

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

KREATİNİN BASKILANMIŞ MAKROGÖZENEKLİ
POLİ(HİDROKSİETİL-METAKRİLAT) KRİYOJELLER

Aykut Arif TOPÇU

MAYIS 2015

Biyoloji Anabilim Dalında Aykut Arif TOPÇU tarafından hazırlanan KREATİNİN BASKILANMIŞ MAKROGÖZENEKLİ POLİ(HİDROKSİETİL-METAKRİLAT) KRIYOJELLER adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Doktora Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Ortak Danışman

Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Adil DENİZLİ _____
Üye (Danışman) : Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK _____
Üye : Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ _____
Üye : Prof. Dr. İlhami TÜZÜN _____
Üye : Doç. Dr. Nuran IŞIKLAN _____

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

KREATİNİN BASKILANMIŞ MAKROGÖZENEKLİ POLİ(HİDROKSİETİL- METAKRİLAT) KRİYOJELLER

TOPÇU, Aykut Arif

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora tezi

Danışman: Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Ortak Danışman: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Mayıs 2015, 83 sayfa

Kreatinin 113 Da ağırlığında, fosfokreatin molekülünün dağılması ile kreatin molekülünün döngüsel anhidrit formu olarak oluşan son üründür. Tüm vücut sıvılarında bulunur ve sağlıklı bireylerde sabit değer aralıklarında seyretmesine rağmen, bireyin tarafından yapılan diyet ve et tüketimine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Kreatinin molekülünün plazmada bulunması gereken miktarı glomerular filtrasyon tarafından kontrol edilir. Sınır değerlerinin değişkenlik göstermesi, kreatinini önemli bir klinik analit olarak kullanılmasına olanak verir. Moleküler baskılama, polimer matrikste kalıp olarak kullanılan moleküle ait tanıma bölgeleri oluşturma yöntemidir. Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanması kolay, dayanıklı, ucuz, hedef moleküle karşı seçicidir ve afinite ayırma araçları olarak kullanılırlar. Kriyojeller donma noktasının altında hazırlanan makrogözenekli jel matrikslerdir. Kriyojeller geniş gözenekleri, kısa difüzyon yolu ve düşük basınç düşmesi gibi avantajları nedeniyle birçok alanda kullanılırlar.

Bu çalışmanın amacı, kreatinin baskılanmış poli(hidroksietil metakrilat) kriyojeller hazırlayarak, sulu çözeltilerden kreatinin saflaştırılmasıdır.

MIP kriyojellerin hazırlanması için Cu^{++} iyonlarıyla birlikte metal şelat monomeri [N-metakriloil-(L)-histidinmetilester (MAH)], hedef molekül kreatinin, çapraz bağlayıcı metilen-bis(akrilamid) (MBBAm), başlatıcı olarak amonyum persülfat (APS) ile aktivatör olarak N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) kullanılmış ve hidroksi etil metakrilat (HEMA) ile kopolimerize edilmiştir. Polimerizasyon sonrası kalıp molekül kreatinin 1 M NaCl çözeltisi kullanılarak MIP kriyojelden uzaklaştırılmış ve kreatinin adsorpsiyonu sürekli sistemde çalışılmıştır. Maksimum kreatinin adsorpsiyonu 2.35 mg kreatinin/g kriyojel olarak bulunmuştur. Kreatinin baskılanmış olan p[HEMA-MAH-Cu(II)] kriyojellerin maksimum spesifik yüzey alanı ve şişme oranı sırasıyla $32.65 \text{ m}^2/\text{g}$ ile % 89.5 olarak belirlenmiştir. Seçicilik bağlama çalışmalarında ürik asit ve kreatin kullanılmıştır. Kreatinin/ürik asit ve kreatinin/kreatin için MIP kriyojelin bağlı seçicilik katsayısı, kreatinin baskılanmamış olan p[HEMA-MAH-Cu(II)] NIP2 kriyojele göre sırasıyla 1.39 ve 2.4 kat belirlenmiştir. Ayrıca kreatinin baskılanmış olan MIP kriyojelin bağlı seçicilik katsayısı p(HEMA) NIP2 kriyojele göre ürik asit için 3.45 ve kreatin için de 4.37 kat daha fazla bulunmuştur. Son aşamada MIP kriyojelin tekrar kullanılabilirliği incelenmiş ve yapay idrar çözeltisi kullanılarak adsorpsiyon çalışması değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Moleküler baskılama, Kriyojeller, Kreatinin adsorpsiyonu

ABSTRACT

CREATININE IMPRINTED MACROPOROUS POLY(HYDROXYETHYL- METHACRYLATE) CRYOGELS

TOPÇU, Aykut Arif

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Co-Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

May 2015, 83 pages

Creatinine 113 Da molecular weight, which is the final product of decomposition of phosphocreatine and cyclic anhydride of creatine. It is found in all body fluids and concentration of creatinine remain in constant rate in healthy individuals although creatinine rates are depended on individuals diet and meat intake. Creatinine plasma concentration rate is controlled by glomerular filtration. Owing to variability plasma concentration of creatinine which permits an important useful clinic analyte. Molecular imprinting is to create recognition sites in polymer matrix using a template molecule. Molecular imprinting polymers (MIP) are easy to prepare, fixed, cheap selectivity towards template molecule and used affinity separation materials. Cryogels are macroporous gel matrix and prepared at sub-zero temperatures. Cryogels are used some areas because of many advantages such as macroporous, short diffusion path and low pressure drop.

The aim of this study is to prepare creatinine imprinting poly(hydroxyethyl methacrylate) for purification of creatinine from aqueous solution. For preparing MIP cryogels; Cu⁺⁺ ion, metal chelate monomer [N-methacryloyl-(L)-histidinemethylester (MAH)], template molecule creatinine, crosslinker methylene-bis(acrylamide), initiator, activator N,N,N',N'-tetramethylene diamine (TEMED) and poly(hydroxyethyl methacrylate) were used for copolymerization. After polymerization

step, template molecule creatinine was removed from MIP by 1 M NaCl and creatinine adsorption was performed in continuous system. Maximum creatinine adsorption was found 2.35 mg creatinine/g cryogel. Creatinine imprinting p[HEMA-MAH-Cu(II)] cryogels maximum specific surface area and swelling ratio were determined 32.65 m²/g, % 89.5 respectively. Uric acid and creatine were used for selective binding studies. The relative selectivity coefficients of MIP cryogel of creatinine/uric acid and creatinine/creatine were determined 1.39 and 2.4 times respectively greater than non-imprinting p[HEMA-MAH-Cu(II)] NIP2 cryogel. Also relative selectivity coefficients of creatinine imprinting MIP cryogel was found for uric acid 3.45 and for creatine 4.37 times greater than p(HEMA) NIP1 cryogel. Last step, usability of MIP and artificial urine adsorption studies also was evaluated.

Key Words: Molecular imprinting, Cryogels, Creatinine adsorption

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda her zaman bana destek olan ve yardımlarını, fedakarlıklarını eksik etmeyen sayın hocam Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK'a teşekkürlerimi sunarım. Eş danışmanlığımı kabul ederek, beni BİOREG Araştırma grubunun bir üyesi yapan, Hacettepe Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalında doktora çalışmalarımın tamamlanmasında büyük emeği geçen bilgi ve deneyimlerini her zaman paylaşan kıymetli hocam Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye teşekkürü borç bilirim.

Tez izleme komitesinde bulunan ve her zaman güler yüzlü tavırlarıyla desteklerini esirmeyen Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca bana her konuda destek olan, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak tezimin tamamlanmasında katkısı bulunan Doç. Dr. Nilay BERELİ'ye teşekkür ederim.

Bilimsel katkı ve desteklerinin yanında her konudaki destek ve yardımları için Doç. Dr. Lokman UZUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Kırıkkale Üniversitesinde bulunan, bilimsel katkı ve destekleri için güler güzlü hocam Doç. Dr. Nuran IŞIKLAN'a teşekkür ederim.

İdrar analizlerinde yardımcı olan Doç. Dr. Abbas TANER'e ayrıca teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmalarım sırasında sıcak, samimi ve yardımlarını eksik etmeyen, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Emin ÇORMAN'a, Arş. gör. Dr. Sevgi ASLIYÜCE ÇOBAN'a, Dr. Gülsu ŞENER'e, Arş. gör. Canan ARMUTÇU'ya, Dr. Ahmet Hamdi DEMİRÇELİK'e, Arş. gör. Recep ÜZEK'e teşekkürlerimi sunarım. Değerli arkadaşım ve beni her zaman dinleyen, yardımcı olan Arş. gör. Erdoğan ÖZGÜR'e teşekkürü borç bilim.

Başarıların daim olmasını beklediğim tüm BİOREG çalışma grubu arkadaşlarıma ve ekibimize, beni yalnız bırakmadıkları için tekrar tekrar teşekkür ederim.

Her zaman maddi ve manevi desteğini gördüğüm, beni hep destekleyen sevgili annem ve babama binlerce kez teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kreatin Metabolizması ve Önemi.....	1
1.2. Kreatinden Kreatinin Molekülünün Oluşması.....	2
1.3. Böbrekler ve Fonksiyonel Görevleri.....	4
1.3.1. Böbreğin İşlevleri.....	6
1.4. Kronik Böbrek Yetmezliği ve Böbrek Hasarlarının Belirlenmesi.....	7
1.5. Kreatinin (Krn) Tayin Edilmesi ve Glomerüler Filtrasyon Oranı.....	11
(GFO) Arasındaki İlişki.....	11
1.6. Kreatinin Tayin Edilmesinde Kullanılan Yöntemler.....	13
1.7. Moleküler Baskılama.....	14
1.7.1. Moleküler Baskılama Yönteminde Kullanılan Temel.....	15
Bileşenler.....	15
1.7.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri.....	17
1.7.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Kullanım Alanları.....	19
1.8. Kriyojeller.....	20
1.8.1. Kriyojellerin Özellikleri ve Yapısının Kontrolü.....	21
1.8.2. Kriyojellerin Kullanım Alanları.....	22
1.9. Kreatinin Baskılanmış Polimerlerin Literatür Çalışmaları.....	23
2. MATERYAL ve METOT	26
2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	26
2.2. N-Metakriloil-(L)-Histidin Metil Ester (MAH) Monomerinin Sentezi..	27

2.3. MAH-Cu(II) Önkomplesinin Hazırlanma Aşaması.....	28
2.4. Kreatinin Baskılanmış P[HEMA-MAH-Cu(II)].....	28
Süpermakrogözenekli Kriyojellerin Hazırlanması.....	28
2.5. Kalıp Molekülün (Kreatinin/Krn) Yapıdan Uzaklaştırılması.....	29
2.6. Kreatinin Baskılanmış (Krn-MIP) ve Baskılanmamış (NIP).....	29
Kriyojellerin Karakterizasyonu.....	29
2.6.1. FTIR Analizi.....	29
2.6.2. Yüzey Alanı Ölçümleri.....	30
2.6.3. Şişme Testi.....	30
2.6.4. Yüzey Morfolojisi.....	31
2.7. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları.....	32
2.7.1. Kreatinin Adsorpsiyonu.....	32
2.7.2. Seçicilik Çalışmaları.....	33
2.7.3. Desorpsiyon.....	34
2.8. Yapay İdrardan Kreatinin Molekülünün Tayini.....	35
3. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMA.....	36
3.1. Kreatinin Baskılanmış (MIP) ve Baskılanmamış (NIP).....	36
Kriyojellerin Karakterizasyonu.....	36
3.1.1. FTIR Analizi.....	36
3.1.2. Yüzey Alanı Ölçümü.....	38
3.1.3. Şişme Testi.....	39
3.1.4. Yüzey Morfolojisi.....	40
3.2. Sulu Çözeltiden Kreatinin Adsorpsiyonu.....	44
3.2.1. Adsorpsiyon Üzerinde pH Etkisi.....	44
3.2.2. MAH-Cu(II) Oranı Kreatinin Adsorpsiyonu Arasındaki İlişki..	45
3.2.3. Adsorpsiyon Üzerinde Akış Hızı Etkisi.....	46
3.2.4. Adsorpsiyon Üzerinde Derişim Etkisi.....	47
3.2.5. Adsorpsiyon Üzerinde İyonik Şiddet Etkisi.....	48
3.2.6. Adsorpsiyon Üzerinde Sıcaklığın Etkisi.....	49
3.2.7. Adsorpsiyon İzotermeleri.....	50
3.2.8. Adsorpsiyon Kinetiği.....	53
3.2.9. Seçicilik Deneyleri.....	57

3.2.10. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	60
3.3. Yapay İdrardan Kreatinin Molekülünün Analizi.....	61
4. YORUM.....	64
KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. NIP1, NIP2 ve MIP polimerler için denge şişme ve makrogözenek..... oranları.....	40 40
3.2. Krn-MIP kriyojelin Langmuir ve Freundlich iztotermleri.....	53
3.3. Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojel için birinci ve ikinci derece..... verileri.....	57 57
3.4. Kreatinine göre ürik asit ve kreatin moleküllerinin Kd ve k değerleri.....	59
3.5. Kreatinine göre ürik asit ve kreatin moleküllerinin Kd ve k değerleri.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Kaslarda bulunan ve enerji kaynağı olarak kullanılan kreatin molekülü.....	1
1.2. Arjinin ve glisin amino asitlerinden transaminidaz enzimiyle (EC 2.1.4.1)....	2
ornitin ile guanidoasetik asit sentezi.....	2
1.3. Transferaz (EC 2.5.1.6) ve ATP varlığında L- metiyoninden S – adenosil-L-.	2
metiyonin sentezi.....	2
1.4. Kreatinin molekülün metabolik yolağı (Tietz, 1963).....	3
1.5. Kreatin ve fosfokreatin moleküllerinden oluşan kreatinin molekülü.....	4
1.6. Böbreğin anatomik yapısı (5. referans, sayfa 37 den alınmıştır).....	5
1.7. Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezi (A, B, C fonksiyonel.....	15
monomerler, D; baskılanmak istenen hedef molekül).....	15
1.8. Kovalent baskılama.....	17
1.9. Non-kovalent baskılama.....	18
1.10. Kriyojellerin sentez aşamaları.....	20
1.11. Monolitik kriyojellerin optik fotoğrafı.....	21
2.1. N-metakriloil-L-histidin metil ester monomerinin sentezi.....	27
2.2. Kreatinin adsorpsiyonunda kullanılan sürekli sistem düzeneği.....	32
3.1. p[HEMA-MAH-Cu(II)/Kreatinin] (Krn-MIP) kriyojele ait FTIR.....	37
spektrumu.....	37
3.2. p[HEMA-MAH-Cu(II)] (NIP1) kriyojele ait FTIR spektrumu.....	37
3.3. p(HEMA) (NIP2) kriyojele ait FTIR spektrumu.....	38
3.4. NIP1 p[HEMA-MAH-Cu(II)] kriyojelin değişik büyütme aralıklarında.....	41
ve süpermakrogözenek yapıları.....	41
3.5. NIP2 p(HEMA) kriyojelin değişik büyütme aralıklarında yığın ve.....	42
süpermakrogözenek yapıları.....	42
3.6. Krn-MIP p[HEMA-MAH-Cu(II)/Kreatinin] kriyojelin değişik büyütme.....	43
aralıklarında süpermakrogözenek yapıları.....	43
3.7. Kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerinde pH'nın etkisi; Kreatinin.....	45

derişimi 0.3 mg/mL, akış hızı 1mL/dak, adsorpsiyon süresi 120 dakika.....	45
sıcaklık 25°C.....	45
3.8. Artmış olan MAH-Cu(II) önkomples oranlarının kreatinin molekülünün.....	46
adsorpsiyonu üzerindeki etkisi; Kreatinin derişimi 0.3 mg/mL, MOPS.....	46
(pH 7.4), akış hızı 1 mL/dak, adsorpsiyon süresi 120 dakika ve sıcaklık.....	46
25°C.....	46
3.9. Kreatinin molekülü üzerinde akış hızının etkisi; Kreatinin derişimi.....	47
0.3 mg/mL, MOPS (pH 7.4), adsorpsiyon süresi 120 dakika ve sıcaklık.....	47
25°C.....	47
3.10. Kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerinde derişim etkisi; Akış hızı.....	48
1mL/dak, MOPS (pH 7.4), adsorpsiyon süresi 120 dakika ve sıcaklık.....	48
25°C.....	48
3.11. Kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerinde iyonik şiddet etkisi;.....	49
derişim 0.3 mg/mL, akış hızı 1 mL/dak, MOPS (pH 7.4), adsorpsiyon.....	49
süresi 120 dakika ve sıcaklık 25°C.....	49
3.12. Kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerinde sıcaklığın etkisi; derişim.....	50
0.3 mg/mL, akış hızı 1mL/dak, MOPS (pH 7.4), adsorpsiyon süresi 120.....	50
dakika.....	50
3.13. Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojel için Langmuir adsorpsiyon.....	51
izotermi.....	51
3.14. Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojel için Freundlich adsorpsiyon.....	52
izotermi.....	52
3.15. Krn-MIP kriyojel kullanılarak elde edilen yalancı-birinci derece.....	54
kinetik grafiği.....	54
3.16. Krn-MIP kriyojel kullanılarak elde edilen yalancı-ikinci derece.....	56
grafiği.....	56
3.17. Ürik asit (168.11 g/mol), kreatin (131.13 g/mol) ve kreatinin.....	58
(113.12 g/mol) moleküllerinin yapıları.....	58
3.17. (devam) Ürik asit (168.11 g/mol), kreatin (131.13 g/mol) ve kreatinin.....	58
(113.12 g/mol) moleküllerinin yapıları.....	58
3.18. Sulu çözeltiden Krn-MIP ile NIP1 kolonlarının adsorpsiyonu: Kreatinin.....	59

Ürik Asit ve Kreatin derişimleri: 03 mg/mL, MOPS (pH 7.4).....	59
akış hızı: 1mL/dak, adsorpsiyon süresi: 120 dak ve T: 25°C.....	59
3.19. Sulu çözeltiden Krn-MIP ile NIP2 kolonlarının adsorpsiyonu: Kreatinin.....	60
Ürik Asit ve Kreatin derişimleri: 0.3 mg/mL, MOPS (pH 7.4).....	60
akış hızı: 1 mL/dak, adsorpsiyon süresi: 120 dak ve T:25°C.....	60
3.20. Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojelin tekrar kullanılabilirliği;.....	61
kreatinin derişimi: 0.3 mg/mL, MOPS (pH 7.4), akış hızı; 1mL/dak.....	61
T: 25°C, desorpsiyon ajanı: 1M NaCl.....	61
3.21. Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojel kullanılarak yapay idrardan.....	62
kreatinin adsorpsiyonu, pH: 6.2, akış hızı: 1mL/dak, T: 25°C,.....	62
adsorpsiyon süresi 120 dakika.....	62
3.22. Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojel kullanılarak yapay idrardan.....	63
kreatinin geri dönüşümü ve kriyojelin verimliliği pH: 6.2, karıştırma hızı:...	63
130 rpm, T: 25°C, adsorpsiyon süresi 20 dakika.....	63

SİMGELER DİZİNİ

g	gram
mL	mililitre
°C	santigrad derece
%	yüzde
mmol	milimol
mg	miligram
µL	mikrolitre
cm	santimetre
M	Molarite
mM	mikromolar
dak	dakika
nm	nanometre
m ²	metrekare

KISALTMALAR DİZİNİ

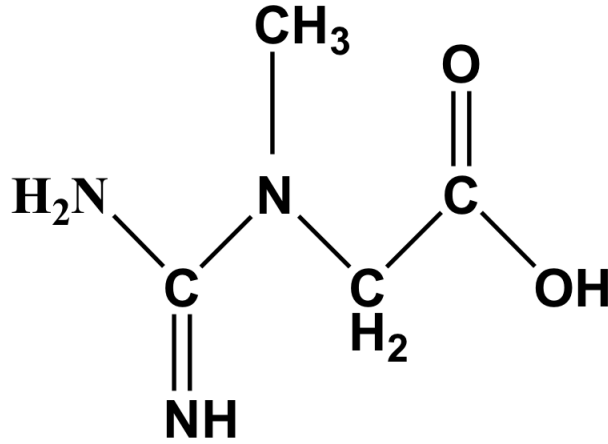
ABH	Akut böbrek hastalığı
KBY	Kronik böbrek yetmezliği
GFO	Glomerular filtrasyon oranı
KYABP	Karaciğer tipi yağ asidi bağlayıcı protein
SC	Sistatin C
NJİL	Nötrofil jelatinaz ilişkili protein
AD	Asimetrik dimetilarjinin
BTP-1	Böbrek hasar proteini 1
İ-18	İnterlökin 18
AL	Albuminüri
NAG	N-Asetil- B-D-glukozaminidaz
Krn	Kreatinin
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
MBP	Moleküler baskılanmış polimerler
MAH	N-metakroil –L-histidin metil ester
MAH-Cu(II)	N-metakroil –L-histidin metil ester-Cu(II)
HEMA	Hidroksietil metakrilat
p[(HEMA-MAH-Cu(II) kreatinin]	Kreatinin baskılanmış kriyojeller
p[(HEMA-MAH-Cu(II)]	Kreatinin baskılanmamış kriyojeller
p(HEMA)	poli hidroksietil metakrilat
Krn-MIP	DeneySEL çalışmalarda kullanılan kriyojeller
MBBAM	N,N-metilen bisakrilamid

TEMED	N,N,N',N'- tetraetilenamin
APS	Amonyum persulfat
FTIR	Fourier dönüşüm kızılötesi spektrofotometresi
BET	Branuer- Emmet-Teller Yüzey Analizi
SEM	Taramalı elektron mikroskop
MIP	Kreatinin baskılanmış P[(HEMA-MAH- Cu(II)] kriyojeller
NIP1	Kreatinin baskılanmamış P[(HEMA- MAH-Cu(II)] kriyojeller
NIP2	Kreatinin baskılanmamış P(HEMA) kriyojeller

1. GİRİŞ

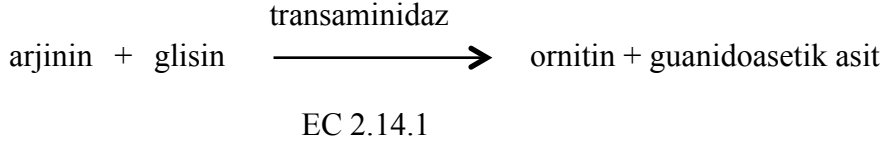
1.1. Kreatin Metabolizması ve Önemi

Kreatin molekülü; (Şekil 1.1) yüksek miktarda kaslarda bulunan, hücrelerin enerji ihtiyacını karşılayan ve yapısında azot içeren organik bir bileşiktir [1]. Kreatin molekülü böbrekler (özellikle insan kaynaklı kreatin molekülü), pankreas ve karaciğerde iki enziminin kontrolü altında sentezlenmektedir [1,2]. İlk tepkimedey arjinin ve glisin amino asitlerinin transamidasyonuylay guanidoasetik asit oluşur, ikinci tepkimedey guanidoasetik asitin metilasyonuylay da S-adenosil metiyonin açığay çıkmaktadır [2]. İlk tepkime (Şekil 1.2), transaminidaz enzimiyle (EC 2.1.4.1) böbreklerde, ikinci tepkime de (Şekil 1.3) transferaz (EC 2.5.1.6) enzimiyle karaciğerde oluşur [3].



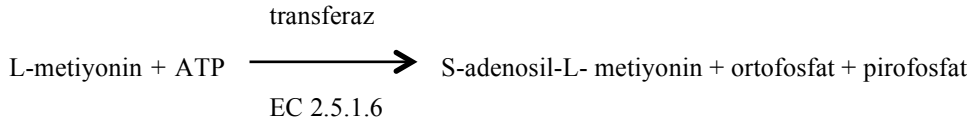
Şekil 1. 1 Kaslarda bulunan ve enerji kaynağı olarak kullanılan kreatin molekülü.

Böbreklerde oluşan tepkimedey;



Şekil 1.2. Arjinin ve glisin amino asitlerinden transaminidaz enzimiyle (EC 2.14.1) ornitin ile guanidoasetik asit sentezi.

Karaciğerde oluşan tepkime basamağında;

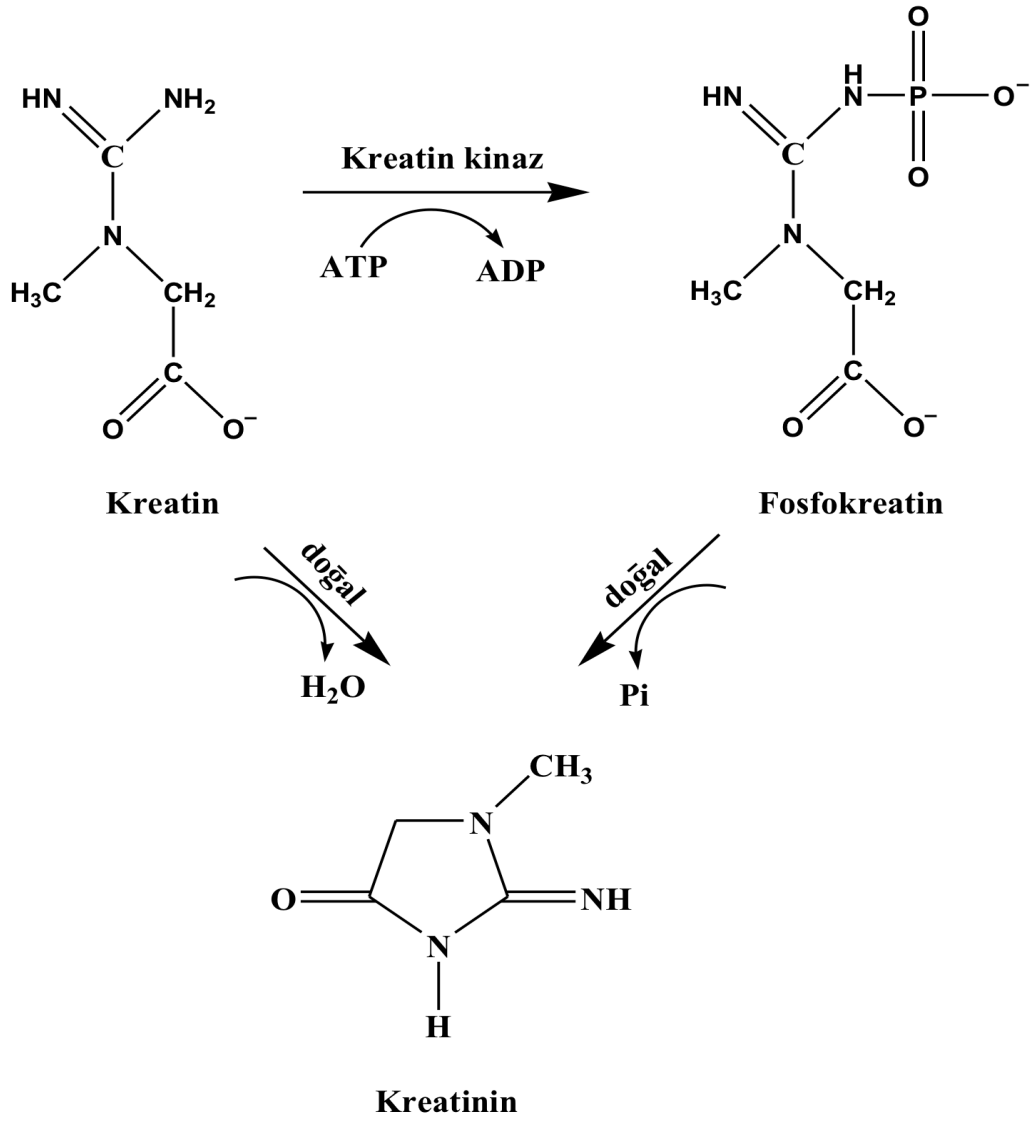


Şekil 1.3. Transferaz (EC 2.5.1.6) ve ATP varlığında L- metiyoninden S – adenosil - L – metiyonin sentezi.

Kreatin sentezinin kontrolü geri beslemeli mekanizmalar (negatif feed-back) tarafından transaminidaz enzimin inhibisyonuna bağımlı olarak kontrol edilmektedir [1].

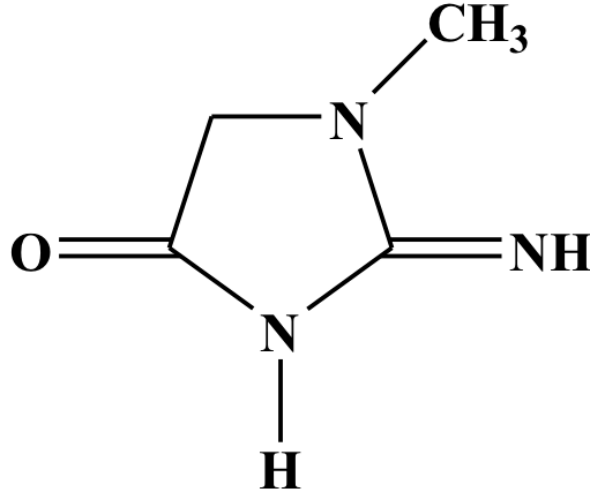
1.2. Kreatinden Kreatinin Molekülünün Oluşması

Sentezlenmiş olan kreatin molekülü kan yoluyla kas ve beyin gibi organlara taşınır ve iki metabolik ürünü oluşturur [2]. İlk ürün kreatin kinaz enzimi tarafından katalizlenen ve yüksek enerjili bir bileşik olan fosfokreatindir ve son ürün olan kreatinin de her iki molekül tarafından kendiliğinden oluşur [2]. Her iki molekülün kreatinine dönüşümleri kas kasılma bağı olarak gerçekleşmektedir [2].



