

**NÜKLEOTİD SAFLAŞTIRILMASI İÇİN BASKILANMIŞ
MANYETİK POLİ(HİDROKSİETİL METAKRİLAT)
(MPHEMA) NANOKÜRELER**

**IMPRINTED MAGNETIC POLY(HYDROXYETHYL
METHACRYLATE) (MPHEMA) NANOSPHERES FOR
NUCLEOTIDE PURIFICATION**

EMİNE ÖNGÜN

PROF. DR. HANDAN YAVUZ ALAGÖZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

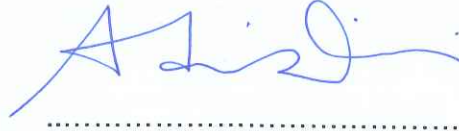
olarak hazırlanmıştır.

2019

EMİNE ÖNGÜN'nün hazırladığı "Nükleotid Saflaştırılması İçin Baskılanmış Manyetik Poli(Hidroksietil Metakrilat) (mPHEMA) Nanoküreler" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan



Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Danışman



Doç. Dr. Fatma YILMAZ

Üye



Doç. Dr. Nilay BERELİ

Üye



Doç. Dr. Deniz TÜRKMEN

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak / / tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Defne Vera'ya...

ETİK

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

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

beyan ederim.

18 / 06 / 2019



EMİNE ÖNGÜN

YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- ☐ Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

18 / 06 / 2019

(İmza)

EMİNE ÖNGÜN



ÖZET

NÜKLEOTİD SAFLAŞTIRILMASI İÇİN BASKILANMIŞ MANYETİK POLİ(HİDROKSİETİL METAKRİLAT) (MPHEMA) NANOKÜRELER

Emine ÖNGÜN

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Haziran 2019, 117 sayfa

Nükleozidler ve nükleotidler, biyosentetik yolların bir parçası oldukları ve biyolojik düzenleyiciler olarak önemli bir rol oynadıkları için metabolik fonksiyonlara katılırlar. Nükleotidler çeşitli biçimlerde, hücre büyümesi ve enerji metabolizması, genetik iletim ve sinyal iletimi üzerinde önemli rol oynarlar. Nükleotidler, ya nükleozid 5p-fosfatlar olarak ya da 3p,5'-siklik adenosin monofosfat (AMP), guanosin tetraposfat (ppGpp) ve 3p,5'-siklik diGMP gibi modifiye edilmiş nükleotidler şeklinde metabolik sinyal molekülleri olarak işlev görürler. Nükleotidlerin her biri için sentetik reseptörler hazırlanması konusunda literatürde farklı çalışmalar mevcuttur. Ancak yapay reseptör tasarlama işlemleri genellikle karmaşık ve zordur. Bu yöntemlere alternatif olarak moleküler baskılama tekniği hızlı, basit ve seçici polimerik reseptörler hazırlama olanağı sağlamaktadır. MIP'ler, seçilen hedef moleküllere karşı yüksek seçicilik sağlayan özel moleküler tanıma yeteneklerine sahip sentetik polimerik malzemelerdir.

Bu tez kapsamında, nanoteknolojinin nükleotid saflaştırma alanındaki rolünün bir incelemesi sunulmaktadır. Moleküler baskılama yöntemi kullanılarak sitidin saflaştırılması için Fe_3O_4 (manyetit) varlığında manyetik 2-hidroksietil metakrilat (mPHEMA) nanoküreler miniemülsiyon polimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH), sitidin baskılanmış

nanokürelerin (MIP) hazırlanmasında fonksiyonel monomer olarak seçilmiştir. MAH ve Cu(II) arasında koordinasyon kompleksi oluşumu sağlanarak hazırlanan MAH-Cu(II) kompleksine kalıp molekül Cyt eklenerek ön-kompleks hazırlanmıştır. Kalıp molekül olmaksızın baskılanmamış (NIP) mPHEMA aynı yöntemle hazırlanmıştır.

Hazırlanan nanokürelerin karakterizasyon çalışmaları; boyut analizi için Nano Zeta Sizer ve yüzey alanı ölçümleri Brunauer Emmet Teller (BET) yöntemi ile, polimerlerin yapı analizi için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisiyle (FTIR), yüzey morfolojisi için taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) ve polimerik yapıdaki manyetik özelliğin belirlenmesi için elektron spin rezonans (ESR) spektrometresi kullanılarak yapılmıştır.

Karakterizasyon çalışmaları sonrasında, Cyt nükleotidi baskılanmış nanokürelerin sulu çözeltilerde maksimum adsorpsiyon koşullarını belirlemek için başlangıç derişimi, pH, sıcaklık, zamana bağlı değişim ve iyonik şiddet parametreleri incelenmiştir. Cyt baskılanmış nanokürelerin seçiciliğinin belirlenmesi için üridin (Üri) ve timidin (Tym) yarışmacı nükleotidleri ile seçicilik deneyleri gerçekleştirilmiştir. Cyt baskılanmış nanokürelerin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı nanoküreler kullanılarak 10 kez tekrar edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada metal koordinasyon ve moleküler baskılama tekniğinin birleştirilmesiyle sentezlenen Cyt baskılanmış manyetik nanoküreler Cyt'nin yüksek seçicilikle tanınması için oldukça etkin bir malzeme olarak başarılı bir şekilde sentezlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nükleotid saflaştırma, Manyetik nanoküre, PHEMA, Moleküler baskılanmış polimerler, Sitidin.

ABSTRACT

IMPRINTED MAGNETIC POLY(HYDROXYETHYL METHACRYLATE) (MPHEMA) NANOSPHERES FOR NUCLEOTIDE PURIFICATION

Emine ÖNGÜN

Master of Science, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

June 2019, 117 pages

Nucleotides and nucleosides participate in other metabolic functions because they are part of the biosynthetic pathways and play an important role as biological regulators. Nucleotides in various forms play an important role in cell growth and energy metabolism, genetic transmission and signal transduction. The nucleotides serve as either nucleoside 5p-phosphates or as metabolic signaling molecules in the form of modified nucleotides such as 3p, 5'-cyclic adenosine monophosphate (AMP), guanosine tetraphosphate (ppGpp) and 3p, 5'-cyclic diGMP. There are different studies in the literature on the preparation of synthetic receptors for each of the nucleotides. However, the process of designing artificial receptors is often complex and difficult. As an alternative to these methods, the molecular suppression technique allows the preparation of fast, simple and selective polymeric receptors. MIPs are synthetic polymeric materials with specific molecular recognition capabilities that provide high selectivity to selected target molecules.

In this thesis, a review of the role of nanotechnology in nucleotide purification is presented. Magnetic 2-hydroxyethyl methacrylate (mPHEMA) nanospheres were synthesized by miniemulsion polymerization method in the presence of Fe₃O₄ (magnetite) for cytidine purification using molecular suppression method. N-

methacryloyl-(L)-histidine methyl ester (MAH) was selected as the functional monomer in the preparation of Cyt-imprinted nanospheres (MIP). MAH and Cu(II) prepared by providing coordination between the complex formation MAH-Cu(II) complex to pre-complex by adding Cyt target molecule is prepared. The unpressured (NIP) mPHEMA without the target molecule was prepared by the same method. Characterization studies of prepared nanospheres were performed by using; Nono Zeta Sizer for size analysis, Brunauer Emmet Teller (BET) method for surface area measurement, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for structural analysis of polymers, scanning electron microscopy (SEM) for surface morphology and electron spin resonance (ESR) spectroscopy for determination of magnetic properties of polymeric structures.

After characterization studies, initial concentration, pH, temperature, time dependent change and ionic strength parameters of Cyt nucleotide suppressed nanospheres were investigated to determine the maximum adsorption conditions in aqueous solutions. Selectivity experiments with uridine (Uri) and thymidine (Tym) competitor nucleotides were performed to determine the selectivity of Cyt-imprinted nanospheres. In order to determine the reusability of Cyt-imprinted nanospheres, the adsorption-desorption process was repeated 10 times using the same nanospheres.

As a result, in this study, Cyt imprinted magnetic nanospheres synthesized by combining metal coordination and molecular imprinting technique have been successfully synthesized as a highly effective material for high selectivity recognition of Cyt.

Keywords: Nucleotide purification, Magnetic nanospheres, PHEMA, Molecular imprinting polymers, Cytidine.

TEŞEKKÜR

Bu tezi başarıyla gerçekleştirebileceğime inanan ve tüm sorularıma ve endişelerime sabırla ve özenle cevap vererek bana kılavuz olan, ilgisini ve desteğini esirgemeyen, sonsuz saygı duyduğum sayın hocam Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye,

Çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, her zaman güler yüzü ve anlayışlı yaklaşımıyla yanımda olan tecrübelerinden yararlandığım sayın danışman hocam Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e,

Tezimin ilk aşamasından son aşamasına kadar yanımda olan, tüm sorunlarımı sabırla dinleyerek çözüm bulan, yeri geldiğinde hocam yeri geldiğinde arkadaşım olarak beni yalnız bırakmayan, olağan üstü fedakarlıklar gösteren, mükemmel bir akademisyen olduğuna inandığım şahane insan Semra Akgönüllü'ye,

Yardım ve tecrübesi ile laboratuvar çalışmalarımı kolaylaştıran Bioreg üyeleri ve çalışanlarına,

Her zaman yanımda olan, desteklerini her daim hissettiren arkadaşlarım Serap Arabacı Anul'a ve İpek Çakal'a,

Lisans ve yüksek lisans eğitimimin tüm aşamalarına şahit olan, bana olan desteğini her adımda daha çok hissettiren ve bu süreci tamamlamam için beni motive eden eşim Görkem Öngün'e,

Hayatım boyunca bana öğrettiklerinin ve fedakarlıklarının yanında, her türlü desteği sağlayan annem Nilüfer Hüseyinağaoğlu'na, babam Mehmet Uğur Hüseyinağaoğlu'na, kardeşlerim Mahperi Tinar, Emir Tinar, Gamze Hüseyinağaoğlu, Fatih Cihan Hüseyinağaoğlu'na,

Ve benim için kelimelerle anlatamayacağım kadar özel olan minik Vera'ma,

Sonsuz teşekkürlerimle...

Emine ÖNGÜN

Haziran 2019, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÇİZELGELER	ix
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi	4
2.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri	6
2.2.1. Kovalent Baskılama Yöntemi.....	6
2.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama Yöntemi	7
2.2.3. Yarı-Kovalent Baskılama Yöntemi	9
2.3. Metal Şelat Etkileşimleri	10
2.4. Baskılamayı Etkileyen Faktörler	11
2.4.1. Kalıp Moleküller.....	11
2.4.2. Fonksiyonel Monomer	12
2.4.3. Çapraz Bağlayıcı	13
2.4.4. Porojen Çözücüler.....	14
2.5. Polimerizasyon Sentez Teknikleri.....	15
2.5.1. Emülsiyon Polimerizasyonu.....	15
2.6. Nanoküreler ve Manyetik Nanoküreler	20
2.6.1. Manyetik Nanokürelerin Sentezi	23
2.7. Nükleotidler ve Sitidin	26
2.7.1. Nükleik Asitlerin Bileşenleri	29
2.7.2. Nükleotidlerin Biyosentezi	30
2.8. Sitidin Nükleotidlerin Sentezi	33
4. DENEYSEL YÖNTEMLER.....	36
3.1. Kimyasal Malzemeler	36
3.2. PHEMA Manyetik Nanokürelerin Sentezi	36
3.3. N-metakriloil-(L)-Histidin Metil Ester (MAH) Monomerinin Sentezi	38

3.4. MAH-Cu(II) Kompleksinin Hazırlanması	38
3.5. Sitidin Baskılanmış (Cyt-MIP) manyetik nanokürelerin hazırlanması	39
3.6. Kalıp Molekülün (Sitidin) Uzaklaştırılması	39
3.7. Nanokürelerin Karakterizasyon Çalışmaları	39
3.7.1. Zeta Size ile Boyut Analizi	39
3.7.2. Yüzey Alanı Analizi	40
3.7.3. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi	40
3.7.4. FTIR Çalışmaları	40
3.7.5. Elektron Spin Rezonans (ESR) Spektrometresi İle Manyetik Analiz	
41	
3.8. Adsorpsiyon Çalışmaları	41
3.9. Seçicilik Deneyleri	42
3.10. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	42
5. SONUÇLAR	44
4.1. Nanokürelerin Karakterizasyonu	44
4.1.1. Zeta Boyut Analizi	44
4.1.2. Yüzey Alanı Analizi	47
4.1.3. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi	47
4.1.4. Taramalı Elektron Mikroskopi Analizi (Screening Electron	
Microscopy, SEM)	49
4.1.5. Manyetik Analiz	52
4.2. Adsorpsiyon Çalışmaları	54
4.2.1. Sulu Çözeltilerden Sitidin Adsorpsiyonu	54
4.2.1.1. pH'nın Etkisi	59
4.2.1.2. Sitidin Başlangıç Derişimlerinin Etkisi	60
4.2.1.3. Sıcaklığın Etkisi	61
4.2.1.4. Tuz Tipinin Etkisi	62
4.2.1.5. Adsorpsiyon Zamanı	64
4.2.2. Adsorpsiyon İzotermi	64
4.2.3. Adsorpsiyon Kinetiği	69
4.5. Seçicilik Deneyleri	71
4.6. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	74
6. YORUM	76

6. KAYNAKLAR	80
--------------------	----



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. İşlevselliğine göre sınıflandırılmış, moleküler baskılamada en sık kullanılan fonksiyonel monomerler [26].	12
Çizelge 3.1. Nanoküre sentezi oranları.	37
Çizelge 4.1. Farklı sentezlere ait manyetit partiküllerin boyut değerleri.	45
Çizelge 4.2. Cyt- MIP, NIP ve boş nanokürelere ait çap değeri ve boy dağılımı sonuçları.	46
Çizelge 4. 3. Cyt baskılanmış ve baskılanmamış nanokürelerin yüzey alanları.	47
Çizelge 4.4. Langmuir ve Freundlich sabitleri.	68
Çizelge 4.5. Sitidin baskılanmış mPHEMA nanoküreler için birinci ve ikinci derece kinetik verileri.	70
Çizelge 4.6. Nükleotidlerin bazı yapısal özellikleri.	72
Çizelge 4.7. Cyt baskılanmış ve baskılanmamış manyetik nanoküreler için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.	73

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Moleküler baskılama prensibinin şematik gösterimi a: Fonksiyonel monomerler, b: çapraz bağlayıcı, c: kalıp molekül; 1: ön polimerizasyon kompleksinin montajı, 2: polimerizasyon, 3: baskılanmış molekülün uzaklaştırılması (desorpsiyon), 4: yeniden bağlanma [16].	6
Şekil 2.2. Kovalent olmayan baskılama yaklaşımı kullanılarak moleküler olarak baskılanmış polimer hazırlama ilkesinin şematik gösterimi [22].	8
Şekil 2.3. Bir MIP'nin sentezi, tanınması ve ayrılmasının şematik gösterimi.	9
Şekil 2.4. Moleküler baskılama ile ilgili son on yılda (2009- 2019) yapılan yayın sayıları [37].	17
Şekil 2.5. (a) Üretim kategorilerine, (b) bölgelere göre ürünlerin dağılımı (30 Ülke) [39].	19
Şekil 2.6. Manyetit partikül oluşumunun reaksiyon mekanizmasını bir baz ilavesiyle bir sulu demir ve demir klorür karışımından gösterimi [40].	24
Şekil 2.7. MMIP'lerin şematik hazırlama protokolü [11, 16].	25
Şekil 2.8. Nükleotidlerin kimyasal yapıları [67].	30
Şekil 2.9. Nükleotid metabolizması.	32
Şekil 2.10. CTP sentezinin gösterimi.	33
Şekil 2.11. Kennedy yolu üzerinden fosfatidilkolin (PC) biyosentezi.	34
Şekil 3.1. mPHEMA nanokürelerin hazırlanmasında kullanılan miniemülsiyon polimerizasyon düzeneğinin şematik gösterimi.	37
Şekil 3.2. MAH monomerinin sentez tepkimesi [73].	38
Şekil 4.1. Cyt-MIP nanokürelerin 41.49 nm çapındaki çap ve boy dağılımını veren Zeta boyut dağılımı grafiği.	44
Şekil 4.2. NIP nanokürelerin 51.87 nm çapındaki çap ve boy dağılımını veren Zeta boyut dağılımı grafiği.	45
Şekil 4.3. Boş nanokürelerin 72.44 nm çapındaki çap ve boy dağılımını veren Zeta boyut dağılımı grafiği.	46
Şekil 4.4. (a) ve (b); (3A) MagNPs, (3B) Cyt-NIP ve (3C) Cyt-MIP nanokürelerine ait FTIR spektrumları.	48

Şekil 4.5. NIP (a), (b) ve MIP (c), (d) nanokürelerinin SEM görüntüleri.	51
Şekil 4.6. Cyt-MIP nanokürelerin ESR spektrumu.	52
Şekil 4.7. NIP nanokürelerin ESR spektrumu.	53
Şekil 4.8. Boş nanokürelerin ESR spektrumu.	53
Şekil 4.9. Cyt- MIP sentezlenmiş manyetik nanokürelerle uzaklaştırma sistemi.	55
Şekil 4.10. (a) Adsorpsiyon çözeltisi, (b) manyetik alanda adsorpsiyon çözeltisi; (c), (d) ve (e) manyetik sistem deney düzeneğinde adsorpsiyon çözeltileri ve manyetik partiküllerin optik görüntüleri.	57
Şekil 4.11. Manyetik alanda adsorpsiyon çözeltisinden ayrılan nanokürelerin görünümü.	58
Şekil 4.12. Sitidin molekülü kalibrasyon grafiği.	58
Şekil 4.13. Sitidin adsorpsiyonuna pH'nın etkisi: Cyt derişimi: 1.0 mg/mL, çözelti: 5.0 mM, 5.0 mL, adsorpsiyon süresi: 2 saat, T: 25°C.	60
Şekil 4.14. Sitidin derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi; pH: 7.4, T: 25°C, zaman: 120 dk.	61
Şekil 4.15. Cyt adsorpsiyon kapasitesine sıcaklığın etkisi; Cyt derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7.4; zaman: 120 dk.	62
Şekil 4.16. Sitidin adsorpsiyon kapasitesine farklı tuzların etkisi; Cyt derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7.4; zaman: 120 dk.	63
Şekil 4.17. Sitidin adsorpsiyon zamanı.	64
Şekil 4.18. Sitidin için Langmuir adsorpsiyon izotermi.	66
Şekil 4.19. Sitidin için Freundlich adsorpsiyonu izotermi.	67
Şekil 4.20. Sitidin baskılanmış nanokürelere ait deneysel adsorpsiyon kapasitesi ile Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılması. .	68
Şekil 4.21. Sitidin baskılanmış mPHEMA nanoküreler için yalancı-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.	70
Şekil 4.22. Cyt baskılanmış mPHEMA nanoküreler için yalancı ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.	71
Şekil 4.23. Sitidin baskılanmış ve baskılanmamış nanokürelere aynı derişimlerdeki yarışmacı nükleotidlerin adsorplanan madde miktarları (mg/g). Adsorpsiyon koşulları; pH: 7.4 çözelti hacmi: 1.5 mL, T: 25°C, adsorpsiyon süresi: 2 h.	72

Şekil 4.24. Sitidin baskılanmış nanokürelerin tekrarlanabilirliği. Adsorpsiyon koşulları; pH: 7.4 çözelti hacmi: 1.5 mL, T: 25°C, adsorpsiyon süresi: 2 h.75



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C :	Analit derişimi
Cu :	Bakır
Fe :	Demir
Ka :	Bağlanma sabiti
N :	1 mL süspansiyondaki nanopartikül sayısı
S :	% katı
d :	Çap
ps :	Polimer yoğunluğunu
Q :	Adsroplanan madde miktarı
ppb :	Parts per Billion
Kd :	Dağılma katsayısını
Ci :	Başlangıç derişimi
Cf :	Sonuç derişimi
V :	Kullanılan çözelti hacmini
m :	Kullanılan nanopartiküllerin ağırlılığını
k :	Seçicilik kat sayısı
k' :	Bağıl kat sayısı
h :	Planck sabiti
C_{eq} :	Çözeltinin denge durumuna geldiğindeki derişimi
b :	Langmuir sabitini
Q_L :	Adsorpsiyon kapasitesi
Q_{eq} :	uzaklaştırma miktarı
C_{eq} :	Çözeltideki Cyt derişimi

Q_F :	Uzaklaştırma kapasitesi
1/n :	Freundlich sabitini
k₁ :	Yalancı-birinci derece adsorpsiyon hız sabitini
k₂ :	Yalancı ikinci dereceden hız sabiti
t :	Zaman (dk)

Kısaltmalar

MAH :	N-metakriloil-(L)-histidin metil ester
HEMA :	2-hidroksietil metakrilat
FTIR-ATR :	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
SEM :	Taramalı elektron Mikroskopu
MIP :	Moleküler Baskılanmış Polimer
NIP :	Baskılanmamış Polimer
NP :	Nanopartikül
MNP :	Manyetik Nanopartikül
FDA :	US Food ve Drug Administration
WHO :	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
ESR :	Elektron Spin Rezonansı
DNA :	Deoksiribo Nükleik asit
RNA :	Ribo Nükleik asit

1. GİRİŞ

Bilimsel ilerlemedeki her yenilik, mevcut dogmadan sapma ve yaygın olarak kabul edilen inançların tersi yönünde atılmış yeni bir adımdan sonra gerçekleşmiştir. 21. yüzyılın önde gelen teknolojisi olarak kabul edilen nanoteknoloji, bu adımların atıldığı önemli alanlardan biri olmayı başarmıştır.

Vücudumuzu oluşturan hücre ve moleküller birbirleri ile uyumlu bir düzende çalışırlar ve yaşamsal işlevler bir düzen içerisinde gerçekleşir. Bu nedenle moleküler tanıma yaşamın varlığı için çok önemlidir. Doğadaki moleküllerin birbirini tanıması, çoğu bilim insanını onları taklit etme yönünde harekete geçirmiştir ve bu da moleküler tasarımın serbest ve doğal bir şekilde gerçekleştiği yapay reseptörleri ortaya çıkarmıştır [1].

“Nano” kelime anlamı olarak, fiziksel bir büyüklüğün milyarda biridir. Bir nanometre, bir metrenin milyarda biridir. Eric Drexler (Foresight Enstitüsü’nün kurucusu), nanoteknoloji kavramını ilk defa dile getiren kişidir. Massachusetts Teknoloji Enstitüsü laboratuvarındaki eğitim süresinde, nanoteknolojinin ilk tohumlarını biyolojik sistemlerden esinlenerek moleküler düzeyde makineler yapılabileceğini önermesi ile atmıştır. Nanoteknolojinin ortaya çıkışını, 1959 yılında fizikçi Richard Feynman’ın “Malzeme Ve Cihazların Moleküler Boyutlarda Üretilmesi İle Başarılabilecekler” konusunda yapmış olduğu önemli konuşmasına kadar götürebiliriz [2].

Nanometre büyüklüğündeki malzemelerin bilimi ve mühendisliği günümüzde çok sayıda bilimsel, endüstriyel, ekolojik ve teknolojik alanın geliştirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyoloji, tıp, kimya, ecza, tarım, gıda endüstrisi ve malzeme bilimi, nanobilimde gelişen büyük teknolojik ilerlemeden yararlanan ana alanlardır ve birçok bilim insanı nanomalzemelerin (NM) büyük bir potansiyel ile birlikte beklenmeyen özelliklere sahip olduğunu doğrulamıştır [3].

Nanoteknoloji hala çok erken aşamalarını yaşamaktadır. Bununla birlikte, bu eşsiz teknolojinin sayısız uygulaması özellikle tıp camiasında büyük ilgi görmektedir. Nanoteknoloji, karmaşık nanoparçacık yapı iskelelerini inşa etme, çeşitli teşhis ve tedavi edici yardımcı malzemelerle kompozitler oluşturma, seçici

olarak belirli hedef dokulara ilaç gibi spesifik elementler sağlama ve harekete geçirmek için hücreleri uyarma vb. yeteneğine sahiptir. Diğer farmakolojik ajanlar ve vektörlerle karşılaştırıldığında nanoküreler fiziksel, kimyasal, biyolojik özelliklerinde son derece küçük boyutları, kutupları veya elektriksel iletkenlikleri, uygun şekilleri ve daha büyük yüzey alanı/hacim oranlarını içeren avantajlar göstermektedir [4].

Nanoteknoloji kavramı uzun zamandır iyi bir şekilde oluşturulmuştur ancak son zamanlarda toksisite artışları ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu da nanobiyomalzemelerin uygulanmasının güvenli olup olmadığını veya sağlıklı hücrelere toksisite sağlayıp uzun süreli sağlık sorunları üretip üretmediklerini bilmeyi zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle NM'lerin insan sağlığı ve çevre üzerindeki potansiyel riskleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Boyut, şekil ve yüzey kimyası gibi NM'lerin fizikokimyasal özellikleri ile hücre içi ve *in vivo* biyodağılımları arasındaki ilişki büyük ölçüde bilinmemektedir [5].

Nanoteknoloji endüstri ürünleri geniş bir uygulama kazandığından, büyük potansiyel faydalar ve büyük finansal karlar sağlaması öngörülebilir. Endüstri araştırmalarına göre nano özellikli ürünlerin küresel gelirleri 2013 yılında 1 trilyon ABD dolarına ulaşmıştır [6].

Proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere biyolojik moleküller için yeni tespit yöntem ve tekniklerinin geliştirilmesi, hastalığın tanı ve tedavisi de dahil olmak üzere insan sağlığına olan ilginin artması nedeniyle dikkat çekicidir [7].

Sonuç olarak son yıllarda DNA ve RNA nanoteknolojisi potansiyel uygulamalar için iyi tanımlanmış, nanoyapıların tasarımında çalışan birçok araştırmacı tarafından büyük ilgi görmüştür. Yeni nükleik asit temelli nano dizaynların farklı uygulamalardaki performansının çoğu DNA ve RNA'daki nükleobazlar arasında moleküler tanıma dayanmaktadır. Moleküler tanımanın sadece supramoleküler kimyada değil aynı zamanda biyokimyasal çerçevelerde de en önemli kimyasal oluşumlardan biri olduğu bir gerçektir. Özellikle DNA ve RNA'daki nükleobazların tanınması, genetik iletim ve protein ekspresyonu için çok önemlidir [8].

Bu tez kapsamında, nanoteknolojinin nükleotid saflaştırma alanındaki rolünün bir incelemesi sunulmaktadır İlk olarak moleküler baskılama yöntemi kullanılarak sitidin baskılanmış manyetik 2-hidroksietil metakrilat (mPHEMA) nanoküreler (MIP) miniemülsiyon polimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomeri ile Cu(II) metal iyonu arasında koordinasyon kompleksi oluşumu sağlanarak hazırlanan MAH-Cu(II) kompleksine kalıp molekül Cyt eklenerek ön-kompleks hazırlanmıştır. Ayrıca kalıp molekül olmaksızın baskılanmamış (NIP) mPHEMA nanoküreler aynı yöntemle hazırlanmıştır. Baskılanmış ve baskılanmamış manyetik nanokürelerin karakterizasyonu için zeta-sizer, Fourier Transform İnfrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM), yüzey alanı hesaplamaları ve elektro manyetik rezonans (ESR) ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sitidin adsorpsiyon çalışmaları farklı parametrelerde (pH, denge derişim, sıcaklık, iyonik şiddet ve zaman) incelenmiştir. Son olarak mPHEMA nanokürlerin sitidine karşı seçiciliğini ve kararlılığını göstermek için farklı nükleotidlerle adsorpsiyon deneyleri incelenmiştir. Cyt baskılanmış manyetik nanokürelerin etkin bir malzeme olarak başarılı bir şekilde sentezlendiği 10 tekrar adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri sonucu gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskılamanın temeli, enzim fonksiyonu ve antibadi oluşumu üzerine yapılan ilk teorilere kadar görülebilir. 1890'larda Emil Fischer, enzimlerin seçiciliğini tanımlamak için “kilit ve anahtar” uyum fikrini benimsemiştir. Bir enzimin bağlanma bölgesi, substratı ile etkileşime giren fonksiyonel gruplara sahiptir. Bu etkileşimler hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimleri ve hidrofobik kuvvetleri içermektedir. Antibadiler, iyi bağlanma ve olağanüstü seçicilik sağlayabilen, Hedef molekülleri spesifik olarak bağlayan bir başka biyolojik protein sınıfıdır [9].

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), hem antibadilerden çok farklıdır hem de aynı zamanda onlarla çok ortak noktaları vardır. Mevcut konfigürasyonlarında MIP'ler, antibadilerden katı, daha sert ve çözünmezdir, ancak doğal reseptör moleküllerinin en önemli özelliğini paylaşırlar: spesifik olarak bir kalıp moleküle bağlanma yeteneği [10].

Frank Dickey “yapay antibadi” gelişimine yönelik ilk deneyleri gerçekleştirmiş ve daha sonra “molecular imprinting (moleküler baskılama)” olarak adlandırılan ve “yapay adsorpsiyon” adı verilen, sentetik reseptörler oluşturmak için silika polimerleri kullanarak bir teknik tasarlamıştır. Dickey'in başlangıçtaki ilk çalışmasında spesifik adsorpsiyon için gösterilen ilk hedefi şekerin kiral ayrımıdır. Her ne kadar daha önceki raporlar “moleküler baskılama” terimine değinmemiş olsa da (“seçici adsorbanların” sentezi olarak tanımlanmaktadır), tanımlanan kavram, moleküler baskılama olarak tanımladığımız yöntemle karşılık gelir [9].

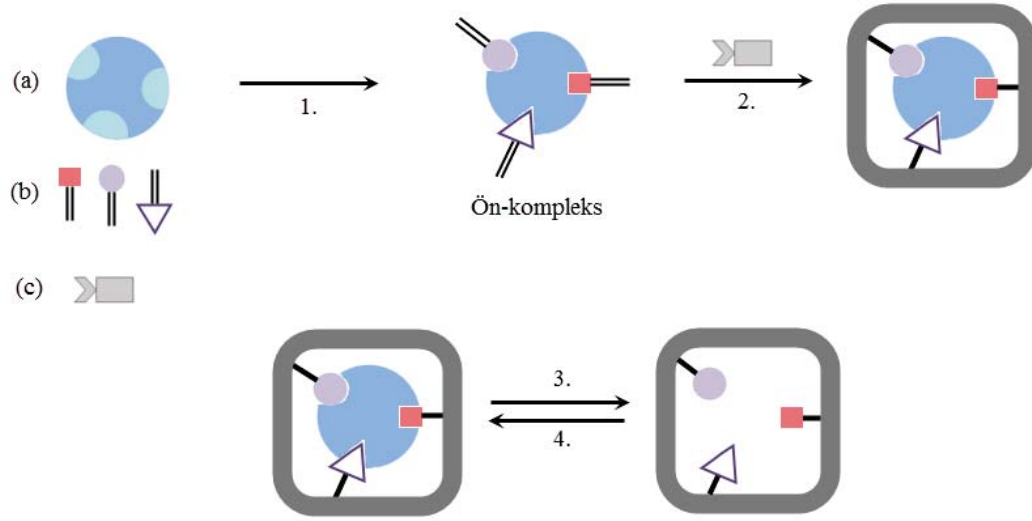
MIP'ler, seçilen moleküllere karşı yüksek seçicilik sağlayan özel moleküler tanıma yeteneklerine sahip sentetik polimerik malzemelerdir. [11]

Moleküler baskılama, bir kalıp (hedef) molekülün varlığında sentez yaparak bir polimerde moleküler tanıma alanlarının oluşturulması işlemidir. Fonksiyonel monomerler ve kalıp molekül arasındaki tamamlayıcı etkileşimler, polimerizasyon işlemi ile korunur ve polimerin çapraz bağlanması ile daha da kararlı hale getirilir. Elde edilen MIP, kalıp analitin seçici olarak tanınması yeteneğine sahiptir.

Moleküler baskılama tekniği, şu anda sentetik moleküler reseptörler oluşturmada en genel, çok yönlü, ölçeklenebilir ve uygun maliyetli bir yaklaşımdır [12, 13].

Moleküler baskılama Günter Wulff ve çalışma arkadaşları tarafından ilk defa 1972’de kavram olarak tanımlanmıştır [14]. Moleküler baskılama tekniği, bir kalıp molekül varlığında fonksiyonel monomerlerin bazı etkileşimlerle (kovalent veya kovalent olmayan) düzenlenmesi ve bu düzenlemelerin ardından birtakım işlemler ile kimyasal işlevlere sahip katı malzemelerin meydana getirilmesini hedeflemektedir. Kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılması ile kalıp moleküle spesifik tanıma bölgeleri oluşmaktadır. MIP’ler, doğal reseptörlere benzer afinite ve seçicilikleri, moleküler tanımaya dayalı ayırma teknikleri doğal moleküllerle karşılaştırıldıklarında kararlılıklarının yüksek olması, hazırlanmalarının ve çeşitli uygulamalara uyarlanmalarının kolay olması gibi avantajları nedeniyle araştırmalara konu olmaktadır. Bu nedenle, MIP’ler yapay bir afinite malzemesi olarak düşünölebilir [13, 15].

Moleküler baskılamanın ilk aşamasında, kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler ile ön-kompleks aşaması gerçekleşir. Polimerizasyonun gerçekleşmesinin ardından kalıp molekülün yapısında bulunan fonksiyonel gruplar polimerik yapı içerisinde tutulmaktadır. Kalıp molekülün ortamdaki uzaklaştırılmasıyla, kalıp moleküle şeklen uygun, boyut ve yük açısından tamamlayıcı bağlanma bölgeleri ortaya çıkar. Böylelikle, polimerde moleküler olarak hafıza meydana gelir, daha sonraki aşamalarda oluşturulan bu hafıza sayesinde analit yüksek seçicilik göstererek yeniden tanınır (şekil 2.1.) [16].



Şekil 2.1. Moleküler baskılama prensibinin şematik gösterimi a: Fonksiyonel monomerler, b: çapraz bağlayıcı, c: kalıp molekül; 1: ön polimerizasyon kompleksinin montajı, 2: polimerizasyon, 3: baskılanmış molekülün uzaklaştırılması (desorpsiyon), 4: yeniden bağlanma [16].

