

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
2013-DR-003

MİYOGLOBİN TEŞHİSİ İÇİN TAYİN KİTLERİNİN
ÜRETİMİ

Nevra ÖZTÜRK ATAY

Tez Danışmanları

Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER

Prof. Dr. Sinan AKGÖL

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE
AYDIN

Kimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Nevra Öztürk Atay tarafından hazırlanan Miyogloblin Teşhisi İçin Tayin Kitlerinin Üretimi başlıklı tez 11.03.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. A.Alev KARAGÖZLER	ADÜ
Üye : Prof. Dr. Sinan AKGÖL	EGE. Üniv
Üye : Doç. Dr. Erol AKYILMAZ	EGE. Üniv
Üye : Doç. Dr. Emin GÜNAY	ADÜ
Üye : Doç. Dr.Deniz AKTAŞ UYGUN	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

11/03/2013

Nevra ÖZTÜRK ATAY

ÖZET

MİYOGLOBİN TEŞHİSİ İÇİN TAYİN KİTLERİNİN ÜRETİMİ

NEVRA ÖZTÜRK ATAY

Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER

İkinci Danışman: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

2013, 126 sayfa

Bu çalışmanın amacı, nanoboyutta MIP temelli immün-teşhis sistemlerinin miyoglobinin teşhisinde kullanılması ve ticari olarak mevcut bulunan teşhis sistemlerinin dezavantajlarını ortadan kaldıran yüzey plazmon rezonans (SPR) nanosensörünün geliştirilmesidir. SPR nanosensör, altın yüzeyin miyoglobinin baskılanmış poli (hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-triptofan metil ester) poli(HEMA-MATrp) nanopartikülleri ile modifiye edilmesiyle hazırlanmıştır. Öncelikle, N-metakriloil-(L)-triptofan metil esteri sentezlenmiş ve NMR ve FTIR ile karakterize edilmiştir. MATrp ve miyoglobinin kalıp molekülü ön kompleksleştirilmiştir ve baskılanmış nanopartiküller, miniemülsiyon polimerizasyon reaksiyonu ile hazırlanmıştır. Ayrıca baskılanmamış nanopartiküller de hazırlanmıştır. Nanopartiküller, altın yüzeye tutturulmuştur. Hazırlanan SPR nanosensörler, AFM, elipsometre, FTIR, SEM ve temas açısı ölçümleriyle karakterize edilmiştir. Desorpsiyon çalışmaları, kesikli sistemde 1,0 M etilen glikol çözeltisi (20 mM pH 7.4 fosfat tamponu) ile gerçekleştirilmiştir. Nanosensörlerin miyoglobinin tayin duyarlılığı, miyoglobinin çözeltileri (20 mM pH 7.4 fosfat tamponunda) ve insan kanından araştırılmıştır. Plazma örneklerindeki miyoglobinin derişimi ELISA yöntemi ile kıyaslandığında % 70 doğrulukla belirlenmiştir. Farklı derişimlerdeki miyoglobinin çözeltileri adsorpsiyon kinetiklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Langmuir adsorpsiyon modeli, en uygun model olarak bulunmuştur. Miyoglobinin baskılanmış nanopartiküllerin seçiciliğini göstermek için miyoglobinin, sığır serum albümini (BSA) ve sitokrom c'nin yarışmalı adsorpsiyonu araştırılmıştır. Sonuçlar, baskılanmış nanosensörün miyoglobinin için yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Moleküler baskılama, nanopartikül, yüzey plazmon rezonans, miyoglobinin, nanosensör, kalp krizi.

ABSTRACT**PRODUCTION OF KITS FOR MYOGLOBINE DIAGNOSIS**

NEVRA ÖZTÜRK ATAY

Ph.D. Thesis, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER

Cosupervisor: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

2013, 126 pages

The aim of this study is to use MIP based immune-diagnostic systems for recognition of myoglobine and to develop surface plasmon rezonance (SPR) biosensor which could remove disadvantages of commercial diagnostic systems. SPR biosensor was prepared by modification of the gold surface of SPR nanosensor with myoglobine imprinted poly(hydroxyethylmetacrylate-N-methacryloyl-(L)-tryptophane methyl ester) poly (HEMA-MATrp) nanoparticles. In the first step, N-methacryloyl-(L)-tryptophane methyl ester (MATrp) monomer was synthesized and characterized by nücleer magnetic rezonance (NMR) and fourier transform infrared spectrophotometry (FTIR) analyses. MATrp monomer and template molecule myoglobine were precomplexed and the imprinted nanoparticles were prepared by miniemulsion polymerization. Non-imprinted nanoparticles were prepared without myoglobine for control experiments. The nanoparticles were immobilized to gold surface. Prepared SPR nanosensors were characterized with AFM, ellipsometer, FTIR, SEM and contact angle measurements. Desorption studies were performed by using 1.0 M ethylen glycol solution (20 mM pH 7.4 phosphate buffer). Nanosensors were determined with myoglobin solutions (in 20 mM pH 7,4 phosphate buffer) and in the plasma taken from a patient with myocardial infarction. Compared with the ELISA method, myoglobin concentration in the sample was determined 70 % accuracy. Myoglobin solutions with different concentrations were used to determine the adsorption kinetics. Langmuir adsorption model was found as the most suitable model for this system. In order to show the selectivity of the myoglobin imprinted nanoparticles, competitive adsorption of myoglobin, bovine serum albumin (BSA) and cytochrome *c* was investigated. The results show that the imprinted nanosensor has high selectivity and sensitivity for myoglobin.

Key Words: Molecular imprinting, nanoparticle, surface plasmon resonance, myoglobine, nanosensor, miyokard infarction.

ÖNSÖZ

Doktora tezi çalışmalarım boyunca bana her türlü imkanı sağlayan, desteğini esirgemeyen, lisans döneminden itibaren kendime örnek aldığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Alev Karagözler'e ,

Her zaman beni destekleyen ve bana güvenen, moralimi hep yüksek tutmamı sağlayan ve en önemlisi bugünlere gelmemde çok emeği geçen ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sinan Akgöl'e ,

Çalışmalarında Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nın olanaklarını sonuna kadar kullanmama izin veren, karşılaştığım her türlü sorunla ilgilenip çözüm getiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Yine çalışmalarında Uludağ Üniversitesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nın imkanlarından faydalanmamı sağlayan Uludağ Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Necati Beşirli'ye ,

Her ihtiyaç duyduğumda bıkmadan bana yardım eden, çalışmalarında bana yardımcı olan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Dr. Bilgen Osman'a ve çalışmalarım boyunca bana huzurlu bir laboratuvar ortamı sağlayan Arş. Gör. Aslı Göçenoğlu, Şenay Kök ve Emel Demirbel'e,

Her türlü destek ve yardımlarından dolayı sayın hocam Doç.Dr. Deniz Aktaş Uygun'a ve Adnan Menderes Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma grubuna,

Yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Lokman Uzun, Deniz Türkmen, Nilay Bereli, Gülsu Şener, Erkut Yılmaz, M. Emin Çorman'a ve tüm Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Araştırma grubuna,

Çalışmalarım sırasında beni her zaman maddi manevi destekleyen aileme, eşime ve varlığıyla bana moral olan kızım İnci'ye,

TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxviii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Reseptörler.....	1
1.1.1. Doğal Reseptörler.....	1
1.1.2. Yapay Reseptörler.....	1
1.2. Moleküler Baskılama.....	1
1.2.1. Non-Kovalent Yaklaşım.....	3
1.2.2. Kovalent Yaklaşım.....	3
1.2.2.1. Boronik Asit İle Baskılama.....	4
1.2.2.2. Karbonat Esterleri İle Baskılama.....	5
1.2.2.3. Asetal ve Ketallerle Baskılama.....	5
1.2.2.4. Schiff Bazları İle Baskılama.....	5
1.2.2.5. S-S Bağları İle Baskılama.....	5
1.2.2.6. Koordinasyon Bağları İle Baskılama.....	6
1.2.3. Yarı Kovalent Yaklaşım.....	6
1.3. Moleküler Baskılamayı Etkileyen Faktörler.....	6
1.3.1. Başlatıcılar.....	6

1.3.2. Çapraz Bağlayıcı.....	7
1.3.3. Kalıp Molekül.....	10
1.3.4. Fonksiyonel Monomer.....	10
1.3.5. Çözücü.....	12
1.4. Moleküler Baskılamanın Avantaj ve Dezavantajları.....	12
1.5. Protein Baskılama.....	13
1.5.1. Protein Baskılama Yaklaşımları.....	14
1.5.1.1. Proteinlerin Üç Boyutlu (3D) Baskılanması.....	14
1.5.1.2. İki Boyutlu (2D) Yüzey Baskılama.....	15
1.5.1.3. 2D Epitop Baskılama.....	15
1.6. Polimer Nanopartiküller.....	16
1.7. Ön Şekillendirilmiş Polimerlerin Dispersiyonu.....	17
1.7.1. Çözücü Buharlaştırma Yöntemi.....	17
1.7.2. Salting Out.....	17
1.7.3. Nanoçöktürme.....	18
1.7.4. Diyaliz.....	18
1.7.5. Süperkritik Sıvı Teknolojisi.....	18
1.7.5.1. Süperkritik çözeltilerin hızlı genleşmesi.....	19
1.7.5.2. Sıvı çözücülerdeki süperkritik çözeltilerin hızlı genleşmesi.....	19
1.8. Monomerlerin Polimerizasyonu.....	19
1.8.1. Emülsiyon Polimerizasyonu.....	19
1.8.1.1. Geleneksel Emülsiyon Polimerizasyonu.....	20
1.8.1.2. Sürfaktan Serbest Emülsiyon Polimerizasyonu.....	20
1.8.1.3. Mini Emülsiyon Polimerizasyonu.....	21
1.8.1.4. Mikro Emülsiyon Polimerizasyonu.....	22
1.8.2. Arayüzey Polimerizasyonu.....	22

1.8.3. Kontrollü/Yaşayan Radikal Polimerizasyonu (C/LRP).....	22
1.9. Baskılanmış Nanopartiküller.....	23
1.9.1. Çöktürme Polimerizasyonu.....	24
1.9.2. Mini- ve Mikro- Emülsiyon Polimerizasyonu.....	24
1.9.3. Çekirdek-Kabuk Polimerizasyonu.....	25
1.10. MIP Nanopolimerlerin Kullanım Alanları.....	25
1.11. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Tekniği.....	26
1.11.1. Yüzey Plazmon Rezonans'ın Teorisi.....	28
1.11.2. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi.....	30
1.11.3. Yüzey Plazmon Rezonans Sisteminin Klinik Kullanımda Diğerlerine Göre Avantajları.....	31
1.12. Miyogloblin.....	31
1.13. Kalp Krizi.....	33
1.14. Miyogloblinin Kalp Krizinin Erken Teşhisindeki Rolü.....	34
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	36
2.1. Moleküler Baskılama.....	36
2.1.1. Non-Kovalent Yaklaşım.....	36
2.1.2. Kovalent Yaklaşım.....	36
2.2. Protein Baskılama.....	36
2.3. Monomerlerin Polimerizasyonu.....	39
2.4. Baskılanmış Nanopartiküller.....	40
2.5. MIP Nanopolimerlerle Yapılmış Çalışmalar.....	40
2.6. MIP Temelli SPR Sensör Uygulamaları.....	41
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	43
3.1. Materyal.....	43
3.2. Yöntem.....	44

3.2.1. Metakriloil-amidotriptofan metil ester (MATrp) Monomerinin Sentezi.....	44
3.2.2. MATrp Monomerinin Karakterizasyonu.....	44
3.2.2.1. FTIR analiz.....	44
3.2.2.2. NMR analizi.....	44
3.2.3. MATrp-Mb Önkomplesinin Hazırlanışı.....	44
3.2.4. Poli (HEMA-MATrp) Nanopartiküllerinin Hazırlanışı.....	45
3.2.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	45
3.2.5.1. Zeta Boyut Analizi.....	45
3.2.5.2. Sentezlenen MIP Nanopartiküllerinin Yüzey Alanı Hesaplaması.....	46
3.2.5.3. Elementel Analiz.....	46
3.2.6. Yüzey Plazmon Rezonans Nanosensörler.....	47
3.2.6.1. Yüzey Plazmon Rezonans Sensör Yüzeyine Nanopartiküllerin Tutturulması	47
3.2.6.2. Kalıp Molekülün Desorpsiyonu.....	47
3.2.7. Yüzey Plazmon Rezonans Nanosensörlerin Karakterizasyon.....	48
3.2.7.1. FTIR-ATR analizi.....	48
3.2.7.2. Temas açısı analizi.....	48
3.2.7.3. AFM analizi.....	48
3.2.7.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi.....	49
3.2.7.5. Elipsometre Analizi.....	49
3.2.8. Miyoglobinin Baskılanmış Poli (HEMA-MATrp) Nanopartiküllerle Adsorpsiyon Çalışması.....	49
3.2.9. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Plazmon Ölçümleri.....	50
3.2.10. Nanosensörle Kinetik Analizler.....	51
3.2.10.1. Yarışmalı kinetik analizler.....	52
3.2.11. Poli (HEMA-MATrp) sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi..	52

3.2.12. Kan örneği ile Analizler.....	52
4. BULGULAR	54
4.1. MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	54
4.1.1. FTIR.....	54
4.1.2. NMR.....	55
4.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	56
4.3.1. Nanopartiküllerin Boyut Analizi.....	56
4.3.2. Yüzey Alanı Hesaplaması.....	57
4.4. Nanosensörlerin Karakterizasyonu.....	57
4.4.1. FTIR Analizi.....	57
4.4.2. Temas Açısı Analizi.....	58
4.4.3. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi (AFM).....	62
4.4.4. SEM analizi.....	65
4.4.5. Elipsometre Analizi.....	66
4.5. Miyoglobinin Spektroflorimetrik Analizi.....	66
4.6. Miyoglobin Baskılanmış Poli(HEMA-MATrp) SPR Nanosensör İle Kesikli Sistemde Adsorpsiyon Çalışması.....	67
4.7. Miyoglobin Baskılanmış Poli(HEMA-MATrp) SPR Nanosensör İle Kinetik Analizler.....	67
4.8. Denge ve Bağlanma Kinetik Analizleri.....	70
4.9. Denge İzoterm Modelleri.....	73
4.10. Yarışmalı Kinetik Analizler.....	76
4.11. Poli(HEMA-MATrp) Nanosensörün Baskılama Seçiciliği.....	81
4.12. Poli(HEMA-MATrp) SPR Nanosensörün Rejenerasyonu.....	86
4.13. Kan Örneği ile Kinetik Analizler.....	87
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	90
KAYNAKLAR.....	95

EK 1.....	115
EK 2.....	117
ÖZGEÇMİŞ.....	119

SİMGELER DİZİNİ

AA	Akrilik asit
AAm	Akrilamit
ABCHC	2,2'-azo-bis-(sikloheksil karbonitril)
ABDV	2,2'-azo-bis-(2,4-dimetil valeronitril)
AcOH	Asetik asit
AFM	Atomic Kuvvet Mikroskopy
AIBN	Azo-bis-izobütironitril
AMI	Akut Miyokard İnfarktüsü
AMPSA	2-akrilamido-2-metil-1-propan sülfonik asit
AN	Akrilonitril
AOT	1,4-bis (2-etilheksil) sülfosüksinat
ATR	Attenuated Total Reflectance
ATRP	Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu
BisA	Bisakrilat
BSA	Sığır Serum Albumin
C/LRP	Kontrollü/Yaşayan radikal polimerizasyonu
CK	Kreatin kinaz
CK-MG	Kreatin kinaz izoenzim miyogloblin
Cyt- <i>c</i>	Sitokrom <i>c</i>
DAP	1,4-diakriloil piperazin
DBTS	Dibenzotiofen
DEAEM	<i>N,N</i> -dietil aminoetil metakrilamid
DIM	Diiyodometan
DIP	1,3-diizopropenil
DMF	Dimetil florür
DMSO-d ₆	Dimetil sülfoksit-d ₆
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent analiz
EDMA	Etilen glikoldimetakrilat
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
Fab	Antigen Binding Fragments
FTIR	Fourier transform infrared
5-FU	5-floraurasil
Hb	Hemoglobin
HBsAb	Hepatit B yüzey antibadi

HEMA	2-hidroksietil metakrilat
HEMA-MATrp	2-Hidroksietil metakrilat metakriloil-amido-L-triptofan metil ester
HgH	İnsan büyüme hormonu
¹ H NMR	Proton Nükleer magnetik rezonans
QCM	Quartz Crystal Microbalance
LF	Langmuir-Freundlich
LOD	Tayin sınırı
LOQ	Tayin limiti
Lyz	Lizozim
MAA	Metakrilik asit
MAAP	Metakrilamido antipirin
MAH	N-Metakriloil-amido-L-histidin metil ester
Mb	Miyoglobin
MBisA	N,N'-metilenbisakrilamit
MI	Miyokardiyal infarktüs
MATrp	N-Metakriloil-amido-L-triptofan metil ester
MATrp-Mb	Metakriloil amido triptofan-miyoglobin
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
MIP-Fs	Baskılanmış polimer filmler
NIP-Fs	Baskılanmamış polimer filmler
NMP	Nitroksit ortamlı polimerizasyon
NMR	Nükleer magnetik rezonans
PEDMAH	poli (etilenglikol dimetakrilat-N-metakriloil-L-histidin metil ester)
PETEA	pentaeritritol tetraakrilat
PETRA	pentaeritritol triakrilat
PHDFDA	poliheptadekaflorodesil akrilat
PMMA	Polimetil metakrilat
PNP	Polimer nanopartikül
RAFT	Parçalama Transfer Zincir Polimerizasyonu
RESS	Süperkritik Çözeltilerin Hızlı Genleşmesi
RESOLV	Sıvı çözücülerdeki süperkritik çözeltilerin hızlı genleşmesi
RU	Rezonans birimi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu

SPCE	Yüzey Plazmon Bağlı Emisyon
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
SPW	Yüzey plazmon dalgaları
TDMA	Tetrametilen dimetakrilat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tf	Transferin
TFMAA	2 (triflorometil)-akrilik asit
TRIM	trimetilpropan trimetakrilat
UV	ultra viole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi.....	2
Şekil 1.2. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	9
Şekil.1.3.Kovalent olmayan baskılamada kullanılan bazı fonksiyonel monomerler.....	11
Şekil 1.4. Polimer nanopartiküllerin şematik görüntüsü.....	16
Şekil 1.5. Polimerik nanopartiküllerin sentez yöntemleri.....	17
Şekil 1.6. Mini-emülsiyon polimerizasyonu şeması.....	21
Şekil 1.7. Yüzey plazmonlarının uyarılması.....	27
Şekil 1.8. Sensogram: zamana karşı SPR açısının değişimi.....	27
Şekil.1.9.Yüzey plazmonların uyarılmasında kullanılan Kretschmann konfigürasyonu.....	30
Şekil 1.10. Miyoglobindeki α -heliks yapıları.....	32
Şekil 1.11. Hem grubunun moleküler yapısı.....	32
Şekil 1.12. Damardaki aterosklerozun zaman içinde ilerlemesi.....	34
Şekil 3.1. SPR sensör yüzeyine nanopartiküllerin tutturulması.....	47
Şekil 3.2. SPRimager II (GWC Technologies, Madison, ABD) yüzey plazmon rezonans sistemi.....	50
Şekil 3.3. GWC SPRimager II cihazının temel ekipmanları.....	51
Şekil 4.1. MATrp monomerinin sentez reaksiyonu.....	54
Şekil 4.2. MATrp Monomerinin FTIR spektrumu.....	55
Şekil 4.3. MATrp monomerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.....	56
Şekil 4.4. Nanopartiküllerin zeta boyut analizi.....	56
Şekil 4.5. MIP, MIP-Mb ve miyoglobinin FTIR spektrumları.....	58
Şekil 4.6. Temas açısı.....	58
Şekil 4.7. Su, etilen glikol, ve diiyodometan ile alınan temas açısı görüntüleri.	62
Şekil 4.8. Miyoglobin baskılanmamış SPR nanosensörünün yarı degen modda alınan AFM görüntüleri (a) Yüzey görüntüsü; (b) 3B görüntüsü.....	63

Şekil 4.9. Miyogloblin baskılanmış SPR nanosensörün yarı değen moda alınan AFM görüntüleri (a) Yüzey görüntüsü; (b) 3B görüntüsü.....	64
Şekil 4.10. (a) Altın yüzeyin SEM görüntüsü (b) Nanoküre kaplı altın yüzeyin SEM görüntüsü.....	65
Şekil.4.11.Doğal, desorbe ve denatüre miyogloblin çözeltilerinin spektrofiorimetre spektrumları.....	66
Şekil 4.12. Miyogloblin adsorpsiyonuna miyogloblin başlangıç derişiminin etkisi.....	67
Şekil 4.13. Miyogloblin çözeltileri ile poli(HEMA-MATrp) sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar.....	68
Şekil 4.14. Miyogloblin derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki.....	69
Şekil 4.15. SPR nanosensörünün derişim-sinyal grafiği.....	69
Şekil 4.16. Bağlanma kinetik yaklaşımı ile hız sabiti belirlenmesi.....	72
Şekil 4.17. Adsorpsiyon modelleri.....	74
Şekil 4.18. 1000 ng/ml derişiminde miyogloblin, sitokrom c ve sığır serum albumini (BSA) proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar.....	78
Şekil 4.19. 1000 ng/mL derişiminde miyogloblin, sitokrom c ve sığır serum albumini (BSA) proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile miyogloblin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar.....	82
Şekil 4.20. MIP damlatılmış altın çipin rejenerasyon sensogramı.....	86
Şekil 4.21. Kör örnek ve 300, 500, 700, 900, 1000, 1500 ng/mL miyogloblin derişimindeki kan örneklerinin poli(HEMA-MATrp) ile etkileştirilmesi ile elde edilen sensogram.....	88
Şekil 4.22. Standart katma yöntemi ile elde edilen miyogloblin derişimi-sinyal grafiği.....	88
Şekil 4.23. Standart katma yöntemi ile elde edilen miyogloblin derişimi / % ΔR grafiği.....	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kovalent ve non-kovalent yaklaşımın avantaj ve dezavantajları..	4
Çizelge 4.1. Yüzey enerjilerini hesaplamada kullanılan sabitler.....	61
Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri.....	72
Çizelge 4.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich Parametreleri....	76
Çizelge 4.4. Kalıp ve yarışmacı proteinlerin molekül ağırlığı , izoelektrik nokta ve moleküler boyutları.....	77
Çizelge 4.5. Miyoglobine göre BSA ve sitokrom <i>c</i> için seçicilik ve bağlı seçicilik kat sayıları.....	86

1. GİRİŞ

Spesifik moleküler tanıma, hem biyolojik açıdan hem de fonksiyonel açıdan kontrol sağlayan bir prostestir (Turner vd., 2006). Moleküler baskılama metodu ise, çok yönlü reseptörleri etkin ve ekonomik olarak sağlamak için son yıllarda gelişmiş bir metoddur. Reseptörler doğal reseptörler ve yapay reseptörler şeklinde sınıflandırılabilirler.

1.1. Reseptörler

1.1.1. Doğal Reseptörler

Vücudumuzda pek çok hücre ve molekül vardır ve hepsi muazzam bir düzen içinde işbirliği yaparak çalışmaktadır. Bu karşılıklı anlama ve işbirliği olmadan yaşam düşünülemez. Bu yüzden, moleküler tanıma yaşamın varlığı için önemlidir (Komiya vd., 2003). Örneğin, reseptör-hormon, antibadi-antijen, enzim-substrat, protein-protein etkileşimleri moleküler tanıma ile gerçekleşir.

1.1.2. Yapay Reseptörler

Doğadaki moleküler tanımanın güzelliği, bilim adamlarını onu taklit etmeye teşvik etmiştir. Yapay reseptörlerin doğal reseptörlere göre üstünlüklerinden bir tanesi moleküler dizayn serbestliğidir. İhtiyaca göre kararlılık, esneklik ve diğer özellikler ayarlanabilir (Komiya vd., 2003).

Moleküler tanıma sağlayabilmek için gerekli faktörler Cram, Lehn ve Pederson (1987'de Nobel ödülü kazanan bilim adamları) tarafından aşağıdaki gibi belirlenmiştir (Lehn, 1995):

- 1) Reseptör ve hedef molekülün fonksiyonel grupları birbirine komplementer olmalıdır.
- 2) Her iki bileşenin konformasyonel serbestliği minimuma indirilmelidir.
- 3) Kimyasal koşullar uygun şekilde ayarlanmalıdır.

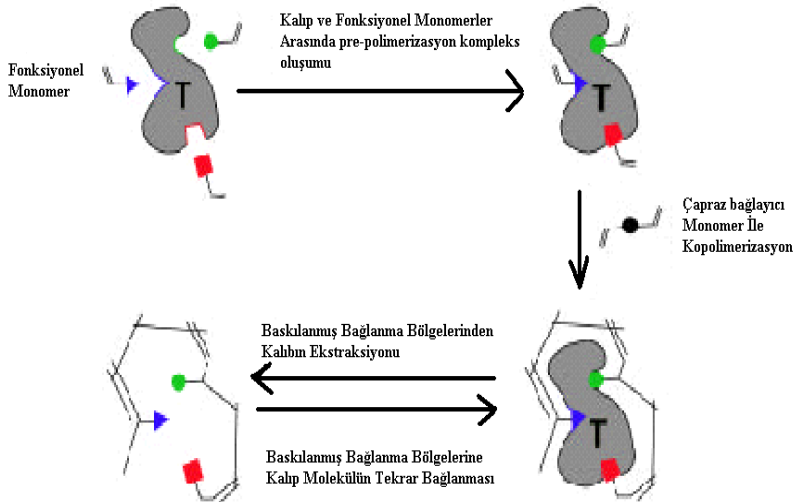
Hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler, apolar etkileşimler gibi etkileşimler olsa da seçicilikleri ve bağlanma güçleri yüksektir.

1.2. Moleküler Baskılama

Moleküler baskılama, son yıllarda, sentetik tanıma kimyasının bir branşı olarak hızla gelişmektedir (Su vd., 2009). Kimya alanında, genellikle analiz ve

ayrımalarında, hedef moleküle olan yüksek seçiciliği ve yüksek afinitesi nedeniyle artan bir ilgi toplamaktadır (Andersson, 2000; Jiang vd., 2007).

Moleküler baskılama, sentetik bir polimerde seçici bağlanma bölgeleri oluşturmaya dayalı bir tekniktir (Wulff ve Sarhan, 1972; Aburto ve LeBorgne., 2004). Prensibi, şekil ve fonksiyon açısından kalıp molekül ile tamamen uyuşabilen oyuklar oluşturmayı içermektedir. Fonksiyonel monomer ve kalıp arasında oluşturulmuş önkomplesin çapraz bağlayıcı tarafından sarılması ile başarılabilir. Polimerden kalıp molekülün uzaklaştırılmasından sonra geride kalan oyuk, kalıp moleküle özgüdür (A'Vila vd., 2008).



Şekil 1.1. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi

Moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) sentezleme tekniği kolaydır, ucuzdur ve elde edilen polimerler, yüksek seçicilik, mükemmel mekanik güç, ısı, pH gibi koşullarda dayanıklılık gibi özelliklere sahiptir (A'Vila vd., 2008). Bu özellikler, moleküler baskılanmış polimerlerin, katı faz ekstraksiyonu (Urraca vd., 2007), sensörler (Villoslada ve Urraca, 2007), analitik ve elektroforetik ayırılarda durgun faz ve yapay antibadi üretimi (Guilbault ve Mascini, 1993; Kempe, 1996; Arce vd., 2007) gibi çeşitli alanlarda kullanımına olanak sağlar.

Moleküler baskılanmış polimerler üç farklı baskılama yaklaşımı ile sentezlenebilirler: non-kovalent, kovalent ve yarı-kovalent (Jiang vd., 2007).

1.2.1. Non-Kovalent Yaklaşım

Non-kovalent yaklaşım, ilk kez Arshady ve Mosbach (1981) tarafından tanıtılmıştır. Bu yaklaşım, polimerizasyondan önce, seçilen monomerler ve kalıp molekül arasındaki zayıf ve non-kovalent etkileşimlere dayanır (Jiang vd., 2007). Non-kovalent baskılama, çözeltideki kalıp ve fonksiyonel monomerlerin etkileşimini sağlamak üzere, van der Waals kuvvetleri, dipol-dipol etkileşimleri, iyonik etkileşimler, hidrojen bağları gibi tipik molekül içi etkileşimlerden oluşur (Mayes ve Whitcombe, 2005). Kalıp molekül, polimerizasyondan sonra kolayca basit bir ekstraksiyon ile uzaklaştırılabilir. Önemli pekçok molekül (herbisitler, biyolojik olarak aktif maddeler v.b.) hidroksil, karboksil, amino ve amid gibi non-kovalent etkileşim için gerekli polar gruplara sahiptirler. Non-kovalent yaklaşım çok fazla kullanılmaktadır çünkü basit ve çok yönlüdür (Wulff ve Sarhan, 1972), polimerizasyonun ardından kalıbın desorbe edilmesi kolaydır ve fazla sayıda afinite bölgesi oluşturulabilir (Jiang vd., 2007).

Son birkaç yıldır, non-kovalent baskılamada pek çok farklı fonksiyonel monomer test edilmiştir. En fazla kullanılan fonksiyonel monomer ilk kez Cormack ve Mosbach (1999) tarafından yayınlanmış olan metakrilik asittir. Kullanılan diğer asidik monomerler, 4-vinil benzoik asit (Andersson vd., 1984), akrilik asit (Zhou vd., 2000), 2-akrilamido-2-metil-1-propansülfonik asit (AMPSA) (Steinke vd., 1996), (2-triflorometil) akrilik asit (Guo ve He, 2000), itakonik asit (Suedee vd., 1999), 2-(metakriloiloksi) etil fosfat'dır (Kugimiya vd., 2001). Bazik monomerlerden 4-vinilpiridin en fazla kullanılanıdır (Chen vd., 2000). N,N-dietilaminoetil metakrilat (Tarbin ve Sharman, 2001), aminostiren (Ju vd., 1999) ve vinilimidazol (Mathew ve Buchardt, 1995) de bazik monomerler arasındadır. Nötral monomerlerden, akrilamid (Zhang vd., 2001), vinil piroldon (Sreenivasan ve Sivakumar, 1997) ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) (Sreenivasan, 1999) kullanılmaktadır.

1.2.2. Kovalent Yaklaşım

Kovalent yaklaşım üç basamakta gerçekleştirilir:

-Fonksiyonel monomer ve kalıp molekülün önkomplesleştirilmesi ile aralarında kovalent bağ oluşturulması.

- Bu oluşan önkomplesin uygun koşullar altında polimerize edilmesi.

- Kovalent bağı kırılıp, kalıp molekülün uzaklaştırılması.

Kovalent yaklaşımda, fonksiyonel monomer ve kalıp arasında iletişimi sağlayan kovalent bağ seçimi çok önemlidir. Bu kovalent bağ çok kararlı olmalı ve polimerizasyon esnasında bütünlüğünü korumalıdır fakat daha sonra baskılama işlemine zarar vermeden, uygun koşullar altında, kolayca kırılmalıdır (Komiya vd., 2003).

Çizelge 1.1'de kovalent ve non-kovalent yaklaşımın avantaj ve dezavantajları gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Kovalent ve non-kovalent yaklaşımın avantaj ve dezavantajları (Komiya vd., 2003)

	Kovalent Yaklaşım	Non-kovalent yaklaşım
Monomer-Kalıp Önkomplesinin Sentezi	Önemli	Önemli Değil
Polimerizasyon koşulları	Daha serbest	Çok sıkı
Polimerizasyonun ardından kalıp molekülün uzaklaştırılması	Zor	Kolay
Kalıp molekülü bağlama ve salma	Yavaş	Hızlı
Kalıp bağlama bölgesinin yapısı	Temiz	Daha az temiz

1.2.2.1. Boronik asitle baskılama

Boronik asit esterleri boronik asit ve cis-1,2- veya cis-1,3-diol bileşikleridir. Oluşumları ve ayrışmaları hızlıdır. İstenen konformasyonda kovalent konjugatlara uymak için yeteri rijitlikte 5 siklik yapısı vardır. Bu yüzden etkili bir moleküler baskılama aracı olduğu düşünülmektedir. Polimerizasyondan sonra bu bağlar hidroliz ile kırılır ve konjugatlardaki boronik gruplar hedefe bağlanmak için uygun yerlere yönelir (Komiya vd., 2003).

1.2.2.2. Karbonat esterleriyle baskılama

Karbonat esterleri karboksilik asit esterlerinden daha az kararlıdır ve 1.0 M NaCl çözeltisi ile metanolde tamamen hidroliz olabilir (Komiyama vd., 2003). Karbonat esterleri, Shea vd. (1980) ve Domen ve Neckers (1980) tarafından karboksilik ester bağları kullanılarak baskılanmıştır. Yavaş bağlanma kinetiği ve aktive olmuş ara ürünlere olan gereksinim nedeniyle kısıtlamalara sahiptir (Alexander vd., 2006).

1.2.2.3. Asetal ve ketallerle baskılama

Keton ve aldehit bileşikleri, 1,3-diol bileşikleri ile reaksiyona girerler ve fonksiyonel monomer olarak ketal ve asetal ürünleri oluşur. Baskılanmış polimerin hedef bağlanma bölgesinde, hedefe komplementer olarak 1,3-diol grupları bağlanır (Komiyama vd., 2003).

1.2.2.4. Schiff bazları ile baskılama

Aldehit bileşikleri, Schiff bazı oluşturmak üzere, amino grupları ile reaksiyona girerler. Alternatif olarak, bağlanma bölgelerindeki amino grupları aldehit bileşiklerine bağlanabilir. Ayrıca ek bir aktivasyona gerek duyulmaz. Amino asitler (Wulff vd., 1984; Wulff ve Vietmeier, 1989) ve mono- ve di-aldehitler (Wulff vd., 1986; Shea vd., 1990) bu yaklaşım ile baskılanmıştır. N-(5-vinilsalisiliden)-L-fenilalanin metilesteri kullanılarak böyle bir çalışma denenmiştir (Wulff ve Vietmeier, 1989). Fakat, kovalent bağdan kaynaklanan desorpsiyon güçlüğü, kromatografi gibi potansiyel uygulamalar için yavaştır.

1.2.2.5. S-S bağları ile baskılama

Bu bağlar polimerizasyon şartlarında yeterince kararlıdır fakat indirgenme ile kolayca kopabilir. Baskılanmış polimerdeki -SH (sülfidril) grupları hedef moleküle bağlanır. İlginç özelliklerden birisi de, hedefteki -OH (hidroksil) grupları ve -SH gruplarının güçlerinin farklılığıdır. -SH, -OH arasındaki H bağları,-SH ile-SH arasındakinden daha güçlüdür. Bu yüzden, baskılanmış polimerler, -SH gruplarına oranla -OH gruplarını tercih ederler (Komiyama vd., 2003).

1.2.2.6. Koordinasyon bağları ile baskılama

Metal iyonları ve ligandlar arasındaki bazı koordinasyon bağları kovalent baskılama için yeterli kararlılığa sahiptir. Vinil grupları metal komplekse bağlanır ve polimerize edilebilir metal kompleksler fonksiyonel monomer olarak kullanılabilir. Bunlar, uygun ligand (kalıp) varlığında polimerize edilirler. Ligand uzaklaştırıldıktan sonra, aynı koordinasyon bağı ile hedef molekül bağlanır.

1.2.3. Yarı Kovalent Yaklaşım

Yarı kovalent yaklaşım, non-kovalent ve kovalent yaklaşımın hibritleşmesi ile oluşmuştur. Polimerizasyondan önce, fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasında kovalent bağlar oluşturulur. Polimer matriksten kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra, analitin moleküler baskılanmış polimere tekrar bağlanması non-kovalent etkileşimlerle gerçekleşir (Caro vd., 2006).

Yarı kovalent yaklaşım 2 şekilde uygulanabilir (Caro vd., 2006):

- 1) Kalıp molekül ve monomerin doğrudan bağlanması
- 2) Kalıp molekülün ve monomerin uzatıcı bir kol aracılığıyla bağlanması.

Whitcombe vd. (1994), bağlanma bölgesinin kalabalıklığından kaçınmak ve non-kovalent geri bağlanmanın sterik engelsiz gerçekleşmesi için uzatıcı kol yaklaşımını gerçekleştirmişlerdir. Bu yaklaşım, salisilik asit gibi büyük moleküllerin baskılanmasında da kullanılabilir (Caro vd., 2006)

1.3. Moleküler Baskılamayı Etkileyen Faktörler

1.3.1. Başlatıcılar

Genellikle, serbest radikal polimerizasyonunu başlatan başlatıcılar moleküler baskılamada kullanılabilir; fakat kalıp molekülün termal veya fotokimyasal kararlılığına göre kullanılan başlatıcı türü değişebilir. Divinilbenzen (DVB) ve (met)akrilat temelli MIP'lerin sentezinde serbest radikal kaynağı olarak azo-başlatıcıların termal bozunması en fazla kullanılan yöntemdir. Azo-bis-izobütironitril (AIBN) standarttır (Caro vd., 2006). Bu bileşiğin fotokimyasal bozunması, MIP'lerin daha düşük sıcaklıkta hazırlanmasına olanak sağlar (Sellergren ve Shea , 1993) ve polimerin ayırma etkinliğinde artış gözlenir. 2,2'-azo-bis-(2,4-dimetilvalero nitril) (ABDV)'nin termal bozunma sıcaklığı AIBN'den

daha düşüktür; böylece termal polimerizasyon 40°C’de başlayabilir (O’Shannessy vd., 1989). 2,2'-azo-bis-(sikloheksilkarbonitril) (ABCHC) başlatıcısının düşük sıcaklıklardaki çözünürlüğü AIBN’ye göre daha iyidir bu da fotokimyasal başlamada bir avantajdır (Skudar vd., 1999). 4,4'-azobis (4-siyanopentonoik asit) gibi azo başlatıcıları, MIP’lerin kapilere (Schweitz, 2002) veya silika kürelere (Quaglia vd., 2001) aşılması için yüzeye tutturulur. Benzoil peroksit (Haginaka vd., 1998) ve lauril peroksit (Hirayama vd., 2002) gibi organik peroksitleri içeren diğer temel başlatıcılar ve amonyum (Pe’ rez vd., 2000) veya potasyum persülfat (Asanuma vd., 2001) gibi suda çözünebilir inorganik başlatıcılar tek başına veya N,N, N', N'- tetrametilendiamin (TEMED) (Hart ve Shea, 2002) ile kullanılabilir. Kullanılan diğer fotobaşlatıcılar ise benzofenon (Piletsky vd., 2000), 2,2'-dimetoksi-2-fenilasetofenon (Striegler, 2002), benzoin etil eter (Kochkodan vd., 2001) ve 2,4,6-trimetilbenzolfenilfosfinat (Li vd., 2003) dir.

