

**BOYA TAKILI MANYETİK POLİ(HİDROKSİETİL-METAKRİLAT)
NANOKÜRELER İLE KANDAN ALBÜMİN AZALTILMASI**

**DYE-ATTACHED MAGNETIC POLY(HYDROXYETHYL-METHACRYLATE)
BASED NANOSPHERES FOR ALBUMIN DEPLETION OUT OF HUMAN
PLASMA**

ÖZNUR SAKA

DOKTORA TEZİ

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
KİMYA Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2011

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Adil Denizli

Üye :.....
Prof. Dr. Serap Şenel

Üye :.....
Prof. Dr. Rıdvan Say

Üye :.....
Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

Üye :.....
Doç. Dr. Handan Yavuz

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil Denizli
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sevim Annem' e...

BOYA TAKILI MANYETİK POLİ(HİDROKSİETİL-METAKRİLAT) NANOKÜRELER İLE KANDAN ALBÜMİN AZALTILMASI

ÖZNUR SAKA

ÖZ

Sunulan bu çalışmanın amacı; insan serum albüminini (HSA) plazmadan etkin bir şekilde ayırabilmek için nanobiyoteknolojik bir yaklaşım geliştirilmesidir. Bu kapsamda Afinite Kromatografisi yöntemleri arasında, son yıllarda yoğun bir uygulama alanı bulan, Boya-Ligand Afinite Kromatografisi kullanılmıştır. Çünkü boya-ligandları oldukça yüksek derecede bir seçicilikle proteinleri bağlama kapasitesine sahiptirler. Aynı zamanda ticari olarak kolay temin edinebilme, ucuzluk ve özellikle hidroksil grubu taşıyan matrikslere kolay immobilize edilebilme gibi çok önemli avantajları vardır. Kısaca albümin diye de bilinen serum albümini, insan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasında bulunan en yaygın proteindir. Özellikle taşımadan sorumludur ve kanda bulunan toplam proteinin yaklaşık % 80'ini oluşturduğundan teşhis ve tedavide de büyük rol oynamaktadır. Manyetit (Fe_3O_4) ya da onun oksitlenmiş hali olan maghemit ($\gamma-Fe_2O_3$) gibi demir oksit partikülleri son zamanlarda biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Manyetik partiküllerin vazgeçilmez özelliği manyetik kuvvete karşı gösterdikleri tepkidir. Biyomedikal uygulamalarda oda sıcaklığında süperparamanyetik davranış gösteren manyetik partiküller tercih edilir. Çünkü manyetik alan ortamdaki uzaklaştırıldığında manyetizma alanını muhafaza etmezler. Buna ilaveten manyetitlerin sahip oldukları yüksek manyetik doyumluk, biyoyumluluk ve yüzeylerdeki etkileşimli fonksiyon gösterebilme gibi özellikleri manyetik nanoküreler kullanılmasının önemli avantajlarından biridir. Çalışmanın birinci bölümünde mikroemülsiyon polimerizasyonu uygulanmıştır. Manyetit varlığında 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerinin polimerizasyonu ile ortalama 98.9 nm boyutunda polidispersite indeksi (PDI) 0.156 olan manyetik poli(hidroksietil-metakrilat) (m-PHEMA) nanoküreler elde edilmiştir. m-PHEMA nanoküreleri; HEMA fonksiyonel monomerinin Etilen Glikol Dimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcısıyla Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ve Poli(vinil alkol) (PVA) karışımından oluşan sulu dağıtma ortamında başlatıcı olarak Amonyum Per Sülfat (APS)

kullanılmasıyla sentezlenmiştir. Nanoküre “yüzey alanı/kütle” oranı oldukça yüksek olduğundan dolayı sentezlenen polimerin spesifik yüzey alanı da $1302 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Daha sonra sentezlenen m-PHEMA nanokürelere bir mono triazin boya olan Cibacron Blue F3GA (CBF3GA) boya afinite ligandı olarak bağlanmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde sentezlenen CBF3GA bağlı m-PHEMA (CBF3GA/m-PHEMA) nanokürelerin boyut, boyut dağılımı (PDI); Zeta Sizer ile, yüzey yükü özellikleri; Zeta Potansiyeli ile, morfolojik özellikleri; AFM ve SEM ile, kimyasal yapısı; elemental analiz, FTIR, DSC, TGA, DTG, DTA ile ve manyetik özellikleri ise; ESR ve VSM ile karakterize edilmiştir. Elde edilen karakterizasyon sonuçları formülasyonun başarıyla kullanılabileceğini desteklemiştir. Çalışmanın üçüncü ve dördüncü bölümlerinde ise sentezlenen nanokürelerin sulu çözelti ortamından ve plazmadan seçimli olarak albümin adsorplama performansları incelenmiştir. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerle sulu ortamdan HSA adsorpsiyonu davranışlarına; pH, protein derişimi, etkileşim süresi, tuz derişimi ve sıcaklık parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Nanokürelerin albümin adsorpsiyonunda optimum koşullar; adsorpsiyon ortam pH'ı 5.0, başlangıç protein derişimi 4.0 mg/ml HSA, etkileşim süresi 300 dakika, başlangıç tuz derişimi 0.01 M ve adsorpsiyon sıcaklığı ise 25°C olarak tespit edilmiştir. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin optimum albümin adsorpsiyon kapasitesi 598 mg HSA/g polimer olarak bulunmuştur. Çalışmanın dördüncü aşaması kapsamında CBF3GA/m-PHEMA nanoküreler in-vitro koşullarda kan plazması ile de etkileştirilmiştir. Yapılan bu deneyler sonucunda; geliştirilen bu manyetik afinite nanokürelerin insan serum albümininin plazmadan tek adımda % 42.35 verimle ayrılmasını sağladığı belirlenmiştir. Gerçekleştirilen desorpsiyon deneyleri sonucunda da yüksek performans sağlanmış ve polimerin tekrar kullanılabilirliğini destekleyici sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nanoküreler, İnsan Serum Albümini, Mikroemülsiyon, Nanobiyoteknoloji.

Danışman: Prof. Dr. Adil Denizli. Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya ABD, Beytepe, ANKARA

DYE-ATTACHED MAGNETIC POLY(HYDROXYETHYL-METHACRYLATE) BASED NANOSPHERES FOR ALBUMIN DEPLETION OUT OF HUMAN PLASMA

ÖZNUR SAKA

ABSTRACT

The aim of this study is to develop a nanobiotechnological approach in order to deplete human serum albumin (HSA) from plasma effectively. The advantage of Dye-Ligand Affinity Chromatography which is widespreadly used among the chromatographic techniques in recent years was taken in this content. Because dye-ligands are able to bind most types of proteins, in some cases in a remarkably specific manner. They are commercially available, inexpensive, and can easily be immobilized especially on matrixes bearing hydroxyl groups. Human serum albumin, which is called as “albumin” shortly, is known as the most abundant protein appearing both in blood plasma of human beings and other mammals. Transport function of albumin is almost above all other functions. Since albumin forms approximately 80 % of the existing total blood proteins, it figures large both in diagnosis and therapeutics. Iron oxide particles such as magnetite (Fe_3O_4) or its oxidized form maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) are by far the most commonly employed in biomedical applications. The unique feature of magnetic particles is their response to magnetic force. For biomedical applications, magnetic particles exhibiting superparamagnetic behavior at room temperature are preferred because they do not retain any magnetism after removal of the magnetic field. Furthermore, the particles must have combined properties of high magnetic saturation, biocompatibility and interactive functions at the surfaces. In the first step of the submitted study microemulsion polymerization was applied. In this context magnetic poly(hydroxyethyl-methacrylate) (m-PHEMA) nanospheres (with an average size of 98.9 nm having a polydispersion (PDI) index of 0.156) were obtained by the polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) monomers in the presence of magnetite. m-PHEMA nanospheres were synthesized in aqueous dispersion medium of HEMA functional monomers composed of EGDMA cross-linker, SDS and PVA mixture and APS initiator. Hence the “surface

area/mass” ratio of nanospheres appears extremely high, specific surface area of the magnetic nanospheres was found to be 1302 m²/g. Afterwards Cibacron Blue F3GA mono triazin dye was attached to the synthesized m-PHEMA nanospheres as a dye affinity ligand. In the second step of the study synthesized CBF3GA/m-PHEMA nanospheres were characterized in respect of a) size and size distribution (PDI) by Zeta Sizer; b) surface charge properties by Zeta Potential; c) morphological properties by AFM and SEM; d) chemical structure by elemental analysis, FTIR, DSC and TGA, DTG, DTA; e) magnetic properties by ESR and VSM. The obtained characterization results supported that the formulation could be used successfully. In the third and the fourth steps of the study it was aimed to detect the selective albumin adsorption performance of the synthesized nanospheres from the aqueous dissolving medium and plasma reciprocally. For this reason the effects of the required parameters over albumin adsorption of CBF3GA/m-PHEMA nanospheres from the aqueous dissolving medium were investigated. The investigated parameters were pH, protein concentration, salt concentration, reaction time and temperature. The optimum albumin adsorption conditions of nanospheres were determined as follows: pH of adsorption medium; 5.0, initial protein concentration; 4.0 mg/ml HSA, adsorption time; 300 minutes, initial salt concentration; 0.01 M and adsorption temperature; 25°C. Optimum albumin adsorption of CBF3GA/m-PHEMA nanospheres was detected as 598 mg HSA/g polymer. In the fourth and the last step of the study CBF3GA/m-PHEMA nanospheres were also treated to adsorb albumin from blood plasma with in-vitro experiments. As a conclusion it was proved that these developed magnetic affinity nanospheres are able to deplete human serum albumin from plasma in single step with 42.35 % efficiency. As a result of the desorption experiments high performance was achieved supporting the reusability of the synthesized polymer.

Keywords: Nanospheres, Human Serum Albumin, Microemulsion, Nanobiotechnology.

Advisor: Prof. Dr. Adil Denizli. Hacettepe University, Chemistry Department, Biochemistry Division, Beytepe, ANKARA

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden her fırsatta yararlanmama olanak sağlayan değerli hocam, danışmanım sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye; tezimin yürütülmesindeki desteklerinden ve dostane yaklaşımlarından ötürü derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Biyomühendislik Bölümü'ndeki Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgileri ve tecrübeleri ile yetişmemde ve Biyokimya Bölümü'ndeki Doktora Programı'na yönlendirilmemde büyük emeği olan sayın hocalarım Prof. Dr. Erhan Pişkin'e ve Prof. Dr. Hakan Ayhan'a şükranlarımı sunarım.

Tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Serap Şenel, Prof. Dr. Sema Bektaş, Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş ve Prof. Dr. Abdülkerim Karabakan'a,

Yardım ve tecrübesi ile laboratuvar çalışmalarımı kolaylaştıran arkadaşım Veyis Karakoç'a ,

Tezin hazırlanmasında çok önemli destek ve ilgilerinden dolayı Doç. Dr. Sinan Akgöl, Doç. Dr. Handan Yavuz, Lokman Uzun, Nilay Bereli, Deniz Türkmen, Müge Andaç, Erkut Yılmaz, Kazım Köse, Fatma Yılmaz ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet Odabaşı'na şükran ve minnet dolu en özel teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda emeği geçen bütün Biyokimya Araştırma Grubu hocaları, öğrencileri ve çalışanlarına,

Desteklerinden dolayı Maltepe Kız Teknik ve Meslek Lisesi eski müdürü Hülya Narsap'a ve yeni müdürü Hatice Dürdane Ekmekçibaşı'na,

Hayatımın bu aşamasında, gücümü kaybettiğim anlarda sevgi ve dostluklarını her zaman hissettiren arkadaşlarım Arzu Borlaş'a, Ali Özbek'e, Yeşim Mutlu'ya, Eylem Aslan'a, Başak Atay'a ve Alev Şirincan'a,

***Daima esprileriyle bana moral kaynağı olan sevgili kardeşim Burak'a,
Tüm fedakârlıklarından dolayı canım kardeşim Özlem'e ve eşi Mustafa'ya,
canım kardeşim Ercan ve nişanlısı Selma'ya,
Beni her zaman özveriyle, güvenle destekleyip, bu duruma gelmemi
sağlayan sevgili annem Naciye Gökay'a ve babam Osman Gökay'a,***

***Tezimin gerçekleştirilmesinde benimle birlikte tüm sıkıntılara katlanarak
büyük destek ve sabır gösteren sevgili eşim Ersen Saka'ya,***

Ve yaşamım boyunca örnek aldığım sevgili dedem Kamil Vergili'ye

en içten minnet ve şükran duygularıyla sonsuz teşekkürler.

ACKNOWLEDGEMENT

I want to express my gratitude to my advisor Prof. Dr. Adil Denizli for inspiration and cooperation since he gave me the chance of benefiting from his academic acquirements and experience during my research.

I am grateful to Prof. Dr. Erhan Pişkin and Prof. Dr. Hakan Ayhan who have major roles not only in my master's degree education at Bioengineering Department but also in my orientation to Postgraduate Program at Biochemistry Department.

I would like to thank Prof. Dr. Serap şenel, Prof. Dr. Sema Bektaş, Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş and Prof. Dr. Abdülkerim Karabakan since they let me benefit from their professional experiences.

I am grateful to Veyis Karakoç who has facilitated my laboratory works providing assistance.

All my lab buddies at Biochemistry Research Group Laboratory made it a convivial place to study and research. In particular, I would like to thank Assoc. Prof. Dr. Sinan Akgöl, Assoc. Prof. Dr. Handan Yavuz, Lokman Uzun, Nilay Bereli, Deniz Türkmen, Müge Andaç, Erkut Yılmaz, Kazım Köse, Fatma Yılmaz and Assist. Prof. Dr. Mehmet Odabaşı for their friendship and help in recent years.

I would like to also express my gratitude to my ex and recent school headmistresses (of Maltepe Vocational High School); Hülya Narsap and Hatice Dürdane Ekmekçibaşı.

I gratefully acknowledge my dear friends Arzu Borlaş, Ali Özbek, Yeşim Mutlu, Eylem Aslan, Başak Atay and Alev Şirincan who always make me feel their love and fellowship.

Many thanks go in particular to my brother Burak who manages to make me smile with his jokes every time and to my dear sister Özlem and her husband Mustafa , to my brother Ercan and his fiancée Selma due to all of their sacrifices.

My deepest gratitude goes to my parents Naciye and Osman Gökay who were and are still my greatest supporters. I owe my today's status to their confidence and self-sacrifice.

Above all I thank my husband, Ersen Saka, who stood beside me and encouraged me constantly.

Finally I would like to thank my grandfather, Kamil Vergili, who is my role model.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ VE ARAŞTIRMANIN AMACI	1
2. TEMEL BİLGİLER	3
2.1. Proteomiks	3
2.1.1. Proteomik Teknolojisi	4
2.1.1.1. Örnek Hazırlığı	5
2.1.1.2. Örnek Hazırlığında En Çok Kullanılan Sıvı; Kan.....	6
2.1.1.3. Kandan Protein Uzaklaştırılması ile ilgili Literatür.....	8
2.1.2. Protein Ayırma Metodları	8
2.1.2.1. İki Boyutlu Elektroforez.....	8
2.1.2.2. Tek ve İki Boyutlu Sıvı Kromatografisi	9
2.1.2.3. Kütle Spektrometresi (MS)	10
2.1.2.4. Protein Mikroçip Teknolojisi.....	11
2.1.2.5. Proteomik Teknolojisinin Sınırlılıkları.....	12
2.1.3. Tıpta Proteomik	12
2.1.3.1. Erken Kanser Tanısında Proteomik.....	12
2.1.4. Toplumsal Proteomik.....	13
2.2. Nanoteknoloji.....	14
2.2.1. Nanoölçek Nedir?	15
2.2.2. Nanoteknolojide Yeni Gelişmeler.....	16
2.2.3. In Vivo Nanoprobalar.....	16
2.2.4. Nanosistemler	17
2.2.5. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları.....	17

2.2.5.1. Nanobiyoteknolojinin Tanımı	18
2.2.5.2. Nanobiyoteknolojinin Uygulama Alanları	19
2.2.5.2.1. Doku Mühendisliği	20
2.2.5.2.2. Kanser Tedavisi.....	21
2.2.5.2.3. Biyolojik Analizlerde Çok Renkli Optik Kodlama	22
2.2.5.2.4. Hücre ve Biyomoleküllerin İşlenmesi	22
2.2.5.2.5. Protein Analizi.....	23
2.3. Afinite Kromatografisi	24
2.3.1. Afinite Kromatografi Süreci.....	25
2.3.1.1. Afinite ilişkileri	26
2.3.1.2. Matris seçimi.....	27
2.3.1.3. Ligandların sınıflandırılması	27
2.3.1.3.1. Monospesifik Düşük Mol Kütleli Ligandlar	27
2.3.1.3.2. Grup-Spesifik Düşük Mol Kütleli Ligandlar	28
2.3.1.4. Ligand seçimi.....	28
2.3.1.5. Uzatıcı Kol Seçimi	29
2.3.1.6. Ligandın Destek Matrisine Bağlanması	29
2.3.2. Boya-Ligand Afinite Kromatografisi	32
2.3.2.1. Afinite Ligandı Olarak Boyalar	33
2.3.2.2. Kısa tarihçe	33
2.3.2.3. Boya Ligandların Kimyasal Yapısı	34
2.3.2.4. Boya-Ligand Protein Etkileşimleri	36
2.3.2.5. CBF3GA'nın Boya-Ligand Olarak Kullanımı	38
2.4. Manyetik Alan Etkisiyle Ayırma ve Saflaştırma.....	39
2.4.1. Manyetik Taşıyıcı Teknolojisi.....	39
2.4.2. Manyetik Taşıyıcı Olarak PHEMA Kullanılması	40
2.4.3. Manyetik Nanokürelerin Hazırlanması.....	42
2.4.3.1. Manyetik Dolgular	42
2.4.3.1.1. Manyetik Karakteristikleri.....	42
2.4.3.1.2. Polimer Dolgusu Olarak İnorganik Nanoküreler.....	46
2.4.3.1.3. Demir Oksitler/Feritler.....	47

2.4.3.1.4. Manyetit Kristal Yapısı ve Manyetik Özellikleri	49
2.4.3.2. Manyetik Polimerlerin Hazırlanması	50
2.4.4. Ayırma Tekniklerinde Manyetik Polimerlerin Kullanılması	51
2.4.4.1. Afinite Etkileşimine Dayanan Ayırma Teknikleri.....	51
2.4.4.2. Enzimlerin ve Diğer Proteinlerin İzolasyonu	52
3. DENEYSEL YÖNTEMLER	53
3.1. Kimyasal Maddeler	53
3.2. Deneysel Çalışmalar	53
3.2.1.1. m-PHEMA Nanokürelerin Sentezlenmesi	54
3.2.1.1.1. Nanokürelerin Çöktürülmesi	56
3.2.1.2. m-PHEMA Nanokürelere Cibacron Blue F3GA Bağlanması	56
3.2.2. CBF3GA/m-PHEMA Nanokürelerin Karakterizasyonu	58
3.2.2.1. Zeta Sizer ile Boyut Analizi	58
3.2.2.2. Zeta Potansiyel ile Yüzey Yükü Analizi.....	58
3.2.2.3. Yüzey Alanı Analizi.....	58
3.2.2.4. Morfolojik Analiz	58
3.2.2.4.1. AFM Çalışmaları.....	58
3.2.2.4.2. SEM Çalışmaları.....	59
3.2.2.5. Elemental Analiz.....	59
3.2.2.6. FTIR çalışmaları	60
3.2.2.7. Manyetik Analiz	60
3.2.2.7.1. ESR Çalışmaları	60
3.2.2.7.2. VSM Çalışmaları.....	60
3.2.2.8. Termal Analiz.....	60
3.2.2.8.1. DSC Çalışmaları.....	60
3.2.2.8.2. TGA, DTG ve DTA Çalışmaları.....	61
3.2.3. CBF3GA/m-PHEMA Nanokürelerle HSA Adsorpsiyonu	61
3.2.3.1. Sulu Çözeltilerden HSA Adsorpsiyonu	61
3.2.3.2. İnsan Plazmasından Seçici Albümin Azaltılması	62
3.2.3.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik.....	62
3.2.3.4. SDS-PAGE Analizi	63

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	65
4.1. CBF3GA/m-PHEMA Nanokürelerin Karakterizasyonu	65
4.2.1. Zeta Sizer ile Boyut Analizi	65
4.2.2. Zeta Potansiyel ile Yüzey Yükü Analizi	66
4.2.3. Yüzey Alanı Analizi	67
4.2.4. Morfolojik Analiz	67
4.2.4.1. AFM Çalışmaları	67
4.2.4.2. SEM Çalışmaları	69
4.2.5. Elemental Analiz	70
4.2.6. FTIR çalışmaları	70
4.2.7. Manyetik Analiz	74
4.2.7.1. ESR Çalışmaları	74
4.2.7.2. VSM Çalışmaları	76
4.2.8. Termal Analiz	78
4.2.8.1. DSC Çalışmaları	78
4.2.8.2. TGA, DTG ve DTA Çalışmaları	79
4.3. CBF3GA/m-PHEMA Nanokürelerle HSA Adsorpsiyonu	81
4.3.1. Sulu Çözeltilerden HSA Adsorpsiyonu	81
4.3.1.1. pH Etkisi	81
4.3.1.2. HSA Başlangıç Derişiminin Etkisi	82
4.3.1.3. Etkileşim Süresinin Etkisi	84
4.3.1.4. İyonik Şiddetin Etkisi	85
4.3.1.5. Sıcaklığın Etkisi	86
4.3.1.6. Adsorpsiyon İzotermleri	87
4.3.1.7. Adsorpsiyon Kinetiği	90
4.3.2. İnsan Plazmasından Seçici Albümin Azaltılması	93
4.3.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	94
4.3.4. SDS-PAGE Analizi	96
4.4. Literatür Karşılaştırması	98
5. SONUÇLAR	101
KAYNAKLAR DİZİNİ	105

EKLER	114
ÖZGEÇMİŞ	116

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Proteomiksin genel çalışma akışının şeması.....	4
Şekil 2.2.	Albümin ve IgG uzaklaştırılmadan önce ve sonra (Denizli, 2007).	7
Şekil 2.3.	Nanoskobik ebatların gösterimleri (Karakuş, 2006).....	15
Şekil 2.4.	Tıbbi ve biyolojik problemlerde nanobiyomalzemelerden yararlanılan uygulamalar (Salata, 2004).....	20
Şekil 2.5.	Afinite kromatografisindeki temel basamakların şematik gösterimi	25
Şekil 2.6.	Ligandların aktive edilmiş taşıyıcılara immobilizasyonları: (A) siyanojen bromür ile aktive edilmiş siyonat esteri (B) Amit türevi oluşturan N-hidroksisüksinimidesteri (C) ve (D) karbamat türevleri oluşturan p-nitro fenilkloroformat veya DSC ile aktive edilmiş p-nitro-fenil ve N-hidroksisüksinimit karbonat (Wilchek ve Miron, 1999).	31
Şekil 2.7.	Reaktif boyalara örnekler, (a) Siyanürik klorür; (b) Procion MX serileri (ICI); (c) Cibacron (Ciba-Geigy) ve Procion H (ICI); (d) Procion H-E (ICI); (e) Monoflorotriazinil, Cibacron, Ciba-Geigy; (f) Trikloroprimidinil, Drimarene, Sandoz; (g) Diklorokloro-primidinil, Levafix, Bayer ve Drimarene, Sandoz; (h) Sülfatoetil sülfon, Remazol, Hoechst.	35
Şekil 2.8.	Cibacron Blue F3GA'nın Kimyasal Yapısı (Altıntaş ve Denizli, 2006).	38
Şekil 2.9.	(m-PHEMA)'nın moleküler yapısı (Odabaşı ve Denizli, 2004).	39
Şekil 2.10.	Manyetik taşıyıcı teknolojisi (Denkbaş, 2003).	40
Şekil 2.11.	(a) Sıfır remanansa sahip bir paramanyetik (1) ve bir süperparamanyetik (2) malzemenin manyetiklik eğrisi. Süperparamanyetik malzeme (2) hem manyetiklik M hem de doymun manyetiklik M_s değerleri açısından daha yüksek değerlere ulaşır. (b) Bir ferromanyetin histerezis eğrisi. O-P eğrisine göre; başlangıç durumunda manyetikleştirilmeyen bir örneğin manyetikliği M, alan şiddetindeki H artışla beraber artış gösterir. Eğrinin eğimi duyarlılık değerini verir. Manyetiklik alan şiddetindeki takip eden azalmayla beraber azalır- oklara bakınız. Alan şiddetindeki tekrarlanan siklik değişiklikler, oklarla da görüldüğü gibi manyetikliğin siklik değişikliğine yol açarlar. Eğer örnek manyetiklik doymunluğuna M_s ulaşmazsa, manyetiklik eğrisi benzer olur (Horak ve ark., 2007).	45
Şekil 2.12.	(a) İğne modeli ve (b) kübik model manyetit için taramalı elektron mikrografı (c) Çökellemeyle birlikte elde edilen sitrik asitle stabilize edilmiş maghemitin transmisyon elektron mikrografı (Horak ve ark., 2007).	48
Şekil 2.13.	Manyetit ters spinal kristal yapısı.	49

Şekil 2.14.	Kompozit manyetik polimerlerin farklı morfolojik yapıları. (a) tek-dolgu, (b) çoklu-dolgu, (c) çilek ve (d) fırça (saç) modeli.....	50
Şekil 3.1.	m-PHEMA nanokürelerin hazırlanmasında kullanılan mikroemülsiyon polimerizasyonun şematik gösterimi.....	55
Şekil 3.2.	Cibacron Blue F3GA'nın m-PHEMA'ya bağlanması (Başar ve ark., 2007).	57
Şekil 4.1.	Sentezlenen manyetik özellikte polimerik nanokürelerin Zeta Sizer grafiği.	66
Şekil 4.2.	Sentezlenen manyetik özellikte polimerik nanokürelerin farklı pH değerlerindeki Zeta Potansiyel grafiği.	67
Şekil 4.3.	CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin AFM görüntüleri. (A) Yüzey Görüntüsü (B) 3B Görüntüsü (Zeta Sizer ile ölçülen partikül boyutu 98.9 nm).	68
Şekil 4.4.	CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin SEM görüntüleri.....	69
Şekil 4.5.	Manyetik PHEMA, CBF3GA ve CBF3GA/m-PHEMA nanokürelere ait FTIR spektrumları.....	72
Şekil 4.6.	CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin ESR spektrumu.	76
Şekil 4.7.	CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin manyetizma eğrisi.....	77
Şekil 4.8.	CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin DSC grafiği.	79
Şekil 4.9.	CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin TGA, DTG ve DTA grafikleri.	80
Şekil 4.10.	pH'in adsorpsiyona etkisi.....	81
Şekil 4.11.	HSA derişiminin adsorpsiyona etkisi.	83
Şekil 4.12.	Adsorpsiyon süresinin adsorpsiyona etkisi.....	84
Şekil 4.13.	İyonik şiddetin adsorpsiyona etkisi.	85
Şekil 4.14.	Sıcaklığın adsorpsiyona etkisi.	87
Şekil 4.15.	CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin Langmuir adsorpsiyon izotermi...88	
Şekil 4.16.	CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	89
Şekil 4.17.	CBF3GA/m-PHEMA nanoküreler için psödo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği ve psödo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.	92
Şekil 4.18.	Tekrar kullanılabilirlik.....	95
Şekil 4.19.	CBF3GA/m-PHEMA nanokürelere insan serum adsorpsiyonunun SDS-PAGE analizi. [(% 5–12) SDS-PAGE; 1.Hat: Standard BSA (1 mg/ml, Sigma), 2.Hat: Sigma Belirleyici (Moleküler Ağırlık, Da, Ürün kodu: M6539, Sigma), 3.Hat: işlem görmemiş insan serumu, 4.Hat: CB bağlı nanokürelerle işlem görmüş insan serumu ve 5.Hat: desorpsiyon].	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Kan plazmasındaki proteinlerin bulunurluk oranları (Denizli, 2007).....	7
Çizelge 2.2.	Biyolojik ve tıbbi alanlarda kullanılmak üzere nanomalzemeleri geliştiren şirketler (Salata, 2004).....	23
Çizelge 2.3.	Afinite kromatografisindeki biyolojik ilişkilere örnekler (Öncel, 2004).....	24
Çizelge 2.4.	Afinite kromatografisinin alt dalları.	32
Çizelge 2.5.	Manyetik alan işlemleri.	39
Çizelge 2.6.	Manyetit ve maghemitin fiziksel özellikleri.	48
Çizelge 2.7.	Demir oksihidroksit ve demir oksit türleri.	48
Çizelge 3.1.	98.9 nm (Polidispersite: 0.156) boyutundaki nanokürelerin hazırlanma reçetesi.	55
Çizelge 3.2.	98.9 nm (Polidispersite: 0.156) boyutundaki nanokürelerin polimerizasyon koşulları.	55
Çizelge 4.1.	FTIR spektrumlarından elde edilen bazı karakteristik titreşim bantları.	72
Çizelge 4.2.	CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin manyetizma değerleri.	77
Çizelge 4.3.	CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin camsı geçiş (T_g), erime (T_m) ve bozunma (T_d) sıcaklıkları.	79
Çizelge 4.4.	CBF3GA/m-PHEMA nanoküreler için Langmuir ve Freundlich izotermleri.....	90
Çizelge 4.5.	CBF3GA/m-PHEMA nanoküreler için birinci ve ikinci derece kinetik verileri.	93
Çizelge 4.6.	İnsan plazmasından HSA adsorpsiyonu.	93
Çizelge 4.7.	Sulu çözeltiden HSA adsorpsiyonu ile sağlıklı vericiden alınan insan plazmasından HSA adsorpsiyonu oranlarının karşılaştırılması.	93
Çizelge 4.8.	Literatür karşılaştırması.....	98
Çizelge 5.1.	“Boya Takılı Manyetik Poli(hidroksietil-metakrilat) Nanoküreler İle Kandan Albümin Azaltılması” için genel sonuçlar.....	104

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Å	Angstrom
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
AMP	Adenozin-mono-fosfat
APS	Amonyum Per Sülfat
3B	Üç Boyutlu
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Gözenek Boyutu Dağılımı
°C	Santigrat Derece
CBF3GA	Cibacron Blue F3GA
Da	Dalton
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
2D-PAGE	İki Boyutlu Poliakrilamid Jel
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DTA	Diferansiyel Termal Analiz
DTG	Türevsel Termogravimetri
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
eq	Denge
ESR	Elektron Spin Rezonans
Fe	Demir
FRET	Floresan Rezonans Enerji Transferi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrometresi
g	Gram
G	Gauss
GFP	Yeşil Floresan Proteini
GTP	Guanozin Tri Fosfat
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
HSA	İnsan Serum Albümini
Hz	Hertz
ICI	İmperiyal Kimyasal Endüstriler
IgG	Immunoglobulin G

LC-MS	Sıvı Kromatografisi -Kütle Spektrometresi
m ²	Metrekare
Mag	Manyetik
Maks	Maksimum
mg	Miligram
ml	Mililitre
mmol	Milimol
m-PHEMA	Manyetik poli(hidroksietil-metakrilat)
NaCl	Sodyum Klorür
NaN ₃	Sodyum Azit
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
P	Basınç
PDI	Polidispersite İndeksi
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PHEMA	Poli(hidroksietil-metakrilat)
PS	Poli(stiren)
PVA	Poli(vinil alkol)
Q	Miktar
rpm	Devir/dakika
s	Saniye
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
t	Zaman
T	Geçirgenlik
Td	Bozunma Sıcaklığı
Temp	Sıcaklık
Tg	Camsı Geçiş Sıcaklığı
TGA	Termogravimetrik Analiz
Tm	Erime Sıcaklığı
VSM	Titreşimli Örnek Manyetometresi

1. GİRİŞ VE ARAŞTIRMANIN AMACI

Proteom, bir organizma ya da dokunun genomu tarafından ifade edilen proteinlere verilen addır. Proteomik olarak tanımlanan protein analizi, proteinlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesini ve işlevlerinin aydınlatılmasını kapsar. Proteom çalışmalarında en çok çalışılan biyolojik sıvı, kan plazması ve serumdur. Kan plazması, insan vücudunda yer alan ana protein kategorilerinin büyük çoğunluğunu içermesi nedeniyle hastalıklara özgü proteinlerin belirlenmesi için ideal bir kaynaktır. İnsan plazmasında tahmini 10^6 'dan daha fazla sayıda farklı protein moleküllerinin varlığı bilinmektedir. Bu proteinler arasında en bol bulunanlardan 30 tanesi de toplam protein kütlesinin yaklaşık % 99'unu oluşturmaktadır (Anderson, 2002, 2005). İki-boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) ya da LC-MS/MS gibi geleneksel proteomik yöntemlerin; yüksek derişimlerdeki proteinlerin maskelemelerinden ve MS elektrospreydeki iyon baskılamalarından kaynaklanan, az bulunan proteinlerin saptanmasındaki kayda değer sınırlandırmalara engel olamadıkları bilinmektedir. Oysa esas biyoişaretçiler plazma ya da serumda ng/ml oranında yer tutan düşük bulunurluk oranına sahip proteinlerdir. Albümin ve immunoglobulinler ise plazma proteinlerinin % 80'ini oluştururlar ve az miktardaki diğer proteinleri maskelerler. Dolayısıyla bu proteinlerin ortamdaki uzaklaştırılması sayıca daha az olan hastalık işaretçi proteinlerinin belirlenmesini kolaylaştıracaktır.

Nanoküreler yüksek yüzey alanı/hacim oranları nedeniyle biyomoleküllerin adsorpsiyonunda özellikle tercih edilirler. Sunulan bu çalışmada ise, ortalama 98.9 nm boyutunda ve polidispersitesi (PDI) 0.156 olan nanoküreler Fe_3O_4 varlığında mikroemülsiyon polimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiştir.

Metal oksit nanokürelerinin kullanılması; ilgili literatürde de vurgulandığı gibi; yüzey graftlamasıyla fonksiyonelliği artırmaktadır. Literatürde maghemit ($\gamma-Fe_2O_3$) varlığında PHEMA'nın renkli hibrit kaplama çalışmasıyla yapıya kuvvetli bir sağlama katmasının; polimer zincirleri ve nanokürelerin yüzey hidroksil grupları arasında kuvvetli etkileşim oluşturan partiküllerin homojen dağılımından kaynaklandığı ispatlanmıştır. Bu çalışmada hidrojen bağlarına ek olarak, yüzey demir katyonu ve polimer arasındaki iç koordinasyon komplekslerinin,

nanokürelerin yüzeyine graft edilen PHEMA zincirlerindeki ester fonksiyonel gruplarının karboksilat gruplarına hidrolizi sonucu ortaya çıktığı belirtilmiştir (Jolivet ve ark., 2010).

Temel hedefi “İnsan serum albüminini plazmadan etkin bir şekilde ayırabilmek için nanobiyoteknolojik bir yaklaşım geliştirmek” olarak sunulan bu araştırmada; sentezlenen manyetik PHEMA nanokürelerin yüzey alanı $1302 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak ölçülmüştür. Protein adsorplayıcı ligand Cibacron Blue F3GA tekstil boyasının kovalent olarak m-PHEMA nanokürelerin yüzeyine bağlanmıştır. m-PHEMA nanokürelerin yüzey morfolojileri ve kimyasal özellikleri boyut dağılımı (PDI); Zeta Sizer, Zeta Potansiyeli, AFM, SEM, elemental analiz, FTIR, DSC, TGA, DTG, DTA, ESR ve VSM ile karakterize edilmiştir. Cibacron Blue F3GA bağlanmış m-PHEMA (CBF3GA/m-PHEMA) nanokürelerle insan serum albümini adsorpsiyon-desorpsiyon davranışı izlenmiştir. Sulu çözeltilerden albümin adsorpsiyonuna etki eden faktörler incelenerek optimum koşullar belirlenmiştir. Son aşamasında ise; insan plazmasından seçici albümin azaltılması çalışılmıştır.

2. TEMEL BİLGİLER

2.1. Proteomiks

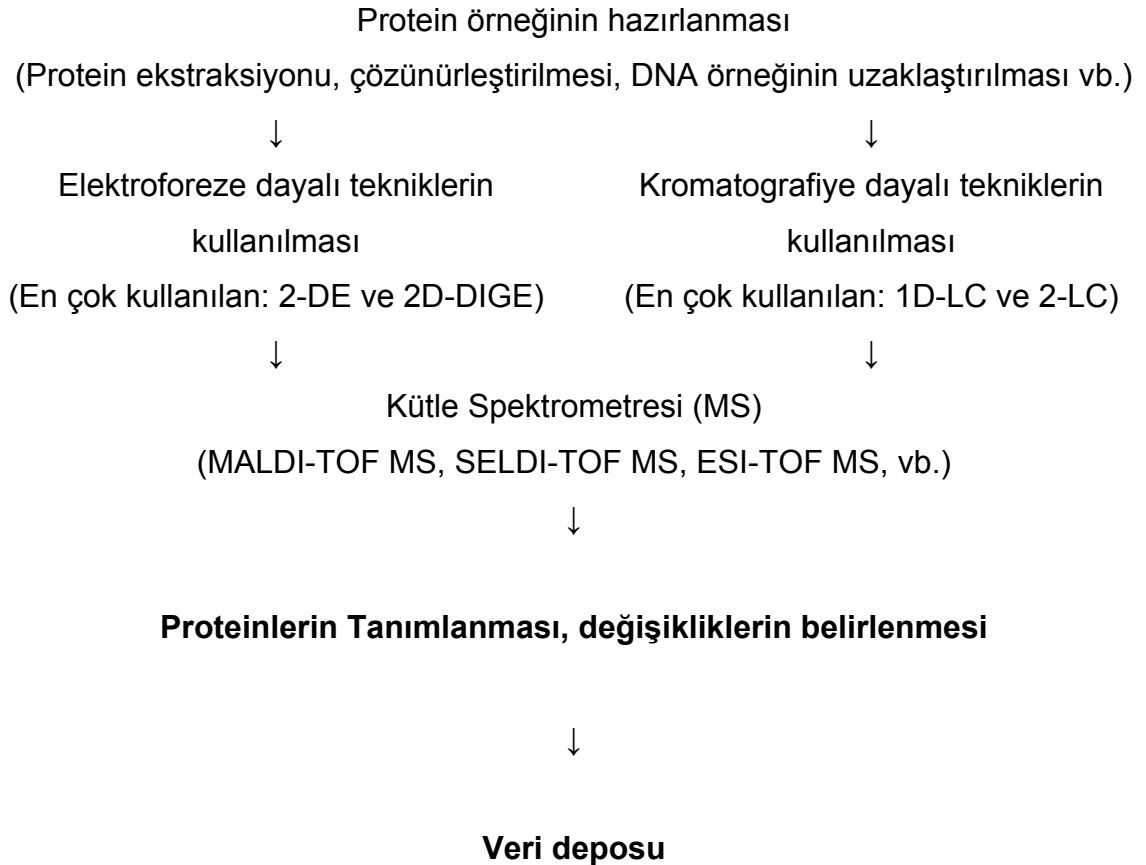
Genom; DNA'nın taşıdığı genetik bilgiyi ifade eder. Bu bilginin ortaya çıkarılması ile ilgili tüm çalışmalar ise genomik olarak adlandırılmaktadır. Genomik çalışmalarda hastalık ya da fizyolojik süreçlerle ilgili genler tanımlanmaya çalışılır (Denizli, 2007).

Fakat genomik çalışmalar, organizmanın tanımlanan bu genleri hangi oranda kullandığı hakkında bilgi vermez. Ayrıca, bir gen, birçok biyolojik işleve sahip farklı proteinler kodlamakta ve bu proteinler sentez sonrası değişimlere uğramaktadır. Çoğu durumda, sentez sonrası değişimler de gen işlevinden bağımsızdır. Bu nedenlerden dolayı, çok fazla miktarda bilimsel veri olmasına karşın genomik çalışmalara dayanan teşhis yaklaşımları klinik kullanım için yeterli değildir (Arthur, 2003). Gen ürünü mRNA'ların ifade düzeyleriyle bu mRNA'lardan kodlanan proteinlerin miktarları arasında da zayıf bir doğrusal ilişki olduğu gösterilmiştir (Anderson ve ark., 1997). Gen ürünlerinin sentez sonrası değişimleri, hücrede buldukları yerler ve göreceli miktarlarının anlaşılması için genomik sonrası bilgilere ihtiyaç vardır. Bu noktada proteom ve proteomik teknolojisi karşımıza çıkmaktadır.

Proteom kelimesi ilk kez 1994 yılında, Marc Wilkins tarafından önerilmiş ve kabul görmüştür. Proteom genom tarafından kodlanan proteinleri tanımlar. Bir hücrenin, organın veya organizmanın belirli bir zaman ve mekânda sahip olduğu (izoformlar, polimorfizimler ve sentez sonrası değişimler de dahil olmak üzere) tüm proteinlerin bir toplamıdır. Bir organizma vücudunun farklı bölgelerinde, hücre döngüsünün farklı evrelerinde ve farklı çevre koşullarında farklı protein ekspresyonlarına sahiptir (Arthur, 2003). Sabit bir yapı olan ve bir organizma için çok iyi tanımlanabilen genomun aksine, proteom, hücreden hücreye farklılık gösterir ve iç ve dış uyaranlara yanıt olarak biyokimyasal etkileşimler aracılığı ile sürekli bir değişim halindedir (Denizli, 2007).

Proteomik ise belli şartlar altında belli bir dokuda genom tarafından sentezlenen tüm proteinlerin analiz edilmesi, yani proteomun tanımlanması işlemidir. Proteomik, spesifik hastalıklar, toksik ajanlar veya enfeksiyonlar gibi pek çok dış faktör uyarısı sonucu oluşan proteinlerin seviyeleri ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi, işlevlerinin aydınlatılması ve etkileşimleri üzerinde çalışan ve multidisipliner, teknoloji gerektiren bir bilimdir. Hücrelerin fonksiyonları genler ve mRNA'lardan ziyade direk olarak proteinler ile düzenlenir (Arthur, 2003). Proteinlerin fonksiyonlarında ise hücredeki lokalizasyonları, fizyolojik uyaran sonucu lokalizasyonlarında meydana gelen değişiklikler ve posttranslasyonel modifikasyonları önemlidir. Bu da ancak proteomik çalışmaları ile belirlenebilir (Graham ve ark., 2005).

2.1.1. Proteomik Teknolojisi



Şekil 2.1. Proteomiksin genel çalışma akışının şeması.

Proteomik teknolojisi, önce örnekteki proteinlerin ayırımı ve sonra bu proteinlerin tanımlanması prensibine dayanmaktadır. İlk aşamada örnekte bulunan proteinler yukarıda belirtilen ayırma yöntemlerine tatbik edilebilir hale getirilir. Sonra proteinlerin bu ayırma yöntemlerine tatbik edilmesinden elde edilen veriler gerekli yazılımlar kullanılarak değerlendirilir ve proteinler belirlenir. Son aşamada ise kütle spektrometresi (MS) yöntemi ile bu proteinlerin kütleleri saptanır ve kesin ve doğru olarak proteinlerin tek tek tanımlanması sağlanır (Graham ve ark., 2005).

2.1.1.1. Örnek Hazırlığı

Hücre ve doku örnekleri; farklı tekniklerle parçalandıktan sonra proteinleri çözünür hale getirilir. Membran proteinlerinin veya diğer hidrofobik proteinlerin hazırlanmasında farklı deterjanlar ve indirgeme ajanlarının kullanılması gerekmektedir. Ayrıca nükleik asitlerin örnek preparatlarında bulunması, izoelektrik odaklama (IEF) elektroforezinde proteinlerin ayrılmasında problemlere neden olabileceğinden ortamdaki uzaklaştırılmaları önerilmektedir. Bunun için nükleik asitler ya taşıyıcı amfolitlere bağlandıktan sonra ultra santrifüj yolu ile veya endonükleazlarla enzimatik olarak parçalandıktan sonra uzaklaştırılır (Chen ve ark., 2008).

