

**BAKTERİYEL SELÜLOZ NANOFİBERLER İLE PROTEİN
UZAKLAŞTIRILMASI**

**PROTEIN DEPLETION WITH BACTERIAL CELLULOSE
NANOFIBERS**

ILGİM GÖKTÜRK BAŞAL

**PROF. DR. ADİL DENİZLİ
TEZ DANIŞMANI**

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2016

Ilgım GÖKTÜRK BAŞAL'ın hazırladığı “Bakteriyel Selüloz Nanofiberler ile Protein Uzaklaştırılması” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sema Bektaş

Başkan

.....

Prof. Dr. Adil Denizli

Danışman

.....

Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz

Üye

.....

Doç. Dr. Bora Garipcan

Üye

.....

Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA tezi olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

24/10/2016

ILGİM GÖKTÜRK BAŞAL

ÖZET

BAKTERİYEL SELÜLOZ NANOFİBERLER İLE PROTEİN UZAKLAŞTIRILMASI

Ilgım GÖKTÜRK BAŞAL

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Ekim 2016, 88 sayfa

İnsan serum albumin (HSA) baskılanmış bakteriyel selüloz (MIP BS) kompozit nanofiberler, proteomik çalışmalarda albumin gibi yüksek yoğunlukta bulunan proteinlerin plazmadan uzaklaştırılması amacıyla hazırlanmıştır. N-metakriloil L-histidin metil ester (MAH) monomeri spesifik tanıma bölgeleri oluşturmak için sentezlenmiştir. MAH monomeri ile Cu^{+2} iyonu arasında kompleks oluşumundan sonra metal iyon koordinasyon etkileşimleri kullanılarak MAH- Cu^{+2} monomeri ve HSA hedef molekülleri ile önkomples hazırlanmıştır. MIP BS kompozit nanofiberler farklı toplam % monomer oranlarında ve farklı monomer/hedef molekül mol oranlarında hazırlanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları için FTIR-ATR, SEM, BET ve temas açısı ölçümleri yapılmıştır. Adsorplanan protein molekülleri polimerik yapıdan 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılarak desorbe edilmiştir. Adsorpsiyon çalışmaları farklı pH, sıcaklık ve iyonik şiddette gerçekleştirilmiş ve adsorpsiyon kapasitesi spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Uygun denge izoterm modeli Langmuir izotermi olarak belirlenmiştir. Bu sistem için hız sınırlayıcı basamağın kimyasal reaksiyon olmasından dolayı yalancı-ikinci derece kinetik modelin bu sisteme daha uygun olduğu belirlenmiştir. MIP BS kompozit nanofiberlerin seçiciliğinin değerlendirilmesi için hedef moleküle benzer yapıda olan insan miyoglobin (Myo) ve insan transferrin (HTr) proteinleri kullanılmıştır. MIP BS kompozit nanofiberlerin bağıl seçicilik katsayısı HSA/HTr ve HSA/Myo molekül çifti için sırasıyla 4.73 ve 3.02 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, moleküler baskılanmış polimerler

hazırlanırken metal iyon koordinasyonu etkileşimlerinin spesifik bağlanma bölgeleri oluşturmada katkısının olduğu tespit edilmiş, protein baskılama işleminin yüksek adsorpsiyon kapasitesi ile başarılı bir şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bakteriyel selüloz nanofiberler, metal-iyon koordinasyonu, moleküler baskılanmış polimerler, protein tanıma, proteomiks.



ABSTRACT

PROTEIN DEPLETION WITH BACTERIAL CELLULOSE NANOFIBERS

Ilgım GÖKTÜRK BAŞAL

Doctor of Philosophy, Nanotechnology and Nanomedicine Division

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

October 2016, 88 pages

Human serum albumin (HSA) imprinted bacterial cellulose (MIP BC) composite nanofibers were synthesized to deplete high abundance proteins such as albumin for proteomics studies. N-methacryloyl-L-histidine methyl ester (MAH) was synthesized to create specific binding sites. After the complexation between MAH and chelating metal ion, Cu^{+2} , the preorganized complex was prepared by MAH- Cu^{+2} monomer and HSA template molecules via metal ion coordination interactions. HSA imprinted bacterial cellulose composite nanofibers were prepared in the presence of different amounts of total monomer weight (%) and monomer/template ratio. FTIR-ATR, SEM, BET and contact angle measurements were carried out for characterization of bacterial cellulose composite nanofibers. 1.0 M NaCl solution was used for desorption of adsorbed proteins from the polymer network. Adsorption studies were performed with respect to pH, temperature and ionic strength and the adsorption capacity was evaluated spectrophotometrically. The suitable equilibrium isotherm model was determined as Langmuir isotherm. It was determined that pseudo-second order kinetic model was more convenient to this system referring chemical reaction as a rate limiting step. To evaluate the selectivity of the MIP BC composite nanofibers, similar proteins were utilized as competitor proteins, which were human myoglobin (Myo) and human transferrin (HTr). The relative selectivity coefficients of MIP BC composite nanofibers for HSA/HTr and HSA/Myo

pairs were calculated as 4.73 and 3.02, respectively. Consequently, while preparing molecularly imprinted polymers, metal ion coordination interactions were found to contribute for the fabrication of specific recognition binding sites with imprinting of the template protein successfully with high adsorption capacity.

Key words: Bacterial cellulose nanofibers, metal-ion coordination, molecular imprinted polymers, protein recognition, proteomics.



TEŞEKKÜRLER

Zor zamanlarımda moral veren pozitif konuşmalarıyla beni cesaretlendiren, bu tez çalışmasının bitirilmesinde her türlü laboratuvar imkanlarından yararlandığım, saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Bilimsel sorunların üstesinden gelmemde karşılıksız bir özveriyle bana destek olan, tezin olgunlaşmasında emeği büyük hocam Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a ve tez çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Emel Tamahkar Irmak'a,

Tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz, Doç. Dr. Nilay Bereli, Doç. Dr. Bora Garipcan, Doç. Dr. Deniz Türkmen, Doç. Dr. Gözde Baydemir, Dr. Işık Perçin Demirçelik, Doç. Dr. Lokman Uzun ve Doç. Dr. Müge Andaç'a,

İyi günde kötü günde yanımda olan, desteklerini her zaman hissettiğim, beraber ağlayıp beraber gülebildiğim güzel yürekli arkadaşlarım Dr. Monireh Bakhshpour Yücel, Semra Akgönüllü ve Yeşeren Saylan'a,

Parçası olmaktan mutluluk duyduğum BIOREG ailesinin üyeleri Dr. Ali Derazshamshir, Dr. Aykut Arif Topçu, Bahar Ergün, Canan Armutcu, Duygu Sarı, Duygu Çimen, Erdoğan Özgür, Fatma Kartal, Dr. Gülsu Şener, İlker Koç, Kemal Çetin, Meltem Koca Esentürk, Dr. Sevgi Aslıyüce Çoban, Sabina Hüseyinli, Seda Koyun ve Sona Nouri'ye,

Bu zorlu süreçte en büyük destekçim, hayat arkadaşım Sinan Başal'a ve kendisini istemeden olsada yorduğum, kucağımıza alacağımız günü sabırsızlıkla beklediğimiz minik misafirimiz Ali Erdem'e,

ve beni her türlü özveriyle büyütüp okutan, bu günlere gelmem de emeklerini ödeyemeyeceğim annem Seher Göktürk ve babam M. Tevfik Göktürk'e ve kardeşim Alihan Göktürk'e,

teşekkürlerimi borç bilirim.

Ekim 2016

Ilgım Göktürk Başal

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER.....	ix
ÇİZELGELER	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Bakteriyel Selüloz ve Özellikleri	3
2.1.1. Selüloz Kaynakları	5
2.1.2. Bakteriyel Selülozun Biyokimyası.....	7
2.1.3. Bakteriyel Selüloz Temelli Ürünler ve Patentler	7
2.1.4. Bakteriyel Selüloz Uygulamaları	10
2.2. Proteomiks	13
2.2.1. İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi (İMAK) ve Proteomiks Uygulamaları	17
2.3. Biyomakromoleküler Baskılama.....	19
2.3.1. Protein Baskılama	21
2.3.1.1. Yığın Baskılama	22
2.3.1.2. Yüzey Baskılama.....	23
2.3.1.3. Epitop Baskılama	24
2.4. Moleküler Baskılamada Metal İyon Koordinasyonu.....	26
2.4.1. Metal Koordinasyon Etkileşimlerine Dayanan Moleküler Baskılanmış Polimerler	27
2.4.2. Yüzeyi Modifiye Edilmiş Metal Koordinasyonlu Baskılanmış Polimerler.....	30
2.5. İnsan Serum Albuminin (HSA) Yapısı.....	31
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	33
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	33
3.2. Bakteriyel Selüloz Üretimi	33
3.3. N-Metakriloil-L-Histidin Metil Ester (MAH) Monomerinin Sentezi	34
3.4. MAH-Cu ⁺² HSA Kompleksinin Hazırlanması.....	34
3.5. MIP ve NIP BS Kompozit Nanofiberlerin Hazırlanması	35
3.6. Karakterizasyon Çalışmaları.....	36

3.6.1. Bakteriyel Selüloz (BS) Kompozit Nanofiberlerin Şişme Özelliği	36
3.6.2. BS Kompozit Nanofiberlerin Yüzey Morfolojisi.....	36
3.6.3. BS Kompozit Nanofiberlerin BET ile Yüzey Alanı Ölçümü	36
3.6.4. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi -Azaltılmış Toplam Yansıma (FTIR-ATR) Analizi	37
3.6.5. BS Kompozit Nanofiberlerin Temas Açığı Ölçümü	37
3.7. Adsorpsiyon Çalışmaları	37
3.7.1. Sulu Çözeltilerden HSA Adsorpsiyonu	37
3.7.2. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	38
3.7.3. Seçicilik Çalışmaları.....	38
3.8. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	39
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	40
4.1. Karakterizasyon Çalışmaları.....	40
4.1.1. MAH Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	40
4.1.2. MAH-Cu ⁺² HSA Kompleksinin Hazırlanması.....	41
4.1.3. BS Kompozit Nanofiberlerin Şişme Özellikleri	42
4.1.4. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi	43
4.1.5. BET ile Yüzey Alanı Ölçümü	49
4.1.6. FTIR-ATR Analizi	50
4.1.7. Temas Açığı Ölçümü	50
4.2. Adsorpsiyon Çalışmaları	52
4.2.1. Monomer/Kalıp Molekül Oranı Etkisi	54
4.2.2. Toplam Monomer Oranı Etkisi	55
4.2.3. pH Etkisi	55
4.2.4. Başlangıç HSA Derişiminin Etkisi.....	56
4.2.5. Adsorpsiyon Süresinin Etkisi.....	57
4.2.6. İyonik Kuvvetin Etkisi	58
4.2.7. Sıcaklığın Etkisi	59
4.3. Adsorpsiyon İzotermi	60
4.4. Adsorpsiyon Kinetik Model Çalışmaları	66
4.5. Termodinamik Hesaplamalar	70
4.6. Seçicilik Çalışmaları.....	71
4.7. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	74
4.8. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	75
4.9. Literatür Karşılaştırması	75
5. SONUÇ	79

KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	88



ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Bakteriyel nanoselüloz (BNS) ve çeşitli Gluconacetobacter suşlarının ağsı yapısı. .	4
Şekil 2.2. Farklı büyütme oranlarındaki mikrofibrillerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri...	5
Şekil 2.3. Selüloz üretim yolları	6
Şekil 2.4. Biyo-şekillenmiş BNS hidrojel malzemeler.....	7
Şekil 2.5. Sıklıkla kullanılan monomer, çapraz bağlayıcı ve BNS kompozit malzemeler	9
Şekil 2.6. Bakteriyel selüloz temelli yayınlar	10
Şekil 2.7. Selüloz membran yüzeyine propranolol enantiyomeri ile moleküler baskılanmış polimer modifikasyonu	13
Şekil 2.8. Genel olarak proteomiks çalışma prensibi	14
Şekil 2.9. Plazma proteinlerinin bulunma bollukları.....	15
Şekil 2.10. Metal şelatlı afinite desteğe protein bağlanması.....	18
Şekil 2.11. Proteomiks çalışmalardaki potansiyel İMAK uygulamaları	19
Şekil 2.12. Yıllara göre yayınlanan makromoleküler baskılama makalelerinin sayısı [52]	20
Şekil 2.13. 1994-2010 yılları arasında literatürdeki makromoleküler MIP'ların ortak bileşenlerinin bağıl frekansı.	22
Şekil 2.14. Beş ana moleküler baskılama yöntemi.....	25
Şekil 2.15. bis-imidazol substratları için moleküler baskılanmış metal koordinasyon yapan polimerlerin hazırlanması	29
Şekil 2.16. Poli(TRIM) partiküller kullanarak yüzey baskılanmış metal-koordinasyonlu polimerlerin hazırlanması	31
Şekil 2.17. İnsan serum albuminin (HSA) yapısı.....	32
Şekil 3.1. MAH-Cu ⁺² HSA kompleksinin oluşumu	35
Şekil 4.1. MAH monomerinin sentez reaksiyonu	40
Şekil 4.2. MAH ve MAH-Cu ⁺² monomerine ait FTIR-ATR spektrumları	41
Şekil 4.3. MAH-Cu ⁺² HSA komplekslerinin UV-vis spektrumları	42
Şekil 4.4. BS, MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin % şişme kapasiteleri.....	43
Şekil 4.5. Bakteriyel selüloz (BS) nanofiberlerin farklı büyütme oranlarındaki (a-50 000X, b-100 000X) SEM görüntüsü ve fiber çapı dağılım grafiği	45
Şekil 4.6. MIP BS kompozit nanofiberlerin farklı büyütme oranlarındaki (a-20 000X, b-50 000X, c-100 000X) SEM görüntüsü ve fiber çapı dağılım grafiği.....	47
Şekil 4.7. NIP BS kompozit nanofiberlerin farklı büyütme oranlarındaki (a-20 000X, b-50 000X, c-100 000X) SEM görüntüsü ve fiber çapı dağılım grafiği.....	49
Şekil 4.8. MAH-Cu ⁺² kompleksinin, BS ve MIP BS kompozit nanofiberlerin FTIR-ATR spektrumu.....	50
Şekil 4.9. BS, MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin temas açısı görüntüleri	52
Şekil 4.10. Monomer/kalıp molekül oranlarının MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 1.0 mg/mL, pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C	54
Şekil 4.11. Kütlece toplam monomer oranlarının MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 1.0 mg/mL, pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C	55
Şekil 4.12. pH değerinin MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 1.0 mg/mL, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C	56
Şekil 4.13. Başlangıç HSA derişiminin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C.....	57

Şekil 4.14. Adsorpsiyon süresinin MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 2.0 mg/mL, pH: 6.0, sıcaklık: 25°C	58
Şekil 4.15. Tuz derişiminin MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 1.0 mg/mL pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C.....	59
Şekil 4.16. Farklı sıcaklıkların MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 1.0 mg/mL, pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak.	60
Şekil 4.17. Küçük moleküllerin (A) ya da protein gibi büyük moleküllerin (B) bakteriyel selüloz nanofiber yüzeyine adsorpsiyonunun şematik gösterimi	61
Şekil 4.18. MIP BS kompozit nanofiberler için Langmuir izotermi. pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C	62
Şekil 4.19. NIP BS kompozit nanofiberler için Langmuir izotermi. pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C	63
Şekil 4.20. MIP BS kompozit nanofiberler için Freundlich izotermi. pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C	64
Şekil 4.21. NIP BS kompozit nanofiberler için Freundlich izotermi. pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C	65
Şekil 4.22. MIP BS kompozit nanofiberler için yalancı birinci derece kinetik grafiğı	68
Şekil 4.23. NIP BS kompozit nanofiberler için yalancı birinci derece kinetik grafiğı.....	68
Şekil 4.24. MIP BS kompozit nanofiberler için yalancı ikinci derece kinetik grafiğı	69
Şekil 4.25. NIP BS kompozit nanofiberler için yalancı ikinci derece kinetik grafiğı	69
Şekil 4.26. Kalıp molekül (HSA) ve yarışmacı moleküller (HTr ve Myo) için MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin seçicilik çalışmaları	73
Şekil 4.27. SDS-PAGE görüntüsü.....	74
Şekil 4.28. MIP BS kompozit nanofiberlerin tekrar kullanılabilirliğini gösteren adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü. Desorpsiyon koşulları: 1.0 M NaCl çözeltisi, başlangıç HSA derişimi: 1.0 mg/mL; etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C.....	75

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Bakteriyel selüloz temelli ürünler	8
Çizelge 2.2. Bakteriyel selülozun biyokimyasal özellikleri ve olası uygulama alanları	11
Çizelge 2.3. MIP ile doğal tanıma elemanlarının karşılaştırılması	20
Çizelge 2.4. Farklı bis-imidazol türevleri için moleküler baskılanmış metal koordinasyon yapan polimerler.....	30
Çizelge 3.1. Hestrin-Schramm sıvı besi yeri	33
Çizelge 4.1. MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin BET analizi sonuçları	49
Çizelge 4.2. HSA adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon değerleri.....	66
Çizelge 4.3. MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler için birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri	70
Çizelge 4.4. MIP BS kompozit nanofiberlerin termodinamik parametreleri	71
Çizelge 4.5. HSA, HTr ve Myo moleküllerin K_d , k ve k' değerleri	73

SİMGELER ve KISALTMALAR

BS	Bakteriyel selüloz
BNS	Bakteriyel nanoselüloz
HSA	İnsan serum albumin
MIP	Moleküler baskılanmış polimerler
MIP BS	HSA baskılanmış bakteriyel selüloz kompozit nanofiber
NIP BS	HSA baskılanmamış bakteriyel selüloz kompozit nanofiber
Ma	Moleküler ağırlık
kDa	Kilodalton
GPa	Gigapaskal
pI	İzoelektrik nokta
MAH	N-Metakriloil-(L)-histidin metil ester
FTIR-ATR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi-Azaltılmış Toplam Yansıma
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
BET	Brunauer, Emmet ve Teller
FDA	Amerikan Gıda ve ilaç İdaresi

1. GİRİŞ

Serum ve plazma esaslı proteomik çalışmalarda başlangıç basamağı, albumin ve yüksek miktarda bulunan diğer proteinlerin (immunoglobulin, transferrin, haptoglobin) uzaklaştırılmasıdır. Düşük miktarda bulunan potansiyel protein biyobelirteçler bu sayede keşfedilmektedir. Albumin proteini de bir biyobelirteçtir. Örneğin, miyokardiyal iskemi sonucunda insan serum albumin (HSA)'da konformasyonel bir değişiklik meydana gelir. Ayrıca, protein ve peptidlere bağlanan HSA kanser biyobelirteci olarak kullanılma potansiyeline sahiptir [1]. HSA negatif yüklü, yüksek çözünürlüğe sahip, ligand bağlayıcı ve taşıma özellikleri iyi bilinen insan serumunda en bol miktarda bulunan proteindir. Toplam serum protein miktarının yaklaşık % 50'sini oluşturur. Albumin ilaçlara (ibuprofen ve diazepam), metal iyonlarına, peptitlere (interferon, insülin) ve proteinlere (serum amiloyid A ve streptokokal G) bağlanabilir. Son zamanlarda araştırmacılar, albuminom (albumine bağlanan peptid ve proteinler) karakterizasyon çalışmalarına odaklanmıştır. Albuminomun bir serum ve plazma subproteomu olduğu gösterilmiştir. Proteom analizi için sadece albumin ve immunoglobulinlerin (serum proteinlerinin % 80'inden fazlası) uzaklaştırılması bile belirgin bir iyileştirme sağlamaktadır. Yüksek yoğunluklu proteinlerin uzaklaştırılması için etkinliği fazla ve ucuz bir yöntemin bulunması fazlasıyla önemlidir.

Moleküler baskılama, ilgilenilen analit için seçici tanıma bölgelerine sahip polimerlerin hazırlanmasında kullanılan bir yöntemdir. Moleküler baskılama yöntemi ile hazırlanan taşıyıcılar hedef moleküle yüksek seçicilik göstermesi nedeniyle önemlidir. Biyolojik moleküller ile metal iyon koordinasyonu özgüllük ve kararlılığından dolayı tercih edilmektedir. Metal-şelat etkileşimli baskılamada, metal şelat etkileşimleri, bağlanma gücü ve seçiciliği açısından sulu çözeltilerdeki elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları ile karşılaştırıldığında kovalent etkileşimlere daha çok benzer. Bununla birlikte hedef molekülün yapıdan uzaklaştırılması kovalent baskılamada olduğu kadar güç değildir. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP), moleküler tanımaya elverişli, ucuz ve kolaylıkla hazırlanabilirler.

Selüloz; bitkiler, hayvanlar ve bakteriler gibi geniş bir canlı grubu tarafından sentezlenebilen ve dünyada en çok bulunan ürünlerdendir. Bakteriyel selüloz (BS) doğal yollarla sentezlenen bir nanomalzemedir. BS ile ilgili olarak gün geçtikçe artan yayın sayısı, dünyadaki birçok farklı araştırma grubunun ilgisini çektiğini gösterir.

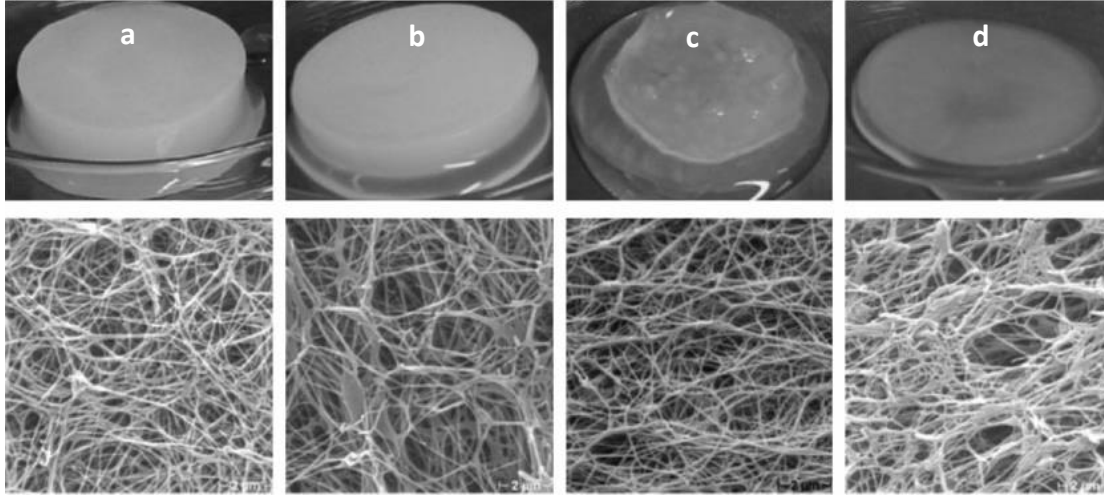
Bu tez çalışmasında, HSA baskılanmış bakteriyel selüloz kompozit nanofiberlerin, proteomik çalışmalar için önemi olan plazmadan albumin uzaklaştırılması amacıyla kullanımları araştırılmıştır. Moleküler baskılama metal şelat etkileşimi ile gerçekleştirilmiştir. İlk önce, metal şelatlayıcı monomer olan N-Metakriloil-L-histidin metil ester (MAH), metakriloil klorür ve L-histidin metil ester reaksiyonu ile sentezlenmiş ve daha sonra bakır iyonları ile önkompleks oluşturarak metal şelatlayıcı monomer (MAH-Cu⁺²) elde edilmiştir. HSA moleküllerinin eklenmesiyle kararlı üçlü kompleks oluşturulmuştur. Çapraz bağlayıcı ile polimerizasyon sonrasında kalıp molekül kompozit yapıdan uzaklaştırılmıştır. HSA baskılanmış BS kompozit nanofiberlerin karakterizasyonları BET, FTIR-ATR, SEM ve temas açısı ölçümleriyle gerçekleştirilmiştir. Optimum polimerizasyon koşullarını belirlemek için monomer/kalıp molekül oranı ve toplam monomer oranı etkisi araştırılmıştır. HSA baskılanmış BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon özellikleri, farklı deneysel koşullar altında sulu ortamda kesikli sistem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 1.0 M NaCl çözeltisi ile desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Uygun bağlanma denge izoterminin Langmuir adsorpsiyon izoterm modeline uyduğu görülmüştür. Seçicilik çalışmaları insan transferrin (HTr) ve miyoglobin (Myo) molekülleri ile yapılmıştır. HSA baskılanmış BS kompozit nanofiberlerin HTr için 4.73; Myo için ise 3.02 kat daha seçici olduğu görülmüştür.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Bakteriyel Selüloz ve Özellikleri

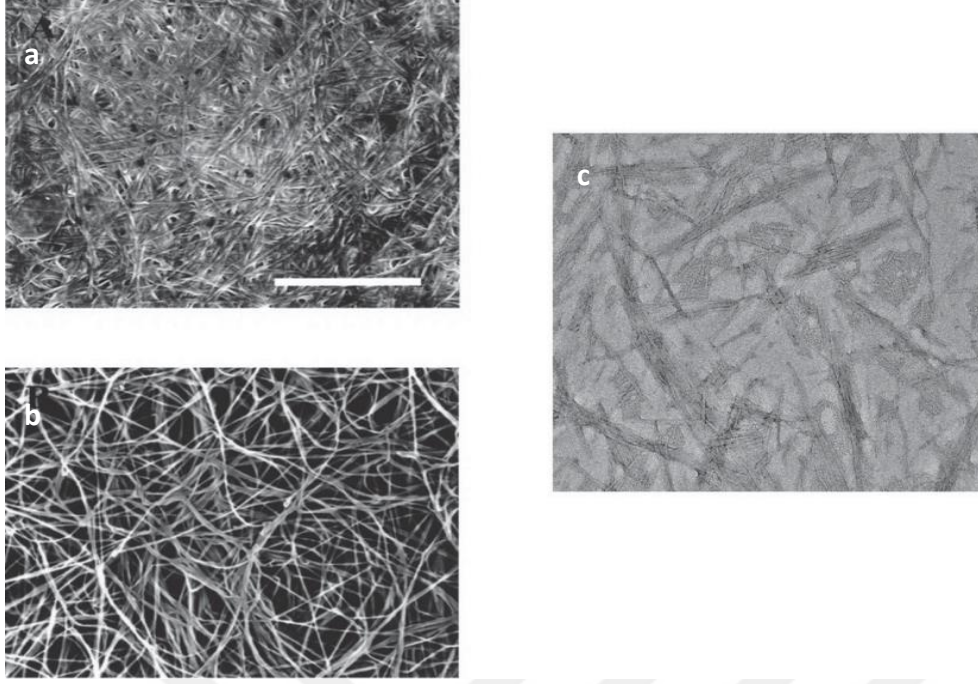
Selüloz; bitkiler, hayvanlar ve bakteriler gibi geniş bir canlı grubu tarafından sentezlenen ve dünyada en çok bulunan ürünlerdendir. Hayvanlar aleminde en basit omurgalılar olarak bilinen tulumlulardan *Microcosmus fulcatus* gibi canlılar çubuk benzeri kristal selüloz üretme özellikleriyle eşsizdirler. Bitkiler asıl selüloz üreticileri olmasına rağmen, bakteriler tarafından sentezlenen selüloz yüksek saflığa (lignin, hemiselüloz, pektin ve bitkisel selülozla ilişkili diğer bileşenleri içermez) yüksek polimerizasyon derecesine, yüksek kristaliniteye (% 60-90), yüksek su tutma kapasitesine, yüksek elastik özelliğe ve mekanik kararlılığa (özellikle ıslak formda) sahiptir [2-3].

Bakteriyel selülozun tarihi, J.M. Brown tarafından ilk kez tanımlandığı 1886 yılına kadar uzanmaktadır. BS poliesterler, poliamidler ve inorganik polianhidridler gibi ekzopolisakkarid kategorisinde yer almaktadır. Selüloz üretiminde kullanılan bazı bakteriler arasında α -proteobakteriler, β -proteobakteriler, γ -proteobakteriler (gram-negatif) ve gram-pozitif bakteriler bulunmaktadır [4]. Selüloz sentezleyen başlıca bakteriler, *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* ve *Sarcina* cinslerine ait olan türlerdir. Bakteriyel selülozun biyosentezi bu bakterilerde aynıdır ama yapısı organizmaya göre farklılık gösterebilir [5]. Selüloz üreticileri arasında en iyi olanı *Acetobacter xylinum* (*A. xylinus*) olmakla birlikte *Gluconacetobacter* grubundaki *G. hansenii*, *G. europaeus*, *G. oboediens* ve *G. intermedius* da önemli selüloz üreticisi suşlardır (Şekil 2.1). BS, ayrıca laboratuvar koşullarında üretilebilir ve yöresel bir Doğu Asya şekerlemesi olan *nata de coco* gibi yiyeceklerin hazırlanmasında kullanılır (Şekil 2.2) [6].



Şekil 2.1. Bakteriyel nanoselüloz (BNS) ve çeşitli *Gluconacetobacter* suşlarının ağsı yapısı. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, büyütme 10,000X a) DSM 14666, b) ATCC 53582, c) ATCC 23769, d) ATCC 10245 [7]

Biyokimyasal olarak selüloz, β -1,4 glikozidik bağlarıyla bağlanmış uzun zincirli anhidroglukoz birimlerinin kondenzasyon polimerizasyonu sonucu oluşmuş bir polisakkarittir. Bitkilerde 36 bağımsız selüloz molekülü zinciri hidrojen bağları ile biraraya gelerek 50 nm çapında amorf ve kristal bölgeleri olan ‘mikrofibriller’ oluşturur [6]. Selüloz mikrofibriller Herrik ve ark. ile Tubark ve ark. tarafından 1983 tarihinde mekanik parçalama ile bitki hücresinden (ağaç gövdesi) ekstrakte edilmiştir [2]. Bitki selülozu, BS’ye benzemeyen bir şekilde lignoselülozik polimer olarak üretilir. Selüloz, fibrillerden farklı olarak nanokristal selüloz (NKS) şeklinde var olabilir ve asit hidrolizi ile elde edilen negatif formunun yüksek-özgül kuvveti, özgül yüzey ve fizikokimyasal özellikleri vardır [8].



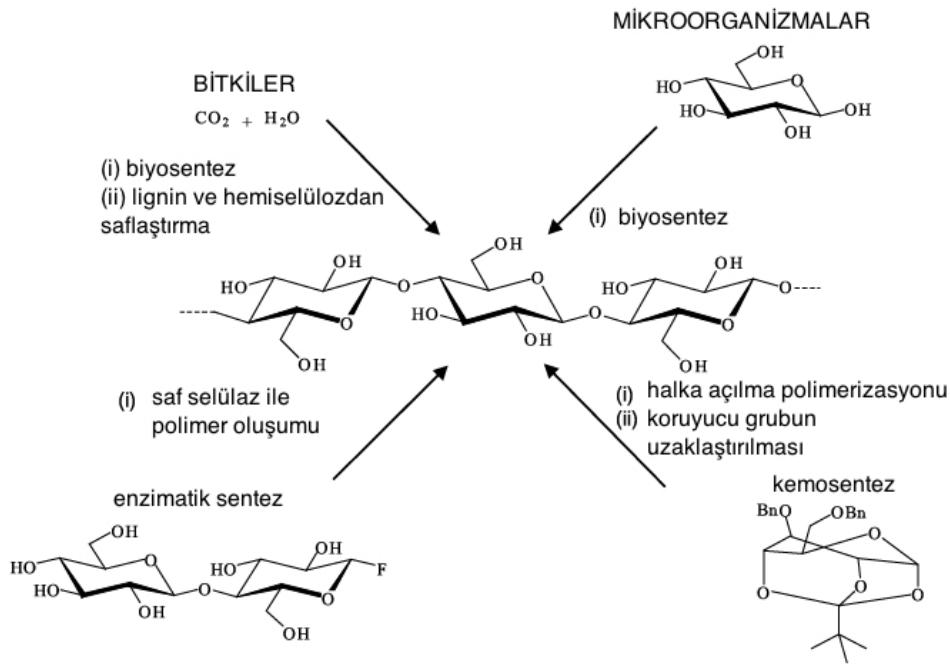
Şekil 2.2. Farklı büyütmelelerdeki mikrofibrillerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (a ve b) ve *nata de coco*'dan elde edilen nanokristallerin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (c) [6].

Model organizma *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*) tarafından sentezlenen bakteriyel selüloz (BS) yüksek kristal yapısıyla en çok kullanılan BS kaynağıdır. Çok yönlü BS'nin sentezi ve translokasyonu, BSsA ve BSsB aracılı proteinler ile kolaylaştırılmış taşınım ile gerçekleştiği model organizma *Rhodobacter spheroids*'te gösterilmiştir [9]. BS biyoyumlu, esnek, gözenekli yapısıyla vücudumuzdaki kollajene benzer özellikler gösterir. Selüloz, yüksek sıcaklıklardaki kararlılığı sayesinde ısı sterilizasyona uygundur [10]. Sodyum hidroksit kullanılarak saflaştırılabilir olması ve endotoksin değerinin sınırın altında olmasıyla Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından implant olarak kullanımı onaylanmıştır. Böylece BS'nin potansiyel olarak intravenöz uygulamalarda güvenilir kullanımı söz konusudur [6].

2.1.1. Selüloz Kaynakları

Bazı algler ve mantarlar, bakteri tarafından üretilmiş selüloza benzer yapıda selüloz üretir ve bu üçü birlikte mikrobiyal selüloz olarak isimlendirilir [11]. Bu organizmalar çeşitli yiyecek üretim süreçlerinde kullanılır ve ticari olarak Hestrin ve Schramm besiyeri (maya ekstraktı, pepton ve çözeltiler) ile birlikte kullanılır [12]. Amaca uygun olarak besi yerinin değiştirilmesi söz konusudur. Farklı besi yerleri farklı karbon kaynakları içerir. Glukoz,

galaktoz, gliserol ve mannitol kullanılan polisakkaritlere örnektir [13]. Son yıllarda, endüstriyel kalıntılar mikrofibriller BS üretiminde kullanılmaktadır. Kullanılan karbon kaynakları, BS yapısını ve özelliklerini, bakteri suşu ve besi ortamı kadar etkiler. Sıcaklık ve pH diğer önemli iki parametredir. Optimum biyosentezin 30°C ve pH 3.8'den 7.5'e kadar olduğu şartlarda gerçekleştiği rapor edilmiştir [6]. Kültür süresi de önemlidir. BS sentezinin 6 güne kadar arttığı ancak polimerizasyon derecesinin 28 günden sonra azaldığı gösterilmiştir [14].



Şekil 2.3. Selüloz üretim yolları [12]

Biyopolimer selüloz üretmek için dört farklı yolak tanımlanmıştır. En popüler ve endüstriyel önemi olan yolak, lignin ve hemiselüloz uzaklaştırılarak bitkilerden selüloz saflaştırılmasıdır. İkinci yolak, farklı organizmalardan selülozun biyosentezidir. Algler (*Vallonia*), mantarlar (*Saprolegnia*, *Dictyostelium discoideum*) ya da bakteriler (*Acetobakter*, *Akromobakter*, *Aerobakter*, *Agrobakterium*, *Pseudomonas*, *Rizobium*, *Sarcina*, *Alkaligenes*, *Zoogloea*) literatürdeki bilinen organizmalardır. Ancak bu bakteriyel türlerin hepsi ekstraselüler olarak selüloz sentezlemez. Selülozun enzimatik olarak sellobiyosil floridden başlayarak *in vitro* sentezlenmesi ve benzillenmiş türevlerinin halka açılma polimerizasyonu ile glulozdan ilk kimyasal sentezi bilimsel açıdan önemlidir. Bu yolların hepsi şematik olarak Şekil 2.3'te gösterilmiştir.

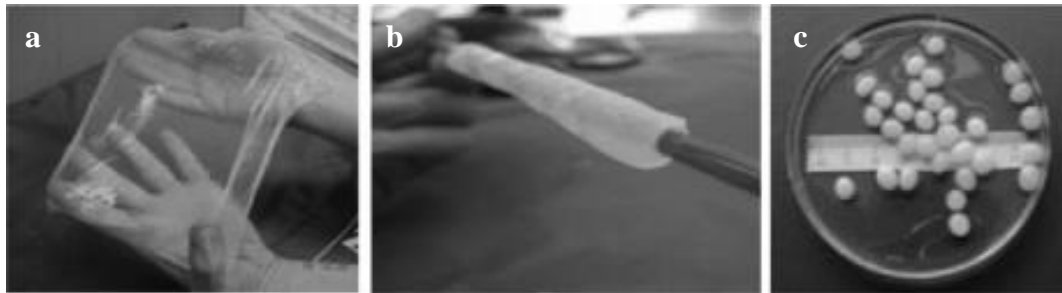
2.1.2. Bakteriyel Selülozun Biyokimyası

Doğal selüloz gibi BS'nin temelinde hidrojen bağlarının varlığı yatar. Fakat BS daha küçük çaplı ve sayıca fazla fibril içerir ve hatta daha güçlü hidrojen bağlarına sahiptir. BS asit hidrolizine maruz kalmadığı sürece mikrofibril olarak sentezlenir. Hidrojen bağlarının işlem görmesiyle çözündürme, kimyasal modifikasyon, polimerizasyon ya da depolimerizasyon mümkündür. Bazı durumlarda, hidrojen bağları gliserol ya da etilen glikol gibi diğer moleküller ile etkileşerek yüksek bağlanma afinitesi gösterir [15]. Diğer taraftan çözünürlük ile ilgili olarak, sadece hidrojen bağlarını zayıflatan çözücülerin başarılı olduğu kanıtlanmıştır.

Hidrojen bağının BS'nin biyomedikal ve farmasötik uygulamalarındaki etkisini raporlayan fazla çalışma olmadığı için hidrojen bağının BS'nin karakteristik mekanik özelliklerinden sorumlu olup olmadığını söylemek zordur. BS'nin yüksek mekanik özellikleri ve kristal yapısı elastik modülünden kaynaklanır. BS'nin elastik modülüsü tek bir fiber için atomik kuvvet mikroskobu ile 78 GPa, Raman spektroskopisi ile 114 GPa olarak belirtilmiştir [16-17].