Şekil 1.4. Kreatinin molekülün metabolik yolağı (Tietz, 1963).

Kreatinin (Şekil 1.5) 113 Da ağırlığındadır ve tüm vücut sıvıları ile salgılarında bulunur [2]. Fosfokreatin molekülünün dağılması ile kreatin molekülünün döngüsel anhidrit formu olarak oluşan son üründür [2]. Kreatinin molekülünün tarihçesi 1847'lere kadar uzanırken, Liebig; kreatin molekülünü mineral asitlerle ısıtarak elde etmiş ve isimlendirmiştir [3]. Horbaczewski tarafından 1885 yılında ilk kez kreatinin molekülünün sentezi gerçekleştirilmiş olup, bu sentez de Paulmann tarafından (1894 yılında) kreatin molekülünün metilguanido asetik asit olduğunu ve kreatinin de bu formun iç anhidriti olarak kanıt gösterilerek kabul edilmiştir [3].



Şekil 1.5 Kreatin ve fosfokreatin moleküllerinden oluşan kreatinin molekülü.

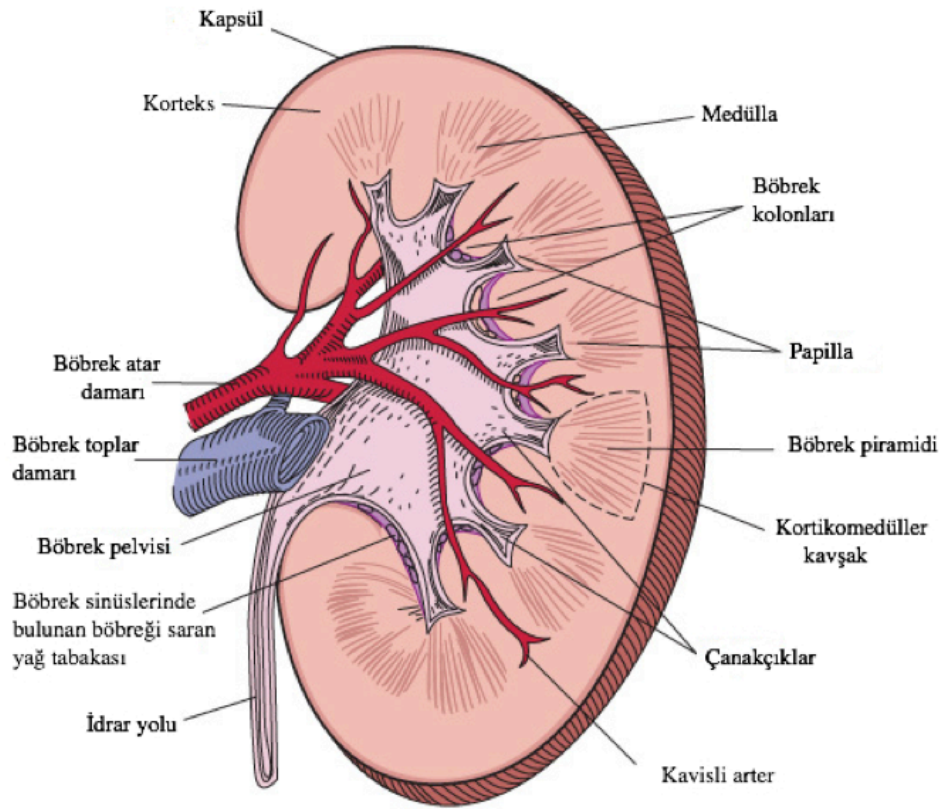
Kaslarda bulunan kreatin molekülün %1-2'lik kısmı kendiliğinden, geri dönüşümü olarak atık madde olan kreatinine dönüşür ve vücutta günlük üretilen kreatinin miktarı kas kütleğine bağlı olarak sabit değerlerdedir [2]. Sağlıklı bireylerde kanda bulunan kreatinin miktarı sabit değer aralıklarında seyretmesine rağmen, bireyin yapmış olduğu diyet ve et tüketimine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir [2]. Bunlara ek olarak kreatin üretiminin geri beslemeli inhibisyonu, kreatinden kreatinin oluşumu ve diğer metabolizmaların kontrolünde miktar değişikliği göstermesi mümkündür [1]. Kreatinin vücutta üretilmesi ve plazmada bulunması gereken sınır değerleri glomerular filtrasyon tarafından kontrol edilir [2]. Sınır değerlerinin değişkenlik göstermesi kreatininin önemli bir klinik analit olarak kullanılmasına olanak verir [2].

1.3. Böbrekler ve Fonksiyonel Görevleri

Böbrekler; (Şekil 1.6) bele kadar uzanan, dıştan fibröz kapsüllerle çevrilmiş, fasülye biçimli ve vücudun her iki tarafında bulunan retroperitoneal organlardır [4,5]. İnsan böbreğinin her bir uç kutbu 12. göğüs omuruna doğru uzanır, alt kutuplar ise 3. alt omurun ters istikametine doğru konumlanmıştır [5]. Her insan böbreği erişkin erkek bireylerde 125 ile 170 gr arasında, erişkin bayanlarda ise 115 ile 155 gr arasında

değişiklik gösterirken, yaklaşık uzunluğu 11 ile 12 cm dolaylarında, 5 ile 7.5 cm genişliğinde ve 2.5 ile 3 cm kalınlığındadır [5].

Böbreğin her bir fonksiyonel birimleri nefrondur, sayı olarak yaklaşık 1 milyon kadardır [2] ve yenilenme özelliği göstermezler [6]. Yenilenme özelliğine sahip olmadıkları için, böbrek hasarı ve normal yaşlanmaya bağlı olarak sayıları azalmaktadır [6].



Şekil 1.6 Böbreğin anatomik yapısı (5. referans, sayfa 37 den alınmıştır).

1.3.1. Böbreğin İşlevleri

- Kanın temizlenmesi: Böbreğin temel işlevlerinin başında, artık maddelerden idrar oluşturarak kanın temizlenmesi gelmektedir [4].
- Artık maddelerin atılımı: Bazı bileşikler ya da maddelerin yıkım ürünü olan maddelerin örneğin; amino asitlerin yıkım ürünü olan üre, nükleik asitlerin metabolik artığı olan ürik asit, hemoglobinin parçalanmasıyla ortaya çıkan bilirubin ve kreatinin gibi maddelerin uzaklaştırılmasını üstlenmiştir [6].
- Fazla suyun uzaklaştırılması: Böbreklerin diğer bir önemli görevi de ise fazla suyun uzaklaştırmasıdır [4].
- Arteriel kan basıncının düzenlenmesi: Böbrekler kanda bulunan Na^{++} iyonu ile su dengesinin kontrolünü sağlarlar ve dolaylı olarak kan arteriel basıncını da kontrolü gerçekleştirirler [6].
- Kırmızı kan hücrelerinin üretiminin düzenlenmesinde: Eritropoetin; kemik iliğini stimule ederek kırmızı kan hücrelerinin yapımını artıran peptid bir hormondur ve salgılanmasının büyük kısmı böbrekler tarafından kontrol edilir [7].
- Asit ve baz dengesinin düzenlenmesinde: Böbrekler, akciğerle koordineli bir şekilde asit-baz dengesinin kontrolünü sağlar ve protein metabolizmasının yan ürünü olan sülfirik asit ile fosforik asitin uzaklaştırmasından sorumludurlar [6].
- Vitamin D üretiminin regülasyonu: Vitamin D'nin aktif formu böbrekler tarafından sentezlenir ve sentez oranı hormonlar tarafından Ca^{++} ile fosfat oranına bağlı olarak kontrol edilmektedir [7].
- Glikoz sentezi: Uzun süreli açlık durumlarında amino asitler ve moleküllerden glikoz sentezi "glukoneojenez" ile böbrekler tarafından gerçekleştirilir [7].

1.4. Kronik Böbrek Yetmezliği ve Böbrek Hasarının Belirlenmesi

Böbrek rahatsızlıkları akut ve kronik böbrek hasarları olarak tanımlanır [8]. Akut böbrek hasarı (ABH); tanısında 48 saat içerisinde böbrek fonksiyonlarındaki azalma ile en az 6 saatlik süre içerisinde ki serum kreatinin miktarı önemlidir ve üre ile elektrolit seviyelerinin doğrudan ölçümleriyle değerlendirilir [8].

Kronik böbrek yetmezliği (KBY) ya da hasarı genel itibariyle böbreğin hem fonksiyonlarının hem de yapısının bozulması olarak tanımlanabilir, geri dönüşümsüzdür ve ilerleyici özelliktedir [8,9]. KBY'nin oluşmasında başlatıcı ve devamlılık teşkil eden 2 önemli faktör rol oynamaktadır [10]. Örneğin kalıtsal faktörlere bağlı olan ve tek gen kusuruyla ilişkilendirilen polisistik böbrek hastalığı yada Alport's hastalıkları örnek olabilirken, bazı ilaçların kullanımı (penisilinler, antienflamatuvar gibi) ve streptokok enfeksiyonların da KBY'e neden olduğu düşünülmektedir [10]. Ayrıca KBY hastalarının çoğunda uzun dönemli, hipertansiyon, kardiyovasküler rahatsızlıklar, diyabet ve ateroskleroz gibi durumlarla HIV, hepatit B ve C gibi enfeksiyon etkenleriyle karşılaşılması olasıdır [10,11].

Renal klirens ya da temizlenme; birim zamanda (dakika) plazmada bulunan bazı spesifik endojen ya da eksojen moleküllerin süzülmesidir ve aşağıda verilmiş olan formülle tanımlanır [12,13].

$$C_m = (U_m \times V) / P_m \quad (1.1)$$

C_m ; dakikada plazmadan süzölmüş olan madde miktarını, U_m ; idrardaki madde miktarını ve P_m de maddenin plazma miktarı ifade etmektedir.

KBY'nin değerlendirilmesinde glomerular filtrasyon oranı (GFO) kullanılır ve GFO bazı moleköl ya da eksojen bileşenlerin (örneğin fruktoz kökenli polimer inülin, ^{124}I -iyotalamat ve ^{48}Cr - EDTA ya da azotlu bileşenler gibi) kandan süzölme oranı olarak tanımlanır, nefronların sayısı ve fonksiyonlarıyla ilişkili olup, nefronların sayı-fonksiyon azalışı ilerleyen böbrek hasarlarına neden olmaktadır [12,13]. KBY'ni GFO oranından tanımlanmak istenirse; GFO oranının $< 60 \text{ mL/dak}$, 1.73 m^2

oranından düşük olması ve bu sürenin de 3 ay ya da daha fazla süre devam etmesi olarak tanımlamak mümkündür [9]. KBY hastalığı GFO oranına göre 5 aşamaya ayrılmaktadır [14], bu değerler sırasıyla $GFO \geq 90$ ise; I. evre olarak değerlendirilir ve teşhis ile tedaviyi, GFO 60-89 aralığı ilerleme dönemi yani II. evreyi, 30-59 aralığı değerlendirme ve komplikasyon tedavisi olan III. evreyi, GFO oranının 15-29 olduğu aralık değeri böbrek replazman hazırlık evresi olan IV. evreyi ve $GFO < 15$ değeri de son aşama olan (V. evre) diyaliz ya da böbrek nakline ihtiyaç duyulan evredir [15].

Böbrek hasarlarının tanısında ve teşhisinde son zamanlarda kullanılan bazı özgül moleküller;

- Karaciğer tipi yağ asidi bağlayıcı protein (KYABP): Karaciğer tipi yağ asidi bağlayıcı proteinler, insan proksimal tübüllerinde eksprese olmaktadır [16]. Kamijo ve ark, [17] tarafından böbrek hastaları üzerinde yapılan çalışmada idrarda artış gösteren böbrek hasar proteinleri ve tubulointerstisyel hasar miktarlarıyla birlikte KYABP'nin de yükselmiş olduğu rapor edilmiş, KYABP'nin böbrek hastalıklarını tayin etmede kullanılabileceği rapor edilmiştir.

- Sistatin C (SC): İnsan SC proteini;13.343-13.359 Da moleküler ağırlıklı, 151 nm çapında, 120 amino asit kalıntısına sahiptir ve yıkımını böbrekler üstlenmiştir [18]. Endojen biyomarker özelliği taşır, glomeruller tarafından süzülür ve hem KBY hem de ABY'ni teşhis etmek için kullanılır [19,20]. Sağlıklı bireylerde serum plazmasındaki değer aralığı 0.8-1.2 mg/L'dir [18]. Yapılmış olan çalışmalarda SC'in de GFR oranının değerlendirilmesinde kullanılabiliğini ileri sürülmüştür [21,22].

- Nötrofil Jelatinaz İlişkili Lipokalin (NJİL): NJİL nötrofillerde bulunan jelatinaza kovalent olarak bağlanmış, 25 kDa ağırlığında ve 178 amino asite sahip bir proteindir [23,24]. Küçük molekül ağırlığından dolayı parçalanmaya karşı dirençlidir ve idrarda tayin edilmesi kolay bir moleküldür [25]. ABY'nin tayin edilmesinin yanında KBY'nin hem teşhis edilmesinde hem de seyri ve gidişatını gözlemlenme de kullanılır [26]. Literatürde yapılmış olan çalışmalarda NJİL proteinin KBY teşhislerinde kullanılabileceği gözlemlenmiştir [25,27].

- Asimetrik Dimetilarjinin (AD): Asimetrik dimetilarjinin 220 dalton ağırlığında [28], nitrik oksit sentaz enzimin önemli endojen inhibitörüdür ve ilk defa hemodiyaliz hastalarında rastlanılmıştır [29,30]. AD proteinlerin post translasyon sonrası metillenmesiyle oluşur (arjinin amino asiti) ve proteolitik enzimlerle yıkım ürünü olarak açığa çıkar [30,31]. Fliser, ve ark., [32] tarafından yapılan çalışmada AD seviyesinin normal ve tolera edilebilir GFR oranlarında fazla yükselmediği sonucuna ulaşılmış, bu değerlerin böbrek hastalarında yüksek değerlere ulaştığı ve AD'in böbrek hastalarının takibinde kullanılabileceğini rapor edilmiştir. Diğer bir çalışmada AD serum seviyesinin, KBY hastalarında yüksek değerlere ulaştığı ve diyaliz işlemi sonucunda bu değerlerin daha düşük seviyelere düşürüldüğü gözlenmiştir [33].

- Beta-Trace Protein (BTP): BTP düşük molekül ağırlığına (23 ile 26 kDa) sahip bir proteindir, prostaglandin D sentaz olarak da adlandırılır ve böbrekler tarafından filtre edilir [34,35]. Yumurtalık hariç tüm dokularda sentezlenir ve vazodilatasyon, plateletlerin agregasyonunun inhibisyonunu (kümelenme) düzenlemek gibi görevleri üstlenmiştir [36]. Donadio, ve ark., [35], BTP ile GFO arasındaki ilişkiyi incelemiş ve böbrek fonksiyonlarının kaybıyla birlikte (GFO oranının dikkate alınmış) serum BTP miktarının artabileceğini ileri sürmüşlerdir. Diğer çalışmalarda da BTP ile azalmış olan GFO arasındaki ilişkiler ortaya konulmuştur [37]. Hoffmann, ve ark. [38] tarafından yapılmış olan çalışmada BTP miktarının hem böbrek hasarlarında hem de diyaliz hastalarında yüksek miktarlara ulaştığı gözlenmiştir.

- Böbrek Hasar Proteini 1 (BHP-1): BHP-1 proteini; dış domain tarafında immunglobulin yapısında olduğu gibi altı adet sistein içeren, iki N-glikosilasyon bölgesinde de treonin, serin ve prolin amino asitlerince zengin tip 1 musin benzeri Q glikosillenmiş trans membran glikoproteinlerinden birisidir [39]. BHP-1 protein sağlıklı böbrekler tarafından az miktarda sentezlenirken, böbreklerin kansızlığı (post-iskemi) durumunda sentezlenen miktar artış göstermektedir [40]. BHP-1'nin gen ifadesinde artış ya da ekspresyonu tübül epitel hücrelerinde oluşan hasar durumlarında ortaya çıkmaktadır [39]. Ayrıca in-situ hibridizasyon ve immünohistokimyasal çalışmalar neticesinde proksimal tübül epitel hücrelerinin yenilenmesi sırasında da BHP-1 ve mRNA miktarlarında yüksek ifade edilebilirlik

değerlerine ulaştığı saptanmıştır [40]. Literatürde yapılmış olan çalışmalara bakıldığı zaman Han, ve ark., [41] hem normal hem de böbrek rahatsızlıkları olan hastalarla ilgili yapmış oldukları çalışmada iskemik böbrek hastalarının idrarlarında BHP-1 protein miktarını daha yüksek değerlerde saptamış ve idrar örneklerini Western Blot analizi ve Elisa Testi ile karşılaştırarak artış gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Yapılmış olan diğer bir çalışmada allogreft hastalarından (diyabetli hastalarda dahil olmak üzere) alınan idrar örnekleri BHP-1 kiti yardımıyla incelenmiş ve renal fonksiyonel bozukluklara sahip olan kişilerde BHP-1 miktarının artış gösterdiği sonucunu gözlemlemişlerdir [42].

- İnterlökin 18 (İ-18): İ-18 kronik inflamasyon durumlarında, oto-immün hastalıklarda, çeşitli kanser türleri ile birçok enfeksiyon gösteren hastalıkla eksprese olan İ-1 sitokin süper familyası elemanıdır ve aktif makrofajlar tarafından yüksek miktarlarda sentezi yapılmaktadır [20,43]. Literatürde yapılmış olan çalışmalarda İ-18 ile böbrek rahatsızlıkları (ABY) arasında önemli ilişki verilerine ulaşıldığı görülmektedir. Parikh, ve ark., tarafından [44], sağlıklı bireyler ile, ABY hastalarının idrarlarında bulunan İ-18 düzeylerini incelemiş ve ABY hastalarının idrarlarında yüksek oranda İ-18 miktarını tayin edilmiştir. Yapılmış olan diğer bir çalışmada akut akciğer rahatsızlığı nedeniyle yoğun bakımda yatan ve aynı zaman da ABY olan hastaların idrarlarındaki İ-18 miktarı değerlendirilmesi yapılmıştır [45]. Değerlendirme sonuçlarına göre (24 ve 48 saatlik idrar numunelerin incelemesi) İ-18'in ABY erken teşhisinde İ-18'in kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

- Albüminüri (AL): Albümin; 66 kDa ağırlıklı, 585 aminoasit içeren, negatif yüke sahip, idrar da bulunan protein miktarının hesaplanması için kreatinin ile birlikte kullanılan ve idrardaki miktarı 300 mg'nin altı ile 30 mg'dan yüksek olduğu durumlarda mikroalbümini olarak kabul gören bir proteindir [46,47]. AL proteini glomerüller tarafından süzülür ve bunu takiben proksimal tübül hücreleri tarafından tekrar absorbe edilir (kubilin ve megalin reseptör proteinleri yardımıyla) ve yıkılmak üzere lizozomlara taşınır [48,49]. İdrarda artmış olan proteinler veya albümin (mikroalbümin) değeri hem kardiyovasküler rahatsızlıklar böbrek hasarlarının belirleyici hem de kardinal bulgularında bağımsız risk faktörü olarak kullanılır [50]. Keane, ve Eknayan, [50] proteinürinin böbrek hasarları ve son dönem böbrek

hastalığıyla doğrudan alakalı olduğu öne sürmüşlerdir. Literatür çalışmalarında örneğin; Wu- T,M. ve ark., [51] KBY rahatsızlığı bulunan 602 hasta üzerinde yapmış oldukları çalışma da KBY hastalarında rastlamış oldukları AL ile proteinüri miktarlarının artışı gözlemlenmiştir. Diğer bir çalışmada proteinürinin yalnızca böbrek hasarları ile miyokardiyal enfarktüs durumundaki ilerlemesi incelenmiştir [52]. Yapılan çalışmada böbrek hastalıkları yanında miyokardiyal enfarktüs ve böbrek hasarının ilerlemesinde proteinüri miktarının arttığı gözlenmiştir.

- N-Asetil-B-D-glukozaminidaz (NAG): NAG molekülü yaklaşık olarak 140 kDa ağırlığında, proksimal tübül hücrelerinde bulunan lizozomlar tarafından oluşturulur ve NAG A ile NAG B olmak üzere iki farklı izoenzim formundadır [53,54]. Yüksek molekül ağırlığı nedeniyle böbrekler tarafından filtre edilmesi güçtür ve idrarda bulunması gereken miktarı geçtiği zamanlarda proksimal tübüller ile lizozomlarda oluşan hasarların göstergesi olarak kabul edilebilir [54]. Literatürde yapılmış olan çalışmalara incelendiği zaman bu olguyu destekler nitelikte yayınlara rastlamak mümkündür. Örneğin Liangos, ve ark., [55] tarafından yapılan çalışma da 201 ABY hastasının NAG ile BHP-1 düzeylerini 3 yıllık süre içerisinde incelemişlerdir. Hastalar üzerinde NAG enzim aktivitesini spektrofotometrik yöntem kullanarak değerlendirilmiş ve NAG ile BHP-1 seviyeleri ABY'nin değerlendirilmesinde kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Diğer bir literatür çalışması da böbrek transplantasyonu geçirmiş olan 87 hasta üzerinde yapılmış (1 ve 12 aylık dönemde) kreatinin ile birlikte NAG enzim seviyeleri incelenmiştir [56]. Elde ettikleri verilere göre idrarda bulunan NAG enziminin aktivitesi tübüler hasarın erken dönemleri ile uzun dönemli böbrek transplantasyonlarını değerlendirmede kullanılabileceğini göstermiştir.

1.5. Kreatinin (Krn) Tayin Edilmesi ve Glomerüler Filtrasyon Oranı (GFO) Arasındaki İlişkisi

Kreatinin; 113 Da ağırlığında, proksimal tübül hücreleri tarafından salgılanan ve glomeruluslar tarafından filtre edilen amino asit kalıntısıdır [59]. Kas metabolizmasının ürünü olarak ortaya çıkar, küçük miktarlarda proksimal tüplerden

salgılanır ve GFO'nı değerlendirme de kullanılan endojen biyobelirteçtir [12,13]. Sağlıklı bir bireyin plazmasında bulunması gereken Krn miktarı yaklaşık olarak 1 mg/dL'dir [6] fakat birey tarafından yapılmış olan diyet miktarı [1] cinsiyet, ırk ve yaşa bağlı olarak kreatinin miktarı değişiklik göstermektedir [58].

Kreatinin böbrek fonksiyonlarının değerlendirmesinde kullanılan endojen biyobelirteç özelliği taşır [12]. Kreatinin klirensini değerlendirmede 24 saatlik idrar tercih edilir ve bazı matematik modellemeleri kullanılarak değerlendirilir [12]. Krn temel alınarak oluşturulan bu denklemler bazı etkenlerden örneğin ilaçlar (simetidin, trimetoprim gibi), diüretikler, kas kütlesi ve hamilelik gibi durumlardan etkilenmektedir [12]. Böbrek fonksiyonlarını değerlendirme de kullanılan GFO oranı ve Krn ile birlikte kullanıldığı modeller [12], sırasıyla aşağıda verilmiştir.

- Cockcroft- Gault Eşitliği; eşitlikte sabit değerler erkekler için 1.23 ve bayanlar için 1.04 olup, ve K'da derişim olarak verilmiş olup (İngiltere için) denklem aşağıdaki gibidir;

$$K_{Krn} = \frac{(140 - \text{yaş}) \times \text{Ağırlık (kg)} \times (\text{sabit})}{\text{Serum kreatinin } (\mu\text{mol/litre})} \quad (1.2)$$

- Böbrek hastalığı çalışma grubu denkleminde diyet modifikasyonu;

$$\text{GFO (mL min}^{-1} \text{ 1.73 m}^{-2}\text{)} = 186 \times \text{serum kreatinin } (\mu\text{mol/litre})^{-1.154} \times \text{yaş}^{-0.203} \times 1.21 \text{ (siyahi bireyler)} \times 0.742 \text{ (bayan)} \quad (1.3)$$

- Schwartz denklemi; Çocuklar için tercih edilen bu denkleme göre;

$$K_{Krn} \text{ (mL min}^{-1} \text{ 1.73 m}^{-2}\text{)} = \frac{\text{uzunluk (cm)} \times k}{\text{Serum kreatinin (mg/dl)}} \quad (1.4)$$

k sabiti: 0.33 premature bebekler, 0.45 1 yaş bebekler için, 0.55 1 ile 13 yaş çocuklar için ve 0.70 genç erkekler ile 0.55 genç bayanlar

- Serbest su klirensi eşitliğine göre (SSK);

$SSK = V(1 - \frac{Ü_{osmalite}}{P_{osmalite}})$ ve denkleme göre; V; idrar hacmini, Ü; idrar osmalitesini ve P de plasma osmalitesini ifade etmektedir.

1.6. Kreatinin Tayin Edilmesinde Kullanılan Yöntemler

Kreatinin molekülün tayin edilmesinde kullanılan yöntemler sırasıyla;

Jaffe Tepkimesi

1896 yılında Jaffe alkalın pikrat ile kreatinin molekülünü metilen grubuyla alkali sodyum pikrat etkileştirmiş ve kırmızı-turuncu renkli kompleksi gözlemlemiş ve Folin tarafından 1904 yılında idrardan kreatinin tayini gerçekleştirilmiştir [59, 60, 61]. Bu yöntem kullanılarak insan serumunda tayin edilebilen kreatinin üst sınır değerleri 1.6-1.9 mg/dL aralığındadır [62].

Biyosensörler

Kreatinin tayin edilmesinde biyosensörler incelendiğinde potansiyometrik ve amperometrik olarak 2 yöntemle karşılaşmak mümkündür [60]. Amperometrik cihazlar kullanılarak kreatinin tayin edilmesi Tsuchida, ve Yoda, [63], tarafından 3'lü enzim sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve birkaç istina dışında amperometrik cihazlar ile kreatinin tayininde 3'lü enzim sistemi kullanılmaktadır [60]. Kullanılan ilk enzim kreatinin amidohidrolaz olup, kreatinin molekülünü kreatinine dönüştürür. Bu tepkimeden sonra kreatin amidohidrolaz enziminin katalizi sonucu sarkozin ile üre oluşur. Son basamakta glisin, formaldehit ile H₂O₂ oluşumu da sarkozin oksidaz enzimiyle gerçekleştirilir. Bu yöntem H₂O₂'ün tayin edilmesi temeline dayanır [63]. Potansiyometrik cihazlar kullanarak kreatinin molekülün tayinde edilmesinde temel yaklaşım kreatinin molekülünün, kreatinin iminohidrolaz enzimi tarafından kataliz edilmesiyle birlikte yüzeydeki NH₄⁺'ün iyon seçici elektrot tarafından tayin edilmesi temel prensibi üzerine kurulmuştur [60].

Meyerhoff, ve Rechnitz, tarafından [64] kreatinaz enzimi kullanılarak (enzim tarafından kreatinin molekülü amonyak ile *N*-metilhidantoine dönüştürülür) sensör çalışmaları başlatılmıştır.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak kreatinin tayin edilmesine ait ilk çalışmalar 1977 yıllarına kadar dayanmaktadır [65]. Erken dönemde YPSK kullanılarak yapılmış olan tayin çalışmalarına bakıldığı zaman; 1977 yılında Brown, ve ark. tarafından [66] kreatinin molekülünün tayini YBSK kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İleri zamanlarda YBSK kullanılarak yapılmış olan çalışmalara örnek olarak izokratik iyon çifti ters faz ayrımı ile kreatinin tayini [67] yapılmıştır. Ayrıca sıçan serumu kullanılarak kreatinin miktarı YBSK ile tayin edilmiş ve böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılmıştır [68].

1.7. Moleküler Baskılama

Moleküler baskılama; fonksiyonel monomerin, çapraz bağlayıcının ve hedef molekülün (analit) ön-kompleksleşmesiyle meydana gelen polimerizasyon işlemidir [69]. Moleküler baskılanmış polimerlerin; (MBP) kararlı yapıları (uç pH değişimlerine, basınç ve yüksek sıcaklık gibi), düşük maliyetleri, seçici olmaları MBP'lerin afinite ayırma sistemlerinde, biyoanalitik tayinlerde, kimyasal sensörler ve enzim-benzeri kataliz işlemlerinde kullanılmasına olanak sağlamaktadır [70,71].

