HEMOGLOBİN BASKILI
POLİ(*N*- t - BUTİLAKRİLAMİT - KO – AKRİLAMİT / İTAKONİK ASİT)
HİDROJELLERİNİN SENTEZİ VE ADSORPSİYON
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

AYŞE GÜL UYSAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞUSTOS 2006
ANKARA

Ayşe Gül UYSAL tarafından hazırlanan ‘‘HEMOGLOBİN BASKILI POLİ(*N*- t - BUTİLAKRİLAMİT-KO– AKRİLAMİT / İTAKONİK ASİT) HİDROJELLERİNİN SENTEZİ VE ADSORPSİYON ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ’’ adlı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tuncer Çaykara

Tez Yöneticisi

Bu çalışma jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi oalrak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Belma IŞIK

Üye : Doç. Dr. Tuncer ÇAYKARA

Üye : Doç. Dr. Nursel PEKEL

Üye : Doç. Dr. Nursel DİLSİZ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

Tarih : 25/08/2006

Bu tez Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

AYŞE GÜL UYSAL

HEMOGLOBİN BASKILI
POLİ(*N*- t - BUTİLAKRİLAMİT - KO – AKRİLAMİT / İTAKONİK ASİT)
HİDROJELLERİNİN SENTEZİ VE ADSORPSİYON ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

AYŞEGÜL UYSAL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ağustos 2006

ÖZET

Bu çalışmada, moleküler baskılama metodu kullanılarak , serbest radikal kopolimerleşmesi ile 3 ayrı pH'da (4, 6,8, 8) poli(N-t-bütilakrilamit-ko-akrilamit/itakonik asit) hidrojelleri sentezlenmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış hidrojel sistemleri için üç ayrı pH'da (4, 6,8, 8) Hemoglobin adsorpsiyonu araştırılmıştır. Hba ile baskılanmış hidrojeller yüksek adsorpsiyon kapasitesi ve seçicilik göstermişlerdir. Bütün çalışılan koşullarda en yüksek adsorpsiyon % 4,15 Hba ile baskılanmış hidrojellerde tespit edilmiştir. Ek olarak, baskılanmış hidrojeller hemoglobin için yüksek seçicilik ve yapıya katılan Hba miktarına bağlı olarak yüksek adsorpsiyon hızı göstermişlerdir. Adsorpsiyon çalışmaları neticesinde baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin Hba adsorpsiyon kapasitesini , pH ve başlangıç Hba konsantrasyonu gibi diğer faktörlerin etkilediği gözlenmiştir.

Bilim Kodu : **201.1.117**
Anahtar Kelimeler : **Hemoglobin adsorpsiyon, moleküler baskılama, hidrojel**
Sayfa Adedi : **71**
Tez Yöneticisi : **Doç.Dr. Tuncer ÇAYKARA**

SYNTHESIS and INVESTIGATION OF ADSORPTION PROPERTIES OF HEMOGLOBIN IMPRINTED POLY(*N-t*-BUTYLACRYLAMIDE-CO-ACRYLAMIDE/ITACONIC ACIDE) HYDROGELS

(M. Sc. Thesis)

AYŞEGÜL UYSAL

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

August 2006

ABSTRACT

In this study, pH sensitive imprinted poly(*N-t*-butylacrylamide-co-acrylamide/itaconic acide) hydogels were synthsized via free radical crosslinking copolymerization of corresponding monomers in three different pH buffer solutions (4, 6,8, 8) for hemoglobin (Hba) by using molecular imprinting method. Hba adsorption from Hba buffer solutions with three different pH was investigated by two types of hydrogels systems prepared by non-imprinted and imprinted methods. Hydrogels imprinted with Hba showed higher adsorption capacity and specificity for Hba than hydrogels prepared by the usual procedure . At all studied conditions the highest Hba adsorption was observed in the hydrogel imprinted with 4,15 % Hba. In addition, the imprinted hydrogels exhibited both good selectivity for Hba and high adsorption rate depending on the number of Hba sized cavities. Adsorption studies showed that other stimuli, such as pH and initial Hba concentration also influenced the imprinted hydrogels.

Science Code : **201.1.117**
Key Words : **Hemoglobin adsorption, molecular imprinting ,hydrogel**
Page Number : **71**
Supervisor : **Assoc. Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA**

TEŞEKKÜR

Bütün yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmam boyunca yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Tuncer ÇAYKARA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Canım ailem, her zaman hep yanımda olduğunuz için teşekkürler.

Çalışmalarım süresince yönlendiren fikirleri, neşeli sohbetleri ve yardımları için Arş. Gör. Gökçen BİRLİK 'e, Eylem TURAN'a, Burcu BAŞER'e, Arş. Gör. Gökhan DEMİREL 'e ,Uzman Suzan VASFİ'ye çok teşekkürler.
İyi ki varsınız…

Hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen ve çoğu zaman hayatımı kurtaran Uzman Ferat Şahin'e, Serkan DEMİRCİ'ye , Ferhat ÇAKAR'a ve laboratuar çalışmalarımdaki yardımcım Yunus ÇINAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET…….....iv

ABSTRACT..……v

TEŞEKKÜR……vi

İÇİNDEKİLER……...vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ……..……..x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ…….……..…...xi

SİMGELER VE KISALTMALAR…….……... xiii

1. GİRİŞ……..……..…....1

2. MOLEKÜLER BASKILAMA……..…….....4

2.1. Kovalent Baskılama…….……..5

2.1.1. Boronat esterleri ile kovalent baskılama…….……..8

2.1.2. Shiff bazlar ile kovalent baskılama…..…….....8

2.1.3. Asetal ve ketaller ile kovalent baskılama……..…….....8

2.2. Non-kovalent Baskılama…….....…….....8

2.2.1. Tek fonksiyonel monomerle non-kovalent baskılama….....…10

2.2.2. Monomer kombinasyonları ile non-kovalent baskılama……12

2.2.3. Çapraz bağlayıcılar ……..……....15

3. METAL İYONLARI İLE BASKILAMA…….…....16

4. NON POLAR BASKILAMA……..…17

5. MOLEKÜL BASKILI POLİMER OLUŞUMU…….....18

6. MOLEKÜL BASKILI POLİMERLERİN KULLANIM ALANLARI……..…19

7. HEMOGLOBİN……....21

Sayfa

7.1. Hemoglobin Yapısı…….22

.

7.1.1. Hem grubu……..…..…23

7.1.2. Hemoglobinde mutasyon…….....24

8. DENEYSEL KISIM……..…….26

8.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler…….……26

8.2. Hidrojellerin Hazırlanması……28

8.2.1. Baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA)hidrojellerinin sentezi…….28

8.2.2. Hba baskılı p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerinin sentezi…….29

8.2.3. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin denge şişme oranına pH etkisi …….……29

8.2.4. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin Hba adsorpsiyonu üzerine pH etkisi…….30

8.2.5. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin Hba adsorpsiyonu üzerine başlangıç Hba derişim etkisi……...31

8.2.6. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin Hba adsorpsiyon hızı…….32

8.2.7. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin Hba seçiciliği……..……..32

9. SONUÇLAR ve TARTIŞMA……..34

9.1. Baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAM/IA) Hidrojellerinin Sentezi……..34

9.2. Baskılanmış ve Baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) Hidrojellerin Denge Şişme Oranına pH etkisi ……...37

9.3. Baskılanmış ve Baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAM/IA) Hidrojellerin Hba Adsorpsiyonu Üzerine pH etkisi……..……..39

Sayfa

9.4. Baskılanmış ve Baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) Hidrojellerin Hba Adsorpsiyonu Üzerine Başlangıç Hba Derişim Etkisi…….44

9.5. Baskılanmış ve Baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) Hidrojellerin Hba Adsorpsiyon Hızı…….55

9.6. Baskılanmış ve Baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) Hidrojellerin Hba Seçiciliği……..…….57

10. FT-IR SPEKTRUMLARI……..……61

11. SONUÇLAR……...63

KAYNAKLAR……65

ÖZGEÇMİŞ……..71

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 9.1. Farklı pH'larda hazırlanan hidrojellerin adsorpsiyon sabitleri. …….48

Çizelge 9.2. Baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin seçiciliği… ……...58

Çizelge 9.3. pH 4'de sentezlenen hidrojellerin miyoglobin seçiciliği……...59

Çizelge 9.4. pH 6,8 'de sentezlenen hidrojellerin miyoglobin seçiciliği……..59

Çizelge 9.5. pH 8'de sentezlenen hidrojellerin miyoglobin seçiciliği……..59

Çizelge 9.6. pH 4'de sentezlenen hidrojellerin fibrinojen seçiciliği……..60

Çizelge 9.7. pH 6,8 'de sentezlenen hidrojellerin fibrinojen seçiciliği……....60

Çizelge 9.8. pH 8 'de sentezlenen hidrojellerin fibrinojen seçiciliği…….60

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Moleküler baskılamada hedef molekül ve monomer etkileşimleri……..……4

Şekil2.2. Kondenzasyon ilehazırlanan kovalent kalıp……..……..……..…6

Şekil 2.3. Fulluren C60 yüzeyine sakkaritin kovalent baskılanması……..…7

Şekil 2.4. Non-kovalent baskılamada kullanılan bazı monomerler ……..…11

Şekil 2.5. Non-kovalent baskılamada kullanılan bazı monomerler ve monomer karışımları……..14

Şekil 2.6. Çapraz bağlayıcılar ……..…15

Şekil 5.1. Molekül baskılı polimer oluşumu……..18

Şekil 7.1. Hemoglobin yapısı…….……..……....22

Şekil 7.2. Hemoglobinde alfa sarmal ve beta yaprak yapısı…….23

Şekil 7.3. Hem grubu…….....24

Şekil 7.4. Histidin ile koordine edilmiş hem grubu …….…..…24

Şekil 7.5. Normal ve hasta hemoglobin beta zinciri karşılaştırması……25

Şekil 9.1. APS ile TEMED reaksiyonu sonucu oluşan ortaklanmamış tek elektron içeren aktif TEMED molekülünün monomere katılması sonucu oluşan radikal…….…….....35

Şekil 9.2. Sentezlenen baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerinin kimyasal yapısı. ……....….36

Şekil 9.3. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin denge şişme oranına pH etkisi…….....…..38

Şekil 9.4. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAM-ko-AAM/IA) hidrojelleri Hba adsorpsiyonu üzerine pH etkisi……...40

Şekil 9.5. Farklı pH ‘daki çözeltilerde amino asit davranışı……..…...41

Şekil **Sayfa**

Şekil 9.6. Arginin 3 boyutlu ve düzlemsel yapısı……..…….42

Şekil 9.7. Lizin 3 boyutlu ve düzlemsel yapısı……..…….....43

Şekil 9.8. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin Hba adsorpsiyonu üzerine başlangıç Hba derişim etkisi…….…….....46

Şekil 9.9. pH 4,0 de sentezlenen hidrojellerin Langmuir adsorpsiyon sabitleri (Q^0) ve (b) için lineer grafikler….....49

Şekil 9.10. pH 6,8 de sentezlenen hidrojellerin Langmuir adsorpsiyon sabitleri (Q^0) ve (b) için lineer grafikler….....50

Şekil 9.11. pH 8,0 de sentezlenen hidrojellerin Langmuir adsorpsiyon sabitleri (Q^0) ve (b) için lineer grafikler….....51

Şekil 9.12. pH 4,0 de sentezlenen hidrojellerin Freundlich adsorpsiyon sabitleri (k_F) ve(1/n) için lineer grafikler ….....52

Şekil 9.13. pH 6,8 de sentezlenen hidrojellerin Freundlich adsorpsiyon sabitleri (k_F) ve(1/n) için lineer grafikler ….....53

Şekil 9.14. pH 8,0'de sentezlenen hidrojellerin Freundlich adsorpsiyon sabitleri (k_F)ve (1/n) için lineer grafikler ……...54

Şekil 9.15. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin Hba adsorpsiyon hızı……..…….56

Şekil10.1. Baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin FT-IR spektrumları…….……..……61

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı kısaltmalar , açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
TBAAm	N-t-bütilakrilamit
AAm	Akrilamit
IA	İtakonik asit
P(TBAAm-ko-AAm/IA)	poli(N-T-bütilakrilamit-ko-akrilamit/itakonik asit)
Hba	Hemoglobin A
HbS	Hemoglobin S
MBAAm	N,N'-Metilen-bis-akrilamit
APS	Amonyumpersülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen diamin
Miyoglobin	Myg
Fibrinojen	Fbr

1. GİRİŞ

İnsanoğlunun hayatta kalabilmek amacı ile başlayan doğayı taklit etme isteği geçen zamanla birlikte doğayı aşma, doğanın sunduklarından daha fazlasını elde etme yönüne kaymıştır. Hassas dengeler üzerinde süregelen bu doğal düzeni taklit, çok sayıda teknolojik gelişmenin de temelini oluşturmuş ve halen de oluşturmaya devam etmektedir. Bilim adamları doğal düzeni taklit ederek çok sayıda biyolojik molekülü sentezlemeye çalışmaktadırlar. Bu moleküllerin başında enzimler, antikorlar gibi yüksek seçiciliğe sahip, etkileyeceği molekülü tanıyan ve yalnızca ona özgü tepkiler veren moleküller gelmektedir [1].

Moleküler baskılama yöntemi kullanılarak yapılan başarılı çalışmalar, konunun gelecek açısından önemini vurgulamaktadır. Bu konudaki ilk başarılı çalışma, 1972 yılında Günter Wullf, Mosbach ikilisi tarafından yapılmış ve tanınması istenen molekülün polimer yüzeyine baskılanması olarak ifade edilen '*moleküler baskılama'* kavramı ilk kez bu çalışma ile gündeme getirilmiştir [2]. Enzim ve antikorlar gibi doğal moleküllerin yapay olarak elde edilebilmesi fikri yani biyomimetik molekül (biyolojik moleküllerin taklidi) sentezi ilk başlarda hayal olarak görülse de yapılan çalışmalarla moleküler tanıma özelliğine sahip yapay moleküllerin sentezlenmesiyle, biyolojik işleve sahip biyomimetik moleküller hazırlanmış olacaktır. Spesifik yapıda, bir tek konformasyonda akıllı polimerik jellerin elde edilmesi biyoloji, ilaç, tıp, eczacılık, fizik, kimya ve malzeme bilimi gibi farklı alanlardaki bilim dallarının ortaklaşa çalışmasını gerektirir. Yeni biyomateryallerin sentezi biyotaklit bir yaklaşıma sahiptir. Biyotaklit yaklaşım ise, doğal uygulamaların incelenerek ve prensipleri araştırılarak, istenilen fonksiyonların nasıl yerine getirildiğinin anlaşılması ve bu bilgiler ışığında yeni fonksiyonel biyomateryal dizayn edilerek yapılır [3]. Moleküler tanıma yeteneğine sahip polimerik materyallerin sentezi bu yaklaşımların en sonuncusu olarak kabul edilir. Bu biyomimetik moleküllerin biyoteknoloji ve biyoanalitik alanlarında son derece yararlı olacağı açıktır.

2005 yılında Hawkins ve arkadaşları poliakrilamit hidrojelleriyle bovin hemoglobine seçici bir strateji geliştirmişlerdir. Sentezledikleri hidrojele protein baskılanmasının yapılmasının ardından yapıdan ayrılan ve daha sonra geri kazanılan kalıp molekülün % ayrılma ve % geri kazanım oranları belirlenmiştir. Ayrıca oluşturdukları materyalin sitokrom C'ye karşı seçiciliği de araştırılmıştır [4].

Çaykara ve arkadaşları tarafından yürütülmüş başka bir çalışmada ise, bovin serum albümin polimerik materyale baskılanmış ve baskılanmayan polimer ile baskılanmış polimerin adsorpsiyon davranışları üzerine pH ve sıcaklık etkileri araştırılmıştır [5].

Bu çalışmada; poli(*N*-t butilakrilamit-ko-akrilamit/itakonik asit) (p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojelleri, sabit miktarlarda TBAAm, AAm, IA monomerleri, artan miktarlarda hemoglobin (Hba) varlığında N,N'-metilenbisakrilamit (MBAAm) çapraz bağlayıcısı ile amonyumpersülfat (APS) -N,N,N,N ' tetrametilendiamin (TEMED) redoks çifti kullanılarak metanol içerisinde serbest radikal polimerleşmesi ile oda sıcaklığında, ve üç farklı pH'da (4,0 - 6,8 – 8,0) sentezlenmiştir.

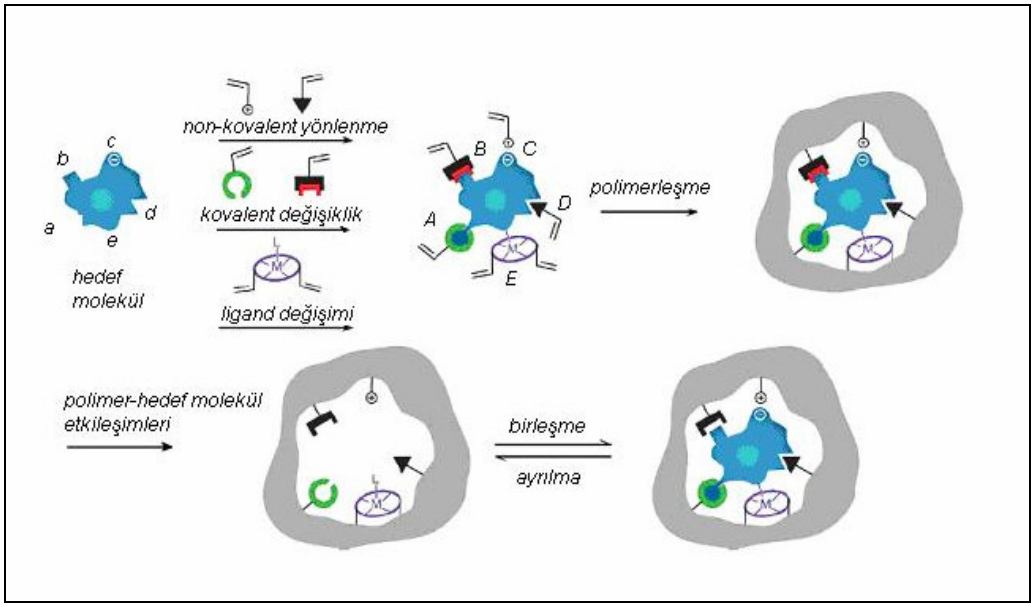
Artan miktarlarda hemoglobin varlığında, kimyasal yöntemle, üç farklı pH'da sentezlenen Hba baskılanmış ve bakılanmamış (P(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin denge şişme oranlarının pH ile değişimi ve değişen pH 'nın hemoglobin adsorpsiyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin farklı başlangıç Hba derişmine sahip çözelti içerisindeki adsorpsiyon kapasitelerinin belirlenmesiyle maksimum adsorpsiyonun sağlandığı derişim tespit edilerek Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri hesaplanmıştır.

Belirlenen maksimum adsorpsiyonun gözlendiği derişimdeki Hba çözeltileri içerisinde, baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin 72 saat boyunca belirlenen zaman aralıklarında adsorpsiyon hızları test edilmiş ve hedef molekül Hba yanında miyoglobin ve fibrinojen kullanılarak sentezlenen polimerik materyalin hemoglobine seçiciliği araştırılmıştır.

2. MOLEKÜLER BASKILAMA

Moleküler baskılama; üzerinde hedef molekülü (baskı molekülü, kalıp) tanıma özelliği taşıyan merkezler içeren polimerlerin sentezlenmesi işlemidir [1]. Tanımdan da açıkça görüldüğü gibi moleküler baskılamanın temeli, '*moleküler tanıma*' kavramına dayanır. Fischer'in öne sürdüğü 'anahtar-kilit' modeliyle moleküler tanıma kavramının temelleri atılmıştır. Bir anahtarın kilidi açabilmesi için nasıl geometrik olarak tamamlayıcıları olması gerekiyorsa, enzimler de ancak geometrik açıdan tamamlayıcısı olan moleküllerle (ya da moleküllerin uygun bölgeleriyle) tepkimeye girerek katalizleme görevini yerine getirebilirler.



Şekil 2.1. A)Tersinir kovalent bağlar. B) Non-kovalent etkileşimler için hedef molekül tarafından aktive edilmiş bağlanma bölgeleri.
C) Elektrostatik etkileşimler. D) Hidrofobik veya van der Waals etkileşimleri. E) Hedef molekül üzerindeki yapısal bir element veya fonksiyonel gruplarla tamamlayıcı bölge [6]

Moleküler baskılama tekniği hedef molekül için spesifik bağlanma bölgeleri içeren sentetik polimerlerin hazırlanmasına olanak sağlar. Fonksiyonel grup taşıyan monomerler, non-kovalent (iyonik, hidrofobik etkileşimler, metal koordinasyon bağı ve hidrojen bağı) veya kovalent etkileşimlerle baskı molekülü etrafında düzenlenirler. Hedef molekül polimerizasyon süresince ortamda bulunur ve moleküler kalıp olarak görev yapar (Şekil 2.1).

İlk basamakta baskılanacak molekül ile monomer etkileşir ve kompleks yapı kendiliğinden oluşur. Ardından yüksek derecede çapraz bağlanmayla polimerleşme gerçekleştirilir ve içerisinde baskı molekülünü barındıran polimer ağ yapısı elde edilir. Polimerleşme gerçekleştikten sonra makro gözenekli matriks içinden kalıplanan molekül, yıkama işlemiyle uzaklaştırılır. Böylelikle geride baskılanmış, hedef molekül için yüksek seçiciliğe ve bağlanma eğilimine sahip bir polimer kalır. Oluşturulan kalıp polimer tarafından korunur ve tanıma bölgesindeki fonksiyonel grupların düzenine göre hedef molekülle tekrar bağlanma gerçekleştirilir (Şekil 2.1).

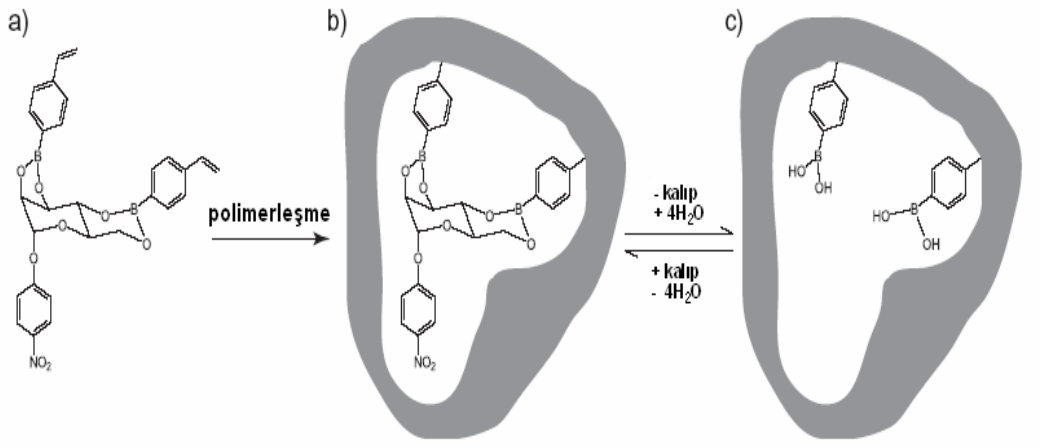
Moleküler baskılama tekniği, kalıp molekül ve monomerler arasında oluşan bağ yapıları dikkate alındığında; kovalent, non-kovalent, metal koordinasyon ve non-polar baskılama olarak sınıflandırılabilir [6].

