

**BİYOMOLEKÜLLER İÇİN MOLEKÜL
BASKILANMIŞ POLİMERİK
YAPAY RESEPTÖR GELİŞTİRİLMESİ VE
BİYOKROMATOĞRAFİ UYGULAMALARI**

Ayça ÖZCAN
Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Haziran 2007

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayça Özcan'ın "Biyomoleküller için Molekül Baskılanmış Polimerik Yapay Reseptör Geliştirilmesi ve Biyokromatografi Uygulamaları" başlıklı Kimya Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 15.06.2007 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı): Doç. Dr. ARZU ERSÖZ

Üye : Prof. Dr. RIDVAN SAY

Üye : Prof. Dr. TEVFİK GEDİKBEY

Üye : Prof. Dr. MUSTAFA ŞENYEL

Üye : Prof. Dr. ADİL DENİZLİ

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

BİYOMOLEKÜLLER İÇİN MOLEKÜL BASKILANMIŞ POLİMERİK YAPAY RESEPTÖR GELİŞTİRİLMESİ VE BİYOKROMATOĞRAFI UYGULAMALARI

Ayça ÖZCAN

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

**Danışman: Doç.Dr. Arzu ERSÖZ
2007, 120 sayfa**

Bu tez çalışması, biyomoleküllerin (protein, aminoasit, kolesterol vb.) buldukları çok bileşenli karmaşık ortamlardan (kan, vücut sıvıları vb.) ayrılmaları ve saflaştırılmaları için, metal-şelat etkileşimlerine dayalı moleküler baskılı polimerlerin (MIP) hazırlanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak, yüzeyinde histidin içeren proteinler ve D-L-histidin enantiyomer karşımını ayıracak L-histidin belleklere sahip yeni nesil biyo-adsorban geliştirilmiş ve kromatografik uygulaması incelenmiştir. İkinci aşamada, çeşitli vücut sıvılarında bulunan ve DNA'daki oksidatif zararın tanısında kullanılan 8-Hidroksi-2'-deoksiguazin (8-OHdG) molekülünün, bulunduğu matriksten ayrılması için yeni bir molekül baskılı adsorban sentezlenmiş ve elde edilen adsorbanın katı-faz ekstraksiyon uygulamasındaki kullanılabilirliği incelenmiştir. Tezin son aşamasında ise vücut için oldukça önemli bir biyomolekül olan kolesterolün tayini için yeni bir kromatografik destek malzemesi hazırlanmış ve etkinliği incelenmiştir. Bu çalışma, literatürde Hızlı Protein Sıvı Kromatografisi (FPLC) ile yapılan ilk preparatif protein ayırım uygulaması ve 8-OHdG baskılanmasıyla gerçekleştirilmiş ilk çalışmadır. Dahası, tez kapsamında hazırlanan tüm MIPler ilgili moleküller için yüksek seçiciliğe sahip, düşük maliyetli ve biyolojik sistemlerle uyumludur.

Anahtar Kelimeler: Molekül Baskılanmış Polimerler (MIP), Biyokromatografi, Biyomoleküller, Enantiyomerik Ayırım, Ön-deriştirme.

ABSTRACT**PhD Dissertation****DEVELOPMENT OF MOLECULAR IMPRINTED POLYMERIC ARTIFICIAL RECEPTORS FOR BIOMOLECULES AND THEIR BIOCHROMATOGRAPHY APPLICATIONS****Ayça ÖZCAN****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Program****Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Arzu ERSÖZ
2007, 120 pages**

This thesis has been performed in order to prepare molecule imprinted polymers (MIP) based on the metal-chelate interaction for the isolation and purification of the biomolecules (proteins, aminoacids, cholestrole, etc.) from their complex matrixes (blood, body fluids, etc.). For this purpose, firstly, a new generation bio-adsorbent having L-histidine memory in order to extract the proteins including surface histidine and differentiate D-L-histidine enantiomers has been devoloped and its chromatographic application has also been investigated. In the second step, a novel molecule imprinted adsorbent has been synthesized for the separation of 8-Hydroxy-2'-deoxyguanasine (8-OHdG) found in the different body fluids and used in the diagnosis of the oxidative DNA damage from its matrix and the availability of the obtained adsorbent in the solid phase extraction of 8-OHdG has also been investigated. In the last section, a novel chromatographic column material has been evolved for the determination of cholesterol which is a very important biomolecule for the human and efficiency of this column has been investigated. This study presents the first application for the preparative protein seperation using Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) and first attempt towards the imprinting of 8-OHdG in the literature. Moreover, all the MIPs that have been prepared within thesis have high selectivity towards related molecules, have low cost and are compatible with biological systems.

Keywords: Molecular Imprinted Polymers (MIP), Biochromatography, Biomolecules, Enantiomeric Separation, Pre-concentration.

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde, bilgisini, sabrını ve desteğini benden hiç bir zaman esirgemeyen, benim için bir hocadan çok daha fazla anlam taşıyan sevgili danışman hocam Sayın Doç. Dr. Arzu ERSÖZ'e,

Deneysel çalışmalarım boyunca bilgi birikimi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, yol göstericiliğinden ve değerli katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a

Bölümümüz imkanlarından yararlanmamızı sağlayan ve bizi her zaman destekleyen Kimya Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Lale ZOR'a, Fakülte olanaklarından yararlanmamızı sağlayan değerli Dekanımız Sayın Prof. Dr. Mustafa ŞENYEL'e,

Tez İzleme Komitemde yer alan ve çalışmalarım boyunca desteğini eksik etmeyen Sayın Prof. Dr. Tevfik GEDİKBEY'e,

Edindiğim teorik bilgilerime ve deneysel çalışmalarına değerli katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye,

Deneysel çalışmalarımda, imkanlarından rahatlıkla yararlanmamı sağlayan Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi çalışanları ve yöneticilerine,

Bu zorlu süreçte benim nazımı çeken ve bana maddi, manevi her türlü yardımda bulunan, Sibel EMİR DİLTEMİZ, Yasemin ÇİMEN, Filiz YILMAZ, Mutlu ŞAHİN ve tüm sevgili arkadaşlarıma,

Yanımda olmasalarda, manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiren canım AİLEM'e

Tezime ve asıl önemlisi hayatıma kattıklarından dolayı birtanem Ali ÖZCAN'a ve ansızın hayatıma girip, bana şimdi bu tezi nasıl bitiririm, dedirten canım bebeğim HASAN BERK'e

Sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Ayça ÖZCAN

Haziran 2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Biyomoleküller.....	3
1.1.1. Nükleik asitler	4
1.1.1.1. Primidin bazları	5
1.1.1.2. Purin bazları	6
1.1.1.3. Nükleozidler	7
1.1.1.4. 8-Hidroksi-2'-deoksiganazinin.....	8
1.1.2. Proteinler	9
1.1.2.1. Aminoasiler	10
1.1.2.2. Proteinlerin yapısı	16
1.1.2.3. Proteinlerin denatürasyonu ve renatürasyonu	20
1.1.2.4. Proteinlerin sınıflandırılması.....	20
1.1.2.5. Proteinlerin saflaştırılması	21
1.1.3. Kolesterol	23
1.1.3.1. Kolesterolün özellikleri.....	24
1.1.3.2. Hücre içinde kolesterol düzeyinin denetimi.....	25
1.2. Yapay Reseptörler	27
1.2.1. Molekül Baskılanmış Polimerler (MIP).....	28
1.2.1.1. Kovalent Baskılama	30
1.2.1.2. Non-Kovalent Baskılama	30
1.2.1.3. MIP hazırlama teknikleri	31

1.2.1.4. Moleküler baskılamada kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	31
1.2.1.5. MİPlerin uygulama alanları	32
1.2.1.6. Biyomoleküllerin ayrılmasında MIP lerin kullanımı	33
1.3.Kromatografi.....	40
1.3.1. Kromatografinin Teorisi.....	41
1.3.2. Kromatografik Yöntemlerde Ayırmada Etkin Olan Mekanizmalar... 46	
1.3.2.1. Adsorpsiyon mekanizması	46
1.3.2.2. Partisyon (dağılma) mekanizması	47
1.3.2.3. İyon değişim mekanizması.....	47
1.3.2.4. Jel geçirgenliği mekanizması	48
1.3.3. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	49
1.3.3.1. İnce tabaka kromatografisi.....	50
1.3.3.2. Kağıt kromatografisi	50
1.3.3.3. Kolon kromatografisi	50
1.3.3.4. Gaz kromatografisi.....	51
1.3.3.5. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi.....	51
1.3.3.6. Süperkritik akışkan kromatografisi	54
1.3.3.7. İyon değişim kromatografisi	55
1.3.4. Enantiyomerik karışımların kromatografik yöntemlerle ayrılması....	55
1.3.5. Katı-faz ekstraksiyonu	57
2. MATERYEL VE YÖNTEM.....	60
2.1. Materyal	60
2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	60
2.1.2. Kullanılan cihazlar	60
2.2. Yöntem.....	61
2.2.1. Metakrilamidohistidin (MAH) monomerinin sentezi	61
2.2.2. Metakrilamidohistidin-Cu(II) metal-şelat monomeri sentezi.....	61
2.2.3. L-Histidin Baskılı Polimerik Kürelerin Hazırlanması	62
2.2.4. Metakrilamidohistidin-Pt (II) metal-şelat monomeri sentezi.....	63
2.2.5. 8-Hidroksi-2-deoksiganizin (8-OHdG) baskılı polimerin sentezi ...	63
2.2.6. Kolesterol baskılı polimerinin sentezi.....	64

3. BULGULAR	66
3.1. Hazırlanan Monomer ve Polimerlerin Karakterizasyonu	66
3.1.1. MAH ve MAH-Cu(II) monomerlerinin karakterizasyonu	66
3.1.2. MAH-Pt(II) monomerinin karakterizasyonu.....	68
3.1.3. L-Histidin baskılı polimerik kürelerin karakterizasyonu	69
3.1.3.1. L-Histidin baskılı mikrokürelerin yüzey morfolojisi	70
3.1.4. 8-OHdG baskılı polimerin karakterizasyonu	71
3.1.4.1. 8-OHdG baskılı polimerin yüzey morfolojisi	73
3.1.5. Kolesterol baskılı polimerin karakterizasyonu.....	74
3.1.5.1. Kolesterol baskılı mikrokürelerin yüzey morfolojisi	75
3.2. Proteinlerin Ayrılması.....	76
3.2.1. Protein adsorpsiyonuna tampon türü ve pH'ın etkisi.....	77
3.2.2. Cyt-c adsorpsiyonuna başlangıç derişimlerinin etkisi.....	77
3.2.3. Histidin baskılı mikrokürelerin cyt-c adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon izotermi.....	78
3.2.4. Histidin baskılı mikrokürelerin cyt-c bağlama etkinliğinin ölçülmesi	81
3.2.5. Histidin baskılı mikrokürelerin yeniden kullanılabilirliği	82
3.2.6. HIBS dolgulu kolonla gerçekleştirilen protein ayırımı.....	83
3.3. Enantiyomerik Karışımların Ayrılması.....	85
3.3.1. L-Histidin adsorpsiyonuna pH'ın etkisi	85
3.3.2. L-Histidin adsorpsiyonuna başlangıç derişimlerinin etkisi.....	86
3.3.3. Histidin baskılı mikrokürelerin L-histidin adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon izotermi.....	87
3.3.4. Histidin baskılı mikrokürelerin L-histidin bağlama etkinliğinin ölçülmesi.....	89
3.3.5. HIBS dolgulu kolonla gerçekleştirilen enantiyomerik ayırım	90
3.4. 8-OHdG Adsorpsiyon Kapasitesinin İncelenmesi, Katı-Faz Ekstraksiyonu Uygulaması ve CE ile Tayini	92
3.4.1. 8-OHdG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi.....	92
3.4.2. 8-OHdG adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi.....	93

3.4.3. 8-OHdG baskılı polimerin 8-OHdG adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon izotermi	94
3.4.4. 8-OHdG baskılı polimerin 8-OHdG bağlama etkinliğinin ölçülmesi	96
3.3.5. 8 -OHdG baskılı polimerin seçiciliği	96
3.4.6. 8-OHdG baskılı polimerin yeniden kullanılabilirliği	97
3.4.7. Katı-Faz ekstraksiyonu ile kandan 8-OHdG'nin önderiştirilmesi	98
3.4.8. Kapiler elektroforez (CE) cihazı ile 8-OHdG tayini	98
3.5. Kolesterol Baskılı Mikrokürelerin Adsorpsiyon Kapasitelerinin İncelenmesi ve Biyokromatografik Uygulaması	100
3.5.1. Kolesterol adsorpsiyonuna başlangıç derişimlerinin etkisi	100
3.5.2. Kolesterol baskılı polimerin kolesterol adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon izotermi	101
3.5.3. Kolesterol baskılı polimerin bağlama etkinliğinin ölçülmesi	103
3.5.4. Kolesterol baskılı polimerin yeniden kullanılabilirliği	104
3.5.5. Kolesterol baskılı polimerin biyokromatografik uygulaması	105
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	107
KAYNAKLAR	113

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. Nükleik asitin yapısında bulunan bileşiklerin sınıflandırılması.....	5
1.2. Pirimidin bazlarının molekül yapıları	6
1.3. Purin bazlarının molekül yapıları.....	6
1.4. Adenozinin molekül yapısı	7
1.5. Oksijen radikalleriyle 8-OHdG oluşumu	9
1.6. Genel aminoasit yapısı	11
1.7. Amino asitlerin ninhidrin reaksiyonu	15
1.8. Alfa-heliks yapısı.....	17
1.9. Beta tabakalı yapısı.....	18
1.10. Kolesterolün molekül formülü.....	23
1.11. Kovalent ve non-kovalent moleküler baskılama yönteminin şematik görünümü.....	29
1.12. MIP hazırlamada en çok kullanılan çapraz bağlayıcılar	32
1.13. C-Y. Hsu ve ark. tarafından hazırlanan RNase A-MIP sentezinin şematik gösterimi	38
1.14. Rachkov A. ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen Parça Baskılama Yaklaşımının şematik gösterimi.....	39
1.15. İki bileşenli bir karışımdan elde edilebilecek bir kromatogram.....	42
1.16. H-v ilişkisinin hareketli fazın (a) sıvı ve (b) gaz olduğu durumlarda grafiksel gösterimi.....	44
1.17. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması.....	49
2.1. L-Histidin kalıp oluşumunun şematik gösterimi.....	63
2.2. 8-OHdG baskılı polimer oluşumunun şematik gösterimi	64
3.1. Metakrilamidohistidin monomerinin molekül formülü	66
3.2. MAH monomerinin ¹ H-NMR spektrumu	67
3.3. MAH monomerinin FT-IR spektrumu	67
3.4. MAH monomerinin kiral kolon kullanımıyla HPLC analizi	68
3.5. MAH-Pt(II) monomerinin FT-IR spektrumu	69
3.6. Kromatografik dolgu malzemesi olarak kullanılan HIBSlerin SEM görüntüleri.....	71

3.7. MAH-Pt-8-OHdG polimerinin kalıp uzaklaştırılmasından önceki ve sonraki IR spektrumu	72
3.8. Katı-faz ekstraksiyon sorbenti olarak kullanılan 8-OHdG baskılı polimerlerin SEM görüntüleri	73
3.9. MAH-Cu-kolesterol polimerinin kalıp uzaklaştırılmasından önceki ve sonraki IR spektrumu	74
3.10. Kromatografik dolgu malzemesi olarak kullanılan kolesterol baskılı polimerlerin SEM görüntüleri	75
3.11. Cyt-c adsorpsiyonuna pH'ın etkisi	77
3.12. HIBS üzerine cyt-c adsorpsiyonuna tampon türünün etkisi	77
3.13. Cyt-c başlangıç derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi	78
3.14. HIBS partiküllerin cyt-c adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izotermi	80
3.15. HIBS partiküllerin cyt-c adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon izotermi	81
3.16. Cyt-c bağlanmasına ilişkin Scatchard grafiği	82
3.17. L-Histidin baskılı mikrokürelerin yeniden kullanılabilirliği	83
3.18. Ribinükleaz A ve cyt c moleküllerinin, MAH-Cu-L-Histidin baskılanmış polimer dolgulu bir kolonda FPLC ayırımı	84
3.19. L-Histidin Adsorpsiyonuna pH'ın Etkisi	86
3.20. L- Histidin başlangıç derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi	87
3.21. HIBS partiküllerin L-histidin adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izotermi	88
3.22. HIBS partiküllerin L-histidin adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon izotermi	88
3.23. L-Histidin bağlanmasına ilişkin Scatchard Grafiği	90
3.24. D-Histidin ve L-Histidin moleküllerinin, MAH-Cu-L-Histidin baskılanmış polimer dolgulu bir kolonda FPLC Ayırımı	91
3.25. Deneylerde kullanılan HIBS dolgulu kolon ve FPLC sistemi	91
3.26. 8-OHdG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi	93
3.27. 8-OHdG adsorpsiyonuna başlangıç derişimlerinin etkisi	94

3.28. 8-OHdG baskılı partiküllerin 8-OHdG adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izotermi	95
3.29. 8-OHdG baskılı partiküllerin 8-OHdG adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon izotermi	95
3.30. 8-OHdG bağlanmasına ilişkin Scatchard grafiği	96
3.31. 8-OHdG baskılı polimerin yeniden kullanılabilirliği	97
3.32. 20 mM borat tamponundaki 8-OHdG molekülüne ait elektrofereogram .	98
3.33. 8-OHdG tayini için CE cihazıyla elde edilen kalibrasyon eğrisi	98
3.34. Kolesterol adsorpsiyonuna başlangıç derişimlerinin etkisi	101
3.35. Kolesterol baskılı partiküllerin kolesteol adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izotermi	102
3.36. Kolesterol baskılı partiküllerin kolesterol adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon izotermi	102
3.37. Kolesterol bağlanmasına ilişkin Scatchard grafiği	104
3.38. Kolesterol baskılı polimerin yeniden kullanılabilirliği	104
3.39. Kolesterol ve ergosterol moleküllerinin, kolesterol baskılanmış polimer dolgulu bir kolonda kromatografik ayırımı	105

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. Bir E. Coli hücresinin moleküler bileşimi.....	4
1.2. Bazı Önemli Aminoasitler.....	12
1.3. 20 amino asitin üç ve tek harfli adlandırılması.....	16
1.4. Yapılarına göre proteinlerin sınıflandırılması.....	21
1.5. Affinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.....	22
1.6. MIPLerle kolesterol bağlanma çalışmaları (Gore 2004).....	36
3.1. Baskılanmış mikro kürelerin ve baskılama öncesi mikro kürelerin yüzey alanı ve gözenek boyutu analiz verileri.....	70
3.2. L-Histidin baskılı mikroküreler için Langmuir and Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması.....	89
3.3. HİBS malzemesiyle elde edilen kromatografik ayırma verileri.....	91
3.4. 8-OHdG baskılı sorbent için Langmuir and Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması.....	95
3.5. 8-OHdG baskılı polimerin seçiciliği.....	97
3.6. Kanda 8-OHdG tayini.....	100
3.7. Kolesterol baskılı sorbent için Langmuir and Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması.....	102
3.8. Kolesterol baskılı mikrokürelerle elde edilen kromatografik ayırma verileri.....	106

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIBN	: 2,2'-azobisisobütironitril
BET	: Brunauer-Emmett-Teller
BioLC	: Biyolojik sıvı kromatografisi
BJH	: Barrett–Joyner–Halenda
CE	: Kapiler elektroforez
Cyt-c	: Sitokrom C
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDMA	: Etilenglikoldimetakrilat
FPLC	: Hızlı protein sıvı kromatografisi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HIBS	: L-histidin baskılı küreler
MAH	: Metakrilamidohistidin
MAH-Pt(II)	: Metakrilamidohistidin-Pt(II)
MAH-Cu(II)	: Metakrilamidohistidin-Cu(II)
MIP	: Molekül baskılanmış polimerler
N,N'-MBAA	: N,N'-metilbisakrilamid
8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanizin
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu

1.GİRİŞ

Modern biyoteknolojide karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, hormonlar, antibadiler, antijenler vb), buldukları çok bileşenli karmaşık ortamlardan (kan, vücut sıvıları vb) seçici olarak kazanılması ve saflaştırılmasıdır. Bu moleküllerin elde edilmesinde tüm maliyetin % 50-80'ini ayırma ve saflaştırma işlemleri oluşturmaktadır (Denizli 2002).

Yapılan bu çalışma; protein, aminoasitler ve kolesterol gibi tıbbi alanda kullanılan biyolojik moleküllerin ayrılması ve saflaştırılmasına yönelik, biyolojik sistemlerle uyumlu, ilgili moleküller için yüksek seçiciliğe sahip ve düşük maliyetli, yeni nesil molekül bellekli polimerlerin (MIP) hazırlanması ve biyo-kromatografik amaçlı kullanılmasını içermektedir.

Moleküler bellekleme yöntemi, çeşitli ortamlardan belirli iyonların ve moleküllerin yüksek seçicilikle ayrılmaları için akıllı polimerler elde edilmesi ve bunun farklı uygulamalarda kullanılmasını yaygınlaştıran yeni bir kromatografik malzeme geliştirme metodudur. Moleküler baskılamada, hedef molekül, çevresi ile etkileşen bir kalıp olarak davranır, çapraz bağlı monomerler hedef molekül çevresinde düzenlenir ve kalıp benzeri bir tabaka oluşturmak üzere birlikte polimerleşirler. Polimerizasyondan sonra hedef molekül uzaklaştırılır ve bağlanma bölgeleri hedef moleküle büyüklük, şekil ve fonksiyonel grupların yerleşimi olarak tamamlayıcıdır. Bu yöntemde, hedef molekül ve fonksiyonel monomerler arasında kovalent (Wulff ve ark. 1977; Shea ve ark.1986; Sellergren ve ark. 1994; Whitcombe ve ark. 1995), kovalent olmayan (Arshady ve ark. 1981; Ramstrom ve ark. 1993; Spivak ve ark. 1998) veya metal-şelat etkileşimleri (Kuchen ve ark. 1988; Dhal ve ark. 1992; Say ve ark. 2003; Say ve ark. 2003) söz konusudur. Bu tez çalışmasında metal-şelat etkileşimlerinin gerçekleştiği türden MIP'ler sentezlenmiştir. Metal-şelat etkileşimleri, bağlanma gücü, seçiciliği ve yönlenme açısından sulu çözeltilerdeki elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarıyla kıyaslandığında kovalent etkileşimlere daha çok benzemektedir. Bununla birlikte hedef molekülün yapıdan uzaklaştırılması kovalent baskılamada olduğu kadar güç değildir (Dhal ve ark. 1992).

MIP'lerin, proteinler (Bossi ve ark 2001; Dabulis ve ark. 1992; Ou ve ark. 2004), amino asitler (Vidyasankar ve ark 1997.) ve peptidler (Hart ve ark. 2002) gibi biyolojik aktif moleküllerin seçici olarak ayrılmaları ve saflaştırılmalarında kullanılmalarına yönelik çalışmalara literatürde son yıllarda sıklıkla rastlanmaktadır. Bu yöntem ile L-fenil alanin ve L-Valin gibi aminoasitler ve peptidler, getiladenin gibi nükleotid baz analogları, efedrin, psödefrin, timolol, propranolol, kolesterol, kortikosteroidler, testesteron gibi bir çok biyomolekül için baskılanmış polimer hazırlanmış ve sonuç olarak bu moleküler baskılanmış polimerlerin, saflaştırılması istenilen hedef moleküle mükemmel bir seçicilik gösterdiği ve başarıyla uygulanabildiği kanıtlanmıştır (Denizli 2002).

Son yıllarda insan sağlığını koruma ve hastalıkları önleme amacıyla yapılan büyük yatırımlar, bu alanda geniş çaplı ve disiplinler arası AR-GE faaliyetlerinin hızla artmasını sağlamıştır. Özellikle 21. yüzyılda ortaya çıkan ve oldukça farklılaşan immunolojik hastalıkların teşhisi ve tedavisine yönelik araştırmalar tüm araştırmalara ayrılan kaynaklar içinde büyük oranlara ulaşmıştır. Ne yazık ki disiplinler arası grup çalışmasının yapılamaması ve kaynak yetersizliği nedeniyle ülkemizde bu alanlarda yapılan çalışmalara yeterince yatırım yapılamamaktadır.

Sağlığa dayalı teknolojilerin en önemlilerinden olan tedavi amaçlı biyokromatografi teknolojisi, kan proteinlerinin ve biyolojik moleküllerin, yüksek teknolojiye dayanan akıllı polimerik katı faz sorbentlerinin kullanımıyla, ultra-yüksek saflıkta saflaştırılmalarına olanak sağlamaktadır. Ayrıca rekombinant DNA teknolojisinin başarılı olabilmesi, rekombinant proteinlerin ultra-saflıkta, homojen ve biyolojik aktif ürünlerin hazırlanması amacıyla farmasötik kullanımlarda saflaştırılmasını gerektirir.

Bu tez çalışmasında, biyolojik sistemlerde en önemli unsur olan biyoyumluluğa özen gösterilmek kaydıyla, yüzeyinde histidin aminoasiti içeren proteinler ve D ve L- histidin enantiyomer karışımını ayıracak L-histidin belleklere sahip metal-şelat etkileşimlerine dayalı malzeme geliştirilmesi ve kromatografik kullanımına yönelik olarak temel bilgi ve veriler oluşturulması, ayrıca 8-hidroksi-2'-deoksiganizin ve kolesterol gibi biyomoleküllerin buldukları çoklu

ortamdan ayırılmaları ve saflaştırılmalarının yine tarafımızca hazırlanacak moleküler bellekli adsorbanlarla gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Biyomoleküller

Canlılarda bulunan biyomoleküller olağanüstü bir çeşitlilik ve komplekslik gösterirler. En küçük hücreler olan bakteriler bile binlerce farklı organik bileşiği yapısında bulundurlar. Örneğin basit bir *Escherichia coli* bakterisi yaklaşık 3000 kadar protein, 1000 aminoasit içermektedir ve her canlı türü kendine has proteinlere sahiptir, hatta aynı fonksiyonu gören proteinler bile farklıdır. Bu derece çeşitliliğe rağmen protein ve nükleik asitler çok basit ve belli sayıda yapı taşlarından oluşmaktadır. Mesela canlılarda bulunan bütün proteinler 20 çeşit aminoasitten, nükleik asitler ise 8 çeşit mononükleotidden sentezlenmektedir. Canlılarda bu kadar çok çeşitte biyomolekülün olması canlılık halinin sürdürülmesi için bir çok işlevin gerçekleştirilmesi gerekliliğinden kaynaklanmaktadır.

Canlı organizmalardaki bütün kimyasal reaksiyonlar, enzim adı verilen protein yapısındaki bileşikler tarafından katalizlenmektedir. Enzimler sayesinde, kimya laboratuvarlarında günler ve haftalar sürebilecek bir sentez, seri halde çok kısa bir süre içinde ve çok yüksek verimle gerçekleştirilir. Görüldüğü gibi biyokimya sahası oldukça incelikler ve harikulade özelliklerle doludur. Bu inceliklerin ve özelliklerin araştırılıp ortaya çıkarılması da ancak çok hassas ayırma, teşhis ve tayin metotlarının geliştirilmesinden sonra gerçekleştirilebilmiştir. Özellikle kanser araştırmaları için projelere büyük kaynakların aktarılması moleküler biyoloji de akıl almaz gelişmelere yol açmıştır.

Bütün organik biyomoleküller, çevreden sağlanan su, CO₂ ve N₂ gibi basit başlangıç maddelerinden yapılmaktadır. Bu başlangıç maddeleri, canlılar tarafından bir takım metabolik ara bileşikler yoluyla, molekül ağırlıkları 100 ile 350 arasında değişen ve makromoleküllerin yapı taşlarını teşkil eden biyomoleküllere dönüştürülürler. Bu moleküller kovalent bağlarla birleşerek makromolekülleri oluşturur. Örneğin aminoasitler proteinleri, monosakkaritler polisakkaritleri ve yağ asitleri de bazı lipidleri meydana getirirler. Bundan sonraki

daha yüksek seviyede düzenlenme, makromoleküllerin oluşturdukları “supra-moleküller” adı da verilen büyük molekül kompleksleridir. Lipoproteinler, lipid ve proteinlerin, ribozomlar, nükleik asit ve proteinlerin kovalent olmayan bağlarla meydana getirdikleri supra-molekül örnekleridir. Bunlar iyonik, hidrofobik etkileşimler ile hidrojen bağları ve Van der Waals çekim kuvvetlerini içermektedirler. Bu bağlar çok kuvvetli olmamalarına rağmen oluşan kompleksler oldukça kararlıdır. Bu kararlılık, kompleks bileşeni olan moleküllerin üç boyutlu yapılarının birbirine uygunluk göstermesinin bir sonucudur. Çizelge 1.1. de *E. coli* hücrelerinde bulunan makromoleküllerin ve diğer bileşiklerin yüzdeleri ve çeşitleri verilmiştir. Burada görüldüğü gibi canlı hücrelerde en çok protein çeşidi bulunmaktadır. (Keha ve ark. 2000)

Çizelge.1.1. Bir *E. coli* hücrenin moleküler bileşimi.

	Yüzde Ağırlık	Her Bir Moleküler Çeşit
Su	70	-
Proteinler	15	3000
DNA	1	1
RNA	6	1000
Karbonhidratlar	3	50
Lipidler	2	40
Yapı taşları ve ara bileşikler	2	50
Anorganik iyonlar	1	12

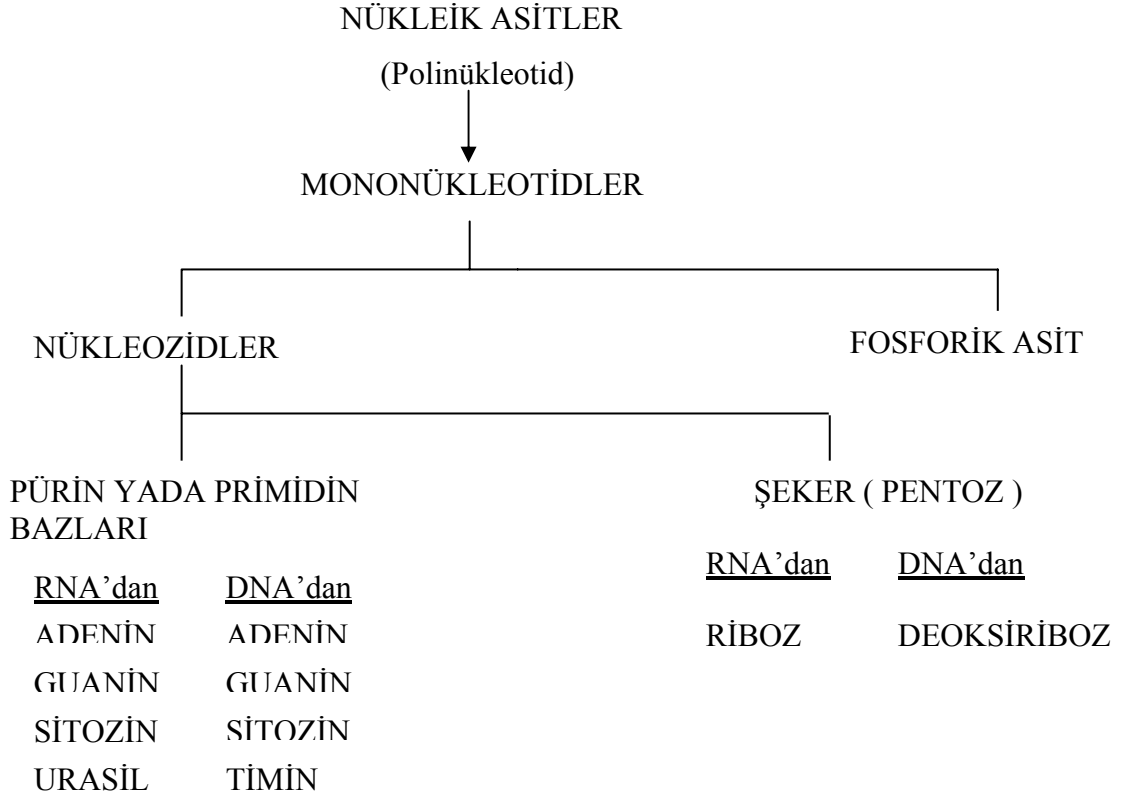
1.1.1.Nükleik asitler

Nükleik asitler genetik bilgileri içeren makromoleküller olup, protein sentezine doğrudan katılırlar. Bu nedenle nükleik asitler yaşamın temel molekülleridir. Polinükleotidler nükleotidlerin polimerleşmesinden meydana gelmişlerdir. Temel yapı birimi olan nükleotidlerin yapısında, bir pentoz molekülü, heterosiklik baza N-glikozidik bağla bağlanmış olup bir de fosforik asit taşır. Bu yapıdaki nükleotidlerin polimerleşmesi sonucu yüz milyonlarca molekül kütlesine sahip nükleik asitler oluşur.

Karbonhidrat içeriği bakımından farklı 2 çeşit nükleik asit vardır:

1.RNA(Ribonükleik Asit):Yapısında riboz bulunur.

2.DNA(Deoksiribonükleik Asit):Yapısında 2-deoksiriboz bulunur.

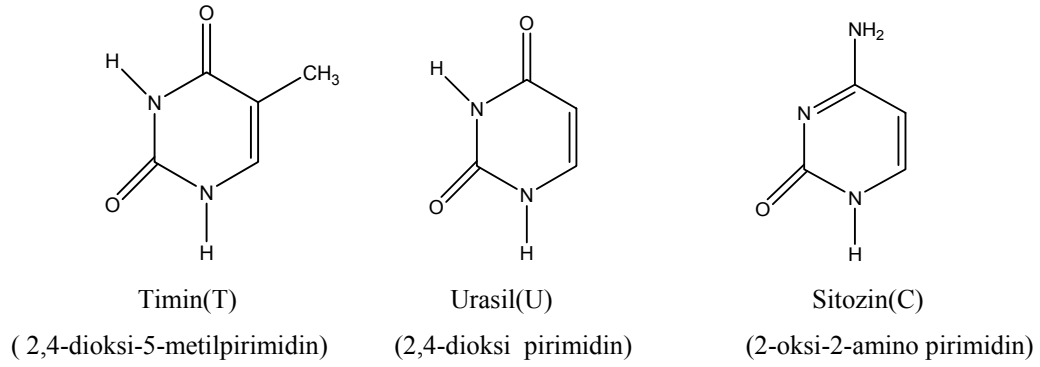


Şekil.1.1 Nükleik asitin yapısında bulunan bileşiklerin sınıflandırılması

Nükleik asitlerin enzimatik hidrolizi sonucu bütün yapı birimleri ortaya çıkar. Şekil 1.1'de görüldüğü gibi tam hidroliz sonucunda purin ve pirimidin nükleo bazlarıyla bir pentoz şeker ve fosforik asit ortaya çıkar. Tam olmayan hidrolizlerinde ise mononükleotidler ve nükleozidler meydana gelir.

1.1.1.1. Pirimidin bazları

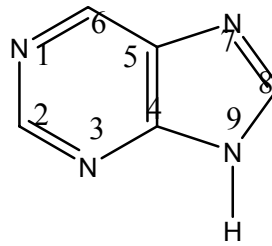
Nükleik asitlerde bulunan pirimidin bazlarının hepsi pirimidin türevleridir. Sitozin, urasil ve timin pirimidin bazlarıdır. Sitozin RNA ve DNA'da bulunurken urasil yalnızca RNA'da, timin ise yalnızca DNA'da bulunur.



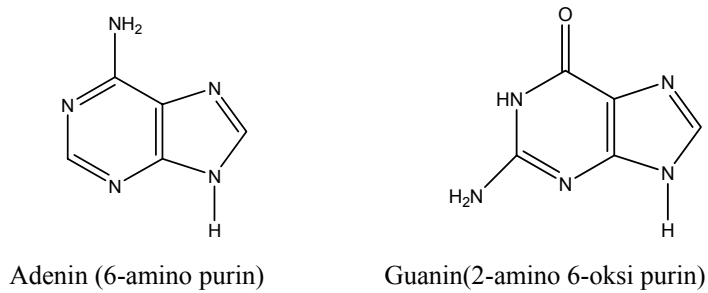
Şekil.1.2. Pirimidin bazlarının molekül yapıları

1.1.1.2. Purin bazları

Purin halkası 6 atomlu pirimidinin 5 atomlu imidazol halkasıyla kondanse olmasından meydana gelir.



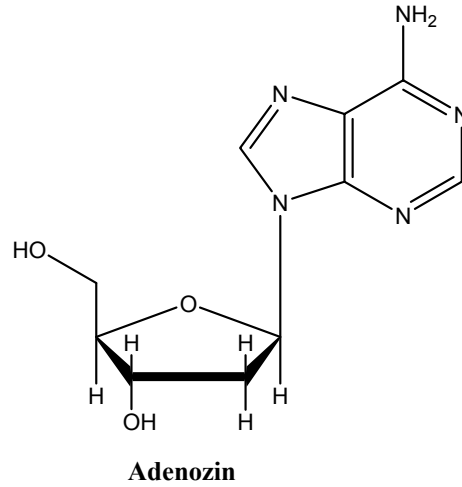
Başlıca purin bazları adenin ve guanin olup hem RNA'da hem de DNA'da bulunurlar.



Şekil 1.3. Purin bazlarının molekül yapıları

1.1.1.3. Nükleozidler

Nükleozidler, purin veya pirimidinlerin riboz ya da deoksiriboz ile N-glikozidik bağla bağlanmaları sonucu oluşurlar. Riboz veya deoksiribozun 1 numaralı karbon atomu, β -bağı ile pirimidin bazı içeren nükleozidlerde pirimidin bazının 1 numaralı azot atomuna, purin bazı içerenlerde ise purin halkasının 9 numaralı N atomuna bağlıdır. Bazların riboz şekerine bağlanması ile ribonukleozitler, deoksiriboz şekerine bağlanması ile de deoksiribonükleozitler oluşur.



Şekil 1.4. Adenozinin molekül yapısı

Nükleozitler, içerdikleri nükleobazlara göre sitidin, üridin, adenozin (Şekil 1.4) ve guanozin şeklinde adlandırılırlar.

Pürin ve pirimidin bazları gibi nükleozitler de hücre içerisinde nükleotidlerin fosfat gruplarının hidroliziyle çok az miktarda üretilmektedirler. Nükleozitler suda ait oldukları bazlardan daha fazla çözünmektedirler. Ayrıca pirimidin nükleozitler, pürin nükleozitlere kıyasla asit hidrolizine karşı daha dayanıklıdır (Gözükara 2000).