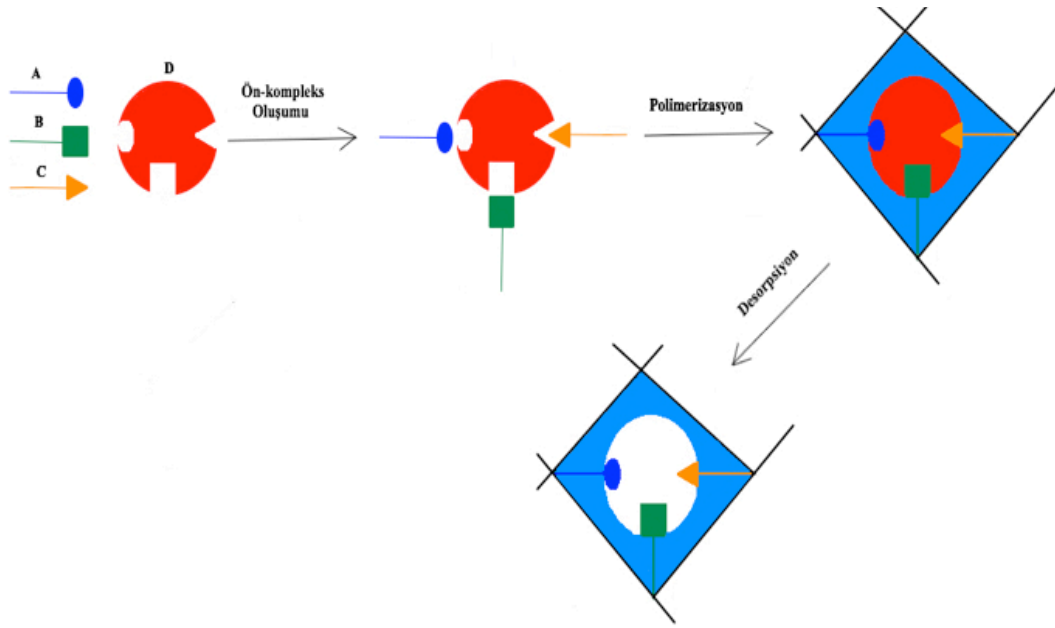
Moleküler baskılama yöntemi 1972 yılında Günter Wulff ve arkadaşları tarafından başlatılmış ve destek malzemesi üzerinde fonksiyonel monomer ya da monomerlerin üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle elde edilmiştir [72]. Moleküler baskılama yöntemi üç basamaktan oluşmaktadır [72],

Birinci basamakta ön-kompleksleşme gerçekleşir, bu basamakta polimerleşebilen ve hedef molekül ile etkileşime (kovalent ya da non-kovalent) girebilecek fonksiyonel gruplara sahip monomer ile hedef molekülün etkileşimi söz konusudur. Bu basamak

hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri açısından önem teşkil etmektedir.

İkinci basamak; polimerizasyon aşamasıdır ve polimerizasyon için uygun çapraz bağlayıcı ve başlatıcının kullanıldığı basamaktır [72].

Polimerizasyonun son aşamasında hedef molekülü uygun çözücü ya da çözücüler kullanılarak, destek malzemesinden uzaklaştırılır. Hedef molekülün polimer matriksten uzaklaştırılmasıyla hedef moleküllere ait (üç boyutlu yapı, büyüklük ve şekil) kimyasal, topolojik ve hedef moleküle ait özgül boşluklar elde edilmektedir [72] (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezi (A, B, C fonksiyonel monomerler, D; baskılanmak istenen hedef molekül).

1.7.1. Moleküler Baskılama Yönteminde Kullanılan Temel Bileşenler

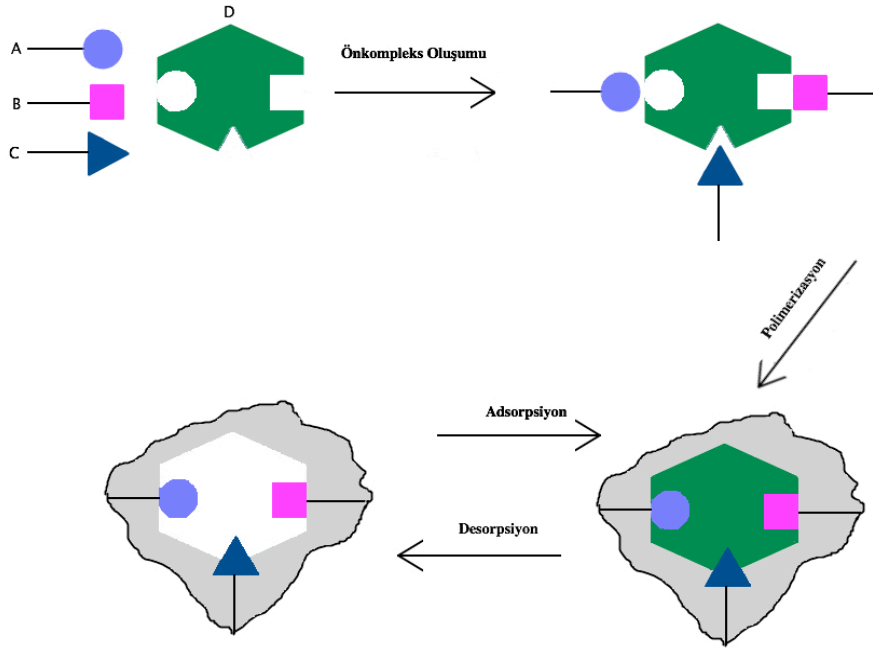
Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezlenmesinde gerekli olan temel bileşenler sırasıyla [72];

- Fonksiyonel monomer ya da monomerler: Fonksiyonel monomer ya da monomerler hedef molekülün bağlanmasını oluşturan temel yapılarıdır ve etkin bir baskılamanın oluşması için hedef molekül ile etkileşimlerine girebilen fonksiyonel gruplar taşımalarıdır [72].
- Çapraz Bağlayıcı: MBP hazırlanmasında kullanılan çapraz bağlayıcıların üç temel işlevi bulunur [73]. Temel görevi destek malzemesinin (polimer matriks) morfolojik yapısının kontrol edilmesinde (örneğin makrogözenekli, jel-tipli ya da mikrojel toz gibi) görev alır [73]. Bunu takiben moleküler baskılanmış bölgeler ile polimer matriksin kararlılığını kontrol eder [73] ve destek malzemesinin suda çözünmesini engeller [74].
- Çözücü: Polimerizasyonda kullanılan çözücünün temel görevi; polimerizasyonda kullanılan bileşenleri (monomer/monomerler, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve MBP sentezinin gerek duyulduğu durumlarda hedef molekül de dahil olmak üzere) tek bir faz altında toplamaktır [72]. Bunlara ek olarak polimerizasyon sonrası gözenekli yapının oluşmasında, polimerizasyon sıcaklığının homojen olarak dağıtılmasında ve non-kovalent etkileşimlerde hedef molekül ile kompleks oluşumuna olumlu etkileri bulunmaktadır [72].
- Başlatıcılar: Polimerizasyonda kullanılan başlatıcı miktarı (%1 wt yada % 1 mol oranlarında), polimerizasyonda kullanılan monomer oranlarına göre oldukça düşüktür (73). Başlatıcının kimyasal yapısına göre oluşan radikal oranı ve miktarları sıcaklık, ışık gibi faktörler tarafından tetiklenmektedir [73].
- Hedef moleküller: Moleküler baskılama teknolojisinde kullanılan hedef moleküllere örnek olarak; enzimler [75], iyonlar [76] ve proteinler [74,77] gösterilebilir. Hedef molekülün seçilmiş olan uygun fonksiyonel monomer ya da monomerler ile kompleks yapabilecek gruplara sahip olması [74] ve polimerizasyon yüksek sıcaklıklarda oluşacaksa, hedef molekülün kararlı olması beklenmektedir [72].

1.7.2. Molekül Baskılama Yöntemleri

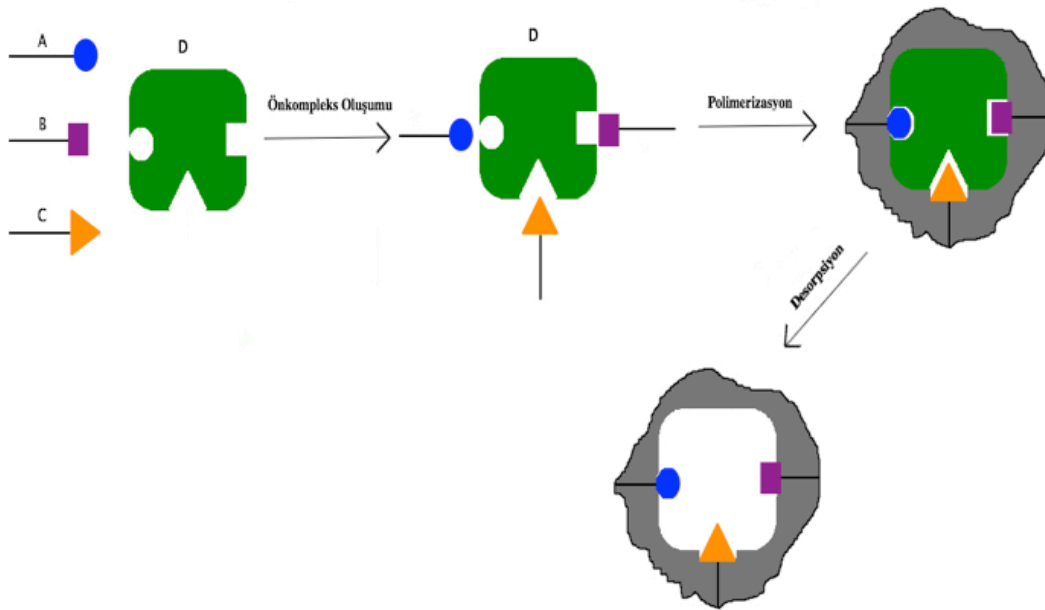
Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezlenmesinde hedef molekül ile fonksiyonel monomer/monomerlerin etkileştirilmesinde kovalent ve non-kovalent etkileşimlerden yararlanılır [73].

- Kovalent Baskılama: Kovalent baskılama yöntemi kullanarak MBP'in sentezi Günter Wulff ve arkadaşları tarafından başlatılmıştır [78]. Hedef molekülün baskılanmasında tersinir kovalent bağlar rol alır ve çapraz bağlayıcı kullanılarak gerçekleştirilen kopolimerizasyonu sonunda hedef molekül uzaklaştırılır [73]. Kovalent etkileşimlerin kullanıldığı MBP sentezlerinde hedef moleküllere karşı güçlü ve özgül bağlanmalar oluşmaktadır (Şekil 1.8.,78). Kovalent baskılama hedef moleküllerin seçimlerinde sınırlamalar getirmesinin yanında, asit hidrolizi gereken durumlarda hedef molekül ile fonksiyonel monomer/monomerler arasında oluşan kovalent bağlarının yıkımlarına neden olmaktadır [73]. Ayrıca hedef molekül ile fonksiyonel monomerin kovalent bağlanma etkisiyle, hedef molekülün destek malzemesinden uzaklaştırılması zordur ve adsorpsiyon işlemlerinde hedef molekülün kendine özgü boşluk ya da oyuklara yavaş bağlanması olasıdır [72].



Şekil 1.8. Kovalent baskılama.

- Non-Kovalent Baskılama: Moleküler baskılanmış polimerler elde etmek amacıyla kullanılan diğerk bir yaklaşımda zayıf etkileşimler tarafından kontrol edilen non-kovalent baskılamadır [78]. Non-kovalent etkileşimler kullanılarak yapılan öncü çalışmalara örnek olarak akrilik monomeri kullanılarak boya moleküllerinin baskılanması örnek verilebilir [79]. Non-kovalent etkileşimlerin kullanıldığı moleküler baskılanmış polimerlerde iyonik, hidrofobik, hidrojen bağları, yük transferi gibi etkileşimlerden yararlanır (Şekil 1.9.,79). Polimerizasyon sonrasında hedef molekül basit yıkama işlemleriyle uzaklaştırılır ve çapraz bağlayıcı tarafından hedef moleküle özgü üç boyutlu bağlanma bölgeleri korunmaktadır [79]. Non-kovalent baskılama yöntemin iki büyük avantajı vardır; ilk olarak non-kovalent etkileşimler tarafından yürütülen polimerizasyon yöntemleri kovalent etkileşim gösteren polimerizasyon yöntemlerine göre daha kolaydır ve hedef molekülün bağlanma bölgelerine olan afinitesi daha yüksektir [73]. Buna ek olarak non-kovalent etkileşimlerde hedef molekülün bağlanması daha hızlı olmakta birlikte ve monomer hedef molekülün sentezine gerek duyulmamaktadır [72].



Şekil 1.9. Non-kovalent baskılama.

1.7.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Kullanım Alanları

Moleküler baskılanmış polimerlerin kullanım alanları incelendiğinde üç önemli alanda kullanıldıkları (ayırma, teşhis ve sensör ile kataliz) göze çarpmaktadır [80].

- Ayırma İşlemlerinde: Moleküler baskılanmış polimerler yüksek ve düşük pH aralıklarına, toksik çevresel koşullara olan dirençliliğe, yüksek sıcaklık ile yüksek basınç gibi koşullar altında kararlılık gösterdikleri için afinite ayırmalarında, katı faz ekstraksiyonlarında ve ayırma işlemlerinde kullanılmaktadır [80].

- Çevresel Uygulamalar: Ağır metallerin çevreden uzaklaştırılması amacıyla kullanılan yöntemlerden birisi nanofiltrasyon ve ters-osmos membran sistemleridir [80]. Ters-osmos membranlar ortamda bulunan tüm iyonları kendi bünyesinde biriktirme özelliğine sahiptir ve MBP hem seçicilikte hem de çevresel koşullarda daha kararlı oldukları için, bu tip membranların yerlerine tercih edilmektedirler [80,81].

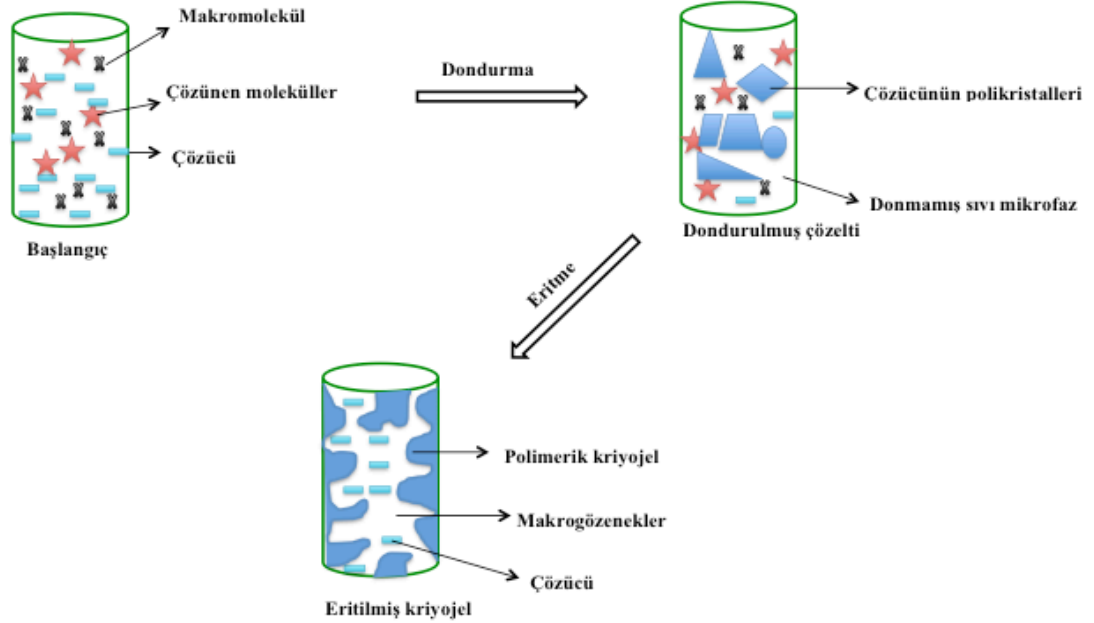
- Sensör: Moleküler baskılanmış olan polimerlerin geniş kullanım alanlarına örnek olarak biyosensörler de verilebilir [80]. Biyolojik malzemeler kullanılarak tasarlanan biyosensörlerin kararsız olmaları, yüksek maliyetleri ve hedef moleküle özgü enzim ya da uygun reseptörler kullanılmadığı zaman seçiciliğin azalması gibi bir takım dezavantajlarla karşılaşmak mümkündür [80]. Ayrıca maliyeti düşürmek ve hedef moleküle özgü olan enzim ya da reseptörün kullanılmasına gerek duyulmadan moleküler baskılanmış polimerler biyosensör uygulamalarında tercih edilmektedirler. [80]. MBP'lerin biyosensör uygulamalarına örnek olarak; enzimlerin tayin edilmesi [82], hücre tanınması (83) ve bazı hastalıkların teşhisi [84] örnek olarak verilebilir.

Kataliz: Enzimler spesifik oldukları hedef moleküllerine karşı (substrat) özgül, üç boyutlu yapılarına karşı seçici, ılımlı koşullarda tepkimeleri yüksek oranda hızlandıran moleküllerdir [85]. Enzimlerin katalitik etkileri organik çözücüler, sıcaklık ve pH gibi durumlardan etkilenmektedir. Moleküler baskılanmış polimerler basınç, yüksek sıcaklık, asidik-bazik koşullar ile birçok organik çözücünün bulunduğu ortamlarda kullanılabilme özelliği gösterirler [86]. Moleküler baskılama

teknolojisi kullanılarak sentezlenen enzim benzeri yapılar; biyolojik sistemlerde seçicilik (üç boyutlu) ve tepkimeleri hızlandırma özelliği gösterdikleri için tercih edilmektedirler [85]. Kataliz çalışmalarına örnek olarak Cu(II) iyonu kullanılarak, difenollerin oksidasyonu [85], etantiyomer seçici olarak ester hidrolizi [87] örnek verilebilir.

1.8. Kriyojeller

Kriyojel tanımı yunanca da krios yani donma ya da buz anlamına gelmektedir ve kriyojeller gel matrisler olarak tanımlanırlar [72,88]. Uygun monomer ya da polimer öncüleri kullanılarak kısmi donmuş sıvı faz içerisinde sentezlenir (Şekil 1.10) ve buz kristalleri gözenek yapıcı olarak görev alır, polimerleşme sonunda buz kristallerin erimesiyle birbirine bağlı gözenekli yapılar elde edilir [72,89].



Şekil 1.10. Kriyojellerin sentez aşamaları.

Kriyojeller (kriyotopik jelleşme) kovalent, non-kovalent yada iyonik bağlardan oluşabilir (Şekil 1.11) ve dondurma sistemi kullanılmadan elde edilen jellerle kıyaslandıkları zaman önemli morfolojik farklılıklara) sahiptir [88].



Şekil 1.11. Monolitik kriyojellerin optik fotoğrafı.

1.8.1. Kriyojellerin Özellikleri ve Yapısının Kontrolü

Kriyojeller normal jellerle kıyaslandıkları zaman heterofaz sistemlerden oluşurlar ve elastik yapıları, birbirlerine bağlantılı geniş gözenekleri ($1 < X < 300 \mu\text{m}$) temel özelliklerinin başında gelmektedir [88,90,91].

Kriyojellerin yapısal özelliklerinin belirlenmesinde sıcaklık önemli bir faktördür. Kriyojeller sulu çözeltiler kullanılarak -10°C ile -20°C arasında sentezlenmektedirler [98]. Sentez sırasında buz kristalleri hem çözücü görevini de üstlenirler hem de eritme işleminin ardından birbirlerine bağlantılı gözenek oluşumundan sorumludurlar [91]. Örneğin oda sıcaklığında hazırlanmış olan jel form ile -20°C 'de hazırlanmış olan kriyojelin gözenek yapıları incelendiği zaman, oda sıcaklığında hazırlanmış olan jelin homojen, mikrogözenekli yapıda olduğu saptanmış, kriyojelin gözenek çapının $100 \mu\text{m}$ 'den büyük olduğu ve gözeneksiz duvarlara sahip olduğu gözlemlenmiştir [91]. Sentez sırasında buz kristalleri tarafından kriyojelin gözeneklerine yapılan basınçtan ötürü, makrogözenek duvarları ince-nano ya da makrogözenekli olmaktadır

[90]. Yapılan sentez (kriyojelasyon) türüne göre gözenek boyutlarını da kontrol etmek mümkündür [91]. Plieva, ve ark [92] tarafından poliakrilamid kriyojeller üzerinde yapılmış olan çalışmada, tercih edilen polimerizasyon yöntemi üzerinde çapraz bağlayıcı ile farklı monomer oranlarının etkilerini araştırılmıştır. Kullanılan çapraz bağlayıcının türüne göre sentezlenmiş olan kriyojellerin daha elastik ve süngerimsi yapıya yöneldiğini kaydedilmiştir. Ayrıca artmış olan monomer miktarıyla birlikte kriyojellerin gözenek çaplarında değişimler belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada poliakrilamid kriyojellerin yapısını incelemek amacıyla başlatıcı-stabilizör, monomer miktarları ile çözücünün özellikleri incelenmiştir [93]. Elde edilen verilere göre, artmış olan stabilizör-başlatıcı ve monomer miktarlarıyla birlikte poliakrilamid kriyojellerin daha sert bir yapıya büründüğü ve özellikle artan monomer miktarına bağlı olarak kriyojellerin elastik yapılarını kayb ettikleri ve çözücülerin değişmesiyle gözenekli yapılarında değiştiği saptanmıştır [93]. Sonuç olarak polimerizasyon aşamasında kullanılan maddeler uygun koşullar altında optimize edilerek, kriyojellerin yapıları değiştirilebilmektedir.

1.8.2. Kriyojellerin Kullanım Alanları

Kriyojeller gözenekli yapıları, hızlı şişme kinetikleri (hidrofilik karakterden dolayı), elastik ve kararlı yapılarıyla, akış hızlarına karşı gösterdikleri düşük dirençten dolayı avantajlı malzemelerdir [91,94]. Kriyojellerin uygulama alanları incelenecek olursa;

Destek Malzemesi: Kriyojeller sahip oldukları avantajlar nedeniyle ayırma işlemlerinde kromatografik destek malzemesi olarak kullanım alanı bulmuşlardır. Ayırma işlemlerinde kullanılan kriyojellere örnek olarak; insan periferik kan lenfositlerini ayırma [95] ile L-glutamik asitin ayrılması [96] verilebilir.

Hücre ve Enzim Tutuklanması: Mekanik kararlılığı ve fizikokimyasal karakterleri de barındıran kriyojeller, hücre taşınmasında da kullanım alanı bulmuştur [91]. Örneğin Efremenko, ve ark., [97] tarafından yapılmış olan çalışmada polivinil alkol kriyojellere hücre tutuklanmış (*Rhizopus oryzae*) ve laktik asit biyokatalizini hedeflemişlerdir. Diğer bir çalışmada; polivinil alkol kriyojellere enzim (glukoz

oksidaz) immobilize edilmiştir [98]. Destek malzemesi olarak kullanılan kriyojel membranların aynı zamanda sensör uygulamasında kullanılabilirliği araştırılmıştır [98].

Doku Mühendisliği: Doku iskeletleri (scaffold) doku mühendisliğinde kullanılan sentetik ya da doğal polimerlerden sentezlenen, 3 boyutlu ve gözenekli yapıya sahip malzemelerdir [99]. Sharma, ve ark., tarafından doğal polimerler (jelatin ve karrageenan) kullanarak uygun koşullar altında kriyojel doku iskeleti hazırlamış ve doku mühendisliğinde kullanılabilirliğini araştırmışlardır [99]. Diğer doku mühendisliği çalışmasında doğal (dekstran) ve sentetik kaynaklı (hidroksietil metakrilat) sentezlenen, biyobozunur özellikteki kriyojelin doku mühendisliği için uygulduğu araştırılmıştır [100].

1.9. Kreatinin Baskılanmış Polimerlerin Literatür Çalışmaları

Kreatinin baskılanmış polimerlerin literatür çalışmaları tarih sırasıyla özetlenecek olursa;

1997 yılında Sreenivasan, ve Sivakumar, tarafından başlatılmış olup, 3 farklı monomer kullanarak (metakrilik asit, 2-hidroksi-etilmetakrilat ve N-vinil pirrolidin) kreatininin adsorpsiyonunu incelemişlerdir [101].

2004 yılında yapılmış olan çalışmada [102], moleküler baskılama tekniğini kullanarak, etilen glikolmetakrilat ve Lewis asit özelliği gösteren Zn(II) siklenin kopolimerizasyonu sonucu, kreatinin molekülüne özgü polimerler sentezlenmiş ve kreatinine karşı olan seçiciliğini incelemiştir.

2005 yılında yapılmış olan çalışmada [103], fonksiyonel monomer olarak 4-vinilpiridin ile çapraz bağlayıcı olarak divinilbenzeni kullanmış ve kreatinin bağlanma özellikleri araştırılmıştır. Aynı yıl yapılmış olan diğer bir çalışma da; aynı araştırmacılar tarafından [104] farklı monomer ile çapraz bağlayıcı kullanılarak (β -siklodekstrin ve epiklorohidrin) iki farklı moleküler baskılanmış polimer

sentezlenmiş ve kreatinin molekölü moleküler baskılanmış polimerler arasındaki etkileşim ya da etkileşimler gözlenmiştir.

2006 yılında Sreenivasan, tarafından yapılmış olan çalışmada [105] polistiren destek malzemesi yüzeyine kreatinin baskılanmıştır. Uygun olan boşluklara bağlanması beklenen kreatinin molekölünün tayin edilmesinde Fourier dönüşüm kızılötesi spektrofotometresini (FTIR) kullanmıştır. Hsieh, ve ark., [106] 2006 yılında yapılmış olan moleküler baskılama çalışmasında kreatinin molekölün tayin edilmesinde iki farklı monomer (β -siklodektrin ve 4-vinilpiridin) kullanmışlardır. Sonuçlar incelendiği zaman 4-vinilpiridin monomeri kullanarak sentezlenmiş olan polimerin kreatinine karşı daha seçici olduğu ve seçicilikte hedef molekölün şeklinin önemine değinilmiştir. 4-vinilpiridin monomeri kullanılarak, insan serumundan kreatinin tayini yapılmıştır.

2008 yılında etilen ve vinil alkol kullanılarak kreatinin baskılanmış membranlar sentezlenmiştir ve sentezlenen polimerin katı faz ekstraksiyonunda uygulanabilirliği ile seçicilik çalışmaları için uygunluğu araştırılmıştır [107].

2009 yılında yapılmış olan çalışmada organik ve inorganik monomerler (2-akrilamido-2-metilpropan-sülfonik asit ve tetraetoksisilan) kullanılmış ve kreatinin baskılanmış sol-jel polimerler sentezlenmiştir [108]. Sentezlenmiş olan hibrit karakterli MBP'lerin kreatinin ile kreatinine karşı yapı benzerliği gösteren moleküller üzerindeki seçiciliği ve adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2010 yılında yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde Syu, ve ark., tarafından [109] sentezlenmiş olan polimerlerin kreatinin varlığında floresan özelliklerin incelenmesi üzerine gerçekleştirilmiştir. Çalışmada fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit ile floresan özellik kazandırmak amacıyla da 4-metilamino-N-alilnaftalimit kullanılmıştır. Diğer çalışma ise; [110] silika partiküller üzerinde metakrilik asit fonksiyonel monomeri kullanılmış ve silika partiküllerin yüzeyinde kreatinine özgü boşlukların elde edilerek adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2011 yılında yapılmış olan bir diğer çalışmada [111] sol-jel polimer destek malzemesi tetraetoksilan monomeri kullanılarak kreatinin baskılanmış sol-jel polimerler sentezlenmiştir. Adsorpsiyon çalışmaları için iki farklı yürütücü faz (su ve metanol) kullanılmış ve hem sulu fazların adsorpsiyon üzerindeki etkileri hem de kreatininle benzer yapıda olan analog moleküllerin seçicilikleri araştırılmıştır.

2012 yılında yapılmış olan araştırmada Haginaka, ve ark., tarafından [112], kreatinin baskılanmış eş boyutlu (monodispers) polimer üretilmiştir. Fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit kullanılmış, sentezlenmiş olan polimerin seçiciliği hidrofilik afiniye kromatografisiyle değerlendirmiştir. 2012 yılında yapılmış olan bir diğer çalışmada [113], sol-jel yöntemi tercih edilmiştir. Kullanılan yöntemde matriks olarak silika tercih edilirken, MBP elde etmek amacıyla tetraetoksilan çapraz bağlayıcı olarak kullanılmış, Al^{+3} kreatininle etkileştirilmiş ve kreatinin baskılanmış polimerin adsorpsiyon çalışmaları değerlendirilmiştir.

2013 yılında yapılmış olan bir başka çalışmada [114], metakrilik asit fonksiyonel monomer, divinilbenzen de çapraz bağlayıcı olarak kullanılmış ve eş boyutlu (monodispers) polimerik mikroküreler sentezlenmiştir. Araştırmacılar kreatinin baskılanmış polimerleri kullanarak insan serum ve idrarında kreatinin analizi hidrofilik etkileşim kromatografisiyle araştırmışlardır.