2.1.3. Bakteriyel Selüloz Temelli Ürünler ve Patentler

FDA tarafından onaylanmış ürünler farklı klinik uygulamalar için tasarlanmış olup Çizelge 2.1'de gösterilmiştir. Fermentasyon ile bakteriyel selüloz oluşumu *in situ* olarak şekillendirme sağlar (Şekil 2.4). Bu biyo-şekil verme işlemi ile kültürasyon sırasında düz malzemeler a) kaplama, folyo, b) içiboş tüp, c) küre fiberler elde edilir. Çalkalamalı kültürasyon koşullarında (sallama ve karıştırma) bakteriyel nanoselüloz (BNS) oluşumu küre şeklindedir [7].

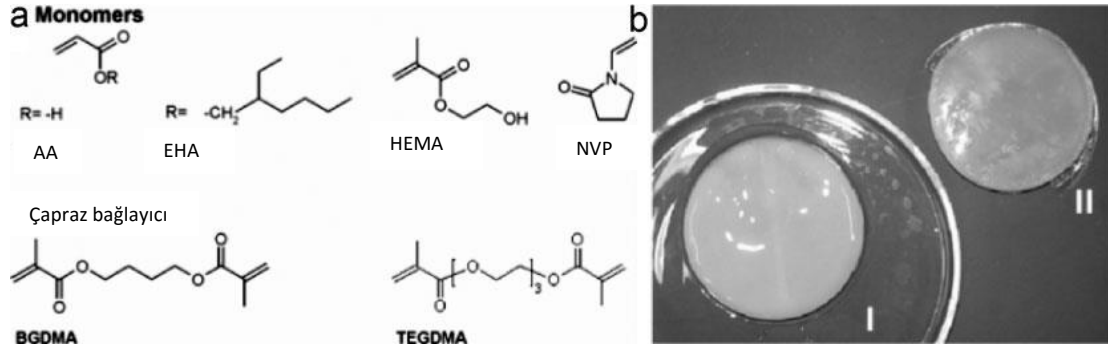


Şekil 2.4. Biyo-şekillenmiş BNS hidrojel malzemeler: a) folyo (kalınlık 200 mm); b) damar implantı olarak tüp (15 cm uzunluk, 6 mm iç çap); c) 80-100 rotasyon hızında sallamalı kültürasyon ortamında üretilmiş küreler (2-3 mm çap) [7].

Çizelge 2.1. Bakteriyel selüloz temelli ürünler [6]

Ürün	Çeşit	Klinik Kullanım	Şirket
Basyc	Damarıçi implant(tüp)	Kalp arteri by-pass ameliyatı	Jenpolymer materials Ltd.&Co.
Bio Fill	Yara iyileştirici	Yanıklar	Robin goad
Bioprocess	Yapay deri	Yanıklar	Biofill Produtos Biotechnologicos
Cellulon	Bağlayıcı madde	Medikal uygulamalar	CP Kelco
CellulonPX microfibrus cellulose	Süspansiyon ajanı	Partiküllerin süspansiyonu, enzimlerin enkapsülasyonu	CP Kelco
CelMat (C) MG & CelMat (R) MG	Koruyucu giysi/ceket	Maden işçilerini potansiyel yanıktan koruma	Polonya Hükümeti
Dermafill	Yara iyileştirici yama	Yanıklar	Fibrocel
Gengiflex	Selüloz membran	Periodontitis	Biofill Produtos Biotechnologicos
Mineral trioksit Agregat koruyucu doku	Biyoyumlu implant	Yaralanma ve iyileşme tedavisi	Xylos corporation
Securian	Doku yenileyici matris	Tendon onarımı	Xylos corporation

Kramer ve ark., hiç kurutulmamış yöntem kullanılarak BNS modifiye etmiş ve BNS/sentetik polimer kompozitler hazırlamıştır [18]. Akrilat, metakrilat monomerleri ve merakrilat çapraz bağlayıcı (Şekil 2.5a) kullanılarak etanolde şişirilmiş BNS nanofiber ağ fotopolimerleştirilmiştir (Şekil 2.5b-I). Sonuçta kollajen benzeri bir malzeme (Şekil 2.5b-II) elde edilmiştir. BNS'nin, şekil, nanofiber ağ yapısı, gözenekliliği, biyoyumluluğu gibi özellikleri aynı kalmıştır. Monomeri farklı derişimlerde kullanarak hem gözenekleri doldurma hem de fiber kaplama ile BNS kompozitler elde edilmiştir. Optimize edilmiş kompozit malzeme, 5-20 MPa Young's modulus özelliğindeki saydam kıkırdak yapısına sahiptir.



Şekil 2.5. Sıklıkla kullanılan monomer, çapraz bağlayıcı ve BNS kompozit malzemeler. a) monomerler ve çapraz bağlayıcılar: AA (akrilik asit), EHA (2-etilhekzil akrilat), HEMA (2-hidroksietil metakrilat) NVP (N-vinil piroldon), BGDMA (1,4-bütandiol dimetakrilat), TEGDMA (trietilen glikol dimetakrilat), b-I) başlangıç malzemesi: hiç kurutulmamış BNS ince zar (cam tüpte şekillendirilmiş) sudan etanole çözücü değişimi yapıldıktan sonra ve b-II) BNS-sentetik kompozit polimer.

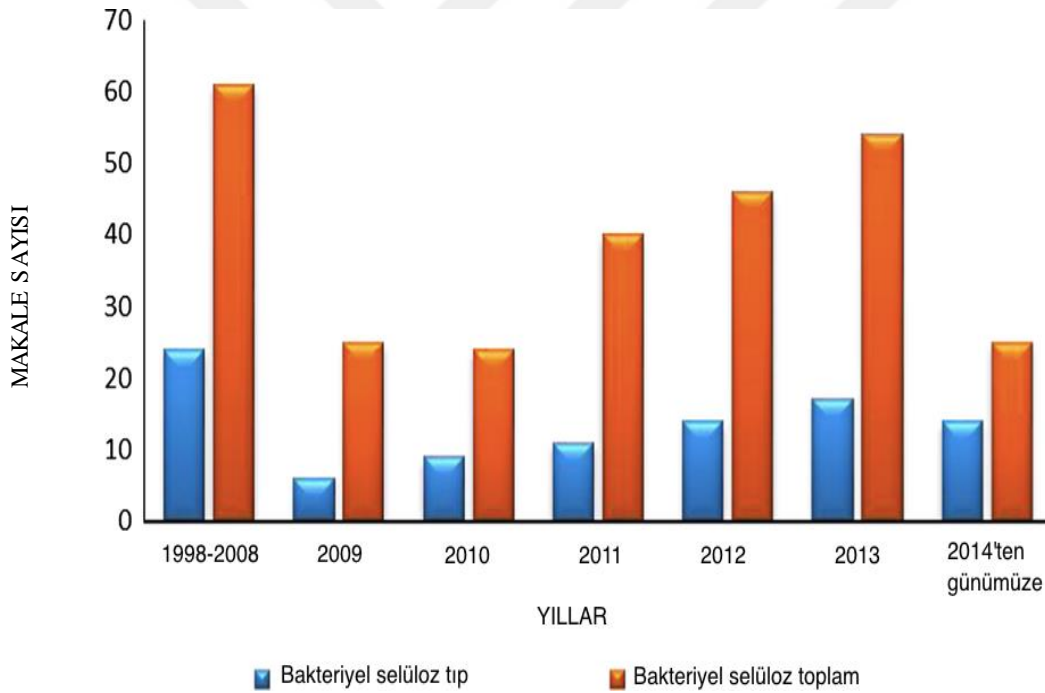
BS üzerine aşılama ise bir çeşit yüzey modifikasyonudur. Akrilik asitin BS yüzeyine ultraviyole (UV) aşılama polimerizasyonu ile kationik değişim membranı hazırlanmıştır [19]. Akrilik asiti BS yüzeyine aşılama fikri geliştirilerek iyonlaştırıcı elektron ışını radyasyonu ile intestinal pH'da kontrollü salım yapan ağız yolu ile alınan ilaç salım malzemesi geliştirmişlerdir [20]. Akrilamidi mikrodalga radyasyonu kullanarak da BS yüzeyine aşılama yapmışlardır. Böylece kontrol edilmesi gereken parametreler azaltılarak daha hızlı bir aşılama gerçekleşmiştir [21]. Halka açılma polimerizasyonu ise BS nanopartikül yüzeyine poli(kaprolakton) aşılama için kullanılmıştır [22].

Bakteriyel nanoselülozun avantajları sıralanırsa;

- 1) Bakteri suyu, kültür ortamındaki karbon kaynağı, kültürasyon sırasında ortama eklenen maddeler ve kültürasyon koşulları seçilerek kültürasyon sırasında süpermoleküler yapı ve özelliklerinin kontrol edilmesi sağlanabilir.
- 2) Bakteriyel nanoselüloz malzemelerin farklı morfolojilerde (küreler, fibriller ya da tüpler gibi) sentezlenmesine olanak verir.
- 3) Selüloz maddesinden sırasıyla hidrojeller ve arojeller (kurutmadan sonra) gibi doğrudan oluşum söz konusudur.
- 4) Malzeme kaplanmasında ince tabaka kültürasyonu ile yüzey selülozlanabilir.

- 5) Dağılmış partikül ve suda çözünür katkı maddeleri kullanarak *in situ* kompozit oluşumları gerçekleştirilebilir.
- 6) Selülozün nanofibril destek malzemesi gibi partikül, metal ve proteinler için kullanılma özgünlüğü vardır.
- 7) Yüksek saflıkta selüloz, yüksek moleküler ağırlığa, yüksek kristalliğe, kontrol edilebilir yüksek su tutma kapasitesine, fibril kararlılığına ve biyoyumluluğa sahiptir.

BS doğal yollarla sentezlenen bir ‘nanomalzeme’dir ve bu alanda gün geçtikçe artan yayın sayısı, dünyadaki birçok farklı araştırma grubunun ilgisini çektiğini gösterir. Şekil 2.6’da Science Direct arama motorunda ‘bakteriyel selüloz’, ‘tıp’ ve ‘biyotıp uygulamaları’ olarak arama yapıldığında 1998 yılından günümüze kadarki yayın sayılarının dağılımı gösterilmektedir [23].



Şekil 2.6. Bakteriyel selüloz temelli yayınlar (Science Direct arama motorunda ‘bakteriyel selüloz’, ‘tıp’ ve ‘biyotıp uygulamaları’ olarak arama yapıldığında) [23].

2.1.4. Bakteriyel Selüloz Uygulamaları

Bakteriyel selülozün birincil yapısı bitkisel selüloza benzerlik göstermekle beraber; mikrofibrillerden oluşan şerit benzeri yapıya sahip olmaları ve kalınlıklarının ($0.1 \times 10^{-6} \text{m}$) bitkisel selülozdan ($10 \times 10^{-6} \text{m}$) yüz kat daha küçük olmasıyla ayrılır. Bununla beraber,

mikrofibriller düzgün ağısı bir yapı oluşturur. Bakteriye selülozun karakteristik mikroyapısı, yüksek gerilim gücü, esnekliği, yüzey alanının fazla olması gibi birçok özelliği sayesinde son yıllarda ticari uygulamalarında artış görülmüştür. Çizelge 2.2’de bakteriye selülozun biyokimyasal özellikleri ve uygulama alanları özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Bakteriye selülozun biyokimyasal özellikleri ve olası uygulama alanları [6]

Olası Reaksiyonlar	Olası Uygulamalar
BS üzerindeki hidroksil gruplarının reaksiyonu	BS’un farklı polimerler ile yeni kombinasyonları
Hidrofobik modifikasyon	Hücrenin çift tabakalı fosfolipid bariyeri sayesinde hücre tutunması ve transportu
Mekanik ve gerilme direnci özelliklerinin biyokimyasal modifikasyonu	Klinik uygulamalar için mekanik olarak dayanıklı ürünler
Optimize edilmiş çözücü sistemlerinin kullanılması	İlaç salınım ve dağılımı için deneyim kazanma

BS doğal polimerik yara iyileştirici malzeme olarak 1980’lerden beri kullanılmaktadır. Klinik bir çalışmada, BS temelli yara sargısının (XCell®) bacak toplardamarı ülseri tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir [23]. Yara sargı malzemesi olarak kullanımının dışında, BS yapay kan damarı şeklinde kardiyovasküler implant olarak kullanılmıştır. İstenilen kalıba uyarlanabilmesi sayesinde, patentlenmiş matriks tekniği ile fermentasyon esnasında çok düzgün tüp şeklinde üretilebilir. BASYC® ismi altında patenti alınmış bu ürün 6 hafta boyunca 4°C’de muhafaza edilebilir [12].

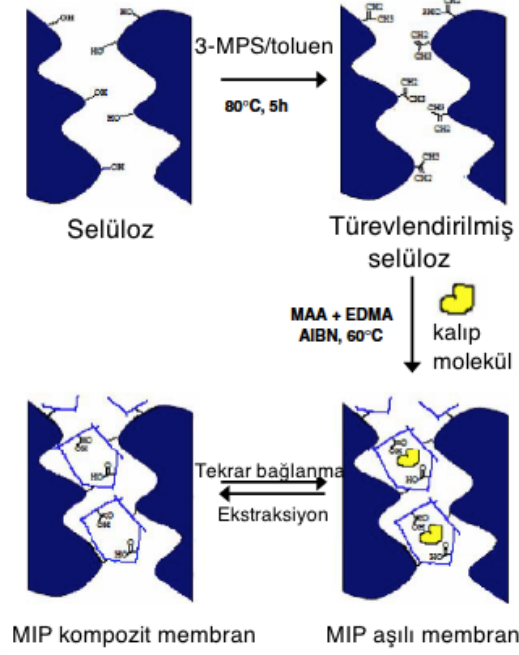
Kıkırdak dokusunun kendini yenileme yeteneği çok az olduğu için, kıkırdak hasarlarının tedavisi klinikte zordur. Yapay kıkırdak dokusunun hem sağlam olması hem de biyobozunmaya dirençli olması gerekmektedir. Ancak vücuda implante edilen bir malzeme biyolojik mekanizmalar ile zamanla bozunur. BS’nin *in vitro* makrofaj görüntüleme yöntemi sırasında yangı oluşturucu sitokinleri aktive etmediği gösterilmiştir. BS üzerine yerleşen kondositler çoğalma göstermiş ve kolojen tip II üretmişlerdir [24]. Biyomimik özelliği gösteren BS temelli kompozit sentezi için, *A. xylinum* X-2’den elde edilen saf selüloz kalsiyum klorür ile inkübe edildikten sonra, dibazik sodyum fosfat çözeltisinde bekletilmiştir [25]. 20-50 nm boyut aralığında olan kalsiyum fosfat partikülleri (% 50–90) BS hidrojel içerisine girerek bir kemik implantı oluşturmuştur.

Son derece sıkıntılı olan sinir dokusu onarımı için süreklilik gösteren BS fiberler hücrelerin sızmasını destekler. Yapılan bir çalışmada, BS’a tutunmuş mezenkimal kök hücreler çoğalmış

ve sinir büyüme faktörü nörotropin salgılayarak sinirsel rejenerasyonu aktive edici bir mikroçevre oluşturmuştur [26].

Bakteriyel selülozun biyomedikal uygulamalarının yanı sıra çevresel uygulama alanları da vardır. Canlılardaki toksik etkilerinden dolayı atık sulardaki ağır metal iyonların uzaklaştırılması son derece önemlidir. Metal iyonları tutucu bakteriyel selüloz uygulamalarında adsorpsiyon kapasitesini artırmak için malzemeyi modifiye etmek gerekebilir. Shen ve ark., bakteriyel selülozu dietilentriamin ile işlevselleştirerek farklı koşullardaki Cu^{+2} ve Pb^{+2} adsorpsiyon özelliklerini araştırmışlardır [27]. Chen ve ark. ise karboksimetillenmiş BS ile atık suların Cu^{+2} ve Pb^{+2} uzaklaştırmışlardır [28]. Çalkalamalı ortamda *Gluconoacetobacter hansenii* tarafından üretilen BS boya uzaklaştırılması, protein ve ağır metal adsorpsiyonu amacıyla kullanılmıştır. BS azo boyası ve anilin mavisini 60 dakika içerisinde % 80 etkinlikle uzaklaştırmıştır. Potansiyel biyoadsorpsiyon malzemesi olarak BS'den kurşun, kadmiyum ve nikel (Pb^{+2} , Cd^{+2} ve Ni^{+2}) ve BSA adsorpsiyonu ve elüsyonu yeşil çevre uygulaması olarak gerçekleştirilmiştir [29].

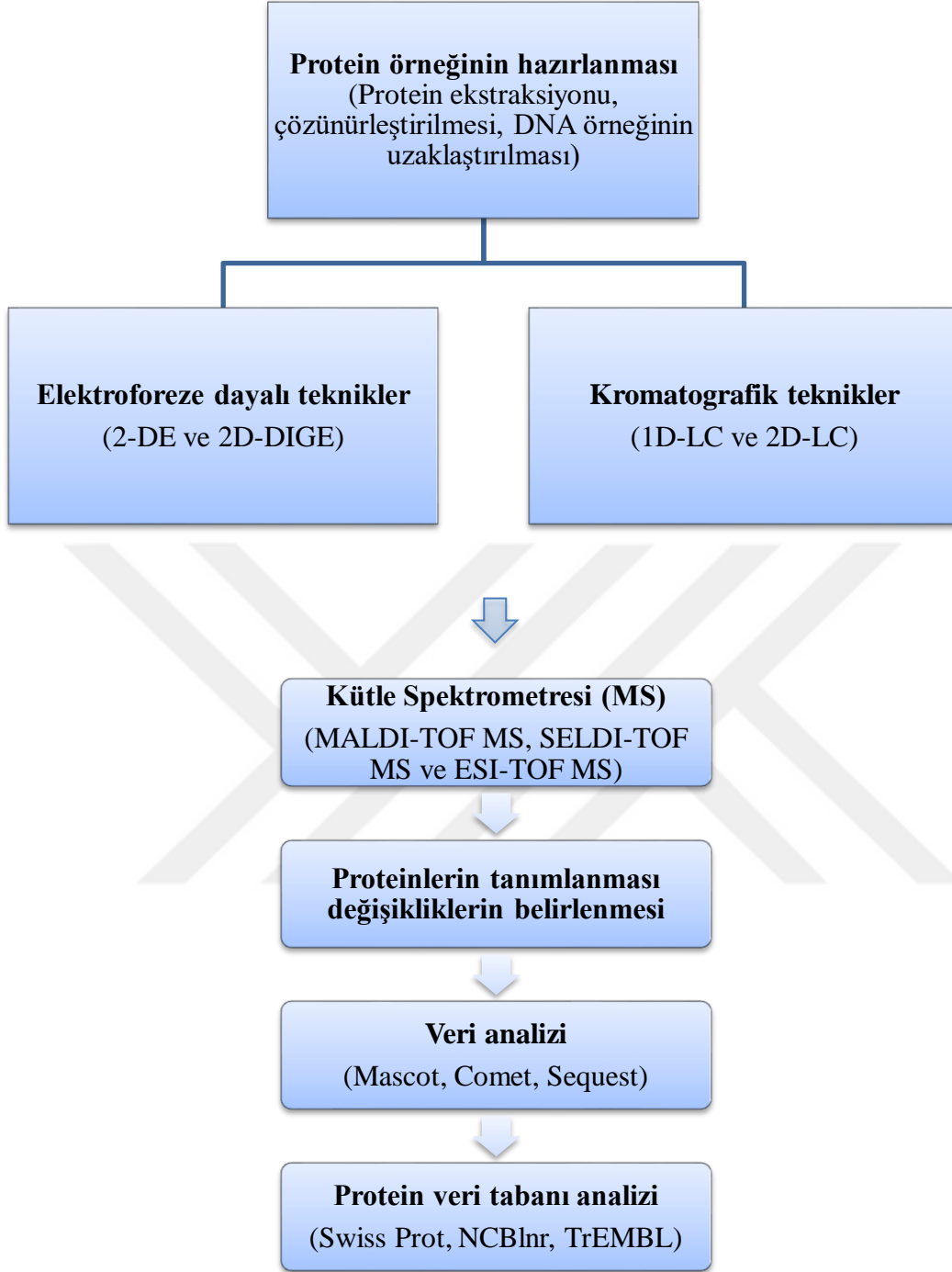
Potansiyel transdermal salım sistemi olarak tasarlanan, moleküler baskılanmış polimerler ve BS kompozit membranların kullanıldığı bir çalışmada, model ilaç olarak seçici olmayan β -adrenerjik reseptör antagonisti olan S-propranolol seçilmiştir. Moleküler baskılanmış kompozit ile ilacın taşınımı hem membran gözenek yapısı hem de moleküler tanıma kontrollü gerçekleşmiştir. Etilen glikol dimetakrilat ve metakrilik asit kopolimerin bakteriyel selülozun gözenekli yüzeyine aşılması Şekil 2.7'de şematik olarak gösterilmiştir [30]. Yapılan çalışmada, stereoseçicilik sağlanarak deri yoluyla S-propranolol'ün kontrollü salınımı moleküler baskılanmış BS kompozit membranlar ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.7. Selüloz membran yüzeyine propranolol enantiyomeri ile moleküler baskılanmış polimer modifikasyonu [30]

2.2. Proteomiks

DNA'nın taşıdığı olduğu genetik bilgiyi deşifre etmek için yapılan tüm çalışmalara genomik denir. Genomik çalışmalar, hastalık ya da fizyolojik süreçler ile ilgili tüm genleri keşfetmeyi amaçlar; ancak bu genlerin hangi oranda kullanıldığı hakkında bilgi vermez. Bir gen farklı biyolojik işleve sahip birçok protein kodlayabilir. Bu proteinler translasyon sonrası modifikasyonlara uğrayabilir ve bu değişimler gen işlevinden bağımsızdır. Bu sebepten dolaydır ki birçok bilimsel veri olmasına rağmen, genomik çalışmalara dayanan teşhis klinikte yetersizdir. Gen ürünü mRNA'ların ifade düzeyleri ile bu mRNA'lardan kodlanan proteinlerin miktarları arasında zayıf doğrusal bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Gen ürünlerinin translasyon sonrası modifikasyonları, hücredeki lokasyonları ve miktarlarının belirlenmesi için genomik sonrası takibe gereksinim duyulur. Yani, proteom ve proteomik çalışmalara ihtiyaç vardır. Proteomik teknolojisinde, önce örnekteki proteinlerin ayırımı söz konusudur. Daha sonra bu proteinler tanımlanır. İlk önce örnekteki proteinler belirli ayırma yöntemleri ile işlenir. Sonra bu ayırma yöntemleriyle elde edilen veriler bazı yazılımlar kullanılarak değerlendirilir ve proteinler tespit edilir. Son olarak, kütle spektrometresi (MS) yöntemi ile bu proteinlerin kütleleri saptanır. Proteinlerin kesin ve doğru bir şekilde tanımlanması sağlanır [31].

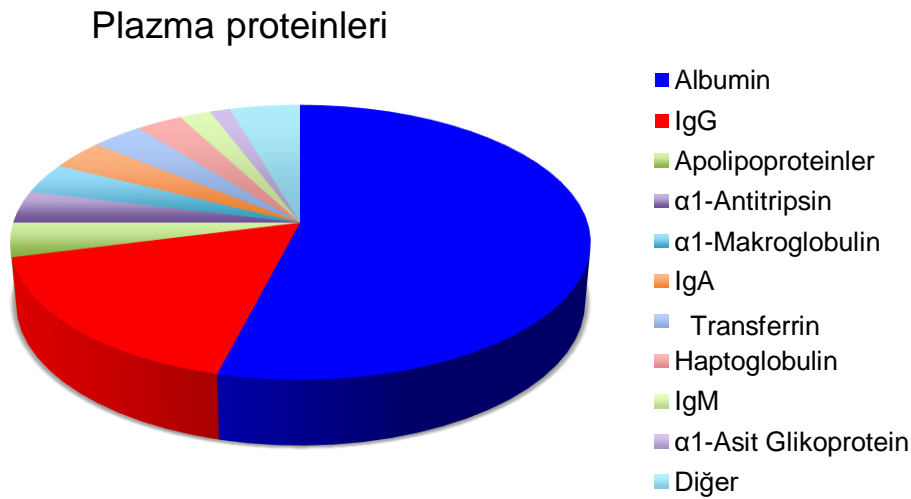


Şekil 2.8. Genel olarak proteomiks çalışma prensibi

Proteom, belirli bir hücre hattında, vücut sıvısında ya da organizmadaki bütün proteinleri fiziksel ve nicel olarak haritalar. Proteomik çalışmalardaki amaç; birçok hastalığın (enfeksiyon, inflamasyon, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, beslenme bozukluğu, Alzheimer ve diğer otoimmün hastalıklar) teşhisinde biyobelirteç olabilecek yüzlerce özgün serum protein/peptidlerin keşfedilmesidir [32].

Kan plazması, 60-80 mg/mL gibi yüksek miktarda protein içerir. Toplam proteinlerin tahmini sayısı 10.000 kadardır; fakat hem normal hem de hastalıklı hücrede her protein çeşitli translasyon sonrası ve metabolik modifikasyonlara uğradığı için bu sayı birkaç katına çıkabilir. Bu proteinler, biyolojik sıvılarda düşük ya da orta seviyedeki derişimlerde bulunur ve tüm proteomun yaklaşık % 5'ini oluşturur. Bu proteinlerin keşfedilmesi için, ilk önce sayılarının artırılması yani zenginleştirilmeleri gereklidir [33-34].

Proteinlerin plazmadaki bulunma bollukları Şekil 2.9'da verilmiştir. Plazmada en fazla bulunan proteinler albumin ve immünoglobulinlerdir. Bu proteinler plazma proteinlerinin % 80'ini oluşturur ve derişimi az olan diğer proteinleri maskeler. Örneğin, iki boyutlu jel elektroforezinden önce bu proteinler uzaklaştırılmazsa hastalıklara özgü proteinlere ait noktaları jelde tespit etmek imkansızdır. Dolayısıyla yüksek yoğunluklu proteinlerin uzaklaştırılması önemlidir [35].



Şekil 2.9. Plazma proteinlerinin bulunma bollukları

Serum ve plazma esaslı proteomik çalışmalarda başlangıç basamağı, albumin ve yüksek miktarda bulunan diğer proteinlerin (immunoglobulin, transferrin, haptoglobin) uzaklaştırılmasıdır. Düşük miktarda bulunan potansiyel protein biyobelirteçler bu sayede keşfedilmektedir. Albuminin kendisi de bir biyobelirteçtir. Örneğin, miyokardiyal iskemi sonucunda HSA'de konformasyonel bir değişiklik meydana gelir. Ayrıca, protein ve peptidlere bağlanan HSA kanser biyobelirteci olarak kullanılma potansiyeline sahiptir [1]. HSA negatif yüklü, yüksek çözünürlüğe sahip, ligand bağlayıcı ve taşıma özellikleri iyi bilinen insan serumundaki en bol bulunan proteindir. Toplam serum protein miktarının

yaklaşık % 50'sini oluşturur. Albumin ilaçlara (ibuprofen ve diazepam), metal iyonlarına, peptidlere (interferon, insülin) ve proteinlere (serum amiloyid A ve streptokokal G) bağlanabilir. Son zamanlarda araştırmacılar, albuminom (albumine bağlanan peptid ve proteinler) karakterizasyon çalışmalarına odaklanmıştır. Albuminomun bir serum ve plazma subproteomu olduğu gösterilmiştir. Proteom analizi için sadece albumin ve immunoglobulinlerin (serum proteinlerinin %80'inden fazlası) uzaklaştırılması bile belirgin bir iyileştirme sağlar. Yüksek yoğunluklu proteinlerin uzaklaştırılması için etkinliği fazla ve ucuz bir yöntemin bulunması büyük bir öneme sahiptir.

Bazı temel protein ayırma yöntemlerinden bahsedilirse, tek boyutlu sıvı kromatografisi (1D-LC) proteinleri izoelektrik noktaları, kütleleri veya hidrofobikliklerine göre ayırır. En çok kullanılan 1D-LC, proteinleri hidrofobikliklerine göre ayıran ters faz sıvı kromatografisidir. İki boyutlu sıvı kromatografisi (2D-LC) proteinleri önce izoelektrik noktalarına, sonra hidrofobikliklerine göre ayırır. 2D-LC fraksiyonlarında çok fazla protein olduğu için örnekteki proteinlerin tanımlanması ve örnekler arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla gelişmiş bilgisayar programları kullanılmaktadır ve 2-DE'de kullanılanlara benzer gelişmiş programlara ihtiyaç duyulmaktadır. Proteomikteki gelişmeler ve proteomikse dayalı biyobelirteçlerin keşfedilmesi MS'deki gelişmelerle yakından ilişkilidir. MS manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analiz yapar. MS ile proteinlerin ve peptidlerin tanımlanması, molekül kütlesi ve özellikle translasyon sonrası modifikasyonların belirlenmesi sağlanmaktadır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan sistemler Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF), Elektro Spray Ionization-Time of Flight (ESI-TOF) ve Surface Enhanced Laser Desorption Ionization- Time of Flight (SELDI-TOF) olarak sıralanabilir.

Elektroforez yöntemi ise, proteinlerin elektriksel bir alan içerisinde büyüklüklerine, molekül ağırlıklarına, şekillerine, yüklerine bağlı olarak elektrik akımının etkisi ile hareket etmeleri esasına dayanır. Proteomik analizi ve protein ayrıştırmasında ise iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) yönteminin gelişmesi bir dönüm noktası olmuştur. 2-DE, karmaşık protein karışımlarının ayrılmasında kullanılan en önemli tekniklerden biridir. 2-DE'de iki ayırma tekniği kullanılarak binlerce protein tek adımda ayrılabilir. Birinci yönde izoelektrik fokuslama (IEF) elektroforezi ile pH gradientinde yük bağlı ayırma ve ikinci yönde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül ağırlığına bağlı ayırma yöntemleri uygulanır. Her bir teknik kendi başına 100 proteini ayırma kapasitesine sahipken,

birleştiklerinde 1000-3000 polipeptidi ayırabilirler. Ayrıca, örnekteki 1 ng kadar küçük proteinler uygun bir boyama ile tespit edilebilir [31].

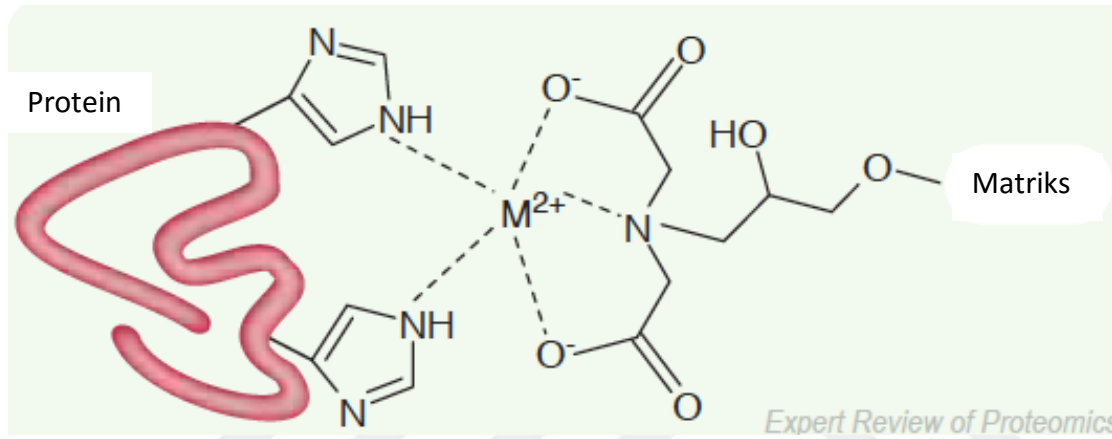
Proteomiks çalışmalarında sıklıkla kullanılan iki yöntem, proteinleri ayırmak için iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE) ile ayrılan proteinlerin tespiti için kullanılan kütle spektrometresidir (MS). En iyi 2-DE bile birkaç bin proteinden fazlasını ayıramazken, analizde ham bir protein karışımının kullanılması sadece yüksek yoğunluklu proteinlerin görülmesine sebep olacaktır. Bu bağlamda, 2-DE'nden önce afinite-temelli protein uzaklaştırılması düşük yoğunlukta bulunan proteinlerin miktarını arttırarak analizlerini kolaylaştıracaktır [36]. Ultrasantrifugal filtrasyon, immunoöktürme, boya afinite, immunoafinite, immobilize metal şelat afinite kromatografisi ve moleküler baskılama teknikleri gibi birçok farklı yöntem, serum örneklerinden yüksek yoğunluklu proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılmıştır [37-45].

Afinite kromatografisinde ideal bir matriks; homojen, hidrofilik, seçici, özgül olmayan adsorpsiyon minimum, düşük maliyetli ve adsorpsiyon kapasitesi yüksek olmalıdır. Albumin ve immunoglobulinlerin uzaklaştırılmasında kullanılan en temel yaklaşım, albumine afinitesi yüksek bir tekstil boyası olan Cibacron Blue F3GA, immunoglobulinler için ise Protein A/G ligandı kullanmaktır [46]. Antikorların yüksek özgülüğü mükemmel seçicilik sağlarken, matriksten antikor sızıntısı ve kontaminasyon riskine bağlı sorunlar klinik uygulamalarda sıkıntı yaratmaktadır. Antikorların düzgün oryantasyonda immobilize edilmesi de zordur. Sterilizasyon sırasında degradasyon riskleri vardır. Bu malzemelerin fiyatları göreceli olarak oldukça yüksektir. Boya afinite sistemleri ise yüksek ligand yükleme kapasitesiyle HSA uzaklaştırılmasında antikor temelli sistemlere avantaj sağlar; ancak özgülüğü azdır, daha doğrusu grup özgüdür [47].

2.2.1. İmmobilize Metal İyon Afinite Kromatografisi (İMAK) ve Proteomiks Uygulamaları

İmmobilize metal iyon afinite kromatografisi (İMAK), destek malzemesi üzerine kovalent olarak bağlı şelat yapıcı bir grup tarafından tutulan bir metal iyonuna sistein, histidin ve triptofan gibi dışarı ulaşabilir ve elektron verebilir amino asitlere sahip proteinleri bağlayarak işlev görür (Şekil 2.10). Genel olarak kullanılan iyonlar Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} ve Co^{+2} gibi hafif metallerdir. İMAK'da proteinin alıkonması, metal ile etkileşime girebilen asılı grupların sayısı ve türüne bağlıdır. Proteinin büyüklüğü, ligand yoğunluğu, immobilize metal ve şelatın türü, kullanılan tuzun çeşidi ve derişimi, çözücünün türü, sıcaklık, pH gibi etkenler etkileşimde önemli rol oynar. Şelat oluşturuucu bileşiklerde bulunan (N, S, O) gibi elektron

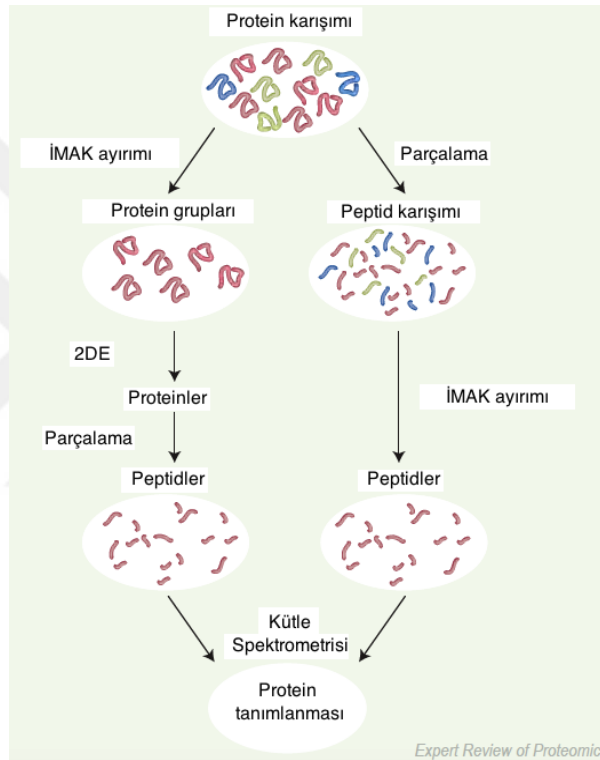
verici gruplar, ortamda bulunan koordinasyon bağlarının sayısına bağlı olarak, iki dişli, üç dişli vb. olabilen metal şelatları oluşturarak, metal iyonları ile koordinasyon bağı yapabilirler. Geride kalan metal koordinasyon bölgeleri normalde su molekülleri tarafından işgal edilir. Daha sonra proteinden gelen uygun elektron verici gruplar ile yer değiştirebilir. Bazı amino asitler özellikle yan zincirindeki elektron verici atomlarından dolayı bağlanma için uygundur. Glu, His, Arg, Lys, Asp, Tyr, Cys ve Met gibi çoğu kalıntıların bağlanmaya katılabilesine rağmen İMAK'de proteinin gerçekte alıkonması histidil kalıntılarının varlığı temeline dayanır. Trp, Phe ve Tyr gibi aromatik yan zincire sahip amino asitler de, dışarı yönlenebilen histidil kalıntılarına yakın iseler onlar da bağlanmaya katkıda bulunabilir [35].



