]	53
Çizelge 4.2.	Kan Serumundan Hemoglobinin Seçici Olarak Bağlanması	54
Çizelge 4.3.	Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları (Myoglobin)	62
Çizelge 4.4.	Kan Serumundan Myoglobinin Seçici Olarak Bağlanması	63
Çizelge 4.5.	Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları (Sitokrom-C)	72
Çizelge 4.6.	Kan Serumundan Sitokrom-C'nin Seçici Olarak Bağlanması	73

ŞEKİL LİSTESİ

ŞekilNo		Sayfa
Şekil 2.1.	Moleküler Baskılama Teknolojisi Bağlanma Mekanizması	3
Şekil 2.2.	Kovalent Baskılama Tekniğinin Şematik Gösterimi	5
Şekil 2.3.	Kovalent Olmayan Baskılama Tekniğinin Şematik Gösterimi	6
Şekil 2.4.	Moleküler Baskılama Tekniğinde Kullanılan Fonk. Monomerler	9
Şekil 2.5.	Moleküler Baskılama Tekniğinde Kullanılan Çapraz Bağlayıcılar	10
Şekil 2.6.	Moleküler Baskılama Tekniğinde Kullanılan Başlatıcılar	11
Şekil 2.7.	Kriyojel Üretim Şeması	17
Şekil 2.8.	Hemoglobinin (Hb) Yapısı	19
Şekil 2.9.	(a) Hemoglobin (Hb) molekülünde alfa sarmal yapısı (b) Hemoglobin (Hb) molekülünde beta yaprak yapısı	19
Şekil 2.10.	Fe(II) atomu ile koordine kovalent bağ oluşturmuş Hem- Grubu	20
Şekil 2.11.	Myoglobin (Mb) Molekülündeki α-heliks yapıları	21
Şekil 2.12.	Damardaki Aterosklerozun Zaman içinde İlerlemesi	22
Şekil 2.13.	Sitokrom-C prostetik grubunun kimyasal yapısı	23
Şekil 2.14.	Mitokondriyalsitokrom-C Molekülünün Kristal Yapısı	24
Şekil 3.1.	Hazırlanan Kriyojel Polimerlerin Görüntüsü	38
Şekil 4.1.	Metakrioilamidoantipirin (MAAP) Monomerinin Sentezi	43
Şekil 4.2.	$(MAAP)_2Ce(III)$ Kompleks Monomeri	44
Şekil 4.3.	MAAP ve $(MAAP)_2Ce(III)$ Kompleks Monomeri FT-IR Spektrumu	44
Şekil 4.4.	Hb ve $(MAAP)_2Ce(III)$-Hb Kompleks yapısının Near-IR Spektrumu	45
Şekil 4.5.	Hemoglobin baskılı kriyojel polimerin (MIP) SEM görüntüsü	46
Şekil 4.6.	Hemoglobin baskısız p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (NIP) SEM görüntüsü	47

Şekil4.7.	Hemoglobin-UV Kalibrasyon Grafiği (Λ=400 nm)	47
Şekil 4.8.	Optimum pH Tespiti	48
Şekil. 4.9.	Optimum Akış Hızı Tespiti	49
Şekil 4.10.	Başlangıç Hemoglobin Derişimi ve Maximum Bağlanma Kapasitesi Tespiti	50
Şekil 4.11.	Tuz Etkisi	51
Şekil 4.12.	Sıcaklık Etkisi	51
Şekil 4.13.	Tekrarlanabilirlik Sayısı	52
Şekil 4.14.	Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları (Hemoglobin)	53
Şekil 4.15.	Myoglobin ve $(MAAP)_2Ce(III)$-Mb Kompleks yapısının Near-IR Spektrumu	55
Şekil 4.16.	Myoglobin baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (MIP) SEMgörüntüsü	56
Şekil 4.17.	Myoglobin Baskısız p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (NIP) SEM görüntüsü	57
Şekil. 4.18.	Myoglobin-UV Kalibrasyon Grafiği (Λ=411 nm)	57
Şekil 4.19.	Optimum pH Tespiti	58
Şekil 4.20.	Optimum Akış Hızı Tespiti	59
Şekil 4.21.	Başlangıç Myoglobin Derişimi ve Maximum Bağlanma Kapasitesi Tespiti	59
Şekil 4.22.	Tuz Etkisi	60
Şekil 4.23.	Sıcaklık Etkisi	61
Şekil 4.24.	Tekrarlanabilirlik Sayısı	62
Şekil 4.25.	Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları (Myoglobin)	63
Şekil 4.26.	Sitokrom-C ve $(MAAP)_2Ce(III)$-Sit-C Kompleks yapısının Near-IRSpektrumu	65
Şekil. 4.27.	Sitokrom-C baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (MIP) SEM görüntüsü	66
Şekil 4.28.	Sitokrom-C Baskısız p-HEMA-MAAP-Ce(III)	66

kriyojelpolimerin(NIP]SEM görüntüsü

Şekil 4.29. Sitokrom-C-UV Kalibrasyon Grafiği (Λ= 426 nm) 67

Şekil 4.30. Optimum pH Tespiti 67

Şekil 4.31. Optimum Akış Hızı Tespiti 68

Şekil 4.32. Başlangıç Sitokrom-C Derişimi ve Maximum Bağlanma Kapasitesi Tespiti 69

Şekil 4.33. Tuz Etkisi 70

Şekil 4.34. Sıcaklık Etkisi 71

Şekil 4.35. Tekrarlanabilirlik Sayısı 71

Şekil 4.36. Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları (Sitokrom-C) 72

KISALTMALAR VE SİMGELER

MAAP: Metakriloilamidoantipirin

HEMA: Hidroksi etil metakrilat

APS: Amonyumpersülfat

TEMED: N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine

Ce(III): Seryum (III) iyonu

Hb: Hemoglobin

Mb: Myoglobin

Sit-C: Sitokrom-C

^{0}C: Celsius

mL: Mililitre

g: Gram

mg: miligram

nm: nanometre

dk: Dakika

IR:İnfrared

NIR: YakınİnfraredUltraviyole

ICP: InductivelyCoupledPlasma

1. GİRİŞ

Canlı yaşamının hayatta kalabilmek amacı ile başlayan doğayı taklit etme isteği geçen zaman ile birlikte doğanın sunduklarından daha fazlasını arama yönüne doğru ilerlemiştir. Bu doğal düzeni taklit etme isteği çok sayıda teknolojik gelişmenin de temelini oluşturmuş ve halen de oluşturmaya da devam etmektedir. Günümüzde araştırmacılar doğal düzeni taklit ederek çok sayıda biyolojik molekülü sentezlemeye çalışmaktadırlar. Bu moleküllerin başında proteinler, enzimler, antikorlar gibi yüksek seçiciliğe sahip, hedef molekülünü iyi tanıyan ve yalnızca hedef molekülüne özgü tepkiler veren moleküller gelmektedir.

Moleküler baskılama tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar, bu alanda yapılan çalışmaların gelecek açısından ne kadar önemli olduğunu ayrıca göstermektedir. Bu alandaki ilk başarılı çalışma, Wulf ve arkadaşları (1972) tarafından gerçekleştirilmiş ve hedef molekülün polimer yüzeyine baskılanması olarak ifade edilen 'moleküler baskılama' kavramı ilk kez bu çalışma da kullanılmıştır. Protein, enzim ve antikorlar gibi canlı organizmada bulunan makro moleküllerin yapay olarak elde edilebilmesi fikri yani biyomimetik molekül (biyolojik moleküllerin taklidi) sentezi ilk zamanlarda uzak bir ihtimal gibi görünse de yapılan çalışmalar ile moleküler tanıma işlevine sahip yapay moleküllerin sentezlenmesiyle, biyolojik işleve sahip biyomimetik moleküller başarıyla hazırlanmış ve hazırlanmaya devam etmektedir (Jia ve Arkadaşları 2018, Dabrowski ve arkadaşları 2018, Malik ve Arkadaşları 2017, Gama ve arkadaşları 2017, Deshmukh ve arkadaşları 2015). Yüksek seçicilik özelliğine sahip akıllı polimerik malzemelerin hazırlanması kimya, biyoloji, tıp, eczacılık, fizik ve malzeme bilimi gibi farklı alanların multidisipliner çalısmasını gerektirebilir. Yeni biyo-malzemelerin hazırlanması biyo-taklit bir yaklasıma sahiptir. Biyo-taklit yaklasım ise, doğadaki uygulamaların incelenmesiyle, prensiplerinin arastırılmasıyla, istenilen işlevlerin nasıl yerine getirildiğinin anlasılmasıyla ve elde edilen bilgiler ısığında yeni fonksiyonel biyo-malzeme dizayn edilerek gerçekleştirilir (Mosbach 2001). Moleküler baskılama yetenegine sahip polimerik malzemelerin hazırlanması bu yaklasımların en günceli olarak kabul edilmekte ve bu biyomimetik özellikli polimerlerin biyoteknoloji ve biyoanalitik alanlarda oldukça yararlı olduğu görülmektedir.

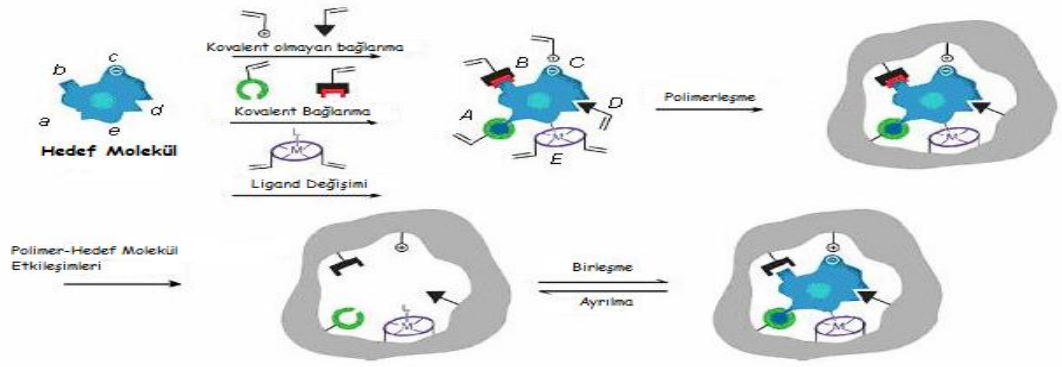
Bu çalışmada, Lantanid içerikli yeni bir polimer olan p-HEMA-MAAP-Ce(III) kullanılarak sulu çözeltide ve kan serumunda bulunan hemoglobin (Hb), myoglobin (Mb) ve sitokrom-C (Sit-C) proteinlerinin çeşitli proteinlerin varlığında sulu çözeltilerinden ve kan serumundan yüksek seçicilik ile ayrılmaları sağlanmıştır. Bu amaçla kullanılan protein baskılı polimer serbest radikal polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanmıştır. Fonksiyonel Monomer olarak MAAP (metakrioilamidoantipirin) kullanılmış, bağlanma etkinliğini arttırmak amacıyla yüksek sayıda koordinasyon bağı yapabilen lantanid grubu elementlerinden Ce(III) iyonu ile kompleksleştirilmiş ve MAAP-Ce(III) kompleks monomeri oluşturulmuştur. Hazırlanan MAAP-Ce(III) kompleks monomeri, p-HEMA (poli-2-hidroksietilmetakrilat) ve ayrı ayrı her bir protein ile etkileştirilerek baskılı kriyojel polimerler hazırlanmış daha sonra polimer içerisindeki baskılanmış proteinler 0,1 M NaCI-Na_2SO_4 ile desorbe edilerek sırasıyla Hb, Mb ve Sit-C baskılı lantanid içerikli p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan kompleks monomerlerin, baskılı ve baskısız polimerlerin karakterizasyonları FT-IR, UV-NIR ile yüzey görüntüleri SEM ile yapılmıştır. Bağlanma çalışmalarında optimum koşulları belirlemek amacıyla yapılan deneylerde, pH, akış hızı, başlangıç protein konsantrasyonu, tuz etkisi, tekrarlanabilirlik sayısı gibi parametreler incelenmiş ve optimum koşullar tespit edilmiştir. Tespit edilen optimum koşullarda hazırlanan baskılı polimerlerin (MIP), baskısız polimerlere (NIP) göre oldukça yüksek seçicilik ve bağlanma etkinliği gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca belirlenen optimum koşullarda, hazırlanan baskılı polimerlerin kan serumunda bulunan hedef proteinlere karşı oldukça yüksek seçicilik gösterdikleri tespit edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskılama teknolojisi; hedef molekülü (template) tanıma özelliği taşıyan bağlanma bölgeleri ihtiva eden polimerlerin hazırlanması işlemidir (Piletsky 2001). Tanımdan da anlaşıldığı üzere moleküler baskılama teknolojisinin temeli, 'moleküler tanıma' kavramına dayanmaktadır. Fischer'in ileri sürdüğü 'anahtar-kilit' modeliyle moleküler baskılama teknolojisinin temelleri atılmıştır. Bu tanıma göre, bir anahtarın kilidi açabilmesi için nasıl geometrik olarak tamamlayıcısı olması gerekiyorsa, enzimler de ancak geometrik açıdan tamamlayıcısı olan moleküllerle ya da moleküllerin uygun bölgeleriyle etkileşerek kataliz görevlerini yerine getirebilirler.

Moleküler baskılama yöntemi hedef molekül için seçici bağlanma bölgeleri içeren polimerlerin hazırlanmasına olanak sağlar. Fonksiyonel grup taşıyan monomerler, kovalent olmayan (iyonik, hidrofobik etkilesimler, metal koordinasyon bağı ve hidrojen bağı) ya da kovalent etkileşimler ile baskı bölgeleri etrafında düzenlenirler. Hedef molekül polimerizasyon süresince ortamda bulunur ve moleküler kalıp olarak görev yapar. İlk basamakta baskılanacak molekül ile monomer etkileşir ve kompleks monomer meydana gelir. Daha sonra çapraz bağlayıcı ortama ilave edilir ve yüksek sayıda çapraz bağlanma ile polimerizasyon gerçekleştirilir ve içerisinde baskı molekülünü barındıran baskılanmış polimer oluşturulur. Polimerleşme işlemi sona erdikten sonra makro, mikro ya da nano gözenekli yapıdan baskılanan molekül uygun bir desorbsiyon ajanı ile uzaklaştırılır. Sonuç olarak, hedef molekül için yüksek seçiciliğe ve bağlanma eğilimine sahip baskılanmış polimer kalıp kalır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi Bağlanma Mekanizması (Pıletsky, 2001)

Moleküler baskılama tekniği, hedef molekül ve monomerler arasında oluşan bağ yapıları göz önüne alındığında; kovalent baskılama tekniği, kovalent olmayan baskılama tekniği ve metal-şelat baskılama tekniği olmak üzere üç başlık altında sınıflandırılır (Hashim ve Arkadaşları 2014).

2.1.1. Kovalent Baskılama Tekniği

Kovalent baskılama tekniği, hedef molekül yardımı ile bir veya birden fazla polimerleşebilen birimin 'hedef molekül-monomer' yapısı oluşturmak amacıyla kovalent etkileşimler ile bir araya gelmesi işlemidir. Hedef molekül ile monomerin ko-polimerizasyonu esnasında, ortama yüksek miktarda çapraz bağlayıcı ilavesiyle içerisinde kovalent etkileşimler ile bağlanmış olan hedef molekülü içeren polimer meydana getirilir. Hedef molekülün polimer yapısından ayrılmasından sonraki tekrar bağlanma işlemi bazı kimyasal reaksiyonları gerektirebilir (Şekil 2.2).

Kovalent baskılama tekniği; boronat ester, ketal/asetal ve shiff bazlarının kondenzasyon reaksiyonları sonucunda gerçekleştirilir. Hedef molekülü polimerik yapıdan uzaklaştırma işlemi sulu çözeltide yapılır. Uygulanan yöntemde hedef molekül ve monomer arasında stokiyometrik oranlar dikkate alınır. Bu yüzden fonksiyonel gruplar içeren monomerlerin aşırısı ortamda yer almamalıdır. Kovalent baskılama tekniğinde kullanılan hedef moleküller ortamda yer alan suyun varlığına karsı duyarlı olabileceğinden dolayı bu teknikte genelde 'emülsiyon' yada 'süspansiyon' polimerizasyon teknikleri kullanılır.

Bu teknikte, fonksiyonel monomer artıkları hedef molekül ile etkileşen bölgede bulunur ve bu da daha düşük seçicilikte bağlanmalara neden olur. Bu tekniğin en belirgin dezavantajı ise; hedef molekülün ayrılmasının oldukça zor olması ve bunun için bir takım kimyasal işlemlere gerek duyulmasıdır. Yapıdan ayrılamayan hedef molekül, polimer ile kovalent bağlanmayı sürdürür. Hedef molekülü yıkayarak uzaklaştırmaya çalışmak oldukça güçtür.

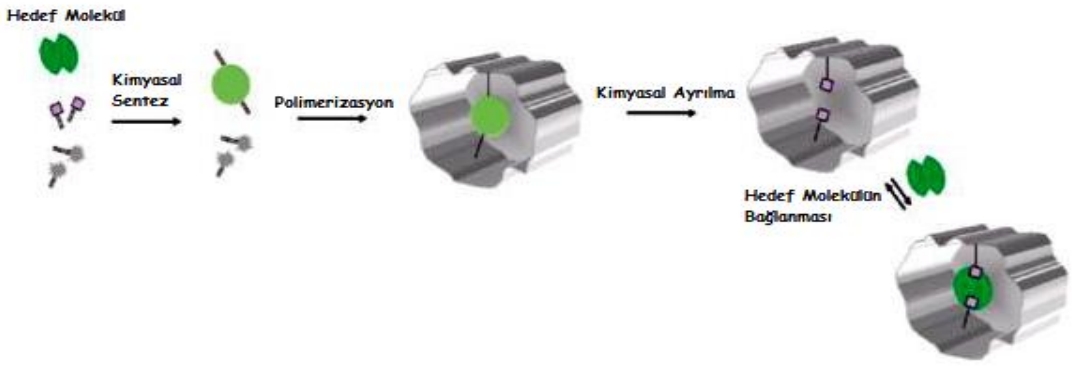
2.1.1.1. Boronat Esterleri ile Kovalent Baskılama Tekniği

Boronat esterleri ile yapılan baskılama çalışmaları hedef molekülün karbonhidrat türevlerinin olduğu en başarılı tekniktir. Bu yöntemde baskılama için kullanılan hedef moleküller; glukoz (Li ve Arkadaşları 2018) , mannoz ve türevleri (Okutucu ve

arkadaşları 2011), siyalik asit (Panagiotopoulou ve Arkadaşları 2017), galaktoz ve fruktoz (Zhao ve Arkadaşları 2018) ve L- DOPA (Zaidi 2018) olarak örneklendirilebilir.

2.1.1.2. Schiff Bazları ile Kovalent Baskılama Tekniği

Shiff bazları yapısında birincil amin gurubu taşıyan bileşikler ile karbonil gurubu taşıyan bilesiklerin kondenzasyonu ile olusur. Bundan dolayı hem amin hem de aldehit grubu taşıyan hedef moleküllerin baskılanması için oldukça uygun bir yöntemdir. Aminoasit ve türevleri bu teknik ile oldukça başarılı bir şekilde baskılanmaktadır (Monier ve Arkadaşları 2018).



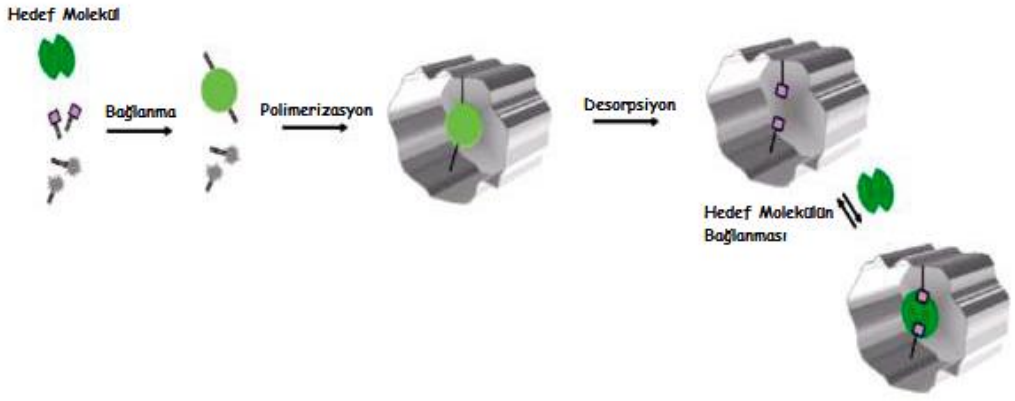
Şekil 2.2. Kovalent Baskılama Tekniğinin Şematik Gösterimi (Monier ve Arkadaşları, 2018)

2.1.2. Kovalent Olmayan Baskılama Tekniği

Kovalent olmayan baskılama tekniğinde, çözelti içerisindeki hedef molekül ve monomerlerin birbirleri ile etkileşmesi için iyonik etkileşimler, dipol-dipol etkilesimleri, van der Waals etkileşimleri ve H bağı gibi moleküller arası etkileşimler ile gerçekleşir. Çözelti içerisinde meydana gelen bu etkileşimler kovalent baskılamaya göre daha kararsızdır ve kovalent olmayan baskılama tekniğinin en büyük dezavantajıdır. Baskılanmış polimer üzerinde oluşturulan baskılama bölgelerinde hareketliliğe izin vermesi ve aynı zamanda kovalent baskılama tekniğine göre daha az kimyasal işlem gerektirmesi ve hazırlanan polimerden hedef molekülün kolay bir şekilde sökülmesi bu yöntemin baskılama işlemleri için diğerlerine oranla daha fazla tercih edilmesinin sebepleri arasında yer alır (Şekil 2.3).

Kovalent olmayan baskılama tekniğinde, kompleksin hedef molekül ve fonksiyonel monomerler arasında polimerizasyon öncesi oluştuğu varsayılır. Hedef molekül ve monomerler arasındaki etkileşimlere çözücünün polarlığı ve H bağı yapma gücü ve polimerizasyon esnasındaki ortam sıcaklığı gibi parametreler etki etmektedir. Bu yöntemde H bağı etkileşimleri düşük polarite ve sıcaklıkta avantajlı olmasına rağmen iyonik ve dipolar etkileşimler polaritesi yüksek olan çözücülerde daha etkilidir. Pratikte çözücü polaritesi ile hedef molekülün çözünürlügü arasında uyum olmalıdır. Çözücünün özellikleri polimerizasyon öncesi oluşan hedef molekül-monomer kompleksini ve polimer yapısındaki gözenek boyutunu da etkiler (Liu ve Arkadaşları 2018).

Hedef molekül ve monomer arasındaki bağlanma etkinliği ve stokiyometrisi nükleer magnetik rezonans (NMR) yada UV-visible spektrometresi ile tespit edilebilir (Li ve Arkadaşları 2018). Polimerizasyon işleminde fonksiyonel monomer miktarı oldukça önemli bir parametredir. Ortamda yüksek miktarda fonksiyonel monomer bulunması spesifik olmayan bağlanmalarda artışa sebep olur ve aynı zamanda hedef molekülün yapı ile tam olarak etkileşmesini engeller. Sonuç olarak polimer yapısında baskılanmış bölgelerin sayısında ciddi miktarda azalma meydana gelir. Ayrıca polimerizasyon esnasında sıcaklık kontrolü yapmak hedef molekül ve monomer arasındaki etkilesimleri daha karalı kılmaya yardımcı olacak önemli bir parametredir.



Şekil 2.3. Kovalent Olmayan Baskılama Tekniğinin Şematik Gösterimi (Li ve Arkadaşları, 2018)

Polimerizasyon esnasında her iki bağlanma şekli dikkate alındığında kovalent olmayan baskılama tekniği aşağıdaki sebeplerden dolayı daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

- ✓ Kovalent olmayan baskılama tekniği daha kolay yürütülebilen bir işlemdir.
- ✓ Bu teknik ile hedef molekül monomer kompleksinin sentezi esnasında meydana gelebilecek olumsuzlukların önüne geçilmiş olur.
- ✓ Hedef molekülün baskılanmış bölgelerden uzaklaştırılması işlemi çok daha kolaydır.
- ✓ Kovalent olmayan baskılama tekniği kullanılarak, baskılanmış polimerin bağlanma bölgelerindeki işlevsellik daha yüksek olur.
- ✓ Kovalent bağlanma tekniğine göre daha az kimyasal işlem gerektirir.
- ✓ Hedef molekülün tekrar bağlanma verimi yüksek, kinetiği hızlıdır.
- ✓ Kovalent olmayan baskılama tekniğinde fonksiyonel monomer ile etkileşime girebilecek çok sayıda bileşik vardır.

2.1.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin (MIP) Sentezinde Kullanılan Bileşenler

Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında beş ana bileşen kullanılır. Bunlar;

- ✓ Hedef molekül
- ✓ Fonksiyonel monomer(ler)
- ✓ Çapraz bağlayıcı
- ✓ Gözenek oluşturucu
- ✓ Başlatıcı

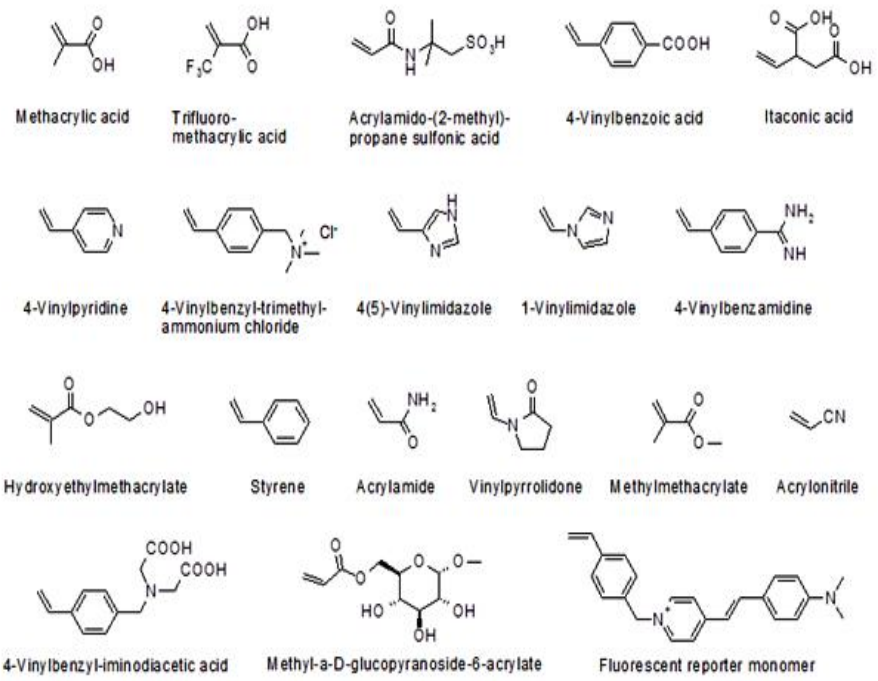
2.1.3.1. Hedef Molekül

Moleküler baskılama tekniğinde hedef molekülün merkezi bir önemi vardır. Hedef moleküller, fonksiyonel monomerler üzerinde bulunan bağlanma bölgelerinin organizasyonunu yönlendirir. Moleküler baskılama tekniğinin en önemli özelliği çeşitli aralıkta hedef moleküller için uygulanabilir olmasıdır. Ancak her hedef molekül moleküler baskılama işlemi için uygun olmayabilir. Bu alanda yapılan çalışmalar incelendiğinde hedef molekül ile etkileşecek fonksiyonel monomer(ler) arasındaki etkileşimler dikkate alınarak uygun fonksiyonel monomer seçimi yapılmalı ve polimerizasyon esnasında kullanılan çözücünün kimyasal özelliği bilinmelidir. Moleküler baskılama tekniğinde kullanılan hedef moleküller genellikle farmasotik ilaçlar, pestisitler, amino asitler, nükleotidler, steroidler, şekerler, peptitler ve proteinlerdir.