2. MATERYAL ve METOT

Deneysel çalışmalar için sırasıyla aşağıdaki işlem basamakları izlenmiştir;

- ❖ Fonksiyonel monomerin N-metakroil –L-histidin metil ester (MAH) sentezi
- ❖ MAH-Cu(II) önkomplesinin hazırlanması
- ❖ Kreatinin baskılanmış p[HEMA-MAH-Cu(II)/Kreatinin] (MIP1, MIP2, MIP3, Krn-MIP) ve p[HEMA-MAH-Cu(II)] (NIP1) ile p[HEMA] (NIP2) kriyojellerin sentezi
- ❖ Sentezlenmiş olan MIP, NIP1 ve NIP2 kriyojellerin karakterizasyonu
- ❖ Kreatinin baskılanmış (Krn-MIP) kriyojellerin adsorpsiyon çalışmaları
- ❖ Kreatinin baskılanmış kriyojel kolonların seçicilik çalışmaları
- ❖ Kreatinin baskılanmış kriyojel kolonların desorpsiyonu ve tekrar kullanılabilirlik çalışmalarının incelenmesi
- ❖ Kreatinin baskılanmış kriyojelin yapay idrarda kullanılabilirliğinin araştırılması

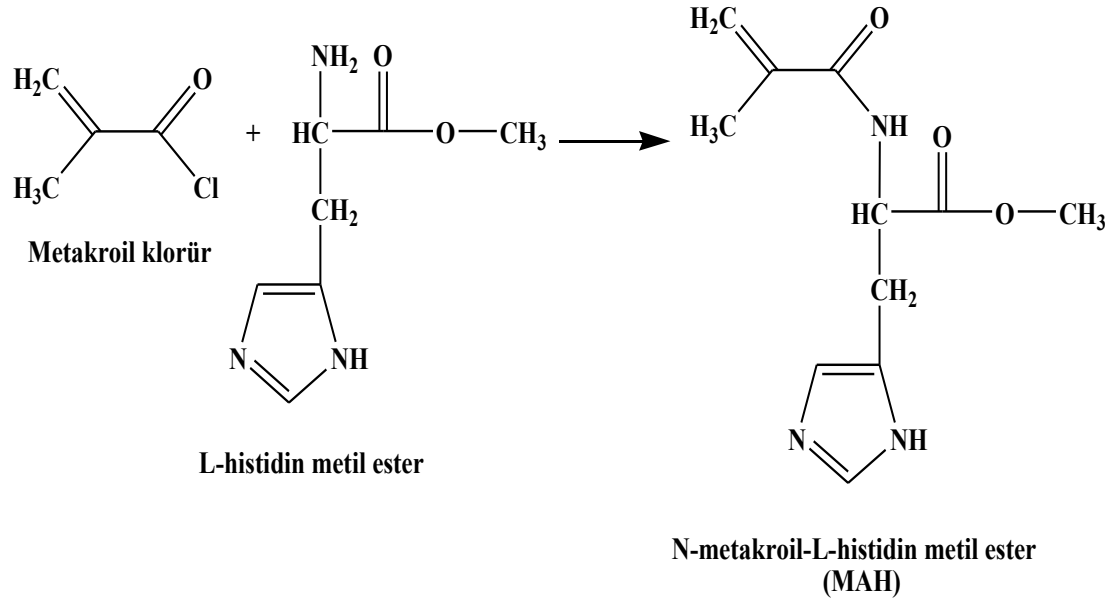
2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Deneysel çalışmalarda kolonların sentezlenmesinde kullanılan ana matriks monomeri hidroksietil metakrilat (HEMA), çapraz bağlayıcı olarak kullanılan N,N-metilen bisakrilamid (MBAAm), polimerizasyon aşamasında sırasıyla stabilizatör ve başlatıcı görevini üstlenen N,N,N',N'-tetraetilendiamin (TEMED) ile amonyum persülfat (APS) ve fonksiyonel monomerin sentez aşamasında kullanılmış olan L-histidin metilester ile metakroil klorür Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Baskılanmak istenen kreatinin molekülü, seçicilik çalışmalarında kullanılan ürik asit ile kreatin, üre, NH₄Cl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaCl, KCl, Merck'ten temin edilmiştir. Yapay idrar reçetesi oluşturmak için Na₂C₂O₄ Horasan Kimya (Türkiye), NaHCO₃, Na₂SO₄, Na₃C₆H₅O₇.2H₂O Sigma firmasından ve CaCl₂.H₂O, Montplet&Esteban, SA firmasından temin edilmiştir.

Organik tamponlar Sigma firmasından alınmıştır ve deneylerde kullanılan distile su (18.2 deiyonize ve iletkenlik sabitine) mp Minipure cihazından elde edilmiştir.

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

N-metakriloil-(L)-histidin metil Ester (MAH) monomerinin sentezi için öncelikle; 5.0 g L-histidin-metil ester ile 0.2 g hidrokinon, 100 mL diklorometan (CH_2Cl_2) içerisinde çözülmüş ve ardından çözelti 0°C 'a soğutulmuştur. Bunu takiben soğutulmuş çözeltiye 12.7 g trietilamin eklenmiş ve bu işlemi takiben 5.0 mL metakroil klorür çözeltiye yavaşça eklenerek, tepkime çözeltisi azot atmosferi altında oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı kullanılarak 2 saat boyunca karıştırılmıştır (Şekil 2.1). Süre sonunda tepkimeye girmemiş olan metakroil klorürün ekstrakte edilmesi için %10'luk NaOH çözeltisi kullanılmış ve sulu fazın döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmasını ardından kalan katı kısım (MAH) etanolde çözülmüştür [115].



Şekil 2.1. N-metakriloil-L-histidin metil ester monomerinin sentezi.

2.3. MAH-Cu(II) Önkomplesinin Hazırlanma Aşaması

MAH-Cu(II) kompleksinin hazırlanması için MAH monomeri (0.1 mmol, 22.3 mg) 10 mL etanol içerisinde çözülmüş ve ardından oda sıcaklığında bakır nitrat ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (23.3 mg, 0.1 mmol) ilave edilerek, manyetik karıştırıcıda 3 saat boyunca açık mavi renkli çözelti elde edilene dek karıştırılmıştır. Mavi renkli katı kısmın elde edilmesi için etanol, döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmıştır.

Hedef molekül olan kreatinin (30 mg) ve (MAH-Cu(II), yaklaşık 6 mg) 1 mL damıtık su içerisinde çözülmüş ve kreatinin-MAH-Cu(II) ön-organizasyonu yapmak üzere 3 saat boyunca manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırılmıştır.

2.4. Kreatinin Baskılanmış P[HEMA-MAH-Cu(II)] Süpermakrogözenekli Kriyojellerin Hazırlanması

Kreatinin baskılanmış P[(HEMA-MAH-Cu(II))] kriyojellerin hazırlanması için yoğun polimerizasyonu tercih edilmiş ve polimerizasyon işlemi için iki ayrı faz kullanılmıştır. Birinci fazda çapraz bağlayıcı olan 0.283 g N,N-metilen bisakrilamid (MBAAM), 10 mL damıtık su içerisinde çözülmüştür. İkinci faz 1.3 mL HEMA, 1 mL MAH-Cu(II)-kreatinin kompleksi ile son hacim 5 mL olacak şekilde saf su eklenmesiyle hazırlanmıştır. Homojen çözelti elde etmek üzere ikinci faz birinci faza eklenmiş ve serbest radikal polimerleştirmesi için başlatıcı ile katalizör olarak amonyum persülfat (APS) ile N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED) kullanılmıştır. Homojen çözeltiye 20 mg APS ile 25 µL TEMED eklenmiş ve buz kalıbı içerisinde bulunan plastik şırıngalara eşit hacimlerde (5 mL, çap: 0.8 cm) dağıtılmış ve 24 saat boyunca -12°C 'de polimerleşmeye bırakılmıştır. 24 saatlik süre sonunda kriyojeller oda sıcaklığında çözülmeleri için bekletilmiş, bunu takiben polimerizasyona girmemiş olan monomer ile diğer safsızlıklar damıtık suyla yıkanarak (200 mL) yapıdan uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi sonunda kreatinin baskılanmış p[(HEMA-MAH-Cu(II)/Kreatinin)] makrogözenekli kriyojeller (Krn-MIP) sentezlenmiştir. Ayrıca farklı MAH-Cu(II) kompleksi (75µL-200 µL) ve hedef

molekül oranlarında hazırlanmış olan (MIP1, MIP2, MIP3) kriyojeller de aynı sentez basamakları kullanılarak sentezlenmiştir.

Kreatinin baskılanmamış p[HEMA-MAH-Cu(II)] (NIP1) ve p(HEMA) (NIP2) kriyojeller için hedef molekül olmaksızın aynı yöntemden yararlanılarak makrogözenekli kriyojeller sentezlenmiştir. MIP ile NIP kriyojeller kullanılmadıkları süre zarfında mikrobiyal kontaminasyonu önlemek amacıyla 0.02% sodyum azür içeren çözeltide +4°C'de saklanmışlardır.

2.5. Kalıp Molekülün (Kreatinin/Krn) Yapıdan Uzaklaştırılması

Kalıp molekül olan Krn'nin kriyojellerden uzaklaştırılması için 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılmış ve yapıdan uzaklaştırma işlemi U.V spektrofotometresinde (235 nm) kreatinin molekülü tayin edilmeyene kadar devam ettirilmiştir (48 saat). Yapıdan uzaklaştırma işlemi ardından Krn-MIP kolon 50 mM NaOH çözeltisi ve bunu takiben damıtık su kullanarak temizlenmiştir.

2.6. Kreatinin Baskılanmış (Krn-MIP) ve Baskılanmamış (NIP) Kriyojellerin Karakterizasyonu

Sentezlenmiş olan Krn-MIP ve NIP kriyojellerin karakterizasyon çalışmalarında sırasıyla; FTIR analizi, yüzey alanı ölçümleri (BET), şişme testi ile yüzey morfoloji ve yığın yapıları incelenmiştir.

2.6.1. FTIR Analizi

Sentezlenen Krn-MIP, NIP1 ve NIP2 kriyojellerin FTIR analizleri Spectrum One series (Perkin Elmer, ABD) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. FTIR analizinden önce kriyojeller vakum etüvünde 24 saat kurutulmuştur. FTIR spektrumlarının tayin edilmesi için 2 mg kriyojel örnekleri ile 98 mg KBr ile karıştırılmış bunu takiben

havanda dövülmüş ve hidrolik preste (10-11 ton) bekletilerek ince tablet haline getirilmiştir. Hazırlanmış olan tabletlerin 4000-450 cm⁻¹ dalga sayısında FTIR spektrumları analiz edilmiştir.

2.6.2. Yüzey Alanı Ölçümleri

Sentezlenen MIP ve NIP kriyojellerin spesifik yüzey alanları BET (Branuer- Emmet-Teller) (Quantochrome, Autosorb-6B, ABD) cihazıyla analiz edilmiştir. Öncelikle kriyojeller tartılmış ve örnek haznesine yerleştirilmiştir. Ardından örneklerin gazı azot atmosferinde 80°C'de 1 saat boyunca alınmıştır. Gaz adsorpsiyonu -210°C'de ve desorpsiyonu oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyonda elde edilen sonuçlar kullanılarak spesifik yüzey alanları hesaplanmıştır.

2.6.3. Şişme Testi

MIP ve NIP kriyojellerin şişme oranlarının belirlenmesi için sırasıyla aşağıdaki işlem basamakları uygulanmıştır. Öncelikle kriyojeller liyofilizatörde kurutulmuş ve kuru ağırlıkları (W_{kuru}) ± 0.0001 duyarlılıkta hassas terazi kullanılarak kaydedilmiştir. Tartımı alınan kriyojeller 50 mL saf su içeren behere konularak farklı zaman aralıklarında (1-120 dakika) bekletilmiş ve yüzeylerinde biriken su, kurutma kağıdıyla uzaklaştırıldıktan sonra tekrar (W_{islak}) tartım alınmıştır. Son aşamada aşağıda verilmiş olan eşitlik kullanılarak MIP ve NIP kriyojellerin şişme oranları hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Şişme miktarı} = \frac{W_{islak} - W_{kuru}}{W_{kuru}} \times 100 \quad (2.1)$$

Eşitlikte W_{kuru} ; kriyojellerin kurutma işlemi sonundaki ağırlığını (g), W_{islak} ; belirli zaman aralıklarında suda bekletilmiş olan kriyojellerin ağırlığını (g) temsil etmektedir.

Kriyojellerin sahip olduğu makrogözenek miktarının belirlenmesi için kullanılan işlem basamakları sırasıyla şöyledir. Öncelikle şişerek dengeye gelmiş olan kriyojellerin ağırlıkları belirlenmiştir. Bunu takiben denge noktasına ulaşmış olan kriyojeller enjektör içerisine alınmış, enjektör yardımıyla sıkıştırılarak makrogözenekleri tarafından tutulmuş olan suyun uzaklaştırılmış ve tekrar tartım alınmıştır. Kriyojellerin makrogözenek miktarları aşağıda verilmiş olan eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = [(W_{\text{denge}} - W_{\text{son}}) / W_{\text{denge}}] \times 100 \quad (2.2)$$

Eşitlikte W_{denge} ; kriyojellerin suda şişmesi sonucu denge noktasına ulaşmış kriyojellerin ağırlıklarını (g), W_{son} ; şırınga yardımıyla makrogözenekler tarafından tutulmuş olan suyun uzaklaştırılmasından sonra elde edilen kriyojellerin ağırlıklarını (g) ifade etmektedir.

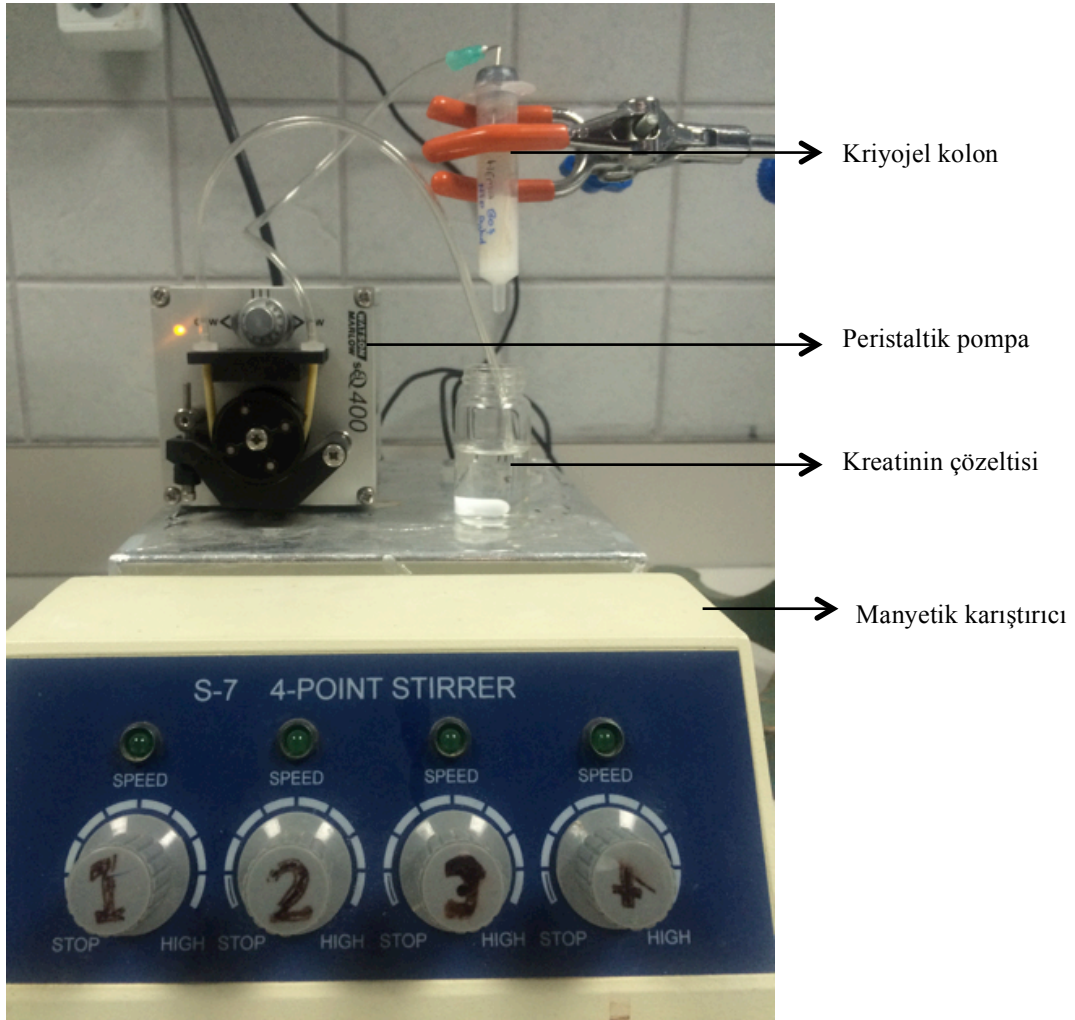
2.6.4. Yüzey Morfolojisi

Sentezlenmiş olan K_{rn}-MIP ve NIP1, NIP2 kriyojellerin yüzey analizlerinin ve yığın yapılarının değerlendirilmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Jeol 5600, Tokyo, Japonya) kullanılmıştır. Kurutulmuş olan kriyojellerden ince kesitler alınarak stamlara yerleştirilmiş ve Polaron SC500, Sputter Coater cihazı kullanılarak kriyojellerin yüzeyleri altın kaplanmıştır. Kaplama işlemi sonunda, örneklerin çeşitli büyütme oranlarında fotoğrafları çekilmiştir.

2.7. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

2.7.1. Kreatinin Adsorpsiyonu

Kreatinin molekülünün sulu çözeltilerden adsorpsiyon çalışmaları için sürekli sistem kullanılmış ve K_{rn}-MIP kriyojeller, manyetik karıştırıcıda devamlı karışan 10 mL kreatinin çözeltisiyle, 120 dakika boyunca etkileşime sokulmuştur . Adsorpsiyon kapasitesinde pH'nın (4.0-8.0), farklı kompleks oranlarının, akış hızının (0.5-3.0 mL/dak), derişimin (0.5-2.0 mg/mL), sıcaklığın (4°C-45°C), iyonik şiddetin (0.01-0.5 M NaCl) etkileri incelenmiştir.



Şekil 2.2. Kreatinin adsorpsiyonunda kullanılan sürekli sistem düzeneği.

Kreatinin molekülünün çözeltilerdeki derişimi 235 nm'de spektrofotometrik (Shimadzu UV-1601, Japonya) olarak tayin edilmiştir. Deneysel verileri sonucunda gram başına adsorplanan kreatinin miktarları aşağıda verilmiş olan eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$M_g = C_o \cdot q \cdot t \quad (2.3)$$

$$M_c = C \cdot V \quad (2.4)$$

Eşitliklerde; M_g : kolona girmiş olan kreatinin miktarını (mg), C_o : kreatinin miktarının başlangıç derişimini (mg/mL), q : akış hızını (mL/dak), t : zaman (dk), M_c : kolondan çıkan kreatinin miktarını (mg), C : adsorpsiyon sonundaki kreatinin derişimini (mg/mL), V : kolondan çıkan toplam çözelti hacmini (mL) ifade etmektedir.

Polimerler tarafından adsorbe edilen kreatinin miktarı ise aşağıdaki eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır;

$$Q = [M_g - M_c] / m \quad (2.5)$$

m ; değeri kolon olarak kullanılan kriyojelin ağırlığını (g) ifade etmektedir.

2.7.2. Seçicilik Çalışmaları

Kreatinin baskılanmış Krn-MIP, kriyojellerin seçiciliğın belirlenmesi için ürik asit ve kreatin yarışmacı moleküller olarak tercih edilmiştir. Yarışmacı moleküller ayrı ayrı 0.3 mg/mL derişimde, önceden belirlenmiş olan optimum koşullar dikkate alınarak 120 dakika boyunca Krn-MIP ve NIP kriyojel kolonlardan geçirilmişlerdir. Adsorpsiyon süresi sonunda ürik asit ve kreatin moleküllerinin miktarları (Shimadzu

UV-1601, Japonya) sırasıyla 290 ile 220 nm'de UV spektrofotometresi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Yarışmacı moleküllerin kreatinin molekülüne göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıda verilmiş olan eşitlikten yararlanılarak değerlendirilmiştir;

$$K_d = [(C_i - C_f) / C_f] \times V / M \quad (2.6)$$

Eşitliğe göre K_d dağılma katsayısı (mL/g), C_i ve C_f değerleri sırasıyla çözeltilerin başlangıç ile sonuç derişimlerini (mg/mL), V adsorpsiyon işleminde kullanılan çözelti hacmini (mL), M ise kriyojelin kuru ağırlığını (g) temsil etmektedir.

Yarışmaları ajanların olduğu ortamda, hedef molekülün bağlanması için seçicilik katsayısının (K) hesaplanması için aşağıdaki denge bağlantısı kullanılmıştır.

$$K = K_{\text{baskılanan molekül}} / K_{\text{yarışmacı molekül}} \quad (2.7)$$

Bağıl seçicilik katsayısının (k') yani hedef molekülün baskılanmış olduğu polimerin dağılma katsayısı ile yarışmacı moleküllerin dağılma katsayılarının oranlanmasıyla elde edilen k değerini kullanarak, baskılama seçiciliğini değerlendirmek için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır;

$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad (2.8)$$

2.7.3. Desorpsiyon

Kreatinin molekülünün desorpsiyon çalışmaları için 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Kreatinin adsorplanmış olan K_{rn}-MIP kriyojellerden kreatinin molekülünün uzaklaştırılması için, 1 mL/dak akış hızında, oda sıcaklığında 1 saat süre ile 10 mL desorpsiyon çözeltisi kullanılmış ve desorpsiyon derişiminin belirlenmesi UV spektrofotometresinde 235 nm'de (Shimadzu UV-1601, Japonya)

yapılmıştır. Desorpsiyon oranının belirlenmesi için kriyojel tarafından adsorbe ve desorbe edilen kreatinin miktarları kullanılmış ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamında bulunan kreatinin miktarı}}{\text{Kriyojelde adsorplanan kreatinin miktar}} \times 100 \quad (2.9)$$

2.8. Yapay İdrardan Kreatinin Molekülün Tayini

Yapay idrardan kreatinin molekülünün adsorpsiyon çalışmaları için Chutipongtanate, ve Thongboonkerd, tarafından [116] önerilmiş olan yapay idrar reçetesi kullanılmıştır. Normal miktarda kreatinin içeren yapay idrar reçetesi için 200 mL damıtık su içerisinde sırasıyla 2.427 g üre, 0.034 g ürik asit, 0.090 g kreatinin, 0.297 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.634 g NaCl , 0.450 g KCl , 0.161 g NH_4Cl , 0.089 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.100 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.034 g NaHCO_3 , 0.003 g $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, 0.258 g Na_2SO_4 , 0.100 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ile 0.011 g Na_2HPO_4 çözülmüştür. Aynı reçeteye 0.360 g kreatinin eklenmesiyle yüksek miktarda kreatinin içeren diğer bir çözelti de hazırlanmıştır. Adsorpsiyon çalışmasında kullanılan Krn-MIP kriyojel kolon $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 ve NaHCO_3 çözeltileriyle dengeye getirilmiş ve oda sıcaklığında, 1 mL/dak akış hızında, 2 saat süreyle adsorpsiyon işleminde kullanılmıştır. Başlangıç ve sonuç yapay idrar çözeltileri 0.45 μM gözenek boyutlu naylon filtre kullanılarak süzülmüş, Ankara Kuru Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında, “İntegra 400 Roche” cihazı kullanılarak analiz edilmiştir.

3. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMA

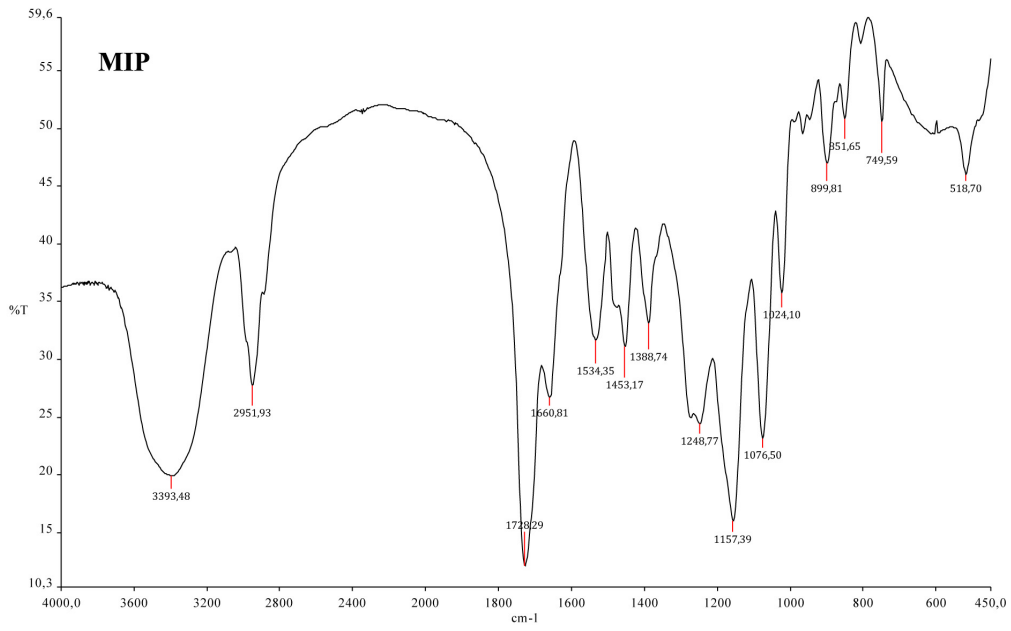
Bu bölümde sentezlenmiş olan MAH monomerinin, Krn-MIP, NIP1 ve NIP2 kriyojellerin karakterizasyonları ile Krn-MIP kriyojelin sulu çözeltiden kreatinin adsorpsiyon çalışmalarına yer verilmiştir. Son aşamada sentezlenmiş olan Krn-MIP kriyojellerin seçicilik çalışmaları incelenmiş ve yapay idrar çözeltisinde kreatinin molekülünün seçiciliği değerlendirilmiştir.

3.1. Kreatin Baskılanmış (Krn-MIP) ve Baskılanmamış (NIP) Kriyojellerin Karakterizasyonu

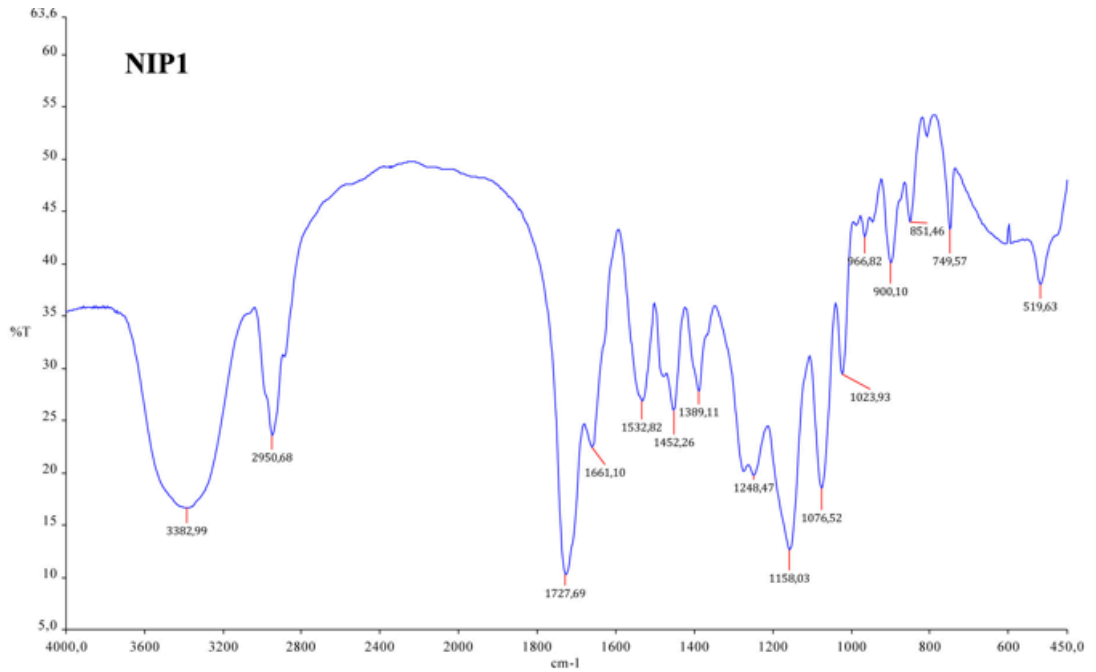
Kriyopolimerizasyon yöntemi kullanılarak sentezlenmiş moleküler baskılanmış Krn-MIP ve moleküler baskılanmamış olan p[(HEMA-MAH-Cu(II)), p(HEMA) kriyojeller FTIR, yüzey alanı ölçümleri, şişme testi ve yüzey analizleri yapılarak karakterize edilmiştir.

