

**MİYOĞLOBİN TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER
BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON REZONANS
BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI**

BİLGEN OSMAN

TEZ ONAYI

Bilgen Osman tarafından hazırlanan “ Miyogloblin tayinine yönelik moleküler baskılanmış yüzey plazmon rezonans biyosensör hazırlanması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından Kimya Anabilim Dalı’da **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof.Dr.Necati Beşirli

İkinci Danışman : Prof.Dr.Adil Denizli

Başkan:	Prof.Dr.Necati Beşirli U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı	İmza
Üye:	Prof.Dr.Rıdvan Say A.Ü. Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı	İmza
Üye:	Prof.Dr.Gazi İrez U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı	İmza
Üye:	Prof.Dr.Veysel Turan Yılmaz U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı	İmza
Üye:	Prof.Dr.Rahmi Bilaloğlu U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı	İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof.Dr.Kadri ARSLAN

Enstitü Müdürü

.../.../.....



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİYOGLOBİN TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ YÜZEY
PLAZMON REZONANS BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI

BİLGEN OSMAN

Prof.Dr.Necati BEŞİRLİ
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA 2011
Her hakkı saklıdır

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada ;

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

beyan ederim.

31/05/2011

İmza

Bilgen OSMAN

ÖZET

Doktora tezi

MİYOGLOBİN TAYİNİNE YÖNELİK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON REZONANS BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI

Bilgen OSMAN

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Necati Beşirli

2. Danışman: Prof.Dr.Adil Denizli

Bu çalışmada, moleküler baskılama tekniğinin yeni bir yaklaşımı olan mikro-temas baskılama yöntemi kullanılarak yüzey plazmon rezonans (SPR) miyogloblin sensör hazırlandı. Bu amaçla SPR çip yüzeyinde miyogloblin tanıma bölgelerine sahip poli(hidroksietil metakrilat- metakriloil-amidotriptofan metil ester) [poli(HEMA-MATrp)] polimeri ince bir film halinde sentezlendi. Fonksiyonel monomer olarak metakriloil-amidotriptofan metil ester (MATrp) kullanıldı ve metakriloil klorür ile L-triptofan metil esterin reaksiyonu ile sentezlendi. MATrp monomerinin karakterizasyonunda FTIR ve NMR teknikleri kullanıldı. Baskılanmış poli(HEMA-MATrp) film miyogloblinin varlığında MATrp, hidroksietil metakrilat (HEMA) ve etilen glikol dimetakrilatın (EGDMA) polimerizasyonu ile hazırlandı. Kontrol deneyleri için baskılanmamış poli(HEMA-MATrp), kalıp molekül miyogloblin olmadan sentezlendi. Poli(HEMA-MATrp) filmin hazırlanmasında kullanılan modifiye altın ve cam yüzeyleri ile miyogloblin baskılanmış film; FTIR, temas açısı ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) teknikleri kullanılarak karakterize edildi. Ayrıca hazırlanan filmin kalınlığı elipsometri yöntemiyle ölçüldü. Hazırlanan sensörün etkinliği SPR sistemi kullanılarak araştırıldı. Optimum polimerizasyon koşullarının belirlenmesinden sonra baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensörün miyogloblin tayin duyarlılığı, miyogloblin çözeltileri (pH 7,4 fosfat tamponunda) ve kalp krizi geçiren hasta plazması kullanılarak araştırıldı. Plazma örneklerindeki miyogloblin derişimi ELISA yöntemi ile kıyaslandığında % 66 doğrulukla belirlendi. Farklı derişimdeki miyogloblin çözeltileri ile elde edilen veriler adsorpsiyon kinetiğinin belirlenmesinde kullanıldı. Langmuir adsorpsiyon modelinin, bu afinite sistemi için en uygun model olarak bulundu. Tayin limiti 87,6 ng/mL olarak belirlendi. Miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün seçiciliğini göstermek için miyogloblin, lizozim, sitokrom c ve sığır serum albumininin (BSA) yarışmalı adsorpsiyonu araştırıldı. Elde edilen sonuçlar, baskılanmış sensörün miyogloblin için yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Moleküler baskılama, yüzey plazmon rezonans, miyogloblin, biyosensör

2011, xiii + 210 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

DEVELOPMENT OF MOLECULAR IMPRINTED SURFACE PLASMON RESONANCE BIOSENSOR FOR MYOGLOBIN DETERMINATION

Bilgen OSMAN

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Necati Beşirli
2nd Supervisor: Prof.Dr.Adil Denizli

In this study, surface plasmon resonance (SPR) myoglobin sensor was prepared by using micro-contact imprinting method, a new approach of molecular imprinting. For this purpose, poly(hydroxyethyl methacrylate- methacryloyl-amidotryptophane methyl ester) [poly(HEMA-MATrp)] was synthesized on surface of SPR chip as a thin film. Methacryloyl-amidotryptophane methyl ester (MATrp) was used as functional monomer and synthesized with reaction between methacryloyl chloride and L-tryptophane methyl ester. Characterization of MATrp was made by FTIR and NMR techniques. Imprinted film was prepared with polymerization of MATrp, hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and ethyleneglycol dimethacrylate (EGDMA) in the presence of myoglobin. Non-imprinted poly(HEMA-MATrp) was also synthesized without myoglobin for control experiments. Modified gold and glass surfaces which were used in the preparation of poly (HEMA-MATrp) film and myoglobin imprinted film were characterized with FTIR, contact angle, atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). In addition, the thickness of the film was measured with ellipsometry. The effectiveness of sensor was investigated by using SPR system. After the determination of optimal polymerization conditions, myoglobin sensing ability of imprinted and non-imprinted sensors were determined with myoglobin solutions (in pH 7,4 phosphate buffer) and in the plasma taken from a patient with myocardial infarction. Compared with the ELISA method, myoglobin concentration in the sample was determined 66% accuracy. Myoglobin solutions with different concentrations were used to determine the adsorption kinetics. Langmuir adsorption model was found as the most suitable model for this affinity system. The detection limit was found as 87,6 ng/mL. In order to show the selectivity of the myoglobin imprinted poly(HEMA-MATrp) sensor, competitive adsorption of myoglobin, lysozyme, cytochrome c and bovine serum albumin (BSA) was investigated. The results show that the imprinted sensor has high selectivity and sensitivity for myoglobin.

Key words: Molecular imprinting, surface plasmon resonance, myoglobin, biosensor
2011, xiii + 210 pages

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bana her türlü imkanı sağlayan, hiçbir desteğini esirgemeyen ve en önemlisi bana güvenen danışman hocam Sayın Prof.Dr. Necati Beşirli'ye teşekkür ederim. Her zaman ve her konuda beni destekleyen ve ufkumu açan yardımcı danışman hocam Sayın Prof.Dr.Adil Denizli'ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Araş.Gör.Dr.Hasene Mutlu, Araş.Gör Yeliz Faturacı ve Araş.Gör.Dr.Elif Tümay ÖZER başta olmak üzere tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma bana verdikleri bilimsel destek ve güzel dostlukları için teşekkürü borç bilirim. Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri Erkut Yılmaz ve Gülsu Şener'e yardımları için teşekkürler. Beni her zaman anlayışla karşılayan eşim Dr. Erdinç Osman'a, her zaman ayakta durmamı sağlayan en değerli varlığım annem Melahat Civan'a, ve zamanlarını çaldığım biricik yavrularım Beril ve Orkun Osman'a sonsuz sevgilerimi sunuyorum.

Bilgen OSMAN

30.05.2011

SİMGELER ve KISALTMALAR

Kısaltmalar

MIP	Moleküler Baskılanmış Polimerler
QCM	Quartz Kristal Mikroterazi
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
CK	Kreatin Kinaz
CK-MB	Kreatin Kinaz İzoenzim Miyokardial Band
MATrp	Metakriloil-Amidotriptofan Metil Ester
AAm	Akrilamid
BisA	Bisakrilamid
MAA	Metakrilik Asit
BSA	Sığır Serum Albumini
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
APTES	3-Aminopropil-trietoksisilan
HEMA	Hidroksietil Metakrilat
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
VBIDA	N-(4-vinil-benzil) İminodiasetik Asit
RNAase	Ribonükleaz A
ABPA	3-Aminofenil Boronik Asit
CD	Sirküler Dikroizm
HSA	İnsan Serum Albumini
TEGDMA	Tetraetilen Glikol Dimetakrilat
MMA	Metil Metakrilat
RIA	Radyoimmünoassay
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Assay
IAA	İmmünoaglutinasyon Assay
FIA	Flüoresans İmmünoassay
ATR	Toplam İç Yansıma
GM1	Gangliozid GM1
NAD ⁺	β-nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP ⁺	β-nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
T-SPR	Transmisyon Yüzey Plazmon Rezonans Spektroskopisi
DPDPE	δ-Opiod G-Protein Bağlı Reseptör Anagonisti
MI	Miyokardiyal İnfarktüs
ACE	Anjiyotensin-Dönüştürücü Enzim
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
SAM	Self-Assembled Monolayer
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1.2.1.	Antibadi-antijen arasında gerçekleşen tanıma	8
Şekil 2.1.1.2.2.	Antijenlerin antibadilerin bağlanma bölgesindeki uygun (a) boşluklara (b) yarıklara ya da (c) yüzeylere bağlanması	9
Şekil 2.1.2.1.	Moleküler baskılama metodunun şematik gösterimi	11
Şekil 2.1.3.1.	(a) Kovalent olmayan (b) Kovalent moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi	13
Şekil 2.1.3.2.	Kovalent olmayan baskılamada kullanılan bazı fonksiyonel monomerler	17
Şekil 2.1.3.3.	Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar	19
Şekil 2.1.3.4.	Moleküler baskılamada kullanılan başlatıcılar	21
Şekil 2.1.4.1.2.1.	Epitop yaklaşımının şematik gösterimi	31
Şekil 2.1.4.1.2.2.	Protein baskılanmış film kullanarak epitop baskılama (a) Cam modifikasyon ve peptid bağlama metodu (b) MIP oluşumunun gösterimi (c) C-terminal peptid sekansı baskılanmış yüzeyde için öngörülen tanıma mekanizması	32
Şekil 2.1.4.1.3.1.	Yüzey baskılanmış nanotellerin hazırlanmasına ait şematik gösterim	35
Şekil 2.1.4.1.3.2.	Protein immobilizasyonunun şematik gösterimi	36
Şekil 2.1.4.1.3.3.	Kristal lizozim kullanılarak yüzey plazmon rezonans çip yüzeyinde baskılanmış polimer hazırlanması	40
Şekil 2.1.4.1.3.4.	Mikrotemas baskılama yönteminin şematik gösterimi	41
Şekil 2.1.5.1.	Bir biyosensörün yapısı ve bileşenleri	44
Şekil 2.5.1.2.1.	(A) Antibadi temelli sensör (B) MIP temelli biyomimetik sensörün çalışma prensibi	48
Şekil 2.2.1.	Yüzey plazmonlarının uyarılması	52
Şekil 2.2.2.	Sensogram: zamana karşı SPR açısının değişimi	53
Şekil 2.2.1.1.1.	α geliş açısına sahip ışığın kırılma indisleri n_1 ve n_2 olan iki materyalin arayüzeyindeki kırınımı	55
Şekil 2.2.1.3.1.	Yüzey plazmonlarının dağılım eğrileri	58
Şekil 2.1.3.2.	Farklı uyarılma dalga boyları için 46 nm kalınlığındaki gümüş (kesikli) ve altın (kesiksiz) tabaka ile düşük refraktif indeksli taraf su olmak üzere SPR minimumları	59
Şekil 2.2.2.1.	SPR sistemteki 3 ana bölümün şematik gösterimi: (1) SPR optik, (2) sıvı sistem, (3) sensör çip	60
Şekil 2.2.2.2.	Yüzey plazmonlarının uyarılmasında kullanılan Kretschmann konfigürasyonu	61
Şekil 2.4.1.	Damardaki aterosklerozun zaman içinde ilerlemesi: (A ve B), önemli darlık oluşturması (C), ve sonunda tıkanarak (D) kalp krizine yol açması	76
Şekil 2.5.1.	Kalp krizinin teşhisinde kullanılan biyomarker proteinler ve serum düzeylerinin zamana göre değişimi	84
Şekil 2.6.1.	İspermeçet Balinası (<i>Physeter catodon</i>) miyoglobininin yapısı	87

Şekil 2.6.2.	Miyoglobinin hidrofobik ve hidrofilik yönlenmelerini gösteren yapı. Hem grubu (turuncu,sarı), proksimal ve distal (sarı) histidinler ve miyogloin ana yapısı.	
	Hidrofobik rezdüler (beyaz) , polar ve yüklü rezidüler (mavi)	87
Şekil 2.6.3.	(a) Hem grubu ve (b) miyoglobin molekülündeki bağlanma	88
Şekil 3.2.3.1.1.1.	Cam slaytların temizlenmesi	91
Şekil 3.2.3.1.2.	(a) Cam yüzeyin APTES ve glutaraldehid ile modifikasyonu (b) Cam yüzeyine miyoglobin bağlanması	94
Şekil 3.2.3.2.1.	GWC SPRImager II sisteminde kullanılan SPRchip™ altın çip	96
Şekil 3.2.3.2.2.	(a) Altın yüzeyinin modifikasyonu (b) Allil gruplarının yönlenmesi	96
Şekil 3.2.4.1.	Yüzey plazmon rezonans çip yüzeyinde polimerik film hazırlanması	97
Şekil 3.2.6.1.1	SPRImager II (GWC Technologies, Madison, ABD) yüzey plazmon rezonans sistemi	100
Şekil 3.2.6.1.2.	SPRImager II sisteminin (a) çalışma ve (b) sensogram oluşturma prensibi	101
Şekil 3.2.6.1.3.	GWC SPRImager II cihazının temel ekipmanları	102
Şekil 3.2.6.1.4.	Örnek hücrenin hazırlanması (a) yüzey plazmon rezonans çipin örnek tutucuya yerleştirilmesi (b) akış hücresinin takılması (c) giriş ve çıkış uçlarının yerleştirilmesi (d) prizma ve akış hücresinin bir araya getirilmesiyle örnek hücrenin hazırlanması	103
Şekil 4.1.1.	MATrp monomerinin sentez reaksiyonu	106
Şekil 4.2.1.1.	Altın yüzeyinde SAM oluşumunun şematik gösterimi	107
Şekil 4.1.2.	MATrp'nin ¹ H-NMR spektrumu	108
Şekil 4.1.3.	MATrp monomerinin FT-IR spektrumu	109
Şekil 4.2.1.2.	Oktadekantiyol kullanılarak hazırlanan altın yüzeye ait IR spektrumu (C-H gerilme bölgesi)	110
Şekil 4.2.1.3.	Allil merkaptan kaplanmış altın çipe ait speküler reflektans FTIR spektrumu (sıyırma açısı 80 ⁰) (a) spektrum (b) 2650-3100 cm ⁻¹ aralığının yakından görünüşü	112
Şekil 4.3.1.	(a) Cam yüzeyin APTES ile modifikasyonu (b) APTES modifiye camın glutaraldehid aktivasyonu (c) Miyoglobinin modifiye cam yüzeyine kovalent olarak bağlanması	116
Şekil 4.3.2.1.	Cam slaytların su ile temas açısı ölçümleri; (a) Asidik pirana ile temizlenmiş cam yüzeyi, (b) APTES ile modifiye edilmiş cam yüzeyi (c) APTES + glutaraldehid ile modifiye edilmiş cam yüzeyi (d) Miyoglobin bağlanmış cam (protein damgası)	120
Şekil 4.3.2.2.	APTES ve glutaraldehid ile modifiye edilmiş cam yüzeyin yarı degen modda alınan AFM görüntüleri (a) yüzey görüntüsü (b) 3D görüntüsü (1 x 1 µm ²)	121
Şekil 4.3.2.3.	Miyoglobin bağlanmış modifiye cam yüzeyin (protein damgası) yarı degen modda alınan AFM görüntüleri (a) yüzey görüntüsü (b) 3D görüntüsü (1 x 1 µm ²)	122

Şekil 4.4.1.1.	Farklı oranlarda MATrp:HEMA:EGDMA içeren polimerizasyon karışımları ile hazırlanan miyoglobın baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) sensörler ile elde edilen $\% \Delta R$ ve baskılama faktörü ($\% \Delta R_{MIP} / \% \Delta R_{NIP}$) değerleri	124
Şekil 4.4.1.2.	1:1:1 mol oranında MATrp:HEMA:EGDMA içeren polimerizasyon karışımları ile hazırlanan miyoglobın baskılanmış (MIP-myö) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) sensör ile 10 000 ng/mL derişimindeki miyoglobın çözeltilerinin etkileştirilmesi sonucu elde edilen sensogramlar	125
Şekil 4.4.1.3.	1:1:3 mol oranında MATrp:HEMA:EGDMA içeren polimerizasyon karışımları ile hazırlanan miyoglobın baskılanmış (MIP-myö) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) sensör ile 10 000 ng/mL derişimindeki miyoglobın çözeltilerinin etkileştirilmesi sonucu elde edilen sensogramlar	125
Şekil 4.4.1.4.	1:1:5 mol oranında MATrp:HEMA:EGDMA içeren polimerizasyon karışımları ile hazırlanan miyoglobın baskılanmış (MIP-myö) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) sensör ile 10 000 ng/mL derişimindeki miyoglobın çözeltilerinin etkileştirilmesi sonucu elde edilen sensogramlar	126
Şekil 4.4.1.5.	1:1:6 mol oranında MATrp:HEMA:EGDMA içeren polimerizasyon karışımları ile hazırlanan miyoglobın baskılanmış (MIP-myö) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) sensör ile 10 000 ng/mL derişimindeki miyoglobın çözeltilerinin etkileştirilmesi sonucu elde edilen sensogramlar	126
Şekil 4.4.2.1.	Poli(HEMA-MATrp) filmin kimyasal yapısı	127
Şekil 4.4.2.2.	Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) filmin FTIR-ATR spektrumu	129
Şekil 4.4.2.3.	Poli(MATrp) ve poli(HEMA-MATrp) filmin FTIR-ATR spektrumu	130
Şekil 4.4.2.4.	Poli(HEMA) ve poli(HEMA-MATrp) filmin FTIR-ATR spektrumu	131
Şekil 4.4.2.5.	Poli(EGDMA) ve poli(HEMA-MATrp) filmin FTIR-ATR spektrumu	132
Şekil 4.4.3.1.	Katı yüzeyinde temas açısının oluşumu	133
Şekil 4.4.3.2.	Su ile temas açısı ölçümleri; (a) altın yüzey, (b) allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey, (c) miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulan altın yüzey (d) miyoglobın baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulan altın yüzey	135

Şekil 4.4.3.3.	Etilen glikol ile temas açısı ölçümleri; (a) altın yüzey, (b) allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey, (c) miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulan altın yüzey, (d) miyoglobın baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulan altın yüzey	136
Şekil 4.4.4.1.	Modifiye edilmemiş altın çipin yarı değen modda alınan AFM görüntüleri (a) yüzey görüntüsü (b) 3D görüntüsü (2 x 2 μm^2)	139
Şekil 4.4.4.2.	Allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çipin yarı değen modda alınan AFM görüntüleri (a) yüzey görüntüsü (b) 3D görüntüsü (2 x 2 μm^2)	140
Şekil 4.4.4.3.	Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulmuş altın çipin yarı değen modda alınan AFM görüntüleri (a) yüzey görüntüsü (b) 3D görüntüsü (5 x 5 μm^2)	141
Şekil 4.4.4.4.	Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulmuş altın çipin yarı değen modda alınan AFM görüntüleri (a) yüzey görüntüsü (b) 3D görüntüsü (2 x 2 μm^2)	142
Şekil 4.5.1.	Miyoglobın çözeltileri ile poli(HEMA-MATrp) sensör arasındaki etkileşimlere ait sensogramlar	144
Şekil 4.4.6.1.	(a) Altın yüzeyi (b) miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) yüzeye ait SEM görüntüleri (c) kesit görüntüsü	145
Şekil 4.5.2.	Miyoglobın derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki	146
Şekil 4.5.3.	100-1000 ng/mL aralığında miyoglobın derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki	147
Şekil 4.6.1.	Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı; (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı	151
Şekil 4.7.1.	Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich	153
Şekil 4.8.1	1000 ng/mL derişiminde miyoglobın, lizozim, sitokrom c ve sığır serum albumini (BSA) proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör arasındaki etkileşimlere ait sensogramlar: (a) Miyoglobın, (b) Lizozim, (c) Sitokrom c, (d) BSA, (e) BSA-Sitokrom c, (f) BSA-Lizozim, (g) BSA-Miyoglobın, (h) Sitokrom c-Miyoglobın, (i) Lizozim-Sitokrom c, (j) Miyoglobın-Lizozim, (k) BSA-Sitokrom c, (l) BSA-Sitokrom c-Miyoglobın, (m) Miyoglobın-Lizozim-Sitokrom c, (n) BSA-Miyoglobın-Lizozim-Sitokrom c	157

Şekil 4.9.1.	1000 ng/mL derişiminde miyogloblin, lizozim, sitokrom c ve sığır serum albumini (BSA) proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile miyogloblin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar: (a) Miyogloblin, (b) Lizozim, (c) Sitokrom c, (d) BSA, (e) BSA-Sitokrom c, (f) BSA-Lizozim, (g) BSA-Miyogloblin, (h) Sitokrom c-Miyogloblin, (ı) Lizozim-Sitokrom c, (j) Miyogloblin-Lizozim, (k) BSA-Sitokrom c, (l) BSA-Sitokrom c-Miyogloblin, (m) Miyogloblin-Lizozim-Sitokrom c, (n) BSA-Miyogloblin-Lizozim-Sitokrom c	165
Şekil 4.10.1.	1000 ng/mL derişimde miyogloblin ile yapılan kinetik analiz ve rejenerasyon	175
Şekil 4.10.2.	Poli(HEMA-MATrp) sensörün tekrar kullanımı	176
Şekil 4.11.1.	Kör örnek ve 300, 500, 700, 900, 1000 ng/mL miyogloblin derişimindeki kan örneklerinin poli(HEMA-MATrp) ile etkileştirilmesi ile elde edilen sensogram	178
Şekil 4.11.2.	Standart katma metodu ile elde edilen miyogloblin derişimi sinyal grafiği	178
Şekil 4.11.3.	Standart katma metodu ile elde edilen miyogloblin derişimi/ % Δ R grafiği	179

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Sensörlerde kullanılan doğal biyomoleküller ile moleküler baskılanmış polimerlerin kıyaslanması	3
Çizelge 2.1.3.1.	Kovalent olmayan baskılamadaki etkileşim türleri ve tahmin edilen bağ enerjileri	14
Çizelge 2.1.5.2.1.	Farklı transdüser prensiplerini kullanan MIP temelli sensör örnekleri	50
Çizelge 2.3.1.1.	MIP temelli SPR sensörlerin analitik karakteristikleri	68
Çizelge 2.5.1.	Miyokardiyal infarktüs tanısında kullanılan biyolojik belirteçler	85
Çizelge 3.2.5.2.1.	Yüzey enerjilerini hesaplamada kullanılan sabitler	98
Çizelge 4.3.1.1.	Cam yüzeylerine ait temas açısı değerleri	117
Çizelge 4.4.1.1.	Farklı oranlarda MATrp:HEMA:EGDMA oranları ile hazırlanan baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensör için elde edilen baskılama faktörü değerleri	124
Çizelge 4.4.3.1.	Altın yüzey, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey, miyoglobine baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) film hazırlanmış altın yüzeylerin su ve etilen glikol ile elde edilen temas açıları ve birim alandaki yüzey enerjileri	142
Çizelge 4.6.1.	Kinetik hız sabitleri	152
Çizelge 4.7.1.	Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri	154
Çizelge 4.8.1.	Kalıp ve yarışmacı proteinlerin molekül ağırlığı, izoelektrik nokta ve moleküler boyutları	156
Çizelge 4.9.1.	Miyoglobine göre BSA, sitokrom c ve lizozim için seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları	173

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1. Moleküler Tanıma	7
2.1.1. Doğal tanıma sistemleri	7
2.1.1.1. Proteinlerde moleküler tanıma	7
2.1.1.2. Bağışıklık sistemde moleküler tanıma	8
2.1.1.3. Sentetik polimerik matrikslerde moleküler tanıma	10
2.1.2. Moleküler baskılama	10
2.1.3. Moleküler baskılanmış polimer hazırlamada kullanılan yaklaşımlar	12
2.1.4. Protein baskılama	22
2.1.4.1. Protein baskılamada kullanılan yaklaşımlar	22
2.1.4.1.1. Kütle (Yığın) polimerizasyonu ile protein baskılama	23
2.1.4.1.1.1. Akriyatlar	23
2.1.4.1.1.2. Hidrojeller	27
2.1.4.1.1.3. Sol-jeller	29
2.1.4.1.2. Epitop yaklaşımı	30
2.1.4.1.3. Yüzey baskılama	32
2.1.5. Biyosensörler	43
2.1.5.1. Moleküler tanıma katmanı	45
2.1.5.1.1. Antiadiler	45
2.1.5.1.2. İmmünosensörlerde kullanılan alternatif tanıma elementleri	46
2.1.5.2. Biyosensörlerde kullanılan transdüserler	49
2.2. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)	51
2.2.1. Yüzey plazmon rezonans olayının teorisi	53
2.2.1.1. Kaybolan dalga	54
2.2.1.2. Yüzey plazmonları	56
2.2.1.3. Yüzey plazmonlarının uyarılması	57
2.2.2. Yüzey plazmon rezonans sistemi	60
2.2.3. Yüzey plazmon rezonans tekniğinin klinik tanı amaçlı kullanımı	62
2.3. Moleküler Baskılanmış Polimerler ve Optik Sensör Uygulamaları	63
2.3.1. MIP temelli yüzey plazmon rezonans sensörler	67
2.4. Kalp Krizi	76
2.4.1. Kalp krizinin nedeni ve belirtileri	77
2.4.2. Kalp krizinin teşhisi ve tedavisi	79
2.4.3. Hastalığın seyri ve önlenmesi	82
2.5. Kalp Krizinin Teşhisinde Kullanılan Biyolojik Belirteçler	82
2.6. Miyoglobin	86
3. MATERYAL ve YÖNTEM	89
3.1. Materyal	89
3.2. Yöntem	90

3.2.1. Metakriloil-amidotriptofan metil ester (MATrp) monomerinin sentezi	90
3.2.2. MATrp monomerinin karakterizasyonu	90
3.2.2.1. FTIR analizi	90
3.2.2.2. NMR analizi	90
3.2.3. Miyogloblin baskılanmış yüzey plazmon rezonans sensörün hazırlanması	91
3.2.3.1. Cam slaytların yüzey modifikasyonu	91
3.2.3.1.1. Cam slaytların temizlenmesi	91
3.2.3.1.2. Protein kalıbının hazırlanması	92
3.2.3.1.3. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi	92
3.2.3.1.4. Temas açısı analizi	95
3.2.3.2. SPR altın çip yüzeylerinin modifikasyonu	95
3.2.3.2.1. Speküler reflektans FTIR analizi	95
3.2.4. SPR çip yüzeyinde poli(HEMA-MATrp) filmin sentezi	96
3.2.5. Poli(HEMA-MATrp) SPR çiplerin yüzey karakterizasyonu	98
3.2.5.1. FTIR-ATR analizi	98
3.2.5.2. Temas açısı analizi	98
3.2.5.3. AFM analizi	99
3.2.5.4. Elipsometre	99
3.2.6. Yüzey plazmon rezonans sistemi ile ölçümler	99
3.2.6.1. SPR sisteminin analiz için hazırlanması	99
3.2.6.2. Yüzey plazmon rezonans sistemi ile sensogram alınması	101
3.2.7. Yüzey plazmon rezonans sistemi ile kinetik analizler	104
3.2.7.1. Yarışmalı kinetik analizler	104
3.2.7.2. Poli(HEMA-MATrp) sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi	104
3.2.8. Kan örneği ile analizler	104
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	106
4.1. MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	106
4.2. Altın Yüzey Modifikasyonunun Karakterizasyonu	107
4.2.1. FTIR analizi	107
4.3. Cam Yüzey Modifikasyonunun Karakterizasyonu	111
4.3.1. Temas açısı analizi	115
4.3.2. AFM analizi	117
4.4. Miyogloblin Baskılanmış Poli(HEMA-MATrp) Sensörün Hazırlanması ve Karakterizasyonu	118
4.4.1. Polimerizasyon karışımının optimizasyonu	123
4.4.2. Poli(HEMA-MATrp) filmin FTIR-ATR analizi	127
4.4.3. Temas açısı analizi	128
4.4.4. AFM analizi	138
4.4.5. Elipsometri analizi	143
4.4.6. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	143
4.5. Miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) SPR sensör ile kinetik analizler	144
4.6. Denge ve Bağlanma Kinetik Analizleri	148
4.7. Denge İzoterm modelleri	152
4.8. Yarışmalı Kinetik Analizler	155
4.9. Poli(HEMA-MATrp) Sensörün Baskılama Seçiciliği	164
4.10. Poli(HEMA-MATrp) SPR Sensörün Tekrar Kullanımı	174
4.11. Kan Örneği ile Kinetik Analizler	176
5. SONUÇ	180

KAYNAKLAR	185
EKLER	202
EK 1	203
EK 2	208
ÖZGEÇMİŞ	210

1.GİRİŞ

Günümüzde tedavisi olmayan, ölümcül ya da nedeni anlaşılamamış bir çok hastalık vardır. Bu hastalıkların çoğunda (alzheimer, diabet, kanser vb.) temel sebep genellikle bilinmemekte veya hastalığın tedavisinin yapılabileceği süre içerisinde belirlenememektedir. Günümüzde hastalıklara neden olan kimyasal mekanizmayı anlamak için erken teşhise olanak verecek olan ve “biomarker” olarak adlandırılan protein ve/veya hormonları belirlemek, tedavi ve aşılarda geliştirmek amacıyla yoğun çaba harcanmaktadır. Canlı organizmada 20 000 kadar gen bulunmakta ve bu genler yaklaşık 150 000 farklı proteini kodlamaktadır. Sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında vücut sıvıları ya da dokularda bazı proteinlerin varlığı, yokluğu veya farklı modifikasyonlarının ortaya çıkması hastalıkların teşhisi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla düşük tayin sınırları olan, biyomolekülleri kompleks karışımlardan (kan, tükürük, idrar vb.) ucuz ve seçici olarak analiz edebilen, ve aynı anda fazla sayıda örneği inceleyebilecek yöntemlere ihtiyaç vardır.

Günümüz laboratuvarlarında biyolojik sıvılarda bulunan bir çok analitin kantitatif tayini antibadi-antijen etkileşimine dayanan immunolojik testler ile yapılmaktadır. Hibridoma hücre teknolojisinin gelişmesiyle monoklonal antibadilerin üretimindeki ilerlemeler ve tayin sistemlerindeki gelişmeler sayesinde yüksek hassasiyete ve seçiciliğe sahip immunolojik testler geliştirilmiştir. Fakat antibadi üretiminde hayvanların kullanılması bazı alanlarda endişe ile karşılanmakta alternatif yöntemlerin geliştirilmesi için çaba harcanmaktadır.

Antibadilere dayanan testler kullanılan biyolojik tanıma elementleri nedeniyle bazı temel sınırlamalara sahiptir. Kimyasal ve fiziksel olarak dayanıksız olmaları nedeniyle antibadilerin depolanma süreleri sınırlıdır. Daha da ötesi küçük molekül olması durumunda bağışıklık cevabın alınabilmesi için antijen kendisi immunojenik olmadığından taşıyıcı haptene bir kalıntının eklenmesi gerekmektedir. Seçilen haptene göre immunizasyon işlemi farklı özellik ve afinitede antibadilerin oluşmasına neden olmaktadır. Daha kararlı antibadilerin geliştirilmesi için bir çok çalışma (antibadi

fragmentleri, rekombinant antibadiler v.b) yapılmasına rağmen mevcut teknikler zaman ve maliyet açısından yeterli değildir (Nathalie ve ark. 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile hedef moleküllere biyolojik karşılığı olan moleküller ile aynı afinite ve seçicilikle bağlanabilen moleküler baskılanmış polimerler (MIP) hazırlanabilmektedir. Moleküler baskılanmış polimerler kararlı ve sağlamdır. Hedef molekülü tanıma kapasiteleri asitler, bazlar, organik çözücüler ile muameleden ya da sıcaklık değişimlerinden etkilenmemektedir. Bu benzersiz fiziksel ve kimyasal kararlılıkları moleküler baskılanmış polimerlerin, antibadilerin kullanılmadığı bir çok durumda kullanımına olanak sağlamaktadır.

Moleküler baskılanmış polimerlerin immuno tayinlerde kullanılan biyolojik antibadilere göre birçok avantajı vardır:

- 1) Küçük moleküller için antibadi seçmek ve üretmek zordur. (Antibadiler inokülasyondan önce taşıyıcı bir protein üzerine bağlanmalıdır). Ancak bu tür moleküller moleküler baskılama için en uygun bileşiklerdir.
- 2) Yüksek toksisiteye sahip bileşikler ya da immunolojik baskılayıcılar için doğal bir antibadinin elde edilmesi çok zordur. Fakat moleküler baskılamada bu tür analitler için herhangi bir sorun yoktur.
- 3) Bazı durumlarda su yerine organik çözücülerde çalışmak gerekebilir. Antibadiler böyle durumlarda kullanılamaz, fakat moleküler baskılanmış polimerler genellikle sulu çözeltilerden çok organik çözücülerde çok daha iyi sonuçlar verir.
- 4) Moleküler baskılanmış polimerler biyolojik moleküller olan antibadiler ile karşılaştırıldığında çok daha kararlıdır.
- 5) Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanması sırasında hayvan kullanmaya gerek yoktur.

Kütle polimerizasyonu ile monolitik malzemelerin hazırlanması küçük moleküllerin baskılanmasında temel dayanak noktası olmasına rağmen büyük makromoleküller için uygun değildir. Bu durumda en çok kullanılan yaklaşım baskılanmış filmleri doğrudan quartz kristal mikroterazi (QCM) ya da yüzey plazmon rezonans (SPR) gibi sensör yüzeylerinde oluşturmaktır. Baskılanmış ince film doğası gereği yüksek spesifik yüzey

alanına sahiptir. Bu nedenle kütle aktarımı veya protein kalıbın polimerik yapıda hapsedilmesi gibi sorunları ortadan kalkmaktadır. Sensör yüzeyinde moleküler tanıma bölgelerine sahip ince moleküler baskılanmış polimerler sensörlerde kullanılan kararsız biyolojik tanıma elementleri ile karşılaştırıldığında pek çok avantaja sahiptir. Çizelge 1.1‘de sensörlerde kullanılan doğal biyomoleküller ile moleküler baskılanmış polimerler karşılaştırılmıştır (Piletsky ve ark. 2006).

Çizelge 1.1. Sensörlerde kullanılan doğal biyomoleküller ile moleküler baskılanmış polimerlerin karşılaştırılması

Doğal biyomoleküller	MIP
Kararsızdır	Yüksek ve düşük pH'lara, basınca ve sıcaklığa dayanıklıdır
Enzim ve reseptörler pahalıdır	Ucuz ve kolayca hazırlanabilir
Sulu ortamlar dışında performansı kötüdür	Organik çözücülerde de kullanılabilir
Her biyomolekülün kullanım şartları farklıdır (pH, iyonik şiddet, sıcaklık ve substrat)	Kullanım sınırları daha geniş olduğundan MIP temelli sensörlerin hazırlanması daha kolaydır
Doğal reseptör ve enzimler sadece sınırlı sayıdaki bileşik için mevcuttur	Prensipite her bileşik için MIP hazırlanabilir
Mikroleşme teknolojisi ve minyatürizasyon için çok uygun değildir.	Polimerler mikroleşme teknolojisi için çok uygundur ve tekrar tekrar kullanılabilir.

