

**KARBONHİDRAT/AMİNO ASİT BASKILANMIŞ
AKRİLİK POLİMERLERİN HÜCRE
BİYOTEKNOLOJİSİNDEKİ KULLANIM
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF USABILITIES OF
CARBOHYDRATE/AMINO ACID IMPRINTED
ACRYLIC POLYMERS IN CELL BIOTECHNOLOGY**

SEZİN GÖNEN

Hacettepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2006

KARBONHİDRAT/AMİNO ASİT BASKILANMIŞ AKRİLİK POLİMERLERİN HÜCRE BİYOTEKNOLOJİSİNDEKİ KULLANIM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Sezin Gönen

ÖZ

Sunulan çalışmada, hücre biyoteknolojisi uygulamalarına yönelik olarak akrilat bazlı MIP'ler sentezlenmiş ve iki farklı uygulamada kullanılmıştır. Bu amaçla, yüksek ve düşük çapraz bağ oranına sahip iki farklı yapıda polimer ile farklı hedef moleküller için moleküler baskılama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Moleküler baskılama işlemlerinde iki amino asit, L-arjinin, glisin, bir tripeptid, Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptid molekülleri ve bir karbonhidrat, D-Mannoz, kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA), ana-matris monomeri olarak hidroksietil metakrilat (HEMA) ve çapraz bağlayıcı olarak da etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) kullanılarak polimer sentezi gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon işlemi su ortamında ve $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ redoks başlatıcısı varlığında yürütülmüştür. Sentezlenen polimerik örneklerin karakterizasyonu, ^{13}C NMR, FTIR, SEM, elementel analiz, gözenek boyutu analizi ve şişme deneyleri gibi çalışmalarla gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen ve karakterize edilen örnekler iki farklı uygulamada kullanılmıştır. İlk uygulamada, D-Mannoz baskılanmış, yüksek oranda çapraz bağlayıcı içeren metakrilik asit/HEMA kopolimerleri, durgun sistemde model lektin olarak seçilen Concanavalin A (Con A)'nın izolasyonunda kullanımı incelenmiş ve en yüksek çapraz bağlayıcı mol oranına sahip baskılanmış ve mannoz yüklenmiş örnekle, Hedef molekül ve polimer arasındaki bozunma sabiti, K_D değeri, $0.52 \mu\text{mol/L}$ olarak, birim polimer kütlesi başına adsorplanan maksimum Con A miktarı, B_{max} , 0.66 olarak hesaplanmış, bu örneklerin Con A saflaştırılması için uygun olduğu görülmüştür.

İkinci uygulamada ise, daha düşük çapraz bağlayıcı oranında hazırlanmış benzer kopolimer bileşimi, farklı bir kalıp moleküller arjinin, glisin ve RGD tripeptid yapısı ile baskılanarak hidrojel yapıda bir malzeme elde edilmiştir. Elde edilen bu malzeme kullanılarak, moleküler baskılamanın L-929 fibroblast hücrelerinin yapışması ve üremesi üzerine etkisi incelenmiştir. Hücre ekimi yapılan örnekler Giemsa ile boyanarak çekilen fotoğraflar ve hücre sayımlarıyla hücre yapışması, tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, %100 yapışma ve 10^6 mertebesinde hücre üreme değeri belirlenmiş, RGD-baskılanmış yüzeylerin hücre yapışması ve yayılmasını desteklediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: moleküler baskılama, hidrojel, polimer, hücre kültürü, Con A, adsorpsiyon.

Danışman: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

INVESTIGATION OF USABILITIES OF CARBOHYDRATE/AMINO ACID IMPRINTED ACRYLIC POLYMERS IN CELL BIOTECHNOLOGY

Sezin Gönen

Abstract

In this study, acrylate-based molecularly imprinted polymers were prepared and used in two different applications. Two different polymer types were prepared with low and high crosslinking levels by using four template (or print) molecules, i.e., two amino acids, L-arginine and glycine, one tripeptid, Arginine-Glycine-Aspartic acid (RGD) and one carbohydrate, D-mannose. Polymerizations were conducted by using methacrylic acid (MAA) as a functional monomer, hydroxyethyl methacrylate (HEMA) as a backbone monomer and ethylene glycol dimethacrylate as a crosslinker. Redox initiators $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ were used and polymerization was proceeded in distilled water medium. Characterization of prepared polymeric samples were carried out by ^{13}C NMR, FTIR, SEM, elemental analysis, pore size analysis and swelling kinetics analysis.

Samples, which had been prepared, were used in two different applications after characterization. In first application usability of D-mannoz imprinted MAA/HEMA copolymers with high crosslinking ratio were investigated by adsorption studies of model lectin conconavalin A (Con A), K_D (dissociation constant for template and binding site of the polymer) and B_{max} (the maximal amount of template bound by unit-weight of polymer) values were found $0.52 \mu\text{mol/L}$ and 0.66 respectively for mannose adsorbed molecularly imprinted polymer with highest crosslinker ratio. Suitability of samples for Con A adsorption was concluded.

In the second application similar copolymer composition was used with low crosslinking ratio and arginine, glycine and RGD template molecules were imprinted to the material in hydrogel form. Effects of molecular imprinting on attachment and spreading of L929 cell line were investigated. Invert microscope photographs and hemacytometric counting determined cell attachment. 100% cell attachment and 10^6 cell account was observed. All these studies establish the suitability of samples for tissue culture applications.

Key words: molecular imprinting, hydrogel, polymer, tissue culture, Con A, adsorption.

Advisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELIOĞLU, Hacettepe University, Chemical Engineering Department

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca, desteğini, bilgi ve tecrübelerini hiç eksik etmeyen, çalışmalarımın yürütülmesi ve yönlendirilmesindeki büyük katkısından dolayı her zaman minnettar olacağım değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na,

Bu çalışmaya verdikleri destek sebebiyle Türkiye Bilimsel ve Teknik Araőtırmalar Kurumuna,

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında gösterdiği sonsuz yardım ve hayatıma kattığı her şey için sevgili ablam ve hocam Araő. Gör. Ayőe Karakeçili'ye,

Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü ve çalışanlarına,

Hücre kültürü çalışmalarında gösterdiği yardım ve özveri için sevgili arkadaşım Tuğrul Tolga Demirtaő'a,

Özellikle FTIR analizlerinin gerçekleştirilmesinde gösterdiği yardım ve ilgiden dolayı Belgin Aslan'a,

Her konuda yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen sevgili laboratuvar arkadaşlarım Esra Özdemir, Pelin Aği, Araő. Gör. Esin Aslankaraoğlu, Alper Kemal Doğan, Deniz Erce ve Soner Çakmak ve Araő. Gör. Hilal Türkoğlu'na

Tüm hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, yüreklendiren, sevgi ve yardımlarını esirgemeyen sevgili annem ve babama,

Verdiği sevgi ve moralle bana her zaman destek olan sevgili eőim Burak Gönen'e

sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Sezin Gönen

SİMGELER ve KISALTMALAR

SİMGELER

k	Kapasite faktörü
t_g	Hedef molekülün alıkonma süresi
t_0	Standardın alıkonma süresi
V_g	Hedef molekülün alıkonma hacmi
V_0	Standardın alıkonma hacmi
K_D	Bozulma sabiti (dissociation constant)
$B_{\text{bağlanan}}$	Birim polimer kütlesi başına bağlanan hedef molekül miktarı
B_{max}	Birim polimer kütlesi başına bağlanan maksimum polimer kütlesi miktarı
C	Derişim
W_C	Su içeriği (water content)
W_d	Kuru örnek ağırlığı
W_s	Şişme sırasında herhangi bir t anındaki örnek ağırlığı

KISALTMALAR

MIP	Moleküler olarak baskılanmış polimer (Molecularly Imprinted Polymer)
MAA	Metakrilik asit
HEMA	Hidroksi etil metakrilat
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
MMA	Metil metakrilat
Con A	Conconavalin A
RGD	Arjinin-Glisin-Aspartik Asit
Arg	Arjinin
Gly	Glisin
ECM	Hücre dışı matris (Extra Cellular Matrix)
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
SEM	Taramalı elektron mikroskopu (Scanning Electron Microscope)
EWC	Denge şişme değeri (Equilibrium Water Content)
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography)

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER.....	iv
KISALTMALAR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Moleküler Baskılama	4
2.1.1.Tarihçe	5
2.1.2.Temel prensipler	8
2.1.2.1. Kovalent moleküler baskılama	9
2.1.2.2. Non-kovalent moleküler baskılama	10
2.1.3. Moleküler baskılamayı etkileyen faktörler	11
2.1.3.1. Kalıp molekül	11
2.1.3.2. Fonksiyonel monomer	12
2.1.3.3. Çapraz-bağlayıcı	12
2.1.3.4. Çözücü (Porojen)	14
2.1.3.5. Başlatıcı	16
2.2. MIP'lerin Kullanım Alanları	16
2.2.1. Moleküler olarak baskılanmış hidrojenlerin kontrollü ilaç salımında kullanımı	17

2.2.2. Ayırma işlemleri	19
2.3. MIP'lerin Etkinliğinin İncelenmesi	20
2.3.1. Kromatografik deneyler	20
2.3.2. Kesikli hedef molekül bağlanma deneyleri	21
2.3.3. Hedef molekül bağlama sabitinin saptanması	22
2.4. Farklı Yöntemlerle MIP sentezi	23
2.5. Lektinler ve Con A Adsorpsiyonu	25
2.5.1. Lektinlerin genel özellikleri	25
2.5.2. Molekül özellikleri	26
2.5.3. Temel yapılar ve benzerlikler	27
2.5.3.1. Conconavalin A (Con A)	27
2.5.3.2. Lektinlerin yapısı ve karbonhidratlar ile olan etkileşimlerinin mekanizması	29
2.5.3.3. Lektinlerin saflaştırılması	30
2.6. Hayvansal Hücre Kültürleri	31
2.6.1. Yüzeğe bağımlı hücreler	32
2.6.2. Yüzeğe bağımlı hücrelerin yapışması	32
2.6.3. RGD'nin hücre yapışmasındaki kullanımı ve etkinliği	33
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	36
3.1. Moleküler Olarak Baskılanmış Polimerlerin Hazırlanması	36
3.1.1. MIP sentezi.....	36
3.1.1.1. Amino asit baskılanmış hidrojeller	37
3.1.1.2. D-Mannoz baskılanmış polimerler	39
3.2. Moleküler Olarak Baskılanmış Polimerlerin Karakterizasyonu	40
3.2.1. ¹³ C NMR analizi	40

3.2.2. FTIR analizi	41
3.2.3. SEM analizi	41
3.2.4. Şişme kinetiği	41
3.2.5. Elementel analiz	42
3.2.6. Gözenek boyutu analizi	42
3.3. Moleküler Olarak Baskılanmış Polimerlerin Uygulamaları	42
3.3.1. D-Mannoz baskılanmış polimerler ile Con A saflaştırılması	43
3.3.1.1. D-Mannoz bağlanması	43
3.3.1.2. Con A adsorpsiyon çalışmaları	44
3.3.2. RGD-baskılanmış hidrojeller ile yapılan çalışmalar	46
3.3.2.1. Durgun ortamda hücre kültürü çalışmaları	46
3.3.2.2. RGD bağlama çalışmaları	48
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI	50
4.1. Moleküler Baskılama Yönteminin Seçimi	50
4.2. MIP'lerin Bileşimlerinin Belirlenmesi ve Sentezi	51
4.3. MIP'lerin Uygulamaları ve Karakterizasyonu	57
4.3.1. D-Mannoz baskılanmış polimerlerin karakterizasyonu ve Con A adsorpsiyonunda kullanımı	57
4.3.1.1. FTIR analizi sonuçları	57
4.3.1.2. ¹³ C NMR analizi sonuçları	59
4.3.1.3. Durgun ortamda Con A saflaştırılması çalışmaları	60
4.3.2. Amino asit ve RGD baskılanmış örneklerin karakterizasyonu ve hayvansal hücre kültürlerinde kullanımı	72
4.3.2.1. FTIR analizi sonuçları	72
4.3.2.2. ¹³ C NMR analizi sonuçları	74

4.3.2.3. SEM analizi sonuçları	77
4.3.2.4. Şişme kinetiği sonuçları	79
4.3.2.5. Elementel analiz sonuçları	82
4.3.2.6. Gözenek boyutu analizi sonuçları	84
4.3.2.7. Hücre kültürü çalışmaları	88
4.3.1.8. RGD bağlanma çalışmaları	92
5. GENEL SONUÇLAR	98
KAYNAKLAR DİZİNİ	102
EKLER	107
EK 1 D-Mannoz Kalibrasyon Grafiği	107
Ek 2- Kümülatif Mannoz adsorpsiyonu değerleri	108
EK 3 Con A Kalibrasyon Grafiği	115
EK 4 Hücre Sayım Yöntemi	116
EK 5 Giemsa ile Boyama Tekniği	117
EK 6 RGD Kalibrasyon Grafiği	118
ÖZGEÇMİŞ	119

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Moleküler baskılama işleminin şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.2. Moleküler baskılama işleminde kullanılan monomerler.....	13
Şekil 2.3. Moleküler baskılama işleminde kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	15
Şekil 2.4. Tipik HPLC kromatogramı.....	21
Şekil 2.5. Conconavalin A tetramerinin şematik gösterimi.....	28
Şekil 2.6. RGD sekansının hücre yapışmasındaki görevi.....	34
Şekil 3.1. Polimerizasyonda kullanılan monomerler	37
Şekil 3.2. Hidrojellerin baskılanmasında kullanılan kalıp moleküllerin kimyasal yapısı.....	38
Şekil 3.3. D-Mannoz kalıp molekülünün kimyasal yapısı	40
Şekil 3.4. Ninhidrin reaksiyonu	48
Şekil 4.1. P3 bileşimi için baskılanmamış (A), 80 mg D-mannoz baskılanmış ekstraksiyon sonrası (C) saf D-mannoza ait FTIR spektrumları	58
Şekil 4.2. P-3 polimeri için ¹³ C NMR analizi sonuçları	
a) baskılanmamış	59
b) 80 mg mannoz baskılanmış	59
c) Mannoz baskılanmış kalıp uzaklaştırılmamış	60
Şekil 4.3. P-2 bileşiminde ki örnek için adsorpsiyon izotermi.....	62
Şekil 4.4. P-2 bileşimine ait Scatchard grafiği	63
Şekil 4.5. Farklı bileşimlerdeki moleküler olarak baskılanmış polimerlerin 1.5 mg/ml rezervuar derişiminde gram polimer başına adsorpladıkları maksimum D-Mannoz miktarları (denge süresi ~ 40 dakika)	64
Şekil 4.6. P-1 bileşimindeki örnek için Con A adsorpsiyon izotermi	69
Şekil 4.7. P-1 bileşimine ait Scatchard grafiği	69
Şekil 4.8. P-1 bileşimi için Con A desorpsiyon eğrisi	71
Şekil 4.9. H-4 bileşimi için baskılanmamış (A), Gly baskılanmış ekstraksiyon sonrası (B) ve Gly baskılanmış ekstraksiyon öncesi (C) polimerlerin FTIR spektrumları	73

Şekil 4.10. H-4 bileşimine ait	
a) baskılanmamış	75
b) arjinin baskılanmış	75
c) Baskılanmış arjinin kalıp molekülü uzaklaştırılmamış	76
d) saf arjinin	76
Şekil 4.11. H-1 bileşimi için	
(a) baskılanmamış,	
(b) Gly baskılanmış (ekstraksiyon öncesi),	
(c) Gly baskılanmış (ekstraksiyon sonrası),	
(d) H-4 için baskılanmamış,	
(e) Arg baskılanmış (ekstraksiyon öncesi) ve	
(f) Arg baskılanmış (ekstraksiyon sonrası) örneklere ait	
SEM görüntüleri	77
Şekil 4.12. a) Gly baskılanmış H-1 bileşimi ve	
b) Arg baskılanmış H-4 bileşimine ait kesitlerden alınmış	
SEM görüntüleri	78
Şekil 4.13. Tüm bileşimler için baskılanmamış ve Arg/Gly baskılanmış	
hidrojellerin karşılaştırmalı şişme kinetiği	81
Şekil 4.14. H-4 bileşimine ait BJH Adsorpsiyon grafiği	85
Şekil 4.15. H-4 bileşimi için baskılanmamış	
(a) ve Gly baskılanmış	
(b) örneklere ait civalı porozimetre histogramları	86
Şekil 4.16. Gly baskılanmış	
(a) H-1 ve	
(b) H-6 bileşimlerine ait civalı porozimetre histogramları	86
Şekil 4.17. RGD peptid sekansının moleküler formülü ve isimlendirmesi.....	88
Şekil 4.18. L-929 hücre hattı ile gerçekleştirilen kontrol çalışması invert	
mikroskop görüntüleri	
a) 24. saat,	
b) 48. saat.....	91
Şekil 4.19. Hücre kültürü çalışmaları	
(a, b, c, d)	93
(e, f, g, h)	94

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Moleküler baskılama yöntemiyle hazırlanmış moleküller ve uygulama alanları.....	7
Çizelge 3.1. Amino asit baskılanmış hidrojellerin bileşimleri	38
Çizelge 3.2. Kalıp moleküllerin özellikleri	39
Çizelge 3.3. D-Mannoz baskılanmış polimerlerin bileşimleri	40
Çizelge 4.1. Glisin baskılanmış örneklerin mol oranları	55
Çizelge 4.2. Arjinin baskılanmış örneklerin mol oranları	55
Çizelge 4.3. RGD baskılanmış örneklerin mol oranları	55
Çizelge 4.4. 40 mg D-mannoz baskılanmış örneklerin mol oranları	56
Çizelge 4.5. P-2 bileşimindeki baskılanmış ve baskılanmamış örneklere ait D-mannoz bağlama verileri	63
Çizelge 4.6. Con A için, floresan kromofor grup içeren amino asit yüzdeleri...	67
Çizelge 4.7. Aromatik amino asitlerin absorpsiyon ve floresans özellikleri	68
Çizelge 4.8. P-2 bileşimindeki baskılanmış ve baskılanmamış örneklerin kinetik değerleri	70
Çizelge 4.9. Desorpsiyon verim değerleri	71
Çizelge 4.10. Glisin baskılanmış 4 numaralı bileşim için FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi	73
Çizelge 4.11. Çalışma kapsamında sentezlenen hidrojellerin 37°C ve pH=7.4 PBS çözeltisindeki denge şişme değerleri	80
Çizelge 4.12. Ekstraksiyon süresinin etkisinin elementel analiz (C, H, N) ile incelenmesi	82
Çizelge 4.13 Elementel Analiz sonuçları	83
Çizelge 4.14. Örneklerin civalı porozimetre ile elde edilen gözenek dağılımları (%)	87
Çizelge 4.15. RGD ile modifiye edilen polimer yapıdaki biyomalzemeler ve kullanılan hücre tipleri	89
Çizelge 4.16. RGD baskılanmış H4 bileşimi örneklerinin RGD bağlama Kapasiteleri	97

1. GİRİŞ

Moleküler olarak baskılanmış polimerler (Molecularly Imprinted Polymer (MIP)), doğal reseptörlere benzer olarak gösterdikleri afinite ve seçicilik, yüksek kararlılık kolay sentezlenme ve çeşitli uygulamalara kolaylıkla adapte olabilme gibi özellikleri nedeniyle son yıllarda araştırmacıların ilgi odağını oluşturmuştur.

Moleküler baskılama işlemi, baskılanacak molekül (kalıp veya hedef molekül) üzerinde çeşitli monomerlerin bağ oluşturmasıyla başlar ve daha sonra polimerizasyonun gerçekleşmesiyle devam eder. Polimerizasyondan sonra kalıp molekül yapıdan uzaklaştırılır ve baskılanmış moleküle özgü tanıma merkezleri içeren polimerik yapı elde edilir.

Sentez için iki temel gereksinim vardır: 1) hedef molekül veya diğer bir deyişle baskılanacak molekül, 2) hedef molekül ile etkileşebilecek (kovalent yada non-kovalent bağlanma ile) işlevsel bir monomer. Bu temel gereksinimlerin yanı sıra çözücü, çapraz-bağlayıcı gibi yan gereksinimler de mevcuttur.

Moleküler baskılama işlemi, üç basamaktan oluşur. İlk basamakta baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer(ler) etkileşerek bir kompleks oluştururlar. İkinci basamakta bu kompleks yapı, işlevsel monomer üzerinden polimerleştirilir. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra baskılanan molekül, yıkama işlemiyle polimerik yapıdan uzaklaştırılır. Böylelikle geride baskılanmış bağlanma bölgelerine sahip bir polimer kalır. Artık bu polimer hedef molekül için yüksek seçicilik ve ilgiye sahiptir (Haupt, 2003).

MIP'ler mekanik stres, yüksek sıcaklık, basınç, asit, baz, metal iyonları ve geniş bir pH dağılımında çözücüler gibi fiziksel ve kimyasal faktörlere karşı oldukça dayanıklıdır. Ayrıca polimerler, tekrar kullanılabilirler.

Baskılanmış polimerlerin uygulamaları temel olarak 3 gruba ayrılabilir; ayırma malzemeleri olarak; katalitik uygulamalarda enzim taklidi yapılar olarak, biyosensör ve

immunoassay uygulamalarında tanıma elemanı olarak (Mosbach ve arkadaşları, 1996).

Sunulan tez kapsamında, hayvansal hücre biyoteknolojisi uygulamalarına yönelik olarak akrilat-bazlı MIP yapıların sentezi amaçlanmıştır. Gerçekleştirilen moleküler baskılama işlemlerinde, L-arjinin, glisin, Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptid molekülleri ve D-mannoz, kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA), ana-matris monomeri olarak hidroksietil metakrilat (HEMA) ve çapraz bağlayıcı olarak da etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) kullanılarak polimer sentezi gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak, hücre kültüründe yapıştırıcı molekül işlevi gören lektinlerin izolasyonunda halen mevcut problemlerin giderilmesine yönelik olarak mannoz baskılanmış polimerler sentezlenerek, model lektin olarak seçilen Con A'nın izolasyonunda kullanımı incelenmiştir.

Endüstriyel boyutta hücre ve hücrel ürünlerin üretiminde kullanılan hücrelerin pek çoğunun yüzeye-bağımlı (anchorage-dependent) oluşu, uygun yüzey özelliklerine ve fonksiyonlitesine sahip biyomalzemelerin geliştirilmesini gerektirmektedir. İkinci uygulamada ise yukarıdaki amaca yönelik olarak hücre yapışmasında etkin olduğu bilinen fibronektin molekülünün RGD (arginine-glycine-aspartic acid) sekansından oluşan tripeptid baskılanmış metakrilik asit/hidroksietil metakrilat kopolimerleri sentezlenmiştir. Bu kopolimerlerden uygun özelliklere sahip olan MIP'lerin L929 fibroblast hücrelerinin yapışmasındaki etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, baskılanmamış polimerlerle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Sentezlenen polimerik örneklerin karakterizasyonu, ¹³C NMR, FTIR, SEM, elementel analiz, gözenek boyutu analizi ve şişme deneyleri gibi çalışmalarla gerçekleştirilmiştir.

Yapılan alışmalar ışığında moleküler baskılama işleminin hücre biyoteknolojisi uygulamalarında hem ayırma işlemlerinde hem de hücre kültürü yüzeyi olarak etkin bir şekilde kullanılabileceği ortaya konmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

Bu çalışmada, hayvansal hücre biyoteknolojisi uygulamalarına yönelik olarak akrilat-bazlı, moleküler olarak baskılanmış polimerik yapıların sentezi ve moleküler baskılamanın hayvansal hücre biyoteknolojisinde kullanım potansiyelinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, ilk uygulamada mannoz baskılanmış metakrilik asit (MAA)/hidroksietil metakrilat (HEMA) kopolimerleri sentezlenerek, model lektin olarak seçilen Concanavalin A (Con A)'nın izolasyonunda kullanımı incelenmiştir. İkinci uygulamada ise polimerizasyon yöntemi kısmen değiştirilerek hazırlanmış benzer kopolimer bileşimi, farklı bir kalıp molekülü olan RGD (Arjinin-glisin-aspartik asit) tripeptid yapısı ile baskılanarak, moleküler baskılamanın fibroblastik morfolojiye sahip L929 hücrelerinin yapışmasındaki etkisi incelenmiştir. Bu doğrultuda moleküler baskılama, lektinler, lektin izolasyonu ve hayvansal hücre kültürleri ile ilgili genel bilgiler aşağıda sunulmuştur.

2.1. Moleküler Baskılama

Moleküler olarak baskılanmış polimerler (Molecularly Imprinted Polymer (MIP)), yapay reseptörleri ile malzeme biliminde yeni bir sınıf oluştururlar. 1972'de Dusseldorf Üniversitesinden Günter Wulff tarafından keşfedilmelerinden bu yana bilim adamlarının ve mühendislerin ilgisini çekerek kromatografik absorplayıcıların, membranların, sensörlerin, yapay enzim ve reseptörlerin elde edilmesini sağlamışlardır. Moleküler olarak baskılanmış polimerler, doğal reseptörlere benzer olarak gösterdikleri afinite, seçicilik ve kararlılık, kolay sentezlenmeleri ve çeşitli uygulamalara kolay adapte olmaları gibi özellikleriyle araştırmaların hedefi olmuşlardır. Farklı amaçlar için, pek çok bileşik moleküler olarak baskılanmış ve oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bunun yanı sıra elde edilen polimerik yapı biyolojik yapılardan daha dayanıklı ve ucuzdur (Piletsky ve arkadaşları, 2001).

MIP'ler, biyolojik reseptörlerin spesifik kalıp molekülü tanıma ve bağlanma gibi iki en önemli özelliğine sahiptirler. Ancak MIP'ler polimerizasyon sırasında yüksek oranda çapraz bağlayıcı kullanıldığından rijid, büyük ve çözünmez oluşlarıyla biyolojik

reseptörlerden farklıdır. Biyolojik reseptörler, daha küçük, esnek ve çoğunlukla çözünürdürler. Elde edilen polimerin boyutlarına bağlı olarak MIP'ler yüzlerce hatta binlerce bağlanma merkezi içerebilirler, biyolojik moleküller ise çok daha az sayıda bağlanma merkezine sahiptir (Gümüşderelioğlu, 2003).

2.1.1.Tarihçe

MIP'ler, malzeme bilimi ve ayırma teknolojisi uygulamaları nedeniyle bilimsel aktiviteler için ilgi odağı olmuştur. Çalışmalar başlangıçta spesifik absorplayıcıları sentezlemek ve bunların özgülüğünü anlamak için yapılmıştır. Araştırma çalışmalarının yaygın yapısı on yıl öncesine kadar değişmemiştir. Ancak son on yıl içerisinde moleküler olarak baskılanmış polimerlerin sağladığı yeni alanlar yeni fırsatlar sunmuş, immunoassay ve sensörlerin, membranların ve kapiler elektroforezin gelişimini ve özel fonksiyonlu polimerlerin (ilaç salım matrisleri gibi) üretimini sağlamıştır (Peppas ve arkadaşları, 2002).

Moleküler baskılamanın temeli "moleküler tanıma" kavramına dayanır. "Moleküler tanıma" kavramı Cram, Lehn ve Pederson'ın 1987 yılında Nobel ödülünü almalarıyla tüm dünyada öğrenilmiştir. Ancak bu konunun temelleri çok daha eskilere, 1890'lı yıllarda Fischer'in öne sürdüğü "anahtar-kilit modeli"ne kadar gitmektedir.

Moleküler baskılama alanında yapılan çalışmalarla, pek çok molekül başarılı bir şekilde baskılanmıştır. Şimdiye kadar baskılanmış moleküller arasında çeşitli ilaçlar, hormonlar, proteinler, amino asitler, karbonhidratlar, boyalar, böcek ilaçları, nükleotidler, koenzimler ve kolesterol gibi steroidler sayılabilir.

S. Vidyasankar, M. Ru, F.H. Arnold tarafından 1997 yılında yapılan çalışmada α -amino asitler baskılanarak enantiomer ayırma amaçlı ligand değiştirici *sorbent* elde edilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada fonksiyonel monomer olarak Cu(II)-N-(4-vinil benzil) iminodiasetik asit, çapraz bağlayıcı olarak ise etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) kullanılarak MIP'ler sentezlenmiş ve kromatografik çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

K. Mosbach ve grubu tarafından 1990 yılında yapılan çalışmada amino asit türevleri kullanılarak metakrilat bazlı MIP'ler sentezlenmiş ve bunların HPLC'de kullanımına yönelik olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Andersson ve arkadaşları, 1990).

K. Mosbach ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise metakrilik asit (MAA) monomeri ve EGDMA çapraz bağlayıcısı kullanılarak N-Ac-L-Phe-Trp-Ome peptid zinciri moleküler olarak baskılanmış ve ligand seçiciliği HPLC kolonunda denenmiştir. Çalışma sonucunda moleküler olarak baskılanmış polimerler ile enantiomer ayırma faktörü 17,8'e varan ligand seçiciliği elde edilmiştir (Ramström ve arkadaşları, 1994).

S. Hjerten, J.L. Liao ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada miyogloblin molekülü baskılanarak elde edilen polimerler kolon dolgu maddesi olarak protein adsorpsiyonunda denenmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Hjerten ve arkadaşları, 1997).

2001 tarihli bir diğer çalışmada, N. Nagahori ve S. Nishimura tarafından sentezlenen glikoproteinlerin monomer olarak kullanıldığı MIP'ler model lektin olarak Concanavalin A (Con A) adsorpsiyonunda kullanılmıştır (Nagahori ve arkadaşları, 2001).

Moleküler olarak baskılanmış hidrojellerin, özellikle ilaç salım sistemlerinde kullanımı araştırmacıların ilgisini çeken konulardandır. C. Alvarez-Lorenzo ve grubu tarafından timolol ilaç molekülü baskılanmış HEMA/MAA ve HEMA/MMA kopolimerlerinin timolol'ün kontrollü salımında kullanılması araştırılmıştır (Alvarez-Lorenzo ve arkadaşları, 2002). Yine aynı grup tarafından yapılan bir diğer çalışmada da N,N-dietil akrilamid/MAA komonomeri kullanılarak sentezlenen moleküler olarak baskılanmış kontakt lens bileşimindeki hidrojeller timolol salım ve tekrar yükleme çalışmalarında kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Hiratani ve arkadaşları 2002).

Baskılanmış polimerlerin uygulamaları temel olarak 3 gruba ayrılabilir; ayırma malzemeleri olarak; katalitik uygulamalarda enzim taklidi yapılar olarak, biyosensör ve

immunoassay uygulamalarında tanıma elemanı olarak. Çizelge 2.1.'de moleküler baskılama yöntemiyle baskılanmış moleküller ve uygulama alanları özetlenmiştir (Mosbach ve arkadaşları, 1996).

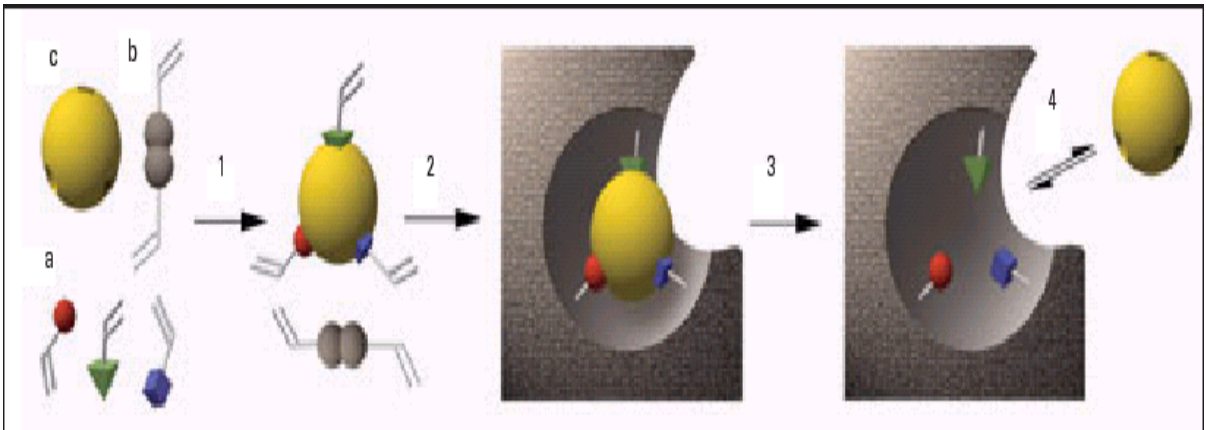
Çizelge 2.1. Moleküler baskılama yöntemiyle hazırlanmış moleküller ve uygulama alanları

SINIF	BİLEŞİK	YAKLAŞIM	UYGULAMA
İlaç	Timolol	Non-kovalent	Kiral ayırma
	Teofilin	Non-kovalent	Immunoassay
	Diazepam	Non-kovalent	Immunoassay
	Morfin	Non-kovalent	Immunoassay
	Naproksen	Non-kovalent	Kiral ayırma
	Ephedrine	Non-kovalent	Kiral ayırma
	Pentamidine	Non-kovalent	Ayırma
Hormonlar	Enkefalin	Non-kovalent	Immunoassay
Böcek ilaçları	Atrazine	Non-kovalent	Immunoassay / ayırma
Proteinler	Transferin	Kovalent	Ayırma
	RNase A	Non-kovalent	Ayırma
	Üreaz	Non-kovalent	
Amino asitler	Amino asit türevleri	Non-kovalent	Kiral ayırma
	Dansyl-Phe-OH	Non-kovalent	Sensör
Peptidler	Ac-Trp-Phe-OMe	Non-kovalent	Kiral ayırma
	Phe-Gly-anilide	Non-kovalent	Kiral ayırma
	Boc-Phe-Gly-OEt	Non-kovalent	Kiral ayırma
	Cbz-Ala-Ala-OMe	Non-kovalent	Kiral ayırma
	Cbz-Ala-Gly-Phe-OMe	Non-kovalent	Kiral ayırma
Karbonhidratlar	Galaktoz türevleri	Non-kovalent	Ayırma / Immunoassay
		Kovalent	Kiral ayırma
	Glukoz türevleri	Non-kovalent	Ayırma / Immunoassay
	Fruktoz türevleri	Non-kovalent	Kiral ayırma
Koenzimler	Pyridoksal türevleri	Non-kovalent	Katalizör
Nükleotidler	NAD ⁺	Kovalent	Ayırma
Steroidler	Kolesterol	Kovalent	Ayırma
Boyalar	Safranin O	Non-kovalent	Ayırma
	Rodanil mavisi	Non-kovalent	Ayırma
Metal iyonları	Ca ²⁺	Metal koordinasyon	Sensör
	Cu ²⁺	Metal koordinasyon	Ayırma
Diğer	Bis-imidazoller	Metal koordinasyon	Ayırma
	Mandelik asit	Non-kovalent	Kiral ayırma

2.1.2.Temel prensipler

Moleküler baskılama kısaca, üzerinde hedef molekülü tanıma özelliği taşıyan merkezler içeren polimerlerin sentezlenmesi işlemidir. Sentez için iki temel gereksinim vardır: 1) hedef molekül veya diğer bir deyişle baskılanacak molekül, 2) hedef molekül ile etkileşebilecek (kovalent ya da non-kovalent bağlanma ile) işlevsel bir monomer. Bu temel gereksinimlerin yanı sıra çözücü, çapraz-bağlayıcı gibi yan gereksinimler de mevcuttur.

Moleküler baskılama işlemi, Şekil. 2.1 de özetlendiği gibi üç basamaktan oluşur. İlk basamakta baskılanacak molekül (c) ile fonksiyonel monomer(ler) (a) etkileşerek bir kompleks oluştururlar. İkinci basamakta bu kompleks yapı, işlevsel monomer üzerinden (b) polimerleştirilir. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra baskılanan molekül, yıkama işlemiyle polimerik yapıdan uzaklaştırılır. Böylelikle geride baskılanmış bağlanma bölgelerine sahip bir polimer kalır. Artık bu polimer hedef molekül için yüksek seçicilik ve ilgiye sahiptir. Örneğin, hedef molekülü içeren bir karışım, baskılanan polimer ile etkileşecek olursa, sahip olduğu bağlanma bölgeleri nedeniyle yalnızca hedef molekülü tanıyarak ona bağlanacak ve böylelikle hedef molekülün karışım ortamından uzaklaştırılması, yani saflaştırılması sağlanacaktır (Haupt, 2003).



Şekil 2.1. Moleküler baskılama işleminin şematik gösterimi

İlk basamakta, fonksiyonel monomer ve kalıp molekül kovalent olarak yada non-kovalent etkileşimlerle bağlanabilir. Bu bakımdan moleküler baskılama işlemi kovalent ve non-kovalent moleküler baskılama olarak iki gruba ayrılabilir. Her iki moleküler baskılama tipinin özellikleri, avantaj ve dezavantajları aşağıda açıklanmıştır.

2.1.2.1. Kovalent moleküler baskılama

İlk kovalent moleküler baskılama 1977 yılında Wulff ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. (Wulff, 1977). Bu yöntemde polimerizasyon öncesi, fonksiyonel monomer ve kalıp molekül birbirine kovalent bağ ile bağlanır. Oluşan kovalent konjugat, moleküller arası kovalent bağ korunarak polimerize edilir. Polimerizasyon sonrası kovalent bağ yıkılır ve kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır.

Kovalent moleküler baskılamanın avantajları şöyle sıralanabilir:

- i) Monomer-kalıp konjugatı kararlı ve stokiyometrik orandadır ve bunun sonucu olarak moleküler baskılama prosesi ve polimer üzerindeki bağlanma merkezlerinin yapısı daha kesindir.
- ii) Monomer-kalıp arasındaki kovalent bağların kararlı oluşu nedeniyle çok çeşitli polimerizasyon şartları (Örneğin; yüksek sıcaklık, yüksek ya da düşük pH, polar çözücü gibi) uygulanabilir.

Dezavantajları ise şöyledir:

- i) Monomer-kalıp molekül konjugatının sentezi genellikle zahmetli ve pahalıdır.
- ii) Oluşabilecek tersinir kovalent bağ çeşitleri sınırlıdır.
- iii) Üçüncü basamaktaki kalıp uzaklaştırma işlemi sırasında kovalent bağlar koparken baskılamanın etkisi kısıtlanabilir.
- iv) Tekrar bağlanma ve salım, kovalent bağların oluşup tekrar yıkılması gerektiğinden, yavaştır.

2.1.2.2. Non-kovalent moleküler baskılama

Mosbach ve arkadaşları kalıp ve fonksiyonel monomer arasında kovalent bağlanmanın her zaman gerekli olmadığını ortaya koymuştur (Arshady ve arkadaşları, 1981). Non-kovalent moleküler baskılamada fonksiyonel monomer ile kalıp molekülünü birbirine bağlamak için hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve koordinasyon bağlarının oluşumu gibi non-kovalent etkileşimler kullanılır. Bu etkileşimler, bileşenlerin reaksiyon karışımına eklenmesiyle kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Polimerizasyon sonrası, kalıp molekül, polimer yapı içinden uygun çözücüler ile uzaklaştırılır.

Non-kovalent moleküler baskılamanın avantajları şöyledir:

- i) Monomer-kalıp konjugatını sentezlemeye gerek yoktur.
- ii) Bağlanma sadece zayıf non-kovalent etkileşimlerle gerçekleştiğinden, kalıp molekül çok yumuşak şartlarda kolayca polimerik yapıdan uzaklaştırılır.
- iii) Tanıma merkezlerine tekrar bağlanma ve ayrılma hızlı ve kolaydır.

Dezavantajları ise şu şekilde ifade edilebilir:

- i) Baskılama prosesi ve oluşan tanıma merkezleri kesin değildir ve stokiometrik bağlanma gözlenmez.
- ii) Polimerizasyon koşulları, non-kovalent etkileşimleri maksimuma ulaştırmak için çok dikkatli seçilmelidir.
- iii) Yüksek oranda kullanılan fonksiyonel monomer (dengeyi etkileşim oluşumu yönüne kaydırmak için) spesifik olmayan bağlanma merkezlerinin oluşumuna ve bağlanma seçiciliğinin azalmasına neden olur (Komiya ve arkadaşları, 2003).