Şekil 2.10. Metal şelatlı afinite desteğe protein bağlanması [48]

İMAK hücrel protein havuzundaki fraksiyonları zenginleştirmek ve farklı olarak (fosfoproteom, metalloproteom) kütle spektrometrik yöntemler ile analiz edilebilmek için proteomik uygulamalarda kullanılmaktadır. İMAK genellikle küre temelli ya SELDI (yüzey arttırılmış lazer desorpsiyon/iyonizasyon) çipleri gibi işlevselleştirilmiş yüzeylerde ligand olarak kullanılmaktadır. Çip-temelli uygulamalardan bir diğeri, yüzey plazmon rezonans (SPR) dir. Nicel fonksiyonel ve kinetik araştırmalar için His-işaretili proteinlerin immobilizasyonu gereklidir. Bununla beraber, İMAK temelinde Chelex ismiyle anılan teknoloji ile kan gibi karmaşık örneklerden nükleik asitlerin polimer zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu öncesinde inhibitör uzaklaştırma basamağı olarak kullanılmıştır [49]. Aslında İMAK metallo- ve histidin içeren proteinlerin grup spesifik saflaştırılması amacıyla geliştirilmiştir. Günümüzde ise bu özellikler düşük yoğunluklu proteinlerin hassas analizlerinde proteomik çalışmalarda karmaşıklığı azaltmak amacıyla kullanılır. Sonuç olarak, sıvı, ters-faz, iyon değişim ve afinite temelli ön saflaştırma yöntemleri protein zenginleştirme amacıyla kullanılır olmuştur [49].

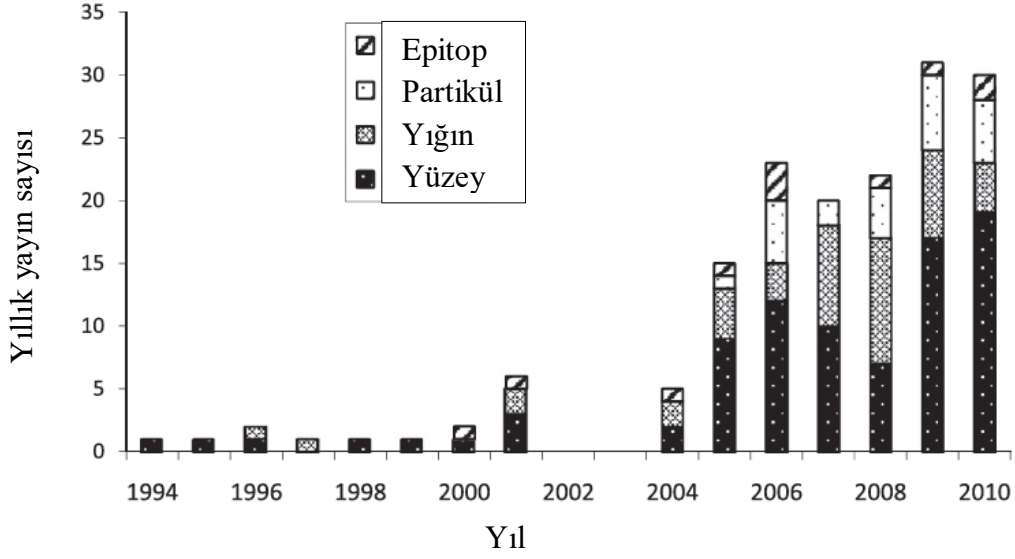
Proteomiks çalışmalarındaki İMAK uygulamaları Şekil 2.11’de şematize edilmiştir. Zenginleştirme basamağında, hücre lizatı ya da kan gibi karmaşık örnekler İMAK matriksinden geçirilir, yıkanır ve ilgilenilen fraksiyonlar pH değişimi ya da yüksek derişimdeki imidazol ile elüe edilir. Bu fraksiyon, daha sonra kütle spektrometresi (MS) ya da iki boyutlu jel elektroforezini takiben MS ya da buna ilave olarak MS ile birlikte sıvı kromatografisi (LC-MS) cihazlarıyla analiz edilir. İMAK en azından mono- ve dinükleotidlere immobilize metalin olası bağlanma bölgelerine (fosfat gruplarındaki oksijen, bazlardaki nitrojen ve oksijen, ribozdaki hidroksil grupları) afinitesi sayesinde bağlanabilir ve ayırım sağlar [50-51].



Şekil 2.11. Proteomiks çalışmalarıdaki potansiyel İMAK uygulamaları [48]

2.3. Biyomakromoleküler Baskılama

Makromoleküler baskılanmış polimerler (MIP) makromoleküler kalıpların (>1500Da) kullanıldığı, özellikle 2005’ten beri bilimsel çevreler tarafından ilgi gören önemli bir çalışma alanıdır (Şekil 2.12). Önemlerine bağlı olarak proteinler sıklıkla çalışılan kalıp moleküllerdir. Ancak MIP alanında yayınlanan çalışmaların % 2’den azında kalıp molekül olarak proteinler kullanılmıştır [52].



Şekil 2.12. Yıllara göre yayınlanan makromoleküler baskılama makalelerinin sayısı [52]

MIP'ların potansiyel uygulamaları; biyotanıma, vücuttaki toksik moleküllerin uzaklaştırılması/nötralleştirilmesi ya da geri dönüşüm-kontrollü cihazlarda hedeflendirilmiş terapötik taşıyıcı gibi laboratuvar uygulamalarının çok ötesindedir. Protein MIP'lar özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın olan bulaşıcı hastalıkların saptanmasında ya da doğal afetler sonrasında tıbbi altyapının eksik olduğu ortamlarda teşhis araçları olarak istihdam edilmeye uygundur [52]. Çizelge 2.3'te doğal tanıma elemanları ile MIP'ların karşılaştırılması özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. MIP ile doğal tanıma elemanlarının karşılaştırılması

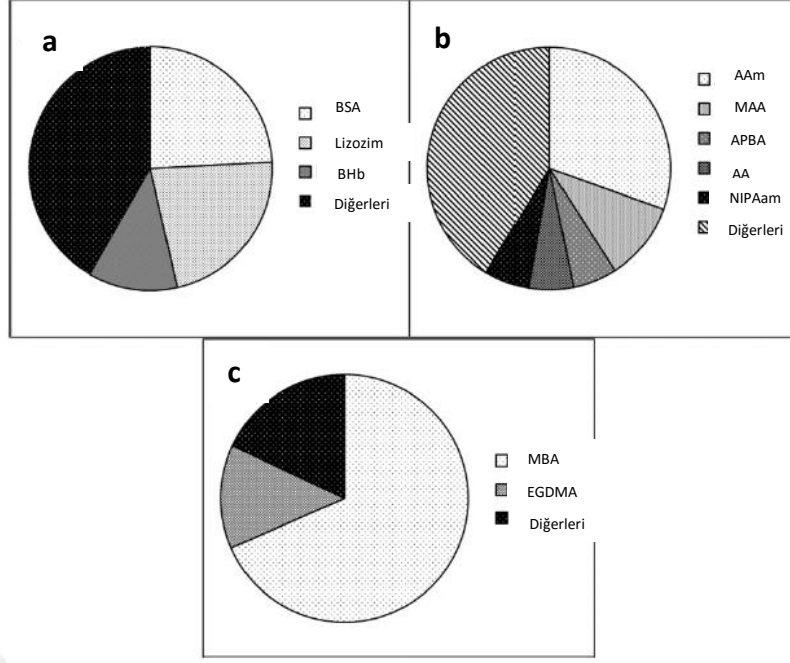
	Doğal tanıma elemanları	MIP
Bağlanma afinitesi	Yüksek etkinlik/özgülük	Değişkenlik gösterir (özellikle makromoleküler kalıplar için)
Genellik	Analit başına tek bir reseptör	Herhangi bir kalıp için geliştirilebilir
Dayanıklılık	Sınırlı kararlılık (her eleman kendi ihtiyaçlarına gereksinim duyar)	Birçok değişken durumda kararlılık (pH, sıcaklık, iyonik kuvvet, çözücüler)
Maliyet	Pahalı sentez fakat uygun maliyet	Ucuz
Depolama	Oda sıcaklığında günlerce	Performanstan kaybetmeden uzun süreli depolama (birkaç aydan yıllarca)
Sentez/hazırlama	Zaman alıcı	Basit, kolay
Sensör uygulamaları	Dönüştürücü yüzeyi ile zayıf uyumluluk	Tamamen uyumlu
Altyapı gereksinimleri	Pahalı analitik cihazlar/uzman ihtiyacı	İşaretsiz tanıma

2.3.1. Protein Baskılama

Varlığı en az 40 yıl öncesine dayanan moleküler baskılama teknolojisinden beri, en önemli biyomakromoleküllerden biri olan proteinlerin kalıp molekül olarak kullanılması, kapsamlı bir şekilde araştırılmasına rağmen gelişmeler yavaş olmuştur. Bu teknolojinin zorluğu, şaşırtıcı olmayan bir şekilde proteinlerin doğal özellikleridir. Proteinler moleküler ağırlıkları 6000 daltondan birkaç milyon daltona kadar değişen biyomakromoleküllerdir. Bu büyüklükteki boyut, proteinlerin yapay bağlanma bölgelerine ulaşmasını ve bu bölgeleri terk etmesini engeller. Ayrıca, fazla miktarda potansiyel bağlanma bölgeleri ve protein yüzeyinde fonksiyonel grup bulunmaktadır. Bu karmaşa proteinler ve moleküler baskılanmış polimerler arasında özgül olmayan bağlanmaların artmasına neden olarak zayıf seçicilik ve çapraz reaktiviteye yol açar.

Daha önemlisi, proteinler birçok moleküler baskılanmış polimerlerin sentezinde kullanılan organik çözücülerle uyumlu değildir. Moleküler baskılama için sulu çözelti kullanımı genellikle reaktif fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı seçimini sınırlar. Ayrıca, ortamdaki su molekülleri, kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki hidrojen bağlarını bozarak rekabete girebilir. Proteinler sıcaklık, pH ve iyonik şiddete duyarlıdır, denatüre olabilir, konformasyonel değişimlere uğrayabilir ya da agrege olabilir.

Kapsamlı bir literatür araştırması birkaç belirgin eğilimi ortaya çıkarmaktadır. Genel olarak model protein olarak sığır serum albumin (BSA), lizozim, sığır hemoglobin (BHb) kullanılmaktadır (Şekil 2.13a). Çalışmaların büyük çoğunluğunda fonksiyonel monomer olarak akrilamid ve çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilenbisakrilamid (MBA) kullanılmaktadır (Şekil 2.13b ve 2.13c). En çok kullanılan monomerler; akrilamid (AAm), metakrilik asit (MAA), aminofenilboronik asit (APBA), akrilik asit (AA) ve N-isopropilakrilamid (NiPAAm) olup literatürde kullanılan monomerlerin % 60'ını oluşturmaktadır [52].



Şekil 2.13. 1994-2010 yılları arasında literatürdeki makromoleküler MIP'ların ortak bileşenlerinin bağıl frekansı. a) Makromoleküler kalıplar-sığır serum albumin (BSA), lizozim, sığır hemoglobun (BHb); b) Fonksiyonel monomerler-akrilamid (AAm), metakrilik asit (MAA), aminofenilboronik asit (APBA), akrilik asit (AA) ve N-isopropilakrilamid (NiPAam); c) çapraz bağlayıcılar-N,N'metilenbisakrilamid (MBA) ve etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) [52]

Bir bütün olarak MBA ve EGDMA yayınlanmış raporların % 80'inden fazlasında kullanılan çapraz bağlayıcılardır (Şekil 2.13c). Sonuç olarak yapılmış çok sayıdaki çalışmaya rağmen araştırmacıların aynı bileşenleri kullandıkları görülmektedir [52].

Protein baskılama yaklaşımları, kalıp molekülün baskılanan bölgesine (proteinin tamamı, bir kısmı ya da küçük bir epitop bölgesi) göre genellikle üç kategoride sınıflandırılabilir. Bunlar, yığın baskılama, yüzey baskılama ve epitop baskılamadır.

2.3.1.1. Yığın Baskılama

Protein baskılama için en kolay yaklaşım yığın baskılamadır. Bu yaklaşımın avantajı proteinin tamamının ekstraksiyon ya da yıkama ile uzaklaştırılması, daha sonra 3 boyutlu boşluklara tekrar bağlanabilmesidir. Proteinlerin büyük boyutlarına bağlı olarak, sentez sırasında oluşturulan gözeneklerin sayısı ve boyutunu kontrol etmek ve MIP yüzeye dağıtmak etkili bir tasarım için gereklidir.

Hemoglobin [53], lizozim [54] ve sığır serum albumin [55] gibi proteinlerin yığın baskılanmasında en çok kullanılan polimerik malzeme poliakrilamid ve türevleridir. Ancak protein transferini kolaylaştırmak için genellikle polimerik ağ yoğunluğundan ödün verilir. Düşük yoğunluklu MIP'ların daha az kararlı olduğu bilindiği için hidrojel ve sol jel gibi daha uygun matrislere ilgi artmaktadır.

Hidrojeller çapraz bağlı, sulu ortamda şişebilen ama çözünmeyen, üç boyutlu hidrofilik polimerik ağlardır. pH, sıcaklık gibi dış faktörlere cevap olarak hacimlerini değiştirebilirler ve bu sayede polimer ağı kontrol edilebilir.

Örnek olarak, BSA baskılanmış kalsiyum aljinat kapasitesi, eklenen hidrofilik bir selüloz türevi olan hidroksietil selüloz varlığında artmıştır [56]. Böylece, azalmış ağ örgü boyutu ve artmış çapraz bağlayıcı kararlılığı ile daha yoğun bir polimerik ağ yapısı oluşmuştur. Bu etkilerin daha fazla baskılanmış bölge yaratarak etkileşim bölgelerini daha az hareketli hale getirerek ve boşlukların orjinal kalıp moleküle daha çok tamamlayıcı olmasını sağlayarak büyük fark yarattığı düşünülmektedir. Literatürde hemoglobin [57-58] ve lizozim [59] baskılanmış hidrojel çalışmaları mevcuttur.

2.3.1.2. Yüzey Baskılama

Protein gibi büyük kalıpların baskılanmasındaki en büyük problem bu moleküllerin yüksek çapraz bağlı polimerik ağ içerisinde engellenen hareketi ile birlikte eski haline dönebilme yeteneğinin ve bağlanma etkinliğinin zayıf olmasıdır.

Yüzey baskılama bu tür zorlukların üstesinden gelmek için iyi bir alternatiftir. Burdaki temel strateji baskılanacak bölgelerin yüzeye yakın konumlandırılmasıdır. Yığın baskılama ile karşılaştırıldığında proteinlerin hareketi daha kolaydır ve bağlanma kinetikleri genellikle düşük olmasına rağmen daha az engellenmiştir. Sadece proteinin belli bir kısmı bağlandığı ve tanındığı için seçicilik de düşük olabilir.

Yenilikçi bir yüzey baskılama yaklaşımı Yılmaz ve ark. tarafından ortaya konmuştur [60]. Gözenekli silika küreler üzerinde tiyofilin kalıp molekülünün yönlendirilmiş immobilizasyonu polimerizasyon öncesinde gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon sonrasında, silika destek çözündürülmüş ve kalıp moleküle birlikte uzaklaştırılmıştır. Bu durum, sadece kalıp molekülün uzaklaştırıldığı geleneksel yüzey baskılamaya göre bir fark yaratmıştır.

Chou ve ark. protein tanıma için mikro temas baskılama yöntemini tanımlamışlardır [61]. Bu yaklaşımda Yılmaz ve ark.'nın fikri ile birlikte damgalama tekniği kullanılmıştır. Bu yöntemin hızlı MIP sentezi, düşük miktarda monomer kullanımı ve kalıp molekül için çözücü uyumluluğu gibi birçok avantajı olduğu gösterilmiştir.

Kuartz kristal mikroterazi’de (QCM) kullanılan altın yüzeyin üzerine protein baskılanmış film ya da kaplama yaparak uygulanan sensör uygulamaları da vardır. Örneğin, Zhang ve ark., sol-jel ve kendiliğinden oluşum teknolojisini birleştirerek altın elektrot yüzeyini BSA baskılanmış ince bir filmle kaplamışlardır [62]. Sensörün diğer yarışmacı ajanlara (BSA ve Hb) göre seçiciliğinin çok iyi olduğu ve bu seçiciliğin yük, moleküler yapı ve baskılanmış filmin şişme derecesine bağlı olduğu vurgulanmıştır.

Yüzey baskılama, baskılanmış polimer yüzeyinde özgül boşlukların oluşmasıyla sonuçlanır. Yüzeydeki bu boşluklar belirli bir şekle sahiptir ve kalıp protein molekülünün belirli bir bölgesi ya da bölümüne komplementerdir. Fakat proteinlerin konformasyonel esnekliği ve karmaşıklığı, fonksiyonel monomer ile protein arasında istenilen özgüllüğü ve etkinliği sağlayamamaktadır. Sonuç olarak, protein yüzey baskılanmış polimerler bazen çapraz reaksiyona, özgül olmayan bağlanmaya ve düşük seçiciliğe neden olur. Bu sebepten dolayı yüzey ve yığın baskılama yöntemlerini biraraya getiren “epitop baskılama” iyi bir alternatif olarak görülmektedir.

2.3.1.3. Epitop Baskılama

Yüzey ve yığın baskılama yöntemlerini birleştiren epitop yaklaşımı, tanınmak istenen daha büyük bir polipeptidin ya da proteinin bir parçasını temsilen, polimerizasyon sırasında kısa bir polipeptidin kalıp olarak kullanıldığı baskılama yöntemidir. Bu yaklaşım, örnek olarak antikor ve antijen arasındaki gibi özgül etkileşimleri taklit etme eğilimindedir.

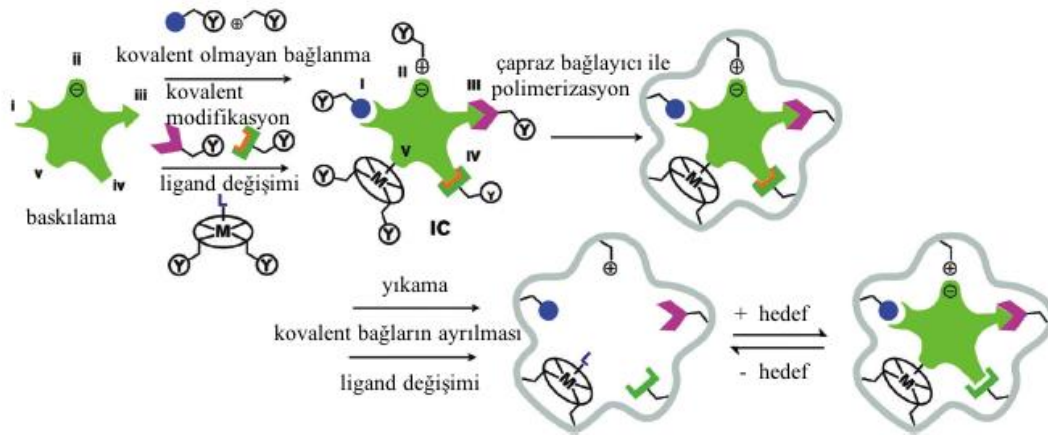
Öncelikle, kalıp molekülün küçük olması, yüksek çapraz bağlanma sağlar ve bağlanma bölgeleri kalıp molekülün uzaklaşmasında sorun yaratmaz. Amaç asıl molekülün tanınması olduğu için, yine de tekrar bağlanma çalışmalarında difüzyonel sınırlamaların üzerinde düşünmek gerekir. İkinci olarak, doğal tanıma yolları türevleri küçük moleküler ağırlıklı baskılama gibi, kalıp molekülün karmaşıklığını azaltılır ve dolayısıyla özgül olmayan bağlanmalar sınırlandırılmış olur. Sonuç olarak, MIP’ların bağlanma afinitesi ve seçiciliği teoride artar. Üçüncü olarak polipeptidlerin ikinci ve üçüncü yapıları çevresel etkilere daha hassastır. Bununla beraber, aprotik organik çözücüler çözünürlük ya da konformasyonel değişim sıkıntısı yaratmadan kullanılabilirler. Ayrıca, protein biyoişaretleyiciler pahalıdır. Dolayısıyla, proteinin kısa peptidlerini kullanmak maliyeti düşürebilir; ancak işlevselleştirilmiş peptidlerin sentezlenmesi ya da saflaştırılması zor olabilir. Epitop baskılama umut verici bir yaklaşım olarak görülmekte ve araştırmalar devam etmektedir.

Protein baskılanmış polimerlerin başarısı monomer-kalıp molekül kompleksinde saklıdır (Şekil 2.14). Kompleks reaksiyon ortamında termodinamik olarak uygun ve kararlı olmalıdır.

Fakat aynı zamanda sonraki kalıp molekülün uzaklaştırılması için, polimer ağına ve bağlanma bölgelerine zarar verilmeden bağlar kolaylıkla kırılmalıdır. Makromoleküler MIP'lar tanıma için yaygın olarak kovalent olmayan (hidrojen bağları, elektrostatik ve hidrofobik) etkileşimler kullanır. Teorik olarak, kalıp moleküle yüksek ilgi gösteren monomer seçimi ile ön-polimerizasyon çözeltisi optimize edilir ve daha seçici olarak tanıma sağlanır.

Kovalent baskılamada, kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kovalent bağlar kuvvetlidir; ancak yavaş bağlanma kinetiği gösterir ve polimerizasyondan sonra kalıp molekülü uzaklaştırmak için şiddetli koşullar uygulamak gerekir. Eğer fonksiyonel monomer ile hedef molekülün bağlanması kovalent olmayan (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve koordinasyon bağı oluşumu gibi) etkileşimlerle gerçekleşiyorsa **kovalent olmayan baskılama** denir.

Metal-şelat etkileşimli baskılamada, metal şelat etkileşimleri, bağlanma gücü ve seçiciliği açısından sulu çözeltilerdeki elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları ile karşılaştırıldığında kovalent etkileşimlere daha çok benzemektedir. Bununla birlikte hedef molekülün yapıdan uzaklaştırılması kovalent baskılamada olduğu kadar güç değildir. Özellikle hidrojen bağlarının etkin olduğu baskılama sistemlerine göre çözücü profilinin su da dahil olmak üzere geniş sınırlarda kullanılabilmesi ve baskılanacak tamamlayıcı ligandın geometrik yönlendirmesinin seçiciliğe getirdiği avantaj nedeniyle metal-şelat etkileşim temelli baskılama sistemleri daha çok tercih edilmektedir.



Şekil 2.14. Beş ana moleküler baskılama yöntemi (i) kovalent olmayan, (ii) elektrostatik/iyonik, (iii) kovalent, (iv) yarı kovalent ve (v) metal şelat koordinasyonu

Baskılanacak molekül, kovalent olmayan, kovalent, ya da ligand (L) aracılı metal (M) etkileşimler ile tamamlayıcı fonksiyonel gruplar ile bir araya getirilir. Hedef molekül ile fonksiyonel monomer (IC) bir kompleks oluşturur. Kompleksteki bağlanma (I) hidrojen bağları ya da van der Waals etkileşimleri ile olabilir; (II) elektrostatik ya da iyonik etkileşimlerle olabilir; (III) kovalent etkileşimle olabilir; (IV) uzatıcı kol (turuncu) varlığında kovalent etkileşimle olabilir; (V) ligand-metal ya da metal-ligand koordinasyonu ile olabilir.

Fonksiyonel monomer, uygun çapraz bağlayıcı varlığında çapraz bağlanma reaksiyonu gösteren fonksiyonel bir grup, Y, içerir. Çapraz bağlayıcı varlığında kompleksin polimerizasyonu katı polimer matriksini (gri) oluşturur. Baskılanan fonksiyonel monomer etkileşimleri bozulmamıştır. Hedef molekül yıkama, kimyasal bağların kırılması ya da ligand değişimi ile uzaklaştırılır. Geride duvarlarında fonksiyonel grupları içeren özgül boşluklar kalır. Daha sonra hedef molekülün bu özgül boşluğu tanınması kovalent olmayan etkileşimler (i, ii ve iv), kovalent bağ oluşumu (iii), ya da ligand değişimi (v) ile gerçekleşir. Bununla birlikte, çapraz bağlanma sırasında hedef molekül çevresinde oluşturulan özgül olmayan yüzey özellikleri sayesinde matriksin hedef molekülü tanıma ve bağlanmaya katkıda bulunması söz konusudur.

2.4. Moleküler Baskılamada Metal İyon Koordinasyonu

Biyolojik moleküller ile metal iyon koordinasyonu özgüllük ve kararlılığından dolayı tercih edilmektedir. Baskılama esnasında metal koordinasyonunda metal şelatlayıcı monomerler metal iyonlarıyla (genellikle geçiş metal iyonu) ön kompleks oluşturur. Metal koordinasyonu hidrojen bağına göre daha kuvvetlidir. Bu onu suda daha kararlı yapar. Örneğin Cu^{+2} ve histidindeki imidazol kompleksinin bağlanma enerjisi 4.8 kcal/mol'dur. Bu değer tipik hidrojen bağlanma etkileşimlerinden 1 kcal/mol kadar azdır [63]. Bununla beraber metal koordinasyonu hızlı bir bağlanma gösterir. Ayrıca, seçiciliği arttırmak için metal iyonu başka bir metalle değiştirilebilir.

Metal afinite adsorpsiyonunda triptofanın indol, sistemin tiyol ve histidin imidazol grubu gibi yüzeyde bulunan elektron verici amino asit kalıntıları, immobilize metalin bağlanmasına katkıda bulunur. Proteinler immobilize metal ile aralarındaki afinite sabitini azaltan bazı koşulların oluşması durumunda komplekslerinden ayrılabilirler. Tuz derişimi, pH değişimi veya bağlanmada görev alan amino asit kalıntılarının benzerliği, yarışmacı ajanın varlığı, proteini bağlı bulunduğu kompleksten uzaklaştırabilir.

Metal iyonları ile biyolojik ligandlar arasındaki etkileşimler oldukça özgüdür. Bu etkileşimlerin oluşması ve kırılması sulu çözeltilerde hafif koşullar altında gerçekleşir [64]. Moleküler baskılamada bu tip etkileşimlerin kullanılmasının birçok avantajı vardır. Örneğin proteinlerin histidin kalıntılarındaki imidazol gruplarını hedeflemek için Cu^{+2} ve Fe^{+2} kullanılabilir. Diğer taraftan, Ni^{+2} ve Zn^{+2} fosforil gruplarını hedeflemede kullanılabilir. Polimer matriksi içinde metal iyonlarının yerinin değiştirilmesi seçiciliği değiştirir. Sulu çözeltilerde elektrostatik ve hidrojen etkileşimleri zayıftır ancak metal koordinasyon etkileşimleri çözücü ortamından etkilenmez. Diğer kovalent olmayan etkileşimlerin aksine substrat ve metal merkez arasında kesin bir etkileşim gerçekleşir. Bağlayıcı grupların fazlalığına gerek olmadan özgül olmayan bağlanma bölgelerinin oluşumu minimize edilir. Farklı çözeltilerdeki metal koordinasyon etkileşimlerinin kuvvetliliği ve özgüllüğü biraraya getirilerek biyolojik kökenli substratları tanımak için metal koordinasyon etkileşimleri ilgi çekici hale gelir.

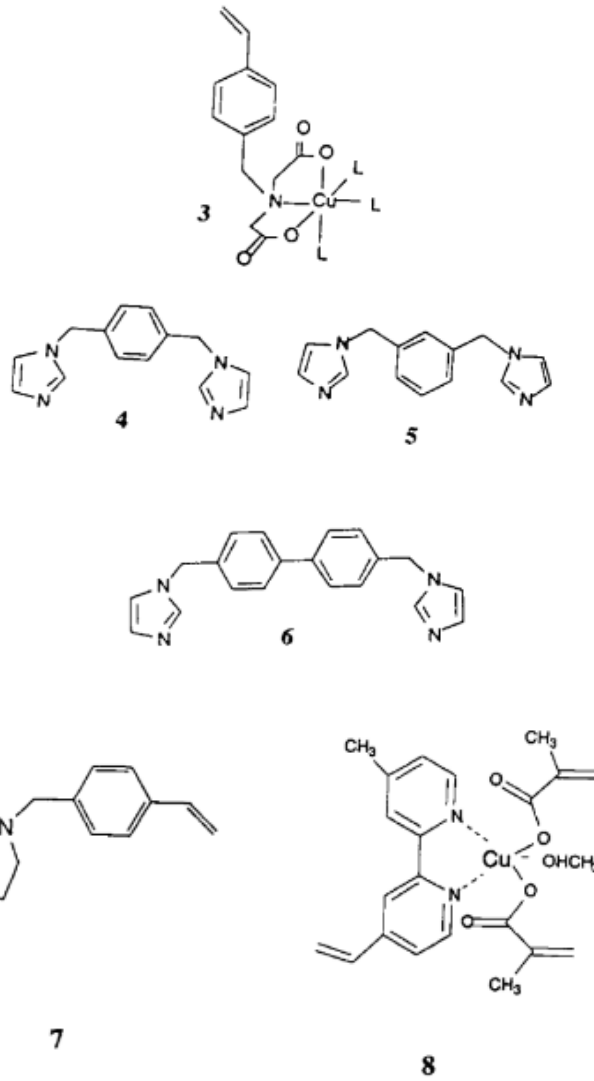
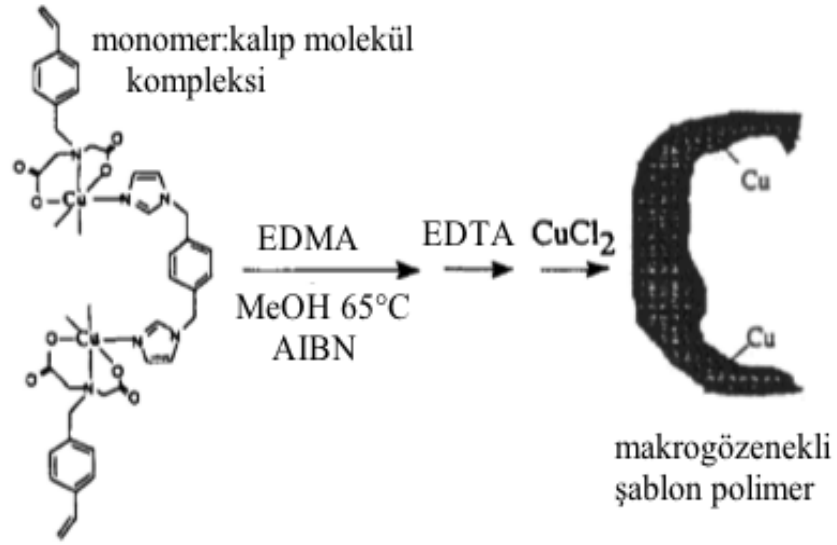
Saflaştırma teknolojilerinde, ligand-değişim kromatografisinde bileşikleri ayırmak için metal komplekslerin hızlı ve tersinir formasyonundan yararlanır, elektron verilebilir ve katı destek üzerine immobilize olmuş metal kompleksler ile koordinasyon yapılabilir. Alıkonma süresi, doğrudan ligand kompleksin kararlılığına bağlıdır. Kiral moleküllerin ayrılmasında kullanılan bu yöntem, proteinler gibi biyolojik makromoleküller için de başarıyla uygulanmıştır.

2.4.1. Metal Koordinasyon Etkileşimlerine Dayanan Moleküler Baskılanmış Polimerler

Substrat molekülü üzerindeki ligandların metal iyonlarıyla eşleşmesi, metal-kompleks yapıcı monomer ile substratın önorganizasyonu ile oluşur ve sonra çapraz bağlama polimerizasyonu gerçekleşir. Metal-ligand koordinasyonunun gücü ve özgüllüğü uygun metal iyonu ve ligand seçimi ile olur. Böylece farklı fonksiyonel gruplar içeren baskılanmış polimerler sentezlenir. Metal-ligand koordinasyon kompleksleri sulu ortamda kararlı olduklarından dolayı enzim, hormon, DNA, RNA gibi karmaşık biyolojik makromoleküller için reseptör tasarlamak mümkün olmuştur. İlk yaklaşım, iminodiasetik asit (IDA)- Cu^{+2} kompleksi ve imidazol arasındaki kuvvetli koordinasyonu kullanarak moleküler baskılanmış polimerler hazırlamak olmuştur. Fonksiyonel monomer olarak bileşik (3), kalıp molekül olarak çeşitli bis-imidazol türevleri (4-6) ve çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat kullanılarak polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon sırasında kalıp molekül ile polimerin kompleks yapması polimer içindeki metal iyonlarının pozisyonunu yönlendirirken yüksek derecede kullanılan çapraz bağlayıcı, metal koordinasyon bölgelerinin uzaysal

düzenlenmesini sabitler. Bu polimerizasyon süreci Şekil 2.15'te şematize edilmiştir. Elektron spin rezonans (ESR) spektroskopisi kullanılarak Cu^{+2} merkezleri ile imidazol grupları arasındaki etkileşimler karakterize edilmiştir. Farklı polimerlerden elde edilen ESR bilgileri, baskılanmış malzemelerdeki metal iyon bölgelerinin belirli düzenlenmelerinin kontrol polimerinde olmadığını göstermiştir. Polimer yarışmacı ajanların varlığında kalıp molekül için seçicilik gösterir. Diğer taraftan kontrol polimerleri her substrat için eşit bir tercih gösterir. Bu çalışmadan çıkarılacak sonuç baskılanmış polimerler imidazol konumlanmasında sadece $\sim 4 \text{ \AA}$ fark olan izomerlerin (**4 ve 5**) ayrımını yapabilir.





Şekil 2.15. bis-imidazol substratları için moleküler baskılanmış metal koordinasyon yapan polimerlerin hazırlanması [64]

Bu polimerlerin maksimum bağlama kapasiteleri, farklı substratlara ve benzerlerine olan bağlanma sabitleri belirlenmiştir. Sonuçlara göre substrat seçiciliği bis-imidazolün metal merkezlere koordinasyonu ile bağlanma bölgelerini içeren boşluklarla sterik etkileşiminin kombinasyonuna bağlıdır. Moleküler tasarımda metal ligand etkileşimlerinin kovalent bağa yakın bir kuvvette olmasını sağlamak önemlidir. Bu durum monomer birimlerinin polimer zincirindeki özgül olmayan birleşmelerini azaltır. Siklik poliamin (7) ve bipyridin (8) ligandlarını içeren metallerle kompleks yapıcı monomerler sentezlenmiştir. Monomer (8), bipyridin grupları haricinde üç tane polimerleşebilen grup daha içerir. Bis-imidazol substratları baskılanmış polimerler bu monomer kullanılarak hazırlanmıştır. IDA monomeri ile sentezlenen polimerik reseptörlere kıyasla, bu polimerik reseptörler daha fazla seçicilik göstermiştir (Çizelge 2.4) [64].

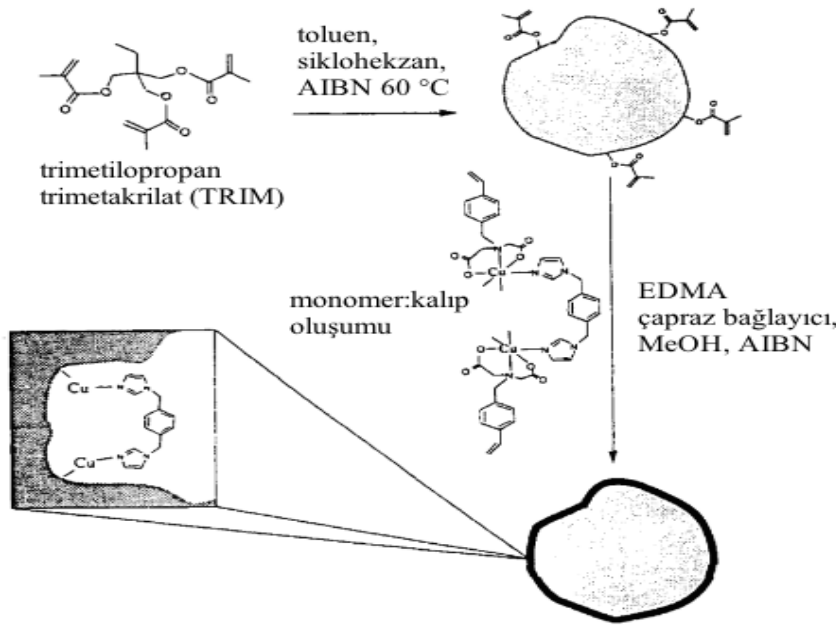
Çizelge 2.4. Farklı bis-imidazol türevleri için moleküler baskılanmış metal koordinasyon yapan polimerler

Monomer	Kalıp molekül	Substrat çifti	Bağlı Seçicilik katsayısı (α)
3	-	4+5	$\alpha_{4/5}=1.02$
3	4	4+5	$\alpha_{4/5}=1.17$
3	4	4+6	$\alpha_{4/6}=1.35$
3	5	4+5	$\alpha_{5/4}=1.15$
8	4	4+5	$\alpha_{4/5}=1.38$
8	4	4+6	$\alpha_{4/6}=1.72$

2.4.2. Yüzeyi Modifiye Edilmiş Metal Koordinasyonlu Baskılanmış Polimerler

Kromatografik uygulamalarda, özgül bağlanma bölgelerini yakalamak için göreceli olarak yüksek derişimde çapraz bağlayıcıların kullanıldığı baskılanmış polimerlerin partikül içine substrat difüzyonu engellenmiş olur. Bunun sonucunda band genişlemesi ve zayıf pik çözünürlüğü görülür. Büyük substratların bağlanma bölgelerine ulaşılabilirliği de engellenmiş olur. Ayrıca yığın polimerleşmiş kalıp polimerler, mekanik dayanıma ve hızlı bağlanma için gerekli homojenliğe sahip olmaz. Bu problemleri azaltmak için kullanılan yaklaşımlardan biri, baskılanmış polimeri ince film şeklinde uygun reaktif katı bir yüzeyde üretmektir. Kimyasal yaklaşımdan biri, Arnold ve ark.'larının kullandığı trimetilopropan trimetakrilat (TRIM) monomeridir [65]. Kontrollü şartlarda, bu üç fonksiyonlu monomerin makrogözenekli polimer ağında yüzeyde ulaşılabilir polimerleşmemiş metakrilat kalıntıları bulunur. Metakrilat kalıntılarına çeşitli fonksiyonel polimer zincirleri bağlanabilir. Poli(TRIM) matriks yüksek

mekanik kararlılığa ve farklı çözücülerde düşük şişme eğilimine sahiptir. Spektroskopik ve yüzey analiz yöntemleri (^{13}C NMR ve FTIR-ATR) ile karakterizasyon yapıldığında yüzey bağlı metakrilat kalıntılarının yok olduğu ve yeni fonksiyonel polimer zincirlerinin yapıya girdiği görülmüştür. X-ışını fotoelektron spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu analizleri ile aşılınmış fonksiyonel polimer zincirlerinin poli(TRIM) partiküllerin yüzeyini kapladığı kanıtlanmıştır. Şekil 2.16'da gösterilen moleküler baskılama, Cu^{+2} -IDA monomeri ve bis-imidazol kalıp molekülü ile bu reaktif polimer yüzeyinde gerçekleşmiştir.