Kalp-damar hastalıkları, tüm dünyadaki ölümlerin birinci derecede nedenidir. Günümüzde dünya nüfusunun % 25'i kalp damar hastalıklarından etkilenmektedir. Kalp hastalığı, kanserlerden (meme, akciğer, prostat, bağırsak) ve diğer bulaşıcı hastalıkların tümünden daha fazla insanın hayatını kaybetmesine neden olmaktadır.

Kalp krizi kalp kasının kansız ve oksijensiz kalması durumunda ortaya çıkmaktadır. Eğer hemen tedavi edilmezse kalp kasının etkilenmiş olan bölgesi ölmeye başlar ve bu da insan vücudunda ciddi komplikasyonlara ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Kalp krizi geçiren bir kişi hayatta kalırsa kalp kasının zarar gören bölgesi skar dokusu ile yer

değiştirir ve bu da kalbin pompalama kapasitesini azaltır ve sonuç olarak kalp yetmezliği ve diğer komplikasyonlar ortaya çıkabilir. Kalp krizi için etkili tedavi yöntemleri mevcuttur ve bu yöntemler ani ölümleri ve uzun süreli komplikasyonları önlemeye yöneliktir. En fazla yararı sağlayabilmek için bu tedaviler kalp krizi semptomlarının başlamasını takip eden 1 saat içinde uygulanmalıdır. Hızlı hareket etmek hayat kurtarır ve kalbin göreceği hasarı azaltır.

Kalp hücreleri hasar görmeye başladığı zaman kan dolaşımına farklı enzimler ve moleküller bırakırlar. Bu tür maddelerin kandaki ve idrardaki düzeylerinin artması ciddi göğüs ağrısı olan hastalarda kalp krizi olup olmadığının belirlenmesini sağlayarak tedavi stratejisinin belirlenmesine yardımcı olur. Kalp krizinin teşhisinde kullanılan markerler troponinler, kreatin kinaz (CK), kreatin kinaz izoenzim miyokardial band (CK-MB) ve miyoglobindir. Miyoglobin hemen hemen bütün memelilerde, başlıca kas dokusunda bulunan nispeten basit bir oksijen bağlayan proteindir. Bir molekül hem ve 153 aminoasit kalıntısı içeren tek bir polipeptittir. Küçük boyutları nedeniyle (17,6 kDa) miyokardiyal infarktüsün gerçekleştiği ilk 1 saat içerisinde kandaki düzeyi artar ve 3-15 saat arası bu düzeyini korur (Christenson ve Azzazy 1998). 24 saat içerisinde serum miyoglobin düzeyi normal düzeye döner (Brogan ve ark. 1994). Göğüs ağrısı başladığında ve ağrı başladıktan sonraki birkaç saat içerisinde miyoglobinin hassasiyeti CK, CK-MB ve troponinlerden (T ve I) daha yüksektir (Kilpatrick ve ark. 1993).

Miyoglobin düzeyi aynı zamanda iskelet kası harabiyetleri ve kas erimesi (masküler distrofi) ve polimiyozitis gibi kas hastalıklarında da yükselir. Miyoglobinin fazla miktarda bulunması böbrekler için toksik etki yapar. Kanda çok fazla miktarda miyoglobini bulunan bir kişide böbrek yetmezliği nedeniyle miyoglobinin tam olarak uzaklaştırılmaması söz konusudur. Bu nedenle kandaki miyoglobin düzeyinin izlenmesi böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi açısından da önemlidir.

Bu tezde, moleküler baskılama tekniğinin yeni bir yaklaşımı olan mikrotemas baskılama yöntemi kullanılarak mevcut yöntemlere alternatif kanda miyoglobin tayinine olanak sağlayacak moleküler baskılanmış poli(hidroksietil metakrilat-metakriloil-amidotriptofan metil ester) [poli(HEMA-MATrp)] yüzey plazmon rezonans sensörü hazırlanmıştır. Fonksiyonel monomer olarak metakriloil-amidotriptofan metil ester

(MATrp) kullanılarak SPR çiplerin yüzeyinde miyogloblin tanıma bölgeleri oluşturulmuş ve polimerik film FT-IR, AFM, SEM ve temas açısı analizleri ile karakterize edilmiştir. Hazırlanan sensörün etkinliği GWC SPRImagerII yüzey plazmon rezonans sistemi kullanılarak hem sulu çözeltiler ile hem de kardiyak hastalardan alınan plazma örneği ile yapılan kinetik analizler ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar , günümüz laboratuvarlarında kullanılan enzim bağı immunosorbent assay (ELISA) tayin kitleri ile karşılaştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Doğada moleküler tanıma iki farklı molekül üzerinde yer alan fonksiyonel gruplar arasındaki spesifik etkileşimler ile gerçekleşmektedir. Moleküler tanımda hedef molekül liganda, yapı olarak hedef moleküle benzeyen yüzlerce molekül arasından seçici olarak bağlanabilmektedir. Örneğin, enzimlerin ligand moleküllerine bağlanması spesifik amino asitler ile gerçekleşir. Ligand bağlanma bölgesindeki amino asit dizilişi hedef molekül ile hem kimyasal fonksiyonellik hem de üç boyutlu yapı olarak tam bir uyum içerisindedir. Doğadan alınan ipuçları ile doğada gerçekleşen bu moleküler tanıma olayı sentetik polimerler kullanılarak taklit edilebilir. Çünkü fonksiyonel yapılar polimer yapısına dahil edilebilir ve doğada gerçekleşen bir ligand hedef molekül etkileşimi gerçekleştirilebilir. Aynı zamanda bu etkileşimler polimer yapısında çapraz bağlanma ile sabitleştirilerek üç boyutlu bir tanıma bölgesi elde edilebilir. Bu sayede hedef moleküle yüksek seçicilikle bağlanabilen biyomimetik bir polimer yapısı elde edilebilir. Belirlenen hedef molekülleri tanıyabilen tamamen sentetik bir sistem birçok uygulamada güçlü bir tayin aracı olarak kullanılabilir. Örneğin, böyle bir sistem kanda istenmeyen analitler olan kolesterol ya da virüsleri hedef alabilir. Bu sentetik yapı istenmeyen moleküllere spesifik olarak bağlanarak kan dolaşımından uzaklaştırabilir ve yapay bir ilaç gibi hareket ederek hastalığı tedavi edebilir.

İlave olarak biyomimetik polimer, tanıma elementi olarak tedavi edici bir aletin yapısına ilave edilebilir. Bu teknolojinin kullanılabileceği diğer bir alan ise ilaç salınım sistemleridir. Bunun yanında analit düzeylerini izlemek ya da hastalık teşhisinde hassas testler geliştirerek biyosensör hazırlamada kullanılabilir.

Biyomimetik tanıyıcı sistemler tasarlanırken dikkat edilmesi gereken en önemli hususlar şöyle sıralanabilir:

- 1) Polimer yapısında yer alan monomer ve hedef molekül arasında oluşan etkileşim kararlı olmalıdır ve polimer hedef molekülü benzer yapıdaki moleküller arasından seçici olarak tanımalıdır.

- 2) Biyomimetik sistem biyolojik ortamlarda kullanılacağından polimerik yapı kompleks çözeltilerde tanıma yeteneğini sürdürebilmelidir.
- 3) Hedef molekül polimerik yapıya hızlı bir şekilde difüze olabilmelidir.
- 4) Tanıma özelliğine sahip polimerlerin kullanılabilceği uygun platformlar belirlenmelidir.

2.1. Moleküler Tanıma

Bir molekülün hedef molekülü benzer yapıdaki moleküller arasından seçici olarak tanıyıp bağlanmasında biyolojik ve kimyasal süreçler esastır. Moleküler tanıma ancak iki molekülün geometrik ve kimyasal olarak uyumlu olduğu yani üç boyutlu yapı olarak birbirini tamamladığı, hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler ve zayıf metal koordinasyonu gibi kovalent olmayan etkileşimler ile bağlandığı zaman gerçekleşir (Chen ve ark. 2002). Bu sürece örnek olarak enzimin substrata bağlanması (Tulinsky 1996), ilacın biyolojik bir hedefe bağlanması (Cudic ve ark. 2002, Britschgi ve ark. 2003), bağışıklık sistemindeki antijen-antikör bağlanması (Jimenez ve ark. 2003, Sundberg ve Mariuzza 2003) ve DNA kalıplarından mRNA oluşması verilebilir (Gitlin ve ark. 1988). Moleküler tanıma tüm yaşam olaylarında gerçekleşen temel süreçtir.

2.1.1. Doğal tanıma sistemleri

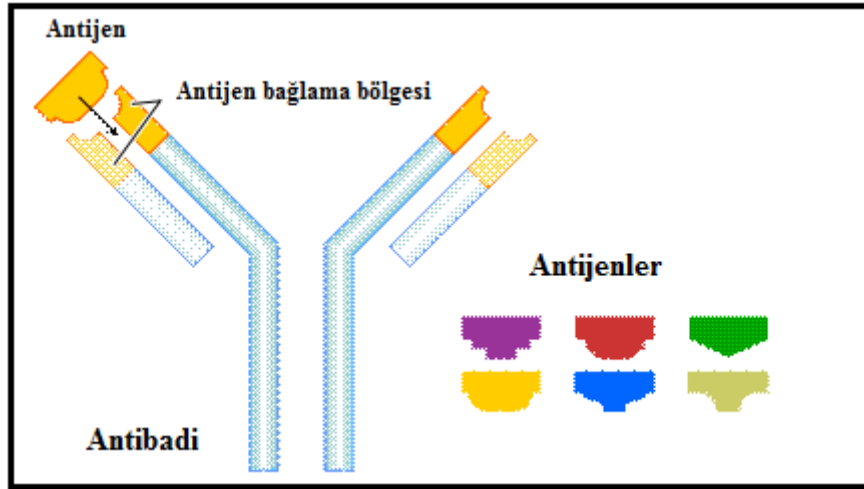
2.1.1.1. Proteinlerde moleküler tanıma

Proteinler uzun ve dallanmamış aminoasit zincirleri içeren heteropolimerlerdir. İnsan vücudunda yer alan birçok protein 200-300 civarında aminoasit içerir. Canlı yapısında bulunan tüm sistemin çalışmasında proteinler ve proteinlerin bu sistemleri entegre etmek amacıyla diğer molekülleri nasıl tanıdığı esastır. Kas-iskelet hareketleri, sindirimde enzim katalizi, hücre ve dokulara tedavi edici ilaçların alınması, proteinin moleküler tanınmasının esas olduğu olaylara örnek olarak verilebilir. En iyi karakterize edilmiş protein moleküler tanıma olayı avidin-biyotin arasında gerçekleşir. Avidin dört adet alt birime sahip tetramerik bir glikoprotein olup molekül ağırlığı yaklaşık 66 000 daltondur. Aynı zamanda H vitamini olarak bilinen biyotin ise her hücrede bulunan bir

moleküldür. Avidin yapısındaki bulunan dört tetramerik bölgenin her biri spesifik olarak bir biyotin molekülüne bağlanır. Bu bağlanma doğada gerçekleşen en güçlü non-kovalent etkileşimdir ($K_A=10^{15}M^{-1}$), (Pugliese ve ark. 1993). Avidin yapısında yer alan lizin ve triptofan kalıntılarının (özellikle Trp70, Trp 110, Lys 46 ve Lys 94) biyotin yapısında bulunan karboksil grupları ile güçlü bir etkileşime girdiği düşünülmektedir (Gitlin ve ark. 1987). Avidin-biyotin kompleksini kovalent olmayan etkileşimlere dayanan tanıma sistemlerinde en çok çalışılan etkileşim haline getiren de bu moleküllerin birbirine olan yüksek afinitesi, yapısal ve kimyasal uyumudur.

2.1.1.2. Bağışıklık sisteminde moleküler tanıma

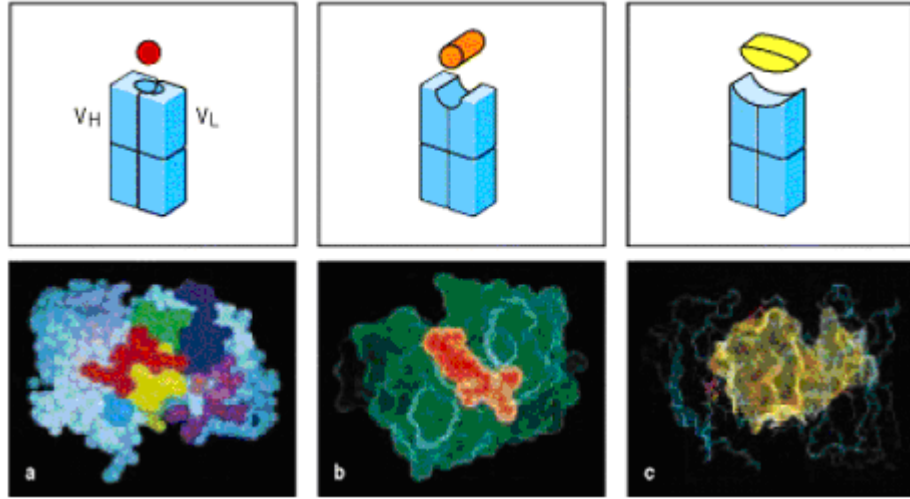
Moleküler tanımanın gerçekleştiği diğer bir olay da bağışıklık sisteminde gerçekleşen antijen-antikor etkileşimidir. Antibadiler kan dolaşımındaki yabancı maddeleri tanıyıp bağlayabilen spesifik bağlanma bölgeleri içeren globüler proteinlerdir. Antijen olarak adlandırılan yabancı maddeler basit bir protein ya da büyük bir bakteri, virüs olabilir.



Şekil 2.1.1.2.1. Antibadi-antijen arasında gerçekleşen tanıma

Antibadiler ağır zincir (55 kDa) olarak adlandırılan iki eş polipeptid içeren lineer amino asit sarmalları ve hafif zincir olarak adlandırılan, “Y” yapısını oluşturmak üzere disülfid bağlarıyla bağlanmış olan iki eş polipeptid zincirinden (25 kDa) oluşur. Zincirlerin N-terminal ucunda, antijenlerin epitop olarak adlandırılan özel bir bölgesini tanıyabilen

değişken bir amino asit dizisi yer alır. Tanımayı sağlayan sadece aminoasit dizisi değil, ağır ve hafif zincirler tarafından oluşturulmuş olan bağlanma bölgesinin oryantasyonudur (Şekil 2.1.1.2.1).



Şekil 2.1.1.2.2. Antijenlerin antبادilerin bağlanma bölgesindeki uygun (a) boşluklara (b) yarıklara ya da (c) yüzeylere bağlanması (Bergman 2005)

Bir antijenin epitopu ile antبادinin değişken bölgesi arasındaki etkileşim (Şekil 2.1.1.2.2) elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik kuvvetler ya da tüm bu kovalent olmayan etkileşimlerin ortak etkisi ile gerçekleşir.

Bağışıklık sisteminin çalışabilmesi için antبادiler çok fazla sayıda farklı molekülü tanımak zorundadır. Amino asit dizilişlerindeki farklılık ve esneklik sayesinde çok fazla sayıda olası kimyasal hedef molekül tanınabilmektedir. Bazı araştırmacılar, insan bağışıklık sisteminin 10^7 ile 10^9 farklı antبادi yapısına sahip olduğunu tahmin etmektedir. Birçok araştırmacı epitop bağlanmasını örnek olarak hastalıkların tedavisi için yapay antبادilerin hazırlanması için çaba harcamaktadır (Rachkov ve Minoura 2001). Haupt ve Mosbach (1998), Vlatakis ve ark. (1993) yaptıkları çalışmalarda bu yapay antبادileri, enzim inhibitörleri olarak potansiyel yeni ilaçlar için kütüphane oluşturulmasında ve protein bağlanmasında hedef moleküllerin belirlenmesinde kullanmaktadırlar.

2.1.1.3. Sentetik polimerik matrikslerde moleküler tanıma

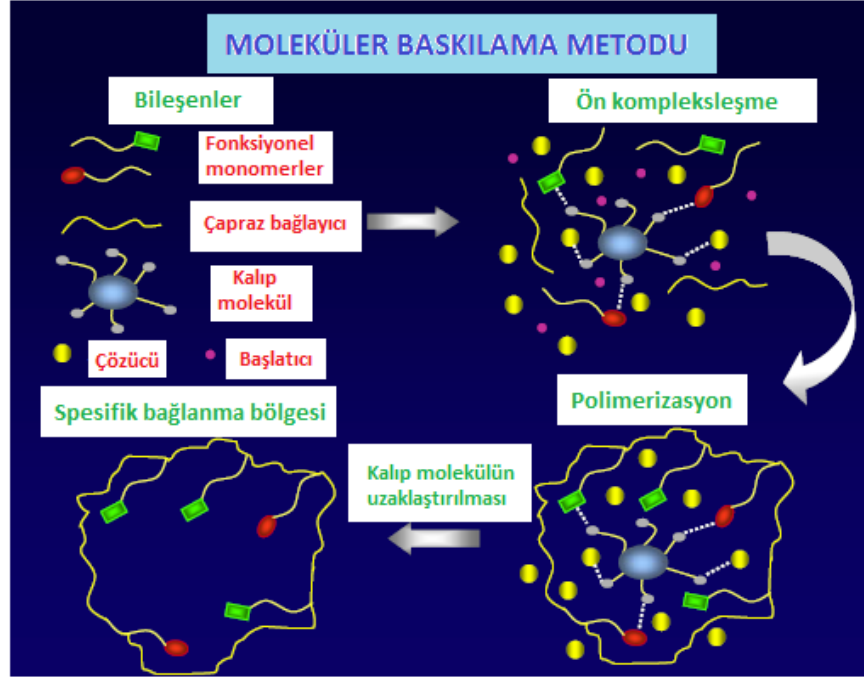
Protein kimyasındaki ilerlemeler ve protein tanıma olayının aydınlatılması ile araştırmacılar hedef moleküle spesifik olarak bağlanan tamamen sentetik polimer malzemeler hazırlamak amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Bu tür malzemeler katı faz ekstraksiyonundan kromatografik kolon dolgu maddesine ve kontrollü ilaç salınımına kadar birçok farklı potansiyel kullanım alanına sahiptir. Günümüzde bu polimerlerin çoğu hedef molekülün varlığında hazırlanmaktadır. Bunun amacı hedef molekülün tanınabilmesi ve dolayısıyla biyolojik tanımanın taklit edilebilmesi için hedef molekülün kimyasal fonksiyonelliğinin ve üç boyutlu yapısının sentetik matriksin hafızasına alınmasını sağlamaktır. Sentetik yapılarda çok sayıda farklı fonksiyonel özelliği yapıya kazandırmak ve mekanik kararlılığı sağlamak mümkündür.

2.1.2. Moleküler baskılama

Moleküler baskılama fikri Nobel ödülü sahibi olan Linus Pauling'in antibadi oluşumuna ilişkin teorilerinden ilham alınarak ortaya çıkmıştır. (Ansell ve ark. 1996, Mosbach ve Ramstrom 1996). Pauling antibadilerin denatüre protein gibi davrandığını, hidrojen bağı içermediğini ve zincirlerinin serbestçe hareket edebildiğini varsaymıştır. Antijen ile karşılaştığında "moleküler tamamlama" adını verdiği olay gerçekleşmekte ve antijenin kimyasal yapısında yer alan fonksiyonel gruplar antibadideki aminoasitler ile etkileşmektedir. Bu sayede antibadi antijenin yapısını hafızasına almaktadır (Pauling 1940). Daha sonra bu hipotezin yanlış olduğu kanıtlanmış fakat serbest halde hareket eden polimer zincirlerinin bir molekül etrafında tamamlayıcı bir şekilde organize olabileceği fikri moleküler baskılama olayı için ilham kaynağı olmuştur.

Doğada gerçekleşen bağışıklık yanıtı, ligand-reseptör etkileşimi ve enzim katalizi gibi bir çok biyolojik olaydaki moleküler tanıma olayını temel alan araştırmacılar daha iyi, daha seçici ve hassas analitik çalışmalar yapabilmek için doğada gerçekleşen bu spesifik tanıma olayını sentetik reseptörler hazırlamak için kullanarak "moleküler baskılama" olarak bilinen yeni bir alanın doğmasına neden olmuştur.

Moleküler baskılama kalıp molekül etrafında fonksiyonel monomerlerin organize olması ve çapraz bağlayıcı ilavesiyle polimerizasyonun gerçekleştirilmesi sonucunda, şekil ve boyut olarak kalıp moleküle özgü bağlanma bölgeleri içeren yeni bir malzemenin elde edilmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 2.1.2.1).



Şekil 2.1.2.1. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır:

- (1) Ön kompleksleşme
- (2) Polimerizasyon
- (3) Kalıp (hedef) molekülün uzaklaştırılması

Ön kompleksleşme aşamasında kalıp molekül (küçük bir molekül, biyolojik bir makromolekül ya da bir mikroorganizma) tamamlayıcı fonksiyonel gruplar içeren ve polimerleşebilen bir monomer ile tersinir kovalent bağ(lar), elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları, Van der Waals etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler ya da bir metal ile koordinasyon bağı oluşturmak suretiyle etkileşir. Ön polimerizasyon karışımına (kalıp molekül-monomer kompleksi) bir çapraz bağlayıcı, bir başlatıcı ve analitin spesifik

bağlanma bölgelerine kolayca ulaşmasını sağlayacak olan gözenekleri oluşturacak bir gözenek yapıcı (porojen) ilave edilir.

Polimerizasyon aşamasında monomer kalıp kompleksi, kullanılan kalıp molekülün karakteristik özelliklerine de bağlı olarak ısı ya da düşük sıcaklıkta fotokimyasal olarak polimerleştirilir.

Monomer ve çapraz bağlayıcı molekülleri arasında kimyasal bağların oluşmasından dolayı polimerizasyon gerçekleştirildiğinde kalıp molekül etrafında fonksiyonel monomerlerin pozisyonu sabitlenir. Son aşamada kalıp molekülün uzaklaştırılması ile şekil, boyut ve fonksiyonel grup bakımından kalıp moleküle özgü bağlanma bölgeleri içeren üç boyutlu bir polimerik yapı hazırlanmış olur. Diğer bir deyişle baskılanmış molekülün sterik ve kimyasal bilgisi polimer yapısına aktarılır.

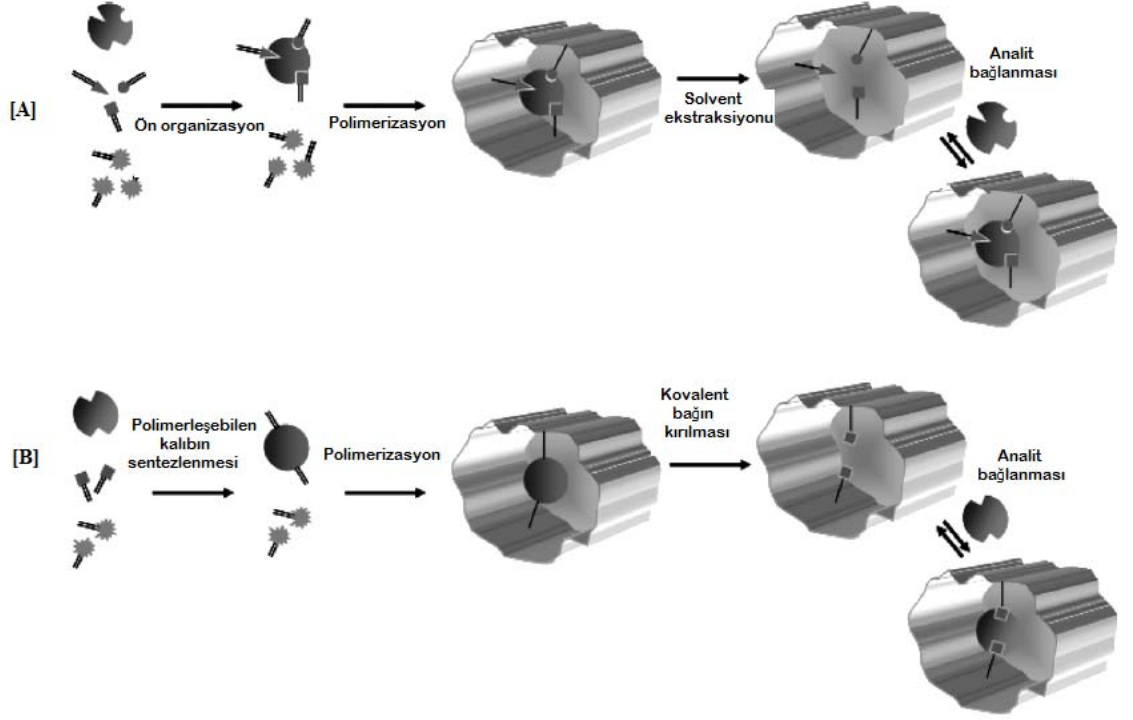
Bu teknik basit ve ucuz olup, elde edilen moleküler baskılanmış polimerler yüksek seçicilikte, mükemmel mekanik kuvvette, sıcaklık, asidik ve bazik koşullar ile organik çözücülere dayanıklıdır. Bu yöntem katı faz ekstraksiyonu (Tamayo ve ark. 2007), sıvı kromatografisi (Sellergren 2001) , ilaç salınım sistemleri (Cunliffe ve ark. 2005), kapiler elektroforez ve elektrokromatografi (Turiel ve Martin-Esteban 2005), enzim benzeri kataliz (Hall ve ark. 2005) veya sensör geliştirilmesi (Ye ve Haupt 2004a) gibi alanlarda geniş çapta kullanılmaktadır.

2.1.3. Moleküler baskılanmış polimer hazırlamada kullanılan yaklaşımlar

Bugüne kadar moleküler baskılamada geliştirilmiş olan iki farklı yaklaşım kovalent ve kovalent olmayan baskılamadır (Şekil 2.1.3.1).

Kovalent yaklaşım 1972 yılında Günter Wulff ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Wulff ve Sahran 1972). Kovalent baskılamada kalıp molekül polimerleşebilen bir fonksiyonel monomere (boronat ester, ketal ve asetal ya da schiff bazları) kovalent olarak bağlanır. Bir çapraz bağlayıcı kullanılarak gerçekleştirilen kopolimerizasyonun ardından kalıp molekül yüksek derecede çapraz bağlı polimer içerisinden kovalent bağı

kırmak suretiyle uzaklaştırılır ve kalıp molekülü spesifik olarak tanıyan moleküler boşluklar elde edilir.



Şekil 2.1.3.1. (a) Kovalent olmayan (b) Kovalent moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi

Kovalent olmayan baskılama ise 1981 yılında Klaus Mosbach ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş bir yaklaşımdır (Arshady ve Mosbach 1981, Andresson ve ark. 1984). Bu yaklaşımda spesifik bağlanma bölgeleri kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki ön organizasyon ve ardından gelen çapraz bağlanma ile oluşmaktadır. Kalıp molekül gerek ön organizasyon gerekse geri bağlanma sırasında bağlanma bölgelerine hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri ve iyonik gruplar arasında gerçekleşen Coulomb etkileşimleri gibi kovalent olmayan etkileşimler ile bağlanmaktadır. Çizelge 2.1.3.1’de kovalent olmayan baskılamadaki etkileşim türleri ve bağ enerjileri verilmiştir (O’Mahony ve ark. 2006, Wei ve ark. 2007).

Çizelge 2.1.3.1. Kovalent olmayan baskılamadaki etkileşim türleri ve tahmin edilen bağ enerjileri

Bağ türü	Bağ enerjisi (kJ/mol)	Relatif kuvvet
Hidrojen bağı	20 ⁸ 4-60 ⁹ 2-5 ¹⁰	Zayıf/orta
Hidrofobik etkileşim	1-3 ⁶	Zayıf
İyon-İyon (1/r)	250 ⁸	Güçlü
Dipol-İyon (1/r²)	100-350 ⁹ 15 ⁸	Zayıf
Dipol-Dipol (1/r³)	2 ⁸	Zayıf/orta
π-π etkileşimi	5-50 ⁹	Zayıf/orta
Dağılma (London) (1/r⁶)	0-50 ⁹ 2 ⁸	Zayıf
Katyon- π	<5 ⁹ 5-80 ⁹	Orta

Kovalent olmayan baskılama yöntemin basitliği nedeniyle moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında daha sık kullanılan bir yaklaşım olup kovalent baskılamaya göre birçok avantajı vardır. En önemli üstünlükleri ön kompleksleşmenin kalıp molekül ve fonksiyonel monomeri basitçe karıştırmakla hazırlanabilmesi ve etkileşimin kovalent olmamasından dolayı kalıp molekülün yapıdan kolayca uzaklaştırılabilmesidir. Biyolojik molekülleri de içine alan çok sayıda molekülün fonksiyonel monomerler ile kovalent olmayan etkileşimlere girme kapasitesine sahip olması nedeniyle, kovalent olmayan baskılama çok daha fazla gelecek vaadeden bir yaklaşımdır.

Kovalent olmayan moleküler baskılamada en büyük sınırlama çalışılan moleküle özgü bağlanma koşullarıdır. Çoğu durumda monomer ve kalıp molekül arasında oluşan etkileşim hidrofobiktir ve polar ortam bu etkileşimleri bozar. Diğer sınırlayıcı durum ise etkileşim için birden fazla bölgenin bulunmasına duyulan gereksinimdir. Tek bir etkileşim bölgesine sahip olan moleküller, örneğin sadece bir karbonil grubu, genellikle sınırlı miktarda moleküler tanıma yeteneğine sahip moleküler baskılanmış polimerler elde edilmesine neden olur.

Moleküler tanıma olayı üç boyutlu yapı ve fonksiyonel uyum gibi bir çok faktöre bağlıdır. Fonksiyonel tamamlayıcılık dikkate alındığında kalıp molekül ile moleküler bağlanma bölgesi arasında gerçekleşecek moleküler tanıma için tüm kovalent olmayan etkileşimler oluşsa bile oluşan moleküler baskılanmış ürünün kalite ve performansını belirleyen, kalıp molekül, monomerler ve polimerizasyon reaksiyonunun kendisidir. Daha da ötesi moleküler tanıma bölgelerinin sayısı ve kalitesi, monomer ile kalıp arasında oluşan ön kompleksin özellikleri ve oluşum mekanizmasıyla yakından ilişkilidir.

Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında kullanılan **(1)** kalıp molekül, **(2)** monomer, **(3)** çapraz bağlayıcı, **(4)** çözücü, **(5)** başlatıcı ve başlama yöntemi ve **(6)** polimerizasyon yönteminin kendisi hazırlanan polimerin kimyasal, morfolojik ve moleküler tanıma özelliklerini etkilemektedir (Yan ve Row 2006, Cormack ve Elorza 2004).

(1) Kalıp molekül

Kalıp molekül fonksiyonel monomer ile etkileşerek moleküler tanıma bölgelerinin sayısı ve kalitesini etkilediğinden bütün moleküler baskılama yöntemlerinde merkezi bir öneme sahiptir. Bir çok nedenden dolayı tüm moleküllerin kalıp olarak kullanılması mümkün değildir. Moleküler baskılanmış polimerler çoğunlukla serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlendiğinden polimerizasyonun gerçekleştirilebilmesi açısından, kalıp moleküller polimerizasyon koşullarında kimyasal olarak inert olmalıdır. Eğer kalıp molekül radikalik reaksiyonlara katılıyorsa ve polimerizasyon koşullarında dayanıklı değil ise alternatif baskılama stratejileri belirlenmelidir. Bir kalıp molekülde aranan özellikler şöyle sıralanabilir:

(a) Kalıp molekül polimerleşebilir gruplar taşımamalıdır.

(b) Kalıp molekülde serbest radikal polimerizasyonunu önleyebilecek ya da yavaşlatabilecek gruplar ya da kalıntılar (tiyol, hidrokinon kalıntıları gibi) bulunmamalıdır.

(c) Kalıp molekül polimerizasyonun gerçekleştirileceği sıcaklıklarda ya da UV ışığa karşı dayanıklı olmalıdır.

Baskılanacak molekül olarak ilaçlar, amino asitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisidler, koenzimler ve iyonlar kullanılabilir. Baskılanan molekül olarak iyon kullanıldığında polimerik malzemenin seçiciliği, baskılanmış iyonun yüküne, boyutuna, koordinasyon sayısına ve geometrisine bağlıdır.

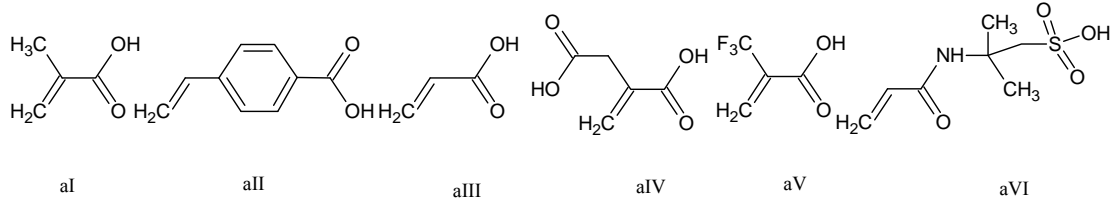
(2) Fonksiyonel Monomer

Fonksiyonel monomerler baskılanmış bağlanma bölgesindeki bağlanma etkileşiminden sorumludur ve genellikle kovalent olmayan baskılama yönteminde kalıp molekül ile monomer arasındaki ön kompleks oluşumunda reaksiyonu kompleks oluşumu yönüne kaydırmak için monomer, kalıp moleküle göre daha fazla miktarda kullanılır. Kompleks oluşumunu ve baskılama etkisini arttırmak için kalıp molekülün fonksiyonelliği ile monomerin fonksiyonelliği uyumlu olmalıdır. Örneğin biri H-bağı donörü ise diğeri H-bağı akseptörü olmalıdır. Fakat bununla birlikte iki ya da daha fazla monomer aynı anda kullanılarak polimerizasyon gerçekleştirilecekse monomerlerin reaktifliklerinin oranı uygun olmalıdır. Kalıp molekül ile monomer arasında gerçekleşecek olan ön kompleksleşme monomerin elektronik ve sterik yapısını etkileyerek monomerin reaktivitesini değiştirecektir. Farklı kimyasal yapıya ve polariteye sahip fonksiyonel monomerler ticari olarak mevcuttur ya da sentezlenebilmektedir. Şekil 2.1.3.2'de kovalent olmayan baskılamada kullanılan bazı önemli fonksiyonel monomerlerin yapıları görülmektedir.

