

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSÜLİN BASKILANMIŞ POLİ (HEMA-MAH)
KRİYOJELLERİN HAZIRLANMASI**

Aynur ÇAVUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Aralık 2011

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Aynur ÇAVUŞ tarafından yapılan “İnsülin Baskılanmış Poli(HEMA-MAH) Kriyojellerin Hazırlanması” konulu bu çalışma , jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. Çetin AYTEKİN

Üye : Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL (Danışman)

Üye : Doç. Dr. Fikret UYAR

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 28/12/2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2012

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Bu çalıőmanın gerçekleşmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen, gösterdiği ilgi ve emek ile çalıőmanın sonuca ulaőmasını sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Zübeyde Baysal' a teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarımda yakın ilgisini grdğim, bilgi ve tecbelerinden faydalandığım Biyokimya Anabilim Dalı Baőkanı Prof. Dr. M. etin Aytekin' e teşekkür ederim.

Hacettepe niversitesi' nin olanaklarından faydalanmamı sağlayan Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Oğretim yesi Prof. Dr. Adil Denizli, Uzman Nilay Bereli ve Biyokimya alıőma grubuna teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Alkan ve Dr. Murat Yavuz' a ve teşekkür ederim.

Çalıőmalarım sırasında manevi desteğini grdğim arkadaőım Ayőegül Ayla ve diğer arkadaőlarıma teşekkür ederim.

Bu alıőmaya DÜBAP-09-FF-70 no' lu araştırma projesi olarak maddi destek veren DÜBAP' a teşekkür ederim.

Her türlü maddi ve manevi özveride bulunarak, beni her konuda destekleyen sevgili aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
ÇİZELGE LİSTESİ	VII
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
EK LİSTESİ	X
KISALTMA VE SİMGELER	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Afinite Kromatografisi.....	1
1.2. Kriyojeller.....	1
1.3. Moleküler Baskılama.....	3
1.4. İnsülin.....	4
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
2.1. Afinite Kromatografisi.....	7
2.1.1. Matriks Seçimi.....	12
2.1.2. Afinite Ligandın Seçimi.....	13
2.1.3. Uzatıcı Kollar.....	16
2.2. Kriyojeller.....	18
2.3. Moleküler Baskılama Teknolojisi.....	23
2.3.1. Moleküler Baskılama Yöntemleri.....	25
2.3.1.1. Kovalent Baskılama.....	25
2.3.1.2. Non- Kovalent Baskılama.....	26
2.3.1.3. Kovalent Bağlanma ile Non- Kovalent Bağlanmanın Avantajları ve Dezavantajları.....	26

2.3.2. Moleküler Baskılı Polimerlerin Uygulama Alanları.....	27
2.4. İnsülin	29
2.4.1. İnsülinin Yapısı.....	30
2.4.2. İnsülinin Metabolik Etkileri	34
2.4.2.1. Karbohidrat Metabolizması Üzerine Etkileri.....	34
2.4.2.2. Lipid Metabolizması Üzerine Etkileri.....	35
2.4.2.3. Protein Sentezi Üzerine Etkileri.....	35
2.4.3. Glukagon.....	35
2.5. Önceki Çalışmalar.....	36
3. MATERİYAL VE METOT.....	41
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	41
3.2. Kullanılan Cihazlar	41
3.3. Tampon Çözeltiler	41
3.4. MAH Sentezi	41
3.5. Süpermakrogözenekli İnsülin Baskılı Kriyojellerin Hazırlanması.....	42
3.6. İnsülinin Uzaklaştırılması.....	42
3.7. Kriyojelin Karakterizasyonu.....	42
3.7.1. Şişme Testi.....	42
3.7.2. Yüzey Morfolojisi Deneyi.....	43
3.7.3. FT-IR Çalışmaları.....	43
3.8. İnsülin Adsorpsiyon Dinamiklerinin Belirlenmesi	43
3.9. Standart İnsülin Eğrisi	44
3.10. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	47
4.1. Şişme Deneyi	47
4.2. Yüzey Morfolojisi	48
4.3. FT-IR Çalışmaları.....	48

4.4. Standart İnsülin Eğrisinin Belirlenmesi	51
4.5. İnsülin Başlangıç Derişiminin Etkisi	51
4.6. İnsülin Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisi	52
4.7. İnsülin Adsorpsiyonuna pH' nın Etkisi	53
4.8. İnsülin Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi	53
4.9. İnsülin Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisi	54
4.10. İnsülin Adsorpsiyon İzotermi.....	55
4.11. Tekrar Kullanılabilirliğin Belirlenmesi.....	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
6. KAYNAKLAR	65
EKLER	75
ÖZGEÇMİŞ	77

ÖZET

İNSÜLİN BASKILANMIŞ POLİ (HEMA-MAH) KRİYOJELLERİN HAZIRLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aynur ÇAVUŞ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2011

İnsülin canlı sistemde glukoz düzeyinin kontrolünü sağlayan ve metabolizma üzerinde önemli etkileri olan bir hormondur. İnsülin üretimi veya insülin kullanımı azaldığında diabetik hastalıklar oluşmaktadır. İnsülinin ayrılması, saflaştırılması veya saf proteinler, diabetik ilaçların saf materyallerini oluşturdukları için büyük bir öneme sahiptirler. Bu noktada adsorpsiyon yoluyla proteinlerin saflaştırılması biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalar için oldukça önemlidir.

Çalışmada insülin adsorpsiyonu için afinite adsorpsiyon tekniği çalışıldı. Bu amaçla insülin adsorpsiyonu için insülin-baskılı süpermakrogözenekli kriyojel hazırlandı. N-metakriloil-L-histidin metilester (MAH) monomer olarak seçildi. MAH, Hacettepe Üniv. Fen Fak. Kimya Bölümü, Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda Prof. Dr. Adil Denizli ve çalışma grubu tarafından metakriloil klorür ve L-histidin metil esterden sentezlendi.

İlk aşamada insülin MAH ile komplekştirilerek, insülin baskılı p(HEMA-MAH) kriyojel serbest polimerizasyon reaksiyonu ile polihidroksimetakrilat p(HEMA), N,N,N',N'- tetrametildiamit (TEMED) ve amonyum persülfat (APS) ile buz banyosunda hazırlandı. Daha sonra 0.1 M Glisin- HCl tamponu (pH: 3.5) ile insülin kriyojelden uzaklaştırıldı. Kriyojel taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier infrared spektroskopisi (FT-IR) ve şişme testi ile karakterize edildi. P(HEMA) için kriyojelin denge şişme oranı 8.56 g H₂O / g polimer ve insülin baskılanmış p(HEMA-MAH) için 7.2 g H₂O / g polimer olarak bulundu. İnsülin adsorpsiyon çalışmaları sürekli sistemlerde farklı şartlar altında (akış hızı, ortamın pH'sı, insülin konsantrasyonu, sıcaklık ve iyonik şiddet gibi) araştırıldı. Sulu çözeltide p(HEMA-MAH) kriyojelin, insülin adsorpsiyon kapasitesi 8.13 g H₂O / g polimer olarak belirlendi. Adsorpsiyon kapasitesinde anlamlı bir azalma olmaksızın, p(HEMA-MAH) kriyojeli ile insülinin tekrarlanabilir bir şekilde adsorplandığı-desorplandığı gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: insülin, afinite adsorpsiyon, moleküler baskılı polimer, poli (HEMA-MAH), kriyojel.

ABSTRACT

PREPARATION OF INSULIN-IMPRINTED POLY(HEMA-MAH) CRYOGELS

MSc THESIS

Aynur ÇAVUŞ

UNIVERSITY OF DICLE
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

2011

Insulin is one of the most important hormone and it has profound effects on metabolism by controlling of glucose homeostasis. When insulin production or the use of insulin ability decrease these disorders cause diabetic illness. Separation and purification of insulin or purified proteins are very important because of to obtain as a purified raw materials of diabetics drugs. Protein separation techniques gain more importance at this point. Protein purification via adsorption is of significant importance in biomedical and biotechnological purposes.

In present study, affinity adsorption technique is studied for insulin adsorption. For this aim insulin-imprinted supermacroporous cryogel was prepared for the insulin adsorption. N-methacryloyl- L- histidin methylester (MAH) was chosen as the monomer. MAH was synthesized using methacryloyl chloride and L- histidinemethyl ester by Hacettepe University Faculty of Science Department of Biochemistry Prof. Dr. Adil Denizli's group.

In the first step, insulin was complexed with MAH and insulin-imprinted p(HEMA-MAH) cryogel was prepared by free radical polymerization by polyhydroxymethacrylate p(HEMA), N,N,N',N'- tetrametiletilediamin (TEMED) and ammonium persulphate (APS) in an ice bath. Then, insulin was removed from cryogel by using 0.1 M glycine-HCl buffer (pH: 3.5). Cryogel was characterized by using scanning electron microscopy (SEM), Fourier transfer infrared spectroscopy and swelling test. The equilibrium swelling ratios of the cryogels were 8.56 g H₂O/g polymer for p(HEMA) and 7.20 g H₂O/g polymer for insulin-imprinted p(HEMA-MAH). Insulin adsorption experiments were carried out under different conditions in continuous system (i.e., flow rate, medium pH, insulin concentration, temperature and ionic strength). Insulin adsorption capacity of p(HEMA-MAH) cryogel from aqueous solution was found to be 8.13 mg/g polymer. It was observed that insulin could be repeatedly adsorbed and desorbed with p(HEMA-MAH) cryogel without any significant loss in the adsorption capacity.

Key words: insulin, affinity adsorption, molecularly imprinted polymer, poly(HEMA-MAH), cryogel

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1.	Kromatografik teknikler	8
Çizelge 2.2.	Afinite kromatografisinin dalları	11
Çizelge 2.3.	Afinite kromatografisi için bazı katı destek türleri	13
Çizelge 2.4.	Afinite kromatografisinde kullanılan bazı ligand grupları	15
Çizelge 2.5.	Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler	16
Çizelge 2.6.	Memeli türlerinde insülin yapısındaki farklılıklar	32
Çizelge 4.1.	Langmuir ve Freundlich izotermlerinin adsorpsiyon katsayıları	57

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Kriyojelleşme olayı	2
Şekil 1.2. Moleküler baskılama	3
Şekil 2.1. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi	9
Şekil 2.2. Afinite de saflaştırma basamakları	10
Şekil 2.3. Uzatıcı kolun fonksiyonunun temeli	17
Şekil 2.4. Afinite kromatografisinde kullanılan bazı uzatıcı kollar	18
Şekil 2.5. Kriyojel ve jelin SEM fotoğrafı	19
Şekil 2.6. Kriyojelleşme olayı	20
Şekil 2.7. Kriyojellerin gözenekliliği	21
Şekil 2.8. Süpermakrogözenekli kriyojellerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri	22
Şekil 2.9. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi	24
Şekil 2.10. Kovalent moleküler baskılama yöntemi	25
Şekil 2.11. Non- kovalent moleküler baskılama yöntemi	26
Şekil 2.12. MIP’de kalıp-fonksiyonel monomer etkileşimleri	28
Şekil 2.13. İnsan insülin molekülü	30
Şekil 2.14. İnsülinin üç boyutlu yapısı	31
Şekil 2.15. Glukagon molekülü	35
Şekil 4.1a. Şişmiş ve kurutulmuş p(HEMA) kriyojel	47
Şekil 4.1b. Şişmiş ve kurutulmuş p(HEMA-MAH) kriyojel	47
Şekil 4.2. P(HEMA-MAH) kriyojelinin SEM görüntüsü	48
Şekil 4.3. P(HEMA-MAH) kriyojellerin molekül yapıları	49
Şekil 4.4. P(HEMA-MAH) kriyojellerin FT-IR spektrumu	50
Şekil 4.5. İnsülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojellerin FT-IR spektrumu	50

Şekil 4.6. Standart insülin eğrisi	51
Şekil 4.7. İnsülin başlangıç derişiminin etkisi	52
Şekil 4.8. İnsülin adsorpsiyonuna akış hızının etkisi	52
Şekil 4.9. İnsülin adsorpsiyonuna pH' ın etkisi	53
Şekil 4.10. İnsülin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi	54
Şekil 4.11. İnsülin adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi	54
Şekil 4.12. Langmuir adsorpsiyon izotermi	55
Şekil 4.13. Freundlich adsorpsiyon izotermi	56
Şekil 4.14. İnsülin baskılı kriyoje lin tekrar kullanılabilirliği	57

EKLER

Ek. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

75

KISALTMA VE SİMGELER

P(HEMA)	2-Hidroksietil metakrilat
P(HEMA-MAH)	2-Hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-histidin metilester
MAH	N- metakriloil-(L)-histidin metilester
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
MBAAm	N,N'-metilen-bis-akrilamid
APS	Amonyum persülfat
PVA	Polivinil alkol
PEG	Polietilen glikol
PAAM	Poliakrilamid
EDMA-MAH	Etilen glikol dimetakrilat-N-metakriloil-(L)-histidin
MIP	Moleküler baskılanmış polimerler
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
DEAE=SID	Silika-dextran
AGE	Alil glisidileter
MATrp	N-metakriloil-(L)-triptofan
PGMA	Poliglisidil metakrilat
EDMA	Etilen glikol dimetakrilat
P (TBA-co- AAm/MA)	N-tert- bütillakrilamit- co-akrilamit/ maleik asit
MAA	Metakrilik asit

1. GİRİŞ

1.1. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi biyolojik olarak aktif yapıların komplementer bileşenlerini çok seçici ve tersinir olarak bağlama özelliklerine dayalı bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir. Enzimlerin inhibitörleri, substratları veya kofaktörleri, aktif veya düzenleyici bölgeleri ile, nükleik asitlerin nükleotidlerle kompleksleri, hormon ve toksinlerin reseptörlerle meydana getirdiği kompleksler, taşıyıcı proteinlerin vitaminler ve şekerlerle oluşturdukları kompleksler afinite kromatografisine örnek olarak verilebilir.

Antikor ve antijenler, proteinler, hücreler ve ilaçlar gibi birçok biyolojik yapının kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak izole edilmesinde ve saflaştırılmasında kullanılan “afinite kromatografisi”, saflaştırma teknikleri arasında seçiciliği ve duyarlılığı ile eşsiz bir yere sahiptir. Klasik yöntemlerden farklı olarak, bu teknikte biyolojik moleküller çok seçici olarak “Biyolojik Tanıma” yeteneğine sahip “ligandlar” sayesinde saflaştırılmaktadır (Alkan 2009).

1.2. Kriyojeller

Kriyojeller donma sıcaklığının altında oluşan, süpermakrogözeneklere sahip üç boyutlu jel matrislerdir (Demiryas ve ark. 2007), (Alkan ve ark. 2009), (Baydemir ve ark. 2009), (Yılmaz ve ark. 2009). Kriyojel oluşumu sırasında, öncü çözünen parçacıklar, hızla donarak genellikle su gibi uygun bir çözücü içerisinde çözünür. İlerleyen aşamalarda çözücünün büyük kısmı donup birbirine bağlı buz kristalleri oluştururken, bu buz kristallerinin etrafındaki donmamış sıvıda bulunan polimer öncüleri polimerleşerek buz kristallerinin etrafında bir ağ yapısı oluştururlar. Tepkime tamamlanınca donmuş karışım oda sıcaklığına getirildiğinde buz kristalleri erir ve “**kriyojel**” olarak adlandırılan gözenekli polimer ağ yapısı elde edilir. Gözenek duvarının etrafındaki çözücünün yüzey geriliminden dolayı buz kristallerinin erimesi, kriyojellerdeki gözeneklerin dairesel şekle sahip olmalarını sağlar. Kriyojeller yüksek esneklik ve süngersi morfolojisiyle, yüksek ve düşük molekül ağırlıklı öncüllerle hazırlanır ve sulu ortamda serbest radikal polimerizasyon ile negatif sıcaklıkta üretilir (Plieva ve ark. 2004), (Plieva ve ark. 2005), (Plieva ve ark. 2006), (Plieva ve ark. 2007).

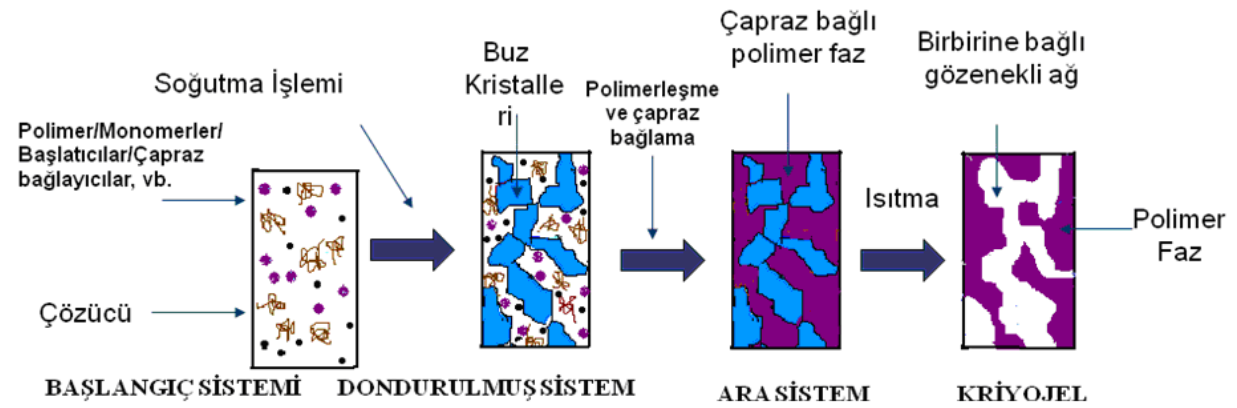
Kriyojellerin süngersi yapıları poliakrilamid (PAAM), polihidroksimetakrilat (PHEMA), polietilen glikol (PEG), polivinil alkol (PVA) temeline dayanır (Arvidsson ve ark. 2003), (Plieva ve ark. 2005), (Plieva ve ark. 2007).

Makrogözenekli kriyojellerin üretimi Şekil 1.1' de verilmektedir:

Üretim kısmen donmuş reaksiyon sisteminde gerçekleşmektedir. Buz kristalleri gözenek yapıcı olarak davranmakta ve polimerizasyon donmamış mikrofazda gerçekleşmektedir. Polimerleşme tamamlandıktan sonra, buz kristalleri eritilmektedir. Buz kristallerinin bulunduğu bölgelerde makrogözenekler oluşmaktadır. Bu makrogözeneklerin etrafında kriyojel oluşumu yoğun donmamış mikrofazda gerçekleşir.

Kriyojellerin uygulama alanları;

- Proteinlerin, mikroorganizmaların, hücrelerin vb. kromatografik ayırma işlemlerinde
- Biyomoleküllerin, hücrelerin vb. immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kullanılmaları şeklindedir.

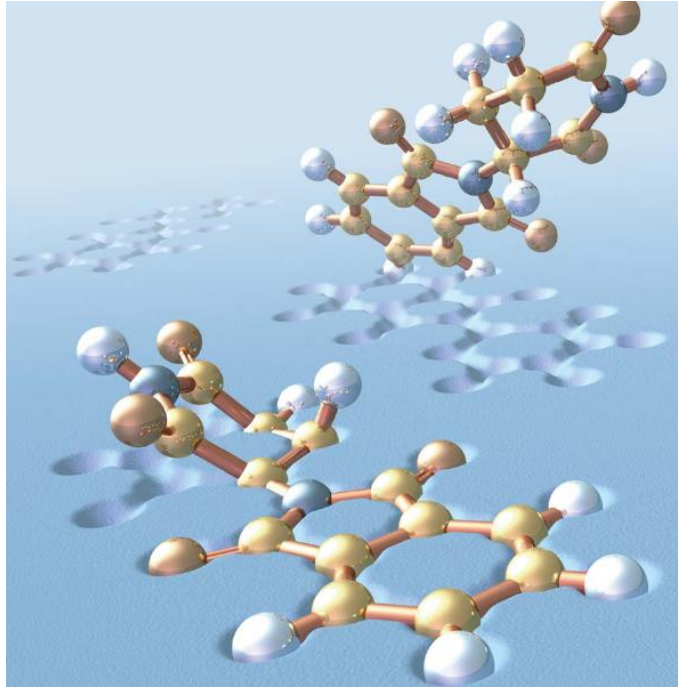


Şekil 1.1. Kriyojelleşme olayı

1.3. Moleküler Baskılama

Moleküler baskılama yöntemi ilk defa 1972 yılında Günter Wulff ve çalışma grubu tarafından ifade edilmiş ve polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda istenilen enzim tepkimelerinin substratlarını, ürünlerini veya geçiş analoglarını kalıp molekül olarak kullanarak bu yöntemle “YAPAY ENZİM” elde edilebileceğini de ifade etmişlerdir (Wulff ve Poll 1987).

Moleküler baskılama, ilgilenilen analit için seçici tanıma bölgelerine sahip polimerlerin hazırlanmasında kullanılan yöntemdir (Şekil 1.2). Moleküler baskılama yöntemi ile hazırlanan taşıyıcılar hedef moleküle yüksek afinite göstermesi nedeniyle oldukça önemlidir.



Şekil 1.2. Moleküler baskılama

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP); moleküler tanımaya elverişlidir, ucuzdur ve kolayca hazırlanabilir. Ayrıca moleküler baskılanmış polimerler yüksek mekanik özellikleri, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlıkları, asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücüler gibi ortamlardaki yüksek karalılıkları

sebebiyle oldukça dayanıklıdır. Birkaç yıl boyunca performanslarında herhangi bir değişim olmaksızın saklanabilirler (Ensing ve ark. 2001), (Rao ve ark. 2004).

Baskılanmış polimerler;

- Zor ayırmalar için (enantiyomerler gibi) kromatografik destek malzemesi olarak,
- Katalitik aktiviteye sahip polimerler veya yapay enzim olarak,
- Biyolojik reseptörleri taklit eden yapılar olarak,
- Tanıma elemanı olarak biyosensörlerde,

kullanılmaktadır.

1.4. İnsülin

İnsülinin görevini anlayabilmek için öncelikle, vücudumuzun fonksiyonlarını yerine getirirken gerekli olan enerjiyi nasıl sağladığımızı kısaca bilmemiz gerekir. Yediğimiz besinlerin çoğu sindirime uğradıktan sonra vücudumuzda bulunan enzimler sayesinde şekere parçalanır. Şeker (glikoz) kan akımı ile vücudun tüm bölümlerine taşınır. Vücudumuzun ana besin kaynağı olan şeker, enerji sağlayabilmek için kandan vücut hücrelerinin (kas hücreleri, yağ hücreleri ve karaciğer hücreleri) içine girmelidir.

İnsülin, vücudumuzda midenin arka tarafında bulunan bir organ olan pankreastaki beta hücrelerinde salgılanan bir hormondur. Kandaki şekerin kandan ayrılarak hücre içine girmesini sağlar. Böylelikle kandaki şeker düzeyi de azalmış olur.

İnsülin, moleküler ağırlığı 5.8 kilodalton (kDa) olan, polipeptit yapılı ve vücuttaki karbohidrat özütürmesinin düzenlenmesinde glukagon ile birlikte rol alan bir hormondur. Kan şekerini düşürücü etki yapar. Pankreasın hormonal salgı birimleri olan Langerhans adacıklarından salgılanan insülinin adı da Latince'de "ada" anlamına gelen "insula" sözcüğünden türetilmiştir.

İnsülinin karbohidrat özütürmesinin birincil dengeleyicisi olmanın yanında, karbohidrat metabolizması ile ilişki içinde bulunan yağ ve protein metabolizmaları üzerinde de önemi vardır ve kandaki insülin derişimi değişikliklerinin tüm bedende yaygın etkileri bulunur. Bu hormonun tam yokluğu, şeker hastalığının 1. tipine (yüksek şeker); görece azlığı ya da insüline karşı direnç ya da her ikisinin birlikte olması ise 2. tip şeker hastalığına (düşük şeker) yol açar. Bu doğrultuda, endüstriyel

olarak üretilmiş olan insülin, 1. tip şeker hastalığında ve başka ilaçların yetersiz kaldığı 2. tip şeker hastalığı vakalarında ilaç olarak da kullanılır.

İnsülinin yapısı hayvanlar arasında küçük farklara bağlı olarak bir çeşitlilik gösterir ve insan insülinine en benzer yapıdaki insülin, arada tek bir aminoasit biriminin farklı oluşuyla, domuz insülinidir. İnsan insülin dizisinde B zincirindeki 30. aminoasit Thr iken, domuz insülininde ise Ala aminoasiti bulunmaktadır. İnsülinin karbohidrat metabolizması üzerindeki düzenleyici işlevinin etkinliği de insandan insana değişkenlik gösterebilmektedir (www.wikipedia.org).