2.1.3. Moleküler baskılamayı etkileyen faktörler

Moleküler baskılama son derece basit bir işlem olarak gözüküyor olsa da yöntemin başarısında pek çok faktör rol oynar. Bu faktörler, kalıbın doğası ve büyüklüğü, fonksiyonel monomer, çapraz-bağlayıcı, çözücü ve başlatıcının kimyasal yapısı ve özellikleri olarak sıralanabilir. Bu faktörlerin moleküler baskılama üzerine etkileri aşağıda özetlenmiştir.

2.1.3.1. Kalıp molekül

Tüm moleküler baskılama proseslerinde kalıp molekül, baskılamanın başarısı açısından kilit rol oynar. Bağlanan fonksiyonel monomerler üzerindeki fonksiyonel gruplar kalıp molekülle etkileşime girer. Ancak, tüm kalıp moleküller çeşitli nedenlerle doğrudan kalıp olmaya elverişli olmayabilir. Polimerizasyon reçetesiyle uyumsuzluğa yol açmaması bakımından, kalıp molekül polimerizasyon şartlarında kimyasal olarak inert olmalıdır. Kalıp molekülün farklı reaksiyonlara girmesi ya da herhangi bir nedenle polimerizasyon koşullarında kararsız olması gibi durumlarda alternatif baskılama stratejileri ortaya çıkabilir. Bu durumda oluşan tanıma merkezleri beklenildiği gibi olmayacak, dolayısıyla moleküler baskılama, istenilen başarıyı gösteremeyecektir. Bir kalıp molekül incelenirken aşağıdaki sorular sorulmalıdır.

- i) Kalıp molekül, polimerize olabilecek grup taşıyor mu?
- ii) Kalıp molekül, polimerizasyonu inhibe edecek ya da geciktirecek fonksiyonel gruplar (Örneğin; tiol grubu) taşıyor mu?
- iii) Kalıp molekül polimerizasyonun gerçekleştiği yüksek sıcaklıklara (Örneğin; AIBN'nin başlatıcı olarak kullanıldığı durumlarda sıcaklık 60°C civarında olur) veya UV ışını gibi şartlarda kararlı kalabilir mi?

Kalıp molekül ile ilgili bir diğer kısıtlama da molekül büyüklüğüdür. Çok büyük moleküllerin polimerin çapraz bağları arasından uzaklaştırılması zor olacağından moleküler baskılama işleminde genellikle küçük moleküller kalıp olarak tercih edilir.

Çizelge 2.1.'de listelendiği gibi, ilaçlar, hormonlar, proteinler, pestisitler, amino asitler, karbonhidratlar gibi çok sayıda molekül, baskılama işleminde kullanılmıştır.

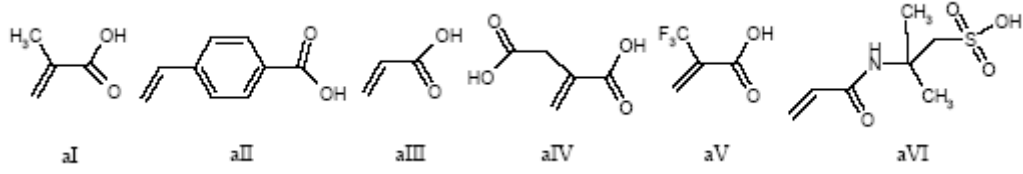
2.1.3.2. Fonksiyonel monomer

Fonksiyonel monomerler, baskılanmış tanıma merkezlerindeki bağlanma etkileşimlerinden sorumludurlar. Non-kovalent bağlanma protokollerinde kalıp molekül ile fonksiyonel monomer etkileşimini arttırmak için fazla oranda fonksiyonel monomer kullanılır (kalıp/fonksiyonel monomer oranı 1:4 veya üzerinde olabilir). Diğer bir önemli faktör de kalıp molekülün fonksiyonallitesiyle fonksiyonel monomerin fonksiyonallitesinin uyumudur (Örneğin; hidrojen bağı vericisi, hidrojen bağı alıcısı). Bu uyum kompleks oluşumunu dolayısıyla da baskılamanın etkisini artırır. Birden fazla monomerin bir arada kullanıldığı durumlarda, monomerlerin reaktiflik oranlarının kopolimerleşmeyi desteklediğinden emin olmak gerekir. Moleküler baskılama da kullanılan tipik fonksiyonel monomerler karboksilik asitler, sülfonik asitler ve heteroarmik bazlardır. Şekil.2.2.'de moleküler baskılama işleminde kullanılan monomerler gösterilmiştir.

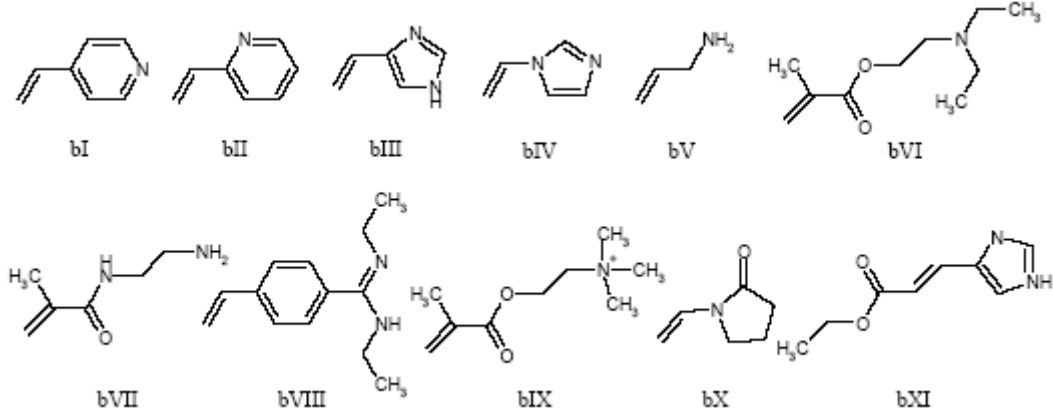
2.1.3.3. Çapraz-bağlayıcı

Baskılanmış polimerlerde çapraz-bağlayıcının üç temel fonksiyonu vardır. İlk olarak çapraz-bağlayıcı, polimerin matris yapısını kontrol eder buna bağlı olarak polimer jel formunda, makro gözenekli veya mikrojel pudra şeklinde olabilir. İkinci fonksiyon baskılanmış bağlanma merkezinin kararlılığının sağlanmasıdır. Çapraz bağlayıcı son olarak, polimer matrisin kararlılığını belirler. Moleküler baskılama işlemlerinde genellikle yüksek oranda çapraz bağlayıcı, baskılanmış polimerlerin tanıma merkezlerinin kararlılığını arttırmasının yanı sıra, makro gözenekli ve mekanik dayanıklılığı yüksek malzemeler elde edilmesi bakımından da tercih edilir. Bu nedenle moleküler olarak baskılanmış polimerler genelde %80'in üzerinde çapraz bağlayıcı içerirler.

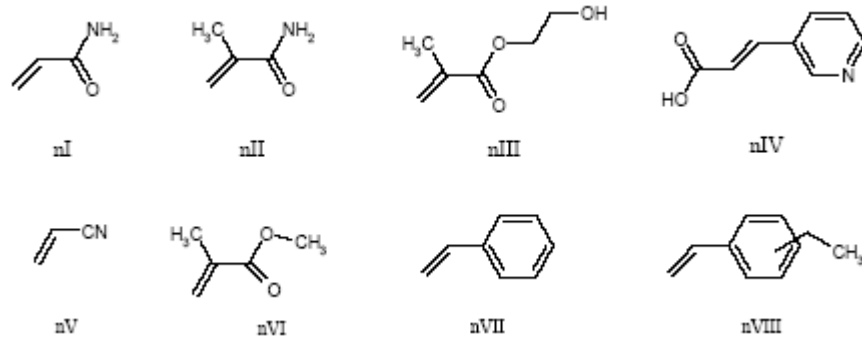
Asidik (a)



Bazik (b)



Nötral (n)



Şekil.2.2. Moleküler baskılama işleminde kullanılan monomerler

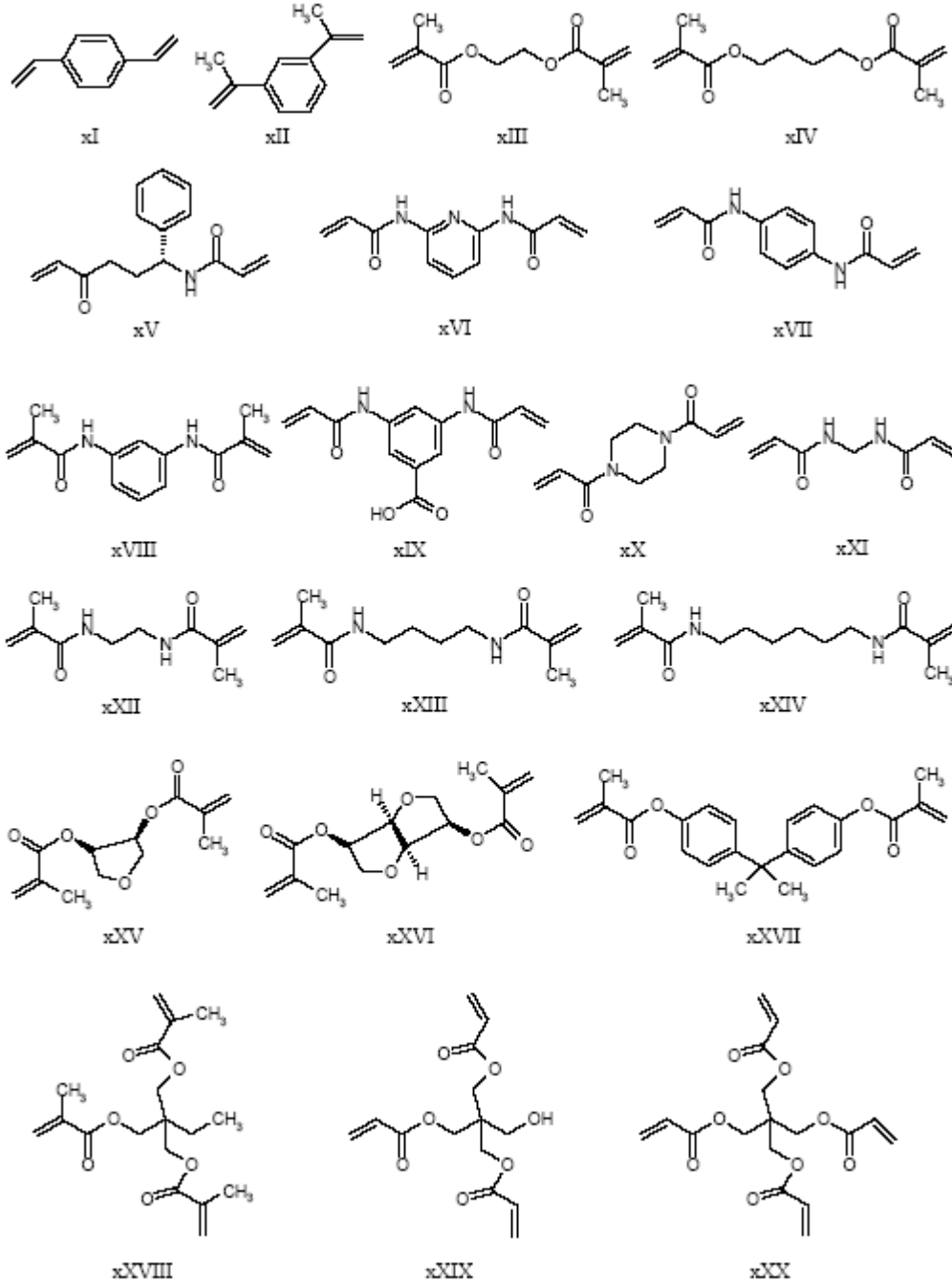
Asidik; **aI:** Metakrilik asit (MAA), **aII:** p-vinilbenzoik asit, **aIII:** Akrilik asit (AA), **aIV:** İtakonik asit; **aV:** 2-(triflorometil)-akrilik asit (TFMAA), **aVI:** Akrilamido-(2-metil)-propan sülfonik asit (AMPSA)
Bazik; **bI:**4-vinilpridin (4-VP), **bII:** 2-vinilpridin, **bIII:**4-(5)-vinilimidazol, **bV:** alilamin, **bVI:** N,N-dietil aminoetil metakrilamid (DEAEM), **bVII:** N-(2-aminetil)-metakrilamide, **bVIII:** N,NN-dietil-4-stirilamidin, **bIX:** N,N,N,-trimetil aminoetilmetakrilat, **bX:** N-vinilprolidon (NVP), **bXI:** Ürokanik etil ester
Nötral; **nI:** Akrilamid, **nII:** Metakrilamid, **nIII:** 2-hidroksi etil metakrilat (2-HEMA), **nIV:** trans-3-(3-pridil)-akrilik asit, **nV:** akrilonitril (AN), **nVI:** Metil metakrilat (MMA), **nVII:** Stiren, **nVIII:** Etilstiren. (Cormack, Elorza, 2004)

Birden fazla monomerin bir arada kullanıldığı durumlarda yukarıda bahsedilen özellikleri sağlayabilmek için çapraz bağlayıcının reaktiflik oranı ile monomerlerin reaktiflik oranı birbirleriyle uyumlu olmalıdır. Aksi takdirde fonksiyonel monomer yada çapraz bağlayıcı ajan daha baskın olarak polimerleşebilir ve kopolimerizasyon başarıyla gerçekleşemeyebilir (Cormack ve arkadaşları 2004). Başarılı bir çapraz bağlayıcının gelişigüzel (random) kopolimerizasyonun gerçekleşmesine, fonksiyonel uçların meydana gelmesine ve düzenli bir şekilde polimerik yapı içinde dağılmasına olanak sağlaması gerekir. Şekil.2.3.'de sıkça kullanılan çapraz bağlayıcılar listelenmiştir.

Çapraz bağlayıcı ajanın fonksiyonel monomere olan mol yüzdesi oranı da bir diğer önemli parametredir. Eğer oran çok küçükse, tanıma merkezleri birbirine çok yakın konumdadır ve birbirlerinden bağımsız olarak fonksiyon gösteremezler. Örneğin bir tanıma merkezine bir molekül bağlandığında bu bağlanma birçok komşu bağlanma merkezini inhibe edebilir. Aşırı yüksek mol oranlarında ise, çapraz bağlayıcı ajan fonksiyonel monomerler veya kalıp molekülle non-kovalent etkileşimlere girerek moleküler baskılamamanın etkisini azaltabilir (Komiya ve arkadaşları, 2003).

2.1.3.4. Çözücü (Porojen)

Çözücü; kalıp molekül, fonksiyonel monomerler, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve tüm bileşenlerin tek bir fazda bir araya gelmesini sağlaması nedeniyle önemli bir ajandır. Bunun yanı sıra gözenek oluşumunu gerçekleştirerek makro gözenekli yapılar elde edilmesini sağlaması da bir diğer önemli fonksiyonudur. Bu nedenle “çözücü” kelimesi yerine sıklıkla “porojen” kelimesi de kullanılır. Polimerizasyon esnasında, çözücü molekülleri polimer yapı içinde dağılır ve polimerizasyon sonrasında çözücünün uzaklaşmasıyla polimer yapıda gözenekler oluşur. Makro gözenekli polimerik yapı hazırlanırken, porojenin özellikleri, polimerin morfolojisinin ve toplam gözenek hacminin kontrol edilmesinde kullanılabilir. Termodinamik açıdan iyi özelliklere sahip çözücüler kullanılması, düzgün gözenek oluşumu ve yüksek spesifik yüzey alanı oluşumunu sağlarken, termodinamik açıdan zayıf çözücüler düzensiz



Şekil.2.3. Moleküler baskılama işleminde kullanılan çapraz bağlayıcılar

xI: p-divinilbenzen (DVB), **xII:** 1,3-diizopropenil benzen (DIP), **xIII:** Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), **xIV:** Tetrametilen dimetakrilat (TDMA), **xV:** N,O-bisakrilolil-1-fenilalolinol, **xVI:** 2,6-bisakrilolilamido pridin, **xVII:** 1,4-fenilen diakrilamid, **xVIII:** N,N-1,3-fenilenbis(2-metil-2-propenamida) (PDBMP), **xIX:** 3,5-bisakrilamido benzoik asit, **xX:** 1,4-diakrilolil piperazin (DAP), **xXI:** N,N-metilen bisakrilamid, **xXII:** N,N-etilen bisakrilamid, **xXIII:** N,N,tetrametilen bismetakrilamid, **xXIV:** N,N-hekzametilen bismetakrilamid, **xXV:** anhidroeritritol dimetakrilat, **xXVI:** 1,4;3,6-dianhidro-d-sorbitol-2,5-dimetakrilat, **xXVII:** İzopropilenbis(1,4-fenilen) dimetakrilat, **xXVIII:** Trimetilpropan trimetakrilat(TRIM), **xXIX:** Pentaeritritol triakrilat (PETRA), **xXXX:** Pentaeritritol tetraakrilat (PETEA). (Cormack, Elorza, 2004)

gözenek oluşumuna ve düşük spesifik yüzey alanı oluşumuna neden olur. Çözücünün hacminin artırılması, gözenek hacminin de artırılmasını sağlar. Oluşan gözenekler, kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılmasında ve tekrar spesifik bağlanmayı sağlamada önemli ölçüde etkindirler.

Çözücü seçimi aynı zamanda baskılamanın çeşidine de bağlıdır. Kovalent baskılamada bileşenleri istenen şekilde çözmesi halinde pek çok çözücü kullanılabilir. Ancak non-kovalent baskılama proseslerinde, çözücü, kalıp ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşim, kompleks oluşumunda kritik bir rol oynar. Çözücünün bu oluşumu desteklemesi ve dolayısıyla baskılamanın etkisini artırıcı rol oynaması beklenir. En iyi çözücüler, toluen ve diklorometan gibi dielektrik sabiti düşük olan çözücülerdir. Polar çözücülerin kullanımı, kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında oluşacak etkileşim kuvvetlerini azaltacak, bu da tanıma kapasitesini düşürecektir. Diğer yandan hazırlanan polimerin ortalama gözenek çapı da çözücü tipine bağlıdır. Örneğin, asetonyitril oldukça polar bir çözücüdür ve dielektrik sabiti $\epsilon=36$ 'dır. Bu nedenle, asetonyitril varlığında kloroformdan ($\epsilon=5$) daha makrogözenekli polimerler oluşur. Yüzey alanı ve makrogözenekliliğin azalması tanıma bölgelerine erişimi azaltacağından "moleküler tanıma"nın azalmasına neden olacaktır.

2.1.3.5. Başlatıcı

Temel olarak her tür başlatıcı, moleküler baskılama işlemlerinde kullanılabilir. Ancak polimerizasyon sisteminin özellikleri gibi çeşitli kısıtlamalar başlatıcı seçiminde önemli rol oynar. Örneğin, kalıp molekül fotokimyasal yada termal olarak kararsız ise bu tip başlatıcıların kullanılması uygun olmayacaktır. Kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimin hidrojen bağı ile sağlandığı durumlarda düşük polimerizasyon sıcaklığı tercih edileceğinden düşük sıcaklıklarda kullanılacak fotokimyasal başlatıcılar seçilmelidir (Komiya ve arkadaşları, 2003).

2.2. MIP'lerin Kullanım Alanları

MIP'ler en çok ayırma sistemlerinde, biyomedikal, çevresel işlemler ve gıda analizi gibi işlemlerde endüstriyel olarak uygulama alanı bulmuştur.

2.2.1. Moleküler olarak baskılanmış hidrojellerin kontrollü ilaç salımında kullanımı

Hidrojeller, suda çözünmeyen, hidrofilik homo veya hetero kopolimerlerden oluşmuş, belirli ölçüde su absorplama kapasitesine sahip çapraz bağlı polimerik yapılardır. Hidrojeller diğer polimerik yapılardan farklı olarak düşük çapraz bağ yoğunluğuna sahiptirler ve çeşitli ilaçlar, peptidler ve proteinler için taşıyıcı olarak kullanılırlar. Hidrojellerin pH, sıcaklık, iyon konsantrasyonu gibi uyarılara cevap verebilmesi kontrollü ilaç salım sistemlerinin temelini oluşturur. Tüm bu nedenlerden dolayı hidrojeller de moleküler baskılama için ilgi odağı oluşturan yapılardır. Ancak hidrojeller, yüksek oranda şiştiğinden ve yüksek oranlarda hidrofilik çözücü içerdiklerinden, tanıma merkezlerinin konformasyonlarının korunması, dolayısıyla tekrar bağlanma çalışmalarında, diğer polimerik yapılardaki kadar olumlu sonuçlar elde etmek zordur (Byrne ve arkadaşları, 2002).

Moleküler baskılama, ilaçlar, biyoaktif moleküller gibi çeşitli bileşiklerin ayrılması ve tayin edilmesi gibi analitik uygulamalarda başarıyla uygulanan bir yöntemdir. Ayırma bazlı teknolojilerden elde edilen sentez yöntemleri ve optimum performans için gereklilikler baskılanmış kontrollü salım sistemleri yaratılmasında iyi bir başlangıç noktasıdır. Ancak, uygulamada bu sistemler arasındaki farklar dikkate alınmalıdır.

Dikkate alınması gereken en önemli fark, hidrojel sistemlerinin esneklik gerekliliği nedeniyle baskılama merkezlerinin korunmasının güçlüğüdür. Baskılanmış merkezlerin konformasyonu kalıp molekülün olmadığı durumlarda da yeterince kararlı olmalı ancak kalıp molekülün yapı içinden salınması ve yüklenmesi arasında hızlı bir denge oluşumunu sağlaması açısından esnek olmalıdır. Bu durum polimerin bir teşhis cihazında tanıma elemanı olarak kullanılacağı ya da toksik bir madde taşıyıcısı olarak kullanılacağı durumlarda daha da önemlidir. Bu bakımdan değerlendirildiğinde non-kovalent yaklaşım, kovalent yaklaşımdan daha hızlı denge kinetiği sağlar (Allender ve arkadaşları, 1999). Daha önce de bahsedildiği gibi polimerin mekanik özellikleri ve baskılama merkezlerinin konformasyonu büyük ölçüde çapraz bağlayıcı miktarına bağlıdır. Analitik uygulamalarda kullanılan moleküler olarak baskılanmış polimerlerin

çoğu %25–90 oranında çapraz bağlayıcı içerir. Bu yüksek çapraz bağlanma oranı ağ yapının hidrofobik özelliğini artırır ve konformasyonunun değişmesine engel olur. Bunların sonucu olarak, kalıp moleküle gösterilen afinite dış değişkenlerden bağımsızdır. Polimerin içinde bulunduğu ortamın fizikokimyasal özelliklerindeki değişikliklere yada belirli bir kimyasal bileşiğe karşı polimerik yapının tepkisindeki eksiklik bu polimerlerin “*activation*” veya “*feedback-modulated*” kontrollü salım sistemleri olarak kullanılmalarını kısıtlar. Bunun yanı sıra yüksek çapraz bağ oranı nedeniyle oluşan sıkı yapı, dokularda sürtünmeye bağlı hasara neden olabilir (örneğin göz içi implantlar) (Wulff, 1995).

Moleküler olarak baskılanmış hidrojellerle ilgili bir diğer önemli nokta da kimyasal kararlılıktır. İlaç salımında kullanılacak baskılanmış polimerlerin, enzimatik ve kimyasal ataklara karşı yeterince kararlı olması gerekir. Bunun nedeni, biyolojik sıvıların kompleks bileşimlerinin ve farklı pH değerlerinin enzimatik aktiviteyi arttırmasıdır. Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve benzeri çapraz bağlayıcıların, in vitro şartlarda geniş pH ve sıcaklık aralıklarında kararlı ağ yapılar oluşturdukları kanıtlanmıştır (Svenson ve arkadaşları, 2001). Ancak in vivo ortamlardaki davranışlarıyla ilgili bilgi elde etmek için daha fazla araştırma yapılmalıdır. Çünkü in vivo şartlarda, esteraz enzimleri ve çok yüksek/çok düşük pH değerleri hidroliz reaksiyonunu katalizleyebilir (Yourtee ve arkadaşları, 2001).

Buna ek olarak, moleküler baskılama teknolojisinin ilaç salım sistemlerine uygulanması için sistemlerin güvenilirliğinin ve toksik özelliklerinin dikkate alınması gerekir. Hassas dokularla temasa girecek malzemeler yüksek biyouyumluluğa sahip olmalıdır. Bu yüzden, moleküler baskılama sisteminin dikkatli seçilmesi gerekir (Aydın ve arkadaşları, 2002). Diğer yandan pek çok klasik olarak baskılanmış polimer, elektrostatik etkileşimlerdeki ve hidrojen bağı oluşumundaki avantajın kullanılabilmesi için organik çözücü varlığında sentezlenmiştir (Allender ve arkadaşları, 1999). Organik çözücünün polimerik yapı içinde kalması hücresel zarara neden olabilir. Bu yüzden çözücünün tam olarak uzaklaşıp uzaklaşmadığı kontrol edilmelidir. Bu durum

su varlığında sentezlenen ve saflaştırılan hidrofilik polimerlerin organik çözücü varlığında sentezlenen polimerlere tercih edilmesi sonucunu doğurur.

Pek çok hidrojel in ilaç salımında yararlı olduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır. Moleküler baskılamanın su ortamında gerçekleştirilmesi, polar çözücü içerisinde elektrostatik etkileşimlerin ve hidrojen bağı etkileşimlerinin zayıflığı nedeniyle zorluklar yaratır. Bu durumu ortadan kaldırmak ve moleküler olarak baskılanmış polimerin liganda karşı ilgi ve seçiciliğini arttırmak için çalışmalar devam etmektedir. Ancak hidrofobik etkileşimler ve metal koordinasyon etkileşimleri, su ortamında kalıp molekül ile fonksiyonel monomerin etkileşimlerini arttırma yönünde umut vericidir (Komiya ve arkadaşları, 2003).

Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda, polimer bileşimi ve çözücü iyi bir moleküler baskılama için anahtar parametreler olsa da fonksiyonalitye ve biyouyumluluk arasındaki tercih dikkatli yapılmalıdır. Malzemenin kullanımındaki temel işlev dikkate alınarak baskılanmış sistemin performansı ve güvenliği açısından denge sağlanmalıdır (Alvarez-Lorenzo ve arkadaşları, 2004).

Baskılanmış hidrojellerin ilaç salımında kullanımıyla ilgili yapılan bir çalışmada moleküler baskılamanın, düşük çapraz bağı yoğunluğuna sahip hidrojellerin yükleme kapasitesi üzerine etkisini belirlenmesi amaçlanmış ve bu nedenle kontakt lenslerde timolol salımında kullanımı incelenmiştir. Moleküler baskılamanın hem ilaç yükleme, hem de ilacın tekrar salımında olumlu etkisi olduğu saptanmıştır (Hiratani ve arkadaşları, 2002).

2.2.2. Ayırma işlemleri

Moleküler baskılama, ayırma malzemesinin önceden belirlenmiş bir seçiciliğe sahip olmasını sağlayan basit ve açık bir yöntemdir. Bunun yanı sıra, moleküler baskılama, ayırma işleminde hedeflenen moleküle özgü tepki verebilen moleküllerin olmadığı, elde edilmesinin zor ya da pahalı olduğu, molekülün çok hassas olması nedeniyle uygulamanın kısıtlandığı durumlarda, ucuz, basit ve dayanıklı bir alternatif oluşturur.

Özellikle ilaç sanayisinde, üretilen ilaçlarda kullanılan molekülün saf olmasının yanı sıra tek bir optik formda bulunması da istenir. Rasemik karışımların kiral ayırma işlemleri MIP'lerle yoğun olarak çalışılmıştır ve geniş uygulama bulmuştur. Naproxen, Timolol gibi farmasötik malzemelerin kiral ayırma işlemleri gerçekleştirilmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Mosbach ve arkadaşları, 1996).

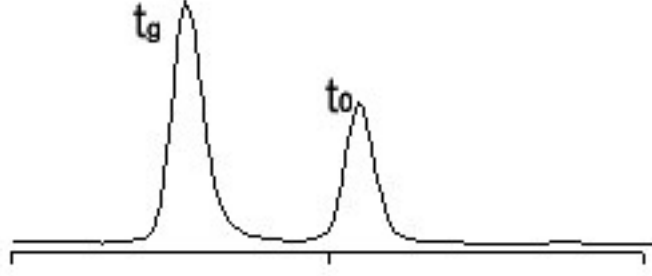
Bunların yanı sıra, geleneksel kolon kromatografisi ve diğer ayırma sistemlerinde de MIP'ler ile gelişmeler elde edilmiştir. MIP'lerin kullanıldığı bir diğer ilgi çekici yaklaşım da ince tabaka kromatografisidir. Bu konuda yapılan bir çalışmada, L-fenil alanin baskılanmış polimerik parçacıklar cam plakalar üzerine kaplanmış ve bu şekilde ince tabaka kromatografi ile baskılanmış molekül ve onun optik antipod'u arasında tanıma gerçekleşmiştir (Kriz D ve arkadaşları, 1994). Ayırma alanında bir başka gelişme de MIP'lerin kapiler elektroforezde kullanılmasıdır. Polimerler, direkt olarak kapilerler içinde antiparazit ilaç olan pentamidine baskılanmışlar ve kapilerler elektroforez sisteminde kullanılmışlardır (Mosbach ve arkadaşları, 1996).

2.3. MIP'lerin Etkinliğinin İncelenmesi

DeneySEL olarak baskılanmış polimerlerin, hedef molekülü bağlama etkinliği, kromatografik deneyler ve kesikli bağlanma deneyleriyle tespit edilir. Moleküler baskılamanın etkinliğini tespit etmek amacıyla yapılan deneyler baskılanmışlarla aynı şartlar altında, ancak kalıp molekül olmadan sentezlenen baskılanmamış polimerlerle karşılaştırmalı olarak değerlendirilir.

2.3.1. Kromatografik deneyler

Bu yöntemde baskılanmış polimerler, paslanmaz çelik bir kolonun içine sıkıca yerleştirilerek, yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) durgun faz olarak kullanılır. Adından da anlaşılacağı gibi polimerin bağlanma gücü ve bağlanma seçiciliği kromatografik yöntemle tespit edilir. Başarılı bir moleküler baskılama, hedef moleküle bağlanmayı seçici bir şekilde arttıracığından, alıkonma süresinde artışa neden olmalıdır. Tipik bir HPLC kromatogramı Şekil.2.4'de gösterilmiştir (Komiya ve arkadaşları, 2003).



Şekil.2.4. Tipik HPLC kromatogramı

Bu piklerden büyük olan, hedef molekülü ifade etmektedir ve alıkonma süresi t_g olarak ifade edilir. Küçük olan pikin alıkonma süresi t_0 ile ifade edilir ve polimere zayıf bir şekilde bağlanan standart (örneğin, asetik asit, aseton, asetonitril) tarafından oluşturulur. Baskılanmış polimerin hedef moleküle bağlanma ilgisi, kapasite faktörü (capacity factor) k , aşağıdaki Eşitlik 2.1 ile ifade edilir.

$$k = (t_g - t_0) / t_0 \quad (2.1)$$

Bu denklemde t_g ve t_0 değerleri yerine hedef molekül ve bağlanmamış moleküllerin alıkonma hacimleri (retention volume) olarak V_g ve V_0 değerleri de konulabilir.

Eğer moleküler baskılama işlemi başarılıysa, hedef molekülün k değeri diğer tüm parametreler değişmeden kalırken dikkate değer bir şekilde artar. Bu durum moleküler baskılama yöntemiyle hazırlanan polimerin hedef molekülü tanıma ve daha fazla alıkonma süresinin oluşmasıyla açıklanır (Komiya ve arkadaşları, 2003).

2.3.2. Kesikli hedef molekül bağlanma deneyleri

Bu yöntemde, baskılanmış polimerin hedef molekül bağlama aktivitesi, polimer tarafından bağlanan hedef molekülün miktarından direkt olarak tayin edilir. İlk olarak, önceden belirlenmiş miktarlarda polimer değişik derişimdeki hedef molekül çözeltilerine eklenir ve hedef molekül bağlanmasında dengeye ulaşana kadar inkübasyona devam edilir. Polimerin çözücü içerisinde çözünmez yapıda olması

gerekir. Daha sonra, polimer, santrifüjleme ya da filtrasyon gibi işlemlerle uzaklaştırılır ve hedef molekülün çözeltideki derişimi (C), HPLC, UV ya da diğer analitik yöntemlerle belirlenir. Polimerin hedef seçiciliği, polimer tarafından bağlanan hedef molekül miktarının ($B_{\text{bağlanmış}}$, birim polimer kütlesi başına bağlanan hedef molekül miktarı) diğer bileşikleri bağlama miktarıyla karşılaştırmalı olarak hesaplanır.

2.3.3. Hedef molekül bağlama sabitinin saptanması

Hedef molekül ile polimerin bağlanma merkezi arasındaki etkileşimlerin bozunma sabit (K_D , dissociation constant) aşağıdaki Eşitlik 2.2 ile ifade edilir.



Bu denklemden kompleks oluşumunun 1:1 stokiyometri ile gerçekleştiği, tüm bağlanma merkezlerinin olduğu ve her bağlanma merkezine bir kalıp molekülün bağlandığı varsayımları yapılır. Bu şartlar altında K_D değerini Eşitlik 2.3 ile hesaplanır.

$$K_D = \frac{(B_{\text{bağlanmamış}} \times C) B_{\text{bağlanmış}}}{(B_{\text{max}} - B_{\text{bağlanmış}}) \times C} \quad (2.3)$$

Bu eşitlikte B_{max} , küttele birim polimer başına bağlanan maksimum hedef molekül miktarı (site density), C, hedef molekülün o anda rezervuar çözeltideki derişimidir. B_{max} , 2.4 numaralı eşitlik ile ifade edilebilir.

$$(B_{\text{max}} = B_{\text{bağlanmış}} + B_{\text{bağlanmamış}}) \quad (2.4)$$

K_D 'nin birimi derişim birimidir ve bu değer küçük oluğuunda hedef bağlanması daha güçlüdür. Genellikle 2.4 numaralı eşitlik 2.5 numaralı eşitliğe (Scatchard eşitliği) dönüştürülür ve $B_{\text{bağlanmış}} / C$ değerlerine karşı $B_{\text{bağlanmış}}$ grafiği çizilir.

$$\frac{B_{\text{bağlanmış}}}{C} = \frac{(B_{\text{max}} - B_{\text{bağlanmış}})}{K_D} = - \left(\frac{1}{K_D} \right) \times B_{\text{bağlanmış}} + B_{\text{max}} / K_D \quad (2.5)$$

$B_{\text{bağlanmış}} / C$ değerlerine karşı çizilen $B_{\text{bağlanmış}}$ grafiğinde elde edilen doğrunun eğiminden ve kesim noktasından sırasıyla K_D ve B_{max} değerleri bulunur. İdeal olarak baskılanmış polimerlerde, güçlü ve seçici bağlanma için, K_D değeri sadece kalıp molekül için küçük olmalıdır. Rezervuar çözeltisinin derişimi (C) de bağlanma deneylerinde çok önemli rol oynar. Eğer çok küçük derişim değerleri seçilirse doygunluk olayı gözlenemez. Eğer C değerleri K_D değerinden daha büyükse, bağlanma merkezleri hedef molekül tarafından tamamıyla kapatılmış olacağından, C değerlerinden bağımsız sonuçlar elde edilir. Her iki durum da K_D ve B_{max} değerlerinin hesaplanmasında tercih edilmeyen durumlardır. Bu değerleri etkin bir şekilde tespit edebilmek için, C değerlerinin bazıları K_D 'nin altında, bazıları ise üzerinde olmalıdır (Komiya ve arkadaşları, 2003).

2.4. Farklı Yöntemlerle MIP sentezi

Moleküler olarak baskılanmış polimerlerin sahip oldukları, geniş kullanım alanı ve potansiyel uygulamaları nedeniyle değişik polimer özelliklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Seçicilik, kapasite, örneğin kullanılacağı ortam ihtiyaç duyulan özelliklerin bazılarıdır. Bu talep, MIP'lerin sentezinde değişik yöntemlerin geliştirilmesine neden olmuştur. Moleküler olarak baskılanmış polimerler; yığın (bulk), süspansiyon, çöktürme, emülsiyon, çekirdek-kabuk (core-shell), film sentezi, aerosol polimerizasyonu, iki basamaklı şişme (two-step swelling) ve silika parçacıkları yüzeyinde polimerizasyon gibi değişik yöntemlerle sentezlenmişlerdir. Her bir yöntem, sentez esnasında farklı parametrelerin kontrol edilmesini gerektirir ve birbirinden farklı özelliklere sahip polimerler elde edilir (Pérez-Moral ve arkadaşları, 2004).

Kronolojik olarak ilk kullanılan yöntem, yığın polimerizasyonudur. Bu yöntem, basitliği nedeniyle en çok kullanılan yöntemdir. Yığın polimerizasyonunda genellikle organik çözücüler kullanılır ve tüm bileşenlerin (kalıp molekül, monomer, çözücü ve başlatıcı) karıştırılıp polimerize edilmesiyle gerçekleştirilir. Sonuç olarak polimerik bir blok yapı elde edilir. Bu yöntemin dezavantajı elde edilen polimer üzerinde ki merkezlerin büyük kısmının öğütme sırasında bozulmasıdır. Diğer bir dezavantaj da özellikle U.V. ile

başlatılan reaksiyonlarda polimerizasyon sırasında kontrolün zor oluşu nedeniyle polimerik matristeki heterojenliklerdir (Mosbach ve arkadaşları, 1996).

Florokarbon çözücüde gerçekleştirilen süspansiyon polimerizasyonu, Mayes ve Mosbach tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntem U.V. radyasyonu ile iki saatten daha kısa bir zamanda (kolay polimerleşen monomerler için 10–15 dakika) gerçekleştirilebilecek hızlı ve güvenilir bir metodolojidir. Karıştırma hızına ve ortama eklenen yüzey aktif madde (surfektan) miktarına bağlı olarak boyutu 5–50 µm arasında değişen boncuklar (beads) elde edilir. Sürekli fazda kullanılan perflorokarbon çözücü, yığın polimerizasyonla elde edilen polimerdeki etkileşimlerin aynılarının elde edilmesini sağlar (her bir parçacık, bir mini-bulk reaktör gibi davranır). Florokarbon süspansiyon ortamı, distilasyon ile kolayca geri kazanılabilir (Mayes ve arkadaşları, 1996).

Çöktürme polimerizasyonu, submikron (0,3–10 µm) boyutunda parçacıkların elde edilmesini sağlayan bir diğer yöntemdir. Yöntem, oluşan zincirlerin büyümesi esnasında organik çözücü ortamında çözünürlüklerinin azalması sonucu parçacıklar halinde çökmesi esasına dayanır. Bu durumda parçacıklar çapraz bağlanma sırasında elde edilen katılık sayesinde kümeleşmezler ve ekstra stabilizatöre ihtiyaç duyulmaz.

İki basamaklı polimerizasyon, Hosoya ve arkadaşları tarafından 1994 yılında ortaya konmuştur. Polimerizasyon gerçekleşmeden önce, başlangıç parçacıkları ile baskılama karışımı arasında bir kaç şişme basamağının gerçekleşmesi gerekir. Bu yöntemde polimerizasyon ortamındaki sürekli faz sudur ve 2–50 µm aralığında monodispers parçacıklar elde edilmesini sağlar. Elde edilen parçacıkların son boyutu ve parçacık sayısı üzerindeki kontrol sağlanması kolaydır (Hosoya ve arkadaşları, 1994).

Çekirdek-kabuk yapısındaki parçacıklar, emülsiyon polimerizasyonu ile elde edilir. Bu yöntemle sentezlenen parçacıklarda baskılanmış dış kabuğun yapısını değiştirmeden,

çekirdeğin morfolojik özelliklerini değiştirmek mümkündür. Polimerizasyon sırasında kullanılan sürekli faz sudur. Çekirdek kabuk yapısındaki parçacıklar monodisperstir ve 0,05-2 µm aralığında değişen koloidal yapılar elde edilebilir (Pérez ve arkadaşları, 2001).