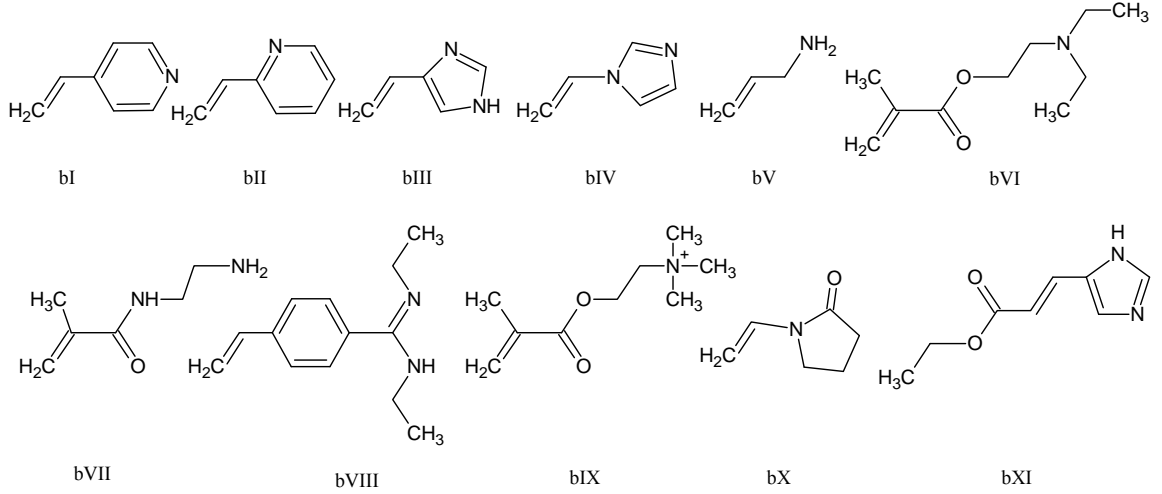
(3) Çapraz Bağlayıcı

Baskılanmış bir polimerde çapraz bağlayıcı polimer matriksin morfolojisinin (jel tipi, makrogözenekli ya da mikrojel toz) belirlenmesi, baskılanmış bağlanma bölgesinin kararlılığının sağlanması ve polimer matrikse mekanik dayanıklılık kazandırılması gibi

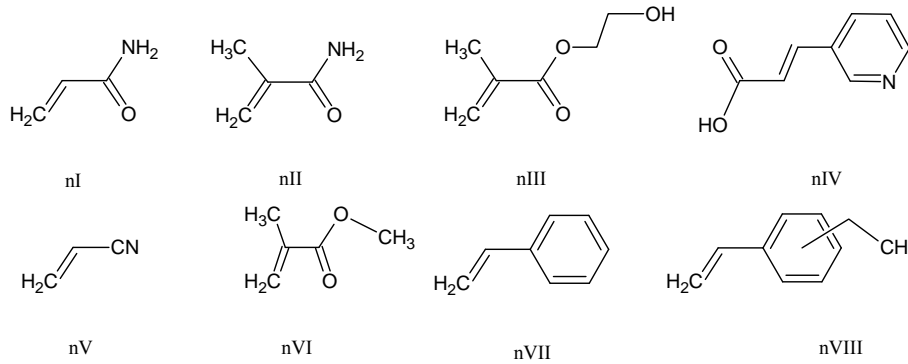
Asidik (a)



Bazik (b)



Nötral (n)



Şekil 2.1.3.2. Kovalent olmayan baskılamada kullanılan bazı fonksiyonel monomerler

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

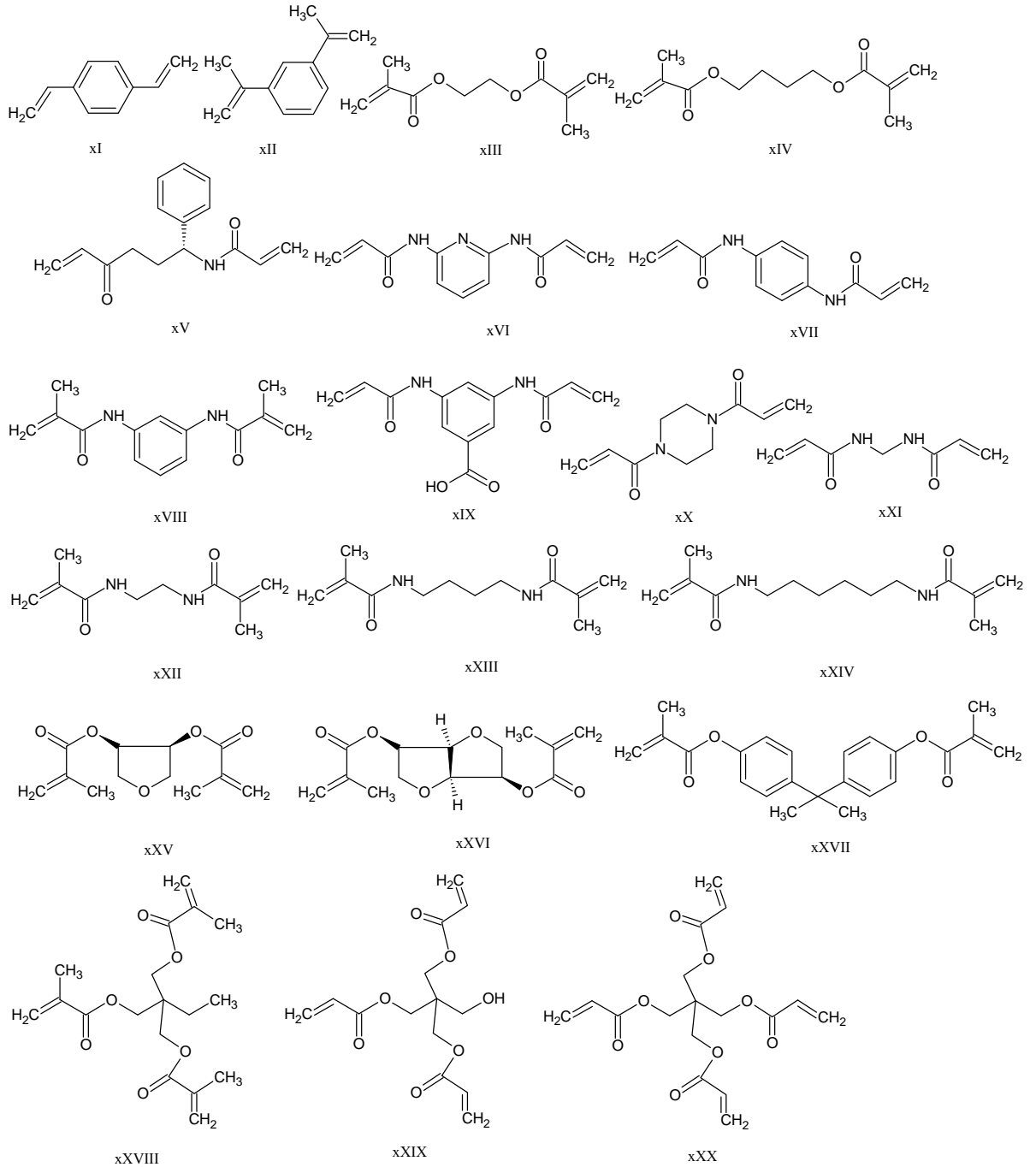
üç temel görev üstlenir. Kullanılan çapraz bağlayıcı miktarının moleküler tanıma kapasitesine olan etkisi ile ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen olaya polimerizasyon açısından bakıldığında yeterli mekanik dayanıklılığa sahip makro gözenekli malzemeler elde etmek için genellikle yüksek çapraz bağlanma oranları kullanılmakta ve hazırlanan polimerlerde çapraz bağlanma oranları %80'i aşmaktadır. Yüksek oranda çapraz bağlama polimerin çözünmesini önleyerek kolayca kullanılmasını sağlar.

Polimerizasyonda çapraz bağlayıcının reaktifliği ile fonksiyonel monomerin reaktivlikleri uygun olmalıdır. Fonksiyonel monomer ya da çapraz bağlayıcı fazla olursa kopolimerizasyon etkin şekilde gerçekleşmez. Çapraz bağlayıcı ajanın fonksiyonel monomere oranı da önemlidir. Eğer mol oranları çok küçükse, kalıp moleküllerin bağlanma bölgeleri birbirlerine çok yaklaşır, hedef molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından kapatılır ve etkin bir sonuç elde edilemez. Çok büyük mol oranlarında da, çapraz bağlayıcının fonksiyonel monomerlerle ya da kalıp molekülle kovalent olmayan etkileşimlere girmesi sonucu baskılamanın etkinliği yine azalmaktadır.

Moleküler baskılama için yaygın olarak kullanılan bir çok çapraz bağlayıcı vardır. Bunlardan çoğu ticari olarak üretilmektedir ve bunlardan çok azı kalıp molekül ile etkileşime girerek fonksiyonel monomer olarak hareket ederler. Organik çözücülerde moleküler baskılama için etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve divinil benzen (DVB), suda ise N,N' metilen bisakrilamid yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılardır. Şekil 2.1.3.3 'te yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar görülmektedir.

(4) Çözücü

Moleküler baskılamada kullanılan çözücü, kullanılan tüm bileşenlerin (kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı) tek faz içerisinde olmasını sağlayan bileşendir. Diğer önemli bir fonksiyonu da makro gözenekli polimerdeki gözeneklerin oluşumudur. Bu nedenle çözücü genellikle porojen olarak da adlandırılır.



Şekil 2.1.3.3 Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar

xI: *p*-divinilbenzen (DVB); **xII:** 1,3-diizopropenil benzen (DIP); **xIII:** etilen glikol dimetakrilat (EGDMA); **xIV:** tetrametilen dimetakrilat (TDMA); **xV:** *N,O*-bisakriloil-*l*-fenilalanin; **xVI:** 2,6 bisakriloilamidopiridin; **xVII:** 1,4-fenilen diakrilamid; **xVIII:** *N,N'*-1,3-fenilenbis(2-metil-2-propenamid) (PDBMP); **xIX:** 3,5-bisakrilamido benzoik asit; **xX:** 1,4-diakriloil piperazin (DAP); **xXI:** *N,N'*-metilen bisakrilamid (MDAA); **xXII:** *N,N'* etilen bismetakrilamid; **xXIII:** *N,N'*-tetrametilen bismetakrilamid; **xXIV:** *N,N'*-heksametilen bismetakrilamid; **xXV:** anhidroeritritol dimetakrilat; **xXVI:** 1,4;3,6-dianhidro-*d*-sorbitol-2,5-dimetakrilat; **xXVII:** izopropilenbis(1,4-fenilen) dimetakrilat; **xXVIII:** trimetilpropan trimetakrilat (TRIM); **xXIX:** pentaeritritol triakrilat (PETRA); **xXX:** pentaeritritol tetraakrilat (PETEA).

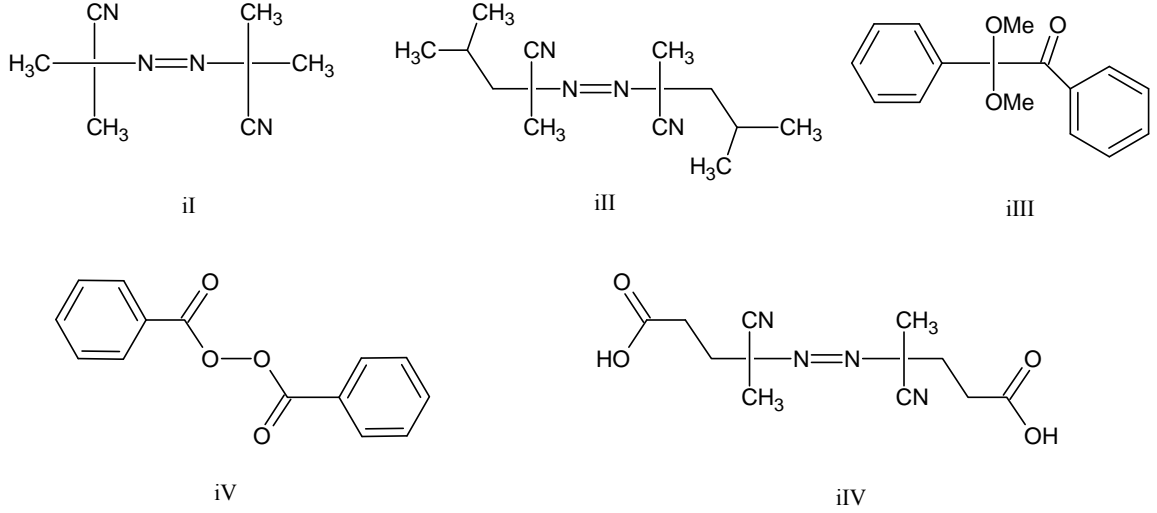
Makro gözenekli polimerler hazırlanırken kullanılan gözenek yapıcının özellikleri ve miktarı polimerin morfolojisini ve toplam gözenek hacmini belirleyen en önemli etmendir. Termodinamik açıdan uygun bir gözenek yapıcı kullanıldığında elde edilen polimerler genellikle hem iyi bir gözenek yapısına hem de yüksek bir spesifik yüzey alanına sahip olmaktadır. Kullanılan gözenek yapıcının miktarını arttırmak, gözenek hacmini de arttırmaktadır.

Çözücünün diğer bir rolü ise polimerizasyon reaksiyonu oluşurken sıcaklığı dağıtmasıdır. Aksi takdirde, reaksiyon karışımının sıcaklığı bölgesel olarak çok yüksek olur ve istenmeyen yan reaksiyonlar oluşabilir. Çözücünün seçimi baskılamamanın türüne de bağlıdır. Kovalent baskılamada tüm bileşenleri iyi bir şekilde çözdüğü takdirde bir çok çözücü kullanılabilir. Kovalent olmayan baskılamada ise kullanılan çözücü kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimi ve baskılama etkisini arttıracak nitelikte olmalıdır. Toluen gibi apolar, aprotik çözücüler hidrojen bağlarının oluşumunu stabilize ederken, kompleksleşme için hidrofobik etkileşimden yararlanılacaksa su iyi bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır.

(5) Başlatıcı

Prensip olarak serbest radikal polimerizasyonunu başlatmak için kullanılan tüm başlatma yöntemleri kalıp molekülün varlığında da kullanılabilir. Fakat başlatıcının seçimi kalıp olarak kullanılan molekül için farklı olacaktır. Eğer kalıp molekül fotokimyasal ya da termal olarak kararsız ise uygun başlatıcının seçiminde göz önünde bulundurulmalıdır. Bunun yanı sıra, ön kompleks oluşumunda hidrojen bağları etkin ise daha düşük polimerizasyon sıcaklıkları tercih edilecektir ve bu durumda da düşük sıcaklıklarda kullanılacak fotokimyasal olarak aktif başlatıcılar tercih edilmelidir. Şekil 2.1.3.4 'de bazı polimerizasyon başlatıcıları görülmektedir.

Kalıp molekülün yüksek seçicilikle tanınması ve baskılanmış polimerler tarafından bağlanması, malzemenin fiziksel ve kimyasal (esneklik, bağlanma bölgelerinin sayısı ve malzemenin yapısı gibi) özelliklerine bağlıdır.



Şekil 2.1.3.4. Moleküler baskılamada kullanılan başlatıcılar

ii: azobisisobutyronitril (AIBN); **iii:** azobisdimetilvaleronitril (ABDV); **iii:** benzil dimetilasetal ; **iV:** benzoilperoksid (BPO); **iV:** 4,4-azo(4-siyanovalerik asit).

Moleküler baskılanmış polimerlerin daha kullanışlı olmaları için, seçiciliğin yanında, uygun koşullar altında desorpsiyon ve geri bağlanma kinetiğinin de hızlı olması gerekir. Bu yüzden moleküler baskılanmış malzemelerin tasarımı yapılırken uygun bağlanma etkileşimlerinin seçimi oldukça önemlidir. Birden fazla bağlanma bölgesinin olması, monomerin bağlanma bölgeleri ile kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin daha iyi olması, dolayısıyla moleküler tanımanın daha seçici olmasını sağlar. Moleküler etkileşimlerin farklılığı, seçiciliğin ve tersinirliğin derecesini etkiler. Örneğin, kovalent bağlarla oluşturulan etkileşimler oldukça spesifiktir ancak geri bağlanma kinetiği yavaştır. Bununla beraber, hidrofobik etkileşimlerin kinetiği daha hızlıdır fakat seçiciliğinde azalma gösterir. Genel olarak kovalent olmayan etkileşimler, birçok bileşiğe uygulanabilir olmaları, hızlı kinetiği ve daha uygun koşullarda bağ oluşumu ve kırılması özellikleri göstermeleri nedeniyle daha geniş uygulama alanlarına sahiptir. Dahası, π - π etkileşimleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi belirli kovalent olmayan etkileşimler yeni moleküler baskılanmış fonksiyonel polimerlerin tasarımı için gelecek vaad etmektedir.

2.1.4. Protein baskılama

1990'lı yıllardan bu yana çok sayıda farklı molekül, moleküler baskılama teknolojisi ile spesifik tanıma bölgelerinin elde edilmesi için kullanılmıştır. Bunlardan bazıları polipeptidler (Kempe ve Mosbach 1995, Anderson ve ark. 1995), bakteriler (Dickert ve Hayden 2002), düşük moleküler ağırlıklı bileşikler (Katz ve Davis 2000, Pampi ve Kofinas 2004, Yılmaz ve ark. 2000) ve proteinlerdir (Burow ve Minoura 1996, Bossi ve ark. 2001, Guo ve ark. 2004). Moleküler baskılama teknolojisi 20 yılı aşkın süreden beri kullanılmasına rağmen, proteinler gibi yüksek molekül ağırlığına sahip moleküllerin ve hatta hücrelerin kalıp molekül olarak kullanıldığı çalışma sayısı oldukça azdır. Bunun sebebi baskılanmak istenen protein moleküllerinin özellikleridir. Proteinler suda çözünen bileşiklerdir ve bu da polimer hazırlanması için organik çözücülerin kullanılmasını gerektiren moleküler baskılama tekniği ile tamamen uyumsuzdur. İkincisi ise proteinlerin sıcaklık ve pH gibi değişimlerden kolayca etkilenen esnek bir yapı ve konformasyona sahip olmasıdır. Termodinamik ve pratik açılarından bakıldığında da bu özelliklere sahip bir molekül için moleküler baskılama işlemini gerçekleştirmek zordur. Üçüncüsü de proteinlerin, fonksiyonel monomerler ile etkileşebilecek çok sayıda fonksiyonel grup içermesidir. Baskılama işleminin belirlenmesinde baskılanması istenen proteinlere uygun koşulların seçilmesi gerekmektedir.

2.1.4.1. Protein baskılamada kullanılan yaklaşımlar

Proteinlerin baskılanmasına ilişkin yaklaşımlar proteinin baskılamaya dahil edilen kısmına göre (protein molekülünün tamamı, belli bir bölgesi ya da protein üzerindeki belli bir epitop) genel olarak üç başlık altında incelenebilir;

(1) *Kütle (Yığın) polimerizasyonu ile baskılama*

(2) *Epitop yaklaşımı*

(3) *Yüzey baskılama*

Üç boyutlu (3D) baskılama metodu olarak adlandırılan kütle polimerizasyonu ile baskılama metodunda protein bir bütün olarak üç boyutlu yapısıyla polimer matrisin içerisinde baskılanmakta ve fonksiyonel monomerler ile bir bütün olarak etkileşmektedir. Proteinin geri bağlanması da bu şekilde gerçekleşmektedir. Yüzey

baskılamada ise baskılama ve tanıma üç boyutlu yapının tamamı ile değil proteinin belli bir bölgesi ile kısmen gerçekleşmekte ve tanıma bölgeleri moleküler baskılanmış polimerin yüzeyinde ya da yüzeyine yakın bölgede yer almaktadır. Yüzey baskılama yöntemi iki boyutlu (2D) baskılama yöntemi olarak adlandırılan baskılama yöntemleri arasında yer almaktadır.

Proteinin küçük bir epitopunun baskılanmasıyla gerçekleşen yaklaşım ise epitop yaklaşımıdır ve elde edilen moleküler baskılanmış polimer proteini baskılanan bu epitop sayesinde tanıyabilmektedir. Bu yaklaşım da yine 2D baskılama metodları arasında yer almaktadır. Protein baskılama alanında yapılmış olan önemli çalışmalar Ek-1 'de , protein baskılamanın tarihsel gelişimi Ek-2'de özetlenmiştir.

2.1.4.1.1. Kütle (Yığın) polimerizasyonu ile protein baskılama

2.1.4.1.1.1 Akrilatlar

Protein baskılamadaki en basit ve bilinen yaklaşım küçük moleküller için de sıklıkla kullanılan yaklaşım olan kütle polimerizasyonu ile monolitlerin hazırlanmasıdır (Wulff 1995). Bu yöntem ile oluşturulan bağlanma bölgeleri proteinin tümünü tanımaya elverişli olduğundan, yıkama ya da ekstraksiyon yapılarak proteinin bir bütün olarak polimer yapısından uzaklaştırılabilmesi ve oluşan bağlanma bölgesine tekrar bağlanabilmesi bu yöntemin en önemli avantajlarıdır. Proteinlerin boyutlarının büyük olması nedeniyle etkin bir MIP hazırlayabilmek için polimerizasyon sırasında oluşan gözeneklerin sayısı, boyutu ve hazırlanan polimerin yoğunluğunun kontrol edilmesi, dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardır.

Protein baskılanmış polimerleri hazırlamak için geleneksel (met)akrilat kimyasını kullanan çok sayıda çalışma vardır. Fakat bu yaklaşımdaki temel sınırlama, proteinlerin bu yöntemde kullanılan çözücülerdeki çözünürlüğünün düşük olmasıdır. Bunun yanısıra proteinler organik çözücüler içerisinde çözündüğünde suda sahip olduğu konformasyondan çok farklı bir konformasyona dönüşürler. Bu durumun elde edilen moleküler baskılanmış polimerin sulu çözeltideki etkinliğine bir fayda sağlayacağı

düşünülerek, bazı araştırmacılar içerik olarak elektroforetik jellere benzeyen moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında suda çözünebilen akrilik monomerleri kullanmışlardır.

Hjerten ve ark. (1997) protein molekülünün varlığında akrilamid (AAm) ve N,N'-metilenbisakrilamidi polimerleştirerek bir jel hazırlamışlardır. Jel elenerek elde edilen partiküller bir kromatografi kolonuna doldurulmuş ve hazırlanan baskılanmış polimerin etkinliği incelenmiştir. Proteinin jelden uzaklaştırılması için asetik asit-SDS karışımı kullanılmıştır. Kalıp proteini içeren protein karışımı kolondan geçirildiğinde kalıp proteinin seçici olarak bağlandığı belirlenmiştir. Bu teknik sığır serum albumini, sitokrom c, ve transferin (Liao ve ark. 1996) ve daha sonra insan büyüme hormonu, RNaz, ve miyoglobin (Tong ve ark 2001) için başarıyla kullanılmıştır. Bu çalışmada protein ile jel arasında çok sayıda zayıf elektrostatik etkileşimin oluştuğu ve bunun da güçlü bir etkileşim oluşturarak baskılamayı gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür. Bu da az sayıda kuvvetli bağ ile bağlanmanın çok sayıda zayıf bağlanmaya göre daha avantajlı olduğu görüşünün tam tersidir. Hjerten'in teorisi küçük proteinlerin tanıma bölgelerine spesifik olarak bağlanması, aynı jelde büyük proteinlere göre daha düşük adsorpsiyon hacimleri gerektirmesi ile kanıtlanmıştır. Çünkü protein büyüdükçe yüzey alanı artmakta ve bu yüzden jel ile daha fazla etkileşime girebilmektedir.

Vaidya ve ark. (2001) tripsini baskılamak için AAm ve bisakrilamid (BisA) kullanmışlardır. Tripsin ve onun polimerleşebilen inhibitörü N-akriloil p-aminobenzamidin (spesifik monomer olarak) kullanılmıştır. Dimetilformamid-su karışımında polimerleştirilmiş ve kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılmasında aseton kullanılmıştır. Hem polimerin yapısal bütünlüğü sağlanmış hem de proteinin yapıya kolayca girip çıkmasına olanak sağlayacak çapraz bağlayıcı oranı optimize edilmiştir. Kalıp protein tripsin ile yapılan bağlanma deneyleri ve kimotripsin ile gerçekleştirilen yarışmalı bağlanma deneyleri ile hazırlanan reseptörün etkinliği araştırılmıştır.

Hirayama ve ark. (2001) akrilik asit, akrilamid ve N,N-dimetilaminopropil-akrilamidi beraberce kullanarak lizozim baskılanmış polimer hazırlamışlardır. Silika küreler lizozim baskılanmış polimer tabakası ile kaplanmış ve hazırlanan bu baskılanmış

polimerin lizozimi yarışmacı protein sığır serum albumini (BSA) yanında seçici olarak bağladığı belirlenmiştir.

Lizozim baskılanması için diğer bir çalışma Ou ve arkadaşları (2004) tarafından yapılmıştır. Çalışmada metakrilik asit (MAA) ve AAm fonksiyonel monomerler olarak, 2-(dietilamino) etil metakrilat ise çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Elde edilen polimer yaş iken süzölmüş ve deiyonize su, NaCl çözeltisi ve kalıp molekülü uzaklaştırmak için tekrar deiyonize su ile yıkanmıştır. Jel liyofilize edilmiş ve spesifitesi araştırılmıştır. Baskılama faktörü (baskılanmış polimere bağlanma/baskılanmamış polimere bağlanma) 1,83 ile 3,38 arasında bulunmuştur. Fakat bununla birlikte sığır serum albumini (BSA) ile yapılan geri bağlanma deneyleri, hazırlanan polimerin kalıp proteine karşı spesifitesinin düşük olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda orijinal kalıp molekülün % 25'inden fazlası da polimerin içinde kalmıştır.

Akrilamid jel, Guo ve arkadaşları (2004) tarafından hemoglobin baskılanması için bir hapsetme malzemesi olarak kullanılmıştır. Makrogözenekli çapraz bağlı kitosan küreler polimerizasyondan önce akrilamid ve proteinin difüze olması için bir destek maddesi olarak kullanılmıştır. Protein daha sonra asetik asit/sodyum dodesil sülfat (SDS) karışımı kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Baskılanmış kitosan küreler, kalıp proteini hem baskılanmamış kitosan akrilamid kürelerden hem de sadece poliakrilamidten hazırlanan baskılanmamış kürelerden çok daha seçici bir şekilde bağlamıştır. Bu çalışma ile hazırlanan kürelerin daha sonra kromatografi malzemesi olarak kullanılması ve hazırlanan baskılanmış polimerin hemoglobin ve BSA'ye karşı olan seçiciliği kanıtlanmıştır (Guo ve ark. 2005). Bu çalışma ile kitosanın oluşturulacak bağlanma bölgelerini desteklemek üzere yüzeye eklenmesinin, kürelerin mekanik kararlılığını arttırdığı kanıtlanmıştır.

Huang ve ark. (2005) proteinlerin ayrılması için amfoterik baskılanmış polimer hazırlamışlardır. Bu çalışmada, iki fonksiyonel monomer (MAA ve N-[3-(dimetilamino)propil] metakrilamid), çapraz bağlayıcı (BisA), ve gözenek yapıcı, CaCO₃'ün fosfat tamponu içerisinde hazırlanan süspansiyonunda lizozim ve BSA baskılanmıştır. Elde edilen jel CaCO₃'ü uzaklaştırmak için asitle yıkanmış kalıp molekül

ise proteaz kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan jel kromatografi kolonunda denendiğinde lizozimin seçici olarak bağlandığı ancak, BSA'nın seçici olarak bağlanmadığı belirlenmiştir. Bu durum ortak çoklu etkileşimlerle açıklanmıştır.

Pang ve ark. (2006a) metakrilik asit temelli jel kürelere BSA baskılamıştır. Çalışmada kaliteli ve proteinin jel içerisindeki hareketini kolaylaştıracak makrogözenekli küreler hazırlanmıştır. Baskılanmamış ve baskılanmış kürelerin adsorpsiyon kapasiteleri karşılaştırıldığında bağlanmanın yüksek olduğu belirlenmiş ve daha da önemlisi BSA (MA; 67 kDa, pI 4,8) ve yarışmacı protein ovalbumin (MA; 44 kDa, pI 4,5) ile karşılaştırıldığında 4,71 gibi yüksek bir seçicilik değeri elde edilmiştir. Bu çalışmada etkin bir materyalin hazırlanabilmesinin Hjerten ve ark. (1997) tarafından önerildiği gibi sterik faktörler ve çoklu elektrostatik etkileşimlerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür.

Son yıllarda akrilatlar ile yapılan çalışmalarda lizozim (Lu ve ark. 2006) ve sığır serum albumini (Pang ve ark. 2005, Pang ve ark. 2006b) kütle polimerizasyonu tekniği ile baskılanmış fakat yine proteinin polimerik yapı içerisine giriş çıkışını kolaylaştırmak için çapraz bağ oranı düşük tutulmuştur.

Takeuchi ve ark. (2007) akrilik asit ve 2-dimetilaminoetil metakrilat (DMA) monomerlerini kullanarak sitokrom c, ribonükleaz ve alfa-laktalbumini baskılamışlardır. Yapılan çalışmada asidik bir protein olan laktalbuminin bazik monomer DMA ile bazik proteinler olan sitokrom c ve ribonükleazın asidik bir monomer olan akrilik asit ile kuvvetli bir şekilde etkileşebileceği öngörülmüş ancak elde edilen sonuçlar böyle düzenli bir değişimin olmadığını göstermiştir.

Kütle polimerizasyonunda hazırlanan monolitin parçalanmasını gerektiğinden, küçük moleküllerin baskılanması için genellikle süspansiyon polimerizasyonu kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda farklı bir yaklaşım ile ribonükleaz A baskılanmış manyetik kapsüllenmiş (Tan ve Tong 2007) mikroküreler hazırlanmıştır. Bu çalışmalarda, poli(vinil alkol) gibi bir yüzey aktif madde kullanarak monomer içeren oleik asit yağ fazı ve protein içeren sulu faz, polimerizasyondan önce

emülsiyon haline getirilmiştir. İşlem proteinin doğal yapısını koruyacak şekilde optimize edilse de geri bağlanma deneylerinde elde edilen seçicilik değerleri düşüktür.

Proteinlerin sulu çözeltilerde akrilat kimyası ile baskılanması, büyük moleküllerin hareketini sağlamak amacıyla düşük derecede çapraz bağ oranına sahip jellerin hazırlanması temeline dayanmaktadır. Yukarıda sözü edilen yöntemler kullanılarak bazı başarılı çalışmalar yapılmıştır. Ancak çapraz bağ derecesi düşük malzemeler baskılanma ile kazandırılmış özelliklerini çok çabuk kaybederler ve çevresel değişimlere karşı dayanıksızdırlar. Akrilat ile gerçekleştirilen baskılama işlemleri uygun monomerlerin bulunması açısından da sınırlıdır ve bu nedenle de daha farklı ve etkili malzemelere ihtiyaç vardır.

2.1.4.1.1.2. Hidrojeller

Son yıllarda hidrojel adı verilen şişme özelliğine sahip malzemeler hazırlanabilmektedir. Dış uyarılara cevap veren polimerler, sıcaklık, çözücü bileşimi, pH, iyonik şiddet, ışık ve spesifik kimyasallar ile muamele edildiğinde tersinir bir dönüşüme girerek şişme davranışı göstermektedir. Bu jeller akıllı jeller olarak adlandırılmakta ve genellikle kontrollü ilaç salınımı, sensörler ve yapay kas geliştirilmesi gibi alanlarda kullanılmaktadırlar. Bu malzemelerin, proteinleri spesifik olarak bağlamasıyla bir cevap oluşturabileceği düşüncesinden yola çıkılarak hidrojel ve moleküler baskılama teknikleri bir araya getirilmiş ve enzim benzeri özellikler gösteren hidrojeller hazırlanmaya çalışılmıştır.

Karmalkar ve ark. (1996) metal-ligand etkileşimli bir yöntem kullanarak imidazol, karboksil ve hidroksil gruplarını hidrojel matrisinde yönlendirerek serin proteaz sınıfı bir enzim olan alfa-kemotripsinini taklit etmeye çalışmıştır. Kalıp molekül, 2-((izobutirilamino) kaproil]-L-fenilalanil) 2-aminopiridinin uzaklaştırılması ile polimerin katalitik aktivitesi, nitrofenil esterlerin katalizinin izlenmesi ile belirlenmiştir. Baskılanmış polimer alfa-kemotripsin ile kıyaslanabilir büyüklükte bir hızda hidrolizi gerçekleştirirken baskılanmamış polimer kötü bir katalitik aktivite sergilemiştir.

Watanabe ve ark. (1998) N-izopropilakrilamid (NIPAM) ve akrilik asidi bir çapraz bağlayıcı ve çeşitli kalıp moleküllerin varlığında polimerleştirerek sıcaklığa duyarlı hidrojeller hazırlamışlardır. Kalıp molekülün uzaklaştırılmasından sonra hidrojelin kritik sıcaklıkta karakteristik şişme davranışı gösterirken daha yüksek sıcaklıklarda tamamen çökmüş durumda olduğu belirlenmiştir. Düşük bir sıcaklıkta şişmiş olan jelin kalıp molekül ile etkileşmesi sonucu şişme davranışında herhangi bir değişim olmaz iken yüksek sıcaklıkta çökmüş olan jelin kalıp molekül derişiminin artmasıyla artan bir şişme davranışı sergilediği görülmüştür. Bu da çökmüş durumdaki jelin kalıp molekülü tanıdığını, ancak şişmiş durumda tanımadığını göstermiştir. Norefedrin spesifitesi artan efedrin derişimi ile şişmenin artması ancak adrenalin ile şişmenin olmamasının gözlenmesi ile kanıtlanmıştır.

Parmpi ve Kofinas (2004) ve Wizeman ve ark. (2001) kovalent olmayan baskılama tekniğini kullanarak glukoz fosfat ile baskılanmış poli(allilamin hidroklorür) hidrojel hazırlamışlardır. Hazırlanan moleküler baskılanmış hidrojel ile kantitatif olarak izomer spesifik glukoz ayırımı gerçekleştirilmiştir. Polimerin hazırlanmasında ilk olarak iyonik etkileşimlere dayanan ön polimerleşme kompleksi oluşturulmuş ardından epiklorhidrin ile çapraz bağlanma gerçekleştirilmiştir. Moleküler baskılanmış hidrojellerin seçiciliği fruktoz ile denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Baskılanabilen hidrojeller sadece küçük moleküller için hazırlanabilmelerine rağmen, şişme özellikleri sayesinde kalıp molekülün kolayca hareketine olanak sağlayan kafesleme özellikleri ile protein baskılama ile ilgili problemlere bir çözüm önerisinde bulunmaları açısından önemlidirler. Bu düşünce bu malzemelerin protein salınım araçları olarak kullanımını rapor eden çalışmalar ile desteklenmiştir (Peppas ve ark. 2000, Peppas 2002). Proteinin biyolojik aktivitesini koruyarak bir malzeme içine hapsedilmesine ilişkin çok sayıda çalışma yapılmıştır (Gill ve Ballesteros 2000a,b). Bu tür katkılanmış polimerlerin hazırlanmasında sol-jel kimyasının kullanılmasının ideal bir çözüm olacağı kanıtlanmıştır (Gill 2001).

Zhang ve ark. (2006a) tarafından yapılan bir çalışmada BSA baskılanmış Ca-alginat kürelerin BSA adsorplama kapasitesinin hidrofilik bir selüloz türevi olan hidroksietil

selüloz ilavesiyle arttığını gösterilmiştir. Bu sistem daha yoğun bir polimer ağ yapısına sahip olup çapraz bağların sağlamlığının artmasına neden olmuştur.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile hemoglobin (Xia ve ark. 2005, Hawkins ve ark. 2006) ve lizozim (Odabaşı ve ark. 2007) baskılanmış hidrojel hazırlanmıştır.

2.1.4.1.1.3. Sol-jeller

Sol jeller kütle polimerizasyonu ile proteinlerin baskılanmasında kullanılabilen diğer bir polimer grubudur. Sol jeller katı bir malzeme oluşturmak üzere jelleştirilen silika partiküllerinin koloidal bir süspansiyonudur. Sol jel prosesinde su bulunması ve ılıman çalışma koşulları (pH ve iyonik şiddet gibi) bu polimerleri moleküler baskılama için kullanılabilir hale getirmektedir.