2.1.3.2. Fonksiyonel Monomer(ler)

Fonksiyonel monomer seçimi hedef molekülle baskılama bölgesi arasındaki etkileşimler açısından oldukça büyük önem taşımaktadır. Kovalent baskılama tekniğinde, hedef molekül ile fonksiyonel monomer miktarındaki değişimler önemli değildir. Çünkü bu teknikte hedef molekül kovalent olarak bağlanabilen fonksiyonel monomerin sayısını belirler ve fonksiyonel monomerler ortamdaki hedef molekülün stokiyometrisine uygun bir biçimde bağlanır. Kovalent olmayan baskılama tekniğinde ise hedef molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki oran oldukça önemlidir. Ortamdaki hedef molekül miktarı arttıkça sentezlenecek olan baskılı polimerin formülasyonunda değişiklikler olabilir. Çünkü polimerizasyon işleminden önce oluşturulan hedef molekül - fonksiyonel monomer kompleksinin polimerizasyon öncesinde meydana gelen karışımda bileşen konsantrasyonu artacak ve buna bağlı olarak bağlanma afinitesini de artış gösterecektir. Sonuç olarak, meydana gelen baskılanmış polimerde bağlanma bölgelerinin sayısında artış ve gram polimer başına artan bağlanma ve seçicilik faktörü ile sonuçlanır. Fonksiyonel monomerler bağlanma bölgelerindeki bağlanma etkinliğinden sorumludur. Baskılama etkisi ve kompleks oluşumunu en üst düzeye çıkarmak için hedef molekül ile fonksiyonel monomerin birbiri ile uyumlu olması oldukça önemlidir (Zhao ve Arkadaşları 2018). Moleküler baskılama tekniğinde kullanılan bazı fonsiyonel monomerler Şekil 2.4'de verilmiştir.

Şekil 2.4'de de görüldüğü üzere kullanılan fonsiyonel monomerler asidik, bazik ve nötral karakterli olabilmekte, baskılanacak hedef molekülün kimyasal çevresine göre uygun özellikte monomer seçimi yapılmaktadır.

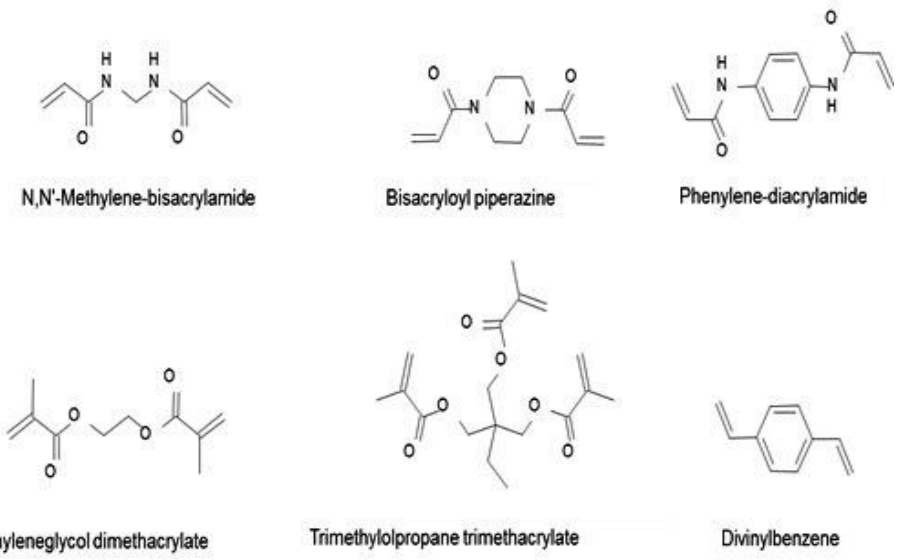


Şekil 2.4. Moleküler Baskılama Tekniğinde Kullanılan Fonsiyonel Monomerler (Zhao ve Arkadaşları, 2018)

2.1.3.3. Çapraz Bağlayıcı

Moleküler baskılama teknolojisinde çapraz bağlayıcı seçiminin oldukça önemli bir rolü vardır. Çapraz bağlayıcı, bağlama kabiliyetinin devam etmesi için mekanik dayanıklılığın sağlanmasında ve bağlanma bölgelerinin kararlı hale getirilmesinde görev alır. Yüksek çapraz bağ oranı genellikle yeterli mekanik kararlılıkta kalıcı gözenekli malzemelerin eldesinde kullanılır. Yapılan bazı çalışmalarda, çapraz bağlayıcının polimerin fiziksel özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki spesifik etkileşimler üzerinde daha az etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Yeşilova ve Arkadaşları 2018). Baskılı polimerin örgü yapısında çapraz bağlayıcının rolü, hedef molekül etrafındaki fonksiyonel monomerin yapısında bulunan fonksiyonel grupları belirli yer ve yönlerde sabitlemek ve böylece baskılanmış bölgelerini korumaktır. Çapraz bağlayıcının önemli görevlerinden biri de

baskılanmış polimerin çözücüler içinde çözünmesini engellemesidir. Moleküler baskılama tekniğinde kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar Şekil 2.5'de verilmiştir.



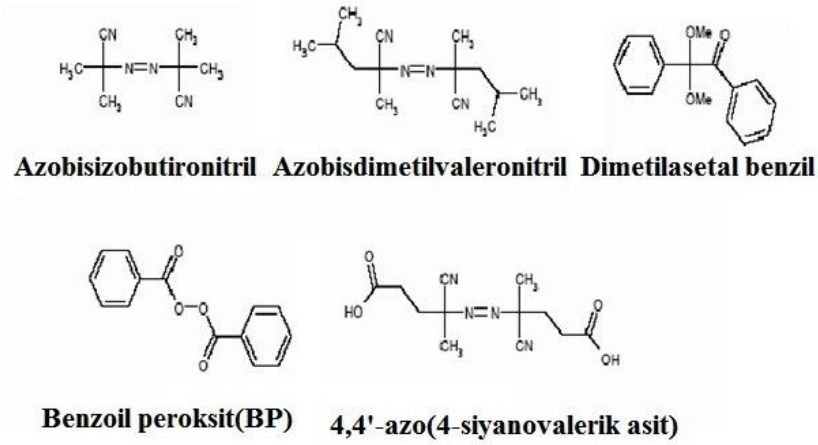
Şekil 2.5. Moleküler Baskılama Tekniğinde Kullanılan Çapraz Bağlayıcılar (Yeşilova ve Arkadaşları, 2018)

2.1.3.4. Gözenek Oluşturucu

Polimerizasyon işlemi esnasında kullanılan gözenek oluşturucunun seçimi ve miktarı hem baskılama peryodunu hem de oluşan baskılı polimerin fiziksel durumunu (gözenek boyut dağılımı, gözenek yapısı, dayanıklılık, şişme ve morfoloji) etkiler. Gözenek oluşturucu kullanılarak hazırlanan baskılı polimerin, kullanılmadan yapılan baskılı polimere göre daha etkin olduğu tespit edilmiştir (Alexander ve Arkadaşları 2006).

2.1.3.5. Başlatıcı (Radikal Oluşturucu)

Moleküler baskılama teknolojisinde kullanılan farklı kimyasal özelliklere sahip pek çok kimyasal başlatıcı 'serbest radikal polimerizasyonun'da radikal oluşturucu olarak kullanılabilir. Başlatıcının radikallere ayrışma hızı ve biçimi başlatıcının kimyasal yapısına bağlı olarak ısı, ışık, kimyasal/elektrokimyasal özellikler dahil olmak üzere bir çok parametreden etkilenebilir. Moleküler baskılama tekniğinde kullanılan bazı başlatıcılar Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Moleküler Baskılama Tekniğinde Kullanılan Başlatıcılar (Dolak ve Arkadaşları, 2018)

2.1.4. Molekül Baskılı Polimerlerin Sentezleme Teknikleri

Molekül baskılı polimerler 5 farklı yöntemle sentezlenebilir. Bunlar;

- ✓ Serbest Radikal Polimerizasyonu
- ✓ Bulk Polimerizasyonu
- ✓ Süspansiyon Polimerizasyonu
- ✓ Emülsiyon Polimerizasyonu
- ✓ Kimyasal Aşılama

2.1.4.1. Serbest Radikal Polimerizasyonu

Serbest radikal polimerizasyonu Çok yönlü uygulamaları ve deneysel kolaylığının yanında ekonomik bir yöntem olduğu için baskılı polimerlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimerizasyon süreci; 2,2'-Azobis (izobutironitril) (AIBN) veya amonyum persülfat (APS) gibi bir radikal başlatıcının bozulmasıyla başlatılır (Dolak ve Arkadaşları 2018).

Serbest radikal polimerizasyonunda, fonksiyonel monomerler aktif merkeze birer birer katılarak polimer zincirlerini büyütürler. Polimerizasyon sürecinin başlaması için radikal oluşturacak başlatıcı kullanılmalıdır. Başlatıcının etkisi ile fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcıların etkileşmesi için radikaller meydana gelir ve bunun sonucunda oluşan serbest radikaller etkileşerek yüksek mol kütleli baskılı polimerleri meydana getirirler.

2.1.5. Baskılı Polimerlerin Hazırlanması

Baskılı polimerlerin hazırlanması üç basamakta gerçekleşir;

- ✓ Fonksiyonel monomerler, hedef molekül ile kompleks oluştururlar.
- ✓ Oluşan Hedef molekül- Fonksiyonel monomer kompleksi ortama uygun başlatıcı ilavesi ile çapraz bağlayıcılar ile ko-polimerize olurlar.
- ✓ Oluşan polimerik yapıdan hedef moleküle özgü baskılı bölgeler oluşturmak için hedef molekül uygun bir desorbsiyon ajanı ile uzaklaştırılır ve böylece hedef moleküle özgü seçici bağlanma bölgeleri meydana getirilmiş olur.

2.1.6. Baskılı Polimerlerin Karakterizasyonu

Hazırlanan baskılı polimerlerin karakterizasyon işlemi için şu metotlar kullanılır;

- ✓ **SEM (Scaning Electron Microscopy) görüntüsü;** Hazırlanan baskılı polimerlerin yüzeyinde meydana gelen baskı bölgelerinin gözenek boyutları ve yapılarını görüntülemek amacıyla kullanılır.
- ✓ **Element analizi;** Hedef Molekül-Fonksiyonel Monomer arasındaki etkileşim ve daha sonra polimerleşme işlemi sonrası oluşan baskılı polimerin yapısındaki elementel değişimi izlemek amacıyla kullanılır.
- ✓ **Tanecik Boyutu Analizi;** Hazırlanan baskılı polimerlerin tanecik boyutlarının makro, mikro yada nano boyutta olup olmadıklarını tespit etmek amacıyla kullanılır.
- ✓ **BET (Yüzey Morfolojisi Analizi);** Hazırlanan baskılı polimerlerin yüzey yapısını, dayanıklılığını ve morfolojisini tespit etmek amacıyla kullanılır.

- ✓ **FT-IR (Fourier transform-Infrared Spectroscopy);** Sentezlenen hedef molekül-fonksiyonel monomer arasındaki etkileşim sonucu ve polimerizasyon işlemi sonrası meydana gelen yapısal değişiklikleri izlemek amacıyla kullanılır.

2.1.7. Baskılı Polimerlerin Kullanım Alanları

Moleküler baskılama teknolojisinde hazırlanan baskılı polimerler şu alanlarda kullanılırlar;

- ✓ Katı faz ekstraksiyonunda sabit faz olarak (Samah ve Arkadaşları 2018, Lian ve Arkadaşları 2018, Wang ve Arkadaşları 2018, Kumar ve Arkadaşları 2018)
- ✓ Sensör olarak;
- Biyokimyasal sensör olarak (Zhang ve Arkadaşları 2018, Zhang ve Arkadaşları 2018)
- Elektrokimyasal sensör olarak (Güzel ve Arkadaşları 2017, Zhao ve Arkadaşları 2017)
- Floresans Özellikli sensör olarak (Gui ve Arkadaşları 2018, Yang ve Arkadaşları 2018)
- ✓ Katalitik aktiviteye sahip polimerler olarak (Diaz-Diaz ve Arkadaşları 2011, Escobar ve Arkadaşları, 2018)
- ✓ Yapay Enzim olarak (Cieplak ve Arkadaşları, 2016, Mathew ve Arkadaşları 2018)
- ✓ Antibadi olarak (Hasanzadeh ve Arkadaşları 2018, Du ve Arkadaşları 2016)
- ✓ Metal ayırmalarında (Keçili ve Arkadaşları 2018, Dolak ve Arkadaşları 2015)

2.1.8. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Biyolojik Reseptörlere Göre Avantaj ve Dezavantajları

Moleküler baskılanmış polimerlerin biyolojik reseptörlere göre pek çok avantajı vardır. Bunlar;

- ✓ Moleküler baskılanmış polimerlerin binlerce hatta milyonlarca bağlanma bölgeleri varken biyolojik reseptörlerin ise bir veya birkaç tane bağlanma bölgeleri vardır.
- ✓ Moleküler baskılanmış polimerler biyolojik reseptörlere göre oldukça kararlı ve dayanıklıdırlar.
- ✓ Moleküler baskılanmış polimerler ağır çevresel koşullarda (pH, iyonik şiddet ve yüksek sıcaklık) kararlılıklarını korurken biyolojik reseptörler bu koşullarda kararlılıklarını koruyamamaktadır.

Moleküler baskılanmış polimerlerin dezavantajları da vardır. En büyük dezavantajı ise bu metotta baskılanan hedef molekülün polimerden tamamen uzaklaştırılması zor bir işlemdir. Bir diğer önemli dezavantajı ise baskılanma bölgelerindeki boşlukların çok az bir kısmının hedef molekül ile birebir uyuşmasıdır.

2.1.9. Protein Baskılama

Moleküler baskılama teknolojisi ilk çalışma gününden bugüne kadar özellikle Küçük moleküllerin ve iyonların (amino asit, peptid yada metal) baskılanması ile ilgili oldukça fazla sayıda baskılanmış polimerler hazırlanmışken, protein kalıplara yönelik moleküler baskılamaların geçmişi çok eski değildir. Çünkü protein baskılama tekniğinde protein kalıba, fonksiyonel açıdan tümüyle tamamlayıcı baskılama bölgeleri oluşturmak oldukça güçtür. Protein baskılama üzerine ilk çalışma 1985 yılında Glad ve arkadaşları tarafından yayınlanmış olup daha sonraki yıllarda daha başarılı çalışmalar yapılmıştır.

Protein baskılama tekniğinde protein kalıplarının özelliklerine bağlı olarak bazı dezavantajlar ortaya çıkmaktadır.

- ✓ Proteinler suda kolaylıkla çözünebilen yapılar olduğundan baskılı polimerlerin sentezi esnasında organik çözücülerin kullanılmasından dolayı bazı sıkıntılar ortaya çıkabilir.
- ✓ Proteinlerin esnek yapı ve konformasyonları nedeniyle sıcaklık veya herhangi bir çevresel değişimden kolayca etkilenirler.
- ✓ Proteinler, fonksiyonel monomerler ile etkileşime girebilecek çok sayıda fonksiyonel gruba sahip olması, desorbsiyon işlemini güçleştirmektedir.
- ✓ Protein gibi büyük moleküllerin kullanıldığı moleküler baskılamada moleküler tanımayı başarıyla gerçekleştirmek için yüksek oranda çapraz bağlayıcı kullanılması gerekmektedir. Bu yüzden kalıp molekül polimerizasyonunun ardından kolayca desorbe edilememektedir. Bundan dolayı protein baskılama işlemlerinde genellikle yüzey baskılama yöntemi tercih edilmektedir.

2.1.9.1. Protein Baskılama Teknikleri

(a) Proteinlerin 3D (üç boyutlu) baskılanma Tekniği

3D Baskılama yöntemi, yığın polimerizasyonu olarak da bilinmektedir. Bu yöntemde protein 3 boyutlu yapısı ile tam olarak baskılanmaktadır ve geri bağlanması da aynı şekilde gerçekleşmektedir. Baskılanmış sistemin en önemli özelliği hedef proteinin yüksek seçicilik ve verimle bağlanması, kolayca uzaklaştırılabilmesi ve baskılanmış bölgeye kolayca tekrar bağlanabilmesidir.

Akrilat ve hidrojeller ile baskılanmış polimerler 3D protein baskılama tekniğinde yaygınca kullanılan yöntemlerdir.

Akrilatlar

Akrilatlar, Protein baskılanmış polimerler hazırlamak için sıklıkla kullanılan malzemelerdir. Bu metodunen en büyük dezavantajı proteinlerin çözünmedikleri solventlerin kullanılmasıdır. Bu olay baskılı polimerlerin etkinliğini düşürebilir. Bundan dolayı akrilat kaynaklı baskılı polimerler hazırlanırken sudaki çözünürlüğü yüksek olan akrilatlar kullanılır.

Akrilatların protein baskılamasında kullanılmasının ana nedeni, protein gibi büyük moleküllerin mobilitesi için düşük miktarlarda çapraz bağlayıcılar kullanılarak oluşturulan jellere dayanır. Buna karşın düşük miktarda çapraz bağlayıcı ile sentezlenmiş baskılı polimerler hızlı bir şekilde baskılama özelliklerini kaybederler ve değişen çevresel koşullara karşı daha az direnç gösterirler.

Hidrojeller

Moleküler baskılama tekniğinde kullanılan hidrojeller, çapraz bağlayıcı miktarının oldukça az olduğu hidrofilik bir sistem olarak tasarlanmıştır. Proteinler gibi makro moleküllerin baskılanmış komplekslerin baskılama bölgelerine geçişi kolay bir şekilde sağlayan baskılanmış polimer komplekslerin sentezine olanak sağlarlar.

(b) Proteinlerin 2D (iki boyutlu) baskılanma Tekniği

3D (üç boyutlu) moleküler baskılama, çözeltideki bir molekülün büyük miktarlarının yüksek seçicilikte olarak bağlanmasına karşın bazı dezavantajlara sahiptir.

2D (iki boyutlu) baskılama tekniğinde ‘yüzey baskılama’ sayesinde bu dezavantajlar ortadan kalkmıştır. Bu metottda sadece yüzey baskılanacağından dolayı daha az miktarlarda hedef moleküle ihtiyaç duyulur. Bu teknikte, yüzeye çok yakın baskılı bağlanma bölgeleri meydana gelir ve bunun sonucunda bağlanma bölgeleri daha kolay ulaşılabilir hale gelir. Bu özellik sayesinde 3D (üç boyutlu) baskılamada karşılaşılan difüzyon problemleri ortadan kalkar, bağlanma çok daha hızlı olur ve dengeye gelme zamanı oldukça kısalır.

2.2. Kriyojeller

Makrogözenekli polimerik malzemeler; biyoteknolojik ve biyotıp alanında büyük ilgi görmektedir. Makrogözenekli materyalleri hazırlamak için; donma-kurutma, mikro emülsiyon oluşumu, gaz üfleme tekniği ve faz ayrışması gibi çeşitli metotlar kullanılır. Açık gözenekli yapı ve kontrollü gözenekler ile makrogözenekli polimerik malzemeler kriyojelleşme teknolojisi ile üretilmektedir. Kriyojelleşme, hemen hemen her türlü jel şekillendirme sistemleri ile gerçekleşen geniş çaplı gözenekli formlar ile makro gözenekli hidrojeller hazırlamak mümkündür. Makrogözenekli hidrojeller; sulu ortamda sentezlenen buz kristalleri ve erime sonrası makro yapı için bir kalıp oluşturularak sentezlenir. Klasik jellerin aksine, kriyojeller, içte birbirine bağlı makrogözenek içeren çözücü ve polimer ağa bağlı heterofaz sistemlerdir. 0.2’den 400 μm ile gözenek boyutları ile kriyojel kullanılan jel öncüleri ve kimyasal reaksiyona bağlı olarak oluşabilir (Lozinsky ve arkadaşları 2002).

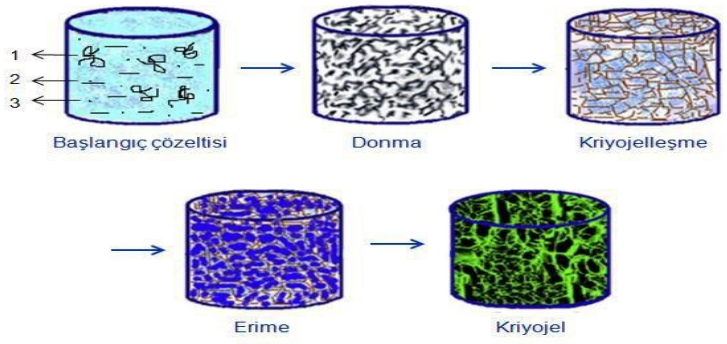
Makrogözenekli kriyojeller; sulu ortamda vinil ve divinil monomerlerin serbest radikal ko-polimerizasyonu ile sentezlenirler. Monomer olarak akrilamid, akrilik asit, N-izopropilakrilamid, dimetilakrilamid ve metakrilik asit türevleri kullanılır. Makrogözenekli kriyojellerin özellikleri ve kriyojelleşme koşulları birçok parametreye bağlıdır ve serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanır.

Kriyojellerin avantajları; hidrofobik ortamda geniş ve büyük ölçüde birbirine bağlı gözeneklere sahip olmasıdır. Bu özellik kriyojel gözeneklerine mikrop, hayvan hücreleri, protein gibi çeşitli boyutlarda moleküllerin bağlanabileceğini göstermektedir. (Arvidsson ve arkadaşları 2003). Kriyojellerde gözenek boyutları diğer jellere göre 100 ile 1000 kat arasında daha geniştir. Bununla birlikte, kriyojeller düşük geri basınç

özelliklerinden dolayı diğer kromatografik destek malzemelerine göre yüzey alanı azaltmayı sağlamaktadır.

2.2.1. Kriyojellerin Oluşumu ve Özellikleri

Kriyojel oluşumunda sadece sulu çözeltiler değil formamid, dioksan gibi organik solventler de kullanılabilir (Kirsebom ve Arkadaşları 2011). Kriyojel sentezinin ilk aşamasında hedef molekül, monomer(ler), başlatıcılar (radikal oluşturucular) ve çapraz bağlayıcılar çözücü içinde karıştırılır ve ılıman donma koşullarında bekletilir. Dikkat edilmesi gereken en önemli husus ise jelleşme hızının çok yüksek olmamasıdır, aksi takdirde bileşenleri ihtiva eden çözücü donma işleminden önce hızlı bir şekilde jelleşme meydana gelecektir. Polimerleşme hızı ise karışım içerisindeki başlatıcı miktarına bağlıdır. Donma işlemi gerçekleşirken çözünmüş maddeler "sıvı mikrofaz" olarak adlandırılan donmamış mikrobölgelerde toplanır ve polimerleşme bu donmamış mikro bölgelerde ilerlerken buz kristalleri meydana gelir. Dondurulmuş sistem, katı faz (donmuş çözücünün kristalleri) ve donmamış sıvı mikrofazdan oluşan heterojen bir sistemdir. Mikrofaz hacmi çözücünün yapısına, çözünmüş maddelerin ilk derişimine, donma sırasında örneğin termal geçmişine, çözünür ve çözünmez karışımın varlığına bağlıdır. Donmamış kısım genellikle toplam örneğin % 0,5 - 15'ini oluşturur. Donma esnasında oluşan buz kristalleri gözenek oluşturucu olarak hareket eder ve polimerizasyon işlemi sona erdikten sonra eriyerek kolaylıkla polimerik yapıdan ayrılabilir ve böylece gözenekli yapıya neden olan boşlukları meydana getirir. Sonuç olarak sürekli birbirine bağlı büyük gözeneklere sahip kriyojeller sentezlenir (Tripathi ve Arkadaşları 2013). Kriyojel üretim mekanizması Şekil 2.7'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Kriyojel Üretim Şeması (Tripathi ve Arkadaşları, 2013)

2.2.2. Kriyojellerin Kullanım Alanları

Kriyojellerin uygulama alanları oldukça geniştir. Özellikle biyokimaysal ayırma ve afinite kromatografisi kriyojellerin en yaygın uygulama alanlarıdır (Güven ve Arkadaşları 2018, Yeşilova ve Arkadaşları 2018, Çorman 2018, Guan ve Arkadaşları 2018). Kriyojellerin kimyasal ve mekanik kararlılıklarından dolayı biyolojik materyallerin yüksek seçicilik ve bağlanma verimi ile ayırımı hususunda önemli kılmaktadır. Kriyojeller, biyoteknoloji ve biyotıp alanlarında da doğrudan fermantasyon ortamından ürün kazanımında, insan kan lenfositlerinin ve insan tümör hücrelerinin ayrılmasında ve hücre immobilizasyonunda kullanılmaktadır (Tripathi ve Arkadaşları 2009). Ayrıca kriyojeller, yüksek biyolojik uyumluluğu ve doğal yumuşak dokulara uyumlu yapısından dolayı birçok biyomedikal, kozmetik ve farmasötik (eczacılık) uygulamalarda da kullanılmaktadır.

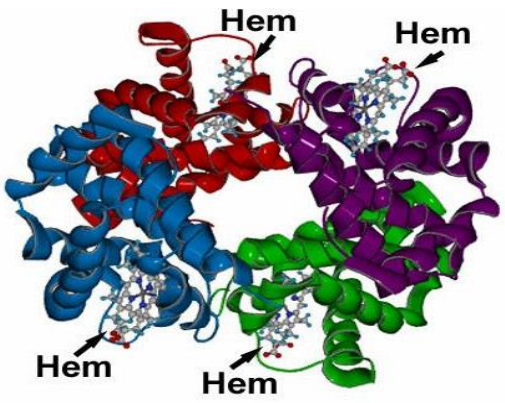
2.3. Hemoglobin (Hb)

Hemoglobin (Hb) hücrelere oksijen tasıma görevini yapan özel bir moleküldür. Bu işlemi yaparken Hb akciğerdeki oksijeni alırken, karbondioksidi bırakır ve oradan kaslara geçer ve kaslar da besinleri yakıp karbondioksit oluşturur. Hb molekülü kaslara ulastığında önceki görevinin aksine bir işlev göstererek oksijeni bırakıp karbondioksidi alır. Bir maddenin gerektiği durumda oksijene ilgi gösterip gerektiği durumda da ilgisini kaybedip serbest bırakması ve organizmada mikroskoplarla görülebilecek kadar küçük bir molekülün karar verme ve tercih yapma gibi özelliklerinin olması ve buna göre işlev göstermesi onu mükemmel kılmaktadır. Hb molekülünün gösterdiği bu işlevler sayesinde canlılar yaşamını sürdürebilmektedir. Canlı organizmada saatte ortalama 1 milyar alyuvar üretilir ve yalnızca bir alyuvar hücresinde ise yaklasık 300 milyon Hb molekülü bulunur. Canlı organizmada bulunan Hb moleküllerinin sayısı ve bu moleküllerin hepsinin istisnasız aynı yeteneklere sahip oldukları ve görevlerini yerine getirdikleri göz önüne alınırsa Hb molekülünün önemi daha iyi anlaşılır.