1.3.2. Çapraz Bağlayıcı

Moleküler baskılamada çapraz bağlayıcının üç önemli görevi vardır:

1) Çapraz bağlayıcı ajan, polimer matriksin morfolojisinin kontrolünde büyük önem taşır. Buna göre polimer, jel formunda, makro gözenekli formda veya mikrojel pudra formunda sentezlenebilir.

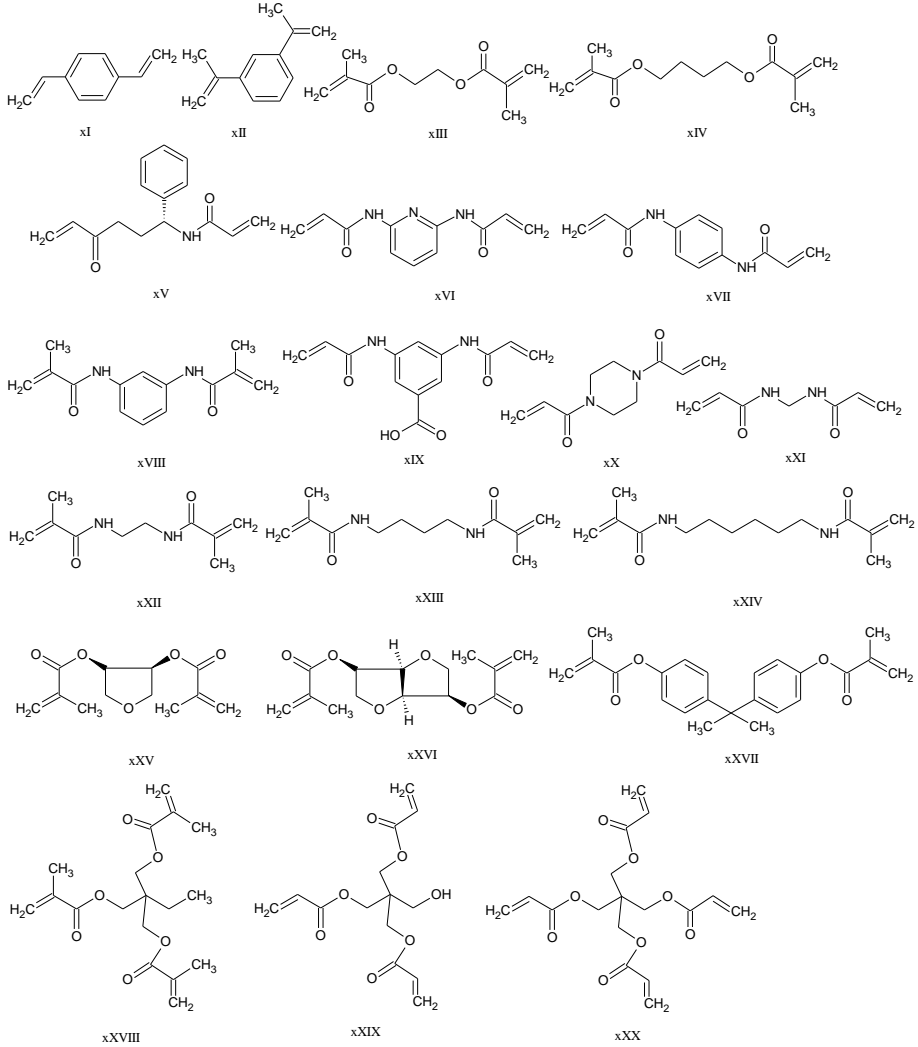
2) Çapraz bağlayıcı ajan, baskılanmış bölgelerin kararlılığında rol oynar.

3) Çapraz bağlayıcı ajan, polimer matrikste mekanik kararlılık sağlar (Cormack ve Elorza, 2004).

Etkili bir bağlanma için, çapraz bağlayıcı ajanın reaktivitesi fonksiyonel monomerinkine benzer olmalıdır (aksi halde, ya fonksiyonel monomer ya da çapraz bağlayıcı ajan ağırlıklı olarak polimerleşir, ve kopolimerizasyon yeterli derecede gerçekleşemez). Uygun çapraz bağlayıcı ajan seçilerek, kopolimerizasyon başarıyla başlar ve fonksiyonel gruplar (fonksiyonel monomerlerden türeyen) polimer ağda eşboyutta dağılırlar (Komiya vd., 2003). Yüksek oranlarda kullanılan çapraz bağlayıcı miktarları, gözenekli materyellerin sentezlenmesinde ve mekanik kararlılıklarında rol oynar. Bu yüzden, moleküler baskılanmış polimerlerin % 80’in üzerinde çapraz bağlayıcı içermesi normaldir (Cormack ve Elorza, 2004). Çapraz bağlayıcının fonksiyonel monomere mol oranları da önemlidir. Eğer oran çok küçükse, kalıp bağlanma

bölgeleri birbirine çok yakın yer alır, bu da bağımsız çalışmalarını engeller. Aşırı durumlarda, kalıp bağlanan bir bölge komşu bölgeyi tamamiyle inhibe eder. Çok büyük mol oranlarında, çapraz bağlayıcı ajan, fonksiyonel monomer veya kalıpla non-kovalent etkileşim sergilediğinde baskılama etkinliği zarar görür (Komiya vd., 2003).

MIP çalışmalarında, pek çok sayıda çapraz bağlayıcı ajan kullanılmaktadır. Ve bu ajanlar şekil 1.2'de gösterilmektedir. Bunların arasında en fazla kullanılanlar, divinilbenzen (DVB) ve etilen glikol dimetakrilat (EDMA)'dır.



Şekil 1.2. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar

xI: *p*-divinilbenzen (DVB); **xII:** 1,3-diizopropenil benzen (DIP); **xIII:** etilen glikol dimetakrilat (EDMA); **xIV:** tetrametilen dimetakrilat (TDMA); **xV:** *N,O*-bisakriloil-*l*-fenilalaninol; **xVI:** 2,6 bisakriloilamidopiridin; **xVII:** 1,4-fenilen diakrilamid; **xVIII:** *N,N*-1,3-fenilenbis(2-metil-2-propenamid) (PDBMP); **xIX:** 3,5-bisakrilamido benzoik asit; **xx:** 1,4-diakriloil piperazin (DAP); **xxI:** *N,N*-metilen bisakrilamid (MDAA); **xxII:** *N,N*-etilen bismetakrilamid; **xxIII:** *N,N*-tetrametilen bismetakrilamid; **xxIV:** *N,N*-heksametilen bismetakrilamid; **xxV:** anhidroeritritol dimetakrilat; **xxVI:** 1,4;3,6-dianhidro-*d*-sorbitol-2,5-dimetakrilat; **xxVII:** izopropilenbis (1,4-fenilen) dimetakrilat; **xxVIII:** trimetilpropan trimetakrilat (TRIM); **xxIX:** pentaeritritol triakrilat (PETRA); **xxx:** pentaeritritol tetraakrilat (PETEA) (Osman, 2011).

1.3.3. Kalıp Molekül

Fonksiyonel monomerlerdeki fonksiyonel grupların organizasyonunu direkt etkilediğinden tüm moleküler baskılama proseslerinde kalıp molekülün önemi çok büyüktür. Pek çok nedenle, her kalıp molekül baskılanmaya uygun olmayabilir. Serbest radikal polimerizasyonuna uygunluk açısından, polimerizasyon şartları altında, kalıp molekül kimyasal olarak inert olmalıdır aksi takdirde alternatif baskılama stratejileri geliştirilmesi gerekebilir (Cormack ve Elorza, 2004).

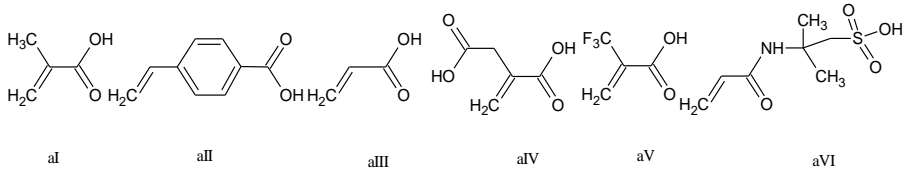
Kullanılacak kalıp molekülün özellikleri için şu sorular sorulmalıdır:

- 1) Kalıp molekül herhangi bir grup içeriyor mu?
- 2) Kalıp molekül, tiol grubu veya hidrokinon grubu gibi polimerizasyonu inhibe edecek ya da geciktirecek fonksiyonel grup içeriyor mu?
- 3) Kalıp molekül, polimerizasyonun gerçekleştiği yüksek sıcaklıklarda (AIBN'nin başlatıcı olarak kullanıldığı 60 °C civarı gibi) veya UV (ultra viole) ışık altında kararlılığını koruyabiliyor mu (Cormack ve Elorza, 2004) ?

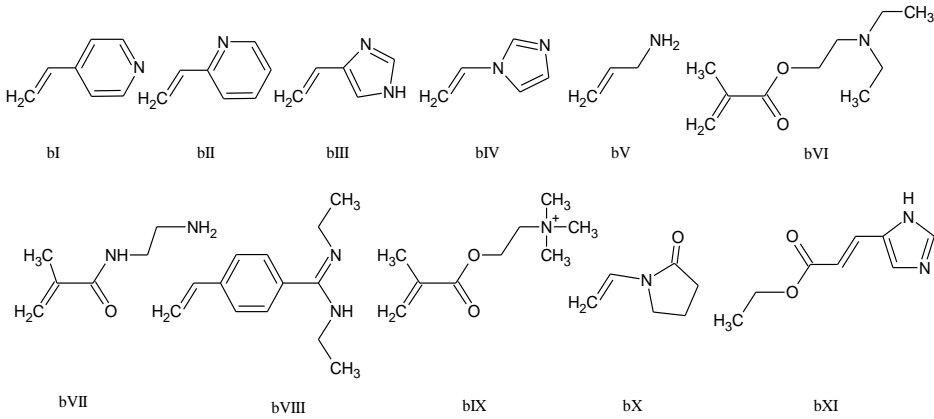
1.3.4. Fonksiyonel Monomer

Fonksiyonel monomerler, baskılanmış bölgelerdeki bağlanma etkileşimlerinden sorumludur ve non-kovalent moleküler baskılama protokollerinde, kalıp molekül ile fonksiyonel monomer etkileşimini arttırmak için sıkça kullanılır (kalıp/fonksiyonel monomer oranı 1:4 veya üzerinde olması normaldir). Kompleks oluşumunu maksimuma çıkarmak ve dolayısıyla baskılama etkinliğini arttırmak için, kalıp molekülün işlevi ve fonksiyonel monomerin işlevinin uyumluluğu da çok önemlidir. Kokteyl polimerizasyonunda, iki veya daha fazla fonksiyonel monomer kullanılan durumlarda, monomerlerin reaktivite oranlarının kopolimerizasyona uygulanabilir olduğundan emin olmak gerekir. Çok çeşitli yapıda ve polaritede fonksiyonel monomer ticari olarak mevcuttur ve daha fazlasının dizayn edilmesi mümkündür (Cormack ve Elorza, 2004). Şekil 1.3'de çeşitli yapıda ve polaritede fonksiyonel monomerler gösterilmektedir.

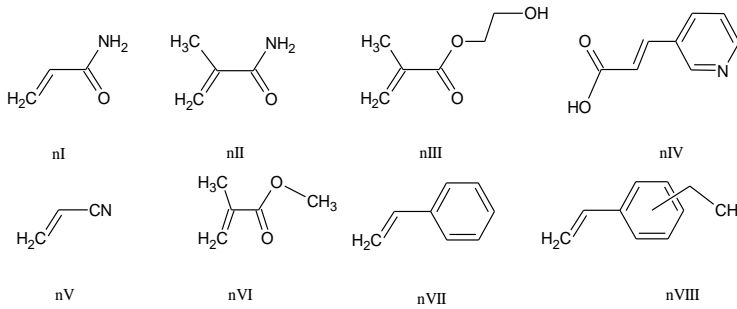
Asidik (a)



Bazik (b)



Nötral (n)



Şekil 1.3. Kovalent olmayan baskılamada kullanılan bazı fonksiyonel monomerler

Asidik; aI: metakrilik asit (MAA); **aII:** *p*-vinilbenzoik asit; **aIII:** akrilik asit (AA); **aIV:** itakonik asit; **aV:** 2 (triflorometil)-akrilik asit (TFMAA); **aVI:** akrilamido-(2-metil)-propan sulfonik asit (AMPSA). **Bazik; bI:** 4-vinilpiridin (4-VP); **bII:** 2-vinilpiridin (2-VP); **bIII:** 4-(5)-vinil imidazol; **bIV:** 1-vinil imidazol; **bV:** allilamin; **bVI:** *N,N*-diethyl aminoetil metakrilamid (DEAEM), **bVII:** *N*-(2-aminetil)-metakrilamid; **bVIII:** *N,N*-diethyl-4-stirilamidin; **bIX:** *N,N,N*-trimetil aminoetilmetakrilat; **bX:** *N*-vinilpirrolidon (NVP); **bXI:** urokanik etil ester. **Nötral; nI:** akrilamid; **nII:** metakrilamid; **nIII:** 2-hidroksietil metakrilat (2-HEMA); **nIV:** trans-3-(3-piridil)-akrilik asit; **nV:** akrilonitril (AN); **nVI:** metil metakrilat (MMA); **nVII:** stiren; **nVIII:** etilstiren (Cormack ve Elorza, 2004).

1.3.5. Çözücü

Çözücülerin en basit rolleri, polimerizasyon için gerekli bileşenleri çözmektir. Fakat, daha kritik rolleri de vardır. Bunlardan bir tanesi, baskılanmış polimerlere gözenekli yapılar sağlamak ve kalıp bağlanma hızlarını arttırmaktır. Bağlanan kalıp molekülün polimerden salımı da gözeneklilik ile ilgilidir. Polimerizasyonda, çözücü molekülleri polimer içine girer ve sonraki işlemlerle uzaklaştırılır. Polimerler, çok sıkı ve yoğun çözücülerin ve zor bağlanan kalıpların yokluğunda hazırlanırlar. Reaksiyon karışımının sıcaklığı lokal olarak yüksektir ve istenmeyen bölge reaksiyonları burada başlar. Çözücülerin başka bir rolü, polimerizasyonu yöneten reaksiyon ısısını dağıtmaktır. Dahası, monomer-kalıp bileşiğinin oluşumu ki bu etkili bir non-kovalent baskılama için gereklidir - baskı altına alınmıştır (Komiya vd., 2003).

Çözücü seçimi baskılama çeşidine bağlıdır. Kovalent baskılamada, tüm bileşenleri çözene kadar pek çok çözücü tipi uygulanabilir. Non-kovalent baskılamada, çözücü seçimi daha kritiktir çünkü fonksiyonel monomer ile kalıp arasında non-kovalent bağların oluşumu gereklidir ve böylece baskılama etkinliği artar. Kloroform, çok fazla kullanılan çözücülerden bir tanesidir çünkü pek çok monomeri ve kalıbı çözebilir ve hidrojen bağlarını iyice baskılar. Fakat, ticari olarak bulunan kloroform, depolama esnasında zehirli fosgen oluşumunu engellemek için etanol ile stabilize edilir. Bu etanol, genelde moleküler baskılamada uygun değildir (genellikle non-kovalent baskılamada), bu yüzden monomer ve kalıp arasındaki hidrojen bağlarını inhibe eder. İyi sonuçlar elde etmek için, ticari kloroform, etanol uzaklaştırılmadan önce destile edilmelidir. Karbontetraklorür moleküler baskılama için uygun değildir. Radikal polimerizasyonda, zincir transfer ajanıdır ve polimerlerin moleküler ağırlığı düşer (Komiya vd., 2003). Toluene gibi apolar, aprotik çözücüler hidrojen bağlarının oluşumunu stabilize ederken, kompleksleşme için hidrofobik etkileşimden yararlanılacaksa su iyi bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır (Cormack ve Elorza, 2004).

1.4. Moleküler Baskılamanın Biyolojik Reseptörlere Göre Avantaj ve Dezavantajları

Moleküler baskılanmış materyallerin biyolojik reseptörlere göre pek çok avantajı vardır. Boyutlarına bağlı olarak moleküler baskılanmış materyallerin binlerce veya

milyonlarca bağlanma bölgeleri vardır; biyolojik reseptörlerin ise bir veya birkaç tane bağlanma bölgesi vardır (Jiang vd., 2007). Moleküler baskılanmış materyaller kararlı ve dayanıklıdır (Jiang vd., 2007). Moleküler baskılanmış materyaller olağanüstü çevresel koşullarda (yüksek sıcaklık, pH ve iyonik şiddet) kararlılıklarını koruyabilmekteyken biyolojik reseptörler bu koşullarda kararlılıklarını koruyamamaktadır (Svenson ve Nicholls, 2001).

Moleküler baskılanmış materyallerin dezavantajları da vardır. Örneğin, kalıp molekülün tamamen polimerden uzaklaştırılması zordur, baskılanmış polimer çözünmez yapıdadır, baskılanmış polimer yapısında pek çok boşluk bulundurur ki bunların az bir kısmı kalıp molekül ile birebir uyuşabilir. Bu sebeplerden dolayı, son yıllarda pek çok sentetik metod geliştirilmiştir (Haupt, 2002; Jiang vd., 2007).

1.5. Protein Baskılama

Küçük moleküllerin baskılandığı çok fazla sayıda moleküler baskılanmış polimerler sentezlenmişken, protein kalıplara yönelik moleküler baskılamalar henüz çok başarılı değildir. Protein kalıba, fonksiyonel açıdan tümüyle komplementer bir baskı yaratmak zor bir olasılıktır (Hansen, 2007). Protein baskılama üzerine ilk yayın 1985 yılında çıkmıştır (Glad vd., 1985) ve daha sonraki yıllarda da takip eden yayınlar çıkmıştır.

Protein baskılama protein kalıplarının özelliklerine bağlı olarak bazı kısıtlamalara sahiptir (Bossi vd., 2007):

- 1) Proteinler suda çözünen bileşikler olduğundan polimer sentezinde organik çözücülerin kullanıldığı MIP tekniğine her zaman uygun değildir.
- 2) Proteinler esnek yapı ve konformasyonları nedeniyle sıcaklık değişimi ve herhangi bir çevresel değişimden kolayca etkilenirler. Bu özelliklerden dolayı termodinamik ve pratik açıdan da baskılama zorlaşmaktadır.
- 3) Proteinler, fonksiyonel monomerler ile etkileşime girebilecek çok sayıda fonksiyonel gruba sahiptir.
- 4) Protein gibi büyük moleküllerin kullanıldığı moleküler baskılamada moleküler tanımayı başarıyla gerçekleştirmek için yüksek oranda çapraz bağlayıcı kullanılması gerekmektedir. Bu yüzden kalıp molekül polimerizasyonunun ardından kolayca desorbe edilememektedir. Genellikle yüzey baskılama yöntemi tercih edilmektedir (Bergmann ve Peppas, 2008).

1.5.1. Protein Baskılama Yaklaşımları

1.5.1.1. Proteinlerin (üç boyutlu) 3D baskılanması

3D Baskılama yöntemi, kütle (yığın) polimerizasyonu olarak da bilinmektedir. Bu yöntemde protein, 3 boyutlu yapısı ile tam olarak baskılanmaktadır ve geri bağlanması da aynı şekilde gerçekleşmektedir. Baskılanmış sistemin ana ihtiyacı, kalıp molekülün kolayca uzaklaştırılabilmesi ve baskılanmış bölgeye kolayca tekrar bağlanabilmesidir.

Akrilatlar, hidrojeller, soljeller ve hibritler, 3D protein baskılama stratejilerinde kilit rolindedir.

Akrilatlar

Protein baskılanmış polimerler hazırlamak üzere geleneksel akrilatlar pek çok sayıda çalışmada kullanılmıştır. Bu yaklaşımın en önemli dezavantajı, proteinlerin genellikle içinde çözünmedikleri çözücülerin kullanılmasıdır. Ek olarak, protein organik çözücülerde sudaki konformasyonlarından farklı bir konformasyon sergiler. Bu da sulu ortamdaki MIP etkinliğini etkileyebilir. Bu yüzden elektroforetik jellere benzer MIP'lerin hazırlanması için suda çözünebilir akrilik monomerler kullanılmıştır (Turner vd., 2006).

Akrilat kimyasını protein baskılamada kullanmanın temeli, büyük moleküllerin mobilitesi için düşük doz çapraz bağlayıcılar kullanılarak oluşturulan jellere dayanır. Fakat düşük doz çapraz bağlayıcı ile sentezlenmiş materyaller hızla baskılanma özelliklerini kaybederler ve değişen çevresel koşullara karşı daha az kararlılık gösterirler. Akrilatlar ile yapılan çalışmalarda uygun monomeri bulmak ta zordur bu yüzden yeni materyallere gereksinim duyulmaktadır (Conrad ve Shea, 2005).

Hidrojeller

Moleküler baskılamada hidrojeller, çapraz bağlayıcı içeriğinin az olduğu hidrofilik dinamik bir sistem olarak ve makromoleküllerin ve moleküllerin baskılanmış komplekslerin içine ve dışına kolay geçişini sağlayan şişme karakteristikleri ile baskılanmış polimer komplekslerin sentezine olanak sağlarlar.

Su içerdikleri için doğal dokularla kıyaslandığında esneklerdir (Hillberg ve Tabrizian, 2008).

Sol-jeller

Sol jeller, protein enkapsülasyonu için protein ile spesifik olarak etkileşebilirler (Gill ve Ballesteros, 2000a; 2000b). Sol jellerin, ılımlı polimerizasyon şartları (pH, iyonik şiddet gibi) ve sulu çözeltilerde kullanılabilirliğinden faydalanarak protein baskılamaya adapte edilmiştir (Turner vd., 2006).

1.5.1.2. İki boyutlu (2D) yüzey baskılama

Geleneksel 3D moleküler baskılama, çözeltideki bir molekülün büyük miktarlarının spesifik olarak bağlanmasını başarmasına rağmen bazı kısıtlamalara sahiptir. 2D baskılama stratejileri (yüzey baskılama) sayesinde bu kısıtlamaların üstesinden gelinmiştir. 2D baskılama yaklaşımında sadece yüzey kaplanacağından daha az kalıp moleküle ihtiyaç vardır. Bu yaklaşım, bağlanma bölgelerinin heterojen kaplandığı yüzeyler veya yüzeye çok yakın bölgeler yaratır; böylece bağlanma bölgeleri daha ulaşılabilir hale gelir. Bu sayede 3D baskılamada karşılaşılan difüzyon problemleriyle karşılaşmaz; dengeleme zamanı kısalmış ve bağlanma kinetikleri gelişir (Hillberg ve Tabrizian, 2008).

1.5.1.3. 2D epitop baskılama

Tanınması istenen proteinin veya bir polipeptidin bir kısmının kalıp olarak polimerizasyon esnasında kullanıldığı bir yaklaşımdır (Tai vd., 2005; Nishino, 2006; Hoshino vd., 2008). Bu teknik, antibodi ve antijen arasındaki spesifik etkileşimi taklit eder.

Epitop yaklaşımının, yığın ve yüzey baskılamaya göre avantajları vardır. İlk olarak, küçük kalıp yüksek derecede çapraz bağlamaya olanak sağlar ve kalıp uzaklaştırılmadan bağlanma bölgelerinin oluşmasını sağlar. İkincisi, küçük mol kütleli baskılama kadar iyi olan doğal tanıma yolunun bir türevidir, kalıbın kompleksliği minimuma indirilmiştir, böylece non-spesifik etkileşimler kısıtlanır. Dolayısıyla, bağlanma afinitesi ve seçicilik artar. Üçüncüsü, polipeptidler çevresel faktörlerden daha az etkilenirler çünkü sekonder ve tersiyer yapıları yoktur. Ek olarak, uygun organik çözücülerde çözünebilirlik ve konformasyonel değişim kavramları olmadan kullanılabilir (Kryscio ve Peppas, 2012).

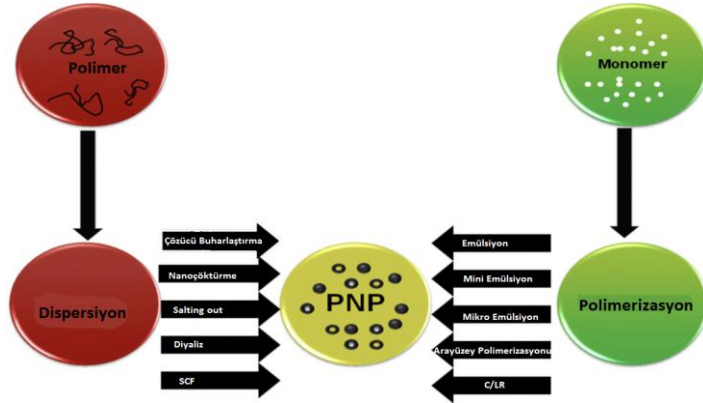
1.6. Polimer Nanopartiküller

Nanopartiküller, 10-1000 nm aralığındaki katı, koloidal partiküller olarak tanımlanır (Kreuter, 1994). Polimer nanopartikül (PNP) terimi, herhangi bir nanopartikül tipi için kullanılabilir de spesifik olarak nanoküreler ve nanokapsüller için söylenen bir terimdir. Nanoküreler, moleküllerin küre yüzeyine adsorplandığı veya partiküle enkapsüle olduğu katı matris partiküllerdir. Her ne kadar şekilleri küresel olsa da, küresel olmayan şekillerin de nanoküre olarak geçtiği literatürlere rastlanmaktadır (Vauthier ve Couvreur, 2000). Nanokapsüller, içinde katı materyal kabuk tarafından sarılmış sıvı bir oyuk içeren (yağ veya su), moleküllerin tutuklandığı, bir tür depo olarak rol oynayan keseli sistemlerdir (Couvreur vd., 1995).



Şekil 1.4. Polimer nanopartiküllerin şematik görüntüsü (A) Nanokapsülün kabuk kısmı (B) İçinde yağ bulunduran nanokapsül (C). İçinde su bulunduran nanokapsül (Rao ve Geckeler, 2011)

PNP'ler, elektronikten fotonığa, partiküllerden sensörlere, tıptan biyoteknolojiye, çevre kirliliğinin kontrolü teknolojisine uzanan geniş bir spektrumda hızla gelişmekte ve önemli bir rol oynamaktadır (Rao ve Geckeler, 2011). PNP'ler, ön şekillendirilmiş polimerlerden veya monomerlerin direkt polimerizasyonu ile hazırlanabilir.



Şekil 1.5. Polimerik nanopartiküllerin sentez yöntemleri(Rao ve Geckeler, 2011)

1.7. Ön Şekillendirilmiş Polimerlerin Dispersiyonu

1.7.1. Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Ön şekillendirilmiş polimerlerden geliştirilen ilk yöntemdir (Vanderhoff vd., 1979). Her ne kadar polimer kimyacıları tarafından tasarlansa da, ilaç üretimi ve farmakolojik teknolojiye önemli avantajlar sunmuştur (Gurny vd., 1981). Bu yöntemde, polimer çözeltiler uçucu çözücüler içinde hazırlanır, emülsiyonlar oluşturulur. Emülsiyon, çözücünün buharlaştırılmasıyla nanopartikül süspansiyonuna dönüşür. Geçmişte çokça kullanılan diklormetan ve kloroformun yerini iyi bir toksikolojik profile sahip etil asetat almıştır (Anton vd., 2008). Bu yöntemde, çözücünün buharlaştırılmasının ardından yüksek hızda homojenizatör veya ultrasonikatör kullanılır. Katılaştıran nanopartiküller ultrasantrifüj ile toplanıp, kalıntıları uzaklaştırmak için destile su ile yıkanır. Son olarak da ürün liyofilize edilir. Genelde, organik çözücü içinde çözünen polimer yağ fazını, kararlılık sağlayıcı ajan içeren sulu faz da su fazını oluşturur.

Her ne kadar çözücü buharlaştırma yöntemi basit bir yöntem olsa da, zaman alıcıdır ve buharlaşma esnasında nanodamların olası birleşmesi partikül boyutunu ve morfolojisini etkileyebilir (Rao ve Geckeler, 2011).

1.7.2. Salting Out

Organik çözücülerin kullanıldığı yöntemler fizyolojik sistemler kadar çevreye de zararlıdır. Bu sorunun üstesinden gelmek için, Bindschaedler vd. (1990),

emülsiyon prosesini modifiye ederek, surfaktan ve klorlanmış çözücülerden uzak duran bir proses olan salting out prosesini başlatmışlardır.

Emülsiyon modifikasyonu, su veya aseton ile kolayca karışabilen polimer çözücü ile sağlanır. Sulu fazda güçlü salting-out etkiye sahip tuz veya sükrözün çözünmesiyle polimer çözeltinin sulu fazda emülsiyonu sağlanır (Ganachaud ve Katz, 2005). Emülsiyonun fazla miktarda su ile seyreltilmesi sonucu ters salting out etkisi, emülsiyon damlaları içinde çözünmüş polimerin çökmesini sağlar.

1.7.3. Nanoçöktürme

Nanoçöktürme yöntemi, Fessi vd. (1989) tarafından geliştirilmiştir. Çözücü yerdeğişim yöntemi olarak da bilinir. Lipofilik bir çözeltiden ayrılabilen ve su ile kolayca karışabilen yarı polar bir çözücünün yer değiştirmesinin ardından arayüzeyde polimer birikimi esasına dayalı bir tekniktir. Çözücünün çözücü olmayan faza hızlı difüzyonu iki faz arasındaki gerilimi düşürür, bu da yüzey alanını arttırarak organik çözücünün küçük damlalarının oluşumuna olanak sağlar (Mishra vd., 2010). Polimer nanopartiküller, organik fazın sulu faza, karıştırılarak eklenmesiyle sentezlenir.

1.7.4. Diyaliz

Diyaliz, küçük boyutlu polimer nanopartiküllerin hazırlanması için basit ve etkili bir yöntemdir. Polimer, organik bir çözücü içinde çözünür, bir diyaliz tüpüne alınır. Diyaliz tüpü çözücü olmayan bir sıvıyla dolu kaba alınır. Çözücünün membran içine göçünü, çözünürlük kaybından dolayı polimerin agregasyonu ve homojen nanopatikül oluşumu takip eder (Rao ve Geckeler, 2011).

1.7.5. Süperkritik Sıvı Teknolojisi

Herhangi bir organik çözücüye ihtiyaç olmadan polimer nanopartiküllerin yüksek saflıkta sentezlendiği bir tekniktir. İki proses şeklinde sınıflandırılabilir:

A) Süperkritik Çözeltilerin Hızlı Genleşmesi (RESS)

B) Sıvı Çözücülerdeki Süperkritik Çözeltilerin Hızlı Genleşmesi (RESOLV)

1.7.5.1. Süperkritik çözeltilerin hızlı genişmesi (RESS)

Geleneksel bir RESS yönteminde, polimer, çözelti oluşturmak üzere süperkritik sıvı içinde çözünür, ardından kapiler bir fiskiye den havaya hızla püskürtülmesi sağlanır. Yüksek derecede süper doygunluk, püskürtme sırasındaki hızlı basınç düşmesi ile sağlanır böylece iyi disperse olmuş partiküller sentezlenir. RESS prosesi ile yapılan çalışmalarda mikro ve nano boyutlu partiküller sentezlenmiştir (Weber ve Thies, 2002). RESS prosesi ile sentezlenen nanopartikül çalışması az sayıdadır çünkü bu yöntemin en büyük dezavantajı, nanoboyuttan çok mikrobeyutlu partiküllerin sentezlemesine olanak vermesidir. Chernyak vd. (2001), poli(perfloropolietir diamid) damlalarını CO₂ (karbon dioksit) çözeltisinin hızlı püskürtülmesiyle sentezlemişlerdir .

1.7.5.2. Sıvı çözücülerdeki süperkritik çözeltilerin hızlı genişmesi (RESOLV)

RESS prosesinde basit fakat önemli bir modifikasyon yapılarak gerçekleştirilen bir prosestir. Süperkritik polimer çözeltisi hava yerine sıvı çözücü içine püskürtülür (Sun vd., 2002). Bu sayede, nanoboyutta partiküllerin elde edilmesi daha olasıdır çünkü sıvı çözücü, partikül büyümesini baskılamaktadır. Meziani vd. (2004), 50 nm'den daha küçük boyutlarda poli heptadekaflorodesil akrilat (PHDFDA) nanopartiküllerini bu prosesle sentezlemişlerdir .

1.8. Monomerlerin Polimerizasyonu

Ön şekillendirilmiş polimer nanopartiküller herhangi bir polimerizasyon prosesi içermezler. İstenilen özellikleri sağlamak için, monomerlerin polimerizasyonu ile sentezlenen kullanışlı polimer nanopartiküller dizayn edilmelidir. Monomerlerin polimerizasyonu doğrultusunda, polimer nanopartiküllerin sentezi, mini-, mikro-, ve geleneksel emülsiyon polimerizasyonu gibi üç ana yöntemle gerçekleştirilir. Arayüzey ve yaşayan/kontrollü radikal polimerizasyon gibi heterofaz polimerizasyon da polimer nanopartikül sentezinde uygulanabilir (Rao ve Geckeler, 2011).

1.8.1. Emülsiyon Polimerizasyonu

Polimer nanopartiküllerin sentezinde en fazla kullanılan yöntemdir. Dispersiyon ortamında kullanılan su, çevreye dosttur ve polimerizasyon esnasında ısının mükemmel olarak dağılmasını sağlar. Sürfaktan kullanımına bağlı olarak

geleneksel veya surfaktansız emülsiyon polimerizasyonu şeklinde sınıflandırılır (Thickett ve Gilbert, 2007).

1.8.1.1. Geleneksel emülsiyon polimerizasyonu

Geleneksel sistemde bileşenler: su, suda çözünürlüğü düşük bir monomer, suda çözünebilir bir başlatıcı ve surfaktandır. Reaksiyon sonunda her biri pek çok polimer zincir içeren yaklaşık 100 nm boyutunda polimer nanopartiküller sentezlenir. Kolloidal kararlılık sağlayıcılar, sterik veya elektrostatik veya hem sterik hem elektrostatik kararlılık sağlarlar (Rao ve Geckeler, 2011).

Sürekli fazda çözülmüş monomer molekülleri, serbest radikal veya iyon şeklinde olabilen başlatıcı ile polimerizasyon başlar. Alternatif olarak, γ -ışınları, UV veya güçlü görünür ışın gibi yüksek enerjili ışınlar ile de başlatılabilir. Faz ayrımı veya katı partiküllerin oluşumu, polimerizasyon reaksiyonunun bitiminden önce veya sonra gerçekleşebilir (Rao ve Geckeler, 2011).

Polistiren (PS) (Munoz-Bonilla vd., 2010), poli(metilmetakrilat) (PMMA) (Costa vd., 2009), poli(vinilkarbazal) (Su-Jung vd., 2009), poli(etilsiyanoakrilat) (PECA) ve poli(bütilsiyanoakrilat) (El Samaligy vd., 1986) nanopartikülleri, sikloheksan, n-pentan ve toluen gibi çözücülerdeki surfaktanlar aracılığıyla dağılmasıyla sentezlenmiştir. Polimer nanopartiküllerin çapı, ortama eklenen surfaktan tipine bağlıdır. Polietilenoksit lauril esterini ile 50 nm çapında polimer nanopartiküller sentezlenirken, anyonik bir surfaktan ile yaklaşık 300 nm çapında polimer nanopartiküller sentezlenebilmiştir (Vranckx vd., 1996).