2.5. Lektinler ve Con A Adsorpsiyonu

Lektin, çoğu canlı organizmanın dokularında bulunan, bir veya daha fazla karbonhidrat bağlama özelliğine sahip olan birimler içeren bir proteindir. Lektinler, özelliklerinin ve potansiyel uygulamalarının çeşitliliği nedeniyle ilgi çekmektedirler. Lektinlere duyulan yoğun ilginin nedenleri şu şekilde sıralanabilir:

- Çözeltideki ve hücre yüzeylerindeki karbonhidratlarla ilgili çalışmalarda yararlıdır.
- Lektinler ile karbonhidratların etkileşimlerinin incelenmesi, genel olarak proteinlerle karbonhidratlar arasındaki reaksiyonların moleküler detaylarının elde edilmesini sağlamaktadır. Dolayısıyla hücreler arasındaki reaksiyonlar hakkında da fikir vermektedir.
- Biyolojik ve tıbbi araştırmalarda yararlı kullanım alanlarına sahiptirler. Kullanım alanlarına örnek olarak farmakoloji, immünoloji, kanser tedavisi ve tarım uygulamaları verilebilir.

2.5.1. Lektinlerin genel özellikleri

Lektinlerin en önemli özelliği hücreleri veya polisakkaritleri ve glikoproteinleri çöktürebilmeleridir. Bu özellik lektinlerin polivalent oluşlarından kaynaklanmaktadır. Her lektin molekülü en az iki karbonhidrat bağlanma bölgesine sahiptir ki, bunlar hücreler arasında veya şeker içeren makromoleküller arasında çapraz bağlanmaya izin verir.

Karbonhidrat bağlama yeteneğine sahip pek çok enzim mevcuttur (kinazlar, mutazlar, glikozidazlar ve transferazlar). Ancak bu proteinler molekül başına yalnızca bir

karbonhidrat bağlama bölgesine sahiptirler. Bu nedenle hücreleri çöktüremezler (Sharon, 1989).

Lektinler genellikle saflaştırıldıkları türün bilimsel adlandırılmasından kaynaklanan isimlerle tanınırlar. Bu nedenle örneğin, "Vicia faba" dan kaynaklanan lektin "favin" olarak bilinir. Diğer lektinler, kaynaklandıkları türün yaygın isimleri ile bilinirler; örneğin "soybean" ve "pea" lektinleri. "Canavalla ensiformis"den elde edilen bir lektin olan Con A ise bir saflaştırma protokolüne göre adlandırılmıştır.

Lektinler büyük ölçüde doğada yayılmışlardır; mikroorganizmalarda, hayvanlarda ve bitkilerde bulunmaktadır. Lektinler, yapraklardan, meyvelerden, köklerden, yumrulardan ve daha çok tohumlardan saflaştırılmaktadırlar. Lektinlerin değişik türlerde, dokularda veya hücrelerde geniş bir şekilde var oluşları bu moleküllerin doğadaki önemini göstermektedir.

2.5.2. Molekül özellikleri

Lektinler, molekül özellikleri açısından farklılıklar gösterdikleri için, heterojen bir protein grubunu oluştururlar. Hepsinde ortak olan özellikler; protein olmaları ve alt birimlerden veya protomerlerden meydana gelmeleridir. Molekül ağırlıkları 8500 Da ile 400.000 Da arasında değişmektedir.

Lektinler genellikle iki veya dört alt birimden oluşurlar (Bu sayı bazı lektinler için 20 veya daha fazla olabilmektedir). Alt birimler çoğunlukla benzerdirler ve her biri aynı özgüllüğe sahip tek bir şeker bağlama bölgesine sahiptir. Alt birimler genellikle tekli polipeptid zincirlerinden oluşmaktadırlar.

Lektinlerin çoğu metal iyonları (Mn^{2+} ve/veya Ca^{2+}) içermektedir ve bazı durumlarda aktivite için bu metallere ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, sadece Conconavalin A için metal iyonlarının rolü ayrıntılı olarak incelenmiştir. Tamamen aktif lektin, her bir alt birim başına bir tane olmak üzere sırasıyla S1 ve S2 olarak birbirinden ayrı bölgelerde bulunan Mn^{2+} ve Ca^{2+} iyonlarına sahiptir. Demetalize Conconavalin A

(Şekil.2.5.) hiçbir şekilde karbonhidratlara bağlanamaz. Aktif bir forma dönüşmesi için metal iyonlarının önce Mn^{2+} ve daha sonra Ca^{2+} olmak üzere eklenmesi gerekmektedir. Mn^{2+} iyonu S1 bölgesine bağlanır, böylece Ca^{2+} iyonu için özgül bağlanma bölgesi olan S2'nin oluşumuna neden olur. Her iki metal bağlanma bölgesi de dolu olursa lektin ancak şekerlere bağlanabilir (Kennedy, 1994).

2.5.3. Temel yapılar ve benzerlikler

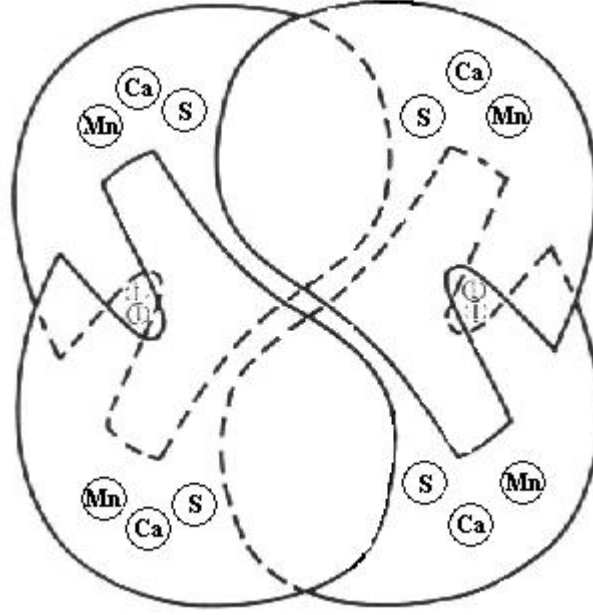
Pek çok lektinin temel sekansları belirlenmiştir. Bu sekansların karşılaştırılması, birçok homolog lektin ailesinin varlığını göstermiştir. Bunlardan en çok üzerinde çalışılan "legume" lektinleridir; yaklaşık bir düzine tamamlanmış sekansları ve çok sayıda kısmi sekansları bilinmektedir. Sekans bilgileri mevcut diğer aileler ise şunlardır: β -galaktoz özgül vertebrate (omurgalı) lektinleri; karaciğer zarı lektinleri ve birçok bakteriyel yüzey lektinleridir.

Sunulan çalışmada legume lektin sınıfından olan Con A kullanıldığı için aşağıda bu lektin ile ilgili açıklamalar yer almaktadır.

2.5.3.1. Conconavalin A (Con A)

Con A en yaygın olarak kullanılan ve iyi karakterize edilmiş olan lektinlerden biridir. Con A çoğunlukla şeker bulunan bir yapı olan α -bağlı mannozu tanınmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır.

Con A-şeker etkileşimleri üzerine Goldstein tarafından yapılan çalışmalar göstermiştir ki; bağlanma mono ve oligosakkaritler ile indirgenmeyen terminal α -D-mannopiranosil (α -D-ma) ve α -D-glukopiranosil (α -D-glc) bölgeleri ile ve aynı zamanda dahili glukoz ve mannoz ile gerçekleşmektedir (Goldstein, 1965). Con A'nın spesifik şekerlere bağlanma özelliği onu pek çok uygulamada yararlı kılmaktadır.



Şekil 2.5. Conconavalin A tetramerinin şematik gösterimi. Ca, Mn ve S sırasıyla, Ca^{2+} , Mn^{2+} iyonlarının ve karbonhidrat bağlanma bölgelerinin pozisyonlarını göstermektedir.

Pek çok glikoprotein, Con A ve konjugatları ile kontrol edilebilmekte veya saflaştırılabilmektedir. Kısaca Con A, hormon reseptör çalışmalarında, mitojenik tayanlerde, normal ve habis hücrelerin karakterizasyonunda, glikoprotein saflaştırılmasında, viral antijen izolasyonunda, dekstran ve mannan fraksiyonasyonunda, hücre aglütinasyon çalışmalarında, bakteri agregasyonunda, membran akıcılığı ve yanal hareketlilik (lateral mobility) araştırmalarında, şeker için türbidimetrik tahlillerde, lenfokin üretiminde ve diğer pek çok uygulamada kullanılmaktadır.

Conconavalin A, 235 aminoasitten (MW:26.000) oluşan benzer alt birimlerin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Nötr ve alkalik pH'ta Con A, her biri yaklaşık 26.000 Da molekül ağırlığına sahip 4 benzer alt birimden oluşan bir tetramer halinde bulunmaktadır. pH 4.5 ile 5.6 arasında Con A, 52.000 Da molekül ağırlığında aktif dimerlere parçalanır pH 7'nin üzerinde ise 104.000 Da molekül ağırlığında baskın olarak tetramerik yapıdadır. Optimum aktivite pH 7 civarında gerçekleşmektedir.

Con A bir metaloproteindir yani, karbonhidrat bağlanması için her alt birim başına bir Ca^{2+} ve bir Mn^{2+} iyonuna gereksinim duymaktadır (Şekil 2.5). Her ne kadar bu divalent metal iyonları polipeptid yapısına kuvvetli bir şekilde bağlansa da, kalsiyum iyonuna bağlanabilen tamponlar (örneğin; fosfat) genellikle Con A seyreltilmesinde kullanılmazlar. Çünkü bu durum aktivite kaybına yol açmaktadır (Agi, 2003).

1965 yılında Goldstein ve Agrawal tarafından lektinlerin saflaştırılması için afinite kromatografinin kullanılmasına başlanmıştır. Con A'nın dekstranlar (α -bağlı glikoz polimerleri) ile tepkimesinden yararlanılarak, jack bean tozunun saf ekstraktından, lektinin doğrudan izolasyonu için basit ve kullanışlı bir teknik geliştirilmiştir. Bu teknikte adsorpsiyon ticari çapraz bağlayıcı dekstranlardan (Sephadex) oluşan bir kolon ile, sıyırma işlemi de glikoz ile gerçekleştirilmiştir. Böylece Con A, geleneksel yöntemler ile saflaştırılan, kristalize edilebilen ve şeker özgüllüğü ispatlanan ilk lektin olmuştur. Daha sonraki yıllarda da Con A lektin araştırmaları için kullanılmıştır. Bu nedenle, karbonhidratların yapısal çalışmaları için ve glikoproteinlerin afinite saflaştırılması için de kullanılan ilk lektin olmuştur (Agi, 2003).

2.5.3.2. Lektinlerin yapısı ve karbonhidratlar ile olan etkileşimlerinin mekanizması

Lektinlerin yapısal organizasyonunda büyük çeşitlilik mevcuttur. Molekül başına düşen alt birim sayısı değişkendir ve polipeptidlerin niteliği farklı veya benzer olabilmektedir. Alt birimlerin birleşmeleri, hidrofobik etkileşimler, disülfid bağları ve hidrojen bağlarıyla gerçekleşmektedir.

Birbirine benzemeyen polipeptidler farklı fonksiyonlara sahip olabilirler. Örneğin, A ve B zincirleri. Bunlardan A alt birimi enzimatik aktiviteye ve B alt birimi de karbonhidrat bağlayıcı bölgeye sahiptir. Lektinlerin karbonhidrat bağlayıcı bölgeleri karbonhidrat ligandını bir anahtar kilit tipi mekanizma ile tanır ve liganda uyum sağlar. Bu mekanizma hidrojen bağlarından oluşan karmaşık ağ yapılarını gerektirmektedir (Agi, 2003).

2.5.3.3. Lektinlerin saflaştırılması

Lektinlerin farklı kaynaklardan saflaştırılmasında başlangıç basamağı, özütlerin tuzlu suda veya bir tampon çözeltisinde hazırlanmasıdır. Bakteri, maya, mantar, protozoa, deniz süngerı, yılan, böcek kanlenfi, (tunicates), balık yumurtası, sıçan, fare, tavuk, kuzu, keçi, bufalo ve insan akciğeri, karaciğeri ve bağırsağı, domuz kalbi ve insan plazması, serumu, plasentası, beyni lektin kaynaklarından bazılarıdır. Bitkilerde ise ekstraktlar, yumrulardan, tahıllardan, meyvelerden, soğanlardan, ağaç kabuklarından, yapraklardan ve tohumlardan hazırlanmaktadır. Gerekirse, bir ön ekstraksiyon işlemi organik çözücülerle gerçekleştirilir (Agi, 2003).

Lektin aktivitesine sahip pek çok ekstrakt halen ayrıntılı diyaliz, pH bağımlı damıtma veya tuz damıtması ile kısmen saflaştırılır. Bir proteinin sulu tuz çözeltisindeki çözünürlüğü iyon tipine ve tuz konsantrasyonuna bağlıdır. Bir kısım saflaştırma, farklı tuzlarda çöken kısımların geri kazanımı ile gerçekleştirilebilmektedir. Amonyum sülfat, çok yüksek iyonik kuvvetler elde edildiği için, proteinlerin tuzlandırılmasında sık sık kullanılır. I^- , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} ve B^{2+} gibi bazı iyonlar protein çözünürlüğünü arttırlar.

Lektinlerin saflaştırılması için, proteinin yüküne ve büyüklüğüne dayanan pek çok yaygın teknik mevcuttur. İyon değiştirme kromatografisinde proteinler adsorbent ile iyonik etkileşimden dolayı matrise adsorbe olurlar.

Afinite kromatografisi protein saflaştırması için en güçlü tekniklerden biridir. Reseptörlerin, enzimlerin ve diğer proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Lektinlerin izolasyonunda da bir dönüm noktasını temsil etmektedir.

Afinite kromatografisinin lektin saflaştırmasında uygulaması, temel olarak proteinin özgül ve tersinir bir şekilde karbonhidratlara bağlanma yeteneğine dayanmaktadır.

Lektinlerin karbonhidratlara olan özgülüđüne dayanarak lektinler için deđiřik afinite matrisler sečilmetedir. Lektin özgülüđü, basit monosakkaritler veya kompleks

karbonhidratlar kullanılarak hemaaglutinasyon aktivitesinin inhibisyon tahlilleri ile belirlenmektedir.

Lektinler tanıma özgüllükleri dikkate alınarak şu şekilde sınıflandırılmaktadırlar; I. mannoz/glukoz; II. galaktoz/N-asetilgalaktosamin; III. N-asetilglukozamin; IV. L-fukoz; V. Sialik asit ve X. Sadece oligosakkaritler ile etkileşenler.

Her gruba ait lektinler çeşitli monosakkarit analoglarına ve türevlerine olan afinitelerine göre birbirlerinden ayrılmaktadırlar.

Glukoz/mannoz veya bunların türevlerine özgü lektinler, matris olarak Sephadex kullanılabilir (Agraval ve arkadaşları, 1968).

2.6. Hayvansal Hücre Kültürleri

Hücre kültürü, kompleks doku veya organlardan izole edilen hücrelerin yapay besi ortamlarında (in vitro koşullarda) üretilmesi esasına dayanır. Hücre ve doku kültürünün ilk amacı, özel hücre davranışlarının ve fonksiyonlarının in vitro olarak gerçekleştirilmesi ve anlaşılmasıdır.

1949 yılında Enders tarafından insan patojen virüslerinin, kültür hücrelerinde üreyebildiğinin keşfedilmesi hücre kültür teknolojisinin başlangıç noktası olmuştur. Önceleri virüslerin sadece canlı hücrelerde üreyebildiği düşünüldüğünden, aşı üretimi embriyonik tavuk gibi canlı organizmalarda gerçekleştirilmiştir. Kültür hücrelerinin virüs üremesinde kullanılması, aşı üretiminin daha ucuz, daha kolay, biyolojik olarak daha güvenli ve daha kontrollü gerçekleştirilmesinin önünü açmıştır (Kiremitçi, 1988).

Enders'in keşfinden sadece beş yıl sonra, ilk hücre-bazlı aşının klinik amaçlı kullanımı için lisans alınmıştır (Salk tarafından maymun böbrek hücrelerinde çocuk felci aşısı elde edilmesi, 1954). Aşılar hayvansal hücrelerden elde edilen ilk ticari ürünlerdir ve bunlar daha sonraki 20–25 yılda da en baskın ürünler olmuşlardır. Bu zaman içerisinde birincil hücrelerin (maymun böbreği, tavuk embriyosu gibi) yerine daha

güvenli hücre hatları kullanılmaya başlanmış ve birçok insan aşısının lisansı alınmıştır (Gümüşderelioğlu, 2003)

Hayvansal hücre kültürü proseslerinde kullanılan hücre tiplerini temel olarak iki farklı gruba ayırmak mümkündür.

- 1- Yüzeye bağımlı hücreler (anchorage-dependent cells)
- 2- Süspanse hücreler

2.6.1.Yüzeye bağımlı hücreler

Üremek için uygun bir yüzeye ihtiyaç duyan ve bu yüzeye yapışarak yayılan ve üreyen hücrelerdir. Hayvansal hücrelerin büyük kısmı bu türdendir. Yüzeye bağımlı hücrelerin primer hücreler, diploid hücreler, hat hücreleri gibi çeşitli tipleri mevcuttur.

Virüslere karşı duyarlı ve tümörjenik özellik göstermeyen hücrelerdir ancak yapısal kararlılık göstermezler. Yüzeye bağımlı hücreler üredikleri yüzey üzerinde tek bir tabaka oluştururlar bu yüzden yüzeye bağımlı hücre kültürleri “tek tabaka hücre kültürleri” (monolayer cell culture) olarak adlandırılır.

2.6.2. Yüzeye bağımlı hücrelerin yapışması

Yüzeye bağımlı hücrelerde, hücre büyümesi yüzey alanı ve yüzey özelliklerine bağlıdır. Hücre kültüründe kullanılan yüzeyler kollajen, proteoglikanlar gibi doğal yüzeyler olabileceği gibi cam, plastik gibi sentetik yüzeyler de kullanılabilir. Hücre kültürlerinde en çok kullanılan sentetik malzeme polistiren kültür kaplarıdır ve bu kaplar plazma polimerizasyonu ile pozitif yükle modifiye edilerek hücre kültürü için uygun hale getirilir.

Yüzey özelliklerinin sağlanmasına ek olarak, hücre kültüründe kullanılacak yüzeyin çoğu zaman yapışmayı destekler duruma getirilebilmesi için modifiye edilmesi gerekir. Yüzey modifikasyonu için kullanılan ilk yaklaşım yüzeyin fibronektin, laminin ve kollajen gibi yapıştırıcı proteinlerle kaplanmasıdır. Örneğin fibronektin yapışmayı

sağlamak amacıyla hücre tarafından salgılanır ayrıca yapışmayı arttırmak amacıyla yüzeyler fibronektin immobilizasyonu ile modifiye edilmesi de sık kullanılan bir yöntemdir.

Ancak proteinlerin immobilize edilmesi;

- Hayvanlardan izole edilmesi gerekliliği sebebiyle immun tepkilere yol açabilmesi
- Proteinlerin kolaylıkla bozunması nedeniyle uzun süre kullanılmasının mümkün olmaması
- Proteinlerin büyük yapılar olması nedenlerle immobilizasyon işleminin istenen başarıyı gösterememesi gibi sebeplerle tercih edilmemeye başlanmıştır.

Protein immobilizasyonunun yerini, daha küçük, daha kararlı, daha ucuz ve daha etkili immobilizasyona imkan veren peptid immobilizasyonu almaya başlamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda fibronektin ile hücre arasındaki asıl etkileşimin fibronektin üzerinde var olan RGD (Arjinin-Glisin-Aspartik asit) peptid sekansından gerçekleştiği ortaya konulmuştur. Bu çalışmaların sonucunda RGD ile yüzey modifikasyonu fibronektin immobilizasyonunun yerini almıştır (Hersel ve arkadaşları, 2003).

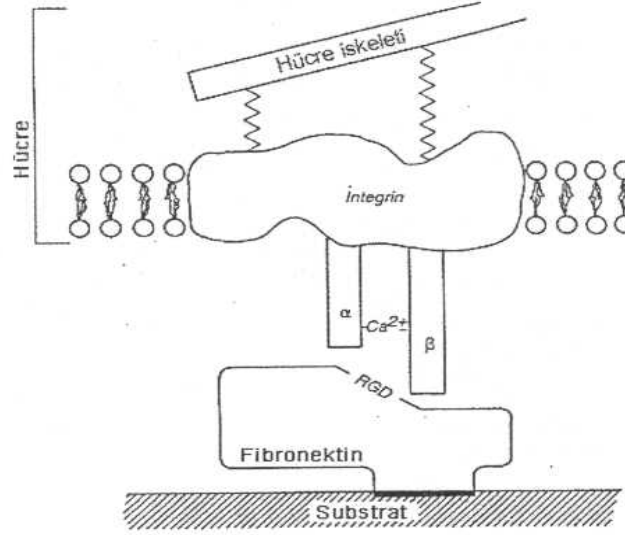
2.6.3. RGD'nin hücre yapışmasındaki kullanımı ve etkinliği

RGD peptid sekansı, sentetik yüzeylerde hücre yapışmasını desteklemek için en sık kullanılan ve en etkili peptid sekansıdır. Bunun nedeni, RGD'nin birden fazla hücre yapışma reseptörüyle etkileşebilmesi, hücre tutunması üzerinde çok büyük etkisinin bulunması ve yapışma davranışının sürdürülebilirliği üzerine etkisidir.

Çok hücreli organizmalarda, hücrelerin komşu hücrelerle ve içinde buldukları hücre dışı matris (Extra Cellular Matrix, ECM) proteinleriyle olan etkileşimleri, hücre yapışma reseptörleri ile gerçekleşir. Bunlar arasında, integrin ailesi en çok kullanılan

gruptur. İntegrinler hücre tutunmasının yanı sıra embriyogenes, hücre farklılaşması, yara iyileşmesi gibi hücre faaliyetlerinde de önemli rol oynar.

Makromoleküler ligandları, küçük tanıma sekanslarına indirgemek için 1984 yılında Piersbacher ve Rouslahti tarafından yapılan çalışmada, RGD'nin fibronektin içindeki minimum gerekli peptid sekansı olduğu tespit edilmiştir. Şekil 2.6.'da RGD sekansının hücre yapışmasındaki fonksiyonu gösterilmektedir. RGD dışında hücre yapışmasını destekleyen peptidler de vardır dolayısıyla RGD evrensel hücre tanıma motifi değildir. Ancak geniş dağılımı ve kullanımıyla eşsizdir.



Şekil 2.6. RGD sekansının hücre yapışmasındaki görevi

İntegrinlerle sağlanan hücre yapışması dört basamaktan oluşur; hücre tutunması, hücre yayılması, aktin hücre iskeleti (actin cytoskeleton) oluşması ve fokal yapışma.

İlk basamakta, hücre tutunması, bazı ligand bağlanmaları gerçekleşir ve bu bağlanmalar zayıf kayma kuvvetlerine karşı direnç sağlar. İkinci basamakta, hücre yatay bir pozisyon almaya ve plazma membranı substrat üzerinde yayılmaya başlar. Üçüncü olarak, mikrofilament bağlar arasında aktin organizasyonu gerçekleşir, ECM proteinleri aktin hücre iskeletine bağlanır. Fokal yapışmada, sayılan integrinlerin dışında, elliden fazla transmembran ve membran molekülleri rol oynar. Bu dört

basamakta integrinler, fiziksel tutunmanın yanı sıra hücre membranından sinyal geçişinde de görev alırlar (Lebaron ve arkadaşları, 2000).

RGD peptidinin yüzeye kararlı bir şekilde bağlanması, güçlü hücre yapışmasını gerçekleştirdiği için önemlidir. Çünkü fokal yapışma, eğer ligandlar dış kuvvetlere dayanıklıysa gerçekleşebilir. Eğer bu ligandlar yeterince iyi bağlanmazsa, kuvvetli yapışma gerçekleşmez sadece fibrillerle tutunma gerçekleşir. Bunların yanında, serbest haldeki integrinler, hücrelerin yüzeyden ayrılmasına neden olabilir.

RGD sekansının yüzeye bağlanması genellikle RGD'nin kimyasal yollarla substrat üzerine bağlanması yani immobilizasyon ile gerçekleştirilir. RGD'nin kararlı bir şekilde bağlanması için, hidroksil, amino ve karboksil gibi gruplarla kovalent olarak bağlanması gerekir.

Genelde RGD peptidleri, polimer yüzeyine kararlı amid bağlarıyla kovalent olarak bağlanır. Bu bağlanma genellikle yüzey üzerindeki karboksilik asit grubuyla peptidin nükleofilik N-ucu arasında gerçekleşir.

Ancak immobilizasyon oldukça zahmetli bir işlemdir ve immobilizasyon, sterik engeller, aktif grupların yüzeye tutturulma sırasında fonksiyonunu kaybedebilmesi gibi sorunlara neden olabilir. Yüzeye tutturulan biyolojik moleküller, ortam şartlarına karşı çok hassastır uzun süre fonksiyonlarını kaybetmeden saklanmaları ve tekrar tekrar kullanılmaları mümkün değildir (Hersel ve arkadaşları, 2003).

Sunulan tez kapsamında, polimerik yüzeyler üzerine RGD sekansı baskılanarak polimer yapı üzerinde RDG tripeptid sekansına özgü tanıma merkezlerinin oluşturulması ve bu yöntemle hazırlanan yüzeylerin immobilizasyon işlemi olmaksızın hücre yapışması ve yayılmasını desteklemesi, tekrar kullanılabilen ve saklanabilen yüzeylerin hazırlanması amaçlanmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

Sunulan çalışmada, hücre biyoteknolojisi uygulamalarına yönelik olarak akrilat bazlı MIP'ler sentezlenmiş ve iki farklı uygulamada kullanılmıştır. İlk uygulamada, mannoz baskılanmış, yüksek oranda çapraz bağlayıcı içeren metakrilik asit/HEMA kopolimerleri sentezlenerek, durgun ve akışlı sistemde model lektin olarak seçilen Concanavalin A (Con A)'nın izolasyonunda kullanımı incelenmiştir. İkinci uygulamada ise, daha düşük çapraz bağlayıcı oranında hazırlanmış benzer kopolimer bileşimi, farklı bir kalıp molekülü olan RGD tripeptid yapısı ile baskılanarak hidrojel yapıda bir malzeme elde edilmiştir. Elde edilen bu malzeme kullanılarak, moleküler baskılamanın L-929 fibroblast hücrelerinin yapışmasındaki etkisi incelenmiştir. Bu bölümde ilk olarak, MIP'lerin sentezi ve sentezlenen MIP'lerin karakterizasyon çalışmaları anlatılmıştır. Daha sonraki bölümde ise sentezlenen MIP'ler ile gerçekleştirilen D-mannoz, Con A ve RGD adsorpsiyon ve hücre kültürü çalışmaları anlatılmış ve örneklerin bu tür uygulamalarda kullanılabilirliklerine yönelik bilgi verilmiştir.

3.1. Moleküler Olarak Baskılanmış Polimerlerin Hazırlanması

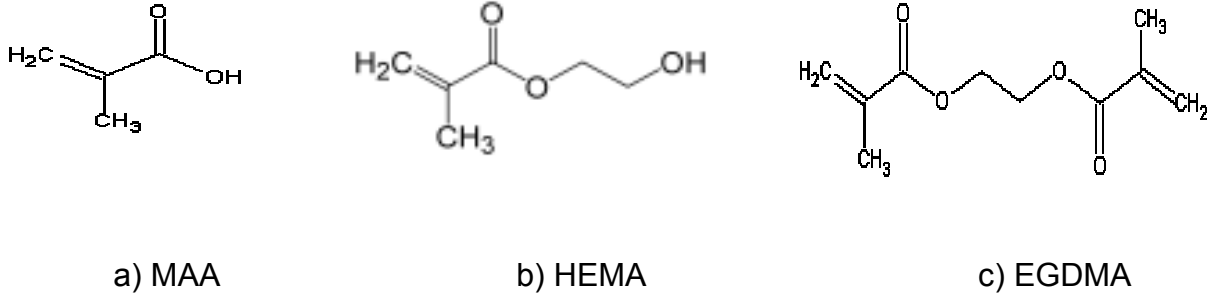
Bu çalışmada kullanılan polimerler, non-kovalent moleküler baskılama yöntemiyle ve su ortamında hazırlanmıştır. Bu yöntem Bölüm 3.1.1'de ayrıntılı olarak açıklanmış ve sentezlenen örneklerin bileşimleri Çizelge 3.1. ve 3.2. de verilmiştir.

3.1.1. MIP sentezi

Sunulan bu çalışma kapsamında, benzer fonksiyonel monomer, monomer ve çapraz bağlayıcı molekülleri farklı oranlarda kullanılarak, hedeflenen uygulamanın gerekliliklerine bağlı olarak yüksek ve düşük çapraz bağ oranına sahip iki farklı yapıda polimerle, farklı hedef moleküller için moleküler baskılama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen moleküler baskılama işlemlerinde, L-arjinin (Merck), glisin (Sigma), Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptid molekülleri (Sigma) ve D-mannoz (Sigma), kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA, Sigma), ana-matris monomeri olarak hidroksietil metakrilat

(HEMA, Sigma) ve çapraz bağlayıcı olarak da etilen glikol dimetakrilat (EGDMA, Aldrich) kullanılarak polimer sentezi gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon işlemi su ortamında ve $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ redoks başlatıcısı varlığında yürütülmüştür.

Polimerizasyonda kullanılan monomerlerin kimyasal yapıları Şekil 3.1. de verilmiş ve polimerizasyon her iki sistem için de ayrı ayrı açıklanmıştır.

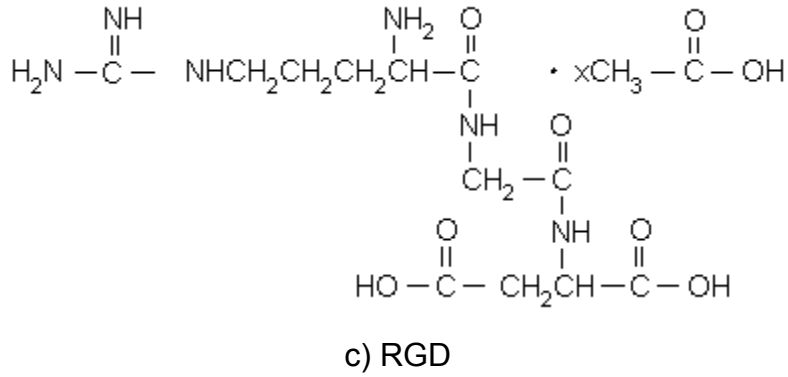
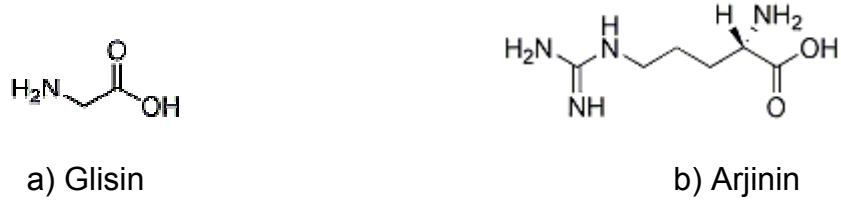


Şekil. 3.1. Polimerizasyonda kullanılan monomerler

3.1.1.1. Amino asit baskılanmış hidrojel

Moleküler baskılama işleminin ilk basamağında farklı miktarlarda EGDMA çapraz bağlayıcısı (0.16-4.00 mol %), MAA (3-25 mol %) ve HEMA monomeri ile (75-97 mol %) cam tüp içerisinde karıştırılmıştır. Tüm monomer ve çapraz bağlayıcı oranları ve çözücü miktarı Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Kalıp moleküller (Glisin, Arjinin ve RGD) monomer çözeltisine eklenmiştir. Kalıp moleküllerin kimyasal yapıları Şekil 3.2.'de, özellikleri ise Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Bu basamakta monomerler birbirleriyle etkileşime girerek konformasyonlarını diğer monomerlere ve kalıp moleküle göre ayarlayarak, moleküler baskılama öncesi serbest enerjiyi minimize ederler. Bu etkileşim basamağı moleküler baskılamanın başarısını büyük ölçüde etkiler. Başka bir tüpte 1 ml distile su içerisinde 10mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ /10mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ redoks başlatıcısı çözülür. Başlatıcı çözeltisi 1.5 ml hacmindeki monomer çözeltisine eklenir ve polimerizasyon oda sıcaklığında 0.5-2 saat arasında gerçekleşir. Baskılanmamış polimerlerin sentezi de aynı işlem kullanılarak, ancak kalıp molekül olmadan gerçekleştirilir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra polimer 1.0 cm çapında ve ~1.0

mm kalınlığında diskler oluşturacak şekilde kesilir. Kesilen diskler, 2 hafta boyunca saf su ile yıkanarak kalıp molekül ekstraksiyonu gerçekleştirilir.



Şekil.3.2. Hidrojellerin baskılanmasında kullanılan kalıp moleküllerin kimyasal yapısı

Çizelge 3.1. Amino asit baskılanmış hidrojellerin bileşimleri *

Hidrojel	EGDMA (% mol)	MAA (% mol)	HEMA (% mol)	HEMA/MAA (mol/mol)
H 1	0.16	3.00	~ 97	30
H 2	1.00	3.00	~ 96	30
H 3	2.00	3.00	~ 95	31
H 4	4.00	3.00	~ 93	32
H 5	0.16	10.0	~ 90	9
H 6	0.16	25.0	~ 75	3

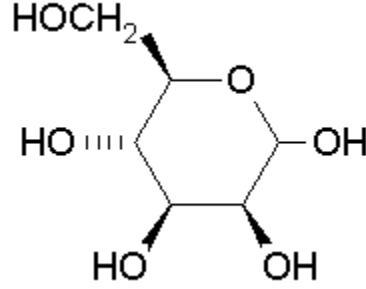
Baskılanmış polimerler, her bileşimde 1,5 ml monomer karışımına 40 mg kalıp molekül eklenmesiyle sentezlenmiştir. Kalıp molekül ve redoks başlatıcıları toplam 1 ml su içerisinde çözüldüğünden tüm örneklerde porojen (su) miktarı 1 ml değerinde sabit tutulmuştur.

Çizelge 3.2. Kalıp moleküllerin özellikleri

Kalıp Molekül	Molekül Ağırlığı (Da)	Çözünürlük (suda)
Glisin	75,07	200 mg/ml
Arjinin	174,2	50 mg/ml
RGD	346,3	10 mg/ml

3.1.1.2. D-mannoz baskılanmış polimerler

D-mannoz (M.A. 180.16, çözünürlük 50 mg/ml (suda)) kalıp molekülünün baskılanması işleminin ilk basamağında MAA fonksiyonel monomeri (15 mol %), kalıp molekül olan D-mannoz ile birlikte cam bir tüp içerisinde karıştırılarak kalıp molekül ile fonksiyonel monomerin etkileşmesi sağlanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu karışıma, farklı miktarlarda EGDMA çapraz bağlayıcısı (25-85 mol %) ve HEMA monomeri (10-60 mol %) eklenmiştir. Tüm monomer ve çapraz bağlayıcı oranları Çizelge 3.3'de verilmiştir. Yapılan moleküler baskılama işlemlerinde kalıp molekül olan D-mannoz 40 mg ve 80 mg olmak üzere farklı miktarlarda toplam 1 ml monomer çözeltisine eklenmiştir. D-mannoz'un kimyasal yapısı Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Başka bir tüpte 1.6 ml distile su içerisinde 10 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ /10 mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ redoks başlatıcısı çözülmüş ve başlatıcı çözeltisinin 1ml monomer çözeltisine eklenmesiyle polimerizasyon oda sıcaklığında 0.5-2 saat arasında gerçekleştirilmiştir. Baskılanmamış polimerlerin sentezi de aynı işlemler kullanılarak, ancak kalıp molekül olmadan gerçekleştirilmiştir. Elde edilen polimerik yapı, kalıp molekülün yapıdan tümüyle uzaklaştırılması için 2 hafta saf su ile yıkanmış ve elde edilen polimerler pulverizatör (Retsch, MM301) yardımıyla öğütülerek eleme işlemi sonrasında küçük boyutta (~100 μ) parçacıklar elde edilmiştir.



Şekil.3.3. D-mannoz kalıp molekülünün kimyasal yapısı

Çizelge 3.3. D-mannoz baskılanmış polimerlerin bileşimleri

Polimer	EGDMA (% mol)	MAA (% mol)	HEMA (% mol)	HEMA/MAA (mol/mol)
P 1	85	15	---	---
P 2	75	15	10	0,66
P 3	50	15	35	2,40
P 4	25	15	60	4,03

*Baskılanmış polimerler, her bileşimde 1ml monomer karışımına 40 mg ve 80 mg kalıp molekül eklenmesiyle sentezlenmiştir. Kalıp molekül ve redoks başlatıcıları toplam 1 ml su içerisinde çözüldüğünden tüm örneklerde porojen (su) miktarı 1 ml değerinde sabit tutulmuştur.

3.2. Moleküler Olarak Baskılanmış Polimerlerin Karakterizasyonu

Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonu için kullanılan yöntemler bu bölümde açıklanmıştır.

3.2.1. ¹³C NMR analizi

Yapılan çalışmada, moleküler baskılamanın katı yapı üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandığından ¹³C NMR analizleri gerçekleştirilmiştir. Kalıp uzaklaştırması öncesi

ve sonrasında elde edilen örnekler ve baskılanmamış örnekler kurutulmuş ve amino asit baskılanmış örnekler diskler halinde, mannoz baskılanmış örnekler ise öğütülerek toz halde analiz edilmişlerdir. Örneklerin çapraz polarizasyon (cross polarization) spektrumları ODTÜ Merkezi Laboratuvarındaki Bruker Superconducting FT.NMR Spectrometer Avance TM 300 MHz WB ^{13}C NMR cihazıyla tespit edilmiştir.

3.2.2. FTIR analizi

Sentezlenen moleküler baskılanmış polimerlerin ve hidrojellerin kimyasal yapısı Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) kullanılarak belirlenmiştir. Örnek tabletleri, vakum etüvüne kurutulan hidrojellerin öğütülerek KBr içerisinde dağıtılmasıyla hazırlanmıştır. Örneklerin spektrumu $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında, ekstraksiyon öncesi ve sonrasında FTIR-8101 (Shimadzu) cihazı ile tespit edilmiştir.

3.2.3. SEM analizi

Hidrojellerin morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) kullanılarak incelenmiştir. Örnekler vakum ortamında altın-paladyum ile kaplanarak SEM (JEOL JSM-840A) cihazı ile incelenmişlerdir.

3.2.4. Şişme kinetiği

Şişme kinetiği yalnızca hidrojel örnekler için belirlenmiş ve dinamik şişme ölçümleri gravimetrik olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir bileşim için, jel örnekler vakum etüvünde sabit tartıma gelene kadar kurutulduktan sonra 37°C 'de 25 ml fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) içeren rezervuarlara yerleştirilmiştir. Her bir örnek belirli zaman aralıklarıyla rezervuardan alınmış ve yüzeyindeki fazla su kağıt mendil ile uzaklaştırıldıktan sonra tartılmış ve farklı zamanlardaki su içeriği (%), bağıl ağırlık artışıyla belirlenmiştir. Bu işlem jellerde ağırlık değişimi olmayana, yani dengeye ulaşana kadar devam ettirilmiştir. Örneklerin su içeriği (water content, Wc) Eşitlik 3.1. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ su içeriği} = (W_s - W_d) \times 100 / W_d \quad (3.1)$$

Burada, W_d , kuru örneğin ağırlığını, W_s ise herhangi bir t anındaki ağırlığını ifade etmektedir.

Her bir hidrojinin su içeriğinin zamana karđı değiğimi, grafiksel olarak ifade edilmiş ve sonuçlar % şişme ve denge şişmesi (equilibrium water content, EWC) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. Elementel analiz

Amino asit ve RGD tripeptid molekülü baskılanmış örneklerde, monomerlerin ve çapraz bağlayıcının kimyasal yapısı göz önüne alındığında kalıp molekül örneklerdeki tek azot kaynağıdır. Bu nedenle moleküler baskılama işleminin başarisını görmek amacıyla örneklerin ekstraksiyon öncesi ve sonrası kütlece yüzde azot içeriği değerleri, elementel analiz ile saptanmıştır. Elementel analiz, TÜBİTAK, Beşevler Araştırma Merkezindeki LECO CHNS cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Gözenek boyutu analizi

Moleküler baskılamanın polimerin morfolojisi üzerine olan etkileri, civalı porozimetre ve BET cihazı ile gerçekleştirilen gözenek boyutu analiziyle saptanmıştır. Gözenek boyutu analizi çalışmaları, ODTÜ Merkezi Laboratuvardaki Quantachrome Corporation, Poremaster 60 civalı porozimetre cihazı ve Quantachrome Corporation, Autosorb-1-C/MS cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

3.3. Moleküler Olarak Baskılanmış Polimerlerin Uygulamaları

Sunulan tez kapsamında moleküler olarak baskılanmış polimerler, iki farklı uygulamada kullanılmıştır. Bu çalışmalarla ilgili ayrıntılı bilgi aşağıda sunulmuştur.