Serum, diğer vücut sıvıları, hücre ve doku ekstraktlarından proteinlerin hazırlanması için analizlenecek örneğe ve hedefe göre örnek hazırlığı yapılması iyi bir ayırma ve doğru bir protein tanımlaması için gereklidir (Guo ve ark., 2007). Vücutta yer alan proteinlerin pek çoğu serumda bulunduğu için, serum çok sayıda protein içerir.

Bu yüzden hastalıklara özgü proteinlerin belirlenmesi için serum iyi bir kaynaktır. Fakat albümin ve immunoglobulinler serumda bulunan proteinlerinin yaklaşık % 80-90'ını oluşturduğundan serumda az miktarda bulunan diğer proteinlerin sağlıklı bir biçimde belirlenebilmesi için önce bu proteinlerin uzaklaştırılması gerekmektedir (Denizli, 2007).

2.1.1.2. Örnek Hazırlığında En Çok Kullanılan Sıvı; Kan

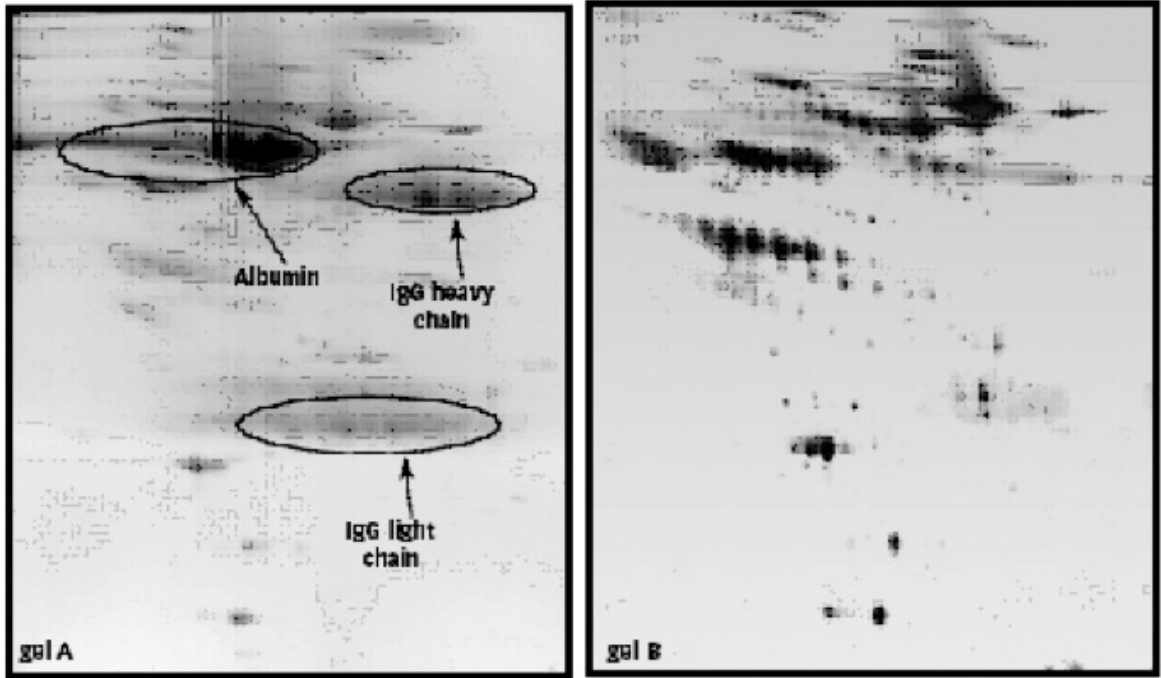
En çok çalışılan biyolojik sıvı, kan plazması ve serumdur. Kan santrifüjlendikten sonra üstte kalan sarı renkli kısım plazma olarak adlandırılır ve kanın % 55'lik kısmını oluşturur. Plazma pıhtılaşma proteinlerini de içerir ve bu proteinlerin ayrılmasından sonra geriye kalan kısım serumdur (Denizli, 2007).

Hastalık teşhisinde de kullanılan temel malzemedir kan. Mililitrede 60-80 mg protein, yani yüksek derişimde protein içerir. Kanın farklı organlar ve dokularla temasta bazı proteinlerinin ayrılmasına ve var olan proteinlerin değişimine yol açar. Bu proteinlerin belirli bir fizyolojik durum ya da hastalık durumunda değişime uğraması olasıdır. İnsan plazma proteinleri üzerine yapılan son değerlendirmeler, vücutta yer alan ana protein kategorilerinin büyük çoğunluğunun kan plazmasında yer aldığını da göstermiştir. Yani çok sayıda protein içermesi nedeniyle plazma, hastalıklara özgü proteinlerin belirlenmesi için ideal bir kaynaktır. Ancak plazma proteomu, yapısında yer alan proteinlerin geniş derişim aralığı (10^{10}) nedeniyle oldukça karmaşıktır da. Örneğin kanda albümin derişimi 30-50 mg/ml gibi yüksek bir değerdedir. Hastalıklara özgü proteinler; örneğin sitokinler ve prostat spesifik antijen (PSA) ise pg/ml (yani mililitrede bir pikogram; ki, bu da gramın trilyonda biri demektir) düzeyindedir. Tüm plazma proteinlerinin % 90'ını 10 protein, % 9'unu ise 12 protein oluşturur ve hastalıklara özgü proteinler geriye kalan % 1'lik kısımda yer alır (Denizli, 2007).

Çizelge 2.1.'deki oranlarda da görüldüğü gibi; albümin ve immuno-globulinler plazma proteinlerinin % 80'ini oluştururlar ve az miktardaki diğer proteinleri maskelerler. Örneğin, iki boyutlu jel elektroforezinden önce bu proteinler uzaklaştırılmazsa, jelde hastalıklara özgü proteinlere ait noktaları tespit etmek neredeyse olanaksızdır. Dolayısıyla bu proteinlerin uzaklaştırılması, Şekil 2.2.'den de anlaşılacağı gibi proteom analizinde büyük önem taşır (Denizli, 2007).

Çizelge 2.1. Kan plazmasındaki proteinlerin bulunurluk oranları (Denizli, 2007).

Plazma Proteinleri	%
Albümin	54.0
IgG	17.0
Apolipoproteinler	4.0
α 1-Antitripsin	3.8
α 2-Makroglobulin	3.6
IgA	3.5
Transferrin	3.3
Haptoglobulin	3.0
IgM	2.0
α 1-Asit Glikoprotein	1.3
Diğer	4.5



Şekil 2.2. Albümin ve IgG uzaklaştırılmadan önce ve sonra (Denizli, 2007).

2.1.1.3. Kandan Protein Uzaklaştırılması ile ilgili Literatür

Son yıllarda plazma protein içeriğinin belirlenmesinde albümin ve immunoglobulinlerin uzaklaştırılması için birçok ticari ürün geliştirilmiştir. Bu ürünlerin birçoğunda kullanılan temel yaklaşım; albümine çekilmeye yüksek yatkınlık gösteren bir tekstil boyası olan “Cibacron blue”, immunoglobulinler için ise “Protein A/G” kullanmaktır.

Literatürde az bulunan proteinlerin tayini için yapılmış en son çalışmalar arasında; HPLC-Çip LC/MS/MS çok-boyutlu ayırma yaklaşımı ile maskeleyici 14 protein çeşidinin insan serumu ve plazmasından ayrıştırılması (Zolotarjova ve ark., 2008), afinite ve psödo-afinite kromatografisi kullanılarak seçimli HSA ve IgG ayrıştırması için optimum koşulların saptanması (Urbas ve ark., 2009), reçine bazlı immunoafinite yaklaşımlarından farklı bir yöntem olan indirgeyici-ajan aracılığı ile albümin ve transferrin gibi disülfidçe zengin yüksek derişimli proteinlerin serum ve plazmadan çöktürülmesi (Warder ve ark., 2009) ve proteomik analiz için hidrofobik etkileşim kromatografisi ile plazmadan α -1-antitripsin ve albümin uzaklaştırılması (Mahn ve ark., 2010) öne çıkmaktadır.

2.1.2. Protein Ayırma Metodları

Çok çeşitli protein ayırma metodları bulunmaktadır. En çok kullanılan yöntemler ise; iki boyutlu jel elektroforezi (2-DE), iki boyutlu diferansiyel jel elektroforezi (2D-DIGE) ve tek ve iki boyutlu sıvı kromatografisi (1D-LC ve 2D-LC) olarak karşımıza çıkar (Kurban ve ark., 2010).

2.1.2.1. İki Boyutlu Elektroforez

Elektroforez; proteinlerin elektriksel bir alan içerisinde büyüklüklerine, molekül ağırlıklarına, şekillerine, yüklerine bağlı olarak elektrik akımının tesiri ile hareket etmeleri esasına dayanır. Proteomik analizi ve protein ayrıştırmasında ise 2-DE metodunun gelişmesi bir dönüm noktası olmuştur. 2-DE, kompleks protein karışımlarının ayrılmasında kullanılan en önemli tekniklerden birisidir. 2-DE’de iki ayırma tekniği kullanılarak binlerce proteinin tek adımda ayrılması sağlanır. Birinci

yönde IEF elektroforezi ile pH gradientinde yük bağımlı ayırma ve ikinci yönde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül ağırlığına bağımlı ayırma metodları uygulanır. Her bir teknik kendi başına 100 proteini ayırma kapasitesine sahipken, birleştiklerinde 1000–3000 polipeptidi ayırabilirler. Ayrıca, uygun bir boyama ile örnekteki 1 ng kadar küçük proteinler saptanabilmektedir (Guo ve ark., 2007).

Jellerin Değerlendirilmesi

Proteinlerin doğru olarak belirlenebilmesi için iki boyutlu elektroforez jellerinin görüntü analizinde çok fazla sayıda protein jelinin karşılaştırılması gerekmektedir. Fakat jellerin görüntüsü tam olarak örtüşmediğinden jeller arasındaki farklılıklar görüntü karşılaştırmasının değerlendirilmesini güçleştirmektedir. Ayrıca, bir jelde çok fazla sayıda protein bulunduğundan protein belirlenmesinin doğru olarak yapılabilmesi için gelişmiş bilgisayar programlarına ihtiyaç duyulur.

İki boyutlu elektroforez jellerinden proteinlerin tanımlanması ile elde edilen büyük miktardaki veri protein 2-DE veri tabanlarında depolanmaktadır. Aynı proteinler jelde aynı pozisyona sahip olduğundan, iki yönlü elektroforez jellerinin görüntüleri veri tabanlarında karakterize edilmiş görüntüler ile karşılaştırılarak proteinler tanımlanır (Graham ve ark., 2005).

2-DE teknolojisi protein ayırımında standart olmakla birlikte proteinlerin kütle ve çözünürlüğü ile sınırlıdır. 2D-DIGE ise 2-DE teknolojisinden geliştirilmiş ve kısa süre önce kullanılmaya başlanmış bir teknolojidir. 2D-DIGE metodunda jel elektroforezinden önce değişik hastalık veya çalışmalara ait proteinler farklı iki floresan boyası ile işaretlenir. Farklı kütle ve dalgaboyuna sahip boyalar ile işaretli bu proteinler daha sonra 2-DE yapılarak elde edilen jelin farklı dalga boylarında taranarak kontroller ile karşılaştırılması ile tanımlanır (Eggeling ve ark., 2001).

2.1.2.2. Tek ve İki Boyutlu Sıvı Kromatografisi

Kromatografi, herhangi bir karışımdaki maddelerin biri hareketli ve diğeri sabit olan iki faz yardımıyla birbirinden ayrılması işlemidir. Bileşenlerine ayrılacak karışım, sabit fazın başlangıç bölgesine konur ve hareketli fazın ileriye doğru ilerletilmesi

sırasında çözdüğü karışımdaki maddeleri de sabit faz üzerinde değişik hızlarda iletir. Bileşenler, fizikokimyasal özelliklerine göre sabit fazın farklı bölgelerinde tutularak birbirlerinden ayrılırlar. Kromatografinin dayandığı fizikokimyasal olaya göre veya sabit ve hareketli fazların yapılarına göre çeşitli kromatografi teknikleri vardır.

1D-LC proteinleri izoelektrik noktaları, kütleleri veya hidrofobikliklerine göre ayırır. En çok kullanılan 1D-LC, proteinleri hidrofobikliklerine göre ayıran ters faz sıvı kromatografisidir. 2D-LC'de proteinler önce izoelektrik noktalarına, ikinci olarak hidrofobikliklerine göre ayrılır. Standart strateji 2D-LC fraksiyonlarında çok fazla sayıda protein olduğundan örnekteki proteinlerin tanımlanması ve örnekler arasındaki farklılıkların belirlenmesi için gelişmiş bilgisayar programlarının kullanımınıdır. Fakat hala 2-DE'de kullanılanlara benzer gelişmiş programların yapılmasına ihtiyaç vardır (Sheng ve ark., 2006).

2.1.2.3. Kütle Spektrometresi (MS)

Proteomikteki gelişmeler ve proteomike dayalı biyoışaretçilerin keşfi MS'deki gelişmelerle yakından ilişkilidir. MS manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışmaktadır. MS ile proteinlerin ve peptidlerin tanımlanması, moleküler kütle ve özellikle posttranslasyonel modifikasyonların belirlenmesi sağlanmaktadır. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan sistemler Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF), Elektro Spray Ionization Time of Flight (ESI-TOF) ve Surface Enhanced Laser Desorption Ionization (SELDITOF) olarak sıralanabilirler (Hilario ve ark., 2006).

Ayırma yöntemleri ile tanımlanan proteinlerin MS ile doğrulanması gerekmektedir. Proteinlerin MS ile tanımlanması için iki temel yaklaşım vardır: Birinci yaklaşımda örnekteki proteinler enzimatik olarak parçalandıktan sonra proteini oluşturan peptid parçalarının (bir ayırma metodu ile belirlendikten sonra) kütleleri MS ile belirlenir. Daha sonra karışımdaki bireysel peptidlerin ölçülen kütleleri, bir proteinde bulunduğu düşünülen teorikçe türetilmiş peptid kütleleri ile kıyaslanarak protein

tanımlanır. Bu yaklaşım, başlangıçtaki örnekten çok fazla sayıda peptid türediğinden proteomik karmaşıklığını artırmaktadır. İkinci yaklaşımda ise önce protein MS ile belirlenir ve sonra eğer gerekli ise peptidler tanımlanır (Nedelkov ve ark., 2006). Yeni kanser biyoişaretçilerin çoğu ikinci yaklaşımın modifikasyonu ile geliştirilen SELDI-TOF teknolojisi kullanılarak yapılmıştır. MALDI-TOF ise düşük konsantrasyon ve düşük molekül ağırlıklı proteinlerin yüksek özgüllük ve duyarlılıkta ayırımını ve tayinini mümkün kılmaktadır (Kurban ve ark., 2010).

2.1.2.4. Protein Mikroçip Teknolojisi

Protein mikroarray (mikroçip) teknolojisi proteinlerin küçük bir alanda yakalanarak sabitlenmesi ve sonra bu proteinlerin analiz edilmesi prensibine dayanmaktadır. Temel olarak analitik ve fonksiyonel olmak üzere iki tip protein mikroarray vardır: Analitik mikroçipte proteinlere bağlanabilme özelliğine sahip olan spesifik moleküller küçük bir cam yüzey üzerine yerleştirilmiştir. Bu özel cam yüzey seçilirken amaç proteinlerin yüzey üzerinde sabitlenmesi ve maksimum bağlanmanın gerçekleştirilmesidir. Solüsyonundaki proteinler bu moleküllere bağlanır ve yıkamadan sonra belirlenirler. Antikor mikroçip en çok kullanılan analitik mikroçiptir. Bu tip mikroçipler genellikle klinik tanıda, sağlıklı ve hastalıklı dokudaki protein farklılıklarını ve hastalık durumunda proteinlerde meydana gelen değişiklikleri tanımlamak için kullanılmaktadırlar. Fonksiyonel protein mikroçip ise analitik mikroçipten tüm fonksiyonel proteinlerin tanımlanması ile ayrılır. Bu ölçümde protein çipler protein-protein, protein-DNA, protein-RNA ve protein-fosfolipid gibi pek çok protein etkileşimlerini çalışmak için kullanılırlar (Hail ve ark., 2007).

Protein çip üzerindeki reaktif proteinler floresan, fotokimyasal veya radyoizotop yöntemlerle işaretlendikten sonra belirlenirler. En çok floresan işaretleme kullanılmaktadır. Protein mikroçip teknolojisi ile MS'nin birlikte çalıştığı sistemlerde çiplere bağlı proteinler MS ile belirlenmektedir. SELDI-TOF MS dayalı protein mikroarrayler MALDI-TOF MS'nin varyantı olmakla birlikte aynı anda fazla sayıda örneğin ve özellikle küçük molekül ağırlıklı proteinlerin analizini sağlamaları açısından avantajlıdırlar (Guo ve ark., 2007).

2.1.2.5. Proteomik Teknolojisinin Sınırlılıkları

Günümüzde kullanılan protein ekstraksiyon protokolleri tüm biyolojik örneklerin hepsine uygulanamamaktadır. Hidrofobik proteinler kolaylıkla ekstrakte edilemez ve iki yönlü elektroforez jelleri üzerinde gösterilemez. Bir proteomdan beklenen proteinlerin çoğunun hidrofobik olması ise bu sorunun artmasına sebep olmaktadır. Ayrıca, ekstrakte edilmiş olan proteomdaki proteinlerin gösterilebilmesi anlamında da sınırlılıkları vardır. Proteomik analizi için kullanılan küçük hacimlerde (~10–300 µl) bulunan proteinler tanımlanabilmeleri için yeterli miktarda olmayabilir veya düşük konsantrasyondaki bu proteinler total proteinlerin analizi süresince belirlenmeyebilirler (Guo ve ark., 2007).

2.1.3. Tıpta Proteomik

Proteomik fenotip belirlemenin en doğru ve güvenilir yolu olarak ortaya çıkmıştır. Tıpta, hastalıkların tanı ve takibinde, terapötik uygulamaların etkilerinin izlenmesi ve patojenik mikroorganizmalara karşı etkin ilaç ve aşı geliştirmede kullanılacak hastalığa özgün proteinlerin yani yeni belirleyicilerin belirlenmesi gibi çok önemli uygulamalara sahiptir. Örnek içerisinde az miktarda bulunan ama belirleyici olabilecek proteinlerin ayrımı için çok hassas bir çalışma ve iyi bir gözlem gerekmektedir. Bu proteinlerin tanımlanması, hastalığın gelişimi ile ilgisi ve bu verilerin bilgi bankalarında toplanarak değerlendirilmesi ile normal biyolojik süreçlerin ve hastalıkların altında yatan mekanizmaların tanımlanması amaçlanmaktadır. Normal-hastalık veya yaşlı-genç vb. iki farklı durum arasındaki ekspresyon farklılıklarının tanımlanması başlıca onkolojide olmak üzere nöroloji, kardiyoloji, nefroloji ve enfeksiyon hastalıkları gibi pek çok dalda tanı ve tedavide önemli gelişmeler sağlamaktadır (Han ve ark., 2008).

2.1.3.1. Erken Kanser Tanısında Proteomik

Proteomik teknolojisini kullanarak kanser tanısı için yeni biyobelirleyicilerin tanımlanması ve bu biyobelirleyici moleküllerin analizi ile erken kanser tanısında önemli adımlar atılmıştır (Nedelkov ve ark., 2006).

Günümüzde tek biyobelirleyici analizleri ile yapılan kanser tanısının özgüllük ve hassasiyeti yeterli değildir. Proteomik teknolojisi kullanılarak tek biyobelirleyici analizinde karşılaşılan bu problem çoklu biyobelirleyici analizi ile ortadan kaldırılmakta, yüksek özgüllük ve duyarlılıkta erken dönemde kanser tanısı mümkün olmaktadır. Çünkü proteomik teknolojisi ile birden fazla biyobelirleyici molekülün ekspresyon değişimleri oldukça yüksek bir özgüllük ve duyarlılıkla değerlendirilebilmektedir. Bu amaçla kanser ve normal doku proteinleri karşılaştırılarak farklı olan proteinler belirlendikten sonra bu proteinlerden belirleyici olarak prediktif değeri en iyi olanları bulunur ve saflaştırması yapılır (Kuramitsu ve ark., 2006).

2.1.4. Toplumsal Proteomik

Toplumsal proteomik toplumun kendi içinde ve toplumlar arasında insan proteinlerinin belirlenmesi, farklılıklarının tanımlanması ve hastalığa spesifik proteinlerin keşfi için yapılan geniş ölçekli çalışmaların tümünü kapsar. Standart immünolojik tayini ile yüzlerce proteinin derişimi belirlenebilmekle beraber yapısal değişimleri ve sağlıklı ve hasta grubunda dağılımı ile ilgili çok az bilgi sağlanır. Toplumsal proteomik amacını ilk olarak proteinlerin genel popülasyondaki frekansını ve yapısal farklılıklarını belirlemek ve sonra bu farklılıklarla spesifik hastalıklar arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır (Nedelkov ve ark., 2008).

Bu konudaki ilk çalışma 96 sağlıklı erişkinin plazmasında orta veya fazla miktarda bulunan 25 plazma proteininin araştırıldığı çalışmadır (Nedelkov ve ark., 2005).

İnsan proteomunun karmaşıklığından dolayı henüz toplumsal proteomik alanında yeterli ilerleme sağlanamamıştır ve bu konuda yapılacak geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak hastalıklar, toksik ajanlar veya enfeksiyonlar gibi faktörler sonucu oluşan proteinlerin seviyeleri ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi ve işlevlerinin aydınlatılmasını amaçlayan proteomik çalışmalarında başarıya ulaşıldığı takdirde, özellikle erken kanser tanısı olmak üzere pek çok hastalığın tanı ve tam hedefe yönelik tedavisi sağlanabilecektir. Proteomik teknolojisi özellikle kanser tanısı için

doğru ve güvenilir belirleyicilerin belirlenmesinde önemli avantajlar sağlamakla birlikte günümüzde yaygın olarak araştırma laboratuvarlarında kullanılmasına rağmen henüz klinik laboratuvarlarda yaygın kullanılır hale gelmemiştir. Proteomik teknolojisinin yaygın olarak kullanılmasında metotların standardizasyonu ve ölçüm sistemlerindeki teknolojik ilerlemeler önemli rol oynayacak ve proteomik teknolojileri ve biyobelirleyiciler klinik laboratuvarlarda yakın zamanda yerini alacaktır. Toplumsal proteomik çalışmaları ile toplumların protein haritalarının çıkarılması ve böylece proteinlerin genel popülasyondaki dağılımı yapısal farklılıkların belirlenmesi ve sonra bu farklılıklarla spesifik hastalıklar arasındaki ilişkinin ortaya konması planlanmaktadır (Kurban ve ark., 2010).

2.2. Nanoteknoloji

Nanobiyosistemlerin bilim ve mühendisliği, nanoteknolojinin en hızlı gelişen sektörlerinden biridir. Tek atom ve molekülleri incelemek için yeni teknikler geliştirilirken nanometre boyutlarındaki atomik ve moleküler düzenin maddenin özellikleri ile nasıl bağdaştığının keşfine yarayan cihazlar da bulunmuştur. Bu buluşlar, yaygın uygulama alanı bulan birçok malzeme ve gerecin elde edilme yöntemini tamamen değiştirmişlerdir. Nano ölçekte maddelerin ve yapıların kontrolü, mühendislik yaklaşımları ile mümkün olur. Nanobilim ve nanoteknolojinin, biyoloji ve tıp araştırmalarını da tamamen değiştireceğine bilim dünyasının önemli bir bölümü inanmaktadır (Vogel ve ark., 2003).

Nanoteknolojinin Amaçları

- Nanometre lekli yapıların analizi,
- Nanometre boyutunda yapıların fiziksel özelliklerinin anlaşılması,
- Alışılandan farklı ve üstün malzeme özellikleri/üretim süreçlerinin elde edilmesi,
- Daha dayanıklı, daha hafif, daha hızlı yapılar,
- Daha az malzeme ve enerji kullanımıdır.

Nanoteknolojinin Avantajları

- Sağlam
- Kaliteli

- Uzun ömürlü
- Ucuz
- Hafif
- Küçük cihazlar
- Fonksiyon
- Kullanımda kolaylık.

2.2.1. Nanoölçek Nedir?

1–500 nanometre büyüklük aralığına nano ölçek denir (Biggs, 2003).



Şekil 2.3. Nanoskobik ebatların gösterimleri (Karakuş, 2006).

Nano, kelime anlamı ile herhangi bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri demektir. Nano yapılar uzunluk olarak bakıldığında yaklaşık 10–100 atımluk sistemlere (10^{-9} metre) karşılık gelmektedirler. Nano ölçek seviyesinde malzemelerin özellikleri makroskopik ölçekten tamamen farklı olup nano ölçeğe yaklaştıkça birçok özel ve yararlı olay ve yeni özellikler ortaya çıkmaktadır. Örneğin, iletim özellikleri (momentum, enerji ve kütle) artık sürekli olarak değil ancak kesikli olarak tanımlanmaktadır. Benzer olarak, optik, elektronik, manyetik ve kimyasal davranışlar klasik değil kuantum olarak tanımlanmaktadır (TÜBİTAK, Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri, 2004).

2.2.2. Nanoteknolojide Yeni Gelişmeler

Biyologlar tarafından geliştirilen optik mikroskopi, canlı hücreler ve organizmalardaki dinamik olayların düzenlenmesini ve anlaşılmasını sağlayan bir tekniktir. In vivo koşullarda organ ve organ fonksiyonlarının izlenmesi, manyetik rezonans izlenimi (NMI), Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) ve ultrases ile mümkündür ama bu teknolojilerin hiçbiri doğru nanometre uzaysal çözünürlüğe sahip değildir. PET ve NMI moleküler seçicilik sağlar. Teknolojilerin izlenimindeki en büyük aralık, çok büyük biyolojik supramoleküllerin incelenmesi veya ayırma teknikleri veya nükleer manyetik rezonans (NMR) ile bozulmalarıdır. Günümüzde optik mikroskopi için bunlar çok küçüktür. Örnek olarak, transkripsiyon faktör kompleksleri, bağlanan kompleksler, ribozomlar, plazma membranları, ekzo ve endo sistemler içeren protein ve membranca zengin kompleksler, multienzim işlemleri verilebilir. PET ve NMI seçilen bileşenlerin izolasyonu ve derişimlerinin belirlenmesi ve sistemde reaksiyon oranlarının bulunmasını sağlayabilir (Vogel ve ark., 2003).

Pek çok yeni teknoloji, nanoteknoloji ve hücre biyolojisi arasındaki ilişkiyi açıklamaya başlamıştır. Yukarıda da açıklandığı gibi, optik izlenim teknolojisi proteinlerin dağılımını üç boyutlu olarak nanoölçekte ve daha kısa sürede izleyebilmektedir. Canlı hücrelerdeki fiziksel bağlamlar içinde moleküler karışımlar hakkındaki soruların artması, yeni araştırmalar yapılmasını sağlamıştır. Nanoteknolojideki gelişmeler, çeşitli fiziksel büyüklüklerin ölçülüp, tercüme edilmesine yönelik mikronaltı hücresele bölgelere ve hücresele cevaplarına izin vermesiyle başlamıştır. Bu nedenlerden dolayı biyomedikal uygulamalar, mikro/nanoüretim, sentetik nanosistemler ve diğer yaklaşımlar gelişmeye başlamıştır (Vogel ve ark., 2003).

2.2.3. In Vivo Nanoproblar

Nanoproblar, proteinlerin fonksiyonel bölgelerinin değerlendirilmesini ve canlı hücrelerdeki diğer biyomoleküllerdeki yapısal değişmelerin tespitini belirleyen, optik olarak kombine edilmiş problardır. Örneğin tekli-Yeşil Floresan Protein (GFP)-esaslı indikatörler pH'a cevap vermek için, serbest Ca^{2+} veya redoks

potansiyelleri, molekül içi Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET)-esaslı indikatörler hücre içi Ca^{2+} , siklik Guanozin Tri Fosfat (GTP), **GTPaz** ve kinaz aktivitesini biyomoleküllerdeki güçler kadar iyi yönetebilmek için geliştirilmiştir. Protein-protein ilişkileri, Adenozin Mono Fosfat (AMP) dinamikleri, membran bölgelerinin demetleri de aynı zamanda molekül içi FRET-esaslı problemler ile araştırılmaktadır. Elektrokimyasal süreçler, membran geçiş gerilimleri, iyon akımı ve diğer hücresel süreçler de bu problemlerle araştırılabilir (Vogel ve ark., 2003).

2.2.4. Nanosistemler

Nanosistemler, biyolojik hücrelerdeki pek çok farklı özelliklerin belirlenmesi için geliştirilmişlerdir. Örneğin, genetik olarak kodlanmış nanoküreler, iç veya dış reseptörlerin spesifik olarak belirlenmesine yardımcı olur. Eğer bunlar floresans özelliğe veya yüksek elektron yoğunluğuna sahip olurlarsa, bu reseptörlerin optik izlenim ve elektron mikroskopu ile yüksek uzaysal çözünürlükte tespitleri de mümkün olur. Nanokürelerin başka bir tipi ise, moleküler grupların hücre sinyallerini ve metabolik yolları nasıl kontrol ettiğini açıklayabilen çok yönlü ligandların kimyasal sentezidir. Bu biyomimetrik malzemeler pek çok yönden uygundur. İlk olarak, biyomimetrik organellerdeki protein fonksiyonlarının test edilmesinde kullanılabilir. İkinci olarak ise, hücre organelleri ve bölgeleri arasındaki ilişkiyi açıklamak için koşulların belirlenmesinde kullanılabilir (Vogel ve ark., 2003). Hücre fonksiyonlarının nanoteknoloji esaslı in vivo analizi, hücre düzenlenmesinde özellikle kornea/tendonlardaki kollajen belirlenmesi ve membran organizasyonu gibi alanlarda faydalıdır. Örnek olarak, endoplazmik retikulum membranlarının kristal yapıda kendiliğinden organizasyonu verilebilir. Bu süreç, kararlı bir yapı için, düşük afinite ilişkilerine gereksinim duyar (Vogel ve ark., 2003).

2.2.5. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları

Nanoteknolojinin gelişmekte olan pek çok potansiyel uygulama alanı mevcuttur. Bunlar arasında; küçük, hızlı, akıllı ve çoklu analiz yapabilen sensörler; küçük, yüksek yoğunluklu ve hızlı özelliklere sahip elektronikler ve optikler; daha iyi kontrol ve daha iyi salınım yapabilen ilaç salım sistemleri; yüksek dayanıklılık, kararlılık ve optik özelliklerinden dolayı kompozit ve film yapımı; elektrik, yüksek

yoğunluk depolaması gibi özelliklerinden dolayı enerji; yumuşak iyileştirme filmleri, oto-lens gibi sistemlerde kullanılabilen akıllı sistemler; istenen ürün üzerinde çalışan nanofabrikalar sayılabilir. Bu potansiyel uygulama alanlarına sahip nanoteknolojinin alt dalları ise; Nanomateryaller, Naoelektronikler, Nanobiyoteknoloji, Nanomakinalar olarak sayılabilir (Biggs, 2003).

2.2.5.1. Nanobiyoteknolojinin Tanımı

Nanobiyoteknolojinin tanımı, çalışmalar sırasında ortaya çıkan bir konunun gelişimi ile bulunmuştur. Nanobiyoteknoloji, nanoteknolojinin tıp ve biyoloji ile birleşiminin başlangıç noktası olarak tanımlanabilir (Vogel ve ark., 2003).

Günümüzde modern biyoteknoloji, tıpta tanı ve tedavi için, tarım, hayvancılık, endüstriyel, gıda vb. birçok dalda genetik türevlendirmeler ile ürün türünü, verimliliğini artırmak ve ekonomik üretim olanağı sağlamak yönünde kullanılmaktadır. Bunların doğru yapılması, risklerinin belirlenmesi ve ortadan kaldırılması için de hem genetik değişimlerin hem de bunların ürünlerinin son derece duyarlı ve hızlı olarak tanınması ve miktarlarının belirlenmesine gereksinim vardır (TÜBİTAK, Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri, 2004).

Biyolojik olayları kontrol eden biyolojik moleküllerin (başta proteinler olmak üzere) varlıklarının, fonksiyonlarının ve aralarındaki ilişkilerin tanımlanması gelişmiş moleküler analiz yöntemleri gerektirir (TÜBİTAK, Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri, 2004).

Bugün yeteri kadar hızlı, çok sayıda örneği aynı anda değerlendiren, çok düşük derişimlerde ölçüm olanağı veren cihazlar yoktur. Biyoçip teknolojisi bu yönde geliştirilen en önemli teknoloji olarak gözüke de, henüz istenilen ölçümleri tanımlanan hızda, nitel/nicel şekilde yapan ve yaygın kullanıma olanak verecek şekilde ekonomik olmaktan çok uzaktır. Gelecekte mutlaka moleküler düzeyde ölçüm yapan, nanoteknolojinin şimdilik çoğu bilinmeyen veya ürüne dönüştürülemeyen avantajlarını kullanan yeni yaklaşımlara gereksinim olacaktır (TÜBİTAK, Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri, 2004).

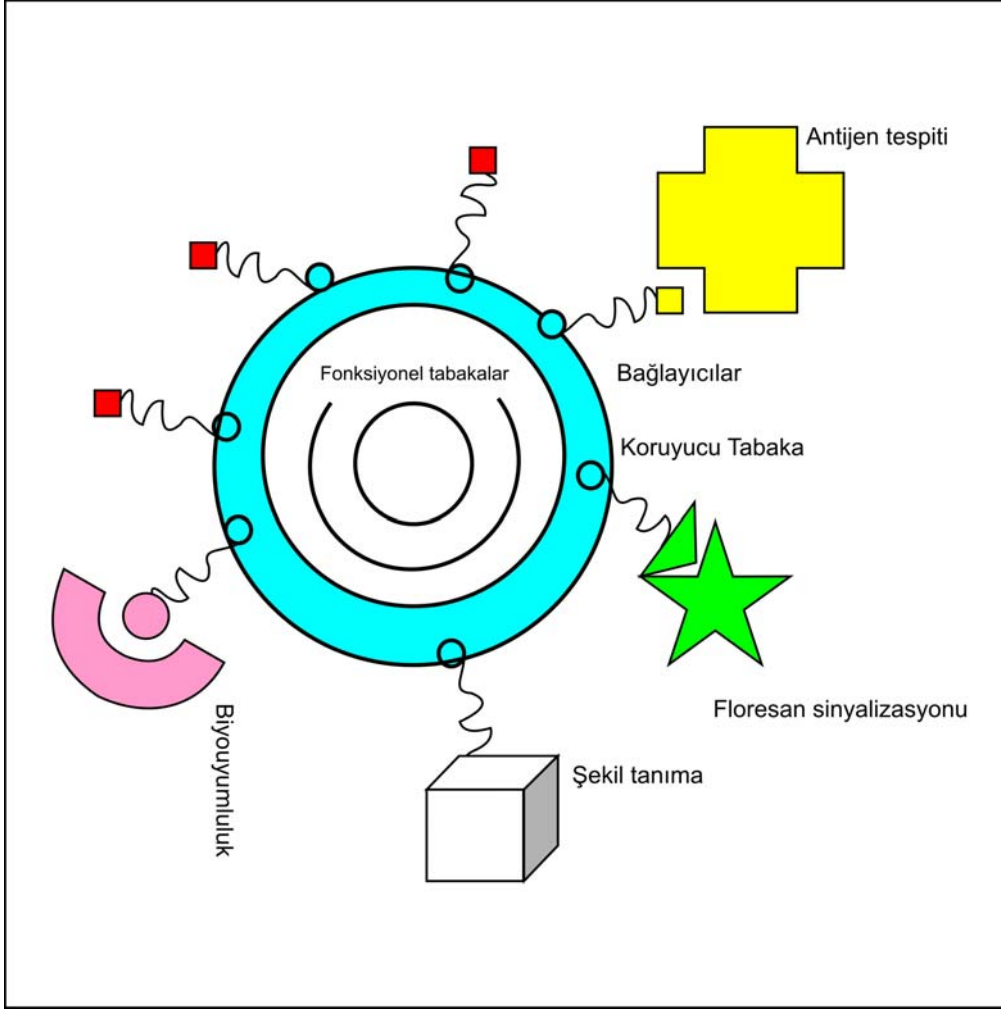
2.2.5.2. Nanobiyoteknolojinin Uygulama Alanları

Nanoteknoloji nanometre boyutlarındaki nesnelere dayalı bir teknolojidir. Nanoteknolojinin malzemeler, aletler ve sistemler gibi pek çok dalda gelişmesi beklenmektedir. Günümüzde nanomalzemeler hem bilimsel alanda hem de ticari uygulamalarda kullanılmaktadır. 10 yıl öncesine kadar, boyuta bağlı kimyasal ve fiziksel özelliklerinden dolayı nanoküreler çalışılmaktaydı. Günümüzde ise, nanoküreler ticari uygulamalarda da kullanılmaya başlanmıştır (Salata, 2004).

Canlı organizmalar yaklaşık 10 µm boyutlara sahip hücrelerden oluşmaktadırlar. Fakat hücre bölümleri daha küçüktür ve mikron altı boyutlardadırlar. Proteinler ise 5 nm boyutlarındaki partiküllerdir, bu sayede sentetik küçük nano yapılar ile karşılaştırılabilirler. Aşağıda, nano yapıların tıp ve biyolojide kullanılan bazı uygulama alanları verilmektedir:

- a) Floresan biyolojik etiketler (Bruchez ve ark., 1998; Wang ve ark., 2002).
- b) İlaç ve gen salınımı (Mah ve ark., 2000; Panatarotto ve ark., 2003).
- c) Patojenlerin biyotanıması (Edelstein ve ark., 2000).
- d) Protein analizi (Nam ve ark., 2003).
- e) DNA yapılarının saptanması (Mahtab ve ark., 1995).
- f) Doku mühendisliği (Ma ve ark., 2003; De la Isla ve ark., 2003).
- g) Isı ile tümör parçalanması (Yoshida ve ark., 1999).
- h) Biyolojik moleküllerin ve hücrelerin saflaştırılması (Molday ve ark., 1982).
- i) Fagokinetik çalışmalar (Parak ve ark., 2002).

Nanoküreler eş boyutlu oldukları için biyoetiketleme uygulamalarına uygundurlar. Fakat boyut nanokürelerin karakteristik özelliklerinden sadece bir tanesidir. Biyolojik etiketleme, biyolojik veya moleküler kaplama, biyoorganik yüzeye sahip tabaka oluşturma nanokürelere bağlı olarak yapılmalıdır. Biyolojik kaplama, antibadileri, kollajen gibi biyopolimerleri, küçük moleküllerin monotabakalarını içermektedir. Sonuç olarak, optik tespit teknikleri gibi nanoküreler ya ışığa yapmalı ya da optik özelliklerini değiştirebilmelidir. Nanobiyomalzemelerin yapımında kullanılan yaklaşımlar Şekil 2.4.'de gösterilmiştir (Salata, 2004).



Şekil 2.4. Tıbbi ve biyolojik problemlerde nanobiomalzemelerden yararlanılan uygulamalar (Salata, 2004).

2.2.5.2.1. Doku Mühendisliği

Doğal kemiğin yüzeyi, yaklaşık 100 nm partiküller içerir. Eğer yapay kemik, dümdüz ise vücut bunu reddeder. Çünkü yüzey, implantın yüzeyini kaplayan lifli doku yapısını oluşturmak zorundadır. Bu tabaka, kemik-implant ilişkisini azaltır ve bu yüzden implant kaybına neden olabilir. Eğer kalça ve diz protezlerinde yüzeyde nano boyut özelliği sağlanırsa reddetme riski, osteoblast oluşumunu uyararak azalır. Osteoblastlar, kemik matriksinin büyümesinden sorumlu hücrelerdir ve gelişmekte olan kemiğin yüzeyinde bulunur. Bu uygulamanın etkinliği, polimerik, seramik ve son zamanlarda metal malzemeler ile kanıtlanmaktadır. İnsan kemik hücrelerinin % 90'dan fazlası nanoyapılı metal malzemeler yapışabilir ama

bunların sadece % 50'si kontrol örneğindedir. Bu sonuçlara dayalı olarak daha dayanıklı ve uzun süre kullanılabilen diz ve kalça protezleri tasarımı yapılabilir (Gutwein ve ark., 2003).

Titanyum, ortopedi ve diş hekimliği alanlarında sıkça kullanılan bir onarım malzemesidir. Çatlamalara karşı yüksek direnç, yumuşaklık gibi özelliklere sahiptir. Fakat hücre yapışmasına ve gelişimine katkıda bulunamaz ve biyoaktivitesini kaybeder. Apatit kaplamalar biyoaktif olarak bilinirler ve kemiğe bağlanabilirler. Bu yüzden, titanyum üzerine apatit kaplama çalışmaları geçmişte çok fazla yapılmıştır (Salata, 2004).

Fakat bu kaplamalar, eşboyutlu bir inceliğe sahip değillerdi. Zayıf yapışma özelliğinde olup mekanik güçleri ise çok düşüktü. Sonuç olarak, hücre gelişimi için kararlı gözenekli bir yapıya ihtiyaç duyulmuştur. Tabaka üzerinde 60 nm boyutlarında kristaller olmalı, kararlı ve nanogözenekli bir yapıda olmalı ve biyoaktif olmalıdır (Ma ve ark., 2003).

Gerçek kemik bir nanokompozit malzemedir. Organik matriks içinde genellikle kollajenden oluşan hidroksiapatit kristalleri vardır. Mekanik olarak güçlü aynı zamanda da esnektir. Geliştirilen nanoölçek mekanizması bu özelliklerin uygun kombinasyonundan oluşur (Salata, 2004).

Yapay bir melez malzeme, 15-18 nm seramik nanokürelerinden ve poli(metilmetakrilat) kopolimerinden hazırlanır. Viskoelastik davranış gösteren insan dişleri yapılabilir (De la Isla ve ark., 2003).

2.2.5.2.2. Kanser Tedavisi

Fotodinamik kanser terapisi, atomik oksijen ile üretilen lazer tarafından, kanser hücrelerinin yıkımına dayanır. Atomik oksijen üretilirken kullanılan özel bir boyanın büyük miktarı, sağlıklı hücreye oranla kanser hücresinde daha çok etki yaratır. Bu yüzden, sadece kanser hücreleri parçalanır. Maalesef, boya molekülleri cilde ve gözlere göç eder ve bu da hastayı güneş ışığına bile çok duyarlı hale getirir. Bu etki altı hafta kadar sürebilir (Salata, 2004).

Bu etkiden kaçınmak için boya molekülü hidrofobik olarak uyarlanır ve gözenekli bir nanoküre içine konulur. Boya sadece nanoküre içinde kalır ve böylece vücudun diğer bölgelerine yayılmaz. Aynı zamanda, oksijen üretme yeteneği etkilenmez ve yaklaşık 1 nm civarındaki gözenek boyutu oksijenin dışarı difüzlenmesine olanak sağlar (Roy ve ark., 2003).

2.2.5.2.3. Biyolojik Analizlerde Çok Renkli Optik Kodlama

Yarıiletken ve bileşiklerin hazırlanabilen kuantum noktaları, çeşitli biyoetiketleme uygulamalarında organik boyaların yerine başarıyla kullanılmaktadır. Bu, farklı floresans özelliklerine sahip kuantum noktalarında polimerik mikrokürelerle karıştırılarak tek basamakta uygulanmıştır. Kuantum noktalarının kontrolü tam olarak sağlanmıştır. Bu deneylerde nanoküre kullanılması 6 farklı renk oluşturmuştur. Bu da 1 milyonun üzerinde karışımların kodlanabilmesi demektir. Partiküllerin eşboyutluluğu ve tekrar kullanılabilirliği partikül karakterizasyonuna olanak sağlar (Han ve ark., 2001; Parak ve ark., 2003).