1.8.1.2. Surfaktansız emülsiyon polimerizasyonu

Geleneksel emülsiyon polimerizasyonu, sentezlenen üründen elimine edilmesi gereken surfaktanlarla yapılan bir polimerizasyon sistemidir fakat bu surfaktanların tamamen uzaklaştırılması çok zordur. Zaman alıcıdır ve ürünün maliyetini artırır. Alternatif olarak, emülsiyon polimerizasyonu, eklenen bir emülsifiye edici olmadan veya az sabunlu emülsiyon polimerizasyonu olarak denenmiştir. Bu yöntem, surfaktan uzaklaştırılmasına gerek duyulmadan, basit ve çevreye dost olarak polimer nanopartikül üretimini sağlamaktadır (Liu ve Liu, 2010). Surfaktansız bir sistemde kullanılan reaktifler, deiyonize su, suda çözünebilir bir başlatıcı (potasyum persülfat gibi) ve monomerlerdir (genelde vinil veya akril monomerleri). Böyle bir polimerizasyon sisteminde, polimer

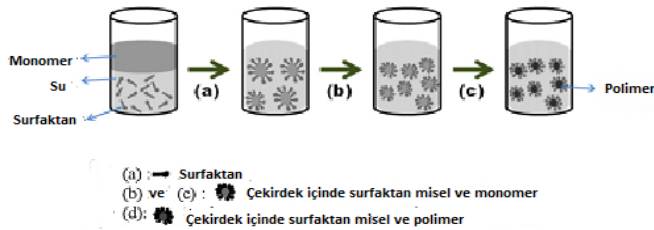
nanopartiküllerin kararlılığı, iyonize olabilen başlatıcılar veya iyonik komonomerler kullanıldığında sağlanır.

Surfaktansız emülsiyon polimerizasyonu, polimer nanopartikül üretiminde ekstra surfaktan eklenmesine ve uzaklaştırılmasına gerek olmayan basit, çevreye dost bir prosestir. Tüm bu başarıya rağmen, surfaktansız emülsiyon polimerizasyonunun kullanımını kısıtlayan, monodispers ve tam kontrollü polimer boyutu sağlayamamak gibi bazı engeller vardır.

1.8.1.3. Mini-emülsiyon polimerizasyonu

Mini-emülsiyon polimerizasyonu üzerine yapılan yayınlar ve uygun polimer materyallerin geniş bir alanda geliştirilmesi son yıllarda hızla artmıştır.

Tipik bir mini-emülsiyon polimerizasyonu, su, monomer karışımı, ko-kararlılık sağlayıcı, surfaktan ve başlatıcı içerir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Mini-emülsiyon polimerizasyonu şeması (Rao ve Geckeler, 2011)

Emülsiyon polimerizasyonu ve mini emülsiyon polimerizasyonu arasındaki temel fark, ko-kararlılık sağlayıcı olarak düşük mol kütleli bileşenlerin ve yüksek parçalayıcı karıştırıcıların kullanılmasıdır. Mini emülsiyonlar çok kararlı, kararlı duruma ulaşmak için yüksek parçalayıcı karıştırıcılara ihtiyaç duyan ve arayüzey gerilimi 0'dan çok daha fazla olan emülsiyonlardır (Rao ve Geckeler, 2011).

1.8.1.4. Mikro-emülsiyon polimerizasyonu

Nanoboyutlu polimer partiküllerin sentezi için mikro-emülsiyon polimerizasyonu yeni ve etkili bir yaklaşımdır. Her ne kadar emülsiyon ve mikro-emülsiyon polimerizasyonu, yüksek mol kütleli koloidal polimer partiküller üretebilmek açısından benzer görünseler de, kinetik olarak incelendiğinde farklıdırlar. Mikro-emülsiyon polimerizasyonunda hem partikül boyutu, hem de partikül başına ortalama zincir sayısı oldukça küçüktür (Puig, 1996).

Bir mikro-emülsiyon polimerizasyonu, şişmiş miseller içeren termodinamik olarak kararlı mikroemülsiyon sulu fazına suda çözünebilir başlatıcı eklenerek gerçekleşir. Polimerizasyon, termodinamik olarak kararlı, kendiliğinden oluşmuş bu fazdan başlar ve yağ/su arayüzeyindeki arayüzey gerilimini sıfıra yaklaştıran çok miktarda surfaktan sistemlere bağlıdır. Dahası, surfaktanın çok olan miktarından faydalanmak için partiküller surfaktan ile tamamen kaplanır. Başlangıçta, polimer zincirler sadece bazı damlalar içinde oluşur çünkü başlatıcı, tüm mikrodamlara kendiliğinden ulaşamaz. Daha sonra zincirlerin osmotik ve elastik etkisi, hassas mikroemülsiyonları destabilize eder ve partikül boyutunda artışa, boş misel oluşumuna ve ikincil nükleasyona yol açar. 5-50 nm boyutlarında çok küçük lateksler, son üründeki boş miseller ile tekrar oluşur (Antonietti ve Landfester, 2002).

Bu yöntemin ticari olarak kullanımında bazı kısıtlamalar vardır; çünkü tipik polimer formülasyonunda kullanılan miktarlar azdır ve ticari boyutta fazla miktarda surfaktan/monomer oranlarına ihtiyaç vardır.

1.8.2. Arayüzey Polimerizasyonu

İki faz içinde çözünebilen (sürekli ve dispers faz) iki reaktif monomerin veya ajanın polimerizasyonunu içerir ve reaksiyon iki sıvının arayüzeyinde gerçekleşir (Karode vd., 1998). Yağ içeren nanokapsüller, yağ/su arayüzeyinde monomerlerin polimerizasyonu ile sentezlenmiştir (Khoury Fallouh vd., 1986).

1.8.3. Kontrollü/Yaşayan Radikal Polimerizasyonu (C/LRP)

Radikal polimerizasyonun primer kısıtlamaları, molar kütlelerin, molar kütle dağılımının ve makromoleküler yapının kontrol yetersizliğidir. Kısıtlamalar, istenmeyen hızlı radikal-radikal sonlandırma tepkimelerine yol açar.

Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyonu eski bir polimerizasyon tekniğini kullanarak yeni bir alan açar (Zetterlund vd., 2008). C/LRP için üç yaklaşım başarılı olmuştur ve çok çalışılmıştır: Azot ortamı polimerizasyonu (NMP) (Dire vd., 2009), atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) (Li vd., 2009), ve tersinir ekleme ve parçalama transfer zincir polimerizasyonu (RAFT) (Rieger vd., 2010).

Kontrol ajanının, monomerin ve başlatıcının derişimi ve doğası ve emülsiyon tipi polimer partiküllerin boyut tespitinde önemlidir. NMP, ATRP ve RAFT için ortak sorun, üründe kalan kontrol ajanının varlığı, proses kompleksliği ve maliyettir.

1.9. Baskılanmış Nanopartiküller

Yığın monolitlerin tersine, MIP nanopartiküllerin boyutları küçüktür ve geniş yüzey alanına sahiptirler; böylece kalıp molekülün baskılanmış bölgelere ulaşımı daha kolaydır ve bağlanma kinetikleri gelişmiştir (Gao vd., 2007; Tokonami vd., 2009). Ek olarak, MIP nanopartiküller çözelti içinde kullanılabilirler için analizlerde doz ayarlaması daha kolaydır (Ge ve Turner, 2009).

Nanopartiküllerin moleküler baskılanması geleneksel MIP sorunlara çözüm olabilecek umut veren bir yöntemdir (Gao vd., 2007; Lu vd., 2007; Vandeveld vd., 2007). Nanoboyuttaki partiküllerin baskılanmış bölgeleri, yüzeyde ya da yüzeye çok yakındadırlar. Böylelikle, bu yapıdaki baskılanmış malzemelerin bağlanma kinetiğinin hızlanması ve kapasitenin artması, baskılanmış bölgelere erişim kolaylığının büyük oranda artması beklenmektedir. Baskılanmış filmlerle ve yüzey baskılanmış malzemelerle karşılaştırıldığında baskılanmış nanomalzemelerin hedef moleküle daha fazla afinitesi ve seçiciliği vardır ve tanıma bölgeleri daha homojen dağılmıştır (Guan vd., 2008).

Ne yazık ki MIP nanopartiküllerinin sentezi kolay değildir. Çapraz bağlayıcı derecesi, güçlü monomer-kalıp ilişkisinin sağlanması gibi nedenler MIP nanopartikül sentezi için uygun yöntemin seçimini zorlaştırabilir (Pe´rez-Moral ve Mayes, 2006).

MIP nanopartikül sentezi için en fazla kullanılan yöntemler:

- 1) Çöktürme polimerizasyonu
- 2) Mini- ve mikro- emülsiyon polimerizasyonu
- 3) Çekirdek-kabuk polimerizasyonudur.

1.9.1. Çöktürme Polimerizasyonu

MIP nanopartikül sentezinde çöktürme polimerizasyonu ilk kez 1999 yılında, 17 β -estradiol ve teofilin için baskılanmış partiküllerin sentezlenmesi ile gerçekleştirilmiştir (Ye vd., 1999).

Çöktürme polimerizasyonunda baskılanmış nanopartiküller, çözücünün fazla miktarlarında (monomer derişimi % 2 v/v) sentezlenir. Büyüyen polimer zincirler agregatlaşmaz; çözeltiden oligomer ve monomerleri yakalamaya devam eder ve boyutları reaksiyon ortamında çözünemez hale geldiğinde çökerler. Teknik kolaydır, diğer prosedürlerden daha az zaman alır ve iyi ürün verir (Poma vd., 2010).

1.9.2. Mini- ve Mikro- Emülsiyon Polimerizasyonu

Mini-emülsiyon polimerizasyonu ile yüksek verimde MIP nanopartikülleri sentezlenebilir (Vaihinger vd., 2002). Bu metod yüksek devirli homojenizasyon basamağı ve 50-500 nm arası partiküller elde etmek için ko-surfaktan kullanımı gerektirir (Van Herk ve Monteiro, 2003). Polimerik monomer surfaktanı, MIP nanopartiküllerinin yüzeyinde, baskılamayı kuşatmak için kullanılır.

Mini-emülsiyon polimerizasyonu ile çok küçük (30-220 nm) küresel partiküller üretilse de, çeşitli kimyasalların varlığı (surfaktanlar ve ko-kararlılık sağlayıcılar gibi) baskılama işleminde girişim yapabilir, bu yüzden afinite bölgeleri dağınık olarak yayılır. Semi-kovalent baskılama yaklaşımı faydalı olabilir ama kalıbın kimyasal yapısı değişir. Saflaştırma basamağında tüm bu kimyasalların uzaklaştırılması zaman alıcı ve meşekkatlidir. Şener vd. (2010), miniemülsiyon polimerizasyonu ile yaklaşık 50 nm boyutlarında lizozim baskılanmış nanopartiküller sentezleyip QCM temelli bir nanosensör geliştirmişlerdir.

Mikroemülsiyon sisteminde, iki karışmayan faz (su ve yağ) ve surfaktan molekülleri mevcuttur. Bunlar kalıp molekül ile yağ-su arayüzeyinde monotabaka oluşturur; surfaktan molekülün hidrofobik grupları yağ fazında, hidrofilik kafa grupları su fazında yer alır.

1.9.3. Çekirdek-Kabuk Polimerizasyonu

MIP nanopartiküller, bu yöntemle, kompleks yapılarda ve kalıp moleküle spesifik kontrollü boyutlarda sentezlenebilirler. Bu yaklaşımda, silika, polimer veya magnetit gibi çeşitli materyallerden oluşan nanoküreler üzerine MIP tabakası birikir. Bu yaklaşımda, istenen özelliklerde çekirdek kullanmak mümkündür; böylece baskılanmış nanosistem performansı geliştirilebilir (Tan ve Tong, 2007).

Çekirdek-kabuk MIP nanopartikül sentezinde en fazla kullanılan teknik çekirdek-kabuk emülsiyon polimerizasyonudur (Pe'rez vd., 2000), iki basamaklı bir tekniktir: monodispers çekirdek lateks oluşturulması ve emülsiyon polimerizasyonu ile baskılanmış kabuğun oluşturulması.

Çekirdek-kabuk MIP nanopartiküllerinin sentezinde kullanılan başka bir teknik, sentezlenen nanopartikül yüzeyinde ince MIP tabakasının ağ oluşturmasıdır. Nanopartikül yüzeyine, N,N'-diethylthiocarbamat trihidrat gibi bir başlatıcı immobilize edilir ve fazlaca miktarda MIP ağ tabakası oluşturulur (Pe'rez-Moral ve Mayes, 2007).

RAFT (Lu vd., 2007) ve ATRP (Lu vd., 2009) gibi kontrollü canlı radikal polimerizasyon metodları da çekirdek-kabuk MIP nanopartiküllerinin sentezinde kullanılabilir. Her iki metod da MIP tabakasının inceliğini iyi kontrol eder böylece ikinci bir polimerizasyona ihtiyaç yoktur (Titirici ve Sellergren, 2006). Fakat, ATRP tekniğinde, kalıp molekül etkileşimlerinden bozulabilecek asidik veya bazik ligandlar ve Cu iyonu gibi katalitik kompleksler kullanılır. Dahası, metalik katalistin üründen uzaklaştırılması gereklidir (Ye ve Mosbach, 2008). Polimerizasyon şartları iyi oluşturulursa RAFT tekniğinin ATRP tekniğinden daha iyi sonuçlar verdiği söylenebilir.

1.10. MIP Nanopolimerlerin Kullanım Alanları

MIP nanopolimerler, optik, akustik ve elektrokimyasal biyosensörler olarak, immunoanalizlerde bağlanma ajanı olarak, çözünür baskılanmış katalistler, lif, membran ve küreler üzerine immobilizasyon, farmakoloji ve ilaç salım sistemleri olarak, çevresel kirliliklerin uzaklaştırılması gibi alanlarda kullanılabilir.

1.11. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Tekniği

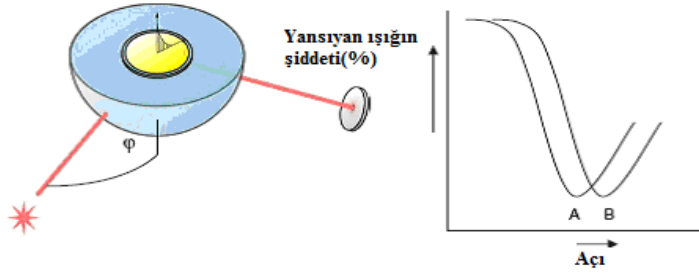
Yüzey plazmon dalgalarının uyarılmasıyla oluşan kırınım ağları üzerindeki sıra dışı kırınım olayı ilk kez 20. yüzyılın başlarında Wood (1902) tarafından gözlemlenmiştir . Wood, ayna üzerine düşen ışığın yansıyan kısmında karanlık ve aydınlık bantlar gözlemlenmiştir. Olayın fiziksel olarak yorumlanması, Lord Rayleigh (1907) ve Fano (1941) tarafından başlatılmış fakat, 1968’de, toplam yansımanın azalması ile yüzey plazmonların uyarımı Krestchmann (1968) ve Otto (1968) tarafından kanıtlanmıştır. O günlerden beri yüzey plazmonlar yoğun bir şekilde çalışılmış ve major özellikleri incelenmiştir. Biyomoleküler etkileşimlere SPR temelli sensör uygulamaları ilk kez Liedberg vd. (1983) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Yüzey plazmon dalgaları (SPW), metal ve dielektrik arayüzeyinde çoğalan elektromanyetik dalgalarıdır. Bu dalgalar, ışından aldıkları enerjiyi arayüzey boyunca iletebildiklerinden yüzey plazmon rezonans (SPR) sistemlerinde kullanılabilirler. SPW ve gelen ışının rezonansa gelmesi için, her ikisinin de eşit büyüklükte dalga vektörüne sahip olması gerekir. Eğer SPW’nin yayılan vektörü, gelen ışığın dalga vektöründen büyük olursa, bu elektromanyetik dalgaların direkt teması sonucu SPW uyarılması gerçekteşmez. Bu yüzden, optik sistemler, gelen dalganın momentumunu arttırmaya yönelik geliştirilmiştir. SPW, rezonans enerji transferi boyunca gelen ışığın dalgasından enerji alabilir. SPR sistemlerinde, evanesans manyetik alan oluşturmak üzere daha düşük optik yoğunluğun ortasına nüfus etmek üzere, arayüzeyde, gelen dalga fraksiyonunun yayılımı gerçekteşir (Damos vd., 2004).

Yüzey plazmon rezonans (SPR) sistemi, biyosensörler için etkili bir dönüştürücüdür (Liedberg vd., 1983; Shimomura vd., 2001; Soh vd., 2003) çünkü SPR sistemleri, orijinal olarak, protein ve DNA gibi biyomoleküler etkileşimlerini incelemek amacıyla geliştirilmiştir. SPR sistemleri, yüksek duyarlılığa sahip, eş zamanlı ve otomatik izleme sağlayabilen sistemlerdir (Soh vd., 2003).

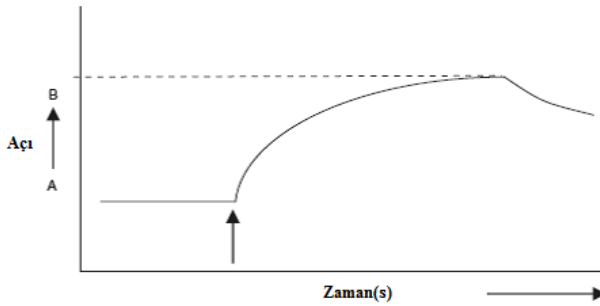
Günümüzde, biyomoleküler etkileşimlerini incelemek için, biyokimyasal bir metod olan, enzim bağlı immunosorbent analiz (ELISA) metodu sıklıkla kullanılmaktadır. Bu metodun yüksek seçicilik, yüksek duyarlılık gibi avantajları olsa da, prosedür bazen komplike bir hale gelebilir ve tek bir ölçüm için saatler harcanabilir (Soh vd., 2003).

SPR tekniği, bir metal üzerine adsorplanan çok ince materyal tabakanın refraktif indeksini ölçen optik bir metoddur. Keskin bir açıyla gelen ışık demeti fotonları, metal filmdeki delokalize elektronlar ile etkileşime girer, elektronların titreşimine sebep olur (plazmon) ve böylece yansıyan ışık demetinin şiddetinde azalmaya neden olur.



Şekil 1.7. Yüze plazmonlarının uyarılması (Osman, 2011)

Yansıyan ışığın şiddetinde maksimum kaybın gerçekleştiği açı, rezonans açısı ya da SPR açısı olarak adlandırılır. SPR açısı sistemin optik karakteristiklerine yani metalin (genellikle altın) her iki tarafındaki kırılma indislerine bağlıdır. Prizma tarafındaki kırılma indisi değişmez iken, metal yüzeyinin hemen yakınında bulunan kırılma indisi, üzerinde toplanan kütle nedeniyle (örneğin protein) değişecektir. Kırılma indisi değiştiginde, yansıyan ışık şiddetinin minimuma düştüğü açıda Şekil 1.7' de gösterildiği gibi bir kayma olacaktır. (A) geliş açısına karşı yansıyan ışık şiddetini gösterirken, (B) kırılma indisinde gerçekleşen değişimden sonrasını göstermektedir.



Şekil 1.8. Sensogram: zamana karşı SPR açısının değişimi (Osman, 2011)

Şekil 1.8’de, sensogram adı verilen zamana karşı açıdaki kaymayı gösteren grafik görülmektedir. Bu kayma, biyomoleküler etkileşimlerden kaynaklanırsa, etkileşim kinetikleri eş zamanlı olarak çalışılabilir.

1.11.1. Yüzey Plazmon Rezonans Tekniğinin Teorisi

Evenesans dalga, yüzey plazmon rezonans tekniğinin merkezindedir. Evenesans dalga, yansımadan, diğer ortama geçen ışığa verilen isimdir. Kırılma indisi n olan bir ortamdaki elektromanyetik dalgaların oluşturduğu elektrik alan:

$$E = E_0 \exp(j\omega t - jk \cdot r) = E_0 \exp(j\omega t - jk_x x - jk_y y - jk_z z) \quad 1.1$$

E_0 elektrik alanın genliği, ω açısal frekans, k dalga vektörü, $r(x, y, z)$ vektörün konumudur.

Yönü dalga dağılımına paralel olan dalga vektörü k 'nın büyüklüğü :

$$k = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2} = n \frac{2\pi}{\lambda} = n \frac{\omega}{c} \quad 1.2$$

λ ve c sırasıyla dalga boyu ve hızıdır.

Böyle bir dalga kırılma indisi n_1 ve n_2 olan 1 ve 2 nolu iki ortam arasında kırıldığında ışık demetinin yönü $k_z = 0$ olarak seçilebilir. Böylece problem iki boyutlu hale gelebilir. Fizikteki Snell yasasından:

$$n_1 \sin \alpha = n_2 \sin \beta \quad 1.3$$

veya

$$k_{x1} = k_{x2} \equiv k_x \quad 1.4$$

Eşitlik 1.2 ve 1.4 ü kullanarak ara yüzeye dik konumda olan k_y dalga vektörü için aşağıdaki ifade elde edilir.

$$k_{y2}^2 = n_1^2 \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^2 \left(\frac{n_2^2}{n_1^2} - \sin^2 \alpha \right) \quad 1.5$$

$n_1 > n_2$ olduğunu varsaydığımızda, eşitlik 1.5'ten, $\sin \alpha > n_2 / n_1$ olduğunda eşitliğin sağ tarafı negatif olacak ve sonuç olarak k_y yalın sanal bir sayı olacaktır.

Eşitlik 1.1'e dönersek, bu durumu 2. ortam için değerlendirdiğimizde, ara yüzeye paralel hareket eden bir dalganın oluştuğunu görürüz.

$$E_2 = E_0 e^{-k_y y} \exp(j\omega t - jk_x x) \quad 1.6$$

İkinci ortamda oluşan bu alan kaybolan alan olarak adlandırılır.

Gelen ışık demeti, metal filmdeki serbest elektronların titreşimine sebep olurken, sistemin rezonans şartlarında değişime neden olarak metal/ortam arayüzeyinin çevresini değiştirir. Bu da, SPR açısında kaymaya neden olur. Gelen ışının açısına bağlı olarak, gelen ışığın bir paralel bileşeni olan dalga vektörü (k_x):

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon} \sin \theta \text{ dir.} \quad 1.7$$

θ metal yüzeyine geliş açısı; ϵ prizmanın dielektrik sabiti; ω gelen ışının açısal frekansı; C ışık hızıdır. Metal/dielektrik arayüzeyindeki yüzey plazmon dalgalarının (SPW) yayılım sabiti (k_{SPW}):

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_p}{\epsilon_m + \epsilon_p}} \quad 1.8$$

Ω dalga açısal frekansı; c ışık hızı; ϵ_p yüzey ile etkileşen türlerin dielektrik sabiti, ϵ_m metal dielektrik sabitidir.

Dielektrik sabiti ve kırılma indisi arasında $\epsilon \equiv n^2$ eşitliği vardır.

$$\epsilon_p(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad 1.9$$

$$\omega_p = \sqrt{4\pi n_e e^2 / m_e} \quad 1.10$$

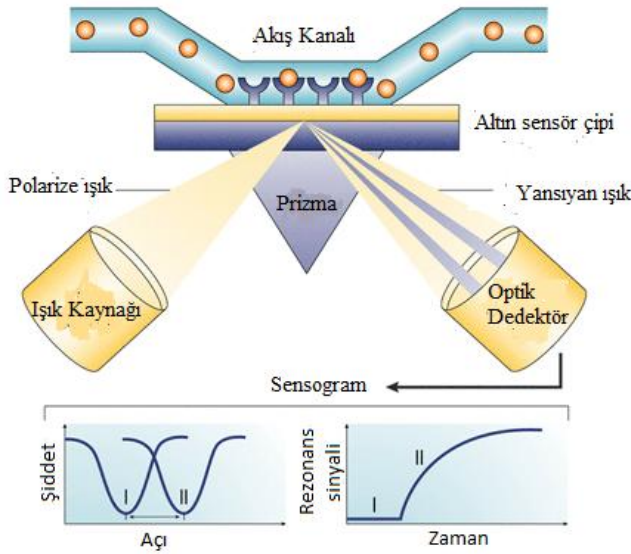
ω_p plazma frekansı, n_e serbest elektron yoğunluğu, e ve m_e sırasıyla elektron yükü ve yoğunluğudur.

Genel olarak $\omega < \omega_p$ olması elektromanyetik alanın metal içerisinde dağılmayacağı anlamına gelir (Schasfoort ve Tudas, 2008).

1.11.2. YüzeY Plazmon Rezonans Sistemi

SPR cihazları, SPR açısındaki kaymayı belirlemek için farklı yollarla konfigüre edilirler. YüzeY plazmonlarını uyararak için genellikle 3 farklı optik sistem kullanılır: prizmalar, gratingler ve optik dalgalar. Ancak cihazlarda en yaygın olarak kullanılan, Kretschmann konfigürasyonunda hazırlanan prizmalardır.

Bu konfigürasyonda, Şekil 1.9’ da gösterildiği gibi, bir prizma p-polarize ışığı ince altın metalle kaplanmış sensör yüzeyi ile eşleştirir. Işık fotodiyot ya da bir kamera kullanılarak onun şiddetini ölçecek olan dedektöre yansıtılır.



Şekil 1.9. YüzeY plazmonların uyarılmasında kullanılan Kretschman konfigürasyonu (Cooper, 2002).

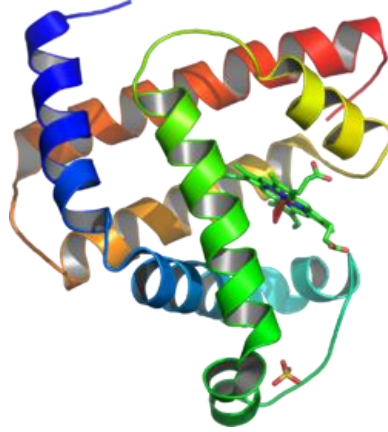
1.11.3. Yüzey Plazmon Rezonans Sisteminin Klinik Kullanımda Diğer Sistemlere Göre Avantajları

- Biyomolekül etkileşimlerinin eş zamanlı izlenmesi: SPR sistemi çok sayıda bağlanma olayını ayrı ayrı tanımlanmış bölgelerde aynı anda dedekte edebilir. Aynı anda yapılacak ölçüm sayısı cihazın ayırma kabiliyetine ve yakalama yapılan platformdaki bileşenlerin yoğunluğuna bağlıdır.
- Kinetik eğrisinden etkileşim sabitlerinin hesaplanabilmesi: SPR klinik uygulamalarda verimli bir şekilde kullanılacak kadar minyatürize edilebilecek basit bir optik sistem gerektirmektedir.
- Herhangi bir işaretleme yöntemine gerek olmaması: Molekülü işaretlemek onun bağlanma kinetiğini ve afinitesini etkileyebilir.
- Zamandan tasarruf: Dedeksiyon hızlıdır. Dedeksiyon yüzeye yakın bölgedeki refraktif indeks değişimine dayandığından spesifik bağlanma olayı gerçekleştiği anda izlenebilir.
- Çalışılan biyomoleküle zarar vermez.
- 1-10 ng'lık duyarlılığa sahip ölçümler yapılabilir.
- İki boyutlu ince altın filmin non-spesifik molekül tutunmalarını önler.

1.12. Miyogloblin

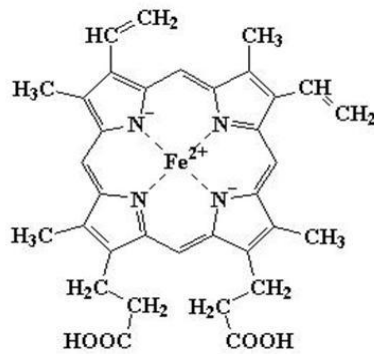
Miyogloblin, düşük mol kütesine sahip (17,800 Da) yaklaşık bütün memelilerde, başlıca kas dokusunda bulunan nispeten basit şekilde oksijen bağlayan bir proteindir. Miyogloblin, enerji gereksiniminin yüksek olduğu zamanlar için oksijeni depolar ve oksijen açlığı çeken dokulara dağıtımını kolaylaştırır (Nelson ve Cox, 2005).

Miyogloblin bir molekül hem ve 153 amino asit içeren tek bir polipeptit zinciridir. Birincil ve üçüncül yapıları benzer olan globülinler olarak adlandırılan protein ailesinin tipik bir üyesidir. Polipeptit, dönemeçlerle bağlı sekiz kadar α -helikal parçadan oluşur. Proteindeki amino asitlerin % 78'i bu α -helikslerde bulunur (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 1.10. Miyoglobindeki α -heliks yapıları (Takano, 1977)

Hem grubu, protoporfirin adı verilen ferröz (Fe^{2+}) durumundaki tek bir demir atomunun bağlandığı organik halka yapısından oluşur. Demir atomu, altı koordinasyon bağına sahiptir, dördü porfirin halka sisteminin düz kısmının azot atomlarına bağlanmıştır, ikisi porfirin halkasına diktir. Düzenlenen azot atomları (elektron verme özelliğine sahiptir) hem molekülündeki demirin ferrik (Fe^{3+}) durumuna değişimi önlemeye yardım eder. Fe^{2+} durumundaki demir, oksijeni geri dönüşümlü olarak bağlar, Fe^{3+} durumundaki demir oksijeni bağlayamaz (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 1.11. Hem grubunun moleküler yapısı

Serbest hem moleküllerinde, oksijenin demirin iki açık koordinasyon bağının birindeki (porfirin molekül düzlemine dik, altta ve üstte) tepkimesi, Fe^{2+} 'nın Fe^{3+} 'e geri dönüşümsüz değişimine neden olabilir. Hem içeren proteinlerde hem, iki açık koordinasyon bağına girişin kısıtlı olduğu protein yapısının iç bölgelerinde tutularak bu tepkime önlenir. Bu iki koordinasyon bağından biri bir His biriminin yan zincirindeki azot tarafından kapatılır. Diğer moleküler oksijen (O_2) bağlanma bölgesidir. Oksijen bağlandığında, hemin demir yükünün değişen elektronik özellikleri, oksijeni bitmiş ven kanının koyu mor renginin oksijenden zengin arter kanının parlak kırmızı rengine değişiminden sorumludur. Karbon monoksit (CO) ve nitrik oksit (NO) gibi bazı küçük moleküller hem demirine O_2 'den daha büyük bir ilgiyle bağlanır. Bir molekül CO heme bağlandığında O_2 çıkarılır, bu, aerobik organizmalar için CO'in neden çok toksik olduğunu açıklar. Oksijen bağlayan proteinler, hemi çevreleyerek ve tutarak, CO'in hem demirine girişini düzenler (Nelson ve Cox, 2005).

Miyoglobin, zedelenen kas dokusundan fazla miktarda salınır. Salınan miyoglobin böbrekler tarafından süzülür fakat bu böbrekler için toksiktir ve akut böbrek yetmezliğine yol açabilir (Naka vd., 2005).

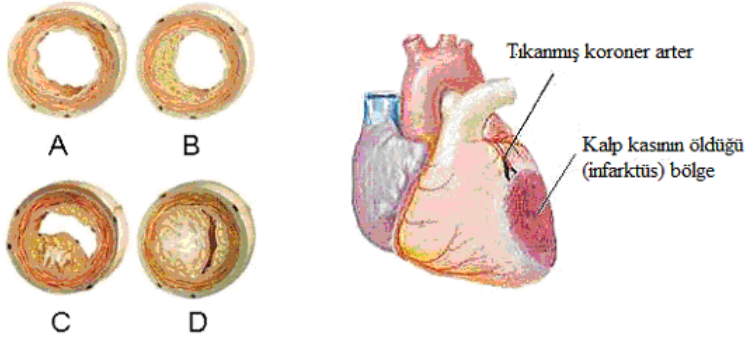
Miyoglobin, kas zedelenmesinin duyarlı bir belirteçidir bu da miyoglobini göğüs ağrısı çeken hastalarda kalp krizinin potansiyel belirteçlerinden biri yapar (Weber vd., 2005).

Miyoglobin teşhisi için günümüzde laboratuarlarda, enzim bağlı immunosorbent analiz (ELISA) tekniği kullanılmaktadır. Fakat bu yöntem, çok zaman harcanması, doğal antibadilere gereksinim duyulması, etiketleme ihtiyacı olması ve tekrar tekrar kullanılamaması gibi dezavantajlara sahiptir.

1.13. Kalp Krizi

Kalp krizi tüm dünyada başlıca ölüm nedenidir. Kalp krizlerinin çoğu aslında birçok insan için önlenmesi mümkün olan koroner arter hastalığının yıllarca süren sessiz ancak sürekli ilerleyişinin bir sonucudur. Kalp krizi sıklıkla koroner arter hastalığının ilk semptomudur. Amerikan Kalp Birliği'nin elde ettiği verilere göre kadınların % 63'ü erkeklerin de % 48'i herhangi bir belirti oluşmadan, aniden koroner kalp hastalığından ölmektedir. Kalp krizinin diğer bir adı miyokardiyal infarktüstür (MI) .

Kalp krizi kalbe kan taşıyan bir veya daha fazla koroner arterin tamamen tıkanması ya da kalp kasına taşınan kanın azalması durumunda ortaya çıkmaktadır. Tıkanma genellikle ateroskleroz nedeniyle olmaktadır. Ateroskleroz plakların ya da kan pıhtılarının koroner arterlerde birikmesidir. Bazen de nedeni bilinmeyen bir şekilde sağlıklı ya da aterosklerotik koroner arterde spazm olmakta ve kalbe giden kan azaldığından kalp krizi meydana gelebilmektedir (Şekil 1.12). Kalp krizi geçiren hastaların yaklaşık yarısı yardım almadan önce en az iki saat beklemektedir. Bu da hastaların ani ölüm ya da kalp yetersizliği riskini arttırmaktadır. Kalp krizi süresince arterin tıkalı kalma süresi uzadıkça, kalbin göreceği hasar da o kadar fazla olmaktadır (Osman, 2011)



Şekil 1.12. Damardaki aterosklerozun zaman içinde ilerlemesi: (A ve B), önemli darlık oluşturması (C), ve sonunda tıkanarak (D) kalp krizine yol açması (Osman, 2011)

1.14. Miyoglobinin Kalp Krizinin Erken Teşhisindeki Rolü

Akut miyokard infarktüsü (AMI) için, daha doğru ve hızlı bir teşhis gerekliliği ve hastaların göğüs rahatsızlığının kontrolü için yeni biyokimyasal metodlar ve stratejiler geliştirilmektedir (Bhayana ve Henderson, 1995; Keffer vd., 1996; Plebania ve Zaninotto, 1998). Araştırma altında olan biyokimyasal belirteçler arasında enzimatik belirteçlere alternatif, enfarktüsün en erken non-spesifik indikatörü miyoglobin (Mb) ve troponinlerdir (Vaidya, 1994).

Kalp krizinde etkili bir müdahale süphesiz ki erken tanıyla mümkündür. Miyokardiyal infarktüs tanısını koymak zor olduğu için acil servise göğüs ağrısı

ile gelip alıkonan hastaların sayısı da fazla olmaktadır. Acil servisteki esas problem atipik semptomların belirlenmesi ve kişinin kalp krizi geçirip geçirmediğinden emin olunabilmesidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün AMI için belirlediği kriterlere göre kardiyak belirteçler tanıyı kolaylaştırmaktadır. Biyokimyasal belirteçler uzun zamandan beri tanıda önemli bir rol oynamakta ve özellikle düşük ve orta risk grubunda yer alan hastalar için büyük önem taşımaktadır (Osman, 2011).

Miyogloblin, belirli bir zaman dilimi içinde kalbin hasarlı bölgesinden salınan, akut miyokard enfarktüsünün teşhisinde kullanılabilen ilk biyokimyasal belirteçtir. Duyarlılığı, diğer kalp krizi belirteçleri olan kreatin kinaz (CK), kreatin kinaz izoenzim MB (CK-MB), troponin T ve troponin I'dan göğüs ağrısı başladığı an ve ilk birkaç saat içinde daha fazladır. Kalp krizinin başladığı ilk 2 saat içinde miyoglobin serum düzeyleri artmaya başlar, 6-9 saat içinde pik yapar ve 24 saat içinde de eski düzeylerine döner (Plebani ve Zaninotto, 1998). Göğüs ağrısı başladığında ve ağrı başladıktan sonraki birkaç saat içerisinde miyoglobinin hassasiyeti CK, CK-MB ve troponinlerden (T ve I) daha yüksektir (Kilpatrick vd., 1993). Kalp krizinin teşhisinde kullanılacak ilk biyomarker olması nedeniyle miyoglobin düzeyinin hızlı ve güvenilir bir şekilde tayini büyük önem taşımaktadır.

Bu tezde, mevcut yöntemlere alternatif kanda miyoglobin tayinine olanak sağlayacak moleküler baskılanmış nano-poli(hidroksietil metakrilat-metakriloil-amidotriptofan metil ester) [poli(HEMA-MATrp)] yüzey plazmon rezonans sensörü hazırlanmıştır. Fonksiyonel monomer olarak metakriloil amidotriptofan metil ester (MATrp) kullanılarak miyoglobin ile önkomples oluşturulmuş daha sonra nanoyapıların sentezi gerçekleştirilmiştir. Miyoglobin baskılanmış nanoyapılar SPR altın çip üzerine damlatılmış, FTIR (Fourier transform infrared), AFM (atomic force microscopy), SEM (Scanning electron microscopy) ve temas açısı analizleri ile karakterize edilmiştir. Hazırlanan sensörün etkinliği GWC SPRImagerII yüzey plazmon rezonans sistemi kullanılarak hem sulu çözeltiler ile hem de kardiyak hastadan alınan plazma örneği ile yapılan kinetik analizler ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar , günümüz laboratuvarlarında kullanılan enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA) tayin kitleri ile karşılaştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Moleküler Baskılama

2.1.1. Non-Kovalent Yaklaşım

Ersöz vd. (2004), fonksiyonel monomer olarak metakrilamidoantipirin (MAAP) kullanarak, π - π ve hidrojen bağlarına dayalı, nitrofenol baskılanmış polimerler sentezleyerek fenolik bileşiklerin uzaklaştırılmasına yönelik bir çalışma yapmışlardır. Odabaşı vd. (2007), N-metakriloilamido-L-histidinmetilester (MAH) fonksiyonel monomerini kullanarak, lizozim baskılanmış polimerler sentezleyerek, lizozim saflaştırılmasına yönelik bir çalışma yapmışlardır. Kugimiya vd.(1998), 2 farklı fonksiyonel monomer, p-vinilbenzen boronik asit ve metakrilik asit kullanarak moleküler baskılanmış polimerler sentezlemişlerdir.

