

**BAZI HASTALIKLARIN TANISI
İÇİN SİTRULİN BASKILI VE
MODİFİYE NANOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

Özlem YALÇINKAYA PÜYE

Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Eylül 2015

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Özlem YALÇINKAYA PÜYE'nin “BAZI HASTALIKLARIN TANISI İÇİN SİTRULİN BASKILI VE MODİFİYE NANOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı **Kimya** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 17.08.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı Soyadı	İmza
Üye (Danışman)	: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ	
Üye	: Prof. Dr. Lütfi GENÇ	
Üye	: Prof. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK	
Üye	: Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ	
Üye	: Yard. Doç. Dr. Bora GARİPCAN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI HASTALIKLARIN TANISI İÇİN SİTRULİN BASKILI VE MODİFİYE NANOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Özlem YALÇINKAYA PÜYE

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

2015, 131 sayfa

Multiple Skleroz (MS); özellikle genç erişkinlerde görülen, normal gelişimini tamamlamış olan miyelinin (sinirlerin etrafındaki kılıfın) yıkımı (demyelinizasyon) ile şekillenen, sebebi tam olarak bilinmeyen santral sinir sisteminde dağınık lezyonların bulunduğu bir hastalıktır. Merkezi sinir sistemi, miyelinin yaklaşık % 35'i farklı izoform ve izomerlerin karışımını içeren miyelin kılıf ile korunmaktadır. Bu miyelin kılıfda en çok bulunan proteinlerden biri olan Miyelin Temel Protein (MBP) dir. MS hastalarında, MBP yapısındaki argininlerin sitruline dönüşmesi söz konusudur. Bu nedenle, sitrulin aminoasidinin tayininin gerçekleştirilmesi ile MS hastalığının varlığı tespit edilebilir. Romatoid Artrit (RA) ise, dünyada ve ülkemizde en sık rastlanılan otoimmün hastalıktır. RA'de sitrulinlenmiş yapılara karşı üretilmiş otoantikorlar uzun süredir bilinmekte ve tanı amacıyla kullanılmaktadır. Anti sitrulinlenmiş siklik protein (anti-CCP) antikorlarının keşfi RA tanısı için önemli bir aşama olmuştur.

Bu çalışmada, sitrulin tayini için moleküler baskılama tekniği ile karbon nanotüp (CNT) ve Altın (Au) nanoparçacıkları yüzeyinde sitrulin aminoasidine duyarlı polimerler elde edilmiştir. Bu modifiye polimerler sayesinde MS hastalığında MBP'nin demyelinizasyonu sonucu ortaya çıkan sitrulin aminoasidinin sitruline özgü bağlanma bölgeleri ile bağlanarak dedeksiyonunun sağlanıp sağlanmadığı araştırılmıştır. Diğer taraftan, RA'de ortaya çıkan ve sitrulinlenmiş yapılara spesifik bir şekilde bağlanabilen Anti-CCP otoantikorlarının sitrulin modifiye polimerle etkileştirildiğinde RA teşhisi gerçekleştirilip gerçekleştirilmediği araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Moleküler Baskılanmış polimerler, modifiye polimerler, Sitrulin, Anti-CCP, MS, RA

ABSTRACT

PhD Dissertation

IMPROVEMENT OF CITRULLINE PRINTED AND MODIFIED NANOSENSORS FOR DIAGNOSIS OF SOME DISEASES

Özlem YALÇINKAYA PÜYE

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Department**

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

2015, 131 pages

Multiple Sclerosis (MS) is a disease, especially seen in young adults, which is taken formed by the destruction (demyelination) of myelin (around the nerve sheath) that has completed the normal development, found in central nervous system having diffuse lesions and the reason of disease is not known exactly. Central nervous system (CNS) is protected by myelin sheath containing 35 % of different isoforms and isomers of the myelin. The most abundant protein in the myelin sheath is Myelin Basic Protein (MBP). In MS patients, the arginine found in the structure of MBP is converted to citrulline. Therefore, the existence of MS can be determined by performing the determination of citrulline. Rheumatoid Arthritis (RA) is the most common autoimmune disease in the world and our country. The autoantibodies which have been produced against citrullinated structures in RA have long been known and are used for diagnostic purposes. The discovery of anti-cyclic citrullinated protein (anti-CCP) antibodies has been an important stage for RA diagnosis.

In this study, citrulline sensitive polymers have been produced by the molecularly imprinting technique on the surface of carbon nanotube (CNT) and gold (Au) for citrulline diagnosis. The binding of citrulline to specific binding sites has been investigated by these modified polymers. On the other hand, it has been investigated if the diagnosis of RA is possible when anti-CCP autoantibodies which are specifically bound to citrullinated structures are interacted with citrulline modified polymer.

Keywords: Molecularly Imprinting polymers, modified polymers, Citrulline, Anti-CCP, MS, RA

TEŞEKKÜR

Lisanüstü eğitimim boyunca her konuda desteğini yanımda hissettiğim, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ'e

Deneysel çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımıyla her zaman yanımda olan, yol göstericiliği ve değerli katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a

Tez izleme komitesinde yer alan ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Lütfi GENÇ ve Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ'e

Çalışmalarım boyunca bölümümüz imkânlarından yararlanmamı sağlayan Kimya Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. İbrahim KANİ'ye

Tez çalışmam süresince destekleri ve yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN, Uzm. Sibel BÜYÜKTİRYAKİ, Uzm. Rüstem KEÇİLİ, tüm SYNREG grup üyelerine,

Deneysel çalışmalarındaki TEM analizlerindeki katkılarından dolayı Biyolog Arzu İŞCAN'a, laboratuvar olanakları sağlayan BİBAM yönetimine,

Desteklerinden dolayı arkadaşlarım Kimya Mühendisi Özlem YILMAZ, Kimyager Okan USLU'ya

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan ve manevi desteğini esirgemeyen canım ANNEM, BABAM, KARDEŞLERİM ve biricik yeğenim ÇINAR EGE'ye

Hayatıma girdiği günden beri sevgi, emek ve desteğiyle daima yanımda olan sevgili eşim Serkan Ethem PÜYE'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Özlem YALÇINKAYA PÜYE

Eylül - 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ix
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1 Sitrülin Aminoasidi	2
1.2 Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP).....	6
1.3 Polimer Sentezi	10
1.3.1 Serbest Radikal Polimerizasyonu	11
1.3.2 Serbest Radikal Ko-Polimerizasyonu	12
1.3.3 Çapraz Bağlı Polimerler	13
1.3.4 Moleküler Baskılama Yöntemleri	13
1.3.5 Kovalent Moleküler Baskılama	14
1.3.6 Metal-Şelat Baskılama.....	14
1.3.7 Non-kovalent Moleküler Baskılama.....	15
1.4 Moleküler Baskılı Polimerlerdeki Önemli Parametreler.....	16
1.4.1 Konuk Molekül.....	16
1.4.2 Fonksiyonel Monomerler	17

1.4.3	Çapraz Bağlayıcılar	19
1.4.4	Çözücüler.....	22
1.4.5	Başlatıcılar	22
1.5	Moleküler Baskılı Polimerlerin Uygulama Alanları	23
1.5.1	MIP-temelli Biyosensörler	23
1.5.2	Kromatografik Ayırım.....	24
1.5.3	Diğer Uygulama Alanları	25
1.5.3.1	Antikor Benzerleri	25
1.5.3.2	Enzim Benzerleri	25
1.5.3.3	Yapay Katalizörler	26
1.6	Otoimmün Hastalıklar	26
1.6.1	Romatoid Artrit (RA)	27
1.6.2	Multipl Skleroz (MS)	29
1.7	Nanoteknoloji ve Nanomalzemeler	31
1.7.1	Nanomalzemelerin üretim yöntemleri	31
1.7.2	Karbon nanotüp (CNT).....	35
1.7.3	CNT Sentezleme Yöntemleri	37
1.7.2.1	Katı Hâlde Karbondan Sentezlenenler.....	37
1.7.2.2	Diğer Sentezleme Yöntemleri.....	42
1.7.4	Karbon Nanotüplerin Uygulama Alanları	43
1.7.3.1	CNT'nin Günümüzdeki Uygulamaları	44
1.7.3.2	Geleceğe Yönelik Uygulama Planları.....	47
1.7.5	Altın (Au) Nanopartiküller	48
1.7.6	Au NP Sentezi	50

1.7.7 Au NP'lerin Uygulama Alanları.....	51
1.8 Spektroskopik Analiz Yöntemleri.....	53
1.8.1 Ultra Viyole (UV) Spektroskopisi.....	53
1.8.2 Frouier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi.....	54
1.8.3 Bağlanma ve Bağlanma İzotermi 55	
1.8.3.1 Bağlanmayı Etkileyen Faktörler	55
1.8.3.2 Bağlanma İzotermi.....	56
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	60
2.1 Materyal	60
2.1.1 Kullanılan kimyasallar maddeler.....	60
2.1.2 Kullanılan cihazlar.....	60
2.2 Yöntem.....	61
2.2.1 Metakroil amido antipirin-Tb(III) ((MAAP) ₂ -Tb(III)) Metal-Şelat Monomerinin Sentezi.....	64
2.2.2 Au NP Sentezi	65
2.2.3 Au NP'lerin Metakriloil Amido Sisteyn (MAC) ile Modifikasyonu.....	65
2.2.4 Au-MAC Nanopartiküllerin Metakriloil Antipirin Terbiyum(III) (MAAP ₂ -Tb(III)) Metal-şelat Monomeri ile Modifikasyonu.....	66
2.2.5 Au NP yüzeyinde Modifiye ve Baskılı Polimer Sentezi	66
2.2.6 Karboksillenmiş CNT Sentezi.....	66
2.2.7 CNT'ün Metal-Şelat Monomeri ile Etkileştirilmesi.....	67
2.2.8 CNT-(MAAP) ₂ -Tb(III)-sitrulin Polimerinin Sentezi	67
2.3 Bağlanmayı Etkileyen Etmenler.....	68
2.4 Baskılı Nanosensörler için Seçicilik Çalışmaları	69

3. BULGULAR	70
3.1 Karakterizasyon Çalışmaları	70
3.1.1 Metakroil amido antipirin-Tb(III) ((MAAP) ₂ -Tb(III)) Metal-Şelat Monomerinin Karakterizasyonu	70
3.1.2 CNT Yüzeyinde Sentezlenen Polimerin Karakterizasyonu ..	71
3.1.2.1 CNT ve CNT-COOH Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	71
3.1.2.2 CNT-(MAAP) ₂ -Tb(III) Karakterizasyonu	72
3.1.2.3 CNT-(MAAP) ₂ -Tb(III)-Sitrulin Polimeri Karakterizasyonu	73
3.1.3 Au Nanopatikül (NP) Yüzeyinde Sentezlenen Polimerin Karakterizasyonu	74
3.1.3.1 Au NP Karakterizasyonu	74
3.1.3.2 Au-MAC Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	75
3.1.3.3 Au-MAC-MAAP ₂ -Tb(III) Moleküllerinin Karakterizasyonu	77
3.1.4 CNT ve Au NP yüzeyinde Modifiye ve Baskılı Polimerlerin TEM Görüntüleri	79
3.2 CNT Yüzeyindeki Baskılı ve Modifiye Polimerler ile Derişim Çalışması	81
3.2.1 CNT yüzeyindeki baskılı polimerler-sitrulin derişim çalışması	81
3.2.2 CNT-yüzeyindeki baskılı polimerler-sitrulin bağlanma izotermeleri.....	82
3.2.3 CNT yüzeyindeki modifiye polimerler-anti-CCP derişim çalışması	85
3.2.4 CNT-yüzeyindeki modifiye polimerler-anti-CCP bağlanma izotermeleri	85
3.3 Au NP Yüzeyinde Baskılı ve Modifiye Polimerlerle Yapılan Derişim Çalışması	88

3.3.1 Au NP yüzeyinde baskılı polimerlerle yapılan derişim çalışması	88
3.3.2 Au NP yüzeyindeki baskılı polimerler-sitrulin bağlanma izotermi.....	89
3.3.3 Au NP yüzeyindeki modifiye polimerlerle yapılan derişim çalışması	91
3.3.4 Au NP yüzeyindeki modifiye polimerler-anti-CCP bağlanma izotermi	93
3.4 Bağlanmayı Etkileyen Etmenler.....	97
3.5 Baskılı Nanosensörler için Seçicilik Çalışmaları	101
3.6 Polimerlerin temsili numunelerle etkileştirilmesi	101
4. TARTIŞMA, SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	106
KAYNAKLAR	113

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sitrulinin Kimyasal Yapısı	2
Şekil 1.2. Üre Döngüsünde Sitrulinden Argininin Oluşumu	3
Şekil 1.3. Peptidil Argininin Peptidil Sitruline Dönüşümü	4
Şekil 1.4. Organlararası Sitrulin Metabolizması.....	5
Şekil 1.5. Moleküler Baskılamanın Şematik Olarak Gösterimi.....	7
Şekil 1.6. AIBN Başlatıcısının Fotolizle Bozunmaya Uğramasının Şematik Gösterimi	12
Şekil 1.7. A. İki Farklı Monomerin Bağlanması B. İki Farklı Monomer Ön- Organizasyon Sonrasında Komonomer Oluşturması	12
Şekil 1.8. Non-Kovalent Yaklaşım İçin Seçilmiş Bazı Fonksiyonel Monomerler	18
Şekil 1.9. Moleküler Baskılama İçin Kullanılan Çapraz Bağlayıcılar.....	21
Şekil 1.10. Moleküler Baskılamada Çoğunlukla Kullanılan Başlatıcıların Kimyasal Yapıları	23
Şekil 1.11. Nanopartikül Üretim Yöntemlerinin Genel Gösterimi	32
Şekil 1.12. Karbonun Allotropları	36
Şekil 1.13. Au NP'lerin Sentezinin Zamana Bağlı Grafiği.....	50
Şekil 2.1. CNT Yüzeyinde Modifiye ve Baskılı Polimerizasyon İşlemlerinin Şematik Gösterim	62
Şekil 2.2. Au NP Yüzeyinde Modifiye ve Baskılı Polimerizasyon İşlemlerinin Şematik Gösterimi	63

Şekil 2.3. Metakrilo Amidoantipirin (MAAP) Monomerinin	
Sentez Reaksiyonu.....	64
Şekil 2.4. (MAAP) ₂ -Tb(III) Metal-Şelat Monomerinin Molekül Formülü	65
Şekil 2.5. CNT' Nin Karboksillenmesi.....	67
Şekil 2.6. Karboksillenmiş CNT'ün Metal-Şelat Monomeri ile	
Fonksiyonellendirilmesi	67
Şekil 2.7. Arginin Molekül Yapısı.....	69
Şekil 3.1. (MAAP) ₂ -Tb(III) Metal-Şelat Monomerinin FT-IR Spektrumu	70
Şekil 3.2. (MAAP) ₂ -Tb(III) Metal-Şelat Monomerinin MALDI-TOF-MS	
Spektrumu.....	71
Şekil 3.3. Karboksillenmiş CNT'e Ait FT-IR Spektrumu	72
Şekil 3.4. Metal-Şelat Monomeri ile Fonksiyonellendirilen CNT.....	73
Şekil 3.5. CNT-(MAAP) ₂ -Tb(III)-Sitrulin Polimerine Ait FT-IR Spektrumu	73
Şekil 3.6. Au NP'lere Ait UV Spektrumu.....	74
Şekil 3.7. Au NP'lere Ait FT-IR Spektrumu	75
Şekil 3.8. Au-MAC Nanopartiküllere Ait UV Spektrumu	76
Şekil 3.9. Au-MAC Nanopartiküllere Ait FT-IR Spektrumu	77
Şekil 3.10. Au-MAC-MAAP ₂ Tb(III) Moleküllerine Ait UV Spektrumu	78
Şekil 3.11. Au-MAC-MAAP ₂ -Tb(III) Modifiye Nanopartiküllerine Ait FT-IR	
Spektrumu	78
Şekil 3.12. A. Au NP'ler, B. Au NP Yüzeyindeki Modifiye Polimerler,	
C. Au NP Yüzeyindeki Baskılı Polimerlere Ait TEM Görüntüleri ...	79
Şekil 3.13. A. CNT, B. CNT Yüzeyindeki Modifiye Polimerler, C CNT	
Yüzeyindeki Baskılı Polimerlere Ait TEM Görüntüleri	80

Şekil 3.14. Sitrulin Derişimi ile Floresans Şiddeti Arasındaki İlişki.....	81
Şekil 3.15. Stern-Volmer Grafiğı.....	82
Şekil 3.16. Sitrulin Amino Asidi İçin Langmuir Bağlanma Modeli.....	83
Şekil 3.17. Sitrulin Amino Asidi İçin Freundlich Bağlanma Modeli	83
Şekil 3.18. CNT Yüzeyinde Baskılı Polimerlerin Scatchard Analizi	84
Şekil 3.19. Anti-CCP Derişimi ile Floresans Şiddeti Arasındaki İlişki.....	85
Şekil 3.20. Anti-CCP İçin Langmuir Bağlanma Modeli	86
Şekil 3.21. Anti-CCP İçin Freundlich Bağlanma Modeli	86
Şekil 3.22. Anti-CCP İçin Scatchard Bağlanma Modeli	87
Şekil 3.23. Sitrulin Derişimi ile Floresans Şiddeti Arasındaki İlişki.....	88
Şekil 3.24. Sitrulin Amino Asidi İçin Langmuir Bağlanma Modeli.....	89
Şekil 3.25. Sitrulin Amino Asidi İçin Freundlich Bağlanma Modeli	90
Şekil 3.26. Sitrulin İçin Scatchard Bağlanma Modeli.....	91
Şekil 3.27. Anti-CCP Derişimi ile Floresans Şiddeti Arasındaki İlişki.....	92
Şekil 3.28. Stern-Volmer Grafiğı.....	92
Şekil 3.29. Anti-CCP Otoantikoru İçin Langmuir Bağlanma Modeli	93
Şekil 3.30. Anti-CCP Otoantikoru İçin Freundlich Bağlanma Modeli.....	94
Şekil 3.31. Anti-CCP İçin Scatchard Bağlanma Modeli	94
Şekil 3.32. CNT ve Au NP Yüzeyinde Modifiye Polimerlerle Anti-CCP Bağlanmasına Ph Etkisi.....	97
Şekil 3.33. CNT ve Au NP Yüzeyinde Baskılı Polimerlerle Sitrulin Bağlanmasına Ph Etkisi.....	98
Şekil 3.34. CNT ve Au NP Yüzeyinde Modifiye Polimerlerle Anti-CCP Bağlanmasına Sıcaklık Etkisi.....	98

Şekil 3.35. CNT ve Au NP Yüzeyinde Baskılı Polimerlerle Sitrulin	
Bağlanmasına Sıcaklık Etkisi.....	99
Şekil 3.36. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	100
Şekil 3.37. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	100
Şekil 3.38. Standart Ekleme Yöntemi Kullanılarak CNT Yüzeyinde Baskılı	
Polimerle Temsili Numunedeki Sitrulin Miktarının Tayini.....	103
Şekil 3.39. Standart Ekleme Yöntemi Kullanılarak Au NP Yüzeyinde Baskılı	
Polimerle Temsili Numunedeki Sitrulin Miktarının Tayini.....	103
Şekil 3.40. Standart Ekleme Yöntemi Kullanılarak CNT Yüzeyinde Modifiye	
Polimerle Temsili Numunedeki Anti-CCP Miktarının Tayini.....	104
Şekil 3.41. Standart Ekleme Yöntemi Kullanılarak Au NP Yüzeyinde Modifiye	
Polimerle Temsili Numunedeki Anti-CCP Miktarının Tayini.....	105

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABDV	:	Azobisdimetilvaleronitril
ACPA	:	Anti-Sitrulinize-Protein Antikorları
AFM	:	Atomik Kuvvet Mikroskopi
AIBN	:	Azobis İzobütironitril
AKA	:	Anti-Keratin Antikorları
Anti-CCP	:	Antisiklik Sitrullenmiş Antikorlar
APF	:	Anti-Perinükleer Faktör
ARG	:	Arginin
Bis-NAD	:	Bis- Nikotinamid Adenin Dinükleotit
BPO	:	Benzoilperoksit
CCVD	:	Katalizörlü Kimyasal Buhar Çökeltme
CFM	:	Kimyasal Kuvvet Mikroskop
CIT	:	Sitrulin
CNT	:	Karbon Nanotüp
CVC	:	Kimyasal Buhar Yoğunlaştırma
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
EAE	:	Otoimmün Ensefalomyelit
EDMA	:	Etilen Glikol Dimetakrilat
FT-IR	:	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
GFAP	:	Glialfibriler Asidik Protein
GLN	:	Glutamin
GLNase	:	Glutaminaz
HPLC	:	Yüksek Performans Sıvı Kromatografi
IgG	:	İmmunoglobulin G

MAA	:	Metakrilik Asit
MAAP	:	Metakroil Amido Antipirin
MAC	:	Metakrilamidosistein
MAH	:	N-Metakroil- L-Histidin
MALDI-TOF-MS	:	Matriks Yardımcılı Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometri
MBP	:	Miyelin Temel Protein
MIP	:	Moleküler Baskılanmış Polimerler
mRNA	:	Mesajcı RNA
MS	:	Multipl Skleroz
MSS	:	Merkezi Sinir Sistemi
MWPCVD	:	Mikrodalga Plazmayla Kimyasal Buhar Çökeltme
NMR	:	Nükleer Manyetik Rezonans
NO	:	Nitrik Oksit
OAT	:	Ornitin Aminotransferaz
OCT	:	Ornitin Karbamoiltransferaz
PAD	:	Peptidil Arginin Deiminaz
PETRA	:	Pentaeritritol Triakrilat
RA	:	Romatoid Artirit
RF	:	Romatoid Faktör
T1D	:	Tip 1 Diyabet
TEM	:	Geçirimli Emisyon Mikroskobu
TLC	:	İnce Tabaka Kromatografisi
TRIM	:	Trimetilpropan Trimetakrilat
UV	:	Ultra Viole
XRD	:	X-Işını Kırınım

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1. Nanosensörlere uygulanan Langmuir, Freundlich ve Scatchard	
bağlanma izotermelerinin karşılaştırılması	96
3.2. Sitrulin baskılı polimerlerle seçicilik çalışması	101
3.3. Temsili numunelerdeki analit miktarları	106

1. GİRİŞ

Bilim dünyası, son yıllarda birçok hastalığın teşhisi için biyolojik malzemelerin tayinine yönelik nanomalzemeler geliştirerek bu malzemelerin kullanım amaçlarına yeni bir boyut eklemiştir. Son yıllarda artan araştırmalar sonucunda mevcut teknolojilerin eksikliklerini gidererek kullanımı kolay, yüksek duyarlılıkta, seçici teşhis araçlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bilim insanları tarafından geliştirilen nanosensörler, nanomalzeme temeline dayanan, var olan teşhis araçlarına nazaran kullanımı kolay, yapımı ve üretimi ucuz, seçiciliği ve duyarlılığı yüksek teşhis araçlarıdır. Birçok farklı tür için geliştirilen yöntem, hedef molekülün tanınması imkânını sağlamaktadır. Fakat biyolojik tanıma elementlerinin kullanıldığı biyosensörler, bu elementlerin kolay bozulmasından dolayı, kararlılıkları az ve cihazların kullanımını zor hale getirmektedir.

Son yıllarda yeni bir çıkış yolu olarak “Moleküler Baskılama” teknolojisi ortaya çıkmıştır. Bu teknikle, moleküler tanıma yeteneğine sahip, işlevselleştirilmiş sentetik polimerler hazırlanmaktadır. Hazırlanan bu polimerler hedef moleküle ait tanıma yerleri ve hedef molekülü biçim ve konum açısından tamamlayıcı özelliktedir. Bu polimerler, biyolojik numunelere (antikorlar ve reseptörler) ait tanıma bölgelerine sahip olduğunda ise, analitik kimya açısından oldukça kullanışlı bir kimyasal sensör oluşturulabilmektedir. Son zamanlarda, nano yapıları kimyasal sensör sistemlerinin yapılması, yeni biyomalzemelerin üretimi ve izolasyonuna yönelik çalışmalar yoğunluk kazanmakta olup ülke ekonomisi için oldukça önemli ve öncelikli alanlar arasında yer almaktadır.

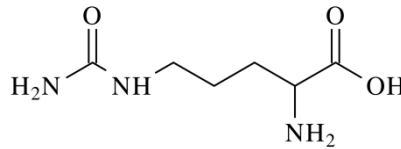
Sitrulin, özde var olmayan (Kaore ve Kaore 2014, Odewunmi, 2015), fakat doğal olarak oluşan ve yapısında amit, karboksilik ve amin fonksiyonel gruplarını bulunduran (Odewunmi, 2015) bir aminoasittir. Bütün canlı organizmalarda ve memelilerde bulunan sitrulin renksiz ve suda çözünebilen bir aminoasit olup (Morito 2014), böbreklerdeki absorpsiyonu açısından argininden daha iyidir (Odewunmi 2015) ve karaciğerdeki üre döngüsünde amonyak salgılama esnasında kilit rol oynamaktadır (Endo 2004). Sitrulin birçok hastalık için biyobelirteç olarak kullanılmakta olup bunlardan bazıları Romatoid

Artrit(RA), Sjögren's sendromu, Multipl skleroz (MS), sepsis (kan zehirlenmesi) hastalıklarıdır.

Bu doğrultuda; çalışma kapsamında geliştirmeyi hedeflediğimiz, sitrulin molekülünü tanıyan yeni nesil sensör bazlı çalışma, biyosensör içerikli literatürde yer almamaktadır. Bu amaçla; MS ve RA hastalıklarının tanısı için tek platform üzerinde nanosensör geliştirilmesi hedeflenmiştir. RA için Karbon Nanotüp (CNT) ve Altın (Au) nanopartikül (NP) yüzeyinde modifiye polimer sentezi gerçekleştirilirken, MS için yine CNT ve Au NP'ler yüzeyinde moleküler baskılı polimer sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu iki sensör için, proses basamakları bir noktaya kadar aynı giderken, bir noktadan sonra farklılaşmıştır. Bu farklılaşma da RA ve MS için aynı platformda sensör oluşturulmasını sağlamaktadır.

1.1 Sitrulin Aminoasidi

Sitrulin (Şekil 1.1), doğal olarak oluşan bütün canlı organizmalarda var olan bir aminoasittir. Molekül formülü $C_6H_{13}N_3O_3$ olup, molekül ağırlığı 175,19 g mol⁻¹'dir.

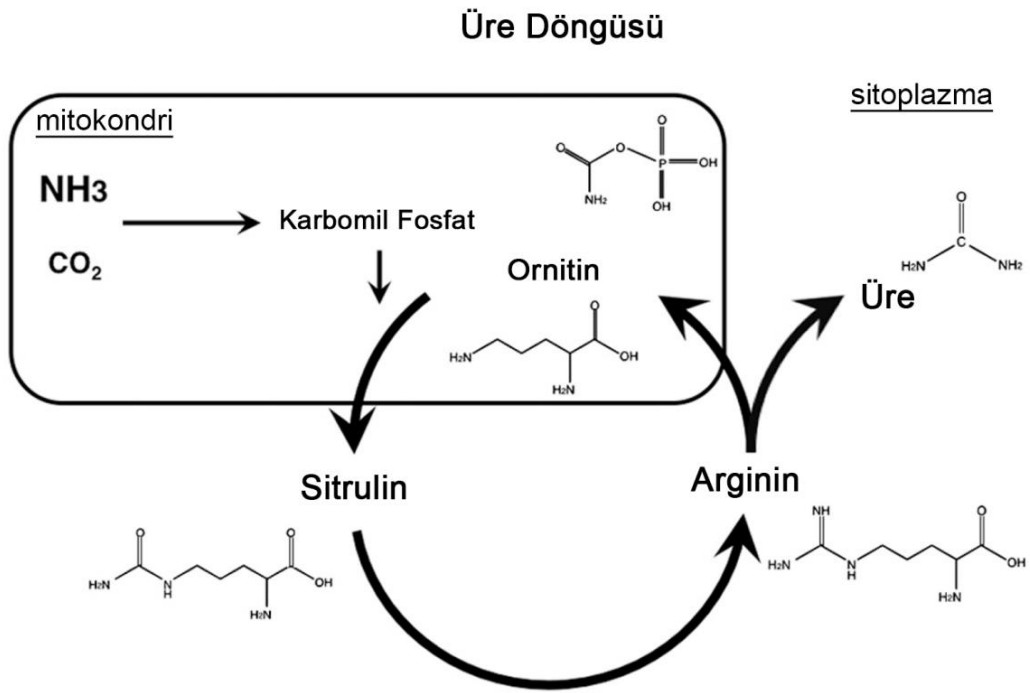


Şekil 1.1. Sitrulinin kimyasal yapısı

Karpuz, salatalık, kavun gibi birçok besinde bulunan sitrulin insan vücudunda doğal olarak sentezlenebilmektedir (Kaore ve Kaore, 2014)). İsmi ise karpuzun latince ismi olan *Citrullus vulgaris*'den gelmektedir ve ilk kez karpuzdan saflaştırılmıştır (Bahri ve ark., 2013; Kaore ve Kaore, 2014) Memelilerde amonyak üretimi yapılan üre döngüsünde anahtar rol oynar ve karaciğerde üre döngüsünün bileşenleri olan ornitin ve karbomoil fosfattan,

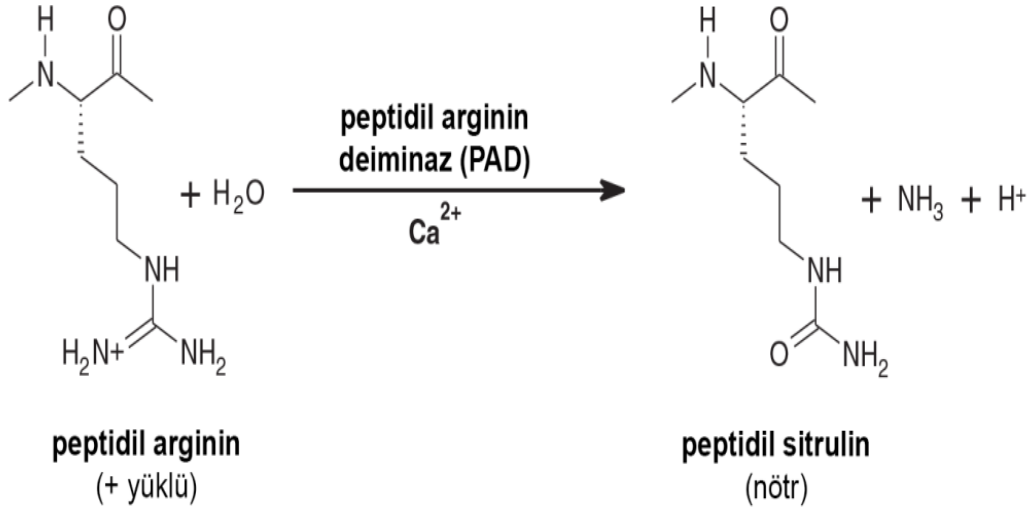
enterositlerde glutamin ve argininden elde edilmektedir (Takeda, 2011). Arginin öncül olduğundan dolayı sitrulin, argininden sentezlenebilir.

Şekil 1.2’den de anlaşılaçağı gibi üre döngüsü üçü mitokondride, ikisi stoplazmada gerçekleşen beş basamaktan oluşmaktadır. Bu basamaklardan biri de sitrulin sentezi olup, mitokondride karbomil fosfat ve ornitinden, stoplazmada ise glutamin ve argininden oluşmaktadır.



Şekil 1.2. Üre döngüsünde sitrulinden argininin oluşumu (Takeda ve Takemasa 2013)

Sitrulin, Peptidil arginin deiminaz (PAD) (EC 3.5.3.15.) enziminin arginin deiminasyonu sonucunda elde edilen bir aminoasittir (Raijmakers, 2007; Tuttüren, 2010; Crenn, 2008) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Peptidil argininin peptidil sitriline dönüşümü (Raijmakers, 2007)

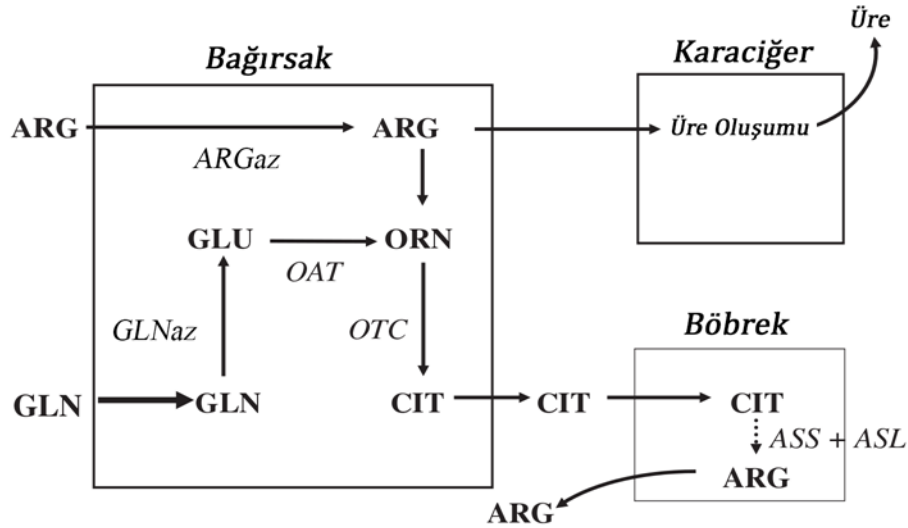
Arginin bazı hücrelerde, nitrik oksit (NO) döngüsünde büyük önem taşıyan sitrulinden de geri dönüştürülebilir. Bu nedenle, NO sentezi için, sitrulin arginin ön-maddesi olarak işlev görebilir ve NO metabolizması ve düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Häberle, 2012).

Bu nedenle sitrulin NO metabolizmasına ait bozuklukları kontrol etmek ve kardiyovasküler fonksiyonu iyileştirmek için bir tedavi yöntemi olabilir. Ancak, arginin takviyesinin gerektirdiği bütün koşullar ya da hastalıklar için sitrulin takviyesinin zararlı olabileceği dikkate alınmalıdır (Takeda ve Tohru Takemasa 2013; Kaore ve Kaore, 2014; Bahri ve ark. 2013; Wauven ve Stalon.1985).

Sitrulin metabolizması çok iyi açıklanamamakla birlikte bağırsakta gerçekleşen metabolik reaksiyonlar için şimdiye kadar yayınlanmış birkaç yayından elde edilen bilgiler bulunmaktadır. Bağırsak sitrulin üretimi muhtemelen bağırsak villus orta ve üst kısımlarından, proksimal ince bağırsak ağırlıklı olmaktadır. Bağırsaklardan çıktıktan sonra, sitrulin önemli derecede metabolize olmadan karaciğere geçer ve daha sonra dolaşım sisteminin bir parçası olan

sistemik dolaşıma ulaşır. Karaciğer sitrulin dolaşım seviyelerine önemli ölçüde katkıda bulunmaz (Bahri ve ark., 2013).

Şekil 1.4’de de görüldüğü gibi, Glutamin (GLN) bağırsaktaki sitrulinin öncül maddesi olarak kabul edilir. GLN metabolizmasının nihayi ürünü olarak sitrulin oluşmaktadır. GLN’den sitrulin sentezine katılan 5 farklı mitokondriyal enzim bulunmaktadır: glutaminaz (GLNase), ornitin aminotransferaz (OAT), ornitin karbamoiltransferaz (OCT), pirolin-5-karboksilat sentaz ve karbomil fosfat sentetaz-I. Burada anahtar rol oynayan enzimler, ince bağırsak eritsositlerine özgü ornitin aminotransferaz ve pirolin-5-karboksilat sentazdır.



Şekil 1.4. Organlararası sitrulin metabolizması. ARG, arginin; ARGase, arginaz; ASS+ASL, argininosüksinat sentetaz ve argininosüksinat liyazı; CIT, sitrulin; GLN, glutamin; GLNase, glutaminaz; GLU, glutamat; OAT, ornitin aminotransferaz; OCT, ornithine karbamoiltransferaz; ORN, ornithine (Bahri ve ark., 2013)

Böbrek, sitrulin dolaşımı için büyük tüketicidir. Kan yoluyla böbreğe yaklaşık 1,5 g sitrulin/gün gelirken bağırsak tarafından yaklaşık % 83’ü böbreğe salınan sitrulinin % 35’i böbrek tarafından metabolize edilir. Kandan ekstre edilen sitrulinin % 75’i stokiyometrik olarak argininosüksinat sentetaz ve argininosüksinat liyazı ile kısmi üre döngüsünde arjinin haline dönüştürülür (Şekil

1.2). Sentezlenen arginin önce böbrek atardamarına, sonra da kana verilir. Böbrek tarafından sitrulinden dönüştürülmüş arginin vücudun ihtiyaçlarını karşılayacak miktardadır. Sitrulinden sentezlenen arginin, vücut tarafından sentezlenen toplam argininin % 60'ını oluşturmaktadır (Kaore ve Kaore, 2014; Bahri ve ark., 2013).

Sitrulin birçok hastalıkta kullanılan bir biyobelirteçtir. L-Sitrulinin belirlenmesi için birçok yöntem belirlenmiştir. Archibald metodu, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve ince tabaka kromatografisi (TLC) kullanılan yöntemlerden bazılarıdır. L-sitrulinin miktar tayini Archibald metodu ve TLC ile kesin bir şekilde belirlenemezken, HPLC yöntemi ile daha düşük tayin sınırlarına inilmiştir (Kameya ve Asano 2014). HPLC'nin diğer yöntemlere göre avantajı düşük tayin sınırına, $0,4 \mu\text{molL}^{-1}$, inilebilmesidir. (Jiayou,2006; Filho,2003; Meneguello,2003; Archibald, 1944;).

1.2 Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP)

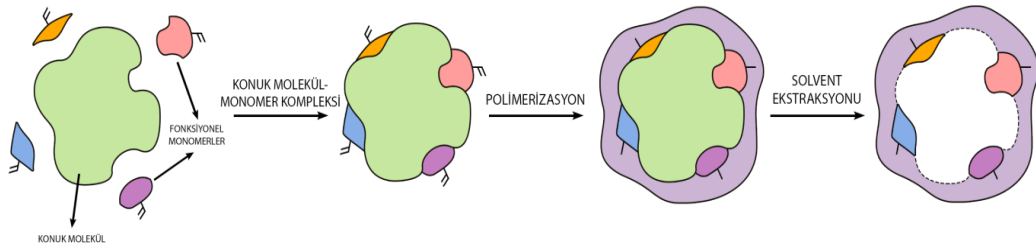
1987'de Cram, Lehn ve Pederson Nobel ödülü aldığından beri "moleküler tanımlama" bütün dünyada tanınmıştır. Moleküler tanımlama konsepti farmakolojik ve fizyolojik olayların anlaşılması için güçlü bir araç olabilir, çünkü yaşamın korunması ve üretimi moleküler tanımlamanın temeli olan basit ama özel kimyasal reaksiyonlarının birleşimi ile yönetilir. Moleküler tanımlama biyolojik fonksiyonların kökeni olduğu için, moleküler tanımlama yeteneğine sahip sentetik moleküllerin kombinasyonu ve hazırlanması, bize biyo-fonksiyonel yapay moleküllerin oluşturulmasını sağlar. Biyoteknolojide, medikalde ve biyoanalitik alanlarda doğal biyomoleküller için bazı biyobenzer moleküller son derece kullanışlıdır. Bu nedenle, araştırmacılar yapay reseptörlerin sentezi ve dizaynına büyük ilgi göstermektedirler. Fonksiyonel moleküller, moleküler tanımlama biyolojik prosesinde yaygın olarak bulunabilir. Supramolekül oluşumunu içeren biyobenzer bir strateji olarak "moleküler baskılama", moleküler tanıma yeteneğine sahip işlevselleştirilmiş sentetik polimerler hazırlamak için ısmarlama bir yol olarak kabul edilir ve işlem aşağıda belirtilen üç basamakla özetlenebilir;

- (1) Polimerize edilebilir monomerler, kovalent ve / veya kovalent olmayan bağlanma ile, hedef molekül ile etkileşime girebilen fonksiyonel

grup'(lar)a sahip fonksiyonel monomerler ile kompleks oluşturur. Bu basamakta fonksiyonel monomerler konuk molekül etrafında bağlanma bölgelerinin oluşumu için biraraya gelirler, (2) Polimerizasyon gerçekleştirilir, (3) “terzi işi” bağlanma bölgelerine sahip olan sonuç polimer matrislerinden konuk molekülün ayrılması işlemi gerçekleştirilir.

Kısaca anlatmak gerekirse, moleküler baskılama bir konuk molekül etrafında polimerleşebilir fonksiyonel monomerlerin düzenlenmesini içerir. Bu düzenleme konuk molekül ve fonksiyonel monomerler arasındaki ya Hidrojen bağları, iyon çifti etkileşimleri gibi nonkovalent etkileşimlerle (nonkovalent baskılama) ya da tersine kovalent etkileşimlerle (kovalent baskılama) gerçekleştirilir. Oluşan kompleksler, daha sonra bir çok çapraz bağlanmış makro-gözenekli polimer matrisine polimerizasyonu yolu ile dahil edilmiştir. Konuk molekülün yapıdan uzaklaştırılması ile polimerde konuk moleküle özgü şekil ve fonksiyonel grup tamamlayıcılığı bulunan bağlanma bölgeleri kalır (Mayes, 1997).

Şekil 1.5, moleküler baskılamanın aşamalarını ve bu aşamalar sonunda polimerizasyonun nasıl ilerlediğini göstermektedir.



Şekil 1.5. Moleküler Baskılamanın şematik olarak gösterimi

Bu teknik, tasarlanmış bağlanma bölgeleri için sentetik bir strateji olarak, basitlik ile karakterize edilebilir ve en önemli avantajı, bağlanma bölgelerinin ayrıntılı bir tasarım için geleneksel yapay küçük molekül reseptörlerinin hazırlanmasından farklı olarak, daha önce hazırlanmasının gerekli olmasıdır.

Daha iyi, daha seçici ve hassas analitik prosedürlerin de dahil olduğu ilaç ve çevre sektörlerinde yeni, hızlı ve etkili yöntemlere sürekli ihtiyaç vardır. Analitlerin sayısındaki artış hızlı bir yöntem geliştirmeyi ve analizlerin artan sayısı da otomasyon için hızlı yöntemleri gerektirir. Kompleks matrisleri için analitik metotlar etkili örnek zenginleştirmeye ve seçici analizlere bağlıdır. MIP'ler cazip özellikleri olan yeni bir sorbent türü olarak ilgi kazanmıştır. Konuk molekül-monomer sistemi, çözelti ortamında konuk molekül ile onunla kompleks oluşturan bir veya birkaç fonksiyonelden seçilir. Ortaya çıkan baskılı polimer konuk molekül için sterik (boyut ve şekil) ve kimyasal hafızaya sahiptir. Konuk molekülün çıkarılmasını takiben, karışımındaki baskılanmış molekül yeniden bağlanarak seçici olarak polimer molekülleri ile ayrılması sağlanır.

Moleküler baskılama, son yıllarda kimya, biyokimya ve biyoteknolojinin birçok alanında kullanılmaktadır. Son zamanlarda baskılı polimerler ilaçlar, herbisitler, şekerler, nükleotitler, amino asit ve proteinler gibi farklı konuk molekülleriyle kataliz ya da sentetik prosesler kadar analitikte de kullanılmaktadırlar. Baskılanmış polimerler sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez, kapiler elektrokromatografi, katı faz ekstraksiyon, ligand bağlanma analizi ve sensör teknolojisi gibi birçok birçok analitik teknikte kullanılmaktadırlar (Andersson, 2000). Moleküler baskılı malzemenin, üretilmeden ve kullanıcı temel amacını belirlemeden polimerin uygun biçiminin önceden tasarlanması gerekir.

Bu malzemeleri elde etmenin yollarından biri bulk polimerizasyonu ile üretimdir. Fakat bu prosedür zaman alıcıdır ve ne yazık ki malzeme kaybına neden olmaktadır. Polimer verimi genellikle % 20'dir. Bu dezavantajdan kaçınmak için alternatif bir metot bulunmuştur; mikrokürelerin üretimi. Bu malzemeler, üretimden hemen sonra direkt olarak kullanılabilir. Sadece konuk molekül ekstraksiyon yöntemiyle uzaklaştırılır. Bu yöntem daha avantajlıdır, çünkü bu mikroküreler aynı yapıda üretilmektedir.

Bu bilgilerden şu sonuç çıkarılabilir ki; MIP'ler kimya, biyoteknoloji ve eczacılığın farklı alanlarında uygulanabilme özelliğine sahiptirler. Değerlendirilen

ilk şey, biyobenzer malzeme formatıdır. Bu akıllıca bir seçimdir, MIP'in en iyi performansının bu format üzerinde odaklanılarak bulunabileceği düşünülmüştür (Bruggemann, 2000). MIP'ler için 3 temel çalışma alanı öngörülmüştür.

- (i) "terzi-işi" (tailor-made) yapıya özel ayırma malzemeleri
- (ii) enzim teknolojisinde ve organik sentezlerde enzim mimik (benzeri) malzemeler ve katalitik olarak aktif polimerler
- (iii) biyosensör benzeri yapılarda sensörler olarak, ki bu sayede, normal olarak kullanılan polimerler, biyolojik malzemeler için ikame olarak kullanılmaktadır (Kempe ve Mosbach 1995b). Bir moleküler baskılanmış polimerin sentez ve dizaynının tecrübesiz bir uygulayıcı tarafından yapılması göz korkutucu olabilir, en azından deneysel değişkenlerin sayısının çokluğu buna sebep olur. Bu değişkenler, konuk molekülün seviye ve doğası, fonksiyonel monomerler, çapraz bağlayıcılar, çözücüler ve başlatıcı, başlatma metodu ve polimerizasyon süresidir. Neyse ki, literatürde bu konuda yardımcı olabilecek hatırı sayılır "temel kurallar" mevcuttur, fakat yine de serbest radikal polimerizasyon proseslerinin temel kurallarının kullanılması yararlı olacaktır (Cormack, 2004).