Bu tezde, polimerik destek materyali olarak kullanılacak olan insülin baskılı poli (2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-L-histidin metil ester) [P(HEMA-MAH)] kriyojeli hazırlanarak spesifik olarak insülin adsorpsiyonu incelendi. Bu amaçla psödo-spesifik ligand olarak MAH kullanılarak, hazırlanan insülin-MAH, HEMA ile polimerize edildi. [P(HEMA-MAH)], taramalı elektron mikroskobu (SEM), FTIR ve şişme testi ile karakterize edildi. İnsülin derişimi etkisi, insülin adsorpsiyonu üzerine pH, sıcaklık, iyonik şiddet ve akış hızı gibi parametrelerin etkisi incelendi. Bunun yanı sıra, insülin baskılanmış [p(HEMA-MAH)] kriyojellerin tekrar kullanılabilirlik özelliği de analiz edildi.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Afinite Kromatografisi

Kromatografi kelimesi Yunanca “Chroma” renk ve “Graphein” yazmak kelimelerinden kaynaklanmıştır. İlk defa yirminci yüzyılın başlarında görünür renkli bitki pigmentlerinin ayrılmasında kullanılmış olup, bir durağan ve bir hareketli faz arasında moleküllerin diferansiyel etkileşimlerine dayalı bir “ayırma teknikleri ailesi”dir.

Kromatografi, aynı zamanda biyomoleküllerin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan teknikleri tanımlar. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) ise kromatografiyi, kimyasal maddelerin iki ortam arasında dağılmaları ile gerçekleşen fiziksel bir ayırma tekniği olarak tanımlar.

Kromatografi farklı bileşiklerin değişken bir şekilde farklı fazlarda dağılmasına dayanır. Hareketli faz, durağan fazın üzerinden geçer ve ayrılması istenen maddeyi ortamdan sürükler. Ayrılacak maddeler farklı derecede durağan fazla etkileşime girerler. Durağan fazla etkileşimi fazla olan bileşenler daha ağır, etkileşimi az olan bileşenler ise daha çabuk hareket ettiklerinden bileşenler birbirinden ayrılırlar. Bileşenlerin ayrılmasında, durağan faz ile bileşenler arasındaki etkileşimin yapısına göre farklı kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. Bu etkileşim molekül büyüklüğüne, polariteye, spesifik bağlanma özelliklerine veya elektrostatik çekim gücüne göre değişmektedir.

Çeşitli maddelerin teşhisi, saflaştırılması, izolasyonu amacı ile kullanılan kromatografik yöntemler ve ayırma prensipleri Çizelge 2.1’ de özetlenmiştir (Alkan 2009).

Afinite kromatografisi biyolojik olarak aktif yapıların komplementer bileşenlerini çok seçici ve tersinir olarak bağlama özelliklerine dayalı bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir. Bu maddeler genellikle ligand olarak adlandırılır. Enzimlerin inhibitörleri, substratları veya kofaktörleri ile aktif veya düzenleyici bölgeleri ile, nükleik asiterin nükleotidlerle kompleksleri, hormon ve toksinlerin reseptörlerle meydana getirdiği kompleksler, taşıyıcı proteinlerin vitaminler ve şekerlerle oluşturdukları kompleksler afinite kromatografisine örnek olarak verilebilir.

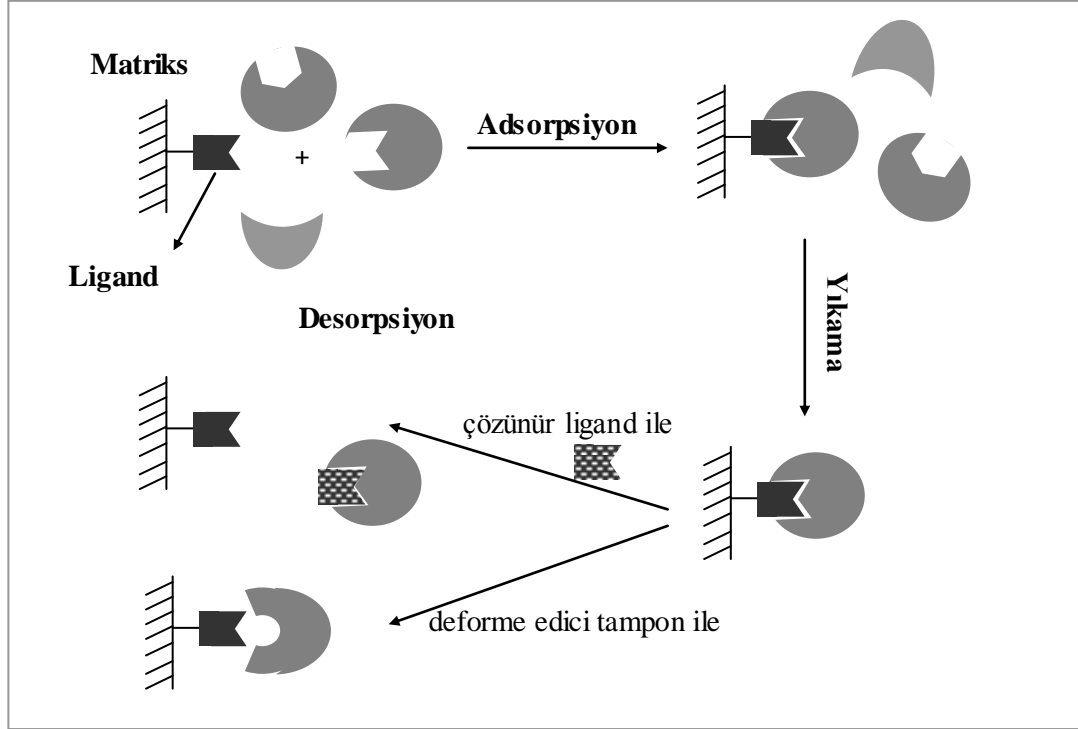
2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çizelge 2.1. Kromatografik teknikler

Yöntem	Temel
Biyofinite Kromatografisi	Biyolojik Seçimlilik
İyon Değişirme Kromatografisi	Yük
Jel Geçirgenlik Kromatografisi	Boyut
İzoelektrik Odaklama Kromatografisi	İzoelektrik Nokta
Hidrofobik Kromatografisi	Hidrofobik Etkileşim
Sıvı Kromatografi	Çözünürlük

Proteinler, antikor ve antijenler, ilaçlar ve hücreler gibi birçok biyolojik yapının biyolojik ve kimyasal özelliklerinden yararlanarak izole edilmesinde ve saflaştırılmasında kullanılan “afinite kromatografisi”, saflaştırma teknikleri arasında seçiciliği ve duyarlılığı ile çok ayrı bir yerdedir. Klasik yöntemlerden farklı olarak, bu teknikte biyolojik moleküller çok seçici olarak “Biyolojik Tanıma” yeteneğine sahip “ligandlar” kullanılarak saflaştırılmaktadır.

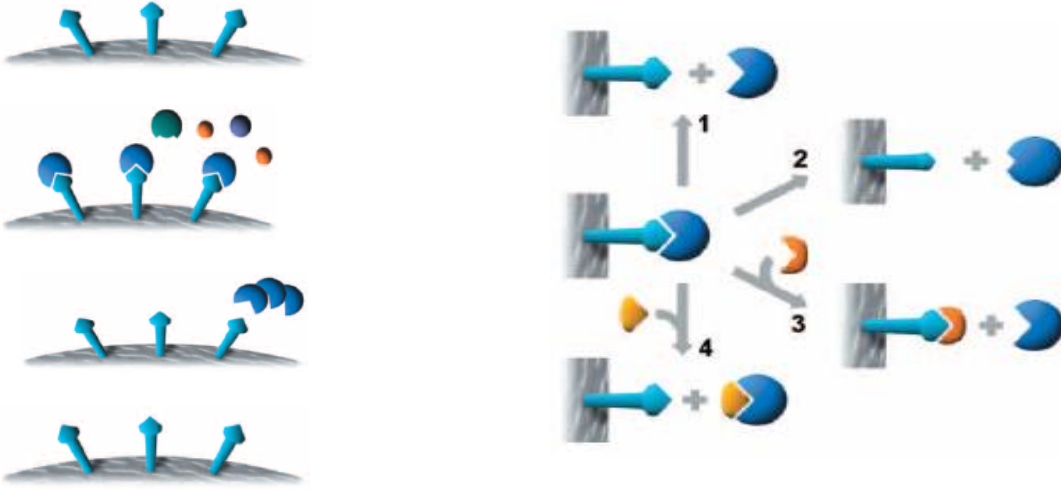
Ligandın kovalent olarak bağlandığı katı destek, kromatografik kolonda sabit faz olarak kullanılır. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi Şekil 2.1’ de verilmiştir.



Şekil 2.1. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi

Yöntemde ayrılacak olan molekülü içeren karışım kolondan geçirilir, belirlenen deneysel koşullarda immobilize olan afinite ligandı ile etkileşime girecek uygun grupları bulunmayan moleküller kolondan alıkonmadan çıkarlar, afinite olanlar ise kolonda adsorplanırlar. Daha sonra adsorplanan moleküller ortam koşulları değiştirilerek (pH, iyonik şiddet, sıcaklık) veya ligandın kendi çözeltisi kullanılarak kolondan uzaklaştırılırlar (Şekil 2.2).

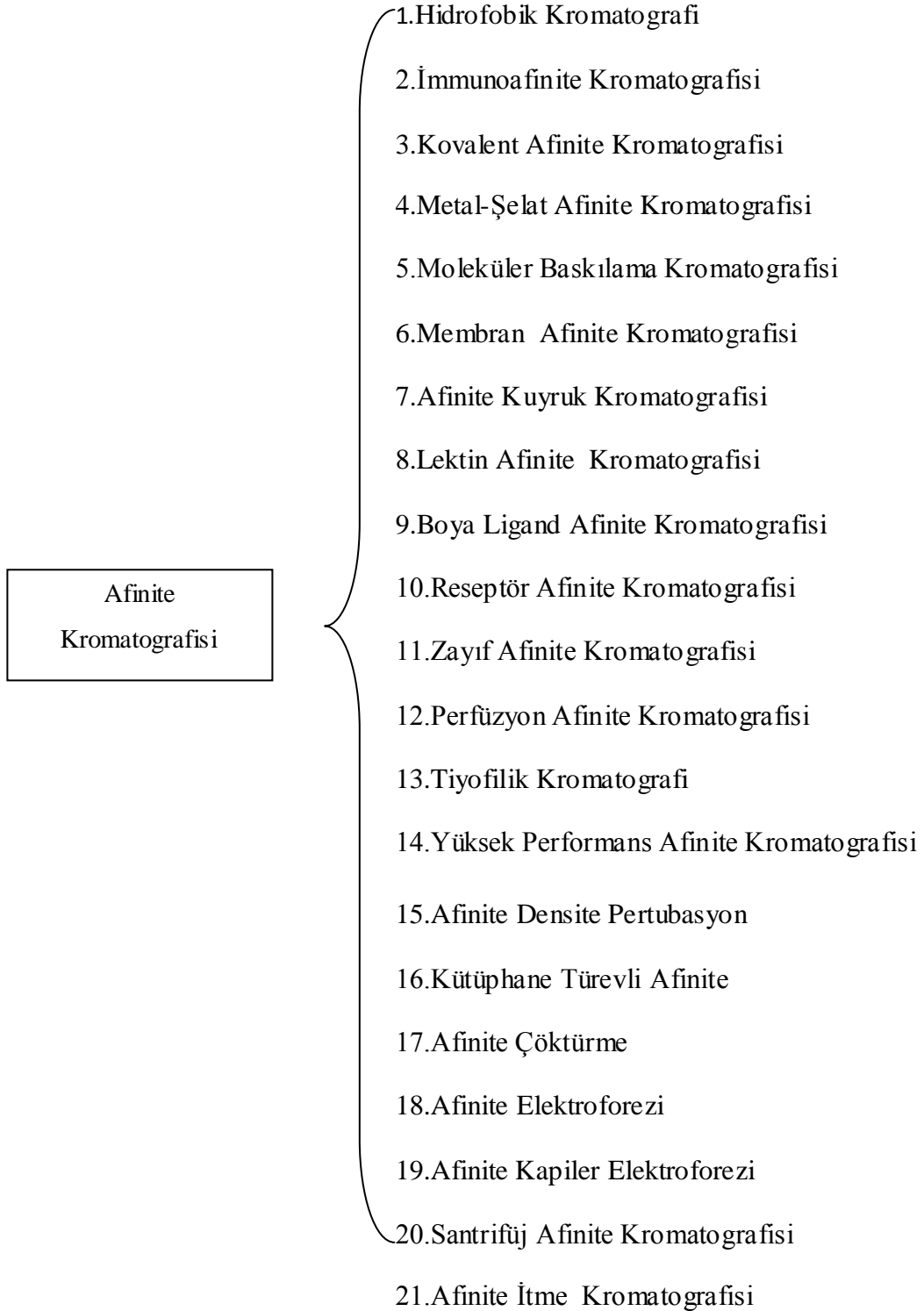
Ligand ile saflaştırılan molekül arasında kompleks oluşumu iyonik etkileşim, hidrofobik kuvvetler, London dağılma kuvveti, dipol-dipol etkileşimi veya yük-aktarım etkileşimleri gibi genel moleküler kuvvetler ile meydana gelir. Bu kuvvetlerden birkaçının aynı zamanda gerçekleşmesi biyospesifik bağın seçiciliğini ve etkinliğini belirleyen en temel nedendir (Lowe 1996), (Wilchek ve Miron 1999), (Anspach 2004).



Şekil 2.2. Afinitede saflaştırma basamakları

1. Afinite ortamı bağlanma tamponunda dengelenir.
2. Örnek, hedef molekülünün ligand ile tercihli olarak bağlanabileceği koşullarda uygulanır. Hedef spesifik, fakat tersinir bağlanır; bağlanamayan bileşenler yıkanarak kolondan uzaklaşır.
3. Hedef molekül, koşulların elüsyon yönünde değiştirilmesiyle geri kazanılır. Elüsyon, yarışmacı ligantla spesifik olarak veya non-spesifik olarak pH, iyonik şiddet veya polarite değiştirilerek gerçekleştirilir. Hedef protein saflaştırılıp, konsantre halde biriktirilir.
4. Afinite ortamı bağlanma tamponu ile tekrar dengelenir.

Afinitenin geniş alanda değişik uygulamaları ortaya çıkmıştır. Bu tekniklerin çoğu kendi isimleriyle kabul edilmektedir. Bunların bir kısmı Çizelge 2.2' de gösterilmiştir (Bereli ve ark. 2005), (Öncel ve ark. 2005), (Altıntaş ve Denizli 2006), (Babaç ve ark. 2006), (Özcan ve ark. 2006).



Çizelge 2.2. Afinite kromatografisinin dalları

Afinite teknolojisinin kullanım nedenleri şunlardır;

❖ Tıbbi nedenler,

- İstenmeyen bileşenlerin elimine edildiği çok saf ve yüksek kalitede ürüne ihtiyaç duyulması

❖ Biyokimyasal nedenler,

- İlimli saflaştırma koşullarına ihtiyaç duyulması
- Denatürasyonun söz konusu olmadığı durumlarda
- Proteinin biyolojik aktivitesinin korunması
- Antijen oluşum riskinin düşük olması

❖ Ekonomik nedenler,

-Kapasite ve yüksek verim

❖ Teknik nedenler,

- İşlem basamaklarının kolay kontrolü
- Ölçek büyütmenin kolaylığı
- Standardizasyonun mümkün olması

2.1.1. Matriks Seçimi

Afinite kromatografisinin gelişmesindeki en önemli etmenlerden birisi de katı desteklerin geliştirilmesidir. Katı desteğin doğru seçilmesi, matriks ve afinite ligandı arasındaki kovalent bağ kromatografik ayırmanın belki de en önemli basamağını meydana getirmiştir. Katı destek immobilize edilen ligand ve adsorplanacak biyomolekülün kararlılığı üzerine de önemli etkiye sahiptir. Katı destek bazı durumlarda ligandın kendisi de olabilmektedir. Çok sayıda farklı türde destek malzemesi, bunların aktive edilmiş yapıları ve hemen kullanıma hazır hale getirilmiş afinite sorbentleri ticari olarak bulunmaktadır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Afinite kromatografisi için bazı katı destek türleri

Tür	Kimyasal Yapı
Biyopolimerler	Agaroz, Dekstran, Selüloz
Sentetik kopolimerler	Poliakrilamid, poli (HEMA), polistiren
İnorganik malzemeler	Gözenekli cam, demir oksit
Biyopolimer/sentetik kopolimerler	Agaroz, poliakrilamid
İnorganik malzemeler/organik kopolimerler	Silika/hidrofilik kopolimerler

Katı destek aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmalıdır:

1. Çözünmemelidir.
2. Uygun geçirgenliğe ve büyük iç yüzey alanı özelliğine sahip olmalıdır.
3. Yüksek sertlik ve uygun partikül yapısı bulunmalıdır.
4. Non-spesifik adsorpsiyonu düşük olmalıdır.
5. Afinite ligandının bağlanması için fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır.
6. Ligand immobilizasyonu, adsorpsiyon, desorpsiyon ve rejenerasyon durumlarına karşı kimyasal olarak kararlı yapıya sahip olmalıdır.
7. Mikrobiyal ve enzimatik ataklara karşı dayanıklı olmalıdır.
8. Hidrofilik karakterde olmalıdır (Alkan 2009).

2.1.2. Afinite Ligandın Seçimi

Afinite kromatografisinde yararlanılacak ligandın aşağıdaki koşulları sağlaması gerekmektedir;

- Saflaştırılacak madde ile spesifik ve tersinir bir kompleks meydana getirmelidir.
- Adsorbente bağlanmasını sağlayacak fonksiyonel gruplar içermelidir.

Bu iki koşula uyan çok sayıda bileşik mevcuttur. Afinite kromatografisi ilkelerinin pratiğe uygulanmasında kullanılacak çeşitlilik, yöntemin etkinliğini belirler. Bu etkinliği sağlayan faktörler şunlardır:

- ✓ İstenilen amaca özel olarak uyarlanabilecek ligandların çeşitliliği,
- ✓ Grup-spesifik ligandların kullanımı,
- ✓ Bir maddenin saflaştırılması için gerekli ligandların çeşitliliği.

Ligandlara örnekler Çizelge 2.4' de verilmiştir. Afinite ligandları oldukça farklı yapılarda kimyasal bileşikler olabilir. Proteinler ve antikorlar gibi yüksek molekül ağırlıklı moleküllerin yanı sıra substratlar gibi basit, düşük molekül ağırlıklı bileşikler de afinite ligandı için uygundur. Ayrıca herhangi bir biyolojik fonksiyonu olmayan basit moleküllerin kullanımına da olanak verir. Hemoglobin saflaştırılması için katı desteğe bağlı imidazol (Pommerening ve ark. 1979) ve grup-spesifik ligand olarak geniş uygulama alanı bulan reaktif boyalar bu tür ligandlara örnek olarak verilebilir (Tuncel ve ark. 1993), (Denizli ve ark. 1999), (Kassab ve ark. 2000), (Denizli ve Pişkin 2001).

Afinite kromatografisi bir biyolojik ligand (örneğin: substrat, enzim ya da hormon) ya da onun sentetik bir analogu ile protein molekülü üzerindeki komplementer bağlanma bölgesi arasında olan özgün etkileşimi esas alır. Burada söz konusu etkileşim antikorların antijenlerle, enzimlerin substrat analoglarıyla ve de hormonların reseptörleri ile olan etkileşimleri türündendir. Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler Çizelge 2.5' de verilmiştir.

Afinite ligandları spesifite ve kapasite bakımından oldukça geniş bir dağılıma sahiptirler. Antijen-antikor etkileşimi gibi yüksek afiniteli etkileşimler ve enzim-substrat etkileşimleri gibi daha düşük afiniteli etkileşimler afinite kromatografisinde kullanılabilir.

Dar bir seçicilik aralığına sahip veya monospesifik bir ligandın kullanılması yüksek bir etkinlik ve saflıkta tek bir bileşiğin saflaştırılmasına imkan verir. Ancak, bu aynı zamanda saflaştırılacak her madde için spesifik bir ligand-matriks kombinasyonu olduğundan bir dezavantajdır. Dolayısıyla grup-spesifik ligandlar çok daha büyük pratik öneme sahiptir (Garıpcan ve Denizli 2002), (Özkara ve ark. 2003), (Garıpcan ve ark. 2004).

Çizelge 2.4. Afinitite kromatografisinde kullanılan bazı ligand grupları

Uygulama alanı	Ligand
Enzimoloji (enzimler, inhibitörler, kofaktörler)	Enzimler, substratlar ve analogları, ürünleri, inhibitörleri, kofaktörler, antikorlar, biyolojik fonksiyonu olmayan maddeler
Peptitler	Enzimler, antikorlar
İmmünooloji	Haptenler, antijenler, antikorlar
Protein Kimyası (reseptörler, taşıma proteinleri, glikoproteinler)	Hormonlar, vitaminler, steroidler, lipidler, antikorlar, mono- ve polisakkaritler
Nükleik asitler, Nükleotidler	Nükleik asit bazları, nükleozidler, oligonükleozidler
Hücre ve virüslerin izolasyonu	Antijenler, antikorlar, hormonlar.

Çizelge 2.5. Afinite kromatografisinde kullanılan biyolojik etkileşimler

Ligand	Ligandla Etkileşen Protein
Antikor	Antijen, virüs, hücre
İnhibitör	Enzim
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzey reseptörleri, zar proteini, hücre
Nükleik asit	Nükleik asite bağlı protein
Hormon, Vitamin	Reseptör, Taşıyıcı protein
Şeker	Lektin, enzim veya diğer şeker bağlı proteinler

Bazı durumlarda, protein adsorpsiyon tekniklerinde psödo-spesifik ligandlar da kullanılmaktadır. Bu amaçla amino asit molekülleri herhangi bir sızıntıya ihtimal vermeden rahatlıkla kullanılabilen, protein ligandlardan daha kararlı olup, biyolojik aktivite için spesifik bir tersiyer yapıya ihtiyaç duymamaktadırlar. Protein afinite kromatografisinde bu amaçla en çok kullanılan amino asitlerden biri histidindir (Haupt ve Vijayalakshmi 1993), (Alvarez ve ark. 1997). Histidin karboksil, amino ve imidazol grupları izoelektrik noktaları civarında proteinlerle etkileşirler (Bereli ve ark. 2006).

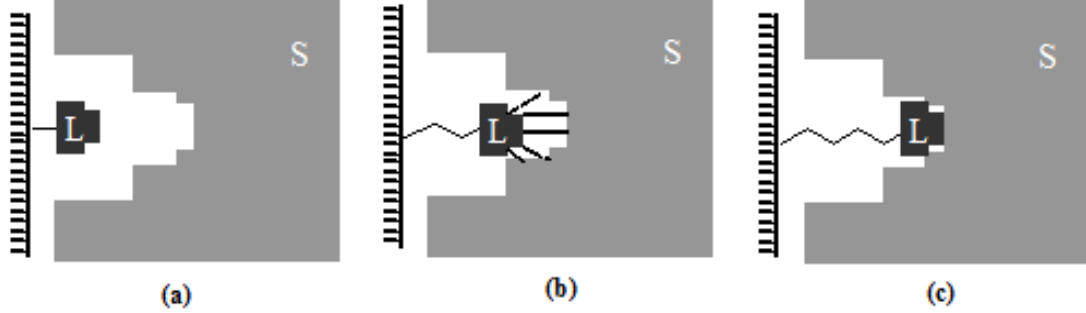
2.1.3. Uzatıcı Kollar

Genellikle düşük molekül ağırlıklı ligandların kullanıldığı durumlarda ($MA < 5000$) sterik engellemelerin giderilmesi için taşıyıcıya bağlanan bileşikler uzatıcı kol olarak tanımlanır (Şekil 2.3).

Bu tür taşıyıcıların sentezi için iki yöntem vardır;

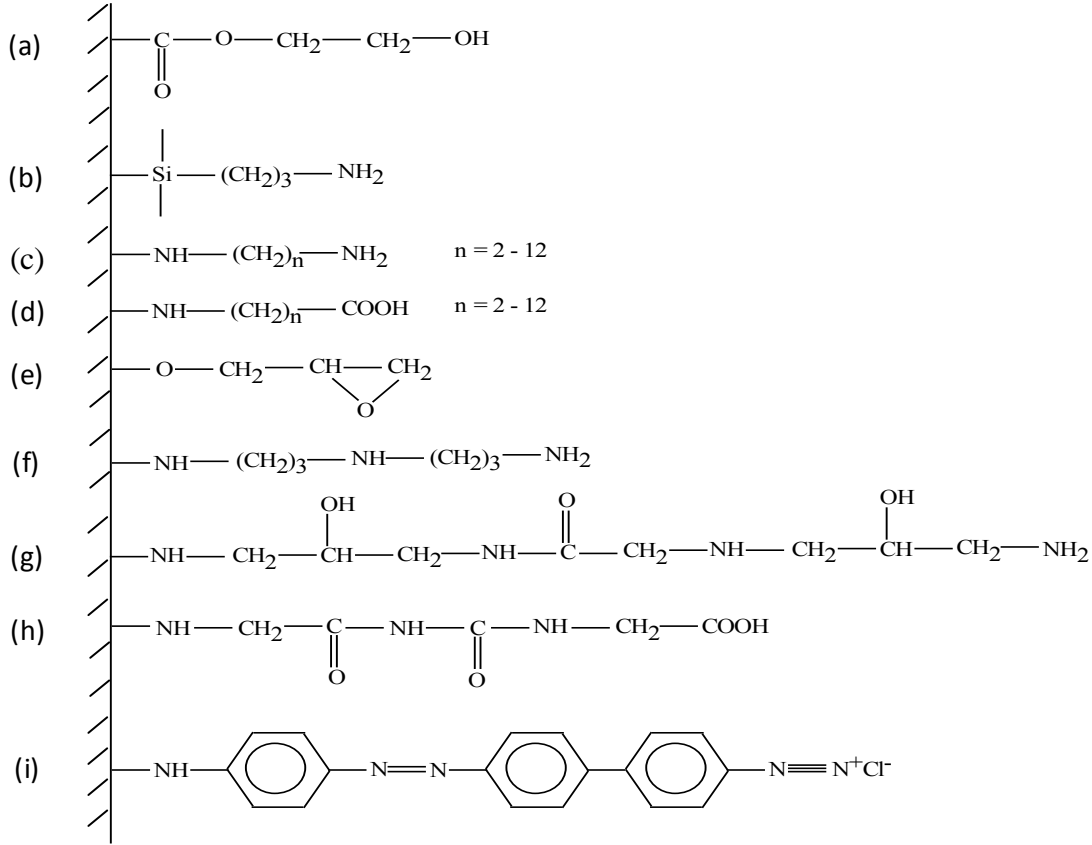
1. Uzatıcı taşıyıcıya bağlanır ve aktivasyon ile uzatıcının uç grubuna ligand bağlanır.