2.1.2. Kovalent Yaklaşım

Wulf vd. (1977) kovalent yaklaşımı kullanarak ilk kez moleküler baskılama çalışması yapmışlardır. p-Vinilbenzen boronik asit ve kalıp olarak 4-nitrofenil- α -D-mannopiranosid kullanarak bir kovalent konjugat hazırlamışlardır.

Bir çalışmada, kolesteril 4-vinilfenil karbonat, 4-vinilfenol ve kolesteril klorformat reaksiyonu ile sentezlenmiş ve polimerize edilmiştir (Whitcombe vd.,1995).

İlk doğru kovalent yaklaşım, Sellergen ve Andersson tarafından (1990), p-aminofenilalanin etil esterinin baskılanmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Caro vd. (2006) tarafından yapılan 4-nitrofenolün seçici ekstraksiyonuna yönelik bir çalışmada, iki farklı MIP sentezlemişlerdir. Bir tanesi non-kovalent yaklaşımla diğeri ise yarı kovalent yaklaşımla sentezlenmiştir. Fakat non-kovalent MIP daha seçici bir davranış sergilemiştir. Cacho vd. (2006) kalıp molekül olarak propazin metakrilatı kullanarak yarı kovalent baskılanmış polimer sentezlemişlerdir.

2.2. Protein Baskılama

Vaidya vd. (2001), tripsinin moleküler baskılanmasında, AAm (akrilamit) ve BisA (bisakrilamit) kullanmışlardır. Tripsin ve polimerize olabilen inhibitörü N-akriloil p-aminobenzamidin kompleksi (spesifik monomer olarak görev alır) DMF (dimetil

florür) ve su karışımında polimerize edilmiştir ve protein polimer jelden aseton ile desorbe edilmiştir. Proteinin tamamen geçişine izin vermek için uygun gözenek boyutu ve baskılama etkinliğini sağlamak için çapraz bağlayıcı derişimi optimize edilmiştir.

Hjerten vd. (1997), protein varlığında, jel oluşturmak üzere, AAm ve N,N'-metilenbisakrilamiti (MBisA) polimerize etmişlerdir. Jel, elekte preslenmiş ve kalan partiküller kromatografi kolonuna doldurulmuştur. Jelden asetik asit (AcOH) ve sodyum dodesilsülfat (SDS) çözeltisi geçirilerek protein desorbe edilmiştir. Hazırlanan bu kolon, çeşitli protein kalıpların seçici adsorpsiyonunu sağlamıştır. Bu teknik, sığır hemoglobini (Hb), sitokrom *c* (Cyt-*c*) ve transferin (Tf) (Liao vd., 1996), ve daha sonra insan büyüme hormonu (HgH), RNAaz ve at miyoglobini (Mb) (Vaidya vd., 2001) proteinlerine uygulanmıştır. Protein ve jel arasında zayıf elektrostatik bağlar oluşmakta ve böylece güçlü bir etkileşim sergilenerek başarılı bir baskılama gerçekleştirilmiştir. Bu deney, az sayıda güçlü bağların çok sayıda zayıf bağlardan daha iyi bir baskılama sağladığını savunan geleneksel baskılama teorisine ters düşmektedir. Hijertenin teorisine göre, küçük proteinlerin spesifik olarak jelde bağlanması, büyük proteinlerin aynı jelde bağlanmasından daha az adsorpsiyon hacimleri gerektirmektedir (Protein büyüdükçe yüzey alanı artar ve jel ile daha fazla etkileşime girer).

Huang vd. (2005), protein saflaştırmaya yönelik amfoterik baskılanmış polimer geliştirmişlerdir. BSA (sığır serum albumin) ve yumurta akı lizozimi (Lyz), iki fonksiyonel monomer (MAA ve N-[3-(dimetilamino) propil] metakrilamid), çapraz bağlayıcı (BisA) ve gözenek oluşturucu ajan olarak fosfat tamponunda çözünmüş CaCO₃ (kalsiyum karbonat) süspansiyonunda baskılamışlardır. Oluşan jel, CaCO₃'ü uzaklaştırmak için asit ile muamele edilmiş ve kalıbı desorbe etmek için de piranoz ile muamele edilmiştir. Sentezlenen polimerler, kromatografide durgun faz olarak, kapasite ve seçicilik belirlemede kullanılmıştır. Lizozim, polimere seçici olarak bağlanırken, BSA bağlanmamıştır. Bunun nedeni, çoklu elektrostatik etkileşimlerdir.

Miyata vd. (1996, 1999, 2006), çözücü, pH, sıcaklık ve çapraz bağlayıcı yoğunluğu gibi çeşitli faktörler tarafından yönetilen hidrojellerin şişme özelliklerinden faydalanmak için yıllar harcamışlardır. Araştırmaları doğrultusunda, şişmenin, spesifik bir protein bağlanmasından da etkilendiğini ortaya çıkarmışlardır. İlk çalışmalardan biri, antibadi bağlanmasının şişme

özelliğinde artışa yol açtığını gösteren tersinir antijen duyarlı jeller üzerinedir. Hidrojeller, antijen ve antibadisinin polimer ağa bağlanmasıyla hazırlanmıştır. Böylece oluşan iki bağ sisteme bağlanır. Bu nonkovalent çağraz bağların kırılması ile jel hacminde serbest antijen değişimi gerçekleşir, bu çalışma hidrojellerin şekle bağlı rol oynayabildiğini de vurgular. Son olarak, proteinlerin moleküler baskılamada ligand olarak kullanılabileceğini başarıyla kanıtlamışlardır.

Kitosan hidrojeller, baskılanmış ağlar geliştirmekte kullanılmıştır (Aburto ve LeBorgne, 2004; Xia vd., 2005). Mükemmel işlevlerinden dolayı moleküler baskılama için önemlidirler. Kitosan, yapısında fazlaca amino ve hidroksil grupları bulundurur, biyouyumludur, toksik değildir ve hidrofildir.

Aburto ve LeBorgue (2004), zehirlenmeye neden olan ve korozyon kaynağı olarak rol oynayan, petrolde bulunan dibenzotiofenlerin (DBTS) baskılanmasını denemişlerdir. Deneysel yaklaşım basit olup DBTS (kalıp) varlığında kitosan ve gluteraldehitin çapraz bağlanmasını içerir.

Venton ve Gudipati (1995), polisilokson kopolimerleri içinde, 3-aminopropiltrioksolan ve tetraetilortosilikat kullanarak BSA ve üreaz baskılamıştır. Polimerler, monolit olarak hazırlanıp öğütüldükten sonra, proteinler pronaz ile uzaklaştırılmıştır. Her iki kalıp için de artmış afinite gözlemlenmiştir (+%30 üreaz için, + %3 BSA için).

Yüzey baskılama yaklaşımında pek çok çalışma yapılmıştır. Son yıllarda, Lin vd. (2006), lizozim, ribonükleaz A, miyogloblin proteinlerinin baskılanması üzerine çapraz bağlayıcı etkisini incelemişlerdir. Harvey vd. (2006), moleküler baskılanmış küreler ile spor-spesifik dio-tanım sistemi üretmek amacıyla baskılama tekniğini kullanmışlardır. Yine son zamanlarda yapılan bir başka çalışmada, Jing vd. (2011) insan idrar örneklerinden lizozimin seçici bir şekilde tayinine yönelik hızlı, düşük maliyetli, yeni bir metod geliştirmişlerdir. Fonksiyonel monomer olarak AAm ve MAA ve çapraz bağlayıcı olarak MBisA'nın termal serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenen MIP tabakasının kovalent tutulumunu desteklemek amacıyla Fe₃O₄ [Demir (II, III) oksit] nanopartikülleri silanize edilmiştir. Kolondan elüsyona veya santrifüje ihtiyaç duyulmadan lizozimin seçici tayini kemilüminesans kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimal koşullar altında analitik prosedür 12 dakikadan daha kısa bir sürede başarılı ve tayin limiti 5 ng/mL bulunmuştur. Baskılama faktörü

yaklaşık 9, seçicilik 4'ün üzerinde ve kapasite g polimer başına 110 mg lizozim olarak bulunmuştur.

Rachkov ve Minoura (2001) tarafından, MAA (fonksiyonel monomer), EGDMA (çapraz bağlayıcı), asetonitril (çözücü) kullanılarak 2-D epitop baskılama ilk kez çalışılmıştır. Yüksek çapraz bağlayıcı içeren polimer ağ, tetrapeptid [YPLG (Tirozin-prolin-lösin-glisin amid)] varlığında aynı C-terminale sahip oksitosinin tanınması için sentezlenmiştir.

2.3. Monomerlerin Polimerizasyonu

Chiu ve Dan (2008), $\text{Cu}^{2+}/\text{HSO}_3^-$ redoks başlatıcı sistemini kullanarak MMA polimerizasyonu ile PMMA nanopartiküllerini sentezlemişlerdir. Fang vd. (2009), 200-600 nm boyutlarında PMMA nanoküreleri sentezlemişlerdir. Öztürk vd. (2008), 150 nm çapında, 17,779 m^2/g polimer yüzey alanına sahip ve 1,171 polidispersiteye sahip PHEMA nanopartiküllerini sentezlemişlerdir.

Landfester vd. (2000), surfaktan olarak Span 80 ve KLE3729, kullanarak PHEMA nanopartiküllerini sentezlemişlerdir . Aynı grup, 100-180 nm boyut aralığında akrilonitril nanopartiküllerini surfaktan olarak SDS, ko-kararlılık sağlayıcı olarak HD kullanarak sentezlemişlerdir (Landfester ve Antonietti, 2000). Magnetik bir çekirdek, magnetit ve biyobozunabilir bir polimerik kabuk (poli(etil-2-siyanoakrilat)) içeren çekirdek-kabuk polimer nanopartikülleri mini-emülsiyon polimerizasyonu ile başarıyla sentezlenmiştir (Arias vd., 2001). Şener vd. (2010), miniemülsiyon polimerizasyonu ile yaklaşık 50 nm boyutlarında lizozim baskılanmış nanopartiküller sentezleyip kuartz kristal mikrobalsans (QCM) temelli bir nanosensör geliştirmişlerdir.

Macias vd. (1995), surfaktan olarak AOT [1,4-bis (2-etilheksil)sülfosüksinat] kullanarak, MMA ve NMA (N-metilolakrilamit) kopolimerleri mikroemülsiyonu ile partiküller sentezleyip, başlatıcı tipinin, fonksiyonel monomer miktarının reaksiyon kinetiği üzerine etkisini incelemişlerdir. Sosa vd. (2000), 40 nm boyutundan daha küçük vinil-asetat mikro-emülsiyonlarını sentezlemişlerdir.

Charcosset ve Fessi (2005), arayüzey polimerizasyonu ile membran reaktörü kullanarak nanopartiküller sentezlemişlerdir . Nanometre boyutlu oyuk polimer partiküller radikal polimerizasyonu (Scott vd., 2005) veya polikondensasyon (Crespy vd., 2007) gibi arayüzey reaksiyonları ile sentezlenmiştir. Kuo vd. (2008),

PSS (polistiren sülfonat)'ın sulu çözeltisinde amonyum peroksidisülfat ile anilin oksidatif polimerizasyonundan faydalanarak arayüzey polimerizasyonu ile suda ayrışabilen 5-15 nm boyutlarında polianilin nanopartiküllerini sentezlemişlerdir.

2.4. Baskılanmış Nanopolimerler

Kalıp molekül olarak mellitin kullanılıp, çöktürme polimerizasyonu yöntemi ile *in vivo* uygulamalar yapılmıştır (Hoshino vd., 2008, 2010). İnsan rinovirüs immunoglobulinleri için çöktürme polimerizasyonu yöntemi ile MIP nanopartikülleri sentezlenmiştir (Schirhagl vd., 2010). Ayrıca çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenen MIP nanopartikülleri ilaç salınım sistemine de uygulanmaya çalışılmıştır. Kalıp olarak 5-floraurasil (5-FU) kullanılarak salınımı incelenmiştir (Vaihinger vd., 2002).

2.5. MIP Nanopolimerlerle Yapılmış Çalışmalar

Vulfsan vd. (1990), kalsiyum karbonatın spesifik kristal bir fazı olan kalsiti kalıp olarak kullanıp, sentetik bir nanopolimer hazırlamışlardır. Baskılanmış bölgeler, kalsiyum karbonatın başka bir polimorfu olan aragonitin yerine kalsit gelişimini seçici olarak desteklemiştir.

MIP nanopartikülleri ilaç salınımı sistemine de uygulanmaya çalışılmıştır. Kalıp olarak 5-floraurasil kullanılarak 5-FU salınımı incelenmiştir (Vaihinger vd., 2002).

Kindchy ve Alocilja. (2005), 70 nm inceliğindeki MIP filmi, elektrokimyasal bir sensör için indiyum kalay oksit (ITO) elektrodları üzerine kaplamışlardır. Sensör, model analitler için yüksek duyarlılık ve kiral seçicilik göstermiştir.

Kotrotsiou vd. (2005), tiofilin ve simozin için seçici sentetik reseptörler olarak metakrilik asit temelli MIP nanopartiküllerini sentezlemişlerdir.

Sığır hemoglobini kalıp olarak kullanılıp magnetik nanopartiküller ile protein baskılama çalışması yapılmıştır (Li vd., 2009).

Şener vd. (2010), miniemülsiyon polimerizasyonu ile yaklaşık 50 nm boyutlarında lizozim baskılanmış nanopartiküller sentezleyip QCM temelli bir nanosensör geliştirmişlerdir.

Piperno vd. (2011), elektrospon poli(vinil alkol) nanofiberleri içine moleküler baskılanmış nanopartiküller immobilize ederek floresans temelli bir biyosensör çalışması yapmışlardır.

2.6. MIP Temelli SPR Sensör Uygulamaları

Kugimiya vd. (2001), sialik asit tayini için, moleküler baskılanmış polimer kaplı sensör ile SPR çalışması gerçekleştirmişlerdir. Altın yüzeye kaplanmış polimer, sialik asit ve p-vinilbenzenboronik asit varlığında, N,N,N-trimetilaminoetil metakrilat, 2-hidroksietil metakrilat ve etilenglikol dimetakrilat ile kopolimerize edilerek hazırlanmıştır.

Li ve Hussen (2006), moleküler baskılanmış yüzeylere, dansillenmiş aminoasitleri adsorbe ederek bir yüzey plazmon rezonans çalışması yapmışlardır. Dansillenmiş aminoasit baskılanmış polimer filmler (MIP-Fs) ve baskılanmamış polimer filmler (NIP-Fs) atom transfer radikal polimerizasyonu ile altın yüzeylerde sentezlenip, kinetik çalışmalar sentezlenmiştir.

Matsunaga vd. (2007), lizozim temelli moleküler baskılanmış filmler ile yüzey plasmon rezonans çalışması gerçekleştirmişlerdir. Lizozim seçici moleküler baskılanmış ince filmler, akrilik asit ve N,N'-metilenbisakrilamitin radikalik kopolimerizasyonu ile SPR sensör altın yüzeyinde gerçekleştirilmiştir.

Uzun vd. (2009), hepatit B teşhisine yönelik, SPR temelli teşhis kitleri üretmişlerdir. Hepatit B yüzey antipadi (HBsAb), SPR çipi yüzeyinde sentezlenen poli (hidroksietilmetakrilat-N-metakrilolil-L-tirozin metil ester) filmlerine baskılanmıştır. Kalıp uzaklaştırıldıktan sonra, kinetik çalışmalar yapılmıştır.

Hao vd. (2011), yüzey plasmon rezonans tekniğini kullanarak, morfinin yüksek seçicilikte tespit edilmesini sağlayan moleküler baskılanmış polimerler sentezlemişlerdir. Polimerizasyon metakrilik asit (MAA) ve etilenglikol dimetakrilat (EDMA) varlığında, altın kaplı cam yüzeyde, azot gazı altında, 60°C'de 4 saatte gerçekleştirilmiştir. Morfin elue edildikten sonra SPR ile kinetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Wei vd. (2011), moleküler baskılama tekniğini kullanarak bir pestisit çeşidi olan asefata ultraduyarlı yüzey plazmon rezonans sensörü hazırlamışlardır. Asefata

varlığında gerçekleştirilen polimerizasyon ile baskılanmış ultra ince filmler sentezlenmiştir. Bu film SPR cihazının altın yüzeyine kaplanmıştır ve kinetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Şener vd. (2011), biyotanıma elementi olarak moleküler baskılanmış nanopartikülleri kullanarak SPR sensörü hazırlamışlardır. Lizozim baskılanmış poli(etilenglikol dimetakrilat-N-metakriloil-L-histidin metil ester) (PEDMAH) nanopartikülleri sentezlenip, SPR sensör yüzeyi bu nanopartiküllerle kaplanmıştır.

Ertürk vd. (2011), insan immunoglobulin G tayininde Fab parçacıkları baskılanmış SPR biyosensörleri hazırlamışlardır. SPR biyosensör çipi, Fab parçacıkları baskılanmış polimer nanofilmler ile kaplanıp kinetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Deneylerde, Fourier transform infrared (FTIR) spektrofotometresi (Perkin Elmer, Spektrum 100, Waltham, MA, ABD); Nükleer magnetik rezonans (NMR) cihazı (Varian Mercury Plus, 400 MHz); homojenizatör (IKA RW16); manyetik karıştırıcı (VELP Scientifica Multistirrer 15, ABD); santrifüj (Hettich Zentrifugen, Universal 32 R, Almanya); Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere); elementel analiz cihazı (Leco, CHNS-932, ABD); temas açısı analiz cihazı (Phonenix 300, ABD); Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere); Taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Carl Zeiss Evo 40, Cambridge, İngiltere); yüzey plazmon rezonans (SPR) cihazı SPRImager II (GWC Technologies, Madison ABD), spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601, ABD), Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazları kullanılmıştır.

Deneylerde, L-Triptofan metil ester ($C_{12}H_{14}N_2O_2$) (Sigma-Aldrich), hidrokinon ($C_6H_6O_2$) (Merck), diklormetan (CH_2Cl_2) (Riedel-deHaen), metakriloil klorür (C_4H_5ClO) (Fluka), trietilamin ($C_6H_{15}N$) (AcrosOrganics), sodyum hidroksit (NaOH) (Merck), etil alkol (C_2H_5OH) (Merck), hidrojen peroksit (H_2O_2)(Merck), polivinil alkol (PVA) (Sigma-Aldrich), sodyum dodesil sülfat ($C_{12}H_{25}O_4SNa$)(Sigma-Aldrich), sodyum bisülfat ($Na_2S_2O_5$) (Riedel), sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) (Riedel), amonyum persülfat [$(NH_4)_2S_2O_8$] (Sigma-Aldrich), miyoglobin (At iskelet kasından saflaştırılmış) (Sigma), hidroksietil metakrilat ($C_6H_{10}O_3$) (Merck), etilenglikol dimetakrilat [$H_2C=C(CH_3)CO_2CH_2$] $_2$) (Sigma-Aldrich), sitokrom *c* (sığır kalbinden saflaştırılmış) (Sigma), albumin (Sığır serumundan saflaştırılmış) (Sigma), etilen glikol ($HOCH_2CH_2OH$) (Sigma-Aldrich), potasyum bromür (KBr) (Merck) kimyasal maddeleri kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Metakriloil-amidotriptofan metil ester (MATrp) monomerinin sentezi

Metakriloil-amidotriptofan metil ester (MATrp) monomerinin sentezi kısaca şu şekildedir: Beş gram L-triptofan metil ester ve 0.2 g hidrokinon, 100 mL diklorometan (CH_2Cl_2) içerisinde çözüldü. Çözelti 0°C 'e soğutuldu. 12.74 g trietilamin, soğutulan çözeltiye eklendi. Beş mL metakriloil klorür yavaş yavaş bu çözeltinin üzerine eklendi. Bu karışım azot gazı altında manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Kimyasal reaksiyonun sonunda, reaksiyona girmeyen metakroil klorür, % 10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edildi. Metakriloil-amidotriptofan metil esteri içeren kısmın çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve kalan katı etanolde çözüldü (Yılmaz vd., 2000).

3.2.2. MATrp Monomerinin Karakterizasyonu

3.2.2.1. FTIR analizi

MATrp monomerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi kullanılarak elde edildi. MATrp monomerinin etil alkol ile hazırlanan çözeltisinden 100 μL alınarak temizlenmiş cam slayt üzerine damlatıldı. 40°C 'da 2 saat vakum etüvünde kurutuldu ve ATR (attenuated total reflectance) aparatı kullanılarak FTIR spektrumu alındı.

3.2.2.2. NMR analizi

MATrp monomerinin ^1H NMR spektrumu, DMSO- d_6 (Dimetil sülfoksit- d_6) içerisinde Varian Mercury Plus 400 MHz NMR cihazı kullanılarak alındı. Kimyasal kaymalar (δ) ppm cinsinden DMSO- d_6 referans alınarak rapor edildi.

3.2.3. MATrp-Mb Önkomplesinin Hazırlanışı

0.47 μmol kalıp protein (miyogloblin), 0.65 μmol MATrp monomerine eklendi ve karışım, etkin monomer-kalıp etkileşimini gerçekleştirmek için manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırıldı.

3.2.4. Poli (HEMA-MATrp) Nanopartiküllerinin Hazırlanışı

Miyogloblin baskılanmış nanopartiküllerin hazırlanmasında şu yöntem izlendi: Polimerizasyon ikili sıvı faz karışımında gerçekleştirildi. Birinci sıvı faz olarak PVA (93.8 mg), SDS (14.43 mg) ve sodyum bikarbonat (11.73 mg)'ın sulu çözeltisi (5 ml) kullanıldı. İkinci sıvı faz olarak, PVA (50 mg) ve SDS (50 mg)'nin sulu çözeltisi (100 ml) kullanıldı. Monomer fazı ise; HEMA (0.65 μ mol), EDMA (6.5 μ mol) kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan monomer fazı, birinci sıvı faza eklendi. Karışım, miniemülsiyon elde etmek için 25000 rpm'de homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Daha sonra hazırlanan MATrp-Mb önkompleksi miniemülsiyona eklendi ve manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırıldı. Karıştırma işlemi devam ederken kalıp molekülü içeren miniemülsiyon yavaşça ikinci sıvı faza eklendi. Daha sonra karışım cam polimerizasyon reaktörüne aktarıldı. Reaktör mekanik olarak karıştırıldı (300 rpm) ve 40°C'de ısıtıldı. Son olarak, sodium bisülfid (57.5 mg) ve amonyum persülfat (63 mg) karışıma eklendi. 40°C'ta 24 saat süreyle polimerize edildi. Elde edilen miyogloblin baskılanmış nanopartiküller bir kez deiyonize su, bir kez etil alkol ve tekrar deiyonize su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen monomer, yüzey aktif madde ve başlatıcı uzaklaştırıldı. Her bir yıkama basamağı için çözelti 18000 rpm'de 1 saat süreyle santrifüj edildi ve nanopartiküller yıkama ortamından ayrıldı. Temizlenen nanopartiküller, deiyonize su içerisinde tekrar dağıtıldı ve 4°C'de saklandı.

Baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküller polimerizasyon ortamında kalıp molekül (miyogloblin) olmaksızın aynı yöntem ile hazırlandı.

3.2.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.5.1. Zeta boyut analizi

Sentezlenen poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin boyut analizi, Nano Zetasizer ile belirlenmiştir. Zeta boyut analizi, ışık saçılması tekniği ile ölçüm yapan nanopartiküllerin hidrodinamik boyutu (0.6 nm-6.0 μ m aralığında), zeta potansiyeli (maksimum iletkenlik 200 mS) ve molekül ağırlığının ($1 \times 10^3 - 2 \times 10^7$ aralığında) tayinine olanak sağlayan bir sistemdir. Zeta boyut analizi için izlenen deneysel yöntem şu şekildedir: nanopartikül çözeltisi (3 mL) nanoboyut analizörünün örnek yuvasına yerleştirilmiştir. Işık saçılması 90°'lik geliş açısında 25°C'da tayin edilmiştir ve veri analizi için, deiyonize suyun yoğunluğu (0.88

mPas) ve kırılma indeksi (1.33) kullanılmıştır. Işık saçılma sinyali birim saniyedeki partikül sayısı (partikül sayısı/s) olarak hesaplanmıştır. Ölçümler 3 kere tekrarlanmıştır ve sonuçlar zeta boyut analizörünün yazılımı ile incelenmiştir ve standard sapma değerleri ile birlikte rapor edilmiştir.

3.2.5.2. Sentezlenen MIP nanopartiküllerinin yüzey alanı hesaplaması

Sentezlenen MIP nanopartiküllerinin yüzey alanlarının bulunması için 1 mL süspansiyondaki partikül sayısını veren aşağıdaki eşitlikten (Bangs, 1987) yararlanılmıştır:

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

Burada N, 1 mL süspansiyondaki nanopartikül sayısı; S, % katı; d, çap (μm); ρ_s , polimer yoğunluğunu (g/mL) göstermektedir.

Nanopartiküllere ait çizilen kütle-hacim standart grafiğinden yararlanılarak mL süspansiyondaki mg nanopartikül sayısı teorik olarak saptanmıştır. Elde edilen bu verilerden yararlanarak kürenin yüzey alanı eşitliği de kullanılıp, sentezlenen MIP nanopartiküllerinin spesifik yüzey alanı hesaplanmıştır.

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

Burada π , 3.14; r, nanopartikül yarıçapını (m) göstermektedir.

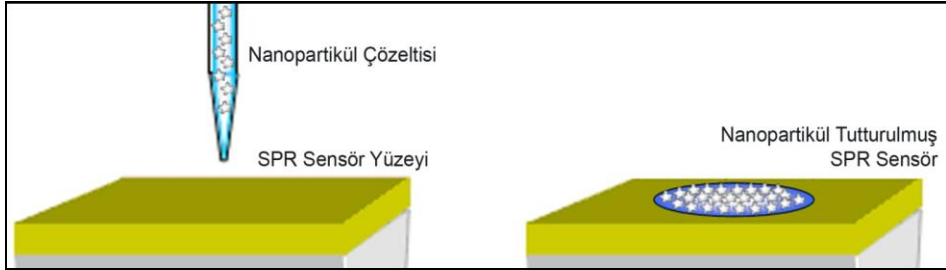
3.2.5.3. Elementel analiz

Sentezlenen nanokürelerin, triptofan içeriğinin belirlenmesi için, elementel analiz cihazı kullanılmıştır. Elementel analizin yapılmasında aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Polimerik nano yapılar (1.0 mg) elementel analiz cihazının alüminyum örnek hücrelerine yerleştirilerek ± 0.0001 g duyarlılıkla tartılmıştır. Polimerik nano yapılar cihaza konularak yakma işlemi sonucunda % karbon (C), % hidrojen (H), % oksijen (O) ve % azot (N) analizi yapılmıştır.

3.2.6. YüzeY Plazmon Rezonans Nanosensörler

3.2.6.1. YüzeY plazmon rezonans sensör yüzeyine nanopartiküllerin tutturulması

Nanopartiküllerin yüzeY plazmon rezonans sensör yüzeyine tutturulmasından önce SPR sensörün altın yüzeyi bazik pirana çözeltisi (3:1 H₂O:H₂O₂, v/v) ile temizlenmiştir. Bazik pirana çözeltisi (10 mL) içerisinde daldırılan sensör, 20 saniye çözelti içerisinde bekletilmiştir. Çözeltiden çıkarılan sensör deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkanmıştır ve vakum etüvünde (200 mm Hg, 40°C) 3 saat kurutulmuştur. YüzeYi temizlenen SPR sensörün altın yüzeyine nanopartikül çözeltisi damlatılmıştır (50 µL). Nanopartiküllerin altın sensör yüzeyinde homojen dağılması için dönel kaplayıcı kullanılmıştır. 37°C'de 3 saat kurutulmuştur. Nanopartiküllerle kaplanmış SPR sensör yüzeyi deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) kurutulmuştur.



Şekil 3.1. SPR sensör yüzeyine nanopartiküllerin tutturulması (Şener, 2010)

3.2.6.2. Kalıp molekülün desorpsiyonu

MATrp monomeri ve miyoglobin arasında ikincil kuvvetlerden kaynaklanan ortak bir etkileşim söz konusudur. Ancak temel etkileşimler, MATrp monomerinde bulunan indol grubu ile miyoglobin üzerinde bulunan apolar gruplar arasında oluşması muhtemel hidrofobik etkileşimlerdir. Kalıp molekül olan miyoglobinin polimerik yapıdan sökülebilmesi için yukarıdaki etkileşimleri kırabilecek bir desorpsiyon ajanının kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla desorpsiyon ajanı olarak pH 7.4 fosfat tamponunda hazırlanmış 1.0 M etilen glikol çözeltisi kullanılmıştır. Kalıp molekülün desorpsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir.

Yüzey plazmon rezonans sensör yüzeyine tutturulan miyoglobın baskılanmış nanopartiküller üzerine desorpsiyon çözeltisi (10 mL) eklenmiştir. Çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalanmıştır (200 rpm). Desorbe edilen sensör, deiyonize su ile yıkanmıştır ve vakum etüvünde (200 mmHg, 25°C) kurutulmuştur. Desorbe edilen miyoglobının denature olup olmadığı spektrofotometre ile belirlenmiştir.

3.2.7. Yüzey Plazmon Rezonans Nanosensörlerin Karakterizasyonu

3.2.7.1. FTIR-ATR analizi

Miyoglobın baskılanmış yüzey plazmon rezonans çiplerin yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılmıştır. Poli(HEMA-MATrp) nanopartikülleri ile kaplanmış altın çip, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiştir ve 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür.

3.2.7.2. Temas açısı analizi

Altın yüzey, yüzeyinde miyoglobın baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanopartikülleri ile kaplanmış altın yüzeylerin ıslanabilirlik özelliklerinin incelenmesi amacıyla bu yüzeylerin su, etilen glikol ve diiyodometan ile yaptıkları temas açıları ölçülmüştür ve yüzey serbest enerjileri Owens, Wendt ve Fowkes yaklaşımı kullanılarak Phoenix 300 cihazının Image XP yazılımı ile hesaplanmıştır.

3.2.7.3. AFM analizi

Miyoglobın baskılanmamış ve miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartikülleriyle kaplanmış altın yüzeyin karakterizasyonu için yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu kullanılmıştır. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı degen modda gerçekleştirilmiştir. Salınım rezonans frekansı, 341.30 Hz olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği, 1 V_{RMS} ve boş titreşim genliği ise 2 V_{RMS} 'dir. Örneklerden 2 $\mu\text{m/s}$ tarama hızında, 256 x 256 piksel çözünürlükte, 2 x 2 μm^2 lik alanların görüntüsü alınmıştır.

3.2.7.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanosensörlerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Analiz edilecek örnekler ilk olarak vakum altında çok ince bir altın tabaka (100 Å) ile kaplanmıştır ve ardından taramalı elektron mikroskop kullanılarak (Carl Zeiss Evo 40, Cambridge, İngiltere) görüntüleri alınmıştır.

3.2.7.5. Elipsometre Analizi

Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanosensörlerin yüzeylerindeki kalınlık ölçümleri tek dalgaboylu Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile karakterize edilmiştir. Kalınlık ölçümleri 658 nm dalga boyunda, 60° ve 72°'lik geliş açılarında gerçekleştirilmiştir. SPR nanosensör lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiştir. Yüzey kalınlığı hesaplama program için SF10 cam substrat üzerinde hava/polimer/altın ve krom katmanlarından oluşan dört fazlı modelleme veri olarak öngörülmüştür. Ölçümler nanosensör yüzeyinde 9 farklı noktadan alınmış, sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edilmiştir.

3.2.8. Miyoglobın Baskılanmış Poli (HEMA-MATrp) Nanopartiküllerle Adsorpsiyon Çalışması

Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllere miyoglobın adsorpsiyonu deneyleri kesikli sistemde incelenmiştir. Polimerik nanopartiküller , 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0 mg/mL derişimlerinde 10 mL miyoglobın çözeltileriyle denge süresi boyunca (2 saat) 130 rpm hızda magnetik olarak karıştırılmıştır. Çözeltilerdeki miyoglobın derişimi 280 nm'de spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Polimerik nanopartiküllere miyoglobın adsorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesi için ise Eşitlik 3.3 kullanılmıştır.

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

Burada q, birim nanopartikül üzerine adsorplanan miyoglobın kütlesini (mg/g); C_o ve C sırasıyla, nanopartiküller ile miyoglobın etkileştirilmeden önceki ve nanopartiküller ile miyoglobın etkileştirildikten sonraki derişimlerini (mg/mL); V, hacmi (mL); m, deneylerde kullanılan nanopartikül kütlesini (g) göstermektedir.

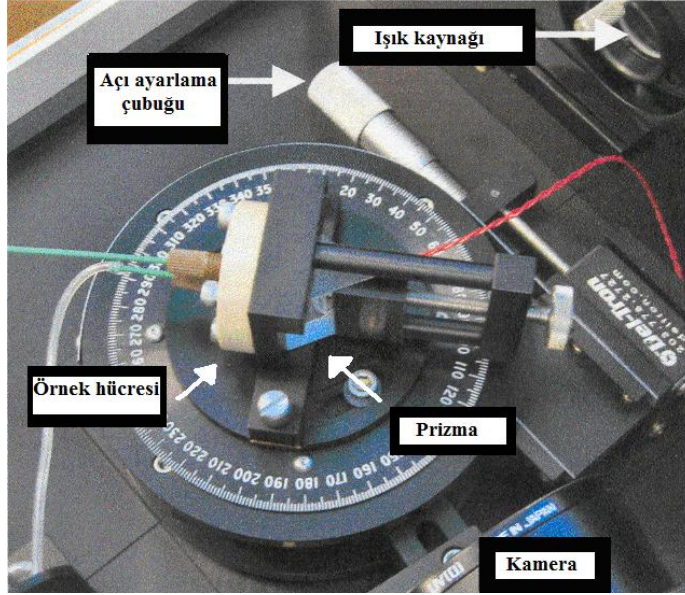
3.2.9. YüzeY Plazmon Rezonans Sistemi ile Plazmon Ölçümleri

Hazırlanan miyoglobin baskılanmış poli (HEMA-MATrp) nanosensör ile kinetik analizler Şekil 3.2’de gösterilen yüzeY plazmon rezonans sistemi SPRimager II ile gerçekleştirilmiştir. Sensogramların elde edilmesinde sistem ile birlikte sağlanan Digital Optics V++ görüntüleme yazılımı ve bu yazılımla birlikte çalışan Microsoft Excel programı kullanılmıştır. Sistem, lazer kaynağı, ayna sistemi, kamera sistemi, peristaltik pompa ve bilgisayardan oluşmaktadır (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. SPRimager II (GWC Technologies, Madison, ABD) yüzey plazmon rezonans sistemi (Osman, 2011)

Miyoglobın baskılanmış nanopartikül kaplı yüzey plazmon rezonans çip ile kinetik analizler yapılabilmesi için hazırlanan çip, nanopartikül kaplı yüzeyi akış hücresi yönünde olacak şekilde örnek tutucuya yerleştirilmiştir ve üzerine kırılma indisi eşitleyici sıvı (kırılma indisi: $1,720 \pm 0,0005$, Cargille Laboratories series M fluid) damlatılarak üzerine prizma yerleştirilmiştir. Bu sayede SF-10 cam prizma ile altın çip arasındaki bağlantı sağlanmıştır. Ardından akış hücresi, giriş ve çıkış uçları da örnek tutucuya eklenerek örnek hücresi hazırlanmıştır ve kinetik analizlerin gerçekleştirilmesi için cihaza yerleştirilmiştir. Sıcaklık sensörü kullanılarak sıcaklık 25°C 'a sabitlenmiştir ve tüm sensogramlar bu sıcaklıkta alınmıştır.



Şekil 3.3. GWC SPRImager II cihazının temel ekipmanları (Osman, 2011)

3.2.10. Nanosensörle Kinetik Analizler

Kinetik çalışmalar, farklı derişimlerdeki miyoglobin çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiler 20 mM pH 7.4 fosfat tamponuyla 300-10000 ng/mL arasında hazırlanarak SPR sistemine verilmiştir. Kinetik analiz çalışmalarında yüzeyine miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküller tutturulan SPR nanosensör kullanılmıştır. Örnek hücresi hazırlanarak cihaza yerleştirilmiştir. İlk olarak sisteme 20 mM pH 7.4 fosfat tamponu gönderilerek çip üzerindeki polimer yüzeyinin ıslanması sağlanmıştır ve yüzeyden 150 μ L/dakika hızında 30 dakika süre ile 20 mM pH 7.4 fosfat tamponu geçirilmeye devam edilmiştir. Daha sonra geliş açısı yüzey plazmon rezonans açısına yakın bir açıya sabitlenerek sensogram alınmaya başlanmıştır. Sistemden ilk olarak 20 mM pH 7.4 tamponu geçirilmiştir ve ardından analizi yapılacak olan çözelti çip yüzeyine gönderilerek yansıyan ışığın şiddetindeki değişim farkı değerleri anlık olarak gözlenerek denge durumuna geldiğinde (yaklaşık 25 dakika) sisteme tekrar 20 mM pH 7.4 fosfat tamponu verilerek spesifik olarak bağlanmayan analit molekülleri yüzeyden uzaklaştırılmıştır. Ardından yüzeye 10 dakika 1.0 M etilen glikol karışımı verilerek desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonra, yüzey plazmon rezonans sensörünün yüzeyi 10 dakika su ve tekrar dengeye gelene kadar (yaklaşık 10

dakika) 20 mM pH 7.4 tamponu ile yıkanarak rejenere edilmiştir. Ardından cihazla birlikte verilen yazılımlar kullanılarak sensogram elde edilmiştir.