2.2.5.2.4. Hücre ve Biomoleküllerin İşlenmesi

Fonksiyonel manyetik nanoküreler, hücre saflaştırılması gibi pek çok uygulamalarda rol almaktadır. Pek çok manyetik partikül küresel olduğu için nanokürelerin çok fonksiyonel özelliklerini sınırlandırır. Alternatif olarak silindirik nanoküreler, nanogözenekli alüminyum kalıplar içinde metal elektrohareketlilik ile oluşturulabilir. Kalıbın özelliklerine göre, nanosilindir yarıçapı 5-500 nm arasında seçilebilir, uzunlukları ise 60 µm kadardır. Farklı incelikteki metallerin harekete geçmesiyle, silindirik nanoyapıların manyetik özellikleri ve yapıları değiştirilebilir (Reich ve ark., 2003).

Metal yüzeylerin fonksiyonelliği için, farklı bölümlere bağlanacak ligandlar da farklı seçilebilir. Örneğin, tiol veya karboksil bağlı porfirinler altın veya nikel bölümlere kendiliklerinden bağlanırlar. Bu sayede, Floresans bölümleri bulunan manyetik nanoteller üretilebilir (Salata, 2004).

2.2.5.2.5. Protein Analizi

Çizelge 2.2. Biyolojik ve tıbbi alanlarda kullanılmak üzere nanomalzemeleri geliştiren şirketler (Salata, 2004).

Şirket	Aktivite Alanı	Teknoloji
Advectus Life Sciences Inc.	İlaç Salınımı	Antitümör ilaç taşıyan polimerik nanoküre üretimi
Alnis Biosciences, Inc.	Biyo-farmakotikal	İlaç salınımı için biyobozunabilir polimerik nanoküreler
Argonide	Membran filtrasyonu	Endotoksin filtrasyonu, ortopedik ve dental protezler, DNA ve protein saflaştırılması için nanogözenekli seramik malzemeler
BASF	Diş parlaticısı	Diş yüzeyini geliştirmek için hidroksiapatit nanoküreler
Biophan Technologies, Inc.	MRI koruma	Tıbbi aletleri RF alanlarından korumak için nanomanyetik/karbon kompozit malzemeler
Capsulation NanoScience AG Dynal Biotech	İlaç çözünürlüğü için farmakotik kaplamalar	Tabaka tabaka polielektrolit kaplamalar, 8-50 nm manyetik küreler
Eiffel Technologies	İlaç salınımı	İlaç partiküllerinin boyutlarını 8-50 nm'ye düşürmek
EnviroSystems, Inc.	Yüzey dezenfekte ediciler	Nanoemülsiyonlar
Evident Technologies	Luminisan biyoetiketleri	Yüzeyinde karboksil ve amin grupları içeren yarıiletken kuantum noktaları
Immunicon	Farklı hücre tiplerinin saflaştırılması	Hücre tespiti için antibadi ile kaplı polimerik bir tabaka ile çevrili manyetik çekirdek
NanoBio Corporation	Farmakotikal	Anti-mikrobik nano-emülsiyonlar
NanoCarrier Co., Ltd	İlaç salınımı	İlaç, DNA ve protein enkapsülasyonu için misel nanoküreler
Nanoplex Technologies, Inc	Biyoanalizler için biyobarkodlar	Karakterizasyon amaçlı her nanoprobe takılı DNA barkodları
NanoMed Pharmaceutical, Inc.	İlaç salınımı	İlaç salınımı için nanoküreler
Oxonica Ltd	Güneşten koruyucular	Zararlı UV ışınları absorplayıp ısıya dönüştüren nanoküreler
PSiVida Ltd	Doku mühendisliği, protez, ilaç ve gen salınımı, biyo-filtrasyon	Nanoyapılı gözenekli silikonun özelliklerini taşıyan malzemeler
Smith & Nephew	Bandajlar	Nanokristal gümüş patojenlere karşı zehirlidir
QuantumDot Corporation	Luminisens Biyoetiketleri	Birleşik yarıiletken kuantum noktaları

Proteinler hücrelerin önemli bir bölümünü oluştururlar. İnsan vücudu için proteinlerin fonksiyonelliklerinin anlaşılması önemlidir. Altın nanoküreler, immunohistoşimide, protein-protein ilişkilerini açıklamak için çok kullanılırlar. Fakat bu tekniğin çok fazla protein içeren örneklerde uygulanması zordur. Raman saçılım spektroskopisi tek boya moleküllerinin tespiti ve karakterizasyonu için iyi bir yöntemdir. Tek bir nanoküre probu içinde bu iki yöntemi birleştirerek protein karışımlarının analizi sağlanabilir (Cao ve ark., 2000).

2.3. Afinite Kromatografisi

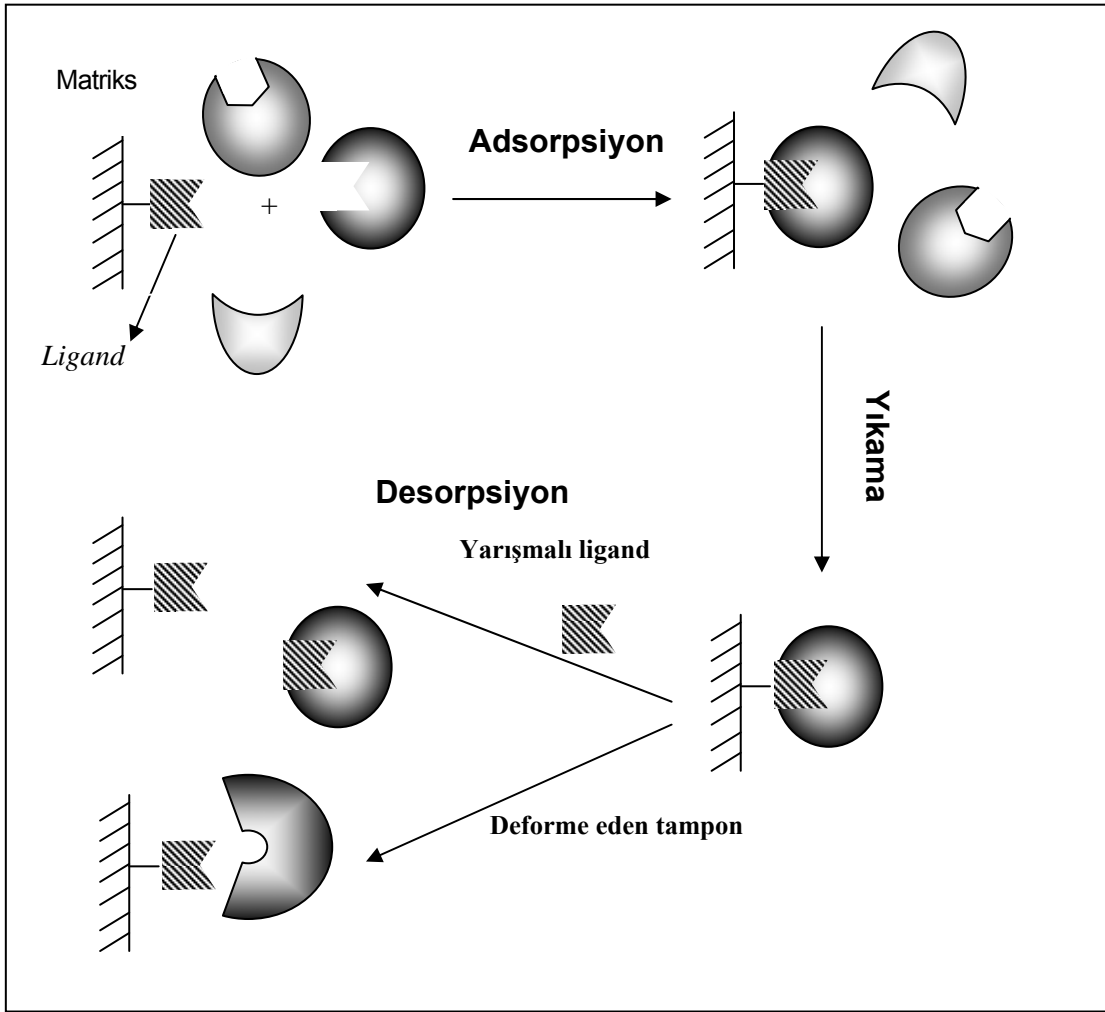
Tüm biyolojik süreçler moleküller arası özgül ilişkilere dayalıdır. Bu ilişkiler bir protein ile düşük mol kütleli bir madde (substrat ve enzim gibi) arasında gerçekleşebilir. Fakat, biyoözgül ilişkiler iki veya daha fazla biyopolimer ve proteinler arasında gerçekleşebilir. Afinite ligandı ile biyomolekül arasındaki ilişki tamamlayıcı grupların derecesi ile artar (Öncel, 2004).

Çizelge 2.3. Afinite kromatografisindeki biyolojik ilişkilere örnekler (Öncel, 2004).

Ligand	Saflaştırılan molekül
Antibadi	Antijen, virüs, hücre
İnhibitör	Enzim (ligandlar genellikle substrat analogu veya kofaktör analogudurlar)
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre yüzeyi reseptörü, membran proteini, hücre
Nükleik asit	Nükleik asit bağlayan protein (enzim veya histon)
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Şeker	Lektin, enzim, veya diğer şeker bağlayan proteinler

Şekil 2.5.'de afinite kromatografisinin prensipleri gösterilmektedir. İlk basamakta taşıyıcı matriks seçilir ve aktive edilir. Eğer gerekiyorsa, taşıyıcının aktif

bölgelerinden kovalent olarak uzatıcı kol takılır. Ligand adsorban ile uzatıcı kol üzerinden tepkimeye girer. Bazı durumlarda ligand-uzatıcı kol kombinasyonu ilk basamakta sentezlenir ve daha sonra taşıyıcıya tek basamakta immobilize edilir. Elde edilen afinite adsorbenti karışık ortamlardan ilgilenilen molekülün, tek basamaklı saflaştırılmasında kullanılabilir. Adsorbent üzerine bağlanan analit molekülleri, yarışmacı molekül ve/veya etkileşim bozucu bir tampon kullanılarak elüe edilir.



Şekil 2.5. Afinite kromatografisindeki temel basamakların şematik gösterimi (Öncel, 2004).

2.3.1. Afinite Kromatografi Süreci

Bütün protein saflaştırma süreçleri iyi optimize edilmelidir. Çünkü hiçbir genel kural protein saflaştırmasının faktörlerini ve parametrelerini önceden belirleyemez. Fakat afinite kromatografisi sürecini etkileyen bazı genel faktörler ve bunların

saflaştırma sürecine bağlantıları iyi bilinmektedir. Bu faktörler genellikle istenilen ürünün doğası ve miktarı ile tespit edilerek kullanılır (Öncel, 2004; Sadana ve ark., 1994; Narayanan, 1994).

Afinite Kromatografisinin başarısını etkileyen faktörlerden bazıları aşağıda verilmiştir: Ligand seçimi; Geri kazanım; Tekrarlanabilirlik; Kararlılık vemaleyettir.

Ligand seçimi en önemli parametrelerden biridir. Geri kazanım sürecin sonunda elüe edilen biyolojik aktif protein miktarı ile belirlenir. Tekrarlanabilirlik sürecin geçerliliğinin bir ölçüsüdür. Ligand kararlılığı da kullanılan kolonun dayanıklılığını ve sürecin maliyetini belirleyen önemli bir faktördür (Öncel, 2004).

2.3.1.1. Afinite ilişkileri

Biyolojik etkileşimlerin kimyası, genellikle reseptörün reaktif grupları ve ligand arasındaki kovalent olmayan ilişkiye dayanır. Biyolojik moleküller arasındaki afinite tepkimeleri bu moleküllerin konfigürasyon, yük ve hidrofobisite gibi bazı özelliklerine bağlı olan farklı tipteki etkileşimler ile düzenlenirler. Bu değişik güçler tamamlayıcı olabilir, toplamları ayrışma sabitini (K_d) veya bağlanma afinitesini verir.

$$K_d = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad (2.1.)$$

Burada örneğin A bir antibadiyi, B bir antijeni, AB ise aralarında oluşturdukları bileşiği simgeler. Bağlanma afinitesi aynı zamanda katı desteğin özelliklerinden ve protein bağlayan katı fazın fonksiyonel yeteneğiyle aktivitesinden de etkilenir (Nisnevitch ve ark., 2001). Örneğin; afinite kromatografisi için K_d değeri 10^{-3} - 10^{-7} M arasında değişir (Mohr ve ark., 1985). Bu durumda katı fazın hem kimyasal hem de mekanik özellikleri önemlidir. Katı faz ile ligand arasındaki özgül olmayan etkileşimler tutarsızdırlar ve önceden kestirilemezler, bu yüzden elüsyon basamağını zorlaştırırlar (Fleminger ve ark., 1990).

Diğer taraftan katı faz polimerinin fiziksel yapısı yüksek K_d değerlerinde serbest ligand ile protein arasındaki etkileşimde sterik engel yaratabilir. Bu problemlerin her ikisi de hareketsiz bir uzatıcı kol kullanılmasıyla azaltılabilir (Soltys ve ark.,

2000; Scouten, 1981). Partiküller biyolojik etkileşim için K_d sadece uygun elüsyon sisteminin geliştirilmesinde kullanılır (Cochet ve ark., 1994).

Elüsyon tamponu çok uygun olmalıdır. Bu bölgesel denatürasyona ve hedef protein salınımında aktivite kaybına yol açabilir (Yarden ve ark., 1985). Alternatif olarak, zayıf etkileşimler bağlanmanın spesifitesindeki azlık ve düşük saflaştırma faktörleri ile sonuçlanabilir (Öncel, 2004).

2.3.1.2. Matriks seçimi

Afinite Kromatografisinde kullanılacak olan taşıyıcı matrikste aranan özellikler:

- Geniş mol kütleli proteinler ve ligandların kolayca etkileşebilmeleri için makrogözenekli yapıda olmalıdır.
- Proteinlerin non-spesifik etkileşimlerinden kendisini korumak için hidrofilik ve nötral karakterde olmalıdır.
- Çeşitli kimyasal reaksiyonlarla türevlenerek fonksiyonel gruplar içermelidir.
- Türevlenme, rejenerasyon ve bakım sırasında sert koşullara karşı kimyasal olarak kararlı olmalıdır.
- Kolon uygulamalarında karşılaşılan hidrodinamik etkilere, adsorpsiyon/desorpsiyon ve sterilizasyon koşullarına karşı fiziksel olarak kararlı olmalıdır.
- Endüstriyel uygulamalar için ekonomik olmalıdır (Öztürk, 2006).

2.3.1.3. Ligandların sınıflandırılması

Afinite kromatografisinde kullanılan ligandlar, genellikle monospesifik ve grup spesifik olarak sınıflandırılırlar:

2.3.1.3.1. Monospesifik Düşük Mol Kütleli Ligandlar

Bu grup, steroid hormonları, vitaminler ve belli enzim inhibitörleri gibi ligandları içerirler. Monospesifiklik, bir hücre ekstraktından veya vücut sıvısından tek veya çok az proteinin bu ligandlara bağlanmasını tanımlar. Yüksek spesifiteye rağmen, non-spesifik bağlanmalar gerçekleşebilir. Bunun sebebi immobilizasyon veya

uzatıcı koldan ligand veya ligand grupları ile ilişki olabilir. Bu problemle başa çıkmanın bir yolu ligandın sadece kendisini içeren ikinci bir adsorban kullanmak ve desorplanan proteinin uygun koşullarda ligand içeren adsorbandan geçmesine izin vermektir (Öncel, 2004).

2.3.1.3.2. Grup-Spesifik Düşük Mol Kütleli Ligandlar

Çeşitli enzim, kofaktör ve bunların analoglarını içeren en geniş ligand grubudur. Bu grup aynı zamanda, biyomimetik boyaları, boronik asit türevlerini, çok sayıda aminoasit ve vitaminleri de içerir.

Çok sayıda çeşitli fonksiyonel grup içeren yüksek mol kütleli ligandlar (proteinler gibi) yapıyı veya fonksiyonu etkilemeden normalde kolayca immobilize edilebilirler. Düşük mol kütleli ligandlar ise molekülde değişikliklere yol açar. Afinite etkileşimleri azalırsa, ligand fonksiyonel bir grupla türevlendirilebilir. Kullanılan fonksiyonel grup kovalent bağla bağlanmış olmalıdır bu sayede ligand matriksten kopamaz. Bu, genellikle tek noktadan bağlanan küçük ligandlar için önemlidir. Proteinler için ise ligand ve matriks arasında pek çok bölgeden bağlanma söz konusudur. Ayrıca ligand immobilizasyon işlemi sırasında kararlılığını da korumak zorundadır (Öncel, 2004).

2.3.1.4. Ligand seçimi

İyi bir afinite ligandında olması gereken özellikler aşağıda sıralanmıştır:

- Ligand protein ile izole edilmek üzere tersinir kompleksler oluşturmalıdır.
- Planlanan uygulama için spesifite veya bağlanma afinitesi uygun olmalıdır.
- Kararlı komplekslerin oluşumu için kompleks sabiti yeterince yüksek olmalıdır.
- İzole edilen protein veya ligandı etkilemeden, ortamdaki basit bir değişimle kompleks kolayca ayrılabilmelidir.
- Matrikse kolayca immobilize edilebilmek için birtakım kimyasal özelliklere sahip olmalıdır (Öncel, 2004).

2.3.1.5. Uzatıcı Kol Seçimi

Genellikle, afinite adsorbanı sterik engellemelerden dolayı ligand ile zayıf etkileşim gösterirler. Buna yüksek mol kütleli ligandlarda çok nadir rastlanırken düşük mol kütleli ligandlarda sıkça rastlanır (Öncel, 2004).

Uzatıcı kol kullanımı pek çok durumda bu problemi çözer. Genellikle kullanılan uzatıcı kollar alifatik, iki ucunda da fonksiyonel grup bulunduran doğrusal hidrokarbon zincirleridir. Gruplardan biri (genellikle primer amin, $-NH_2$) matrikse bağlanır, diğer uçtaki grup ise liganda bağlanmak üzere seçilir. Uç grup olarak adlandırılan grup karboksil ($-COO$) veya amino ($-NH_2$) grubudur. En çok kullanılan uzatıcı kollar, 6-aminohekzonik asit [$H_2N-(CH_2)-COOH$], hekzaetilen diamin [$H_2N-(CH_2)-NH_2$] ve 1,7-diamino-4-azoheptan'dır (3,3-diamino dipropilamin) (Öncel, 2004).

Uzatıcı kolun kimyasal yapısı, istenilen uygulamaya göre seçilmelidir. Hidrofobik kollar kolayca bulunabilirler ve basit bileşiklerdir. Fakat non-spesifik etkileşimler gerçekleştirebilirler. En çok kullanılan hidrofilik uzatıcı kollar ise sentetik polipeptitlerdir. Ancak bunlar da non-spesifik iyonik etkileşimlere yol açabilirler (Öncel, 2004).

Uzatıcı kol kullanmaktaki en önemli neden bu kolların immobilize ligand ile saflaştırılacak ürün arasında sterik uygunluğu arttırmalarıdır. Bu yüzden uzatıcı kolun uzunluğu önemli bir parametredir. Kısa uzatıcı kollar sterik etkileri sistematik olarak elemezlerse, hidrofobik karakterdeki uzun uzatıcı kollar non-spesifik adsorpsiyonlara neden olabilirler (Öncel, 2004).

2.3.1.6. Ligandın Destek Matriksine Bağlanması

Ligand moleküllerinin destek matriks üzerine bağlanabilmesi için ılımlı basamaklar içeren çeşitli yöntemler vardır (Matejtschuk, 1997). Bu süreç 3 basamaktan oluşur;

- 1) Ligandın fonksiyonel grupları ile etkileşebilmesi için matriksin aktivasyonu,
- 2) Ligandın bağlanması,

- 3) Etanolamin gibi düşük mol kütleli uygun maddeler ile bazı aktif grupların deaktivasyonu veya bloke edilmesi.

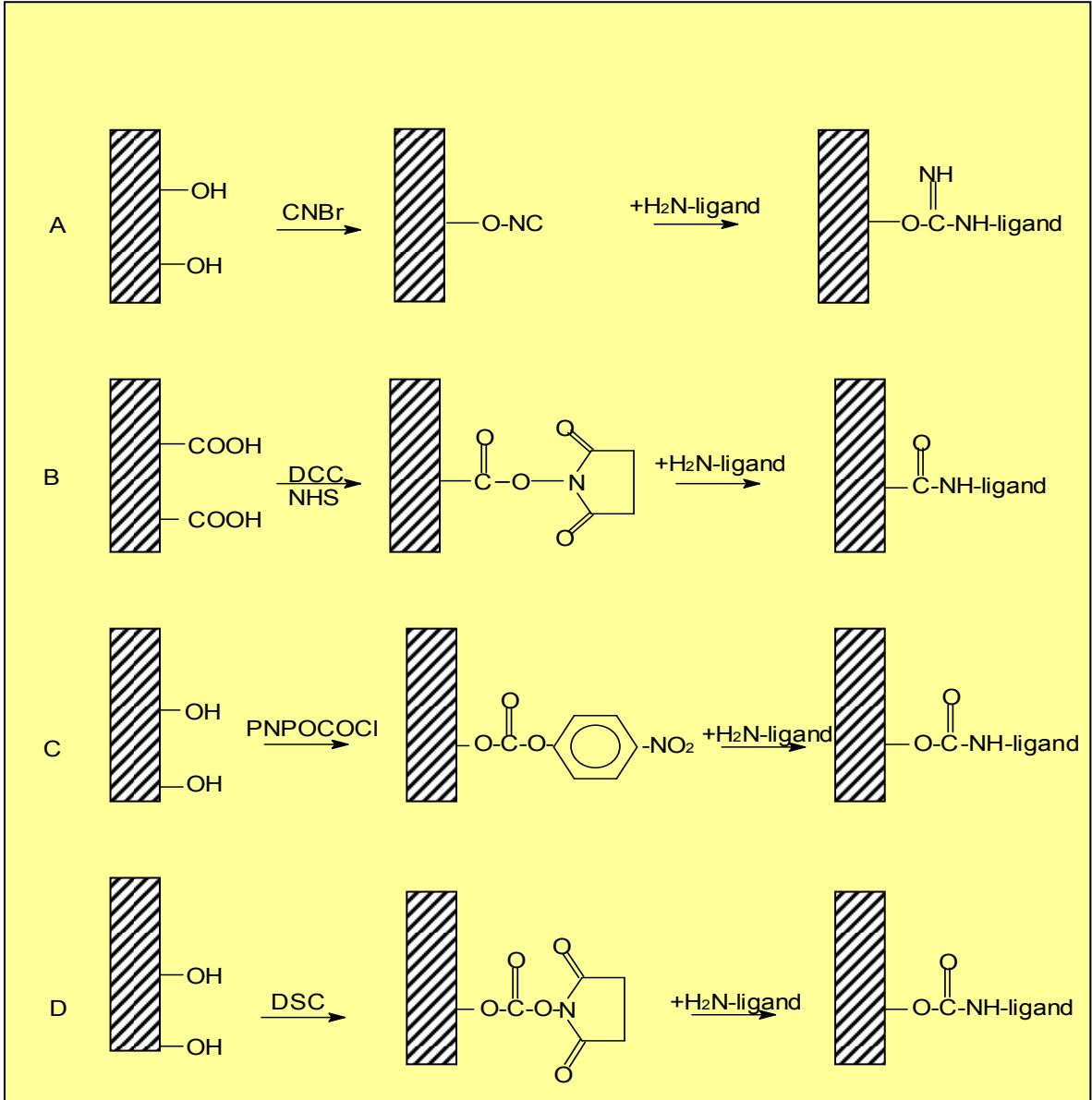
Bağlama yönteminin ve koşulların doğru seçilmesi matriks ve liganda bağlıdır. Öncelikle ligand ile hedef molekül arasındaki özgül etkileşimi etkileyebilecek girişimleri önleyebilmek için ligandın matrikse bağlanması aktif bölge dışında bir bölgeden yapılır (Öztürk, 2006). Aktivasyonda elektrofilik bir matriks, liganddaki -NH₂ (amino), -SH (tiyol), ve OH (hidroksil) gibi nükleofilik gruplarla tepkimeye girer. Alternatif olarak, nükleofilik gruplar taşıyan bir matriks üzerine elektrofilik gruplar taşıyan bir ligand immobilize edilebilir. Bazı durumlarda bağlama işlemi aktivasyonun hemen arkasından gerçekleştirilir.

En sık kullanılan yöntem, siyonat esterlerine yüksek reaktivlik gösteren agarozun (ticari olarak kullanılabilen aktive edilmiş reçine) siyanojen bromür ile aktivasyonudur. Bu yöntemin popüleritesi olmasına rağmen, ligand bağları saflaştırma işlemi sırasında non-spesifik bağlanmalar ve ligand bağlarının kararsızlığı gibi problemler yaratabilirler (Öncel, 2004).

Afinite kromatografisinin ilk dönemlerinde, N-hidroksil-süksinimid (NHS) esterleri gibi aktif esterler de ligand immobilizasyonunda kullanılmaktaydı. Aktif esterlerin hazırlanması için karboksilik gruplar içeren matrikse ihtiyaç vardır. Bu matriksler, agarozun siyanojen bromür, aktive edilmiş karbonatlar gibi hidroksil grupları içeren farklı ajanlarla aktive edilerek kolayca hazırlanabilirler. Uzaticı kol uzunluğuna dayalı farklı ω-amino asitlerle başarılı bir tepkime sağlanabilir. NHS esterleri daha sonra karboksilik matriksin disikloheksilkarbodiimid ve NHS ile karıştırılmasıyla hazırlanır. Kararlılık problemi yüzünden, N,N,N',N'-tetrametil (süksinimid) uranyum tetrafloroborat'a dayalı yeni bir yöntem geliştirilmiştir (Öncel, 2004).

Polisakkaritlerin aktivasyonu için diğer bir yöntem, hidroksil grupları içeren polimerlerle yüksek reaktivlikte karbonat türevleri oluşturan N'-N-disüksinimidil karbonat (DSC) kullanımınıdır. Bu türevler ılımlı, fizyolojik koşullarda (pH: 7.4) nükleofillerle tepkimeye girer ve işlem taşıyıcıya bağlı kararlı karbamat bağları ile sonuçlanır.

Bazı durumlarda yüksek derecedeki yer değiştirmenin non-spesifik bağlanmalara yol açabileceği unutulmamalıdır. Antijen molekülünün pek çok noktadan bağlanması antijen ve antibadinin aktif bölgesi arasındaki etkileşimi zayıflatarak konformasyonu değiştirebilir (Öncel, 2004).



şekil 2.6. Ligandların aktive edilmiş taşıyıcılara immobilizasyonları: (A) siyanojen bromür ile aktive edilmiş siyonat esteri (B) Amit türevi oluşturan N-hidroksisüksinimidesteri (C) ve (D) karbamat türevleri oluşturan p-nitro fenilkloroformat veya DSC ile aktive edilmiş p-nitro-fenil ve N-hidroksisüksinimit karbonat (Wilchek ve Miron, 1999).

Afinite bir ürün molekülünün bir immobilize ligand ile adsorpsiyonunu içerdiği için, matriks adsorpsiyon kapasitesinde mol kütlelerinin oranı çok önemlidir. Immobilizasyon derecesi, ligand boyutu, ligand spesifitesi ve matriks gözenekliliği iyi optimize edilmelidir.

2.3.2. Boya-Ligand Afinite Kromatografisi

İlk uygulamasından günümüze kadar afinite kromatografisi inanılmaz bir hızla gelişmiştir. Son zamanlarda kendi isimleriyle anılan afinite alt sınırları ortaya çıkmıştır. Çizelge 2.4.'de ise bu alt sınıfların bazıları özetlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 2.4. Afinite kromatografisinin alt dalları.

Afinite Kromatografisi	Hidrofobik Afinite Kromatografisi
	İmmünoafinite Kromatografisi
	Kovalent Afinite Kromatografi
	Metal-Şelat Afinite Kromatografisi
	Moleküler Baskılama Afinite Kromatografi
	Membran-Temelli Afinite Kromatografi
	Afinite Kuyruk Kromatografi
	Lektin Afinite Kromatografisi
	Boya Ligand Afinite Kromatografisi
	Reseptör Afinite Kromatografisi
	Perfüzyon Afinite Kromatografisi
	Tiyofilik Afinite Kromatografisi
	Yüksek Performans Afinite Kromatografisi
	İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi
	Kütüphane Türevli Afinite Kromatografi
	Afinite Çöktürme
	Afinite Elektroforez
Afinite Kapiler Elektroforez	
Santrifüj Afinite Kromatografisi	
Afinite İtme Kromatografisi	

Triazin türevi boyalar, tekstil sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bu boyaların proteinlerle seçici etkileşim özellikleri, bu kimyasalların ligand olarak kullanımlarına olanak sağlamıştır. Boyaların ligand olarak kullanıldığı, afinite kromatografisi alt dalı ise; Boya Ligand Afinite Kromatografisi olarak adlandırılmaya başlanmıştır.

2.3.2.1. Afinite Ligandı Olarak Boyalar

Enzimler, koenzimler, kofaktörler, antibadiler, aminoasitler, oligopeptitler, proteinler, nükleik asitler ve oligonükleotidler gibi çeşitli fonksiyonel moleküller yeni sorbentlerin tasarımında ligand olarak kullanılabilir (Lilehoj ve Malik, 1982; Chase, 1988; Denizli ve Pişkin, 1995; Denizli ve ark.,1995). Bu ligandlar birçok uygulamada önemli derecede spesifiktirler. Ancak üretim ve/veya saflaştırma maliyetlerinden dolayı pahalıdırlar. Spesifik sorbentlerin hazırlanmasında biyolojik kayıplardan dolayı, matrikse immobilize edilmeleri zordur.

Boya-ligandlar, yukarıda bahsedilen dezavantajları ortadan kaldırarak afinite kromatografisi için önemli alternatiflerden biri olarak düşünülmektedir. Boya-ligandlar, özellikle enzimler olmak üzere birçok proteini bağlayabilirler; kolay elde edilebilir ve ucuzdurlar. Ayrıca özellikle hidroksil grubu içeren matrikslere kolayca immobilize edilebilirler. Boyalar doğada sentetik olmalarına karşın substrat, kofaktör ya da proteinlerin bağlanma bölgelerini taklit ederek birçok proteinin aktif bölgesiyle etkileştiklerinden afinite ligandı sınıfına dahil edilirler.

2.3.2.2. Kısa tarihçe

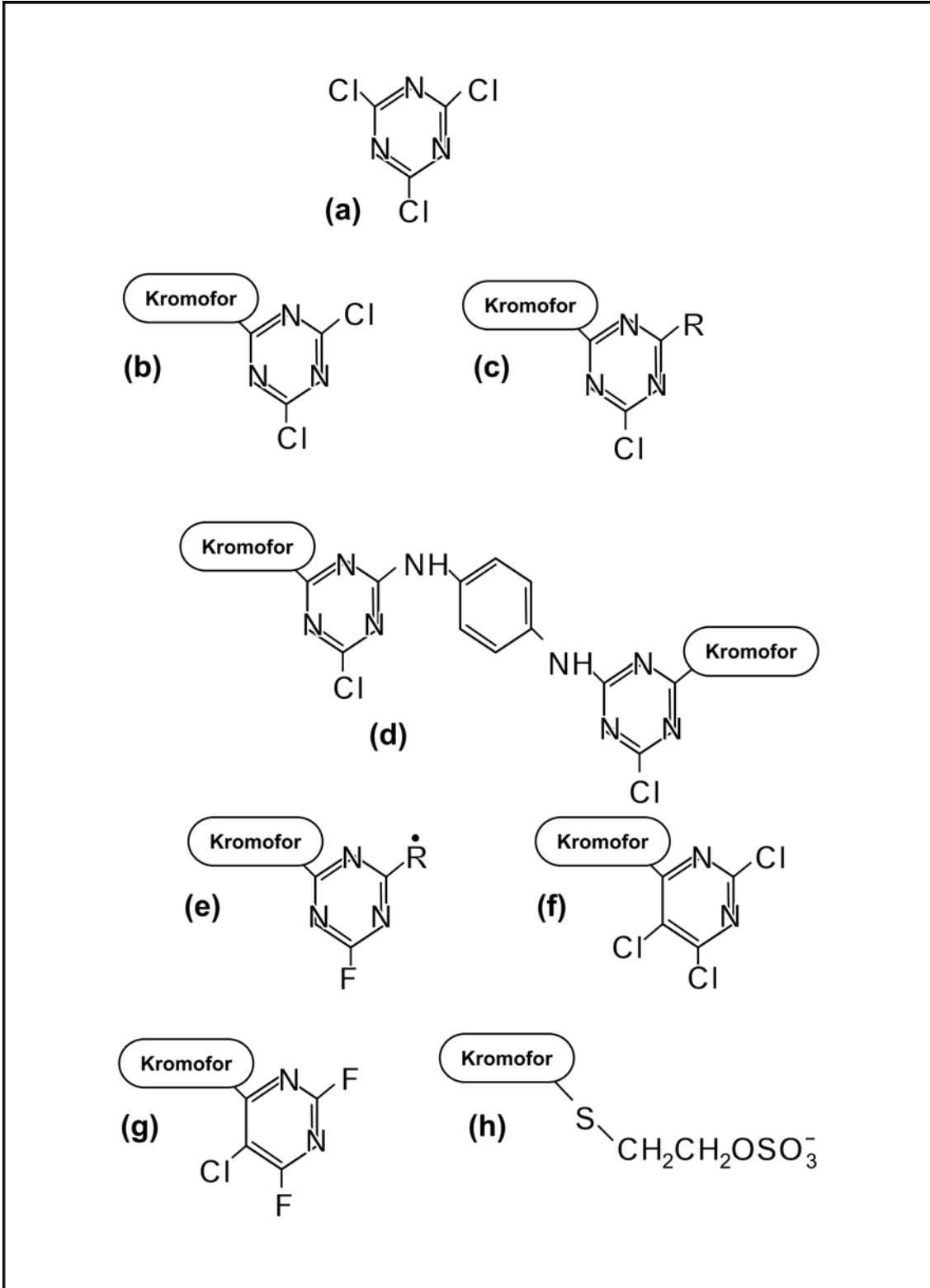
Boya afinite kromatografisi Blue-Dekstran ile çeşitli kinazların beklenmedik etkileşimlerinin gözlenmesiyle fark edildi (Dean ve Johnson, 1985). Önceki çalışmalarda, bazı proteinler (eritrosit piruvat kinaz, fosfofruktokinaz, glutatyon redüktaz ve çeşitli pıhtılaşma faktörleri) blue dekstran ile boyut dışlamalı kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır (Kopperschlager ve ark., 1968; Bohme ve ark., 1972). Bu çalışmalar reaktif boya Cibacron Blue F3GA'nın proteinlerle etkileşebileceğini göstermiştir. İlk kez Roschlau ve Hess, Cibacron Blue F3GA'yı kovalent olarak Sephadex G-200'e doğrudan immobilize ederek maya piruvat

kinazı saflaştırmıştır (Roschlau ve Hess, 1972). Daha sonra bu yöntem, Cibacron Blue F3GA'yı taşıyan farklı matrikslerle farklı proteinlerin saflaştırılmasında uygulanmıştır (Lowe ve ark., 1981).

2.3.2.3. Boya Ligandların Kimyasal Yapısı

Reaktif boyalar olarak bilinen tekstil boyları, çeşitli proteinlere seçici ve tersinir şekilde bağlanabildiğinden boya ligand afinite sistemlerinde protein saflaştırılması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadırlar. Boya afinite sistemlerinde kullanılan birçok reaktif boya, bir kromofor bir de reaktif grup; ayrıca sulu ortamda molekülün istenen çözünürlükte olabilmesi için sülfonik asit grubu içermektedir. Tüm pH'larda negatif yüklüdürler. Bazılarının yapısında karboksil, amino, klorür ya da metal kompleks grupları bulunmaktadır.

Günümüzde protein saflaştırılmasında sıklıkla kullanılan triazinil bazlı boyalar, amino köprüleri yardımı ile birbirine bağlı 2 ayrı birimden oluşur. Genellikle kromofor birimi yapıya rengini verirken diğer reaktif kısım destek malzemesiyle kovalent bağı yapan kısımdır. Kromofor, reaktif birimin bağlanabileceği amino grubu ve sulu ortamda çözünürlüğü sağlamak için sülfonik asit grupları içermelidir (Stead, 1987). Triazinil boyların sentezinde kullanılan temel madde siyanürik klorürdür (1,3,5-trikoloro-simtriazin). Elektronegatif atomların varlığı, 3 karbon atomunu ileri derecede pozitif yapar ve böylece molekül nükleofilik saldırılara karşı hassaslaşır. Kromofor molekülleri diklorotriazinil boyları oluşturmak üzere kolayca bu moleküle bağlanır. Procion MX serisi bu tip boylara tipik örnektir. Bu moleküllerin diğer nükleofilik süstitüentlerle ileri tepkimeleri ile monoklorotriazinil boylar sentezlenir. Cibacron Blue F3GA ve Procion H bunlara örnektir. İki adet diklorotriazinil molekül, bifonksiyonel triazinil boya oluşturmak için bifonksiyonel moleküle bağlanır. Triazinil boylara diğer örnekler monoflorotriazinil (Cibacron, Ciba-Geigy), triklorotriazinil (Drimarene, Sandoz) ve diflorokloroprimidimil (Lavafix, Bayer ve Drimarene, Sandoz) Şekil 2.7'de verilmektedir. Dikkat edilecek bir husus da triazinil halkasındaki klorür atomlarının diğer gruplarla yer değiştirmesi durumunda boyanın reaktivitesinin önemli ölçüde azalmasıdır. Boya molekülleri, fazla sayıda klorür ya da florür atomu içererek ligand immobilizasyon basamağında matriksteki nüfleofilik gruplarla kolaylıkla etkileşebilmektedir.



Şekil 2.7. Reaktif boyalara örnekler, (a) Siyanürük klorür; (b) Procion MX serileri (ICI); (c) Cibacron (Ciba-Geigy) ve Procion H (ICI); (d) Procion H-E (ICI); (e) Monoflorotriazinil, Cibacron, Ciba-Geigy; (f) Trikloroprimidinil, Drimarene, Sandoz; (g) Diklorokloro-pirimidinil, Levafix, Bayer ve Drimarene, Sandoz; (h) Sülfatoetil sülfon, Remazol, Hoechst.

Tekstil boyaların hedef proteinlerle olan spesifitesinin geliştirilmesi amacıyla boya yapısının tasarımı önemli bir stratejidir. Bu yeni tip liganda 'biyomimetik boya' adı verilir. Bunlar hem daha spesifiktirler hem de modifiye edilmemiş boyanın tüm avantajlarına sahiptirler. Bu fikir 1980'lerde ilk defa Lowe tarafından uygulanmakla birlikte; sonraları enzimlerin spesifik olarak uzaklaştırılması için de kullanılmıştır (Lowe ve ark., 1981; Clonis ve ark., 2000).

İlk biyomimetik boya, diaminometilbenzen grubu kullanılarak reaktif klorotriazin halkasına benzamidin bağlayarak hazırlanmıştır ve kimotripsinden tripsinin saflaştırılması için kullanılmıştır (Bode ve Schwager, 1975). Afinite kromatografisinde sıklıkla kullanılan boyalar çeşitli reaktif klorotriazin boyalardır (Clonis, 2000). Birçok proteinle etkileşiminden dolayı immobilize Cibacron Blue 3GA ya da F3GA afinite kromatografisinde geniş kullanım alanı bulmuştur (Clonis, 2000).

2.3.2.4. Boya-Ligand Protein Etkileşimleri

Proteinin bağlanma bölgesi, üç boyutlu yapısı içindeki iyonik, polar ve hidrofobik grupların stereokimyasal düzenlenmesidir. Bu bölge, polipeptit zincirlerinin en muhtemel esnekliğe sahip bölgesidir. Boya ligand molekülleri proteinle sıkı ve spesifik bağlanabilmek için kovalent olmayan etkileşimlere katılırlar. Birçok kinetik çalışmada gösterilmiştir ki; triazinil boyalar analit enzimin doğal ligandıyla yarışmalı olarak enzimin bağlanma bölgesiyle etkileşmiştir (Lowe ve ark., 1981; Wilson, 1976; Clonis ve Lowe, 1981). Yarışmalı, yarışmalı olmayan ve karışık inhibisyon olmak üzere inhibisyonun birçok şekli bu etkileşimlerde gözlemlenmiştir. Proteinlerin Cibacron Blue F3GA immobilize olmuş kolona bağlanması nükleotid spesifik, iyonik ve hidrofobik olarak karakterize edilmektedir. Bir anlamda, Cibacron Blue F3GA için yukarıdaki etkileşimlerden biri ya da hepsinin olması olasıdır. Bu durum, çalışılan ortam koşullarına, destek malzemesinin karakteri gibi parametrelere bağlıdır.

Aromatik triazin boyanın yapısı, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) yapısına benzemektedir ve bu boyaların proteinlerin dinükleotid bölgesinden etkileştiği rapor edilmiştir (Thompson ve ark., 1975). Birçok dehidrojenaz ve kinaz, Cibacron

Blue immobilize olmuş kolona nükleotid bağlanma bölgeleri üzerinden bağlanırlar ve uygun nükleotidlerin düşük derişimlerinde kolondan sıyrılırlar (Thompson ve ark., 1975). Bu biyospesifik bağlanma ve ayrılmasıdır. Ancak, desorpsiyon karakterinden adsorpsiyon mekanizmasını çıkarmak doğru değildir. Bu yüzden Cibacron Blue immobilize olmuş kolondan dehidrojenazların nükleotidlerle desorpsiyonu, adsorpsiyon sürecinin biyospesifitesini göstermez.

Mavi kromofor, amino ve sülfonat gruplarını birlikte içerdiğinden non-spesifik iyon değişim etkileri beklenebilir. Albümin ve hemoglobin gibi çeşitli proteinlerin, düşük iyonik şiddette Blue Sefaroz kolonda spesifik olmayan bağlanma gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Spesifik olmayan bağlanma hidrofobik, iyonik ya da ikisinin birlikte olduğu durumlarda gerçekleşebilir. Genellikle hidrofobik bağlanma kaotropik tuzların vb. yüksek derişimleriyle ortadan kaldırılabilirken amonyum ya da sodyum sülfat vb. nin yüksek derişimlerinde artar. Spesifik olmayan bağlanma iyonik bir karaktere sahipse; proteinin destek malzemesinden sökülmesi yüksek tuz derişimleriyle ya da pH'nin değiştirilmesiyle gerçekleştirilebilir. Birçok protein, Cibacron Blue immobilize edilmiş kolona izoelektrik noktalarının altında bağlanır ve daha üstündeki pH'da sökülür. Bu genel bir yaklaşım olmakla birlikte yüklü grupların lokasyonları gibi faktörler bu durumdan farklılığa neden olabilir (Subramanian, 1984).