2.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri

2.2.1. Kovalent Baskılama Yöntemi

Bu yönteme göre, kalıp molekül-monomer ön-kompleksi arasında tersinir kovalent etkileşimler gerçekleşir. Yani polimerizasyon aşamasından önce fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün arasında güçlü, tersinir bir kovalent bağ meydana gelir. Kovalent bağların bozulmadığı bölgelerde kovalent konjugatları polimerize olur. Polimerleşme meydana geldiği sentez sonrasında tersinir kovalent bağlar çözücü (eluent) varlığında seçici olarak koparılır ve kalıp molekül polimer yapısından uzaklaştırılır. Kovalent baskılama yönteminde, kovalent bağların yüksek kararlılığı, bağlanma bölgelerinin daha homojen bir şekilde dağılımını sağlar. Özdeş yeniden bağlanma alanlarının oluşumu kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında hızlı ve tersinir kovalent bağlar gerektirdiğinden bu baskılama tekniği için uygun kalıp molekül sınırlıdır. Bu yöntemde boronik asit esterleri, ketaller, disülfid bağları, asetaller ve shiff bazları monomer olarak kullanılmaktadır. Polimer, kalıp molekül ile etkileştirildiğinde aynı kovalent bağlar

tekrar oluşturulur. Bu yöntem kullanılarak kararlı ve homojen bağlanma yerleri oluşturulabilir ancak bu yöntemin en büyük dezavantajı yeniden bağlanma için kuvvetli kovalent bağlardan dolayı yavaş bir kinetiğe sahip olmasıdır. Ayrıca ayrılmada termodinamik dengeye ulaşmayı zorlaştırır [14, 17, 18].

Kovalent baskılama, MIP'nin seçiciliğini artırmak için ideal bir yöntemdir, çünkü kovalent baskılamada kalıp-fonksiyonel monomer kompleksi, polimerizasyon sırasında serbest monomerlerden kaçınır, homojen bağlanma bölgeleri oluşturur ve MIP'nin spesifik olmayan bağlanma bölgelerini asgariye indirir [19, 20].

2.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama Yöntemi

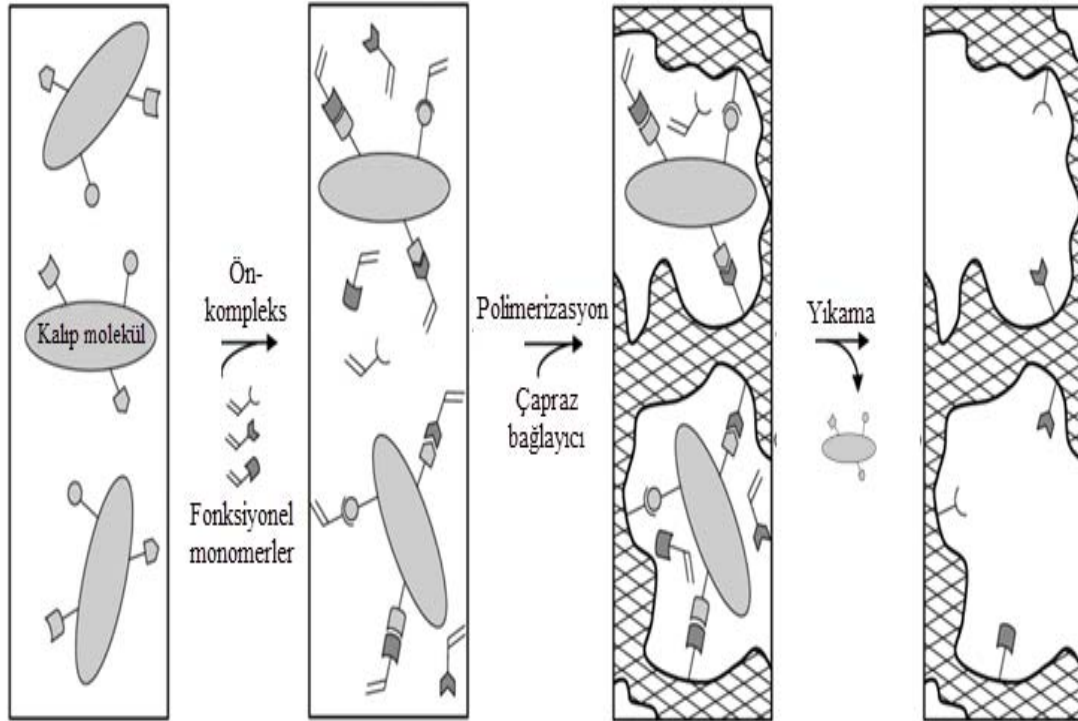
Kovalent olmayan baskılama Mosbach ve Arshady tarafından 1981'de öne sürülen bir yöntemdir. Mosbach ve arkadaşları fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında kovalent bağlanmanın daima gerekli olmadığını ileri sürmüştür. Kovalent olmayan etkileşimler fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasında meydana gelmiştir. Bir MIP'nin bu yöntemle hazırlanmasının teknik olarak basit olmasına rağmen, kalıp ile fonksiyonel monomerler arasındaki ayrı ayrı zayıf kovalent olmayan etkileşimlerin kararlılığının başarısına dayanır. Bu kararlılık sırayla fonksiyonel bağlama gruplarının, kalıplanmış bölgelere dahil edilmesine yol açacaktır [21].

Kovalent olmayan yaklaşım, günümüzde en yaygın şekilde kullanılan yaklaşımdır. Çünkü MIP'lerin kolay hazırlanmasına ve geniş kimya yelpazesindeki fonksiyonel monomerlerin ve mevcut muhtemel kalıp molekülünün seçilmesine izin verir. Ek olarak, kovalent olmayan baskı yaklaşımı tarafından hazırlanan baskılanmış polimerler, kovalent yaklaşım tarafından hazırlananlara göre çok daha hızlı ve tersinir bağlanma kinetiği sergilerler.

Bu yaklaşımda elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim, yük transferi, metal şelat ve hatta van der Waals gibi zayıf kovalent olmayan etkileşimler sayesinde kalıp molekül ve seçilen fonksiyonel monomerler ile ön-kompleks oluşur. Sentez sırasında kompleksleşme basamağı uygun bir porojende (çözücü) uygun bir monomerin ya da monomerlerin kalıp molekül ile karıştırılmasıyla gerçekleşir. Ardından polimerleşme vasıtası ile bu ön-kompleks dizilimi korunur. Sentez sonrasında kalıp molekül, bir çözücü ya da çözücü

karışımı ile yıkanarak basit bir şekilde elde edilen polimerden uzaklaştırılır. Kalıp molekülün uygun oyuklara tekrar bağlanması aynı kovalent olmayan etkileşimlere dayanır. Kovalent olmayan baskılama yöntemi kolaylığından dolayı moleküler baskılanmış polimerler hazırlamak için en etkili ve en yaygın olarak kullanılan yöntemdir.

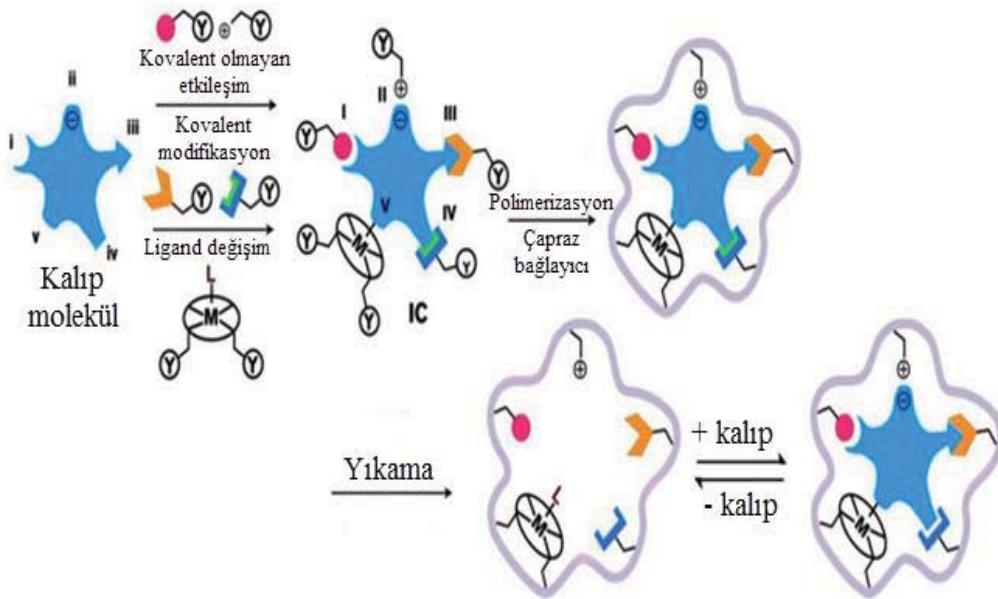
Baskılanmış moleküller hem baskılama süreci hem de yeniden bağlanma sırasında iyonik, hidrofobik ve hidrojen bağları gibi kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla polimerle etkileşir. Hidrojen bağı moleküler baskılanmış polimerin moleküler tanıma etkileşimi olarak sıkça kullanılır. Bu açıdan akrilik asit ve metakrilik asit genellikle, karboksil grubunun aynı anda bir hidrojen verici ve bir hidrojen alıcısı olarak işlev görmesinden dolayı fonksiyonel monomerler olarak kabul edilirler. Kovalent olmayan etkileşimler, asit ve bazların sulu çözeltileri ya da metanolle muamele edilerek kolay bir şekilde ortadan kaldırılır. Böylece polimerizasyon sonrasında ağdan kalıp molekül uzaklaştırılabilir (Şekil 2.2.) [14, 17, 18, 20].



Şekil 2.2. Kovalent olmayan baskılama yaklaşımı kullanılarak moleküler olarak baskılanmış polimer hazırlama ilkesinin şematik gösterimi [22].

2.2.3. Yarı-Kovalent Baskılama Yöntemi

1990'ların sonunda Whitcombe ve ekibi tarafından yarı-kovalent baskılama sistemi geliştirildi ve bu melez yöntem kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın avantajlarının birleştirilmesine olanak sağladı. Bu yöntemde, polimerizasyondan önce kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasında kovalent bağ oluşurken polimer matriksinden kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra, kalıp molekülün tekrar bağlanması kovalent olmayan baskılama protokolünde olduğu gibi kovalent olmayan etkileşimler sayesinde gerçekleşir. Yarı-kovalent baskılama yöntemini geliştirmek için yapılan çalışmalardan biri de fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasına kalıp molekülle birlikte ortamdan ayrılan aracı gruplar eklemektir. Bu gruplar hem polimer oluşumu esnasında kalıp molekül ile monomerin birbirine bağlanmasını sağlar hem de kovalent olmayan geri bağlanmada sterik engellemeleri ortadan kaldırır. Yarı-kovalent yaklaşım, kovalent baskılama ile homojen bağlanma bölgeleri oluşumu ve kovalent olmayan baskılama ile de hızlı yeniden bağlanma kinetiği gibi avantajlar sağlar. Yarı kovalent polimerler için kalıbın uzaklaştırılması polimerlerin hidrolizini gerektirirken, kovalent olmayan polimerlerin kalıbı desorpsiyon ile uzaklaştırılabilir (Şekil 2.3.) [14, 17, 18, 23, 24].



Şekil 2.3. Bir MIP'nin sentezi, tanınması ve ayrılmasının şematik gösterimi.

MIP'lerin sentezi sırasında kullanılan kovalent baskılama, kovalent olmayan baskılama ve yarı kovalent baskılama gibi çeşitli yaklaşımlar arasında, kalıbın kolay uzaklaştırılması nedeniyle kovalent olmayan etkileşim en iyisi olarak kabul edilebilir [25].

2.3. Metal Şelat Etkileşimleri

Metal iyon etkileşimleri iyon seçici kromatografi, protein saflaştırma yöntemleri, biyosensör, katalitik antibadiler gibi seçici tanıma sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Metal iyon etkileşimlerinde metal merkezi ve substrat arasında diğer kovalent olmayan etkileşimlerden daha güçlü ve seçici bir etkileşim meydana gelir. Çünkü farklı metal iyonlarının farklı fonksiyonel gruplara daha fazla ilgisi söz konusudur. Moleküler baskılama teknolojisi, metal iyonları sayesinde yüksek seçiciliğe ve afiniteye sahip polimerik sistemlerin geliştirilmesine katkı sağlar. Bu sistemler biyokromatografik ayırım, biyosensörler, yapay enzim sistemleri ve kontrollü ilaç salınımı gibi alanlarda kullanılabilir [17]. Metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimlerinin moleküler baskılama için diğer etkileşimlere göre avantajları mevcuttur:

- 1) Genel olarak metal şelat etkileşimleri hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimlerinden daha kuvvetli olduğu için fonksiyonel monomerlerin gelişigüzel birleşmesini önemli derecede azaltır;
- 2) Etkileşim su-alkol sisteminde kararlıdır;
- 3) Kovalent olmayan bir güce sahiptir.

Bu etkileşim, bağlanma seçiciliği ve gücü yönünden sulu çözeltilerdeki etkileşim ve hidrojen bağlarıyla kıyaslandığında kovalent etkileşimlere yakın benzerlik göstermektedir ancak kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılması kovalent baskılamada olduğu kadar zor değildir [1].

Metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimleri iki kısımdan oluşur:

- 1- Baskılama etkisi ile üretilen baskılama boşluğu ve substrat arasındaki spesifik metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimleri

2- Spesifik olmayan metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimleri

Metal-kompleks yapıcı baskılanmış polimerin substratı tanınması spesifik metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimlerine ve baskılama etkisi ile üretilen baskılama boşluğu ve substrat arasındaki spesifik hidrofobik etkileşimlere dayanır. Spesifik olmayan metal koordinasyon-şelatlaşma etkileşimlerinin seçimli tanımaya katkısı bulunmamaktadır. Spesifik olmayan metal koordinasyon şelatlaşma etkileşimleri ve spesifik olmayan hidrofobik etkileşimler yalnızca metal-kompleks yapıcı baskılanmış polimerde substratın daha iyi tutunmasını sağlar [18].

2.4. Baskılamayı Etkileyen Faktörler

Moleküler baskılama işleminde moleküler tanımının etkinliği birçok parametreden etkilenmektedir. Baskılama için kullanılabilecek reaktiflerin temel özelliklerinden bazıları aşağıda listelenmiştir.

2.4.1. Kalıp Moleküller

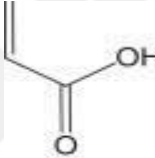
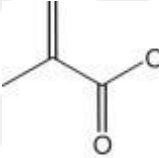
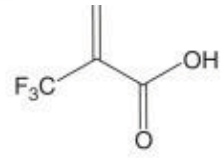
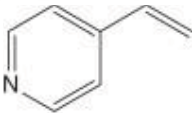
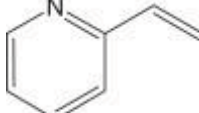
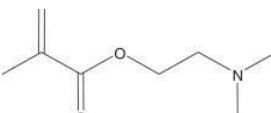
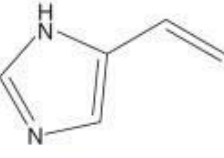
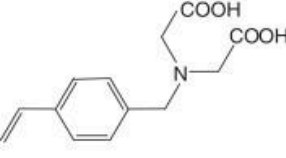
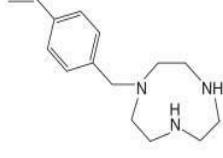
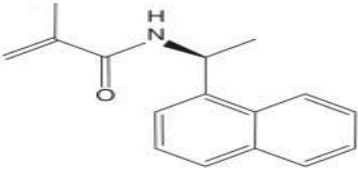
Baskı sürecinde farklı etkileşimler eşzamanlı davrandığından, prensipte baskılanan moleküllerin kalıp olarak kullanılabileceği konusunda bir sınır yoktur. Termodinamik düşünceler, kalıp ne kadar sert olursa, tanımının seçiciliği ve afinitesinin o kadar yüksek olduğunu göstermektedir. Kalıbın yapısı ve kimyasal özellikleri, takip edilmesi gereken baskılama yaklaşımını seçmek için başlangıç noktası gibi görünmektedir [26].

Kalıp uzaklaştırma, kalıp ile monomer(ler) arasındaki etkileşimin tipine bağlı olarak basit bir desorpsiyon prosedürüyle veya kimyasal bölünme ile gerçekleştirilebilir. Bu, kalıp moleküle şekil, boyut ve işlevsellikte tamamlayıcı olarak spesifik tanıma alanlarına sahip gözenekli bir polimer veya yakından ilişkili yapısal analogları verir [27]. Kalıp moleküller, çapraz bağlanmış polimerler basmak için şablonlar olarak kullanılabilir. Kalıbın uzaklaştırılmasından sonra, kalan polimer daha seçicidir. Polimerin seçiciliği, oyuğun boyutu, şekli ve yeniden bağlama etkileşimleri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır [28].

2.4.2. Fonksiyonel Monomer

Moleküler baskılama işleminin başarısı, monomer-kalıp etkileşimine oldukça bağlı olduğundan, bir kalıp molekülünü hedeflemede en önemli aşamalardan biri de uygun fonksiyonel monomer seçimidir. Bugüne kadar metakrilik asit (MAA), triflorometakrilik asit (TFMAA), 4-vinilpiridin (4-VP) gibi çok sayıda fonksiyonel monomer moleküler baskılama sistemlerinde başarıyla kullanılmıştır (Şekil 2.1). Bunlar arasında MAA, iyonik etkileşim yoluyla hidrojen bağları ve aminler aracılığıyla amitler, karbamatlar ve karboksillerle etkileşime girebilen en yaygın şekilde kullanılan fonksiyonel monomer olmuştur [20].

Çizelge 2.1. İşlevselliğine göre sınıflandırılmış, moleküler baskılamada en sık kullanılan fonksiyonel monomerler [26].

Asit ve hidrojen bağı oluşturan monomerler	 Acrylic acid	 Methacrylic acid	 Trifluoromethyl acrylic acid
Temel fonksiyonel monomerler	 4-Vinylpyridine	 2-Vinylpyridine	 N,N-Dimethylaminoethyl methacrylate
Metal şelatlama monomerleri	 5-Vinylimidazole	 4-Vinylbenzyliminodiacetic acid	 1-(4'-Vinylbenzyl)-1,4,7-triazacyclononane
Kiral fonksiyonel monomerler	 (S)-(-)-N-Methacryloyl-1-naphthylethylamine		

Fonksiyonel monomerler, kalıp molekülünün fonksiyonel grupları ile etkileşime girebilme yetenekleri göz önüne alınarak seçilir. Polimerizasyon gerçekleştiğinde, kalıp moleküller uzaklaştırılır ve kalıp analiti tamamlayıcı boyut, şekil ve işlevsellikte bağlayıcı bölgeleri oluşturulur. Elde edilen baskılanmış polimerler sağlam, kararlı ve çeşitli sıcaklık, pH ve çözücülere karşı dirençlidir [11].

Monomer, MIP'nin sentezi için anahtar bir bileşendir. Rolü, şablonun yeniden birleştirilmesi için elektronik tanıma noktaları sağlamaktır ve yukarıda belirtildiği gibi, seçimi genellikle, hidrojen bağları veya kalıp ile bir oluşturma kapasitesine dayanmaktadır. Ticari olarak temin edilebilen bir dizi asidik, bazik, nötr, metal şelatlayıcı ve kiral bileşikler (Çizelge 2.1.) bulunmaktadır. Bunlar arasında, metakrilik asit temelli monomerler, elektron veren fonksiyonlara sahip şablonlarla etkileşime girmek için sıklıkla kullanılır [26].

2.4.3. Çapraz Bağlayıcı

Baskı işleminde, özgüllük ve seçicilik elde edebilmek için çok yüksek oranda bir çapraz bağlama gereklidir. Bunun sağlanabilmesi için, fonksiyonel monomer, nispeten büyük oranda çapraz bağlama monomeri ile kopolimerize edilir. Bununla birlikte, polimerin bağlanma spesifikliğini korumak için uygun çapraz bağlama maddesi seviyesi optimize edilmelidir. Seviyeler çok yüksekse, yüksek çapraz bağlama derecesi kalıp difüzyonunu engeller. Bağlanma bölgelerine girerken, düşük seviyelerde çapraz bağlanma tekrar bağlanmayı azaltabilir, çünkü fonksiyonel gruplar yeterince sabit değildir. Başka bir açıdan, çapraz bağlayıcının hidrofobik/hidrofilik dengesi, spesifik olmayan bağlanma derecesini etkileyen MIP'nin hidrofobik/hidrofilik yapısını belirler. Genel olarak, çapraz bağlayıcının doğru seçimi ve oranı genellikle deneme yanılma sonucu ile elde edilir [26].

Ek olarak, çapraz bağlanan monomerler moleküler baskılamada önemli bir rol oynarlar ve sonuçta ortaya çıkan MIP'lerin nihai özellikleri üzerinde önemli bir etki gösterirler, çünkü bunlar MIP'lerin büyük bir bölümünü oluşturur ve moleküler olarak baskılanmış boşlukların dengelenmesinden sorumludurlar [20].

Çapraz bağlayıcı ile fonksiyonel monomer mol oranları çok küçükse, kalıp molekülere ait bağlanma alanları birbirlerine oldukça fazla yaklaşır, komşu bölgeler tarafından kalıp moleküle ait bağlanma bölgeleri kapatılır ve etkili bir sonuç alınamaz. Çok yüksek mol oranlarında ise, çapraz bağlayıcılar kalıp moleküle veya fonksiyonel monomerlere kovalent olmayan etkileşimler göstermeleri neticesinde, etkin baskılama azalmaktadır [29].

Uygun olan çapraz bağlayıcı ajanların sayısı monomerleştirilmiş kalıbın ve çapraz bağlayıcının çözünürlüğü nedeniyle sınırlıdır. Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), trimetilolpropantrimetakrilat (TRIM), pentaeritrol gibi tri- ve tetra-fonksiyonel çapraz bağlayıcılar gibi akrilik çapraz bağlayıcılar triakrilat veya pentaeritrol tetrakrilat yaygın olarak kullanılır [20].

2.4.4. Porojen Çözücüler

Çözücünün moleküler baskılamadaki rolü, ön hazırlık (kovalent olmayan) yaklaşımda özellikle önemlidir. Çözücü sadece polimer morfolojisini etkilemez (iç yüzey alanı ve ortalama gözenek büyüklüğü) aynı zamanda kovalent olmayan etkileşimlerin gücünü de artırır. Genellikle çözücü ne kadar polar olursa, çözücünün polaritesi kovalent olmayan etkileşimleri zayıflattığından, sonuçta elde edilen tanıma o kadar başarısız olur. Bu şekilde, çözücü kalıp ve fonksiyonel monomer arasındaki iyonik etkileşimleri en üst düzeye çıkarmak için mümkün olduğu kadar kutupsuz olmalıdır. Hidrojen bağı etkileşimlerinin yer alması beklendiğinde, düşük hidrojen bağlanma baz/asitliğine sahip çözücüler kullanılmalıdır. Kullanılan çözücü ayrıca MIP'nin fiziksel özelliklerini de etkiler [20]. Polimerizasyon reaksiyonu oluşurken sıcaklığın dağıtılması çözücünün diğer bir rolüdür. Sıcaklık dağılımının sağlanamaması halinde, reaksiyon karışımının sıcaklığı bölgesel olarak çok yüksek olur ve istenmeyen yan reaksiyonlar oluşur [30].

Pek çok farklı faktörün de moleküler baskılama işlemleri ve dolayısıyla reaksiyon bileşenlerinin molar oranları, çözücülerin miktarı ve reaksiyon sıcaklığı gibi MIP'lerin özellikleri üzerinde önemli bir etkisi vardır. Bu nedenle MIP'lerin hem polimerizasyon süreçleri hem de tanıma özellikleri üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılması, MIP'lerin etkili hazırlanmasını yönlendirmek ve temel bilgilerin elde

edilebilmesi için oldukça önemlidir. MIP'ler doğal moleküllere göre daha az hazırlık süresi, daha az maliyet ve daha yüksek çevresel stabilite dahil olmak üzere pek çok avantaja sahiptir. MIP'ler türlerine ve hacimlerine bağlı olarak çeşitli uygulamalarda kullanılabilirler. Binlerce veya milyonlarca bağlanma yerine sahipken biyolojik reseptörler tipik olarak birkaç bağlanma yerine sahiptir. Bununla birlikte, MIP'lerin işlevsel mekanizması tam olarak bilinmemektedir ve doğal materyalleri değiştirme yeteneği konusunda tartışmalı fikirler bulunmaktadır [31].

2.5. Polimerizasyon Sentez Teknikleri

MIP temelli nanokürelerin üretimi kolay bir iş değildir; bununla birlikte, en yaygın sentez teknikleri şunlardır: Yığın polimerizasyonu, çözelti polimerizasyonu, emülsiyon (mini ve mikro emülsiyon) polimerizasyonu ve süspansiyon polimerizasyonu vb. [11, 32].

Ortam koşulları etkisi altında radikalik polimerizasyonlar homojen ya da heterojen olabilir. Bu durum genel olarak başlangıç reaksiyon karışımının homojen ya da heterojen olup olmamasına dayanmaktadır. Reaksiyon aşamasında bazı homojen sistemler, polimerin çözünmez olmasının bir sonucu olarak polimerizasyon ilerledikçe heterojen özellikte olabilir. Süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyonları heterojen işlemler iken, çözelti ve kütle polimerizasyonları homojen işlemlerdir [2].

2.5.1. Emülsiyon Polimerizasyonu

Su ortamında, yüzey aktif madde, monomer ve suda çözünen (amonum persülfat, potasyum persülfat gibi) bir başlatıcı bulunur. Sürfaktanlar veya yüzey aktif ajanlar birbirleriyle miseller oluşturmak üzere bir araya gelerek, kritik değerlerdeki derişimlerde suda çözünebilirler. Sürfaktan moleküller bu miseller içinde, suda hidrokarbon (veya olefilik veya hidrofobik) uçları ve polar uçlarından (hidrofilik) eş boyutlu ve ufak küreler meydana getirmek için düzenlenirler. Sodyum dodesil sülfat (SDS) veya benzer anyonik, non-iyonik surfaktanlar ile emülsiyon polimerizasyonu başlatılır. Bu surfaktan kıvrımlı şekilde bulunur.

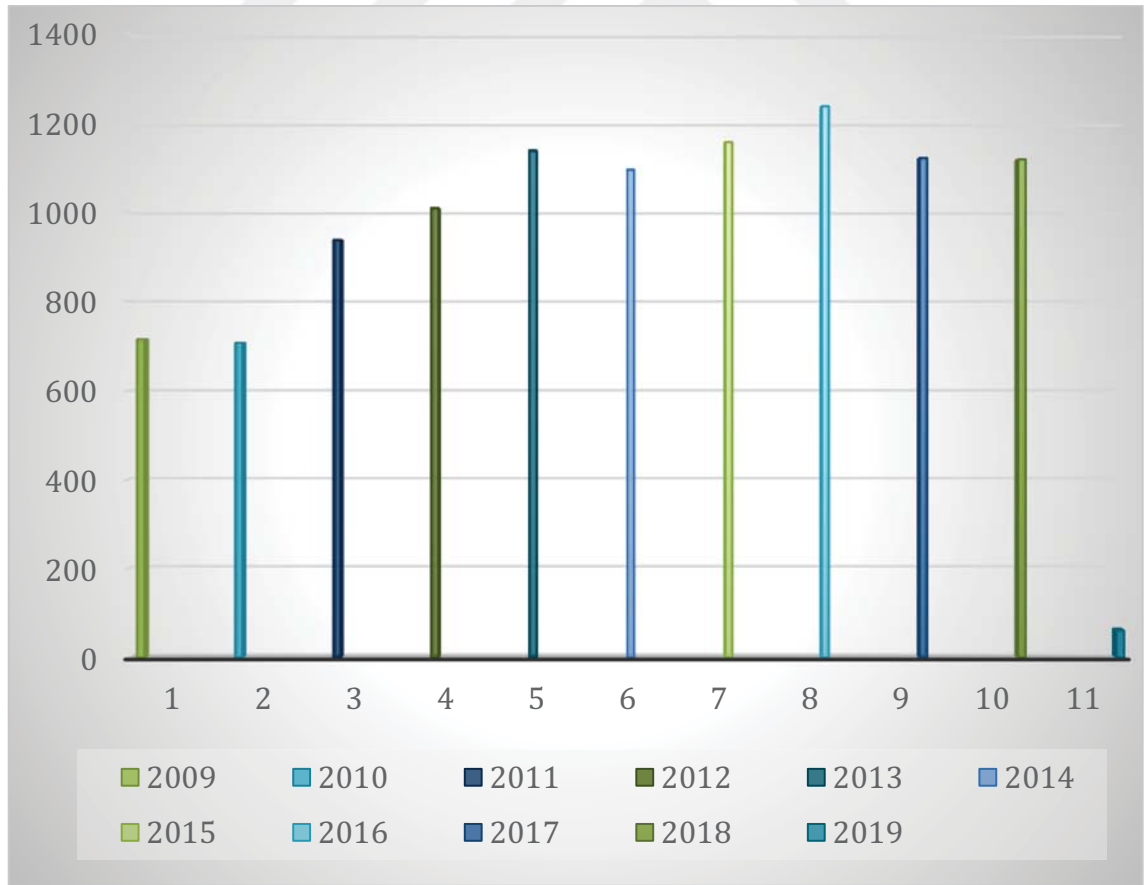
Emülsiyon polimerizasyonu farklı avantajlara sahiptir. Emülsiyon (kolloidal) sisteminin fiziksel hali işlemin kontrol edilmesini kolaylaştırır. Polimerizasyon hızında bir azaltma olmadan polimerin molekül kütlesini artırma yeteneğine sahiptir. Farklı reaksiyon mekanizmasından ötürü hem yüksek reaksiyon hızlarına eş zamanlı olarak ulaşma hem de yüksek molekül kütlesi avantajına sahiptir [2]. Hidrofobik aktif maddelerin tek bir reaksiyon adımında daha kolay kapsüllenmesi nedeniyle miniemülsiyon polimerizasyon tekniği, sıklıkla kullanılır, daha homojen ve stabil nanoküreler üretir [33].

Miniemülsiyon sistemlerinde monomer damlacıklarının yüzey alanı aşırı derecede büyüktür ve damlacıkların büyüklüğünü korumak ve yüzey aktif maddelere ek olarak birleşmelerini önlemek için yeterli hidrofobik malzeme (heksadekan gibi ko-stabilizatör) gereklidir. Emülsiyon ve miniemülsiyon yöntemleri, dağınık nanoparçacıkları vermek üzere çözünmeyen veya düşük çözünür monomerlerin polimerizasyonu için çoğunlukla dispersiyon ortamı olarak su kullanan heterojen polimerizasyonlar arasındadır. Sürekli faz olarak su, polimerizasyon sırasında mükemmel ısı transferine izin verir ve bu teknikleri çevre dostu yapar [34].

MIP'ler biyolojik mekanik benzerlerine (reseptörler ve antibadiler) göre iyi mekanik/kimyasal stabilite, hazırlık kolaylığı, potansiyel yeniden kullanılabilirlik, çok çeşitli deneysel koşullar ve solventler üzerinde iyi fiziksel ve kimyasal stabilite ve düşük üretim maliyeti gibi birçok avantaja sahiptir [35]. MIP'lerin bu avantajları, birçok bileşiğin tespiti veya ayrılması için kullanıldığı gıda analizleri, ilaçlar, biyolojik ve çevresel örnekler gibi analitik kimyada geniş uygulamalara neden olmuştur ve manyetik malzemeler, immünoassay, ilaç hedefleme, afinite kromatografisi ve çevresel tespit vb. alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, MIP'lerin bazı dezavantajları (yavaş kütle transferi, düzensiz şekil, eksik şablon (kalıp) çıkarma, zayıf bölge erişilebilirliği veya bağlama yerlerinin heterojen dağılımı gibi) uygulamalarını sınırlandırmıştır. Gelecek vaat eden alternatiflerden biri MIP'lere manyetizma vermek ve ardından manyetik ayırma kullanmaktır. Son yıllarda, MIP'ler ek manyetik özelliklerle birleştirilmiştir ve umut verici manyetik moleküler baskılanmış polimer (MMIP) stratejisi geliştirilmiştir. MMIP, ek santrifüj veya filtrasyon olmadan harici bir manyetik alan

tarafından kolayca toplanabilir/izole edilebilir ve geri dönüştürülebilir [11,16]. MIP'ler, kalıp, monomer ve çapraz bağlayıcıların formülasyonlarını değiştirerek çeşitli ilaçlar için tasarlanabilir. Bu çok yönlülük, uyararla tetiklenen ve düzenlenmiş salınım mekanizmalarının uygun bir şekilde dahil edilmesiyle birlikte, bu polimerik malzeme sınıfının ilaç dağıtımında her zaman en son teknolojiye sahip olmasına yardımcı olur [36].

Bununla birlikte, MIP'ler yeni ve seçici ilaç dozaj formları olarak kullanılabilecekleri ilaç dağıtımında büyük bir potansiyele sahiptir. Çünkü doğal olarak ilaç molekülleri için rezervuar görevi görürler ve ilaç moleküllerinin fonksiyonel grupları ve MIP'ler arasındaki spesifik etkileşimler yoluyla ilacın kalma süresini artırırlar ve böylece ilaç salım hızını azaltabilirler. MIP'lerin etkinliği, yükleme kapasitesini değiştirerek ve çevredeki ortamın özelliklerine duyarlı hale getirilebilen bırakma davranışını kontrol ederek artırılabilir [35].

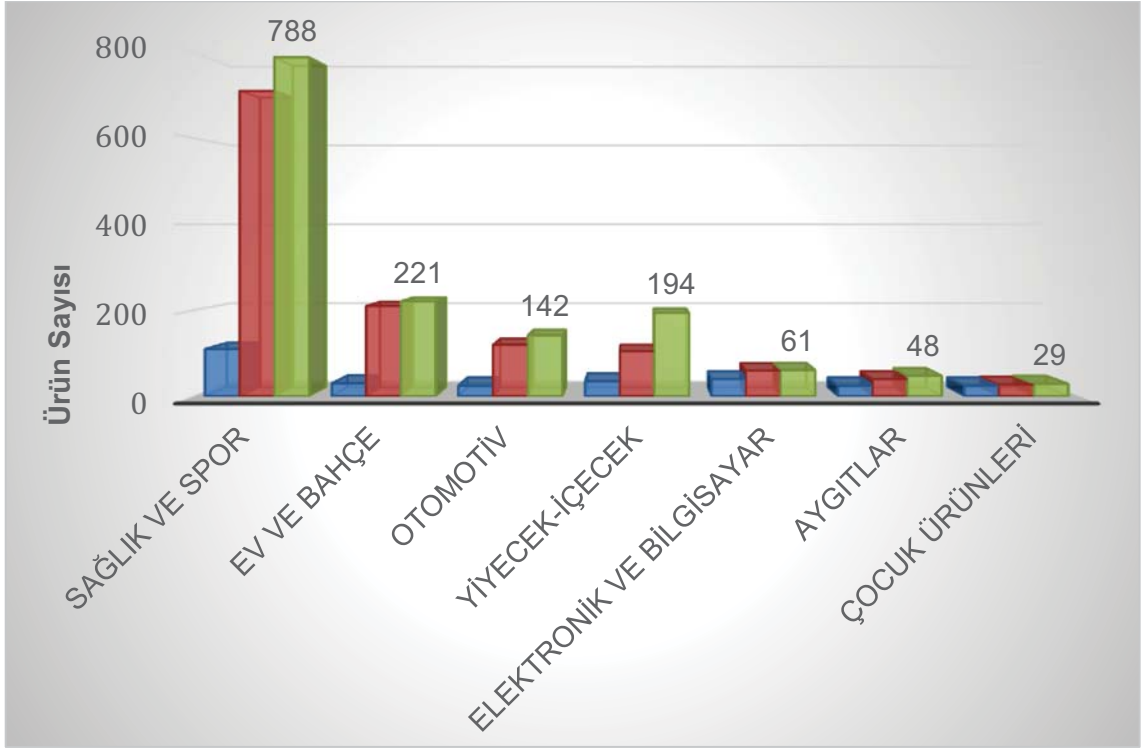


Şekil 2.4. Moleküler baskılama ile ilgili son on yılda (2009- 2019) yapılan yayın sayıları [37].