Venton ve ark. (1995a,b) polisiloksan kimyasını keşfetmişler ve silanol monomerleri üzerindeki organo-fonksiyonel yan zincirlerin polimerizasyon prosesinde protein yüzeyindeki tamamlayıcı kalıntılar ile assosiyeye olduğunu ve böylece polimer içerisinde proteine özgü bağlanma bölgeleri oluşturabildiklerini kanıtlamışlardır. 3-Aminopropiltrietoksisilan (APTES) ve tetraetilortosilikatın (mol oranı 1:3) protein varlığında (BSA ve üreaz) polimerleştirilmesi ile hazırlanan polimerin kalıp moleküle seçici olarak bağlanma özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Fakat bununla birlikte çapraz bağ oranının yüksek olması nedeniyle yüksek oranda kalıp molekül polimerik yapının içinde kalmıştır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda farklı protokoller kullanılarak yüksek dayanıklılığa ve farklı fizikokimyasal özelliklere sahip değiştirilebilen bir sol-jel türevi olan xero-jel kullanılarak ovalbumin baskılanmış polimer hazırlanmıştır (Tao ve ark. 2006). Analitin bağlanması bağlanma bölgesinin luminesans özelliğe sahip molekül ile işaretlenmesiyle takip edilmiştir. Elde edilen baskılanmış polimer ile iki farklı kaynaktan elde edilen aynı protein bile birbirinden ayrılabilmiştir. (Örn. insan ve domuz interlökin-1 α proteini gibi)

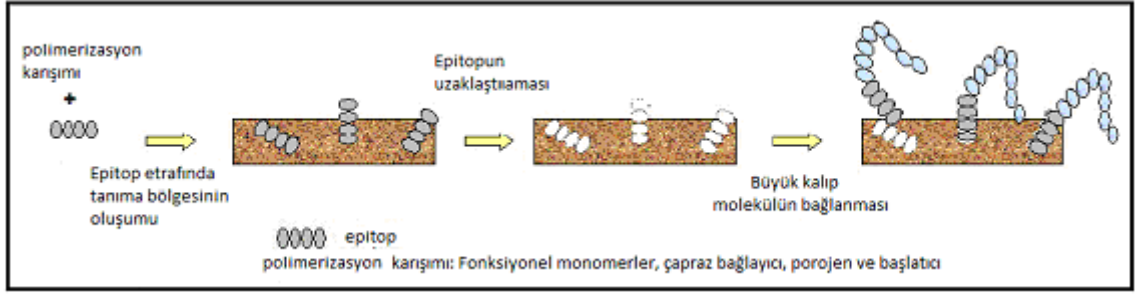
Sol-jel reaksiyonu ılıman reaksiyon koşulları, sulu ortama uyumluluğu gibi özellikleri nedeniyle proteinlerin baskılanması için oldukça uygundur. Fakat proteinlerin kütle polimerizasyonu ile baskılanması yukarıda verilen örnekler ile sınırlıdır. Bunun nedeni sol jel yapısının çok yoğun olması ve bağlanma bölgelerine ulaşımı sağlamak için polimerin parçalanmasına olan gereksinimdir. Büyük moleküllerin bağlanma bölgeleri küçük moleküllerin bağlanma bölgelerinden farklı olarak mekanik parçalamadan zarar görmektedir ve bu da bağlanma bölgelerinin spesifitesini azaltmaktadır.

2.1.4.1.2. Epitop yaklaşımı

Doğada gerçekleşen antijen-antikor etkileşimi antikor ile proteinin üzerinde epitop adı verilen bölge arasında gerçekleşen antijenik tanımaya bağlıdır. Epitop antikorun tanıma bölgesini tamamlayan kısa aminoasit parçalarıdır. Moleküler baskılama alanında Rachkov ve Minoura (2000, 2001) bu olguyu protein tanıyan polimerlerin hazırlanmasında yeni bir prosedür geliştirmek için kullanmışlardır. MIP hazırlanmasında bütün bir protein yerine protein yüzeyinde yer alan kısa bir peptid sekansı kullanılmıştır (Şekil 2.1.4.1.2.1). Matriks bir kez polimerleştirildiğinde oluşan baskılanmış malzeme tüm proteini tanıyıp bağlanabilmektedir.

Rachkov ve Minoura (2001) yaptıkları çalışmada monomer olarak hidroksietil metakrilat (HEMA) , çapraz bağlayıcı olarak da etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) kullanarak bir nörohipofizal hormon ve nonapeptid olan oksitosin için baskılama işlemini gerçekleştirmişlerdir. Üç aminoasitlik bir oksitosin sekansının baskılanması ile tüm proteinin tanınması sağlanmıştır.

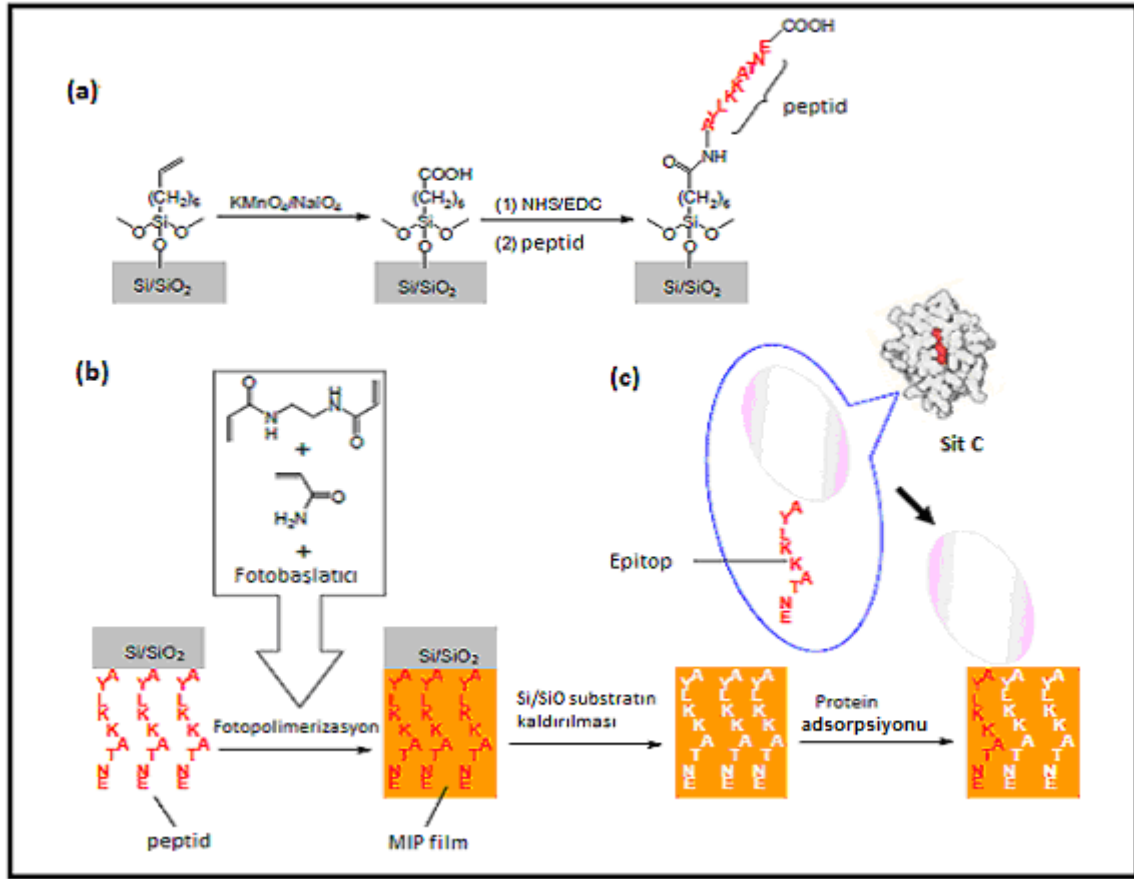
Daha sonra epitop yaklaşımı bir oktapeptid olan anjiotensin II hormonunun tanınması için başarıyla kullanılmıştır (Rachkov ve ark. 2004). Ardından bu yaklaşım, ds-DNA kalıp molekül olarak kullanılarak silika temelli malzemelerde de uygulanmıştır (Slinchenko ve ark. 2004).



Şekil 2.1.4.1.2.1. Epitop yaklaşımının şematik gösterimi

Nishino ve ark. (2006) epitop yaklaşımını sitokrom c, BSA ve alkoldehidrojenaz tanımaya yönelik polimerlerin hazırlanmasında kullanmışlardır. Bunun için ilk olarak, proteinlerin peptid epitopları cam ya da silikon yüzeye kovalent olarak bağlanmış ve ardından akrilamid, N,N'-etilenbisakrilamid ve polietilen glikol 200-diakrilat MIP oluşturulması amacıyla yüzeyde polimerleştirilmiştir (Şekil 2.1.4.1.2.2). Yakalama bölgeleri olarak sitokrom c için yine bu proteinin küçük peptid fragmentini kullanmışlardır. Hazırlanan baskılanmış filmin baskılanmamış filme göre 7 kata daha seçici bir afinite ve bağlanma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Doğru peptid epitop olarak seçildiğinde BSA içinde yine seçiciliği yüksek bir polimerik film başarıyla hazırlanmıştır. Özellikle dikkat etmek gerekir ki mutant bir peptid kullanıldığında (sadece bir aminoasidi farklı) seçicilik düşmüştür. Bu çalışmada ayrıca potansiyel bağlanma bölgelerinin sayısı azaltıldığından spesifik olmayan bağlanma da azaltılmış ve hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi ortak ve çoklu etkileşimlerle spesifik bağlanma sağlanmıştır.

Sitokrom c nin tanınması ve ayrılmasına yönelik sıra dışı bir yaklaşım metal şelat oluşturma yeteneğine sahip monomer olan N-metakriloil-L-histidin-Cu₂ ile metal koordinasyon etkileşimine giren L-histidinin epitop kalıp olarak kullanılması ile gerçekleştirilmiştir (Özcan ve ark. 2006). Metal koordinasyonu bağlanma afinitesini ve seçiciliği arttırmaktadır. Baskılanmış sistem kararludur ve adsorbsiyondan sonra bağlanma kapasitesinde bir azalma olmadan kullanılmıştır. Ancak bu sistem sadece monomer ile koordinasyon bağı oluşturabilecek aminoasitleri yüzeyinde taşıyan bazı proteinler (hemoglobin, miyoglobin vb.) için kullanılabilir.



Şekil 2.1.4.1.2.2. Protein baskılanmış film kullanarak epitop baskılama (a) Cam modifikasyon ve peptid bağlama metodu (b) MIP oluşumunun gösterimi (c) C-terminal peptid sekansı baskılanmış yüzeyde için öngörülen tanıma mekanizması(Nishino ve ark. 2006)

Epitop yaklaşımında baskılama işlemi epitop ile polimer arasındaki etkileşime bağlı olduğu için küçük bir bölgeden gerçekleşecek etkileşim tüm protein ile polimer arasında yeterince güçlü bir afinite sağlamayabilir. Bu nedenle epitop yaklaşımının başarısı seçilen epitopun üç boyutlu yapısı ile yakından ilişkilidir. Fonksiyonel ya da modifiye peptidlerin ise sentezi ve saflaştırılması oldukça zordur.

2.1.4.1.3. Yüzey baskılama

Kütle polimerizasyonu ile baskılama tekniğinin büyük moleküller olan proteinler için kullanımı sınırlıdır. Alternatif yaklaşımlardan biri polimerleri ince filmler şeklinde hazırlamak ya da bir destek yüzeyine tutturaktır (Nicholls ve Rosengren 2002). Yüzey baskılamada temel strateji bağlanma bölgelerinin yüzeyde ya da yüzeye yakın

bölgelerde oluşturulmasıdır. Bu sayede protein moleküllerinin kolayca bağlanma bölgelerine ulaşması sağlanmaktadır. Fakat bununla birlikte bu yaklaşım ile hazırlanan moleküler baskılanmış polimerlerde protein yüzeyinin belli bir bölümü baskılandığından seçicilik düşük olabilir. Aynı zamanda heterojen bağlanma bölgelerinin oluşma olasılığı yüksektir. Yüksek kütle transferi, sensör platformları ile entegrasyon ve sağlamlık gibi avantajlar ise bu yaklaşımı protein baskılamada klasik kütle polimerizasyonuna göre daha fazla tercih edilen bir metod haline getirmiştir. Bu avantajlar ve son zamanlarda yüzey kimyasına olan artan ilgi nedeniyle yüzey baskılama metodu ile protein baskılanmasına ilişkin araştırma sayısı artmaktadır.

Protein baskılama alanında rapor edilen ilk çalışma Glad ve ark. (1985) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada baskılanmış polimerin silanlanmış silika kürelerin yüzeyine kaplanmasına dayanan bir metod geliştirilmiştir. Glikoprotein Tf in baskılanması için organik silan karışımı, silika partiküllerinin yüzeyinde Tf in karbonhidrat bölümü ile etkileşim için dizayn edilen yeni bir boronat-silan monomeri içeren sulu çözeltide polimerleştirilmiştir. HPLC deneyleri ile baskılanmış partiküllerin kalıp proteini bağlama kapasitesi kontrol partiküller ile karşılaştırıldığında baskılanmış partiküllerin üstün enzimatik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu partiküller aynı zamanda kalıp moleküle yarışmacı molekül BSA ya göre çok daha yüksek bir afinite ile bağlanabilmektedir. Bu sonuçlar silan kalıpların proteinleri üç boyutlu yapıları ile tanıyabildiğini göstermiştir.

Bu metod ile protein baskılamaya yönelik önemli çalışmalardan birisi de Kempe ve ark. (1995) tarafından yapılmıştır. Bu çalışma ile proteinin belli bir bölümü baskılanarak belli bir oryantasyondaki proteinin tanınması sağlanmıştır. Baskılamadaki etkileşimler Mallik ve ark. (1994a,b) tarafından önerildiği gibi metal koordinasyonu ile sağlanmıştır. Silika yüzeyleri 3-(trimetoksisilil)propilmetakrilat ile türevlendirilmiş ve böylece yüzeyde çift bağlar oluşturularak polimer yüzeye bağlanmıştır. Kalıp protein ribonükleaz A, metal iyonları ve fonksiyonel monomer N-(4-vinyl-benzyl) iminodiasetik asit (VBIDA) ile karıştırılmıştır. Proteinin yüzeyinde bulunan imidazol grupları, metal bağlanmış fonksiyonel monomer ile kompleksleştirilerek proteinin tanınmasını sağlayacak boşluklar oluşturulmuştur. Hazırlanan moleküler baskılanmış

partiküllerin seçiciliği kromatografi kolonu kullanılarak test edilmiştir. Seçicilik faktörü lizozim için 2,46 iken, kalıp molekül olan ribonükleaz için 5,79 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu olumlu sonuçlara rağmen metal-şelat yaklaşımı çok kullanılan bir yaklaşım değildir. Bunun ana sebebi bu yaklaşımın sadece yüzeyinde histidin aminoasit kalıntıları taşıyan proteinlere uygulanabilmesidir. İlaveten , metal-şelat oluşturucu grup spesifik olmayan bağlanmalara da uygundur. Bu da gerçek örneklerde bağlanmayı zorlaştıracaktır.

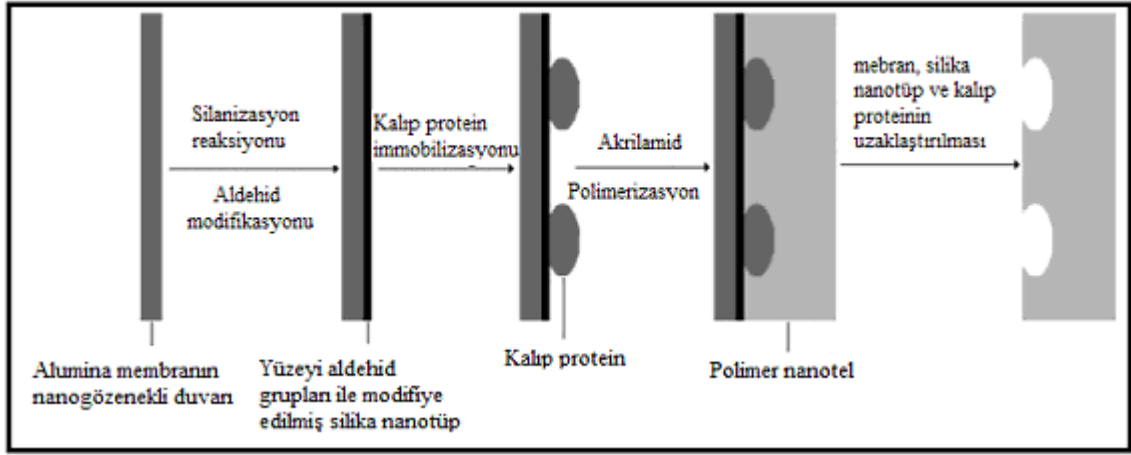
Burow ve Minoura (1996) ve ardından Hirayama ve ark. (1998) glukoz oksidaz proteinini, akrilatları kullanarak türevlendirilmiş silika küreler üzerine baskılamıştır. İki çapraz bağlayıcı (metilen bisakrilamid ve N,N'-1,2-dihidroksietilenbisakrilamid) ve iki fonksiyonel monomerden (akrilamid ve akrilik asit) oluşan polimerizasyon karışımı protein ve yüzeyi modifiye edilmiş silika kürelerin varlığında polimerleştirilmiştir. Böylece silika küreleri saran ince bir polimerik film tabakası elde edilmiştir. Hazırlanan moleküler baskılanmış polimerin glukoz oksidaza olan seçiciliği BSA ya karşı denenmiştir. Tanıma özelliğinin elektrostatik etkileşimler ve kalıp ile protein arasındaki şekilsel konformasyon uyumundan kaynaklandığı düşünülmüştür.

Hirayama ve arkadaşları (2001) aynı tekniği kullanarak lizozim baskılanmış polimer hazırlamışlardır. Seçicilik deneyleri için lizozim ve hemoglobin kullanılmış ve her iki protein için de spesifik olmayan bağlanma olmasına karşın hazırlanan MIP hemoglobine göre orta derecede bir seçicilik göstermiştir.

Yılmaz ve ark. (2000) gözenekli silika üzerine kalıp molekül teofilini immobilize ettikleri bir çalışma ile yüzey baskılamaya yeni bir yöntem kazandırmışlardır. Polimerizasyondan sonra , silika destek çözülmüş ve kalıp molekül ile birlikte uzaklaştırılmıştır. Bu teknik MIP hazırlandıktan sonra kalıbın uzaklaştırıldığı klasik yüzey baskılama tekniğinden farklıdır. Sonrasında aminoasitler ve peptidler de bu yöntem kullanılarak baskılanmıştır (Titirici ve ark. 2002, Titirici ve ark. 2003).

Bu zekice yaklaşımdan ilham alarak Li ve ark. (2006a) yüzey baskılanmış nanotellerin hazırlanması için yeni bir protokol geliştirmiştir. Bu yöntemde kalıp molekül (hemoglobin, sitokrom c ve BSA), akrilamid ve metilen bisakrilamid ile

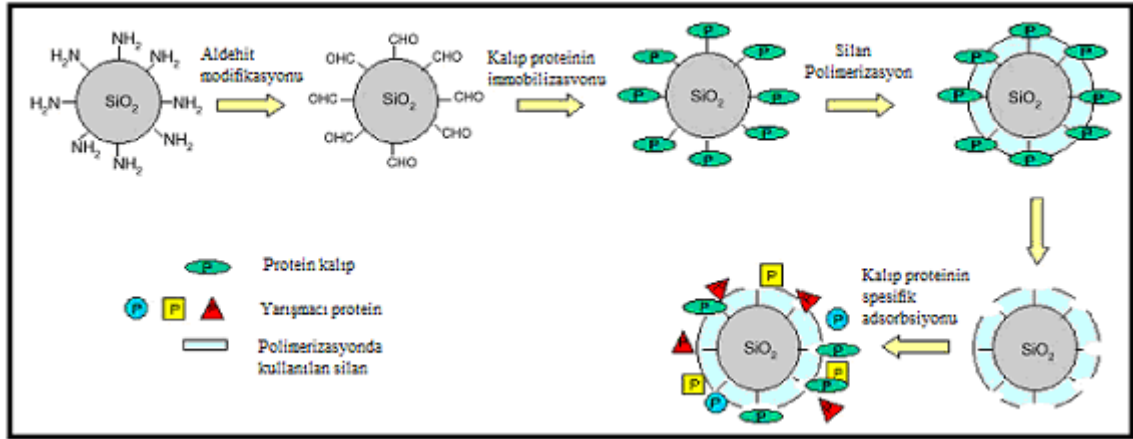
polimerizasyondan önce gözenekli alumina üzerine immobilize edilmiştir. Alumina membran polimerizasyondan sonra çözülerek yüzeyinde bağlanma bölgeleri içeren baskılanmış polimer nanoteller hazırlanmıştır (Şekil 2.1.4.1.3.1). Baskılanmış nanotellerin bağlanma kapasitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca baskılanmış nanoteller ile 547 aminoasidin sadece % 15' inde farklılık gösteren sığır albumini ile insan albuminini bile birbirinden ayrılabilmiştir. Bağlanma kapasitesinin bu kadar yüksek olmasının monodispers nanotellerin oldukça yüksek bir baskılanmış alan sağlamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 2.1.4.1.3.1. Yüze baskılanmış nanotellerin hazırlanmasına ait şematik gösterim

Shiomi ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada ise kalıp proteini silika küreler üzerine immobilize etmede başka bir yaklaşım kullanılmıştır. Bu çalışma silika monomerlerinin kalıp molekül varlığında silika küreler üzerine bağlandığı Şekil 2.1.4.1.3.2 de gösterilen yöntem ile, yukarıda bahsedilen çalışmalarla temelleri atılan metodu ileriye taşıyacak niteliktedir (Glad ve ark. 1985, Venton ve Gudipati 1995 a,b). Bu çalışmada kalıp molekül hemoglobin polimerizasyon sırasında serbest halde bırakılmak yerine türevlendirilmiş silika yüzeyine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Immobilize edilmiş ve edilmemiş hemoglobin ile hazırlanan moleküler baskılanmış polimerler karşılaştırıldığında immobilize durumda bağlanma kapasitesinin diğerine göre çok yüksek olmadığı ancak yarışmalı bağlanma deneylerinde performansının daha iyi olduğu görülmüştür. Moleküler baskılanmış polimerler kalıp

moleküle spesifik olarak bağlanırken, yarışmacı proteinler olan transferin ve kimotripsinogen pratik olarak hiç bağlanmamıştır. Bu da küreler üzerinde homojen bağlanma bölgelerinin oluştuğunu göstermektedir. Fakat aynı zamanda miyogloblin gibi kalıp moleküle benzer yükte ve neredeyse hemoglobine eşit pI değerine sahip bir protein polimere bağlanmakta ve uzun inkübasyon sürelerinden sonra ayrılmaktadır.



Şekil 2.1.4.1.3.2. Protein immobilizasyonunun şematik gösterimi

Diğer bir yüzey baskılama yöntemi de kalıp molekülün katı bir destek üzerine yönlendirilerek immobilize edilmesidir. Büyüyen polimer zinciri, kalıp molekülü taşıyan yüzeye çok yakın polimerleştirilir. Polimerizasyondan sonra , destek maddesi sert kimyasal koşullarda parçalanır. Kalıp molekülü yüzeye bağlamanın çok sayıda avantajı vardır. Örneğin , polimerizasyon karışımında çözünmeyen bir kalıp molekülle kolayca çalışmak mümkündür. Daha da ötesi kalıp molekül immobilizasyonu protein agregasyonunu minimize eder ve bağlanma yüzeyinin daha homojen olmasını sağlar. Shi ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada kalıp molekül mika gibi hidrofilik ve negatif yüklü bir destek maddesi üzerine tutturulmuştur. Bu, adsorbe edilmiş proteinlerin denaturasyonunu önlemek açısından çok önemlidir. Protein kalıp mika üzerine tutturulmuş, disakkarit tabakası ile kaplanmış ve ardından tekrar 10-30 nm kalınlığında hekza-floropropilen ince film tabakası ile kaplanmış. Elde edilen film epoksi reçine kullanılarak kalıplamada kullanılacak cam yüzeye tutturulmuş ve fırınlanmıştır. Ardından sert kimyasal koşullar kullanılarak mika baskılanmış filmden uzaklaştırılarak kalıp moleküle özgü boşluklar oluşturulmuştur. Hazırlanan moleküler

baskılanmış polimerin kalıp moleküle olan seçiciliği yarışmalı bağlanma deneyleri ile kanıtlanmıştır. Seçiciliği araştırmak için çok yakın fizikokimyasal özelliklere ve izoelektrik noktaya sahip iki protein olan ribonükleaz A (RNAase) ve lizozim kullanılmıştır. RNAase 'ın kalıp molekül olarak kullanıldığı durumda lizozim ve RNAase karışımından RNAase 20 kat seçicilikle tanınmıştır. Bu, kalıp molekülün yüksek seçilikle bağlandığını göstermektedir.

İki boyutta gerçekleştirilen baskılama işleminin üç boyutlu polimerik matrislerde karşılaşılan difüzyon kontrollü dengeyi ortadan kaldırarak daha etkin bir bağlanma kinetiğinin elde edilmesini sağlayacağı (Mirsky ve ark. 1999) düşüncesinden yola çıkarak ilk olarak Piletsky ve ark. (2001) polistiren mikropalaklar üzerine 3-aminofenilboronik asit (ABPA) den yapılmış ince filmler hazırlamışlardır. Bu teknik hem atrazin ve epinefrin gibi küçük moleküller hem de proteinler için uygulanmıştır. Protein baskılanması sırasında, yıkama ve tekrar bağlanma koşullarının optimizasyonundan sonra, moleküler baskılanmış plakların bağlanma seçicilikleri denenmiştir. Çalışmada boyut ve izoelektrik noktaları değişen laktoperoksidaz, hemoglobin, horseradish peroksidaz, sitokrom c ve mikoperoksidaz proteinleri kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Geri bağlanma çalışmaları yük ve boyutun geri bağlanmada çok önemli olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, küçük proteinlerin μM düzeyinde K_D dissosiasyon sabitlerine sahip olduğu; laktoperoksidaz, hemoglobin ya da horseradish peroksidaz gibi büyük proteinlerin dissosiasyon sabitlerinin ise küçük proteinlerden bin kat daha küçük olduğunu göstermiştir. Uygulanan bu yaklaşımı ile hemoglobin ve glikozillenmiş izoformu birbirinden ayrılabilmiştir.

Bossi ve ark. (2001) 3-aminofenilboronik asidi amonyum persülfat ile yükseltgeyerek horse radish peroksidaz, hemoglobin, mikoperoksidaz, laktoperoksidaz gibi proteinlerin baskılanmasında kullanmıştır. Polimerizasyon prosesi süresince oluşan polimer mikrotabaka, polistiren yüzeyine aşılmalıdır. Bu aşılama işleminin baskılamaya ve dolayısıyla proteinin bağlanma bölgelerince kolayca tanınmasına yardımcı olduğu kanıtlanmıştır. Kullanılan tüm proteinler için oldukça iyi baskılama faktörleri ve oldukça yüksek seçicilik değerleri elde edilmiştir.

Ardından bu yaklaşım QCM çip yüzeyinde protein sensörün hazırlanmasında kullanılmıştır. QCM piezoelektrik etkiyi temel alan basit, düşük maliyetli, ayırma gücü yüksek bir kütle hassas tekniktir. Metodoloji olarak bakıldığında , geniş çözelti-yüzey arayüzeyi ve ölçüm yeteneğine sahip olması nedeniyle analitik kimyadaki kütle ölçümleri için değerlidir ve geniş bir dedeksiyon aralığına sahiptir. Rick ve Chou (2005) QCM in MIP uygulamasında kullanıldığı yeni bir çalışmayı literatüre kazandırmışlardır. Bu çalışmada kalıp molekül olarak lizozim ve sitokrom c kullanılarak poli-APBA, QCM çip üzerinde hazırlanmış ve her iki protein için de yüksek seçicilik değerleri elde edilmiştir. Albumin ve miyogloblin gibi yarışmacı proteinler için elde edilen geri bağlanma değerleri ihmal edilebilecek kadar düşüktür. Çalışmanın en büyük başarısı ise lizozim ve sitokrom c' nin aynı anda kalıp molekül olarak kullanıldığı durumda bile iki proteini birbirinden ayırabilmesidir.

Son zamanlarda quartz kristal mikrobalsan çip yüzeyinde MIP hazırlanmasına ilişkin çalışmalar ön plandadır (Turner ve ark. 2007a, Rick and Chou 2006). Zhang ve ark. (2006b) sol- jel ve SAM (self-assembled monolayer) teknolojisinin birleştirildiği yeni bir metod geliştirmişlerdir. Bu çalışmada QCM çip üzerinde insan serum albumini baskılanmış polimer hazırlanmıştır. Hazırlanan sensör BSA ve hemogloblin proteinleri ile karşılaştırıldığında kalıp molekül insan serum albuminine karşı büyük bir seçicilik göstermiş ve bu seçiciliğin, yük, moleküler tanıma ve hazırlanan filmin şişme derecesinin toplam etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

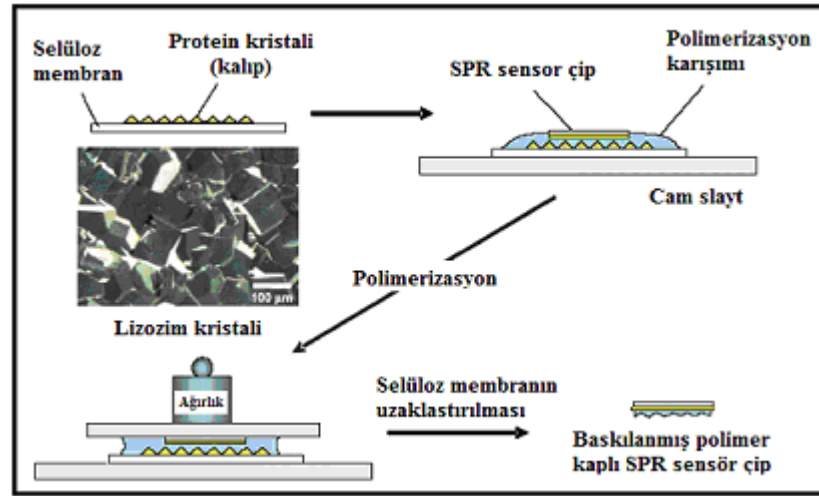
Son zamanlarda yapılan başarılı çalışmalardan bir diğeri de Baltus ve ark. (2007) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada QCM sensör yüzeyine immobilize edilen alfa-östrojen reseptörün genetik mühendislik ile hazırlanan hormon bağlanma bölgesi için bir ligand geliştirilmiştir. Genetik olarak değiştirilmiş reseptörün QCM altın çipi üzerine bağlanması için iki farklı yaklaşım kullanılmıştır: (1) tek çözücü ile muamele sistein içeren mutant reseptörün kükürt altın kimyasından yararlanarak QCM yüzeyine direkt olarak bağlanması (2) N-terminal histidin kuyruğu nikel ile kompleksleştirilmiş 3,3- ditiyobis-[N-(5-amino-5-karboksipentil) propiyonamid-N,N'-diasetik asit] aracılığı ile reseptörün bağlanması. Bu sonuçlar reseptörü sensör yüzeyine bağlamak için kullanılan yöntemin istenen sensör cevabın alınmasında temel oluşturduğunu

göstermiştir. Bu çalışma protein reseptörleri kullanılarak QCM temelli sensörlerin hazırlanmasında önemli bir aşama sağlamıştır.

QCM kullanarak gerçekleştirilen yeni bir uygulama protein baskılama alanında iyi sonuçlar vermiştir (Turner ve ark. 2007b). Çalışmada APBA model protein olarak kullanılan sığır alfa-laktoglobulinin doğal, termal ya da çözücü ile indüklenmiş konformasyonlarının ayrılmasında protein baskılama matrisi olarak kullanılmıştır. Proteinin konformasyonel değişimleri sirküler dikroizm (CD) kullanılarak izlenmiştir. Baskılanmış ve kontrol poli(APBA) filmlere protein bağlanması ise QCM ile izlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre , her bir izoformun kendi yapısına ait moleküler boşluklara büyük bir afinite gösterdikleri belirlenmiştir. Bu da protein baskılanmış boşlukların hazırlanmasında sterik özelliklerin ne kadar önemli olduğunu kanıtlamıştır. Bu çalışma aynı zamanda moleküler baskılama tekniğinin aynı proteinin farklı konformasyonlarını ayırmada da etkin olduğunu göstermiştir. Bu sayede farklı proteinleri birbirinden ayırt etmekten bir adım öteye gidilmiş , orta seviyedeki seçicilik değerlerine rağmen, moleküler baskılama tekniğinin esnek bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Çalışmayı gerçekleştiren bilim adamlarına göre elde edilen sonuçlar literatürde ilk ve iyi sonuçlardır.

Kütle polimerizasyonu ile monolitik malzemelerin hazırlanması küçük moleküller için baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında temel dayanak noktası olmasına karşın, bu şekilde hazırlanan malzemeler sensörler ile entegre edilememektedir. Bu nedenle, moleküler baskılanmış filmlerin direkt olarak sensör yüzeylerinde hazırlanması son yıllarda popüler bir araştırma alanı haline gelmiştir. Daha da ötesi moleküler baskılanmış ince filmler doğası gereği kütle transferini arttıran ve kalıp proteinin hapsedilmesini engelleyen yüksek bir yüzey alanına sahiptir. Matsunaga ve Takeuchi (2006) direkt olarak SPR sensör yüzeyinde protein baskılanmış film hazırlamışlardır. Kalıp olarak protein molekülünü kristalize halde kullanmışlardır. Kristalin halde proteinler, sulu çözeltide olduklarından çok daha kararlı bir yapıda olup denatürasyona karşı daha dayanıklıdırlar. Buna karşın her iki durumda da konformasyon aynıdır. Şekil 2.1.4.1.3.3 de gösterildiği gibi, lizozim selüloz membran üzerinde kristallendirilmiş ve ardından akrilik asidin sulu çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Poli(etilen glikol) de

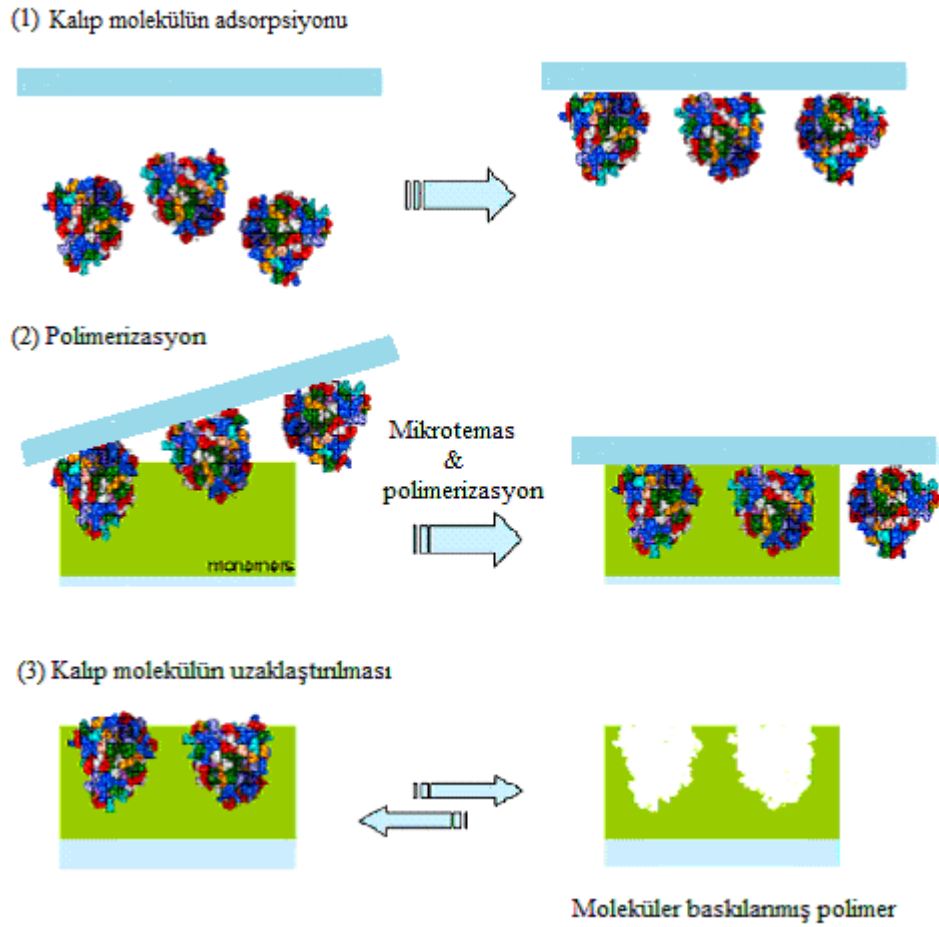
çözeltiye proteinin çözünmesini engellemek için ilave edilmiştir. Membran daha sonra polimerizasyon karışımının tamamı ile ve daha önceden N,N'-bis(akrilolil)sistamin ile modifiye edilmiş SPR çip ile temas ettirilmiştir. N,N'-bis(akrilolil)sistamin kullanılmasının nedeni baskılanmış polimerin adhezyonunu sağlamaktır. Polimerizasyon 36 ° C'de gerçekleştirilmiş ve selüloz membranın çözünmesi için çip aseton ile muamele edilmiştir. Daha sonra kalıp protein lizozim yapıdan uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan SPR çipler lizozim, sitokrom c, kimotripsin ve tripsin ile test edilmiştir. Kalıp molekül lizozim yüksek bir sinyal değeri verirken diğer üç kontrol protein sinyal vermemiştir. Kullanılan proteinlerin hepsi baziktir ve lizozim boyut olarak bu proteinlerin ne en büyüğü ne de en küçüğüdür. Hidrofobisitesi en az olandır. Bu bilgiler lizozimin SPR çip üzerinde oluşturulan bağlanma bölgelerine spesifik olarak bağlandığını göstermektedir. Baskılanmamış polimeri içeren SPR çip lizozimi baskılanmış SPR çipe göre çok daha düşük seçicilikle bağlamıştır. Bu sonuçlar kalıp olarak protein kristalleri kullanmanın proteinlerin baskılanmasında yararlı olabileceğini göstermiştir.