2. İkinci yöntemde uzatıcı kol sübstitüent olarak liganda bağlanır. Daha sonra matriks aktivasyonu gerçekleştirilir. Böylece uzatıcı kol-ligand kompleksi taşıyıcıya doğrudan bağlanır.



Şekil 2.3. Uzatıcı kolun fonksiyonunun temeli (a) bağlanmama, (b) zayıf etkileşim, (c) ligand ve substrat arasında optimum etkileşim

Her iki yöntemin de avantajları ve dezavantajları vardır. Basit olması nedeniyle ilk yöntem daha çok kullanılmaktadır. Dezavantajı; sentezlenen matriksin heterojenliğidir. Polimer analogu tepkime üzerindeki basamaklı sentez sonucu, matrikste kalan sübstitüe olmamış uzatıcılar hidrofobik veya iyonik etkileşimlere girerek non-spesifik bağlanmaya neden olurlar. Spesifik olmayan etkileşimler uzatıcının zincir uzunluğuna ve yapısına göre değişmektedir. Çok sayıda uzatıcı kol ve bunların değişik matrikslere bağlanması araştırılmıştır. Bazı karakteristik örnekler Şekil 2.4' de özetlenmiştir (Alkan 2009).



Şekil 2.4. Afinite kromatografisinde kullanılan bazı uzatıcı kollar:

- (a) Hidroksialkilmetakrilat; (b) 3-aminopropilsilan; (c) w,w'- diaminokarbonikasit;
 (d) w-aminokarbonikasit; (e) bisokziran; (f) 3,3'-diaminopropilamin;
 (g) 1,3-diamino-2-propanol; (h) oligopeptitler; (i) diazonyum tuzları

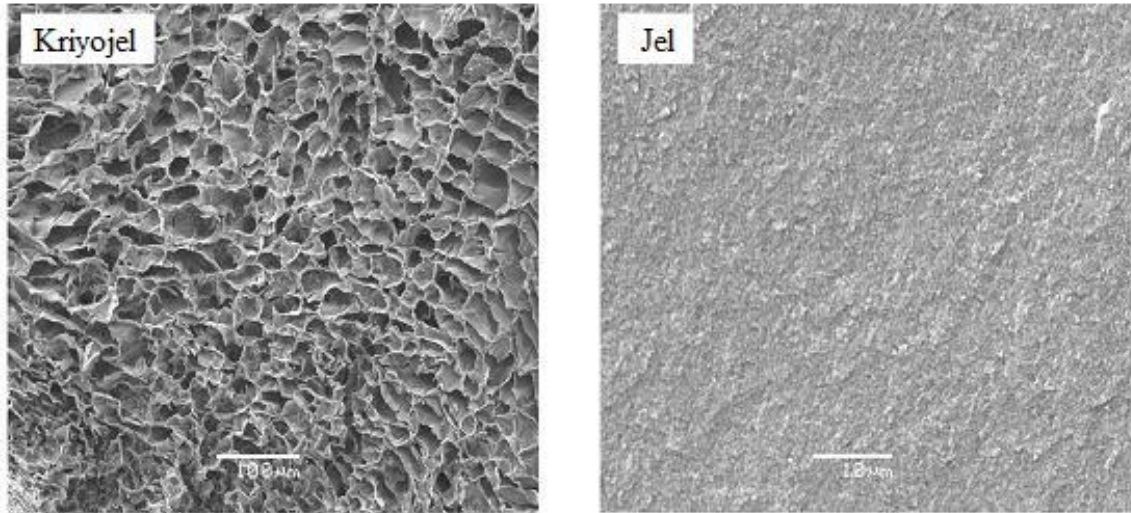
2.2 KRİYOJELLER

Makrogözenekli polimerik materyaller biyoteknolojide, biyomedikalde ve eczacılık biliminde çok hızlı bir şekilde ilerlemektedir (Peppas ve ark. 2000), (Hentze ve Antonietti 2002), (Baydemir ve ark. 2009), (Derazshamshir ve ark. 2010). Makrogözenekli polimerik materyallerin sentezindeki yaklaşımlar, indüklenmiş faz dağılmasını, gaz veya sıvı porojenlerin kullanımı, süper kritik uygulamalar veya kalıp sentezlerini içerir (Hjerten ve ark. 1989), (Nam ve Park 1999), (Wood ve Cooper 2001), (Hentze ve Antonietti 2002), (Kabiri ve ark. 2003). Son zamanlarda kriyotropik jelleşme tekniği negatif sıcaklıklarda hidrofilik makrogözenekli materyallerin hazırlanmasında kullanılır (Lozinsky ve ark. 2002), (Plieva ve ark. 2005), (Plieva ve ark. 2006). Bu polimerik gözenekli materyaller “**kriyojeller**” olarak bilinmektedir.

Kriyojeller pratik olarak bir jel oluşturan öncüllerden üretilir ve birçok değişik yapıya ve gözenek boyutuna sahiptirler.

Kriyojellerin (makrogözenekli jeller de denebilir) oluşumunda yarı donmuş sulu ortamda buz kristalleri gözenekli bir yapı meydana getirir. Kalıp buz kristallerin erimesinden sonra gözenekler birbiriyle bağlanmış olur. Sistemin büyük çoğunluğunda gözenekler birbiriyle bağlantılı ve yüksek esnekliğe sahiptir. Klasik jellerin (çözeltileri homofaz sistemler iken) aksine kriyojeller heterofaz sistemde polimerleşir. Kriyojellerde makro ve mikrogözenekli yapılar da olabilir (Şekil 2.5), (Plieva ve ark. 2007).

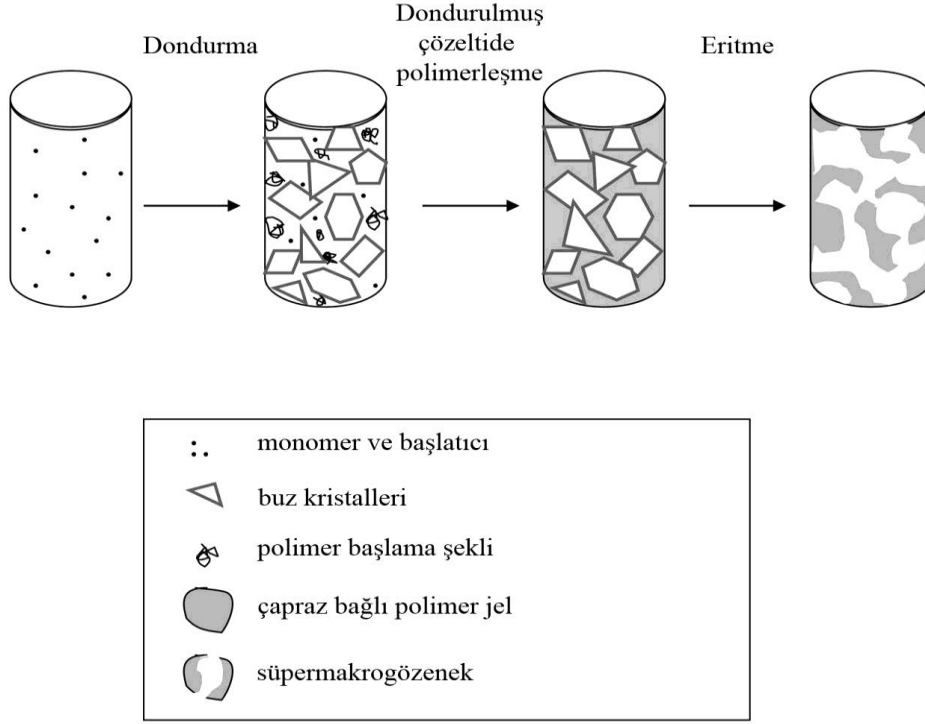
Kriyojeller yüksek esneklik ve süngersi yapısıyla, yüksek ve düşük molekül ağırlıklı yapılarla hazırlanan ve sulu ortamda serbest radikal, polimerizasyon ile negatif sıcaklıkta meydana gelirler (Plieva ve ark. 2004), (Plieva ve ark. 2005), (Plieva ve ark. 2006), (Plieva ve ark. 2007). Kriyojellerin süngersi yapıları poliakrilamid (pAAM), polihidroksimetakrilat (pHEMA), polietilenglikol (PEG), polivinilalkol (PVA) temeline dayanmaktadır (Arvidsson ve ark. 2003), (Plieva ve ark. 2005), (Plieva ve ark. 2007).



Şekil 2.5. Kriyojel ve jelin SEM fotoğrafı

Kriyojel oluşumu sırasında, öncü çözünen parçacıklar, hızla donarak genellikle su gibi uygun bir çözücü içerisinde çözünür. İlerleyen aşamalarda çözücünün büyük kısmı donup birbirine bağlı buz kristalleri oluştururken, bu buz kristallerinin etrafındaki donmamış sıvıda bulunan polimer öncüleri polimerleşerek buz kristallerinin etrafında bir ağ yapı oluştururlar. Tepkime tamamlanınca donmuş karışım oda sıcaklığına

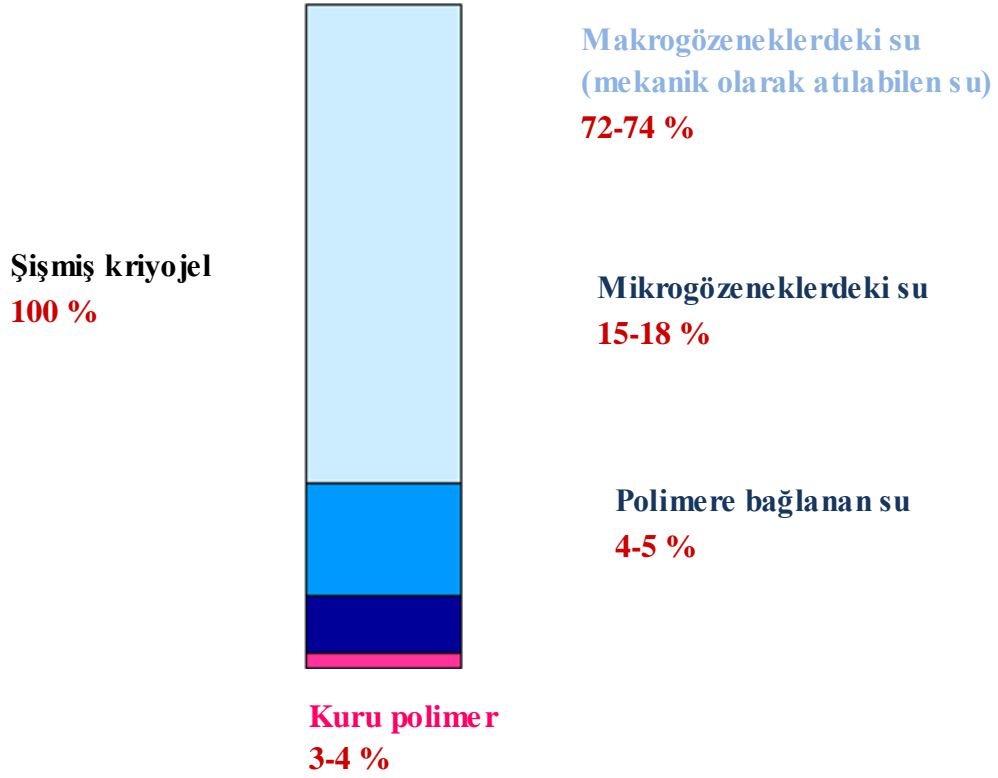
getirildiğinde buz kristalleri erir ve “kriyojel” olarak adlandırılan gözenekli polimer ağ yapı elde edilir. Gözenek duvarının etrafındaki çözücünün yüzey geriliminden dolayı buz kristallerinin erimesi, kriyojellerdeki gözeneklerin dairesel şekle sahip olmalarını sağlar (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Kriyojelleşme olayı (Plieva ve ark. 2007)

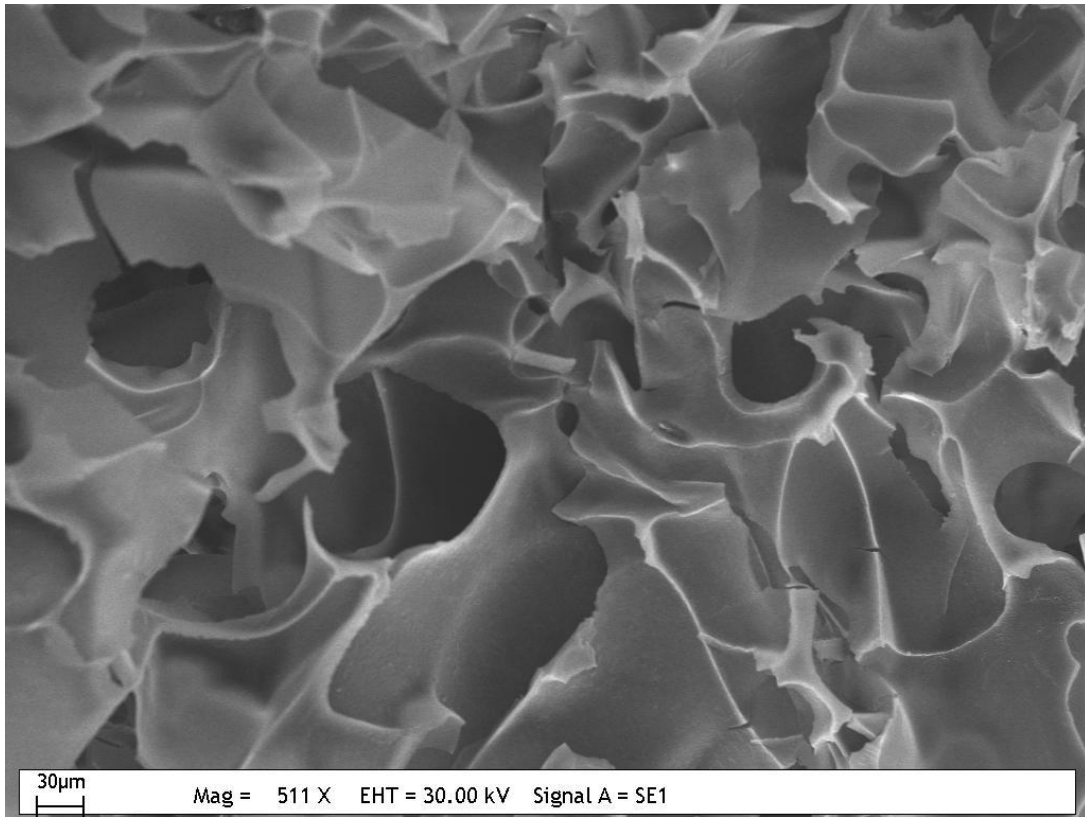
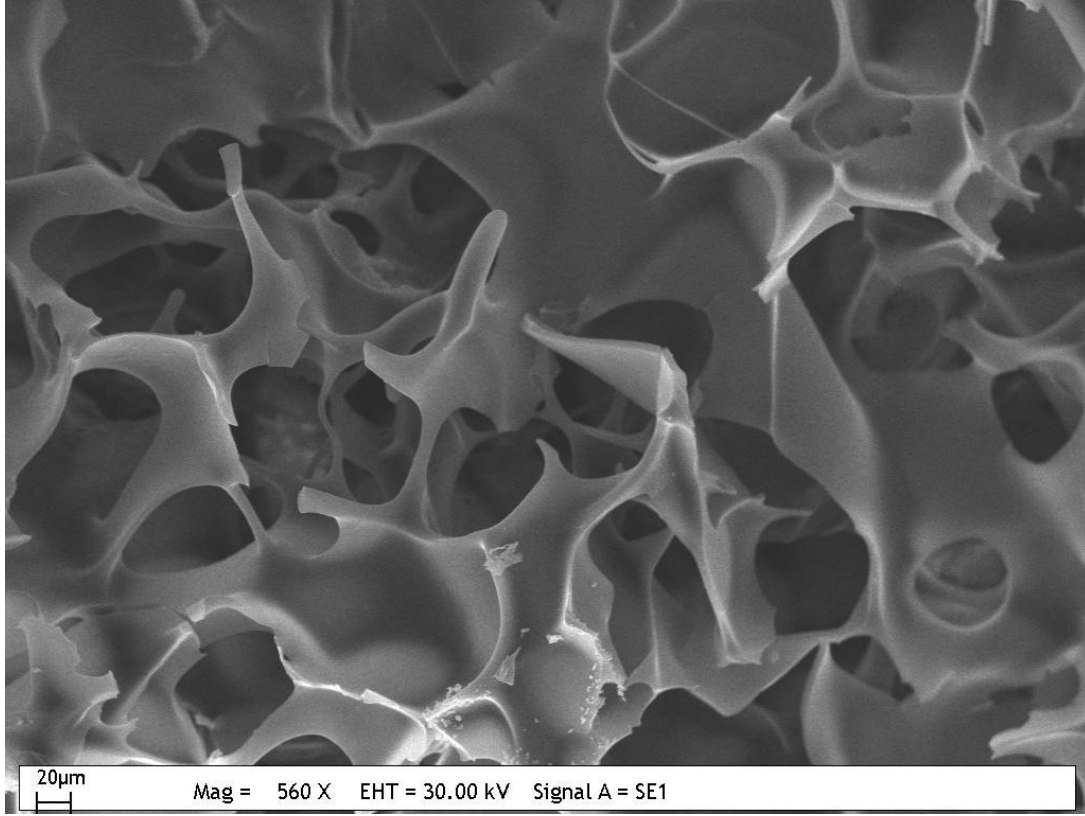
Kriyojellerin eşsiz olmalarının nedeni hazırlanmalarının çok basit bir yöntemle, polimerin türüne bağlı olarak çok çeşitli uygulamalarda kullanılabilen, birbiriyle bağlantılı büyük ve açık gözenek ağına sahip yapıların elde edilmesine olanak vermesidir. Kriyojellerin birbirleriyle olan bağlantılı yapıları taramalı elektron mikroskobu (Şekil 2.8), mikro-bilgisayarlı tomografi (μ CT) ve konfokal mikroskopla tayin edilebilmektedir. Kriyojellerin süngersi yapıda ve makrogözenekli oluşu değişen büyüklükteki moleküllerin jel boyunca düzgün akışını mümkün kılmaktadır (Şekil 2.7).

Kriyojeller, hücrelerin gelişimi ve üremesi için uygun üç boyutlu yapıya sahiptirler. Makrogözenekli yapılarından dolayı sahip oldukları hızlı şişme kinetiği, onları ilaç taşınım araçları ve biyosensörler gibi uyarı-duyarlı sistemlerin tasarımına elverişli kılar.



Şekil 2.7. Kriyojellerin gözenekliliği

Oldukça saf biyolojik materyallerin (düşük molekül ağırlıklı bileşenler, protein gibi biyopolimerler, DNA, virüsler, hücresel organeller ve tüm hücreler) geliştirilmesi ve biyoayırma kullanılan polimerik materyallerin gelişi, uygulamalı biyokimyada yeni devrimler yaratmıştır (Lozinsky ve ark. 2002). Genel olarak uygulanması, aminoasit analizi için yüksek performans iyon kromatografisi, moleküler elek, sephadex, poliakrilamid jel elektroforezi, mikro ve ultrafiltrasyon membranlarıdır (Arvidsson ve ark. 2002), (Kumar ve ark. 2003), (Yao ve ark. 2006). Bu polimerik yapılar, nükleik asitler ve proteinlerin saflaştırılması ve izolasyonlarıyla birlikte, yapıların ve fonksiyonların aydınlatılmasında ilerleme kaydedilmiştir. Bu nedenle, yeni biyolojik materyallerle ilgilenmek biyoteknolojinin farklı alanlarında oldukça ilgi görmüştür.



Şekil 2.8. Süpermakrogözenekli kriyojellerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri

2.3. MOLEKÜLER BASKILAMA TEKNOLOJİSİ

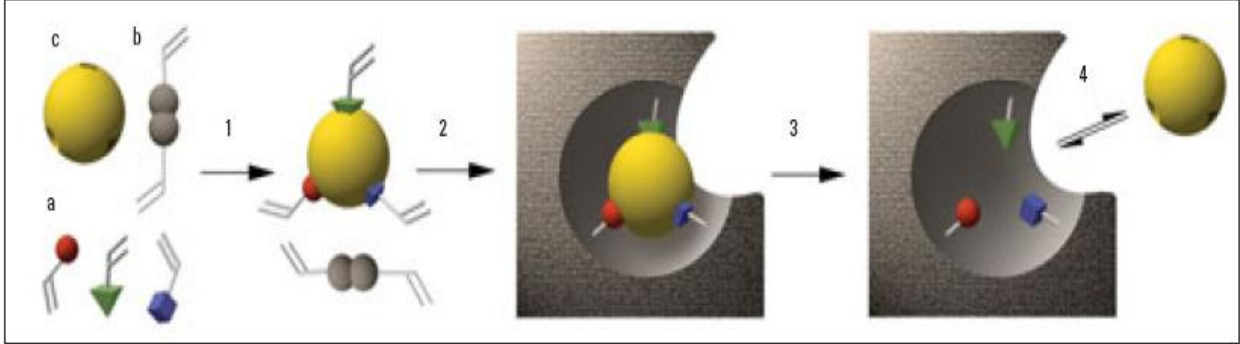
Moleküler baskılama, ilgilenilen analit için seçici tanıma bölgelerine sahip polimerlerin hazırlanmasında kullanılan yöntemdir. Moleküler baskılama yöntemi ile hazırlanan taşıyıcılar hedef moleküle yüksek afinite göstermesi nedeniyle oldukça önemlidir. Moleküler baskılama yöntemi ilk defa 1972’ de Günter Wulff ve çalışma grubu tarafından ifade edilmiş ve polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar istenilen enzim tepkimelerinin substratlarını, ürünlerini veya geçiş analoglarını kalıp molekül olarak kullanarak bu yöntemle “YAPAY ENZİM” elde edilebileceğini de ifade etmişlerdir (Wulff ve Poll 1987).

Moleküler baskılama yöntemi, hedef moleküle yüksek spesifiklik gösteren yapıların sentezinde kullanılan gelişen bir teknolojik yöntem olup, bu yöntemde sentetik polimer matriksinde kalıp moleküle yapısal ve fonksiyonel olarak komplementer boşluklar oluşturulmaktadır (Mayes ve Mosbach 1997), (Nicholls ve Rosengren 2002), (Sellergren ve Allender 2005), (Kindschy ve Alocilja 2005), (Widstrand ve ark. 2006), (Lok ve Son 2009). Moleküler baskılama işleminin basamakları:

- **Ön kompleksleşme:** Fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında kovalent ya da kovalent olmayan yapıların meydana gelmesi.
Bu aşamada fonksiyonel monomer ile kalıp molekül, kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle birbirine bağlanır. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemlidir.
- **Polimerizasyon:** Polimerizasyon sırasında, bu konjugatların yapıları polimerin üç boyutlu ağında dondurulur. Fonksiyonel monomere gelen fonksiyonel kısımlar şekil ya da büyüklük olarak kalıp molekülün tamamlayıcısıdır.
- **Kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması:** Üçüncü aşamada, kalıp moleküller polimerden ayrılmaktadır. Böylece polimerde kalıp moleküle ait kısımlar boşluk olarak elde edilmektedir. Uygun koşullarda, bu boşluklar kalıp molekülün boyut, yapı ve diğer fizikokimyasal özelliklerini

tanır ve molekülü ya da analogunu etkili ve seçici olarak bağlar (Denizli ve Küfrevioğlu 2009).