3.3.1. D-mannoz baskılanmış polimerler ile Con A saflaştırılması

Yüksek çapraz bağlayıcı varlığında hazırlanan (Çizelge 3.3) D-mannoz baskılanmış polimerlerin Con A afinitesinin değerlendirilmesi çalışmaları iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, D-mannoz baskılanmış örnekler tekrar D-mannozun bağlanması çalışmaları yapılarak baskılanmanın başarısı ve seçiciliği tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan durgun ortamdan Con A adsorpsiyonu çalışmaları ile baskılanmış (kalıp molekülün uzaklaştırıldığı, uzaklaştırılmadığı ve tekrar yüklendiği örnekler) örnekler ve baskılanmamış örnekler kullanılarak, hazırlanan örneklerin Con A adsorpsiyon verimi belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarla ilgili ayrıntılı bilgi aşağıda sunulmuştur.

3.3.1.1. Mannoz bağlanması

Çizelge 3.3.'de bileşimleri verilen polimerlerin kalıp molekül olan D-mannozu tekrar bağlama kapasiteleri, 37°C sıcaklıkta incelenmiştir. Örnekler vakum etüvünde kurutulup sabit tartıma geldikten sonra değişik derişimlerde D-mannoz içeren 20 ml hacminde rezervuarlara yerleştirilmiş ve D-mannoz bağlanma çalışmaları 50 rpm hızında çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan örnekler tarafından adsorplanan D-mannoz miktarı, belirli zaman aralıklarında rezervuardan alınan örneklerin, spektrofotometrik tayini ile saptanmıştır.

Mannoz tayininde, Dubois ve arkadaşları tarafından yayınlanan yöntem kullanılmıştır (Dubois ve arkadaşları, 1956). Bu yöntemde, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 2 ml hacminde stok çözeltilere, 0,05ml fenol (kütlice % 80'lik) çözeltisi ve 5 ml derişik sülfürik asit çözeltisi eklenir ve çözeltiler oda sıcaklığına gelmeleri için 15-20 dakika kadar bekletilir. Bu süre sonunda elde edilen çözeltilerin rengi, içindeki şeker konsantrasyonuna bağlı olarak açık sarıdan turuncuya kadar değiştiğinden, U.V. visible spektrofotometre (Labomed Inc., Spectro UV-VIS Double Beam PC) ile 490 nm dalga boyunda absorbands ölçümü yapılmıştır. Bu yöntem kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiği Ek-1'de verilmiş ve daha sonraki mannoz tayin çalışmalarında, bu grafikten faydalanılmıştır.

Mannoz bağlanma çalışmalarında, tek bir bileşim seçilerek, belirli miktardaki polimerin (yaklaşık 50 mg), D-mannoz derişimi 0.01 mg/ml ile 1.5 mg/ml arasında değişen 20 ml hacmindeki rezervuar çözeltilerinden D-mannozu adsorplama kinetiği ve kapasitesi incelenmiştir. Kinetik çalışmalar, 37°C’de çalkalama varlığında gerçekleştirilmiş ve belirli zaman aralıklarında alınan örnekler ile yukarıda açıklanan yöntem kullanılarak rezervuardaki mannoz derişimindeki değişim tespit edilmiştir. Elde edilen veriler kümülatif olarak değerlendirilerek gram polimer başına adsorplanan mannoz miktarına (mg) karşı zaman grafiği çizilmiş ve kinetik veriler elde edilmiştir. Örneklerin adsorpladıkları maksimum mannoz miktarına karşı çizilen rezervuar başlangıç derişim grafiği ile de adsorpsiyon izotermi elde edilmiştir.

3.3.1.2. Con A adsorpsiyon çalışmaları

Çalışmanın bu bölümünde hazırlanan moleküler olarak baskılanmış akrilat polimerin Con A’yı adsorplama kapasiteleri incelenmiştir.

Floresan spektrofotometresi ile Con A tayini

Con A’nın polimerlere adsorpsiyonunu takip etmek amacıyla oldukça duyarlı bir yöntem olan floresan spektrofotometresi seçilmiştir.

Con A (from Canavalia ensiformis (Jack Bean) Type VI, L7647, Sigma) 1 M’lık NaCl içerisinde çözülmüş ve 0.1 M’lık KAc-HCl (Potasyum asetat tampon çözeltisi, pH 6-7) ile seyreltilmiştir. Tampon çözelti içerisinde 1mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂ ve 1 mM CaCl₂ bulunmaktadır. Bu iyonlar, Con A izolasyonu için ortamda özellikle Mg²⁺ ve Ca²⁺ iyonlarının bulunması gerekliliğinden dolaydır (Bölüm 2.5.3.i.). Yukarıda özetlendiği gibi hazırlanan 1 mg/ml ve 2 mg/ml derişimindeki çözeltiler “stok çözelti” olarak çalışma sırasında kullanılmıştır.

Floresan spektrofotometrede (Varian, Carry Eclipse), uyarılma ve emisyon dalga boyunun belirlenmesi amacıyla 1x10⁻³ mg/ml derişimine seyreltilen Con A çözeltisi kullanılmıştır. Uyarılma dalga boyu 280 nm’de sabit tutularak, emisyon dalga boyu

taranmıştır. Analizler, triptofan uç üzerinden yürütülmüştür. Tarama sonucunda maksimum emisyon dalga boyunun 342 nm olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra floresan spektrofotometresi ile gözlenebilen konsantrasyon aralığı, farklı derişimlerde hazırlanan çözeltiler kullanılarak tayin edilmiştir. Belirlenen konsantrasyon aralığında (0.25-2 µg/ml) 5 farklı stok çözelti hazırlanmış; 1 cm²'lik kuartz hücreye alınarak floresan şiddetleri ölçülmüştür. Bu değerler ve elde edilen kalibrasyon grafiği Ek-2'de verilmiştir.

Durgun ortamda Con A adsorpsiyon çalışmaları

Con A adsorpsiyon deneyleri öncelikle durgun sistemde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerden adsorpsiyon parametreleri belirlenmiştir.

Kinetik çalışma

Moleküler olarak baskılanmış akrilat bazlı polimerlerin Con A Adsorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada Floresan spektrofotometresi ile Con A tayini kısmında anlatıldığı gibi hazırlanan stok çözeltiler kullanılarak sırasıyla; 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, mg/ml başlangıç derişimlerinde 4 farklı Con A çözeltisi hazırlanmıştır. Her bir derişim için seçilen bileşimdeki polimer ile durgun sistem deneyleri en az iki kez tekrarlanmıştır.

Hafif çalkalamalı ortamda 5 ml çözelti içeren ağzı rodajlı Erlenmayerlerin her birine polimer örnekler eklenmiştir. Belirli zaman aralıklarında her iki çözeltiden eş zamanlı olarak 10 µl'lik örnekler alınmıştır. Alınan örnekler Con A kalibrasyon aralığına seyreltilmiş ve floresan spektrofotometre ile floresan şiddetleri ölçülmüştür. Elde edilen konsantrasyon değerlerinden "kuru polimer gramı başına adsorplanan Con A" miktarları hesaplanmış ve zamana karşı grafiğe geçirilerek kinetik eğriler çizilmiştir.

Con A izoterm çalışmaları

İzoterm çalışması için 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, mg/ml olarak 4 farklı başlangıç derişimi için bir önceki bölümde elde edilen kuru polimer ağırlığı başına adsorplanan Con A

miktarlarının zaman karşı grafikleri kullanılmıştır. Denge de maksimum adsorplanan Con A miktarlarından polimer için adsorpsiyon izotermi elde edilmiştir.

3.3.2. RGD-baskılanmış hidrojeller ile yapılan çalışmalar

Tez çalışmasının bu kısmında, moleküler olarak baskılanmış hidrojellerle yapılan çalışmalardan bahsedilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmaların ilkinde örnekler hücre kültürü çalışmalarında substrat olarak kullanılmış, ikinci çalışmada ise aynı örneklerle RGD bağlama çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarla ilgili ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir.

3.3.2.1. Durgun ortamda hücre kültürü çalışmaları

Tüm hücre kültür çalışmaları, L-929 hücre hattıyla yürütülmüştür. Çalışmalarda kullanılan bu hücre hattı Ankara Şap Enstitüsü, Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir.

Çalışmalarda, uzun süre saklanmak üzere -80°C'de dondurucu (REVCO-Ultima II) içerisinde korunan ve hücre membranının stabilizasyonunu sağlamak üzere kriyoprotektan bulunan ampullerde (Nunc, CryoTube™, Vials) stoklanmış hücreler kullanılmıştır. Dondurulmuş hücreleri aktive etmek için -196°C'de saklanan ampuller alınmış ve hızlı bir şekilde 37°C'deki su banyosunda (NÜVE, BM101) çözündürülmüştür. Ampul içeriği besi ortamıyla seyreltilerek santrifüjlenmiştir (Hettich, EBA 20). Daha sonra tekrar besi ortamı içerisinde süspanse edilerek 75 cm²'lik flasklarda (TPP) inkübasyona bırakılmıştır. L929 hücre kültürü için, flask içinde "confluent layer" oluşturmuş olan, yani logaritmik üreme fazında bulunan aktif hücreler, tripsin (% 0,25) ile yüzeyden koparılmıştır. Yüzeyden alınan hücreler, tripsinin hücrelere zarar vermesini engellemek için az miktarda üreme ortamıyla birlikte flasktan alınarak santrifüjlenmiştir (6 dakika, 800 rpm). Elde edilen hücreler bir miktar besi ortamıyla homojenize edilip, içerisinden örnek alınmış ve % 0,1'lik tripan blue (Sigma, T6146) çözeltisiyle boyanarak canlılık kontrolü yapıldıktan sonra hemositometre (Neubauer) ile hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücre sayım yöntemi Ek-3'de açıklanmıştır. Yeni hazırlanacak hücre kültüründe, istenilen inokülasyon yoğunluğuna ulaşılması için

gerekli sayıdaki hücre seyreltilerek steril haldeki kültür ortamına aktararak hücre kültürü çalışmaları başlatılmıştır.

Çalışmalarda besi ortamı olarak “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” (DMEM, Sigma, D5796) kullanılmıştır. Besi ortamı sterilizasyonu 0.2 µm gözenek boyutuna sahip Sartorius (Minisart) filtrelerle yapılmıştır. Steril edilen besi ortamına hacimce % 20 oranında fetal bovine serum (FBS, Sigma, F9665) eklenmiş ve tüm çalışmalar, her biri 1.5 cm çapa sahip 24-gözlü PS kültür kaplarında (TPP) durgun koşullarda yürütülmüştür. Petri kaplarının her gözü parafilm ile kaplanarak, hücrelerin Petri kabına değil, baskılanmış polimerik yüzeylere yapışmasına izin verilmiştir. Steril ortam gerektiren tüm çalışmalar, laminar akışlı steril hücrede (Bioair, Safeflow 1.2) gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon ortamı olarak % 95-98 nem, % 5 CO₂ ve % 95 hava içeriğine sahip CO₂ etüvü (Heraeus, Heracell) kullanılmıştır. Etüv sıcaklığı 37± 0.5°C’dir.

Hücre yapışması

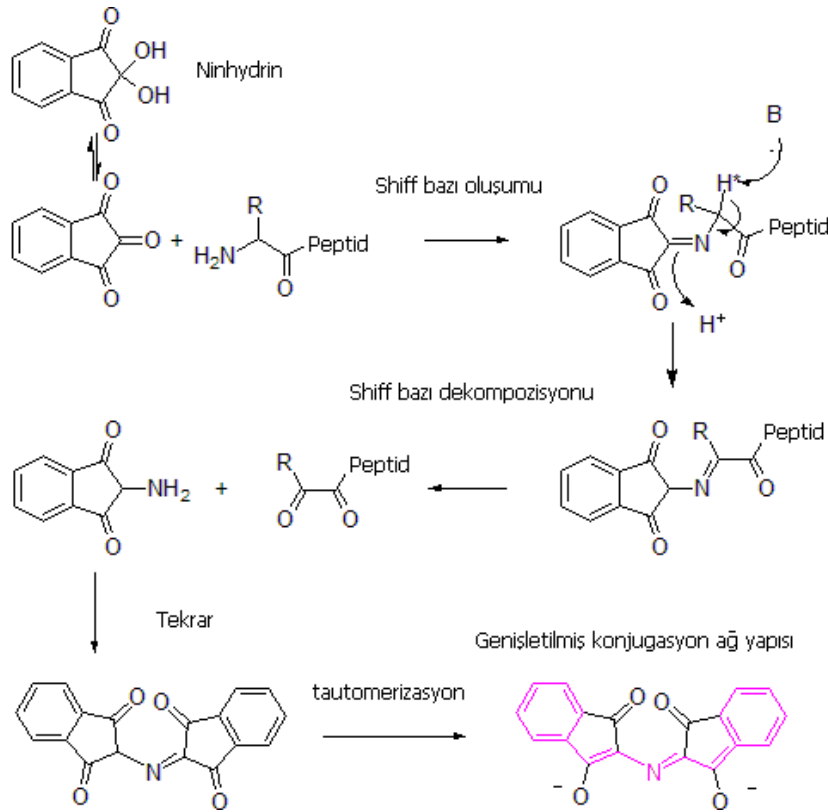
Çalışma öncesi, 3 grup örnek (RGD baskılanmış-kalıp molekül uzaklaştırılmış ve uzaklaştırılmamış örnekler ile kontrol olarak kullanılan aynı bileşimdeki baskılanmamış örnekler) Petri kaplarına yerleştirilmiş ve UV’de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 24-gözlü Petrilere yerleştirilen örneklerin üzerine 4,5 x 10⁴ hücre/ml derişiminde hücre her bir gözdeki hacim 2 ml olacak şekilde aktarılmıştır. Hücre yapışması mikroskopik olarak (Olympus, TH4-200) incelenmiş ve optik fotoğraflarla belgelenmiştir.

Hücre yayılması

Hücrelerin baskılanmış yüzeyler üzerinde yayılması mikroskopik olarak incelenmiştir. Hücrelerin yapışma ve yayılmasını net bir şekilde gözlemleyebilmek için örnekler, Giemsa (Sigma, G9641) ile boyanmıştır. Giemsa ile boyama tekniği Ek-4’te verilmiştir. Giemsa ile boyanan önekler daha sonra mikroskopik olarak incelenerek hücre yayılması tespit edilmiştir.

3.3.2.2. RGD bağlama çalışmaları

Moleküler baskılama işleminin, elde edilen hidrojel yapıların RGD kalıp molekülünü tanıması üzerindeki etkisi, RGD bağlanma çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, çapraz bağlayıcı oranı en yüksek olan 4 numaralı bileşim seçilmiş ve bu bileşimdeki RGD baskılanmış, hücre kültüründe kullanılmamış ve kullanılmış örneklerin RGD bağlama kapasiteleri kontrol olarak incelenen baskılanmamış örneklerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Her bir örnek için iki paralel ile yürütülen çalışmada örnekler, 24 gözlü Petrilere yerleştirilmiş ve üzerlerine 1,7 mg/ml derişiminde 1 ml RGD çözeltisi eklenmiştir. Örnekler, inkübatörde 37°C'de ve 25 rpm'de 14 saat bekletilmiş ve hidrojellerin yüzeyine bağlanan RGD miktarı Şekil 3.4'de reaksiyonları açıkça gösterilmiş olan ninhidrin yöntemiyle tespit edilmiştir.



Şekil 3.4 Ninhidrin reaksiyonu

Ninhidrin, primer aminlerle reaksiyon veren bir kimyasaldır ve amino asit analizinde kullanılır. Ninhidrin amino asitlerle reaksiyona girdiğinde kromofor oluşturur ve koyu mavi yada mor bir renk verir. Bu renk değişimi sayesinde amino asitler kantitatif olarak tayin edilebilir.

Sunulan çalışmada, hazırlanan yüzeylere bağlanan RGD miktarının belirlenmesinde amino asit analizinin temelini oluşturan, Spackman ve Stein tarafından tanımlanmış olan yöntem kullanılmıştır (Spackman ve arkadaşları, 1958). Bu yöntemde, RGD ile etkileşmiş polimerik yüzey 1 ml, 6N HCl ile 120°C'de 1 saat otoklavda bekletilerek yüzeye tutunan RGD moleküllerinin yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen zeltiye 1 ml, 6N NaOH eklenerek zelti nötralize edilmiş ve 0.5 ml asetik asit ile pH 5.5'e ayarlanmıştır. pH'ı ayarlanmış zeltiye daha sonra 0.5 ml Ninhidrin zeltisi (200 mg Ninhidrin + 30 mg hidrindantin + 7.5 ml methyl cellosolve) ve 2.5 ml asetik asit tamponu eklenerek 100°C'de 15 dakika ısıtılmıştır. zeltiler daha oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen zeltilerin rengi, içindeki aminoasit konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiğinden, U.V. visible spektrofotometre (Labomed Inc., Spectro UV-VIS Double Beam PC) ile 550 nm dalga boyunda absorbans ölümü yapılmıştır.

Bu yöntem kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiği Ek-5'de verilmiş ve yüzeye bağlanan RGD miktarının belirlenmesinde bu kalibrasyon grafiğinden yararlanılmıştır.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI

Sunulan tez çalışmasında, MAA/HEMA kopolimer bileşimine sahip MIP'ler sentezlenmiş ve hücre kültürü uygulamalarına yönelik olarak iki farklı uygulamadaki performansları değerlendirilmiştir. İlk uygulamada, mannoz baskılanmış, yüksek oranda çapraz bağlayıcı içeren polimerler sentezlenerek, durgun ve akışlı sistemde model lektin olarak seçilen Concanavalin A (Con A)'nın izolasyonunda kullanımı incelenmiştir. İkinci uygulamada ise, daha düşük çapraz bağlayıcı oranında hazırlanmış benzer kopolimer bileşimi, kalıp molekül olarak iki amino asit, arjinin, glisin ve bir tripeptid, RGD, baskılanarak hidrojel yapıda malzemeler elde edilmiştir. RGD baskılanmış hidrojel kullanılarak, moleküler baskılamanın L-929 hücrelerinin yapışmasındaki etkisi incelenmiştir. Bu bölümde ilk olarak, MIP'lerin sentezi ve sentezlenen MIP'lerin karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar tartışılmıştır. Daha sonraki bölümlerde ise, sentezlenen MIP'ler ile gerçekleştirilen mannoz, Con A, RGD adsorpsiyon ve hücre kültürü çalışmalarının sonuçları açıklanmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

4.1. Moleküler Baskılama Yönteminin Seçimi

Vücudumuzda çok sayıda hücre ve molekül, kooperatif bir çalışma ile karmaşık bir düzen içinde hareket etmektedir. Bu karmaşık sistemin temelini "moleküler tanıma" oluşturur. Başka bir deyişle "moleküler tanıma" hayatın sürdürülebilirliği için gereklidir. Örneğin, hücre membranı üzerindeki reseptörler hormonlara bağlanırlar ve hücre-hücre iletişiminden sorumludurlar. Reseptör hormona bağlandığında, hormonun konformasyonu değişir ve hormonun taşıdığı mesaj hücreye iletilir. Artık hücre vücudun neye ihtiyacı olduğu bilgisini almıştır ve bundan sonraki faaliyetler bu bilgiye göre düzenlenir. Bu sistemdeki en önemli nokta, reseptörün sadece tek bir hormona özgül olması ve diğerleriyle etkileşime girmemesidir. Buna benzer şekilde enzim-substrat etkileşimleri, antijen-antikor etkileşimleri de "moleküler tanıma" ile gerçekleşir.

Moleküler tanıma kavramının yaşam faaliyetleri üzerindeki büyük etkisi bilim adamlarını bu sistemi taklide yöneltmiştir. "Yapay reseptörler" bu eğilimin bir

sonucudur ve moleküler dizayna olanak sağlaması en önemli avantajlarından biridir. Moleküler baskılama yöntemi, yapay reseptörlerin elde edilmesinde oldukça basit ve kolay bir yöntemdir. Fonksiyonel monomer, kalıp molekül, çözücü ve çapraz bağlayıcı ajan, sistemi kurmak için yeterlidir. Karmaşık bir organik senteze yada kompleks bir moleküler dizayna ihtiyaç yoktur. Tüm bu olumlu özellikleriyle moleküler baskılama yöntemi umut vadeden, bilim ve teknolojiye gelişmelere yol açacak bir yöntemdir.

Sunulan tez kapsamında tüm bu avantajlar göz önüne alınarak moleküler baskılama yöntemi seçilmiş ve MIP'lerin sağladığı moleküler tanıma özelliğinin hücre kültürü uygulamalarında kullanılmasına yönelik iki farklı sistem geliştirilmiştir. İlk sistemde hücre kültüründe kullanılan temel lektinlerden biri olan Con A izolasyonuna yönelik olarak, lektinlerin karbonhidratlara olan ilgisinden yararlanılarak, D-mannoz baskılanmış polimerler hazırlanmış ve polimerlerin durgun sistemdeki performansları incelenmiştir. İkinci uygulama da ise, MIP'ler literatürde şimdiye kadar gerçekleştirilmemiş bir uygulama olan hücre kültürlerinde destek malzeme olarak kullanılması amacıyla hazırlanmış ve elde edilen düşük çapraz bağ yoğunluğundaki baskılanmış hidrojellerin hücre yapışması ve yayılması üzerindeki etkisi incelenmiştir.

4.2. MIP'lerin Bileşimlerinin Belirlenmesi ve Sentezi

Moleküler baskılama yöntemi oldukça basit bir yöntem olmasına karşılık, polimerizasyon sistemindeki her bir parametrenin (moleküler baskılama tipi, polimerizasyon türü, fonksiyonel monomer, çözücü, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı) elde edilen polimerin seçiciliği üzerine çok büyük etkileri vardır. Yapılan tez çalışmasında bu parametrelere nasıl karar verildiği aşağıda tartışılmıştır.

Moleküler baskılama tipinin belirlenmesi, daha sonraki bütün parametreleri etkileyeceğinden öncelikli olarak ele alınmıştır. Bölüm 2.1.2.'de de açıkça bahsedildiği gibi moleküler baskılama işlemleri kovalent ve non-kovalent olmak üzere iki farklı tipte gerçekleştirilebilir. İki yaklaşımın avantaj ve dezavantajları birbirinden farklıdır. İlk moleküler baskılama işlemi Wulff ve arkadaşları tarafından 1977 yılında "kovalent moleküler baskılama" yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak 1981 yılında Mosbach ve grubu kovalent baskılamanın her zaman gerekli olmadığını ortaya

koymuştur (Arshady ve arkadaşları, 1981). Non-kovalent moleküler baskılama, geniş bir spektrumdaki kalıp moleküller için kolay ve kabul edilebilir bir seçicilik sağladığından genellikle tercih edilmektedir (Komiya ve arkadaşları, 2003). Sunulan tez çalışmasında da tüm bu avantajlar göz önünde bulundurularak “non-kovalent moleküler baskılama” seçilmiştir.

Non-kovalent moleküler baskılama işlemlerinde kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında non-kovalent etkileşimler gerçekleşir. Elde edilen polimerik yapının seçiciliği non-kovalent bağların tekrar oluşmasına bağlıdır. Bu yüzden fonksiyonel monomer seçimi çok önemlidir. Metakrilik asit (MAA) sahip olduğu karboksilik asit grubuyla hidrojen bağı oluşumunu desteklediğinden literatürde daha önce yapılmış çalışmalarda en çok tercih edilen fonksiyonel monomerlerdendir (Komiya ve arkadaşları, 2003). MAA sahip olduğu bu özellikler ve tez çalışmasında kullanılan amino asit kalıp moleküllerle hidrojen bağı oluşturma kapasitesinden dolayı fonksiyonel monomer olarak seçilmiştir.

Fonksiyonel monomerden sonra polimerin sahip olması beklenen mekanik özellikler dikkate alınarak ana-matris (back-bone) monomeri seçilmiştir. Tez çalışmasında ana matris monomeri olarak kullanılan hidroksietil metakrilat (HEMA), hidrofilik yapısı nedeniyle hidrojel sentezinde çok kullanılan monomerlerden biridir ve MAA fonksiyonel monomeri ile birlikte moleküler baskılama işlemlerinde sıklıkla kullanılır (Cormack ve arkadaşları, 2004).

Etkili bir baskılama elde etmek için, fonksiyonel gruplar polimerik ağ yapısı içinde düzenli olarak dağılmalıdırlar. Bu durum, çapraz bağlayıcı ajanın reaktifliğinin, fonksiyonel monomerle eşit olmasıyla sağlanır. Aksi takdirde, fonksiyonel monomer yada çapraz bağlayıcı diğerine baskın bir şekilde polimerleşebilir (Komiya ve arkadaşları, 2003). Bu çalışmada, etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), çapraz bağlayıcı olarak seçilmiştir. MAA ve EGDMA'nın kimyasal yapısı birbirine oldukça benzerdir ve reaksiyon karışımında eş zamanlı olarak kopolimerize olurlar. Bu eş zamanlı polimerleşme karboksilik asit rezidularının düzenli dağılmasını sağlar.

Literatürde yapılan çalışmalarda da MAA/EGDMA sıklıkla kullanılmaktadır ve yapılan çalışma bu bilgilerle uyumludur.

Başarılı bir non-kovalent baskılamada en önemli noktalardan biri hidrojen bağı oluşturacak merkezlerin reaksiyon ortamında oluşmasıdır. İyi bir çözücünün bu oluşumu desteklemesinin yanında fonksiyonel monomer ve kalıp molekülün çözübilmesi de diğer bir gereksinimdir. Organik çözücüler, sahip oldukları elektrostatik özellikler ve hidrojen bağı oluşumunu desteklemeleri sebebiyle moleküler baskılama işlemlerinde tercih edilirler. Ancak kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimler organik çözücü varlığında oluşturulduğundan, malzeme biyolojik sıvılarda ve suda aynı etkileşimleri göstermeyebilir. Bunun yanı sıra, yapıdan uzaklaştırılmamış organik çözücüler biyouyumluluğu azaltabilir. Tüm bu dezavantajları ortadan kaldırabilmek amacıyla, moleküler baskılama işlemlerinin su ortamında gerçekleştirilmesi ve bu sistemlerde seçiciliğin artırılması yönünde çalışmalar önem kazanmıştır (Alvarez-Lorenzo ve arkadaşları, 2004). Sunulan tez çalışmasında, literatürdeki bu gereklilik ve kalıp moleküllerin çözünürlük özellikleri dikkate alınarak moleküler baskılama işlemleri su ortamında gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmalarda, polimerizasyon türü olarak, her iki uygulama için de en uygun örneklerin hazırlanmasına olanak veren “yığın polimerizasyonu” seçilmiştir. İlk uygulamada kullanılan hidrojel yapıların sentezlenmesinde en uygun yöntem, disk şeklinde yapılar elde edilebilmesi ve moleküler baskılama işleminin tüm yapıda etkisini gösterebilmesine olanak vermesinden dolayı yığın polimerizasyonudur ve literatürde daha önce yapılan, benzer kopolimer bileşimine sahip benzer çalışmalarda da yığın polimerizasyonu tercih edilmiştir (Alvarez-Lorenzo ve arkadaşları, 2002). Yığın polimerizasyonu ayrıca adsorpsiyon çalışmalarında tüm yapıda çok sayıda tanıma merkezleri oluşturması ve eleme ile istenilen boyut aralığında parçacık elde edilmesinin sağladığından avantajlıdır ve literatürdeki var olan çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Pérez-Moral ve arkadaşları, 2004).

Yukarıda sayılan tüm parametrelerin belirlenmesinden sonra başlatıcı sistemine karar verilmiştir. Redoks başlatıcılar, suda çözünebilmelerinin yanında, U.V. yada

radasyon gibi kalıp moleküle zarar verebilecek herhangi bir dış etkiye ihtiyaç duymadıkları için tercih edilmiş ve başlatıcı olarak kütlece 1:1 oranında $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ redoks başlatıcı çifti kullanılmıştır. Polimerizasyon sırasında açığa çıkan enerji sonucu artan ısı, kalıp moleküllerin etkilenmemesi için su banyosu kullanılarak polimerizasyon ortamından uzaklaştırılmıştır.

Moleküler baskılama için gerekli baskılama tipi, polimerizasyon türü, monomerler, çapraz bağlayıcı ve çözücüye karar verildikten sonra tüm bileşenlerin oranları belirlenmiştir.

Hücre kültürü uygulamasında kullanılacak olan polimerlerin hidrojel yapıda olması istendiğinden moleküler baskılama işleminin düşük çapraz bağ yoğunluğuna sahip yapılardaki uygulamaları incelenmiştir. 2002 yılında Alvarez-Lorenzo ve grubu tarafından gerçekleştirilen, MAA'nın fonksiyonel monomer, HEMA'nın ana-matris monomeri ve EGDMA'nın çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığı, yumuşak kontakt lenslerde moleküler olarak baskılamanın amaçlandığı çalışma, gösterdiği benzerlikler nedeniyle temel alınmıştır. Ancak hedeflenen sistemde, moleküler baskılama işlemi bahsedilen çalışmadan farklı olarak, su ortamında ve redoks başlatıcı kullanılarak gerçekleştirileceğinden EGDMA ve MAA oranları değiştirilerek bu parametrelerin baskılama üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Diğer parametreler değiştirilmesine rağmen kalıp molekül miktarı tüm sistemlerde sabit tutulmuştur. Bu durum glisin, arjinin ve RGD'nin su içinde zaten çok yüksek olmayan çözünürlüğünün ortama eklenen monomerler sebebiyle daha da azalmasının bir sonucudur. Kalıp molekülün tam olarak çözünmeden polimerizasyon ortamında bulunması istenmediğinden, kullanılan bileşimlerdeki kalıp molekül miktarı çözünürlük sebebiyle kısıtlanarak 1.5 ml monomer çözeltisi başına 40 mg kalıp molekül olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.1, 4.2. ve 4.3.'de tüm bu değerlendirmeler göz önünde bulundurularak kullanılan bileşenlerin miktarı, kalıp molekül başına düşen mol oranları cinsinden verilmiştir.

Sunulan çalışmada, seçilen sistem öncelikle glisin ve arjinin amino asitlerine uygulanmış, bu örneklerle gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları sonucunda

çalışmalara, değişen parametrelerin etkisinin en iyi belirlendiği izelge 3.1.'de bileşimleri verilen 1, 4 ve 6 numaralı örneklerle devam edilerek RGD molekülünün bu bileşimlerle baskılanmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.1. Glisin baskılanmış örneklerin mol oranları

Bileşim	Glisin (mol)	MAA (mol)	HEMA (mol)	EGDMA (mol)
H 1	1	0.75	22.75	0.036
H 2	1	0.75	22.39	0.220
H 3	1	0.72	22.09	0.460
H 4	1	0.67	21.39	0.910
H 5	1	2.43	21.98	0.039
H 6	1	6.34	19.11	0.040

Çizelge 4.2. Arjinin baskılanmış örneklerin mol oranları

Bileşim	Arjinin (mol)	MAA (mol)	HEMA (mol)	EGDMA (mol)
H 1	1	1.82	54.82	0.086
H 2	1	1.81	53.95	0.500
H 3	1	1.72	53.23	1.100
H 4	1	1.62	51.54	2.200
H 5	1	5.85	52.95	0.094
H 6	1	15.27	46.04	0.097

Çizelge 4.3. RGD baskılanmış örneklerin mol oranları

Bileşim	RGD (mol)	MAA (mol)	HEMA (mol)	EGDMA (mol)
H 1	1	13.92	417.69	0.66
H 4	1	12.42	392.75	16.79
H 6	1	116.95	350.85	0.74

Con A adsorpsiyonuna yönelik olarak sentezlenen polimerlerde ise Ramström ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen, yüksek çapraz bağlayıcı oranına sahip polimerlerin non-kovalent moleküler baskılama ile sentezlendiği çalışma (Ramström ve arkadaşları, 1994) temel alınmış ve daha önce de bahsedildiği gibi, parametrelerin yeni sistem üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla farklı bileşimler denenmiştir. D-mannozun sudaki çözünürlüğü (Çizelge 3.3) oldukça yüksek olduğundan, amino asitlerle yapılan çalışmada olduğu gibi kullanılan kalıp molekül miktarı, çözünürlük tarafından kısıtlanmamıştır. Çalışmada sistemin bu olumlu özelliği değerlendirilerek 1 ml monomer çözeltisi başına 40 mg veya 80 mg kalıp molekül katılmıştır ve bu örnekler sırasıyla A ve B olarak isimlendirilmiştir. D-mannozun iki farklı miktarda kullanılması kalıp molekül miktarının baskılama üzerine etkisinin incelenmesine olanak sağladığından önemlidir. Çizelge 4.4.'de tüm bu etkiler göz önünde bulundurularak kullanılan mol oranları, kalıp molekül başına düşen mol miktarı cinsinden verilmiştir.

Çizelge 4.4. 40 mg D-mannoz baskılanmış örneklerin mol oranları *

Bileşim	D-mannoz (mol)	EGDMA (mol)	MAA (mol)	HEMA (mol)
P 1	1	22.25	3.85	---
P 2	1	19.09	3.83	25.45
P 3	1	17.12	4.77	11.48
P 4	1	9.26	5.51	22.21

*80 mg D-mannoz baskılanmış örnekler için mol oranları verilen değerlerin yarısı kadardır.

Çizelge 4.4.'den de anlaşılacağı gibi, D-mannoz/MAA oranı 1:4 civarında tutulmaya çalışılmıştır. Bu durum, literatürdeki non-kovalent moleküler baskılama yapılan pek çok çalışmada etkin olduğu saptanan 1:4 oranının korunması amacıyla tercih edilmiştir (Cormack ve arkadaşları, 2004).

4.3. MIP'lerin Uygulamaları ve Karakterizasyonu

Sunulan tez çalışmasında moleküler olarak baskılanmış akrilat polimerleri iki farklı uygulamada kullanılmıştır. İlk uygulamada D-mannoz kalıp molekülü baskılanmış yüksek oranda çapraz bağlayıcı içeren polimerler Con A adsorpsiyonunda kullanılmış, ikinci uygulamada ise amino asit ve RGD tripeptid molekülü baskılanmış polimerler hücre kültürü uygulamalarında kullanılmıştır. Tezin bu kısmında, her iki uygulamayla ilgili karakterizasyon çalışmalarının ve uygulamaların sonuçları aşağıda sunulmuştur.

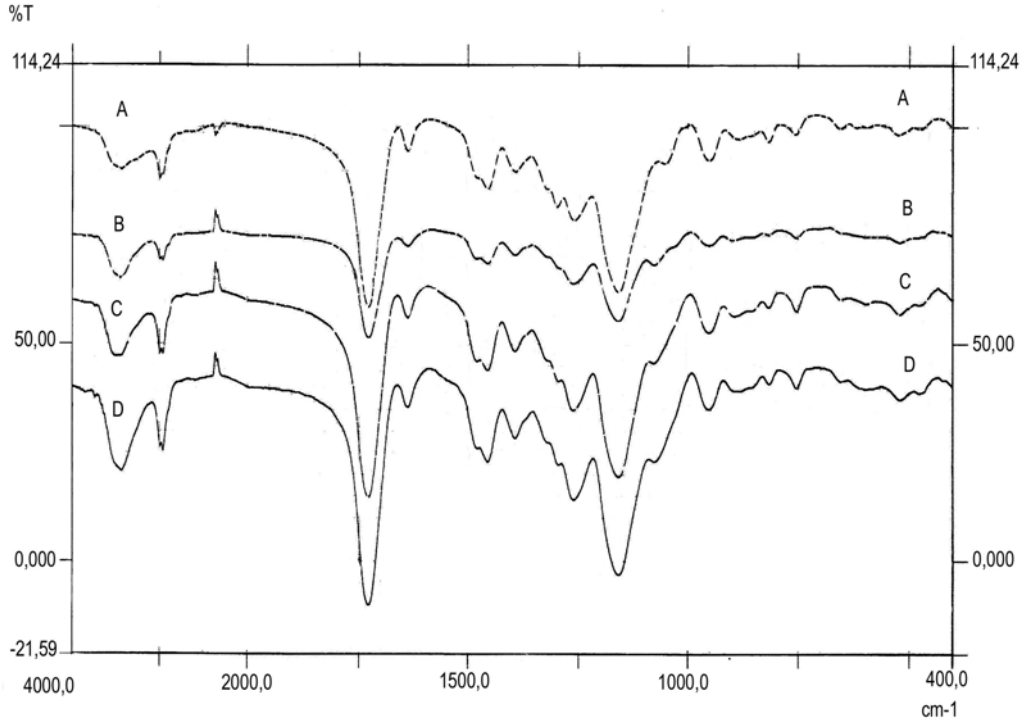
4.3.1. D-mannoz baskılanmış polimerlerin karakterizasyonu ve Con A adsorpsiyonunda kullanımı

Bu kısımda, D-mannoz baskılanmış örneklerin karakterizasyon çalışmaları sonucu elde edilen sonuçlar tartışılmış ve tekrar mannoz yüklemesi ve Con A adsorpsiyon çalışmalarında elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Sonuçlar ve tartışmalar, aşağıda sunulmuştur.

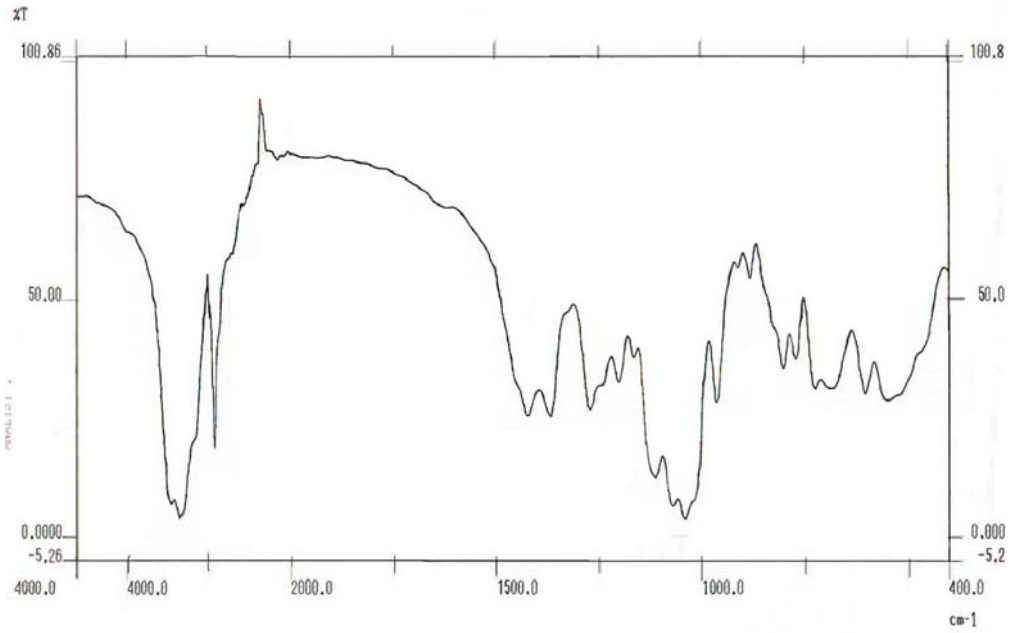
4.3.1.1. FTIR analizi sonuçları

FTIR çalışmasında, P3 bileşimindeki örnek için baskılanmamış, baskılanmış kalıp molekül (D-mannoz) uzaklaştırılmış polimer örnekleri ve D-mannoza ait spektrumlar alınmıştır. Şekil 4.1'de bu örneklere ait spektrum verilmiştir.