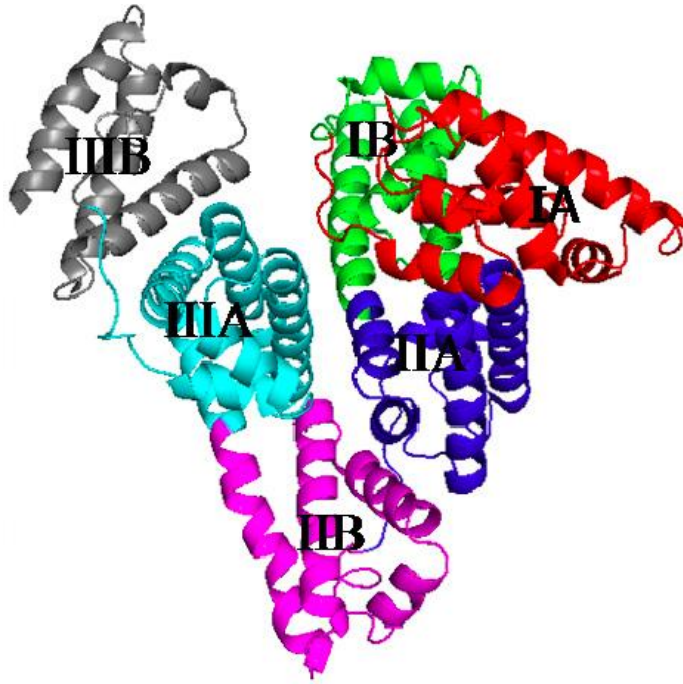
Şekil 2.16. Poli(TRIM) partiküller kullanarak yüzey baskılanmış metal-koordinasyonlu polimerlerin hazırlanması [64]

2.5. İnsan Serum Albuminin (HSA) Yapısı

Albumin en önemli damar içi proteindir. Albuminin yüksek derişimde olması ve boyutunun küçüklüğü nedeni ile normal plazma ozmotik basıncın yaklaşık % 75'ni oluşturur. Ayrıca taşıyıcı, tamponlayıcı ve serbest oksijen radikal temizleyicisi gibi önemli özellikleri olan tek bir polipeptittir. Moleküler ağırlığı 66-69 kDa'dur. Sağlıklı erişkinlerde karaciğer günde 9-12 g albumin sentezi yapar. Hepatositlerin % 20-30 kadarı albumin sentezine katılır.

İnsan serum albumin (HSA) bol miktarda bulunan, çok fonksiyonlu glukolize olmamış, ligand bağlayıcı ve taşıma özelliğine sahip, antioksidan görevi olan ve enzimatik aktivite gösteren negatif yüklü bir plazma proteindir [66]. Albumin, plazmada yaklaşık olarak 0.6 mmol/L derişimde bulunur. Toplam plazma proteinlerinin % 50'den fazlasını oluşturur. HSA, birkaç triptofan ya da metiyonin kalıntısı ile birlikte bol miktarda lizin ve aspartik asit gibi yüklü

kalıntılara sahip, prostetik grup ya da karbohidrat içermeyen, 585 amino asitten oluşan küçük bir globüler proteindir. X-ışını kristallografisi albuminin kalp şeklinde tersiyer yapısını göstermiştir ama albumin sulu çözeltilerde elipsoidal şekildedir. Tersiyer yapının % 67'si α -heliksten oluşmaktadır.



Şekil 2.17. İnsan serum albuminin (HSA) yapısı; kırmızı oksijen; mavi nitrojen; bölge IA, kırmızı; bölge IB, yeşil; bölge IIA, mavi; bölge IIB, pembe; bölge IIIA, turkuaz; bölge IIIB ise gri olarak gösterilmiştir [67].

Şekil 2.17'de gösterildiği üzere, protein, hem topolojik hem de üç boyutlu yapı olarak aynı olan üç eş bölgeden, bölge I (kalıntılar 1–195), II (196–383) ve III (384–585) ve her bir bölge iki alt-bölgeden (A ve B) oluşmaktadır. Alt-bölgeler 4 ve 6 α -heliksten oluşur. HSA, disülfid köprüsü (toplam 17) oluşturan 35 sistein kalıntısı içerir [67-68]. Ayrıca, plazmadaki tiyolün % 80'inden sorumlu olan, bir serbest sistein türevli, redoks aktif, tiyol grup (-SH) (Cys-34) içerir. HSA'nın N-ucu (N-Asp-Ala-His-Lys-) Cu, Ni ve Co iyonlarına yüksek afiniteyle bağlanırken; Au, Ag ve Hg iyonları Sistein-34'e bağlanır. HSA, plazmada esas Zn bağlayıcı proteindir. HSA'nın ayrıca zayıf etkileşimler ile özgül olmayan demir bağlama özelliği vardır. Bu durum, plazmadaki özgül ve yüksek seçicilikte demir bağlayıcı protein transferrin olduğu için normal koşullar altında önemsizdir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan *Acetobacter xylinum* ATCC 10245 suşu, Amerika Birleşik Devletleri, Tarımsal Araştırma Servisi Kültür Koleksiyonu'ndan (Agricultural Research Service Culture Collection, ARS, USA) liyofilize formda temin edilmiştir. Bakteriyel selülozun sentezlenmesinde kullanılan besi yeri bileşenleri olan D(-) glukoz, pepton, maya özütü, K₂HPO₄ ve KHPO₄ Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından analitik saflıkta temin edilmiştir. 3-(Trimetoksisilil) propil metakrilat (3-MPS), coomassie mavisi, N,N,N',N',tetrametiletildiamin (TEMED), amonyum persülfat (APS), akrilamid, N,N'-metilenbisakrilamid (MBAAm), insan serum albumin (HSA), insan transferrin (HTr) ve miyogloblin (Myo) Sigma (St. Louis, ABD) firmasından elde edilmiştir. Yapay insan plazması TOKRA (Ankara, Türkiye) firmasından satın alınmıştır. Asetik asit ve kullanılan diğer kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiş olup analitik saflıktadır. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters osmoz Barnstead Ropure LP® birimi ile ve ardından Barnstead D3804 NANOpure organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun direnci 18 MΩ/cm'dir.

3.2. Bakteriyel Selüloz Üretimi

Çalışmada kullanılan besi ortamı, literatürde çalışılmış ve optimum olarak belirlenmiş olan koşulların arasından seçilmiştir. Sıvı besi yeri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Bu besi yeri 1.0 M HCl ile pH 5.0'e ayarlanmış ve 120°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Çizelge 3.1. Hestrin-Schramm sıvı besi yeri

Bileşen	Derişim
Baktopepton	10 g/L
Maya özütü	10 g/L
D(-) Glukoz	20 g/L
KH ₂ PO ₄	4 mM
K ₂ HPO ₄	6 mM

Çizelge 3.1'de verilen besi yerine 15 g/L agar eklenerek otoklavda steril edilmiştir. Petri kaplarında hazırlanan bu katı besi ortamına stok kültürden öze ucu yardımıyla çizilerek tek

koloni düşürme yöntemi ile ekim yapılmıştır. Durgun koşullardaki 3 günlük inkübasyon süresi sonunda oluşan olgun 3 koloni öze ucu ile seçilmiştir. Bu koloniler 100 mL'lik erlene transfer edilip 3 gün boyunca çalkalamalı etüvde, sıvı besi (Çizelge 3.1) ortamında inkübe edilerek standart aşı çözeltisi oluşturulmuştur [69]. Süre sonunda stok kültürden 10 mL alınarak 3 adet 100 mL Hestrin-Schramm besiyerinin erlenmayerlere ekimi yapılarak 28°C'de inkübatörde durgun ortamda 2 hafta süreyle inkübe edilmiştir.

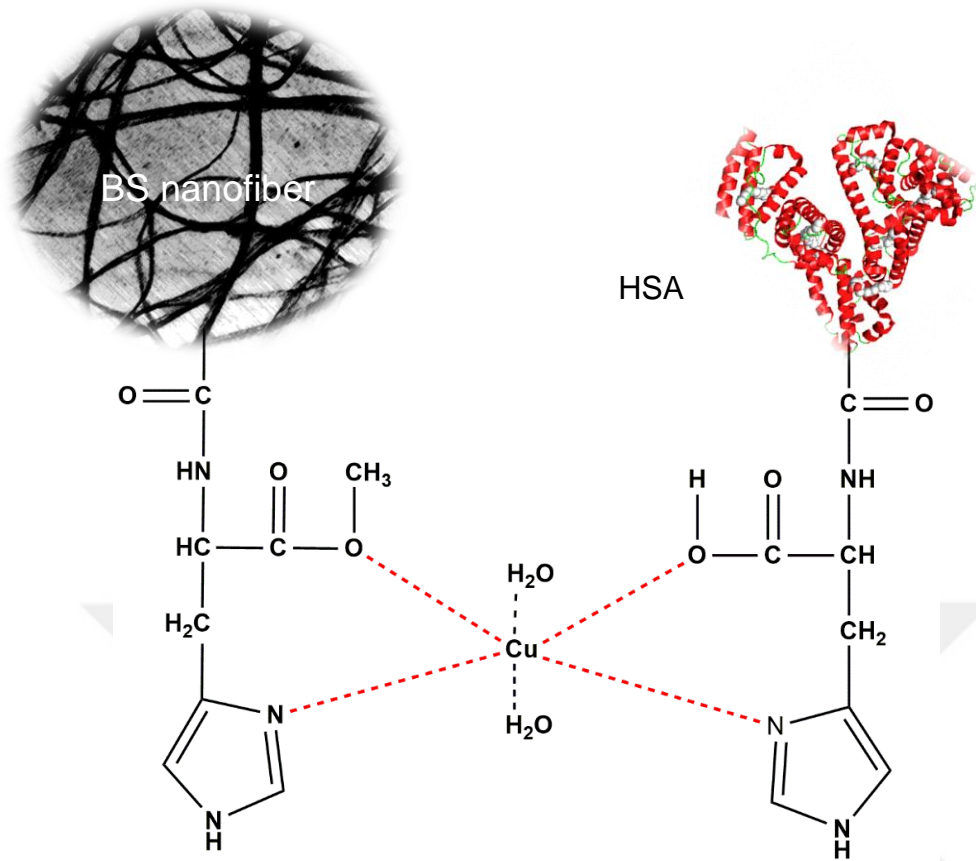
Bakteriyel selüloz nanofiber membranlar daha sonra 1.0 M NaOH çözeltisinde 1 saat boyunca 80°C'ta kaynatılmıştır. NaOH muamelesi nanofiberler membranların içinde gömülü olan bakterilerin parçalanmasını sağlayarak nanofiberleri saflaştırır. Bazik koşulların giderilmesi amacıyla yıkama suyunun pH'sı nötr olana dek membranlar distile su ile sürekli yıkanmışlardır. Kurutma etüvünde 40°C'te kuruyana kadar bekletilmiş ve tartımı yapılmıştır.

3.3. N-Metakriloil-L-Histidin Metil Ester (MAH) Monomerinin Sentezi

N-Metakriloil-L-histidin metil ester (MAH) monomerinin sentezi için 5.0 g L-histidin metil ester ve 0.2 g hidrokinon, 100 mL diklorometan (CH_2Cl_2) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C'a soğutulmuştur. 12.7 g trietilamin bu çözeltiliye ilave edilmiştir. 5.0 mL metakriloil klorür yavaşça bu çözeltiliye eklenmiştir. Bu reaksiyon karışımı azot gazı altında manyetik karıştırıcı ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyonun sonunda, reaksiyona girmeyen metakriloil klorür, % 10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan kısım etanolde çözülmüştür. Daha sonra kristallendirme işlemi ile saf N-metakriloil-L-histidin metil ester katı halde elde edilmiştir [70].

3.4. MAH-Cu⁺² HSA Kompleksinin Hazırlanması

MAH-Cu⁺² metal şelat monomerinin hazırlanması için 0.01 mmol MAH ve 0.01 mmol Cu(NO₃)₂ 5 H₂O 1.0 mL 10 mM pH 6.0 fosfat tamponunda oda sıcaklığında yarım saat boyunca karıştırılmıştır. UV-vis spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya) cihazı ile belirlenen en uygun MAH-Cu⁺² kompleksi mol oranı 1:1'dir [71]. MAH-Cu⁺² HSA kompleksi için farklı mol oranlarında mmol MAH-Cu⁺²: mmol HSA (20:1, 40:1, 80:1 ve 100:1) olacak şekilde metal şelat monomeri hazırlanmıştır. HSA miktarı sabit tutularak farklı mol oranlarındaki MAH-Cu⁺² kompleksi 10 mM pH 6.0 fosfat tamponunda biraraya getirilerek oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır. Literatürde L-histidin-Cu⁺² kompleksinin farklı koordinasyon mekanizmaları mevcuttur [72]. Şekil 3.1'de muhtemel MAH-Cu⁺² HSA kompleksinin oluşumu şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. MAH-Cu²⁺ HSA kompleksinin oluşumu

3.5. MIP ve NIP BS Kompozit Nanofiberlerin Hazırlanması

İki haftalık BS nanofiberler ilk önce, toluen içerisinde ağırlıkça %10 3-(trimetoksisilil) propil metakrilat (3-MPS) ile 80°C'de 5 saat bekletilmiş ve daha sonra metanol ile 24 saat yıkanmıştır. MIP BS kompozit nanofiberlerin hazırlanması için, farklı mol oranlarında MAH-Cu²⁺ HSA kompleksleri (20:1, 40:1, 80:1 ve 100:1 mmol HSA: mmol MAH-Cu²⁺) ile BS nanofiberler ayrı ayrı oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak MBAAm eklendikten sonra, çözelti 5 dakika boyunca azot gazına tutulmuştur. APS/TEMED (20 µL, %10 APS ve 20 µL TEMED) başlatıcı çifti varlığında oda sıcaklığında polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, üç farklı toplam monomer derişimde (ağırlıkça % 1; % 0.5; % 0.1) BS MIP kompozit nanofiberler sentezlenmiştir. Polimerizasyon sonrası reaksiyona girmeyen kimyasalları uzaklaştırmak için nanofiberler birçok kez distile su ile yıkanmış ve kullanılabilece kadar 4°C'de bekletilmiştir. Kalıp molekül olan HSA, 1.0 M NaCl ile uzaklaştırılmıştır. NIP BS kompozit nanofiberler aynı yöntem ile kalıp molekül kullanılmadan hazırlanmıştır. Ayrıca, metal iyonunun adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisini görmek için

MAH monomeri Cu²⁺ iyonları olmadan doğrudan HSA molekülleri ile etkileştirilmiş ve aynı koşullarda polimerizasyon gerçekleştirilmiştir (BS-kontrol).

3.6. Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.1. Bakteriyel Selüloz (BS) Kompozit Nanofiberlerin Şişme Özelliği

BS kompozit nanofiberler ile sentezlenen MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler 24 saat boyunca oda koşullarında kurutulduktan sonra ± 0.0001 duyarlıkla tartılmıştır. Daha sonra, distile suda bekletilerek zamanla değişen şişme oranları aşağıdaki Eşitlik 3.1 kullanılarak elde edilmiştir.

$$\% \text{ Su tutma oranı} = [(W_s - W_0) / W_0] \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

W_0 ve W_s nanofiberlerin sırayla şişmeden önceki ve sonraki ağırlıklarıdır (g). Yeni üretilmiş ve saflaştırılmış BS kompozit nanofiberlerin ilk şişmesi için ilk tartımı ve kurutmadan sonra da ikinci tartımı alınmıştır. Eşitlik 3.1 ile % su tutma oranları hesaplanmıştır.

3.6.2. BS Kompozit Nanofiberlerin Yüzey Morfolojisi

BS kompozit nanofiberlerin yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) (QUANTA 400F Field Emission, Ortadoğu Teknik Üniversitesi) ile incelenmiştir. Bu amaçla ilk basamakta BS kompozit nanofiberler 1 saat derin dondurucuda bekletilmiş, ardından 24 saat boyunca (-60°C, 0.050 mbar) liyofilize edilmişlerdir (Liyofilizatör, Christ Alpha 1-2 LD plus, Almanya). Nanofiber parçaları iletken yapıştırıcı ile SEM örnek plakası üzerine tutturulmuştur. Daha sonra örnek yüzeyi vakum altında metalik altın ile kaplanarak yüzey iletken hale getirilmiştir. Hazırlanan örnekler SEM yuvasına yerleştirilerek farklı büyütme oranlarında fotoğraflanmıştır.

3.6.3. BS Kompozit Nanofiberlerin BET ile Yüzey Alanı Ölçümü

MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin yüzey alanı ölçümü Brunauer, Emmet ve Teller (BET) methodu (Quantachrome, Nova 2200E, USA) kullanılarak 77 K sıcaklıktaki sıvı azotta, azot gazı adsorpsiyonu yöntemine göre, çok noktalı BET yüzey alanı ölçümü ile gerçekleştirilmiştir.

3.6.4. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi -Azaltılmış Toplam Yansıma (FTIR-ATR) Analizi

MAH monomeri ve MIP BS kompozit BS nanofiberler, FTIR-ATR spektrofotometresi (FTIR-ATR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) kullanılarak incelenmiştir. MAH monomeri (2 mg) ve MIP BS kompozit nanofiber (2 mg), KBr (98 mg, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırıldıktan sonra tablet haline getirilmiş ve 450-4000 cm⁻¹ aralıkta spektrumları çekilmiştir.

3.6.5. BS Kompozit Nanofiberlerin Temas Açısı Ölçümü

MIP BS kompozit nanofiberlerin temas açısı KRUSS DSA 100 (Hamburg, Almanya) cihazı ile Sessile Drop yöntemi kullanılarak bir damla suyun nanofiber yüzeyine düşürülmesi ile 20 ölçümün ortalaması alınarak ölçülmüştür.

3.7. Adsorpsiyon Çalışmaları

3.7.1. Sulu Çözeltiden HSA Adsorpsiyonu

Sulu çözeltiden HSA adsorpsiyonu, MIP ve NIP kompozit BS nanofiberler ile kesikli sistemde çalışılmıştır. Başlangıç HSA derişimi (0.1- 3.0 mg/mL), ortam pH'ı (3.0-8.0), adsorpsiyon zamanı (0-90 dak), sıcaklık (15-45°C) ve iyonik şiddet (0-0.2 M NaCl) parametrelerinin HSA adsorpsiyonuna etkileri incelenmiştir. Nanofiberler ile etkileşmeden önce ve sonraki HSA derişimleri belirlenerek adsorplanan HSA miktarı belirlenmiştir. Bu amaçla UV spektrofotometre (Shimadzu 1601, Tokyo, Japonya) cihazı kullanılmıştır. Ölçümler 280 nm'deki absorbans okumaları ile gerçekleştirilmiştir. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir. Birim nanofiber ağırlığına adsorplanan HSA miktarı aşağıdaki eşitlik ile belirlenmiştir:

$$Q = (C_{ilk} - C_{son}) V / m \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

Bu eşitlikte; Q: adsorplanan HSA miktarı (mg/g nanofiber); C_{ilk}: adsorpsiyon öncesi HSA çözeltisinin derişimi (mg/mL); C_{son}: adsorpsiyon sonrası HSA çözeltisinin derişimi (mg/mL); V: çözelti hacmi (mL); m: nanofiberlerin kuru ağırlığı (g)'dır.

3.7.2. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerden HSA desorpsiyonu için 1.0 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Bu amaçla HSA adsorbe nanofiberler desorpsiyon çözeltisine aktarılmış, oda sıcaklığında 2 saat süre ile 20 rpm'de karıştırılmıştır. Desorpsiyon çözeltisindeki HSA miktarı spektrofotometrik olarak okunmuştur. Nanofiber membranların tekrar kullanılabilirliğinin tespiti amacıyla adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı membranlarla 6 kez tekrarlanmıştır.

3.7.3. Seçicilik Çalışmaları

MIP BS kompozit nanofiberlerin HSA (Ma: 67.0 kDa, pI: 4.9) seçiciliği, insan transferrin (HTr; Ma:80.0 kDa; pI:5.2) ve miyoglobin (Myo; Ma:17.0 kDa; pI:6.8-7.2) yarışmacı ajanları varlığında 50 mM pH 6.0 fosfat tamponunda kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. HSA, transferrin (HTr) ve miyoglobin (Myo) molekülleri 1.0 mg/mL derişimlerde hazırlanmıştır. HSA, HTr ve Myo moleküllerinin MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlere adsorbisyon miktarını belirlemek için UV-vis spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. HSA, HTr ve Myo moleküllerinin seçicilik ve dağılım katsayıları eşitlik 3.3, 3.4, 3.5'e kullanılarak hesaplanmıştır.

Eşitlikte K_d dağılım katsayısını (mL/g) ifade eder. C_i ve C_f , moleküllerin ilk ve son derişimlerini (mg/mL); V , çözelti hacmi (mL) ve m kullanılan BS kompozit nanofiberin kütlesini (g) gösterir.

$$Kd = \left[\frac{(C_i - C_f)}{C_f} \right] \times \left(\frac{V}{m} \right) \quad (\text{Eşitlik 3.3})$$

Yarışmacı türler varlığında HSA molekülünün bağlanma seçiciliğini ifade eden **seçicilik katsayısı** Eşitlik 3.4'e göre denge bağlanma verileri kullanılarak elde edilir.

$$k = \frac{Kd, kalıp}{Kd, yarışmacı} \quad (\text{Eşitlik 3.4})$$

Baskılanmış adsorbent ile diğer moleküllerin k değerleri, baskılama seçiciliğinin değerlendirilmesinde kullanılır. **Bağlı seçicilik katsayısı** aşağıdaki Eşitlik 3.5 ile gösterilmiştir.

$$k' = \frac{KMIP}{KNIP} \quad (\text{Eşitlik 3.5})$$

3.8. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

BS kompozit nanofiberler insan plazmasından adsorplanan ve desorplanan HSA'nın saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE kullanılmıştır. İnsan plazması çözeltisi BS kompozit nanofiberler ile 3 saat inkübe edilmiş ve desorpsiyonun ardından toplanan örnekler yükleme çözeltisi ile uygun oranlarda karıştırılmıştır. Hazırlanan örnekler denatüre edildikten sonra, örnekler buza alınarak jele yüklenmiştir. Cihaz 100 V'ta 2.5 saat süre ile yürütülmüştür. Bu süre sonunda jel boyama öncesi uygun çözeltiliye (% 5 asetik asit, % 50 metanol) alınmıştır. Daha sonra coomassie mavi boyasına alınarak çözeltiliyle birlikte gece boyunca bekletilmiştir. Jeldeki fazla boyayı uzaklaştırmak amacıyla % 20 metanol ve % 10 asetik asit içeren çözelti ile defalarca yıkama yapılmıştır.

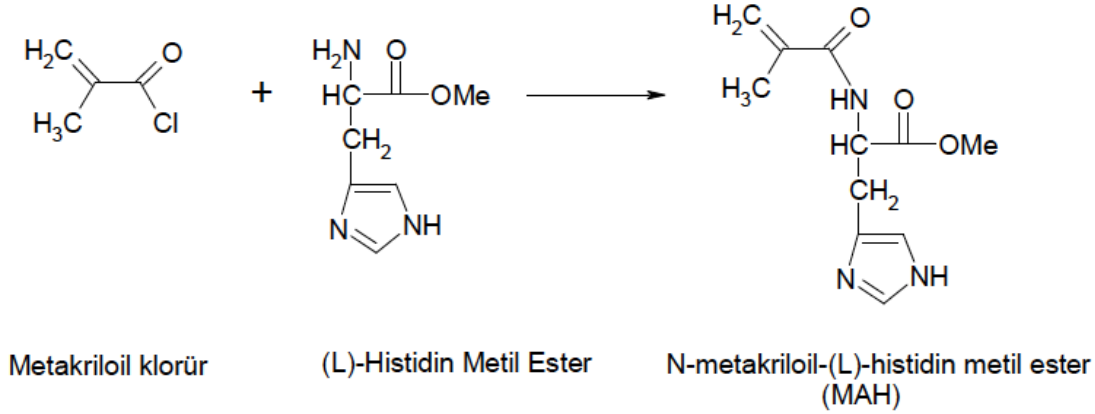


4. SONUÇ VE TARTIŞMA

4.1. Karakterizasyon Çalışmaları

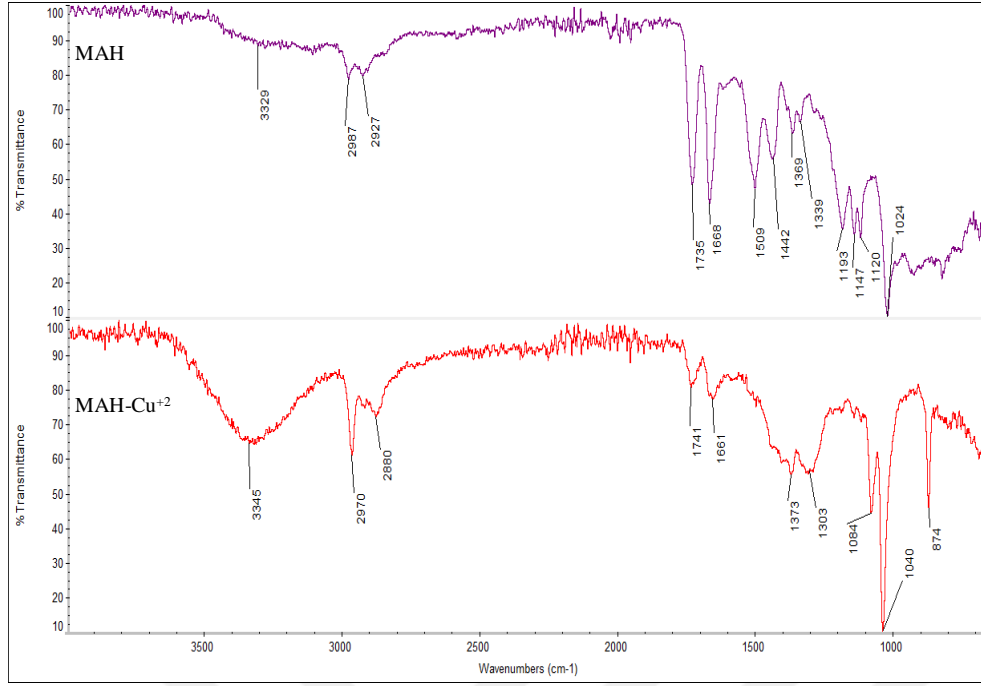
4.1.1. MAH Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

MAH monomeri, L-histidin metil esterin metakriloil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MAH monomerinin sentez reaksiyonu

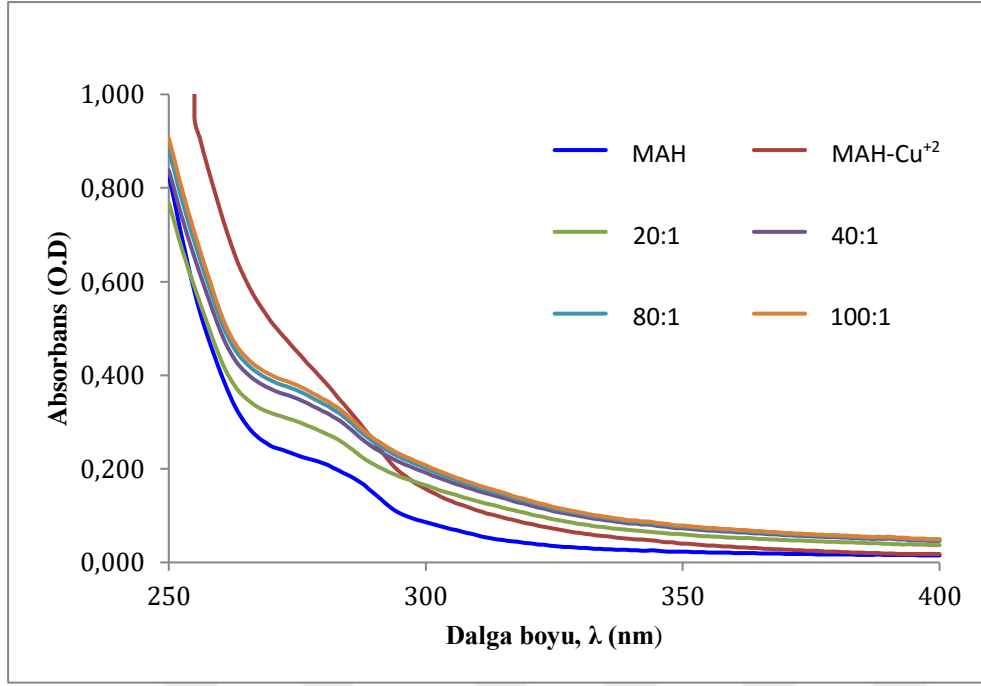
MAH monomerinin yapısal karakterizasyonu için FTIR-ATR yöntemi kullanılmıştır. Şekil 4.2.'de MAH monomeri ve MAH-Cu⁺² kompleksine ait FTIR-ATR spektrumları görülmektedir. MAH monomerine ait 1735 cm⁻¹'de karakteristik karbonil bandı (-C=O); 1668 cm⁻¹ amid gerilme bandı (-C-N) ve 1442 cm⁻¹'de metilen gerilme bandı (-CH₂) görülmektedir. MAH-Cu⁺² kompleksinde ise 1735 cm⁻¹ deki karbonil bandı 1741 cm⁻¹ ve 1668 cm⁻¹'deki amid bandı 1661 cm⁻¹'e kaymış ve şiddetlerinde azalma meydana gelmiştir. Ayrıca 1442 cm⁻¹'deki -CH₂ bandı 1303 cm⁻¹'e kaymıştır. Bu kaymalar Cu⁺² iyonlarının MAH monomerine koordine olduğunu gösterir.



Şekil 4.2 . MAH ve MAH-Cu²⁺ monomerine ait FTIR-ATR spektrumları

4.1.2. MAH-Cu²⁺ HSA Kompleksinin Hazırlanması

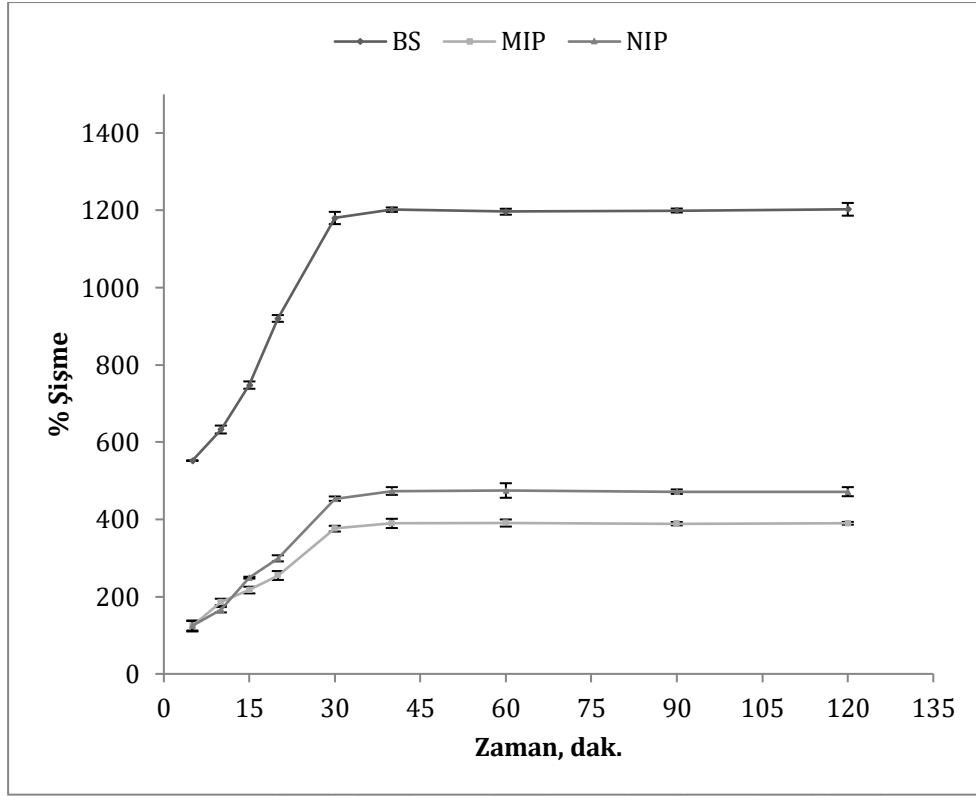
Proteinlerin hafif metallere (Cu²⁺) bağlanması kalıntılardaki histidin ve sistein gibi elektron verici gruplar sayesinde olur. HSA'nın N-ucu (N-Asp-Ala-His-Lys-) Cu²⁺ iyonlarına yüksek afiniteyle bağlanır. HSA yüzeyde bir adet serbest tiyol (Cys 34) kalıntısına sahiptir. Bu sistein ve triptofan (Trp 214) kalıntıları da şelatlayıcı Cu²⁺ iyonu ile HSA arasındaki bağlanmaya yardımcı olabilir [73]. MAH-Cu²⁺ HSA kompleksinin hazırlanması için, dört farklı mol oranında (20:1, 40:1, 80:1, 100:1) MAH-Cu²⁺ kompleksi 10 mM pH 6.0 fosfat tamponunda 0.0005 mmol HSA ile bir saat karıştırılmıştır. Böylece yüzeydeki elektron verici gruplar protonlanmamış ve metal iyonu ile koordinasyon yapabilecek durumdadır. Şekil 4.3'te MAH-Cu²⁺ HSA komplekslerinin UV-görünür bölge (UV-vis) spektrumları gösterilmektedir. Dört farklı mol oranındaki MAH monomeri 343 nm dalgaboyu civarında maksimum absorptans vermiştir. MAH-Cu²⁺ kompleksinde 393 nm dalga boyuna kayma gözlenmiştir. MAH-Cu²⁺ HSA kompleksi ise yaklaşık aynı dalga boyunda artan şiddette maksimum absorptans vermiştir. Şiddetin artması hem MAH monomerinden hem de HSA'de bulunan amino asitlerin görünür bölgede absorptans vermesinden dolayı beklenen bir durumdur.



Şekil 4.3. MAH-Cu²⁺ HSA komplekslerinin UV-vis spektrumları

4.1.3. BS Kompozit Nanofiberlerin Şişme Özellikleri

Çapraz bağlanma oranı düşük sistemlerde makromoleküler zincirlerin hareketi özellikle fonksiyonel grupların yerleşimi, seçilen çözücüye göre ağ yapısı genişletip daralttığı için değişecektir [74]. Bu süreç tersinirdir ve bağlanma davranışını etkiler. Biyolojik uygulamalarda kovalent olmayan sentez yolları tercih edilir; böylece sert koşullar uygulamadan kalıp molekülün uzaklaştırılması sağlanabilir. Baskılanma başarısını gösteren yüksek bağlama afinitesi ve özgülük kalıp molekül-monomer kompleksi oluşumu sırasında, çözücü ve kovalent olmayan etkileşimler (hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, π - π orbital etkileşimleri, iyonik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri) arasındaki göreceli çapraz etkileşim miktarına bağlıdır. Eğer çözücü bu etkileşimleri engeller ya da onlarla yarışır daha az etkili bir tanıma gerçekleşir. Makromoleküler zincir hidrofobisitesini arttırmak [75] için hidrofobik bölgeler ile güçlü iyonik tanıma bölgeleri ya da daha güçlü hidrojen bağı donör ve akseptörleri içeren [76] kovalent olmayan etkileşimler ayarlanabilirse, bağlanmanın arttığı ve sulu çözeltilerde seçici tanımanın başarılı şekilde gerçekleştiği görülmüştür. Ligand-reseptör bağlanma enerjisinin termodinamik analizleri bu parametrelerin kovalent olmayan tanımda önemini göstermiştir [77].