2.3.1. Hemoglobin (Hb) Molekülünün Yapısı

Şekil 2.8'den de görüldüğü üzere Hb molekülü yapısal olarak bir heterotetramer bir proteindir ve 2 alfa, 2 beta olmak üzere dört adet polipeptit zincirinden meydana gelir. Alfa zincirlerinde 141 aminoasit artığı, beta zincirlerinde ise 146 aminoasit artığı

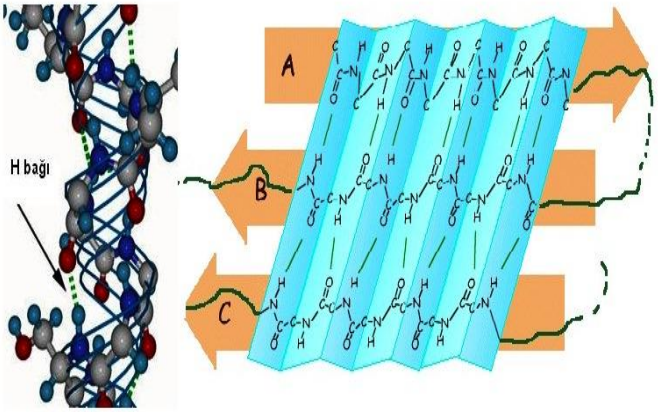
bulunmaktadır. Hb molekülünün bu formu Hemoglobin A adlandırılır ve HbA olarak simgelenir. Bu formda her polipeptit zincirleri sarmal halde bulunur.



Şekil 2.8. Hemoglobinin (Hb) Yapısı

Şekil 2.9 (a)'dan da görüldüğü üzere alfa heliks yapıda her aminoasit zincirin diğer tarafındaki aminoasit ile H bağı yapar. Aminoasitler arasındaki H bağı –NH grubu ile –CO grubu arasında meydana gelir.

Şekil 2.9 (b)'den de görüldüğü üzere Hb molekünün diğer yapısı ise beta yaprak yapısıdır. Bu yapıda aminoasitler birbirlerine paralel şekilde dizilirler ve polipeptit zincirleri yan yana uzanır ve yine bu yapıda da aminoasitler arası H bağı iki zincir arasındaki -NH ile –CO grupları arasında meydana gelir.

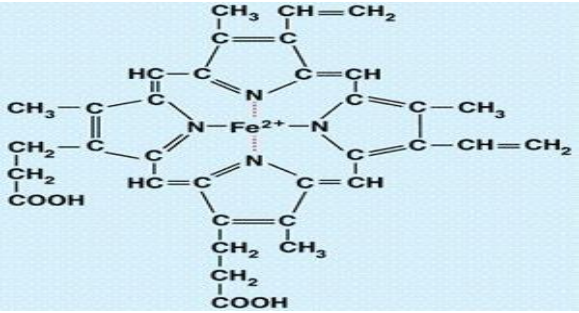


Şekil 2.9. (a) Hemoglobin (Hb) molekülünde alfa sarmal yapısı **(b)** Hemoglobin (Hb) molekülünde beta yaprak yapısı

2.3.1.1. Hem- Grubu

Hb molekülünde her polipeptit zinciri bir hem- grubu içerir. Her hem grubu ise; porfirin olarak bilinen heterosiklik halkanın merkezinde Fe(II) atomu içerir (Şekil 2.10).

Porfirin molekülündeki dört azot atomu bir Fe(II) atomuyla koordine kovalent bağ oluşturarak Hem-Fe(II) kompleksini meydana getirirler. Ayrıca Hb molekülündeki Hem- grubu oksijeni bağlayan kısımdır.



Şekil 2.10. Fe(II) atomu ile koordine kovalent bağ oluşturmuş Hem- Grubu

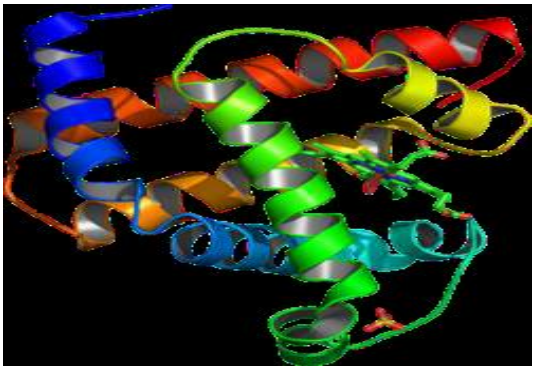
2.3.2. Hemoglobin (Hb) Molekülünde Bozulmalar (Mutasyon)

Hb molekülleri (HbA) normal koşullarda pürüzsüz ve küresel yapıdadır ve sahip oldukları bu yapılarından dolayı oksijeni kolaylıkla hücrelere taşırlar. Bozuk Hb molekülleri (HbS) ise oldukça sert yapıda ve orak şeklindedirler. Bu yüzden yapıdaki histidin aminoasitlerinin oksijen tasıma kapasiteleri normal hemoglobine göre oldukça düşüktür. Hb molekülünün kompleks yapısı tüm kompleks organizmalarda olduğu gibi herhangi bir mutasyona izin vermeyecek ölçüde hassastır. Yapısında meydana gelebilecek herhangi bir bozulma (mutasyon) Hb molekülünü bir anda işlev göremez bir aminoasit yığınına dönüştürebilir. Hb molekülünde meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon canlı organizmada anemi hastalığına yol açar.

2.4. Miyoglobin (Mb)

Miyoglobin (Mb) düşük mol kütlesine sahip (17,800 Da) yaklaşık bütün memelilerde başlıca kas dokularında bulunan ve oksijen bağlayan bir proteindir. Mb, enerji gereksiniminin yüksek olduğu zamanlarda oksijeni depolar ve oksijen ihtiyacı bulunan dokulara dağıtımını sağlar (Nelson ve Arkadaşları 2005).

Mb, 1 molekül hem ve 153 tane aminoasit içeren tek bir polipeptit zinciridir. Birincil ve üçüncül yapıları benzer olan ve globülinler olarak adlandırılan protein ailesinin tipik bir üyesidir. Polipeptit, sekiz tane α-heliks parçadan meydana gelir. Mb proteininin yapısında bulunan amino asitlerin % 78'i bu α-heliks yapılarda bulunmaktadır (Şekil 2.11).



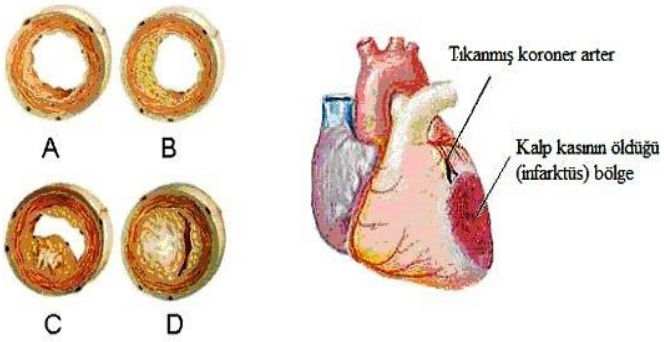
Şekil 2.11. Myoglobin (Mb) Molekülündeki α-heliks yapıları

Hasar gören kas dokularından fazla miktarda Mb ortama verilir. Ortama verilen Mb böbrekler tarafından emilir. Ancak bu böbrekler için oldukça toksiktir ve akut böbrek yetmezliğine yol açabilir (Naka ve Arkadaşları 2005). Mb, kas zedelenmesinin duyarlı bir belirtecidir bu özellik Mb molekülünü göğüs ağrısı çeken hastalarda kalp krizinin potansiyel belirteçlerinden biri yapar (Weber ve Arkadaşları 2005). Kanda Mb teşhisi için laboratuarlarda, enzim bağlı immunosorbent analiz (ELISA) tekniği kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemin çok zaman harcanması, etiketleme ihtiyacı olması, doğal antibadilere ihtiyaç duyulması, ve tekrar kullanılamaması gibi dezavantajları bulunmaktadır.

2.4.1. Kalp Krizi

Kalp krizi tüm dünyada başlıca ölüm nedenlerindendir. Kalp krizlerinin çoğu aslında birçok insan için önlenmesi mümkün olan koroner arter hastalığın yıllarca süren sessiz ancak sürekli ilerleyişinin bir sonucudur. Kalp krizi sıklıkla koroner arter hastalığın ilk belirtisidir. Kalp krizinin diğer bir adı ise miyokardiyal infarktüstür (MI).

Kalp krizi, kalbe kan taşıyan bir veya daha fazla koroner arterin tamamen tıkanması ya da kalp kasına taşınan kanın azalması durumunda ortaya çıkmaktadır. Tıkanma genellikle ateroskleroz nedeniyle olmaktadır. Ateroskleroz plakların ya da kan pıhtılarının koroner arterlerde birikmesidir. Bazen de nedeni bilinmeyen bir şekilde sağlıklı ya da aterosklerotik koroner arterde spazm olmakta ve kalbe giden kan azaldığından kalp krizi meydana gelebilmektedir (Şekil 2.12). Kalp krizi süresince arterin tıkalı kalma süresi uzadıkça, kalbin göreceği hasar da o kadar fazla olmaktadır.



Şekil 2.12. Damardaki Aterosklerozun Zaman içinde İlerlemesi: (A) ve (B) Önemli Darlık oluşturması (C) sonunda tıkanarak (D) kalp krizine yol açması (Weber ve Arkadaşları, 2005)

2.4.1.1. Miyoglobin (Mb) Molekülünün Kalp Krizi Erken Teşhisindeki Rolü

Akut miyokard infarktüsü (AMI) için, daha doğru ve hızlı bir teşhis gerekliliği ve hastaların göğüs rahatsızlığının kontrolü için yeni biyokimyasal metotlar ve stratejiler geliştirilmektedir. Araştırılan biyokimyasal belirteçler arasında enzimatik belirteçlere alternatif, enfarktüsün en erken non-spesifik belirteci Mb molekülü ve troponinlerdir (Vaidya 1994).

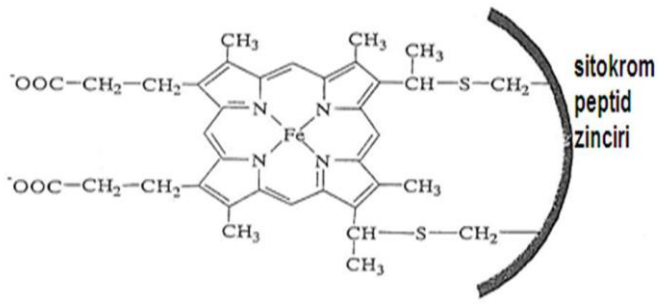
Kalp krizinde en etkili bir müdahale erken teşhisdir. Miyokardiyal infarktüs tanısını koymak zor olduğu için acil servise göğüs ağrısı ile gelip alıkonan hastaların sayısı da fazla olmaktadır. Acil servisteki esas problem kişinin kalp krizi geçirip geçirmediğinden emin olunabilmesidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün AMI için belirlediği kriterlere göre kardiyak belirteçler tanıyı kolaylaştırmaktadır. Biyokimyasal belirteçler uzun zamandan beri tanıda önemli bir rol oynamakta ve özellikle düşük ve orta risk grubunda yer alan hastalar için büyük önem taşımaktadır (Osman 2011).

Mb, belirli bir zaman dilimi içinde kalbin hasarlı bölgesinden salınan ve AMI teşhisinde kullanılabilen ilk biyokimyasal belirteçtir. Duyarlılığı, diğer kalp krizi belirteçleri olan kreatin kinaz (CK), kreatin kinaz izoenzim MB (CK-MB), troponin T ve troponin I'dan göğüs ağrısı başladığı an ve ilk birkaç saat içinde çok daha yüksektir.. Kalp krizinin başladığı ilk 2 saat içinde Mb serum düzeyleri artmaya başlar, 6-9 saat içinde pik yapar ve 24 saat içinde de eski seviyesine Göğüs ağrısı başladığında ve ağrı başladıktan sonraki birkaç saat içerisinde Mb hassasiyeti CK, CK-MB ve troponinlerden (T ve I) daha yüksektir (Kilpatrick ve Arkadaşları 1993). Kalp krizinin teşhisinde

kullanılabilecek ilk biyomarker olması nedeniyle kandaki Mb miktarının hızlı ve güvenilir bir şekilde tayini oldukça büyük önem taşımaktadır.

2.5. Sitokromlar

Sitokromlar, kendilerine has görünür bölge spektrumlarına sahip kırmızı-kahverengi renkte olabilen hem- proteinleridir. Elektron transfer sistemindeki sitokromlar genellikle absorpsiyon spektrumlarındaki dalga boylarına bağlı olarak A, B ve C gibi harflerle tanımlanmaktadırlar. B ve C gibi sitokromlar protoporfirin IX sistem ile kompleksleşmiş bir demir atomu içerirler. Bazı C türü sitokromlarda ise (C ve C1 gibi) hem- prostetik grubundaki iki vinil grubu ile peptid zincirindeki iki sistein birimleri arasında tiyoeter bağları üzerinden sitokromun polipeptid zincirine kovalent olarak bağlıdırlar (Şekil 2.13).



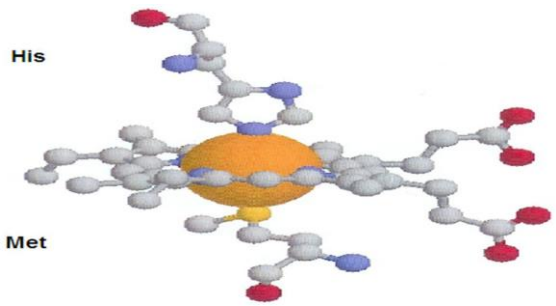
Şekil 2.13. Sitokrom-C prostetik grubunun kimyasal yapısı.

Doğada bugüne kadar birbirinden farklı yapı ve özellikte bir çok sitokrom molekülüne (A, B, C, D, F sitokrom p-450 ve sitokrom p-448) rastlanmıştır. Sitokromlar ilk defa solunum zincirinde tespit edilmiştir. Ancak daha sonraları sitokromların solunum zincirinden başka bitki hücrelerinde, endoplazmik retikulumda, bakterilerde ve mayalarda da bulunduğu saptanmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda sitokromların solunum olayının oksidasyon fazında, yeşil bitkilerde fotosentezin ışık fazında, canlının metabolik gelişimi sırasında çeşitli yerlerde, ilaçların etkileşim mekanizmasında, toksik maddelerin zehir etkisinin yok edilmesi ve hormonlara etkisi gibi çeşitli önemli biyolojik aktivitelerde rol aldıklarını tespit edilmiştir. Sitokromlar, elektron taşıyan enzimlerin koenzimleri ya da oksido redüksiyon reaksiyonlarında elektron transfer edici madde olarak da işlev göstermektedir.

Sitokromlar içerdikleri metal iyonu üzerinden yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarına katılabilirler. C türü sitokromlarda hem- demiri +2 ve +3 yükseltgenme basamaklarına dönüşebilir. Bu özelliklerinden dolayı sitokromlar tek elektron taşıyıcıdırlar.

2.5.1. Sitokromların Yapıları

Mitokondriyal sitokrom-C üzerinde sıklıkla çalışma yapılan elektron transfer proteinlerindendir (Şekil 2.14) . Sitokrom-C suda kolayca çözünür ve mitokondriyal ortamından ayrılır. Ayrıca, sitokrom-C zayıf iç membran alanı ile ilişkilidir.



Şekil 2.14. Mitokondriyal sitokrom-C Molekülünün Kristal Yapısı

Sitokrom-C, 104 aminoasitlik tek bir polipeptid zincirinden oluşan kovalent bir hem grubuna bağlıdır. Sitokrom-C 19 pozitif yüklü lizin kalıntılarının yanı sıra aynı zamanda pozitif yüklü iki arginin ve 12 asidik aminoasit kalıntısı vardır (glutamik asit, aspartik asit). Sitokrom-C'nin izoelektrik noktası pH 10 civarındadır.

2.6. Önceki Çalışmalar

2.6.1. Metametakrioil klorür (MA-) Kökenli Fonksiyonel Monomerler Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Ersöz ve Arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAH (Metakrioil histidin), çapraz bağlayıcı olarak EGDMA (Etilen glikol dimetil akrilat) kullanılarak Ni(II) baskılı [poly(EGDMA-MAH/Ni(II))] polimeri sentezlenmiş, gerekli karakterizasyonlar yapıldıktan sonra Ni(II) iyonunun Cu(II), Zn(II) ve Co(II) gibi iyonlar varlığında yüksek seçicilik ile ayrılması sağlandığı ve hazırlanan baskılı polimerin belirtilen diğer iyonlara göre daha yüksek miktarda Ni(II) bağladığı tespit edilmiştir. Ayrıca hazırlanan Ni(II) baskılı polimer kullanılarak eser düzeydeki Ni(II) iyonlarının ön deriştirilme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Yavuz ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAGA (Metakrioil-L-glutamik asit), polimer oluşturucu olarak HEMA (Hidroksi etil metakrilat) kullanılarak Fe(III) baskılı poly(HEMA–MAH-Fe(III))] kriyojel polimeri sentezlenmiş, sentezlenen bu kriyojel polimerin Cr(III) ve Zn(II) iyonları varlığında Fe(III) iyonunu sırasıyla 48,6 ve 17,3 kat daha seçici bağladığı tespit edilmiş olup elde edilen optimum koşullarda yapılan deneylerde Fe(III) bağlama kapasitesinin 92,6 mg/g olduğu tespit edilmiştir.

Odabaşı ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAH (Metakrioil histidin), polimer oluşturucu olarak HEMA (Hidroksi etil metakrilat) kullanılarak lizozim baskılı poly(HEMA–MAH-Liz-MIP)] kriyojel polimeri sentezlenmiş, gerekli karakterizasyonlar yapıldıktan sonra kan serumunda lizozim saflaştırılmasında kullanılmış ve elde edilen optimum koşullarda yapılan deneyler sonucunda hazırlanan baskılı polimerin lizozim bağlama kapasitesinin 12,1 mg/g olduğu tespit edilmiştir.

Baydemir ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAT (Metakrioil-(L)-tirozin metil ester), polimer oluşturucu olarak HEMA (Hidroksi etil metakrilat) kullanılarak bilirubin baskılı poly[(HEMA-MAT-Bil)] kriyojel polimeri hazırlanmış, gerekli karakterzasyon işlemleri yapıldıktan sonra insan serumunda bilirubin molekülünün seçici adsorbsiyonu yapılmış ve yapılan deneyler

sonucunda hazırlanan bilirubin baskılı kriyojel polimerin kolesterol ve testesteron molekülleri yanında bilirubine oldukça yüksek seçicilik gösterdiği tespit edilmiştir.

Gültekin ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAC (Metakrioil-(L)-sistein) ile Pt(II) ile kompleksi [MAH-Pt(II)] oluşturulmuş, oluşturulan bu kompleks monomerin nanopartikülleri oluşturulmuş ve kolik asit tayininde nanosensör olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Bu sayede kan serumundaki kolik asit saflaştırılması ve tayini yapılmıştır.

Dolak ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAFol (Metakrioil folik asit), çapraz bağlayıcı olarak EGDMA (Etilen glikol dimetil akrilat) kullanılarak Nd(III) baskılı [poly(EGDMA-MAH/Nd(III))] polimeri sentezlenmiş, gerekli karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra Nd(III) iyonunun Ce(II), La(III) ve Eu(III) gibi iyonların varlığında yüksek seçicilik ile ayrılması sağlandığı ve hazırlanan baskılı polimerin belirtilen diğer iyonlara göre daha yüksek miktarda Nd(III) bağladığı tespit edilmiştir. Ayrıca hazırlanan Nd(III) baskılı polimerin tespit edilen optimum koşullar altında Nd(III) bağlama kapasitesinin 14,6 mg/g olduğu tespit edilmiştir.

2.6.2. Metakrioil Amido Antipirin Fonksiyonel Monomeri Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Ersöz ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAAP (Metakrioil amido antripirin), çapraz bağlayıcı olarak EGDMA (Etilen glikol dimetil akrilat) kullanılarak fenolik bileşiklerden nitrofenol baskılı [poly(EGDMA-MAAP/NF)] polimeri sentezlenmiş, gerekli karakterizasyonlar yapıldıktan sonra elde edilen optimum koşullarda yapılan deneylerde fenolik bileşiklerin bağlanma kapasitesinin 173 μmol/g olduğu tespit edilmiştir.

Keçili ve arkadaşları (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAAP (Metakrioil amido antripirin), çapraz bağlayıcı olarak EGDMA (Etilen glikol dimetil akrilat) kullanılarak penisilin asilaz baskılı Poly(EGDMA-MAAP) polimeri sentezlenmiş, gerekli karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra elde edilen optimum koşullarda yapılan deneylerde hazırlanan baskılı polimerin penisilin asilaz

bağlama kapasitesinin 82,2 mg/g olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 1 M NaOH çözeltisi ile bağlanan penisilin asilazın % 97'sinin geri kazanıldığı belirtilmiştir.

Say (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAAP (Metakrioil amido antripirin), çapraz bağlayıcı olarak EGDMA (Etilen glikol dimetil akrilat) kullanılarak organofosfat esterlerinin seçici olarak transferi için baskılı Poly(EGDMA-MAAP) sentezlenmiş, gerekli karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra elde dilen optimum koşullarda organofosfatların baskılı bölgelere bağlanma koşulları incelenmiş ve gerekli termodinamik-kinetik hesaplamalar yapılmıştır.

Ersöz ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAAP (Metakrioil amido antripirin), polimerleştirici olarak N-N′-metilenbisakilamit kullanılarak DNA yapısında bulunan 8-Hidroksi-2′-deoksiguanozin (8-OHdG) baskılı sensör geliştirilmiş ve katı faz ekstraksiyonu yöntemi ile optimum koşullarda 8-Hidroksi-2′-deoksiguanozin molekülünün saflaştırılması ve QCM metodu ile tayini gerçekleştirilmiştir.

Özkütük ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAAP (Metakrioil amido antripirin), MAAP monomeri Cu(II) iyonlarıyla etkileştirilmiş ve MAAP-Cu(II) kompleks monomeri oluşturulduktan sonra paraoksan baskılı QCM nanosensör geliştirilmiştir. Gerekli karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra elde edilen optimum koşullarda geliştirilen paraoksan baskılı nanosensör ile paraoksanın yüksek seçicilik ile bulunduğu matriksten ayrılmasına ve nano düzeyde miktar tayinine olanak sağlayan metot geliştirildiği belirtilmiştir.

Gültekin ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAAP (Metakrioil amido antripirin), MAAP monomeri Fe(III) iyonlarıyla etkileştirilmiş ve MAAP-Fe(III) kompleks monomeri oluşturulduktan sonra kafeik asit baskılı QCM nanosensör geliştirilmiştir. Elde edilen optimum koşullarda geliştirilen kafeik asit baskılı nanosensör ile kafeik asitin yüksek seçicilik ile bulunduğu matriksten ayrılması ve nano düzeyde miktar tayinini yapıldığı belirtilmiştir.

Büyüktiryaki ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAAP (Metakrioil amido antripirin), MAAP monomeri Tb(III) ve Eu(III) iyonlarıyla etkileştirilmiş, MAAP-Tb(III) ve MAAP-Eu(III) kompleks monomerleri oluşturulduktan sonra fosferin baskılı nanosensörler geliştirilmiştir.

Yapılan deneylerde geliştirilen sensörler ile fosferin saflaştırılması ve nano düzeyde miktar tayini yapılmış, bu sayede kanser tanısında belirteç olan kanser antijen 125'in indirekt tayinine olanak sağlayan bir metot geliştirilmiştir.

Keçili ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAAP (Metakrioil amido antripirin), polimer oluşturucu olarak HEMA (Hidroksi etil metakrilat) kullanılarak Ce(III) baskılı poly(HEMA–MAH-(Ce(III)] kriyojel polimeri sentezlenmiştir. Tespit edilen optimum koşullar altında yapılan deneylerde bastnaesit cevherindeki Ce(III) iyonunun yüksek seçicilik ile matriksten La(III) ve Nd(III) yanından ayrıldığı ve hazırlanan polimerin maksimum bağlama kapasitesinin 36,6 mg/g olduğu tespit edilmiştir.

Dolak ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAAP (Metakrioil amido antripirin) kullanılan MAAP monomeri Ce(III) iyonları ile kompleksleştirilerek MAAP-Ce(III) kompleks monomeri oluşturulmuştur. Polimer oluşturucu olarak HEMA (Hidroksi etil metakrilat) kullanılarak miyoglobin baskılı poly(HEMA–MAH-(Ce(III)-Mb] kriyojel polimeri sentezlenmiştir. Gerekli karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra kan serumunda hemoglobin, lizozim ve sitokrom-C yanında bulunan miyoglobinin seçici olarak ayrılması ve tayinine olanak sağlayan sonuçlar elde edilmiştir. Tespit edilen optimum deney koşullarında hazırlanan baskılı kolonun miyoglobin bağlama kapasitesinin 36,0 mg/g olduğu tespit edilmiştir.

2.6.3. Moleküler Baskılı Polimerler Kullanılarak Hemoglobin Ayrılması ve Analizi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Lv ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, hemoglobinin floresans yöntemi ile tayini için floresans özellikli hemoglobin baskılı dopamin fonksiyonel monomeri ile modifiye edilmiş magnetik özellikli karbon nokta polimerleri sentezlenmiş, gerekli karakterizasyonlar yapılmıştır. Tespit edilen optimum koşullarda yapılan deneylerde kan serumunda diğer bileşenler ile birlikte bulunan hemoglobinin seçici olarak ayrılması ve floreasans özellikli cihazlar ile çok düşük miktarlardaki (17,3 nM) hemoglobinin tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın devamında uygun desorbsiyon ajanı ile bağlanan hemoglobinin % 99'una yakını geri kazanılmıştır.

Hajizadeh (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, hücre yapısında bulunan hemoglobinin diğer bileşenlerden ayrılması ve saflaştırılması için hemoglobin baskılı makrogözenekli kriyojeller hazırlanmış, yapılan deneyler sonucunda baskılanmış kriyojelin hemoglobin bağlama kapasitesinin 5,2 mg/g, baskılanmamış kriyojelin hemoglobin bağlama kapasitesinin ise 3,6 mg/g olduğu tespit edilmiştir.

Bakhshpour ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, kan serumunda bulunan hemoglobinin diğer bileşenlerden ayrılması ve saflaştırılması için fonksiyonel monomer olarak MAH (Metakrioil histidin) Cu(II) iyonları ile kompleksleştirilmiş, oluşturulan bu kompleks bakteriyal selüloz nanofiber ile polimerleştirilmiş ve bu polimere hemoglobin baskılanmıştır. Hazırlanan hemoglobin baskılı nanofiber özellikli polimerin karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra hemoglobinin seçici adsorbsiyon yöntem ile bulunduğu matrixten ayrılması sağlanmış, termodinamik ve kinetik tüm veriler hesplanmıştır.