2 .1. Kovalent Baskılama

Kovalent baskılama kalıp molekül yardımıyla bir veya birden fazla polimerleşebilen birimin ‘kalıp-monomer’ yapısı oluşturmak üzere kovalent bağlarla bir araya gelmesi işlemidir. Kalıp ile monomerlerin kopolimerizasyonu sırasında, ortama yüksek oranda çapraz bağlayıcı ilavesiyle içerisinde kovalent bağlarla bağlanmış olan hedef molekülü barındıran polimer matriksi oluşturulur. Kalıbın yapıdan ayrılmasından sonraki tekrar bağlanma basamağı bir takım kimyasal reaksiyonları gerektirir (Şekil 2.2).

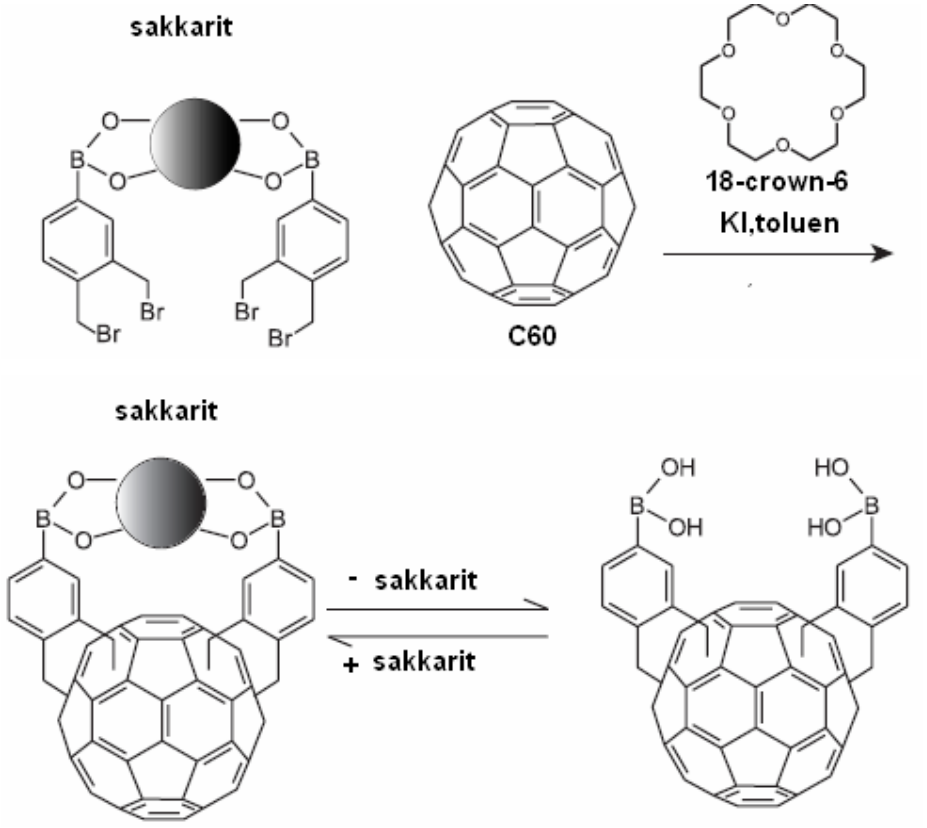
Kovalent baskılama metodu; boronat ester, ketal /asetal ve shiff bazların kondenzasyon reaksiyonları sonucunda gerçekleştirilir. Hedef molekülü polimerik yapı içinden uzaklaştırma işlemi sulu ortamda yapılır. Uygulanan teknikte hedef molekül ve monomerler arasında stokiyometrik oranlar dikkate alınır. Bu yüzden fonksiyonel gruplar içeren monomerlerin aşırısı ortamda yer almaz ve spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçilebilir. Kovalent baskılamada kullanılan hedef moleküller ortamda yer alan suyun varlığına karşı duyarlı olabileceklerinden daha çok emülsiyon veya süspansiyon polimerleştirme teknikleri uygulanır.

Uygulanan teknikte fonksiyonel monomer artıkları kalıpla birleşilen bölgede bulunur. Bu da daha düşük non-spesifik bağlanmalara sebep olur. Polimerizasyon koşulları emülsiyonlar ile çalışılmasına izin verir. En belirgin dezavantajı ise; bütün kovalent bağlanma stratejileri kalıp üzerine taşınmak ve kalıbın ayrılması için bir takım kimyasal işlemlere gerek duyulmasıdır. Yapıdan ayrılamayan kalıp, polimerle olan kovalent bağlanmayı sürdürür ve kalıbı yıkayarak uzaklaştırmaya çalışmak kullanım için uygun olmaz.



Şekil 2.2 a) 4-vinilbenzenboronikasit ile 4-nitrofenil- D –mannoz kondenzasyonu ile hazırlanan kovalent kalıp. b) Divilbenzen ile kopolimerleşme. c) Oluşan spesifik bölge [6].

Aril boronik asit bileşiklerine duyarlı gruplara bağlı, monosakkarit boronat esterleri Shinkai tarafından C60 yüzeyinde baskılanmış bir bölge oluşturmak üzere kullanılmıştır. Sonuçta elde edilen materyal kalıp olarak sakkaritin kovalent olarak baskılanmasıyla elde edilen fulluren-boronat yapısının izomer karışımıdır (Şekil 2.3) [7,8,9].



Şekil 2.3 Fulluren C60 yüzeyine sakkaritin kovalent baskılanması [7].

Hemi asetal, floresan izoindol elde etmek için o-ftalaldehitin allil merkaptan ile reaksiyonu sonucu oluşturulur [10]. Bu reaksiyon dizisi spesifik ve tersinir olmamakla birlikte kovalent baskılama ile ilgilidir ve tekrar bağlanma yeteneğine sahip olmayan benzer kalıplar (metilkreatin, metilkreatinin) kreatin [11] veya kreatinin [12] için baskılama senaryosu olarak kullanılabilir.

2.1.1. Boronat esterleri ile kovalent baskılama

Boronat esterleri ile baskılama çalışmaları karbonhidrat türevleri baskılanması için kullanılan en başarılı tekniktir. Baskılama için kullanılan hedef moleküller; gliserik asit [13] , mannoz ve türevleri [14], galaktoz ve fruktoz [15], siyalik asit [16], L- DOPA [17] ve nükleotitler [18] olarak örneklendirilebilir.

2.1.2. Shiff bazlar ile kovalent baskılama

Shiff bazlar, yapısında birincil amin gurubu taşıyan bileşiklerle karbonil gurubu taşıyan bileşiklerin (genellikle aldehit) kondenzasyonu ile oluşur. Bu nedenle hem amin hem de aldehit gurubu taşıyan kalıpların baskılanması için uygun bir yöntemdir. Aminoasit türevleri bu metotla başarı ile baskılanmasına rağmen oluşan enantiyoselektif baskılanmış polimerlerde yer değiştirme, ayırma işlemi için oldukça yavaştır [17,19].

2.1.3. Asetal ve ketaller ile kovalent baskılama

Bir diol ve karbonil bileşiğinin birlikteliğinden oluşan ketaller (veya asetal) moleküler baskılamada kullanılabilirler. Mono ve di ketonlar Shea tarafından çalışılmış olup Shea polimerleşebilen diol guruplarını bağlanma siteleri haline getirmiştir [20,21]. Ayrıca semi asetal gruplarından bazıları monoalkoller için bağlanma grupları olarak çalışılmıştır [22].

2.2. Non-Kovalent Baskılama

Non-kovalent baskılamada, çözelti içerisinde hedef molekül ve monomerleri birbirine yaklaştırmak için H-bağı, dipol-dipol etkileşimleri, iyonik etkileşimler van der Waals kuvvetleri gibi moleküller arası kuvvetler kullanılır. Çözelti içerisindeki bu yaklaşmalar kovalent baskılamaya göre daha kararsızdır ve non-kovalent yöntem kullanılarak dizayn edilen polimerlerin en büyük

dezavantajıdır. Mosbach ve grubunun çalışmaları, non-kovalent baskılamanın sentetik polimerlerde baskılanmış bölgeler oluşturmak için uygulanabileceğini göstermiştir. Kalıp üzerinde işlevsel bölgelerde hareketliliğe izin vermesi ve aynı zamanda kovalent bağlanmalara göre daha az kimyasal işlem gerektirmesi bu yöntemin baskılama işlemleri için diğerlerine oranla daha fazla tercih edilmesinin sebepleri arasında yer alır.

Non-kovalent baskılamada genellikle polimerizasyon öncesi kompleksin, kalıp ve fonksiyonel monomerler arasında oluştuğu varsayılır. Tekli monomer-kalıp etkileşimlerine oranla çoklu etkileşimler daha yüksek seçicilik sergilemektedirler.

Çözücünün polaritesi ve H-bağı yapma gücü, polimerizasyon sıcaklığı diğer etkenlere göre kalıp-monomer(ler) arasındaki etkileşimler üzerinde daha güçlü etkileri vardır.

Genelde H-bağı etkileşimleri düşük sıcaklık ve düşük polariteli çözücüler içerisinde avantajlı olmasına karşın iyon çiftleri ve diğer güçlü dipolar etkileşimler polar çözücüler içinde daha etkilidir. Pratikte çözücü polaritesi ile hedef molekülün çözünürlüğü arasında uyum olmalıdır. Çözücü aynı zamanda polimerizasyon öncesi kompleks yapıyı ve polimerdeki gözenekliliği de etkiler [23]. Kloroform, diklorometan, asetonitril, toluen, tetrahidrofuran güçlü H- bağlı kompleksler için uygun olabilir. Monomer-kalıp arasındaki bağlanma gücü ve stokiyometrisi UV-visible spektrometresi veya nükleer magnetik rezonans (NMR) ile belirlenebilir [24,25].

Polimerizasyonda fonksiyonel monomerlerin miktarı önemli bir parametredir. Fazla miktarda fonksiyonel monomer yüksek oranda spesifik olmayan bağlanmalara sebep olur ve aynı zamanda kalıbın yapıya tam olarak katılmasını engeller. Polimer yapısında baskılanmış bölgelerin sayısı azalır. Kalıp ve monomer arasındaki etkileşimleri daha karalı kılmaya yardımcı olmak için polimerizasyon esnasında sıcaklık kontrolü önemlidir.

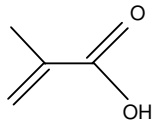
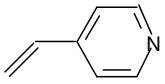
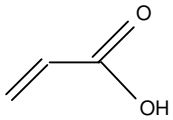
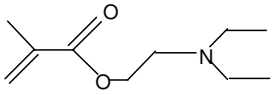
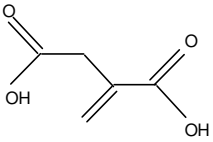
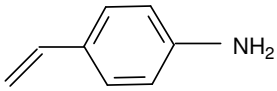
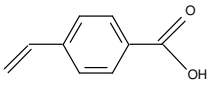
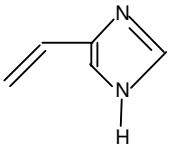
2.2.1. Tek fonksiyonel monomerle non-kovalent baskılama

Bu yöntem non-kovalent baskılamanın en kolay ve aynı zamanda en fazla çalışılmış uygulamasıdır. İstenen kalıp-monomer etkileşimleri ile birlikte hem kalıp hem de çapraz bağlayıcı ile fonksiyonel monomer etkileşimleri meydana gelebilir. İlk durum; polimerde oluşturulacak olan seçici bölgelerin tanımlanması adına gerekli olduğundan önemlidir. İkinci durum ise; hedeflenen kalıp-monomer arasındaki bağlanma dengesini bozacağı için istenmez. (Unutulmamalıdır ki çapraz bağlayıcı miktarı ortamda hedef molekül ve fonksiyonel monomer oranlarından daha fazla bulunmaktadır.) Bunlara ek olarak fonksiyonel monomerlerin kendi kendine birleşmeleri de mümkün olabilir. Bu durum güçlü bir dimerleşme eğilimine sahip karboksilik asitler için önemli bir sorun teşkil eder.

Başlatıcı ile oluşması mümkün etkileşimler de dikkate alınmalıdır. Bu genellikle göz ardı edilir. Fakat başlatıcı ortamda nerdeyse hedef molekülle yakın konsantrasyonda bulunur. Son 20 yılda çok çeşitli fonksiyonel monomerler, non-kovalent baskılama için test edilmiştir. Bazıları için fazla çalışma alanları bulunurken bazıları da sadece özel durumlarda kullanılmıştır (Şekil 2.4).

Güçlü dimerleşme engellerine rağmen (yüksek konsantrasyon, düşük polarite) karboksilik asit monomerlerinden metakrilik asit non-kovalent baskılamaya cevap veren en başarılı monomerlerden biridir. Bu başarısı H-bağı, iyon çifti yapısı, dipo-dipol etkileşimleri gibi çeşitli yollarla kalıbı güçlü bir şekilde etkilemesi yeteneğine sahip olmasıyla açıklanabilir. Metakrilik asit aynı zamanda, yapısındaki metil grubu varlığıyla akrilik aside göre konformasyonel hareketliliğinin daha fazla olmasına ek olarak baskılanacak bölgedeki şekli belirlemeye yardımcı olan van der Waals kuvvetlerini içermesi gibi avantajlara da sahiptir.

Basit şekillerinde aromatik halkalarında π e ⁻ içeren monomerler, kalıpla güçlü bir şekilde etkileşirler. Buna rağmen önemli engellemeler vardır. Vinilbenzoik asit aromatik halkasındaki π e ⁻ nedeniyle bu yöntem için uygun bir seçenek olabilir ama pratikte iyi olmayan sonuçlar vermiştir. Kalıbın sulu ortamda tekrar bağlanması sonucunda ortaya çıkan π- π etkileşimleri ortamdaki analitlerin polimere spesifik olmayan bağlanmalarını arttırmaktadır.

Monomerler	Uygulama Alanı	Monomerler	Uygulama Alanı
Asidik grup taşıyan		Bazik grup taşıyan	
Metakrilik Asit 	Aminoasit türevleri[26],peptitler [27,28,29] Teofilin[30],propanol [31]morfin[32], monosakkarit türevleri[33]	4-vinilpiridin 	S-Naproksen [38] Aminoasit türevleri [39,28]
Akrilik asit 		Dietilaminoetilmetakrilat 	Atrazin[40]
İtakonik asit 	Aminoasit türevleri [34]. β – blokerleri (S-(-)Timolol[35] (-)-norefedrin[36]	p-aminostiren 	Gıda boyarmaddeleri [41,42]
p-vinil benzoik asit 	Aminoasit türevleri [37]	4(5) vinilimidazol 	ATP [43]

Şekil 2.4. Non-kovalent baskılamada kullanılan bazı monomerler [6].

Baskılamada amaç; dizayn edilen polimerin hedef moleküle % 100 e yakın seçiciliğini sağlamaktır. Değişik nötral monomerler etkili baskılama işlemi gerçekleştirmek için kullanılmıştır. Bu anlamda en başarılı olanı ise akrilamit ve akrilamidin N-alkil türevleridir. Akrilamit metakrilik asitle karşılaştırıldığında düşük polariteli koşullarda daha yüksek H-bağı yapma eğilimine sahiptir. Fakat sulu ortamda elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler H-bağı yapma eğiliminden daha ön planda olduğu için metakrilik asit polimerleri daha yüksek tanıma eğilimine sahiptirler.

2.2.2. Monomer kombinasyonları ile non-kovalent baskılama

Çeşitli özelliklere sahip farklı monomerlerin karışımlarının baskılama için kullanılması ilgi çekici olmakla beraber polimerizasyon öncesi karışım içinde bütün dengeler göz önüne alındığında zor bir işlemdir (Şekil 2.5). Buna rağmen bütün baskılama metotlarında monomer karışımları sıklıkla kullanılmaktadırlar. Kullanılan çapraz bağlayıcı güçlü fonksiyonel gruplara sahip olmamasına rağmen hem hedef molekülü hem de monomerleri etkileyebilir.(Çapraz bağlayıcı ortamda fazla miktarda bulunur.) Spivak ‘ın çalışmaları şunu göstermiştir ki: Çapraz bağlayıcı başarılı bir şekilde işlevselleştirilirse iyi bir baskılama işlemi gerçekleştirilebilir [44].

Baskılamanın istenileni vermesi için kalıp ve fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimlerin monomerlerin kendi aralarındaki etkileşimlerden daha kuvvetli olması gerekmektedir. Monomer karışımlarının kullanıldığı baskılama işlemleri tek fonksiyonel kullanılarak yapılan formülasyonlara nazaran daha iyi sonuçlar vermektedir. AAm ve 2- VP kombinasyonu Meng’in çalışmalarında yer almış ve değişik hedef moleküllere karşı iyi sonuçlar vermiştir [45]. AAm / 2-VP monomer karışımı, MAA/2-VP monomer karışımına göre kalıbı daha fazla etkilemektedir. Sebebi ise; AAm ve 2-VP arasındaki etkileşimlerin MAA/ 2-VP kombinasyonuna göre daha az olması olabilir.

Bu yöntemin en belirgin avantajı uygulanmasındaki kolaylıktır. Hedeflenen kimyasal fonksiyonalitede çeşitlilik söz konusudur ve bileşenler kolayca karıştırılır. Kovalent baskılamada sadece birkaç farklı tipte fonksiyonel monomer kullanılır ve kullanılan etkileşimler seçici bölgenin içinde ya da dışında yer değiştirmeye imkan sağlarken; non-kovalent uygulamayla herhangi bir fonksiyonellik adres gösterilerek yer değiştirme sağlanır. Non-kovalent yöntemin monomer çeşitliliği geniştir ve herhangi bir fonksiyonel grupla uygun etkileşimler oluşturulabilir fakat bu işlem yöntemin uygulanma kolaylığını eksilten bazı denemeleri gerektirir.

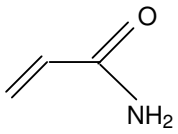
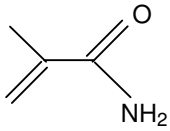
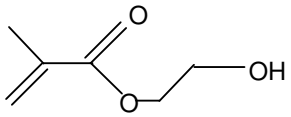
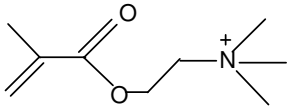
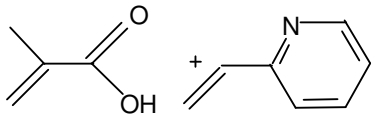
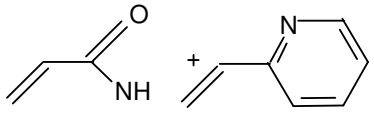
Diğer güçleştiren faktör ise; çapraz bağlayıcıyla ya da monomerlerin kendi aralarındaki istenmeyen fakat göz ardı edilmemesi gereken etkileşimlerdir. Non-kovalent uygulamada üç önemli engel söz konusudur:

Bunlardan birincisi; oluşturulan seçici bölgedeki heterojenliktir. Polimerizasyon öncesi karışımda yer alan değişik fonksiyonel monomer(ler) ve kalıbın seçici bölgede heterojen dağılımı genelde yüksek afiniteden düşük afineteye doğru gider. Seçici bölgede afinitenin bu şekilde sıralanması yararlı olabilir ama dizayn edilen polimeri çalışılması güç hale getirir.

İkinci olarak; seçici bölge dışında polimer ağ yapısı etrafında monomerler ortamda dağılmış halde bulunabilirler. Bu sebeple polimerle ortamdaki diğer analitler arasında spesifik olmayan bağlanmalar gerçekleşebilir. Seçimli olmayan bu bağlanmalarla monomer, polimer yüzeyinin hidrofobikliği ile birlikte H-bağı oranını arttırırken van der Waals etkileşimleriyle oluşturulan bağlanmaları azaltır. Bu etkilerin dengesi polimer ağ yapısına bağlıdır.

Son olarak; non-kovalent baskılamayla, polimerizasyon öncesi karışımda bulunan hedef molekülün miktarına bağlı olarak istenen yüksek afinitede spesifik bölgelerin oluşumunda verimin az olması olması gösterilebilir. Bunun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte polimerizasyon öncesinde kalıp ile monomer(ler)in yaklaşmalarının, kullanılan çapraz bağlayıcının

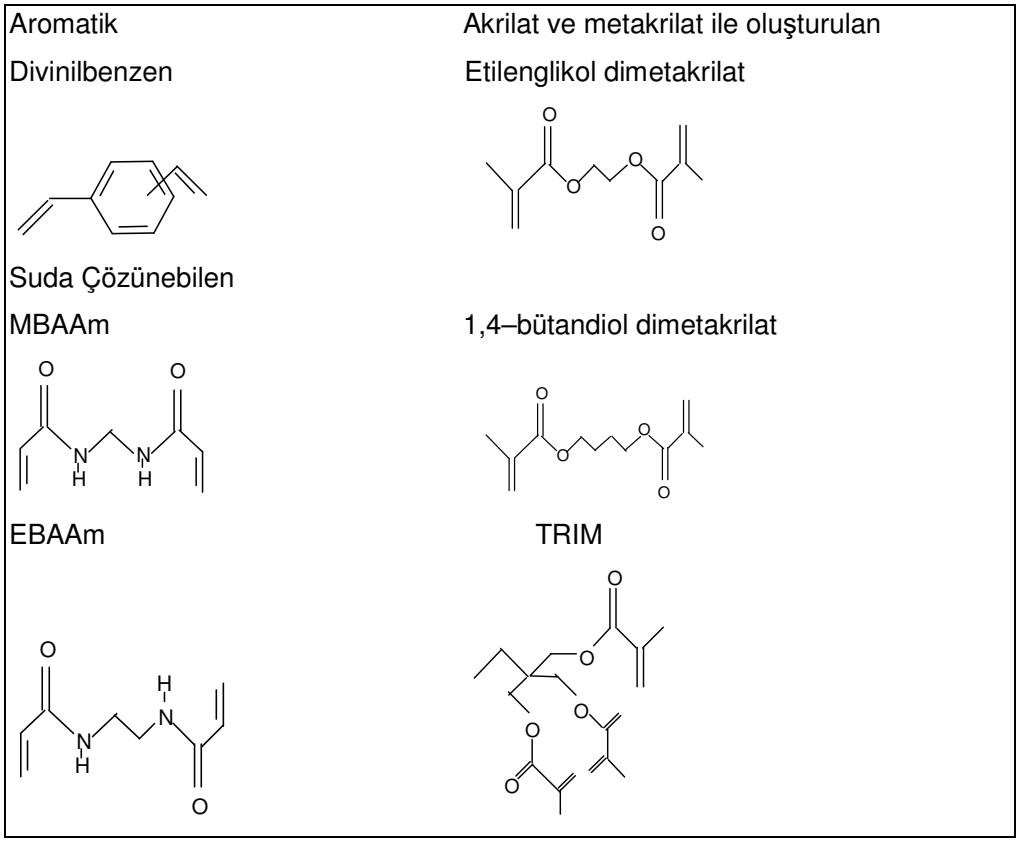
konformasyonel bütünlüğü sağlamak adına yeterli rijitlikte olmamasından kaynaklanan konformasyonel ve termal etkilerden dolayı kaybolabileceği söylenebilir.