Moleküler baskılama yöntemi temelde 4 basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.9):



Şekil 2.9. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi

Sentetik bir polimerde moleküler baskılamayı gerçekleştirmek için:

- (a) fonksiyonel monomerler
- (b) çapraz bağlayıcı
- (c) kalıp molekül karıştırılır

- (1) Fonksiyonel monomerler kalıp molekül ile kompleks oluştururlar
- (2) Fonksiyonel monomerler çapraz bağlayıcı ile kopolimerize olurlar
- (3) Polimerizasyon ilerlerken kalıp etrafında çözünmez, çapraz bağlı polimer ağı oluşur.
- (4) Kalıbın uzaklaştırılmasıyla kalıba uygun, oldukça seçici, tamamlayıcı bağlanma bölgeleri içeren polimer elde edilir.

Moleküler baskılama teknolojisi, bilim adamlarına bazı avantajlar sunan hedef moleküle yönelik yüksek seçicili reseptör bölgelerine sahip gelişmekte olan bir yöntemdir (Ramström ve ark. 2001). Moleküler baskılanmış polimerler (MIP), kalıp molekül olarak kullanılan hedef molekül doğrultusunda elde edilmektedir. Kalıp molekül, çapraz bağlayıcı ile bağlanmadan önce fonksiyonel monomerlerle etkileşim içine girmektedir. Kalıp molekül katı polimerden ayrıldığında ise hedef moleküle komplementer olan spesifik bağlanma bölgeleri meydana gelmektedir (Lok ve Son 2009). Afinite ve seçicilik bakımından doğal reseptörlere benzeyen moleküler

baskılanmış polimerler kolay hazırlanabilme ve adaptasyon, birçok çözücü ve koşulda dengeli olma gibi özelliklere sahiptirler.

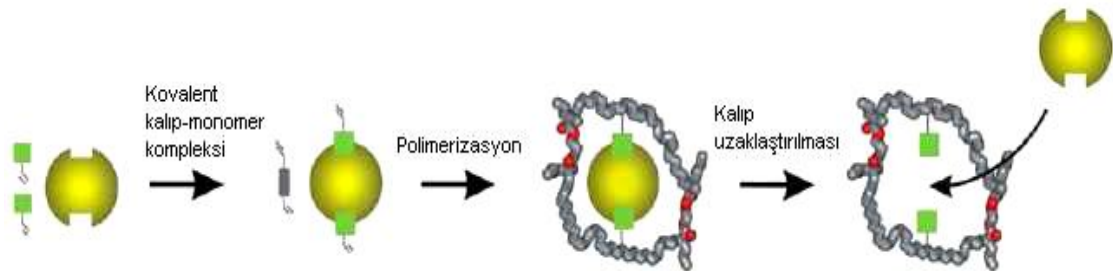
Moleküler baskılanmış polimerler (MIP); moleküler tanıma elverişlidir, ucuzdur ve kolayca hazırlanabilir. Ayrıca moleküler baskılanmış polimerler yüksek mekanik özellikleri, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlımlıkları, asitler, bazlar, metal iyonları gibi ortamlardaki yüksek karalılıkları sebebiyle oldukça dayanıklıdır. Birkaç yıl boyunca performansında değişim olmaksızın saklanabilirler (Ensing ve Berggren 2001), (Rao ve ark. 2004).

Moleküler baskılama teknolojisi ortaya çıktığından beri gıda üretimi, analizi ve kalite kontrolü alanlarında da çok geniş halde uygulanmış ve halen de gelişmektedir. Gıda endüstrisinde gıdanın tüketim açısından güvenilir olup olmadığının test edilmesi için bulaşanların tayin edilmesi oldukça önemlidir. Gereken korumayı sağlamak için gıda endüstrileri ve resmi kurumlar, gıdalarda bulunabilecek bulaşanlar ya da antimikrobiyal ilaçların hızlı, basit ve doğru bir şekilde analiz edilmesini önermektedirler (Lok ve Son 2009).

2.3.1. Moleküler Baskılama Yöntemleri

2.3.1.1. Kovalent Baskılama

Kovalent baskılama için, baskılayıcı molekülün polimerize olabilecek bir ürününü sentezlemek gerekir ve polimer sentezi sonrasında baskı molekülü yapıdan kimyasal olarak ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Bu yaklaşım öncelikle Wulff ve arkadaşları tarafından dile getirilmiştir (Aşçı 2008).



Şekil 2.10. Kovalent moleküler baskılama yöntemi

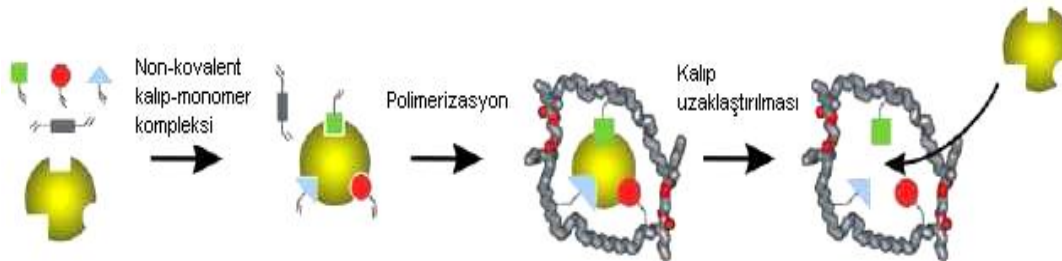
Polimerizasyon işleminden önce fonksiyonel monomer ile kalıp molekül birbirlerine kovalent bağlarla bağlanır. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve yuvayı oluşturmak amacıyla polimerden ayrılırlar. Hedef molekül, baskılanmış

polimerlerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağ yeniden meydana gelerek baskı iyonu yuvaya seçici olarak yerleşir (Shea ve Dougherty 1986). Şekil 2.10' da kovalent moleküler baskılama yöntemi şematik olarak verilmektedir.

2.3.1.2. Non-Kovalent Baskılama

Moleküler baskılama yönteminde kovalent bağlanmanın yanı sıra non-kovalent bağlanma da meydana gelmektedir. Bu bağlanmada, fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması non-kovalent (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler gibi) etkileşimlerle gerçekleşir. Şekil 2.11' de görüldüğü üzere; polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle kalıp molekül polimerden ayrılır. Hedef molekül ile baskılanmış polimerler non-kovalent etkileşimlerle bağlanırlar (Molinelli 2004), (Ersöz ve ark. 2005).

Bu yöntem kovalent bağlanmayla kıyaslandığında daha zayıf olsa da çok yönlü bağlanma gerçekleştirilmesi ile dikkatleri üzerine çekmiştir (Shea ve Dougherty 1986). Kompleks oluşumunda hidrojen bağı, iyonik bağ, hidrofobik etkileşimler gibi zayıf etkileşimler meydana gelmektedir. Dolayısıyla da kolay uzaklaştırılabilir özelliğe sahip olmaktadır.



Şekil 2.11. Non-kovalent moleküler baskılama yöntemi

2.3.1.3. Kovalent Bağlanma ile Non-Kovalent Bağlanmanın Avantajları ve Dezavantajları

Kovalent bağlanmada monomer-kalıp molekül kompleksi oldukça kararlıdır, stökiyometrik oranlarda oluşur ve homojen bir dağılım sağlar. Polimerizasyon koşulları yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve polar çözücüler için istenildiği gibi

uygulanabilir, çünkü konjugatlar kovalent bağlarla meydana gelmiştir ve oldukça kararlıdır (Ikegami ve ark. 2004).

Ancak baskılanmış polimer hazırlamak için non-kovalent yöntem daha çok rağbet görmektedir (Sellergren ve ark. 1988), (Zhong ve ark. 2001). Non-kovalent yaklaşım polimerizasyon öncesinde non-kovalent etkileşimlerle kalıp molekül etrafında fonksiyonel monomerlerin düzenlenmesine imkan sağladığı için kolay ve sorunsuzdur. Non-kovalent bağlanma enzim-substrat bağlanmalarına benzemektedir (Sellergren ve ark. 1988).

Moleküler baskılama yönteminin kullanıldığı ilk yıllarda temel kavramların gelişmesi ve baskılanmış polimerlerin optimize edilmesi kovalent etkileşimlerle meydana gelmiştir. Daha sonraları non-kovalent etkileşimler uygulamadaki kolaylıkları nedeniyle daha cazip hale gelmiştir. Non-kovalent etkileşimlerde bağlanma sabitleri daha düşüktür ve baskılama işlemi sırasında monomerlerin bağlanma bölgelerinin ortamda fazlasıyla bulunması istenir. Sonuçta oluşan polimerdeki bağlanma bölgeleri boşlukların içerisine tam olarak yerleşemez. Özellikle katalitik uygulamalarda ve kromatografik amaçlı çalışmalarda bu durum bir engel olarak görülmektedir (Wulff ve Poll 1987).

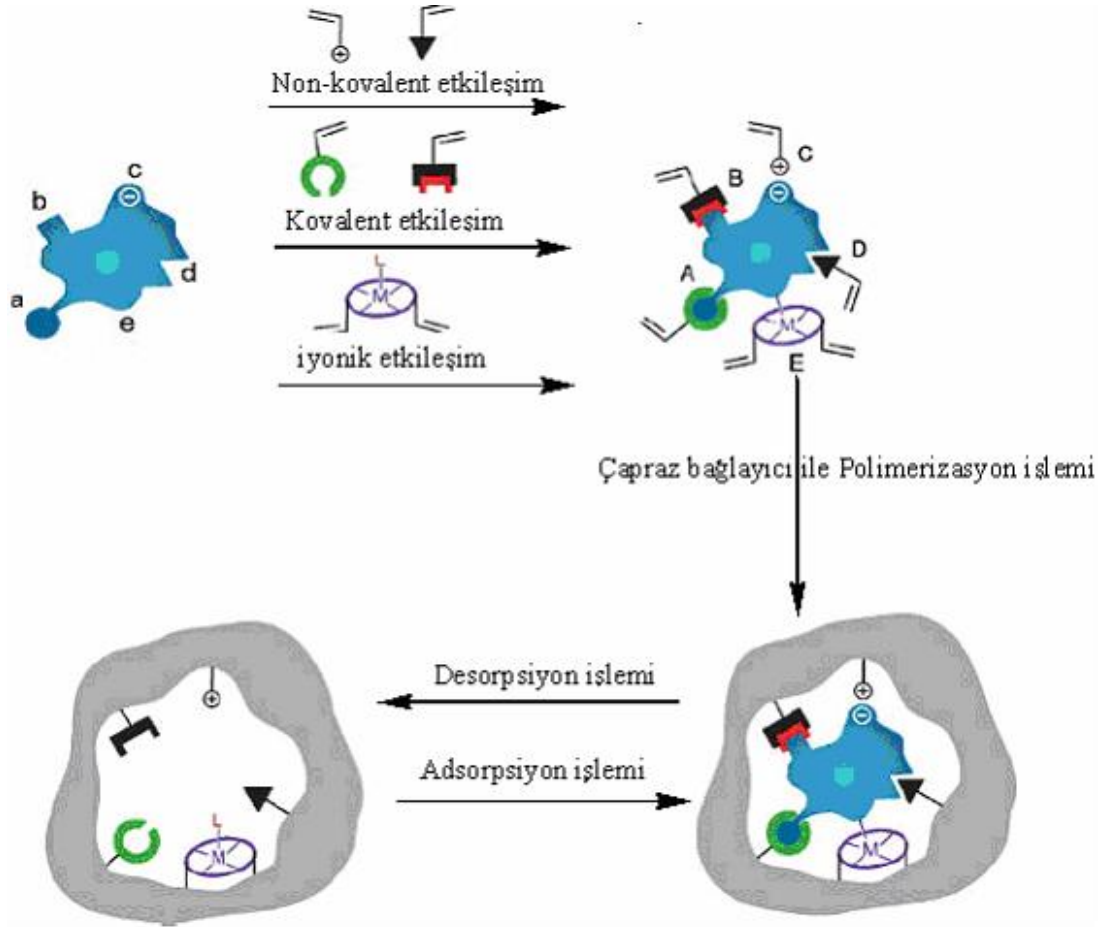
Moleküler baskılama işlemi için her türlü polimerizasyon tekniği kullanılabilir. Yeter ki polimerizasyon koşulları bileşenlere (kalıplar, çapraz bağlayıcı ajanlar ve diğerleri) zarar vermesin. MIP hazırlama yönteminde kullanılan farklı kalıp-monomer etkileşimleri Şekil 2.12'de görülmektedir (Mayers ve Whitcombe 2005).

2.3.2. Moleküler Baskılı Polimerlerin Uygulama Alanları

MIP'ler farmakolojik, analitik, biyolojik seçici moleküller tanıma alanlarında yoğun bir şekilde ilgi görmüş olup, sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez, kapiler elektrokromatografi ve katı-faz ekstraksiyon gibi analitik tekniklerde kullanımı sürekli artmıştır (Haupt 2001), (Zhong ve ark. 2001).

Bir diğer uygulama alanı ise sensörlerde tanıma elemanı olarak kullanılmasıdır (Spegel ve ark. 2002). Substratların yüksek seçicilikle tanınması ve baskılanmış polimerler tarafından bağlanması, materyalin fiziksel ve kimyasal (esneklik, bağlanma bölgelerinin sayısı ve materyalin yapısı gibi) özellikleriyle ilgilidir. MIP'lerin daha

kullanışlı olmaları için, substratın seçiciliğinin öneminin yanında, uygun koşullar altında desorpsiyon ve geri bağlanma kinetiğinin de hızlı olması gerekmektedir. Bu yüzden moleküler baskılanmış yapıların tasarımı oluşturulurken uygun bağlanma etkileşimlerinin seçimi oldukça önemlidir. Birden fazla bağlanma bölgesinin olması, monomerin bağlanma bölgeleri ile kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin daha iyi olması, dolayısıyla moleküler tanımanın daha seçici olmasını gerektirmektedir (Aşçı 2008).



Şekil 2.12. MIP’de kalıp-fonksiyonel monomer etkileşimleri: (a) kovalent etkileşimi, (b) non-kovalent etkileşim, (c) iyonik etkileşimi, (d)hidrofobik veya Van der Waals etkileşimi, (e) Metal-ligand etkileşimi

2.4. İNSÜLİN

İlk kez 1922 yılında, pankreas Langerhans adacıklarında bulunan ve kan şekerini düzenleyen bir hormonun varlığı belirlenerek buna iç ada anlamına gelen insuladan esinlenerek insülin adı verildi.

Proteinlerin birincil yapısını saptayan ilk kişi Frederick Sanger' dir. Sanger ve arkadaşları insülin hormonunun aminoasit dizisini İngiltere'de 1940' lı yılların sonu ve 50' lerin başında ortaya çıkarmışlardır. Sanger'in yaklaşımı zincirleri tamamen hidroliz etmek yerine protein parçalayan enzimleri ve diğer katalizörleri kullanarak, polipeptitleri özgül noktalardan kırmak olmuştur. Bu ajanlardan herhangi birisiyle muamele edilen polipeptit, daha küçük parçalara kırılır. Bu küçük peptit parçaları kromatografi tekniği ile birbirinden ayrılır. Polipeptidin başka bir ajanla muamele edilmesi, onun farklı noktalardan kırılmasına yol açar ve böylece ikinci grup parçalar ortaya çıkar. Sanger bu küçük parçaların aminoasit dizisini saptamak için kimyasal yöntemler kullandı. Daha sonra farklı ajanlarla hidroliz edilerek, elde edilen parçaların birbiri ile çakışan bölgeleri araştırıldı (Gündüz ve ark. 2008). 1949 yılında Sanger tarafından insülinin disülfid köprüleriyle birbirine bağlı iki amino asit zincirinden oluştuğu ortaya konuldu (Yılmaz 1999).

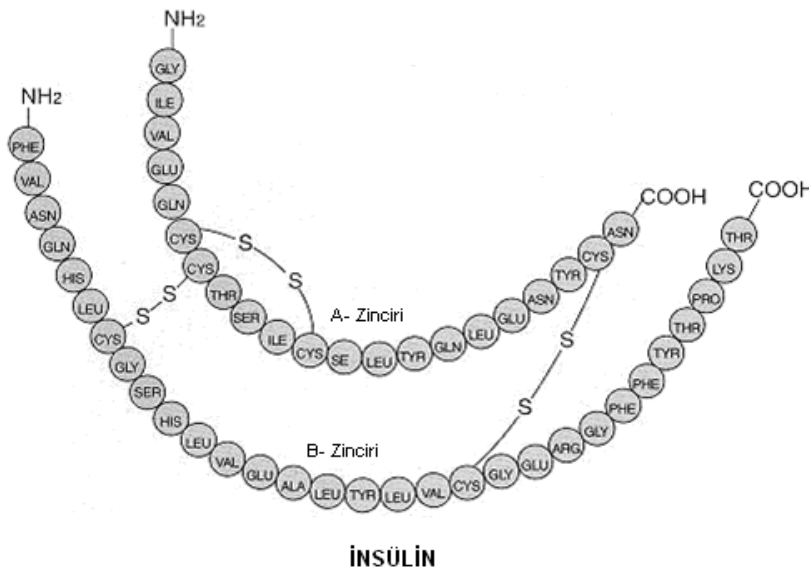
İnsülin, hormon etkisi ilk kez onaylanan, ilk kez kristallendirilen, ilk kez dizisi belirlenen, ilk kez kimyasal yöntemlerle sentezlenen, ilk kez büyük bir öncül molekül halinde sentezlendiği gösterilen ve ilk kez ticari kullanım için rekombinant DNA teknolojisi ile hazırlanan proteindir. Bu etkileyici **“ilkler”** listesine karşın, insülinin molekül düzeyinde nasıl görev yaptığı konusundaki bilgiler, diğer birçok hormonun bu düzeyde nasıl görev yaptığı konusundaki bilgilerden daha azdır.

Pankreas, hem endokrin hemde ekzokrin işlevi olan birçok organdan biridir. Endokrin hücreler, pankreasın ağırlığının ancak %1-2 sini oluşturur. Organın geri kalan kısmı, ekzokrin dokudur; bu dokunun ürettiği bikarbonat iyonları ve sindirim enzimleri, pankreatik kanal aracılığıyla ince bağırsağa taşınır. Bu ekzokrin dokular arasında serpiştirilmiş durumda Langerhans adacıkları denilen ve dolaşım sistemine iki temel hormon salgılayan endokrin hücre kümeleri bulunur. Her adacıkta bulunan alfa hücreleri grubu, bir peptid hormon olan glukagonu; beta hücreleri grubu ise insülin hormonunu salgırlar.

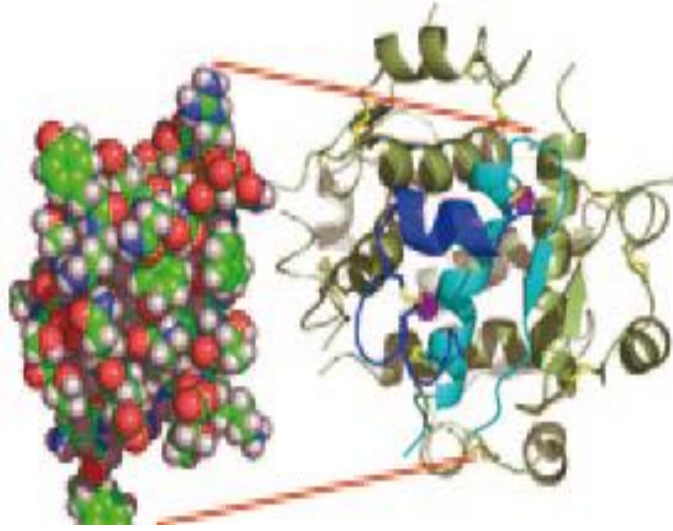
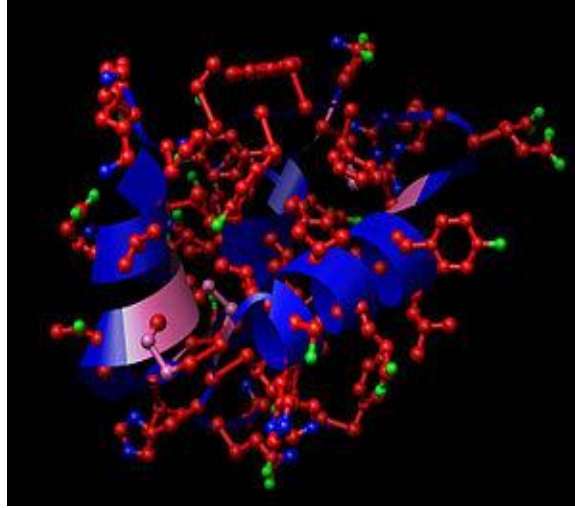
2.4.1. İnsülinin Yapısı

Bir hormon nasıl keşfedilir ve saflaştırılır? Öncelikle, bir dokudaki fizyolojik bir sürecin başka bir dokudan köken alan bir sinyale bağlı olup olmadığına bakılır. Varsayılan hormonun bir fizyolojik etkisi bulunduğundan sonra, hormonun tayini için kantitatif bir biyoanaliz geliştirilebilir. Hormonu içeren özütler, diğer biyomolekülleri saflaştırmada kullanılan tekniklerle (çözücü ile fraksiyonlama, kromatografi ve elektroforez) fraksiyonlanır ve daha sonra her bir fraksiyondaki hormon aktivitesi ölçülür. Bir maddenin ancak saflaştırıldıktan sonra, kimyasal bileşimi ve yapısı saptanabilir (Kılıç 2005). İnsülin söz konusu olduğunda, analiz, insülinde yoksun deney hayvanlarına pankreas özütlerinin (saf olmayan bir insülin kaynağı) enjeksiyonunu ve daha sonra kan ve idrar glukoz derişimlerinde meydana gelen değişikliklerin nicel ölçümünü içerir.

İnsülinin kimyasal yapısı türlere göre farklılık göstermektedir. İnsanda yaklaşık 6000 Dalton molekül ağırlığında olan insülin, 21 amino asitlik A ve 30 amino asitlik B polipeptid zincirlerinden oluşmaktadır. Bu iki peptid birbirine iki disülfid bağı ile bağlıdır, A zinciri üzerinde sistein amino asitleri arasında yer alan bir iç disülfid köprüsü de bulunmaktadır. İnsülin monomerleri, bir komşu insülin monomeriyle antiparalel bağlantı kurarak güçlü dimer bağları oluşturmaktadırlar (Şekil 2.13), (Akar 1997), (Yılmaz 1999), (Bonneil ve ark. 2002). İnsülinin üç boyutlu yapısı Şekil 2.14’ te gösterilmektedir.



Şekil 2.13. İnsan insülin molekülü



Şekil 2.14. İnsülinin üç boyutlu yapısı

Domuz, köpek ve balina insülinleri birbirine çok benzer iken, sığır, koyun, at ve balina insülinlerindeki farklılık A zincirindeki 8. 9. ve 10. amino asitlerde görülür (Yılmaz 1999). Farelerde A zincirindeki bir tek amino asit farklılığından ileri gelen iki farklı insülin vardır. Bazı balık türlerinde ise A ve B zincirlerindeki farklılıklardan kaynaklanan birden fazla insülin türü bulunur (Yenson 1988). Tavşan insülini B zincirinin 30. amino asiti serin iken, insanlarda treonin, domuz, balina ve köpeklerde ise alanindir. İnsülinin etkinliği amino asit dizilimindeki farklılıklardan ziyade disülfid bağlarından kaynaklanır. Bu nedenle domuz insülinini insan insülinine benzeyen etkin bir yapıya dönüştürmek mümkündür. A ve B zinciri birbirinden ayrıldığı zaman ise insülin etkinliğini yitirir (Yılmaz 1999).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

İnsan insülininin kovalent yapısı gösterilmiş ve çeşitli türlerde farklılık gösteren aminoasitlerin karşılaştırılması Çizelge 2.6’da yapılmıştır. Bu farklılıklar, biyoetkinliği etkilemeksizin aynı zincir içinde birçok konumda görülebilir ve özellikle A zincirinin 8, 9 ve 10. konumlarında siktir. Yani, bu bölge biyoetkinlik için kritik değildir.

Çizelge 2.6. Memeli türlerinde insülin yapısındaki farklılıklar

Türler	İnsan aminoasit dizisinden farkı	
	A-zincirindeki konumu	B-zincirindeki konumu
	8-9-10	30
İnsan	Thr-Ser-Ile	Thr
Domuz,köpek,balina	Thr-Ser-Ile	Ala
Tavşan	Thr-Ser-Ile	Ser
Sığır,keçi	Ala-Ser-Val	Ala
Koyun	Ala-Gly-Val	Ala
At	Thr-Gly-Ile	Ala
Deniz aslanı	Ala-Ser-Thr	Ala

Öte yandan, birçok konum ve bölge ileri derecede korunmuş olup bunlar;

- 1) üç tane disülfid köprüsünün konumları
- 2) B zincirinin karboksil uç bölgesindeki hidrofob artıklar ve
- 3) A zincirinin amino ve karboksil uç bölgelerini kapsar.

Bu bölgelerdeki kimyasal değişiklikler veya özgül aminoasitlerin bir diğeri ile yer değiştirmesi, araştırmacılara bileşik bir etkin bölgeyi formüle etme şansı vermiştir.

(Hormonun biyolojik etkinlik için en büyük önemi taşıdığına inanılan bölümü olan B24 ve B25 fenil alanin kalıntıları, insülinin biyoetkinliğini etkileyen mutasyon noktalarıdır). B zincirinin karboksil uç hidrofob bölgesi de insülinin dimerize olmasına katılır.