Anirudhan ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, kan serumunda bulunan hemoglobininin seçici olarak ayrılması ve potansiyometrik analizi için karbon nanotüp bazlı bir baskılı polimer geliştirilmiştir. Hazırlanan polimerin karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra kan serumunda bulunan hemoglobinin yüksek seçicilik ile ayrılması ve nano yüzeyde potansiyometrik tayini gerçekleştirilmiştir.

Gao ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, kan serumunda bulunan hemoglobininin seçici adsorpsiuonu için Cu(II) içerikli manyetik özellikli nanopartikül sentezlenmiştir. Sentezlenen bu manyetik nanopartikül ile gerekli çapraz bağlayıcı ve reaktifler kullanılarak hemoglobin baskılı polimer sentezlenmiş, gerekli karakterizasyon işlemleri yapıldıktasn sonra kan serumunda bulunan hemoglobinin biyosorpsiyonunda kullanılmıştır. Tespit edilen optimum koşullarda yapılan deneylerde yüksek adsorpsiyon kapasitesi ve seçicilikte hemoglobin saflaştırıldığı açıklanmıştır.

Guo ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, kan serumunda bulunan hemoglobininin tanınması ve saflaştırılması için manyetik grafen (MG) kullanılarak bir nanopartikül sentezlenmiş, uygun bileşenlerle ile bu nanopartikülden hemogobin baskılı polimer sentezlenmiş, gerekli karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra hemoglobin molekülünün seçici adsorbsiyonunda kullanılmıştır. Tespit edilen

optimum koşullarda yapılan deneyler sonucunda hazırlanan nanopolimerin hemoglobin bağlama kapasitesinin 186,7 mg/g olduğu tespit edilmiştir.

Zhang ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak itakonik asit kullanılarak hemoglobin baskılı nanopartikül sentezlenmiş, gerekli karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra kan serumundan hemoglobinin seçici ayırımı için kullanılmıştır. Tespit edilen optimum koşullarda yapılan deneyler sonucunda hazırlanan nanopolimerin hemoglobin bağlama kapasitesinin 77,6 mg/g olduğu tespit edilmiştir.

Wang ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, grafen bazlı hemoglobin baskılı nanopolimer sentezlenmiştir. Hazırlanan bu polimer ile hem hemoglobininin bulunduğu matrixten yüksek verimle ayrılması sağlanmış hemde elektrokimyasal olarak hemoglobinin tayinine yönelik metot geliştirilmiştir. Hazırlanan bu yöntemle $3,09x10^{-11}$ g/L düzeyindeki hemoglobinin tayini gerçekleştirilmiştir.

Kan ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, sulu çözeltide bulunan hemoglobinin ayırımı ve tayini için molekül baskılı polimer bazlı elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Hazırlanan bu sensör sayesinde sulu çözeltide bulunan hemoglobinin yüksek seçicilik ve verimle ayrılması sağlanmış ve elektrokimyasal olarak tayin edilmiştir.

Uysal ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak itakonik asit kullanılarak hemoglobin baskılı hidrojeller sentezlenmiştir. Hazırlanan hemoglobin baskılı hidrojellerin gerekli karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra kan serumundan hemoglobinin seçici ayırımı için kullanılmıştır. Tespit edilen optimum koşullarda yapılan deneyler sonucunda hazırlanan hidrojellerin hemoglobin bağlama kapasitesinin gram jel başına 12,4 mg olduğu tespit edilmiştir.

Guo ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, akrilamit bazlı çitosan içerikli hemoglobin baskılı polimer hazırlanmış ve hemoglobinin seçici adsorpsiyonunda kullanılmıştır. Hazırlanan polimerin karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra matriks içerisindeki hemoglobinin seçici adsorpsiyonunda kullanılmış, tespit edilen optimum koşullarda % 100 bağlanma verimi tespit edilmiştir.

2.6.4. Moleküler Baskılı Polimerler Kullanılarak Myoglobin Ayrılması ve Analizi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Dolak ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak MAAP (Metakrioil amido antripirin) kullanılan MAAP monomeri Ce(III) iyonları ile kompleksleştirilerek MAAP-Ce(III) kompleks monomeri oluşturulmuştur. Polimer oluşturucu olarak HEMA (Hidroksi etil metakrilat) kullanılarak miyoglobin baskılı poly(HEMA–MAH-(Ce(III)-Mb] kriyojel polimeri sentezlenmiştir. Gerekli karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra kan serumunda hemoglobin, lizozim ve sitokrom-C yanında bulunan miyoglobinin seçici olarak ayrılması ve tayinine olanak sağlayan sonuçlar elde edilmiştir. Tespit edilen optimum deney koşullarında hazırlanan baskılı kolonun miyoglobin bağlama kapasitesinin 36,0 mg/g olduğu tespit edilmiştir.

Shumyantseva ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, moleküler bakılı karbon nanotüpler kullanılarak kan serumunda bulunan myoglobinin katı faz ekstraksiyonu yöntemi ile seçici olarak ayrılması ve devamında elektrokimyasal tayinine olanak sğlayan metot geliştirildiği belirtilmiştir. Bu sayede kandaki myoglobin molekülü miktarından yola çıkarak kalp krizinin hızlı bir şekilde tanısı olabileceği belirtilmiştir.

Ribeiro ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, fenolün elektrooksidatif polimerizasyonu ile myoglobin baskılı polimer sentezlenmiş, hazırlanan bu polimer ile myoglobin molekülünün elektrokimyasal tayinine olanak tanıyan sensör geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sensör sayesinde myoglobin analizinin kardiyal tanıda kullanılabileceği belirtilmiştir. Hazırlana myoglobin baskılı polimerin myoglobin bağlama kapasitesinin 0,12 ng/mL olduğu tespi edilmiştir.

Shumyantseva ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, myoglobin baskılı polimerler sentezlenmiş hazırlanan bu polimer ile myoglobin molekülünün elektrokimyasal tayinine olanak tanıyan QCM sensörler geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem sayesinde $3{,}3 \times 10^{-9}$ M düzeyinde myoglobin tayini yapılabileceği belirtilmiştir.

Osman ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, fonksiyonel monomer olarak metakriloil-l-triptofan metil ester ve çapraz bağlayıcı olarak hidroksi etil metakrilat (HEMA) kullanılarak myoglobin baskılı [poly(HEMA-MATrp)] polimerler sentezlenmiş hazırlanan bu polimer ile myoglobin molekülünün tayinine olanak tanıyan'surface plasmon resonance (SPR)' sensörler geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem sayesinde 87,6 ng/mL düzeyinde myoglobin tayini yapılabileceği belirtilmiştir.

Moreira ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, myoglobin ayrıması ve tayini için polimer oluşturucu olarak karboksilat poli(vinil klorür) (PVC-COOH) kullanılmıştır. Hazırlanan polimer yüzeyin gerekli karakteriazsyon işlemleri yapıldıktan sonra myoglobin için elektrokimyasal (voltametrik) tayin metodu geliştirilmiş ve 0,85 ile 4,3 μg/mL aralığındaki myoglobin tayini mümkün hale getirilmiştir.

2.6.5. Moleküler Baskılı Polimerler Kullanılarak Sitokrom-C Ayrılması ve Analizi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Amin ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, insan plazmasında bulunan sitokrom-C proteininin seçici bir şekilde tayini için floresans bazlı CdTe içerikli nanosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sensör sayesinde 0,5−2,5 μM aralığındaki sitokrom-C tayini mümkün hale getirilmiştir.

Yan ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, azot ile etkileştirilmiş grafen yapılı quantum-dot elektrot kullanılarak kan serumunda bulunan sitokrom-C'nin voltametrik tayinine yönelik bir elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Geliştirilen sensör ile 0,1 μM düzeyinde sitokrom-C'nin tayininin yapıldığı belirtilmiştir.

Guo ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, konversiyonel nano partiküller kullanılarak sentezlenen baskılı polimerler ile insan plazmasında bulunan Sitokrom-C proteininin seçici olarak ayrılması ve florometrik yöntemlerle analizi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan baskılı polimerin karakterizasyon işlemleri yapıldıktan

sonra yapılan deneylerde baskılı polimere bağlanma faktörünün 3,2 olduğu tespit edilmiştir.

Tamahkar ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, Cu(II) iyonu şelatlaştırılmış N-Metakriloil-(L)-histidin (MAH) fonksiyonel monomer olarak kullanılarak kan serumunda bulunan sitokrom-C proteininin saflaştırılması için yüzey baskılı bakteriyel selüloz içerikli nanofiberler kullanılarak sitokrom-C baskılaması yapılmıştır. Hazırlanan yüzey baskılı yapının tespit edilen optimum koşullarda yapılan deneylerde 36,4 mg/g sitokrom-C bağladığı tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal, Çözeltiler ve Standart Maddeler

3.1.1.1. Fonksiyonel Monomer (Metakrioilamido antipirin) Sentezinde Kullanılan Kimyasallar

Fonksiyonel monomer sentezinde, Metakrioil klorür (Sigma Aldrich marka % 97), Antipirin (Sigma Aldrich marka 4-amino antipirin), piridin (Sigma Aldrich marka susuz % 99,8 Piridin), kloroform (Sigma Aldrich marka ≥ % 99,5 kloroform), benzen (Sigma Aldrich marka susuz % 99,8 benzen), etil asetat (Sigma Aldrich marka) gibi kimyasallar kullanıldı.

Metakrioilamido antipirin (MAAP) monomeri sentezlendikten sonra Ce(III) iyonu ile etkileştirilip MAAP-Ce(III) kompleks monomer sentezinde, Ce(III) (Sigma Aldrich marka % 99,999 Serium(III) nitrat hekzahidrat) tuzu kullanıldı.

3.1.1.2. Baskılı ve Baskısız Polimerlerin (p-HEMA-MAAP) Sentezinde Kullanılan Kimyasallar

Baskılı-baskısız polimerlerin sentezinde, HEMA (Sigma Aldrich marka % 97 2-Hidroksietil metakrilat), Akrilamit (Sigma Aldrich marka N-N-methylenbisacrilamid), amonyum persülfat (APS) (Sigma Aldrich Marka ≥ % 98 Amonium persülfat), TEMED (Sigma Aldrich Marka ~ % 99 N,N,N′,N′-Tetramethylethylenediamine) gibi kimyasallar kullanıldı.

3.1.1.3. Deneysel çalışmalarda Kullanılan Proteinler;

- **Hemoglobin:** Sigma Aldrich Marka lyophilized powder Hemoglobin from bovine blood (CAS Number: 9008-02-0)

- **Myoglobin:** Sigma Aldrich Marka 95-100%, essentially salt-free, lyophilized powder Myoglobin from equine skeletal muscle (CAS Number: 100684-32-0)
- **Sitokrom-C:** Sigma Aldrich Marka ≥95% based on Mol. Wt. 12,327 basis Cytochrome c from bovine heart (CAS Number: 9007-43-6)

proteinleri kullanıldı.

. 3.1.1.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan pH ayarlayıcılar ve Desorbsiyon Ajanları

pH 4 ve 5 (Asetik asit/Sodyum asetat tamponu) için Sigma Aldrich Marka pH 3,2 ± 2,0 (25 °C), for molecular biology, 3 M, 0,2 μm filtered Sodium acetate buffer solution (CAS Number: 126-96-5) tamponları kullanıldı.

pH 6, 7 ve 8 için (Dihidrojenfosfat/monohidrojenfosfat tamponu) için Sigma Aldrich Marka BioUltra, >0,04 M Na_2HPO_4, >0,02 M NaH_2PO_4 Phosphate Buffer Solution) tamponları kullanıldı.

Baskılı Polimerlere bağlanan proteinlerin desorbsiyonu için Merck marka tuzlarından hazırlanmış 0,1 M NaOH-Na_2SO_4 tuzları kullanıldı.

3.1.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Hazırlanan baskılı kriyojel kolonlardan belirli hızlarda protein ve diğer (desorpsiyon, yıkama) çözeltilerini geçirme işlemi Watson Marlow Marka Sci-Q 300 Model Peristatik Pompa ile yapıldı.

Sıcaklık kontrolü çalışmalarında ortam sıcaklığını sabitlemek için Bendir Marka İnkübatör kullanıldı.

MAAP-Ce(III) kompleks monomerin sentez aşamasındaki Ce(III) iyonunun stokiyometrik bağlanma hesaplamaları ve analizleri Perkin Elmer Marka Optima 7000-DV Model ICP-OES Spektrometresi ile yapıldı.

İşlem öncesi ve işlem sonrası tüm protein (Hemoglobin, Myoglobin ve Sitokrom-C) miktar tayinleri Shimadzu marka 3600 model UV-NIR Spektrometresi ile yapıldı.

Hazırlanan, fonksiyonel monomerin (MAAP), kompleks monomerin (MAAP-Ce(III)), protein baskılı ve baskısız polimerlerin [p-(HEMA-MAAP)] IR spektrumları Perkin Elmer Marka Laser Spektrum 400 model IR cihazı ile yapıldı.

Hazırlanan fonksiyonel monomer (MAAP), kompleks monomer (MAAP-Ce(III)) ve protein ile etkileştirilmiş kompleks monomerin (MAAP-Ce(III)-Protein) Near IR spektrumları Shimadzu marka 3600 model UV-NIR Spektrometresi ile yapıldı.

Hazırlanan protein baskılı polimerlerin SEM görüntüleri FEI Quanta Marka FEG-250 model SEM cihazında alındı. Bunun için 20 mg polimer alınarak pt yüzeye serpiştirildi ve pellet hazırlandı. Daha sonra hazırlanan pelletin yüzeyine numunenin iletkenliğini arttırmak amacıyla 10 nm kalınlığında altın nanoyüzey serpiştirildi ve SEM görüntüleri alındı.

3.2. Metot

Çalışmanın ilk aşamasında deneysel çalışmalarda kullanılacak olan fonksiyonel monomer (MAAP) sentezlendi ve gerekli karakterizasyon işlemleri yapıldıktan sonra hazırlanan monomer Ce(III) iyonu ile etkileştirilip MAAP-Ce(III) kompleks monomeri oluşturuldu. Daha sonra hangi protein baskılanacak ise kompleks monomer ile o protein etkileştirildi ve [MAAP-Ce(III)-Protein] kompleks yapısı oluşturuldu. Daha sonra gerekli polimerizasyon malzemeleri kullanılarak (HEMA, Akrilamit, TEMED, APS) baskılı ve baskısız kriyojel polimerler hazırlandı (Şekil 3.1).

Hazırlanan kriyojel polimerler özel yapım şırınga kolonlara dolduruldu ve hazırlanan kolonlar peristatik pompaya bağlandı. Bu sayede peristatik pompa yardımı ile tamponlayıcı çözelti protein çözeltileri ve yıkama çözeltileri istenilen akış hızında kolondan geçirildi.



Şekil 3.1. Hazırlanan Kriyojel Polimerlerin Görüntüsü

Baskılanan ve saflaştırılan protein sayısına bağlı olarak yaptığımız çalışma 3 aşamalı bir çalışma olup her bir aşamayı şu şekilde sınıflandırabiliriz:

1. **Hemoglobin saflaştırılması:** Hazırlanan hemoglobin baskılı kriyojel polimerler kullanılarak sulu çözeltide hemoglobinin bağlanma koşullarının optimizasyonu (pH, akış hız, tuz etkisi, sıcaklık, başlangıç protein derişimi, hazırlanan kriyojel polimerlerin tekrar kullanım sayısı gibi) işlemlerinin yapılması ve devamında tespit edilen optimum koşullarda maksimum bağlanma kapasitesinin tespiti, karışım çözeltiden bağlanma seçiciliği tespiti ve kan serumunda bulunan hemoglobin bağlanması.
2. **Myoglobin saflaştırılması:** Hazırlanan myoglobin baskılı kriyojel polimerler kullanılarak sulu çözeltide myoglobinin bağlanma koşullarının optimizasyonu (pH, akış hız, tuz etkisi, sıcaklık, başlangıç protein derişimi, hazırlanan kriyojel polimerlerin tekrar kullanım sayısı gibi) işlemlerinin yapılması ve devamında tespit edilen optimum koşullarda maksimum bağlanma kapasitesinin tespiti, karışım çözeltiden bağlanma seçiciliği tespiti ve kan serumunda bulunan myoglobin bağlanması.
3. **Sitokrom-C saflaştırılması:** Hazırlanan sitokrom-C baskılı kriyojel polimerler kullanılarak sulu çözeltide sitokrom-C bağlanma koşullarının optimizasyonu (pH, akış hız, tuz etkisi, sıcaklık, başlangıç protein derişimi, hazırlanan kriyojel polimerlerin tekrar kullanım sayısı gibi) işlemlerinin yapılması ve devamında tespit edilen optimum koşullarda maksimum bağlanma kapasitesinin tespiti,

karışım çözeltiden bağlanma seçiciliği tespiti ve kan serumunda bulunan sitokrom-C bağlanması.

pH optimizasyonu çalışmalarında, pH 4, 5, 6, 7 ve 8 tamponlarında hazırlanan 0,5 mg/ml protein çözeltileri hazırlanan kriyojel kolonlardan 1,0 mL/dakika akış hızında 1 saat süreyle geçirildi. Daha sonra kolon 0,1 M NaOH-Na_2SO_4 ile yıkanarak bağlanma bölgelerine bağlanan proteinler desorbe edildi. işlem öncesi ve sonrası, desorpsiyon öncesi ve sonrası elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri Shimadzu marka 3600 model UV-NIR Spektrometresi ile yapıldı ve gerekli hesaplamalar yapılarak bağlanan ve desorbe edilen protein miktar tayin edildi. Yapılan analizler sonucunda bağlanmanın maksimum olduğu pH değeri tespit edildi ve çalışmanın devamındaki tüm deneylerde bu pH değerinde çalışıldı.

Akış hızı optimizasyonu çalışmalarında, tespit edilen optimum pH tamponunda hazırlanan 0,5 mg/ml protein çözeltileri hazırlanan kriyojel kolonlardan 1,0 mL/dakika ile 4,0 mL/dakika akış hızlarında 1 saat süreyle geçirildi. Daha sonra kolon 0,1 M NaOH-Na_2SO_4 ile yıkanarak bağlanma bölgelerine bağlanan proteinler desorbe edildi. İşlem öncesi ve sonrası, desorpsiyon öncesi ve sonrası elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri Shimadzu marka 3600 model UV-NIR Spektrometresi ile yapıldı ve gerekli hesaplamalar yapılarak bağlanan ve desorbe edilen protein miktar tayin edildi. Yapılan analizler sonucunda akış hızının bağlanma verimine etkisi incelendi ve akış hızının artmasıyla bağlanma veriminde meydana gelen değişiklik tespit edildi.

Sıcaklık optimizasyon çalışmalarında, tespit edilen optimum pH ve akış hızında hazırlanan 0,5 mg/ml protein çözeltileri 4, 25 ve 37 ^{0}C sıcaklıklarda hazırlanan kriyojel kolonlardan geçirildi. Daha sonra kolon 0,1 M NaOH-Na_2SO_4 ile yıkanarak bağlanma bölgelerine bağlanan proteinler desorbe edildi. İşlem öncesi ve sonrası, desorpsiyon öncesi ve sonrası elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri Shimadzu marka 3600 model UV-NIR Spektrometresi ile yapıldı. Yapılan analizler sonucunda ortam sıcaklığına bağlı olarak bağlanma veriminde meydana gelen değişiklik tespit edildi.

Protein bağlanma verimine tuz etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerde tespit edilen optimum pH ve akış hızı ve sıcaklıkta farklı derişimlerdeki (0.0 – 1.0 M) NaCl içerisinde hazırlanan 0,5 mg/ml protein çözeltileri hazırlanan kriyojel kolonlardan

geçirildi. Daha sonra kolon 0,1 M NaOH-Na_2SO_4 ile yıkanarak bağlanma bölgelerine bağlanan proteinler desorbe edildi. İşlem öncesi ve sonrası, desorpsiyon öncesi ve sonrası elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri Shimadzu marka 3600 model UV-NIR Spektrometresi ile yapıldı. Yapılan analizler sonucunda bağlanma ortamında bulunan NaCl tuzunun ve derişiminin bağlanma verimine etkisi tespit edildi.

Başlangıç protein derişiminin bağlanma verimine etkisini inceleyip maksimum bağlanma verimini tespit etmek amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda, tespit edilen optimum pH, akış hızı ve sıcaklıkta hazırlanan 0,5 – 2,5 mg/ml aralığındaki protein çözeltileri hazırlanan kriyojel kolonlardan geçirildi. Daha sonra kolon 0,1 M NaOH-Na_2SO_4 ile yıkanarak bağlanma bölgelerine bağlanan proteinler desorbe edildi. İşlem öncesi ve sonrası, desorpsiyon öncesi ve sonrası elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri Shimadzu marka 3600 model UV-NIR Spektrometresi ile yapıldı. Yapılan analizler sonucunda her bir derişimde bağlanan protein miktarları tespit edilip maksimum bağlanma kapasiteleri tespit edildi.

Hazırlanan baskılı kolonların tekrar kullanılabilirlik sayısını tespit etmek amacıyla yapılan deneylerde belirlenen optimum koşullarda ardışık olacak şekilde en az 10 tekrar deney yapıldı. İşlem öncesi ve sonrası, desorpsiyon öncesi ve sonrası elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri Shimadzu marka 3600 model UV-NIR Spektrometresi ile yapıldı. Yapılan analizler sonucunda bağlanma verimlerinde meydana gelebilecek azalmaya bağlı olarak kriyojel kolonların tekrar kullanım sayıları belirlendi.

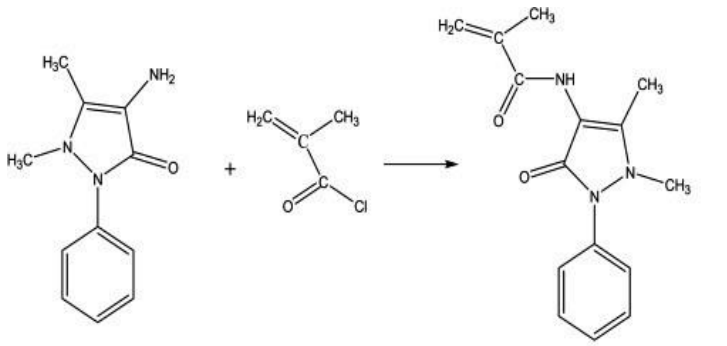
Gerçek numune çalışmalarında, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarlarında gönüllüler tarafından verilen kan numuneleri temin edildi. Temin edilen kan numuneleri santrifüjlendikten sonra üzerindeki serumu dekante edildi. Daha sonra kan serumuna 10 mL'sinde 500 µg/L olacak şekilde protein (Hemoglobin, Myoglobin, Sitokrom-C) ilave edildikten sonra optimum pH tamponları gerekli seyreltmeler yapıldı. Bu şekilde hazırlanan protein içerikli kan serumları kolondan 1,0 mL/dakika akış hızında 1 saat geçirildi. İşlem öncesi ve sonrası, desorpsiyon öncesi ve sonrası elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri Shimadzu marka 3600 model UV-NIR Spektrometresi ile yapıldı.

Son olarak seçicilik çalışmalarında, her bir protein için belirlenen optimum koşullarda farklı proteinler içeren karışım çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan karışım çözeltiler her bir proteinin baskılı olduğu kriyojel kolonlardan geçirildi ve yapılan analizler sonucunda hazırlanan kriyojel kolonların baskılı proteinlerine olan seçicilikleri tespit edildi.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Fonksiyonel Monomer (Metakrioilamido antipirin (MAAP)) Sentezi ve Karakterizasyonu

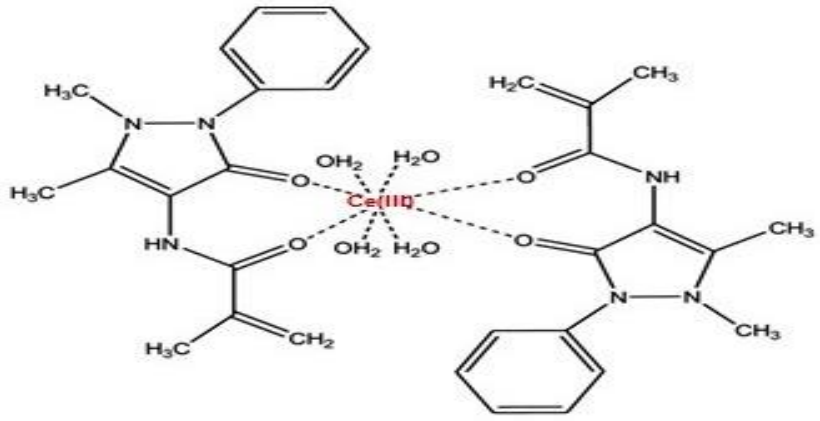
4-aminoantipirin (0,5 g; 2,5 mmol) ve piridin (0,2 mL; 2,5 mmol) alınıp 100 mL kuru $CHCI_3$ içinde çözüldü ve hazırlanan çözelti 0 °C'ye soğutuldu. Hazırlanan bu karışım daha sonra oda sıcaklığında 2 saat boyunca manyetik olarak karıştırılırken, metakrilloil klorür (0,26 mL; 2,5 mmol) bu çözeltiye karıştırma esnasında yavaşça ilave edildi. İşlem sonunda karışım çözelti, seyreltik HCI ve NaOH çözeltisi ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra organik çözücü evaporatörde buharlaştırıldı. Oluşan katı fonksiyonel monomjer petrol eteri ve etil asetat içinde kristalleştirildi (Say, 2006) (Şekil 4.1).