1.1.1.4. 8-Hidroksi-2'-deoksiguanizin

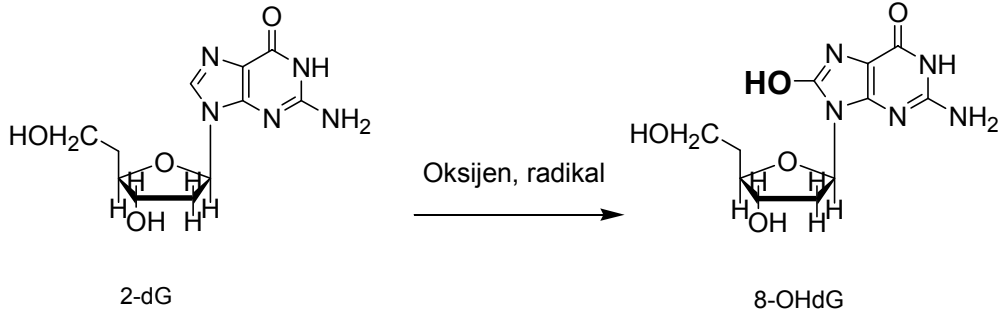
Son yıllarda ortaya çıkan önemli bir bilimsel görüş hastalıkların %90'ından fazlasına, aktif oksijen, diğer serbest radikaller ve lipid peroksitleri nedeniyle oluşan, oksidatif stresin yol açtığıdır. Aktif oksijen vücudumuz için hayati bir öneme sahip olmakla beraber, yine vücudumuzun temel bileşenleri olan protein, lipid, enzim ve DNA'ya zarar verebilmektedir. Özellikle sigara içimi ya da hava kirliliği gibi yaşamsal ve çevresel koşullar, maruz kalınan reaktif oksijen türlerinin (Metal oksitler, asbest, hidrojen peroksit, polifenol, X-Ray vb.) RNA veya DNA'ya verdiği zararın etkilerini artırmaktadır (Loft ve ark. 1992; Loft ve ark. 1999). Bu da yaşlanmanın hızlanmasına ve çeşitli hastalıklara, özellikle kansere neden olmaktadır.

Yapılan hesaplamalara göre solunum yoluyla vücuda alınan oksijenin %2'si aktif oksijene dönüştürülmektedir. Bu oranın %10'a çıkması kötü sonuçlara yol açabilir. Aktif oksijen, vücuda zarar verecek yabancı bir madde girdiğinde vücudun ondan kurtulmak için enerjiye ihtiyaç duymasıyla üretilir. Bu nedenle gerçekten vücudumuz için gerekli, önemli bir bileşendir. Aşırı miktarda açığa çıkması ise az önce de söylendiği gibi organlara, dokulara ve kan hücrelerine zararlı olmaya başlar.

2-Deoksiguanizin(2-dG), DNA'nın bileşenlerinden biridir ve oksijenle yükseltlendiğinde 8-Hidroksideoksiguanizin'e (8-OHdG) dönüşür (Şekil 1.5). Dolayısıyla 8-OHdG, DNA'nın oksidatif zararının tanısı ve izlenmesinde biyomarker olarak kullanılmaktadır (<http://www.cosmobio.co.jp>).

Ayrıca Alzheimer hastalarında da yaşlanma takibi amacıyla yine vücuttaki 8-OHdG ve 8-Hidroksiguanizin (8-OHG) maddelerinin ölçümü kullanılmaktadır (Nunomura ve ark. 1999; Abe ve ark. 2002).

Çeşitli vücut sıvılarındaki 8-OHdG miktarlarının tayini için son zamanlarda bir çok analitik metot geliştirilmiştir. Bunlar kapiler elektroforez, HPLC, immunoafinite kromatografi-monoklinal antibadi temelli ELISA kitleridir (Arnett ve ark. 2005; Samcová ve ark. 2004; Yin ve ark. 1995).



Şekil.1.5. Oksijen radikalleriyle 8-OHdG oluşumu

1.1.2. Proteinler

Proteinler, bütün canlı varlıkların en önemli ve hücrelerinde en bol bulunan organik bileşiklerdir. Bütün biyolojik olaylarda önemli görevler üstlenmişlerdir. Bu fonksiyonlardan en önemlileri şöyle sıralanabilir:

Enzimatik katalizleme: Biyolojik sistemlerdeki kimyasal reaksiyonların hemen hemen tamamı enzimlerin olağanüstü katalizleme güçleri sayesinde yürür. Bugün 2000 civarında enzim tanımlanmış olup bazı katalitik RNA molekülleri hariç hepsinin protein yapısında olduğu ortaya konmuştur.

Taşıma ve depolama: Birçok küçük molekül ve iyon spesifik proteinler tarafından taşınmakta ve depolanmaktadır. Örneğin, oksijen kanda hemoglobinle taşınır, kaslarda ise miyoglobin sayesinde depolanır. Demir kan dolaşımında, transferrin proteini ile taşınırken, karaciğerde ferritin adlı başka bir proteinle kompleks oluşturularak depolanır.

Mekanik hareket: Proteinler, kasların en başta gelen bileşenidir. Kas kasılması iki çeşit lif yapısındaki proteinin kayma hareketleriyle ortaya çıkmaktadır.

Mekanik destek: Deri ve kemik dokularının gerilmeye dayanıklılığı fibröz bir bağ dokusu proteini olan kollagen tarafından sağlanmaktadır. Yine saç, kıl, tırnak ve pençe gibi destek ve koruyucu yapılar α -keratin grubu proteinlerden oluşur.

Koruma: Antikorlar, vücuttaki virüs, bakteri ve diğer organizma hücreleri gibi yabancı maddeleri tanıyan ve onlara bağlanarak dolaşımdan

uzaklaştırılmalarını sağlayan çok spesifik proteinlerdir. Ayrıca, kanama anında pıhtılaşmayı sağlayan koagülasyon faktörlerinin tamamı protein yapısındadır.

Sinir iletimi: Spesifik uyarılara karşı sinir hücrelerinin cevabı reseptör proteinler aracılığı ile olmaktadır. Mesela, rodopsin, retinal çubuk hücrelerinin fotoreseptör (ışık algılayıcı) proteindir.

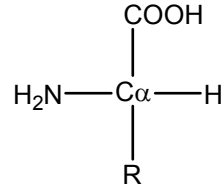
Hormonlar: Metabolizma olaylarının koordineli biçimde yürümesini sağlayan hormonların büyük bölümü protein yapısındadır. Bunun yanı sıra bütün hormonlar, hedef hücrelerinde protein yapısında olan reseptör moleküllere bağlanarak etkilerini gösterirler

Proteinlerin %50'si karbon, %7'si hidrojen, %23'ü oksijen, %16'sı azot ve %0-3'ü de kükürttten ibarettir ve bu maddeler proteinlerin yapı taşı olan amino asitleri oluştururlar. Bunların yanısıra fosfor, demir, iyod, bakır ve mangan gibi bazı elementlerde bir takım spesifik proteinlerde bulunabilirler (Keha ve ark. 2000).

1.1.2.1. Amino asitler

Basit proteinler asit, baz veya enzimler tarafından hidroliz edildiklerinde, yapı taşları olan α -aminoasitlere parçalanırlar. Proteinlerin üç boyutlu yapısını ve biyolojik özelliklerinin bir çoğunu, içerdikleri aminoasitin cinsi ve bunların bir polipeptid zinciri içindeki sıralanışı belirler. Amino asitlerin hücrelerde ve sinir sisteminde de oldukça önemli görevleri vardır. Amino asitlerin hücre içinde taşınmasındaki anormallikler, bazı hastalıklara neden olur. Bunların birçoğu, idrarda bir veya birden fazla aşırı miktarda amino asitin bulunuşu ile karakterize edilir ve aminoasidüridler olarak adlandırılırlar (Harper ve ark. 1993).

Bütün amino asitler, hem amino hem de karboksilik fonksiyonel gruplarını içerirler. Amino asitlerin iyonlaşmamış haldeki genel formülleri Şekil 1.6'da görüldüğü gibi yazılabilir.



Şekil 1.6. Genel aminoasit yapısı

R grubunun H dışındaki durumlarında α -karbon atomu asimetric olduğundan, amino asitler optikçe aktiftirler. D- ve L- izomerleri mevcuttur, ancak proteinlerin yapısında L- amino asitler bulunmaktadır.

Proteinler, şekil, büyüklük, yük, hidrojen bağı yapma kapasitesi ve kimyasal aktivite yönünden birbirinden farklı R gruplarını bulunduran yirmi çeşit amino asidi ihtiva ederler. Proteinlerin birbirinden son derece farklı fonksiyonları, aynen ciltlerce kitabın yirmidokuz harften yazılması gibi sözü geçen aminoasitlerin değişik dizilişleri ile ortaya çıkmaktadır. Çizelge 1.2'de bu aminoasitlerden bazılarının yapıları görülmektedir (Keha ve ark. 2000)

Çizelge.1.2. Bazı Önemli Aminoasitler

Aminoasit	Yapısı	Özelliği
glisin	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{CO}_2^- \\ \\ \text{H} \end{array}$	Elektrostatik ve lipofilik yüzey
asparajin	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{NH}_2 \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{CO}_2^- \\ \\ \text{H} \end{array}$	Polar, elektrostatik yüzey
fenilalanin	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{CO}_2^- \\ \\ \text{H} \end{array}$	Nonpolar, aromatik
histidin	$\begin{array}{c} \text{N} \\ // \quad \backslash \\ \text{C} \quad \text{NH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N} \quad \text{C} = \text{O} \\ / \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{HO} \end{array}$	Nötral, pK~6 Fizyolojik pH da pozitif yüklü
aspartat	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O}^- \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{CO}_2^- \\ \\ \text{H} \end{array}$	Negatif yüklü, pK~4 Elektrostatik yüzey
lisin	$\begin{array}{c} \text{N}^+\text{H}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{CO}_2^- \\ \\ \text{H} \end{array}$	Pozitif yüklü, pK~9.5, Elektrostatik yüzey

Çizelge 1.2' de de görüldüğü gibi bu aminoasitlerin en basiti glisindir ve R grubu yerine hidrojen atomu vardır, bu nedenle α karbonu asimetric değildir. R grubu hidrokarbon yapısında olan aminoasitler lösin, izolösin, prolin ve alanindir. Serin ve treonin alifatik hidroksil grupları ihtiva eder ve bu grupların biyolojik fonksiyon açısından büyük önemi vardır. Yan gruplarında birer kükürt taşıyan iki amino asit vardır: sistein ve metiyonin. Sistein protein yapısında disülfid çapraz kovalent bağlarını oluşturmasıyla özel bir öneme sahiptir. Bahsi geçen bu aminoasitler vücut pH'ında yüksüzdür (Keha ve ark. 2000).

Fizyolojik pH'da pozitif yüklü yan gruplara sahip amino asitler ise Lisin, arginin ve histidindir. Bunlardan aromatik özellikteki imidazol halkasına sahip olan histidin yerleşim çevresine göre bazen pozitif yüklü bazen de yüksüzdür. Bu nedenle, bu amino asit yan zinciri metaloproteinlerde koordinasyon ligandı ve ayrıca belirli enzimlerde katalitik bölge olarak çeşitli uygulamalarda yer alır. İmidazol yan zinciri farklı özelliklere sahip iki azot atomuna sahiptir. Bunlardan birisi hidrojene bağlıdır ve serbest elektron çiftini aromatik halkaya verir ve bu yüzden kısmen asidiktir. Buna karşın, diğer azot sadece bir elektronunu halkaya verir bu yüzden bir çift elektron boşluğuna sahiptir ve baziktir. Histidin aynı zamanda histamin ve karnosinin biyosentezinde yer alan öncü bir maddedir (Scriver ve ark. 2007).

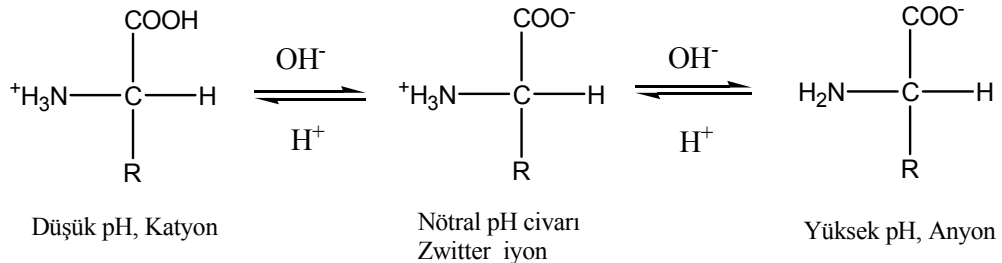
R grupları negatif yüklü, yani asidik olan aminoasitler ise glutamik asit ve aspartik asitdir. Bunlar genelde tuz yani anyon isimleriyle anılırlar: aspartat ve glutamat.

Genellikle nonpolar aminoasitler protein yapısının iç kısımlarında lokalize olurlar. Proteinler sulu ortamlarda çözünür olduklarından polar ve yüklü amino asitler de yüzey kısmında yer alırlar. Ancak bazı polar amino asitler iç kısımlarda yerleşmiş olabilirler (Kocabay 1996).

Bahsi geçen bu yirmi amino aside ilave olarak, bazı özelleşmiş proteinlerin hidrolizlenmesiyle farklı bir takım aminoasitler de elde edilmiştir. Bunlar da normal amino asitlerin türevi olup bir takım grupların ilavesiyle veya çıkarılmasıyla ortaya çıkmışlardır. Zaten protein sentezinde takip edilen genetik şifrede anormal amino asitlere karşılık gelen bir şifre, bir tRNA ve bir enzim bulunmamaktadır.

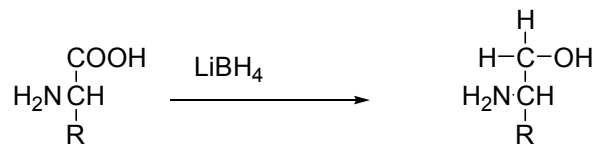
Aminoasitlerin asit-baz özelliklerinin bilinmesi proteinlerin bir çok özelliğini anlamak ve incelemek için son derece önemlidir. Farklı aminoasitleri ayırabilmek, teşhis edebilmek ve miktarını tayin edebilmek, proteinlerin amino asit bileşimlerini belirlemek için çok gereklidir.

Kristal haldeki amino asitlerin erime noktaları 200°C ve daha yukarıdadır. Sudaki çözünürlükleri, daha az polar çözücülere nispeten daha fazladır. Bu özelliklerde ancak amino asitlerin nötral sulu çözeltilerinden dipolar iyonlar halinde yani zwitter iyon şeklinde kristallendiğini göstermektedir. Nötralliğe yakın çözeltilerde dipolar hali gözlenen amino asitlerin düşük pH' larda katyon, yüksek pH' larda ise anyon şekli gözlenmektedir.

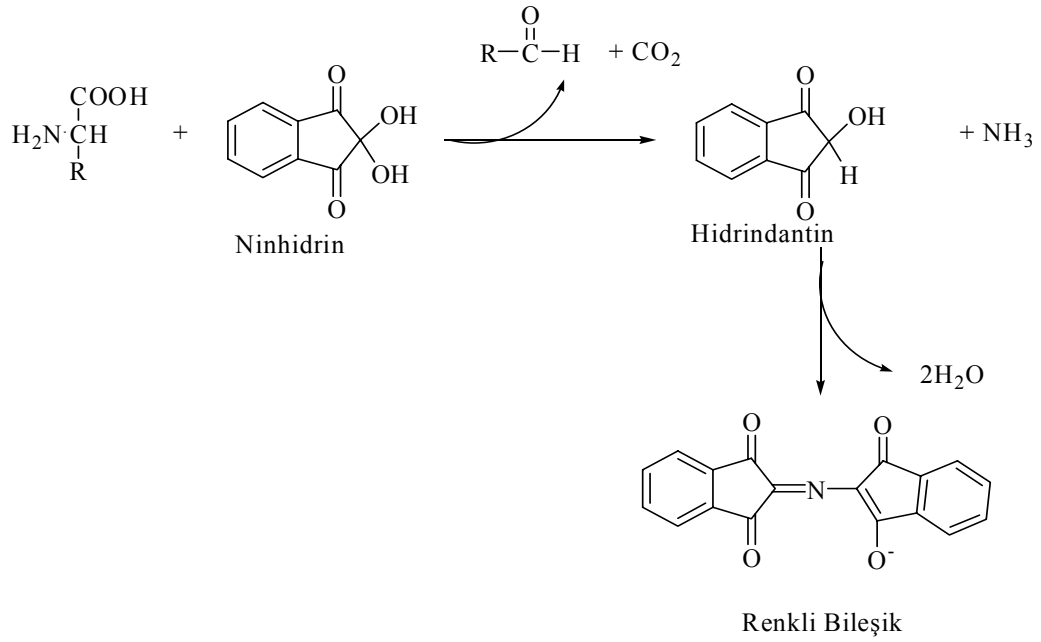


Bir amino asit üzerindeki toplam yükün sıfır olduğu pH değerine izoelektrik nokta denir ve pI ile gösterilir. Bu noktada amino asit zwitter iyon halindedir ve molekül bir elektrik alana maruz bırakılırsa hiç bir tarafa hareket etmez. $pI = (pK_1 + pK_2) / 2$ formülü kullanılarak bütün amino asitlerin izoelektrik noktaları hesaplanabilir (Keha ve ark. 2000).

Bilim adamları amino asit miktarını veya türünü teşhis edebilmek için çeşitli özel reaksiyonlar yürütürler. Amino asitlerin bu karakteristik reaksiyonları, yapılarındaki α -karboksil ve α -amino grupları tarafından verilmektedir. Burada örnek olarak en çok kullanılan iki reaksiyon verilecektir. Bunlardan ilki yapıdaki α -amino asidin karboksil grubunun lityum borhidrür ile α -amino alkole indirgenmesidir.

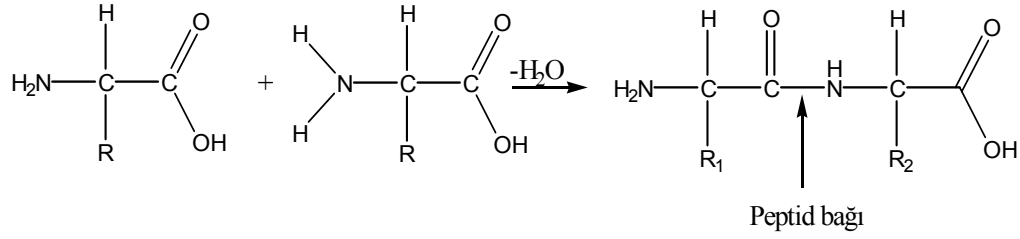


α -Amino grubunun en karakteristik reaksiyonu ninhidrin ile vermiş olduğu reaksiyondur (Şekil 1.7). Bu yolla az miktardaki aminoasitlerin kantitatif tayini yapılabilir. α -Amino asitlerin iki eşdeğer ninhidrinle ısıtılması sonucu mavi renkli bir bileşik oluşur ve bu renklenme kolorimetre ile ölçülerek kantitatif analiz olanağı sağlar. Bu mavi renk serbest amino asiti olan tüm aminoasitler tarafından oluşur, yalnız sekonder α -amino grubuna sahip olan prolin ve hidroksi prolin sarı renkte bileşik verir (Keha ve ark. 2000).



Şekil 1.7. Amino asitlerin ninhidrin reaksiyonu

Proteinler en başta da söylendiği gibi amino asitlerin birbirine bağlanması sonucu oluşur. Bu ise bir amino asidin α -karboksil grubu ile bir diğer amino asidin α -amino grubu arasında bir H_2O molekülünün açığa çıkmasıyla oluşan bir kovalent bağla gerçekleşir. Bu bağa *peptid bağı* adı verilir. Peptid bağı bir çeşit amid bağıdır. Yan grupları R_1 ve R_2 olan iki amino asit arasındaki peptid bağı oluşumu reaksiyonu şöyle gösterilebilir:



Buraya kadar bahsi geçen 20 adet aminoasitin isimleri, üç harfli ve tek harfli kısaltmaları Çizelge 1.3’de verilmiştir.

Çizelge 1.3. 20 amino asitin üç ve tek harfli adlandırılması

AMİNO ASİT	ÜÇ HARFLİ KISALTMA	TEK HARFLİ KISALTMA
Alanin	Ala	A
Arjinin	Arg	R
Asparajin	Asn	N
Aspartik asit	Asp	D
Sistein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutamik asit	Glu	E
Glisin	Gly	G
Histidin	His	H
İzolözin	Ile	I
Lösin	Leu	L
Lisin	Lys	K
Methionin	Met	M
Fenilalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Tirozin	Tyr	Y
Valin	Val	V

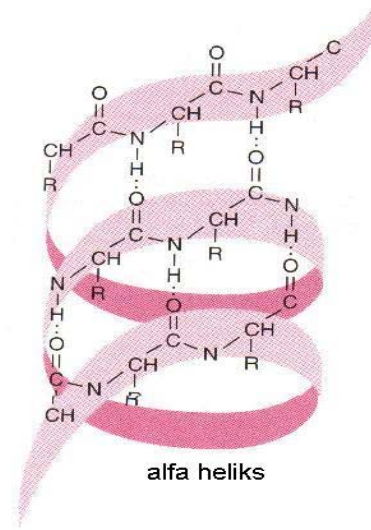
1.1.2.2 Proteinlerin yapısı

Bir protein zinciri amino asitlerin birleşmesiyle meydana gelir ancak yalnızca amino asitlerden ibaret olan bir protein molekülü her zaman biyolojik aktivite göstermeyebilir. Biyolojik fonksiyonunu yerine getirebilmek için bazen

amino asit, yapısında olmayan metal iyonları, karbohidratlar, lipidler, koenzimler, porfirin halkaları gibi kimyasal birimlerle birleşir, bazen de birden fazla polipeptid zinciri bir araya gelerek belirli bir biyolojik görevi üstlenirler. Örneğin kanda O₂ taşımamasını üstlenen hemoglobin, dört polipeptid zincirinden ibarettir. Bu zincirlerin her birine alt birim adı verilir. Hemoglobin dört alt birimin yanı sıra, her bir alt biriminde, porfirin halkası ve demir iyonu içeren gruplar mevcuttur. Proteinlere yapışık olan bu tip gruplara prostetik grup adı verilir.

Yüzlerce amino asidin oluşturduğu protein molekülünün sulu çözelti içinde uzunca tek bir zincir halinde kalması mümkün değildir. Amino asitlerin yan grupları ve polipeptid zinciri omurgası üzerindeki polar bölgeler arasında bir takım etkileşimler olacağı açıktır.

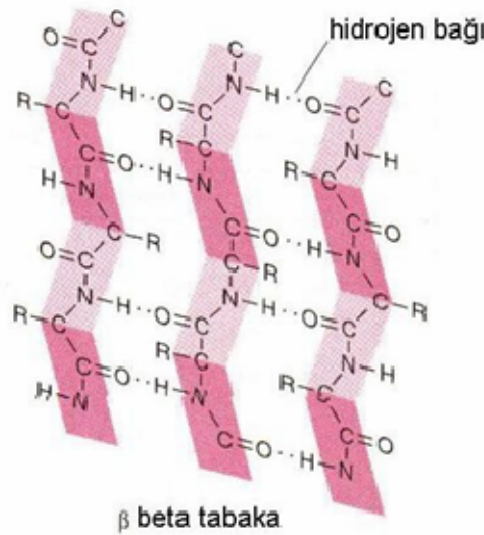
Pauling ve Corey bir çok polipeptid konformasyonunu, moleküler modellerini yaparak değerlendirmişler ve 1951’de bu çalışmalarına dayanarak iki tip periyodik polipeptid omurga yapısı ileri sürmüşlerdir: α sarmalı ve β tabakalı tabaka. α sarmalı, çubuğumsu bir yapıdır. Sıkıca sarılmış polipeptid omurgası çubuğun iç kısmını teşkil ederken, R grupları da bir sarmal düzeninde dışarıya doğru uzanırlar. α -sarmalı, zincir omurgası üzerindeki NH ve CO grupları arasında oluşan hidrojen bağları ile stabilize edilirler. Her bir amino asidin –CO grubu, sıralanışta kendisinden 4 kalıntı sonra gelen amino asidin NH grubuna hidrojen bağıyla bağlanır (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Alfa-heliks yapı

Bu şekilde protein omurgasında bulunan bütün CO ve NH grupları hidrojen bağları oluşturabilir. Eğer sarılmayı yukarıya doğru düşünürsek, birbirini takip eden amino asitler arasında 1,5 Å'lık bir mesafe, 100°'lik bir dönüş gözlenir. Sarmal sağ el veya sol el yönünde olabilirse de bütün bilinen proteinlerde α -sarmal sağ el yönündedir.

Aynı yılda Pauling ve Corey, proteinlerde ikinci bir yapısal periyodik motif keşfetmişlerdir ve ona da β tabakalı yapı adı vermişlerdir (β harfi α -sarmalından sonra ikinci yapı olarak bulunduğu için kullanılmıştır). β tabakalı yapı, α -sarmalının çubuk yapısının aksine tabaka halindedir. β tabakalı yapıda polipeptid zinciri α -sarmalde olduğu gibi sıkı sarılmış halde değil, tamamen uzamış yapıdadır. Birbirine komşu amino asitler arasındaki eksenel mesafe 3,5 Å'dur. (α -sarmalde 1,5 Å idi). Bir diğer fark da β tabakalı yapının farklı polipeptid zincirlerindeki NH ve CO grupları arasındaki hidrojen bağlarıyla stabilize edilmesidir (Şekil 1.9). α -sarmalda ise hidrojen bağları aynı zincir üzerindeki peptid grupları arasındadır (Keha ve ark. 2000).



Şekil 1.9. Beta tabakalı yapı

Üçüncü tip periyodik motif de kollagen sarmalıdır. Bu yapı deri, kemik ve eklemlerin başlıca proteini olan kollagen'in yüksek gerilme gücünü sağlayan özelliğini verir. Bu yapıda üç polipeptid zinciri birbiri üzerine sarılmıştır. Her bir zincirin sarmal motifi α -sarmalden tamamen farklıdır. Bu yapıyı stabilize eden hidrojen bağları, zincirlerin birisinin üzerindeki glisinin NH gruplarıyla bir diğer zincir üzerindeki amino asitlerin CO grupları arasında teşekkül eder.

Proteinler, biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için gerekli olan üç boyutlu şekillerini dört basamakta kazanırlar. Bu dört basamak primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapılar olarak isimlendirilirler. Bunlar belirli bir yapıdan daha çok yapılanma çeşidini ve safhasını ifade eder.

Primer yapı, basitçe bir proteindeki amino asitlerin sıralanışıdır ve proteinin omurgasını oluşturur. Bu yapı DNA'daki baz dizilişi tarafından şifrelenir ve proteinin üç boyutlu aktif konformasyonunu belirleyen en önemli husustur.

Sekonder yapı lineer dizilişte birbirine yakın amino asit yan zincirleri arasındaki etkileşmeler sonucu meydana gelir. Bu etkileşimlerin bazıları periyodik ve düzenli bir özelliktedir. Mesela α -sarmal, β -kırmalı tabaka ve kollagen sarmalı bir yapıya dahildir. Bir protein zincirinin bazı bölgelerinin maruz kaldığı bu yapılanmayı hidrojen bağları oluştururken, amino asitlerinin R gruplarından kaynaklanan etkileşmeler de bu yapının proteinin hangi bölgelerinde olacağını belirler.

Tersiyer yapı, lineer dizilişte birbirinden uzak noktadaki amino asitler arasındaki sterik etkileşmelerle ortaya çıkar. Bir protein zinciri içindeki kararlı katlanmalar sonucu, lineer dizilişte birbirlerinden uzakta olan amino asit yan zincirleri bir araya gelir ve proteinin aktif bölgesini de oluşturur. Tersiyer yapıda belli bir düzenlilik ve periyodik şekil göze çarpmaz. Disülfid bağı bu yapıyı daha kararlı hale getirir.

Kuaterner yapıya ise, birden fazla polipeptid zincirine sahip oligomerik proteinlerde rastlanır. Polipeptid alt birimleri, sekonder ve tersiyer yapıları meydana getiren sterik etkileşmelerle oluşan bağlar vasıtasıyla bir arada tutulur (Keha ve ark. 2000).

1.1.2.3. Proteinlerin denatürasyonu ve renatürasyonu

Proteinin üçüncül yapısı, çevrenin etkisi (sıcaklık, çeşitli ajanlar, yabancı yüzeyle temas vb.) ile tersinir veya tersinmez olarak değişebilir. Bu değişiklik “denatürasyon” olarak adlandırılır. Üçüncül yapıyı oluşturan bazı ikincil bağların kırılması sonucu tersinir değişimler gözlenir. Bu tür değişimde protein fonksiyonunu kaybeder fakat çevrenin etkisi ortadan kalkınca yeniden orijinal üç boyutlu yapıya döner (renatürasyon) ve fonksiyon göstermeye başlar. Çevrenin etkisi şiddetli ise polipeptit zinciri ikincil düzenini kaybederek katlanmamış duruma ulaşır. Örneğin yumurtanın pişirilmesinde albüminin denatürasyonu ile katı hale geçmesi tersinmezdir. Ancak, bazı proteinlerin (enzimlerin) bu durumdan renatürasyon ile orijinal hallerine dönebildikleri belirlenmiştir. İki veya daha fazla polipeptit zincirinin yine çok spesifik bir düzen içinde bir araya geldikleri durumlarda bu hal söz konusudur. Eğer protein dördüncül yapıya sahipse, denatürasyon sonucu protein alt birimleri birbirlerinden ayrılır ve kuaterner yapı bozulur. Denatürasyon eğer ılımlı koşullarda gerçekleşmiş ise renatürasyon ile fonksiyonlarını geri kazanabilir. Örneğin, hemoglobin tuz çözeltisi ile etkileştirilirse molekül iki ayrı alt birime ayrılır (denatürasyon). Diyaliz ile tuz ortamdan çekildiğinde ise iki alt birim bir araya gelir ve protein tekrar fonksiyonel hale gelir (renatürasyon) (Gözükara, 2000).

1.1.2.4. Proteinlerin sınıflandırılması

Proteinler farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmalardan biri yapılarına göre sınıflandırmadır (Çizelge1.4.). Yapılarına göre proteinler iki grup altında incelenir:

1. Basit Proteinler: Yapıları yalnızca proteinlerden oluşmuştur.
2. Konjuge Proteinler: Başka moleküllerle kompleks yapmış proteinlerdir.

Çizelge 1.4. Yapılarına göre proteinlerin sınıflandırılması

Protein	Yapısal Bileşenleri ve Özellikleri	Örnek
Basit Proteinler		
Albuminler	Suda çözünür	Serum albumin
Globulinler	Suda çözünmez, HCl'de çözünür	Serum globulini
Konjuge Proteinler		
Nükleoproteinler	Nükleik asitlerle kompleks yapmış kromozomlar	Proteinler
Glikoproteinler	Karbohidratlarla kompleks yapmış proteinler	Mukopolisakkaritler
Lipoproteinler	Lipidlerle ester yapmış proteinler	Serum Lipoprotein
Fosfoproteinler	Fosfatlarla ester yapmış proteinler	Kazein
Kromoproteinler	Fe-porfirin ile kompleks yapmış proteinler	Sitokrom-c
Metalloproteinler	Fe, Cu ve Zn ile kompleks yapmış proteinler	Transferin Seruloplazmin

1.1.2.5. Proteinlerin saflaştırılması

Her türlü organizma kendisine has proteinlere sahiptir ve proteinler biyolojik aktivitelerini ancak belirli pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Bu sebeplerden dolayı bir proteinin saf bir şekilde bir hücre veya dokudan izolasyonu güç bir iştir. Bu güçlükler rağmen bir çok protein saf olarak elde edilmiştir. Bunun üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve iki yüzden fazlası saf kristal halde elde edilmiştir. İzolasyon işlemleri oldukça yüksek dikkat ve gayret gerektirir.

Globular proteinlerin çözelti içindeki davranışlarından faydalanılarak, onların saflaştırılması yapılmaktadır. Bu özellikler şunlardır: molekül büyüklüğü,

çözünürlük, elektriksel yük, adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıklar ve diğer moleküllere karşı biyolojik afinite.

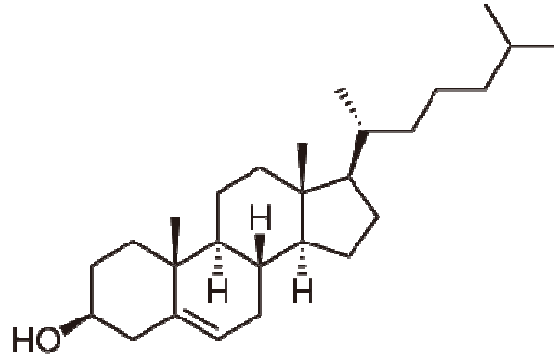
Molekül büyüklüğü esasına dayanarak protein ayırma metotları; diyaliz ve ultrafiltrasyon, yoğunluk gradienti santrifügasyonu ve jel geçirgenlik kromatografisidir. Çözünürlük farklılıkları esasına dayanarak proteinlerin ayrılmasında ise çözünürlüğün pH, iyonik şiddet ve sıcaklığa bağlı olmasından yararlanır. İzoelektrik çökeltme, nötral tuzlarla çöktürme ve çözücülerle fraksiyonlama bu grupta yer alan saflaştırma teknikleridir. Elektriksel yük esasına dayanarak proteinleri ayırmada kullanılan metotlar, elektroforez ve iyon değişim kromatografisidir. Seçimli adsorbsiyon esasına dayanarak proteinlerin ayrılmasında kizelgur, alüminyum oksit ve hidroksilapatit gibi adsorban maddeler kullanılır. Afinite kromatografisiyle saflaştırma da yine bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon dolgu maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir olarak bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak sephadex, sepharose ve biogel kullanılabilir. Bu teknikte önemli olan saflaştırılacak maddeye spesifik ve tersinir affinite gösteren ligandın seçilmesidir. Çizelge 1.5’de afinite kromatografisinin en çok kullanıldığı biyolojik sistemler gösterilmiştir. Bazı durumlarda matrikse bağlanan küçük bir ligand büyük enzim yapılarını saflaştırmada, sterik engeller dolayısıyla, yeterince etkin olmayabilir. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı sağlamak için matriksle ligand arasına sokulurlar (Keha ve ark. 2000)

Çizelge 1.5 Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler

Saflaştırılacak Madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein
Nükleik asit	Komplimenter baz dizisi, nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein
Hormon	Reseptör protein
Vitamin	Taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi proteini, lektin

1.1.3. Kolesterol

Kolesterol, hayvanların vücut dokularındaki hücre zarlarında bulunan ve kan plazmasında taşınan bir sterol, yani bir steroid ve alkol birleşimidir. Steroid ise birbiriyle kaynaşmış dört halkadan oluşmuş karbon iskeletli bir lipittir. Kolesterol ilk defa 1754'te safra taşlarında bulunduğu için bu maddenin ismi Yunanca chole- (safra) ve steros (katı) sözcükleri ile kimyadaki -ol ekinden türetilmiştir. Açık yapısı Şekil 1.10'da verilen kolesterol, özellikle hayvansal gıdalarda bulunur ama vücuttaki kolesterolün ancak ufak bir kısmı gıda kaynaklıdır; çoğu vücut tarafından sentezlenir. Vücudun her hücresinde bulunmakla beraber, onun sentezlendiği veya hücre zarlarının daha çok olduğu organ ve dokularda, örneğin karaciğer, omurilik ve beyinde, ayrıca ateromlarda, kolesterolün yoğunluğu daha yüksektir.



Şekil 1.10. Kolesterolün molekül formülü

Kolesterol kanda normalden fazla bulunması halinde damarlarda birikerek damar sertleşmesine ve daralmasına (ateroskleroz veya arteriyoskleroz) yol açar. Bazen de safra pigmentleri ile birleşerek safra taşlarının oluşumunda rol oynar. Kolesterol pek çok biyokimyasal reaksiyonda yer almasına rağmen özellikle lipoproteinlerin kolesterolü taşıma biçimleri ve kandaki kolesterol düzeyleriyle kalp hastalıkları arasındaki bağlantıdan dolayı bilinir. Vücut, kolesterolü kullanarak hormonlar (kortizol, üreme hormonları), D vitamini ve yağları sindiren safra asitlerini üretir. Bu işlemler için kanda çok az miktarda kolesterol bulunması yeterlidir. Aterosklerozda damar duvarında biriken tek madde kolesterol değildir;

akyuvarlar, kan pıhtısı, kalsiyum gibi maddeler de birikir. Ateroskleroza halk arasında damar sertliği, damar kireçlenmesi de denir. Yüksek kan kolesterolünün zararlarından bahsedilirken söz konusu olan "kötü kolesterol", yani düşük yoğunluklu lipoprotein (Low Density Lipoproteins, LDL) tarafından taşınan kolesterol düzeyidir. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (High Density Lipoproteins, HDL) tarafından taşınan kolesterola "iyi kolesterol" denir.

Kolesterol hücre zarlarının (membranlarının) inşası ve bakımı için gereklidir. Kolesterol içeren membranlar daha geniş sıcaklık aralığında akışkanlıklarını korurlar. Kolesterol, yağların sindirimine yarayan safranin sentezlenmesinde kullanılır. Ayrıca yağda çözünen vitaminlerin (A,D, E ve K vitaminleri gibi) metabolizmada rolü önemlidir. Aldosteron, testosteron, östrojen ve projesteron gibi steroid hormonlarının ve kortizolun sentezlerinde yer alır. Başka araştırmalar kolesterolün sinir hücreleri arasındaki sinapslarda ve bağışıklık sistemi hücrelerinin işlevlerinde rol oynadığını gösterir. Hücre membranının yapısına etkisi sonucunda hücre sinyal aktarımına ve membranlardaki iyon ve proton geçirgenliğine de etki eder.

1.1.3.1. Kolesterolün özellikleri

Kolesterol suda çok az çözüdüğünden kanın sulu kısmında taşınmaz. Kolesterolün kanda taşınması, suda çözünebilen ve kolesterol ve diğer yağ türevlerini taşıyabilen lipoproteinler aracılığıyla olur. Bu lipoproteinlerin yüzeyinde yer alan proteinler, kolesterolün hangi hücrelerden alınıp hangi hücrelere taşınacağını belirler. Şilomikronlar kolesterol ve trigliseritleri ince bağırsaktan karaciğere taşır. Bu kolesterolün bir kısmı besin yoluyla edinilmiştir, bir kısmı ise vücudun sentezleyip karaciğere salgıladığı safradan kaynaklanır. Şilomikronlar taşıdıkları lipitlerin bir kısmını vücuttaki dokulara bırakıp sonra karaciğer tarafından alınırlar. Şilomikronların kalmadığı yemek arası zamanlarda ise kolesterolün başlıca kaynağı karaciğerdir. Karaciğerde üretilen kolesterol ve diğer lipitlerin vücuttaki diğer dokulara ulaştırılması için çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (VLDL) içinde kana salgılanır. VLDL'de bulunan trigliserit ve kolesterol hücrelere aktarıldıkça VLDL'in yapısı ve yoğunluğu değişir ve LDL'ye

dönüşür. Bu sürecin sonunda arta kalan kolesterolü içeren LDL karaciğer tarafından geri alınır. Kandaki LDL miktarının yüksek olması bu lipoproteinlerin arter damarlarının çeperlerinde birikmesine yol açar, bu da aterosklerozun ilk aşamasıdır. HDL ise vücut hücrelerinde sentezlenen kolesterolü vücuttan atılması için karaciğere taşır.