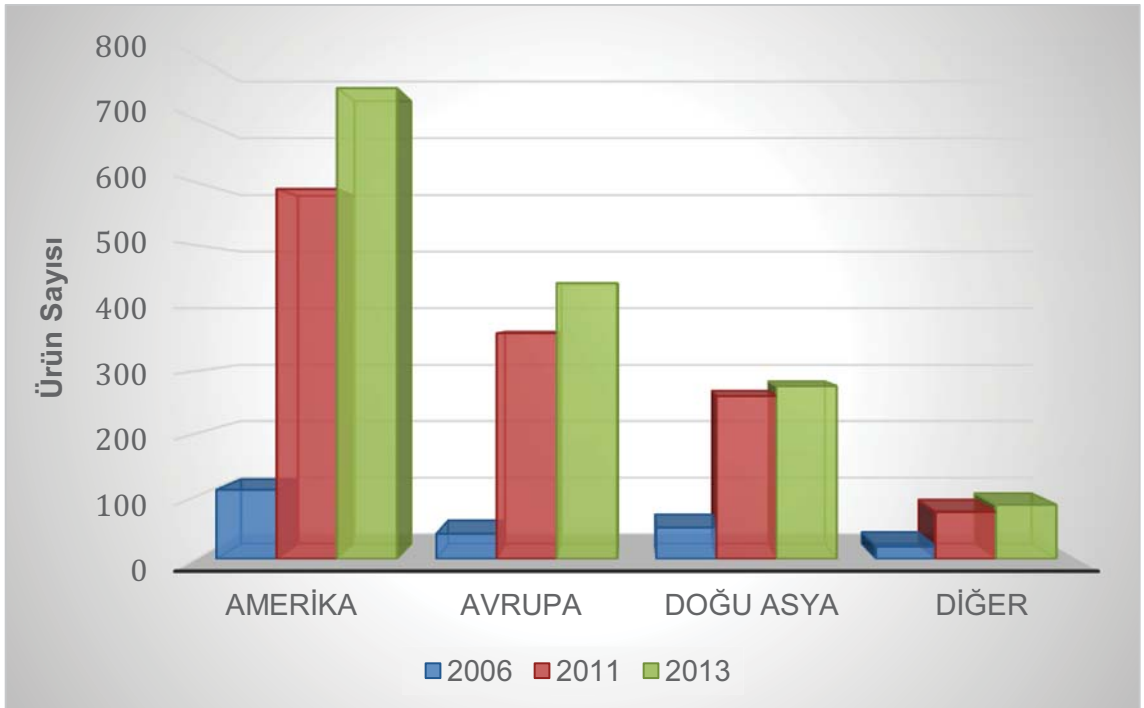
MIP'lerin sentez ve uygulaması ile ilgili çalışmalara ait yayınların sayısı oldukça hızlı bir büyüme sürecindedir. Son on yılda yapılan çalışmalarda büyük kazanımlar tanımlanmıştır ve MIP uygulamaları hakkında dünya çapında 10000'den fazla makale yayınlandığı görülmektedir (Şekil 2.4.).

1970 ve 2015 yılları arasında, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi'ne nanomalzeme içeren ilaç ürünleri için 359 başvuru gönderilmiştir. Boyutsal bakımdan, başvuruların %40'ı 100 nm'den az, %41'i 100 ila 300 nm arasında, %10'u 300 ila 600 nm arasında ve geri kalan %9'u 600 ile 1000 nm arasındaydı. Parçacık tipleri bakımından lipozomlar en yaygın kategoriye oluştururken (%33), ardından nanokristaller (%23), emülsiyonlar (%14), demir-polimer kompleksleri (%9) ve miselleri (%6) sıralanmıştır. Endikasyonlarla ilgili olarak, ürünlerin %35'i kanser tedavisi, %18'i enflamatuar, bağışıklık ve ağrı bozuklukları için %18, enfeksiyonlar için %12 ve geri kalan %35'i ise diğer hastalık koşulları ve kozmetik, teşhis ve beslenme amacıyla kullanılmıştır [33]. Nanoküreler için FDA onaylarının sayısına göre değerlendirme yapıldığında, nanoteknolojinin onay ve kullanımının artmakta olduğu görülmektedir. Yalnızca 2017 yılında, 50 nanodiküller ve 60 araştırma nanodikülü onaylanmıştır. Bununla birlikte, MIP'nin gerçek potansiyeli, onun rolü ile sınırlı değildir. Yeni ilaçların verilmesi için bir yöntem olarak MIP etkinliğini artırarak, bilinen ilaçların yeniden formüle edilmesine ve yeniden kullanılabilmesine de yardımcı olabilir ayrıca MIP'nin daha önce başarısız olan klinik çalışmalarda kullanılan ilaçlarla kullanımı da düşünülmelidir [36].

Nanoteknolojinin tüketici pazarındaki nüfuzunu belgelemek ve bu alandaki gelişmeleri takip edebilmek için 2005 yılında Nanoteknoloji Tüketici Ürün Envanteri (TÜFE) oluşturulmuş ve TÜFE'nin oluşturulmasından bu yana, dünya genelinde nanoteknolojiyle ilgili farklı envanterler geliştirilmiştir. Bu envanterler nanoteknolojinin yaygınlığı, önemi ve gelişimi hakkında bakış açısı oluşturmaktadır (Şekil 2.5.) [38].



(a)



(b)

Şekil 2.5. (a) Üretim kategorilerine, (b) bölgelere göre ürünlerin dağılımı (30 Ülke) [39].

2.6. Nanoküreler ve Manyetik Nanoküreler

Nanoteknoloji, biyomedikal uygulamalar ve teşhisler için nanokürelerin fonksiyonel özelliklerini üretme, karakterize etme ve özel olarak uyarlama yeteneği ile mümkün olduğu ölçüde gelişmiştir [40].

Tasarım ilkesi, MIP ile paralel olarak “baskılanmamış” polimer (NIP) sentezi sırasında ön polimerizasyon karışımına bir kalıp yerleştirilmemesiyle oluşturulabilir. Bu NIP daha sonra aynı sisteme karşı test edilebilir ve böylece MIP'nin özgünlüğünün doğru bir şekilde değerlendirilmesini ve optimizasyonunu sağlar. Bu amaçla, bu boşluklardan faydalanan MIP'ler de “sentetik antibadi” ve “yarı sentetik enzim” olarak adlandırılmıştır [36].

İçi boş nanoküreler, tıp, eczacılık, malzeme bilimi ve boya endüstrisi ile ilgilenen özel bir malzeme sınıfını temsil eder. Özellikle, içi boş kürelerin düşük yoğunluklarının, süspansiyonlarının katı benzerleriyle karşılaştırıldığında kararlılıklarını artırması beklenir. Bu özellik ayırma uygulamaları için oldukça avantajlıdır [41]. Son yıllarda, çeşitli inorganik malzemelerden üretilen gözenekli içi boş nanoküreler, biyomedikal uygulamalarda, özellikle ilaç verme sistemleri için yeni bir taşıyıcı tipi olarak, yaygın bir şekilde çalışılmıştır. Bu yapılar, içi boş kürelerin içindeki genler, amino asitler ve proteinler gibi biyomoleküllerin kapsüllenmesini mümkün kılar. Çok çeşitli içi boş nanoküreler arasında manyetik nanoküreler, harici uygulanan manyetik bir alana tepki verdikleri için özellikle ilgi çekicidir. Manyetik nanoküreler (MNP), gözenekli bir küre çeperi oluşturmak üzere bağlanmış manyetik nanoküreciklerden oluşur [42].

Nanoteknoloji, tıbbın her alanında hızla gelişen yeni terapötik ve tanısal kavramların öncüsüdür. MNP'ler, bir dış manyetik alanın etkisi altında manipüle edilebilen bir nanoküre sınıfıdır. Kontrollü bir gözenek hacmine ve kabuk kalınlığına sahip içi boş nano yapılar, önemli bir nanomalzeme sınıfı olarak ortaya çıkmıştır [43]. MNP'ler genellikle demir, nikel, kobalt ve bunların oksitleri gibi manyetik elementlerden oluşur [44].

1–100 nm arasındaki boyut aralığı, biyomedikal uygulamalar için uygundur çünkü boyutları hücreler, virüsler, genler ve proteinler gibi çeşitli biyolojik varlıklar ile karşılaştırılabilir. Manyetik nanoküreler, toplu sistemler ve atomik yapılar veya

moleküller arasındaki köprüyü oluşturur. Nanokürelerin manyetik özellikleri, bu boyutlarda aşağı doğru karşılık gelen diğer malzemelerinden önemli ölçüde farklı olabilir [45]. Bu sonsuz boyut etkileri, nanokürelerin kozmetik, sağlık, üretim, elektronik ve bilgi depolama gibi çeşitli alanlarda uygulama bulması anlamına gelir [46].

Manyetik içi boş küreler, sınırlı nano- ve mezo-reaksiyon kapları, ilaç taşıyıcıları ve koruyucu kabuklar olarak önemli potansiyel faydaları için ortaya çıkmıştır. Yüzeyden hacme yüksek bir orana sahip olmanın yanı sıra, ilaçların ve tıbbi teşhislerin, enerji depolamasının ve dönüştürülmesinin kontrollü salınımlarında ümit verici uygulamalar için büyük bir gözenek hacmine ve düşük yoğunluğa sahip içi boş küreler kullanılmıştır [47].

Nanometre'den mikrometre ölçeğine kadar değişen manyetik nanoküreler çeşitli teknolojik uygulamaları nedeniyle artan sayıda tıbbi uygulamada kullanılmaktadır [48]. Manyetik nanoküreler, biyo-parçalanma, hipertermi ve biyomolekül immobilizasyonu gibi geniş bir uygulama yelpazesi için de önemli bir malzemedir [49].

MNP'lerin harici bir manyetik alan tarafından yönlendirilmesindeki eşsiz yeteneği, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), hedeflenen ilaç ve gen dağıtımı, doku mühendisliği, hücre takibi ve biyo-parçalanma, yüksek yoğunluklu depolama, spintronik, terapötik ilaçlar, gen ve radyonüklid iletimi, radyonüklid ayırma ve kanser termoterapisi (hipertermi) için ısıtma araçları için kontrast maddeleri olarak potansiyel kullanımları gibi birçok uygulamada kullanılabilmesi nedeniyle dikkat çekmektedir. Biyonanoteknoloji ve hastalıkların tanı ve tedavisi alanında, gelişmiş görüntüleme ve hedeflenmiş tedavi için çok yönlü bir platform olarak hareket edebildikleri için en ilgi çekici olasılıklardan birini temsil etmektedir [44, 45, 48]. Biyomedikal uygulamalar sentez yöntemlerinden etkilenebilecek MNP'lerin özelliklerine bağlıdır, parçacık büyüklüğü dağılımı, parçacıkların arasındaki etkileşimin yanı sıra parçacık büyüklüğü ve NP'lerin şeklidir. Bu nedenle, boyut ve şekil, MNP'lerin fiziksel stabilitesini düzenleyen temel özellikleri temsil eder [40].

MNP'lerin popülaritesi temel olarak yalnızca manyetik olarak değil, sıcaklıkla da kontrol edilebilen akıllı yapılarına dayanmaktadır. MNP'ler, metal bazlı bir konfigürasyona sahip inorganik ve sıfır boyutlu malzemelerdir. Bu NP'ler, alternatif bir manyetik alan kullanılarak kolayca manipüle edilebildiklerinden ve daha sonra çeşitli uygulamalarda kullanılabildiklerinden artan bir önem kazandılar [43].

MNP'ler peptitler ve nükleik asitler gibi ilaçlar ve biyoaktif maddelerle daha fazla "fonksiyonalize" edildiğinde, hücre ve doku bariyerlerine nüfuz eden ve spesifik terapötik ve diagnostik modaliteler sunan farklı parçacık sistemleri oluştururlar. MNP'lerin işlevsel hale getirilmesi ve aynı zamanda bir manyetik alana cevap vermesi, onları tıpta bireyselleştirmeyi hedefleyen terapötik ve tanısal teknolojilerin füzyonu teagnostikler için yararlı bir araç haline getirmiştir. Çok katmanlı fonksiyonelleştirme sayesinde, MNP'ler aynı anda tanı moleküler görüntüleme ajanları ve ilaç taşıyıcıları olarak hareket edebilir [44]. Biyoaktif nanoküreler, örneğin hücre ayırma, biyolojik etiketleme ve manyetik rezonans görüntüleme gibi klinik tıp uygulamalarında uygulanmıştır, çünkü bunlar izlenebilir ve görselleştirilebilen hem manyetik hem de flüoresan özelliklere sahiptir [50].

Tipik bir nanoküre geniş yüzey alan-hacim oranı, tek bir çekirdek manyetik parçacık, örneğin terapötik parçalar, hedefleme maddeleri veya tedavi araçları gibi birkaç varlığın bağlanmasına izin vermektedir. Yüzey işlevselliği sayesinde, bu manyetik çekirdekler aynı zamanda iskelet görevi görerek, bağlı olan yüklerini, manyetik karakterlerinden yararlanarak ve bunları yönlendirmek veya kalıp molekülleri kullanmak suretiyle uygulanmış alanları kullanarak, seçilen bir bölgeye gönderir. Özellikle, süperparamanyetik özellikler sergileyen manyetik demir oksit nanoküreleri büyük ilgi çekmiştir [46].

Nano tanecikli parçacıklar ne atomun ne de kütle eşlerinin karakteristik özelliği olan fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Kuantum boyutu etkileri ve manyetik nanokürelerin geniş yüzey alanı manyetik özelliklerin bazılarını önemli ölçüde değiştirir ve süperparamanyetik fenomenler ve manyetizasyonun kuantum tünelini gösterir, çünkü her bir parçacık tek bir manyetik alan olarak düşünülebilir [40].

Demir oksitler (örn. Fe_3O_4), biyomedikal uygulamada, iyi biyo-uyumluluk, toksisite ve benzersiz manyetik özelliklerinden dolayı en önemli manyetik malzemelerden biri olarak kabul edilmektedir. Manyetik Fe_3O_4 içi boş kürelere kıyasla, yüksek yüzey-hacim oranı, küçük parçacık yoğunluğu ve iyi dispersite özelliği gösterirler. Bu nedenle, manyetik boşluklu küreler hücre ayırma, ilaç salınımı, depolama ve serbest bırakma alanında iyi bir uygulama beklentisi oluşturmaktadır [50].

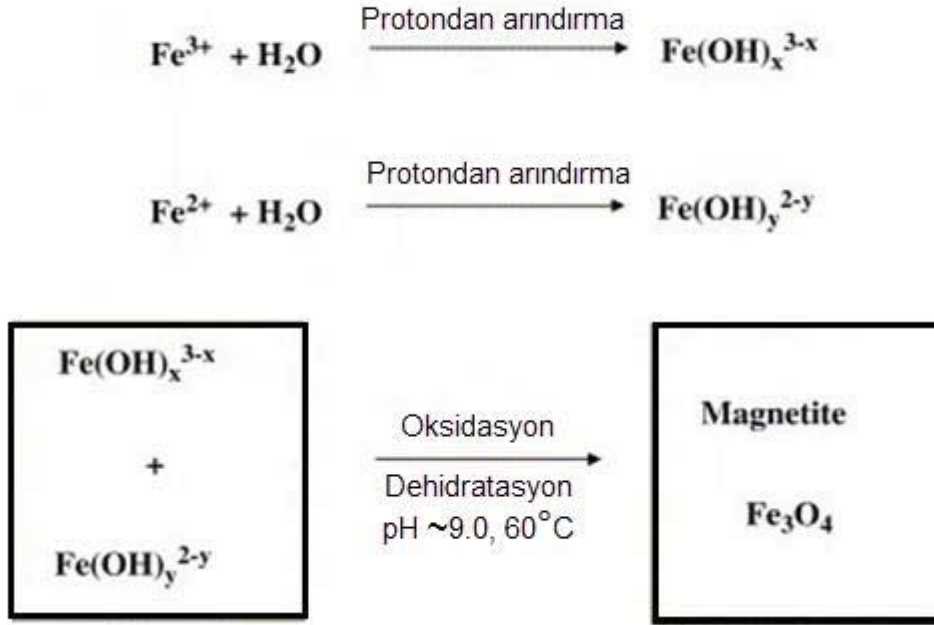
Medikal uygulamalar için manyetik nanokürelerin önemli özellikleri, toksik olmayan, biyouyumlu, enjekte edilebilirlik ve hedef doku veya organda yüksek seviyeli birikimdir. Yukarıda belirtilenler arasında yer alan en önemli özellik toksisitedir. Demir veya demir oksit, manyetik parçacıkların ana bileşenidir, ancak diğer uygulama alanlarında kobalt ve nikel gibi metaller kullanılır [48]. Nano ölçekteki malzemelerin yığın ve moleküler muadillerine göre artan toksik potansiyeli, büyük ölçüde artmış reaktif yüzey alanı, hücre ve doku bariyerlerini çaprazlama ve biyodegradasyona karşı dirençlerinden kaynaklanmaktadır [44].

2.6.1. Manyetik Nanokürelerin Sentezi

Moleküler ve katı haller arasındaki ara maddeler olarak inorganik nanoküreler çözeltideki kimyasal erişilebilirliği yığın fazın fiziksel özellikleriyle birleştirir. Bu nedenle, nanoyapılı malzemelerin yapımı için ideal elemanlardır ve ayarlanabilir fiziksel ve kimyasal özelliklerle tasarlanmıştır. Son yıllarda, çeşitli tiplerde demir oksitlerle ilgili araştırmalar, nanomanyetik küreler (çoğunlukla maghemit, $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ veya manyetit, Fe_3O_4) alanında gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.6.) [40]. Fe_3O_4 nanoküreleri enzim aktivitesini, yükleme ve stabiliteyi iyileştirmek için enzim immobilizasyonunda geniş bir ilgi görmüştür. Biyouyumluluğa ve kolay senteze sahip Fe_3O_4 nanoküreleri, diğerlerine kıyasla enzim için daha uygun desteklerdir [49].

Demir oksitler (Fe_3O_4 veya $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$) Fe^{2+} ve Fe^{3+} sulu tuz çözeltilerinin bir baz eklenmesiyle birlikte çökeltilmesiyle sentezlenebilir. Nanokürelerin boyut, şekil ve bileşiminin kontrolü; kullanılan tuzların türüne (örneğin klorürler, sülfatlar, nitratlar, perkloratlar vb.), Fe^{2+} ve Fe^{3+} oranına, ortamın iyonik kuvvetine ve pH'ına bağlıdır. Genel olarak, manyetit, 1:2 molar oranda bir Fe^{2+} ve Fe^{3+} klorür

sulu bir karışımına bir baz ilave edilerek hazırlanır. Çöken manyetit siyah renktedir.

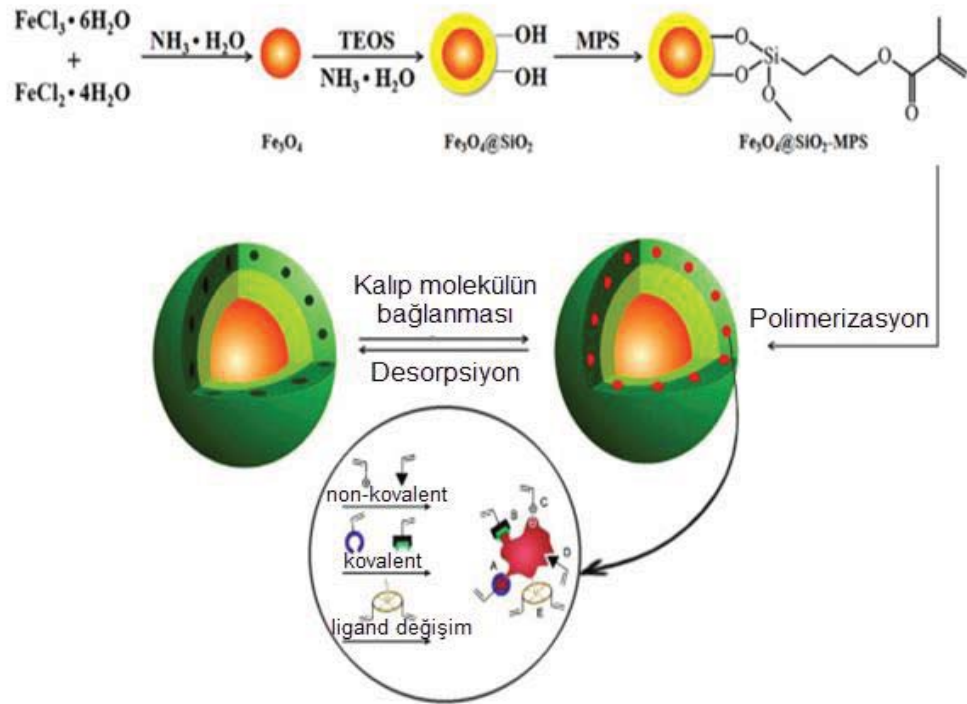


Şekil 2.6. Manyetit partikül oluşumunun reaksiyon mekanizmasını bir baz ilavesiyle bir sulu demir ve demir klorür karışımından gösterimi [40].

Manyetik nanoparçacıkların doğrudan kullanımı; toplanma, biyolojik uyumluluk ve çevresel stabilite kaygıları nedeniyle katı sınırlamalara sahiptir. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek ve bunları biyomoleküller ile kolayca işlevselleştirmek için MNP'ler genellikle çok yönlü yöntemlerle polimer matrislerine gömülür. Bunlar arasında miniemülsiyon, ters miniemülsiyon ve emülsiyon manyetik polimer nanokürelerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Emülsiyon ve miniemülsiyon yöntemleri, manyetik nanoparçacıkları polimer matrislerine dahil etmek için en uygun yöntemlerdir. MNP'lerin hazırlanmasındaki ana amaç, biyoaktif yüklü moleküllerin aktivitesini, kontrollü teslimatını ve verimliliğini artırmaktır [34].

MMIP'ler için birkaç hazırlık yaklaşımı vardır. Sentez prosedürü çeşitli ana adımlardan oluşur. İlk adım, manyetit adı verilen demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) elde edilmesini içerir. Tipik olarak bu bileşik, hidratlanmış demir (II) klorür ($\text{FeCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$)

ve demir(III)klorür ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)'ün birlikte çöktürülmesi kullanılarak elde edilir. İkinci oksidasyon durumundaki demir ayrıca demir(II)sülfattan ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) elde edilebilir. Her iki reaksiyon sodyum hidroksit çözeltisinde veya amonyakta $80-100^\circ\text{C}$ sıcaklıkta gerçekleştirilir. Bir sonraki adım, manyetit yüzeyinin değiştirilmesidir. MNP'ler, tetraetil ortosilikat (TEOS) reaksiyonu kullanılarak bir SiO_2 tabakası ile kaplanır. Daha sonra elde edilen silanol grupları, polimer-MAPS veya sonraki polimerizasyon işlemi için vazgeçilmez olan çoklu bağları içeren diğer silanlarla fonksiyonelleştirilir. Diğer bir yöntem, oleik asit veya etilen glikol gibi yüzey aktif maddelerin kullanılmasıdır. Örneğin, oleik asit polimer molekülün yüzeyini amfoterik hale getirir, bu da polar çözeltilerde (örneğin suda) kullanım olasılığını artırır. Son aşama MIP'nin oluşturulmasıdır. Bu reaksiyon, uygulanan kalıba ve porojen çözeltisine bağlı olarak farklı fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcılar ile gerçekleştirilebilir. MIP sentezi durumunda olduğu gibi polimerizasyon aşamasından sonra kalıp moleküllerin uzaklaştırılması son aşamadır. Yaygın olarak uygulanan bir karışım, 9:1 (v/v) oranında metanol ve asetik asit içerir. Daha az sıklıkla, tekrar tekrar yıkama ve MMIP sonikasyon uygulanır. MMIP'lerin şematik hazırlama protokolü, Şekil 2.7. 'de verilmektedir.



Şekil 2.7. MMIP'lerin şematik hazırlama protokolü [11, 16].

2.7. Nükleotidler ve Sitidin

Tüm canlı hücrelerdeki genetik bilgi, öncelikle kromozomlarda bulunan deoksiribonükleik asit (DNA) moleküllerinde taşınır. DNA'nın temel yapısı 1953'te James Watson ve Francis Crick tarafından aydınlatılmıştır. Önerdikleri yapı, hücrelerde kimyasal olarak saklanan genetik bilginin ilk defa nasıl oluştuğunu ve bir nesilden diğerine nasıl kopyalandığını ve aktarıldığını açıkça ortaya koymuştur. Önerilen DNA yapısı ayrıca mutasyonların kimyasal yapısına ve bunların çoğaltma sırasında nasıl oluşabileceğine dair görüş sağlamıştır [51].

Biyolojik dokularda ve sıvılarda serbest monomerik nükleotidler ve nükleozidler, polimerik nükleotidler (DNA ve RNA) olarak bulunurlar ve biyolojik olarak ilgili diğer kısımlara konjuge edilirler. Biyolojik kaynaklı örneklerde nükleotidlerin ve nükleotid katabolitlerinin metabolik öncüleri de mevcut olabilir. Nükleotidlerin bulunabileceği form çeşitliliği, hücresel ve biyolojik fonksiyonlardaki çeşitliliği ile eşleştirilir. Nükleotidler çeşitli biçimlerde, hücre büyümesi ve enerji metabolizması, genetik iletim ve sinyal iletimi üzerinde kilit rol oynarlar. Nükleotidler, ya nükleozid 5p-fosfatlar olarak ya da 3p, 5'-siklik adenosin monofosfat (AMP), guanosin tetraposfat (ppGpp) ve 3p, 5'-siklik diGMP gibi modifiye edilmiş nükleotidler şeklinde metabolik sinyal molekülleri olarak işlev görürler [52, 53]. Örneğin GTP, guanine nükleotid bağlayıcı proteinleri (G proteinleri) sinyalleşme zincirlerinin kilit araçları olarak aktive eder ve siklik nükleotidler önemli ikincil haberci molekülleri temsil eder. Ek olarak, nükleotidler koenzimlerin (örneğin, nikotinamid adenin dinükleotid) bütünleşik yapısal elemanları olarak işlev görürler, böylece redoks reaksiyonları gibi metabolik süreçleri kontrol ederler [54]. Ayrıca immün tepkisini artırmak, yağ asitlerinin metabolizmasını etkilemek in vitro ve yetişkin merkezi sinir sisteminde akson büyümesini stimüle eden, gastro intestinal sistemin büyümesini (bağırsakta demir emilimine katkıda bulunduğu) ve farklılaşmasını etkileyen ve bağışıklık tepkisini koruyan antikonvülsan aktivitesi gibi birçok fizyolojik aktiviteye sahiptirler [55, 56]. Tümör hücresi metabolizmasında çok sayıda kritik rol oynarlar. Ayrıca, ürün nükleozid profilleri ile kanser hastalıkları arasında bazı ilişkiler olduğu gösterilmiştir [57]. Bu nedenle hücre içi nükleotid derişimlerinin belirlenmesi,

belirli hastalık durumlarının mekanizması ve regülasyonu ile bağlantılı hücresel süreçlerin enerji durumu hakkında fikir sağlarlar [58, 59].

Nükleozidler ve nükleotidler organizmaya dışardan gıda yoluyla alınabilir; insan vücudu onları emme ve kullanma yeteneğine sahiptir. Belli koşullar altında endojen takviyesi yetersiz kalır bunun sonucunda nükleozidlere ve nükleotidlere olan talep artar ve bu bileşiklerin alınması organizmanın fonksiyonlarının normal gelişimi için zorunlu hale gelir. Birçok çalışma bu bileşiklerin diyetle bulunmasının bağışıklık tepkisi, demir emilimi, lipid metabolizması, bağırsak florası ve hem bağırsak hem hepatik morfoloji ve fonksiyon üzerinde yararlı etkilere sahip olduğunu göstermiştir [60].

İnsan sütü en iyi nükleotid kaynağıdır ve sütün protein olmayan azot içeriğinin bir parçasını oluşturur. İnek sütünde protein olmayan azot, toplam azotun sadece %2'sini temsil eder. Bu nedenlerden ötürü, Avrupa Gıda Bilimsel Komitesi (SCF, 1993), bebek formüllerine, insan sütündekilere benzer derişimlerde nükleotidler takviye edilmesini önermiştir. Sitidin 5'-monofosfat (CMP), adenosin 5 mon-monofosfat (AMP), üridin 5'-monofosfat (UMP), GMP ve IMP'nin serbest formlarının insan sütünde yüksek derişimde görünmesine rağmen bazı araştırmacılar sitidin 5'-difosfatın (CDP) insan sütündeki baskın bir nükleotid olduğunu tespit etmiştir. Süt ürünleri dışındaki gıda takviyeleri de enerji ve besinler söz konusu olduğunda uygun bir bileşime sahip olmalıdır çünkü bazı durumlarda 6 ila 12 aylık bebekler için tek besin kaynağı olarak kullanılırlar. Bu tür yiyeceklerde arzu edilen nükleotidlerin seviyeleri hakkında halihazırda hiçbir bilgi bulunmamakla birlikte, çalışmalar gittikçe daha fazla farklı içerik içerdiğinden ilgi çekmektedir [60].

Nükleik asitlerin degradasyonundan kaynaklanan hem doğal hem de modifiye edilmiş pürin ve pirimidin nükleozidler insan vücut sıvılarında bulunur ve insan hastalıklarının teşhisi için izlenir. Ayrıca, tıbbi kimyagerler bu doğal yapılardan ilham almış ve çeşitli ciddi insan patojenlerinin terapötik köşe taşlarını temsil eden nükleozid analogları geliştirmiştir. Bir dizi FDA onaylı pürin tipi antimetabolitler, lösemi (klofarabin, kladribin, fludarabin) tedavisinde veya immünosupresif ilaçlar (6-tioguanin, 6-merkaptopurin) olarak otoimmün bozuklukların tedavisinde kullanılmaktadır [61].

UCK2, pirimidin ribonükleotidi fosforilasyonundan (üridin ve sitidin) pirimidin nükleotidlerinin biyosentezinin geri kazanım yolundaki karşılık gelen monofosfatlara sorumlu olan bir enzimdir. Memeli hücrelerinde, UCK2'nin hız sınırlayıcı enzim olduğu kabul edilir ve bu nedenle sıkı bir şekilde düzenlenir. UCK2, normal hücresel metabolizma için gereken pirimidin nükleotidlerinin sentezini karşılamak için ATP tarafından tamamen aktif hale getirilir. Hücresel ihtiyaçları ayarlamak ve nükleotidlerin aşırı üretimini önlemek için UTP ve CTP tarafından inhibe edilen geri bildirimdir. Kanseri hücre çoğalması sırasında, bu nükleotidler protein sentezini korumak için sürekli sentezlenir [62].

Nükleozidlerin ve nükleotidlerin yüksek polaritesi nedeniyle, bu analitleri farklı gıda örneklerinden desorbe etmek için en sık kullanılan yöntem, esas olarak su veya başka polar çözücüler kullanılarak, sıvı-sıvı veya katı-sıvı ekstraksiyonuydu. Bugüne kadar çeşitli kromatografik yöntemler (ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC), ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC) kılcal elektrokromatografi (CEC) vb.) kullanarak bitkisel ilaçlarda, gıda bileşenlerinde, çeşitli memeli sütlerinde ve süt ürünlerinde ve biyolojik sıvılarda nükleozidlerin ve bunların analoglarının miktarının belirlenmesi için birçok analitik yöntem geliştirilmiştir. Çeşitli örneklerdeki nükleotidlerin ve metabolitlerinin tam profillerinin hassas ve doğru bir yöntemle belirlenmesi, fizyolojik ve farmakolojik çalışmalar için faydalı olacaktır [55, 60, 63]. Ayrıca nükleozid ve nükleotid derişimlerdeki değişikliklerin incelenmesi hastalıklardaki rollerini anlamada daha fazla bilgi sağlayabilir ve kanseri hedef alan yeni yöntemler geliştirebilir. Bu nedenle, nükleozidler ve nükleotidler gibi biyobelirteç adaylarının kesin olarak tanımlanması ve nicelleştirilmesinin önemli bir etkiye sahip olması beklenmektedir [57].

Nükleik asitlerin baskılanmasıyla ilgili ilk çalışmalar, 1989-1990 döneminde gerçekleştirilmiştir. Nükleozidler, nükleotidler ve nükleotid trifosfatlar gibi bileşiklerin, ilgili şablonlar için değişen derecelerde özgüllüğe sahip polimerlerin oluşumuna yardımcı olabildiği gösterilmiştir. Ne yazık ki, organik çözücüler içinde hazırlanan "geleneksel" etilen glikol dimetakrilat bazlı polimerlerde DNA dizilerinin baskılanmasının etkisiz olduğu kanıtlanmıştır. Spivak ve Shea, polimer kompozisyonunu, dimerler ve adenin tetramerleri gibi nükleik asit türevlerinin

baskılanması için optimize etmeye yönelik kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir ve bu çalışma, dimerlerden daha büyük olan DNA dizilerinin baskılanmasının son derece zor olması ile sonuçlanmıştır [64].