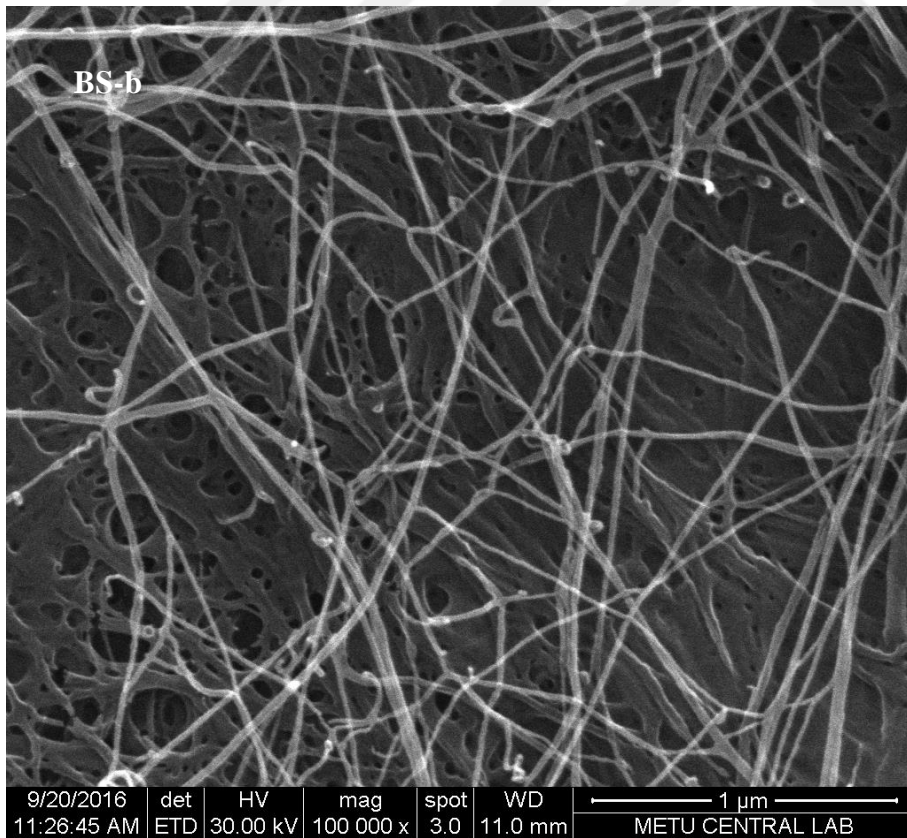
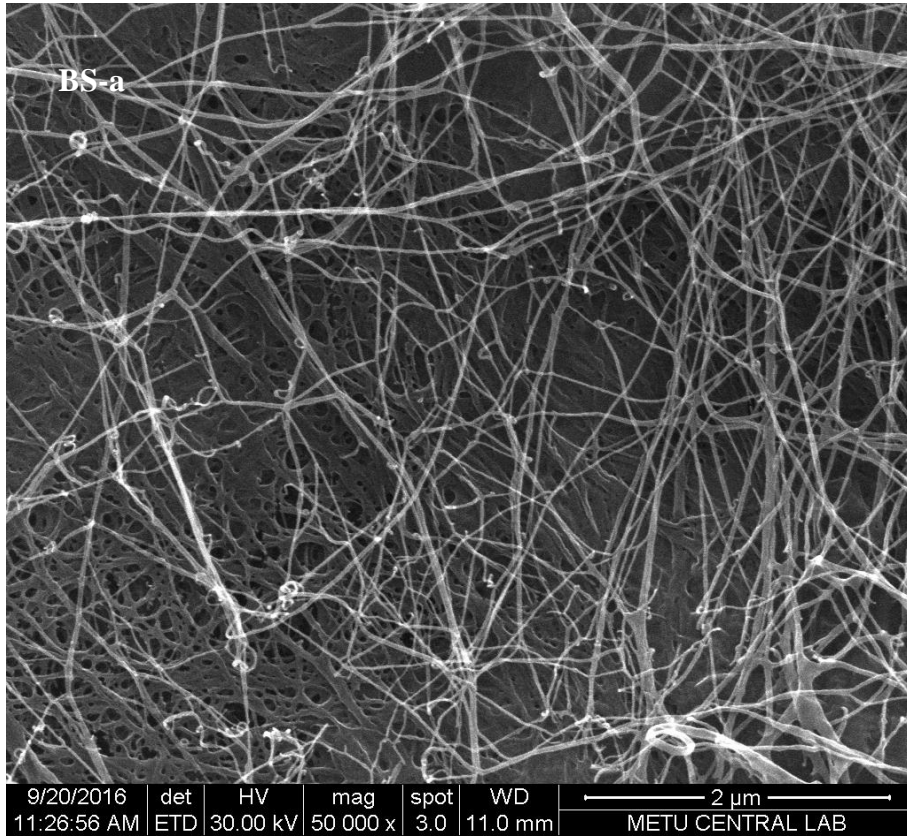
Şekil 4.4. BS, MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin % şişme kapasiteleri

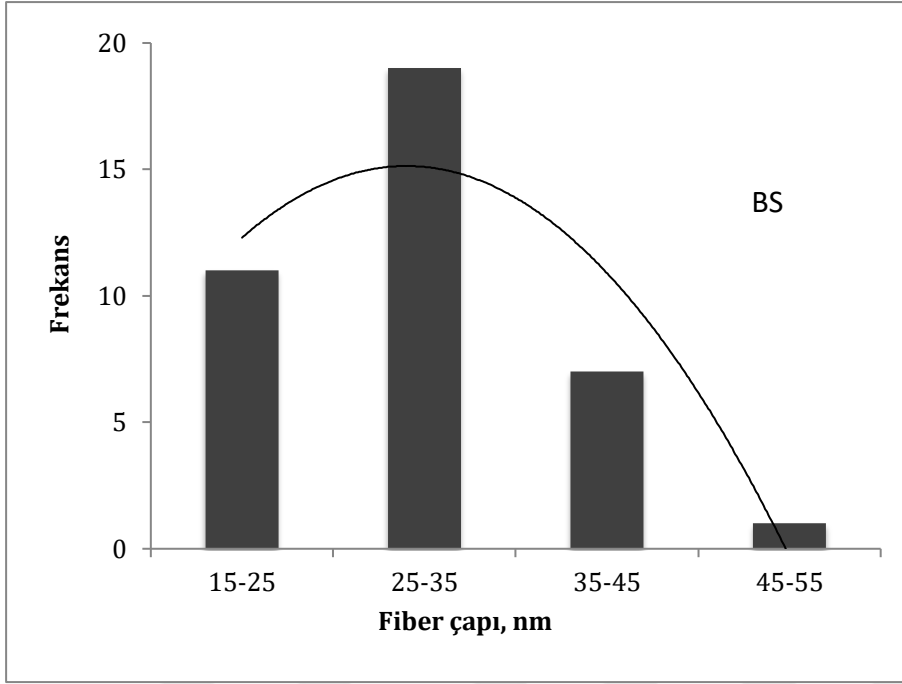
BS kompozit nanofiberlerin şişme davranışları ağ yapısının elastikiyetine, polimerdeki hidrofilik grupların (-OH, -COOH, -CONH₂) varlığına çapraz bağlayıcıya ve polimerin porozitesine bağlıdır. Şişme özelliği malzemenin yapısı hakkında bilgi verir ve ağ yoğunluğu, iyonik kuvvet, pH ve sıcaklık gibi birçok parametreden etkilenir [78].

Şekil 4.4'te görüldüğü gibi bakteriyel selülozun hidrofilik yapısı nedeniyle su tutma kapasitesi fazladır. BS'nin yüksek yüzey alanı sayesinde yüzde şişme oranı da fazladır. BS'nin polimerizasyon işleminden sonra su tutma kapasitesi azalmıştır. Su tutma kapasitesindeki bu azalma MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler için yakın değerdedir.

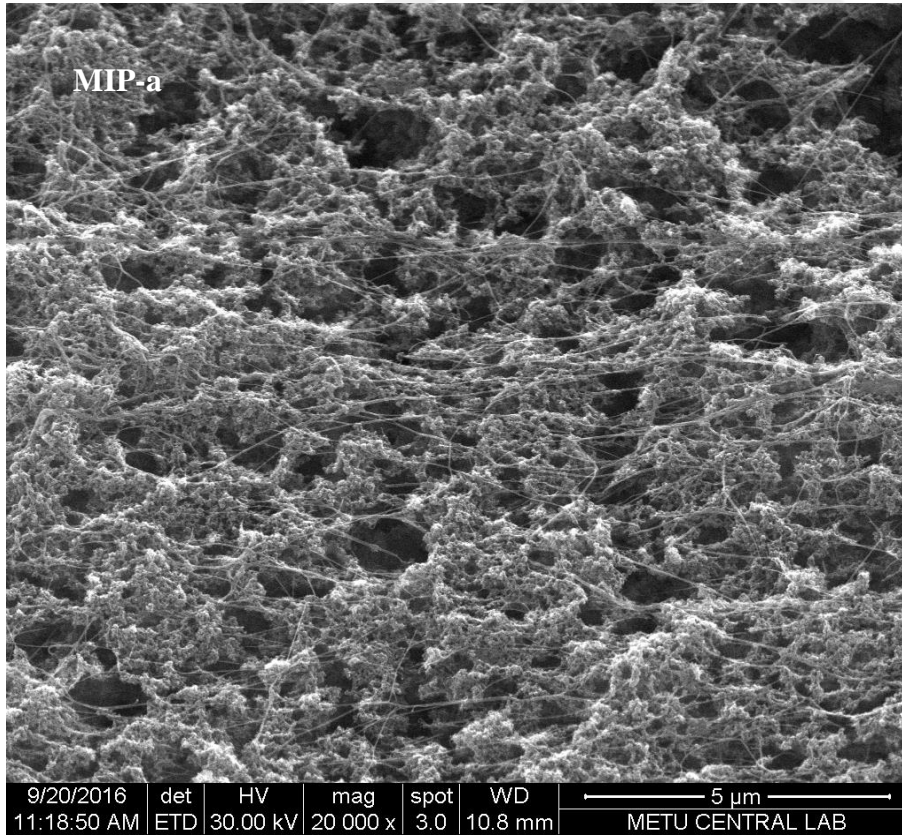
4.1.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

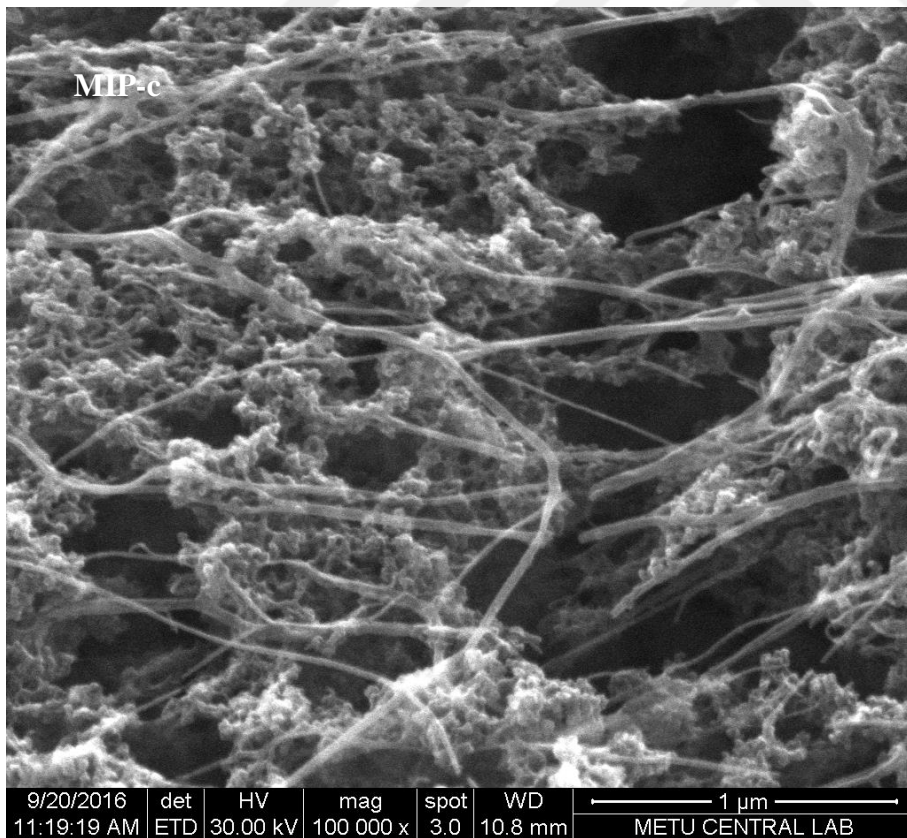
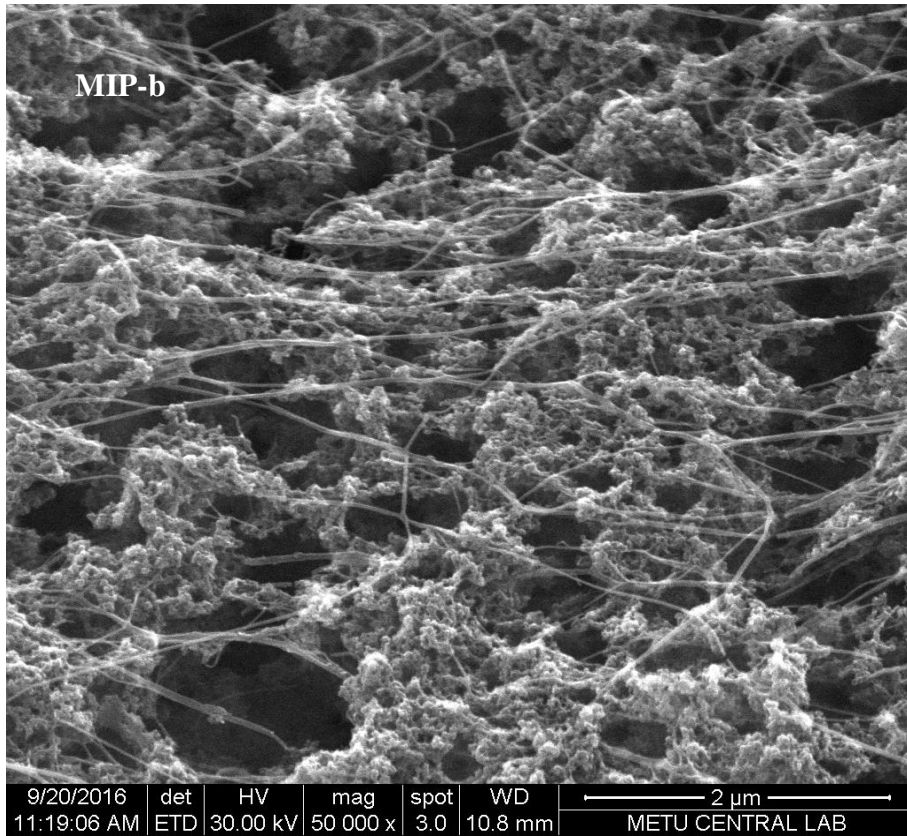
BS, MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7'deki BS, MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin SEM görüntülerinde fiber ipliklerin benzer özellikte olduğu görülmektedir. SEM görüntülerinden en az 50 adet bağımsız fiber seçilerek fiber çapı boyutu ve dağılımı ImageJ yazılımı ile belirlenmiştir. BS, MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler için ortalama fiber çapı boyutu sırasıyla 29.6 ± 7 nm, $32,2 \pm 9.2$ ve 27.3 ± 6.8 şeklindedir. Polimerik yapının fiber iplikleri etrafında oluştuğu görülmektedir.

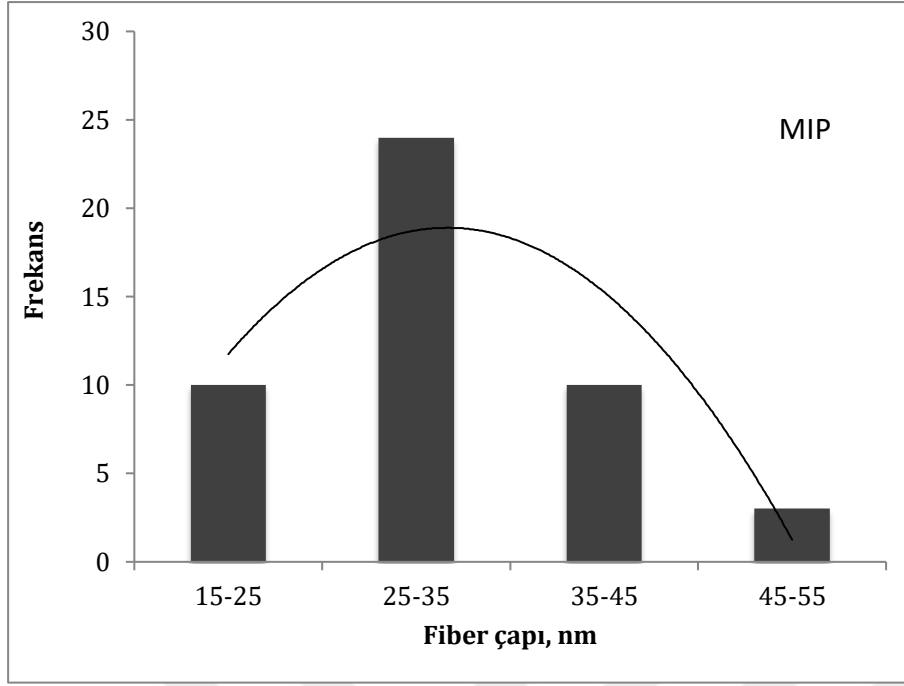




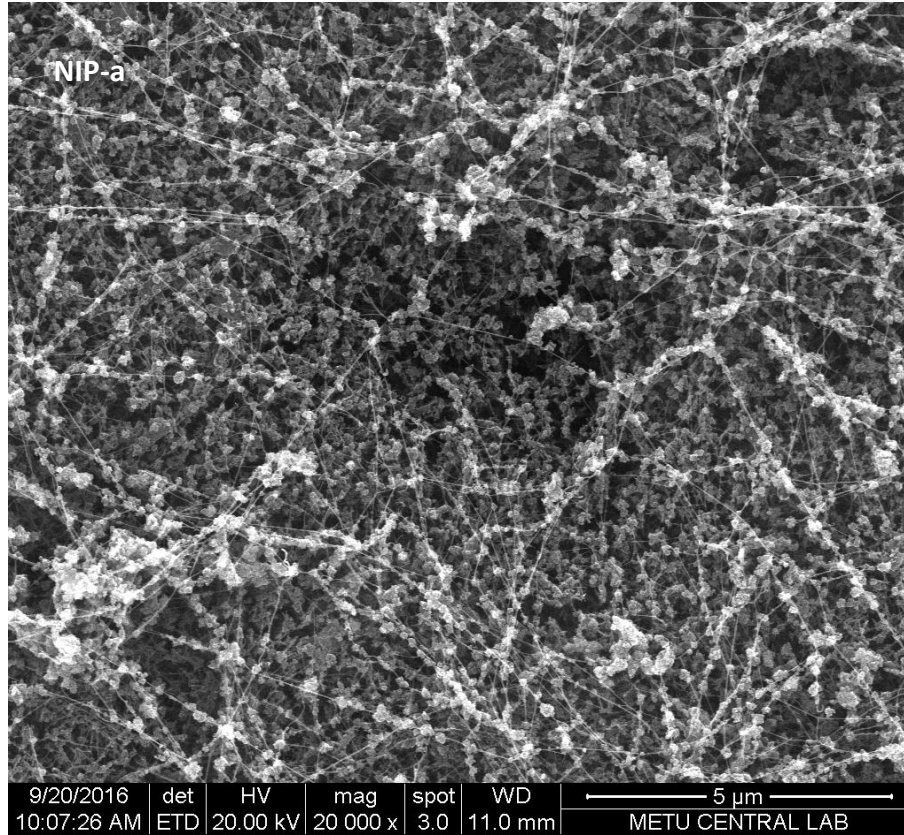
Şekil 4.5. Bakteriyel selüloz (BS) nanofiberlerin farklı büyütme oranlarındaki (a-50 000X, b-100 000X) SEM görüntüsü ve fiber çapı dağılım grafiği

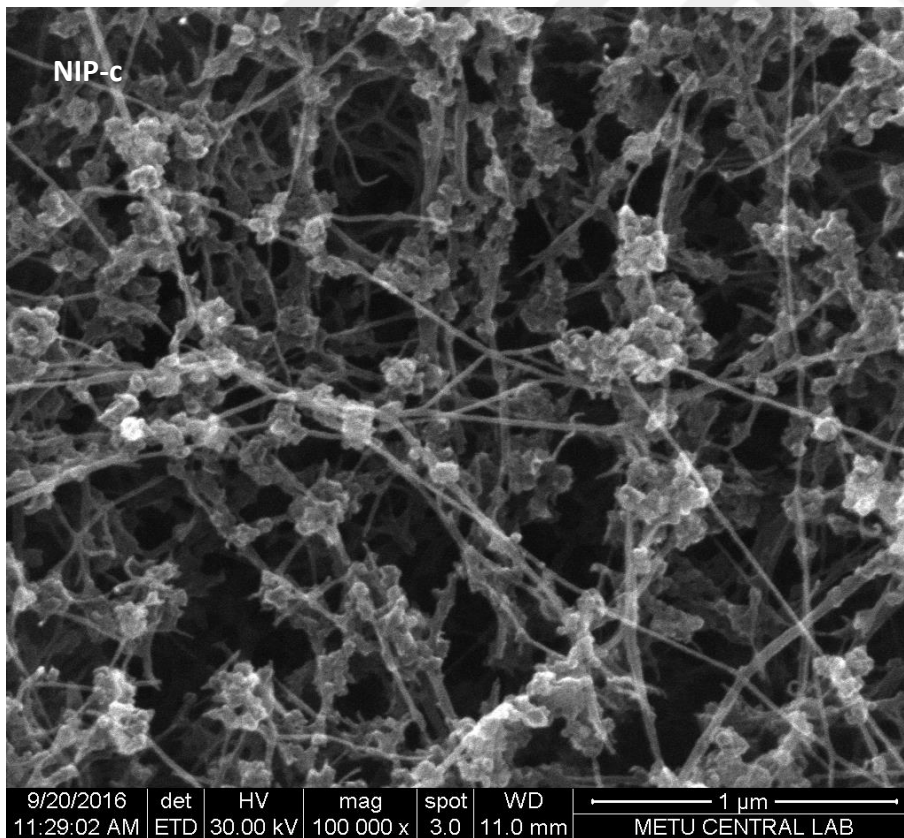
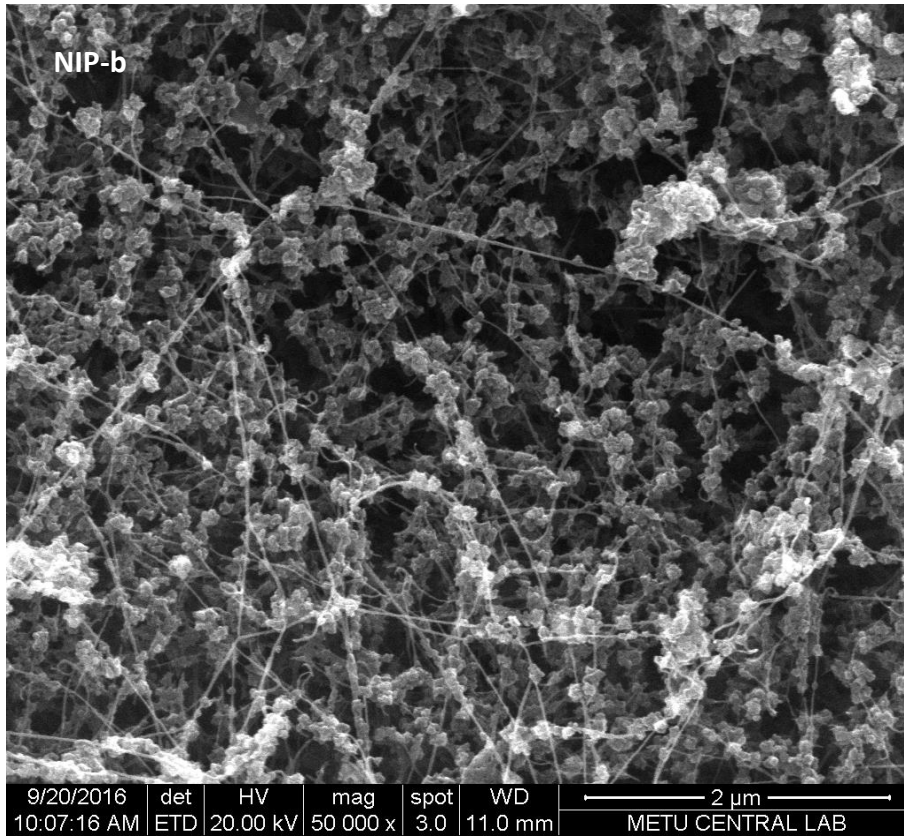


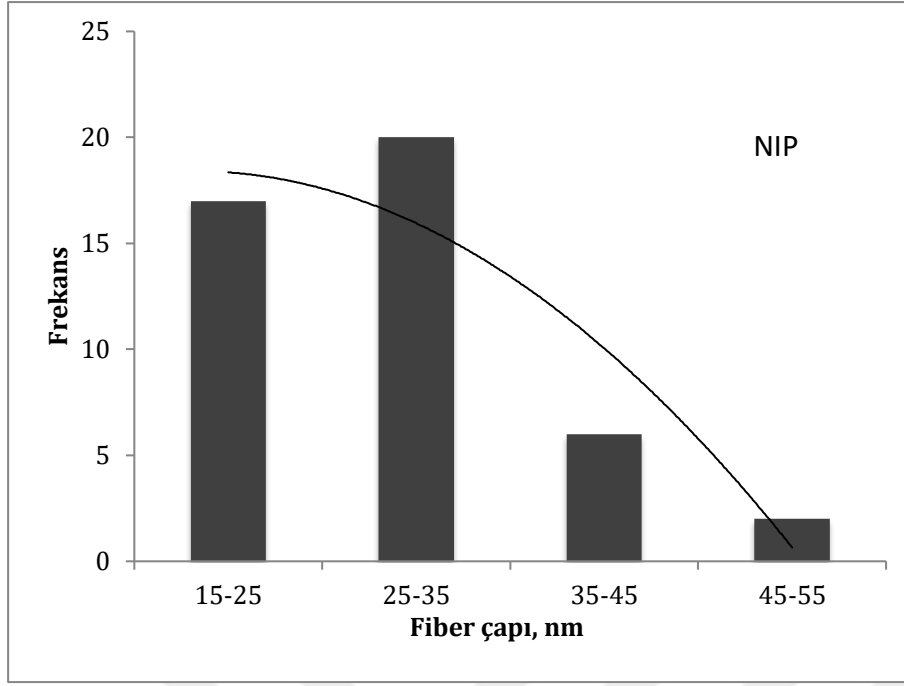




Şekil 4.6. MIP BS kompozit nanofiberlerin farklı büyütme oranlarındaki (a-20 000X, b-50 000X, c-100 000X) SEM görüntüsü ve fiber çapı dağılım grafiği







Şekil 4.7. NIP BS kompozit nanofiberlerin farklı büyütme oranlarındaki (a-20 000X, b-50 000X, c-100 000X) SEM görüntüsü ve fiber çapı dağılım grafiği

4.1.5. BET ile Yüzey Alanı Ölçümü

MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin yapısının özgül yüzey alanları, ortalama gözenek çapları ve toplam gözenek hacimleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Bu değerler BJH yöntemi ile hesaplanmıştır. MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler için özgül adsorpsiyon yüzey alanları sırasıyla $350.5 \text{ m}^2/\text{g}$ ve $295.1 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1. MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin BET analizi sonuçları

	Yüzey alanı ^a (m^2/g)	Toplam gözenek hacmi ^b (mL/g)	Ortalama gözenek çapı ^c (Å)
MIP	350.5 ± 0.41	0.11 ± 0.0002	16.5 ± 0.020
NIP	295.1 ± 0.22	0.065 ± 0.0001	21.1 ± 0.015

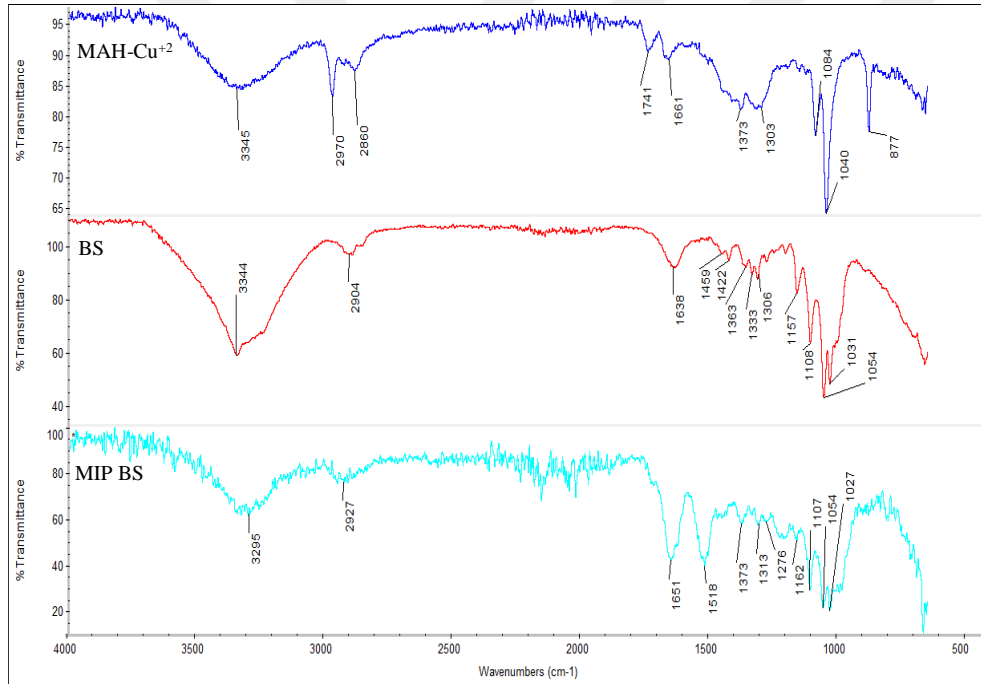
^a Çok noktalı BET yöntemiyle tayin edilmiştir.

^b 20-245 Å arasındaki gözeneklerin BJH kümülatif desorpsiyon gözenek hacmi.

^c 20-245 Å arasındaki gözeneklerin BJH kümülatif desorpsiyon gözenek çapı.

4.1.6. FTIR-ATR Analizi

MAH-Cu⁺² kompleksi ve MIP BS kompozit nanofiberler, fonksiyonel grupların titreşimlerinden kaynaklanan yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel bilgilerin elde edilmesini sağlayan FTIR-ATR yöntemi ile incelenmiştir. Şekil 4.8.'deki FTIR-ATR spektrumunda, MAH-Cu⁺²'ın 1741 cm⁻¹ ve 1661 cm⁻¹'de karbonil (-C=O) ve amid (-C-N) grubuna ait bandlar BS yapısına katılarak 1651 cm⁻¹ ve 1518 cm⁻¹'de görülmektedir. BS'deki 3000-3600 cm⁻¹ arasındaki band O-H gerilme bandına aittir. BS'un 1054 cm⁻¹ ve 1031 cm⁻¹'deki eter grubuna ait (-C-O) bandlar, MIP BS'da 1054 cm⁻¹ ve 1027 cm⁻¹'de görülmektedir. Ayrıca BS'un 1108 cm⁻¹'deki tipik glikozidik eter (-C-O-C) bandları MIP BS spektrumunda 1107 cm⁻¹'de mevcuttur. Sonuç olarak, MAH-Cu⁺² kompleksinin BS yapısına katıldığı kanıtlanmıştır.



Şekil 4.8. MAH-Cu⁺² kompleksinin, BS ve MIP BS kompozit nanofiberlerin FTIR-ATR spektrumu

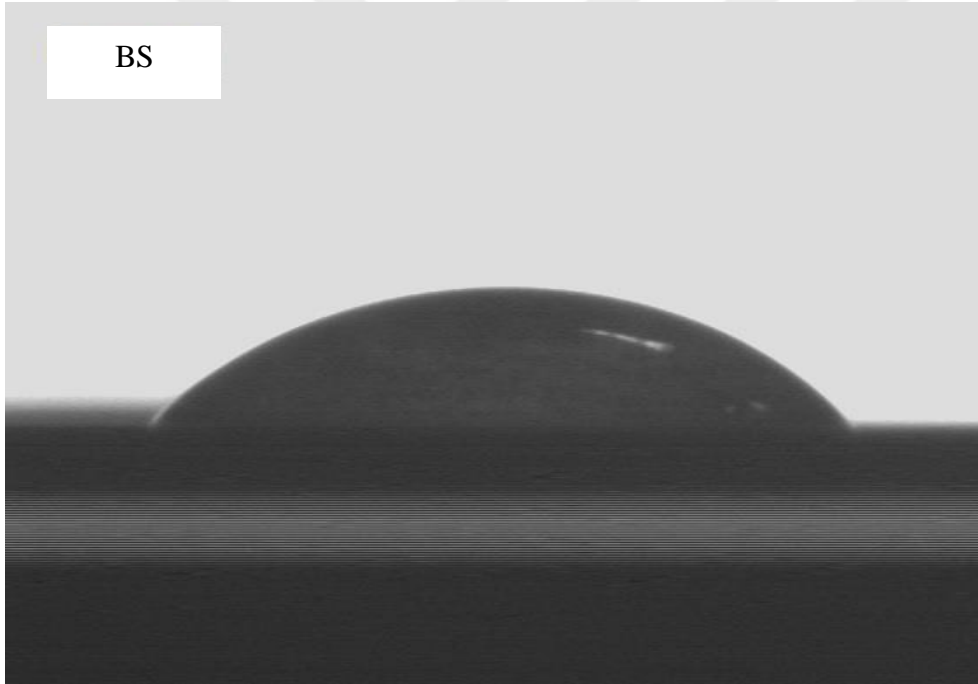
4.1.7. Temas Açısı Ölçümü

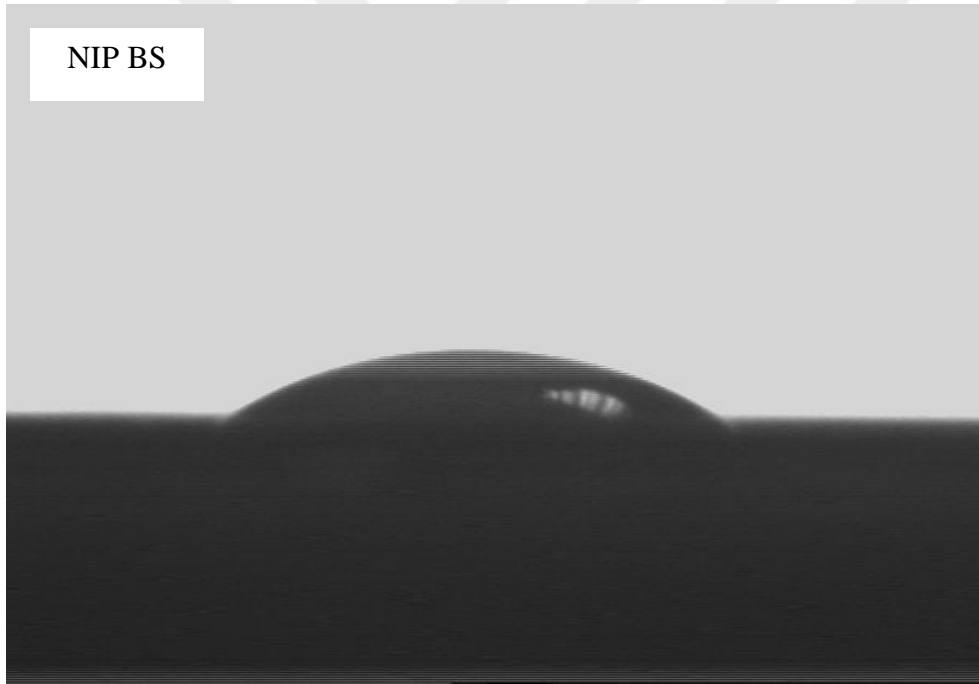
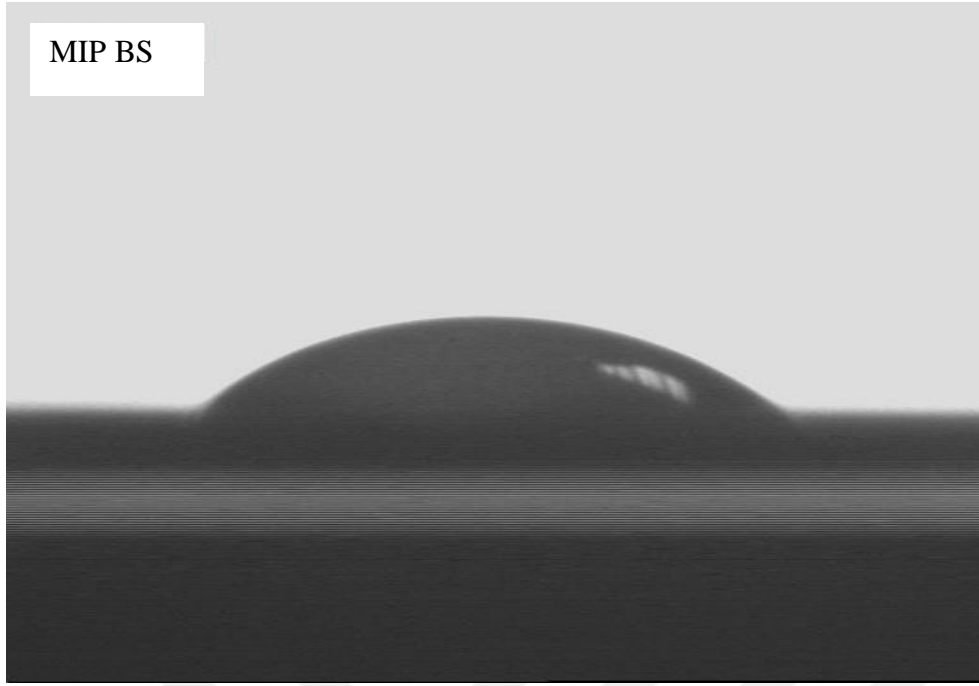
Katı bir yüzeye sıvı damlatıldığında damla yüzeyde yayılır. Su damlasının şekli damlatılan katı malzemenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Su damlası hareket edene kadar 3 fazın yüzey gerilimleri toplamı sıfırdır.

Temas açısı ölçümleri KRUSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Şekil 4.9’da BS, MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler için temas açısı ölçümleri sırasıyla $34.2^{\circ} \pm 1.2$, $51.2^{\circ} \pm 2.4$ ve $48.7^{\circ} \pm 1.7$ ’dir. Bu sonuçlar yapının hidrofilik özellikte olduğunu göstermektedir. Yüzey gerilimi ve temas açısı arasındaki bağıntı aşağıdaki gibidir.

$$\cos\theta_c = (\gamma_{GS} - \gamma_{LS}) / \gamma_{GL} \quad (\text{Eşitlik 4.1})$$

θ_c temas açısı, γ_{GS} gaz-sıvı arasındaki yüzey gerilimi, γ_{LS} sıvı-katı yüzey gerilimi ve γ_{GL} ise gaz-sıvı yüzey gerilimidir. Katı yüzeyler yüksek veya düşük enerjili olarak karakterize edilir ve yüksek enerjili yüzeylerde su yüzeyde düzgün olarak dağılarak ince bir film oluşturur. Bu durumda temas açısı sıfırdır. Yüzey tamamen ıslanır ve hidrofilik denir. Düşük enerjili yüzeylerde su damlaları ayrı ayrı yerleşirler. Bunlarda temas açısı 90° ’den büyüktür ve yüzey hidrofobiktir. Su damlacıkları düşük enerjili yüzeyden ayrılmak ister.