Vücuttaki kolesterolün çoğu vücut tarafından imal edilir. Günlük üretimim %20-25'i karaciğerde gerçekleşir, ayrıca, ince bağırsak, adrenal bezleri ve üreme organlarındaki sentezlenme miktarı diğer dokulara kıyasla daha yüksektir. Yaklaşık 70 kg ağırlığındaki bir kişinin vücudunda toplam 35 g kolesterol vardır. Günlük dahili üretim miktarı 1 g, besin yoluyla alınan miktar ise 200-300 mg'dır. Bağırsaklara (safra ve besin yoluyla) giren 1.200-1.300 mg'ın yarısı kana geçer. Kolesterol çoğu hücre ve dokuda HMG-KoA Redüktaz enziminin başlattığı mevalonat yolu adlı reaksiyon zinciri ile sentezlenir

1.1.3.2. Hücre içinde kolesterol düzeyinin denetimi

Kolesterol biyosentezi, mevcut kolesterol seviyesine bağlıdır, ancak bunu sağlayan homeostatik mekanizma henüz bilinmemektedir. Besin yoluyla gelen girdideki bir artış, dahili üretimin azalmasına yol açar, besinden gelen miktarın azalması da karşıt sonucu doğurur. En önemli düzenleme mekanizması, hücre içinde endoplazmik retikulumdaki kolesterol miktarının SREBP1 ve 2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein, sterol düzenleme elemanına bağlanan protein 1 ve 2) tarafından algılanması ile gerçekleşir. LDL reseptörü ise kanda dolaşan LDL'in hücrelere bağlanıp taşımakta olduğu kolesterolü hücrelere vermesini sağlar. Kanda aşırı miktarda kolesterol olması halinde bu kolesterol damarların çeperlerini oluşturan hücrelerde birikir. Bu birikmeyle başlayan ateroskleroz sonucunda damar tıkanabilir ve tıkanan damarın bulunduğu organa bağlı olarak, kalp krizi veya inme meydana gelebilir.

Kolesterol karaciğerden safra aracılığıyla atılır ve bir kısmı ince bağırsak tarafından geri alınır. Safra kesesi içinde, derişiminin yüksek olması nedeniyle kristalleşebilir ve bu durumda safra taşı oluşumuna yol açabilir (ancak daha ender olarak lesitin veya bilirubinden oluşmuş safra taşları da görülebilir). Oksitlenmiş

kolesterol içeren küçük boyutlu LDL taneciklerinin yüksek düzeyde olduğu hallerde bu LDL damar çeperlerinde yine aterom denen birikmelere yol açar. Ateromlar hangi organın damarında birikirse o organa ait hastalıklar ortaya çıkar. Örneğin, kalbi besleyen atardamarlarda (koroner arterler) aterom koroner arter hastalığı'na, böbrek damarlarında yüksek tansiyona ve böbrek yetmezliğine, beyin damarlarında ise inme yol açabilir.

HDL tanecikleri, özellikle büyük boyutlu HDL, ateromlardaki kolesterolü karaciğere geri taşıyabilir. Bu yüzden yüksek HDL aterosklerozun yavaşlaması hatta gerilemesi ile ilişkilidir. Aralarında LDL ve VLDL bulunan diğer lipoprotein türleri ateroskleroza yol açar. Bu lipoproteinlerde bulunan kolesterol miktarı ile aterosklerozun ilerlemesi ilişkili bulunmuştur. Bu yüzden toplam kolesterol seviyesine değil bu kolesterolün ne kadarının hangi tür lipoproteinlerde bulunduğuna bakılmalıdır.

LDL ölçüm teknikleri aslında LDL'yi doğrudan ölçmez; ekonomik nedenlerden dolayı LDL değeri şu formüle göre hesaplanır:

hesaplanan LDL değeri = toplam kolesterol – toplam-HDL – trigliserit değerinin %20'si

Kolesterol düzeyinin kontrol altında tutulması ve kolesterolün azaltılması için kişilerin hayat tarzlarında değişiklik yapmaları gerekir. Statin grubundan ilaçlar, safra asidi ayırıcıları, nikotinic asit, fibroik asit ve kolesterolün bağırsaklardan emilmesini engelleyen ilaçlar kolesterol kontrolünde kullanılır. Statin grubu ilaçlar özellikle çok etkilidir. Diğer ilaçlar da bazen statinlerle beraber, bazen tek başlarına etkili olur. Ayrıca enginar yapraklarında bulunan cynarin adlı madde karaciğerin safra üretimini artırarak vücuttaki fazla kolesterolün atılmasına yardımcı olur. Balıklarda bulunan omega-3 yağ asitleri yağları da kolesterol kontrolünde kullanılır (<http://en.wikipedia.org/wiki/Cholesterol>).

1.2. Yapay Reseptörler

Vücudumuzda pek çok hücre ve molekül bulunmaktadır ve bunlar büyük bir düzende çalışmaktadırlar. Bu işbirliği ve karşılıklı tanıma olmadan hayatta kalamayız. Bu yüzden moleküler tanıma yaşamın varlığı için gereklidir. Örneğin hücre membranlarının yüzeyindeki reseptörler hormonları bağlarlar ve hücrelerin birbirleri ile iletişiminden sorumludurlar. Reseptör bir hormonu bağladığı zaman konformasyonu değişir ve bu konformasyon değişimi yoluyla hormonun mesajı hücreye geçer. Aynen bir eldivendeki el gibi, özel yapılar örneğin antibadiler, hormon reseptörleri ve enzimler kendi hedef moleküllerine çok güzel uyarlar fakat bunlar doğal çevrelerinde olmadıkları zaman kararsızdırlar. Bu maddeler genellikle çok az miktardadırlar ve ilgilenilen partiküler bir molekül için doğal bir reseptör olmayabilir. Bu yüzden hedef molekülleri yüksek seçicilik ve afinite ile bağlayabilen ve tanıyabilen yapay reseptörlerin elde edilmesi araştırmacıların uzun zamandan beri üzerinde çalıştıkları konulardır.

Doğadaki moleküler tanımanın zerafeti pek çok bilim adamını onu taklit etmeye teşvik etmektedir. Doğru moleküler tanıma için aşağıdaki faktörler gereklidir.

- a) Tanınacak molekül ve reseptörün fonksiyonel grupları birbirlerini tamamlayıcı olmalıdır,
- b) Her iki bileşenin konformasyonel serbestliği minimize edilmelidir,
- c) Kimyasal şartlar uygun bir şekilde düzenlenmelidir.

Prensipite iyi reseptörler;

- i) Hazırlanmaları için gerekli zaman ve üretim maliyeti dikkate alınmazsa
- ii) Tanınacak molekül uygun küçüklükte ise
- iii) Molekülün tanınması için organik çözücüler kullanılırsa başarılı bir şekilde hazırlanabilir.

Pratikte reseptörler hedef molekülleri reaksiyon karışımlarından ekonomik olarak ayırmak ve tehlikeli kimyasalları atık sularından uzaklaştırmak için kullanılırlar. Moleküler biyolojide reseptörlerin uygulamaları iyi sonuçlar vermektedir. Bazı durumlarda ürünün ayrılması ve saflaştırılması üretim maliyetlerinin yarısından fazlasını teşkil ettiğinden dolayı yüksek derecede seçici

ve ekonomik reseptörler elde edilmesi çok önemlidir. Moleküller belirli bir düzende yerleştirilerek çeşitli materyaller üretilebilir. Fakat elde edilen moleküller arasında tam tanınmanın olması gereklidir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucu moleküler hafızalar, moleküler araçlar ve moleküler makineler belirli bir seviyeye getirilmiştir. Yakında insan yapımı reseptörlerin yapay hücre membranları üzerine yerleştirilerek yapay hücrelerin hazırlanacağı söylenmektedir.

Pratikte uygulamalar için yeni reseptörler dizayn ederken aşağıdaki faktörler göz önüne alınmalıdır.

- 1) Düşük maliyette, büyük miktarlarda kolay hazırlanma,
- 2) Geniş uygulama koşullarında kararlılık ve aktivite,
- 3) Büyük moleküllere karşı seçici ve güçlü bağlanma,
- 4) Sulu ortamda tanınacak molekülün bağlanması.

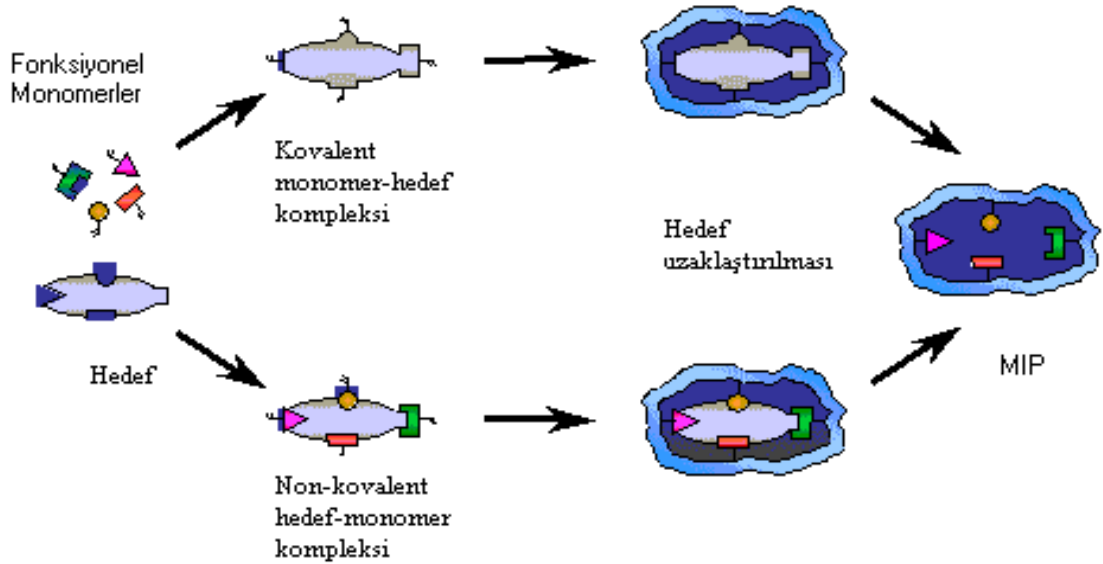
1.2.1. Molekül Baskılanmış Polimerler (MIP)

Yapay makro moleküler reseptörler elde etmenin bir yolu moleküler baskılama ile sentetik polimerler hazırlamaktır. Moleküler baskılamada, hedef molekül çevresi ile etkileşen bir kalıp olarak davranır, çapraz bağlı monomerler hedef molekül çevresinde düzenlenir ve kalıp benzeri bir tabaka oluşturmak üzere birlikte polimerleşirler. Temel olarak monomerler kovalent veya non-kovalent etkileşimler yoluyla yuva molekül ile bir kompleks oluşturur. Polimerizasyondan sonra yuva molekül uzaklaştırılır ve bağlanma bölgeleri yuva moleküle büyüklük, şekil ve fonksiyonel grupların yerleşimi olarak tamamlayıcıdır (Shea ve ark. 1993). Böylece esas olarak yuva molekülü seçici olarak tekrar bağlayabilen polimer üzerine bir moleküler ‘bellek’ baskılanmıştır. Böylece molekül baskılanmış polimerler biyolojik reseptörlerin en önemli iki özelliğine yani tanıma yeteneği ve spesifik hedef molekülleri bağlama yeteneğine sahiptirler. Fakat molekül baskılanmış polimerler biyolojik reseptörlerden şu açılardan farklıdır.

- Molekül baskılanmış polimerler çok büyük, katı ve çözünmezdirler.

- Buna karşın bunların doğal karşılıkları daha küçük, esnek ve çoğu durumlarda çözünürdürler.
- Büyüklüklerine bağlı olarak molekül baskılanmış polimerler binlerce veya milyonlarca bağlanma bölgesine sahiptirler.
- Buna karşın biyolojik reseptörler çok az veya sadece bir tane bağlanma bölgesine sahiptirler.
- Buna ilaveten molekül baskılanmış polimerlerdeki bağlama bölgelerinin popülasyonu heterojendir.

Ayrıca baskılama için kullanılan pek çok polimerin kaotik yapısı, heterojen gözenek büyüklüğü dağılımı ve bağlama bölgelerinin katı materyal boyunca bulunması genellikle kütle aktarımını yavaşlatır. Her zaman problem olmamasına karşın bu özellikler molekül baskılanmış polimerlerin genel uygulamalarda doğal reseptörlerin yerini almalarını önlerler. Şekil 1.11’de moleküler baskılama yöntemi şematik olarak gösterilmektedir. Bu şekilde de görüldüğü gibi hedef molekül ve monomer arasındaki etkileşimin türüne göre moleküler baskılama kovalent ve non-kovalent baskılama olmak üzere iki ana gruba ayrılır.



Şekil 1.11. Kovalent ve non-kovalent moleküler baskılama yönteminin şematik görünümü

1.2.1.1. Kovalent Baskılama

Ön organizasyonlu moleküler baskılama yaklaşımında, polimerizasyondan önce baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomerler arasında kuvvetli, tersinir bir kovalent düzenleme gerçekleşir. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp oluşturmak amacıyla polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül, baskılanmış polimerlerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağ yeniden oluşur (Shea ve Dougherty 1986, Molinelli 2004)

Avantajları:

Monomer-kalıp molekül kompleksi oldukça kararlıdır ve sitokiyometrik oranlarda gerçekleşir.

Polimerizasyon koşulları (yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve polar solventler gibi) istenildiği gibi uygulanabilir, çünkü konjugatlar kovalent bağlarla oluşturulmuştur ve oldukça kararlıdır (Ikegami ve ark. 2004).

Dezavantajları:

Monomer-kalıp molekül konjugatının sentezinde sık sık sorunlar çıkabilir ve sentez prosesi pek ekonomik değildir.

Hedef molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısı sınırlıdır.

Kovalent bağ oluşumu nedeniyle bağlanma kinetiği yavaştır (Steinke ve ark. 1995).

1.2.1.2. Non-kovalent Baskılama

Fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması non-kovalent (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve koordinasyon bağ oluşumu gibi) etkileşimlerle gerçekleşir. Polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül ile baskılanmış polimerler non-kovalent etkileşimlerle bağlanır (Ersöz ve ark. 2005).

Avantajları:

Kovalent monomer-kalıp konjugatının sentezine gerek yoktur.

Polimerizasyondan sonra kalıp molekül polimerden kolayca uzaklaştırılır, çünkü non-kovalent etkileşimler daha zayıftır.

Hedef molekülün bağlanma kinetiği hızlıdır(Sellergen ve ark. 1988).

Dezavantajları:

Polimerizasyon koşulları, non-kovalent etkileşimleri arttırmak amacıyla, sınırlıdır.

Fonksiyonel monomerler bağ oluşum dengesini arttırmak amacıyla fazlaca kullanılır ve non-spesifik bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olabilir (Katz ve ark. 1999, Dong ve ark. 2002).

1.2.1.3. MIP hazırlama teknikleri

Molekül baskılanmış polimer hazırlama yöntemi olarak aşağıdaki yöntemler verilebilir:

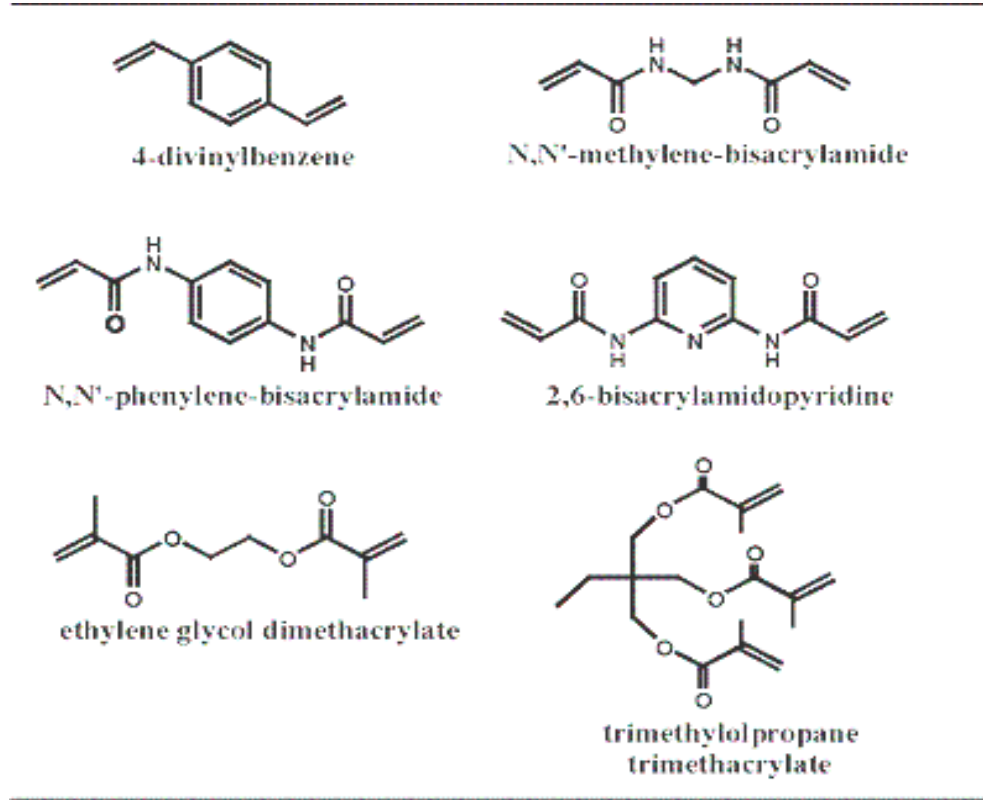
1. Yığın polimerizasyonu
2. Süspansiyon polimerizasyonu
3. Kimyasal grafting
4. Soft lithography
5. Moleküler self-assembled yaklaşımı
6. Elektropolimerizasyon

Moleküler baskılamada genel olarak yığın polimerizasyonu kullanılır. Elde edilen katı polimer parçalanır ve uygun boyutlara öğütülür. Ancak bu proses zaman alıcı ve ekstra bir işlemdir (Wulff 2002).

1.2.1.4. Moleküler baskılamada kullanılan çapraz bağlayıcılar

Çok iyi derecede spesifikliğe ulaşabilmek için çok güçlü (% 70-90) çapraz bağa ihtiyaç duyulduğundan sınırlı sayıda çapraz bağlar kullanılmaktadır. Çünkü çapraz bağlayıcının polimer öncesi çözeltisinde (monomer ve baskı molekülünün bulunduğu çözelti) çözünmeden kaldığı görülür. Bu da çapraz bağlayıcıların alternatiflerini azaltmıştır. Etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve trimetil propan trimetakrilat (TRIM) bir çok sistemde yaygın olarak kullanılır. Son zamanlarda

pentaeritrol triakrilat (PETRA) ve pentaeritrol tetraakrilat (PETEA) gibi tri ve tetra fonksiyonel akrilat çapraz bağlayıcıları peptit seçici moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. MIP hazırlamada en çok kullanılan çapraz bağlayıcılar

1.2.1.5. MIP lerin uygulama alanları

Molekül baskılanmış polimerler aşağıdaki alanlarda kullanılmaktadırlar:

- a) Katı faz ekstraksiyonu
- b) Sıvı kromatografisi
- c) Kapiler elektroforez
- d) Kapiler elektrokromatografi
- e) Kimyasal sensör geliştirilmesi.

Son zamanlarda molekül baskılanmış polimerler kimyasal sensör sistemlerinde molekül tanıma membranı veya tabakası olarak kullanılmaktadırlar.

Molekül baskılanmış polimerler ile transdüserlerin birleştirilmesi amaçlanmaktadır.

1.2.1.6. Biyomoleküllerin ayrılmasında MIP lerin kullanımı

MIP ler, antiadilerden daha büyük, rijiditeleri daha yüksek ve çözünürlükleri çoğu zaman az olmasına karşılık, doğal reseptör moleküllerin oldukça önemli bir özelliğini taşımaktadırlar; o da hedef moleküle spesifik bağlanma kabiliyetidir. MIPler immunodifüzyon, immunoelktroforez veya doku immunofloresansı gibi bazı alanlarda suda çözünebilir antiadilerle rekabet edemez, buna karşın immobilize antiadilere dayalı immunoaffinite kromatografisi, immunoassays ve immunosensörler gibi tekniklerde oldukça önemli bir alternatif olarak karşımıza çıkarlar.

Enzim immunoassay ve radyoimmunoassayın çeşitli konfigürasyonlarını içerecek şekilde analitlerin tayinini sağlayan bir çok teknik geliştirilmiştir. Bu tekniklerin temeli, antiad-antijen komplekslerinden serbest antijenin ayırımını basitleştirmek amacıyla, katı bir faz yüzeyine antiad immobilizasyonuna dayanmaktadır. Bu gösterir ki, molekül baskılı polimerler immunoassay türü bağlanmalarda antiadilerin yerine kullanılabilir (Haupt ve Mosbach, 1998). MIPlerin antiadilerin yerine kullanılabilirliği ilk defa bronkodilatörteofilin için MIP assay geliştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Vlatakis ve ark., 1993). Bu çalışma antiad temelli enzimimmunoassayle iyi bir uyumu göstermekle kalmamış, aynı zamanda monoklinal antiadilerin çapraz reaktivite profiline oldukça benzer bir ürünle sonuçlanmıştır. Aynı ekibin başka bir çalışmasında kortizol baskılı bir polimer, kortizolün analogu olan prednisolona %36 daha az reaktivite ve orijinal hedef bileşikteki keto grubunun yerine hidroksili olan kortizona ise %1'den az reaktivite göstermektedir (Mosbach , 1996).

Hem organik hem de sulu çözeltilerde gösterdikleri yüksek seçicilik, kararlılık ve tamamlayıcılık özellikleri nedeniyle MIPlerin katı-faz ekstraksiyonuyla örnek deriştirme ve saflaştırmada kullanımları da oldukça etkin olmaktadır. Rutin analizler, genellikle iyon-değişim veya hidrofobik reçineler gibi bilinen adsorbentlerle, katı-faz veya çözücü-faz ekstraksiyon basamakları içerirler.

İşte bu işlemlerde kullanılan adsorbentlerin yerini MIPler almaya başlamıştır. Kan serumu, idrar gibi kompleks örneklerden bir çok bileşiğin ekstraksiyonu bu yöntemle gerçekleştirilmiştir (Muldoon ve ark., 1997). Örneğin analijezik bir ilaç olan sameridin, kan plazmasından 20 nM seviyesinde ekstrakte edilmiş ve gaz kromatografisiyle tayin edilmiştir (Andersson ve ark., 1997). Bu yolla elde edilen kromatogramlar, standart sıvı-sıvı ekstraksiyon metoduyla elde edilenlerden çok daha temiz ve açık olmaktadır.

Vücudumuz için oldukça önemli bir biyomolekül olan kolesterolün seçici olarak tanınması ve ayrılması için de çeşitli molekül baskılı polimerler geliştirilmiştir. Kolesterol baskılamaya yönelik ilk çalışma Whitcombe ve ark (1995) tarafından kovalent baskılama metoduyla gerçekleştirilmiştir. Onların metoduna göre 4-vinilfenil karbonat ester ile kolesterol arasında hidrolitik bir etkileşim olmakta ve kalıp molekül ile tanıma bölgeleri arasında hidrojen bağı gerçekleşmektedir. Kovalent olmayan kolesterol baskılama teknikleri ise akrilik asit, 2-hidroksietilmetakrilat veya β -siklodekstrin gibi bileşiklerle hazırlanmıştır ve bu yöntemlerin bir çoğunda başlatıcı olarak gamma ışınları kullanılmıştır (Hwang ve ark. 2002).

Hwang ve ark. (2002)' nin çalışmaları da hem kovalent hem de kovalent olmayan kolesterol baskılı polimer hazırlamaya yöneliktir. Kovalent baskılama için kolesteril (4-vinil)fenil karbonat, kovalent olmayan baskılama için ise metakrilik asit ve 4-vinilpiridin kullanmışlardır. Hazırladıkları MIP leri kolon dolgu malzemesi olarak kullanmışlar ve kolesterolün, benzer bir steroid olan β -estradiolden sıvı kromatografisi yöntemiyle ayrılmasını sağlamışlardır. Sonuç olarak kovalent baskılı polimerin kovalent baskılı olmayan iki türden daha yüksek adsorpsiyon kapasitesine ve kromatografik etkinliğe sahip olduğunu göstermişlerdir.

Bu ve benzeri çalışmalarda kovalent yaklaşımın, kovalent olmayan yaklaşımlara göre daha etkin olduğu gösterilmekle birlikte bilinen başka bir gerçek ise susuz ortamlardan kolesterolün uzaklaştırılmasına ilişkin çalışmalarda kovalent olmayan baskılamanın daha yaygın olduğudur. Hidrofobik etkileşime dayalı kolesterol baskılanmış polimerlerin sulu ortamlarda da kapasite ve seçiciliğinin artırılması için Gore ve ark. (2004) kolesterol ile türevlendirilmiş

yeni monomer ve çapraz bağlayıcılar kullanarak en etkin polimeri bulmaya çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmada monomer olarak monokolesiril itaconat vekolestiril metakrilat, çapraz bağlayıcı olarak ise EDMA, gliseroldimetakrilat, gliserildikolestiril itaconat ve monokolestiril itaconat gliserol metakrilat kullanılmıştır. Farklı oranlarda hazırlanan polimerler içinde seçiciliği ve baskılama etkinliği en yüksek olan polimeri EDMA ve monokolestiril itaconat gliserol metakrilat kullanımıyla elde etmişlerdir. Kolesterol baskılamaya ilişkin daha önceden yapılan tüm çalışmalar bu yayında bir izelge halinde özetlenmiştir (izelge 1.6):

Çizelge 1.6. MIPLerle kolesterol bağlanma çalışmaları (Gore 2004)

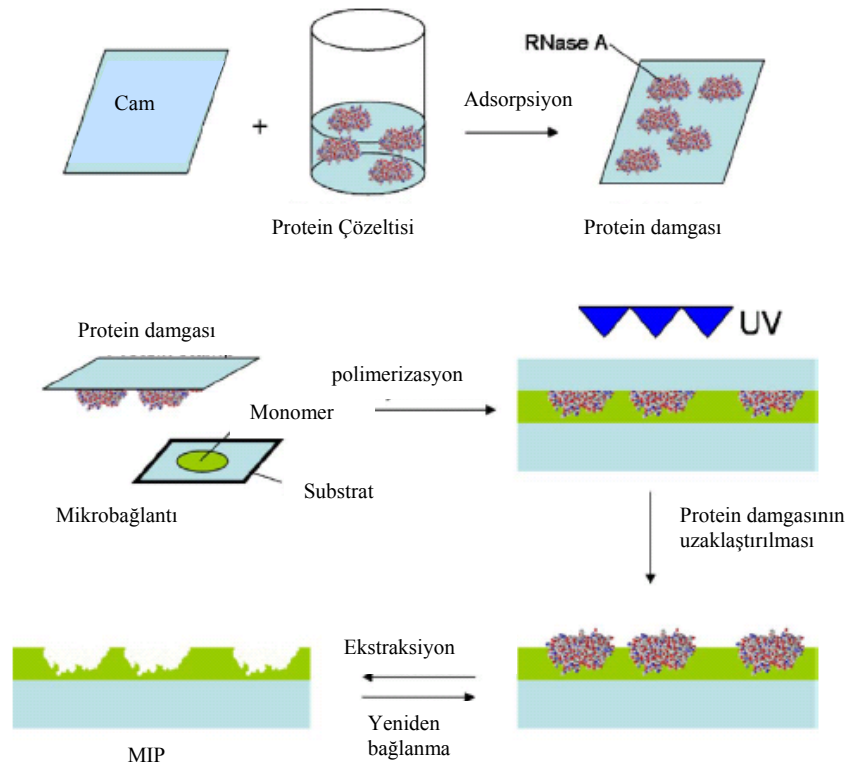
Polimer	Fonksiyonel monomer	Bağlanma kapasitesi (mg/g)	Ortam	Baskılama etkinliği	Bağlanma mekanizması	Sonuç
Çapraz bağlı CD ve TDI, EPH	CD	70	Su/THF	2,0	Hidrofobik	Sulu ortamda kullanılabilir.
4-Vinilkarbonat ester ve EDMA	4-Vinilkarbonat ester	44	Hekzan	-	Hidrojen bağı	Sulu ortamda kullanılamaz.
CD ve TDI	CD	0,15	Su/THF	>15	Hidrofobik	Sulu ortamda kullanılabilir. Seçicilik çalışması yok.
Metakrolilkolesterol ve safra asiti türevleri, EDMA	Metakrolilkolesterol	17	Bağırsak ortamı benzeri çözelti	1,3	Hidrofobik etkileşim ve Hidrojen bağı	Düşük kapasite ve Seçicilik çalışması yok.
HEMA ve EDMA	HEMA	3,9	Diklorometan	24,37	Hidrojen bağı	Düşük kapasite , iyi seçicilik
CD-HEMA ve HEMA	CD-HEMA	46,8	Metanol	2,6	Hidrofobik	İyi kapasite ve seçicilik
2-(metakriloksi)etil ve EDMA	2-(metakriloksi)etil	15,8	Kloroform ve asetik asit	2,4	Hidrojen bağı	Sulu ortamda kullanılamaz.
Cu(II) akrilat ve EDMA	Cu(II) akrilat	1,22	Diklorometan	1,1	Metal-iyon etkileşimi	Düşük kapasite ve seçicilik
Kolestirilakrilat ve akrilol-6-amino-6-deoksi-CD ve DAPA	Kolestirilakrilat ve akrilol-6-amino-6-deoksi-CD	19,3	2-propanol	5,6	Hidrofobik	Düşük kapasite, yüksek seçicilik
Akrilik asit ve EDMA	Akrilik asit	2,9	Diklorometan	1,3	Hidrojen bağı	Sulu ortamda kullanılamaz.
Kolestiril(4-vinil) fenil karbonat, DVB ve EDMA	kolestiril(4-vinil) fenil karbonat	7,3	Isohekzan	7,3	Hidrojen bağı	Sulu ortamda kullanılamaz.,
Kovalent: kolestiril(4-vinil) fenil karbonat ve EDMA	kolestiril(4-vinil) fenil karbonat	3,5	Glasial asetik asit	3,2	Hidrojen bağı	Sulu ortamda kullanılamaz., kapasite ve seçicilik iyi

Sensör teknolojisinde MIPIlerin kullanımına ise daha yakın zamanlarda rastlanmaktadır. Bir kimyasal veya biyosensör, bir tanıma elementi ve onunla bağlantılı bir transduser içerir ve bu transduserin görevi, analitin bağlanmasıyla oluşan değişimi, ölçülebilir bir dış sinyale dönüştürmektir. Bu sensörlerde kullanılan biyomoleküller çoğunlukla zayıf fiziksel ve kimyasal kararlılık gösterirler, bu nedenle yapay reseptörlere duyulan ilgi artmaktadır. Özellikle MIPIler zorlayıcı şartlarda gösterdikleri dayanıklılık ve yüksek seçicilikte tanıma bölgelerine sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedir. MIP temelli ilk sensör baskılı-polimer membran ince filmi içeren bir alan-etki kapasitörüdür ve analitin bağlanmasıyla kapasitansta meydana gelen değişim ölçülmüştür (Hedborg ve ark., 1993). Daha sonra ise elektrokimyasal (Piletsky ve ark., 1995; Kriz ve ark. 1995a) ve optik (Kriz ve ark. 1995b; Levi ve ark. 1997)) transduserlere dayalı başka sensörler geliştirilmiştir (Haupt ve Mosbach 1998).

Görüldüğü gibi küçük boyutlardaki biyomoleküllerin baskılanmasına dayalı bir çok farklı çalışma mevcuttur, ancak nispeten oldukça büyük kalıplar olan proteinlerin baskılanmasına ilişkin çalışmalara daha az rastlanmaktadır. Proteinlerin baskılanmasının güç olmasının nedenleri büyük kalıpların düşük rijiditeleri ve baskılama sırasında bağlanma kavitelelerindeki azalmadır. Dahası protein gibi büyük biyomoleküllerin ikincil ve üçüncül yapıları ısı veya ışına maruz kaldığında etkilenebilmektedir (Mahony ve ark. 2005). Yine de son zamanlarda protein kalıplarının uzaklaştırılması ve yeniden yüklenmesiyle ilgili bazı ileri düzeyde çalışmalar yapılmıştır (Hawkins ve ark. 2005).

Proteinlerin moleküler baskılanması, düz bir ince film üzerine disakkarit molekülleriyle kaplı proteinlerin radyofrekans plazma ark boşalımıyla tutturulmasıyla gerçekleştirilmiştir (Shi, H. ve ark. 1999). Bu yöntemle benzer diğer bir çalışma C-Y. Hsu ve ark. tarafından ribonükleaz A tanınması için yapılmıştır. Bu çalışmada, yüksek seçicilikte, yüksek kararlılıkta ve düşük maliyetli olan MIPIlerin ribonükleaz A'nın bir reaksiyon karışımından ekstrakte edilmesinde oldukça kullanışlı olabileceği düşüncesinden yola çıkılmıştır. Bu amaçla fonksiyonel monomer olarak sitiren, çapraz bağlayıcı olarak polietilenglikol 400 dimetakrilat monomerlerinden çeşitli oranlarda MIPIler

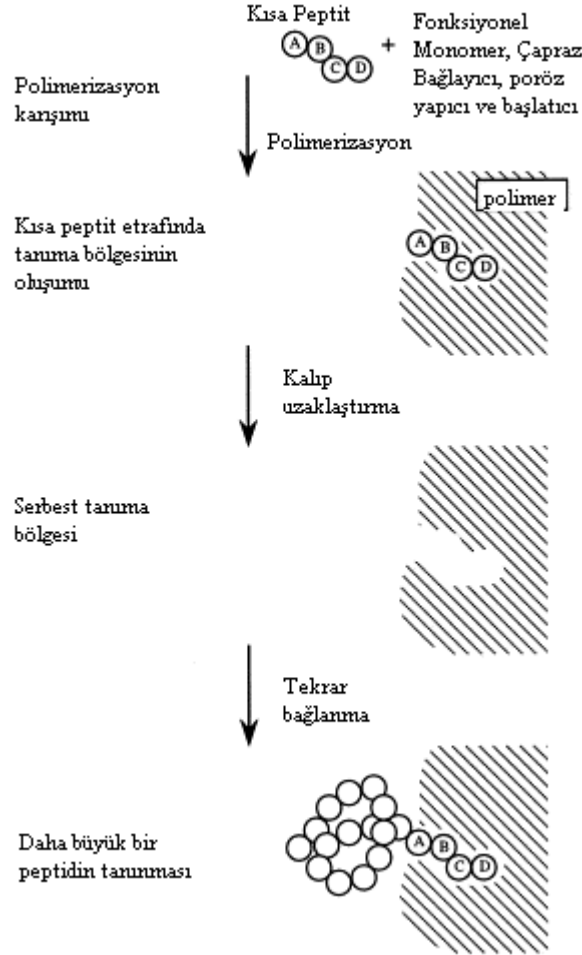
sentezlenmiştir. Baskılama prosedürü düz bir cam yüzeye önce proteinin Wan der Vals etkileşimleriyle tutturulmasından sonra aşağıda verilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada maksimum bağlanma kapasitesine stiren/PEG400DMA oranları 20/100(V/V) olduğunda ulaşılmıştır. Lizozim, BSA ve IgG gibi diğer proteinler varlığında bile hazırlanan MIPlerin ribonükleaza yüksek seçicilik gösterdiği, izotermal kalorimetre ölçümleriyle, saptanmıştır (C-Y. Hsu ve ark. 2006). Ancak kullanılan bu metot sadece düz yüzeylere uygulanabilmektedir(F.J. Wolman ve ark. 2006) (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. C-Y. Hsu ve ark. tarafından hazırlanan RNase A-MIP sentezinin şematik gösterimi

Daha klasik olan diğer bir yöntem ise proteinin bir parçasını baskılamaktır. Rachkov ve arkadaşları (2001) moleküler baskılama yaklaşımının biyomimetik bileşik hazırlamadaki kullanılabilirliğini incelemişlerdir. Daha önceleri sadece düşük moleküler ağırlıktaki maddelere seçici olarak gerçekleştirilen moleküler baskılama tekniğini, peptit ve protein gibi yüksek moleküler ağırlıktaki bileşiklerin baskılanmasında kullanmışlardır. Bu yaklaşımda büyük bir peptit veya

proteinin bir parçası olan daha küçük bir yapı hedef molekül olarak seçilmiş ve hazırlanan MIP büyük yapıdaki protein veya peptidin seçici ayrılmasında kullanılmıştır (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. Rachkov A. ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen Parça Baskılama Yaklaşımının şematik gösterimi

Rachkov A. ve arkadaşları bu yaklaşımı geliştirmek için bir nanopeptid olan oksitosin (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂) hormonunu seçmişlerdir. Hedef molekül olarak daha küçük tetrapeptidleri kullanmışlar ve oksitosin tanınmasındaki etkinliği incelemişlerdir. Çalışmada fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit, çapraz bağlayıcı olarak 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) ve kalıp molekül olarak Tyr-Pro-Leu-Gly amid (TPLG) kullandıklarında, TPLG baskılı polimerin en fazla yine TPLG'ye daha sonra

sırasıyla PLG ve oksitosine seçicilik gösterdiği, biraz daha farklı bir yapı olan tokinoik asite karşı ise çok daha düşük bir seçicilik gösterdiğini bulmuşlardır. Çalışmanın sonucunda ucuz ve yüksek seçicilikte sentetik adsorbentler elde etmişlerdir (Rachkov ve ark. 2001).

Wolman ve ark. (2006) ise kovalent olmayan yaklaşımlara bir alternatif olarak gelişen polar ortamda metal-iyon kompleksleriyle hazırlanan MIPler için farklı bir polimerizasyon tekniği hazırlamışlardır. Bu çalışmada MIP ler polar bir ortamda eş zamanlı radyasyon başlatıcılı aşılı polimerizasyon yoluyla sentezlenmiştir. Halkalı bir deka peptid olan bacitracin hedef molekül olarak kullanılmıştır. Bunun için öncelikle vinil piridin, bacitracin ve Cu(II)'nin çözünür üçlü kompleksi elde edilmiştir. Bu kompleksler polietilen mikro gözenekli membran üzerine aşılınmış ve bu membran üzerinde polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan materyallerin bahsedilen peptid için oldukça yüksek seçiciliğe sahip olduğu gösterilmiştir.

1.3. Kromatografi

Bir karışımda bulunan maddelerin iki fazlı bir sisteme ayrışarak, başlangıçta bulduklarından farklı bölge veya fazlarda toplanmasını sağlayan analitiksel yöntem "kromatografi" denilmektedir (Yıldız ve ark. 1997). Kromatografi sözcüğü, bir çok ayırma yöntemlerini içermektedir (Erdik ve ark. 1997). Diğer ayırma yöntemlerinin hiçbirisi kromatografi kadar etkili olmayıp, uygulamada kromatografi kadar yaygın olarak kullanılmazlar.