Şekil 2.1.4.1.3.3. Kristal lizozim kullanılarak yüzey plazmon rezonans çip yüzeyinde baskılanmış polimer hazırlanması

Son zamanlarda geliştirilen yöntemlerden birisi de mikro-temas baskılamadır (Şekil 2.1.4.1.3.4). Bu yöntem Chou ve ark. (2005) tarafından geliştirilmiş ve ilk kez cam yüzeyinde spesifik bağlanma bölgelerinin hazırlanması için kullanılmıştır. O-(4-nitrofenilfosfaril) kolin (4-NPPC) fonksiyonel monomer, polietilen glikol 400

dimetakrilat çapraz bağlayıcı olarak kullanılarak mikroskop camı yüzeyinde her biri 206 amino asitten oluşan beş adet eş alt birimden oluşan bir protein olan C-reaktif protein (CRP) için tanıma bölgeleri içeren tek tabaka hazırlanmıştır. Bağlanma deneyleri sonucu kalıp molekül için yüksek bağlanma değerleri elde edilmiş, CRP için bağlanma değeri $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ iken, insan serum albumini (HSA) ve lizozim için bu değer sırasıyla $0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak bulunmuştur.



Şekil 2.1.4.1.3.4. Mikrotemas baskılama yönteminin şematik gösterimi

Aynı yaklaşım ile daha sonra miyogloblin, lizozim ve ribonuclease A için moleküler baskılanmış polimerler hazırlanmış ve bu çalışmada monomer ve çapraz bağlayıcının önemi vurgulanmıştır (Lin ve ark. 2006).

Aynı bilim adamları miyoglobini tanımaya yönelik ince bir polimerik film hazırlamışlar ve daha önce hazırladıkları polimerlerin tanıma kapasitesini arttırmaya çalışmışlardır (Lin ve ark. 2007). Miyoglobine özgü farklı özellikteki farklı polimerler hazırladılar. Örneğin tetraetilen glikol dimetakrilat (TEGDMA) kalıp moleküle en az afinite gösteren çapraz bağlayıcı olarak belirlenmiştir. Metil metakrilat (MMA) fonksiyonel monomer olarak seçilmiş, TEGDMA ile birlikte kullanıldığında ve diğer fonksiyonel monomerler ile hazırlanan polimerler ile karşılaştırıldığında çok daha yüksek seçicilik değerleri elde edilmiştir. Doğal biyolojik matrisler olan idrar ve kan ile çalışıldığında moleküler baskılanmış film baskılanmamış filme göre çok daha yüksek afinite ile kalıp moleküle bağlanmıştır. Seyreltilmemiş idrar ile yapılan analizlerde 37,4 değerinde bir baskılama kapasitesine ulaşılmıştır. Bağlanma ve yarışmalı bağlanma deneyleri ile elde edilen sonuçlarla bu tekniğin ileride yapılacak uygulamalar için etkin olduğu kanıtlanmıştır.

Bu sonuçlar, mikrotemas baskılama yönteminin proteinler için yüksek bağlanma kapasiteli ve seçicilikte moleküler baskılanmış polimerler hazırlanmasında kullanılabilceğini göstermektedir.

Kütle polimerizasyonu ile gerçekleştirilen protein baskılama metodlarının dezavantajlarını ortadan kaldıran yüzey baskılama tekniği bu alanın gelişmesini sağlayan bir metod olarak karşımıza çıkmaktadır. Proteinin spesifik bölgelerinin baskılanması 3D polimer matikslerdeki difüzyon kontrollü dengenin sağlanması için gerekli süreyi azaltarak bağlanma kinetiğini değiştirmektedir (Rick ve Chou 2005). Daha da ötesi baskılanmış polimerler sensörler ile entegre edilebilirler. Yüzey baskılama ile hazırlanmış moleküler baskılanmış polimerlerde toplam protein bağlama kapasitesi azalmaktadır ve her protein için geçerli bir protokol yoktur. Daha da ötesi proteinin yalnızca belli bir bölümü baskılandığından heterojenite ve spesifitede azalma kaçınılmazdır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar ile kalıp molekül bir yüzeye immobilize edilerek baskılanmıştır. Kalıp molekülün immobilizasyonu ile hazırlanan MIP ler ile yapılan tüm deneyler daha homojen bağlanma bölgelerinin oluştuğunu göstermektedir. Daha da ötesi bu yöntem ile polimerizasyon karışımında çözünmeyen kalıp moleküller ile de çalışılabilmekte ve protein agregasyonu minimize edilebilmektedir.

2.1.5. Biyosensörler

Yaşam bilimleri alanındaki gelişmeler sayesinde (genomiks, proteomiks, moleküler mühendislik) birçok hastalığın tedavisi için yeni yöntemler geliştirilmiş , halk sağlığı daha üst düzeye taşınmış ve yaşam süresi beklentisi artmıştır. Gelişmiş ülkelerde yaşam tarzından kaynaklanan kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıklar temel halk sağlığı problemi olmaya başlamış ve en önemli ölüm sebeplerinden biri haline gelmiştir. Bu nedenle sağlık alanında hastalıkların teşhisine olanak verecek hatta hastalıkları semptomları ortaya çıkmadan teşhis etmeye olanak sağlayacak biyolojik belirteçler bulmaya ve bunlar için tayin yöntemleri geliştirmeye yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. İlâveten, vücut sıvılarında yer alan bu maddelerin miktarındaki değişimi izlemek hastalığın gelişiminin izlenmesine de olanak sağlamaktadır. Bazı hastalıklar için biyomarker proteinler belirlenmiş olup klinik olarak kullanılmaktadır. Ancak bazı hastalıklar için halen güvenilir biyolojik belirteçler bulunmaya çalışılmaktadır. Günümüzde vücut sıvılarında bulunan biyolojik belirteçlerin tayini için hastane ve özel laboratuarlarda farklı teknikler kullanılmaktadır. Bunlar radyoimmünoassay (RIA), enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA), immünoaglutinasyon essay (IAA) ve floresans immünoassay (FIA) gibi geleneksel immünoassay temelli teknikler olup, bu testler yüksek hassasiyet, düşük tayin sınırı ve geniş tayin aralığı gibi avantajlara sahiptir. İmmünoassaylerde biyolojik tanıma elementi olarak antibadiler kullanılır ve antibadi mühendisliğindeki gelişmeler nedeniyle en hızlı büyüyen tayin metodlarından biridir. Fakat sözü edilen bu metodlar oldukça uğraştırıcı ve zaman alıcıdır. Ayrıca otomasyon ve operasyonel aşamalar arasında bağlantı kurma şansı sınırlıdır (McGlennen 2001). Tanıma için genellikle işaretlemeye ve analit ile reseptör arasındaki bağlanmayı gösterecek ilave maddelere ihtiyaç vardır (Peter ve ark. 2001). İşaretleme testin süresini uzatır, maliyeti arttırır, ve reseptör bağlanma bölgesini bozarak yanlış negatif sonuçların alınmasına neden olabilir. Daha da ötesi floresans bileşikler çoğunlukla hidrofobiktir ve birçok metotta gürültü bir problemdir ve yanlış pozitif sonuçların elde edilmesine neden olmaktadır.

İdeal bir görüntüleme platformu hızlı, hassas, spesifik, güvenilir ve kullanımı kolay olmalıdır. İlâveten analit tayini için kan, idrar, plazma, tükürük , serebrospinal sıvı gibi örnekler; örnek hazırlama basamağına ihtiyâç duyulmaksızın direkt olarak

kullanılabilmelidir. Kullanılan cihazlar klasik homojen ya da heterojen immunoessaylerde mümkün olmayan analit konsantrasyonunun sürekli takibine olanak sağlayacak nitelikte olmalıdır.

Biyosensörler mevcut tanı yöntemlerine karşı uygun bir alternatif olabilecek nitelikte olup , gereksinimleri karşılayabilecek potansiyele sahiptir. Biyosensör moleküler tanıma aracı olarak biyomoleküllerin yüksek seçiciliğini kullanan ve kompleks bir karışım içerisinde hedef analiti tayin eden analitik bir alettir. Genel olarak bir biyosensör örnek içerisinde analizi yapılmak istenen hedef moleküle seçici olarak bağlanan biyomoleküllerden oluşan bir moleküler tanıma katmanı ve burada gerçekleşen biyokimyasal olayı kantitatif bir elektrik sinyaline dönüştüren bir çevirici sistemden oluşur (Şekil 2.1.5.1). Moleküler tanıma için kullanılan biyomateryalin türüne göre biyosensörler katalitik biyosensörler ve afinite biyosensörleri olarak ikiye ayrılır. (Ramanavieius ve ark. 2005). Katalitik biyosensörlerde tanıma elementi (enzim , hücre , doku) substrat moleküllerini ürüne dönüştürür ve bu sayede sinyal amplifikasyonunu olanaklı kılar. Afinite biyosensörlerine tanıma molekülü (antibadi, nükleik asit, peptid, hücre reseptörü ve protein) analite bağlanır. Bu iki tür biyosensörde elektrot, transistör, termistör ve optik araçlar gibi çeviriciler (transduserler) ile birlikte kullanılır.



Şekil 2.1.5.1. Bir biyosensörün yapısı ve bileşenleri

Katalitik bir biyosensör türü olan elektrokimyasal sensörler insülin, glukoz, hCG, teofilin, α 1-glikoprotein, apolipoprotein E, FSH, LH gibi maddelerin kanda ya da idrardaki düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan bir biyosensördür (Morgan ve ark.

1996). Bu elektrokimyasal sensörler basitlik ve yüksek hassasiyet gibi avantajlara sahiptir. Bu güne kadar geliştirilmiş olan elektrokimyasal sensörler vücut sıvılarında interferans yapan maddelerin varlığında düşük seçicilik gibi dezavantajlara sahiptirler. Fakat bununla birlikte bugüne kadar geliştirilmiş olan en başarılı biyosensör türü, enzim temelli amperometrik sensörlerdir ve ticari olarak glukoz, laktat, üre v.b. maddelerin tayininde kullanıp atılabilen sensörler olarak kullanılmaktadırlar.

2.1.5.1. Moleküler tanıma katmanı

2.1.5.1.1. Antibadiler

Biyosensörlerde genellikle moleküler tanıma aracı olarak antibadi ya da antijen kullanılır ve hazırlanan sensörler immunosensör olarak adlandırılır. Bu bölümün görevi antijen antibadi arasında oluşan kompleks ile sensörün seçicilik ve hassasiyetini sağlamaktadır. İmmunosensörlerde poliklonal ya da monoklonal antibadiler kullanılmaktadır. Poliklonal antibadiler halen geniş çapta özellikle yarışmalı immunoassaylerde primer antibadi olarak kullanılmaktadır. En büyük avantajı göreceli basitliği ve hazırlama prosedürünün düşük maliyetidir. İki antibadili sandwich immunoassayler tek tip poliklonal antibadi ile hazırlanabilir ve iki tür monoklonal antibadinin ya da monoklonal-poliklonal antibadi karışımlarının kullanıldığı sistemlerle kıyaslandığında çok daha basittir. Genellikle kullanım amaçlarına uygun spesifiktirler ve büyük bir hayvanın immunizasyonu ile uzun süreli temini mümkündür. Fakat bununla birlikte poliklonal antibadiler bağlanma afinitesi, izotip ve özgülleri açısından çok sayıda farklı B-lenfositten elde edilen heterojen antibadiler karışımıdır. Sonuç olarak, her hayvandan her farklı seferde elde edilen antibadiler kendine has özelliklere sahiptir. Bu durumda, düzgün bir sinyal/derişim oranı sadece tek bir hayvandan tek seferde elde edilen antibadiler ile sağlanır. Farklı zamanlarda elde edilen antibadiler immunoassaylerde sinyal oranının değişmesine neden olacaktır. Bu da bir immunoassayde tek tip bir deney tasarlanabilmesi için kullanılacak antibadi miktarının belirlenmesi aşamasında zorluk yaratmaktadır. Daha da ötesi poliklonal antibadiler hem immunojendeki hem de onunla birlikte enjekte edilen safsızlıklardaki epitoplari da tanımaktadır. Bu da spesifik olmayan bağlanmaya neden olarak

immunosensörün tayin sınırının artmasına neden olur. İlk geliştirilen immunoassaylerde hayvan serumlarından elde edilen poliklonal antiadiler kullanılsa da günümüzde immunoassay endüstrisi füzyon (kaynaştırma) teknolojisi ile üretilen monoklonal antiadileri tercih etmektedir. Hibridoma hücreleri tek tip antiadı üretebilirler (monoklonal antiadiler). Monoklonal ya da poliklonal, yeni antiadilerin üretimi daima yeni aşılama işlemini gerektir. Bu proses her zaman başarı garantisi olmayan, uzun ve yorucu bir prosestir.

2.1.5.1.2. İmmunosensörlerde kullanılan alternatif tanıma elementleri

İmmunoassaylerde poliklonal ya da monoklonal antiadilerin yaygın olarak kullanılmasına rağmen bu proteinlerin kullanılmasının immunoreaksiyonlar için bazı dezavantajları vardır. Bunlar şöyle sıralanabilir: (1) Eğer çalışma koşulları vücut özelliklerinden ya da koşullarından farklıysa , molekülün yapısı değişebilir ve immunoreaksiyonlar için uygunsuz bir hale gelebilir. (2) Rejenerasyon işlemi sırasında immobilize antiadı zarar görebilir ya da yüzeyden ayrılabilir. Yeterli bir analitik hassasiyet ancak yüksek afiniteli ($>10^{10} M^{-1}$) antiadilerin elde edilmesi ile sağlanabilir (Hock 1997). Bu yüzden yüksek bir afinite sabiti ve labil bir immobilize antiadı pratik uygulamalarda yüzeyin rejenerasyonunu sınırlar ve bu da immunosensörlerin tek kullanımlık cihazlarda kullanımlarını sınırlar (Morgan ve ark. 1996). (3) Antiadı ve antijen arasındaki reaksiyon süresi transdüserin dedeksiyon zamanından daha kısadır ve bu da analiz zamanını uzatmaktadır. Bu sözü edilen problemlerin çözümü için biyosensörün moleküler tanıma bölgesi olarak yeni yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bunlar şöyle sıralanabilir:

(1) Aptamerler

Aptamerler; nükleotid, ilaç, protein gibi hedef molekülleri yüksek afinite ve spesifite ile tanıyabilen, sentetik, tek sarmal DNA ya da RNA oligonükleotid parçalarıdır (Luppa ve ark. 2001). Aptamerler immunosensörün yüzeyine bağlanma açısından antiadiler ile kıyaslandığında üstün özelliklere sahiptirler ve sentetik yaklaşımlar ile tekrarlanabilir bir şekilde ve istenilen miktarda hazırlanabilirler. Fakat bununla birlikte, aptamerlerin

yüksek maliyetleri ve kararsızlıkları bu moleküllerin immunoafinite biyosensörlerde kullanılabilmesi için çözülmesi gereken problemlerdir.

(2) Antikalin

Rekombinant antibadi fragmentlerine alternatif olabilecek gelecek vaadeden bir teknik olarak lipokalin, çeşitli aminoasitlerin rastgele mutajenezi ile antikalinlerin hazırlanmasında kullanılabilir. Retinol bağlayıcı proteinler gibi lipokalinler de hidrofobik ve/veya kimyasal olarak duyarlı organik bileşiklerin depolanması ve taşınmasında rol alan bir protein ailesidir. Bu bağlayıcı proteinler sekiz antiparalel β -tabakadan oluşan ve merkez çekirdek etrafında sarılmış olan ortak bir β -barel yapıya sahiptir. Örneğin bilin-bağlayıcı protein, digoksinin gibi potansiyel antijenler ile spesifik olarak kompleks oluşturacak şekilde yapısal olarak tekrar şekillendirilebilir. (Schlehuber et al., 2000). Fakat bununla birlikte, antikalinlerin sentezi ve kararlılığı, afinite sabitinin büyüklüğü gibi çözülmesi gereken problemler mevcuttur.

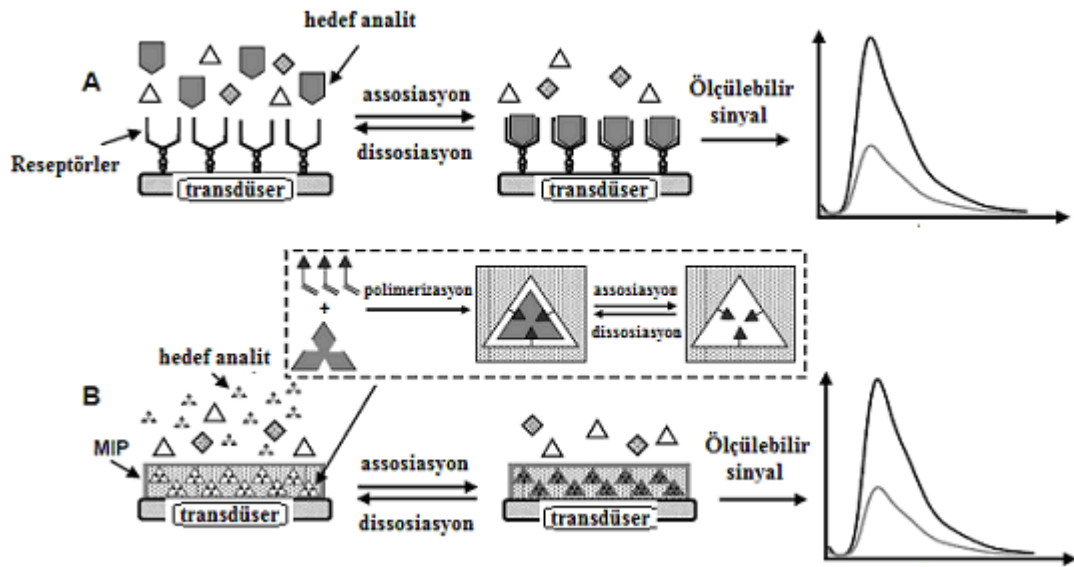
(3) Moleküler baskılanmış polimer (MIP)

Biyolojik reseptörler spesifik moleküler afiniteye sahiptir ve tanı amaçlı sensörlerde geniş çapta kullanılmalarına rağmen yüksek maliyetli karmaşık protokoller ile üretilmekte düşük kararlılıkları nedeniyle uygun koşullar gerektirmekte ve birçok analit için doğal reseptör bulunmamaktadır. (Whitcombe ve ark. 2000, Wulff 2002, Haupt ve ark. 2000, Ye ve Haupt 2004a). Bu nedenle yapay tanıma elementlerinin sentezlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Moleküler baskılama yapay tanıma elementlerinin hazırlanmasında kullanılacak en etkili metodlardan biridir (Guan ve ark. 2008). Bu sentetik teknik basit ve ucuz olup, elde edilen moleküler baskılanmış polimer yüksek seçicilikte, mükemmel mekanik kuvvette, sıcaklık, asidik ve bazik koşullar, organik çözücüler ile muameleye dayanıklı ve biyolojik reseptörler ile karşılaştırıldığında daha iyi mühendislik özelliklerine sahiptir (Wulff 2002, Haupt ve Mosbach 2000, Ye ve Haupt 2004a). Daha da ötesi bu yaklaşım doğal reseptörü bulunmayan analitler için de sensör geliştirme olanağı sağlar.

Bu karakteristikler nedeniyle MIP malzemeler yaşam, farmasötik ve çevre bilimleri gibi birçok alanda tanıma elementi olarak geniş çapta kullanılabilirler (Andersson ve ark. 1990, Ramstrom ve ark. 1996, Spivak 2005). Temel kullanım alanı seçici ayırma olmasına rağmen , aktif moleküllerin tayini, farmasötikler ve kirleticiler için MIP temelli sensörlerin geliştirilmesi en iddialı konulardan biri olup son yıllarda dikkate değer ölçüde ilgi çekmektedir (Piletsky ve Turner 2002, Holthoff ve Bright 2007, Hillberg ve ark. 2005. Stephenson ve Shimizu 2007).

Biyosensörlerde sinyal, analitin moleküler tanıma katmanında bulunan tanıma elementine bağlanması ile oluşturulmaktadır. Ardından transdüser bu sinyali ölçülebilir bir büyüklüğe dönüştürerek sonuç bir verinin elde edilmesini sağlamaktadır. Tanıma elementi olarak biyomoleküller yerine moleküler baskılanmış polimerler kullanıldığında da aynı prensip kullanılabilir (Şekil 2.5.1.2.1).



Şekil 2.5.1.2.1. (A) Antibadi temelli sensör (B) MIP temelli biyomimetik sensörün çalışma prensibi

Dedeksiyon için analitin bazı genel özellikleri ya da analit bağlanması ile sistemin fizikokimyasal özelliklerinde meydana gelen değişimler kullanılır. Bu prensip geniş çapta kullanılabilme özelliğine sahiptir ve analitin özelliğinden büyük ölçüde bağımsızdır. Alternatif olarak bazı moleküller işaretleme ya da sensör cevabını

arttırmak için kullanılabilir. Analitin spesifik özelliklere sahip olduğu bazı durumlarda bu özellik MIP temelli sensörlerin hazırlanmasında kullanılabilir. Çizelge 2.5.1.2.1’ de farklı transdüser prensipleri ile çalışan ve tanıma elementi olarak moleküler baskılanmış polimerleri kullanan sensörlere örnekler verilmiştir.

2.1.5.2. Biyosensörlerde kullanılan transdüserler

Biyosensörlerde kullanılan transdüserler sinyal oluşturma türlerine göre dört ana gruba ayrılabilirler; elektrokimyasal transdüserler (amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik, kapasitatif), optik transdüserler (floresans, luminesans, kırılma indisi, elipsometrik, yüzey plazmon rezonans) kütle değişimine duyarlı transdüserler (piezoelektrik , akustik dalga) ya da termal transdüserler (kalorimetrik).

Bir biyosensör dedeksiyon metoduna göre iki gruba ayrılabilir: (1) Doğrudan dedeksiyon (2) antijen antibadi etkileşimi için işaretlemenin kullanıldığı yada kullanılmadığı dolaylı dedeksiyon. Doğrudan sensörde, bağlanma olayı kırılma indisi (SPR transdüser), kütle değişimi (QCM transdüser) ve dielektrik sabiti (elektrokimyasal transdüser) gibi farklı fiziksel özelliklerin değişmesine neden olur. Dolaylı sensörler immün kompleksteki moleküllerden birinin üzerinde sinyal üreten bir etiket bulunmasını gerektirir. Bu etiket özelliğe bir değişim oluşturabilmesi için ayrı bir aşamaya daha ihtiyaç vardır. Bu sensörlerde genellikle immunoassaylerde kullanılan çok farklı etiketler bulunmaktadır (Morgan ve ark. 1996, Lippa ve ark. 2001, D’Orazio 2003). Doğrudan sensörler analiz süresini kısaltır ve eş zamanlı olarak bağlanan analitin tayinine olanak verir. Etiket kullanılmadığında bu sensörler daha da ucuza üretilmektedir. Son yıllardaki ilerlemeler sayesinde doğrudan sensörlerin hazırlanması gelişmiş ve son zamanlarda bu sensörler tıbbi uygulamalarda tercih edilen immunosensörler haline gelmiştir.

Optik immunosensörler hızlı sinyal oluşumu ve okuma gibi avantajları ile biyoanaliz için günümüzdeki en popüler immunosensörlerdir. Optik immunosensörler arasında SPR transdüser gibi direkt bir optik transdüser klinik kimyada immunoreaksiyonların izlenmesinde en popüler olanıdır (Lippa ve ark. 2001).

Çizelge 2.1.5.2.1. Farklı transdüser prensiplerini kullanan MIP temelli sensör örnekleri

	<i>Transdüser</i>	<i>Analit</i>	<i>Tayin aralığı (µM)</i>	<i>Referans</i>
Genel Yöntemler	Elipsometri	Vitamin K1	Kalitatif	Anderson ve ark. 1988
	YüzeY Plazmon Rezonans	Teofilin	5 000-33 000	Lai ve ark. 1998
		Fenilalanin anilid	Kalitatif	Hedborg ve ark. 1993
	Kapasitans	Fenil alanin	6 000	Panasyuk ve ark. 1999
	Kondüktimetri	Atrazin	0,005-0,05	Sergeyava ve ark. 1999
	YüzeY Akustik Dlage	Çözücü buharları	0,1 (µL/L)	Dickert ve ark. 1998
		Çözücü buharları	4 (µL/L)	Dickert ve ark. 1998
	Kuartz Kristal Mikroterazi	Glukoz	1 000-20 000	Maleista ve ark. 1999
S-propanolol Lizozim		50- 1300 0,2-1500 mu g/mL	Haupt ve ark. 1999a Sener ve ark. 2010	
Infrared Kaybolan Dalga	2-metoksi 3-metilpirazin	4,5-1 000	Jakusch ve ark. 1999	
Analitin sinyal oluşturduğu yöntemler	Floresans	Dansil fenilalanin	25-250	Kriz ve ark. 1995
		PAH (piren)	0,00015-0,2	Dickert ve ark. 1999
	Amperometri	Morfin	3,5-35	Kriz ve Moscbah 1995
Yarışmalı bağlanma metodları	Kolorimetri	Kloramfenikol	10-3 000	Levi ve ark. 1997
	Voltametri	2,4 D	0,1-100	Kroger ve ark. 1999
Polimerin sinyal oluşturduğu metodlar	pH	Glukoz	1 000-25 000	Chen ve ark. 1997
	Floresans	cAMP	0,1-100	Turkewitsch ve ark. 1998

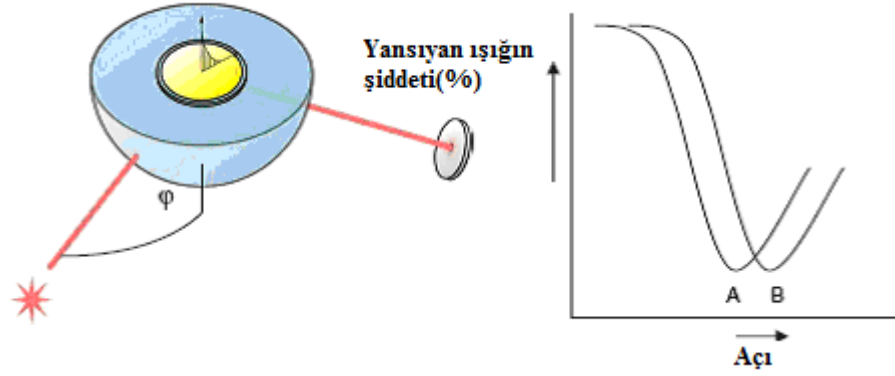
Direkt optik transdüserin ana avantajı dedeksiyon için işaretlemeye ihtiyaç duyulmaması ve böylece bağlı türün serbest türden ayrılması için gerekli ayırma aşamasının ortadan kalkmasıdır. Daha da ötesi, ışığın manyetik alan bileşeninin sadece yüzeyin çok yakınındaki bölgeyi etkilemesi nedeniyle örnekte bulunan diğer maddeler ile girişimin engellenmesidir (D’Orazio 2003).

QCM, sensörde transdüser olarak kullanılır ve yüksek sensitiviteye sahiptir. QCM optik özelliğın değil kütleının değişimini ölçmesine rağmen , SPR ve QCM dalga-dağılım olgusuna dayanır ve rezonans yapısı gösterir. QCM direkt immunosensör olarak geniş çapta kullanılmaktadır. SPR tekniği yüzeyin çok yakınındaki bölgede gerçekleşen kırılma indisi değişimini, QCM ise yüzeye bağlanan kütleinin miktarındaki değişme ile ilgili frekans değişimlerini ölçer.

SPR biosensörler protein adsorbsiyonu ya da antijen antibadi tanınması açısından QCM sensörler ile kıyaslandığında; hassasiyet, monoklonal antibadi ve serum tayin sınırları açısından çok yakın özelliklere sahiptirler (Koesslinger ve ark. 1995). QCM cihazı daha ucuz, daha kolay kullanılabilir olsa da SPR sensörler QCM ile karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptirler. SPR sensörlerde yanıt süresi daha kısadır ve SPR tekniği daha ucuzdur (Laricchia-Robbio ve Revoltella 2004). Daha da ötesi SPR sisteminde tanımanın gerçekleştiği alan QCM sensörlere göre daha küçüktür. Dolayısıyla QCM sensörler ile karşılaştırıldığında aynı yüzey yoğunluğunu sağlamak için daha az sayıda moleköl yeterlidir ve daha küçük akış hücreleri ile daha düşük örnek hacimleri ile çalışılabilir. Sonuç olarak SPR transdüserler “lab on a chip” olarak adlandırılan ve örnek hazırlama, kimyasal analiz ve veri değerlendirme özelliklerini aynı anda taşıyan total bir analiz sistemi geliştirmek için mikroakışkanlar ile daha kolay entegre edilebilir.

2.2. Yüzey Plasmon Rezonans (SPR)

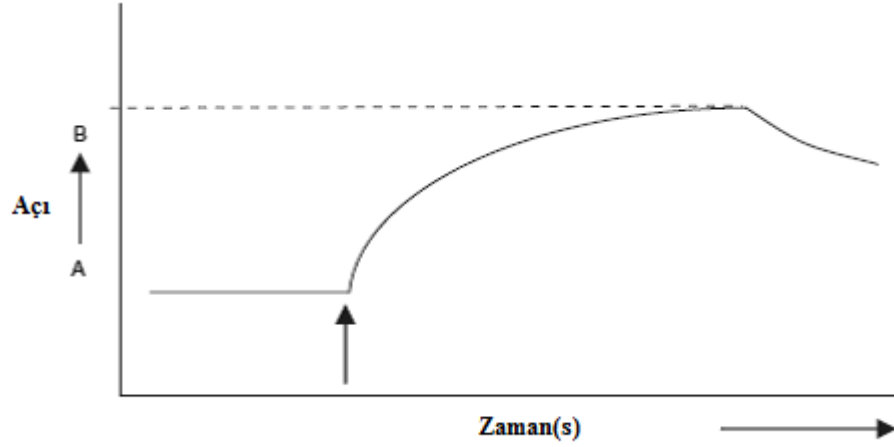
Polarize ışık, yüzeyi ince bir metal film ile kaplı sensör yüzeyine gönderildiğinde ışık bir ayna gibi hareket eden bu yüzeyden yansıtılacaktır. Geliş açısını değiştirerek, yansıyan ışığın şiddeti izlendiğinde ışığın yansıma şiddetinin bir minimumdan geçtiği görülecektir (Şekil 2.2.1).



Şekil 2.2.1. Yüzey plazmonlarının uyarılması

Belli bir geliş açısında ışık, metal yüzeyindeki plazmonları uyarır ve yüzey plazmon rezonans olayı gerçekleşir. p-Polarize ışığın fotonları metal yüzeyindeki serbest elektronlar ile etkileşir ve serbest elektronların dalga benzeri titreşimine neden olarak (rezonans) yansıyan ışığın şiddetinde bir azalmaya neden olur. Yansıyan ışığın şiddetine maksimum kaybın gerçekleştiği açı, rezonans açısı ya da SPR açısı olarak adlandırılır. SPR açısı sistemin optik karakteristiklerine yani metalin (genellikle altın) her iki tarafındaki kırılma indislerine bağlıdır. Prizma tarafındaki kırılma indisi değişmez iken, metal yüzeyinin hemen yakınında bulunan kırılma indisi, üzerinde toplanan kütle nedeniyle (örn protein) değişecektir. Kırılma indisi değiştiğinde, yansıyan ışık şiddetinin minimuma düştüğü açıda Şekil 2.2.1 de gösterildiği gibi bir kayma olacaktır. (A) geliş açısına karşı yansıyan ışık şiddetini gösterirken, (B) kırılma indisinde gerçekleşen değişimden sonrasını göstermektedir. Yüzey plazmon rezonans olayı sadece bu iki basamak arasındaki farkı değil, aynı zamanda minimumun gözlendiği rezonans açısındaki kayma izlenirse zamanla gerçekleşen değişimi de gösterebilir.

Şekil 2.2.2 SPR açısındaki kaymaları gösterir ve sensogram olarak adlandırılır. Eğer bu değişim bir biyomoleküler etkileşimden kaynaklanıyorsa etkileşimin kinetiği eş zamanlı olarak incelenebilir. SPR sensörler metal yüzeyindeki oldukça sınırlı bir alanı ya da sabit bir hacmi tayin edebilirler. Sinyalin alınabildiği elektromanyetik alanın (kaybolan alan) penetrasyon derinliği genellikle birkaç yüz nanometreyi aşmaz ve sensör yüzeyindeki metalden uzaklaştıkça eksponansiyel olarak azalır. Kaybolan alanın penetrasyon derinliği gelen ışığın dalga boyunun bir fonksiyonudur.



Şekil 2.2.2. Sensogram: zamana karşı SPR açısının değişimi

SPR sensörlerin intrinsik bir seçicilikleri yoktur. Tüm kırılma indisi değişimleri sinyal değişimi olarak yansır. Bu değişimler ortamların farklı kırılma indisine sahip olmasından kaynaklanabilir. Örneğin, tampon bileşimindeki ya da derişimindeki değişim, aynı zamanda sensör yüzeyine farklı materyallerin adsorpsiyonu kırılma indisi değişimine neden olabilir. Adsorplanan türlerin miktarı Şekil 2.2.2’de gösterildiği gibi denge tamponun injeksiyonundan sonra belirlenebilir. SPR sensör yüzeyinde seçici bir tanıma için, sensörün yüzeyi, hedef molekölü seçici olarak yakalayabilecek, ancak örnekteki ya da tampon bileşimindeki diğer herhangi bir bileşene bağlanma eğilimi olmayan bir ligand ile modifiye edilmelidir.