Enzimler ve antikorlar gibi elementlerin biyolojik tanımlanması biyosensörlerin geliştirilmesi için yıllardır kullanılmaktadır. Fakat, doğal hedefleriyle uyum sağlamalarına rağmen, biyolojik reseptörler kendi çevrelerinde kararsız olduklarında, her zaman hedef olarak kullanılamazlar ve özel kullanımlar için ince-ayar yapmak zordur. Fuchs ve arkadaşları (Fuchs, 2012), seçici tanımlama ve yüksek afiniteli hedef bağlanma moleküllere sahip fakat aynı zamanda daha kararlı, üretimi daha kolay, düşük maliyetle sağlanabilen ve endüstriyel fabrikasyon üretimlere entegre edilebilmesi kolay olan sentetik "terzi işi" reseptörler geliştirmişlerdir. Yapay reseptör üretmek için en doğru stratejilerden biri; sentetik polimerlerin moleküler baskılanmasıdır. Bu teknik, fonksiyonel monomerlerin ve çapraz bağlayıcının konuk molekül de denilen baskı molekülün etrafında konumlanmasıyla kopolimerizasyon temeline dayanır.

Başlangıçta, konuk molekül ve fonksiyonel monomerler bir kompleks oluştururlar. Kopolimerizasyondan sonra fonksiyonel monomerler çapraz bağlı polimerik ağ tarafından özel konumda “donmuş”lardır. Konuk molekülün ayrılması konuk molekülün kimyasal gruplarının pozisyonunu, şekil ve büyüklüğünü içeren polimer yapısında boş kavitelere sebep olur, moleküler baskılanmış polimer böylece moleküler hafızaya sahip olur ve hedef moleküle spesifik olarak bağlanır ve tanır. Diğer organik malzemeler ve hatta sol-jel malzemeler gittikçe popüler hale gelmesine rağmen serbest radikal polimerizasyonu ile elde edilen polimetakrilat ya da polivinil tipi polimerler moleküler baskılama için matriks olarak kullanılırlar.

Mayes ve Mosbach (Mayes, 1997) çalışmalarında baskılama yöntem bilimindeki son gelişmeleri özellikle de son zamanlarda ortaya çıkan fonksiyonel monomerler ve direkt olarak kromatografi için uygun olan polimer malzeme elde etme yöntemlerini yeniden gözden geçirmişlerdir. Bunu takiben, analitik metodolojilere baskılı polimerlerin eklenmesi girişimleri eleştirel olarak gelecekteki araştırmalar için olası yönde bazı göstergelerle tartışılmıştır.

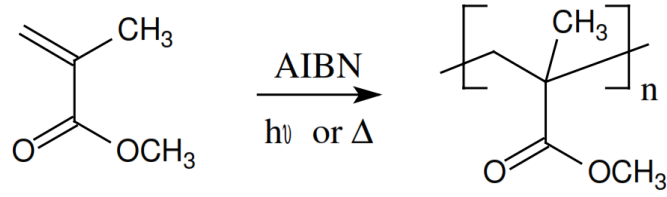
1.3 Polimer Sentezi

Bilim adamları, kendi laboratuvarlarında kendi amaçları doğrultusunda moleküler tanıma özelliklerini incelemek amacıyla geliştirilen moleküler baskılı polimerlerin üretimi için sentetik yöntemleri sürekli olarak geliştirmektedir. Şaşırtıcı bir şekilde bazı sentezler bir sentetik polimer kimyacı kadar, bir analitikçi ya da biyokimyacı tarafından da yapılabilir. Araştırmacılar tarafından özel ekipman ya da özel laboratuvarlar olmadan MIP sentezlenebilir (Kempe ve Mosbach 1995b).

Polimer sentezinde ya da daha da özelleştirilirse moleküler baskılama yönteminde üç farklı polimerizasyon tekniği kullanılmaktadır. Bu teknikler; Serbest radikal polimerizasyonu, serbest radikal ko-polimerizasyonu ve çapraz bağlı polimerler olarak sıralanabilir.

1.3.1 Serbest Radikal Polimerizasyonu

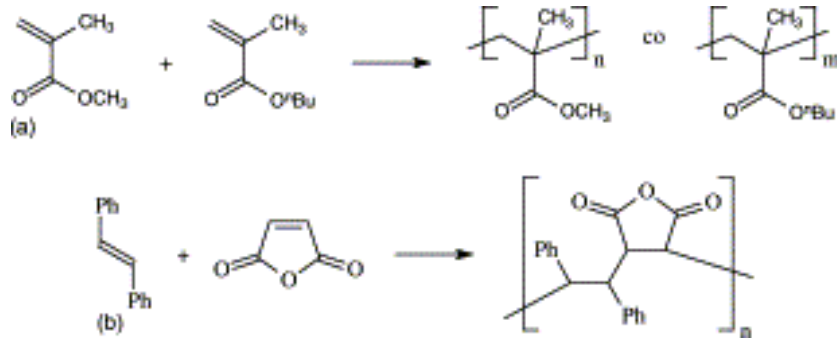
Serbest radikal polimerizasyonu, monomeri polimere dönüştürmek için bugün ulaşılabilen en önemli sentetik metottur ve üretim için endüstride oldukça sık kullanılmaktadır. Etilen, stiren ve metil metakrilat gibi özellikle endüstriyel öneme sahip olan sayısız vinil monomer etkili bir şekilde serbest radikal polimerizasyon metotlarıyla polimere dönüşebilir. Serbest radikal polimerizasyonu orta reaksiyon koşullarında (ortam sıcaklığı ve atmosferik basınçta) bulk olarak veya çözeltide gerçekleştirilebilir. Ortamdaki kirliliklere ve monomerlerdeki fonksiyonel gruplara toleranslı bir yöntemdir. Bu nedenle, çok sayıda vinil monomer, serbest radikal polimerizasyonu genellikle moleküler baskılı polimerler hazırlamak için tercih edilen bir yöntem olduğundan, düşük maliyetle ticari olarak temin edilebilir. Serbest radikal polimerizasyon mekanizması 3 ana aşamayla karakterize edilir: (1) Başlama, (2) Yayılma, (3) Sonlanma. Serbest radikal polimerizasyonu için iki önemli noktaya vurgu yapılacak olursa, bunlardan ilki, polimerizasyonun yayılması, başlamasından daha hızlıdır, yeni polimer sonlanmadan önce çok kısa bir süre içerisinde büyük molekül ağırlığa ulaşır. Bunun anlamı, düşük monomer miktarından yüksek molekül ağırlıklı ürün elde edilir. İkinci olarak, serbest radikal kaynağı (başlatıcı) polimerizasyon boyunca aktiftir. Serbest radikal polimerizasyonunda radikal kaynağı olarak farklı kimyasal özellikleriyle birçok kimyasal başlatıcı kullanılabilir. Normalde monomerle karşılaştırıldığında düşük oranlarda kullanılır, örneğin % 1 (kütlece) ya da polimerleşebilir çift bağların sayısının toplamının % 1 mol.'ü kadar başlatıcı kullanılır. Radikaller için başlatıcının oluşma şekli ve oranı birçok yolla tetiklenebilir ve kontrol edilebilir. Bu yollar, ısı, ışık, kimyasalın doğasını da içeren kimyasal/elektrokimyasal yollardır. Örneğin, azo başlatıcı olarak kullanılan azobis izobütironitril (AIBN), fotolizle (UV) ya da termolizle uygun biçimde bozunmaya uğrayabilir. Vinil monomerlerin sayısının büyüklüğü karbon-merkezli radikallerin başlatabilme kapasitesini gösterir. Vinil monomerlerin polimerize edilmesine açıklayıcı bir örnek, Şekil 1.6.'da verildiği gibi AIBN, termal veya fotokimyasal koşullar altında metil metakrilatı polimerize edebilmesidir (Cormack, 2004).



Şekil 1.6. AIBN başlatıcısının fotolizle bozunmaya uğramasının şematik gösterimi

1.3.2 Serbest Radikal Ko-Polimerizasyonu

İkinci bir polimerizasyon tekniği olarak, iki ya da daha fazla vinil monomerin aynı reaksiyon içinde eşzamanlı olarak kopolimerler vermesi de yüksek oranda düşünülebilir. Bu, ürünlerin her biri bağımsız bir monomerin polimerizasyonu ile elde edilen polimerden farklı olarak kimyasal özelliklere sahip polimerler elde edilmesini sağlar. Şekil 1.7.a'da görülen iki farklı monomerin polimerde hangi oranlarda bulunduğu nispi olarak derişimlerine bağlıdır. Şekil 1.7.b'de görülen iki farklı monomer için ön-organizasyon sonrasında komonomer ve ardından kopolimerizasyon gerçekleşir (Cormack, 2004).



Şekil 1.7. a. İki farklı monomerin bağlanması b. İki farklı monomer ön-organizasyon sonrasında komonomer oluşturmaları

Diğer yandan, pek çok ortak monomerlerin nispi reaktivlikleri bilinir ve monomerlerin belirli çiftleri için tepkime oranları tablo halinde sunulmaktadır (Yu, 2008).

1.3.3 Çapraz Bağlı Polimerler

şimdiye kadar açıklanan bütün polimerizasyonlar, tek fonksiyonlu monomerler olarak adlandırılan tek bir polimerize edilebilir vinil grubu ile monomerlerden türetilen polimerlerin büyümesini içermiştir. Mono-fonksiyonel monomerler, normalde kimyasal açıdan uyumlu çözücüler içinde çözünür olan doğrusal makromolekülleri vermek üzere polimerize olurlar. 2 veya daha fazla polimerleşebilir vinil gruba sahip çok fonksiyonlu monomerler, kendi başlarına polimerize olurlar ya da bir monomer ya da komonomer ile kombinasyon halinde polimerize olurlar. Sonuç oldukça farklıdır ve bu hazırlanan yüksek ticari değerin doğrusal olmayan polimerlerin sayısının çok olmasını sağlar. Bu malzemeler çözünebilir ya da çözünemez ve makromolekül, mikrojel ve makroskopik ağlar olarak sınıflandırılabilirler. Çok-fonksiyonlu monomerler sıklıkla çapraz bağlayıcı olarak anılırlar ve lineer polimer zincirlerindeki 2 veya daha fazla monomeri kimyasal olarak bağlamak için kullanılırlar.

Moleküler baskılama dünyasında, lineer-olmayan polimerler büyük ölçekli polimer ağları olarak sentezlenir ve çalışılırlar, ki bunlar sertlik veren ve moleküler bağlanma bölgelerine mekanik kararlılık sağlayan çözülemeyen parçalardır. Literatürdeki bazı yayınlarda baskılı mikrojeller (çözülebilir) ya da lineer makromoleküllerin üretildiği belirtilmiştir, ancak bunların sayısı nispeten daha azdır (Cormack, 2004).

1.3.4 Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler düzeyde moleküler baskılı polimerler için 2 yaklaşım geliştirilmiştir: konuk molekül ile fonksiyonel monomer(ler) arasında bağlar farklılık gösterir, bu sayede kovalent ve nonkovalent moleküler baskılama türleri oluşur. Her iki durumda da baskılanacak molekülün fonksiyonel gruplarıyla etkileşime girebilecek fonksiyonel monomerler baskılanacak molekül varlığında polimerleştirilirler (Kempe ve Mosbach 1995b).

1.3.5 Kovalent Moleküler Baskılama

İlk prosedür 1972 yılında Wulff tarafından açıklanmıştır (Fuchs, 2012). Kovalent ya da önceden organizasyonlu yaklaşımda, baskılanacak molekül polimerleşebilir fonksiyonel monomer(ler)e kovalent olarak bağlanır. Şekil 1.5'de görülen ilk basamakta molekül ile fonksiyonel monomer(ler) arasında kovalent bir bağlanma söz konusudur. Çapraz bağlayıcı ile kopolimerizasyondan sonra konuk molekül yüksek oranda çapraz bağlanmış polimerden kimyasal olarak ayrılır. Bu tip bağlanma tersinir kovalent bağlara dayanır, tersinir bağlanmada konuk molekül kendine özgü kavitelere kolaylıkla bağlanıp, ayrılabilir. Kovalent baskılama türevlendirmeler için kullanılır (Kempe ve Mosbach 1995b; Andersson, 2000).

Wulff ve arkadaşları (Wulff, 1993; 2001) kovalent moleküler baskılama sistemleriyle ilgili olarak yoğun bir çalışma yapmış ve onların öncü çalışmaları yeni moleküler baskılama sistemlerinin daha da gelişmesine yol açmıştır. Kovalent sistemlerde, konuk molekül-monomer kompleks, şeker, gliserik asit ve türevleri, amino asit ve türevleri, mandelik asit, aromatik ketonlar, dialdehitler, transferrin ve bis- Nikotinamid adenin dinükleotit (bis-NAD) için (Kempe ve Mosbach 1995b) ester, asetal/ketal, metal koordinasyon gibi ters çevrilebilir kovalent bağlarla oluşturulur. Diğer taraftan spesifik ve homojen bağlanma bölgeleri sağlar, baskılama süreci sırasında konuk molekül-monomer kompleksinin kararlı kalması önemlidir. Fakat yavaş bağlanma kinetiğinden dolayı kromatografik ayrımlar için uygun olmaması gibi dezavantajı da bulunmaktadır. Ayrıca, uygun kovalent bağlanma güçlüğüle bulunur, çünkü bu bağlar kolayca kırılabilir ve yeniden bağlanabilirler (Takeuchi, 1999).

1.3.6 Metal-Şelat Baskılama

Kovalent baskılama tekniğinin dezavantajlarının avantaja dönüştürülebilmesi için kovalent moleküler baskılama yöntemi olarak metal-şelat koordinasyonunun kullanılması da düşünülmektedir. Takeuchi ve arkadaşları (Takeuchi, 1999) metal-şelat koordinasyonunun, bağ kararlılığının diğer kovalent etkileşimlere göre daha kuvvetli ve ligand-değişim kinetiğinin kovalent bağ ile

karşılaştırıldığında oldukça hızlı olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte hedef molekülün yapıdan uzaklaştırılması kovalent baskılamada olduğu kadar güç değildir. Özellikle hidrojen bağlarının etkin olduğu baskılama sistemlerine göre çözücü profilinin su da dahil olmak üzere geniş sınırlarda kullanılabilmesi ve baskılanacak tamamlayıcı ligandın geometrik yönelmesinin seçiciliğe getirdiği avantaj nedeniyle metal-şelat etkileşimlerine dayanan baskılama sistemleri daha çok tercih edilmektedir. Say ve ark. (Say, 2004) tarafından yapılan bir çalışmada, metal iyonu, Nmetakroil- L-histidin (MAH) monomeriyle şelat oluşturduktan sonra bir Lewis asidi gibi davranarak hedef molekülde yer alan elektron alıcı bir grupla koordinasyonunu tamamlamaktadır. Bu nedenle oluşan bağlanma oldukça seçici ve kovalent olmayan etkileşimlere göre çok daha güçlüdür.

1.3.7 Non-kovalent Moleküler Baskılama

Non kovalent yaklaşımda, konuk molekül, konuk molekül ile non-kovalent olarak etkileşebilen fonksiyonel monomerlerle etkileşir. Fonksiyonel monomerler, son derece sert ve çapraz bağlanmış polimer elde etmek için çapraz bağlayıcı ile ko-polimerize edilmektedir. Şekil 1.5’de moleküler baskılama için belirtilen şematik gösterimde ilk basamakta yer alan konuk molekül ve fonksiyonel monomer(ler) non-kovalent etkileşimlerle gerçekleşir. İkinci aşamada ortama çapraz bağlayıcı ve serbest radikal polimerizasyonunun başlaması için radikalik başlatıcı da eklendikten sonra polimerizasyon gerçekleşir. Konuk molekül sonradan kendine özgü bağlanma bölgeleri olan boşluklar bırakarak polimerden uzaklaştırılır. Diğer bir deyişle kompleksleşme basamağı konuk molekülün fonksiyonel monomerlerle karıştırılmasıyla gerçekleştirilir ve polimerizasyon oluşturulan kompleksler izole edilmeden gerçekleştirilir (Takeuchi, 1999). Polimerin yapısı moleküler hafıza bölgeleri içerir. Konuk molekül, hem baskılama sırasında hem de yeniden bağlanma sırasında polimerle iyonik, hidrofobik ya da hidrojen bağları gibi non-kovalent olarak etkileşir.

Mosbach ve arkadaşları (Mosbach, 1988) tarafından geliştirilen non-kovalent ya da kendiliğinden, yaklaşımda hem kovalent, hem de non-kovalent metotların kombinasyonu bazen kullanılabilir. Konuk molekülüyle bağlanma-

ayrılma dengesindeki non-kovalent bağların zayıf olmasına, bağlanma gruplarının pozisyonundan dolayı bağlanma bölgelerinin heterojen dağılmanın oluşmasına rağmen, bu yöntem fonksiyonel monomerlerin ve konuk molekülün geniş bir aralıkta seçilmesine olanak sağlar. Biyomoleküler etkileşimler en çok non-kovalent tipi kullandıkları için, biyolojik tanımlama prosesleri benzerdir. Pratikte, non-kovalent baskılama MIP fabrikasyonu için en sık kullanılan yöntemdir. Non-kovalent baskılama yönteminin kullanıldığı sentetik moleküler baskılanmış polimerler için hedef molekül, küçük organik moleküllerden (şekerler, aminoasitler, steoritler) peptit ve proteinlere kadar geniş aralıkta kullanılabilir. Fakat, sentetik matrikste proteinler gibi baskılanan makromoleküller kolay değildir. Non-kovalent yöntemle hazırlanan MIP'ler katı faz ekstraksiyonu, kontrollü ilaç salınımı, afinite ayırımı, immünoassayler, kimyasal sensörler, sentez ve kataliz gibi geniş alanda üretilirler. İmmünoassaylerde antikor benzerleri olarak diagnostik araç olarak MIP'ler kullanılırken, Mosbach tarafından 1993'de açıklayana kadar, terapötik olarak uygulamaları hiç gösterilmemiştir. Fakat Shea'nın grubu son zamanlarda terapötik antikor benzerleri olarak MIP'lerin potansiyel kullanımı hakkında anlaşılır sonuçlar yayınlamışlardır (Fuchs, 2012).

Non-kovalent moleküler baskılama boyaların, diaminlerin, vitaminlerin, aminoasit türevlerinin, peptitlerin, nükleotit bazların seçici polimerlerinin hazırlanması için kullanılır (Takeuchi, 1999; Kempe, 1995).

1.4 Moleküler Baskılı Polimerlerdeki Önemli Parametreler

MIP'in sentezinde dikkate alınması gereken bazı parametreler söz konusudur. Bu parametrelerin neredeyse hepsi olmazsa olmaz faktörler olup, herbirinin polimerizasyonda merkezi öneme sahip bir görevi bulunmaktadır. Bahsedilen parametreler aşağıda maddeler halinde anlatılacaktır.

1.4.1 Konuk Molekül

Bütün moleküler baskılama proseslerinde konuk molekül, fonksiyonel monomerler etrafında pozisyon alacağından dolayı merkezi öneme sahiptir. Ne yazık ki, bütün konuk moleküller baskılama için uygun değildir. Serbest radikal

polimerizasyonu ile uyumluluk açısından, konuk moleküller polimerizasyon koşulları altında kimyasal olarak inert olmalıdır, böylece konuk molekül radikal reaksiyonlarına katılırsa ya da polimerizasyon koşulları altında başka kararsızlık varsa alternatif baskılama yöntemleri aranması gerekebilir. Konuk molekül için cevaplanması gereken sorular: (1) konuk molekül polimerize grupları kaldırır (taşır) mı?, (2) konuk molekül serbest radikal polimerizasyonunu inhibe edebilir mi?, (3) konuk molekül yüksek sıcaklıklarda kararlılığını koruyabilir mi? (Cormack, 2004).

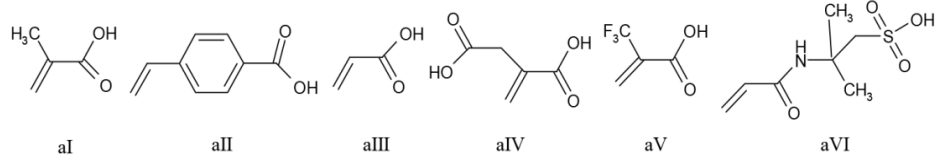
Bu soruların cevapları gözönüne alınarak MIP hazırlanması için uygun şartlar ayarlanır.

1.4.2 Fonksiyonel Monomerler

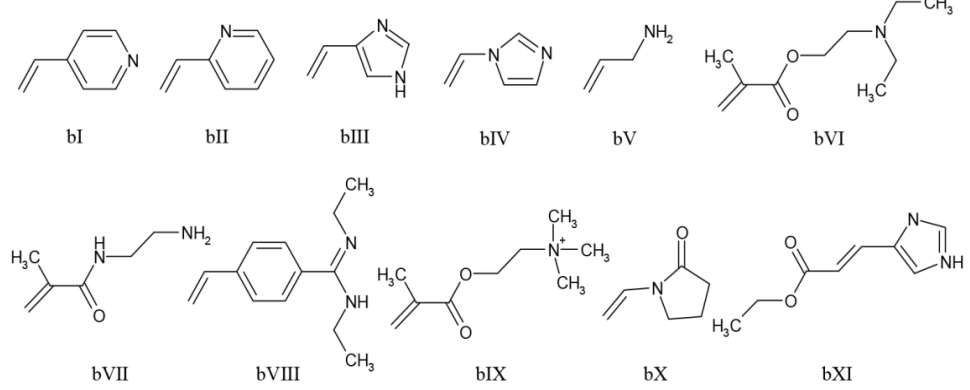
Fonksiyonel monomerler moleküler bağlanma bölgelerinde bağlanma etkileşiminden sorumludurlar ve non-kovalent moleküler baskılama protokolleri için konuk molekülün formülüne bağlı olarak konuk molekülün mol sayısına bağlı kalınarak kullanılırlar (konuk molekül:fonksiyonel monomerler, 1:4 oranında etkileşime girerler). Kompleks formasyonunun maksimuma ulaşması, böylece baskılamanın etkili olması için ve fonksiyonel monomerin fonksiyonelliği ile konuk molekülün fonksiyonelliğinin birbiriyle eşleşmesi çok önemlidir. Polimerizasyon karışımında aynı anda 2 veya daha fazla fonksiyonel monomer kullanıldığında, kopolimerizasyonun uygulanabilir olması için fonksiyonel monomerlerin reaktivite oranlarının göz önünde bulundurulması çok önemlidir.

Kimyasal olarak farklı yapıda ve polaritedeki fonksiyonel monomerler ticari olarak bulunabilir ve birçoğu mantıklı bir oluşumla hazırlanabilir. Şekil 1 8.'de kimyasal olarak özellikle seçilmiş çok önemli fonksiyonel monomerler gösterilmiştir (Cormack, 2004).

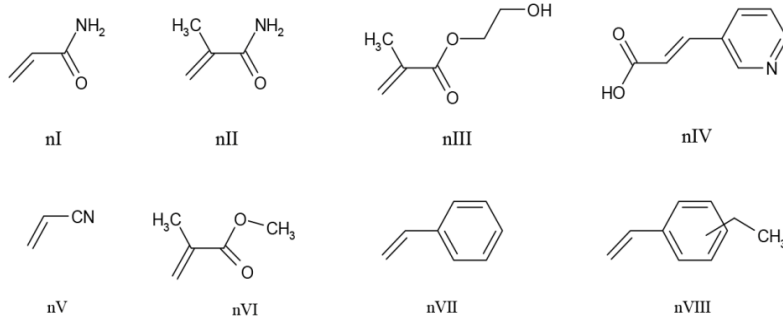
Asidik (a)



Bazik (b)



Nötral (n)



Şekil 1.8. Non-kovalent yaklaşım için seçilmiş bazı fonksiyonel 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-vinilpiridin (4-VP); **bII**: 2-vinilpiridin (2-VP); **bIII**: 4-(5)-vinilimidazol; **bIV**: 1-vinilimidazol; **bV**: allilamin; **bVI**:N,N'-dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM), **bVII**:N-(2-aminetil)-metakrilamit; **bVIII**:N,N'-dietil-4-stirilamidin; **bIX**:N,N,N,-trimetil aminoetilmetakrilat; **bX**:N-vinilpirrolidon (NVP); **bXI**: urokanik etil ester. Nötral; **nI**: akrilamit; **nII**: metakrilamit; **nIII**: 2-hidroksietil metakrilat (2-HEMA); **nIV**: trans-3-(3-piridil)-akrilic asit; **nV**: akrilonitril (AN); **nVI**: metil metakrilat (MMA); **nVII**: stiren; **nVIII**: etilstiren.

En çok kullanılan fonksiyonel monomer metakrilik asittir (MAA). MAA'nın aminlerle iyonik etileşimler yoluyla, amitler, karbamatlar ve karboksillerle hidrojen bağları yoluyla etkileşim yaptığı kabul edilmektedir. İyonik etkileşim, hidrojen bağı etkileşiminden daha sağlamdır ki konuk molekülün polimerle iyonik bağlarla yaptığı etkileşim hidrojen bağları ile yaptığı etkileşimden daha seçicidir. 4-Vinilpiridin non-kovalent MIP yapımında kullanılan ve karboksil grupları içeren konuk moleküller ile polimerdeki tanımlanma bölgeleri arasında iyonik etkileşimi yapan fonksiyonel bir monomerdir. Bu, MAA ile yapılan baskılı polimerlerin seçiciliği ile kıyaslandığında daha iyi bir seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir. Başka bir benzer monomer olan 2-vinilpiridin, yalnız veya MAA ile beraber, aynı amaç için kullanışlı bir monomerdir (Kempe, 1995).

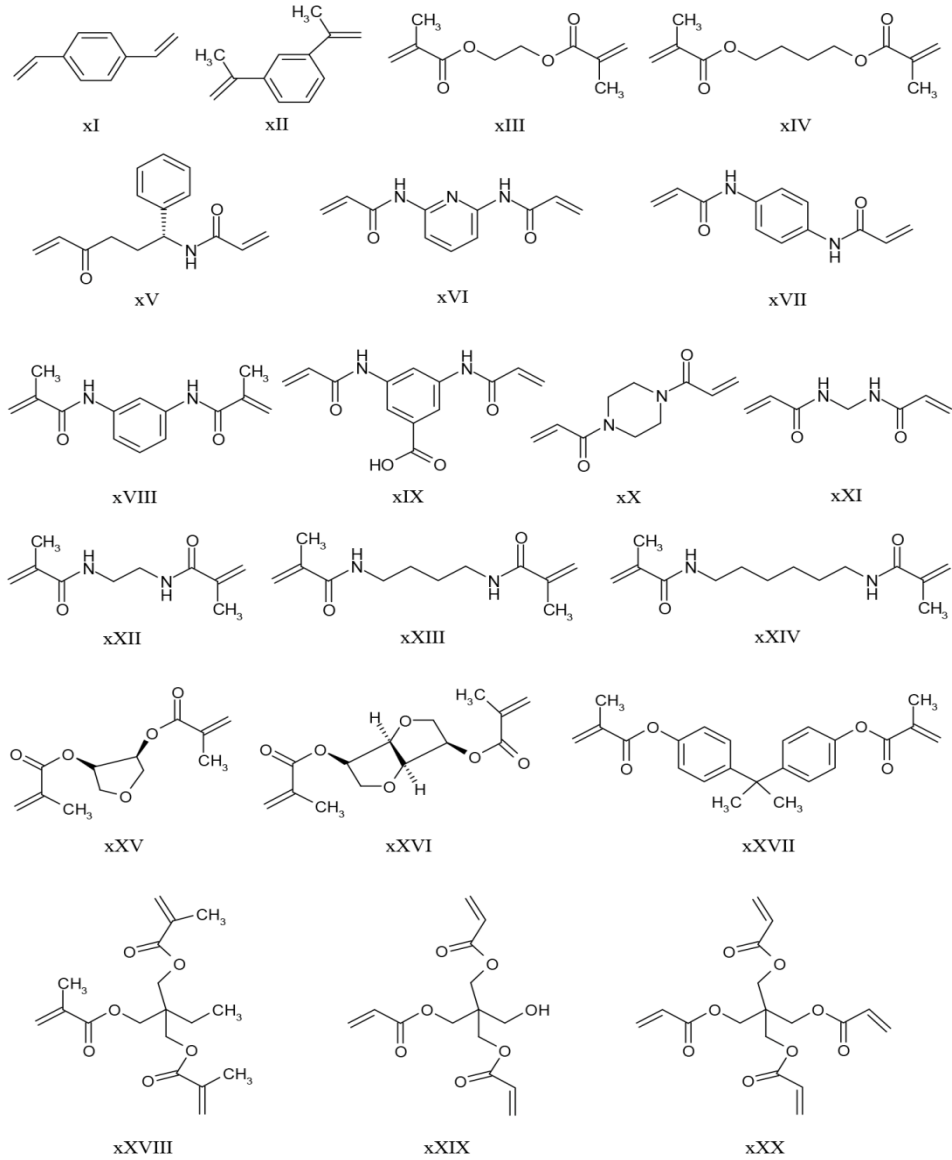
1.4.3 Çapraz Bağlayıcılar

Baskılanmış polimerlerde çapraz bağlayıcı, 3 temel fonksiyonu yerine getirir. Bunlardan ilki, çapraz bağlayıcı jel-tipi, makro-gözenekli ve mikrojel yapıda olup olmayacağı konusunda polimer matriksini kontrol etmede önemlidir. İkincisi, baskılanmış bağlanma bölgelerinin mekanik kararlılığının korunmasını ve son olarak da polimer matriksinin kararlılığını sağlar. Daha önce de belirtildiği gibi, baskılanmış polimerlerdeki moleküler tanımlama davranışında çapraz bağlayıcının etkisi büyüktür, fakat polimerizasyon tarafından bakıldığında, genellikle gözenekli yapının sürekli olması ve mekanik olarak kararlı malzemeler üretilmesi için yüksek çapraz bağlayıcı oranları tercih edilir.

Ayrıca çapraz bağlayıcının reaktiflik oranı fonksiyonel monomer(ler)in reaktiflik oranıyla ve ko-monomerlerin polimerizasyon karışımına pürüzsüz bir şekilde katılması için de fonksiyonel monomerlerin reaktiflik oranlarının eşleşmesi gerekmektedir. Çapraz bağlayıcıların reaktiflik oranlarının bilinmediği durumlarda benzer yapıların değerleri denenerek bulunabilir. Farklı kimyasal vinil gruplarının bulunduğu multi-fonksiyonel monomerlerin farklı reaktif oranlarının olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin; farklı vinil grupları polimere farklı oranlarda birleşebilir.

Moleküler baskılama ile uyumlu olan çok sayıda çapraz bağlayıcının olduğu bilinmektedir. Bunların çoğu ticari olarak elde edilebilir ve iyi bilinen bazı çapraz bağlayıcılar Şekil 1.9.'da gösterilmektedir (Cormack, 2004).

Önceleri, çapraz bağlayıcı olarak da non-kovalent MIP'lerde EDMA kullanılırken, daha sonra 3 veya 4 vinil grubu içeren çapraz bağlayıcılar kullanılmıştır. PETRA ve TRIM, 3 vinil grubu içeren pentaeritrol türevleri olup EDMA'dan üstün oldukları görülmüştür. Ayrıca; bunlarla yapılan polimerlerin sıvı kromatografisinde sabit faz olarak kullanıldığında daha seçici, daha iyi yükleme kapasitesine sahip ve daha iyi çözme özelliklerine sahip oldukları gözlenmiştir (Kempe, 1995).



Şekil 1.9. Moleküler baskılama için kullanılan çapraz bağlayıcılar **xI**: *p*-divinilbenzen (DVB); **xII**: 1,3-diizopropenil benzen (DIP); **xIII**: etilen glikol dimetakrilat (EDMA); **xIV**: tetrametilen dimetakrilat (TDMA); **xV**: *N,O*-bisakriloil-*L*-fenilalaninol; **xVI**: 2,6-bisakriloilamidopiridin; **xVII**: 1,4-fenilen diakrilamit; **xVIII**: *N,N'*-1,3-fenilenbis(2-metil-2-propenamit) (PDBMP); **xIX**: 3,5-baisakrilamido benzoik asit; **xX**: 1,4-diakriloil piperazin (DAP); **xXI**: *N,N'*-metilen bisakrilamit (MDAA); **xXII**: *N,N'*-etilene bismetakrilamit; **xXIII**: *N,N'*-tetrametilene bismetakrilamit; **xXIV**: *N,N'*-hexametilen bismetakrilamit; **xXV**: anhidroeritritol dimetakrilat; **xXVI**: 1,4;3,6-dianhidro-*D*-sorbitol-2,5-dimetakrilat; **xXVII**: izopropilenbis(1,4-fenilen) dimetakrilat; **xXVIII**: trimetilpropan trimetakrilat (TRIM); **xXIX**: pentaeritritol triakrilat (PETRA); **xXX**: pentaeritritol tetraakrilat (PETEA).

1.4.4 Çözücüler

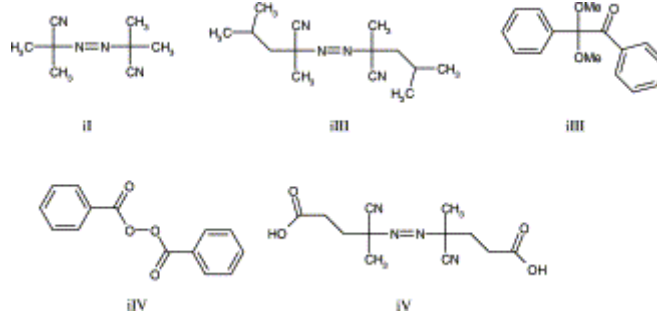
Çözücü, polimerizasyondaki konuk molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı gibi bütün bileşenlere uygun olmak zorundadır. Ayrıca, makro-gözenekli polimerlerde gözeneklerin üretilebilmesi için önemli bir rol oynar.

Bunun için, çözücü, genellikle bir gözenek oluşturma maddesi ve non-kovalent baskılama polimerizasyonunda konuk molekülün ve fonksiyonel monomerlerin kompleks oluşturma olasılığının en üst düzeyde sağlayacak şekilde porojen madde olarak kullanılır. Makro-gözenekli polimer hazırlanırken, gözeneklerin toplam hacmi ve morfolojisinin kontrolünü gerçekleştirmek için porojenin seviyesi ve yapısı önemlidir. Daha da özelleştirilirse, termodinamik olarak iyi bir çözücünün kullanımı, iyi gelişmiş gözenek yapıları ve yüksek spesifik yüzey alanına sahip polimerlere yol açma eğilimindedir. Termodinamik olarak zayıf bir çözücü kullanımıyla az gelişmiş gözenek yapıları ve düşük özgün yüzey alanına sahip polimerler elde edilmektedir. Porojen hacmi arttıkça gözenek hacmi artar.

Normalde, toluen gibi apolar olarak anılan non-protik çözücüler hidrojen bağlarının kararlılığı için tercih edilebilir, fakat hidrofobik kuvvetler kullanılırsa bu durumda su çözücü olarak seçilebilir (Cormack, 2004).

1.4.5 Başlatıcılar

Prensipte, önceden bahsedilen başlama metotlarından herhangi biri konuk molekül varlığında serbest radikal polimerizasyonunu başlatmak (Şekil 1.10) için kullanılabilir. Örneğin; konuk molekül fotokimyasal ya da termal olarak kararsız olursa, fotokimyasal ya da termal olarak tetikleyebilen başlatıcılar etkili olamayabilirler. Hidrojen bağlarıyla yürüyen kompleksleşmede düşük polimerizasyon sıcaklıkları ve bu şartlar altında düşük sıcaklıklarda etkili bir polimerizasyon için fotokimyasal olarak çalışan aktif başlatıcılar tercih edilebilir (Cormack, 2004).



Şekil 1.10. Moleküler baskılamada çoğunlukla kullanılan başlatıcıların kimyasal yapıları ii: azobisisobutironitril (AIBN); iiii: azobisdimetilvaleronitril (ABDV); iiii: dimetilasetal of benzil; iiv: benzoilperoksit (BPO); iv: 4,4'-azo(4-siyanovaleik asit)

1.5 Moleküler Baskılı Polimerlerin Uygulama Alanları

1.5.1 MIP-temelli Biyosensörler

Biyosensörlerde, tanımlama elemanı olarak analit molekülü bağlandığında, kimyasal ya da fiziksel bir sinyal oluşur. Tanıma elemanı ile yakın temasta bulunan transdüser, analit derişimi ile ilişkili sinyali ölçülebilir bir sinyale dönüştürecektir. Biyosensörler, transdüser yüzeyinde çoğu durumda immobilize edilmiş biyolojik reseptörler temeline dayanır. Konuk molekül için yüksek moleküler afinite göstermelerine rağmen, kullanımları, yüksek fabrikasyon fiyatları ve sınırlı kararlılığa (pH, sıcaklık, iyonik kuvvet, organik çözücüler ve diğer katkı maddeleri) sahip olmaları nedeniyle ve bunun sonucunda da taşınması ve depolaması zor olduğu için sınırlıdır. Araştırmacılar, bu nedenlerle kararlı ve düşük maliyetli, doğal reseptörlerin yerine alabilecek biyosensör ve bioçiplerde tanıma elemanı olarak uygulanabilir olan moleküler baskılı polimerler gibi biyobenzer sentetik reseptörler geliştirmeye çalışmaktadırlar. MIP'ler transdüserlerin farklı tiplerine uygulanabilirler. Elektrokimyasal sensörler, analitin ya da analit varlığında sistemde meydana gelen elektrokimyasal reaksiyonların oluşturduğu elektrokimyasal farkları ölçerler. Akustik sensörler, analit bağlarındaki akustik dalga frekansını ya da yayılma hızındaki değişiklikleri tespit ederler ve kalorimetrik sensörler ise bir kimyasal reaksiyon veya analit dahil edildiğinde tanıma olgusu üzerine çıkan ısıyı ölçerler. Floresans veya floresans gibi optik dedeksiyon teknikleri algılama uygulamaları için MIP'lerle kullanılırlar. Son trend analitin özel bir özelliğine gerek duymadan çalışabilecek etiketsiz

(label-free) optik sensörlerin geliştirilmesine doğru gitmektedir. Absorpsiyon, yansıtma, kırılma indisi gibi MIP'lerin genel özelliklerinin değişmesi analit dedeksiyonu ve kantitatif analizi için kullanılır ve istenirse uygun sinyale dönüştürülebilir. Yüksek duyarlılıkta MIP-tabanlı sensörlerin gelişimi normalde tanımlanan eleman ile transdüser arasında mükemmel arayüzey gerektirir. Bunun için, ya transdüserin yüzeyi önceden MIP ile kaplanır ya da MIP transdüser yüzeyinde deney sırasında polimerleştirilir. Fotopolimerizasyonun avantajlarından biri, polimerizasyon sırasında mekansal kontrol için bu yöntemin çok yönlü olduğudur. Örneğin, MIP ince filmler halinde, hem filmlerin kalınlığı hem de morfolojisi kontrol edilerek üretilebilir ve sensör alanında uygulanabilir. Spin-kaplama gibi standart mikrofabrikasyon teknikleri, gözenekli ince moleküler baskılanmış filmlerin fotopolimerizasyonundan sonra ön-polimerizasyon formülasyonlarının çökmesi için kullanılır. Son 5 yılda, polimer fotoüretimi MIP-temelli sensör gelişim alanında çok sayıda yenilik ve gelişmeyle sonuçlanmıştır. Az ya da çok standart yaklaşımlar ve teknikler MIP fabrikasyonuna uyum sağlamıştır (Fuchs, 2012).

MIP'lerin biyosensör olarak kullanım alanlarından birisi de bir fiber optik demeti sonuna fiziksel temas içinde tutulan polimer partiküllerine floresan özellikte konuk molekül bağlanarak ölçüm yapıldığında cevabın derişim ve test bileşiminin enantiomerik şekline bağlı olarak alınması olmuştur. Ancak, bu teknik süreç açısından yavaş ilerleyen bir süreçtir. Polimerlerin ve optiklerin daha iyi yapılandırılmalarıyla sistem iyileştirilebilir ve örneğin derişimi ve enantiyomerik yapısının belirlenmesi için gerekli bilginin sağlanmasıyla sonuca ulaşılabilir olarak düşünülmüştür (Mayes, 1997).

1.5.2 Kromatografik Ayırım

Moleküler baskılama, kararlı seçicilikte sentetik polimerlerin hazırlanması için kullanılan basit ve kolay anlaşılır bir tekniktir. Normalde, polimerler fonksiyonel monomerlerin ve çapraz bağlayıcı monomerlerin, konuk molekül etrafında konumlandıktan sonra karıştırılarak bulk polimerizasyon tekniği ile elde edilirler. Ardından öğütme yapılır ve konuk molekül boşlukların oluşması için

yapıdan uzaklaştırılır. Partikül büyüklüğü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'nde ve ince tabaka kromatografisi (TLC)'nde kullanılan durgun fazlar için uygun düzeydedir. Elüent olarak susuz çözücü ya da karışımları uygundur. Bu, yıkama çözeltisi polimerizasyon çözücüsü ile aynı ise mümkün olduğu kadar tanıma sitelerinin oluşumunda avantajlı olduğu kabul edilir, fakat bir ön koşul değildir. Polimerler oldukça çapraz bağlı olduğundan eluentler değiştirildiğinde, şişme veya polimerlerin daralması nedeniyle kromatografik sorunlar yaşanmaz. Elüsyonlarla genellikle ortam sıcaklığında çalışılır. Bazı durumlarda ise yüksek sıcaklıkta çalışıldığı da olmuştur. Alternatif yaklaşımlar, polimer çubukların, süspansiyon polimerizasyon ile polimer tanelerinin ve kompozit malzemelerin hazırlanmasını içerir (Kempe, 1995; Takeuchi, 1999; Mosbach, 1997).

1.5.3 Diğer Uygulama Alanları

1.5.3.1 Antikor Benzerleri

Baskılı polimerlerin başka bir test alanı da bu polimerlerin antikor benzeri olarak kullanılıp kullanılamayacağıdır. Baskılı polimerler, teofilin sakinleştirici olarak kullanılan diazepama karşı aşırı seçicilik göstermiştir. Aslında, MIP'ler rekabetçi radyoimüno tarzı tahlillerinde test edildiğinde, ilgili yapılarının tanınması ya olmayacak veya konuk molekülünün aşağısında olacaktır. Şaşırtıcı bir şekilde, bu MIP'lerin çapraz reaktivite profilleri, pratikte bu ilaçlara karşı monoklonal antikorlar için elde edilmiştir. Anti-teofilin MIP'ler hasta serum örneklerinde teofilinin belirlenmesi için kullanılmıştır ki bu yöntem geleneksel yöntemlere alternatif olarak denenmiştir. Ölçülen ayırma sabitleri ise mikromolar aralığındadır (Mayes, 1997; Takeuchi, 1999; Alexander, 2003; Fuchs, 2012).

1.5.3.2 Enzim Benzerleri

Bilim insanları uzun zamandır enzim-benzeri özellikte sentetik polimerleri oluşturmak için girişimde bulunmaktadırlar. Moleküler baskılama ile antikor bağlanma bölgeleri ve enzim benzeri oluşturma çalışmalarının sonucu ışığında görülmüştür ki, aynı teknikle katalitik fonksiyon kazandırılabilen polimer

sistemleri de geliştirilebilir (Mayes, 1997; Takeuchi, 1999; Bruggemann, 2000; Alexander, 2003; Fuchs, 2012).

1.5.3.3 Yapay Katalizörler

MIP'lerin diğer bir özelliği de yeni özel katalistlerin geliştirilmesi için potansiyelleri olmasıdır. Moleküler baskılama, potansiyel olarak antikor yapımından daha kolaydır ve eğer gerekirse kilolarca hatta tonlarca bile yapılabilir. Üretilen plastikler (polimerler) birçok proteinden bile fiziksel ve kimyasal olarak daha dayanıklıdır ve bu nedenle zor koşullarda çalışmak için çok cazip adaylardır. Bu gibi malzemeler için potansiyel çok büyükken, bugüne kadar elde edilen başarılar çok mütevazı olmuştur. Fonksiyonel katalizörler üretilmiş, ancak düşük sabitlere ve cirolara sahip oldukları görülmüştür. Yararlı uygulamaları olmağından analitik cihazlarda kullanımı olası değildir. Fakat önümüzdeki yıllarda bu alanda önemli gelişmeler olacaktır (Mayes, 1997; Alexander, 2003; Fuchs, 2012). Say ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (Say, 2005) paraoksonun konuk molekül olarak sentezlendiği MIP'lerle paraoksonun parçalanmasında katalizör olarak kullanılıp kullanılamayacağı incelenmiştir.

1.6 Otoimmün Hastalıklar

Otoimmün hastalıklar, sağlıklı hücrelerin ve dokuların normal "kendi" antijenlerine karşı bir bağışıklık sonucu ortaya çıkarlar ve çevresel faktörler kadar genlerden de kaynaklanırlar. En yaygın otoimmün hastalıklar, bu hastalıklarda genetik faktörlerin önemini düşündüren bir şekilde, tek yumurta ikizlerinde çift yumurta ikizlerine göre genellikle daha yüksektir. Ayrıca, genetik kalıtım ve farklı hastalıklar için risk ile ilişkili genlerin sayısı, hastalıklar ve etnik gruplar arasında farklılık gösterir. Otoimmun hastalıklarla ilişkili genler bazı etnik gruplarda fazla ortaya çıkarken, diğer etnik grupta daha az ortaya çıkabilmektedir, ya da daha farklı ifade etmek gerekirse bazı etnik gruplarda kalıtsal olarak otoimmun hastalıklar fazla görülürken, bazı etnik gruplarda daha az görülebilmektedir. RA, MS, sistemik lupus eritematoz, Tip 1 diyabet (T1D), Crohn hastalığı ve diğerlerini de içine alan otoimmün hastalıklar için birçok genom çalışması yapılmıştır. Bu

alışmalar göstermiştir ki otoimmün hastalıklar birçok genetik faktörü paylaşırlar (Suzuki, 2011).

Bu tez kapsamında otoimmün hastalıklardan RA ve MS hastalıkları incelenmiştir. İlerleyen kısımlarda da anlatılacağı gibi RA ve MS hastalıklarının bazı ortak yanları bulunmaktadır. Her ikisinde de bulunan özelliklerden biri ve tez kapsamında üzerinde durulacak olan arginin amino asidinin deiminasyonu ile oluşan ikincil bir aminoasit olan sitrulin amino asididir (Yamada, 2005).