Kromatografik yöntemlerde karışımdaki bileşenler, hareketsiz fazın içerisinden hareketli fazın geçirilmesiyle birbirlerinden ayrılırlar. Bu ayrışma sırasında her iki faz birbiriyle etkileşime girmektedir. Fiziksel ve kimyasal özellikleri farklı olan bileşenlerin her iki fazla olan etkileşimleri de farklı ölçüde olmaktadır. Böylece hareketli faz tarafından yürütülen bileşenler, sabit faz tarafından farklı ölçüde tutulduklarından, sabit fazı farklı zamanlarda terk etmektedirler. Ayırma ortamında en az tutulan bileşen ortamdan ilk önce, en fazla tutulan bileşen ise en son ayrılmaktadır. Bileşenlerin ayırma ortamı tarafından

alıkonma süreleri birbirinden yeteri kadar farklı ise bileşenlerin birbirinden ayrılması gerçekleşmektedir (Erdik ve ark. 1997).

Kromatografik yöntemler, çok hızlı bir gelişme göstererek günümüze kadar gelmiş olup, son yıllarda özellikle ucuzluğu, basitliği ve güvenilirliği açısından oldukça fazla kullanım alanı bulmaktadır (Skoog ve ark. 1996).

1.3.1. Kromatografinin Teorisi

Kromatografik ayırmaların temeli, örnekteki bileşenlerin sabit faz ile hareketli faz arasındaki dağılım farklılığına dayanmaktadır. Bir X bileşeninin sabit faz ile hareketli faz arasındaki dağılımı,

$$X_h = X_s \quad (1.1)$$

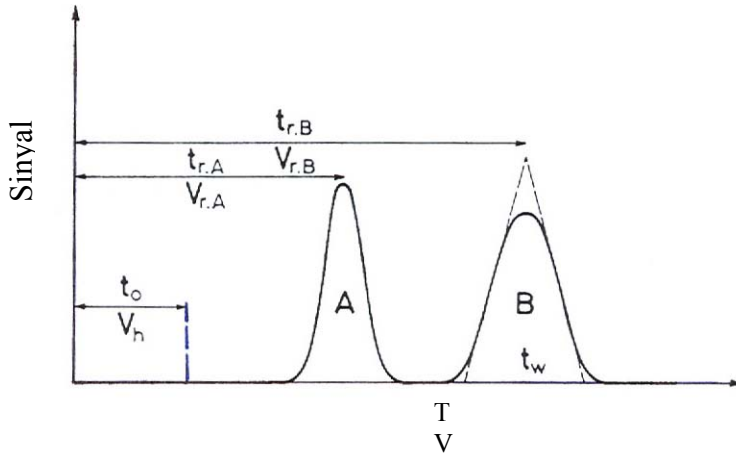
denmesine göre oluşmakta ve X bileşeninin iki fazdaki derişimlerinin oranına, dağılım katsayısı, K_x , adı verilmektedir.

$$K_x = \frac{[X]_s}{[X]_h} \quad (1.2)$$

K 'nın değerinin büyük olması, bileşenin sabit fazda iyi tutulduğunu ve bu yüzden kolon boyunca yavaş ilerlediğini belirtir. K 'nın değerinin küçük oluşu ise bileşenin hareketli faza olan ilgisinin fazla olduğu ve böylece kolon içinde hızlı ilerlediği anlamına gelmektedir. Bir karışımda bulunan bileşenlere ait K değerlerinin farklı oluşu, bunların kolon boyunca birbirlerine göre farklı hızlarda ilerlemesine yol açar. Böylece bileşenler, kolonun sonlarına doğru birbirlerinden ayrılmış olur ve kolonu farklı zamanlarda terk ederler. Kolondan çıkan bileşenlerin derişimlerinin, uygun bir yöntemle ölçülerek zamana veya hareketli fazın hacmine karşı çizilen grafiğine kromatogram denir.

Şekil 1.15'de, iki bileşenden oluşan bir karışıma ait kromatogram görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi, bir bileşen kolondan ne kadar erken

çıkarsa o bileşene ait kromatografi pikide o kadar keskin olarak elde edilmektedir. Kolondan geç çıkan maddenin piki ise genişlemektedir. Kromatografik bant genişlemesinin nedenleri olarak; örneğin kolona yeterince hızlı verilememesi, kolon içinde derişimi yüksek bölgelerden derişimi düşük bölgelere difüzyonla madde aktarılması, kolon içinde moleküllerin farklı yollar izlemesi ve bileşenlerin hareketli ve sabit faz arasında dağılımlarının dengeye ulaşamaması sayılabilir. Karışımda başlangıçta eşit miktarlarda A ve B bileşenlerinin bulunduğu durumda bunlara ait piklerin altında kalan alanlar birbirine eşittir. t_o veya V_h olarak verilen değerler, hareketli fazın kendisinin kolondan çıkması için geçen süre ya da harcanan hacimdir.



Şekil 1.15. İki bileşenli bir karışımdan elde edilebilecek bir kromatogram

Bir bileşene ait pikin maksimumuna karşı gelen süre, t_r , alıkonma süresi; hacim, V_r , ise alıkonma hacmi adını almaktadır. Bir pike ait taban genişliği, t_w , bu pik üzerinde üçgen yardımıyla hesaplanabilmektedir. Alıkonma hacmi ile alıkonma süresi arasında,

$$V_r = vt_r \quad (1.3)$$

eşitliği ile belirlenen bir ilişki vardır. Burada v , hareketli fazın mL dk⁻¹ cinsinden akış hızıdır. Hareketli fazın kolondan çıkabilmesi için harcanan hacim, V_h , ölü

hacim veya kolondaki boşluk hacmi adını almakta ve bu hacim ile hareketli fazın kolondan çıkması için geçen süre, t_0 , arasındaki ilişkiyi,

$$V_h = vt_0 \quad (1.4)$$

eşitliği belirlemektedir.

Bir X bileşenine ait kapasite faktörü, k_x , bu bileşenin sabit ve hareketli fazlardaki mol sayılarının oranı olarak tanımlanmaktadır.

$$k_x = \frac{V_s [X]_s}{V_h [X]_h} = \frac{V_s}{V_h} K_x \quad (1.5)$$

Bu eşitlikteki V_s , kolonda kullanılan sabit fazın hacmidir. k_x 'in değeri, alıkonma sürelerinden, aşağıdaki eşitlikle hesaplanır:

$$k_x = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1.6)$$

Alıkonma hacmi ile k ve K değerleri arasında,

$$V_r = V_h(1 + k_x) = V_h + V_s K_x \quad (1.7)$$

ilişkisi yazılabilir. Elde edilen kromatografi piklerinin keskinliği bir kromatografi kolonunun verimini belirtmektedir. Verimin nicel ölçüsü ise, teorik plaka sayısı adı verilen N değeridir. N değeri, kromatogramlardan ölçülen alıkonma süresi (t_r) ile o pikin taban genişliğinden (t_w), aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmaktadır.

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{t_w} \right)^2 \quad (1.8)$$

Bir kromatografi kolonunun uzunluğu, L , ile hesaplanan N değeri kullanılarak, kolondaki bir teorik plakanın eşdeğer yüksekliği, H , hesaplanmaktadır.

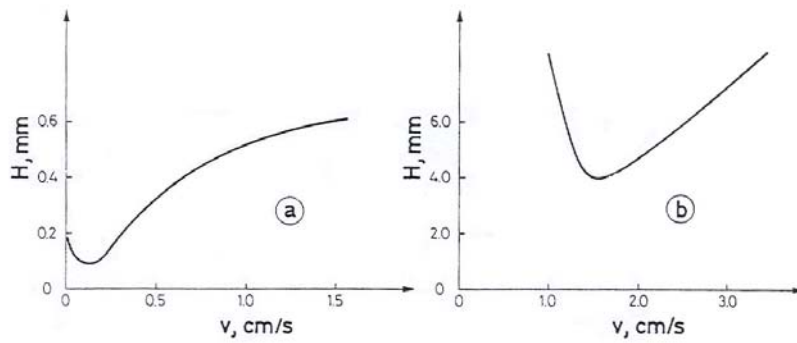
$$H = \frac{L}{N} \quad (1.9)$$

Bir kolonda N değeri ne kadar büyük ise, yani H değeri ne kadar küçük ise, kolonun verimi o kadar yüksektir. H 'ın değerini büyüten her etken, kolonun verimini düşürmekte ve pik genişlemesine neden olmaktadır. Örneğin tümünün aniden kolonun giriş kısmına verilememesi, kolonda bileşenlerin yüksek derişimli bölgelerden düşük derişimli bölgelere doğru difüzyonla dağılması, kolon içerisinde ilerleyen bir bileşene ait moleköl veya iyonların farklı yollar izlemesi ve bileşenlerin sabit faz ile hareketli faz arasında dağılma dengesine ulaşmasının gecikmesi gibi nedenler, kromatografide elde edilen piklerin genişliğinin artmasına yol açmaktadır.

Hareketli fazın akış hızı ile teorik plaka eşdeğer yüksekliği arasında, aşağıdaki van Deemter eşitliği ile belirlenen ilişki vardır.

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv \quad (1.10)$$

Şekil 1.16.'da, van Deemter eşitliği, hareketli fazın sıvı veya gaz olması durumları için, grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.16. H-v ilişkisinin hareketli fazın (a) sıvı ve (b) gaz olduğu durumlarda grafiksel gösterimi

Bir kromatografi kolonun verimli çalışması için önce bu kolon için kullanılacak optimum akış hızının belirlenmesi gerekmektedir. Hareketli faz gaz ise, $H-v$ eğrisinin minimuma ulaştığı akış hızı değeri kullanılmakta, hareketli fazın sıvı olduğu durumda ise bu minimum değer çok küçük akış hızlarında elde edilmektedir. Bu akış hızı değerinin uygulanması ile alıkonma süreleri çok fazla artacağından daha büyük akış hızı değerlerine gereksinim duyulmaktadır. H değerini küçültmek için bir dizi önlem alınarak kolonun verimliliği artırılabilir. Yukarıdaki eşitlikteki akış hızından bağımsız olan A değeri (Eddy difüzyon terimi), bileşenlerin kolonda ilerlerken farklı yollar izlemesi nedeni ile artmaktadır. Kolon dolgu maddesinin çok küçük tanecikli olarak seçilmesi ile A 'nın değeri küçültülebilir.

Eşitlikteki ikinci terim difüzyon terimi olup, özellikle düşük akış hızlarında önem kazanmaktadır. Bu terimin katkısı, bileşenlerin hareketli faz içindeki difüzyon katsayılarının değerleri ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Hareketli fazın gaz olması durumunda bu terim çok daha önemlidir. Çünkü gazlarda çözülmüş maddelerin difüzyon katsayıları, sıvılarda çözünenlere göre yaklaşık 10^5 kat daha büyüktür. Hareketli faz olarak kullanılan gazın mol kütlelerinin büyük olması B 'nin değerini bir miktar küçültür. B 'nin değeri ayrıca kolon sıcaklığının azaltılması ile de küçülür. Kolona basınç uygulayarak da B 'nin değerinin küçültülmesi olasıdır.

Eşitliğin üçüncü terimi yüksek akış hızlarında önem kazanan kütle aktarımı terimidir. Akış hızı arttıkça bileşenlerin iki faz arasında dağılma dengesine ulaşabilmeleri için gereken süre azalmakta ve dolayısıyla dağılma dengesine tam olarak erişilememektedir. Bu terimdeki C değerinin küçültülebilmesi için hareketli sıvı fazın viskozitesinin az olması, kolon sıcaklığının artırılması, sabit faz ince bir sıvı filmi ile kaplı ise bu filmin kalınlığının çok küçük bir değere sahip olması gerekir. Hareketli fazın gaz olduğu durumda bazı uygulamalarda içinde dolgu maddesi olmayan ince bir kapiler boru da kolon olarak kullanılabilir. Bu durumda kapiler borunun çapının küçültülmesi ile de kolonun verimi artırılabilir (Yıldız ve ark. 1997).

1.3.2. Kromatografik Yöntemlerde Ayırmada Etkin Olan Mekanizmalar

Kromatografik yöntemlerle ayırmada etkin olan dört farklı mekanizma vardır. Bunlar; adsorpsiyon, partiyon (dağılma), iyon değişimi ve jel geçirgenliğidir.

1.3.2.1. Adsorpsiyon mekanizması

Adsorpsiyon, kısaca yüzeyde tutunma anlamına gelmektedir. Sıvılardaki yüzey geriliminin nedeni, yüzeydeki sıvı moleküllerinin iç kısımdaki moleküllerin aksine ancak iki yönden çekilmeleri ve enerjilerinin iç moleküllerin enerjilerinden daha yüksek olmasıdır. Aynı nedenlerle katıların da yüzeyindeki moleküllerin enerjileri içindeki moleküllerin enerjilerinden daha yüksektir. İnce toz haline getirilerek yüzey alanı artırılmış katılarda ise bu özellik daha belirgindir. Böyle katılar, yüzeylerindeki enerjilerini azaltmak için başka maddeleri çekerler. Bu özelliğe sahip katılara “adsorban”, yabancı maddelerin katı maddenin yüzeyinde tutulması olayına “adsorpsiyon”, bundan yararlanarak karışımların birbirinden ayrılması yöntemine ise “adsorpsiyon kromatografisi” denilmektedir. Adsorpsiyon kromatografisi yöntemi ile ayırma, birbirine karşı olan iki kuvvetin çarpışması sonucu gerçekleşmektedir. Bu iki kuvvet, hareketli fazdaki itici ve hareketsiz fazdaki tutucu kuvvettir.

Adsorpsiyon kromatografisinde, yüzeye çekilen maddeler katı ile aynı polar özellikte ise kuvvetli, değilse gevşek tutunurlar. Bu yöntemde, hareketli faz ilerlerken, hem çözücü hem de madde, adsorban yüzeyindeki aktif uçlar için yarışır. İki taraftan çok madde taşıyan karışımların ayrılmasında, madde sayısı ve derişim çok büyük önem taşımaktadır, çünkü adsorban yüzeyindeki aktif uçların sayısı sınırlıdır. Aktif uçların sayısını arttırmak için adsorbanın ısıtılarak aktif hale getirilmesi gerekmektedir. Bir çok adsorban havanın nemini kolayca kaparak inaktif hale geçtiğinden bu işlem özellikle ince tabaka kromatografisi uygulamasından önce yapılmalıdır.

Adsorbanlar kendi aralarında üçe ayrılırlar. Bunlar;

- (a) **Zayıf kuvvette olanlar**: Şeker, klorofil, ksantofil gibi bitki pigmentleri, nişasta, enzimler, selüloz ve talk,
- (b) **Orta kuvvette olanlar**: CaCO_3 , Ca(OH)_2 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, MgCO_3 ve Mg(OH)_2 ,
- (c) **Kuvvetli olanlar**: Salisilik asit, magnezyum silikat, alumina, silikajel, aktif kömür, kaolin, bentonit ve diğer killerdir.

1.3.2.2. Partisyon (dağılma) mekanizması

Bir karışımdaki maddelerin birden fazla çözücü içerisinde çözünürlükleri oranında ayrışmasına “partisyon (dağılma)”, bu mekanizmadan yararlanarak karışımların birbirinden ayrılması yöntemine ise “partisyon kromatografisi” denilmektedir.

Partisyon kromatografisinde, bir madde iki fazlı bir sisteme konulmakta ve çözünürlüğü oranında iki faz arasında dağılmaktadır. Hareketsiz faz su veya sulu çözelti değil de, apolar bir organik sıvı ise sıklıkla partisyon kromatografisi kullanılmaktadır. Bu yöntemde genelde hareketsiz faz hidrofilik (suyu seven), hareketli faz ise hidrofobiktir (suyu sevmeyen). Hareketsiz faza (selüloz vb. gibi) hidrofobik bir maddenin (düşük kaynama noktasına sahip petrol eteri ile) emdirilmesi halinde hidrofobik bir hareketsiz faz elde edilmekte ve hidrofilik bir hareketli faz, yıkama çözeltisi olarak kullanılmaktadır (Erdik ve ark. 1997).

1.3.2.3. İyon değişim mekanizması

Benzer yüklü iyonların geri döndürülebilir şekilde yer değiştirmesine “iyon değişimi”, iyon değişimi mekanizmasının rol aldığı kromatografik yöntem ise “iyon değişim kromatografisi” denilmektedir. Bu yöntemde; hareketsiz fazı oluşturan iyon değiştiriciye kimyasal bağlarla bağlı yüklü gruplar, hareketli fazdaki benzer iyonlarla yer değiştirirler. Bu yer değiştirme istendiği anda geri

döndürülebilmektedir. Böylece değiştirilebilir iyon taşıyan maddelerin (asitler, antibiyotikler, amino asitler, alkaloidler vb.) ayrılması sağlanmış olmaktadır.

İyon değişim kromatografisinde, bir karışımdaki iyonlar, bir iyon değiştirici yardımıyla elektrot potansiyellerine göre polarize olmaktadır. Bu nedenle iyonların katı-sıvı fazda dağılımı, (+) ve (-) yüklü iyonik kuvvetlerinin ayrılmasında rol oynamaktadır. İyonlaşabilen grupların reçineye bağlanış durumuna göre hareketsiz faz (reçine), katyonik veya anyonik olabilmektedir.

Örnekteki iyonik bileşenlerin bu reçinelere olan ilgileri ve kolonun seçimliliği; ortamın pH değerine, iyonik şiddete, iyonların yük ve büyüklüğüne, reçinenin porozitesine, çözücünün cinsine ve sıcaklığa bağlıdır.

Kullanılan iyon değiştiriciler, katı reçineler olabildiği gibi, bir katı yüzeyine film halinde tutturulmuş sıvı halindeki reçineler de olabilmektedir. İyon değişimi kromatografisinde kullanılan hareketli faz, belli bir pH değerine tamponlanmış sulu çözeltilerdir. Bu nedenle yöntem; özellikle metal iyonlarının, anyonların, protein ve amino asitlerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Hidrojen iyonu ile doyurulmuş (asidik) bir iyon değiştirici reçineye +1 yüklü iyonların ilgisi; $Li^+ < H^+ < Na^+ < NH_4^+ < K^+ < Rb^+ < Cs^+ < Ag^+ < Tl^+$; +2 yüklü iyonların ilgisi ise; $Mg^{+2} < Zn^{+2} < Co^{+2} < Cu^{+2} < Cd^{+2} < Ni^{+2} < Ca^{+2} < Sr^{+2} < Pb^{+2} < Ba^{+2}$ sırası ile artmaktadır.

İyon değiştirici reçinelerle doldurulmuş kolonlarda ayrıca seyreltik çözeltilerde bulunan çok az miktardaki metal iyonları tutulup, daha sonra kolondan daha küçük hacimdeki bir çözücü ile dışarı çıkartılarak değiştirilmektedir. Bir başka yararlı uygulama ise, bir çözeltinin, içindeki istenmeyen katyonlardan arındırılmasıdır.

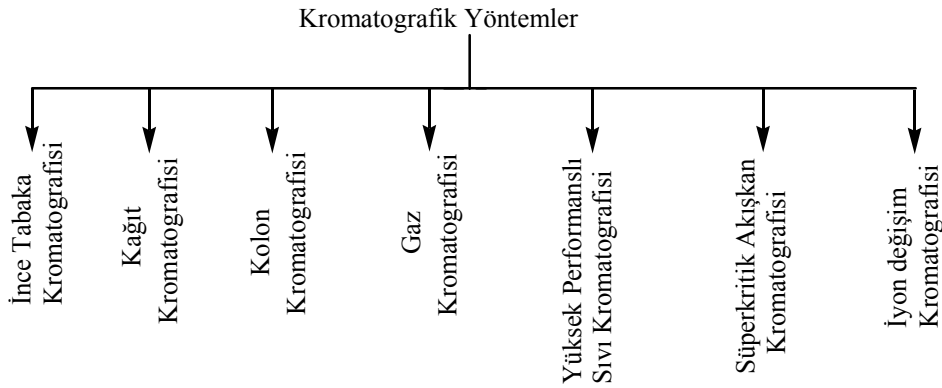
1.3.2.4. Jel geçirgenliği mekanizması

Bir karışımdaki maddelerin porlu (gözenekli) bir jel sisteminden geçirilerek, büyük moleküllerin küçük moleküllerden önce jelden geçmesine “jel geçirgenliği”, bu mekanizmadan yararlanarak karışımların birbirinden ayrılması yöntemine ise “jel geçirgenliği kromatografisi” denilmektedir. Bu yöntemde,

maddeler moleköl büyüklüklerine göre ayrılmakta ve hareketsiz faz olarak doğal (selüloz gibi) veya yapay (sefadeks gibi) bir jel sistemi, hareketli faz olarak ise ayrılması istenen karışımındaki maddeleri tamamen çözebilen bir çözücü kullanılmaktadır. Hareketsiz faz olarak kullanılan ve katının içindeki boşluklara girebilen küçük moleküller, kolonda daha çok tutunurlar. Bu boşluklara giremeyen büyük moleküller ise kolondan hızlı bir biçimde sürüklenerek ayrılırlar. Bu yöntem, özellikle kromatografik ayırma sırasında bozunması veya değişikliğe uğraması istenmeyen protein ve enzim gibi biyolojik moleküllerin ve biyolojik sıvılardaki yüksek mol kütleli bileşenlerin ayrılması işleminde kullanılmaktadır. Ayrıca bu yöntem ile polimerlerin ortalama mol kütleleri ve dağılımları da belirlenmektedir (Yıldız ve ark. 1997).

1.3.3. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler, hareketli ve hareketsiz fazın türüne göre Şekil 1.17'deki gibi sınıflandırılabilirler.



Şekil 1.17. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

1.3.3.1. İnce tabaka kromatografisi

İnce tabaka kromatografisinde, sabit faz; cam, aluminyum veya plastikten yapılmış düz bir destek üzerine ince tabaka halinde sürülmektedir. Hareketli faz ise bir çözücü veya bir çözücü karışımından oluşmaktadır. İnce tabaka kromatografisinde tüm mekanizmalar geçerli olmasına karşın, genellikle adsorpsiyon mekanizması daha etkilidir.

1.3.3.2. Kağıt kromatografisi

Kağıt kromatografisinde sabit faz olarak, Whatman vb. gibi özel kağıtlar veya kaba süzgeç kağıdına emdirilmiş madde; hareketli faz olarak da, ince tabaka kromatografisinde olduğu gibi bir çözücü veya bir çözücü karışımı kullanılmaktadır. Jel geçirgenliği hariç diğer mekanizmaların hepsi bu tür kromatografik ayırmalarda etkin olmasına karşın, çoğunlukla partisyon mekanizması diğerlerinden daha etkilidir.

1.3.3.3. Kolon kromatografisi

Kolon kromatografisinde sabit faz, aktif yüzeyli katı bir madde, hareketli faz ise bir çözücü veya çözücü karışımını içermektedir. Sabit faz, cam veya metal kolona uygun şekilde doldurularak hazırlanmakta, fakat genellikle cam kolonlar daha fazla tercih edilmektedir. Kolon kromatografisi işlemi sırasında, ayırımı yapılacak karışımın uygun bir çözücüdeki çözeltisi belli bir hızla bu kolondan geçirilmektedir. Karışım, çözücü akışı ile aşağıya doğru ilerlerken polaritelerine göre bileşenlerine ayrılmaktadır. İnce tabaka kromatografisindeki gibi tüm mekanizmalar geçerli olmasına karşın, çoğunlukla adsorpsiyon mekanizması daha etkilidir.

1.3.3.4. Gaz kromatografisi

Gaz kromatografisi kendi arasında gaz-sıvı ve gaz-katı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. İki yöntemin farkı, gaz-sıvı kromatografisinde sabit fazın sıvı, gaz-katı kromatografisinde ise katı bir adsorban olmasıdır.

Gaz-sıvı kromatografisinde sabit faz, genellikle destek katısı üzerine hareketsiz faz (sıvı) kaplanarak hazırlanan kapiler kolonlardır. Kolon yüksek sıcaklıkta tutularak ayrılacak maddelerin gaz fazına geçmesi sağlanmaktadır. Hareketli faz ise inert (N_2 gibi) bir gazdır. Madde kolona enjekte edildikten sonra, önce gaz haline getirilmekte, daha sonra sürükleyici gaz ile kolon içerisinde hareket ettirilerek ayırım gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşenler kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle belirlenip kaydedilmektedir. Gaz-sıvı kromatografisinde diğer kromatografik yöntemlerden farklı olarak sadece partiyon mekanizması geçerlidir.

Gaz-katı kromatografisinde ise, sabit faz, katı adsorban içeren kolondur. Gaz-sıvı kromatografisindeki gibi uygulanmakta, fakat bu yöntemde gaz-sıvı kromatografisinden farklı olarak adsorpsiyon mekanizması geçerlidir. Eğer ayrılacak bileşikler, gaz veya küçük moleküllü hidrokarbonlar ise bu yöntem kullanılmakta ve ayırma, aktif yüzeyli bir katının üzerinde adsorplanarak gerçekleşmektedir.

1.3.3.5. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

Bir sıvıda çözülmüş olan ayrılacak bileşenler, bir kolonda bulunan genellikle katı bir destek maddesi üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşime girmekte ve kolon içinde farklı hızlarda ilerleyerek, kolonu farklı alıkonma sürelerinde terk etmektedirler. Gaz kromatografisinden farklı olarak hareketli faz (sürükleyici) sıvıdır. Burada sürükleyici sıvı, pompalarla kolona pompalanarak yüksek hareketli faz akış hızı sağlanmakta, ayırma çabuk ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşikler kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle belirlenip kaydedilmektedir. Bu tip yüksek hızda gerçekleştirilen

ayırımların yapıldığı sıvı kromatografik yöntemlere “yüksek performanslı sıvı kromatografisi sistemleri (HPLC)” denilmektedir.

Geleneksel sıvı-sıvı kromatografisi oldukça yavaş ve çözücü akışı sırasında kolonun sıkışması olasıdır. Ayrıca normal kolon kromatografisinde kolondan alınan her bileşen tanımlanmak amacıyla titre edilmek zorundadır. Elde edilen fraksiyonlar çok az miktarlarda aranan bileşeni içerdiğinden yöntem pratik değildir. Ayrıca kolonda sürüklenen bileşenler renkli bantlar oluşturmadığı sürece onları görmek olanaksızdır. Dolayısıyla kolondan alınan hangi fraksiyonun titre edileceği belirgin değildir, fakat HPLC’de farklı dedektörler bu amaçla kullanılmakta ve çok hızlı bir şekilde ayırım sağlanmaktadır. Örneğin; UV-görünür bölge dedektörü, özellikle 254 nm’de absorpsiyon yapan birçok aromatik bileşiğin ayrılmasında ve tanımlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. HPLC’de en önemli değişkenlerden birisi de kolaylıkla ayarlanabilen hareketli faz akış hızıdır. Böylece teorik plaka eşdeğer yüksekliği (TPEY) değişebilir ve arzulanan minimum düzeyde tutulabilir. Çünkü bir kolonda, daha düşük TPEY, daha fazla teorik plaka sayısı, dolayısıyla, bu daha iyi ayırım anlamına gelmektedir. Geleneksel kolon kromatografisinde kolonun sürekli izlenmesi, sıkışıklığın giderilmesi gibi zorluklar vardır. Buna benzer sorunların olmadığı bir kromatografik yöntem olan HPLC 1960’lı yıllarda kullanılmaya başlanmış ve günümüzde de yöntem, geliştirilerek kullanılmaya devam etmektedir. HPLC’nin cihaz tasarımı ve uygulaması gaz-sıvı kromatografisine benzemesine karşın, aralarında bazı belirgin farklılıklar bulunmaktadır. En önemli farklılıklardan birisi gaz kromatografisinde sadece partiyon mekanizması etkili iken HPLC’de her dört mekanizma da rol oynamaktadır. Diğer bir fark ise HPLC’de hareketli faz gaz-sıvı kromatografisindeki gibi bir gaz değil sıvıdır. Ayrıca bu yöntemin uçucu olmayan bileşenlere uygulanabilmesi gibi bir başka üstünlüğü de vardır. HPLC’nin diğer sıvı kromatografik yöntemlere göre en önemli üstünlüklerinden birisi de kullanılan hareketli fazın kolon boyunca yüksek hızda pompalanabilmesidir. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının diğer nedenleri; duyarlılığının yüksek olması, kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması, doğruluk ve kesinliğinin yüksek olması ve hepsinden de önemlisi

birçok bilim dalında ve endüstride uygulanabilir olmasıdır. Yöntem ile; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, aromatik hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler kolaylıkla analiz edilebilmektedirler.

Pratikte hareketli fazı sabit fazından daha az polar olan sıvılarla gerçekleştirilen kromatografiye normal faz, sabit fazından daha polar sıvılarla yapılan kromatografiye ise ters faz sıvı kromatografisi denilmektedir. Mol kütlesi 10000'den daha büyük molekülleri ters-faz dağılma kromatografisi ile incelemek olası ise de, bu amaçla boyut seçicilik kromatografisi daha çok tercih edilmektedir. Daha küçük mol kütleli iyonik türler için, iyon değiştirme kromatografisi uygundur. Küçük, polar, ancak iyonik olmayan türler, en iyi dağılma kromatografisi yöntemleri ile incelenebilir. Ayrıca, bu işlem, homolog serilerin ayrılması için çoğu zaman daha kullanışlıdır. Adsorpsiyon kromatografisi genellikle, polar olmayan türlerin, yapısal izomerlerin ayrılması ve alifatik hidrokarbonlar gibi bileşik sınıflarının alifatik alkollerden ayrılması için seçilmektedir.

Kullanılan kolon, yüksek basınçlara dayanıklı ve genellikle paslanmaz çelikten yapılmıştır. Kolon, normal kolon kromatografisinde olduğu gibi küre şeklindeki katı destek maddesi ile film şeklinde kaplanmış sabit sıvı bir fazı içerir ve hareketli faz ile analiz edilecek olan karışım beraberce kolon boyunca aşağıya doğru sürüklenirler. Sıvı ve küre taneciklerinin birarada bulunduğu bu durum porlu tabaka olarak adlandırılmaktadır. Taneciklerin porlu tabakası normal kolon kromatografisindeki silikajele benzemektedir. Normal kolon kromatografisinden farklı olarak HPLC'de hareketli faz için bir depo bulunmakta ve bu depodan hareketli faz kolon boyunca aşağıya doğru bir HPLC pompası ile pompalanmaktadır. Pompanın giriş basıncı 500-5000 psi arasındadır. Analiz edilecek örnek, bir şırınga ile kolonun üst tarafında bulunan enjeksiyon bölümünden enjekte edilmektedir. Partisyon mekanizması ile ilerleyen ve birbirinden ayrılan bileşenler öncelikle kolonu terk edip dedektörde sinyal olarak kaydedilmekte ve daha sonra çıkışta bir toplama kabında fraksiyonlar halinde toplanmaktadır.

Gaz kromatografisi ile HPLC'nin kolon verimlilikleri ve ayırma güçleri arasında farklılıklar vardır. En uygun hareketli faz akış hızları için bulunan teorik plâka eşdeğer yüksekliği (TPEY), iki kromatografik yöntem için de aynı büyüklüklerde; fakat teorik plaka sayısı, N , sıvı kromatografisinde 100-1000, gaz kromatografisinde ise 1000-50000 arasında değişmektedir. Hareketli faz akış hızları, örneğin; gazın akış hızı, viskozitesi çok farklı olduğundan sıvıdan çok fazladır. Ayırma hızı van Deemter eşitliğindeki "C" terimi ile orantılıdır. Bu terim, gaz için, sıvı hareketli faza göre 10^3 - 10^5 defa daha küçüktür. Bu nedenle iyi bir ayırma için sıvı kromatografisinde az teorik plaka sayısı (N) yeterli olmakta ve kolon boyları 10-100 cm arasında değişmektedir. Gaz kromatografisinde ise kolon boyları çok daha uzun, fakat kolon çapları ise HPLC'deki kolonlarla aşağı yukarı aynı boyutlardadır (Şahin 2005).

Hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) ise kompleks karışımlardan proteinlerin ayrılmasını veya saflaştırılmasını sağlayan bir kromatografi cihazıdır. HPLC'den farklı olarak daha düşük basınçlarda çalışır ve genellikle cam veya teflon bileşenlerden oluşur. Cihaz genellikle biyokimya ve enzimoloji alanlarında kullanılır (Kunz ve ark. 1989, Hollar ve ark. 1991). FPLC ile kullanılan kolonlar; makromolekülleri, yük, boyut, hidrofobisite veya biyotanıma esaslarına göre ayırabilirler. Bu nedenle amaca yönelik uygun bir kolon seçmek gereklidir. Sistem protein, peptid vb. ayırımlarını kısa sürede gerçekleştirebilen bir sıvı kromatografi sistemidir. Aynı zamanda mikro düzeyde saflaştırma ve preparatif bazda HPLC analizleri yapmak için uygundur. FPLC cihazı ayrılan türlerin UV absorbansını ölçmekle birlikte; ortamın, iletkenlik ve pH ölçümünü de yapabilmektedir.

1.3.3.6. Süperkritik akışkan kromatografisi

Süperkritik akışkan kromatografisi, gaz ve sıvı kromatografilerinin üstün taraflarını biraraya getiren, bunların karışımı olan bir yöntemdir. Bazı uygulamalarda hem gaz-sıvı hem de yüksek performanslı sıvı kromatografisine üstünlük sağlamaktadır. Süperkritik akışkan, bir maddenin, kritik sıcaklığının üzerine ısıtıldığı zaman elde edilen fiziksel hali olarak tanımlanmaktadır.

Süperkritik akışkan kromatografisinde hem dolgulu hem de açık tip kolonlar kullanılabilir. En çok kullanılan hareketli faz ise CO₂'dir. Süperkritik akışkan kromatografisinin en önemli üstünlüğü, gaz-sıvı kromatografisinde kullanılan duyarlı ve çok amaçlı dedektörlerin bu yönteme de uygulanabilmesidir. Yöntem, en çok ağır petrol fraksiyonlarının ayrılmasında kullanılmaktadır.

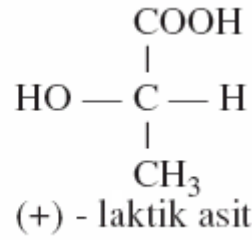
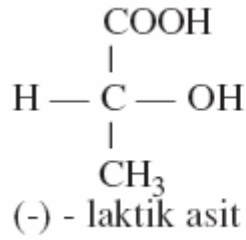
1.3.3.7. İyon değişim kromatografisi

Önceleri iyon değişim kromatografisi olarak bilinen iyon kromatografisi, sıvı kromatografisinin iyonlara uygulanan türü olarak sınıflandırılabilir. Yöntem genel olarak, iyonların ve iyonlaşan türlerin ayrılmasında, oligomerik iyon karışımlarının kalitatif dağılımlarının belirlenmesinde, karışımdaki birkaç iyonun aynı anda (eş zamanlı) ve düşük derişimli ve özellikle girişim yapan matrikslerin bulunduğu örneklerdeki iyonik türlerin deriştirilmesinde (ön deriştirme) ve belirlenmesinde kullanılmaktadır (Yıldız ve ark. 1997).

1.3.4. Enantiyomerik karışımların kromatografik yöntemlerle ayrılması

Bilindiği gibi bir maddenin polarize ışık düzlemini döndürme yeteneğine optikçe aktiflik denir. Optikçe aktif maddeler düzlem polarize ışığın dağılıma düzlemini sağa ya da sola, optik izomerlerden birisi kendi çözeltisi içinden geçen düzlem polarize ışığı sağa, diğeri ise sola çevirir. Düzlem polarize ışığı sağa veya sola çeviren bu bileşiklerin her birine enantiyomer denir ve bunlar birbirinin optik izomeridirler. Enantiyomerler birbirinin ayna görüntüsüdür.

Optik izomerlerden birisi ışığı kaç derece sağa çevirmiş ise diğeri de aynı açı ile sola çevirir. Polarize ışık düzlemini sağa çeviren izomer (+) veya (d) sola çeviren ise (-) veya (l) simgesiyle belirtilir.



(+) ve (-) izomerler eşit oranlarda karıştırılırsa optikçe aktiflik tamamen kaybolur. Bu tür karışımlara rasemik karışımlar ya da rasemat denir. Rasematlar polarize ışığa etki etmezler. Dolayısıyla rasemik karışımlardaki enantiyomerleri birbirinden ayırmak ve saflaştırmak oldukça zor olmaktadır ve bunun için genellikle elektroforez ve kromatografik yöntemler kullanılır (March 2004).

Optikçe aktif bileşiklerin stereoizomerlerinin biyolojik aktiflikleri de birbirinden farklıdır. Dolayısıyla biyolojik sistemlerde kullanılacak malzemelerin optikçe yüksek saflıkta olması gerekmektedir. Bu nedenle özellikle ilaç üretiminde, kiral bileşiklerin enantiyomer bileşiminin saptanabilmesi için güvenilir metotlara olan ihtiyaç artmaktadır. Doğrudan ve dolaylı kiral ayırımlar kapiler elektroforez (CE) ve miseller elektrokinetik kromatografiyle (MEKC) gerçekleştirilebilmektedir. Doğrudan kiral ayırımlar bir elektrolit varlığında farklı kiral ilavesiyle gerçekleştirilir. Dolaylı kiral ayırımlarda ise analit enantiyomerler, kiral bir reaktifin (+) veya (-) formuyla reaksiyona sokularak önce diastereomerik çifti oluşturulur, daha sonra CE veya MEKC yoluyla birbirlerinden ayrılırlar. Wan ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada aminoasitlerin CE ile dolaylı ve direkt ayırımlarını incelemişlerdir ve bir çok amino asiti her iki yöntemle de ayırabilmişlerdir. 10 adet, 1-(9-florenil)etil kloroformatla türevlendirilmiş, aminoasiti MEKC ile bir seferde ayırabilmişler ancak daha kompleks bir karışım enjeksiyonunda bir çok pikin ayrılmadığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca dolaylı metotun doğrudan metoda göre daha etkin bir ayırma sağladığını öne sürmüşlerdir. Tivesten ve Folsetad 17 adet amino asiti kısaca OPA/TATG adı verilen bir reaktifle 5 dakikadan az bir sürede bir kaç çiftli pik haricinde ayırabilmişlerdir. Nishi ve arkadaşları da 19 adet amino asitin ayırımını 2,3,4,6 – tetra-o-asetil-β-D-glukopiranosil isotiyosiyanat ile türevlendirdikten sonra ayırmışlardır (Thorsen ve ark. 1997). Bahsi geçen bu yöntemler enantiyo seçici ligand değişimi ile elektrogöç ayırım tekniklerini birleştiren yöntemlerdir. Bu

yöntemlerin dışında yine enantiyo seçici ligand değişim ile kromatografik yöntemleri birleştiren teknikler de mevcuttur. Bu tekniklerde, kiral sabit bir faz, kiral bir mobil faz veya kiral maddeyle kaplı bir sabit faz kullanılarak enantiyomerlerin ayırımları gerçekleştirilmiştir (Davankov 2003).