2.2.1. Yüzey plazmon rezonans olayının teorisi

Yüzey plazmonlarının oluşması için esas olan, iki materyalin ara yüzeyinde serbest elektronların bulunmasıdır. Burada kastedilen materyallerden biri bol miktarda serbest elektron içeren metallerdir. Bu koşullarda metal-dielektrik arayüzeyi Maxwell eşitliği ile analiz edilebilir. Bu analize göre yüzey plazmonları metal ve dielektrik ara yüzeyinde yayılmış olan elektron yoğunluk dalgaları olarak tanımlanabilir. Alternatif olarak yüzey plazmonları bu ara yüzeye kuvvetlice bağlanan elektromanyetik dalgalar olarak da düşünülebilir. Yüzey plazmonları ile ilgili çalışmalar 1968 yılında elektron demeti uyarılması ile başlamış , optik uyarılma Otto (1968) ve Kretschmann ve Raether (1968) tarafından kanıtlanmıştır. İkinci yaklaşım daha çok uygulanabilir hale gelmiştir.

2.2.1.1. Kaybolan dalga

Eğer prizma son derece yüksek kırma indisine sahip bir materyal ile kaplanırsa, yüzeye gönderilen ışığın neredeyse tamamı yansır. Buna karşılık ışığın çoğunluğu prizma içinde geri yansır, bir kısmı da geri yansımadan yüzeyden diğer ortama geçer. Doğrudan yansımadan geçen bu ışığa "kaybolan dalga (evanescent wave)" adı verilir. Kırılma indisi n olan bir yüzeyde bulunan elektromanyetik yüzey dalgası matematiksel olarak elektrik alan ile ifade edilir.

$$E = E_0 \exp(j\omega t - jk \cdot r) = E_0 \exp(j\omega t - jk_x x - jk_y y - jk_z z) \quad (2.2.1.1.1)$$

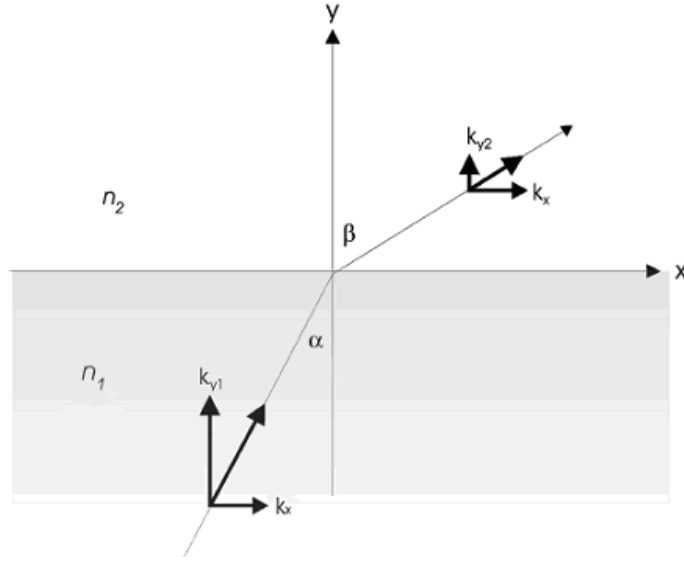
E_0 elektrik alanının genliği, ω açısal frekans, k dalga vektörü, $r(x, y, z)$ vektörün konumudur. Bu eşitlikte yönü dalga dağılımına paralel olan dalga vektörü k 'dır (Şekil 2.2.1.1.1). Büyüklüğü aşağıdaki formül ile verilir.

$$k = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2} = n \frac{2\pi}{\lambda} = n \frac{\omega}{c} \quad (2.2.1.1.2)$$

λ ve c sırasıyla dalga boyu ve vakumdaki dağılım hızıdır. Böyle bir dalganın kırılma indisi n_1 ve n_2 olan 1 ve 2 nolu iki yüzey arasında kırıldığında genliği kaybetmeden ışık demetinin yönünü seçilebilir $k_z = 0$ olduğunda problem iki boyutta düşünülebilir.

$$n_1 \sin \alpha = n_2 \sin \beta \quad (2.2.1.1.3a)$$

$$k_{x1} = k_{x2} \equiv k_x \quad (2.2.1.1.3b)$$



Şekil 2.2.1.1.1. α geliş açısına sahip ışığın kırılma indisleri n_1 ve n_2 olan iki materyalin arayüzeyindeki kırınımı

Eşitlik 2.2.1.1.2 ve 2.2.1.1.3b yi kullanarak ara yüzeye dik konumda olan k_y dalga vektörü için aşağıdaki ifade elde edilir.

$$k_{y2}^2 = n_1^2 \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^2 \left(\frac{n_2^2}{n_1^2} - \sin^2 \alpha \right) \quad (2.2.1.1.4)$$

Şimdi $n_1 > n_2$ olduğunu varsayalım. Eşitlik 2.2.1.1.4'te görüldüğü gibi $\sin \alpha > n_2 / n_1$ olduğunda eşitliğin sağ tarafı negatif olacak ve sonuç olarak k_y yalın sanal bir sayı olacaktır. Bu durumu 2. ortam için değerlendirirsek ve Eşitlik 2.2.1.1.1'e dönecek olursak, sadece elektrik alanının büyüklüğü y doğrultusunda $1/k_{y2} \equiv 1/jk_{y2}$ karakteristik uzaklığında eksponansiyel olarak azalan ara yüzeye paralel hareket eden bir dalganın oluştuğunu görürüz.

$$E_2 = E_0 e^{-k_{y2}y} \exp(j\omega t - jk_x x) \quad (2.2.1.1.5)$$

Açıklanmaya çalışılan bu nedenlerden dolayı 2. ortamda oluşan bu alan kaybolan alan olarak adlandırılır. Elektromanyetik alan sadece arayüzeye yakın bölgede oluşmaktadır.

Bu nedenle de arayüze çok yakın bölgedeki dielektrik özelliği değiştirmek (yani kırılma indisini değiştirmek) bu alanı etkileyecektir.

2.2.1.2. Yüzey plazmonları

İki farklı ortam arasında oluşan arayüzeyde p-polarize gelen ışık elektrik alan için kompleks yansıma katsayısı r_p Fresnel eşitliği ile ifade edilir.

$$r_p = \frac{E_i}{E_r} = |r_p| e^{j\varphi} = \left| \frac{\tan(\alpha - \beta)}{\tan(\alpha + \beta)} \right| e^{j\varphi} \quad (2.2.1.2.1)$$

E_i ve E_r sırasıyla gelen ve yansıyan elektrik alandır. Açılar Şekil 2.2.1.1.1'de gösterildiği gibidir. Yansıyan alanın, gelen alana göre faz değişimi j kullanılan materyallerin kırılma indislerine bağlı olarak değişir. Yansıma yoğunluklarının oranı olarak tanımlanan yansıtıcılık aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir:

$$R_p = |r_p|^2 \quad (2.2.1.2.2)$$

Eğer $\alpha + \beta = \pi/2$ ise; Eşitlik 2.2.1.2.1 payda büyür ve R_p sıfıra gider. Bu durum p-polarize ışık için hiç yansımanın olmadığı Brewster açısını tanımlar. Diğer durum ise $\alpha - \beta = \pi/2$ olduğu durumdur. Bu durumda R_p sonsuz olur. Çok küçük E_i değerleri için sonlu E_r değerleri vardır. Bu durum rezonans ile ilgilidir.

α ve β arasındaki bu ilişkiden şu sonucu çıkarabiliriz. Eğer $\alpha - \beta = \pi/2$ ise $\cos \alpha = -\sin \beta$ ve $\tan \alpha = k_{1x}/k_{1y} = -n_2/n_1$. Dalga vektörünün $k = (k_x, k_y)$ bileşenleri için aşağıdaki eşitlikler yazılabilir.

$$k_x^2 = k_1^2 - k_{y1}^2 = k_1^2 - k_x^2 \frac{\epsilon_1}{\epsilon_2} \quad (2.2.1.2.3)$$

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \quad \text{ve} \quad k_{yi} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_i^2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \quad (2.2.1.2.4)$$

ε_1 ve ε_2 sırasıyla 1. ve 2. materyalin dielektrik sabitleri ve $i = 1$ ya da 2 dir. Eşitlik 2.2.1.2.4 arayüzeydeki SPR dağılım eşitliği olarak ifade edilir. Dielektrik sabiti ve kırılma indisi arasında $\varepsilon \equiv n^2$ eşitliği vardır.

2. ortamın metal olduğu durumu düşünelim. Bu ortam çok sayıda serbest elektron içermektedir ve belli bir açısal frekansta $\omega < \omega_p$ olacağından bu ortamın dielektrik sabiti ε_2 negatif olacaktır.

$$\varepsilon_2(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (2.2.1.2.5)$$

$$\omega_p = \sqrt{4\pi n_e e^2 / m_e} \quad (2.2.1.2.6)$$

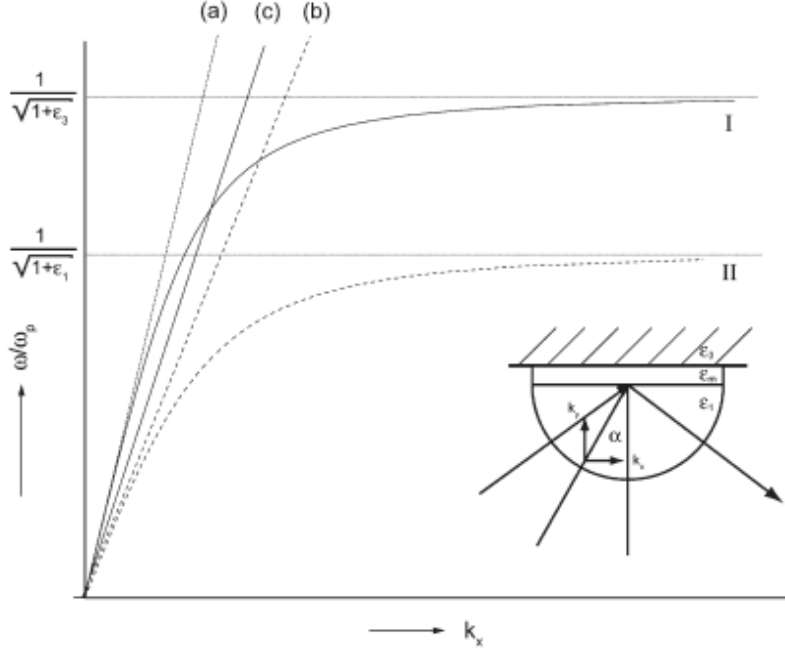
ω_p plazma frekansı , n_e serbest elektron yoğunluğu, e ve m_e sırasıyla elektron yükü ve yoğunluğudur.

Genel olarak $\omega < \omega_p$ olması elektromanyetik alanın metal içerisinde dağılmayacağı anlamına gelir. Daha spesifik olarak bakıldığında $\varepsilon_2 < -\varepsilon_1$ koşulu sağlandığında k_{yi} yalın sanal bir sayı iken k_x gerçek bir sayıdır. Bu durumda elektromanyetik dalga mevcuttur ve arayüzeyde belirgin bir şekilde oluşmaktadır. Yüzeyin her iki tarafında da dağılmış kaybolan kuyruğa sahiptir.

2.2.1.3. Yüzey plazmonlarının uyarılması

Yüzey plazmonlarının uyarılması ışığın kaybolan dalga olarak adlandırılan bileşeni ile serbest metal elektronlarının rezonansa gelmesi ile gerçekleşir. Eşitlik 2.2.1.2.5 ve 2.2.1.2.6 , Eşitlik 2.2.1.2.4 'de yerine koyulursa Şekil 2.2.1.3.1' de I ile gösterilen SPR dağılımına ilişkin grafik elde edilir. Aynı şekilde “normal” ışığın dağılımına ilişkin eğri de (a) ile gösterilmiştir. Eğride hemen dikkat çeken durum orjin dışında SPR eğrisi ile ışığın eğrisinin kesiştiği bir noktanın olmadığıdır. Bunun anlamı, bu geometride normal

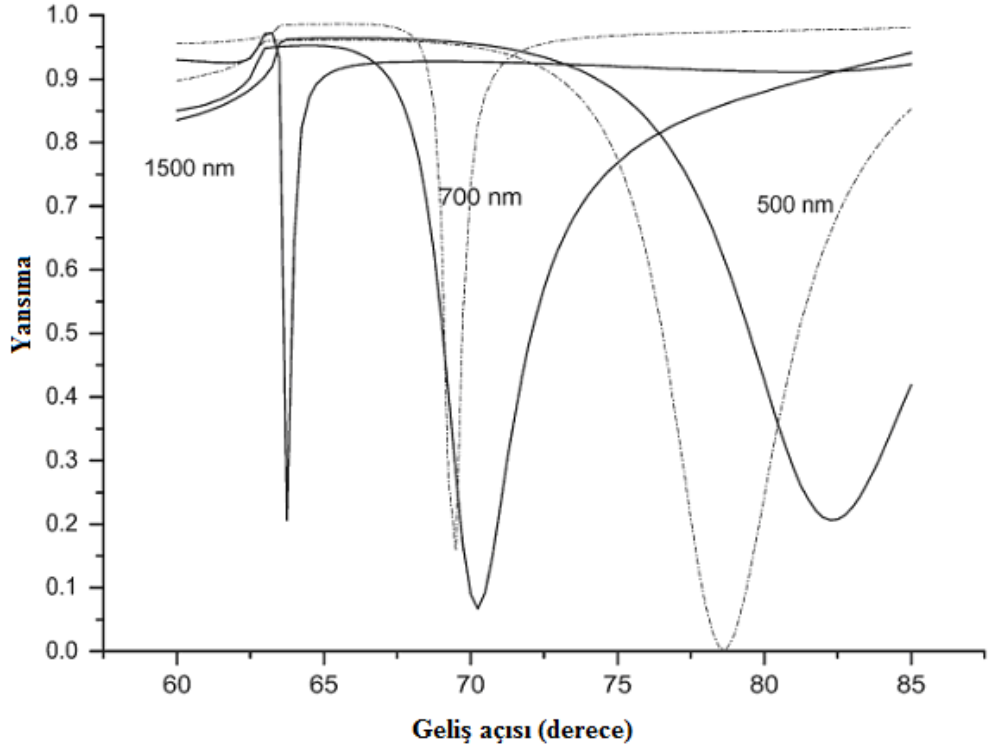
ışığın yüzey plazmonlarını uyarmak için doğru dalga vektörü ve açısal frekans sağlayamayacağıdır.



Şekil 2.2.1.3.1. Yüzey plazmonlarının dağılım eğrileri. I ve II nolu eğri sırasıyla ϵ_3/ϵ_m ve ϵ_1/ϵ_m arayüzeylerinde yüzey plazmonlarının dağılımını göstermektedir. a ve b sırasıyla çalışılan deneysel koşullar altında geliş açısına α bağlı olarak değişen “normal” ışığın ϵ_1 ve ϵ_3 ortamındaki dağılım eğrileridir. α açısını değiştirerek a ve b arasındaki herhangi bir b çizgisi elde edilebilir

Bu problemi çözmek için bir yolu Şekil 2.2.1.3.1’de gösterildiği gibi ikinci bir arayüzeyi kullanmaktır. Burada ince bir metal tabaka (dielektrik sabiti ϵ_m) dielektrik sabitleri ϵ_1 ve ϵ_3 olan iki ortam arasına yerleştirilir. İki ayrı arayüzeye Fresnel eşitliklerini uygulayarak Eşitlik 2.2.1.2.4’den daha kompleks dağılım eşitlikleri elde edilir. Fakat temel fizik kuralları değişmez. Bu durumda k_x için her biri farklı iki arayüzeyi ifade eden iki dağılım eşitliği yazılabilir. Şekilde görüldüğü gibi 1. ortamda “normal” ışığın dağılım ilişkisini gösteren eğri (b), metal/3.ortam arayüzeyinde yüzey plazmon dağılım çizgisini keser. Bu geliş açısı α nın ayarlanması ile 1. ortamdaki gelen ışığın yüzey plazmonlarını uyarabileceğini gösterir. Gelen dalga vektörünü $k_x = kn_1 \sin \alpha$ yüzey plazmonlarını uyarmak için gerekli dalga vektörüne eşitleyebiliriz. Bu yolla Şekil 2.2.1.3.1’de a ve b olarak işaretlenen iki eğri arasındaki herhangi bir k_x değeri

ayarlanabilir. Örnek olarak böyle bir eğri (c) ile gösterilmiştir. Bu Kretschman ve Raether tarafından geliştirilen ve daha sonra yüzey plazmonlarının uyarılması için kullanılan standart bir teknik haline gelen toplam iç yansımaya (ATR) olayıdır.



Şekil 2.1.3.2. Farklı uyarılma dalga boyları için 46 nm kalınlığındaki gümüş (kesikli) ve altın (kesiksiz) tabaka ile düşük kırılma indisli taraf su olmak üzere SPR minimumları

SPR için uygun bir metal, ışık ile uygun dalga boyunda rezonansa girebilecek iletim bandı elektronlarına sahip olmalıdır. Genelde en çok kullanılan metaller altın, gümüş, bakır, alüminyum, sodyum ve indiyumdur. Metal seçimi sırasında iki kritik kısıtlama söz konusudur.

- i) Metal yüzeyi oldukça saf olmalıdır; atmosferik nedenlerle oluşabilecek oksitler, sülfidler ve diğer film tabakaları rezonansı engeller.
- ii) Metal, analiz edilecek maddelerle uyumlu olmalıdır.

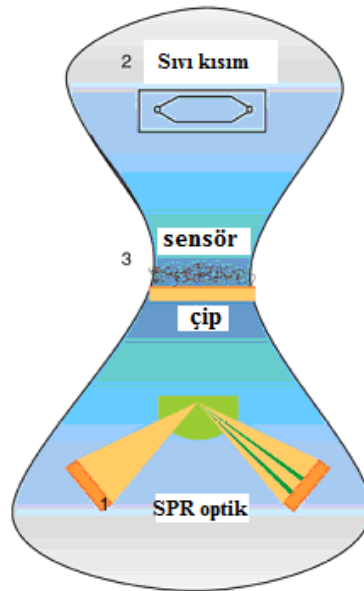
Seçilebilecek metaller arasında en yaygın kullanılanı altındır (Şekil 2.1.3.2). Altın metali, yakın IR spektrum bölgesinde oldukça güçlü ve kolay ölçülebilen rezonans

sinyali verir. Ayrıca oksidasyona ve diğer atmosferik kirlenmelere karşı oldukça dirençlidir. Üzerinde çeşitli türde bağlı molekülleri barındıracak kadar reaktiftir. Diğer metaller altın kadar kullanışlı değildir. İndiyum çok pahalı olduğu için, Na oldukça reaktif olduğu için, Ag ise oksidasyona karşı dirençli olmadığı için pek tercih edilmezler.

2.2.2. Yüzey plazmon rezonans sistemi

SPR cihazları bir sistem içerisinde entegre edilmiş üç temel bölümden oluşur: optik, sıvı sistem ve sensör çip. Cihazlar performanslarını etkileyen optik , sıvı sistem ve otomasyon derecesi açısından farklılaşırlar. İlave olarak , sensör çiplerin kalitesi ve özellikleri biyomoleküllerin etkileşimleri ile ilgili ölçümleri etkiler.

Şekil 2.2.2.1’de optik, sıvı sistem ve sensör çipin entegre edildiği SPR cihazı şematize edilmeye çalışılmıştır. Belirtildiği gibi sensör çip optik sistem ile (kuru bölüm) sıvı sistem, akış hücresi (sıvı bölüm) arasında fiziksel bir bariyer olarak yer almaktadır.



Şekil 2.2.2.1. SPR sistemindeki 3 ana bölümün şematik gösterimi.: (1) SPR optik, (2) sıvı sistem, (3) sensör çip

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

Bu konfigürasyonda, Şekil 2.2.2.2' de gösterildiği gibi, bir prizma p-polarize ışığı ince altın metalle kaplanmış sensör yüzeyiyle eşleştirir. Işık fotodiyot ya da bir kamera kullanılarak onun şiddetini ölçecek olan dedektöre yansıtılır.



Şekil 2.2.2.2 Yüzey plazmonlarının uyarılmasında kullanılan Kretschmann konfigürasyonu

Grating coupler içeren cihazlarda ışık daha düşük kırılma indisli substrat üzerine yansıtılır. Pratikte bunun anlamı, elipsometrik cihazlarda olduğu gibi fotonların yüzey plazmon dalgalarını oluşturmasından önce ışığın sıvı içerisinde yol aldığıdır. Bunun yanında bazı cihazlar kaymayı ölçmek için optik dalgaları kullanırlar. Tüm konfigürasyonlarda ortak olan olgu; sensör yüzeyindeki kırılma indisi değişimlerini ölçmek, direkt, işaretleme olmaksızın ve eş zamanlı ölçüm alabilmektir.

SPR sensörler sensör yüzeyi yakınındaki kimyasal ve biyolojik bileşiklerin çok düşük miktarlarını ölçebilme kapasitesine sahiptir. Biyomoleküler bağlanma olayının dedekte edilebilmesi biyomoleküllerin sensör yüzeyinde toplanmasıyla gerçekleşir. Çünkü bu durumda biyomoleküller dengeleme çözeltisi olarak kullanılan elektrolit ile yer değiştirerek kırılma indisinin değişimine neden olmaktadır. Protein molekülleri su

moleküllerinden daha yüksek bir kırılma indisine sahiptir ($\Delta n \sim 10^{-1}$). Bir çok SPR cihazının hassasiyeti $\Delta n \sim 10^{-5}$ ya da 1pg protein/mm² aralığındadır.

2.2.3. YüzeY plazmon rezonans tekniğinin klinik tanı amaçlı kullanımı

Son yıllarda klinik uygulamalarda yüzeY plazmon rezonans temelli tayin metodlarının kullanılması ilgi çekmektedir. Yapılan çalışmalar ile çok sayıda hastalığa ait biyomarker, hormon ve ilaçlar için SPR temelli sensörler geliştirilmiştir. Bu tayin deneylerinin çoğu minimal ya da hiç matriks etkisinin olmadığı saf örneklerde gerçekleştirilmiş ancak klinik örnekler ile çalışılmamıştır.

SPR sistemleri üreten firmalar geniş bir yelpaze oluşturmaktadır (Biacore, IBIS, GWC Technologies, GenOptics, Biosensing Instruments, K-Mac ve Lumera gibi). Ancak bu cihazlar araştırma alanında kullanıma yöneliktir. Günümüzde klinik tanımayı kolaylaştıran, insan örneklerinde aynı anda çok sayıda ölçüm yapabilen, az sayıda eğitilmiş insana ihtiyaç duyan taşınabilir SPR tayin platformları yoktur. Klinik örneklerde SPR ile tayin yapmak birkaç nedenden dolayı çok uygundur.

1. Dedeksiyon hızlıdır. Dedeksiyon yüzeYye yakın bölgedeki refraktif indeks değişimine dayandığından spesifik bağlanma olayı gerçekleştiği anda izlenebilir. Bağlanmamış reagentin uzaklaştırılması için zaman alıcı yıkama işlemlerine gerek yoktur. Bu floresans gibi metodlar ile karşılaştırıldığında süreyi oldukça kısaltır.

2. Dedeksiyon için hedef molekölü işaretlemeye gerek yoktur. Molekölü işaretlemek onun bağlanma kinetiğini ve afinitesini etkileyebilir. Aynı zamanda metodun kompleksliğini ve reagentlerden kaynaklanan maliyeti artırır.

3. SPR temelli immunoassayler klinik kullanımı olan bir çok maddenin tayininde kullanılabilirliği açısından yeterlidir. Hassasiyet ya da tayin sınırının yetersiz olduğu durumlarda bu iki parametreyi en iyi şekilde ayarlamak için sinyal artırımını sağlayacak metodlar kullanılabilir.

4. SPR klinik uygulamalarda verimli bir şekilde kullanılacak kadar minyatürize edilebilecek basit bir optik sistem gerektirmektedir.

5. SPR sistemi çok sayıda bağlanma olayını ayrı ayrı tanımlanmış bölgelerde aynı anda dedekte edebilir. Aynı anda yapılacak ölçüm sayısı cihazın ayırma kabiliyetine ve yakalama yapılan platformdaki bileşenlerin yoğunluğuna bağlıdır.

6. Kompleks örneklerde var olan interferans yapabilecek maddelerin SPR yüzeyine spesifik olmayan bir şekilde bağlanması çok sayıda referans yüzey kullanılarak azaltılabilir.

7. Mikroakışkanlardaki son gelişmeler düşük hacimli örneklerin SPR yüzeyindeki akışının ön koşullanmasına olanak sağlamaktadır. Bu sayede non-spesifik bağlanmalar ile yüzeyin kirlenmesini minimize etmek mümkün olabilmektedir. İlaveten, kompleks örneklerin ön koşullandırılması beklenen tayin aralıklarını belirgin derecede azaltabilir, bu yüzden örnek analizi daha da basitleştirilir.

Klinik kullanımı olan SPR temelli tanıma sisteminin geliştirilebilmesi için temel gereksinimler şöyle sıralanabilir:

- (1) Minyatürizasyon ve düşük maliyet için mekanik ve optik basitlik
- (2) Analizi yapılmak istenen maddenin dedekte edilebilmesi için yeterli bir performans.
- (3) Sıcaklık ve kırılma indisi değişikliklerinde dayanıklı bir şekilde kullanılabilme
- (4) Kompleks örneklerden aynı anda, hızlı ve kantitatif analit ölçümleri yapabilecek biyoassayler geliştirilebilmesi

2.3. Moleküler Baskılanmış Polimerler ve Optik Sensör Uygulamaları

Moleküler baskılama, kalıp molekül varlığına spesifik tanıma bölgelerinin oluşması ile gerçekleşen bir olaydır. Bu tekniği kullanarak hazırlanan sentetik reseptörler, biyosensörlerde kullanılan doğal reseptörler, enzimler ve antibadiler ile kıyaslandığında

sahip oldukları yüksek afinite, spesifite, düşük maliyet ve dayanıklılık nedeniyle oldukça ilgi çeken malzemelerdir.

Biyolojik karşılıkları ile kıyaslandığında moleküler baskılanmış polimerlerin sensörlerde tanıma elementi olarak kullanılmasının bazı avantajları vardır: (Kandimalla ve Ju 2004)

- Prensipite , her tür bileşik için moleküler baskılanmış polimer hazırlanabilir ve üretim için antibadilerde olduğu gibi hayvanların kullanılmasına gerek yoktur.
- Yüksek derecede çapraz bağlı yapısı nedeniyle moleküler baskılanmış polimerler antibadilerden daha karardır. Bu nedenle asidik ya da bazik koşullarda, organik çözücülerin varlığında ya da yüksek sıcaklık ve basınçlarda rahatlıkla kullanılabilirler.
- Moleküler baskılanmış polimerler ucuz ve kolay bir şekilde hazırlanabilirler ve oda sıcaklığında kuru bir ortamda tanıma kapasitelerini kaybetmeden depolanabilirler.
- Genellikle MIP üretimi hızlı ve ucuzdur. Ayrıca hazırlanan materyal çok kez tekrar tekrar kullanılabilir.
- Bu polimerlerin sentezi lab-on-a-chip ve nanoteknoloji ile tamamen uyumludur.

Son zamanlarda protein baskılanmış polimerlerin hazırlanması için yoğun çaba harcanmaktadır. Proteinlerin organik çözücülerdeki çözünürlüğünün düşük olması, çözünme esnasında üç boyutlu yapılarının bozulması ve diğer bazı problemler nedeniyle protein seçici moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasını sınırlamaktadır. Fakat protein baskılanmış polimerlerin hazırlanması sadece sensör hazırlanmasında değil aynı zamanda tıp, tanı, proteomiks, çevresel analizler ve ilaç salınımı açısından da ilgi çekici ve iddialı bir alandır.

Moleküler baskılanmış polimerlerin optik sensörlerde tanıma elementi olarak kullanılmasının bazı dezavantajları da vardır:

- Transdüser ile entegrasyonun ve bağlanma olayının ölçülebilir optik bir sinyale dönüştürülmesindeki zorluklar. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için farklı fonksiyonellikteki yeni monomerler ya da işaretlenmiş kalıp moleküller geliştirilmekte ve sensör cevabın alınmasında kullanılmaktadır.
- Monoklonal antibadiler gibi seçici ve belirgin bağlanma bölgelerine sahip biyolojik reseptörlerin aksine moleküler baskılanmış polimerler genellikle hetorejen bağlanma bölgelerine sahiptirler.
- Çoğu durumda biyolojik reseptörler ile kıyaslandığında afinite sabitleri daha düşük ve bağlanma kinetikleri biyolojik reseptörlere göre daha yavaştır.
- Biyomoleküllerin mükemmel performans gösterebildiği sulu çözeltide seçici tanıma sınırlıdır.
- MIP sentezi genellikle fazla miktarda kalıp molekül kullanılmasını gerektirir. Bu durum pahalı ya da toksik bir kalıp molekül kullanılması durumunda bir sınırlamaya neden olabilmektedir. Fakat prensipte bu moleküllerin polimerizasyondan sonra geri kazanılması ya da kalıpların sentetik analoglarının kullanılması mümkün olmaktadır.

Bu materyallerin optik sensör hazırlamadaki kullanımları, uygun fonksiyonellikte yeni monomerlerin ve işaretli analit türevlerinin varlığına ve transdüser ile etkin bir entegrasyona olanak sağlayan polimer hazırlama prosedürlerinin optimizasyonuna paralel olarak yavaş bir şekilde artmaktadır.

Sentetik malzemeler olması nedeniyle , baskılanmış polimerlerin enzim ya da reseptörlerden daha kararlı olması doğal bir sonuçtur. Bu yüksek derecede kararlılığın altında yatan esas neden, baskılama ile hazırlanan polimer içerisinde oluşturulan bağlanma bölgelerinin rijit olmasını sağlayan yüksek çapraz bağlanma oranıdır. Baskılanmış polimerler asidik ve bazik koşullara ve organik çözücüler ile muameleye dayanıklıdır. Aynı zamanda yüksek ve düşük basınç ya da ekstrem sıcaklık değerlerinde kararlıdır.

Baskılama polimerizasyonu ile yapay reseptörlerin hazırlanması için oldukça ucuz bir yöntemdir. Çoğu durumda bir baskılama prosedürünün maliyeti sadece kullanılan kalıp

moleküle bağılıdır. Daha da ötesi eğer kalıp molekül pahalı ise kalıp molekülü geri kazanıp tekrar kullanmak mümkündür. Alternatif olarak ucuz kalıp molekül analogları MIP hazırlamada kullanılabilir. Genel olarak şunu söyleyebiliriz ki; MIP hazırlama işleminin maliyeti doğal reseptörlerin üretilmesi prosesinden 3-4 kat kadar daha ucuzdur ve bu da MIP teknolojisini diğer yöntemler ile yarışabilir duruma getirmektedir.

Moleküler baskılanmış polimerlerin organik çözücüler ile kullanılabilmesi biyomimetik sensörler ve kimyasal ve farmasötik üretiminde kullanım gibi yeni uygulama alanları açmaktadır. Kalite kontrol ve üretim prosesinin online görüntülenmesi gibi alanlar oldukça ilgi çekicidir.

Multisensör hazırlama ile ilgili en önemli problemlerden biri doğal reseptör ve enzimlerin performanslarındaki önemli farklılıklardır. Bu moleküllerin her biri farklı kararlılık, aktivite ve hassasiyete sahiptirler ve çoğu durumda da farklı substratlar ve iyonik şiddetleri farklı olan değişik tampon sistemlerine ihtiyaç duyarlar. Bu gibi faktörler nedeniyle doğal biyomoleküllerin tek bir donanım üzerine entegrasyonu problemlidir. MIP hazırlanması ise esnek koşullarda yapıldığından ve farklı monomerler kullanılabileceğinden çok sayıda kalıp molekül için neredeyse tamamen eşit operasyonel koşullara (pH, çözücü, sıcaklık v.b) sahip polimerler hazırlanabilir.

Moleküler baskılanmış polimerleri geleneksel fotorezist materyaller gibi kullanmak da ilave avantajlar getirir. Moleküler baskılanmış polimerler, maskeler ve fotopolimerizasyon yöntemi kullanılarak dedektör yüzeyine spotlar şeklinde immobilize edilebilir. Moleküler baskılanmış polimerlerin çok küçük boyuttaki sensörler ile uyumu MIP temelli multi-sensörlerde bu materyalleri kullanma olasılığını arttırmaktadır.

Moleküler baskılanmış polimerlerin sonuncu fakat bir o kadar da önemli özelliklerinden birisi de pratik olarak her tür bileşik için hazırlanabilmeleridir. İnorganik iyonlar, ilaçlar, nükleik asitler, proteinler ve hatta hücreler MIP hazırlanması mümkün olan kalıp moleküllerdir. Antibadiler de çok sayıda bileşik için üretilebilirler ancak moleküler baskılanmış polimerler ile kıyaslandığında bu moleküllerin iki temel dezavantajı vardır.

Birincisi, küçük moleküller için antibadi üretilebilmesi için bu küçük moleküllerin türevlendirilmesi gerekmektedir. Bu gereksinim bir çok basamağın ilave edilmesini gerektirir ve bu ilave işlemler çoğu zaman tanıma özelliklerini önemli ölçüde değiştirmektedir. İkincisi, antibadi hazırlanmasındaki esneklik 20 doğal aminoasit ile sınırlıdır. Ancak MIP hazırlanmasında doğal bileşikler ile kıyaslanamayacak esneklik ve çeşitlilikte bağlanma bölgesi tasarlanmasını olanaklı kılan çok sayıda monomer mevcuttur.

2.3.1. MIP temelli yüzey plazmon rezonans sensörler

Moleküler baskılanmış polimerler SPR sensörlerin hazırlanmasında seçici tanıma elementleri olarak kullanılabilirler. Bu amaçla polimer metal filmin üzerinde hazırlanır ve SPR analit varlığında polimer yüzeyinde meydana gelen kırılma indisi değişimlerini belirlemede kullanılır. SPR yüksek hassasiyete sahip bir sistem olmasına karşın moleküler baskılanmış polimerlerin SPR ile uygulamaları sınırlıdır. Temel sebep baskılanan moleküllerin küçük olması nedeniyle meydana getirdikleri kırılma indisi değişimlerinin dedeksiyonunun güç olması ve bunun da analitik performansı düşürmesinden kaynaklanmaktadır. Tüm bu sınırlamalara rağmen bu materyallerin SPR sistemlerinde tanıma elementi olarak kullanım potansiyelini gösteren çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 2.3.1.1).

MIP temelli SPR sensörler ile ilgili ilk çalışmalardan biri sulu çözeltide teofilin, kafein ve ksantini tayin etmeye yönelik olarak Lai ve ark. (1998) tarafından gerçekleştirilmiştir. Parçalanıp elenmiş moleküler baskılanmış polimerler gümüş film üzerine tutturulmuş ve buharlaştırmadan sonra tanımayı gerçekleştirecek olan tabakalar 60 dakika süre ile örnek çözeltilisine daldırılmıştır. Filmler kurutulmuş ve SPR açısındaki kaymalar analit konsantrasyonu ile korele edilmiştir. Lineer dinamik aralık 6 mg/mL 'ye kadar ulaşmakta olup teofilin için tayin limiti 0,4 mg/mL olarak belirlenmiştir. Ölçümlerin kesinliğinin, tanıma tabakasının hazırlanmasındaki tekrarlanabilirlik ile sınırlı olduğu ve kararlılığın da depolanma koşullarına bağlı olarak 3 ila 5 gün olduğu belirlenmiştir. Seçicilik çalışmalarında teofilin, kafein ve ksantine benzeyen sekiz farklı bileşik kullanılmış ve yüksek seçicilik değerleri elde edilmiştir.