3.1.1. FTIR Analizi

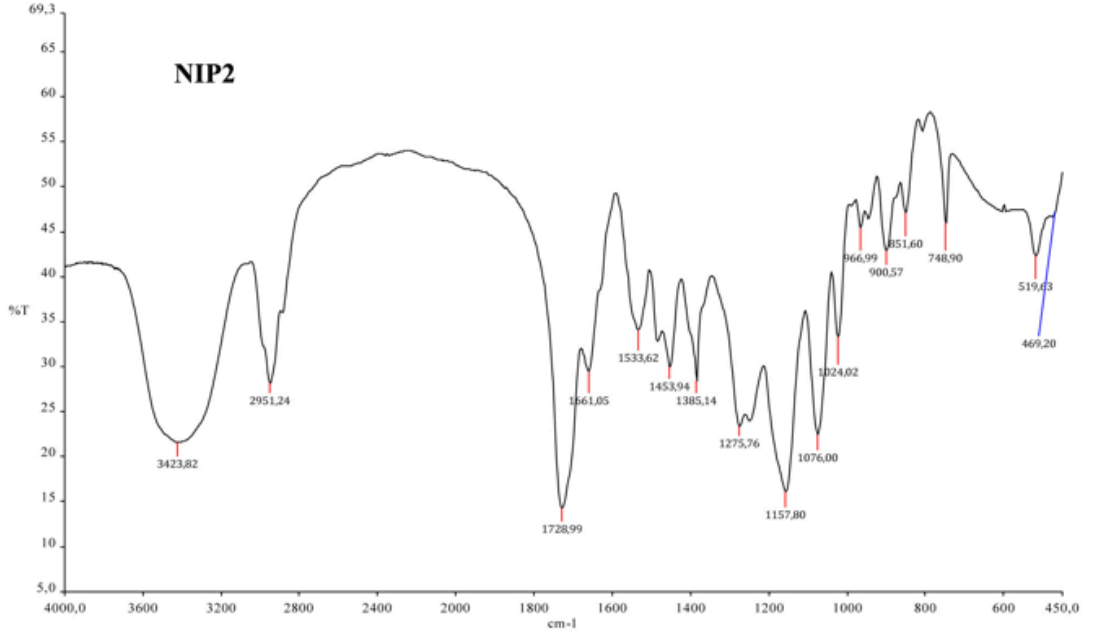
Kreatinin baskılanmış p[(HEMA-MAH-Cu(II)] ve baskılanmamış NIP1 ve NIP2 kriyojellerin, FTIR analizinden önce, kriyojeller (Krn-MIP, NIP1 ve NIP2) kurutulmuş, KBr ile pellet haline getirilmiş ve 450 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} dalga sayısında FTIR spektrumları alınmıştır. Krn-MIP kriyojelin sentezinde MAH-Cu(II) kompleksi ve kreatinin, NIP1 kriyojelin sentezinde yalnız MAH-Cu(II) kompleksi ve NIP2 kriyojel sentezinde ise yalnız 2-hidroksietil metakrilat monomeri kullanılmıştır. FTIR analizi sonucunda sentezlenmiş olan kriyojellerin fonksiyonel grupları aynı spektrum aralığında bulunmuştur.



Şekil 3.1. p[HEMA-MAH-Cu(II)/Kreatinin] (Krn-MIP) kriyojele ait FTIR spektrumu.



Şekil 3.2. p[HEMA-MAH-Cu(II)] (NIP1) kriyojele ait FTIR spektrumu.



Şekil 3.3. p(HEMA) (NIP2) kriyojele ait FTIR spektrumu.

Sentezlenmiş olan kriyojellerin FTIR spektrum sonuçlarına göre –OH band aralıkları 3400 cm^{-1} 'de (geniş band), alifatik –CH gerilme band aralıkları 2951 cm^{-1} civarlarında, karbonil bandları 1728 cm^{-1} ve amid bandları 1661 cm^{-1} ile 1533 cm^{-1} aralıklarında bulunmuştur. Elde edilmiş olan FTIR spektrum değerlerine göre, hem ana matris monomerine (HEMA) hem de fonksiyonel monomere (MAH) ait karakteristik gruplar saptanmıştır. Elde edilmiş olan FTIR analiz sonuçlarına göre p[HEMA-MAH-Cu(II)/Kreatinin] kriyojellerin başarılı şekilde sentezlendiği görülmüştür.

3.1.2. Yüzey Alanı Ölçümü

Kreatinin baskılanmış p[HEMA-MAH-Cu(II)] kriyojeller için bulunmuş olan spesifik yüzey alanları MIP1 için $24.36\text{ m}^2/\text{g}$, MIP2 için $27.81\text{ m}^2/\text{g}$, MIP3 için $30.02\text{ m}^2/\text{g}$ ve Krn-MIP için de $32.65\text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Kreatinin baskılanmamış olan NIP1 kriyojelin spesifik yüzey alanı $22.96\text{ m}^2/\text{g}$ ve NIP2 kriyojel içinde $21.59\text{ m}^2/\text{g}$ olarak belirlenmiştir. Baskılama işlemi ve önkompleks oranlarının artması

spesifik yüzey alanlarının artmasına neden olmuştur. Karşılaşılan bu durumun nedeni polimerizasyon aşamasındaki kreatinin molekülünün ortamda bulunması ve baskılanmış olan kriyojellerde kreatinin molekülüne özgül oyuklarının gözenek alanını artırmasıdır.

3.1.3. Şişme Testi

Kriyojeller; çapraz bağlı, suda çözünmeyen hidrofilik yapılı jel matrislerdir. Destek malzemesinin hidrofilik yapısına, çapraz bağ miktarına bağlı olarak su alıp şişme özelliği gösterirler. Doktora tez kapsamında hazırlanmış olan kreatinin baskılanmış olan p[(HEMA-MAH-Cu(II))] kriyojellerin (MIP1, MIP2, MIP3 ve Krn-MIP) ve kreatinin baskılanmamış olan p[(HEMA-MAH-Cu(II))] (NIP1) ile p(HEMA) (NIP2) kriyojellerin denge şişme ve makrogözenek oranları Çizelge 3.1’de verilmiştir. p(HEMA) kriyojellerin denge şişme oranlarıyla kreatinin baskılanmış p[(HEMA)-MAH-Cu(II)] ve kreatinin baskılanmamış p[(HEMA-MAH-Cu(II))] NIP2 kriyojellerin denge şişme oranları karşılaştırıldığı zaman, yapıya girmiş olan MAH monomerinin etkisiyle şişme oranlarının arttığı görülmüştür. Şişme oranlarında gözlemlenen artışın nedenleri iki şekilde açıklanabilir. Öncelikle yapıya girmiş olan MAH monomerinin de etkisiyle, destek malzemesinde bulunan hidrofilik grupların sayıca artışını ve su molekülleriyle daha fazla etkileşime girmesiyle açıklanabilir. İkinci olarak fonksiyonel monomerin (MAH) polimerin yapısına katılması sonucu, polimerin molekül ağırlığını düşürmesi ve su moleküllerinin de polimer zincirlerin içlerine doğru hareketini artırmasıyla ifade edilebilir.

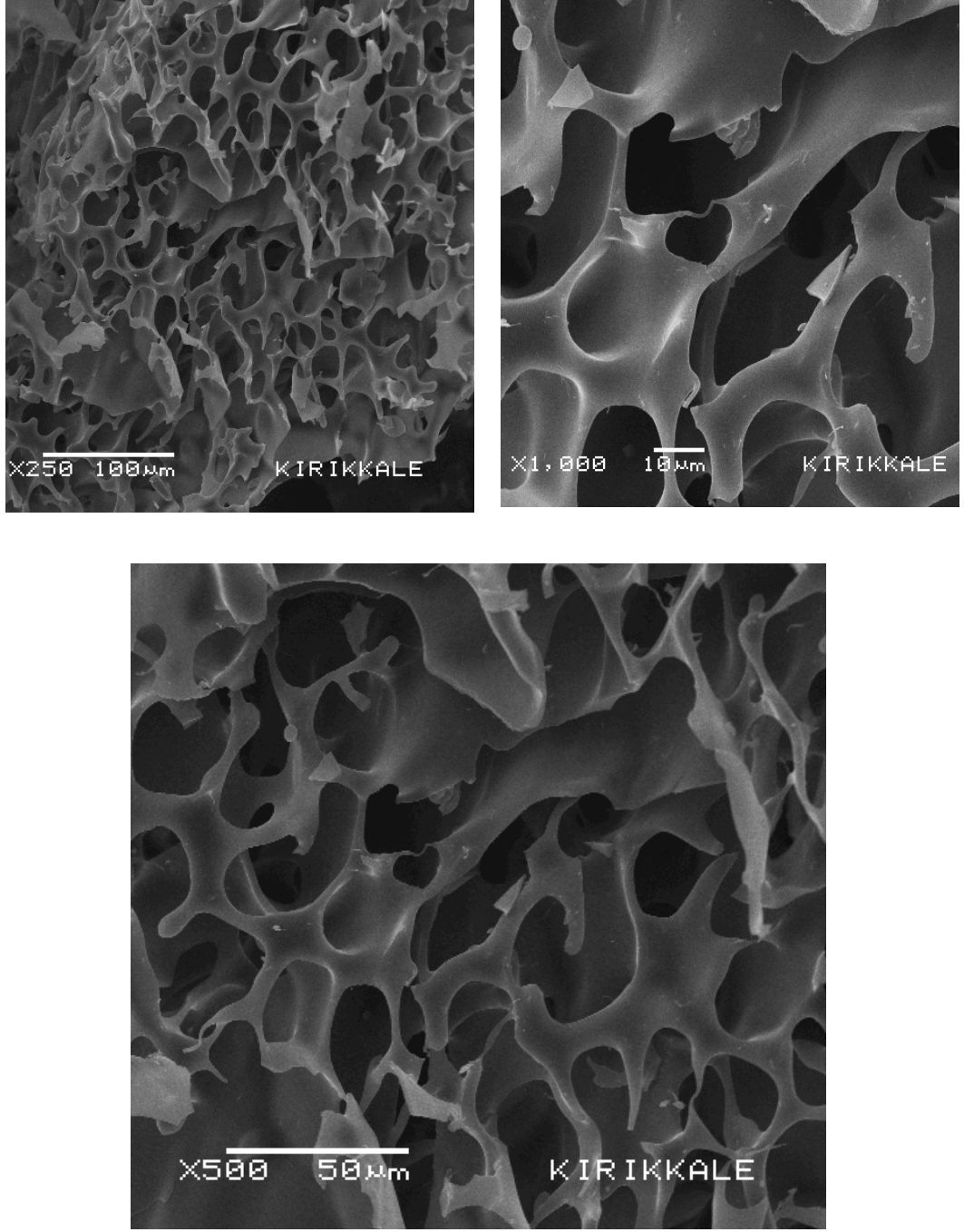
Molekül baskılanmış ve baskılanmamış kriyojellerin şişme oranları karşılaştırıldığı zaman; baskılama yapılmış olan kriyojellerin daha fazla şişme oranlarına sahip oldukları saptanmıştır (Çizelge 3.1). Elde edilen sonuçlara göre; artmış olan baskılama oranlarıyla birlikte, spesifik yüzey alanlarında da artışlar saptanmıştır.

Çizelge 3.1 NIP1, NIP2 ve MIP polimerler için denge şişme ve makrogözenek oranları.

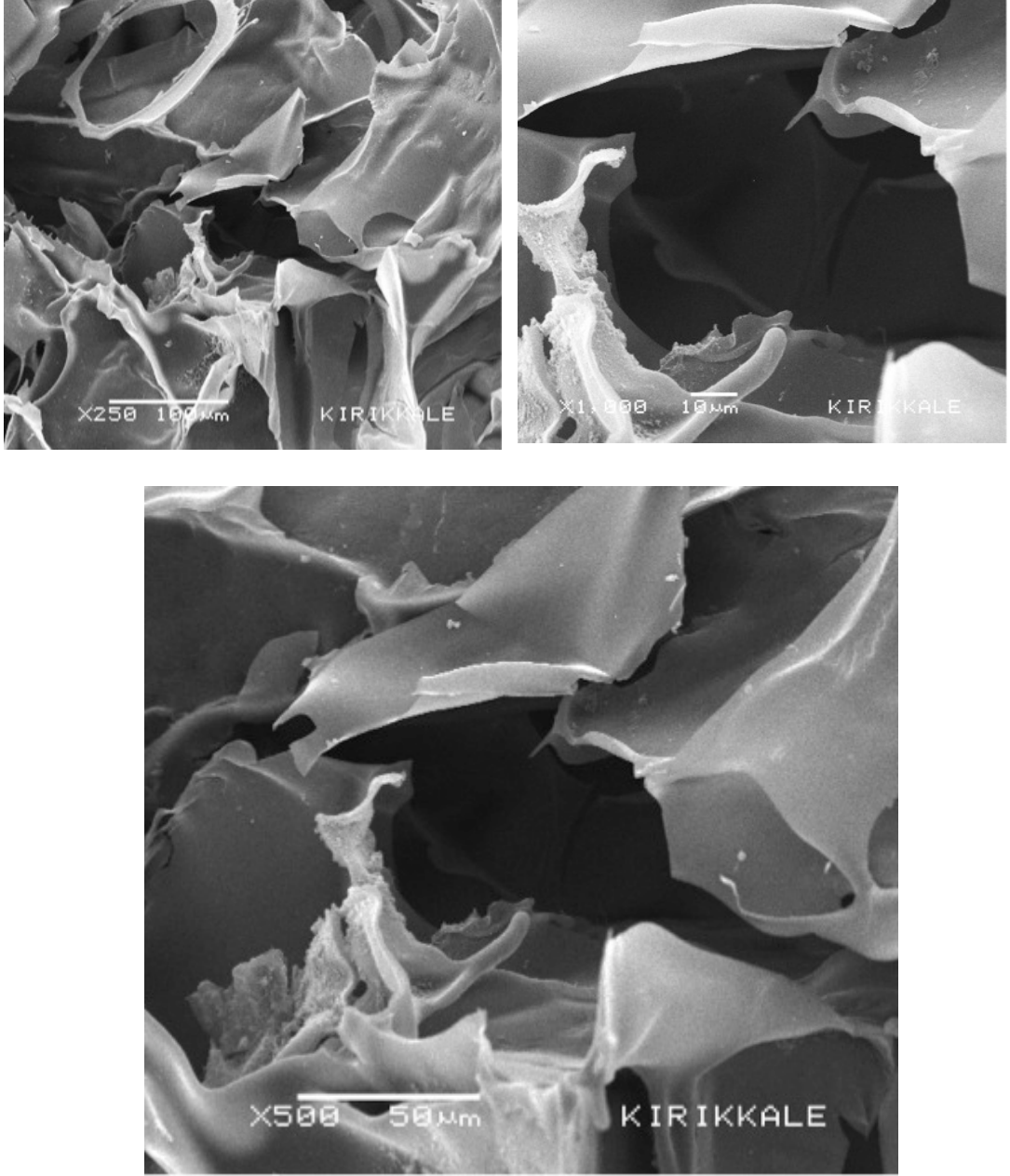
Polimer kodu	Şişme oranı (%)	Makrogözenek oranı (%)
NIP1	79.4	67.3
NIP2	75.7	69.5
MIP1	81.3	72.2
MIP2	84.6	74.0
MIP3	87.0	76.1
Krn-MIP (deney polimeri)	89.5	78.4

3.1.4. Yüzey Morfolojisi

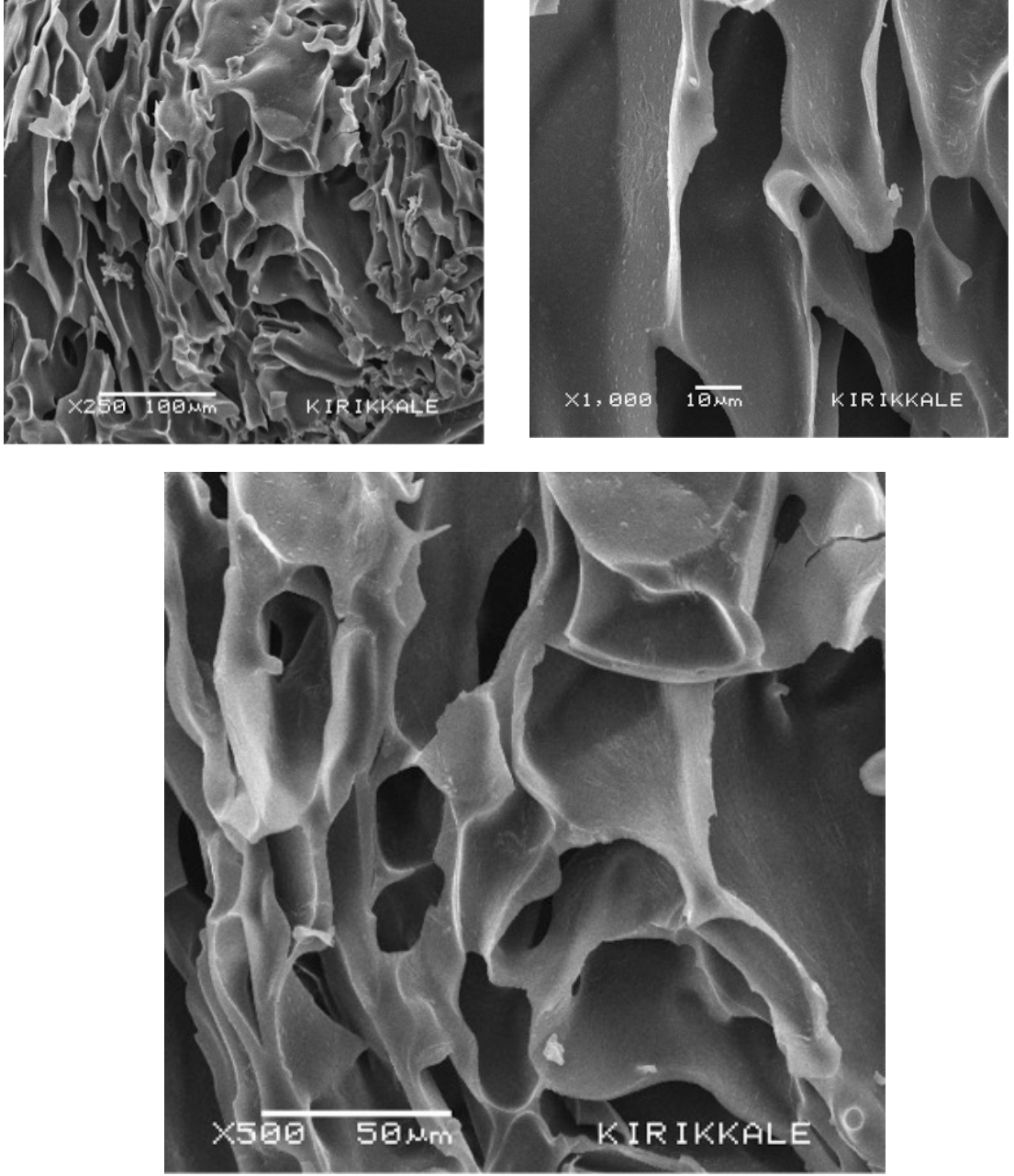
Sentezlenmiş olan Krn-MIP ve NIP kriyojellerin yüzey morfolojileri ve iç yapılarının incelenmesi taramalı elektron mikroskop (SEM) ile yapılmıştır (Şekil 3.4, 3.5, 3.6). Fotoğraflarda görüldüğü üzere; moleküler baskılanmış ve baskılanmamış olan kriyojellerin birbirlerine bağlantılı süpermakrogözenekli akış kanallarına sahip oldukları saptanmıştır. Ayrıca bu akış kanalları baskılanmış olan kreatinin molekülünün kriyojel içerisine difüzyonunu da kolaylık sağlamaktadır.



Şekil 3.4. NIP1 p[HEMA-MAH-Cu(II)] kriyojelin değişik büyütme aralıklarında yığın ve süpermakrogözenek yapıları.



Şekil 3.5. NIP2 p(HEMA) kriyojelin değişik büyütme aralıklarında yığın ve süpermakrogözenek yapıları.



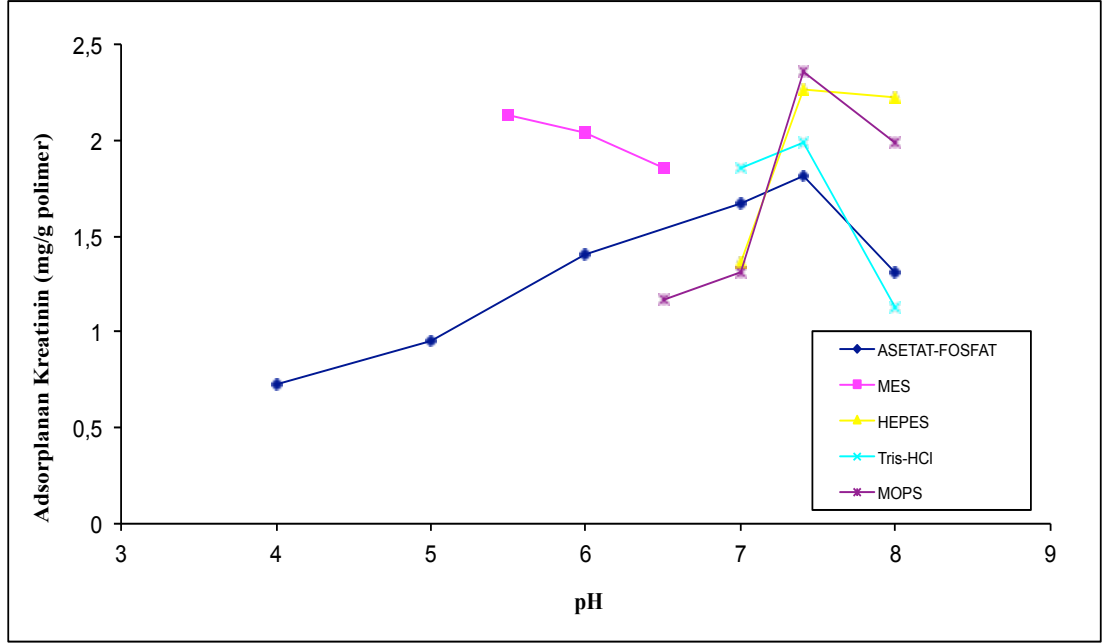
Şekil 3.6. K_{rn}-MIP p[HEMA-MAH-Cu(II)/Kreatinin] kriyojelin değişik büyütme aralıklarında yığın ve süpermakrogözenek yapıları.

3.2. Sulu Çözeltiden Kreatinin Adsorpsiyonu

Sulu çözeltiden kreatinin molekülünün adsorpsiyon çalışmaları için sırasıyla ortam pH'sının, akış hızının, kreatinin molekülünün derişiminin, sıcaklığın, tuz derişiminin ve yarışmacı moleküllerin adsorpsiyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen veriler Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modellerine uygulanmış ve uygun adsorpsiyon izoterm modeli belirlenmiştir. Kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerindeki mekanizmaların belirlenmesi için yalancı birinci ve yalancı ikinci derece kinetik denklemleri uygulanmış, adsorpsiyona uygun olan kinetik model saptanmıştır. Kreatinin molekülüne özgü olan kriyojelin seçiciliğın belirlenmesi için yarışmacı moleküller kullanılmış, dağılma ve seçicilik katsayıları hesaplanmıştır. Sentezlenmiş olan kriyojelin tekrar kullanılabilirliğın saptanması için aynı kriyojel üst üste 5 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsüne tabi tutulmuştur. Son aşamada aynı kriyojel kullanılmış ve hazırlanmış olan yapay idrar çözeltisinde kreatinin molekülüne karşı seçiciliğı araştırılmıştır.

3.2.1. Adsorpsiyon Üzerinde pH Etkisi

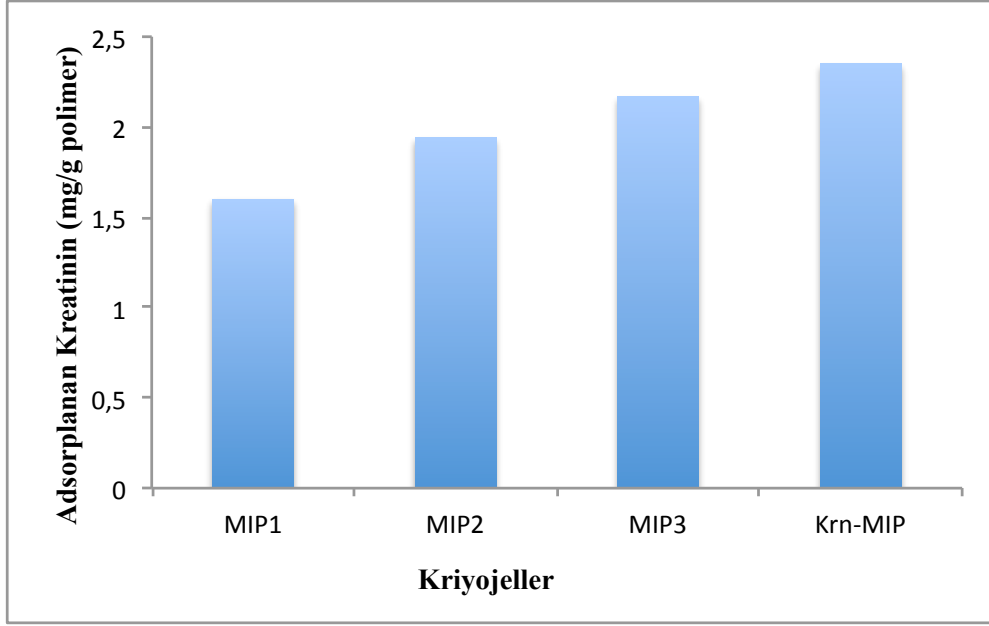
Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojelin adsorpsiyonu üzerinde pH'nın etkinliğın incelenmesi amacıyla hem organik hem de inorganik tamponlar kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil (3.7) de gösterilmiştir. Krn-MIP kriyojelin en yüksek adsorpsiyon değerleri organik tamponlarda MOPS (pH 7.4) 2.35 mg/g, HEPES 2.26 mg/g, MES 2.03 mg/g, Tris-HCl 1.99 mg/g olarak ve asetat-fosfat tamponunda 1.81 mg/g olarak bulunmuştur. Ayrıca belirlenmiş olan pH 7.4 değeri MAH monomeri ile yapılmış olan literatür çalışmalarıyla da örtüşmektedir [72]. Kriyojelin adsorpsiyon çalışmaları için ortamın pH'sı 7.4 olarak seçilmiştir.



Şekil 3.7. Kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerinde pH'nın etkisi; Kreatinin derişimi 0.3 mg/mL, akış hızı 1 mL/dak, adsorpsiyon süresi 120 dakika ve sıcaklık 25°C.

3.2.2. MAH-Cu(II) Oranı Kreatinin Adsorpsiyonu Arasındaki İlişki

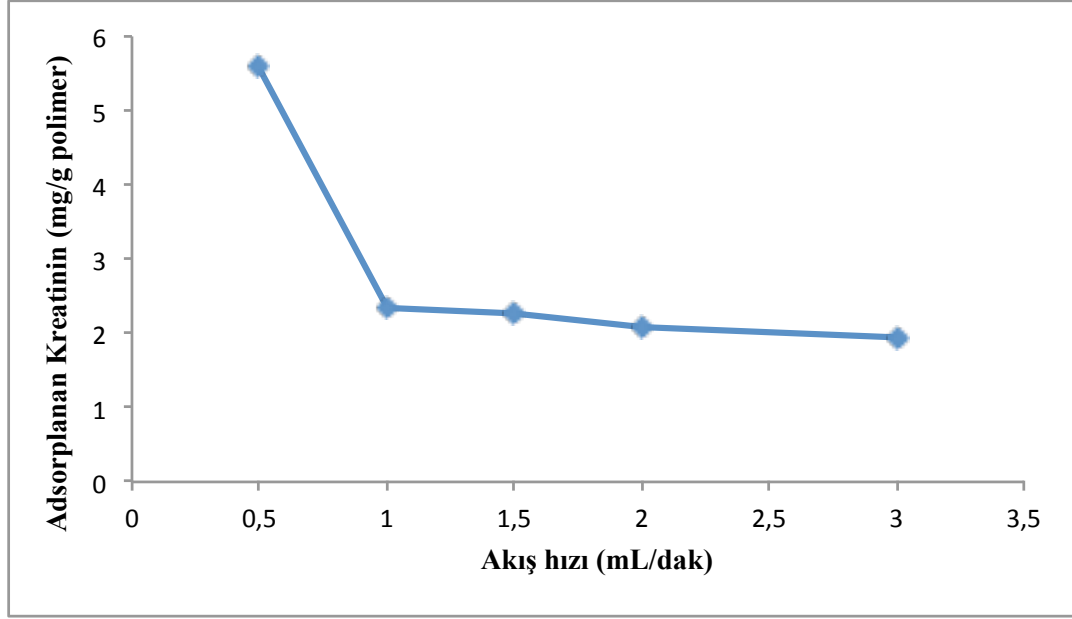
Kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerindeki MAH-Cu(II) ön-kompleks miktarının belirlenmesi amacıyla değişik oranlarda MAH-Cu(II) ön-kompleksi kullanılmış ve kreatinin baskılanmış dört farklı p[HEMA-MAH-Cu(II)] kriyojel sentezlenmiştir. Sentezlenmiş olan kriyojellere MOPS (pH 7.4) ortamında adsorpsiyon işlemi uygulanmış ve maksimum kreatinin adsorpsiyonunun saptandığı kriyojel (Krn-MIP) kullanılarak adsorpsiyon çalışmalarına devam edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Artmış olan MAH-Cu(II) önkomples oranlarının kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerindeki etkisi; Kreatinin derişimi 0.3 mg/mL, MOPS (pH 7.4), akış hızı 1 mL/dak, adsorpsiyon süresi 120 dakika ve sıcaklık 25°C.