3.2.10.1. Yarışmalı kinetik analizler

Miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin seçiciliğini göstermek için miyoglobin, sığır serum albumini (BSA) ve sitokrom *c* proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar (tekli, ikili, üçlü çözeltiler) SPR sistemine gönderilerek yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiler, 20 mM pH 7.4 tamponunda 1000 ng/mL derişiminde hazırlanmıştır ve poli(HEMA-MATrp) nanosensör yüzeyine gönderilerek sensogramlar alınmıştır.

3.2.11. Poli(HEMA-MATrp) Sensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için 20 mM pH 7.4 fosfat tamponunda 1000 ng/mL derişiminde hazırlanan miyoglobin, sığır serum albumini (BSA) ve sitokrom *c* proteinleri ve bu proteinlerin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar (tekli, ikili, üçlü) baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanosensör yüzeyine gönderilerek sensogramlar alınmıştır.

3.2.12. Kan Örneği İle Analizler

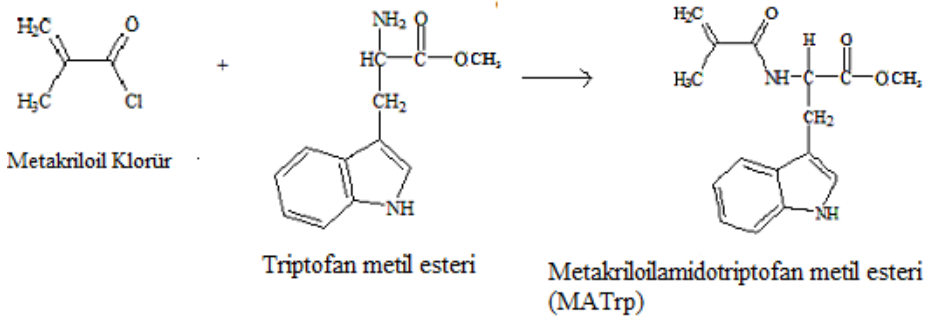
Hazırlanan miyoglobin baskılanmış poli (HEMA-MATrp) nanosensörün gerçek örnekler ile kullanılabilirliğinin ve mevcut yöntemler ile uyumluluğunun araştırılabilmesi için kan örneği kullanılmıştır. Kan örneği Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilimdalı yoğun bakım bölümüne kalp krizi şikayeti ile gelen hastadan alınmıştır (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu Karar No: 2008-19/30, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu Karar No:B.30.2.ADÜ.0.20.05.00/050.04-36). Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) içeren vakumlu tüpler ile toplanmış olan kan, kırmızı kan hücrelerinin uzaklaştırılması için oda sıcaklığında 30 dakika 4000 g'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra plazma kısmı 3 µm'lik filtreden geçirilmiş ve -20°C'da dondurularak saklanmıştır. Kullanmadan önce plazma 37°C'da 1 saat bekletilerek tavlanmıştır. Uygulamadan önce, plazma örneklerinin seyreltilmesinde % 0,95 NaCl içeren izotonik çözelti kullanılmıştır. Kan örneğinin analizinde kanın kırılma indisi değişiminden gelebilecek hataları azaltmak için standart katma metodu kullanılmıştır. Kan örneğindeki toplam seyrelme miktarı 1:8 olacak şekilde önce

kör örnek, ardından da aynı seyrelme oranında, miyoglobin derişimi 300, 500, 700, 900, 1000 ve 1500 ng/mL olan çözeltiler % 0,95 NaCl içeren izotonik çözelti kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör yüzeyine gönderilerek % ΔR /zaman değişiminden oluşan sensogramlar alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

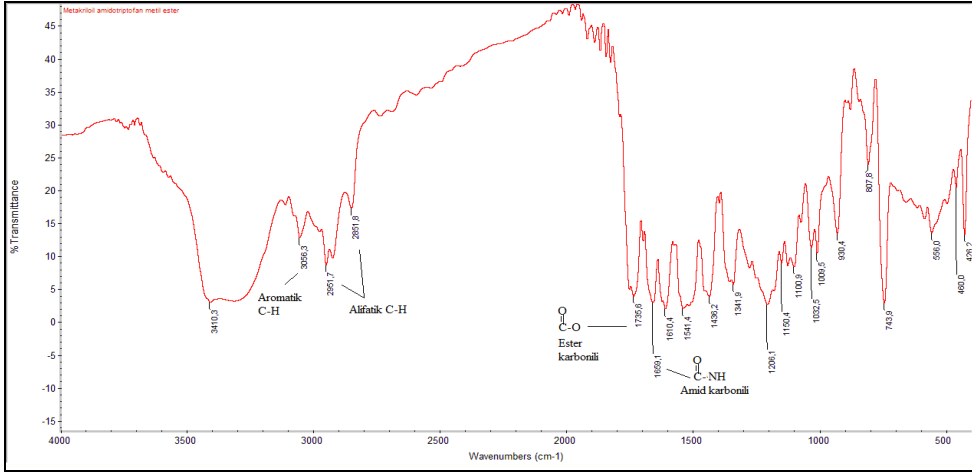
MATrp monomeri, L-triptofan metil esterinin metakrilil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen monomer, NMR ve FTIR spektrumları alınarak karakterize edilmiştir.



Şekil 4.1. MATrp monomerinin sentez reaksiyonu

4.1.1. FTIR Analizi

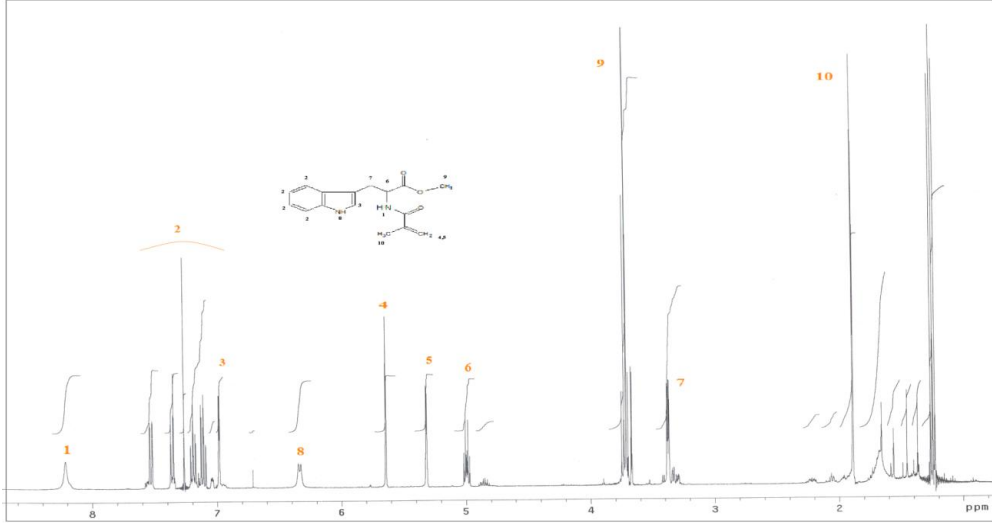
Şekil 4.2’de MATrp monomerinin FTIR spektrumu verilmiştir. Spektrum üzerinde bileşiğe ait olan karakteristik bandlar gösterilmiştir. 3100-3000 cm^{-1} aralığında aromatik C-H, 2952 ve 2853 cm^{-1} ’de alifatik C-H gerilmelerinden kaynaklanan absorpsiyon bandları gözlenmektedir. 1734 cm^{-1} ’de ester karbonil (C=O) grubuna ait gerilme bandı, 1659 cm^{-1} ’de ise amid karbonil grubuna ait gerilme bandı yer almaktadır. N-H gerilme titreşiminden kaynaklanan absorpsiyon bandı da 3500 cm^{-1} civarında ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.2. MATrp Monomerinin FTIR spektrumu

4.1.2. NMR Analizi

MATrp monomerinin kimyasal yapısının belirlenebilmesi için $^1\text{H-NMR}$ tekniği de kullanılmıştır. Şekil 4.3 MATrp'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunu göstermektedir. Monomerin yapısında bulunan ilgili protonlara ait pikler spektrum üzerinde gösterilmiştir. Karakteristik pikler şöyledir: **(1)** 8,22 (1H s, CONH), **(2)** 7,54-7,09 (4H Ar-H), **(3)** 6,98 (1H, s, 5'li halka), **(4)** 5,64 (1H, s, CH_2), **(5)** 5,32 (1H, s, CH_2) **(6)** 4,99 (1H, t, CH) **(7)** 3,38 (2H, d, CH_2) **(8)** 6,34 (1H, d, amid NH), **(9)** 3,71 (3H, s, OCH_3), **(10)** 1,24 (3H, s, CH_3), (400 MHz, DMSO- d_6).

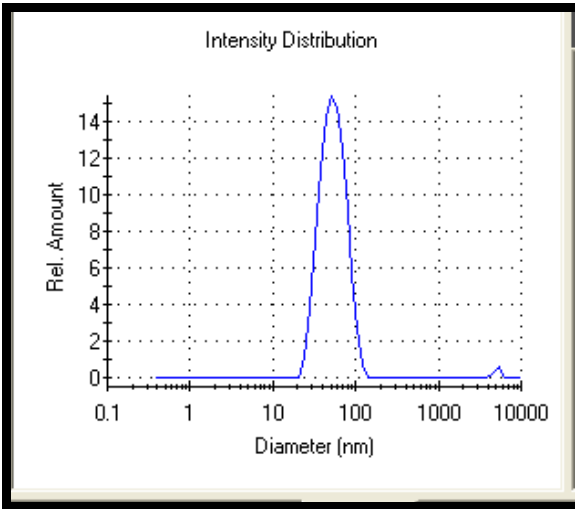


Şekil 4.3. MATrp monomerinin ¹H-NMR spektrumu

4.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.3.1. Nanopartiküllerin Boyut Analizi

Şekil 4.4’de miyoglobin baskılanmış nanopartiküllerin zeta boyut analizi sonuçları görülmektedir. Miyoglobin baskılanmış partiküllerin ortalama boyutu 50 nm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.4. Nanopartiküllerin zeta boyut analizi

4.3.2. Yüzey Alanı Hesaplaması

Nanopartiküllere ait çizilen kütle-hacim standart grafiğinden yararlanılarak mL süspansiyondaki mg nanopartikül miktarı teorik olarak saptanmıştır. Elde edilen bu verilerden yararlanarak kürenin yüzey alanı eşitliği de kullanılıp, sentezlenen MIP nanopartiküllerinin spesifik yüzey alanı $1283,3 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak hesaplanmıştır.

4.3.3. Elementel Analiz

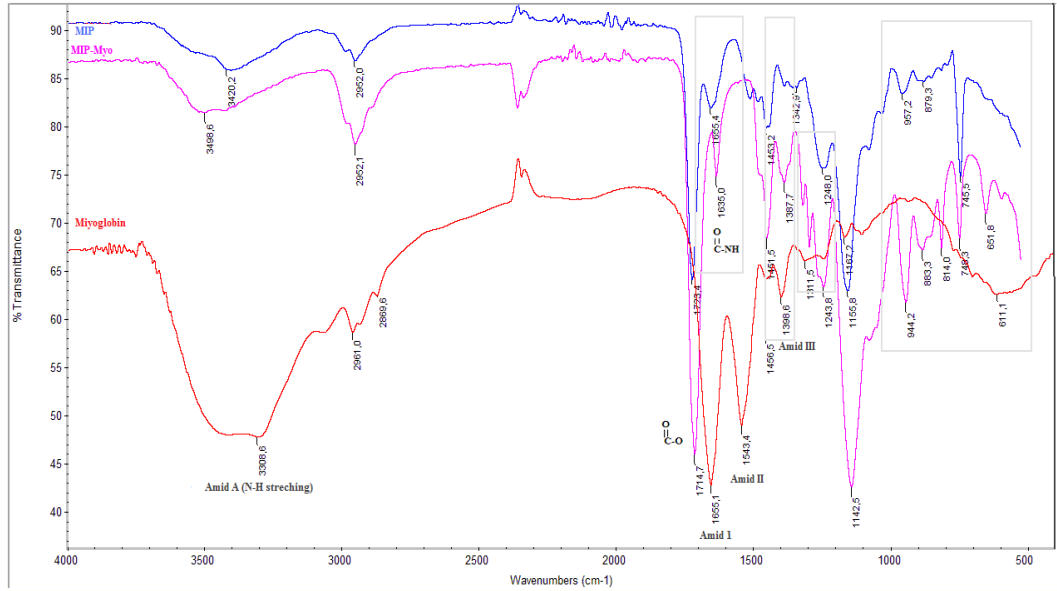
Sentezlenen nanopartiküllerin, triptofan içeriğinin belirlenmesi için elementel analiz gerçekleştirilmiştir ve 1 g nanopartikül başına 6,5 mg triptofan olduğu hesaplanmıştır.

4.4. Nanosensörlerin Karakterizasyonu

4.4.1. FTIR Analizi

Şekil 4.5’de MIP, MIP-Mb ve miyoglobinin FTIR spektrumları görülmektedir. MIP-Mb, MIP üzerine protein adsorpsiyonu ile hazırlanmıştır. İlgili absorpsiyon bandları spektrum üzerinde gösterilmiştir.

Miyoglobin tipik protein absorpsiyon bandlarına sahiptir. MIP-Mb MIP spektrumunda olmayan bazı gerilme ve titreşim bandlarına sahiptir. Bu miyoglobinin adsorpsiyonundan kaynaklanmaktadır. MIP için 1655 cm^{-1} ’de gözlenen amid karbonil titreşimi MIP-Mb için 1635 cm^{-1} değerine kaymıştır. Ayrıca miyoglobin spektrumunda 1398 cm^{-1} de gözlenen kuvvet alanı, yan zincirlerin doğası ve hidrojen bağları ile ilgili detaylara bağlı olan amid III bandı MIP-Mb spektrumunda 1387 cm^{-1} ’de gözlenmiştir. Bunun yanında $1315\text{-}1240 \text{ cm}^{-1}$ aralığında MIP spektrumunda gözlenmeyen bandlar ortaya çıkmıştır. Bu da sentezlenen poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin miyoglobin bağladığının bir kanıtıdır.

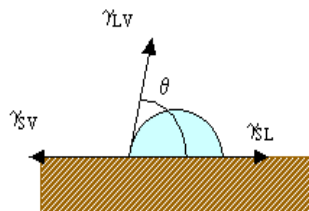


Şekil 4.5. MIP, MIP-Mb ve miyoglobinin FTIR spektrumları

4.4.2. Temas Açısı Analizi

Temas açısı bir sıvının bir yüzeye yayılabilme ölçüsüdür. Metod, bir katı üzerindeki damlanın teğet noktasının ve bu katının yüzeyi arasındaki açının ölçümüne dayanır. Temas açısı yüzey enerjisinin bir ölçüsüdür ve polar ve apolar etkileşimler arasındaki farka dayanarak yüzey enerjisinin hesaplanmasında kullanılır (Owens ve Wendt 1969; Neumann vd., 1979; Van Oss vd., 1987).

Bir damla katı yüzeyine damlatıldığında, katı yüzeyi ve damlanın teğet noktası arasındaki açı temas açısıdır (θ) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Temas açısı

Temas açısı ölçümü üç bilgi verir:

- Katı yüzeyine sıvının afinitesi: Eğer temas açısı ölçümü için su kullanılıyorsa, yüzeyin hidrofobik (büyük açı) veya hidrofilik (küçük açı) karakterde olduğu anlaşılabilir.
- Eğer çeşitli referans sıvıları kullanılırsa, polar ve dispersiv bileşenler arasındaki farktan katının yüzey enerjisi hesaplanabilir.
- Gelen ışık ve yansıyan ışık arasındaki gecikme yüzeyin homojen olmadığını gösterir (pürüzlü, kirli gibi).

Katı yüzeyindeki damlanın şeklini etkileyen üç parametre vardır:

Katı-sıvı arayüzey gerilimi γ_{SL}

Katı-gaz arayüzey gerilimi $\gamma_{SV}(\gamma_S)$

Sıvı-gaz arayüzey gerilimi $\gamma_{LV}(\gamma_L)$

Bu üç parametre Young eşitliği ile temas açısı θ 'ya bağlanır:

$$-\gamma_{SV} + \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta = 0 \quad 4.1$$

γ_{LV} ve θ ölçülebilir bu yüzden γ_{SL} ve γ_{SV} tespiti için ek eşitlikler gerekmektedir.

Owens & Wendt Model

Owens ve Wendt, yüzey enerjisini iki bileşene ayırır. Dispersif etkileşimlere bağlı yüzey enerjisi ve polar etkileşimlere bağlı yüzey enerjisi. Bu teori Young eşitliğinden türemiştir:

$$\frac{\sigma_L (\cos \theta + 1)}{2\sqrt{\sigma^{DL}}} = \frac{\sqrt{\sigma^{PS}}\sqrt{\sigma^{PL}}}{\sqrt{\sigma^{DL}}} + \sqrt{\sigma^{DS}} \quad 4.2$$

Bu eşitlik $y = mx + b$ şeklindedir:

$$y = \frac{\sigma_L (\cos\theta + 1)}{2\sqrt{\sigma^D L}} \quad m = \sqrt{\sigma^P S}; \quad x = \frac{\sqrt{\sigma^P L}}{\sqrt{\sigma^D L}}; \quad b = \sqrt{\sigma^D S} \quad 4.3$$

Fowkes Modeli

Fowkes modeli Owen Wendt modelinin biraz değiştirilmesinden türemiştir.

$$\frac{\sigma_L (\cos\theta + 1)}{2} = \sqrt{\sigma^P S} \sqrt{\sigma^P L} + \sqrt{\sigma^D S} \sqrt{\sigma^D L}$$

4.4

Eşitliğin her iki tarafı da $\sqrt{\sigma^D L}$ 'a bölünürse Owen-Wendt eşitliğine dönülür.

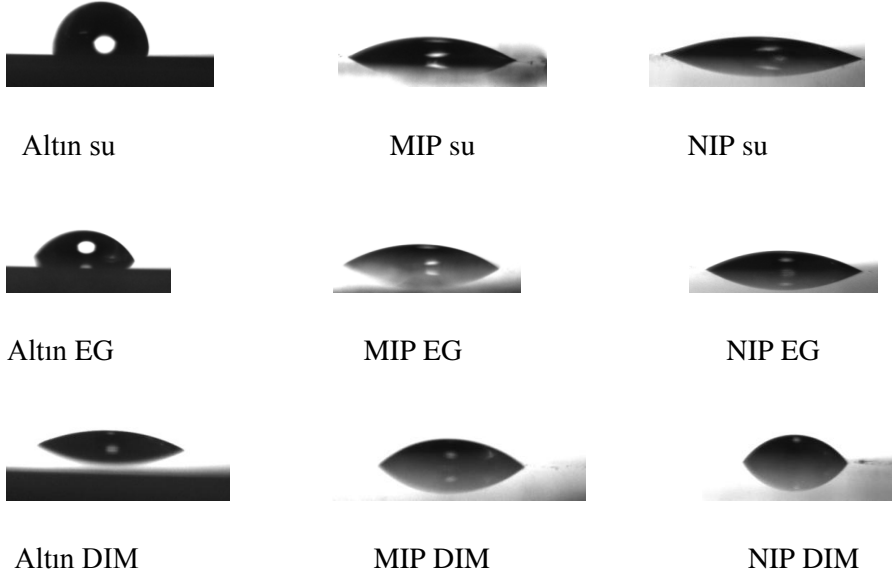
Fowkes modelinde genellikle iki ana sıvı kullanılır; birisi apolar bir sıvı olan diiyodometan (DIM) diğeri polar bir sıvı olarak bilinen sudur (Owens ve Wendt 1969; Neumann vd., 1979; Oss vd., 1987)

Altın yüzey, miyoglobın baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanoküreleri damlatılmış altın yüzeylerin ıslanabilirlik özelliklerinin incelenmesi amacıyla bu yüzeylerin su, etilen glikol ve diiyodometan ile yaptıkları temas açıları ölçülmüş ve yüzey serbest enerjileri Owens, Wendt, Fowkes yaklaşımı kullanılarak hesaplanmış ve Çizelge 4.1'de özetlenmiştir. Şekil 4.7'de ise sırasıyla su, etilen glikol, ve diiyodometan ile alınan temas açısı görüntüleri verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yüzey enerjilerini hesaplamada kullanılan sabitler

Yüzey	Temas Açısı, ^o H ₂ O	Temas Açısı, ^o Etilen Glikol	Temas Açısı, ^o DIM	Yüzey Serbest Enerjisi (mN/m)
Altın yüzey	95,34±4,9	59,84±4,8	28,12±2,4	44,09±4,1
MIP nanopartikülleri damlatılmış altın film	30,25±3,08	30,95±3,65	44,68±4,7	58,69±5,3
NIP nanopartikülleri damlatılmış altın film	19,62±5,7	22,92±4,2	47,97±4,4	63,30±5,6

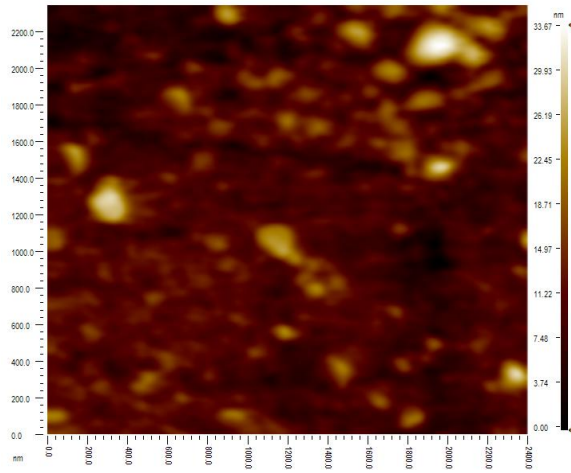
Su ile yapılan temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi altın yüzeyin temas açısı değeri $95,34^{\circ} \pm 4,9'$ dur. Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA- MATrp) nanoküre damlatılmış altın yüzey temas açısının ($59,84 \pm 4,8$), miyoglobın baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanoküre damlatılmış altın yüzey ($19,62 \pm 5,7$) değerine sahip olması, poli(HEMA-MATrp) yapısı içerisinde miyoglobın kalmadığının göstergesidir. Yüzeyin temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. Bu çalışmada temel yaklaşım nanopartikül temelli nanosensörlerin hazırlanmasıdır. Bu bağlamda moleküler baskılan(ma)mış nanopartiküller SPR sensör yüzeyine tutturulmuştur. Nanopartiküllerin yüzeye tutturulması sonucunda yüzeydeki pürüzlülük artmaktadır. Yüzey pürüzlülüğündeki artış yüzeyin hidrofilitesini arttırmaktadır.



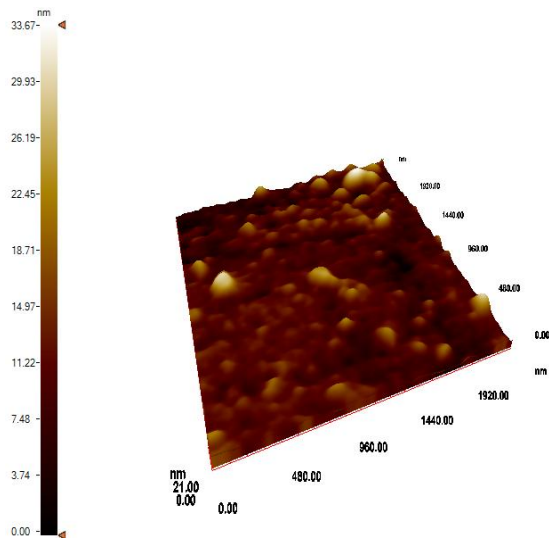
Şekil 4.7. Su, etilen glikol, ve diiyodometan ile alınan temas açısı görüntüleri

4.4.3. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi (AFM)

Miyoglobin baskılanmamış ve miyoglobin baskılanmış nanopartiküllerle kaplı altın yüzeyin yüzey morfolojisi yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Miyoglobin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanopartikülleri tutturulmuş SPR nanosensörün yüzey derinliği, 33.67 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8). Miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartikülleri tutturulmuş SPR nanosensörün yüzey derinliği 38.19 nm (Şekil 4.9) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, nanopartiküllerin yüzeye başarılı bir şekilde tutturulduğunu göstermektedir.

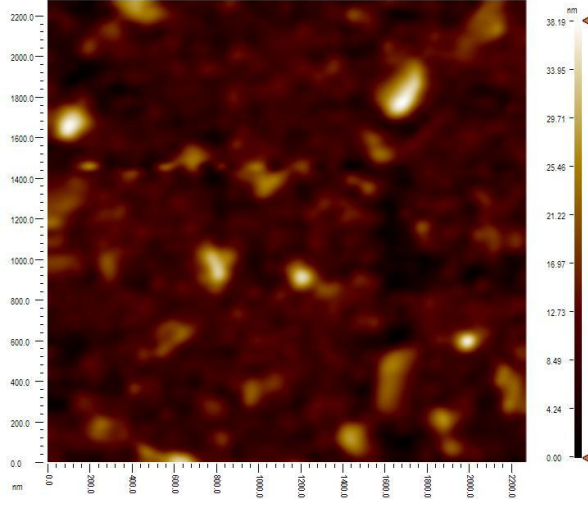


(a)

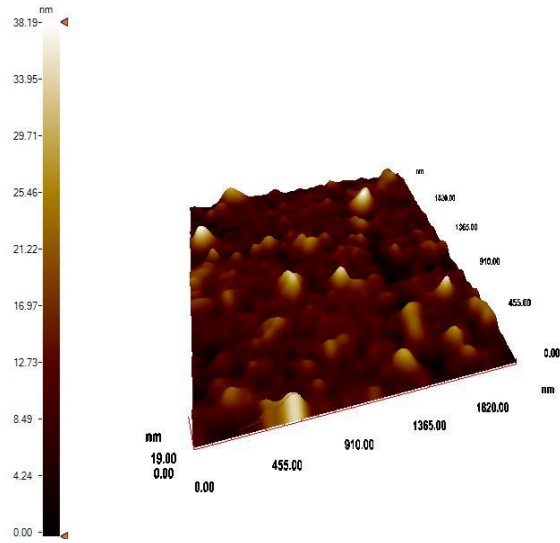


(b)

Şekil 4.8. Miyogloblin baskılanmamış SPR nanosensörün yarı değen modda alınan AFM görüntüleri (a) Yüzey görüntüsü, (b) 3B görüntüsü.



(a)

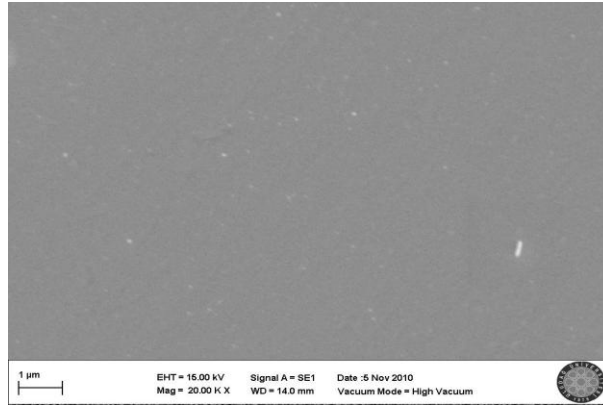


(b)

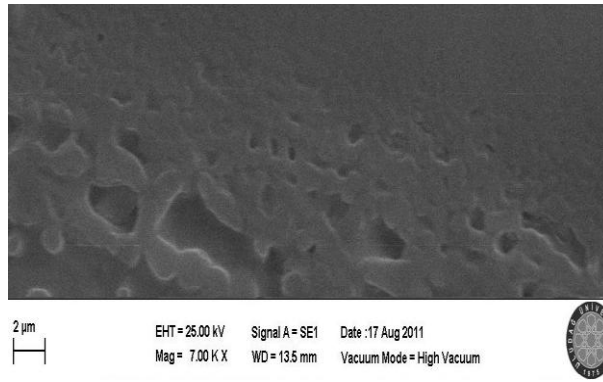
Şekil 4.9. Miyoglobun baskılanmış SPR nanosensörün yarı değen modda alınan AFM görüntüleri (a) Yüzey görüntüsü, (b) 3B görüntüsü.

4.4.4. SEM Analizi

Altın çip ve miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanaopartikül kaplı altın çipe ait yüzey görüntüleri Şekil 4.10'da verilmiştir. SEM görüntüleri altın yüzeyin nanoküreler ile kaplandığının kanıtıdır.



(a)



(b)

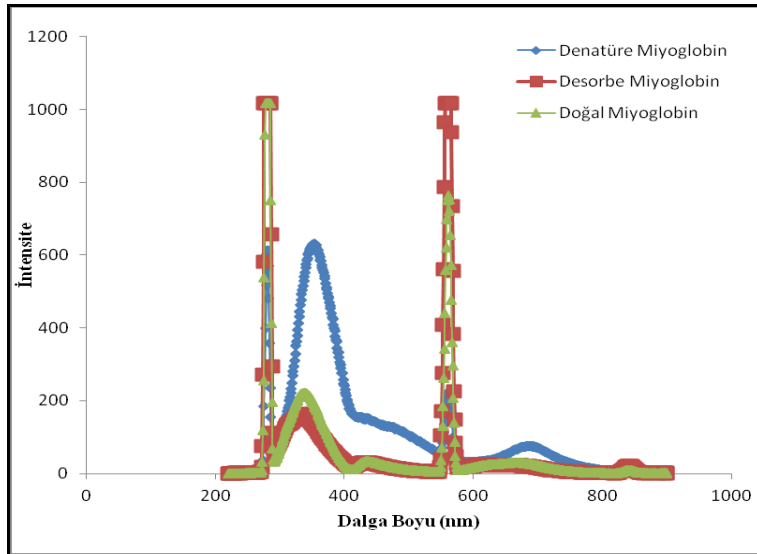
Şekil 4.10. (a) Altın yüzeyin SEM görüntüsü (b) Nanoküre kaplı altın yüzeyin SEM görüntüsü

4.4.5. Elipsometre Analizi

Miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartikül kaplı altın çipin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir. Kalınlık ölçümleri 658 nm dalga boyunda, 60° ve 72°'lik geliş açılarında gerçekleştirilmiştir. Miyoglobin baskılanmış nanosensörün ortalama kalınlık değerleri 60° ve 72° için sırasıyla 11.9 ± 1.7 nm ve 10.8 ± 6.03 nm olarak hesaplanmıştır.

4.5. Miyoglobinin Spektroflorimetrik Analizi

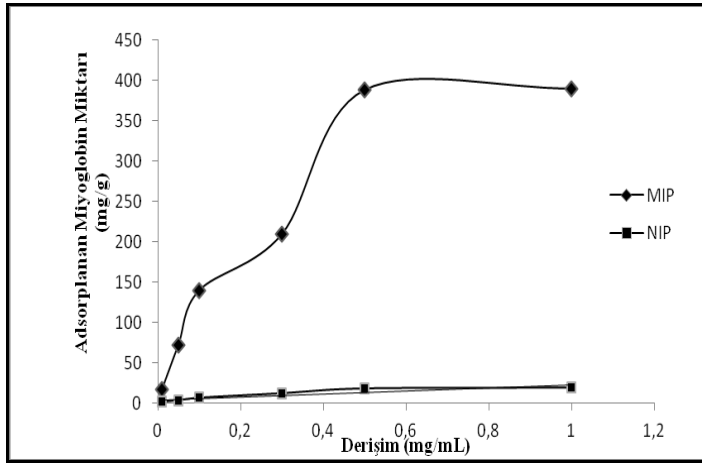
Miyoglobin'in denatürasyonu için hazırlanan 5 mg/mL'lik çözelti 75°C'de 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra miyoglobin, desorbe ve denature miyoglobin çözeltileri 280 nm'de uyarılmış ve 200-900 nm'de emisyon spektrumları alınmıştır (Şekil 4.11). Desorbe miyoglobin'in spektrumu doğal formdaki miyoglobin'in spektrumu ile benzer davranışlar göstermektedir. Ancak denature edilmiş miyoglobin, diğer spektrumlarda gözlenmeyen bir emisyon bandına sahiptir (681 nm). Şekil 4.11'deki spektrum polimerik yapıdan miyoglobin'in denature edilmeden başarı ile söküldüğünü göstermektedir



Şekil 4.11. Doğal, desorbe ve denatüre miyoglobin çözeltilerinin spektroflorimetrik spektrumları

4.6. Miyoglobın Baskılanmış Poli (HEMA-MATrp) SPR Nanosensör İle Kesikli Sistemde Adsorpsiyon Çalışması

Başlangıç derişiminin miyoglobın adsorpsiyonuna etkisi Şekil 4.12`de verilmiştir. Őekilden grldği gibi, çözeltideki miyoglobın derişiminin artmasıyla, MIP nanopartiküller tarafından birim kütle başına adsorplanan miyoglobın miktarı çalışılan kesikli sistemde 0,5 mg/mL`den düşük derişimlerde artmış, daha sonra dengeye ulaşmıştır. Bu adsorpsiyon davranışında beklenen bir durumdur. Derişimin artması ile adsorpsiyon için sürücü kuvvet olan derişim farkı (ΔC) artmaktadır. Sürücü kuvvetin artması ile adsorpsiyon kapasitesinde de artış gözlenmektedir.



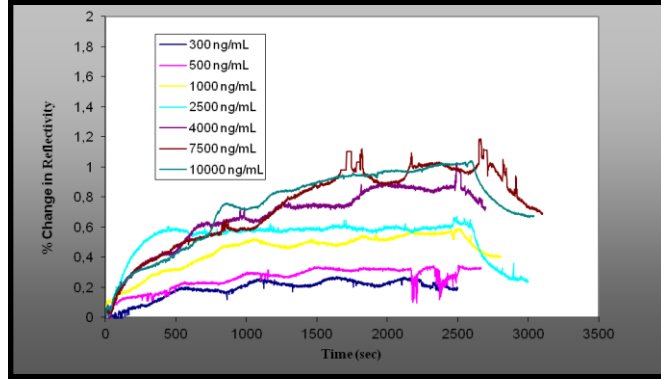
Şekil 4.12. Miyoglobın adsorpsiyonuna miyoglobın başlangıç derişiminin etkisi

NIP Nanoyapılara miyoglobın adsorpsiyonu ihmal edilebilir düzeydedir (18,855 mg/mL). Kesikli sistemdeki çalışmalarda MIP için maksimum miyoglobın adsorpsiyonu, 0.5 mg/mL derişim için 388.273 mg/g olarak bulunmuştur.

4.7. Miyoglobın Baskılanmış Poli (HEMA-MATrp) SPR Nanosensör İle Kinetik Analizler

Bu çalışmada miyoglobın baskılanmış SPR nanosensör hazırlanmıştır. Miyoglobın derişimi ile SPR sinyali arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde (300-10000 ng/mL) miyoglobın çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler peristaltik pompa aracılığıyla poli(HEMA-MATrp) nanosensrle etkileştirilerek

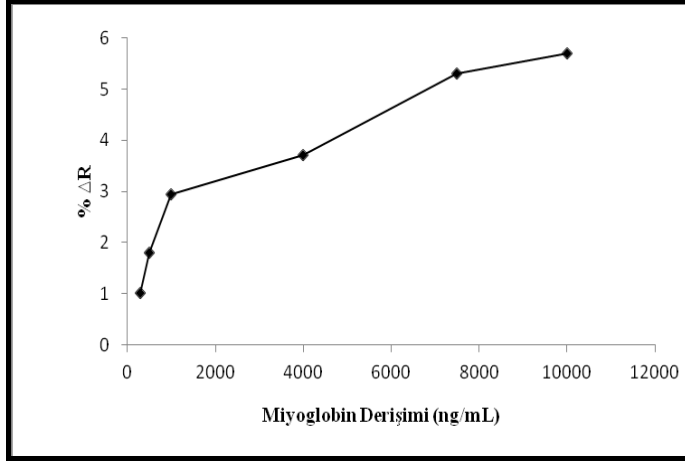
sensogramlar alınmıştır. Şekil 4.13’de farklı derişimlerde miyogloblin çözeltileri ile etkileşimden elde edilen sensogramlar toplu halde görölmektedir.



Şekil 4.13. Miyogloblin çözeltileri ile poli(HEMA-MATrp) sensör arasındaki etkileşimlere ait sensogramlar

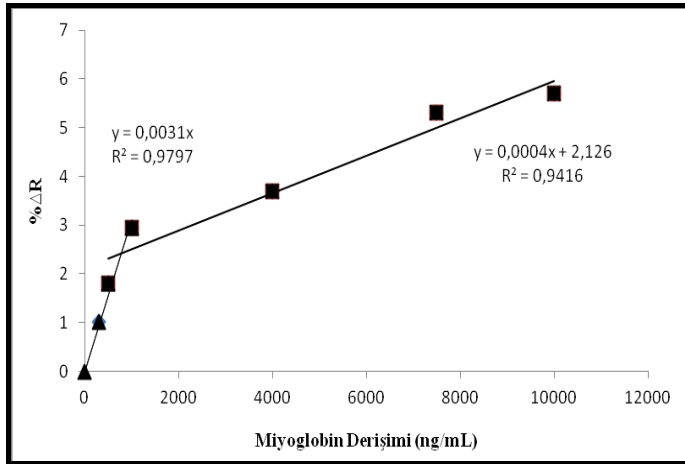
Şekil 4.13’ de görüldüğü gibi yüzeye miyogloblin gönderilmesi ile birlikte % ΔR değeri artmaktadır. Standart bir ölçümde, sistemden öncelikle denge tamponu, daha sonra sistem yeniden dengeye ulaşana kadar miyogloblin çözeltileri geçirilmiş ve son aşamada tekrar denge tamponu kullanılmıştır. Bütün ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için yaklaşık 25 dakika beklenmiştir.