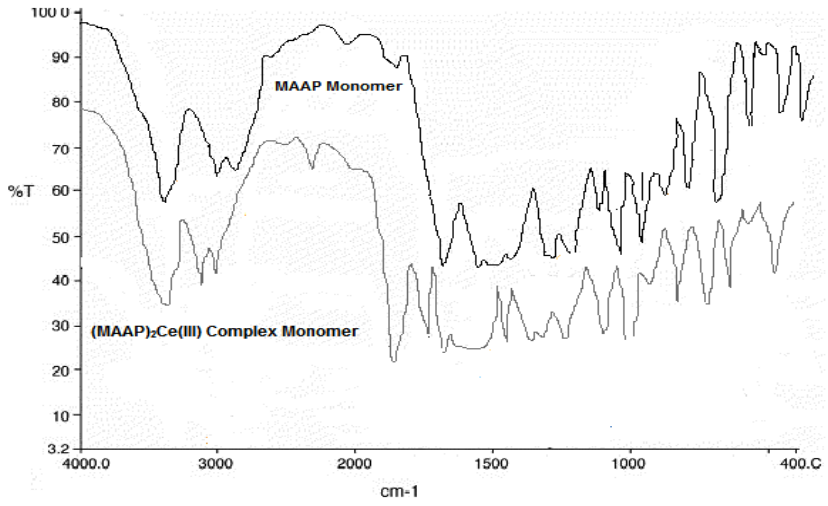
Şekil 4.1. Metakrioilamido antipirin (MAAP) Monomerinin Sentez Mekanizması (Say, 2006)

4.2.Kompleks Monomer [$(MAAP)_2$-Ce(III)] Sentezi ve Karakterizasyonu

Gerekli stokiyometrik hesaplamalar yapıldıktan sonra MAAP derişimi Ce(III) derişimin 2 katı olacak şekilde; 540 mg MAAP (2 mmol) monomeri alındı, saf suda çözüldü daha sonra üzerine 140 mg Ce(III) (1 mmol) ilave edildi ve magnetik karıştırıcıda 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu işlem sonunda oluşan kompleks monomerin (Şekil 4.2) ve MAAP monomerinin IR Spektrumları alındı (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. $(MAAP)_2Ce(III)$ Kompleks Monomeri



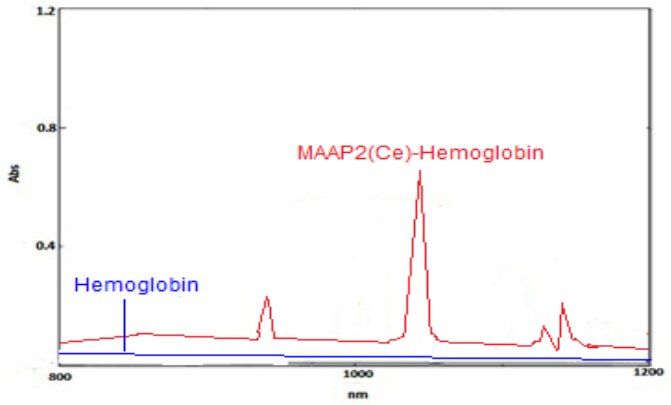
Şekil 4.3. MAAP Monomeri ve $(MAAP)_2Ce(III)$ Kompleks Monomeri FT-IR Spektrumu

Şekil 4.3'ten görüldüğü üzere, MAAP fonksiyonel monomerinde 3260 cm^{-1}'de N-H piki, 2975 ve 2925 cm^{-1}'de C-H pikleri, 1730 cm^{-1}'de siklik keton pozisyonundaki karbonil piki, 1642 cm^{-1}'de amit ketonuna ait karbonil piki, 1580 ve 1500 cm^{-1} bölgesinde metakrioil pikleri ve 770 ve 700 cm^{-1} bölgesinde de sübstitüe benzen pikleri görülmektedir. Monomer yapıya Ce(III) iyonu girmesi ve kompleks yapının oluşması ile oluşan koordinasyon bağının etkisi ile oluşan konjugatif yapıdan dolayı özellikle N-H ve C-O pik bölgelerinde kaymalar meydana gelmiştir.

4.3.Hemoglobin (Hb) Baskılama

4.3.1. $(MAAP)_2Ce(III)$-Hb Kompleks Yapısının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Hazırlanan $(MAAP)_2Ce(III)$ kompleks monomeri ihtiva eden çözeltiye 10 mg Hemoglobin ilave edilip oda sıcaklığında 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu işlem sonunda meydana gelen $(MAAP)_2Ce(III)$-Hb kompleks yapısının karakterizasyonu Near-IR (Yakın-IR) spektrumu ile yapıldı.



Şekil 4.4. Hemoglobin ve $(MAAP)_2Ce(III)$-Hb Kompleks yapısının Near-IR Spektrumu

Şekil 4.4'ten görüldüğü üzere, yakın-IR bölgede (800-1200 nm aralığında) hemoglobin molekülüne ait herhangi bir absorbsiyon piki gözlenmezken, $(MAAP)_2Ce(III)$-Hb kompleks yapısına ait 4 adet pik görülmektedir. Meydana gelen bu pikler nadir toprak elementlerinden olan Ce(III)'dan kaynaklı olup MAAP ve Hemoglobin ile oluşturduğu ikili kompleks sayesinde bu maddelerin de yakın-IR bölgede pik vermelerini sağlamıştır.

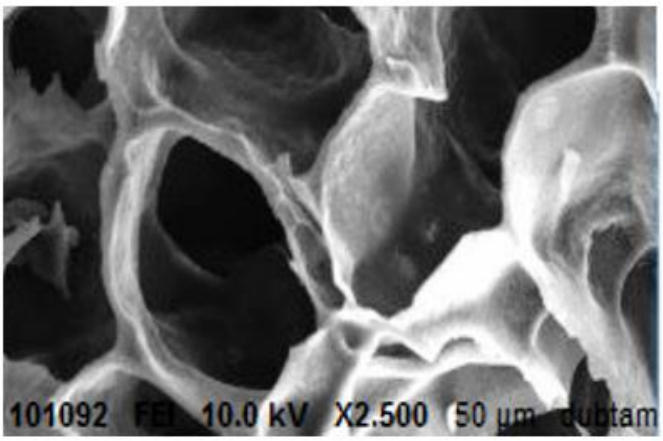
4.3.2. p-HEMA-MAAP-Ce(III) Kriyojel Polimerlerin Hazırlanması

4.3.2.1. Hemoglobin Baskılı (MIP) Kriyojel Polimerin Hazırlanması

A) 1,3 mL HEMA 5 mL saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 1 mL $(MAAP)_2$-Ce(III)-Hb kompleks çözeltisi ilavesi yapıldı ve magnetik karıştırıcıda karıştırıldı.
B) 0,28 g N-N-methylenbisacrilamid (10 mL saf suda çözüldü)

Hazırlanan A ve B çözeltileri karıştırıldı. Daha sonra 20 mg APS ilave edildi (3 dakika karıştırıldı) 50 µL TEMED ilave edildi (3 dakika buz içinde karıştırıldı) ve enjektörlere boşaltılıp -20 ^{0}C'de bekletildi ve HEMA-MAAP-Ce(III)-Hb (MIP) kriyojel Kolon hazırlandı.

Daha sonra hazırlanan HEMA-MAAP-Ce(III)-Hb kriyojel polimerden hemoglobini sökmek amacıyla hazırlanan kolondan 0,1 M Na_2CO_3-NaOH çözeltisi (desorbsiyon çözeltisi) geçirildi ve işlem sonrasında desorpsiyon çözeltisinde hemoglobin miktar tayini 400 nm'de UV spektrometresinde yapıldı. Yapılan analizler sonucunda kriyojel polimerdeki hemoglobinin kolondan tamamen desorbe edildiği tespit edildi ve böylece hemoglobin baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimeri (MIP) hazırlanmış oldu. Hazırlanan hemoglobin baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (MIP) SEM görüntüsü alındı (Şekil 4.5)



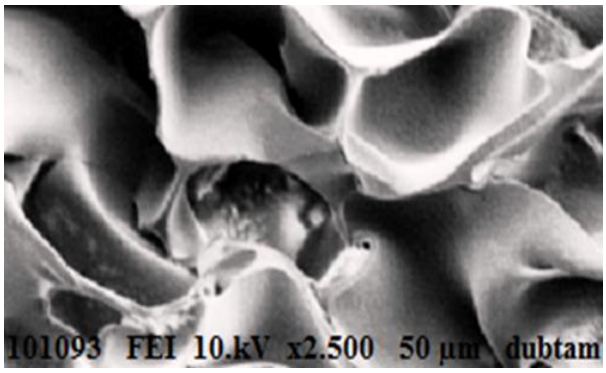
Şekil 4.5. Hemoglobin baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (MIP) SEM görüntüsü

4.3.2.2. Hemoglobin Baskılanmamış (NIP) Kriyojel Polimerin Hazırlanması

A) 1,3 mL HEMA 5 mL saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 1 mL $(MAAP)_2$-Ce(III) kompleks monomer çözeltisi ilavesi yapıldı ve magnetik karıştırıcıda 24 saat karıştırıldı.

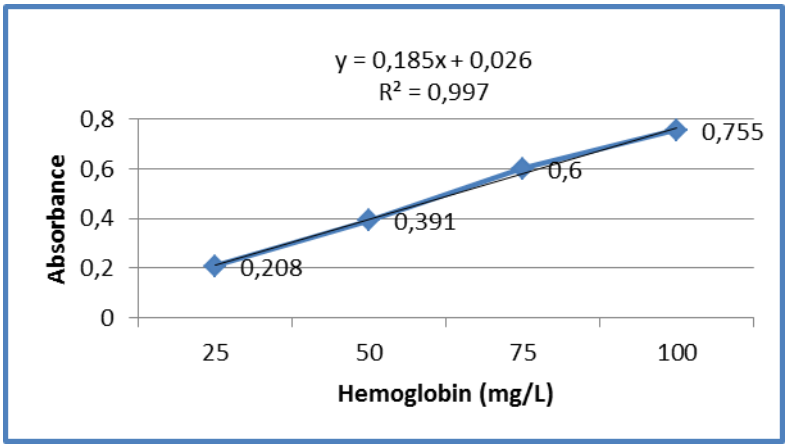
B) 0,28 g N-N-methylenbisacrilamid (10 mL saf suda çözüldü)

hazırlanan A ve B çözeltileri karıştırıldı. Daha sonra bu karışım çözeltiye 20 mg APS ilave edildi (3 dakika karıştırıldı) 50 µL TEMED ilave edildi (3 dakika buz içinde karıştırıldı) ve enjektörlere boşaltılıp -20 ^{0}C'de bekletildi ve HEMA-MAAP-Ce(III) (NIP) Kriyojel Kolonu hazırlandı. Hazırlanan hemoglobin baskısız p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (NIP) SEM görüntüsü alındı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Hemoglobin baskısız p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (NIP) SEM görüntüsü

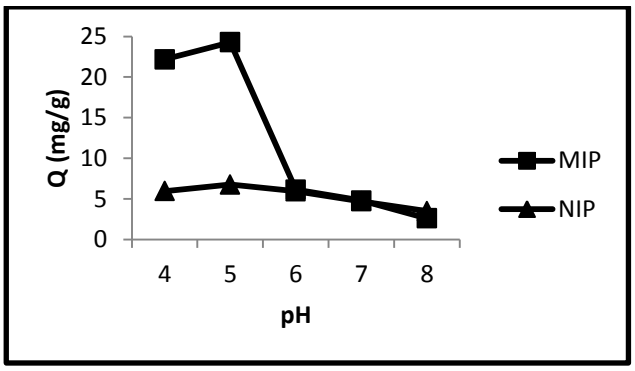
4.4. Baskılı ve Baskısız Kriyojel Polimerler ile Hemoglobinin Bağlanma Veriminde Optimizasyon Çalışmaları



Şekil 4.7. Hemoglobin-UV Kalibrasyon Grafiği (Λ=400 nm)

4.4.1. Optimum pH Tespiti

Hazırlanan hemoglobin baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma veriminin pH faktörüne bağlı olarak değişimini incelemek amacıyla yapılan deneylerde pH 4,0 ve 5,0 için asetat tamponu (CH_3COOH/CH_3COONa), pH 6,0, 7,0 ve 8,0 için fosfat tamponu (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) kullanıldı. Hazırlanan tampon çözeltiler içerisinde 0,5 mg/mL derişiminde hemoglobin çözeltileri hazırlanmış ve kriyojel kolondan peristatik pompa yardımıyla 1 mL/dakika akış hızında 1 saat süre ile geçirildi. Elde edilen bağlanma sonuçları Şekil 4.8'de verilmiştir.



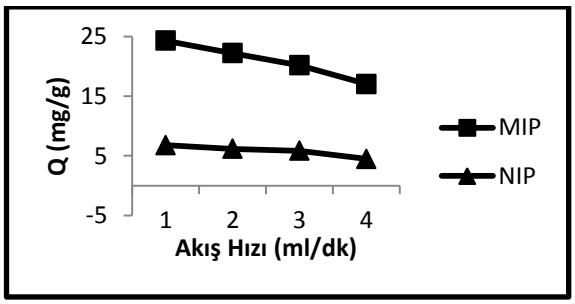
Şekil 4.8. Optimum pH Tespiti (Cb: 0.5 mg/mL (10 mL) Akış Hızı: 1 mL/dakika, Temas Süresi: 1 saat, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

Şekil 4.8'den görüldüğü üzere hemoglobin bağlanma verimine pH etkisi incelendiğinde, bağlanma verimin en yüksek olduğu pH değerinin 5,0 olduğu tespit edilmiş olup bu pH'da bağlanan hemoglobin miktarının 24,3 mg/g olduğu ve tamamına yakınının bağlandığı tespit edildi. Aynı koşullarda baskılanmamış kriyojel polimerin hemoglobin bağlama veriminin de 6,8 mg/g olduğu tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlardan hazırlanan hemoglobin baskılı polimerin (MIP), baskısız polimere (NIP) oldukça yüksek bağlanma etkinliği gösterdiği tespit edildi. pH faktörüne bağlı olarak yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde hemoglobin bağlanma veriminin genellikle düşük pH'larda olduğu, bunun nedeninin de hemoglobin proteininin izoelektronik pH'ına bağlı olduğu tespit edilmiştir (Gao ve Arkadaşları, 2016). Baskılı polimerimizin bağlanma verimi kıyaslandığında ise daha etkin bir bağlanma etkinliği gösterdiği tespit edilmiştir. (Hajizadeh ve Arkadaşları, 2018)

Hemoglobinin bağlanma çalışmalarında bu aşamadan sonra yapılan deneylerin tamamında pH 5,0 tamponu kullanıldı.

4.4.2. Optimum Akış Hızı Tespiti

Hazırlanan hemoglobin baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma veriminin kolon akış hızı etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerde pH 5,0 tamponunda hazırlanan 0,5 mg/mL derişimindeki hemoglobin çözeltileri hazırlandı ve kriyojel kolondan peristatik pompa yardımıyla 1 mL/dakika ile 4 mL/dakika akış hızlarında 1 saat süre ile geçirildi. Elde edilen bağlanma sonuçları Şekil 4.9'da verilmiştir.



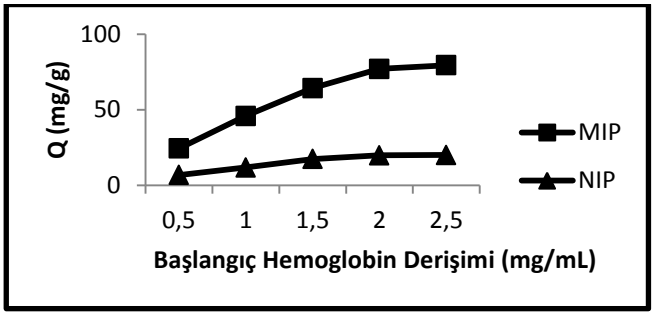
Şekil 4.9. Optimum Akış Hızı Tespiti (Cb: 0,5 mg/mL (10 mL), pH: 5,0, Temas Süresi: 1 saat, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

Şekil 4.9'dan görüldüğü üzere hemoglobin bağlanma verimine akış hızı etkisi incelendiğinde, akış hızı arttıkça bağlanma verimlerinde azalma meydana geldiği ancak bu azalmanın çok büyük olmadığı tespit edildi. Yapılan deneylerde akış hızı 1 mL/dk tutulduğunda bağlanan hemoglobin miktarının 24,3 mg/g olduğu, 4 mL/dakika'da ise 17,0 mg/g değerine düştüğü tespit edildi. Bağlanma veriminde meydana gelen bu azalma hemoglobin çözeltisinin kolondan geçiş hızına bağlı olarak baskı bölgesiyle etkileşiminin azaldığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Anirudhan ve Arkadaşları, 2017.)

4.4.3. Başlangıç Hemoglobin Derişimi Etkisi ve Maksimum Bağlanma Kapasitesi Tespiti

Hazırlanan hemoglobin baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma verimine başlangıç hemoglobin derişimi etkisini inceleyip maksimum bağlanma verimini tespit etmek için yapılan deneylerde, pH 5.0 tamponunda hazırlanmış 0,5 mg/mL – 2,5 mg/mL derişimindeki hemolobin çözeltileri kriyojel

kolondan 1,0 mL/dakika akış hızında 1 saat süre ile geçirildi. Elde edilen bağlanma sonuçları Şekil 4.10'da verilmiştir.

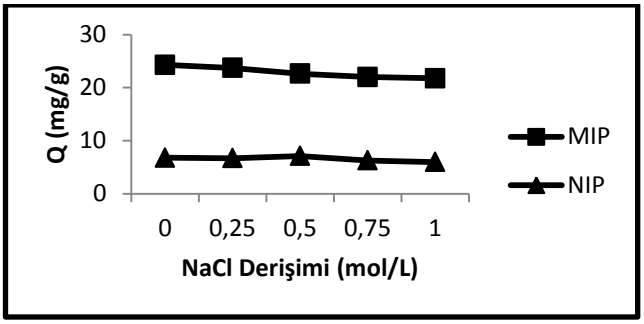


Şekil 4.10. Başlangıç Hemoglobin Derişimi ve Maximum Bağlanma Kapasitesi Tespiti (pH: 5,0, Akış Hızı: 1,0 mL/dakika, Temas Süresi: 1 saat, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

Şekil 4.10'dan görüldüğü üzere hemoglobin derişimi arttıkça bağlanma miktarında ciddi miktarda artış olduğu tespit edilmiş olup bu artışın sabitleşme gösterdiği noktada hazırlanan kriyojel kolonun hemoglobin bakımından doygunluğa ulaştığı sonucuna düşünülmüş ve doygunluk noktasında bağlanan hemoglobin miktarının MIP için gram kriyojel başına 79,40 mg/g olduğu tespit edilirken, aynı koşullarda NIP için ise 20,0 mg/g olduğu tespi edildi. yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde baskılı polimer için tespit edilen bağlanma verimin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (Zhang ve arkadaşları, 2014; Uysal ve arkadaşları, 2008).

4.4.4. Bağlanma Verimine Elektrolit (Tuz) Etkisi

Hazırlanan hemoglobin baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma verimine elektrolit (tuz) etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerde, pH 5,0 tamponunda hazırlanmış 0,5 mg/mL hemoglobin çözeltisinin içerisine 0,25 – 1,0 M aralığında NaCl çözeltisi ilavesi yapıldı, bağlanma veriminin tuz etkisi ve derişimi ile nasıl değiştiği yapılan analizler sonucunda tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11'de verilmiştir.

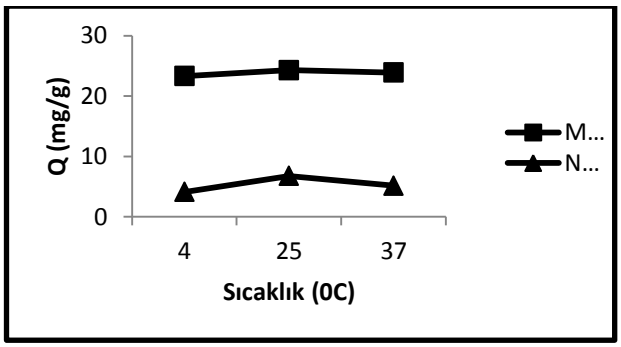


Şekil. 4.11. Tuz Etkisi (Cb: 0,5 mg/mL, Temas Süresi: 1 saat, pH: 5,0, Akış Hızı: 1,0 mL/dakika, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

Şekil 4.11'den görüldüğü üzere çözelti ortamındaki NaCl (elektrolit) derişimi arttıkça hemoglobin bağlanma veriminde küçük azalmalar meydana geldiği, bağlanan hemoglobin miktarının 24,3 mg/mL'den 21,7 mg/mL'ye düştüğü yapılan analizler sonucunda tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar baskılanan kriyojel polimerin hemoglobine olan etkinliğinin çözelti ortamında bulunan diğer etkenlerden çok fazla etkilenmediğini göstermektedir (Kan ve arkadaşları, 2012).

4.4.5. Sıcaklık Etkisi

Hazırlanan hemoglobin baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma verimine sıcaklık etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerde, pH 5,0 tamponunda hazırlanmış 0,5 mg/mL hemolobin çözeltisi 4, 25 ve 37 ^{0}C'de hazırlanan kriyojel kolondan 1,0 ml/dakika akış hızında 1 saat sürelerle geçirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12'de verilmiştir.



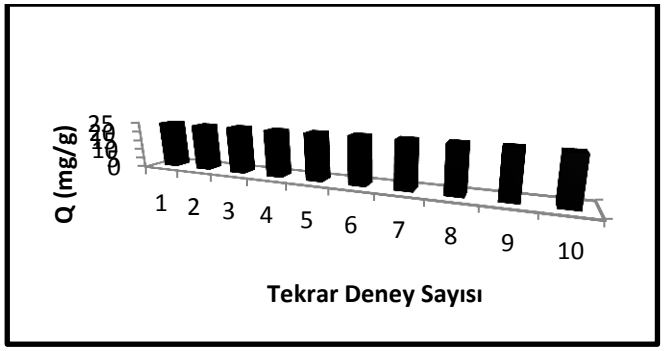
Şekil 4.12. Sıcaklık Etkisi (Cb: 0,5 mg/mL, Temas Süresi: 1 saat, pH: 5,0, Akış Hızı: 1 ml/dakika)

Şekil 4.12'den görüldüğü üzere hazırlanan hemoglobin baskılı kriyojel polimer düşük sıcaklıkta (4 ^{0}C), oda sıcaklığında (25 ^{0}C) ve vücut sıcaklığında (37 ^{0}C) bağlama etkinliğini çok fazla kaybetmediği tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar hazırlanan kriyojel polimerin hemoglobin bağlama etkinliğinin sıcaklık ile değişmediği ve bu

yönden de diğer benzer çalışmalara üstünlük gösterdiği tespit edilmiştir (Bakhshopur ve arkadaşları, 2017).

4.4.6. Hazırlanan Hemoglobin Baskılı Kriyojel Kolonun Tekrar Kullanım Sayısı Tespiti

Hazırlanan hemoglobin baskılı (MIP) kriyojel polimerlerin tekrar kullanım sayısını tespit etmek amacıyla yapılan deneylerde, pH 5,0 tamponunda hazırlanmış 0,5 mg/mL hemoglobin çözeltileri tespit edilen optimum koşullarda hazırlanan kolonlardan 10 kez geçirildi, yapılan analizler sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13. Tekrarlanabilirlik Sayısı (Cb: 0,5 mg/mL, Temas Süresi: 1 saat, pH: 5,0, Akış Hızı: 1,0 mL/dakika, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

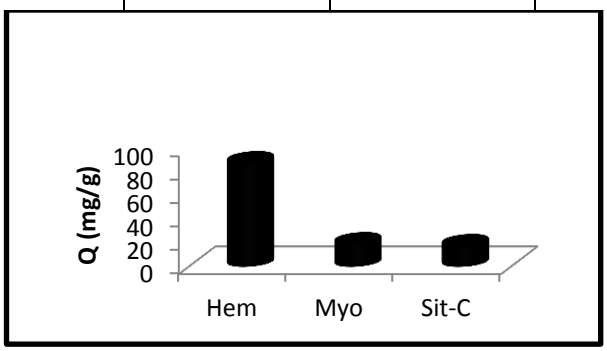
Şekil 4.13 incelendiğinde hazırlanan hemoglobin baskılı kolonun 10 tekrar deneyinde bile bağlanma etkinliğinde bir azalma olmadığı tespit edildi. Elde edilen bu sonuç hazırlanan kriyojel kolonun kararlılığını ve tekrar tekrar aynı verimde kullanılabileceğini göstermiştir (Hajizadeh ve arkadaşları, 2018).

4.4.7. Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları

0,5 mg/mL hemoglobin, myoglobin ve sitokrom-C içeren 10 mL karışım çözelti hemoglobin baskılanmış kriyojel kolondan belirlenen optimum koşullarda geçirildi. UV spektrofotometresinde yapılan analizlerde, toplam protein miktarı tayini Bradford Reaktifi ilave edilerek 595 nm'de, karışımdaki Hemoglobin tayini 400 nm'de, karışımdaki myoglobin tayini 411 nm'de ve karışımdaki sitokrom-C tayini 427 nm'de ayrı ayrı dalga boyları ayarlanarak yapılmış olup elde edilen bağlanma sonuçları Çizelge 4.1 ve Şekil 4.14'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları (Hemoglobin)

Protein Türü	UV'de çalışılan Dalga Boyu	Başlangıç Protein Derişimleri	İşlem Sonrası Protein Derişimleri	% Bağlanma
Myoglobin	411 nm	0,5 mg/mL	0,40 mg/mL	18,60
Hemoglobin	400 nm	0,5 mg/mL	0,06 mg/mL	87,40
Sitokrom-C	426 nm	0,5 mg/mL	0,415 mg/mL	17,00



Şekil 4.14. Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları (Hemoglobin)

Çizelge 4.1 ve Şekil 4.14'den görüldüğü üzere hazırlanan hemoglobin baskılı kriyojel kolonun aynı koşullarda hemoglobin bağlama verimi % 87,40 iken, myoglobin ve sitokrom-C bağlama yüzdeleri sırasıyla 18,60 ve % 17,00 olduğu ve elde edilen bu sonuçlar baskılama işleminin seçiciliği ciddi bir şekilde arttırdığı tespit edildi.

4.4.8. Gerçek Numune Çalışmaları (Kan Serumundan Hemoglobin Ayrılması)

Gönüllüler tarafından temin edilen kan numuneleri santrifüjlendikten sonra üzerindeki serumu dekante edildi. Daha sonra kan serumuna 10 mL'sinde 500 µg/L olacak şekilde hemoglobin ilave edildikten sonra pH 5,0 tamponu 1/10 oranında seyreltme işlemine tabi tutuldu. Bu şekilde hazırlanan hemoglobin içerikli kan serumları kolondan 1,0 mL/dakika akış hızında 1 saat geçirildi. Kolon çıkış örneklerinde yapılan analiz sonucu geriye kalan hemoglobin miktarları tayin edilmiş olup elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kan Serumundan Hemoglobinin Seçici Olarak Bağlanması

MIP			**NIP**		
Başlangıç Hemoglobin Derişimi	**İşlem Sonrası Hemoglobin Derişimi**	**% Bağlanma**	**Başlangıç Hemoglobin Derişimi**	**İşlem Sonrası Hemoglobin Derişimi**	**% Bağlanma**
50 µg/L	2,83 µg/L	94,34	50 µg/L	32,21 µg/L	35,58

Çizelge 4.2'den görüldüğü üzere, hazırlanan hemoglobin baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel kolonların kan serumunda bulunan hemoglobini bağlama etkinlikleri kıyaslandığında hemoglobin baskılanmış polimerin % 94,3 oranında hemoglobin bağladığı, baskılanmamış polimerin ise % 35,6 oranında hemoglobin bağladığı tespit edildi.