Şekil 4.9. BS, MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin temas açısı görüntüleri

4.2. Adsorpsiyon Çalışmaları

Hidrojeller şiştiği ve büyük ölçüde hidrofilik çözücüler içerdiği için baskılama işlemi farklı bir yöntem izlemektedir. Ancak doğada bu sistemlerin sayısız örneği mevcuttur. Proteinler hem esnek hem de sabit bölgeler içeren farklı dinamik bağlanma işlevlerine sahip heteropolimerlerdir. Bir polimerde yan zincir esnek, amino asit parçası hareketli ve farklı amino asit bölgeleri arasında esneklik olabilir [79]. Düz amino asit zinciri ya da zincirlerinden

oluşan proteinlerde, her amino asitin özgün kalıntı grubu (hidrofilik ya da hidrofobik, değişen elektrostatik özellikler, hidrojen bağı donör ya da akseptörleri vb.) son protein konformasyonunu belirler. Bu grupların su ile, birbirleri ile ve diğer moleküller ile doğrudan etkileşimi proteinin kararlı üç-boyutlu katlanmasını etkiler. Makromoleküler yapı geleneksel olandan farklı tasarlanmalı ve değişken çapraz bağlayıcı yoğunluğu (mikro ve makroporlu bölgeler) içermelidir [74]. Bu tasarım sayesinde bilinen yoğun jellere (düşük kütle transferi ve kalıp molekül matriks içerisinde hapsoldüğü için düşük tekrar bağlanma yüzdesi) kıyasla bağlanma kinetikleri ve kütle transferi arttırılabilir.

Çözücü içerisinde polimerizasyon gerçekleşirken (seyreltik polimer çözeltisi çapraz bağlanırken, fiziksel polimer yumak oluşumu ve polimer ağ içindeki heterojenlik azalır [80]) tekrar bağlanma için çözücünün dielektrik sabiti, polaritesi, protik doğası vb. açısından (ya da tekrar bağlama sırasında orjinal çözücüyü kullanma) şişme davranışlarındaki farklılık azalır.

Wizeman ve Kofinas düşük çapraz bağlı glukoz baskılanmış jeller (toplam monomer mol başına %13) sentezlemişlerdir [81]. Wulff ve Mosbach çapraz bağlama yüzdesini düşürerek özgül tanıma sağlayabilmişlerdir [82-83]. Genel olarak daha iyi bir afinite, kapasite ve seçicilik için moleküler baskılanmış jeller yüksek çapraz bağlıdır. Bu yüzdeler normal hidrojel çapraz bağlama miktarına (mol monomer başına 0.1-3% mol) oranla hala yüksek olmasına rağmen, düşük çapraz bağlı sistemlerde de etkili bir tanıma gerçekleşebileceği gösterilmiştir [74].

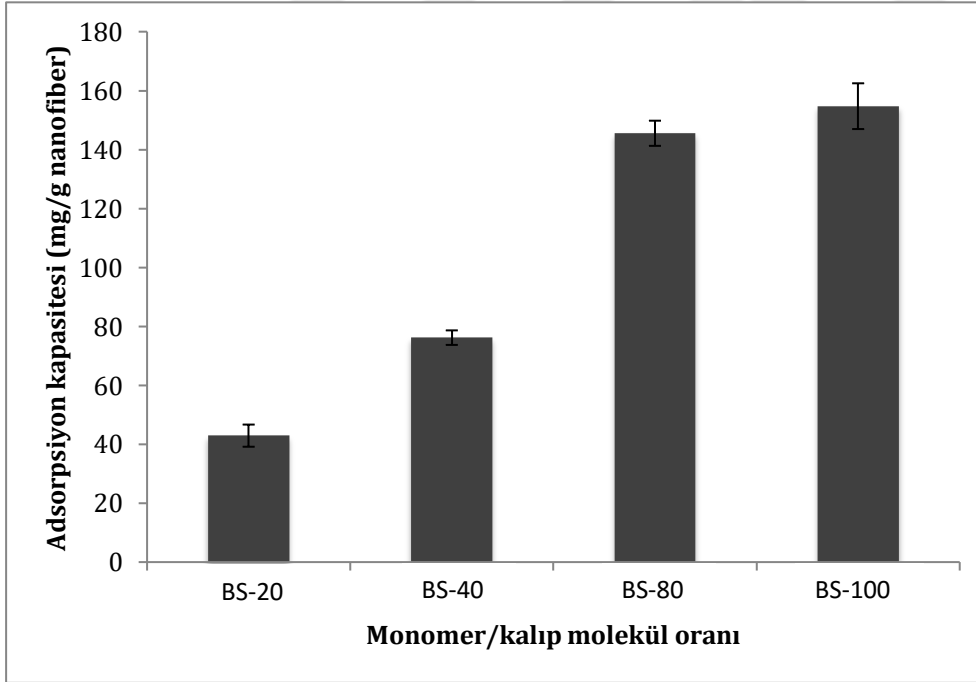
Monomer çeşidine ve kompozisyonuna göre makromoleküler yapıyı tasarlarken çapraz bağlayıcı monomerin moleküler kütlesi arttırıldığında fonksiyonel monomer ya da monomerlerin de uzunluğu arttırılmalıdır. Polimerizasyon kinetiği ve polimerizasyon sırasında oluşan zincirler moleküler seviyede ağ morfolojisini etkiler. Çapraz bağlayıcı monomer oranı yüksek olduğunda oluşan zincir tipleri; çapraz bağlayıcı ve fonksiyonel monomerin birincil kopolimer zincirleri ve çapraz bağlayıcının her bir makromer birimini bağlayan diğer ikincil zincirleridir [80]. Bu yüzden, belirli bir analiti baskılarken, fonksiyonel monomerin molekül kütlelerini aynı oranda arttırmadan çapraz bağlayıcı molekül kütlelerini arttırmak başarılı sonuçlar verir. Benzer şekilde, çapraz bağlayıcının molekül boyutunu belirli bir değerin altına düşürmek kalıp molekülün difüzyonu ve tekrar bağlanması için sınırlı bir polimerik ağ yaratır. Dolayısıyla, optimum bir çapraz bağlayıcı-fonksiyonel monomer oranı vardır ve bu değer kalıp molekülün boyutuna bağlıdır. Molekül kütlesi küçük olan moleküllerin baskılanmasında, etilen glikol dimetakrilat sıklıkla kullanılmıştır. Ayrıca, makromoleküler zincir boyutları arttıkça zincirlerin esnekliği de artacaktır. Demchenko, esnek moleküler yapılar arasındaki moleküler tanıma hakkında bir derleme yayınlamış ve

biyolojik makromoleküllerin tanınmasındaki ortak konformasyonel adaptasyonun ardışık basamaklarını vurgulamıştır [84].

Tezin bu kısmında BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon çalışmalarının sonuçları tartışılmıştır.

4.2.1. Monomer/Kalıp Molekül Oranı Etkisi

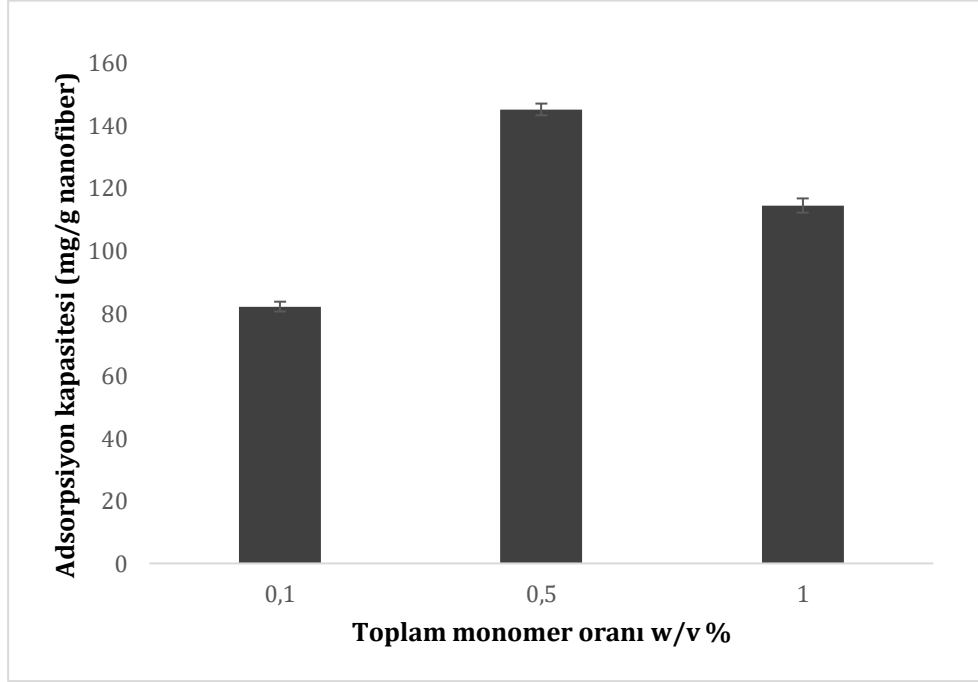
İlk olarak farklı fonksiyonel monomer/kalıp molekül oranlarının adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Yüksek seçicilik için monomerdeki fonksiyonel grupların kalıp molekül ile etkileşiminin fazla olması gerekir. Kalıp molekül miktarı sabit tutularak fonksiyonel monomerin kalıp moleküle mol oranı 20:1 (BS-20), 40:1 (BS-40), 80:1 (BS-80) ve 100:1 (BS-100) olacak şekilde değiştirilmiştir. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi, HSA adsorpsiyon kapasitesi monomer/kalıp molekül oranı 80:1 oluncaya kadar artış göstermiş ve sonrasında hemen hemen aynı kalmıştır. Ortamdaki HSA molekülleriyle koordinasyon yapabilen maksimum monomer oranı 80:1'dir ve bundan sonraki çalışmalarda BS-80 kodlu MIP BS kompozit nanofiberler kullanılmıştır.



Şekil 4.10. Monomer/kalıp molekül oranlarının MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 1.0 mg/mL, pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C

4.2.2. Toplam Monomer Oranı Etkisi

MIP BS kompozit nanofiberlerin kütlece toplam monomer oranları % 0.1, % 0.5 ve % 1.0 olacak şekilde sentezlenmiş, adsorpsiyon kapasiteleri hesaplanmış ve en yüksek adsorpsiyon kapasitesinin kütlece % 0.5 toplam monomer oranında olduğu tespit edilmiştir. Muhtemelen % 1.0 toplam monomer oranında, nanofiber yapısında yığın şeklinde oluşan polimerik yapı nanofiberin ağısı yapısı içine difüzyonu zorlaştırarak adsorpsiyon kapasitesinin düşmesine neden olmuştur (Şekil 4.11).

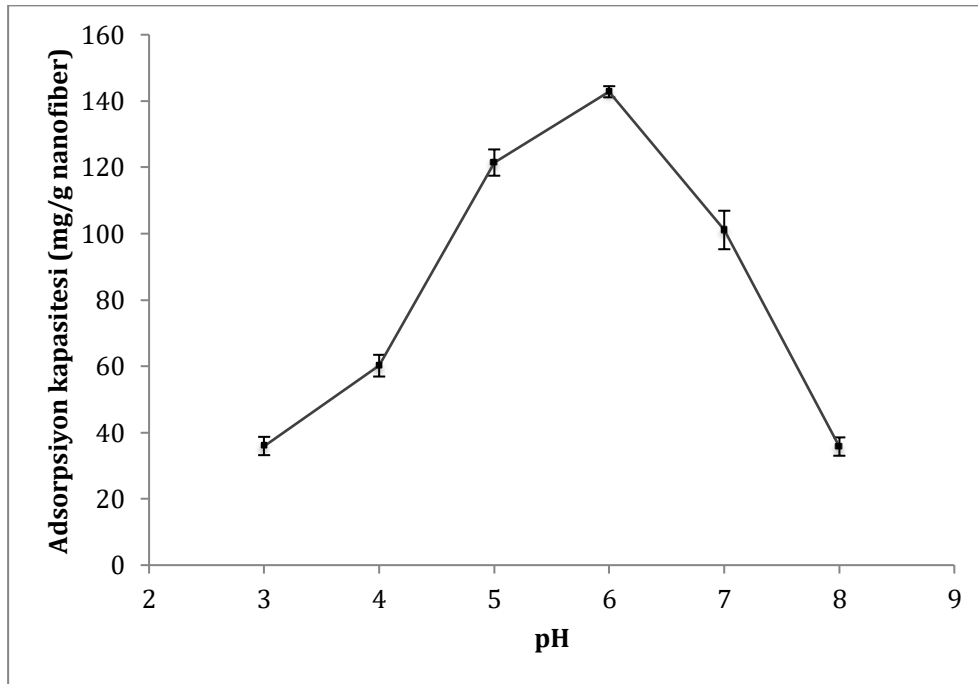


Şekil 4.11. Kütlece toplam monomer oranlarının MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 1.0 mg/mL, pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C

4.2.3. pH Etkisi

HSA adsorpsiyon çalışmaları farklı pH değerlerindeki asetat ve fosfat tamponları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler kesikli sistemde, 1.0 mg/mL HSA çözeltisi ile 50 mM asetat tampon (pH 4.0-5.0) ve 50 mM fosfat tamponu (pH 6.0-8.0) kullanarak sulu çözeltide yapılmıştır. Proteinin yapısal konformasyonunda pH değerinin önemi büyüktür. Moleküler baskılama sırasında bile nanoboşlukların düzgün oluşması için belirli bir pH değerinde baskılama işleminin gerçekleştirilmesine gerek vardır. Çok düşük pH değerlerinde, adsorpsiyon kapasitesinin düşük olması beklenir. HSA için izoelektrik nokta 4.8'dir. Dolayısıyla düşük pH değerlerinde proteindeki pozitif yükler itme kuvvetlerine sebep olur. Yani asidik pH değerlerinde protein yüzey yükleri protonlanır. Çok yüksek pH aralıklarında

ise hidroksit iyonları ve tampon çözeltideki fosfat iyonları metal iyonu ile kompleks yaparak protein molekülleri ile yarışabilir. Şekil 4.12'ye bakıldığında MIP BS kompozit nanofiberlerin pH 6.0 fosfat tamponunda maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaştığı görülmüştür. Daha yüksek pH değerlerinde, adsorpsiyon kapasitesi bahsedilen yarışmacı molekül etkilerinden dolayı düşmeye başlar.

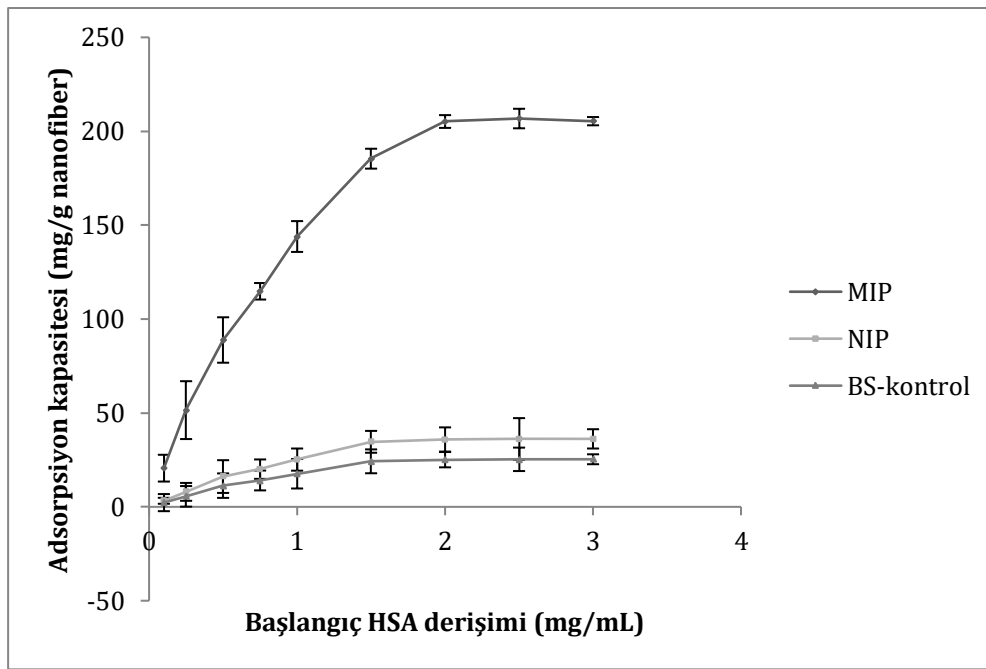


Şekil 4.12. pH değerinin MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 1.0 mg/mL, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C

4.2.4. Başlangıç HSA Derişiminin Etkisi

Cu^{+2} iyonlarının adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisini görmek için HSA molekülleri MAH monomeri ile doğrudan etkileştirilmiş ve BS ile kompozit yapı oluşturulmuştur (BS-kontrol). BS-kontrol, MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerle ortamdaki başlangıç HSA derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Deneysel çalışmada nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitelerini belirlemek için 0.1-3.0 mg/mL derişimlerdeki HSA sulu çözeltileri pH 6.0 fosfat tamponunda hazırlanmıştır. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi, MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi 2.0 mg/mL HSA derişimine kadar hızla artmış ve HSA molekülünün bağlanabileceği özgül boşlukların dolmasıyla 2.0 mg/mL HSA derişiminde platoya ulaşmıştır. Derişimin artması ile adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı da (ΔC) artarak adsorpsiyon kapasitesini arttırmaktadır. MIP BS kompozit nanofiberlerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 206.8 mg/g'dır. NIP BS kompozit

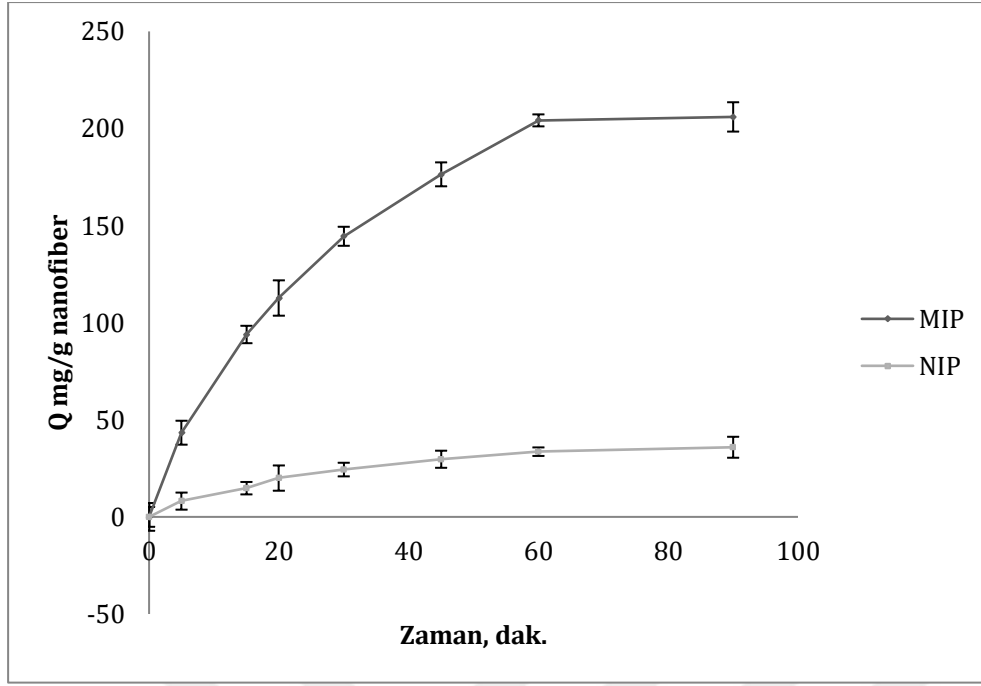
nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi ise 36.2 mg/g olarak hesaplanmıştır. Moleküler baskılama tekniği ile sentezlenmiş adsorbentlerde, hedef moleküller yüzeyde baskılanmış molekülü tanıyan bölgelere daha kolay bağlanır. Baskılama faktörü, MIP BS kompozit nanofiberlerin maksimum adsorpsiyon kapasitesinin NIP BS kompozit nanofiberlerin maksimum adsorpsiyon kapasitesine bölünmesi ile hesaplanmış ve 5.71 olarak bulunmuştur. BS-kontrol kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi ise 25.0 mg/g olarak bulunmuştur. HSA ile koordinasyon yapacak Cu^{+2} iyonları olmadan daha zayıf bir moleküler baskılama işlemi gerçekleşerek adsorpsiyon miktarının azalmasına sebep olmuştur.



Şekil 4.13. Başlangıç HSA derişiminin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C

4.2.5. Adsorpsiyon Süresinin Etkisi

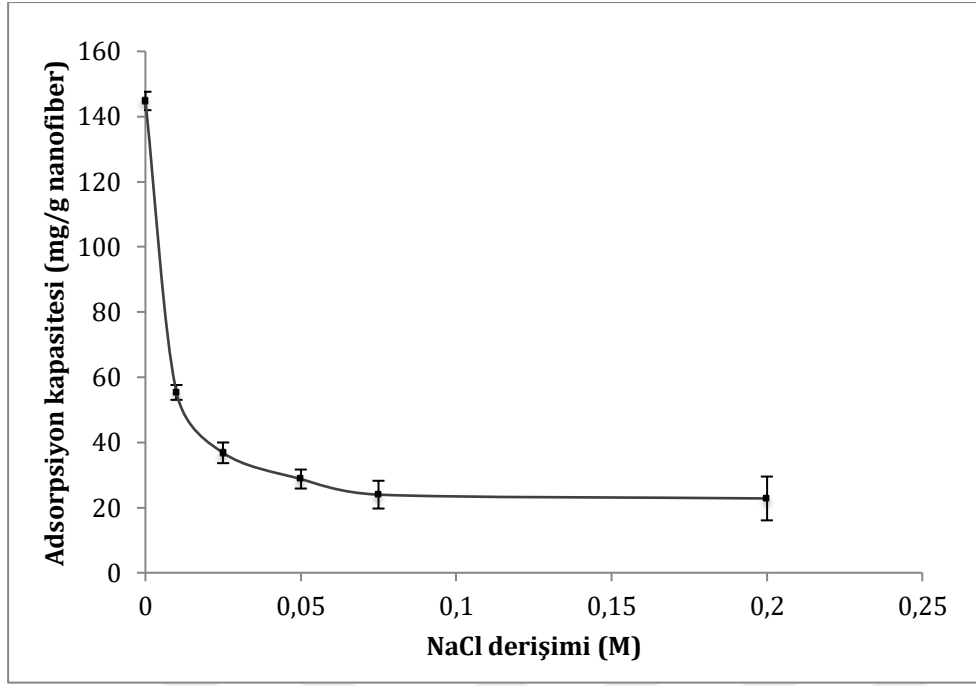
Adsorpsiyon süresinin etkisini incelemek için 2.0 mg/mL derişimdeki HSA sulu çözeltisinden farklı zaman aralıklarında (5-90 dak.) örnek alınarak MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler için adsorplanan protein miktarı hesaplanmıştır (Şekil 4.14.) NIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi MIP BS kompozit nanofiberlere göre oldukça düşüktür. 60 dakikada adsorpsiyon kapasitesinin platoya ulaştığı görülmektedir.



Şekil 4.14. Adsorpsiyon süresinin MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 2.0 mg/mL, pH: 6.0, sıcaklık: 25°C

4.2.6. İyonik Kuvvetin Etkisi

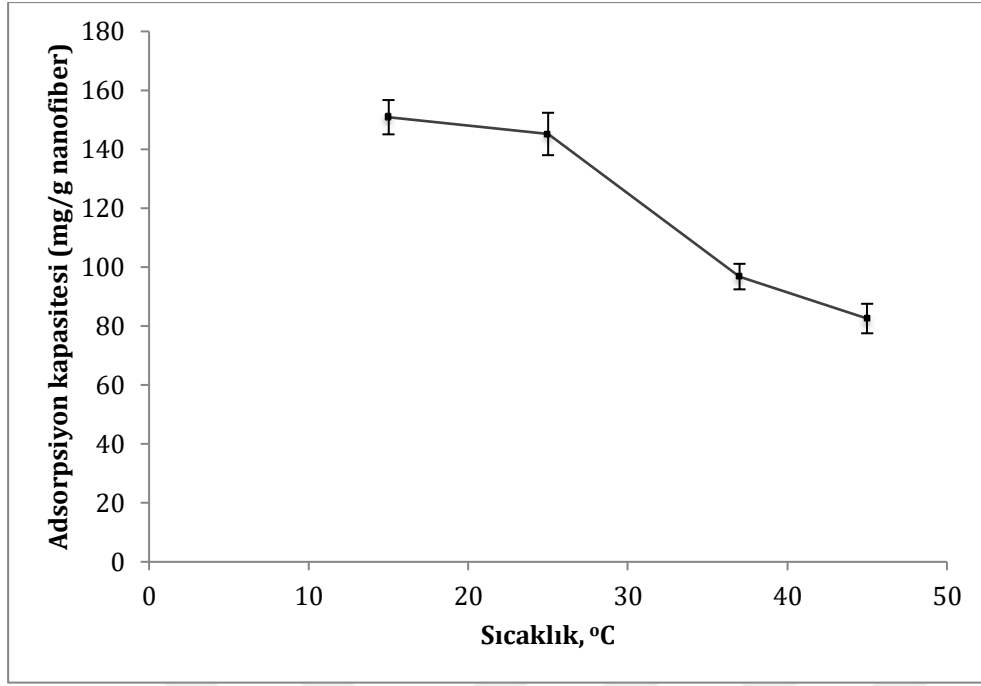
NaCl derişiminin HSA adsorpsiyonu üzerine etkisi incelendiğinde artan tuz derişimi ile MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesinde ciddi düşme olduğu görülmüştür. Tuz molekülleri ile HSA arasındaki muhtemel elektrostatik etkileşimler ile bağlanma bölgelerinin maskelenmesi olasıdır. Artan tuz derişimi ile adsorpsiyon kapasitesinin azalmasından HSA molekülünün MIP BS kompozit nanofiberlere elektrostatik etkileşimler ile bağlandığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.15. Tuz derişiminin MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 1.0 mg/mL pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C

4.2.7. Sıcaklığın Etkisi

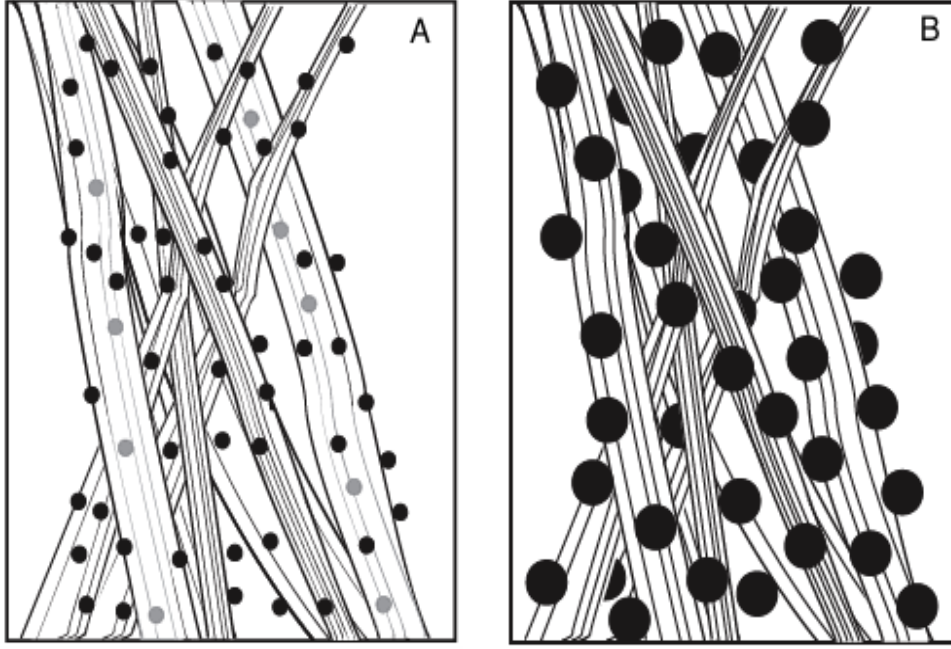
Proteinlerin konformasyonel düzenlenmeleri sıcaklığa kuvvetli ölçüde bağlıdır. Sıcaklığın HSA adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi farklı sıcaklıklarda (15°C, 25°C, 37°C ve 45°C’de) incelenmiştir. 50 mM pH 6.0 fosfat tamponu kullanılarak HSA derişimi 1.0 mg/mL olacak şekilde sabit tutulup, her bir sıcaklık değeri için MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasiteleri hesaplanmıştır (Şekil 4.16). Cu^{+2} iyonları ile HSA arasındaki etkileşimler koordine kovalent bağ ve elektron paylaşımı gibi etkileşimlerdir. Çalışılan pH 6.0 değerindeki HSA molekülünün sahip olduğu negatif yükler ile Cu^{+2} iyonları arasındaki elektrostatik etkileşimler de bağlanmanın mekanizmasını açıklar. Bu etkileşimlerin kuvveti sıcaklıkla ters orantılı olduğu için sıcaklık arttıkça adsorpsiyon kapasitesinde düşme meydana gelir. Polimerizasyon sürecinin oda sıcaklığı koşullarında gerçekleştirildiği ve adsorpsiyon kapasitesinde fazla bir düşüş olmadığı görüldüğü için diğer bütün deneyler 25°C’de yapılmıştır. Bu sıcaklıkta oluşan bağlanma bölgelerinin hedef protein olan HSA için uygun yapı ve konformasyonda olduğu söylenebilir.



Şekil 4.16. Farklı sıcaklıkların MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 1.0 mg/mL, pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak.

4.3. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi adsorbent ile hedef molekül arasında gerçekleşen adsorpsiyon işleminin mekanizmasını tanımlar. Bu izoterm, iki faz dengede olduğu durumda, çözeltideki analit derişimi ve katı faza adsorplanmış analit miktarını ölçülmesi ile belirlenir. Adsorpsiyon işlemi, adsorbent yüzeyindeki madde derişimi ile çözeltinin içinde bulunan madde derişimi arasında denge sağlanıncaya dek sürer. HSA moleküllerinin BS kompozit nanofiberler ile etkileşimini belirlemek amacıyla kullanılan Langmuir izotermi adsorbantın adsorbent yüzeyi üzerinde homojen olarak dağıldığını kabul ederken, Freundlich izotermi farklı bağlanma enerji bölgeleri ile heterojen adsorpsiyon bölgelerinin oluştuğunu tanımlamaktadır. Sulu çözeltilerden ağır metal iyonları ve kirlenici boyalar ya da lizozim gibi büyük proteinlerin de bakteriyel selüloz yüzeyine adsorpsiyonunun Langmuir izotermine göre gerçekleştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur [85-87].



Şekil 4.17. Küçük moleküllerin (A) ya da protein gibi büyük moleküllerin (B) bakteriyel selüloz nanofiber yüzeyine adsorpsiyonunun şematik gösterimi [87]

Şekil 4.17’de protein gibi büyük moleküllerin ya da daha küçük moleküllerin bakteriyel selüloz yüzeyine adsorpsiyonunun şematik gösterimi görülmektedir. Moleküller ne kadar büyük olursa içteki bağlanma bölgelerine ulaşması güçleşeceği için adsorbentin sadece yüzeyine yönlenebilir. Buna rağmen, bakteriyel selülozun adsorblama kapasitesi bitkisel selülozdan yüksektir. Bu kavram bazı çalışmalar ile de desteklenmiştir. Sellobioz dehidrogenaz ($Ma= 89.000 \text{ g mol}^{-1}$) ve ksiloglukan (ortalama $Ma= 980.000 \text{ g mol}^{-1}$) gibi göreceli büyük moleküllerin BS adsorpsiyon kapasitesi mikrofibrilli selüloza göre daha fazladır [88]. Benzer şekilde, dördüncül amonyum bakteriyel selüloz, dördüncül amonyum bitkisel selülozla karşılaştırıldığında hemoglobin molekülü için daha yüksek bir adsorpsiyon kapasitesi göstermiştir [89].

Tanımlanmış bölgelere sabit sayıda molekül adsorplandığı ve her tanımlanmış bölgeye yalnızca bir molekül tutunacağı Langmuir adsorpsiyon modelinin esas ilkesidir. Tanımlanmış bu bölgelerin birbirinden uzak, enerji bakımından eşit olduğu ve komşu bölgelere adsorplanan moleküller arasında etkileşimin bulunmadığı kabul edilmektedir [90].

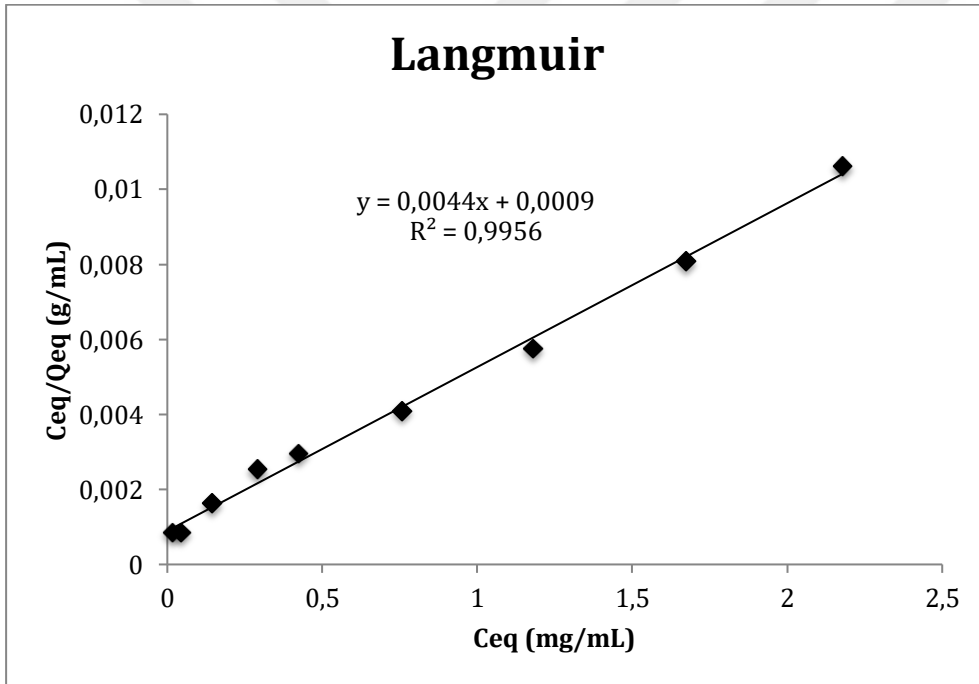
Langmuir adsorpsiyon izotermi Eşitlik 4.2’de verilmiştir. MIP BS kompozit nanofiberlerin HSA için denge verilerinin değişimleri doğrusal bir eğri oluşturur. Eğer sistemden doğrusal bir grafik elde ediliyorsa, sistemin Langmuir adsorpsiyon modeline uyduğu söylenebilir.

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

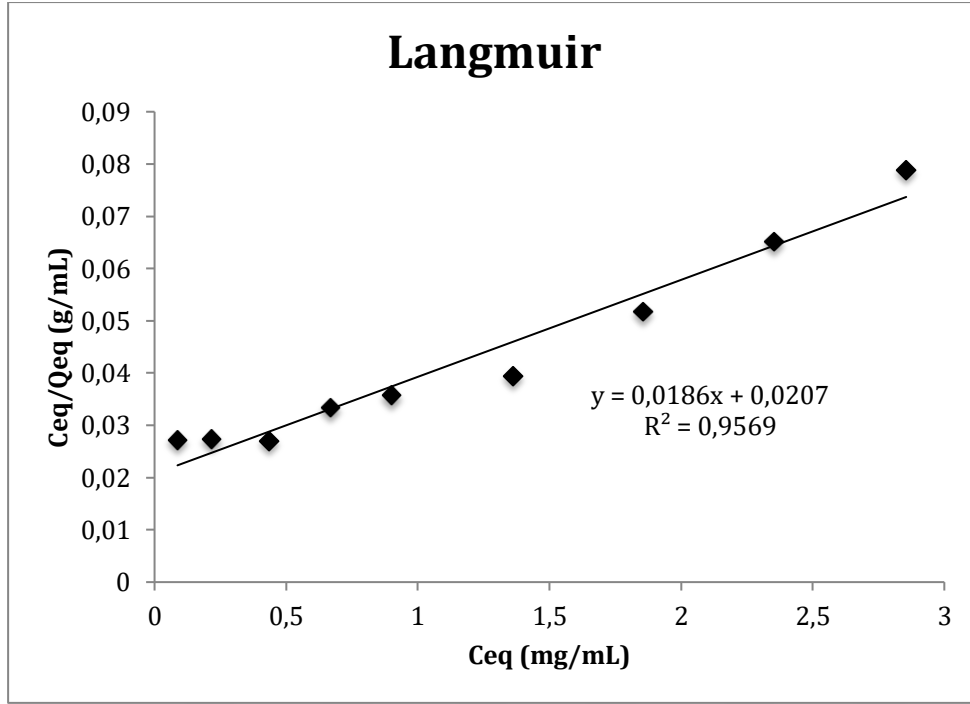
Eşitlikte; Q_{eq} adsorplanmış HSA miktarı (mg/g), C_{eq} dengedeki HSA derişimi (mg/mL), b Langmuir sabiti (mL/mg) ve Q_{max} (mg/g) maksimum HSA adsorpsiyon kapasitesi değerlerini ifade eder. Eşitlik doğrusallaştırılır ise;

$$1/Q_{eq} = [1/(Q_{max} \times b \times C_{eq})] + (1/Q_{max}) \quad (\text{Eşitlik 4.3})$$

elde edilir. $1/C_{eq}$ değerine karşı $1/Q_{eq}$ grafiğinin y eksenini kestiği nokta $1/Q_{max}$ değerini ve eğimi de $1/Q_{max} \times b$ değerini verir. MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler için elde edilen Langmuir izoterm grafiği Şekil 4.18 ve 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.18. MIP BS kompozit nanofiberler için Langmuir izotermi. pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C



Şekil 4.19. NIP BS kompozit nanofiberler için Langmuir izotermi. pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C

Yapılan çalışmada, MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlere ait maksimum adsorpsiyon kapasiteleri (Q_{max}) MIP BS kompozit nanofiberler için 227.3 mg/g ve NIP BS kompozit nanofiberler için 53.8 mg/g olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Langmuir korrelasyon katsayıları (R^2), MIP BS kompozit nanofiberler için 0.995 iken, NIP BS kompozit nanofiberler için 0.956'dır. Sonuçlar, Langmuir izoterm modelinin HSA adsorpsiyonu için daha uygun olduğunu göstermektedir. Yani moleküler baskılama sırasında oluşturulan boşlukların homojen dağıldığı, eş enerjili olduğu ve yanıl etkileşimlerin olmadığı söylenebilir.