Şekil 4.14’de görüldüğü gibi miyogloblin derişimi arttıkça ΔR değerlerinin de arttığı daha açık bir şekilde görölmektedir.



Şekil 4.14. Miyoglobin derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki

Bu değer yaklaşık 7500 ng/mL civarında dengeye ulaşmış ve denge değeri 5,33 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.15’de görüldüğü gibi SPR nanosensör, iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Şekil 4.14’de görüldüğü gibi 0-10000 ng/ml aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğruların denklemi ($y = 0,0031x$), ($y = 0.0004x + 2.0057$) ve doğrusallıkları (R^2) sırasıyla 0.9797 ve 0.9293 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre, miyoglobin molekülleri SPR yüzeyine iki farklı bölgeden yüksek afinite ile bağlanmaktadır (Tamayo vd., 2007).

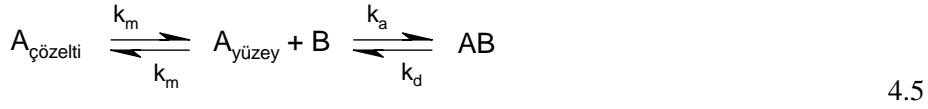


Şekil 4.15. SPR nanosensörünün derişim-sinyal grafiğı

Hazırlanan poli(HEMA-MATrp) nanosensör için elde edilen veriler kullanılarak tayin sınırı (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri R^2 değeri 0,9797 olan derişim aralığı için belirlenmiştir. Tayin sınırının (LOD) hesaplanması için $3s/m$ denklemi kullanılmıştır. Bu eşitlikte, s değeri sensör yüzeyinden geçen denge çözeltisi (kör çözelti) geçerken alınan sinyal değeri (ΔR) ölçümlerine ait standart sapma değeri ve m de kalibrasyon grafiğinin eğimidir. Kör çözelti için ΔR değeri 10 ölçümün ortalaması alınarak, ölçümlere ait standart sapma değeri ile birlikte $0,034780 \pm 0,0219$ olarak belirlenmiştir. Buna göre kalibrasyon grafiğine ait yukarıdaki denklem kullanılarak tayin sınırı (LOD) $4,72 \text{ ng/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Tayin limitinin (LOQ) hesaplanması için ise $10s/m$ eşitliğinden yararlanılmış ve tayin limiti $15,74 \text{ ng/mL}$ olarak belirlenmiştir.

4.8. Denge ve Bağlanma Kinetik Analizleri

SPR biyosensörlerde, rezonans sinyalindeki değişimler % kırınım, % ΔR , rezonans birimi (RU) gibi farklı şekillerde ifade edilebilir. Bu değişimler zamanın fonksiyonu olarak izlenir ve sensogramlar ile gösterilir. Bu verilerden, çip ile analit arasındaki bağlanma kinetik sabitleri hesaplanabilir. Analit (A) ve SPR çip (B) arasında akış hücresinde oluşan AB kompleksinin oluşumu basit olarak şu şekilde gösterilebilir:



Burada; k_m analitin yüzeye bağlanma ve yüzeyden ayrılma hız sabiti (her iki yönde de aynıdır); k_a ve k_d kompleks oluşum hız sabitleridir.

Kompleks oluşum hızı:

$$d[AB]/dt = k_a[A]([B]_0 - [AB]) - k_d[AB] \quad 4.6$$

$[AB]$ bağlanan analit miktarı; $[A]$, serbest analit miktarı; $[B]_0$, sensörün toplam ligand yoğunluğudur. Bu durumda bağlanmanın ileri ve geri yöndeki tepkimelerinin hız sabitleri ve bağlanma sabitleri aşağıda anlatılan iki yaklaşım kullanılarak hesaplanmaktadır.

Denge Analizi

Toplam ligand miktarı ($[B]_0$), yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak tanımlanırsa diğer tüm derişim değerleri SPR sinyali olarak ifade edilebilir. Böylelikle kütlenin derişime dönüştürülme işleminin yapılmasına gerek kalmayacaktır. Serbest analit derişiminin akış hücresinde sabit kaldığı yalancı-birinci derece koşulları altında bağlanma şu şekilde ifade edilir:

$$d\Delta R / dt = k_a C (\Delta R_{\max} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad 4.7$$

Burada, $d\Delta R/dt$, SPR sinyalinin değişim hızı; R ve R_{\max} , bağlanma ile ölçülen ve maksimum sinyal; C , analit derişimi ($\mu\text{g/ml}$); k_a , bağlanma hız sabiti ($\text{ml}/\mu\text{g.s}$) ve k_d , ayrılma hız sabiti ($1/\text{s}$)'dir. Bağlanma sabiti K_A ($\text{mL}/\mu\text{g}$), k_a ve k_d sabitlerinin oranından hesaplanır ($K_A = k_a/k_d$). Denge durumunda, $d\Delta R/dt=0$ alınarak eşitlik basitleştirilir:

$$\Delta R_{\text{denge}}/C = K_A \Delta R_{\max} - K_A \Delta R_{\text{denge}} \quad 4.8$$

Bundan dolayı, bağlanma sabiti K_A , $\Delta R_{\text{denge}}/C$ 'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinden hesaplanır. Ayrılma sabiti K_D ise; $1/K_A$ eşitliği ile hesaplanabilir.

Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 4.7 tekrar düzenlendiğinde:

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{\max} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad 4.9$$

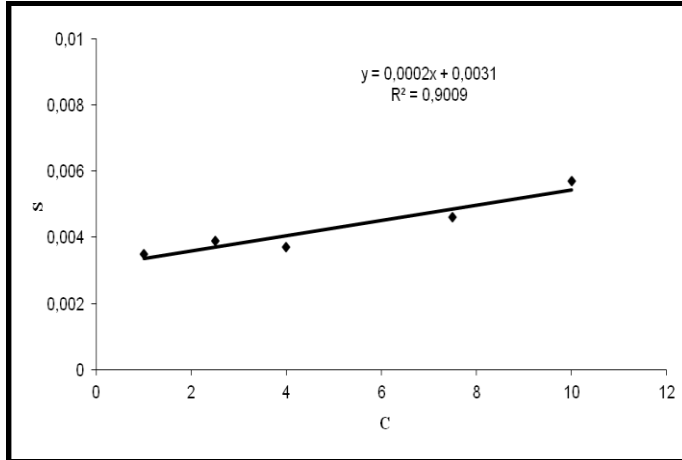
Eşitliği elde edilir. Buradan, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiğinin, eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bir doğru verdiği görülmektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusal bir ilişki içerisindedir ve kantitatif olarak derişim belirlenmesinde kullanılır. Eğer R_{\max} değeri biliniyorsa, tek bir sensogram kullanılarak k_a ve k_d değerleri hesaplanabilir. Yüzeyi tamamen doygunluğa erdirmek ve çok yüksek analit derişimlerine gerekli olduğu için R_{\max} 'ın deneysel olarak belirlenmesi zordur. Tercih edilen yaklaşım, birçok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensogramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri (S) vermektedir:

$$S = k_a C + k_d \quad 4.10$$

S'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası k_d değerini vermektedir. Fakat, $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda k_d hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad 4.11$$

Burada: ΔR_0 ve ΔR_t , ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir (Lin vd., 2005). Şekil 4.16'da bağlanma kinetik analizi için çizilen doğru verilmiştir. Bu doğruya ait denklemden hesaplanan k_a ve k_d değerleri Çizelge 4.2'de özetlenmiştir.



Şekil 4.16. Bağlanma kinetik yaklaşımı ile hız sabiti belirlenmesi

Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri

Bağlanma Kinetik Analizi	
k_a , $\mu\text{g/ml.s}$	0,0002
k_d , 1/s	0,0031
R^2	0,9009

4.9. Denge İzoterm Modelleri

Miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanosensör ile miyogloblin arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla üç farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri.

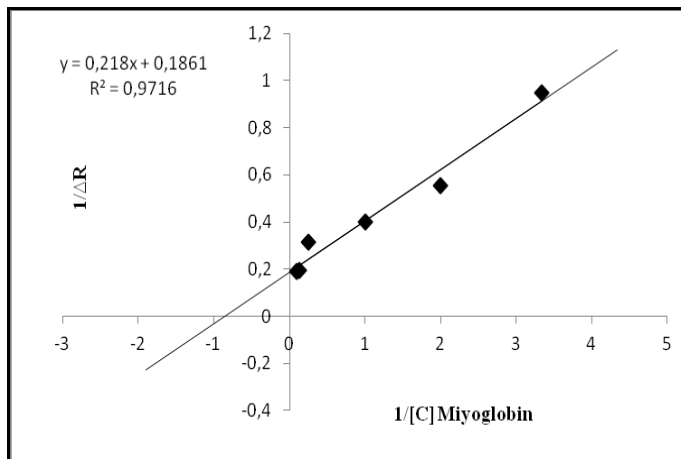
$$\text{Langmuir} \quad \Delta R = \left\{ \Delta R_{maks} [C] / K_D + [C] \right\}$$

$$\text{Freundlich} \quad \Delta R = \Delta R_{maks} [C]^{1/n}$$

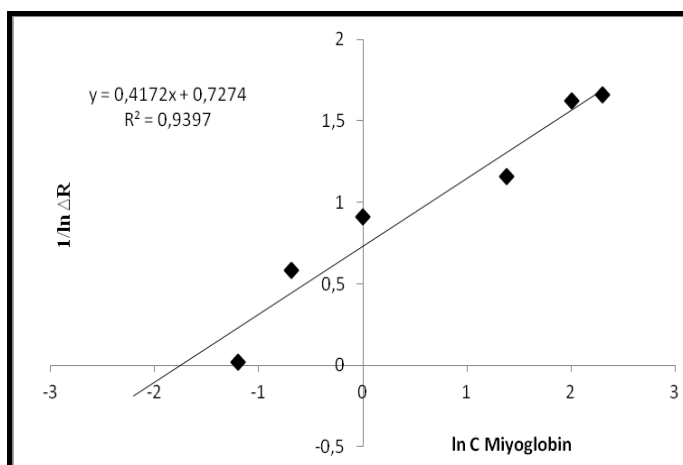
$$\text{Langmuir-Freundlich} \quad \Delta R = \left\{ \Delta R_{maks} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n} \right\}$$

Burada; ΔR_{maks} , maksimum SPR sinyal kayması; ΔR , denge halindeki SPR sinyal kayması; $[C]$, analit derişimi ($\mu\text{g/mL}$); K_D ($\text{ml}/\mu\text{g}$), ayrılma denge sabiti; $1/n$, Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.

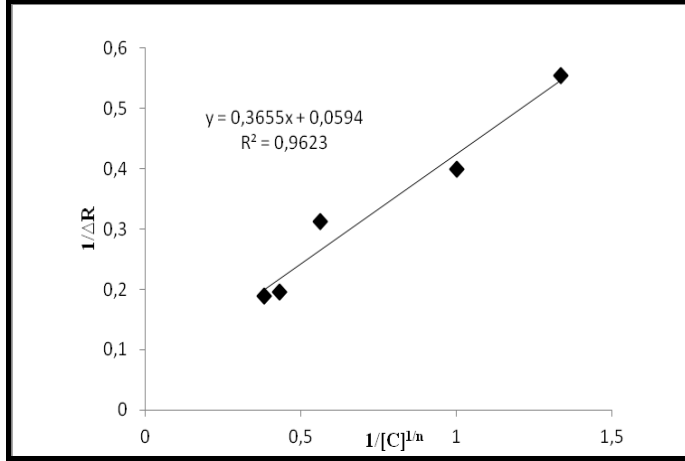
Homojen bağlanma bölgeleri modeli olan Langmuir modeli moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı bağlanma izotermelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Li ve Husson, 2006). Freundlich modeli heterojen bir modeldir (Umpleby vd., 2001). Langmuir-Freundlich modeli (LF), doyunluğa kadar geniş derişim aralığında heterojenite ile bilgi sağlamakta ve adsorpsiyon davranışını daha tutarlı olarak tanımlamaktadır. Şekil 4.17'de Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich modellerine ait grafikler verilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.17. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich

Şekil 4.17' ye göre deneysel olarak elde edilen veriler Langmuir modeli ile en uyumludur ($R^2 = 0,9716$). Bu sonuç; hazırlanan baskılanmış nanosensör yüzeyindeki miyogloblin bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir. Buradan hesaplanan ΔR_{maks} değeri deneysel değere (5,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$) yakındır. Langmuir denkleminde hesaplanan K_A ve K_D değerleri sırasıyla 0,853 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 1,1714 $\text{mL}/\mu\text{g}$ olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich Parametreleri

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
ΔR_{maks} , $\mu\text{g/ml}$	5,3734	ΔR_{maks} , $\mu\text{g/ml}$	2,0696	ΔR_{maks} , $\mu\text{g/ml}$	16,83
K_D , $\text{ml}/\mu\text{g}$	1,1714	$1/n$	0,4172	$1/n$	0,4172
K_A , $\mu\text{g/ml}$	0,853	R^2	0,9397	K_D , $\text{ml}/\mu\text{g}$	6,15
R^2	0,9716			K_A , $\mu\text{g/ml}$	0,162
				R^2	0,9623

4.10. Yarışmalı Kinetik Analizler

Sığır serum albumini (BSA) ve sitokrom *c* için miyogloblin molekülerine göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = \left[\frac{C_i - C_f}{C_f} \right] \times V/m \quad 4.12$$

Eşitlikte K_d , dağılma katsayısını (mL/g); C_i ve C_f , biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini ($\mu\text{g/mL}$); V , kullanılan çözelti hacmini (mL) ve m , polimerin ağırlığını (g) ifade etmektedir. SPR sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerçekleştirilmektedir (Lin vd., 2005). Bu yaklaşımdaki temel sebepler, başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi ve polimerin kütesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin ΔR ile doğrusal ilişkide olmasıdır. Bu durumda seçicilik katsayısı k ,

$$K = \Delta R_{\text{kalıp}} / \Delta R_{\text{girişimci}} \quad 4.13$$

şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için ise;

$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad 4.14$$

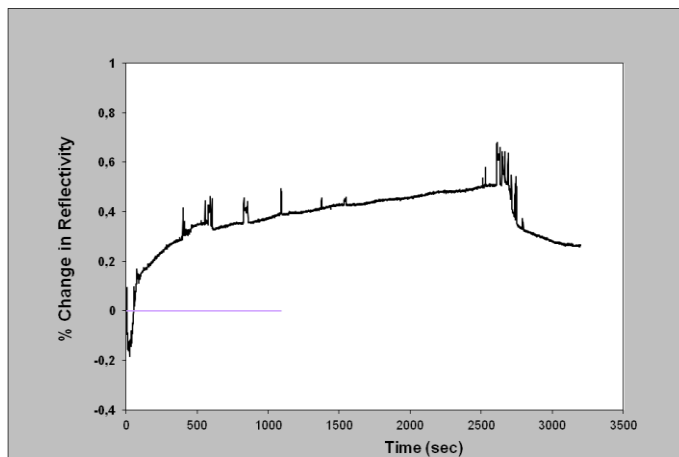
şeklinde ifade edilebilir. Hazırlanan miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün miyoglobline karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon

deneyleri 1000 ng/mL derişimindeki BSA, sitokrom *c* ve miyogloblin proteinlerinin tekli, ikili ve üçlü karışım çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sensörün bu karışımlara gösterdiği tepki, Şekil 4.18'de % ΔR /zaman ilişkilerine ait sensogramlarda görülmektedir. Sitokrom *c* miyoglobline yakın moleköl ağırlığına sahip olması, BSA'nın ise boyut, moleköl ağırlığı ve yük bakımından miyoglobline oldukça farklı olması nedeniyle yarışmacı proteinler olarak seçilmişlerdir. Yarışmalı kinetik analizlerde kullanılan proteinler ve özellikleri Çizelge 4.4 de özetlenmiştir (Zhang vd., 2010).

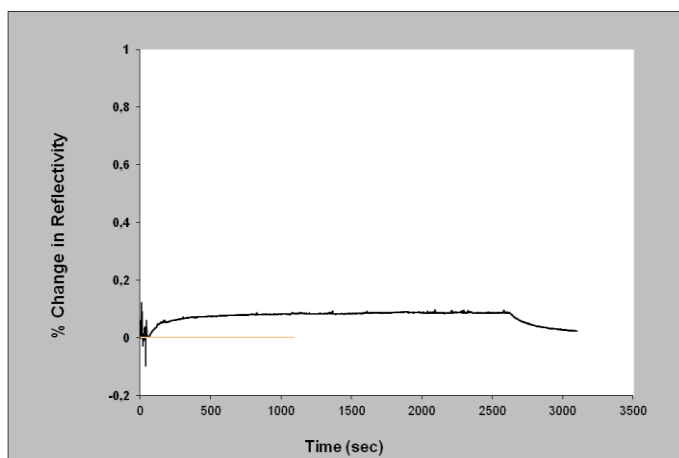
Çizelge 4.4. Kalıp ve yarışmacı proteinlerin moleköl ağırlığı , izoelektrik nokta ve moleköl boyutları

Protein	Moleköl Ağırlığı	İzoelektrik nokta	Moleköl boyut
Miyogloblin	17.600	7,3	2,5 nm x 3,4 nm x 4,2nm
BSA	66.430	4,7	5 nm x 7 nm x 7 nm
Sitokrom <i>c</i>	12.327	10,2	2,6 nm x 3,2 nm x 3nm

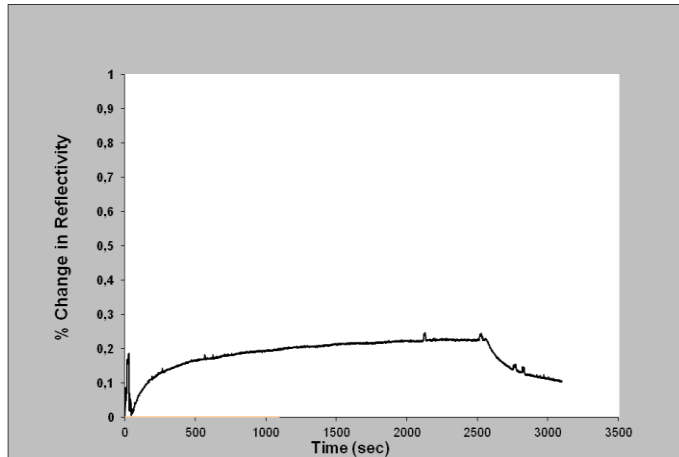
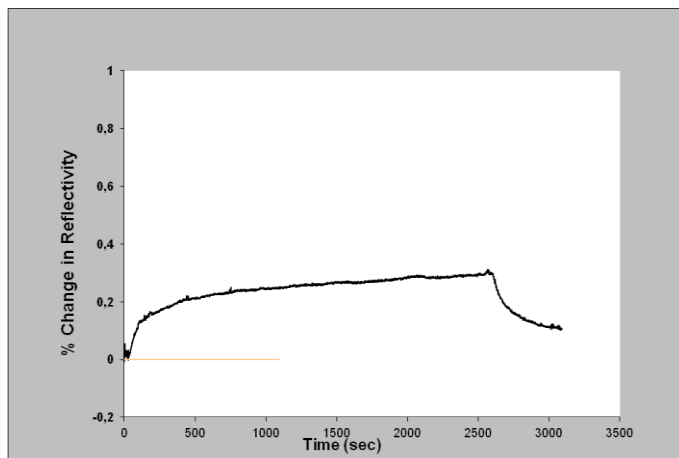
Sitokrom *c* nin hem moleköl ağırlığı hem de izoelektrik noktası miyoglobline benzerlik göstermektedir. Miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün sitokrom *c*'ye verdiği sensogram sinyal değeri (% ΔR), 0,2; BSA'ya verdiği sensogram sinyal değeri (% ΔR) 0,03'tür. Aynı derişimdeki miyogloblin için elde edilen sinyal değeri (% ΔR) ise 0,47'dir. İkili ve üçlü karışımların sinyal değerleri incelendiğinde, poli(HEMA-MATrp) sensörün sinerjik bir etki ile cevap verdiği görülmüştür. Karışımların SPR sinyallerinin, bileşenlerin tekli çözeltilerindeki sinyallerinin toplamından daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

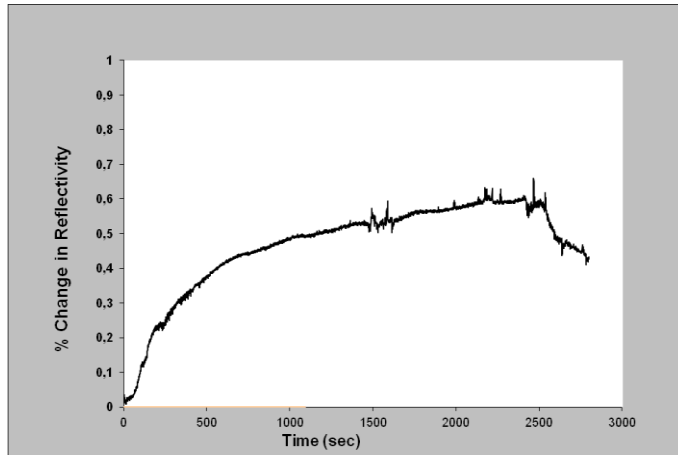


(a) Miyoglobin

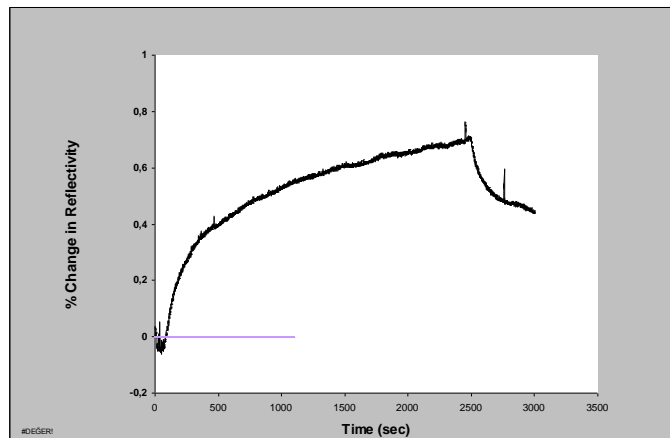


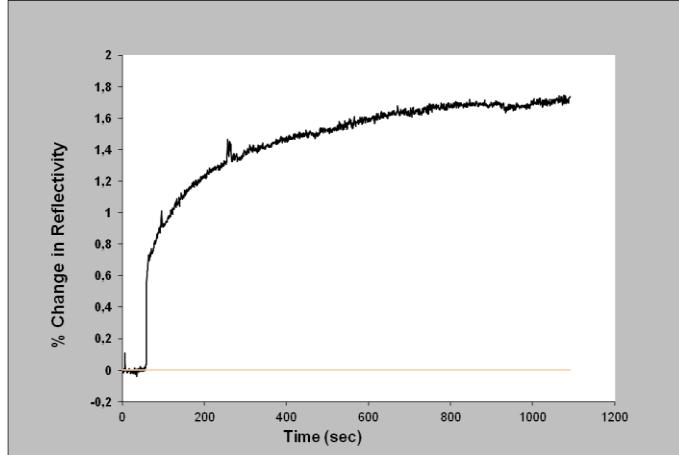
(b) BSA

(c) sitokrom *c*(d) BSA-sitokrom *c*



(e) BSA-miyoglobin

(f) sitokrom *c*-miyoglobin

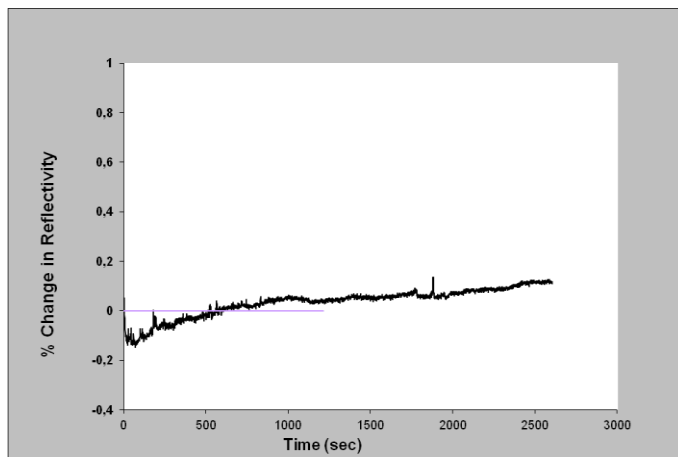


(g) BSA-sitokrom *c*- miyoglobin

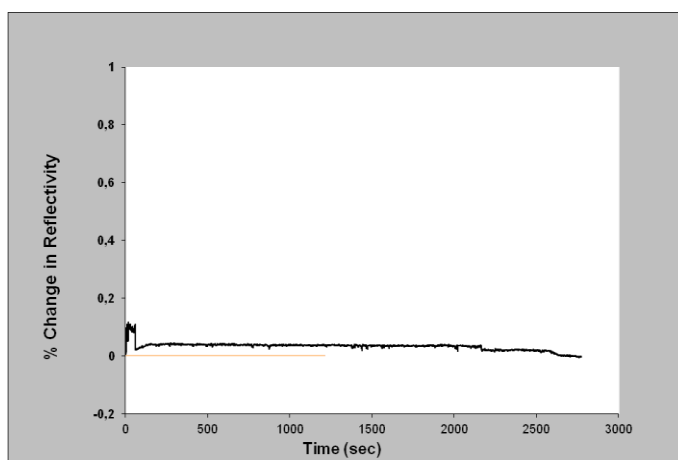
Şekil 4.18. 1000 ng/ml derişiminde miyoglobin, sitokrom *c* ve siğır serum albumini (BSA) proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör arasındaki etkileşimlere ait sensogramlar: (a) Miyoglobin, (b) BSA, (c) Sitokrom *c*, (d) BSA-sitokrom *c*, (e) BSA-miyoglobin, (f) sitokrom *c*-miyoglobin, (g) BSA-sitokrom *c*-Miyoglobin

4.11. Poli(HEMA-MATrp) Nanosensörün Baskılama Seçiciliği

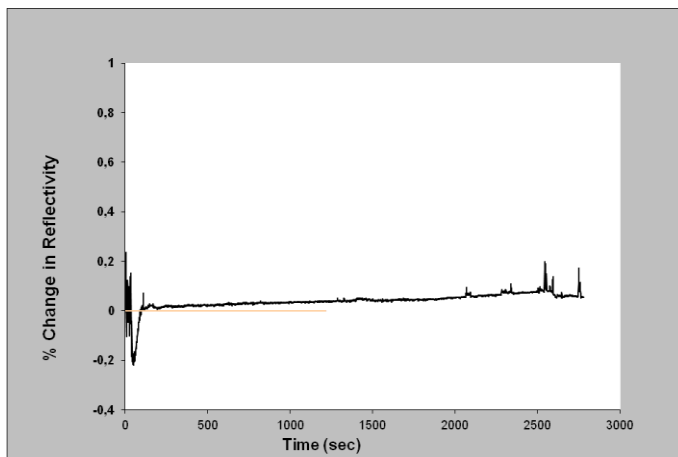
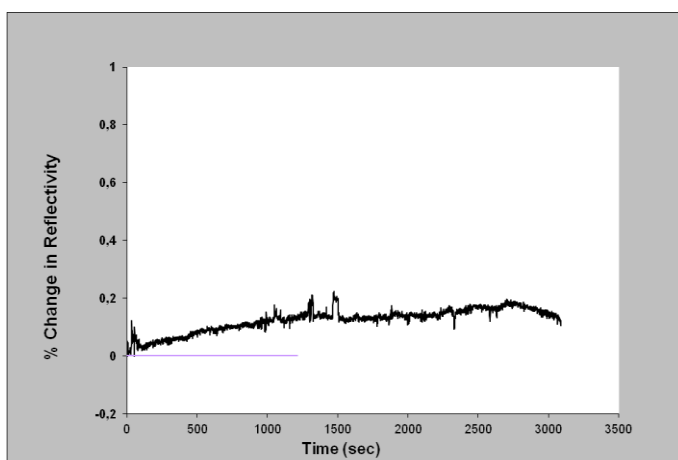
Miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için miyoglobin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanosensör de hazırlanmıştır. Miyoglobin, BSA ve sitokrom *c* ile hazırlanan karışımlar SPR sistemine gönderilmiştir. Bu çözeltiler fosfat tamponunda (pH 7.4) 1000 ng/mL derişiminde hazırlanmıştır. Baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanosensörün bu karışımlara gösterdiği tepki, Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



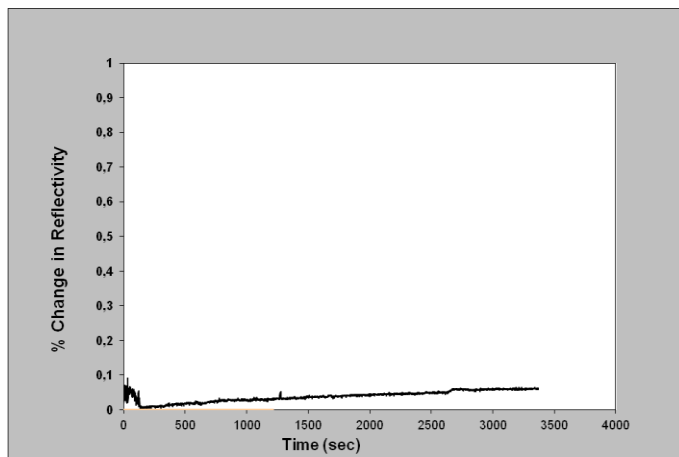
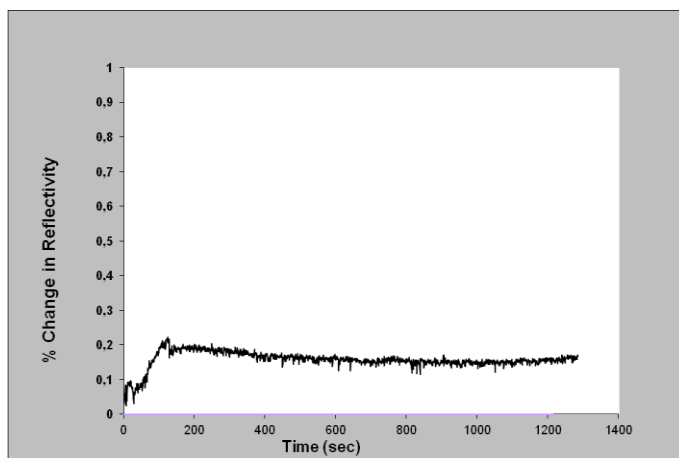
(a) Miyoglobin

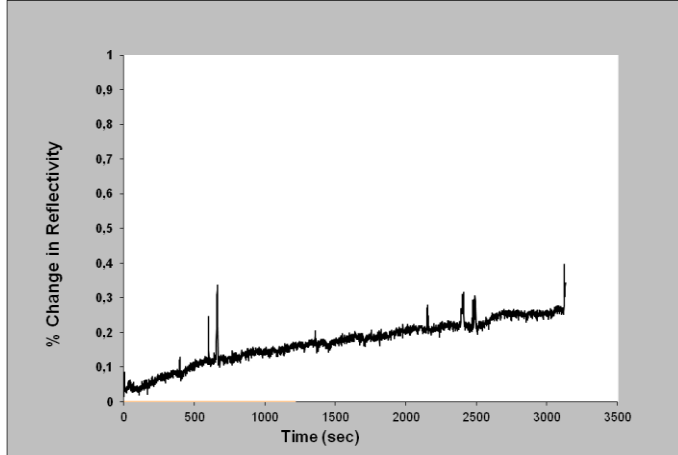


(b) BSA

(c) Sitokrom *c*

(d) Miyoglobin-BSA

(e) Miyoglobin- Sitokrom *c*(f) Sitokrom *c*-BSA



(g) Sitokrom *c*-BSA-Miyoglobin

Şekil 4.19. 1000 ng/mL derişiminde miyoglobin, sitokrom *c* ve sığır serum albumini (BSA) proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile miyoglobin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar: (a) Miyoglobin, (b) BSA, (c) Sitokrom *c*, (d) BSA-Miyoglobin, (e) Sitokrom *c*-Miyoglobin, (f) Sitokrom *c*-BSA, (g) Sitokrom *c*-BSA-Miyoglobin

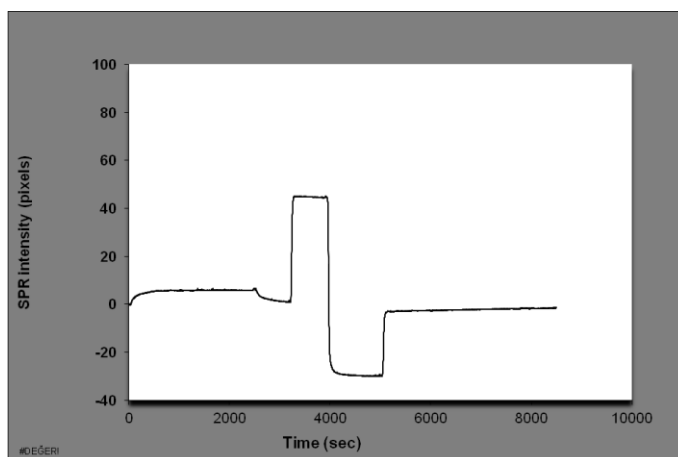
Baskılama seçiciliğini gösteren bağıl seçicilik katsayısı 1.76 (miyoglobin/sitokrom *c*) ve 2.61 (miyoglobin/BSA) olarak hesaplanmıştır. Bir başka tanımla; miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör, miyoglobini sitokrom *c*'ye göre 1.76 kat , BSA'ya göre 2.61 kat seçicilikte tanımaktadır. Bağıl seçicilik değeri, 1'in ne kadar üzerinde ise baskılama işleminin o kadar etkin olduğu bilinmektedir (Zhang vd., 2002). Tirozin amino asidinin baskılandığı bir çalışmada; tirozin ile fenilalanin amino asitleri arasındaki bağıl seçicilik katsayısının 1.82 olduğu rapor edilmiştir (Zhang vd., 2002). Bereli vd. (2008) yaptıkları bir çalışmada lizozim baskılanmış kriyojeller hazırlamışlar ve lizozimin BSA ve sitokrom *c*'ye göre bağıl seçicilik katsayılarını 4.6 (lizozim/BSA) ve 3.2 (lizozim/sitokrom *c*) olarak rapor etmişlerdir.

Çizelge 4.5. Miyoglobine göre BSA ve sitokrom c'nin için seçicilik ve bağlı seçicilik kat sayıları

Protein	MIP		NIP		
	ΔR	k	ΔR	k	k'
Miyoglobin	0,47	-	0,2	-	
BSA	0,03	15,66	0,02	6	2,61
Sitokrom c	0,20	2,35	0,09	1,33	1,76

4.12. Poli(HEMA-MATrp) SPR Nanosensörün Rejenerasyonu

Şekil 4.20'de 1000 ng/mL derişimindeki miyoglobin çözeltisi poli(HEMA-MATrp) nanosensör yüzeyinden geçirilerek kinetik analiz tamamlanmış ve ardından yüzeye onbeşer dakikalık süreler ile sırasıya 1.0 M etilen glikol, saf su ve denge tamponu (20 mM pH 7.4 fosfat tamponu) gönderilmiştir.



Şekil 4.20. MIP damlatılmış altın çipin rejenerasyon sensogramı

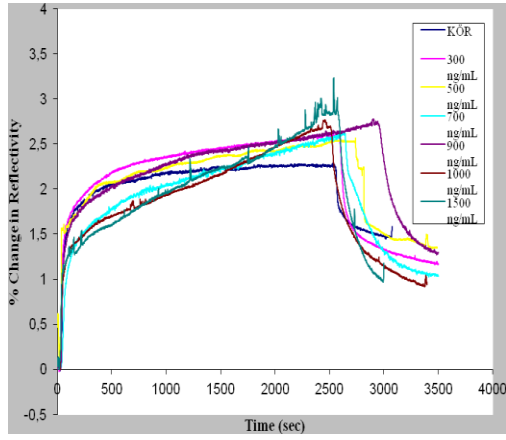
4.13. Kan Örneği ile Kinetik Analizler

Klinikte tanı amaçlı kullanılacak SPR sistemlerinin işlemsel bir dayanıklılığa ve sağlamlığa sahip olması gerekir. Sistem değişen koşullar altında kan, idrar ve tükürük gibi kompleks örneklerde kullanılabilirdir. SPR temelli sistemlerde sıcaklık değişimleri ve örneğin kırılma indeksindeki değişimler en önemli noktalardır.