Glukoz, hücre solunumu için temel yakıt ve diğer organik bileşiklerin sentezinde gerekli olan karbon iskeletlerinin anahtar kaynağıdır. Metabolik denge için belirlenmiş kan glukoz düzeyi insanda yaklaşık 90 mg/100 mL olmalıdır. Bu değer üzerine çıkılacak olursa, insülin salgınarak glukoz düzeyi düşürülür. Glukoz düzeyinin belirlenen değer altına inmesi durumunda da glukagon bunu yükseltmektedir.

İnsülin, beyin hücreleri dışında kalan tüm vücut hücrelerini kandan glukoz alması için uyarmak suretiyle, kan glukoz düzeyini düşürmektedir (Beyin hücreleri, kandan glukozu alma konusunda insüline gereksinim duymamaları nedeniyle olağan dışıdır). İnsülin ayrıca, karaciğerde glikojen yıkımını azaltarak ve aminoasitlerle gliserolün (yağlardan) şekere dönüşümü engellenerek kan glukozunu azaltır. Glukoz homeostasisini sağlayan mekanizmalarda bir terslik olduğunda, sonuçlar ciddi olmaktadır. Endokrin hastalıklarından belki de en iyi bilineni olan Diabetes mellitus (şeker hastalığı) insülin azlığından ya da hedef hücrelerin insüline tepkisizliğinden oluşmaktadır. Sonuç; yüksek kan glukozudur. Glukoz düzeyi o denli yüksek olur ki, şeker hastasının böbrekleri glukoz atmaya başlar, bu da şeker hastalığı tanısında, idrarda glukoz aranmasının nedenidir. İdrarda glukoz arttıkça beraberinde su da götüreceğinden, idrar miktarında ve su içme isteğinde aşırı artış görülür.

Şeker hastalarında, vücut hücreleri, temel enerji maddesi olan glukozu alamadığından, hücre solunumu için enerji kaynağı olarak yağları kullanmak durumundadır. Hastalığın ileri aşamalarında, yağların yıkımından gelen asidik ürünlerin birikmesi, yaşamı tehlikeye düşürecek oranda düşük kan pH' sına yol açmaktadır (Gündüz ve ark. 2008).

Farklı nedenlere bağılı olarak, iki tip şeker hastalığı vardır:

Tip 1 Diabetes mellitus (insüline bağılı şeker hastalığı) otoimmün bir bozukluk olup bağılıklık sisteminin pankreas hücrelerini hedef almasıyla oluşmaktadır. Bu bozukluk daha çok çocukluk döneminde aniden ortaya çıkmakta ve kişinin insülin üretme yetisini ortadan kaldırmaktadır. Tedavi, genelde günde birkaç kez insülin enjekte edilmesi ile yapılır. Yakın zamana kadar, insülin hayvan pankreaslarından elde edilmekteydi, ancak genetik mühendislik, hormonu şifreleyen insan DNA' sının bakterilere yerleştirilmesini sağlayarak daha ucuz bir kaynak yaratmıştır. Tip 1 Diabetes mellitus (T1DM) Batı dünyasında tüm diyabet vakalarının yaklaşık olarak %5-10'unundan sorumludur. β – hücre yıkımından kaynaklanan ciddi insülin eksikliği ile meydana gelmektedir. Netice itibari ile, dolaşan insülin konsantrasyonları ihmal edilecek kadar azdır veya tamamen yoktur. Bu nedenle bu bireyler yaşamak için insüline “bağımlıdırlar” (Demiriz ve Demiriz 2009).

Tip 2 Diabetes mellitus (insüline bağılı olmayan şeker hastalığı) ise ya insülin azlığından, ya da daha sık olarak, hedef hücrelerdeki reseptörlerin farklılaşması sonucu insüline tepkinin azalmasıyla oluşur. Tip 2 hastalığı genelde 40 yaşından sonra, ilerleyen yaşla birlikte görülme olasılığı artarak ortaya çıkar. Tip 2'nin çoğu egzersiz ve perhizle kan glukozlarını dengede tutabilmektedirler. Ancak, yardımcı birçok ilaç da bulunmaktadır. Kalıtım ve aşırı şişmanlık Tip 2 hastalığının oluşmasında temel unsurdur. Birçok yönden, Tip 2 Diabetes mellitus (T2DM) T1DM'den tamamen ayrı bir bozukluktur. Daha sık görülen bir durumdur, tüm dünyada diyabet vakalarının %90'ından fazlasından sorumludur (Demiriz ve Demiriz 2009).

Diabetes mellitus insülinin yetersiz etkisine bağımlı olup olayın nedeni, ya insülinin yokluğu veya bunun etkisine gösterilen dirençtir. Zıt yönde etki yapan glukagon bu tabloyu ağırlaştırır.

2.4.2. İnsülinin Metabolik Etkileri

2.4.2.1. Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkileri: İnsülinin glukoz metabolizması üzerine olan etkileri, en belirgin olarak üç dokuda gözlenir: karaciğer, kas ve yağ dokusu. Karaciğerde, insülin, glukoneogenez ve glikojen yıkımını inhibe ederek, glukoz üretimini azaltır. Kas ve karaciğerde, insülin, glikojen sentezini artırır.

Kas ve yağ dokusunda, insülin, hücre membranlarındaki glukoz-taşıyıcılarını arttırarak, glukoz alımını çoğaltır.

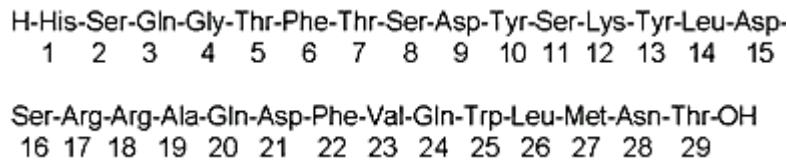
2.4.2.2. Lipid Metabolizması Üzerine Etkileri: İnsülin verilmesinden birkaç dakika sonra, yağ dokusundan yağ asidi salınmasında belirgin bir düşme görülür.

2.4.2.3. Protein Sentezi Üzerine Etkileri: İnsülin, çoğu dokuda, amino asitlerin hücre içine girişlerini ve protein sentezini uyarır (Tokullugil ve ark. 1997).

2.4.3. Glukagon

İlk kez 1923 yılında varlığı belirlenen glukagon, pankreasın Alfa hücrelerinde oluşan, 29 aminoasitlik tek bir polipeptid zincirinden meydana gelen, 3500 Dalton molekül ağırlığında bir hormondur (Şekil 2.15). Glukagonun türlere göre değişmediği, insan, sığır, domuz, tavşan ve rat glukagon yapısının aynı olduğu kabul edilmektedir. Glukagona yapısal ve fonksiyonel olarak benzerlik gösteren bir başka hormon olarak da enteroglukagon ya da glisentin gösterilmektedir. Bu hormon hipoglisemide bağırsak hücrelerinde yapılır (Yılmaz 1999).

Glukagon , epinefrin, kortizol ve büyüme hormonuyla beraber (karşı düzenleme hormonları), insülinin birçok etkisine ters etkiler gösterir. İnsülinin tersine, glukagonun amino asit dizisi bütün memelilerde aynı yapıdadır.



Şekil 2.15. Glukagon molekülü

Glukagon salgılanması yüksek kan şekeri ve insülin tarafından belirgin olarak düşürülür. Bu iki madde, glukoz veya karbonhidrattan zengin yiyeceklerin yenmesinden sonra yükselir.

İnsülin ve glukagon, kandaki glukoz düzeyini ayarlayan, birbirine zıt etkili hormonlardır.

2.5. Önceki Çalışmalar

Arvidsson ve ark. (2002) immobilize metal affinite ligandı (IMA), (Cu^{2+} yüklü imminodiasetik asit) ve anyon değiştirici ligantlarla [2-(dimetilamino) etil grubu] hazırlanan süper makrogözenekli kromatografik kolona *E.coli* hücrelerini immobilize etmişlerdir. Kriyojel hazırlanıp eridikten sonra birbirine bağlı porların büyüklüğü 10-100 μm olarak bulundu. Matriksin büyük gözenek boyutuna sahip olması *E.coli* hücrelerinin kolondan geçmesine kolaylık sağladı. Düşük iyonik güçte iyon-değiştirici kolona bağlı *E.coli* hücreleri 0,35-0,40 M NaCl konsantrasyonunda %70-80 oranında elüe edilirken, IMA-kolona bağlı hücreler ise hem 10 mM imidazol hem de 20 mM EDTA kullanılarak %80 civarında elüe edildi. Hücrelerin bağlanma/elüsyon prosedüründen sonra da yaşamlarını sürdürdükleri görüldü. Bu sonuçlar, mikrobiyal hücrelerin de süper makrogözenekli kolonlarda kullanılabileceğini gösterdi.

Nakamura ve ark. (2004) poli(metakrilik asit-g-etilen glikol) hidrojellerini hazırlayarak bunların büyüklük, şişme davranışları ve insülin adsorpsiyon- desorpsiyon kinetiklerini çalışmışlardır. Hazırlanan hidrojellerin asidik ortamda serbest kaldıklarını ve insülini bağlayabileceğini gördüler. Çalışmada biyoyuumluluğun %4.6-7.2 olduğunu ve bunun da reaksiyon ortamındaki çözücüye bağlı olduğunu görmüşlerdir.

Yu ve ark. (2004) insüline uygun ligantlar bulmak için bir hepta peptit faj kütüphanesini taramışlardır. Peptit sentezlenerek EAH sepharose 4B ile etkileştirildi. Afinite bağlanma için elektrostatik etkileşimlerin daha baskın olduğu, buna ilaveten hidrojen bağının da bağlanmaya katkı sağladığı bulundu.

Lakhiari ve Muller (2004) yaptıkları çalışmada silika taneciklerinin pozitif yüklü dietilamino etil (DEAE) grupları taşıyan dekstranla kaplanmasını sağlayarak, proteinlerin yüksek performans likit affinite kromatografisi (HPLC) ile ayrılmasını incelemişlerdir. Daha sonra bu destek materyallere (silika-dextran-DEAE=SID) N-asetilglukozamin (GlcNAc) bağlamışlardır. Çalışmada, canlı sistemde hipoglisemik peptit hormon olan insülin kullanılarak, destek materyallerinin insüline tersinir ve spesifik ilgi gösterdiği ayrıca yüksek verimle ayırmanın gerçekteştiği görülmüştür. Buna ilave olarak, bazı fizikokimyasal parametreler (pH, NaCl ve insülin konsantrasyonu gibi) çalışıldı. Adsorpsiyon tamponunda artan tuz konsantrasyonu ile adsorbe olan insülin miktarının azaldığı, bazik pH' larda adsorbe olan insülin miktarının

arttığı görüldü. Adsorplanan insülin miktarının insülin derişiminin artmasıyla arttığı bulundu.

Demirel ve ark. (2005) moleküler baskılama metodunu kullanarak bovin serum albumin (BSA) için pH/sıcaklığa duyarlı iyonik poli (N-tert-bütillakrilamit-co-akrilamit/maleik asit) [P(TBA-co-AAm/MA)] hidrojelleri hazırlamışlardır. Sulu BSA çözeltisinden BSA'nın adsorpsiyonu, BSA baskılı ve BSA baskısız hazırlanan hidrojel sistemlerin iki çeşidiyle de araştırıldı. BSA ile baskılanmış hidrojellerin, BSA için yüksek adsorpsiyon kapasitesi ve spesifiklik gösterdiği tespit edildi. Yapılan adsorpsiyon çalışmalarında pH, sıcaklık ve başlangıç BSA konsantrasyonu gibi parametrelerin de hidrojeller için BSA adsorpsiyon kapasitesini etkilediği sonucuna varıldı.

Özcan ve ark. (2006) N-metakriloil-(L)-histidin-bakır (II) [MAH-Cu(II)] gibi yeni bir metal şelatlayıcı monomer kullanarak sitokrom c (Cyt c)'nin seçici ayrılmasını incelemişlerdir. Bu amaçla hazırlanan mikroküreler süspansiyon polimerizasyon yöntemiyle, etilen glikoldimetakrilat ve MAH-Cu(II)-(L)-histidinden hazırlandı. Polimerizasyondan sonra kalıp histidine baskılanmış metal-şelatları oluşturuldu. Cyt c adsorpsiyon kapasitesinde anlamlı kayıp olmaksızın L-histidin baskılı metal-şelat mikroküreler bir çok defa kullanıldı.

Yao ve ark. (2006) nanometre boyutlu parçacıklar gömülü yeni süpermakrogözenekli monolit kriyojelleri, alil glisidileter (AGE), N,N'-metilen-bis-akrilamit (MBAAM) ve akrilamidin (AAm) kopolimerizasyonu ile hazırlamışlardır. Bu özel ayırma matriksinin gözenek boyutunu 10-50 µm çapında bularak, BSA'nın adsorpsiyon-desorpsiyon özelliklerini incelemiş ve bu yeni kriyojelin protein kromatografisi için kullanılacağını belirtmişlerdir. Kriyojeldeki nano parçacıkların morfolojisi ve jel matriks yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve taşıma elektron mikroskobu (TEM) yoluyla analiz edilmiştir.

Odabaşı ve ark. (2007) yumurta akı ve sulu çözeltiden lizozimin saflaştırılması için lizozim-baskılı polimerler hazırlamışlardır. Bu amaçla p(HEMA-MAH)-Cu²⁺ polimerik destek materyalini hazırlamışlar. Önce MAH-Cu²⁺ kompleksi, ardından lizozim-baskılı poli(HEMA-MAH) [Lys-MIP] tanecikleri oluşturuldu. Daha sonra, kalıp lizozim 0,1 M NaCl çözeltisi kullanılarak uzaklaştırıldı. Lys-MIP'in spesifik yüzey

alanı $22,9 \text{ m}^2/\text{g}$, partikül büyüklüğü $20-63 \text{ }\mu\text{m}$ ve şişme oranı ise %57 olarak bulundu. Analiz sonuçlarına göre, parçacıkların $421 \text{ }\mu\text{mol MAH/g}$ polimer içerdiği, maksimum lizozim adsorpsiyon kapasitesinin ise $12,1 \text{ mg/g}$ olduğu bulundu.

Yılmaz ve ark. (2009) tavuk yumurta akından lizozim saflaştırmak için N-metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) içeren poli(2-hidroksietil metakrilat) [PHEMATrp] süper makrogözenekli kriyojelleri hazırladılar. PHEMATrp kriyojel FT-IR, SEM ve şişme çalışmalarıyla karakterize edildi. PHEMATrp kriyojelin parçacık boyutu $60-100 \text{ }\mu\text{m}$, yüzey alanı ise $50 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulundu. Kriyojelin denge şişme oranı pHEMATrp için $6,99 \text{ g H}_2\text{O/g}$ ve PHEMA için ise $7,18 \text{ g H}_2\text{O/g}$ olarak hesaplandı. Lizozim adsorpsiyon çalışmaları sürekli sistem içinde farklı koşullar altında araştırıldı (pH, akış hızı, protein konsantrasyonu, sıcaklık, tuzun cinsi). Sulu çözeltilerden PHEMA ve pHEMATrp kriyojelin lizozim adsorpsiyon kapasitesi sırayla $2,9$ ve $46,8 \text{ mg/g}$ ($0,49$ ve $7,85 \text{ mg/ml}$) olarak hesaplandı. Lizozim $0,5 \text{ M}$ etilen glikol çözeltisiyle %91' lik bir geri kazanımla desorbe edildi. PHEMATrp kriyojel, yumurta akından lizozimin saflaştırılması için kullanılarak, lizozimin saflığı SDS-PAGE ile belirlendi.

Singh ve Chauhan (2010) medikal öneme sahip bir jel olan Psyllium (şeker düşürücü ilaç) ve akrilamit/metakrilamit hidrojellerini hazırlayarak FT-IR analizlerini yapmışlardır. İlaç yüklenen hidrojellerden insülinin serbest bırakılması üzerine pH etkisini incelemişlerdir. pH 7.4 tamponu, saf su ve pH 2.2 tamponu kullanılarak, en iyi serbest insülin miktarını pH 7.4 tampon sisteminde elde etmişlerdir.

Derazshamshir ve ark. (2010) insan kanından hemoglobinin uzaklaştırılması için yeni nesil moleküler baskılı makrogözenekli hidrojeller hazırlamışlardır. Bu amaçla öncelikle monomer olarak pHEMA' yı sentezleyip hemoglobinle kompleksleştirmişlerdir. Hazırladıkları hemoglobin baskılı kriyojellerin karakterizasyonunu, FT-IR, SEM, şişme testi, akış hızı ve yüzey alan ölçümleri ile belirlemişlerdir. Seçicilik deneylerinde yarışmalı protein olarak miyoglobin ve bovin serum albumin (BSA) kullanılmıştır. Hazırlanan poli(HEMA-MAH) kriyojellerin miyoglobin ve BSA varlığında hemoglobin için yüksek bağlanma kapasitesi ve seçiciliği gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca hazırlanan kriyojelin hemoglobin adsorpsiyon kapasitesinde anlamlı bir azalma göstermeyip defalarca kullanılacağı görülmüştür.

Bereli ve ark. (2010) serum proteinlerin analizinde önemli yeri olan immüoglobülin G ve albüminin uzaklaştırılması için Cibacron Blue F3GA ve immünodiasetik asetik- Cu^{+2} içeren poli glisidil (metakrilat) (PGMA) mikro küreleri poli HEMA kriyojel içine gömdüler. PGMA mikro küreleri Cibacron Blue F3GA, immünodiasetik asit- Cu^{+2} ile modifiye edilmiştir. Modifiye edilmiş bu PGMA mikrokürelerin varlığında serbest radikal polimerizasyonu ile poli HEMA kriyojellerini sentezlediler. Hazırlanan poli HEMA ve poli HEMA/PGMA kompozit kriyojellerin şişme testleri ve SEM analizleri yapıldı. Protein çalışmalarında, PGMA-Cibacron Blue F3GA gömülü poli HEMA kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesi 342 mg/g, PGMA-immünodiasetik asetik- Cu^{+2} gömülü p(HEMA) kriyojellerin immüoglobülin G adsorpsiyon kapasitesi ise 257 mg/g olarak bulundu.

Tyagi ve ark. (2011) poli (HEMA-MAA) hidrojelleri, serbest radikal başlatıcı olarak APS/TEMED ve çapraz bağlama ajanı olarak etilen glikol dimetakrilat, monomer olarak farklı konsantrasyonlarında metakrilik asit, 2-hidroksi etil metakrilat kullanarak redoks serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmişlerdir. %30 MAA kullanılarak hazırlanan poli (HEMA-MAA) için en yüksek şişme derecesi %587 olarak bulundu. pH 8' de %10 MAA kullanılarak sentezlenen hidrojin şişme derecesi ise %413 olarak bulundu. SEM analizinde, hazırlanan hidrojel partiküllerinin, karboksil gruplarının iyonizasyonundan dolayı düzensiz ve kümeli bir yapıda olduğu gözlemlendi. %10, 30, 40 ve %60 MAA derişimlerinde hazırlanan hidrojel ile en iyi insülin yükleme kapasitesi %60 MAA ile bulundu. Diyabet fareler ile yapılan çalışmada bu jellerin diyabet hastaları için uygun, güvenilir ve etkili olduğu görüldü.

Ünlü ve ark. (2011) çalışmalarında monolitik kriyojel içine gömülü Ni^{+2} -diatomit (da) partiküllerinin protein adsorpsiyon kapasitesini araştırmışlardır. Bunun için süpermakrogözenekli poli HEMA monolitik kompozit- Ni^{+2} - (da) hazırlanarak insan serumu ve sulu çözeltiden serum albuminini saflaştırmışlardır. Kompozit kriyojin karakterizasyonu SEM ile araştırılarak, pH' nın etkisi, gömülü Ni^{+2} - (da) miktarı, başlangıç serum albumin derişimi, sıcaklık ve akış hızı gibi parametrelerin adsorpsiyon üzerine etkisi incelendi. En yüksek serum albumin adsorpsiyonu pH: 8.0 fosfat tamponu ile 485.15 mg/ g olarak bulundu. Ayrıca hazırlanan kompozit kriyojin serum albumin adsorpsiyon kapasitesinde anlamlı bir azalma göstermeyip defalarca kullanılacağı görülmüştür.

Sarı ve ark. (2011) insülinin afinite adsorpsiyonu için poli (etilen glikol dimetakrilat-N-metakriloil-(L)-histidin) poli (EDMA-MAH) mikroküreleri hazırlamışlardır. Hazırlanan mikrokürelerin karakterizasyonu SEM, FT-IR, şişme testi ve element analizi ile yapıldı. Mikrokürelerin ortalama boyutu 2-2 µm olarak bulundu. Poli (EDMA-MAH) ve poli (EDMA)'nın denge şişme oranları sırasıyla %65 ve %55 olarak bulundu. Adsorpsiyon deneyleri farklı koşullar altında (pH, sıcaklık, protein derişimi ve iyonik şiddet gibi) gerçekleştirildi. Maksimum insülin adsorpsiyon kapasitesi 24.7 mg /g poli (EDMA-MAH) olarak bulundu. 10 kullanımda dahi insülin adsorpsiyon kapasitesinde anlamlı bir azalma gözlenmedi.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar

İnsülin (Actrapid® HM 100 IU/ml), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) Fluka AG (İsviçre) firmasından temin edilip kullanılana kadar 4 °C'de muhafaza edildi. Amonyum persülfat, N,N'-metilen bisakrilamid (MBAAm), Tris-baz, HCl, Glisin, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl, CH₃COOH ve NaOAc Sigma firmasından temin edilip kullanıldı. MAH ise Hacettepe Üniversitesi'nden temin edildi.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Hassas terazi (Gec Avery)

pHmetre (Mettler-Toledo)

Manyetik karıştırıcı (Heidolph)

Spektrofotometre (UV mini 1240 UV-Vis spectrophotometer Shimadzu)

Peristaltik pompa (Watson-Marlow)

FT-IR (Mattson 1000 FT-IR Spectrometer)

SEM (JEOL, JSM 5600)

3.3. Tampon Çözeltiler

Tampon çözeltiler Ekler kısmında verilmiştir.

3.4. MAH Sentezi

MAH, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı tarafından aşağıdaki prosedüre göre sentezlenmiştir (Garıpcan ve Denizli 2002).

5.0 g L-histidin metilester ve 0.2 g hidrokinon 100 mL diklorometan içinde çözüldü. Çözelti 0 °C'de soğutulduktan sonra 12.7 g trietilamin ilave edildi. Ardından 5 mL metakriloil klorür yavaşça bu çözeltiliye katılarak 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon sonunda, reaksiyona girmeyen metakriloil klorür %10 NaOH ile ekstrakte

edildi. Sulu faz evapore edildikten sonra MAH etanol ve etilasetat içinde kristallendirildi.

3.5. Süpermakrogözenekli İnsülin Baskılı Kriyojellerin Hazırlanması

3 µmol (0.729 mg) MAH ile 3 µmol (17.5 mg/mL) insülin oda sıcaklığında 2 saat karıştırıldı. Öte yandan 0.283 g N,N'-metilen-bisakrilamid (MBAAm) 10 mL saf suda çözüldü. 1.3 mL HEMA, 3.7 mL saf suda çözünerek önceden hazırladığımız N,N'-metilen- bisakrilamid ile karıştırıldı. Sonra bu karışıma insülin+MAH karışımı ilave edildi. Serbest radikal polimerleşmesi 20 mg amonyum persülfat (APS)–25 µl TEMED çifti ile oluşturuldu. Sonra reaksiyon karışımı, altında kapalı bir çıkışı olan plastik bir şırıngaya (5 mL, iç çapı 0.8 cm) bırakıldı. Polimerleşme çözeltisi 24 saat -12 °C' de dondurulduktan sonra oda sıcaklığına getirilen kriyojeller hazırlanmış oldu.

3.6. İnsülinin Uzaklaştırılması

Hazırlanan kriyojelden, insülinin ve reaksiyona girmeyen diğer kimyasalların uzaklaştırılması için kriyojel 2 saat boyunca 0.1 M Glisin-HCl tamponu (pH: 3.5) ve 1 saat saf suyla yıkandı.

3.7. Kriyojelin Karakterizasyonu

3.7.1. Şişme Testi

Başlangıçta kuru olan kriyojel dikkatlice tartıldıktan sonra, 50 mL saf su içeren bir beher içine konuldu. 25 °C' de 2 saat bekletildikten sonra, kriyojeller ortamdaki alınıp hassas terazi ile tartıldı. Kuru ve şişmiş kriyojellerin ağırlıkları kaydedilerek, polimerik kriyojellerin su içeriği aşağıdaki eşitlik ile hesaplandı:

$$\text{Şişme oranı} = (W_s - W_o) / W_o \dots\dots\dots(3.1)$$

W_o ve W_s sırasıyla kriyojelin su bağlamadan önceki ve sonraki ağırlıkları (g) olarak gösterildi.