2.7.1. Nükleik Asitlerin Bileşenleri

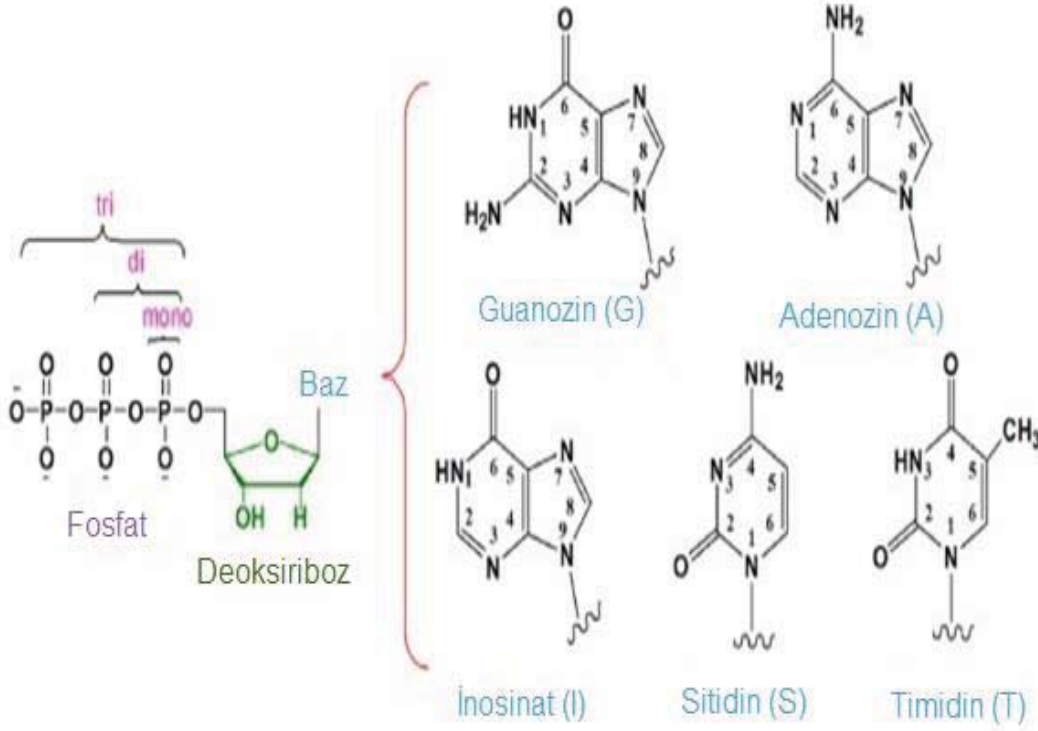
Canlı hücrelerin karmaşık yapılarını ve süreçlerini korumak için gerekli olan moleküllerin bolluğu arasında, nükleotidler temel öneme sahiptir. Bütün nükleotidler ortak bir yapıyı paylaşır ve bir fosfoester ile bir fosfat grubuna bağlanan bir nükleozidten oluşur. Nükleozidler, bir β -glikosidik bağlantı yoluyla bir riboz şekere (ribonükleozidler) bağlanmış bir pürin veya pirimidin bazından (örneğin, adenin, sitozin, guanin ve urasil) oluşan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Şekil 2.8.) [22]. Pürin nükleozidlerinin isimleri, -osin ile sonlanırken, pirimidin nükleosidleri, -idin ile sona ermektedir [54, 65].

Bir nükleik asit bir polinükleotittir. Üç bileşen ile tanımlanan nükleotidlerin doğrusal bir polimeridir:

1. Bir N-glikozidik bağ ile şekerin 1'-karbon atomuna bağlı bir azotlu heterosiklik baz (bir pürin veya bir pirimidin). DNA'da pürin bazları adenin (A) ve guanindir (G); pirimidin bazları ise sitozin (C) ve timindir (T) dir. RNA'daki bazlar, bir pirimidin olan urasil (U) 'in timinin yerini alması dışında aynıdır.
2. RNA için riboz ve DNA için deoksiriboz olan siklik bir beş karbonlu şeker. Şekerin karbon atomları, onları aynı nükleotid yapısındaki bazdaki karbon atomlarından ayırmak için bir astar ile numaralandırılır.
3. Bir fosfodiester bağı ile şekerin 5'-karbon atomuna bağlı bir fosfat grubu.

Bu fosfat grubu hem nükleotidlerin hem de nükleik asitlerin güçlü negatif yükünden sorumludur [65, 66].

Nükleik asitlerdeki nükleotidler, bir nükleotidin 5'-fosfatını bitişik nükleotidin 3'-OH grubuna birleştiren ikinci bir fosfodiester bağı ile birbirine bağlanır. Bu şekilde ikiye bölünmüş fosfat, fosfodiester grubu olarak adlandırılır.



Şekil 2.8. Nükleotidlerin kimyasal yapıları [67].

Adenosin trifosfat (ATP) ve guanosin trifosfat (GTP) metabolik süreçlerde enerjinin taşıyıcılarıdır. Pürin ve pirimidin nükleotidleri polisakarit ve lipid biyosentezinde kofaktörler olarak etki ederler, dolayısıyla hücre zarfın oluşumunda doğrudan rol oynarlar. Nükleotidler, nükleozidler ve nükleobazlar ve bunların türevleri, biyoteknolojik ürünler olarak endüstriyel açıdan önemlidir [68].

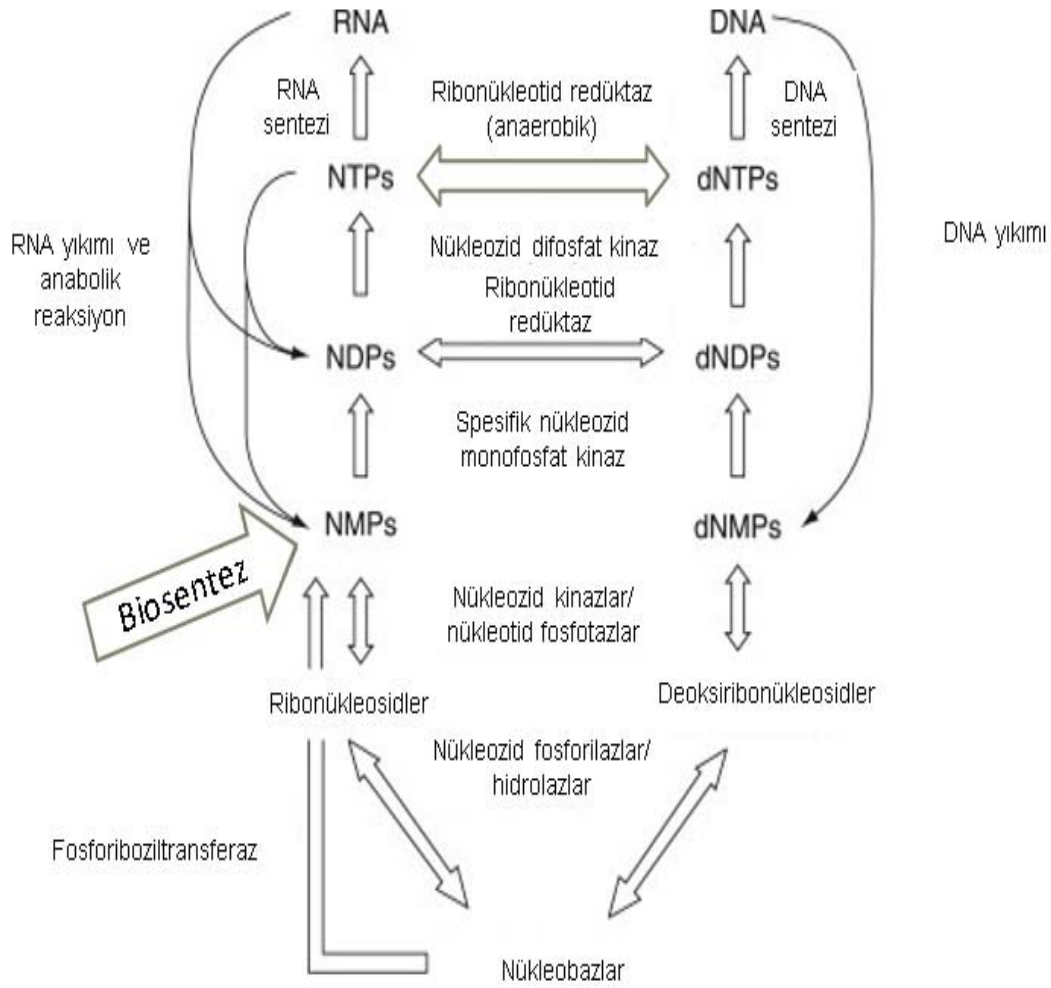
2.7.2. Nükleotidlerin Biyosentezi

Nükleozidler ve nükleotidler, biyosentetik yolların bir parçası oldukları ve biyolojik düzenleyiciler olarak önemli bir rol oynadıkları için diğer metabolik fonksiyonlara katılırlar. İnsan vücudu bu molekülleri endojen olarak sentezleyebilme yeteneğine sahiptir, bu da organizmada sürekli olarak oluştukları ve parçalandıkları anlamına gelir. Dolayısıyla oluşum iki farklı şekilde gerçekleşebilir: Birincisi öncü amino asitlerden yeni hücrelerde de novo sentezi ile ikincisi bazlar ve nükleozidler gibi DNA ve RNA'nın parçalanmasında üretilen aracı maddelerin yeni nükleotidleri sentezlemek için kullanıldığı kurtarma yolları olarak bilinen alternatif kurtarma yollarıdır (Şekil 2.9.) [60]. Birincisi prekürsör moleküllerden pürin ve pirimidin

sentezini ifade eder; ikincisi, diyet kaynaklarından, çevreleyen ortamdan veya nükleotid katabolizmasından elde edilen önceden oluşturulmuş pürin ve pirimidinlerin nükleotidlere dönüşümünü ifade eder. Pürin nükleotidleri ile ortak olan pirimidin nükleotidleri, DNA ve RNA sentezi için gereklidir. Ayrıca ara metabolizmaya da katılırlar. Örneğin, pirimidin nükleotidleri glikojenin ve fosfolipitlerin biyosentezinde yer alır [52, 65].

Nükleotid metabolizması toplamda dört farklı sınıfa bölünebilen 100 farklı reaksiyondan oluşur:

- (1) Nükleozid monofosfatlarının (NMP) ve üridin 5'-monofosfatın (UMP) olduğu de novo yolları,
- (2) NMP ve UMP ve diğer fosforile edilmiş türevlerin farklı nükleozid trifosfatlar (NTP'ler) ve dNTP'lere dönüştürüldüğü ara evre,
- (3) Farklı nükleozidlerin ve nükleobazların NMP'ye dönüştürüldüğü kurtarma,
- (4) Şeker ve baz kısımlarının karbon ve nitrojen kaynakları olarak kullanıldığı bozunma [68].

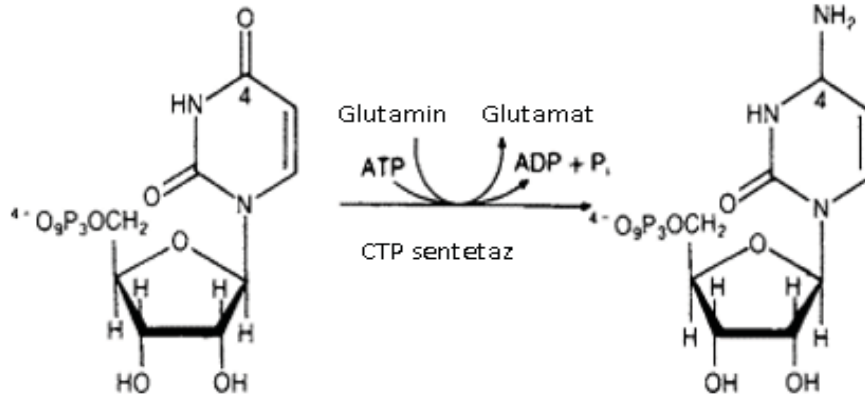


Şekil 2.9. Nükleotid metabolizması.

Dolaşımdaki pirimidinler üridin ve sitidin, nükleik asitlere dahil edilmelerinin yanı sıra, pirimidin nükleotid sentezinin kurtarma yolu için substratlar olarak da (fosfatidilkolin (PC) ve fosfatidiletanolamin (PE) biyosentetik yolunda ihtiyaç duyulan sitidin trifosfatın (CTP) öncülleri olarak) kullanılabilirler. İnsanlarda baskın dolaşımdaki pirimidin üridin olup; sıçanlarda sitidindir. Bu pirimidinlerin beyin ekstraselüler sıvısına, daha sonra nöronlara ve gliaya taşınması, bu nükleozidlerin beyinde kullanılması için gerekli ön koşuldur. Sitidin ve üridin, çeşitli beyin fonksiyonları üzerinde, örneğin kendi ilgili nükleotidlerine dönüştürülerek önemli etkiler gösterir. Bu işlevlerden biri nöronal membran fosfolipit sentezidir [69].

2.8. Sitidin Nükleotidlerin Sentezi

CTP, UTP'nin pirimidin halkasının C-4' ne glutamin amit azotunun transferi ile UTP'den sentezlenir ( ekil 2.10.). Bu reaksiyon, bir enerji kaynağı olarak ATP gerektirir.



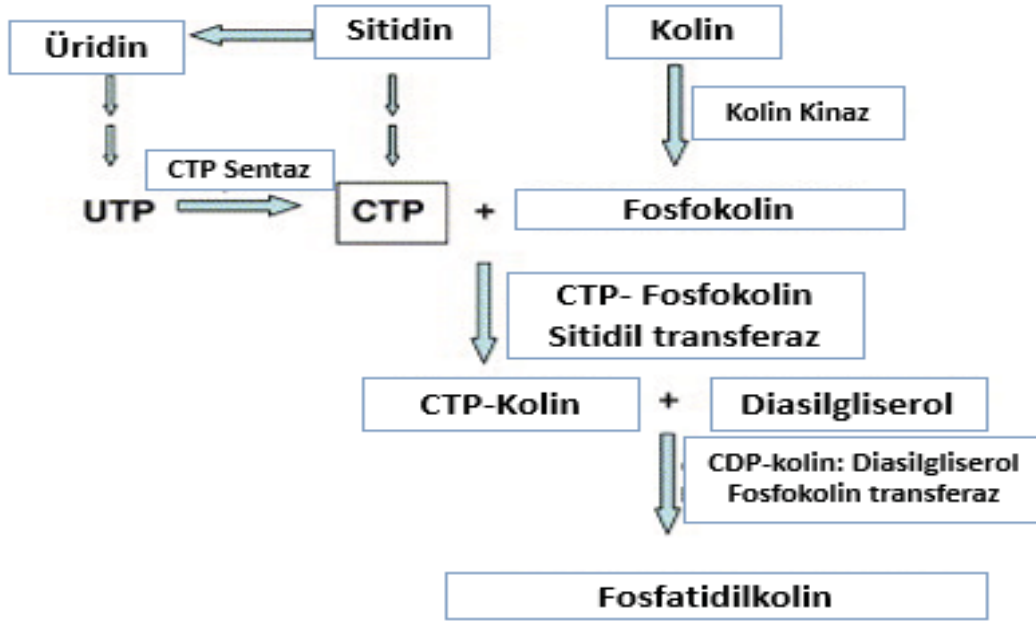
Şekil 2.10. CTP sentezinin gösterimi.

Deoksisitidin fosfatlar, pürin nükleotidleri için tarif edilene benzer bir mekanizma ile CDP'nin dCDP'ye indirgenmesinden kaynaklanır. Daha sonra dCDP, nükleozid difosfat kinaz ile dCTP'ye d n    r l r.

Sitidin 5p-monofosfat (5'-CMP), birkaç nükleotid türevinin hazırlanmasında anahtar ara maddelerdir. Sitidin 5'-trifosfat ve Sitidin difosfatın her ikisi de tedavide kullanılan kolin üretimindeki başlangıç materyaldir. 5'-CMP'nin her ikisi de pirimidin n kleotidleridir ve bazı yetişkin kişiler, bebekler ve memeli yavrularında bağı ıklıkta rol oynar ve bebek formülü için hayati bileşenler arasındadır [70].

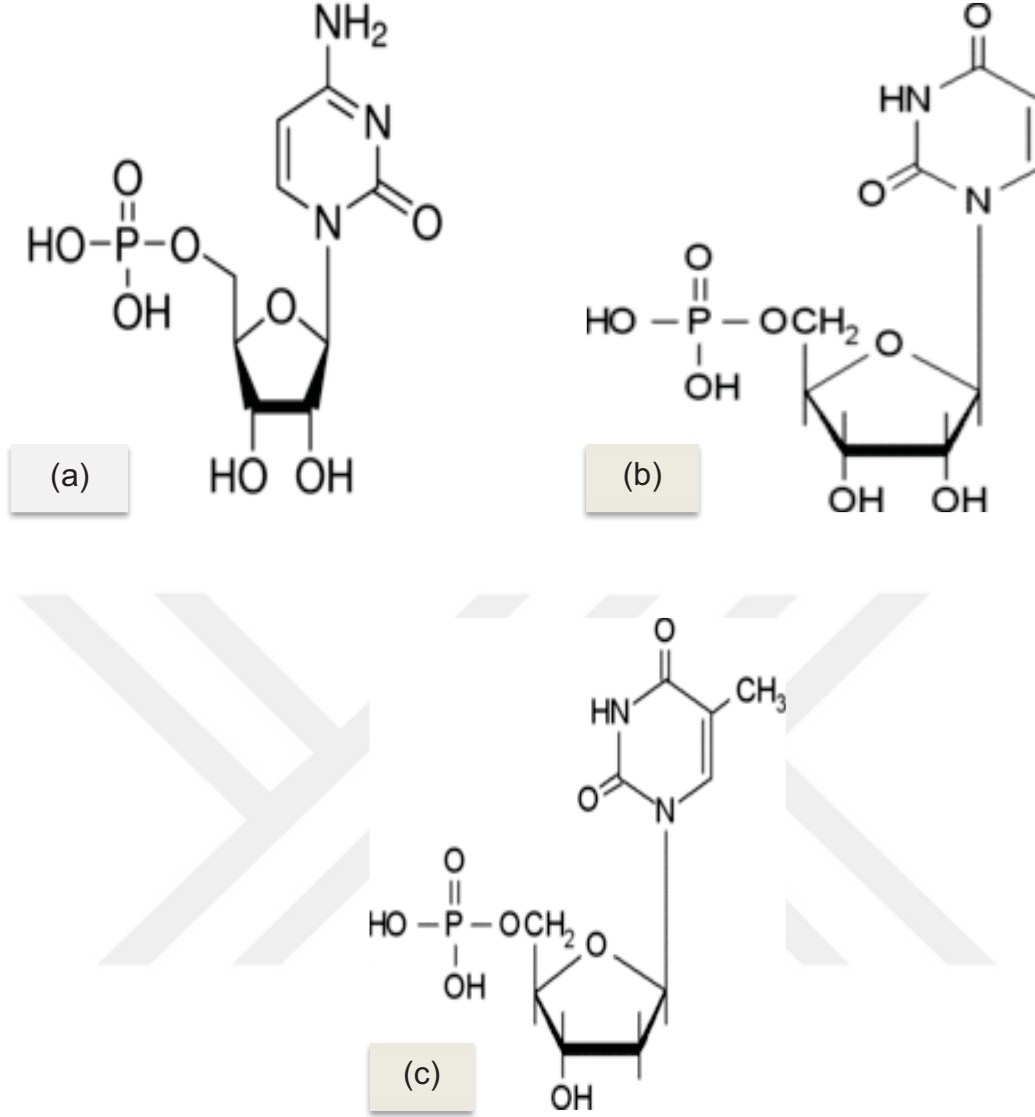
CDP-kolin (sitikolin), fosfolipid metabolizmasında yer alan önemli bir endojen metabolittir ( ekil 2.11.). Nöral iyile mede, iskemik nöral hastalıklarda, nörodejeneratif hastalıklarda, nöropatik ağrıda, bazı kardiyovasküler ve endokrin hastalıklarda yararları bilinmektedir. Başta fosfatidilkolin olmak üzere hücre membranının yapısal fosfolipitlerinin biyosentezi için gerekli bir moleküldür. Oral yoldan alındıktan sonra ince bağırsakta sitidin ve kolin alt birimlerine hidrolize olur. CDP-kolin, Japonya ve Avrupa'da kafa travması ve nörodejeneratif

hastalıkların tedavisi için onay almıştır. CDP-kolinin bazı görme bozukluklarında (glokom, ambliopi ve nonarteritik iskemik optik nöropati) görme fonksiyonunu artırdığı bildirilmiştir. CDP-kolin'nin aksonal rejenerasyonu potansiyalize ederek fonksiyonel iyileşmeyi artırma anlamındaki etkinliği için sitidin ve kolinin ortamda birlikte bulunmaları gerektiği saptanmıştır [71].



Şekil 2.11. Kennedy yolu üzerinden fosfatidilkolin (PC) biyosentezi.

Sıçan kan-beyin bariyeri (BBB), sitidin için yüksek afiniteli bir taşıyıcıya sahip olmadığından sadece küçük miktarlarda dolaşımdaki sitidin CTP'ye dönüştürülür; buna karşılık üridin daha sonra CTP sintaz ile CTP'ye dönüştürülen UTP'yi veren yüksek afiniteli transporter yoluyla kolayca beyne girer.



Şekil 2.12. (a) Sitidin, (b) Üridin ve (c) Timidin nükleotidlerinin moleküler yapıları.

Beynin dolaşımdaki üridini aldığı ve alım yolu açıklanmış ve daha sonra tek bir enjeksiyon yöntemi kullanılarak, adenin, adenosin, guanosin, inosin ve üridinin hepsinin sıçan BBB'sini geçebildiği gösterilirken; sitidin, timidin ve bunların bazlarının olmadığı gösterilmiştir. Çalışmalarda, adenosin ve üridin gibi pürinler için sıçan BBB'de yüksek afiniteli bir nükleozid taşıyıcının (CNT2) ekspresyonunu ortaya koyulmuş ancak sitidin için bu geçerli olmamıştır. BBB transportu, dolaşan bileşiklerin çoğunda beyin alımının ana belirleyicisi olduğundan bu bulgunun, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda sitidin veya üridin kaynaklarının olası etkilerini araştırmak için yeni yollar açabileceği düşünülmektedir [69].

4. DENEYSEL YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Malzemeler

Metakriloil klorür, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA, %98), sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum bikarbonat (NaHCO_3 , %99.7-100.3%), amonyum persülfat (APS, %98) ve sodyum bisülfat (NaHSO_3 , minimum %99) Sigma (Sigma Chemical Co., ABD) ve Poli(vinil alkol) (PVA; MW: 16.000, %98) Acros (Organics, ABD) firmalarından temin edilmiştir. Ayrıca Cu^{+2} iyonu için $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ tuzu Sigma (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Nano boyutlu manyetit demir tozu (Fe_3O_4 , ortalama çapı $\approx 20\text{-}50$ nm), sitidin, üridin ve timidin Sigma firmasından satın alınmıştır.

Çalışma aşamasında kullanılan diğer kimyasal maddeler analitik saflıktadır ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deney çalışmalarında kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROPure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi ile saflaştırılmıştır. Elde edilen deiyonize suyun iletkenliği 18.2 MΩ/cm'dir.

3.2. PHEMA Manyetik Nanokürelerin Sentezi

Fe_3O_4 (manyetit) varlığında manyetik 2-hidroksietil metakrilat (mPHEMA) nanokürelerin sentezlenmesi için miniemülsiyon polimerizasyon yöntemi uygulanmıştır ve bu yöntem şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

İlk sulu fazı oluşturmak için (faz-I); 0.05 g PVA (stabilizatör) ve 0.05 g SDS (sürfaktan) 100 mL deiyonize suda çözünmüştür. 100 mg manyetit (Fe_3O_4) bu faza eklenmiştir. İkinci bir sulu faz (faz-II) dağıtma ortamıdır; 0.0935 g PVA, 14 mg SDS ve 12.5 mg NaHCO_3 'ün 5.0 mL deiyonize suda çözünmesi ile hazırlanmıştır. Daha sonra organik fazı (faz-III) oluşturmak üzere 0.5 mL HEMA (ana monomer) ve 1.0 mL EDMA (çapraz bağlayıcı) karıştırılmıştır. Daha sonra faz-III, faz-II'ye yavaşça eklenerek reaksiyona takviye edilmiş ve 15 dk 25 000 rpm'de mini-emülsiyon polimerizasyonunu elde etmek için homojenize edildi. Organik faz-II, III karışımı manyetitle faz-I karışımına eklendi (Çizelge 3.1.). Elde

edilen karışımın son hali 250 ml'lik iki boyunlu cam balona aktarılarak, 500 rpm'de karıştırılarak ısıtılmıştır. Karışımın 40°C'ye ulaşmasının ardından 50 mg NaHSO₃ ve 100 mg APS başlatıcı çifti reaksiyon ortamına eklenerek, 500 rpm'de 24 saat polimerizasyona devam edilmiştir (Şekil 3.1.).

Çizelge 3.1. Nanoküre sentezi oranları.

Faz-I	Faz-II	Faz-III (Monomer Fazı)	Başlatıcı çifti
50 ml H ₂ O 0.05 g PVA 0.05 g SDS 100 mg Fe ₃ O ₄	5 ml H ₂ O 0.0935 g PVA 14 mg SDS 12.5 mg NaHCO ₃	1 ml EDMA 0.5 ml HEMA	100mg APS 50 mg NaHSO ₄

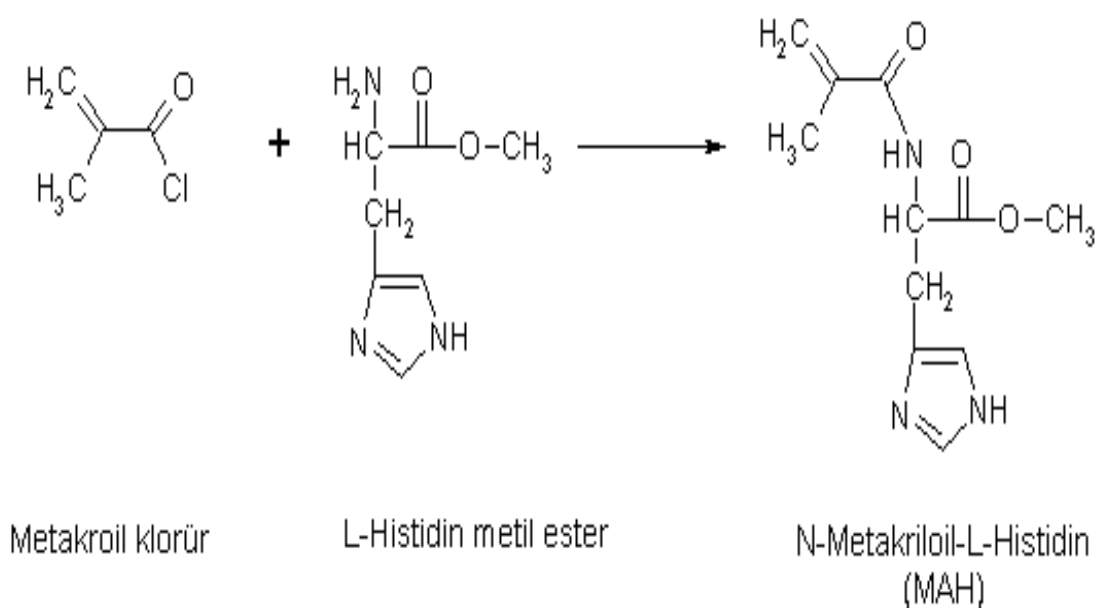
Yıkama işlemlerinin gerçekleştirilmesi ve adsorpsiyon deneylerinde büyük boyuta sahip nanokürelerin çöktürülmesi gerekmektedir. Bunun için ultrasantrifüj (Beckman Coulter, Allegra 64R, ABD) kullanılmıştır. Süspansiyon halindeki nanoküreler, 30000 rpm hızda 1 saat süreyle santrifüjlenerek çöktürülmüştür.



Şekil 3.1. mPHEMA nanokürelerin hazırlanmasında kullanılan miniemülsiyon polimerizasyon düzeneğinin şematik gösterimi.

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

Cyt baskılanmış nanokürelerin hazırlanmasında fonksiyonel monomer olarak N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) seçilmiştir. MAH'ın sentezi literatürde daha önce bildirilmiştir (Şekil 3.2.) [72]. MAH monomerinin sentez yöntemi kısaca şöyledir: L-histidin metil ester (5.0 g) ve hidrokinon (0.2 g) diklorometan (CH_2Cl_2) (100 mL) çözeltisi içinde çözülmüştür. Çözelti 0°C de soğutulmuştur. Trietilamin (12.74 g) bu çözeltiye eklenmiştir. Metakroil klorür (5.0 mL) yavaşça bu çözeltinin üzerine dökülmüştür. Reaksiyon karışımı manyetik karıştırıcı ile azot atmosferi altında oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu kimyasal reaksiyon periyodu sonunda reaksiyona girmeyen metakroil klorür, %10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Sıvı faz döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAH) etanolde çözülmüştür [72].



Şekil 3.2. MAH monomerinin sentez tepkimesi [73].

3.4. MAH-Cu(II) Kompleksinin Hazırlanması

MAH-Cu(II) kompleksinin hazırlanması için ilk olarak MAH monomeri (0.2 mmol) 300 μL olarak tartıldı ve daha sonra oda sıcaklığında bakır nitrat ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$) (1.0 mmol, 23.2 g) ile muamele edilmiştir. Çözelti yarım saat boyunca sürekli olarak vortekslenmiş ve sonikatörde karıştırılmıştır. Kalıp molekül Sitidin (Cyt) (0.15 mmol), MAH-Cu(II) kompleksi içerisinde çözülene kadar

karıştırılmıştır ve Cyt-MAH-Cu(II) kompleksinin ön kompleksleşme basamağı gerçekleştirilmiştir.

3.5. Sitidin Baskılanmış (Cyt-MIP) manyetik nanokürelerin hazırlanması

Sitidin baskılanmış nanokürelerin (Cyt-MIP) hazırlanmasında izlenen yol şu şekildedir: Polimerizasyon sistemi üç fazın karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Faz-I'de 0.05 g PVA ve 0.05 g SDS 100 mL deiyonize suda çözünmüştür. Faz-II ise 93.5 mg PVA, 14 mg SDS ve 12.5 mg NaHCO₃'ün 5.0 mL deiyonize suda çözünmesiyle hazırlanmıştır. Faz-III, 0.5 mL HEMA (ana monomer) ve 1 mL çapraz bağlayıcı EGDMA, MAH-Cu(II)- Cyt ön kompleksi (5.0 mL) ile manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Polimerleşme aşamasında NaHSO₃ katalizör, serbest radikal oluşumuna sebep olan amonyum persülfat (APS) reaksiyon başlatıcı olarak kullanılmıştır. Çözeltiye 100 mg APS ve 500 mg NaHSO₃ eklenmiştir. 500 rpm karıştırma hızında karıştırılarak ısıtılmıştır. Karışım 40°C'ye ulaştıktan sonra 500 rpm'de 24 saat boyunca polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Oluşan nanoküreler oda sıcaklığına getirilmiş ve reaksiyona girmemiş monomerlerin ve diğer safsızlıklar polimerik yapıdan uzaklaştırılması için su ile yıkanarak Cyt baskılanmış manyetik nanokürelerin (Cyt-MIP) sentezi gerçekleştirilmiştir.

Baskılanmamış (NIP) manyetik nanoküreler ise ortama kalıp molekül olan Cyt eklenmeksizin aynı yöntemle sentezlenmiştir.

3.6. Kalıp Molekülün (Sitidin) Uzaklaştırılması

Cyt'e özgü moleküler tanıma boşluklarının elde edilebilmesi için Cyt baskılanmış nanoküreler (MIP) 1.0 M NaCl çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak kalıp molekül Cyt'nin uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir.

3.7. Nanokürelerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.7.1. Zeta Size ile Boyut Analizi

Sentezlenen Cyt-MIP ve nanokürelerin boyut analizi, Nano Zeta Sizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile analiz edilmiştir. Zeta boyut ölçüm cihazının hücresi içine ~250 µL süspansiyon halindeki sentezlenen nanoküreler

konularak ölçüme hazır hale getirilmiş ve analiz sonrası sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.7.2. Yüzey Alanı Analizi

Cyt-MIP nanokürelerin yüzey alanı hesabında 1.0 ml süspansiyondaki partikül sayısını veren eşitlik (3.1.) kullanılmıştır.

$$N = 6 \times 10^{10} \times S / \pi \times \rho_s \times d^3 \quad (3.1)$$

Burada N, 1.0 ml süspansiyondaki nanoküre sayısı; S % katı; d çap (nm); ρ_s polimer yoğunluğunu göstermektedir. Nanokürelerin spesifik yüzey alanı m^2/g biriminde eşitlik (3.2) yardımı ile hesaplanmıştır.

$$\text{Kürenin yüzey alanı} = 4 \times \pi \times r^2 \quad (3.2)$$

3.7.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Baskılanmış ve baskılanmamış manyetik nanokürelerin yüzey morfolojisi için kullanılan yöntemlerden biri de taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizidir. Kuru nanokürelerin yüzey morfolojisi QUANTA 400F Field Emission cihazıyla incelenmiştir. Nanoküreler iletken bir yapıştırıcıyla SEM örnek plakası üzerine tutturulmuştur. Daha sonra vakum altında örnek yüzeyleri altın ile kaplanarak yüzey iletken hale getirilmiştir. SEM cihazına verilip farklı büyütme oranlarında fotoğraflarına bakılmıştır.

3.7.4. FTIR Çalışmaları

Manyetik nanokürelerin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Ölçüm yapılan örnek haznesinden 10 dk. azot gazı geçirilerek havadan kaynaklanan nem ve karbondioksit uzaklaştırılmıştır. Kuru formda bulunan manyetik nanoküreler cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülerek spektrumlar

alınmıştır. mPHEMA, Cyt-MIP ve NIP manyetik nanoküreler FTIR-ATR spektrumları ile rapor edilmiştir.

3.7.5. Elektron Spin Rezonans (ESR) Spektrometresi İle Manyetik Analiz

mPHEMA nanokürelerin polimerik yapısındaki manyetik partiküllerin varlığı elektron spin rezonans (ESR) spektrofotometresi ile araştırılmıştır (EL 9, Varian, ABD).

3.8. Adsorpsiyon Çalışmaları

Bakır Cu(II) bağlı mPHEMA nanokürelere Cyt adsorpsiyonu deneyleri kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon deneylerinde Cyt başlangıç derişimlerinin (0.05 mg/mL-3.0 mg/mL aralığında), pH'ın (4.0-8.0), ortam sıcaklığının (4°C-45°C), zamana bağlı değimin ve farklı tuzların (NaCl, MgCl₂ ve CaCl₂) Cyt adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir. Çalışmalarda Cyt içeren 30 mg/L derişiminde 10 mL stok çözelti hazırlanmıştır (pH 7.4). Belirlenen derişimlere stok çözelti seyreltilerek geçilmiştir. Adsorpsiyon çalışmalarında 0.05-3.0 mg/L derişim aralığında 1.5 mL'lik çözeltiler kullanılmıştır.

Çözeltideki Cyt derişimleri, 270 nm'de spektrofotometrik (Shimadzu UV- 1601, Japonya) olarak belirlenmiştir. Cihazın duyarlılığı periyodik olarak standart Cyt çözeltisi ile kontrol edilmiştir. Ölçümler ve deneyler 3 kez tekrar edilmiş ve ortalama sonuçlar alınmıştır. Gram polimer başına adsorplanan Cyt miktarı (mg/g polimer), kalibrasyon eğrisi ile aşağıda yer alan eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Q = [(C_o - C) V] / m \quad (3.3.)$$

Burada Q, birim nanoküre üzerine adsorplanan Cyt kütlesini (mg/g); C_o ve C sırasıyla, nanoküreler ile Cyt etkileştirilmelerinden önce ve sonraki derişimlerini (mg/ml); V, çözelti hacmi (ml); m, kullanılan nanoküre ağırlığını (g) ifade etmektedir.