1.6.1 Romatoid Artrit(RA)

RA, etiyoijisi bilinmeyen, toplumun % 0,5-1'ini etkileyen, kronik iltihaplı yaygın bir sistemik otoimmün hastalıktır (Vossenaar 2004a). Kalıcı ağrı, sinovit (Sinovya zarı iltihabı), eklem yıkımı ve işlevsel yeti yitimine neden olmaktadır. Geri dönüşü olmayan eklem yıkımı hastalığın ilk aylarında müdahale ile önlenabilir. Romatologlar erken bulguların tedavi edilebildiğini söylemektedirler. Daha sofistike ve etkili tedavilerin mevcut olması ve erken müdahalenin geri dönüşü olmayan eklem hasarını önleyebildiği görüşü, bu hastalığın çok erken bir aşamada teşhis edilmesinin önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca; erken RA'da klinik parametreler genellikle (henüz) hastalıkla eşleştirebilmiş değildir. Bu nedenle, hastalığın erken tanısı için spesifik ve hassas belirteçlere ihtiyaç vardır. Çözünabilir antijenlere karşı oto-antikorlar ihtiva eden immün kompleksleri içerdiğinden RA, bir immün kompleks hastalığı olarak tanımlanabilir. Özellikle, bir otoantikor olarak bilinen romatoid faktör (RF), RA hastalarının % 70-80'inde gözlemlenmektedir ve RA tanısı için günümüzde teşhis amaçlı, rutin olarak kullanılan ve serumda bakılan tek serolojik testtir (Schellekens, 1998) RF, İmmunoglobulin G (IgG) izotip IgG'lerin Fc bölgelerine tepki veren oto-antikorlardır. RF, immün komplekslerin oluşumu bağlamında bağışıklık tepkisinin aktivasyonunun bir sonucu olarak, artan RA için spesifik olmayan bir biyobelirteçtir. Hatta, diğer oto-immün hastalıklarda da ortaya çıkar. Genç ve sağlıklı insanlarda bile görülebilir (Martínez 2011). Spesifik olan ve son zamanlarda araştırmalarda göz önünde bulunan otoantikorlar ise sitrullenmiş peptidlere karşı ortaya çıkan otoantikorlardır (Cantaert, 2006; Smolen, Multisystem Autoimmune Diseases; Schellekens, 1998). En sık RA ile ilişkili

antikorlar: anti-perinükleer faktör (APF), anti-keratin antikorları (AKA), anti-Sa antikorları, ve antisiklik sitrullenmiş antikorlar (Anti-CCP) dır ki Anti-CCP Anti-sitrulinize-protein antikorları (ACPA)’ndan biridir (Martínez, 2011). Ana odak, sadece RA'ya özgü aynı zamanda erken fazda ortaya çıkan ACPA’lardır. Başlangıçta, AKA ve APF olarak tanımlanmış antikorlar (Nienhuis ve Mandema, 1964; Young ve ark. 1979) daha sonra sitrulin peptitler (Schellekens ve ark. 1998; Girbal-Neuhauser ve ark. 1999) ile reaktif olarak karakterize edilmişlerdir. ACPA kötü bir teşhis sonucuyla ilişkili ve RA için RF’den daha spesifiktir. Bununla birlikte, çalışma sayısındaki artış ile, ACPA kronik enfeksiyonlar ve diğer romatizmal hastalıklar da dahil olmak üzere mevcut olduğu hastalıkların çok sayıda olduğu bildirilmiştir (Vossenaar ve ark. 2004a; Candia ve ark. 2006; Bassyouni ve ark. 2009; Lima ve Santiago 2010; Du Toit ve ark. 2011; Singh ve ark. 2011; Lima ve ark. 2013). Daha da önemlisi, ACPA ve RF’nin her ikisinde özellikleri mevcut olduğunda ve bu değerlerin yüksek olduğu hastaların % 90’dan fazlasında, RA, özellikle şiddetli olmaktadır (Rantapaa-Dahlqvist ve ark. 2003). İlginç bir şekilde, son bulgular, RF ve ACPA bağımsız eklem hasarı ilerlemesi ile ilişkili olduğunu belirtmektedir ve ACPA RF’den daha kuvvetli hastalık aktivitesi ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Genel olarak, ACPA’nın belirlenmesi tanısal araçlara değerli bir katkı olabileceği, ancak öncelikle RF-negatif hastalarda bunu yapmanın yeterli olabileceği düşünülmektedir (Rudolf 2009) RA hastalarının % 70-80’nin de RF tespit edilebilirken diğer otoimmün ve bulaşıcı hastalıklar da da nispeten yüksek oranda tespit edilir ve sağlıklı bireylerin de % 15’inde görülebilir. RA serumunda mevcut olan antikorlara spesifik üçüncü bir sınıf olarak adlandırılan AKA’lardır. AKA testinin duyarlılığı % 88-99 arasında bir özgünlüğe sahip ve hastaların % 36-59’unda mevcut olduğu bildirilmiştir. APF ve AKA arasındaki ilişkinin immünolojik olduğu düşünülmekte ve hasta serumundaki varlıkları kuvvetli bir korelasyon göstermektedir. APF/AKA antikorlarının varlığı ve hastalık belirgin belirtileri not edilir, bu otoantikorların olası varlıkları ve yüksek özgüllükleri RA patogenezinde önemli rol oynamaktadır (Schellekens ve ark. 1998, Cantaert, 2006). Bu antikorlar, aynı zamanda hastalığın patolojisinde de görünen antikorlardır (Nijenhuis 2004). Fakat, son yıllarda anti-siklik sitrullenmiş peptit (anti-CCP) antikorları RA için kullanışlı bir biyobelirteç olarak

talep görmektedir (Yamada, 2005; Raptopoulou, 2007; Bizzaro, 2001; Khosla, 2004; Tedesco, 2009; Vossenaar 2004b) RA'nın gelişme riskine, çevresel etkilerin yanı sıra, enfeksiyöz ajanları, sigara ve doğum kontrol hapları ile genetik faktörlerin katkısının da yaklaşık % 60 olduğuna inanılmaktadır. Ayrıca; cinsiyet de RA'nın gelişmesinde önemli bir risk faktörüdür. RA için tedavi yaklaşımı son yıllarda gelişmiş ve hastalığın tedavisi radyografik ilerlemesini engelleyebilen yeni geliştirilmiş ilaçlarla erken fazda iyileştirilmiştir (Nijenhuis, 2004). Kadınlarda görülme sıklığı 40 ve 60 yaş arasında ortaya çıkar.

1.6.2 Multipl Skleroz (MS)

MS, gelişmiş merkezi sinir sistemi (MSS)'ni etkileyen otoimmün kökenli ve miyelin kılıfta oluşan iltihaplı bir hastalık olup, MSS'de demiyelizasyonla akson kaybına neden olarak omuriliğe zarar veren oto-bağışıklık bir saldırı olarak kabul edilmiştir (Suzuki, 2011; Harauz, 2004).

MBP, miyelin kılıfda en fazla bulunan proteinlerden biridir ve MS'de otoimmünden sorumlu muhtemel antijendir. Bu protein çok basit ve fosforilasyon, deamidasyon, metilasyon ve deiminasyon gibi modifikasyonların aşırısına neden olan yüklü izomerleri (C1-C8) olan bir proteindir. MS hastalarında bulunan MBP'in aşırı modifikasyonu C8 yüklü izomerinde meydana gelen argininlerin sitruline dönüşmesidir (Bates, 2002). Hastalıkta hem MBP-Cit/toplam MBP oranı hem de MBP-Cit deki sitrullin sayısı artmaktadır (György, 2006). MBP'nin farklı izoformları, mRNA'nın birbirine eklenmesi yoluyla oluşmaktadır. İnsanlarda 17.3, 18.5, 20.2, ve 21.5 kDa ağırlığında 4 farklı izoform bulunmaktadır. 18,5 kDa'luk izoformun yüklü izomeri, alkalın üre jel elektroforezi ile farklı yüklü sekiz bileşenden en öne çıkandır. En pozitif yüklü bileşen MBP-C1'ken, en az pozitif yüklü bileşen MBP-C8'dir. MBP-C8, deiminasyon ile 6 argininin sitruline dönüşmesi sonucu oluşur. Her argininin sitruline dönüşmesiyle yapı bir pozitif yükünü kaybeder.

MBP-C8 formu erken gelişimde en öne çıkan formdur. 2 yılın sonunda hemen hemen bütün MBP'ler MBP-C8 formuna dönüşür. İlginç bir şekilde MS hastalarının beyinlerinde MBP-C8 artış görülmektedir ki MS'deki miyelin

gelişimsel olarak olgunlaşmamış, daha az yoğun ve dolayısıyla daha savunmasızdır. X-ışını kırınım (XRD) yöntemi ile elde edilen bulgular bu hipotezi desteklemektedir. MS hastalarında, MBP-C8 oluşumuna yol açan temel mekanizma bilinmemektedir. PAD, MBP'le ilgili argininlerin sitruline dönüşümünü sağlayan enzimdir. MBP-C8'deki 6 seçilmiş arginini deiminize ederken, normalde 19 argininden 17 arginini deiminize eder. Fakat, MBP-C8 formundaki 6 argininin deiminasyonunun seçiciliği miyelin membrandaki proteinlerin yönlendirilmesiyle diğer argininlerin korunması olarak açıklanabilir (Keyser, 1999). Diğer bir deyişle; MSS nöronları oligodendroglia hücreleri tarafından sentezlenen miyelin kılıflarını aşamalı olarak kaybederler. Sonuç olarak, elektriksel ileti zarar görür. Hastalık zamanla felç ya da ölüme sebep olabilir (György, 2006).

MS'in Avrupa halkındaki yaygınlığı % 0.1–0.2 iken, Asya halkında % 0.004–0.01 oranıyla daha düşüktür. Bu değerlerden, RA ve MS'in kalıtsal olarak ortaya çıkan hastalıklar olduğunu kanıtlayan güçlü delillerin var olduğu anlaşılmaktadır (Suzuki, 2011).

Miyelin ana proteinlerinden birkaçı potansiyel otoantijen olmasına rağmen, MBP'ne T-hücre tepkileri yaygın olarak incelenmiştir. T-hücrelerinin sistemik cevap frekansı MS ve kontrol hastalarında eşittir, beyin-omurilik sıvısında aktif MBP reaktif T-hücrelerinin frekansı yükselir (McLaurin, 1995).

Sitrullenme, negatif yüklü miyelin fosfatidil-serin kalıntıları düşüren proteinlerin pozitif yüklerinin azalmasına neden olur. MS ile PADI arasındaki genetik ilişki henüz gösterilememiştir. MBP, metillenmiş proteindir ve metillenmeseydi, miyelin kılıf oluşmazdı. Metilasyon, MBP'nin hidrofobikliğini artırır ve sitrullenme kabiliyetini düşürür, metillenmiş MBP modife edilmemiş yapısına göre daha yoğun yapıdadır. MS'de MBP'nin sitrullenmesinin artmasının metiltransferaz enziminin aktivitesine bağlı olduğuna yönelik tahminler vardır. Bazı son raporlar, MS'in hayvan modelinde deneysel otoimmün ensefalomyelit (omurilik yangısı) (EAE) deiminasyonuna uğramış proteinleri göstermiştir. Miyelin oligodendrosit glikoprotein enjeksiyonu sonucunda EAE'nin

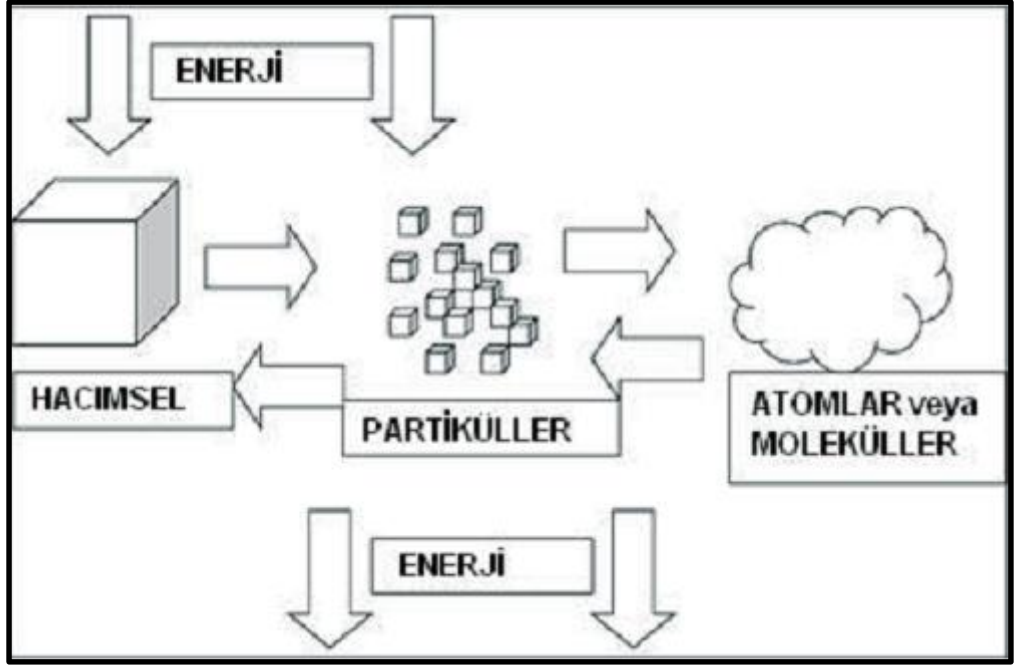
tetiklenmesiyle farenin beyin sıvısında sitrullenmiş peptitler içeren birkaç parça bulunmuştur. Bu parçalardaki deiminasyona uğramış proteinler, MBP ve GFAP'dir. Farelerde sitrullenmiş MBP'lerin EAE'yi tetiklemesi şaşırtıcı değildir (György, 2006).

1.7 Nanoteknoloji ve Nanomalzemeler

Nanoteknoloji, nanometre (nm) ölçeğindeki malzemelerin üretimi, tasarımı, karakterizasyonu, montajı ve bu malzemelerden elde edilmiş fonksiyonel sistemlerin uygulamalarını inceleyen ve hızla gelişen disiplinlerarası araştırma ve geliştirme faaliyetlerinin tamamını temsil etmektedir. Nanoteknoloji, 1-100 nm boyutlarındaki maddelerin ve sistemlerin anlaşılması, kontrol edilmesi ve atomsal seviyede değiştirilip, fonksiyonlarına göre işlevsel hale getirilmesini hedeflemektedir.

1.7.1 Nanomalzemelerin üretim yöntemleri

Nanomalzemeler; istenilen yüzey özelliklerine sahip bir şekilde, metal, metal alaşımı, polimer veya seramik esaslı ve bunların karışımından hazırlanabilirler. Nanomalzemelerin elde edilmesinde iki temel metot uygulanmaktadır. Aşağıdan yukarıya (bottom-up) ve yukarıdan aşağıya (top down) olarak isimlendirilen bu iki temel yaklaşım Şekil 1.11'de bahsedildiği şekilde şematize edilebilir (Gürmen ve Ebin; 2008).



Şekil 1.11. Nanopartikül üretim yöntemlerinin genel gösterimi (Gürmen ve Ebin; 2008).

- 1- “Aşağıdan yukarıya” (bottom-up) yaklaşımı (küçükten büyüğe), moleküler nanoteknolojiyi belirtir ve organik veya inorganik yapıları, atomlardan başlayarak atom atom, molekül molekül inşa edilmesi yöntemi olarak ifade edilmekle birlikte, aşağıdan yukarıya yaklaşımı atomları yada molekülleri kimyasal reaksiyonlar ile büyütürük partikül oluşumunun gerçekleştirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımı ile nanokristalin metal ve alaşımlarının üretimi, kullanılan ilk yöntem olan gaz yoğunlaştırma tekniği ile yapılmaktadır. Bu yaklaşımın en çok bilinen diğer üyeleri ise kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma, sol jel ve sprej piroliz yöntemleri olarak sıralanabilir.
- 2- “Yukarıdan aşağıya” (top-down) yaklaşımı (büyükden küçüğe), makineler ve benzeri mekanik yöntemler ya da asit gibi kimyasal yöntemler kullanılarak nano yapıların imal edilmesi ve fabrikasyonu yöntemlerini ifade eder. Yukarıdan aşağıya yaklaşımında malzemeye dışarıdan mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler ile enerji verilerek

malzemenin nano boyuta inebilecek kadar küçük parçalara ayrılması esas alınmaktadır. Mekanik öğütme ve aşındırma yukarıdan aşağıya yaklaşımı ile çalışan yöntemlere verilebilecek örneklerdir (Gürmen ve Ebin, 2008; Özkan, 2006). Bu tekniklerde klasik öğütme işlemlerinden çok daha fazla enerji harcanması gerektiğinden yüksek enerjili öğütme veya yüksek hız değirmenleri olarak da isimlendirilebilmektedirler (Kavaz 2011).

Partikül üretiminde kullanılan yöntemlerin yukarıda açıklanan 2 sınıflandırma dışında fiziksel veya kimyasal temelli olarak da iki ayrı sınıflandırma mümkündür. Mekanik enerjinin kullanıldığı fiziksel temelli yöntemler, fiziksel ve kimyasal reaksiyonların kullanıldığı yöntemler ise kimyasal temelli olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemler

- ❖ Kimyasal Buhar Yoğunlaştırma Yöntemi
- ❖ Hidrojen Redüksiyonu Yöntemi
- ❖ Asal Gaz Yoğunlaştırma Yöntemi
- ❖ Mikroheterojen Sistemlerden Nanopartikül Üretimi
- ❖ Alev Sentezi Yöntemi
- ❖ Mekanik Aşındırma Yöntemi
- ❖ Ultrasonik Sprey Piroliz Yöntemi

olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bu yöntemlerden kısaca bahsedilecek olursa;

Kimyasal buhar yoğunlaştırma yöntemi (CVC) ilk kez 1994 yılında Almanya'da geliştirilmiş olup, yüksek miktarlarda NP üretimi için ideal bir yöntemdir (Zaki, 2014; Wang 2003). Bu yöntemde başlangıç malzemesi olarak buhar fazına kolaylıkla geçebilen bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşikler metalorganikler, karboniller, klorürler ve hidrürler olarak sıralanabilir. CVC yönteminin en önemli getirisi farklı içerikli olan başlangıç kimyasal malzemelerin ticari olarak kolaylıkla temini ile neredeyse her çeşit malzeme, geniş bir kimyasal bileşimde üretilmesinin mümkün kılmasıdır. Yöntem temel olarak gaz fazında bulunan kimyasal malzemenin ısı parçalanma işlemi uygulanarak partiküle dönüşümüne dayanmaktadır. Isıl parçalanma işlemi sonucunda oluşan atom grupları veya NP'ler fırın çıkışında bulunan farklı toz toplama yöntemleriyle

biriktirilmektedirler. İlk aşamada kullanılan başlangıç çözeltisi buharlaştırıldıktan sonra, taşıyıcı veya redükleyici bir gazla ısıtılmış ön bölgeye ve oradan da redüksiyonun gerçekleşeceği daha sıcak bölgeye taşınarak partikül oluşumu gerçekleştirilmektedir.

Nanokristalin metal ve alaşımlarının aşırı doymuş buhar fazından direkt olarak üretiminde kullanılan en eski tekniklerden biridir. AGY yöntemi çok yönlü olduğundan dolayı günümüzde nano-yapılı tozların sentezinde laboratuvar ölçekli olarak kullanılmaktadır. AGY yönteminde, metalik, seramik ve kompozit NP'ler üretilebildiği gibi oksijen gibi bir reaktif gaz kullanılarak oksitler veya diğer bileşikler de üretilebilir (Swihart, 2003). Yöntem, ısınan su buharlaştıktan sonra ısı kaybetmeye başlamasıyla soğuk cam yüzeyinde su damlacıklarının yoğunlaşmasına benzer.

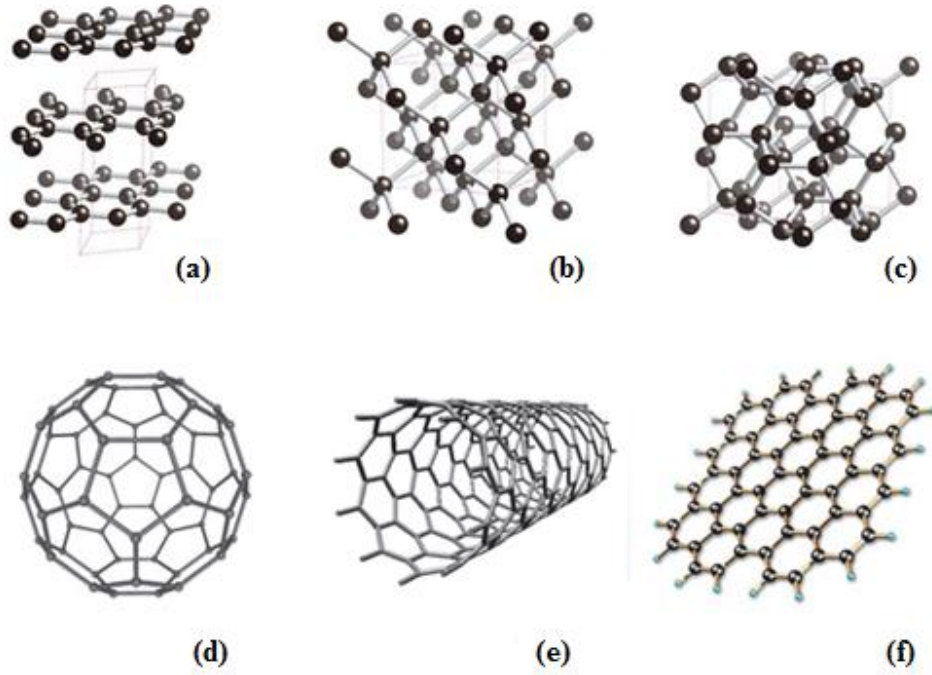
Partikül büyüklüğünü doğal olmayan partiküllerin varlığı, elektrostatik enerji bariyeri ve sterik itme etkilemektedir (Diltemiz 2006). Ortamda oluşan veya bulunan doğal olmayan partiküllerin varlığı partiküllerin orantısız olarak büyümesine neden olurken, elektrostatik enerji bariyeri kolloial partiküllerin yüklü olmasından kaynaklanır ve benzer yüklü partiküllerin birbirlerini itmesiyle koagülasyona sebep olabilir. Sterik etki ise surfaktan eklenmesi ile kolloidler stabilize edilerek önlenmektedir.

NP oluşum dinamiği türlerin çözücünde çözünmesine bağlı olabildiği gibi çözücünün dielektrik sabitine, ortam sıcaklığına ve çözeltilerin derişimine bağlıdır. Seyreltik çözeltiler kullanıldığında partiküller arası çarpışma en aza indirgeneceğinden aglomerasyon ve çökelme gerçekleşmez.

NP'ler 100 nm'den küçük ve boyutlarına özgül özelliklere sahip bileşiklerdir. Boyutlarının küçük olması ve elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmon rezonansı gibi özellikleri nedeniyle biyolojik sistemlerde kolayca kullanılabilmişlerdir.

1.7.2 Karbon nanotüp (CNT)

Karbon, yapısına katılabildiği bileşiklerin sayısı ve çeşitliliği bakımından, diğer elementlerden farklı ve özgün bir yapıdadır. Şimdiye kadar, karbonun yarım milyonun üzerinde farklı bileşiğin yapısına katıldığı bilinmektedir. Grafit (Şekil 1.12.a), elmas (Şekil 1.12.b) ve fulleren (Şekil 1.12.d) karbonun allotroplarıdır. Bir grafit katmanında (grafin) her bir karbon atomu diğer 3 karbon atomuna sp^2 hibritleşmesi ile bağlanır. Grafit tabakaları da iki boyutlu düzlemde birbirlerine bağlanır. Çok kararlı, güçlü ve esnek bir yapıda olan her bir grafit katmanı tek olarak da kararlılığını koruduğundan, komşu katmanlara çok zayıf bağlarla bağlanmaktadır. Bu nedenle, tabakalar birbiri üzerinde kolayca kayabilirler. Grafitin iyi bir yağlayıcı olma özelliği buradan kaynaklanmaktadır. Elmasta ise bir karbon atomu diğer 4 karbon atomuna sp^3 hibritleşmesi yaparak bağlanır. Karbon atomları arasındaki bu bağların çok kuvvetli olması nedeniyle elmas çok sert ve kararlı bir yapıya sahiptir ve ısı iletkenliği çok yüksektir. Son yıllarda gerçekleşen gelişmelerle karbonun önemi daha da artmıştır. Bu gelişmelerin en önemlisi 1985 yılında Kroto ve ark. tarafından (Kroto, 1985) 60 karbon atomunun simetrik olarak bağlanmasıyla elde edilen futbol topu şeklindeki (Şekil 1.12.d) “buckminster fullerene” molekülünün keşfidir. 1 nm büyüklüğündeki bu moleküller çelikten daha güçlü fakat plastikten daha hafiftir, ısı ve elektriği iletirler. Şekil 1.12.e’de görülen ve bir karbon türevi olan CNT, Şekil 1.12.f’deki grafenden türetilen bir nanoyapıdır (Oganov, 2013; Sederberg, 2009).



Şekil 1.12. Karbonun allotropları a) grafit, b) elmas, c) BC8, d) fulleren, e) nanotüp, f) grafen (Oganov, 2013)

CNT, grafitin bal peteğine benzeyen atom düzleminin bir silindir üzerine kesiksiz olarak hiçbir kusur oluşturmada sarılmış bir şekli olarak düşünülebilir (Lijima 1991). Nanotüpler bilinen en güçlü fiberlerdir. Tek bir CNT, birim alanda taşıyabildiği yük göz önüne alındığında, çelikten kat kat daha güçlü olmakla birlikte çok hafif olması, yüksek elastikiyete sahip olması ve bilinen en dayanıklı fiber olması ihtimalleri CNT'lerin en önemli özelliklerindendir. CNT'ler koltuk tipi nanotüp, zikzak yapan nanotüp ve her iki tür nanotüpten farklı yapıya sahip chiral tip nanotüp olmak üzere üç farklı oluşum gösterirler (Barone ve ark., 2006; Hornbaker, 2003; Saito, 1992; Wildöer, 1998). Ayrıca birden fazla sarım üst üste yapılarak çok duvarlı nanotüp yapılar da elde edilebilir ki çok duvarlı nanotüpler yapıya mukavemet artışı sağlamaktadır. Grafenin simetrisi ve kendine has elektriksel yapısından ötürü, CNT'nin yapısı elektriksel özelliklerini önemli bir derecede değiştirmektedir. CNT'lerdeki atomların diziliş şekline yani çeşitlerine (koltuk, zikzak, kiral) göre elektriksel özellikleri de farklılık göstermektedir. Örneğin tüm koltuk tipi nanotüpler, metalik özelliğe sahip olup iletkenlikleri

yüksektir. Teoride metalik nanotüplerin elektrik gerilim yoğunlukları gümüş ya da bakır gibi metallere göre 1000 kat daha fazladır.

1.7.3 CNT Sentezleme Yöntemleri

CNT sentezi için yıllar süren çalışmalar sonucunda belirli yöntemler ön plana çıkmıştır. Sentezleme yöntemleri, farklı uygulama ve kullanım amacına yönelik olarak farklı doğrultularda şekillendirilmiştir. Yüksek saflıkta CNT sentezleme arzusu, düşük sıcaklıklarda ve yüksek üretim kapasitesiyle sentezleme için birçok değişik yöntem yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konulmuştur. Üretimde başlangıçta yola çıkılan malzemelerden esinlenerek katı hâlde karbondan ve gaz hâlde karbondan sentezleme şeklinde iki farklı sentezleme yöntemi olarak sınıflandırılmıştır. Bu yöntemlerin dışında ve farklı isteklere cevap veren durumlar ise diğer sentezleme yöntemleri olarak belirtilmiştir.

1.7.3.1 Katı Hâlde Karbondan Sentezlenenler

Katı hâlde karbondan sentezleme yöntemlerinde karbon kaynağı olarak, katı haldeki grafit parça kullanılmasıdır. Grafitin geometrisinin önemi yöntemden yönteme değişmektedir. Bu yöntemlerde yüksek sıcaklıklar ve yüksek basınçlar söz konusu olmaktadır.

Lazerle Aşındırma Yöntemi

Bir grafit parçanın çıkış maddesi olarak kullanılması ve 500 Tor basınç altında yaklaşık 1200 °C sıcaklıkta çalışan bir fırın içinde lazer ünitesiyle bombardımanı ile CNT sentezlenmesi gerçekleştirilmektedir. İlk olarak Rice Üniversitesinde 1995 yılında keşfedilen yöntemde, lazer kullanılarak buharlaştırılan grafitten çıkan karbon kümeleri, soy gaz ortamında (helyum veya argon) su soğutmalı bakır toplayıcı üzerinde birikirler. Biriken malzeme içinde CNT'ler olduğu gibi, az miktarda da karbon nano parçacıkların bulunduğu düşünülmektedir. Saf grafit hedef alınarak yapılan bombardıman sonucu oluşan CNT'lerin çok duvarlı oldukları bildirilirken, Co, Ni, Fe, Y gibi katalizör içeren hedeflerle oluşan CNT'ler tek duvarlı olarak görülmüşlerdir. Lazerle aşındırma

yöntemi, aşağıda anlatılan ark boşaltma yöntemine göre daha kaliteli tek duvarlı CNT'ler üretmek için daha elverişli olmasına rağmen maliyeti yüksek ve üretim kapasitesi düşük bir yöntem olduğundan dolayı daha az tercih edilmektedir (Küçükyıldırım ve Eker, 2012).

Ark Boşaltma Yöntemi

Ark boşaltma yöntemi, CNT sentezinde kullanılan yöntemlerin en eskilerinden biridir. Yöntemde, biri anot biri de katot olmak üzere ark oluşacak şekilde bir mesafe oluşturularak yerleştirilmiş iki grafit çubuk arasında doğru akım uygulanarak CNT sentezi gerçekleştirilir. Yöntemin çalıştırılabilmesi için bir ark reaktörü içerisinde genellikle helyum gazı ile 600mbar'dan yüksek bir basınç sağlanır ve 6mm çapında olan anot ile 9 mm çapında olan katot arasında 20-40 V arası bir gerilim ve 50-100 A arası bir akım oluşturulur. Kararlı arkın oluşabilmesi için anot ile katot arasındaki mesafesinin 1mm veya daha az olması gerekmektedir. Anot yüzeyine gelen elektronlar anot ile çarpışır ve katot üzerinde karbon kümelerinin birikmesine yol açar. Bu oluşan birikim içinde CNT'ler, nano parçacıklar ve kümelenmiş karbon bulunur. Bunun yanında, ark reaktörünün iç çeperinde de karbon kümeleri görülebilir. Yukarıda bahsedilen lazer yönteminde de olduğu gibi ark boşaltma yönteminde de saf grafit çıkış maddesi ile yapılan birikim sonucu elde edilen CNT'ler çok duvarlı olurken, anot parçacığının merkezine yerleştirilen Co, Ni, Fe, Y gibi katalizör içeren çıkış maddelerinden elde edilen CNT'ler, tek duvarlı yapıda olabilmektedirler (Küçükyıldırım ve Eker, 2012).

Solar Fırın Yöntemi

Solar fırın yöntemi daha çok fulleren sentezlenmesi için tasarlanmış bir yöntem olup daha sonra CNT sentezlemek için de kullanılmaya başlanmıştır. 4000°K işlem sıcaklıklarına kadar çıkılması gereken bu yöntemde, düşük verimli üretim elde edildiğinden pek tercih edilmemektedir. Solar fırın yönteminin en önemli avantajı güneş enerjisinin kullanarak sentezin gerçekleştirilmesidir.

Gaz Halde Karbondan Sentezlenenler

Bu yöntemlerde kullanılan karbon kaynakları çeşitli konvansiyonel (atomik olmayan) gazlar olmaktadır. Bu yöntemlerden en önemlisi olan ve günümüzde de özellikle yüksek miktarlarda CNT üretmek için sıklıkla kullanılan ve üzerinde durulan yöntem kimyasal buhar çökeltme yöntemidir.

Kimyasal Buhar Çökeltme

Bu yöntem, gaz halde karbondan sentezlenen yöntemler içinde en önemlisi olmakla birlikte, genellikle katalizörlü kimyasal buhar çökeltme (CCVD) olarak bilinir ve katalizör yardımıyla karbon gazlarından koparılan karbon nanoparçacıkların üretilmesi yöntemi uzun süredir uygulanmaktadır. 90'lı yıllara kadar karbon nanoparçacıklar, katalizör kullanılmadan CVD işlemlerinde kalınlaşmasıyla oluşturulan buhar yardımıyla büyütülen karbon üretiminde çekirdek altlığı olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde tek duvarlı ya da çok duvarlı CNT'lerin CCVD metodlarıyla üretilmesi, karbon içeren bir kaynaktan koparılan karbon kümelerinin küçük metal parçaları ve ya öbekleri üzerinde ayrışması olarak açıklanabilir. Bir katı altlık kullanımı gerekiyorsa bu işlem heterojen işlem, her şey bir gaz fazı içinde gerçekleşiyorsa işleme homojen işlem denmektedir. Bu tepkimelerde küçük metal parçaları olarak bahsedilen metaller genelde Fe, Co ve Ni gibi geçiş metalleridir. Daha önce bahsedilen lazer ve ark teknikleriyle karşılaştırıldığında bu yöntem, daha düşük sıcaklıklarda uygulanır, çünkü CNT'ler 600°C ila 1000°C sıcaklıkları arasında oluşmaktadır. Düşük sıcaklık kullanımından ötürü, CCVD yöntemi özellikle çok duvarlı CNT'lerin sentezlenmesinde kullanılması daha iyi bir seçimdir. Homojen ve heterojen işlemlerin ikisi de hem kullanılan katalizörün doğası hem de işlem şartları gereği oldukça hassas yöntemlerdir. Ark boşalım yöntemiyle üretilen CNT'ler ile kıyaslandığında CCVD metoduyla üretilen CNT'ler genellikle çok daha uzunlardır. Ark boşalım yöntemi kullanılarak elde edilen CNT'ler birkaç mikrometre uzunlukta iken, CCVD yöntemiyle üretilen CNT'ler onlarca hatta yüzlerce mikrometre uzunluklarında olabilirler. Düşük sıcaklıkta gerçekleştirilen tepkime karbon atomlarının diziliminde yapısal değişikliklere izin vermemesinden

dolayı CCVD yöntemiyle üretilen çok duvarlı CNT'lerin kalitesi ark boşalım yöntemiyle üretilenlerden daha düşüktür. Bu sorunlar inert gaz kullanılarak ya da vakum ortamında yapılan ısıtma işlemleri ile giderilebilir. Karşılaşılan bu tarz sorunların tek duvarlı CNT'ler için geçerli olup olmadığı ise halen çözülememiştir. CCVD ile üretilen tek duvarlı nanotüpler daha küçük çaplı (birkaç on nm) olup, ark ve lazer yöntemleriyle üretilen CNT'ler daha büyük (yaklaşık 100 nm çaplı) demetler halinde bulunurlar. CCVD yöntemleriyle CNT'lerin üretimi daha düşük maliyetlerle seri olarak yapılabilmesi mümkündür. Bu durum endüstriyel büyüklükteki uygulamaları için kilit nokta olmaktadır.

Isıl Kimyasal Buhar Çökeltme

Isıl kimyasal buhar çökeltme yöntemi ile CNT sentezinin çıkan ürün ve hidrokarbon çeşitliliğinin fazlalığı, kalitesi yüksek malzemelerin sentezlenebilmesi ve mikroskopik yapıların kontrol edilebilirliği gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Tepkime sırasında kullanılan gazın akış hızındaki değişimler kararsız gaz tedarikine neden olmakta birlikte bu yöntemde altlığın homojenliği açısından iyi değildir. Elde edilen sonuç, işlem ve tepkime odasının sıcaklığına da bağlıdır. Bu dezavantajlarının yanı sıra cihaz kurulumu ve seri üretimde kullanımının basitliği bu yöntemin öne çıkan avantajlarındandır. Isıl kimyasal buhar çökeltme ile CNT üretimi; öncelikle Fe, Ni, Co, ya da bu üç katalizör metalinin alaşımı bir altlığın üzerine çökeltilerek başlanır. Metal/metal alaşımı altlık, suyla seyreltilmiş HF çözeltisiyle dağlandıktan sonra numune kuartz teknesine, tekne de bir kimyasal buhar çökeltme reaktörüne yerleştirilir ve katalizör metal/metal alaşımının NH_3 ile 750 ile 1050 °C sıcaklık aralığında bir kez daha dağlanmasından sonra nano ölçekte küçük metal katalizör taneler oluşurlar. Bu küçük katalizör metal parçalarının üzerinde CNT'ler oluştuklarından bu basamak yöntemin kullanılabilirliği açısından en önemli işlemdir.

Mikrodalga Plazmayla Kimyasal Buhar Çökeltme (MWPCVD)

CNT'lerin üretilmesinde kullanılan bir diğer yöntem ise Mikrodalga plazmayla CVD yöntemidir. Yöntemde, CNT'lerin atmosferik basınçlarda üretilmesi söz konusu olup, reaksiyon düzeneğinde mikrodalga gücü bir mikrodalga jeneratörü tarafından sağlanır. Mikrodalgalar; dalga rehberi, eşleştirme ünitesi ve bir eş eksenli hattan geçerek demirden bir üfleç ile elektroda doğru giderler. Bu yöntemde, CH₄ gibi konvansiyonel (atomik olmayan) gazlar karbon kaynağı olarak kullanılırken, argon ve hidrojen de çökeltmenin sağlanması için dışardan üflece eklenir. CNT üretimi için gerekli olan ve genellikle silikon malzemelerden oluşturulan altlık, kuartz tutucu üzerine konulur. Kuartz tüp elektrot nozülün (*bir akışkanın akış yönünü kontrol etmeye yarayan parçaların genel adıdır*) üzerinde olup, kuartz tüp üstünde duran bir kapağa bağlanmış vaziyette yerleştirilmiştir. Akış halindeki argon gazı içerisinde (1000 sccm ("*standard cubic centimeters per minute*" bir gaz akış birimi olup "*dakika başına akan standart santimetreküp*" anlamına gelmektedir)) plazma üfleci ateşlendikten sonra, 300 sccm H₂ ve 10-50 sccm CH₄'ten oluşan çökeltme karışımı eklenir. Son olarak nozülde istenilen bir uzaklığa altlık yerleştirilir ve MWPCVD yöntemiyle altlık üzerine dışarıdan ısı uygulanmadan, atmosferik basınçlar altında, çok duvarlı CNT'ler düzgün sıralı bir şekilde üretilmektedir. MWPCVD yönteminin avantajları altlığın çabuk ısıtılabilmesi ve eş zamanlı olarak reaktif karbon türlerinin boşalmadaki yüksek derişimleri olarak sıralanabilir.

Buhar Fazında Büyütme

CNT'lerin gaz haldeki karbon kaynaklardan üretim yöntemlerinin birçoğunda, CNT'ler C₂H₂, CH₄, C₂H₄, C₂H₆ gibi konvansiyonel gazların bir altlık üzerine bulunan metal katalizörlerin üzerine çökeltmesiyle üretilmektedir. Buhar fazında büyütme yönteminde ise CNT'ler, tepkime odasına bir altlık olmaksızın tepkime gazı ve metal katalizörün gönderilmesiyle üretilirler. Kütle akış kontrolörü bir köşede bulunur ve metal katalizörlerin bulunduğu kısım tepkime odasının içinde yer almaktadır. Tepkimenin gerçekleştirileceği oda, iki farklı

fırından oluşmakta olup, birinci fırın daha düşük sıcaklıklarda bulunurken, ikinci fırın daha yüksek sıcaklıklarda bulunur. Bunun sebebi, asıl tepkimenin ikinci fırının olduğu kısımda gerçekleşmektedir. İlk fırında hidrokarbon gazın ayrışması için yeterli sıcaklık sağlanamamakla birlikte, metal katalizörün buharlaşması için yeterli sıcaklık sağlanmış olur. Buharlaştan metal katalizörler atomlar halinde olurlar ve çarpışarak odanın içinde küçük tanecikler haline gelerek toplanırlar. Düşük sıcaklığa sahip ilk fırında metalden buharlaştan küçük katalizör taneleri ikinci fırına ulaşırlar, bu fırında daha sıcak bir ortam olduğundan bu kısımda bulunan ayrıştımış karbonlar tarafından absorbe edilirler ve CNT olarak sentezlenir. Buhar fazında büyütme yöntemi reaksiyon ve üretim şartlarının kolaylığı bakımından seri üretim açısından daha uygun bir yöntemdir.

1.7.3.2 Diğer Sentezleme Yöntemleri

Bu yöntemler sıklıkla kullanılmamakla birlikte, daha çok deneysel ve geliştirme amaçlı uygulanırlar. Bu yöntemler hidrotermal sentezleme ve elektroliz yöntemi olarak iki grupta sınıflandırılabilir.

Hidrotermal Sentezleme

Hidrotermal sentezleme yönteminde, bazı tekniklerle yüksek basınç altında bulunan sulu bir çözeltiden kristalize edilerek büyüme gerçekleştirilir. Yöntem “hidrotermal metot” olarak da anılmakta olup, CNT üretimi, besleyici malzemenin su ile beraber basınçlı bir kap olan çelikten yapılmış otoklav yolları ve reaksiyon otoklav içinde gerçekleşir. Otoklav içerisinde bulunan iki farklı oda farklı sıcaklıklarda olup, sıcak odada besleyici madde çözülürken, soğuk odada tohumların büyümesi gerçekleşir. Elementler, basit ve karmaşık oksitler, silikatlar, tungstatlar, karbonatlar, germanatlar, molibdetler gibi farklı sınıftaki birçok bileşik, hidrotermal sentezleme yöntemi kullanılarak üretilmektedir. Hidrotermal sentezleme yöntemi ticari değeri yüksek sentetik kuartz ve değerli taşların üretiminde de kullanılan bir yöntemdir. Sentetik olarak üretilen kristallerden bazıları zümrüt, yakut, kuartz ve aleksandritlerdir ki hidrotermal yöntemle bu taşların verimli bir şekilde üretilmesi mümkün olmaktadır. Ayrıca,

bu yöntemle karbon malzemelerin üretimi de gerçekleştirilebilmektedir. 100 MPa ve 600 °C gibi düşük basınç ve sıcaklık değerlerinde polivinil klorür bazlı kokun su ve kalsiyum karbonat ile tepkimeye girmesiyle grafitizasyon gerçekleştiği gözlenmiş, aynı araştırma dahilinde 1 GPa ve 1400 °C gibi daha yüksek basınç ve sıcaklık değerlerinde su kullanılmadığı durumda grafitizasyonun görülmediği kaydedilmiştir. Hidrotermal sentezleme CNT'lerin üretiminin yanı sıra karbon filamanların, bir altlık üzerinde dizilmiş halde de üretimi dahil birçok ürün için önemli bir potansiyel taşımaktadır. Oluşan CNT'ler oldukça düzgün sıralanmış grafitik duvar yapılarına sahiptirler.

Hidrotermal CNT'lerin sentezi, karbon kaynağının çeşidine bağımlı değildir fakat, karbon, oksijen ve hidrojen atomlarının gerekli oranda sisteme verilmesi gerekmektedir. Neredeyse her hidrokarbon/su karışımı uygun bir şekilde kullanılarak CNT sentezi mümkündür. Nikel katalizörü hidrotermal yöntemle CNT sentezi için zorunlu olsa da, grafitin büyümesi nikel katalizörü ile alakalı değildir. Ortamda bulunan su, yüksek grafitik yapının ve büyük iç kanalların oluşumundan sorumludur. Su yokluğunda gerçekleştirilen sentezlerde elde edilen ürünlerin daha az grafitik yapı ve çok sayıda kapalı iç yapılara sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Yoshimura ve Byrappa, 2008).

Elektroliz

Elektroliz yönteminde çok duvarlı nanotüplerin üretimi, ergiyik lityum klorürün, grafit bir hücre kullanılarak elektrolize edilmesiyle sağlanmıştır. Hücre içindeki anot grafit bir pota olup, potanın atmosferdeki sıcaklığı yaklaşık 600 °C'dir. Bu yöntemle, 20 V ve 3–20 A'dan daha az doğru akım (DC) kullanıldığında 0,5 µm ya da daha fazla uzunlukta ve 2–10 nm çaplı çok duvarlı CNT'ler üretilmektedir. CNT'lerin içinde yan ürün olarak amorf karbonlar oluşabilmektedir (Alekseev, 2005).

1.7.4 Karbon Nanotüplerin Uygulama Alanları

CNT'ler bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda sağladıkları farklar nedeniyle büyük önem taşımaktadırlar. Dünyada ve ülkemizde CNT'ler üzerinde

yapılan çalışmaların çoğu ticari uygulamalara geçmişken, bazı çalışmalar ise şu an için teorik düzeyde bulunmaktadır. CNT'ler, birçok araştırma grubu tarafından tüm dünyada üzerinde yıllardır çalışılan bir alandır. Yaklaşık olarak son 20 yıldır yapılan çalışmaların sonuçları günümüzde alınmaya başlanmıştır. Son yıllarda, endüstriyel boyuta sınırlı bir şekilde geçilmiş olsa da büyük çaplı uygulamalar için biraz daha zamana ihtiyaç vardır. Hatta, CNT'lerle yapılacak uygulama planları gelecekte çok önemli kazanımlar vaat etmektedir.

1.7.4.1 CNT'nin Günümüzdeki Uygulamaları

Günümüzdeki CNT uygulamaları kısıtlı seviyelerdedir ve geniş kitleler tarafından kullanılabilir durumda bulunmamaktadır. Fakat özellikle nanotüplerin teorideki özellikleri yapılan deneysel çalışmalarla pratikte de kullanılabilir olduğunu ispatlandığından dolayı büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, nanotüplerin pratikteki uygulamalarından faydalanılarak yeni alanlara yönelim, iyileştirme çalışmalarının sonuçlanması, uzun vadede yeni ufukların açılabilmesi mümkün olmaktadır. Nanotüp teknolojisinin daha uygun fiyatlarla, endüstride seri üretimde kullanılabilir duruma getirilmesi kullanılabilirliğinin artmasını sağlayacaktır.