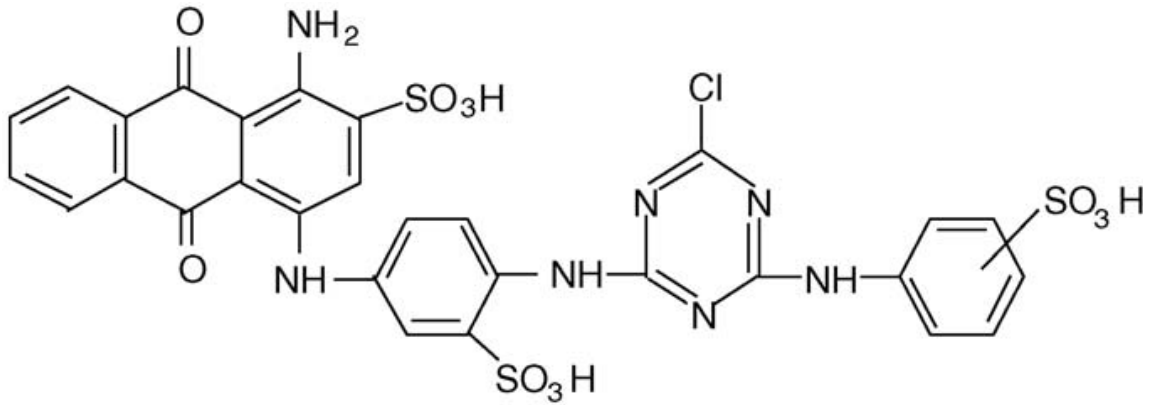
Boya-protein etkileşimlerinde ayrıntılı bilgi veren ilk x-ışını kristal yapısı, at karaciğer dehidrojenaz ile Cibacron Blue 3GA kompleksi için elde edilmiştir (Biellmann, 1979). Daha sonraları Cibacron Blue 3GA-NAD(P)H: kuinon redüktaz kompleksi ile Cibacron Blue 3GA-glutatiyon S-transferaz kompleksi için de x-ışını kristal yapısı oluşturulmuştur (Oakley ve ark., 1999). Cibacron Blue 3GANAD(P)H:kuinon redüktaz kompleksi için sonuçlar, AMP bağlanmasını taklit eden Cibacron Blue 3GA'nın 3 halka sisteminin varlığıyla boya-ligand Cibacron Blue 3GA ve NADP+'ın AMP birimi, enzim ile benzer şekilde etkileştiklerini göstermektedir. Cibacron Blue 3GA-glutatiyon S-transferaz kompleksi için boyanın antrakuinon kromoforu her enzim alt biriminin H-bölgesiyle etkileşir ve amino asitlerle, Phe-8, Val-10, Ile-104, Tyr-108 ve Gly-205, van der Waals etkileşimi yapmaktadır. Ayrıca, Tyr-7'nin hidroksil grupları ile Cibacron Blue 3GA'nın

antrakuinon halkasının karbonil grubu ve Arg-13'ün guanidil grubu ile Cibacron Blue 3GA'nın sülfonik asit grubu arasında hidrojen bağı oluşması olasıdır.

Yakın geçmişte, matriks-yardımlı lazer desorpsiyon/ionlaşma kütle spektrometresi (matriks-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry; MALDI-MS) boya protein etkileşimleri çalışmalarına da uygulanmıştır (Salih ve Zenobi, 1998). Bu yaklaşım, Cibacron Blue 3GA'nın sülfonik asit gruplarının sadece arjininin yan zincirlerine bağlandığını göstermektedir. Bu spesifik etkileşimin boya-protein bağlanmasındaki sürücü güç olduğu düşünülmektedir. Bu durumda, tüm amino asitler içinde arjininin en fazla gaz-faz alkanite ve pKa değerine sahip olması ile açıklama getirilmektedir (guanidino grubu için pKa= 12.48). Bu, arjinin için sülfonat grubunun seçiciliğinin nedeni olabilir.

2.3.2.5. CBF3GA'nın Boya-Ligand Olarak Kullanımı

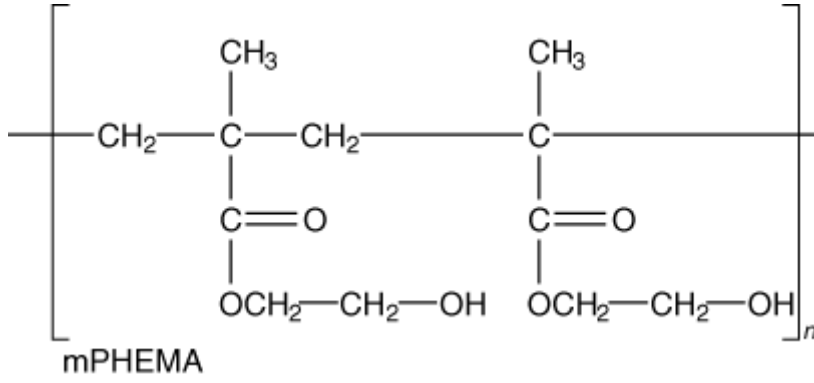
Protein saflaştırmasında; Cl Reaktif Blue 2'nin bir orto-izomeri olan Cibacron Blue 3GA ya da F3GA (CB3GA) bilinen farklı reaktif boya ligandların arasında en çok rağbet gören ligandlardandır. Literatürde de belirtildiği gibi daha önce benzer bir çalışma manyetik mikroküreler ile yapılmıştır (Odabaşı ve Denizli, 2004).



Şekil 2.8. Cibacron Blue F3GA'nın Kimyasal Yapısı (Altıntaş ve Denizli, 2006).

Söz konusu bu çalışmada; destek matriksi olarak manyetik poli(hidroksietil-metakrilat) (m-PHEMA) (Şekil 2.8.) kullanılarak boya afinite manyetik mikroküreler hazırlanmıştır. Bir boya ligandı olan Cibacron Blue F3GA'nın manyetik mikrokürelere; reaktif boyanın klorür grupları ile (m-PHEMA) mikrokürelere

hidroksil grupları arasındaki bağlar vasıtasıyla kovalent olarak bağlandığı ortaya çıkartılmıştır. Bu çalışmada; farklı pH, iyonik güç ve HSA başlangıç derişimleri değerlerindeki HSA adsorpsiyonlarıyla, albümine karşı Cibacron Blue F3GA bağlı (m-PHEMA) mikrokürelerin yüksek seçiciliği ve afinitesi gösterilmiştir.



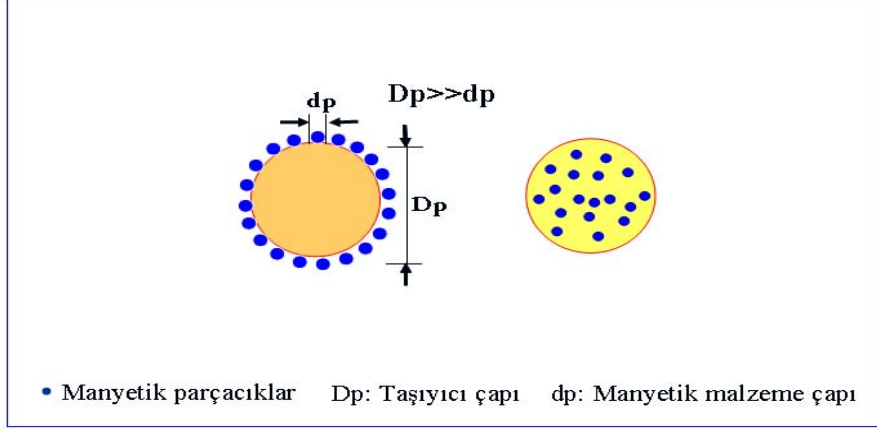
Şekil 2.9. (m-PHEMA)'nin moleküler yapısı (Odabaşı ve Denizli, 2004).

2.4. Manyetik Alan Etkisiyle Ayırma ve Saflaştırma

2.4.1. Manyetik Taşıyıcı Teknolojisi

Çizelge 2.5. Manyetik alan işlemleri.

Manyetik Alan İşlemleri
Manyetik toplama
Manyetik flokülasyon
Manyetik sedimentasyon
Manyetik yüzdürme
Manyetik anizotropik tasnif
Manyetik stabilizasyon
Manyetik taşınım
Manyetik etiketleme teknolojisi
Manyetik taşıyıcı teknolojisi



Şekil 2.10. Manyetik taşıyıcı teknolojisini (Denkbaş, 2003).

Geleneksel ayırma ve saflaştırma yöntemlerinde yaşanan olumsuzluklar; seçimli ayırma zorlukları, tam çökelmeme, kimyasal kararsızlık, maliyet olarak karşımıza çıkar. Ayrıca biyolojik moleküllerin dekompoze olması, inaktif hale gelmesi, deforme olması önemli dezavantajlardır. Bu olumsuzlukları yenmek üzere manyetik alan etkisi ile ayırma ve saflaştırma işlemleri gündeme gelmiştir. Çizelge 2.5.'de biyoteknolojide kullanılan Manyetik Alan İşlemleri verilmiştir. Şekil 2.10. ise manyetik taşıyıcı teknolojisini genel prensiplerini sembolize etmektedir.

2.4.2. Manyetik Taşıyıcı Olarak PHEMA Kullanılması

Manyetik malzemelerin kullanımı pratikte onların manyetiklik, morfoloji, şekil, boyut, polidispersite gibi özelliklerine bağlıdır. Eğer en iyi hidrodinamik (akış) özelliklerine gereksinim varsa; çubuk, tel, tüp, membran, levha ve düzensiz formlu gibi pek çok makul şekilleri olmasına karşın bilye formları kullanıma daha uygundur. Gerek kesikli gerekse sürekli ayırma işlemlerinde kolay kullanım açısından pratik avantajlar sağlarlar. Düzensiz formda olanlar küresel olanlara göre mekanik aşınmaya ve parçalanmaya karşı daha hassastırlar. Büyük partikül

boy dağılımına sahip geleneksel partiküllerin tersine, eş boyutlu mikroküreler (ya da en azından küçük boy dağılımına sahip olanlar) büyük avantaj sağlarlar. Çünkü eş boyutlu mikroküreler düzgün fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptirler ve boyut dağılımına sahip partiküller gibi sıvılarda kümelenme oluşturmazlar. Büyük partiküller fonksiyonel grupların bağlanması ya da biyomoleküllerin (enzimleri de kapsayan) immobilizasyonu için küçük spesifik yüzey alanına sahip olma dezavantajını barındırırlar. Mikroküreler (mikrometre ve daha da küçük boyutta olanlar) ise büyük spesifik yüzey alanına sahip olduklarından dolayı reaktif grupların, enzimlerin ve diğer biyolojik aktif bileşiklerin immobilizasyonu için uygundur ve faz transferi reaksiyonlarında da katalitik aktiviteyi desteklerler. Fakat bununla beraber çok küçük partiküllerle manyetik duyarlılığı sekteye uğratma riski de vardır. Manyetik mikrokürelerin manyetik duyarlılıklarının olabildiğince yüksek olması gerekir. Bu durumda da aktif yüzey ve manyetik özellikler arasında bir uyum sağlanmalıdır.

Piyasada manyetik ayırma amaçlı partiküller sentetik veya doğal polimerlerle ya da inorganik malzemelerle kaplanır. Poli(stiren) (PS) ve polimetilmetakrilat (PMMA) manyetik mikropartiküller için baştan beri en sık kullanılan matriksler olmuşlardır. Yaygın kullanımlarına karşın hidrofobisiteleriyle ilgili bazı dezavantajları çoğu zaman sorun teşkil etmiştir. Örneğin immünolojik tayınlarda PS özgül olmayan protein adsorpsiyonu özelliğinden dolayı istenmeyen bir geri plan sinyali üretebilir. PS'nin aynı zamanda özgül ligandlara ya da tanıma gruplarına kimyasal modifiye olması da zordur. Üstelik PS'nin hidrofobik doğası su ve alkol gibi polar çözücülerde şişmeyi de engeller. Bu durum manyetik poli(hidroksietil-metakrilat) (PHEMA) bazlı mikrokürelerin üzerine araştırmaların yoğunlaştırılmasını doğurmuştur. Biyomedikal alanda önemli yer teşkil eden biyoyumluluk ve düşük nonspesifik adsorpsiyon avantajları sayesinde PHEMA hidrofilik (hidrojel) destek olarak seçilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. PHEMA'nın biyoyarışmalı, nontoksik ve mekanik olarak kararlı olmasından ve bununla beraber minimize edilmiş nonspesifik protein adsorpsiyonu göstermesinden dolayı hidrofobik matrikslere kıyasla; uzun bir kullanım geçmişi vardır. Ancak hidroksi grubunun reaktivitesi düşük olduğundan dolayı; çoğu zaman matrikse amino, polietilenimin, tosil grubu gibi fonksiyonel grupların takılması farklı ligandların bağlanması ya da immobilizasyonu sağlamak için gerekli olmaktadır (Horak ve ark., 2007).

2.4.3. Manyetik Nanokürelerin Hazırlanması

Manyetik mikroküreler; analiti metal oksitle (çoğu zaman demir oksit) doğrudan kirlenmeden koruyan bir polimer kabuk içerisine gömülmüş ve genellikle süperparamanyetik olan çekirdeklerden (dolgulardan) meydana gelirler. Manyetik dolguları çevreleyen polimer kabuk avantajı yüzey fonksiyonelleşmesi ve bir hedef biyomolekülün immobilizasyonu içinde uyumludur.

Manyetik kolloid (ferroakışkan) nano ya da mikrokürelerin hazırlanmasında önemli bir başlangıç bileşenidir. Nano ya da mikrokürelerin sentezinde farklı yöntem ve malzemeler kullanılmıştır. Taşıyıcı tipi (kimyasal bileşimi, partikül boyutu, gözeneklilik, hidrofilik ya da hidrofobik karakteri, manyetik özelliği ve minimal nonspesifik analit adsorpsiyonu) ve immobilizasyon işlemi de çeşitlilik göstermektedir. Mikrokürelerin manyetik özellikleri genellikle manyetik malzemenin seçimi, ağırlık derişimi ve polimer partiküller içerisindeki dağılımı ile belirlenir (Horak ve ark., 2007).

2.4.3.1. Manyetik Dolgular

2.4.3.1.1. Manyetik Karakteristikleri

Malzemenin manyetik özelliklerini tanımlayabilmek için; manyetiklik M (manyetik polarizasyon) ve maddelerin içindeki manyetik alan H arasındaki bağıntının belirlenmesi gerekir. Manyetik alandaki malzemenin davranışına göre maddeler (suprailetkenler hariç) iki gruba ayrılabilirler. Birinci grup zayıf manyetik davranışlı malzemeleri içerir. Onların manyetikliği sadece küçük değerlerde kalır. Ancak ikinci gruptaki yüksek manyetik davranışlı malzemeler hayli büyük değerlerde manyetikliğe ulaşırlar. Zayıf manyetik davranışlı malzemeler paramanyetik ve diyamanyetik olanlar şeklinde ikiye ayrılırlar ve alan şiddetine ve manyetikliğe karşı doğrusal bir bağımlılık gösterirler (Şekil 2.11.a). Bu doğrusallığın denklemi aşağıda gösterilmiştir.

$$M_{(r)} = V_m H_{(r)} \quad (2.2.)$$

V_m manyetik duyarlılık kavramını ifade eder. Diyamagnetler için küçük negatif değerlere (10^{-6}) ve paramanyetler için ise küçük pozitif değerlere (0-0.01) sahiptir. Manyetik duyarlılığın sıcaklık bağımlılığı ise aşağıda verilen Curie Kanunu ile tanımlanır.

$$V_m = C/T \quad (2.3.)$$

T mutlak sıcaklığı (K) ve C ise her madde için karakteristik olan Curie sabitini ifade eder. Her iki grubun maddeleri de ayırma ve taşınımı için ortam tasarlamaya elverişli değildir.

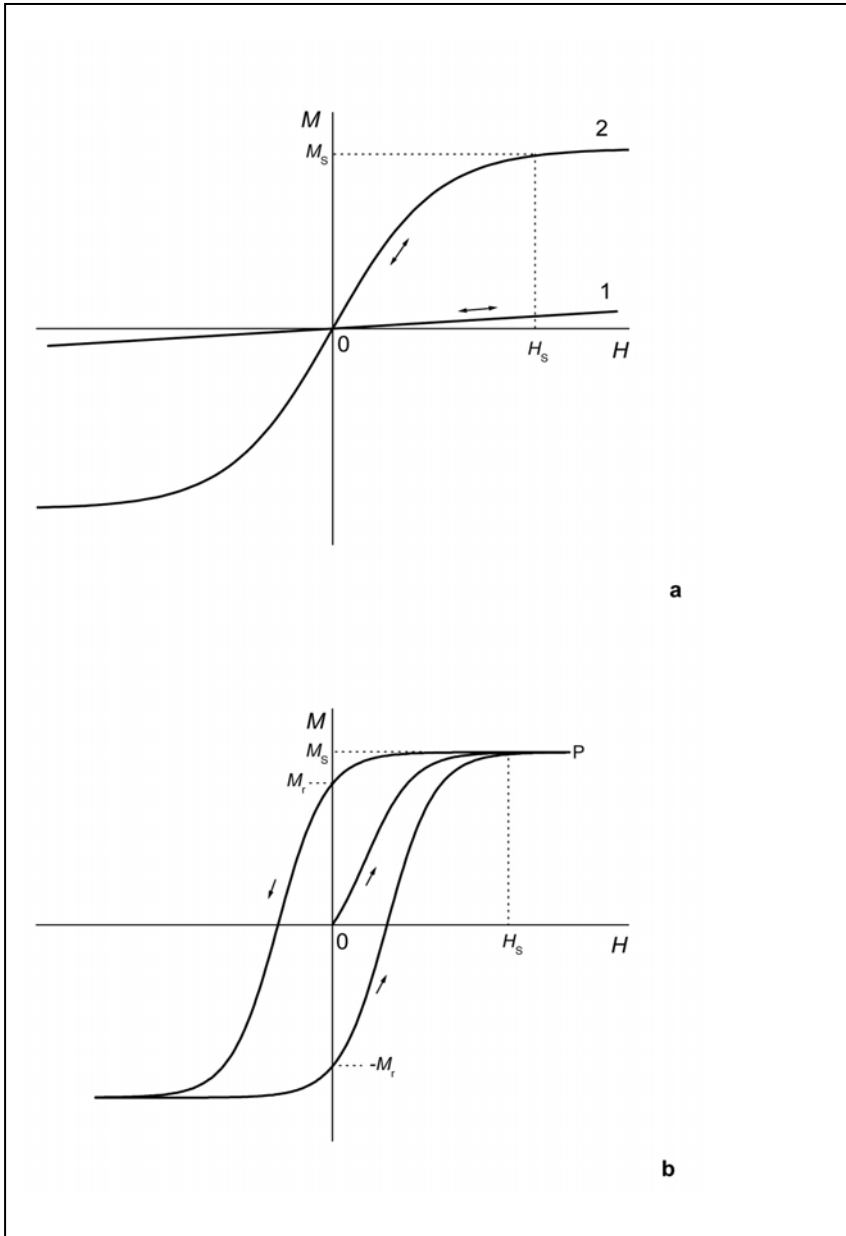
Güçlü manyetik davranışlı malzemelerin bu davranışlarının sebebi; manyetik etki alanlarındaki atomların düzenlenmemiş manyetik momentlerinin kendiliğinden sıralanmasıdır. Yüksek manyetik davranışlı malzemeleri; ferromanyetler, ferrimanyetler, antiferromanyetler ve diğerleri şeklinde sınıflandırmak mümkündür. Bunların para/diyamanyetlerden farkı sadece yüksek manyetiklik ve duyarlılık ($0.01-10^6$) değil, aynı zamanda histerezis eğrisi diye adlandırılan alan şiddetinin manyetikliğinin kompleks bir bağımlılığıdır (Şekil 2.11.b).

Manyetik sıralanma daima belirli bir kritik sıcaklığın altında ortaya çıkar. Bu kritik sıcaklık ferromanyetler için Curie Sıcaklığı T_c , ferrimanyetler ve antiferromanyetler için ise T_n olarak adlandırılır. Kritik sıcaklığın altında ferromanyetik maddelere uygulanan artan alan, doygunluk manyetikliği M_s 'e kadar manyetikliği artırır (Şekil 2.11.b). M_s değeri herhangi bir manyetik malzeme için çok önemli bir özelliktir ve sıcaklığa bağlıdır. T_c ve T_n sıcaklıklarının altındaki değerlerde M_s değeri artan sıcaklıkla azalır. Diğer bir önemli özellik de sıfır uygulanan alana denk gelen ve kalıcı manyetiklik M_r diye adlandırılan manyetiklik değeridir. Sıfır M_r değeri zıt yönlerde manyetik alan uygulayarak (zorlayıcı alan H_c) ya da T_c ve T_n sıcaklıklarının üstünde bir sıcaklık artışıyla kaydedilebilir. Malzemeler T_c ve T_n sıcaklıklarının üstünde manyetik özelliklerini kaybedebilirler ya da paramanyetik olabilirler. Bu durumda malzemenin genel manyetiklik davranışını da etkileyen manyetiklik geçmişini kaybettiği söylenebilir. Bu sebeplerden dolayı T_c ve T_n sıcaklıkları çok önemli özelliklerdir.

Süperparamanyetik davranış paramanyetik ve ferromanyetik davranışların bir bileşimi şeklinde tanımlanabilir. Süperparamanyetik malzemeler paramanyetiklerin de yaptığı gibi; T_c ve T_n sıcaklıklarının altında alan şiddeti üzerinde genellikle doğrusal bir manyetik bağımlılık gösterirler. Fakat M_s değerine ulaştıktan sonra manyetiklik hemen hemen sabit kalır (Şekil 2.11.a). Manyetik duyarlılık ise ferromanyetik ve paramanyetik malzemelerin arasında bir yerdedir.

Süperparamanyetiklik; yığın halde ferro/ferrimanyetik olan, malzemenin çok küçük kristalleriyle (1-30 nm) ortaya çıkarılır. Bu durum demiroksitler, ferritler ve alaşımlar (Fe-C, Fe-Co) gibi farklı malzemeler için gözlenmiştir. Kompleks süperparamanyetik davranış sadece malzeme bileşimine, kristal boyutuna ve sıcaklığa bağımlı değildir. Aynı zamanda komşu partiküllerden ve onların yüzey karakterlerinden de etkilenirler.

Nanometrik partikül boyutundan dolayı her partikül sahip oldukları manyetik alan tarafından komşu partiküllerin manyetik davranışını da etkiler. Yüzeyin karakteri ve bileşimi hacim (yığın) özelliklerinin aksine partikül malzemenin davranışında önemli oranda etkilidir. Yüzeye bağlı surfaktanların (yüzey aktif maddeler) ve partikül hazırlanmasından (çöken) arta kalan bileşiklerin manyetik özellikler üzerindeki etkileri büyüktür.



Şekil 2.11. (a) Sıfır remanansa sahip bir paramanyetik (1) ve bir süperparamanyetik (2) malzemenin manyetiklik eğrisi. Süperparamanyetik malzeme (2) hem manyetiklik M hem de doygun manyetiklik M_s değerleri açısından daha yüksek değerlere ulaşır. **(b)** Bir ferromanyetin histerezis eğrisi. O-P eğrisine göre; başlangıç durumunda manyetikleştirilmeyen bir örneğin manyetikliği M , alan şiddetindeki H artışla beraber artış gösterir. Eğrinin eğimi duyarlılık değerini verir. Manyetiklik alan şiddetindeki takip eden azalmayla beraber azalır- oklara bakınız. Alan şiddetindeki tekrarlanan siklik değişiklikler, oklarla da görüldüğü gibi manyetikliğin siklik değişikliğine yol açarlar. Eğer örnek manyetiklik doygunluğuna M_s ulaşmazsa, manyetiklik eğrisi benzer olur (Horak ve ark., 2007).

2.4.3.1.2. Polimer Dolgusu Olarak İnorganik Nanoküreler

İnorganik manyetik dolgu maddelerinde olması beklenen en önemli özellikler şunlardır:

Uygulanan dış manyetik alana iyi tepki vermelidir. Tepki ne kadar iyi olursa, uygulanan alanın gerekli şiddeti o kadar az olur ve işlem dinamiği o kadar iyi olur.

Remanansı çok düşük olmalıdır. Remanans ne kadar düşük olursa, dış manyetik alanı kapattıktan sonra partikül dağılımı o kadar iyi olur. Sıfır remanans dış manyetik alanı kapatıldıktan sonra partiküller arasında hiçbir manyetik etkileşime (agregasyon) yol açmazlar.

Boyutu (çap) küçük olmalıdır. Ayırma/taşınma işlemlerinin çoğunluğu heterojendir. Partiküller ne kadar küçük olursa, potansiyel etkileşim için uygun olan yüzey o kadar büyük olur.

Farklı pH ve redoks koşullarında iyi kimyasal kararlılık göstermelidirler. Ekonomik olmalıdırlar. Kolay üretilmelidirler. Düşük Curie sıcaklığına (100 °C'ye kadar) sahip süperparamanyetik ya da paramanyetik partiküller gereksinimleri yerine getirirler. Düşük Curie sıcaklığı (sıralanmış feri-/ferromanyetiklikten paramanyetik hale kadar geçiş sıcaklığı) manyetizmayı kontrol edebilmek için bir ön koşuldur.

Süperparamanyetik partiküllerin çapı nanometre boyutundadır. Süperparamanyetik partiküller aynı zamanda uygulanan manyetik alana gerekli tepkiyi verirler ve neredeyse sıfır remanansa sahiptirler.

Manyetik nanopartiküllerin sudaki ya da apolar çözücülerdeki kolloid dispersiyonları (manyetit ya da maghemit tipik olanlarıdır) manyetik akışkanlar ya da ferroakışkanlar diye adlandırılırlar ve son zamanlarda pek çok makalede ve monografılarda yeniden gözden geçirilmişlerdir (Horak ve ark., 2007).

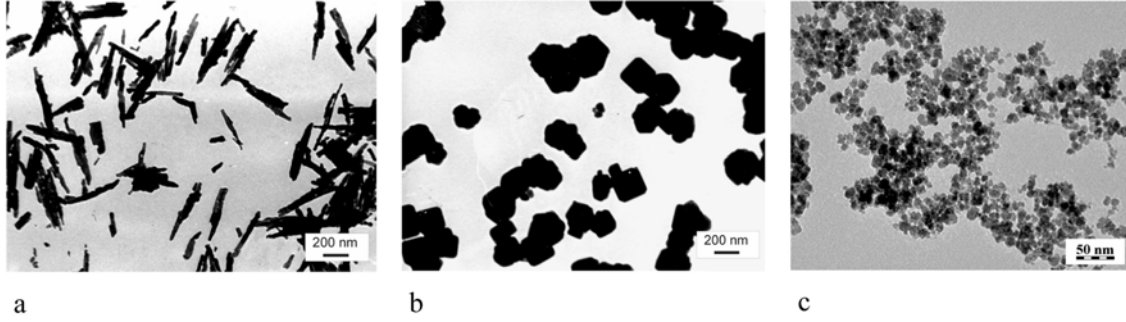
2.4.3.1.3. Demir Oksitler/Feritler

Demir oksitler farklı manyetik özellikler ile değişik kimyasal bileşenlerden oluşmaktadır. Ferrimanyetizma gösteren bu ilginç malzemeler $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, Fe_3O_4 , $\text{MO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ (M=Co, Mn, Ni veya Cu) gibi demir oksitlerdir. Ferrimanyetik demir oksitler geçiş metalleri gibi ferromanyetik metallere daha küçük bir manyetik cevap özelliği gösterirler. Fakat, demir oksitler yükseltgenmeye daha az duyarlı ve bu nedenle kararlı manyetik etkilerini korumaktadırlar (Güven, 2005).

“Demir oksitler” terimi $\text{Fe}_x\text{O}_y\text{H}_z$ (genellikle $z=0$ olur) formülüyle simgelenen çok sayıda bileşiği içerir. Ferritlerin kimyasal formülü genellikle $\text{MO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ biçimindedir. Ferrit yapısındaki M atomları Mn, Co, Zn, Cu ve Ni gibi tipik geçiş metalleridir.

Manyetit (M=Fe) diye adlandırılan malzeme de ferrit ailesindedir. Bu malzemelerden manyetit ve maghemitin en yüksek manyetik doygunluğa (80–100 $\text{A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$) sahip olmaları itibari ile istisnai önemleri vardır. Bu manyetik doygunluk diğer demir oksitlere göre iki sıra daha büyüktür. Onların kristalleriyle 30 nm’den daha düşük süperparamanyetik davranış gözlenmiştir. Bu tür kristaller için yaygın olarak süperparamanyetik demir oksit nanoküreleri (SPION) kavramı kullanılmaktadır. SPION’ların doygunluk manyetiklikleri çoğu zaman yığın halinden % 20–50 daha düşüktür. SPION’ların biyoyarırlıkları yakın zamanda gözden geçirilmiştir. Her iki süperparamanyetik malzeme de uygun fiyatlıdır ve hazırlanması kolaydır. Demir oksit bazlı ferroakışkanlar sıklıkla maghemit ve manyetit materyallerinin bir karışımı olarak da karşımıza çıkmaktadırlar.

Manyetit Fe_3O_4 ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) hem Fe(II) hem de Fe(III) iyonlarını içeren ters spinal yapıya sahip siyah bir ferrimanyetik oksittir. Sıklıkla maghemit için öncü olarak kullanılır. Manyetin mikrometre boyutundaki kristalleri (Şekil 2.12.a ve b); yüksek M_s değerlerinden dolayı manyetik şeritlerin üretiminde ve daha pek çok endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ancak mikrometre boyutundaki manyetin sıfır remanansa sahip olduğu da unutulmamalıdır. Tüm bu sebeplerden ötürü SPION partikülleri ayırma/taşınım işlemleri için dolgu malzemeleri olarak diğerlerine göre üstünlüklerini korumaktadırlar.



Şekil 2.12. (a) İğne modeli ve (b) kübik model manyetit için taramalı elektron mikrofrafı (c) Çökelmeyle birlikte elde edilen sitrik asitle stabilize edilmiş maghemitin transmisyon elektron mikrofrafı (Horak ve ark., 2007).

Çizelge 2.6. Manyetit ve maghemitin fiziksel özellikleri.

	Kristal yapısı	Hücre Boyutu (nm)	Renk	Doğunluk manyetikliği	Curie sıcaklığı
Manyetit	Kübik	$a_0=0.839$	Siyah	90-98	850
Maghemit	Kübik tetragonal	$a_0=0.834$	Kırmızı kahve	76-81	820-986

Çizelge 2.7. Demir oksihidroksit ve demir oksit türleri.

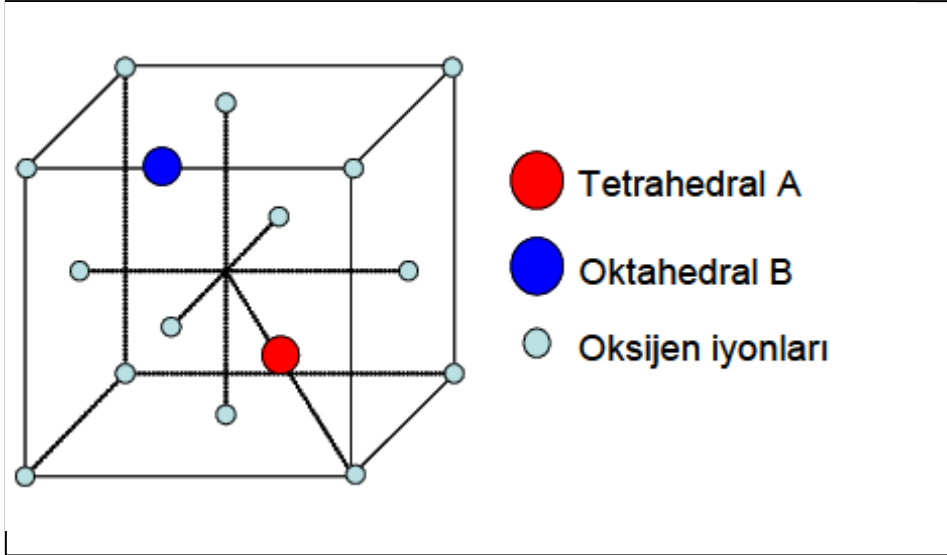
Mineral	Formül	Manyetik Özellik
Goethit	α -FeOOH	Antiferromanyetik
Akaganeit	β -FeOOH	Antiferromanyetik
Lepidocrocit	γ -FeOOH	Antiferromanyetik
Feroksait	σ -FeOOH	Ferrimanyetik
Ferrihidrit	$Fe_5HO_8 \cdot 4H_2O$	Antiferromanyetik
Hematit	α - Fe_2O_3	Zayıf ferrimanyetik
Maghemit	γ - Fe_2O_3	Ferrimanyetik
Manyetit	Fe_3O_4	Ferrimanyetik

Manyetit (Fe_3O_4) ve maghemit (γ - Fe_2O_3) en genel ve en çok araştırılan demir oksitlerdir. MO. Manyetit ve maghemit aynı fiziksel özelliklere ve kristal yapısına sahiptir (Çizelge 2.6.). Her ikisi de ferrimanyetik özellik gösterir (Çizelge 2.7.).

Fakat maghemit daha düşük doygunluk manyetikliğine sahiptir. Bunların manyetik cevapları alt örgü etkileşimleri nedeniyle değişmektedir. Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sadece Fe^{3+} iyonlarından oluşmaktadır. Kristal yapısında Fe^{3+} iyonlarının yarısı düzgün dört yüzlü diğer yarısı da düzgün sekiz yüzlü düzenlenmiştir (Güven, 2005).

2.4.3.1.4. Manyetit Kristal Yapısı ve Manyetik Özellikleri

Manyetit ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$), 1:2 molar oranında Fe^{3+} ve Fe^{2+} iyonlarından oluşmaktadır. Fe^{3+} iyonlarının yarısı düzgün dört yüzlü diğer yarısı düzgün sekiz yüzlü ve Fe^{2+} iyonlarının hepsi düzgün sekiz yüzlü olarak düzenlenmiştir (Şekil 2.13.) (Güven, 2005).

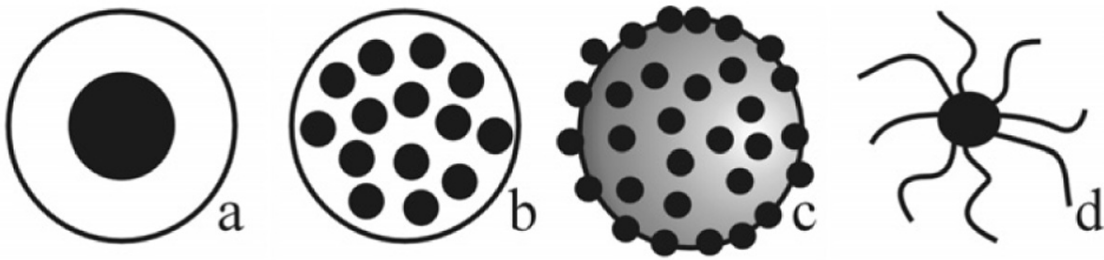


Şekil 2.13. Manyetitin ters spinel kristal yapısı.

Manyetit (Fe_3O_4), oksijen iyonlarının her üç eksen boyunca birbirine karşı gelen pozisyonlarda küp içerisinde düzenli yerleştiği kübik birim hücre merkezi şekil ile bir ters spinel kristal yapısına sahiptir. Birim hücre, 32 adet O^{2-} anyonu 16 adet Fe^{3+} katyonu ve 8 adet Fe^{2+} katyonları olmak üzere toplam 56 atomdan oluşmaktadır. Manyetitin kimyasal formülü Fe_3O_4 , fakat $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ olarak tanımlanmaktadır. Ters spinel yapı Fe^{3+} iyonlarının yarısı düzgün dört yüzlü, geri kalan Fe^{3+} iyonları ve Fe^{2+} iyonlarının hepsi düzgün sekiz yüzlü olarak düzenlenmiştir (Cornell, 1996; Brabers, 1995).

2.4.3.2. Manyetik Polimerlerin Hazırlanması

Manyetik polimerler, inorganik ve organik malzemelerin bir bileşkesidirler. Bunların hazırlanması için çok çeşitli yöntemler mevcuttur. Ancak her yöntemin partiküllerin içine hapsedilen manyetik malzeme miktarı, partikül boyutu ve polidispersite indeksi bakımından sınırlamaları da vardır. Hiçbir yöntem polimerlerin kullanımından beklenen bütün gereksinimlerin (biyoyarışır bir yüzeyle boyutu kontrol ederek manyetik dolguları tamamen hapsedmiş, fonksiyonelleştirilmiş eş boyutlu küresel partiküller üretebilmek gibi) hepsini yerine getiremez. Bir polimerin ya da monomerin bir manyetik dolgu maddesine karşı istenen afinitesi genellikle fonksiyonel gruplarla (OH, COOH, PO(OH)₂, NH₂), uygun seçilmiş çevreyle ya da elektrostatik etkileşimlerle sağlanır. Morfolojik yapı bakımından farklılık gösteren (Şekil 2.14. (a-d)) manyetik polimerlerin üretimini gerçekleştirebilecek çeşitli hazırlama yöntemleri mevcuttur. Manyetik polimer mikrokürelerin morfolojik yapıları; manyetik dolgu-polimer kabuğu (Şekil 2.14.a), polimer matrisin içine homojen olarak dağıtılmış manyetik çoklu dolgular (Şekil 2.14.b), bir polimer dolgunun yüzeyine yerleştirilmiş manyetik nanoküreler (çilek morfolojisi) (Şekil 2.14.c) ve fırça (saç) modeli (polimer zincirleri manyetik dolguya tutunurlar) (Şekil 2.14.d) olarak dört grupta incelenebilirler.



Şekil 2.14. Kompozit manyetik polimerlerin farklı morfolojik yapıları. (a) tek-dolgu, (b) çoklu-dolgu, (c) çilek ve (d) fırça (saç) modeli.

Nanokompozit polimerler ve manyetik çekirdeklerden (faz-ayırma, çözücü buharlaştırılması, tabaka yanında tabaka işlemi) üretilirler. Alternatif yöntem olarak da kimyasal metal oksit çöktürmesi (tortulanma) gibi polimer içinde/üstünde yani yerinde çöktürme yöntemi kullanılabilir. Bu yöntemler içerisinde manyetik nanoküre varlığında heterojen polimerizasyon yöntemleri en çok tercih edilenlerdir (Horak ve ark., 2007).

2.4.4. Ayırma Tekniklerinde Manyetik Polimerlerin Kullanılması

Manyetik polimerler bir süspansiyon içerisinde askıda bulunan diğer katı maddeler varlığında seçilmiş hedef türlerin manipülasyonuna ve in-vitro ayırımına imkân sağlarlar. İzole edilecek ya da saflaştırılacak başlıca türler arasında; antibadiler, peptitler, nükleik asitler, enzimler, proteinler, hücreler, bakteriler ve virüsler gibi bazı basit inorganik bileşikler ve biyomolekülleri örnek gösterebiliriz. Dolayısıyla bunları doğrudan fermantasyon bakteri besi ortamı, hücre parçacıkları, kan, plazma, dokular, gıda maddeleri, kesilmiş süt suyu, toprak ya da farklı kaynakların suları gibi kompleks biyolojik karışımlardan ve işlem çözeltilerinden ayırmak mümkündür. Manyetik ayırma teknikleri santrifüj ya da filtrasyon gibi ön işlemleri elemeyi sağlarlar. Bu teknikler hızlı, ılımlı ve ölçeklendirilebilir tekniklerdir. Ayrıca diğer tekniklerin uygulanmasının pratik olmadığı ya da imkânsız olduğu durumlarda kolaylıkla kullanılabilirler. Bu teknikleri iki grupta inceleyebiliriz:

- 1) İyon-değişimi Ayırma Teknikleri
- 2) Afinite Etkileşimine Dayanan Ayırma Teknikleri
 - a) Nükleik Asitlerin Ayrılması
 - b) Hücre Ayırımı ve Saptaması
 - c) Enzimlerin ve Diğer Proteinlerin İzolasyonu

2.4.4.1. Afinite Etkileşimine Dayanan Ayırma Teknikleri

Afinite kromatografisi iki tamamlayıcı bileşenin biyolojik etkileşimi esasına dayanan biyokimyasal karışımların seçimli ayrılması için bir yöntemidir. Bu iki tamamlayıcı bileşen antibadi ve antijen/virüs/hücre; lektin ve plisakkarit/glikoprotein/hücre yüzey reseptörü/hücre; nükleik asit ve tamamlayıcı baz dizilimi/histon/nükleik asit polimerazı; biyotin ve avidin/streptavidin gibi değişik türlerde olabilir. Afinite kolon kromatografisi için tanımlanan pek çok uygulama yöntemleri arasında en önemli etkileşimler manyetik desteklerde gerçekleşmiştir.

2.4.4.2. Enzimlerin ve Diğer Proteinlerin İzolasyonu

Yakın zamanlarda manyetik polimerler üzerinden proteinlerin ve peptitlerin afinite ayrıştırılmaları ve saflaştırılmaları tekrar incelenmiştir. Kısaca bu çalışmalar manyetik boya-ligand kromatografisini, geçiş metallerinin şelatlarıyla manyetik destekleri ve tamamlayıcı maddelerin izolasyonu için afinite ligandları kapsayan çalışmalardır. Literatürden örnek olarak; lizozimin, albüminin, alkol dehidrojenazın ve laktat dehidrojenazın izolasyonu ve saflaştırılması için CBF3GA'nın ya da Procion Red 120'nin grup seçici ligandlar olarak kullanıldığı çalışmaları gösterebiliriz (Horak ve ark., 2007).

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Maddeler

İnsan serum albümini (HSA) Fluka (Biochemika, İsviçre) firmasından temin edilmiş ve 4°C'de muhafaza edilmiştir. Boya ligand olarak kullanılan Cibacron Blue-F3GA Sigma (St. Louis, MO, ABD) firmasından alınmış ve herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmaksızın kullanılmıştır. Kullanılan 2-hidroksietil metakrilat monomerleri (HEMA, % 97) Sigma (Aldrich, Almanya) ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA, % 98) Merck (Schuchardt, Almanya) firmalarından temin edilmiş ve kullanılmadan önce düşük basınç altında damıtılarak polimerizasyon inhibitörlerinden arındırılmıştır. Monomerler kullanılıncaya kadar 4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Sodyum bikarbonat (NaHCO_3 , % 99.7–100.3), sodyum bisüfit (NaHSO_3 , minimum % 99) ve amonyum persülfat (APS, % 98) Sigma (Aldrich, Almanya) ve Poli(vinil alkol) (PVAL; MW: 16.000, % 98 hidroliz edilmiş) Acros (Organics, ABD) firmalarından temin edilmiştir. Nano boyutlu manyetit demir tozu (Fe_3O_4 , ortalama çapı \approx 20-50 nm) Sigma firmasından satın alınmıştır. Asetik asit ve kullanılan diğer kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir ve analitik saflıktadır. Deneyselerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmos Barnstead Ropure LP® birimi ile ve ardından Barnstead D3804 NANOpure organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun direnci 18 M Ω /cm'dir.

3.2. Deneysel Çalışmalar

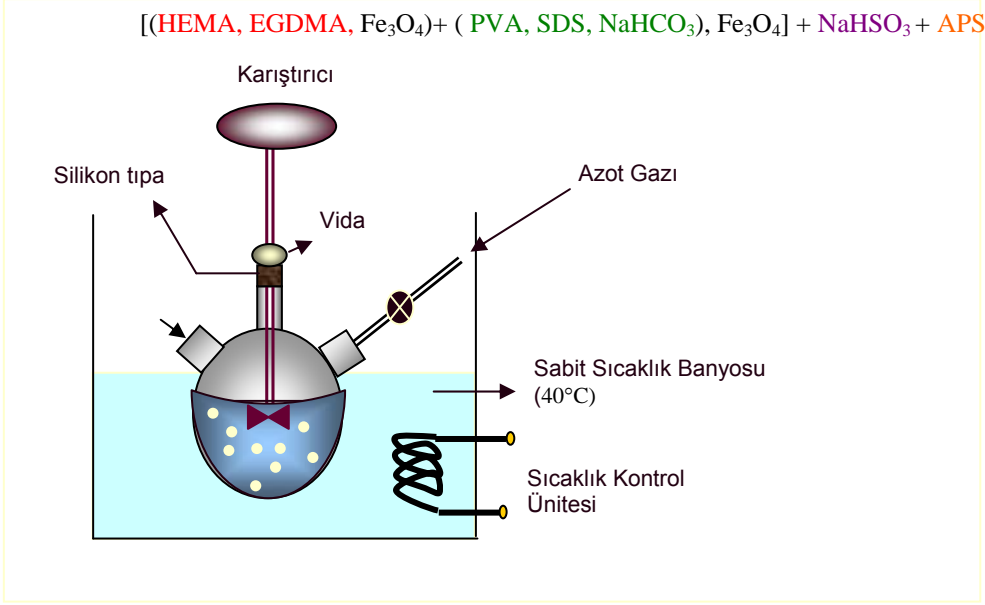
Sunulan araştırma kapsamında yapılan deneysel çalışmaları dört ana grup altında toplamak mümkündür. Bu ana gruplar:

- Manyetik poli(hidroksietil-metakrilat) (m-PHEMA) nanokürelerin sentezlenmesi ve Cibacron Blue F3GA (CBF3GA) bağlanması,
- Cibacron Blue F3GA bağlı m-PHEMA (CBF3GA/m-PHEMA) nanokürelerin karakterizasyonu,

- CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerle HSA adsorpsiyonu/desorpsiyonu,
- İnsan plazmasından seçici albümin azaltılmasıdır.