Monomerler Uygulama Alanı	Uygulama Alanı	Monomerler
Nötral Monomerler Akrilamid  Metakrilamid  2-Hidroksietil metakrilat  Yüklü monomer N,N,N trimetilaminoetil klorür 	Aminoasit türevleri[46] Antiepileptik (phentyoin) [47] cAMP[48] , efedrin[49] kolesterol[50] Siyalik asit [51]	Monomer Kombinasyonları Metakrilikasit ve 2-vinilpiridin  [52] Akrilamid ve 2 -vinilpiridin  [50]

Şekil 2.5. Non-kovalent baskılamada kullanılan bazı monomerler ve monomer karışımları [6].

2.2.3. Çapraz bağlayıcılar

Moleküler baskılamadaçapraz bağlatıcılar polimerizasyon prtamında yüksek oranda bulunurlar. DVB ve EDMA en çok kullanılan çapraz bağlayıcılardır. DVB ve EDMA elde edilen polimer için sonsuz konformasyon olasılıkları verirken bütandiol dimetakrilat polimer performansında belirgin azalmaya neden olur. TRIM(trimetilolpropan trimetakrilat) gibi çift fonksiyonlu çapraz bağlayıcıların bazı uygulamalarda daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. MBAAm ve EBAAm sudaki çözünürlükleri düşük olmasına rağmen çoğunlukla kullanılan çapraz bağlayıcılar arasında yer alırlar(Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Çapraz bağlayıcılar [6].

3. METAL İYONLARI İLE BASKILAMA

Bu yöntemle baskılamada metal iyonları kalıp ya da polimer-kalıp etkileşimlerinin bir bileşeni olarak rol oynarlar. Metal iyonları ile polimerleşebilen ligandların çapraz bağlayıcı ile kopolimerizasyonu, düzenlenen kompleksin kararlılığına bağlı olarak organik moleküllerin non-kovalent ya da kovalent baskılanmasına benzer.Ca^{2+} ve Mg^{2+}baskılanması ile sorumlu olduğu kalıp iyona göre, spesifik bağlanma bölgelerine sahip bir reçine elde edilir. Metal kalıplı imidazol türevi reçineler ile Ni^{2+} ve Co^{2+}, vinilpiridin ile Cu^{2+} baskılanmaktadır. Metakrilik asit ve 4-vinilpiridin Cu^{+2} iyonunun bis-bakır kompleksi olarak baskılanması için kullanılan kombinasyonlardan biridir [53].

Polimerleşebilen metal kompleksleri hem yüklü hem de nötral kalıpların baskılanması için, çok yönlü fonksiyonel monomerlerdir.

Aminoasit türevleri Co^{3+} kompleksleri kullanılarak , (N-benzil-L-valin) kalıplı, enantiyoselektif bağlanma özelliği gösteren polimerler sentezlenmişitir.

Zn^{+2} kompleksi kreatinin ve timin baskılanması için kullanılmıştır. Polimerleşebilen Zn^{2+} porfirin 9-etil adeninin baskılanmasında fonksiyonel monomer olarak rol almıştır. Her iki durumda da Zn^{2+} azot ligandlarını bağlamak için kullanılmıştır. Metal merkezli (Ni) azot ligandları Hart ve Shea tarafından N-terminal histidin parçası içeren peptitlerin baskılanmasında kullanılmıştır [54].

Cu kompleksleri karbonhidratların baskılanmasında yoğunlukla kullanılmıştır. Cu, azot ligandları kadar oksijene karşı birleşme eğilimi gösterir. Koordinasyon sayısı arttıkça piridil gruplarıyla kaplı substratlara benzerler ve en katalitik aktifliği gösterirler.

4. NON-POLAR BASKILAMA

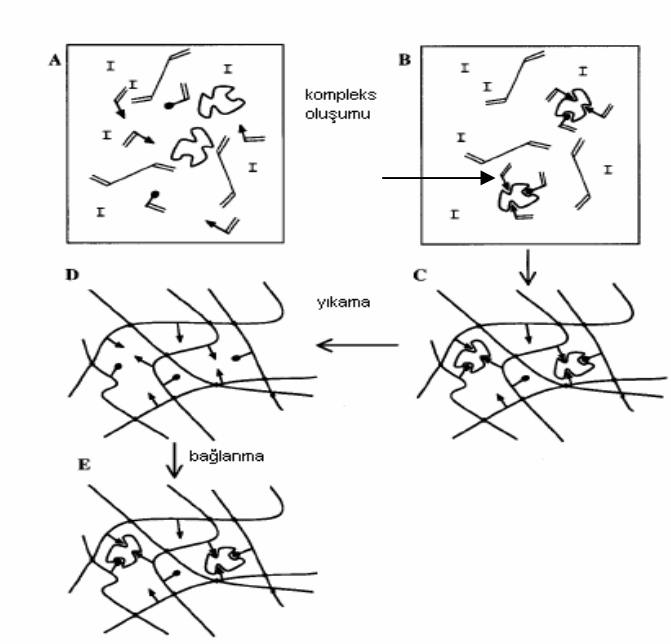
Baskılama işleminin bütün tanımları çoğunlukla oksijen, azot gibi heteroatomlar içeren polar fonksiyonel grupların etkileşimi üzerinedir. Polimer matriksi, bu etkileşimler yanında kalıbın baskılanması ile sterik ve van der Waals etkileşimlerini de içerir. Non-kovalent baskılı polimerlerde hidrofobik etkinin incelenmesiyle, kalıbı sulu çözelti ortamında tanıyan ve H-bağının bağlanmayla katkısının bulunmadığı durumlarda bu etkileşimlerin kalıbı nasıl etkilediği gösterilir. Bu metod peptit ve antibiyotiklerin siklodekstrin merkezli akrilat fonksiyonel monomeri ile baskılanmasına izin verir. Bu işlemde moleküler tanımayı hidrofobik etkileşimler sağlar [6].

5 . MOLEKÜL BASKILI POLİMER OLUŞUMU

Sentez için iki temel gereksinim vardır:

1) Hedef molekül ya da diğer deyişle baskılanacak molekül
2) Hedef molekülle etkileşebilecek (kovalent veya kovalent olmayan bağlanmayla) işlevsel bir ya da daha fazla monomer.

İşlem üç basamaktan oluşur. İlk basamakta baskılanacak molekül ile monomer etkileşerek bir bileşik oluştururlar. İkinci basamakta bu yapı işlevsel monomer üzerinden polimerleştirilir. Polimerleştirme gerçekleştikten sonra kalıplanan molekül yıkama işlemi ile yapıdan uzaklaştırılır. Geride spesifik bağlanma bölgelerine sahip polimer kalır. Artık bu polimer hedef molekül için yüksek seçicilik ve ilgiye sahiptir. Hedef molekülü de içeren bir karışım, baskılanan polimer ile etkileşecek olursa, sahip olduğu bağlanma bölgeleri nedeniyle yalnızca hedef molekülü tanıyarak ona bağlanır [1]. Böylelikle hedef molekülün karışım ortamından spesifik olarak uzaklaştırılması sağlanır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Molekül baskılı polimer oluşumu [1].

6. MOLEKÜL BASKILI POLİMERLERİN KULLANIM ALANLARI

Moleküler olarak baskılanmış polimerlerin uygulama alanları ayırma işlemleridir. Bu polimerlerin, baskılanan molekülü benzer birçok molekül arasından (hatta bazı moleküllerin D ve L formunun ayırması gibi) tanıyabilme özelliği pek çok ayırma, saflaştırma işlemi açısından ilgi çekicidir. Naproksen, Timolol gibi ilaçları ayırma işlemleri, ilaçların tek formunun kullanılması gerektiğinden en önemli ayırma işlemlerinden biridir ve baskılanmış polimerler kullanılarak yapılan ayırma işlemleri oldukça iyi sonuçlar vermiştir [2].

Baskılanmış polimerler katalizör olarak da kullanılabilirler. Bu tür uygulamalar için geliştirimiş baskılanmış polimerler ' *plastik enzim'* olarak adlandırılırlar. Plastik enzim hedef molekülü tanır ve ona bağlanarak kimyasal tepkimenin aktivasyon hızını düşürür. Böylece tepkime daha hızlı, verimli ayrıca daha düşük sıcaklıkta gerçekleşir. Bu uygulamadaki sistem oldukça basittir ve doğal enzimlerden daha avantajlıdır. Enzimler yüksek sıcaklık ve organik çözücüler içinde denatüre olur (üç boyutlu yapılarını kaybeder) ve işlevlerini yitirirler. Ancak enzimlerin plastik taklitleri, organik çözücüler içinde oldukça geniş bir pH aralığında ve 150 ºC 'ye kadar yüksek sıcaklıklarda özelliklerini kaybetmeksizin güvenle kullanılabilirler [1].

Moleküler baskılanmış polimerlerle ilgili en ilgi çekici gelişmelerin yaşandığı bir başka uygulama alanıysa; bu yapıların biyo-algılayıcı v.b cihazlarda tanıma elemanı olarak kullanılmasıdır. Bilindiği gibi biyo-algılayıcılar enzimler ve antikorlar gibi belirli molekülleri tanıma özelliği taşıyan yapılar kullanılarak çeşitli moleküllere karşı özgül olarak elde edilen tepkilerin uygun cihazlar yardımıyla fiziksel ve ölçülebilir verilere dönüştürülmesini sağlayan düzeneklerdir. Biyo-algılayıcılar, enzimler ve antikorlar gibi günümüzde çeşitli teşhis kitlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Baskılanmış polimerler biyo-algılayıcılardaki tanıma elemanlarına seçenek olarak kullanılabilirler. Bu cihazlarda baskılanmış polimerlerin kullanılması doğal yapıların yerini

tümüyle almasa da polimerler gösterdikleri kararlılık ile oldukça ilgi çekici seçenek oluştururlar. Polimerlerin doğal yapılara göre gösterdikleri dayanıklılık ve kararlılığın yanı sıra ucuz olmaları da avantajları arasında yer alır. Baskılanmış polimerlerin elde edilme maliyeti doğal antikorlardan daha düşüktür ve poliklonal antikor elde etmek için hayvan gereksinimini ortadan kaldırırlar.

Baskılanmış polimerlerin su arıtımında, su içerisindeki istenmeyen molekülleri tutucu bir eleman olarak kullanılması mümkündür. Çeşitli savunma sistemlerinde kimyasal ve biyolojik silah tehdidine karşı kullanılabilirler. Bu sistemlerde polimerlerin tanıma özelliğinden yararlanılarak kimyasal ve biyolojik silah moleküllerinin polimer tarafından tespit edilmesi sağlanabilir ve erken uyarı sistemleri geliştirilebilir [3].

Moleküler baskılanmış polimerlerin son yıllarda hızla gelişen diğer uygulama alanı da hidrojellerdir. Moleküler baskılamayla hidrojellerde daha fazla ilaç yüklenmesine olanak sağlayacak bölgeler ve bağlanma merkezleri elde etmek mümkündür.

Gelecekte yöntemin geliştirilmesiyle çok daha iyi tanıma özelliğine sahip yapılar elde edilebilir ve şu an akla gelmeyen pek çok işlevin gerçekleştirilmesi mümkün olabilir.

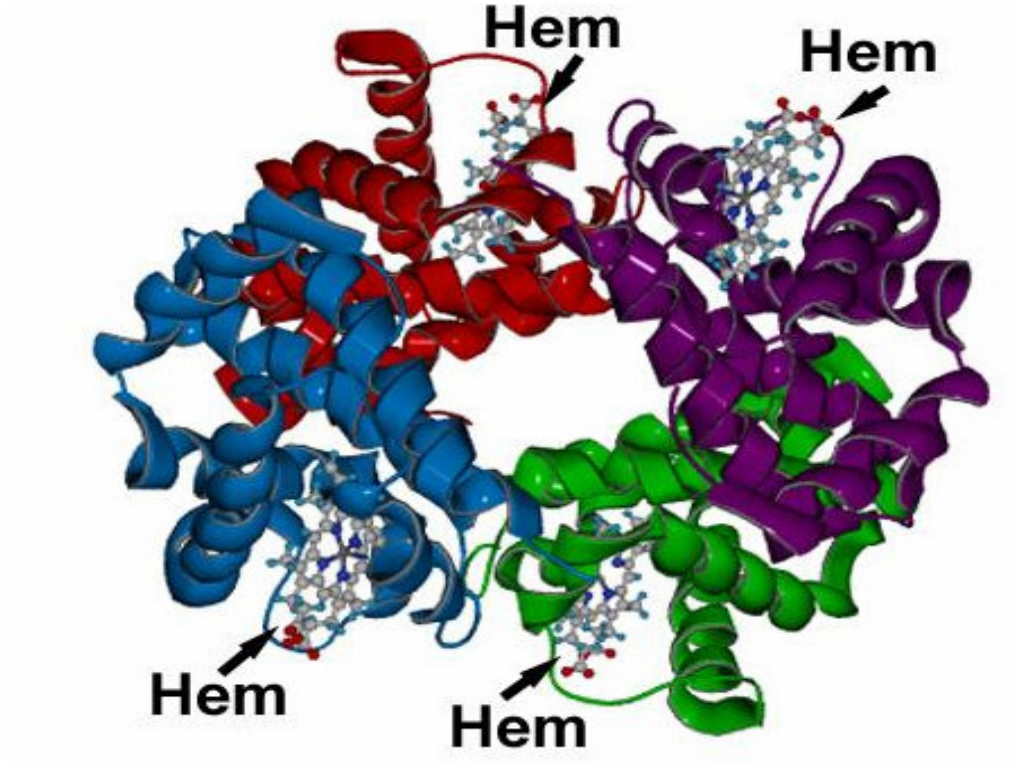
7. HEMOGLOBİN

Hemoglobin molekülü hücrelere oksijen taşıma görevini üstlenmiş özel bir moleküldür. Hemoglobin akciğerdeki oksijeni alırken, karbondioksidi bırakır ve oradan kaslara geçer. Bu sırada kaslar da besinleri yakıp karbondioksit oluştururlar. Hemoglobin molekülü kaslara ulaştığında öncekinin tam tersi bir işlev görerek oksijeni bırakıp karbondioksidi alır. Bilim adamları birbirinden farklı bu iki işlevi yapan hemoglobini "olağanüstü bir molekül" olarak nitelendirmektedirler. Bu madde gerçekten olağanüstü bir moleküldür ki, bir anda oksijene karşı birleşme eğilimi gösterirken, birkaç saniye sonra bu eğilimini kaybeder. Bir anda tercihi karbondioksite bağlı olarak değişir. Bu da onu daha dikkate değer yapar. Bu anlatılanlardan da anlaşıldığı gibi, hemoglobin molekülü adeta şuur sahibi bir varlık gibi gerektiği yerde ve gerektiği zamanda hareket ederek gereken seçimi yapabilmektedir ve hiçbir zaman oksijen ile karbondioksiti birbirine karıştırmamaktadır.

Mikroskoplarla görülebilecek kadar küçük bir molekülün düşünme, karar verme ve tercih yapma gibi özellikler gerektiren davranışlarda bulunması elbette ki düşündürücüdür. Bu molekülün sergilediği olağanüstü şuur sayesinde, insan yaşamını rahatlıkla sürdürebilmektedir. İnsan vücudunda saatte ortalama 900 milyon alyuvar üretilir. Sadece bir alyuvar hücresinde ise yaklaşık 300 milyon hemoglobin molekülü bulunur. İnsan vücudunda bulunan hemoglobin moleküllerinin sayısı ve bu moleküllerin hepsinin istisnasız aynı yeteneklere sahip oldukları düşünüldüğünde konunun önemi daha net anlaşılmaktadır. Böyle bir seçiciliğin tesadüfen ortaya çıkamayacağı, tesadüflerin insan vücudundaki milyarlarca hemoglobine bu özellikleri kazandıramayacağı akıl sahibi her insan için çok açık bir gerçektir [55].

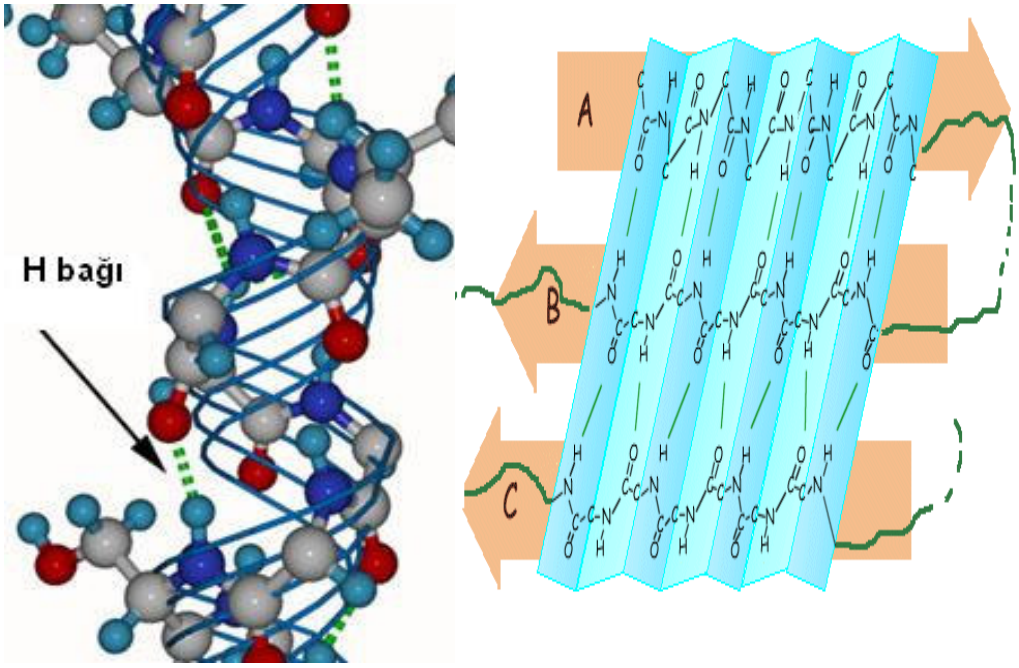
7.1. Hemoglobin Yapısı

Hemoglobin yapısal olarak bir heterotetramer bir proteindir. 2 alfa, 2 beta olmak üzere dört polipeptit zincirinden oluşur. Alfa zincirlerinde 141 aminoasit artığı, beta zincirlerinde ise,146 aminoasit artığı yer alır. Hemoglobinin bu formu Hemoglobin A (Hba) olarak simgelenir. Her polipeptit zinciri birbirine sarılmış haldedir(Şekil 7.1).



Şekil 7.1 Hemoglobin yapısı.(Moleküler şekil X -ray ile belirlenmiştir.)[56].

Alfa heliks yapıda her aminoasit, zincirin karşı tarafındaki aminoasit ile H bağı yapar.(Şekil 7.2) Hemoglobinde H bağı –NH grubu ile –CO gurubu arasında gerçekleşir. Diğer yapı beta yaprak yapısıdır. Bu yapıda aminoasitler birbirlerine pararlel sıralanırlar ve polipeptit zincirleri yan yana uzanır (Şekil 7.3). H bağı iki zincir arasındaki -NH ile –CO grupları arasında oluşur [56].

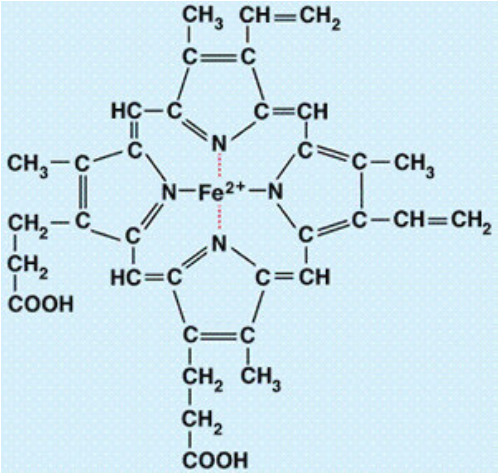


(a) (b)

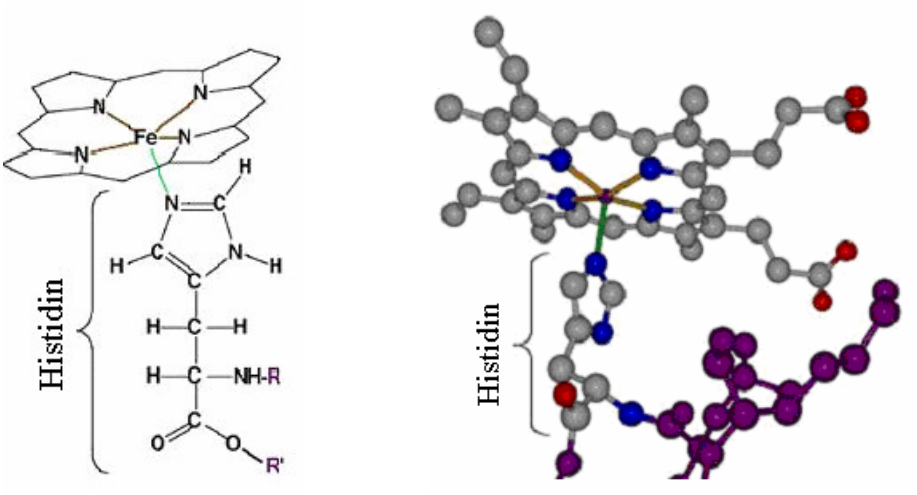
Şekil 7.2. a) Hemoglobinde alfa sarmal yapısı b) Hemoglobinde beta yaprak yapısı. A ,B,C polipeptit zincirleri [56].

7.1.1. Hem grubu

Hemoglobinde her polipeptit zinciri bir hem grubu içerir. Her hem grubu ise; porfirin olarak bilinen heterosiklik halkanın merkezinde Fe (II) atomu içerir(Şekil 8.4). Porfirin molekülü dört azot atomu ve bir demir atomuyla tarak şeklinde bir ligand oluşturur. Azot ve demir birbirlerine koordine kovalent bağlarla bağlanırlar. Hem grubu hemoglobinde oksijeni bağlayan kısımdır.



Şekil 7.3 Hem grubu [56].