Mikroskop Problemleri

Yüksek dayanıklılıklarından ötürü CNT'ler taramalı uç mikroskoplarında (SPM), atomik kuvvet mikroskoplarında (AFM) ve kimyasal kuvvet mikroskoplarında (CFM) kullanılmaktadır (Xu ve ark., 2011; Hafner, 2001). CNT'lerin yüksek dayanıklılığa sahip olmaları nedeniyle dayanımı yüksek uçlar elde edilmiş, böylelikle yüzeyler yüksek çözünürlüklerde gözlemlenebilmiştir. Yüzey inceleme dayanıklılıklarından dolayı çok duvarlı nanotüplere bırakmışlardır. CFM'de kimyasal seçiciliklerinden yararlanılarak seçilmiş görüntüler almak için kullanılırlarken, AFM'de yüksek boy oranı, mükemmel elastik burkulma özelliği, elektrik ve ısı iletkenliği gibi pek çok mükemmel özelliğinden dolayı kullanılmaktadırlar. Nanotüplerin uç kısımları kimyasal olarak en reaktif bölgeleri olduğundan uygulama türüne göre fonksiyonelleştirilerek uzaysal çözünürlük arttırılabilmektedir.

Elektron Yayılmı Temelli Cihazlar

Yapılan araştırmalar sonucunda CNT'ler yüksek elektron yayma özelliğine sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde son yıllarda televizyon, telefon veya bilgisayar ekranlarında ya da elektron üretilmesi istenen bir katoda ihtiyaç duyulduğu her türlü uygulamada kullanılmaları için çalışmalar yürütölmektedir.

Kimyasal Sensörler

CNT'ler, 1991 yılında keşfedilmesinden bu yana, sahip olduğu benzersiz özellikleri nedeniyle çeşitli uygulamalar için büyük bir potansiyel göstermesi açısından ilgi çekmiştir. CNT yüzeyindeki C atomlarının altıgen dizilimleri güçlü bir etkileşim sağladığından ve CNT karbon materyalini temsil ettiğinden dolayı yaygın nanomaterial olarak kabul edilmekte ve katı faz ekstraksiyon adsorbanı olarak büyük bir analitik potansiyel göstermektedir. Ayrıca, CNT'nin yüzeyleri, çeşitli organik fonksiyonel grupların eklenmesiyle modifiye edilebilir, böylece kuvvetli, yüzey alanına, ayarlanabilir yüzey yüküne, kimyasal iyonizasyon için bir proton kaynağı olma özelliğine sahip olabilir (Cirillo ve ark., 2012)

Yarı iletken özellikte tek duvarlı CNT'ler, normal koşullarda kendilerini çevreleyen ortamdaki kimyasal değişimlere karşı oldukça hassas davranmaktadırlar. Yeni nesil nanotüp bazlı sensörler, günümüzde kullanılan standart sensörlerden daha hassas, ayrıca çok daha küçük basit yapılar içeren, oda sıcaklıklarında çalışabilen ve yüksek seçiciliğe sahip sensörlerdir. Bu sahip oldukları seçicilikleri sayesinde, tek bir cihaz farklı birçok uygulama için kullanılabilir.

Elektrokimyasal algılama yaklaşımlarında elektrot malzemesi olarak CNT kullanımı, benzersiz yapıları ve özellikleri sayesinde minimum yüzey kirliliği ve güçlü elektro katalitik etkinlik sağlamıştır. Nanofabrikasyon aygıt bütünleştirme teknolojileri, CNTlerin sentezinde, arıtılmasında, konjugasyonunda ve biyofonksiyonlandırılmasında önemli ilerlemeler ile birlikte ortaya çıkmıştır.

Bu tür ortak çabalar, gelişmiş algılama hassasiyeti ve seçiciliği ile birlikte önemli analitlerin bolluğu sayesinde CNT tabanlı sensörlerin hızla gelişmesine katkıda bulunmuştur. CNTlerin kullanımı enzim ve aktif elektrot alanı arasındaki doğrudan elektron transferi için fırsat yaratmıştır. Bu konudaki özel bir nokta da CNTlerin hidrojen peroksit ve nikotinamid adenin dinükleotidinin redoks reaksiyonu üzerindeki iyi elektrokatalitik faaliyetlerdir. Bu kusursuz elektrokataliz, oksidazlar için “on-site biosensör”lerin ve geliştirilmiş seçiciliğe sahip dehidrojenazların basit tasarımı ve uygulanması için gelecek vadetmektedir. Bugüne kadar, anti-parazit tabaka veya yapay bir elektron arabulucu kullanımı, istenmeyen endojen elektroaktif türü oluşumunu aşmak için gerekli görülmekteydi. Bu tip etkileşime giren türler, NADH, tiol ve hidrojen peroksit oksitlenmesi kullanımından bu yana CNT temelli elektrotların kullanılmasıyla birlikte etkili şekilde baskılanmıştır (Vashist, 2011).

CNTler, yüksek mukavemetleri, geniş yüzey alanları ve benzersiz kimyasal özellikleriyle moleküler baskılama yönteminde destekleyici eleman olarak kullanılmaktadırlar (Cirillo, 2012). Lee ve Kim, 2009 yılında yaptıkları çalışmada iniferter-modifiye edilmiş CNT üzerine moleküler baskılanmış polimerleri aşlamışlardır. Tween 20 ilk kez bu çalışmada hidrofobik etkileşimlerle CNT üzerinde sabitlendikten sonra fonksiyonellendirilen CNT yüzeyinde teofilin için MIP oluşturulmuştur. CNT yüzeyindeki bu MIP’lerin, alan etkili CNT transistörü tabanlı biyosensör sistemlerindeki prob malzemelerinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Lee ve Kim, 2009). Yu ve Lai, 2005 yılında, moleküler baskılanmış polimerleri, paslanmaz çelik emaye (frit) üzerinde kırmızı şarapta bulunan bir toksin olan okratoksin A’nın konuk molekül, CNT’nin katı destek olarak kullanıldığı, fonksiyonel monomer olarak pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu ile hazırlanmasıyla elde etmişlerdir ve böylece mikro-katı faz ön konsantrasyon (μ SPP) cihazlarında nanoyapılı CNT içeren nanosensör olarak kullanımlarını incelemişlerdir (Yu ve Lai, 2005).

Katalizör Desteği

Karbon malzemeler, heterojen katalizörlerin kullanılması gereken proseslerde kullanılan destek malzemelerinin en önemlilerinden biridirler. CNT'ler, heterojen katalizörlerin kullanıldığı proseslerde aktive edilmiş diğer karbon yapılarına göre çok daha üstün özelliklere sahip olduklarından katalizör desteği olarak kullanılmaktadırlar. CNT'lerin yapıları, özellikle boy en oranlarının çok büyük olması aktif olan metal parçacıklar üzerine yayılmalarını katalitik olarak kolaylaştırmaktadır.

Üç Boyutlu Güneş Hücreleri

Günümüzde kullanılan güneş hücreleri iki boyutlu olup ve üzerlerine gelen güneş ışığının bir kısmını geri yansıtmaktadırlar. Üç boyutlu güneş hücreleri ise üzerlerine gelen güneş ışığının neredeyse hepsini yakalaması ve bu sayede elde edilen verimin çok artması, ağırlık ve mekanik karmaşıklığın düşebilmesi mümkündür (Küçükıldırım ve Eker 2012; Yan ve ark. 2013). CNT'nin (i) birçok organik bileşikten farklı olarak yakın IR bölgede (800-1800 nm) ışığı absorpsiyonu oldukça fazla olduğundan, (ii) yakın IR ve görünür bölgede sürekli iletkenlik ve (iii) hızlı difüzyon sağlayan yüksek taşıma kapasitesi sağladığından kullanımı hızla artmaktadır (Gorji ve Houshmand, 2013).

1.7.4.2 Geleceğe Yönelik Uygulama Planları

CNT'nin bilimsel ve endüstriyel uygulamalarında özellikle heyecanlandıran kısım geleceğe yönelik planlara CNT'nin büyük oranda dahil olmasıdır. CNT teknolojisi için teorikle pratik buluştuğu anda, üzerinde çalışılan konuların birçoğu hayata geçirilebilir olacaktır. Son yıllarda, CNT ile ilgili uygulamalar deneysel olarak yürütölmekte olup, birçok farklı alanda planlamalar ve tasarımlar devam ettirilmektedir. CNT'lerin yapısal, kimyasal, elektriksel vb. özelliklerinden dolayı aşağıda belirtilen uygulamalarda yararlanmak için çalışmalar devam etmektedir.

- Kapasitörler
- Yakıt Hücreleri
- Gaz Depolama
- Absorbantlar
- Bio-Sensörler
- Kompozit Malzemeler
 - Metal Matrisli Kompozitler
 - Seramik Matrisli Kompozitler
 - Plastik Matrisli Kompozitler
- Çok Fonksiyonlu Malzemeler
- Nano Araçlar, Nano Cihazlar, Nano Sistemler

1.7.5 Altın (Au) Nanopartiküller

Au NP'ler metal NP grupların muhtemelen en dikkat çekici üyeleri ve kataliz, biyoloji ve optikteki potansiyel uygulamalar için oldukça ilgi çekicidirler. Son on yılda, sentez yöntemlerinin kapsamlılığı, özellikle tohum büyüme sentezi, umut vaat eden uygulamaların araştırılmasına yol açmıştır. Au NP'ler aşağıdan yukarıya ya da yukarıdan aşağıya yaklaşımlarının her ikisiyle de sentezlenebilirler. Yukarıdan aşağıya yönteminde Au yığın kütleden öğütülerek Au NP'lere kadar inilebilmektedir. Fakat bu yöntemde boyutun ve şeklin kontrol edilebilmesi sınırlıdır. Tam aksine, aşağıdan yukarıya yaklaşımda, Au NP'ler, birbirinden ayrı moleküllerden kimyasal ya da biyolojik indirgenmeyle oluşurlar. Bu yöntemde, boyut ve şekil kontrol edilebilir (Zhao, 2013).

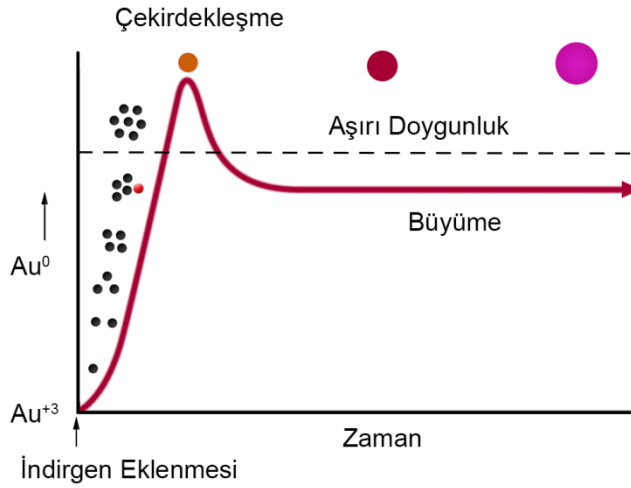
Geleneksel tedavi yöntemleri düşük biyouyumluluk ve yüksek toksisiteye sahip olmalarından dolayı ilaçların tedavi edici etkisini ciddi bir şekilde azaltmaktadır. Fakat nanoölçekli sistemler ise ilaç moleküllerini çevreleyerek tedavi edici molekül vb. ajanları doğrudan hastalıklı bölgeye iletmekte, bundan dolayı da ilaçların toksisite seviyeleri en aza indirilebilmektedir. Özetle ilaç taşıyıcı nanoteknolojik sistemler vücutta hedeflenen bölgelere ilaçları taşımaktadırlar. Böylece ilaç hedefli şekilde çalışan sistemler sayesinde yalnızca hastalıklı bölgeye ulaşan terapötik kimyasallar sağlam dokulara zarar vermeden

hastalıklı bölgeyi tedavi etmektedirler. Fakat platform olarak kullanılacak nanomalzemenin hastalıklı bölgelere hedeflenebilmesi için bu malzemelerin biyodolaşım ve farmakokinetik özellikleri, ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılıyorsa taşıdığı ilaç moleküllerinin salım yeri ve zamanı çok önemlidir. Ayrıca bu malzemelerin düşük toksisiteye sahip olması ve vücuttan kolay uzaklaştırılması gerekmektedir. İlaç hedefleme ve kontrollü salınım için birçok nanomalzeme kullanılmasına karşın, Au nanopariküller bu nanomalzemelere kıyasla daha iyidir. Altının soy metal olup nontoksik özellik göstermesi, asidik ortamdan kolaylıkla etkilenmemesi nedeniyle oksidasyona uğramaması onun vazgeçilmez özelliklerindendir. Nontoksik özelliği sayesinde sağlam hücrelere zarar vermez.

Au NP'ler tiyol (-SH) grubu ile etkileşime girerek oligonükleotit biyomolekülleri kendine kolaylıkla bağlar, böylece hücrenin çekirdeğine hedefleme (gen taşınması) yapılmasına olanak sağlamaktadır. Hedefleme yapacak NP'ler pH, glutasyon gibi hücre içi etkileşimle ya da dışarıdan uyarılmasıyla taşıdıkları yüklerini hedef doku ve hücrelere bırakmaktadırlar. Au NP'ler, anti kanser ajanları gibi birçok ilacı ve terapotik biyokimyasalları kendine kolaylıkla bağlayabilmektedirler. Au NP'ler, yüzey plazmon rezonans özelliğine sahiptir ve bu özellikleri sayesinde görünür ve yakın IR (NIR) bölgede güçlü ışık absorpsiyonu ve saçılımı yapar. Au NP'lerin bu optik özelliği partiküllerin boyutuna, şekline ve dielektirik çevresine bağlı olup, partiküllerin görüntüleme ve algılama paobları olarak kullanımlarına imkan sağlamaktadır. Ayrıca Au NP'ler optik enerjiyi ısıya çevirirler, ki bu özellik partiküllere yoğun termal özellik kazandırmaktadır, böylece partiküller sayesinde elde edilen bölgesel ısınma hastalıklı dokunun yok edilmesinde cerrahi müdahalenin yerini alabilmesi açısından önemlidir. Au NP'lerin neredeyse bütün formları (nanoçubuk, nanoküre, nanokabuk, nanokafes) kanser hücrelerinin fototermal olarak yok edilmesinde kullanıldığı bilinmektedir. Özetle Au NP'ler, yüksek absorplama özelliğine ve ışık kararlılığına sahip, nontoksik özellikte, antikor ve proteinlere kolaylıkla bağlanabilen, optik özellikleriyle fototermoliz için gelecekte sıklıkla kullanılacak malzemelerdir.

1.7.6 Au Nanopartikül Sentezi

Au NP'ler, Hidrojen tetra kloro aurat III (HAuCl₄) çözeltisinin değişik koşullarda farklı indirgen kimyasallar kullanılarak indirgenmesiyle sentezlenmektedir. Sentezleme aşamasında indirgen kimyasal olarak genellikle sitrat kullanılmakta ve aynı tip ve boyutta Au NP sentezlenebilmektedir. "Turkevich metodu" olarak literatüre geçen bu sentezleme işleminde sitrat hem anyonik stabilizatör hem de indirgen kimyasal olarak kullanılmaktadır. Altın/sitrat oranının kontrol edilmesiyle 10-150 nm aralığında Au NP sentezlenebilmektedir (Turkevich ve ark., 1951; Sivaraman ve ark., 2011; Skrabalak ve ark., 2008; Zhao ve ark., 2013). Ortamdaki sitrat miktarı arttıkça daha küçük NP'ler sentezlenirken, azaldıkça boyut daha da büyür. Au NP'ler için diğer sentez yöntemi ise 1857 yılında Faraday tarafından kullanılan yöntemden esinlenerek HAuCl₄'ün tiyol kaplama ajanı varlığında sodyum bor hidrür (NaBH₄) ile indirgenmesidir. Bu yöntemde ise tiyol/altın oranı kontrol edilerek farklı boyutta NP'ler sentezlemek mümkündür (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Au NP'lerin sentezinin zamana bağlı grafiği

Yukarı bahsedilen iki yöntem dışında lazer aşındırma, ultrasona dayalı bu tür bir işlemle, HAuCl₄'nin glukoz ile reaksiyonu olan sonoliz ve tohum büyüme yöntemleriyle de Au NP sentezi yapılabilmektedir.

1.7.7 Au Nanopartiküllerin Uygulama Alanları

Tarihsel açıdan bakıldığında Au NP'ler Eski Mısır, Hindistan ve Çin'de çiçek, frengi, kızamık gibi hastalıkların tedavisinde oldukça sık kullanılmışlardır. Günümüzde ise kalp pili ve stentlerin yapımında kullanılmaktadırlar. Daha yeni çalışmalarda anti-tümör, anti-mikrobiyal, anti-HIV için organoaltın kompleks ürünler kullanılmaktadır. Ayrıca organoaltın bileşikleri günümüzde RA tedavisinde kullanılmıştır. Bu bileşikler hastalığın yol açtığı semptomları azaltmakta, ancak bazı yan etkilere neden olmaktadır.

Au NP'lerle yapılan başka bir çalışmada ise Kogan ve ark. Alzheimer hastalığında ortaya çıkan beta amiloid fibrillerini ve plaklarını yok ettiğini gözlemlemişlerdir. Bu araştırma sırasında yapılan deneyler kapsamında sağlıklı hücrelere zarar gelmemiştir. Ayrıca plakların tekrar oluşma eğilimi ise çok düşük seviyelerde seyretmektedir. Araştırmacılar bu ve buna benzer çalışmalardan yola çıkarak diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için kullanılıp kullanılmayacağı üzerinde çalışmaktadırlar. Ayrıca Au NP'ler günümüzde kullanılan bazı kanser ilaçlarının kapsüllenmesinde ve de kanser tedavisinde ortaya çıkan bulantı, kusma, saç dökülmesi gibi yan etkilerin giderilmesinde de kullanılabilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (Kogan ve ark. 2006; Tan ve ark., 2012).

Au NP'lerin uygulama alanlarından en çok öne çıkan çalışmalar, elektrokimyasal sensör olarak kullanılabileceği çalışmalardır. Araştırmacılar elektrot yüzeyini Au NP'lerle kaplayarak analizi istenen analite özgü elektrot geliştirmeyi sağlamışlardır. Altıntaş ve ark. elektrot yüzeyine Au NP'lerle kapladıktan sonra, yüzey; tanısı hedeflenen antijene özgü antikorların yüzeye bağlanmasıyla algılamayı sağlayarak birden fazla kanser biyobelirteci için sensör geliştirmeyi hedeflemiştir (Altıntaş ve ark., 2014). He ve ark., birçok kanser türünde ortaya çıkan miyelositomatoziz onkoprotein (C_{Ag}) tanısı için bir sensör geliştirmişlerdir. Modifiye edilen katı desteğe birincil antikor bağlandıktan sonra hedef antijen olan C_{Ag} bağlanmış, daha sonra antijene özgü birincil antikorlar bağla Au NP'ler ortama eklenerek antikor-antijen etkileşiminden yola çıkarak C_{Ag}

tain gerçekleştirilmiştir (He ve ark., 2013). Feng ve ark. ise Au NP-chitosan kaplı kompozit filmle glukoz tayininin elektrokimyasal olarak yapılacağını bildirmişlerdir (Feng ve ark. 2009). Başka bir çalışmada ise Jena ve Raj yine glukoz için amperometrik sensör geliştirmeyi hedeflemişlerdir ve bu çalışmalarıyla glukozun nanomolar seviyesine kadar inerek tayinini gerçekleştirmişlerdir (Jena ve Raj 2006). He ve ark. ise Cu²⁺ iyonlarını algılamak için florimetrik ve kolorimetrik sensör geliştirmişlerdir (He ve ark. 2005).

Tez çalışmamız sırasında da kullanılan teknik olan moleküler baskılama tekniği, Au NP yüzeyinde yapılarak sitrulin için sensör geliştirilmesi hedeflenmiştir (Xue ve ark. 2013). Bu alışmada Au NP'ler hem yüzeyin kaplanmasında hem de konuk molekülün yüzeye bağlanmasında kullanılmışlardır.

Au NP'lerle yapılan çalışmaların başka bir eşitisi ise gen teknolojisi için kullanılan DNA tanımlama sensörleridir (Han ve ark. 2006; Castaneda ve ark. 2006). Castaneda ve ark. 2006'da yayınladıkları yayında DNA etiketleme ve DNA algılama için geliştirilmiş elektrokimyasal sensörlerin bir özetini gerçekleştirmiştir (Castaneda ve ark. 2006).

Biyolmler için ilk Au NP uygulamaları 1970'lerde 5-50 nm çaplı kolloidal altın kullanımı ve elektron mikroskop için immnositokimyasal prob kullanımı ile başlamıştır. Bunun yanında, sinyal iletici olarak etki gösteren Au NP'ler biyolojik örneğin işaretlenmesinde kullanımından ziyade genellikle tanısıl ölçümlerde kullanılırlar. Sinyal iletiminde NP'nin bir diğerine göre lokalizasyonu ya da ölçümün biyolojik bileşenlerinde bir değişiklik oluştuğuunda; ölçülebilen sinyalde bir değişim meydana gelir. Au NP'lerle çalışılan sistemlerde en önemli değişiklik altın NP'lerinin agrege olmalarıdır. En çok kullanılan yöntem, antijen konjuge Au NP'lerin agregasyonu sonucunda antikor derişimi tain edilebilir. Agregasyon metodu ile kanda immnogulobulin ölçümü için altın nanokabuklar kullanılabilir. Nanokabuklar, küresel NP'ler olup, Au nanokabuğun içerisinde dielektrik çekirdek olarak silisyum bulunmaktadır ve Au silisyumun etrafını ince metal bir kabuk gibi sarmaktadır. Yakın infrared (IR) bölgede güçlü absorban özelliğe sahip olan Au nanokabuklar, doku gibi biyolojik örneklerde alışıldığuında

çevre hücrelerin fazla ısınmasına ve hücre hasarına yol açabilirler. Bu nedenle nanokabuklar kanser tedavisi sırasında kendi çevresinde bulunan kanser hücrelerinin hedefleme yapılarak sıcaklık ile yokedilmesinde kullanılabilirler (Portakal, 2008).

1.8 Spektroskopik Analiz Yöntemleri

Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül ve ya iyonların bir enerji düzeyinden başka bir enerji düzeyine geçişleri sırasında absorplanan ya da yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesidir. Spektroskopik yöntemlerde maddenin elektromanyetik ışıma ile etkileşimi incelenmektedir.

1.8.1 Ultra Viyole (UV) Spektroskopisi

Monokromatik ve I_0 şiddetindeki bir ışık demeti, kalınlığı b cm olan bir küvete gönderildiğinde, küvette bulunan çözeltideki herhangi bir molekül tarafından absorplandığında şiddeti azalabilir ve küveti I şiddetinde terk eder. Işımanın şiddetindeki bu azalmanın önemli bir kısmı çözeltideki molekül tarafından absorplama sonucu oluşurken, az bir kısmı ise, örnek kabının (küvetin) çeperlerinde ortaya çıkan yansımalar veya çözeltide bulunabilecek asılı taneciklerinin yol açtığı saçılmalar sonucu oluşur. Sadece moleküllerin o dalga boyundaki ışımayı absorplaması sonucu ortaya çıkan azalma Beer-Lambert eşitliği ile verilir. Bu eşitliğe göre, örnek kabına giren ve kabı terk eden ışık şiddetlerinin logaritmalarının farkı, ışıkla etkileşen moleküllerin birim hacimdeki sayısı ile, yani derişim ile, orantılıdır:

$$\log (I_0/I)=\epsilon bc=A \quad (1.1)$$

A ile C arasında bu basit doğrusal ilişkiden analitik uygulamalarda yararlanılır. Eşitlikte derişim C , molL^{-1} , örnek kabının kalınlığı b ise cm birimindedir. ϵ ,molar sönüm veya molar absorpsiyon katsayısı ya da molar absorptivite olup, birimi $\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dir; A ise absorbans adını alır. A 'ya optik yoğunluk veya sönüm adları verilir. Derişimin gL^{-1} olarak kullanılması halinde

A'yı C'ye bağlayan eşitlikte katsayı a ile gösterilir ve birimi $\text{Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak verilir; a, sönüm veya absorpsiyon katsayısı ya da absorptivite adını alır:

$$A = abc \quad (1.2)$$

Örnek kabını terk eden ve kaba giren ışık şiddetleri arasındaki orana geçirgenlik, T adı verilir:

$$I/I_0 = T = 10^{-abc} \quad (1.3)$$

Görüldüğü gibi, geçirgenlik ile derişim arasındaki ilişki üstel olup bunun uygulamada kullanılması zordur. A ile T arasındaki basit ilişki ise,

$$A = -\log T = 2 - \log \%T \quad (1.4)$$

şeklindedir ve yüzde geçirgenlik % T adını alır (Skoog, 1971)

1.8.2 Frouier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi

Kızılötesi (IR) absorpsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir; IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Matematiksel Fourier dönüşümü (FT) spektroskopisinde ışım şiddeti, zamanın bir fonksiyonu olarak alınır. Her dalga boyunu ayrı ayrı tarama gerekmeksizin hızlı ve yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilebilir. FT-IR yöntemiyle, moleküler bağ karakterizasyonu; katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel grupların varlığı, iki bileşiğin birbirlerine benzeyip benzemedikleri, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenebilir.

Bir molekülün IR ışımasını absorplaması için dipol momentinde net bir değişim olması gerekmektedir. Molekülün üzerine gönderilen IR ışımasının frekansı, molekülün titreşim frekansına eşit olduğu zaman ancak bir absorpsiyon söz konusu olabilir. Titreşim ve dönme hareketleri sırasında net bir dipol moment değişimi olmayan homonükleer moleküller (O_2 , N_2 , Cl_2 gibi) IR ışımasını absorplayamazlar.

FT-IR spektroskopisinde, amaç herhangi bir bileşiğin yapısı hakkında bilgi sahibi olmak veya yapısındaki değişiklikleri incelemektir. FT-IR spektroskopisi, basit ve güvenilir bir ölçüm tekniği olduğundan hem araştırmada hem de sanayide sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem tek başına çok aydınlatıcı olmadığından diğer spektroskopik yöntemlerin yanında destekleyici olarak kullanılmalıdır.

Eğer örnek katı ise spektroskopik potasyum bromür (KBr) ile örnek belli oranda karıştırılarak homojenize edilir. KBr'nin IR bölgesinde absorpsiyonu olmadığından ölçümler için kullanılması oldukça uygundur. Kullanılan KBr nem içerdiği durumda FT-IR spektrumda hatalı bantların gözlenmesine neden olacağından nem içermemesine dikkat edilmelidir.

Eğer örnek çözelti durumundaysa, dikkat edilmesi gereken en önemli faktör, seçilen çözücünün IR bölgesinin her yerinde ışığı geçirebilmesidir. Bu nedenle en fazla tercih edilen çözücüler karbontetraklorür, kloroform, karbondisülfür, sikloheksan, benzen, tetrakloroetilendir. Ayrıca çözücünün IR hücresinin yapıldığı maddeyi çözmemesine de dikkat edilmelidir. IR hücreleri genellikle tuzdan (NaCl) yapılmış tabletler olduğundan çözücü kesinlikle su olmamalı ya da su içermemelidir. Aksi durumda örnek hücresi fiziki hasar görebilir (Skoog, 1971).

1.8.3 Bağlanma ve Bağlanma İzotermi

Atom, iyon ya da moleküllerin bir katı yüzeyinde tutulmasına bağlanma, tutunan taneciklerin yüzeyden ayrılmasına desorpsiyon, katıya adsorplayıcı (adsorbent), katı yüzeyinde tutunan maddeye ise adsorplanan (adsorben) adı verilir.

1.8.3.1 Bağlanmayı Etkileyen Faktörler

Bağlanmayı etkileyen faktörler aşağıda verildiği gibi açıklanabilir:

pH: Bağlanmayı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Hidronyum ve hidroksil iyonları adsorplayıcıya kuvvetli adsorbe olduklarından, diğer iyonların

bağlanmasında da çözelti pH'ı etkilidir. Ayrıca, asidik ve bazik bileşiklerin iyonizasyon derecesi de bağlanmayı etkileyen en önemli faktörlerden biridir.

Sıcaklık: Adsorpsiyon işlemi genellikle ekzotermik bir tepkime biçiminde gerçekleştiğinden, azalan sıcaklık ile bağlanma oranı artar. Açığa çıkan ısıнын genellikle fiziksel bağlanmada yoğunlaşma veya kristalizasyon ısıları şeklinde, kimyasal bağlanmada ise kimyasal reaksiyon ısısı şeklinde olduğu bilinmektedir.

Yüzey Alanı: Bağlanma bir yüzey işlemi olduğundan, bağlanma kapasitesi spesifik yüzey alanı ile orantılıdır. Adsorplayıcının yüzey alanının geniş, partikül boyutunun küçük ve gözenekli yapıda olması bağlanmayı arttıran özelliklerden birkaçıdır.

Çözünen maddenin cinsi ve özellikleri: Çözünen maddenin çözünürlüğü, bağlanma dengesi için önemli bir faktördür. Genel olarak, çözünen maddenin adsorbent yüzeyine bağlanma hızı ile sıvı fazdaki çözünürlüğü arasında ters bir ilişki vardır. Çözünen maddenin çözünürlüğü arttıkça çözücü-çözünen bağ kuvvetlenirken, adsorbenta bağlanma derecesi azalır. Çoğu zaman, herhangi bir organik bileşiğin zincir uzunluğu arttıkça karbon sayısı artacağından, bileşik hidrokarbona daha çok benzer, böylelikle sudaki çözünürlüğü azalır. Maddenin yapısı hidrokarbon yapıya benzedikçe çözünen maddenin hidrofobik özelliği artar. Hidrofobik özellikteki maddeler adsorbentler tarafından daha çok adsorplanır. İyonlaşma arttıkça, bağlanma azalır. Yüklü türler için bağlanma minimum, nötral olanlar için maksimumdur. Bu, çözünenin cinsi ve bağlanma arasındaki bağlantıyı belirten ikinci temel ifadedir.

Bağlanma işlemleri, adsorbentler ile çözeltilerin birbirini nasıl etkilediklerini ve adsorbentlerin çözümsel optimizasyonunda kullanımının önemini tarif eder (Sarıkaya, 1993).

1.8.3.2 Bağlanma İzotermi

Bağlanma izotermi, her bir molekülün adsorbanlarla etkileşimlerinin karakterizasyonu için kullanılır. Bağlanma izotermi, iki faz dengede iken katı faza

adsorbe olan iyon miktarı ve çözeltideki moleküllerin derişimi arasında ilişki kurulmasını sağlar.

Langmuir bağlanma modeli, her biri yalnız bir molekülü tutmaya elverişli belirli sayıdaki tanımlanmış bölümlere moleküllerin adsorbe olduğunu varsayar. Bu bölümlerin enerji olarak eşdeğer olduğu ve yakın bölümlerdeki adsorbe olmuş moleküllerle arasında hiçbir etkileşim olmayacak kadar birbirinden uzak olduğu varsayılır.

Langmuir denklemi Eşitlik (1.5) ile aşağıdaki şekilde gösterilebilir.

$$Q = Q_{\max} b C_{\text{eq}} / (1 + b C_{\text{eq}}) \quad (1.5)$$

Bu denklemde Q: adsorbana bağlanan situlin miktarını (mg g^{-1}), C_{eq} : çözeltideki denge sitrulin derişimini (mg mL^{-1}), b: tek tabakalı bağlanmayı yansıtan Langmuir sabitini (mL mg^{-1}), $Q_{\max}$: maksimum bağlanma kapasitesi (mg g^{-1}) ni gösterir. Bu deklemler lineerize edildiğinde aşağıdaki denklem elde edilir.

$$1/Q = [1/(Q_{\max} b)] [1/C_{\text{eq}}] + [1/Q_{\max}] \quad (1.6)$$

Eşitlik 1.6'da verilen $1/C_{\text{eq}}$ 'ya $1/Q$ grafiğı çizildiğinde kesim $1/Q_{\max}$, eğim ise $1/(Q_{\max} b)$ 'yi vermektedir.

Bu kısımda tartışılan ikinci bağlanma modeli ise Freundlich izotermidir. Freundlich denklemi, ideal olarak temiz ve homojen olmayan katı yüzeylerdeki bağlanmalar için Alman Fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich tarafından deneysel çalışmalara bağlı olarak türetilmiştir. Freundlich denklemi aşağıda verilen Eşitlik (1.7)'de gösterilmektedir.

$$\ln Q = \ln K_f + n \ln C_{\text{eq}} \quad (1.7)$$

Bu eşitlikte; Q adsorbana adsorplanmış sitrulin derişimi (mg g^{-1}), C_{eq} çözeltideki sitrulin denge derişimi (mg L^{-1}), n Freundlich sabiti, K_f Freundlich sabitini ifade etmektedir.

Adsorbana adsorplanmış sitrulin derişimi olarak bilinen Q değeri ise Eşitlik (1.8)'da yer alan eşitlik ile hesaplanmaktadır.

$$Q = \frac{(C_2 - C_1) V}{m} \quad (1.8)$$

Bu eşitlikte; C_2 bağlanmadan önceki başlangıç derişimini ve C_1 bağlanmadan sonraki sitrulin derişimini ifade etmektedir. V sulu fazın hacmini (mL) ve m kullanılan modifiye ya da baskılı polimerin miktarını (g) gösterir.

Eşitlik (1.7)'de $\ln Q$ 'ya karşı $\ln C_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde, eğrinin y eksenini kestiği noktadan K_f ve eğimden de n sabitleri bulunabilir (Sarıkaya, 1993).

Tez çalışmaları için tartışılan bir diğer bağlanma modeli de Scatchard izotermidir. Sitrulin ve Anti-CCP konuk molekülleri ile CNT ve Au nanosensörler arasındaki bağlanma etkileşimleri Scatchard yöntemi ile de elde edilmiş ve izoterme ait denklem Eşitlik (1.9) verilmiştir.

$$\frac{I}{C_0} = \frac{I_{max}}{K_D} - \frac{I}{K_D} \quad (1.9)$$

Bu eşitlikte;

K_D : ayrışma sabitini

I : floresans şiddetini

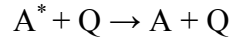
I_{max} : maksimum floresans şiddetini

C_0 : derişimi

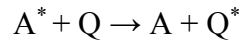
göstermektedir.

Floresans şiddetinin (I) I/C_0 'ye karşı grafiğe geçirilmesi sonucu elde edilen doğru eğiminden her bir substrat için afinite sabitleri (K_A) hesaplanmaktadır.

Adsorpsiyon çalışmaları sırasında, floresans şiddetinin düşmesi durumunda diğer bir deyişle sönümlenme ile sonuçlanan adsorpsiyon çalışmalarında, kalibrasyon negatif yönelimli bir grafikte açıklanabilmektedir. Sönümlenme ile sonuçlanan kalibrasyon grafiğini, eğimi pozitif olan kalibrasyon doğrusuna dönüştürmek için Stern-Volmer denkleminde yararlanılarak elde edilen grafik floresans ya da fosforesans ölçümleri için kullanılmaktadır. Genel olarak bu süreç aşağıdaki gibi verilmektedir:



ya da



Bu sürecin kinetiği de Stern-Volmer ilişkisi Eşitlik (1.10)'de verilmektedir.

$$\frac{I_f^0}{I_f} = 1 + k_q \tau_0 \cdot [Q] \quad (1.10)$$

Bu eşitlikte I_f^0 sönümleyicinin olmadığı durumdaki floresans yoğunluğu, I_f sönümleyicinin var olduğu durumdaki floresans yoğunluğu, k_q sönümleyici oranı katsayısı, Q sönümleyici olarak ifade edilmektedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

Sunulan tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar aşağıdaki başlıklar altında özetlemek mümkündür.

1. Metakroil amido antipirin-Tb(III) (MAAP₂Tb(III)) metal-şelat monomeri ve Au NP'lerin sentezi, MAAP₂Tb(III) ile fonksiyonellendirilmiş Au NP ve CNT oluşturulması,
2. Fonksiyonellendirilen Au NP ve CNT yüzeyinde Sitrulin modifiye ve baskılı polimerler sentezlenmesi ve karakterizasyonları,
3. Au ve CNT yüzeyinde sitrulin / Anti-CCP modifiye ve baskılı florimetrik nanosensörler ile sırasıyla sitrulin ve Anti-CCP bağlanma kapasitelerinin ölçümü,
4. Nanosensörlerin temsili numunelerle etkileşiminin incelenmesi.

2.1.1 Kullanılan kimyasallar maddeler

Azobisisobutironitril (AIBN), H₂SO₄, CNT, HAuCl₄ Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany) firmasından, etilenglikoldimetakrilat (EDMA) MERCK AG (Darmstadt, Germany), L-sitrulin FLUKA AG (Buchs, Switzerland) firmasından, L-arginin ABCAM (Cambridge, USA) firmasından, anti-CCP Euro Diagnostica AB (Malmö, Sweden), HNO₃ (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edilmiş ve gerekli koşullarda saklanmıştır. Deneylerde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi ve Human UP 900 kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohmcm⁻¹'dir.

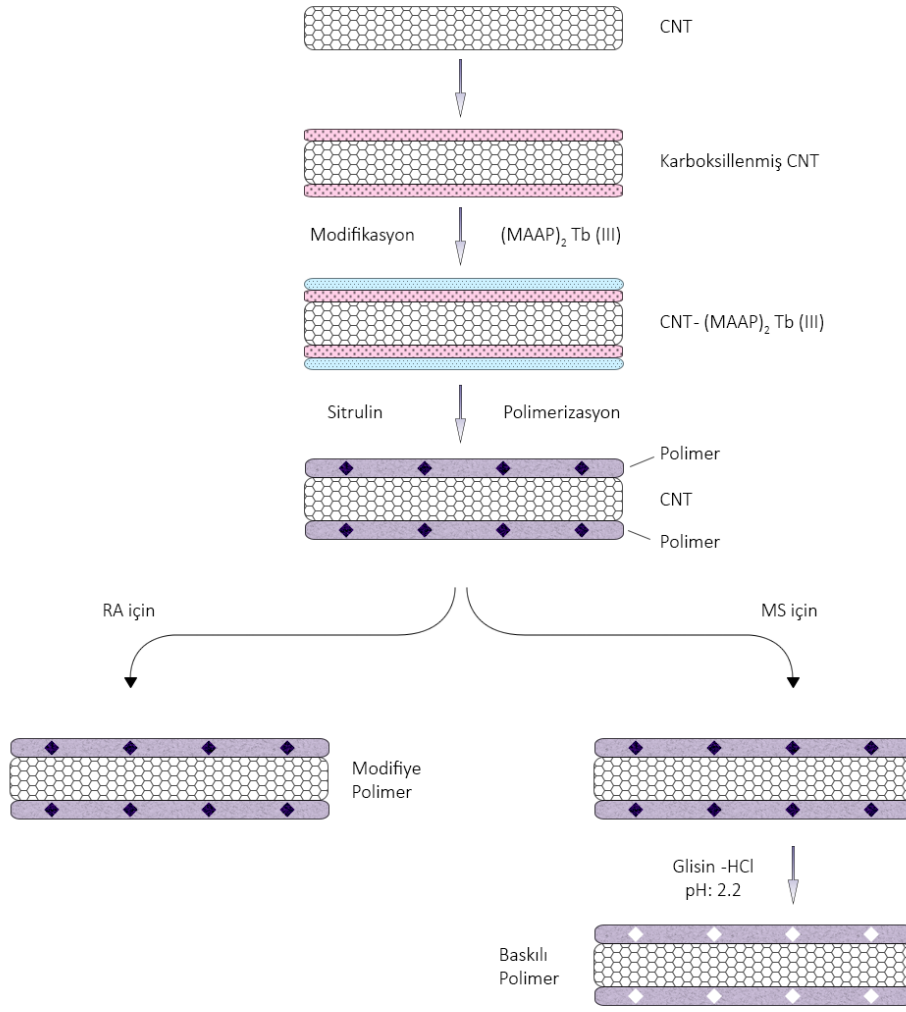
2.1.2 Kullanılan cihazlar

FT-IR spektrumları Perkin Elmer Spectrum 100 ve 2000 FT-IR Spectrometere cihazları ile alınmıştır. pH ölçümleri WTW Series InoLab pH730

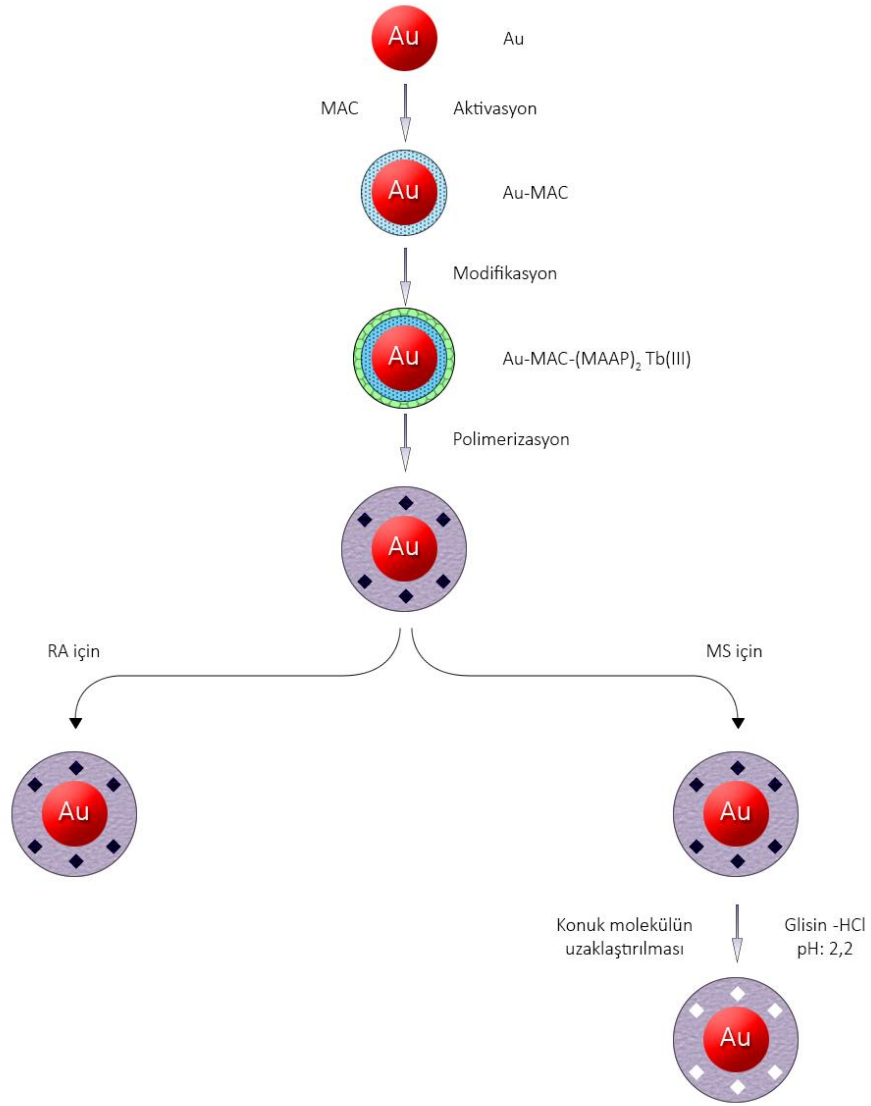
model pH metre ile yapılmıştır. ^1H ve ^{13}C NMR spektrumları Bruker 500 MHz NMR cihazıyla, Geçirimli Emisyon Mikroskobu (TEM) görüntüleri FEI-TecnaTM G² Sprit mikroskobu ile (20-120 kV) ve metal-şelat monomerlerinin karakterizasyonu için MALDI-TOF-MS spektrumları Applied Biosystems Voyager STR ile elde edilmiştir. Kesikli sistemde sitrulin ve Anti-CCP adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri için floresans ölçümleri Varian Cary Eclipse marka spektrofiorometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2 Yöntem

Tez kapsamında, CNT ve Au NP yüzeyinde sentezlenen modifiye ve baskılı polimerler için izlenen yöntemler aşağıda ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Öncelikle ticari olarak temin edilen CNT yüzeyi karboksillenmiş, böylelikle CNT yüzeyi fonksiyonellendirilmiş, ardından bu yapıya sitrulin eklenerek modifikasyonu ve baskılama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Baskılama işlemi için sitrulin yapıdan uzaklaştırılmıştır (Şekil 2.1). Au NP'ler yüzeyinde modifiye ve baskılı polimerler için ise, Au NP'ler tarafımızdan sentezlenmiş, ardından MAC ile fonksiyonellendirildikten sonra aynı şekilde yapıya sitrulinin bağlanarak modifiye edilmiş ve en son basamak olarak da sitrulinin yapıdan uzaklaştırılmasıyla baskılı polimerler elde edilmiştir (Şekil 2.2). Diğer bir deyişle, bu iki sensör için, proses basamakları bir noktaya kadar aynı giderken, bir noktadan sonra farklılaşmıştır. Bu farklılaşma da RA ve MS için aynı platformda sensör oluşturulmasını sağlamaktadır.