4.4.9. Şişme ve Makrogözenek Miktarı Deneyleri

- Baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) kriyojel polimerlerin Şişme Oranları

MIP: (Şişme Oranı) $(W_{yaş\ kriyojel} - W_{kuru\ kriyojel})/W_{kuru\ kriyojel} = (2,84 - 0,29)/0,29 = 8,8$

NIP: (Şişme Oranı) $(W_{yaş\ kriyojel} - W_{kuru\ kriyojel})/W_{kuru\ kriyojel} = (2,45 - 0,28)/0,28 = 7,8$

- Baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) kriyojel polimerlerin Makrogözenek miktarları

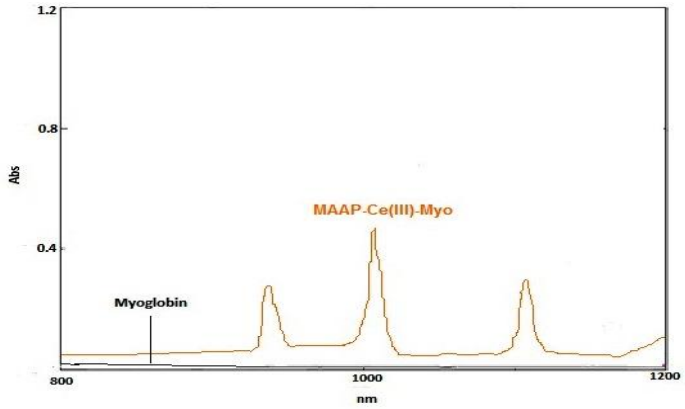
MIP: % Makrogözenek = $(W_{yaş\ kriyojel} - W_{sıkılmış\ kriyojel})/W_{sıkılmış\ kriyojel}$ X 100 = (2,84 - 1,12)/2,84 X 100 = % 58,67

NIP: % Makrogözenek = $(W_{yaş\ kriyojel} - W_{sıkılmış\ kriyojel})/W_{sıkılmış\ kriyojel}$ X 100 = (2,45 - 0,63)/2,45 X 100 = % 74,22

4.5. Myoglobin (Mb) Baskılama

4.5.1. $(MAAP)_2Ce(III)$-Mb Kompleks Yapısının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Hazırlanan $(MAAP)_2Ce(III)$ kompleks monomeri ihtiva eden çözeltiye 10 mg myoglobin ilave edilip oda sıcaklığında 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu işlem sonunda meydana gelen $(MAAP)_2Ce(III)$-Mb kompleks yapısının karakterizasyonu Near-IR (Yakın-IR) spektrumu ile yapıldı.



Şekil 4.15. Myoglobin ve $(MAAP)_2Ce(III)$-Mb Kompleks yapısının Near-IR Spektrumu

Şekil 4.15'ten görüldüğü üzere, yakın-IR bölgede (800-1200 nm aralığında) myoglobin molekülüne ait herhangi bir absorbsiyon piki gözlenmezken, $(MAAP)_2Ce(III)$-Mb kompleks yapısına ait 3 adet pik görülmektedir. Meydana gelen bu pikler nadir toprak elementlerinden olan Ce(III)'dan kaynaklı olup MAAP ve myoglobin ile oluşturduğu ikili kompleks sayesinde bu maddelerin de yakın-IR bölgede pik vermelerini sağlamıştır.

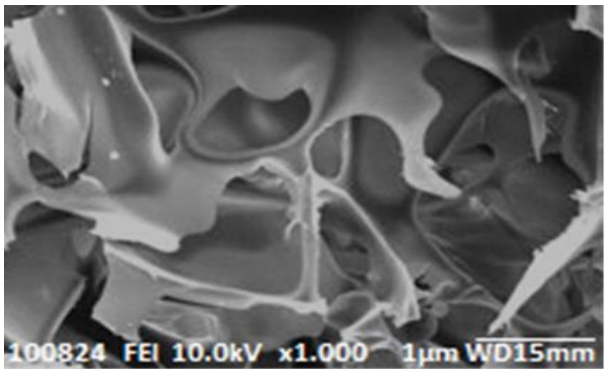
4.5.2. p-HEMA-MAAP-Ce(III) Kriyojel Polimerlerin Hazırlanması

4.5.2.1. Myoglobin Baskılı (MIP) Kriyojel Polimerin Hazırlanması

A) 1,3 mL HEMA 5 mL saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 1 mL $(MAAP)_2$-Ce(III)-Mb kompleks çözeltisi ilavesi yapıldı ve magnetik karıştırıcıda karıştırıldı.
B) 0,28 g N-N-methylenbisacrilamid (10 mL saf suda çözüldü)

hazırlanan A ve B çözeltileri karıştırıldı. Daha sonra 20 mg APS ilave edildi (3 dakika karıştırıldı) 50 µL TEMED ilave edildi (3 dakika buz içinde karıştırıldı) ve enjektörlere boşaltılıp -20 ^{0}C'de bekletildi ve HEMA-MAAP-Ce(III)-Mb (MIP) kriyojel Kolon hazırlandı.

Daha sonra hazırlanan HEMA-MAAP-Ce(III)-Mb kriyojel polimerden myoglobini sökmek amacıyla hazırlanan kolondan 0,1 M Na_2CO_3-NaOH çözeltisi (desorbsiyon çözeltisi) geçirildi ve işlem sonrasında desorpsiyon çözeltisinde myoglobin miktar tayini 410 nm'de UV spektrometresinde yapıldı. Yapılan analizler sonucunda kriyojel polimerdeki myoglobinin kolondan tamamen desorbe edildiği tespit edildi ve böylece myoglobin baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimeri (MIP) hazırlanmış oldu. Hazırlanan myoglobin baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (MIP) SEM görüntüsü şekil 4.16'da verilmiştir.



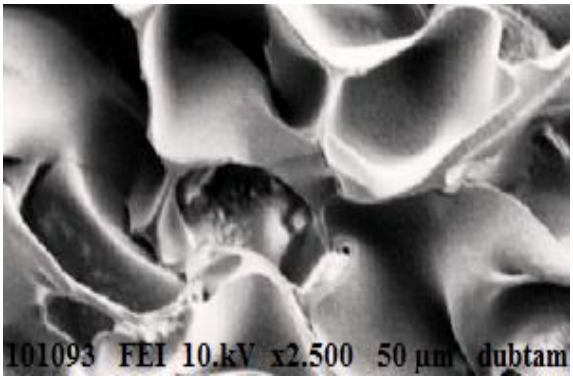
Şekil 4.16. Myoglobin baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (MIP) SEM görüntüsü

4.5.2.2. Myoglobin Baskılanmamış (NIP) Kriyojel Polimerin Hazırlanması

A) 1,3 mL HEMA 5 mL saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 1 mL $(MAAP)_2$-Ce(III) kompleks monomer çözeltisi ilavesi yapıldı ve magnetik karıştırıcıda 24 saat karıştırıldı.

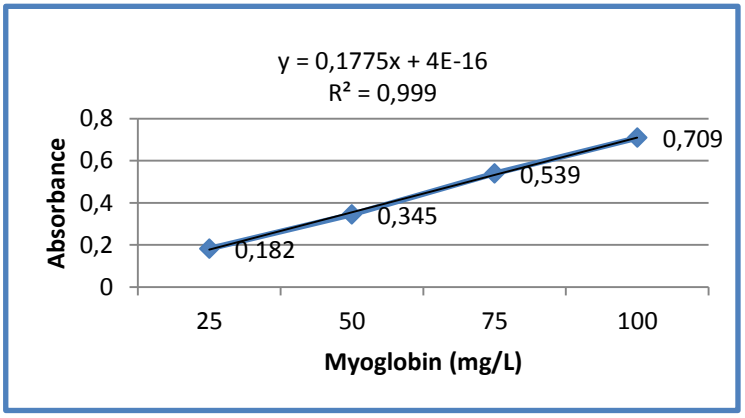
B) 0,28 g N-N-methylenbisacrilamid (10 mL saf suda çözüldü)

hazırlanan A ve B çözeltileri karıştırıldı. Daha sonra bu karışım çözeltiye 20 mg APS ilave edildi (3 dakika karıştırıldı) 50 µL TEMED ilave edildi (3 dakika buz içinde karıştırıldı) ve enjektörlere boşaltılıp -20 ^{0}C'de bekletildi ve HEMA-MAAP-Ce(III) (NIP) Kriyojel Kolonu hazırlandı. Hazırlanan myoglobin baskısız p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerinin (NIP) SEM görüntüsü alındı (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Myoglobin Baskısız p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (NIP) SEM görüntüsü

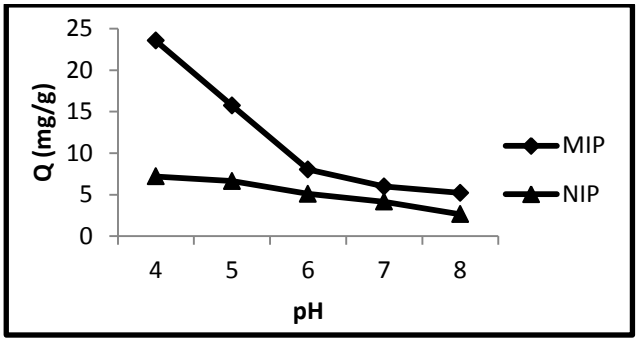
4.6. Baskılı ve Baskısız Kriyojel Polimerler ile Myoglobinin Bağlanma Veriminde Optimizasyon Çalışmaları



Şekil 4.18. Myoglobin-UV Kalibrasyon Grafiği (Λ=411 nm)

4.6.1. Optimum pH Tespiti

Hazırlanan myoglobin baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma veriminin pH faktörüne bağlı olarak değişimini incelemek amacıyla yapılan deneylerde pH 4,0 ve 5,0 için asetat tamponu (CH_3COOH/CH_3COONa), pH 6,0, 7,0 ve 8,0 için fosfat tamponu (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) kullanıldı. Hazırlanan tampon çözeltiler içerisinde 0,5 mg/mL derişiminde myoglobin çözeltileri hazırlandı ve kriyojel kolondan peristatik pompa yardımıyla 1,0 mL/dakika akış hızında 1 saat süre ile geçirildi. Elde edilen bağlanma sonuçları Şekil 4.19'da verilmiştir.



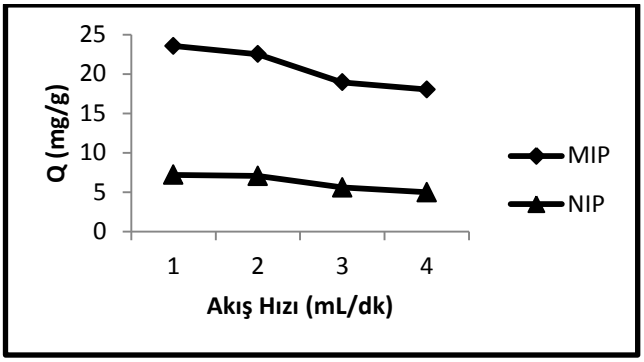
Şekil 4.19. Optimum pH Tespiti (Cb: 0,5 mg/mL (10 mL) Akış Hızı: 1 mL/dakika, Temas Süresi: 1 saat, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

Şekil 4.19'den görüldüğü üzere myoglobin bağlanma verimine pH etkisi incelendiğinde, bağlanma verimin en yüksek olduğu pH değerinin 4,0 olduğu tespit edilmiş olup bu pH'da bağlanan myoglobin miktarının 23,6 mg/g olduğu ve tamamına yakınının bağlandığı, aynı koşullarda baskılanmamış kriyojel polimerin myoglobin bağlama veriminin de 7,2 mg/g olduğu tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlardan hazırlanan myoglobin baskılı polimerin (MIP), baskısız polimere (NIP) oldukça yüksek bağlanma etkinliği gösterdiği tespit edildi. Myoglobin ile ilgili yapılan diğer çalışmalar ile kıyaslandığında bağlanma veriminin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (Ribeiro ve arkadaşları, 2017; Osman ve arkadaşları, 2013)

Myoglobinin bağlanma çalışmalarında bu aşamadan sonra yapılan deneylerin tamamında pH 4,0 tamponu kullanıldı.

4.6.2. Optimum Akış Hızı Tespiti

Hazırlanan myoglobin baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma veriminin kolon akış hızı etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerde pH 4,0 tamponunda hazırlanan 0,5 mg/mL derişimindeki myoglobin çözeltileri hazırlandı ve kriyojel kolondan peristatik pompa yardımıyla 1,0 mL/dakika ile 4,0 mL/dakika akış hızlarında 1 saat süre ile geçirildi. Elde edilen bağlanma sonuçları Şekil 4.20'de verilmiştir.

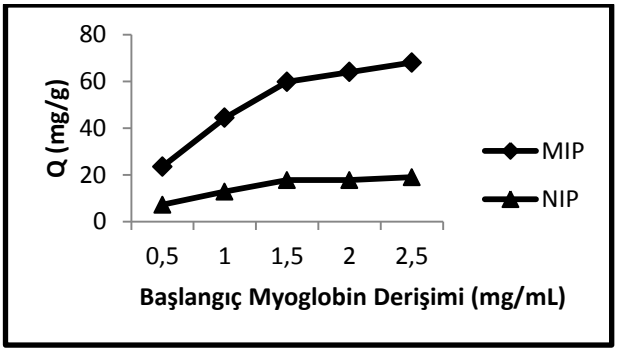


Şekil 4.20. Optimum Akış Hızı Tespiti (Cb: 0,5 mg/mL (10 mL), pH: 4,0, Temas Süresi: 1 saat, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

Şekil 4.20'den görüldüğü üzere myoglobin bağlanma verimine akış hızı etkisi incelendiğinde, akış hızı arttıkça bağlanma verimlerinde azalma meydana geldiği ancak bu azalmanın çok büyük olmadığı tespit edildi. Yapılan deneylerde akış hızı 1,0 mL/dk tutulduğunda bağlanan hemoglobin miktarının 23,54 mg/g olduğu, 4,0 mL/dakika'da ise 18,0 mg/g değerine düştüğü tespit edildi. Bağlanma veriminde meydana gelen bu azalma myoglobin çözeltisinin kolondan geçiş hızına bağlı olarak baskı bölgesiyle etkileşiminin azaldığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.6.3. Başlangıç Myoglobin Derişimi Etkisi ve Maksimum Bağlanma Kapasitesi Tespiti

Hazırlanan myoglobin baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma verimine başlangıç myoglobin derişimi etkisini inceleyip maksimum bağlanma verimini tespit etmek için yapılan deneylerde, pH 4,0 tamponunda hazırlanmış 0,5 mg/mL – 2.5 mg/mL derişimindeki myoglobin çözeltileri kriyojel kolondan 1 mL/dakika akış hızında 1 saat süre ile geçirildi. Elde edilen bağlanma sonuçları Şekil 4.21'de verilmiştir.

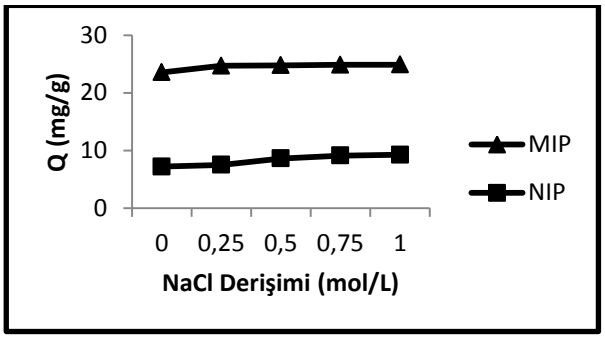


Şekil 4.21. Başlangıç Myoglobin Derişimi ve Maximum Bağlanma Kapasitesi Tespiti (pH: 4,0, Akış Hızı: 1,0 mL/dakika, Temas Süresi: 1 saat, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

Şekil 4.21'den görüldüğü üzere myoglobin derişimi arttıkça bağlanma miktarında ciddi miktarda artış olduğu tespit edilmiş olup bu artışın azalma gösterdiği noktada hazırlanan kriyojel kolonun myoglobin bakımından doygunluğa ulaştığı sonucuna varılmıştır. Doygunluk noktasında bağlanan myoglobin miktarının MIP için gram kriyojel başına 68,0 mg/g olduğu tespit edilirken, aynı koşullarda NIP için ise 18,9 mg/g olduğu tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar daha once yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında oldukça yüksek bağlanma verimleri olduğu tespit edilmiştir (Ribeiro ve arkadaşları, 2017; Shumyantseva ve arkadaşları, 2016).

4.6.4. Bağlanma Verimine Elektrolit (Tuz) Etkisi

Hazırlanan myoglobin baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma verimine elektrolit (tuz) etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerde, pH 4,0 tamponunda hazırlanmış 0,5 mg/mL myoglobin çözeltisinin içerisine 0,25 – 1,0 M aralığında NaCl çözeltisi ilavesi yapılmış, bağlanma veriminin tuz etkisi ve derişimi ile nasıl değiştiği yapılan analizler sonucunda tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.22'de verilmiştir.

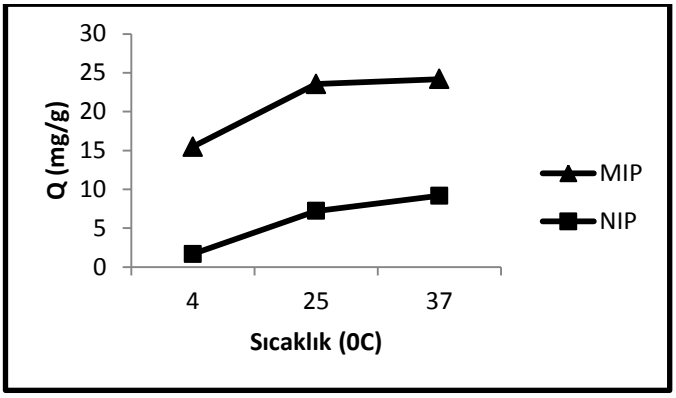


Şekil. 4.22. Tuz Etkisi (Cb: 0,5 mg/mL, Temas Süresi: 1 saat, pH: 4,0, Akış Hızı: 1,0 mL/dakika, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

Şekil 4.22'den görüldüğü üzere çözelti ortamındaki NaCl (elektrolit) derişimi arttıkça myoglobin bağlanma veriminde değişiklik meydana gelmediği yapılan analizler sonucunda tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar baskılanan kriyojel polimerin myoglobine olan etkinliğinin çözelti ortamında bulunan diğer etkenlerden çok fazla etkilenmediğini göstermektedir (Osman ve arkadaşları, 2013).

4.6.5. Sıcaklık Etkisi

Hazırlanan myoglobin baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma verimine sıcaklık etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerde, pH 4,0 tamponunda hazırlanmış 0,5 mg/mL myoglobin çözeltileri 4, 25 ve 37 ^{0}C'de hazırlanan kriyojel kolondan 1,0 mL/dakika akış hızında 1 saat sürelerle geçirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.23'de verilmiştir.

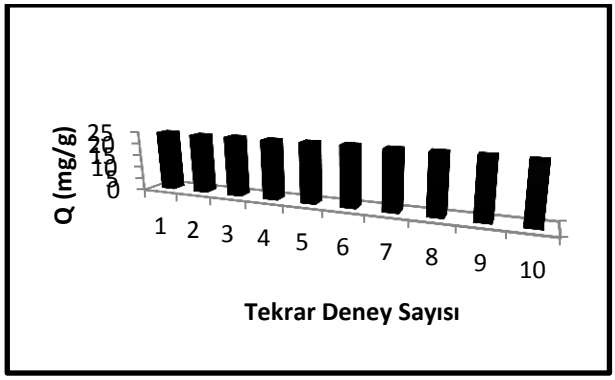


Şekil 4.23. Sıcaklık Etkisi (Cb: 0,5 mg/mL, Temas Süresi: 1 saat, pH: 4,0, Akış Hızı: 1,0 mL/dakika)

Şekil 4.23'den görüldüğü üzere hazırlanan myoglobin baskılı kriyojel polimer düşük sıcaklıkta (4 ^{0}C) myoglobin bağlama veriminde azalma meydana geldiği ve bağlanan myoglobin miktarının 15.5 mg/g değerine düştüğü, oda sıcaklığında (25 ^{0}C) ve vücut sıcaklığında (37 ^{0}C) bağlama etkinliğinin çok fazla düşmediği tespit edildi.

4.6.6. Hazırlanan Miyoglobin Baskılı Kriyojel Kolonun Tekrar Kullanım Sayısı Tespiti

Hazırlanan myoglobin baskılı (MIP) kriyojel polimerlerin tekrar kullanım sayısını tespit etmek amacıyla yapılan deneylerde, pH 4,0 tamponunda hazırlanmış 0,5 mg/mL myoglobin çözeltileri tespit edilen optimum koşullarda hazırlanan kolonlardan 10 kez geçirildi ve yapılan analizler sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.24'de verilmiştir.



Şekil 4.24. Tekrarlanabilirlik Sayısı (Cb: 0,5 mg/mL, Temas Süresi: 1 saat, pH: 4,00, Akış Hızı: 1,0 mL/dakika, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

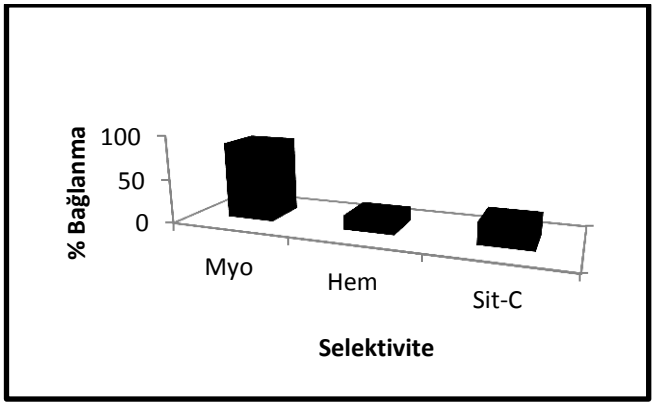
Şekil 4.24 incelendiğinde hazırlanan myoglobin baskılı kolonun 10 tekrar deneyinde bile bağlanma etkinliğinde bir azalma olmadığı tespit edildi. Elde edilen bu sonuç hazırlanan kriyojel kolonun kararlılığını ve tekrar tekrar aynı verimle kullanılabileceğini göstermiştir.

4.6.7. Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları

0,5 mg/mL myoglobin, hemoglobin ve sitokrom-C içeren 10 mL karışım çözelti myoglobin baskılanmış kriyojel kolondan belirlenen optimum koşullarda geçirildi. UV spektrofotometresinde yapılan analizlerde, toplam protein miktarı tayini Bradford Reaktifi ilave edilerek 595 nm'de, karışımdaki hemoglobin tayini 400 nm'de, karışımdaki myoglobin tayini 411 nm'de ve karışımdaki sitokrom-C tayini 427 nm'de ayrı ayrı dalga boyları ayarlanarak yapılmış olup elde edilen bağlanma sonuçları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.25'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları (Myoglobin)

Protein Türü	UV'de çalışılan Dalga Boyu	Başlangıç Protein Derişimleri	İşlem Sonrası Protein Derişimleri	% Bağlanma
Myoglobin	411 nm	0,5 mg/mL	0,407 mg/mL	87,6
Hemoglobin	400 nm	0,5 mg/mL	0,063 mg/mL	16,4
Sitokrom-C	426 nm	0,5 mg/mL	0,415 mg/mL	25,0



Şekil 4.25. Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları (Myoglobin)

Çizelge 4.3 ve Şekil 4.25'den görüldüğü üzere hazırlanan myoglobin baskılı kriyojel kolonun aynı koşullarda hemoglobin bağlama verimi % 87,6 iken, hemoglobin ve sitokrom-C bağlama kapasitesi sırasıyla 16,4 ve % 25,0 olduğu ve elde edilen bu sonuçlar baskılama işleminin seçiciliği ciddi bir şekilde arttırdığı tespit edildi.

4.6.8. Gerçek Numune Çalışmaları (Kan Serumundan Myoglobin Ayrılması)

Gönüllülerden temin edilen kan numuneleri santrifüjlendikten sonra üzerindeki serumu dekante edildi. Daha sonra kan serumuna 10 mL'sinde 500 µg/L olacak şekilde myoglobin ilave edildikten sonra pH 4,0 tamponu 1/10 oranında seyreltme işlemine tabi tutuldu. Bu şekilde hazırlanan hemoglobin içerikli kan serumları kolondan 1,0 mL/dakika akış hızında 1 saat geçirildi. Kolon çıkış örneklerinde yapılan analiz sonucu geriye kalan hemoglobin miktarları tayin edilmiş olup elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kan Serumundan Myoglobinin Seçici Olarak Bağlanması

MIP			**NIP**		
Başlangıç Myoglobin Derişimi	**İşlem Sonrası Myoglobin Derişimi**	**% Bağlanma**	**Başlangıç Myoglobin Derişimi**	**İşlem Sonrası Myoglobin Derişimi**	**% Bağlanma**
50 µg/L	4,65 µg/L	91,7	50 µg/L	35,7 µg/L	28,7

Çizelge 4.4'den görüldüğü üzere, hazırlanan myoglobin baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel kolonların kan serumunda bulunan myoglobini bağlama etkinlikleri kıyaslandığında baskılanmış yapının % 91,7 oranında myoglobin bağladığı, baskılanmamış yapının ise % 28,7 oranında myoglobin bağladığı tespit edildi.

4.6.9. Şişme ve Makrogözenek Miktarı Deneyleri

- Baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) kriyojel polimerlerin Şişme Oranları

MIP: (Şişme Oranı) $(W_{yaş\ kriyojel} - W_{kuru\ kriyojel})/W_{kuru\ kriyojel} = (2,56 - 0,21)/0,21 = 11,0$

NIP: (Şişme Oranı) $(W_{yaş\ kriyojel} - W_{kuru\ kriyojel})/W_{kuru\ kriyojel} = (2,05 - 0,24)/0,22 = 7,5$

- Baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) kriyojel polimerlerin Makrogözenek miktarları

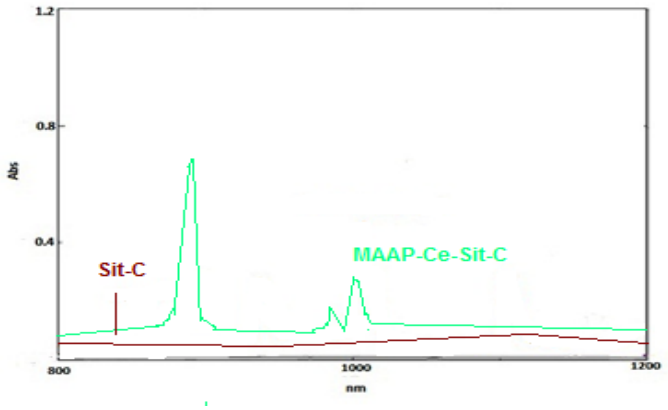
MIP: % Makrogözenek = $(W_{yaş\ kriyojel} - W_{sıkılmış\ kriyojel})/W_{sıkılmış\ kriyojel}$ X 100 =(2,56 - 1,12)/2,56 X 100 = % 56,2

NIP: % Makrogözenek = $(W_{yaş\ kriyojel} - W_{sıkılmış\ kriyojel})/W_{sıkılmış\ kriyojel}$ X 100 = (2,05 - 0,58)/2,05 X 100 = % 71,80

4.7. Sitokrom-C (Sit-C) Baskılama

4.7.1. $(MAAP)_2Ce(III)$-Sit-C Kompleks Yapısının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Hazırlanan $(MAAP)_2Ce(III)$ kompleks monomeri ihtiva eden çözeltiye 10 mg sitokrom-C ilave edilip oda sıcaklığında 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu işlem sonunda meydana gelen $(MAAP)_2Ce(III)$-Sit-C kompleks yapısının karakterizasyonu Near-IR (Yakın-IR) spektrumu ile yapıldı.



Şekil 4.26. Sitokrom-C ve $(MAAP)_2Ce(III)$-Sit-C Kompleks yapısının Near-IR Spektrumu

Şekil 4.26'dan görüldüğü üzere, yakın-IR bölgede (800-1200 nm aralığında) sitokrom-C molekülüne ait herhangi bir absorbsiyon piki gözlenmezken, $(MAAP)_2Ce(III)$-Sit-C kompleks yapısına ait 3 adet pik görülmektedir. Meydana gelen bu pikler nadir toprak elementlerinden olan Ce(III)'dan kaynaklı olup MAAP ve sitokrom-C ile oluşturduğu ikili kompleks sayesinde bu maddelerin de yakın-IR bölgede pik vermelerini sağlamıştır.