(a) (b)

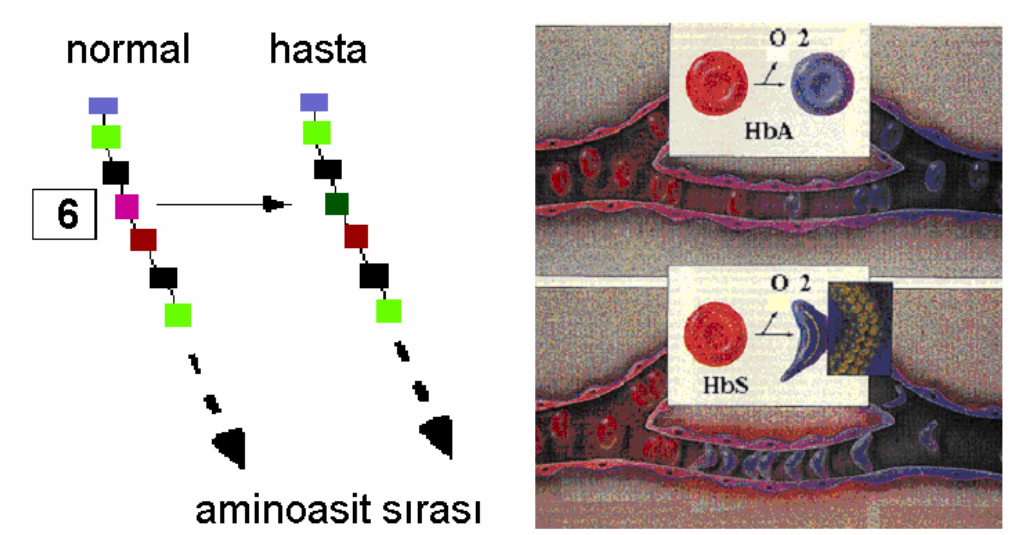
Şekil 7.4. (a)Histidin ile koordine edilmiş hem grubu iki boyutlu yapısı [56].
(b)Histidin ile koordine edilmiş hem grubu üç boyutlu yapısı [56].
Kırmızıgruplar grubun O_2 bağladığını göstermektedir.

7.1.2. Hemoglobinde mutasyon

Normal hemoglobin hücreleri (Hba) pürüzsüz ve küreseldir. Sahip oldukları yapılarından dolayı oksijeni kolaylıkla hücrelere taşırlar(Şekil 7.5 b). Bozuk hemoglobin hücreleri (HbS) ise, sert ve orak şeklindedirler. Bu yüzden

oksijen taşıma kapasiteleri normal hemoglobine göre daha azdır. Bozuk hemoglobinlerin hücrede 10-20 gün arasında ömürleri vardır. Hemoglobinin kompleks yapısı, diğer tüm kompleks organizmalarda olduğu gibi, rastgele oluşan herhangi bir mutasyona izin vermeyecek derecede hassastır. Yapısında meydana gelebilecek herhangi bir rastgele kimyasal etki, bu değerli proteini bir anda işe yaramaz bir amino asit yığınına dönüştürebilir.

Hasta hemoglobin mutasyonu, normal hemoglobinde oluşan tek bir aminoasidin yerini başka bir aminoasidin almasıyla açıklanabilir. Alfa polipeptit zinciri her iki hemoglobinde aynıyken beta zincirinde 6. pozisyonda glutamik asidin yerini valin alır (Şekil 7.5.a). Hba yerine HbS varlığı organizmada anemi hastalığına yol açar.



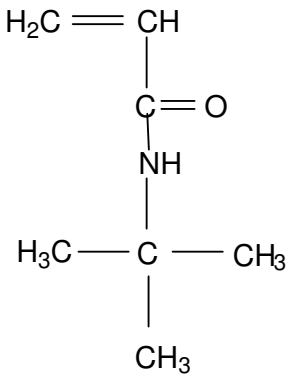
(a) (b)

Şekil 7.5. a) Normal hemoglobin beta zinciri. b) Normal hücreler (Hba) damarlardan kolay geçer. Deforme hücrelerin (HbS)geçişi zordur[56].

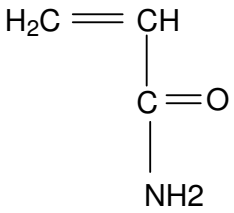
8. DENEYSEL KISIM

8.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

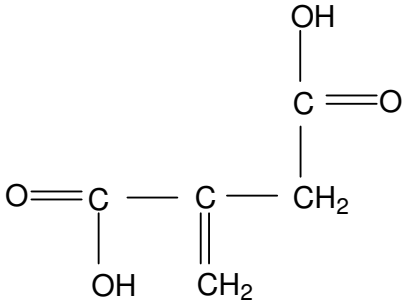
Bu çalışmada kullanılan N-t-bütilakrilamit (TBAAm), Akrilamit (AAm), İtakonik asit (IA) monomerleri, N,N'–metilenbisakrilamit (MBAAm), çapraz bağlayıcısı, polimerizasyon başlatıcısı amonyum persülfat (APS), N,N,N,N-tetrametilendiamin (TEMED) hızlandırıcısı, hemoglobin (Hba), miyoglobin ve fibrinojen Aldrich firmasından temin edilmiştir. Kullanılan maddelerin kimyasal yapıları aşağıda verilmiştir.



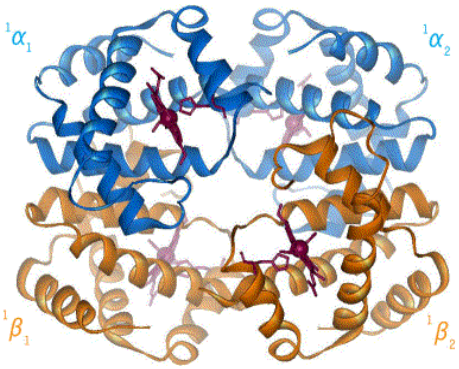
N-t - bütilakrilamit
(TBAAm)
Mol Kütlesi : 127,19 g / mol



Akrilamit
(AAm)
Mol Kütlesi :71,08 g / mol



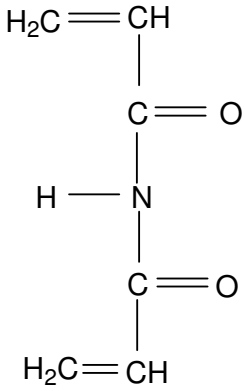
İtakonik asit
(IA)
Mol Kütlesi : 130,10 g / mol



Hemoglobin

(Hba)

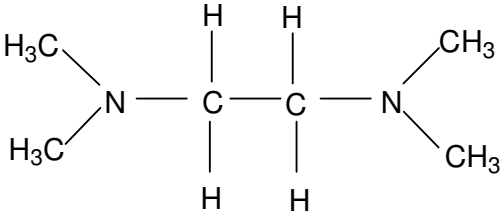
Mol Kütlesi : 65000 Dalton



N , N ‘– metilenbisakrilamit

(MBAAm)

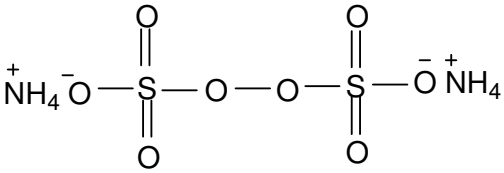
Mol Kütlesi : 154 , 2 g / mol



N ,N,N’,N’- tetrametilendiamin

(TEMED)

Mol Kütlesi : 116,2 g / mol



Amonyum persülfat

(APS)

Mol Kütlesi : 228 g / mol

Yoğunluğu : 1,98 g / mL

Hidrojellerin sentezinde kullanılan stok çözeltiler aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

APS stok çözeltisi: 1,28 g APS saf suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 100 mL 'ye tamamlanmıştır.

TEMED stok çözeltisi: 9,6 mL TEMED metanolde çözüldükten sonra hacmi metanol ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Britton-Robinson çözeltisi: 2,3 mL asetik asit, 2,7 mL fosforik asit ve 2,4720 g borik asit karışımı saf suda çözüldükten sonra hacim saf suyla 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tamponun ilk pH'sı 1,9 olarak ölçülmüştür. Tampon pH 'sı 1 M NaOH çözeltisi pH 4,0, pH 6,8 ve pH 8,0 ayarlanmıştır.

Hba stok çözeltileri: 0,01 g, 0,02 g , 0,03 , 0,04 g , 0,05 g Hba üç ayrı pH da ayarlanan (4,0 , 6,8 , 8,0) B-R tampon çözeltisinde ayrı ayrı çözüldükten sonra hacimleri 250 mL'ye tamamlanmıştır. Sonuçta 5 ayrı derişimde ve üç ayrı pH da stok Hba çözeltileri elde edilmiştir.

8.2. Hidrojellerin Hazırlanması

8.2.1. Baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerinin sentezi

Baskılanmamış p(TBAAM-ko-AAm/IA)hidrojelleri; TBAAm, AAm ve IA monomerleri MBAAm çapraz bağlayıcısı eşliğinde APS/TEMED başlatıcı sistemi kullanılarak serbest radikal kopoimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Sentezde 0,8 g TBAAm, 0,2 g AAm, 0,15 g IA monomerleri yüzde mol oranı 0,52 olan çapraz bağlayıcı (MBAAm) ile 10 mL metanol-tampon (1:1) karışımında çözüldükten sonra, çözeltiye 2 mL APS ve 3 mL TEMED stok çözeltilerinden ilave edilerek 4 mm çaplı PVC plastik pipetlere konulmuştur. Bu aşamada metanolle birlikte kullanılan tampon pH' ları 4,0, 6,8 ve 8,0 dir.

Polimerleşmenin tamamlanması için 24 saat 25^{o}C ‘de bekletilmiştir. Daha sonra plastik pipetlerden çıkarılan jeller polimerleşmeyen monomerlerin ve safsızlıkların uzaklaştırılması için 4 gün saf suda bekletilmişitir. Bu jeller ~1 cm uzunluğunda kesilerek 40 ºC ‘de vakum etüvünde kurutulmuştur. Sonuçta 3 ayrı pH da (4,0; 6,8; 8,0) polimer sentezi gerçekleştirilmiştir.

8.2.2. Hba baskılı p(TBAAM-ko-AAM/IA) hidrojellerinin sentezi

Baskılanmış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojelleri; TBAAm, AAm ve IA monomerleri ve MBAAm çapraz bağlayıcısı 6 mL metanolde çözülmüştür. Diğer tarafta pH 4’e ayarlanan B-R tamponu içinde çözülen farklı derişimlerdeki Hba çözeltilerinin her birinden 4 mL alınarak metanollü monomer çözeltisi içerisine ilave edilmiş ve bir süre manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra 2 mL APS, 3 mL TEMED ortama katılmasıyla polimerleştirme başlatılmıştır. Polimerleşmenin tamamlanması için 24 saat 25^{o}C ‘de bekletilmiştir. Plastik pipetlerden çıkarılan jeller polimerleşmeyen monomerlerin, safsızlıkların ve yapıya katılan Hba ‘nın uzaklaştırılması için 4 gün saf suda bekletilmiştir. Bu jeller ~1 cm uzunluğunda kesilerek 40 ºC ‘de vakum etüvünde kurutulmuştur. Sonuçta pH 4 ‘te ve içerisinde beş farklı Hba miktarı baskılanmış hidrojeller elde edilmiştir.

Yukarıdaki işlemler pH 6,8 ve pH 8,0’de sentezlenen hidrojeller için aynen tekrarlanmıştır.

8.2.3. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin denge şişme oranına pH etkisi

Hazırlanan BR tampon çözeltisi (pH=1,9) 250 mL’lik hacimlere bölünerek 1M NaOH çözeltisi ile sekiz farklı pH ‘da (2,0 , 3,0 , 4,0 , 5,0 , 6,0 , 7,0 , 8,0 , 9,0) tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Daha önce sentezlenen baskılanmamış ve farklı pH’larda artan Hba miktarlarında baskılanmış hidrojellerin kuru tartımları alındıktan sonra her bir kompozisyon hazırlanan tampon

çözeltilerinin 10 mL'lik kısımlarına atılarak 9 gün bekletilmiştir. 9 gün sonunda denge şişme değerine ulaşan hidrojeller çözeltilerden çıkarılarak tartımları alınmış ve her pH 'daki şişmiş kütleleri belirlenmiştir. Polimer yoğunluğu piknometre kullanılarak aseton içerisinde belirlenmiştir.

Elde edilen verilerle aşağıdaki eşitlik kullanılarak hidrojellerin denge şişme oranları Eş. 8.1 yardımıyla hesaplamıştır.

$$q_V = 1 + \frac{(m_ş / m_k - 1) \cdot \rho_{polimer}}{\rho_{çözücü}} \qquad (8.1)$$

$m_ş$: Hidrojelin şişmiş kütlesi
m_k : Hidrojelin kuru kütlesi
ρ_{pol}: Polimer yoğunluğu(1,1 g/mL)
q_v : Denge şişme oranı

8.2.4. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin Hba adsorpsiyonu üzerine pH etkisi

Hazırlanan BR tampon çözeltisi (pH=1,9) 250 mL'lik hacimlere bölünerek 1 M NaOH çözeltisi ile sekiz farklı pH 'da (2,0 , 3,0 , 4,0 , 5,0 , 6,0 , 7,0 , 8,0 , 9,0) tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Daha önce sentezlenen farklı pH'larda artan Hba miktarlarında baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin kuru tartımları alındıktan sonra her bir kompozisyon hazırlanan tampon çözeltilerinin 10 mL'lik kısımlarına atılarak 3 gün bekletilmiştir. Diğer taraftan sekiz farklı pH daki tampon çözeltilerinde 0,004 g Hba çözülmüş ve 3 gün BR tamponu içerisinde şişen polimerler Hba çözülmüş tampon çözeltilerinin 10'ar mL'lik kısımlarına atılarak 4 gün bekletilmiştir. 4 gün sonunda içerisinde baskılanmış ve baskılanmamış kompozisyonları barındıran Hba

çözeltilerinden 5 ‘er mL’lik örnekler alınarak ATI UNICAM marka UV-VISIBLE spektrofotometresinde 406 nm sabit dalga boyunda ölçümler alınmıştır. Bu ölçümler sonucu elde edilen verilerle baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin farklı pH’lardaki hemoglobin adsorpsiyon kapasiteleri tespit edilmiş ve maksimum sağlandığı pH değeri belirlenmiştir. Bu işlemlerin hepsi 3 ayrı pH (4,0, 6,8 , 8,0) da ve farklı miktarda Hba varlığında sentezlenen jeller için ayrı ayrı uygulanmıştır. Hidrojellerin adsorpsiyon kapasiteleri Eş. 8.2 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$q_e = \frac{(c_i - c_e) \cdot V}{m_k} \qquad (8.2)$$

q_e : Adsorplanan Hba miktarı(mg/g kuru jel)

C_i : Hba başlangıç derişimi

Ce : Hba denge derişimi

V : Çözelti hacmi

8.2.5. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAM-ko-AAm/IA) hidrojellerin Hba adsorpsiyonu üzerine başlangıç Hba derişim etkisi

Hazırlanan BR tampon çözeltisinin (pH=1,9) 1 M NaOH çözeltisi ile pH ‘sı 4,0 ‘e ayarlanarak 250mL’lik hacimlere bölünmüştür. Bölünen hacimlerle farklı derişimlerde (0,002 g /250mL , 0,004 g/250mL , 0,006 g/250mL , 0,008 g/250mL , 0,012 g/250mL , 0,016 g/250mL) Hba çözeltileri hazırlanmıştır. Kuru tartımları alınan hidrojeller pH ‘sı 4,0 ‘e ayarlanan B-R tamponu içerisinde 3 gün bekletildikten sonra farklı derişimlerdeki Hba çözeltileri içerisine atılarak 4 gün bekletilmiştir. 4 gün sonunda içerisinde baskılanmış ve baskılanmamış kompozisyonları barındıran farklı başlangıç derişimlerdeki Hba çözeltilerinden 5 ‘er mL’lik örnekler alınarak ATI UNICAM marka UV-VISIBLE spektrofotometresinde 406 nm sabit dalga boyunda ölçümler alınmıştır. Ölçümler sonucunda hazırlanan üç ayrı pH ‘daki baskılanmış ve

baskılanmamış hidrojellerinin Hba adsorpsiyonu üzerine farklı başlangıç derişimi etkisi incelenerek, adsorpsiyonun en iyi olduğu pH ‘da hangi derişimde adsorpsiyonun maksimuma ulaştığı belirlenmiştir.

8.2.6. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin Hba adsorpsiyon hızı

Bu çalışma maksimum adsorpsiyonun sağlandığı pH ve Hba derişimi göz önüne alınarak yürütülmüştür. Hazırlanan BR tampon çözeltisinin 1 M NaOH çözeltisi ile pH ‘sı 4,0 ‘e ayarlanarak 250 mL ’lik kısmı ayrılmış ve bu kısımda 0,008 g Hba çözülmüştür. Daha önceden kuru tartımları alınan ve ph 4,0 ‘te 3 gün boyunca şişirilerek dengeye getirilen üç ayrı pH’da ve farklı miktarda Hba ile sentezlenen baskılanmış ve baskılanmamış hidrojeller hazırlanan Hba çözeltisi içerisine atılmış ve 72 saat boyunca belirlenen zaman aralıklarında UV-VISIBLE spektrofotometresi ile 406 nm sabit dalga boyunda ölçümler alınmıştır.(İlk 24 saatte 30 ‘ar dakika, ikinci 24 saatte 60 ‘şar dakika ve son 24 saatte 120 ‘şer dakika zaman aralıklarında, ölçümler alınmıştır.) Hidrojellerin adsorbe ettiği Hba miktarı eşitlik (8.2) ile hesaplanmıştır.

8.2.7. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin Hba seçiciliği

Baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin seçicilik çalışması için miyoglobin ve fibrinojen kullanılmıştır. Daha önce sentezlenen farklı pH’larda artan Hba miktarlarında baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin kuru tartımları alındıktan sonra hazırlanan pH 4,0 tampon çözeltisine (10 mL) atılarak 3 gün bekletilmiştir.

Her iki proteinin pH 4 BR- tamponunda içinde çözeltileri hazırlanarak (4 mg/mL miyoglobin, 4 mg/mL fibrinojn) % 0,00 ve % 4,15 oranında Hba ile 3 ayrı pH‘da sentezlenmiş hidrojeller bu protein çözeltilerinde 4 gün bekletilmiştir. 4 gün sonunda içerisinde baskılanmış ve baskılanmamış

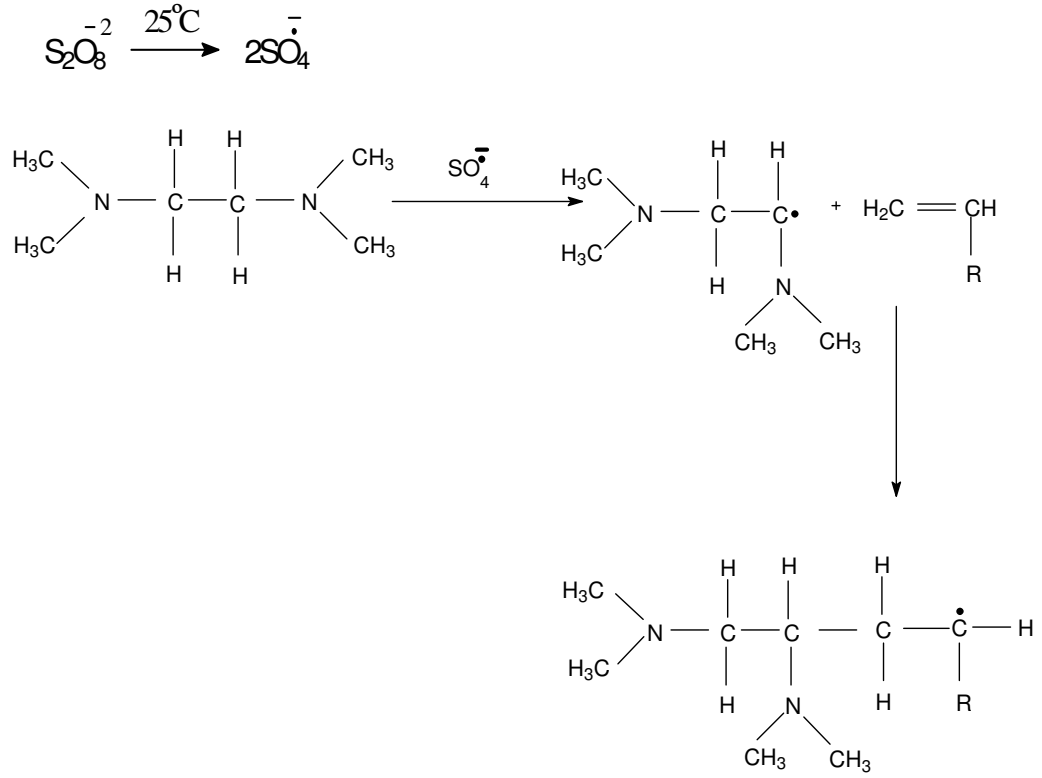
kompozisyonları barındıran protein çözeltilerinden 5‘er mL’lik örnekler alınarak ATI UNICAM marka UV-VISIBLE spektrofotometresinde miyoglobin için 772 nm, fibrinojen için 585 nm sabit dalga boyunda ölçümler alınmıştır. Bu ölçümler sonucu elde edilen verilerle baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin miyoglobin ve fibrinojen adsorpsiyonu tespit edilmiştir. Adsorpsiyon kapasitesi hesabı için Eş. 8.2 kullanılmıştır.

9. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

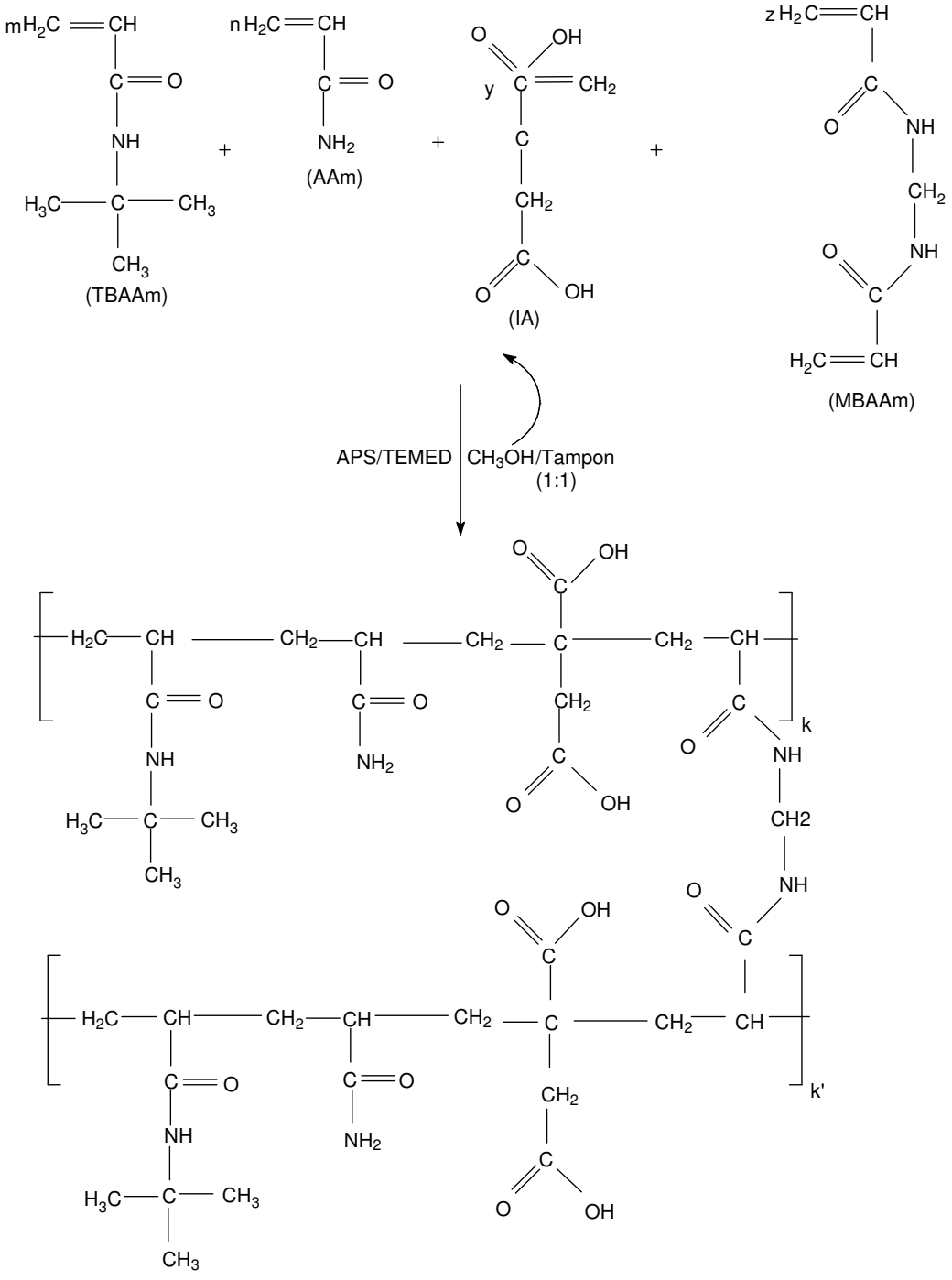
9.1. Baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) Hidrojellerinin Sentezi

Baskılanmamış p(TBAAM-ko-AAM/IA) hidrojelleri; TBAAm, AAm ve IA monomerleri MBAAm çapraz bağlayıcısı eşliğinde APS/TEMED başlatıcı sistemi kullanılarak serbest radikal kopolimerizasyonu ile metanol- tampon karışımı (1:1) içerisinde farklı pH'larda (4,0, 6,8, 8,0) sentezlenmiştir. Polimerizasyon 25^{o}C'de 24 saatte gerçekleştirilmiştir.