Elde edilen spektrumlar değerlendirildiğinde baskılanmış ve baskılanmamış örnekler arasında belirgin bir farklılık olmadığı görülmektedir. Bu durum D-mannoz ve örneklerin yapılarında benzerlikten kaynaklanmaktadır ve D-mannoza ait spektrum ile örneklere ait spektrumun benzerliğiyle kanıtlanmaktadır.



a)

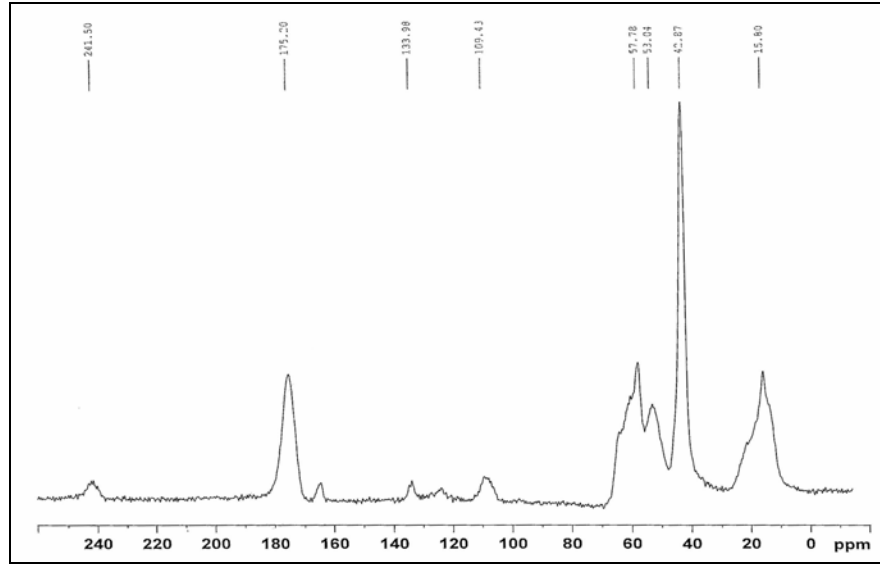


b)

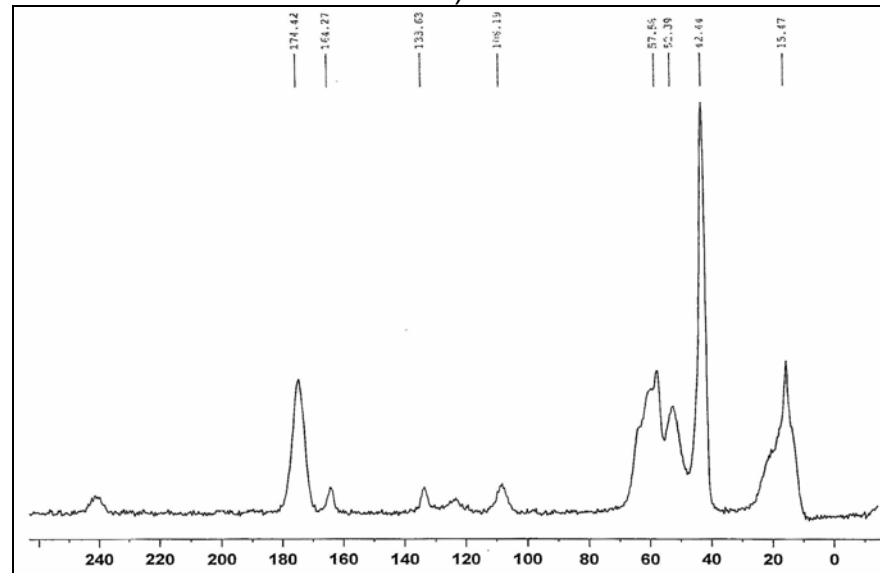
Şekil 4.1 P3 bileşimi için (a) baskılanmamış (A), 40 mg D-mannoz baskılanmış (B), 80 mg D-mannoz baskılanmış ekstraksiyon sonrası (C), ekstraksiyon öncesi (D) ve (b) saf D-mannoza ait FTIR spektrumları

4.3.1.2. ^{13}C NMR analizi sonuçları

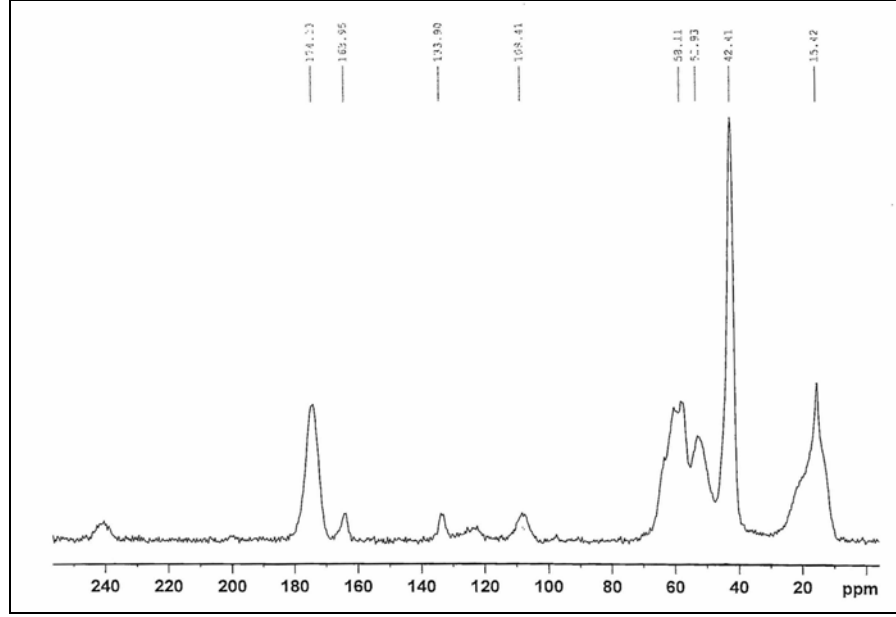
Şekil 4.2'de P3 örneğine ait baskılanmamış (a), 80 mg MannoZ baskılanmış (b) ve baskılanmış kalıp molekülü uzaklaştırılmamış (c) örnekler için ^{13}C NMR analizi sonuçları verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde örnekler arasında dikkat çekici bir değişiklik gözlenememiştir. Bu durum literatürde de belirtildiği gibi katı örneklerde bilgi verici sonuçların elde edilmesinin güçlüğü ile açıklanabilir.



a)



b)



Şekil 4.2 P-3 polimeri için ^{13}C NMR analizi sonuçları a) baskılanmamış, b) 80 mg mannoz baskılanmış, c) Mannoz baskılanmış kalıp uzaklaştırılmamış

4.3.1.3. Durgun ortamda Con A saflaştırılması çalışmaları

Con A saflaştırılması çalışmaları, bölüm 3.3.1'de hazırlanması ayrıntılı bir şekilde açıklanan moleküler olarak baskılanmış yüksek oranda çapraz bağlayıcı içeren polimerlerle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada öncelikle sentezlenen polimerlerin kalıp molekül olan D-mannozu tekrar bağlama kapasiteleri incelenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda ise D-mannoz tekrar bağlanmış polimerlerle Con A saflaştırılması çalışmaları yürütülmüştür. Tayin yöntemindeki hassasiyeti arttırmak amacıyla çalışmalar, 80 mg D-mannoz baskılanmış örneklerle gerçekleştirilmiştir. Con A saflaştırılması sonuçları ilerleyen bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiştir.

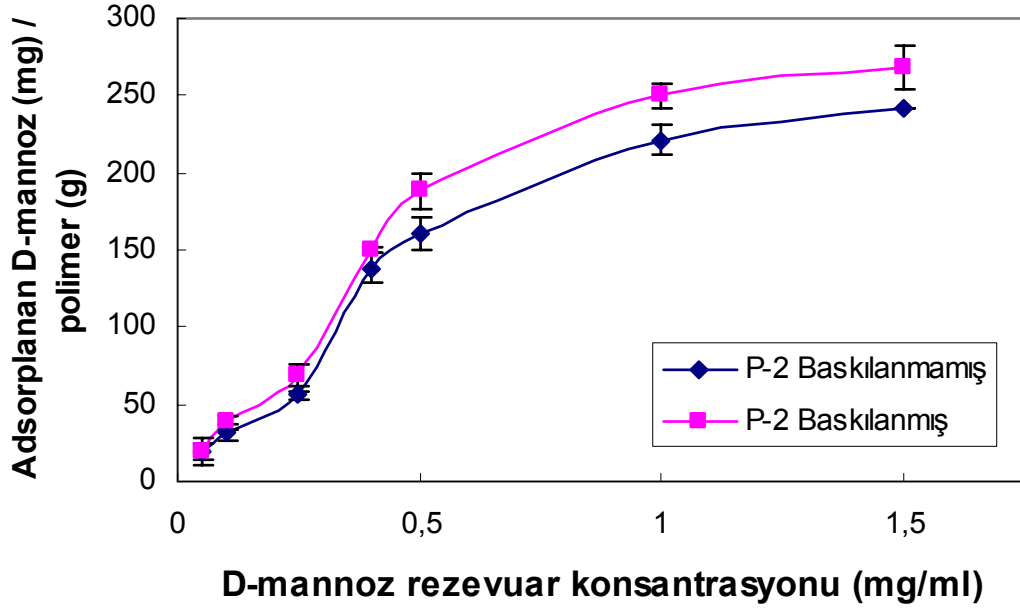
Mannoz bağlanması çalışmaları

Moleküler baskılama işlemlerinde baskılanmış polimerin kalıp molekülü tekrar bağlama kapasitesi baskılamanın başarısını gösteren önemli bir parametredir. Hazırlanan örneklerin mannoz bağlama kapasitelerinin belirlenmesinde Dubois ve arkadaşları tarafından ortaya konulan kolorimetrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde basit şekerlerin, oligosakkaritlerin, polisakkaritler ve bunların serbest veya potansiyel

olarak serbest indirgeyici gruplu metil eterleri de dahil olmak üzere türevlerinin, fenol ve konsantre sülfürik asit ile muamele edildiğinde sarı-turuncu renk vermesi özelliğine dayanmaktadır (Dubois ve arkadaşları, 1956). Bu yöntem az miktarda şekerin tespitinde bile kullanılabilir. Yöntem, hızlı, basit, hassastır ve tekrar edilebilir sonuçlar verir. Elde edilen renk stabildir ve eğer gerekiyorsa okuma saatler sonra da yapılabilir. Karakteristik sarı-turuncu rengin absorbansı hegzoslar için 490 nm'de, pentozlar ve üronik asitler için 480 nm'de ölçülür. Yapılan çalışmada, ölçümler 490 nm'de yapılmış ve konsantrasyon hazırlanan standart kalibrasyon eğrisi ile tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda, tek bir bileşim seçilerek, belirli miktardaki polimerin (yaklaşık 50 mg), D-mannoz derişimi 0.01 mg/ml ile 1.5 mg/ml arasında değişen 20 ml hacmindeki rezervuar çözeltilerinden D-mannozu adsorplama kinetiği ve kapasitesi incelenmiştir. Kinetik çalışmalar, 37°C'de çalkalama varlığında gerçekleştirilmiş ve belirli zaman aralıklarında alınan örnekler UV spektrofotometri ile incelenerek rezervuardaki mannoz derişimindeki değişim belirlenmiştir. Aynı bileşimde ancak biri baskılanmış, diğeri baskılanmamış P-2 örnekleri ile elde edilen verilerin kümülatif olarak değerlendirilmesi sonucu örneklerin adsorpladıkları maksimum mannoz miktarına karşı çizilen rezervuar başlangıç derişim grafiği ile de adsorpsiyon izotermi elde edilmiş ve Şekil 4.3'de sunulmuştur. P-2 örneğinin adsorpladığı D-mannoz miktarı ile ilgili kümülatif bilgiler Ek-2'de sunulmuştur. Adsorpsiyon izoterminden de açıkça görüldüğü gibi, her iki polimerin de D-mannoz adsorplama kapasitesi artan konsantrasyonla birlikte artmış ancak daha sonra dengeye ulaşmıştır. P-2 baskılanmış ve baskılanmamış örnekler karşılaştırıldığında, örneklerin adsorpsiyon davranışının benzer olduğu, aynı zamanda dengeye ulaştığı ve baskılanmış örneğin tüm konsantrasyon değerlerinde baskılanmamıştan biraz daha fazla D-mannoz adsorpladığı görülmektedir.

P-2 Adsorpsiyon izotermi

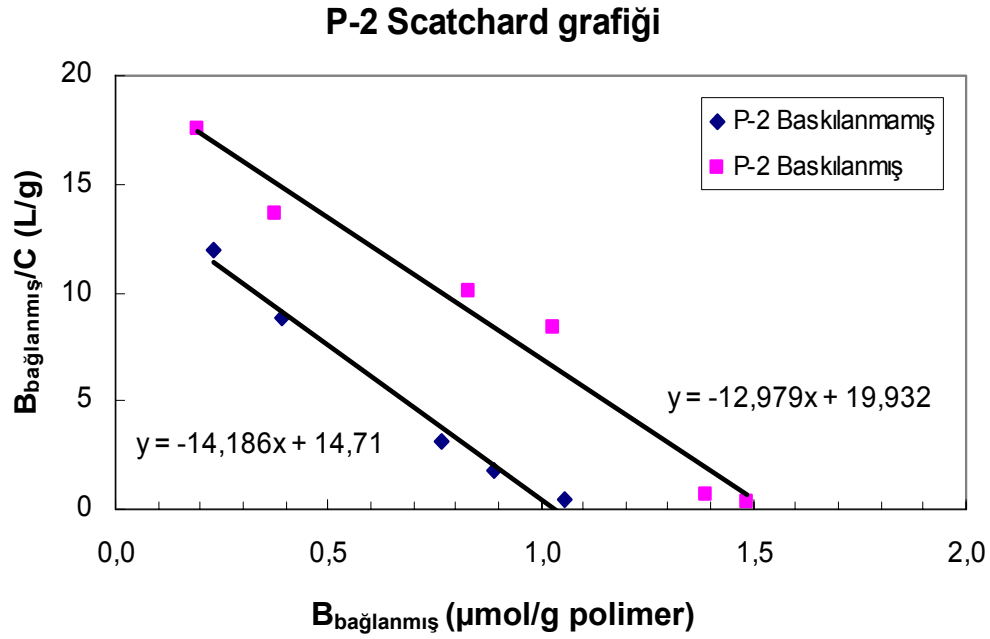


Şekil 4.3 P-2 bileşimindeki örnek için adsorpsiyon izotermi

Bölüm 2.2.3'de de anlatıldığı gibi hedef molekül ile polimerin bağlanma merkezi arasındaki etkileşimlerin bozunma sabit (K_D , dissociation constant) aşağıdaki Eşitlik 2.2 ile ifade edilir ve K_D değeri Eşitlik 2.5 (Scatchard) kullanılarak hesaplanır.

$B_{\text{bağlanmış}}/C$ değerlerine karşı çizilen $B_{\text{bağlanmış}}$ grafiğinde elde edilen doğrunun eğiminden ve kesim noktasından sırasıyla K_D ve B_{max} değerleri bulunur.

Şekil 4.4'de 80 mg D-mannoz baskılanmış ve baskılanmamış örnek için $B_{\text{bağlanmış}} / C$ değerlerine karşı çizilen $B_{\text{bağlanmış}}$ grafiği sunulmuştur. Bu grafikte C , o andaki rezervuar konsantrasyonunu, $B_{\text{bağlanmış}}$ ise bu konsantrasyonda birim polimer kütlesi başına adsorplanan en yüksek mannoz miktarını ifade etmektedir



şekil 4.4 P-2 bileşimine ait Scatchard grafiği

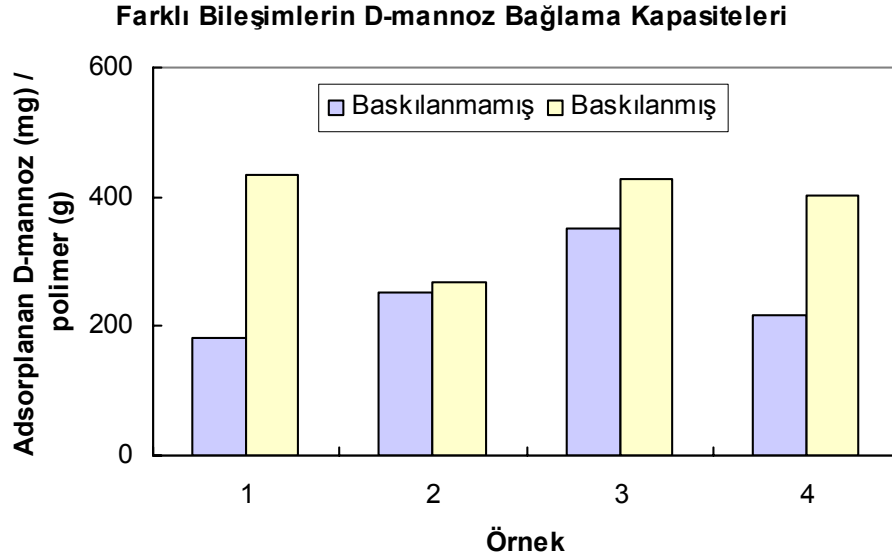
Scatchard denkliğindeki K_D (bozunma sabiti) ve B_{max} (gram polimer başına adsorplanan maksimum mannoz miktarı, $\mu\text{mol/g}$ polimer) değerleri Scatchard grafiğinin sırasıyla eğimi ve y eksenini kesim noktasından hesaplanmış sonuçlar izelge 4.5'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.5 P-2 bileşimindeki baskılanmış ve baskılanmamış örneklere ait mannoz bağlama verileri

	P-2 Baskılanmamış	P-2 Baskılanmış
K_D ($\mu\text{mol/L}$)	0.070	0.077
B_{max} ($\mu\text{mol/g}$)	1.02	1.54
R^2	0.98	0.97

şekil 4.4'de görüleceği gibi, her iki bileşim de belirlenen konsantrasyon aralığında lineer davranış göstermektedir ($R^2=0.98$ ve 0.97). Çizelge 4.5 incelendiğinde baskılanmış polimere ait K_D ve B_{max} değerlerinin baskılanmamıştan bir miktar daha fazla olduğu görülmektedir.

Daha sonra yapılan çalışmalarda, en yüksek D-mannoz bağlama kapasitesine ulaşılan denge değeri olan 1.5 mg/ml D-mannoz rezervuar derişimi kullanılarak çeşitli bileşimlerdeki baskılanmamış ve 80 mg mannoz baskılanmış örneklerin adsorpladıkları mannoz miktarı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5’de sunulmuştur. Elde edilen grafik incelendiğinde her bileşimde baskılanmış örneklerin baskılanmamış örneklerden daha yüksek mannoz bağlama kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Bu fark özellikle en yüksek çapraz bağlayıcı oranına sahip P-1 bileşimi ve en yüksek HEMA/MAA mol oranına sahip P-4 bileşimlerinde daha belirgindir. En yüksek adsorpsiyon (434.88 mg D-mannoz / g polimer) en yüksek çapraz bağlayıcı oranına sahip örnekle elde edilmiştir ve yüksek çapraz bağlayıcı oranlarında daha iyi adsorpsiyon elde edilmesi moleküler baskılamanın karakteristik özelliklerindedir. P-2 bileşiminde yapıya HEMA eklenmesi ve dolayısıyla çapraz bağlayıcı EGDMA mol oranının azalması ile adsorpsiyon miktarında bir düşme gözlenmiş ancak artan HEMA/MAA oranıyla adsorpsiyon yine artma eğilimi göstermiştir. Daha sonra gerçekleştirilen Con A adsorpsiyonu çalışmalarında P-1 bileşimi kullanılmıştır.



Şekil 4.5 Farklı bileşimlerdeki moleküler olarak baskılanmış polimerlerin 1.5 mg/ml rezervuar derişiminde gram polimer başına adsorpladıkları maksimum D-mannoz miktarları (denge süresi ~ 40 dakika)

Con A adsorpsiyonu çalışma koşullarının seçimi

Yapılan çalışmada kullanılan Con A, hücre yüzey analizlerinde ve hücre fonksiyonlarının ayarlanmasında bir prob gibi yaygın olarak kullanılan tipik bir lektindir. Hücre biyolojisi çalışmalarının çoğunda ticari Con A kullanılmaktadır (Ishii, 1990). Con A'yı bu kadar yararlı kılan özelliği spesifik olarak şekerlere bağlanmasıdır. Bu yüzden ki hücre yüzeylerindeki karbonhidratlarla gerçekleştirilen çalışmalarda yararlıdır. Con A'nın karbonhidratlara gösterdiği spesifik afinite, antikorların antijenlere gösterdiği afinite ile karşılaştırıldığında, eşit yada daha iyi olduğu bilinmektedir (Chern, 1999).

Con A genellikle, çeşitli matrislere immobilize edilerek afinite kromatografisinde bir ligand olarak görev yapmaktadır. Örneğin Sepharose üzerine immobilize edilmiş Con A, glikoproteinlerin, polisakkaritlerin ve glikolipidlerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında rutin olarak kullanılmaktadır (Novotny, 2001; Jara-Pérez, 2003). Tüm bu özellikler göz önüne alındığında Con A'nın önemi ortaya çıkmaktadır.

Con A mannoza spesifik afinite göstermektedir. Fakat pek çok lektin, bağlandıkları şekerin C-2 pozisyonundaki bazı varyasyonları tolere edebilmektedir. Bu yüzden pek çok lektin gibi Con A da glukoz ve N-asetilglukozamin ile iyi uyum sağlayabilmektedir (Sharon, 1989). Literatürde yer alan Con A ile ilgili çalışmalarda daha çok mannoz ve glukoz spesifikliğinden yararlanılmıştır. Ruckenstein ve grubunun bir çalışmasında, selüloz asetat membranlara bir oligosakkarit olan mannoz immobilize edilmiş ve Con A saflaştırılmasında kullanılmıştır (Ruckenstein, 2001).

Çalışma koşulları belirlenirken Con A'nın 2.5.3.1'de açıklanan özellikleri göz önüne alınmıştır. Bilindiği gibi pH 7 civarında ve daha üstünde Con A tetramerik yapıdadır. pH 6'nın altındaki değerlerde ise dimerlerine ayrılmaktadır. İzoelektrik noktasının da 7.1 olduğu (Chern, 1999) göz önüne alındığında, optimum aktivitesinin pH 7 civarında elde edilebileceği açıktır. Bu yüzden çalışmaların tümünde adsorpsiyon nötr ortamda incelenmiştir.

Con A için kullanılacak tampon çözeltisinin seçimi de önemli bir parametredir. Rezai ve Gorgani'nin Con A-Sepharose submitokondrial partiküllerin adsorpsiyonunu incelediği bir çalışmada, optimum etkileşimi sağlamak amacıyla dört farklı tampon denenmiştir. Bunlar 25 mM, pH 7.4 Tris-asetat tamponu; 1M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂ ve 1 mM MgCl₂ içeren pH 7.0 Tris-asetat tamponu; 1 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂ ve 1 mM MgCl₂ içeren 0,1 M, pH 6,0 asetat tamponu ve son olarak 1 mM CaCl₂ ve 1 mM MnCl₂ içeren 5 mM, pH 6,5-7,0 HEPES tamponudur. Bu çalışmada asetat ve HEPES tamponu ile daha iyi bağlanma aktivitesi elde edilmiştir (Rezaei ve arkadaşları, 1996). Literatürde bir diğer çalışmada da 1 mM MnCl₂, 1mM MgCl₂ ve 1 mM CaCl₂ içeren 0,1M sodyum asetat-HCl (NaAc-HCl) (pH=7.0) tamponu kullanılmıştır (Ruckenstein, 2001). Bu veriler ışığında tez çalışmasında, 1mM MnCl₂, 1mM MgCl₂ ve 1 mM CaCl₂ içeren 0,1M sodyum asetat-HCl (pH=7.0) tamponu kullanılmıştır. MnCl₂, MgCl₂ ve CaCl₂'ün varlığının nedeni Con A'nın sakkaritlere bağlanabilmesi için ortamda bu metal iyonlarının bulunması gerekliliğidir.

Floresan Spektroskopisi ile Kantitatif Analiz

Con A'nın adsorpsiyon kapasitesini takip etmek amacıyla floresan spektrofotometresi kullanılmıştır. Floresan spektroskopisi, biyolojik örneklerin özellikle proteinler ve bu yapıların katı yüzeylerdeki adsorpsiyon davranışlarının incelenmesinde oldukça yararlı bir yöntemdir (Guilbault, 1973; Doğan, 2003, Kesgin, 2002). Floresan emisyonu, absorpsiyon prosesine göre enerjisi daha az ve daha uzun dalga boylarında izlenir. Absorpsiyona göre, kromoforun çevresel etkileşim ve değişmelerine çok daha duyarlıdır. Proteinleri oluşturan yirmi tür amino asitten sadece üçü floresan kromofor içerir. Protein floresansı (intrinsik floresan), fenilalanin, tyrosin ve tryptophan aromatik amino uçlarından izlenmektedir.

Con A'nın aminoasit dizilimine yukarıda söz edilen 3 kromofor da yer almaktadır. Çizelge 4.6'da bu amino asitlerin yüzdeleri verilmiştir. Bu durumda hem kantitatif tayindeki hassasiyet, hem de adsorpsiyon koşullarında protein yapısında meydana gelebilecek konformasyonel değişimlerin incelenmesine olanak vermesi açısından floresan spektroskopisi ile çalışılmıştır.

Çizelge 4.6 Con A için, floresan kromofor grup içeren amino asit yüzdeleri (Agi, 2003).

Amino asit	Con A (%)
Fenilalanin	4,50
Tryptophan	1,89
Tyrosin	4,50

Con A gibi her üç amino asidi içeren proteinlerin floresansı, genellikle tryptophan uçlarından kaynaklanır. Çizelge 4.7’de bu üç amino asidin absorbans ve floresans özellikleri gösterilmektedir. Çizelge 4.7’den açıkça görülebileceği gibi tryptophanın uyarılma dalga boyundaki molar uyarılma katsayısı ve emisyon kuantum verimi diğerlerine göre daha büyüktür. Doğal bir protein içinde fenilalanin floresansı izlenemez. Ayrıca uçlar arasındaki enerji aktarımı fenilalanin floresansını söndürmektedir. Diğer yandan tirozin ve triptophan 280 nm civarında kuvvetli absorpsiyon yaparlar. Fenilalanin emisyonu bu dalga boyuna rastladığında bir self-absorpsiyon olayı ortaya çıkar (Eren, 2000).

Tez çalışmasında adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları floresan spektrofotometresi ile tryptophan uçlarından izlenerek yürütülmüştür. Stok Con A çözeltisinin (1 mg/ml) UV spektrofotometre ile maksimum absorbans yaptığı dalga boyu 280 nm olarak belirlenmiş ve floresan spektrofotometresinde de $\lambda_{uy}=280$ nm’de tutularak emisyon dalga boyu taranmış ve $\lambda_{em}=342$ nm olarak bulunmuştur. Kantitatif analiz Ek 3’de verilen Con A kalibrasyon grafiği kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 4.7 Aromatik amino asitlerin absorbands ve floresans özellikleri (Agi, 2003)

Amino asit	Absorbans			Floresan	
	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{\max} Duyarlılık (nm)	Q_f	$\epsilon_{\max} Q_f$
Tryptophan	280	5600	348	0,20	1100
Tyrosin	274	1400	303	0,14	200
Fenilalanin	257	200	282	0,04	8

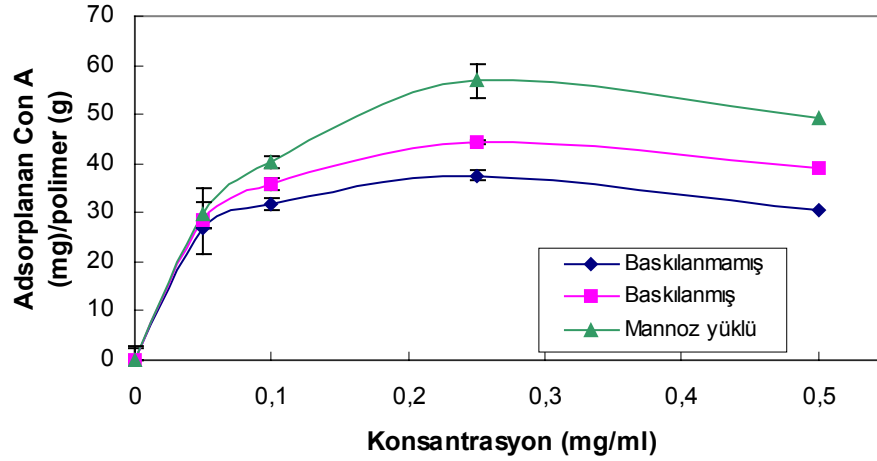
Con A adsorpsiyonu çalışmaları

Con A adsorpsiyonu ile ilgili yapılan kinetik çalışmada, D-mannoz adsorpsiyonunun en yüksek olduğu P-1 bileşimi seçilerek, belirli miktardaki polimerin (yaklaşık 50 mg), Con A derişimi 0.005 mg/ml ile 0.5 mg/ml arasında değişen 20 ml hacmindeki rezervuar çözeltilerinden Con A'yı adsorplama kinetiği ve kapasitesi incelenmiştir. Kinetik çalışmalar, 37°C'de durgun ortamda gerçekleştirilmiş ve belirli zaman aralıklarında alınan örnekler Floresan spektrofotometri ile incelenerek rezervuardaki Con A derişimindeki değişim hazırlanan kalibrasyon grafiği Ek-3 kullanılarak belirlenmiştir.

Aynı bileşimde baskılanmamış, baskılanmış ve baskılanmış mannoz yüklenmiş P-1 örnekleri ile elde edilen verilerin kümülatif olarak değerlendirilmesi sonucu örneklerin adsorpladıkları maksimum Con A miktarına karşı çizilen rezervuar başlangıç derişimi grafiği ile de adsorpsiyon izotermi elde edilmiş ve Şekil 4.6'da sunulmuştur.

İzoterm incelendiğinde baskılanmış ve mannoz yüklenmiş örneğin en yüksek Con A adsorplama kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Bu durum, Con A'nın moleküler baskılama yöntemiyle baskılanan ve yükleme ile yapıya katılan mannoza olan afinitesinin bir sonucudur. Ancak baskılanmış örnek, yapısında Con A'ya yüksek afinitesi olan mannoz içermemesine rağmen baskılanmamış örnekten daha yüksek adsorpsiyona sahiptir ve moleküler baskılama işleminin moleküler adsorpsiyon üzerine etkisi açıktır ve örnekler tekrar mannoz yüklenmesine gerek duyulmadan daha iyi Con A adsorplama kapasitesine sahiptir.

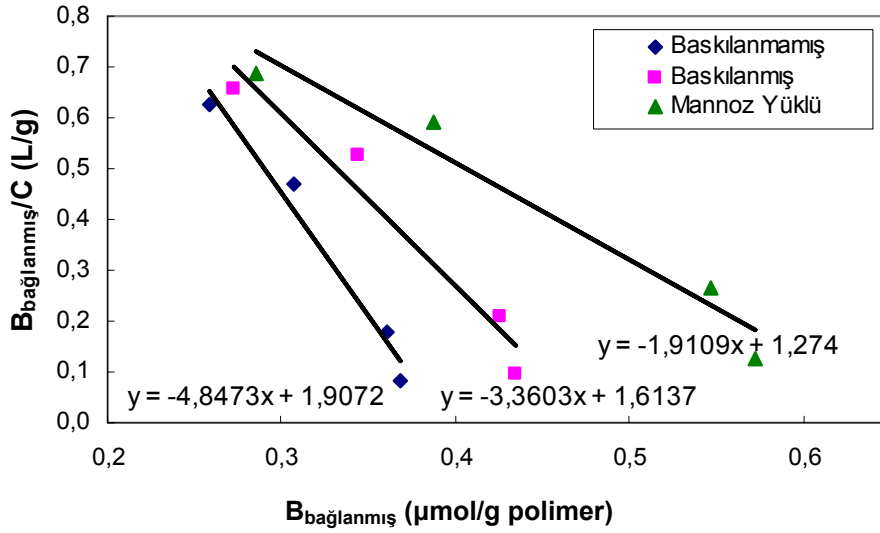
P-1 Con A Adsorpsiyon izotermi



Şekil 4.6 P-1 bileşimindeki örnek için Con A adsorpsiyon izotermi

$B_{\text{bağlanmış}} / C$ değerlerine karşı çizilen $B_{\text{bağlanmış}}$ grafiğinde incelendiğinde, her üç bileşimde belirlenen konsantrasyon aralığında örnekleri lineer adsorpsiyon davranışı gösterdiği görülmektedir. Elde edilen doğruların eğiminden ve kesim noktasından K_D ve B_{max} değerleri hesaplanmış ve elde edilen değerler Çizelge 4.8'de özetlenmiştir.

P-1 Scatchard grafiği



Şekil 4.7 P-1 bileşimine ait Scatchard grafiği

Çizelge 4.8'den de görüleceği gibi, Baskılanmış ve mannoz yüklenmiş örnek en yüksek K_D ve B_{max} değerlerine sahiptir onu baskılanmış ancak mannoz içermeyen örnek izlemektedir. Baskılanmamış örnek diğerleriyle aynı bileşimde olmasına rağmen moleküler olarak baskılanmadığı için en düşük adsorpsiyon sabitlerine sahiptir ve tüm bu sonuçlar moleküler baskılamanın belirlenen sistemdeki potansiyeli artırıcı etkisini ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.8 P-2 bileşimindeki baskılanmış ve baskılanmamış örneklerin kinetik değerleri

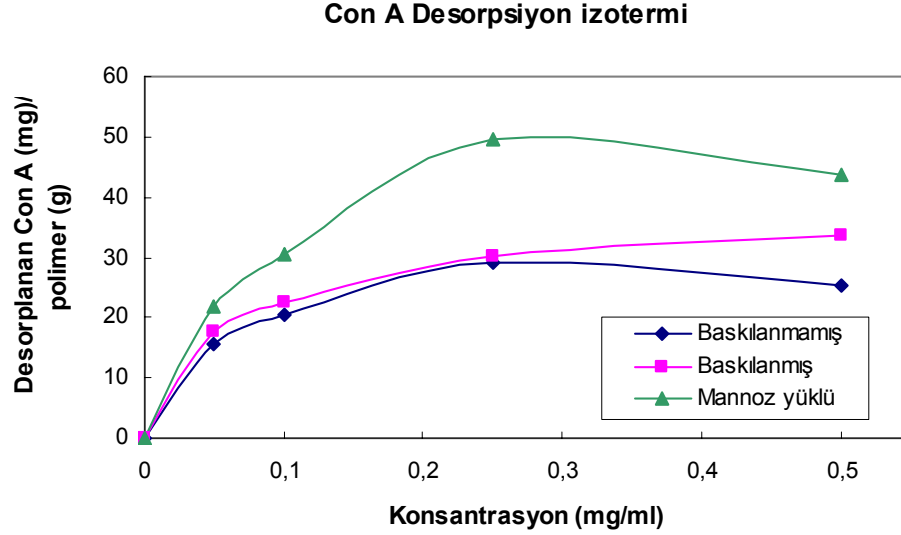
	Baskılanmamış	Baskılanmış	Mannoz Yüklü
K_D ($\mu\text{mol/L}$)	0,20	0,29	0,52
B_{max} ($\mu\text{mol/g}$)	0,39	0,48	0,66
R^2	0,97	0,95	0,96

Con A adsorpsiyonu ile ilgili Pai ve arkadaşları tarafından 1993 yılında yapılan çalışmada Con A-glukoz çifti için K_D değeri $1 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$ olarak tespit edilmiştir (Gümüşderelioğlu, 2004). Yapılan çalışmada elde edilen K_D değeri bu değerden daha yüksektir. Bu sonuç Con-A moleküler baskılama sistemi arasındaki afinite etkileşimlerin Con A-glukoz çifti arasındaki etkileşimlerden daha güçlü olduğunu göstermektedir.

Con A Desorpsiyon çalışması

Tez çalışmasında Con A adsorpsiyonunda kullanılan örneklerden, Con A'nın desorpsiyonu için "karşı ligand" olarak α -D-metil manno piranosid kullanılmıştır. Desorpsiyon işlemi yaklaşık olarak 2 saat sürmüştür. Desorplanan Con A miktarı, çözeltide bulunan Con A miktarının kuru membran kütlelerine oranı olarak ifade edilmiş ve Şekil 4.8'de başlangıç konsantrasyonuna karşı grafiğe alınmıştır. Grafikler incelendiğinde baskılanmamış, baskılanmış ve mannoz yüklü örneklerdeki desorpsiyon davranışı birbirine benzemektedir ancak baskılanmamış ve baskılanmış

örneklerin desorpsiyon miktarları neredeyse birbirinin aynısı iken mannoz yüklü örnekte bu değer diğerlerinden oldukça yüksektir. Ayrıca elde edilen grafik ile Çizelge 4.9 beraber değerlendirildiğinde özellikle mannoz yüklü örnekte hem desorplanan Con A miktarının hem de desorpsiyon veriminin daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 4.8 P-1 bileşimi için Con A desorpsiyon eğrisi

Çizelge 4.9 Desorpsiyon verim değerleri

% Desorpsiyon			
Konsantrasyon (mg/ml)	Baskılanmamış	Baskılanmış	Mannoz yüklü
0,05	57,6	62,3	73,4
0,1	64,0	63,0	66,7
0,25	77,3	68,1	87,3
0,5	83,5	85,7	88,7

Tüm bu adsorpsiyon-desorpsiyon davranışları değerlendirildiğinde, moleküler olarak mannoz baskılanmış sistemlerin Con A saflaştırılması için uygun sistemler olduğu görülmektedir.

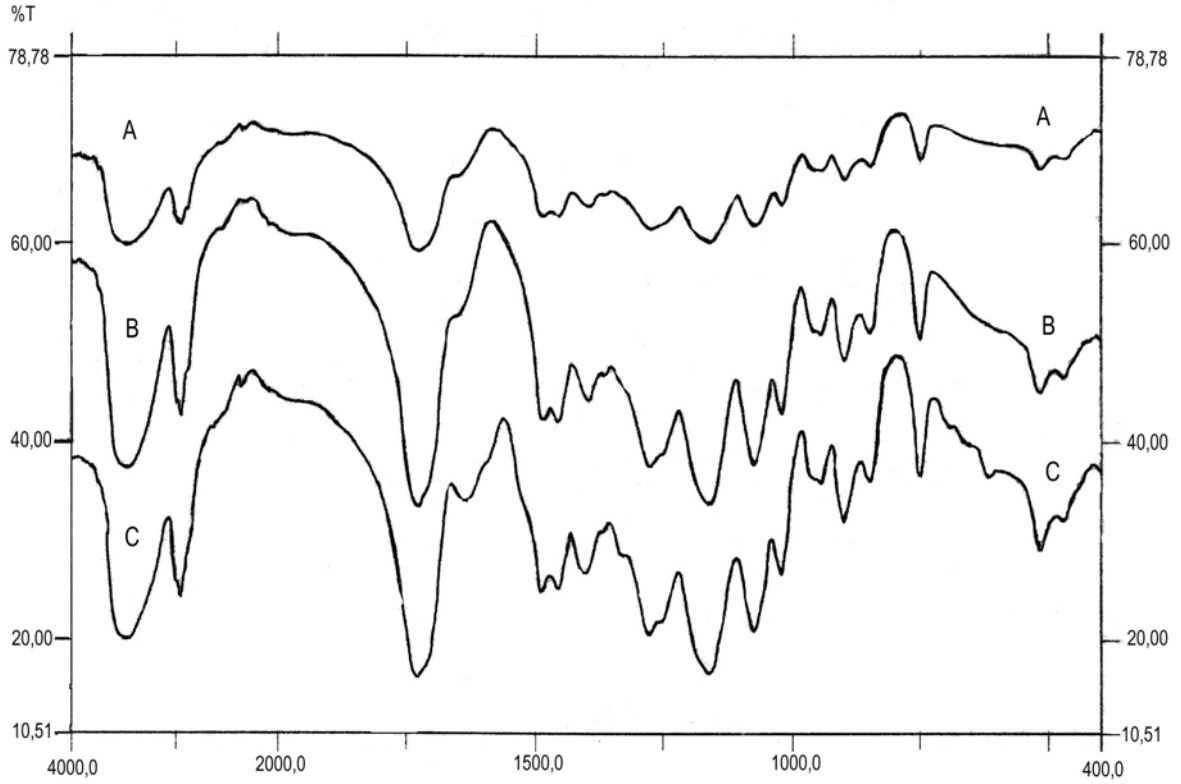
4.3.2. Amino asit ve RGD baskılanmış örneklerin karakterizasyonu ve hayvansal hücre kültürlerinde kullanımı

Bu kısımda, glisin, arjinin ve RGD baskılanmış örneklerin karakterizasyon çalışmaları sonucu elde edilen sonuçlar tartışılmış ve hayvansal hücre kültürü çalışmalarında elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Sonuçlar ve tartışmalar, aşağıda sunulmuştur.