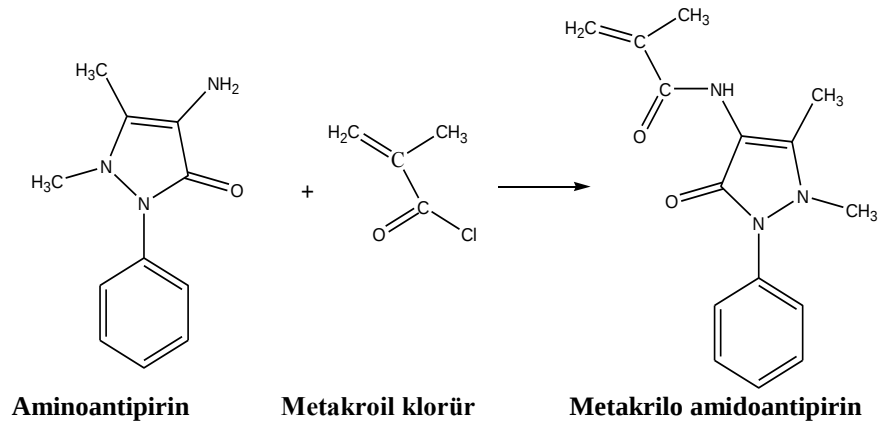
Şekil 2.1. CNT yüzeyinde modifiye ve baskılı polimerizasyon işlemlerinin şematik gösterim



Şekil 2.2. Au NP yüzeyinde modifiye ve baskılı polimerizasyon işlemlerinin şematik gösterimi

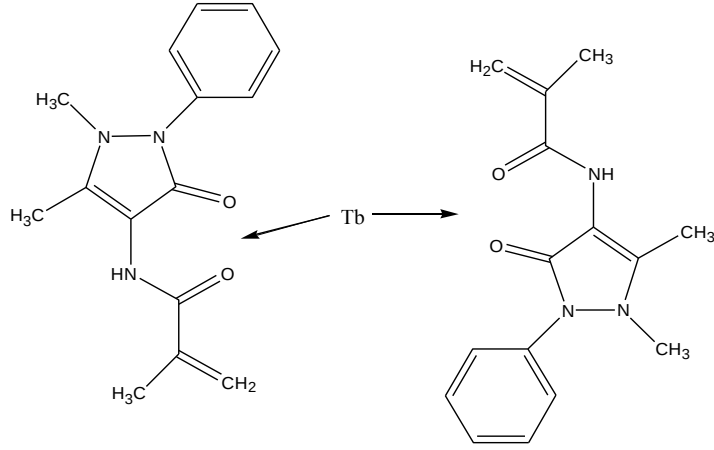
2.2.1 Metakroil amido antipirin-Tb(III) ((MAAP)₂-Tb(III)) Metal-Şelat Monomerinin Sentezi

Metakroil amido antipirin (MAAP) monomeri (Şekil 2.3) daha önceden Ersöz ve ark. (Ersöz, 2004) tarafından gerçekleştirilen yöntem baz alınarak aşağıda verildiği şekilde sentezlenmiştir: 4-aminoantipirin (0.5 g, 2.46 mmol) ve piridin (0.2 mL, 2.46 mmol) 100 mL kloroformda çözülmüş ve çözelti 0 °C'ye soğutulmuştur. Ardından, metakriloilklorür (0.26 mL, 2.46 mmol) yavaşça bu çözeltiye eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyon sonunda, çözelti 50 mL 0.1 M HCl ve 50 mL 0.1 M NaOH içeren çözelti ile yıkandıktan sonra organik faz döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmıştır. Kalıntı petrolümbenzin-etilasetat içinde kristallendirilmiştir.



Şekil 2.3. Metakroil amidoantipirin (MAAP) monomerinin sentez reaksiyonu

(MAAP)₂-Tb(III) metal-şelat monomeri, MAAP ve Tb(NO₃)₃.9H₂O ile yeniden düzenlenmiştir. MAAP (0.1mmol) ve Tb(NO₃)₃.9H₂O (0.05 mmol) 5.0 mL dimetil sülfoksit (DMSO) içeren bir vialde çözülüp, çözelti 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyon gerçekleştikten sonra (MAAP)₂-Tb(III) metal-şelat monomeri (Şekil 2.4) süzülerek ortamdan uzaklaştırılmıştır.



Şekil 2.4. (MAAP)₂-Tb(III) metal-şelat monomerinin molekül formülü

2.2.2 Au NP Sentezi

Projenin bu aşamasında; yüzeyinde MIP sentezlenecek ve sitrulin amino asidine yönelik sensör çalışmasında kullanılacak olan Au NP'ler Turkevich yöntemine (Turkevich, 1951) göre sentezlenmiştir. Metoda göre, 20 mL % 0.01'lik HAuCl₄(suda) çözeltisi hazırlanmış, kaynama sıcaklığına kadar manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılmış ve ısınan bu çözelti üzerine Au'nun indirgenmesi için 2 mL % 1'lik Na₃C₆H₅O₇ çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra karışımın 10 dak kaynaması sağlanmıştır. Çözeltinin rengi Na₃C₆H₅O₇ çözeltisi eklemeyen önce açık sarı iken, Na₃C₆H₅O₇ eklendikten 10 dak. sonra kırmızı rengi almıştır. (Bu açıklama olara yazıldı) Çözeltinin renginin açık sarıdan kırmızı rene dönmesi Au'nun indirgendiğini göstermektedir (Sivaraman, 2011; Zhao, 2013; Liu, 2014).

2.2.3 Au NP'lerin Metakriloil Amido Sisteyn (MAC) ile Modifikasyonu

Au NP'lerin metakriloil amido sisteyn (MAC) ile modifikasyonu için; NP'ler, 20 mL suda dispers edilmiş ve 10 ppm'lik MAC (etanolde) ile etkileştirildikten sonra karıştırıcıda 4 s karıştırılmıştır. MAC, yapısında bulunan sülfür grubu sayesinde Au NP'lere bağlanmakta ve bu durum da Au NP'lere başka grup ya da grupların kolay bir şekilde bağlanmasını sağlamaktadır.

2.2.4 Au-MAC Nanopartiküllerin Metakriloil Antipirin Terbiyum(III) (MAAP₂-Tb(III)) Metal-şelat Monomeri ile Modifikasyonu

Amacımız; Au NP'lerin yüzeyinde sitrulin amino asidine özgü boşluklar bulunduran MIP sentezlemek olduğundan, kolay polimerizasyon sağlayacak metal-şelat monomeri kullanmak gerekmektedir. Bunu sağlamak amacıyla da daha önceki bölümlerde yer alan CNT yüzeyinde MIP sentezinde polimerizasyonu sağlamak amacıyla yüzeye MAAP₂-Tb(III) metal-şelat monomerinin bağlanmasına benzer şekilde, MAC ile modifiye edilmiş Au NP'lerin yüzeyine metal-şelat monomeri olarak (MAAP₂-Tb(III) monomerinin bağlanması sağlanmıştır. Kısaca; Au NP yüzeyine metal-şelat monomerinin bağlanmasını sağlayabilmek için önce MAC ile modifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

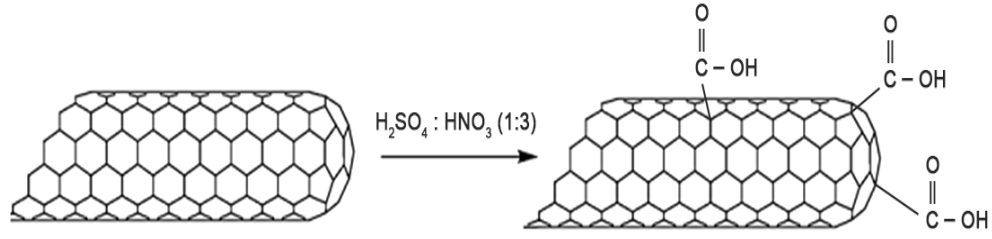
2.2.5 Au NP yüzeyinde Modifiye ve Baskılı Polimer Sentezi

Au NP'lerin yüzeyi metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirildikten sonra, $1,0 \times 10^{-3}$ M sitrulin çözeltisi ile etkileştirilip 24 s boyunca karıştırılmış ve ortama yüzey başlatıcısı olarak 0,001 g omega, omega-dimetoksi-omega-fenilasetofenon ve 20 µL çapraz bağlayıcı (etilen glikol dimetakrilat, EDMA) eklendikten sonra, UV ışık altında 4 s bekletilerek polimerleştirilmiştir. Polimerizasyonun ardından; polimerler süzülüp kurutulmuştur. Elde edilen polimerler modifiye polimerler olup, RA için geliştirilen nanosensörler için Anti-CCP bağlanmasının incelenmesi için kullanılmıştır.

Modifiye polimerlerden sitrulin molekülünün glisin-HCl (pH 2,2) ile uzaklaştırılmasından sonra, baskılı polimerler elde edilmiştir. Baskılı polimerler ile MS için geliştirilen nanosensörler için sitrulin bağlanması incelenmiştir.

2.2.6 Karboksillenmiş CNT Sentezi

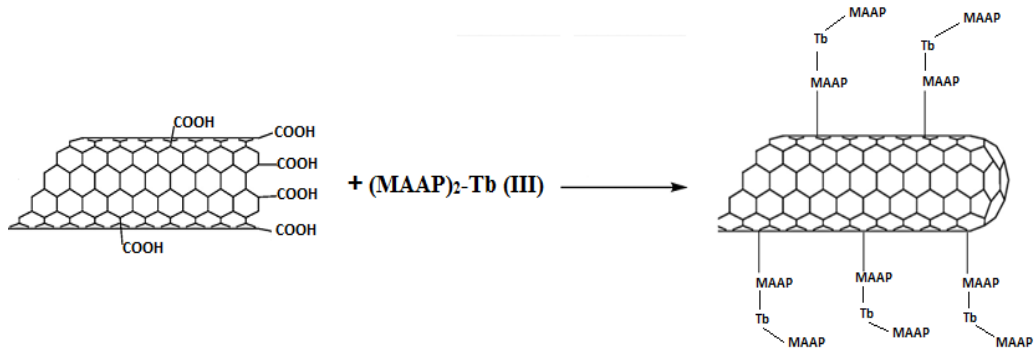
CNT (0.02 g), 1:3 HNO₃ ve H₂SO₄ ün 4 s ultrasonik banyoda karıştırılmasıyla karboksillenmiştir. Santrifüjleme işleminden sonra geriye kalan katı, karboksillenmiş CNT (CNT-COOH)'dür (Şekil 2.5) (Lee, 2008).



Şekil 2.5. CNT' nin karboksillenmesi

2.2.7 CNT'ün Metal-Şelat Monomeri ile Etkileştirilmesi

Karboksillenmiş CNT, 5 mL 0.05 mmol (MAAP)₂-Tb (III) metal-şelat monomeri ile etkileştirilerek katı desteğin yüzeyi sitrulin baskılamının yapılması için fonksiyonellendirilmiştir (Şekil 2.6). Bu yolla CNT yüzeyine kolay polimerizasyonu ve yapısında bulunan Tb elementi sayesinde florimetrik özellik katan metal-şelat monomeri bağlanmıştır.



Şekil 2.6. Karboksillenmiş CNT'ün metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilmesi

2.2.8 CNT-(MAAP)₂-Tb(III)-sitrulin Polimerinin Sentezi

CNT-(MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri, 1×10^{-3} M sitrulin çözeltisi ile etkileştirilip 24 saat boyunca karıştırıldıktan sonra, ortama yüzey başlatıcısı olarak 0,001 g omega, omega-dimetoksi-omega-fenilasetofenon ve 20 μ L çapraz bağlayıcı (etilen glikol dimetakrilat, EDMA) eklendikten sonra, UV ışık altında 4 saat bekletilerek polimerleştirilmiştir. Polimerizasyonun ardından polimerler süzülüp kurutulmuştur. CNT yüzeyinde elde edilen bu polimerler

modifiye polimerler olup yapılarında sitrulin bulundurmaktadırlar ve Anti-CCP'nin polimerlere bağlanması incelenmiş ve RA için geliştirilecek olan nanosensör için etkinliği araştırılmıştır.

Au NP yüzeyinde baskılı polimer eldesi işleminin aynısı gerçekleştirilmiştir ve modifiye polimerlerden sitrulin molekülünün glisin-HCl (pH 2,2) ile uzaklaştırılmasından sonra, baskılı polimerler elde edilmiştir. Baskılı polimerler ile MS için geliştirilen nanosensörler için sitrulin bağlanması incelenmiştir.

2.3 Bağlanmayı Etkileyen Etmenler

CNT ve Au NP yüzeyinde modifiye sensörlerin Anti-CCP adsorpsiyonu ile CNT ve Au NP yüzeyinde baskılı sensörlerin sitrulin adsorpsiyonu kesikli sistemle çalışılmıştır. Bu çalışmalarda her iki sensör için pH, sıcaklık ve tekrar kullanılabilirliğin etkisi incelenmiştir. Bu çalışmalardan pH etkisini belirlemek için baskılı polimerden 1 mg alınarak 175 mgmL⁻¹ sitrulin derişiminde pH 4.5-8.0 aralığında PBS tamponu kullanılarak ve yine modifiye polimerden 1 mg alınarak 0,0055 mgmL⁻¹ Anti-CCP derişimi ile çalışılmıştır. Ölçülen floresans sonuçları Eşitlik 1.8' de yer alan denklikte yerine konularak Q değerleri hesaplanarak oluşturulmuştur. Adsorpsiyon sonrası kullanılan modifiye ya da baskılı polimer uzaklaştırılarak çözeltideki adsorplanmadan kalan sitrulin ve Anti-CCP derişimi floresans şiddetinin ölçülmesiyle belirlenmiştir.

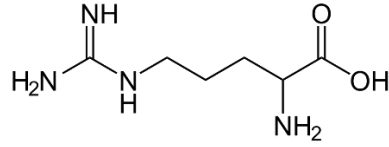
Sıcaklığın bağlanmaya etkisini incelemek için sitrulin adsorpsiyon çalışmaları 4-45 °C sıcaklık aralığında 175 mgmL⁻¹ sitrulin derişiminde pH 7 PBS tamponunda gerçekleştirilmiştir. Anti-CCP adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini incelemek için ise 4-45 °C sıcaklık aralığında 0,0055 mgmL⁻¹ Anti-CCP derişiminde pH 7.0 PBS tamponunda gerçekleştirilmiştir.

Modifiye ve baskılı nanosensörlerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri 10 defa tekrarlanmıştır. Desorpsiyon oranı ise eşitlik 2.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \frac{\text{Desorbe edilen sitrulin (Anti-CCP) miktarı}}{\text{Adsorplanan sitrulin (Anti-CCP) miktarı}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.4 Baskılı Nanosensörler için Seçicilik Çalışmaları

CNT ve Au yüzeyindeki baskılı polimerlerle oluşturulan nanosensörlerin seçicilik çalışmaları sitruline karşı öncül molekülü olan arginin (Şekil 2.7) kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 2.7. Arginin molekül yapısı

Nanosensörlerin arginine karşı sitruline olan seçiciliği Eşitlik (2.2)'de yer alan

$$k = K_D(\text{sitrulin}) / K_D(\text{arginin}) \quad (2.2)$$

denkleminde hesaplanmaktadır. Bu eşitlikteki k seçicilik katsayısı, K konuk ve arginin molekülünün ayrılma katsayısıdır. Ayrılma katsayıları Eşitlik (2.3)'de yer alan denkleme göre hesaplanmaktadır.

$$K_D = [(C_1 - C_2) / C_2] \times V / m \quad (2.3)$$

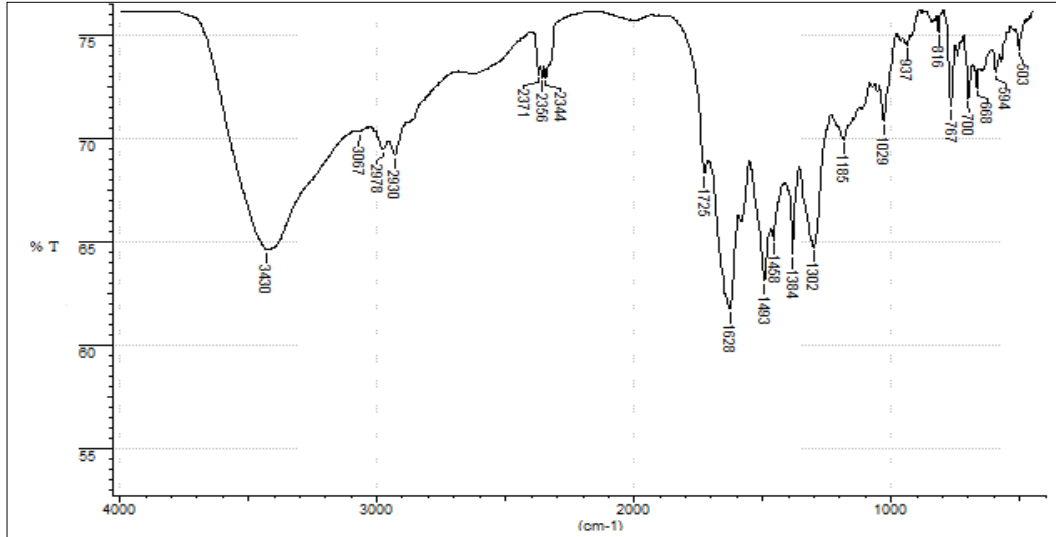
Bu eşitlikteki K_D ayrılma katsayısı, C_1 ilk derişim, C_2 etkileşimden sonraki derişim, V çözeltinin hacmi (mL), m ise kullanılan polimerin miktarıdır (g) (Yavuz ve ark., 2005).

3. BULGULAR

3.1 Karakterizasyon Çalışmaları

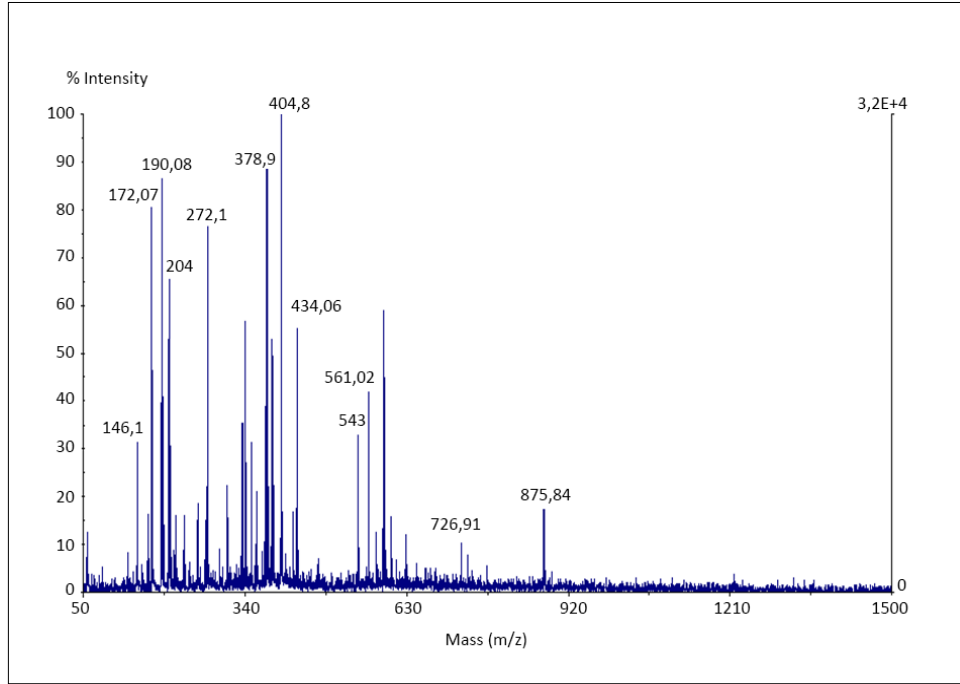
3.1.1 Metakroil amido antipirin-Tb(III) ((MAAP)₂-Tb(III)) Metal-Şelat Monomerinin Karakterizasyonu

((MAAP)₂-Tb(III)) metal-şelat monomerinin yapısının belirlenmesinde, Fourier transform infrared spektroskopisi (FT-IR) kullanılmıştır. Şekil 3.1’ de yukarıda yapısı verilen ((MAAP)₂-Tb(III)) metal-şelat monomerinin FT-IR spektrumunda alınan karakteristik pikleri 767–700 cm⁻¹ monosubstitüe benzen halkası, 1628 cm⁻¹ amid karbonil piki; 1725 cm⁻¹ siklik keton pozisyonunda karbonil piki; 2930 ve 2978 cm⁻¹ C-H piki ve 3430 cm⁻¹ N-H piki şeklindedir.



Şekil 3.1. ((MAAP)₂-Tb(III)) metal-şelat monomerinin FT-IR spektrumu

Ayrıca; ((MAAP)₂-Tb(III)) metal-şelat monomeri için MALDI-TOF-MS spektrumu da (Şekil 3.2) alınmış ve sonuçlar aşağıda verilmiştir.



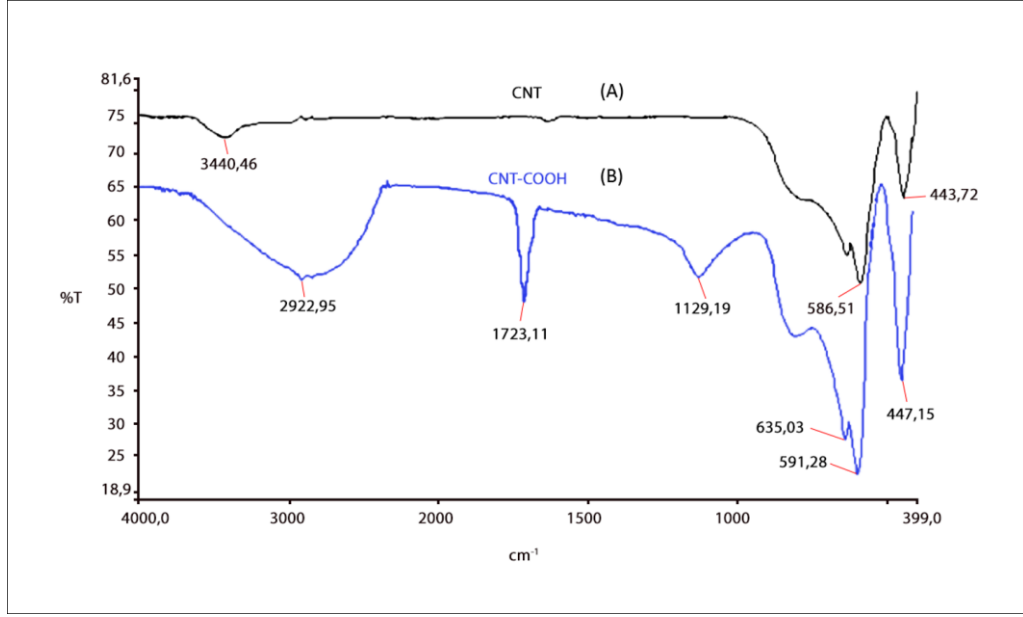
Şekil 3.2. (MAAP)₂-Tb(III) metal-şelat monomerinin MALDI-TOF-MS spektrumu

m/e 434 MAAP-Tb(III) kompleksine; m/e 561 2(MAAP)-H⁺ dimerine; m/e 726 (MAAP)₂-Tb(III) kompleksine; m/e 875 (MAAP)₂-Tb (III) kompleksine koordine olan DMSO' yu göstermektedir.

3.1.2 CNT Yüzeyinde Sentezlenen Polimerin Karakterizasyonu

3.1.2.1 CNT ve CNT-COOH Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

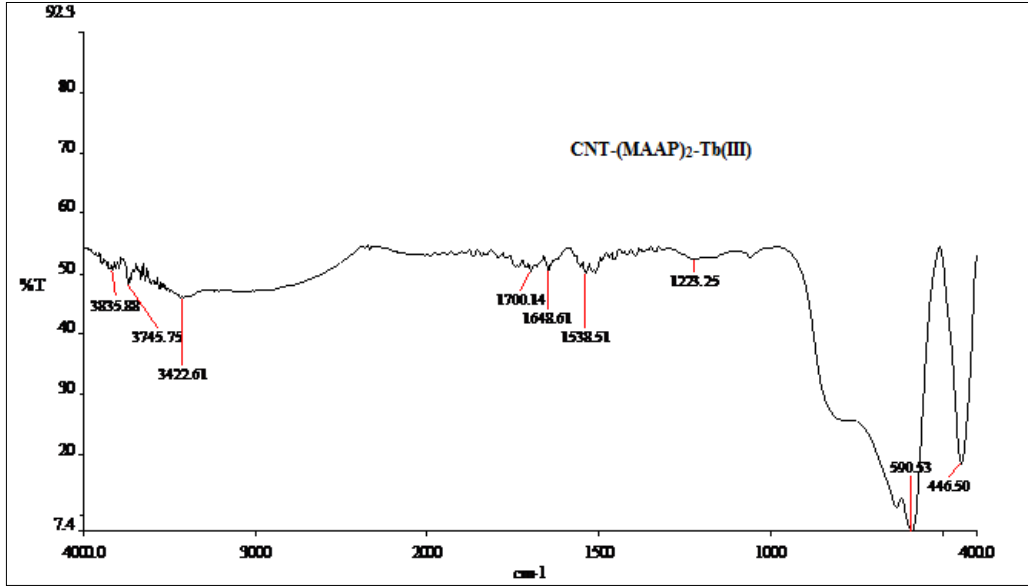
Şekil 3.3 A'da CNT'e ait FT-IR spektrumunda 443 cm⁻¹, 586 cm⁻¹ ve 3440 cm⁻¹'de görülen pikler CNT'deki C-C bağlarına ait gerilme ve esneme titreşimlerini göstermektedir. Şekil 3.3 B'de 1700 cm⁻¹'deki karbonil ve 1129 cm⁻¹'deki karboksil bandlarının gözlenmesi CNT'ün karboksillendiğini düşündürmektedir.



Şekil 3.3. Karboksillenmiş CNT'e ait FT-IR spektrumu

3.1.2.2 CNT-(MAAP)₂-Tb(III) Karakterizasyonu

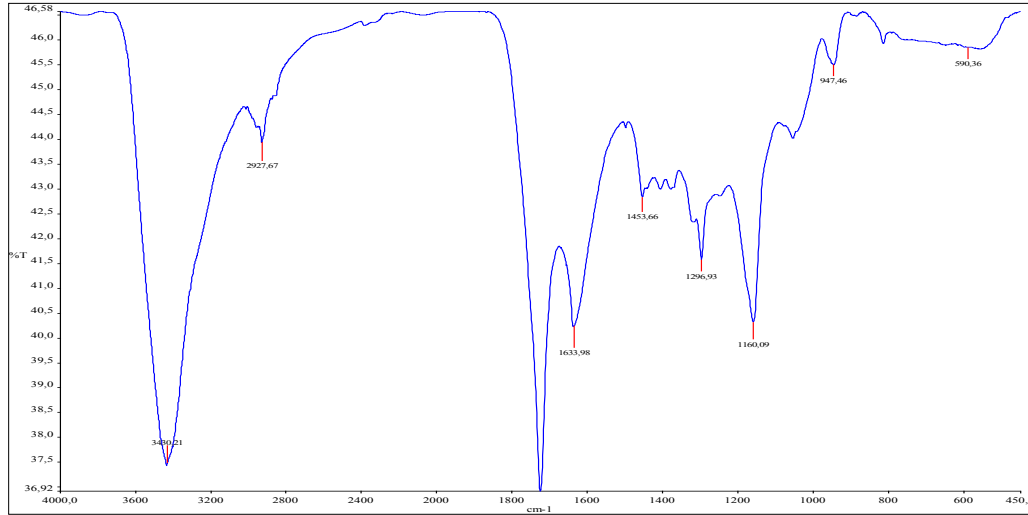
Yukarıda anlatıldığı gibi CNT-COOH'in (MAAP)₂-Tb(III) metal-şelat monomeri ile etkileştirilerek fonksiyonellendirilmiş hali FT-IR ile karakterize edilmiştir. Şekil 3.3'de görülen karboksillenmiş CNT'nin FT-IR spektrumunda 2922 cm⁻¹'de gözlenen karboksile ait pikin, (MAAP)₂-Tb(III) ile fonksiyonellendirilmiş FT-IR spektrumunda (Şekil 3.4) kaybolması ve bu spektrumda 1538 cm⁻¹'de amine ait N-H; 1648 cm⁻¹'de karbonile ait piklerin gelmesi CNT üzerine MAAP monomerinin bağlandığını göstermektedir.



Şekil 3.4. Metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen CNT

3.1.2.3 CNT-(MAAP)₂-Tb(III)-Sitrulin Polimeri Karakterizasyonu

CNT-(MAAP)₂-Tb(III)-sitrulin polimerinin yapısının belirlenmesinde, FT-IR kullanılmıştır. Polimerin FT-IR spektrumunda (Şekil 3.5) yapıya ait karakteristik pikler görülmektedir.



Şekil 3.5. CNT-(MAAP)₂-Tb(III)-sitrulin polimerine ait FT-IR spektrumu

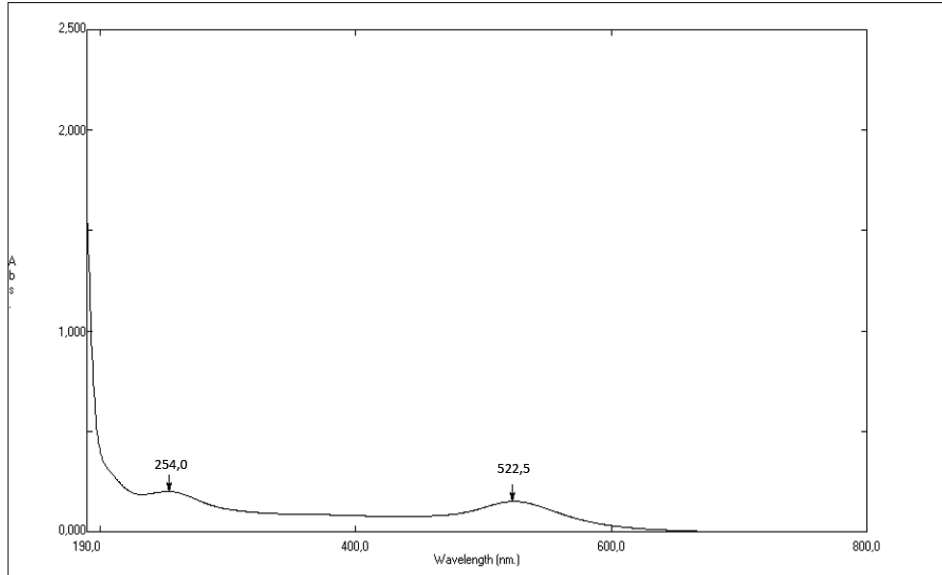
Bu karakteristik pikler; 590 cm⁻¹'de aromatik halkalara ait pik; 947 ve 1160 cm⁻¹'de karboksilik asit bantları (C-O); 1296 cm⁻¹'de alifatik amin piki (C-

N); 1724 cm^{-1} 'de amid karbonil piki ve 3430 cm^{-1} 'de amin piki (N-H) şeklindedir.

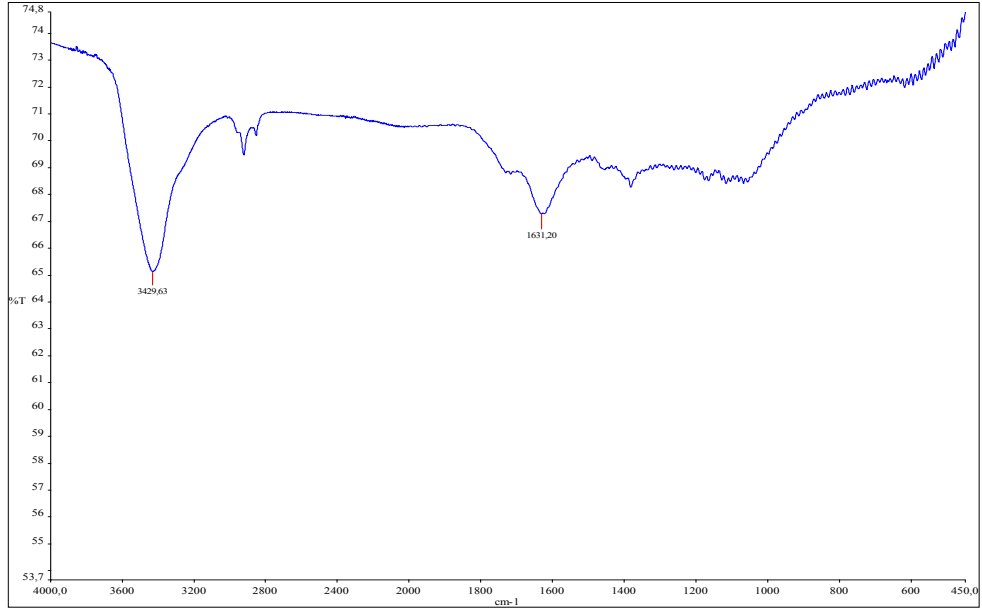
3.1.3 Au Nanopatikül (NP) Yüzeyinde Sentezlenen Polimerin Karakterizasyonu

3.1.3.1 Au NP Karakterizasyonu

Sentezlenen Au NP'lerin karakterizasyonu için UV ve FT-IR spektrumları incelenmiştir. UV spektrumu (Şekil 3.6) incelendiğinde, 254,00 ve 522,50 nm'de gözlenen iki UV absorbans bandından, Au NP'lerin 2 farklı dalga boyunda absorbans özellik gösterdiği anlaşılmaktadır. Au NP'lere ait FT-IR spektrumu (Şekil 3.7) incelendiğinde ise 3412 cm^{-1} , 1621 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} 'de IR bantları gözlemlenmiştir. 1380 cm^{-1} 'de gözlenen pikin, Au-Au metal molekülleri arasındaki gerilmelerden 1621 cm^{-1} ve 3412 cm^{-1} 'deki pikler ise Au NP'lerin bulunduğu ortamdan kaynaklı bantlar olduğu düşünülmektedir. Özellikle 3412 cm^{-1} 'de görülen pik, Au NP'lere bağlı halde bulunan su moleküllerinden kaynaklı O-H gerilmelerinin sonucu olarak görülmektedir ve bundan sonra gerçekleştirilen aşamalarda da bu spektrumdan yola çıkarak yorumlar yapılmıştır.



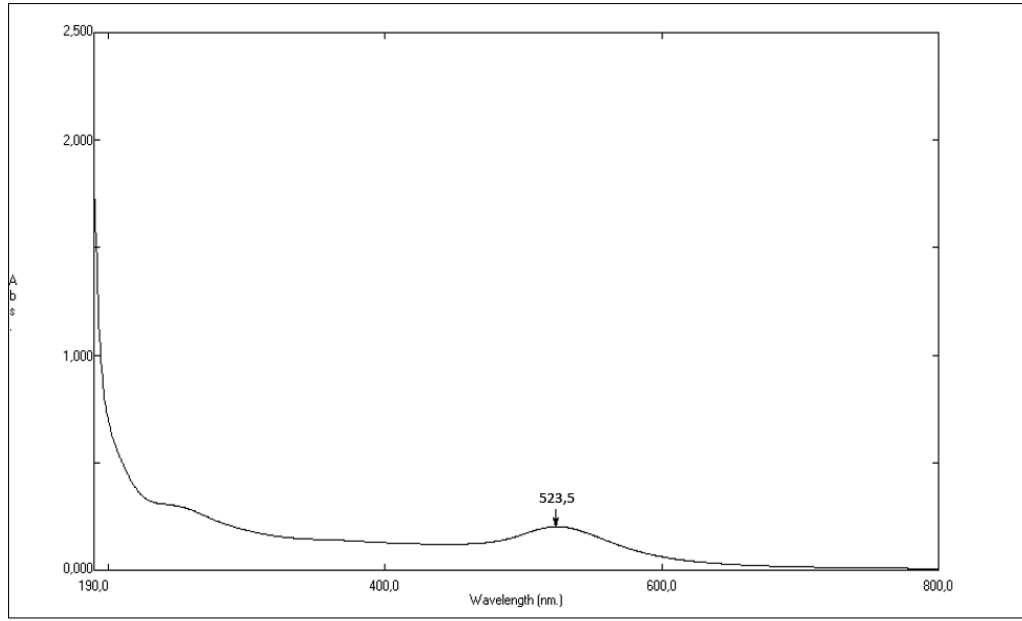
Şekil 3.6. Au NP'lere ait UV spektrumu



Şekil 3.7. Au NP'lere ait FT-IR spektrumu

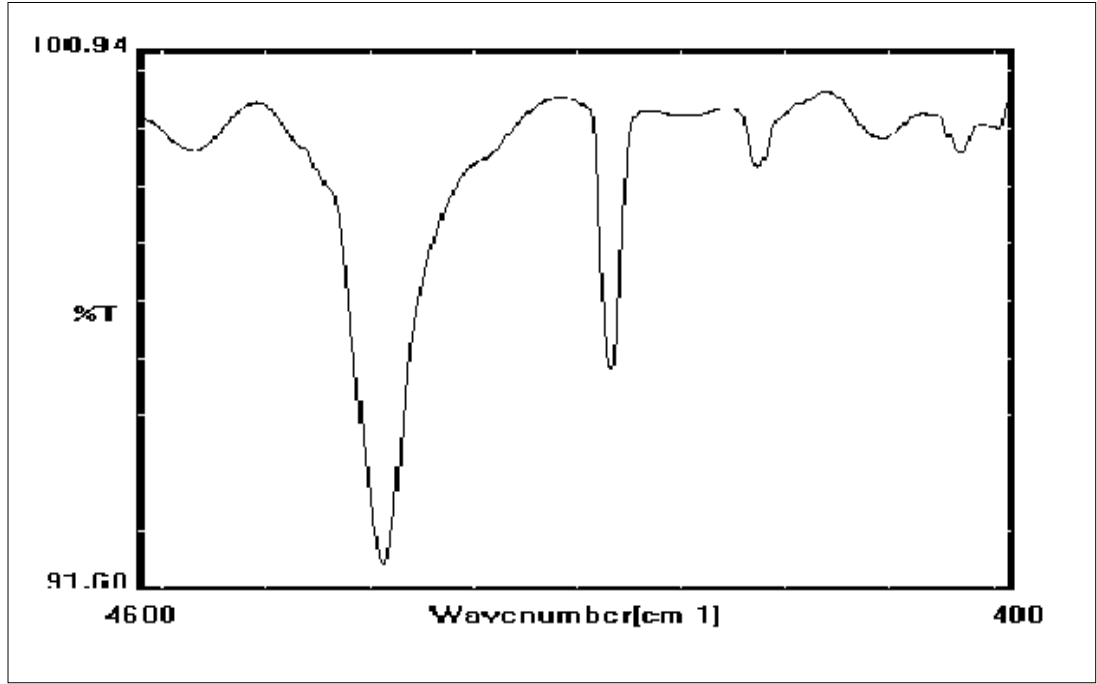
3.1.3.2 Au-MAC Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Au-MAC NP'lerin karakterizasyonu için, Au NP'lere uygulanan karakterizasyon işlemlerine paralel işlemler yapılmıştır. UV ve FT-IR spektrumları incelendiğinde NP'lerin modifiye edildikleri gözlenmiştir. Şekil 3.6' daki UV spektrumunu incelendiğinde 522,5 nm'deki pik, Au NP'lere ait UV spektrumundaki 523,5 (Şekil 3.8) nm'deki pik ile aynı özellikleri göstermekte olup, sadece 1 nm'lik kayma gözlemlenmiştir. Fakat; diğer taraftan Au NP'lere ait UV spektrumunda 254,0 nm'de bulunan pik, bu spektrumda net bir şekilde gözlemlenmemiş olup, MAC moleküllerinin 254,0 nm'de absorbansını perdeleyecek şekilde Au NP'lere bağlandığını düşündürmektedir.



Şekil 3.8. Au-MAC NP'lere ait UV spektrumu

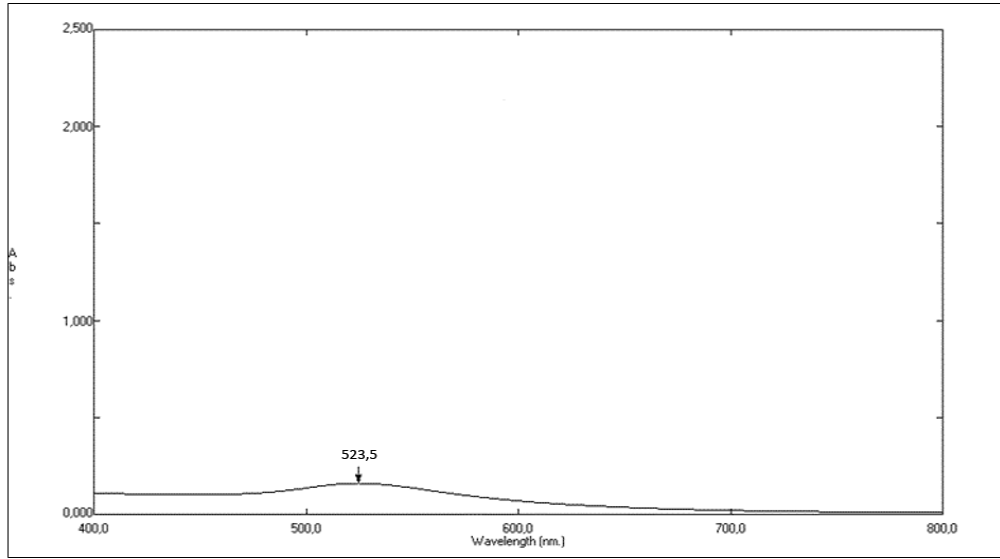
Diğer taraftan; Au-MAC NP'lere ait FT-IR spektrumu (Şekil 3.9) incelendiğinde 2910 cm^{-1} (S-H), 3434 cm^{-1} (N-H), 1631 cm^{-1} (C=O), ve 1380 cm^{-1} (C-H gerilmesi)'de görülen bantlar MAC molekülüne ait karakteristik bantlardır. Bu aşamaya kadar, özellikle S-H gruplarına ait bant ile N-H gruplarına ait bant yalnız MAC moleküllerinde var olup MAC moleküllerinin Au NP'lere bağlandığını göstermektedir.



Şekil 3.9. Au-MAC NP'lere ait FT-IR spektrumu

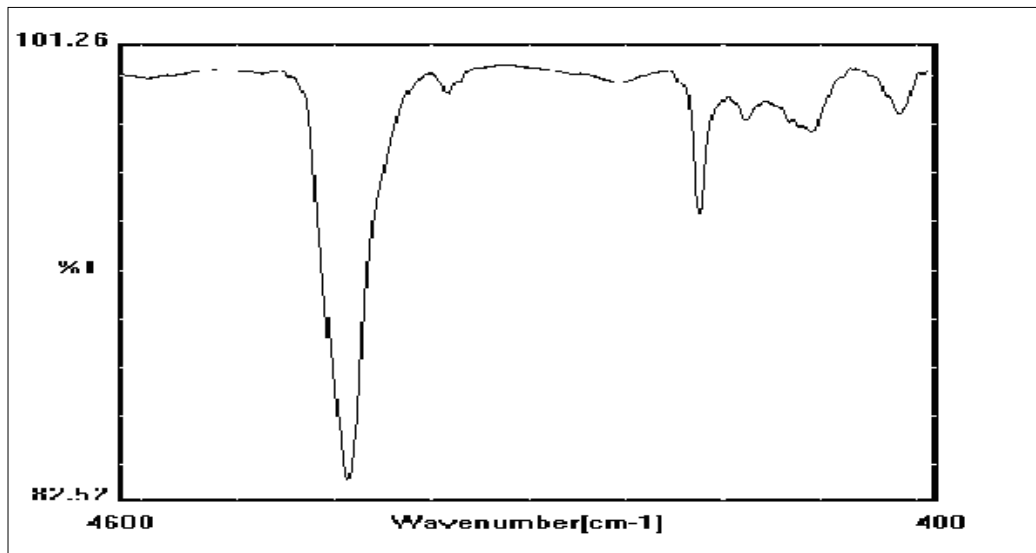
3.1.3.3 Au-MAC-MAAP₂-Tb(III) Moleküllerinin Karakterizasyonu

Au-MAC-MAAP₂-Tb(III) moleküllerinin karakterizasyonu; Au ve Au-MAC NP'lerin karakterizasyonlarına benzer şekilde gerçekleştirilmiştir. UV ve FT-IR spektrumları alındıktan sonra daha önce sentezlenen Au ve Au-MAC moleküllerine ait UV ve FT-IR spektrumları ile karşılaştırılarak karakterizasyon işleminin gerçekleştirildiği gözlenmiştir. Au-MAC-MAAP₂-Tb(III) modifiye edilmiş NP'lere ait UV spektrumu incelendiğinde (Şekil 3.10) Au-MAC NP'lerine ait UV spektrumunda (Şekil 3.8) görülen fakat absorbans şiddeti az olduğundan spektrumda yer almayan 254,0 nm'deki absorbans piki tamamıyla yok olmuş, bu da MAAP₂-Tb(III) moleküllerinin yapıya MAC ucundan bağlandığını ve 254,0 nm'de bulunan absorpsiyonun tamamen ortadan kalktığını göstermiştir.



Şekil 3.10. Au-MAC-MAAP₂Tb(III) moleküllerine ait UV spektrumu

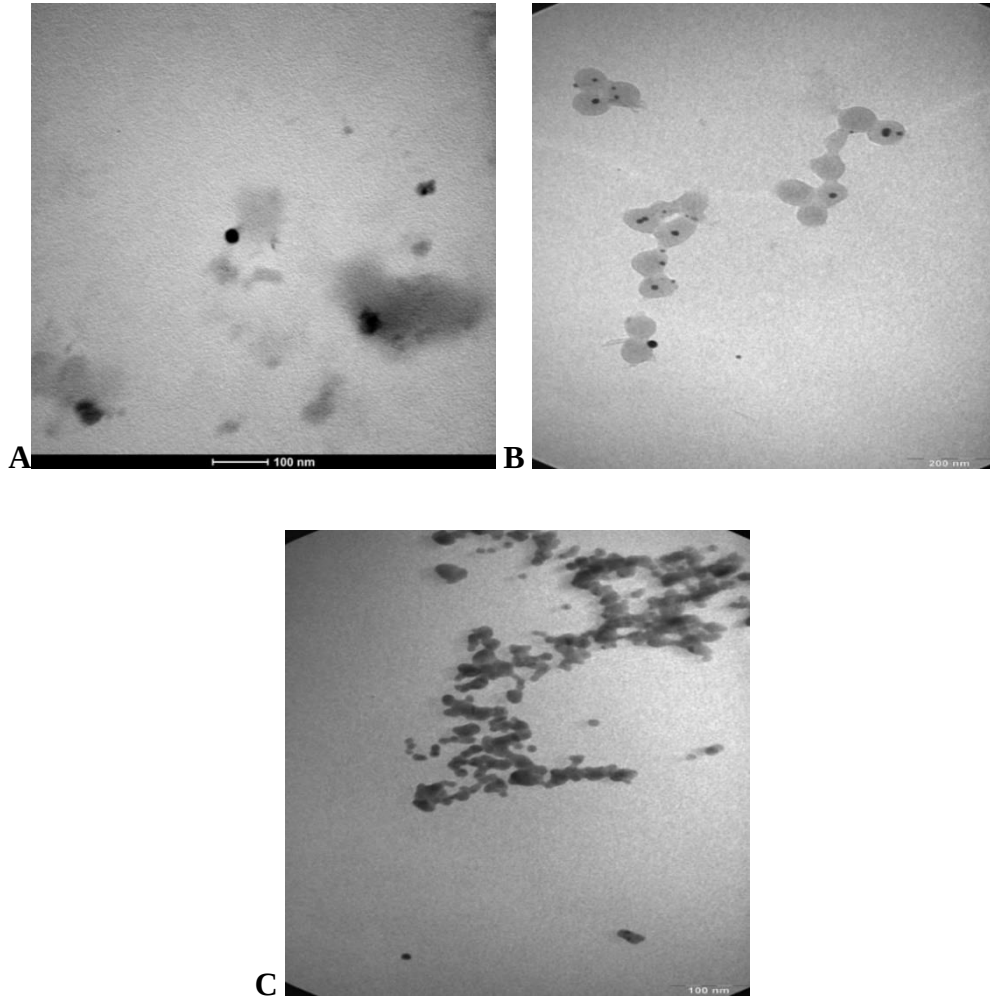
Au-MAC-MAAP₂-Tb(III) moleküllerine ait FT-IR spektrumuna (Şekil 3.11) bakıldığında ise 3432 cm⁻¹ (N-H), 2919 cm⁻¹ (S-H), 1627 cm⁻¹ (C=O), 1384 cm⁻¹ (C-H gerilmesi), 1056 cm⁻¹ ve 597 cm⁻¹'de gözlenen Tb metaline bağlı gerilme bantları Au-MAC NP'lerin MAAP₂-Tb(III) metal-şelat monomeri ile modifiye edildiğinin diğer bir kanıtıdır.