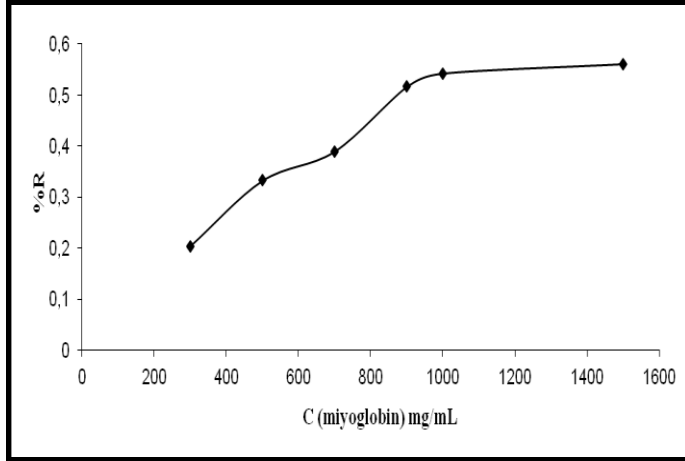
Çalışmada kullanılan GWC SPRImager II sistemi sıcaklık kontrol ünitesine sahiptir. Bu nedenle hem sulu çözelti hem de kan örneği ile yapılan tüm analizler sabit sıcaklıkta (25 °C) gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklık değişiminin yanı sıra örnek bileşimindeki değişim kırılma indeksi değişimine neden olan diğer bir etmendir. Klinik bir tanı sistemi söz konusu olduğunda kompleks insan örneklerinin kırılma indisinde olabilecek doğal değişimler özellikle dikkat edilmesi gereken bir konudur. Kanın kırılma indis 10 mg/dL glukoz durumunda $1,4 \times 10^{-5}$ RIU'dur. Kontrol edilemeyen diabet durumunda glukoz derişimi 100 mg/dL'ye ulaşabilmektedir. İdrar örneklerinin kırılma indeksi değerleri de değişken olup $6,4 \times 10^{-3}$ RIU olarak rapor edilmiştir (Wolf ve Pillay, 1969). Klinik uygulamaya bağlı olarak , analizi yapılan örneğin ön şartlandırılması ya da görüntüleme koşullarının ayarlanması ile örnekten gelen kırılma indeksi değişimleri dengelenebilir.

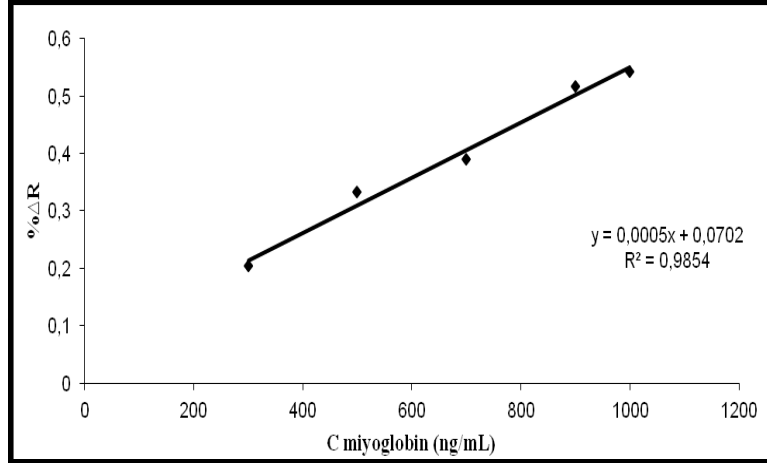
Bu çalışmada kalp krizi şikayetiyle acil servise başvuran bir hastadan alınan kan örneğindeki miyogloblin derişimi hazırlanan poli(HEMA-MATrp) nanosensör ile tayin edilmiştir. Kan örneğindeki miyogloblin miktarının tayininde standart katma yöntemi kullanılmıştır. Standart katma yönteminin kullanılması ile kan örneğinin içeriğinden kaynaklanan kırılma indis etkisi ortadan kaldırılmıştır. Kan örneğindeki toplam seyrelme miktarı 1:8 olacak şekilde önce kör örnek, ardından da aynı seyrelme oranında, ilave miyogloblin derişimi 300; 500; 700; 900, 1000 ve 1500 ng/mL olacak şekilde kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler poli(HEMA-MATrp) sensör yüzeyine gönderilerek sensogramlar alınmıştır. Elde edilen % ΔR /zaman değişimleri Şekil 4.21'de görülmektedir.



Şekil 4.21. Kör örnek ve 300, 500, 700, 900, 1000, 1500 ng/mL miyoglobin derişimindeki kan örneklerinin poli(HEMA-MATrp) ile etkileştirilmesi ile elde edilen sensogram



Şekil 4.22. Standart katma yöntemi ile elde edilen miyoglobin derişimi-sinyal grafiği



Şekil 4.23. Standart katma yöntemi ile elde edilen miyoglobin derişimi / % ΔR grafiği

Şekil 4.22 ve 4.23’de miyoglobin derişimi ile % ΔR değerleri arasındaki ilişki gösterilmiştir. Görüldüğü gibi poli(HEMA-MATrp) sensör 300-1000 ng/mL ilave miyoglobin derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Bu aralıktaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ($y=0,0005x+0,0702$) ve doğrusallığı 0,9854 olarak hesaplanmıştır. Bu denklemden 1/8 oranında seyreltilmiş örnekteki miyoglobin derişimi 140,4 ng/mL, seyrelme yapılmamış başlangıç kan örneğindeki miyoglobin derişimi ise 1123,2 ng/mL olarak belirlenmiştir. Aynı kan örneği için ELISA testi ile belirlenen miyoglobin derişimi ise $869,3 \pm 253,6$ ng/mL dir. Bu sonuç hazırlanan miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörünün kan örneği içerisindeki miyoglobin derişimini ELISA yöntemi ile karşılaştırıldığında % 70 doğrulukla tayin edebildiğini göstermiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

MATrp monomeri, L-triptofan metil esterinin metakroil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir. Elde edilen monomer NMR ve FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir

MATrp monomerinin kimyasal yapısının belirlenebilmesi için ¹H-NMR kullanılmıştır. MATrp monomerine ait karakteristik pikler şunlardır: 8,22 (1H s, CONH), 7,54-7,09 (4H Ar-H), 6,98 (1H, s, 5'li halka), 5,64 (1H,s, CH₂), 5,32 (1H, s,CH₂) 4,99 (1H, t, CH) 3,38 (2H,d,CH₂) 6,34 (1H,d,amid NH) , 3.71(3H,s, OCH₃), 1,24 (3H ,s ,CH₃) ,(400 MHz, DMSO-d₆).MATrp monomerinin yapısının belirlenmesi için FTIR tekniği de kullanılmıştır. 3100-3000 cm⁻¹ aralığında aromatik C-H , 2952 ve 2853 cm⁻¹'de alifatik C-H gerilmelerinden kaynaklanan absorpsiyon bandları gözlenmektedir. 1734 cm⁻¹'de ester karbonil grubuna ait gerilme bandı, 1659 cm⁻¹'de ise amid karbonil grubuna ait gerilme bandı yer almaktadır. N-H gerilme titreşiminden kaynaklanan absorpsiyon bandı ise 3500 cm⁻¹ civarında ortaya çıkmıştır. FTIR ve NMR sonuçları monomerin başarıyla sentezlendiğini göstermiştir.

MATrp-Mb önkomplesinin başarıyla sentezlendiğini göstermek için ayrıca MATrp-Mb önkomplesinin FTIR spektrumunu, sadece MATrp monomerinin ve miyoglobinin FTIR spektrumları ile karşılaştırılmıştır. MAT-Mb önkomplesinin FTIR spektrumunda gözlenen pikler miyoglobindeki amid karbonil titreşimlerinden dolayı MAT monomerinin piklerinden farklılaşmıştır. Bu sonuç MATrp-Mb önkomplesinin başarıyla sentezlendiğinin bir kanıtıdır.

Miyoglobin baskılanmış nanopartiküllerin zeta boyut analizi gerçekleştirilmiştir. Miyoglobin baskılanmış partiküllerin ortalama boyutu 50 nm olarak bulunmuştur.

Sentezlenen MIP nanopatiküllerinin yüzey alanı hesaplanmıştır ve 1283.4 m²/g polimer olarak bulunmuştur.

Nanosensörlerin karakterizasyonu için MIP, MIP-Mb ve miyoglobinin FTIR spektrumları alınmıştır. MIP-Mb, MIP üzerine protein adsorpsiyonu ile hazırlanmıştır. MIP-Mb , MIP spektrumunda olmayan bazı gerilme ve titreşim bandlarına sahiptir. Bu miyoglobinin adsorpsiyonundan kaynaklanmaktadır. MIP için 1655 cm⁻¹'de gözlenen amid karbonil titreşimi MIP-Mb için 1635 cm⁻¹

değerine kaymıştır. Ayrıca miyoglobın spektrumunda 1398 cm^{-1} de gözlenen kuvvet alanı, yan zincirlerin doğası ve hidrojen bağları ile ilgili detaylara bağlı olan amid III bandı MIP-Mb spektrumunda 1387 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Bunun yanında $1315\text{-}1240\text{ cm}^{-1}$ aralığında MIP spektrumunda gözlenmeyen bandlar ortaya çıkmıştır. Bu da sentezlenen poli(HEMA-MATrp) nanokürelerinin miyoglobın bağladığının bir kanıtıdır.

Altın yüzey, yüzeyinde miyoglobın baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanoküre kaplı altın yüzeylerin ıslanabilirlik özelliklerinin incelenmesi amacıyla bu yüzeylerin su, etilen glikol ve diiyodometan (DIM) ile yaptıkları temas açıları ölçülmüş ve yüzey serbest enerjileri Owens, Wendt, Fowkes yaklaşımı kullanılarak hesaplanmıştır.

Su ile yapılan temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi altın yüzeyin temas açısı değeri ($95.34^\circ \pm 4.9$). Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanoküre damlatılmış altın yüzey temas açısının (59.84 ± 4.8), miyoglobın baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanoküre damlatılmış altın yüzey temas açısının (19.62 ± 5.7) değerine sahip olması, poli(HEMA-MATrp) nanoküreleri damlatıldıktan sonra yüzeyin hidrofilitesinin arttığını göstermiştir.

Miyoglobın baskılanmamış ve miyoglobın baskılanmış nanopartiküllerle kaplı altın yüzeyin morfolojisi yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Miyoglobın baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanopartikülleri tutturulmuş yüzey derinliği 33.67 nm olarak belirlenmiştir. Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartikülleri tutturulmuş SPR sensörün yüzey derinliği 38.19 nm olarak belirlenmiştir.

SEM görüntüleri ile altın yüzeyin nanoküreler ile kaplandığı kanıtlanmıştır.

Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanoküre kaplı altın çipin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir. Kalınlık ölçümleri 658 nm dalga boyunda, 60° ve 72° 'lik geliş açılarında gerçekleştirilmiştir. Miyoglobın baskılanmış nanosensörün ortalama kalınlık değerleri 60° ve 72° için sırasıyla $11.9 \pm 1.7\text{ nm}$ ve $10.8 \pm 6.03\text{ nm}$ olarak hesaplanmıştır.

Miyoglobın derişimi ile $\% \Delta R$ arasındaki ilişki incelenmiştir. Miyoglobın derişimi arttıkça $\% \Delta R$ değerlerinin arttığı görülmüştür.

SPR nanosensör, iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. 0-10000 ng/mL aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğruların denklemi ($y = 0.0031x$), ($y = 0.0004x + 2.0057$) ve doğrusallıkları (R^2) sırasıyla 0.9797 ve 0.9293 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre: miyoglobinin molekülleri iki farklı bölgeden yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Hazırlanan poli(HEMA-MATrp) nanosensör için elde edilen veriler kullanılarak tayin sınırı (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri R^2 değeri 0.9797 olan derişim aralığı için belirlenmiştir. Buna göre tayin sınırı (LOD) 4.72 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Tayin limiti (LOQ) ise 15.74 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

Miyoglobinin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanosensör ile miyoglobinin arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla üç farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri. $R^2 = 0.9716$ değeri ile en uygun adsorpsiyon modelinin Langmuir adsorpsiyon modeli olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç hazırlanan baskılanmış nanosensör yüzeyindeki miyoglobinin bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermiştir. Buradan hesaplanan ΔR_{max} değeri deneysel değere (5.33 $\mu\text{g/mL}$) yakındır. Langmuir denkleminde hesaplanan K_A ve K_D değerleri sırasıyla 0.853 $\mu\text{g/mL}$ ve 1.1714 mL/ μg olarak belirlenmiştir.

Miyoglobinin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanosensörün miyoglobine karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri 1000 ng/mL derişimindeki BSA, sitokrom *c*, ve miyoglobinin tekli, ikili ve üçlü karışım çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Miyoglobinin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün miyoglobine karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri 1000 ng/mL derişimindeki BSA, sitokrom *c* ve miyoglobinin tekli, ikili ve üçlü karışım çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Miyoglobinin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün sitokrom *c*'ye verdiği sensogram sinyal değeri (% ΔR) 0.2; BSA'ya verdiği sensogram sinyal değeri (% ΔR) 0.03'tür. Aynı derişimdeki miyoglobinin için elde edilen sinyal değeri (% ΔR) ise 0.47'dir. İkili ve üçlü karışımların sinyal değerleri incelendiğinde poli(HEMA-MATrp) sensörün sinerjik bir etki ile cevap verdiği görülmüştür.

Miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için miyogloblin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanosensör de hazırlanmıştır. Miyogloblin, BSA ve sitokrom *c* kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar SPR sistemine gönderilmiştir. Baskılama seçiciliğini gösteren bağıl seçicilik katsayısı 1.76 (miyogloblin/sitokrom *c*) ve 2.61 (miyogloblin/BSA) olarak hesaplanmıştır. Bir başka tanımla; miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör, miyogloblini sitokrom *c*'ye göre 1.76 kat , BSA'ya göre 2.61 kat seçicilikte tanımaktadır.

Sensör yüzeyinin rejenerasyonu için 1.0 M etilen glikol kullanılmış ve yaklaşık 45 dakika içerisinde tüm rejenerasyon işlemleri başarıyla tamamlanmıştır.

Miyogloblin başlangıç derişiminin miyogloblin adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Kesikli sistemdeki çalışmalarda MIP için maksimum miyogloblin adsorpsiyonu, 0.5 mg/mL derişim için 388 mg/g olarak bulunmuştur. NIP nanoyapılara miyogloblin adsorpsiyonu ihmal edilebilir düzeydedir (18,855).

Hazırlanan poli(HEMA-MATrp) nanosensörün etkinliği miyogloblin düzeyi yüksek hasta kanı kullanılarak araştırılmıştır. 1:8 seyrelme oranındaki kan kullanılarak standart katma metodu ile kandaki miyogloblin düzeyi belirlenmiştir. ELISA yöntemi standart referans kabul edildiğinde hazırlanan sensör kandaki miyogloblin derişimini % 70 doğrulukla tayin etmiştir.

Matveeva vd. (2004), kalp krizinin erken teşhisine yönelik benzer bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında, floresans olarak etiketlenmiş anti-miyogloblin antibadileri ile sandiviç yöntemini kullanarak miyogloblin tayinini yüzey plazmon bağı emisyona (SPCE) tekniğiyle gerçekleştirmişlerdir. 50 ng/mL derişimin altındaki miyogloblini bu yöntemle kısa sürede ve yıkama basamağına ihtiyaç duymadan tayin edebilmişlerdir.

Bu tez çalışması, Osman (2011)'in doktora çalışmasında yaptığı kan çalışmalarının sonucu ile oldukça uyumludur. Osman (2011), miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) film kaplanmış SPR biyosensörü kullanarak yaptığı çalışmasında ELISA yöntemini standart referans kabul ederek kandaki miyogloblin derişimini % 66 doğrulukla tayin etmiştir.

Bu tez çalışması, farklı biyomoleküllerin SPR ile tayinine yönelik benzer çalışmalarla da uyumludur. Uzun vd (2009), hepatit B teşhisine yönelik bir

çalışma yapmışlardır. Poli (hisroksietilmatkarilat-N-metakriloil-L-tirozin metil ester) filmlerine Hepatit B yüzey antibadi (HBsAb) baskılayarak SPR temelli teşhis kitleri üretmişlerdir. Şener vd. (2011) tarafından gerçekleştirilmiş lizozim baskılanmış PEDMAH nanokürelere ile kaplanmış SPR nanosensörü ile yumurta akından lizozim tayininin % 96, 4 doğrulukla yapılabildiği çalışmada SPR nanosensörünün oldukça duyarlı ölçüm yapabildiği vurgulanmıştır. Diğer bir SPR çalışması da, Hao vd. (2011) tarafından yapılmış morfinin tayinine yönelik bir çalışmadır. MAA ve EDMA varlığında yapılan polimerizasyonda morfin baskılanmış polimer elde edilmiş ve morfinin yüksek seçicilikte tayin edilmesini sağlayan SPR sensörü üretmişlerdir.

İleriye dönük çalışmalarda, kalp krizinin erken teşhisine yönelik yapılan miyogloblin baskılanmış SPR teşhis kitini geliştirmek amaçlı en uygun monomer-çapraz bağlayıcı-kalıp miktarlarını tespit ederek daha hızlı bir SPR teşhis kiti üretilebilir. Yine kalp krizinin erken teşhisinde kullanılan diğer belirteçlerin (CK, CK-MB, troponin-T, troponin-I) tayinine yönelik çalışmalar gerçekleştirilebilir. Farklı biyomoleküller de MIP nanokürelere baskılanıp SPR temelli tayin kitleri üretilebilir.

KAYNAKLAR

- Aburto, J., LeBorgne, S. 2004. Selective adsorption of dibenzothiophene sulfone by an imprinted and stimuli-responsive chitosan hydrogel. **Macromolecules**, 37:2938–43.
- Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L.I., Ansell, R.J., Kirsch, N., Nicholls, I.A., O'Mahony, J., Whitcombe, M.J. 2006. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including . **Journal of Molecular Recognition**, 19: 106–180.
- Andersson, L., Sellergren, B., Mosbach, K. 1984. Imprinting of amino-acid derivatives in macroporous polymers. **Tetrahedron Letters**, 25: 5211–5214.
- Andersson, L. I. 2000. Molecular Imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. **Journal of Chromatography. B: Biomedical Sciences and Applications**, 745:3–13.
- Anton, N., Benoit, J.P., Saulnier, P. 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates a review. **Journal of Controlled Release**, 128:185–199.
- Antonietti, M., Landfester, K. 2002. Polyreactions in miniemulsions. **Progress in Polymer Science**, 27:689–757.
- Arce, L., Zougagh, M., Arce, C., Moreno, A., Rí'os, A., Valca'rcel, M. 2007. Self-assembled monolayer-based piezoelectric flow immunosensor for the determination of canine immunoglobulin. **Biosensors and Bioelectronics**, 22 : 3217-3223.
- Arias, J.L., Gallardo, V., Gomez-Lopera, S.A., Plaza, R.C., Delgado, A.V. 2001. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. **Journal of Controlled Release**, 77:309–321.
- Arshady, R., Mosbach, K. 1981. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. **Makromolekulare Chemie**, 182:687–692.
- Asanuma, H., Akiyama, T., Kajiya, K., Hishiya, T., Komiyama, M. 2001. Molecular imprinting of cyclodextrin in water for the recognition of nanometer-scaled guests. **Analytica Chimica Acta**, 435:25–33.
- Avila, M., Zougagh, M., Escarpa, A., Rí'os, A. 2008. Molecularly imprinted polymers for selective piezoelectric sensing of small molecules. **Trends in Analytical Chemistry**, 27:54-65.

- Bangs, L.B. 1987. Uniform Latex particles, Seragen Diagnostics Inc., Seradyn, Third Edition, Indianapolis.
- Bereli, N., Andaç, M., Baydemir G., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli A. 2008. Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels. **Journal of Chromatography A**, 1190:18-26.
- Bergmann, N.M., Peppas, N.A. 2008. Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins. **Progress in Polymer Science**, 33:271–288.
- Bhayana, V., Henderson, A.R. 1995. Biochemical markers of myocardial damage. **Clinical Biochemistry**, 28:1–29.
- Bhayana, V., Cohoe, S., Pellar, T.G., Jablonsky, G., Henderson, A.R. 1994. Combination (multiple) testing for myocardial infarction using myoglobin, creatine kinase-2 (mass), and troponin T. **Clinical Biochemistry**, 27:395–406.
- Bhayana, V., Henderson, A.R. 1995. Biochemical markers of myocardial damage. **Clinical Biochemistry**, 28:1–29.
- Bindschaedler, C., Gurny, R., Doelker, E. 1990. Process for preparing a powder of water-insoluble polymer which can be redispersed in a liquid phase, the resulting powder and utilization there of. US Patent 4968350 .
- Bossi, A., Bonini, F., Turner, A.P.F., Piletsky, S.A. 2007. Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art. **Biosensors and Bioelectronics**, 22:1131–1137.
- Boyd, J. W., Cobb, G. P., Southard, G. E., Murray, G. M. 2004. Development of Molecularly Imprinted Polymer Sensors for Chemical Warfare Agents. **Johns Hopkins APL Technical Digest**, 25:44-48.
- Cacho, C., Turiel, E., Esteban, A.M., Ayala, D., Conde, C.P. 2006. Semi-covalent imprinted polymer using propazine methacrylate as template molecule for the clean-up of triazines in soil and vegetable samples. **Journal of Chromatography A**, 1114:255–262.
- Caro, E., Masque, N., Marce, R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C. 2002. Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples. **Journal of Chromatography A**, 963:169–178.
- Caro, E., Marce, R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C. 2006. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of

- compounds from environmental and biological samples. **Trends in Analytical Chemistry**, 25:143–154.
- Charcosset, C., Fessi, H. 2005. Preparation of nanoparticles with a membrane contactor. **Journal of Membran Science**, 266:115–120.
- Chen, W., Liu, F., Li, K.A., Yang, Y.H., Tong, S.Y. 2000. A hydrochlorothiazide imprinted polymer. **Analytical Letters**, 33: 809–818.
- Chernyak, Y., Henon, F., Harris, R.B., Gould, R.D., Franklin, R.K., Edwards, J.R., DeSimone, J.M., Carbonell, R.G. 2001. Formation of perfluoropolyether coatings by the rapid expansion of supercritical solutions (RESS) process Part 1: experimental results. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, 40:6118–6126.
- Chiu, T.P., Don, T.M. 2008. Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate) nanoparticles by emulsifier-free emulsion polymerization with a redox-initiated system. **Journal of Applied Polymer Science**, 109:3622–630.
- Conrad, P. G., Shea, K. J. 2005. Use of metal co-ordination for controlling imprinted polymers. In: *Molecularly Imprinted Materials: Science and Technology*, (Yan, M., Ramstrom, O., Eds.), pp. 123-180, New York.
- Cormack, P.A.G., Mosbach, K. 1999. Molecular imprinting: recent developments and the road ahead. **Reactive and Functional Polymers**, 41:115–124.
- Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z. 2004. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. **Journal of Chromatography B**, 804:173–182.
- Costa C, Santos AF, Fortuny M, Araujo PHH, Sayer C. 2009. Kinetic advantages of using microwaves in the emulsion polymerization of MMA. **Materials Science and Engineering C**, 29:415–419.
- Couvreur, P., Dubernet, C., Puisieux, F. 1995. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 41:2–13.
- Crespy, D., Stark, M., Hoffmann-Richter, C., Ziener, U., Landfester, K. 2007. Polymeric nanoreactors for hydrophilic reagents synthesized by interfacial polycondensation on miniemulsion droplets. **Macromolecules**, 40:3122–3135.
- D'Souza, S. M., Alexander, C., Carr, S. W., Waller, A. M., Whitcombe, M. J., Vulfson, E. N. 1999. Directed nucleation of calcite at a crystal-imprinted polymer surface. **Nature**, 398:312-320.

- Damen, J., Neckers, D.C. 1980. On the memory of synthesized vinyl polymers for their origins. **The Journal of Organic Chemistry**, 45:1382–1387.
- Damos, F.S., Mendes, R.K., Kubota, L.T. 2004. Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio)sensors. **Quimica Nova**, 27:970-979.
- Dire, C., Magnet, S., Couvreur, L., Charleux, B. 2009. Nitroxide-mediated controlled/living free-radical surfactant-free emulsion polymerization of methyl methacrylate using a poly(methacrylic acid)-based macroalkoxyamine initiator. **Macromolecules**, 42:95–103.
- El Samaligy, M.S., Rohdewald, P., Mahmoud, H.A. 1986. Polyalkylcyanoacrylate nanocapsules. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 38:216–8.
- Ersöz, A., Denizli, A., Şener, İ., Atılır, A., Diltemiz, S., Say, R. 2004. Removal of phenolic compounds with nitrophenol-imprinted polymer based on π - π and hydrogen-bonding interactions. **Separation and Purification Technology**, 38:173-179.
- Erturk, G., Uzun, L., Tumer, M.A., Say, R., Denizli, A. 2011. Fab fragments imprinted SPR biosensor for real-time human immunoglobulin G detection. **Biosensors and Bioelectronics**, 28:97–104.
- Fang, F.F., Kim, J.H., Choi, H.J., Kim, C.A. 2009. Synthesis and electrorheological response of nano-sized laponite stabilized poly(methyl methacrylate) spheres. **Colloid & Polymer Science**, 287:745–749.
- Fano, U. 1941. The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces. **Journal of the Optical Society of America**, 31:213–222.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, 55:R1–R4.
- Fireman-Shoresh, S., Turyan, I., Mandler, D., Avnir, D., Marx, S. 2005. Chiral Electrochemical Recognition by Very Thin Molecularly Imprinted Sol-Gel Films. **Langmuir**, 21:7842-7857.
- Ganachaud, F., Katz, J.L. 2005. Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. **Chemical Physics and Physical Chemistry**, 6:209–216.

- Gao, D., Zhang, Z., Wu, M., Xie, C., Guan, G., Wang, D. 2007. A surface functional monomer-directing strategy for highly dense imprinting of TNT at surface of silica nanoparticles. **Journal of American Chemical Society**, 129:7859–7866.
- Ge, Y. and Turner, A.P.F. 2009. Molecularly imprinted sorbent assays: recent developments and applications. **Chemistry-A European Journal**, 15:8100–8107.
- Gill, I., Ballesteros, A. 2000. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulation biologicals. **Trends in Biotechnology**, 18:282-296.
- Gill, I., Ballesteros, A. 2000. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 2): Non sol-gel protein-polymer biocomposites. **Trends in Biotechnology**, 18:469-479.
- Glad, T., Glad, M., Norrlöw, S., Sellergren, B., Siegbahn, N., Mosbach, K. 1985. Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica . **Journal of Chromatography**, 347 :11–23.
- Guan, G., Liu, B., Wang, Z., Zhang, Z. 2008. Imprinting of Molecular Recognition Sites on Nanostructures and Its Applications in Chemosensors. **Sensors**, 8:8291-8320.
- Guilbault, G.G., Mascini, M. 1993. Uses of Immobilized Biological Compounds. In NATO advanced research workshop on uses of immobilized biological compound for detection, medical, food, and environmental analysis, Kluwer Academic Publisher, pp. 377- 577, Dordrecht, The Netherlands
- Guo, H.S., He, X.W. 2000. Study of the binding characteristics of molecular imprinted polymer selective for cefalexin in aqueous media. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, 368:461–465.
- Gurny, R, Peppas, N.A., Harrington, D.D., Banker, G.S. 1981. Development of biodegradable and injectable lattices for controlled release potent drugs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 7:1–25.
- Haginaka, J., Takehira, H., Hosoya, K., Tanaka, N. 1998. Molecularly imprinted uniform-sized polymer-based stationary phase for naproxen Comparison of molecular recognition ability of the molecularly imprinted polymers prepared by thermal and redox polymerization techniques. **Jornal of Chromatography A**, 816:113–121.
- Hansen, D.E. 2007. Recent developments in the molecular imprinting of proteins. **Biomaterials**, 28 :4178–4191.

- Hao, H.X., Zhou, H., Chang, J., Zhu, J., Wei, T.X. 2011. Molecularly imprinted polymers for highly sensitive detection of morphine using surface plasmon resonance spectroscopy. **Chinese Chemical Letters**, 22:477–480.
- Hart, B.R., Shea, K.J. 2002. Molecular imprinting for the recognition of N-terminal histidine peptides in aqueous solution. **Macromolecules**, 35: 6192–6201.
- Harvey, S.D., Mong, G.M., Ozanich, R.M., McLean, J.S., Goodwin, S.M., Valentine, N.B., Fredrickson, J.K. 2006. Preparation and evaluation of spore-specific affinity-augmented bioimprinted beads. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 386:211–219.
- Haupt, K. 2002. Creating a good impression. **Nature Biotechnology**, 20:884–885.
- Hillberg, A.L., Tabrizian, M. 2008. Biomolecule imprinting: Developments in mimicking dynamic natural recognition systems. **Ingenierie Et Recherche Biomedicale**, 29:89–104.
- Hirayama, K., Sakai, Y., Kameoka, K., Noda, K., Naganawa, R. 2002. Preparation of a sensor device with specific recognition sites for acetaldehyde by molecular imprinting technique. **Sensors and Actuators B**, 86:20–25.
- Hjerten, S., Liao, J. L., Nakazato, K., Wang, Y., Zamaratskaia, G., Zhang, H. X. 1997. Gels mimicking antibodies in their selective recognition of proteins. **Chromatographia**, 44:227-234.
- Homola, J., Yee, S.S., Gauglitz, G. 1999. Surface plasmon resonance sensors: review. **Sensors and Actuators B**, 54:3–15.
- Hoshino, Y., Kodama, T., Okahata, Y., Shea, K.J. 2008. Peptide imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody. **Journal of American Chemical Society**, 130:15242–15243.
- Hoshino, Y., Koide H., Urakami T., Kanazawa H., Kodama T., Oku N., Shea K. J. 2010. Recognition, neutralization, and clearance of target peptides in the bloodstream of living mice by molecularly imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody. **Journal of American Chemical Society**, 132:6644–6645.
- Huang, J., Zhang, J., Zhang, J., Zheng, S. 2005. Template imprinting amphoteric polymer for the recognition of proteins. **Journal of Applied Polymer Science**, 95:358-361.

- Jiang, W., Jiang, N., Zhang, H., Liu, M. 2007. Small organic molecular imprinted materials: their preparation and application. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 389:355–368.
- Jing, T., Xia, H., Guan, Q., Lu, W., Dai, Q., Niu, J., Lim, J-M., Hao, Q., Lee Y-III, Zhou Y., Mei S. 2011. Rapid and selective determination of urinary lysozyme based on magnetic molecularly imprinted polymers extraction followed by chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, 692:73–79.
- Ju, J.Y., Shin, C.S., Whitcombe, M.J., Vulfson, E.N. 1999. Imprinted polymers as tools for the recovery of secondary metabolites produced by fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, 64:232–239.
- Kagen, L., Scheidt, S., Roberts, L., Porter, A., Paul, H. 1975. Myoglobinemia following acute myocardial infarction. **The American Journal of Medicine**, 58:177–182.
- Karode, S.K., Kulkarni, S.S., Suresh. A.K., Mashelkar, R.A. 1998. New insights into kinetics and thermodynamics of interfacial polymerization. **Chemical Engineering Science**, 53:2649–2663.
- Keffer, J.H. 1996. Myocardial markers of injury - Evolution and insights. **American Journal of Clinical Pathology**, 105:305–320.
- Kempe, M. 1996. Antibody-Mimicking Polymers as Chiral Stationary Phases in HPLC. **Analytical Chemistry**, 68:1948-1953.
- Khoury-Fallouh, A.N., Roblot-Treupel, L., Fessi, H., Devissaguet, J.P., Puisieux, F. 1986. Development of a new process for the manufacture of poly isobutylcyanoacrylate nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, 28:125–136.
- Kilpatrick, W.S., Wosornu, D., McGuinness, J.B., Glen, A.C.A. 1993. Early diagnosis of acute myocardial infarction: CK-MB and myoglobin compared. **Annals of Clinical Biochemistry**, 30:435–438.
- Kindchy, L.M., Alocilja, E.C. 2005. A molecularly imprinted polymer on indium tin oxide and silicone. **Biosensors and Bioelectronics**, 20:2163-2167.
- Kochkodan, V., Weigel, W., Ulbricht, M. 2001. Thin layer molecularly imprinted microfiltration membranes by photofunctionalization using a coated cleavage photoinitiator. **Analyst**, 126:803–809.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H. 2003. Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications. Wiley-VCH, Weinheim.

- Kotrotsiou, O., Kotti, K., Dini, E., Kammona, O., Kiparissides, C. 2005. Nanostructured materials for selective recognition and targeted drug delivery. **Journal of Physics: Conference Series**, 10:281–284.
- Kretschmann, E., Raether, H. 1968. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. **Zeitschrift Fuer Naturforschung**, 23:2135–2136.
- Kreuter, J. 1994. Nanoparticles. In: Colloidal drug delivery systems, (Kreuter J, editor), New York: Marcel Dekker, pp. 219–342. New York.
- Kryscio, D.R , Peppas, N.A. 2012. Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. **Acta Biomaterialia** , 8: 461-473.
- Kugimiya, A., Matsui, J., Abe, H., Aburatani, M., Takeuchi, T. 1998. Synthesis of castasterone selective polymers prepared by molecular imprinting. **Analytica Chimica Acta**, 5 : 75-79.
- Kugimiya, A., Kuwada, Y., Takeuchi, T. 2001. Preparation of sterol-imprinted polymers with the use of 2-(methacryloyloxy) ethyl phosphate. **Journal of Chromatography A**, 938: 131–135.
- Kugimiya, A., Takeuchi, T. 2001. Surface plasmon resonance sensor using molecularly imprinted polymer for detection of sialic acid. **Biosensors & Bioelectronics**, 16:1059–1062.
- Kuo, C.W., Wen, T.C. 2008. Dispersible polyaniline nanoparticles in aqueous poly(styrenesulfonic acid) via the interfacial polymerization route. **European Polymer Journal**, 44:3393–3401.
- Landfester, K., Willert, M., Antonietti, M. 2000. Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions. **Macromolecules**, 33:2370–2376.
- Landfester, K., Antonietti, M. 2000. The polymerization of acrylonitrile in miniemulsions: “Crumpled latex particles” or polymer nanocrystals. **Macromolecular Rapid Communications**, 21:820–824.
- Lehn, J.-M. 1995. Supramolecular chemistry: concepts and perspectives. VCH, 271 p., Weinheim, Germany.
- Li, L., He X., Chen L., Zhang, Y. 2009. Preparation of novel bovine hemoglobin surfaceimprinted polystyrene nanoparticles with magnetic susceptibility. **Science in China Series B: Chemistry**, 52:1402–1411.

- Li, P., Rong, F., Yuan, C.W. 2003. Morphologies and binding characteristics of molecularly imprinted polymers prepared by precipitation polymerization. **Polymer International**, 52:1799–1806.
- Li, X., Husson, S.M. 2006. Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: A surface plasmon resonance study. **Biosensors and Bioelectronics**, 22: 336–348.
- Li, W., Matyjaszewski, K., Albrecht, K., Moller, M. 2009. Reactive surfactants for polymeric nanocapsules via interfacially confined miniemulsion ATRP. **Macromolecules**, 42:8228–8233.
- Liao, J. L., Wang, Y., Hjerten, S. 1996. Novel support with artificially created recognition for the selective removal of proteins and for affinity chromatography. **Chromatographia**, 42:259-262.
- Liedberg, B., Nylander, C., Lundström, I. 1983. Surface Plasmon Resonance for gas detection and biosensing. **Sensors and Actuators**, 4:299-304.
- Lin, H-Y., Hsu, C-Y., Thomas, J.L., Wang, S-E., Chen, H-C., Chou, T-C. 2006. The microcontact imprinting of proteins: the effect of cross-linking monomers for lysozyme, ribonuclease A and myoglobin. **Biosensors and Bioelectronics**, 22:534–43.
- Lin, L.P., Huang, L.S., Lin, C.W., Lee, C.K., Chen, J.L., Hsu, S.M., Lin, S. 2005. Determination of binding constant of DNA-binding drug to target DNA by surface plasmon resonance biosensor technology. **Current Drug Target**, 5:61-72.
- Liu, G., Liu, P. 2010. Synthesis of monodispersed crosslinked nanoparticles decorated with surface carboxyl groups via soapless emulsion polymerization. **Colloid and Surfaces A**, 354:377–381.
- Lu, C., Zhou, W., Han, B., Yang, H., Chen, X., Wang, X. 2007. Surface-imprinted core-shell nanoparticles for sorbent assays. **Analytical Chemistry**, 79:5457-5461.
- Lu, C-H., Wang, Y., Li, Y., Yang, H-H., Chen, X., Wang, X-R., 2009. Bifunctional superparamagnetic surface molecularly imprinted polymer core-shell nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, 19:1077–1079.
- Macias, E.R., Rodriguez-Guadarrama, L.A., Cisneros, B.A., Castaneda, A., Mendizabal, E., Puig, J.E. 1995. Microemulsion polymerization of methyl methacrylate with the functional monomer N-methylolacrylamide. **Colloid and Surfaces A**, 103:119–126

- Matthew, A. 2012. Optical biosensors in drug discovery, **Nature Reviews Drug Discovery**, 1:515-552.
- Mathew, J., Buchardt, O. 1995. Molecular imprinting approach for the recognition of adenine in aqueous-medium and hydrolysis of adenosine 5-triphosphate. **Bioconjugate Chemistry**, 6:524–528.
- Matsunaga, T., Hishiya, T., Takeuchi, T. 2007. Surface plasmon resonance sensor for lysozyme based on molecularly imprinted thin films. **Analytica Chimica Acta**, 591:63–67.
- Matveeva, E., Gryczynski, Z., Gryczynski, I., Malicka, J., Lakowicz, J. R. 2004. Myoglobin Immunoassay Utilizing Directional Surface Plasmon-Coupled Emission. **Analytical Chemistry**, 76:6287-6292.
- Mayes, A.G., Whitcombe, M.J. 2005. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 57:1742–1778.
- Meziani, M.J., Pathak, P., Hurezeanu, R., Thies, M.C., Enick, R.M., Sun, Y.P. 2004. Supercritical-fluid processing technique for nanoscale polymer particles. **Angewandte Chemie International Edition**, 43:704–707.
- Mishra, B., Patel, B.B., Tiwari, S. 2010. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: NBM**, 6:9–24.
- Miyata, T., Asami, N., Uragami, T. A. 1999. Reversible antigen-binding hydrogel. **Nature**, 399:766–769.
- Miyata, T., Asami, N., Uragami, T. 1999. Preparation of an antigen sensitive hydrogel using antigen-antibody bindings. **Macromolecules**, 32:2082–2084.
- Miyata, T., Jige, M., Nakaminami, T., Uragami, T. 2006. Tumor marker responsive behavior of gels prepared by biomolecular imprinting. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103:1190–1193.
- Mukawa, T., Goto, T., Nariai, H., Aoki, Y., Imamura, A., Takeuchi, T. 2003. Novel strategy for molecular imprinting of phenolic compounds utilizing disulfide templates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 30:1943-1947.