4.7.2. p-HEMA-MAAP-Ce(III) Kriyojel Polimerlerin Hazırlanması

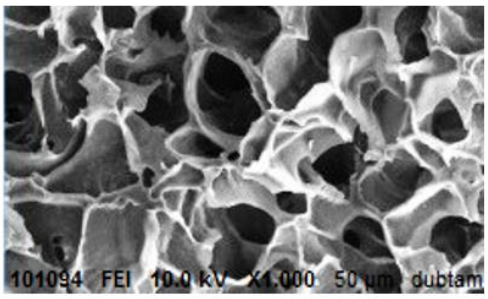
4.7.2.1. Sitokrom-C Baskılı (MIP) Kriyojel Polimerin Hazırlanması

A) 1,3 mL HEMA 5 mL saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 1 ml $(MAAP)_2$-Ce(III)-Sit-C kompleks çözeltisi ilavesi yapıldı ve magnetik karıştırıcıda karıştırıldı.
B) 0,28 g N-N-methylenbisacrilamid (10 mL saf suda çözüldü)

hazırlanan A ve B çözeltileri karıştırıldı. Daha sonra 20 mg APS ilave edildi (3 dakika karıştırıldı) 50 µL TEMED ilave edildi (3 dakika buz içinde karıştırıldı) ve enjektörlere boşaltılıp -20 ^{0}C'de bekletildi ve HEMA-MAAP-Ce(III)-Sit-C (MIP) kriyojel Kolon hazırlandı.

Daha sonra hazırlanan HEMA-MAAP-Ce(III)-Sit-C kriyojel polimerden sitokrom-C'yi sökmek amacıyla hazırlanan kolondan 0,1 M Na_2CO_3-NaOH çözeltisi (desorbsiyon çözeltisi) geçirildi ve işlem sonrasında desorpsiyon çözeltisinde sitokrom-C miktar tayini 426 nm'de UV spektrometresinde yapıldı. Yapılan analizler sonucunda kriyojel polimerdeki sitokrom-C'nin kolondan tamamen desorbe edildiği tespit edildi ve böylece sitokrom-C baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimeri (MIP)

hazırlanmış oldu. Hazırlanan sitokrom-C baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (MIP) SEM görüntüsü alındı (Şekil 4.27).



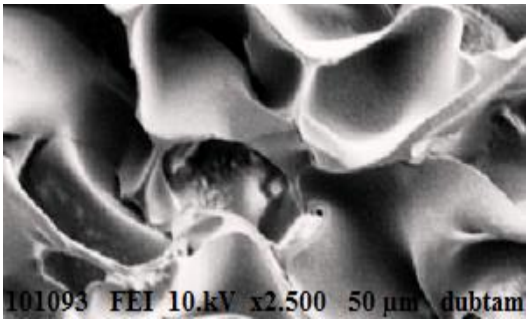
Şekil 4.27. Sitokrom-C baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (MIP) SEM görüntüsü

4.7.2.2. Sitokrom-C Baskılanmamış (NIP) Kriyojel Polimerin Hazırlanması

A) 1,3 mL HEMA 5 mL saf suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 1 ml $(MAAP)_2$-Ce(III) kompleks monomer çözeltisi ilavesi yapıldı ve magnetik karıştırıcıda 24 saat karıştırıldı.

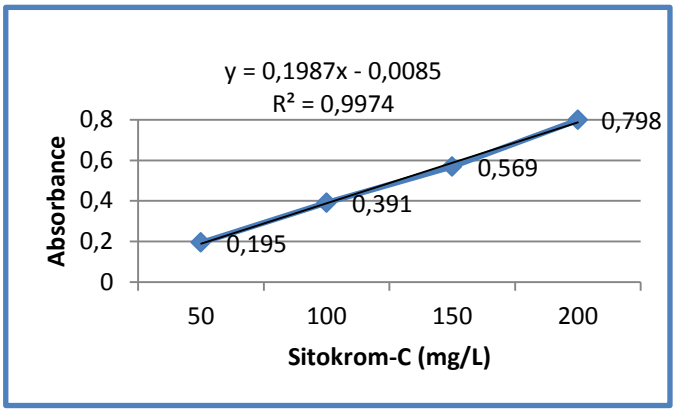
B) 0,28 g N-N-methylenbisacrilamid (10 mL saf suda çözüldü)

hazırlanan A ve B çözeltileri karıştırıldı. Daha sonra bu karışım çözeltiye 20 mg APS ilave edildi (3 dakika karıştırıldı) 50 µL TEMED ilave edildi (3 dakika buz içinde karıştırıldı) ve enjektörlere boşaltılıp -20 ^{0}C'de bekletildi ve HEMA-MAAP-Ce(III) (NIP) kriyojel kolonu hazırlandı. Hazırlanan Sitokrom-C baskısız p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerinin (NIP) SEM görüntüsü alındı (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Sitokrom-C Baskısız p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerin (NIP) SEM görüntüsü

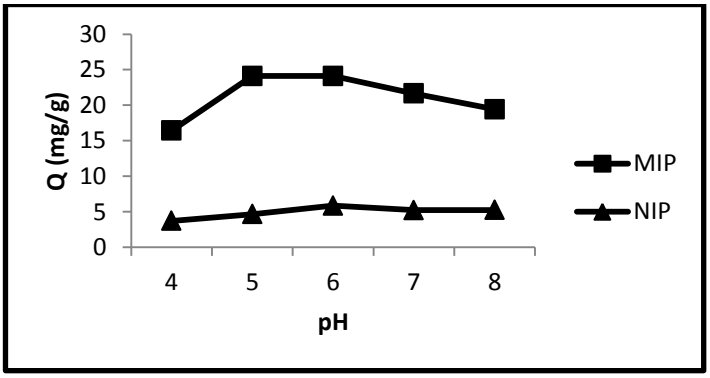
4.8. Baskılı ve Baskısız Kriyojel Polimerler ile Sitokrom-C'nin Bağlanma Veriminde Optimizasyon Çalışmaları



4.29. Sitokrom-C-UV Kalibrasyon Grafiği (Λ= 426 nm)

4.8.1. Optimum pH Tespiti

Hazırlanan sitokrom-C baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma veriminin pH faktörüne bağlı olarak değişimini incelemek amacıyla yapılan deneylerde pH 4,0 ve 5,0 için asetat tamponu (CH_3COOH/CH_3COONa), pH 6,0, 7,0 ve 8,0 için fosfat tamponu (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) kullanıldı. Hazırlanan tampon çözeltiler içerisinde 0,5 mg/mL derişiminde sitokrom-C çözeltileri hazırlandı ve kriyojel kolondan peristatik pompa yardımıyla 1,0 mL/dakika akış hızında 1 saat süre ile geçirildi. Elde edilen bağlanma sonuçları Şekil 4.30'da verilmiştir.



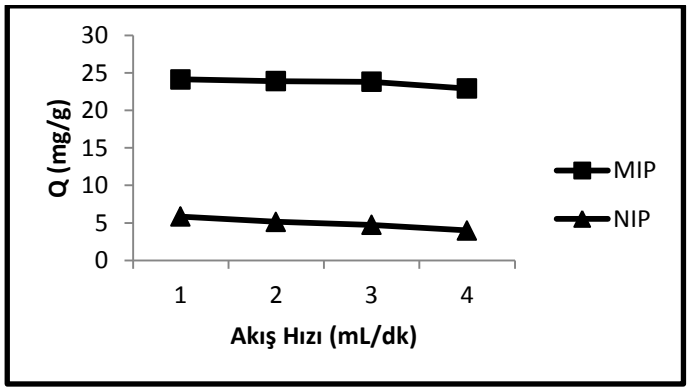
Şekil 4.30. Optimum pH Tespiti (Cb: 0,5 mg/mL (10 mL) Akış Hızı: 1,0 mL/dakika, Temas Süresi: 1 saat, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

Şekil 4.30'dan görüldüğü üzere sitokrom-C bağlanma verimine pH etkisi incelendiğinde, bağlanma verimin en yüksek olduğu pH değerinin 6.0 olduğu tespit edilmiş olup bu pH'da bağlanan sitokrom-C miktarının 24,1 mg/g olduğu ve tamamına yakınının bağlandığı, aynı koşullarda baskılanmamış kriyojel polimerin sitokrom-C bağlama veriminin de 5,8 mg/g olduğu tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlardan hazırlanan sitokrom-C baskılı polimerin (MIP), baskısız polimere (NIP) oldukça yüksek bağlanma etkinliği gösterdiği tespit edildi (Amin ve arkadaşları, 2017; Yan ve arkadaşları, 2017).

Sitokrom-C bağlanma çalışmalarında bu aşamadan sonra yapılan deneylerin tamamında pH 6,0 tamponu kullanıldı.

4.8.2. Optimum Akış Hızı Tespiti

Hazırlanan sitokrom-C baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma veriminin kolon akış hızı etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerde pH 6,0 tamponunda hazırlanan 0,5 mg/mL derişimindeki sitokrom-C çözeltileri hazırlandı ve kriyojel kolondan peristatik pompa yardımıyla 1,0 mL/dakika ile 4,0 mL/dakika akış hızlarında 1 saat süre ile geçirildi. Elde edilen bağlanma sonuçları Şekil 4.31'de verilmiştir.



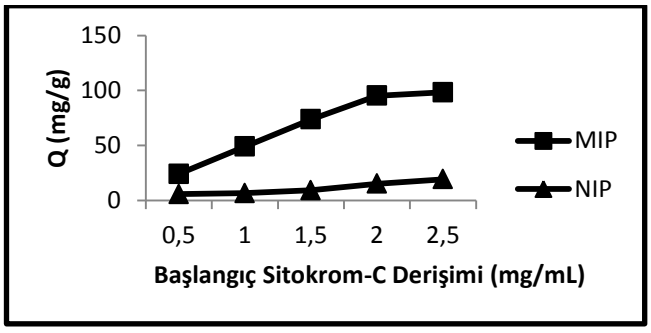
Şekil 4.31. Optimum Akış Hızı Tespiti (Cb: 0,5 mg/mL (10 mL), pH: 6,0, Temas Süresi: 1 saat, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

Şekil 4.31'den görüldüğü üzere sitokrom-C bağlanma verimine akış hızı etkisi incelendiğinde, akış hızı arttıkça bağlanma verimlerinde azalma meydana geldiği ancak bu azalmanın çok büyük olmadığı tespit edildi. Yapılan deneylerde akış hızı 1,0 mL/dakika tutulduğunda bağlanan hemoglobin miktarının 24,1 mg/g olduğu, 4,0

mL/dakika'da ise 22,9 mg/g değerine düştüğü tespit edildi. Bağlanma veriminde meydana gelen bu azalma sitokrom-C çözeltisinin kolondan geçiş hızına bağlı olarak baskı bölgesiyle etkileşiminin azaldığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Tamahkar ve arkadaşları, 2015).

4.8.3. Başlangıç Sitokrom-C Derişimi Etkisi ve Maksimum Bağlanma Kapasitesi Tespiti

Hazırlanan sitokrom-C baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma verimine başlangıç sitokrom-C derişimi etkisini inceleyip maksimum bağlanma verimini tespit etmek için yapılan deneylerde, pH 6,0 tamponunda hazırlanmış 0,5 mg/mL – 2,5 mg/mL derişimindeki sitokrom-C çözeltileri kriyojel kolondan 1,0 mL/dakika akış hızında 1 saat süre ile geçirildi. Elde edilen bağlanma sonuçları Şekil 4.32'de verilmiştir.

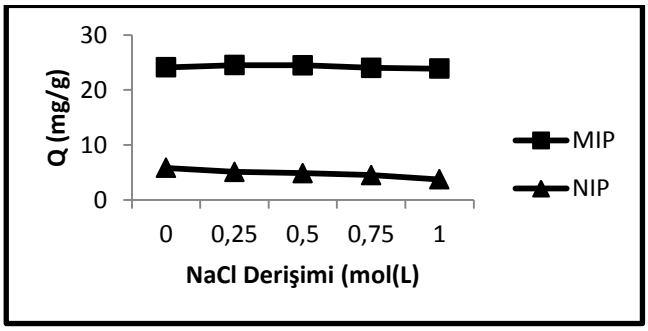


Şekil 4.32. Başlangıç Sitokrom-C Derişimi ve Maximum Bağlanma Kapasitesi Tespiti (pH: 6,0, Akış Hızı: 1,0 mL/dakika, Temas Süresi: 1 saat, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

Şekil 4.32'den görüldüğü üzere sitokrom-C derişimi arttıkça bağlanma miktarında ciddi miktarda artış olduğu tespit edilmiş olup bu artışın sabitleştiği gösterdiği noktada hazırlanan kriyojel kolonun sitokrom-C bakımından doygunluğa ulaştığı sonucuna varıldı. Doygunluk noktasında bağlanan sitokrom-C miktarının MIP için gram kriyojel başına 98.3 mg/g olduğu tespit edilirken, aynı koşullarda NIP için ise 18.3 mg/g olduğu tespit edildi. gram polimer başına bağlanan sitokrom-C miktarlartı göz önüne alındığında daha önce yapılan çalışmalara göre yüksek bağlanma verimleri tespit edilmiştir (Guo ve arkadaşları, 2015; Yan ve arkadaşları, 2017).

4.8.4. Bağlanma Verimine Elektrolit (Tuz) Etkisi

Hazırlanan sitokrom-C baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma verimine elektrolit (tuz) etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerde, pH 6,0 tamponunda hazırlanmış 0,5 mg/mL sitokrom-C çözeltisinin içerisine 0,25 – 1,0 M aralığında NaCl çözeltisi ilavesi yapılmış, bağlanma veriminin tuz etkisi ve derişimi ile nasıl değiştiği yapılan analizler sonucunda tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.33'de verilmiştir.

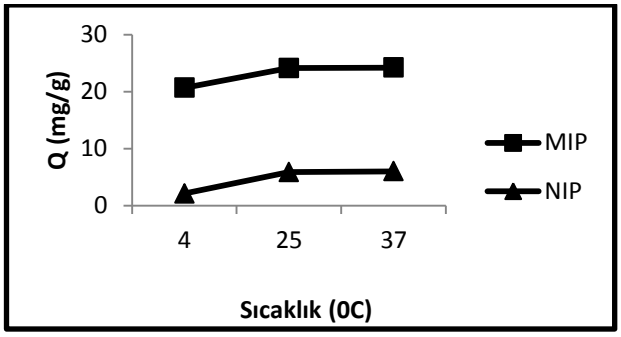


Şekil. 4.33. Tuz Etkisi (Cb: 0,5 mg/mL, Temas Süresi: 1 saat, pH: 6,0, Akış Hızı: 1,0 mL/dakika, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

Şekil 4.33'den görüldüğü üzere çözelti ortamındaki NaCl (elektrolit) derişimi arttıkça sitokrom-C bağlanma veriminde değişiklik meydana gelmediği yapılan analizler sonucunda tespit edildi. Elde edilen bu sonuçlar baskılanan kriyojel polimerin sitokrom-C'ye olan etkinliğinin çözelti ortamında bulunan diğer etkenlerden çok fazla etkilenmediğini göstermektedir.

4.8.5. Sıcaklık Etkisi

Hazırlanan sitokrom-C baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel polimerler ile bağlanma verimine sıcaklık etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerde, pH 6,0 tamponunda hazırlanmış 0,5 mg/mL sitokrom-C çözeltileri 4, 25 ve 37 ^{0}C'de hazırlanan kriyojel kolondan 1,0 mL/dakika akış hızında 1 saat sürelerle geçirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.34'de verilmiştir.

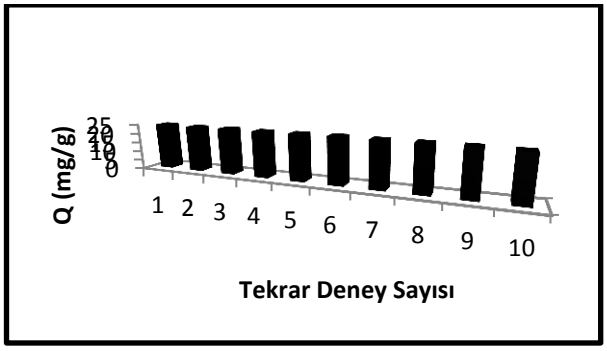


Şekil 4.34. Sıcaklık Etkisi (Cb: 0,5 mg/mL, Temas Süresi: 1 saat, pH: 6,0, Akış Hızı: 1,0 mL/dakika)

Şekil 4.34'den görüldüğü üzere hazırlanan sitokrom-C baskılı kriyojel polimer düşük sıcaklıkta (4 ^{0}C) sitokrom-C bağlama veriminde azalma meydana geldiği ve bağlanan sitokrom-C miktarının 20,6 mg/g değerine düştüğü, oda sıcaklığında (25 ^{0}C) ve vücut sıcaklığında (37 ^{0}C) bağlama etkinliğinin değişmediği tespit edildi.

4.8.6. Hazırlanan Sitokrom-C Baskılı Kriyojel Kolonun Tekrar Kullanım Sayısı Tespiti

Hazırlanan sitokrom-C baskılı (MIP) kriyojel polimerlerin tekrar kullanım sayısını tespit etmek amacıyla yapılan deneylerde, pH 6,0 tamponunda hazırlanmış 0,5 mg/mL sitokrom-C çözeltileri tespit edilen optimum koşullarda hazırlanan kolonlardan 10 kez geçirildi ve yapılan analizler sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.35'de verilmiştir.



Şekil 4.35. Tekrarlanabilirlik Sayısı (Cb: 0,5 mg/mL, Temas Süresi: 1 saat, pH: 6,0, Akış Hızı: 1,0 mL/dakika, Sıcaklık: 25 ^{0}C)

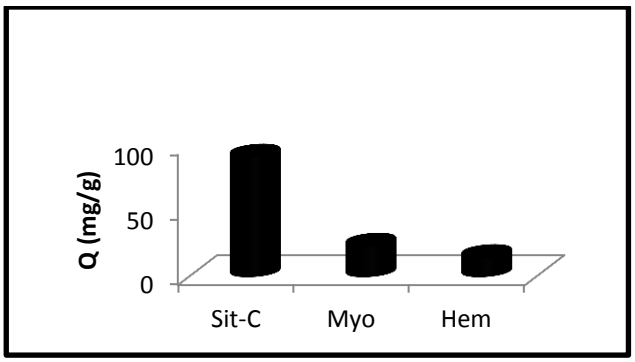
Şekil 4.35 incelendiğinde hazırlanan sitokrom-C baskılı kolonun 10 tekrar deneyinde bile bağlanma etkinliğinde bir azalma olmadığı tespit edildi. Elde edilen bu sonuç hazırlanan kriyojel kolonun kararlılığını ve tekrar tekrar aynı verimle kullanılabileceğini göstermiştir.

4.8.7. Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları

0,5 mg/mL sitokrom-C, myoglobin ve hemoglobin içeren 10 mL karışım çözelti sitokrom-C baskılanmış kriyojel kolondan belirlenen optimum koşullarda geçirildi. UV spektrofotometresinde yapılan analizlerde, toplam protein miktarı tayini Bradford Reaktifi ilave edilerek 595 nm'de, karışımdaki Hemoglobin tayini 400 nm'de, karışımdaki myoglobin tayini 411 nm'de ve karışımdaki sitokrom-C tayini 426 nm'de ayrı ayrı dalga boyları ayarlanarak yapılmış olup elde edilen bağlanma sonuçları Çizelge 4.5 ve Şekil 4.36'da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları (Sitokrom-C)

Protein Türü	UV'de çalışılan Dalga Boyu	Başlangıç Protein Derişimleri	İşlem Sonrası Protein Derişimleri	% Bağlanma
Myoglobin	411 nm	0,5 mg/mL	0,407 mg/mL	23,4
Hemoglobin	400 nm	0,5 mg/mL	0,063 mg/mL	14,6
Sitokrom-C	426 nm	0,5 mg/mL	0,415 mg/mL	91,8



Şekil 4.36. Selektivite (Seçicilik) Çalışmaları (Sitokrom-C)

Çizelge 4.5 ve Şekil 4.36'dan görüldüğü üzere hazırlanan sitokrom-C baskılı kriyojel kolonun aynı koşullarda sitokrom-C bağlama verimi % 91,8 iken, hemoglobin ve myoglobin bağlama verimleri sırasıyla 14,6 ve % 23,4 olduğu ve elde edilen bu sonuçlar baskılama işleminin seçiciliği ciddi bir şekilde arttırdığı tespit edildi.

4.8.8. Gerçek Numune Çalışmaları (Kan Serumundan Sitokrom-C Ayrılması)

Gönüllülerden Temin edilen kan numuneleri santrifüjlendikten sonra üzerindeki serumu dekante edildi. Daha sonra kan serumuna 10 mL'sinde 500 µg/L olacak şekilde sitokrom-C ilave edildikten sonra pH 6,0 tamponu 1/10 oranında seyreltme işlemine tabi tutuldu. Bu şekilde hazırlanan sitokrom-C içerikli kan serumları kolondan 1,0 mL/dakika akış hızında 1 saat geçirildi. yapılan analiz sonucu geriye kalan sitokrom-C miktarları tayin edilmiş olup elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Kan Serumundan Sitokrom-C'nin Seçici Olarak Bağlanması

MIP			**NIP**		
Başlangıç Sitokrom-C Derişimi	**İşlem Sonrası Sitokrom-C Derişimi**	**% Bağlanma**	**Başlangıç Sitokrom-C Derişimi**	**İşlem Sonrası Sitokrom-C Derişimi**	**& Bağlanma**
50,0 µg/L	3,6 µg/L	92,8	50,0 µg/L	38,0 µg/L	24,0

Çizelge 4.6'dan görüldüğü üzere, hazırlanan sitokrom-C baskılı (MIP) ve baskısız (NIP) kriyojel kolonların kan serumunda bulunan sitokrom-C'yi bağlama etkinlikleri kıyaslandığında baskılanmış yapının % 92,8 oranında sitokrom-C bağladığı, baskılanmamış yapının ise % 24,0 oranında sitokrom-C bağladığı tespit edildi.

4.8.9. Şişme ve Makrogözenek Miktarı Deneyleri

- Baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) kriyojel polimerlerin Şişme Oranları

MIP: (Şişme Oranı) $(W_{yaş\ kriyojel} - W_{kuru\ kriyojel})/W_{kuru\ kriyojel} = (2,13 - 0,20)/0,20 = 6,32$

NIP: (Şişme Oranı) $(W_{yaş\ kriyojel} - W_{kuru\ kriyojel})/W_{kuru\ kriyojel} = (2,32 - 0,26)/0,26 = 7,78$

- Baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) kriyojel polimerlerin Makrogözenek miktarları

MIP: % MakrogözeneK $= (W_{yaş\ kriyojel} - W_{sıkılmış\ kriyojel})/W_{sıkılmış\ kriyojel}$ X 100 = (2,13 - 0,89)/2,13 X 100 = % 58,00

NIP: % Makrogözenek = $(W_{yaş\ kriyojel} - W_{sıkılmış\ kriyojel})/W_{sıkılmış\ kriyojel}$ X 100 = (2,32 - 1,12)/2,32 X 100 = % 51,73

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Lantanid içerikli yeni bir kompleks kriyojel polimer olan p[HEMA-MAAP-Ce(III)] kullanılarak sulu çözeltide ve kan serumunda bulunan hemoglobin (Hb), myoglobin (Mb) ve sitokrom-C (Sit-C) gibi proteinlerinin matriks ortamlarında bulunan diğer proteinlerin varlığında baskılanan proteinin yüksek seçicilikle ayrılması ve analizlerine imkan sağlayan bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edildi;

Fonksiyonel Monomer olarak olan MAAP (metakrioilamidoantipirin) kullanıldı. Monomerin yapısında bulunan amino antipirin grupları sayesinde van der wals ve elektrostatik etkileşimleri oldukça kuvvetli olan bu monomer, moleküler baskılama işleminde kullanılan diğer fonksiyonel monomerlere göre oldukça yüksek bağlama etkinliği gösterdiği tespit edildi.

Hedef molekülün bağlanma etkinliğini arttırmak amacıyla hazırlanan MAAP monomeri ile boş f orbitallerinden dolayı koordinasyon sayısı yüksek olan ve bu sayede 9 koordinasyona kadar şelat oluşturabilen lantanid grubu elementlerinden Ce(III) iyonu kompleksleştirildi. Bu sayede hazırlanan kompleks monomerin hedef molekülü bağlama etkinliği saf monomere göre daha yüksek olduğu yapılan çalışmalar sonucunda tespit edildi.

Bu şekilde hazırlanan kompleks monomer 3 farklı hedef molekül (Hemoglobin, myoglobin ve sitokrom-C) ile farklı deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere kompleksleştirildi ve hidroksi etil metakrilat (HEMA) ve uygun polimerizasyon reaktifleri (bis-akrilamit, TEMED ve APS) kullanılarak serbest radikal polimerizasyonu yöntemi ile sırasıyla hemoglobin, myoglobin ve sitokrom-C baskılı kriyojel polimerler sentezlenip kolon dolgu malzemeleri hazırlandı.

Hazırlanan fonksiyonel monomer (MAAP), kompleks monomer (MAAP-Ce(III)) ve protein baskılı kriyojel polimerlerin (p-HEMA-MAAP-Ce(III)) karakterizasyon işlemleri IR, Near-IR ve SEM-EDX spektrumları ile yapılmış elde edilen sonuçlar hedeflenen baskılama malzemelerin

oluştuğunu desteklemiştir. Ayrıca hazırlanan polimerlerin SEM görüntüleri alınmış, bu görüntüler sayesinde polimerlerin baskı bölgelerinin boyutu ve yüzey formolojileri analiz edildi.

Karakterizasyon işlemlerinden sonra her bir protein (hemoglobin, myoglobin ve sitokrom-C) için ayrı ayrı baskılanmış kriyojel polimerler sentezlendi. Sentezlenen kriyojel polimerler belirtilen proteinlerin bağlanma optimizasyonu deneylerinde kullanıldı.

1. **Hemoglobin Saflaştırılması:** hazırlanan hemoglobin baskılı kriyojel polimer kullanılarak sulu çözeltide ve kan serumunda bulunan hemoglobinin yüksek seçicilik ile ayrılması ve saflaştırılması için yapılan deneylerde, pH, akış hızı, başlangıç hemoglobin derişimi, sıcaklık, elektrolit (tuz) etkisi gibi parametreler incelendi ve bağlanma veriminin en yüksek olduğu pH değerinin 5,0 olduğu, akış hızı artmasının bağlanma veriminde çok fazla değişiklik meydana getirmediği, bağlanma veriminin ortam sıcaklığından çok fazla etkilenmediği tespit edildi. Elde edilen optimum koşullarda hazırlanan kriyojel kolonun hemoglobin bağlama kapasitesinin gram kriyojel başına 79,4 mg hemoglobin olduğu, aynı koşullarda baskılanmamış kriyojel polimerin hemoglobin bağlama kapasitesinin ise gram kriyojel başına 20,0 mg hemoglobin olduğu tespit edilmiş olup elde edilen bu sonuça baskılama işleminin bağlama verimini % 550'ler civarında arttırdığı görüldü. Ayrıca hazırlanan baskılı kriyojel polimerin tekrar kullanım sayısını ve buna bağlı olarak dayanıklılığını tespit etmek amacıyla ardışık 10 tekrar deneyi yapıldı ve kriyojel polimerin bağlama veriminde bir azalma olmadığı tespit edildi. Çalışmanın devamında sulu çözeltide bir arada bulunan hemoglobin, myoglobin ve sitokrom-C içeren karışımdan hemoglobinin seçici olarak ayrılması için tespit edilen optimum koşullarda yapılan deneylerde, hemoglobin baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerinin hemoglobin bağlama verimi % 87,40 olurken, myogolobin ve sitokrom-C için sırasıyla % 18,60 ve % 17,00 olduğu tespit edildi. Son olarak kan serumunda bulunan hemoglobinin bağlanması için yapılan deneylerde, hemoglobin baskılanmış (MIP) polimerin bağlama veriminin % 94,3 olduğu, baskılanmamış (NIP) kriyojel polimerlerin ise % 34,3 olduğu tespit edildi.