3.9. Seçicilik Deneyleri

Cyt baskılanmış nanokürelerin seçiciliğini göstermek için Uri ve Tym yarışmacı nükleotidler olarak seçilmiştir. Seçilen nükleotidlerin 1.0 mg/mL derişimindeki sulu çözeltileri ayrı ayrı hazırlanarak kesikli sistemde 2 saat boyunca Cyt baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) nanoküreler ile adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tym ve Uri için Cyt'e göre seçicilik ve dağılma katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f) / C_f] \times V/m \quad (3.4)$$

K_d dağılma katsayısını (mL/g); C_i ve C_f nükleotid çözeltilerinin başlangıç ve son derişimlerini (mg/mL), V kullanılan çözelti hacmini (mL) ve m ise nanokürelerin ağırlığını (g) ifade eder.

Bir nükleotidin bağlanması için yarışmacı türler varlığında seçicilik katsayısı eşitlik 3.5'e göre denge bağlanma verilerinden elde edilebilir.

$$K = K_{\text{kalıp}} / K_{\text{yarışmacı}} \quad (3.5)$$

Cyt baskılanmış nanokürelerle yapılan adsorpsiyon çalışmalarının, NIP çalışmalarına oranı baskılanmanın seçiciliği konusunda değerlendirme yapılmasına olanak sağlar.

Bağıl seçicilik katsayısı (k') aşağıda yer alan eşitlik ile elde edilir;

$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad (3.6)$$

3.10. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Cyt baskılanmış nanokürelerden Cyt desorpsiyonu 1.0 M NaCl çözeltisi içeren 1 mg/mL fosfat tamponu (pH: 7.4) ile gerçekleştirilmiştir. Cyt adsorplanmış MIP nanokürelerin desorpsiyon işlemleri kesikli sistemde incelenmiştir. Cyt

adsorplanmış polimerik nanoküreler, desorpsiyon ortamında 25°C'de, 2 saat boyunca 20 rpm hızda aralıksız şekilde karıştırılmıştır.

Desorpsiyon oranı aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

Desorpsiyon oranı (%) = [salınan Cyt miktarıx100] / [adsorplanan Cyt miktarı]

Cyt baskılanmış nanokürelerin tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi için adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi on defa tekrar edilmiştir.



5. SONUÇLAR

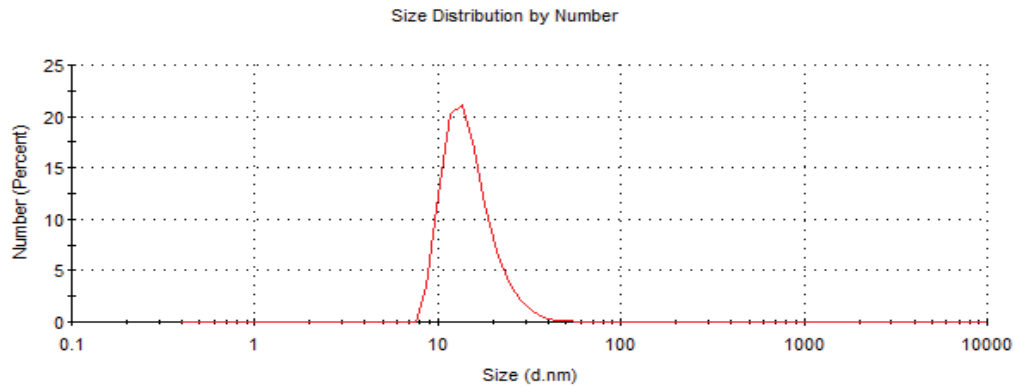
4.1. Nanokürelerin Karakterizasyonu

Çalışmanın bu aşamasında miniemülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle hazırlanan nanokürelerin karakterizasyon sonuçları verilmiştir. Sentezlenen nanoküreler karakterizasyon çalışmaları için liyofilizatörde kurutularak incelenmeye hazır hale getirilmiştir. Nanokürelerin karakterizasyonu; Zeta-boyut analizi ve yüzey alanı hesaplamaları, Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR), Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Elektron Spin Rezonans (ESR) ölçümleri ile yapıldı.

4.1.1. Zeta Boyut Analizi

Cyt-MIP, NIP ve boş olarak sentezlenen nanokürelerin boyut analizi, Nano Zeta-sizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile belirlenmiştir. Zeta boyut analizi için uygulanan deneysel yöntem için; nanoküre çözeltisi (~250µL) analizörün örnek haznesine yerleştirilmiştir. Işık saçılması 90°'lik geliş açısında 25°C'de tayin edilmiştir. Veri analizi için, deiyonize suyun yoğunluğu (0.8872 mPa.s) ile kırılma indeksi (1.330) kullanılmıştır.

	Size (d.nm):	% Number:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 41.49	Peak 1: 15.13	100.0	5.278
Pdl: 0.271	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.926	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			



Şekil 4.1. Cyt-MIP nanokürelerin 41.49 nm çapındaki çap ve boy dağılımını veren Zeta boyut dağılımı grafiği.

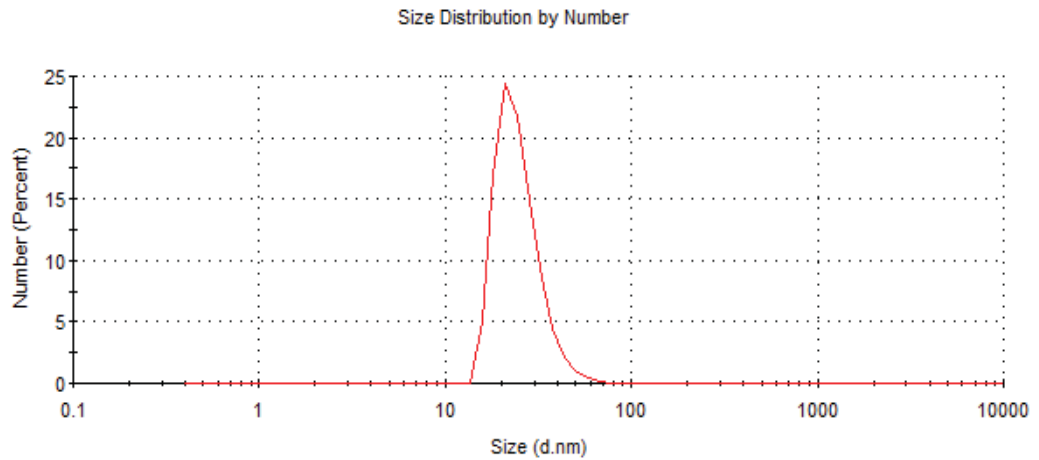
Çizelge 4.1.'de, tez çalışmasında kullanılan 3 farklı denemede sentezlenmiş nanokürelerin boyutsal değerleri ve ortalamaları yer almaktadır. Baskılanmış nanokürelerin ortalama boyutu 42.23 nm ve eş boyut dağılım aralığına sahiptir. Nanokürelerin polidispersitesi 0.293 olarak bulunmuştur (Şekil 4.1.). NIP ve boş nanokürelere ait çap ve boy dağılım grafikleri Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'de verilmiş olup ayrıca Cyt- MIP, NIP ve boş nanokürelere ait çap değeri ve boy dağılımı değerleri Çizelge 4.2.' de yer almaktadır.

Çizelge 4.1. Farklı sentezlere ait manyetit partiküllerin boyut değerleri.

Özellik	1. Sentez	2. Sentez	3. Sentez	Ortalama
Partikül Çapı (nm)	42.43	41.49	42.78	42.23
Boy Dağılımı (Pdl)	0.277	0.271	0.331	0.293

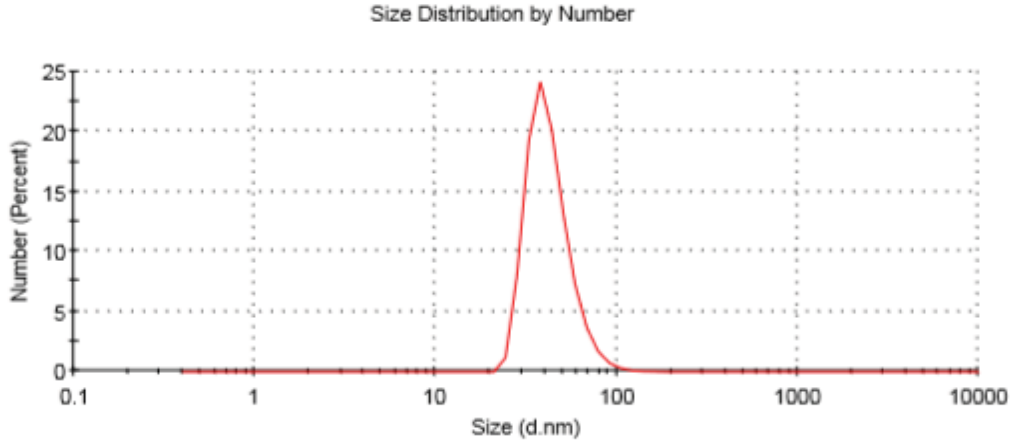
Elde edilen sonuçlara göre partikül boyu açısından kullanılan sentez yöntemi yaklaşık sonuçlar vermiştir. Boy dağılımı bakımından en uygun bulunan 2.sentez ile elde edilen nanoküreler daha sonraki aşamalarda kullanılmıştır.

Z-Average (d.nm): 51.87	Peak 1:	Size (d.nm): 24.90	% Number: 100.0	St Dev (d.nm): 7.472
Pdl: 0.272	Peak 2:	0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.933	Peak 3:	0.000	0.0	0.000
Result quality : Good				



Şekil 4.2. NIP nanokürelerin 51.87 nm çapındaki çap ve boy dağılımını veren Zeta boyut dağılımı grafiği.

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 72,44	Peak 1: 42,96	100,0	12,80
Pdl: 0,152	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,931	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Şekil 4.3. Boş nanokürelerin 72.44 nm çapındaki çap ve boy dağılımını veren Zeta boyut dağılımı grafiği.

Çizelge 4.2. Cyt- MIP, NIP ve boş nanokürelere ait çap değeri ve boy dağılımı sonuçları.

Türü	Partikül Çapı (nm)	Boy Dağılımı (Pdl)
Cyt- MIP	41.49	0.271
NIP	51.87	0.272
NP	72.44	0.152

Sentezlenen nanokürelerin çapları MIP için 41.49 nm, NIP için 51.87 nm ve NP için 72.44 nm'dir. Sentezlenen nanokürelerin polidispersite indeksleri ise 0.271-0.272 ve 0.152 olarak bulunmuştur. Değerlere bakıldığında nanokürelerin dar boyut dağılımına sahip olduğu anlaşılmaktadır.

4.1.2. Yüzey Alanı Analizi

Cyt baskılanmış nanokürelerin toplam yüzey alanı $980.9 \text{ m}^2/\text{g}$, baskılanmamış nanokürelerin ise $780.95 \text{ m}^2/\text{g}$ olduğu bulunmuştur. Baskılamanın yüzey alanının artmasına sebep olduğu görülmektedir. Elde edilen geniş yüzey alanı, düşük kütle transfer sınırlamaları oluşturur ve bu da nanokürelerin yüksek adsorpsiyon kapasitelerine ulaşabilmelerini sağlayabilmektedir.

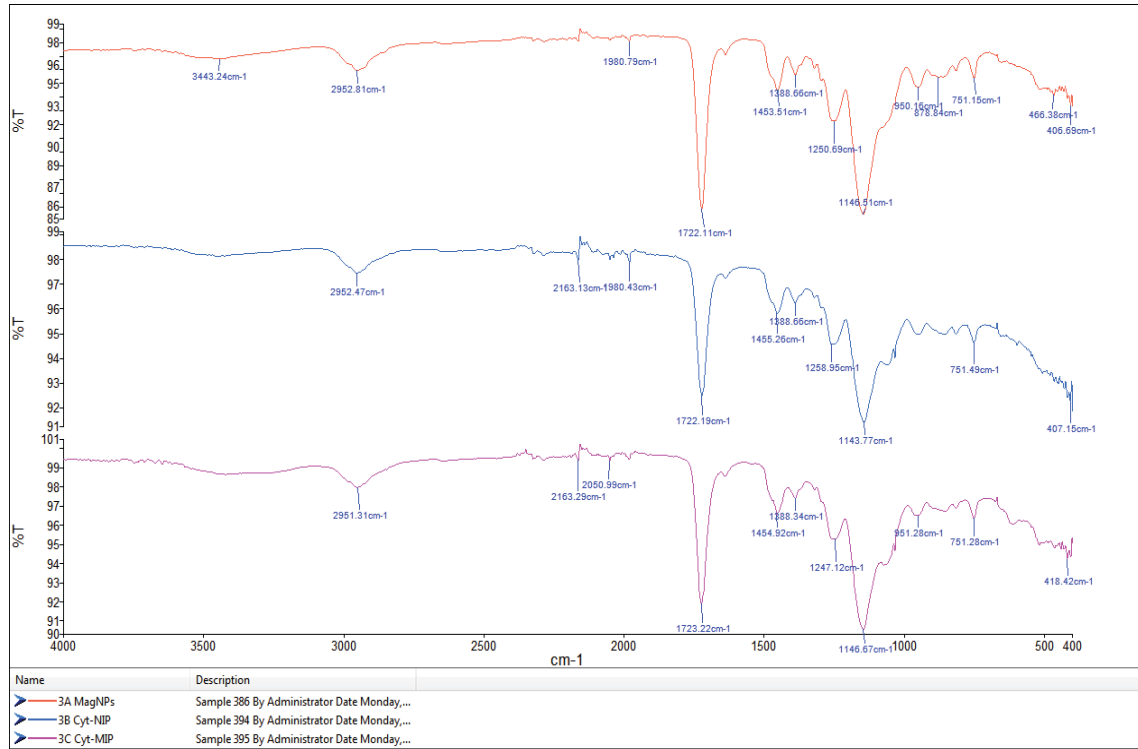
Çizelge 4. 3. Cyt baskılanmış ve baskılanmamış nanokürelerin yüzey alanları.

Polimer Örneği	NIP	MIP	BOŞ
Yüzey alanı (m^2/g)	780.95	980.9	710.68

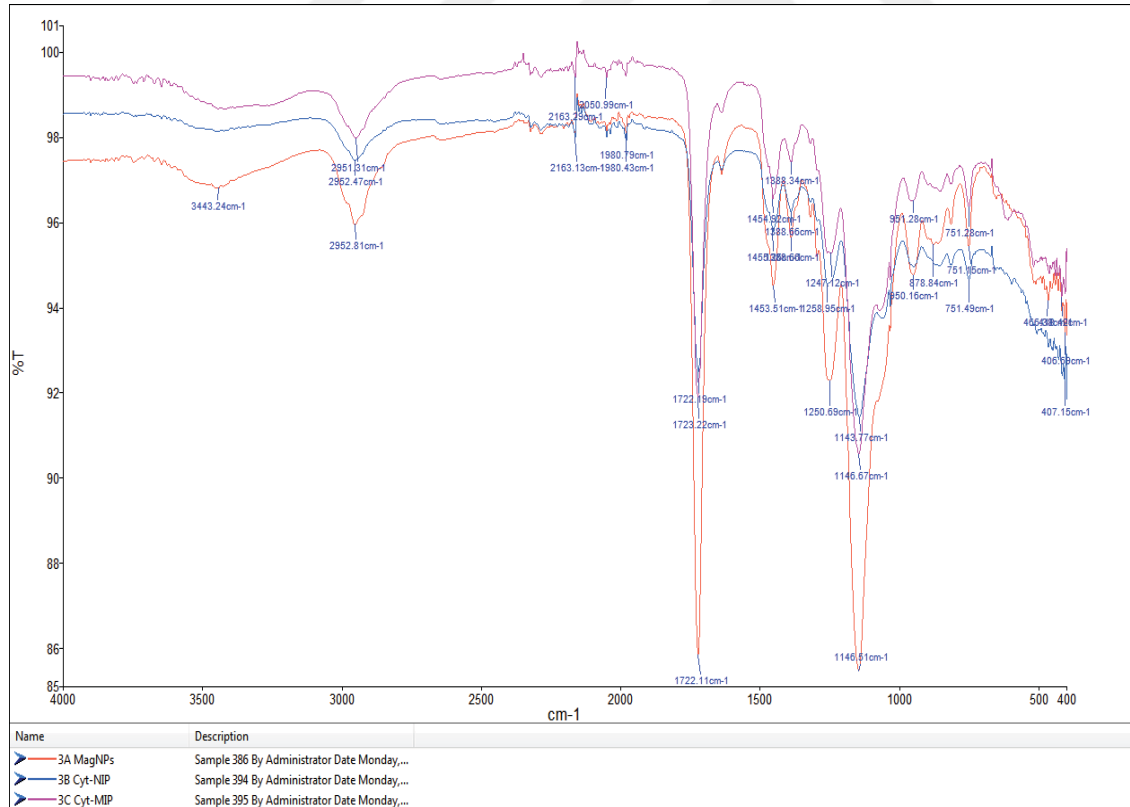
4.1.3. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Araştırma kapsamında sentezlenen manyetik PHEMA, Cyt-MIP ve NIP nanokürelerin FTIR spektrumları çekilmiş ve Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.

Sentezlenen nanokürelerin karakterizasyonu belirlemek için FTIR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Kuru formda bulunan nanoküreler cihazın örnek haznesine yerleştirilerek $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında yüzeyde meydana gelen toplam yansıma miktarı ölçülerek spektrumlar alınmıştır.



(a)



(b)

Şekil 4.4. (a) ve (b); (3A) MagNPs, (3B) Cyt-NIP ve (3C) Cyt-MIP nanoküreslerine ait FTIR spektrumları.

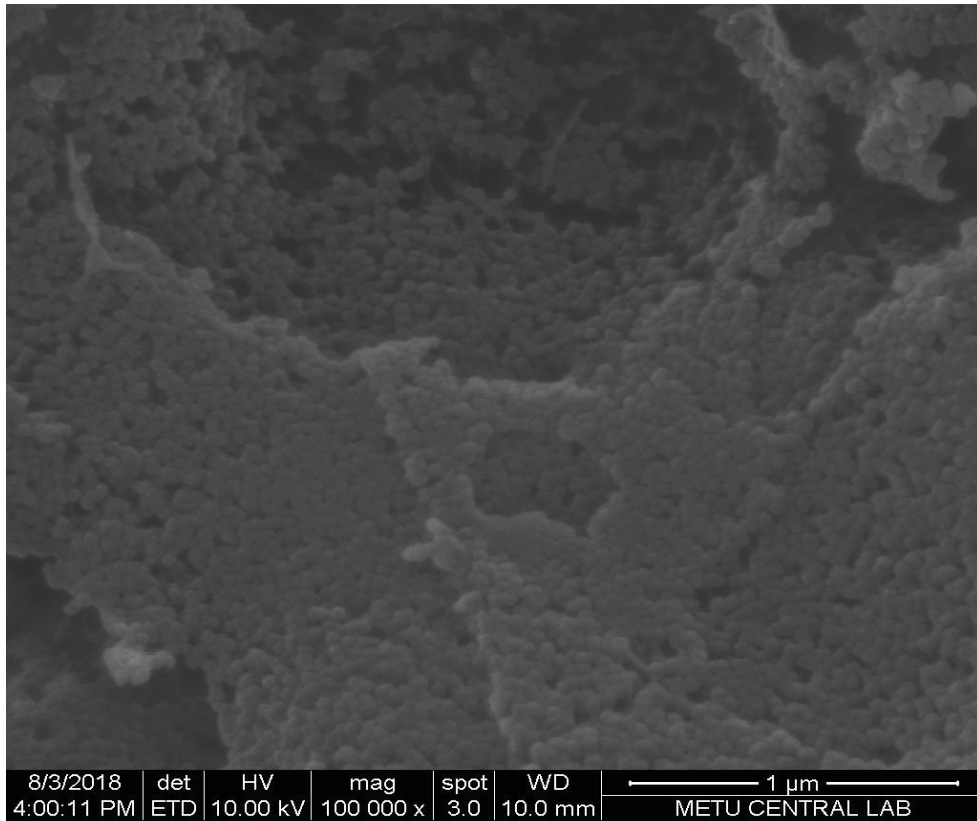
mPHEMA nanokürelerin 3443 cm^{-1} de tespit edilen geniş keskin pik özellikle hidrojen bağına katılmış ve katılmamış O-H gerilme titreşimini karakterize etmektedir [74, 75]. Hidroksil gruplarının kendi arasında oluşan hidrojen bağlarına ilaveten aynı zamanda Fe^{3+} iyonu ve OH grupları arasında da meydana gelen elektrostatik etkileşimler de vardır. Bundan dolayı Fe^{3+} varlığında çekilen spektrumda görülen OH piki çok geniş değildir. PHEMA her bir polimer yan zincirinde bir hidroksil grubu ve bir karbonil grubuna sahip olduğundan; bu fonksiyonel gruplar da OH---O=C ve OH---OH şeklindeki hidrojen bağlarına katkıda bulunabilirler [76]. 1722 cm^{-1} frekansında görülen keskin pik mPHEMA polimerinin C=O gerilme titreşimini karakterize eder C=O bandı keskin bir pik şeklinde gözlenmektedir.

751 cm^{-1} frekansında karşılaşılan pik ise Fe_3O_4 molekülünün Fe-O gerilme titreşimini işaret ederek mPHEMA nanokürelerin manyetikliğini desteklemektedir. 1258 ile 1143 cm^{-1} 'deki pikler C-O gerilme titreşimlerini karakterize ederler [77].

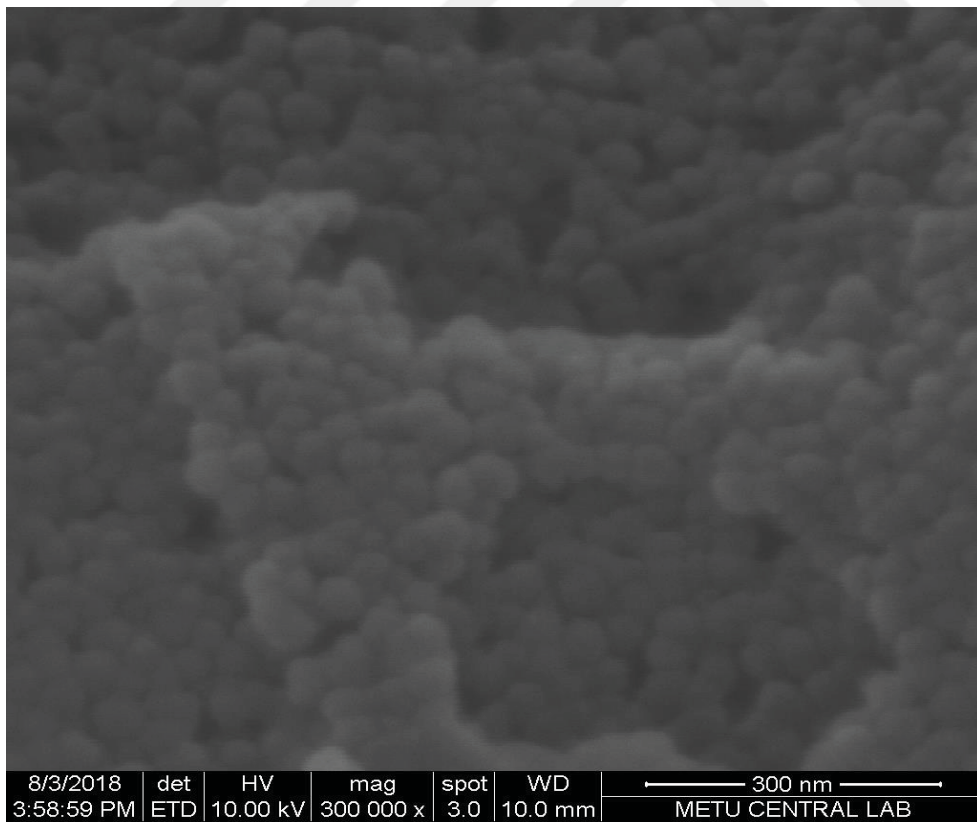
4.1.4. Taramalı Elektron Mikroskopi Analizi (Screening Electron Microscopy, SEM)

Cyt-MIP ve NIP nanokürelerin çeşitli büyütme oranında ($\times 100000$ - 300000) SEM fotoğrafları görüntülenmiş, yüzey morfolojileri ve yapıları belirlenerek Şekil 4.5.'de sunulmuştur. SEM fotoğraflarından nanokürelerin küresel ve eş boyutlu şekillere sahip olduğu görülmüştür. SEM görüntülerinden anlaşıldığı üzere nanoküreler ortalama ~ 40 - 50 nm boyutlarında ve homojen dağılım göstermektedirler.

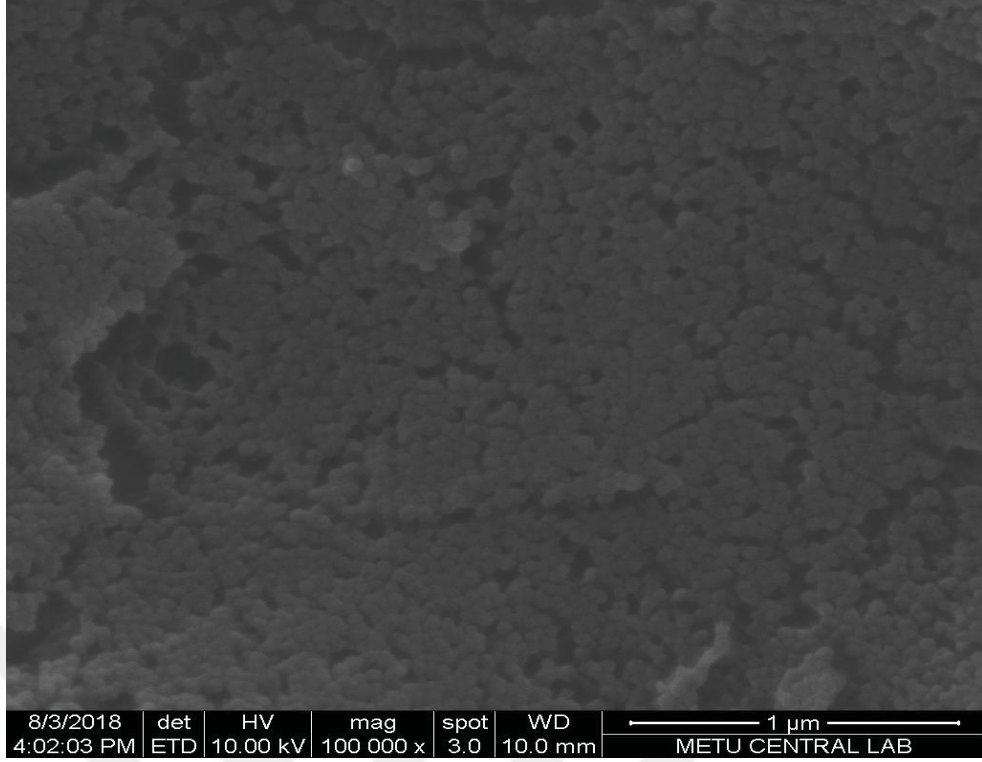
Ayrıca; partiküllerin küçük ve eş-boyutlu olması, hızlı adsorpsiyon kinetiğine ve tekrarlanabilen sonuçlara ulaşılmasını sağlamaktadır [73].



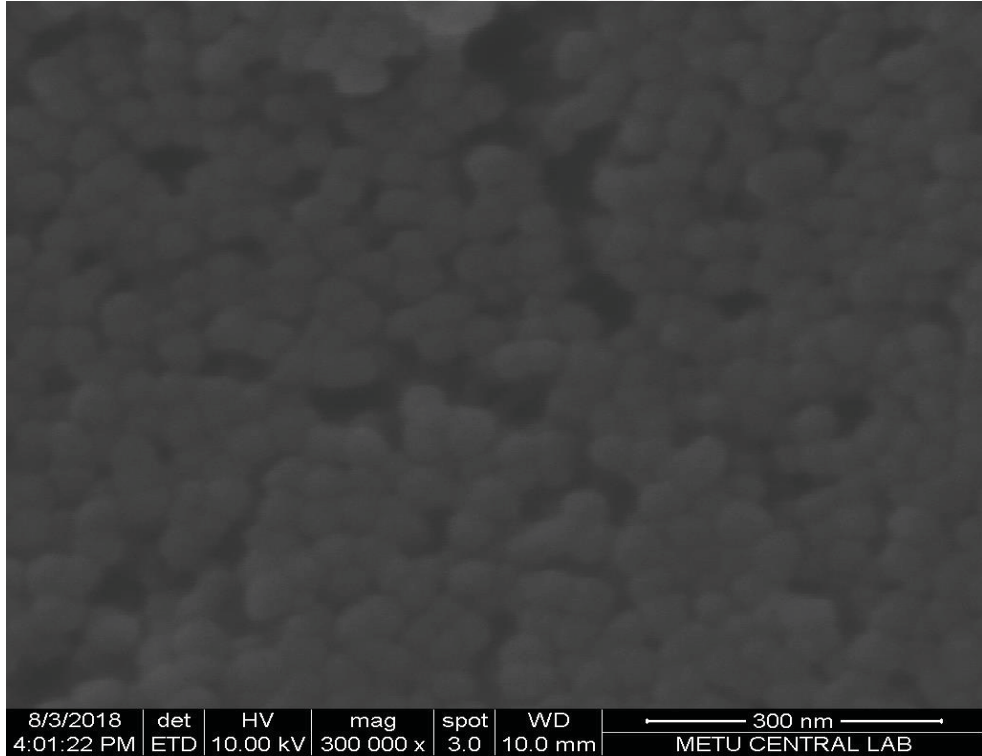
(a) NIP



(b) NIP



(c) MIP

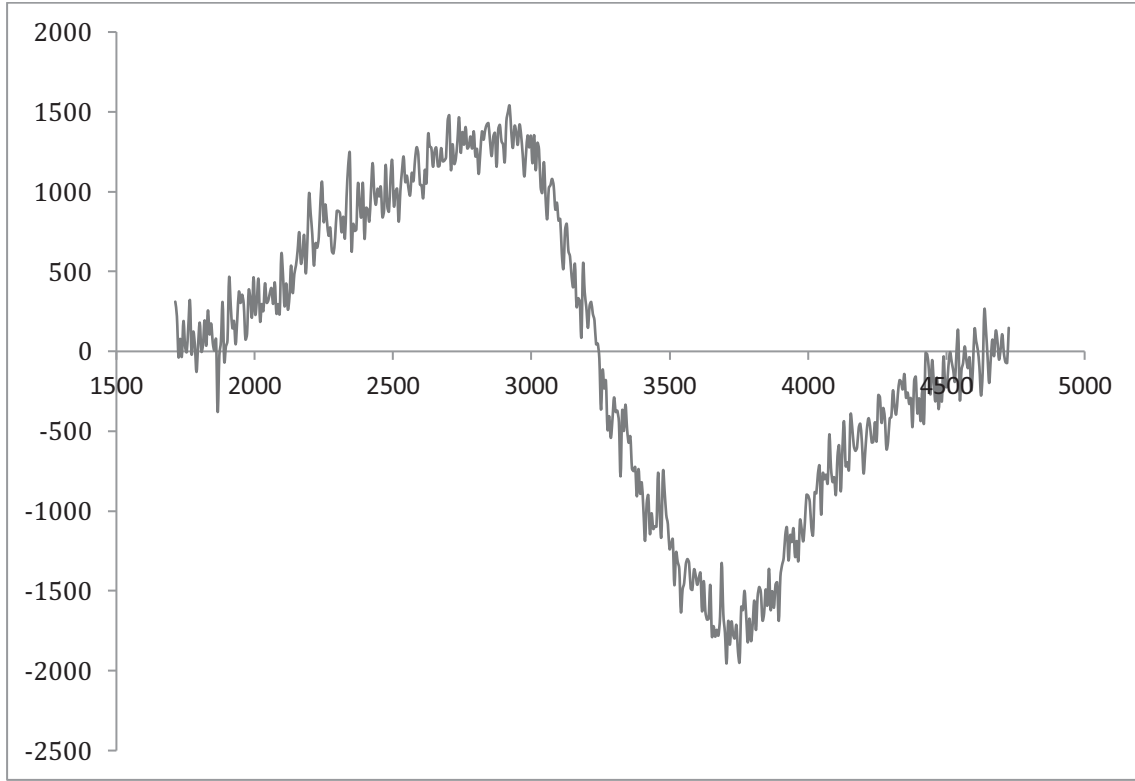


(d) MIP

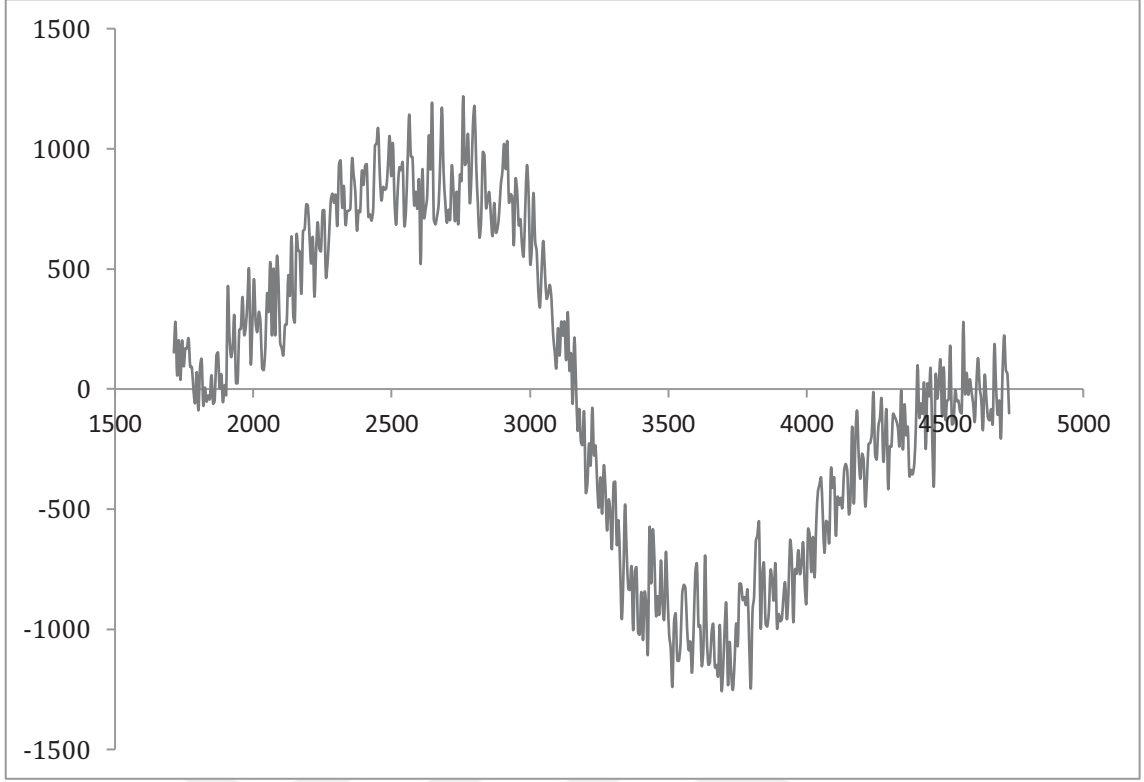
Şekil 4.5. NIP (a), (b) ve MIP (c), (d) nanokürelerinin SEM görüntüleri.