Şekil 3.11. Au-MAC-MAAP₂-Tb(III) modifiye NP'lerine ait FT-IR spektrumu

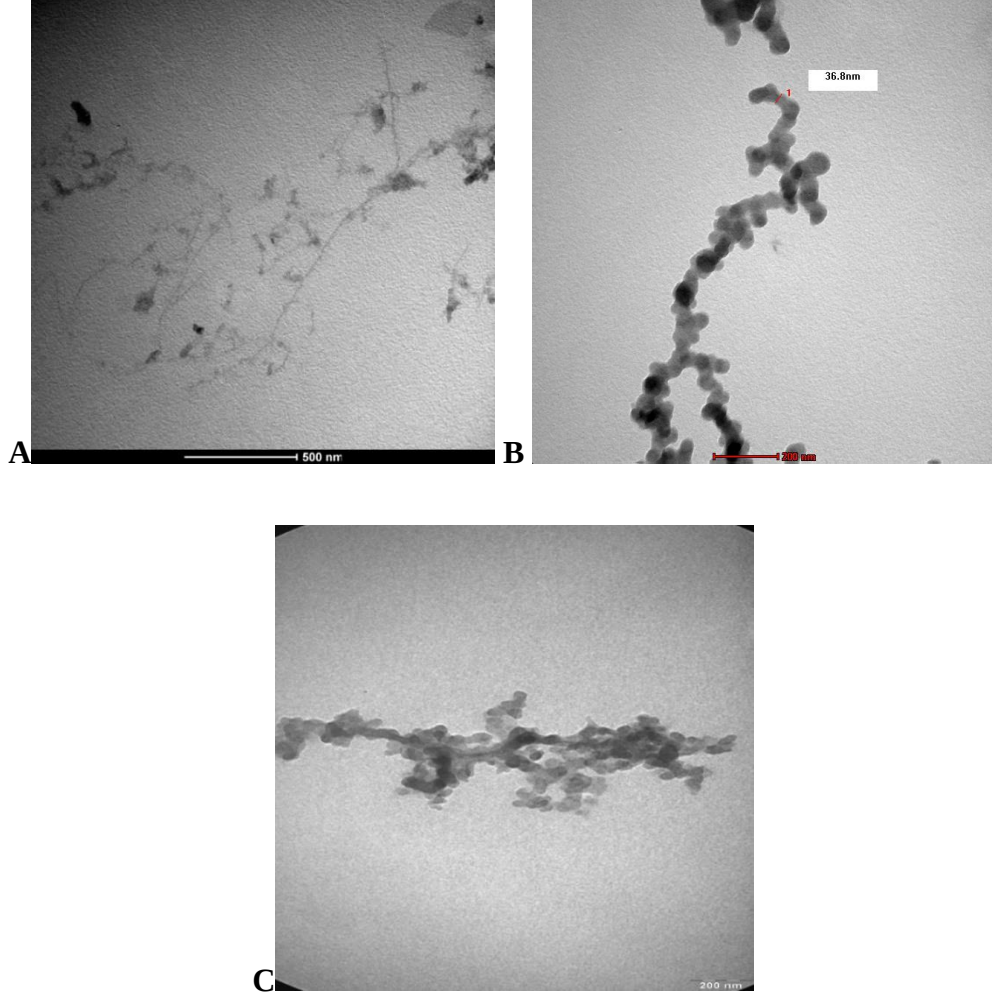
3.1.4 CNT ve Au NP yüzeyinde Modifiye ve Baskılı Polimerlerin TEM Görüntüleri

Daha önceki bölümlerde nasıl sentezlendiği ve karakterizasyonlarının nasıl yapıldığı anlatılan Au ve CNT yüzeyinde baskılı ve modifiye polimerlerin karakterizasyonlarına ilave olarak TEM görüntüleri de alınmıştır. Au NP'lerin büyüklükleri (Şekil 3.12A) 10-20 nm arasında olup, yüzeyinde sentezlenen modifiye (Şekil 3.12B) ve baskılı (Şekil 3.12C) polimerler nedeniyle boyutlarında az da olsa değişiklik olmuştur ve NP'ler 30-40 nm olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.12. **A.** Au NP'ler, **B.** Au NP yüzeyindeki modifiye polimerler, **C.** Au NP yüzeyindeki baskılı polimerlere ait TEM görüntüleri

Buna karşın CNT'e ait TEM görüntüleri ise Şekil 3.13'da verilmiştir. Şekil 3.13A'da görülen TEM görüntüsü CNT'e, Şekil 3.13B'deki görüntü CNT yüzeyinde modifiye polimerlere, Şekil 3.13C'deki görüntü ise CNT yüzeyindeki sitrulin baskılı polimerlere aittir.

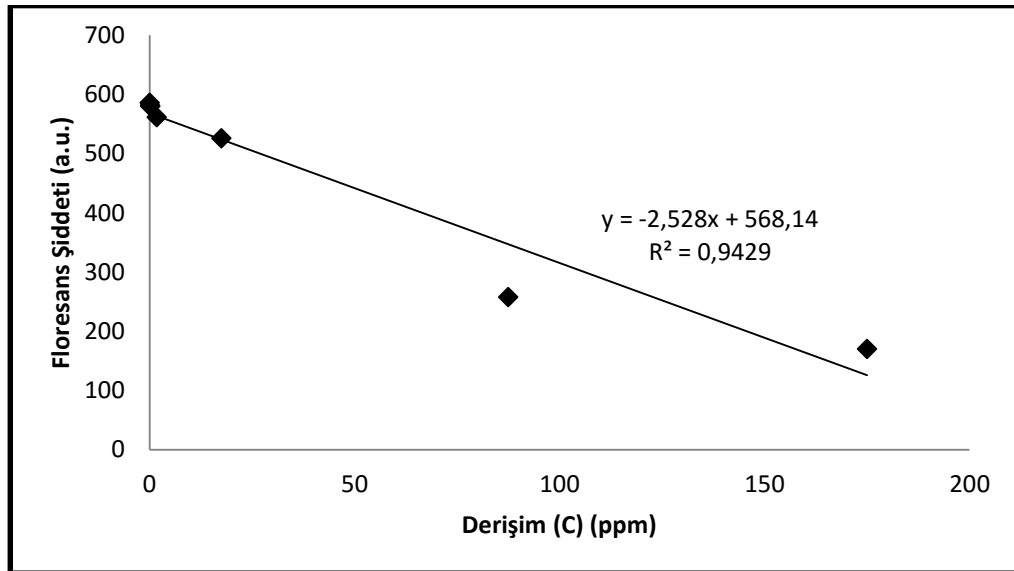


Şekil 3.13. A. CNT, B. CNT yüzeyindeki modifiye polimerler, C CNT yüzeyindeki baskılı polimerlere ait TEM görüntüleri

3.2 CNT Yüzeyindeki Baskılı ve Modifiye Polimerler ile Derişim Çalışması

3.2.1 CNT yüzeyindeki baskılı polimerler-sitrulin derişim çalışması

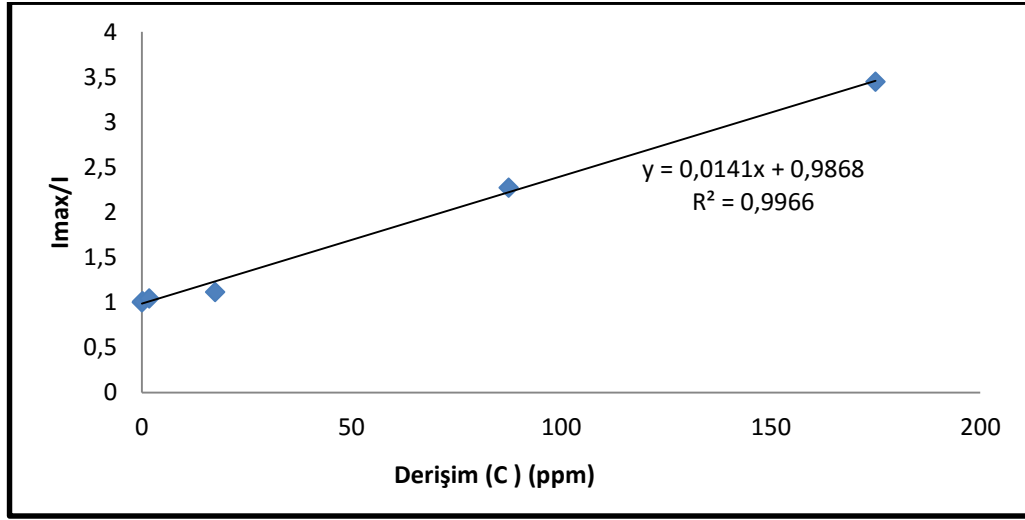
Bu aşamada; sentezlemiş olduğumuz CNT yüzeyinde sitrulin baskılanmış polimerden aynı miktarda alınarak su ile dispers edilmiş, daha sonra sitrulin aminoasidinin farklı derişimlerde (0,0175; 0,0875; 0,175; 1,75; 17,5; 87,5; 175 ppm) hazırlanan çözeltileri ile etkileştirilmiş ve floresans şiddetleri ölçülerek bir kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Polimerler ile farklı derişimlerdeki sitrulin çözeltilerinin etkileştirilmesi sonucu ölçülen lüminesans değerlerinden faydalanarak hazırlanan kalibrasyon doğrusu Şekil 3.14’de verilmiştir.



Şekil 3.14. Sitrulin derişimi ile floresans şiddeti arasındaki ilişki

CNT yüzeyine sitrulin baskılanmış polimerlerin luminesans ölçümleri floresans spektrofotometresi ile 250 nm’de uyarılarak yapılmış ve 497 nm’de maksimum emisyon şiddeti elde edilmiştir. Luminesans ölçümlerinin herbiri en az üçer kere yapılmış ve her biri için ortalama değer hesaplanmıştır. Şekil 3.14’de görüldüğü gibi sitrulin ilavesinin artışı floresans şiddetinde önemli bir düşüşe sebep olmuştur. Bunun nedeni ise; sitrulinin çapraz bağlı nano polimer matriksinin tanınma bölgelerine spesifik olarak bağlanmasıyla CNT yüzeyindeki MIP’lerin emisyon şiddetinde azalma olmasıdır.

Sönümlenme ile sonuçlanan kalibrasyon grafiğini, eğimi pozitif olan kalibrasyon doğrusuna dönüştürmek için Şekil 3.15’de görülen Stern-Volmer grafiği kullanılmıştır. Stern Volmer grafiği, etkileşme sonucunda floresans emisyonunun sönümlenmesi ile sonuçlandığında kullanılan bir grafikdir ve floresans spektroskopisi için kullanılan bir terimdir.

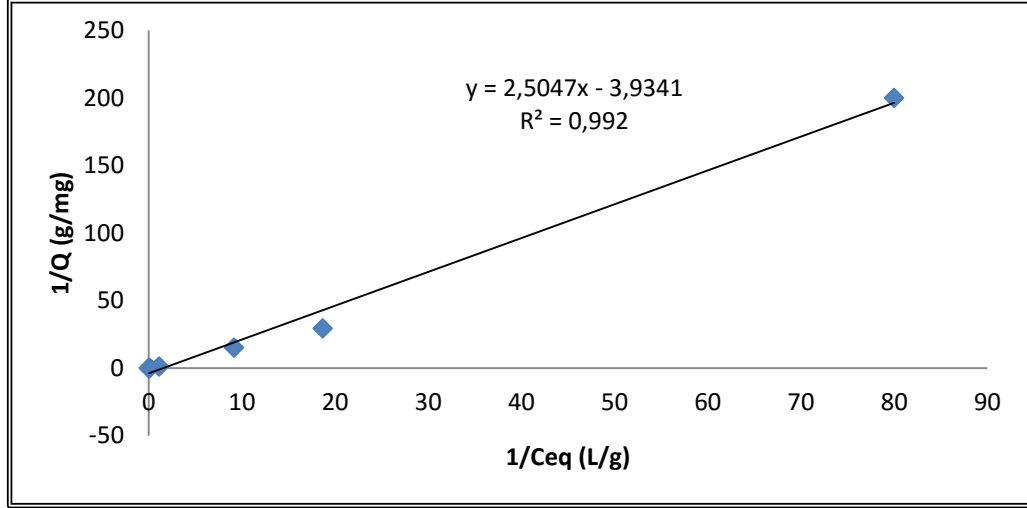


Şekil 3.15. Stern-Volmer grafiği

Stern-Volmer grafiği ile elde edilen pozitif doğrudan korelasyon katsayısı 0,9966 olarak hesaplanmıştır.

3.2.2 CNT-yüzeyindeki baskılı polimerler-sitrulin bağlanma izotermeleri

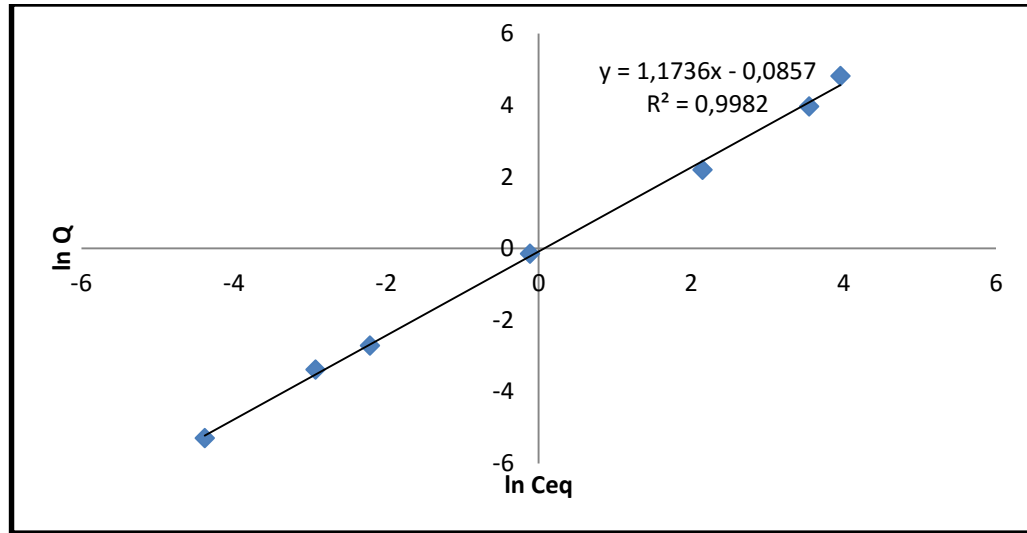
Sitrulin bağlanması için elde edilen veriler sırasıyla Langmuir ve Freundlich bağlanma izotermlerine uygulanmıştır. Eşitlik (1.5)’de $1/C_{eq}$ ’ye karşı $1/Q$ değerleri grafiğe geçirildiğinde Şekil 3.16’da verilen sitrulin molekülünün bağlanması için Langmuir bağlanma modeline ait grafik elde edilmektedir.



Şekil 3.16. Sitrulin amino asidi için Langmuir bağlanma modeli

Langmuir bağlanma izotermi incelendiğinde korelasyon katsayısı 0,992 olarak hesaplanmıştır.

Sistemde uygulanan ikinci bağlanma izotermi Freundlich izotermidir. Şekil 3.17’de CNT yüzeyinde sitrulin baskılı polimerlere sitrulin bağlanması için Freundlich bağlanma modelinin grafiği verilmiştir.

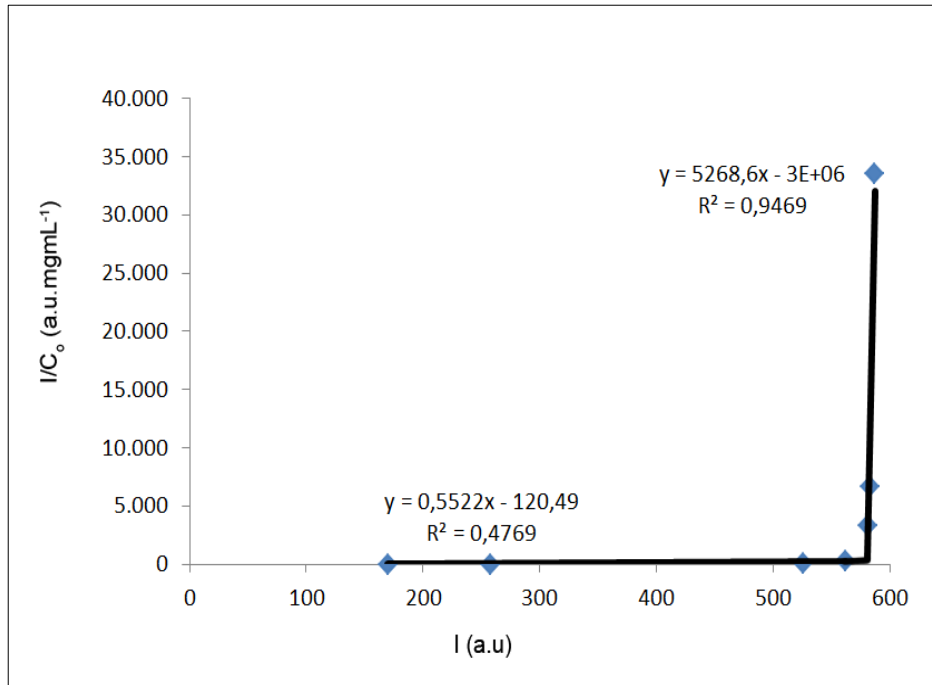


Şekil 3.17. Sitrulin amino asidi için Freundlich bağlanma modeli

Grafikte y ekseninde görülen Q değerleri Eşitlik (1.8)’e göre hesaplanmıştır. Ayrıca bağlanma işlemi 0,01 g polimer ile gerçekleştirilmiştir.

Deneysel veriler incelendiğinde, CNT yüzeyinde gerçekleştirilmiş MIP'lere sitrulin amino asidinin bağlanması için, korelasyon katsayısı 0,9982 değeri bulunurken, Freundlich sabitleri olan K_f ve n değerleri sırasıyla 2,06 ve 0,923 değerleri hesaplanmıştır.

Uygulanan bir diğer bağlanma modeli ise Scatchard bağlanma modelidir. CNT yüzeyinde baskılı polimere sitrulinin bağlanması sonucu ölçülen floresans şiddeti olan I 'ya karşı I/C_0 grafiğe geçirildiğinde Şekil 3.18'deki grafik ortaya çıkmaktadır. Scatchard izotermine ait grafikte yer alan 2 farklı doğruya ait korelasyon katsayıları 0,9469 ve 0,4769 olarak hesaplanmıştır.



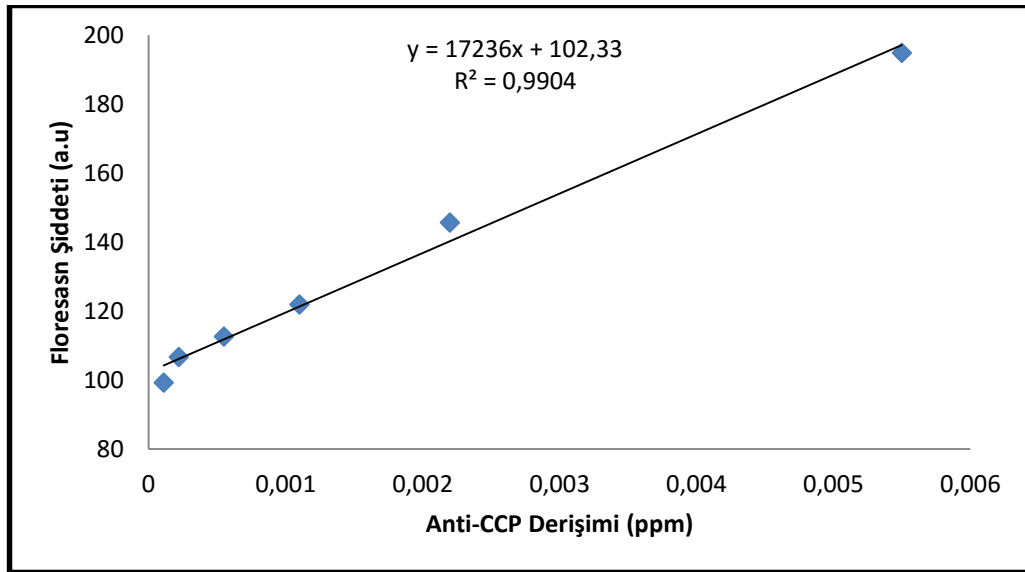
Şekil 3.18. CNT yüzeyinde baskılı polimerlerin Scatchard analizi

Başka bir deyişle Langmuir ve Freundlich bağlanma izotermi incelendiğinde Langmuir izotermi (Şekil 3.16) korelasyon katsayısının (0,992), Freundlich izotermi (Şekil 3.17) korelasyon katsayısından (0,9982) daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçtan yararlanılarak CNT yüzeyindeki MIP'ler tarafından sitrulin amino asidinin aktif merkezler tarafından tutulduğu ve oluşan tabakanın heterojen yapıda olduğu, başka bir deyişle Freundlich bağlanma izotermine uygun olduğu görülmüştür. Scatchard bağlanma izotermi ise yapıya

sitrulinin biri kuvvetli biri daha zayıf olmak üzere 2 tabaka halinde bağlandığını düşündürmektedir.

3.2.3 CNT yüzeyindeki modifiye polimerler-anti-CCP derişim çalışması

CNT yüzeyinde sitrulin modifiye polimerlerle RA hastalığının teşhisine yönelik nanosensör oluşturulması aşamasında; farklı derişimlerde (sırasıyla 0,00011; 0,00022; 0,00055; 0,0011; 0,0022; 0,0055 ppm) hazırlanan anti-CCP otoankironunun çözeltileri polimerle etkileştirilmiş ve floresans şiddetleri ölçülerek bir kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. CNT yüzeyinde sitrulin modifiye polimerler ile farklı derişimlerdeki anti-CCP çözeltilerinin etkileştirilmesi sonucu ölçülen lüninesans değerlerinden faydalanarak hazırlanan kalibrasyon doğrusunun (Şekil 3.19) korelasyon katsayısı 0,9904 olarak bulunmuştur.

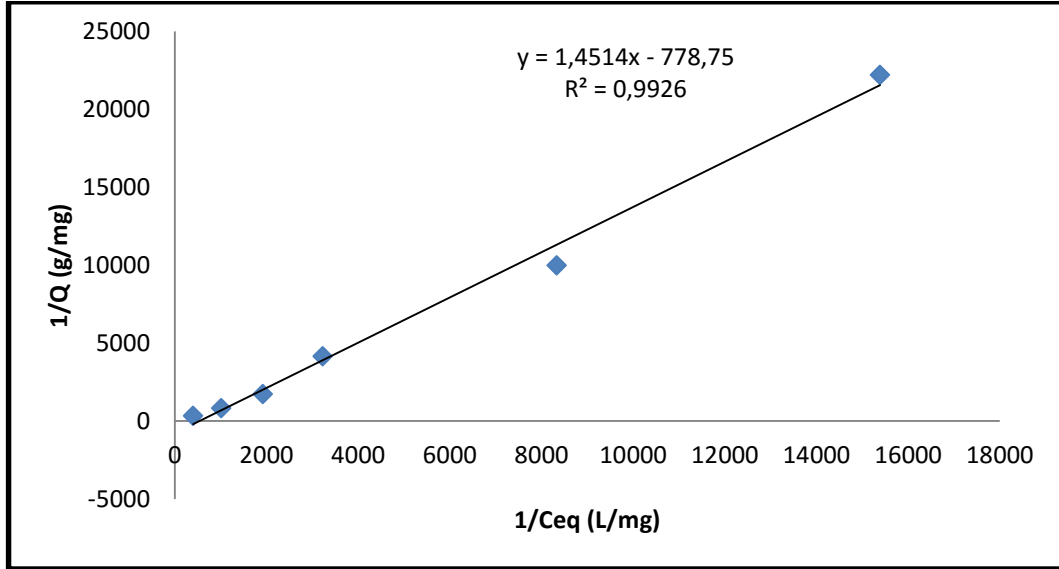


Şekil 3.19. Anti-CCP derişimi ile floresans şiddeti arasındaki ilişki

3.2.4 CNT-yüzeyindeki modifiye polimerler-anti-CCP bağlanma izotermi

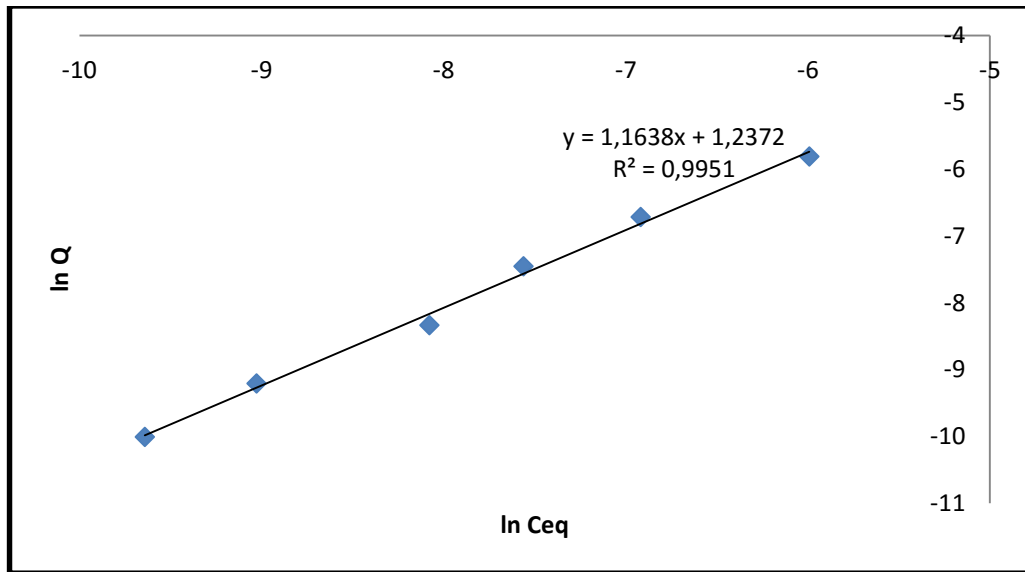
CNT yüzeyinde sentezlenen modifiye polimer ile Anti-CCP otoantikorunun bağlanma floresans ölçüm sonuçları Langmuir, Freundlich ve Scatchard bağlanma modellerine uygulanmıştır. Eşitlik (1.6)'de $1/C_{eq}$ 'ye karşı $1/Q$

değerleri grafiğe geçirildiğinde Şekil 3.20’de görülen Anti-CCP’nin bağlanmasına ait Langmuir bağlanma modelinin grafiği elde edilmiş ve korelasyon katsayısı 0,9926 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.20. Anti-CCP için Langmuir bağlanma modeli

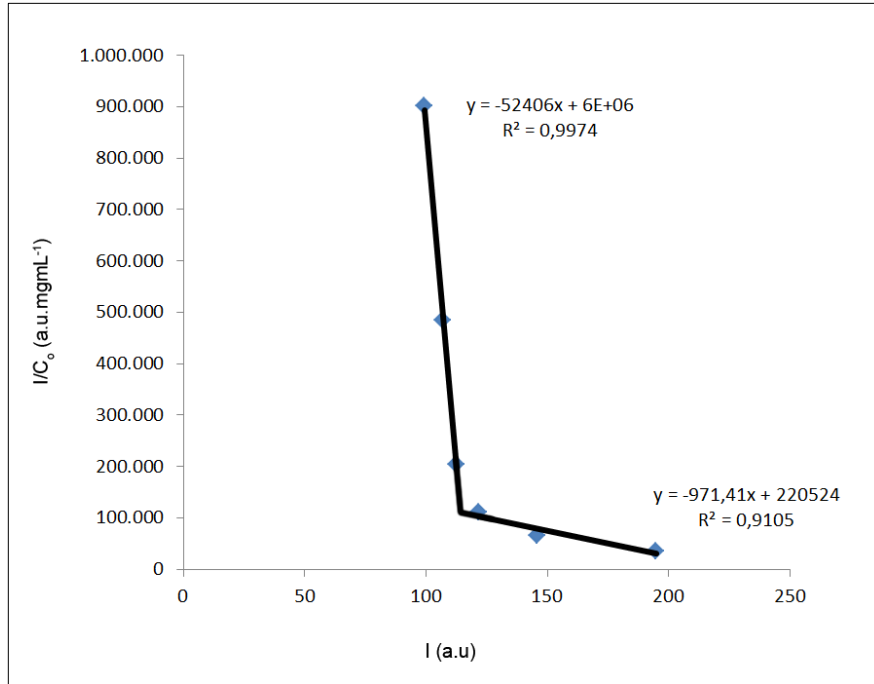
Sistem, ikinci olarak Freundlich bağlanma modeline uygulanmış ve Eşitlik (1.7)’de yer alan $\ln C_{eq}$ ’ya karşı $\ln Q$ değerleri grafiğe geçirildiğinde ise Şekil 3.21’de görülen grafik elde edilmiştir.



Şekil 3.21. Anti-CCP için Freundlich bağlanma modeli

Freundlich bağlanma modeline ait korelasyon katsayısı 0,9951 olarak bulunmuş ve K_f ve n değerleri ise sırasıyla 1,07 ve 0,92 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen floresans değerleri Scatchard bağlanma izotermine de uygulanmış, CNT yüzeyinde modifiye polimer için oluşturulan grafik Şekil 3.22'de verilmiştir.



Şekil 3.22. Anti-CCP için Scatchard bağlanma modeli

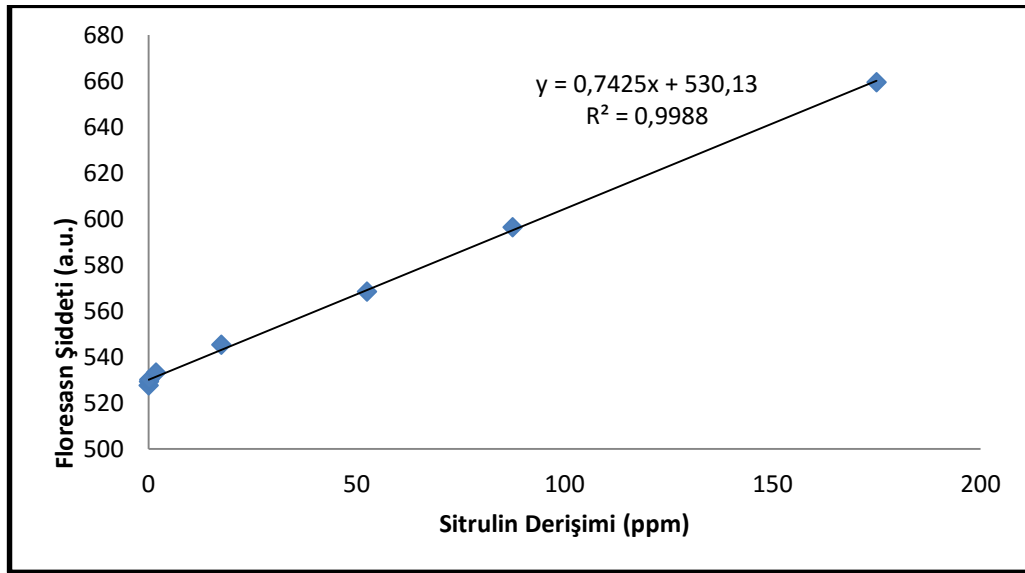
Şekil 3.22’de de görülen Scatchard bağlanma modeline ait grafikte, 2 farklı bağlanma bölgesi olduğu anlaşılmaktadır. 2 farklı eğrinin birleşiminden oluşan grafikteki doğrulardan birinde R^2 değeri 0,9974 hesaplanmışken, ikinci doğruya ait R^2 değeri 0,9105 olarak hesaplanmıştır. Bu durum anti-CCP’nin yapıya iki farklı tabaka halinde ve bu tabakaların da kuvvetli bir şekilde bağlandığını göstermektedir.

3.3 Au NP Yüzeyinde Baskılı ve Modifiye Polimerlerle Yapılan Derişim Çalışması

3.3.1 Au NP yüzeyinde baskılı polimerlerle yapılan derişim çalışması

Önceki bölümlerde anlatılan CNT yüzeyinde sentezlenen modifiye ve MIP yöntemi takip edilerek, Au NP yüzeyinde de modifiye ve baskılı polimer sentezlenmiş olup modifiye polimerle Anti-CCP otoantikörlerinin, MIP’le ise sitrulin aminoasidinin etkileşiminde incelenmiştir.

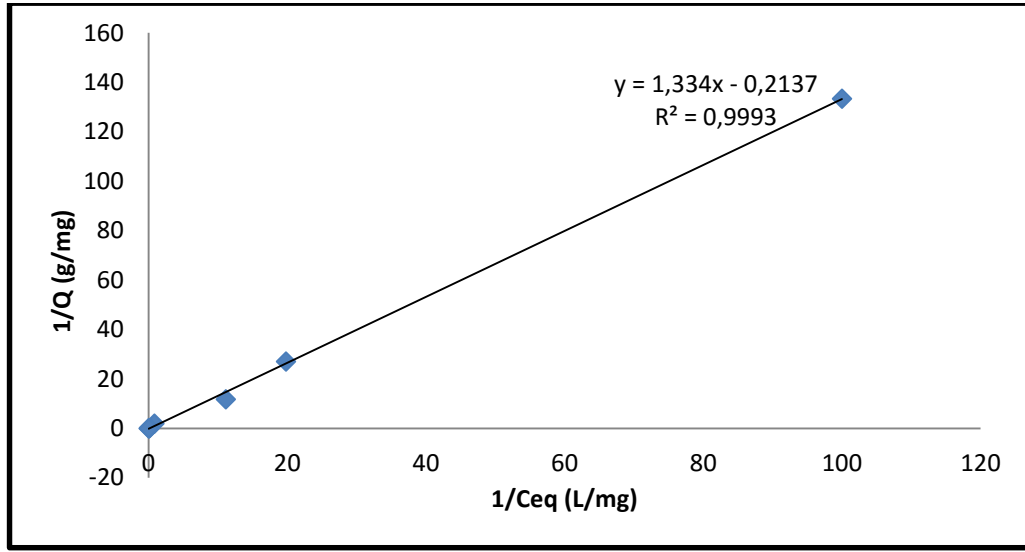
Sentezlemiş olduğumuz Au yüzeyinde sitrulin baskılı polimerden aynı miktarda (0,1 mg) alınarak su ile dispers edilmiş, daha sonra sitrulin aminoasidinin farklı derişimlerde hazırlanan çözeltileri ile etkileştirilmiş ve floresans şiddetleri ölçülerek bir kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Au NP yüzeyinde sentezlenmiş baskılı polimerler ile farklı derişimlerdeki (0,0175; 0,0875; 0,175; 1,75; 17,5; 87,5; 175 M) sitrulin çözeltilerinin etkileştirilmesi sonucu ölçülen floresans değerlerinden faydalanarak hazırlanan kalibrasyon doğrusu Şekil 3.23’de verilmiştir. Kalibrasyon grafiği ile elde edilen pozitif doğrudan korelasyon katsayısı 0,9988 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.23. Sitrulin derişimi ile floresans şiddeti arasındaki ilişki

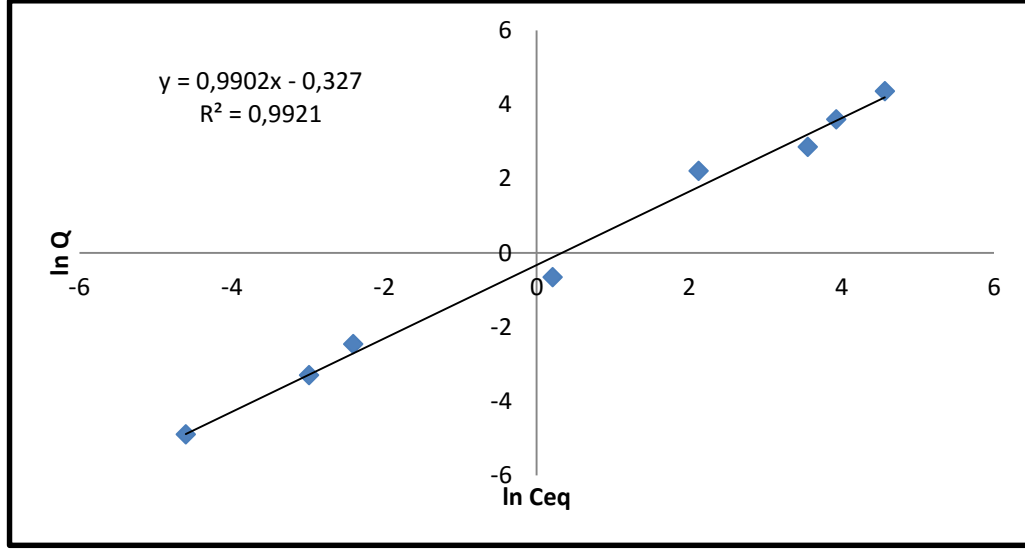
3.3.2 Au NP yüzeyindeki baskılı polimerler-sitrulin bağlanma izotermi

MS tanısı için Au NP yüzeyinde sentezlenen baskılı polimere sitrulin bağlanması için elde edilen veriler sırasıyla Langmuir, Freundlich ve Scatchard bağlanma izotermine uygulanmıştır. Eşitlik (1.6)'da $1/C_{eq}$ 'ye karşı $1/Q$ değerleri grafiğe geçirildiğinde sitrulin aminoasidinin bağlanması için Şekil 3.24'de görülen Langmuir bağlanma modelinin grafiği elde edilmiş ve korelasyon katsayısı 0,9993 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.24. Sitrulin amino asidi için Langmuir bağlanma modeli

Au NP yüzeyinde sitrulin baskılı polimerlere sitrulin bağlanmasını gösteren Freundlich bağlanma izotermi grafiği (Şekil 3.25) eşitlik (1.7)'ye göre oluşturulmuştur.

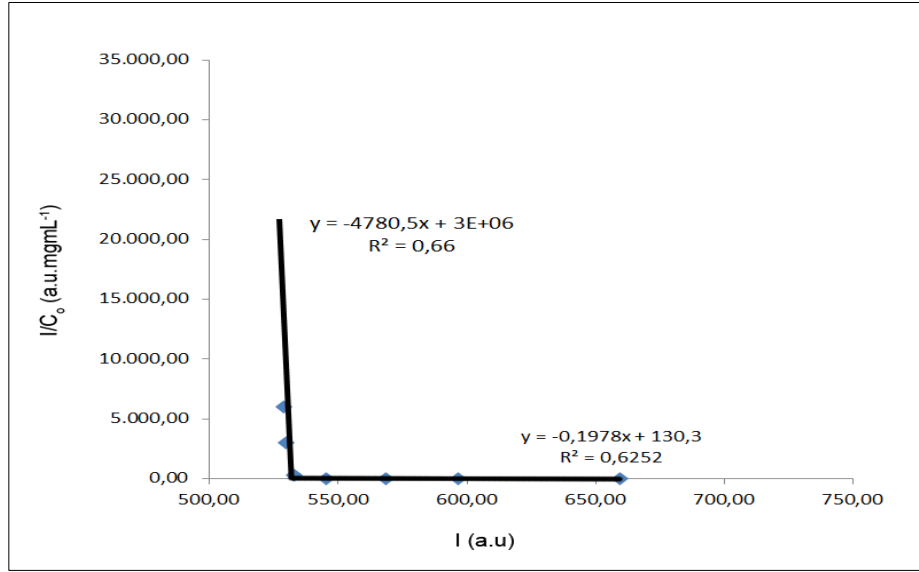


Şekil 3.25. Sitrulin amino asidi için Freundlich bağlanma modeli

Deneyisel veriler incelendiğinde, Au NP yüzeyinde gerçekleştirilmiş MIP'lere sitrulin amino asidinin bağlanması için, korelasyon katsayısı 0,9921 olarak bulunurken, Freundlich sabitleri olan K_f ve n değerleri sırasıyla 1,65 ve 0,952 olarak hesaplanmıştır.

Au NP yüzeyinde baskılı polimerlere sitrulin bağlanmasını incelemek amacıyla sonuçlar Scatchard bağlanma izotermine (Şekil 3.26) de uygulanmıştır.

Langmuir ve Freundlich bağlanma izotermi (Şekil 3.24 ve 3.25, sırasıyla) incelendiğinde Langmuir izotermi korelasyon katsayısının 0,9993, Freundlich izotermi korelasyon katsayısının ise 0,9921 olduğu gözlenmiştir. Au NP yüzeyindeki MIP'lere sitrulinin bağlanması, Langmuir bağlanma izotermine uymaktadır. Bu durumda bağlanma bölgelerinin tek tabakalı ve homojen olduğu düşünülmektedir. Şekil 3.26'daki Scatchard bağlanma modelinden de görülebileceği üzere, iki doğrunun korelasyon katsayılarının birbirine çok yakın olması homojen, fakat değerleri 1'den çok uzak olduğundan dolayı zayıf bağlanmaların olduğunu düşündürmektedir.

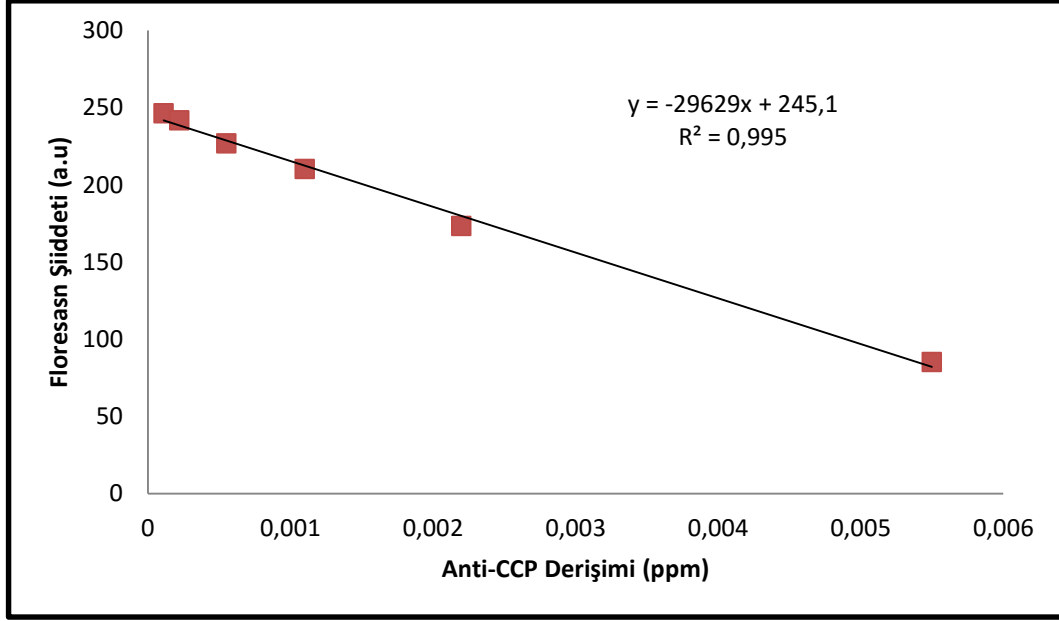


Şekil 3.26. Sitrulin için Scatchard bağlanma modeli

3.3.3 Au NP yüzeyindeki modifiye polimerlerle yapılan derişim çalışması

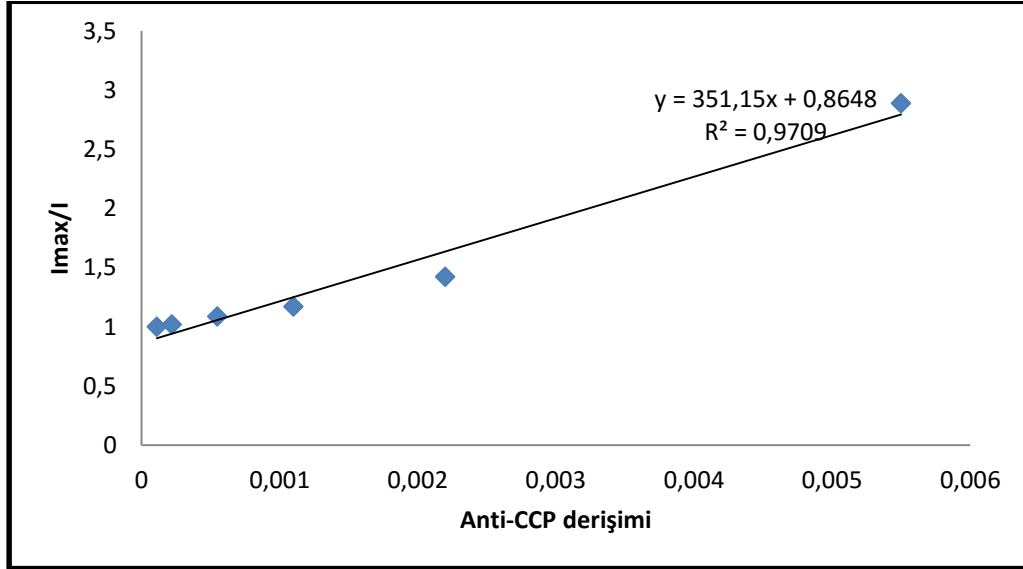
Au NP'lerle yapılan çalışmaların ikinci aşamasında sentezlemiş olduğumuz Au yüzeyinde sitrulin modifiye polimerlerden aynı miktarda (0,1 mg) alınarak su ile dispers edilmiştir. Daha sonra Au NP yüzeyinde sentezlenmiş modifiye polimerler ile farklı derişimlerdeki (0,00011; 0,00022; 0,00055; 0,0011; ;0,0022; 0,0055 ppm) Anti-CCP çözeltilerinin etkileştirilmesi sonucu ölçülen floresans değerlerinden faydalanarak hazırlanan kalibrasyon doğrusu Şekil 3.27'de verilmiştir.