Kimyasal yöntemle sentezlenen baskılanmamış p(TBAAM-ko-AAM/IA) hidrojellerinde ilk önce şekil 9.1 ' de olası reaksiyon mekanizması verilen APS ile TEMED reaksiyonunda $S_2O_8^{-2}$ anyonu 25 ºC de anyonik SO_4^{-} radikalini oluşturmaktadır. Oluşan bu anyonik radikal ortamdaki TEMED molekülü ile etkileşerek ortaklanmamış bir elektron çifti içeren aktif TEMED molekülünü oluşturulabilir. Oluşan aktif TEMED molekülünün monomerler reaksiyonu sonucunda p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojelleri oluşmaktadır. Olası reaksiyon mekanizması aşağıda gösterilmektedir (Şekil 9.1).



Şekil 9.1. APS ile TEMED reaksiyonu sonucu oluşan ortaklanmamış tek elektron içeren aktif TEMED molekülünün monomere katılması sonucu oluşan radikal.



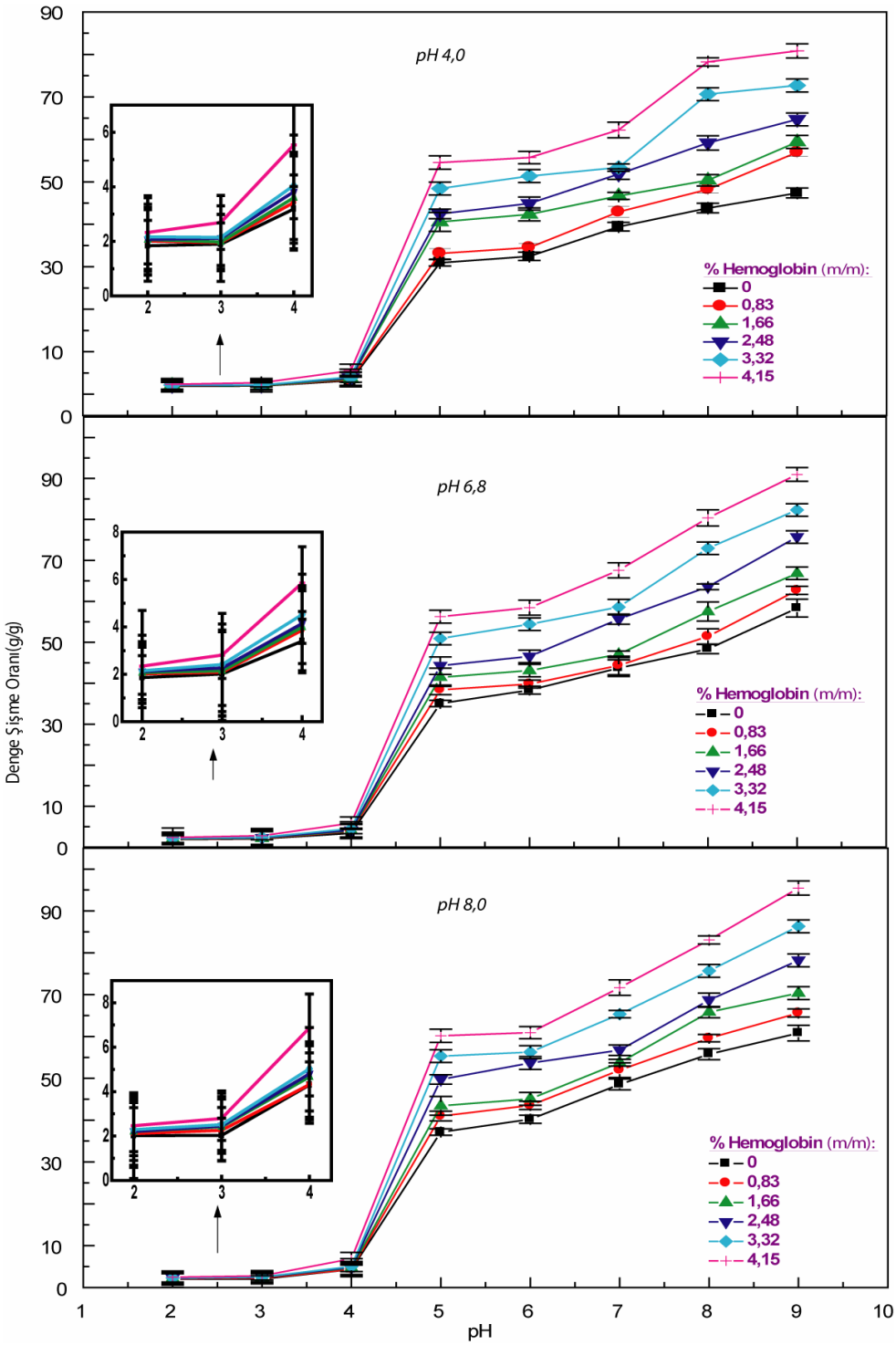
Şekil 9.2. Sentezlenen baskılanmamış p(TBAAM-ko-AAM/IA) hidrojellerinin kimyasal yapısı.

9.2. Baskılanmış ve Baskılanmamış p(TBAAM-ko-AAm/IA) Hidrojellerin Denge Şişme Oranına pH Etkisi

pH 4,0; pH 6,8 ve pH 8,0 de artan miktarlarda Hba ile baskılanan ve baskılanmayan jeller için elde edilen değerlerle denge şişme oranları Eş. 8.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

pH duyarlı hidrojeller iyonik grupları içeren yüklü ağ yapıdadırlar. Negatif ya da pozitif yüklü hidrojeller moleküler yapı ya da yapıya katılan iyonik monomerin miktarına bağlı olarak farklı pH 'ya sahip çözeltiler içerisinde farklı şişme eğilimleri gösteririler. Üç farklı pH 'de sentezlenen hidrojeller için şişme eğrisi S şeklinde gözlenmiştir. Asidik bir monomer olan IA'in ayrıştırma sabitlerinin birbirine çok yakın olması nedeniyle çakışmalarından kaynaklanabilir. (pK_{a1}=3,85 pK_{a2}=5,44) [57]. Asidik monomer IA'nın pK_a 'sındaki artışın eğriyi daha yüksek pH değerlerine kaydırdığı ve pK_a 'sına yakın pH değerinde pH'ya karşı şişme tepkisinin çok hassas olduğu gözlenmiştir. pK_a değerinden daha yüksek pH'larda IA'e ait karboksilik asit grubunun iyonlaşmaya başlamasıyla elektrostatik itici güçler devreye girer ve hidrojelin daha yüksek oranda şişme davranışı göstermesine neden olur.

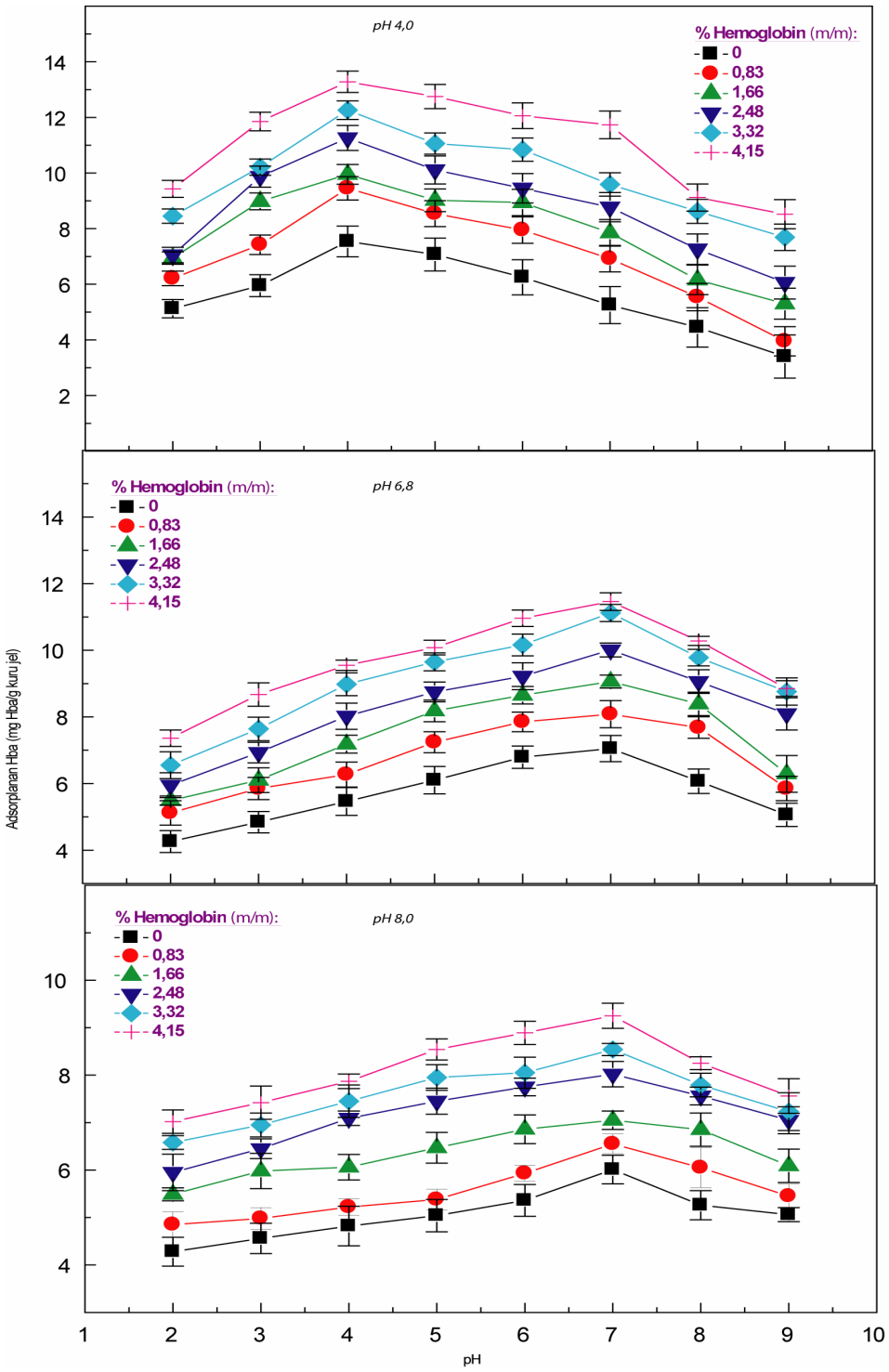
Yapıda bulunan asidik monomer (IA) miktarı bütün hidrojel kompozisyonlarında sabit miktarda kullanılmasına rağmen şişme oranları arasındaki fark yapıya artan miktarlarda katılıp ardından uzaklaştırılan Hba ile ilgilidir. Baskılanmış hidrojellerin denge şişme oranları baskılanmamış jellere nazaran daha yüksek değerdedir. Baskılanmış hidrojellerde Hba 'nın ayrılmasından sonra boşluklar kalır ve bu boşluklara suyun difüzlenmesi daha fazladır. Bununla birlikte pH 4,0 , pH 6,8 , pH 8,0 'de sentezlenen hidrojellerin de denge şişme oranları arasında fark gözlemlenmiştir. pH 4,0 'te sentezlenen hidrojellerin denge şişme oranları ph 6,8 ve pH 8,0'de sentezlenen hidrojellerden daha düşüktür.



Şekil 9.3. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin denge şişme oranına pH etkisi.

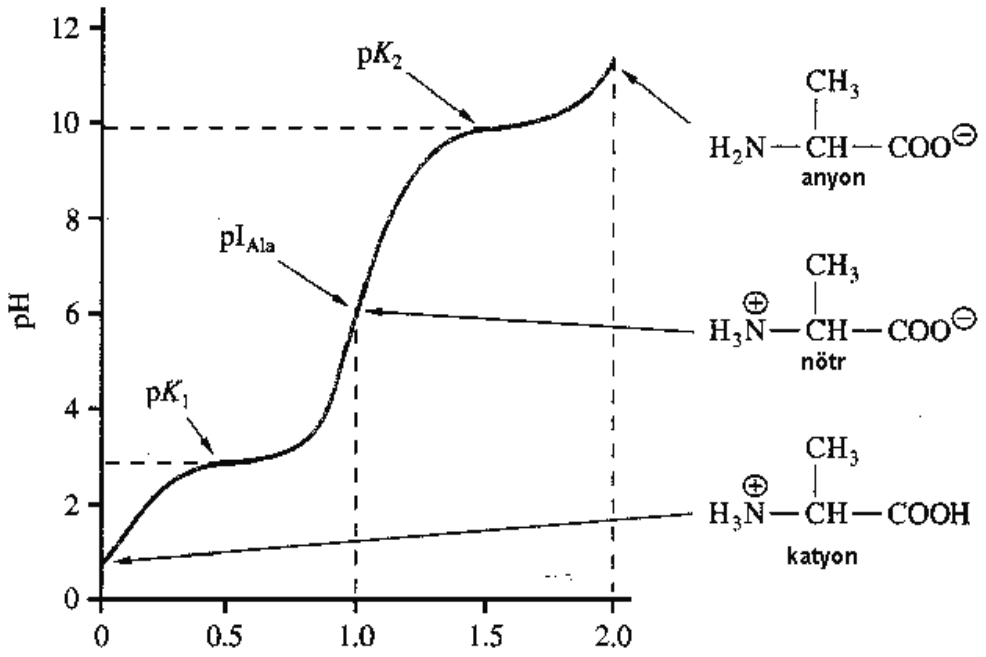
9.3. Baskılanmış ve Baskılanmamış p(TBAAM-ko-AAM/IA) Hidrojellerin Hba Adsorpsiyonu Üzerine pH Etkisi

pH 4,0; pH 6,8 ve pH 8,0 de artan miktarlarda Hba ile baskılanan ve baskılanmayan jeller için elde edilen değerlerle kuru jel başına Hba adsorpsiyon kapasitesi değişen pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 9.4).



Şekil 9.4. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojelleri Hba adsorpsiyonu üzerine pH etkisi.

Adsorpsiyon işleminde ortam pH'sı en önemli parametredir. Çünkü üç boyutlu yapıya sahip olan proteinler farklı pH'ya sahip tampon çözeltileri içerisinde farklı yüklerle yüklenirler. Bunun için baskılanmış ve baskılanmamış iyonik p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerinin Hba adsorpsiyonu üzerine pH etkisi sekiz farklı pH 'daki protein çözeltileri içerisinde (2,0 ,3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0) incelenmiştir. Hba adsorpsiyonunda yüklü Hba molekülleri ile iyonik p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojeli arasındaki iyonik ve elektrostatik etkileşimler önemli rol oynar [58].

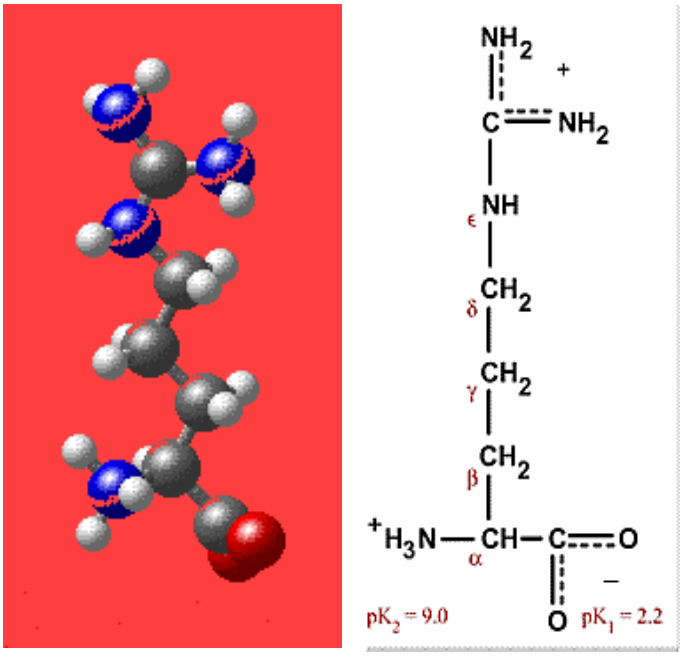


Şekil 9.5 Farklı pH 'daki çözeltilerde aminoasit davranışı[59].

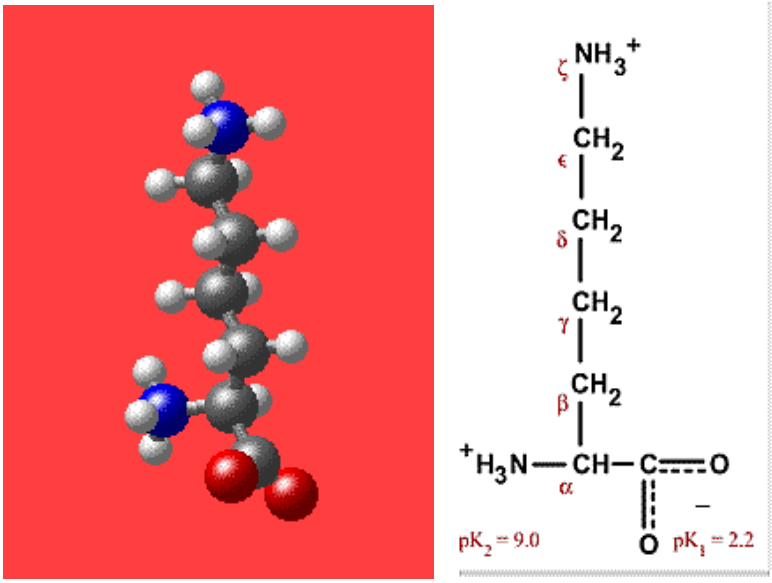
Üç ayrı pH'da sentezlenen hidrojellerin adsorpsiyon kapasiteleri pH 4,0 hidrojeli>pH 6,8 hidrojeli>pH 8,0 hidrojeli olarak sıralandırılabilir. Bütün hidrojellerin maksimum adsorpsiyona ulaştıkları pH sentezlendikleri ortam pH'sı ile eşdeğerdedir.

pH '4,0 te sentezlenen jellerin pH 6,8 ve 8,0 de sentezlenen jellere nazaran daha yüksek Hba adsorpladığı ve yine pH 'sı 4,0 olan protein çözeltisi

içerisinde maksimum adsorpsiyona ulaştığı, daha bazik ortamlarda daha düşük değerde adsorpsiyonun sağlandığı tespit edilmiştir. pH 4,0'te sentezlenen baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerde değişen pH 'daki protein çözeltileri içinde Hba adsorpsiyonundaki değişim pozitif yüklü Hba ile negatif yüklü polimer zinciri arasındaki olası elektrostatik etkileşimlere bağlanabilir. Farklı pH'larda protein moleküllerinin yükü ve konformasyonu değişir. Proteinler izoelektronik noktanın altındaki pH'larda pozitif, izoelektronik noktada nötr, izoelektronik üstündeki pH'larda ise negatif yüklenirler. Hba için izoelektronik nokta 6,8 'dir [60]. pH 4,0'te Hba molekülü pozitif yüklenir. Adsorpsiyon, negatif yüklü IA 'in karboksilik asit grubuyla (pK_{a1}=3,85 pK_{a2}=5,84) Hba 'in pozitif yüklü aminoasit kalıntıları arginin ve lizin arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkan elektrostatik kuvvetler ve H bağı sayesinde sağlanır [61]. Arginin, polardır ve izoelektrik noktanın altında pozitif yüklenir.En az lizin kadar yük dengesini korumaya yardımcıdır(Şekil 9.6). Lizin çözücü ile etkileşimde bulunan diğer aminoasitler ile yüzeyde bulunur.(Şekil 9.7).



Şekil 9.6 Arginin 3 boyutlu ve düzlemsel yapısı [59].



Şekil 9.7 Lizinin 3 boyutlu ve düzlemsel yapısı [59].

pH 6,8 'de sentezlenen jeller için pH 4,0 'teki hidrojellere nazaran daha az Hba adsorpsiyonu söz konusudur. pH 6,8 hemoglobin için izoelektronik noktadır ve bu pH'da Hba net yükü sıfırdır. Bu jeller için elektrostatik etkileşimler adsorpsiyonun lehine işlememektedir.

pH 8,0 'de sentezlenen jeller içinse en düşük Hba adsorpsiyonu gözlenmiştir. Bu pH da iyonik jel ve Hba negatif yüklüdür. Adsorpsiyon için negatif yüklü moleküllerin biribirine yaklaşması ve diğer hidrojellere oranla daha sağlıklı bir adsorpsiyonun gözlenme olasılığı düşüktür.

Diğer taraftan bütün pH'lar için % 0,83 ve % 4,15 Hba kullanılarak baskılanmış hidrojeller Hba molekülüne ait spesifik bağlanma bölgeleri içerdiğinden baskılanmamış hidrojellere oranla daha fazla adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu sonuca göre de; yapıya katılan kalıp molekülün miktarı ile birlikte spesifik bağlanma bölgelerinin oranının arttığı buna bağlı olarak da bağlanma kapasitesinin artış gösterdiği söylenebilir [62].

9.4. Baskılanmış ve Baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) Hidrojellerin Hba adsorpsiyonu Üzerine Başlangıç Hba Derişim Etkisi

pH 4,0; pH 6,8 ve pH 8,0 de artan miktarlarda Hba ile baskılanan ve baskılanmayan jeller için elde edilen değerlerle kuru jel başına Hba adsorpsiyon kapasitesi Eş. 8.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

Hidrojellerin adsorpsiyon davranışları; Langmuir'e göre ve Freundlich'e göre hesaplanan adsorpsiyon sabitleri ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 9.1).

Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon sabitleri hesaplaması.