Farklı bir çalışma ise Nagata ve ark. (2001) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada metiyonin, valin, fenilalanin ve leusinden oluşan dörtlü bir amino asit rasemik karışım 1-floro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanin amid ile türevlendirilerek, ters faz ince tabaka kromatografisiyle ayrılmışlardır. Görüldüğü gibi enantiyomer ayırımlarında kullanılan yöntemlerin bir çoğunda vakit alıcı ön türevlendirme işlemleri gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen enantiyomerik ayırım çalışmasına en yakın çalışma Vidyasankar ve ark. (1997) tarafından gerçekleştirilmiştir. Ekip Cu(II)-N-(4-vinilbenzil)immunodiasetik asit fonksiyonel monomerini ve çeşitli aminoasitleri hedef molekül olarak kullanarak yığın polimerizasyonu ile propilmetakrilat ile türevlendirilmiş silika partikülleri yüzeyinde ligand-değişim adsorbentleri hazırlamışlardır. Hazırlanan D ve L-aminoasit baskılı polimerler ile D-L tayrozin, D-L-alanin, D-L-isoleusin ve D-L-valin enantiyomerik karışımlarının ayırımı herhangi bir türevlendirme olmaksızın gerçekleştirilmiştir. Ancak yayında verilen kromatogramlara ilişkin ayırımlarının çok iyi olmadığı görülmektedir. Ayırıcılık faktörü (α) değerleri de 1,5 civarlarında bulunmuştur.

1.3.5. Katı-faz ekstraksiyonu

Eser elementin analizden önce matriksten ayrılması için kullanılan yöntemlere önderiştirme veya zenginleştirme denir. Önderiştirme için kullanılan en basit yöntem, çözücünün buharlaştırılmasıdır. Ancak bu durumda ilgilenilen elementin yanısıra diğer elementlerin derişimlerinde arttığı ve bunun sonucu olarak matriks etkisinden dolayı seçiciliğin azaldığı bilinmektedir. Bu nedenle çözücü buharlaştırma yöntemi çok basit bir yöntem olmasına karşın pek ilgi görmemiştir. Çöktürme, uygulanan alternatif teknikler arasında en eski olanıdır. Çok basit bir yöntem olmasına karşın, çökelek çözünürlüğünün az olması, çok az çökelek oluşması gibi kısıtlayıcı yönleri vardır. Sıvı-sıvı ekstarksiyonu yaygın

olarak kullanılan önderiştirme yöntemlerindedir. Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi basitliği, hızlılığı, analitin ve adsorbanın geri kazanımının kolay olması nedeni ile yaygın olarak kullanılsa da son zamanlarda katı-faz ekstraksiyonu ile yer değiştirmiştir. Bunun nedeni katı faz ekstraksiyonunun hızlı, basit, kararlı olması, katı fazın tekrar kullanılabilmesi, yüksek önderiştirme faktörü elde edilmesi, az miktarda çözücü kullanılması ve ucuz olması gibi avantajlara sahip olmasıdır.

Katı faz ekstraksiyonu (SPE) kompleks matriks ortamında ya da düşük derişimdeki analitin analizinde yaygın olarak kullanılan önderiştirme ve ayırma tekniğidir. SPE'nin temeli sulu fazdan komşu katı fazdaki aktif bölgelere analitlerin transferine dayalıdır. Katı faz daha sonra örnek ortamından uzaklaştırılarak elüsyon ile ya da gaz fazına termal desorpsiyon ile analitler geri kazanılır. Katı faz girişime neden olan maddelerin eliminasyonu ve matriksin kompleksliğini azaltmak için seçici eluentlerle yıkanır. Çözücü, katı fazdan analitin hızlı uzaklaşmasını sağlayabilmelidir. Katı-faz ekstraksiyonu farmakolojik, klinik, endüstriyel ve çevresel sektörlerde yaygın olarak kullanılan bir işlemdir.

Silika jel veya silika membran diskler, aktif karbon, iyon değıştirici reçineler, selülozik türevler, polistiren-divinilbenzen esaslı adsorbanlar, poliüretan polimerler, şelatlaştırmacı reçineler, şelatlaştırmacı fiberler, naftalin ve moleküler baskılanmış polimerler gibi bazı farklı katı destekler seçilen şelatlaştırmacı reaktiflerin fiziksel yüklenmesi ile ya da kimyasal bağlanması ile eser miktardaki metale seçici katı faz destekler hazırlanabilir. Herhangi bir sabit fazla doldurulan SPE kolonlarına başlıca sorun tutunma mekanizmasının seçiciliğinin düşük olmasıdır. İstenen seviyede seçicilik elde etmek için kolonun doldurulmasında molekül baskılanmış polimerler kullanılabilir. Katı faz ekstraktın ya da önderiştiricisinin seçiciliği immobilize edilen organik bileşimin yapısına, birleşen donör atomların doğasına (O, N, P ve S), katı fazın yüzeyindeki fonksiyonel grupların pozisyonuna ve arzu edilen metal iyonu alındıktan sonra oluşan kompleksin sterik koşuluna bağlıdır.

Silika jel bazlı sorbentler çeşitli koşullar altında kimyasal, termal ve mekanik kararlılık gibi avantajlar sağlamasına karşılık yüzey silanol grupları asidik şartlarda protonlanır ve iyon değışim kapasitesi büyük ölçüde azalır. Silika

jelin yüzeyi fiziksel adsorpsiyon ya da kimyasal immobilizasyon ile modifiye edilerek katı faz ekstraksiyonunda seçici bir şekilde kullanılabilir. Ditizon bir çok eser elementle reaksiyona girmesine karşın ditizonla fonksiyonlanmış silika jelin Hg^{2+} için seçici olduğu gözlenmiştir.

Organik bazlı sorbentler polimerik ve non-polimerik sorbent olarak ikiye ayrılabilir. Polimerik sorbentler tüm pH aralığında kullanılabilmesi nedeni ile silika bazlı sorbentlere göre eser elementlerin önderiştirilmesinde avantaj sağlar ve yaygın olarak kullanılır.

Moleküler baskılanmış polimerlerin ilk olarak katı-faz ekstraksiyonunda kullanımı 1994'de Sellegren ve grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Sellegren bu çalışmada, seyreltik idrar örneğinden pentanamitin ekstraksiyonunu seçici bir şekilde yapan moleküler baskılanmış polimer hazırlamıştır. Daha sonra bir çok grup çeşitli matriks ortamından farklı analitleri ayırmak için MIP hazırlayarak katı-faz ekstraksiyonunda kullanmıştır. MIP'in SPE'de kullanılma dezavantajlarından biri de baskılanan analit molekülünün zor uzaklaştırılmasıdır. Yıkama ve elusyon basamakları seçiciliğin optimizasyonu için en önemli adımlardır (Büyüktiryaki 2005) .

2. MATARYEL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Azobisisobutironitril (AIBN), etilenglikoldimetakrilat (EDMA), sitokrom c ve L-histidin Fluka AG (Buchs, Switzerland) firmasından alınmıştır. 8-hidroksi-2'-deoksiguanizin, ribonükleaz A, bakır(II) sülfat penta hidrat, metakroilklorür, sodyum metabisülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), potasyum peroksidisülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), glisin ve platin (II) klorür Aldrich (Milwaukee, WI, USA) firmasından temin edilmiştir. Diğer bütün kimyasallar ve biyokimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

Deneylerde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP[®] ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure[®] organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm'dir.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Kesikli sistemde L-histidin adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri ve kolesterolün biyokromatografik ayırma işlemleri photodiode array dedektörlü Dionex BioLC sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Cyt-c adsorpsiyon kapasitesi verileri Shimadzu UV 1601 UV-Görünür Bölge Taramalı Spektrofotometresi ile elde edilmiştir. FTIR spektrumları Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer cihazı ile alınmıştır. pH ölçümleri WTW Series InoLab pH730 model pHmetre ile yapılmıştır. Kan örneklerinde 8-OHdG ölçümleri için ise Prince CEC 760 model kapiler elektrokromatografi cihazı kullanılmıştır. Taramalı

elektron mikroskopisi için Oxford Instruments-7430 Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEG-SEM) cihazı kullanılmıştır.

Elde edilmiş olan L-Histidin baskılı polimerik mikrokürelerin kromatografik ayırımlarda kullanılabilirliği Amersham AKTA-FPLC sistemi ile denenmiştir. Bu sistem beraberinde bir adet UV dedektör, bir adet INV 907 pompa ve bir adet Frac 920 fraksiyon toplayıcıyı içermektedir.

Polimerlerin BET analizleri için NOVA 2200e Surface Area Pore Size Analyzer kullanılmıştır.

2.2.Yöntem

2.2.1. Metakrilamidohistidin (MAH) monomerinin sentezi

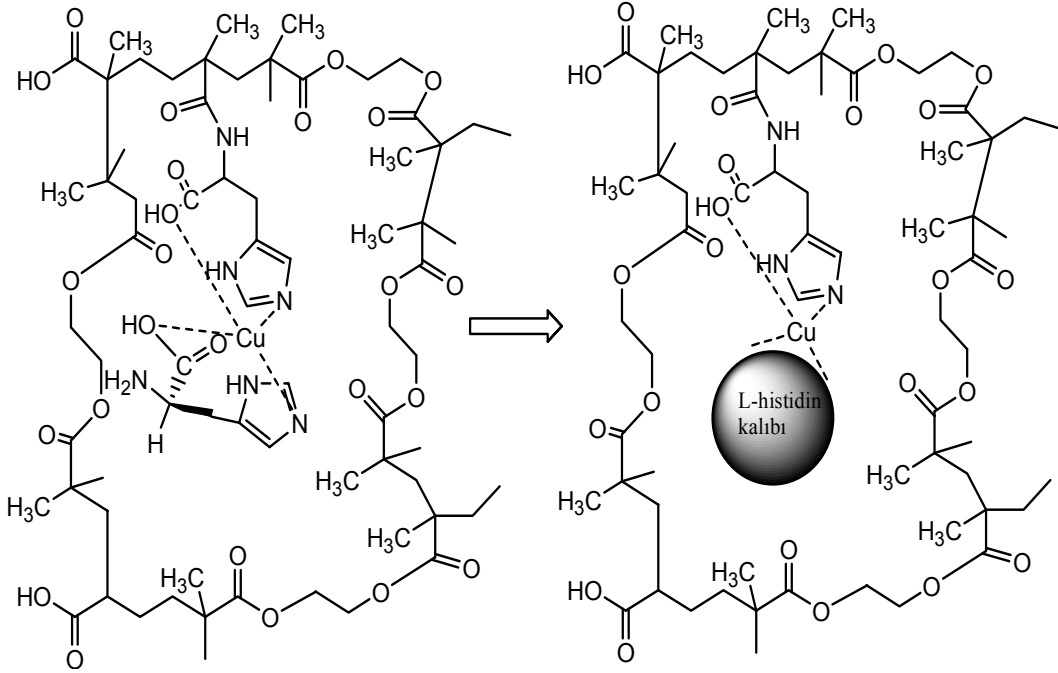
2-metakriloamidohistidin monomerinin sentezi için uygulanan yöntemde; 5.0 g L-histidin ve 0.2 g NaNO₂, 30 mL K₂CO₃ (% 5, v/v) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C'a soğutulmuş ve 4.0 mL metakroilklorür, yavaşça bu çözeltiliye ilave edilmiştir. Karışım azot atmosferi altında, manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyonun sonunda, çözeltinin pH'ı 7.0'ye ayarlanmış ve etilasetat ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz, döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAH), etanol ve etilasetat ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır.

2.2.2. Metakrilamidohistidin-Cu(II) metal-şelat monomeri sentezi

Metakrilamidohistidin-Cu(II) [MAH-Cu (II)] metal-şelat monomeri sentezi için MAH monomeri (1.0 mmol) 15 mL etanolde çözülmüştür. Üzerine 1.0 mmol bakır(II) sülfat penta hidrat yavaşça ve sürekli karıştırılarak eklenmiştir. Bu çözelti 3 saat karıştırılmış ve oluşan berrak mavi renkteki kompleks döner buharlaştırıcıda çözücüsü uzaklaştırılarak etanol/asetonitril karışımından kristallendirilmiştir.

2.2.3. L-Histidin Baskılı Polimerik Kürelerin Hazırlanması

MAH-Cu(II)-L-Histidin ligand değişim monomeri (Şekil 2.1), MAH-Cu(II) ve hedef molekül L-Histidin kullanılarak hazırlanmıştır. MAH-Cu(II) (1,0 mmol) ve L- Histidin (1,0mmol) 3,0 mL etanol içinde çözümlenerek, 20 dak. karıştırılmıştır. Daha sonra, L-histidin baskılı küreler (HIBS) aşağıda belirtilen şekilde süspansiyon polimerizasyon tekniği ile hazırlanmıştır: Dispersiyon ortamı 0,2 g poli(vinil alkol)'ün 60 mL suda çözümlenmesiyle hazırlanmıştır. MAH-Cu(II)-L-histidin monomer kompleks çözeltisi(1,0mmol) 8,0 mL EDMA/12 mL toluen-asetonitril karışımı üzerine ilave edilmiş ve 0,09 g AIBN bu monomer karışımı içinde çözülmüştür. Bu çözelti daha sonra süspansiyon ortamına alınıp, termostatik su banyosunda manyetik karıştırıcı ile 600 rpm sabit hızla azot atmosferinde karıştırılmıştır. Polimerizasyon reaktör sıcaklığının 75°C'de 6 saat ve 90°C'de 3 saat tutulmasıyla gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyonun ardından L-histidin baskılı küreler polimerizasyon ortamından süzülerek ayrılmıştır. Elde edilen mikroküreler kalıp molekülün uzaklaştırılması için %60-40 (v/v) etanol-su karışımıyla 24 saat muamele edilmiştir. Daha sonra mikroküreler etanol ve su ile yıkanmış ve 70°C'de 48 saat vakum altında kurutulmuştur. MAH-Cu(II) ve EDMA kullanılarak aynı yolla kalıp molekül içermeyen baskısız polimerler hazırlanmıştır.



Şekil 2.1. L-Histidin kalıp oluşumunun şematik gösterimi

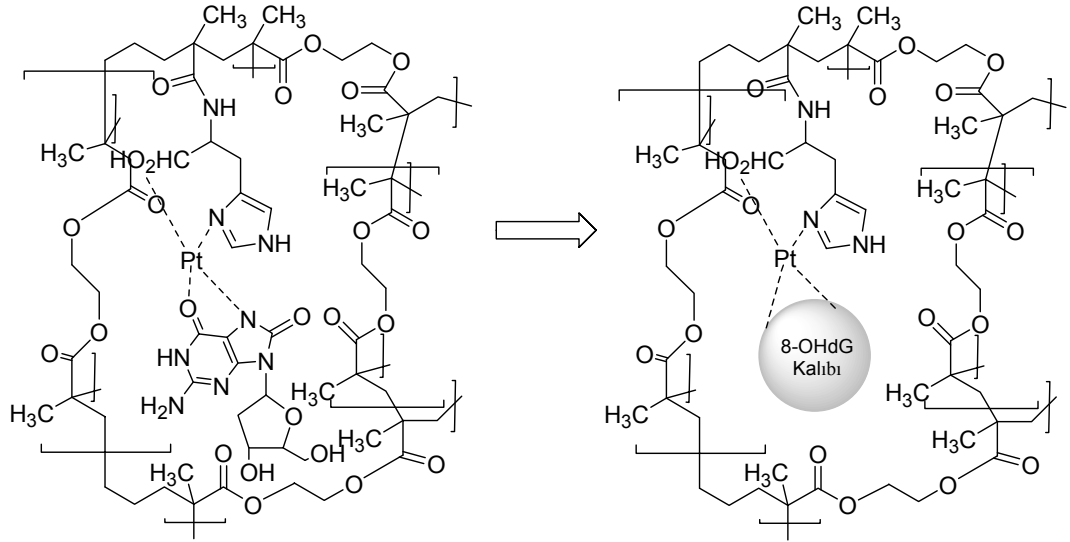
2.2.4. Metakrilamidohistidin-Pt (II) metal-şelat monomeri sentezi

Metakrilamidohistidin-Pt(II) metal-şelat monomeri [MAH-Pt(II)], MAH ve platin (II) klorür bileşiklerinin etkileştirilmesi ile sentezlenmiştir. Bunun için platin (II) klorür (1 mmol) ve MAH monomeri (1 mmol) etanolde ayrı ayrı çözüldürülerek etkileştirilmiş ve kahverengi MAH-Pt(II) metal-şelat monomeri etanol/etilasetat ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır.

2.2.5. 8-Hidroksi-2'-deoksiganizin (8-OHdG) baskılı polimerin sentezi

Metakroilamidohistidin-Pt(II)-8-OHdG monomeri, MAH-Pt(II) ve hedef molekül olan 8-OHdG kullanılarak sentezlenmiştir. MAH-Pt(II) (1,0 mmol) ve 8-OHdG (1,0mmol) 5,0 mL etanol içeren bir vialde çözülüp, 20 dak. karıştırılmıştır. Ardından, 8-OHdG baskılı polimer aşağıda anlatıldığı şekilde yığın polimerizasyon tekniği ile hazırlanmıştır (Şekil 2.2): MAH-Pt-8OHdG monomer kompleks çözeltisi (1,0 mmol) üzerine çapraz bağlayıcı ve başlatıcı olarak sırasıyla 0,75 mmol N-N'-Metilenbisakrilamid (N-N' MBAA) ve 1 mmol $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ çözeltileri ilave edilmiştir. Elde edilen karışım UV ışığı altında

24 saat süreyle tutularak polimerleştirilmiştir. Polimerizasyonun ardından 8-OHdG baskılı polimer, polimerizasyon ortamından ayrılmış ve hazırlanan MIP kalıp molekülün uzaklaştırılması için glisin-HCl tamponu (pH:2,2) ile 48 saat 70°C’de muamele edilmiştir. Daha sonra MIP, etanol ve su ile yıkanarak, 48 saat vakum altında kurutulmuştur.



Şekil. 2.2. 8-OHdG baskılı polimer oluşumunun şematik gösterimi

2.2.6. Kolesterol baskılı polimerinin sentezi

Metakroilamidohistidin-Cu(II)-kolesterol ligand değişim monomeri sentezi için MAH-Cu(II) (0,5mmol) ve kolesterol (1,0 mmol) 5 mL etanol içinde çözülmüş ve 30 dakika karıştırılarak ön-organize edilmiştir. Kolesterol baskılanmış polimerik mikroküreler hazırlamak amacıyla süspansiyon polimerizasyon tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla 0,25 g poli(vinil alkol) 60 mL suda çözülerek dispersiyon ortamı hazırlanmıştır. Sonra MAH-Cu(II)-kolesterol monomer kompleks çözeltisi (1,0mmol) 6,0 mL EDMA/12 mL toluen- karışımı üzerine ilave edilmiş ve 0,2 mmol AIBN bu monomer karışımı içinde çözülmüştür. Bu çözelti daha sonra süspansiyon ortamına alınıp, termostatik su banyosunda manyetik karıştırıcı ile 600 rpm sabit hızla azot atmosferinde karıştırılmıştır. Polimerizasyon, reaktör sıcaklığının 75°C’de 8 saat ve 90°C’de 4

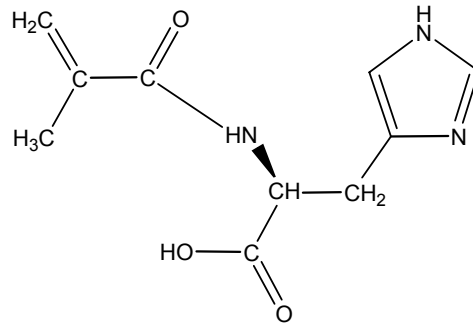
saat tutulmasıyla gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyonun ardından kolesterol baskılı küreler polimerizasyon ortamından süzülerek ayrılmıştır. Elde edilen mikroküreler kalıp molekülün uzaklaştırılması için %50-50 (v/v) metanol-su çözücü karışımında hazırlanmış 1,0 M KOH çözeltisi ile 24 saat 90°C'de muamele edilmiştir. Daha sonra mikroküreler etanol ve su ile yıkanmış ve 70°C'de 48 saat vakum altında kurutulmuştur.

3. BULGULAR

3.1. Hazırlanan Monomer ve Polimerlerin Karakterizasyonu

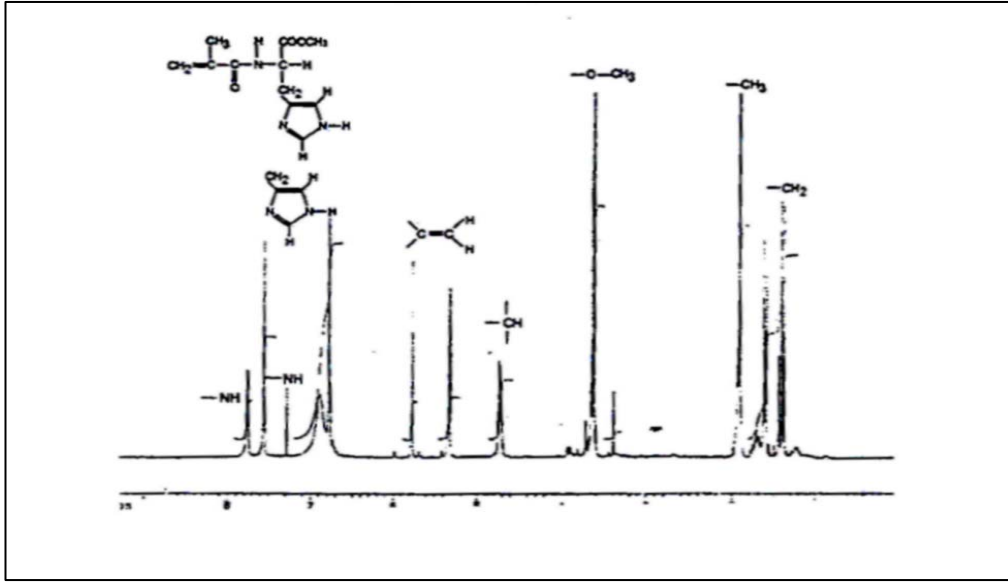
3.1.1.MAH ve MAH-Cu(II) monomerlerinin karakterizasyonu

Şekil 3.1’de açık yapısı verilen MAH monomerinin yapısının belirlenmesinde $^1\text{H-NMR}$ kullanılmıştır.



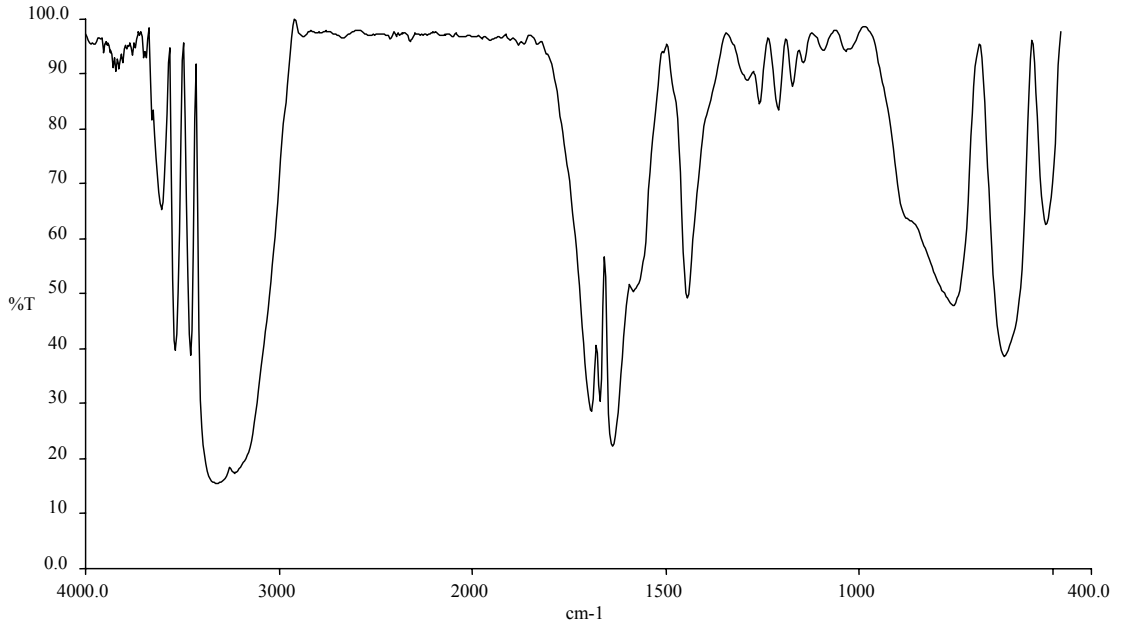
Şekil 3.1.Metakrilamidohistidin monomerinin molekül formülü

Yukarıda açık yapısı görülen MAH monomerinin Şekil 3.2’de verilen $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda MAH’da bulunan gruplara ait karakteristik pikler görülmektedir. Bu karakteristik pikler: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.99 (t; 3H, $J=7.08$ Hz, CH_3), 1.42 (m; 2H, CH_2), 3.56 (t; 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.82-4.87 (m; 1H, metin), 5.26 (s; 1H, vinil H), 5.58 (s; 1H, vinil), 6.86 (d; 1H, $J=7.4$ Hz, NH), 7.82 (d; 1H, $J=8.4$ Hz, NH), 6.86-7.52 (m; 5H, aromatik) olarak bulunmuştur.



Şekil 3.2. MAH monomerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

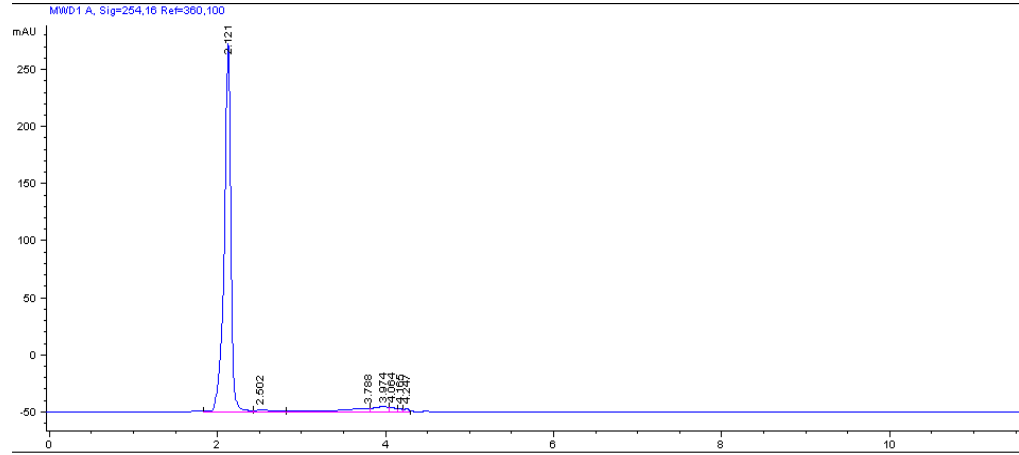
MAH monomeri FTIR ile de karakterize edilmiştir. Şekil 3.3'de FT-IR spektrumu incelendiğinde MAH yapısına ait karakteristik karbonil bandları 1653 ve 1629 cm^{-1} 'de, amid II gerilme titreşim bandı ise 1529 cm^{-1} 'de görülmektedir.



Şekil 3.3. MAH monomerinin FT-IR spektrumu

Hazırlanan MAH monomerinin enantiyo saflığı Chirobiotic T kolonunun kullanımıyla HPLC cihazıyla tayin edilmiştir. Hazırlanan monomerin çözeltisi

cihaza enjekte edilmiş ve Şekil 3.4'de görülen kromatogram elde edilmiştir. Kromatogramda 2.12 dak. da elde edilen tek pik bize elde edilen monomerin %99'luk bir enantiy osafılığına sahip olduğunu göstermektedir.



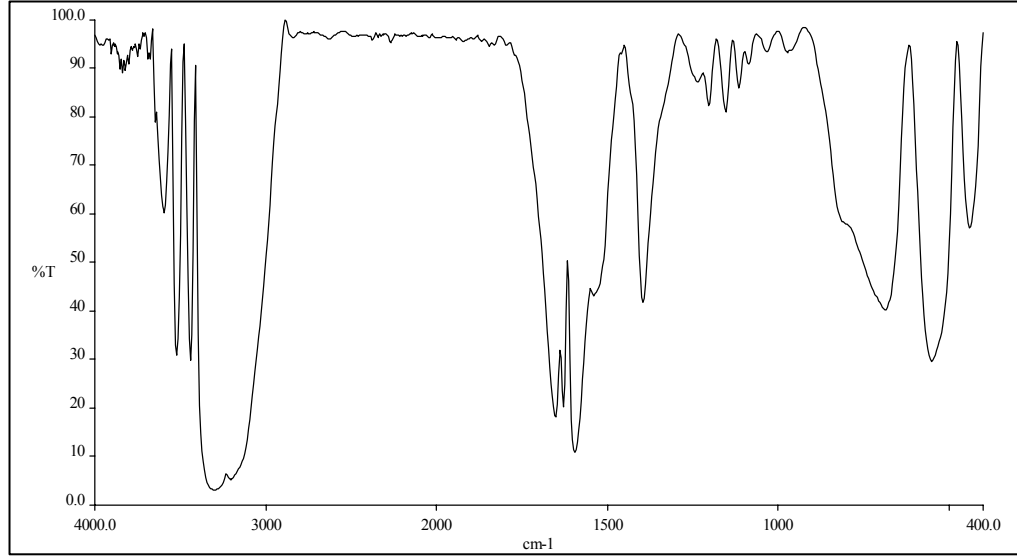
Şekil.3.4. MAH monomerinin kiral kolon kullanımıyla HPLC analizi. Akış Hızı: 0,5 mL/dak., %80-20 metanol-su elüenti, dalga boyu:254 nm.

MAH-Cu(II) metal-şelat monomerinin karakterizasyonu için kullanılan FT-IR analizlerinin karakteristik pikleri ise şöyledir: Bozunma: ≥ 350 °C; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3400$ ve 3250 (-CONH-); 3095 (vinil C-H gerilme); 1680 (C=O karbonil gerilme); 1550 ve 1420 (C=C karboksilat gerilme, sim. ve antisim.); 1520 (C=N, konjuge siklik sistem); 1250 (C-O gerilme); 500 (Cu-N gerilme, zayıf bant). $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{N}_3\text{Cu}$ için elementel analiz cihazına göre bulunan değerler: C, 37.04; H, 5.43; N, 12.86; Cu, 19.91 , analitik olarak hesaplanan değerler: C, 37.20; H, 5.31; N, 13.02; Cu,19.69.

3.1.2. MAH-Pt(II) monomerinin karakterizasyonu

MAH-Pt(II) monomeri FT-IR ile karakterize edilmiştir. Şekil 3.5'de FT-IR spektrumu incelendiğinde MAH yapısına ait karakteristik karbonil bandları 1653 ve 1629 cm^{-1} 'de, amid II gerilme titreşim bandı ise 1529 cm^{-1} 'de görülmektedir. Ayrıca Pt-N titreşimine ait bandlar 552 ve 441 cm^{-1} 'de görülmektedir ki bu Pt(II)

iyonlarının MAH yapısına koordine olduğunu göstermektedir. Bu spektrum hedef metal-şelat monomer yapısının sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 3.5. MAH-Pt(II) monomerinin FT-IR spektrumu

3.1.3. L-Histidin baskılı polimerik kürelerin karakterizasyonu

Çapraz bağlı baskılı ve baskısız kürelerin spesifik yüzey alanları sırasıyla 72.8 ve 235.2 m²/g olarak bulunmuştur. MAH, azot atomlarından dolayı iki adet koordinasyon bölgesine sahiptir ve L-histidin baskılı kürelerin üzerindeki Cu(II)-MAH ligand değişim monomer komplekslerinin boş koordinasyon bölgelerinde histidin molekülleriyle koordine olmuş bir üçlü kompleks oluşturabilir.

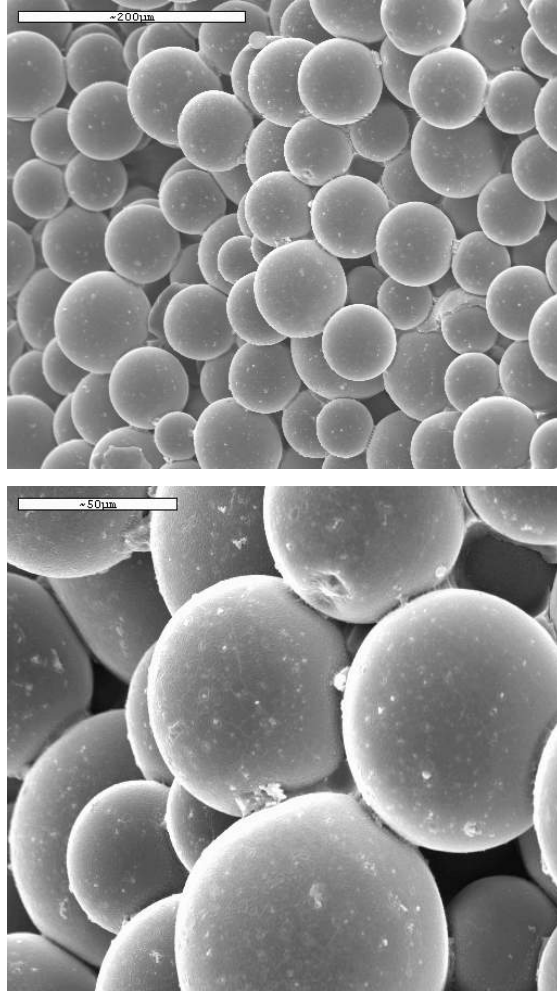
Çizelge 3.1’de baskılı ve baskısız L-histidin küreler için yüzey alanı ve gözenek boyutu değerleri verilmektedir. Baskılanmış HIBS partikülleri için BJH adsorpsiyon kümülatif gözenek hacimleri baskısız olanlara göre daha yüksektir. Dahası L-histidin baskılı kürelerin gözenek yarıçapları 28 Å olarak bulunmuştur ve bu sonuçlar; bu çalışmada nano gözenekli mikro kürelerin elde edildiğini göstermektedir.

Çizelge 3.1. Baskılanmış mikro kürelerin ve baskılama öncesi mikro kürelerin yüzey alanı ve gözenek boyutu analiz verileri

Parametreler	Baskılama öncesi	Baskılama sonrası
BET yüzey alanı (m ² /g)	72.8	235.2
BJH adsorbsiyon yüzey alanı (m ² /g)	104.8	269.5
Toplam gözenek hacmi (cm ³ /g)	0.1132	0.2536
BJH adsorbsiyon gözenek hacmi (cm ³ /g)	0.1132	0.2543
Ortalama gözenek yarıçapı (nm)	2.207	2.792
BJH adsorbsiyon gözenek yarıçapı (nm)	2.207	2.79

3.1.3.1. L-Histidin baskılı mikrokürelerin yüzey morfolojisi

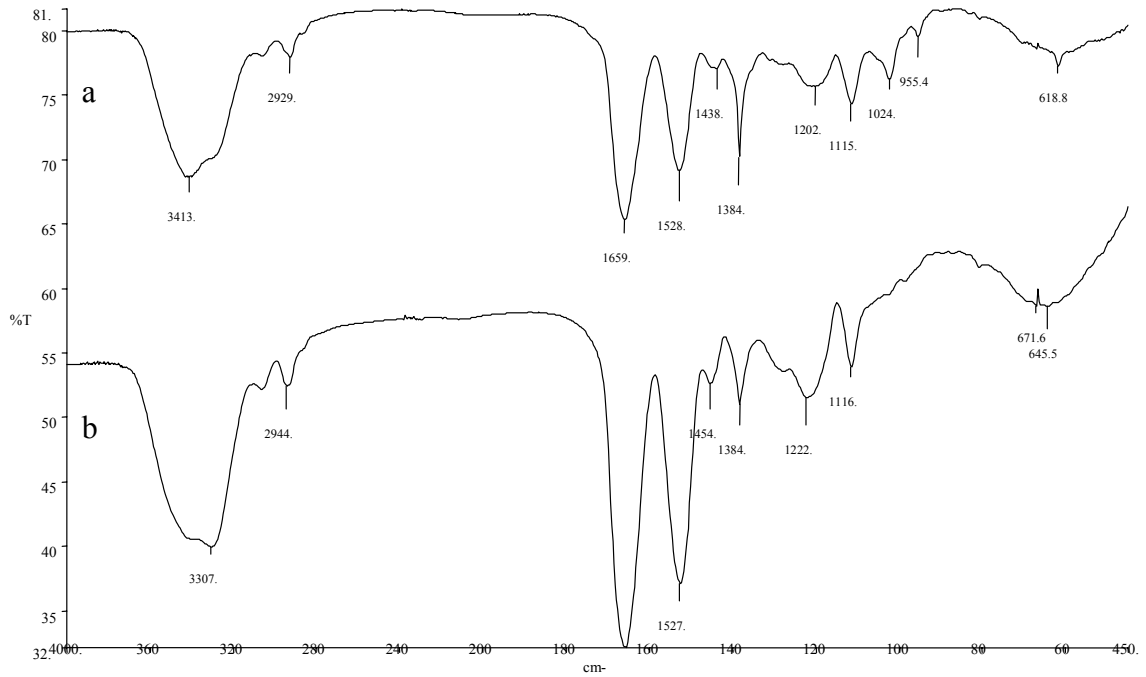
HIBS mikrokürelerin yüzey morfolojisi ve kesit yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.6'da görüldüğü gibi süspansiyon polimerizasyonu sonucunda elde edilen polimerik yapılar küresel bir forma ve gözenekli yüzeylere sahiptirler. Mikroküre yüzeyinin gözenekli bir yapıya sahip olması yüzey alanını artıran bir faktördür. Bu durum polimerik mikrokürelerin pratik uygulamaları için özellikle kromatografik dolgu malzemesi olarak kullanımında bir avantaj oluşturmaktadır. Yapıdaki nanogözenekler polimerik yapının aynı zamanda yüksek iç yüzey alanına sahip olmasına neden olurlar. Sonuçta kütle aktarımını zorlaştıran yüzey ve difüzyon dirençleri azalmakta ve kütle aktarımı nispeten kolaylaşmaktadır.



Şekil 3.6. Kromatografik dolgu malzemesi olarak kullanılan HIBSlerin SEM görüntüleri

3.1.4. 8-OHdG baskılı polimerin karakterizasyonu

Elde edilen polimerin baskılama öncesi ve sonrası karakterizasyonları IR ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7).