4.1.5. Manyetik Analiz

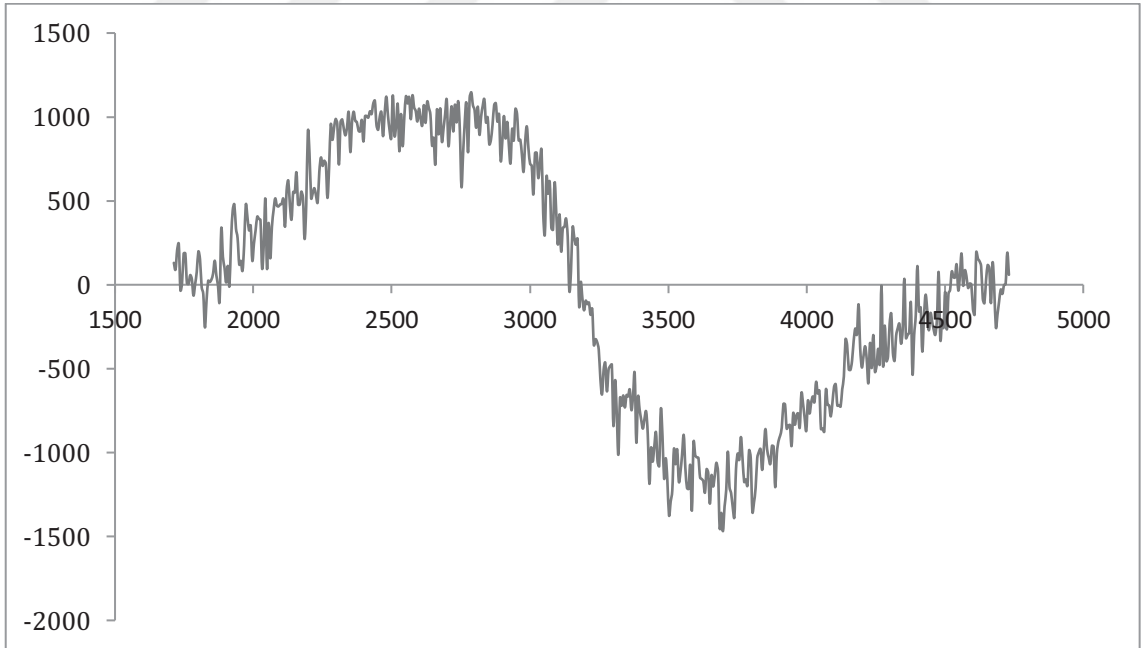
ESR, mikrodalga (MD) bölgesindeki elektromanyetik dalgaların bir manyetik alan içerisinde bulunan çiftlenmemiş elektron spinleri tarafından soğurulmasının gözlemlenmesi ve bu yolla maddenin özelliklerinin incelenmesi için kullanılan fiziksel bir yöntemdir [78].



Şekil 4.6. Cyt-MIP nanokürelerin ESR spektrumu.



Şekil 4.7. NIP nanokürelerin ESR spektrumu.



Şekil 4.8. Boş nanokürelerin ESR spektrumu.

Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de manyetik alana (Gauss) karşı manyetit pikinin şiddeti gözlemlenmektedir. Görüldüğü üzere manyetit yüklü nanokürelerin geniş ve simetrik tek çizgili bir rezonans eğrisine sahip olduğu belirlenmiştir.

Polimer herhangi bir manyetik özelliğe sahip değilken yapı içine manyetik özellik taşıyan manyetik çekirdeğin girmesiyle manyetik yüklü poli(HEMA) nanoküreler elde edilmektedir. Polimerik yapıdaki Fe_3O_4 nanokürelerinin belirlenmesi için PHEMA'nın yapısal karakterizasyonu ESR kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Manyetik olmayan PHEMA nanokürelerin bu şartlar altında mıknatıslanma göstermeyeceğine dikkat edilmelidir. Bu manyetik malzemelerin dış manyetik alandaki değişikliklere duyarlılığını gösterir.

'g' faktörü, çiftlenmemiş elektronların bulunduğu moleküllerin bir nicelik özelliği olarak değerlendirilebilir ve aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanır.

$$g = h\nu / \beta H_r$$

Burada h , Planck sabiti (6.626×10^{-27} erg. s⁻¹) ν , frekans (9.707×10^9 Hz), β evrensel sabittir (9.274×10^{-21} erg. G⁻¹) ve H_r manyetik alan rezonansdır.

Fe_3O_4 için g faktörü literatürde düşük sıkma kompleksleri için 1.4 ve 3.2, yüksek sıkma kompleksleri için 2.0- 9.7 değerleri arasında rapor edilmiştir [79].

mPHEMA nanopartiküller için g faktörü 2.56 olarak hesaplanmıştır. 3245 Gauss değerindeki manyetik alan değerinin de 1.0 g mPHEMA örneğinde bulunan tüm dipol momentleri uyarmak için yeterli olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Adsorpsiyon Çalışmaları

4.2.1. Sulu Çözeltilerden Sitidin Adsorpsiyonu

Adsorpsiyon çalışmaları sentezlenen 3 farklı manyetik nanoküre Cyt-MIP, MIP ve NIP için ayrı ayrı rotator cihazı (Şekil 4.9.) ile 20 rpm'de 2 saat etkileştirilerek kesikli sistemde yapılmıştır. Bu bölümde; nanokürelere ait optimum adsorpsiyon koşulları incelenmiştir. Ortam pH'sının, başlangıç Cyt derişiminin, sıcaklığın, adsorpsiyon zamanının ve farklı tuzların adsorpsiyona etkileri incelenmiş, seçicilik ile tekrar kullanılabilirlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



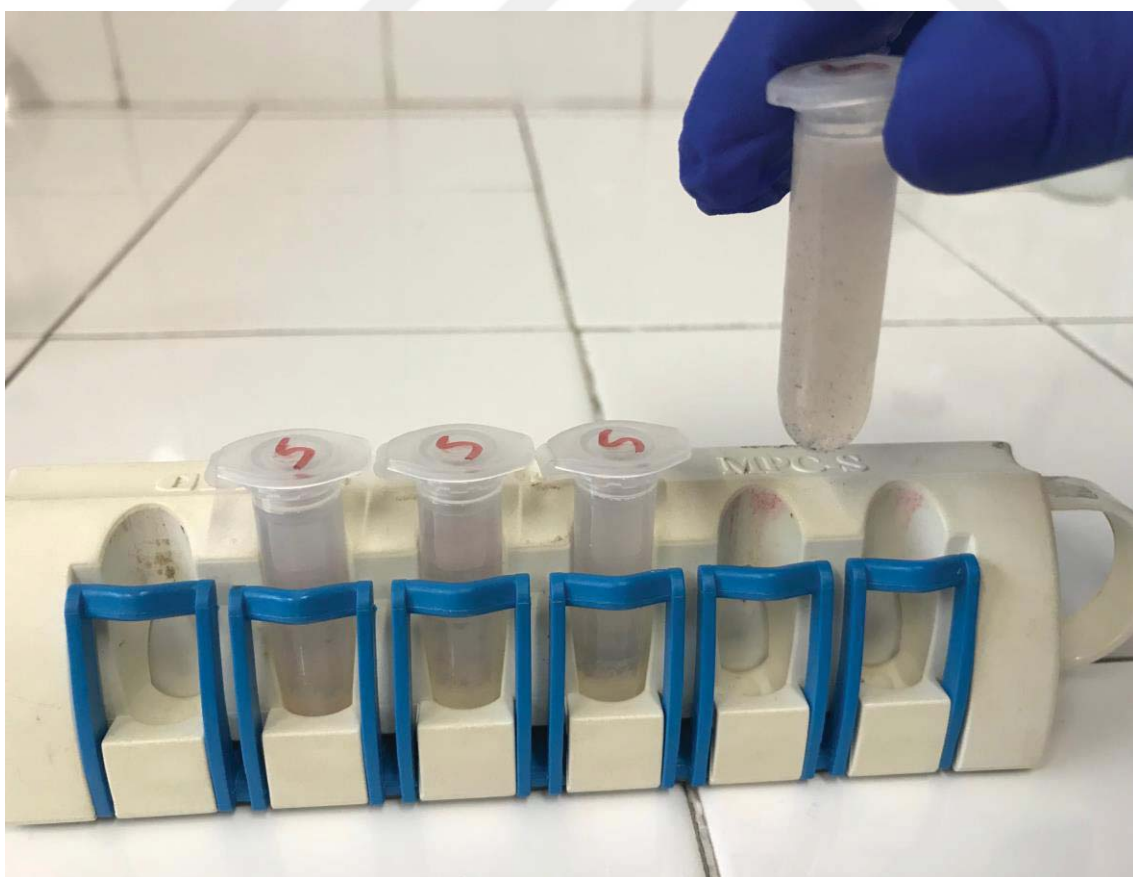
Şekil 4.9. Cyt- MIP sentezlenmiş manyetik nanokürelerle uzaklaştırma sistemi.



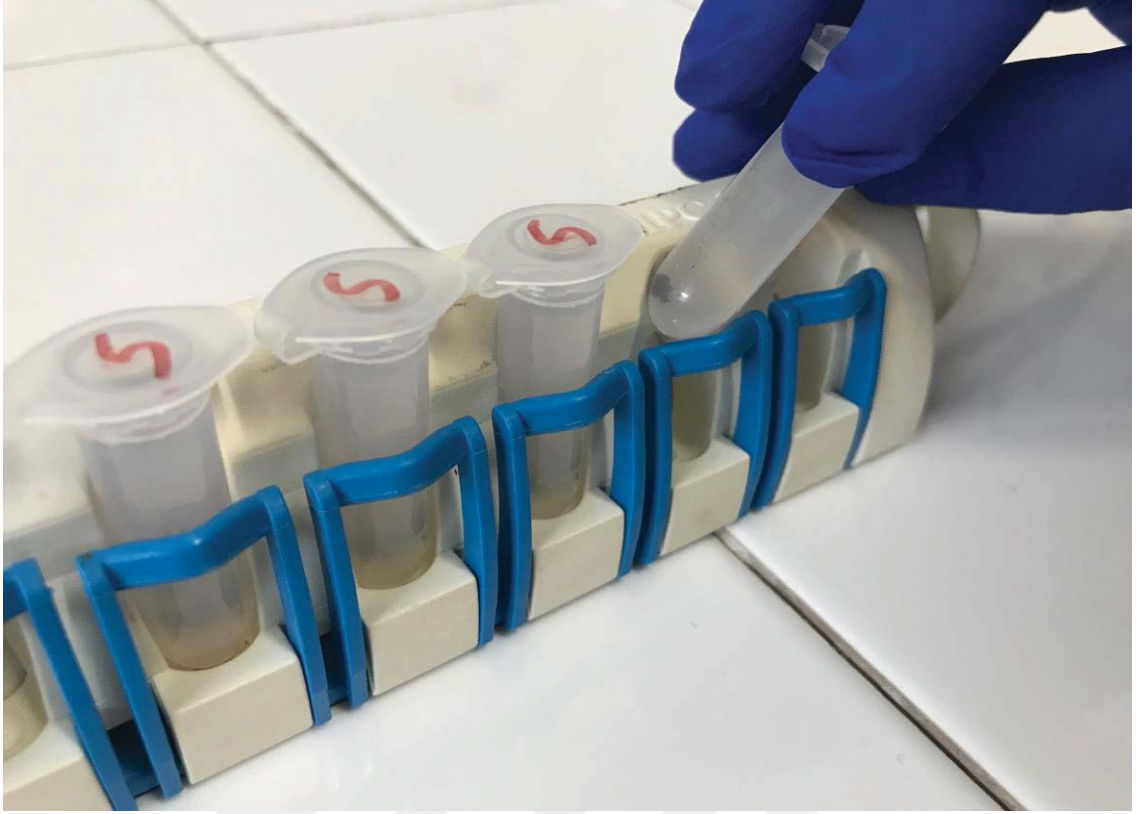
(a)



(b)



(c)



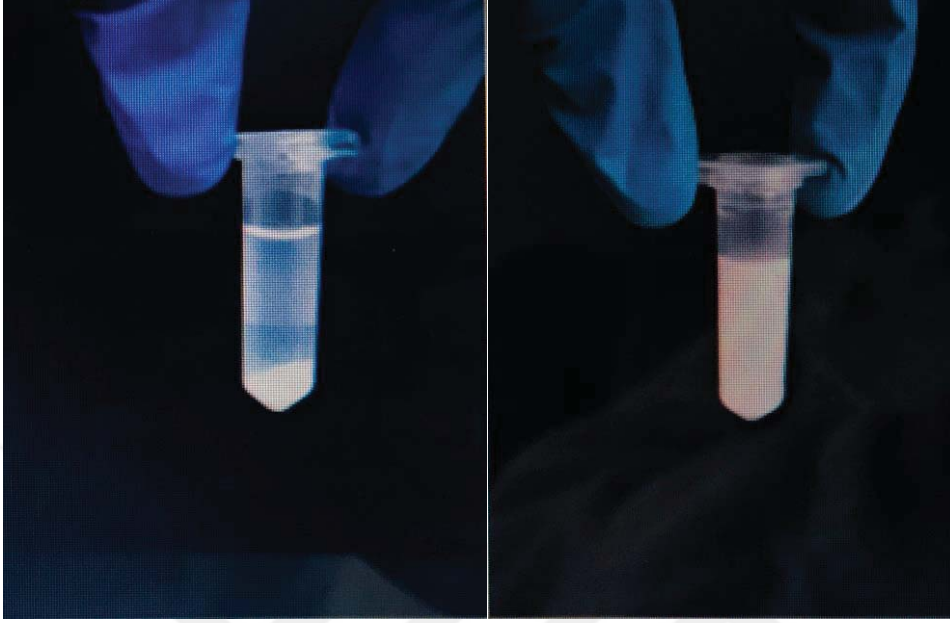
(d)



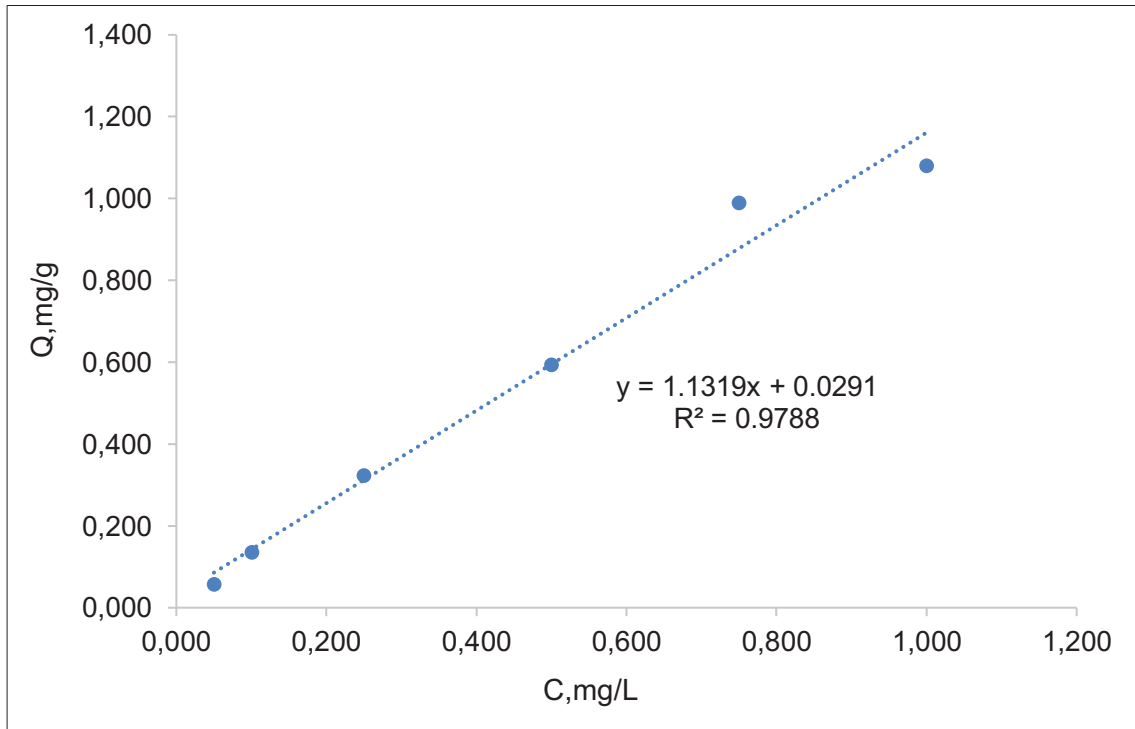
(e)

Şekil 4.10. (a) Adsorpsiyon çözeltisi, (b) manyetik alanda adsorpsiyon çözeltisi; (c), (d) ve (e) manyetik sistem deney düzeneğinde adsorpsiyon çözeltileri ve manyetik partiküllerin optik görüntüleri.

Ependorf tüplerinde süspanse edilen nanoküreler manyetik alan etkisinde bırakılarak çöktürölüp ortamdan ayrılmıştır (Şekil 4.10. Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Manyetik alanda adsorpsiyon çözeltisinden ayrılan nanokürelerin görünümü.



Şekil 4.12. Sitidin molekülü kalibrasyon grafiğı.

4.2.1.1. pH'nın Etkisi

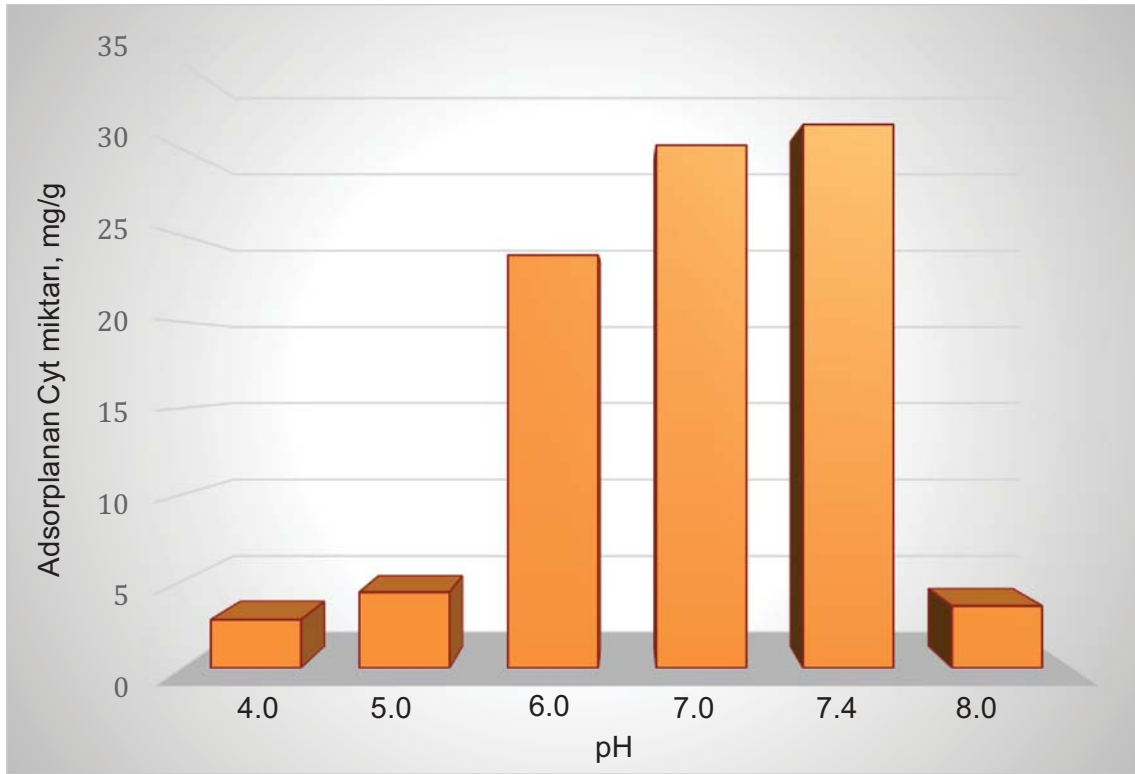
Nükleotid adsorpsiyonu için farklı pH değerlerinde (pH: 4.0, pH: 5.0, pH: 6.0, pH: 7.0, pH: 7.4, pH: 8.0) 0.1 mM'lık 1 mg/mL'lik Cyt çözeltileri hazırlanarak kesikli sistemde partikül etkileşimi sağlanmıştır.

Adsorpsiyon işlemlerinde adsorplanan madde miktarları aşağıda yer alan eşitlik (4.1.) kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Q = [(C_o - C) V] / m \quad (4.1.)$$

Q, nanokürelerin birim başına adsorplanan madde miktarını (mg/g); C_o ve C sırasıyla adsorpsiyon çalışmasından öncesi ve sonrasında Cyt çözeltisinin derişimini (mg/L); V sulu faz hacmi (mL) ve m MIP ağırlığını (g) göstermektedir.

Deneyler üç kez tekrar edilmiş, sulu çözeltilerden Cyt adsorpsiyonu kesikli sistem kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve ortalama değerler kullanılmıştır. Sonuç olarak (Şekil 4.13.) en yüksek adsorpsiyon kapasitesinin 31.4 mg/g değerinde, pH= 7.4'te fosfat tamponuyla sağlandığı bulunmuştur. Bu pH= 7.4 değerinin altındaki daha asidik ve üstündeki daha bazik değerlerde adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı görülmektedir.



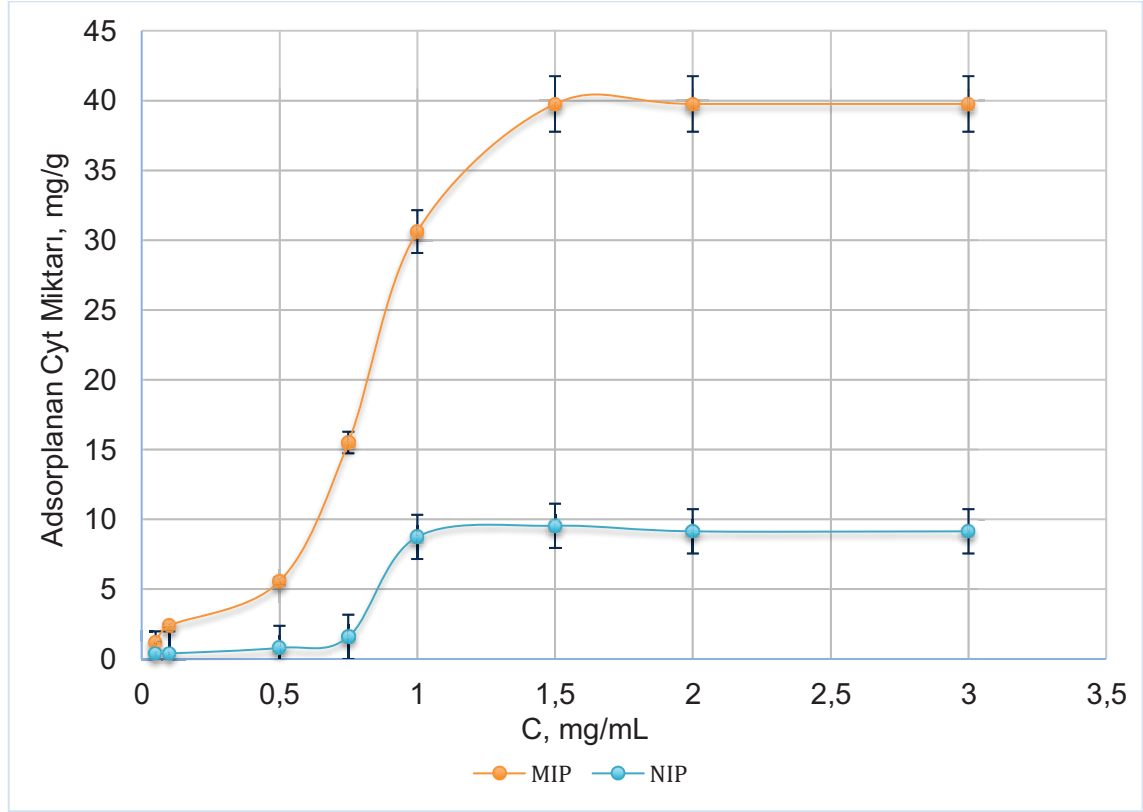
Şekil 4.13. Sitidin adsorpsiyonuna pH'nın etkisi: Cyt derişimi: 1.0 mg/mL, çözelti: 5.0 mM, 5.0 mL, adsorpsiyon süresi: 2 saat, T: 25°C.

4.2.1.2. Sitidin Başlangıç Derişimlerinin Etkisi

Cyt başlangıç derişimlerinin adsorpsiyon kapasitesine olan etkisini incelemek amacıyla 0.1 mM pH 7.4 fosfat tamponu kullanarak 0.05 mg/mL ile 3.0 mg/mL derişim aralıklarında Cyt çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden 1500 μ L alınarak 200 μ L Cyt baskılanmış ve baskılanmamış nanokürelere 25°C'de ilave edilmiştir. 2 saat adsorpsiyon süresi sonunda madde miktarları Cyt için UV-Vis cihazı kullanılarak 270 nm'de tayin edilmiştir.

Başlangıç Cyt derişiminin, Cyt adsorpsiyon kapasitesine olan etkisi Şekil 4.14.'de incelenmektedir. Cyt baskılanmış nanokürelere maksimum adsorpsiyon kapasitesi 39.756 mg/g olarak bulunmuştur. Bu sonuca 1.5 mg/mL Cyt başlangıç derişimi kullanılarak ulaşılmıştır. Görüldüğü üzere birim manyetik nanoküre başına düşen Cyt adsorpsiyon miktarı düşük derişimlerden Cyt derişimi yükseldikçe doğrusal olarak hızla artmaktadır ve doygunluğa erişmektedir. Yaklaşık 2.0 mg/mL Cyt derişimi sonrasında denge durumuna ulaşılmaktadır. Bu noktadan itibaren adsorpsiyonda önemli düzeyde artış gözlenmemektedir. Bu

durum nanokürelerin yüzeyine baskılanan moleküllerin doygunluğa ulaşması ile açıklanabilir. Adsorpsiyon izoterminde görülen dik eğim Cyt nükleotidleri ile Cu^{+2} şelat grupları arasındaki yüksek afinitenin göstergesidir. Baskılanmamış nanoküreler için maksimum adsorpsiyon kapasitesi ise 9.54 mg/g'dır.



Şekil 4.14. Sitidin derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi; pH: 7.4, T: 25°C, zaman: 120 dk.

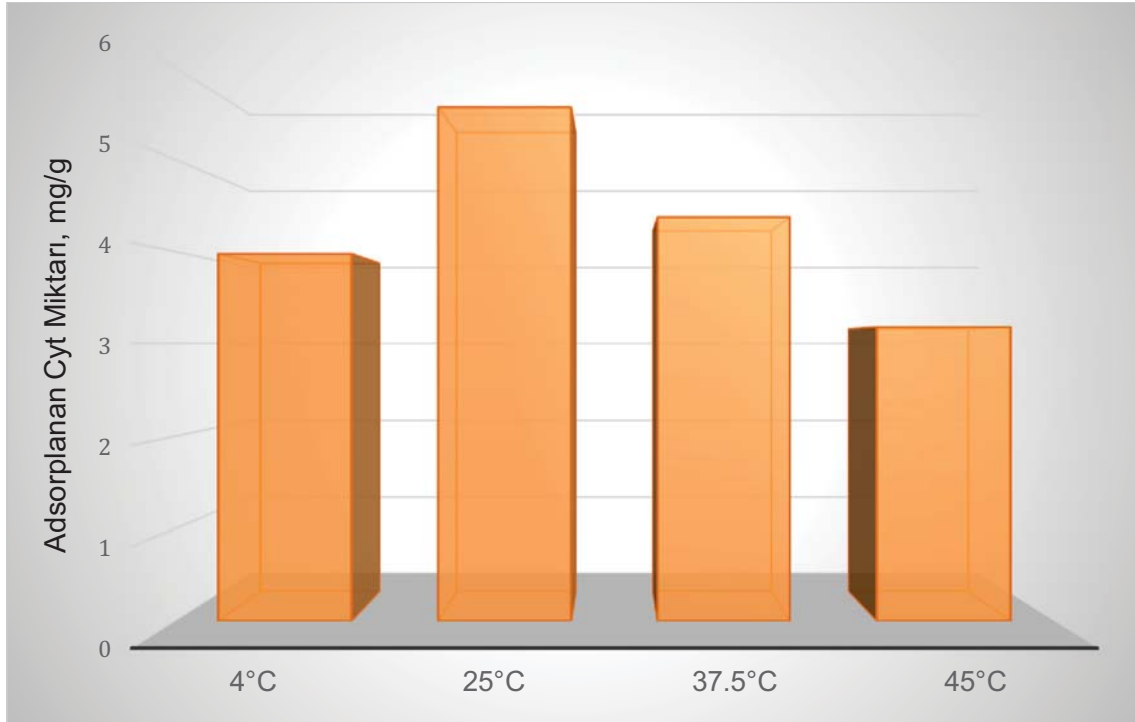
4.2.1.3. Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklık aralığı 4-45°C olarak belirlenmiş ve belirlenen sıcaklık değışiminin Cyt adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Şekil 4.15.'de Cyt baskılanmış nanokürelere Cyt adsorpsiyonunun farklı sıcaklıklardaki etkisi verilmiştir. Cyt'in MIP üzerine denge adsorpsiyonu sıcaklığın 25°C olduğu ortamda maksimuma ulaşmıştır. Sıcaklığın bu noktadan itibaren artmasıyla ve azalması ile de adsorpsiyonda düşüş gerçekleştiği gözlenmiştir.

Adsorpsiyon kapasitesinde meydana gelen değışimler sıcaklıkla ters orantılı ise hidrojen bağları ve iyonik etkileşimleri baskın etkileşimlerdir. Adsorpsiyon

kapasitesinde meydana gelen değişimler sıcaklıkla doğru orantılı olduğunda van der Waals ve hidrofobik etkileşimleri baskın etkileşimlerdir [73]. Sıcaklığın artması ile birlikte meydana gelen adsorpsiyon kapasitesindeki azalmalar; baskın etkileşim türlerinin H-bağları ve elektrostatik (iyonik) etkileşimler olduğunu göstermektedir [80].

Cyt baskılanmış nanoküreler ile 4°C’de 3.975 mg/g, 25°C’de 5.565 mg/g, 37°de 4.373 mg/g ve 45°C’de 3.18 mg/g Cyt adsorpsiyonu gerçekleşmiştir.

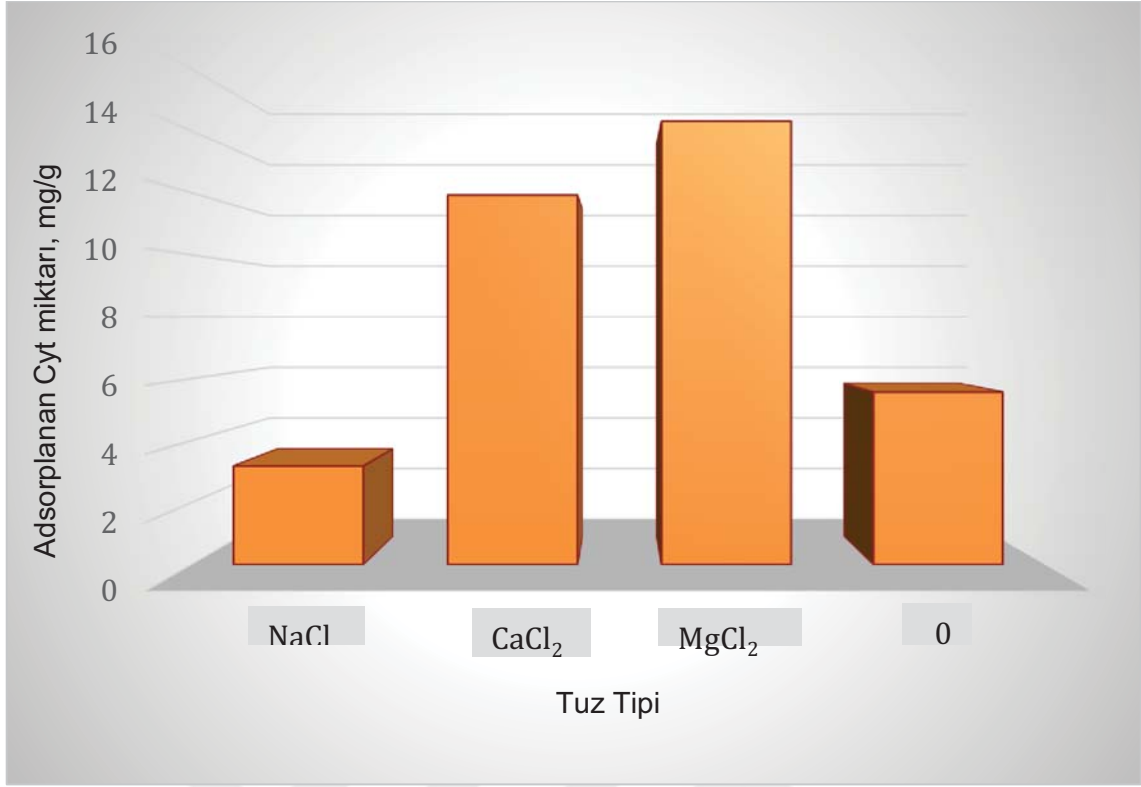


Şekil 4.15. Sitidin adsorpsiyon kapasitesine sıcaklığın etkisi; Cyt derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7.4; zaman: 120 dk.

4.2.1.4. Tuz Tipinin Etkisi

Cyt baskılanmış nanokürelerin adsorpsiyonuna iyonik şiddetin etkisini tespit edebilmek için; adsorpsiyon çalışmaları farklı tipteki tuzlar (0.5 mg/ml derişimde, NaCl, CaCl₂, MgCl₂) içeren çözeltiler ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.16.’da yer almaktadır.

Cyt adsorpsiyon kapasitesi aynı derişimdeki farklı tuzlarda sırasıyla; NaCl: 3.180 mg/ml CaCl₂: 11.926 mg/mL, MgCl₂: 14.312 mg/mL olarak ölçülmüştür.