2. **Myoglobin Saflaştırılması:** hazırlanan myoglobin baskılı kriyojel polimer kullanılarak sulu çözeltide ve kan serumunda bulunan myoglobinin yüksek seçicilik ile ayrılması ve saflaştırılması için yapılan deneylerde, pH, akış hızı, başlangıç hemoglobin derişimi, sıcaklık, elektrolit (tuz) etkisi gibi parametreler incelenmiş, bağlanma veriminin en yüksek olduğu pH değerinin 4,0 olduğu, akış hızı artmasının bağlanma veriminde çok fazla değişiklik meydana getirmediği, bağlanma veriminin düşük sıcaklıkta düştüğü ancak oda ve vücut sıcaklığında değişmediği tespit edildi. Elde edilen optimum koşullarda hazırlanan kriyojel kolonun myoglobin bağlama kapasitesinin gram kriyojel başına 68,0 mg myoglobin olduğu, aynı koşullarda baskılanmamış kriyojel polimerin myoglobin bağlama kapasitesinin ise gram kriyojel başına 19,0 mg myoglobin olduğu tespit edilmiş olup elde edilen bu sonuça baskılama işleminin bağlama verimini % 370'ler civarında arttırdığı görüldü. Ayrıca hazırlanan baskılı kriyojel polimerin tekrar kullanım sayısını ve buna bağlı olarak dayanıklılığını tespit etmek amacıyla ardışık 10 tekrar deneyi yapıldı ve kriyojel polimerin bağlama veriminde bir azalma olmadığı tespit edildi. Çalışmanın devamında sulu çözeltide bir arada bulunan myoglobin, hemoglobin ve sitokrom-C içeren karışımdan myoglobinin seçici olarak ayrılması için tespit edilen optimum koşullarda yapılan deneylerde, myoglobin baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerinin myoglobin bağlama verimi % 87,6 olurken, myogolobin ve sitokrom-C için sırasıyla % 16,4 ve % 25,0 olduğu tespit edildi. Son olarak kan serumunda bulunan hemoglobinin bağlanması için yapılan deneylerde, hemoglobin baskılanmış (MIP) polimerin bağlama veriminin % 91,7 olduğu, baskılanmamış (NIP) kriyojel polimerlerin ise % 28,7 olduğu tespit edildi.
3. **Sitokrom-C Saflaştırılması:** hazırlanan sitokrom-C baskılı kriyojel polimer kullanılarak sulu çözeltide ve kan serumunda bulunan sitokrom-C'nin yüksek seçicilik ile ayrılması ve saflaştırılması için yapılan deneylerde, pH, akış hızı, başlangıç sitokrom-C derişimi, sıcaklık, elektrolit (tuz) etkisi gibi parametreler incelenmiş, bağlanma veriminin en yüksek olduğu pH değerinin 6,0 olduğu, akış hızı artmasının bağlanma veriminde çok fazla değişiklik meydana getirmediği, bağlanma veriminin düşük sıcaklıkta düştüğü ancak oda ve vücut

sıcaklığında değişmediği tespit edildi. Elde edilen optimum koşullarda hazırlanan kriyojel kolonun sitrokrom-C bağlama kapasitesinin gram kriyojel başına 98,3 mg sitokrom-C olduğu, aynı koşullarda baskılanmamış kriyojel polimerin sitokrom-C bağlama kapasitesinin ise gram kriyojel başına 18,2 mg sitokrom-C olduğu tespit edilmiş olup elde edilen bu sonuça baskılama işleminin bağlama verimini % 540'lar civarında arttırdığı görüldü. Ayrıca hazırlanan baskılı kriyojel polimerin tekrar kullanım sayısını ve buna bağlı olarak dayanıklılığını tespit etmek amacıyla ardışık 10 tekrar deneyi yapıldı ve kriyojel polimerin bağlama veriminde bir azalma olmadığı tespit edildi. Çalışmanın devamında sulu çözeltide bir arada bulunan sitokrom-C, hemoglobin ve ve myoglobin içeren karışımdan sitokrom-C'nin seçici olarak ayrılması için tespit edilen optimum koşullarda yapılan deneylerde, sitokrom-C baskılı p-HEMA-MAAP-Ce(III) kriyojel polimerinin sitokrom-C bağlama verimi % 91,8 olurken, hemoglobin ve myoglobin için sırasıyla % 14,6 ve % 23,4 olduğu tespit edildi. Son olarak kan serumunda bulunan sitokrom-C'nin bağlanması için yapılan deneylerde, sitokrom-C baskılanmış (MIP) polimerin bağlama veriminin % 92,8 olduğu, baskılanmamış (NIP) kriyojel polimerlerin ise % 24,0 olduğu tespit edildi.

Hemoglobin analizi özellikle anemik hastalıkların teşhisinde, myoglobin analizi özellikle kalp krizi, kas-doku ve böbrek rahatsızlıklarının teşhisinde, sitokrom-C analizi ise kan yapısında ve hücre dokularında bulunan iyonların miktar tayininde ve buna bağlı oluşabilecek hastalıkların teşhisinde kullanılabileceği düşünüldüğünde, belirtilen proteinlerin analizinin önemi ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda hazırlanan protein baskılı polimerlerin sulu çözeltide ve kan serumunda bulunan hemoglobin, myoglobin ve sitokrom-C gibi canlı organizmada oldukça etkin işlevlere sahip olan proteinlerin yüksek seçicilik ile bulundukları matrixlerden ayrılması ve analizlerinin daha sağlıklı bir şekilde yapılmasına oldukça önemli katkılar sunduğu göz önüne alınırsa yapılan çalışmanın önemi ayrıca ortaya çıkmaktadır.

Son olarak çalışmanın devamında yapılması düşünülen ve öneri olarak sunulabilecek bir diğer önemli husus ise; hazırlanan baskılı polimerlerin Ce(III) iyonundan kaynaklı Near-IR (800-1200 nm) ve floresans özellik göstermesidir.

6. KAYNAKLAR

Aijaz A. M., Chanin N., Theeraphon P. 2017. Molecularly imprinted polymer for human viral pathogen detection. ***Materials Science and Engineering***: C 77; 1341-1348.

Alexander, C., Andersson, H. S., Andersson, L. I., Ansell, R. J., Kirsch, N., Nicholls, I. A., O'Mahony, J., Whitcombe, M. J. 2006. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. ***Journal of Molecular Recognition*** 19; 106–180.

Amin R. M., Elfeky S. A., Verwanger T., Krammer B. 2017. Fluorescence-based CdTe nanosensor for sensitive detection of cytochrome C. ***Biosensors and Bioelectronics*** 98; 415-420.

Anirudhan T. S., Alexander S. 2017 A potentiometric sensor for the trace level determination of hemoglobin in real samples using multiwalled carbon nanotube based molecular imprinted polymer**.** ***European Polymer Journal*** 97; 84-93.

Arvidsson P., Plieva, F. M., Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. 2003. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent**.** ***Journal of Chromatography A*** 986; 275–90.

Bakhshpour M., Tamahkar E., Andaç A., Denizli A. 2017. Surface imprinted bacterial cellulose nanofibers for hemoglobin purification**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 158; 453-459.

Baydemir G., Bereli N., Andaç M., Say R., Galaev I. Y., Denizli A. 2009. Bilirubin recognition via molecularly imprinted supermacroporous cryogels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 68; 33-38.

Büyüktiryaki S., Say R., Denizli A., Ersöz A. 2017. Phosphoserine imprinted nanosensor for detection of Cancer Antigen 125. Talanta 167; 172-180.Cieplak M., Kutner W. 2016. Artificial Biosensors: How Can Molecular Imprinting Mimic Biorecognition?. Trends in Biotechnology 34; 922-94.

Çorman M. E. 2018. Poly-l-lysine modified cryogels for efficient bilirubin removal from human plasma. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 167; 291-298.

Dabrowski M., Lach P., Cieplak M, Kutner M. 2018. Nanostructured molecularly imprinted polymers for protein chemosensing. ***Biosensors and Bioelectronics*** 102; 17-26.

Deshmukh K., Tanwar Y. S., Shende P., Cavalli R. 2015. Biomimetic estimation of glucose using non-molecular and molecular imprinted polymer nanosponges. ***International Journal of Pharmaceutics*** 494; 244-248.

Díaz-Díaz G., Diñeiro G., Menéndez M. I., Blanco-López M. C., Lobo-Castañón M. J., Miranda-Ordieres A. J., Tuñón-Blanco P. 2011. Molecularly imprinted catalytic polymers with biomimetic chloroperoxidase activity. **Polymer** 52; 2468-2473.

Dolak İ., Keçili R, Hür D., Ersöz A., Say A. 2015. Ion-Imprinted Polymers for Selective Recognition of Neodymium(III) in Environmental Samples. Industrial&Engineering Chemistry Research 54; 5328-5335.

Dolak İ., Keçili R., Onat R., Ziyadanoğulları B., Ersöz A., Say R. 2018. Molecularly imprinted affinity cryogels for the selective recognition of myoglobin in blood serum, ***Journal of Molecular Structure*** (Baskıda).

Du X. W., Zhang Y. X., She Y. X., Liu G. Y., Zhao F. N., Wang J., Wang S. S., Jin F., Shao H., Jin M. J., Zheng L. F. 2016. Fluorescent competitive assay for melamine using dummy molecularly imprinted polymers as antibody mimics. ***Journal of Integrative Agriculture*** 15; 1166-1177.

Ersöz A., Say R., Denizli A. 2004. Ni(II) ion-imprinted solid-phase extraction and preconcentration in aqueous solutions by packed-bed columns. **Analytica Chimica Acta** 502; 91-97.

Ersöz A., Denizli A., Şener İ., Atılır A., Diltemiz S., Say R. 2004. Removal of phenolic compounds with nitrophenol-imprinted polymer based on π–π and hydrogen-bonding interactions. **Separation and Purification Technology** 38; 173-179.

Ersöz A., Diltemiz S E., Özcan A A., Denizli A., Say R. 2009. 8-OHdG sensing with MIP based solid phase extraction and QCM technique**. Sensors and Actuators B: Chemical** 137; 7-11.

Escobar C. C., Ruiz Y. P. M., Santos J. H. Z., Ye L. 2018. Molecularly imprinted TiO2 photocatalysts for degradation of diclofenac in water. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** 538; 729-738.

Gama M. R., Bottoli C. B. G. 2017. Molecularly imprinted polymers for bioanalytical sample preparation**.** ***Journal of Chromatography*** B 1043; 107-121.

Gao R., Cui X., Hao Y., He G., Zhang M., Tang Y. 2016. Preparation of Cu2+-mediated magnetic imprinted polymers for the selective sorption of bovine hemoglobin. ***Talanta*** 150; 46-53.

Glad T., Glad M., Norrlöw S., Sellergren B., Siegbahn N., Mosbach K. 1985. Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica . ***Journal of Chromatography***,347; 11–23.

Guan J., Guan Y. X., Yun J. X., Yao S. J. 2018. Chromatographic separation of phenyllactic acid from crude broth using cryogels with dual functional groups. ***Journal of Chromatography*** A 1554; 92-100.

Gui W., Wang H., Liu Y., Ma Q. 2018. Ratiometric fluorescent sensor with molecularly imprinted mesoporous microspheres for malachite green detection. **Sensors and Actuators B: Chemical** 266; 685-691.

Guo T.Y., Xia Y. Q., Hao G. J., Song M. D., Zhang B. H. 2004. Adsorptive separation of hemoglobin by molecularly imprinted chitosan beads. **Biomaterials** 25; 5905-5912.

Guo J., Wang Y., Liu Y., Zhang C., Zhou Y. 2015. Magnetic-graphene based molecularly imprinted polymer nanocomposite for the recognition of bovine hemoglobin. ***Talanta*** 144; 411-419.

Guo T., Deng Q., Fang G., Liu C., Huang X., Wang S. 2015. Molecularly imprinted upconversion nanoparticles for highly selective and sensitive sensing of Cytochrome c. ***Biosensors and Bioelectronics*** 74; 498-503.

Gültekin A., Ersöz A., Denizli A., Say R. 2012. Preparation of new molecularly imprinted nanosensor for cholic acid determination. **Sensors and Actuators B: Chemical** 162; 153-158.

Gültekin A., Karanfil A., Kuş M., Sönmezoğlu S., Say R. 2014. Preparation of MIP-based QCM nanosensor for detection of caffeic acid. ***Talanta*** 119; 533-537.

Güven İ., Gezici O., Bayrakçı M., Morbidelli M. 2018. Calixarene-immobilized monolithic cryogels for preparative protein chromatography. ***Journal of Chromatography A*** 1558; 59-68.

Güzel R., Ersöz A., Dolak İ., Say R. 2017. Multistate proteinous biomemory device based on redox controllable hapten cross-linker. ***Materials Science and Engineering: C*** 79; 336-342.

Hajizadeh S., Kettisen K., Gram M., Bülow L., Ye L. 2018. Composite imprinted macroporous hydrogels for haemoglobin purification from cell homogenate. ***Journal of Chromatography A*** 1534; 22-31.

Hasanzadeh M., Shadjou S., Guardia M. 2018. Cytosensing of cancer cells using antibody-based molecular imprinting: A short-review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry** 99; 129-134.

Hashim S. N. N. S., Boysen R. I., Schwarz L. J., Danylec B., Hearn M. T. W. 2014. A comparison of covalent and non-covalent imprinting strategies for the synthesis of stigmasterol imprinted polymers. ***Journal of Chromatography A*** 1359; 35-43.

Jia M., Zhang Z., Li J., Ma X., Chen L., Yang X. 2018. Molecular imprinting technology for microorganism analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, (Baskıda).

Kan X., Xing Z., Zhu A., Zhao Z., Xu G., Li C., Zhou H. 2012. Molecularly imprinted polymers based electrochemical sensor for bovine hemoglobin recognition. **Sensors and Actuators B: Chemical** 168; 395-401.

Keçili R., Say R., Yavuz H. 2006. Synthesis and characterization of pseudo-affinity ligand for penicillin acylase purification. International Journal of **Biological Macromolecules** 39; 250-255.

Keçili R., Dolak İ., Ziyadanoğulları B., Ersöz A., Say R. 2018. Ion imprinted cryogel-based supermacroporous traps for selective separation of cerium(III) in real samples. ***Journal of Rare Earths*** 36; 857-862.

Kilpatrick W.S., Wosornu D., McGuiness J.B., Glen A.C.A. 1993. Early diagnosis of acute myocardial infarction: CK-MB and myoglobin compared. **Annals of Clinical Biochemistry** 30; 435–438.

Kirsebom, H., Mattiasson, B. 2011. Cryostructuration as a tool for preparing highly porous polymer materials. **Polymer Chemistry** 2; 1059-1062.

Kumar N., Narayanan N., Gupta S. 2018. Application of magnetic molecularly imprinted polymers for extraction of imidacloprid from eggplant and honey. **Food Chemistry** 255; 81-88.

Li J., Ma X., Li M., Zhang Y. 2018. Does polysaccharide is an idea template selection for glycosyl imprinting?. ***Biosensors and Bioelectronics*** 99; 438-442.

Li Q., Ling B., Jiang L., Ye L. 2018. A paradigm shift design of functional monomers for developing molecularly imprinted polymers. ***Chemical Engineering Journal*** 350; 217-224.

Lian Z., Wang J. 2018. Selective detection of chloramphenicol based on molecularly imprinted solid-phase extraction in seawater from Jiaozhou Bay China Marine**.** **Pollution Bulletin** 133; 750-755.

Liu C., Shang L., Yoshioka H., Chen B., Hayashi K. 2018. Preparation of molecularly imprinted polymer nanobeads for selective sensing of carboxylic acid vapors. **Analytica Chimica Acta** 1010; 1-10.

Lozinsky, V.L., Plieva, F. M., Galaev I. Y., Mattiasson B. 2002, The potential of polymeric cryogels in bioseparation. **Bioseparation** 10; 163–88.

Lv P., Xie D., Zhang Z. 2018. Magnetic carbon dots based molecularly imprinted polymers for fluorescent detection of bovine hemoglobin. ***Talanta*** 188; 145-151.

Mathew D., Thomas B., Devaky K. S. 2018. Biomimetic recognition and peptidase activities of transition state analogue imprinted chymotrypsin mimics. Reactive and Functional **Polymers** 124; 121-128.

Monier M., Shafik A.L., Abdel-Latif D. A. 2018. Surface molecularly imprinted amino-functionalized alginate microspheres for enantio-selective extraction of l-ascorbic acid. Carbohydrate **Polymers** 195; 652-661.

Moreira F. T. C., Dutra R. A. F., Noronha J. P. C., Sales M. G. F. 2013. Electrochemical biosensor based on biomimetic material for myoglobin detection. **Electrochimica Acta** 107; 481-487.

Mosbach, K. 2001. Toward the next generation of molecular imprinting with emphasis on the formation, by direct molding of compounds with biological activity (biomimetics). **Analytica Chimica Acta** 435; 1-9.

Naka T., Jones D., Baldwin I., Fealy N., Bates S., Goehl H., Morgera S., Neumayer H.H., Bellomo R. 2005. Myoglobin clearance by super high-flux hemofiltration in a case of severe rhabdomyolysis: a case report. **Critical Care** 9; 90–95.

Nelson D. V., Cox M.M. 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri (Çeviri: N. Kılıç) 3. **Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara**.

Nurlin A. S., Sánchez-Martín M. J., Sebastián R. M., Valiente M., López-Mesas M. 2018. Molecularly imprinted polymer for the removal of diclofenac from water: Synthesis and characterization. ***Science of The Total Environment*** 631; 1534-1543.

Odabaşı M., Say R., Denizli A. 2007. Molecular imprinted particles for lysozyme purification. **Materials Science and Engineering**: C 27; 90-99.

Okutucu B., Önal S. 2011. Molecularly imprinted polymers for separation of various sugars from human urine. ***Talanta*** 87; 74-79.

Osman B. 2011. Miyoglobin Tayinine Yönelik Moleküler Baskılanmış Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensör Hazırlanması. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Osman B., Uzun L., Beşirli N., Denizli A. 2013. Microcontact imprinted surface plasmon resonance sensor for myoglobin detection. ***Materials Science and Engineering***: C 33; 3609-3614.

Özkütük E. B., Diltemiz S. E., Özalp E., Say R., Ersöz A. 2013. Ligand exchange based paraoxon imprınted QCM sensor. **Materials Science and Engineering: C** 33; 938-942.

Panagiotopoulou M., Kunath S., Ximena P., Rangel M., Haupt K., Bui B. T. S. 2017. Fluorescent molecularly imprinted polymers as plastic antibodies for selective labeling and imaging of hyaluronan and sialic acid on fixed and living cells. ***Biosensors and Bioelectronics*** 88; 85-93.

Piletsky A.S., Alcock S., Turner A.P.F. 2001. Molecular imprinting : at the edge of the third millenium. **Trends in Biotechnology** 19; 9-12.

Ribeiro J. A., Pereira C. M., Silva A. F., Sales M. G. F. 2017. Electrochemical detection of cardiac biomarker myoglobin using polyphenol as imprinted polymer receptor. **Analytica Chimica Acta** 981; 41-52.

Say R. 2006. Creation of recognition sites for organophosphate esters based on charge transfer and ligand exchange imprinting methods. **Analytica Chimica Acta** 579; 74-80.

Shabi A. Z. 2018. Development of molecular imprinted polymers based strategies for the determination of Dopamine. **Sensors and Actuators B: Chemical** 265; 488-497.

Shumyantseva V. V., Bulko T. V., Sigolaeva L. V., Kuzikova A. V., Archakov A. I. 2016. Electrosynthesis and binding properties of molecularly imprinted poly-o-phenylenediamine for selective recognition and direct electrochemical detection of myoglobin. ***Biosensors and Bioelectronics*** 86; 330-336.

Shumyantseva V. V., Bulko T. V., Sigolaeva, Kuzikova A. V., Pogodin P. V., Archakov A. I. 2018. Molecular imprinting coupled with electrochemical analysis for plasma samples classification in acute myocardial infarction diagnostic. ***Biosensors and Bioelectronics*** 99; 216-222.

Tamahkar E., Kutsal T., Denizli A. 2015. Surface imprinted bacterial cellulose nanofibers for cytochrome c purification. **Process Biochemistry** 50; 2289-2297.

Tripathi A., Kathuria N., Kumar A. 2009. Elastic and macroporous agarosegelatin cryogels with isotropic and anisotropic porosity for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 90; 680-694.

Tripathi M.P., Baranwal V.K., Pandey R.K., Singh O.P. 2013. A new numerical algorithm to solve fractional differential equations based on operational matrix of generalized hat functions. **Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation** 18; 1327-1340.

Uysal A., Demirel G., Turan E., Çaykara T. 2008. Hemoglobin recognition of molecularly imprinted hydrogels prepared at different pHs. **Analytica Chimica Acta** 625; 110-115.

Vaidya H.C. 1994. Myoglobin: an early biochemical marker for the diagnosis of acute myocardial infarction. ***Journal of Clinical Immunoassay*** 17; 35–39.

Wang D., Gao D., Xu W., Li F., Yin M., Fu Q., Xi Z. 2018. Magnetic molecularly imprinted polymer for the selective extraction of hesperetin from the dried pericarp of Citrus reticulata Blanco. ***Talanta*** 184; 307-315.

Wang Z., Li F., Xia J., Xia L., Zhang F., Bi S., Shi G., Xia Y., Liu J., Li Y., Xia L. 2014. An ionic liquid-modified graphene based molecular imprinting electrochemical

sensor for sensitive detection of bovine hemoglobin. ***Biosensors and Bioelectronics*** 61; 391-396.

Weber M., Rau M., Madlener K., Elsaesser A., Bankovic D., Mitrovic V., Hamm C. 2005. Diagnostic utility of new immunoassays for the cardiac markers cTnI, myoglobin and CK-MB mass. **Clinical Biochemistry** 38; 1027–1030.

Wullf G., Sahran A. 1972. The use of polymers with enzyme-analogus structures for the resolution of racemates. Angew. **Chemical International Edit England** 11; 341-363.

Yan Y., He X., Li W., Zhang Y. 2017. Nitrogen-doped graphene quantum dots-labeled epitope imprinted polymer with double templates via the metal chelation for specific recognition of cytochrome c. ***Biosensors and Bioelectronics*** 91; 253-261.

Yang Q., Li J., Wang X., Peng H., Xiong H., Chen L. 2018. Strategies of molecular imprinting-based fluorescence sensors for chemical and biological analysis ***Biosensors and Bioelectronics*** 112; 54-71.

Yavuz H., Say R., Denizli A. 2005. Iron removal from human plasma based on molecular recognition using imprinted beads. **Materials Science and Engineering**: C 25; 521-528.

Yeşilova E., Osman B., Kara A., Özer E. T. 2018. Molecularly imprinted particle embedded composite cryogel for selective tetracycline adsorption. **Separation and Purification Technology** 200; 155-163.

Zhang L., Zhu C., Chen C., Zhu S., Zhou J., Wang M., Shang P. 2018. Determination of kanamycin using a molecularly imprinted SPR sensor. **Food Chemistry** 266; 170-174.

Zhang M., Wang Y., Jia X., He M., Xu M., Yang S., Zhang C. 2014. The preparation of magnetic molecularly imprinted nanoparticles for the recognition of bovine hemoglobin. **Talanta** 120; 376-385.

Zhang X., Yang S., Jiang R., Sun L, Pang S., Luo A. 2018. Fluorescent molecularly imprinted membranes as biosensor for the detection of target protein **Sensors and Actuators B: Chemical** 254; 1078-1086.

Zhao C., Ma X., Li J. 2017. An Insulin Molecularly Imprinted Electrochemical Sensor Based on Epitope Imprinting. **Chinese Journal of Analytical Chemistry** 45; 1360-1366.

Zhao W., Zhang R., Xu S., Cai J., Zhua X.,, Zhu Y., Wei W., Liu X., Luo J. 2018. Molecularly imprinted polymeric nanoparticles decorated with Au NPs for highly sensitive and selective glucose detection. ***Biosensors and Bioelectronics*** 100; 497-503.

Zhao W., Yang H., Xu S., Cai J., Luo J., Wei W., Liu X., Zhu Y. 2018. Preparation of molecularly imprinted polymer/Au nanohybrids as an effective biosensing material. Colloids and Surfaces A: **Physicochemical and Engineering Aspects** 555; 95-102

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı:RUKEN

Soyadı:ONAT

No:14803505

Medeni Durum:BEKAR

Eğitim Bilgileri

ÜNİVERSİTE:DİCLE ÜNV.FEN FAK.KİMYA BÖLÜMÜ(2004-2008)

YÜKSEK LİSANS:DİCLE ÜNV.FEN BİLİMLERİ ENS.ANALİTİK KİMYA (2009-2011)

DOKTORA:DİCLE ÜNV.FEN BİLİMLERİ ENS.ANALİTİK KİMYA (2014-2019)

İletiişim Bilgileri

GMAİL:rukenonat@gmail.com

TEL:05541409175

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	RUKEN ONAT
ÖĞRENCİ NO	14803505
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2018-2019
YARIYIL	☐ Güz
ANABİLİM DALI	KİMYA
PROGRAM	Doktora
TEZ KONUSU	LANTANİD İÇERİKLİ MOLEKÜLER BASKILI KRİYOJEL POLİMERLER KULLANILARAK KAN SERUMUNDA BULUNAN HEMOGLOBİN, MYOGLOBİN VE SİTOKROM-C PROTEİNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma SınavıSonrası
SAYFA SAYISI	89
BENZERLİK ORANI	%19
RAPORLAMA TARİHİ	11/02/ 2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 89 sayfalık kısmına ilişkin 11/02/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından TURNİKE adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %19 dur.

Uygulanan filtrelemeler:

☐Kabul/Onay sayfaları hariç,
☐Kaynakça hariç
☐Alıntılar hariç/dâhil
☐Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(Öğrencinin Adı Soyadı)RUKEN ONAT 11/02/2019
(İMZA/TARİH)

PROF.DR.BERRİN ZİYADANOĞULLARI
.....
Tez Danışmanı
(İMZA/TARİH)
11/02/2019

PROF.DR.HALUK AYDIN
.....
Anabilim Dalı Başkanı
(İMZA/TARİH)
11/02/2019

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.