3.2.1.1. m-PHEMA Nanokürelerin Sentezlenmesi

Fe_3O_4 (manyetit) varlığında 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerlerin polimerizasyonu için modifiye edilmiş mikroemülsiyon polimerizasyonu yöntemi uygulanmıştır. Polimerizasyon yöntemi şu şekildedir: Sulu fazı oluşturmak için; 0.375 g stabilizör PVA, 57.7 mg sürfaktan SDS ve 46.9 mg $NaHCO_3$, 20 ml deiyonize (DI) suda çözülmüştür. Ardından 0.8 ml HEMA ve 4.2 ml çapraz bağlayıcı EGDMA organik fazı oluşturmak üzere karıştırılmıştır. 0.2 g manyetit (Fe_3O_4) bu organik faza eklenmiştir. Daha sonra organik faz su fazına yavaşça eklenerek reaksiyona takviye edilmiş ve ardından mikroemülsiyon oluşturmak üzere manyetik karıştırıcıda 200 rpm karıştırma hızında 15 dakika karıştırılarak son karışımın homojenizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra; manyetiteli mikroemülsiyon, manyetik karıştırıcıda 200 rpm karıştırma hızında 30 dakika karıştırılmış olan ikinci sulu faza (dağıtma ortamına) karıştırılarak eklenmiştir. Elde edilen son karışım 250 ml'lik üç boyunlu cam balona aktarılarak, 500 rpm karıştırma hızında yavaşça karıştırılarak ısıtılmıştır. Polimerleşme öncesi karışım 40°C'ye ulaştıktan sonra, reaksiyon ortamı 15 dakika boyunca oksijen ile yer değiştirmesi için azot gazına tabi tutulmuştur. Son olarak da 0.230 g $NaHSO_3$ ve 0.252 g APS başlatıcısı reaksiyon ortamına eklenerek, 24 saat polimerizasyona devam edilmiştir.



Şekil 3.1. m-PHEMA nanokürelerin hazırlanmasında kullanılan mikroemülsiyon polimerizasyonun şematik gösterimi.

Çizelge 3.1. 98.9 nm (Polidispersite: 0.156) boyutundaki nanokürelerin hazırlanma reçetesi.

	SDS (mg)	PVA (g)	NaHCO ₃ (mg)	Fe ₃ O ₄ (g)	HEMA (ml)	EGDMA (ml)	NaHSO ₃ (g)	APS (g)	DI su (ml)
Sulu faz	57.7	0.375	46.9	-	-	-	-	-	200
Yağ fazı	-	-	-	0.2	0.8	4.2	-	-	-
Polimerizasyon	-	-	-	-	-	-	0.230	0.252	-

Çizelge 3.2. 98.9 nm (Polidispersite: 0.156) boyutundaki nanokürelerin polimerizasyon koşulları.

Polimerizasyon Koşulları	Reaktör hacmi	Karıştırma Hızı	Zaman	Sıcaklık
	250 ml	500 rpm	24 saat	40°C

Reaktörün soğutma işleminden sonra, sentezlenen nanoküreler 30.000 rpm hızla santrifüjlenip çöktürülerek ortamdaki alınıştır. Sırasıyla etanol ve su ile yıkanarak çözünür bileşenler yapıdan tamamen uzaklaştırılmıştır. 98.9 nm boyutundaki (Polidispersite: 0.156) nanokürelerin hazırlanma reçetesi Çizelge 3.1.'de ve polimerizasyon koşulları ise Çizelge 3.2.'de detaylandırılmıştır. Polimerizasyon

tepkimesi tamamlandıktan sonra, çözünür bileşenler, polimerin su ve etanol ile yıkanmasıyla yapıdan uzaklaştırılmıştır. Üretilen polimerler; kullanılmadıkları zaman, mikrobiyal kirlenmeyi önlemek için % 0.02'lik NaN_3 çözeltisi içerisinde buzdolabında saklanmıştır.

3.2.1.1.1. Nanokürelerin Çöktürülmesi

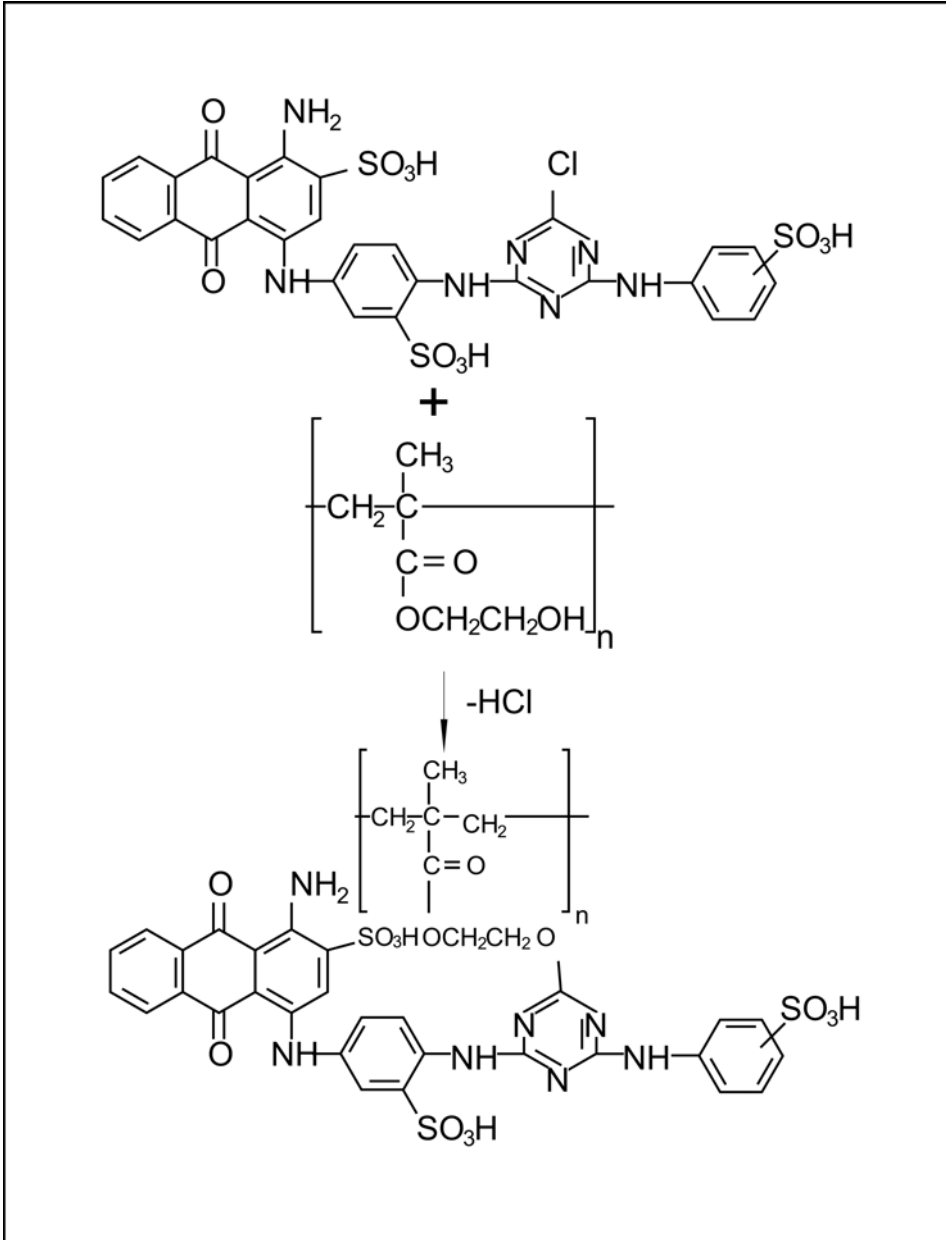
Gerek yıkama işlemlerinin gerçekleştirilmesi, gerekse adsorpsiyon deneylerinde nanokürelerin çöktürülmesi gerekmektedir. Bu amaçla ultrasantrifüj (Beckman Coulter, Allegra 64R, ABD) kullanılmıştır. Süspansiyon halindeki nanoküreler ependorf tüplerine konularak, 30.000 rpm hızda 1 saat süreyle santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Adsorpsiyon deneylerinde HSA derişimleri; santrifüjleme işlemi sonrasında elde edilen çözeltilerden spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

3.2.1.2. m-PHEMA Nanokürelere Cibacron Blue F3GA Bağlanması

Sentezlenen m-PHEMA nanokürelere Cibacron Blue F3GA (CBF3GA) triazin tekstil boyası ligand olarak immobilize edilmiştir. Reaksiyonda HCl molekülü çıkmaktadır. İmmobilizasyon reaksiyonunda, m-PHEMA'ların yüzeyindeki -OH grupları ile triazin halkasındaki -Cl grupları nükleofilik yer değiştirme gerçekleşmektedir. Şekil 3.2.'de Cibacron Blue F3GA'nın m-PHEMA'ya bağlanması verilmektedir.

Uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir: 0.10 g m-PHEMA nanoküre 4.0 g NaOH içeren 100 ml Cibacron Blue F3GA sulu çözeltisiyle kapalı bir reaktörde 80°C sabit sıcaklıkta manyetik karıştırıcıda 400 rpm karıştırma hızında 4 saat karıştırılarak reaksiyona tabi tutulmuştur. Cibacron Blue F3GA'nın reaksiyon ortamındaki başlangıç derişimi 1.0 mg/ml'dir. İnkübasyondan sonra Cibacron Blue F3GA bağlı nanoküreler; fiziksel olarak adsorblanmış olan tüm Cibacron Blue F3GA moleküllerini ortamdan uzaklaştırmak için; çöktürülmüş ve ardından distile su ve etanol ile defalarca yıkanmıştır. Modifiye edilmiş nanoküreler mikrobiyal kirlenmeyi önlemek için % 0.02'lik NaN_3 çözeltisi içerisinde buzdolabında saklanmıştır (Başar, Uzun, Güner ve ark., 2007). Nanokürelere bağlanan Cibacron Blue F3GA

miktarı elemental analiz cihazıyla azot ve kükürt sitokiyometrisinin ölçümü yöntemiyle saptanmıştır.



Şekil 3.2. Cibacron Blue F3GA'nın m-PHEMA'ya bağlanması (Başar ve ark., 2007).

3.2.2. CBF3GA/m-PHEMA Nanokürelerin Karakterizasyonu

3.2.2.1. Zeta Sizer ile Boyut Analizi

Sentezlenen m-PHEMA nanokürelerin boyut analizi, Nano Zeta Sizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile analiz edilmiştir. Zeta boyut ölçüm cihazının hücresi içine 1 ml süspansiyon halindeki m-PHEMA nanoküreleri konulup, kapağı kapatılarak ölçüme hazır hale getirilmiş ve analiz sonrası sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.2.2. Zeta Potansiyel ile Yüzey Yükü Analizi

Sentezlenen m-PHEMA nanokürelerin zeta potansiyelleri, Nano Zeta sizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile analiz edilmiştir. Bu amaçla zeta potansiyel ölçüm cihazının örnek haznesine 1 ml süspansiyon halindeki nanoküre çözeltisi enjekte edilmiş ve yüzey yükü ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3. Yüzey Alanı Analizi

m-PHEMA nanokürelerin yüzey alanı hesabında 1 ml süspansiyondaki partikül sayısını veren eşitlik (3.1.)'den yararlanılmıştır (Bangs, 1987).

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

Burada N, 1 ml süspansiyondaki nanopartikül sayısı; S % katı; d çap (μm); ρ_s polimer yoğunluğunu göstermektedir. Eşitlik (3.2)'den ise nanokürelerin spesifik yüzey alanı m^2/g biriminde hesaplanmıştır.

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

3.2.2.4. Morfolojik Analiz

3.2.2.4.1. AFM Çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında Cibacron Blue F3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin (CBF3GA/m-PHEMA) yüzeylerinin topografik görüntüleri atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir (Nanomagnetics Instruments, Oxford,

İngiltere). Yıkanmış örnekler mika saydamlar üzerine damlatılarak azot atmosferinde ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Mika saydamlar 45° açığa ayarlanıp partiküllerin onlara farklı şiddetlerde tutunmaları sağlanmıştır. Mika saydamlar üzerindeki örneklerin “Yarı değen” modda taramaları yapılarak, AFM görüntüleri elde edilmiştir.

3.2.2.4.2. SEM Çalışmaları

Manyetik nanokürelerin yüzey morfolojisi için kullanılan yöntemlerden biri de taramalı elektron mikroskobu (SEM) cihazıdır. Örnekler analiz edilmeden önce, başlangıçta 25°C’de havada kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Bu kurutulmuş örnek SEM analizi için örnek disklerinin üzerine yayılarak oda sıcaklığında sıvı fazın buharlaşması sağlanmıştır. Daha sonra vakum altında 100Å kalınlığında altın ile kaplanarak SEM cihazında (SEM, Phillips, XL-30S FEG, Almanya) farklı büyütme oranı ile fotoğraflanmıştır.

3.2.2.5. Elemental Analiz

Sentezlenen m-PHEMA nanokürelere bağlanan Cibacron Blue F3GA içeriğinin belirlenmesi için, elemental analiz cihazı kullanılmıştır. Elemental analizlerin belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Polimerik nanoküreler (1,0 mg) elemental analiz cihazının (Leco, CHNS-932, ABD) alüminyum örnek hücreesine yerleştirilerek $\pm 0,0001$ g hassaslıkla tartılmıştır. Polimerik nanoküreler cihaza konularak yakma işlemi sonucunda % kükürt (S) analizi yapılmıştır.

3.2.2.6. FTIR alışmaları

m-PHEMA'nın yığın yapısını incelemek amacıyla toplam yansıma bileşimine sahip Fourier Dönüşümlü Infrared FTIR (FTIR cihazı (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD)) kullanılmıştır. Analizden önce nanoküreler vakum etüvünde 24 saat kurutulmuştur. FTIR spektrumlarının elde edilmesi amacıyla 0,1g polimer örneği, 0,1g KBr (IR Grade, Merck, Almanya) ile karıştırılarak havanda dövölmüş ve hidrolik preste 600 kg/cm² basınçta 10 dakika bekletilerek ince bir tablet haline getirilmiştir. Hazırlanan tabletin 4600–400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında spektrumu alınmıştır.

3.2.2.7. Manyetik Analiz

3.2.2.7.1. ESR alışmaları

m-PHEMA nanokürelerin polimerik yapısındaki manyetik partiköllerin varlığı elektron spin rezonans (ESR) spektrofotometresi ile araştırılmıştır (EL 9, Varian, ABD).

3.2.2.7.2. VSM alışmaları

m-PHEMA nanokürelerin manyetiklik derecesi, titreştirici örnek manyetometresi (VSM) (Princeton Applied Research, Model 150 A, ABD) kullanılarak manyetik alanda ölçölmüştür.

3.2.2.8. Termal Analiz

3.2.2.8.1. DSC alışmaları

Manyetik analiz çalışmalarına ek olarak manyetit (Fe₃O₄) katılıminin polimer yapısına etkisini belirlemek ve nanokürelerin kararlılığındaki değişimi gözlemek için DSC kullanılmıştır. DSC verileri; Mettler 03 data arayüzlü TC10 TA işlemciye sahip DSC bağlantı parçasıyla donanmış bir Mettler TA 3000 sistemi kullanılarak

kaydedilmiştir. Sıcaklık Pt 100 sıcaklık sensörüyle ölçülmüştür. Örnekler (5 mg) 10°C/dk ısıtma hızıyla dinamik azot ortamında 500°C'ye kadar ısıtılmıştır.

3.2.2.8.2. TGA, DTG ve DTA Çalışmaları

Cibacron Blue F3GA bağlı polimerik m-PHEMA nanokürelerin inorganik faz (manyetit) içeriğini saptamak amacıyla termogravimetrik analiz cihazı (TGA 2950) kullanılmıştır. Termogravimetrik analiz 50 cm³/dk hava akış hızıyla ve 10°C/dk ısıtma hızıyla 0°C'den 900°C'ye ısıtılarak gerçekleştirilmiş ve ağırlık kayıpları incelenmiştir.

3.2.3. CBF3GA/m-PHEMA Nanokürelerle HSA Adsorpsiyonu

3.2.3.1. Sulu Çözeltilerden HSA Adsorpsiyonu

Cibacron Blue F3GA bağlı m-PHEMA nanokürelere (CBF3GA/m-PHEMA) HSA adsorpsiyonu deneyleri kesikli sistemde incelenmiştir. Adsorpsiyon deneylerinde; ortam pH'ının, başlangıç protein derişiminin, adsorpsiyon süresinin, tuz derişiminin ve ortam sıcaklığının HSA adsorpsiyonuna etkileri araştırılmıştır. Adsorpsiyon ortamının pH'ı farklı tampon sistemleri (pH 4.0–6.0 aralığı için; 0.1 M CH₃COONa-CH₃COOH, pH 6.0–8.0 için 0.1 M K₂HPO₄–KH₂PO₄) kullanılarak 4.0–8,0 aralığında değiştirilmiştir (Gökay ve Ayhan, 2005). İnsan serum albümini başlangıç derişimi 1,0–8,0 mg/ml aralığında incelenmiştir. Cibacron Blue F3GA bağlı polimerik m-PHEMA nanokürelere HSA adsorpsiyonunda etkin olan önemli değişkenlerden biri de adsorpsiyon süresidir. Bu amaçla süre olarak 15, 30, 60, 120, 180, 240 ve 300 dakikalık periyotlar kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon ortamı tuz derişiminin (iyonik şiddetin) etkisi ise; ise 0.01-0.15 M derişim aralığında NaCl içeren ortamda incelenmiştir. Adsorpsiyon ortam sıcaklığının HSA adsorpsiyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde de ortam sıcaklığı (4, 25 ve 40 ± 1°C olmak üzere) (Gökay ve Ayhan, 2005) üç farklı sıcaklığa ayarlanarak çalışılmıştır. Tipik bir adsorpsiyon deneyinde; önce HSA 4 ml tampon çözeltide çözülmüş, ardından 2.34 mg/ml süspansiyon halindeki nanokürelerden 1 ml eklenmiştir. Manyetik nanoküre eklenmiş ve

adsorpsiyon deneyleri boyunca (2 saat) 130 rpm hızda 25°C'de manyetik olarak karıştırılmıştır.

Bu denge periyodunun sonunda, (CBF3GA/m-PHEMA) nanoküreler tarafından adsorplanan HSA miktarı; Bradford protein analizi yöntemiyle (Bradford, 1976) Coomassie Brilliant Mavisi kullanılarak adsorpsiyon ortamındaki başlangıç ve son protein derişimlerinin ölçülmesiyle tayin edilmiştir (EK 1). Çözeltilerdeki HSA derişimi 595 nm'deki spektrofotometrik ölçümlerle saptanmıştır. Polimerik nanokürelerin HSA adsorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi için ise Eşitlik 3.3. kullanılmıştır.

$$q = [(C_0 - C)V]/m \quad (3.3.)$$

Burada q, birim nanoküre üzerine adsorplanan HSA kütlesini (mg/g); C₀ ve C sırasıyla, nanoküreler ile insan serum albümininin etkileştirilmelerinden önceki ve sonraki derişimlerini (mg/ml); V, hacmi (ml); m, deneylerde kullanılan nanoküre kütlesini (g) göstermektedir.

3.2.3.2. İnsan Plazmasından Seçici Albümin Azaltılması

Cibacron Blue F3GA bağlı polimerik m-PHEMA nanokürelerine insan serumundan HSA adsorpsiyonu için sağlıklı bir donörden alınan insan serumu ile çalışmalar in-vitro ortamda yapılmıştır. İnsan plazmasının normal HSA derişimi 37.8 mg/ml'dir. Adsorpsiyon deneyleri 25°C'de 130 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Cibacron Blue F3GA bağlı polimerik m-PHEMA nanoküreler tarafından adsorplanan HSA miktarı; plazmadaki başlangıç ve son protein derişimlerinin ölçülmesiyle tayin edilmiştir. Plazmanın seyreltilmesi için fosfat tampon tuzu (PBS) (pH:7.4 NaCl, % 0.9) kullanılmıştır.

3.2.3.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

HSA desorpsiyonu için oda sıcaklığında 1.0 M NaCl içeren pH 7.0 fosfat tampon kullanılmıştır. Desorpsiyon deneyleri, adsorpsiyon amacıyla da kullanılan kesikli sistemde incelenmiştir. HSA adsorplanmış polimerik nanoküreler, desorpsiyon

ortamında 25°C'de, 1 saat 130 rpm hızda sürekli karıştırılmıştır. Desorpsiyon ortamındaki HSA miktarı Bradford protein analizi yöntemine (Bradford, 1976) göre 595 nm'de spektrofotometrik yöntem ile Coomassie Brilliant Mavisini kullanılarak belirlenmiştir (EK 1). Desorpsiyon oranı Eşitlik 3.4. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Desorpsiyon} = (\text{Desorplanan HSA} / \text{Adsorplanan HSA}) \times 100 \quad (3.4.)$$

m-PHEMA nanoküreler tekrar kullanılabilirliğinin belirlenebilmesi için aynı nanokürelerle adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü 10 kez tekrarlanmıştır. Her desorpsiyon işlemi sonrasında, m-PHEMA nanoküreler, rejenerasyon ve sterilizasyon için 50 mM NaOH ile yıkanmıştır.

3.2.3.4. SDS-PAGE Analizi

CBF3GA/m-PHEMA nanokürelere, sulu çözeltiden ve insan plazmasından adsorplanan HSA ve desorplanan HSA'nın saflığını kontrol etmek amacıyla sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılmıştır. Elektroforezde izlenen yöntem, aşağıdaki bölümlerde ayrıntılarıyla birlikte verilmiştir:

Poliakrilamid jel, düzgün bir yüzey oluşması amacıyla iki elektroforez camının arasına dökülmüştür. Jel iki cam arasına dökülmeden önce camlar iyice temizlenmiş ve etanol ile silinmiştir. Jelin hazırlanışı sırasında N,N,N',N',tetrametiletilendiamin TEMED ve amonyum persülfat (APS) hariç diğer maddeler behere alınmıştır. Bu karışımın havasının alınması amacıyla 10 dakika sonikatörde muamele edilmiştir. Jel karışımına en son TEMED ve APS eklenmiş ve jel hızlıca camların arasına dökülmüştür. Jelde örneklerin yüklenebileceği boşluklar yaratmak amacıyla, tarak yerleştirilmiştir. Jel polimerleştikten sonra tarak dikkatlice çıkarılmış ve iki cam arasındaki jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Sulu HSA çözeltisi (2 mg/ml) ve insan plazmasının Cibacron Blue F3GA boya takılı m-PHEMA nanokürelerle 3 saatlik inkübasyon süresi ve desorpsiyonun ardından toplanan örnekler yükleme çözeltisi ile uygun oranlarda karıştırılmıştır. Hazırlanan örnekler denatüre edilmek üzere 65°C'de 5 dakika tutulmuş, ardından örnekler buza alınarak jele yüklenmiştir. Cihaz 200 V'da 2.5 saat boyunca

yürümeye bırakılmıştır. Bu süre sonunda jel boyama öncesi uygun çözeltiliye (% 5 asetik asit, % 50 metanol) alınmıştır.

Elde edilen SDS jelinin görüntülenmesi için gümüş nitrat ile boyama yöntemi poliakrilamid jeldeki proteinlerin boyanması için uygulanan en hassas yöntemlerden biridir. Blum ve arkadaşlarının (1987) çalışmalarında verilen gümüş nitrat boyama yöntemi uygulanmıştır. Yöntem şu basamakları içermektedir: Yürütme işleminden sonra jel metanol: asetik asit: su (50:5:45) karışımında en az bir saat bekletilmiştir. Bu aşamada proteinlerin jele sabitlenmesi sağlanmıştır. Sabitleme işleminden sonra jel iki kez ikişer dakika deiyonize su ile yıkanmış ve en az bir saat deiyonize su içinde bekletilmiştir. Jel deiyonize sudan alındıktan sonra bir ya da iki dakika % 0.02'lik sodyum tiyosülfat çözeltisi içine alınmıştır. Daha sonra iki kez 10'ar saniye olmak üzere deiyonize su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra jel % 0.1'lik gümüş nitrat çözeltisine alınmış ve çözelti içinde +4°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Gümüş nitrat çözeltisinden alınan jel deiyonize su ile iki kez 30'ar saniye yıkanmıştır. Jel, daha sonra % 2 sodyum karbonat ve % 0.04 formaldehit içeriğine sahip banyo çözeltisine alınmıştır. Jelde karma gerçekleşince reaksiyon % 1'lik asetik asit çözeltisi ile durdurulmuş ve jel % 1'lik asetik asit çözeltisinde saklanmıştır. Boyama işlemlerinin ardından jeller, Image Quant (Amerhsam, İngiltere) cihazında görüntülenmiştir.

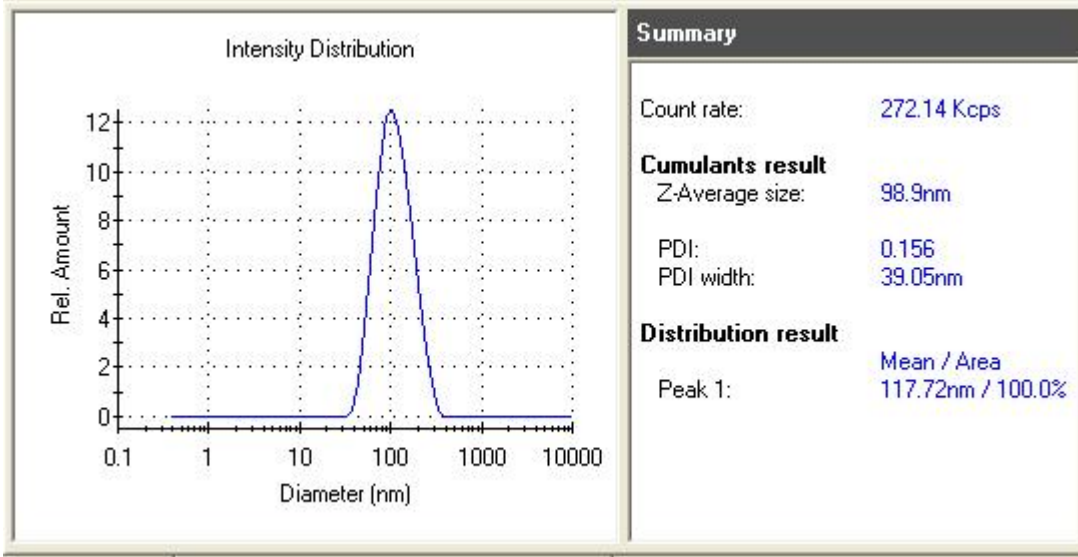
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. CBF3GA/m-PHEMA Nanokürelerin Karakterizasyonu

Çalışmanın bu bölümünde modifiye mikroemülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle hazırlanan nanokürelerin karakterizasyon sonuçları verilmiştir. Fe₃O₄ (manyetit) varlığında 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerinin polimerizasyonu ile hazırlanan m-PHEMA nanoküreler 98.9 nm boyutunda ve 0.156 polidispersite indeksine (PDI) sahiptirler. m-PHEMA nanoküreler; HEMA fonksiyonel monomerinin EGDMA çapraz bağlayıcısıyla SDS ve PVA karışımından oluşan sulu dağıtma ortamında başlatıcı olarak APS kullanılmasıyla sentezlenmiştir. Nanoküre “yüzey alanı/kütle” oranı oldukça yüksek hesaplanmıştır. Sentezlenen polimerin spesifik yüzey alanı 1302 m²/g olarak bulunmuştur. Sunulan araştırmanın bu aşamasında sentezlenen m-PHEMA nanokürelere Cibacron Blue F3GA triazin boya ligandı kovalent olarak bağlanmıştır. Cibacron Blue F3GA'nın biyokimyasal sistemler üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı daha önce rapor edilmiştir (Weber, 1979). Çalışmanın ikinci bölümünde sentezlenen Cibacron Blue F3GA bağlı m-PHEMA (CBF3GA/m-PHEMA) nanokürelerin boyut, boyut dağılımı (PDI), zeta sizer ile; yüzey yükü özellikleri, zeta potansiyeli ile; morfolojik özellikleri, AFM ve SEM ile; kimyasal yapısı, elemental analiz, FTIR, DSC, TGA, DTG, DTA ile ve manyetik özellikleri ise, ESR ve VSM ile karakterize edilmiştir. Gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları başlıklar halinde tartışılarak rapor edilmiştir.

4.2.1. Zeta Sizer ile Boyut Analizi

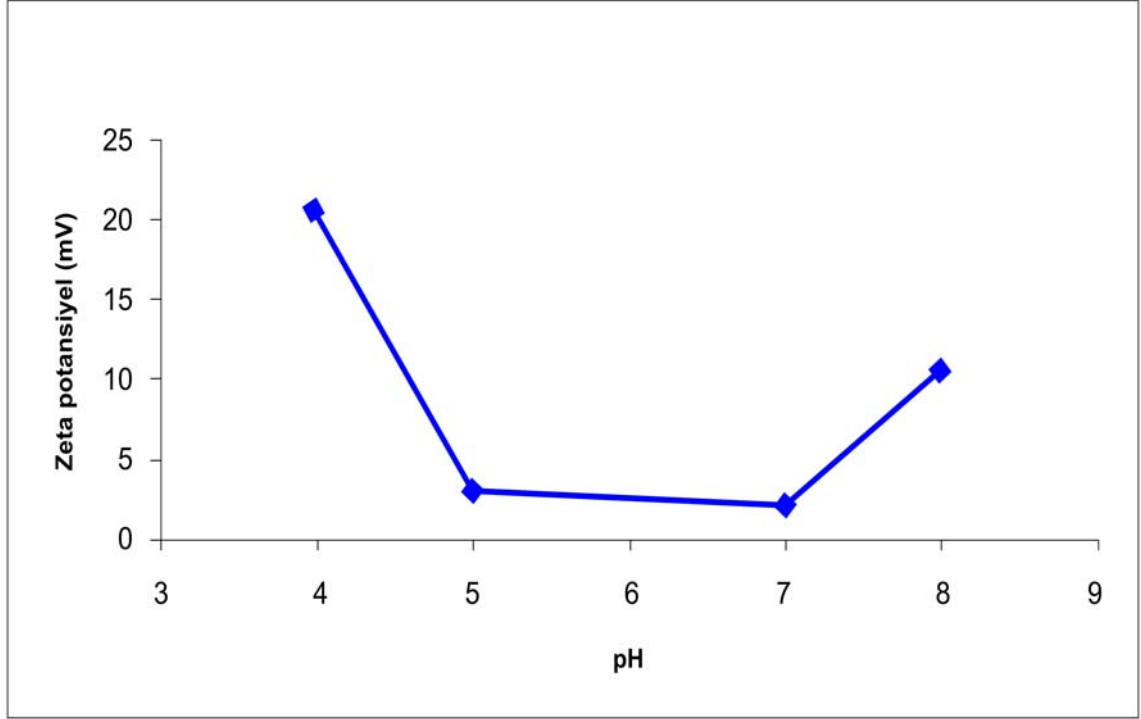
Sentezlenen m-PHEMA nanoküreler boyut analizi, Nano Zeta Sizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile analiz edilmiştir. Yaklaşık 98.9 nm boyuttaki nanokürelerin polidispersitesi 0,156 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1.). Şekilden de görüldüğü gibi; eş boyutlu, dar boyut dağılımına sahip manyetik nanoküreler başarıyla hazırlanmıştır.



Şekil 4.1. Sentezlenen manyetik özellikte polimerik nanokürelerin Zeta Sizer grafiği.

4.2.2. Zeta Potansiyel ile Yüzey Yükü Analizi

Zeta potansiyel değeri, kararlı bir partikül oluşumunu etkileyen (partiküllerin birbirine yapışmaları (mukoadezyon) gibi) önemli bir partikül karakteristiğidir. Teorik olarak pozitif ya da negatif değerdeki zeta potansiyel değerleri, kararlı partikül süspansiyonunun oluşmasına eşlik eder (Kumar ve ark., 2004). Aynı elektrik yüküne sahip partiküller arasındaki elektriksel itme kuvvetleri süspansiyon halindeki kürelerin kümeleşmesini (agregatlaşmasını) önler (Feng ve ark., 2001). Diğer taraftan partiküllerin birbirleriyle yapışması (mukoadezyon) pozitif zeta potansiyel değerleri ile desteklenebilir (Bayems ve ark., 1997). Sonuç olarak, partiküllerdeki pozitif yüklü gruplar varlığında mukus ve partikül arasındaki elektriksel yük etkileşimleri söz konusu olabilir (Kumar ve ark., 2004). Mikroemülsiyon polimerizasyonu tekniği ile 98.9 nm boyutunda hazırlanan m-PHEMA nanokürelerin pozitif zeta potansiyel değeri pH: 5.0'de 3.0 mV olarak bulunmuştur. Ayrıca pH: 4.0'de 20.7 mV, pH: 7.0'de 2.1 mV ve pH: 8.0'de 10.5 mV olarak kaydedilen pozitif zeta potansiyel değerleri de, sentezlenen nanoküre süspansiyonunun kararlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.2. Sentezlenen manyetik özellikte polimerik nanokürelerin farklı pH değerlerindeki Zeta Potansiyel grafiği.

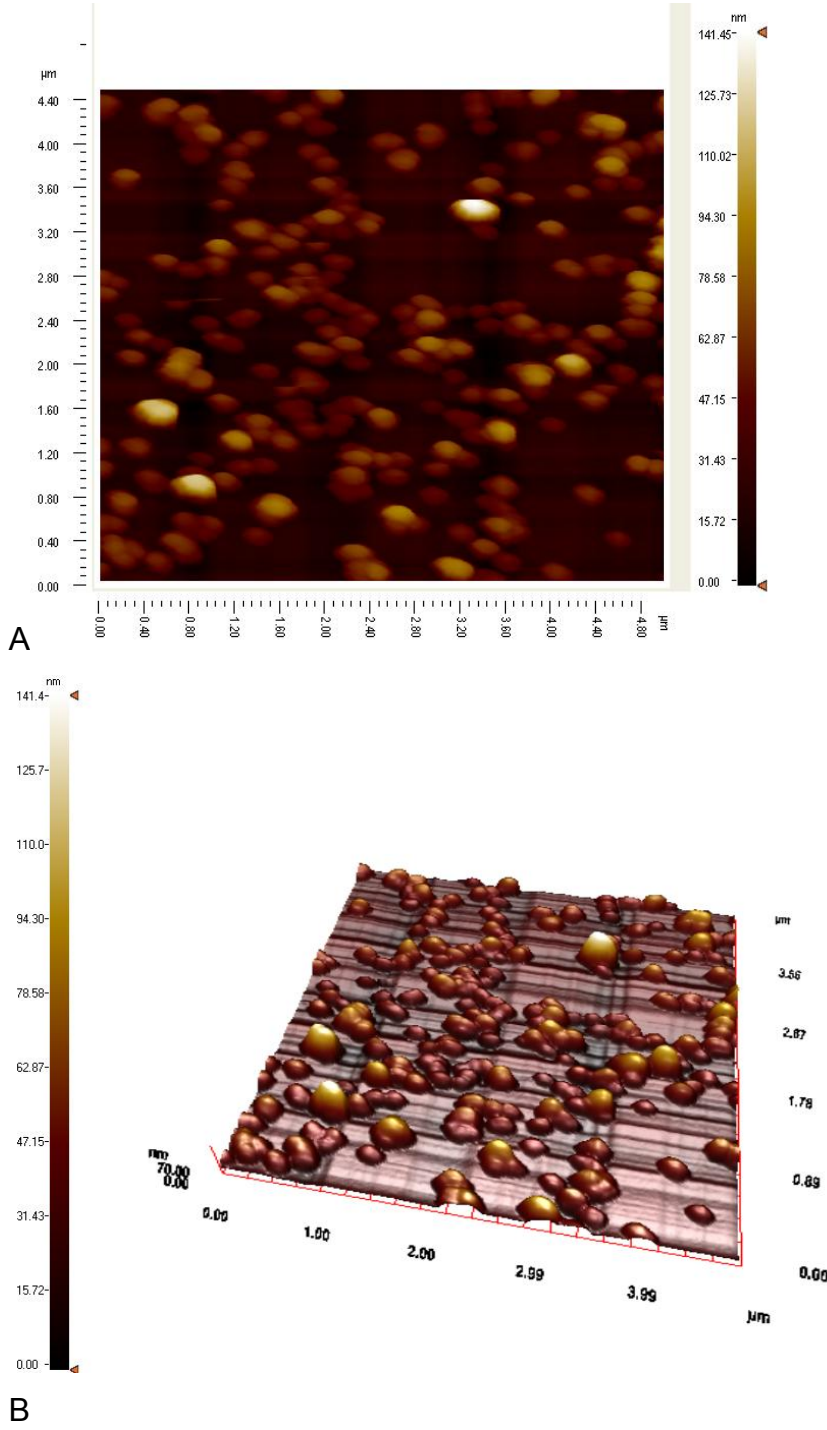
4.2.3. Yüzey Alanı Analizi

CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin spesifik yüzey alanı $1302 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Bulunan bu geniş yüzey alanı, düşük kütle transfer sınırlamaları oluşturduğundan dolayı; nanokürelerin oldukça yüksek adsorpsiyon kapasitelerine ulaşabilmelerini sağlayabilmektedir.

4.2.4. Morfolojik Analiz

4.2.4.1. AFM Çalışmaları

Cibacron Blue F3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin yüzey morfolojisi yarı değen modda AFM ile karakterize edilmiştir. Modifiye edilmiş m-PHEMA nanokürelerin maksimum partikül boyutu yaklaşık 141.45 nm olarak saptanmıştır (Şekil 4.3.).

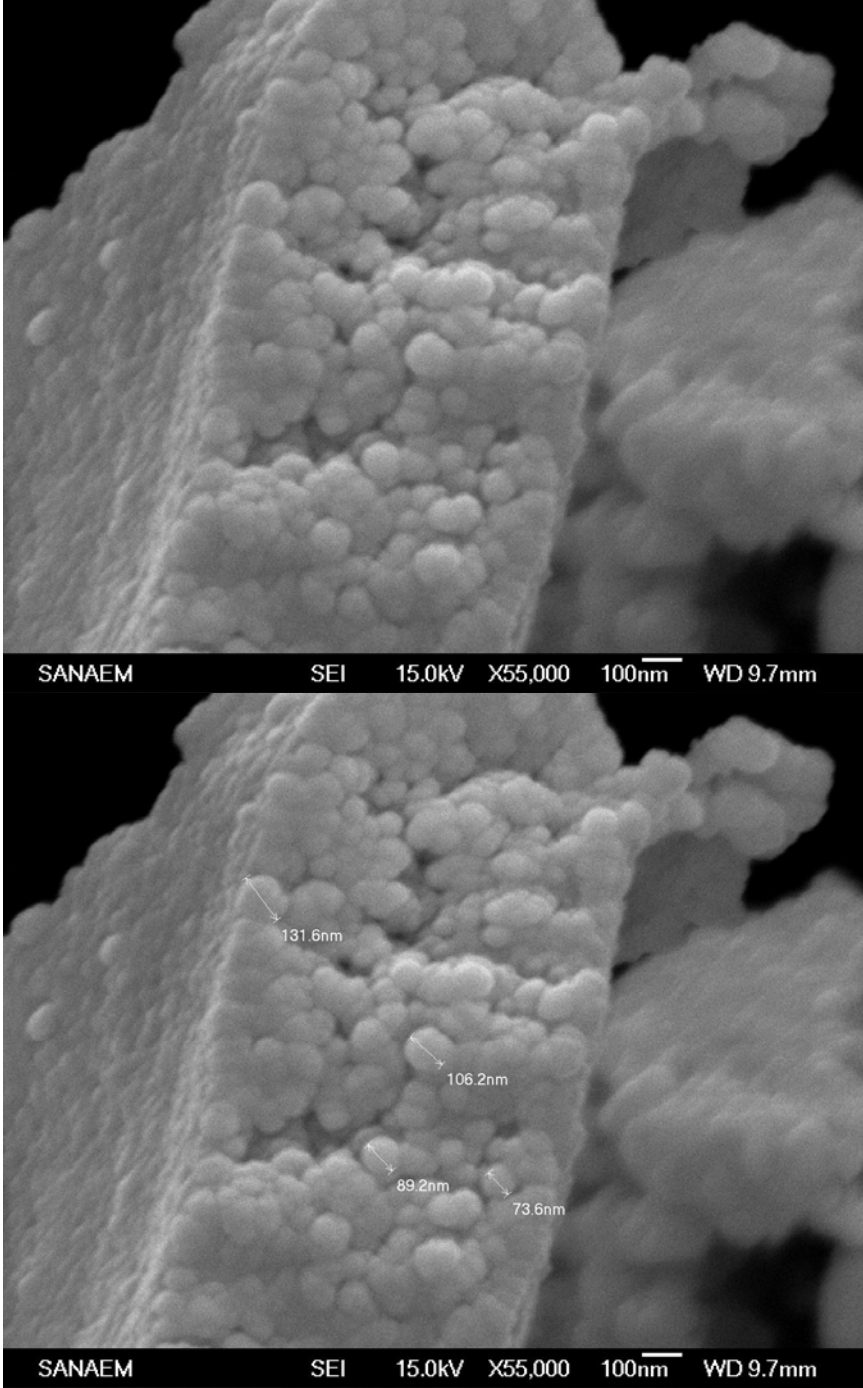


Şekil 4.3. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin AFM görüntüleri. (A) Yüzey Görüntüsü (B) 3B Görüntüsü (Zeta Sizer ile ölçülen partikül boyutu 98.9 nm).

Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi nanoküreler küresel ve eş boyutludur. Nanokürelerin dar boyut dağılımı adsorpsiyon dinamiklerini etkileyen önemli bir parametredir. Eş boyutlu yapı tekrarlanabilir adsorpsiyon işlemlerine olanak sağlamaktadır.

4.2.4.2. SEM Çalışmaları

CBF3GA bağlı m-PHEMA (CBF3GA/m-PHEMA) nanokürelerin yüzey morfolojisi taramalı elektron fotoğraflarıyla incelenmiştir. Kuru haldeki m-PHEMA nanokürelerle çekilen bu SEM fotoğraflarından; nanokürelerin küresel şekilde ve eş boyutlu (Şekil 4.4.) oldukları görülmektedir. SEM görüntülerinden nanokürelerin ortalama boyutlarının 100 nm civarında olduğu rahatlıkla görülmektedir.