Kriyojellerin makrogözeneklilik yüzdesinin bulunabilmesi için uygulanan yöntem şu şekildedir:

Denge şişme oranına sahip olan kriyojel örnekleri (W_1) tartıldı. Daha sonra şişmiş kriyojel örneği bir enjektör içerisine alınıp, kriyojellerin makrogözeneklerinde

bulunan suyun uzaklaştırılması için kriyojel enjektör yardımıyla sıkıldı ve kriyojellerin (W_2) tartılması sağlandı. Aşağıda verilen eşitlik kullanılarak kriyojellerin sahip olduğu makrogözeneklerin yüzdelik derecesi hesaplandı:

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

3.7.2. Yüzey Morfolojisi Deneyi

İnsülin baskılanmış poli (HEMA-MAH) kriyojellerin kesit yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi. İlk aşamada, kriyojellerin gözenek yapısının korunması için kriyojeller kararlı bir hale getirildi. Bu amaç için, kriyojel örnekleri gece boyu 0.15 M sodyum kokadilat çözeltisi içinde (%2.5 glutaraldehit içeren) bekletilmiştir. %1' lik osmiyum tetraoksit içerisinde 1 saat bekletildikten sonra, kriyojel örnekleri aşamalı olarak etanol içerisinde dehidrate edilmiş ve kritik sıcaklık kurutucusunda +10 °C'de ısıtıldı. Bu aşama, geçiş sıvısı olan etanolün sıvı karbondioksit ile değişimi için yapıldı. Sıcaklık daha sonra, +40 °C' ye (100 atm basınç altında) yükseltildi. Bu işlem sırasında; sıvı karbon dioksit doğrudan gaz formuna geçirilmiş ve örneğin buharlaşma ısısı veya yüzey gerilim kuvvetleri dolayısıyla zarar görmesi önlenmiştir. Basıncın 1 atm' ye yükseltilmesi ile birlikte kuru kriyojel örnekleri elde edildi. Son aşama olarak, kriyojel örnekleri ince altın tabaka ile kaplanıp, SEM görüntüleri alındı.

3.7.3. FT-IR Çalışmaları

P(HEMA-MAH) ve insülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojellerin yapı analizi FT-IR spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, kriyojel örnekleri oda sıcaklığında kurutulup daha sonra, havanda dövülerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen örnek, potasyum bromür (KBr, 0.1 mg, IR Grade) ile karıştırılıp pelet haline getirildi. Peletlerin FT-IR spektrumu 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında alındı.

3.8. İnsülin Adsorpsiyon Dinamiklerinin Belirlenmesi

Kriyojel, 20 mL saf su ile 30 dakika yıkandıktan sonra 0.1 M fosfat tamponu (pH: 7.4) ile 1 saat dengeye gelmesi sağlandı. Daha sonra farklı derişimlerde hazırlanan insülin çözeltileri 2 saat boyunca kolondan geçirildi. Adsorplanan insülin miktarı

280 nm'de UV-absorbansdaki düşüş izlenerek belirlendi. Akış hızı (0.5-4.0 mL/dak), başlangıç insülin derişimi (0.125-1.5 mg/mL), pH (0.1 M asetat tamponu; pH: 4.0, 5.0 ve 6.0- 0.1 M fosfat tamponu; pH: 6.0, 7.0, 7.4 ve 8.0- 0.1 M Tris-HCl tamponu; pH: 7.0, 7.4, 8.0 ve 9.0), sıcaklık (4-45 °C) ve iyonik şiddet (0.01-1 M NaCl) gibi parametrelerin insülin adsorpsiyonu üzerine etkileri incelendi.

İnsülin adsorpsiyon kapasitesi aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplandı.

$$Q = (C_o - C) \cdot V / m \dots\dots\dots(3.3)$$

Q: Kriyojelde adsorplanan insülin miktarı (mg/g)

C_o: Kriyojele yükleme yapılmadan önceki insülin derişimi (mg/mL)

C: Kriyojele yükleme yapıldıktan sonraki insülin derişimi (mg/mL)

V: Hacim (mL)

m: Kullanılan kriyojelin ağırlığı (g)

DeneySEL aşamalar sonunda kriyojelde adsorplanan insülin 2 saat boyunca 0.1 M Glisin-HCl tamponu (pH 3.5) ve 1 saat saf su ile yıkanarak kriyojeller tekrar kullanıldı.

3.9. Standart İnsülin Eğrisi

17.5 mg/mL' lik stok insülinde farklı derişimlerde çözeltiler hazırlanarak 280 nm'de absorbans değerleri okundu. İnsülin derişimlerine karşılık absorbans değerleri grafiğe geçirilerek standart insülin eğrisi elde edildi (Şekil 4.4).

3.10. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

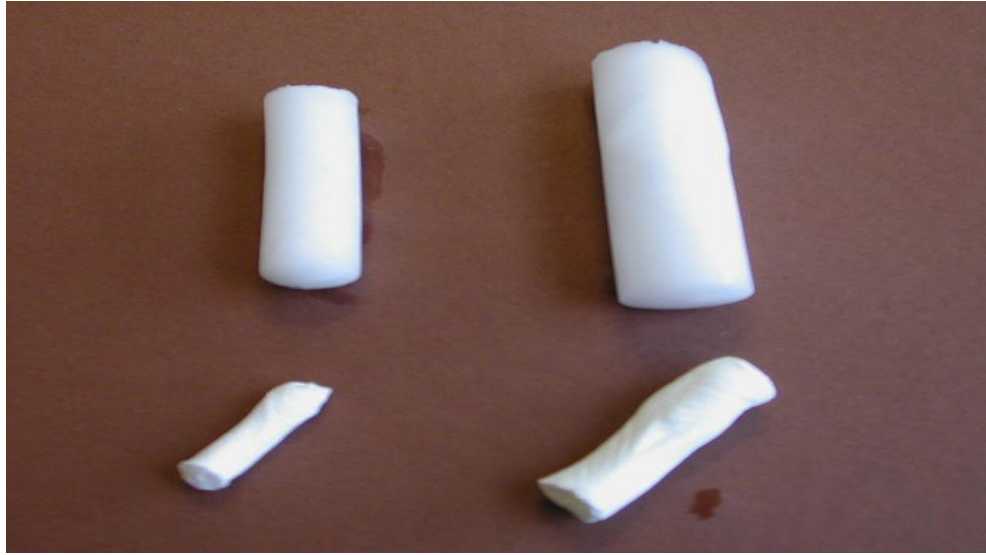
İnsülin desorpsiyonu için 0.1 M Glisin-HCl tamponu (pH 3.5) desorpsiyon ajanı olarak kullanıldı. İnsülin baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojelin desorpsiyon ajanı 1 mL/dk akış hızında 2 saat süreyle kolondan geçirildi. Desorpsiyon ortamındaki insülin miktarı 280 nm' de spektrofotometrik yöntem ile belirlendi.

İnsülin baskılanmış poli(HEMA-MAH) kriyojelin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için aynı adsorbentle adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 5 kez tekrarlanmıştır. Her desorpsiyon işleminde insülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojel, 0.1 M Glisin-HCl tamponu (pH: 3.5) ile 2 saat ve 20 mL saf su ile 1 saat boyunca yıkandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Şişme Deneyi

Yapılan çalışmalarda p(HEMA) kriyojeli için makrogözenek miktarı eşitlik (3.1) yardımıyla %71.6 olarak bulundu. İnsülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojel için ise makrogözenek miktarının %87.8 olduğu bulundu. P(HEMA) ve insülin baskılanmış P(HEMA-MAH) kriyojellerin denge şişme oranı ise eşitlik (3.2) kullanılarak sırasıyla 8.56 ve 7.20 g H₂O/ g polimer olarak bulundu. Şekil 4.1a ve Şekil 4.1b' de şişmiş ve kurutulmuş p(HEMA) ile p(HEMA-MAH) kriyojellerin görüntüsü verilmektedir.



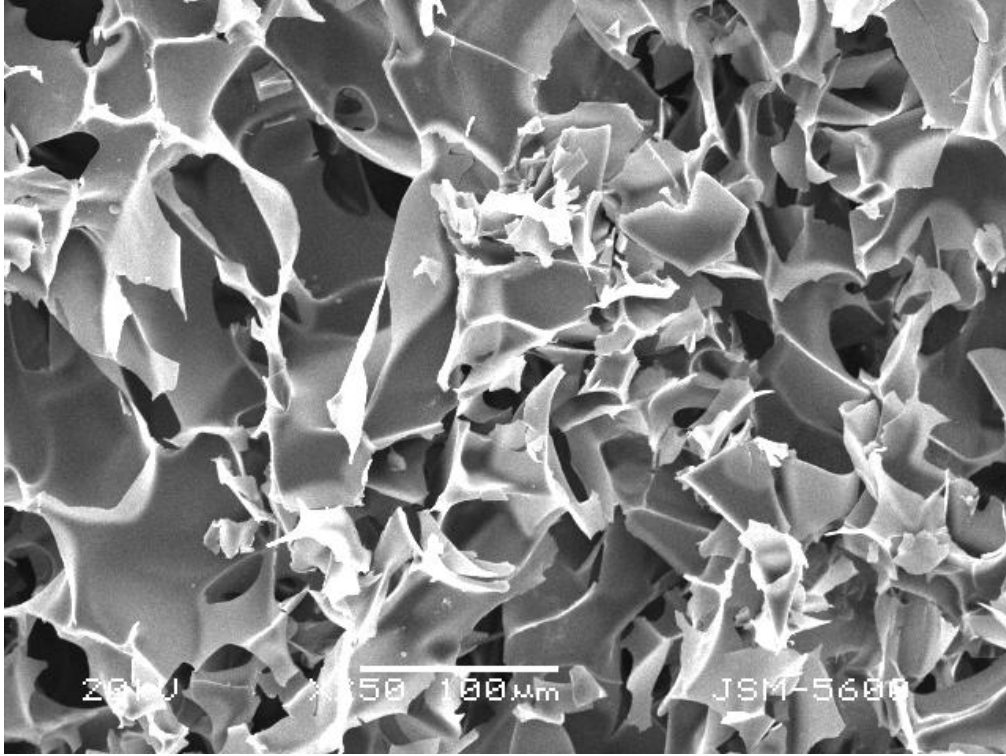
Şekil 4.1a. Şişmiş ve kurutulmuş p(HEMA) kriyojel



Şekil 4.2b. Şişmiş ve kurutulmuş p(HEMA-MAH) kriyojel

4.2. Yüzey Morfolojisi

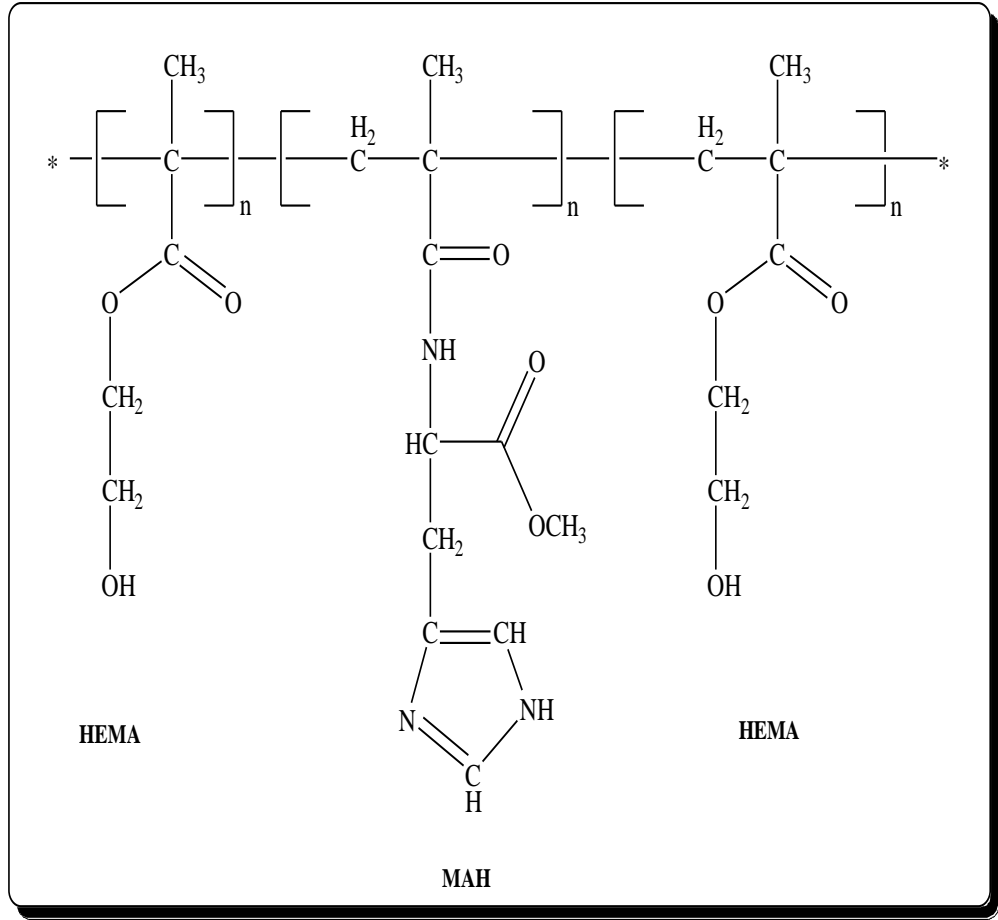
Sem analizinde, p(HEMA-MAH) kriyojelin gözenek boyutu 50-100 µm olarak bulundu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. P(HEMA-MAH) kriyojelin SEM görüntüsü

4.3. FT-IR çalışmaları

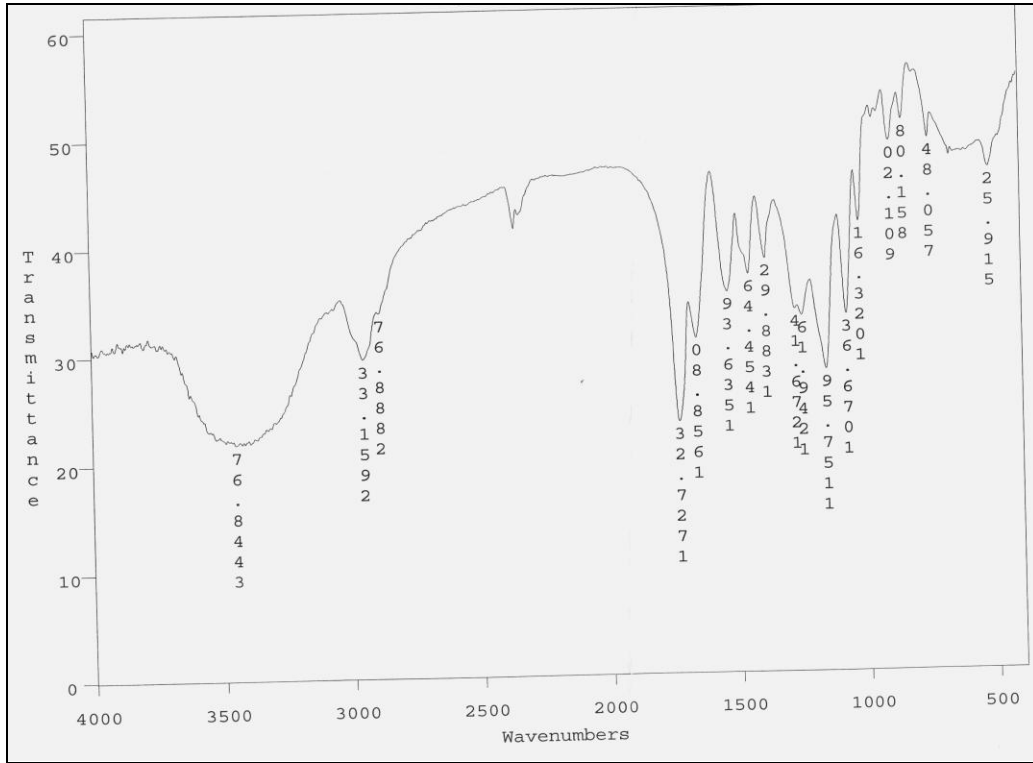
Çalışmada kullanılan p(HEMA-MAH) kriyojelinin olası yapısı Şekil 4.3' de verilmektedir.



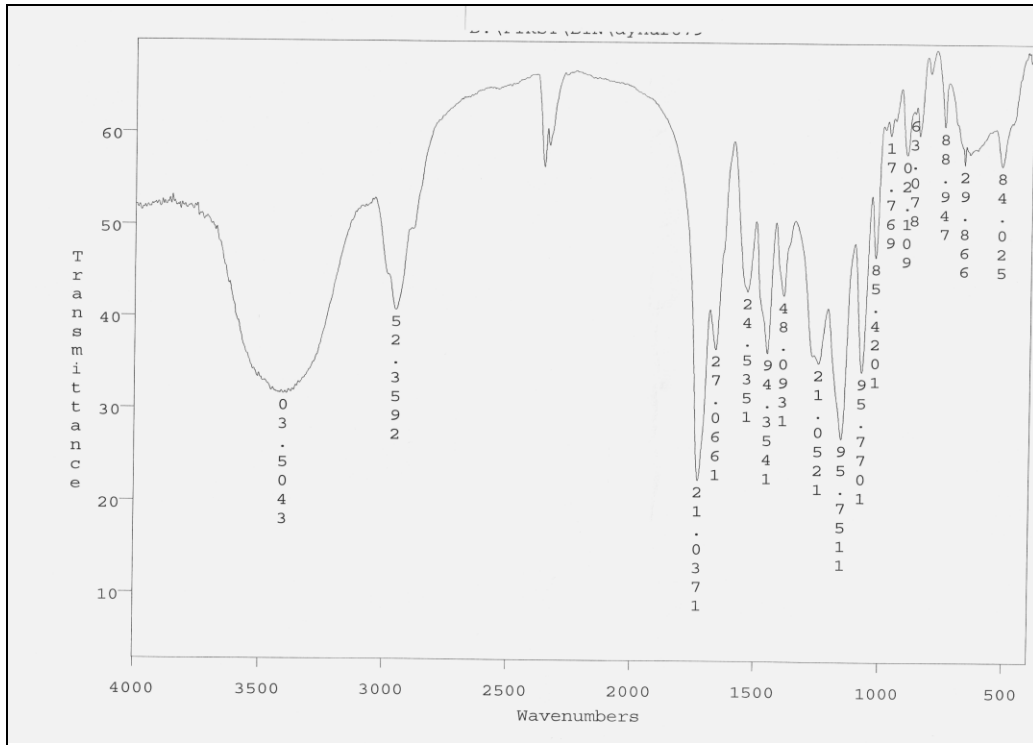
Şekil 4.3. P(HEMA-MAH) kriyojellerinin molekül yapıları (Yılmaz 2007)

P(HEMA-MAH) ve insülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojellerine ait FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’ te verilmektedir. P(HEMA-MAH) spektrumunda 3449 cm^{-1} ’ de gözlenen yayvan band O - H esnemesinden, 2952 cm^{-1} ve 2889 cm^{-1} ’ de gözlenen bandlar ise C - H titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1727 cm^{-1} ’ de görülen güçlü band yapıdaki karbonil (C = O) grubundan ileri gelmektedir. 1659 ve 1536 cm^{-1} ’ de gözlenen orta şiddetteki bandlar sırasıyla C - O (amid I) ve N - H (amid II) gruplarının varlığını göstermektedir. P(HEMA-MAH) ve insülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojellerinin IR spektrumları karşılaştırıldığında, insülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojelindeki O - H grubunun daha düşük frekansta (3405 cm^{-1}) olduğu gözlenmiştir. P(HEMA-MAH) kriyojeli için gözlenen O - H bandı insülin baskılanmış p(HEMA-MAH)’ a göre daha yayvan bir band olarak gözlenmektedir. Karbonil ve amid (I ve II) fonksiyonel gruplarına ait bandlarda ise anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI



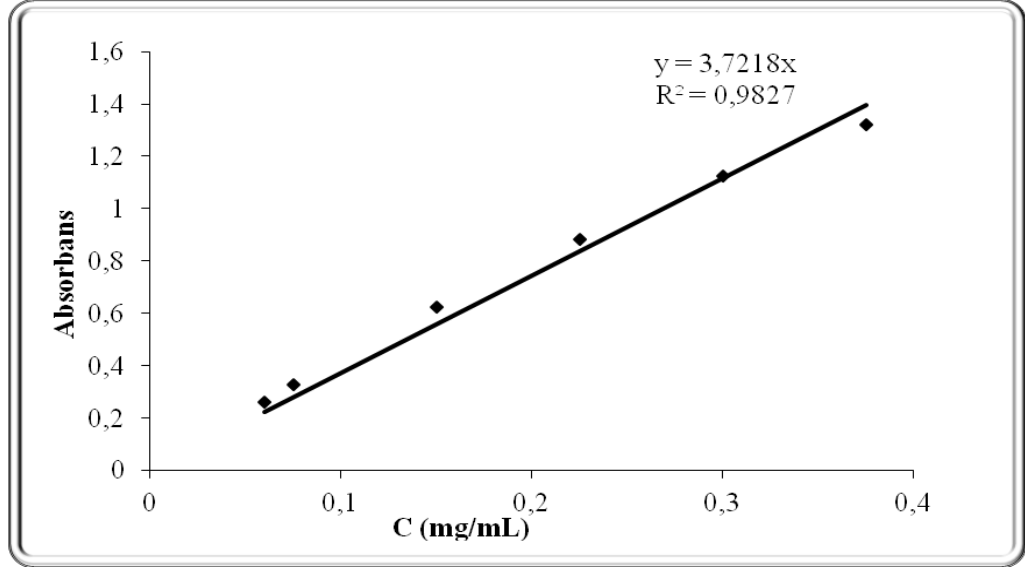
Şekil 4.4. P(HEMA-MAH) kriyojellerin FT-IR spektrumu



Şekil 4.5. İnsülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojellerin FT-IR spektrumu

4.4. Standart İnsülin Eğrisinin Belirlenmesi

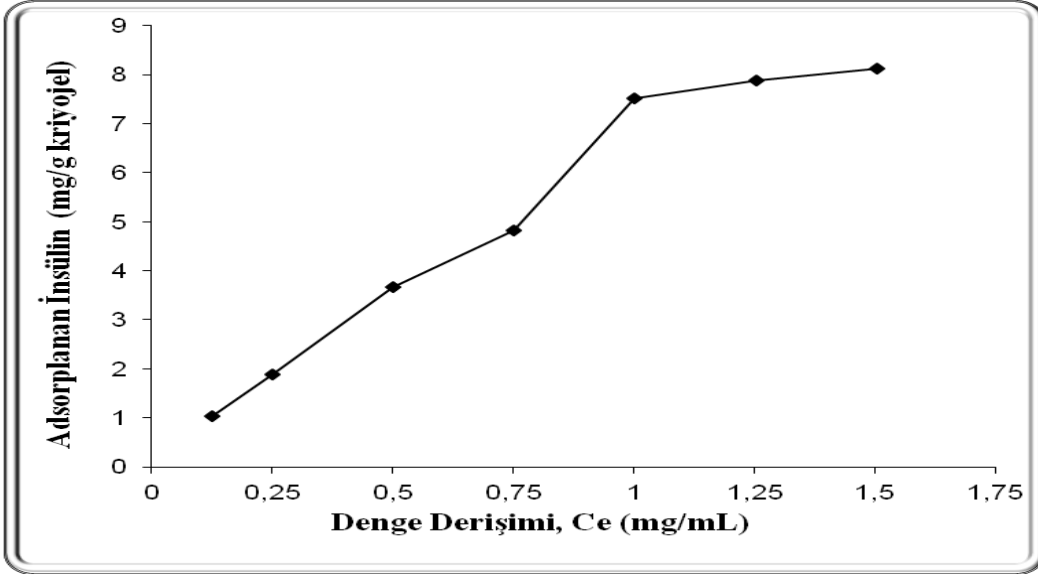
Kısım 3.9 'da belirtilen şekilde hazırlanan standart insülin eğrisi Şekil 4.6 'da verilip, R^2 değeri 0.9827 olarak bulundu.