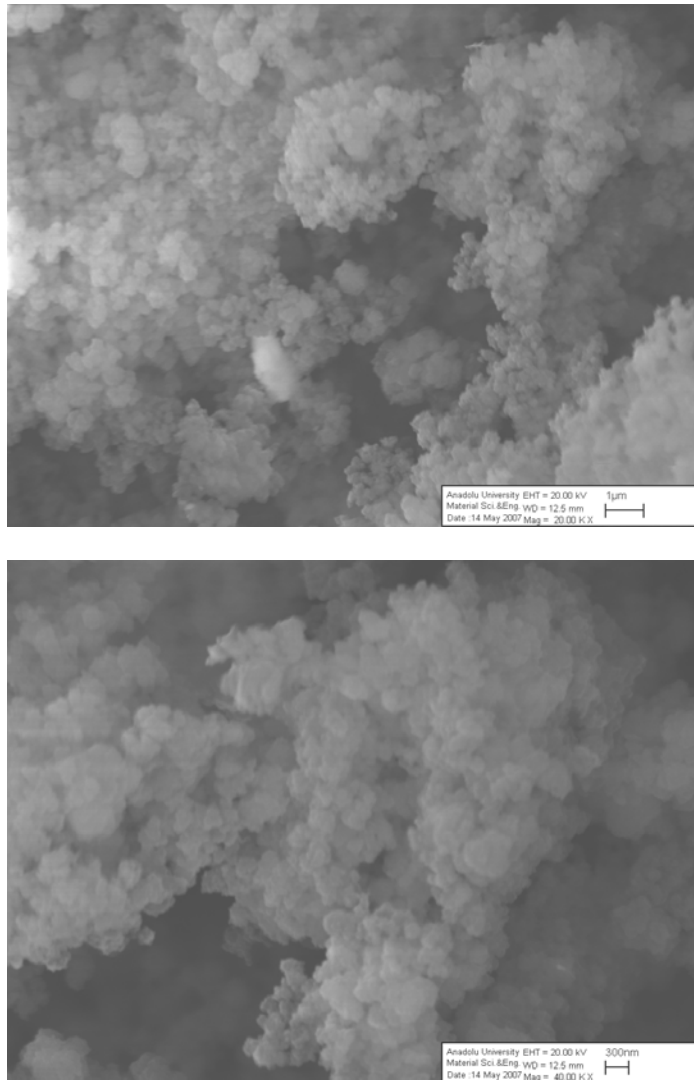
Şekil 3.7. MAH-Pt-8-OHdG polimerinin kalıp uzaklaştırılmasından önceki (a) ve sonraki (b) IR spektrumu

Şekil 3.7'deki FT-IR spektrumu incelendiğinde MAH yapısına ait karakteristik karbonil bandı 1659 cm^{-1} 'de, amid II gerilme titreşim bandı ise 1528 cm^{-1} 'de görülmektedir. MAH-Pt-8-OHdG polimerinin sentezlenmesinin ardından kalıp molekül olan 8-OHdG'nin yapıdan uzaklaştırılmasıyla 8-OHdG'ye ait olan 1024 cm^{-1} ($\text{CH}_2\text{-O}$ gerilme bandı) ve 955 cm^{-1} 'de (epoksitler için asimetrik halka eğilmesi) görülen piklerin kaybolduğu gözlenmiştir.

Ayrıca elde edilen polimerlerin baskılama öncesi ve baskılama sonrasında BET ile yüzey analizleri yapılmış ve yüzey alanları sırasıyla 110 ve $140 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi kalıp molekül olan 8-OHdG'nin yapıdan uzaklaşmasıyla yüzey alanında bir artış gerçekleşmiştir.

3.1.4.1. 8-OHdG baskılı polimerin yüzey morfolojisi

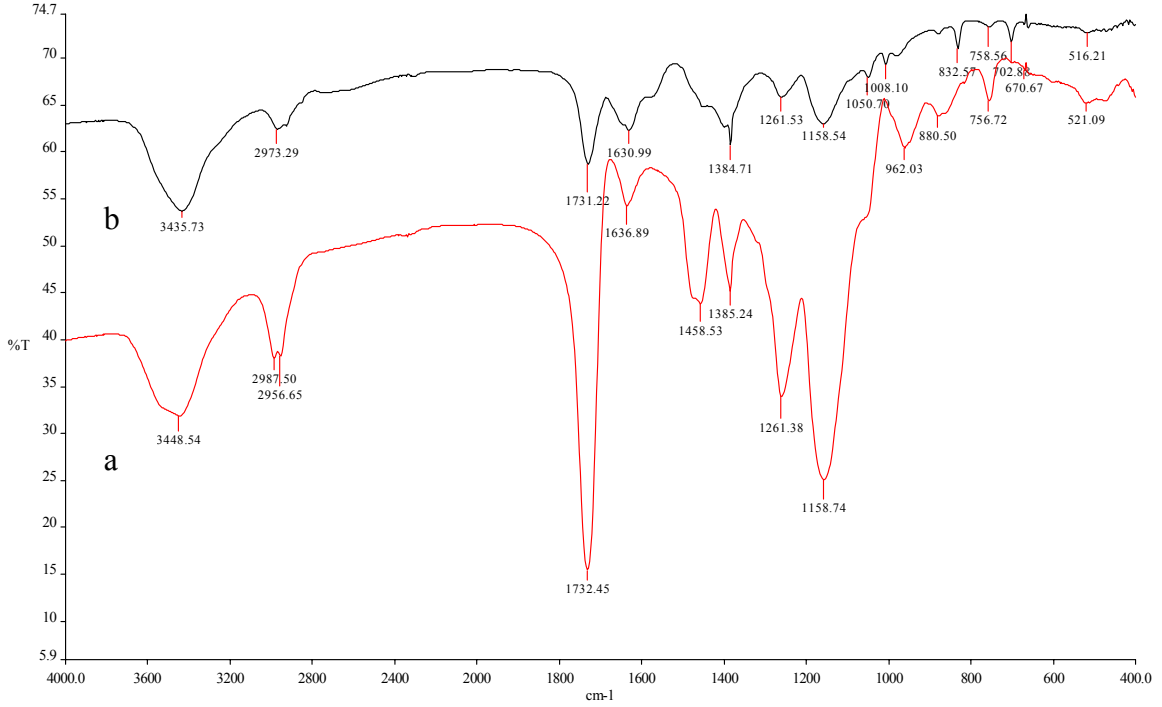
8-OHdG baskılanmış polimerlerin yüzey morfolojisi ve kesit yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Yapılan inceleme sonucu yığın polimerizasyonu sonucunda elde edilen polimerik yapıların nano boyutta partiküller olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla Şekil 3.8’de görülen polimerlerin katı-faz ekstarksiyonu için oldukça geniş bir yüzey alanına sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 3.8. Katı-faz ekstraksiyon sorbenti olarak kullanılan 8-OHdG baskılı polimerlerin SEM görüntüleri

3.1.5. Kolesterol baskılı polimerin karakterizasyonu

Elde edilen polimerin baskılama öncesi ve sonrası karakterizasyonları IR ile gerçekleştirilmiştir



Şekil 3.9. MAH-Cu-kolesterol polimerinin kalıp uzaklaştırılmasından önceki (a) ve sonraki (b) IR spektrumu

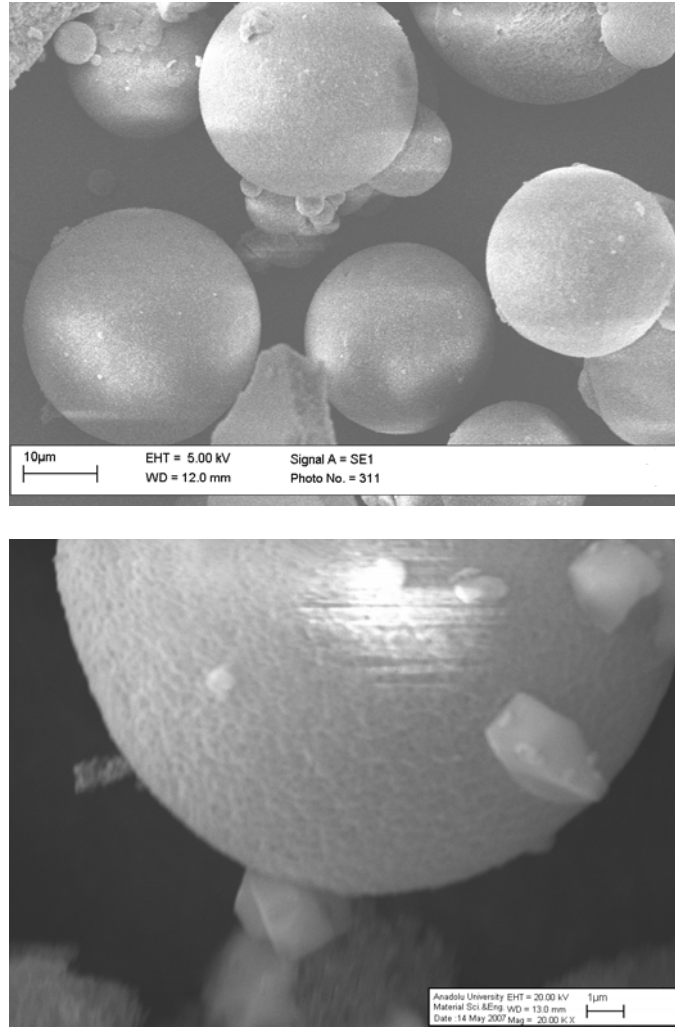
Şekil 3.9'daki FT-IR spektrumu incelendiğinde MAH yapısına ait karakteristik karbonil bandı 1639 cm^{-1} 'de, NH gerilmesi 3400 cm^{-1} civarlarında görülmektedir. MAH-Cu(II) yapısına ait Cu-N zayıf gerilme bandı ise 520 cm^{-1} 'de görülmektedir. MAH-Cu-kolesterol polimerinin sentezlenmesinin ardından kalıp molekül olan kolesterolün yapıdan uzaklaştırılmasıyla kolesterole ait olan 1458 (CH_3 eğilme bandı) ve 880 cm^{-1} 'de ($\text{C}=\text{C}$ metilen grubu) görülen piklerin kaybolduğu gözlenmiştir. Ayrıca 2960 cm^{-1} deki C-H gerilme bantlarının şiddetinde de oldukça büyük bir azalma görülmektedir.

Elde edilen polimerlerin baskılama öncesi ve baskılama sonrasında BET ile yüzey analizleri yapılmış ve yüzey alanları sırasıyla 68 ve $150\text{ m}^2/\text{g}$ olarak

bulunmuştur. Görüldüğü gibi büyük bir kalıp molekül olan kolesterol'ün yapıdan uzaklaşmasıyla yüzey alanında önemli bir artış gerçekleşmiştir.

3.1.5.1. Kolesterol baskılı mikrokürelerin yüzey morfolojisi

Kolesterol baskılı mikrokürelerin yüzey morfolojisi ve kesit yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.10'da görüldüğü gibi süspansiyon polimerizasyonu sonucunda elde edilen polimerik yapılar küresel bir forma ve oldukça gözenekli yüzeylere sahiptirler.



Şekil 3.10. Kromatografik dolgu malzemesi olarak kullanılan kolesterol baskılı polimerlerin SEM görüntüleri

3.2. Proteinlerin Ayrılması

3.2.1. Protein adsorpsiyonuna tampon türü ve pH'ın etkisi

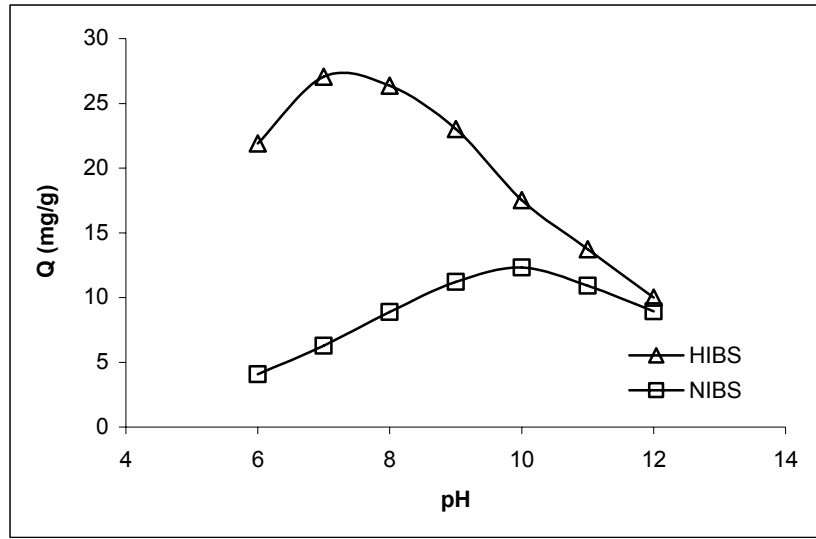
HIBS üzerine protein adsorpsiyonu için farklı pH larda ve farklı tampon türleri (HEPES, Tris, MES ve fosfat) kullanılarak kesikli sistemde 50µM lık cyt-c çözeltileri hazırlanmış ve 2 saat boyunca HIBS adsorbenti ile işleme tabi tutulmuştur. Yapılan tüm adsorpsiyon işlemlerinde adsorplanan madde miktarları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Q = [(C_0 - C) V] / m \quad (3.1)$$

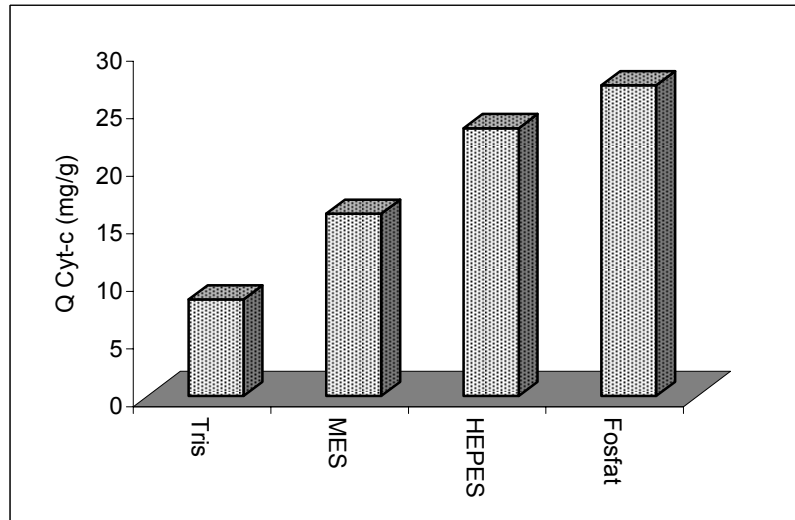
Burada, Q mikrokürelerin birim miktarı başına adsorplanan madde miktarıdır (mg/g); C_0 ve C, cyt-c çözeltilerinin sırasıyla, başlangıç ve adsorpsiyon sonucu süzüntüde kalan derişimleridir (mg/L); V sulu faz hacmi(mL) ve m de kullanılan MIP ağırlığıdır (g).

Sulu çözeltilerden cyt-c adsorpsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Deneyle en az üç kez tekrar edilmiştir. Her bir veri seti için ortalama değerler ve standart sapmayı hesaplamak üzere standart istatistiksel yöntemler uygulanmıştır. Güven aralığı % 95'de tutulmuştur.

Sonuç olarak Şekil 3.11 ve 3.12'de görüldüğü gibi en yüksek adsorpsiyon kapasitesinin, pH 7'de ve fosfat tamponuyla sağlandığı bulunmuştur.



Şekil 3.11. Cyt-c adsorpsiyonuna pH'ın etkisi



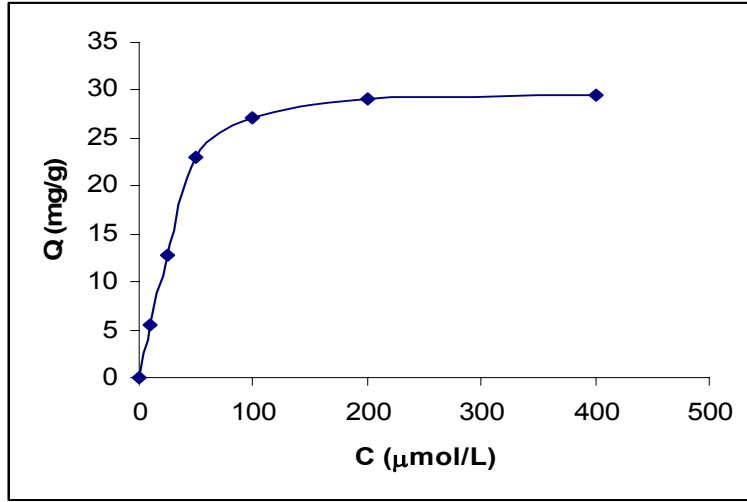
Şekil 3.12. HIBS üzerine cyt-c adsorpsiyonuna tampon türünün etkisi

3.2.2. Cyt-c adsorpsiyonuna başlangıç derişimlerinin etkisi

Cyt-c başlangıç derişimlerinin adsorpsiyon kapasitesine etkisini gözlemek amacıyla 25 mM fosfat tamponu kullanarak 10 ila 500 μ M arasında çeşitli derişimlerde cyt-c çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerden 10'ar mL alınarak 20 mg adsorbent üzerine ilave edilmiştir. 2 saatlik karıştırma sonucu süzüntülerdeki

madde miktarları; cyt-c için UV-Vis cihazı kullanılarak 410 nm'de tayin edilmiştir.

Başlangıç cyt-c derişiminin, cyt-c adsorpsiyonuna etkisi Şekil 3.12'de görülmektedir. Şekil 3.12'den de anlaşıldığı gibi birim HIBS başına düşen cyt-c adsorpsiyon miktarı, düşük derişimlerde, cyt-c derişimi arttıkça doğrusal olarak hızla artmaktadır ve oldukça çabuk doygunluğa ulaşmaktadır. HIBS partiküllerinin cyt-c için maksimum adsorpsiyon kapasitesi 27.06 mg/g olarak bulunmuştur. Bu değere 120 μ M cyt-c başlangıç derişimi kullanılarak ulaşılmıştır. Elde edilen adsorpsiyon izotermindeki bu dik eğim cyt-c ile Cu^{2+} -şelat grupları arasındaki yüksek afinitenin bir göstergesidir. At kalbinden elde edilen cyt-c, 29 pozisyonunda bir adet yüzey histidine sahiptir ve bu tek yüzey histidinin adsorbent yüzeyine protein adsorpsiyonu için yeterli olduğu rapor edilmiştir (O'Brien ve ark. 1996).



Şekil 3.13. Cyt-c başlangıç derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi.

3.2.3. Histidin baskılı mikrokürelerin cyt-c adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon izotermi

Adsorpsiyon izotermi, her bir molekülün adsorbanlarla etkileşimlerinin karakterizasyonu için kullanılır. Adsorpsiyon izotermi, iki faz dengede iken katı faza adsorbe olan iyon miktarı ve çözeltideki moleküllerin derişimi arasında ilişki kurulmasını sağlar. Langmuir adsorpsiyon modeli, her biri yalnız bir molekülü tutmaya elverişli belirli sayıdaki tanımlanmış bölümlere moleküllerin adsorbe olduğunu varsayar. Bu bölümlerin enerji olarak eşdeğer olduğu ve yakın bölümlerdeki adsorbe olmuş moleküllerle arasında hiçbir etkileşim olmayacak kadar birbirinden uzak olduğu varsayılır. Langmuir denklemi aşağıdaki gibi gösterilebilir.

$$Q = Q_{\max} b C_{\text{eq}} / (1 + b C_{\text{eq}}) \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte;

Q = Adsorbana adsorplanmış cyt-c derişimi (mg/g)

C_{eq} = Çözeltideki cyt-c denge derişimi (mg/L)

b = Langmuir sabiti (L/mg)

Q_{\max} = Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mmol/g) dir.

Bu denklem aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir.

$$1/Q = [1/(Q_{\max} b)] [1/C_{\text{eq}}] + [1/Q_{\max}] \quad (3.3)$$

$1/Q$ 'ya karşı $1/C_{\text{eq}}$ grafiğe geçirildiğinde; kesim $1/Q_{\max}$, eğim ise $1/(Q_{\max} b)$ 'yi verir. Şekil 3.14'de cyt-c adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.

Sisteme uygulanan diğer bir adsorpsiyon modeli ise Freundlich izotermidir. Freundlich denklemi ideal olarak temiz ve homojen olmayan katı yüzeylerdeki adsorpsiyonlar için Alman fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich tarafından deneysel çalışmalara bağlı olarak türetilmiştir (Sarıkaya 1993).

$$\ln Q = \ln K_f + n \cdot \ln C_{eq} \quad (3.4)$$

Bu eşitlikte;

Q= Adsorbana adsorplanmış cyt-c derişimi (mg/g)

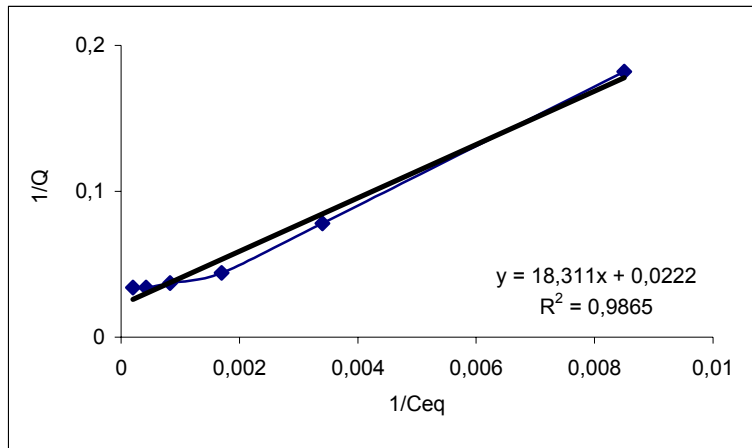
C_{eq} = Çözeltideki cyt-c denge derişimi (mg/L)

n= Freundlich sabiti

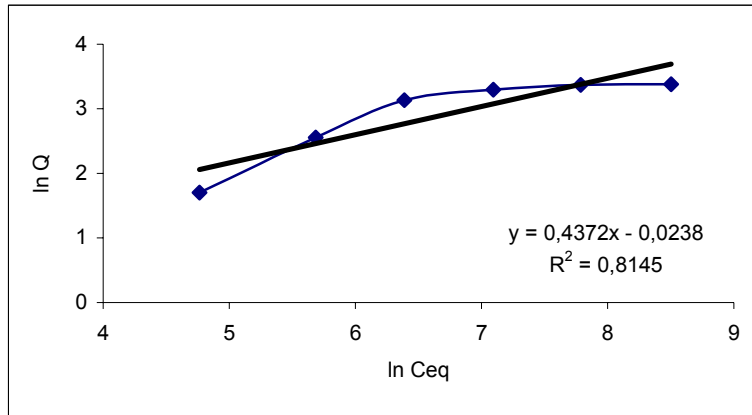
K_f =Freundlich sabiti

$\ln Q$ 'ya karşı $\ln C_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde yine kesimden K_f ve eğimden de n sabitleri bulunabilir. Şekil 3.15'de cyt-c adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.

Cyt-c adsorpsiyon verileri sırasıyla Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermine uygulandığında cyt-c adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Çünkü elde edilen grafiklerin regreasyon sabitlerine (R^2) bakıldığında Langmuir için hesaplanan değer (0,9865), Freundlich için hesaplanan değerden (0,8145) daha yüksek çıkmıştır. Dolayısıyla sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği söylenebilir. Bu izotermiler ile ilgili elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.14. HIBS partiküllerin cyt-c adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izotermi



Şekil 3.15. HIBS partiküllerin cyt-c adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon izotermi

3.2.4. Histidin baskılı mikrokürelerin cyt-c bağlama etkinliğinin ölçülmesi

Baskılı polimer ve kalıp arasındaki bağlanma etkileşimleri ve eşitlikleri Scatchard analizi yöntemi ile elde edilmiş ve bu yöntem MIP çalışmalarında daha önceleri de kullanılmıştır. Bu analizde aşağıdaki eşitlik kullanılmaktadır.

$$\frac{Q}{[C]} = \frac{Q_{maks}}{K_D} - \frac{Q}{K_D} \quad (3.5)$$

Bu eşitlikte;

Q : Polimere bağlanan cyt-c miktarını

C : Serbest cyt-c derişimini

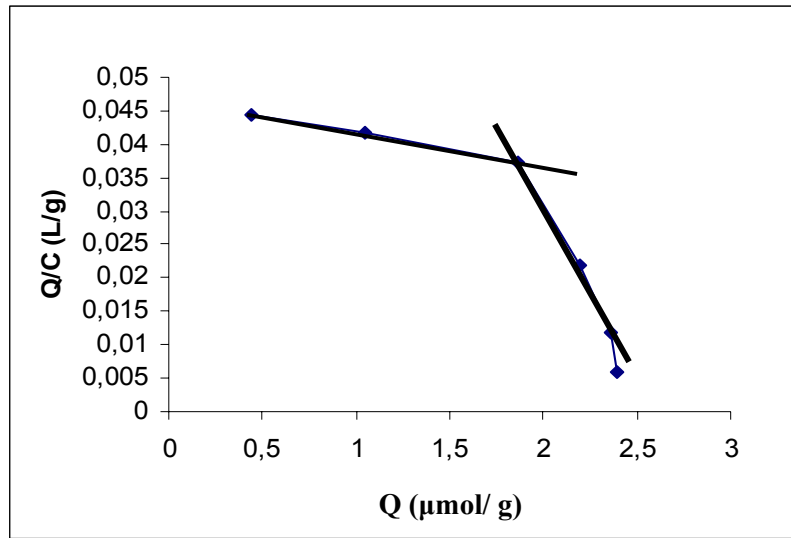
Q_{max} : Bağlanma bölgelerinin maksimum sayısını

K_D : Ligand-değişim temelli metal-şelat kopolimerinin ayrışma sabitini

ifade etmektedir.

HIBS partiküllerinin, cyt-c'yi bağlama etkinliğinin belirlenmesi için çizilen Scatchard grafiği (Şekil 3.16) iki ayrı doğru içermektedir. Bu durum HIBS mikrokürlerinin, cyt-c için iki ayrı bağlanma bölgesine sahip olduğunu düşündürmüştür. Birinci bağlanma bölgesi için Ka (1/Kd), 5200 M⁻¹ ve maksimum ligand-değişim etkileşme sayısı olan Q_{max}, 29,0385 µmol/g olarak

bulunmuştur. İkinci bağlanma bölgesi için ise K_a , 55500 M^{-1} ve Q_{max} , $2,5495 \mu\text{mol/g}$ 'dir. Bayramoğlu (2007) ve ark. yaptıkları bir çalışmada glutamik asit immobilize manyetik poli(metilmatakrilat-ko-glisidilmetakrilat) kürelerine cyt-c adsorpsiyonunu incelemişler ve bağlanma denge sabitini 184500 M^{-1} olarak bulmuşlardır. Zeng ve Ruckenstein (1998) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise protein ayırımı için çapraz bağlı makrogözenekli kitosan anyon-değişim membranları kullanılmış ve cyt-c ile bağlanma için K_a değerini yaklaşık 12300 M^{-1} olarak bulmuşlardır. Bu değerlerle karşılaştırıldığında çalışmamızda elde edilen K_a değerlerinin, bağlanma bölgelerinin cyt-c için oldukça yüksek bir afiniteye sahip olduğunu, gösterdiği söylenebilir. Şekil 3.16'daki grafikte birinci ve ikinci doğru için R^2 değerleri sırasıyla 0,9964 ve 0,9699'dur.



Şekil 3.16. Cyt-c bağlanmasına ilişkin Scatchard grafiği

3.2.5. Histidin baskılı mikrokürelerin yeniden kullanılabilirliği

HIBS partiküllerinin kromatografik dolgu malzemesi olarak kullanımından önce yapılan son çalışma, adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünün incelenmesi ve kürelerin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi olmuştur.

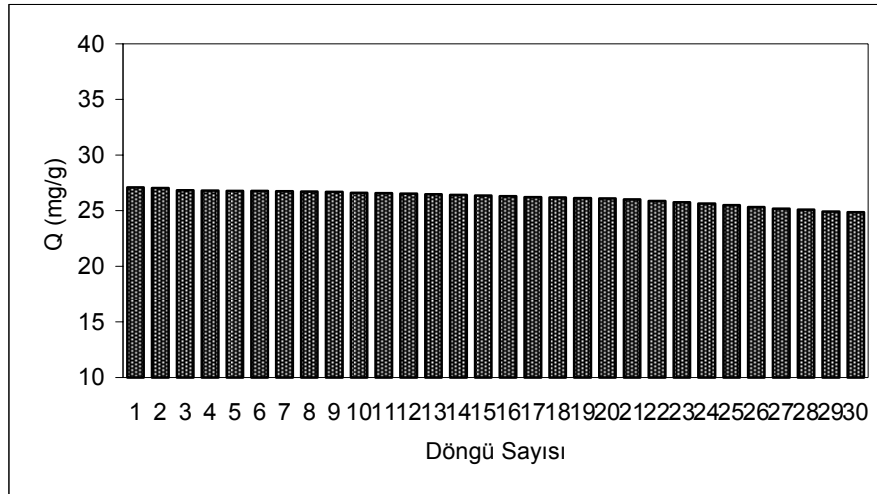
Cyt-c desorpsiyon deneyleri 0,1 M imidazol içeren tampon çözelti ile gerçekleştirilmiştir. Cyt-c adsorplamış küreler desorpsiyon ortamına yerleştirilmiş ve 1 saat 100 rpm hızla oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Desorpsiyon ortamından

elde edilen çözeltideki cyt-c derişmi spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Desorpsiyon oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Desorpsiyon Oranı (\%)} = \frac{\text{Desorbe olan cyt-c miktarı}}{\text{Kürelerin yüzeyinde adsorplanan miktar}} \times 100 \quad (3.6)$$

Bu adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri defalarca yapılmış ve adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir düşüş gözlenmemiştir. Her desorpsiyon işleminden sonra küreler, 30 dakika 50 mM NaOH ile ve 30 dakika fosfat tamponu ile yıkanmıştır.

Bu çalışmalar sonucunda, 30 defa kullanılan mikrokürelerde %8 civarında bir kapasite kaybı gözlenmiştir (Şekil 3.17). Bu sonuç eldeki malzemenin oldukça kararlı bir katı destek olduğunu göstermektedir.

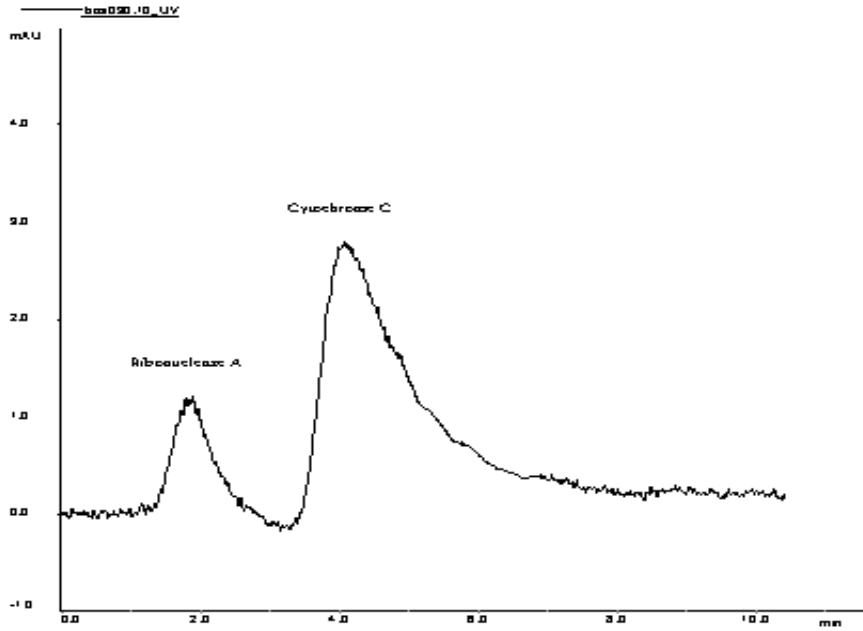


Şekil 3.17. L-Histidin baskılı mikrokürelerin yeniden kullanılabilirliği

3.2.6. HIBS dolgulu kolonla gerçekleştirilen protein ayırımı

Elde edilmiş olan L-Histidin baskılı polimerik mikrokürelerin kromatografik ayırımlarda kullanılabilirliği FPLC sistemi ile denenmiştir. Bu sistem beraberinde bir adet UV dedektör, bir adet INV 907 pompa ve bir adet Frac

920 fraksiyon toplayıcıyı içermektedir. FPLC sistemi ile birlikte gelen 50mm/5 mm ebatlarındaki boş cam kolon, 100-125 µm boyutlarındaki yaklaşık 0,600 g MAH-Cu-L-Histidin mikrokürelerinin tamponda hazırlanan solüsyonu ile doldurulmuştur. Mobil faz olarak 0,05 M NaH₂PO₄ (pH=5.0) seçilmiştir. Yapılan çeşitli denemeler sonucunda ayırımların en iyi oda sıcaklığında, 0,3 ml/dak. akış hızında ve 254 nm de gerçekleştiği gözlenmiştir. Uygun analiz koşullarının belirlenmesinin ardından, kolona önce 50 ppm cyt-c çözeltisi daha sonra 50 ppm ribonükleaz A çözeltisi enjekte edilmiştir. Bu iki proteinin karışımını (cyt-c, ribonükleaz A) içeren çözelti cihaza enjekte edildiğinde ise Şekil 3.18’de görülen kromatogram elde edilmiştir.



Şekil 3.18. Ribonükleaz A ve cyt c moleküllerinin, MAH-Cu-L-Histidin baskılanmış polimer dolgulu bir kolonda FPLC ayırımı. Tüm pikler 254 nm de 0,1 M İmidazol içeren 0,05 M NaH₂PO₄ elüenti ile tespit edilmiştir. Kolon boyut uzunluğu: 50 mm, çapı: 5 mm boş cam TRICORN kolon; doldurulan madde miktarı: 0.600 g.

Şekil 3.18’de ki kromatogramda alıkonma zamanları ribonükleaz A için 1.85, cyt-c için 4,11 dak. olarak görülmektedir. Bu alıkonma zamanlarından yararlanılarak, kromatogramlara ait ayırıcılık sabitleri (R_s), kapasite faktörleri (k'),

seçicilik faktörleri (α) ve teorik plaka sayıları (N) aşağıda verilen denklemler kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılan deneylerde kolonda tutulmayan tür olarak aseton kullanılmıştır.

$$R_s = 2(t_2 - t_1)/(\omega_2 + \omega_1) \quad (3.7)$$

$$k' = (t_R - t_0)/t_0 \quad (3.8)$$

$$\alpha = k'_2/k'_1 \quad (3.9)$$

$$N = 5.54(t_R/w_{0.5})^2 \quad (3.10)$$

Bu eşitliklerde t_2 , cyt-c için alıkonma zamanı, t_1 , ribonükleaz A için alıkonma zamanı, t_0 kolonda tutulmayan tür için geçen ölü zaman, ω_2 , ikinci pikin taban genişliği, ω_1 ise ilk pikin taban genişliğidir. Tabaka sayısını hesaplarken kullanılan $w_{0.5}$ değeri ise pik maksimum yüksekliğinin yarı yüksekliğindeki pik genişliğine karşılık gelmektedir. (Skoog ve ark. 1996).

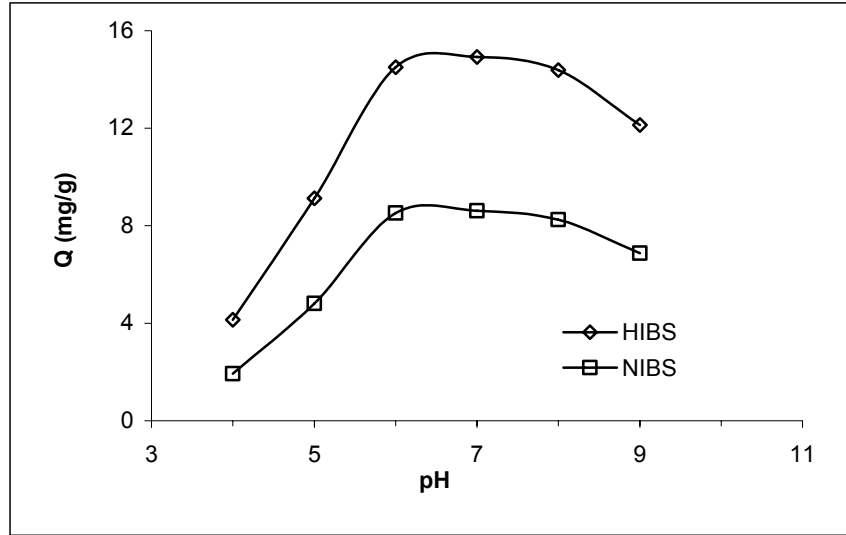
Bu eşitliklerden yola çıkılarak protein ayırımı için bulunan R_s , k' , α ve N değerleri Çizelge 3.3'de verilmiştir. Bu çizelgede görüldüğü gibi protein ayırımı için bulunan R_s ve α değerlerinin (1,39 ve 4,47) birden büyük olması, hazırlanan kolonun iyi bir seçicilik faktörüne ve iyi bir ayırıcılığa sahip olduğunu göstermektedir.

3.3. Enantiyomerik Karışımların Ayrılması

3.3.1. L-Histidin adsorpsiyonuna pH'nin etkisi

L-histidin için adsorbent kapasiteleri kesikli sistemde incelenmiştir. Öncelikle adsorpsiyon kapasitesinin en fazla olduğu pH değerinin bulunması amacıyla farklı pH'larda L-Histidin çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 10'ar mL alınarak 20 mg adsorbent üzerine ilave edilmiş ve 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Çalışma sonucunda en uygun pH yaklaşık 7

olarak bulunmuştur. En yüksek bağlanma afinitesinin Şekil 3.19'da da görüldüğü gibi pH 6-7 arasında bulunması histidin deprotonasyonunun $pK_a=6,2$ 'de gerçekleşmesiyle açıklanabilir.



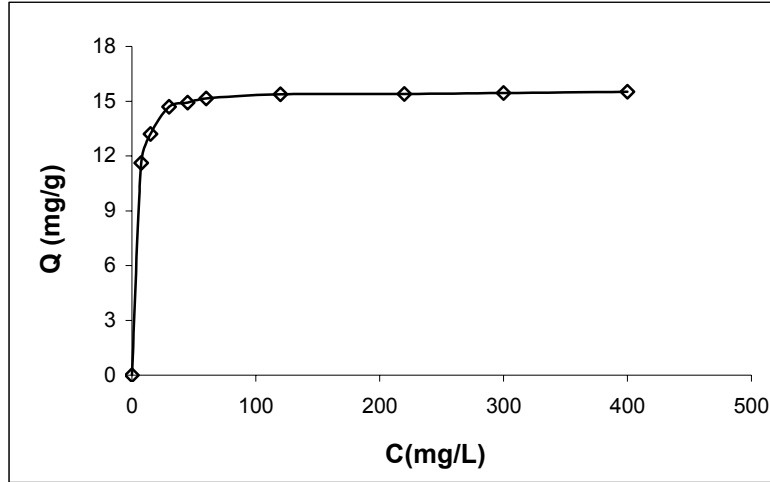
Şekil 3.19. L-Histidin Adsorpsiyonuna pH'nin Etkisi

3.3.2. L-Histidin adsorpsiyonuna başlangıç derişimlerinin etkisi

L-Histidin başlangıç derişimlerinin adsorpsiyon kapasitesine etkisini gözlemek amacıyla 25 mM fosfat tamponu kullanılarak 10 ila 500 ppm arasında çeşitli derişimlerde L-Histidin çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerden 10'ar mL alınarak 20 mg HIBS üzerine ilave edilmiştir. 2 saatlik karıştırma sonucu süzüntülerdeki madde miktarları HPLC cihazı kullanılarak ölçülmüştür. HPLC sistemi ile histidin tayininde 10mM sodyum oktan sülfonat içeren 25 mM sodyumfosfat-fosforik asit tamponu (pH 2,5) ve asetonitrilin %10-90 lık karışımı hazırlanmış ve 1 dk/mL akış hızında isokrotik elüsyon gerçekleştirilmiştir. 220 nm'de UV absorbans dedektörü ile histidin pikleri görüntülenmiştir.