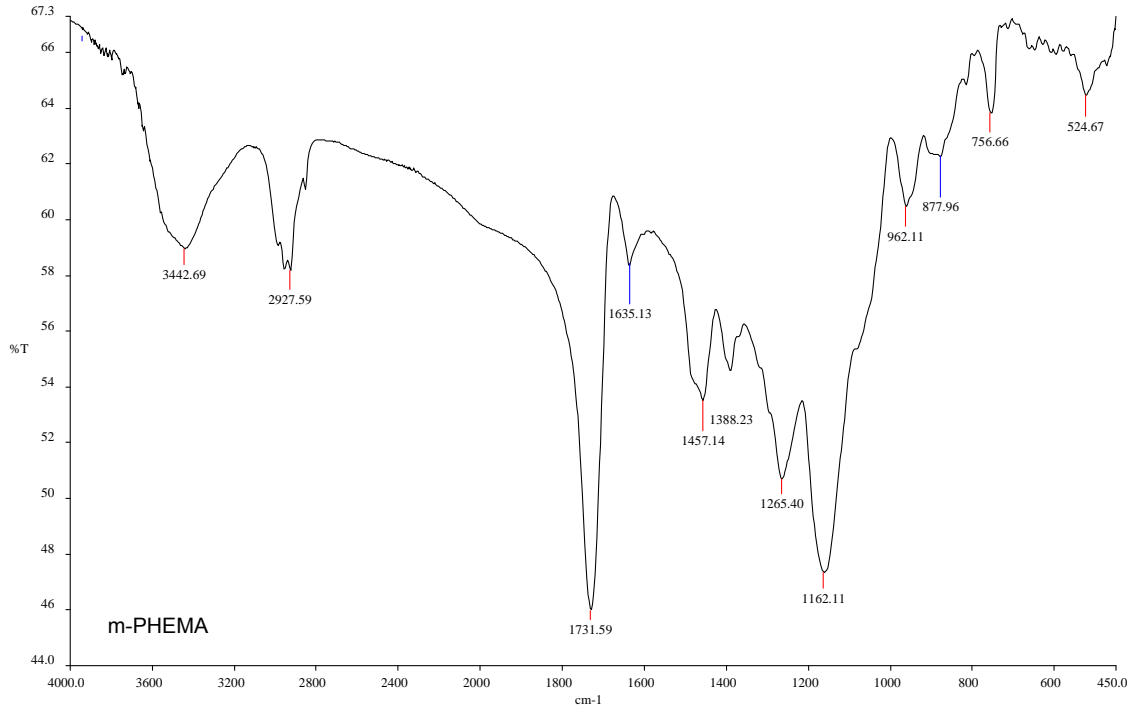
Şekil 4.4. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin SEM görüntüleri.

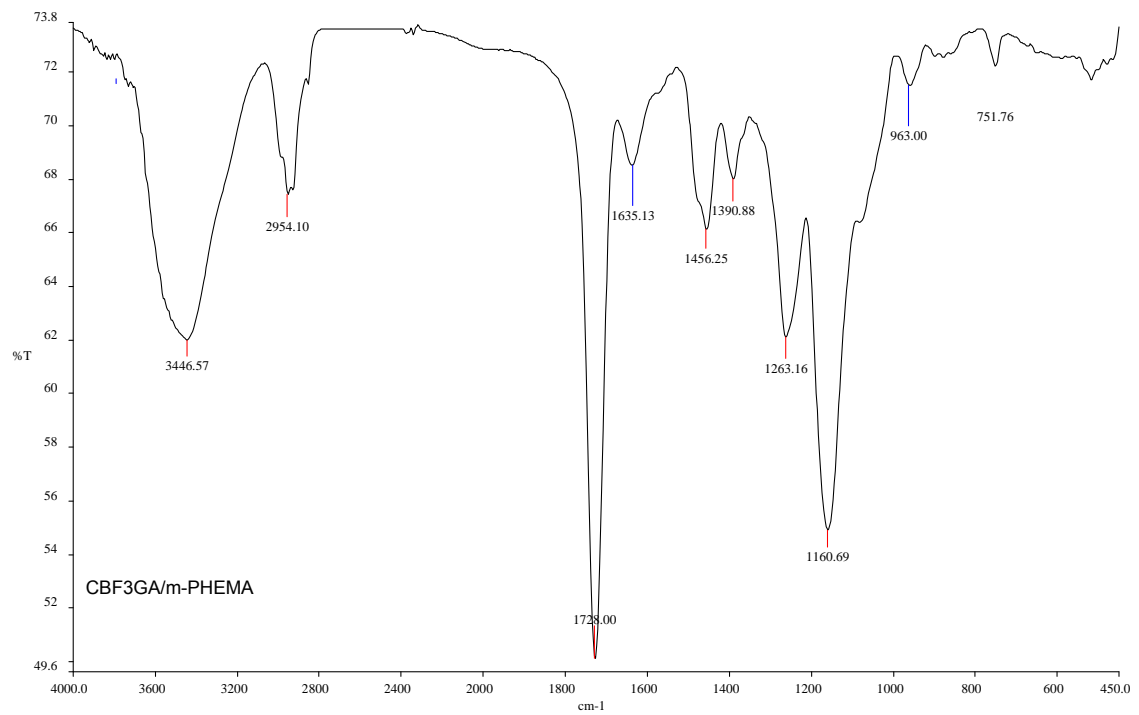
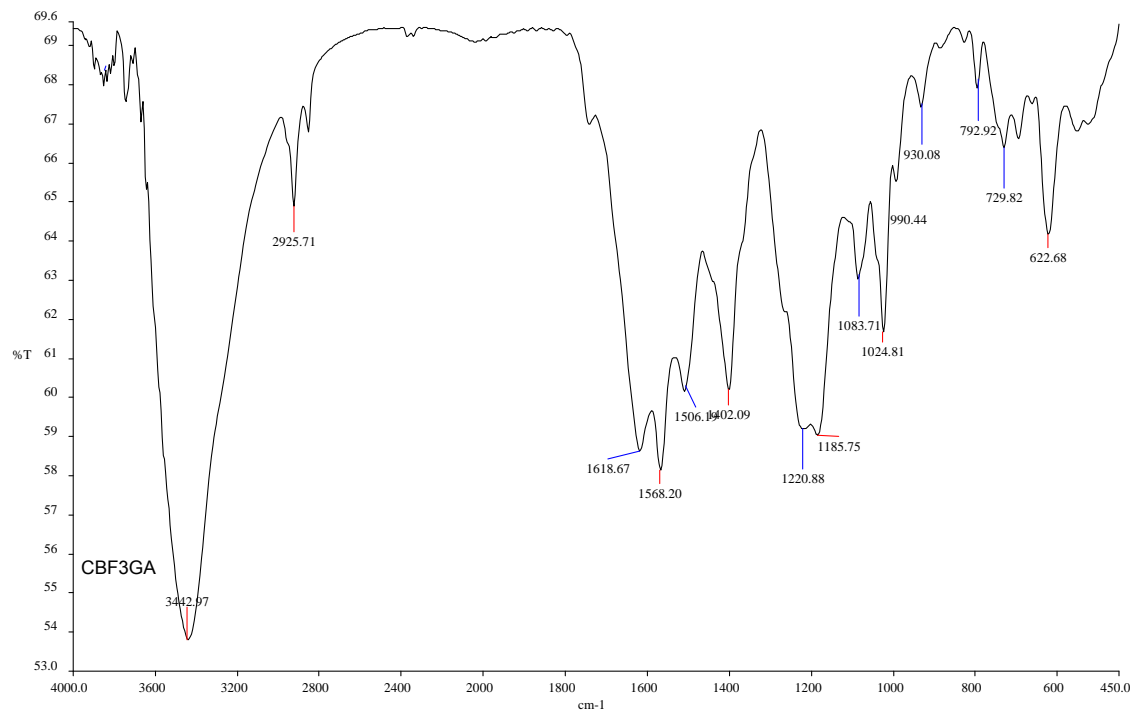
4.2.5. Elemental Analiz

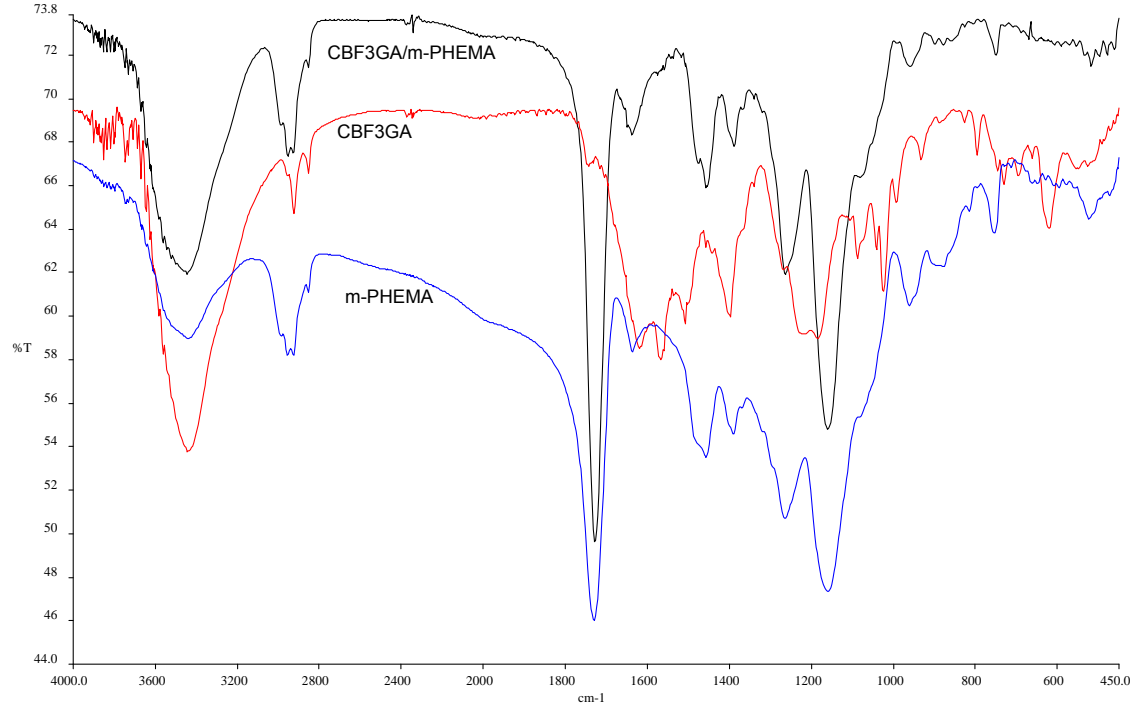
Elemental analiz ile kükürt sitokiyometrisinden faydalanılarak CBF3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin yapısına katılan boya-ligand Cibacron Blue F3GA miktarı 0.80 mmol/g olarak belirlenmiştir. m-PHEMA nanoküreler kükürt içermediğinden elemental analizle belirlenen kükürt miktarı nanokürelerin yapısına katılan Cibacron Blue F3GA'ya aittir.

4.2.6. FTIR çalışmaları

Araştırma kapsamında sentezlenen manyetik PHEMA'nın, kullanılan CBF3GA triazin tekstil boyasının ve sentezlenen CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin FTIR spektrumları çekilmiş ve Şekil 4.5.'de verilmiştir. Nanokürelerin FTIR spektrumlarında görülen karakteristik pikleri ise Çizelge 4.1.'de sunulmuştur.







Şekil 4.5. Manyetik PHEMA, CBF3GA ve CBF3GA/m-PHEMA nanokürelere ait FTIR spektrumları.

Çizelge 4.1. FTIR spektrumlarından elde edilen bazı karakteristik titreşim bantları.

	Dalga Sayısı (cm⁻¹)	Karakteristik pik
m-PHEMA	757 1162, 1265 1635 ± 15 1732 3443 ± 200	Fe-O gerilme C-O gerilme C=CH ₂ C=O gerilme O-H gerilme
CBF3GA	500-700 & 1084 1025 1221 ± 25 1506, 1568 1619 1732 3443 ± 50	C-Cl gerilme S-O gerilme S=O gerilme C=C gerilme C=N gerilme C=O gerilme N-H gerilme
CBF3GA/m-PHEMA	752 1161, 1263 1728	Fe-O gerilme C-O gerilme C=O gerilme

m-PHEMA nanokürelerin $3443-200\text{ cm}^{-1}$ de tespit edilen geniş keskin pik özellikle Hidrojen bağına katılmış ve katılmamış O-H gerilme titreşimini karakterize etmektedir. 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.

m-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. PHEMA'da makromoleküller içi, iç yan zincirler arası, komşu yan zincirler arası ve makromoleküller arası etkileşimlerden dolayı karmaşık hidrojen bağı yapıları beklenmesine rağmen; literatürde PHEMA'nın hidrojen bağları ile ilgili yapılmış pek fazla çalışma yoktur. Morita ve arkadaşları, PHEMA'nın katı haliyle yapmış olduğu IR spektrumu araştırmasında; PHEMA yan zincir terminalleri üzerindeki OH gruplarının % 47.3'ünün OH---O=C tipi hidrojen bağı yaparken, geri kalan OH gruplarının ise OH---OH tipi hidrojen bağlarına katkıda bulunduğunu rapor etmiştir (Morita ve ark., 2009).

1732 cm^{-1} frekansında görülen keskin pik m-PHEMA polimerinin C=O gerilme titreşimini karakterize eder. $1635 \pm 15\text{ cm}^{-1}$ değerlerinde ortaya çıkan zayıf bandın ise EGDMA çapraz bağlayıcısının $\text{C}=\text{CH}_2$ uç gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. 1265 ve 1162 cm^{-1} değerlerinde beliren geniş pikler de O-H gerilme titreşimlerini karakterize etmektedir. 757 cm^{-1} frekansında karşılaşılan pik ise Fe_3O_4 molekülünün Fe-O gerilme titreşimini işaret ederek m-PHEMA nanokürelerin manyetikliğini desteklemektedir.

Yine Şekil 4.5.'de sunulan CBF3GA'nın FTIR spektrumunda; boyanın N-H gerilme titreşim piki 3443 ± 50 frekans aralığında çoklu pikler olarak verilmiştir. Boyanın farklı amin grupları serbest ve H-bağlı olmaya meyilli olduğundan spektral durum düzenlidir. 1732 cm^{-1} 'deki orta şiddetli bant, 1619 cm^{-1} 'deki omuz ve 1568 ile 1506 cm^{-1} 'deki keskin pikler yapının C=O, C=N ve C=C gerilme titreşimlerini karakterize eden spektral kanıtlardır. 1221 cm^{-1} 'deki pik ve bu frekansın yaklaşık 25 cm^{-1} altında ve üstündeki geniş bant da S=O gerilme titreşimini karakterize eder. 1084 cm^{-1} 'de açıkça görünen pik ise C-Cl gerilmesine aittir. S-O gerilme titreşimi 1025

cm^{-1} frekansı gibi düşük dalgaboyunda da spektrumda görülür. Ek olarak boyanın C-Cl gerilim titreşimlerini $500\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında farklı dalgaboylarında görmek mümkündür.

Şekil 4.5.'de CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin IR spektrumunu göstermektedir. C=O bandı keskin bir pik olarak 1728 cm^{-1} frekansında gözlenmektedir. Bu 1650 cm^{-1} frekansındaki pik bandın kuvvetinin zayıf olduğunu ifade etmektedir. 1263 ile 1161 cm^{-1} 'deki pikler C-O gerilme titreşimlerini karakterize ederler. Orijinal Cibacron Blue F3GA'nın 1084 cm^{-1} 'deki gerilim titreşiminin 1081 cm^{-1} 'deki IR piklerinde; zayıf bir destek haline dönüşümü gözlenmektedir. Buna ilaveten $500\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığındaki CBF3GA C-Cl gerilim titreşimlerinin şiddetinde de önemli ölçüde bir azalma vardır.

4.2.7. Manyetik Analiz

4.2.7.1. ESR Çalışmaları

Şekil 4.6'da manyetik alana (Gauss) karşı manyetit pikinin şiddeti gözlemlenmektedir. Örneğe dış bir manyetik alanın uygulanması; dış alana eklenecek ya da dış alandan azaltılacak bir iç manyetik alan yaratabilir. Elektronik manyetik moment tarafından üretilen bölgesel manyetik alan etkin alanı (H_{etkin}) oluşturabilmek için, dış manyetik alana ($H_{\text{dış}}$) vektörel olarak eklenmelidir.

$$H_{\text{etkin}} = H_{\text{dış}} + H_{\text{bölgesel}} \quad (4.1.)$$

Şekil 4.6'dan saptanan bağıl sinyal şiddeti değeri 50'dir. Bu değer polimerik yapının içersindeki manyetitten dolayı bölgesel bir manyetik alana sahip olduğunun bir kanıtıdır.

ESR ile çiftleşmemiş elektronlara sahip molekül yada molekül parçaları analiz edilmektedir. Çiftleşmemiş elektronlara sahip moleküllerin manyetik özellik göstermeleri nedeniyle bu yöntemle maddelerin manyetik özellikte olup olmadığı belirlenebilmektedir. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi manyetit yüklü nanokürelerin geniş ve asimetrik tek çizgili bir rezonans eğrisine sahip olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla

polimerin kendisi herhangi bir manyetik özelliğe sahip değilken yapı içine manyetik özellik taşıyan manyetit çekirdeğin girmesiyle manyetik yüklü PHEMA nanoküreler elde edilmektedir. Elektron spin rezonansla polimerik yapı içinde manyetit partiküllerin varlığı gözlenmiştir.

Çiftleşmemiş elektron içeren bir maddeye uygulanan dış manyetik alan, manyetik momentlerle bağlantılı ΔE kadar enerji farkı olan enerji düzeyleri yaratır. Bu enerji düzeyleri arasındaki fark, $\Delta E = g \cdot \beta \cdot H$ kadardır. Bu enerji farkı mikro dalga enerjisine eşit olduğundaki manyetik alan rezonans alanı (H_r) olarak tanımlanmaktadır. Rezonans alanı ESR spektrumunda sinyal şiddetinin sıfır olduğundaki yani maksimum mikrodalga enerjisi soğurduğundaki manyetik alan değeridir. g ise spektroskopik yarıma çarpanı olup her maddenin kendine özgü karakteristik bir özelliğidir ve demir için bu değer 1.94 ve kobalt için 1.87'dir (Edwards, 1996).

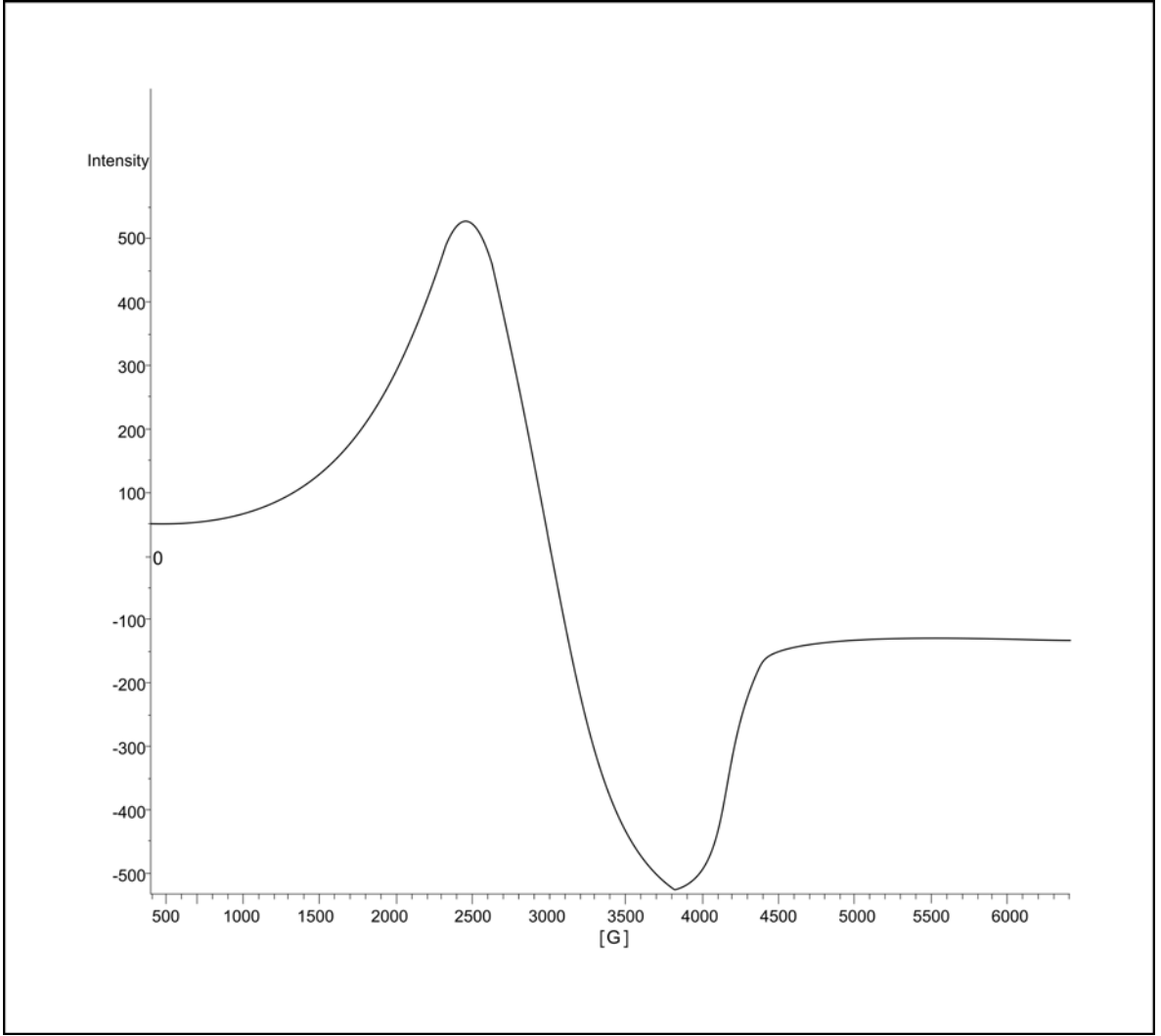
Şekil 4.6'da gösterilen g faktörü; eşleşmemiş elektron çiftlerinin yerleştiği moleküllerin karakteristik bir miktarı olarak da tanımlanabilir. Bilinmeyen bir sinyalin kaynağının tanımlanabilmesi için; g faktörünün belirlenmesi önemli bir destek olabilir. Literatürde Fe^{3+} iyonu için g faktörü düşük spin kompleksi için 1.4-3.1 ve yüksek spin kompleksi için 2.0-9.7 aralığında belirtilmektedir (Swartz ve ark., 1972). m-PHEMA nanoküreler için g faktörü aşağıdaki eşitliğe göre "2.3" olarak bulunmuştur.

$$g = hu / \beta H_r \quad (4.2.)$$

Burada h ; Planck sabiti (6.626×10^{-27} erg x s), u ; frekans (9.707×10^9 Hz), β ; evrensel sabit (9.274×10^{-21} erg/G) ve H_r ; manyetik alan rezonansı (G)' dir.

Manyetik PHEMA nanokürelerin sahip olduğu g faktörü değerinin, hem düşük spinli hem de yüksek spinli Fe^{3+} kompleksleri için belirtilen aralığa girdiği bulunmuştur.

Ayrıca 3050 Gauss değerindeki manyetik alan değerinin de 1.0 g m-PHEMA örneğinde bulunan tüm dipol momentleri uyarmak için yeterli olduğu tespit edilmiştir.

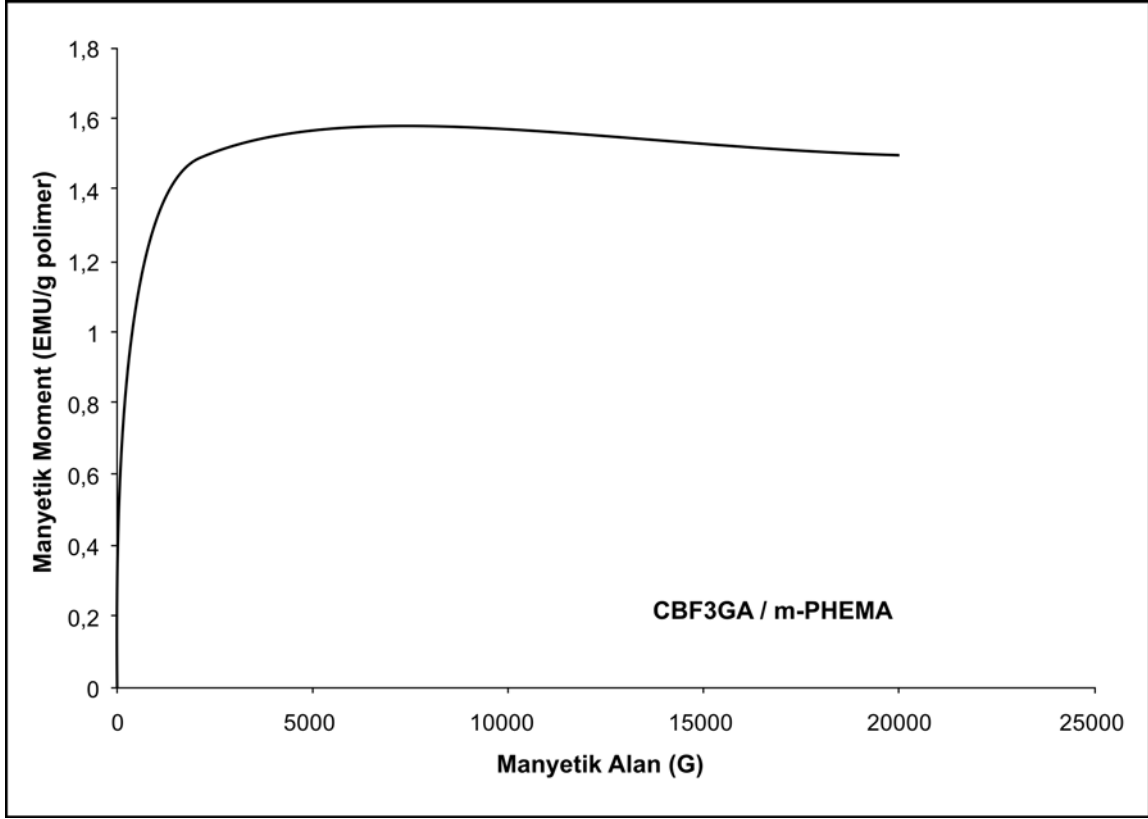


Şekil 4.6. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin ESR spektrumu.

4.2.7.2. VSM Çalışmaları

Şekil 4.7’de VSM ile elde edilen manyetizma eğrileri; Çizelge 4.2.’de de doygunluk manyetikliği (M_s), gram örnek başına rezidüel manyetiklik (M_r), bağlı doygunluk remanansı (arta kalan manyetiklik) ($m_r = M_r/M_s$) ve zorlayıcı alan (H_c) değerleri verilmiştir. Sentezlenen Cibacron Blue F3GA bağlı m-PHEMA nanoküreler oda sıcaklığında bir histerezis eğrisi göstermeksizin tipik bir süperparamanyetik davranış sergilemişlerdir. Düşük M_r/M_s oranı ve sıfır H_c değeri de süperparamanyetik davranışın kanıtı olmuştur.

Manyetik nanokürelerin doygunluk manyetikliğinin yığın malzemenin manyetizmasından daha az olduğu tespit edilmiştir. Buradaki manyetiklik kaybının nedeni; işlem boyunca gerçekleşen yükseltgenmelerin ve polimerizasyon boyunca oksitleyici başlatıcı fragmanlarının varlığının, bazı manyetik olmayan demir oksit moleküllerinin (Fe_2O_3) oluşumuna meydan vermeleri olabilir.



Şekil 4.7. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin manyetizma eğrisi.

Çizelge 4.2. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin manyetizma değerleri.

Doygunluk manyetikliği (M_s)	(emu/g manyetit)	1.5
Gram örnek başına rezidüel manyetiklik (M_r)	(emu/g manyetit)	0.2
Bağıl doygunluk remanansı ($m_r = M_r/M_s$)		0.133
Zorlayıcı alan (H_c)	(O_e)	0

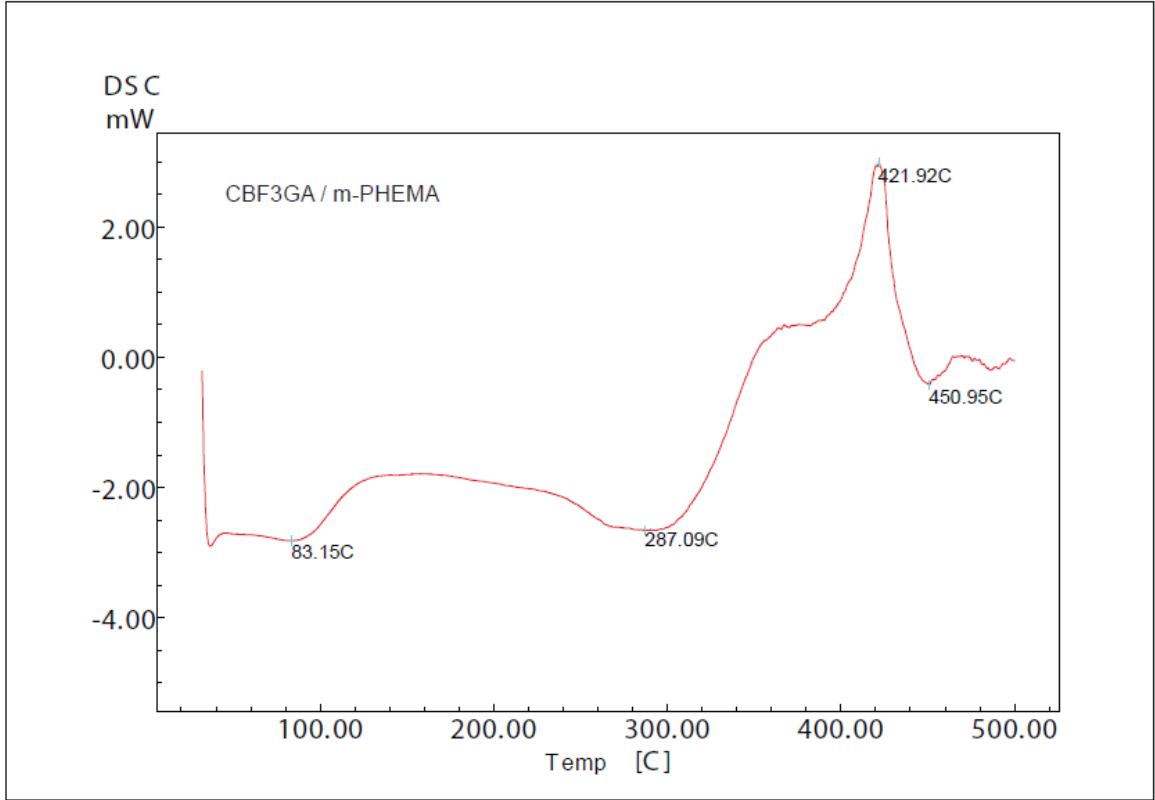
4.2.8. Termal Analiz

4.2.8.1. DSC Çalışmaları

Çalışma kapsamında sentezlenen manyetik yüklü nanokürelerin camsı geçiş sıcaklığı ve erime sıcaklığı gibi iki önemli ısıl özelliği DSC ile belirlenmiştir. Şekil 4.8.'de CBF3GA bağlı manyetik PHEMA nanokürelerin DSC termogramları verilmektedir. Çizelge 4.3.'de ise bu nanokürelere ait ısıl geçişler topluca sunulmuştur.

Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi CBF3GA bağlı manyetik PHEMA nanokürelerin DSC termogramından camsı geçiş sıcaklığı (T_g) 83.15°C, erime sıcaklığı (T_m) 287.09°C'dir. Manyetit içermeyen PHEMA için literatürde tespit edilen camsı geçiş sıcaklığı (T_g) 79.2°C olarak rapor edilmiştir (Ferreira ve ark., 2000). Manyetit içeren aynı polimerin camsı geçiş sıcaklığının arttığı görülmektedir. Bu da yapı içindeki manyetit nanokürelerinin ısıl kararlılığı artırdığını göstermektedir. DSC termogramlarına bakıldığında manyetit içeren polimerin bozunma sıcaklıkları 421.2°C ve 450.95°C'de gözlenmektedir. Bu da polimer içindeki manyetitin ısıl kararlılığı artırdığını göstermektedir. Literatürde de benzer sonuçlar mevcuttur.

Ayrıca DSC grafiğinde yaklaşık 190°C'deki ekzotermik pik manyetitin maghemite geçişini göstermektedir. 300°C üzerindeki sıcaklıklarda maghemitin hematite oksitlendiği rapor edilmiştir (Lauer ve ark., 2000). Dolayısıyla yaklaşık 422°C'deki ikinci ekzotermik pik de maghemitin hematite yükseltgenmesini göstermektedir.



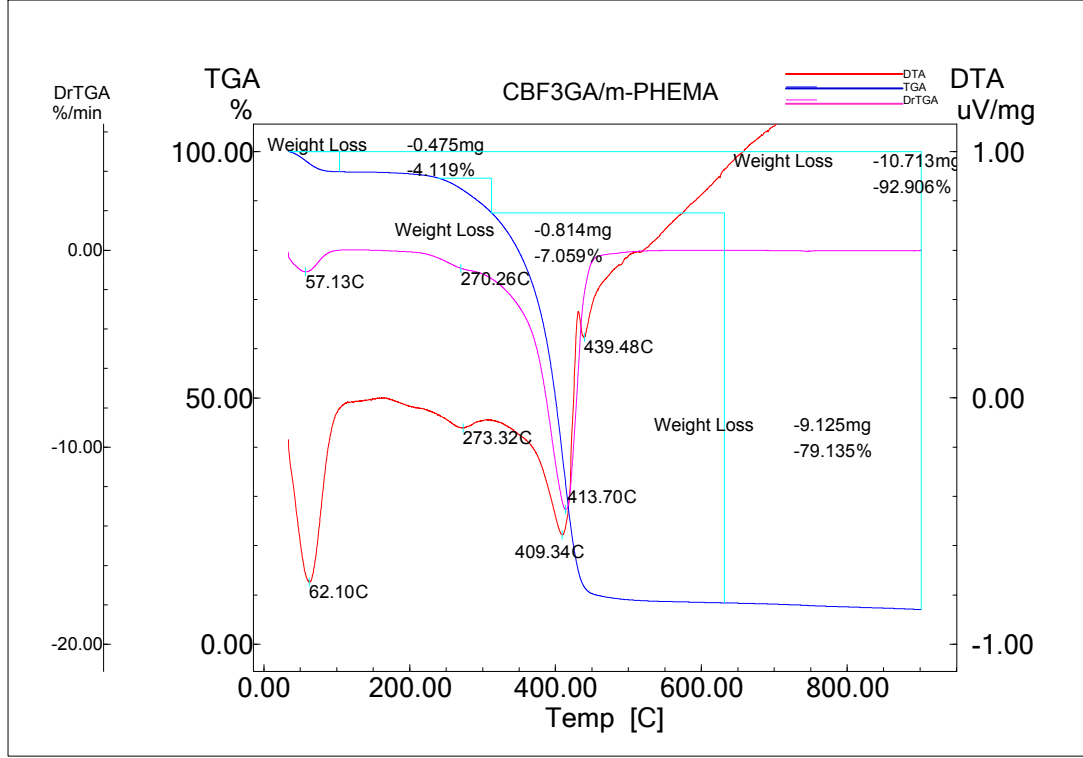
Şekil 4.8. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin DSC grafiği.

Çizelge 4.3. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin camı geçiş (T_g), erime (T_m) ve bozunma (T_d) sıcaklıkları.

Polimer	T_g (°C)	T_m (°C)	T_d (°C)
CBF3GA bağlı m-PHEMA	83.15	287.09	421.2- 450.95

4.2.8.2. TGA, DTG ve DTA Çalışmaları

Şekil 4.9.'da CBF3GA bağlı manyetik PHEMA nanokürelerin termal analizi sonucu elde edilen grafikte; mavi eğri termogravimetrik analiz (TGA) grafiği olup sıcaklık değişimine bağlı ağırlık kaybını verir, pembe eğri TGA eğrisinin türevi (DTG) olup maksimum ağırlık kayıplarının hangi sıcaklıklarda gerçekleştiğini gösterir ve kırmızı eğri ise diferansiyel termal analiz grafiği olup (DTA) endotermik veya ekzotermik reaksiyonların izlenmesini sağlar.



Şekil 4.9. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin TGA, DTG ve DTA grafikleri.

DTA grafiği dört farklı sıcaklıkta endotermik reaksiyonların gerçekleştiğine işaret etmektedir. DTG eğrisi ise maksimum ağırlık kayıplarının gerçekleştiği üç endotermik reaksiyonun meydana gelmiş olduğu sıcaklıkların; 57.13°C, 270.26°C ve 413.70°C olduğunu açıkça göstermektedir. Burada ilk olarak 57.13°C sıcaklıkta fiziksel olarak adsorplanmış su yapıdan ayrılmaktadır. Daha sonra 270.26°C sıcaklıkta polimer erimeye başlamaktadır ve 413.70°C sıcaklıkta ise polimer artık termal bozunmaya uğramış durumdadır. Yapıdan geriye sadece yüksek sıcaklıklara dayanabilen inorganik bir madde türü olan manyetit kalmıştır. Manyetin de bir kısmının maghemit ve hematite ekzotermik olarak dönüşmüş olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

TGA ölçümleri 4-basamaklı bir bozunma göstermiştir: 1.bozunma 50–105°C arasında yaklaşık % 4.119 kütle kaybıyla, 2.bozunma 105–315°C arasında yaklaşık % 7.059 kütle kaybıyla, 3.bozunma 315–625 °C arasında yaklaşık % 79.135 kütle kaybıyla ve 4.bozunma ise 625–900°C arasında yaklaşık % 2.593 kütle kaybıyla gerçekleşmiştir. Şekil 4.9.'da açıkça görünen bu değerler Cibacron Blue F3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin yapılarında % 7.094 oranında inorganik

manyetit içerdiklerini ortaya çıkarmıştır. Polimerik nanokürelerin yüksek manyetit içeriği; bir dış manyetik alan içerisinde kuvvetli bir manyetik duyarlılığa sahip olduklarının kanıtıdır. Böylece manyetik polimer nanoküreler dış manyetik alana doğru çok hızlı bir şekilde hareket ederler ve çok kısa bir sürede de sudan tamamen ayrıştırılabilirler. Sonuç olarak manyetik polimer nanokürelerin manyetizma özelliklerinin manyetik ayırma işlemleri için yeterince kuvvetli olduğu tespit edilmiştir (Zheng, 2005).

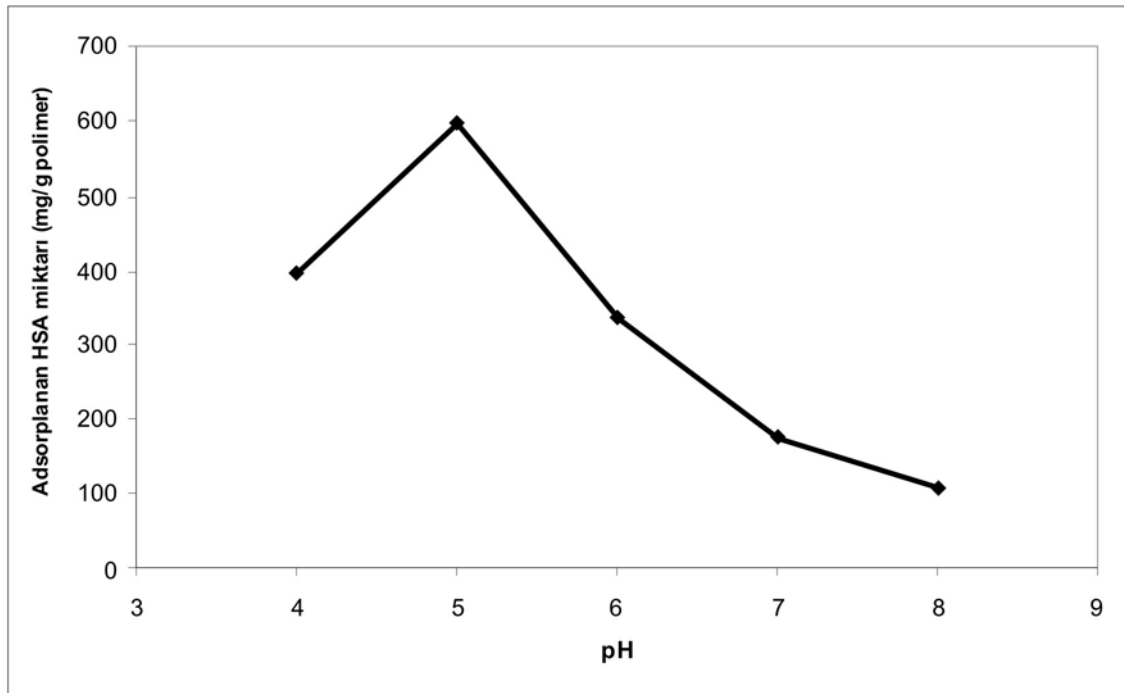
4.3. CBF3GA/m-PHEMA Nanokürelerle HSA Adsorpsiyonu

4.3.1. Sulu Çözeltilerden HSA Adsorpsiyonu

HSA adsorpsiyonu yüklü HSA molekülleri ve immobilize edilmiş CBF3GA arasındaki elektrostatik ve/veya hidrofobik etkileşimleri barındırır.

4.3.1.1. pH Etkisi

CBF3GA/m-PHEMA nanokürelere HSA adsorpsiyonuna pH'ın etkisi pH: 4.0–8.0 aralığında incelenmiştir (Şekil 4.10.). Sulu HSA çözeltilerinin tamponlanması için 0.1 M asetat (pH:5, pH: 6) ve 0.1 M fosfat (pH:6, pH: 8) tamponları kullanılmıştır.



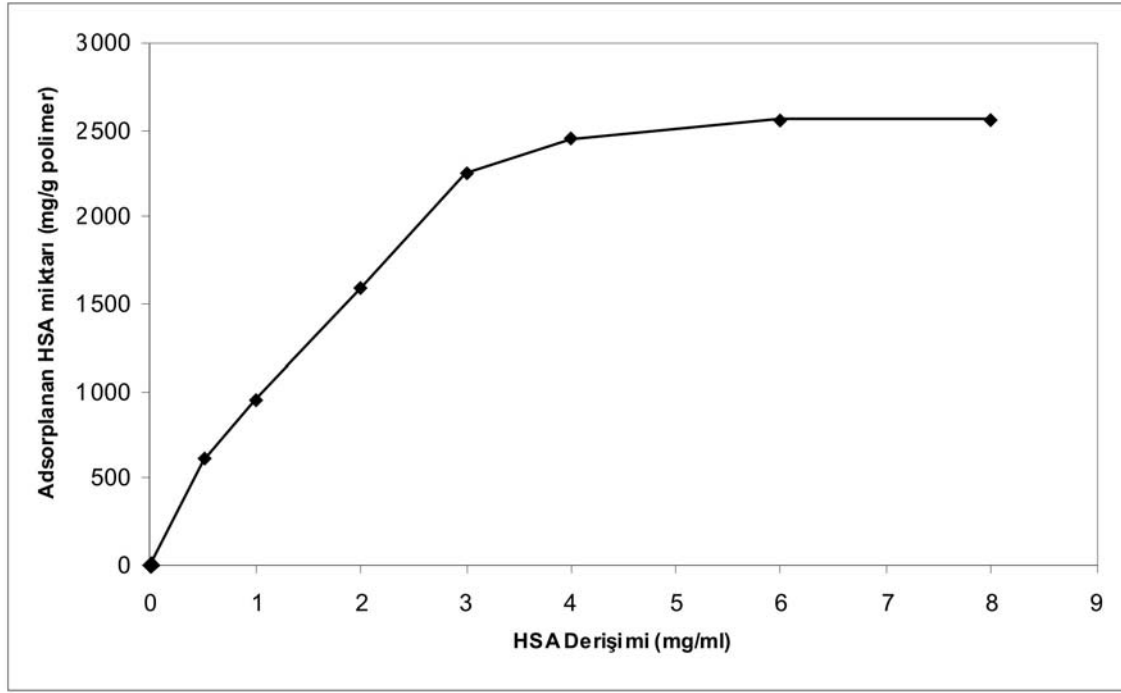
Şekil 4.10. pH'ın adsorpsiyona etkisi.