Freundlich izotermine uygunluk, heterojen adsorpsiyonu tanımlar. Freundlich izotermi tersinir adsorpsiyonu belirtir ve Langmuir izotermi gibi tek katmanlı adsorpsiyon ile kısıtlı değildir. Freundlich adsorpsiyon izotermine uygunluk aslında, adsorpsiyonun çok katmanlı olduğunu ifade eder. Formül Eşitlik 4.4'teki gibidir;

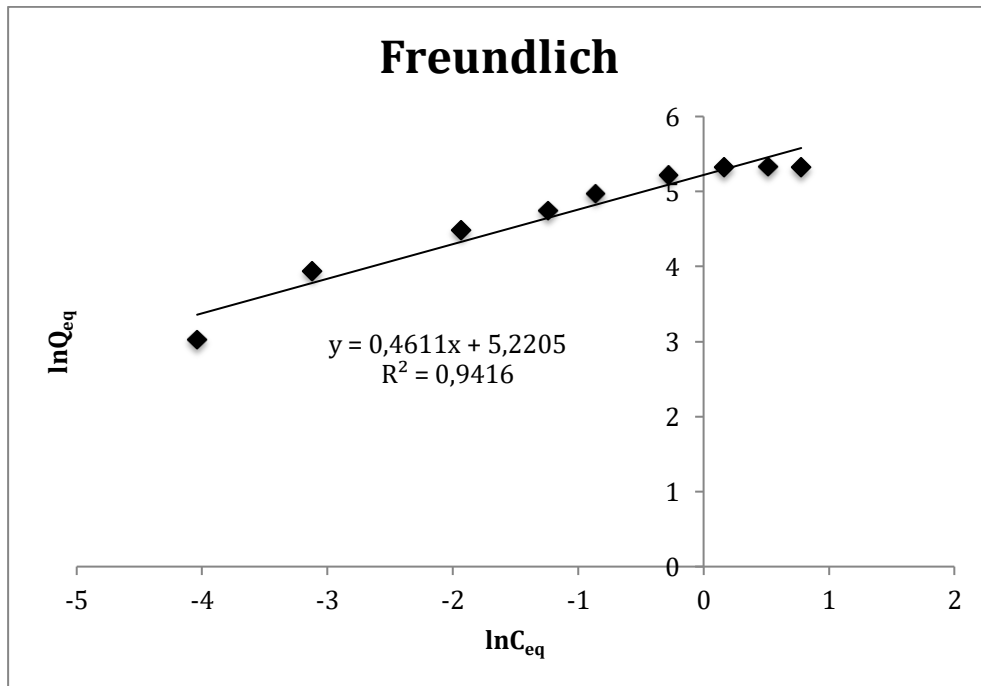
$$Q_{eq} = K_f \times (C_{eq})^{1/n} \quad (\text{Eşitlik 4.4})$$

Bu eşitlikte Q_{eq} adsorpsiyon miktarını (mg/g), K_f adsorpsiyon kapasitesini, C_{eq} çözeltideki adsorbent derişimini (mg/L), ve $1/n$ Freundlich katsayısını ifade eder. Bu katsayı aynı

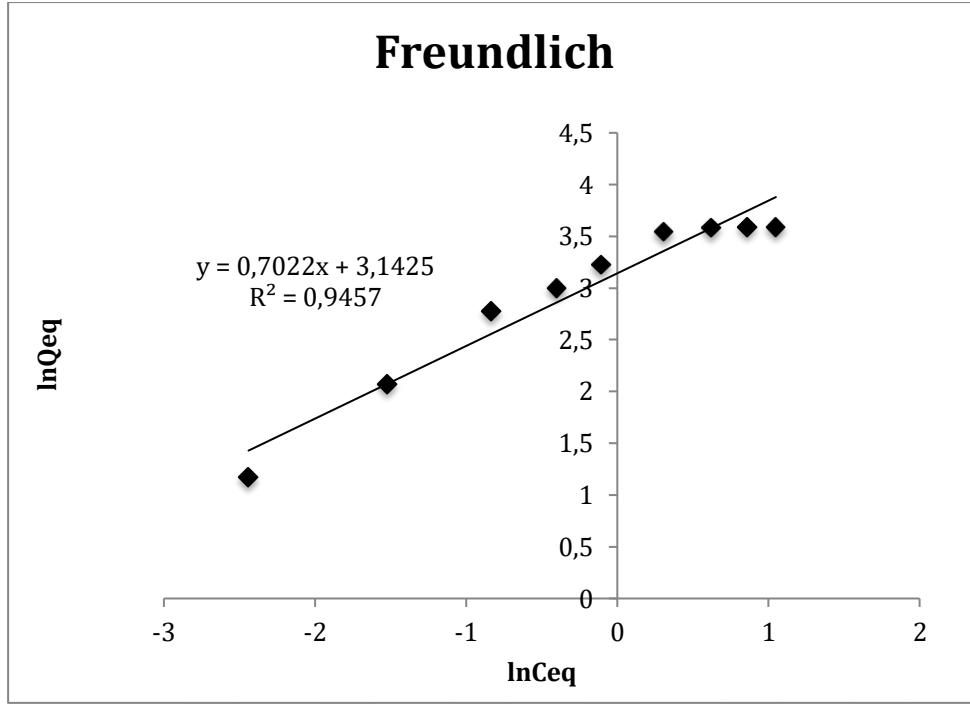
zamanda sistemin heterojenitesini göstermektedir. K_f ve $1/n$ değerleri Eşitlik 4.5'in logaritması alındıktan sonra ve $\ln Q_{eq}$ 'ye karşı $\ln C_{eq}$ doğrusal grafiğinin çizilmesi sonucu hesaplanır.

$$\ln Q_{eq} = \ln K_f + \left(\frac{1}{n}\right) x (\ln C_{eq}) \quad (\text{Eşitlik 4.5})$$

Şekil 4.20 ve 4.21'de MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler için Freundlich izotermi görülmektedir.



Şekil 4.20. MIP BS kompozit nanofiberler için Freundlich izotermi. pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C



Şekil 4.21. NIP BS kompozit nanofiberler için Freundlich izoterminin. pH: 6.0, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C

K_f ve $1/n$, Freundlich izoterminde sistemin yüzey heterojenitesini belirten iki önemli parametredir. Bu parametrelerden $1/n$, yüzey heterojenite indeksidir. $1/n$ değeri 1'e yaklaştıkça sistemin homojenitesi, n değeri sıfıra yaklaştıkça heterojenitesi artmaktadır. Hesaplanan ve Çizelge 4.2'de verilen n değeri, hazırlanan MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin homojen bağlanma bölgelerinin olduğunu ifade etmektedir. Bu sonuçlar heterojen bağlanma bölgelerini gösteren Freundlich adsorpsiyon izoterminin uyum sağlamaz. Bu değerler ve korelasyon katsayıları incelendiğinde, MIP BS kompozit nanofiberler ile gerçekleştirilen adsorpsiyon işlemi çok katmanlı adsorpsiyon şeklinde olmadığı görülür. Sonuç olarak, HSA adsorpsiyonu için Langmuir izoterminin ile bulunan Q_{max} deneysel değere yakın olup, korelasyon katsayı değerinin ($R^2:0.995$) daha yüksek olması adsorpsiyon modelinin Langmuir modeline uygun olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2. HSA adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon değerleri

		Langmuir İzotermi Sabitleri			Freundlich İzotermi Sabitleri		
	Q _{deneyssel} (mg/g)	Q _{max} (mg/g)	b (mg/mL)	R ²	K _f	1/n	R ²
MIP BS	206.80	227.30	4.88	0.995	185	0.46	0.941
NIP BS	36.20	53.80	0.90	0.956	23	0.70	0.945

4.4. Adsorpsiyon Kinetik Model Çalışmaları

Adsorpsiyon sürecinde kimyasal etkileşim ve kütle transferi gibi parametreleri kontrol eden mekanizmaları anlamak için matematiksel kinetik modeller oluşturulur. Optimum adsorbent-adsorban temas süresi diğer bir deyişle alıkonma süresi adsorpsiyon kinetiği model çalışmaları ile tespit edilir. Adsorpsiyon kinetik model çalışmaları adsorpsiyon yönteminin hızını etkileyen adsorpsiyon basamaklarının anlaşılmasını sağlamada önemli bir yöntemdir. Birinci ve ikinci derece kinetik modeller çalışmamızda elde edilen deney verilerine uygulanmıştır. Çalışmalar, ölçtüğümüz derişimlerin adsorbentin yüzey derişimi ile eşit olduğu varsayılarak yürütülmüştür. Lagergren birinci-derece hız denklği sıvı çözeltiden katı yüzeye adsorpsiyonda en sık kullanılan eşitliklerdendir. Şekil 4.6'de ifade edilmektedir [91].

$$\left(\frac{\Delta Q_t}{dt}\right) = k_1 \times (Q_{eq} - Q_t) \quad (\text{Eşitlik 4.6})$$

Eşitlik 4.6'da yalancı-birinci derece adsorpsiyon hız sabiti k_1 (dak^{-1}) ile ifade edilir. Q_{eq} denge zamanında ve Q_t ise herhangi bir zamanda adsorplanan analit miktarını (mg/g) belirtir. Sınır koşulları ($t=0$, $Q_t=0$ ve $t=t$, $Q_t=Q_t$) kabul edilip integralinin alınması durumunda Eşitlik 4.7 elde edilir.

$$\text{Log}\left(\frac{Q_{eq}}{(Q_{eq}-Q_t)}\right) = k_1 \times t \left(\frac{k_1 \times t}{(2.303)}\right) \quad (\text{Eşitlik 4.7})$$

Eşitlik 4.7. düzenlenip doğrusallaştırıldığında:

$$\text{log}((Q_{eq} - Q_t)) = \text{log}(Q_{eq}) - \left(\frac{k_1 \times t}{(2.303)}\right) \quad (\text{Eşitlik 4.8})$$

$\log(Q_{eq})$ 'ye karşı t grafiğinde doğrusallığının yüksek olması kinetik modelin uygulanabilir olduğunu ifade etmektedir. Gerçek birinci-derece işlemde $\log(Q_{eq})$, $\log(Q_{eq}-Q_t)$ 'ye karşı t grafiğinin kesim noktasına eşit olması beklenmektedir.

Adsorpsiyon denge kapasitesi temelli yalancı ikinci derece Eşitlik 4.9'da verilmiştir.

$$\left(\frac{\Delta Q_t}{dt}\right) = k_2 \times (Q_{eq} - Q_t) \quad (\text{Eşitlik 4.9})$$

Eşitlik 4.9'da, yalancı ikinci derece hız sabiti k_2 ($\text{g mg}^{-1}\text{min}^{-1}$) ile ifade edilmektedir. Eşitlik 4.9'da $t=0$ kabul edildiğinde,

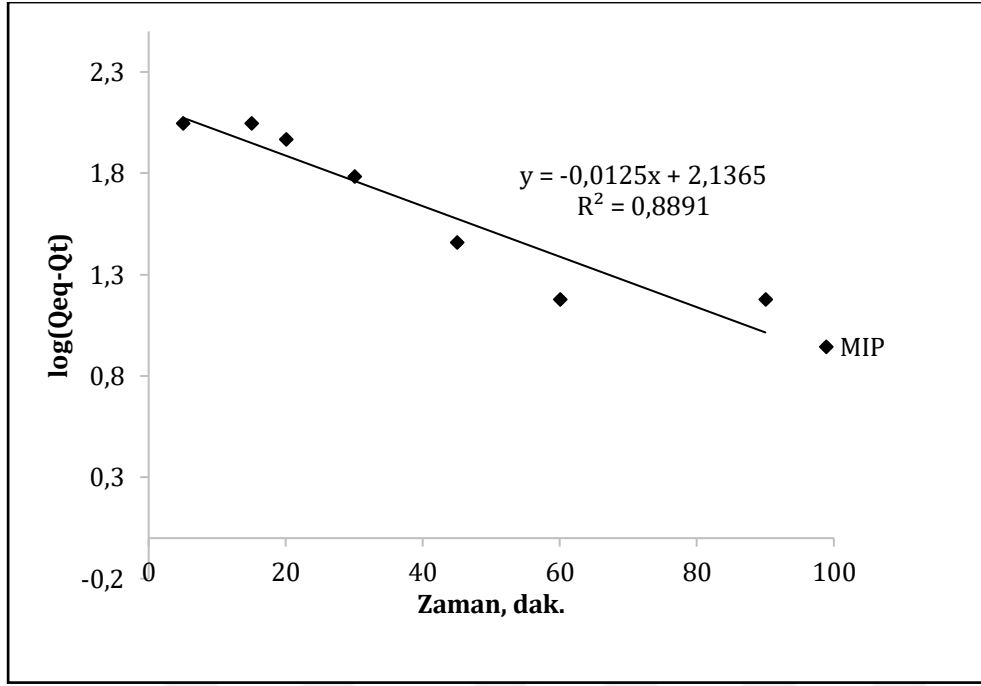
$Q_t=0$ ve $t=t$ ve $q_t=q_t$ sınır koşullarının uygulanması ile eşitlik 4.10 elde edilir;

$$\left(\frac{1}{(Q_{eq}-Q_t)}\right) = k_2 \times t + \left(1/Q_{eq}\right) \quad (\text{Eşitlik 4.10})$$

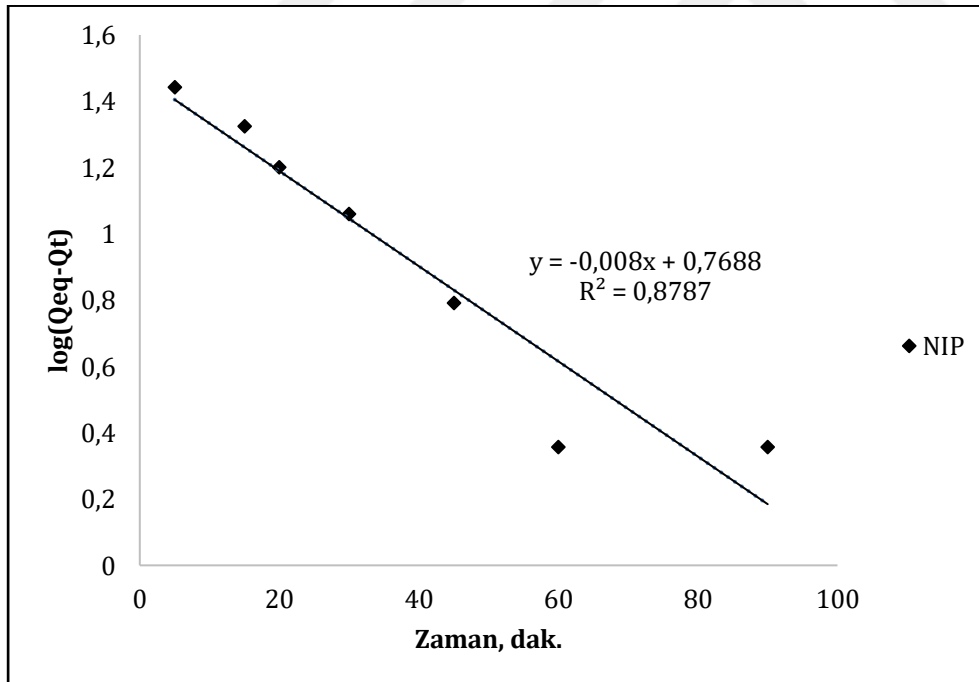
Bu eşitliğin doğrusallaştırılmış hali ile Eşitlik 4.11 elde edilir:

$$\left(\frac{t}{(Q_t)}\right) = 1/k_2 \times Q_{eq} + \left(1/Q_{eq}\right) \times t \quad (\text{Eşitlik 4.11})$$

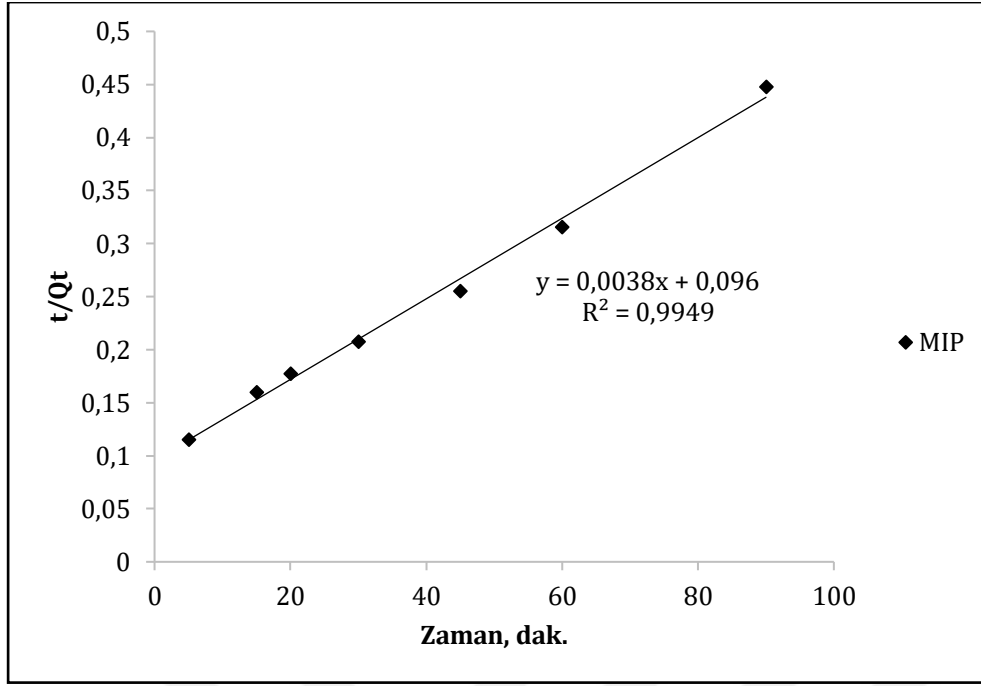
t/Q_t ye karşı t grafiğinin doğrusal olması durumunda ikinci derece kinetiğin uygulanabilir olduğu belirtilebilir. Hız sabiti (k_2) ve denge adsorpsiyonu (Q_{eq}) kesim noktası ve eğim değerlerinden elde edilmektedir. Şekil 4.22 ve 4.23'te MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler için yalancı birinci derece grafikleri verilmiştir. Şekil 4.24 ve 4.25'de MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler için yalancı ikinci derece grafikleri verilmiştir.



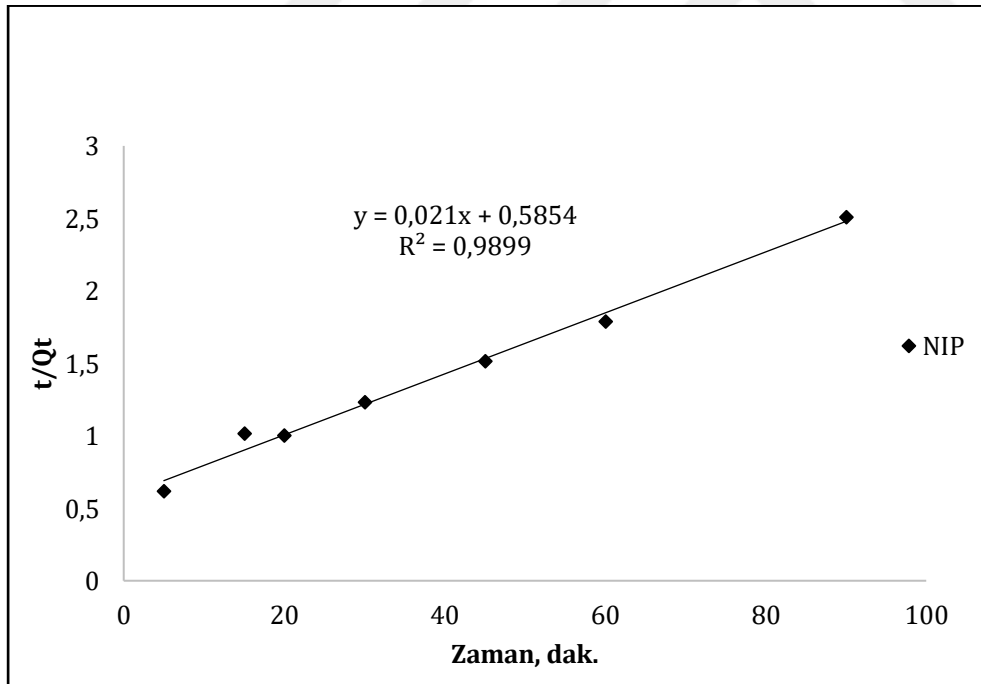
Şekil 4.22. MIP BS kompozit nanofiberler için yalancı birinci derece kinetik grafiği



Şekil 4.23. NIP BS kompozit nanofiberler için yalancı birinci derece kinetik grafiği



Şekil 4.24. MIP BS kompozit nanofiberler için yalancı ikinci derece kinetik grafiği



Şekil 4.25. NIP BS kompozit nanofiberler için yalancı ikinci derece kinetik grafiği

Çizelge 4.3. MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler için birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri

	Yalancı Birinci Derece				Yalancı İkinci Derece		
	Q_{deneysel} (mg/g)	Q_{eq} (mg/g)	k_1 (dak. ⁻¹)	R^2	Q_{eq} (mg/g)	k_2 (g mg ⁻¹ dak ⁻¹)	R^2
MIP BS	206.80	136.93	0.02878	0.8890	263.15	0.00015	0.9948
NIP BS	36.20	5.87	0.01842	0.8787	47.61	0.000753	0.9898

MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin yalancı-birinci ve ikinci derece kinetik sabitleri çizelge 4.3’de verilmektedir. Korelasyon sayıları (R^2) ve Q_{eq} değerleri karşılaştırıldığında, HSA sulu çözeltisinden MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler ile yapılan HSA adsorpsiyonu yalancı ikinci derece kinetik modeline uymaktadır. Yani adsorpsiyonun kinetiği kimyasal kontrollüdür. Bu durum pH 6.0’daki Cu^{+2} iyonları ile negatif yüklü HSA arasındaki elektrostatik etkileşimler ile açıklanır.

4.5. Termodinamik Hesaplamalar

Bağlanma işlemi HSA ve MIP kavitelesinin tanınmış bölgelerinin arasında oluşan çekim kuvveti ile oluşmaktadır. HSA’nın bu kavitelere bağlanması ile entropi artışı ve negatif entalpi değişim değerinden enerji açığa çıktığı görülmektedir. Termodinamik parametreler adsorpsiyon işlemi sırasındaki enerji değişimleri hakkında önemli bilgiler verir. Bu yüzden bu parametrelerin belirlenmesi gereklidir. Gibbs serbest enerji değişimi (ΔG°) adsorpsiyonun kendiliğinden gerçekleşme seviyesini ifade eder. Entalpi değişimi (ΔH°) ve entropi değişimi (ΔS°) aşağıdaki eşitlikler kullanılarak bulunmuştur.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_L \quad (\text{Eşitlik 4.12})$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (\text{Eşitlik 4.13})$$

$$\ln K_L = (\Delta H^\circ) / RT + (\Delta S^\circ) / R \quad (\text{Eşitlik 4.14})$$

Eşitlikte, K_L Langmuir adsorpsiyon katsayısını, R gaz katsayısını (8.314 J/mol K), T sıcaklığı

göstermektedir. MIP BS kompozit nanofiberlerin termodinamik parametreleri ile ilgili değerler Çizelge 4.4'de verilmiştir. ΔG° negatif verileri HSA'nın MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyonunun kendiliğinden oluştuğunu ve termodinamik olarak uygun olduğunu desteklemektedir. ΔS° 'nin pozitif değer göstermesi katı-sıvı faz arasında HSA adsorpsiyonunun entropide artışa neden olduğunu ve adsorpsiyonun tercih edildiğini göstermektedir. Negatif ΔH° değeri ise HSA adsorpsiyonunun ekzotermik olduğunu, böylece adsorpsiyon için sisteme dışarıdan herhangi bir enerji verilmesi gerekmediğini gösterir.

Çizelge 4.4. MIP BS kompozit nanofiberlerin termodinamik parametreleri

Sıcaklık, K	ΔG° (kJ/mol)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (j/mol)
288	-4.72	-5.69	32.25
298	-4.85		
310	-5.04		
318	-5.23		

4.6. Seçicilik Çalışmaları

Moleküler baskılamada etkinliğin belirlenmesinin en doğru yöntemi, baskılanmış maddelerin dağılım ve seçicilik katsayısının hesaplanmasıdır. Dağılım katsayısı; denge durumunda hedef molekülün MIP'ta bulunan miktarının sıvı fazda kalan miktarına oranlanmasıdır. Seçicilik katsayısı ise baskılanmış maddenin dağılım katsayısının baskılanmamış haline oranıdır. Moleküler tanımda seçicilik en önemli parametrelerden biridir. MIP BS kompozit nanofiberlerin HSA için seçiciliği araştırılırken yarışmacı ajan olarak seçilen Myo ve HTr moleküllerinin 50 mM pH 6.0 fosfat tamponundaki adsorpsiyon kapasitelerine bakılmıştır. HTr molekülü (pI=5.2) hemen hemen HSA molekülü (pI=4.9) ile aynı pI değerine sahiptir. Myo (pI=7.2) ise daha küçük bir molekül olmasına rağmen, pI değerinin HSA molekülünün pI değerine yakın olması sebebiyle yarışmacı ajan olarak seçilmiştir. MIP BS kompozit nanofiberlerin HSA, HTr ve Myo proteinlerinin 1.0 mg/mL sulu çözeltileri ile kesikli sistemde adsorpsiyon çalışmaları yapılmış ve adsorpsiyon kapasiteleri şekil 4.26'da grafiksel olarak gösterilmiştir.

HSA göre HTr ve Myo için dağılım katsayıları eşitlik 4.15 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (\text{Eşitlik 4.15})$$

K_d dağılım katsayısını (mL/g), C_i ve C_f başlangıç ve son protein derişimini (mg/mL), V toplam çözelti hacmini (mL) ve m kullanılan nanofiber ağırlığını (g) ifade eder. HSA ile yarışmacı molekülün dağılım katsayıları oranı olan seçicilik katsayısı (k) eşitlik 4.16 kullanılarak hesaplanmıştır.

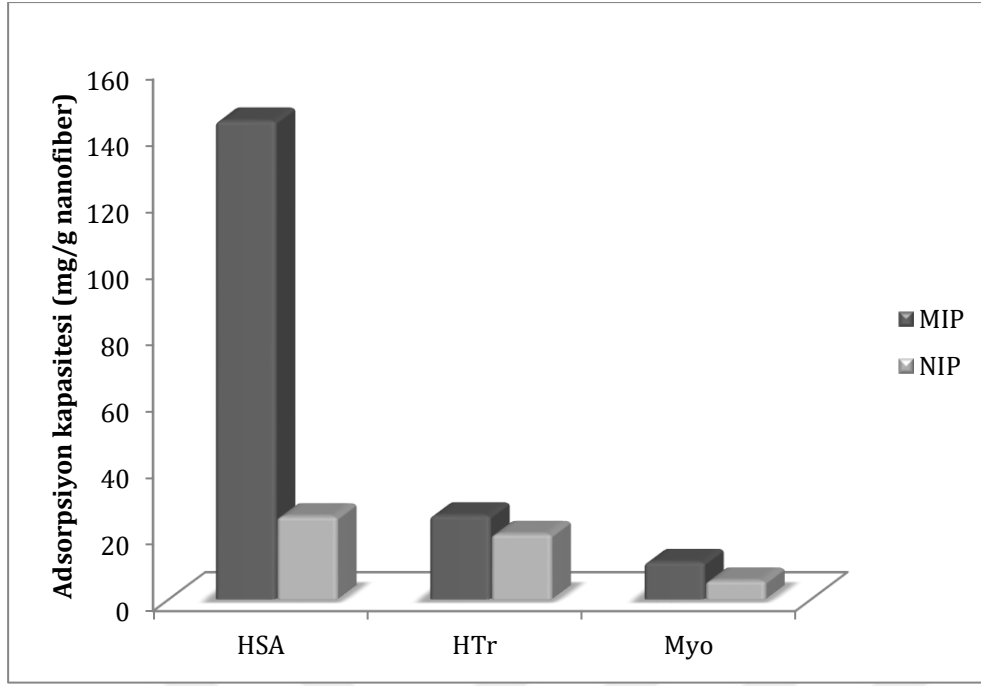
$$k = K_{d(\text{kalıp molekül})} / K_{d(\text{yarışmacı protein})} \quad (\text{Eşitlik 4.16})$$

$K_{d(\text{kalıp molekül})}$ HSA için dağılım katsayısını, $K_{d(\text{yarışmacı protein})}$ ise HTr ve Myo için dağılım katsayısını ifade eder. Bağlı seçicilik katsayıları (k') ise eşitlik 4.17 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$k' = k_{MIP} / k_{NIP} \quad (\text{Eşitlik 4.17})$$

k_{MIP} MIP BS kompozit nanofiber, k_{NIP} ise NIP BS kompozit nanofiber için seçicilik katsayılarıdır.

Çizelge 4.5'de HSA, HTr ve Myo molekülleri için dağılım katsayıları (K_d) katsayıları (k) ve bağlı seçicilik katsayıları (k') verilmiştir. MIP BS kompozit nanofiberlerin yarışmacı moleküller varlığında seçicilik katsayısı (k) değerinin, NIP BS kompozit nanofiberlerin seçicilik katsayısı (k) değerinden yüksek olduğu görülmüştür. k değeri HSA, HTr ve Myo moleküllerinin aktif bağlanma bölgelerinin NIP BS kompozit nanofiberlere göre seçicilik değerini ifade eder. Bağlı seçicilik katsayıları (k') kıyaslandığında HSA'nın HTr ve Myo moleküllerine göre daha seçici olarak adsorplandığı söylenebilir. Hem MIP hem de NIP BS kompozit nanofiberler en yüksek K_d değeri HSA için elde edilmiştir. Bu durum, çalışılan pH 6.0 değerinde baskılama işleminin olmadığı NIP BS kompozit nanofiberler için metal iyonu ile (Cu^{+2}) en fazla elektrostatik etkileşimi yapabilecek molekül olması ile açıklanabilir. pH 6.0'da, pI değerinin üzerinde olan HSA, HTr'ye göre daha negatif yüklüdür.



Şekil 4.26. Kalıp molekül (HSA) ve yarışmacı moleküller (HTr ve Myo) için MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlerin seçicilik çalışmaları. pH: 6.0, protein derişimi: 1.0 mg/mL, etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C)

MIP BS kompozit nanofiberlerin bağıl seçicilik katsayısı HSA/HTr ve HSA/Myo molekül çifti için sırasıyla 4.73 ve 3.02 olarak hesaplanmıştır. Bağıl seçicilik değeri, 1'in ne kadar üzerinde ise baskılama işleminin o kadar etkin olduğu bilinmektedir. MIP BS kompozit nanofiberlerin yarışmacı molekül olarak seçilen HTr ve Myo göre tanıma kabiliyeti fazladır.

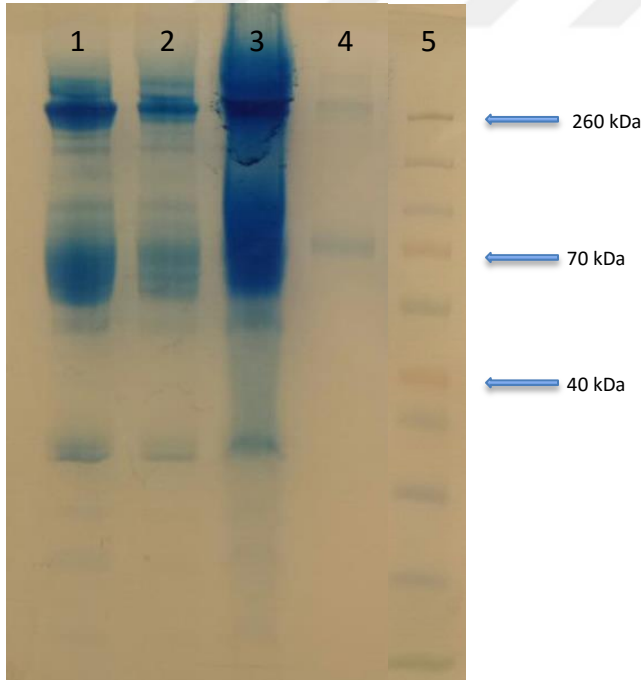
Çizelge 4.5. HSA, HTr ve Myo moleküllerin K_d , k ve k' değerleri

	MIP		NIP		k'
	K_d (mL/g)	k	K_d (mL/g)	k	
HSA	140.24	-	23.11	-	-
HTr	24.09	5.82	18.67	1.23	4.73
Myo	10.61	13.21	5.28	4.37	3.02

4.7. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Plazmadan albumin uzaklaştırılması amacıyla MIP BS kompozit nanofiberlerin kullanılabilirliği için gerçek örnek olarak yapay insan plazmasından SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Şekil 4.27’de görülen jelde, 1. kuyucukta yürütülen örnek MIP BS kompozit nanofiber ile adsorpsiyon sonrasındaki yapay insan plazması çözeltisidir (Son 1). 2. kuyucukta yürütülen örnek ikinci adsorpsiyon sonrası elde edilen yapay insan plazması çözeltisidir (Son 2). 3. kuyucukta yürütülen örnek 1:4 oranında seyreltilen başlangıç yapay insan plazması çözeltisidir (Başlangıç). 4. kuyucukta yürütülen örnek desorpsiyon çözeltisidir. 5. kuyucukta yürütülen örnek ise moleküler ağırlık belirtecidir (Marker Thermo Fischer Scientific Multicolour Broad Range Ladder).

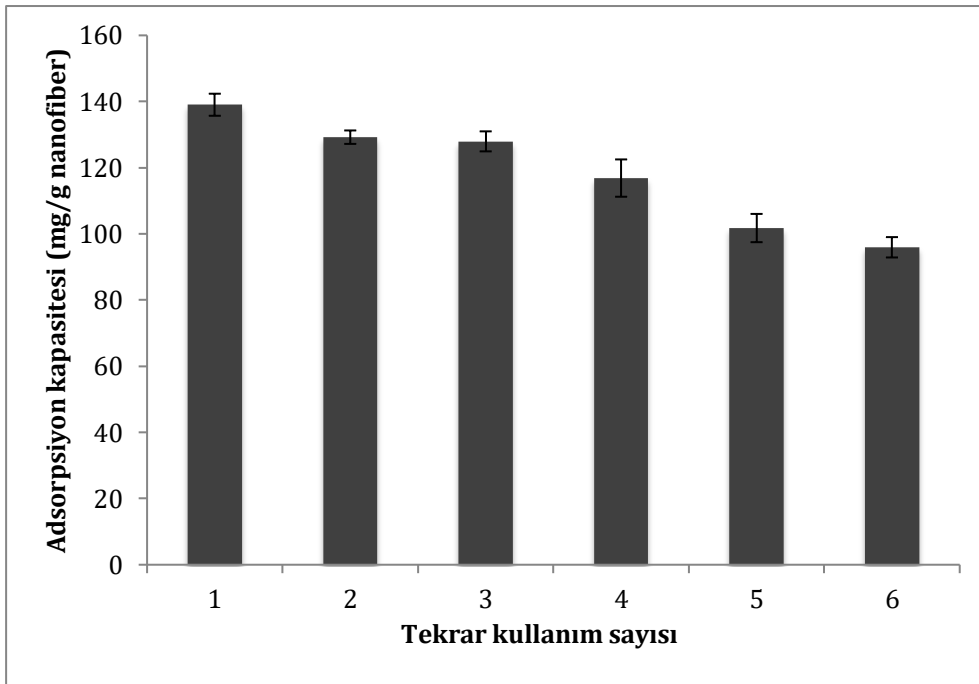
Protein miktarı yönünden yoğun olan yapay plazma örneği adsorpsiyon işlemi öncesi izotonik tuz çözeltisi ile 1:4 oranında seyreltilmiş, MIP BS kompozit nanofiberler ile kesikli sistemde oda sıcaklığı koşullarında 1 saat süreyle etkileştirilmiş ve daha sonra bir kez daha adsorpsiyon işlemi uygulanarak en son 1.0 M NaCl ile 2 saat boyunca desorbe edilmiştir. Şekil 4.27’de de görüldüğü gibi tekrarlı adsorpsiyon sonrası son çözeltideki protein yoğunluğunda başlangıç çözeltisine göre azalma görülmektedir. 4. sıradaki desorpsiyon çözeltisinde 67 kDa civarında görülen band HSA’ya aittir.



Şekil 4.27. SDS-PAGE görüntüsü. 1) adsorpsiyon sonrası çözelti (Son 1), 2) adsorpsiyon sonrası çözelti (Son 2), 3) adsorpsiyon öncesi çözelti (Başlangıç), 4) desorpsiyon çözeltisi, 5) moleküler ağırlık belirteci.

4.8. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

MIP BS kompozit nanofiberlere adsorplanan HSA desorpsiyonu kesikli sistemde 1.0 M NaCl çözeltisi ile 60 dakika süre ile rotatörde gerçekleştirilmiştir. MIP BS kompozit nanofiberlerin tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında, adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı nanofiberler ile 6 defa tekrarlanmıştır. Her adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi arasında, BS'ler 20 mM NaOH (10 mL, 30 dak.) ve dengelemek için tampon çözeltisi (pH 6.0, 10 mL, 30 dak.) ile yıkanarak rejenere edilmiştir. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi sonrası HSA % 87 geri kazanım oranı ile elde edilmiş ve adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir azalma gözlenmemiştir. Şekil 4.28'da tekrar kullanım sayısına göre HSA adsorpsiyonundaki değişim görülmektedir.