3.2.3. Adsorpsiyon Üzerinde Akış Hızı Etkisi

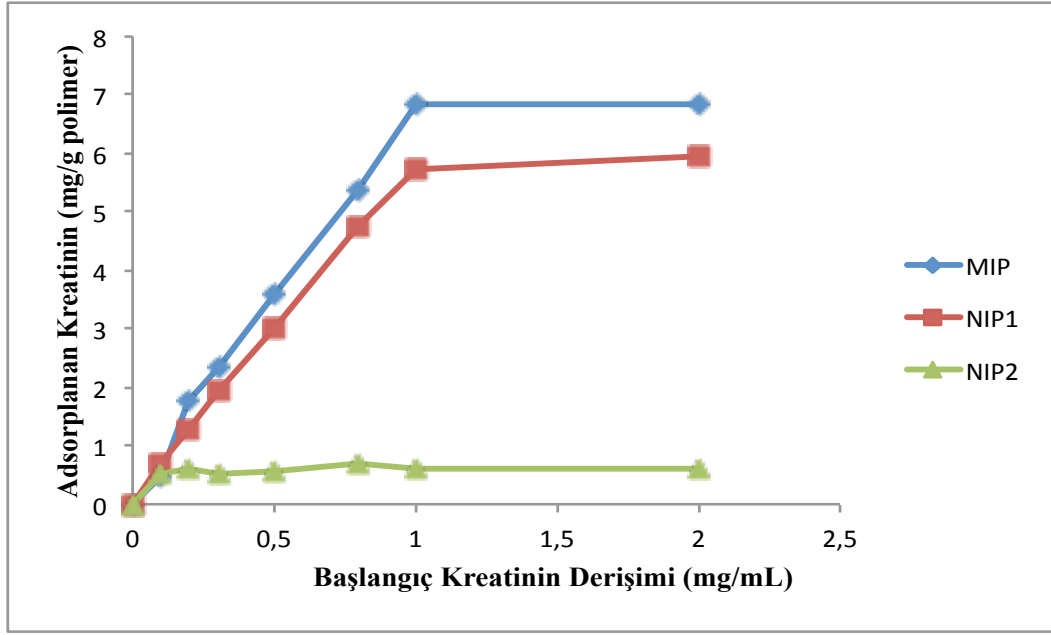
Akış hızının kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerindeki etkisinin incelendiği grup deneylerde akış hızı 0.5-3 mL/dak arasında değiştirilmiş ve diğer parametreler sabit tutulmuştur (Şekil 3.9). Akış hızının artmasıyla birlikte adsorplanan kreatinin miktarında önemli azalmalar saptanmıştır. En düşük akış hızında (0.5 mL/dak) Krn-MIP kriyojel tarafından adsorbe edilen kreatinin miktarı 5.61 mg/g iken, 3 mL/dak akış hızında 1.94 mg/g olarak gözlenmiştir. Gözlenmiş olan bu durum şu şekillerde açıklanabilir; öncelikle akış hızının artmasıyla birlikte, kreatinin molekülünün kriyojel kolonlarda alıkonma zamanı azalır. İkinci olarak da artmış olan akış hızının; kriyojel kolonlar tarafından alıkonmuş olan kreatinin moleküllerini tutunma ortamlarından uzaklaştırmasıyla açıklanabilir.



Şekil 3.9. Kreatinin molekülü üzerinde akış hızının etkisi; Kreatinin derişimi 0.3 mg/mL, MOPS (pH 7.4), adsorpsiyon süresi 120 dakika ve sıcaklık 25°C.

3.2.4. Adsorpsiyon Üzerinde Derişim Etkisi

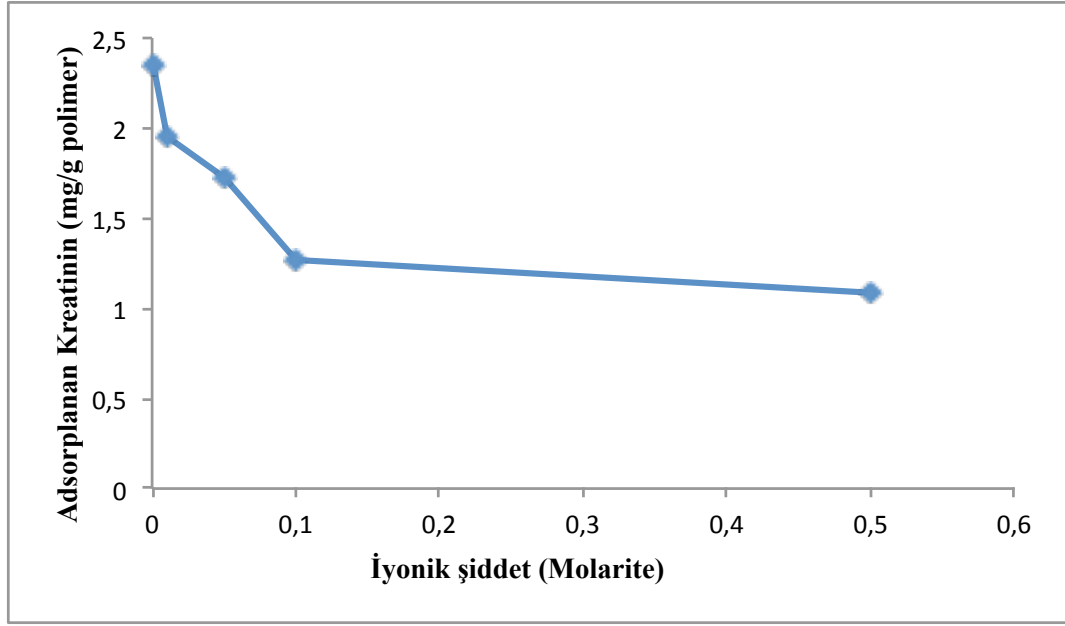
Kreatinin molekülün derişiminin adsorpsiyon üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla Krn-MIP ve NIP kriyojeller kullanılmıştır. 0.1-2 mg/mL'lik derişimlerde hazırlanan kreatinin çözeltisi, 1 mL/dak akış hızında kriyojel kolonlara gönderilmiştir. Şekil 3.10'da görüldüğü üzere artmış olan kreatinin derişimiyle birlikte Krn-MIP ve NIP kriyojel kolonlarda kreatinin adsorpsiyonu artmış ve dengeye gelmiştir. Birim kriyojel ağırlığı tarafından adsorplanmış olan maksimum kreatinin miktarları; Krn-MIP kriyojel için 6.84 mg/mL, NIP1 kriyojel için 5.59 mg/mL ve NIP2 kriyojel için de 0.68 mg/mL olarak belirlenmiştir. Krn-MIP ile NIP1 kriyojel kolonlar için doyunluk miktarı 1 mg/mL derişimdeyken, NIP2 kriyojel kolonda bu değer 0.8 mg/mL değer aralığında gözlenmiştir. Şekil 3.10'da görüldüğü gibi Krn-MIP kriyojel kolonun adsorpsiyon izoterminin başlangıç aşamasında gözlenen keskin eğim, Krn-MIP kriyojel kolonda baskılanmış olan spesifik kreatinin boşluklarıyla açıklanabilir.



Şekil 3.10. Kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerinde derişim etkisi; Akış hızı 1 mL/dak, MOPS (pH 7.4), adsorpsiyon süresi 120 dakika ve sıcaklık 25°C.

3.2.5. Adsorpsiyon Üzerinde İyonik Şiddet Etkisi

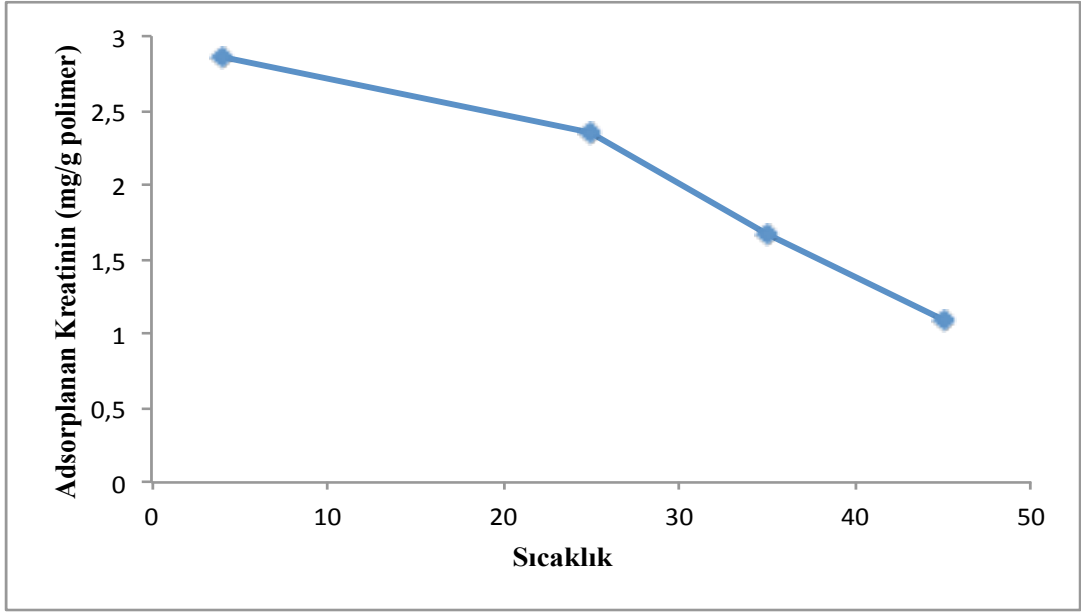
Kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerinde iyonik şiddet etkisinin incelenmesi için farklı derişimlerde 0.01-0.5 M NaCl içeren kreatinin çözeltileri kullanılmıştır. Artan tuz derişimleriyle birlikte kreatinin adsorpsiyonunda önemli derecede azalma saptanmış olup, sonuçlar Şekil 3.11’de gösterilmiştir. MAH monomeri kullanılarak gerçekleştirilmiş olan adsorpsiyon literatür çalışmaları incelendiği zaman artmış olan tuz derişimleriyle birlikte adsorpsiyonda azalmalarla karşılaşmak mümkündür [117]. Şekil 3.12’de gösterildiği gibi NaCl çözeltisi kullanılmayan adsorpsiyon çözeltilinde adsorplanan kreatinin miktarı 2.35 mg/g olarak belirlenmişken, 0.5 M NaCl çözeltisiyle gerçekleşen adsorpsiyon işleminde adsorplanan kreatinin miktarı 1.08 mg/g olarak bulunmuş ve %54 oranında kreatinin adsorpsiyonunda azalma gözlenmiştir. Bu durumda kriyojel kolon ile kreatinin molekülü arasında oluşan itme kuvvetleriyle açıklamak mümkündür. Ayrıca tuz iyonları kreatinin molekülünün etrafını sararak daha kararlı hale getirmiş ve kreatinin çözünürlüğünü artırarak, kreatinin adsorpsiyonunda azalmalara neden olmuştur.



Şekil 3.11. Kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerinde iyonik şiddet etkisi; derişim 0.3 mg/mL, akış hızı 1 mL/dak, MOPS (pH 7.4), adsorpsiyon süresi 120 dakika ve sıcaklık 25°C.

3.2.6. Adsorpsiyon Üzerinde Sıcaklığın Etkisi

Kreatinin moleküllerinin sıcaklıkla olan adsorpsiyon davranışı Krn-MIP kriyojel kolonda 4-45°C derece aralıklarında gerçekleştirilmiştir. Artan sıcaklıkla birlikte kreatinin baskılanmış olan polimerde kreatinin adsorpsiyonunda azalmalar saptanmıştır (Şekil 3.12). Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojel kolonda maksimum kreatinin adsorpsiyonu 4°C’de 2.85 mg/g iken, 45°C’de tespit edilen kreatinin miktarı 1.09 mg/g olarak bulunmuştur. Bu değer aralıklarında adsorbe edilen kreatinin miktarları karşılaştırıldığı zaman 3 katı kadar kreatinin adsorpsiyonunda azalma saptanmıştır. Sıcaklıkla birlikte kreatinin adsorpsiyonda oluşan azalmanın nedeni olarak; kreatinin adsorpsiyonunun ekzotermik olarak gerçekleştiğini ve artan sıcaklıkla birlikte adsorpsiyonda gerçekleşen azalmanın normal olduğu sonucuna ulaşılabilir [118,119].



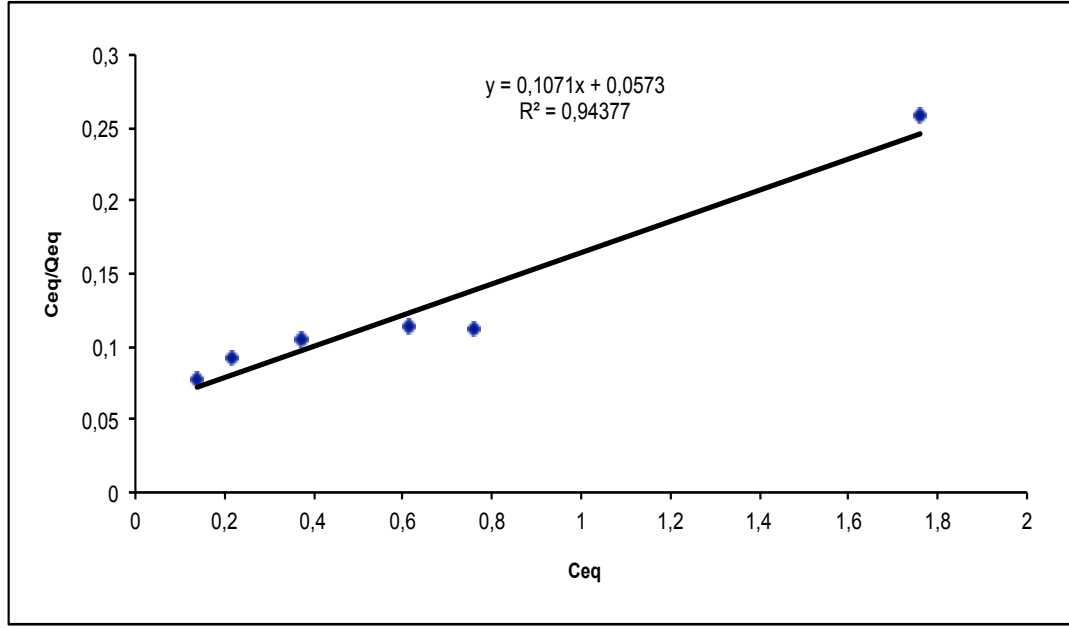
Şekil 3.12. Kreatinin molekülünün adsorpsiyonu üzerinde sıcaklığın etkisi; derişim 0.3 mg/mL, akış hızı, 1 mL/dak, MOPS (pH 7.4), adsorpsiyon süresi 120 dakika.

3.2.7. Adsorpsiyon İzotermi

Kreatinin baskılanmış olan Krn-MIP kriyojel ile kreatinin molekülü arasında oluşan etkileşimlerinin belirlenmesi için Langmuir ve Freundlich modellerinden yararlanılmıştır. Langmuir izotermi; adsorpsiyon işleminin tek tabakalı olarak gerçekleştiğini ve adsorpsiyon yüzeyinin sınırlı sayıda özdeş bölge içerdiğini ileri sürmektedir [120,121]. Aynı zamanda bu modelde yüzey adsorpsiyonunun enerjisinin değişmediği ve yüzey düzleminde adsorban da göç etmediğini ileri sürülmektedir [121]. Langmuir adsorpsiyon eşitliği; Eşitlik 12'ye göre tanımlanır. Denge verilerinin Eşitlik 12'ye uygulanmasıyla, doğrusal bir grafiğin elde edilmesi Langmuir izotermi'nin uygulanabilir olduğunu göstergesidir.

$$1/Q_e = 1/Q_{max} + 1/Q_{max} \cdot b \cdot C_{eq} \quad (3.1)$$

Öngörölmüş olan eşitliğe göre; Q_e değeri adsorbantta bağlanan molekül miktarını (mg/g), C_{eq} çözültide bulunan molekülünün denge derişimini (mg/mL), b Langmuir sabitini (mL/g) ve Q_{max} maksimum molekül adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) ifade etmektedir. $1/C_{eq}$ 'ya karşılık $1/Q$ 'un grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğrunun y eksenindeki kesim noktası $1/Q_{max}$ değerini, aynı doğrunun eğimi $1/Q_{max} \cdot b$ değerini vermektedir. Kreatinin adsorpsiyon verilerinin Langmuir izoterm modeline uygulanması sonucu, elde edilen grafik Şekil 3.13'de gösterilmiştir.



Şekil 3.13. Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojel için Langmuir adsorpsiyon izotermi.

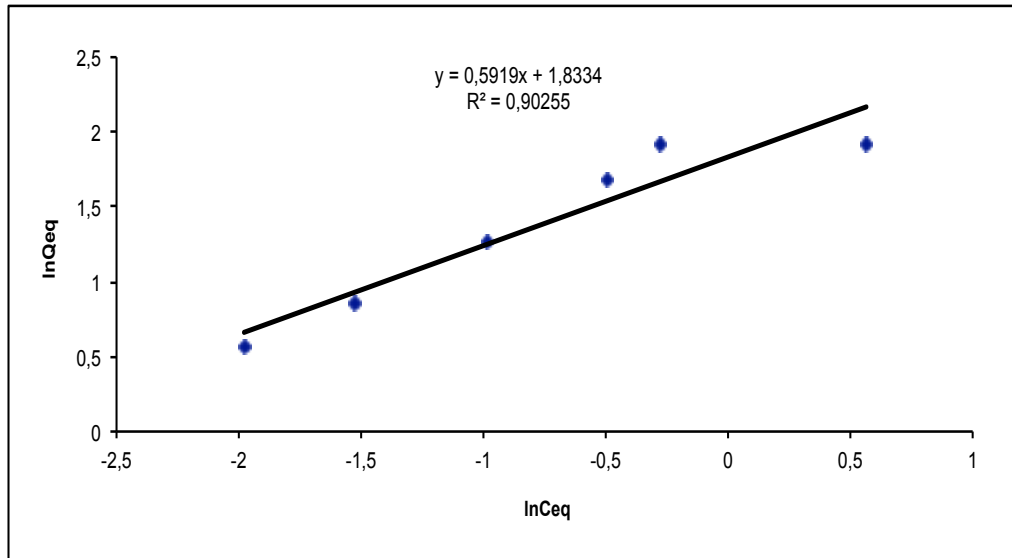
Freundlich adsorpsiyon modeli; adsorbantın yüzey alanının heterojen formdan oluştuğunu ve yüzey üzerinde çoklu tabakalaşmayı ifade etmektedir [122,123]. Freundlich adsorpsiyon modeli aşağıda verilmiş olan eşitlikle tanımlanabilir;

$$Q_e = K_F \cdot C_{eq}^{(1/n)} \quad (3.2)$$

Eşitlikte; Q_e : adsorpsiyon miktarını (mg/g), C_{eq} : çözültide bulunan adsorbant derişimini (mg/mL), K_F ile $1/n$ değerleri sırasıyla adsorpsiyon kapasitesi ile adsorpsiyon şiddetini ifade eden Freundlich sabitleridir. Eşitliğin daha kullanılabilir olması için her iki tarafın logaritması alınarak, Eşitlik 14 elde edilir.

$$\ln Q_e = \ln K_F + (1/n) \ln C_{eq} \quad (3.3)$$

Kreatinin baskılanmış olan Krn-MIP kriyojelin deneysel verileri kullanılarak Freundlich modeline uygunluğu da incelemiştir. $\ln C_e$ 'nin $\ln Q_e$ 'ye karşı logaritması alınarak, grafik çizilmiş ve sonuçlar Şekil 3.14'de gösterilmiştir. Deneysel verilerin değerlendirilmesi sonucunda grafiğin doğrusal çıkması, Freundlich izoterminin uygulanabilirliğinin göstergesidir. Elde edilen doğrusal grafiğin kesim noktası ve eğimi adsorpsiyon sabitlerinin hesaplanmasında kullanılır. K_F ile $1/n$ sabitleri çevresel faktörlere bağlı olarak değişebilir ve $1/n$ sıfır ile 1 aralığında değişiklik gösterir.



Şekil 3.14. Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojel için Freundlich adsorpsiyon izotermi.

Langmuir ve Freundlich izotermi için hesaplanmış olan değerler çizelge 3.2’de verilmiş olup, izotermilerin korelasyon katsayıları incelendiği zaman yapılmış olan çalışmanın Langmuir adsorpsiyon izotermine ($R^2 : 0,94$) daha uygun olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda Langmuir sabiti (Q_{max}) deneysel verilerle uygunluk göstermektedir. K_F ve $1/n$ değerleri kreatinin sulu ortamdan kolayca ayrılabilirdiğini ve tercihli adsorpsiyonu gösterir. K_F değeri adsorbentin adsorpsiyon kapasitesini, eğim, $1/n$, adsorpsiyon kapasitesine derişimin etkisi ile adsorpsiyon şiddetini ifade etmektedir. Çizelgeden görüldüğü üzere, $1/n$ değeri oldukça düşüktür.

Çizelge 3.2. Krn-MIP kriyojelin Langmuir ve Freundlich izotermi.

	Deneysel	Langmuir sabitleri			Freundlich sabitleri		
	q (mg/g)	q _{max} (mg/g)	b (mL/mg)	R ²	K _F	1/n	R ²
Krn-MIP	6.836	9.33	1.87	0,94	6.25	0.5919	0.90

3.2.8. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon kinetikleri; katı-çözeltili ara yüzeyinde tutunmuş olan madde miktarı ile tepkime mekanizmasının açıklanmasında kullanılır [124]. Deneysel verilerin kullanılmasıyla elde edilen bazı kinetik modeller yardımıyla, adsorpsiyon mekanizmasını kontrol eden (kütle transferi, difüzyon kontrolü ile kimyasal reaksiyon) mekanizmalarını değerlendirmek mümkündür [125].

Kütle transferi ve kimyasal tepkime gibi adsorpsiyon işlemini kontrol eden mekanizmaların belirlenmesi için deneysel verilere birinci ve ikinci derece kinetik modeller uygulanmıştır. Ölçülmüş olan derişimlerin adsorbantın yüzey derişimine eşit olduğu varsayılmış ve çözeltilide çözünenin adsorpsiyonunda sıklıkla kullanılan Lagergren’in birinci derece hız eşitliği kullanılmıştır [74],

$$dq_t/dt = k_1(q_{eq}-q_t) \quad (3.3)$$

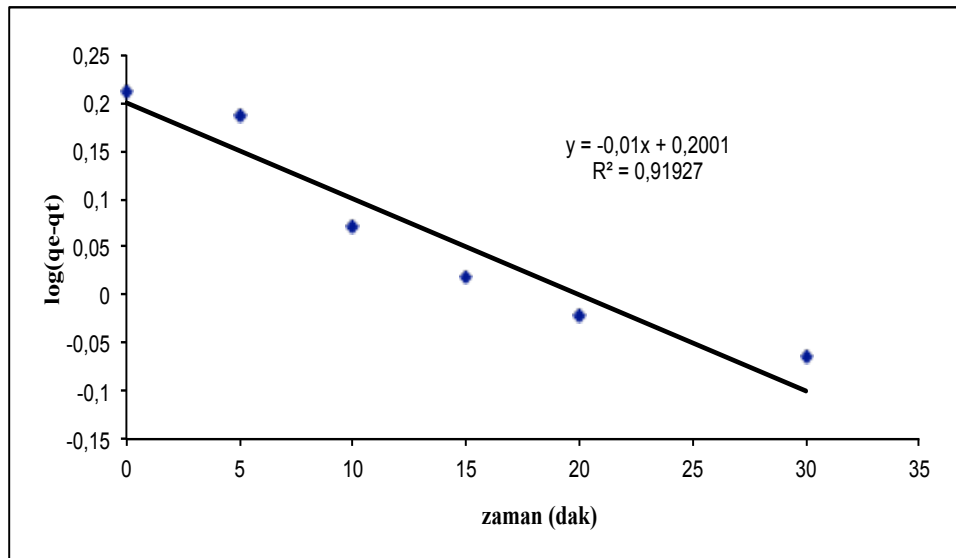
Eşitliğe göre; k_1 ; yalancı-birinci derece adsorpsiyon hız sabitini (dak^{-1}), q_{eq} denge zamanında adsorplanan miktarı (mg/g) ve q_t ise; herhangi bir t zamanında adsorplana madde miktarını (mg/g) gösterir. $T = 0$ 'da $q_t = 0$ ve $t = t$ anında $q_t = q_t$ sınır koşullarının uygulanıp, integralinin alınması sonucu;

$$\log[q_{eq}/(q_{eq}-q_t)] = (k_1 t) / 2.303 \quad (3.4)$$

Yukarıda verilmiş olan eşitliğin tekrar düzenlenip doğrusallaştırılmasıyla;

$$\log(q_{eq}-q_t) = \log(q_{eq}) - (k_1 t)/2.303 \quad (3.5)$$

Elde edilmiş olan eşitlikte; $\log(q_{eq}-q_t)$ değerine karşılık t 'nin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğrunun y eksenini kestiği noktadan $\log(q_{eq})$ ve doğrunun eğiminden $k_1/2.303$ değeri hesaplanmaktadır. Deney verileri kullanılarak elde edilmiş olan yalancı-birinci derece adsorpsiyon kinetiği Şekil 3.15'de verilmiştir.



Şekil 3.15. Krm-MIP kriyojel kullanılarak elde edilen yalancı-birinci derece kinetik grafiği.

Adsorpsiyon denge kapasitesine bağlı olan yalancı-ikinci derece eşitlik aşağıdaki gibidir;

$$q_t/d_t = k_2(q_{eq}-q_t)^2 \quad (18)$$

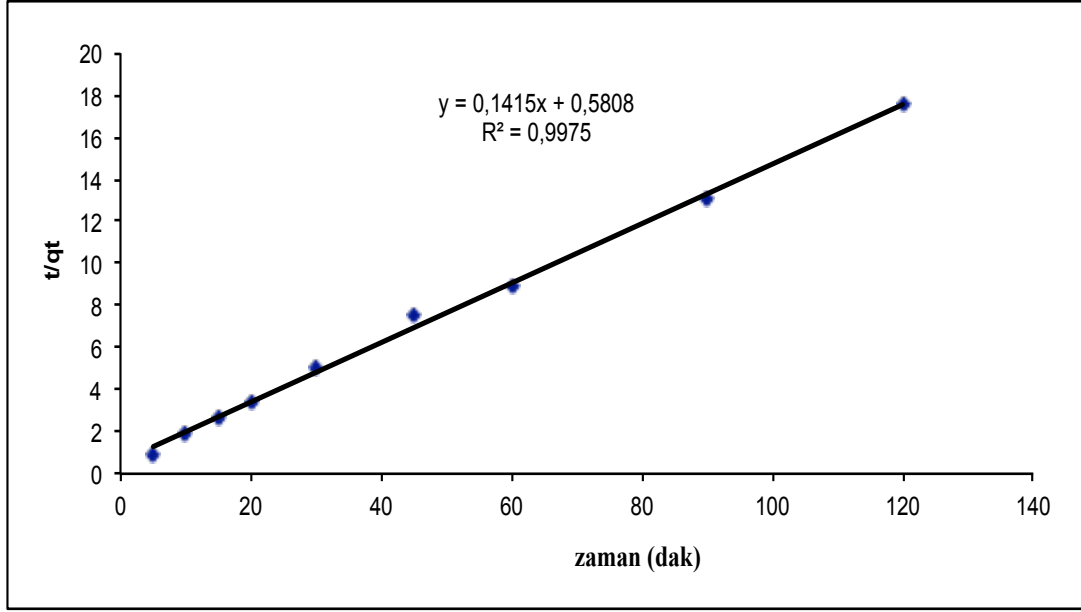
Bu eşitlikte; k_2 pseudo-ikinci derece eşitlik sabitidir (g/mg.dakika), eşitliğe sınır koşulların uygulanması $t = 0$ anında $q_t = 0$ ve $t = t'$ de $q_t = q_t$ ve integralinin alınmasıyla aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$[1/(q_{eq}-q_t)] = (1/q_{eq}) + k_2t \quad (19)$$

Bu eşitliğinde doğrusal hali;

$$(t/q_t) = (1/k_2q_{eq}^2) + (1/q_{eq})t \quad (20)$$

İkinci derece kinetiğin uygulanabilir olması için t/q_t 'ye karşı t grafiğinin doğrusal olması gerekmektedir. Hız sabiti (k_2) ile denge adsorpsiyon miktarı (q_e) sırasıyla y ekseninin kesim noktası ve eğiminden hesaplanmaktadır. Deneysel verilerin kullanılması sonucu elde edilen yalancı-ikinci derece kinetik grafiği Şekil 3.16'da verilmiştir.