Sulu çözeltilerden L-histidin adsorpsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Deneyle en az üç kez tekrar edilmiştir. Her bir veri seti için ortalama değerler ve standart sapmayı hesaplamak üzere standart istatistiksel yöntemler uygulanmıştır. Güven aralığı % 95'de tutulmuştur.

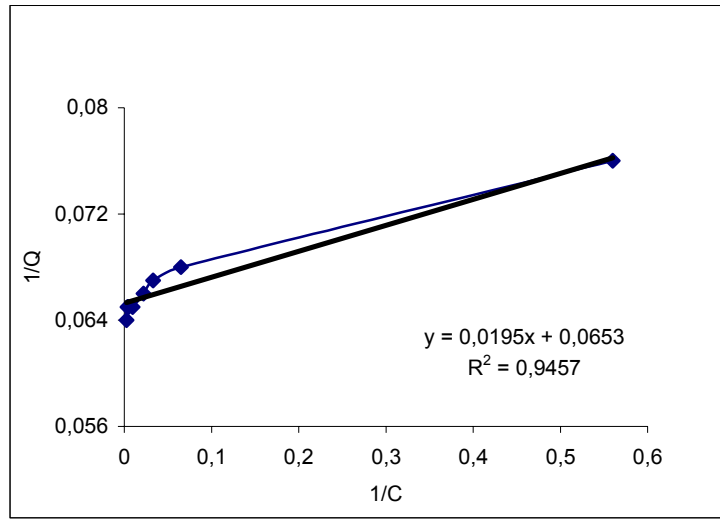
Şekil 3.20’de görüldüğü gibi L-histidin başlangıç derişimi arttıkça birim kütle başına adsorplanan madde miktarıda artmıştır ve her gram HIBS için maksimum adsorpsiyon kapasitesi 15,38 mg/g olarak bulunmuştur. Bu değere 45 ppm L-histidin başlangıç derişimi kullanılarak ulaşılmıştır.



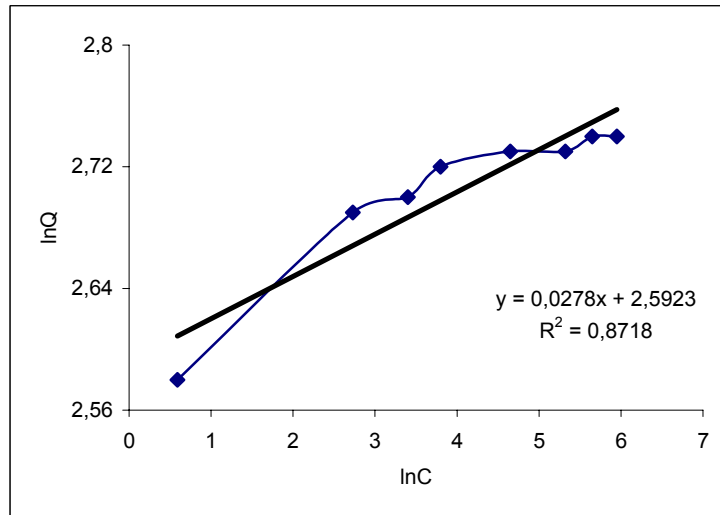
Şekil 3.20. L- Histidin başlangıç derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi pH: 7.0 (Fosfat tamponu); Süre: 2 saat ; T: 25°C.

3.3.3. Histidin baskılı mikrokürelerin L-histidin adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon izotermleri

Histidinin adsorpsiyonu için elde edilen veriler sırasıyla Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermlerine uygulanmıştır. Şekil 3.21 ve Şekil 3.22’de görüldüğü gibi L-Histidin adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Çünkü elde edilen grafiklerin regreasyon sabitlerine (R^2) bakıldığında Langmuir için hesaplanan değer (0,9457), Freundlich için hesaplanan değerden (0,8718) daha yüksek çıkmıştır. Dolayısıyla sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği söylenebilir.



Şekil 3.21. HIBS partiküllerin L-histidin adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izotermi



Şekil 3.22. HIBS partiküllerin L-histidin adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon izotermi

HIBS partiküllerinin L-histidin ve cyt-c adsorpsiyonlarına ilişkin elde edilen deneysel ve kuramsal veriler Çizelge 3.2’de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi özellikle histidin adsorpsiyonu için deneysel olarak bulunan maksimum adsorpsiyon kapasitesi ve Langmuir adsorpsiyon modelinden elde edilen değer arasında oldukça iyi bir uyum bulunmaktadır.

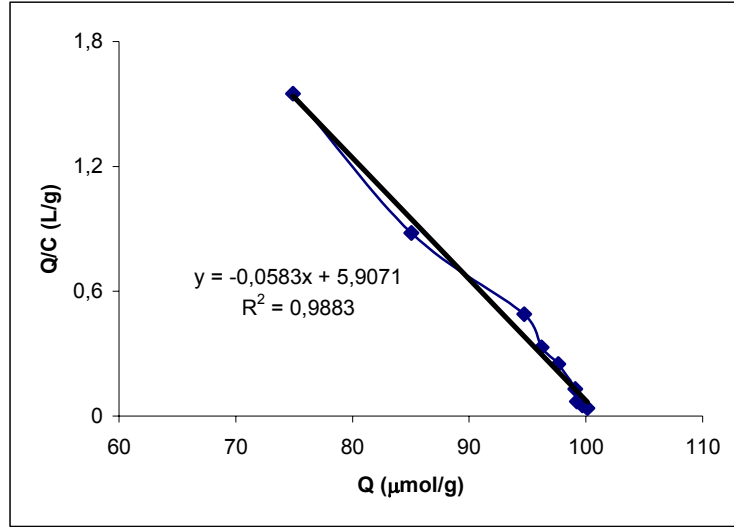
Çizelge 3.2. L-Histidin baskılı mikroküreler için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması

DeneySEL		Langmuir			Freundlich		
Baskılanmış Küreler	Q (mg/g)	Qm (mg/g)	b(L/mg)	R ²	Kd (L/g)	n	R ²
HIBS-Histidin	15,38	15,31	3,349	0,9457	13,361	0,0278	0,8718
HIBS-Cyt.c	27,06	45,05	1,21x10 ⁻³	0,987	0,976	0,4372	0,8145

3.3.4. Histidin baskılı mikrokürelerin L-histidin bağlama etkinliğinin ölçülmesi

Baskılı polimer ve L-Histidin arasındaki bağlanma etkileşimleri ve eşitlikleri yine Scatchard yöntemi ile elde edilmiştir. HIBS ve L-Histidin kullanılarak çizilen grafikte Ka değeri 58300 M⁻¹ ve R² değeri 0,9883 olarak hesaplanmıştır (Şekil3.23). Maksimum ligand-değişim etkileşme sayısı olan Qmax ise yine grafik üzerinde yapılan hesaplamalarla 101,82 µmol/g olarak bulunmuştur.

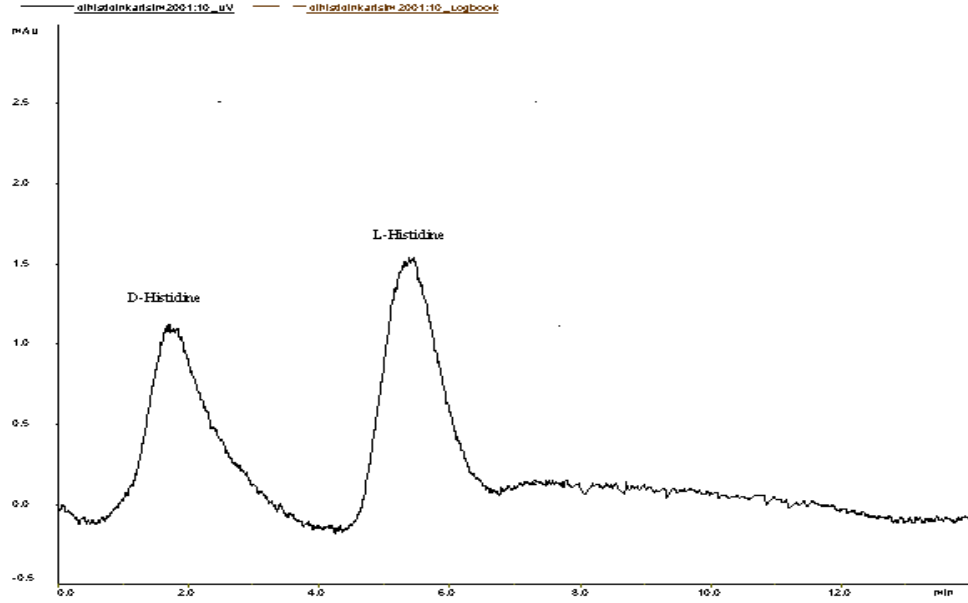
Zhang ve arkadaşlarının histidin sensörü olarak hazırladıkları molekül baskılı sol-gel filmin histidin bağlanma etkinliği ve Qmax ise sırasıyla 835 M⁻¹ ve 23,7 µmol/g olarak bulunmuştur (Zhang ve ark. 2005). Bu değerler çalışmamızda bulunan değerlerle kıyaslandığında oldukça düşük kalmaktadır.



Şekil 3.23. L-Histidin bağlanmasına ilişkin Scatchard grafiği

3.3.5. HIBS dolgulu kolonla gerçekleştirilen enantiyomerik ayırım

Elde edilmiş olan L-Histidin baskılı polimerik mikrokürelerin D ve L-Histidin içeren enantiyomerik bir karışımın kromatografik ayırımında kullanılabilirliği yine FPLC sistemi ile denenmiştir. Ayırımlar için yaklaşık 0,600 g MAH-Cu-L-Histidin polimeri ile dolgulu olan 50mm/5 mm ebatlarındaki cam kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak 0,05 M NaH_2PO_4 (pH=5.0) seçilmiştir. Enantiyomerik ayırımlar, protein ayırımlarında olduğu gibi oda sıcaklığında, 0,3 ml/dak. akış hızında ve 254 nm de gerçekleştirilmiştir. Kolona 50 ppm lik D-L Histidin karışımı enjekte edildiğinde Şekil 3.24'de görülen kromatogramlar elde edilmiştir.



Şekil 3.24. D-Histidin ve L-Histidin moleküllerinin, MAH-Cu-L-Histidin baskılanmış polimer dolgulı bir kolonda FPLC Ayırımı. Tüm pikler 254 nm de 0,1 M İmidazol içeren 0,05 M NaH₂PO₄ elüenti ile tespit edilmiştir. Kolon boyut uzunluğu: 50 mm, çapı: 5 mm boş cam TRICORN kolon; doldurulan madde miktarı: 0.600 g.

Elde edilen kromatogramda alıkonma zamanları D-Histidin için 1.76, L-Histidin için 5.43 olarak görülmektedir. Bu alıkonma zamanlarına göre piklerin ayırıcılık sabiti(R_s) 1,43, α ise 7,56 olarak hesaplanmıştır.

Hem D-L histidin enantiyomer karışımının ayrılmasında, hem de cyt-c-ribonukleaz A, protein karışımının ayrılmasında elde edilen R_s değerlerinin, 1'den büyük olması her iki ayırımında oldukça başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. Çizelge 3.3'de R_s değerlerinin yanı sıra yapılan kromatografik ayırımlarla ilgili diğer verilerde görülmektedir.

Çizelge 3.3. HIBS malzemesiyle elde edilen kromatografik ayırma verileri

	t_R	N	k'	α	R_s
D-Histidin	1.76	18.0	0.47		
L-Histidin	5.43	163.0	3.53	7.56	1.43
Ribonükleaz	1.85	53.0	0.54		
Cyt c	4.11	81.0	2.43	4.47	1.39

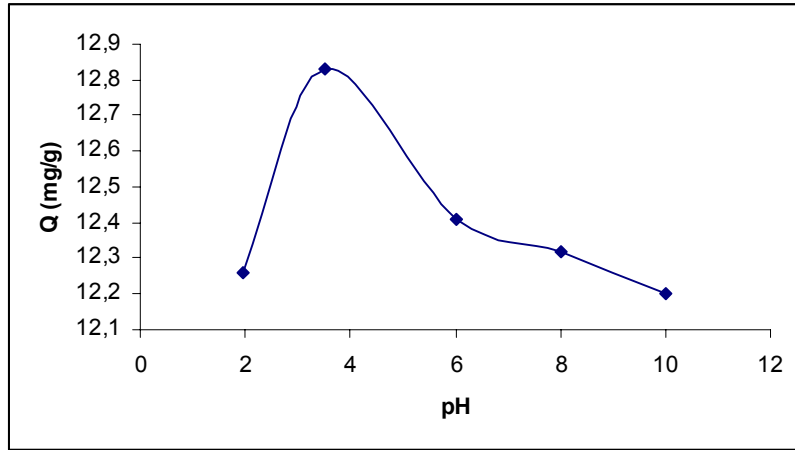


Şekil 3.25. Deneylede kullanılan HIBS dolgulu kolon ve FPLC sistemi

3.4. 8-OHdG Adsorpsiyon Kapasitesinin İncelenmesi, Katı-Faz Ekstraksiyonu Uygulaması ve CE ile Tayini

3.4.1. 8-OHdG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi

8-OHdG baskılı polimerin adsorpsiyon kapasitesinin en fazla olduğu pH değerinin bulunması amacıyla farklı pH'larda 8-OHdG çözeltileri hazırlanarak ve bu çözeltilerden 10'ar mL alınarak 10 mg adsorbent üzerine ilave edilmiş ve 5 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu işlem sonunda süzüntüdeki 8-OHdG miktarları UV-spektrofotometre cihazı kullanılarak bulunmuş ve Q değerleri Eşitlik 3.1'den hesaplanmıştır. Şekil 3.26'da görüldüğü gibi maksimum adsorpsiyon kapasitesine pH 3,5'da ulaşılmıştır.



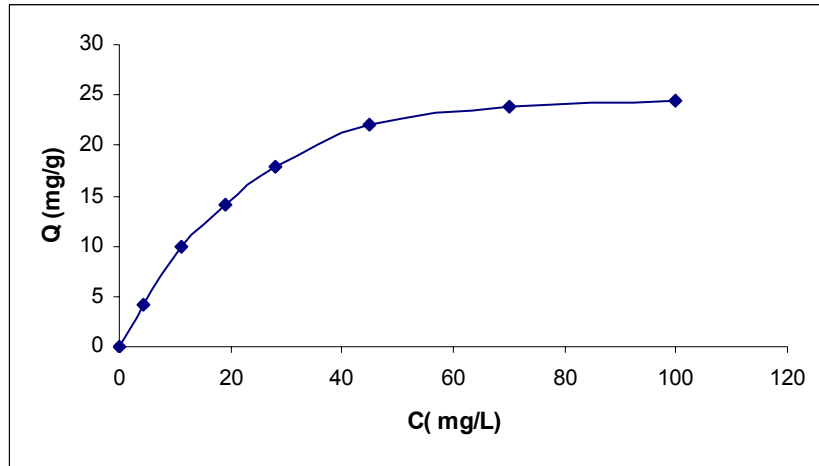
Şekil 3.26. 8-OHdG adsorpsiyonuna pH'ın etkisi

3.4.2. 8-OHdG adsorpsiyonuna başlangıç derişiminin etkisi

8-OHdG başlangıç derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisini gözlemek amacıyla 5 ila 100 ppm arasında çeşitli derişimlerde 8-OHdG çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerden 10'ar mL alınarak 10 mg adsorbent üzerine ilave edilmiştir. 5 saatlik karıştırma sonucu süzöntülerdeki madde miktarları UV cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Yapılan tüm adsorpsiyon işlemlerinde adsorplanan madde miktarları yine Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

Sulu çözeltilerden 8-OHdG adsorpsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Deneyle en az üç kez tekrar edilmiştir. Her bir veri seti için ortalama değerler ve standart sapmayı hesaplamak üzere standart istatistiksel yöntemler uygulanmıştır. Güven aralığı % 95 tutulmuştur.

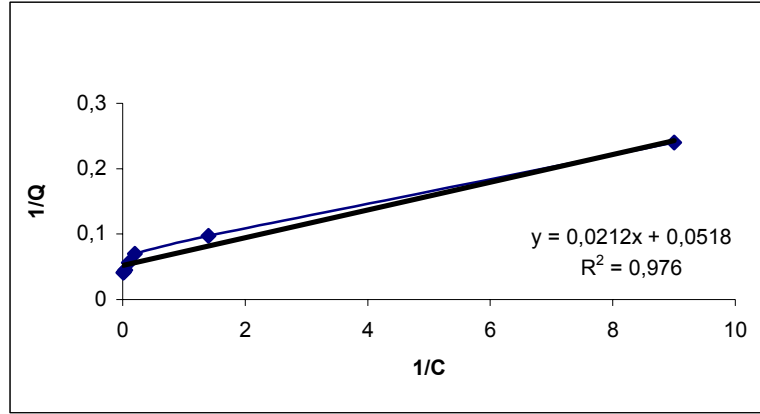
Şekil 3.27'de görüldüğü gibi 8-OHdG başlangıç derişimi arttıkça birim kütle başına adsorplanan madde miktarı da artmış ve her gram polimer için maksimum adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık 22 mg/g olarak bulunmuştur. Bu değere 45 ppm 8-OHdG başlangıç derişimi kullanılarak ulaşılmıştır.



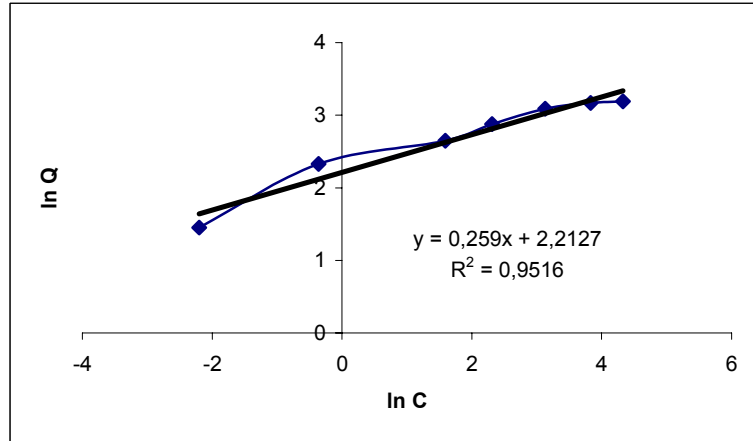
Şekil 3.27. 8-OHdG adsorpsiyonuna başlangıç derişimlerinin etkisi

3.4.3. 8-OHdG baskılı polimerin 8-OHdG adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon izotermleri

8-OHdG adsorpsiyon verileri sırasıyla Langmuir (Şekil 3.28) ve Freundlich (Şekil 3.29) adsorpsiyon izotermlerine uygulandığında 8-OHdG adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Çünkü elde edilen grafiklerin regreasyon sabitlerine (R^2) bakıldığında Langmuir için hesaplanan değer (0,976), Freundlich için hesaplanan değerden (0,952) daha yüksek çıkmıştır. Dolayısıyla sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği söylenebilir. Bu izotermler ile ilgili elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 3.4'de verilmiştir. Çizelge 3.4'de deneysel olarak elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi ile Langmuir modelinden elde edilen değer arasında iyi sayılabilecek bir uyum görülmektedir.



Şekil 3.28. 8-OHdG baskılı partiküllerin 8-OHdG adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izotermi



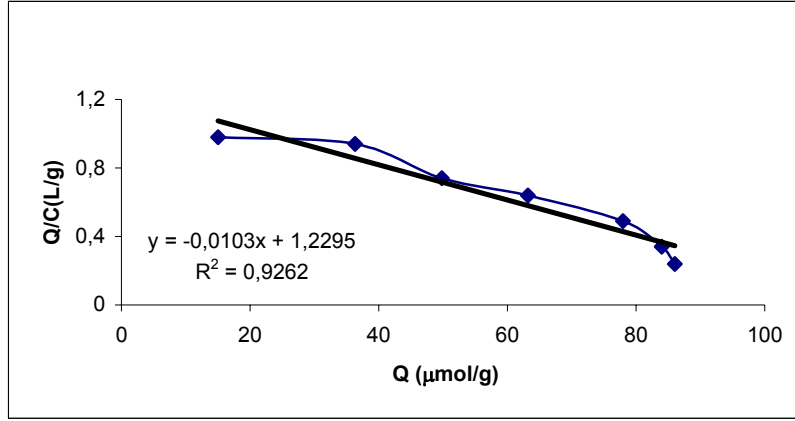
Şekil 3.29. 8-OHdG baskılı partiküllerin 8-OHdG adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon izotermi

Çizelge 3.4.. 8-OHdG baskılı sorbent için Langmuir and Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması

Deneysel		Langmuir			Freundlich		
Baskılanmış Küreler	Q (mg/g)	Qm (mg/g)	b(L/mg)	R ²	Kd (L/g)	n	R ²
MAH-Pt-8-OHdG	22	19,31	2,44	0,976	9,140	0,259	0,952

3.4.4. 8-OHdG baskılı polimerin 8-OHdG bağlama etkinliğinin ölçülmesi

Baskılı polimer ve 8-OHdG arasındaki bağlanma etkileşimlerinin ölçülmesi için çizilen Scatchard grafiğinden elde edilen veriler şöyledir; 8-OHdG baskılı polimer tek bağlanma bölgesine sahiptir ve bu bağlanma bölgesi için K_a , 10300 M^{-1} ve maksimum ligand-değişim etkileşme sayısı olan Q_{max} $33,81 \text{ mg/g}$ 'dır. Bu grafiğe ait R^2 değeri ise $0,9262$ olarak bulunmuştur. Çizilen grafik Şekil 3.30'da görülmektedir. Literatürde 8-OHdG için hazırlanan özel bir ligand olmadığından herhangi bir K_a değerine rastlanmamıştır.



Şekil 3.30..8-OHdG bağlanmasına ilişkin Scatchard grafiği

3.3.5. 8 -OHdG baskılı polimerin seçiciliği

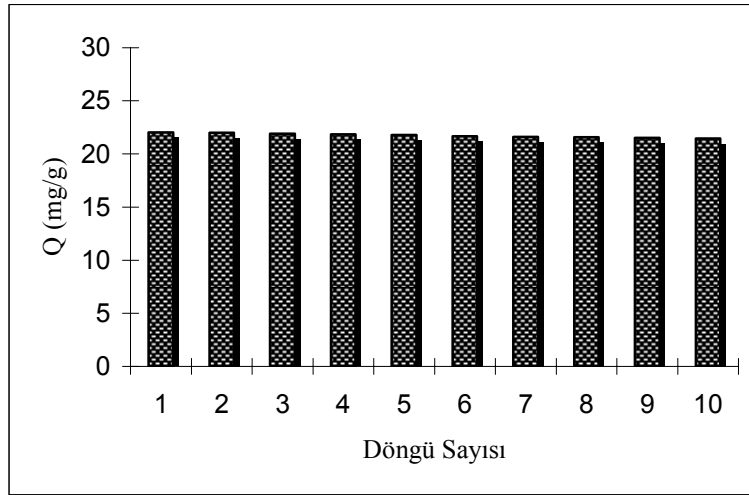
Hazırlanan sorbentin seçiciliğini incelemek amacıyla 8-OHdG'ye yapı olarak benzeyen ve yine kan matriksinde bulunabilecek guanazin ve guanin molekülleri ile çalışılmıştır. Her üç maddeninde 25 ppm lik çözeltileri hazırlanmış ve 8-OHdG baskılı polimer ile 5 saat süresince karıştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5'de verilmiştir. Hazırlanan polimerin yapılan kesikli sistem adsorpsiyon denemleri sonucunda diğer benzer türlere karşı çok düşük bir afinite gösterdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla 8-OHdG baskılı polimerin, 8-OHdG için oldukça yüksek seçiciliğe sahip olduğu söylenebilir.

Çizelge 3.5. 8-OHdG baskılı polimerin seçiciliği

	Q (mg/g)	k ($Q_{8-OHdG}/Q_{diğer}$)
8-OHdG	16	
Guanazin	1,2	13,33
Guanin	0,8	20

3.4.6. 8-OHdG baskılı polimerin yeniden kullanılabilirliği

8-OHdG desorpsiyon deneyleri metanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 8-OHdG adsorplamış sorbentler desorpsiyon ortamına yerleştirilmiş ve 5 saat 100 rpm hızla oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Desorpsiyon ortamından elde edilen çözeltideki 8-OHdG derişmi yine UV-spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Desorpsiyon oranı Eşlik 3.6'ya göre hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, 10 defa kullanılan mikrokürelerde %3 civarında bir kapasite kaybı gözlenmiştir (Şekil 3.31). Bu sonuç eldeki malzemenin oldukça iyi bir katı destek olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

**Şekil 3.31.** 8-OHdG baskılı polimerin yeniden kullanılabilirliği

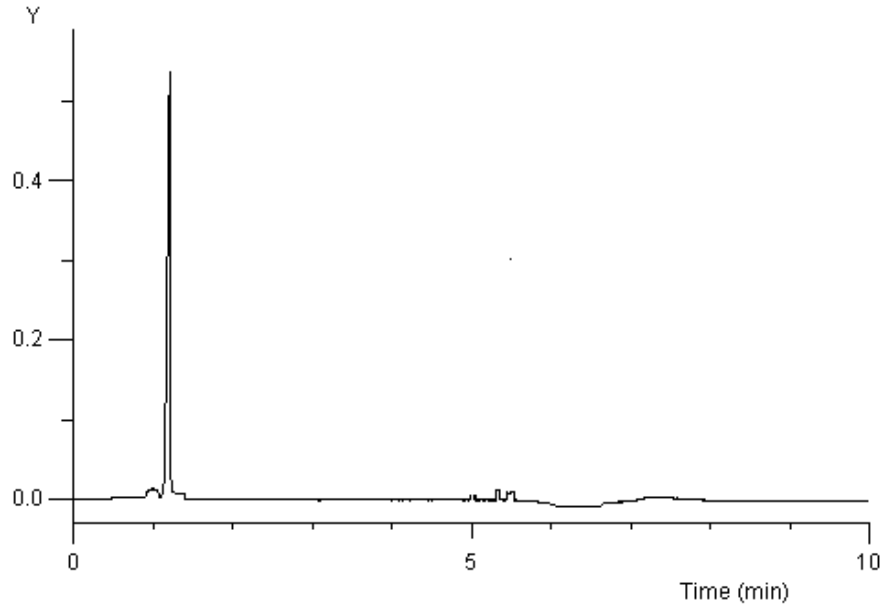
3.4.7. Katı-Faz ekstraksiyonu ile kandan 8-OHdG'nin önderiştirilmesi

Göğüs kanseri olan bayan bir hastanın (CA125:285) kan serumundan 8-OHdG izolasyonu, hazırlanan 8-OHdG baskılanmış sorbent ile gerçekleştirilmiştir. Bu metoda göre 1,5 mL serum örneği alınmış ve plazma proteinlerini çöktürmek amacıyla üzerine eşit hacimde asetonitril ilave edilmiştir. Çöken proteinler 4°C'de 15 dakika 3,000 g de santrifüj edilerek ayrılmıştır. Elde edilen süzüntü, önceden pH 7,5 fosfat tamponu ile yıkanmış 8-OHdG baskılı polimer ile dolgulu kolondan geçirilmiştir. Elüasyon için kolon, 20 mL metanol-su karışımı ile yıkanmıştır.

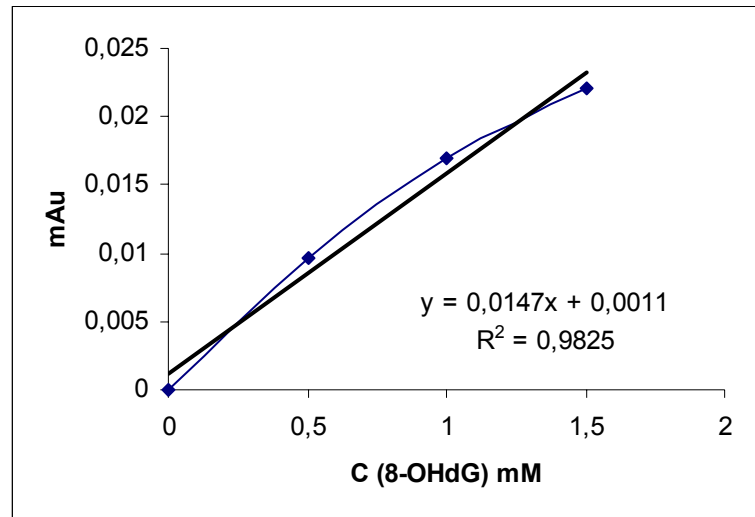
3.4.8. Kapiler elektroforez (CE) cihazı ile 8-OHdG tayini

Kan örneklerindeki 8-OHdG bileşeginin katı-faz ekstraksiyonu ardından ölçümleri Prince CEC cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Ayırımlarda 37 cm uzunluğunda ve 100 µm çaplı dolgusuz silika kapiler kolon kullanılmıştır. 8-OHdG'nin CE ile tayini için yapılan literatür çalışması sonucu optimum koşullar sırasıyla 20 mM borat tamponu (pH 9,5), 25°C, 25 kV ve 12 sn enjeksiyon süresi olarak belirlenmiştir (Ulrich O. ve ark. 1997). Bu şartlar altında gerçekleştirilen deneyler sonucunda yaklaşık 1,2 dakikada 8-OHdG'ye ait elektroferogram gözlenmiştir. (Şekil 3.32) pH 9,5 tamponunda hazırlanan standart 8-OHdG çözeltileri kullanılarak da Şekil 3.33'de görülen kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

DAX 3D 7.2: prince 25/04/07 09:16:34



Şekil 3.32. 20 mM borat tamponundaki 8-OHdG molekülüne ait elektrofereogram.Enjeksiyon koşulları 25°C, 25 kV ve 12 sn.



Şekil 3.33. 8-OHdG tayini için CE cihazıyla elde edilen kalibrasyon eğrisi

Kanda 8-OHdG tayini için kullanılan bu grafiğin kalibrasyon duyarlılığı 0,0147, en düşük tayin sınırı ise 0,05 μM olarak bulunmuştur. Bu sınır değeri CE cihazıyla yapılan diğer analizlere bakıldığında literatürde bulunan değerlerle

uyumludur şöyleki; Ulrich ve ark.(1997)'nin insan kanı hücrelerinde 8-OHdG tayin sınırını, yüksek performanslı kapiler elektroforez cihazıyla, 0,05 μ M olarak, Kvasnicova ve ark.(2003)'nin, UV dedektörlü bir kapiler elektroforez cihazı kullanarak yaptıkları çalışmada, idrarda 8-OHdG tayin sınırını 0,85 μ M ve Martinis ve ark. (2002) tarafından HPLC ile yapılan bir başka çalışmada ise idrardaki 8-OHdG tayin sınırını 5,0 μ g L^{-1} yani yaklaşık 0,018 μ M olarak buldukları görülmektedir.

Kanserli hasta serumundan, katı-faz ekstraksiyonuyla elde edilen elüent cihaza enjekte edilmiş ve üç ölçüm sonucu ortalama 8-OHdG miktarı 0,34 μ M olarak tespit edilmiştir. Yöntemin doğruluğu serum ortamına bilinen miktarda 8-OHdG ilave edilerek saptanmış ve Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Kanda 8-OHdG tayini (%95 güven sınırı, N=3)

Kullanılan Yöntem	Eklenen (μ mol/L)	Bulunan (μ mol/L)
CE	0,0	0,340 \pm 0,048
	0,5	0,836 \pm 0,092
	2,0	2,321 \pm 0,124

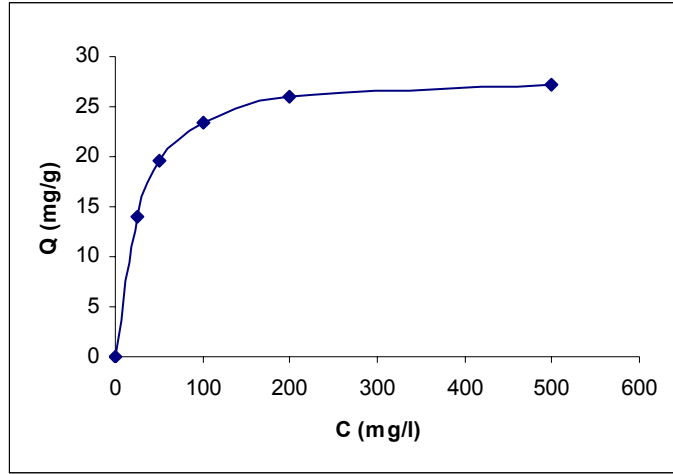
3.5. Kolesterol Baskılı Mikrokürelerin Adsorpsiyon Kapasitelerinin İncelenmesi ve Biyokromatografik Uygulaması

3.5.1. Kolesterol adsorpsiyonuna başlangıç derişimlerinin etkisi

Kolesterol başlangıç derişimlerinin adsorpsiyon kapasitesine etkisini gözlemek amacıyla 25 ila 500 ppm arasında çeşitli derişimlerde kolesterol çözeltileri glacial asetik asit içinde hazırlanmış ve bu çözeltilerden 10'ar mL alınarak 10'ar mg adsorbent üzerine ilave edilmiştir. 3 saatlik karıştırma sonucu süzüntülerden 1'er mL alınmış ve üzerlerine 2'şer mL ortoftalaldehit ve 1'er mL derişik sülfirik asit ilave edilerek her bir örnek içinde kalan kolesterol miktarları UV-Vis cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Yapılan tüm adsorpsiyon işlemlerinde adsorplanan madde miktarları Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

Deneyleler en az üç kez tekrar edilmiştir. Her bir veri seti için ortalama değerler ve standart sapmayı hesaplamak üzere standart istatistiksel yöntemler uygulanmıştır. Güven aralığı % 95’de tutulmuştur.

Şekil 3.34’de görüldüğü gibi kolesterol başlangıç derişimi arttıkça birim kütle başına adsorplanan madde miktarıda artmıştır ve her gram polimer için maksimum adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık 26 mg/g olarak bulunmuştur. Bu değere 200 ppm kolesterol başlangıç derişimi kullanılarak ulaşılmıştır. Çizelge 1.6’da verilen literatür değerleriyle karşılaştırıldığında 26 mg/g lık adsorpsiyon kapasitesinin oldukça iyi bir değer olduğu görülmektedir.

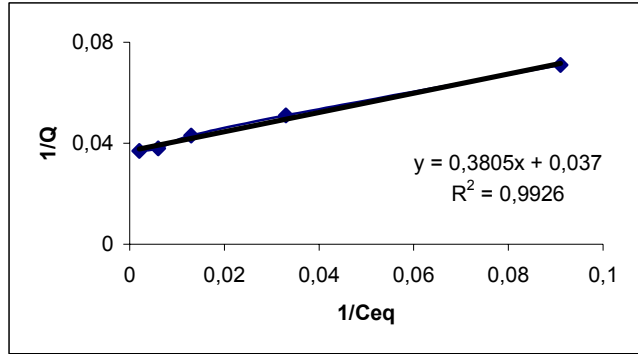


Şekil. 3.34. Kolesterol adsorpsiyonuna başlangıç derişimlerinin etkisi

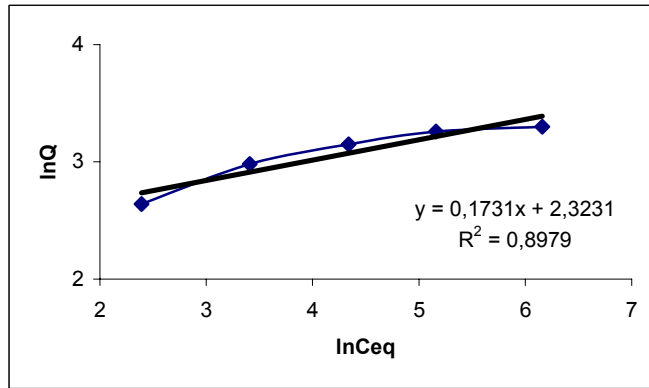
3.5.2. Kolesterol baskılı polimerin kolesterol adsorpsiyonuna ilişkin adsorpsiyon izotermeleri

Kolesterol adsorpsiyon verileri sırasıyla Langmuir (Şekil 3.35) ve Freundlich (Şekil 3.36) adsorpsiyon izotermine uygulandığında kolesterol adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Çünkü elde edilen grafiklerin R^2 değerlerine bakıldığında Langmuir için hesaplanan değer (0,9926), Freundlich için hesaplanan değerden (0,8979) oldukça yüksek çıkmıştır. Dolayısıyla sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği söylenebilir. Bu izotermeler ile ilgili elde edilen tüm

sonuçlar Çizelge 3.7’de verilmiştir. Çizelge 3.7’de deneysel olarak elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi ile Langmuir modelinden elde edilen değer arasında çok iyi sayılabilecek bir uyum görülmektedir.



Şekil 3.35. Kolesterol baskılı partiküllerin kolesteol adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izotermi



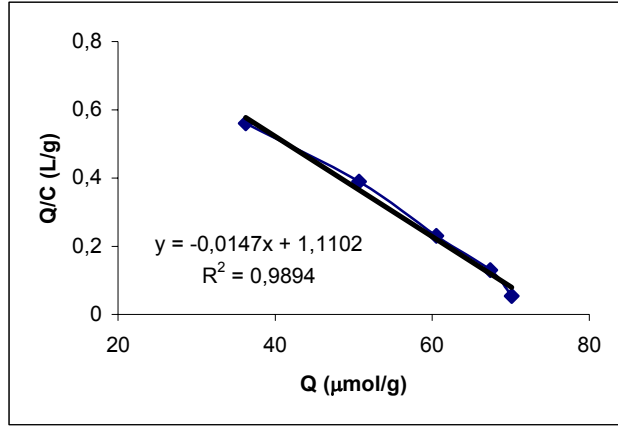
Şekil 3.36. Kolesterol baskılı partiküllerin kolesteol adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon izotermi

Çizelge 3.7. Kolesterol baskılı sorbent için Langmuir and Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması

Deneysel		Langmuir			Freundlich		
Baskılanmış Küreler	Q (mg/g)	Qm (mg/g)	b(L/mg)	R ²	Kd (L/g)	n	R ²
MAH-Cu-Kolesterol	26,06	27,02	0,0972	0,993	10,207	0,1731	0,898

3.5.3. Kolesterol baskılı polimerin bağlama etkinliğinin ölçülmesi

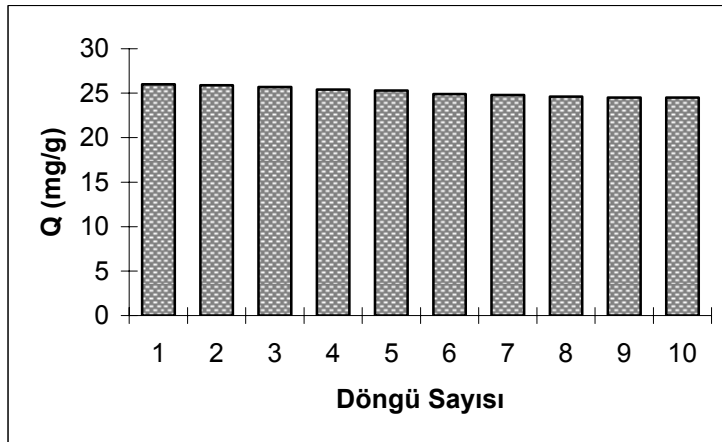
Baskılı polimer ve kolesterol arasındaki bağlanma için elde edilen adsorpsiyon verileri Scatchard modeline dönüştürüldüğünde elde edilen veriler şöyledir; kolesterol baskılı polimer tek bağlanma bölgesine sahiptir ve bu bağlanma bölgesi için K_a , 14700 M^{-1} ve maksimum ligand-değişim etkileşme sayısı olan Q_{max} $29,21 \text{ mg/g}$ 'dir. Bu grafiğe ait R^2 değeri ise $0,989$ olarak bulunmuştur. Çizilen grafik Şekil 3.37'de görülmektedir. Boonpangrak ve ark (2006) nitroksit ortamı radikalik bir polimerizasyonla farklı başlatıcılar kullanarak iki ayrı kolesterol baskılı polimer hazırlamışlar ve hazırladıkları bu polimerler ile kolesterol arasında yüksek ve düşük olmak üzere iki bağlanma bölgesi olduğunu göstermişlerdir. Düşük bağlanma bölgesi için buldukları K_a değerleri ortalama 47 M^{-1} , yüksek bağlanma bölgesi için ise 158730 M^{-1} 'dir. Bu değer oldukça yüksek olmakla beraber kullandıkları polimerizasyon teknikleri oldukça karmaşıktır. Shi ve ark. (2006) yine kolesterol baskılamaya yönelik bir çalışmalarında monomer olarak metakrilik asit ve çapraz bağlayıcı olarak EDMA kullanmışlar ve UV ışığı altında bilinen kolay bir yöntemle baskılı polimerlerini hazırlamışlardır. Çalışmada hazırlanan farklı MIPIler için kolesterol bağlama etkinliği 50000 M^{-1} civarlarında bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada hazırlanan MIPIlerin kolesterolün katı-faz ekstraksiyonu için C18 SPE kolonundan daha iyi bir geri kazanıma da sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada elde edilen Q_{max} değerleri $1,46 \text{ mg/g}$ gibi oldukça düşük değerlerdir.