Şekil 4.28. MIP BS kompozit nanofiberlerin tekrar kullanılabilirliğini gösteren adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü. Desorpsiyon koşulları: 1.0 M NaCl çözeltisi, başlangıç HSA derişimi: 1.0 mg/mL; etkileşim süresi: 60 dak., sıcaklık: 25°C

4.9. Literatür Karşılaştırması

Pang ve ark., BSA baskılanmış poliakrilamid jel küreleri ters faz süspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle sentezlemiştir. Yüksek yoğunluklu çapraz bağlı jel küreler çekirdek, etrafındaki düşük yoğunluklu poliakrilamid gel ise baskılanmış kabuk tabakayı oluşturur [55]. Baskılanmış kürelerin adsorpsiyon hızı yüksektir. Oluşan çoklu hidrojen

bağları ve baskılanmış boşluklar ile kalıp protein arasındaki tamamlayıcı şekil baskılamayı etkileyen temel iki etkidir.

Bereli ve ark., moleküler baskılama yöntemi ile koordinasyon yapıcı monomer olarak N-Metakriloil-(L)-histidinmetilester (MAH) ile Cu^{+2} iyonlarını kompleksleştirmiş ve daha sonra lizozim baskılanmış poli(HEMA–MAH) kriyojeller sentezlemişlerdir. BSA'ya karşı 4.6 kat ve Sitokrom c'ye karşı 3.2 kat seçici olduğu belirtilmiştir [92]. Altıntaş ve ark., IDA şelatlanmış poli(glisidil metakrilat) (poli(GMA)) mikrokürelere Cu^{+2} immobilize ettikten sonra, serumdan IgG uzaklaştırılmak için kullanmışlardır. Serumdan IgG uzaklaştırma etkinliği %98.2'nin üzerindedir [93]. Kartal ve Denizli metal koordinasyonu ve moleküler baskılama yöntemini birleştirerek manyetik özellikte poli(glisidil metakrilat) eş boyutlu mikrokürelere hazırlamışlardır. İmidodiasetik asit, metal koordinasyon ajanı olarak seçilmiş ve HSA, Cu^{+2} iyonları üzerinden manyetik poli(glisidil metakrilat) mikrokürelere yüzeyine baskılanmıştır. HSA baskılanmış manyetik poli(glisidil metakrilat) mikrokürelere maksimum albumin adsorpsiyon kapasitesi 37.7 mg/g kuru polimer olarak belirtilmiştir [94]. Bereli ve ark., tarafından albumin ve IgG uzaklaştırılması için Cibacron blue F3GA ve iminodiasetik asit (IDA)- Cu^{+2} içeren poli(glisidil metakrilat) (PGMA) kürelere poli(hidroksietil metakrilat) (PHEMA) kriyojel içerisine gömülmüştür. PGMA-Cibacron blue F3GA küre gömülü PHEMA kriyojellerin albumin adsorpsiyon kapasitesi 342 mg/g; PGMA-IDA- Cu^{+2} küre gömülü PHEMA kriyojellerin IgG adsorpsiyon kapasitesi ise 257 mg/g polimer olarak belirtilmiştir [95].

Metal şelatlayıcı ligand ve komonomer olan 2 N-Metakriloil-(L)-histidin metilester (MAH) ve metilmetakrilat (MMA) mikrokürelere Cu^{+2} iyonu tutturulmuş ve hem sulu çözeltiden hem de plazmadan IgG adsorpsiyonuna bakılmıştır Cu^{+2} şelatlanmış kürelere maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH 6.5 fosfat tamponunda 12.2 mg/g ve pH 7.0 MOPS tamponunda 15.7 mg/g polimer olarak belirtilmiştir. En yüksek adsorpsiyon değeri % 90.7 saflıkta 54.3 mg/g olarak insan plazmasından elde edilmiştir [96].

Gao ve ark. 240 nm çapındaki Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerin yüzeyine başarılı bir şekilde moleküler baskılanmış polimer hazırlamışlardır. Sığır serum albumin, sığır hemoglobin, ribonükleaz A ve lizozim olmak üzere izoelektrik noktaları farklı dört protein kalıp molekül olarak seçilmiştir. Sığır hemoglobini için MIP maksimum bağlanma kapasitesi 60 dakika içerisinde 100 mg/g polimerden daha fazla miktara ulaşmıştır. Doğal kaynak olarak sığır kanından yapılan deneyler ekstraksiyon etkinliğinin çok yüksek olduğunu göstermiştir [97].

Liu ve ark., 500 nm çapındaki silika partiküllerin yüzeyine metal koordinasyonu yüzey moleküler baskılama yöntemi sayesinde domuz serum albumin tanıyıcı yeni bir afinite

malzemesi hazırlamışlardır. Bakır iyonları, silika yüzeyine immobilize edilmiş ve çapraz bağlı baskılanmış tabaka oluşurken albumin immobilizasyonu için bağlanma noktaları sağlamıştır. Etkileşimler kovalent olmadığı için, bakır iyonları polimerizasyon sonrası kalıp molekül uzaklaştırılmasında yardımcı olmuştur. Bu yüzden, bu malzemenin seçiciliği, tek başına baskılama ya da tek başına İMAK kullanılarak elde edilecek seçicilik değerini aşmıştır. Moleküler baskılanmış nanomalzemenin kütle transferi hızlıdır ve maksimum bağlanma kapasitesi bir dakika içinde ulaşılan 20 mg/g polimerdir [98].

Karbon nanotüplerin, protein yüzey baskılanmada kullanıldığı ilk çalışma Zhang ve ark., tarafından yayınlanmıştır. Çok duvarlı karbon nanotüp tabakaların yüzeyine sığır serum albumin baskılanmıştır. Fonksiyonel monomer olarak akrilamid, çapraz bağlayıcı olarak N,N'-metilenbisakrilamid ve başlatıcı olarak amonyum peroksit kullanılmıştır. Protein tanınması için moleküler baskılama ve çoktabakalı karbon nanotüplerin kullanıldığı ilk çalışma olmasından dolayı yenilikçi bir çalışmadır [99].

Ancak monomer, çapraz bağlayıcı ve kalıp molekül miktarının etkisi incelenirken, sadece adsorpsiyon kapasitesini değerlendirmek doğru değildir [100]. Çünkü adsorpsiyon kapasitesi, hem özgül hem de özgül olmayan bağlanma bölgeleri için bir değerdir. Bunun yerine, özgül bağlanma bölgelerinin seçiciliğini ifade eden baskılama faktörüne bakılmalıdır. Baskılama faktörü, baskılanmış ve baskılanmamış tabakalar için hedef protein adsorpsiyon kapasitesi oranı hesaplanarak bulunur. Ayrıca, kalıp molekül ve yarışmacı proteinler için baskılama faktörü belirlenmesinde karşılaştırmalı deneyler ile özgül seçicilik çalışmaları yapılması önemlidir. Sığır serum albumin için düşük adsorpsiyon kapasitesi (5.53 mg/g) bulunmuştur ve adsorpsiyon kinetiği yavaştır. Dengeye ulaşmak için 10 saat gibi bir süre geçmiştir. Zhang ve ark [101], BSA baskılanmış polimer çevrili çok tabakalı karbon nanotüp-Fe₃O₄ kompozit malzeme hazırlamışlardır. Karbon nanotüpler yüzeyine karboksilik asit grupları kazandırmak için nitrik asitle muamele edilmiştir. Pozitif yüklü Fe₃O₄ manyetik nanopartiküller, ilk kez hidrotermal ısı yardımıyla demir iyon çözeltisinin indirgenmesiyle üretilmiştir. Daha sonra, elektrostatik etkileşimler ile karbon nanotüplere tutturulmuş ve polianilin depozisyonu gerçekleştirilmiştir. Ortalama 25-30 nm kalınlığındaki moleküler baskılanmış polimer tabakası, metakrilik asit ve etilen glikol dimetakrilat kopolimerizasyonu ile BSA varlığında nanomalzeme yüzeyinde oluşturulmuştur. 40 dakika içinde BSA adsorpsiyon kapasitesine (52.8 mg/g) ulaşılmıştır. Baskılanmış malzeme, hedef proteini yüksek seçicilik ve etkinlikte ayırmıştır. Ancak, sadece pH değişiminin protein bağlanma üzerine etkisi incelenmiştir. Fe₃O₄-karbon nanotüp kompleksi elektrostatik etkileşimler de içerdiği için pH

değişimlerinden etkilenebilir ve nanomalzemenin biraraya gelerek çökmesine neden olabilir. Herhangibir sonuca varmadan önce birçok pH değeri test edilmelidir.

Bu tez çalışmasında, HSA baskılanmış bakteriyel selüloz kompozit nanofiberlerin, proteomik çalışmalar için önemi olan plazmadan albumin uzaklaştırılması amacıyla kullanımları araştırılmıştır. Moleküler baskılama, metal şelat etkileşimi ile gerçekleştirilmiştir. İlk önce, metal şelatlayıcı monomer olan N-Metakriloil-L-histidin metil ester (MAH), metakriloil klorür ve L-histidin metil ester reaksiyonu ile sentezlenmiş ve daha sonra bakır iyonları ile önkomples oluşturarak metal şelatlayıcı monomer (MAH-Cu⁺²) elde edilmiştir. MAH-Cu⁺² HSA kompleksiyle çapraz bağlayıcı varlığında polimerizasyon sonrası HSA baskılanmış BS kompozit nanofiberler sentezlenmiştir. MIP BS kompozit nanofiberlerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 206.8 mg/g'dır. Seçicilik çalışmaları insan transferrin (HTr) ve miyogloblin (Myo) molekülleri ile yapılmıştır. HSA baskılanmış BS kompozit nanofiberlerin HTr için 4.73; Myo için ise 3.02 kat daha seçici olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ

➤ MAH monomeri, L-histidin metil esterinin metakriloyl klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiş, sonrasında Cu^{+2} iyonlarıyla kompleks oluşturularak hem UV-vis spektrofotometre hem de FTIR-ATR ile karakterize edilmiştir. MAH monomerine ait 1735 cm^{-1} 'de karakteristik karbonil bandı ($-\text{C}=\text{O}$); 1668 cm^{-1} amid gerilme bandı ($-\text{C}-\text{N}$) ve 1442 cm^{-1} 'de metilen gerilme bandı ($-\text{CH}_2$) görülmektedir. MAH- Cu^{+2} kompleksinde ise 1735 cm^{-1} deki karbonil bandı 1741 cm^{-1} ve 1668 cm^{-1} 'deki amid bandı 1661 cm^{-1} 'e kaymış ve şiddetlerinde azalma meydana gelmiştir.

➤ Yüksek seçicilik için monomerdeki fonksiyonel grupların kalıp molekül ile etkileşiminin fazla olması gerekmektedir. HSA adsorpsiyon kapasitesi monomer/kalıp molekül oranı 80:1 oluncaya kadar artış göstermiş ve sonrasında hemen hemen aynı kalmıştır. Ortamdaki HSA molekülleriyle koordinasyon yapabilen maksimum monomer oranı 80:1 olarak bulunmuştur.

➤ BS, MIP ve NIP BS kompozit nanofiber yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiş ve kompozit yapı gösterilmiştir. BS, MIP ve NIP kompozit nanofiberler için ortalama fiber çapı boyutu sırasıyla $29.6 \pm 7 \text{ nm}$, $32,2 \pm 9.2$ ve 27.3 ± 6.8 şeklindedir.

➤ MIP BS kompozit nanofiberlerin kütlece toplam monomer oranları % 0.1, % 0.5 ve % 1.0 olacak şekilde sentezlenmiş, adsorpsiyon kapasiteleri hesaplanmış ve en yüksek adsorpsiyon kapasitesinin kütlece % 0.5 toplam monomer oranında olduğu tespit edilmiştir.

➤ MIP BS kompozit nanofiberlerin pH 6.0 fosfat tamponunda maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaştığı görülmüştür. Daha yüksek pH değerlerinde adsorpsiyon kapasitesi düşmeye başlar.

➤ MIP BS nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi 2.0 mg/mL HSA derişimine kadar hızla artmış ve HSA molekülünün bağlanabileceği özgül boşlukların dolmasıyla 2.0 mg/mL HSA derişiminde dengeye ulaşmıştır. MIP BS nanofiberlerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 206.8 mg/g 'dir. NIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesi ise 36.2 mg/g 'dir. Cu^{+2} iyonlarının adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisini görmek için HSA molekülleri MAH

monomeri ile doğrudan etkileştirilmiştir. Sentezlenen BS kompozit nanofiberler (BS-kontrol) adsorpsiyon kapasitesi 25.0 mg/g olarak bulunmuştur. HSA ile koordinasyon yapacak Cu^{+2} iyonları olmadan daha zayıf bir moleküler baskılama işlemi gerçekleştiği görülmüştür.

➤ NaCl derişiminin HSA adsorpsiyonu üzerine etkisi incelendiğinde artan tuz derişimi ile MIP BS kompozit nanofiberlerin adsorpsiyon kapasitesinde ciddi düşme olduğu görülmüştür. Artan tuz derişimi ile adsorpsiyon kapasitesinin azalmasından HSA molekölünün MIP BS kompozit nanofiberlere koordine kovalent ve elektrostatik etkileşimler ile bağlandığı anlaşılmaktadır.

➤ Yapılan çalışmada, MIP ve NIP BS kompozit nanofiberlere ait maksimum adsorpsiyon kapasiteleri (Q_{max}) MIP BS kompozit nanofiberler için 227.3 mg/g ve NIP BS kompozit nanofiberler için 53.8 mg/g olarak bulunmuştur. Langmuir korelasyon katsayıları (R^2), MIP BS kompozit nanofiberler için 0.995 iken, NIP BS kompozit nanofiberler için 0.956'dır. Sonuçlar, Langmuir adsorpsiyon modelinin daha uygun olduğunu göstermektedir. Yani moleküler baskılama sırasında oluşturulan boşlukların homojen dağıldığı, eş enerjili olduğu ve yanıl etkileşimlerin olmadığı söylenebilir.

➤ Optimum adsorbent-adsorban temas süresi diğer bir deyişle alıkonma süresi adsorpsiyon kinetiği model çalışmaları ile tespit edilir. Korelasyon sayıları (R^2) ve Q_{eq} değerleri karşılaştırıldığında, HSA sulu çözeltisinden MIP ve NIP BS kompozit nanofiberler ile yapılan HSA adsorpsiyonu yalancı ikinci derece kinetik modeline uymaktadır. Yani adsorpsiyonun kinetiği kimyasal kontrollüdür.

➤ Moleküler baskılamada etkinliğin belirlenmesinin en doğru yöntemi baskılanmış maddelerin dağılım ve seçicilik katsayısının hesaplanmasıdır. MIP BS kompozit nanofiberlerin bağıl seçicilik katsayısı HSA/HTr ve HSA/Myo moleköl çifti için sırasıyla 4.73 ve 3.02 olarak hesaplanmıştır. Bağıl seçicilik değerleri, 1'in ne kadar üzerinde ise baskılama işleminin o kadar etkin olduğu bilinmektedir. Baskılama faktörü, MIP BS kompozit nanofiberlerin maksimum adsorpsiyon kapasitesinin NIP BS kompozit nanofiberlerin maksimum adsorpsiyon kapasitesine bölünmesi ile hesaplanmış ve 5.71 olarak bulunmuştur.

➤ Plazmadan albumin uzaklaştırılması amacıyla MIP BS kompozit nanofiberlerin kullanılabilirliği için yapay insan plazmasından SDS-PAGE analizi yapılmıştır. MIP BS kompozit nanofiberler ile adsorpsiyon sonrası çözeltideki protein yoğunluğunda azalma görülmektedir. Desorpsiyon çözeltisinde HSA'ya ait band 67 kDa civarında görülmektedir.

➤ MIP BS kompozit nanofiberlerin tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında, adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı nanofiberler ile 6 defa tekrarlanmıştır. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi sonrası HSA % 87 geri kazanım oranı ile elde edilmiş ve adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir azalma gözlenmemiştir.



KAYNAKLAR

1. Holewinski, R. J.; Jin, Z.; Powell, M. J.; Maust, M. D.; Van Eyk, J. E., A fast and reproducible method for albumin isolation and depletion from serum and cerebrospinal fluid. *Proteomics*, 13(5): 743-50. **2013**.
2. Siqueira, G.; Bras, J.; Dufresne, A., Cellulosic Bionanocomposites: A Review of Preparation, Properties and Applications. *Polymers*, 2(4): 728. **2010**.
3. Pinto, R. J. B.; Neves, M. C.; Neto, C. P.; Trindade, T., Composites of Cellulose and Metal Nanoparticles. ed. *Nanocomposites - New Trends and Developments*, ed. Vol. **2012**.
4. Rehm, B. H. A., Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Micro*, 8(8): 578-592. **2010**.
5. Çoban Poyrazoğlu, E., Bıyık Halil H., Asetik Asit bakterilerinden Elde Edilen Alternatif Selüloz. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 06(2): 19-26. **2008**.
6. Abeer, M. M.; Mohd Amin, M. C. I.; Martin, C., A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(8): 1047-1061. **2014**.
7. Klemm, D.; Schumann, D.; Kramer, F.; Heßler, N.; Koth, D.; Sultanova, B., Nanocellulose Materials - Different Cellulose, Different Functionality. *Macromolecular Symposia*, 280(1): 60-71. **2009**.
8. Peng, B. L.; Dhar, N.; Liu, H. L.; Tam, K. C., Chemistry and applications of nanocrystalline cellulose and its derivatives: A nanotechnology perspective. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 89(5): 1191-1206. **2011**.
9. Morgan, J. L. W.; Strumillo, J.; Zimmer, J., Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, 493(7431): 181-186. **2013**.
10. Bodin, A.; Bäckdahl, H.; Fink, H.; Gustafsson, L.; Risberg, B.; Gatenholm, P., Influence of cultivation conditions on mechanical and morphological properties of bacterial cellulose tubes. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(2): 425-434. **2007**.
11. Chen, P.; Cho, S. Y.; Jin, H.-J., Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science. *Macromolecular Research*, 18(4): 309-320. **2010**.
12. Klemm, D.; Schumann, D.; Udhardt, U.; Marsch, S., Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26(9): 1561-1603. **2001**.
13. Mikkelsen, D.; Flanagan, B. M.; Dykes, G. A.; Gidley, M. J., Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2): 576-583. **2009**.
14. Strobin, G.; Wlochowicz, A.; Ciechanska, D.; Boryniec, S.; Struszczyk, H.; Sobczak, S., GPC Studies on Bacterial Cellulose. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 53(10): 889-900. **2004**.
15. Pandey, L. K.; Saxena, C.; Dubey, V., Studies on pervaporative characteristics of bacterial cellulose membrane. *Separation and Purification Technology*, 42(3): 213-218. **2005**.
16. Hsieh, Y.-C.; Yano, H.; Nogi, M.; Eichhorn, S. J., An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments. *Cellulose*, 15(4): 507-513. **2008**.
17. Guhados, G.; Wan, W.; Hutter, J. L., Measurement of the Elastic Modulus of Single Bacterial Cellulose Fibers Using Atomic Force Microscopy. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 21(14): 6642-6646. **2005**.

18. Kramer, F.; Klemm, D.; Schumann, D.; Heßler, N.; Wesarg, F.; Fried, W.; Stadermann, D., Nanocellulose Polymer Composites as Innovative Pool for (Bio)Material Development. *Macromolecular Symposia*, 244(1): 136-148. **2006**.
19. Choi, Y.-J.; Ahn, Y.; Kang, M.-S.; Jun, H.-K.; Kim, I. S.; Moon, S.-H., Preparation and characterization of acrylic acid-treated bacterial cellulose cation-exchange membrane. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79(1): 79-84. **2004**.
20. Mohd Amin, M. C. I.; Ahmad, N.; Halib, N.; Ahmad, I., Synthesis and characterization of thermo- and pH-responsive bacterial cellulose/acrylic acid hydrogels for drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 88(2): 465-473. **2012**.
21. Pandey, M.; Amin, M. C. I. M., Accelerated Preparation of Novel Bacterial Cellulose/Acrylamide-Based Hydrogel by Microwave Irradiation. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 62(7): 402-405. **2013**.
22. Goodrich, J. D.; Winter, W. T., Green Composites Prepared from Cellulose Nanoparticles, in *Polysaccharide Materials: Performance by Design*, Edgar, K. J.; Heinze, T.; Buchanan, C. M., Editor^Editors. p. 153-168. **2009**.
23. Rajwade, J. M.; Paknikar, K. M.; Kumbhar, J. V., Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(6): 2491-2511. **2015**.
24. Svensson, A.; Nicklasson, E.; Harrah, T.; Panilaitis, B.; Kaplan, D. L.; Brittberg, M.; Gatenholm, P., Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, 26(4): 419-431. **2005**.
25. Hutchens, S. A.; Benson, R. S.; Evans, B. R.; O'Neill, H. M.; Rawn, C. J., Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. *Biomaterials*, 27(26): 4661-4670. **2006**.
26. Pértile, R.; Moreira, S.; Andrade, F.; Domingues, L.; Gama, M., Bacterial cellulose modified using recombinant proteins to improve neuronal and mesenchymal cell adhesion. *Biotechnology Progress*, 28(2): 526-532. **2012**.
27. Shen, W.; Chen, S.; Shi, S.; Li, X.; Zhang, X.; Hu, W.; Wang, H., Adsorption of Cu(II) and Pb(II) onto diethylenetriamine-bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 75(1): 110-114. **2009**.
28. Chen, S.; Zou, Y.; Yan, Z.; Shen, W.; Shi, S.; Zhang, X.; Wang, H., Carboxymethylated-bacterial cellulose for copper and lead ion removal. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2-3): 1355-1359. **2009**.
29. Mohite, B. V.; Patil, S. V., Bacterial cellulose of *Gluconoacetobacter hansenii* as a potential bioadsorption agent for its green environment applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(18): 2053-2065. **2014**.
30. Bodhibukkana, C.; Srichana, T.; Kaewnopparat, S.; Tangthong, N.; Bouking, P.; Martin, G. P.; Suedee, R., Composite membrane of bacterially-derived cellulose and molecularly imprinted polymer for use as a transdermal enantioselective controlled-release system of racemic propranolol. *Journal of Controlled Release*, 113(1): 43-56. **2006**.
31. Kurban, S.; Mehmetoğlu, İ., *Proteomik. Yeni Tıp Dergisi*, 27: 70-75. **2010**.
32. Andaç, M.; Denizli, A., Affinity-recognition-based polymeric cryogels for protein depletion studies. *RSC Advances*, 4(59): 31130. **2014**.
33. Righetti, P. G.; Boschetti, E., Current Low-Abundance Protein Access, in, Editor^Editors. p. 41-77. **2013**.
34. Han, K. K.; Martinage, A., Post-translational chemical modification(s) of proteins. *The International journal of biochemistry*, 24(1): 19-28. **1992**.

35. Denizli, A.; Küfrevioğlu, Ö. İ., Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler. ed., ed. Vol. Pozitif Matbaacılık 1-295. **2010**.
36. Wen-Chien, L.; Kelvin, H. L., Applications of affinity chromatography in proteomics. *Analytical Biochemistry*. **2004**.
37. Tirumalai, R. S.; Chan, K. C.; Prieto, D. A.; Issaq, H. J.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D., Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(10): 1096-1103. **2003**.
38. Melike, K.; Sinan, A.; Handan, Y.; Rıdvan, S.; Adil, D., Immunoglobulin G depletion from human serum with metal-chelated beads under magnetic field. *International journal of biological macromolecules*, 40(3): 254260. **2007**.
39. Akgöl, S.; Özkara, S.; Uzun, L.; İmaz, F. Y.; Denizli, A., Pseudospecific magnetic affinity beads for immunoglobulin G depletion from human serum. *Journal of applied polymer science*, 106(4): 2405-2412. **2007**.
40. Ming, Z.; David, A. L.; King, C. C.; Haleem, J. I.; Emanuel, F. P.; Lance, A. L.; Timothy, D. V.; Thomas, P. C., An investigation into the human serum "interactome". *Electrophoresis*. **2004**.
41. Bjorhall, K.; Miliotis, T.; Davidsson, P., Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics*, 5(1): 307-317. **2005**.
42. Kassab, A.; Yavuz, H.; Odabaşı, M.; Denizli, A., Human serum albumin chromatography by Cibacron Blue F3GA-derived microporous polyamide hollow-fiber affinity membranes. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **2000**.
43. Francesca, B.; Sergey, P.; Anthony, P. F. T.; Adolfo, S.; Alessandra, B., Surface imprinted beads for the recognition of human serum albumin. *Biosensors and Bioelectronics*. **2007**.
44. Yang, H. H.; Lu, K. H.; Lin, Y. F.; Tsai, S. H.; Chakraborty, S.; Zhai, W. J.; Tai, D. F., Depletion of albumin and immunoglobulin G from human serum using epitope-imprinted polymers as artificial antibodies. *Journal of biomedical materials research. Part A*. **2012**.
45. İ, M.; Garipcan, B.; Denizli, A., Preparation of a novel metal chelate affinity beads for albumin isolation from human plasma. *Journal of applied polymer science*, 90(10): 2840-2847. **2003**.
46. Colantonio, D. A.; Dunkinson, C.; Bovenkamp, D. E.; Van Eyk, J. E., Effective removal of albumin from serum. *Proteomics*, 5(15): 3831-5. **2005**.
47. Altintas, E. B.; Denizli, A., Efficient removal of albumin from human serum by monosize dye-affinity beads. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 832(2): 216-23. **2006**.
48. Sun, X.; Chiu, J.-F.; He, Q.-Y., Application of immobilized metal affinity chromatography in proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 2(5): 649-657. **2005**.
49. Block, H.; Maertens, B.; Spriestersbach, A.; Brinker, N.; Kubicek, J.; Fabis, R.; Labahn, J.; Schäfer, F., Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review, in *Methods in Enzymology*, Richard, R. B.; Murray, P. D., Editor^Editors. Academic Press. p. 439-473. **2009**.
50. Hubert, P.; Porath, J., Metal chelate affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 198(3): 247-255. **1980**.
51. Hubert, P.; Porath, J., Metal chelate affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 206(1): 164-168. **1981**.

52. Kryscio, D. R.; Peppas, N. A., Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *Acta Biomaterialia*, 8(2): 461-473. **2012**.
53. Guo, T. Y.; Xia, Y. Q.; Hao, G. J.; Song, M. D.; Zhang, B. H., Adsorptive separation of hemoglobin by molecularly imprinted chitosan beads. *Biomaterials*, 25(27): 5905-5912. **2004**.
54. Ou, S. H.; Wu, M. C.; Chou, T. C.; Liu, C. C., Polyacrylamide gels with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of lysozyme. *Analytica Chimica Acta*, 504(1): 163-166. **2004**.
55. Pang, X.; Cheng, G.; Li, R.; Lu, S.; Zhang, Y., Bovine serum albumin-imprinted polyacrylamide gel beads prepared via inverse-phase seed suspension polymerization. *Analytica Chimica Acta*, 550(1-2): 13-17. **2005**.
56. Zhang, F.; Cheng, G.; Ying, X., Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres. *Reactive and Functional Polymers*, 66(7): 712-719. **2006**.
57. Derazshamshir, A.; Baydemir, G.; Andac, M.; Say, R.; Galaev, I. Y.; Denizli, A., Molecularly Imprinted PHEMA-Based Cryogel for Depletion of Hemoglobin from Human Blood. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211(6): 657-668. **2010**.
58. Baydemir, G.; Andac, M.; Percin, I.; Derazshamshir, A.; Denizli, A., Molecularly imprinted composite cryogels for hemoglobin depletion from human blood. *J Mol Recognit*, 27(9): 528-36. **2014**.
59. Odabaşı, M.; Say, R.; Denizli, A., Molecular imprinted particles for lysozyme purification. *Materials Science and Engineering: C*, 27(1): 90-99. **2007**.
60. Yilmaz, E.; Haupt, K.; Mosbach, K., The Use of Immobilized Templates—A New Approach in Molecular Imprinting. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(12): 2115-2118. **2000**.
61. Lin, H.-Y.; Hsu, C.-Y.; Thomas, J. L.; Wang, S.-E.; Chen, H.-C.; Chou, T.-C., The microcontact imprinting of proteins: The effect of cross-linking monomers for lysozyme, ribonuclease A and myoglobin. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(4): 534-543. **2006**.
62. Zhang, Z.; Long, Y.; Nie, L.; Yao, S., Molecularly imprinted thin film self-assembled on piezoelectric quartz crystal surface by the sol-gel process for protein recognition. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7): 1244-1251. **2006**.
63. Tamahkar, E.; Denizli, A., Metal ion coordination interactions for biomolecule recognition: a review. *Hittite Journal of Science & Engineering*, 1(1): 21-26. **2014**.
64. Dhal, P. K., Metal-ion Coordination in Designing Molecularly Imprinted Polymeric Receptors. ed. *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry*, ed. Sellergren, B. Vol. Elsevier. 185-202. **2000**.
65. Vidyasankar, S.; Dhal, P. K.; Plunkett, S. D.; Arnold, F. H., Review: Selective ligand-exchange adsorbents prepared by template polymerization. *Biotechnology and Bioengineering*, 48(5): 431-436. **1995**.
66. Friedrichs, B., Th. Peters. Jr.: All about Albumin. *Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. XX and 432 pages, numerous figures and tables. Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996. Price: 85.00 US \$. *Food / Nahrung*, 41(6): 382-382. **1997**.
67. Yang, F.; Zhang, Y.; Liang, H., Interactive Association of Drugs Binding to Human Serum Albumin. *International journal of molecular sciences*, 15(3): 3580. **2014**.
68. Quinlan, G. J.; Martin, G. S.; Evans, T. W., Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*, 41(6): 1211-1219. **2005**.
69. Tamahkar, E.; Babaç, C.; Kutsal, T.; Pişkin, E.; Denizli, A., Bacterial cellulose nanofibers for albumin depletion from human serum. *Process Biochemistry*, 45(10): 1713-1719. **2010**.

70. Garipcan, B.; Denizli, A., A Novel Affinity Support Material for the Separation of Immunoglobulin G from Human Plasma. *Macromolecular bioscience*, 2(3): 135-144. **2002**.
71. Tamahkar, E.; Bereli, N.; Say, R.; Denizli, A., Molecularly imprinted supermacroporous cryogels for cytochrome c recognition. *Journal of separation science*, 34(23): 3433-3440. **2011**.
72. Sarkar, B.; Wigfield, Y., The structure of copper(II)-histidine chelate. The question of the involvement of the imidazole group. *The Journal of biological chemistry*, 242(23): 5572-7. **1967**.
73. Garipcan, B.; Andaç, M.; Uzun, L.; Denizli, A., Methacryloylamidocysteine functionalized poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads and its design as a metal-chelate affinity support for human serum albumin adsorption. *Reactive and Functional Polymers*, 59(2): 119-128. **2004**.
74. Byrne, M. E.; Park, K.; Peppas, N. A., Molecular imprinting within hydrogels. *Advanced drug delivery reviews*, 54(1): 149-161. **2002**.
75. Yu, C.; Ramström, O.; Mosbach*, K., Enantiomeric Recognition by Molecularly Imprinted Polymers Using Hydrophobic Interactions. *Analytical Letters*, 30(12): 2123-2140. **1997**.
76. Yu, C.; Mosbach, K., Molecular Imprinting Utilizing an Amide Functional Group for Hydrogen Bonding Leading to Highly Efficient Polymers. *The Journal of Organic Chemistry*, 62(12): 4057-4064. **1997**.
77. Nicholls, I. A., Towards the rational design of molecularly imprinted polymers. *Journal of Molecular Recognition*, 11(1-6): 79-82. **1998**.
78. Buyanov, A. L.; Gofman, I. V.; Revel'skaya, L. G.; Khripunov, A. K.; Tkachenko, A. A., Anisotropic swelling and mechanical behavior of composite bacterial cellulose-poly(acrylamide or acrylamide-sodium acrylate) hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 3(1): 102-111. **2010**.
79. Huber, R.; Bennett, W. S., Functional significance of flexibility in proteins. *Biopolymers*, 22(1): 261-279. **1983**.
80. Scott, R. A.; Peppas, N. A., Compositional Effects on Network Structure of Highly Cross-Linked Copolymers of PEG-Containing Multiacrylates with Acrylic Acid. *Macromolecules*, 32(19): 6139-6148. **1999**.
81. J. Wizeman, W.; Kofinas, P., Molecularly imprinted polymer hydrogels displaying isomerically resolved glucose binding. *Biomaterials*, 22(12): 1485-1491. **2001**.
82. Wulff, G., Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates— A Way towards Artificial Antibodies. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(17): 1812-1832. **1995**.
83. Yilmaz, E.; Mosbach, K.; Haupt, K., Influence of functional and cross-linking monomers and the amount of template on the performance of molecularly imprinted polymers in binding assays. *Analytical Communications*, 36(5): 167-170. **1999**.
84. Demchenko, A. P., Recognition between flexible protein molecules: induced and assisted folding†. *Journal of Molecular Recognition*, 14(1): 42-61. **2001**.
85. Lu, M.; Zhang, Y.-m.; Guan, X.-h.; Xu, X.-h.; Gao, T.-t., Thermodynamics and kinetics of adsorption for heavy metal ions from aqueous solutions onto surface amino-bacterial cellulose. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 24(6): 1912-1917. **2014**.
86. Lu, M.; Lü, X.; Xu, X.; Guan, X., Thermodynamics and kinetics of bacterial cellulose adsorbing persistent pollutant from aqueous solutions. *Chemical Research in Chinese Universities*, 31(2): 298-302. **2015**.

87. Oshima, T.; Taguchi, S.; Ohe, K.; Baba, Y., Phosphorylated bacterial cellulose for adsorption of proteins. *Carbohydrate Polymers*, 83(2): 953-958. **2011**.
88. Ougiya, H.; Hioki, N.; Watanabe, K.; Morinaga, Y.; Yoshinaga, F.; Samejima, M., Relationship between the Physical Properties and Surface Area of Cellulose Derived from Adsorbates of Various Molecular Sizes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(10): 1880-1884. **1998**.
89. Niide, T.; Shiraki, H.; Oshima, T.; Baba, Y.; Kamiya, N.; Goto, M., Quaternary Ammonium Bacterial Cellulose for Adsorption of Proteins. *Solvent Extraction Research and Development, Japan*, 17: 73-81. **2010**.
90. Wulff, G.; Schauhoff, S., Enzyme-analog-built polymers. 27. Racemic resolution of free sugars with macroporous polymers prepared by molecular imprinting. Selectivity dependence on the arrangement of functional groups versus spatial requirements. *The Journal of Organic Chemistry*, 56(1): 395-400. **1991**.
91. Cheung, C. W.; Porter, J. F.; McKay, G., Sorption kinetic analysis for the removal of cadmium ions from effluents using bone char. *Water Research*, 35(3): 605-612. **2001**.
92. Bereli, N.; Andaç, M.; Baydemir, G.; Say, R.; Galaev, I. Y.; Denizli, A., Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels. *Journal of Chromatography A*, 1190(1-2): 18-26. **2008**.
93. Altıntaş, E. B.; Tüzmen, N.; Uzun, L.; Denizli, A., Immobilized Metal Affinity Adsorption for Antibody Depletion from Human Serum with Monosize Beads. *Ind Eng Chem Res*, 46(23): 7802-7810. **2007**.
94. Kartal, F.; Denizli, A., Surface molecularly imprinted magnetic microspheres for the recognition of albumin. *Journal of separation science*, 37(15): 2077-2086. **2014**.
95. Bereli, N.; Şener, G.; Altıntaş, E. B.; Yavuz, H.; Denizli, A., Poly(glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albumin and immunoglobulin G. *Materials Science and Engineering: C*, 30(2): 323-329. **2010**.
96. Denizli, A.; Alkan, M.; Garipcan, B.; Özkara, S.; Pişkin, E., Novel metal-chelate affinity adsorbent for purification of immunoglobulin-G from human plasma. *Journal of Chromatography B*, 795(1): 93-103. **2003**.
97. Gao, R.; Kong, X.; Wang, X.; He, X.; Chen, L.; Zhang, Y., Preparation and characterization of uniformly sized molecularly imprinted polymers functionalized with core-shell magnetic nanoparticles for the recognition and enrichment of protein. *Journal of Materials Chemistry*, 21(44): 17863-17871. **2011**.
98. Liu, J.; Yang, K.; Deng, Q.; Li, Q.; Zhang, L.; Liang, Z.; Zhang, Y., Preparation of a new type of affinity materials combining metal coordination with molecular imprinting. *Chemical Communications*, 47(13): 3969-3971. **2011**.
99. Zhang, M.; Huang, J.; Yu, P.; Chen, X., Preparation and characteristics of protein molecularly imprinted membranes on the surface of multiwalled carbon nanotubes. *Talanta*, 81(1-2): 162-166. **2010**.
100. Lv, Y.; Tan, T.; Svec, F., Molecular imprinting of proteins in polymers attached to the surface of nanomaterials for selective recognition of biomacromolecules. *Biotechnology advances*, 31(8): 1172-1186. **2013**.
101. Zhang, Z.; Yang, X.; Chen, X.; Zhang, M.; Luo, L.; Peng, M.; Yao, S., Novel magnetic bovine serum albumin imprinted polymers with a matrix of carbon nanotubes, and their application to protein separation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(9): 2855-2863. **2011**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Ilgım Göktürk Başal

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Evli

E-Posta: ilgim@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya ABD 06800 Beytepe/ANKARA

Eğitim

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp A.B.D.

Doktora: Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp A.B.D.

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce YDS: 76

İş Deneyimi

H.Ü. araştırma görevlisi (2009-...)

Deneyim Alanları

moleküler baskılanmış polimerler, protein saflaştırma, nanomalzemeler

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poste Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-