Şekil 3.16. Krn-MIP kriyojel kullanılarak elde edilen yalancı-ikinci derece kinetik grafiği.

Kreatinin baskılanmış olan Krn-MIP kriyojelle ait kinetik analiz verileri kullanılarak hesaplanan yalancı-birinci ve yalancı-ikinci derece kinetik parametreleri Çizelge 3.3'de verilmiştir. Çizelgedeki korelasyon (R^2) katsayıları incelendiği zaman, kreatinin baskılanmış olan kriyojellerin yalancı-ikinci derece kinetik modeline daha uygun olduğu bulunmuştur. Elde edilmiş olan teorik q_e değerleri ile deneysel q_e değerleri oldukça yakınlık göstermektedir.

Hız kontrol mekanizması, adsorpsiyon işleminde üç olası mekanizmaya göre değişebilmektedir. Birinci aşamada; adsorpsiyon işleminin ilk aşamalarında dış yüzey kütle transferi ya da film difüzyon işlemi, ikincisi aşamada bu basamağı tepkime veya sabit hız basamağı takibidir. Son aşamada ise; adsorpsiyon işleminin önemli miktarda azaldığı gözenek içi difüzyon basamağıdır [126]. Bu hız basamakları yalancı-birinci derece kinetik model (difüzyon kontrollü) ve yalancı-ikinci derece kinetik modeller (kimyasal kontrollü) kullanılarak açıklanmaktadır. Adsorpsiyon hızını belirleyen basamak; analitin adsorbentin yüzeyine difüzyonu ile gerçekleşiyorsa, yalancı-birinci derece kinetik model (difüzyon) ile uyumluluk göstermektedir. Adsorpsiyon hızını belirleyen basamak; analit ile adsorbent arasındaki etkileşim olduğu koşullarda, adsorpsiyon işleminin yalancı-ikinci derece

kinetik modele uygunluğu söylenmektedir. Birinci durumunda adsorpsiyon işlemi difüzyon kontrollü, ikinci durumda ise kimyasal kontrollü olarak değerlendirilmektedir. Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojel kullanılarak elde edilen deneysel verilere göre; kreatinin molekülünün adsorpsiyonunun difüzyon kısıtlaması olmaksızın, adsorpsiyonun kimyasal kontrollü olarak oluştuğu gözlenmiştir.

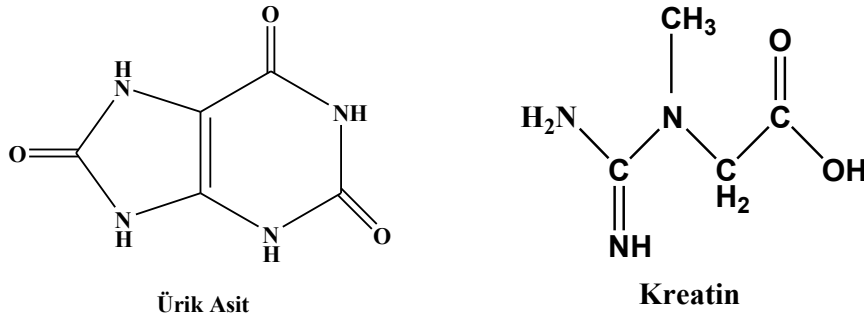
Çizelge 3.3 Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojel için yalancı-birinci ve yalancı-ikinci derece kinetik deneysel verileri.

	Başlangıç Derişimi (mg/mL)	Deneysel Sonuç	Yalancı-Birinci Derece Kinetik			Yalancı-İkinci Derece Kinetik		
			k_1	q_{eq}	R^2	k_2	q_{eq}	R^2
		q_{eq} (mg/g)	1/dak	mg/g		g/mg.dak	mg/g	
Krn-MIP	1.0	6.88	0.23	1.58	0.91	0.034	7.06	0.99

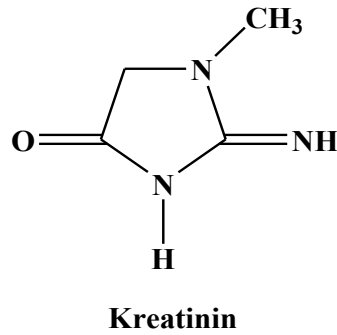
3.2.9. Seçicilik Deneyleri

Kreatinin baskılanmış (Krn-MIP) ve baskılanmamış olan (NIP1-NIP2) kriyojel kolonlarda seçicilik deneyleri kreatin ve ürik asit molekülleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.17). Ürik asit; halkasal yapılı ve kreatinin molekülüyle benzer fonksiyonel gruplara sahip olduğu için tercih edilmiştir. Kreatin de kreatinin ile aynı metabolik yolda yer aldığı ve benzer fonksiyonel gruplara sahip olduğu için yarışmacı molekül olarak kullanılmıştır. Her bir molekül 0.3 mg/mL derişimlerde hazırlanmış, 25°C'de 2 saat boyunca sürekli sistem kullanılarak MIP ile NIP kriyojel kolonlarla etkileştirilmiştir ve alınmış olan başlangıç ve sonuç çözeltileriyle adsorplanan derişim miktarları hesaplanmıştır. Kreatinin baskılanmış p[HEMA-MAH-Cu(II)] (Krn-MIP) ile kreatinin baskılanmamış p[HEMA-MAH-

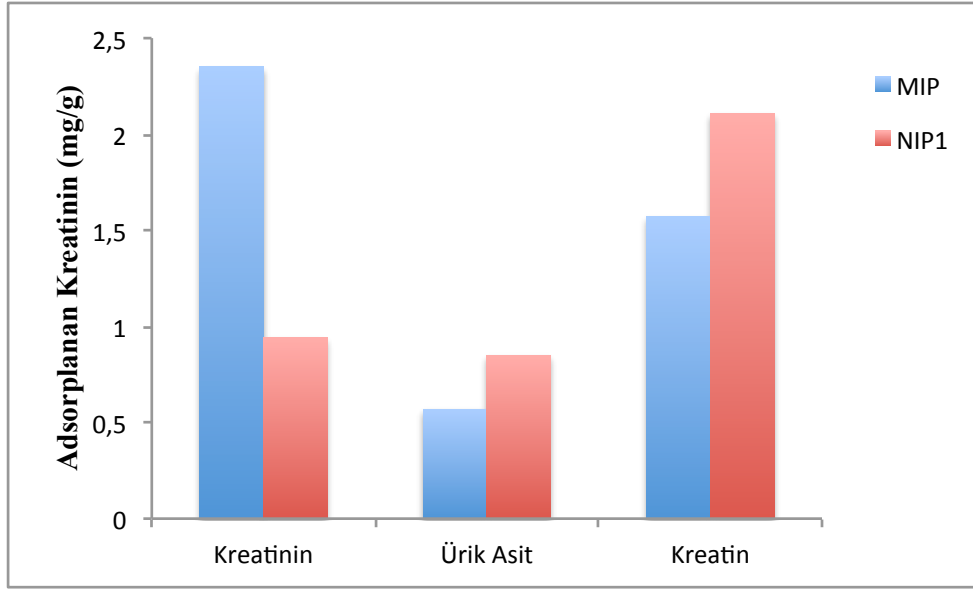
Cu(II)] (NIP1) kriyojel kullanılarak gözlenen adsorpsiyon sonuçları (Şekil 3.18) ile yarışmacı moleküller için K_d ve k değerleri Çizelge 3.4’de verilmiştir. Krn-MIP kriyojel kullanılarak yapılmış olan seçicilik çalışmaları sonucunda Krn-MIP’nin ürik asit molekülüne karşı 1.39 kat ve kreatin molekülüne de 2.4 kat daha seçici olduğu gözlenmiştir. Aynı işlemler p(HEMA) (NIP2) kriyojeli için de yapılmış ve sonuçlar Şekil 3.19 ile Çizelge 3.5’de verilmiştir. Krn-MIP kriyojeli ile NIP2 kriyojeli kullanılarak yapılmış olan ikinci seçicilik çalışmasında Krn-MIP kriyojelin, ürik asite karşı 3.45 kat ve kreatine karşı da 4.37 kat daha seçici olduğu görülmüştür. Kreatinin baskılanmış olan kriyojelin K_d değerleri; kreatinin baskılanmamış olan kriyojellerle karşılaştırıldığı zaman kreatinine karşı daha yüksek olarak bulunmuştur. Bağlı seçicilik katsayısı kreatinin baskılanmış olan kriyojellerde kreatinin tanıma bölgelerinin afinitesini göstermektedir.



Şekil 3.17. Ürik asit (168.11 g/mol), kreatin (131.13 g/mol) ve kreatinin (113.12 g/mol) moleküllerinin yapıları.



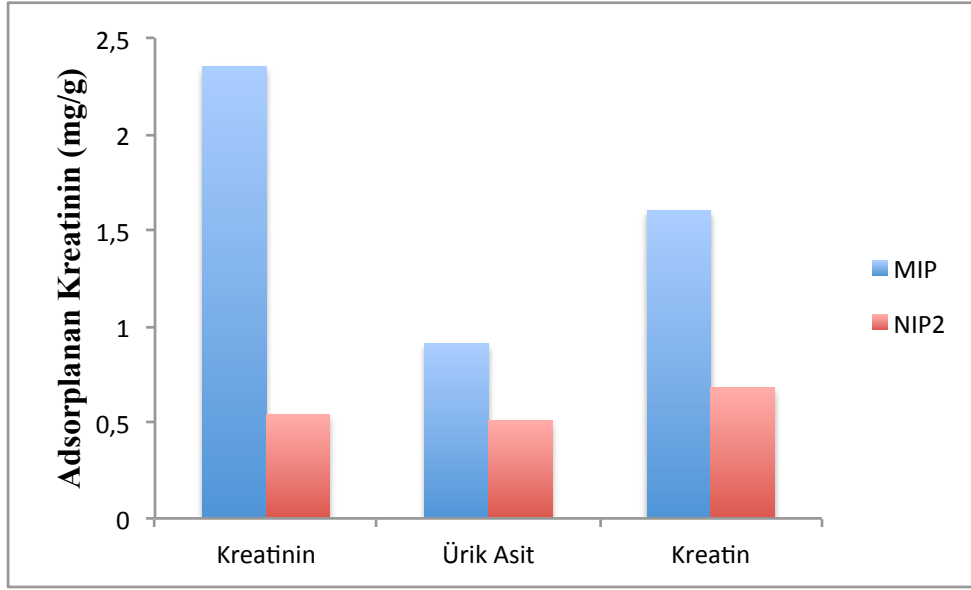
Şekil 3.17 (devam) Ürik asit (168.11 g/mol), kreatin (131.13 g/mol) ve kreatinin (113.12 g/mol) moleküllerinin yapıları.



Şekil 3.18. Sulu çözeltiden Krn-MIP ile NIP1 kolonlarının adsorpsiyonu: Kreatinin, Ürik Asit ve Kreatin derişimleri: 0.3 mg/mL, MOPS pH: 7.4, akış hızı: 1 mL/dak, adsorpsiyon süresi: 120 dak ve T: 25°C.

Çizelge 3.4 Kreatinine göre ürik asit ve kreatin moleküllerinin K_d ve k değerleri.

	NIP1			Krn-MIP			
	Q	k_d	k	Q	k_d	k	k'
Kreatinin	1.94	8.83		2.35	10.79		
Ürik Asit	1.77	5.2	1.69	0.91	4.61	2.34	1.39
Kreatin	1.74	8.98	0.98	1.6	4.56	2.36	2.4



Şekil 3.19. Sulu çözeltilerden Krn-MIP ile NIP2 kolonlarının adsorpsiyonu: Kreatinin, Ürik Asit ve Kreatin derişimleri: 0.3 mg/mL, MOPS pH: 7.4, akış hızı: 1 mL/dak, adsorpsiyon süresi 120 dak ve T: 25°C.

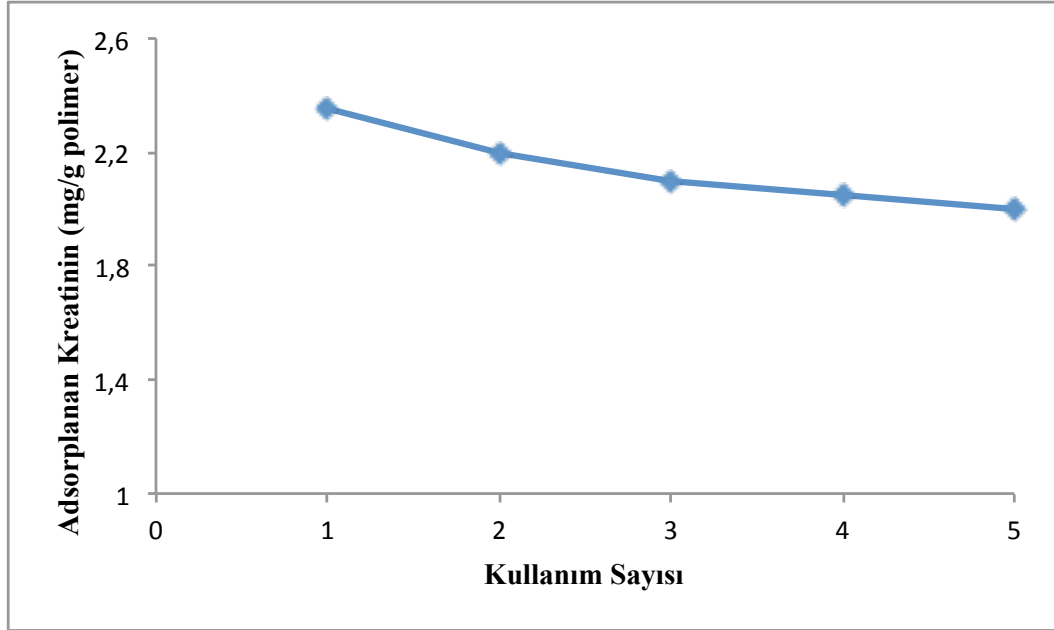
Çizelge 3.5 Kreatinine göre ürik asit ve kreatin moleküllerinin K_d ve k değerleri

	NIP2			Krn-MIP			
	Q	k_d	k	Q	k_d	k	k'
Kreatinin	0.54	1.92		2.35	10.79		
Ürik Asit	0.51	3.72	0.51	0.91	4.61	2.34	3.45
Kreatin	0.68	3.55	0.54	1.6	4.56	2.36	4.37

3.2.10. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Biyofinite adsorbentlerinde aranılan temel özelliklerin biri de; sentezlenmiş olan malzemenin tekrar tekrar kullanılmasıdır. Rejenerasyon ya da tekrar kullanılabilirlik olarak tanımlanan bu özellik, ayırma işlemlerinde maliyeti azaltan bir etmendir. Bu

nedenle desorpsiyon deneyleri, adsorpsiyon için kullanılan kriyojel kolonda incelenmiştir. Desorpsiyon oranı Krn-MIP kolon için % 90'nın üzerinde belirlenmiş ve adsorpsiyonunda önemli bir azalma gözlenmemiştir (Şekil 3.20). Tekrar kullanılabilirliği belirlemek üzere adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü aynı kolon kullanılarak 5 kez tekrarlanmıştır. Rejenerasyon ve sterilasyon için kriyojel kolon 50 mL NaOH çözeltisi ve ardından 200 mL damıtık suyla yıkanmıştır.

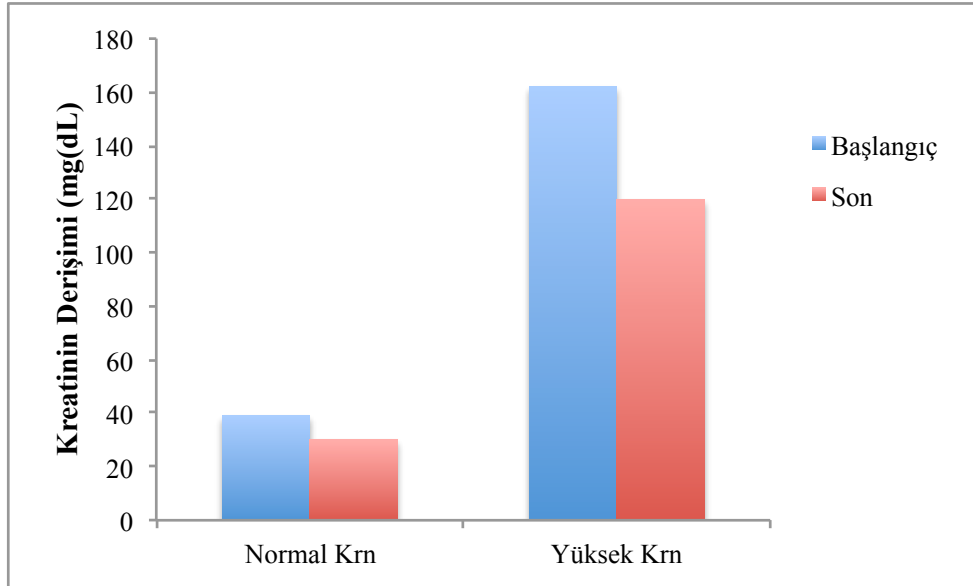


Şekil 3.20. Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojelin tekrar kullanılabilirliği; kreatinin derişimi: 0.3 mg/mL, MOPS, pH: 7.4, akış hızı: 1 mL/dak, T: 25°C, desorpsiyon ajanı: 1M NaCl.

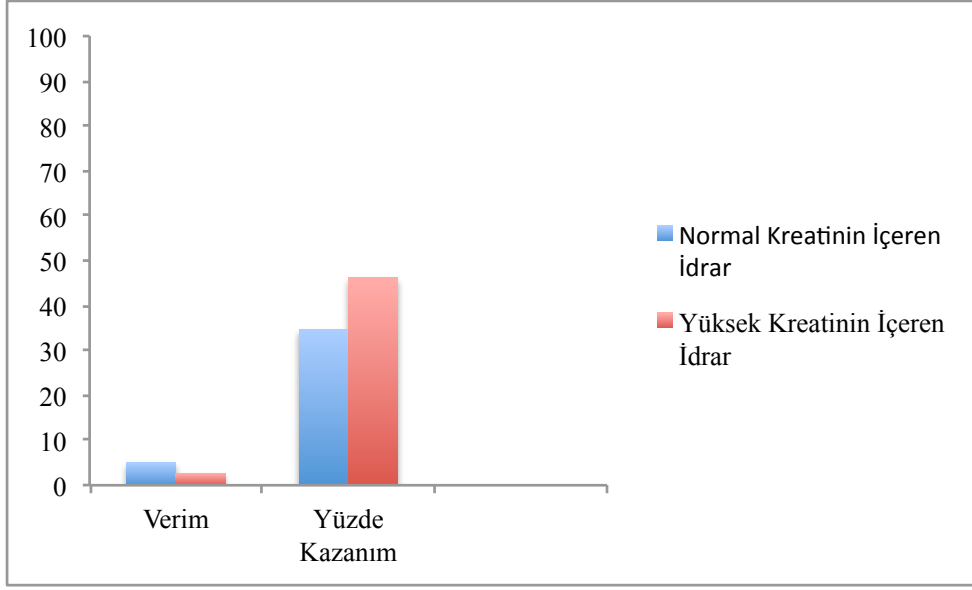
3.3. Yapay İdrardan Kreatinin Molekülün Analizi

Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojelin yapay idrardan seçicilik çalışmaları için hem normal idrar seviyesinde bulunması gereken kreatinin miktarı hem de hasta idrarını temsil etmesi için yüksek miktarda kreatinin yüklemesi yapılan yapay idrar çözeltileri hazırlanmıştır ve Integra Roche 400 cihazıyla analiz edilmiştir. Normal idrarda bulunan başlangıç kreatinin miktarı 39 mg/dL iken, Krn-MIP polimerle

adsorpsiyon çalışması sonrasında 30 mg/dL olarak bulunmuştur. Yüksek oranda kreatinin yüklemesi yapılmış olan yapay idrar çözeltisinin başlangıç derişimi 162 mg/dL olarak saptanmışken, Krn-MIP kolonla adsorpsiyonu sonucu 120 mg/dL olarak saptanmıştır (Şekil 3.21). Ayrıca Krn-MIP kriyojelin normal ve yüksek oranda kreatinin içeren yapay idrar çözeltisi içeren ortamlarda 20 dakika boyunca da adsorpsiyon çalışmaları değerlendirilmiş ve Krn-MIP kriyojelin 20 dakika süredeki verimliliği ile kreatinin molekülünü geri kazanımı da hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; normal idrarda %4.99 verim ve %34.6 kreatinin geri kazanımı ve yüksek idrarda %2.71 verim ile %46.2'lik kreatinin geri kazanımı hesaplanmıştır (Şekil 3.22). Elde edilen sonuçlara göre Krn-MIP kriyojelin yapay idrar çözeltilerinde kreatinine karşı seçici olduğu ve kreatinin miktarını tayin etmede kullanılabilirliği gözlenmiştir.



Şekil 3.21. Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojel kullanılarak yapay idrardan kreatinin adsorpsiyonu, pH: 6.2, akış hızı: 1mL/dak, T: 25°C, adsorpsiyon süresi 120 dakika.



Şekil 3.22. Kreatinin baskılanmış Krn-MIP kriyojel kullanılarak yapay idrardan kreatinin geri dönüşümü ve kriyojelin verimliliği pH: 6.2, karıştırma hızı: 130 rpm, T: 25°C, adsorpsiyon süresi 20 dakika.

4. YORUM

- Doktora çalışmasında NIP1 kriyojeli; HEMA ve MAH-Cu(II) ile çapraz bağlayıcı kullanılarak sentezlenmiştir. NIP1 kriyojeli için elde edilen spesifik yüzey alanı $22.96 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Yalnız HEMA ve çapraz bağlayıcı kullanılarak sentezlenen NIP2 kriyojelinin spesifik yüzey alanı $21.59 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak saptanmıştır. Kreatinin baskılanmış olan kriyojellerin sentezinde HEMA, çapraz bağlayıcı ile farklı oranlarda MAH-Cu(II) ve kreatinin miktarı içeren dört farklı MIP (MIP1, MIP2, MIP3 ve Krn-MIP) kriyojel sentezlenmiştir. MIP1 kriyojeli için elde edilen spesifik yüzey alanı $24.36 \text{ m}^2/\text{g}$, MIP2 kriyojeli için $27.81 \text{ m}^2/\text{g}$, MIP3 için $30.02 \text{ m}^2/\text{g}$ ve Krn-MIP (deneylerde kullanılan kriyojel) için de $32.65 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MIP kriyojellerde artan kompleks miktarıyla birlikte yüzey alanlarında da artışlar saptanmıştır.
- Kreatinin baskılanmış olan p[HEMA)-MAH-Cu(II)/Kreatinin] kriyojeller, çapraz bağlı ve hidrofilik yapıli destek malzemeleridir. Doktora çalışmasında hazırlanan p(HEMA); NIP2 kriyojellerin şişme oranı % 75.7, p[HEMA)-MAH-Cu(II)]; NIP1 kriyojelin şişme oranı % 79.4 ve kreatinin baskılanmış p[HEMA)-MAH-Cu(II)] kriyojeller için sırasıyla MIP1 için % 81.3, MIP2 için % 84.6, MIP3 için % 87 ve Krn-MIP için de % 89.5 olarak belirlenmiştir. Makrogözenek oranları; NIP1 kriyojel için; % 67.3, NIP2 kriyojel için % 69.5, MIP1 kriyojel için 72.2, MIP2 kriyojel için % 74, MIP3 kriyojel için % 76.1 ve Krn-MIP kriyojelde % 78.4 olarak bulunmuştur. P(HEMA) kriyojellerle kıyaslandığı zaman MAH monomerinin yapıya girmesiyle denge şişme oranının arttığı saptanmıştır.
- Kriyojellerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskop (TEM, Jeol 5600, Tokyo, Japan) ile incelenmiştir. Elde edilmiş olan sonuçlar neticesinde kreatinin baskılanmış olan p[HEMA)-MAH-Cu(II)/Kreatinin] (Krn-MIP), baskılanmamış olan NIP1 p[(HEMA)-MAH-Cu(II)] ile NIP2 p(HEMA) kriyojellerin makrogözeneklere ve birbirlerine bağlantılı yapıda oldukları görülmüştür.

- Kreatinin baskılanmış olan Krn-MIP baskılanmamış olan NIP1 ile NIP2 kriyojellerin FTIR spektrofotometresi sonuçları için OH, Alifatik CH, Karbonil ve Amid gruplarına ait olan bantlar incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; OH gerilme bant aralığı Krn-MIP kriyojel için; 3393 cm^{-1} , NIP1 kriyojel için 3382 cm^{-1} ve NIP2 kriyojel için de 3432 cm^{-1} olarak bulunmuştur. Alifatik CH fonksiyonel grubu dikkate alındığında Krn-MIP için 2951 cm^{-1} , NIP1 ve NIP2 kriyojeller içinde sırasıyla 2950 ile 2951 cm^{-1} olarak saptanmıştır. Karbonil bantları irdelendiği zaman MIP, NIP1 ve NIP2 kriyojeller için sırasıyla, 1728 cm^{-1} , 1727 cm^{-1} ve 1728 cm^{-1} olarak karşımıza çıkmaktadır. Son olarak amid bandları da Krn-MIP, NIP1 ve NIP2 kriyojeller için sırasıyla 1660 cm^{-1} , 1661 cm^{-1} ve 1661 cm^{-1} olarak kendisini göstermiştir. Elde edilen FTIR spektrofotometresi sonuçlarına göre; fonksiyonel monomerin (MAH) ana matriks monomeri olan 2-hidroksietil-metakrilatın yapısına girerek polimerleştirdiğini görülmektedir.

- Kreatinin baskılanmış olan Krn-MIP kriyojellerin adsorpsiyon çalışmalarında optimum pH'nın belirlenmesi için organik ve inorganik tamponlar kullanılmıştır. Kreatinin adsorpsiyonun maksimum derişimi MOPS pH 7.4 de, 2.35 mg/g polimer olarak belirlenmiştir. Bundan sonraki kreatinin adsorpsiyon çalışmalarına MOPS pH: 7.4 de devam edilmiştir.

- Kreatinin adsorpsiyonu üzerindeki akış hızının etkisini belirlemek için 0.5 mL/dak (5.61 mg/g kreatinin) ile 3 mL/dak (1.94 mg/g kreatinin) akış hızlarında çalışılmış ve diğer adsorpsiyon parametreleri sabit tutulmuştur. Artmış olan akış hızıyla birlikte, kreatinin adsorpsiyonda önemli azalmalar saptanmıştır. Artmış olan akış hızıyla birlikte kreatinin adsorpsiyonunda meydana gelen azalmaların nedeni olarak, artmış akış hızının kreatinin molekülleriyle kriyojel kolonların etkileşim sürelerinin azaldığı sonucuna ulaşılmıştır.

- Kreatinin adsorpsiyonu üzerinde derişimin etkisi incelendiği zaman artmış olan kreatinin derişimiyle birlikte, adsorpsiyonun da arttığı ve 1 mg/mL derişimden sonra Krn-MIP kriyojel kolonun 6.83 mg/g 'da doyunluğa ulaştığı görülmüştür. Ayrıca NIP1 kolonu kreatinin derişimine 5.93 mg/mL kadar ulaşırken, NIP2 kolonda ise bu değer 0.68 mg/mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler göre NIP1 kolonda

kullanılan MAH fonksiyonel monomeri ile Cu(II) ön-kompleksinin kreatinin adsorpsiyonu üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Krn-MIP kriyojel kolonda doygunluğa erişmenin nedeni olarak hazırlanmış olan Krn-MIP kolonda kreatinine ait olan belirli sayıdaki özgül oyukların, ortamda bulunan kreatinin molekülleriyle doldurulduğunu ve ortamda bulunan diğer kreatinin molekülleri için bağlanma bölgeleri kalmadığı için dengeye ulaştığı gözlenmiştir.

- İyonik şiddetin kreatinin adsorpsiyonu üzerindeki etkisini belirlemek için farklı derişimlerde NaCl çözeltileri kullanılmış ve diğer parametreler sabit tutulmuştur. Adsorpsiyon ortamında NaCl çözeltisi kullanılmadan gerçekleştirilen adsorpsiyon çalışmasında Krn-MIP kolon tarafından tutulmuş olan kreatinin miktarı 2.35 mg/g iken, 0.5 M NaCl çözeltisi varlığında 1.09 mg/g olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak artmış olan tuz derişimleriyle Krn-MIP kolonda tutunmuş olan kreatinin miktarında önemli azalmalar saptanmıştır.