Au NP yüzeyinde sentezlenen modifiye polimerlerin floresans ölçümleri floresans spektrofotometresi ile 300 nm'de uyarılarak yapılmış ve 603 nm'de maksimum emisyon şiddeti elde edilmiştir. Floresans ölçümlerinin herbiri en az üçer kere yapılmış ve her biri için ortalama değer hesaplanmıştır. Şekil 3.27'da görüldüğü gibi Anti-CCP ilavesinin artışı floresans siddetinde düşüşe sebep olmuştur.



Şekil 3.27. Anti-CCP derişimi ile floresans şiddeti arasındaki ilişki

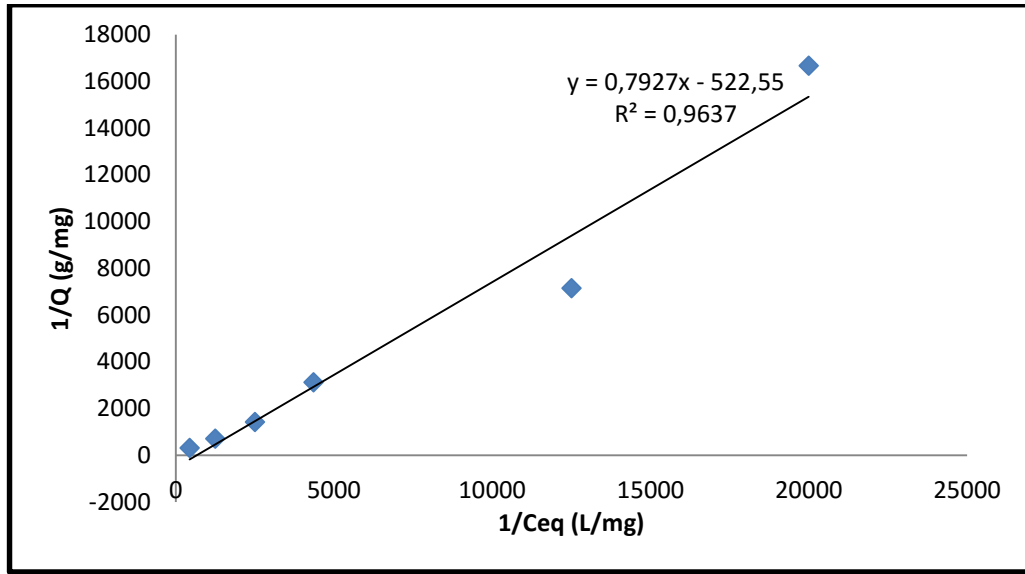
Sönümlenme ile sonuçlanan kalibrasyon grafiğini, eğimi pozitif olan kalibrasyon doğrusuna dönüştürmek için Şekil 3.28’de görülen Stern-Volmer grafiği kullanılmıştır. Stern-Volmer grafiği ile elde edilen pozitif doğrudan korelasyon katsayısı 0,9709 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.28. Stern-Volmer grafiği

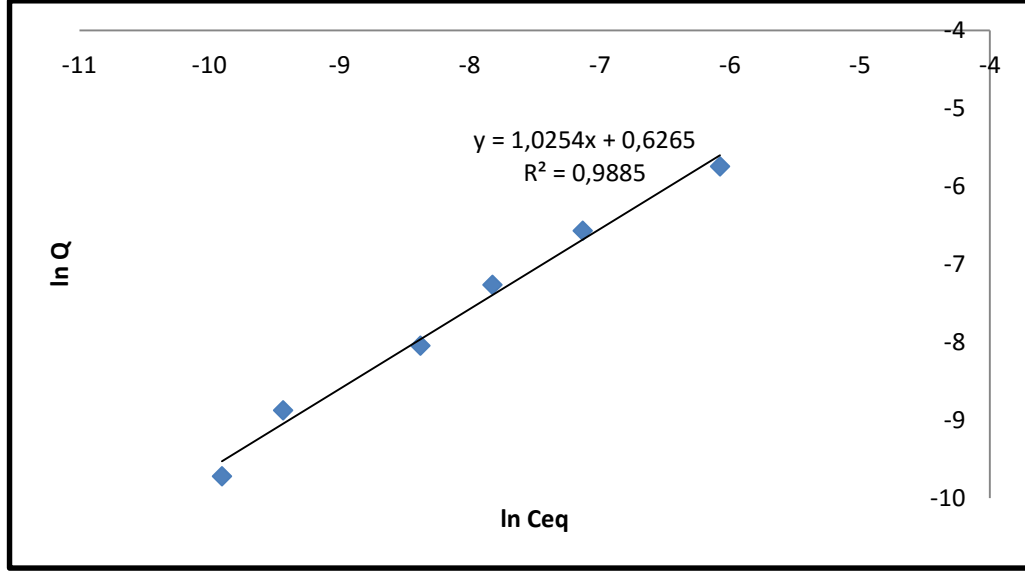
3.3.4 Au NP yüzeyindeki modifiye polimerler-anti-CCP bağlanma izotermi

RA için Au NP yüzeyinde sentezlenen modifiye polimerlerle etkileştirilen Anti-CCP otoantikorunun bağlanması için elde edilen veriler sırasıyla Langmuir (Şekil 3.29), Freundlich (Şekil 3.30) ve Scatchard (Şekil 3.31) bağlanma izotermine uygulanmıştır.



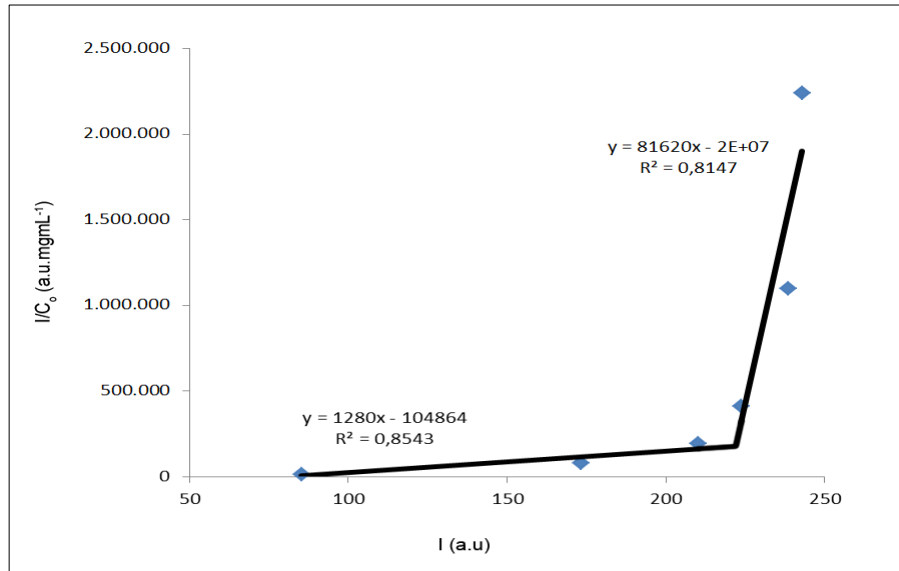
Şekil 3.29. Anti-CCP otoantikoru için Langmuir bağlanma modeli

Langmuir bağlanma izotermi incelendiğinde korelasyon katsayısı 0,9637 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.30. Anti-CCP otoantikoru için Freundlich bağlanma modeli

Deneysel veriler incelendiğinde, Au NP yüzeyinde sentezlenen modifiye polimerlere anti-CCP otoantikorunun bağlanmasına ait Freundlich bağlanma modeline göre, korelasyon katsayısı 0,9885 değeri bulunurken, Freundlich sabitleri olan K_f ve n değerleri sırasıyla 1,496 ve 0,994 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.31. Anti-CCP için Scatchard bağlanma modeli

Langmuir ve Freundlich bağlanma izotermi incelendiğinde Langmuir izotermi (Şekil 3.29) korelasyon katsayısının (0,9637), Freundlich izotermi (Şekil

3.30) korelasyon katsayısından (0,9885) küçük olduğu gözlenmiştir. Au NP yüzeyinde sentezlenen modifiye polimerlerin, anti-CCP otoantikoru adsorplaması Freundlich bağlanma izotermine uymaktadır. Bu da bağlanma bölgelerinin homojen ve tek tabakalı olmadığı anlamına gelir. Diğer bir deyişle bağlanma bölgelerinin heterojen yapıda ve birden fazla tabakalı olduğu düşünülmektedir. Şekil 3.31'deki Scatchard bağlanma modeli incelendiğinde korelasyon katsayılarının 1'den uzak olması bağlanmaların zayıf olduğunu düşündürmektedir.

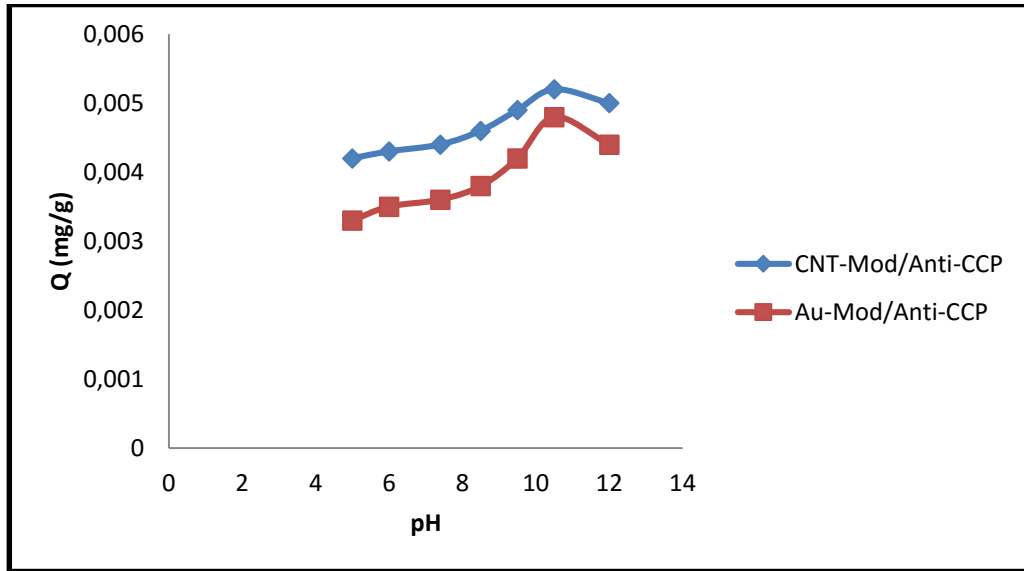
Nanosensörlere uygulanan Langmuir, Freundlich ve Scatchard bağlanma izotermelerinin toplu bir değerlendirmesi Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Nanosensörlere uygulanan Langmuir, Freundlich ve Scatchard bağlanma izotermelerinin karşılaştırılması

	Langmuir			Scatchard		Freundlich		
	Q_m (mgg ⁻¹)	b (mLmg ⁻¹)	R^2	K_D (mg ⁻¹ L)	I_{max}	K_F	n	R^2
CNT- Modifiye-Anti- CCP	1,284x10 ⁻³	536,5	0,9926	1,02 x 10 ⁻³ 1,9 x 10 ⁻⁵	194 112	3,44	0,859	0,9951
Au-Modifiye- Anti-CCP	1,914x10 ⁻⁴	659,2	0,9637	7,81 x 10 ⁻⁴ 1,225 x 10 ⁻⁵	210 246	1,871	0,975	0,9885
CNT-MIP- Sitrulin	0,254	1,571	0,992	1,81 1,89 x 10 ⁻⁴	562 586	0,918	0,852	0,9982
Au-MIP- Sitrulin	4,68	0,160	0,9993	5,05 2,09 x 10 ⁻⁴	659 533	0,721	1,01	0,9921

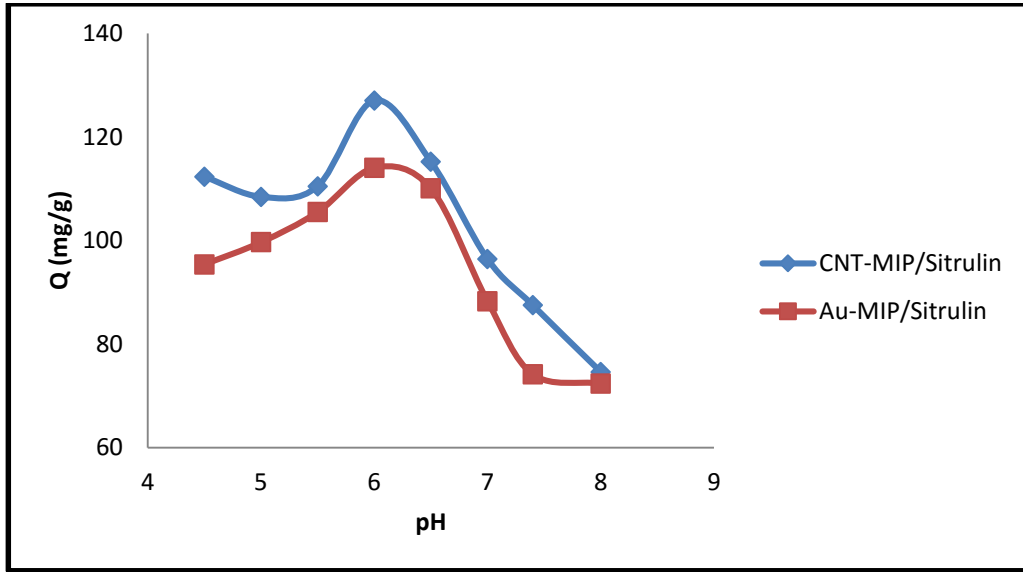
3.4 Bağlanmayı Etkileyen Etmenler

CNT ve Au nanopatiküllerin yüzeyinde sentezlenen ve RA ve MS hastalıklarının teşhisine yönelik nanosensörlerin pH'ye karşı göstermiş oldukları tepkileri Bölüm 2.3'de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür. CNT ve Au NP yüzeyinde modifiye polimerlerin Anti-CCP bağlama kapasitelerinden yola çıkılarak Eşitlik (1.8) ile hesaplanan Q değerleri ile Şekil 3.32'de yer alan grafik elde edilmiştir. Her iki modifiye polimer için de pH 10,5'de maksimum Anti-CCP adsorpsiyonu elde edilmiştir. Q değeri CNT yüzeyinde modifiye polimer için 0,0052 mgg⁻¹ iken, Au modifiye polimer üzerinde 0,0048 mgg⁻¹ olarak hesaplanmıştır.



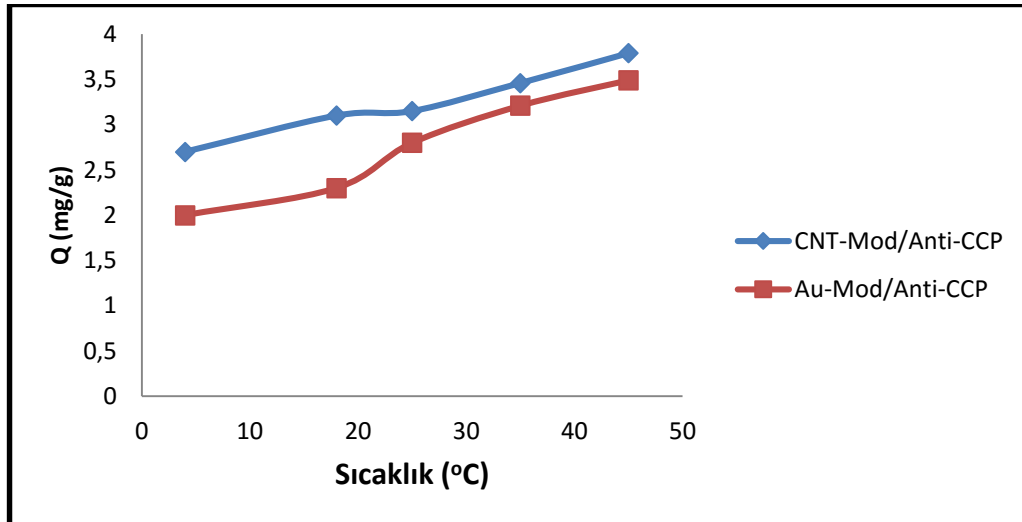
Şekil 3.32. CNT ve Au NP yüzeyinde modifiye polimerlerle Anti-CCP bağlanmasına pH etkisi (Anti-CCP derişimi: 0,0055 mgmL⁻¹; V_{Anti-CCP} : 10 mL; m_{modifiye polimer}: 1 mg; T: 25 °C)

Aynı işlem, MS teşhisinde kullanılacak olan CNT ve Au NP yüzeyindeki baskılı polimerlerle de gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.33). Maksimum sitrulin adsorpsiyonu, CNT yüzeyinde baskılı polimer için pH 6.0'da 127,042 mgg⁻¹ iken, Au NP yüzeyinde baskılı polimer için 114,056 mgg⁻¹ olarak bulunmuştur.



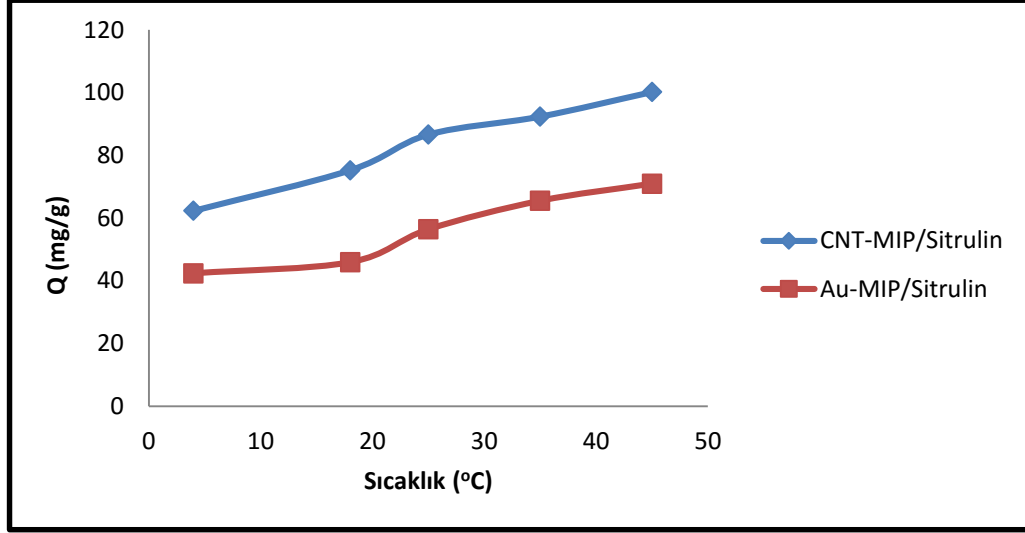
Şekil 3.33. CNT ve Au NP yüzeyinde baskılı polimerlerle Sitrulin bağlanmasına pH etkisi (Sitrulin derişimi: 175 mg mL^{-1} ; V_{sitrulin} : 10 mL; $m_{\text{baskılı polimer}}$: 1 mg; T: 25 °C)

Şekil 3.34’de CNT ve Au NP yüzeyinde modifiye polimerlere Anti-CCP’nin bağlanma kapasitesine sıcaklığın etkisi görülmektedir. Sıcaklığın artması ile her iki polimerde de Anti-CCP’nin adsorpsiyonu artmaktadır. Maksimum Anti-CCP adsorpsiyonu 45 °C’de CNT yüzeyindeki modifiye polimer için $3,79 \text{ mg g}^{-1}$; Au NP yüzeyinde modifiye polimer için $3,49 \text{ mg g}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



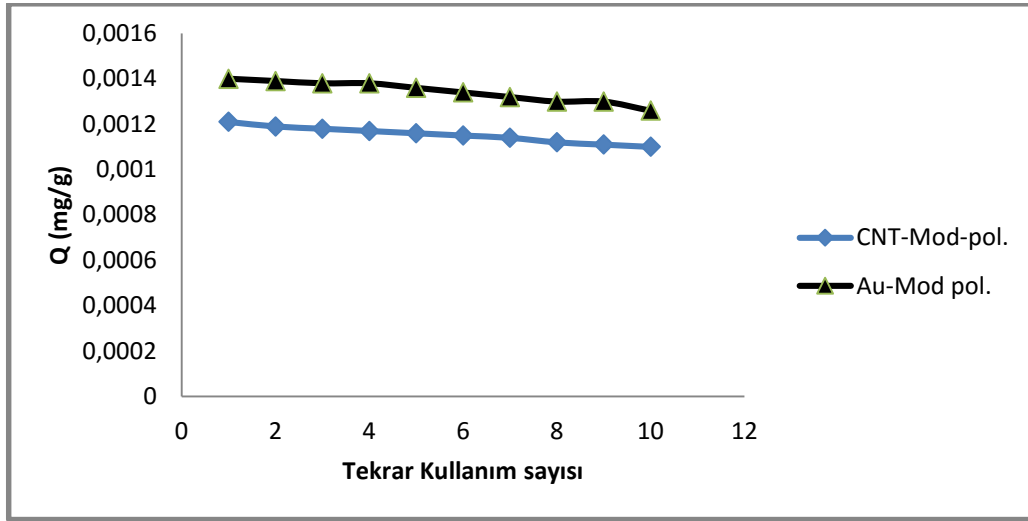
Şekil 3.34. CNT ve Au NP yüzeyinde modifiye polimerlerle Anti-CCP bağlanmasına Sıcaklık etkisi (Anti-CCP derişimi: $0,0055 \text{ mg mL}^{-1}$; $V_{\text{Anti-CCP}}$: 10 mL; $m_{\text{modifiye polimer}}$: 1 mg; pH: 7,0 PBS)

Şekil 3.35’de CNT ve Au NP yüzeyinde baskılı polimerlere sitrulin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Sıcaklığın artması ile her iki polimere de sitrulin adsorpsiyonu artmaktadır. Maksimum sitrulin adsorpsiyonu 45 °C’de CNT yüzeyindeki baskılı polimer için 100,21 mgg⁻¹; Au NP yüzeyinde modifiye polimer için 70,93 mgg⁻¹ olarak bulunmuştur.



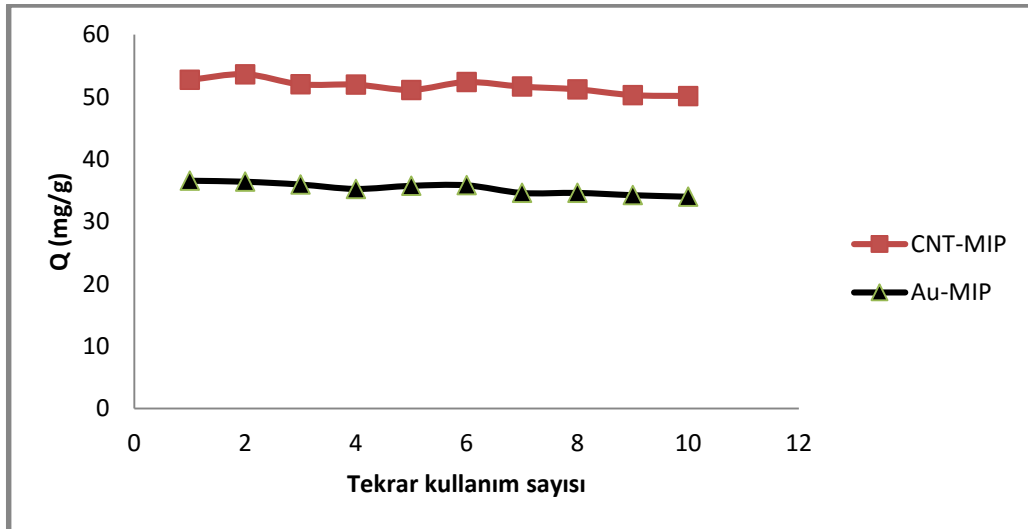
Şekil 3.35. CNT ve Au NP yüzeyinde baskılı polimerlerle sitrulin bağlanmasına Sıcaklık etkisi (Sitrulin derişimi: 175 mgmL⁻¹; V_{Anti-CCP}: 10 mL; m_{modifiye polimer}: 1 mg; pH: 7,0 PBS)

Geliştirilen polimerik nanosensörlerin rejenerasyonu ve tekrar kullanımı ticari uygulamalarda maliyet açısından önemlidir. Şekil 3.36’de CNT ve Au NP yüzeyinde modifiye polimerlere Anti-CCP’nin adsorpsiyon-desorpsiyon oranlarından yararlanılarak tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. CNT yüzeyinde modifiye polimere Anti-CCP’nin desorpsiyon oranı % 90 olarak bulunurken, Au nanoparikül yüzeyinde modifiye polimere Anti-CCP’nin desorpsiyon oranı % 91 olarak bulunmuştur ve 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrasında adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir değişim görölmemiştir.



Şekil 3.36. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik (Anti-CCP derişimi: 0.0022 mgmL^{-1} , $V_{\text{Anti-CCP}}$: 5 mL, $m_{\text{modifiye polimer}}$: 1 mg, pH: 7.4 PBS; Desorpsiyon tamponu 0,5 M NaCl)

Şekil 3.37’de CNT ve Au NP yüzeyinde baskılı polimerlere sitrulin bağlanma kapasitelerinden faydalanılarak tekrar kullanılabilirlikleri ölçülmüştür. CNT yüzeyinde baskılı polimere sitrulinin desorpsiyon oranı % 95 olarak bulunurken, Au nanoparikül yüzeyinde baskılı polimere sitrulinin desorpsiyon oranı % 94 olarak bulunmuştur ve 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrasında adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir değişim görülmemiştir.



Şekil 3.37. Desorpsiyon ve tekrar kullanılabilirlik (Sitrulin konsantrasyonu: $87,5 \text{ mgmL}^{-1}$, V_{Sitrulin} : 5 mL, $m_{\text{baskılı polimer}}$: 1 mg, pH: 7.4 PBS ; Desorpsiyon tamponu 0,5 M NaCl)

3.5 Baskılı Nanosensörler için Seçicilik Çalışmaları

CNT ve Au yüzeyindeki baskılı polimerler için seçicilik çalışması sitruline karşı arginine göre yapılmıştır. Her iki molekül için Eşitlik (2.3)'de bulunan K_d ayrılma katsayıları hesaplanmış, bu değerler Eşitlik (2.2)'de yerine konularak sitrulinin arginine olan seçiciliği bulunmuştur. Elde edilen veriler Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. Sitrulin baskılı polimerlerle seçicilik çalışması

	CNT yüzeyinde MIP		Au yüzeyinde MIP	
Molekül	K_D	k	K_D	k
Sitrulin	957	164,150	912,67	4,66
Arginin	5,83		195,6	

Bu çalışmalar, CNT yüzeyinde baskılı polimerin sitruline arginine kıyasla 164,150 kat seçici olduğunu göstermektedir. Au NP yüzeyinde sitrulin baskılı polimer de arginine kıyasla sitruline 4,66 kat daha seçici davranmaktadır.

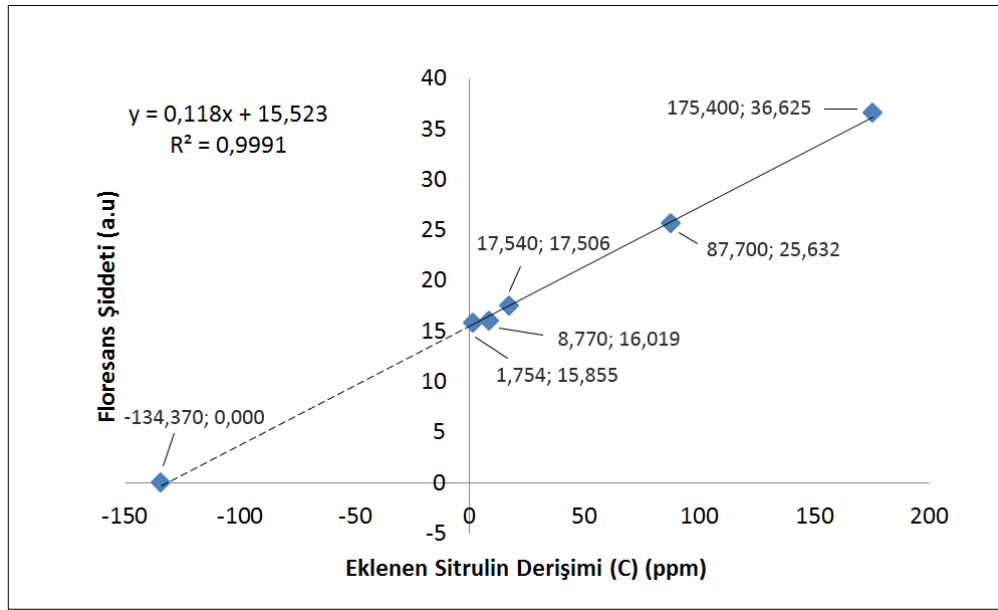
3.6 Polimerlerin temsili numunelerle etkileştirilmesi

MS hastalığının teşhisine yönelik temsili numune ile yapılan çalışmalar için beyin omurilik sıvısı (BOS) örneğine benzer numuneler hazırlanmış, bunun için de BOS örneğini temsil için belirli derişimde (500.0 ppm) sitrulin eklenen çözeltiler kullanılmış ve CNT ve Au NP yüzeyindeki baskılı polimerlerle etkileştirilmiştir. CNT-MIP ile yapılan etkileşme sonunda floresans değeri 248, 211 a.u. şiddetinde, Au-MIP ile yapılan etkileşme sonucunda da 632,99 a.u. şiddetinde ölçülmüştür. Bu değerler, kalibrasyon doğrularında yerine konulduğunda (CNT-MIP için Şekil 3.14; Au-MIP Şekil 3.23) CNT-MIP ile ölçümde sitrulin derişimi 136,9 ppm, Au-MIP ile ölçüldüğünde ise 138,54 ppm olarak hesaplanmıştır.

RA hastalığının teşhisi için RA'li kan serumuna benzemesi açısından temsili numune olarak belirli derişimde (0,05 ppm) Anti-CCP ilave edilmiş

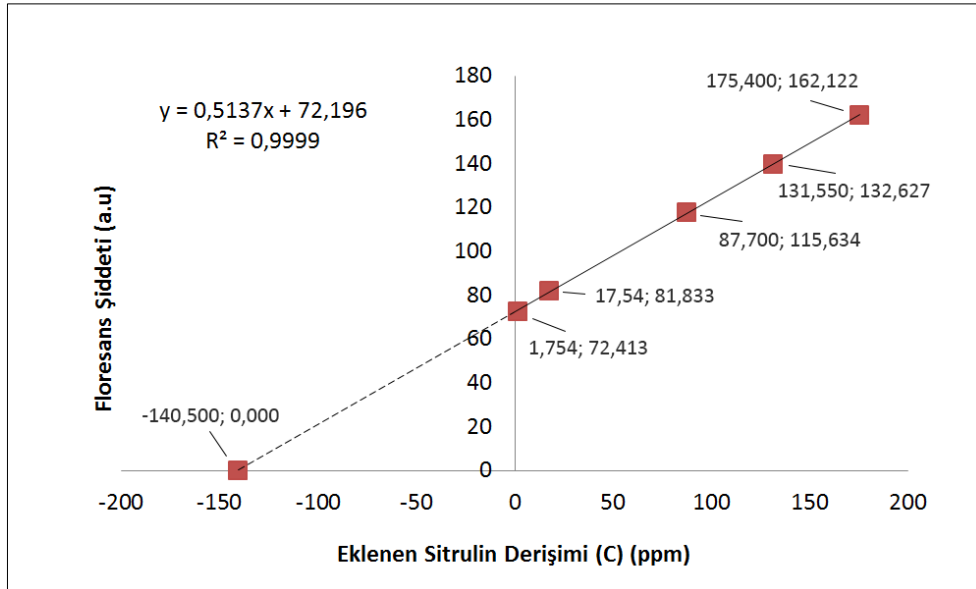
çözeltiler kullanılmış ve temsili numunedeki Anti-CCP miktarı ölçülmüştür. Bu amaçla; temsili numunenin modifiye polimerlerle etkileşimi gerçekleştirilmiş ve etkileşim sonucu floresans şiddetindeki değişiklik tespit edilmiştir. CNT yüzeyinde modifiye polimerlerle RA teşhisi için temsili numune ile yapılan etkileştirme sonucu floresans şiddeti 138,63 a.u olarak ölçülmüş, bu değer, Şekil 3.19'da yer alan eşitlikte yerine konulduğunda Anti-CCP derişimi 0,0363 ppm olarak hesaplanmıştır. Aynı temsili numune, Au NP yüzeyindeki modifiye polimerle de etkileştirilmiş, bu etkileşme sonucunda elde edilen floresans şiddeti ise 96,94 a.u. olarak ölçülmüş, bu değer, Şekil 3.27'de yer alan denklemde yerine konulduğunda ise Anti-CCP derişimi 0,0036 ppm olarak hesaplanmıştır.

Temsili numunelerle etkileştirme işlemi; Standart ekleme yöntemiyle de gerçekleştirilmiştir: MS hastalığı için sentezlenen CNT ve Au NP yüzeyinde baskılı polimerlerle temsili BOS numunesindeki sitrulin miktarı tayin edilmiştir. Standart ekleme yöntemi için, öncelikle temsili BOS numunesinin floresans değeri ölçülmüş; ardından farklı balon jojelere aynı miktarda alınan temsili BOS numunesi üzerine CNT baskılı polimerden ve farklı derişimdeki (1,75; 8,75; 17,5; 87,5; 175,0 ppm) standart sitrulin çözeltilerinden de eşit miktarda (1 mL) eklendikten sonra floresans şiddetleri ölçülmüştür. Ölçülen değerler grafiğe geçirilmiş, hem grafiğe ait denklemde hem de grafikte yer alan doğrunun kesim noktasından temsili BOS numunesindeki sitrulin değeri hesaplanmıştır (Şekil 3.38). Şekil 3.38.'da görülen grafiğe ait denklemde yararlanılarak temsili BOS numunesindeki sitrulin miktarı 134,37 ppm olarak bulunmuştur.



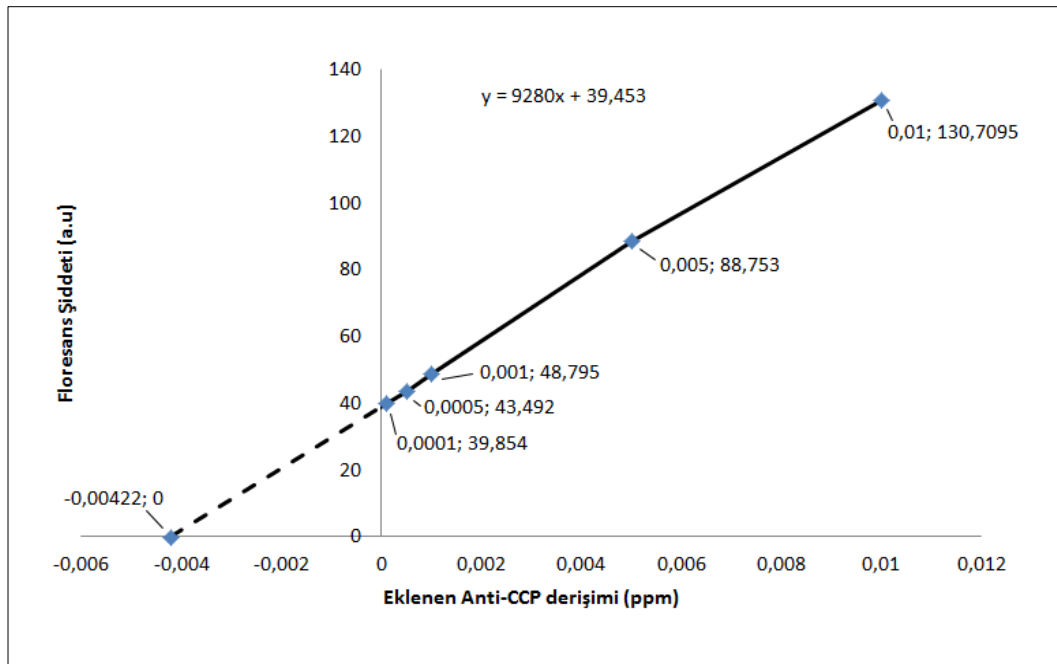
Şekil 3.38. Standart ekleme yöntemi kullanılarak CNT yüzeyinde baskılı polimerle temsili numunedeki sitrulin miktarının tayini

Aynı işlem Au NP yüzeyinde baskılı polimerlerle de tekrarlanmış, floresans değerleri grafiğe geçirildikten sonra, grafiğe ait denklemden temsili BOS numunesindeki sitrulin değeri 140,5 ppm olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.39).



Şekil 3.39. Standart ekleme yöntemi kullanılarak Au NP yüzeyinde baskılı polimerle temsili numunedeki sitrulin miktarının tayini

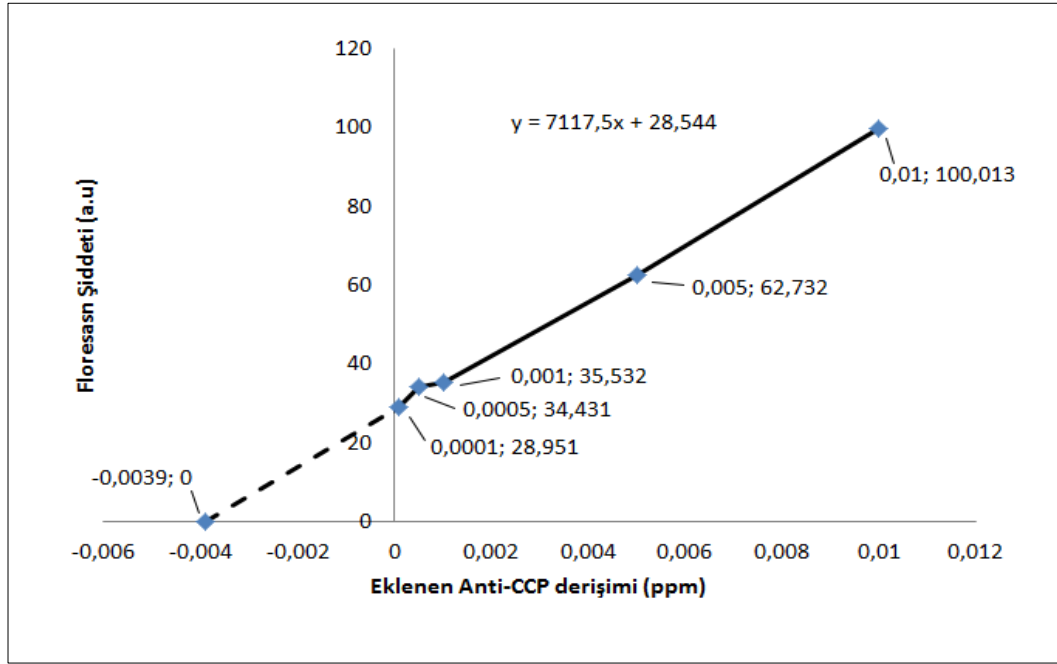
RA hastalığı için ise; standart ekleme yöntemi ile CNT ve Au NP yüzeyinde modifiye polimerlerle RA'lı temsili kan serumu örneği etkileştirilmiştir. CNT üzerinde modifiye polimerle yapılan işlem için öncelikle temsili kan serumu örneğinin floresans şiddeti ölçülmüş; daha sonra temsili kan serumundan eşit miktarda (500 µL) farklı balon jojelere alınmıştır. Temsili kan serumu üzerine farklı derişimlerde (0,0001; 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01ppm) standart Anti-CCP çözeltileri ve aynı miktarda (0,1 mg) polimer ilave edilerek floresans şiddetleri ölçülmüştür. Elde edilen floresans şiddetleri grafiğe geçirilmiş; grafiğe ait denklemden de temsili kan serumundaki Anti-CCP miktarı hesaplanmıştır (Şekil 3.40)



Şekil 3.40. Standart ekleme yöntemi kullanılarak CNT yüzeyinde modifiye polimerle temsili numunedeki Anti-CCP miktarının tayini

Şekil 3.40'da görülen grafikte yer alan denklemden yararlanılarak (y'ye 0 (sıfır) verildiğinde x eksenindeki kesim noktası numunedeki miktarı verir) $x = 4,22 \times 10^{-3}$ ppm olarak hesaplanmıştır.

Au NP yüzeyinde modifiye polimerle ise yine CNT yüzeyinde modifiye polimerle yapılan işlemlerin aynısı gerçekleştirilmiş, floresans şiddetleri ölçüldükten sonra değerler grafiğe geçirilmiştir. Yine grafiğe ait denklemden Anti-CCP miktarı hesaplanmıştır (Şekil 3.41). Şekil 3.41'de görülen grafikte yer alan denklemden yararlanılarak temsili kan serumundaki anti-CCP miktarının tayini $3,9 \times 10^{-3}$ ppm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.41. Standart ekleme yöntemi kullanılarak Au NP yüzeyinde modifiye polimerle temsili numunedeki Anti-CCP miktarının tayini

Elde edilen tüm veriler Çizelge 3.3'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.3. Temsili numunelerdeki analit miktarları

Sensör	CNT yüzeyinde modifiye sensör (RA) (Anti-CCP/ppm)	Au NP yüzeyinde modifiye sensör (RA) (AntiCCP/ppm)	CNT-MIP sensör (MS) (Sitrulin/ppm)	Au-MIP sensör (MS) (Sitrulin/ppm)
Kalibrasyon yöntemi ile bulunan miktar	0,0363	0,0036	136,9	138,54
Standart ekleme yöntemi ile bulunan miktar	0,0042	0,0039	134,37	140,5

4. TARTIŞMA, SONUÇLAR VE ÖNERİLER

RA ve MS hastalıkları dünyada yaygın görülen ve sebepleri tam olarak analiz edilememiş iki hastalıktır. Bu projede, RA ve MS hastalıklarının tanısında ortak özellikleri kullanılabilecek nanosensörü tek platformda birleştirmek hedeflenmiştir. RA ve MS hastalıklarına özgü biyobelirteçlerde bulunan antikor ve antijenlerde yer alan ortak molekül sitrulin aminoasididir. Bu aminoasit temel alınarak biyosensör oluşturmak bu tez çalışmasının ana hedefidir. Bu iki hastalığın ortak noktası sitrulin aminoasidi olduğu için sensör oluşturma basamakları bir noktaya kadar aynı gitmiş, bir noktadan sonra malzeme ikiye ayrılarak sensörlerin özgünlükleri oluşturulmuştur.

İlk aşamada; CNT ve Au NP'leri sensörün katı desteğini oluşturmaktadırlar. CNT ticari olarak temin edilirken, Au NP'ler Bölüm 2.2.2'de detaylı olarak açıklanan prosedüre göre sentezlenmiştir. Öncelikle CNT, karboksillenerek modifikasyona uygun hale getirilmiş, ardından (MAAP)₂-Tb(III) ile fonksiyonellendirilmiştir. Fonksiyonellendirmenin amacı; CNT yüzeyinde polimerizasyona fırsat veren bir yapının CNT'e bağlanmasıdır. Daha sonra yapıya sitrulin, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı eklenmiş ve UV ışık altında polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Buraya kadar olan kısım her iki sensör için de ortak kısımdır.

Bundan sonra malzeme ikiye ayrılmış ilk kısım MS ikinci kısım ise RA teşhisi için kullanılmıştır.

MS için sitrulin yapıdan uzaklaştırılarak sitrulin baskılı polimer elde edilmiş, böylelikle MS'de MBP'de deiminasyon sonucu oluşan sitrulinler kendilerine özgü kavitelere girerek floresans şiddetinde değişikliğe neden olmuşlardır. CNT ile yapılan polimerlere ait Langmuir, Scatchard ve Freundlich adsorpsiyon izotermi incelendiğinde Langmuir izotermi korelasyon katsayısının (0,992), Freundlich izotermi korelasyon katsayısından (0,9982) düşük olduğu hesaplanmıştır. Scatchard bağlanma izotermi ise sitrulinin yapıya biri kuvvetli biri daha zayıf olmak üzere 2 tabaka halinde bağlandığını düşündürmektedir. Bu sonuçtan yararlanılarak CNT yüzeyindeki MIP'ler tarafından sitrulin amino asidinin aktif merkezler tarafından tutulduğu ve oluşan tabakanın heterojen yapıda olduğu, başka bir deyişle Freundlich adsorpsiyon izotermine uygun olduğu görülmüştür. Freundlich bağlanma modeline göre CNT yüzeyinde sentezlenen baskılı polimer birbirine çok yakın bağlanma bölgelerine sahip olduğunu bundan dolayı da birden fazla tabakada bağlanmanın olduğunu düşündürmektedir. CNT yüzeyinde baskılı polimerlere ortam pH'ının etkisi incelendiğinde en yüksek bağlanmanın pH=6.00'da gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bunun nedeni sitrulin izoelektrik noktasının 5,91 olması olarak yorumlanmaktadır. CNT yüzeyinde baskılı polimerlerle sitrulin arasındaki bağlanma sıcaklık yükseldikçe artmaktadır. Ancak 40 °C'den sonra bağlanma daha az olma eğilimindedir. Bunun sebebinin bağlanmanın yüksek sıcaklıklara çıkıldıkça kararlı halde olabileceğini göstermektedir. CNT yüzeyinde baskılı polimerin 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrası adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim gözlenmemiştir. Ayrıca bu polimerlerin sitrulin desorpsiyon oranı % 95 olarak hesaplanmıştır.