Çizelge 2.3.1.1. MIP temelli SPR sensörlerin analitik karakteristikleri

Kalıp molekül	Fonksiyonel monomerler	Çapraz bağlayıcı/porojen	Dinamik aralık	Dedeksiyon limitleri	Örnek	Referans
Teofilin						
Kafein	Metakrilik asit	EGDMA/kloroform	1-6 mg/mL	0,4 mg/mL	-	Lai ve ark. 1998
Ksantin						
Teofilin	N-(N-propil) akrilamid-metakrilik asit	N,N'-metilen bisakrilamid/asetonitril	-	10 ⁻⁶ M	-	Lavine ve ark. 2007
Sialik asit	p-vinilbenzen boronik asit-N,N,N-trimetilaminoetil metakrilat - HEMA	EGDMA/DMF	0,1-0,5 mM	-	-	Kugimiya ve Takeuchi 2001
NAD(P)H NADP ⁺	Akrilamid-akrilamidofenilboronik asit	N,N'- metilenbisakrilamid	10 ⁻⁶ -10 ⁻³ M	10 ⁻⁷ M	-	Raitman ve ark. 2004
Domoik asit	2-(dietilamino) etil metakrilat	EGDMA/su	5-100 µg/L	5 µg/L	-	Lotierzo ve ark. 2004
Dopamin	Akrilik asit-N-izopropilakrilamid	N,N'-metilen bisakrilamid/DMSO	10 ⁻⁹ -10 ⁻³ M	-	-	Matsui ve ark. 2005
DPDPE	n-vinil piroidon , 3-(akriloksisipril)	Etilenglikol diakrilat /n-bütanol-su	5-350 pM	-	-	Devanathan ve ark. 2005
δ-opioid reseptör	trimetoksisilan					
Glukoz	Poliialilamin	Epiklorhidrin/su	0,1-20 mg/mL	-	idrar	Banerji ve ark. 2006
N,N'-didansil-L-sistin	2-vinil piridin	EGDMA/asetonitril	0,1-1 mg/mL 0,01-0,3 mg/mL	-	-	Li ve ark. 2006a,b
Didansil-L-lizin						
Okratoksin A	Pirol	- / etanal:su(1:9)	0,05-0,5 mg/L	-	Beyaz şarap	Yu ve Lai 2005

Son zamanlarda Lavine ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada ise poli N-(N-propil) akrilamid polimerinin sulu çözeltide analit konsantrasyonuna bağlı olarak şişme özelliklerinden yararlanarak yine bir teofilin sensörü hazırlanmıştır. Bu amaçla teofilin baskılanmış nanoküreler (300 nm çapında) süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlanmış, altın film üzerine kaplanarak elektrostatik etkileşimler ile yüzeyde tutulmuştur. 10^{-6} M kadar düşük konsantrasyonda bile teofilini dedekte edilebilen bir partikül şişmesine neden olmuştur. Bu davranış polimer ağının hidrofilitesinin artması yani polimer içerisindeki su yüzdesinin artması nedeniyle polimerin geçiş sıcaklığının artması ile açıklanmıştır. Partiküllerin şişmesi iyonik şiddetten etkilenmemiştir ve cevap süresi 10 dakikadır. Fakat partiküllerin altın yüzeyinde tutunmasında problemler yaşanmıştır. Ayrıca tekrar eden şişme ve büzülme olayları sensörün dayanıklılığını ve tekrar kullanımını azaltmıştır.

Kugimiya ve Takeuchi (2001) sulu çözeltide gangliozid GM1(GM1) içeren sialik asit tayinine yönelik sialik asit baskılanmış SPR sensör hazırlamışlardır. Rezonans açısı 0,1-1 mg/mL GM1 derişim aralığında lineer olarak değişmiştir. Düşük molekül ağırlığı nedeniyle referans şeker olarak kullanılan galakturonik asit ya da sialik asit varlığında sinyal alınamamıştır. Sialik asit ancak sabit konsantrasyonda, GM1 varlığında (1 mg/mL) yarışmalı adsorbsiyon ile tayin edilebilmiştir. Yapılan çalışma ile hazırlanan MIP temelli SPR sensörün selektif lektinler ile hazırlanan SRP biyosensörlere göre 200 kat daha ucuz olduğu belirlenmiştir.

Li ve ark. (2002) in situ bağlanma ve elüsyonu izlemek için L-fenilalanin metil ester için MIP temelli SPR sensör hazırlamışlardır. Fakat bu çalışmada SPR sinyalinde gözlenebilir bir değişim için oldukça yüksek derişimde örneklere (1 g/L) ihtiyaç duyulmuştur.

Taniwaki ve ark. (2003) polisülfonu glutoamil kalıntısı türevi bir oligopeptid ile birlikte baskılama materyali olarak kullanarak, SPR tekniğinin moleküler etkileşimleri incelemek için ne kadar uygun ve kolay bir yöntem olduğunu göstermişlerdir. 9-Etiladenini kalıp molekül olarak kullanarak afinite sabiti baskılama faktörüne bağlı

olarak $1,3 \times 10^4$ ile $1,6 \times 10^4$ L/mol aralığında değişen bir SPR sensörü başarıyla hazırlamışlardır.

Raitman ve ark. (2003, 2004) poliakrilamid-poliakrilamidofenilboronik asit kopolimerini kullanarak β -nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+), β -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP^+) ve bu moleküllerin indirgen hali olan NAD(P)H nin analizi için MIP temelli SPR sensör hazırlamışlardır. Moleküler baskılanmış polimerik filmin adhezyonunu arttırmak için ilk olarak altın yüzeyinde sistamin tek tabaka oluşturulmuş ve akrilik asit kovalent olarak bağlanmıştır. Fonksiyonel monomerler ile sağlanan kovalent ve kovalent olmayan etkileşimler ile oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde edilmiştir. İlginç bir şekilde artan analit konsantrasyonu ile rezonans açısı azalmıştır. Bu davranışın substratın bağlanmasına eşlik eden şişmeden kaynaklandığı düşünülmüştür. NAD(P)^+ ve NAD(P)H kofaktörleri 10^{-6} ile 10^{-3} aralığında tayin edilebilmiştir. Hazırlanan sensörlerin günlük operasyona bağlı olarak 2 ila 10 gün arasında değişen bir süre kararlı olduğu belirlenmiştir. Seçicilik mükemmeldir ve sensör NAD(P)^+ ve NAP^+ moleküllerini birbirinden ayırabilmektedir.

Lotierzo ve ark. (2004) marin toksini domoik asit için MIP temelli SPR sensör hazırlamışlardır. Domoik asit dedekte edilebilir bir kırılma indisi değişimine neden olamayacak kadar küçük bir molekül olduğundan horse radish peroksidaz işaretli-domoik asit kullanılmıştır. Domoik asit için tayin sınırı $5 \mu\text{g/L}$ olarak belirlenmiştir ki bu değer monoklonal antibadiler ile hazırlanan sensör ile elde edilenden 3 kat daha iyidir. Ayrıca monoklonal antibadiler beş kez tekrar kullanımdan sonra aktivitelerini kaybederken , MIP sensörlerin rejenere edilebildiği , en az 30 kez tekrar kullanılabilirdiği ve 4°C 'da depolandığında 3 ay boyunca dayanıklı olduğu belirlenmiştir.

Matsui ve ark. (2005) altın nanopartiküller gömülü MIP-temelli SPR sensör hazırlamışlardır. Yapılan çalışmada sinyal yoğunluğunun, altın nanopartikül gömülmemiş MIP-SPR sensöre göre çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Analit bağlanması sırasında MIP şişmekte ve altın nanopartiküller ile sensör yüzeyindeki film arasındaki uzaklık artmaktadır. Bu da SPR açısındaki kayma şiddetinin artmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada dopamin sensörü hazırlanmış ve nanomolar analit

konsantrasyonlarında bile sinyal alınabilmiştir. Ancak baskılanmamış polimer ile benzer bir çalışma ve kıyaslama yapılmamıştır.

Benzer şekilde Tokavera ve ark. (2006) altın nanopartikülleri kullanarak kolesterol analizi için ultra ince MIP/SPR nanosensör hazırlamışlardır. Lokalize yüzey plazmon rezonans olarak adlandırılan metal nanopartikülleri saran yük yoğunluk titreşimleri, etraftaki değişimlere karşı oldukça hassastır. Bu prensipten yararlanarak geliştirilen spektroskopik metod ise transmisyon yüzey plazmon rezonans spektroskopisidir (T-SPR). MIP in tanıma bölgelerine kolesterol bağlanması yüzeydeki tüm sensör katmanlarının yansımada değişmeye yol açmış ve T-SPR absorpsiyon maksimumu 56 nm kaymıştır. Benzer bileşikler olan stigmasterol (14 nm), digitoksigenin (26 nm) ve progesteron (30 nm) için ise daha düşük değerler elde edilmiştir. Fakat ne yazık ki yine diğer çalışmada olduğu gibi baskılanmamış polimer ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Devanathan ve ark. (2005) sentetik siklik enkefalin analogu spesifik bir afyon ilacı olan δ -opiod G-protein bağlı reseptör anagonistinin (DPDPE) pikomoların altındaki düzeylerini belirleyebilen bir sensör hazırlamışlardır. Dedeksiyon bağlanmanın hem s-hem de p-polarize ışıpta kırılma indisinde artışın ve film kalınlığının arttığını işaret eden daha büyük açılara kayma presibini esas alan plazmon-dalga güdümlü rezonans spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. DPDPE bağlanmasına bağlı olarak s-polarizasyonunu kullanarak elde edilen spektral kaymalar p-polarizasyonu kullanılarak elde edilen kaymalardan daha düşük değerdedir. Bu durum polimer matriks içerisinde yapısal bir anizotropinin olduğunu yani bağlanma bölgelerinin rastgele yönlendiğini göstermiştir. Elde edilen afinite değerleri MIP ve kalıp molekül arasında gerçekleşen hidrojen bağı, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler gibi kooperatif multivalent etkileşimler sayesinde doğal reseptörlerin afinite değerlerinden çok daha iyidir. Baskılanmamış polimer ile hiçbir sinyal alınmamıştır. Bağlanma 3 dakika gibi kısa bir süre içerisinde gerçekleşmiştir ancak rejenerasyon süresi oldukça uzundur (birkaç saat). Fakat polimerik film yalnızca bir kez kullanılabilir. Rejenerasyondan sonra fonksiyonelliğin kaybolması ince filmdeki moleküler boşlukların tanıma ile bozulması ve spesifik ligandın salınması ile açıklanmıştır.

Huang ve ark. (2006) çok az örnek hacmi ile güvenilir bir analiz gerçekleştirilebilen SPR sensör hazırlamışlardır. Çalışmada mikroakışkan bir sistem kullanılmıştır. μM konsantrasyon aralığında progesteron, kolesterol ve testesteron, hem klasik SPR hem de mikroakışkan SPR sistemi ile analiz edilmiş ve bu iki sistemin performansı karşılaştırılmıştır. Özellikle kolesterol ve progesteron, gerçek örneklerde ve herhangi bir deriştirme yapmaksızın analiz edilmiştir. Mikroakışkan SPR/MIP sistem kullanıldığında, analitler ile tanıma bölgelerini içeren yüzeyin daha iyi etkileşmesi nedeniyle daha yüksek assosiasyon hızlarına ulaşılmıştır. Ayrıca geleneksel SPR sistemi ile kıyaslanabilir bir hassasiyet elde edilmiş ve daha az örnek hacimleri ile çalışılabilmiştir. Ancak ne yazık ki baskılanmamış polimer ile çalışılmamıştır. Aynı bilim adamları array-MIP film oluşturulan çok kanallı mikroakışkanlı sistem ile de bir çalışma yapmışlar ve bu sayede çok sayıda örneğin yüksek bir ayırma gücü ile aynı anda analiz edilebileceğini göstermişlerdir (Lee ve ark. 2006).

Banerji ve ark. (2006) idrarda glukoz tayini için glukoz fosfat varlığında poliallilaminin çapraz bağlanmasıyla hazırlanan bir polimer ile MIP temelli bir SPR sensör hazırlamışlardır. Hazırlanan sensörün cevap aralığı fizyolojik açıdan önemli düzeyi kapsamakta ve bu sayede ön bir işleme gerek kalmamaktadır (1-20 mg/mL). Fakat sensörün farklı bölgelerinde, farklı analit bağlama özellikleri gözlenmiştir. Farklı bir yaklaşımda da , MIP içerisine altın nanopartiküller gömülmüş ve SPR sinyalinde 10 katlık bir artış sağlanmıştır. Nanopartiküllerin varlığı daha homojen bir yüzeyin oluşmasını sağlamış ancak rejenerasyon süresinin 5 dakikadan 50 dakikaya uzamasına neden olmuştur.

Li ve Husson (2006a) atom transfer radikal polimerizasyonunu kullanarak MIP temelli bir SPR sensör hazırlamışlar ve bu sensör ile dansillenmiş amino asitlerin adsorbsiyon kinetikleri ve bağlanma izotermelerini incelemişlerdir. Polimerin direkt olarak altın yüzeyinde graflama ile hazırlanması kalınlığı ayarlanabilen oldukça homojen bir film oluşumunu ve dolayısıyla SPR çalışmalarında ortaya çıkabilecek tabakalar arası difüzyonel kütle sınırlamasını ortadan kaldırmıştır. MIP yüzeylerin bağlanma kapasitesinin baskılanmamış yüzeylere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer kalıp moleküller kullanıldığında seçiciliğin azaldığı ve de pH 'a bağımlı olduğu

görülmüştür. Bu çalışma ile iyonlaşabilen analitler ve/veya monomerler içeren sulu MIP sistemlerinde, pH değişiminin seçiciliği ayarlamada etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı bilim adamları bağlanma bölgelerinin yüzeydeki yoğunluğunu kontrol etmeye olanak sağlayan moleküler baskılanmış tek tabakaların hazırlanması ile ilgili iki yeni prosedür geliştirmişlerdir (Li ve Husson 2006 b). Bu yeni yaklaşım ile altın yüzeyinde, düşük bağlanma enerjisine sahip kalıp moleküller baskılanabilmekte ve cevap süresi bir kat daha kısaltılabilmektedir. Bu metodlarda ortadan kaldırılması gereken sınırlamalar şöyle sıralanmıştır: (a) Tanıma mekanizması sadece boyut ve şekle dayanmaktadır. Kalıba özgü fonksiyonel bağlanma bölgeleri yoktur. Bu nedenle spesifik olmayan bağlanma yüksek düzeyde olabilir, (b) Depolanma süresi oldukça kısadır. Yüzeyin hazırlanmasından sonraki 10 gün içerisinde büyük olasılıkla şekle özgü bağlanma bölgelerinin yapısının bozulması nedeniyle bağlanma kapasitesinin %30-40'ı azalmaktadır.

Slinchenko ve ark. (2004) ilk kez DNA 'nın doğal yapısını bozmaya gerek kalmadan ds-DNA 'nın bağlanma kinetiğini ve etkileşimini incelemeye olanak sağlayan MIP temelli SPR sensör hazırlamışlardır. Baskılanmış polimerin hazırlanmasında DNA 'nın A-T baz çiftiyle hidrojen bağı yapabilen 2-vinil-4,6-diamino-1,3,5-triazin fonksiyonel monomer, kalıp molekülün yapıdan kolayca uzaklaştırılabilmesi için düşük konsantrasyonda, N,N'-metilenbisakrilamid ise çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Verotoksin gen sekansına eş olan sentetik ds-DNA 'nın baskılanmış polimere bağlanması FTIC-işaretleli dsDNA kullanılarak floresans spektroskopisi ile, bağlanma kinetiği ise SPR ile analiz edilmiştir. Sensör 1-10 nM konsantrasyon aralığındaki verotoksin ds-DNA analizi için kullanılmıştır. Tanıma deneyleri oligo(dG)-oligo(dC) DNA 'lar ile gerçekleştirilmiş ve rezonans açısında çok düşük bir kayma değeri gözlemlendiğinden hazırlanan moleküler baskılanmış polimerin seçiciliğinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

MIP sentezi için orijinal moleküler tanıma materyalleri olan poli[(2-okso-1,3-dioksolan-4-il)metilmetakrilat-ko-akrilonitril ve ticari bir sentetik poliamid-imid polimeri (Torlon® 4000T) SPR sensör yüzeyinde film oluşturmasında kullanılmıştır (Yoshikawa ve ark. 2005 a,b). İlk materyal Ac-T-trp ve Ac-L-trp kalıp molekül olarak kullanılarak

kiral ayırma yapabilen MIP hazırlanmasında kullanılmıştır. Torlon® 4000T, 9-etiladeninin kalıp molekül olduğu bir çalışmada kullanılmıştır. Elde edilen yüksek afinite sabitleri, seçicilik ve düşük spesifik olmayan bağlanma değerleri ile bu yeni materyallerin MIP hazırlanmasında uygun olduğu belirlenmiştir. Yu ve Lai (2005) elektropolimerizasyon yöntemini kullanarak tahıl ve şarap ekstraktlarında mikotoksin okratoksin A analizine yönelik MIP temelli bir SPR sensör hazırlamıştır. Hazırlanan sensör 0,05-0,5 mg/L konsantrasyon aralığında lineer bir korelasyon göstermiştir. Tayin sınırı ise 0,01 mg/L olarak belirlenmiştir.

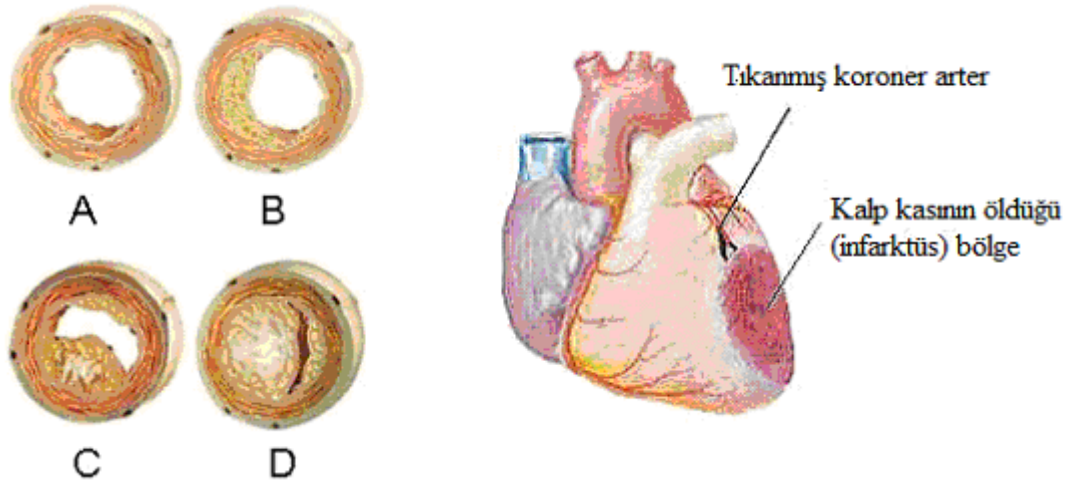
Son zamanlarda Matsunaga ve ark. (2007) lizozime seçici MIP temelli bir SPR sensör hazırlamışlardır. Çalışma ön polimerizasyon karışımında (40 mM) ve geri bağlanma tamponunda (20 mM) NaCl bulunmasının spesifik olmayan bağlamayı önemli derecede azalttığını göstermiştir. NaCl varlığında lizozimle etkileşime giren fonksiyonel monomerin kararlı konformasyonları oluşmakta ve bu sayede sadece lizozime özgü bağlanma bölgelerine sahip homojen MIP hazırlanabilmektedir. Fakat geri bağlanma tamponunda NaCl konsantrasyonunun 20 mM 'ın üzerine çıkması sadece zayıf ve non-spesifik bağlanmayı değil aynı zamanda spesifik bağlanma bölgelerinin de lizozime olan afinitesini azaltmaktadır. Son olarak çalışmada NaCl 'nin benzer molekül ağırlığına sahip sitokrom c gibi proteinlerin varlığında da seçiciliği arttırdığı belirlenmiştir.

Uzun ve ark. (2009) insan kanında antibadi tayinine yönelik sensör geliştirmek için SPR çip yüzeyinde Hepatit B yüzey antibadi baskılanmış poli(hidroksietil metakrilat-N-metakriloilklorür-L-tirozin metilester) (PHEMAT) film hazırlamışlardır. Maksimum tayin sınırı 208,2 mIU/mL, K_A ve K_D değerleri sırasıyla 0,015mIU/mL ve 66 mL/mIU olarak hesaplanmıştır. SPR çipin kontrol deneyleri immünize edilmemiş antibadi negatif serum kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçları antibadi negatif seruma karşı dikkate değer bir sensör cevabının olmadığını göstermiştir.

2.4. Kalp Krizi

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

Kalp krizi kalbe kan taşıyan bir veya daha fazla koroner arterin tamamen tıkanması ya da kalp kasına taşınan kanın azalması durumunda ortaya çıkmaktadır. Tıkanma genellikle ateroskleroz nedeniyle olmaktadır. Ateroskleroz plakların ya da kan pıhtılarının koroner arterlerde birikmesidir. Bazen de nedeni bilinmeyen bir şekilde sağlıklı ya da aterosklerotik koroner arterde spazm olmakta ve kalbe giden kan azaldığından kalp krizi meydana gelebilmektedir (Şekil 2.4.1). Kalp krizi geçiren hastaların yaklaşık yarısı yardım almadan önce en az iki saat beklemektedir. Bu da hastaların ani ölüm ya da kalp yetersizliği şansını arttırmaktadır. Kalp krizi süresince arterin tıkalı kalma süresi uzadıkça, kalbin göreceği hasar da o kadar fazla olmaktadır.



Şekil 2.4.1. Damardaki aterosklerozun zaman içinde ilerlemesi: (A ve B), önemli darlık oluşturması (C), ve sonunda tıkanarak (D) kalp krizine yol açması

Eğer kalbe taşınana kan miktarı ciddi şekilde azalır ve bu süre uzarsa, kas hücreleri geri dönüşümsüz bir şekilde yaralanabilir, ölebilir ve hatta hasta ölebilir. Bu nedenle kalp krizinin belirtilerinin erkenden anlaşılması çok önemlidir. Kalp krizlerinin yaklaşık % 20 'si belirtisizdir ve kişi olup bitenden habersizdir. Hasta acı hissetmemesine karşın, belirti göstermeyen kalp krizi bu süre içerisinde kalp kasına zarar vermeye devam etmektedir. Kalp krizinin meydana getirdiği hasar aynı zamanda tıkanmanın nerede olduğuna, kalp ritminin bozulup bozulmadığına ve başka bir arterin bu bölgeye kan taşıyıp taşımadığına da bağlıdır. Sol koroner arterdeki tıkanmalar genellikle sağ arterdeki tıkanmadan daha ciddidir. Tıkanmalar kalp atım düzensizliğine ve ani ölüme neden olabilmektedir.

2.4.1. Kalp krizinin nedeni ve belirtileri

Kalp krizleri genellikle ciddi koroner arter hastalığından kaynaklanmaktadır. Bir çok kalp krizinin nedeni aterosklerotik plaklar üzerinde oluşan kan pıhtılarıdır. Bu da kalbe oksijen bakımından zengin kanın ulaşmasını engellemektedir. Koroner arter hastalık oluşum riskini arttıran çok sayıda ana ve yardımcı nedenler vardır. Bu nedenlerden bazıları değiştirilebilir iken bazıları değiştirilemez. Ana risk faktörleri koroner arter hastalık riskini büyük ölçüde etkilemektedir.

Değiştirilemeyen ana risk faktörlerini şöyle sıralayabiliriz:

- **Kalıtısal özellikler** : Anne babasında koroner kalp hastalığı olan kişilerin bu hastalığa yakalanma riski daha yüksektir
- **Cinsiyet**: 60 yaşın altındaki erkeklerin kalp krizi geçirme şansı aynı yaştaki kadınlara göre daha fazladır.
- **Yaş**: 45 yaşın üzerindeki erkekler ve 55 yaşın üzerindeki kadınlar riskli grupta yer almaktadırlar. Daha yaşlı insanların (65 üzeri) kalp krizi geçirme olasılıkları daha fazladır. Yaşlı kadınların kalp krizinden sonraki bir hafta içerisinde hayatını kaybetmesi olasılığı erkeklere göre 2 kat daha fazladır.

Değiştirilebilen ana risk faktörlerini ise şöyle sıralayabiliriz:

- **Sigara kullanımı:** Sigara içmek hem koroner kalp hastalığına yakalanma hem de bu hastalıktan ölme riskini çok büyük ölçüde arttırmaktadır. Sigara kullanan insanların ani kardiyak ölüm olasılığı kullanmayan insanlara göre 4 kat , kalp krizi geçirme riski ise 2 kat daha fazladır. Aynı zamanda sigara kullananların kalp krizinden sonraki bir saat içerisinde hayatını kaybetme olasılığı çok daha yüksektir.
- **Yüksek kolesterol:** Kolesterol vücut tarafından üretilen, aynı zamanda et, yumurta , ve diğer hayvansal ürünlerden alınabilen yumuşak yağimsı bir maddedir. Kolesterol düzeyi yaş, cinsiyet, kalıtsal özellikler ve diyetten etkilenmektedir. Kandaki kolesterol düzeyi arttıkça koroner kalp hastalığına yakalanma riski artmaktadır. Diğer faktörler ile biraraya geldiğinde risk daha da artmaktadır. 240 mg/dL ve üzeri kolesterol yüksek risk, 200-239 mg/dL kolesterol ise sınır risk değeridir. LDL kolesterol içinde diğer faktörlere de bağlı olarak yüksek risk 130-159 mg/dL düzeyinde başlamaktadır.
- **Yüksek kan basıncı:** Kan basıncının yüksek olması kalbin daha çok çalışmasına ve zaman içerisinde gücünü kaybetmesine neden olmaktadır. Bu da kalp krizi, böbrek yetmezliği ve konjestif kalp yetmezliği (kalbin vücuda yeterince kan pompalayamaması) riskini arttırmaktadır. Obezite, sigara kullanımı, yüksek kolesterol ya da diyabet ile birlikte bulunduğu kalp krizi riski birkaç kat daha artmaktadır.
- **Yetersiz fiziksel aktivite:** Fiziksel aktivitenin yetersiz olması koroner arter hastalığı riskini artırır. Düzenli yapıldığında orta derecede bir fiziksel aktivite bile yararlıdır.

Koroner arter hastalığı yardımcı risk faktörleri ile yakından ilişkilidir ancak bu etkenlerin önem derecesi ve prevalansı henüz bilinmemektedir. Yardımcı risk faktörlerini şöyle sıralayabiliriz:

- **Diabetes mellitus:** Bu hastalığı olan insanlarda koroner arter hastalığı oluşması riski ciddi bir şekilde artmaktadır. Diyabet hastalarının % 80 'inden fazlası farklı türlerdeki kalp ya da damar hastalıklarından hayatını kaybetmektedir.
- **Obezite:** Vücut ağırlığının fazla olması kalp üzerinde baskı oluşturduğundan diğer risk faktörlerinin hiçbiri olmadığı durumda bile koroner arter hastalığının oluşma ihtimalini arttırmaktadır. Obezite hem kan basıncını hem de kandaki kolesterol düzeyini arttırmakta ve diyabet oluşumuna neden olabilmektedir.

- **Stress ve öfke:** Bazı bilim adamları stres ve öfkenin de koroner arter hastalığının oluşmasında rol aldığını düşünmektedirler. Hayatın zorluklarına karşı verilen mental ve fiziksel reaksiyon olan stres kalp atım hızı ve kan basıncını arttırarak arterlerin iç duvarlarında yaralanmaya neden olabilir. Kanıtlar göstermektedir ki; öfke, kalp hastalığından ölme riskini arttırmakta ve bir öfke krizinden hemen sonra hayatını kaybetme riski iki kattan fazla artmaktadır.

Kalp krizi geçiren kişilerin % 60 'ından fazlası kalp krizinden önce ortaya çıkan belirtileri yaşar. Bazen bu belirtiler kalp krizinin gerçekleşmesinden günler ya da haftalar önce başlar. Fakat kişiler zaman zaman bu belirtileri tanımlayamaz ya da kabullenemezler. Belirtiler şöyle sıralanabilir:

- Göğsün merkezinde birkaç dakika süren ve aralıklarla tekrar eden rahatsız edici bir baskı, dolgunluk, sıkışma ya da ağrı,
- Omuzlar, boyun ve kollara doğru yayılan ağrı,
- Bayılma hissi, fenalık, terleme, mide bulantısı ya da kısa kısa nefes almanın eşlik ettiği göğüste rahatsızlık hissi. Sözü edilen bu belirtiler her kalp krizinde ortaya çıkmaz. Zaman zaman belirtiler kaybolup tekrar ortaya çıkabilir. Bu semptomlardan herhangi birinin varlığını hisseden kişiler mümkün olan en kısa sürede hastanelerin kardioloji kliniğine başvurmalıdır.

2.4.2. Kalp krizinin teşhisi ve tedavisi

Kalp krizinin teşhisi için tek bir kriter bulunmamaktadır. Hastanın kalp atım hızı ve kan basıncı kontrol edilir, elektrokardiyogram ve kan örnekleri alınır. Elektrokardiyogram hangi koroner arterin tıkalı olduğunu gösterir. Kan testleri ile kalp kasında hasara uğramış hücrelerden kan dolaşımına verilen enzim ve diğer biyomarker proteinlerin miktarı tayin edilir.

Kalp krizinin tedavisi, hastanın nefes almasının başlatılması, devamı ya da kalp atımının sağlanması gerektiğinde kardiopulmaner canlandırma (kalp masajı) ile yapılmaktadır. İlave tedavi olarak; yakından görüntüleme, elektrik şoku, ilaç tedavisi, yeniden

damarlandırma (revaskularizasyon), deri üzerinden girerek damarı onarma (perkutan transluminal koroner anjioplasti), koroner arter bypass cerrahisi kullanılabilir.

Hastaneye gelir gelmez hasta yakından görüntülenir. Eğer kalp atışları kontrolsüz çırpımlar şeklinde ise kalbin normal ritmini sağlamak için bir defibrilatör (elektrik şoku cihazı) kullanılabilir. Kalbin yükünü azaltmak ve hastanın daha kolay nefes almasını sağlamak amacıyla genellikle dışarıdan oksijen takviyesi yapılır. Eğer oksijen kalp krizinin ilk saatlerinde kullanılırsa kalbin göreceği hasarı azaltır.

Hastanın durumunu kontrol altına alan ve kalbin göreceği hasarı azaltan ilaçlar trombolitikler, aspirin, anti-koagülanlar, ağrı kesiciler ve trankilizanlar, beta-bloklayıcılar, ace inhibitörleri, nitratlar, ritim düzenleyici ilaçlar ve diüretiklerdir. Hasarı azaltan ilaçlar ancak kalp krizini izleyen ilk bir iki saat içerisinde verilmesi durumunda etkilidir. Kan pıhtılarını parçalayan ve tıkalı arterden oksijence zengin kanın akmasını sağlayan trombolitik ilaçların mümkün olan en kısa zamanda verilmesi, kalp krizi geçiren hastanın hayatta kalma şansını arttırmaktadır. Kalp krizinden sonraki 1-2 saat içerisinde verilen trombolitikler en etkili ilaçlardır. İlave kalp krizlerini önlemek için trombolitik ilacı takiben aspirin ve antikoagülant ilaç verilir. Bu ilave ilaçlar yeni pıhtıların oluşmasını ve var olanların büyümesini engellemektedir. En iyi bilinen antikoagülantlar heparin ve warfarindir. Heparin hasta hastaneye ulaşır ulaşmaz damar yoluyla, warfarin ise daha sonra oral olarak verilir. Aspirin parçalanmış kan pıhtılarının tekrar oluşmasını engellemektedir. Ağrıyı hafifletmek için dil altına nitogliserin tablet verilebilir. Eğer ağrı devam ederse morfin sülfat kullanılabilir. Diazepam (Valium), vealprazolam (Ativan) gibi sakinleştiriciler de kalp krizinin oluşturduğu travmanın etkisini hafifletmek için kullanılabilir. Kalbin hızını azaltmak ve kalbe iyileşmesi için bir şans vermek amacıyla kalp krizinden hemen sonra beta-bloklayıcı ilaçlar damar yoluyla verilir. Bu, aynı zamanda ölümcül karıncık fibrilasyonunun önlenmesine yardımcı olmaktadır. Kalp krizinden hemen sonra kanın kalbe ulaşmasını kolaylaştırması ve kalp yetmezliği belirtilerini azaltmaya yardımcı olması için damar açıcı ilaçlar olan nitratlar da kullanılabilir. Kalp krizi anormal bir kalp atışına neden olabilir. Bu durumda aritmi ilaçları kalbin normal ritmini tekrar sağlamak için kullanılabilir. Anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ACE) kalbin atmasını engelleyen

direnci azaltması nedeniyle kalp yetersizliğini engellemek ve kontrol altına almak için kullanılır. Bu ilaç, kalbi pompalama işlemini etkin bir şekilde yapamayan ve kalp yetersizliği belirtileri olan kalp krizi hastaları için kullanılır. Diüretikler ise kalbin etkin pompalama yapmadığı durumda biriken fazla miktarda suyun atılmasına yardım etmek için kullanılmaktadır. Genellikle oral olarak alınmakta ve vücudun sıvıları idrar olarak dışarı atmasını sağlamaktadır.

Perkütan transluminal anjioplasti ve koroner arter bypass cerrahisi tıkalı koroner arterleri açmaya ve kan akışını düzeltmeye yönelik invazif yeniden damarlandırma prosedürleridir. Bu yöntemler genellikle pıhtı çözücü ilaçların işe yaramadığı, performans testi kötü olan, sol ventiküler fonksiyonu kötü olan yada dokuları yeterince kan alamayan (ischemia) hastalar için kullanılmaktadır. Genellikle anjioplasti, koroner arter bypasstan önce gerçekleştirilir. Koroner anjioplasti cerrahi bir yöntem değildir. Bu yöntemde ucunda balon bulunan bir kateter ile kasık ya da koldaki bir damardan girilmekte ve tıkalı artere baskı yapıp damar genişletilerek tıkalı damar açılmaktadır. İşlem sonunda balonun havası boşaltılır ve kateter çıkartılır. Koroner anjioplasti bir hastenede kardiyolojist tarafından gerçekleştirilir ve iki gün hastenede yatmayı gerektirir. Hastaların üçte birinde koroner anjioplastinin uygulanmasından sonraki altı ay içinde arter daralması tekrar eder. Bu durumda prosedür tekrar uygulanabilir. Anjioplasti, arter bypass cerrahiden daha az invazif ve daha ucuz bir yöntemdir.

Bypass işleminde sağlıklı bir bacak ya da göğüs duvarı damarı kullanılarak alternatif varyant bir damar tıkalı arterin etrafından dolaştırılır. Bundan sonra kalbe oksijence zengin kanı taşıma görevi bu sağlıklı damar tarafından gerçekleştirilmektedir. Bypass ameliyatı iki ya da üç ana arterinde tıkanma olan ya da sol ana arteri ciddi şekilde tıkanmış hastalar ile, diğer tedavilere cevap vermeyen hastalar için uygulanabilecek en uygun cerrahi yöntemdir. Hastanede ve genel anestezi altında koroner artere sağlıklı damar eklenirken hastayı desteklemek için kalp-akciğer cihazı kullanılarak gerçekleştirilir. Bypass ameliyatı geçiren hastaların % 70'i kalbe yeterince kan gitmemesi nedeniyle ortaya çıkan göğüs ağrısından tamamen kurtulur. % 20'si ise kısmen rahatlar. Bypass ameliyatından beş yıl sonra hayatta kalma beklentisi % 90, 10 yıl sonra % 80, 15 yıl sonra % 55 , 20 yıl sonra ise % 40'tır.

Arterlerin tekrar tıkanmasını önlemek için üç cerrahi yaklaşım vardır. Birincisi, cerrahi bıçaklar ile plakların arterden çıkarılması (aterektomi), ikincisi , laser uç içeren bir kateter ile plakların parçalanması veya yakılması (lazer anjioplasti) ve üçüncüsü de tıkanmış arteri açık tutmayı sağlayacak olan metal bir stendin takılmasıdır.