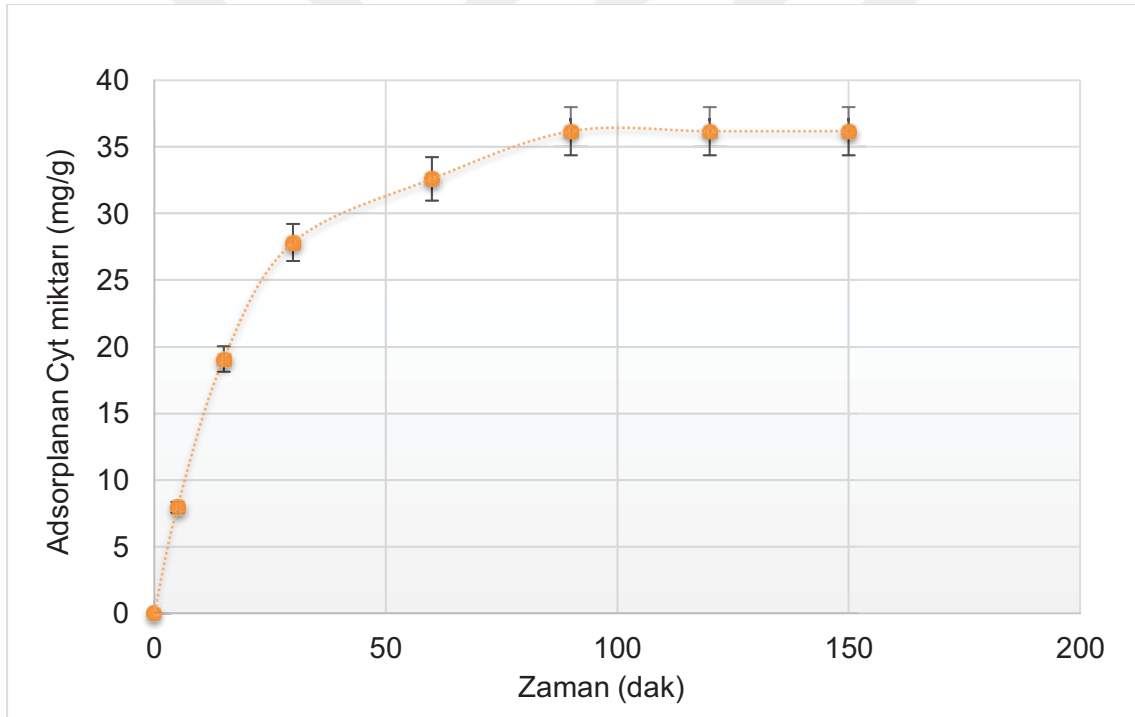


Şekil 4.16. Sitidin adsorpsiyon kapasitesine farklı tuzların etkisi; Cyt derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7.4; zaman: 120 dk.

CaCl₂ ve MgCl₂ tuzları varlığında, yüksek nükleotid adsorpsiyonun elde edildiği görülmektedir. Nanokürelere maksimum Cyt bağlanması, MgCl₂ içeren tamponda elde edilmiştir. Bağlama kapasitesi, bağlanma ortamına MgCl₂ ilavesi ile 5.565 mg/g'dan 14.312 mg/g'a çıkarılmıştır. Ayrıca yüksek iyonik kuvvetlerin, adsorpsiyon çözeltisine NaCl eklendiğinde bağlamayı zayıflattığı görülmektedir. Cyt adsorpsiyon miktarı, NaCl ile birlikte düşmüştür. Bunun olası bir açıklaması şu şekilde olabilir: Tuz varlığında Cyt ile MAH molekülleri arasında mevcut olan tuz köprüleri tahrip olmaktadır. Tuz köprülerinin bozulması yüksek iyonik şiddette düşük nükleotid adsorpsiyonuna sebep olmaktadır. Ayrıca iyonik etkileşimler tanıma ve bağlama işlemine önemli bir katkı sağlamıştır. Karşı tuz iyonları, Cyt molekülleriyle yük-şarj etkileşimleri yoluyla etkileşime girerek bağlanma yerlerini maskeler [81].

4.2.1.5. Adsorpsiyon Zamanı

Adsorpsiyon kapasitesinin zamanla değişimi Şekil 4.17’de, verilmiştir. Cyt baskılanmış mPHEMA nanokürelerin, Cyt ile etkileşiminin zamana bağlı değişimini gözlemlemek için 0-150 dakika aralığı seçilmiştir. Nanoboyutlara sahip nanokürelerin yüksek yüzey alanlarına ve Cyt için spesifik boşluklara sahip olmaları nedeniyle hızlı bir şekilde yüzeyde adsorpsiyon gerçekleşmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, adsorpsiyon işleminin başlangıcında nispeten hızlı adsorpsiyon gözlenmiş ve yaklaşık 80 dk. civarında dengeye ulaşılmıştır. 30. dakikada Cyt nükleotidlerinin 27.82 mg/g değerinde yüzeye adsorbe olduğu gözlenmiş ve 90 dakikada adsorpsiyon kapasitesi 36.178 mg/g değerinde doyumluğa ulaşmıştır.



Şekil 4.17. Sitidin adsorpsiyon zamanı.

4.2.2. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi adsorbent ile kalıp molekül arasındaki etkileşimi yani denge durumunu açıklar. Günümüzde araştırmacılar tarafından farklı izoterm denklemleri kullanılmaktadır bunlar arasında en sık tercih edilen adsorpsiyon izotermi Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermidir.

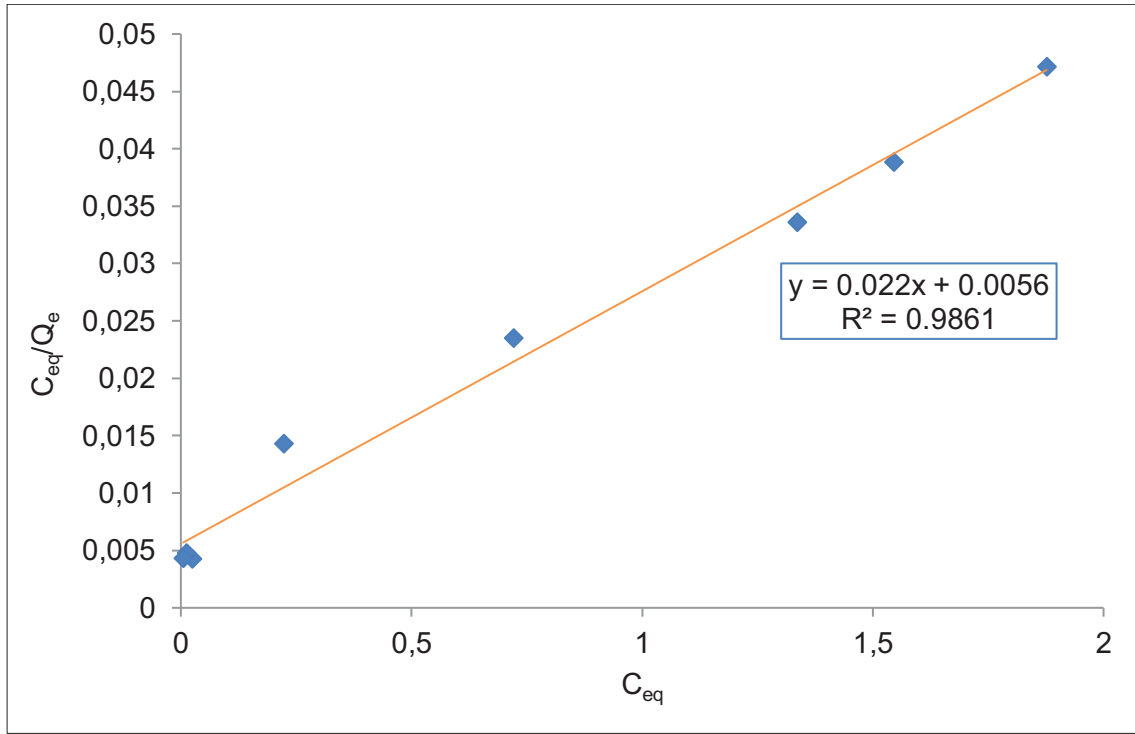
Langmuir tipi adsorpsiyon, tek tabakalı bir işlem olarak kabul edilir. Birim adsorban kütlesi başına maksimum adsorpsiyon kapasitesi, adsorbana çözünen afiniteyi gösteren Langmuir sabiti ile birlikte belirlenir. Freundlich tipi adsorpsiyon, birim adsorban kütlesi başına adsorbe edilen çözünen miktarının kademeli olarak arttığı çok katmanlı bir işlem olarak kabul edilir [82].

Bu çalışmada Cyt baskılanmış nanokürelerin çözeltide bulunan Cyt ile etkileşimi her iki model kullanılarak karakterize edilmiştir. Bir adsorban yüzeye moleküllerin tek bir tabaka halinde adsorpsiyonunu varsayan Langmuir izotermi aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$C_{eq} / Q = 1 / (Q_{max} \cdot b) + (C_{eq} / Q_{max}) \quad (4.2.)$$

Q adsorbente bağlanan Cyt miktarını (mg/g); C_{eq} çözeltinin denge durumundaki Cyt derişimini (mg/mL); Q_{max} maksimum Cyt adsorpsiyon kapasitesi (mg/g) ve b Langmuir sabitini (mL/mg) göstermektedir.

Deneysel çalışma sonucunda elde edilen veriler ile oluşturulan grafik belirgin bir doğrusallık gösteriyor ise adsorpsiyon işleminin Langmuir adsorpsiyon izotermine uyduğu kabul edilebilir. Elde edilen denge verilerinin Langmuir izotermine uygulanması sonucu elde edilen grafik Şekil 4.18'de yer almaktadır.



Şekil 4.18. Sitidin için Langmuir adsorpsiyon izotermi.

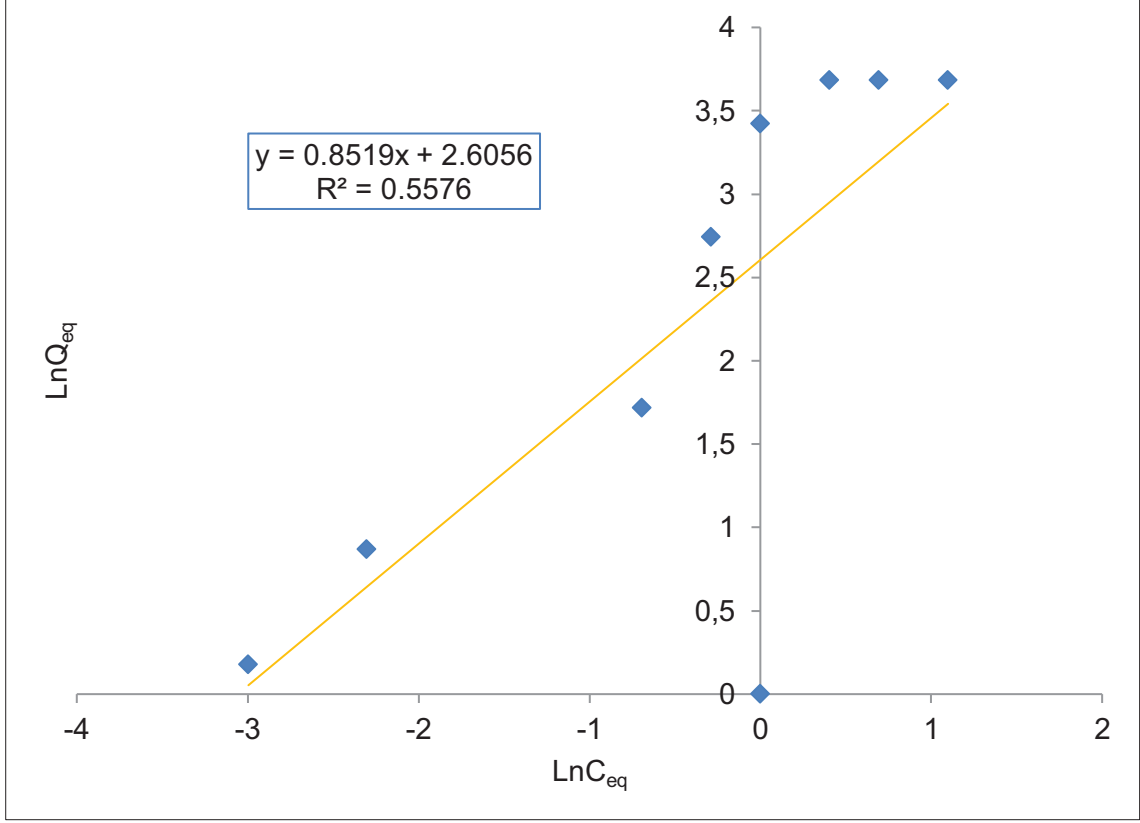
MIP'ler, afinite ve seçicilik aralığında değişen heterojen bağlanma bölgeleri dağılımı içerir. Kovalent olmayan MIP'lerde birincil heterojenite kaynağı, polimerizasyon karışımındaki eksik monomer şablonu kompleksi oluşumudur [83].

Adsorpsiyon davranışını tanımlamak için kullanılan diğer bir izoterm Freundlich izotermi olup tersinir adsorpsiyonu ifade eder ve tek tabakanın oluşumu ile sınırlı değildir [84]. Daha heterojen bir sistem enerjisi olduğunu varsayar. Langmuir modelinden farklı olarak aktif bağlanma bölgelerinin komşu bölgeler ile etkileştiği kabul edilir. Freundlich izoterminin, MIP'lerde heterojenliğin ölçülmesinde yaygın olarak uygulanabilir olduğu gösterilmiştir [85]. Freundlich izotermi aşağıdaki eşitlik ile formüle edilebilir:

$$\ln Q_{eq} = \ln K_F + 1/n \times \ln C_{eq} \quad (4.3)$$

Bu eşitliğe göre; Q_{eq} adsorpsiyon miktarını (mg/g), K_F adsorpsiyon kapasitesini, $1/n$ adsorpsiyon şiddetini, C_{eq} çözeltideki adsorbent derişimini (mg/L) gösterir.

Yüzey heterojenliğini gösteren $1/n$ sayısı, 0 ile 1 arasında değişen değerler almaktadır. Şekil 4.19'da Cyt adsorpsiyon verilerinin Freundlich modeline uygunluğu yer almaktadır.



Şekil 4.19. Sitidin için Freundlich adsorpsiyonu izotermi.

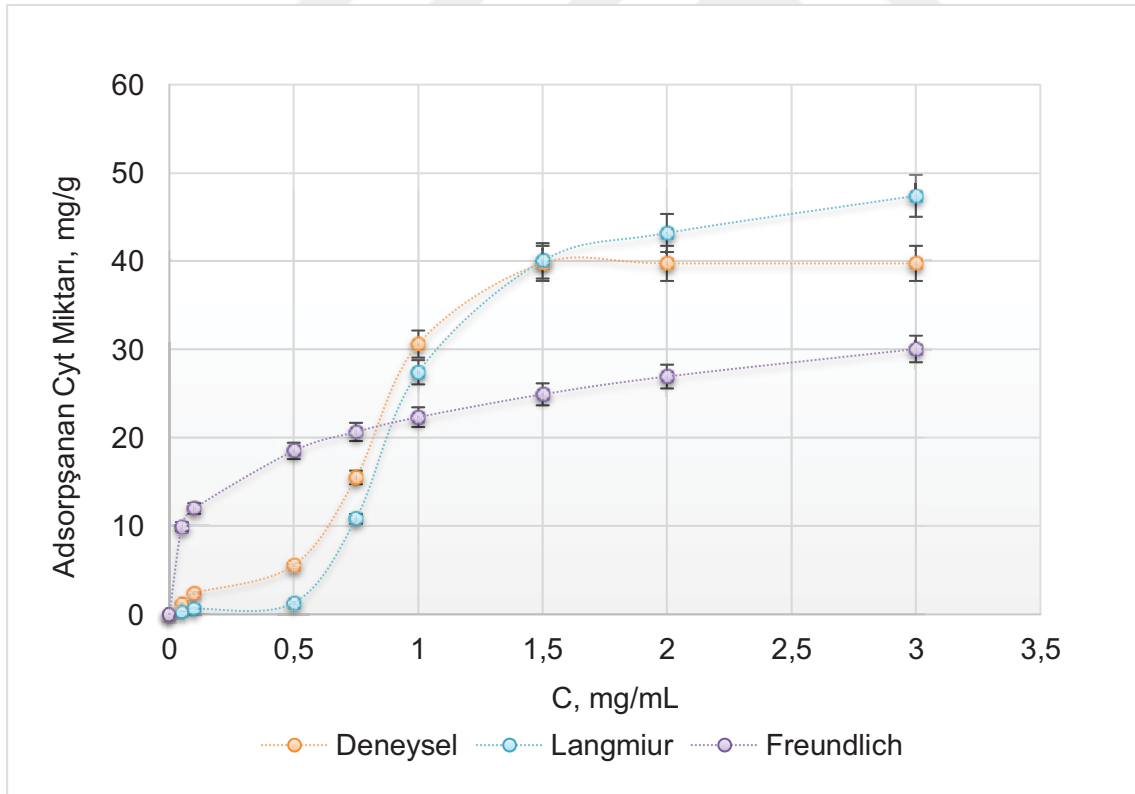
Cyt baskılanmış mPHEMA nanoküreleri için deneysel olarak elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi 39.756 mg/g'dır. Langmuir adsorpsiyon izotermi ile maksimum adsorpsiyon kapasitesi 43.86 mg/g olarak hesaplanmıştır. Teorik olarak hesaplanmış olan maksimum adsorpsiyon değeri, deneysel çalışmada elde edilen maksimum adsorpsiyon değerinden daha yüksektir.

Langmuir izotermi ile hesaplanan Langmuir sabiti (b) ve korelasyon katsayısı (R^2) Cyt baskılanmış mPHEMA nanoküreleri için sırası ile 5.07 mL/g ve 0.986'dır. Korelasyon katsayıları Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sisteme daha uyumlu olduğunu göstermektedir. Langmuir ve Freundlich izotermi için hesaplanmış olan değerler Çizelge 4.4'de yer almaktadır.

Çizelge 4.4. Langmuir ve Freundlich sabitleri.

Cyt-MIP	Deneysel	Langmuir Sabitleri			Freundlich Sabitleri		
	Q_e (mg/g)	Q_{max} (mg/g)	b (mL/mg)	R^2	K_F (mg/g)	$1/n$	R^2
	39.75	43.86	5.07	0.9861	13.46	1.17	0.5576

Freundlich ve Langmuir izotermiyle modellenen adsorpsiyon kapasiteleri ve Cyt baskılanmış mPHEMA nanokürelerin deneysel adsorpsiyon kapasitesi Şekil 4.20.'de karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda sistemin Langmuir izotermine daha uygun olduğu görülmektedir ve Cyt adsorpsiyonunun bir mono tabaka adsorpsiyonu olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 4.20. Sitidin baskılanmış nanokürelere ait deneysel adsorpsiyon kapasitesi ile Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılması.

4.2.3. Adsorpsiyon Kinetiği

Bir birim işlem olarak adsorpsiyon işleminin değerlendirilmesi için iki önemli fiziko-kimyasal özellik, kinetik ve adsorpsiyon dengesidir. Adsorpsiyon kinetiğinde alımın derecesini ölçmek için ölçülen konsantrasyonların adsorban yüzey konsantrasyonlarına eşit olduğu varsayımıyla kinetik modeller (yalancı birinci ve pseudo ikinci dereceden denklemler) kullanılabilir [86]. Her iki modelde de ölçülen derişimlerin, adsorbanın yüzey derişimine eşit olduğu kabul edilmektedir.

Lagergren'in birinci derece hız eşitliği sıvı çözültiden çözünenin adsorpsiyonunda en sık tercih edilen eşitliktir ve şu şekilde ifade edilmektedir;

$$dq_t/dt = k_1 (q_{eq} - q_t) \quad (4.4)$$

yalancı-birinci derece kinetik eşitliğinin logaritması alınıp doğrusal hale getirildiğinde eşitlik 4.5 elde edilir.

$$\log(q_{eq} - q_t) = \log(q_{eq}) - (k_1 t) / 2.303 \quad (4.5)$$

$\log(q_{eq} - q_t)$ 'ye karşılık t grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrunun eğiminden $k_1/2.303$ ve y eksenini kesim noktasından $\log q_{eq}$ hesaplanabilmektedir. Burada; q_{eq} sistem dengeye ulaştığında anda uzaklaştırılan Cyt miktarı (mg/g); q_t t anında uzaklaştırılan Cyt miktarı (mg/g); k_1 yalancı -birinci derece adsorpsiyon hız sabiti ve t zaman (dk) ı ifade eder.

Yalancı -ikinci dereceden kinetik model eşitliği doğrusal hale getirildiğinde eşitlik 4.6 elde edilir.

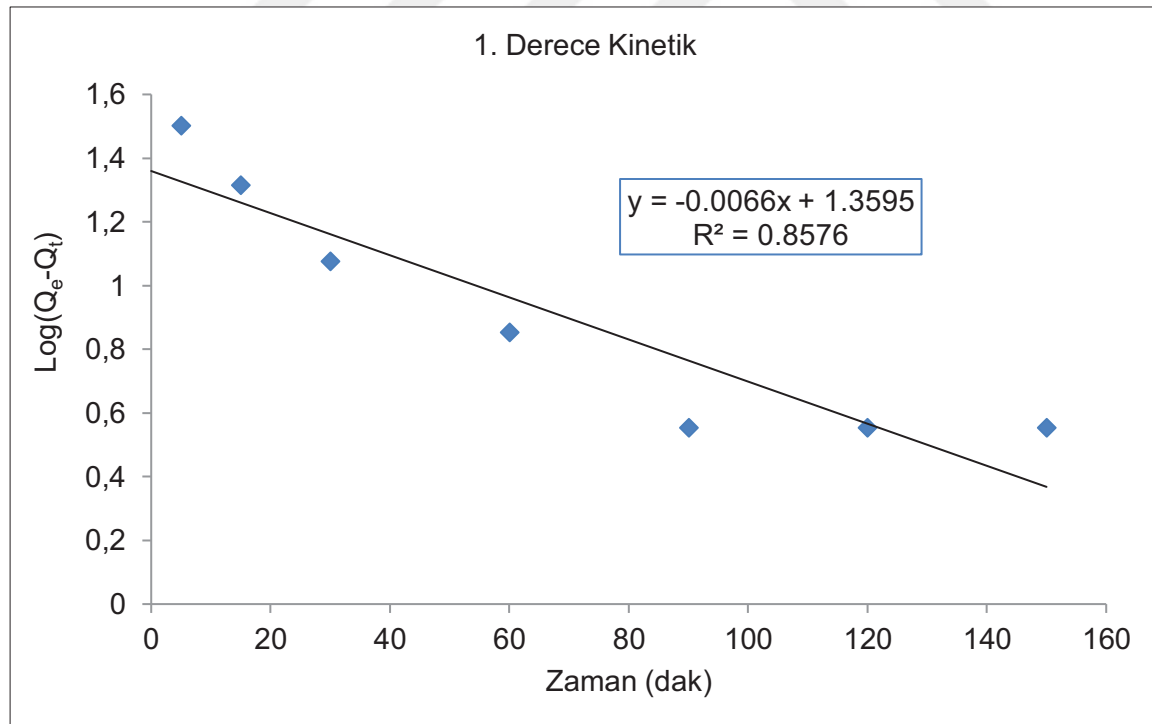
$$t/q_t = (1/k_2 q_{eq}^2) + (1/q_{eq})t \quad (4.6)$$

Burada; q_t t anında uzaklaştırılan Cyt miktarı (mg/g); q_{eq} sistemin dengeye ulaştığı anda uzaklaştırılan Cyt miktarı (mg/g); k_2 yalancı -ikinci dereceden hız denklemleri; t zamanı (dk) ifade eder.

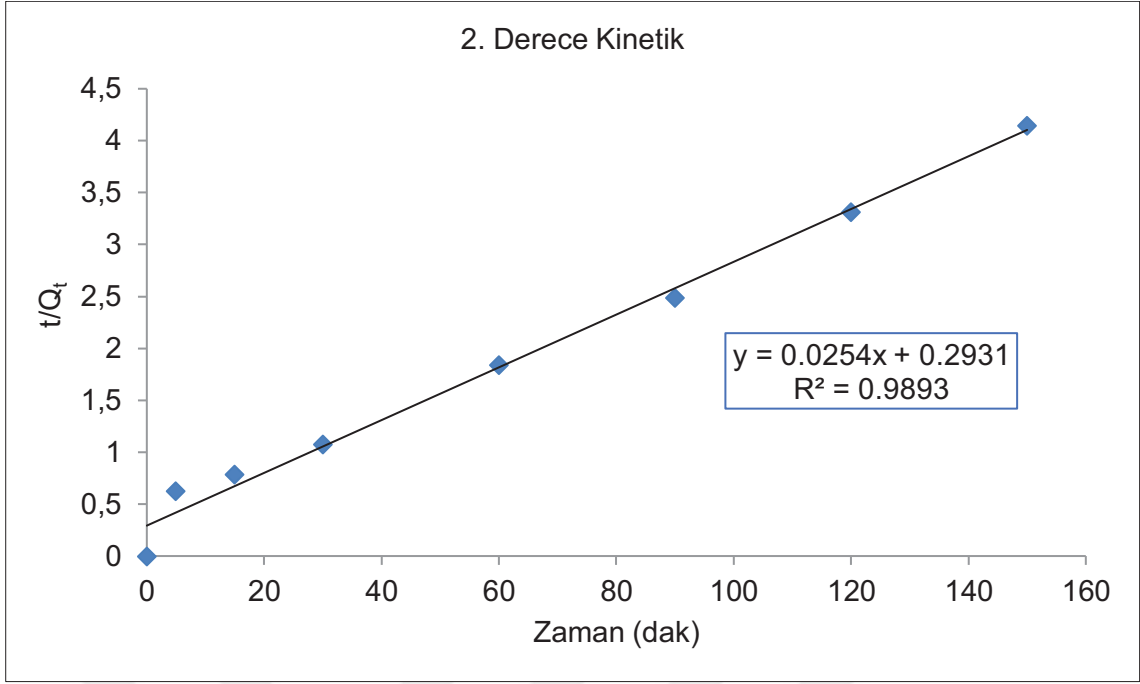
İkinci derece kinetik hesaplamalarının uygulanabilmesi için t/q_t ye karşı t grafiğinin doğrusal olması gereklidir. Adsorpsiyon (q_{eq}) ve hız sabiti (k_2) sırasıyla eğim ve kesim noktasından elde edilebilir. Kinetik hesaplama sonuçları Şekil 4.21. ve Şekil 4.22. ile Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Sitidin baskılanmış mPHEMA nanoküreler için birinci ve ikinci derece kinetik verileri.

Cyt MIP	Denge	Deneysel	1. Derece Kinetik			2. Derece Kinetik		
	Conc. (mg/mL)	Q_e (mg/g)	k_1 (1/min)	Q_e (mg/g)	R^2	k_2 (g/mg.min)	Q_e (mg/g)	R^2
	1.5	39.75	1.6×10^{-2}	4.13	0.8702	7.3×10^{-3}	39.37	0.9893



Şekil 4.21. Sitidin baskılanmış mPHEMA nanoküreler için yalancı-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.



Şekil 4.22. Sitidin baskılanmış mPHEMA nanoküreler için yalancı ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.

Çizelge 4.5'deki verilere göre Cyt baskılanmış nanokürelerin analiz verilerindeki korelasyon katsayıları kıyaslandığında elde edilen sonuçlar, bu metal şelatlı adsorban sisteminin yalancı-ikinci dereceden kinetik modele uygun olduğunu göstermektedir. Hesaplamalarda elde edilen Q_e değeri deneysel olarak elde edilen Q_e değerine yakın bulunmuştur. Sonuçlar Cyt baskılanmış nanokürelerin adsorpsiyonunun kimyasal kontrollü bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

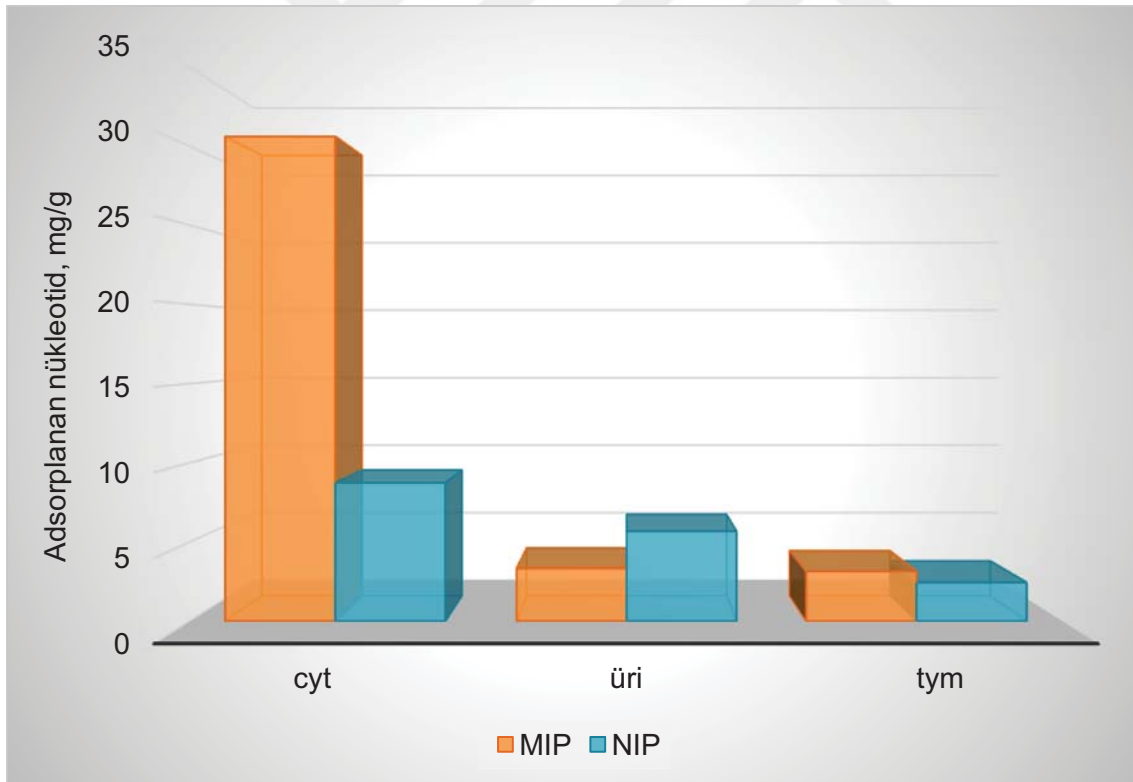
4.5. Seçicilik Deneyleri

Cyt baskılanmış ve baskılanmamış nanokürelerin seçiciliğini göstermek amacıyla seçicilik adsorpsiyon deneyleri 1.0 mg/mL derişiminde, 25°C'de 2 saat süreyle hazırlandı, pH 7.4 fosfat tamponunda gerçekleştirildi ve alınan başlangıç ve sonuç çözeltileri ile adsorplanmış olan nükleotid derişim miktarları belirlendi. Yarışmacı nükleotid olarak molekül yapıları ve ağırlıkları birbirine yakın olduğu için Uri ve Tym nükleotidleri kullanılmıştır. Seçilen nükleotidin baskılanmış nükleotidden daha küçük boyutta olması, baskılı nanokavirlere giriş kolaylığı sağlar. Elde edilen sonuçlar benzerlik ve tanıma boşluklarına giriş kolaylıklarına

rağmen, sitidin için tanıma mekanizmasının birlikte sağlanması gereken hem kimyasal hem de fiziksel etkileşime dayandığını göstermektedir. Çizelge 4.6.'da kullanılan nükleotidlerin bazı özellikleri verilmiştir.

Çizelge 4.6. Nükleotidlerin bazı yapısal özellikleri.

Nükleotid	Molekül Ağırlığı	Erime noktası	UV spektrum
Sitidin ($C_9H_{14}N_3O_8P$)	323.20 g/mol	230.5 °C	270 +/- 2nm
Üridin ($C_9H_{12}N_2O_9P$)	324.18 g/mol	165 °C	261 +/- 2 nm
Timidin ($C_{10}H_{15}N_2O_8P$)	322.21 g/mol	186.5 °C	267 +/- 2 nm



Şekil 4.23. Sitidin baskılanmış ve baskılanmamış nanokürelere aynı derişimlerdeki yarışmacı nükleotidlerin adsorplanan madde miktarları (mg/g). Adsorpsiyon koşulları; pH: 7.4 çözelti hacmi: 1.5 mL, T: 25°C, adsorpsiyon süresi: 2 h.

Cyt baskılanmış nanoküreler, Cyt'e yüksek seçicilik gösterirken, NIP manyetik nanoküreler belirgin bir seçicilik göstermemektedir. Bu sonuçlar, Cyt baskılanmış nanokürelerin diğer yarışmacı nükleotidlere göre Cyt için daha yüksek seçicilik göstermesinden dolayı oluşturulan aktif tanıma bölgelerinin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir. Yapılan analizler sonucunda, Cyt baskılanmış nanokürelerin, tekli yarışmacı nükleotid çözeltisindeki k değerlerinin, NIP nanokürelerin k değerlerinden daha yüksek değerde olduğu hesaplanmıştır. Bağlı seçicilik katsayısı (k' değeri) Cyt baskılanmış nanokürelerin aktif bağlanma bölgelerinin Cyt baskılanmamış nanokürelere göre seçiciliğini (baskılanmış tanıma bölgelerinin afinitesini) göstermektedir.

Çizelge 4.7. Cyt baskılanmış ve baskılanmamış manyetik nanoküreler için seçicilik ve bağlı seçicilik katsayıları.

Nükleotid	MIP		NIP		
	Q mg/g	k	Q mg/g	k	k'
Cyt	30.61	-	8.74	-	-
Üri	3.34	9.14	5.67	1.54	5.93
Tym	3.14	9.73	2.44	3.57	2.72

Sonuçlar, Cyt baskılanmış nanokürelerin Üri nükleotidine göre 9.14 kat, Tym nükleotidine göre 9.73 kat daha seçici olduğunu göstermiştir. Cyt- MIP nanokürelerin seçiciliği, molekül ağırlığı bakımından Cyt molekülüne çok yakın olan Uri ve Tym nükleotidleri için oldukça düşüktür.