Adsorpsiyona pH'ın etkisi incelenirken; HSA'nın biyoaktivitesinin pH:8 değerinin üzerindeki pH değerlerinde yok edileceği göz önünde bulundurulmuştur. Araştırılan tüm parametrelerde maksimum HSA adsorpsiyonu pH:5'de 598 mg/g polimer olarak ortaya çıkmıştır. pH:5 değeri HSA proteininin izoelektrik noktasıdır. Bu pH:5 değerinin altındaki daha asidik ve üstündeki daha bazik değerlerde adsorpsiyon kapasitesinin azaldığı açıkça görülmektedir. Bu azalma benzer yüklü gruplar arasındaki elektrostatik itme güçleri ile izah edilebilir. Proteinler izoelektrik noktalarında net yüke sahip olmadıklarından ve sulu ortamdaki protein çözünürlüğü azaldığından sulu çözeltilerden maksimum adsorpsiyonları genellikle bu noktalar civarında olur. İzoelektrik noktanın altında ve üstündeki asidik ve bazik ortamlar ise proteinlerin pozitif ya da negatif yüklü olmalarına neden olurlar.

İzoelektrik noktanın altındaki pH değerlerinde; protein çözeltisinin pH'ı artarken, aminoasit yan gruplarının protonlanma derecesi azalır ve Cibacron Blue F3GA'nın negatif yükü artar. İzoelektrik noktanın üstünde ise; pH artarken, HSA adsorpsiyon kapasitesinin azalmasının sebebi de HSA ve ligand molekülleri arasındaki elektrostatik itme etkileri olabilir. Böylece de proteinin sulu ortamdaki çözünürlüğü artar ve adsorpsiyon daha az gerçekleşir. Cibacron Blue F3GA bir monoklorotriazin boyasıdır ve yapısında üç asidik sülfonik grup içerir. Buradaki özel etkileşim; Cibacron Blue F3GA üzerindeki bu gruplardan, ligandda ve insan serum albüminindeki aminoasit yan zincirlerinde var olan çeşitli grupların iyonlaşma hallerinden ve HSA moleküllerinin bu pH'daki konformasyonel halinden kaynaklanıyor olabilir. Özgül olmayan adsorpsiyonun pH'dan bağımsız olduğu ve çalışılan tüm pH değerlerinde eşit miktarda olduğu da değerlendirmeye alınmıştır.

4.3.1.2. HSA Başlangıç Derişiminin Etkisi

CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin sulu çözeltilerden HSA adsorpsiyonuna, HSA başlangıç derişiminin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla optimum pH değeri olan pH:5'de farklı derişimlere sahip HSA çözeltileri hazırlanmış ve CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerle etkileştirilmiştir. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelere HSA adsorpsiyonuna HSA derişimi faktörünün etkisi Şekil 4.11.'de verilmiştir.



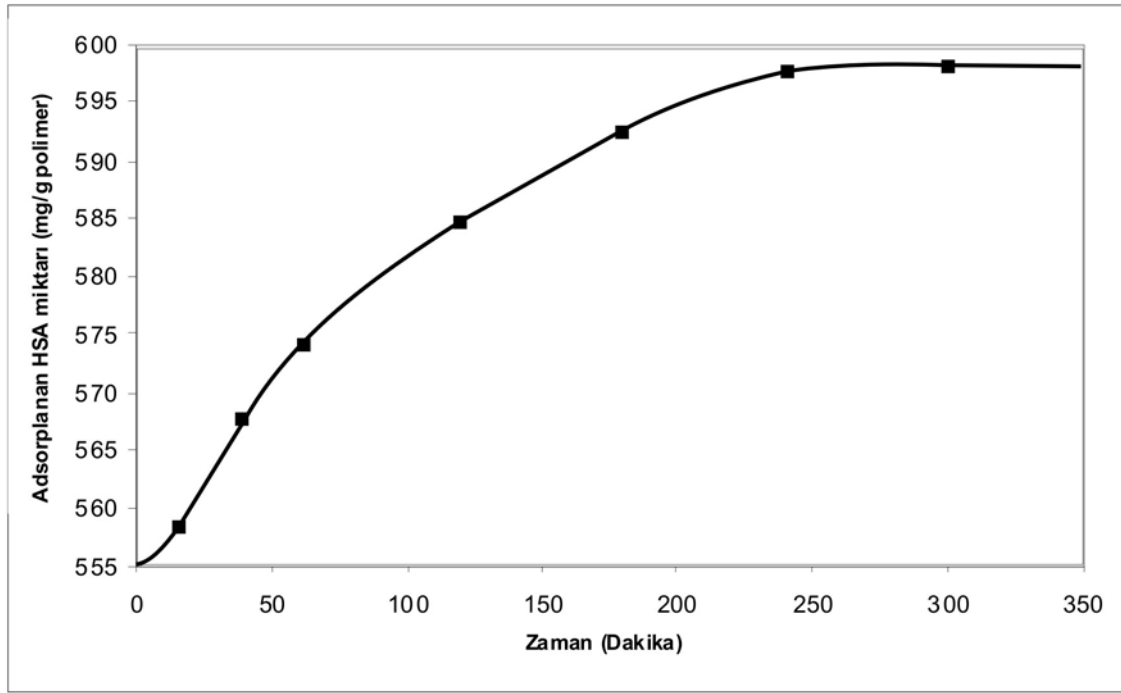
Şekil 4.11. HSA derişiminin adsorpsiyona etkisi.

Şekilden de anlaşılacağı üzere; nanokürelerin birim kütlesi başına adsorplanan HSA miktarı, çözeltilde artan HSA derişimi ile beraber 4.0 mg/ml değerine kadar artış gösterip bu noktadan sonra doygunluğa erişmektedir. Cibacron Blue F3GA immobilizasyonun sulu çözeltilerden HSA adsorpsiyonunu 2560 mg/g HSA değerine kadar önemli ölçüde artırdığı açıkça görülmektedir. HSA adsorpsiyonu kapasitesindeki bu artış Cibacron Blue F3GA ve HSA molekülleri arasındaki özgül etkileşimlerin albümin adsorpsiyonunu destekleyici etkisinden kaynaklanmaktadır. 4.0 mg/ml değerinden sonraki artışlar, adsorpsiyon kapasitesini artırmamaktadır. Bu durum nanokürelerin yüzeyine immobilize edilen ve aktif etkileşim grubu olan boya moleküllerinin doygunluğa ulaşması ile açıklanabilir.

Cibacron Blue F3GA ve HSA molekülleri arasındaki bu işbirlikçi etki; Cibacron Blue F3GA'nın asidik grupları ile aromatik yapılarının ve HSA moleküllerinin aminoasit yan zincirleri üzerindeki grupların sebep olduğu hidrofobik, elektrostatik ve hidrojen bağları gibi farklı etkileşim mekanizmalarının sonucu olabilir.

4.3.1.3. Etkileşim Süresinin Etkisi

CBF3GA/m-PHEMA nanokürelere HSA adsorpsiyonuna etkileşim süresinin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla CBF3GA/m-PHEMA nanokürelere farklı zaman aralıklarında HSA çözeltileriyle etkileştirilmiştir. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelere HSA adsorpsiyonuna etkileşim süresinin etkisi Şekil 4.12.'de verilmiştir.

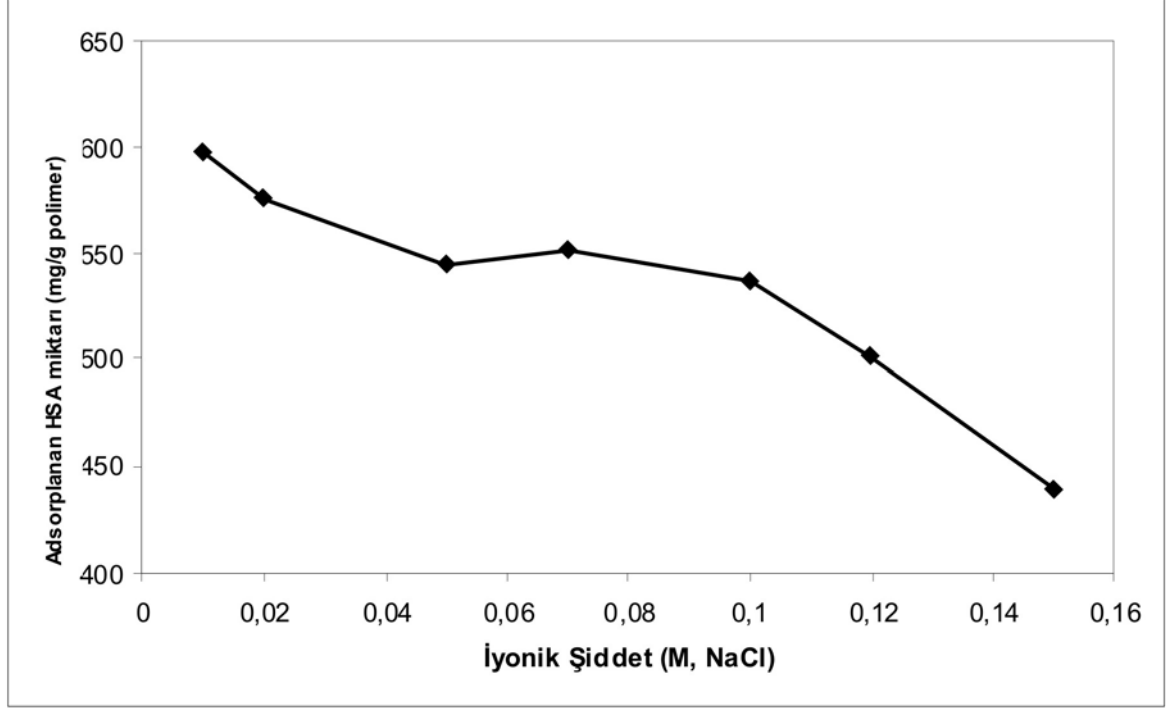


Şekil 4.12. Adsorpsiyon süresinin adsorpsiyona etkisi.

Şekil 4.12.'den de görüldüğü üzere adsorpsiyon prosesin başlarında süre artışıyla beraber HSA adsorpsiyonunda oldukça hızlı bir artış kaydedilmiş, ardından 240. dakika civarındaki 597.3 mg/g polimer parametresine denk gelen adsorpsiyon dengesine doğru adsorpsiyon artışının hızında azalma olmuş ve 300. dakikadan itibaren de 598 mg/g polimer parametresine tekabül eden adsorpsiyon dengesine ulaşılmış ve adsorpsiyon durmuştur. Adsorpsiyon artışının hızındaki bu azalmanın nedeni zamanla meydana gelen adsorpsiyondan dolayı HSA derişiminin azalmasıdır. Hareketli fazdaki (protein çözeltisi) HSA derişimi azaldıkça, itici güç (sulu çözelti ve afinite (sabit faz) arasındaki derişim farkı) de azalır.

4.3.1.4. İyonik Şiddetin Etkisi

Şekil 4.13. ise Cibacron Blue F3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerden HSA adsorpsiyonuna iyonik güç (NaCl ile ayarlanan) faktörünün etkisini göstermektedir.



Şekil 4.13. İyonik şiddetin adsorpsiyona etkisi.

Bağlayıcı tamponun (asetat tamponu: pH: 5) artan iyonik gücüyle HSA adsorpsiyonunun kapasitesinde azalma gözlemlenmektedir. NaCl derişimi 0.01 M'dan 0.15 M değerine artırıldığında, HSA adsorpsiyonunun 598 mg/g polimer değerinden 440 mg/g polimer değerine düşerek; % 26.4 oranda azaldığı tespit edilmiştir. HSA adsorpsiyonunun kapasitesindeki bu azalma boyaya takılı m-PHEMA nanoküreler ve protein molekülleri arasındaki itici elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Adsorpsiyon ortamındaki tuz derişiminin artırılması; boyanın proton kaybına uğramış sülfonik asit gruplarının, tuzun sodyum iyonları arasındaki koordinasyonuyla sonuçlanabilir ve bu da protein adsorpsiyonunun düşüşüne yol açabilir. Yüksek iyonik şiddet seviyelerinde düşük protein adsorpsiyonunun bir diğer sebebi de; mevcut tuz köprülerinin tuz varlığındaki deformasyonu olabilir.

Ayrıca bu durum yüksek iyonik güçlerde albümin moleküllerinde daha sıkı yapıların oluşumuyla da açıklanabilir. Ayrıca yüksek iyonik güçlerde albümin

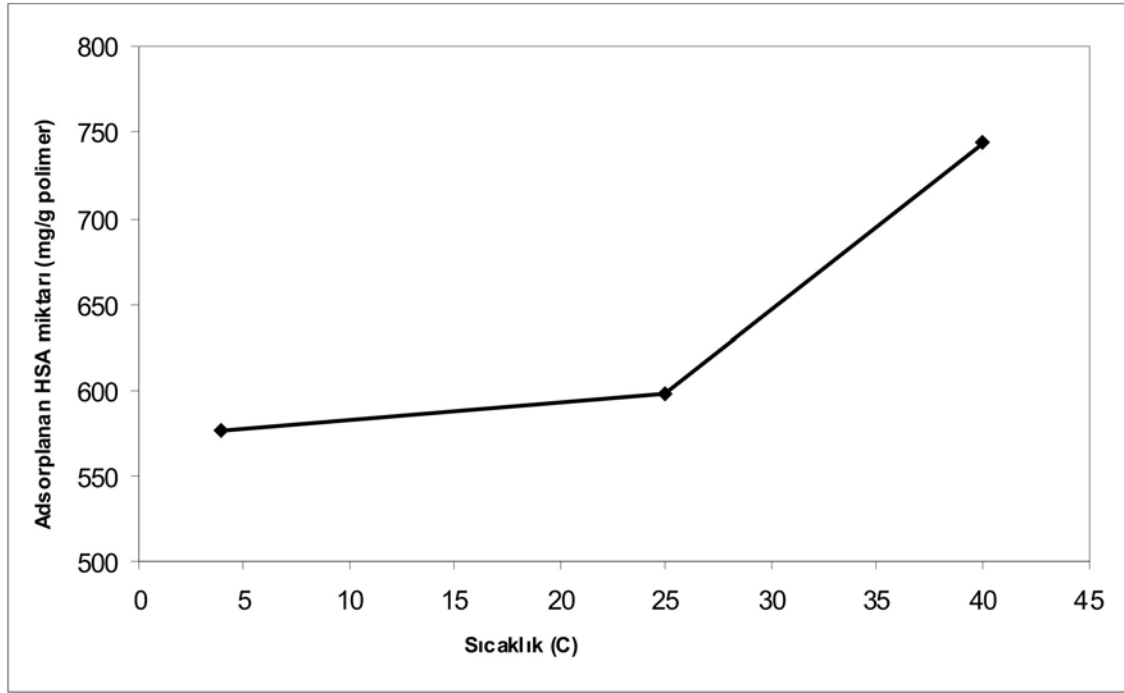
moleküllerine daha fazla iyon bağlanması protein moleküllerinin ekstra stabilizasyonuna yol açmış ve böylece protein molekülleri daha yüksek bir çözünürlüğe sahip olarak düşük adsorpsiyona sebep olmuş olabilir (Gu ve ark., 2008).

Artan iyonik güçle Debye perdeleme etkisinden ötürü iyonik etkileşimlerin de azaldığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Bunlara ek olarak iyonik gücü artırmak aynı zamanda immobilize olmuş boya moleküllerinin kendi aralarındaki hidrofobik etkileşimleri güçlendirerek serbest CBF3GA moleküllerinin yığılmasına neden olur. Bu durumda da iyonik gücün artırılmasıyla, HSA için serbest şekilde bulunan bağlı boya moleküllerinin sayısı azalır ve HSA'nın immobilize boya liganda adsorpsiyonu iyice güçleşir (Altıntaş, 2006).

4.3.1.5. Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın HSA adsorpsiyonuna etkisini belirlemek için adsorpsiyon çalışmaları 3 farklı sıcaklıkta (4°C, 25°C ve 40 ± 1°C) gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.14'de HSA adsorpsiyonuna sıcaklık etkisi verilmiştir. Şekil 4.14.'de görüldüğü gibi artan sıcaklıkla birlikte HSA adsorpsiyonunun arttığı ve 25°C'de HSA adsorpsiyonunun 598 mg/g polimer optimum değerine ulaştığı görülmektedir. Sıcaklık artışıyla adsorpsiyon kapasitesinin artması, Cibacron Blue F3GA'nın asidik grupları ve aromatik yapısı ile albümin molekülünün aminoasit zincirlerindeki gruplar arasındaki hidrofobik, elektrostatik ve H-bağları gibi farklı mekanizmaların birlikte etkisinin bir sonucudur. Cibacron Blue F3GA, çok hidrofobik bir yapı olmamakla birlikte protein molekülündeki hidrofobik gruplarla etkileşebilecek düzlemsel aromatik yüzeylere sahiptir. Genellikle, sıcaklık artışıyla adsorpsiyon kapasitesinin artması hidrofobik etkileşimlerin etkin olduğunun işaretçisidir. Protein ve bağlanmış ligand arasındaki etkileşimde hidrofobik etkileşimler daha etkin ise, protein ve ligandın temas yüzeyi sıcaklıkla artar. Genel anlamda sıcaklık artışının protein adsorpsiyonun arttırdığı ve sıcaklık düşüşünün protein uzaklaştırılmasını arttırdığı bilinir. Ayrıca hidrofobik etkileşimleri sağlayan van der waals kuvvetleri de sıcaklıkla artar.



Şekil 4.14. Sıcaklığın adsorpsiyona etkisi.

4.3.1.6. Adsorpsiyon İzotermi

Adsorpsiyon izotermi, çözültideki protein derişimi ile afinite sorbente adsorplanmış protein arasındaki ilişkiyi açıklamakla birlikte proteinin matriksle etkileşimini karakterize etmek için kullanılır. Adsorpsiyon özelliklerinin değerlendirilmesi için sulu çözültiden HSA adsorpsiyonu çalışmalarında, bu proteinlerin matriksle ilişkisini açıklamak amacıyla kesikli sistem deneyleri sırasında elde edilen deneysel değerlerin, teorik adsorpsiyon izoterm modellerine uygunluğu araştırılmıştır.

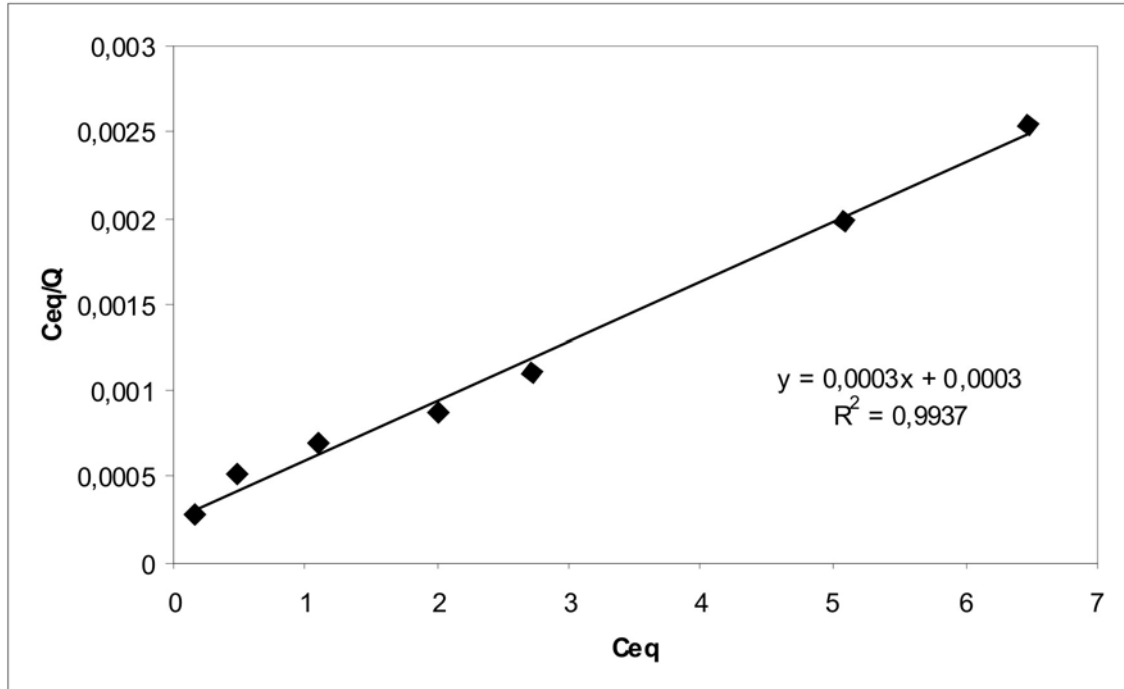
Moleküllerin adsorbentle etkileşimini karakterize etmek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri uygulanmıştır.

Langmuir adsorpsiyon modeli moleküllerin belirli sayıda, her biri yalnızca tek molekül bağlayabilen bölgelere bağlandığını varsayar. Bu noktaların enerji bakımından da eşdeğer olduğu ve komşu bölgelerle adsorplanan moleküller

arasında etkileşim olmadığı kabul edilir. Langmuir adsorpsiyon izotermi Eşitlik 4.3. ile tanımlanır. Denge verilerinin eşitliğe uygulanmasıyla doğrusal bir grafik elde edilmesi, aşağıdaki eşitlikle tanımlanan Langmuir modelinin bu sistemlere uygulanabileceğini göstermektedir:

$$C_{eq}/Q = 1/(Q_{maks} \cdot b) + C_{eq}/Q_{maks} \quad (4.3.)$$

Bu eşitlikte Q adsorbente bağlanan HSA miktarı (mg/g), C_{eq} çözültideki denge HSA derişimi (mg/ml), b Langmuir sabiti (ml/mg) ve Q_{maks} adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) göstermektedir. HSA adsorpsiyonu için deneysel verilerin yarı-resiprokal grafiği Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.15. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin Langmuir adsorpsiyon izotermi.

Freundlich izotermi adsorpsiyon dengesini tanımlayan eşitliklerdendir. Deneysel eşitlik ise aşağıdaki şekildedir;

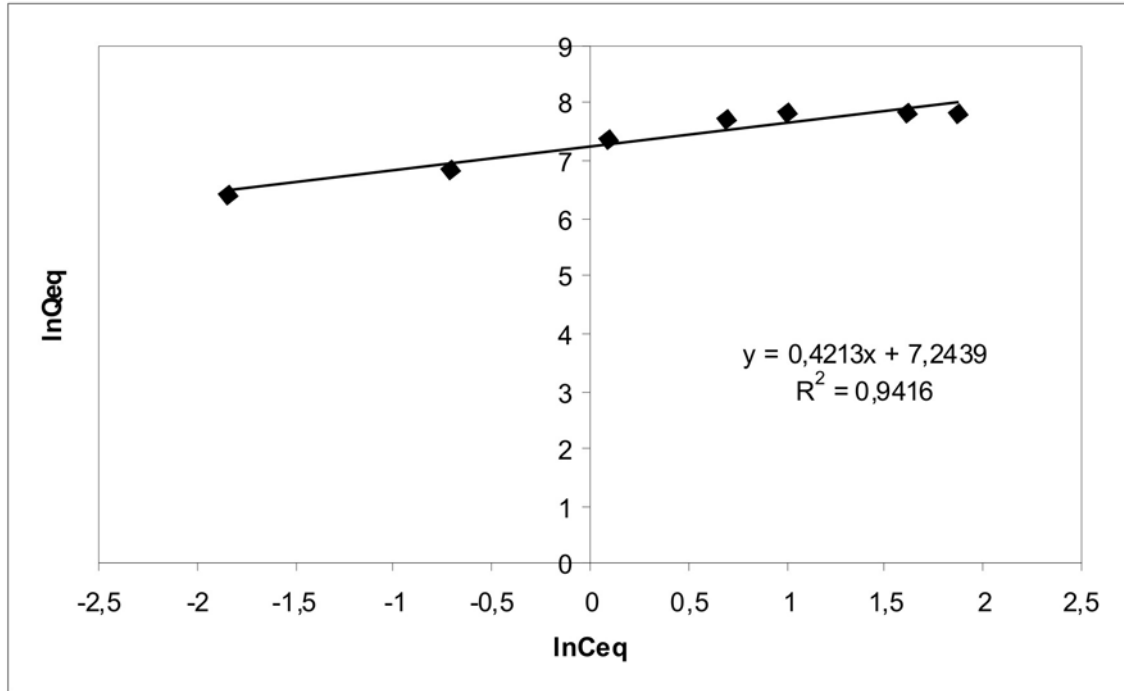
$$Q_{eq} = K_f C_{eq}^{1/n} \quad (4.4.)$$

Bu eşitlikte Q_{eq} adsorpsiyon miktarı (mg/g), C_{eq} çözültideki adsorbent derişimi (mg/l) dir. K_f ve $1/n$ sırasıyla adsorpsiyon kapasitesini ve adsorpsiyon şiddetini gösteren Freundlich sabitleridir. Bu eşitlik her iki tarafın logaritması alınarak daha kullanışlı hale getirilebilir:

$$\ln Q_{eq} = \ln K_f + 1/n \ln C_{eq} \quad (4.5.)$$

Deneysel verilerin Freundlich modeline uygunluğu da incelenmiştir. Bu amaçla $\ln C_{eq}$ 'nin $\ln Q_{eq}$ 'ye karşı grafiğı çizilmiştir (Şekil 4.16.). Grafiğın doğrusal çıkması Freundlich adsorpsiyon izoterminin uygulanabilirliğini gösterir. Adsorpsiyon sabitleri kesim noktası ve eğimden hesaplanabilir. K_f ve n çeşitli çevresel faktörlere bağılı olarak değışen deneysel sabitlerdir ve n birden büyüktür.

Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{maks}) deneysel verilerden CBF3GA bağılı m-PHEMA nanoküreleri için 2560 mg/g olarak bulunmuştur. Teorik adsorpsiyon kapasitesi 3333 mg/g; Langmuir sabiti 1.0 ml/mg ve korelasyon katsayısı (R^2) ise 0.9937'dir (Çizelge 4.4.). Korelasyon katsayıları Langmuir adsorpsiyon modelinin bu sisteme uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.16. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelerin Freundlich adsorpsiyon izotermi.

Langmuir ve Freundlich izotermi için hesaplanan değerler Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Korelasyon katsayılarından adsorpsiyon işleminin Langmuir modeli ile tanımlanabileceği görülmektedir. Langmuir sabiti değeri (Q_{maks}) deneysel verilerle uyuşmaktadır. Diğer taraftan K_f ve n değerleri sulu ortamdan HSA proteininin kolayca ayrılabilirdiğini ve dolayısıyla tercihli adsorpsiyonu gösterir. K_f değeri adsorbent adsorpsiyon kapasitesinin bir göstergesidir; eğim, $1/n$, adsorpsiyon kapasitesine derişimin etkisini göstermektedir ve adsorpsiyon şiddetini ifade eder. Çizelgeden görüldüğü üzere n değerleri adsorpsiyon işlemi için yeterince yüksektir.

Çizelge 4.4. CBF3GA/m-PHEMA nanoküreler için Langmuir ve Freundlich izotermi.

Polimer	Deneysel Q (mg/g)	Langmuir Sabitleri			Freundlich Sabitleri		
		Q_{maks} (mg/g)	b	R^2	K_f	n	R^2
	2560	3333	1	0.9937	1399	2.37	0.9416

4.3.1.7. Adsorpsiyon Kinetiği

Kütle transferi ve kimyasal reaksiyon gibi adsorpsiyon işlemi kontrol eden mekanizmaların belirlenmesi için deneysel verilere birinci ve ikinci derece kinetik modeller uygulanmıştır. Ölçülen derişimlerin adsorbent yüzey derişimine eşit olduğu varsayılmıştır. Lagergren'in birinci derece hız eşitliği çözümlenmiş çözünenin adsorpsiyonunda en çok kullanılan eşitliktir (Cheung ve ark., 2001). Aşağıdaki eşitlikle gösterilir;

$$dq_t/dt = k_1(Q_{eq} - q_t) \quad (4.6.)$$

Eşitlikte k_1 psödo-birinci derece adsorpsiyon hız sabiti ($1/dk$), Q_{eq} ve q_t sırasıyla denge zamanında ve herhangi bir t anında adsorplanan miktarı (mg/g)

göstermektedir. $t = 0$ 'da $q_t = 0$ ve $t = t$ anında $q_t = q_t$ sınır koşulların uygulanıp integralinin alınması;

$$\log[Q_{eq}/(Q_{eq}-q_t)] = (k_1 t)/2.303 \quad (4.7.)$$

eşitliğini vermektedir. Eşitlik 4.7. tekrar düzenlenerek doğrusallaştırılabilir:

$$\log(Q_{eq}-q_t) = \log(Q_{eq}) - (k_1 t)/2.303 \quad (4.8.)$$

$\log(Q_{eq})$ 'e karşı t grafiğinin doğrusallığı kinetik modelin uygulanabilirliğini göstermektedir. Gerçek birinci-derece işlemde $\log(Q_{eq})$, t 'ye karşı $\log(Q_{eq}-q_t)$ grafiğinin kesim noktasına eşit olmalıdır.

Adsorpsiyon denge kapasitesine dayalı psödo-ikinci derece eşitlik aşağıdaki şekilde verilebilir:

$$dq_t/dt = k_2 (Q_{eq}-q_t)^2 \quad (4.9.)$$

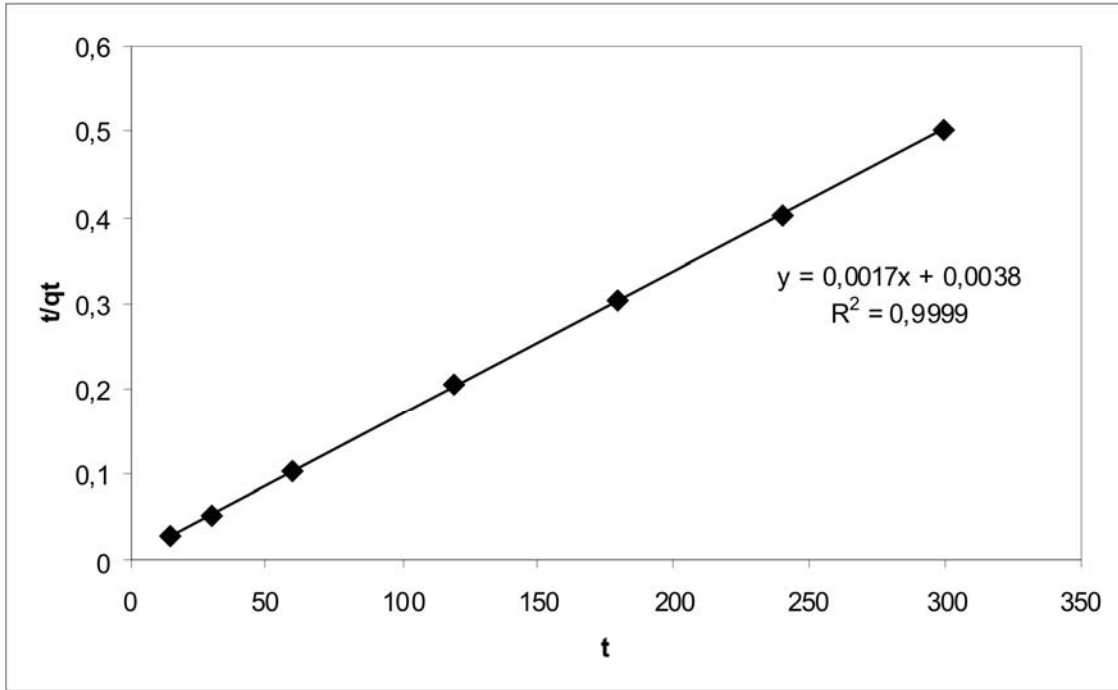
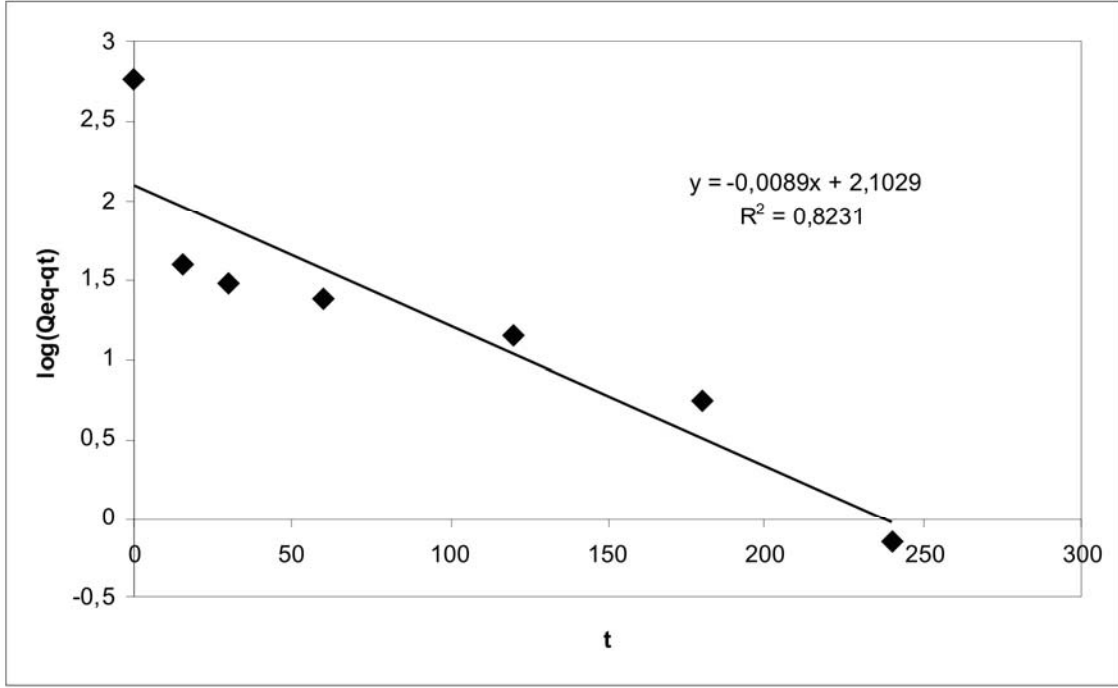
Eşitlikte k_2 psödo-ikinci derece hız sabitidir (g/mg.dk). Eşitlik 4.9'a $t = 0$ da $q_t = 0$ ve $t = t$ 'de $q_t = q_t$ sınır koşullarının uygulanması ile;

$$1/(Q_{eq}-q_t) = (1/Q_{eq}) + k_2 t \quad (4.10.)$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitliğin doğrusal hali:

$$(t/q_t) = (1/k_2 Q_{eq}^2) + (1/Q_{eq})t \quad (4.11.)$$

İkinci derece kinetiğin uygulanabilir olması için t/q_t 'ye karşı t grafiğinin doğrusal olması gereklidir. Hız sabiti (k_2) ve denge adsorpsiyonu (Q_{eq}) sırasıyla kesim noktası ve eğimden elde edilebilir.



Şekil 4.17. CBF3GA/m-PHEMA nanoküreler için psödo-birinci derece adsorpsiyon kinetiği ve psödo-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.

CBF3GA bağlı m-PHEMA nanoküreler için birinci ve ikinci derece kinetik verileri Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. CBF3GA/m-PHEMA nanoküreler için birinci ve ikinci derece kinetik verileri.

Polimer	Deneysel	psödo-birinci derece			psödo-ikinci derece		
		Q_{eq} (mg/g)	Q_{eq} (mg/g)	k_1 (1/dk)	R^2	Q_{eq} (mg/g)	k_2 (g/mg. dk)
	598	126.73	0.0205	0.8231	588.23	0.000761	0.9999

Çizelgedeki korelasyon katsayıları incelendiğinde CBF3GA bağlı m-PHEMA nanoküreler için psödo-ikinci derece kinetik modelin daha uygun olduğu görülmektedir. Ayrıca psödo-ikinci derece kinetik modelde elde edilen teorik Q_{eq} değeri deneysel değere oldukça yakındır. Bu sonuçlar CBF3GA bağlı m-PHEMA nanoküreler için adsorpsiyonun kimyasal kontrollü gerçekleştiğini göstermektedir.

4.3.2. İnsan Plazmasından Seçici Albümin Azaltılması

Cibacron Blue F3GA bağlı polimerik m-PHEMA nanokürelere insan serumundan HSA adsorpsiyonu için sağlıklı bir donörden alınan insan serumu ile çalışmalar kesikli sistemde yapılmış ve ham sonuçlar Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir. Sulu çözülden HSA adsorpsiyonu ile sağlıklı vericiden alınan insan plazmasından HSA adsorpsiyonu oranlarının karşılaştırması ise Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. İnsan plazmasından HSA adsorpsiyonu.

HSA bsl (mg/l)	HSA bts (mg/l)	Toplam Protein bsl (mg/dl)	Toplam Protein bts (mg/dl)
222.2	117.41	34	19.6

Çizelge 4.7. Sulu çözülden HSA adsorpsiyonu ile sağlıklı vericiden alınan insan plazmasından HSA adsorpsiyonu oranlarının karşılaştırılması.

	Sulu çözülden HSA adsorpsiyonu	İnsan Plazmasından HSA Adsorpsiyonu
HSA derişimi (mg/ml)	6	0.33
Uzaklaştırılan HSA miktarı (%)	19.2	42.35

İnsan plazmasıyla yapılan çalışmalardan elde edilen Cibacron Blue F3GA bağlı polimerik m-PHEMA nanokürelere HSA adsorpsiyonu değerlerinin; sulu çözeltilerle yapılan araştırmalardaki değerlerden daha fazla olduğu matematiksel olarak karşımıza çıkmaktadır. Çünkü HSA moleküllerinin konformasyonel yapısı insan plazmasındaki doğal çevresi dahilinde; nanokürelere takılı Cibacron Blue F3GA molekülleriyle özgül etkileşime girebilmek için çok daha uygundur. İnsan plazmasından HSA adsorpsiyonunda yüksek verim elde edilmesine; sulu ve katı fazlar arasındaki büyük itici güçten kaynaklanan yüksek miktardaki HSA derişiminin de katkısı olması muhtemeldir.

Ayrıca albüminler anyon bağlayıcı olarak bilinirler. Triazin boyaları içerisinde de en fazla negatif yüklü olan Cibacron Blue F3GA'dır. Bundan dolayıdır ki; diğer hiçbir triazin boyası albümine Cibacron Blue F3GA'nın bağlanabildiği kadar bağlanmaz. Cibacron Blue F3GA'nın albüminlerle olan etkileşimleri 2 şekilde olur:

Birinci tür etkileşim tüm albüminlerle olan ortak etkileşimdir ve tüm albüminlerin hidrofobik anyon (uzun zincirli yağ asitleri) bağlayıcı bölgeleri ile Cibacron Blue F3GA arasında gerçekleşir.

İkinci tür etkileşim ise daha güçlü olan ve sadece insan serum albümininin bilirubin bağlayıcı bölgeleri ile Cibacron Blue F3GA arasında gerçekleşen etkileşimdir. Cibacron Blue F3GA ile bilirubin genel olarak yapısal benzerlikleri söz konusudur. Her iki molekül de düzlemsel aromatik halka gruplarına ve negatif yüklü gruplara sahiptir ki bu gruplar benzeşen pozisyonlarda üst üste çakışırlar.

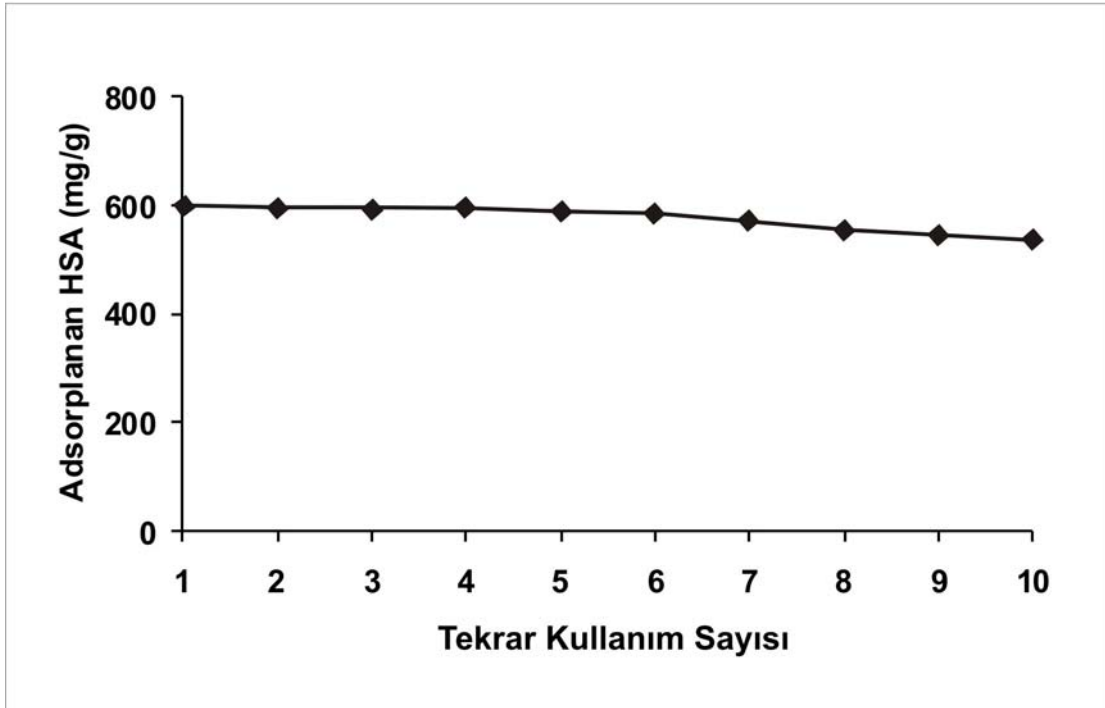
İkinci tür etkileşim albüminin yağ asiti içeriğine bağlı olmadığından; Cibacron Blue F3GA kullanıldığında plazmadan insan serum albümini adsorpsiyonu, diğer herhangi bir albüminin adsorpsiyonundan çok daha fazla olur (Leatherbarrow, 1980).

4.3.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Protein saflaştırılmasında kullanılacak olan adsorbentlerde tekrar kullanılabilirlik önemli bir parametredir. Çünkü, tekrar kullanım birim adsorbent başına düşen

maliyeti düşürmektedir. Bu amaçla, CBF3GA bağlı nanokürelerden; adsorplanan HSA moleküllerinin desorpsiyonu ve nanokürelerin tekrar kullanılabilirlikleri incelenmiştir.

HSA desorpsiyonu için oda sıcaklığında 1.0 M NaCl içeren 0.05 M fosfat kullanılmıştır. Desorpsiyon için pH: 8'de ve kesikli sistemde çalışılmıştır. HSA adsorplanmış nanoküreler desorpsiyon çözeltisine (15 ml) konulmuş; 20 rpm'de oda sıcaklığında, 1 saat boyunca etkileştirilmiştir. Desorpsiyon çözeltisindeki HSA derişimi 595 nm'de yapılan spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. Nanokürelerin tekrar kullanılabilirliklerinin belirlenmesi için aynı nanoküreler 10 kez adsorpsiyon desorpsiyon döngüsüne tabi tutulmuşlardır.



Şekil 4.18. Tekrar kullanılabilirlik.

Tekrarlanan 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonunda nanokürelerin HSA adsorpsiyon kapasitesinin sadece % 7 oranında azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.18.). Bu sonuçlara göre 1 M NaCl çözeltisinin uygun bir desorpsiyon ajanı olduğu ve hazırlanan nanokürelerin adsorpsiyon kapasitesinde önemli bir azalma olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilirler söylenebilir.