Langmuir Eşitliği :

$$q_e = \frac{Q^0 \,.\, b \,.\, c_e}{1 + (b.\, c_e)} \qquad (9.1)$$

Lineer Langmuir eşitliği:

$$\frac{c_e}{q_e} = \left(\frac{1}{Q^o \cdot b} \right) + \left(\frac{1}{Q^o} \right) . c_e \qquad (9.2)$$

c_e : Başlangıç Hba derişimi
q_e : Adsorplanan Hba miktarı(mg/g kuru jel)
Q^o: Langmuir sabiti.
b : Bağlanma afinitesi

Eş. 9.1 kullanılarak baskılanmış ve baskılanmamış bütün kompozisyonlardaki hidrojeller için 'b', ve Q^o değerleri hesaplanmıştır. b ve Q_0 değerlerinin tespiti adına Eş. 9.1 hesaplama yapabilmek için lineer hale getirilmiş ve Eş. 9.2 elde

edilmiştir. c_e/q_e değerleri c_e 'ye karşı grafiğe geçirilerek doğrusal grafikler elde edilmiş, grafik denklemi belirlenmiştir (Şekil 9.9 – Şekil 9.11). Grafiğin eğim değerinden 'Q_o ', kesim noktasından ise ; 'b' değerleri hesaplanmıştır.

Freundlich Eşitliği :

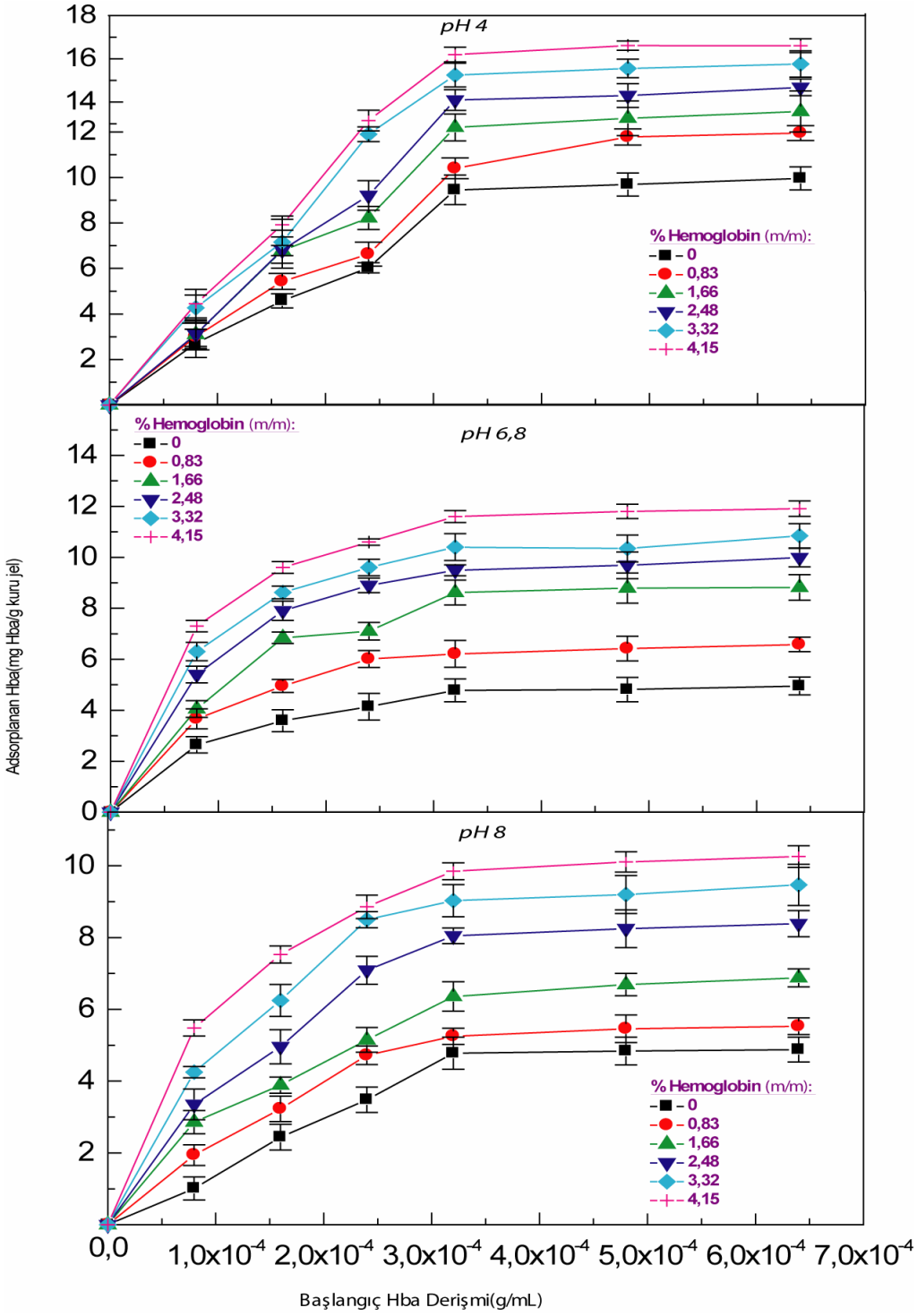
$$q_e = k_F \cdot c_e^{1/n} \tag{9.3}$$

Lineer Freundlich Eşitliği

$$\log q_e = \log k_F + \frac{1}{n} \cdot c_e \tag{9.4}$$

q_e : Adsorplanan Hba miktarı(mg/g kuru jel)
c_e : Başlangıç Hba derişimi
k_F : Freundlich sabiti
1/n: Freundlich sabiti

Eş. 9.3 kullanılarak baskılanmış ve baskılanmamış bütün kompozisyonlardaki hidrojeller için 'k_F' , ve '1/n' değerleri hesaplanmıştır. 'k_F' ve '1/n' değerlerinin tespiti adına Eş. 9.3 hesaplama yapabilmek için logaritması alınarak lineer hale getirilmiş ve Eş. 9.4 elde edilmiştir. log q_e değerleri log c_e 'ye karşı grafiğe geçirilerek doğrusal grafikler elde edilmiş, grafik denklemi belirlenmiştir(Şekil 9.12 - Şekil 9.14). Grafiğin eğim değerinden '1/n' ; kesim noktasından ise ; 'log k_F' değeleri hesaplanmıştır.



Şekil 9.8. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin Hba adsorpsiyonu üzerine başlangıç Hba derişim etkisi.

Hidrojellerin bütün kompozisyonları için Hba adsorpsiyon kapasitesi başlangıç Hba derişiminin artmasıyla artış göstermektedir. Bu artış belirli bir konsantrasyonda (0,32mg/mL) maksimuma ulaşmış ve daha sonraki değerlerde sabitlenmiştir. % 4,15 Hba ile baskılanan hidrojeller bütün kompozisyonlar içinde en fazla adsorpsiyon değerlerine sahiptirler. Baskılanmış hidrojeller için yüksek adsorpsiyon kapasitesi yapıya katılan Hba moleküllerinin miktarının artmasıyla oluşturulan kalıp bölgelerin sayılarının artışına dayandırılabilr.

Bütün kompozisyonlar için adsorpsiyon kapasitesi sıralandırması pH 4,0 te sentezlenen hidrojeller > pH 6,8 'de sentezlenen hidrojeller > pH 8,0'de sentezlenen hidrojeller şeklinde yapılabilir.

Baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin adsorpsiyon davranışları Langmuir ve Freundlich eşitlikleri ile hesaplanan adsorpsiyon sabitlerinin karşılaştırılmasıyla da yapılabilir(Çizelge 9.1). Langmuir ve Freundlich izotermleri tercihen doygun durumlarda ve molekül baskılı adsorbanlar için tercih edilir.

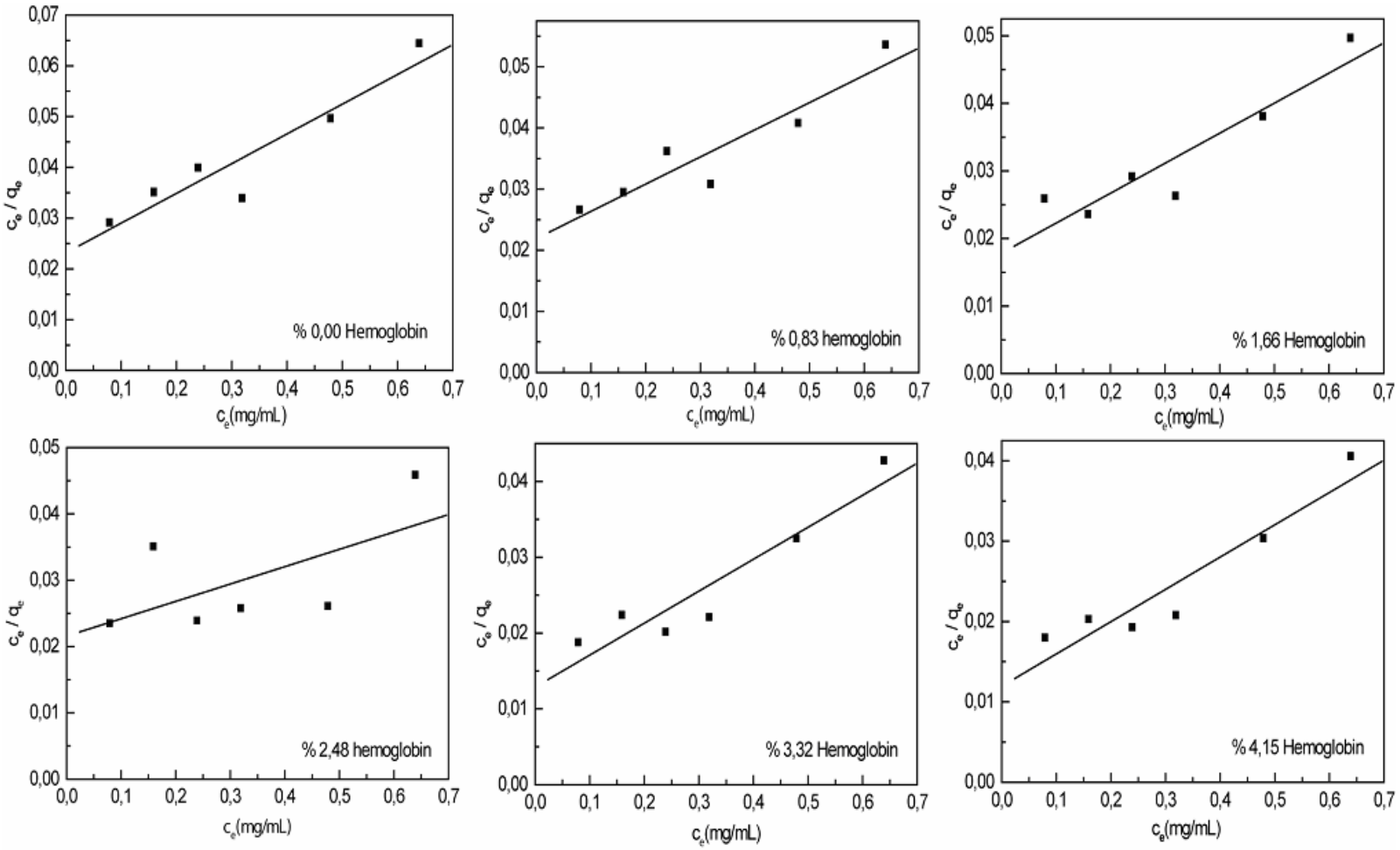
pH 4,0'te sentezlenen baskılanmış hidrojeller için yapıdaki Hba miktarının artışıyla birlikte adsorpsiyon kapasitesinin (Q^o) Langmuir'e göre 17,06'dan 26,32'ye; Freundlich'e göre (k_F) ise 0,693'den 2,66'ya yükseldiği görülmektedir. pH 6,8'de sentezlenen jeller için; yapıdaki Hba miktarının artışıyla birlikte adsorpsiyon kapasitesinin (Q^o) Langmuir'e göre 8,97'den 13,1'e; Freundlich'e göre (k_F) 0,383'den 1,455'e, pH 8,0' de sentezlenen jeller içinse; adsorpsiyon kapasitesinin (Q^o) Langmuir'e göre 7,38'den 11,7'ye Freundlich'e göre (k_F) 0,145'den 0,279'a yükselmiştir.

pH 4,0'te sentezlenen jellerin adsorpsiyon kapasitesindeki artış hem Langmuir hem de Freundlich değerlerinde diğer pH 'lardaki (6,8 ve 8,0) hidrojellere göre daha fazladır.

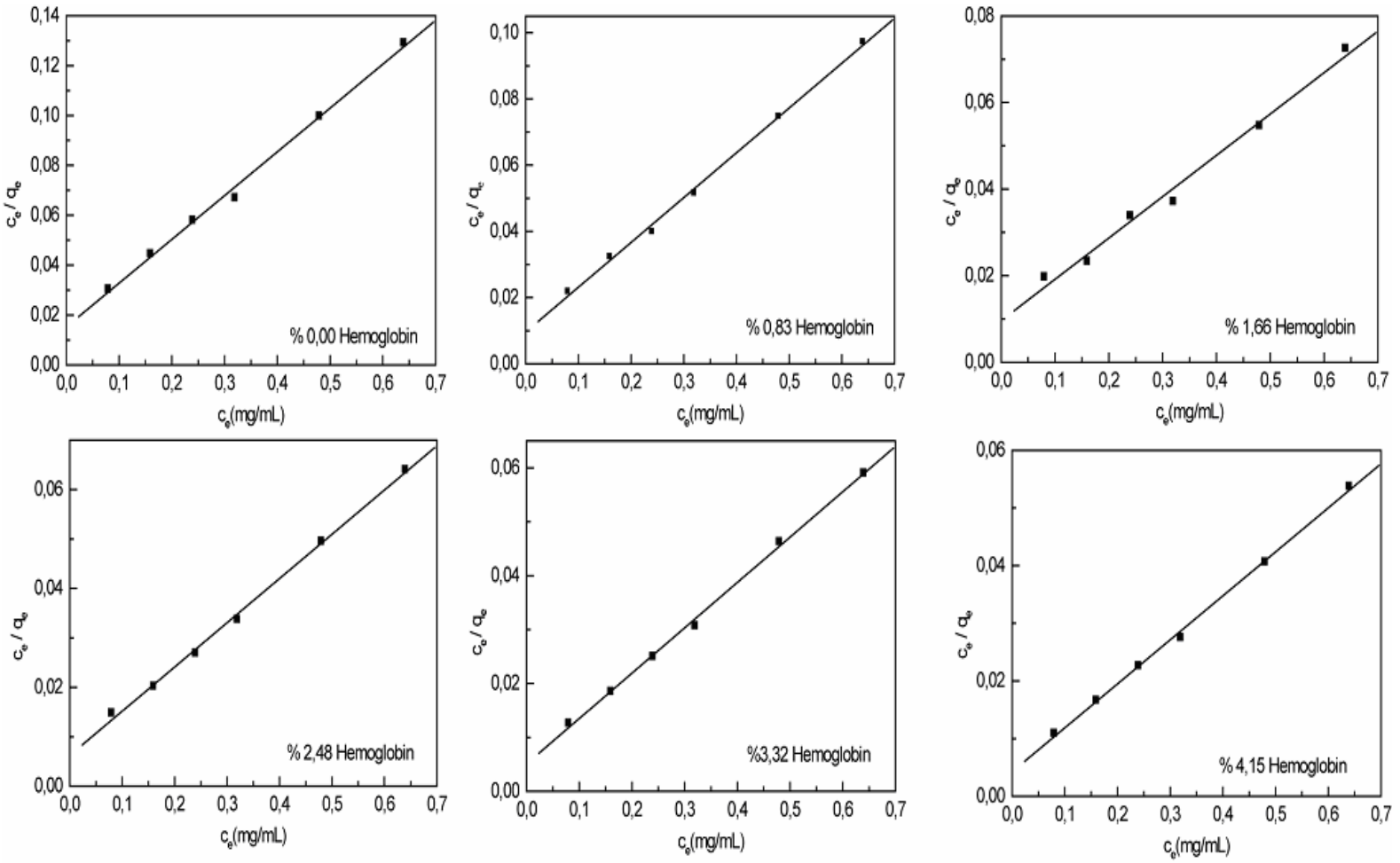
Ek olarak baskılanmış hidrojellerin bağlanma afinitelerinin farklılığı hesaplanan Langmuir (b) ve Freundlich (1/n) değerlerinde açıkça görülmektedir. Bu fark hidrojellerin farklı bağlanma eğilimlerine sahip olmasından kaynaklanır. Bağlanma değerleri gereği baskılama işleminin spesifik bağlanma bölgeleri varlığında monolayer adsorpsiyon ile oluşturulduğu söylenebilir[62].

Çizelge 9.1 Farklı pH'larda hazırlanan hidrojellerin adsorpsiyon sabitleri.

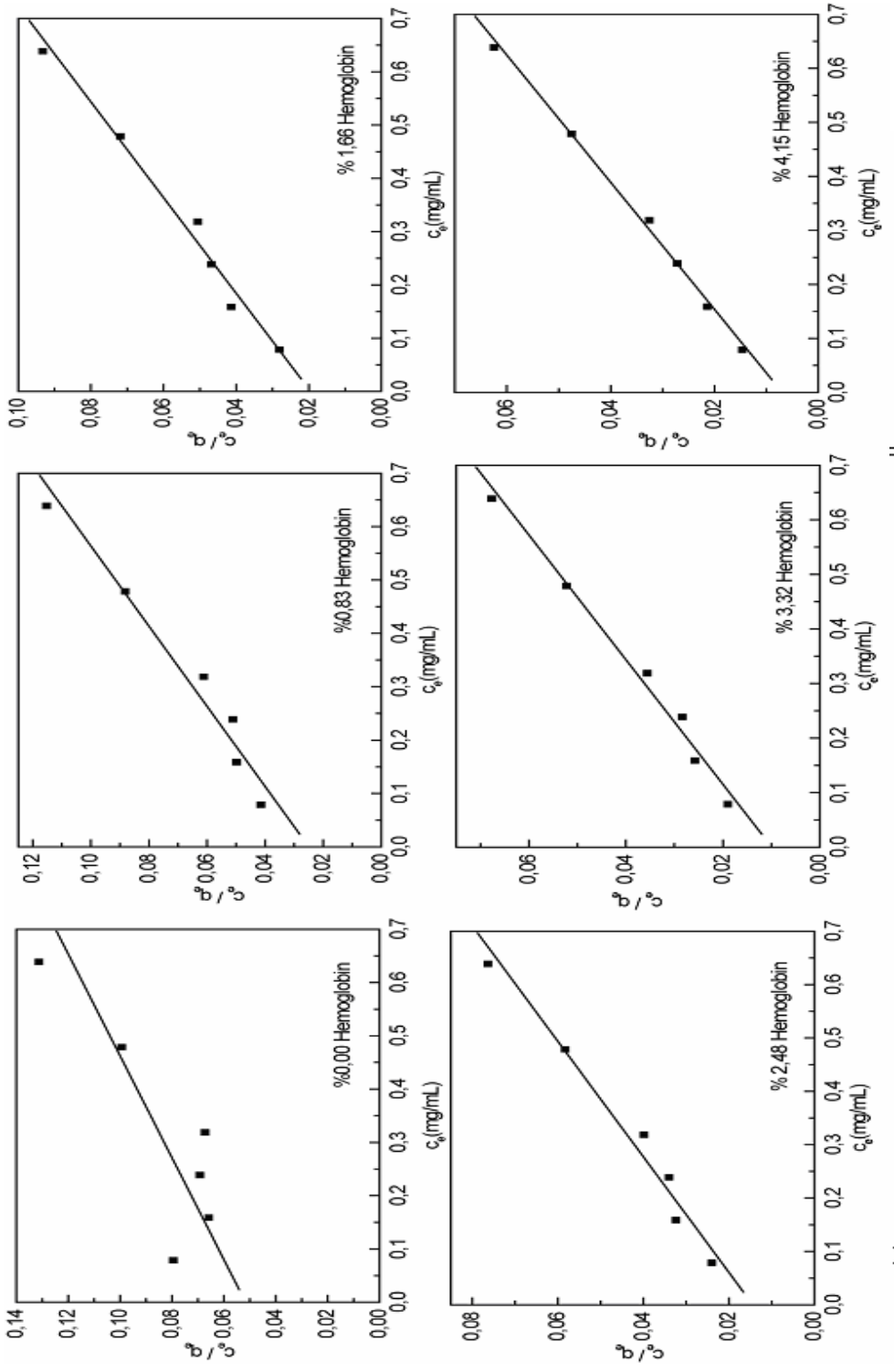
		Freundlich			*Langmuir*		
	%HbA (m/m)	k_F (mg/g)	1/n	R^2	Q^o (mg/g)	b (ml/mg)	R^2
pH=4,0	0,00	0,201	0,244	0,965	17,06	1,03	0,941
	0,83	0,693	0,263	0,975	22,46	2,03	0,937
	1,66	1,093	0,293	0,953	22,49	5,34	0,928
	2,43	1,630	0,296	0,935	23,69	5,72	0,895
	3,32	2,150	0,319	0,943	24,88	6,42	0,941
	4,15	2,660	0,378	0,942	26,32	9,93	0,944
		k_F (mg/g)	1/n	R^2	Q^o (mg/g)	b (ml/mg)	R^2
pH=6,8	0,00	0,148	0,318	0,958	7,50	1,22	0,998
	0,83	0,383	0,407	0,923	8,97	2,02	0,998
	1,66	0,449	0,470	0,944	10,47	2,49	0,994
	2,43	0,788	0,479	0,933	11,17	2,53	0,998
	3,32	0,88	0,540	0,945	11,88	3,28	0,999
	4,15	1,455	0,760	0,947	13,10	8,86	0,999
		k_F (mg/g)	1/n	R^2	Q^o (mg/g)	b (ml/mg)	R^2
pH=8,0	0,00	0,047	0,663	0,942	5,69	1,08	0,847
	0,83	0,145	0,664	0,938	7,38	1,17	0,981
	1,66	0,154	0,669	0,967	9,55	1,43	0,991
	2,43	0,174	0,696	0,946	10,8	1,64	0,987
	3,32	0,261	0,700	0,937	11,4	1,79	0,993
	4,15	0,279	0,741	0,953	11,7	3,36	0,998



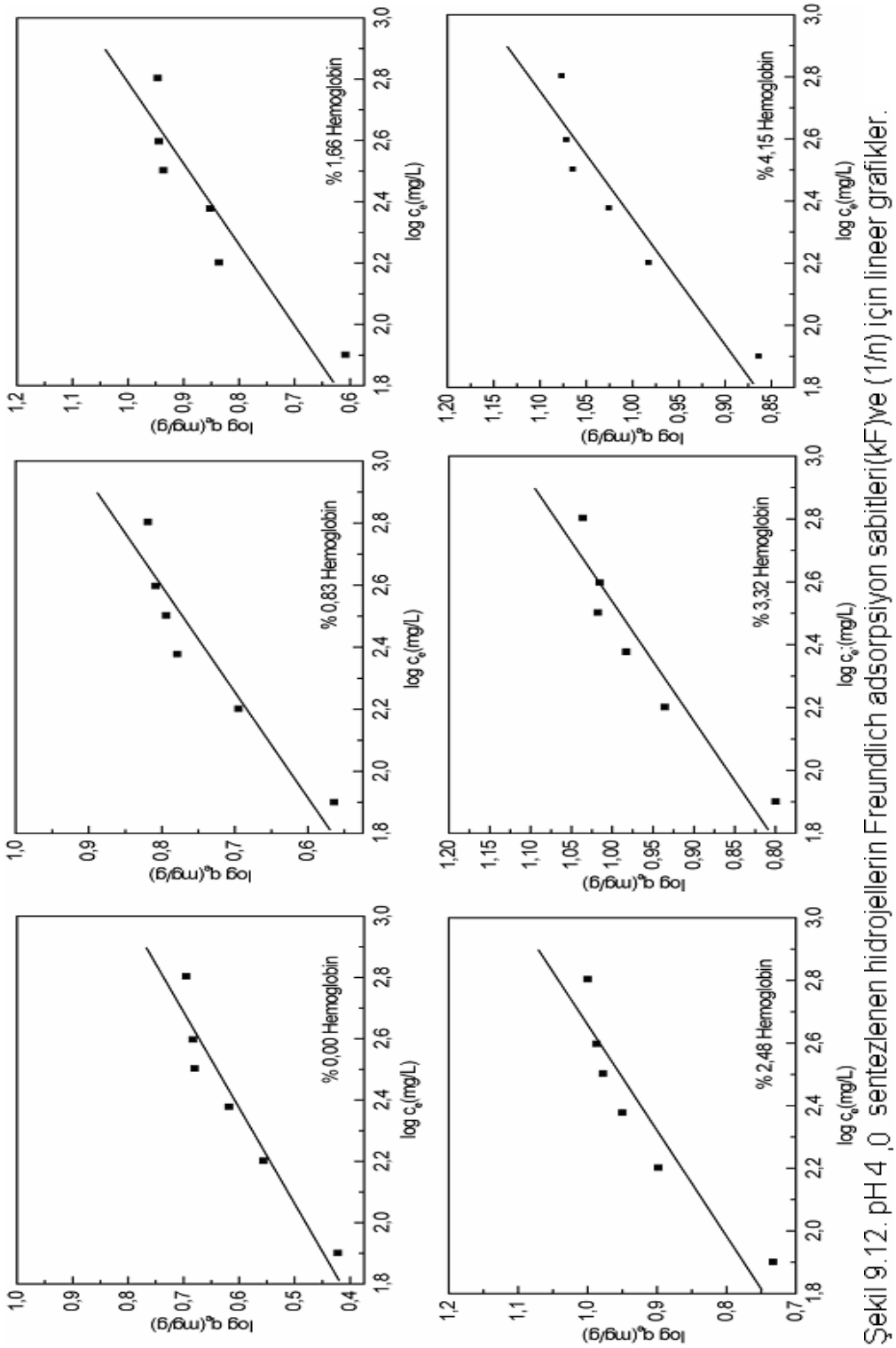
Şekil 9.9. pH 4,0 sentezlenen hidrojellerin Langmuir adsorpsiyon sabitleri(Q^0) ve (b) için lineer grafikler.