- Adsorpsiyon üzerinde sıcaklığın etkisinin incelenmesi 4-45°C sıcaklık aralıklarında yapılmıştır. Krn-MIP kolon tarafından tutulmuş olan maksimum kreatinin derişimi 4°C'de 2.85 mg/g olarak belirlenmiş ve artmış olan sıcaklıkla birlikte adsorpsiyon miktarlarının (25°C'de 2.35 mg/g, 35°C'de 1.67 mg/g ve 45°C'de 1.09 mg/g) azaldığı gözlenmiştir.

- Adsorpsiyon izotermeleri incelendiği zaman hazırlanmış olan Krn-MIP kolonda gözlenmiş olan maksimum kreatinin adsorpsiyon kapasitesi (q_{max}) 6.836 mg/g ve teorik olarak kriyojel tarafından adsorbe edilen kreatinin molekül miktarı da (q_{max}) 9.33 mg/g olarak hesaplanmıştır. Elde edilen Langmuir izoterm korelasyon katsayısı değeri (R^2) 0.94 ve Langmuir sabiti; 1.87 mg/mL olarak belirlenmiş ve Langmuir izotermine uygun olduğu görülmüştür.

- Adsorpsiyon kinetik çalışmalarının incelenmesi sonucunda, Krn-MIP kriyojel kolon çalışmasının yalancı-ikinci dereceden adsorpsiyon kinetik verilerine uygun olduğu bulunmuştur. Elde edilmiş olan veriler yardımıyla; kreatinin moleküllerinin Krn-MIP kriyojel kolonda gözlenen adsorpsiyon işleminde kimyasal etkileşimlerin kontrolü altında olduğu belirlenmiştir.

- Kreatinin baskılanmış p[HEMA)-MAH-Cu(II)/Kreatinin] kriyojellerin Krn-MIP, NIP1 ve NIP2 kriyojellere karşı seçiciliğın belirlenmesi için ürik asit ile kreatin molekülleri yarışmacı moleküller olarak seçilmiştir. Krn-MIP kriyojelin NIP1 kriyojel ile karşılaştırılması sonucunda kreatinin molekülünü ürik asite karşı 1.39 kat ve kreatine karşı da 2.4 kat daha seçici olarak tanıdığı gözlenmiştir. Ayrıca Krn-MIP kriyojel ile NIP2 kriyojelin karşılaştırılması sonucu Krn-MIP'lerin kreatinin molekülünü ürik asite karşı 3.45 kat ve kreatine karşı da 4.37 kat daha seçici olarak tanımıştır. Sonuçlara göre; kriyojeller ile hedef molekülünün etkileşiminde moleküler baskılama yöntemiyle oluşturulan boşlukların önemli etkisi saptanmıştır.
- Tekrar kullanılabilirlik çalışmasının amacı, adsorpsiyonun işleminde kullanılan herhangi bir adsorbantın, adsorpsiyon işlemindeki verimliliğın bir ölçüsü olarak tanımlanabilir. Sentezlenen Krn-MIP kriyojel kolon birbirini takip eden 5 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsüne tabi tutulmuş ve elde edilmiş deney verileri sonucunda adsorpsiyon kapasitesinde önemli azalmalar saptanmamıştır.
- Yapay idrar çalışmaları için normal kreatinin miktarı içeren ve daha yüksek kreatinin derişimine sahip olan iki çözelti kullanılmıştır. Normal kreatinin miktarı bulunan çözeltide, saptanan başlangıç kreatinin miktarı 0.39 mg/dL iken, Krn-MIP kriyojel kolonla etkileşimi sonunda 30 mg/dL olarak bulunmuştur. Hasta idrarını temsil etmesi için hazırlanan ikinci çözeltinin kreatinin başlangıç derişimi 162 mg/dL iken, Krn-MIP kolonla etkileşimi sonucu 120 mg/dL olarak belirlenmiştir.
- Krn-MIP kullanılarak normal ve yüksek miktarda kreatinin içeren 20 dakikalık adsorpsiyon işleminin sonucunda, Krn-MIP kriyojelin kreatinine karşı normal idrarda % 4.9 ve yüksek idrar da % 2.71'lik verime sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca Krn-MIP'in normal idrarda kreatininini % 34.6 ve yüksek miktarda kreatinin içeren çözelti de % 46.2 oranında geri kazanımla tayin ettiği gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Heymsfield, S.B., Arteaga, C., McManus, C., Smith, J. and Moffid, S., Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method^{1,2}, The American Journal of Clinical Nutrition 37: 478-494, 1983.
- [2] Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E., Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 6th Edition. Saunders. Elsevier, 2008.
- [3] Narayanan, S. and Appleton, D.H., Creatinine: Review. Clin. Chem. 26/8, 1119-1126, 1980.
- [4] Stein, A., Wild, A., Kidney failure explained, Class Publishing, London, 1- 152, 2002.
- [5] Brenner, B.M., The Kidney, 8TH Edition, 1-2241, Saunders, 2007.
- [6] Çavuşoğlu, H., (Editör), Tıbbi Fizyoloji, 10. Edisyon, 1-1023, Yücel Yayımevi A.Ş.&Nobel Kitapevleri, LTD. ŞTİ., 2001.
- [7] Eaton, D.C., Pooler, J.P., Vander's Renal Physiology, 7th Edition, Mc Graw Hill Medical, 1-222, 2009.
- [8] Croft, R., Moore, J., Renal failure and its treatment, Anaesthesia and Intensive Care Medicine, 13:7, 336-342, 2012.
- [9] Levery, S.A., Coresh, J., Chronic kidney disease. Lancet. 379: 165-80, 2012.
- [10] Evans, D.P., Taal, W.M., Epidemiology and causes of chronic kidney disease. Medicine. 39 (7): 402-406, 2011.

- [11] Tomson, C., Bailey, P., Management of chronic kidney disease. *Medicine*. 39 (7): 407-413, 2011.
- [12] Jayasundera, S., Macnab, R., Laboratory tests of renal function, *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. 13 (7): 2012.
- [13] Lamb, E., Assessment of kidney functions in adults, *Laboratory Investigations, Medicine*. 35 (7): 359-364, 2007.
- [14] Schiffrin, L.E., Lipman, L.M., Mann, F.E.J., Chronic Kidney Disease Effects on the Cardiovascular System. *Circulation*. 116, 85-97, 2007.
- [15] Vassalotti, A.J., Stevens, A.L., Levey, S.A., Testing for Chronic Kidney Disease: A Position Statement from the National Kidney Foundation. *American Journal of Kidney Disease*. Vol 50, No: 2 (August), 169-180, 2007.
- [16] Kamijo, A., et al., Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 284, 175-182, 2006.
- [17] Kamijo, A., et al., Urinary Excretion of fatty Acid-Binding Protein Reflects Stress Overload and the Proximal Tubules. *Am. J. Pathol.* 165, 1243-1255, 2004.
- [18] Mussap, M and Plebani, M., Biochemistry and Clinical Role Biochemistry and of Human Cystatin C. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*. 41 (5-6): 467-550, 2004.
- [19] Stevens, A.L. et al., Factors other than glomerular filtration rate affect serum cystatin C levels. *Kidney International*. 75, 652-660, 2009.
- [20] Edelstein, L.C., Biomarkers in kidney disease. Academic Press is an imprint of Elsevier, 2011.

- [21] Aghai, V.H., Pasalar, P., Najafi, I and Kadkhodae, M., Serum cystatin C as a new marker of glomerular filtration rate (GFR). *MJIRI*. 26 (1): 29-33, 2002.
- [22] AK, IZ., WZ, M.R., R, I.N., WM, N.W., The useful of cystatin C as a marker for chronic kidney disease. *Universal Journal of Clinical Medicine*. 1(2): 28-33, 2013.
- [23] Alharazy, S.M. and et all., Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as an Early Marker of Constatnt-Induced Nephropathy After Coronary Angiography. *Angiology*. 65 (3): 216-223, 2014.
- [24] Noto, A., Cibacchini, F., Fanos, V. and Mussap, M., NGAL and Metabolomics: The Single Biomarker to Reveal the Metabolome Alterations in Kidney Injury. *BioMed Research International*. Article ID 612032, 6 pages, 2013.
- [25] Malyszko, J., Malyszko, J.S., Bachorzewska-Gajewska, H., Pomiatowski, B., Dobrzycki, S. and Mysliwiec, M., Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is a New and Sensitive Marker of Kidney Functions in Chronic Kidney Disease Patients and Renal Allograft Recipients. *Trasnplantation Proceeding*. 41, 158-161, 2009.
- [26] Devarajan, P., Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): A new marker of kidney disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl*. 241, 89-94, 2008.
- [27] Mitsnefes, M.M. et. all., Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic disease. *Pedatr. Nephrol*. 22, 101-108, 2007.
- [28] Raptis, V., Kapoulos, S. and Grekas, D., Role of a asymmetrical dimethylarginine in the progression of renal disease. *Nephrology*. 18, 11-21, 2013.

- [29] Devarajan, P., The use of targeted biomarkers for chronic kidney disease. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 17(6): 469-479, 2010.
- [30] Kielstein, T.J., Fliser, D. and Veldink, H., Asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine: Axis of evil or useful alliance?. *Seminars in Dialysis.* 22 (4): 346-350, 2009.
- [31] Erbil, M.K., et. all., *Turkish Journal of Biochemistry.* 37(1): 99-105, 2012.
- [32] Fliser, D. et. all., Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: The mild moderate kidney disease study. *J. A. Soc. Nephrol.* 16, 2456-2461, 2005.
- [33] Wahbi, N., Dalton, R.N., Turner, C., Denton, C., Abbs, I., Swominathon, R., Dimethylarginines in chronic renal failure. *Journal Clin. Pathol.* 54, 470-473, 2001.
- [34] Tin, A., Astor, C.B., Bperwinkle, E., Coresh, J. and Linda Kao, H.W., Genome-wide significant locus of beta-trace protein, A novel kidney function biomarker, identified in Europeans and African Americans *Nephrol. Dial. Transplant.* 28, 1497-1504, 2013.
- [35] Donadio, C., Lucchesi, A., Ardini, M., E, Giordani, R., Serum levels of beta-trace protein and glomerular filtration rate-preliminary results. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 32, 1099-1104, 2003.
- [36] Chen, H.H., Beta trace-Protein versus cystatin c: Which is a better surrogate marker of renal function versus prognostic indicator in cardiovascular disease?. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57 (7): 859-860, 2011.
- [37] Priem, F., Althous, H., Birnbaum, M., Sinha, P., Condradt, S.H. and Jung, K., b-trace protein in serum: A new marker of glomerular filtration rate in the creatinine-blind range. *Clinical Chemistry.* 45 (4): 567-586, 1999.

- [38] Hoffmann, A., Nimtz, M., and Condrat, S.H., Molecular characterization of b-trace protein in human serum and urine: A potential diagnostic marker for renal diseases. *Glycobiology*. 7(4): 499-506, 1997.
- [39] Waanders, F., Timmeren, V.M.M., Stegeman, A.C., Bakker, J.L.S. and Goor, V.H., Kidney injury molecule-1 in renal disease. *J. Pathol.* 220, 7-16, 2010.
- [40] Ichimura, T., Bonventre, V.J., Bailly, V., Wei, H., Hession, A.C., Cate, L.R. and Sanicola, M., Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *The Journal of Biological Chemistry and Molecular Biology*. 273 (7): 4135-4192, 1998.
- [41] Han, K.W., Bailly, V., Abichandai, R., Thandani, R. and Bonventre, V.J., Kidney injury molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney International*. 62, 237-244, 2002.
- [42] Malyszko, J., Zorawska, Koc-E., Malyszko, J.S. and Mysliwiec, M., Kidney injury molecule-1 correlates with kidney function in renal allograft recipients. *Transplantation Proceeding*. 42, 3957-3959, 2010.
- [43] Grace, A.J., Robertson, E.S. and McInnes, B.L., *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 73, 213-224, 2003.
- [44] Parikh, R.C., Jani, A., Melnikov, Y.V., Faubel, S., Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis, *American Journal of Kidney Disease*, Vol 43, No:3, 404-414, 2004.
- [45] Parikh, R.C., Abraham, E., Ancukiewicz, M. and Edelstein, L.C., Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit, *J. Am. Soc. Nephrol*, 16: 3046-3052, 2005.

- [46] Ercan, E., Mikroalbüminüri: Kardiyovasküler risk faktörü. Trakya Univ. Tıp. Fak. Derg. 1, 42-48, 2010.
- [47] Dickson, E.L., Wagner, C.M., Sandoval, M.R. and Molitoris, A.B., The proximal tubule and albuminuria: Really!. J. Am. Soc. Nephrol. 25, 443-453, 2014.
- [48] Gorris, L.J., Castelo-Martinez, A., Proteinuria: detection and role in native disease progression. Transplantation Reviews. 26, 3-13, 2012.
- [49] Zhai, Y.X., et all., Cubilin and megalin mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opussum kidney. Kidney International. 58, 1523-1533, 2000.
- [50] Keane, W. and Eknoyan, G., Special Report Proteinuria, Albuminuria, Risk, Assessment, Detection, elimination (PARADE): A position paper of the national kidney foundation. American Journal of Kidney Disease. 33 (5): 1004-1010, 1999.
- [51] Wui, T-M. et all., Albuminuria, proteinuria and urinary albumin to protein ratio in chronic kidney disease. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 26, 82-92, 2012.
- [52] Hemmelgran, R.B. et all., Relation between kidney function, proteinuria and adverse outcomes. JAMA. 3030 (5): 423-429, 2010.
- [53] Charlton, R.J., Portilla, D. and Okusa, D.M., A basic science view of acute kidney injury biomarkers, Nephrol. Dial. Transplant. 1-11, 2014.
- [54] Noyan, T., Şekeroğlu, R.M., Dülger, H., N-asetil- β -d-glukozaminidaz ve böbrek hastalarında kullanımı. Van Tıp Dergisi. 7 (2): 80-83, 2000.

- [55] Liangos, O. et al., Urinary N-acetyl-B-(D)- glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 904-912, 2007.
- [56] Kwiatkowska, E. et al., N-acetyl-beta-glucosaminidase urine activity as a marker of early proximal tubule damage and a predictor of the long-term function of the transplanted kidneys. *Acta Biochimica Polonica.* 61, 275-280, 2014.
- [57] Stevens, A.L., Coresh, J., Greene, T. and Levey, S.A., Assessing kidney function-measured and estimated glomerular filtration rate. *N. Engl. J. Med.* 354, 2473-83, 2006.
- [58] Omerelli, L., Biyokimya laboratuvarında ölçülen endojen kreatinin klirensi değerleri ile, Cockcroft-Gault ve MDRD formülleri ile hesaplanan GFR değerleri arasında korelasyon farkı tespiti Cerrahpaşa (316 hasta) deneyimi. Yüksek Lisans Tezi, 2010.
- [59] Husdan, H. and Papoport, A., Estimation of creatinine by the Jaffe reaction a comparison of three methods. *Clinical Chemistry.* 14 (3): 222-238, 1968.
- [60] Killard, A.J. and Smyth, M.R., Creatinine biosensors: principles and designs. *Tibtech.* 18, 433-437, 2000.
- [61] Jaffe, M., *Z. Physiol. Chem.* 10, 391-400, 1886.
- [62] Levey, A.S., Perrone, R.D. and Madias, N.E., Serum creatinine and renal function. *Ann. Rev. Med.* 39: 465-90, 1988.
- [63] Tsuchida, T. and Yoda, K., Multi-enzyme membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum. *Clinical Chemistry.* 29 (1): 51-55, 1983.

- [64] Meyerhoff, M. and Rechnitz, G.A., An activated enzyme electrode for creatinine. *Analytica Chimica Acta.* 85, 277-285, 1976.
- [65] Myers, G.L. and et all., Recommendations for improving serum creatinine measurements; A report from the laboratory working group of the national kidney disease education program. *Clinical Chemistry.* 52 (1): 5-18, 2006.
- [66] Brown, N.D., Sing, H.C., Neely, W.E. and Koetitz, S.E., Determination of “true” serum creatinine by high-performance liquid chromatography combined with a continuous-flow microanalyzer. *Clin. Chem.* 23 (7): 1281-1283, 1997.
- [67] Kock, R., Seitz, S., Delvoux, B. and Greiling, H. A., A method for the simultaneous determination of creatinine and uric acid in serum by high-performance-liquid chromatography evaluated versus reference methods. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 33, 23-29, 1995.
- [68] Yuen, P.S.T. et all., A simplified method for HPLC determination of creatinine in mouse serum. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F1116-F1119, 2004.
- [69] Haupt, K. and Mosbach, K., Molecularly imprinting polymers and their use in biomimetic sensors. *Chem. Rev.* 100, 2495-2505, 2000.
- [70] Ye, L., *Molecular imprinting principles and applications of micro-and nanostructured polymers.* 1-272, CRC press, 2013.
- [71] Bossi, A., Bonini, F., Turner, A.P.F., Piletsky, S.A., Molecularly imprinting polymers for the recognition of proteins: The state of the art. *Biosensors and Bioelectronics.* 22, 1131-1137, 2007.
- [72] Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., *Protein kromatografisi ve yeni nesil polimerik sistemler.* 1-297, Pozitif Matbaacılık, 2010.

- [73] Yan, H. and Row, H.K., Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *Int. J. Mol. Sci.* 155-178, 2006.
- [74] Demirci, B., Protein saflaştırılması için moleküler baskılanmış adsorbentler. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 2013.
- [75] Bereli, N., Andaç, M., Baydemir, G., Say, R., Galaev, I.G., Denizli, A., protein recognition via ion-coordinated meolecular imprinting supermacroporous cryogels. *Journal of Chromatography A.* 1190, 18-26, 2008.
- [76] Aşır, S., Uzun, L., Türkmen, D., Say, R., Denizli, A., Ion-selective imprinting superporous monolith for cadmium removal from human plasma. *Separation Science and Technology.* 40, 3167-3185, 2005.
- [77] Tamahkar, E., Bereli, N., Say, R., Denizli, A., Molecular imprinting supermacroporous cryogels for cytochrome c recognition. *J. Sep. Sci.* 34, 3433-3440, 2011.
- [78] Lee, S.W., Kunitake, T., *Handbook of molecularly imprinting advances sensors applications*, 1-598, CRC press, 2012.
- [79] Arshady, R., Mosbach, K., Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Makromol. Chem.* 182, 687-692, 1981.
- [80] Piletsky, S.A, Alcock, S. and Turner, A.P.F., Molecular imprinting: At the edge of third millennium. *Trends in Biotechnology.* 19, 7-10, 2001.
- [81] Bereli, N., Türkmen, D., Köse, K., Denizli, A., Glutamic acid containing supermacroporous poly(hydroxyethyl metacrylate) cryogel discs for UO^{+2} removal. *Material Science and Engineering: C.* 32 (7): 2052-2059, 2012.

- [82] Sener, G., Ozgur, E., Yilmaz, E., Uzun, L., Say, R., Denizli, A., Quarts crystal microbalance based nanosensor for lysozyme detection with lysozyme imprinted nanopaticles. *Biosensor and Bioelectronics*. 26, 815-821, 2010.
- [83] Yilmaz, E., Majidi, D., Ozgur, E., Denizli, A., Whole cell imprinting based on *Escherichia coli* sensors: A study for SPR and QCM. *Sensors and Actuators B*. 209, 714-721, 2015.
- [84] Uzun, L., Say, R., Ünal, S., Denizli, A., Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis. *Biosensor and Bioelectronics*. 24, 2878-2884, 2009.
- [85] Jakubiak, A., Kolarz, B.N., Jezierska, J., Catalytic activity of copper(II) enzyme-like catalysts, prepared by molecular imprinting technique in oxidation of phenols. *Macromol. Symp.* 235, 127-135, 2006.
- [86] Vasapollo, G., Sole, R.D., Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scarrano, S. and Mele, G., Molecularly imrinted polymers: Present and future prospective. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 5908-5945, 2011.
- [87] Sellegren, B. and Shea, K.J., Enantioselective ester hydrolysis catalyzed by imprinting polymers. *Tetrahedron: Asymmetry*. 5 (8): 1403-1406, 1994.
- [88] Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.M., Jungvid, H. and Mattioasson, B., Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest, *Trends in Biotechnology*, 21 (10), 445-451, 2003.
- [89] Ertürk, G., Mattiason, B., Cryogels-versatile tools in bioseparation. *Journal of Chromatography A*. 1357, 24-35, 2014.
- [90] Gun'ko, Y.M., Savina, I.N., Mikhalovsky, S.V., Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterization. *Advances in Colloid and Interface Science*. 187-188, 1-46, 2013.

- [91] Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. *J. Sep. Sci.* 30, 1657-1671, 2007.
- [92] Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguliar, M-R., Gomez, D., Mikhalovsky, S. and Galaev, I.Y., Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. *Soft Matter*. 1, 303-309, 2005.
- [93] Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I.Y., Bergenståhl, B. and Mattiason, B., Macroporous elastic polyacrylamide gels prepared at subzero temperatures: control of porous structure. *J. Mater. Chem.* 16, 4065-4073, 2006.
- [94] Kumar, A., Bansal, V., Andersson, J., Roychoudhury, P.K., Mattiason, B., Supermacroporous cryogel matrix for integrated isolation immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of human kidney cell line. *Journal of Chromatography A*. 1103, 35-42, 2006.
- [95] Kumar, A., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiason, B., Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. *Journal of Immunological Methods*. 283, 185-194, 2003.
- [96] Aydoğan, C., Andaç, M., Bayram, E., Say, R., Denizli, A., Molecularly imprinting cryogel for L-glutamic acid separation. *Biotechnol. Prog.* 18, 459-466, 2012.
- [97] Efremenko, E.N., Spiricheva, O.V., Veremenko, D.V., Baibak, A.V. and Lozinsky, V.I., L(+)-lactic acid production using poly(vinyl alcohol)-cryogel-entapped *Rhizopus oryzae* fungal cells. *Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 519-522, 2006.
- [98] Doretto, L., Ferrara, D., Gattolin, P., Lora, S., Schiavon, F., Veronese, F.M., PEG modified glucose oxidase immobilized on a PVA cryogel membrane for amperometric biosensor applications. *Talanta*. 45, 891-898, 1998.

- [99] Sharma, A., Bhat, S., Vishoi, T., Nayok, V. and Kumar, A., Three dimensional chitosan-gelatin cryogel matrix for tissue engineering applications. *BioMed Research International*. 1-15, 2013.
- [100] Bölgen, N., Vargel, I., Korkusuz, P., Güzel, E., Plieva, F., Galaev, I.Y., Mattiason, B., Pişkin, E., Tissue responses to novel tissue engineering biodegradable cryogel scaffolds: An animal model. *Biomed Mater. Res.* 91A. 60-68, 2009.
- [101] Sreenivasan, K., Sivakumar, R., Interaction of molecularly imprinted polymers with creatinine. *Journal of Applied Polymer Science*. 66, 2529-2542, 1997.
- [102] Subat, M., Borovik, A.S. and König, B., Synthetic creatinine receptor: Imprinting of a lewis acidic zinc(II) cyclen binding site to shape its molecular recognition selectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3185-3190, 2004.
- [103] Tsai, H-A., Syu, M-J., Synthesis and characterization of creatinine imprinted poly(4-vinylpyridine-co-divinylbenzene) as a specific recognition receptor. *Analytica Chimica Acta*. 539, 107-116, 2005.
- [104] Tsai, H-A., Syu, M-J., Synthesis of creatinine imprinted poly(β - cyclodextrin) for the specific binding of creatinine. *Biomaterials*. 26, 2759-2766, 2005.
- [105] Sreenivasan, K., Detection of creatinine enriched on a surface imprinted polystyrene film using FT-ATR-IR. *Journal of Molecular Recognition*. 19, 408-412, 2006.
- [106] Hsieh, R-Y., Tsai, H-A., Syu, M-J., Designing a molecularly imprinted polymer as an artificial receptor for the specific recognition of creatinine in serums. *Biomaterials*. 27, 2083-2089, 2006.

- [107] Lee, M-H., Tsai, T-C., Thomas, J.L., Lin, H-Y., Recognition of creatinine by poly(ethylene-*co*-vinyl-alcohol) molecular imprinting membrane. *Desalination*. 234, 126-133, 2008.
- [108] Chang, Y-S., Ko, T-H., Hsu, T-J. and Syu, M-J., Synthesis of an imprinted hybrid organic-inorganic polymer sol-gel matrix toward the specific binding and isotherm kinetics investigation of creatinine. *Anal. Chem.* 81, 2098-2015, 2009.
- [109] Syu, M-J., Hsu, T-J. and Lin, Z-K., Synthesis of recognition matrix from 4-methylamino-N-allylnaphthal-imide with fluorescent effect for the imprinting of creatinine. *Anal. Chem.* 82, 8821-8829, 2010.
- [110] Gao, B., Li, Y., Zhang, Z., Preparation and recognition performance of creatinine-imprinted material prepared with novel surface-imprinting technique. *Journal of Chromatography B*. 878, 2077-2086, 2010.
- [111] Tsai, H-A., Syu, M-J., Preparation of imprinted poly(tetraethoxysilanol) sol-gel for the specific uptake of creatinine. *Chemical Engineering Journal*. 168, 1369-1376, 2011.
- [112] Haginaka, J., Miura, C., Funaya, N. and Maysunaga, H., Monodispersed molecularly imprinted polymer for creatinine by modified precipitation polymerization. *Analytical Sciences*. 28, 315-317, 2012.
- [113] Li, T-J., Chen, P-Y., Nien, P-C., Lin, C-Y., Vittal, R., Ling, T-R., Ho, K-C., Preparation of a novel molecularly imprinted polymer by the sol-gel process for sensing creatinine. *Analytica Chimica Acta*. 711, 83-90, 2012.
- [114] Miura, C., Funaya, N., Maysunaga, H., Haginaka, J., Monodisperse, molecularly imprinted polymers for creatinine by modified precipitation

polymerization and their applications to creatinine for human serum and urine, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 85, 288-294, 2013.

- [115] Garipcan, B., Denizli, A., A novel affinity support material for the separation of immunoglobulin g from human plasma. *Macromol. Biosci.* 3, 135-144, 2002.
- [116] Chtipongtanate, S. and Thongboonkerd, V., systematic comparisons of artificial urine formulas for in vitro cellular study. *Analytical Biochemistry*. 402, 110-112, 2010.
- [117] Uzun, L., Say, R., Denizli, A., Porous poly(hydroxyethyl methacrylate) based monolith as a new adsorbent for affinity chromatography. *Reactive & Functional Polymers*. 64, 93-102, 2005.
- [118] Bereli, N., Uzun, L., Yavuz, H., Elkak, E., Denizli, A., Antibody purification using porous metal-chelate monolithic columns. *Journal of Applied Polymer Science*. 101, 395-404, 2006.
- [119] Altıntaş, E.B., Denizli, A., Monosize poly(glycidyl methacrylate) beads for dye-affinity purification of lysozyme. *International of Biological Macromolecules*. 38, 99-106, 2006.
- [120] Langmuir, I., *The Journal of the American Chemical Society*. 38 (2): 2221-2295, 1916.
- [121] McKay, G., Blair, H.S., Gardner, J.R., Adsorption of dyes on chitin I. equilibrium studies. *Journal of Applied Polymer Science*. 27, 3043-3057, 1982.
- [122] Çakır, E.Ü., Tosunoğlu, V., Bayhan, Y.K., Ceviz ağacı talaşı (*Juglans Regia* L.)'nın krom (IV) adsorpsiyonu üzerine etkileri. *Alınteri Zirai Bilimler Dergisi*. 24(B): 12-19, 2013.

- [123] Atkins, P., Paula, J.D., Atkins physical chemistry. 8th Edition, Oxford Press, 2006.
- [124] Alotman, A.A., Naushad, M., Ali, R., Kinetic, equilibrium isotherm and thermodynamic studies of Cr(IV) adsorption onto low-cost adsorbent developed from peanut shell activated with phosphoric acid. Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 3351-3356, 2013.
- [125] Dogan, M., Alkan, M., Adsorption kinetics of methyl violet onto perlite. Chemosphere. 50, 517-528, 2003.
- [126] Valdman, E., Erijman, L., Pessova, F.L.P., Leite, S.G.F., Continuous biosorption of Cu and Zn by immobilized waste biomass *Sargassum* sp. Process Biochemistry. 36, 869-873, 2001.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aykut Arif TOPÇU

Doğum Tarihi : 28.05.1981

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu : Kırıkkale Üniversitesi, 2006

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2006-2009

Yüksek Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyoloji Anabilim Dalı, 2009.

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Kırıkkale Üniversitesi.

Yayımları (SCI) :

Yayımları (Diğer) :

Araştırma Alanları : Kriyojeller, Moleküler Baskılama Teknolojisi