Şekil 3.37. Kolesterol bağlanmasına ilişkin Scatchard grafiği

3.5.4. Kolesterol baskılı polimerin yeniden kullanılabilirliği

Kolesterol desorpsiyon deneyleri kloroform kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolesterol adsorplamış sorbentler desorpsiyon ortamına yerleştirilmiş ve 3 saat 100 rpm hızla oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Desorpsiyon ortamından elde edilen çözeltideki kolesterol derişmi yine UV-spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Desorpsiyon oranı Eşitlik 3.6'ya göre hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, 10 defa kullanılan mikrokürelerde % 6 civarında bir kapasite kaybı gözlenmiştir (Şekil 3.38). Bu sonuç elde edilen malzemenin iyi bir katı destek olduğunu göstermektedir

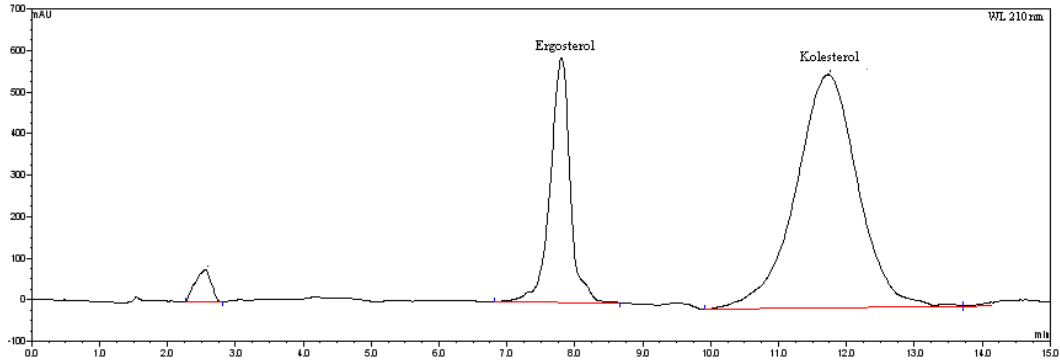


Şekil 3.38. Kolesterol baskılı polimerin yeniden kullanılabilirliği

3.5.5. Kolesterol baskılı polimerin biyokromatografik uygulaması

Elde edilmiş olan kolesterol baskılı polimerik mikrokürelerin kromatografik ayırımlarda kullanılabilirliği BioLC sistemi ile denenmiştir. 50mm/5 mm ebatlarındaki boş bir cam kolon, 75-90 µm boyutlarındaki yaklaşık 0,500 g MAH-Cu-kolesterol mikrokürelerinin metanolde hazırlanan solüsyonu ile doldurulmuştur. Mobil faz olarak metanol seçilmiştir. Yapılan çeşitli denemeler sonucunda ayırımların en iyi oda sıcaklığında, 0,3 ml/dak. akış hızında ve 210 nm de gerçekleştiği gözlenmiştir.

Şekil 3.39'da görülen kromatogramda alıkonma zamanları ergosterol için 7,9, kolesterol için 12 dak. olarak görülmektedir. Bu alıkonma zamanlarına göre piklerin ayırıcılık sabiti (R_s) 1,49, α ise 1,75 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu R_s değerinin, 1'den büyük olması bu ayırımın oldukça başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. Yapılan denemelerde kolonda tutulmayan tür olarak aseton kullanılmış ve t_0 2,5 dak. da elde edilmiştir. Çizelge 3.8'de R_s değerlerinin yanı sıra yapılan kromatografik ayırımlarla ilgili diğer verilerde görülmektedir. Bu verilerden de görüleceği gibi yapılan ayırım için elde edilen teorik plaka sayıları da oldukça yüksektir ve bu, hazırlanan kolonun veriminin de oldukça iyi olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.39. Kolesterol ve ergosterol moleküllerinin, kolesterol baskılanmış polimer dolgulı bir kolonda kromatografik ayırımı. Tüm pikler 210 nm de metanol elüenti ile tespit edilmiştir. Kolon boyut uzunluğu: 50 mm, çapı: 5 mm boş cam TRICORN kolon; doldurulan madde miktarı: 0.500 g.

Çizelge 3.8. Kolesterol baskılı mikrokürelerle elde edilen kromatografik ayırma verileri

	t_R	N	k'	α	R_s
Ergosterol	7,9	3842	2,16		
Kolesterol	12	798	3,8	1,75	1.49

Literatürde kolesterol baskılanmış bir çok polimer sentezi mevcuttur. Ancak bunların bir çoğu hidrofobik ya da hidrojen bağı etkileşimlerine dayalı sentezlerdir ve adsorpsiyon çalışmaları kesikli sistemlerle sınırlı kalmıştır. Kolesterol baskılı polimerlerin kromatografik uygulamasına ilişkin tek çalışma Hwang ve ark.(2002) tarafından gerçekleştirilmiştir ve bu çalışmada β -estradiol ve kolesterolün kromatografik ayırımı gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında ise hem hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimlerden daha kuvvetli olan metal-şelat etkileşimleriyle bir MIP hazırlanmış hem de kolesterole yapısal olarak çok daha fazla benzeyen ergosterol molekülüyle ayırımı başarıyla gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, bazı biyomoleküllerin (proteinler, enzimler, hormonlar, kolesterol vb) buldukları çok bileşenli karmaşık ortamlardan (kan, vücut sıvıları, mikrobiyal kültür ortamları vb) seçici olarak kazanılması ve saflaştırılması için biyolojik sistemlerle uyumlu, ilgili moleküller için yüksek seçiciliğe sahip ve düşük maliyetli, yeni nesil molekül bellekli polimerlerin (MIP) hazırlanması gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla üç farklı MIP hazırlanmıştır. Hazırlanan ilk MIP, L-histidin molekülüne seçici olan MAH-Cu-Histidin mikroküreleridir ve bu mikroküreler hem D-L histidin rasemik karışımının ayrılmasında hem de yüzey histidine sahip proteinlerin ayrılması ve saflaştırılmasında kromatografik malzeme olarak kullanılmıştır. Hazırlanan ikinci MIP, kanser ve çeşitli hastalıkların teşhisinde yararlanılan 8-OHdG biyomolekülüne seçici olarak tasarlanan MAH-Pt-8-OHdG polimeridir. 8-OHdG baskılı bu seçici adsorban oldukça karmaşık olan kan serumu matriksinden 8-OHdG'nin önderiştirilmesi amacıyla katı-faz ekstraksiyonunda kullanılmıştır. Üçüncü MIP, insan vücudu tarafından sentezlenen ve aşırı hastalık sebebi olan kolesterolün seçici olarak ayrıştırılması ve saflaştırılmasına yönelik oluşturulan MAH-Cu-kolesterol polimeridir. Ayrıca bu polimerin biyokromatografik bir uygulaması olarak kolesterol ve ergosterol ayrılması gerçekleştirilmiştir. Yapılan tüm MIP sentezlerinde kullandığımız MAH monomerinin sahip olduğu imidazol halkası, geçiş metalleriyle şelat oluşturma özelliğine sahiptir ve metal-şelat etkileşimleriyle hazırlanan MIP'ler kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlere dayalı MIP'lere göre bir takım avantajlara sahiptir. Bu avantajlardan biri; kullanılan metal iyonu, MAH monomeriyle şelat oluşturduktan sonra bir Lewis asidi gibi davranarak hedef molekülde yer alan elektron verici bir grupla koordinasyonunu tamamlamaktadır. Bu nedenle oluşan bağlanma oldukça seçici ve kovalent olmayan etkileşimlere göre çok daha güçlüdür.

Hazırlanan MIP'lerin karakterizasyonları yapıldıktan sonra kesikli sistemde adsorpsiyon-desorpsiyon denemeleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Öncelikle L-Histidin baskılı mikrokürelere kullanılarak adsorpsiyon kapasitesini önemli ölçüde etkileyen ortam pH'ı ve kullanılan tampon türünün cyt-c adsorpsiyon kapasitesine etkisi incelenmiştir (Şekil 3.10 ve 11). Elde edilen adsorpsiyon kapasitesi değerlerinin pH 7'ye kadar arttığı daha sonra ise azaldığı görülmüştür. Farklı tamponlar kullanılarak yapılan deneylerde ise en uygun tampon çözelti fosfat tamponu olarak belirlenmiştir. Daha sonra aynı mikrokürelere kullanılarak L-histidin adsorpsiyon kapasitesi için ortam pH'ı ve tampon türünün etkisi incelenmiş ve bu molekül için de en yüksek adsorpsiyon kapasitesinin ortam pH'ının 7 olduğunda ve fosfat tamponu kullanıldığında elde edildiği gözlenmiştir. En yüksek bağlanma afinitesinin pH 6-7 arasında bulunması histidin deprotonasyonunun $pK_a=6,2$ 'de gerçekleşmesiyle açıklanabilir.

L-histidin baskılı mikrokürelere histidin ve cyt-c adsorpsiyonlarına başlangıç derişimlerinin etkisi incelenmiş ve her iki molekül için de başlangıç derişimleri arttıkça adsorpsiyon miktarının arttığı ve belirli bir adsorpsiyon kapasitesinde doygunluğa ulaştığı görülmüştür. Bu değerler L-histidin için 15,38 mg/g, cyt-c için ise 27,06 mg/g'dır. Bu aşamada elde edilen Q ve C değerleri kullanılarak her iki sistem için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi oluşturulmuştur. L-histidin adsorpsiyonu, bu izotermine uygulandığında L-Histidin adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Çünkü elde edilen grafiklerin regreasyon sabitlerine (R^2) bakıldığında Langmuir için hesaplanan değer (0,9457), Freundlich için hesaplanan değerden (0,8718) daha yüksek çıkmıştır. Cyt-c adsorpsiyonu Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermine uygulandığında, bu adsorpsiyon için en uygun modelin yine, R^2 değerleri göz önüne alındığında, Langmuir adsorpsiyon modeli olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla hazırlanan polimerde, sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği söylenebilir.

L-Histidin baskılı polimer ve histidin arasındaki bağlanma etkileşimleri Scatchard analiz yöntemi ile elde edilmiştir ve sonuç olarak K_a değeri $58300 M^{-1}$ ve R^2 değeri 0,9883 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.15). Maksimum ligand-değişim etkileşme sayısı olan Q_{max} ise yine grafik üzerinde yapılan hesaplamalarla $101,82 \mu mol/g$ olarak bulunmuştur. L-histidin baskılı polimer ve cyt-c arasındaki Scatchard analizinde ise iki ayrı doğru elde edilmiştir. Bu durum HIBS

mikrokürlerinin, cyt-c için iki ayrı bağlanma bölgesine sahip olduğunu düşündürmüştür. Birinci bağlanma bölgesi için K_a , 5200 M^{-1} ve maksimum ligand-değişim etkileşme sayısı olan Q_{max} , $29,0385 \text{ } \mu\text{mol/g}$ olarak bulunmuştur, ikinci bağlanma bölgesi için ise K_a , 55500 M^{-1} ve Q_{max} , $2,5495 \text{ } \mu\text{mol/g}$ 'dır. Bu değerler literatürle karşılaştırıldığında hazırlanan mikrokürelerin oldukça iyi bir adsorban olduğu görülmüştür.

Hazırlanan mikrokürelerin defalarca kullanılmasına rağmen sadece %8'lik bir adsorpsiyon kaybı gözlenmesi ve SEM analizleriyle oldukça gözenekli yapıda olduklarının görülmesi sonucu bu MIP'in kromatografik dolgu malzemesi olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Hazırlanan L-histidin baskılı mikroküreler 50mm/5mm ebatlarındaki boş cam kolona doldurulmuştur ve önce D-L histidin rasemik karışımının ayrılabilmesi amacıyla kolona 50 ppm'lik D-L Histidin karışımı enjekte edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda optimum D-L Histidin ayırımı 0,3 ml/dak. akış hızında, fosfat tamponu (pH 5,0) kullanılmasıyla elde edilmiştir. Denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve tayin dalga boyu olarak 254 nm kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramda alıkonma zamanları D-Histidin için 1.76, L-Histidin için 5.43 dak. olarak gözlenmiştir. Hazırlanan kolonun aynı koşullarda histidin molekülü içeren cyt-c tayininde ve ribonukleaz A ve cyt-c ayırımında kullanılabilirliği de araştırılmıştır. Bu amaçla HIBS ile doldurulmuş kolon, ve 0,1 M imidazol içeren 0,05 M NaH_2PO_4 tamponu kullanılmış ve cyt-c ve ribonukleaz A ayırımı sırasıyla 1,85 ve 4,11 dak. larda gözlenmiştir. Bu alıkonma zamanlarından yararlanılarak, kromatogramlara ait ayırıcılık sabitleri (R_s), kapasite faktörleri (k'), seçicilik faktörleri (α) ve teorik plaka sayıları (N) hesaplanmıştır. Yapılan deneylerde kolonda tutulmayan tür olarak aseton kullanılmıştır. D-L histidin rasemik ayırımı için elde edilen kromatogramlarda ayırıcılık sabiti 1,43, histidin içeren proteinlerin ayırımı için ise 1,39 olarak bulunmuştur. Hem D-L histidin rasemik karışımının ayrılmasında, hem de cyt-c-ribonukleaz A karışımının ayrılmasında elde edilen R_s değerlerinin, 1'den büyük olması her iki ayırımında oldukça başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. Yapılan bu çalışma aynı zamanda FPLC kullanılarak gerçekleştirilen ilk preparatif protein ayırma çalışmasıdır.

Çalışmanın ikinci aşamasında sentezlenen MAH-Pt(II)-8-OHdG molekül baskılı polimeri için de katı-faz ekstraksiyonu uygulamasından önce optimum koşulların belirlenmesi amacıyla kesikli sistemde adsorpsiyon-desorpsiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle maksimum adsorpsiyonun gerçekleştiği pH incelenmiş ve uygun pH aralığı 3-4 olarak bulunmuştur. Daha sonra maksimum adsorpsiyon kapasitesinin bulunması için farklı 8-OHdG başlangıç derişimleri kullanılmış ve maksimum adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık 22 mg/g olarak bulunmuştur. Bu değere 45 ppm'lik 8-OHdG çözeltisi kullanılarak ulaşılmıştır.

8-OHdG adsorpsiyon verileri sırasıyla Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermine uygulandığında, 8-OHdG adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Çünkü elde edilen grafiklerin R^2 değerlerine bakıldığında Langmuir için hesaplanan değer (0,976), Freundlich için hesaplanan değerden (0,952) daha yüksek çıkmıştır. Bu nedenle sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği söylenebilir. Langmuir adsorpsiyon izotermine göre maksimum adsorpsiyon kapasitesi 19,31 mg/g'dır. Dolayısıyla deneysel olarak elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi ile Langmuir modelinden elde edilen değer arasında iyi sayılabilecek bir uyum görülmektedir. Baskılı polimer ve 8-OHdG arasındaki bağlanma etkileşimlerinin ölçülmesi için çizilen Scatchard grafiğinden elde edilen veriler ise şöyledir; 8-OHdG baskılı polimer tek bağlanma bölgesine sahiptir ve bu bağlanma bölgesi için K_a , $10300 M^{-1}$ ve maksimum ligand-değişim etkileşme sayısı olan Q_{max} ise 33,81 mg/g'dır. Bu grafiğe ait R^2 değeri ise 0,9262 olarak bulunmuştur. Literatür incelemesi yapıldığında 8-OHdG baskılanmış herhangi bir polimer sentezi bulunamadığından elde edilen bu sonuçların ilk olduğunu söyleyebiliriz.

Katı-faz ekstraksiyon uygulamasına geçilmeden önce hazırlanan polimerin seçiciliği ve yeniden kullanılabilirliği de incelenmiştir. Buna göre hazırlanan polimerin guanozin ve guanin gibi benzer türler varlığında bile 8-OHdG'ye seçici olduğu ve 10 defa tekrar kullanılabilceği bulunmuştur.

Göğüs kanseri olan bayan bir hastanın (CA125:285) kan serumundan 8-OHdG izolasyonu, hazırlanan 8-OHdG baskılanmış adsorban ile

gerçekleştirilmiştir. Bu adsorban kullanılarak gerçekleştirilen önderiştirme çalışmalarının ardından 8-OHdG tayini, CE cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen elektroferogramların ticari C18 katı-faz ekstraksiyon kolonlarıyla elde edilenlerden daha temiz olduğu söylenebilir. Yapılan çalışma sonucu kanserli hasta serumundaki 8-OHdG miktarı ortalama 0,34 μM olarak bulunmuştur. Kan örneğinden elde edilen bu sonucu değerlendirecek olursak, Kato ve ark. (2003) normal bir hastanın kanında $9,42 \times 10^{-3}$ μM 8-OHdG, hemodializ hastalarının kanında ise 0,075 μM 8-OHdG bulunduğunu belirtmişlerdir. Dolayısıyla ölçümü yapılan kanserli hastanın kanındaki 8-OHdG miktarı normal bir insana göre yaklaşık 35 kat daha fazladır. Tayin için hazırlanan yöntemde kullanılan kalibrasyon grafiğinden elde edilen tayin sınırı 0,05 μM 'dir ve bu değer literatürde 8-OHdG tayininde kullanılan yöntemlerle oldukça uyumludur. Yöntemin doğruluğu serum ortamına bilinen miktarda 8-OHdG ilave edilerek de kontrol edilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamındaki son uygulama ise kolesterol molekülünün ayrılması ve saflaştırılmasına yönelik molekül baskılanmış bir adsorban hazırlanması ve seçiciliğinin incelenmesi amacıyla yapısal olarak kolesterole oldukça benzeyen başka bir sterol olan ergosterol ile biyokromatografik ayırımlarının gerçekleştirilmesidir. Bu amaçla MAH-Cu(II) metal-şelat monomeri kullanılarak kolesterol baskılı mikroküreler hazırlanmış ve bu mikrokürelerin susuz ortamda kolesterol bağlama etkinlikleri ölçülmüştür. Bu amaçla başlangıç derişimlerinin kolesterol adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Kolesterol başlangıç derişimi arttıkça birim kütle başına adsorplanan madde miktarıda artmıştır ve her gram polimer için maksimum adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık 26 mg/g olarak bulunmuştur. Bu değere 200 ppm kolesterol başlangıç derişimi kullanılarak ulaşılmıştır. Çizelge 1.6'da verilen literatür değerleriyle karşılaştırıldığında 26 mg/g lık adsorpsiyon kapasitesinin oldukça iyi bir değer olduğu görülmektedir. Hazırlanan mikroküreler için Langmuir ve Freundlich izotermleri oluşturulmuş ve sistemin yine kimyasal bir adsorpsiyon gerçekleştiği için Langmuir'e uyduğu görülmüştür. Baskılı mikroküreler ve kolesterol arasındaki bağlanma için elde edilen adsorpsiyon verileri Scatchard modeline dönüştürüldüğünde elde edilen veriler ise şöyledir; kolesterol baskılı polimer tek bağlanma bölgesine sahiptir ve

bu bağlanma bölgesi için K_a , 14700 M^{-1} ve maksimum ligand-değişim etkileşme sayısı olan Q_{max} $29,21 \text{ mg/g}$ 'dir. Elde edilen bu verilerin literatür değerleriyle oldukça uyumlu olduğu saptanmıştır. Biyokromatografik uygulama öncesi son olarak elde edilen mikrokürelerin yeniden kullanılabilirliği incelenmiş ve 10 kullanım sonrası mikrokürelerin kolesterol adsorpsiyon kapasitelerinde sadece %6 lık bir kapasite kaybı gözlenmiştir. Bu veriler ve SEM görüntüleri hazırlanan mikrokürelerin kromatografik dolgu malzemesi olarak kullanılabilceği yönünde bir fikir oluşturduğundan elde edilen mikroküreler 50mm/5 mm ebatlarındaki boş cam kolona doldurulmuştur ve BioLC cihazına bağlanan kolona önce tek tek daha sonra karışım halinde 50 ppm lik kolesterol-ergosterol karışımı enjekte edilmiştir. Yapılan çeşitli denemeler sonucunda ayırımların en iyi oda sıcaklığında, 0,3 ml/dak. akış hızında ve 210 nm de gerçekleştiği gözlenmiştir. Elde edilen kromatogramda oldukça iyi bir ayırıcılık sabiti (1,49) ve yüksek tabaka sayıları ($N_{\text{erg}}=3842$, $N_{\text{kol}}=798$) elde edilmiştir. Görüldüğü gibi kolesterolün seçici ayırımı için hazırlanan MIP susuz ortamdan kolesterol uzaklaştırılmasında kullanılmakla birlikte, oldukça etkin bir kolon dolgu malzemesi olarak da kullanılabilir. Yapılan çalışma MIPIlerin kromatografik dolgu malzemesi olarak kullanımıyla gerçekleştirilen ilk kolesterol-ergosterol ayırımıdır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, aminoasitler, 8-OHdG, kolesterol ve oldukça büyük biyomoleküller olan proteinler gibi tıbbi alanda kullanılan biyolojik moleküllerin ayrılması ve saflaştırılmasına yönelik, seçici, biyosistemlerle uyumlu ve düşük maliyetli molekül bellekli adsorbanlar hazırlanmış ve biyokromatografik uygulamaları başarıyla gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abe, T., Toghi, H., Isobe, C., Murata T. ve Sato, C. (2002), "Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease," *Free Radic Biol Med*, **70**, 447–450.
- Andersson, L. I. , Paprica, A. ve Arvidsson, T. (1997), "Concentration of Sameridine Made by Molecular Imprinting," *Chromatographia*, **46**, 57-62.
- Arnett, S. D., Osbourn, D.M., Moore, K.D., Vandaveer S.S. ve Lunte, C.E. (2005), "Determination of 8-oxoguanine and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the rat cerebral cortex using microdialysis sampling and capillary electrophoresis with electrochemical detection," *Journal of Chromatography B*, **827**, 16-25.
- Arshady, R. ve Mosbach, K. (1981), "Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization," *Macromol. Chem*, **182**, 687-692.
- Bayramoğlu, G., Loğoğlu, E. ve Arica, M.Y. (2007), "Sitokrom c adsorption on glutamic acid ligand immobilized magnetic poly(methylmethacrylate-co-glycidylmethacrylate) beads," *Colloids and Surfaces A*, **297**, 55–62.
- Bossi, A., Piletsky, S.A., Piletska, E., Righetti, P.G. ve Turner, A.P.F. (2001), "Surface-Grafted Molecularly Imprinted Polymers for Protein Recognition," *Analytical Chemistry*, **73**, 5281-5286.
- Boonpangrak, S., Whitcombe, M.J., Prachayasittikul, V. Mosbach, K. ve Ye, L. (2006), "Preparation of molecularly imprinted polymers using nitroxide-mediated living radical polymerization," *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 349–354.
- Büyüktiryaki S. (2005), *Metilciva belleklere sahip polimerik mikrokürelerle civa önderiştirilmesi ve tayini*, Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Dabulis, K. ve Klibanov, A. M. (1992), "Molecular imprinting of proteins and other macromolecules resulting in new adsorbents," *Biotechn. and Bioeng.*, **39**, 176-185.
- Denizli, A. (2002) "Proteinlerin bugünü ve geleceği", *Popüler Bilim*, Eylül, 50-54.

- Dhal, P.K. ve Arnhold, F.H. (1992), "Metal-coordinated interactions in the template-mediated synthesis of substrate-selective polymers: Recognition bis(imidazole) substrates by copper(II) iminodiacetate containing polymers," *Macromolecules*, **25**, 7051-7059.
- Davankov, V. (2003), "Enantioselective ligand exchange in modern separation techniques," *Journal of Chromatography A*, **1000**, 891-915.
- Dong, X.C., Sun, H., Lu, X.Y., Wang, H.B., Lui, S.X ve Wang, N., (2002), "Separation of ephedrine stereoisomers by molecular imprinted polymers influence of synthetic condition and mobile phase compositions on the chromatographic performance," *Analist*, **127**, 1427-1432.
- Erdik, E., Obalı, M., Yüksekışık, N., Öktemer, A., Pekel, T. ve İhsanoğlu, E., (1997), *Denel Organik Kimya*, A.Ü.F.F. Yayınları, Ankara.
- Ersöz, A., Denizli, A., Özcan A. ve Say, R. (2005), "Molecularly Imprinted Ligand-Exchange Recognition Assay of Glucose by Quartz Crystal Microbalance," *Biosensors and Bioelectronics*, **20 (11)**, 2197-2202.
- Gore, M.A., Karmalkar, R.N. ve Kulkarni, M.G. (2004), "Enhanced capacities and selectivities for cholesterol in aqueous media by molecular imprinting: role of novel cross-linkers" *Journal of Chromatography B*, **804**, 211-221.
- Gözükara, E.M. (2000), *Biyokimya*, Dördüncü Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Haupt, K. ve Mosbach, K. (1998), "Plastic antibodies: developments and applications," *Tiptech*, **16**, 468-475.
- Hart, B.R. (2002), "Molecular imprinting for the recognition of n-terminal histidine peptides in aqueous solution," *Macromolecules*, **35**, 6192-6201.
- Harper, H.A. ve Murray, R.K. (1993), *Harper'in Biyokimyası*, Barış Kitabevi, İstanbul.
- Hawkins, D.M., Stevenson, D. ve Reddy, S.M. (2005), "Investigation of protein imprinting in hydrogel-based molecularly imprinted polymers (HydroMIPs)," *Anal. Chim. Acta*, **542**, 61-65.
- Hedborg, F., Winquist, F., Lundstrom, I. ve Mosbach K. (1993), "Some Studies of Molecularly Imprinted Polymer Membranes in Combination with Field Effect Devices," *Sens Actuat A*, **38**, 796-799.

- Hollar , C. M., Law , A.J.R., Dalgleish, D. G., Medrano , J. F. ve Brown, R. J. (1991) "Separation of β -Casein A¹, A², and B Using Cation-Exchange Fast Protein Liquid Chromatography," *Journal of Dairy Science*, **74**, 3308-3313.
- Hwang, C.-C. ve Lee, W.-C. (2002), "Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods," *Journal of Chromatography A*, **962** , 69–78.
- Hsu, C.Y., Lin, H.Y., Thomas, J.L., Wu, B.T. ve Chou, T.C. (2006), "Incorporation of styrene enhances recognition of ribonuclease A by molecularly imprinted polymers," *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 355-363.
- Ikegami, T., Mukawama, T., Nariai, H. ve Takeuchi, T., (2004), "Bisphenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting," *Analytica Chimica Acta.*, **504**, 131-135.
- Kato, A., Odamaki, M. ve Hishida, A. (2003), "Blood 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine is associated with erythropoietin resistance in haemodialysis patients," *Nephrol Dial Transplant*, **18**, 931-936.
- Katz, A., Davis, M.E., (1999), "Investigation into the mechanisms of molecular recognition with imprinted polymers," *Macromolecules*, **32**, 4113-4121.
- Kaya, N. (1993), *Biyokimya*, Atatürk Üniv. Yayınları, Erzurum.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, İ. (2000), *Biyokimya*, Aktif Yayın Evi, 2. baskı.
- Kocabey, Z. (1996), *Biyokimya Ders Notları*, Metay Hacettepe, Ankara.
- Kriz, D. ve Mosbach, K. (1995a), "Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer," *Anal. Chim. Acta*, **300(1-3)**, 71-75.
- Kriz, D., Ramstroem, O., Svensson, A. ve Mosbach, K. (1995b). "A Biomimetic Sensor Based on a Molecularly Imprinted Polymer as a Recognition Element Combined with Fiber-Optic Detection," *Analytical Chemistry*, **67(13)**, 2142-2144.
- Kvasnicova, V., Samcova, E., Jursova, A. ve Jelinek, I. (2003), "Determination of 8-Hydroxydeoxyguanosine in untreated urine by capillary electrophoresis with UV detection," *Journal of Chromatography A*, **985**, 513-517.

- Kuchen, W. ve Shram, J. (1988), "Metal-ion selective exchange resins by matrix with methacrylates," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27(12)**, 1695-1697.
- Kunz, C. ve Lonnerdal, B. (1989), "Human milk proteins: separation of whey proteins and their analysis by polyacrylamide gel electrophoresis, fast protein liquid chromatography (FPLC) gel filtration, and anion-exchange chromatography," *American Journal of Clinical Nutrition*, **49**, 464-470.
- Levi, R., McNiven, S., Piletsky, S.A., Cheong, S.H., Yano, K., ve Karube, I. (1997), "Optical Detection of Chloramphenicol Using Molecularly Imprinted Polymers," *Analytical Chemistry*, **69(11)**, 2017 – 2021.
- Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tjønneland, A., Overvad, K. ve Poulsen, H.E. (1992), "Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index," *Carcinogenesis*, **13**, 2241–2247.
- Loft, S., Poulsen, H.E., Vistisen, K. ve Knudson, L.E. (1999), "Increased urinary excretion of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a biomarker of oxidative damage, in urban bus drivers," *Mutat. Res.* **441**, 11–19.
- Mahony, J.O., Nolan, K. ve Smyth, M.R. (2005), "Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in analytical chemistry," *Anal. Chim. Acta*, **534**, 31-39.
- March, J. (2004), *Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure*, Fourth Edition, Wiley-Interscience Publication, Singapore.
- Martinis, D.S.B. ve Bianchi, M.D.L.P. (2002), "Methodology for urinary 8-Hydroxydeoxyguanosine analysis by HPLC with electrochemical detection," *Pharmacological Research*, **46**, 129-131.
- Molinelli, A., (2004), "Molecular imprinted polymers: Towards a rational understanding of biomimetic materials, Georgia institute of technology . In partial fulfillment of the requirement for the degree doctor of philosophy in chemistry.
- Mosbach, K. ve Ramström, O. (1996) "The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology," *Bio/technology*, **14**, 163-170.

- Muldoon, M.T. ve Stanker, L.H. (1997), "Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction of Atrazine from Beef Liver Extracts," *Anal. Chem.*, **69(5)**, 803–808.
- Nagata, Y., Iida, T. ve Sakai, M. (2001), "Enantiomeric resolution of amino acids by thin-layer chromatography," *Journal of Molecular Catalysis B*, **12**, 105-108.
- Nunomura, A., Perry, G., Pappolla, M.A., Wade, R., Hirai K. ve Chiba S. (1999), "RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease," *J Neurosci*, **19**, 1959–1964.
- O'Brien, S. M., Thomas, O. R.T. ve Dunnill, P. (1996), "Non-porous magnetic chelator supports for protein recovery by immobilised metal affinity adsorption," *J. Biotechnol.*, **50(1)**, 13-25.
- Ou, S. H., Wu, M. C., Chou, T. C. ve Liu, C. C. (2004), "Polyacrylamide gels with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of lysozyme," *Anal. Chim. Acta*, **504(1)**, 163-166.
- Piletsky, S. A., Piletskaya, E. V., Elgersma, A. V. ve Yano, K.I. (1995), "Atrazine sensing by molecularly imprinted membranes," *Biosensors and Bioelectronics*, **10 (9-10)**, 959-964.
- Rachkov, A. ve Minoura, N. (2001), "Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1544**, 255-266.
- Ramström, O., Andersson, L.I. ve Mosbach, K. (1993), "Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting," *J. Org.Chem.*, **58**, 7562.
- Ramström, O., Ye, L. ve Mosbach, K. (1996), "Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting," *Chem Biol*, **3**, 471–477.
- Samcová, E., Marhol, P., Opekar F. ve Langmaier, J. (2004), "Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in obese patients by HPLC with electrochemical detection," *Analytica Chimica Acta*, **516**, 107-110.
- Sarıkaya, Y. (1993), Fizikokimya, Gazi Büro Kitabevi, Ankara.

- Say, R., Birlik, E., Ersöz, A., Yılmaz, F., Gedikbey, T. ve Denizli, A. (2003), "Preconcentration of copper on ion-selective imprinted polymer microbeads," *Anal. Chim. Acta*, **480(2)**, 251-256.
- Say, R., Ersöz, A. ve Denizli, A. (2003), "Selective separation of uranium containing glutamic acid molecular imprinted polymeric microbeads," *Sep. Sci. and Technol.*, **38(14)**, 3429.
- Scriver, C., Beaudet, A.L., Valle, D., Sly, W.S., Vogelstein, B., Childs, B. ve Kinzler, K.W. (2007). "The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease," New York: McGraw-Hill. <http://en.wikipedia.org/wiki/Histidine>.
- Sellergren, B., Lepistö, M., ve Mosbach, K., (1988), "Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interaction-NMR and chromatographic studies on the nature of recognition," *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5853-5860
- Sellergren, B. (1994), "Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer," *Anal. Chem.*, **66**, 1578.
- Sellergren, B. (2001), *Molecularly Imprinted Polymers, Man-Made Mimics of Antibodies and Their Applications in Analytical Chemistry*, Elsevier Publishers, Amsterdam.
- Senholdt, M., Siemann, M., Mosbach, K. ve Andersson, L.I. (1997), "Determination of cyclosporin A and metabolites total concentration using a molecularly imprinted polymer based radioligand binding assay," *Anal Lett.*, **30**, 1809-1821.
- Shea, K. J. ve Dougherty, T. K. (1986) "Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces. The influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition," *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 1091.
- Shea, K., Spivak D. A. ve Sellergren B. (1993), "Polymer Complements to Nucleotide Bases. Selective Binding of Adenine Derivatives to Imprinted Polymers," *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3368-3369.
- Shi, H., Tsai, W.B., Garrison, M.D., Ferrari, S. ve Ratner, B.D. (1999), "Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition," *Nature* **398**, 593-597.

- Shi, Y. Zhang, J.-H., Shi, D., Jiang, M., Zhu, Y.-X., Mei, S.-R. ve Lu, B. (2006), "Selective solid-phase extraction of cholesterol using molecularly imprinted polymers and its application in different biological samples," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **42**, 549–555.
- Spivak, D. A. ve Shea, K.J. (1998) "Binding of Nucleotide Bases by Imprinted Polymers," *Macromolecules*, **31**, 2160.
- Steinke, J., Sherrington, D. Ve Dunkin, I. (1995), "Imprinting of synthetic polymers using molecular templates," *Adv. Polym. Sci.* **123**, 80-125.
- Şahin, M. (2005), *Çevresel ve biyolojik numunelerde anyon ve katyonların iletkenlik-iyon, potansiyometrik-iyon kromatografik hibrit sistemleriyle tayinlerinin araştırılması*, Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir
- Thorsén, G., Engström, A. ve Josefsson, B. (1997), "Enantiomeric determination of amino compounds with high sensitivity using chiral reagents (+) – and (—) -1-(9-anthryl)-2-propyl chloroformate" *Journal of Chromatography B*, **786**, 347-354.
- Ulrich, O. ve Grune, T. (1997) "Detection of 8-Hydroxydeoxyguanosine in K562 human hematopoietic cells by high-performance capillary electrophoresis," *Journal of Chromatography B*, **697**, 243-249.
- Vidyasankar, S., Ru, M. ve Arnold, F. H. (1997), "Molecularly imprinted ligand-exchange adsorbents for the chiral separation of underivatized amino acids," *J. Chromatog A.*, **775**, 51-63.
- Vlatakis G, Andersson LI, Müller R. ve Mosbach K. (1993), "Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting.," *Nature*, **18**; 361, 645–647.
- Whitcombe, M.J.; Rodriguez, M. E.; Villar, P. ve Vulfson, E. N. (1995), "A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol," *J. Am.. Chem. Soc.*, **117**, 7105.
- Wolman, F.J., Smolko, E.E., Cascone, O. ve Graselli, M. (2006), " Peptide imprinted polymer synthesized by radiation-induced graft polymerization," *Reactive and Functional Polymers*, **66**, 1199-1205.

- Wulff, G., Grobe-Einsler, R., Vesper, W. ve Sahran A. (1977), "Enzymeanalogue built polymers, 5. On the specificity distribution of chiral cavities prepared in synthetic polymers," *Makromol. Chem.*, **178**, 2799-2817.
- Wulff G. (2002) "Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers," *Chemical Reviews*, **102**, 1-25
- Yıldız, A., Genç, Ö. ve Bektaş, S., (1997), *Enstrümental Analiz Yöntemleri*, H.Ü. Yayınları, Ankara.
- Yin, B., Whyatt, R. M., Perera, F. P., Randall, M. C., Cooper T. B., ve Santella, R. M. (1995), "Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA," *Free Radical Biology and Medicine*, **18 (6)**, 1023-1032.
- Zeng, X. ve Ruckenstein, E. (1998), "Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations," *Journal of Membrane Science*, **148**, 195-205.
- Zhang, Z., Liao, H., Li, H. ve Yao, S. (2005), "Stereoselective histidine sensor based on molecularly imprinted sol-gel films," *Analytical Biochemistry*, **336**, 108–116.
- http://www.cosmobio.co.jp/exporte/products/kits/products_NNS_20060421_1.asp
<http://en.wikipedia.org/wiki/Cholesterol>
- Anderson, R.G. (2003). "Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology," *Trends Cell Biol.*, **13**, 534 – 9.
- Haines, T.H. (2001), "Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers," *Prog Lipid Res*, **40**, 299 – 324.
- Ockene, I.S., Chiriboga, D.E., Stanek, E.J., Nicolosi, R., Saperia G, Well, A.D, Freedson P, Merriam PA, Reed G, Ma Y, Matthews, C.E. ve Hebert, J.R.. (2004), "Seasonal variation in serum cholesterol levels: treatment implications and possible mechanisms," *Arch Intern Med*, **164**, 863 – 70.