4.3.2.1. FTIR analizi sonuçları

FTIR çalışmasında, H 4 örneği için baskılanmamış, baskılanmış kalıp molekül (glisin) uzaklaştırılmış ve baskılanmış kalıp molekül uzaklaştırılmamış örnekler için spektrumlar alınmıştır. Şekil 4.9'da bu örnekler için spektrum verilmiştir. Çizelge 4.10'da ise, bu spektrumlar değerlendirilmiştir.

Bileşim 4 için elde edilen spektrumlar değerlendirildiğinde, glisin baskılanmış örneğin ekstraksiyon işlemi öncesi spektrumunda 1600 cm^{-1} civarında $-\text{NH}_2$ eğilmesi görülmektedir. Ancak baskılanmamış ve ekstraksiyon sonrası örnekler için spektrumlar incelendiğinde bu eğilme görülmemektedir. Bu durum, amino asidin polimerizasyon sırasında yapı içinde bulunduğu bir kanıttır. Ayrıca, 1540 cm^{-1} civarındaki $-\text{NH}$ gerilmesi ile 1325 cm^{-1} civarındaki $-\text{CH}$ gerilmeleri, fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasındaki non-kovalent etkileşimlere dayanan hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır ve moleküler baskılamanın varlığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.9 H-4 bileşimi için baskılanmamış (A), Gly baskılanmış ekstraksiyon sonrası (B) ve Gly baskılanmış ekstraksiyon öncesi (C) polimerlerin FTIR spektrumları

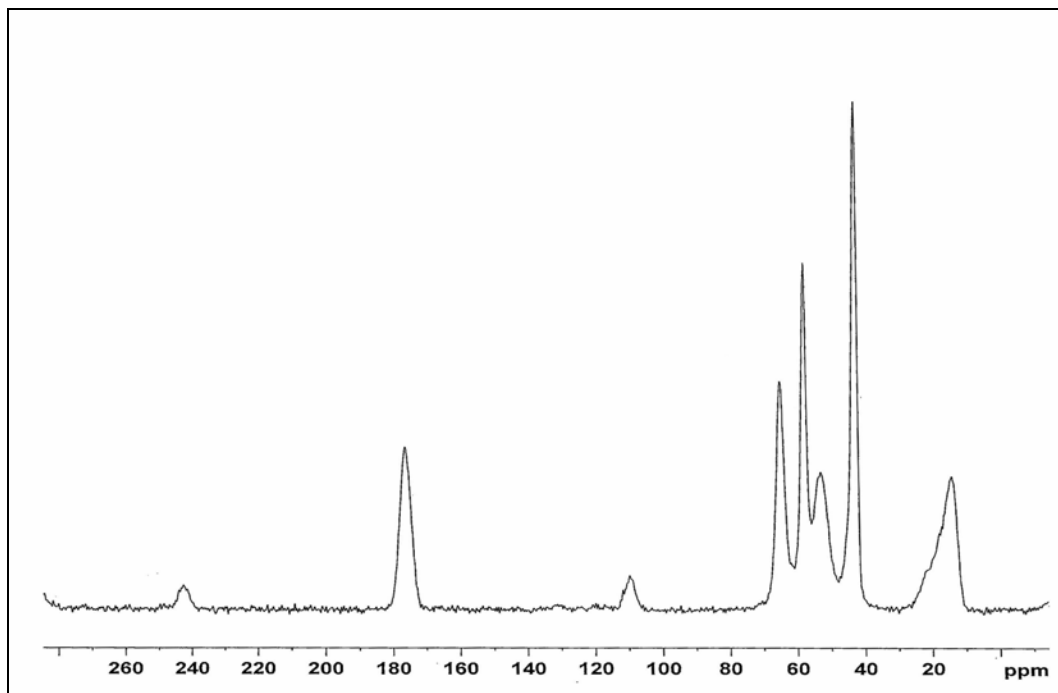
Çizelge 4.10 Glisin baskılanmış 4 numaralı bileşim için FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi

Dalga sayısı (cm ⁻¹)	Titreşim türü
1600	-NH ₂ eğilmesi
1540	-NH eğilmesi
1325	-CH eğilmesi

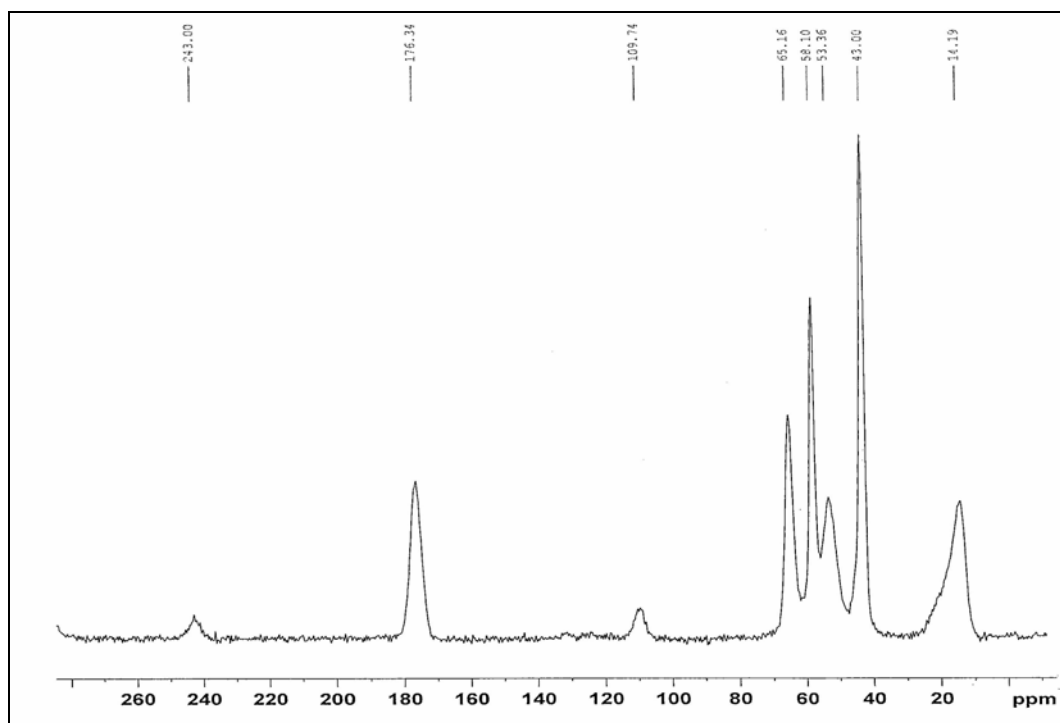
4.3.2.2. ¹³C NMR analizi sonuçları

NMR analizi moleküler baskılamanın başarısının tespitinde en etkili yöntemlerden biridir. Polimerin yapısında hidrojen bağı olduğunda, hidrojen bağındaki protonların elektron yoğunluğu artar. Buna bağlı olarak bu protonun ¹H NMR sinyali daha düşük manyetik alana doğru kayar. Ayrıca ligand değişimi oranı da sinyalin genişliğindeki değişimden tespit edilebilir. ¹H NMR sıvı örneklerde çok faydalı sonuçlar vermesine karşılık, katı örneklerde elde edilen bantlar çok geniş olduğundan bilgi verici sonuçların elde edilmesi güçtür. Bu durumda ¹³C, ¹³P ve ²⁹Si NMR uygulanabilir (Komiya ve arkadaşları, 2003).

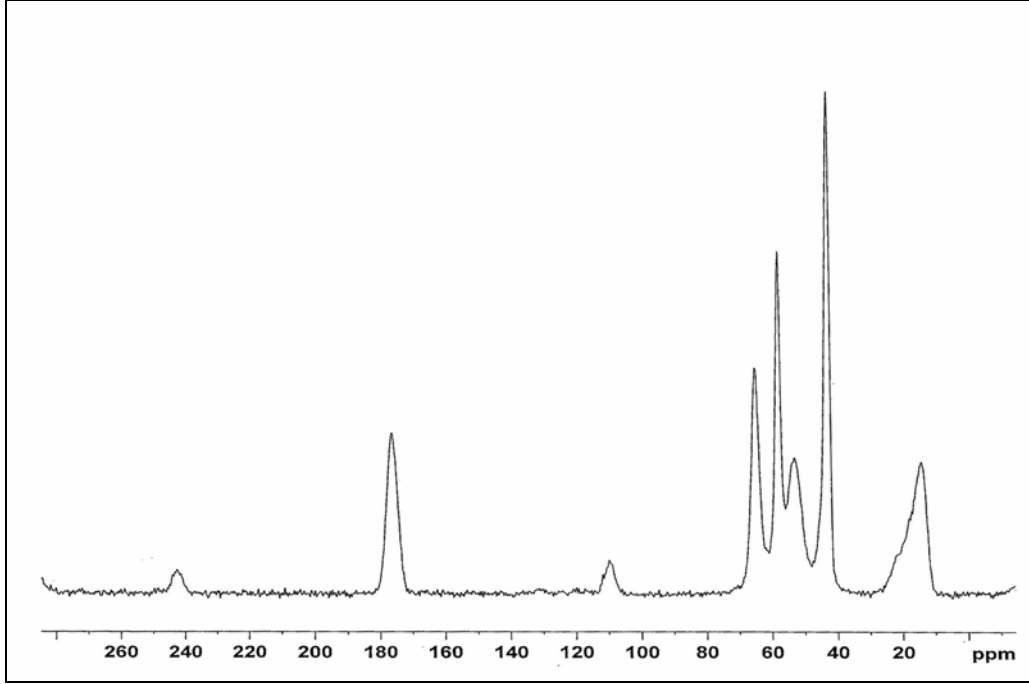
Şekil 4.10'da H4 örneğine ait baskılanmamış (a), Arjinin baskılanmış (b), baskılanmış arjinin kalıp molekülü uzaklaştırılmamış (c) ve saf arjinin (d) için ¹³C NMR analizi sonuçları verilmiştir. Baskılanmış örneğe ait ¹³C NMR spektrumu literatürde bulunan HEMA/MAA kopolimerine ait spektrum ile aynıdır. Sonuçlar incelendiğinde D-mannoz baskılanmış örneklerde olduğu gibi örnekler arasında dikkat çekici bir değişiklik gözlenememiştir. Bu durum kalıp molekül ve polimer yapının sahip olduğu benzer yapıdan kaynaklanmaktadır.



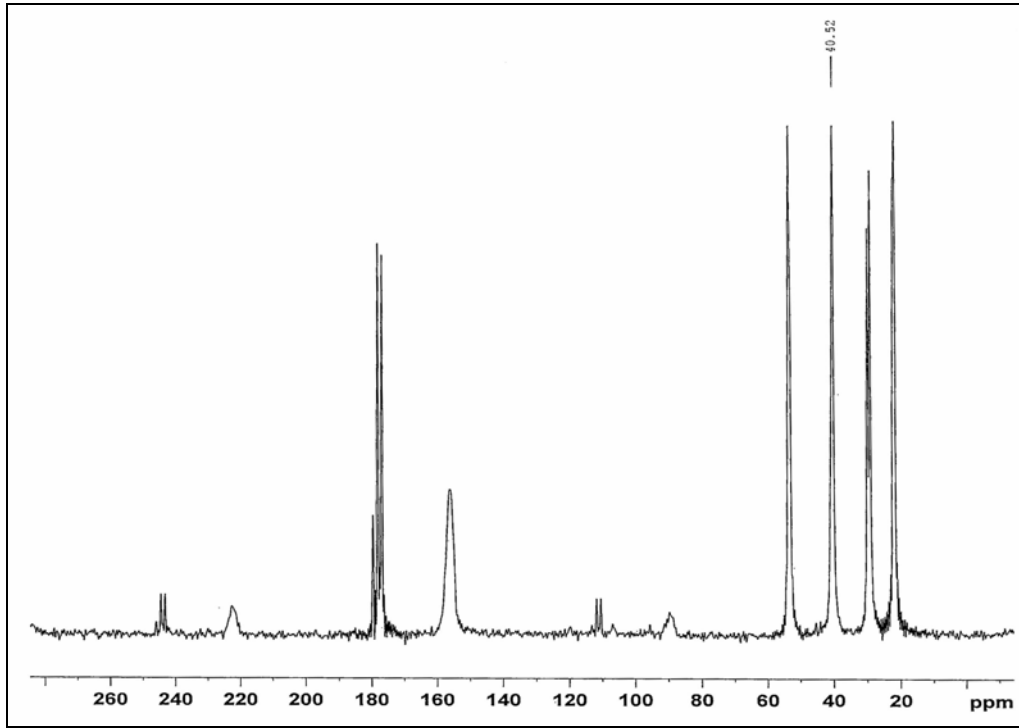
a)



b)



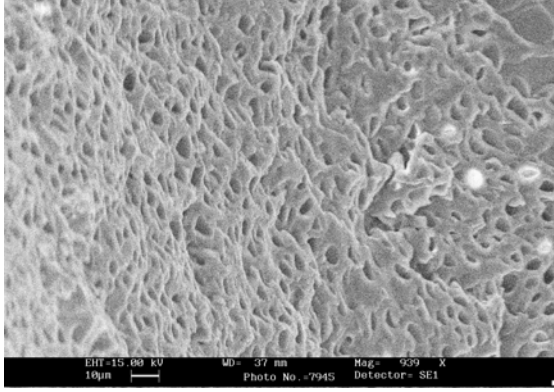
c)



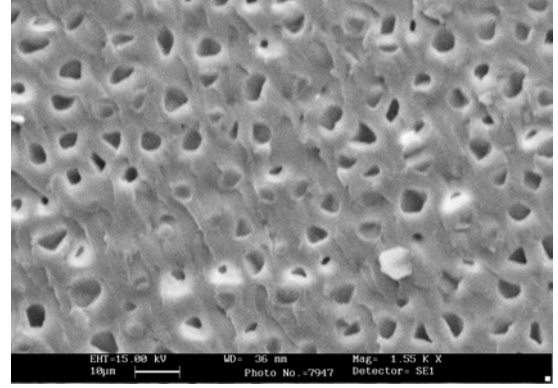
d)

Şekil 4.10 H-4 bileşimine ait baskılanmamış (a), Arjinin baskılanmış (b), baskılanmış Arjinin kalıp molekülü uzaklaştırılmamış (c) ve saf arjinin (d) için ¹³C NMR analizi sonuçları

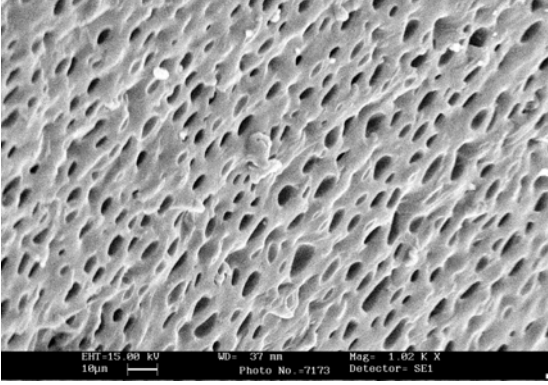
4.3.2.3. SEM analizi sonuçları



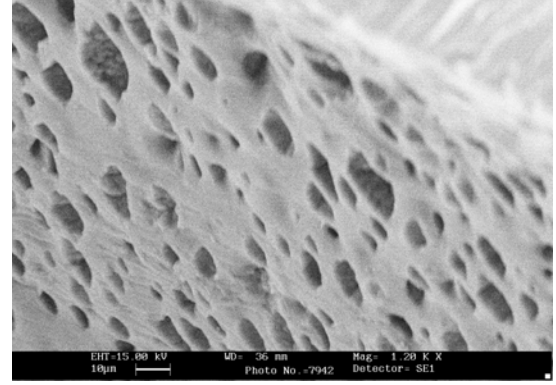
a)



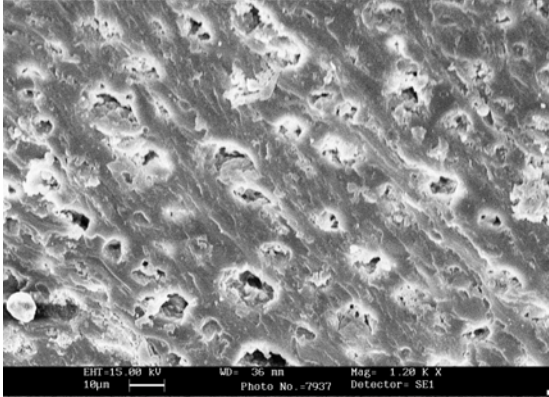
b)



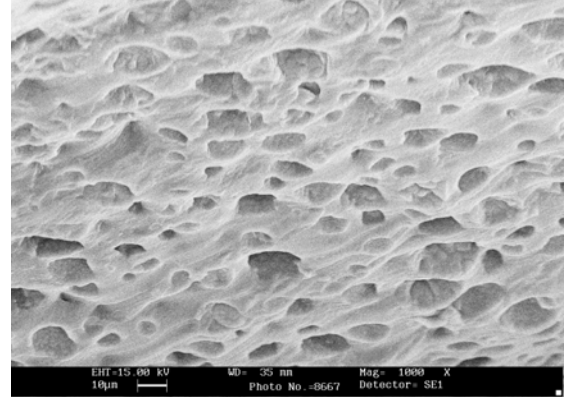
c)



d)

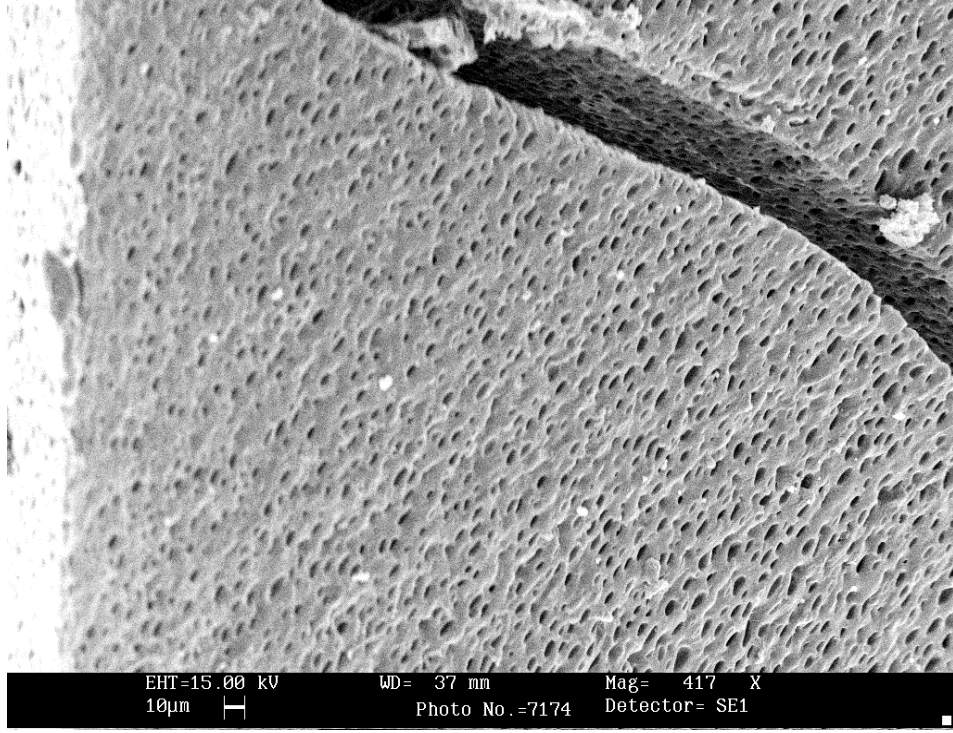


e)

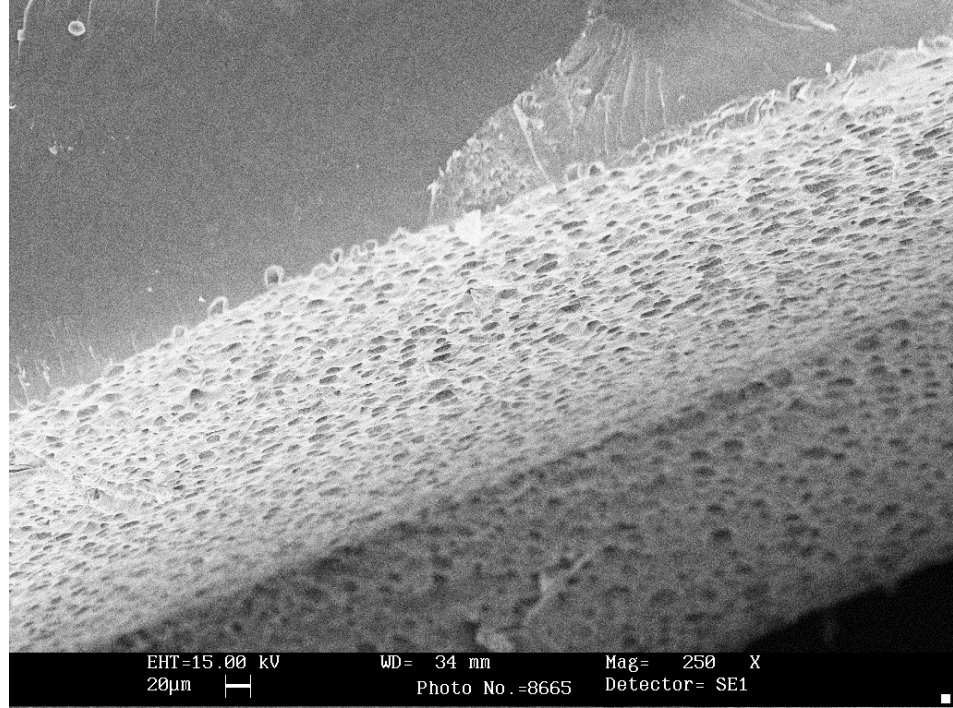


f)

Şekil.4.11 H-1 için (a) baskılanmamış, (b) Gly baskılanmış (ekstraksiyon öncesi), (c) Gly baskılanmış (ekstraksiyon sonrası), (d) H-4 için baskılanmamış, (e) Arg baskılanmış (ekstraksiyon öncesi) ve (f) Arg baskılanmış (ekstraksiyon sonrası) örneklere ait SEM görüntüleri



a)



b)

Şekil 4.12 (a) Gly baskılanmış H-1 bileşimi ve (b) Arg baskılanmış H-4 bileşimine ait kesitlerden alınmış SEM görüntüleri

Şekil.4.11'de gösterilen 1 ve 4 numaralı bileşime ait (H1 ve H4) SEM görüntüleri incelendiğinde moleküler baskılama işlemi sonrasında, baskılanmamış örneklere kıyasla standart boyutta ve homojen dağılımda boşluklar elde edildiği görülmektedir (Şekil.4.11c ve f). Şekil.4.11b ve 4.11c, Şekil 4.11e ve 4.11f karşılaştırıldığında yapılan ekstraksiyon işlemi ile yapıda bulunan kalıp molekülün uzaklaştığı, ekstraksiyon sonrasında oluşan boşlukların sayısının daha fazla olması, daha homojen dağılması ve hemen hemen sabit boyutta olduğu ile ortaya konmuştur. Şekil 4.12 a ve b'de H-1 ve H-4 bileşimindeki örneklerin kesit görüntüleri incelendiğinde gözeneklerin hidrojel yapının içinde homojen bir şekilde dağıldığı görülmektedir.

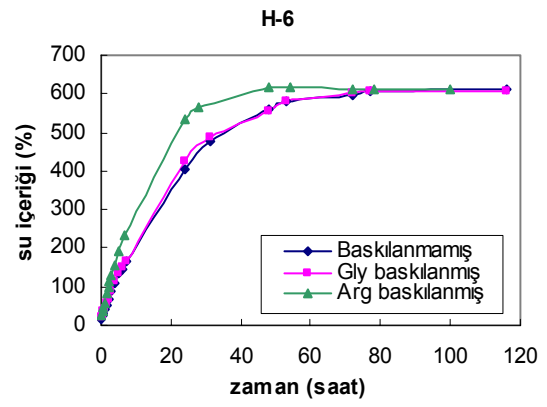
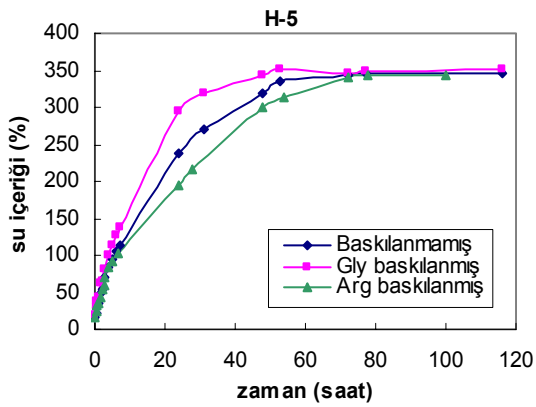
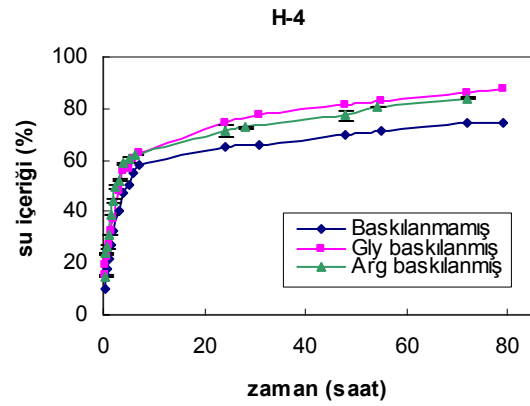
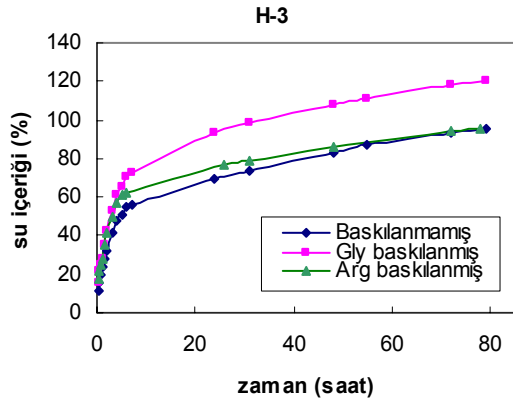
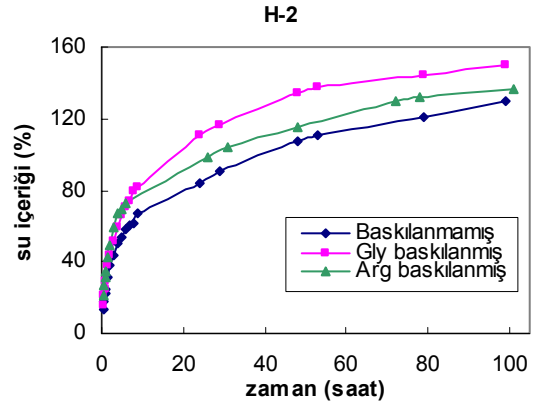
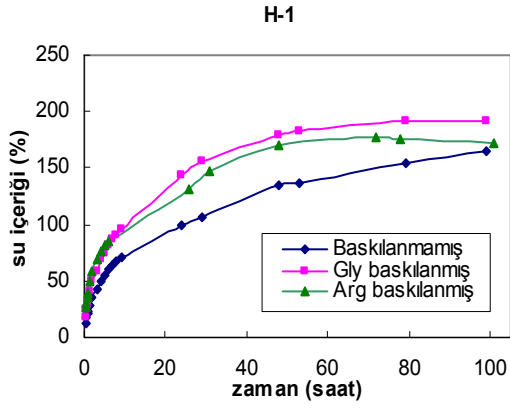
4.3.2.4. Şişme kinetiği sonuçları

Tüm bileşimlere ait, baskılanmamış, glisin ve arjinin baskılanmış örnekler için 37°C'de ve fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında gerçekleştirilen dinamik şişme deneylerine ait denge su içeriği (EWC %) değerleri Çizelge 4.11'de verilmiştir. Şekil.4.13'deki grafiklerde ise tüm bileşimlerin baskılanmış ve glisin/arjinin baskılanmış formlarının şişme kinetikleri karşılaştırılmıştır. Grafikler ve çizelge incelendiğinde, artan çapraz bağlayıcı, EGDMA, içeriğiyle şişme değerlerinde azalma olduğu gözlenmiştir. Tüm örnekler içinde en düşük şişme değerleri H-4 no'lu bileşimde elde edilmiş ve artan çapraz bağlayıcı oranıyla birlikte denge şişme değerlerinde azalma gözlenmiştir. Bu durum yüksek çapraz bağlayıcı içeriğinin bir sonucudur ve hidrojelik yapılar için beklenen bir sonuçtur. Bileşim H-4 için baskılanmış ve baskılanmamış örneklerin sonuçları incelendiğinde, baskılamanın şişme değerlerini az da olsa arttırdığı gözlenmektedir. Bu durum moleküler baskılama işleminin yarattığı morfolojik değişimlerin ve gözenek oluşumunun bir sonucudur.

Çizelge 4.11 Çalışma kapsamında sentezlenen hidrojellerin 37°C ve pH=7.4 PBS çözeltisindeki denge şişme değerleri

Denge Su İçeriği (%)			
Bileşim	Baskılanmamış Polimer	Glisin Baskılanmış	Arjinin Baskılanmış
H-1	165 ± 0.0	192 ± 8.1	171 ± 4.5
H-2	129 ± 2.5	150 ± 3.7	135 ± 1.2
H-3	95 ± 2.6	120 ± 1.0	109 ± 0.1
H-4	75 ± 1.1	88 ± 0.1	92 ± 0.7
H-5	346 ± 2.7	351 ± 6.3	338 ± 7.2
H-6	609 ± 4.7	608 ± 4.1	604 ± 2.2

Çizelge 4.11 incelendiğinde ayrıca en yüksek denge su içeriğine sahip olan örneğin H-6 numaralı örnek olduğu ve artan MAA oranıyla denge su içeriğinde artış olduğu görülmektedir. Bu durum, MAA artışı ile artan iyonlaşma kapasitesinin ve H-6 numaralı örneğin en yüksek MAA içeriğine sahip bileşim olmasının sonucudur. Ancak bileşim H-6 için baskılanmış ve baskılanmamış örnekler incelendiğinde baskılamanın önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Bu durum MAA'in pH 5.5'in üzerinde iyonlaşması nedeniyle, pH 7.4'te gerçekleştirilen şişme deneylerinde iyonlaşmanın etkisinin baskılamanın etkisinden daha baskın olmasıyla açıklanabilir. Bu durum literatürde daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir (Alvarez-Lorenzo ve arkadaşları, 2002).



Şekil 4.13 Tüm bileşimler için baskılanmamış ve Arg/Gly baskılanmış hidrojenlerin karşılaştırmalı şişme kinetiği

4.3.2.5. Elementel analiz sonuçları

Amino asit ve RGD tripeptid molekülü baskılanmış örneklerde, monomerlerin ve çapraz bağlayıcının kimyasal yapısı göz önüne alındığında kalıp molekül örneklerdeki tek azot kaynağıdır. Kalıp molekülün polimerik yapıya katılması moleküler baskılama için önemli bir parametredir. Ayrıca kalıp uzaklaştırılması moleküler baskılama işleminde son basamaktır ve baskılamanın başarısı için kalıp yapıdan tümüyle uzaklaştırılmalıdır.

Ekstraksiyon süresinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, RGD baskılanmış 1 numaralı bileşime ait, 1 hafta ve 2 hafta yıkanmış örneklerin elementel analiz sonuçları karşılaştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.12'de verilmiştir. Çizelgede de görüleceği gibi, ilk hafta sonunda azot yüzdesinde azalma görülmesine rağmen ancak ikinci haftanın sonunda ihmal edilebilecek bir yüzde değerine ulaşılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda ekstraksiyon işlemlerinin 2 hafta sürdürülmesine karar verilmiş ve diğer tüm çalışmalar 2 hafta yıkanmış örneklerle gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.12 Ekstraksiyon süresinin etkisinin elementel analiz (C, H, N) ile incelenmesi

Örnek (RGD baskılanmış 1 no'lu bileşim)	% C	% H	% O	% N
Ekstraksiyon öncesi	52.56	7.35	39.88	0.19
1. Hafta	53.26	6.88	39.78	0.08
2. Hafta	50.99	6.47	42.52	0.02

* Çizelgedeki değerler atomik yüzdelerdir. Oksijen yüzdesi hesaplanarak bulunmuştur.

Çizelge 4.13 Elementel Analiz sonuçları

Örnek		% C	% H	% O	% N	
Bileşim 1	Baskılanmamış		52.91	3.12	43.94	0.028
	Gly Baskılanmış	Ekstraksiyon öncesi	52.44	7.11	40.42	0.47
		Ekstraksiyon sonrası	52.68	6.83	40.47	0.020
	Arg Baskılanmış	Ekstraksiyon öncesi	51.67	9.39	38.18	0.76
		Ekstraksiyon sonrası	----	----	----	----
	RGD Baskılanmış	Ekstraksiyon öncesi	52.56	7.35	39.88	0.190
		Ekstraksiyon sonrası	50.99	6.47	42.52	0.020
Bileşim 4	Baskılanmamış		52.54	5.73	41.69	0.031
	Gly Baskılanmış	Ekstraksiyon öncesi	52.46	7.67	39.49	0.38
		Ekstraksiyon sonrası	52.86	5.93	41.19	0.020
	Arg Baskılanmış	Ekstraksiyon öncesi	51.09	8.6	39.52	0.79
		Ekstraksiyon sonrası	51.47	8.17	40.24	0.012
	RGD Baskılanmış	Ekstraksiyon öncesi	52.76	9.42	37.50	0.32
		Ekstraksiyon sonrası	53.30	6.25	40.43	0.016
Bileşim 6	Baskılanmamış		52,81	6.48	40.69	0.021
	Gly Baskılanmış	Ekstraksiyon öncesi	51,64	7.86	40.05	0.45
		Ekstraksiyon sonrası	52,44	7.11	40.42	0.025
	Arg Baskılanmış	Ekstraksiyon öncesi	51.86	8.06	39.29	0.79
		Ekstraksiyon sonrası	----	----	----	----
	RGD Baskılanmış	Ekstraksiyon öncesi	52.85	6.62	40.19	0.340
		Ekstraksiyon sonrası	51.98	6.01	41.99	0.021

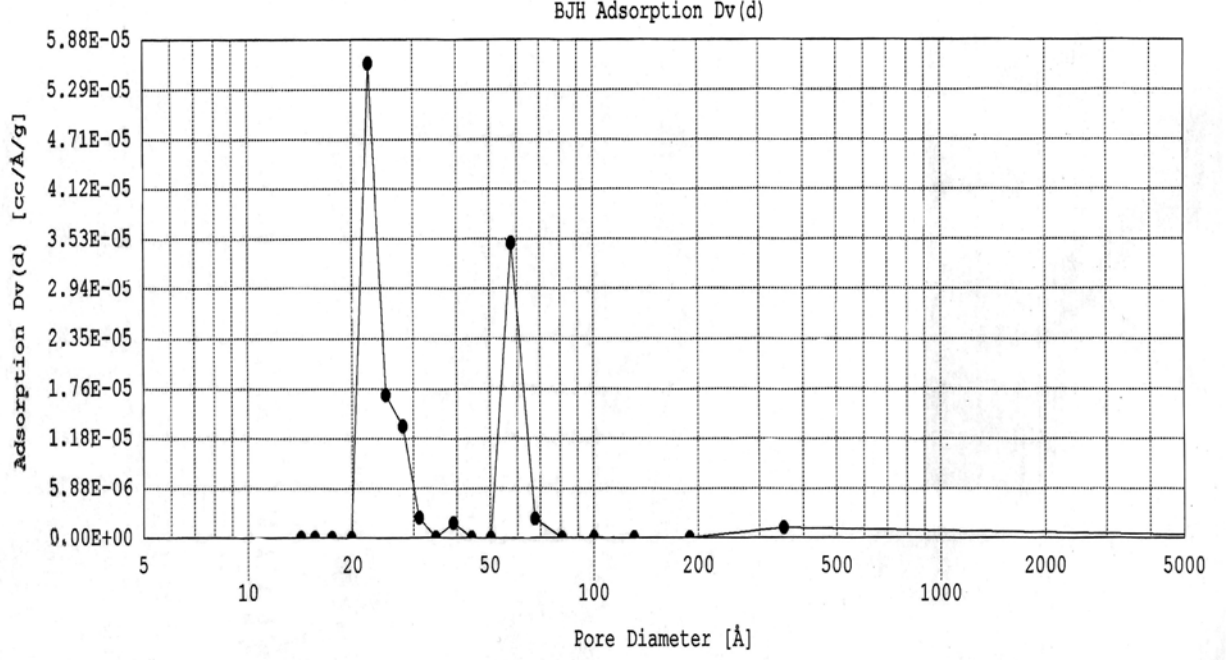
Çizelge 4.13 H-1, H-4 ve H-6 numaralı bileşimler için elementel analiz sonuçlarını göstermektedir. Çizelge 4.13'den de görüldüğü gibi, ekstraksiyon öncesine ait azot değerleri baskılanmamış polimerden yüksektir. Bu durum kalıp molekülün yapıya katıldığını göstermektedir. Ekstraksiyon öncesi ve sonrası azot değerleri karşılaştırıldığında, ekstraksiyon sonrasında yapıda bulunan azot miktarının çok düşük olduğu görülmektedir. Bu durum yapıdan kalıp molekül uzaklaştırılması işleminin başarıyla sonuçlandığını göstermektedir. Baskılanmamış örneklerde görülen çok düşük azot içeriği, havadan gelen azotun sonucu olabilir ve baskılanmamış örneklerde tespit edilen bu değer sıfır kabul edilmiştir.

4.3.2.6. Gözenek boyutu analizi sonuçları

Yapılan çalışmalarda, en yüksek çapraz bağlayıcı içeriğine sahip olan 4 numaralı bileşim seçilerek tüm çalışmalar bu bileşimle gerçekleştirilmiştir. Gözenek boyutu analizi çalışmaları öncelikle BET analizi ile başlatılmış daha sonra örnekler için daha uygun olduğuna karar verilen civalı porozimetre ile devam edilmiştir.

BET analizi öncesinde örnekler 140°C'de 2.5 saat degas işlemi uygulanarak polimerik yapı içinde bulunabilecek reaksiyona girmemiş monomer, su ve benzeri moleküllerin yapıdan uzaklaştırılmış ve gözeneklerin tümüyle açılması sağlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen izoterm incelendiğinde, yapıda makro ve mezo gözeneklerin bulunduğu anlaşılmaktadır. Elde edilen BJH adsorpsiyon verileri de mezo gözenek varlığını desteklemektedir. BJH adsorpsiyon verileri Şekil 4.14'de verilmiştir.

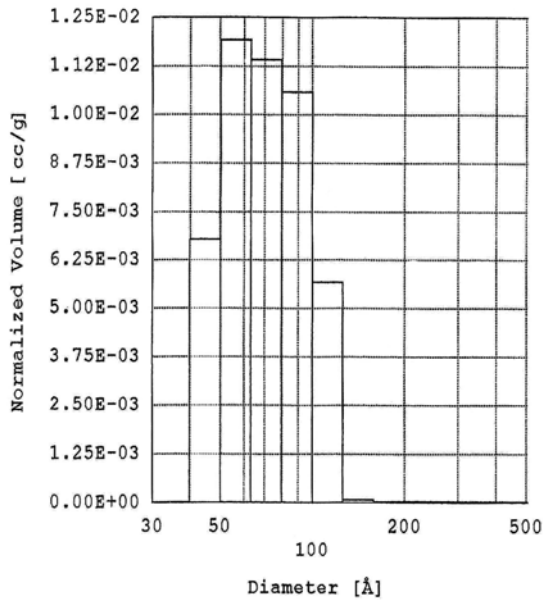
BET ile gerçekleştirilen analizler sonucunda, BJH adsorpsiyon verilerinden de anlaşıldığı gibi makro ve mezo gözeneklerin yapıda baskın olduğu görüldüğünden analizlerin makro ve mezo gözenekleri ölçmede daha uygun olan civalı porozimetre ile devamına karar verilmiştir.