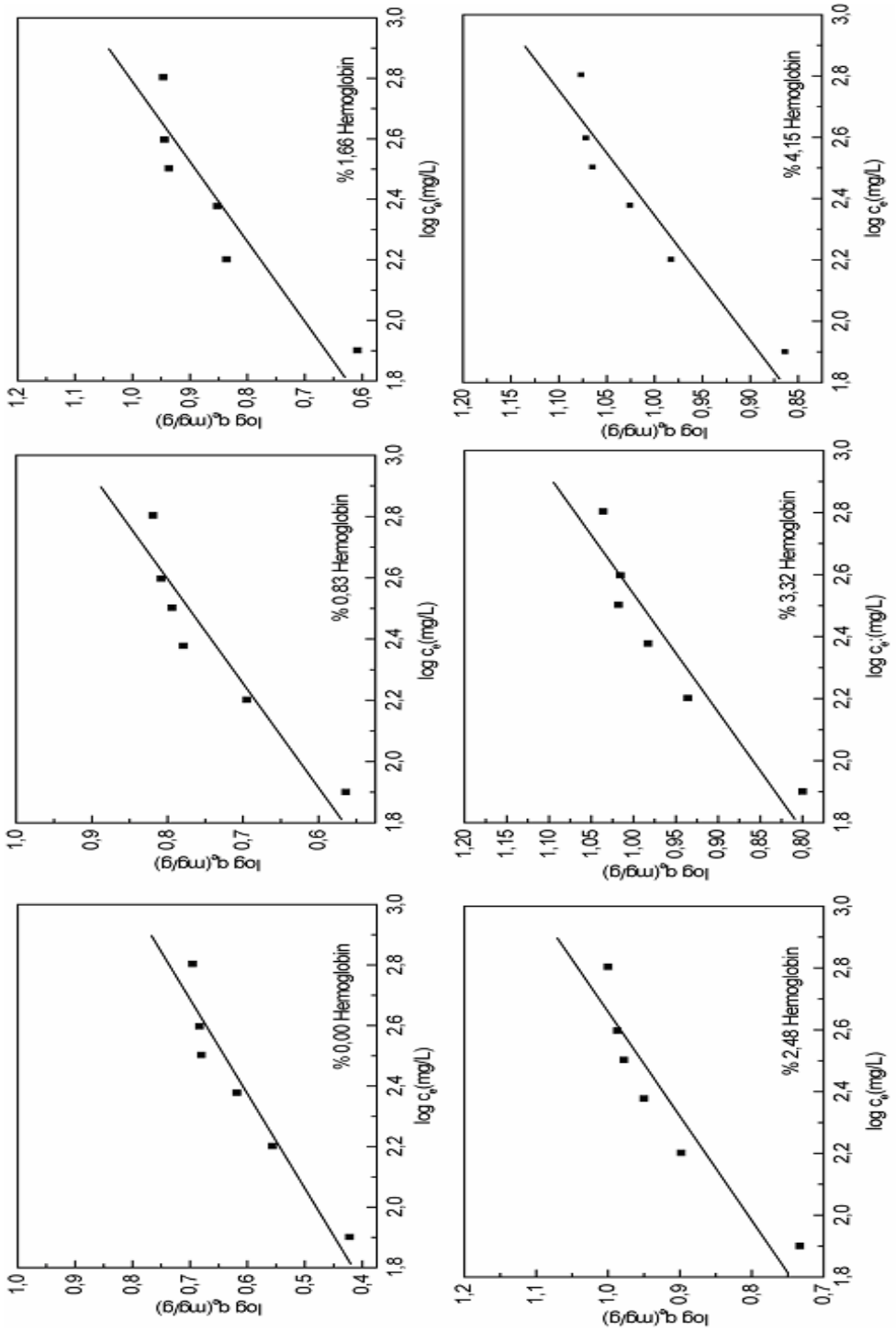
Şekil 9.10. pH' 6,8 de sentezlenen hidrojellerin Langmuir adsorpsiyon sabitleri(Q^0) ve (b) için lineer grafikler.



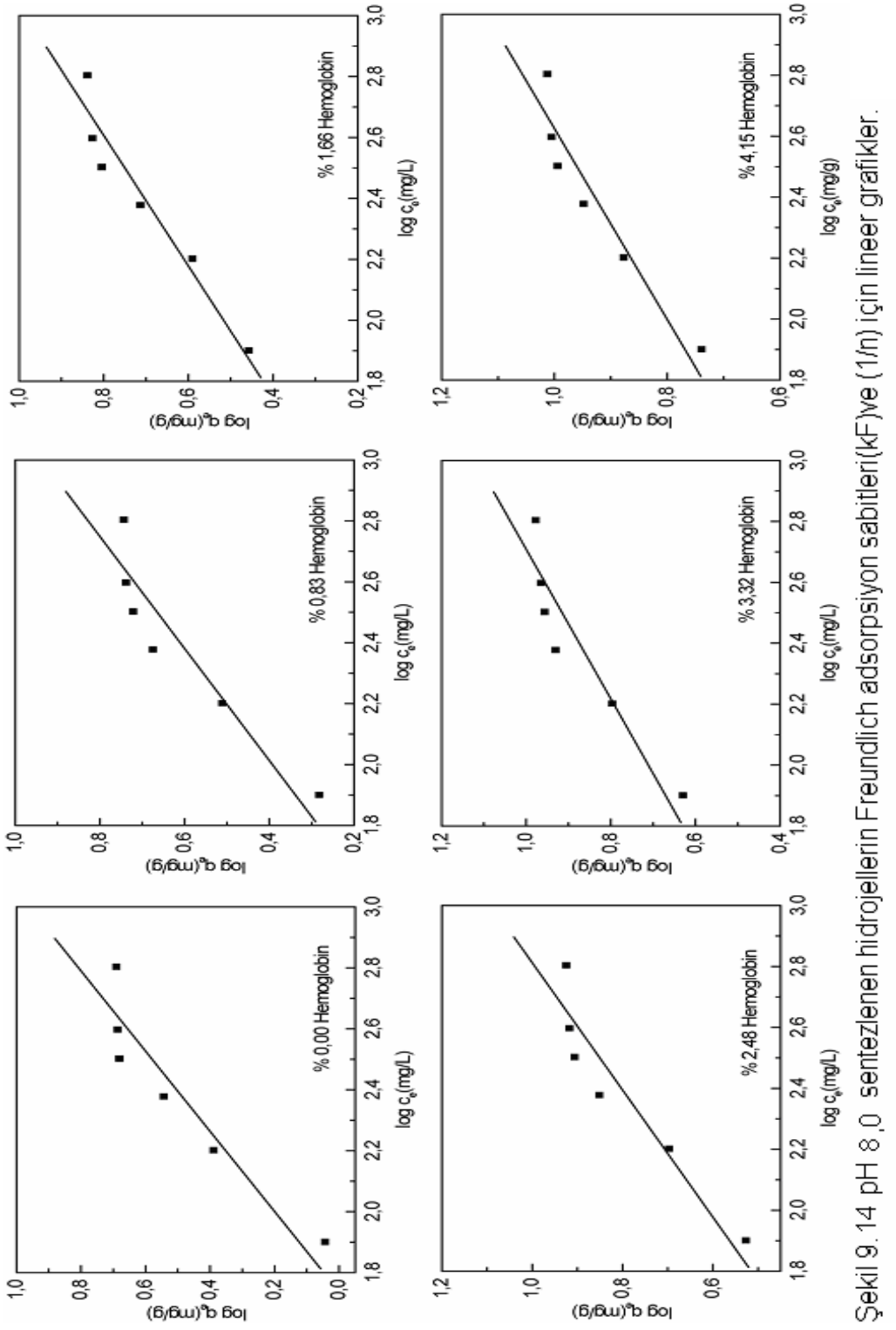
Şekil 9.11 pH 8,0 sentezlenen hidrojellerin Langmuir adsorpsiyon sabitleri(Q^u) ve (b) için lineer grafikler.



Şekil 9.12. pH 4 ,0 sentezlenen hidrojellerin Freundlich adsorpsiyon sabitleri(kF)ve (1/n) için lineer grafikler.



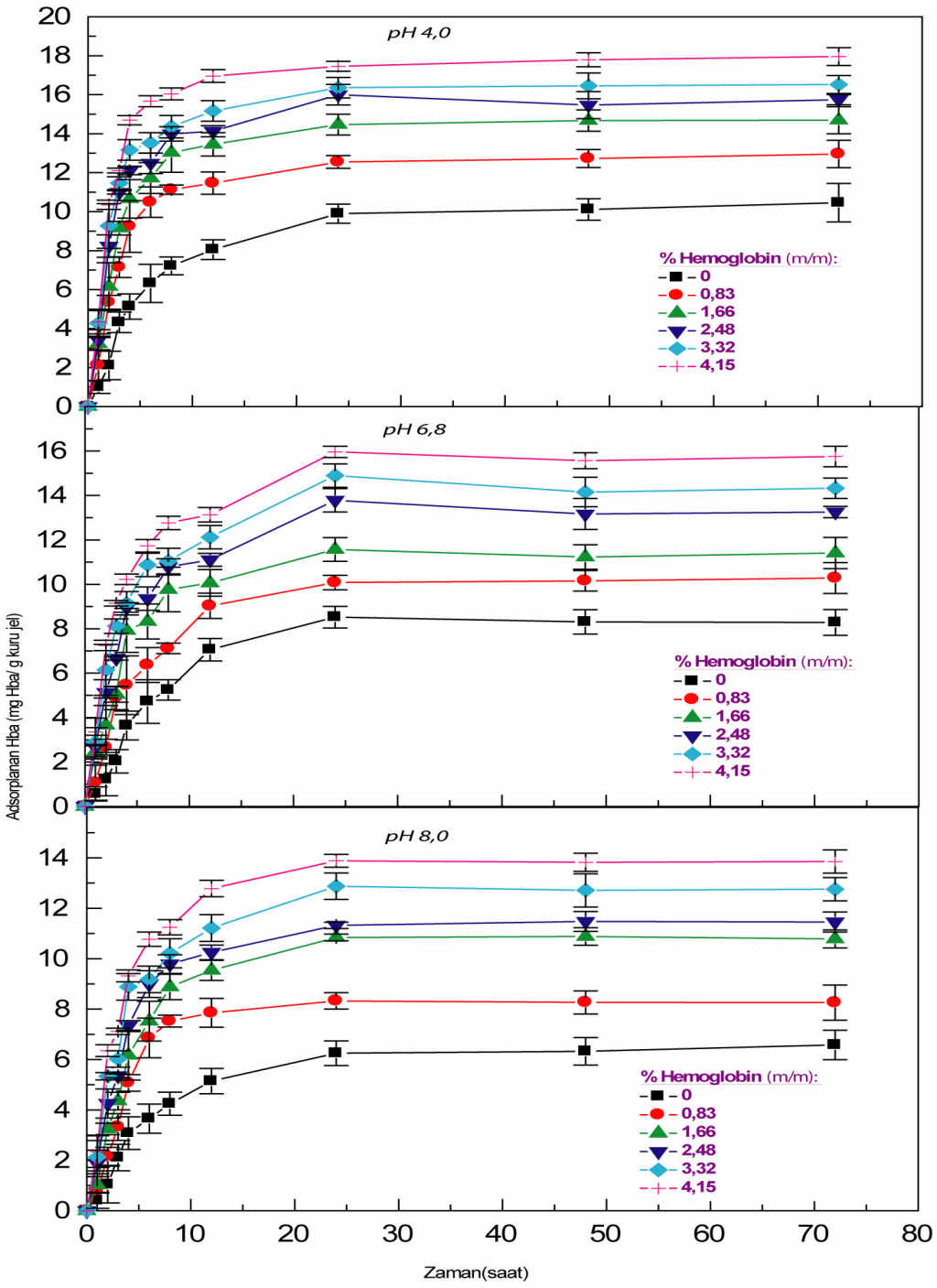
Şekil 9.13. pH 6,8'de sentezlenen hidrojellerin Freundlich adsorpsiyon sabitleri(kF)ve (1/n) için lineer grafikler.



Şekil 9.14 pH 8,0 sentezlenen hidrojellerin Freundlich adsorpsiyon sabitleri(kF)ve (1/n) için lineer grafikler.

9.5. Baskılanmış ve Baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) Hidrojellerin Hba Adsorpsiyon Hızı

pH 4,0, pH 6,8 ve pH 8,0 de artan miktarlarda Hba ile baskılanan ve baskılanmayan jeller için elde edilen değerlerle kuru jel başına Hba adsorpsiyon kapasiteleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir(Şekil 9.15). Yapıya katılan Hba miktarındaki artış ile birlikte hidrojellerin de adsorpsiyon hızlarında artış gözlenmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış bütün hidrojellerin ilk 24 sat içerisinde maksimum adsorpsiyon hızlarına ulaştığı ve geçen zamanla adsorpsiyonlarında gözle görülür bir değişikliğin olmadığı söylenebilir. Bu davranışın sebebi ilerleyen zamanla birlikte Hba konsantrasyonundaki azalma olarak gösterilebilir.



Şekil 9.15. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAM-ko-AAm/IA hidrojellerin Hba adsorpsiyon hızı.

9.6. Baskılanmış ve baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojellerin Hba Seçiciliği

Polimerizasyon hedef molekül Hba etrafında gerçekleşir. Bu esnada spesifik büyüklük ve şekilde tanıma bölgeleri meydana gelir. Hba'in polimerik materyal içinden suyla ekstrakte edilerek alınmasıyla bu tanıma bölgeleri boşalır. Boş kalan spesifik bölgeler hedef moleküle şekil, büyüklük ya da kimyasal yapı bakımından benzerlik gösteren molekülleri tekrar adsorplayabilir. Baskılanmamış hidrojel baskılama işleminin etkilerini göstermek için model olarak kullanılmıştır. Hba ile baskılanmış hidrojeller miyoglobin ve fibrinojene göre Hba 'ne karşı yüksek oranda seçicilik göstermişlerdir. Seçilen proteinlerden miyoglobin yapısal olarak hemoglobine çok benzer. Benzer görevler üstlenen hemoglobin ve miyoglobin molekülleri, benzer moleküler özelliklere sahiptirler. Sahip oldukları hem grupları birbirlerinden hiçbir fark göstermez ve dört zincir de yapılarında aynı şekilde katlanır. Hemoglobinden tek farkı tek bir oksijen atomu taşıyabilmesidir. Ayrıca izoelektrik noktası da hemoglobine çok yakındır (pI=7,2). Mol kütlesi ise; hemoglobinden (64500D) oldukça düşük ve 17000 Daltondur. Fibrinojen ise; daha kompleks yapıda 6 polipeptit zincire sahip bir proteindir. İzoelektrik noktası 5,8 ve mol kütlesi ise, 340000 Daltondur. Fibrinojen hem şekil hem de çok daha yüksek molekül ağırlığına sahip olduğundan dolayı Hba için spesifik boşluklara bağlanamamış ve bu yüzden adsorpsiyonu çok düşük oranda kalmıştır. Adsorpsiyon sonuçlarına bakıldığında molekül şeklinin ve büyüklüğünün baskılama işleminde ne derece önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. Yapısal olarak benzer olmasına ve daha küçük molekül ağırlığına sahip olmasına rağmen miyoglobin adsorpsiyonunun fibrinojene oranla daha fazla olduğu söylenebilir. Hidrojellerde miyoglobin adsorpsiyonu gözlenmesine rağmen değerler hemoglobin kadar yüksek değildir. Bu durumda hidrojellerin hemoglobine bağlanma eğilimini yüksek olduğu ve dizayn edilen polimerde hemoglobine duyarlı bölgelerin oluşturulduğu söylenebilir.

Çizelge 9.2. Baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin seçiciliği.

% Hba (g/g)		Adsorplanan hemoglobin mg /g kuru jel	Adsorplanan miyoglobin mg /g kuru jel	Adsorplanan fibrinojen mg /g kuru jel
	0,00	7,21	7,25	4,80
	0,83	9,56	5,25	3,32
pH	1,66	9,85	5,02	3,50
4,0	2,48	11,26	5,24	3,31
	3,32	12,26	4,75	3,50
	4,15	13,28	4,35	3,33
	0,00	5,46	5,25	4,35
	0,83	6,27	4,47	2,56
pH	1,66	7,18	4,16	2,79
6,8	2,48	8,02	4,01	3,00
	3,32	8,98	4,36	3,24
	4,15	9,55	4,36	3,38
	0,00	4,82	5,25	4,20
	0,83	5,22	5,01	2,30
pH	1,66	6,06	4,21	2,51
8,0	2,48	7,09	4,22	2,77
	3,32	7,45	4,35	2,86
	4,15	8,16	4,42	3,20

Aşağıdaki eşitlikler kullanılarak α_1 ve α_2 katsayıları belirlenmiştir. α_1 baskılanmış hidrojellerin fibrinojen ve miyoglobine karşı seçiciliğini gösterirken α_2 ise baskılanmış hidrojellerin baskılanmış hidrojellere karşı seçiciliğini gösterir.

$$\alpha_1 = q_e \text{ hemoglobin}/q_e \text{ miyoglobin} \quad (9.5)$$

$$\alpha_2 = q_e \text{ baskılanmış}/ q_e \text{ baskılanmamış} \quad (9.6)$$

Çizelge 9.3 pH 4'0 da sentezlenen hidrojellerin miyoglobin seçiciliği.

	% Hemoglobin (g/g)					
	0,00	0,83	1,66	2,48	3,32	4,15
α_1	0,99	1,96	2,14	2,06	2,58	3,05
α_2	-	1,32	1,36	1,56	1,70	1,84

Çizelge 9.4 pH 6,8'0 da sentezlenen hidrojellerin miyoglobin seçiciliği

	% Hemoglobin (g/g)					
	0,00	0,83	1,66	2,48	3,32	4,15
α_1	1,04	1,40	1,72	2	2,05	2,19
α_2	-	1,14	1,31	1,46	1,64	1,74

Çizelge 9.5 pH 8'0 de sentezlenen hidrojellerin miyoglobin seçiciliği.

	% Hemoglobin (g/g)					
	0,00	0,83	1,66	2,48	3,32	4,15
α_1	0,91	1,04	1,43	1,13	1,68	1,84
α_2	-	1,08	1,25	1,47	1,54	1,69

Yapılan hesaplamalarla farklı pH'larda sentezlenen hidrojeller için yapıdaki kalıp miktarının artmasıyla birlikte α_1 oranlarında da artış gözlenmektedir. pH 4,0'de baskılanan hidrojellerin α_1 değerleri baskılanmamış hidrojellere yapıya katılan kalıp miktarının artışıyla birlikte göre 3 katlık bir artış sergilemektedir. Fakat miyoglobin adsorpsiyonunu ifade eden α_2 değerlerinde kayda değer bir artış gözlenmemiştir. α_1 değerleri azalış yönünde pH 4,0'de sentezlenen hidrojeller $\alpha_1 >$ pH 6,8'de sentezlenen hidrojeller $\alpha_1 >$ pH 8,0'de sentezlenen hidrojeller α_1 olarak sıralandırılabilir.

$$\alpha_1 = q_e \text{ hemoglobin } / q_e \text{ fibrinojen} \quad (9.7)$$

$$\alpha_2 = q_e \text{ baskılanmış} / q_e \text{ baskılanmamış} \quad (9.8)$$

Çizelge 9.6 pH 4'0 da sentezlenen hidrojellerin fibrinojen seçiciliği.