- Munoz-Bonilla, A., Herk, A.M.V., Heuts, J.P.A. 2010. Preparation of hairy particles and antifouling films using brush-type amphiphilic block copolymer surfactants in emulsion polymerization. **Macromolecules**, 43:2721–31.
- Naka, T., Jones, D., Baldwin, I., Fealy, N., Bates, S., Goehl, H., Morgera, S., Neumayer, H.H., Bellomo, R. 2005. Myoglobin clearance by super high-flux hemofiltration in a case of severe rhabdomyolysis: a case report. **Critical Care**, 9:90–95.
- Nelson, D. V., Cox, M.M. 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri (Çeviri: N. Kılıç), 3. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Neumann, A.W., Good, R.J. 1979. Techniques of measuring contact angles. **Surface and Colloid Science**, 11:31-91.
- Nishino, H. 2006. Selective protein capture by epitope imprinting. **Angewandte Chemie International Edition**, 45:2392–2396.
- O'Shannessy, D.J., Ekberg, B., Mosbach, K. 1989. Molecular imprinting of amino-acid derivatives at low-temperature (0°C) Using photolytic homolysis of azobisnitriles. **Analytical Biochemistry**, 177:144–149.
- Odabaşı, M., Say, R., Denizli, A. 2007. Molecular imprinted particles for lysozyme purification. **Materials Science and Engineering: C**, 27:90-99.
- Osman , B. 2011. Miyoglobin Tayinine Yönelik Moleküler Baskılanmış Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensör Hazırlanması. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Bursa.
- Otto, A. 1968. Excitation of surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. **Zeitschrift für Physik**, 216 : 398–410.
- Owens, D.K., Wendt, R.C. 1969. Estimation of the surface free energy of polymers. **Journal of Applied Polymer Science**, 13:1741-1747.
- Öztürk, N., Bereli, N., Akgöl, S., Denizli, A. 2008. High capacity binding of antibodies by poly(hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles. **Colloid and Surfaces B**, 67:14–19.
- Pe´rez, N., Whitcombe M. J., Vulfson E. N. 2000. Molecularly imprinted nanoparticles prepared by core-shell emulsion polymerization. **Journal of Applied Polymer Science**, 77:1851–1859.
- Pe´rez-Moral, N. and Mayes, A.G. 2006. MIP formats for analytical applications. In: Molecular Imprinting of Polymers (Piletsky, S.A. and Turner, A., eds), pp. 1–11, Landes Bioscience.

- Pe´rez-Moral, N. and Mayes, A.G. 2007. Molecularly imprinted multilayer core–shell nanoparticles a surface grafting approach. **Macromolecular Rapid Communication**, 28:2170–2175.
- Piletsky, S.A., Matuschewski, H., Schedler, U., Wilpert, A., Piletska, E.V., Thiele, T.A., Ulbricht, M. 2000. Surface functionalization of porous polypropylene membranes with molecularly imprinted polymers by photograft copolymerization in water. **Macromolecules**, 33:3092–3098.
- Piperno, S., Bui, B.T.S., Haupt, K., Gheber, L.A. 2011. Immobilization of molecularly imprinted polymer nanoparticles in electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers. **Langmuir The Acs Journal of Surfaces And Colloids**, 27:1547-1550.
- Plebania, M., Zaninotto, M. 1998. Diagnostic strategies using myoglobin measurement in myocardial infarction. **Clinica Chimica Acta**, 272:69–77.
- Poma, A., Turner, A. P.F., Piletsky, S.A. 2010. Advances in the manufacture of MIP Nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, 28:629-637.
- Ppattnaik, P. 2005. Surface Plasmon Resonance Applications in Understanding Receptor–Ligand Interaction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 126:79-92.
- Puig , J.E. 1996. Microemulsion polymerization (oil-in water). In: Polymeric materials encyclopedia, (Salamone JC, editor), FL: CRC Press, pp. 4333–4341, Boca Raton.
- Quaglia, M., De Lorenzi, E., Sulitzky, C., Massolini, G., Sellergren, B. 2001. Surface initiated molecularly imprinted polymer films: a new approach in chiral capillary electrochromatography. **Analyst**, 126:1495–1498.
- Rachkov, A., Minoura, N. 2001. Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1544:255–266.
- Rao, J.P., Geckeler, K.E. 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, 36 :887–913.
- Rayleigh, L. 1907. On the dynamical theory of gratings. **Proceeding of the Royal Society of London, Series A**, 79:399-416.
- Rieger, J., Zhang, W., Soffelbach, F., Charleux, B. 2010. Surfactant-free RAFT emulsion polymerization using poly(N,N-dimethylacrylamide) trithiocarbonate macromolecular chain transfer agents. **Macromolecules**, 43:6302–6310.

- Rotenberg, Y., Boruvka, L., Neumann, A.W. 1983. Determination of surface tension and contact angle from the shapes of axisymmetric fluid interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, 93,:169-183.
- Schasfoort, R.B.M., and Tudas, A.J. 2008. Handbook of Surface Plasmon Resonance University of Twente, Enchede, The Netherlands.
- Schirhagl, R., Lieberzeit P. A., Dickert F. L. 2010). Chemosensors for viruses based on artificial immunoglobulin copies. **Advanced Materials**, 22:2078–2081.
- Schweitz, L. 2002. Molecularly imprinted polymer coatings for open-tubular capillary electrochromatography prepared by surface initiation. **Analytical Chemistry**, 74:1192–1196.
- Scott, C., Wu, D., Ho, C.C., Co, C.C. 2005. Liquid-core capsules via interfacial polymerization: a free-radical analogy of the nylon rope trick. **Journal of American Chemical Society**, 127:4160–4161.
- Sellergren, B., Andersson, L. 1990. Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate-analog imprinting strategy. **Journal of Organic Chemistry**, 55:3381–3383.
- Sellergren, B., Shea, K.J. 1993. Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers. **Journal of Chromatography A**, 635:31–49.
- Shan, G., Leeman, W.R., Gee, S.J., Sanborn, J.R., Jones, A.D., Chang, D.P.Y., Hammock, B.D. 2001. Highly sensitive dioxin immunoassay and its application to soil and biota samples. **Analytica Chimica Acta**, 444:169-178
- Shea, K.J., Thompson, E.A., Pandey, S.D., Beauchamp, P.S. 1980. Template synthesis of macromolecules. Synthesis and chemistry of functionalised macroporous polydivinylbenzene. **Journal of American Chemistry Society**, 102:3149–3155.
- Shea, K.J., Stoddard, G.J., Shavelle, D.M., Wakui, F., Choate, R.M. 1990. Synthesis and characterization of highly crosslinked polyacrylamides and polymethacrylamides—a new class of macroporous polyamides. **Macromolecules**, 23:4497–4507.
- Shimomura, M., Nomura, Y., Zhang, W., Sakino, M., Lee, K.-H., Ikebukuro, K., Karube, I. 2001. Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, polychlorinated biphenyl and atrazine. **Analitica Chimica Acta**, 434 :223-230.

- Skudar, K., Brüggemann O., Wittelsberger, A., Ramström, O. 1999. Selective recognition and separation of β -lactam antibiotics using molecularly imprinted polymers. **Analytical Communication**, 36:327–331.
- Soh, N., Tokuda, T., Watanabe, T., Mishima, K., Imato, T., Masadome, T., Asano, Y., Okutani, S., Niwa, O., Brown, S. 2003. A surface plasmon resonance immunosensor for detecting a dioxin precursor using a gold binding polypeptide. **Talanta**, 60:733- 745.
- Sosa, N., Zaragoza, E.A., Lopez, R.G., Peralta, R.D., Katime, I., Becerra, F., Mendizabal, E., Puig, J.E. 2000. Unusual free radical polymerization of vinyl acetate in anionic microemulsion media. **Langmuir**, 16:3612–3619.
- Sreenivasan, K., Sivakumar, R. 1997. Interaction of molecularly imprinted polymers with creatinine. **Journal of Applied Polymer Science**, 66:2539–2542.
- Sreenivasan, K. 1999. On the application of molecularly imprinted poly(HEMA) as a template responsive release system. **Journal of Applied Polymer Science**, 71:1819–1821.
- Steinke, J.H.G., Dunkin, I.R., Sherrington, D.C. 1996. Molecularly imprinted anisotropic polymer monoliths. **Macromolecules**, 29:407–415.
- Striegler, S. 2002. Investigation of disaccharide recognition by molecularly imprinted polymers. **Bioseparation**, 10:307–314.
- Su, W-X. , Rick, J. , Chou, T-C. 2009. Selective recognition of ovalbumin using a molecularly imprinting polymer. **Microchemical Journal**, 92:123-128.
- Suedee, R., Songkram, C., Petmoreekul, A., Sangkunakup, S., Sankasa, S., Kongyart, N. 1999. Direct enantioseparation of adrenergic drugs via thin-layer chromatography using molecularly imprinted polymers. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, 19: 519–527.
- Sugawara, Y., Gee, S.J., Sanborn, J.R., Gilman, S.D., Hammock, B.D.,1998. Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay based on polyclonal antibodies for the detection of polychlorinated dibenzo-p-dioxins. **Analytical Chemistry**, 70:1092-1099.
- Su-Jung, Y., Chun, H., Mi-Sun, L., Kim, N. 2009. Preparation of poly (N-vinylcarbazole) (PVK) nanoparticles by emulsion polymerization and PVK hollow particles. **Synthetic Metals**, 159:518–522.

- Sun, Y.P., Rolling, H.W., Bandara, J., Meziani, J.M., Bunker, C.E. 2002. Preparation and processing of nanoscale materials by supercritical fluid technology. In: *Supercritical fluid technology in materials science and engineering: synthesis, properties, and applications*. (Sun YP, editor), New York: Marcel Dekker, pp. 491–576, New York.
- Svenson, J., Nicholls, I. A. 2001. On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers. ***Analytica Chimica Acta***, 435:19–24.
- Şener, G., Özgür, E., Yılmaz, E., Uzun, L., Say, R., Denizli, A. 2010. Quartz crystal microbalance based nanosensor for lysozyme detection with lysozyme imprinted nanoparticles. ***Biosensors and Bioelectronics***, 26:815–821.
- Şener, G., Uzun, L., Say, R., Denizli, A. 2011. Use of molecular imprinted nanoparticles as biorecognition element on surface plasmon resonance sensor. ***Sensors and Actuators B***, 160:791–799.
- Tai, D.F., Lin, C.Y., Wu, T.Z., Chen, L.K. 2005. Recognition of dengue virus protein using epitope-mediated molecularly imprinted film. ***Analytical Chemistry***, 77:5140–5143.
- Takano, T. 1977. Structure of myoglobin refined at 2.0 Å resolution. II. Structure of deoxymyoglobin from sperm whale. ***Journal of Molecular Biology***, 110: 569–584.
- Tamayo, F.G., Turiel, E., Martín-Esteban, A. 2007. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. ***Journal of Chromatography A***, 1152: 32–40.
- Tan, C.J. and Tong, Y.W. 2007. Molecularly imprinted beads by surface imprinting. ***Analytical and Bioanalytical Chemistry***, 389: 369–376.
- Tarbin, J.A., Sharman, M. 2001. Development of molecularly imprinted phase for the selective retention of stilbene-type estrogenic compounds. ***Analytica Chimica Acta***, 433:71–79.
- Thickett, S.C., Gilbert, R.G. 2007. Emulsion polymerization: state of the art in kinetics and mechanisms. ***Polymer***, 48:6965–6991.
- Titirici, M-M. and Sellergren, B. 2006. Thin molecularly imprinted polymer films via reversible addition–fragmentation chain transfer polymerization. ***Chemistry of Materials***, 18:1773–1779.

- Tokonami, S., Shiigi, H., Nagaoka, T. 2009. Review: micro- and nanosized molecularly imprinted polymers for high-throughput analytical applications. **Analytica Chimica Acta**, 641:7–13.
- Turner, N.W., Jeans, C.W., Brain, K.B., Allender, C.J., Hlady, V., Britt, D.W. 2006. From 3D to 2D: A review of the molecular imprinting of proteins. **Biotechnology and Progress**, 22:1474-1489.
- Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Chen, Y., Shah, R.N., Shimizu, K.D., 2001. Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir–Freundlich isotherm. **Analytical Chemistry**, 73:4584–4591.
- Urraca, J.L. , Moreno-Bondi, M.C., Orellana, G. B., Hall, S.A.J. 2007. Molecularly imprinted polymers as antibody mimics in automated on-line fluorescent competitive assays. **Analytical Chemistry**, 79:4915-4923.
- Uzun, L., Say, R., Unal, S., Denizli, A. 2009. Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, 24:2878–2884.
- Vaidya, H.C. 1994. Myoglobin: an early biochemical marker for the diagnosis of acute myocardial infarction. **Journal of Clinical Immunoassay**, 17:35–39.
- Vaidya, A. A., Lele, B. S., Kulkarni, M. G., Mashelkar, R. A. 2001. Creating a macromolecular receptor by affinity imprinting. **Journal of Applied Polymer Science**, 81:1075-1083.
- Vaihinger, D., Landfester K., Krauter I., Brunner H., Tovar G. E. M. 2002. Molecularly imprinted polymer nanospheres as synthetic affinity receptors obtained by miniemulsion polymerisation. **Macromolecular Chemistry and Physics**, 203:1965–1973.
- Van Herk, A.M. and Monteiro, M. 2003. Heterogeneous systems. In: Handbook of Radical Polymerization (Matyjaszewski, K. and Davis, T.P., eds), pp. 301–332, John Wiley & Sons.
- Van Oss, C.J., Chaudhury, M.K., Good, R.J. 1987. Monopolar Surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, 28:35-64.
- Vanderhoff, J.W., El Aasser, M.S., Ugelstad, J. 1979. Polymer emulsification process. US Patent 4177177.
- Vandeveld, F., Belmont, A-S., Pantigny, J., Haupt, K. 2007. Hierarchically nanostructured polymer films based on molecularly imprinted surface-bound nanofilaments. **Advanced Materials**, 19:3717-3720.

- Vauthier, C., Couvreur, P. 2000. Development of nanoparticles made of polysaccharides as novel drug carrier systems. In: Handbook of pharmaceutical controlled release technology. (Wise DL, editor.), New York: Marcel Dekker pp. 413–429, New York.
- Venton, D. L., Gudipati, E. 1995. Influence of protein on polysiloxane polymer formation-evidence for induction of complementary protein-polymer interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1250:126-136.
- A'Vila, M., Zougagh, M., Escarpa, A., Ri'os, A. 2008. Molecularly imprinted polymers for selective piezoelectric sensing of small molecules. **Trends in Analytical Chemistry**, 27:54-65.
- Villoslada, F. N., Urraca, J.L., Moreno-Bondi, M.C., Orellana, G. 2007. Zearalenone sensing with molecularly imprinted polymers and tailored fluorescent probes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 121 : 67-73.
- Vranckx, H., Demoustier, M., Deleers, M. 1996. A new nanocapsule formulation with hydrophilic core: application to the oral administration of salmon calcitonin in rats. **Journal of Pharmaceutics and Pharmacology**, 42:345–347.
- Weber, M., Thies, M.C. 2002. Understanding the RESS process. In: Supercritical fluid technology in materials science and engineering: synthesis, properties, and applications. (Sun YP, editor) New York: Marcel Dekker; pp. 387–437, New York.
- Weber, M., Rau, M., Madlener, K., Elsaesser, A., Bankovic, D., Mitrovic, V., Hamm, C. 2005. Diagnostic utility of new immunoassays for the cardiac markers cTnI, myoglobin and CK-MB mass. **Clinical Biochemistry**, 38: 1027–1030.
- Wei, C., Zhou, H., Zhou, J. 2011. Ultrasensitively sensing acephate using molecular imprinting techniques on asurface plasmon resonance sensor. **Talanta**, 83: 1422–1427.
- Whitcombe, M.J., Rodriguez, M.E., Vulfson, E.N. 1994. In: Separation for Biotechnology 3., (Pyle DL ed.), Royal Society of Chemistry, pp. 565–571, Cambridge.
- Whitcombe, M.J., Rodriguez, M. E., Villar, P., 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. **Journal of American Chemical Society**, 117:7105-7111.

- Wolf, A., Pillay, V. 1969. Renal concentration tests; osmotic pressure, specific gravity, refraction and electrical conductivity compared. **The American Journal of Medicine**, 46:837-843.
- Wood, R.W. 1902. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. **Proceeding of the Physical Society of London**, 4:396-402.
- Wulff, G., and Sarhan, A. 1972. Use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. **Angewandte Chemie International Edition**, 11:341-346 .
- Wulff, G., Vesper, W., Grobe-Einsler, R., Sarhan, A. 1977. Enzyme-analogue built polymers- on the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates. **Makromolekular Chemistry**, 178:2799-2816.
- Wulff , G., Best, W., Akelah, A. 1984. Enzyme-analogue built polymers, 17. Investigations on the racemic resolution of amino-acids. **Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents**, 2:167-174.
- Wulff, G., Heide, B., Helfmeier, G. 1986. Molecular recognition through the exact placement of functional-groups on rigid matrices via a template approach. **Journal of American Chemical Society**, 108: 1089-1091.
- Wulff, G., Vietmeier, J. 1989. Enzyme-analogue built polymers, 26. Enantioselective synthesis of amino acids using polymers possessing chiral cavities obtained by an imprinting procedure with template molecules. **Makromolekular Chemistry**, 190:1727-1735.
- Xia, Y.Q., Guo, T.Y., Song, M.D., Zhang, B.H., Zhang, B.L. 2005. Hemoglobin recognition by imprinting in semi-interpenetrating polymer network hydrogel based on polyacrylamide and chitosan. **Biomacromolecules**, 6:2601-2606.
- Xie, C., Liu, B., Wang, Z., Gao, D., Guan, G., Zhang, Z. 2008. Molecular imprinting at walls of silica nanotubes for TNT recognition. **Analytical Chemistry**, 80:437-443.
- Ye, L., Cormack, P.A.G., Mosbach, K. 1999. Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay. **Analytical Communication**, 36:35-38.
- Ye, L. and Mosbach, K. 2008. Molecular imprinting: synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors. **Chemistry of Materials**, 20:859-868.

- Yilmaz, E., Haupt, K., Mosbach, K. 2000. The use of immobilized templates-a new approach in molecular imprinting. **Angewandte Chemie International Edition**, 39:2115-2118.
- Zetterlund, P.B., Kagawa, Y., Okubo, M. 2008. Controlled/living radical polymerization in dispersed systems. **Chemical Reviews**, 108:3747–3794.
- Zhang, M., Wu, Y., Feng, X., He, X., Chen, L., Zhang, Y. 2010. Fabrication of mesoporous silica-coated CNTs and application in size-selective protein separation. **Journal of Materials Chemistry**, 20: 5835–5842.
- Zhang, L., Cheng, G., Fu, C. 2002. Molecular selectivity of tyrosine-imprinted polymers prepared by seed swelling and suspension polymerization. **Polymer International**, 51:687-692.
- Zhang, T.L., Liu, F., Chen, W., Wang, J., Li, K. 2001. Influence of intramolecular hydrogen bond of templates on molecular recognition of molecularly imprinted polymers. **Analytica Chimica Acta**, 450:53–61.
- Zhou, J., He, X.W., Guo, H.S. 2000. A molecularly imprinted polymer receptor for the enantiomeric recognition of amino acid hydantoins mimicking cooperative hydrogen bonds between nucleotide bases. **Chinese Journal of Chemistry**, 18:482–488.

EK 1:

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Sayı : B.30.2.ADÜ.0.20.05.00/050.04- 36
Konu : Çalışmanız hk.

04/03/2012

Sayın, Prof.Dr. A.Alev KARAGÖZLER
ADÜ Fen-Edebiyat Fak.
Kimya Bölümü
Biyokimya AD

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 01.03.2012 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmanızla ilgili alınan 1 nolu karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize sunarım.

Prof.Dr. M. Selim ÖZKÖK
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

KARAR 1

Protokol No : 2012/12
Sorumlu Yürütücü : Prof.Dr. A.Alev KARAGÖZLER
ADÜ Fen-Edebiyat Fak.
Kimya Bölümü
Biyokimya AD

ADÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü - Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. A.Alev KARAGÖZLER'in "Miyogloblin teşhisi için tayin kitlerinin üretimi" başlıklı klinik araştırmasınının 01.03.2012 tarihli kurul kararında eksiklikler saptanmıştı. 28.02.2012 tarihli gelen dilekçesi ve ekleri görüşüldü. İstenen bilgi ve belgelerin dosyaya konulduğu görülmüştür.

Sonuçta, yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına oy birliğiyle karar verilmiştir

Adres: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü – Kepez Mevkii- AYDIN
Tel: 256- 225 31 66
Faks : 256-212 31 69
Web : <http://www.site.adu.edu.tr/etikkurulu/goek/> e-posta: goetik@adu.edu.tr

EK 2:



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Sayı : B.30.2.ADÜ.0.20.05.00/050.04-330
Konu : Çalışmanız hk.

12.12.2012

Sayın, Prof.Dr. A.Alev KARAGÖZLER
ADÜ Fen-Edebiyat Fak.
Kimya Bölümü
Biyokimya AD

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 13.12.2012 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmanızla ilgili alınan 11 nolu karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize sunarım.

Prof.Dr. Nefati KIYILIOĞLU
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı Yrd.

KARAR 11

Protokol No : 2012/12
Sorumlu Yürütücü : Prof.Dr. A.Alev KARAGÖZLER
ADÜ Fen-Edebiyat Fak.
Kimya Bölümü
Biyokimya AD

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Kurulu'nca 01.03.2012 tarihinde onay verilen; ADÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof.Dr. A.Alev KARAGÖZLER'in "**Miyogloblin teşhisi için tayan kitlelerinin üretimi**" konulu klinik araştırmasının sonuç raporu ile ilgili dilekçesi görüşüldü.

Dilekçesinde çalışmanın tamamlandığı ve sonuç raporunun ekli olduğu görülmüştür.

Sonuçta çalışmanın etik kurallar içinde yürütüldüğü ve tamamlandığı, istenen belgelerin tam olduğu anlaşıldı.

Çalışmanın **Etik Kurul Uygunluk Onayını** almasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Adres: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü – Kepez Mevkii- AYDIN
Tel: 256- 225 31 66
Faks : 256-212 31 69
Web : <http://www.site.adu.edu.tr/etikkurulu/goek/> e-posta: goetik@adu.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nevra ÖZTÜRK ATAY

Doğum Yeri ve Tarihi : Muğla, 1981

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi (2000-2004)

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi (2004-2006)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

1. **Nevra Öztürk**, R. Hilal Şenay, Nesibe Avcıbaşı, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2012). Reversible lysozyme immobilization onto N,N'-bis-(3-(4-morpholino)-propyl)-3,4,9,10 perylenetetracarboxylic acid dimide (MPPDI) attached polymeric nanospheres, *Process Biochemistry*, Basımda.
2. Deniz Aktaş Uygun, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2011). Methacryloylamidohistidine in affinity ligands for immobilized metal-ion affinity chromatography of ferritin, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16, 173-179 .
3. Deniz Aktaş Uygun, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2011). Novel magnetic nanoparticles for the hydrolysis of starch with **Bacillus licheniformis** α -amylase, *Journal of Applied Polymer Science*, 123, 2574-2581 .
4. M. Emin Çorman, **Nevra Öztürk**, Nilay Bereli, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2010). Preparation of nanoparticles which contains histidine for immobilization of *trametes versicolor* laccase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 63, 102–107.

5. M. Emin Çorman, **Nevra Öztürk**, Nalan Tüzmen, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2010). Magnetic polymeric nanospheres as an Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) support for catalase, *Biochemical Engineering Journal*, 49, 159–164.
6. Deniz Aktas Uygun, M. Emin Corman, **Nevra Ozturk**, Sinan Akgol, Adil Denizli. (2010). Poly(hydroxyethyl methacrylate-co-methacryloylamidotryptophane) nanospheres and their utilization as affinity adsorbents for porcine pancreas lipase adsorption, *Materials Science and Engineering C*, 30, 1285–1290.
7. Sinan Akgöl, **Nevra Öztürk**, Adil Denizli. (2010). New generation hydrophobic nanospheres for lysozyme adsorption, *Reactive & Functional Polymers*, 3, 1608 – 1615.
8. Sinan Akgöl, **Nevra Öztürk**, Adil Denizli. (2009). New generation polymeric nanospheres for catalase immobilization, *Journal of Applied Polymer Science* 114, 962–970.
9. Deniz Türkmen, Erkut Yılmaz, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2009). Poly(hydroxyethylmethacrylate) nanobeads containing imidazole groups for removal of Cu(II) ions, *Materials Science and Engineering C*, 29, 2072-2078.
10. Veyis Karakoç, Erkut Yılmaz, Deniz Türkmen, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2009). Selective separation of human serum albumin with copper(II) chelated poly(hydroxyethylmethacrylate) based nanoparticles, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 188-193.
11. Deniz Aktaş Uygun, Murat Uygun, A. Alev Karagözler, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2009). A novel method for antibody purification: Fatty acid attached chitosan microbeads, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 70, 266–270.
12. Sinan Akgöl, **Nevra Öztürk**, Adil Denizli. (2009). New generation polymeric nanospheres for catalase immobilization, *Journal of Applied Polymer Science*, 114, 962-970.

13. Deniz Türkmen, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Assem Elkak, Adil Denizli. (2008), Phenylalanine containing hydrophobic nanospheres for antibody purification, *Biotechnology Progress*, 24, 1297-1303.
14. **Nevra Öztürk**, Nilay Bereli, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2008). High capacity binding of antibodies by poly(hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67, 14-19.
15. Sinan Akgöl, **Nevra Öztürk**, Ahmet Tabak, Adil Denizli. (2008). Reversible immobilization of catalase by using a novel Bentonite-Cysteine (Bent-Cys) microcomposite affinity sorbents. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 322, 148-154.
16. Sinan Akgöl, **Nevra Öztürk**, Adil Denizli. (2008). Dye affinity hollow fibers for β -casein. *Reactive and Functional Polymers*, 68, 225-232.
17. Sinan Akgöl, **Nevra Öztürk**, A. Alev Karagözler, Deniz Aktaş Uygun, Murat Uygun, Adil Denizli. (2008). A new metal-chelated beads for reversible use in uricase adsorption. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51, 36-41.
18. **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Münevver Arısoy, Adil Denizli. (2007). Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres, *Separation & Purification Technology*, 58, 83-90.
19. **Nevra Öztürk**, M. Emin Günay, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2007). Silane modified magnetic beads: application to immunoglobulin G separation, *Biotechnology Progress*, 23, 1149-1156.
20. **Nevra Öztürk**, Ahmet Tabak, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2007). Newly synthesized Bentonite-Histidine (Bent-His) micro-composite affinity sorbents for IgG adsorption, *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 301, 490-497.

-Diğer

1. Sinan Akgöl, M. Emin Çorman, **Nevra Öztürk**, Cem Esen, Adil Denizli. (2008). Batch removal of lead ions from aquatic solutions by 2-hydroxyethyl methacrylate nanobeads carrying Cibacron Blue F3GA, *Analele Universităţii din Oradea-fascicula Chimie*, 15, 36-42.

2. **Nevra Öztürk**, Ahmet Tabak, Sinan Akgöl, Adil Denizli. (2007). Preparation of Bentonite-Cysteine (Bent-Cys) micro-composite affinity sorbents for Ferritin adsorption, Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 35, 67-76.

b) Bildiriler

-Uluslararası

1. Deniz Aktaş Uygun, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Preparation of magnetic nanostructure for immobilization of *Bacillus licheniformis* α -Amylase". XXII. National Chemistry Congress (International participation), Magusa, Northern Cyprus. (2008). BKP-13.
2. Deniz Aktaş Uygun, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Porcine lipase immobilization onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based nanospheres". The International Enzyme Engineering Symposium (IEES'08), 01-05 October 2008, Kusadasi-Turkey. (2008), pp. 98.
3. Deniz Aktaş Uygun, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Preparation of new generation monosize nanospheres and its usage for biomolecule adsorption". The International Enzyme Engineering Symposium (IEES'08), 01-05 October 2008, Kusadasi-Turkey. (2008), pp. 137.
4. **Nevra Öztürk**, M. Emin Çorman, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Newly synthesized nanobeads for high capacity of DNA binding". The International Enzyme Engineering Symposium (IEES'08), 01-05 October 2008, Kusadasi-Turkey. (2008), pp. 138.
5. **Nevra Öztürk**, M. Emin Çorman, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Preparation and usability of Ni(II)-attached methacryloylamidoglutamic acid functionalized nano-p(1-hydroxyethylmethacrylate) nanospheres for urease immobilization". The International Enzyme Engineering Symposium (IEES'08), 01-05 October 2008, Kusadasi-Turkey. (2008), pp. 83.
6. **Nevra Öztürk**, Deniz Aktaş Uygun, Nalân Tüzmen, Tülden Kalburcu, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Removal of cholesterol by Nano-PHEMA based nanostructures". Biomed 2008, 14th Biomedical Science and Technology Symposium & International Workshop on Networking/Platforming in Biomedical Technologies Focus on Nanomedicine, Muğla-Turkey. (2008), pp. 84.

7. **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Preparation of Fe(III)-Immobilized magnetic nano-particles for catalase adsorption". Biomed 2008, 14th Biomedical Science and Technology Symposium & International Workshop on Networking/Platforming in Biomedical Technologies Focus on Nanomedicine, Muğla-Turkey. (2008), pp. 85.
8. Gülay Doğan, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli. "Preparation of a new generation polymeric nanostructures and its usage for laccase immobilization". Biomed 2008, 14th Biomedical Science and Technology Symposium & International Workshop on Networking/Platforming in Biomedical Technologies Focus on Nanomedicine, Muğla-Turkey. (2008), pp. 86.
9. Deniz Aktaş Uygun, **Nevra Öztürk**, Nalân Tüzmen, Tülden Kalburcu, Sinan Akgöl. "Preparation of magnetic hydrophobic nanoparticles for cholesterol removal". IVth Congress of National Affinity Techniques (International Participation), Muğla-Turkey. (2008), pp. 84.
10. Murat Uygun, **Nevra Öztürk**, A.Alev Karagözler, Sinan Akgöl."Preparation of Fe(III)-attached poly(Alginate-Chitosan) microparticles for Ferritin adsorption". IVth Congress of National Affinity Techniques (International Participation), Muğla-Turkey. (2008), pp.

-Ulusal

1. Baskılanmış Spesifik Nanoyapılarla Anti-Kanser-İlaç Taşınımı, **Nevra Öztürk**, M. Emin Çorman, Sinan Akgöl, Adil Denizli, Kromatografi 2010 Kongresi, 16-19 Haziran 2010, Erzurum.
2. Kriyojel Matrikste Lektin Afinite Etkileşimleri ile Sukroz Hidrolizi, Murat Uygun, **Nevra Öztürk**, Emir Özçalışkan, Sinan Akgöl, 6. Ulusla Afinite Teknikleri Kongresi, 26-29 Mayıs 2010, Aksaray, S-3.
3. Yeni Geliştirilen Hidrofobik bir Nano-polimer: Nano-P(HEMA-PTCADI) ve Lizozim İmmobilizasyon Etkinliğinin Araştırılması, **Nevra Öztürk**, M. Emin Çorman, Nesibe Avcıbaşı, Sinan Akgöl, Adil Denizli, Kromatografi 2009 , 26-29 Eylül 2009, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, pp. 14.
4. Moleküler Baskılanmış Nanopartiküllerin Hazırlanması Ve Lizozim Adsorpsiyonunda Kullanılması, **Nevra Öztürk**, M. Emin Çorman, Sinan Akgöl, Adil Denizli, V. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi , 20-24 Mayıs 2009, Ayvalık.

5. Preparation of nano-poly (EGDMA-MAC) nanostructures and its usage for immobilization of glukose oksidase, M. Emin Çorman, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli, 5. Ulusal Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 8-12 Haziran 2009, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, pp. 69.
6. Removal of Cadmium Ions From Aqueous Media Using Nanoparticles, M. Emin Çorman, Cem Esen, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli, 5. Ulusal Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 8-12 Haziran 2009, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, pp. 70.
7. Preparation of nanoparticles which contains amino acid for immobilization of Laccase, **Nevra Öztürk**, M. Emin Çorman, Sinan Akgöl, Adil Denizli, 5. Ulusal Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 8-12 Haziran 2009, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, pp. 79.
8. Synthesis and characterization of magnetic poly (hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles, Veyis Karakoç, Deniz Türkmen, **Nevra Öztürk**, Lokman Uzun, Sinan Akgöl, Adil Denizli, 5. Ulusal Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 8-12 Haziran 2009, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, pp. 96.
9. Lizozim Adsorpsiyonu İçin Afinite Sorbenti Olarak Poli(Hidroksietil metakrilat)-ko- (metakriloilamidotriptofan) Nanoyapılarının Sentezi ve Kullanımı, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, Adil Denizli, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 28-31 Ekim 2007, Antalya, pp. 406.
10. Katalaz immobilizasyonu için yeni mikrokompozit afinite sorbentleri, **Nevra Öztürk**, Ahmet Tabak, Sinan Akgöl, Adil Denizli, III. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 12-14 Eylül 2007, Uludağ Üniversitesi, Bursa, pp. 45.
11. İnsan plazmasından antibadi adsorpsiyonuna yönelik geliştirilen nanoyapıların kullanımı, **Nevra Öztürk**, M. Emin Günay, Sinan Akgöl, Adil Denizli, III. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 12-14 Eylül 2007, Uludağ Üniversitesi, Bursa, pp. 46.
12. Reaktif imidazol grubu taşıyan metal-şelat afinite mikrokürelere ürikaz immobilizasyonu, Deniz Aktaş Uygun, **Nevra Öztürk**, Murat Uygun, A. Alev Karagözler, Sinan Akgöl, Adil Denizli, VI. Ulusal Kromatografi Kongresi, 28-30 Haziran 2006, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, pp. 19.

13. Pseudo-biyospesifik Afinite Ligandı L-Histidin İçeren Bentonit (Bent-His) Mikrokompozit Afinite Sorbentleri ve İmmunoglobulin G Adsorpsiyonunda Kullanılması, **Nevra Öztürk**, Ahmet Tabak, Sinan Akgöl, Adil Denizli, VI. Ulusal Kromatografi Kongresi, 28-30 Haziran 2006, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, pp. 73.
14. Hidrofobik nanoyapılarda Candida Rugosa Lipaz İmmobilizasyonu, **Nevra Öztürk**, Sinan Akgöl, II. Afinite Teknikleri Kongresi, 7-10 Haziran 2006, Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak, pp. 27
15. Yeni sentezlenen bir afinite mikrokompozit sistemi: L-Sistein içeren Bentonit (Bent-Cys) afinite sorbentleri ve Ferritin adsorpsiyonunda kullanılması, **Nevra Öztürk**, Ahmet Tabak, Sinan Akgöl, Adil Denizli, II. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, Karaelmas Üniversitesi, 7-10 Haziran 2006, Zonguldak, pp. 55.
16. Silanize edilmiş manyetik polimerik mikrokürelerin hazırlanması ve immünoglobulin G adsorpsiyonunda kullanılması, **Nevra Öztürk**, M. Emin Günay, Sinan Akgöl, II. Afinite Teknikleri Kongresi, 7-10 Haziran 2006, Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak, pp. 56.
17. Kapari (Capparis spinosa L.) tomurcuklarının antioksidan özelliklerinin incelenmesi, Deniz Aktaş Uygun, A. Alev Karagözler, Murat Uygun, **Nevra Öztürk**, XIX. Ulusal Kimya Kongresi, 2005, Ege Üniversitesi.
18. Kimyasal çapraz bağlanmış akrilamid/sodyum akrilat hidrojenlerine uranil iyonu soğurumu, Semiha Kundakçı, Ömer Barış Üzüm, **Nevra Öztürk**, M. Didem Akyüz, Dursun Saraydın, Erdener Karadağ , V. Ulusal Kromatografi Kongresi 2004, Anadolu Üniversitesi.

c) Katıldığı Projeler

Tarih	Proje Ekibi	Destekleyen Kuruluş	Proje Adı ve No'su
2006	Sinan AKGÖL Nevra ÖZTÜRK	Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı	Hidrofobik Nanoyapılarda Candida Rugosa Lipaz İmmobilizasyonu, FEF06003
2008	Sinan AKGÖL Nevra ÖZTÜRK Nilay BERELİ	TÜBİTAK-MAG	Manyetik akışkan kararlı yatakta Antibadi saflaştırılması için pseudo-seçici sorbentlerin hazırlanması

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Adnan Menders Üniversitesi, 2006-sürüyor

İLETİŞİM

E-posta Adresi : nevraozturk@adu.edu.tr