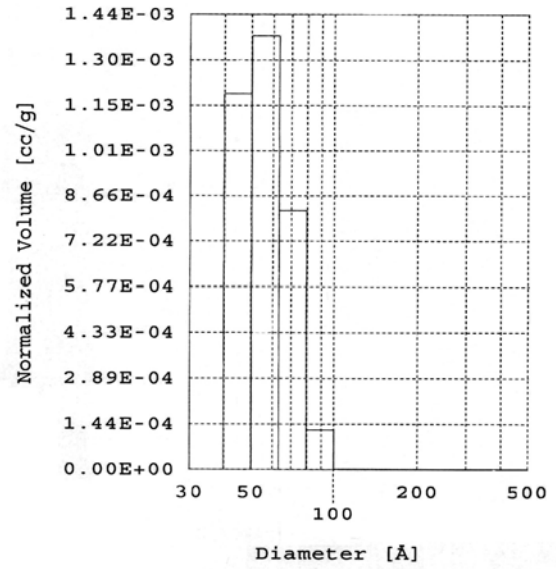
Şekil 4.14 H-4 bileşimine ait BJH Adsorpsiyon grafiği

Civalı porozimetreler, tepkimeye girmeyen, ıslatımsız bir sıvının yeterli basınç uygulanmadıkça küçük gözeneklere giremeyeceği fiziksel prensibine göre çalışmaktadırlar. Uygulanan basınç ile gözenek çapı arasında ilişkiden yararlanılarak gözenek çapı tespiti yapılmaktadır.

Civalı porozimetre ile gerçekleştirilen analizler sonucu elde edilen gözenek boyutu histogramları Şekil 4.15 de ve 4.16'da verilmiştir. H-4 bileşimi için, BJH adsorpsiyon grafiği (Şekil 4.14) ve civalı porozimetre ile elde edilen histogramlar beraber incelendiğinde, BET analizi sonuçlarının civalı porozimetre ile elde edilen sonuçları desteklediği ve her ikisinde de mezo gözenek varlığını işaret ettiği görülmektedir.

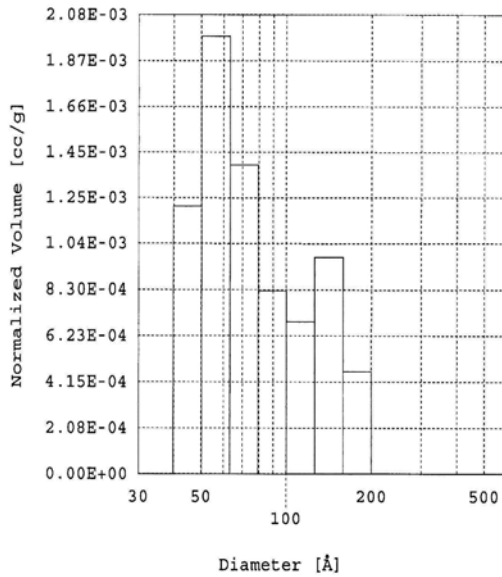


a)

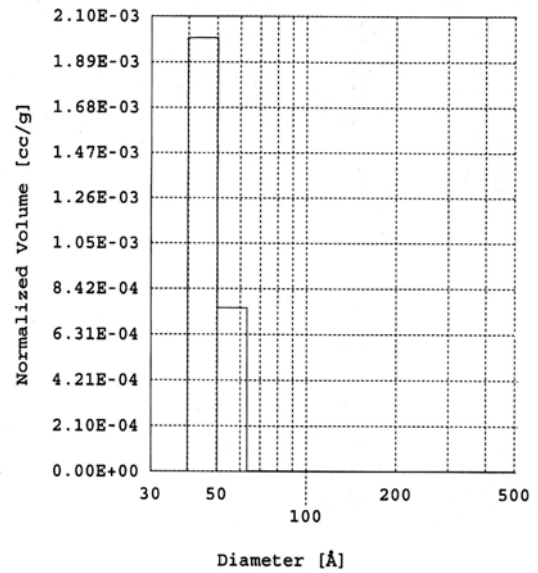


b)

Şekil 4.15 H-4 bileşimi için baskılanmamış (a) ve Gly baskılanmış (b) örneklere ait civalı porozimetre histogramları



a)



b)

Şekil 4.16 Gly baskılanmış H-1 (a) ve H-6 (b) bileşimlerine ait civalı porozimetre histogramları

Civalı porozimetre ile gerçekleştirilen analizler sonucu elde edilen gözenek dağılımları yüzde olarak Çizelge 4.14'de verilmiştir. H-4 bileşimine ait baskılanmış ve baskılanmamış örneklerin gözenek dağılımları incelendiğinde, baskılama işleminin gözeneklerin genel yapısını çok fazla etkilemediği ancak gözenek dağılımını çok az kısıtladığı görülmektedir.

Çizelge 4.14 Örneklerin civalı porozimetre ile elde edilen gözenek dağılımları (%)

	40-50A°	50-60A°	60-80A°	80-100A°	100-150A°	150-200A°
H-4	14.5	25.6	24.4	22.9	12.3	----
H-1*	15.9	26.4	18.4	11.1	21.	6.0
H-4*	32.4	37.	22.0	8.1	----	----
H-6*	72.1	27.1	----	----	----	----

* Gly Baskılanmış örnekler

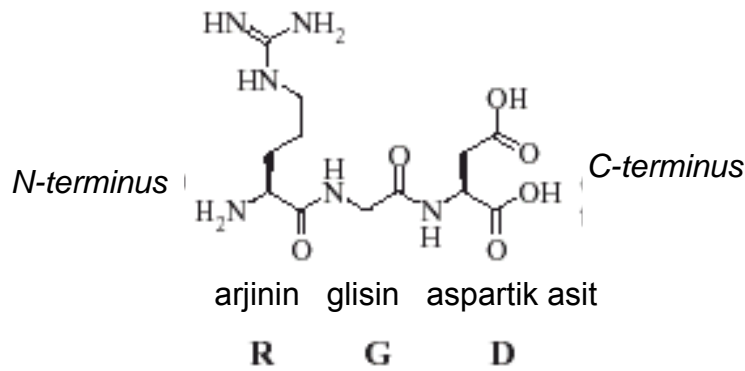
H-1, H-4 ve H-6 bileşimlerine ait baskılanmış örneklerin gözenek dağılımları incelendiğinde H-4 örneğinde artan çapraz bağlayıcı içeriğiyle birlikte gözenek dağılımı aralığında daralma gözlenmektedir. Bu durum, yüksek çapraz bağ yoğunluğunun bir sonucudur ve beklendiği gibidir. H-6'nın en homojen gözenek boyutuna sahip örnek olduğu gözlenmektedir. Bu durum en yüksek MAA miktarının bileşime olan etkisinin sonucudur.

4.3.2.7. Hücre kültürü çalışmaları

Sunulan çalışmada, tek tabaka kültürde üreyebilme özelliğine sahip, L-929 olarak kodlanan fare deri fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin belirlenen kültür ortamı koşullarında (Bölüm 3.3.2.1.), hazırlanan yüzeylerde üretilmiştir.

RGD Sekansı ve İntegrinler Aracılığı İle Gerçekleşen Hücre Yapışması

Hücre yapışmasını destekleyen kısa peptid zincirleri arasında, fibronektinin Arjinin-Glisin-Aspartik asit (Arg-Gly-Asp, RGD) sekansı, biyomalzemelerin fonksiyonel hale getirilmesinde en çok uygulanan ve en etkili peptid sekansıdır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 RGD peptid sekansının moleküler formülü ve isimlendirmesi.

Birden fazla hücre reseptörü ile etkileşebilmesi ve hücre davranışı üzerindeki biyolojik etkileri sebebiyle RGD sekansı ya da bu sekansı içeren peptid zincirlerinin kullanımı tercih edilmektedir. Çizelge 4.15'de çeşitli hücre yapışma çalışmalarında kullanılan farklı hücre türleri ve RGD sekansını içeren peptid zincirleri ile modifiye edilmiş biyomalzemelere örnekler verilmiştir.

Çok hücreli organizmalarda, hücrelerin komşu hücrelerle ve hücre dışı matriksle olan etkileşimi hücre yapışma reseptörleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu reseptörler arasında integrin ailesi sayıca en fazla ve en sık rastlanan grubu oluşturmaktadır.

Hücre farklılaşması, embriyogenez, yara iyileşmesi ve hemostaz gibi proseslerde önemli rol oynayan reseptörlerdir.

İntegrinler, α ve β olarak isimlendirilen iki transmembran altünitenin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Bugüne kadar saptanmış olan 18 α ve 8 β alt ünitesi bulunmakta ve bunlar 24 farklı dimer yapısı oluşturmaktadır. α ve β alt ünitelerinin kombinasyonu integrinin ligandlara olan eğilimini belirlemektedir.

Çizelge 4.15 RGD ile modifiye edilen polimer yapıdaki biyomalzemeler ve kullanılan hücre tipleri.

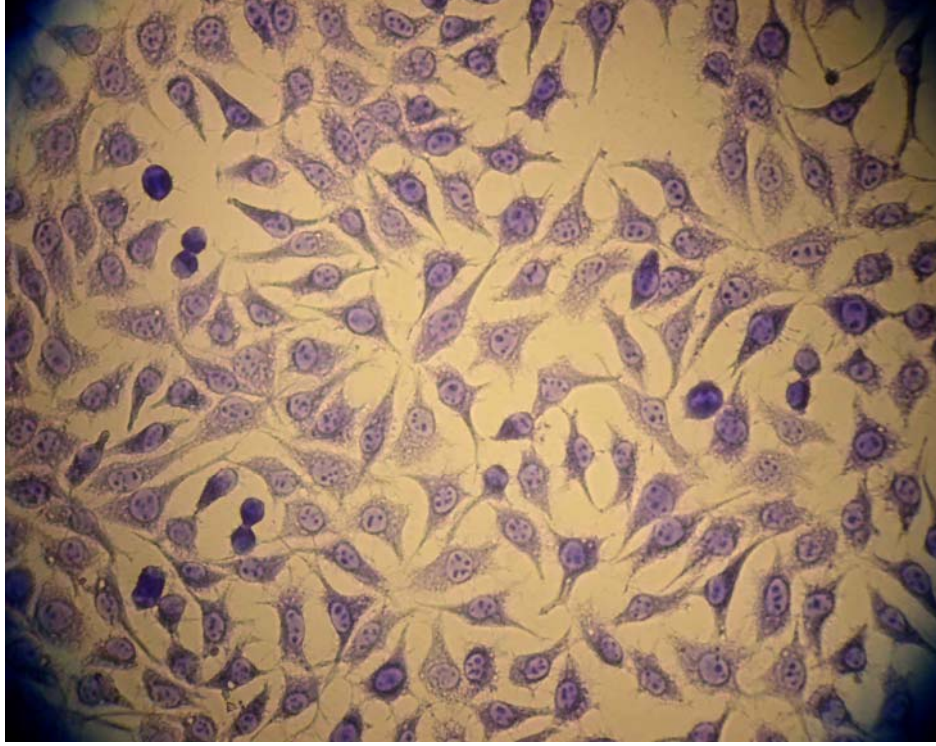
Peptid sekansı	Polimer	Hücre Tipi
RGD	PLLA kopolimeri	Fibroblast
	PCL	Hepatosit AML12
	PET	Deri fibroblast
RGDS	PEA	HeLa, CHO
	PVA	Damar endotel, fibroblast
	PET	Karsinoma
GRGD	PU	Endotel
	PHEMA	Fibroblast
GRGDS	PLA, PLGA	Endotel
	PLA/PLL	Aortik endotel
GRGDVY	PU	Endotel
CGRGDSY	PEG/PPO/PEG	Fibroblast

RGD peptidi, bir yüzey üzerine immobilize edildiğinde ligand görevi görerek fibronektine benzer şekilde hücre yapışmasını desteklerken, çözülmüş olarak ortamda bulunduğu hücre yapışmasını inhibe etmektedir. RGD sekansının,

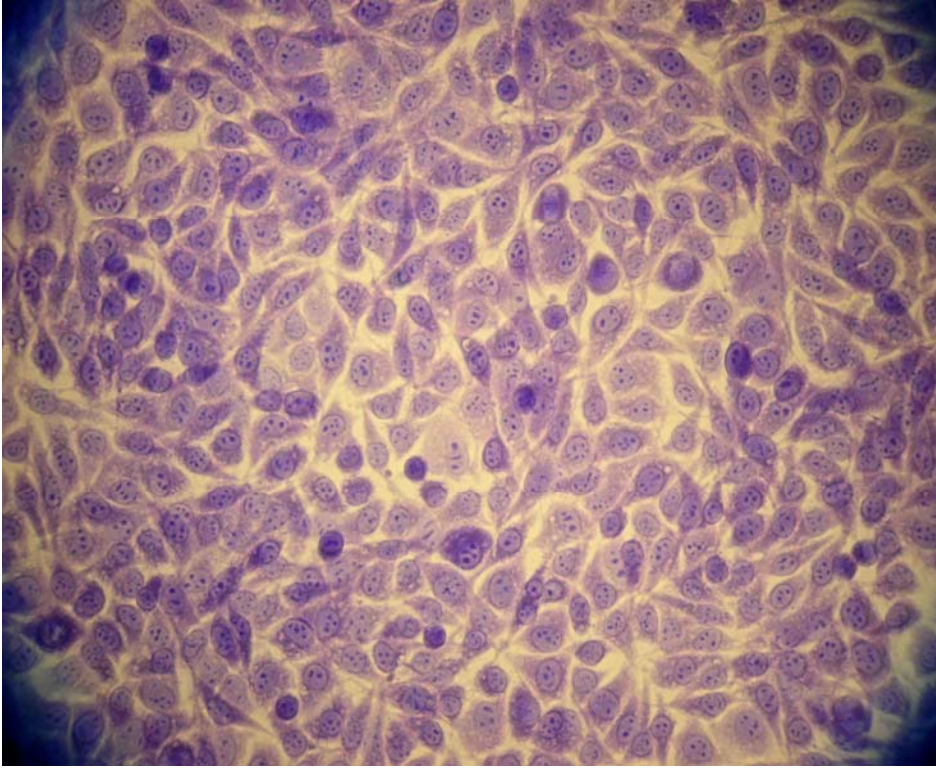
fibronektinin dışında, vitronektin, fibrinojen, osteopontin, laminin gibi ECM proteinlerinin yapısında da olduğu tespit edilmiştir. 24 integrinden yaklaşık yarısı kadarının RGD molekülüne bağlandığı bulunmuştur.

İntegrinler aracılığı ile hücre yapışması birbirini takip eden dört basamakta gerçekleşmektedir. Bunlar sırasıyla; hücrenin yüzeye tutunması, hücrenin yüzey üzerinde yayılması, hücre iskeletinin organizasyonu ve fokal yapışmanın oluşmasıdır. Öncelikle, hücrenin yüzeye tutunma basamağında, hücre yüzeye teması geçmekte ve hücrenin hafif kayma gerilimlerine direnç göstermesini sağlayacak olan ligand bağlanması gerçekleşmektedir. İkinci aşamada, hücrenin plazma membranı yüzey üzerinde yayılır ve hücre yassı bir görünüm alır. Bu durumda hücrenin uzunlamasına boyutu, yüksekliğinin 3-10 katı arasındadır. Hücrenin yüzey üzerinde yayılmasını tamamlamasıyla, üçüncü aşamada aktin organizasyonu gerçekleşir ve hücrenin yüzeye yapışmasını sağlayan lif demetleri oluşur. Son basamakta, hücre iskeletinin hücre dışı matriks proteinlere bağlandığı fokal yapışma gerçekleşir. Dört basamakta gerçekleşen hücrenin yüzeye yapışması olayı sırasında integrinler, bir taraftan hücre ile yüzey arasında fiziksel bir tutucu görevi görürken bir taraftan da hücre membranından gerçekleşen sinyal iletimini sağlarlar. İntegrinler aracılığı ile sağlanan sinyal iletimi her iki yönde de gerçekleşir ve integrinlerin hücre dışı bağlanma aktivitelerini kontrol eder. İntegrinler aracılığı ile gerçekleşen hücre yayılmasının ve bunu takiben fokal yapışmanın, yüzeye bağımlı hücrelerin yaşaması ve üremesi için gerekli olduğu kanıtlanmıştır. Yapışmanın gerçekleşmediği durumda 'anoikis' olarak bilinen hücre ölümü gerçekleşmektedir.

Tek tabaka kültürde üreyebilme özelliğine sahip, L-929 olarak kodlanan fare deri fibroblast hücreleri ile yürütülen çalışmalarda L-929 hücre hattının ikilenme süresi 31 saat, üreme hızı 0.02 saat^{-1} olarak belirlenmiştir. Kontrol amaçlı olarak L-929 hücreleri ile Petri kaplarında hücre kültürü çalışması gerçekleştirilmiş ve çalışmanın 24 ve 48. saatinde alınan invert mikroskop görüntüleri Şekil 4.18'de sunulmuştur.



a)



Şekil 4.18 L-929 hücre hattı ile gerçekleştirilen kontrol çalışması invert mikroskop görüntüleri a) 24. saat, b) 48. saat

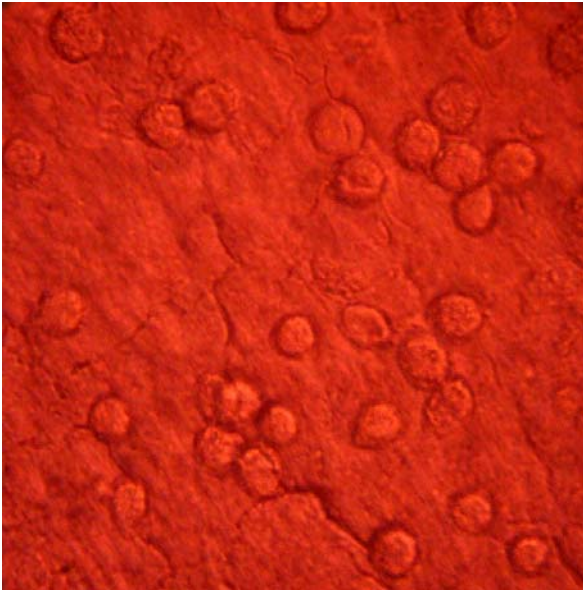
Şekil 4.19'da moleküler olarak baskılanmış yüzeylerde üretilmiş L-929 hücrelerinin değişik zaman aralıklarında çekilmiş invert mikroskop görüntüleri (a-g) ve Giemsa ile boyandıktan sonra çekilmiş fotoğrafı (g) verilmiştir. İlerleyen kültür zamanıyla birlikte hücrelerin tipik fibroblastik morfolojiye sahip bir şekilde üredikleri gözlenmiştir. Şekil 4.19 h'da 120. saat sonunda hücrelerin tipik fibroblastik morfolojisi açıkça görülmektedir. Yalnızca arjinin ve glisin baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerde hücre yapışması son derece düşük oranda gerçekleşmiş, bu nedenle hücre üremesi olamamıştır. Sonuçlar, çalışma kapsamında geliştirilen RGD-baskılanmış hidrojellerin hücre kültürlerinde kullanım açısından önemli olabileceğini vurgulamaktadır. Özellikle H-4 bileşimi yapışma ve üreme açısından mükemmeldir. RGD-baskılanmış H-4 bileşimi hidrojellere %100 hücre yapışması gerçekleşmiş, 5 günlük üreme periyodu sonunda da 10^6 mertebesinde hücre üreme değerine ulaşılmıştır.

4.3.1.8. RGD bağlanma çalışmaları

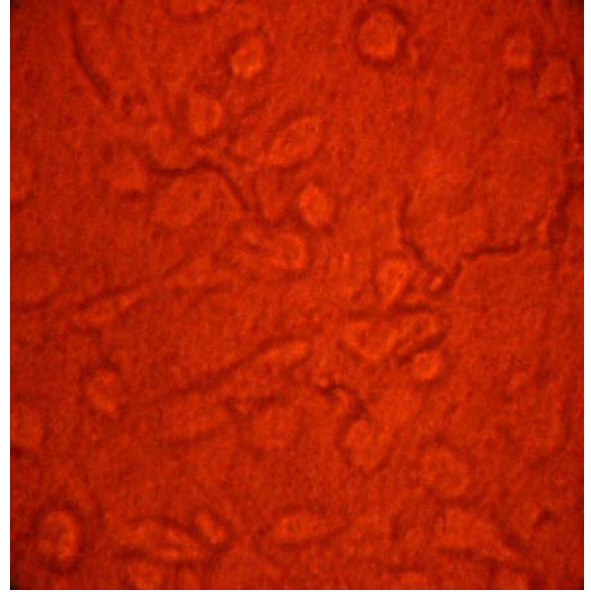
Hücre-yüzey etkileşimini ve hücre yapışmasını arttırmak üzere yüzeylere immobilize edilen RGD sekansının yoğunluğu, yüzey üzerindeki dağılımı ve pozisyonu gibi parametreler biyomimetik malzemelerin tasarımında önem kazanmaktadır. RGD sekansının muntazam bir şekilde immobilize halde bulunduğu bir yüzey şüphesiz hücre tanıyıcı moleküllerin gelişigüzel dağıldığı doğal ECM yapısından farklı olacaktır.

RGD sekansı, integrinlerin bağlayıcı bölgesine ulaşabilmek için bulunduğu yüzey üzerinden dışa doğru yönelmelidir. Biyomalzemelerin peptidler ile modifikasyonunda, peptid sekansı ile yüzey yapısı arasına yerleştirilen ve peptid moleküllerinin serbestçe hareket etmesini sağlayan aramoleküller (spacer) kullanılabilir.

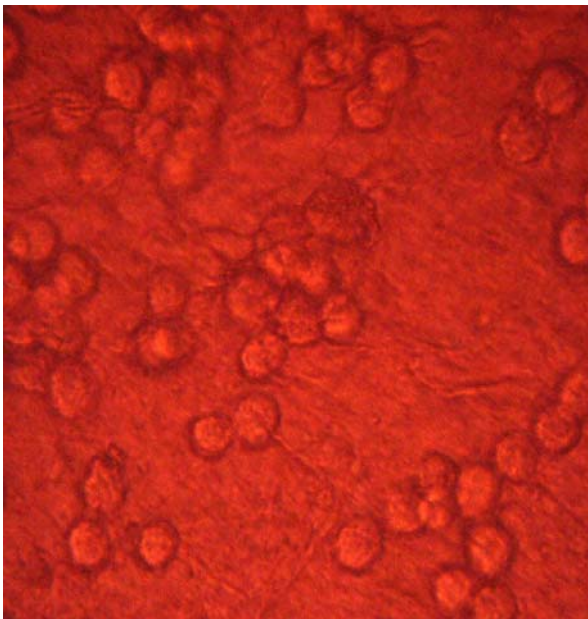
Yapılan çalışmalarda, RGD molekülü ile bağlı olduğu yüzey arasında bulunan minimum aralığın hücre yapışmasını etkileyen bir faktör olduğu saptanmıştır. Yapılan bir diğer çalışmada, poli(akrilonitril) kürelerin üzerine farklı uzunluklarda oligo glisin aramolekülü kullanılarak RGDF (Arjinin-glisin-aspartik asit-fenilalanin) peptidi immobilize edilmiş ve kürelere olan platelet yapışması incelenmiştir. 3 glisin molekülünden oluşan sistemde platelet yapışmasının zayıf



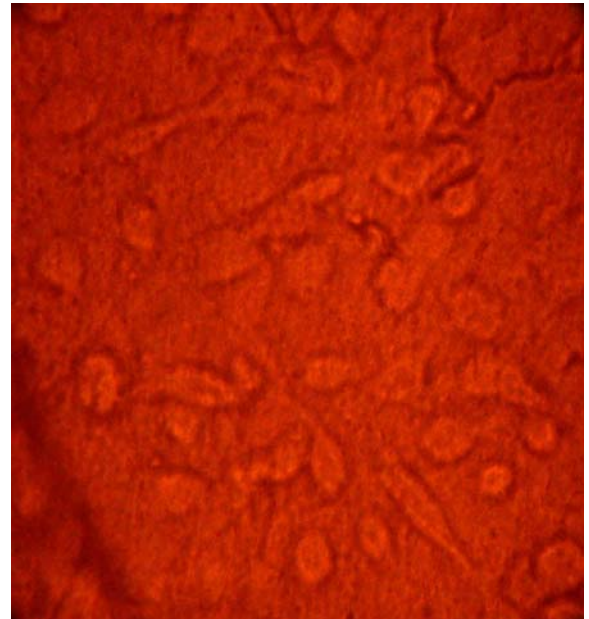
a)



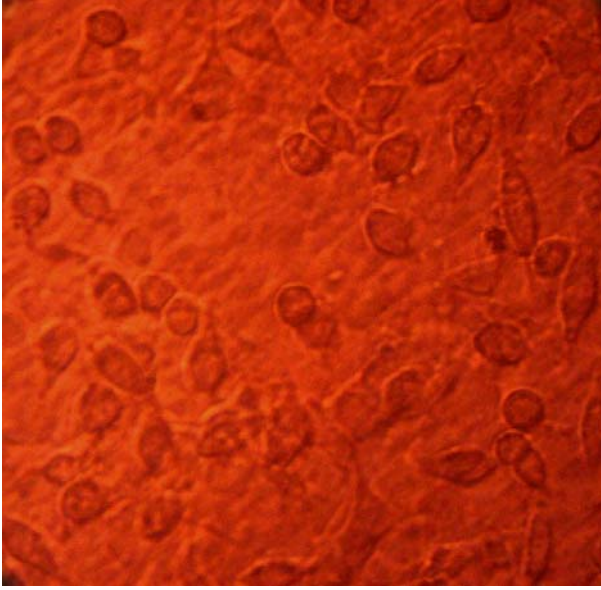
b)



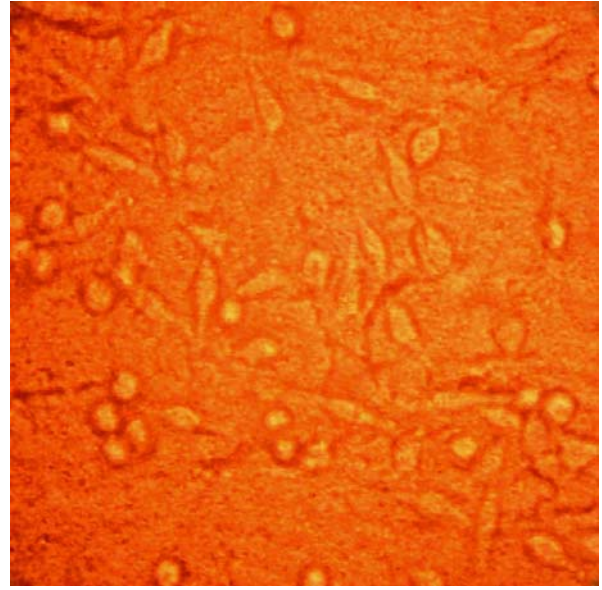
c)



d)



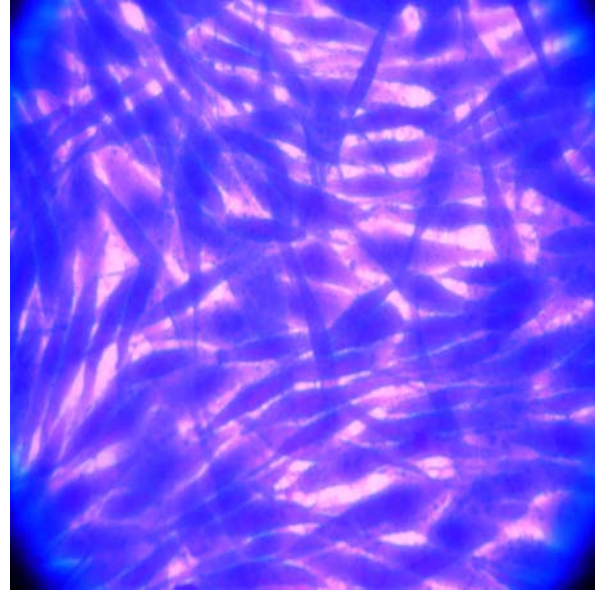
e)



f)



g)



h)

Şekil 4.19 Hücre kültürü çalışmaları

a) baskılanmamış 6 no'lu bileşim (24. saat), b) baskılanmış yıkanmamış 1 no'lu bileşim (24. saat), c) baskılanmış yıkanmamış 6 no'lu bileşim (24. saat), d) baskılanmış yıkanmış 1 no'lu bileşim (24. saat), e) baskılanmamış 1 no'lu bileşim (60. saat), f) baskılanmış yıkanmamış 6 no'lu bileşim (60. saat), g) baskılanmış yıkanmış 1 no'lu bileşim (60. saat), h) baskılanmış yıkanmış 4 no'lu bileşim (120. saat, Giemsa ile boyama)

olduğu gözlenirken, aramolekülün uzunluğunun artmasıyla yapışma değeri artmış ve 13 glisinden oluşan aramolekül kullanıldığında platelet yapışmasının maksimuma ulaştığı bulunmuştur. Bir glisin molekülünün uzunluğunun 3.5 Å olduğu kabul edildiğinde, yüzeyden 11-32 Å uzaklıkta RGD sekansının bağlanma bölgelerinin çoğuna ulaşıldığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte hiçbir aramolekülün kullanılmadığı immobilizasyon sistemlerinde de mükemmel hücre yapışması sağlandığı görülmüştür (Massia ve Hubbell, 1991).

Aramolekül kullanımının ne kadar gerekli olduğu sorusunun cevabı sistemden sisteme göre değişmektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen genel sonuçlar esnek aramoleküllerin hücre yapışmasını arttırdığını fakat aramolekül uzunluğunun fazla olduğu durumlarda yapışmanın ters yönde etkilendiği şeklindedir. Bu durum uzun esnek molekülün sistemin entropisini artırarak kuvvetli yapışmaya engel olmasıyla açıklanabilir. Bunun yanı sıra, hücreler esnek zincirlerin bulunduğu yüzeylere oranla daha sert yüzeylere yapışmayı tercih ederler.

Yüzeye yapışan hücre sayısı RGD sekansının yüzeydeki yoğunluğu ile doğrudan ilişkilidir. RGD konsantrasyonuna bağlı yapışma değerleri sigmoidal olarak artış göstermektedir (Kantlehner ve arkadaşları, 2000, Jeschke ve arkadaşları, 2002). Bu durum, hücre cevabı için kritik bir minimum konsantrasyon değeri olduğunu gösterir. Genel bir kural olarak yüksek RGD yüzey konsantrasyonlarında, hücre yayılması, fokal yapışma ve üremenin arttığı söylenebilir (Chen ve arkadaşları, 1997, Neff ve arkadaşları, 1999). Massia ve Hubbell (1991) tarafından yapılan çalışmalarda, RGD immobilize edilmiş cam yüzeyler üzerinde fibroblast yapışması incelenmiş ve hücre yapışması ve yayılması için 1 fmol/cm² konsantrasyonundaki RGD peptidin yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Fokal yapışmanın ve lif demetlerinin oluşması için ise 10 fmol/cm² konsantrasyonunda RGD peptidinin gerekli olduğu saptanmıştır. Bu çalışmanın ardından, değişik yüzeylerle yapılan araştırmalarda özellikle polimer yüzeylerde hücre yapışması için daha yüksek konsantrasyonlarda peptide ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Neff ve ark., 1999, Elbert ve ark., 2001). Drumheller ve Hubbell (1994) tarafından gerçekleştirilen ve poli (akrilik asit) hidrojelinin model yüzey olarak

kullanıldığı bir çalışmada, farklı RGD yüzey konsantrasyonlarında fibroblast yapışması incelenmiş ve hücre yayılması için gerekli minimum değer 12 pmol RGD/cm² olduğu bulunmuştur. Bu değer fibroblast hücrelerin yüzeyde fokal yapışmaya kadar ilerlemeleri için 66 pmol RGD/cm² olarak verilmiştir (Drumheller, 1994). Bu farklılık polimer yüzeylerin sert cam yüzeylere oranla daha esnek olmaları ve bu durumun entropik açıdan dezavantajlı olması ile açıklanmıştır. Ayrıca hücre yapışması ve yayılmasının yalnızca peptid konsantrasyonuna bağlı olmadığı, substrat olarak kullanılan yüzeyin hidrofilik/hidrofobik özelliklerinin de etkin olduğu açıklık kazanmıştır. Yüksek peptid konsantrasyonlarının, biyomimetik malzemelerde hücre yapışmasını arttırdığı şüphesiz bir gerçektir. Fakat burada dikkat edilmesi gereken nokta, yüksek peptid konsantrasyonlarının hücre göçünü ve üremesini inhibe edebilmesidir.

Biyomimetik malzemelerin geliştirilmesi çalışmalarında, her ne kadar peptid yoğunluğu ve aramolekül kullanımı ile ilgili optimum hücre cevabını sağlayacak genel kurallar saptanmak istense de, bu kriterler kullanılan hücrelerin türüne ve biyomalzemenin intrinsik özelliklerine göre değişiklik göstermektedir.

Tüm bu bilgiler dikkate alınarak baskılanan RGD molekülü için baskılama işleminin başarısı RGD bağlanma çalışmaları ile incelenmiştir. Bu amaçla Deneysel Çalışmalar bölümünde belirtildiği şekilde ninhidrin yöntemiyle ölçümler alınmıştır. Ninhidrin yöntemiyle RGD kalibrasyon grafiği Ek-6'da verilmiştir. Bu eğriden faydalanılarak hesaplanan RGD bağlanma değerleri ise Çizelge 4.16'da yer almıştır. Tüm değerler en az 3 paralel çalışmanın ortalamasıdır. 4 no'lu bileşim RGD ile baskılanmadığı durumda çok düşük miktarda RGD bağlanması gerçekleşirken, RGD baskılanmış örnek durumunda büyük miktarda RGD bağlanmıştır. RGD baskılanmış örnek hücre kültüründe kullanım sonrasında tekrar bağlanma çalışması yapıldığında yine oldukça büyük miktarda RGD'nin hidrojele bağlandığı görülmüştür. Bu durum RGD ile baskılamanın başarısını ortaya koymakta ve hücre kültür çalışmalarının sonuçlarını da desteklemektedir. Yapıdaki RGD molekülüne ait kavimler bu hidrojelin RGD'e

özgöl olmasını sağlamakta ve RGD üzerinden hücre yapışmasına izin vermektedir. En önemli avantajı ise hücre kültüründe tekrarlı kullanıma izin vermesidir.

Çizelge 4.16 RGD baskılanmış H4 bileşimi örneklerinin RGD bağlama kapasiteleri

Örnek	Adsorplanan RGD (μmol) / yüzey alanı cm^2
H.4 Baskılanmamış	2.73 ± 0.13
H.4 Baskılanmış kullanılmamış	5.55 ± 0.89
H.4 Baskılanmış Hücre kültüründe kullanılmış	$1.56 \pm 0,96$

Görüldüğü gibi değerler Hubbel ve arkadaşları tarafından tespit edilen değerlerin üzerindedir. Ayrıca, baskılanmış örneklerin RGD bağlama kapasitesi baskılanmamış örneğin iki katından fazladır. Bu durum moleküler baskılama işleminin başarısını ve moleküler tanıma üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır.

Tüm bu veriler ışığında RGD baskılanmış hidrojellerin hücre kültürü çalışmaları için uygun sistemler olduğu ortaya konmuştur.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında, hayvansal hücre biyoteknolojisi uygulamalarına yönelik olarak akrilat-bazlı MIP yapıların sentezi amaçlanmıştır. Sentezlenen MIP'lerin Con A adsorpsiyonunda, RGD adsorpsiyonu ve hücre kültürü çalışmalarına kullanılabilirlikleri araştırılmış ve çalışma kapsamında ulaşılan önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Gerçekleştirilen moleküler baskılama işlemlerinde, non-kovalent moleküler baskılama tipinin kullanılmasına karar verilmiş ve L-Arjinin, Glisin, Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptid molekülleri ve D-mannoz, kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA), ana-matris monomeri olarak hidroksietil metakrilat (HEMA) ve çapraz bağlayıcı olarak da etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) kullanılarak polimer sentezi gerçekleştirilmiştir.
- Con A adsorpsiyonu çalışmaları için yüksek çapraz bağ yoğunluğuna sahip polimerik yapılar sentezlenmesine karar verilirken, amino asit-RGD baskılanarak hayvansal hücre kültüründe kullanılacak örneklerde biyuyumluluğu arttırmak için hidrojel yapıların sentezlenmesine karar verilmiştir.
- D-mannoz baskılanmış polimerlerle gerçekleştirilen FTIR analizi ile baskılanmış ve baskılanmamış örnekler arasında belirgin bir fark olmadığı görülmüştür. Burum D-mannoz ve polimerik örneklerin yapılarındaki benzerlikten kaynaklanmaktadır.
- D-mannoz baskılanmış polimerlerle yapılan ¹³C NMR analizi ile baskılanmış ve baskılanmamış örnekler arasında dikkat çekici bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum katı örneklerde bilgi verici sonuçlarının elde edilmesinin güçlüğü ile açıklanabilir.
- D-mannoz baskılanmış örneklerden P-2 bileşimi seçilerek yapılan adsorplama kinetiği çalışmasında baskılanmış ve baskılanmamış örnekler arasındaki farkın çok küçük olduğu gözlenmiştir.
- En yüksek D-mannoz bağlama kapasitesine ulaşılan denge değeri, 1.5 mg/ml D-mannoz rezervuar konsantrasyonunda yapılan çalışmada her bileşimde baskılanmış polimerlerin baskılanmamışlardan daha fazla D-mannoz adsorpladığı ve adsorplanan miktarının polimerin kompozisyonu ile değiştiği görülmüştür.

- En yüksek adsorpsiyon (343.88 mg D-mannoz/g polimer) en yüksek çapraz bağlayıcı oranına sahip baskılanmış örneklerle elde edilmiştir. P-2 bileşiminde yapıya HEMA eklenmesi ile adsorpsiyon kapasitesi belirgin bir şekilde düşmüştür ancak daha sonra artan HEMA/MAA oranıyla adsorpsiyon artma eğilimi göstermiş ve baskılanmış ile baskılanmamış örnekler arasındaki fark artmıştır.
- D-mannoz baskılanmış örneklerle gerçekleştirilen Con A adsorpsiyonu çalışmaları için, 1 mM MnCl₂, 1mM MgCl₂ ve 1 mM CaCl₂ içeren 0,1M sodyum asetat-HCl (NaAc-HCl) (pH=7.0) tamponu kullanılmasına karar verilmiştir.
- Con A adsorplama kapasitesini tespit etmek için floresan spektrofotometri kullanılmış ve uyarılma boyu 280 nm, emisyon dalga boyu 342 nm olarak tespit edilmiştir.
- Moleküler olarak baskılanmış polimerlerin Con A adsorpsiyonu ile ilgili yapılan kinetik çalışma, D-mannoz adsorpsiyonunun en yüksek olduğu P-1 bileşimi seçilerek gerçekleştirilmiş ve baskılanmış ve mannoz yüklenmiş örneğin en yüksek Con A adsorplama kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Bu durum, Con A'nın moleküler baskılama yöntemiyle baskılanan ve yükleme ile yapıya katılan mannoza olan afinitesinin bir sonucudur. Ancak baskılanmış örnek yapısında Con A'ya yüksek afinitesi olan mannoz içermemesine rağmen baskılanmamış örnekten daha yüksek adsorpsiyona sahiptir ve moleküler baskılama işleminin moleküler adsorpsiyon üzerine etkisi açıktır ve örnekler tekrar mannoz yüklenmesine gerek duyulmadan daha iyi Con A adsorplama kapasitesine sahiptir.
- D-mannoz baskılanmış örneklerle gerçekleştirilen kinetik çalışma ile K_D ve B_{max} değerleri hesaplanmıştır. Baskılanmış ve mannoz yüklenmiş örnek en yüksek K_D ve B_{max} değerlerine sahiptir ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda Con A-glukoz çifti için 1×10^{-3} olarak tespit edilen K_D değerinden daha yüksektir.
- Con A'nın desorpsiyonu için "karşı ligand" olarak α -D-metil manno piranosid kullanılmıştır. Baskılanmamış, baskılanmış ve mannoz yüklü örneklerdeki desorpsiyon davranışı birbirine benzemektedir ancak baskılanmamış ve baskılanmış örneklerin desorpsiyon miktarları neredeyse birbirinin aynısı iken mannoz yüklü örnekte bu değer diğerlerinden oldukça yüksektir. Özellikle mannoz

yüklü örnekte hem desorplanan Con A miktarının hem de desorpsiyon veriminin daha fazla olduğu görülmektedir.