	% Hemoglobin (g/g)					
	0,00	0,83	1,66	2,48	3,32	4,15
α_1	1,5	2,87	2,81	3,40	4,90	3,90
α_2	-	1,08	1,25	1,47	1,54	1,69

Çizelge 9.7 pH 6,8' de sentezlenen hidrojellerin fibrinojen seçiciliği

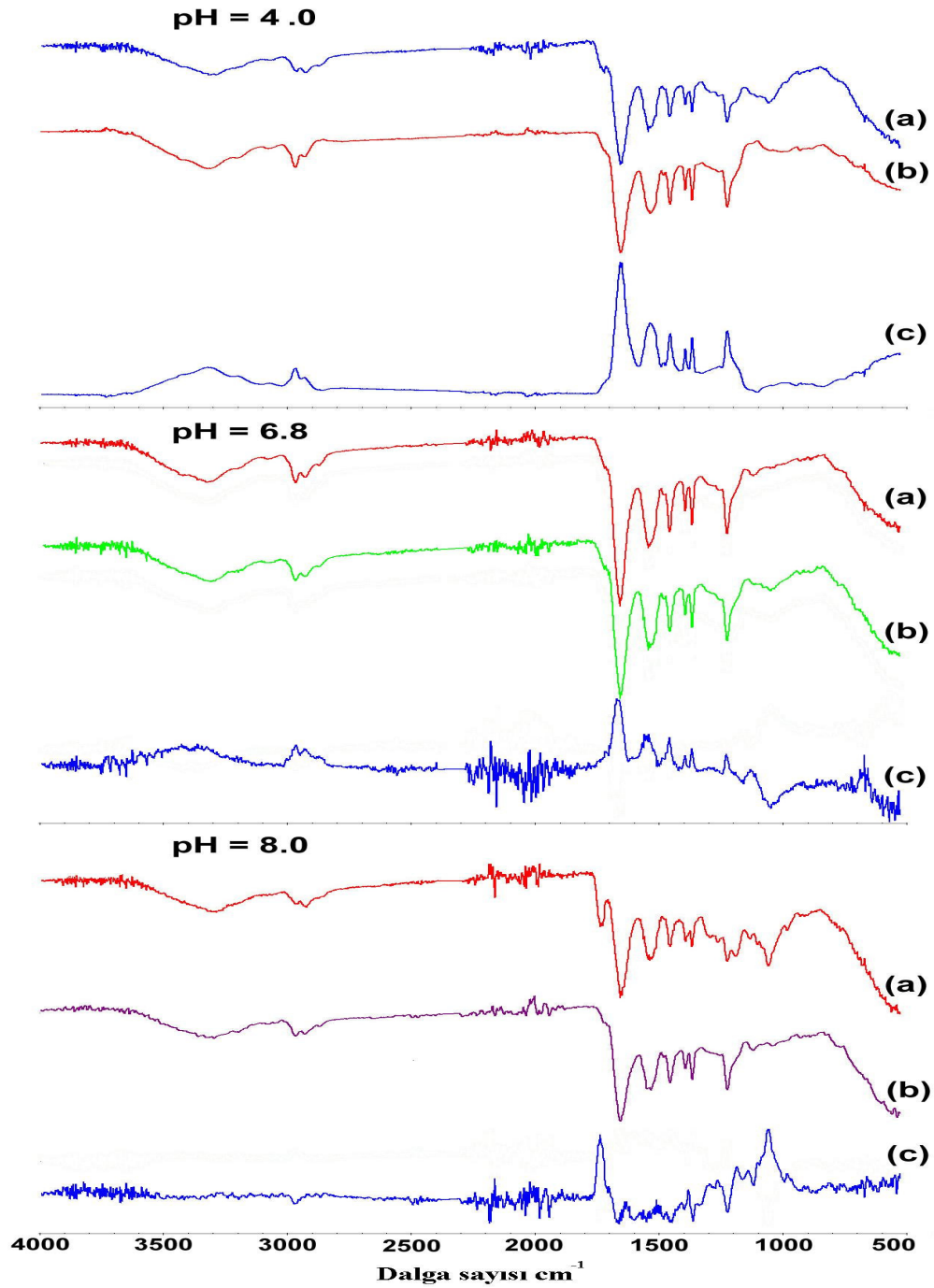
	% Hemoglobin (g/g)					
	0,00	0,83	1,66	2,48	3,32	4,15
α_1	1,25	2,44	2,57	2,67	2,77	2,82
α_2	-	1,08	1,25	1,47	1,54	1,69

Çizelge 9.8 pH 8,0' de sentezlenen hidrojellerin fibrinojen seçiciliği.

	% Hemoglobin (g/g)					
	0,00	0,83	1,66	2,48	3,32	4,15
α_1	0,87	2,26	2,41	2,55	2,60	2,55
α_2	-	1,08	1,25	1,47	1,54	1,69

Sentezlenen hidrojeller için fibrinojene karşı α_1 ve α_2 değerlerinde miyoglobin kadar artış gözlenmemiştir. Bu durum polimerin fibrinojene seçiciliği olmadığını gösterir.

10. FT-IR SPEKTRUMLARI



Şekil 10.1. Baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin FT-IR spektrumları
(a) % 4,15 Hba ile baskılanmış hidrojeller
(b) % 0,00 Hba baskılanmamış hidrojeller
(c) Fark spektrumları.

Sentezlenen hidrojellerin yapısal karakterizasyonu için FT-IR spektrumları alınmıştır. Spektrumlarda, hidrojellerin kendisini oluşturan monomerlerine ait bantlar yer almaktadır. 1650 cm^{-1} 'de gözlenen band karbonil grubuna ait (–C=O) bandır. Farklı pH'larda sentezlenen jeller için band şiddetinde kayda değer bir değişiklik gözlenmemiştir. 3000 cm^{-1} 'de görülen band amin (–NH) grubuna aittir. 3400 cm^{-1} de görülen geniş band ise hidroksil (–OH) grubuna aittir. Fark spektrumları incelendiğinde özellikle –C=0 grubuna ait bandlarda değişiklik görülmektedir. Bu değişikliğin sebebi baskılanma ile polimer yapısında meydana gelen değişiklikler olabilir. Konformasyonel hafızanın korunmuş olması baskılama işleminin başarıya ulaştığının kanıtıdır. Eğer baskılama gerçekleştirilmeseydi, alınan fark spektrumu sadece düz çizgi olarak gözlemlenecekti. Spektrumlardan da görüldüğü üzere bütün pH'larda sentezlenen jeller için fark spektrumları belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir.

11. SONUÇLAR

❖ Baskılanmamış p(TBAAm-ko-AAm/IA) hidrojelleri; TBAAm, AAm ve IA monomerleri MBAAm çapraz bağlayıcısı eşliğinde APS/TEMED başlatıcı sistemi kullanılarak serbest radikal kopolimerizasyonu ile üç ayrı pH'da sentezlenmiştir.

❖ Baskılanmış p(TBAAM-ko-AAM/IA) hidrojelleri; TBAAm, AAm ve IA monomerleri ve MBAAm çapraz bağlayıcısı eşliğinde hemoglobin varlığında ve artan Hba miktarlarında (% Hba 0,00 , 0,83 , 1,66 , 2,48 , 3,32 , 4,15) metanoll-tampon çözücü sistemi kullanılarak üç ayrı pH 'da (4,0 , 6,8 8,0) sentezlenmiştir.

❖ Üç ayrı ph'de sentezlenen hidrojellerin pH=2,0 'den pH=9,0'a kadar değişen pH aralığında tampon çözeltiler içerisinde şişme davranışı incelenerek denge şişme oranları hesaplanmış ve hidrojeller için ortam pH'sının artışıyla şişme oranlarında da artış gözlenmiştir. Üç ayrı pH'lardaki jeller içinse % 4,15 Hba ile baskılanan hidrojellerin diğer kompozisyonlara göre daha fazla şişme eğilimi gösterdiği görülmüştür.

❖ Farklı pH ve değişen Hba miktarlarıyla sentezlenen baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin adsorpisyon kapasiteleri üzerine Ph etkisi araştırılmış ve pH 4 'te sentezlenen jellerin sentezlendiği pH'da diğerlerine oranla daha yüksek adsorpsiyon yaptığı görülmüştür. Maksimum adsorpsiyon pH'sı 4,0 olarak belirlenmiştir. Adsorpsiyon kapasitelerindeki artış pH 4,0 hidrojel>ph 6,8 hidrojel>pH 8,0 hidrojel olarak sıralanabilir. Ek olarak baskılanmış hidrojellerin adsorpsiyon kapasitesinin baskılanmamış hidrojellerden daha yüksek olduğu ve farklı miktarlarda baskılanan hidrojellerin adsorpsiyon kapasitesinin yapıya katılan Hba miktarındaki artışla yükseldiği görülmüştür. Adsorpsiyon kapaitesi en yüksek hidrojel pH 4'de % 4,15 Hba ile baskılanan hidrojeldir.

❖ Baskılanmış ve baskılanmamış hidrojellerin adsorpsiyon kapasiteleri üzerine başlangıç Hba derişimi etkisi pH 4,0'de çalışılmış ve hidrojellerin hidrojellerin maksimum adsorpsiyon yaptığı derişim 0,32 mg Hba/g kuru jel olarak belirlenmiştir. Hidrojellerin bütün kompozisyonları için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon eşitlikleri kullanılarak bağlanma eğilimleri hesaplanmıştır. Her iki eşitlik içinde baskılanmış hidrojellerin baskılanmamış hidrojellere nazaran daha yüksek adsorpsiyon yapma yeteneğine sahip oldukları söylenebilir.

❖ 72 saat boyunca yapılan adsorpsiyon hızı belirleme çalışmasında sentezlenen polimerlerin ilk 24 saat içinde maksimum adsorpsiyon değerlerine ulaştığı daha sonrasında adsorpsiyonlarında kayda değer bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir.

❖ Hba 'ya karşı miyoglobin ve fibrinojen kullanılarak yapılan seçimlilik çalışmasında ise; Langmuir ve Ferundlich adsorpsiyon sabitleri karşılaştırıldığında hidrojellerin, yapılarında yer alan Hba'e spesifik boşluklardan dolayı miyoglobin ve fibrinojene ilgisinin olmadığı söylenebilir.

❖ Hidrojellerin FT-IR spektrumlarından alınan fark spektrumlarındaki değişiklik ise baskılama işleminin gerçekleştiğinin bir kanıtı olabilir.

KAYNAKLAR

1.Piletsky, A.S., Alcock, S., Turner, A.P.F., ‘’Molecular imprinting : at the edge of the third millenium ‘’, ***Trends in Biotechnology***,19:9-12(2001).

2.Peppas, A.N., Park, K., Byrne, M.E., ‘’Molecular imprinting within hydrogels’’, ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 54:149-161 (2002).

3.Mosbach, K., ’’Toward the next generation of molecular imprinting with emphasis on the formation, by direct molding of compounds with biological activity (biomimetics)’’, ***Analytica Chimica Acta***, 435:1 (2001).

4.Hawkins, M.D., Stevenson, D., Reddy, M.S., ‘’İnvestigation of protein imprinting in hydrogel-based molecularly imprinted polymers (HydroMIPs)’’, ***Analytica Chimica Acta***, 542:61-65 (2005).

5.Çaykara, T., Demirel, G., Özçetin, G., ‘’pH/Temperature-sensitive imprinted ionic poly(N-t-butylacrylamide-co-acrylamide/maleic acide) hydrogels for bovine serum albümin’’, ***Macromolecular Bioscience***, 5:1032-1037 (2005).

6.Mayes, A.G., Whitcombe, M.J., ‘’Synthetic strategies for the generation of molecular imprinted organic polymers’’, ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 57:1742-1778 (2005).

7.Nakashima, K., Shinkai, S., ‘’Regioselective introduction of two boronic acid groups into fullerene using saccarides as imprinting templates ‘’, ***Chem. Commun***., 15:1047-1048 (1998).

8.Nakashima, K., Shinkai, S., Ikeda, A., ‘’Saccarise libraries as potential templates for regio and chiroselective introduction of two functional groups into fullerene ‘’, ***J. Org. Chem***., 10:984-990 (1999).

9.Kisch, N., Alexander , C., Davies, S., ‘’Enhancement of selectivity of imprinted polymers via post imprinting modification of recognition sites ‘’, ***Polymer***, 41:5583-5590 (2000).

10.Piletska, E.V., Piletsky, S.A., Karim, K., Turner, A.P.F., ‘’A new reactive polymer suitable for covaşent immobilisation and monitoring of primary amines ‘’, ***Polyme***r, 42:3603-3608 (2001).

11.Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A., Piletska, E.V., Karim, K., Day, R., Turner, A.P.F., Chen, B.N., ‘’Bite and switch approach to creatine recognition by use of molecularly imprinted polymers ‘’, ***Adv. Mater.,*** 12:722-724 (2000).

12. Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A., Piletska, E.V., Karim, K., Chen, B.N., ''Bite and switch approach computationally designed molecularly imprinted polymers for sensing of creatinine '', ***Biosens. Bioelectron***., 16:631-637 (2001).

13. Wullf, G., Sahran, A., ''The use of polymers with enzyme-analogus structures for the resolution of racemates'', ***Angew. Chem. Int. Ed. Engl.***, 11:341(1972).

14. Wullf, G., Vesper, R., Einsler, G., Sarhan, A., ''Enzyme analogue built polymers:4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for resolution of racemates'', ***Makromol Chem***., 178:2799-2816 (1977).

15. Wullf, G., Schauhoff, S., ''Enzyme analogue built polymers:27. Racemic resolution of free sugars with macroporous polymers prepared by imprinting –selectivity dependence on the arrangement of functional groups versus requirements'', ***J. Org. Chem***., 56:395-400 (1991).

16. Kugimiya, A., Matsui, J., Abe, H ., Aburatani, M., Takeuchi, T., ''Synthesis of castasterone selective polymers prepared by molecular imprinting'', ***''Anal .Chim . Acta*** 365 :75-79 (1998).

17. Wullf, G., Vietmeier, J., ''Enzyme analogue built polymers:26. Enantioselective synthesis of amino acids using polymers possessing chiral cavities obtained by an imprinting procedure with template molecules '', ***Makromol. Chem.*** 190:1727-1735 (1989).

18. Sallacan, N., Zayats, M., Bourenko, T., Willner, I., ''Imprinting of nucleotide and monosaccaride recognition sites in acrylamidephenlyboronic acid-acrylamide copolymer membranes associated with electronic transducers'', ***Anal. Chem***. 74:702-712 (2002).

19. Wullf, G., Best, W., Akelah, A., ''Enzyme analogue built polymers:17. Investigation on the racemic resolution of amino acids'', ***Recat. Polym***. 2:167-174 (1984).

20. Shea, K.J ., Dougherty, T. K.,''Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces – the influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition '' , ***J . Am . Chem . Soc .*** 108:1091-1093 (1986).

21. Shea, K.J ., Sasaki, D.Y., ''An analysis of small molecule binding to functionalized network polymers prepared by C-13 CP/MAS NMR and FT-IR spectroscopy'', ***J. Am. Chem. Soc***. , 113:4109-4120 (1991).

22. Wulff, G., Wolf, G., ‘’On the chemistry of binding sites: 6. On the suitability of various aldehydes and ketones as binding sites for monoalcohols ‘’ ***Chem . Ber*** . 119 :1876-1889 (1986).

23. Guyot, A., ‘’Synthesis and structure of polymer supports , in Sherrington, D.C., Hodge, P., ‘’Synthesis and Seperations Using Fonctional Polymers’’, ***Wiley, Chichester***, 1-42 (1998).

24. Anddersson, H.S., Nicholls, N.A., ‘’Spectroscopic evaluation of molecular imprinting polymerization systems’’, ***Bioorg. Chem***., 25:203-211 (1997).

25. Lu, Y., Li, C.X., Zhang, H.S., ‘’Study on the mechanism of chiral recognition with molecularly imprinted polymers ‘’, ***Anal. Chim. Acta,*** 489:33-43 (2003).

26. Sellergen,B., Lepistö, M., Mosbach, K., ‘’Highly enatioselective and subsrate selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing non-covalent interactions –NMR and chromatographic studies on the nature of recognition ‘’, ***J. Am. Chem. Soc***., 110:5853-5860 (1988).

27. Ramström, L.A., Nicholls, I.A., Mosbach, K., ‘’Synthetic peptide receptör mimics highly stereoselective recognition in non-covalent molecularly imprinted polymers’’, ***Tetrahedron:Asymmetry***, 5:649-656 (1994).

28. Kempe, M., Mosbach,K., ‘’Sperations of aminoacids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases’’, ***J. Chromatogr***, A 691:317-323 (1995).

29. Titirici, M.M., Sellergen, B., ‘’Peptide recognition vie hierarchical imprinting’’, ***Anal. Bioanal. Chem***., 378:1913-1921(2004).

30. Vlatakis, G., Anddersson, L.I., Müler, R., Mosbach, K., ‘’Drug assay using antybody mimics made by molecular imprinting’’, ***Nature,*** 361:645-647 (1993).

31. Anddersson, L.I., ‘’Application of molecular imprinting to the development of aqueus buffer and organic solvent based radioligand binding assays for (S)-propranolol’’, ***Anal.Chem***., 68:111-117 (1996).

32. Anddersson, L.I., Müller, R., Vlatakis, G., Mosbach, K.,’’Mimics of the binding sites of opioid receptors obtained by molecular imprinting of enkephalin and morphine ‘’, ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A***. , 92:4788-4792 (1995).

33. Mayes, A.G., Anddersson, L.I., Mosbach, K.,’’Sugar binding polymers showing high anomeric and epimeric discrimination obtained by noncovalent imprinting ‘’, ***Anal. Biochem***., 222:483-488 (1994).

34. Sellergen, B., Ekberg, B., Mosbach, K., ''Molecular imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers –demonstration of substrate selectivity and enantio selectivity by chromatographic resolution of racemic mixtures of amino acid derivatives'', ***J. Chromatogr***., 347:1-10 (1985).

35. Fischer, L., Müller, R., Ekberg B., Mosbach, K.,''Direct enantioseparation of beta adrenergic blockers using a chiral stationary phase prepared by molecular imprinting'', ***J.Am. Chem. Soc***., 113:9358-9360 (1991).

36. Suedee, R., Songkram, C., Petmoreekul, A., Sankasa, S., ''Direct enentioseperation of adrenergic drugs via thin layer chromatography using molecularly imprinted polymers'', ***J. Pharm. Biomed. Anal.,*** 19:519-527 (1999).

37. Andersson, L., Sellergen, B., Mosbach, K., ''Imprinting of amino acids derivatives in macroporous polymers'', ***Tetrahedron Lett***., 25:5211-5214 (1984).

38. Kempe, M., Mosbach, K., ''Direct resolution of naproxen on a noncovalently molecularly imprinted chiral stationary phase '', ***J. Chromatogr.*** , A 664:276-279 (1994).

39. Kempe, M., Fischer, L., Mosbach, K., ''Chiral seperation using molecularly imprinted heteroatomic polymers'', ***J. Mol. Recog***., 6:25-29 (1993).

40. Piletsky, S. A., Piletskaya, E.V., Elgersma, A.V., Yano, K., Karube, I., ''Atrazine sensing by molecularly imprinted membranes '', ***Biosens. Bioelectron***., 10:959-964 (1995).

41. Ju, Y.J., Shin, C. S., Vulfson, E. N., ''Imprinted polymers as tools for the recovery of secondary metabolites produced by fermentation'', ***Biotechnol. Bieng***., 64:232-239 (1999).

42. Ju, Y.J., Shin, C.S., Whitcombe, M.J., Wulfson, E.N. ''Binding properties of an aminostyrene based polymer imprinted with glutamylated monascus pigments'', ***Biotechnol. Tech.,*** 13:665-669 (1999).

43. Mathew, J., Buchardt, O.,''Molecular imprinting approach for the recognition of adenine in aqueous medium and hydrolysis of adenosine 5' – triphosphate '', ***Bioconjug. Chem***., 6:524-528 (1995).

44. Sibrian,M., Spivak, D.A.,''Molecular imprinting made easy'', ***J. Am. Chem. Soc.***, 126:7827-7833 (2004).

45.Meng, Z. H., Wang, J. F., Zhou, Q. H., Zhu, D. Q.,''High performance cocoktail functional monomer for making molecul imprinting polymer'', ***Anal. Sci***., 15:141-144 (1999).

46.Yu, C., Ramström, O.,''Enantiomeric recognitiob by molecularly imprinted polymers using hydrofobic interactions '', ***Anal. Let***., 30:2123-2140 (1997).

47.Pap, T., Horvai, G.,''Characterization of the selectivity of a phenytoin iimprinted polymer'' , ***J. Chromatogr***., A1034:99-107 (2004).

48.Hilal, N., Busca, G., ''Characterization of molecularly imprinted composite membranes using an atomic force microscope'', ***Surf. Interface. Anal.***, 33:672-675 (2002).

49.Piletsky, S. A., Piletskaya, E.V., Karim, K., Turner, A. P. F., ''Polymer cookery:influence of polymerization conditions on the performance of molecularly imprinted polymers '', ***Macromolecules***, 35:7499-7504 (2002).

50.Sreenivasan, K., ''Imparting cholestorol recognition sites in radiation polymerised poly(2-hydroxyethyl methacrylate) by molecular imprinting'', ***Poly. Int***., 42:169-172 (1997).

51.Kugimiya, A., Matsui, J., Yano, K., Karube, I., ''Recognition in novel molecularly imprinted polymer sialic acid receptörs in aqueus media'', ***Anal. Lett.,*** 29:1099-1107 (1996).

52.Ramströ., O., Andderson, L. I. Mosbach, K., ''Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting ''***J. Org. Chem***., 58:7562-7564 (1993).

53.Kuchen, W., Schram, J., ''Metal ion selevtive exchange resins by matrix imprinting with methacrylates '', ***Angew. Chem. Int. Ed. Engl***., 27:1695-1697 (1988).

54.Hart, B. R., Shea, K. J., ''Molecular imprinting for the recognition of N-terminal histidine peptides in aqueus solution'', ***Macromelocules,*** 35:6192-6201 (2002).

55.Taylor, G., ''The great evolution mystery'', ***The Harper&Row Publishers,*** New York, 108 (1997).

56.Perutz, M. F., ''Hemoglobin structure and respiratory transport'' ***Scientific American,*** 239:6 (1978).

57.Çaykara, T., Akçakaya, I., ‘’Sythesis and network structure of ionic poly(N,N –dimethylacrylamide-co-acrylamide hydrogels:Comparison of swelling degree with theory’’, ***European Polymer Journal***, 41:1656 (2005).

58.Chen,J., Andrade, J. D., ‘’Oxy and deoxyhemoglobin adsorption onto glass and polymer surfaces’’ **Biomaterials**, 6:231-236 (1985).

59.Zamyatin, A. A., ‘’Amino acides structures’’ ***Prog. Biophys. Mol. Biol.,*** 24:107-123 (1972).

60. Guo, T. Y., Xia, Y. Q., Song, M. D., ‘’Adsorptive separation of hemoglobin by molecularly imprinted chitosan beads’’ ***Biomaterials,*** 25:5905-5912 (2004).

61.Chen,J., Andrade, J. D., ‘’Oxy and deoxyhemoglobin adsorption onto glass and polymer surfaces’’ **Biomaterials**, 6:231-236 (1985).

62.Çaykara, T., Turan, E., ‘’pH/temperature sensitive imprinted ionic poly(N-t-butylacrylamide-co-acrylamide/maleic acid) hydrogels for bovine serum albümin’’, ***Macromolecular Bioscience***, 5:1032-1037 (2005).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı adı : UYSAL, Ayşe Gül
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri: 19.03.1980-Karaman
Medeni hali : Bekar
Telefon :
Fax :
E-mail : ys.uysal@gmail.com

Eğitim Derece	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet Tarihi**
Lisans	Gazi Üniversitesi Kimya Bölümü	2003
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Kimya Bölümü	2006

Yabancı Dil

İngilizce