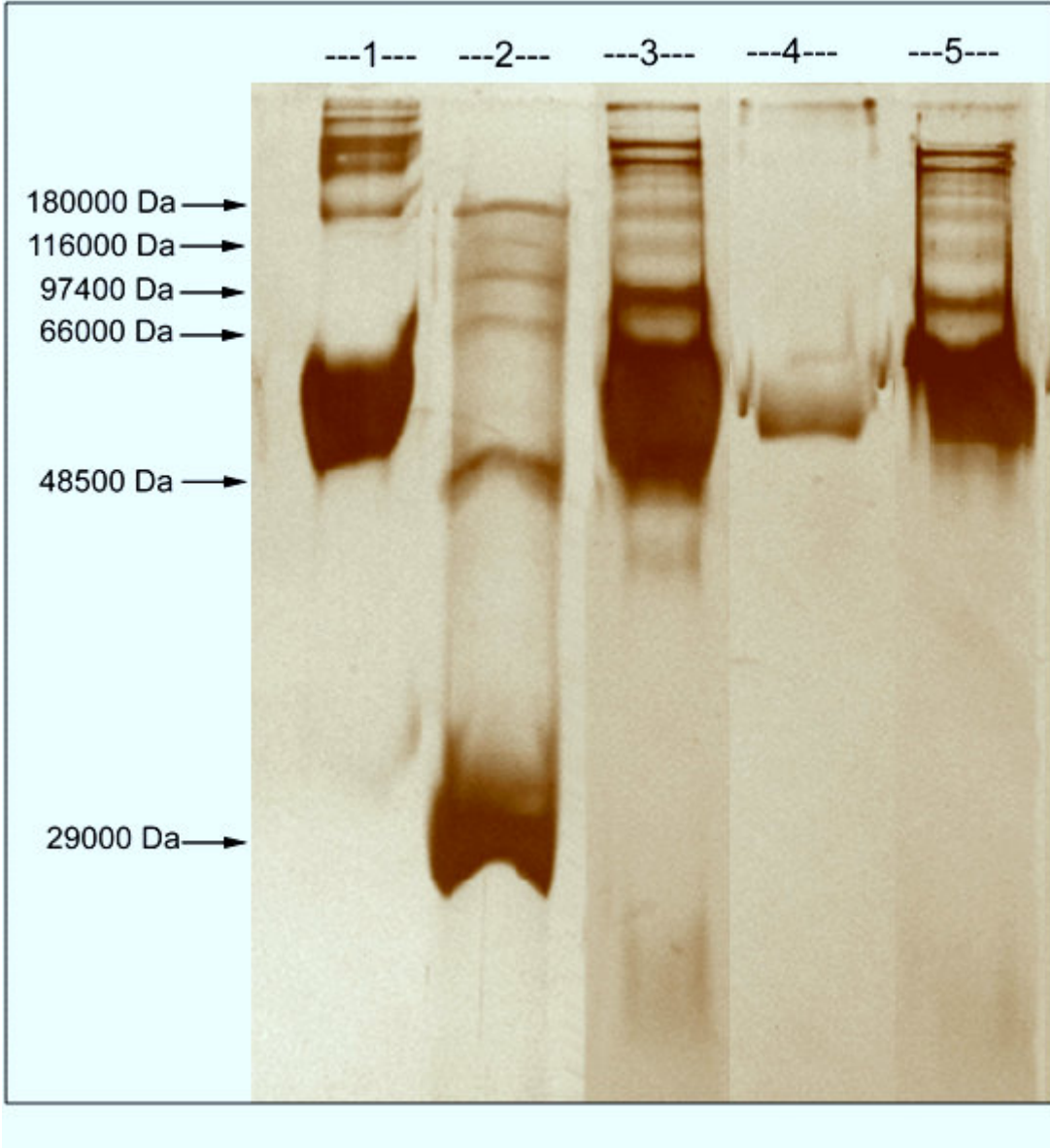
Bu gözlemler; daha önce de bahsedilen NaCl eklenmesiyle artan iyonik gücün, elektrostatik çekim gücünü azaltmasına ve dolayısıyla da HSA desorpsiyonunu teşvik etmesine dayandırılarak; proteinin pozitif yüklü bölgeleri ve Cibacron Blue F3GA'nın negatif yüklü $-SO_3$ grupları arasında oluşan elektrostatik çekim gücünün zayıflaması ile izah edilebilir. Elde edilen desorpsiyon sonuçları protein ayırma tekniği kapsamında HSA'nın tekrar kullanılabilirliği imkanını desteklediğinden ötürü; önem arz etmektedir.

4.3.4. SDS-PAGE Analizi

İnsan plazmasından uzaklaştırılan albüminin moleküler ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Jele ait görüntüler Şekil 4.19.'da görülmektedir. Şekil 4.19.'da verilen jel Gümüş Nitrat ile boyanmıştır. Moleküler ağırlık kontrolü için 1. ve 2. kolon, sırasıyla standard HSA (1 mg/ml) ve Sigma Belirleyici'yi göstermektedir.

Sulu çözeltilerin desorpsiyonu albümin bandının gerisinde gözükmemektedir. Desorpsiyon çözeltisinin jelde yürümesi engellenmiştir.

Şekilde görüldüğü gibi 3. kolonda işlem görmemiş serumda yüksek yoğunluktaki albümin (66000 Da), 4. kolonda CBF3GA nanokürelerle işlem gördükten sonra azalmıştır. 5. kolon CBF3GA nanokürelerden desorbe edilen çözeltinin sadece albümin olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.19. CBF3GA/m-PHEMA nanokürelere insan serum adsorpsiyonunun SDS-PAGE analizi. [(% 5–12) SDS-PAGE; 1.Hat: Standard BSA (1 mg/ml, Sigma), 2.Hat: Sigma Belirleyici (Moleküler Ağırlık, Da, Ürün kodu: M6539, Sigma), 3.Hat: işlem görmemiş insan serumu, 4.Hat: CB bağlı nanokürelerle işlem görmüş insan serumu ve 5.Hat: desorpsiyon].

4.4. Literatür Karşılaştırması

Çizelge 4.8. Literatür karşılaştırması.

Yapılan Çalışma	Elde Edilen İlgili Sonuç	Çalışma Yılı
Bereli ve arkadaşları; albüminin psödo özgül uzaklaştırılması için, PGM küreleri gömülü kriyojelleri kullanmışlardır.	Albümin adsorpsiyon kapasitesi olarak; 342 mg/g ve insan serumundan albümin uzaklaştırma miktarı olarak da % 89.4 değerlerine ulaşmışlardır	(Bereli, 2010)
Andaç; İnsan Serumundan Albümin Uzaklaştırılması İçin Makrogözenekli Poli(hidroksietil-metakrilat) Kriyojeller çalışmasını tamamlamıştır.	HSA baskılı PHEMAPA kriyojelin, HSA moleküllerine karşı yüksek afinite göstermiş olduğu fakat % 35 değerinden ötürü yeterli verim kaydedilemediği rapor edilmiştir.	(Andaç, 2009)
Corchero ve arkadaşları tarafından; uzaktan kontrollü manyetik partiküllerin biyomedikal uygulamaları çalışması tamamlanmıştır.	HSA ile etkileşebilen ligandların tanımlanabilmesi ve seçiciliği için manyetik partiküllerin başarılı bir şekilde kullanılabildiği rapor edilmiştir.	(Corchero, 2009)
Uygun ve arkadaşları; lizozim ayrıştırılması manyetik hidrofobik afinite nanokürelerini kullanmışlardır.	Kaydedilen m-P(HEMA-MAPA) nanokürelerin boyutu 386 nm ve yüzey alanı 580 m²/g olarak rapor edilmiştir.	(Uygun, 2009)

Yapılan Çalışma	Elde Edilen İlgili Sonuç	Çalışma Yılı
Akdoğan; Cibacron Blue F3GA takılı manyetik P(HEMA) mikro küreleri kazein saflaştırmasında kullanmıştır.	Mikro küreler; HEMA monomeri kullanılarak süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlanmış, CBF3GA, manyetik poli(HEMA) kürelerine alkali koşullarda triazin halkasındaki klorür ve HEMA molekülündeki hidroksil grupları arasındaki nükleofilik substitüsyon reaksiyonu ile kovalent olarak immobilize edilmiş ve boya takılı manyetik poli(HEMA) küreleri, FTIR, taramalı elektron mikroskopu, elemental analiz ve şişme testi ile karakterizasyon yapılmıştır. Manyetik mikro kürelerin, 68.3 mikromol CBF3GA/g içerdikleri rapor edilmiştir.	(Akdoğan, 2008)
Gu ve ekibi; CBF3GA takılı mikrogözenekli politetrafloroetilen kapiler membran çalışması yapmışlardır.	198.5 mg/g albümin adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır.	(Gu, 2007)

Yapılan Çalışma	Elde Edilen İlgili Sonuç	Çalışma Yılı
Soskic ve ekibi; hegzadekandioikasit immobilize edilmiş Sefaroz 4B sistemini hazırlamıştır.	% 41.9 albümin uzaklaştırması yapabilmeyi başarmışlardır.	(Soskic, 2006)
Zhang ve ekibi; CBF3GA takılı, aminli kitosan mikroküreler ile çalışmalar yapmışlardır.	G destek materyali başına maks. 108.7 mg albümin adsorpsiyon kapasitesine ulaşmışlardır.	(Zhang,2006)
Chromy ve ekibi; serumdan bol bulunurluklu proteinlerin uzaklaştırması için, antibadi bazlı reçineler hazırlamışlardır.	2D-PAGE yöntemiyle; protein tayini saptamasında % 76 artış elde etmeyi başarmışlardır.	(Chromy, 2004)
Greenough ve ekibi; insan plazmasından albümin ve IgG ağır zincirlerini uzaklaştırma çalışmaları yapmışlardır.	% 98 albümin uzaklaştırması yapabilmeyi başarmışlardır. 2 Boyutlu elektroforez çalışmasıyla da saptamalarını desteklemişlerdir.	(Greenough, 2004)
Nash ve Chase; PVA ile modifiye edilmiş poli(stirendivinilbenzen) kürelerini boya ligandı olarak kullanmışlardır.	Albümin uzaklaştırması için; 11.7–27 mg HSA/g değerinde bir verimlilik elde etmişlerdir.	(Nash and Chase, 1997)
Li ve Spencer; CBF3GA takılı polietilenimin kaplı titan sistemi çalışmalarını rapor etmişlerdir.	Albümin uzaklaştırması için; 4.4 mg HSA/g değerinde bir verimlilik elde etmişlerdir.	(Li and Spencer, 1994)

5. SONUÇLAR

Temeli klasik kromatografi tekniklerinin bir kombinasyonunun kullanımına dayandırılan geleneksel adsorpsiyon yöntemleri zaman kaybına yol açmaktadır. Bu çalışmada kullanılan manyetik taşıyıcı teknolojisi ise; hızlı ve seçici ayırma için manyetik proses kullanımına imkân vermiştir. Geleneksel yaklaşımlara kıyasla manyetik ayırmanın pek çok potansiyel avantajı vardır. Bu teknikte ısı döngüsü ile ayrılmak istenen biyomoleküller; nanokürelerin yüzeyine bağlanmış liganda direk olarak nakledilebilir. Bu durumda da hızlı bir şekilde çok daha yüksek verimler elde edilebilir (Odabaşı, 2004).

Son zamanlarda manyetik polimer partiküller; biyoteknoloji ve biyotıp alanlarının protein saflaştırması, enzim immobilizasyonu, hücre ayrıştırması, immünolojik tayinler, NMR ve hipertermi gibi pek çok konularında sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu alanlarda verimli bir şekilde kullanılabilmesi için sahip olmaları gereken başlıca nitelikler şunlardır; sedimantasyon olmamalıdır, nano boyuta yakın bir boy dağılımına ve yüksek, muntazam süperparamanyetik içeriğe sahip olmalıdırlar, demir sızıntısı olmamalıdır ve nontoksik olmalıdırlar (Zheng, 2005).

Gerçekleştirilen çalışma kapsamında tüm bu kriterler sağlanmıştır.

Manyetik polimer partikülleri sentezlemek için yaygın yöntem; bir polimerizasyon formülasyonunun sıvı fazına manyetik partikülleri direk olarak dağıtıp; manyetik partiküller varlığında monomer polimerizasyonunu gerçekleştirerek manyetik polimer partiküller oluşturmaktır. Bu amaçla pek çok proses geliştirilmiştir. En yaygın kullanılanlar; emülsiyon polimerizasyonu, dispersiyon polimerizasyonu, süspansiyon polimerizasyonu, miniemülsiyon polimerizasyonu ve mikroemülsiyon polimerizasyonudur (Zheng, 2005).

Sunulan bu araştırma kapsamında da mikroemülsiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılmıştır.

Polimerler ve demir oksit partikülleri arasındaki etkileşimler üzerine çalışmalar yapıldığını literatürde görülmektedir. Ayrıntıya girmek gerekirse demir oksit

partiküllerinin polimer matrikslerle etkileşimlerinin; hidrojen bağı, iyonik etkileşimler, kompleksleşme reaksiyonları ya da bu farklı türlerin bir kombinasyonu şeklinde gerçekleştiği çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Chemin ve ark., 2008).

Çalışmada PHEMA/demiroksit kombinasyonunun seçilmesini; hem “Chimie Douce” sentezi tarafından da önerilen demir oksit nanokürelerinin kontrollü boyut ve şekil eldesi hem de demir oksit ve PHEMA'nın birbirleriyle etkileşebilme kabiliyetleri desteklemektedir. Literatürde daha önce yapılan çalışmalar göstermiştir ki; PHEMA metal oksit yüzeylerindeki hidroksil fonksiyonel gruplarıyla ya da karboksil gruplarının metal yüzeyi atomlarına koordinasyonu ile hidrojen bağı etkileşimleri oluşturmaya yatkındır. Bu etkileşimler aslında polimer-demir oksit nanoyapılarının mekanik özelliklerini belirleyen anahtar parametrelerdir (Chemin ve ark., 2008).

Bu çalışmada sentezlenen manyetik PHEMA nanoküreler de; manyetik bir demir oksit türü olan Fe_3O_4 molekülleri varlığında HEMA monomerinin mikroemülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle elde edilmiş ve daha sonra elde edilen bu manyetik nanoküreler, Cibacron Blue F3GA tekstil boyasının kovalent olarak bağlanmasıyla insan serum albümininin afinite adsorpsiyonu için geliştirilmiştir.

Sunulan bu araştırmada; Cibacron Blue F3GA bağlı manyetik PHEMA nanokürelerin seçilmesini destekleyen bir başka parametre de: çapraz bağlı PHEMA hidrojenlerin; üç boyutlu yapılarını koruyan ve suda çözünmez kalmayı başaran, büyük miktarda su emme kapasitesine sahip hidrofilik polimer örgüleridir. Yapıya suyun katılması hidrojenlerin içersindeki ikincil bağları zayıflatır. Bu durum polimer zincirleri arasındaki uzaklığı artırır (Chemin ve ark., 2008). Cibacron Blue F3GA'nın biyokimyasal sistemler üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı ise daha önce rapor edilmiştir (Weber, 1979).

Sentezlenen Cibacron Blue F3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin kimyasal yapısı; FTIR, DSC, TGA, DTG, DTA ve elemental analiz ile morfolojik özellikleri; AFM ve SEM ile, manyetik özellikleri; ESR ve VSM ile, boyut, boyut dağılımı (PDI) Zeta Sizer ile ve yüzey yükü özellikleri ise Zeta Potansiyeli ile karakterize edilmiştir.

Elde edilen karakterizasyon sonuçları formülasyonun başarıyla kullanılabileceğini desteklemiştir.

m-PHEMA polimerinin IR spektrumunda; C=O gerilme titreşimini karakterize eden ve 1732 cm^{-1} frekansında görülen keskin pik bulgusu; literatürdeki” IR spektrumunda 1716 cm^{-1} frekansında gözlemlenen absorpsiyon piki PHEMA'nın karbonil bandını simgeleyerek, Fe_3O_4 nanokürelerin yüzeyine Cibacron Blue F3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin başarıyla sentezlenmiş olduğunu kanıtlamaktadır” yorumuyla benzeşmektedir (Yuan ve ark., 2010).

Sulu çözeltilerden HSA adsorpsiyonu çalışmaları kapsamında; Farklı pH, protein başlangıç derişimi, iyonik güç, etkileşim süresi ve sıcaklık koşulları altında gerçekleştirilen optimizasyon deneyleri sonucunda; Cibacron Blue F3GA takılı m-PHEMA nanokürelerin HSA'ya karşı yüksek seçicilik ve afinite gösterdiğini ortaya çıkmıştır.

Buna ilaveten sentezlenen polimerik manyetik nanoküreleri bir HSA adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünde kullanabilmenin mümkün olduğu görülmüştür.

Tüm çalışmanın matematiksel sonuçlarının genel bir özeti Çizelge 5.1.'de verilmektedir.

Boya takılı manyetik poli(hidroksietil-metakrilat) nanoküreler ile kandan albümin azaltılması amacıyla kullanılan bu sentezleme metodu; geliştirilip, farklı tür inorganik/organik hibrit nanokürelerin hazırlanmasında kullanılarak artan fonksiyonlara imkân sağlayabilir.

Çizelge 5.1. “Boya Takılı Manyetik Poli(hidroksietil-metakrilat) Nanoküreler İle Kandan Albümin Azaltılması” için genel sonuçlar.

CBF3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin boyutu	98.9 nm
CBF3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin PDI değeri	0.156
CBF3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin spesifik yüzey alanı	1302 m ² /g
CBF3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin HSA adsorpsiyonunda optimum pH	pH: 5’de; 598 mg/g polimer
CBF3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin HSA adsorpsiyonunda optimum başlangıç protein derişimi	4.0 mg/ml HSA’da; 2560 mg/g polimer
CBF3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin HSA adsorpsiyonunda optimum adsorpsiyon süresi	300.dk’da; 598 mg/g polimer
CBF3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin HSA adsorpsiyonunda optimum iyonik şiddet	0.01 M’da; 598 mg/g polimer
CBF3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin HSA adsorpsiyonunda optimum adsorpsiyon sıcaklığı	25°C’de; 598 mg/g polimer
CBF3GA bağlı m-PHEMA nanokürelerin; sulu çözeltiden HSA adsorpsiyonu ile sağlıklı vericiden alınan insan plazmasından HSA adsorpsiyonu oranlarının karşılaştırılması	İnsan plazmasından HSA adsorpsiyonu % 42.35; sulu çözeltiden HSA adsorpsiyonu %19.2.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akdoğan, F., 2008, Cibacron Blue F3GA attached mP(HEMA) Beads For Casein Purification, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 64 s.
- Altıntaş, E.B., Denizli, A., 2006, Efficient Removal of Albumin from Human Serum by Monosize Dye Affinity Beads, *Journal of Chromatography B.*, 832, 216-223.
- Andaç, A.M., 2009, İnsan Serumundan Albümin Uzaklaştırılması İçin Makrogözenekli Poli(Hidroksietil-Metakrilat) Kriyojeller, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, ANKARA.
- Anderson, L., 2005, *J. Physiol.* 563, 23.
- Anderson, N.L., Anderson, N.G. 2002, *Mol. Cell Proteomics* 1, 845.
- Anderson, L., Seilhamer, J., 1997, A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver, *Electrophoresis*, 18: 533-7.
- Arthur, J.M., 2003, *Proteomics. Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12: 423–30.
- Bangs, L. B., 1987, *Uniform Latex Particles*, 3. Edition, Seradyn Inc., Indianapolis.
- Başar, N., Uzun, L., Güner, A., Denizli, A. (2007). Lysozyme purification with dye affinity beads under magnetic field, *International Journal of Biological Macromolecules*. 41, 234-242.
- Bayems, V., Gurny, R., 1997. Chemical and physical parameters of tears relevant for the design of ocular drug delivery formulations, *Pharm Acta Helv.*, 72:191-202.
- Bereli, N., Şener, G., Altıntaş, E. B., Yavuz, H., Denizli, A., 2010, Poly(glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for psödo-specific affinity depletion of albumin and immunoglobulin G, *Materials Science and Engineering C.*, 30, 323-329.
- Biellman, J. F., Samma JP, Branden CI, Eklund H., 1979, X-ray studies of the binding of Cibacron Blue F3GA to liver alcohol dehydrogenase, *Eur. J. Biochem*; 102:107.
- Biggs, M.J., Vasileios Koutsos and Rebecca Cheung, 2003-2005.
- Bode, W., Schwager, P., 1975, *J Mol Biol*, 98:693.
- Bohme, H.J., Schulz, G., Hofmann E., 1972, Affinity chromatography of phosphofructokinase using Cibacron Blue F3GA. *J. Chromatogr*, 69:209–14.

Brabers, V.A.M., 1995, in Handbook of Magnetic Materials, Vol. 8 (Ed: K. H. J. Buschow), Elsevier Science, pp. 189.

Bradford, M. M., 1976, *Anal. Biochem.*, 72:248.

Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A.P., 1998, Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels, *Science*, 281, 2013-2016.

Campton, J. J. and Jones. C. G., 1985, *Anal. Biochem.*, 151, 369-374.

Cao, L.Q., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., 2000, Glutaraldehyde Cross-link Analogues from Carbohydrates, *Org. Lett.*, 2, 1361–1364.

Chase, H. A., 1988, Adsorption separation processes for protein purification. In: Mizrahi A., editor. Downstream processes: equipment and techniques. London: Alan R. Liss., p. 159–204.

Chemin, N., ve ark, 2008, Structure and Mechanical Properties of Mesostuctured Functional Hybrid Coatings Based on Anisotropic Nanoparticles Dispersed in Poly(hydroxylethyl methacrylate), *Chem. Mater.*, 20 (14), pp 4602–4611.

Chen, Y., Guo, Z., Wang, X., Qiu, C., 2008, Sample preparation. *J. Chromatogr. A*, 1184: 191–219.

Cheung, C.W., Porter, J.F. and Mckay G., 2001, *Water Research*, 35, 605-612.

Chromy, B. A., Gonzales, A. D., Perkins, J., Choi, M. W., Corzett, M. H., Chang, B.C., Corzett, C. H., Maloney, S. L., 2004. *Journal of Proteome Research*, 3, 1120.

Clonis, Y. D., Labrou, N. E., Kotsira VPh, Mazitsos, C., Melissis, S., Gogolas, G., 2000, Biomimetic dyes as affinity purification tools in enzyme purification. *J Chromatogr*, 891: 33–44.

Clonis, Y. D., Lowe, C. R., 1981, Affinity chromatography on immobilized triazine dyes: studies on the interaction with multinucleotide-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 659: 86–98.

Cochet, S., Berthand, O., Boschetti, E., Girat, P., Hebert, E., Mansigny, M., Poche, A. C., Santambien, P., Sdiqui, N., 1994, Toxicity studies on Reactive Blue-2 leached From Affinity Material Exposed to Extreme Chemical Conditions, *Bioseperation.*, 4(5): 299-309.

Congdon, R. W., Muth, G. W., and Splittgerber, A. G., *Anal. Biochem.*, 1993, 213, 407-413.

- Corchero, J.L., Villaverde, A., 2009, Review: Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles, *Trends in Biotechnology* Vol.27 No.8, 468-476.
- Cornell, R. M., Schertmann, U., 1996, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*, VCH Publishers, Weinheim.
- De La Isla, A., Brostow, W., Bujard, B., Estevez, M., Rodriguez, J.R., Vagas, S., and Castano, V. M., 2003, Nanohybrid Scratch Resistant Coating for Teeth and Bone Viscoelasticity Manifested in Tribology, *Mat. Resr. Innovat.*, 7, 110-114.
- Deluca, P. P., Kanke, M., Geissle, R. G., Powell, D., Kaplan, A., 1989, Macrophage Phagocytosis of Polymeric Drug Carriers, *Cong. Int. Technol. Pharma.*, 5. Edition, 5, 35-61.
- Dean, P. D. G., Johnson, W. S., Middle, F. A., 1985, *A practical approach to affinity chromatography*, Oxford, UK: IRL Press.
- Denizli, A., 2007, Protein Analizi, *Bilim Ve Teknik*, 476: 66–9.
- Denizli, A., Pişkin, E., 1995, DNA immobilized polyhydroxyethylmethacrylate microbeads for affinity sorption of human immunoglobulin-G and anti-DNA antibodies. *J Chromatogr, B*, 666:215–22.
- Denizli, A., Pişkin, E., 1995, Heparin immobilized polyhydroxyethylmethacrylate microbeads for cholesterol removal: a preliminary report. *J Chromatogr, B*, 670:157–61.
- Denizli, A., Rad, A. Y., Pişkin, E., 1995, Protein A immobilized polyhydroxyethylmethacrylate beads for affinity sorption of human immunoglobulin-G. *J Chromatogr, B*, 668:13–9.
- Denkbaşı, E. B., 17-19 Eylül 2003, Ayırma ve saflaştırma işlemlerinde manyetik taşıyıcı teknolojisi, IV. Ulusal Kromatografi Kongresi, Ankara, Türkiye.
- Edelstein, R.L., Tamanaha, C.R., Sheehan, P.E., Miller, M.M., Baselt, D.R., Whitman, L.J., Colton, R.J., 2000, The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents, *Biosen. Bioelectron*, 14, 805-813.
- Edwards, T.M., ve ark., 1996, *Planet. Space Sci.*, 44, 371-386.
- Feng, S., Huang, G., 2001, Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers, *J Control Release.*, 12; 71(1):53-69.
- Ferreira, L., M.M. Vidal, M.H. Gil, *Int. J. Pharm.* 194 (2000) 169.-180.

- Fleminger, G., Hadas, E., Koppel, R., Schwartz, F., Raviv, O., 1990, Enhanced Activity Of Immobilized Dimethylmaleic Anhydrideprotected Poly- and Monoclonal Antibodies, *J. Chromotogr.*, 510:303-9.
- Gökay, O., Ayhan, H., Synthesis of Diagnostic Test Kits for Syphilis with Polymeric Particles, *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, Volume16, 5, 597-610, 2005.
- Graham, D.R., Elliott, S.T., Van Eyk, J.E., 2005, Broad-based proteomic strategies: a practical guide to proteomics and functional screening, *J. Physiol*, 563:1–9.
- Greenough, W.T., Ling, S.C., P.S. Fahrner, and V.I. Gelfand., 2004. Transport of *Drosophila* fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:17428–17433.
- Gu, J., Qi-zhi, Y., Lei, Z., 2008, Adsorption of Human Serum Albumin onto PVA-coated Affinity Microporous PTFE Capillary, *Chem. Res. Chinese Universities*, 24(2),154-161.
- Gu, J., Lei, Z., Qizhi, Y., 2007, *Journal of Membrane Science*, 287, 271.
- Guo, Y., Fu Z., Van Eyk, J.E., 2007, A proteomic primer for the clinician. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 4:9-17.
- Gutwein, L.G., Webster, T.J., 2003, American Ceramic Society 26th Annual Meeting Conference Proceedings.
- Güven G., 2005, Eş boyutlu, katyonik, fonksiyonel grup içeren/içermeyen manyetik nanokürelerin sentezi, karakterizasyonu ve nükleik asit uygulamaları, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.
- Hall, D.A., Ptacek, J., Snyder, M., 2007, Protein microarray technology. *Mech Ageing Dev*, 128:161-7.
- Han, M.H., Hwang, S.I., Roy, D.B., Lundgren, D.H., Price, J.V., Ousman, S.S. ve ark., 2008, Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets, *Nature*, 451: 1076-81.
- Han, M., Gao, X., Su, J.Z., Nie, S., 2001, Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules, *Nature Biotechnol.*, 19, 631-635.
- Holtzscherer, C., Candau, F., 1988, *J. Colloid Interface Sci.*, 125, 87.

- Horak, D., Babic, M., Mackova, H., Benes, M., 2007, Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations, *J. Sep. Sci.*, 30, 1751-1772.
- Hilario, M., Kalousis, A., Pellegrini, C., Müller, M., 2006, Processing and classification of protein mass spectra. *Mass Spectrom Rev*, 25: 409-49.
- Jolivet, J.P. ve ark., 2010, *C.R. Chimie* 13, 40-51.
- Karakuş, S., 2006, Polivinil klorid/bentonit nanokompozitin hazırlanması ve karakterizasyonu, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, İstanbul.
- Kopperschlager, G., Freyer, R., Diezel, W., Hofmann, E., 1968, Some kinetic and molecular properties of yeast phosphofruktokinase. *FEBS Lett*, 1:137-40.
- Kumar, M.N.V., Rav, Bakowsky, U., Lehr, C.M., 2004, Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers, *Biomaterials*, 25 1771-1777.
- Kuramitsu, Y., Nakamura, K., Kuramitsu, Y., Nakamura, K., 2006, Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers, *Proteomics*, 6:5650-61.
- Kurban, S., Mehmetoğlu, İ., 2010, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, *Konya Yeni Tıp Dergisi*, 27:70-75.
- Lauer, Jr., H.V., Ming, D.W., Golden, D.C., Lin, I.-C., Morris, R.V., and Boynton, W.V. (2000) Thermal and evolved gas analyses at reduced pressures: A mineral database for the Thermal and Evolved Gas Analyzer (TEGA). *Lunar and Planetary Science XXXI*, Abstract, 1990, CD-ROM.
- Leatherbarrow, R. J., Dean, P. D. G., 1980, Studies on the Mechanism of Binding of Serum Albumins to Immobilized Cibacron Blue F3G A, *Biochem. J.*, 189, 27-34.
- Li, Y., Spencer, H.G., 1994, In: *Polymers of Biological and Biomedical Significance*; Shalaby, W., Ed.; ACS: Washington DC, p: 297.
- Lillehoj, E. P., Malik, V. S., 1982, Protein purification. In: Fiechter A, editor. *Advances in biochemical engineering biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag, p. 20-65.
- Lowe, C. R., Gald, M., Larsson, P. O., Ohlson, S., Small, D. A. P., Atkinson, T. ve ark., 1981, High performance liquid affinity chromatography of proteins on Cibacron Blue F3GA bonded silica. *J Chromatogr.*, 215:303.

Ma. J., Wong, H., Kong, L.B., Peng, K.W., 2003, Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium, *Nanotechnol.*, 14, 619-623.

Mah, C., Zolotukhin, I., Fraites, T.J., Dobson, J., Batich, C., Byrne, B.J., 2000, Microsphere-mediated delivery of recombinant AAV vectors in vitro and in vivo, *Mol Therapy*, 1, 239.

Mahn, A. ve ark., 2010, Depletion of highly abundant proteins in blood plasma by hydrophobic interaction chromatography for proteomic analysis *J. Chromatogr. B* 878, 1038-1044.

Mahtab, R., Rogers, J.P., Murphy, C.J, 1995, Protein-sized quantum dot luminescence can distinguish between "straight", "bent", and "kinked" oligonucleotides, *J Am Chem Soc*, 117, 9099-9100.

Matejtschuk, P., 1997, *Affinity Separations, A Pratical Approach*, IRL Press, Oxford.

Mohr, P., Klaus, P., 1985, *Affinity Chromatography: Practical and Theoretical Aspects*, Science, 301.

Molday, R.S., Mackenzie, D., 1982, Immunospecific ferromagnetic iron dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells, *J Immunol Methods*, 52, 353-367.

Morita, S., Kitagawa, K., Yukihiro, O., 2009, *Vibrational Spectroscopy*, 51, 28-33.

Nam, J.M., Thaxton, C.C., Mirkin, C.A., 2003, Nanoparticles-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins, *Science*, 301, 1884-188.

Narayanan, R.S., 1994, *Preparative Affinity Chromatography of Proteins*, *Journal of Chromatography A*, 658, 237-258.

Nash, D.C., Chase, H.A., 1997, *J. Chromatogr. A*, 776, 55.

Nedelkov, D., 2008, Population proteomics: investigation of protein diversity in human populations, *Proteomics*, 8:779-86.

Nedelkov, D., Kiernan, U.A., 2006, Niederkofler EE, Tubbs KA, Nelson RW. Population proteomics: the concept attributes, and potential for cancer biomarker research, *Mol Cell Proteomics*, 5:1811-18.

Nedelkov, D., Kiernan, U.A., Niederkofler, E.E., Tubbs, K.A., Nelson, R.W., 2005, Investigating human plasma proteins diversity, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 10852-7.

Nisnevitch, M., Firer, M. A., 2001, The solid phase in affinity chromatography: strategies for antibody attachment, *Biochem. Biophys. Methods*, 49, 467-480.

- Oakley, A. J., Bello, M. L., Nuccetelli, M., Mazzetti, A. P., Parker, M. W., 1999, The ligand (non-substrate) binding site of human pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site), *Journal of Molecular Biology*, Volume 291, Issue 4, 913-926.
- Odabaşı, M., Denizli, A., 2004, Cibacron Blue F3GA- attached magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads for human serum albumin adsorption, *Polym Int.*, 53, 332-338.
- Öncel, S., 2004, Fenilalanin İçeren Hidrofobik Etkileşim Kromatografi Sorbentlerinin Sentezlenmesi ve Lizozim Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.
- Öztürk, N., 2006, Hidrofobik Nanoyapılarda Candida Rugosa Lipaz İmmobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 128 s.
- Panatarotto, D., Prtidos, C.D., Hoebeke, J., Brown, F., Kramer, E., Briand, J.P., Muller, S., Prato, M., Bianco, A., 2003, Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses, *Chemistry & Biology*, 10, 961-966.
- Parak, W.J., Gerion, D., Pellegrino, T., Zanchet, D., Micheel, C., Williams, C.S., Boudreau, R., Le Gros, M.A., Larabell, C.A., Alivisatos, A.P., 2003, Biological applications of colloidal nanocrystals, *Nanotechnol.*, 14, R15-R27.
- Parak, W.J., Boudreau, R., Gros, M.L., Gerion, D., Zanchet, D., Micheel, C.M., Williams, S.C., Alivisatos, A.P., Larabell, C.A., 2002, Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks, *Adv Mater*, 14, 882-885.
- Reich, D.H., Tanase, M., Hultgren, A., Bauer, L.A., Chen, C.S., Meyer, G.J., 2003, *J Appl Phys*, 93, 7275-7280.
- Roschlau, P., Hess, B., 1972, Affinity chromatography of yeast pyruvatekinase with Cibacron blau bound to Sephadex G-200 Hoppe-Seyler's., *Z Physiol Chem.*, 353, 441-3.
- Roy, I., Ohulchansky, T.Y., Pudavar, H.E., Bergey, E.J., Oseroff, A.R., Morgan, J., Dougherty, T.J., Prasad, P.N., 2003, Optical Tracking of Organically Modified Silica Nanoparticles as DNA Carriers: A Nonviral, Nanomedicine Approach for Gene Delivery, *J Am Chem Soc.*, 125, 7860-7865.

Sadana, A., Beelaram, A.M., 1994, Efficiency and economics of bioseparation: some case studies, *Bioseparation*, 4 (4):221-35.

Salata, O. V., 2004, Applications of nanoparticles in biology and medicine, *Journal of Nanobiotechnology*, 2:3.

Salih, B., Zenobi, R., 1998, *Anal Chem.*, 70, 1536-1543.

Scouten, W.H., 1981, *Affinity Chromatography: Bioselective Adsorption on Inert Matrices*, New York: John Wiley and Sons, 348:59.

Sheng, S., Chen, D., Van Eyk, J.E., 2006, Multidimensional liquid chromatography separation of intact proteins by chromatographic focusing and reversed phase of the human serum proteome: optimization and protein database, *Mol Cell Proteomics*, 5: 26-34.

Soltys, P. J., Etzel, M. R., 2000, Equilibrium Adsorption Of LDL and Gold Immunoconjugates to Affinity Membranes Containing PEG Spacers, *Biomaterials*, 21 (1):37.

Soskic, V., Schwall, G., Nyakatura, E., Poznanovic, S., Stegmann, W., Schratzenholz, A., 2006, Hexadecanedioic acid-sepharose 4B: a new tool for preparation of albumin-depleted plasma, *J. Proteome Res.*, 5, 3453-3458.

Stead, C. V., Clonis, Y. D., Lowe, C. R., 1987, Novel cationic dyes for protein purification. *Biotechnol Bioeng*, 30:621.

Subramanian, S., 1984, Dye-ligand chromatography: the interaction of Cibacron Blue F3GA with proteins and enzymes, *CRC Crit Rev Biochem*, 16, 169–205.

Swartz, H.M., Bolton, J.R., Borg, D.C. (1972). *Biological Applications of Electron Spin Resonance*, Wiley, New York.

Thompson, S. T., Cass, K. H., Stellwagen, E., 1975, Blue-Dextran-Sepharose: an affinity column for the dinucleotide folding proteins. *Proc Natl Acad Sci.*, 72:669.

Tübitak, *Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri*, 2004, Ağustos.
<http://www.eteat.gazi.edu.tr/makale/nano.pdf>.

Urbas, L., Brne, P., Gabor, B. ve ark., 2009, Depletion of high-abundance proteins from human plasma using a combination of an affinity and psödo-affinity column, *J. Chromatogr. A.*, 1216, 2689-2694.

Uygun, D.A., Karagözler, A.A., Akgöl, S., Denizli, A., 2009, Magnetic hydrophobic affinity nanobeads for lysozyme separation, *Materials Science and Engineering C* 29, 2165-2173.

Vogel, V., Baird, B., 2003, Report of the national nanotechnology initiative workshop, Arlington, VA, 3, VCH, Weinheim, 617-642.

Von Eggeling, F., Gawriljuk, A., Fiedler, W., Ernst, G., Blaussen, U., Klose, J., ve ark., 2001, Fluorescent dual colour 2D-protein gel electrophoresis for rapid detection of differences in protein patter with standard image analysis software, *Int J Mol Med*, 8:373-7.

Wang, S., Mamedova, N., Kotov, N.A., Chen, W., Studer, J., 2002, Antigen/Antibody Immunocomplex from CdTe Nanoparticle Bioconjugates, *Nano Letters*, 2, 817–822.

Warder, S. E., 2009, High-abundance protein depletion, *Anal. Biochem.* 387, 184-193.

Weber, B., Willeford, K., Moe, J., 1979, *Biocem. Biophys. Res. Commun.*, 86, 252.

Wilchek, M., Miron, T., 1999, *React. And Func. Polymers*, 41, 263-268.

Wilson, J. E., 1976, Applications of Blue dextran and Cibacron Blue F3GA in purification and structural studies of nucleotide requiring enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*, 72, 816-20.

Yarden, Y., Harari, I., and Schlessinger, J., 1985, Purification of An Active EGF Receptor Kinase With Monoclonal Antireceptor Antibodies, *J. Biol. Chem.*, 260, 1, 315-319.

Yoshida, J., Kobayashi, T., 1999, Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes, *J Magn Mater*, 194, 176-184.

Yuan, W., Yuan, J., Zhou, L., Wu, S., Hong, X., 2010, Fe₃O₄@ poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-graft-poly(ε-caprolactone) magnetic nanoparticles with branched brush polymeric shell, *Polymer*, 51, 2540-2547.

Zhang, J., Zhang, Z., Song, Y., Cai, H., 2006. *React. Funct. Polym.*, 66, 916.

Zheng, W., Gao, F., Gu, H., 2005, Magnetic Polymer Nanospheres with high and Uniform Magnetite Content, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 288, 403-410.

Zolotarjova, N. ve ark., 2008, *J. Chromatogr. A* 1189, 332–338.

EKLER

EK 1

BRADFORD YÖNTEMİ

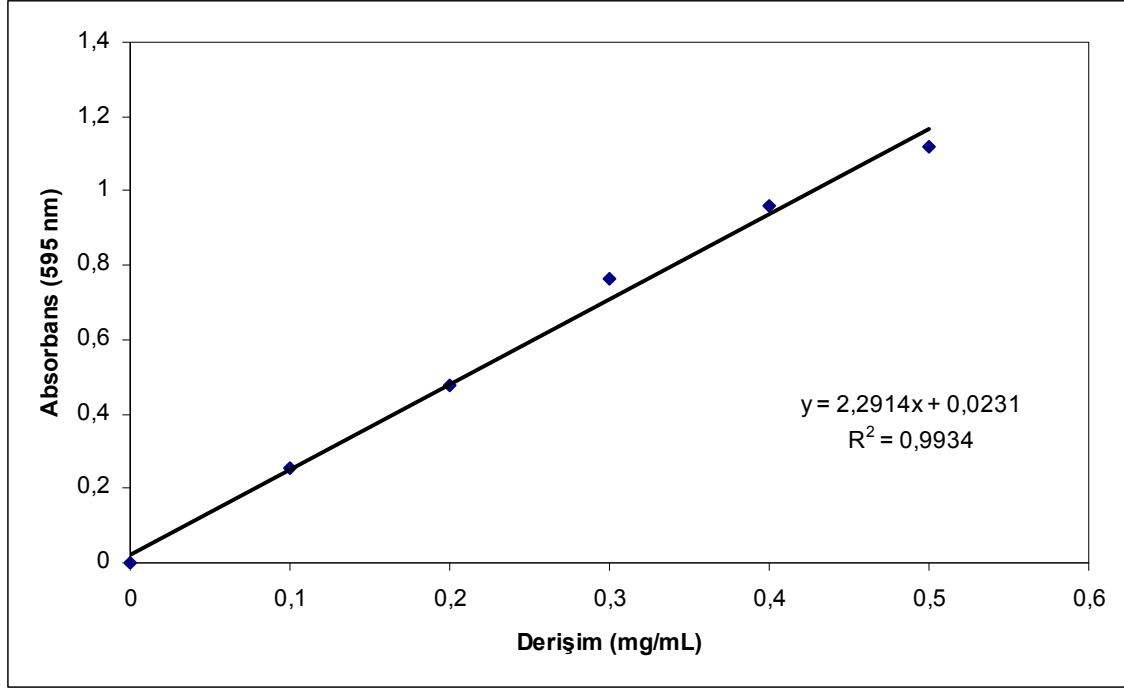
Tüm basamaklarda protein örneklerinin nicel tayini Bradford yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Bradford, 1976).

Protein çalışmalarının pek çok alanında protein derişimi tespiti için hızlı ve doğru bir yöntem gerekliliği doğar. 1976 yılında Bradford tarafından tanımlanan Bradford protein analizi yöntemi bugün pek çok laboratuvarında proteinlerin nicel analizi için kullanılmaktadır. Bu teknik Lowry yönteminden daha basit, daha hızlı ve daha hassastır. Ayrıca Lowry yöntemine kıyasla biyolojik örneklerin protein olmayan bileşenlerinden kaynaklanan girişimlere Bradford yönteminde daha az rastlanır. Bradford yöntemi Coomassie Blue G 250 boyasının proteine bağlanması esasına dayanır. Araştırmalar serbest boyanın dört farklı iyonik formda ortaya çıkabileceğini göstermiştir. Asidik çözeltide baskınlığını gösteren ve boyanın daha katyonik olan kırmızı ve yeşil halleri karşılıklı olarak 470 ve 650 nm değerlerinde maksimum absorbanı gösterirler.

Bunun tam tersi olarak da boyanın daha anyonik olan ve proteine bağlanan mavi formu; 590 nm değerinde maksimum absorbanı gösterir. Böylece de protein miktarı; mavi iyonik haldeki boyanın miktarını saptayarak ortaya çıkartılır. Bu saptama çoğunlukla çözeltinin 595 nm'deki absorbanı değeri ölçülerek yapılır. Boyanın genellikle proteinlerin arjinil and lizil kalıntılara bağlandığı fakat serbest aminoasitlere bağlanmadığı daha önce yapılan literatür çalışmalarında tespit edilmiştir (Campton and Jones, 1985; Congdon, 1993).

Bradford çözeltisi hazırlanırken, 50 mg Coomasie Brilliant Blue G-250 boyası 100 ml etil alkol içinde çözülmüş ve bu karışımın üzerine 50 ml fosforik asit (H₃PO₄) eklenmiştir. Hazırlanan stok Bradford çözeltisi, kullanılacağı zaman 5 kez distile su ile seyreltilmiş ve kaba filtre kağıdından bir kez süzölmüştür.

Protein miktarının belirlenmesi için, 0.2 µl protein örneği ve 2 ml Bradford çözeltisi bir deney tüpüne alınarak vortekslenmiştir. Karışım 10 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede 595 nm'de absorbans değeri okunmuştur.



HSA ile elde edilen Kalibrasyon Grafiği

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Öznur Saka

Doğum Yeri : Karabük

Doğum Yılı : 1978

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu :

Lise : 1993-1996 Karabük Anadolu Lisesi, Karabük

Lisans : 1996-2001 Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Ankara

Yüksek Lisans : 2001-2003 Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik A.B.D., Beytepe, Ankara

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi : 2001-... İngilizce Öğretmeni, Milli Eğitim Bakanlığı

Yayınlar : Ö. Gökay, H. Ayhan, Synthesis of Diagnostic Test Kits for Syphilis with Polymeric Particles, *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, Volume16, 5, 597-610, 2005.