Şekil 4.6. Standart insülin eğrisi

4.5. İnsülin Başlangıç Derişiminin Etkisi

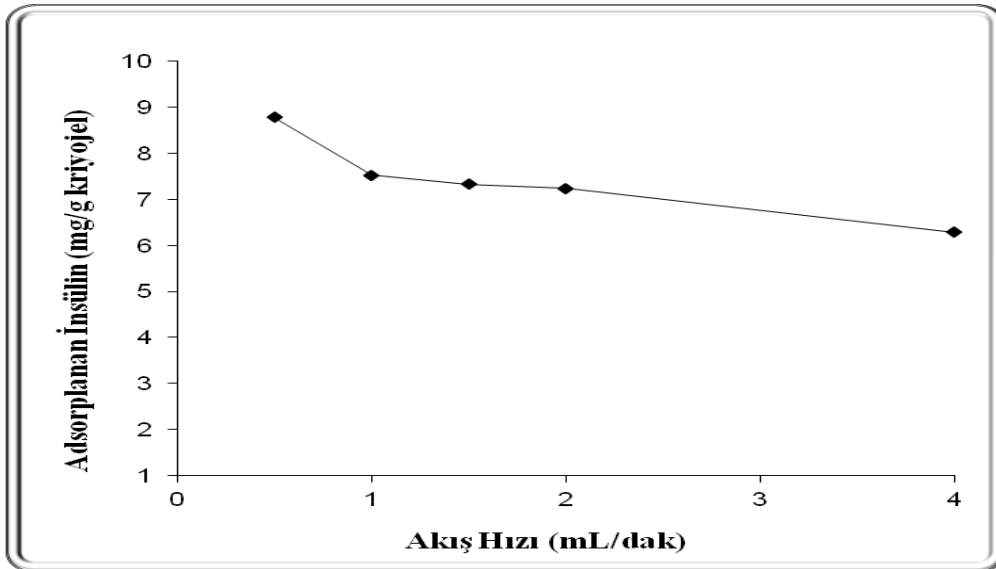
Adsorpsiyon kapasitesi üzerine insülin derişiminin etkisini belirlemek amacıyla, 17.5 mg/mL stok çözeltilerden belli seyreltmeler yapılarak 0.125 –1.5 mg/mL aralığında insülin çözeltileri hazırlandı. Şekil 4.7' de görüldüğü gibi, çözeltideki insülin derişiminin artmasıyla, birim kriyojel başına adsorplanan insülin miktarı artmaktadır. Maksimum insülin adsorpsiyonunun 1.5 mg/mL' lik derişimde 8.13 mg/g olduğu görüldü.



Şekil 4.7. İnsülin başlangıç derişiminin etkisi. 0.1 M fosfat tamponu pH:7.4, T:25 °C, Akış hızı: 1.0 mL/dak

4.6. İnsülin Adsorpsiyonuna Akış Hızının Etkisi

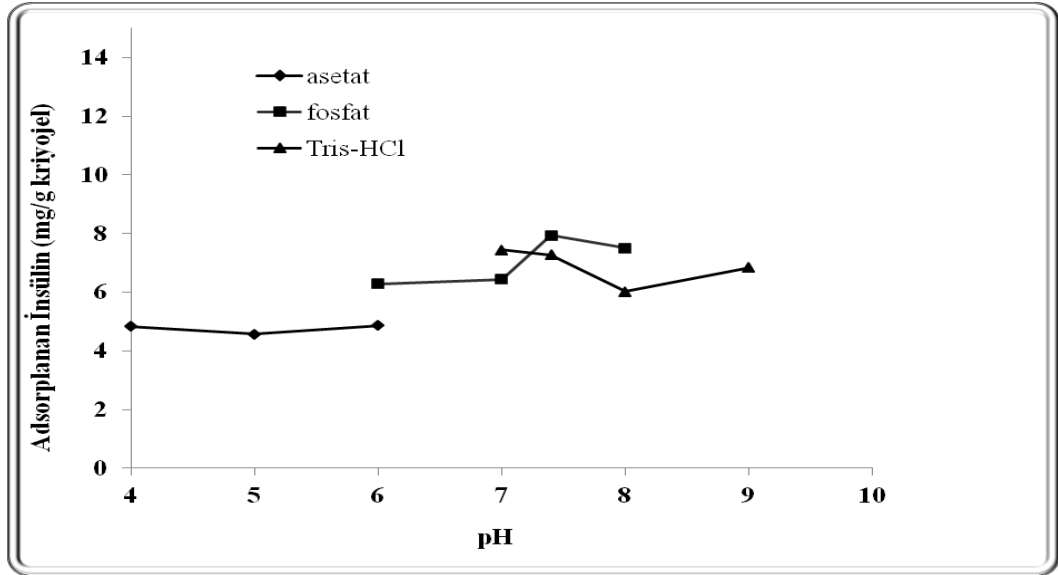
İnsülin baskılı kriyojel kolonunda akış hızının artmasıyla adsorbe olmuş insülin miktarı azalması Şekil 4.8’ de verilmiştir. Akış hızının 0.5 mL/dak’ dan 4 mL/dak’ ya artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinin de 8.78 mg/g’ dan 6.29 mg/g’ a kadar azaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.8. İnsülin adsorpsiyonuna akış hızının etkisi. 0.1 M fosfat tamponu pH:7.4, T:25 °C, İnsülin derişimi: 1 mg/mL

4.7. İnsülin Adsorpsiyonuna pH' nın Etkisi

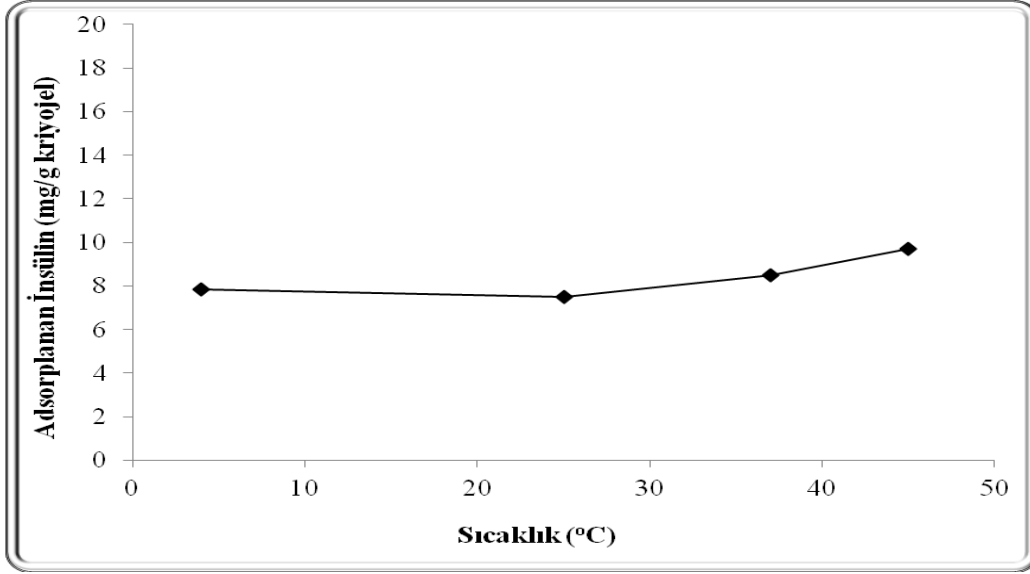
İnsülin adsorpsiyon kapasitesine pH' nın etkisini belirlemek amacıyla çözelti pH' sı 4.0-9.0 aralığında farklı tampon çözeltileri kullanılarak değiştirildi. Çözelti pH' sı pH: 4.0-6.0 için 0.1 M asetat; 6.0-8.0 için 0.1 M fosfat tamponu ve 7.0-9.0 için 0.1 M Tris-HCl tamponları kullanıldı. İnsülin adsorpsiyonunun pH ile değişimi Şekil 4.9'da verilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi maksimum insülin adsorpsiyonu 0.1M pH: 7.4 fosfat tamponu ile 7.93 mg/g olarak belirlendi.



Şekil 4.9. İnsülin adsorpsiyonuna pH' nın etkisi. İnsülin derişimi: 1 mg/mL, T: 25 °C, Akış hızı: 1.0 mL/dak

4.8. İnsülin Adsorpsiyonuna Sıcaklığın Etkisi

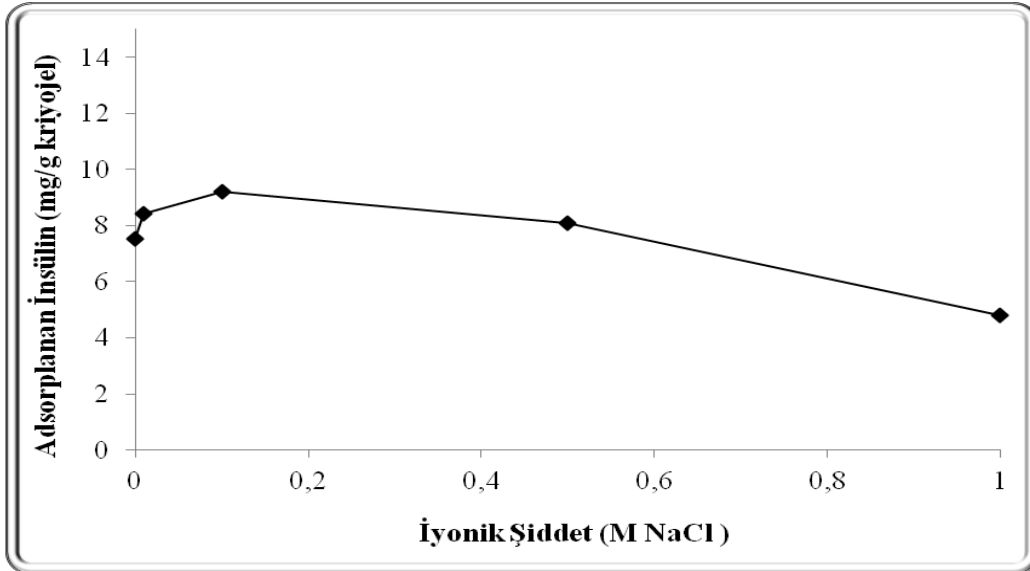
İnsülin adsorpsiyon kapasitesine sıcaklığın etkisi Şekil 4.10' da verilmektedir. Çalışılan 4, 25, 37 ve 45 °C sıcaklıklarda maksimum adsorpsiyon 45 °C' de 9.70 mg/g olarak belirlendi.



Şekil 4.10. İnsülin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi. İnsülin derişimi: 1 mg/mL, 0.1 M fosfat tamponu pH: 7.4, Akış hızı: 1.0 mL/dak

4.9. İnsülin Adsorpsiyonuna İyonik Şiddetin Etkisi

İnsülin adsorpsiyon kapasitesine iyonik şiddetin etkisi Şekil 4.11’ de görülmektedir. Grafiğe bakıldığında artan iyonik şiddete bağlı olarak adsorplama kapasitesinin 7.52 mg/g’ dan 4.81 mg/g’ a kadar azaldığı belirlendi.



Şekil 4.11. İnsülin adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisi. 0.1 M fosfat tamponu pH: 7.4, insülin derişimi: 1 mg/mL, Akış hızı: 1.0 mL/dak , T: 25 °C , NaCl (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 M)

4.10. İnsülin Adsorpsiyon İzotermi

Moleküllerin adsorbentlerle etkileşim özelliklerini belirlemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri uygulanmaktadır. Adsorpsiyon izotermi denge halinde çözeltideki iyonların derişimi ile katı faza adsorplanan iyonların miktarı arasındaki bağlantıyı tanımlamaktadır (Labrou ve Clonis 1995).

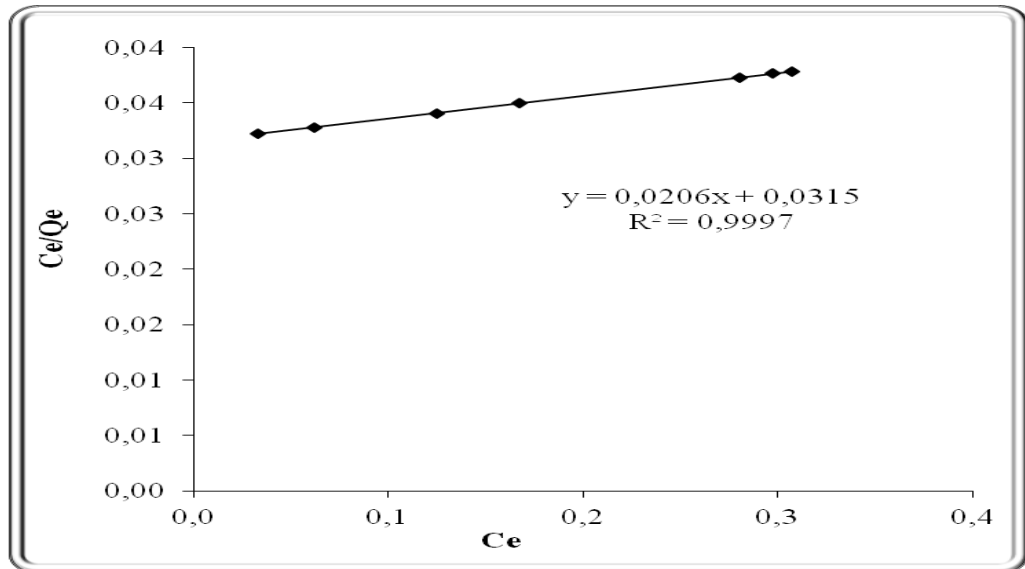
Langmuir adsorpsiyon modeli moleküllerin belirli sayıda, her biri yalnızca tek molekül bağlayabilen bölgelere bağlandığını varsaymaktadır. Langmuir adsorpsiyon izotermi eşitlik 4.1. ile tanımlanır. Denge verilerinin eşitliğe uygulanmasıyla doğrusal bir grafik elde edilmesi, aşağıdaki eşitlikle tanımlanan Langmuir modelinin bu sistemlere uygulanabileceğini göstermektedir:

$$Q_e = Q_{\max} \cdot b \cdot C_e / (1 + bC_e) \dots \dots \dots (4.1)$$

Eşitlikte Q_e , adsorbente bağlanan insülin miktarı (mg/g); C_e , çözeltide denge anındaki insülin derişimi (mg/mL); b , Langmuir sabiti (mL/mg) ve Q_{\max} , adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) göstermektedir. Eşitlik doğrusallaştırılırsa aşağıdaki denklem elde edilir.

$$C_e/Q_e = 1/(Q_{\max} \cdot b) + C_e/Q_{\max} \dots \dots \dots (4.2)$$

İnsülin adsorpsiyonu için deneysel verilerin grafiği Şekil 4.12.'de verilmektedir:



Şekil 4.12. Langmuir adsorpsiyon izotermi. 0.1 M fosfat tamponu pH: 7.4, insülin derişimi: 1 mg/mL, Akış hızı: 1.0 mL/dak, T: 25 °C

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Elde edilen korelasyon katsayısı (R^2) 0.9997 olarak bulundu. Langmuir adsorpsiyon modelinin bu afinite adsorbent sistemine uygulanabilir bir yapıda olduğu görülmektedir.

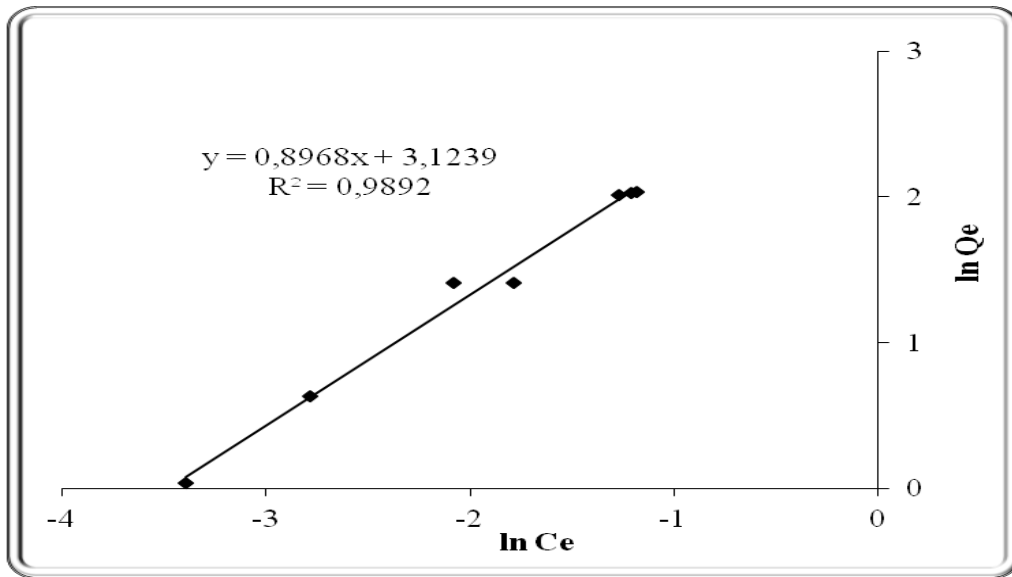
Freundlich izotermi adsorpsiyon dengesini tanımlayan eşitliklerdendir (Kerrigan ve ark. 1997). Freundlich eşitliği adsorbente tanecik adsorpsiyon enerjisinin komşu bağlanma bölgelerinin dolu olup olmadığına bağlı olarak değiştiğini varsayar. Deneysel eşitlik aşağıdaki şekildedir;

$$Q_e = K_F C_e^{1/n} \dots\dots\dots(4.3)$$

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

$$\ln Q_e = \ln K_F + 1/n \ln C_e \dots\dots\dots(4.4)$$

Deneysel verilerin Freundlich modeline uygunluğu da görülmektedir. Bu amaçla $\ln C_e$ ' nin $\ln Q_e$ ' ye karşı grafiğı çizildi (Şekil 4.13). Grafiğın doğrusal çıkması Freundlich adsorpsiyon izotermine uygulanabilirliğini gösterir. Freundlich sabitleri K_F değeri 22.73 ve n değeri 1.11 olarak bulundu (Çizelge 4.1). K_F ve n değerleri sulu ortamdan insülinin kolayca ayrılabilmesini ve dolayısıyla tercihli adsorpsiyonu gösterir.



Şekil 4.13. Freundlich adsorpsiyon izotermi . 0.1 M fosfat tamponu pH:7.4, insülin derişimi: 1 mg/mL, Akış hızı: 1.0 mL/dak , T:25°C

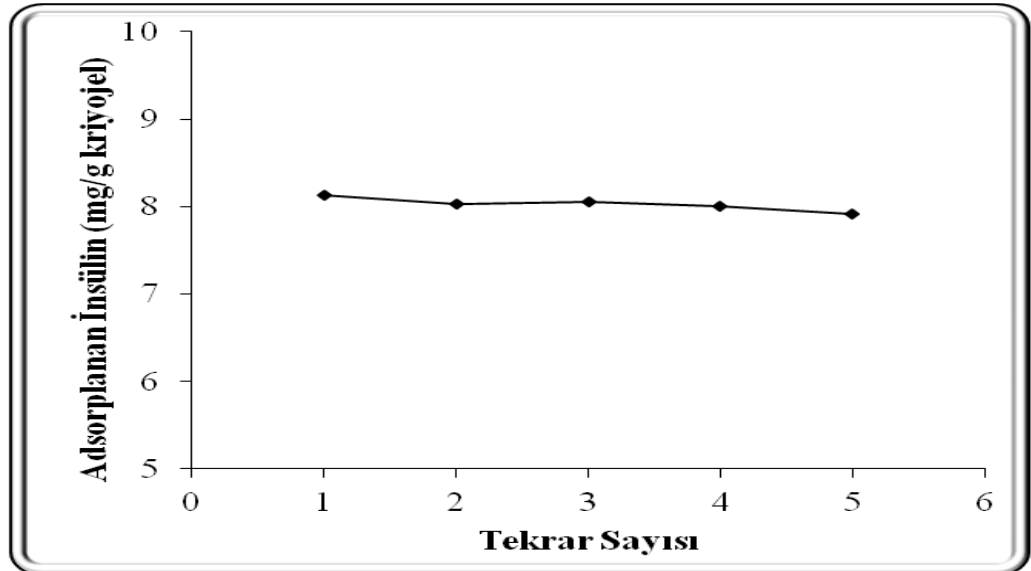
Langmuir ve Freundlich izotermi için hesaplanan değerler, Çizelge 4.1' de verilmektedir.

Çizelge 4.1. Langmuir ve Freundlich izotermilerinin adsorpsiyon katsayıları

Langmuir Adsorpsiyon İzotermi	Freundlich Adsorpsiyon İzotermi
$Q_{\max} = 48.54 \text{ mg/g}$	$K_F = 22.73$
$b = 0.65 \text{ mL/mg}$	$n = 1.11$
$R^2 = 0.9997$	$R^2 = 0.9892$

4.11. Tekrar Kullanılabilirliğin Belirlenmesi

İnsülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojelin kararlılığını ve tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için kriyojel kolonu 5 kez kullanıldı. Kolon dengesinin tekrar sağlanabilmesi için kriyojel 0.1 M pH 7.4 fosfat tamponu ile 1 saat boyunca yıkandı. Daha sonra kriyojel saf su ile 30 dakika yıkayıp, sonraki adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü için dengeye getirildi. Şekil 4.14' de görüldüğü gibi kriyojelin adsorpsiyon kapasite değerleri hemen hemen sabit kalmış ve değişmediği görüldü.



Şekil 4.14. İnsülin baskılı kriyojelin tekrar kullanılabilirliği. Akış hızı: 1.0 mL/dak, V_{toplam} : 20 mL, Süre: 3 saat, T: 25 °C

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

MIP' ler farmokolojik, analitik, biyolojik seçici molekülleri tanıma yönelik ve kontrollü salınım sistemlerinde yoğun bir şekilde kullanım alanına sahiptirler (Zhong ve ark. 2001). Sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez ve katı-faz ekstraksiyon gibi analitik yöntemlerde kullanımları sürekli olarak artmaktadır (Haupt 2001). Bir diğer uygulama alanı ise sensörlerde tanıma elemanı olarak kullanılmaktadırlar (Spegel ve ark. 2002).

Substratların yüksek seçicilikle tanınması ve baskılanmış polimerler tarafından bağlanması, materyalin fiziksel ve kimyasal (esneklik, bağlanma bölgelerinin sayısı ve materyalin yapısı gibi) özelliklerine göre değişmektedir. MIP' lerin daha kullanışlı olmaları için, substratın seçiciliğinin öneminin yanında, uygun koşullar altında desorpsiyon ve geri bağlanma kinetiğinin de hızlı olması gerekir. Bu yüzden moleküler baskılanmış materyaller tasarlanırken, uygun bağlanma etkileşimlerinin seçimi oldukça önem arz etmektedir. Birden fazla bağlanma bölgesinin olması, monomerin bağlanma bölgeleri ile kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin daha iyi olması, dolayısıyla moleküler tanımanın daha seçici olmasını sağlar.

MIP' lerin reseptör olarak geliştirilmesiyle beraber, bunlar moleküler tanımadada ve protein bağlanmasında da kullanılmaya başlanmıştır. Bu tür polimerler proteinlerin bağlanması için sensör gibi özellik göstermektedir. Proteinler, çok miktarda fonksiyonel gruplara sahip, oldukça kompleks ve kırılğan biyolojik yapılardır. Bu yüzden, bu tür substratların moleküler baskılama tasarımı oldukça zor olmaktadır. Bununla beraber, metal-koordinasyon etkileşimlerin ılımlı koşullarda yapılabilmesi ve protein yüzeyindeki spesifik gruplara (histidin rezidülerindeki imidazol grupları gibi) afinite göstermesi, protein tanıma sistemlerinin geliştirilmesi için önemli bir özellik olmuştur.

P(HEMA) ve p(HEMA-MAH) kriyojeller çapraz bağlı hidrofilik yapıya sahip matrikslerdir. Bu yapılarından dolayı sulu ortamda çözünmeyip çapraz bağ derecesine ve matriksin hidrofilitesine bağlı olarak yapılarına su alarak şişerler. Çalışmada p(HEMA) ve p(HEMA-MAH) kriyojellerin şişme dereceleri sırasıyla %71.6 ve %87.8 olarak bulundu. P(HEMA)' ya MAH bağlandığı zaman polimerik yapıda hidrofilik fonksiyonel grup sayısı artmakta, bunun sonucu polimer matriks yapıya daha fazla su

girmekte ve p(HEMA-MAH) kriyojellerin su alma kapasitesi daha yüksek olmaktadır (Yılmaz 2007).

Bu kriyojellerin denge şişme oranı ise p(HEMA) için 8.56 g H₂O/g kriyojel ve insülin baskılanmış p(HEMA-MAH) için 7.2 g H₂O/g kriyojel olarak bulundu. P(HEMA-MAH)' ın denge şişme oranının p(HEMA) kriyojelinkinden daha düşük çıkmasının nedeni ise polimerik kriyojellere insülin adsorpsiyonu sonucunda kriyojelin gözenekliliğinin azalması ile açıklanabilir (Alkan 2009).

P(HEMA) ve p(HEMA-MAH) kriyojel opak, süngerimsi ve esnek bir yapıya sahiptir. Bu yüzden gözeneklerin içinde bulunan suyu uzaklaştırmak için kriyojel el ile kolaylıkla sıkıştırılabilmektedir. Kurutulmuş kriyojel parçası suya daldırıldığında suda yeniden ıslanır ve birkaç saniye içinde orijinal büyüklük ve şeklini alır.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elde edilen görüntülerde poli(HEMA-MAH) kriyojellerin, gözenekli olmayan ve ince polimer duvarlara ve hareketli fazın akması için kanal oluşturan büyük, sürekli ve birbirine bağlı gözenekli yapıda olduğu görülmüştür. Bu gözeneklerden dolayı kriyojel oldukça büyük yüzey alanına sahip olmaktadır. Matriksin gözenek boyutunun protein moleküllerinden çok büyük olması proteinlerin gözeneklerden kolaylıkla geçmesine olanak vermektedir.

İnsülin derişiminin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, çözeltideki insülin derişimi gerekli seyreltmelerle 0.125-1.5 mg/mL aralığında değiştirilmiştir. Maksimum insülin adsorpsiyon miktarı 8.13 mg/g olarak bulundu. Çözeltideki insülin derişiminin artmasıyla, birim kriyojel başına adsorplanan insülin miktarı da artmaktadır. Daha sonra yüzeydeki aktif bölgelerin dolmasıyla birlikte dengeye ulaşması sağlanmıştır.

İnsülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojelin akış hızının 0.5 mL/dak' dan 4 mL/dak' ya artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinin de 8.78 mg/g' dan 6.29 mg/g' a kadar azaldığı görüldü. Akış hızının artması ile kolondan geçen protein çözelti hacmi artmakta ve proteinin kriyojelde alıkonma zamanı azalmaktadır. Akış hızı azaldığında kolonla temas süreside uzamaktadır.

Baydemir ve ark. (2009) bilirubin baskılanmış kriyojeller ile yaptıkları çalışmalarında maksimum bilirubin miktarını 0.5 mL/min akış hızında 2.7 mg/g olarak bulmuşlardır.

Bereli ve ark. (2006) Cu^{+2} bağlı poli(HEMA-MAH) monolitik çalışmalarında farklı akış hızlarında çalışmalarını yapmışlardır. 0.5 mL/dak' dan 4 mL/dak' ya kadar yapılan çalışmada adsorpsiyon kapasitesinde 6.4 mg/g' dan 1.9 mg/g' a kadar bir azalma görmüşlerdir.

İnsülin adsorpsiyon kapasitesine pH' nın etkisini belirlemek amacıyla çözelti pH' sı 4.0-9.0 aralığında farklı tampon çözeltileri kullanılarak değiştirildi. İnsülin adsorpsiyon kapasitesinin pH ile değişiminde maksimum insülin adsorpsiyonun pH: 7.4 0.1M fosfat tamponunda (7.93 mg/g) olduğu görüldü. Bu durum, insülin molekülünün etkileşim için en uygun konformasyona pH 7.4 fosfat tamponunda sahip olması ile açıklayabiliriz.

Lakhiari ve Muller (2004) destek materyallere N-asetilglukozamin bağlayarak canlı sistemde hipoglisemik peptit hormonu olan insülini HPLC' de çalışmışlardır. Bu çalışmada bazik pH' larda adsorbe olan insülin miktarının attığını görmüşlerdir.

İnsülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojeller için sıcaklıkla ilgili yapılan çalışmalarda 4-45 $^{\circ}\text{C}$ aralıklarında çalışıldı. Maksimum adsorpsiyon miktarının 45 $^{\circ}\text{C}$ ' de 9.70 mg/g olduğu belirlendi. İnsülinde amino asit açısından hidrofobik R grubu içeren amino asitler daha baskın olduğu için hidrofobik etkileşimler üzerinden Van der waals çekme kuvvetleri de sıcaklığın artmasıyla etki göstermektedir.

İnsülin adsorpsiyon kapasitesine iyonik şiddetin etkisi incelendiğinde 0.01 M NaCl' den 1 M NaCl' e artan iyonik şiddette adsorplama kapasitesinin 7.52 mg/g' dan 4.81 mg/g ' a kadar azaldığı görüldü. İyonik şiddetin artmasıyla adsorpsiyon kapasitesinde gözlenen azalmanın p(HEMA-MAH) kriyojel ve protein molekülleri arasındaki itici elektrostatik kuvvetlere katkıda bulunması ile açıklayabiliriz. Adsorpsiyon ortamında tuz derişimi arttığı zaman, bu tuzların katyonları ile histidinin protonlanmamış amino grupları arasında bir koordinasyon oluşabilir. Bu durum da daha düşük protein adsorpsiyonuna yol açabilmektedir.

Ayrıca tuz varlığında psödo-spesifik ligand ile protein molekülleri arasındaki tuz köprülerinin bozulması, yüksek iyonik şiddette düşük protein adsorpsiyonun gerçekleşmesine de katkı sağlamaktadır (Koç 2007).

Lakhiari ve Muller (2004) insülinle yaptıkları çalışmalarında, adsorpsiyon tamponunda artan tuz konsantrasyonu ile adsorbe olan insülin miktarının azaldığını görmüşlerdir.

Bereli ve ark. (2011) L-histidin baskılı süpermakrogözenekli kriyojeller ile lizozim saflaştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada benzer sonuçlar bulmuşlardır. Farklı derişimlerdeki NaCl çözeltilerinin lizozim adsorpsiyonu üzerine etkisine bakıldığında, artan NaCl derişimiyle birlikte adsorplanan lizozim miktarının 20.9' dan 8.1 mg/g' a kadar azaldığı görülmüştür.

Moleküllerin adsorbentle etkileşimini karakterize etmek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri uygulanmıştır. Adsorpsiyon izotermi denge halinde çözeltideki iyonların derişimi ile katı faza adsorplanan iyonların miktarı arasındaki bağlantıyı tanımlar (Labrou ve Clonis 1995). Langmuir adsorpsiyon modeli moleküllerin belirli sayıda, her biri yalnızca tek molekül bağlayabilen bölgelere bağlandığını varsayar. Bu noktaların enerji bakımından da eşdeğer olduğu ve komşu bölgelerle adsorplanan moleküller arasında etkileşim olmadığı varsayılır (Zhu ve Alexandratos 2005). Elde edilen korelasyon katsayısı (R^2) 0.9997 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısı Langmuir adsorpsiyon modelinin bu afinite adsorbent sistemine uygulanabilir olduğunu göstermektedir. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{max}) ve Langmuir sabiti sırasıyla 48.54 mg/g, 0.65 mL/mg olarak bulunmuştur. Freundlich modeline uygunluğuna bakıldığında ise Freundlich sabitleri K_F değeri 22.73 ve n değeri 1.11 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısı (R^2) 0.9892 olarak bulundu.

Tekrar kullanılabilirlik afinite adsorbentleri için çok önemli bir özelliktir. İnsülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojelin kararlılığını ve tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için kriyojel kolonu 5 kez kullanılmıştır. İnsülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojelin adsorpsiyon kapasite değerleri hemen hemen sabit kalmış ve değişmemiştir. İnsülin baskılanmış p(HEMA-MAH) kriyojelin tekrar kullanılabilirlik ve kararlılığıyla iyi bir performans gösterdiği görülmüştür. Tekrar kullanılabilirlik olarak adlandırdığımız bu özellik ayırma işleminin maliyetini önemli ölçüde azaltmaktadır.

Afinite adsorpsiyonu hızlı, kolay ve maliyeti düşük bir yöntem olup, seçici protein ayrılmasını ve saflaştırmasını gerçekleştiren bir yöntemdir. Yapılan bu çalışmada insülinin seçici adsorpsiyonu için p(HEMA-MAH) kriyojellerin kullanılabilirliği ve uygunluğu araştırıldı. Elde edilen deneysel verilerden, p(HEMA-MAH) kriyojelin insülinin afinite adsorpsiyonu için uygun özelliklere sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bu yüzden p(HEMA-MAH) kriyojelin biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda kullanılabileceği kanısındayız.

6.KAYNAKLAR

Alkan, H., Bereli, N., Baysal, Z., Denizli, A. 2009. Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel. *Biochem. Eng. J.*, 45: 201-208.

Alkan, M.H. 2009. Romatoid artrit tedavisine yönelik protein A-takılı poli(HEMA) kriyojellerin hazırlanması. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 35-42.

Altıntaş, E.B., Denizli, A. 2006. Efficient removal of albumin from human serum by monosize dye-affinity beads. *J. Chromatogr. B*, 832: 216-223.

Alvarez, C.I., Strumia, M.C., Bertorello, H.E. 1997. Preparation of adsorbents applicable to pseudobiospecific ligand affinity chromatography using different spacers and ligands. *React. Funct. Polym.*, 34: 103-111.

Anspach, F.B. 2004. Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods; part A: fundamentals and techniques. *J. Chromatogr. Lib.*, 69(A): 139-169.

Akar, F. 1997. İnsülin, kan şekerini düşüren ilaçlar ve glukagon, in ' veteriner uygulamalı farmakoloji', Medison Yayınevi, Cilt 2, Ankara, 97-103.

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. *J. Chromatogr. A*, 986: 275- 290.

Arvidsson, P., Plieva, F.M., Savina, I.N., Lozinsky, V.I., Fexby, S., Bülow, L., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2002. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *J. Chromatogr. A*, 977: 27-38.

Aşçı İşler, G. 2008. Çift baskılı polimerlerle Cd(II) iyonlarının sulu ortamdan uzaklaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 19-25.

- Babaç, C., Yavuz, H., Galaev, I.Y., Pişkin, E., Denizli, A. 2006. Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel. *React.Functl. Polym.*, 66: 1263-1271.
- Baydemir, G., Bereli, N., Andaç, M., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A. 2009. Bilirubin recognition via molecularly imprinted supermacroporous cryogels. *Coll. Surf. B*, 68: 33-38.
- Baydemir, G., Bereli, N., Andaç, M., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A. 2009. Supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel with embedded bilirubin imprinted particles. *React. Functl. Polym.*, 69: 36-42.
- Bereli, N., Akgöl, S., Yavuz, H., Denizli, A. 2005. Antibody purification by concanavalin A affinity chromatography. *J. Appl. Polym. Sci.*, 97: 1202-1208.
- Bereli, N., Uzun, L., Yavuz, H., Elkak, A., Denizli, A. 2006. Antibody purification using porous metal-chelated monolithic columns. *J. Appl. Polym. Sci.*, 101: 395-404.
- Bereli, N., Sener, G., Altıntaş, E.B., Yavuz, H., Denizli, A. 2010. Poly(glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albumin and immunoglobulin G. *Mat. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.*, 30: 323-329.
- Bonneil, E., Li, J., Trembly, T-L., Bergeron, J.J., Thibault, P. 2002. Integration of solid-phase extraction membranes for sample multiplexing: application to rapid protein identification from gel-isolated protein extracts. *Electrophoresis*, 23: 3589-3598.
- Chen, J., Jo, S., Park, K. 1995. Polysaccharide hydrogels for protein drug delivery. *Carbohydr. Polym.*, 28: 69-76.
- Demirel, G., Özçetin, G., Turan, E., Çaykara, T. 2005. pH/temperature- sensitive imprinted ionic poly(N-tert-butylacrylamide-co-acrylamide/maleic acid) hydrogels for bovine serum albumin. *Macromol. Biosci.*, 5: 1032-1037.
- Demiryas, N., Tüzmen, N., Galaev, I.Y., Pişkin, E., Denizli, A. 2007. Poly(acrylamide-allyl glycidyl ether) cryogel as a novel stationary phase in dye-affinity chromatography. *J. Appl. Polym. Sci.*, 105: 1808-1816.

Denizli, A., Köktürk, G., Yavuz, H., Pişkin, E. 1999. Dye ligand column chromatography: albumin adsorption from aqueous media and human plasma with poly(EGDMA-HEMA) microbeads. J. Appl. Polym. Sci., 74: 2803-2810.

Denizli, A., Pişkin, E. 2001. Dye-ligand affinity systems. J. Biochem. Biophys. Methods, 49(1-3): 391-416.

Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2009. Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler. Pozitif Matbaacılık Ltd.Şti., 118-119, Ankara.

Demiriz, I.Ş., Demiriz, B. 2009. Diabetes mellitus el kitabı. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, 1-3, İstanbul.

Derazshamshir, A., Baydemir, G., Andac, M., Say, R., Galaev I.Y., Denizli, A. 2010. Molecularly imprinted PHEMA-based cryogel for depletion of hemoglobin from human blood. Macromol. Chem. Phys., 211: 657-668.

Ensing, K., Berggren, C., Majors, R.E. 2001. Selective sorbents for solid-phase extraction based on molecularly imprinted polymers. LC/GC, 19(9): 942-954.

Ersöz, A., Denizli, A., Özcan, A., Say, R. 2005. Molecularly imprinted ligand exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance. Biosens. Bioelectronics, 20: 2197-2202.

Garıpcan, B., Denizli, A. 2002. A novel chromatographic affinity support material for separation of immunoglobulin-G from human plasma. Macromol. Biosci., 2(3): 135-144.

Garıpcan, B., Andaç, M., Uzun, L., Denizli, A. 2004. Methacryloyl amido cysteine functionalized poly (2-hidroxyethyl methacrylate) beads and its design as a metal-chelate affinity support for human serum albumin adsorption. React. Funct. Polym., 59: 119-128.

Gündüz, E., Demirsoy, A., Türkan, İ. 2008. Biyoloji. Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama, İç ve Dış Ticaret Ltd. Şti., 966-968, Ankara.

Haupt, K., Vijayalakshmi, M.A. 1993. Interaction of catechol-2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* with immobilized histidine and histamine. J. Chromatogr. A, 644: 289-297.

Haupt, K. 2001. Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *Analyst*, 126: 747-756.

Hentze, H.-P., Antonietti, M. 2002. Porous polymers and resins for biotechnological and biomedical applications. *Rev. Mol. Biotechnol.*, 90: 27- 53.

Ikegami, T., Mukawama, T., Nariai, H., Takeuchi, T. 2004. Bisphenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting. *Analytica Chimica Acta.*, 504: 131-135.

Kabiri, K., Omidian, H., Zohuriaan-Mehr, M.J. 2003. Novel approach to highly porous superabsorbent hydrogels: synergistic effect of porogens on porosity and swelling rate. *Polymer Int.*, 52: 1158- 1164.

Kassab, A., Yavuz, H., Odabaşı, M., Denizli, A. 2000. Human serum albumin chromatography by cibacron blue F3GA-derived microporous polyamide hollow fibre affinity membranes. *J. Chromatogr. B.*, 746(2): 123-32.

Kerrigan, D.C., Roth, R.S., Riley, P.O. 1997. Forward and inverse dynamic modelling of spastic paretic stiff-legged gait to evaluate potential causes and treatment strategies. *Gait & Posture*, 5 (2): 140-141.

Kılıç, N. 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Palme Yayın, Dağıtım, Pazarlama, İç ve Dış Ticaret Ltd. Şti., 884, Ankara.

Kindschy, L.M., Alocilja, E.C. 2005. A molecularly imprinted polymer on indium tin oxide and silicon. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2163–2167.

Koç, İ. 2007. Synthesis and characterization of macroporous poly(acrylamide-methacrylamido histidine) cryogels and their use in antibody purification. *Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü*, Ankara, 41.

Kumar, A., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2003. Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. *J. Immunol. Methods*, 283: 185-194.

Labrou, N.E., Clonis, Y.D. 1995. The interaction of *Candida boidinii* formate dehydrogenase with a new family of chimeric biomimetic dye-ligands. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316 (1): 169-178.

- Lok, C.M., Son, R. 2009. Application of molecularly imprinted polymers in food sample analysis—a perspective. *International Food Research Journal*, 16: 127-140.
- Lowe, C.R. 1996. Affinity chromatography and related techniques: perspectives and trends. *Adv. Mol. Cell. Biol.*, 15: 513-522.
- Lozinsky, V.I., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2002. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*, 10: 163-188.
- Mayers, A.G., Whitcombe, M.J. 2005. Synthetic strategies for the generation of molecular imprinted organic polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 1742-1778.
- Mayer, A.G., Mosbach, K. 1997. Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 16: 321-332.
- Nakamura, K., Murray, R.J., Joseph, J.I., Peppas, N.A., Morishita, M., Lowman, A.M. 2004. Oral insulin delivering using P(MAA-g-EG) hydrogels: effects of network morphology on insulin delivery characteristics. *Journal of Controlled Release*, 95: 589-599.
- Nam, Y.S., Park, T.G. 1999. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *J. Biomed. Mater. Res.*, 47: 8-17.
- Nicholls, I.A., Rosengren, J.P. 2002. Molecular imprinting of surfaces. *Bioseparation*, 10: 301–305.
- Odabaşı, M., Say, R., Denizli, A. 2007. Molecular imprinted particles for lysozyme purification. *Materials Science and Engineering*, 27: 90-99.
- Öncel, Ş., Uzun, L., Garipcan, B., Denizli, A. 2005. Synthesis of phenylalanine-containing hydrophobic beads for lysozyme adsorption. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 44(18): 7049-7056.
- Özcan, A.A., Say, R., Denizli, A., Ersöz, E. 2006. L-histidine imprinted synthetic receptor for biochromatography applications. *Anal. Chem.*, 78: 7253-7258.
- Özkara, S., Garipcan, B., Pişkin, E., Denizli, A. 2003. N-methacryloyl-(L)-histidinemethylester carrying a pseudospecific affinity sorbent for immunoglobulin-G

isolation from human plasma in a column system. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 14: 761-776(16).

Peppas, N.A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J.H., Zhang, J. 2000. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, 2: 9-29.

Plieva, F.M., Savina, I.N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2004. Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. *J. Chromatogr. B.*, 807: 129-137.

Plieva, F.M., Andersson, J., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2004. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. *J. Sep. Sci.*, 27: 828-836.

Plieva, F., Andersson, J., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2004. Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. *J. Sep. Sci.*, 27: 828-836.

Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I.Y. 2005. Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. *Soft Matter.*, 1: 303-309.

Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I.Y., Bergensthl, B., Mattiasson, B. 2006. Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: control of porous structure. *J. Mater. Chem.*, 16: 4065-4073.

Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2007. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. *J. Sep. Sci.*, 30: 1657-1671.

Plieva, F., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Dainiak, M.B. 2007. Effect of matrix elasticity on affinity binding and release of bioparticles. Elution of bound cells by temperature-induced shrinkage of the smart macroporous hydrogel. *Langmuir*, 23: 35–40.

Pommerening, K., Kuhn, M., Jung, W., Buttgerit, K., Mohr, P., Stamberg, J., Benes, M. 1979. Affinity chromatography of haemoproteins: 1. Synthesis of various

imidazole containing matrices and their interaction with haemoglobin. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1: 79-88.

Ramström, O., Skudar, K., Haines, J., Patel, P., Brüggemann, O. 2001. Food analyses using molecularly imprinted polymers. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(5): 2105-2114.

Rao, T.P., Daniel, S., Gladis, J.M. 2004. Tailored materials for preconcentration or separation of metals by ion-imprinted polymers for solid-phase extraction (II SPE). *Trends in Analytical Chemistry*, 23: 28-35.

Sarı, M.M., Armutcu, C., Bereli, N., Uzun, L., Denizli, A. 2011. Monosize microbeads for pseudo-affinity adsorption of human insulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84: 140-147.

Sellergren, B., Lepistö, M., Mosbash, K. 1988. Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interaction-NMR and chromatographic studies on the nature of recognition. *J. Am. Chem. Soc.*, 110: 5853-5860.

Sellergren, B., Allender, C.J. 2005. Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 1733– 1741.

Sindh, B., Chauhan, N. 2010. Dietary fiber psyllium based hydrogels for use in insulin delivery. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 2: 32-37.

Shea, K.I., Dougherty, T.K. 1986. Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces. The influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition. *J. Am. Chem. Soc.*, 108: 1091-1093.

Spegel, P., Schweitz, L., Nilson, S. 2002. Molecularly imprinted polymers. *Anal. Bioanal. Chem.*, 372: 37-38.

Tokullugil, A., Dirican, M., Ulukaya, E. 1997. *Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya*. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 273, İstanbul.

Tuncel, A., Denizli, A., Purvis, D., Lowe, C.R., Pişkin, E. 1993. Cibacron Blue F3G-A-attached monosize poly(vinyl alcohol)-coated polystyrene microspheres for specific albumin adsorption. *J. Chromatogr. A*, 634: 161-168.

Tyagi, P., Kumar, A., Kumar, Y., Lahiri, S.S. 2011. Synthesis and characterization of poly(HEMA-MAA) hydrogel carrier for oral delivery of insulin. *Journal of Applied Polymer Science*, 122: 2004-2012.

Ünlü, N., Ceylan, S., Erzenin, M., Odabaşı, M. 2011. Investigation of protein adsorption performance of Ni²⁺-attached diatomite particles embedded in composite monolithic cryogels. *J. Sep. Sci.*, 34: 2173-2180.

Wilchek, M., Miron, T. 1999. Thirty years of affinity chromatography. *React. Funct. Polym.*, 41: 263-268.

Widstrand, C., Yılmaz, E., Boyd, B., Billing, J., Rees, A. 2006. Molecularly imprinted polymers: A new generation of affinity matrices. Reprinted from American Laboratory, 1-4, Sweden.

Wood, C.D., Cooper, A.I. 2001. Synthesis of macroporous polymer beads by suspension polymerization using supercritical carbondioxide as a pressure-adjustable porogen. *Macromolecules*, 34(1): 5-8.

Wulff, G., Poll, H.G. 1987. Influence of the structure of the binding sites on the selectivity for racemic resolution. *Makromol. Chem.*, 188: 741-748.

Yao, K.J., Yun, J.X., Shen, S.C., Wang, L.H., He, X J., Yu, X.M. 2006. Characterization of a novel continuous supermacroporous monolithic cryogel embedded with nanoparticles for protein chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1109: 103-110.

Yenson, M. 1988. Hormonlar ve biyofonksiyonları, in 'İnsan Biyokimyası', Geliştirilmiş 6. Baskı, Beta-Basım Yayın Dağıtım A. Ş., 712-752, İstanbul.

Yılmaz, B. 1999. Hormonlar ve üreme fizyolojisi, Feryal Matbaacılık, Tuğra Ajans, 53-59, Ankara.

Yılmaz, E. 2007. Romatoid artrit tedavisine yönelik poli(HEMA-MAH) adsorbentin üretimi ve dolgulu kolon dizaynı. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 48.

Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A. 2009. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. *Biochem. Eng. J.*, 43: 272-279.

Yu, H., Dong, X., Sun, Y. 2004. Affinity chromatography of insulin with a heptapeptide ligand selected from phage display library. *Chromatographia*, 60: 379-382.

Zhong, N., Byun., H.S., Bittman, R. 2001. Hydrophilic cholesterol-binding molecular imprinting polymers. *Tetrahedron Letter.*, 42: 1839-1841.

Zhu, X., Alexandratos, S.D. 2005. Polystyrene-supported amines: affinity for mercury(II) as a function of the pendant groups and the Hg(II) counterion. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 44: 8605-8610.

<http://tr.wikipedia.org/wiki/insülin>.

<http://tr.wikipedia.org/wiki/kromatografi>.

EKLER

Ek. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

pH: 4.0, 0.1 M Asetat Tamponu: 0.1 M CH_3COOH çözeltisinden 41 mL ve 0.1 M NaOAc çözeltisinden 9 mL alınıp balon jöjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 5.0, 0.1 M Asetat Tamponu: 0.1 M CH_3COOH çözeltisinden 14.8 mL ve 0.1 M NaOAc çözeltisinden 35.12 mL alınıp balon jöjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 6.0, 0.1 M Asetat Tamponu: 0.1 M CH_3COOH çözeltisinden 0.25 mL ve 0.1 M NaOAc çözeltisinden 9.75 mL alınıp balon jöjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 6.0, 0.1 M Fosfat Tamponu: 0.1 M Na_2HPO_4 çözeltisinden 6.15 mL ve 0.1 M NaH_2PO_4 çözeltisinden 43.85 mL alınıp balon jöjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 7.0, 0.1 M Fosfat Tamponu: 0.1 M Na_2HPO_4 çözeltisinden 30.5 mL ve 0.1 M NaH_2PO_4 çözeltisinden 19.5 mL alınıp balon jöjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 7.4, 0.1 M Fosfat Tamponu: 0.1 M Na_2HPO_4 çözeltisinden 40.5 mL ve 0.1 M NaH_2PO_4 çözeltisinden 9.5 mL alınıp balon jöjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 8.0, 0.1 M Fosfat Tamponu: 0.1 M Na_2HPO_4 çözeltisinden 47.35 mL ve 0.1 M NaH_2PO_4 çözeltisinden 2.65 mL alınıp balon jöjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 7.0, 0.1 M Tris-HCl Tamponu: 0.1 M Tris-Baz çözeltisinden 50 mL ve 0.1 M HCl çözeltisinden 46.6 mL alınıp balon jöjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 7.4, 0.1 M Tris-HCl Tamponu: 0.1 M Tris-Baz çözeltisinden 50 mL ve 0.1 M HCl çözeltisinden 42 mL alınıp balon jöjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 8.0, 0.1 M Tris-HCl Tamponu: 0.1 M Tris-Baz çözeltisinden 50 mL ve 0.1 M HCl çözeltisinden 29.2 mL alınıp balon jöjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 9.0, 0.1 M Tris-HCl Tamponu: 0.1 M Tris-Baz çözeltisinden 50 mL ve 0.1 M HCl çözeltisinden 5.7 mL alınıp balon jöjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 3.5, 0.1 M Glisin-HCl Tamponu: 0.1 M Glisin çözeltisinden 200 mL alınıp 0.1 M HCl çözeltisiyle pH: 3.5' e ayarlandıktan sonra balon jöjeye bırakıldı ve hacmi saf su ile 250 mL' ye tamamlandı.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler :

Adı Soyadı : Aynur ÇAVUŞ

Doğum Yeri : Mardin

Doğum Tarihi : 25.05.1984

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl) :

Lise : Ziya Gökalp Lisesi \ Diyarbakır- 2002

Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü- 2008

Yüksek lisans : Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D.- 2011