- Tüm bu adsorpsiyon-desorpsiyon davranışları değerlendirildiğinde, moleküler olarak D-mannoz baskılanmış polimerlerin Con A saflaştırılması için uygun sistemler olduğu görülmektedir.
- Amino asit ve RGD baskılanmış örneklerin karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilen FTIR analizi çalışmasında, fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin kanıtı olarak –NH ve –CH gerilmeleri tespit edilmiş ve moleküler baskılamanın varlığı ortaya konmuştur.
- Amino-asit ve RGD baskılanmış örneklerle yapılan ¹³C NMR analizlerinde de D-mannoz baskılanmış örneklere benzer bir şekilde, belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum örnek ve kalıp molekül arasındaki yapı benzerliğinden kaynaklanmaktadır.
- Arg ve Gly baskılanmış örneklerden alınan SEM resimleri incelendiğinde, baskılanmış örneklerle daha standart boyutta ve homojen dağılımda boşluklar elde edildiği yapılan ekstraksiyon işlemi ile yapıdaki kalıp molekülün uzaklaştığı, ekstraksiyon sonrasında daha fazla boşluk oluştuğu ortaya konmuştur. Bu durum moleküler baskılama ile elde edilen spesifik tanıma merkezlerinin bir göstergesidir.
- Arg ve Gly baskılanmış örneklerle PBS ortamında 37°C'de gerçekleştirilen şişme deneyleri ile moleküler baskılamanın şişme değerlerini az da olsa arttırdığı gözlenmiştir ve bu durum moleküler baskılama işleminin yarattığı morfolojik değişimlerin ve gözenek oluşumunun bir sonucudur.
- Gerçekleştirilen elementel analiz çalışması ile moleküler baskılama ile polimerik yapıya kalıp moleküllerin girdiği ve ekstraksiyon ile yapıdan uzaklaştırıldığı kanıtlanmıştır. Ayrıca yapılan çalışma ile kalıp molekülü uzaklaştırmak için gerekli en uygun sürenin 2 hafta olduğu tespit edilmiştir.
- Yapılan gözenek boyutu ölçümü çalışmaları ile moleküler baskılama işleminin gözeneklerin genel yapısını çok fazla etkilemediği ancak gözenek dağılımını çok az kısıtladığı görülmektedir. Artan çapraz bağlayıcı oranı ile gözenek dağılımı aralığının daraldığı gözlenmiştir.

- RGD kalıp molekülü baskılanmış örneklerle gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında Giemsa ile boyandıktan sonra çekilen invert mikroskop görüntüleri ile hücre yapışması tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada ilerleyen kültür zamanı ile birlikte hücrelerin tipik fibroblastik morfolojiye sahip bir şekilde üredikleri gözlenmiştir.
- Sonuçlar RGD baskılanmış hidrojellerin hücre kültürlerinde kullanımını açısında önemli olabileceğini vurgulamaktadır. Özellikle H-4 bileşimi yapışma ve üreme açısında mükemmeldir. RGD baskılanmış H-4 bileşimindeki hidrojellere %100 hücre yapışması gerçekleşmiş, 5 günlük üreme periyodu sonunda 10^6 mertebesinde hücre üreme değerine ulaşılmıştır.
- Baskılanan RGD molekülü için baskılama işleminin başarısı RGD bağlanma çalışmaları ile incelenmiştir. 4 no'lu bileşim RGD ile baskılanmadığı durumda çok düşük miktarda RGD bağlanması gerçekleşirken, RGD baskılanmış örnek durumunda büyük miktarda RGD bağlanmıştır. RGD baskılanmış örnek hücre kültüründe kullanım sonrasında tekrar bağlanma çalışması yapıldığında yine oldukça büyük miktarda RGD'nin hidrojele bağlandığı görülmüştür.
- Baskılanmış örneklerin RGD bağlama kapasitesi baskılanmamış örneğin iki katından fazladır. Bu durum moleküler baskılama işleminin başarısını ve moleküler tanıma üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Ancak tekrar kullanılan örneklerin RGD bağlama kapasitesinde azalma gözlenmiştir. Bu durum hücre kültürü sırasında yapılan boyama işlemlerinin yada sonrasında yapılan yıkama işlemlerinin tanıma bölgeleri üzerindeki negatif etkisinden kaynaklanabilir ancak bağlanan RGD miktarı bahsedilen literatür çalışmaları ışığında hala yüksek kabul edilebilir.
- Yapılan tüm çalışmalar RGD baskılanmış hidrojellerin hücre kültürü çalışmaları için uygun olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agi, P., 2003, Kitosan bazlı afinite membranlar: Üretim, Karakterizasyon ve Protein saflaştırılmasında kullanım, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Agrawal, B., Goldstein, I., Hassing, G., So, L., 1968, Protein-carbohydrate interaction. IVIII. The preparation and properties of acetylated concanavalin A, the hemagglutinin of the Jack Bean, *Biochemistry*, 7, 4211-4218
- Allender, C.J., Brain, K.R., Heard, C.M., King, F.D., 1999, A.W. Oxford (Eds.), *Progress in Medicinal Chemistry*, Vol. 36, Elsevier, Amsterdam, p. 235.
- Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., 2004, Molecularly imprinted polymers for drug delivery, *J. of Chromatography B*, 804, 231-245.
- Alvarez-Lorenzo, C., Hiratani, H., ve arkadaşları, 2002, Soft contact lenses capable of sustained delivery of timolol, *J. of Pharmaceutical Sciences*, Vol.91, No.10, 2182-2192.
- Andersson, L.I., O'shannesy, D., Mosbach, K., 1990, Molecular recognition in synthetic polymers: preparation of chiral stationary phases by molecular imprinting of amino acid amides, *Journal of Chromatography*, 513, 167-179.
- Aydın, O. ve arkadaşları, 2002, The effects of methyl methacrylate on nasal cavity, lung, and antioxidant system (An experimental inhalation study) *Toxicol. Pathol.* 30, 350-356
- Byrne, M.E., Park, K., Peppas, N.A., 2002, Molecular imprinting within hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 149-161.
- Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M., Ingber D.E., 1997, Geometric control of cell life and death, *Science*, 276, 1425-1428.
- Chern, C.S., Lee C.K., Tsai Y.J., Ho, C.C., 1999, Colloidal stability of dextran modified latex particles toward adsorption of concanavalin A, *Colloid. Polym. Sci.*, 276, 427-433
- Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z., 2004, Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterization, *J. of Chromatography B*, 804, 173-182.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton K., Rebers P.A., Smith F., 1956, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, Vo.28, No.3, 350-356.
- Doğan, A.K., 2003, Polisakkarit bazlı taşıyıcılardan neovaskülerizasyon ajanlarının kontrollü salımının in vitro ve in vivo koşullarda incelenmesi, *Bilim Uzmanlığı Tezi*, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Drumhaller, P.D., Elbert, D.L., Hubbel, J.A., 1994, Multifunctional poly(ethylene glycol) semi-interpenetrating polymer Networks as highly selective adhesion substrates for bioadhesive peptide grafting, *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 772-780.
- Elbert, D.L., Hubbel, J.A., Conjugate addition reactions combined with free-radical cross-linking for the design of materials for tissue engineering, 2001, *Biomacromolecules*, 2, 430-41.
- Eren, B., 2000, Selüloz bazlı afinite membranlarının üretimi ve kullanım potansiyelinin araştırılması, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 104s.
- Goldstein, I., Hollerman, C., Smith, E., 1965, Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of concanavalin A with polysaccharides, *Biochemistry*, 4, 876-883.
- Guilbault, G.G., 1973, *Practical Fluorescence; Theory, Methods and techniques*, New York.
- Gümüşderelioğlu, M., Agi, P., 2004, Adsorption of Concanavalin A on the Well-Characterized Macroporous Chitosan and Chitin Membranes, *React. & Funct. Poly.*, 61, 211-220.
- Gümüşderelioğlu, M., Ertan, S., 2003, Biyomimetik moleküller, *Bilim ve Teknik dergisi*, Sayı 431, S: 62-64.
- Gümüşderelioğlu, M., Türkoğlu, H., 2003, Hayvansal hücre teknolojisi ve ürünleri, *Biyotek Dergisi*, No:17, 13-15.
- Haupt, K., 2003, Imprinted polymers: The next generation, *Analytical Chemistry*, 376-383.
- Hersel, U., Dahmen, C., Kessler, H., 2003, RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond, *Biomaterials*, 24, 4385-4415.
- Hjerten, Liao, ve arkadaşları, 1997, Gels mimicking antibodies in their selective recognition of proteins, *Chromatographia*, Vol.44, No.5/6, 227-234.
- Hiratani, H., Alvarez-Lorenzo C., 2002, Timolol uptake and release by imprinted soft contact lenses made of N,N-diethylacrylamide and methacrylic acid, *J. of Controlled Release*, 83, 223-230.
- Hosoya, K., Yoshizako, K., Tanaka, N., Kimata, K., Araki, T. and Haginaka, J. 1994. Uniform-size macroporous polymer-based stationary phase for HPLC prepared through molecular imprinting technique. *Chem. Lett.*, 1437-1438.
- Ishii, S.I., Abe, Y., 1990, High performance affinity chromatography of concanavalin A, *J. Chrom.*, 510, 95-100.

- Jara-Perez, V., Camara-Artigas, A., Andujar-Sanchez, M., 2003, Purification of angiotension converting enzyme from pig lung using concanavalin A sepharose chromatography, *J. Chrom.*, 783, 247-252.
- Jeschke, B., Meyer, J., Jonczyk, A., Kessler, H., Adamietz, P., Meenen, N.M., Kantlehner, M., Goepfert, C., Nies, B., 2002, RGD-peptides for tissue engineering of cartilage, *Biomaterials*, 23, 3455-63.
- Kantlehner, M., Schaffner, P., Finsinger, D., Meyer, J., Jonczyk, A., Defenbach, B., Nies, B., Hölzemen, G., Goodman, S.L., Kessler, H., 2000, Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation, *Chem-BioChem*, 1, 107-14.
- Kennedy, J.F., Palva, P.M.G., Corella, M.T.S., Cavalcanti, M.S.M., Coelho, L.C.B.B., 1994, Lectins, versatile proteins of recognition: a review, *Carbohydrate Polym.*, 26, 219-230.
- Kesgin, D., 2002, pH'ya duyarlı poli(vinil eter) bazlı amfifilik hidrojellerden protein salım kinetiğinin incelenmesi, Yüksek Mühendislik tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kiremitçi, M., 1988, Süspansiyon Polimarezasyonu ile Üretilen Akrilik ve Alkil Plazmaları ile Modifiye Edilen Polistiren Bazlı Polimerik Mikrotaşıyıcılar ile Desteklenmiş BHK Hücre Kültürü ve Şap Virüsü Üretiminin Deneysel ve Matematiksel Olarak İncelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Komiyama, ve arkadaşları, 2003, Molecular imprinting: From fundamentals to applications, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co., Germany, 147 p.
- Kriz, D., Kriz, B., Andersson, L.I., Mosbach, K., 1994, Thin-layer chromatography based on the molecular imprinting technique, *Analytical Chemistry*, 66, 2636-2639.
- Lebaron, R.G., Athanasiou, K.A., 2000, Extracellular matrix cell adhesion peptides: Functional applications in ortopedic materials, *Tissue Engineering*, 6, 85-103.
- Massia, S.P., Hubbel, J.A., 1991, An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin $\alpha\beta 3$ -mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact formation., *J. Cell Biol.*, 114, 1089-1100
- Mayes, A.G., Mosbach, K., 1996, Molecularly imprinted polymer beads: Suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase, *Anal Chem.* 68, 3769-3774.
- Mosbach, K., Ramström, O., 1996, The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, *Biotechnology*, Vol.14, 163-170.

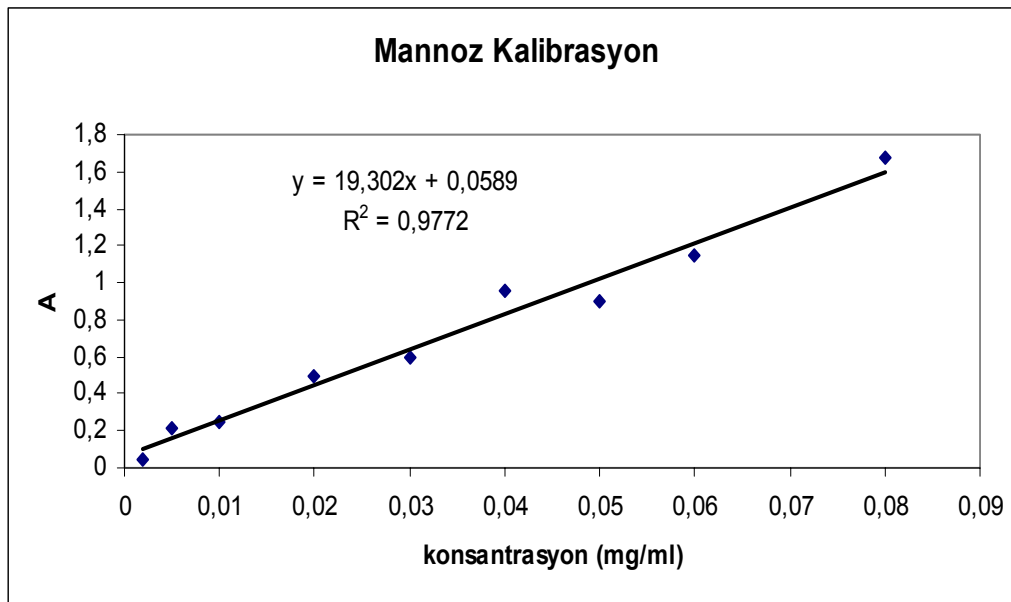
- Nagahori, N., Nishimura, S.I., 2001, Tailored glycopolymers: Controlling the carbohydrate-protein interaction based on template effect, *Biomacromolecules*, 2, 22-24.
- Neff, J.A., Tresco, P.A., Coldwell, K.D., Surface modification for controlled studies of cell-ligand interactions, *Biomaterials* 1999, 20, 2373-2393.
- Novotny, M., Mechref, Y., Cassely, A., Hong, M., 2001, Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis, *J. Chrom. B*, 752, 207-216
- Pai, C.M., Jacobs, H., Bae, Y.H., Kim, S.W., 1993, Synthesis and characterization of soluble concanavalin A oligomer, *Biotechnol Bioeng.* 41,957-963.
- Pérez-Moral, N., Mayes, A.G., 2004, Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerization methods, *Analytica Chimica Acta*, 504, 15-21
- Pérez, N., Whitcombe, M.J., Vulfson, E.N., 2001, Surface imprinting of cholesterol on submicrometer core-shell emulsion particles, *Macromolecules*, 343-, 830-836.
- Piersbacher, M.D., Rouslahti, E., 1984, Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small fragments of the molecule, *Nature*, 309, 30-33.
- Peppas, N.A., Huang, Y., 2002, Polymers and gels as molecular recognition agents, *Pharmaceutical Research*, Vol.19, Iss.5, 578-587
- Piletsky, S., Alcock, S., Turner, A.P.F., 2001, Molecular imprinting: at the edge of the third millennium, *Trends in Biotechnology*, Vol.19, 9-12.
- Ramström, O., Nicholls, I.A., Mosbach, K., 1994, Synthetic peptide receptor mimics: Highly stereoselective recognition in non-covalent molecularly imprinted polymers, *Tetrahedron, Asymmetry*, Vol.5, No.4, 649-656.
- Rezai, M.H., Gorgani, M.N., 1996, Adsorptive immobilization of submitochondrial particles on concanavalin A sepharose-4B, *Appl. Biochem. Biotech.*, 67, 165-181.
- Ruckenstein, E., Zeng, X., 1999, Membrane chromatography: preparation and applications to protein separation, *Biotechnol. Prog.*, 15, 1003-1019.
- Ruckenstein, E., Guo, W., 2001, A new matrix for membrane affinity chromatography and its application to the purification of concanavalin A, *J. Mem. Sci.*, 182, 227-234.
- Sharon, N., Lis, H., 1989, *Lectins*, Chapman and Hall, New York, 127 p.

- Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S., 1958, automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids, *Anal. Chem.*, 30, 1190-1206.
- Svenson, J., Nicholls, I.A., 2001, On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers. *Anal. Chim. Acta*, 435:1:19-24.
- Vidyasankar, S., Ru, M., Arnold, F.H., 1997, Molecularly imprinted ligand-exchange adsorbents of underivatized amino acids, *Journal of Chromatography A*, 775, 51-63.
- Wulff, G., 1995, Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates - A Way towards Artificial Antibodies *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 34 1812-1832
- Wulff, G., W. Grobe-Einsler, W. Vesper, and A. Sarhan. 1977a. Enzyme-Analogue Built Polymers, 5) On the Specificity Distribution of Chiral Cavities Prepared in Synthetic Polymers. *Makromol. Chem.* 178:2817-2825.
- Yourtee, D.M., Smith, R.E., Russo, K.A., Burmaster S., Cannon J.M., Eick J.D., Kostoryz E.L., 2001 The stability of methacrylate biomaterials when enzyme challenged: kinetics and systematic evaluations. *J. Biomedical materials Research*, 57, 522-531.

EKLER

EK 1 D-mannoz Kalibrasyon Grafiği

Çalışma dalga boyu = 490 nm



Ek 2- Kümülatif Mannoz adsorpsiyonu değerleri

0,05 mg/ml													
zaman (dk)	P-2 (A)	C	Toplam mannoz	Atılan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ polimer	P-2 (B)	C	Toplam mannoz	Atılan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ polimer	Ortalama
0	0,541	0,050	0,999		0,000	0,000	0,538	0,050	0,993		0,000	0,000	0,000
5	0,142	0,009	0,164	0,009	0,836	16,728	0,144	0,009	0,168	0,009	0,832	16,649	16,689
10	0,060	0,000	0,002	0,000	0,989	19,787	0,057	0,000	-0,004	0,000	0,995	19,899	19,843
20	0,085	0,003	0,046	0,003	0,945	18,906	0,083	0,002	0,042	0,003	0,949	18,976	18,941
30	0,098	0,004	0,065	0,004	0,924	18,475	0,103	0,005	0,073	0,004	0,915	18,309	18,392
40	0,143	0,009	0,131	0,009	0,854	17,076	0,145	0,009	0,134	0,009	0,851	17,014	17,045
50	0,059	0,000	0,000	0,000	0,976	19,513	0,064	0,001	0,007	0,000	0,968	19,368	19,441
60	0,311	0,026	0,340	0,026	0,636	12,724	0,291	0,024	0,313	0,026	0,663	13,263	12,994

Zaman (dk)	P-2 (A)	C	Toplam mannoz	Atılan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ polimer	P-2 C (B)	C	Toplam mannoz	Atılan	Eksilen mannoz	Adsorplanan / polimer	Ortalama
0	0,541	0,050	0,999		0,000	0,000	0,539	0,050	0,995		0,000	0,000	0
5	0,181	0,013	0,240	0,013	0,760	15,192	0,186	0,013	0,250	0,013	0,750	14,996	15,09398
10	0,071	0,001	0,023	0,001	0,965	19,296	0,081	0,002	0,041	0,001	0,946	18,923	19,10911
20	0,060	0,000	0,002	0,000	0,984	19,683	0,062	0,000	0,005	0,000	0,981	19,613	19,64791
30	0,059	0,000	0,000	0,000	0,986	19,716	0,056	0,000	-0,005	0,000	0,991	19,816	19,76603
40	0,166	0,011	0,166	0,011	0,820	16,390	0,171	0,012	0,174	0,011	0,812	16,235	16,31271
50	0,104	0,005	0,065	0,005	0,909	18,189	0,099	0,004	0,058	0,005	0,917	18,334	18,26153
60	0,288	0,024	0,309	0,024	0,662	13,232	0,287	0,024	0,307	0,024	0,663	13,259	13,24547

Ek-2 Kümülatif Mannoz adsorpsiyon değerleri (Devamı)

0,1 mg/ml													
zaman (dk)	P-2 (A)	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ polimer	P-2 (B)	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ polimer	Ortalama
0						0						0	0
5	0,159	0,021	0,166	0,010	0,634	31,702	0,163	0,022	0,173	0,011	0,627	31,371	31,53663
10	0,168	0,023	0,170	0,011	0,620	31,003	0,165	0,022	0,165	0,011	0,624	31,215	31,10921
20	0,449	0,081	0,566	0,040	0,544	27,211	0,500	0,091	0,640	0,046	0,618	30,905	29,05761
30	0,526	0,097	0,629	0,048	0,567	28,355	0,528	0,097	0,632	0,049	0,564	28,220	28,28722
40	0,062	0,001	0,004	0,000	0,686	34,282	0,068	0,002	0,011	0,001	0,673	33,630	33,95607
50	0,141	0,017	0,094	0,009	0,587	29,355	0,145	0,018	0,098	0,009	0,576	28,795	29,07523
60	0,250	0,040	0,198	0,020	0,483	24,133	0,243	0,038	0,191	0,019	0,483	24,164	24,14879

zaman (dk)	5C A	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	5C A	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	Ortalama
0						0						0	0
5	0,197	0,029	0,229	0,014	0,571	28,552	0,197	0,029	0,229	0,014	0,571	28,552	28,552
10	0,116	0,012	0,089	0,006	0,697	34,847	0,116	0,012	0,089	0,006	0,697	34,847	34,847
20	0,098	0,008	0,057	0,004	0,723	36,153	0,098	0,008	0,057	0,004	0,723	36,153	36,153
30	0,068	0,002	0,012	0,001	0,763	38,173	0,068	0,002	0,012	0,001	0,763	38,173	38,173
40	0,094	0,007	0,044	0,004	0,731	36,557	0,094	0,007	0,044	0,004	0,731	36,557	36,557
50	0,148	0,018	0,102	0,009	0,670	33,479	0,148	0,018	0,102	0,009	0,670	33,479	33,479
60	0,457	0,082	0,412	0,041	0,349	17,471	0,457	0,082	0,412	0,041	0,349	17,471	17,471

Ek-2 Kümülatif Mannoz adsorpsiyon değerleri (Devamı)

0,25 mg/ml													
zaman (dk)	5 (A)	C	Toplam mannoz	Atılan	Eksilen mannoz	adsorplanan/poly	5 (B)	C	Toplam mannoz	Atılan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/poly	Ortalama
0						0,000						0,000	0,000
5	0,590	0,110	0,880	0,055	1,120	55,976	0,585	0,109	0,872	0,055	1,128	56,390	56,183
10	0,658	0,124	0,931	0,062	1,014	50,691	0,652	0,123	0,922	0,061	1,024	51,183	50,937
20	0,854	0,165	1,153	0,082	0,729	36,475	0,861	0,166	1,164	0,083	0,720	36,024	36,250
30	0,936	0,182	1,181	0,091	0,619	30,952	0,941	0,183	1,188	0,091	0,613	30,636	30,794
40	1,090	0,214	1,282	0,107	0,428	21,378	1,070	0,210	1,257	0,105	0,452	22,616	21,997
50	1,049	0,205	1,128	0,103	0,474	23,715	1,051	0,206	1,131	0,103	0,474	23,699	23,707
60	1,043	0,204	1,020	0,102	0,481	24,025	1,045	0,204	1,022	0,102	0,480	24,010	24,018

zaman (dk)	5C A	C	Toplam mannoz	Atılan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/poly	5C B	C	Toplam mannoz	Atılan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/poly	Ortalama
0						0,000						0,000	0
5	0,576	0,107	0,857	0,054	1,143	57,136	0,575	0,107	0,856	0,053	1,144	57,219	57,17749
10	0,435	0,078	0,585	0,039	1,362	68,093	0,438	0,079	0,589	0,039	1,357	67,866	67,97948
20	0,650	0,122	0,857	0,061	1,050	52,499	0,642	0,121	0,846	0,060	1,061	53,069	52,78417
30	0,737	0,141	0,913	0,070	0,933	46,640	0,738	0,141	0,915	0,070	0,932	46,603	46,62159
40	0,506	0,093	0,556	0,046	1,220	61,001	0,605	0,113	0,679	0,057	1,097	54,872	57,93648
50	0,897	0,174	0,955	0,087	0,774	38,718	0,100	0,009	0,047	0,004	1,673	83,651	61,18485
60	0,573	0,107	0,533	0,053	1,110	55,504	0,571	0,106	0,531	0,053	1,185	59,250	57,37696

Ek-2 Kümülatif Mannoz adsorpsiyon değerleri (Devamı)

0,4 mg/ml													
zaman (dk)	5 (A)	C	Toplam mannoz	Atılan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	5 (B)	C	Toplam mannoz	Atılan	Eksilen mannoz	Adsorplanan / poly	Ortalama
0						0						0	0
5	0,586	0,109	0,874	0,055	2,326	116,307	0,591	0,110	0,882	0,055	2,318	115,893	116,0999
10	0,558	0,103	0,776	0,052	2,370	118,483	0,555	0,103	0,771	0,051	2,374	118,690	118,5867
20	0,472	0,086	0,599	0,043	2,494	124,721	0,473	0,086	0,601	0,043	2,493	124,638	124,6793
30	0,269	0,044	0,283	0,022	2,768	138,393	0,271	0,044	0,286	0,022	2,765	138,243	138,3178
40	0,290	0,048	0,287	0,024	2,742	137,087	0,230	0,035	0,213	0,018	2,816	140,792	138,9395
50	0,575	0,107	0,588	0,053	2,417	120,846	0,570	0,106	0,583	0,053	2,428	121,415	121,1305
60	0,707	0,134	0,672	0,067	2,280	114,007	0,704	0,134	0,668	0,067	2,289	114,473	114,24

zaman (dk)	5C A	C	Toplam mannoz	Atılan	Eksilen mannoz	adsorplanan/ poly	5C B	C	Toplam mannoz	Atılan	Eksilen mannoz	Adsorplanan / poly	Ortalama
0						0						0	0
5	0,562	0,104	0,834	0,052	2,366	118,297	0,561	0,104	0,832	0,052	2,368	118,379	118,338
10	0,386	0,068	0,508	0,034	2,639	131,974	0,393	0,069	0,519	0,035	2,629	131,435	131,7045
20	0,212	0,032	0,222	0,016	2,892	144,594	0,200	0,029	0,205	0,015	2,909	145,434	145,014
30	0,129	0,015	0,094	0,007	3,004	150,184	0,127	0,014	0,092	0,007	3,007	150,350	150,2673
40	0,502	0,092	0,551	0,046	2,540	126,995	0,503	0,092	0,552	0,046	2,539	126,974	126,9848
50	0,506	0,093	0,510	0,046	2,535	126,767	0,506	0,093	0,510	0,046	2,536	126,803	126,7853
60	0,983	0,192	0,958	0,096	2,041	102,055	0,987	0,192	0,962	0,096	2,038	101,884	101,9692

Ek-2 Kümülatif Mannoz adsorpsiyon değerleri (Devamı)

0,5 mg/ml													
zaman (dk)	5 (A)	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	5 (B)	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	Ortalama
0						0						0	0
5	1,049	0,205	1,640	0,102	2,360	118,002	1,051	0,205	1,643	0,103	2,357	117,836	117,9194
10	0,499	0,091	0,683	0,046	3,215	160,744	0,087	0,006	0,042	0,003	3,855	192,751	176,7475
20	0,924	0,179	1,254	0,090	2,598	129,918	0,181	0,025	0,176	0,013	3,719	185,933	157,9256
30	0,970	0,189	1,226	0,094	2,536	126,820	0,187	0,026	0,171	0,013	3,711	185,529	156,1745
40	0,502	0,092	0,550	0,046	3,118	155,915	0,091	0,006	0,039	0,003	3,830	191,497	173,7064
50	1,987	0,399	2,197	0,200	1,426	71,287	0,397	0,070	0,384	0,035	3,481	174,059	122,6728
60	1,965	0,395	1,974	0,197	1,449	72,427	0,398	0,070	0,350	0,035	3,480	174,007	123,2168

zaman (dk)	5C A	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	5C B	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	Ortalama
0						0						0	0,000
5	0,728	0,139	1,109	0,069	2,891	144,536317	0,731	0,139	1,114	0,070	2,886	144,287639	144,412
10	0,165	0,022	0,165	0,011	3,766	188,28826	0,167	0,022	0,168	0,011	3,762	188,117294	188,203
20	0,672	0,127	0,889	0,064	3,030	151,514869	0,660	0,125	0,872	0,062	3,047	152,359341	151,937
30	0,710	0,135	0,877	0,067	2,979	148,955549	0,715	0,136	0,884	0,068	2,973	148,655062	148,805
40	0,828	0,159	0,956	0,080	2,832	141,619521	0,240	0,038	0,225	0,019	3,564	178,18568	159,903
50	2,302	0,465	2,557	0,232	1,152	57,6178634	2,305	0,465	2,560	0,233	1,210	60,5035748	59,061
60	1,029	0,201	1,005	0,101	2,471	123,569578	1,036	0,202	1,012	0,101	2,525	126,248057	124,909

Ek-2 Kümülatif Mannoz adsorpsiyon değerleri (Devamı)

1 mg/ml													
zaman (dk)	5 (A)	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	5 (B)	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	Ortalama
0						0,000						0,000	0
5	1,136	0,446	3,571	0,112	4,429	221,432	1,141	0,448	3,588	0,112	4,412	220,603	221,0175
10	1,146	0,451	3,492	0,113	4,397	219,826	1,157	0,455	3,527	0,114	4,361	218,033	218,9296
20	1,389	0,551	4,135	0,138	3,641	182,058	1,380	0,548	4,107	0,137	3,667	183,374	182,7158
30	1,620	0,647	4,691	0,162	2,947	147,352	1,610	0,643	4,661	0,161	2,976	148,818	148,0847
40	1,596	0,637	4,460	0,159	3,017	150,833	1,598	0,638	4,465	0,159	3,011	150,558	150,6958
50	1,866	0,749	5,056	0,187	2,261	113,065	1,869	0,750	5,064	0,188	2,253	112,651	112,8577
60	1,713	0,686	4,456	0,171	2,673	133,674	1,712	0,685	4,453	0,171	2,676	133,799	133,7364

zaman (dk)	5C A	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/poly	5C B	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/poly	Ortalama
0						0,000						0,000	0
5	0,961	0,374	2,991	0,093	5,009	250,445	0,960	0,373	2,988	0,093	5,012	250,610	250,5274
10	0,965	0,376	2,910	0,094	4,996	249,802	0,958	0,373	2,888	0,093	5,019	250,932	250,3668
20	1,156	0,455	3,410	0,114	4,402	220,116	1,164	0,458	3,435	0,115	4,378	218,914	219,5151
30	1,209	0,477	3,456	0,119	4,243	212,153	1,213	0,478	3,468	0,120	4,231	211,552	211,8527
40	1,566	0,625	4,372	0,156	3,207	160,366	1,561	0,623	4,358	0,156	3,221	161,070	160,7181
50	1,121	0,440	2,971	0,110	4,452	222,613	1,114	0,437	2,952	0,109	4,472	223,598	223,1054
60	1,642	0,656	4,265	0,164	3,049	152,434	1,658	0,663	4,308	0,166	3,006	150,320	151,3771

Ek-2 Kümülatif Mannoz adsorpsiyon değerleri (Devamı)

1,5 mg/ml													
zaman (dk)	5 (A)	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	5 (B)	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	Ortalama
0						0,000						0,000	0
5	2,937	1,1929	7,157	0,298	1,843	122,852	2,941	1,194529	7,167	0,299	1,833	122,188	122,5199
10	2,193	0,8845	5,086	0,221	3,616	241,057	2,194	0,884924	5,088	0,221	3,613	240,870	240,9636
20	2,126	0,8567	4,712	0,214	3,769	251,239	2,109	0,849694	4,673	0,212	3,807	253,788	252,5134
30	2,245	0,9061	4,757	0,227	3,510	233,976	1,239	0,48911	2,568	0,122	5,700	379,992	306,9844
40	2,198	0,8866	4,433	0,222	3,607	240,470	2,213	0,892799	4,464	0,223	3,681	245,429	242,9496
50	2,187	0,882	4,190	0,221	3,629	241,913	2,157	0,869589	4,131	0,217	3,792	252,779	247,3464
60	2,260	0,9123	4,105	0,228	3,493	232,837	2,265	0,914351	4,115	0,229	3,590	239,351	236,0937

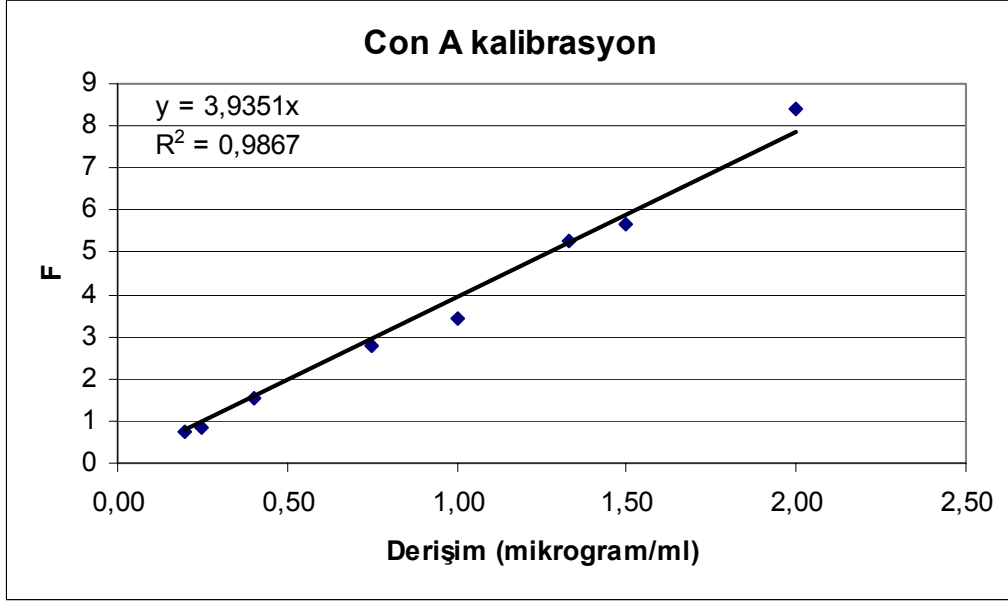
zaman (dk)	5C A	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	5C B	C	Toplam mannoz	Atilan	Eksilen mannoz	Adsorplanan/ poly	Ortalama
0						0,000						0,000	0
5	2,431	0,983	5,899	0,246	3,101	206,739	2,436	0,985	5,911	0,246	3,089	205,910	206,3247
10	2,103	0,847	4,871	0,212	3,883	258,851	2,106	0,848	4,879	0,212	3,875	258,340	258,5957
20	2,137	0,861	4,737	0,215	3,805	253,684	2,140	0,863	4,744	0,216	3,798	253,173	253,4287
30	2,099	0,846	4,439	0,211	3,888	259,197	2,091	0,842	4,422	0,211	3,904	260,281	259,7389
40	2,036	0,819	4,097	0,205	4,019	267,900	2,028	0,816	4,081	0,204	4,035	268,985	268,4426
50	2,045	0,823	3,910	0,206	4,001	266,719	2,101	0,846	4,020	0,212	3,891	259,404	263,0615
60	2,056	0,828	3,725	0,207	3,980	265,351	2,057	0,828	3,727	0,207	3,973	264,875	265,1131

EK 3 Con A Kalibrasyon Grafiği

Uyarılma dalga boyu = 280 nm

Emisyon dalga boyu = 342 nm

Slit aralığı = 10



EK 4 HÜCRE SAYIM YÖNTEMİ

Hücre sayımının amacı, kültür ortamında bulunan hücrelerin sağlıklı olup olmadıklarının belirlenerek hücre verimini saptanmasıdır.

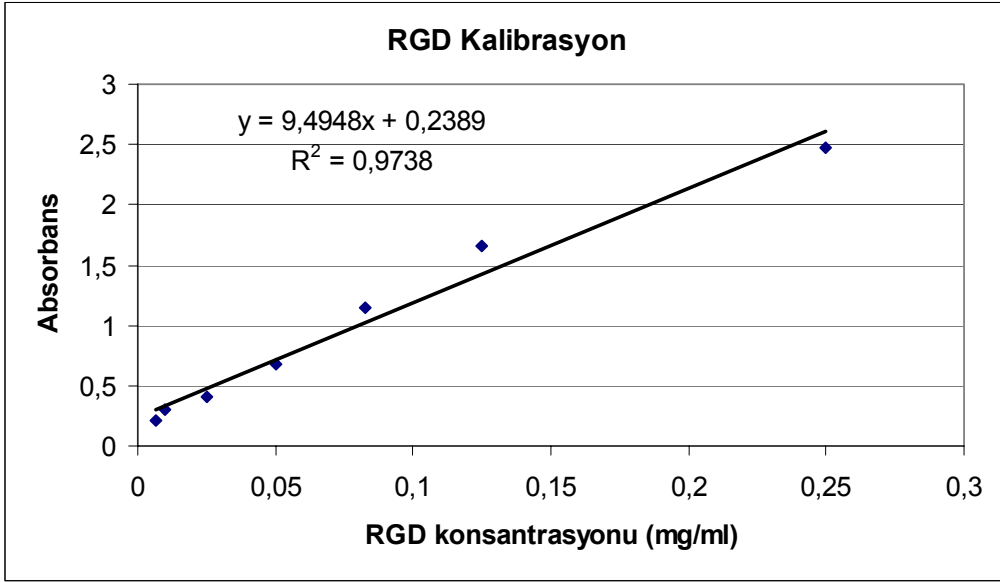
Çalışmada hücre sayımı hemositometre ile ve aşağıda verilen yöntem izlenerek yapılmıştır. Sayımı yapılacak ücre çözeltisinden bir test tüpüne 0,9 ml konulur, üzerine%0,5'lik trypan blue çözeltisinden 0,1 ml ilave edilerek, oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir. Bu beklemede ölü hücrelerin veya ölmek üzere olanların boya almalarını sağlamak içindir. Bu süre içinde ölü hücreler boyanarak koyu mavi veya mavi renkte görünürler, sağlıklı ve canlı hücreler, süre ne kadar uzun olursa olsun boya almazlar, görünüşleri parlak ve düzgündür. Sayım için boyanmamış hücre karışımından bir damla alınarak, hemositometrede lam ve lamel arasına konur, mikroskopta (0,4x10:400 kez büyütülerek) hücrelerin sayımı yapılır. Ölü ve canlı hücreler ayrı ayrı sayılır. Sayma işlemi, ya bütün kareler veya üç büyük kare sayılarak yapılır. Çıkan sayım değeri, sayılmış kare sayısına bölünür. 9 büyük kare ayılmışsa 9'a bölünür, çıkan sayı 10^{-4} ile çarpılır ve 1 ml'deki hücre miktarı bulunmuş olur.

EK 5 Giemsa ile Boyama Tekniği

- Boyama yapılacak örnekler \approx 5 dakika havada kurumaya bırakılır.
- 10-15 saniye boyunca boyanın içine daldırılır.
- 15-30 saniye için distile veya deiyonize su içinde tutulur.
- Örnekler birkaç saniye süreyle tekrar taze distile veya deiyonize su içerisine daldırılarak yıkanır ve havayla kurumaya bırakılır.

EK 6 RGD Kalibrasyon Grafiği

Çalışma dalga boyu = 550 nm



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sezin Gönen

Doğum Yeri : Ayvalık / BALIKESİR

Doğum Yılı : 1981

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : 1995–1998 İzmir Kız Lisesi

Lisans : 1998–2003 Hacettepe Üniversitesi
Kimya Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi:

2005–2006 : Bio-Gen İlaç San. Tic. Ltd. Şti.
Ruhsatlandırma Sorumlusu

2006-..... : Drogsan İlaçları San ve Tic. AŞ.
Ruhsatlandırma Sorumlusu