RA hastalığı için ise; sitrulin yapıdan uzaklaştırılmadan elde edilen modifiye polimerin sensör olarak kullanılması hedeflenmiştir. RA'de ortaya çıkan anti-CCP otoantikorlarının sitrulin aminoasidine yüksek afinite göstermesinden faydalanılarak bir sensör elde edilmeye çalışılmıştır. Sensörün çalışma prensibi yine floresans şiddetine bağlıdır ve sitrulinin yapıya bağlanıp bağlanmadığı floresans şiddetlerindeki değişikliklerle tespit edilmektedir. CNT yüzeyinde

sentezlenen modifiye polimerler ile anti-CCP arasındaki bağlamaya ait bağlanma izotermi incelenmiş olup, Langmuir, Freundlich ve Scatchard bağlanma izotermine ait korelasyon katsayıları sırasıyla 0,9926, 0,9951 ve 0,9974 / 0,9105 olarak hesaplanmıştır. Korelasyon katsayılarından da anlaşılacağı gibi, Anti-CCP'nin modifiye polimerlere bağlanmasının heterojen yapıda olduğu, Scatchard izotermine ait korelasyon katsayılarından da bu heterojen bağlanmanın iki tabakadan oluştuğu anlaşılmaktadır. CNT yüzeyinde modifiye polimerlere ortam pH'ının etkisi incelendiğinde en yüksek bağlanmanın pH=10,50'de gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bunun nedeni Anti-CCP'nin izoelektrik noktasının 10,42 olması olarak yorumlanmaktadır. CNT yüzeyinde modifiye polimerlerle Anti-CCP arasındaki bağlanmanın sıcaklık yükseldikçe arttığı gözlenmiştir. CNT yüzeyinde baskılı polimerlere benzer şekilde 40 °C'den sonra da bağlanma devam etmiş ancak daha düşük sıcaklıklara göre daha az bağlanma gözlenmiştir. Bunun sebebinin CNT yüzeyinde sentezlenen modifiye polimerler ile Anti-CCP'nin yaptığı bağlanmanın kararlılığını koruduğunu düşündürmektedir. CNT yüzeyinde modifiye polimerin 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrası adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim gözlenmemiştir. Ayrıca bu polimerlerin sitrulini desorpsiyon oranı % 90 olarak hesaplanmıştır.

Bu işlemler her iki hastalık için de Au NP yüzeyinde sentezlenen modifiye ve baskılı polimerlerle de gerçekleştirilmiş, yukarıda bahsi geçen işlemler Au NP yüzeyinde sentezlenen modifiye ve baskılı polimerlere de uygulanmıştır. Fakat, Au NP'lere metal-şelat monomeri bağlanmadan önce MAC ile modifiye edilmiş, metal-şelat monomerinin yapıya kolaylıkla bağlanması sağlanmıştır. Aynı şekilde floresans temelli nanosensörler olan Au NP'ler literatürdekine benzer şekilde küçük boyutlu (10-20 nm) olarak sentezlenmiştir. Dolayısıyla, NP'lere ait avantajlı özellikler bu sensörlerde etkilerini göstermektedirler.

RA için; Langmuir, Freundlich ve Scatchard bağlanma izotermi incelendiğinde Langmuir izotermi korelasyon katsayısı 0,9637, Freundlich izotermi korelasyon katsayısı ise 0,9885, Scatchard izotermi korelasyon katsayısı ise 0,8147/0,8543 olarak hesaplanmıştır. Au yüzeyinde sentezlenen modifiye

polimerlerin, anti-CCP otoantikoru adsorplaması Freundlich adsorpsiyon izotermine uymaktadır. Bu da bağlanma bölgelerinin heterojen yapıda ve birden fazla tabakalı olduğunu düşündürmektedir. Scatchard bağlanma izoterminden de anlaşılacağı gibi 2 tabaka halinde bir bağlanma söz konusudur. Au yüzeyinde modifiye polimerlerin bağlanma etkinliklerinin pH ve sıcaklıkla olan değişimler incelenmiş ve Au yüzeyinde modifiye polimerler ile Anti-CCP arasındaki en yüksek bağlanmanın pH 10,50’de gerçekleştiği görülmüştür, CNT yüzeyinde modifiye polimerlerle olan bağlanmaya benzer şekilde olan bu bağlanma Anti-CCP’nin izoelektrik noktasının 10,42 olmasından kaynaklanmaktadır. Au yüzeyinde modifiye polimerlerle yapılan sıcaklık çalışmalarında polimer ile Anti-CCP arasındaki bağlanma sıcaklık yükseldikçe artmaktadır, ancak, 40 °C’den sonra yüksek bir artış gözlemlenmemiştir. Au yüzeyinde modifiye polimerin 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrası adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim olmadığı görülmüş olup, bu polimerlerin Anti-CCP desorpsiyon oranı % 91 olarak hesaplanmıştır.

Au NP yüzeyinde baskılı polimer ile MS için yapılan adsorpsiyon çalışmalarında; Langmuir izotermi korelasyon katsayısının 0,9993 ve Freundlich izotermi korelasyon katsayısının ise 0,9921 olduğu hesaplanmıştır. Bu durum; Au yüzeyindeki MIP'lere sitrulinin adsorpsiyonunun, Langmuir adsorpsiyon izotermine uyduğunu göstermiştir. Bu da bağlanma bölgelerinin tek tabakalı ve homojen olduğunu düşündürmektedir. Bunun anlamı, analit, homojen yüzeyi dengeye ulaşıncaya kadar doldurmakta, denge anında maksimum bağlanma gerçekleşmektedir. Au NP yüzeyindeki baskılı polimer tek tabakadan oluşmaktadır ve sitrulin bu yüzeye dengeye ulaşıncaya kadar bağlanır, dengeye ulaştığı anda maksimum bağlanmasını gerçekleştirmektedir. Scatchard bağlanma modeline bakıldığında ise iki doğrunun korelasyon katsayıları birbirine çok yakın olduğundan homojen fakat değerleri 1’den çok uzak olduğundan dolayı zayıf bağlanmaların olduğu görülmektedir. Au yüzeyinde baskılı polimerlerle de aynı koşullar altında bağlanmalarına ait veriler elde edilmiştir. Bu polimerler ile yapılan pH çalışmasında polimer ile sitrulin arasındaki en yüksek bağlanma pH 6 civarında gerçekleşmiştir. Bunun sebebi sitrulinin izoelektrik noktasının 5,91

olmasından kaynaklanmaktadır. Au yüzeyinde baskılı polimerin 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrası adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir değişim gözlemlenmemiş ve bu polimerlerin Anti-CCP desorpsiyon oranı % 94 olarak hesaplanmıştır.

Temsili numunelerle etkileştirme sonucunda floresans şiddetlerinden yararlanılarak numuneler içindeki sitrulin ve Anti-CCP ölçümleri gerçekleştirilmiştir. MS hastalarında MBP'deki argininler sitruline dönüşmektedir, bu nedenle, sitrulin tayininin baskılı polimerlerle seçici olarak gerçekleştirilmesiyle hastalığın teşhisinin yapılması öngörülmektedir. CNT ve Au yüzeyinde baskılı polimerlerle temsili BOS numunesindeki sitrulin tayini yapılabilmektedir. CNT yüzeyinde baskılı polimerle yapılan etkileşim sonucunda sitrulin derişimi 136,9 ppm iken, Au yüzeyinde baskılı polimerle yapılan etkileşim sonucunda sitrulin derişimi 138,54 ppm olarak hesaplanmıştır. Sağlıklı bir insan BOS'unda sitrulin miktarı $5,6 \times 10^{-6}$ M'dır ve MS hastalığında ise argininin sitruline dönüşmesi sonucunda sitrulin miktarı arttığından oran $1,42 \times 10^{-5}$ M'a yükselmektedir. Bu veriler doğrultusunda CNT ile yapılan nanosensörle daha gerçekçi sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla laboratuvar ortamında Au nanosensörle gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda daha düşük miktar tayinlerine inilebilecekken, temsili numune ile yapılan çalışma sonucunda CNT nanosensörün daha uygun olduğu görülmektedir. Bu durumun Au NP'lerin kendilerine ait floresans değerlerinin CNT'e ait floresans (ki CNT kendine ait floresansı yoktur) değerlerinden yüksek olması sonucun farklı çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir. Au NP'lerin var olan floresansının ölçüm sonuçlarına yardımcı olduğu ve floresans değerlerinin gözlenebilir sınırlarda ölçümü, floresans ölçülerek numunedeki analitin kolay bir şekilde bulunabileceği kanaatine varılmaktadır.

RA teşhisi için gerçek kan serumu ile yapılan çalışmalarda CNT ve Au yüzeyinde modifiye polimerler kullanılmış, serumdaki Anti-CCP miktarının tayini gerçekleştirilmiştir. CNT yüzeyindeki modifiye polimer ile yapılan etkileşim sonucunda Anti-CCP derişimi 0,0363 ppm olarak hesaplanmışken, Au NP'ler yüzeyindeki modifiye polimerle yapılan etkileşim sonucunda Anti-CCP derişimi

0,0036 ppm olarak hesaplanmıştır. Stok çözeltinin 110 ppm anti-CCP (3200 UmL^{-1}) olduğu gözönüne alındığında CNT nanosensör ile teşhis edilen 0,0363 ppm'lik değer doğru orantı ile $1,056 \text{ UmL}^{-1}$, Au nanosensör ile teşhis edilen değer ise 0,0036 ppm'lik değer yine doğru orantı ile $0,104 \text{ UmL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. RA teşhisi, $0,05 \text{ UmL}^{-1}$ 'den daha büyük değerler için konulduğundan; CNT yüzeyinde nanosensörle serumda $1,056 \text{ UmL}^{-1}$ anti-CCP, Au NP yüzeyinde nanosensörle serumda $0,104 \text{ UmL}^{-1}$ anti-CCP hesaplandığından her iki sensörle de hastalığın teşhisi gerçekleştirilebilmiştir.

Yöntemin doğruluğunu kanıtlamak adına 2. bir yöntem olan standart ekleme yöntemiyle de temsili numunelerdeki analit miktarları tespit edilmiştir. Temsili BOS numunesinde sitrulin tayini yapılırken, temsili RA'li kan serumunda Anti-CCP miktar tayini yapılmıştır. MS hastalığının teşhisi için yapılan CNT ve Au yüzeyinde sitrulin baskılı polimerlerle gerçekleştirilen çalışmada; CNT yüzeyinde baskılı polimer ile sitrulin miktarı $134,37 \text{ ppm}$, Au yüzeyinde baskılı polimerle ise $140,5 \text{ ppm}$ sitrulin miktarı olduğu hesaplanmıştır. Kalibrasyon doğrusu metodu ile CNT yüzeyinde polimer ile bulunan sitrulin miktarı $136,9 \text{ ppm}$ iken, standart ekleme yöntemi ile $134,37$ olarak bulunmuştur. Bu veriler ışığında yöntemin doğru çalıştığı sonucuna varılmaktadır. Ayrıca kalibrasyon doğrusu metodu ile Au yüzeyinde baskılı polimerle bulunan sitrulin miktarı $138,54 \text{ ppm}$ olarak, standart ekleme yöntemi ile temsili BOS numunesindeki sitrulin miktarı $140,5 \text{ ppm}$ hesaplanmıştır. Bu verilerden yola çıkılarak Au yüzeyinde sitrulin baskılama yönteminin doğru çalıştığı sonucuna varılmaktadır.

RA hastalığının teşhisinde ise temsili kan serumunda anti-CCP tayininin gerçekleştirilmesi CNT ve Au yüzeyinde sitrulin modifiye polimerle standart ekleme yöntemi ile gerçekleştirilmiş; anti-CCP miktarı CNT yüzeyinde modifiye polimer ile gerçekleştirildiğinde $0,0042 \text{ ppm}$ olarak hesaplanırken; Au yüzeyinde modifiye polimerle $0,0039 \text{ ppm}$ olarak hesaplanmıştır. Daha önceden yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında her iki sensörün de daha düşük tayin sınırına inildiği görülmektedir. Kastbom ve ark., 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada Anti-CCP miktarını ELISA yöntemiyle ölçmüşler ve 131 Uml^{-1} ($4,094 \text{ ppm}$) olarak bulmuşlardır (Kastbom, 2003). Lin ve ark., 2008 yılında yaptıkları

Çalışmada ise Anti-CCP miktarını ELISA yöntemiyle 117 Uml⁻¹ (3,625 ppm) olarak bulmuşlardır (Lin, 2008). Anti-CCP için tez kapsamında elde edilen sonuçlar, önceki yıllarda yapılan çalışmalarla kıyaslandığında oldukça düşük değerlerde gözlenebilmiştir.

Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda RA ve MS hastalıklarının tanısına yönelik spesifik biyobelirteçlerin varlığının tespit edilmesiyle hastalıkların erken dönemde tespiti mümkün olabilecektir. zerinde çalıştığımız bu sensörler de biraz daha modifiye edilerek daha duyarlı hale getirilecektir. Özellikle yapılan bu çalışmalar ışığında, RA için iki ayrı biyobelirtecini aynı platformda birleştirilerek çalışılabilir hale getirilmesi, hastalığın erken tanısı için daha duyarlı bir sensör oluşturma yönünde ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- Alekseev N. I., Arapov O. V., Belozarov I. M., Osipov Yu. G., Semenov K. N., Polovtsev S. V., Charykov N. A. ve Izotova S. G., (2005). " Formation of Carbon Nanostructures in Electrolytic Production of Alkali Metals". *Russian Journal of Applied Chemistry*, **8**, 12.
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O., 3rd, Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Bykerk, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M., Hobbs, K., Huizinga, T. W., Kavanaugh, A., Kay, J., Kvien, T. K., Laing, T., Mease, P., Menard, H. A., Moreland, L. W., Naden, R. L., Pincus, T., Smolen, J. S., Stanislawska-Biernat, E., Symmons, D., Tak, P. P., Upchurch, K. S., Vencovsky, J., Wolfe, F. ve Hawker, G. (2010). "2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative". *Arthritis Rheum* **62**, 2569-81.
- Alexander, C., Davidsonb, L., Hayes, W. (2003) "Imprinted polymers: artificial molecular recognition materials with applications in synthesis and catalysis". *Tetrahedron*, **59**, 2025–2057
- Altintas, Z., Kallempudi, S. S. ve Gurbuz, Y. (2014). "Gold Nanoparticle Modified Capacitive Sensor Platform for Multiple Marker Detection". *Talanta* **118**, 270-6.
- Amato, M. P., Ponziani, G., Rossi, F., Liedl, C. L., Stefanile, C. ve Rossi, L. (2001). "Quality of life in multiple sclerosis: the impact of depression, fatigue and disability". *Multiple Sclerosis* **7**, 340-344.
- Andersson, L.I. (2000) " Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field" *Journal of Chromatography B*, **745**, 3–13

- Ansell, R.J., Mosbach, K. (1997) "Molecularly imprinted polymers by suspension polymerisation in perfluorocarbon liquids, with emphasis on the influence of the porogenic solvent". *Journal of Chromatography A*, **787**, 55-66
- Archibald, R. M., (1944). "Determination of Citrulline and Allantoin and Demonstration of Citrulline in Blood Plasma". *J. Biol. Chem*, **156**, 121-142.
- Bahri, S., Zerrouk, N., Aussel, C., Moinard, C., Crenn, P., Curis, E., Chaumeil, J. C., Cynober, L. ve Sfar, S. (2013). "Citrulline: from metabolism to therapeutic use". *Nutrition* **29**, 479-84.
- Balasubramanian, K. ve Burghard, M. (2006). "Biosensors based on carbon nanotubes". *Anal Bioanal Chem* **385**, 452-68.
- Barash, O., Peled, N., Tisch, U., Bunn, P. A., Jr., Hirsch, F. R. ve Haick, H. (2012). "Classification of lung cancer histology by gold nanoparticle sensors". *Nanomedicine* **8**, 580-589.
- Barone, V., Hod, O. ve Scuseria, G.E., (2006), "Electronic Structure and Stability of Semiconducting Graphene Nanoribbons", *Nano Letters*, **6**,12, 2748-2754.
- Bassyouni, I. H., Ezzat, Y., Hamdy, S. ve Talaat, R. M. (2009). "Clinical significance of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in Egyptian patients with chronic hepatitis C virus genotype IV infection". *Clin Chem Lab Med* **47**, 842-7.
- Bates, I.R., Libich, D.S., Wood, D. D., Moscarello, M.A., Harauz, G. (2002) "An Arg=Lys → Gln mutant of recombinant murine myelin basic protein as a mimic of the deiminated form implicated in multiple sclerosis". *Protein Expression and Purification*, **25**, 330–341

- Benli, B., (2008), "Nanoteknoloji Ve Antik Çağlara Uzanan Killi Nanoyapılar", *Kibited*, **1(3)**, 143-162.
- Bizzaro, N., Mazzanti, G., Tonutti, E., Villalta, D. ve Tozzoli, R. (2001) "Diagnostic Accuracy of the Anti-Citrulline Antibody Assay for Rheumatoid Arthritis". *Clinical Chemistry* **47:6**, 1089–1093
- Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. ve Whyman, R. (1994). "Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid?Liquid system". *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 801.
- Brüggemann, O., Haupt, K., Ye, L., Yilmaz, E., Mosbach, K. (2000) " New configurations and applications of molecularly imprinted polymers". *Journal of Chromatography A*, **889**, 15–24
- Bunz, U. H. ve Rotello, V. M. (2010). "Gold nanoparticle-fluorophore complexes: sensitive and discerning "noses" for biosystems sensing". *Angew Chem Int Ed Engl* **49**, 3268-79.
- Cai, C. ve Chen, J. (2004). "Direct electron transfer of glucose oxidase promoted by carbon nanotubes". *Anal Biochem* **332**, 75-83.
- Cai, W., Gao, T., Hong, H. ve Sun, J., (2008), "Applications of Gold Nanoparticles in Cancer Nanotechnology", *Nanotechnology, Science and Applications*, **1**, 17-32.
- Candia, L., Marquez, J., Gonzalez, C., Santos, A. M., Londono, J., Valle, R., Zabaleta, J., Yaqub, Z. ve Espinoza, L. R. (2006). "Low frequency of anticyclic citrullinated peptide antibodies in psoriatic arthritis but not in cutaneous psoriasis". *J Clin Rheumatol* **12**, 226-9.
- Cantaert, T., De Rycke, L., Bongartz, T., Matteson, E. L., Tak, P. P., Nicholas, A. P. ve Baeten, D. (2006). "Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: crucial...but not sufficient!". *Arthritis Rheum* **54**, 3381-9.

- Castañeda, M. T., Alegret, S. ve Merkoçi, A. (2007). "Electrochemical Sensing of DNA Using Gold Nanoparticles". *Electroanalysis* **19**, 743-753.
- Chadefaux-Vekemans, B., Rabier, D., Chabli, A., Blanc, A., Aupetit, J., Bardet, J. ve Kamoun, P. (2002). "Improving the prenatal diagnosis of citrullinemia using citrulline/ornithine+arginine ratio in amniotic fluid". *Prenat Diagn* **22**, 456-8.
- Chen, P. C., Mwakwari, S. C., Oyelere, A. K., (2000), "Gold nanoparticles from Nanomedicine to Nanosensing", *Nanotechnology, Science and Applications*, **1**, 45-66.
- Chu, X., Duan, D., Shen, G. ve Yu, R. (2007). "Amperometric glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto covalently immobilized carbon nanotube electrode". *Talanta* **71**, 2040-7.
- Cirillo, G., Hampel, S., Puoci, F., Haase, D., Ritschel, M., Leonhardt, A., Iemma F. and Picci, N. (2012). Carbon Nanotubes – Imprinted Polymers: Hybrid Materials for Analytical Applications, Materials Science and Technology, Prof. Sabar Hutagalung (Ed.), ISBN: 978-953-51-0193-2, InTech, DOI: 10.5772/32066.
<http://www.intechopen.com/books/materials-science-and-technology/carbon-nanotubes-imprinted-polymers-hybrid-materials-for-analytical-applications>
- Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J. ve Wyatt, M. D. (2005). "Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity". *Small* **1**, 325-327.
- Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z. (2004) "Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation". *Journal of Chromatography B*, **804**, 173–182

- Crenn, P., Messing, B. ve Cynober, L. (2008). "Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction". *Clin Nutr* **27**, 328-39.
- De Rycke, L., Peene, I., Hoffman, I. E., Kruithof, E., Union, A., Meheus, L., Lebeer, K., Wyns, B., Vincent, C., Mielants, H., Boullart, L., Serre, G., Veys, E. M. ve De Keyser, F. (2004). "Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations". *Ann Rheum Dis* **63**, 1587-93.
- Derkuş, B., (2012), "*Anti-Miyelin Temelli Protein Tayini için İmpedimetrik İmmünoşansör Geliştirilmesi*", Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Diltemiz, S. E., (2006), "*DNA'yı Tanıma Bölgelerine Sahip Moleküler Baskılanmış Polimer Tekniğine Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi*", Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir
- Durai, M., Huang, M., Moudgil, K.D. (2009) "Self heat-shock protein 65-mediated regulation of autoimmune arthritis". *Journal of Autoimmunity*, **33**, 208–213
- Edelman, E. R., Seifert, P., Groothuis, A., Morss, A., Bornstein, D., Rogers, C., (2000), "Gold-Coated NIR Stents in Porcine Coronary Arteries", *Circulation*, 429-434.
- Ersöz, A., Denizli, A., Şener, İ., Atılır, A., Diltemiz, S. ve Say, R. (2004). "Removal of phenolic compounds with nitrophenol-imprinted polymer based on π - π and hydrogen-bonding interactions". *Separation and Purification Technology* **38**, 173-179.
- Feng, D., Wang, F. ve Chen, Z. (2009). "Electrochemical glucose sensor based on one-step construction of gold nanoparticle–chitosan composite film". *Sensors and Actuators B: Chemical* **138**, 539-544.

- Filho, P.Y., Bracht, A., Ishii-Iwamoto, E. L., Lousano, S. H., Bracht, L., ve Kelmer-Bracht, A. M., (2003). "The Urea Cycle in the Liver of Arthritic Rats". *Molecular and Cellular Biochemistry*, **243**, 97-103
- Fuchs, Y., Soppera, O., Haupt, K. (2012) " Photopolymerization and photostructuring of molecularly imprinted polymers for sensor applications—A review". *Analytica Chimica Acta* **717**, 7– 20
- Fukumori, Y., Ichikawa, H., (2005), "Nanoparticles for Cancer Therapy and Diagnosis", *Advanced Powder Technol.*, **17**, 1-28.
- Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K. ve Rotello, V. M. (2008). "Gold nanoparticles in delivery applications". *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 1307-15.
- Gibson, J. D., Khanal, B. P. ve Zubarev, E.R., (2007), "Paclitaxel-Functionalized Gold Nanoparticles", *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 11653-11661.
- Girbal-Neuhauser, E., Durieux, J. J., Arnaud, M., Dalbon, P., Sebbag, M., Vincent, C., Simon, M., Senshu, T., Masson-Bessière, C., Jolivet-Reynaud, C., Jolivet, M. ve Serre, G. (1999). "The Epitopes Targeted by the Rheumatoid Arthritis-Associated Antifilaggrin Autoantibodies are Posttranslationally Generated on Various Sites of (Pro)Filaggrin by Deimination of Arginine Residues". *J Immunol*, **162**, 585-594
- Gorji, N. E. ve Houshmand, M. (2013). "Carbon nanotubes application as buffer layer in Cu(In,Ga)Se₂ based thin film solar cells". *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **50**, 122-125.
- Gürmen, S., Ebin, B., "Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri -1", *Metalurji Dergisi*, TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası, **150**, 31-38, 2008.
- György, B., Tóth, E., Tarcsa, E., Falus, A., Buzás, E. I. (2006) "Citrullination: A posttranslational modification in health and disease" *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **38** 1662–1677

- Häberle, J., Boddaert, N., Burlina, A., Chakrapani, A., Dixon, M., Huemer, M., Karall, D., Martinelli, D., Crespo, P. S., Santer, R., Servais, A., Valayannopoulos, V., Lindner, M., Rubio, V. ve Dionisi-Vici, C., (2012). "Suggested Guidelines for the Diagnosis and Management of Urea Cycle Disorders". *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **7**, 32.
- Han, G., You, C. C., Kim, B. J., Turingan, R. S., Forbes, N. S., Martin, C. T. ve Rotello, V. M. (2006). "Light-regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles". *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 3165-3169.
- Harauz, G., Ishiyama, N., Hill, C.M.D., Bates, I.R., Libich, D.S., Fare`s, C. (2004) " Myelin basic protein—diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis" *Micron* **35**, 503–542
- Hayashi, A., Naseri, A., Pennesi, M. E. ve de Juan, E., Jr. (2009). "Subretinal delivery of immunoglobulin G with gold nanoparticles in the rabbit eye". *Jpn J Ophthalmol* **53**, 249-56.
- He, J.-L., Tian, Y.-F., Cao, Z., Zou, W. ve Sun, X. (2013). "An electrochemical immunosensor based on gold nanoparticle tags for picomolar detection of c-Myc oncoprotein". *Sensors and Actuators B: Chemical* **181**, 835-841.
- He, X., Liu, H., Li, Y., Wang, S., Li, Y., Wang, N., Xiao, J., Xu, X. ve Zhu, D. (2005). "Gold Nanoparticle-Based Fluorometric and Colorimetric Sensing of Copper(II) Ions". *Advanced Materials* **17**, 2811-2815.
- Heyland, D., Dhaliwal, R., Drover, J., Gramlich, L. ve Dodek, P. (2003). "Canadian clinical practice guidelines for nutrition support in mechanically ventilated, critically ill adult patients". *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **27**, 355-373.

- Hirsch, L. R., Gobin, A. M., Lowery, A. R., Tam, F., Dreze, R. A., Halas, N. J. ve West, J. L. (2006). "Metal nanoshells". *Ann Biomed Eng* **34**, 15-22.
- Holm, A., Rise, F., Sessler, N., Sollid, L. M., Undheim, K. ve Fleckenstein, B. (2006). "Specific modification of peptide-bound citrulline residues". *Anal Biochem* **352**, 68-76.
- Hong, R., Han, G., Fernandez, J. M., Kim, B. J., Forbes, N. S. ve Rotello, V. M., (2006), "Glutathione-Mediated Delivery and Release Using Monolayer Protected Nanoparticle Carriers", *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 1078-1079.
- Hornbaker, D. J., (2003) "Electronic Structure of Carbon Nanotube Systems Measured with Scanning Tunneling Microscopy", Department of Physics, University of Illinois. Urbana, Illinois, ABD.
- Hutter, E. ve Maysinger, D. (2013). "Gold-nanoparticle-based biosensors for detection of enzyme activity". *Trends Pharmacol Sci* **34**, 497-507.
- Iijima, S. (1991) "Helical microtubules of graphitic carbon" *Nature* **354**, 56 - 58
- Jacobs, C. B., Peairs, M. J. ve Venton, B. J. (2010). "Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules". *Anal Chim Acta* **662**, 105-27.
- Jena, B. K. ve Raj, C. R. (2006). "Enzyme-free amperometric sensing of glucose by using gold nanoparticles". *Chemistry* **12**, 2702-2708.
- Kaore, S. N. ve Kaore, N. M. (2014). "Citrulline". 883-905.
- Karatas, O. F., Sezgin, E., Aydin, O. ve Culha, M. (2009). "Interaction of gold nanoparticles with mitochondria". *Colloids Surf B Biointerfaces* **71**, 315-318.

- Kastbom, A., Strandberg, G., Lindroos, A., Skogh, T. (2004). "Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project)". *Ann Rheum Dis* **63**, 1085–1089.
- Katz, E. ve Willner, I. (2004). "Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics". *Chemphyschem* **5**, 1084-104.
- Kavaz, D., "Nanopartiküller", *Nanobülten Dergisi*, **13**, 12-19. 2011.
- Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., Schatz, G. C., (2003), "The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment", *J. Phys. Chem. B*, **107**, 668-677.
- Kempe, M., Mosbach, K. (1995a) " Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases" *Journal of Chromatography A*, **691**, 317-323
- Kempe, M., Mosbach, K. (1995b) " Molecular imprinting used for chiral separations" *Journal of Chromatography A*, **694**, 3-13
- Keyser, J., Schaaf, M., Teelken, A. (1999) "Peptidylarginine deiminase activity in postmortem white matter of patients with multiple sclerosis" *Neuroscience Letters* **260**, 74–76
- Khosla,P., Shankar, S., Duggal, L. (2004) "Anti-CCP Antibodies in Rheumatoid Arthritis" *J Indian Rheumatol Assoc.* **12**, 143 -146
- Klareskog, L., Malmstrom, V., Lundberg, K., Padyukov, L. ve Alfredsson, L. (2011). "Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis". *Semin Immunol* **23**, 92-8.
- Kroto, H. W. J., Heath, R., O'Brien, S. C., Curl, R. F., Smalley, R.E. (1985) " C60: Buckminsterfullerene" *Nature* **318**, 162 - 163

- Küçükıldırım, B. O., Akdoğan Eker, A., (2012), "Karbon Nanotüpler, Sentezleme Yöntemleri ve Kullanım Alanları". TMMOB MMO Mühendis ve Makina Dergisi, 53, 630,34-44.
- Lasagna-Reeves, C., Gonzalez-Romero, D., Barria, M. A., Olmedo, I., Clos, A., Sadagopa Ramanujam, V. M., Urayama, A., Vergara, L., Kogan, M. J. ve Soto, C. (2010). "Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice". Biochem Biophys Res Commun 393, 649-55.
- Lee, G., Kim, J., Yoon, J., Bae, J., Shin, B. C., Kim, S., Oh, W., Ree, M. (2008) "Structural characterization of carboxylated multi-walled carbon nanotubes" Thin Solid Films 516, 5781–5784
- Lee, H. Y. ve Kim, B. S. (2009). "Grafting of molecularly imprinted polymers on iniferter-modified carbon nanotube". Biosens Bioelectron 25, 587-91.
- Li, G. ve Liu, L. (2012). "Organic Solar Cells Enhanced by Carbon Nanotubes". 183-198.
- Li, J., Cao, Y., Liu, Q. ve Jiao, Q. (2006). "Determination of Urinary L-citrulline by Enzymatic Method". Chinese Journal of Analytical Chemistry 34, 379-381.
- Li, J., Liu, Q., Liu, Y., Liu, S. ve Yao, S. (2005). "DNA biosensor based on chitosan film doped with carbon nanotubes". Anal Biochem 346, 107-14.
- Li, K., Liu, G., Wu, Y., Hao, P., Zhou, W. ve Zhang, Z. (2014). "Gold nanoparticle amplified optical microfiber evanescent wave absorption biosensor for cancer biomarker detection in serum". Talanta 120, 419-424.
- Lim, S. H., Wei, J., Lin, J., Li, Q. ve Kuayou, J. (2005). "A glucose biosensor based on electrodeposition of palladium nanoparticles and glucose

- oxidase onto Nafion-solubilized carbon nanotube electrode". *Biosens Bioelectron* 20, 2341-6.
- Lima, I. ve Santiago, M. (2010). "Antibodies against cyclic citrullinated peptides in infectious diseases--a systematic review". *Clin Rheumatol* 29, 1345-51.
- Lima, I., Oliveira, R. C., Atta, A., Marchi, S., Barbosa, L., Reis, E., Reis, M. G. ve Santiago, M. B. (2013). "Antibodies to citrullinated peptides in tuberculosis". *Clin Rheumatol* 32, 685-7.
- Lin, Y., Lu, F., Tu, Y. ve Ren, Z. (2004). "Glucose Biosensors Based on Carbon Nanotube Nanoelectrode Ensembles". *American Chemical Society*, 4, 2.
- Liu, G. ve Lin, Y. (2006). "Amperometric glucose biosensor based on self-assembling glucose oxidase on carbon nanotubes". *Electrochemistry Communications* 8, 251-256.
- Lin, H., Lan, J., Chen,D., Chen,Y., Huang, W., Hsieh, T., Hsieh, C., Chen, H., (2008). "The diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis" *22*, 68-73
- Liu, J., Guan, Z., Lv, Z., Jiang, X., Yang, S., Chen, A. (2014) "Improving sensitivity of gold nanoparticle based fluorescence quenching and colorimetric aptasensor by using water resuspended gold nanoparticle" *Biosensors and Bioelectronics* 52, 265–270
- Luther, W., (2004), "Industrial Application of Nanomaterials-Chances and Risks", *Future Technologies*, 54.
- Mahalka, A.K., Kirkegaard, T., Jukola, L.T.I., Jäättelä, M., Kinnunen, P.K.J. (2014) "Human heat shock protein 70 (Hsp70) as a peripheral membrane protein" *Biochimica et Biophysica Acta* 1838, 5, 1344–1361

- Marcelletti, J. F. ve Nakamura, R. M. (2003). "Assessment of serological markers associated with rheumatoid arthritis". *Clinical and Applied Immunology Reviews* 4, 109-123.
- Martínez, E., Ramírez, D.F.H., Núñez-Álvarez, C.A., Cabiedes, J. (2011) "Citrullinated proteins in Rheumatoid Arthritis" *Reumatol Clin.* 7(1), 68–71
- Mayes, A.G., Mosbach, K. (1997) "Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry?" *Trends in analytical chemistry*, 16, 6
- McLaurin, J., Hafler, D.A., Antel, J.P. (1995) "Reactivity of normal T-cell lines to MBP isolated from normal and multiple sclerosis white matter" *Journal of the Neurological Sciences* 128, 205-211
- Meneguello, M. O., Mendonca, J. R., Lancha, A. H., Jr. ve Costa Rosa, L. F. (2003). "Effect of arginine, ornithine and citrulline supplementation upon performance and metabolism of trained rats". *Cell Biochem Funct* **21**, 85-91.
- Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Pérez, B., del Valle, M. ve Alegret, S. (2005). "New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes". *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24, 826-838.
- Miller, D. H., Weinshenker, B. G., Filippi, M., Banwell, B. L., Cohen, J. A., Freedman, M. S., Galetta, S. L., Hutchinson, M., Johnson, R. T., Kappos, L., Kira, J., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Montalban, X., Panitch, H., Richert, J. R., Reingold, S. C. ve Polman, C. H. (2008). "Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach". *Mult Scler* 14, 1157-74.
- Nienhuis, R. L. F. ve Mandema, E., (1964), "A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis - The Antiperinuclear Factor", *Ann. rheum.* 23, 302.

- Nijenhuis, S., Zendman, A.J.W., Vossenaar, E. R., Pruijn, G.J.M., vanVenrooij, W.J. (2004) "Autoantibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: clinical performance and biochemical aspects of an RA-specific marker" *Clinica Chimica Acta* 350, 17–34
- Oganov, A. R., Hemley, R. J., Hazen, R. M. ve Jones, A. P. (2013). "Structure, Bonding, and Mineralogy of Carbon at Extreme Conditions". *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 75, 47-77.
- Olivares Martínez, E., Hernández Ramírez, D. F., Núñez-Álvarez, C. A. ve Cabiedes, J. (2011). "Citrullinated proteins in Rheumatoid Arthritis". *Reumatología Clínica (English Edition)* 7, 68-71.
- Paciotti, G. F., Kingston, D. G. I. ve Tamarkin, L. (2006). "Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors". *Drug Development Research* 67, 47-54.
- Perezjuste, J., Pastorizasantos, I., Lizmarzan, L. ve Mulvaney, P. (2005). "Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications". *Coordination Chemistry Reviews* 249, 1870-1901.
- Pissuwan, D., Niidome, T. ve Cortie, M. B. (2011). "The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems". *J Control Release* 149, 65-71.
- Portakal O. (2008) *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]*; 33 (1) 35–38
- Qiao, Y., Li, C. M., Bao, S.-J. ve Bao, Q.-L. (2007). "Carbon nanotube/polyaniline composite as anode material for microbial fuel cells". *Journal of Power Sources* 170, 79-84.
- Raijmakers, R., Zendman, A. J., Egberts, W. V., Vossenaar, E. R., Raats, J., Soede-Huijbregts, C., Rutjes, F. P., van Veelen, P. A., Drijfhout, J. W. ve

- Pruijn, G. J. (2007). "Methylation of arginine residues interferes with citrullination by peptidylarginine deiminases in vitro". *J Mol Biol* 367, 1118-29.
- Rantapaa-Dahlqvist, S., de Jong, B. A., Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U. ve van Venrooij, W. J. (2003). "Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis". *Arthritis Rheum* 48, 2741-9.
- Raptopoulou, A., Sidiropoulos, P., Katsouraki, M. ve Boumpas D.T. (2007) "Anti-citrulline Antibodies in the Diagnosis and Prognosis of Rheumatoid Arthritis" *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 44(4), 339–363
- Romero, M. J. Platt, D. H., Caldwell, R. B., ve Caldwell, R. W., (2006), "Therapeutic Use of Citrulline in Cardiovascular Disease", *Cardiovascular Drug Reviews*, 24, 3-4, 275-290.
- Saito, R., Fujita, M., Dresselhaus, G. ve Dresselhaus, M.S., (1992), "Electronic Structure of Chiral Graphene Tubules", *Appl.Phys.Lett.*, 60, (18), 2204-2206.
- Sarikaya, Y.(1993), *Fizikokimya*, Gazi Büro Kitabevi, Ankara
- Say, R., Erdem, M., Ersöz, A., Türk, H., Denizli, A. (2005) "Biomimetic catalysis of an organophosphate by molecularly surface imprinted polymers" *Applied Catalysis A: General* 286, 221–225
- Say, R., Ersöz, A., Türk, H., Denizli, A. (2004) "Selective separation and preconcentration of cyanide by a column packed with cyanide-imprinted polymeric microbeads" *Separation and Purification Technology* 40, 9-14
- Schellekens, G. A., de Jong, B. A. W., van den Hoogen, F. A. J., van de Putte, L. B. A. ve van Venrooij, W. J., (1998), "Citrulline is an Essential Constituent of Antigenic Determinants Recognized by Rheumatoid

Arthritis-specific Autoantibodies", The American Society for Clinical Investigation, Inc. 101, 1, 273-281.

Sederberg, D., Allotropes of Carbon: It's All in the Way You're Put Together.
http://www.physics.purdue.edu/psas/instructional_materials.html

Sellergren ,B., Lepistoe, M., Mosbach, K. (1988) Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions. NMR and chromatographic studies on the nature of recognition, J. Am. Chem. Soc., 110 (17), 5853–5860

Sivaraman, S.K., Kumar, S., Santhanam, V. (2011) "Monodisperse sub-10 nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method – The role of chloroauric acid" Journal of Colloid and Interface Science 361, 543–547

Skoog,D., Enstrümantal analiz ilkeleri

Skrabalak, S. E., Chen, J., Sun, Y., Lu, X., Au, L., Cobley, C. M. ve Xia, Y. (2008). "Gold nanocages: synthesis, properties, and applications". Acc Chem Res 41, 1587-1595.

Sun, R. W., Ma, D. L., Wong, E. L. ve Che, C. M. (2007). "Some uses of transition metal complexes as anti-cancer and anti-HIV agents". Dalton Trans, 4884-4892.

Suzuki, A., Kochi, Y., Okada, Y., Yamamoto, K. (2011) "Insight from genome-wide association studies in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis" FEBS Letters 585, 3627–3632

Swihart, M. T.,(2003). "Vapor-phase synthesis of nanoparticles". Current Opinion in Colloid and Interface Science, 8, 127-133.

Takeda, K. ve Takemasa, T. (2013). "An Overview of Ornithine, Arginine and Citrulline in Exercise and Sports Nutrition". 423-431.

- Takeda, K., Machida, M., Kohara, A., Omi, N., Takemasa, T., (2011), "Effects of Citrulline Supplementation on Fatigue and Exercise Performance in Mice", *J Nutr Sci Vitaminol*, 57, 246-250.
- Takeuchi, T., Haginaka, J. (1999) "Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers" *Journal of Chromatography B*, 728, 1–20)
- Tan, G., Onur, M. A. ve SağLam, N. (2012). "Nano Gold and Biomedicine: Scientific Letter". *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 32, 499-506.
- Tang, H., Chen, J., Yao, S., Nie, L., Deng, G. ve Kuang, Y. (2004). "Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucose oxidase at platinum nanoparticle-modified carbon nanotube electrode". *Anal Biochem* 331, 89-97.
- Tedesco, A. , D'Agostino, D., Soriente, I., Amato, P., Piccoli, R., Sabatini P. (2009) "A new strategy for the early diagnosis of rheumatoid arthritis: A combined approach" *Autoimmunity Reviews* 8, 233–237
- Trojanowicz, M. (2006). "Analytical applications of carbon nanotubes: a review". *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 25, 480-489.
- Turkevich, J., Stevenson, P. C. ve Hillier, J., (1951), "A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold", *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55-75.
- Tutturen, A. E., Holm, A., Jorgensen, M., Stadtmuller, P., Rise, F. ve Fleckenstein, B. (2010). "A technique for the specific enrichment of citrulline-containing peptides". *Anal Biochem* 403, 43-51.
- van de Poll, M. C., Ligthart-Melis, G. C., Boelens, P. G., Deutz, N. E., van Leeuwen, P. A. ve Dejong, C. H. (2007). "Intestinal and hepatic

- metabolism of glutamine and citrulline in humans". *J Physiol* 581, 819-27.
- Vossenaar, E. R. ve van Venrooij, W. J. (2004a). "Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) rheumatoid arthritis". *Clinical and Applied Immunology Reviews* 4, 239-262.
- Vossenaar, E. R., Smeets, T. J., Kraan, M. C., Raats, J. M., van Venrooij, W. J. ve Tak, P. P. (2004b). "The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue". *Arthritis Rheum* **50**, 3485-94.
- Wang, J. (2005). "Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review". *Electroanalysis* **17**, 7-14.
- Wang, J. ve Musameh, M. (2005). "Carbon-nanotubes doped polypyrrole glucose biosensor". *Analytica Chimica Acta* 539, 209-213.
- Wang, Z. H., Choi, C. J. Kim, B. K., Kim J. C. and Zhang Z. D. (2003). "Microstructure and magnetic property of Fe-Co nanoparticles prepared by chemical vapor condensation process", *J. of All. And Comp.*, **351**, 319-323.
- Wauven, C.V., Stalon, V., (1985), "Occurrence of Succinyl Derivatives in the Catabolism of Arginine in *Pseudomonas Cepacia*", *J. Bacteriol*, **164 (2)**, 882.
- Wilddöer, J. W. G., Venema, L. C., Rinzler, A. G., Smalley, R. E. ve Dekker, C., (1998), "Electronic Structure of Atomically Resolved Carbon Nanotubes", *Nature*, **391**, 59-62.
- Wu, G., (1998). "Intestinal Mucosal Amino Acid Catabolism". Departments of Animal Science, Medical Physiology, and Veterinary Anatomy and Public Health, and Faculty of Nutrition, Texas A&M University, College Station, Texas.

- Wulff, G. (1993) "Biorecognition in Molecularly Imprinted Polymers" *Molecular Interactions in Bioseparations*, 363-381
- Wulff, G. Knorr, K. (2001) "Stoichiometric noncovalent interaction in molecular imprinting" *Bioseparation* ,**10, 6**, 257-276
- Xu, Z. W., Fang, F.Z. ve Dong, S. (2011). "Carbon Nanotube AFM Probe Technology". *Electronic Properties of Carbon Nanotubes*, ISBN: 978-953-307-499-3
- Xuan, J., Jia, X. D., Jiang, L. P., Abdel-Halim, E. S. ve Zhu, J. J. (2012). "Gold nanoparticle-assembled capsules and their application as hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin". *Bioelectrochemistry* **84**, 32-37.
- Xue, C., Han, Q., Wang, Y., Wu, J., Wen, T., Wang, R., Hong, J., Zhou, X. ve Jiang, H. (2013). "Amperometric detection of dopamine in human serum by electrochemical sensor based on gold nanoparticles doped molecularly imprinted polymers". *Biosens Bioelectron* **49**, 199-203.
- Yamada, R.(2005) "Peptidylarginine deiminase type 4, anticitrullinated peptide antibodies, and rheumatoid arthritis" *Autoimmunity Reviews* **4**, 201– 206
- Yamada, R., Suzuki, A., Chang, X. ve Yamamoto, K. (2003). "Peptidylarginine deiminase type 4: identification of a rheumatoid arthritis-susceptible gene". *Trends in Molecular Medicine* **9**, 503-508.
- Yan, J., Uddin, M. J., Dickens, T. J. ve Okoli, O. I. (2013). "Carbon nanotubes (CNTs) enrich the solar cells". *Solar Energy* **96**, 239-252.
- Yang, M., Yang, Y., Liu, Y., Shen, G. ve Yu, R. (2006). "Platinum nanoparticles-doped sol-gel/carbon nanotubes composite electrochemical sensors and biosensors". *Biosens Bioelectron* **21**, 1125-31.

- Yavuz, H., Say, R. ve Denizli, A. (2005). "Iron removal from human plasma based on molecular recognition using imprinted beads". *Materials Science and Engineering: C* **25**, 521-528.
- Young, B. J. J., Mallya, R. K., Leslie, R. D. G., Clark, C. J. M., Hamblin, T. J., (1979), "Anti-Keratin Antibodies in Rheumatoid Arthritis", *British Medical Journal*, **2**, 97-99.
- Yoshimura, M., Byrappa, K. (2008) "Hydrothermal Technology Past, Present and Future" *Journal of Material Science*, **43**, 2085-2103.
- Yu, X., Yi, B., Wang, X. (2008) "Quantitative structure–property relationships for the reactivity parameters of acrylate monomers" *European Polymer Journal* **44**, **12**, 3997–4001
- Zaki, A. Processing and Synthesis Techniques for the Preparation of Nanomaterials. <[http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID= 1710](http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=1710)>. Erisim 25.06.2014
- Zhang, M., Smith, A., ve Gorski, W. (2004). "Carbon Nanotube-Chitosan System for Electrochemical Sensing Based on Dehydrogenase Enzymes". *Anal. Chem.* **76**, 5045-5050.
- Zhao, P., Li, N., Astruc, D. (2013) "State of the art in gold nanoparticle synthesis" *Coordination Chemistry Reviews* **257**, 638– 665