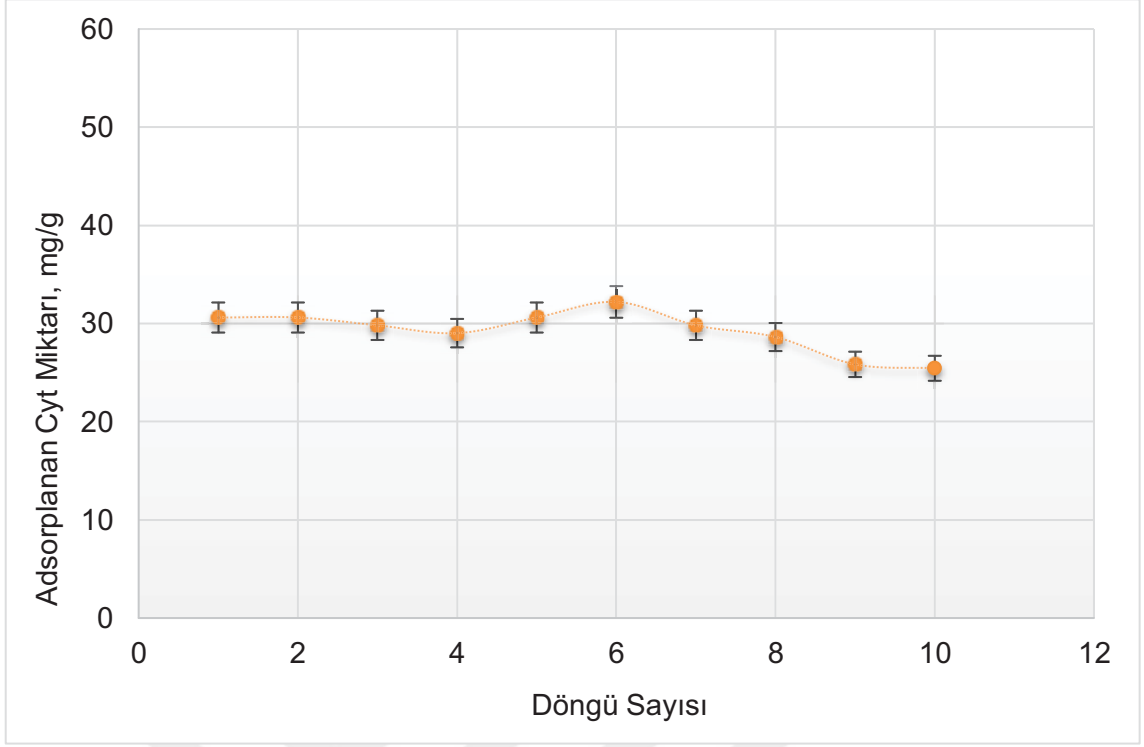
Bağlı seçicilik katsayısı, şablon için baskılı nanosensörde tanıma alanlarına sahip olmak için bir gösterge olarak kullanılır. Şablon moleküller, MIP'deki boşlukları tercihen bağlarsa, seçicilik katsayısı beklendiği gibi yüksek olacaktır [87]. Sitidin için nispi seçicilik katsayıları (k' değerleri), Uri ve Tym'e göre sırası ile 5.93 ve 2.72 kattır. Sonuçlar, moleküler olarak basılmış polimerik tabakada oluşturulan

moleküler nanokavitelerin, tercih edilen şekilde sitidini tanıdığını, oyukların boyutunun Uri ve Tym'den daha iyi olduğunu göstermiştir.

4.6. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Desorpsiyon ve yeniden kullanılabilirlik (rejenerasyon) çalışmaları, üretilen adsorbanın kararlılığını ispatlamak ve tasarlanan işlemin maliyetini kontrol etmek için oldukça önemli bir role sahiptir [88].

Nükleotid saflaştırılmasında kullanılacak olan adsorbentlerde tekrar kullanım olanağı da önemli bir parametredir. Rejenerasyon olarak tanımlanan bu parametre saflaştırma işleminin maliyetini azaltma açısından önemli bir özelliktir. Cyt adsorplanmış nanoküreler desorpsiyon çözeltisine 1.5 mL konulmuş; 20 rpm'de oda sıcaklığında, 2 saat boyunca etkileştirilmiştir. Çözeltideki Cyt derişimi 270 nm'de yapılan spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. Cyt baskılanmış nanokürelerin tekrar kullanılabilirlik oranının belirlenebilmesi için adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı nanoküreler kullanılarak 10 kez tekrarlanmış ve adsorpsiyon çalışmasında desorpsiyon oranı %95.58 olarak hesaplanmıştır. Cyt adsorpsiyon kapasitesinde meydana gelen azalma çok düşük bir orandadır. Cyt baskılanmış nanokürelerin adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü Şekil 4.24.'de yer almaktadır.



Şekil 4.24. Sitidin baskılanmış nanokürelerin tekrarlanabilirliği. Adsorpsiyon koşulları; pH: 7.4 çözelti hacmi: 1.5 mL, T: 25°C, adsorpsiyon süresi: 2 h.

Tekrarlanan döngü sonucunda nanokürelerin adsorpsiyon kapasitesinde önemli derecede bir düşüş olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuç ışığında baskılanmış nanokürelerin tekrar tekrar kullanılabileceği söylenebilir.

6. YORUM

- Gerçekleştirilen bu tez çalışması kapsamında, metal koordinasyon ve yüzey moleküler baskılama tekniğinin kullanılması ile Sitidin seçici tanınması için yeni moleküler baskılanmış manyetik nanoküreler sentezlenmiştir.
- Bunun için manyetik nanokürelerin MAH monomerinin Cu(II) metal iyonunu içeren çözelti ile etkileştirilmesiyle metal iyonunun şelatlanmasının sağlanması için kovalent olarak bağlandı ve sonrasında, MAH ve Cu(II) arasında koordinasyon kompleksi oluşumu sağlanarak hazırlanan MAH-Cu(II) kompleksine kalıp molekül Cyt eklenerek ön-kompleks hazırlandı.
- Metal iyonları polimerizasyon sonrasında kalıp molekülün uzaklaştırılmasını sağlayan çapraz bağlı baskılanmış tabakanın oluşumu sırasında Cyt'nin baskılanması için bağlanma noktalarını oluşturur ve baskılama boşlukları ile birlikte kalıp nükleotidlerin tekrar bağlanması için tanıma bölgeleri şeklinde davranır. Metal iyonları kullanılması moleküler baskılanmış nükleotidin afinitesini güçlendirmek için mekanizma meydana getirir.
- mPHEMA, Cyt-MIP ve NIP nanokürelerin yapısı FTIR, zeta boyut analizi ve yüzey alanı ölçümleri, ESR ve SEM yöntemleri ile karakterize edilerek mPHEMA, MIP ve NIP nanokürelerin başarıyla sentezlendiği sonucuna varılmıştır.
- Yaklaşık 50 nm boyutlarında düzenli küresel şekilli nanoküreler elde edilmiştir. Sentezlenen nanokürelerin çapları MIP için 41.49 nm, NIP için 51.87 nm ve NP için 72.44 nm'dir. Sentezlenen nanokürelerin polidispersite indeksleri ise 0.271-0.272 ve 0.152 olarak bulunmuştur. Değerlere bakıldığında nanokürelerin dar boyut dağılımına sahip olduğu anlaşılmaktadır.

- Yüzey alanı BET yöntemi ile hesaplanarak sırasıyla Cyt baskılanmış nanokürelerin yüzey alanı 980.9 m²/g, baskılanmamış nanokürelerin ise 780.45 m²/g olduğu bulunmuştur.
- ESR ile polimerik yapıdaki manyetit varlığı incelenmiş ve mPHEMA partiküller için g faktörü 2.56 olarak bulunmuştur. Spektrum bantların varlığı polimerik yapı içerisinde manyetit partiküllerin başarıyla sokulduğunu göstermektedir.
- FTIR ile elde edilen fark spektrumları incelenmiştir. 751 cm⁻¹ frekansında karşılaşılan pik Fe₃O₄ molekülünün Fe-O gerilme titreşimini işaret ederek mPHEMA nanokürelerin manyetikliğini desteklemektedir. 1258 ile 1143 cm⁻¹'deki pikler C-O gerilme titreşimlerini göstermektedir. FTIR sonuçları baskılanmış nanokürelerin sentezlendiğini teyit etmiştir.
- Taramalı elektron mikroskop (SEM) incelemeleri, nanokürelerin eş boyutlu ve küresel olduğunu, homojen bir dağılım sergilediğini ve aynı zamanda kürelerin ortalama boyutlarının zeta boyut analizi sonucunu da destekleyecek şekilde ve 40-50 nm olduğunu göstermektedir.
- Farklı pH değerlerinde pH'nın Cyt adsorpsiyonuna etkisi araştırılmış, maksimum Cyt adsorpsiyonu pH 7.4 fosfat tamponunda elde edilmiştir. Elde edilmiş olan veriler sonucunda pH 7.4 fosfat tamponu çalışma ortamı olarak seçilmiştir.
- MIP ve NIP nanokürelere Cyt bağlanma kapasitesini belirlemek için MIP'nin doygunluk adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bağlanan kalıp nükleotidin miktarının çözeltideki nükleotid derişiminin doğrusal olarak artmasıyla doygunluk eğrisinin eğiminde artış olduğu görülmüştür. Sonrasında derişimin yükselmesi ile birlikte doygunluk eğrisi kararlı hale geçmiştir. MIP ve NIP için maksimum Cyt adsorpsiyonu sırasıyla 39.75 ve 9.54 mg/g polimer olarak hesaplanmıştır. MIP üzerindeki baskılama boşlukları ile metal koordinasyon etkisi NIP'nin MIP'den düşük bağlanma kapasitesi göstermesine sebep olmaktadır. Elde edilen veriler

nanokürelerin adsorpsiyon kapasitesinin ve yüzey alanının arttığını göstermektedir.

- Adsorpsiyon zamanı analizine göre, adsorpsiyonun nisbeten hızlı bir şekilde yaklaşık 90 dakika içinde optimum seviyeye ulaştığı görülmüştür. Bu dakikada Cyt için 36.178 mg/g polimer değerlerine ulaşılmıştır.
- MIP'lerin Cyt adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi 4-40°C arasında incelenmiştir. Maksimum adsorpsiyona 25°C'de ulaşılmıştır ve MIP'lerin denge adsorpsiyonu sıcaklığın bu noktadan itibaren artması ve azalması ile önemli derecede azalma göstermiştir. Bu sonuç Cyt baskılanmış manyetik nanokürelerin oda sıcaklığında etkin bir şekilde kullanılabileceklerini göstermektedir.
- İyonik etkilerin belirlenebilmesi için farklı tuzlar (0.5 mg/ml derişimde, NaCl, CaCl₂, MgCl₂) içeren çözeltiler ile gerçekleştirilen adsorpsiyon çalışmaları sonucunda CaCl₂ ve MgCl₂ tuzları varlığında adsorpsiyon kapasitesinin arttığı ancak NaCl varlığında ise azalma gerçekleştiği görülmüştür. Bu azalmanın nedeni şu şekilde yorumlanmıştır; Cyt ile MAH molekülleri arasında mevcut olan tuz köprüleri tahrip olmakta ve tuz köprülerinin bozulması yüksek iyonik şiddette düşük nükleotid adsorpsiyonuna sebep olmaktadır.
- Tekrar kullanılabilirlik oranının gösterilebilmesi için Cyt baskılanmış nanokürelerin adsorpsiyon-desorpsiyon çalışması aynı nanoküreler kullanılarak 10 kez tekrar edilmiştir. Cyt'in desorpsiyonun yüksek oranda (%95.58) olması nanokürelerin adsorpsiyon kapasitesinde önemli derecede düşüş olmadan tekrar tekrar kullanılabileceklerini göstermiştir.
- Gerçekleştirilen analizler sonucunda, Cyt baskılanmış nanokürelerin, K değerlerinin, NIP nanokürelerin K değerlerinden daha yüksek olduğu ve NIP manyetik nanokürelerin Cyt'e belirgin bir seçicilik göstermediği halde Cyt baskılanmış nanokürelerin Cyt'e yüksek seçicilik gösterdiği bulunmuştur.

- Cyt baskılanmış mPHEMA nanokürelerin k' değerleri incelendiğinde, Cyt'nin yarışmacı nükleotidler olan Uri ve Tym'e göre daha seçici olduğu görülmektedir. Sonuçlar, moleküler olarak basılmış polimerik tabakada oluşturulan moleküler nanokavitetlerin, tercih edilen şekilde sitidini tanıdığını, oyukların boyutunun Uri ve Tym'den daha iyi olduğunu göstermiştir.
- Deneysel verilere göre Cyt baskılanmış nanoküreler için maksimum adsorpsiyon kapasitesi 39.756 mg/g'dır. Langmuir adsorpsiyon izotermi ile hesaplanan maksimum adsorpsiyon kapasitesi 43.86 mg/g ve Freundlich adsorpsiyon izotermi için 13.46 mg/g'dır. Karşılaştırma sonucunda sistemin Langmuir izotermine daha uygun olduğu görülmüş ve Cyt adsorpsiyonunun bir mono tabaka adsorpsiyonu olduğu sonucuna varılmıştır.
- Yalancı-birinci derece ve yalancı-ikinci derece kinetik modelleri adsorpsiyon kinetiklerinin analiz edilebilmesi için, deneysel verilere uygulanmıştır. Cyt baskılanmış nanokürelerin analiz verilerindeki korelasyon katsayıları kıyaslandığında elde edilen sonuçlar, bu metal şelatlı adsorban sisteminin pseudo-ikinci dereceden kinetik modele uygun olduğu göstermiştir. Deneysel ve kinetik hesaplamalarda elde edilen Q_e değerleri birbirlerine yakın bulunmuştur. Sonuçlar Cyt baskılanmış nanokürelerin adsorpsiyonunun kimyasal kontrollü bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, bu çalışmada metal koordinasyon ve yüzey moleküler baskılama tekniğinin birleştirilmesiyle sentezlenmesi amaçlanmış olan Cyt baskılanmış manyetik nanoküreler, Cyt'in yüksek seçicilikle tanınması için oldukça etkin bir manyetik afinite malzeme olarak başarılı bir şekilde sentezlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] A. Denizli, Ö. Küfrevioğlu, Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, Bölüm 7, Manyetik Polimerler, Pozitif Matbaacılık, Ankara, 2017.
- [2] Çorman, M.E., Moleküler Baskılanmış Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu 78Ve Lizozim Saflaştırılmasında Kullanılması, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2010.
- [3] Háková, M., Chocholoušová, L., Solich, H., Švec, F., Šatínský, D., Electrospun Nanofiber Polymers As Extraction Phases In Analytical Chemistry –The Advances Of The Last Decade, TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 110, Pages 81-96, January 2019.
- [4] Viswanathan, K., Manoharan, S., Subramanian, S., Moon, A., Nanotechnology in Spine Surgery: A Current Update and Critical Review of the Literature, World Neurosurgery, Volume 123, Pages 142-155, March 2019.
- [5] Amiri, M., Niasari, M., Akbari, A., Magnetic Nanocarriers: Evolution Of Spinel Ferrites For Medical Applications, Advances in Colloid and Interface Science, January 2019.
- [6] Roco, M., Savage, N., Foreword: Perspective on Responsible Development of Nanotechnology, Nanotechnology Environmental Health and Safety (Third Edition) Risks, Regulation and Management, Micro and Nano Technologies, 2019, Pages xxxix-xlii.
- [7] Kim, D., Taek, J., Lee, S., Dual-Signal Detection Of Trypsin Using Controlled Aggregation Of Conjugated Polymer Dots And Magnetic Nanoparticles, Sensors and Actuators B: Chemical, Volume 264, Pages 45-51, July 2018.
- [8] Argudo, P., Muñoz, E., Giner-Casares, J., Romero, M., Camacho, L., Folding of cytosine-based nucleolipid monolayer by guanine recognition at the air-water interface, Journal of Colloid and Interface Science, Volume 537, Pages 694-703, March 2019.
- [9] David, A., Spivak K., Shea, J., Investigation Into The Scope and Limitations Of Molecular Imprinting with DNA Molecules, Analytica Chimica Acta, Volume 435, Issue 1, Pages 65-74, May 2001.
- [10] Haupt, K., Mosbach, K., Plastic Antibodies: Developments and Applications, Trends in Biotechnology, Volume 16, Issue 11, Pages 468-475, November 1998.

- [11] Ansari, S., Karimi, M., Recent Configurations and Progressive Uses of Magnetic Molecularly Imprinted Polymers for Drug Analysis, *Talanta* Volume 167, Pages 470-485, May 2017.
- [12] Ahmad, O., Bedwell, T., Esen, C., Cruz, A., Piletsky, S., Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors, *Trends In Biotechnology*, September 2018.
- [13] Odabaşı, M., Say, R., Denizli, A., Molecular imprinted particles for lysozyme purification, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 27, Issue 1, Pages 90-99, January 2007.
- [14] Öncel P., İlaç Salımı İçin Moleküler Baskılanmış Kriyojel Membranlar, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara 2013.
- [15] Kuru C., Akgöl, S., Denizli, A., Alanin İçeren Moleküler Baskılanmış Nanopolimerlerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antibiyotik Uzaklaştırma Etkinliklerinin İncelenmesi, Ulusal Afinité Teknikleri Kongresi, 13-15 Eylül 2013, Ege Üniversitesi, Çeşme / İzmir.
- [16] Panagiotopoulou, M., Beyazit, S., Nestora, S., Haupt, K., Bernadette, Sum Bui, T., Initiator-Free Synthesis Of Molecularly Imprinted Polymers By Polymerization Of Self-Initiated Monomers, *Polymer*, Volume 66, Pages 43-51, June 2015.
- [17] Çetin K., Moleküler Baskılanmış Kriyojel Disklerden Florourasil Salınımı, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü, Ağustos 2013.
- [18] Kartal F., İnsan Serum Albumin Baskılanmış Eş Boyutlu Manyetik Poli(Glisidil Metakrilat) Partiküller, Yüksek Lisans Tezi, Kimya Bölümü, Ağustos 2013.
- [19] Tang, I., Gao, J., Liu, X., Gao, X., Ma, T., Lu, X., Li, J., Ultrasensitive Detection Of Clenbuterol By A Covalent Imprinted Polymer As A Biomimetic Antibody, *Food Chemistry*, Volume 228, Pages 62-69, August 2017.
- [20] Zhang, H., Water- Compatible Molecularly Imprinted Polymers: Promising Synthetic Substitutes For Biological Receptors, *Polymer*, Volume 55, Issue 3, Pages 699 -714, February 2014.
- [21] Sellergren, B., The non-covalent approach to molecular imprinting, *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Volume 23, Chapter 5, Pages 113-184, 2001.
- [22] Anastassiades, M., Scherbaum, E., Chapter 4, Sample handling and clean-up methods II-new developments, Article in *Comprehensive Analytical Chemistry*, Aralık 2005.

- [23] Ertürk G., Prostat Kanseri Tayini İçin Moleküler Baskılama Temelli Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörlerin Hazırlanması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Eylül 2015.
- [24] Qi., P., Wang, J., Wang, L., Li, Y., Jin, J., Su, F., Tian, Y., Chen, J., Molecularly Imprinted Polymers Synthesized Via Semi-Covalent Imprinting With Sacrificial Spacer For Imprinting Phenols, Polymer, Volume 51, Issue 23, Pages 5417-5423, October 2010.
- [25] Sajini, T., Gigimol, M., Mathew, B., A Brief Overview Of Molecularly Imprinted Polymers Supported On Titanium Dioxide Matrices, Materialstoday Chemistry, Volume 11, Pages 283-295, March 2019.
- [26] Díaz, M., Fernández, G., González, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Encyclopedia Of Analytical Science (Second Edition) Molecularly Imprinted Polymers, Pages 172-182, 2005.
- [27] Hashim, S., Boysen, R., Schwarz, L., Danylec, B., Hearn, M., A comparison of covalent and non-covalent imprinting strategies for the synthesis of stigmasterol imprinted polymers, Journal of Chromatography A, Volume 1359, Pages 35-43, September 2014.
- [28] Diltemiz, S., Denizli, A., Ersöz, A., Say, R., Molecularly Imprinted Ligand-Exchange Recognition Assay Of DNA By SPR System Using Guanosine And Guanine Recognition Sites Of DNA, Sensors and Actuators B: Chemical Volume 133, Issue 2, Pages 484-488, August 2008.
- [29] Demirci B., Protein C Saflaştırılması İçin Moleküler Baskılanmış Adsorbentler, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Haziran 2013.
- [30] Akgönüllü S., L-Fenilalanin'in Tanınmasına Yönelik Afinite Kartuşlarının Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı.
- [31] Hosseini, N., Rusu, C., Krozer, A., Haas, S., Reimhult, K., Lindgren, J., Enoksson, P., Ye, L., Characterization of Molecularly Imprinted Polymers as Novel Materials for Biochemical Sensors 4M Second International Conference on Multi-Material Micro Manufacture, Pages 203-206, 2006.
- [32] Nimesh, S., Methods of nanoparticle preparation, Gene Therapy Potential Applications of Nanotechnology Woodhead Publishing Series in Biomedicine, Pages 13-422, 2013.
- [33] Yuan, D., He, H., Wu, Y., Fan, J., Cao, Y., Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Nanoparticles, Journal of Pharmaceutical Sciences Volume 108, Issue 1, Pages 58-72, January 2019.

- [34] Gharieh, A., Khoei, S., Mahdavian A., Emulsion and miniemulsion techniques in preparation of polymer nanoparticles with versatile characteristics, *Advances in Colloid and Interface Science*, Volume 269, Pages 152-186, July 2019.
- [35] Hemmati, K., Sahraei, R., Ghaemy, M., Synthesis And Characterization Of A Novel Magnetic Molecularly Imprinted Polymer With Incorporated Graphene Oxide For Drug Delivery, *Polymer*, Volume 101, Pages 257-268, September 2016.
- [36] Tuwahatu, C., Yeung, C., WahLam. Y., Roy, V., The Molecularly Imprinted Polymer Essentials: Curation Of Anticancer, Ophthalmic, And Projected Gene Therapy Drug Delivery Systems, *Journal of Controlled Release*, Volume 287, Pages 24-34, October 2018.
- [37] Anonim, https://mipdatabase.com/all_items.php (Erişim tarihi: 6 Mayıs 2019).
- [38] Vance, M., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Jr., Rejeski, D., M.S., Nanotechnology In The Real World: Redeveloping The Nanomaterial Consumer Products Inventory, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 1769–1780, Aug 2015.
- [39] Anonim, The Project On Emerging Nanotechnologies, <http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis> (Erişim tarihi: 6 Mayıs 2019).
- [40] Gupta, A., Gupta, M., Review Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials* Volume 26, Issue 18, Pages 3995-402, June 2005.
- [41] Zhang, Y., Huang, Z., Tang, F., Ren, J., Ferrite Hollow Spheres With Tunable Magnetic Properties, *Thin Solid Films* Volume 515, Issue 4, Pages 2555-2561, December 2006.
- [42] Seisno, S., Suga, K., Takao, T., Yamamoto, A., Synthesis And Characterization Of Hollow Magnetic Nanospheres Modified With Au Nanoparticles For Bio-Encapsulation, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* Volume 427, Pages 276-279, April 2017.
- [43] An, K., Hyeon, T., Synthesis and biomedical applications of hollow nanostructures, Volume 4, Issue 4, Pages 359-373, August 2009. Review
- [44] Shubayev, V., PisanicII, T., Jin, S., Magnetic nanoparticles for theragnostics Theragnostics, *Advanced Drug Delivery Reviews* Volume 61, Issue 6, Pages 467-477, June 2009.
- [45] Yusuf, S.M., Functional Magnetic Materials: Fundamental and Technological Aspects, *Functional Materials Preparation, Processing and Applications*, Pages 111-1543, 2012.

- [46] Williams, M.J., Corr, S.A., Magnetic Nanoparticles for Targeted Cancer Diagnosis and Therapy, *Frontiers of Nanoscience*, Volume 5, Pages 29-63 Chapter 2, 2013.
- [47] Kim, N., Kim, J., Core–Shell Polymerization For Monodispersed Hollow Polymer Spheres Embedded With Magnetic Nanoparticles, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* Volume 18, Issue 5, Pages 1721-1729, 25 September 2012.
- [48] Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Kobayashi, T., Review Medical application of functionalized magnetic nanoparticles, *Journal of Bioscience and Bioengineering* Volume 100, Issue 1, Pages 1-11, July 2005.
- [49] Zhang, W., Qiu, J., Feng, H., Zang, L., Sakai, E., Increase in stability of cellulase immobilized on functionalized magnetic nanospheres, Volume 375, Pages 117-123, February 2015.
- [50] W, T., Pan, H., Chen, R., Luo, D., Li, Y., Wang, L., Preparation and properties of magnetic Fe₃O₄ hollow spheres based magnetic-fluorescent nanoparticles, *Journal of Alloys and Compounds*, Volume 689, Pages 107-113, December 2016.
- [51] Bhagavan, N.V., Nucleic Acid Structure and Properties of DNA, *Medical Biochemistry (Fourth Edition)*, Chapter 23, Pages 521-543, 2002.
- [52] Nygaard, P., Saxild, H.H., Nucleotide Metabolism, Reference Module in Biomedical Sciences, *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* Pages 296-307, 2009.
- [53] Aggett, P., LLeach, J., Rueda, R., MacLean, W., Innovation in infant formula development:: A reassessment of ribonucleotides in 2002, *Nutrition*, Volume 19, Issue 4, Pages 375-384, April 2003.
- [54] Micozzi, D., Pucciarelli, S., Francesco M.Carpi, F., Costanzi, S., Sanctis, G., Polzonetti, V., Natalini, P., Santarelli, I., Vita, A., Vincenzetti, S., Role of tyrosine 33 residue for the stabilization of the tetrameric structure of human cytidine deaminase, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 47, Issue 4, Chapter 29 - Cytidine Deaminase in Myeloprotective Gene Therapy, Pages 471-482, November 2010.
- [55] Yang, F.Q., Li, D.Q., Feng, K., Hu, D.J., Li, S.P., Determination of nucleotides, nucleosides and their transformation products in Cordyceps by ion-pairing reversed-phase liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 1217, Issue 34, Pages 5501-5510, August 2010.
- [56] Wu, L., Chen, L., Selvaraj, J.N., Wei, Y., Wang, Y., Li, Y., Zhao, J., Xue, X., Analytical Methods Identification of the distribution of adenosine

phosphates, nucleosides and nucleobases in royal jelly, *Food Chemistry*, Volume 173, Pages 1111-1118, April 2015.

- [57] Zhu, B., Wei, H., Wang, Q., Li, F., Dai, J., Yan, C., Cheng, Y., A simultaneously quantitative method to profiling twenty endogenous nucleosides and nucleotides in cancer cells using UHPLC-MS/MS, *Talanta* Volume 179, Pages 615-623, March 2018.
- [58] Kiyokawa, E., Hayama, T., Yoshida, H., Yamaguchi, M., Nohta, H., Fluorous-assisted metal chelate affinity extraction for nucleotides followed by HILIC-MS/MS analysis, *Journal of Chromatography B*, Volumes 1074–1075, Pages 86-90, February 2018.
- [59] Gill, B., Indyk, H., Harris, M., Determination of total potentially available nucleosides in bovine milk, *International Dairy Journal*, Volume 21, Issue 1, Pages 34-41, January 2011.
- [60] Álvarez, J., Vivas, M., Gonzalo, E., Gómez, D., Rangel, M., Zamarreño, M., Martínez, R., Determination of nucleosides and nucleotides in food samples by using liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Trac trends analytical chemistry*, Volume 92, Pages 12-31, July 2017.
- [61] Krstulja, A., Schutter, C., Favetta, P., Manesiotis, P., Agrofoglio, A., Artificial receptors for the extraction of nucleoside metabolite 7-methylguanosine from aqueous media made by molecular imprinting, *Journal of Chromatography A*, Volume 1365, Pages 12-18, October 2014.
- [62] Malami, I., Abdul, A., Involvement of the uridine cytidine kinase 2 enzyme in cancer cell death: A molecular crosstalk between the enzyme and cellular apoptosis induction, *Biomedicine & Pharmacotherapy* Volume 109, Pages 1506-1510, January 2019.
- [63] Guo, S., Duan, J., Qian, D., Wang, H., Tang, Y., Qian, Y., Wu, D., Su, S., Shang, E., Hydrophilic interaction ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry for determination of nucleotides, nucleosides and nucleobases in *Ziziphus* plants, *Journal of Chromatography A* Volume 1301, Pages 147-155, August 2013.
- [64] Li, S., Cao, S., Whitcombe M., Piletsky, S., Size matters: Challenges in imprinting macromolecules, *Progress in Polymer Science* Volume 39, Issue 1, Pages 145-163, January 2014.
- [65] Bhagavan, N.V., *Nucleotide Metabolism, Medical Biochemistry* (Fourth Edition), Chapter 27, Pages 615-644, 2002.
- [66] R. Engelking, L., *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, 2015.
- [67] Zhu, B., Wei, H., Wang, Q., Li, F., Dai, J., Yan, C., Cheng, Y., A simultaneously quantitative method to profiling twenty endogenous

nucleosides and nucleotides in cancer cells using UHPLC-MS/MS, Talanta, Volume 179, Pages 615-623, Mart 2018.

- [68] Martinussen, J., Willemoës, M., Kilstrup, M., Nucleotide Metabolism, Comprehensive Biotechnology (Second Edition), Volume 1, Pages 91-107, 2011.
- [69] Cansev, M., Uridine and cytidine in the brain: Their transport and utilization, Brain Research Reviews Volume 52, Issue 2, Pages 389-397, September 2006.
- [70] Qian, Y., Ding, Q., Li, Y., Zou, Z., Yan, B., Ou, L., Phosphorylation of uridine and cytidine by uridine–cytidine kinase, Journal of Biotechnology Volume 188, Pages 81-87, October 2014.
- [71] Gündoğdu, E., Periferik Sinir Kesilerinde Sitikolin Uygulamasının Koruyucu Etki Mekanizmalarının Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı, 2014.
- [72] Perçin, I., Idil, N., Denizli, A., Molecularly imprinted poly(N-isopropylacrylamide) thermosensitive based cryogel for immunoglobulin G purification, Process Biochemistry, 181- 189, 2019.
- [73] Bereli, N., Monoklonal Antibadi Saflaştırılması İçin Eşboyutlu Manyetik Partiküllerin Hazırlanması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, 2010.
- [74] Uygun, D., A. Karagözler, A., Akgöl, S., Denizli, A., Magnetic hydrophobic affinity nanobeads for lysozyme separation, Materials Science and Engineering: C, Volume 29, Issue 7, Pages 2165-2173, August 2009.
- [75] Türkmen, D., Yavuz, H., Denizli, A., Synthesis of tentacle type magnetic beads as immobilized metal chelate affinity support for cytochrome c adsorption, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 38, Issue 2, Pages 126-133, March 2006.
- [76] Saka, Ö., Boya Takılı Manyetik Poli(Hidroksietil-Metakrilat) Nanoküreler İle Kandan Albümin Azaltılması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 2011.
- [77] Idil, N., Perçin, I., Karakoç, V., Yavuz, H., Aksöz, N., Denizli, A., Concanavalin A immobilized magnetic poly(glycidyl methacrylate) beads for prostate specific antigen binding, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Volume 134, Pages 461-468, October 2015.
- [78] Sert, E., Investigation And Dating Of Cave Deposits By Esr (Electron Spin Resonance) Method, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fizik Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 2014.

- [79] Ceylan, Y., Organik Ve İnorganik Malzemeler Üzerindeki Radyasyon Etkilerinin Epr Yöntemiyle Analiz Edilmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fizik Anabilim Dalı, Nisan, 2014.
- [80] Öncel, Ş., Uzun, L., Garipcan, B., Denizli, A., Synthesis of Phenylalanine-Containing Hydrophobic Beads for Lysozyme Adsorption, Industrial and Engineering Chemistry Research, 44(18), 7049-7056, 2005.
- [81] Perçin, I., EmelSağlar, E., HandanYavuz, H., ErolAksöz, E., AdilDenizli, A., Poly(hydroxyethyl methacrylate) based affinity cryogel for plasmid DNA purification, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 48, Issue 4, Pages 577-582, May 2011.
- [82] Chung,H., Kim, W., Park, J., Cho, J., Jeong T., Park, P., Application of Langmuir and Freundlich isotherms to predict adsorbate removal efficiency or required amount of adsorbent, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Volume 28, Pages 241-246, August 2015.
- [83] Rushton, G., L.Karns, C., Shimizu, K., A critical examination of the use of the Freundlich isotherm in characterizing molecularly imprinted polymers (MIPs), Analytica Chimica Acta Volume 528, Issue 1, Pages 107-113, January 2005.
- [84] Koç, İ., Baydemir, G., Bayram, E., Yavuz, H., Denizli, A., Selective removal of 17 β -estradiol with molecularly imprinted particle-embedded cryogel systems, Journal of Hazardous Materials, Volume 192, Issue 3, Pages 1819-1826, September 2011.
- [85] JUmplebyll, R., CBaxter, S., Bode, M., KBerchJr., J., NShah, R., DShimizu, K., Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers, Analytica Chimica Acta Volume 435, Issue 1, Pages 35-42, 17 May 2001.
- [86] Karataş, M., Akgöl, S., Yavuz, H., Say, R., Denizli, A., Immunoglobulin G depletion from human serum with metal-chelated beads under magnetic field, International Journal of Biological Macromolecules Volume 40, Issue 3, Pages 254-260, February 2007.
- [87] Battal, D., Akgönüllü, S., Yalcin, M.S., Yavuz, H., Denizli, A., Molecularly imprinted polymer based quartz crystal microbalance sensor system for sensitive and label-free detection of synthetic cannabinoids in urine, Biosensor and Bioelectronics, 111 (2018) 10–17.
- [88] Çetin, K., Denizli, A., Immunoaffinity micro cryogels for purification of transferrin, Journal of Chromatography B, 1114- 1115, 5-12, 2019.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 18/06/2019

Tez Başlığı / Konusu: NÜKLEOTİD SAFLAŞTIRILMASI İÇİN BASKILANMIŞ MANYETİK POLİ(HİDROKSİETİL METAKRİLAT) (MPHEMA) NANOKÜRELER

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 82 sayfalık kısmına ilişkin, 18/06/2019 tarihinde ~~çalışmam~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 10'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

18.06.2019

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Emine ÖNGÜN

Öğrenci No: N13229919

Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotıp

Programı:

Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emine ÖNGÜN
Doğum yeri : Adapazarı
Doğum tarihi : 26.03.1989
Medeni hali : Evli
Yazışma adresi : -
Telefon : 0554- 6181126
Elektronik posta adresi : emine.huseyinagaoglu@yandex.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi/
Biyoloji Bölümü
: Sakarya Üniversitesi Eğitim Fakültesi/ Pedagojik
Formasyon

İŞ TECRÜBESİ

2013 - 2013 : Isparta Halk Sağlığı Kurumu/ Bakteriyolojik Su
Laboratuvarı
2013 - 2018 : Türkiye İlaç ve Eczacılık Kurumu
2018 - Devam ediyor : Antalya Halk Sağlığı Laboratuvarı/ Tüberküloz Birimi