2.4.3. Hastalığın seyri ve önlenmesi

Kalp krizinden sonraki dönem genellikle zordur. Kalp krizi geçiren hastaların üçte ikisi hiçbir zaman tam anlamıyla iyileşemez. Erkeklerin % 27'si, kadınların ise % 44'ü kalp krizi geçirdikten sonraki bir yıl içinde hayatını kaybetmektedirler. Altı yıl içerisinde erkeklerin % 23'ü, kadınlarınsa % 31'i yeniden kalp krizi geçirirken, erkeklerin %13'ü, kadınların ise % 6'sı ani ölüm sonucu hayatlarını kaybetmektedirler. Kalp krizi geçirip hayatta kalan insanların ani ölüm riski diğer insanlardan dört ila sekiz kat , hastalanıp hayatını kaybetme şansı ise iki ila dokuz kat daha fazladır.

Bir çok kalp krizi, koroner arter hastalığını önleyecek şekilde sağlıklı bir yaşam sürdürerek önlenabilir. Kalp krizi geçirmiş olan kişilerde de sağlıklı bir yaşam şeklinin benimsenmesi ve doktorun önerilerine uyulması bir kez daha kalp krizi geçirmeyi engelleyebilir. Kalbi koruyan bir yaşam şeklinde; doğru besinler tüketilmeli, düzenli egzersiz yapılmalı, vücut ağırlığı belli bir değerde olmalı, sigaradan uzak durulmalı, alkol alımı dengeli olmalı, yasa dışı ilaçlar kullanılmamalı , hipertansiyon kontrol edilmeli ve stresle baş edilmelidir.

2.5. Kalp Krizinin Teşhisinde Kullanılan Biyolojik Belirteçler

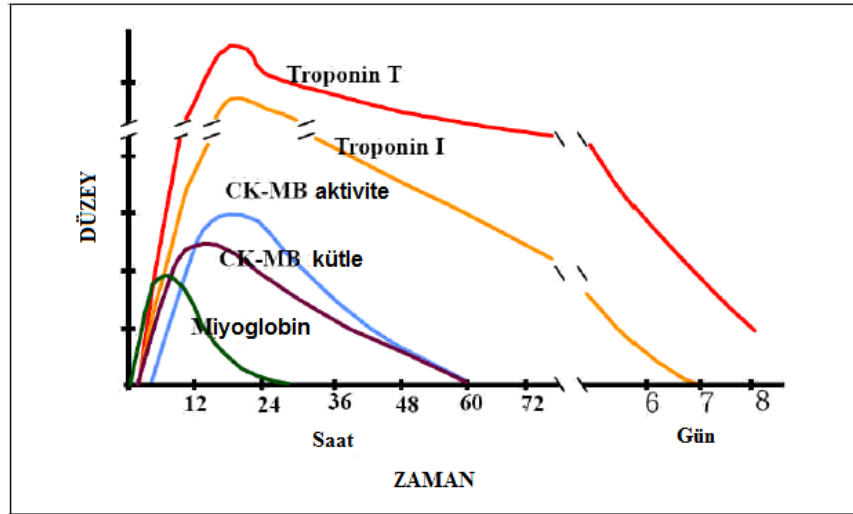
Amerikan Kalp Birliği tarafından yapılan araştırmalara göre 2004 yılında Amerika Birleşik Devletleri 'nde meydana gelen ölümlerin üçte birinden fazlası kardiyovasküler hastalıklar ve bunun sonucunda meydana gelen miyokardiyal infarktüstten (MI) kaynaklanmaktadır. Amerika 'da her yıl yaklaşık 1,1 milyon MI gerçekleşmekte ve bunlardan yaklaşık olarak 515 000'i ölümlerle sonuçlanmaktadır. Bu ölümlerin çoğu da belirtilerin ortaya çıkmasından sonraki birkaç saat içerisinde gerçekleşmekte ve bu hastaların bakımı ve tedavisi için her yıl milyon dolarlar harcanmaktadır. Bu nedenle

ölüm oranlarının azaltılmasında hızlı teşhis ve erken tedavi büyük önem taşımaktadır (Straface ve ark. 2008).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) belirlediği kriterlere göre kalp krizi tanısı için aşağıdaki üç kriterden ikisi sağlanmalıdır: 1) Genellikle 20 dakikadan fazla süren karakteristik göğüs ağrısı, 2) tanısal ECG (elektrokardiyogram) değişiklikleri, 3) kandaki kardiyak biyolojik belirteç düzeylerinin artışı ve ardından düşüşü (Keffer 1996). Kalp krizinde etkili bir müdahale süphesiz ki erken tanıyla mümkündür. Fazla miktarda kardiyak yaralanmanın olduğu durumlarda yukarıda sözü edilen kriterler kolayca sağlanmaktadır. Fakat , küçük koroner dallarda tıkanma olduğunda tipik klinik ya da ECG bulguları oluşmayabilmektedir. Miyokardiyal infarktüstün muzdarip hastaların tahminen % 5'i acil servisten herhangi bir müdahale yapılmaksızın gönderilmektedir. Çünkü bu hastaların yaklaşık olarak 1/4'ü atipik semptomlar göstermekte, 1/3'ünde ise elektrokardiyogramda tanıya olanak sağlayacak herhangi bir değişiklik (ST elevasyonu) gözlenmemektedir (Char ve ark. 1998). Miyokardiyal infarktüs tanısını koymak zor olduğu için acil servise göğüs ağrısı ile gelip alıkonan hastaların sayısı da fazla olmaktadır. Lee ve arkadaşları (1991) göğüs ağrısı ile hastaneye başvuranların yaklaşık % 60-70'inin başka bir teşhis konarak gönderildiğini rapor etmişlerdir. Acil servisteki esas problem atipik semptomların belirlenmesi ve kişinin kalp krizi geçirip geçirmediğinden emin olunabilmesidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün akut MI için belirlediği kriterlere göre kardiyak belirteçler tanıyı kolaylaştırmaktadır. Biyokimyasal belirteçler uzun zamandan beri tanıda önemli bir rol oynamakta ve özellikle düşük ve orta risk grubunda yer alan hastalar için büyük önem taşımaktadır.

Göğüs ağrısı ile gelen hastalara kalp krizi tanısını koyabilmek ya da risk durumlarını belirleyebilmek için rutin olarak kullanılan kardiyak biyomarkerlar miyogloblin, kreatin kinaz (CK)- miyokardiyal band (MB), ve kardiyak troponinler T (cTnT) ve I (cTnI) dir. Bu biyolojik belirteçler tersinmez miyokardiyal nekrozu takiben kan dolaşımına salınırlar (Şekil 2.5.1 ve Çizelge 2.5.1). Bu belirteçlerin kan dolaşımına salınmalarına ait karakteristikler ve kinetikler şöyle sıralanabilir (Califf ve Ohman 1992). 1) Miyogloblin düzeyi belirtilerin ortaya çıkmasından sonraki 1-2 saat içerisinde artar. Bu belirtecin düzeyinin ölçülmesi göğüs ağrısının başlamasından hemen sonra acil servise

başvuran hastaların izlenmesi için uygundur (erken göğüs ağrısı). 2) Kardiyak troponinler bu belirtilerin ortaya çıkmasından sonraki 3-4 saat içerisinde dedekte edilebilirler. Bu nedenle bu biyomaker semptomların ortaya çıkmasının üzerinden uzunca bir zaman geçmesinden sonra gelen hastalar için önem taşımaktadır (orta ya da geç göğüş ağrısı). 3) Kandaki CK-MB düzeyi ise belirtilerin ortaya çıkmasından epey uzun bir zaman sonra acil servise gelen hastalar için yararlıdır (geç göğüş ağrısı) (Storrow ve ark. 2006 a,b).



Şekil 2.5.1. Kalp krizinin teşhisinde kullanılan biyomarker proteinler ve serum düzeylerinin zamana göre değişimi

İdeal bir kardiyak biyomarkerın sahip olması gereken özellikler şöyle sıralanmıştır (Char ve ark. 1998, Storrow ve ark. 2006a):

1. İskelet kası harabiyetinin varlığında bile miyokardiyal hasarın tespitine olanak verecek özgüllükte olmalı
2. Yüksek hassasiyette ve orta derecedeki miyokardiyal hasarı bile tespit edebilecek hassasiyette olmalı
3. Boyutları küçük olmalı ve miyokardiyal yaralanmayı takiben hızla salınmalı
4. Harabiyetle orantılı miktarlarda ortaya çıkmalı
5. Plazmada analizine izin verecek kadar uzun süre kalmalı
6. Fizyolojik koşullar altında kan dolaşımında eser miktarda varlığı ya da yokluğu ve minimum düzeydeki artışı bile tespit edilebilmeli

7. Teknik olarak ölçümü kolay ve ucuz olmalı

Fakat, ne yazık ki günümüzde rutin olarak kullanılan biyolojik belirteçlerden hiçbirisi tek başına acil servise belirtilerin başlamasından sonra farklı zamanlarda başvuran tüm hastalara MI tanısı koyabilmek için ideal bir belirteç özelliği taşımamaktadır.

Çizelge 2.5.1. Miyokardiyal infarktüs tanısında kullanılan biyolojik belirteçler

Belirteç	Molekül ağırlığı (kDa)	Başlangıç artışı (saat)	Pik yapma zamanı (saat)	Normale dönme zamanı (saat)
Miyoglobin	17,6	1-3	5-8	16-24
cTnI	22,5	3-6	14-18	5-10 gün
cTnT	33	3-6	10 -2 gün	10-15 gün
CK-MB	86	3-8	9-24	48-72
CK-MB izoformları	86	1-4	4-8	12-24

MI kalp kasında geri dönüşümü olmayan hasara yol açan biyokimyasal bir olay olduğundan , sözü edilen biyolojik belirteçlerin kandaki düzeylerinin belirlenmesi ve klinik olarak anlamlandırılabilmesi için planlanmış bir test protokolü uygulanmalıdır. Hastaların acil servise başvurma zamanlarının farklılığı ve sözü edilen bu üç biyolojik belirtecin ortaya çıkış zamanlarındaki çeşitlilik MI'ün hızlı tanısında çok sayıda örneğin hızlı ve eş zamanlı takibini kaçınılmaz hale getirmektedir (Storrow ve ark. 2006a, McCullough ve ark. 2002). Bu gerçeklerin ışığında, Amerikan Kardiyoloji Birliği/Amerikan Kalp Birliği olası bir MI'ün tanısı için kullanılacak testlerin 60 dakika ya da tercihen 30 dakika içerisinde sonuçlanması gerektiği konusu üzerine vurgu yapmaktadır. Diğer bir deyişle, kardiyak testler için gerekli devir zamanı acil servis hekimlerinin karar vermede kullandıkları göğüs ağrısı protokolleri ile eş olmalıdır.

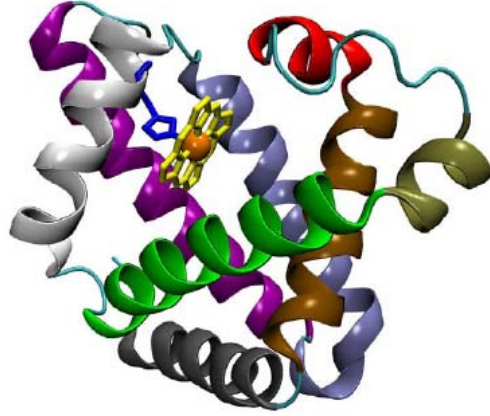
Göğüs ağrısı başladığında ve ağrı başladıktan sonraki birkaç saat içerisinde miyoglobinin hassasiyeti CK, CK-MB ve troponinlerden (T ve I) daha yüksektir

(Kilpatrick ve ark. 1993). Kalp krizinin teşhisinde kullanılabilecek ilk biyomarker olması nedeniyle miyogloblin düzeyinin hızlı ve güvenilir bir şekilde tayini büyük önem taşımaktadır.

2.6. Miyogloblin

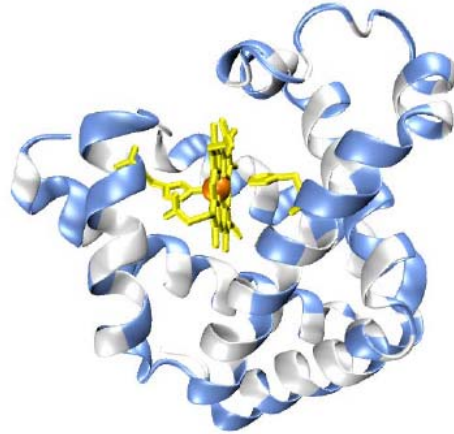
Miyogloblin solunum ile ilgili bir protein olup kaslarda bulunmakta ve oksijen depolanmasında görev almaktadır. Omurgalıların iskelet kaslarında bol miktarda bulunur ve kas dokusunun karakteristik kırmızı renginden sorumludur. Miyogloblin 153 aminoasitten oluşan ve suda çözünen globüler bir protein olup tersiyer yapısı kısa, sarmal olmayan bölgelerle birleştirilmiş 8 adet α -heliksten oluşmaktadır (Şekil 2.6.1). $25 \times 34 \times 42 \text{ \AA}^0$ boyutlarında olup izoelektrik pH değeri 7,3 'tür (Singh-Zocchi 2002). Globüler proteinler, yuvarlak ya da globüler olarak adlandırılabilen şekle katlanan ve farklı tipte ikincil yapılar içeren polipeptid zinciri ile karakterize edilmektedirler. Bu proteinlerin diğer bir önemli özelliği aminoasit yan zincirlerinin pozisyonudur. Bu spesifik yönlendirmeler yapısal kararlılığın büyük bir kısmının hidrofobik etkileşimlerden kaynaklandığının bir göstergesidir. Şekil 2.6.2'de görüldüğü gibi yapıda yer alan hidrofobik yan zincirlerin çoğu su moleküllerinden uzak olacak şekilde, molekülün iç kısmında hidrofilik R gruplarının çoğunluğu ise molekülün dış yüzeyinde yer almaktadır.

Solumun olayında yer alan proteinler olan hemoglobin ve miyogloblin yapılarında buldukları polar olmayan hem grubu sayesinde moleküler oksijen ile tersinir bir reaksiyona girebilirler. Yapılarında proto-porfirin olarak adlandırılan ve Fe atomu bulduran organik bir grup içerirler. Protoporfirin birbirine metan köprüleri (α , β , γ , δ) ile bağlı dört adet pirol halkasından (I, II, III, IV) oluşur (Şekil 2.6.3.a). Yapıda farklı aminoasitlerin yer alması ile farklı çözünürlük, spektrum ve reaktivitede farklı türde porfirinler oluşur. Demir, protoporfirin dördüncü azot atomu ile birlikte hidrofobik kısımdaki hem molekülünü bağlayan miyogloblinin histidin yan zincirine bağlanmaktadır. Bu da histidinden uzak, oksijen bağlamak için uygun olan hem kısmı üzerinde altı bağlanma bölgesi sağlar (Şekil 2.6.3.b). Oksijen bağlanma bölgesi yanındaki kalıntılarla olan etkileşimler oksijen bağını stabilize eder.

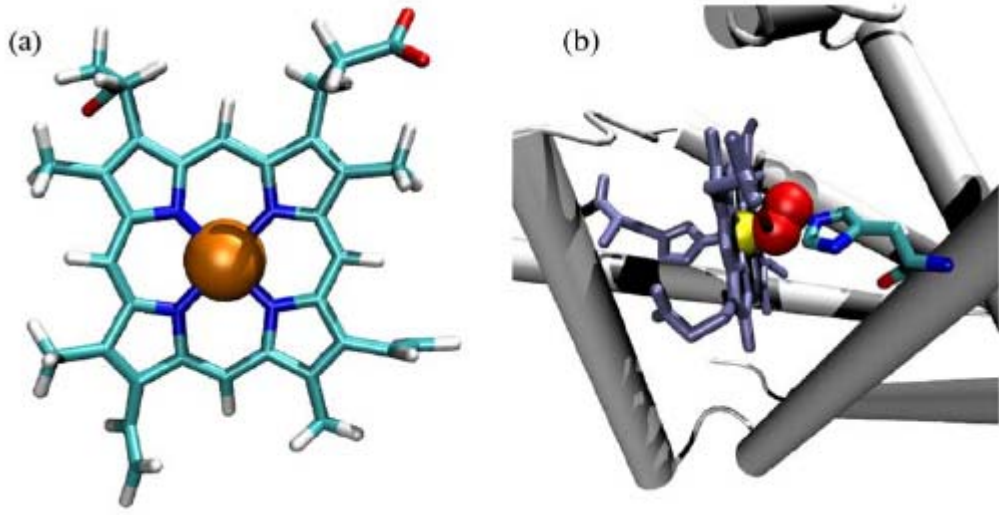


Şekil 2.6.1. İspermeçet Balinası (*Physeter catodon*) miyoglobininin yapısı

Hem grubu Fe atomunun 6. koordinasyon bölgesinin pozisyonuna göre dört farklı oksidasyon basamağında bulunur: 6. koordinasyon bölgesi boş ise, deoksi ; O₂ bağlanmış ise, oksî; H₂O ile doldurulmuş ise, met yada ferri; CO bağlanmış ise, karboksî miyoglobin olarak adlandırılır. Diğer biyolojik moleküller gibi, hemproteinleri çevresel değişimler ve kimyasal maddeler ile muamele edildiğinde biyolojik aktivitelerini kaybedebilirler.



Şekil 2.6.2. Miyoglobinin hidrofobik ve hidrofilik yönlenmelerini gösteren yapı. Hem grubu (turuncu,sarı), proksimal ve distal (sarı) histidinler ve miyogloin ana yapısı. Hidrofobik rezdüler (beyaz) , polar ve yüklü rezidüler (mavi)



Şekil 2.6.3. (a) Hem grubu ve (b) miyoglobin molekülündeki bağlanma

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

L-Triptofan metil ester (C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich	364517
Hidrokinon (C ₆ H ₆ O ₂)	Merck	8.22333
Diklormetan (CH ₂ Cl ₂)	Riedel-de Haen	24333
Metakriloil klorür (C ₄ H ₅ ClO)	Fluka	64120
Trietilamin (C ₆ H ₁₅ N)	Across Organics	157910010
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck	1.06462
Etil Alkol (C ₂ H ₅ OH)	Merck	1.00986
Sodosil [®] 02	Riedel-de Haen	16167
2-Propanol	Riedel-de Haen	24137
3-Aminopropil-trietoksisilan (H ₂ N(CH ₂) ₃ Si (OCH ₃) ₃)	Sigma-Aldrich	28,177-8
Sülfürik asit (H ₂ SO ₄)	Fluka	84721
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Merck	1.08597
Glutaraldehit	Merck	1.04239
Sodyum klorür (NaCl)	Fluka	71376
Aseton ((CH ₃) ₂ CO)	J.T.Baker	8003
2-Propen-1-tiyol (C ₃ H ₆ S)	Fluka	06030
Amonyak (NH ₃)	Merck	1.05422
Miyoglobin	Sigma	M0630
Hidroksietil metakrilat (C ₆ H ₁₀ O ₃)	Merck	8.00588
Etilenglikol dimetakrilat ([H ₂ C=C(CH ₃)CO ₂ CH ₂] ₂)	Sigma-Aldrich	33,568-1
Azoizobutironitril (C ₈ H ₁₂ N ₄)	Merck	
8.01595		
Hidroklorik asit (HCl)	Riedel-de Haen	07102
Metanol (CH ₃ OH)	Merck	1.13351
Lizozim (yumurta beyazından saflaştırılmış)	Sigma	L6876
Sitokrom c (sığır kalbinden saflaştırılmış)	Sigma	C2037
Etilen glikol (HOCH ₂ CH ₂ OH)	Merck	1.00949

3.2. Yöntem

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

Metakriloil-amidotriptofan metil ester (MATrp) monomerinin sentezi için uygulanan yöntem kısaca şöyledir: 5 g L-triptofan metil ester ve 0,2 g hidrokinon, 100 mL diklorometan (CH_2Cl_2) içerisinde çözüldü. Çözelti 0°C'a soğutuldu. 12,74 g trietilamin bu çözeltiliye ilave edildi. 5 mL metakriloil klorür yavaşça bu çözeltinin üzerine döküldü. Bu reaksiyon karışımı azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Kimyasal reaksiyonun sonunda, reaksiyona girmeyen metakroil klorür, % 10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edildi. Metakriloil-amidotriptofan metil esteri içeren kısmın çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve kalan katı etanolde çözüldü (Yılmaz ve ark. 2009).

3.2.2. MATrp monomerinin karakterizasyonu

3.2.2.1. FTIR analizi

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

3.2.2.2. NMR analizi

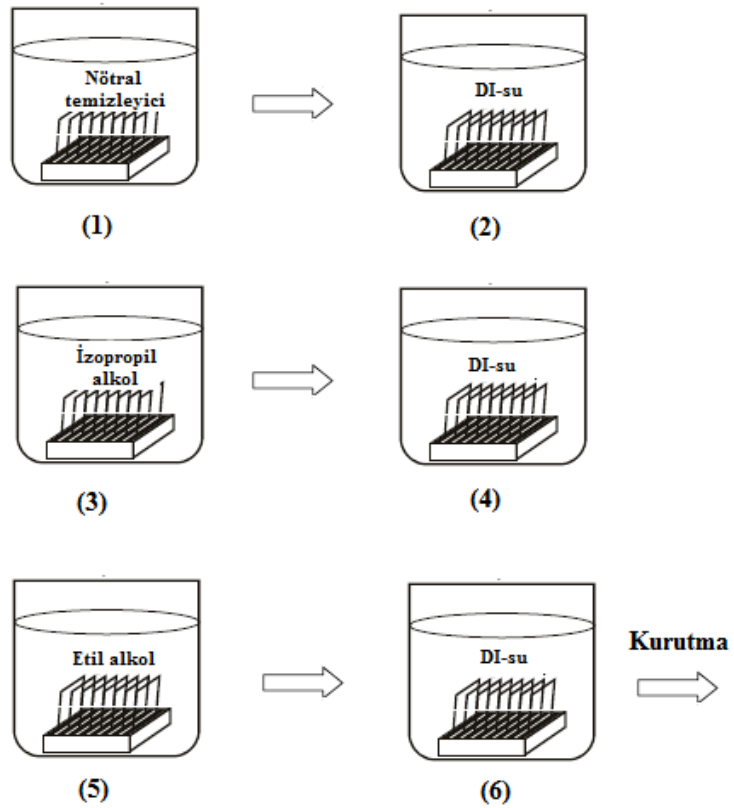
MATrp monomerinin ^1H NMR spektrumu, DMSO- d_6 içerisinde Varian Mercury Plus 400 MHz NMR cihazı kullanılarak alındı. Kimyasal kaymalar (δ) ppm cinsinden DMSO- d_6 referans alınarak rapor edildi.

3.2.3. Miyoglobin baskılanmış yüzey plazmon rezonans sensörün hazırlanması

3.2.3.1. Cam slaytların yüzey modifikasyonu

3.2.3.1.1. Cam slaytların temizlenmesi

Poli(HEMA-MATrp) yüzey plazmon rezonans sensörün hazırlanmasında kalıp molekül olan miyoglobinin immobilizasyonu için kalınlığı 1 mm olan 2,5 cm x 2,5 cm boyutlarındaki mikroskop camı kullanıldı. Cam slaytlar önce sırasıyla 30 dakika süre ile kullanılan sıvı hacimleri 10 mL/slayt olacak şekilde % 2 lik nötr temizleyici (SoDosis[®] 02), deiyonize su, izopropanol, deiyonize su, etanol ve son olarak deiyonize su ile 55 °C de ultrasonik banyoda bekletilerek temizlendi ve vakum etüvünde 100°C'da 1 gece bekletildikten sonra kullanıldı (Şekil 3.2.3.1.1.1).



Şekil 3.2.3.1.1.1. Cam slaytların temizlenmesi

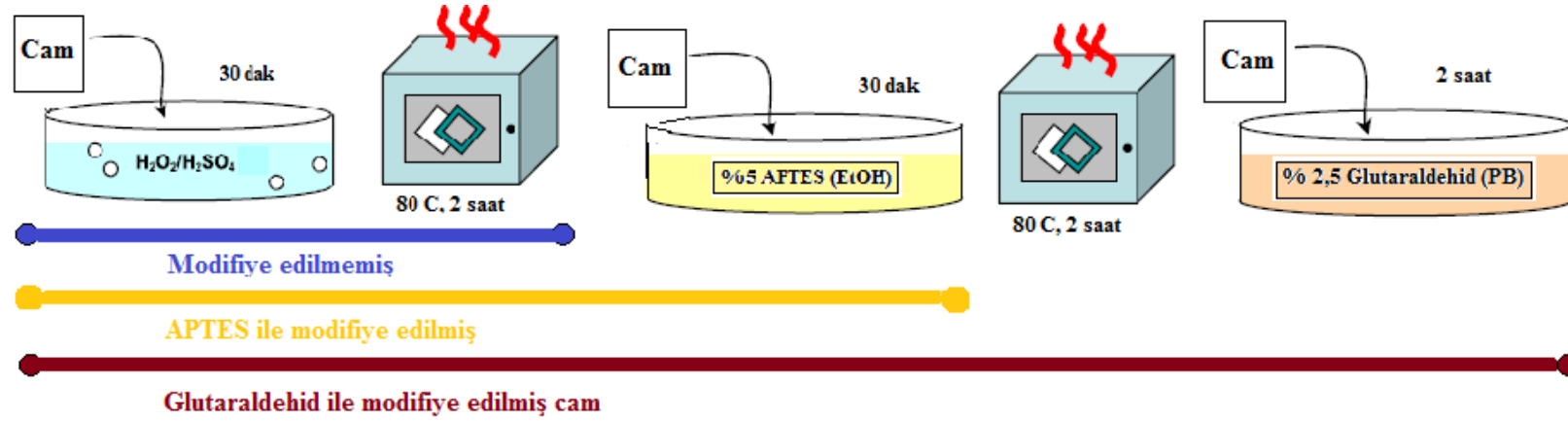
3.2.3.1.2. Protein kalıbının hazırlanması

Protein kalıbının hazırlanması için miyoglobin cam yüzeyine kovalent olarak immobilize edildi. Bu amaçla ilk olarak temizlenmiş olan cam slaytlar oda sıcaklığında 30 dakika süre ile $H_2SO_4:H_2O_2$ (70:30) (v/v) karışımında bekletildi. Ardından saf su ile 5 kez yıkanarak $80^{\circ}C$ 'da vakum etüvünde 2 saat kurutuldu. Kurutulan cam slaytlar aseton ile hazırlanmış % 5 (v/v) APTES (3-aminopropil-trietoksisilan) çözeltisine daldırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda aseton ve damıtık su ile 5'er kez yıkanarak $80^{\circ}C$ 'da vakum etüvünde 2 saat kurutuldu. APTES ile modifiye edilmiş cam slaytlar pH 7,4 fosfat tamponu ile hazırlanmış % 2,5 (v/v) glutaraldehit çözeltisine daldırılarak oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. pH 7,4 tamponu ile yıkanarak yine oda sıcaklığında kurutuldu (Şekil 3.2.3.1.2a). Elde edilen modifiye camlar 10 mL 0,01 mg/mL miyoglobin çözeltisine daldırılarak 24 saat süre ile $+4^{\circ}C$ 'de bekletildi. (Şekil 3.2.3.1.2b). Elde edilen miyoglobin kalıbı cam slaytlar pH 7,4 tamponu ile 5 kez yıkanarak reaksiyona girmeyen miyoglobin uzaklaştırıldı. Hazırlanan slaytlar oda sıcaklığında kurutulurken miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) filmin hazırlanmasında protein kalıbı olarak kullanıldı. Baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) filmin hazırlanmasında ise APTES ve glutaraldehid ile modifiye edilen cam slaytlar sadece pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde bekletildi ve kurultulduktan sonra kullanıldı.

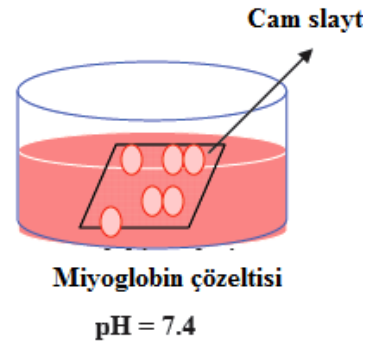
3.2.3.1.3. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi

Protein kalıbının hazırlanmasında kullanılan APTES ve glutaraldehid ile modifiye edilmiş cam yüzeyi ile protein immobilize edilmiş modifiye cam yüzeyin karakterizasyonu için yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanıldı. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı degen modda gerçekleştirildi. Salınım rezonans frekansı, 341,30 Hz olarak uygulandı. Titreşim genliği, 1 V_{RMS} ve boş titreşim genliği ise 2 V_{RMS} 'dir. Örneklerden 2 $\mu m/s$ tarama

hızında, 256 x 256 piksel çözünürlükte, 1 x 1 μm^2 , 2 x 2 μm^2 , 5 x 5 μm^2 ' lik alanların görüntüsü alındı.



(a)



(b)

Şekil 3.2.3.1.2. (a) Cam yüzeyin APTES ve glutaralhid ile modifikasyonu (b) Cam yüzeyine miyoglobin bağlanması

3.2.3.1.4. Temas açısı analizi

Cam yüzeye ait her bir modifikasyon aşamasında (cam, APTES modifiye cam, glutaraldehid modifiye cam, protein immobilize cam) cam yüzeyin su ile yaptığı temas açısı belirlendi. Temas açısı ölçümlerinde Phoenix 300 (Kore) cihazı kullanıldı. Temas açısı ölçümünde yapışık damla (Sessile Drop) yönteminden yararlanıldı. Bu yöntemle analizi yapılmak istenen yüzeyler üzerine 1 damla su damlatılarak her birinin temas açısı ölçüdü. Ölçümlerde yüzeylerin farklı bölgelerine su damlatmak suretiyle 40 ayrı fotoğraf çekildi ve her biri için ayrı temas açısı belirlendi. Temas açısı ölçümlerinde Phoenix cihazı ile birlikte verilen ImageXP yazılımı kullanıldı. Bu yazılımda temas açısı değerleri damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı dikkate alınarak belirlenmektedir. Her bir yüzey için belirlenen temas açısı 40 ölçümün ortalama değeridir.

3.2.3.2. SPR altın çip yüzeylerinin modifikasyonu

Miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) yüzey plazmon rezonans sensörünün hazırlanmasında Şekil 3.2.3.2.1'de gösterilen GWC SPRimager II sistemine uygun 2,5 cm x 2,5 cm boyutlarındaki altın kaplı çip (SPRchipTM) kullanıldı. Bu çipler SF10 cam üzerine 2 nm titanyum ve 42,5 nm altın kaplama içermekte ve firmadan hazır olarak temin edilebilmektedir. Altın kaplı çip yüzeyleri allil merkaptan ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{SH}$) kullanılarak modifiye edildi. Modifikasyon öncesi altın yüzey bazik pirana çözeltisi (3:1 (v/v) $\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}_2$) ile temizlendi. Yüzeyi temizlenen altın çipler -18°C 'da 24 saat 3 mM allil merkaptan içeren 5 mL etanol:su (4:1) çözeltisine daldırılarak polimerizasyonun altın yüzeyinde gerçekleşmesi için gerekli doymamış bağlar oluşturuldu (Şekil 3.2.3.2.2).

3.2.3.2.1. Speküler reflektans FTIR analizi

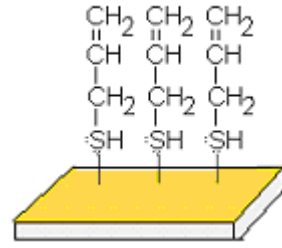
Allil merkaptan ile kaplanan altın yüzeyin karakterizasyonu Perkin Elmer (Spektrum 100 Waltham, MA, ABD) FTIR cihazı ile cihaza ait speküler reflektans aparatı kullanılarak gerçekleştirildi. Spektrum, 80 derecelik bir sıyırma açısı ile 4 cm^{-1} çözünürlükte örnek başına 256 adet tarama yapılarak alındı.



Şekil 3.2.3.2.1. GWC SPRimager II sisteminde kullanılan SPRchip™ altın çip



(a)



(b)

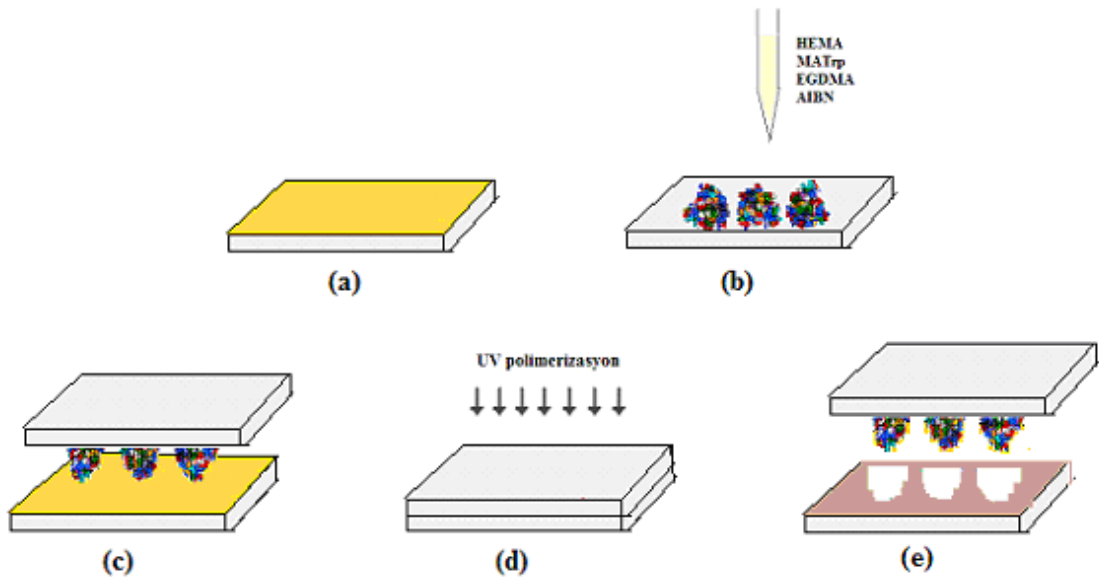
Şekil 3.2.3.2.2. (a) Altın yüzeyinin modifikasyonu (b) Allil gruplarının yönlenmesi

3.2.4. SPR çip yüzeyinde poli (HEMA-MATrp) filmin sentezi

Allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey plazmon rezonans altın çip yüzeyinde miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) polimerinin hazırlanması için ilk olarak HEMA, MATrp ve EGDMA ultrasonik banyoda 2 saat süre ile karıştırılarak stok polimerizasyon karışımı hazırlandı. Daha sonra bu karışımdan 0,5 mL alınarak içerisinde 5 mg azobisisobütironitril (AIBN) eklenerek polimerizasyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımından azot gazı geçirilerek çözünmüş haldeki oksijen ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra reaksiyon karışımından 5 µL numune alınarak daha önceden hazırlanmış olan protein kalıbı üzerine damlatıldı ve kalıp molekül ile monomerler arasında ön organizasyonun gerçekleşmesi için 30 dakika süre ile + 4°C'da beklendi. Ardından allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey plazmon rezonans çip bu karışım üzerine ters çevrilerek polimerizasyon UV ışığı (100 W, 356 nm, UVP B100-AP High Intensity UV-lamp) altında 4 dakika bekletmek suretiyle gerçekleştirildi. Polimerizasyon işleminden sonra protein kalıbı yüzey plazmon rezonans çip yüzeyinden

ayrıldı. Polimer kaplanmış yüzey plazmon rezonans çipler önce 0,1M HCl/metanol ardından saf su ve etil alkol ile yıkandı ve vakum etüvünde kurutuldu. Polimerizasyon yöntemi Şekil 3.2.4.1'de görülmektedir. Baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) filmin hazırlanmasında ise APTES ve glutaraldehit ile modifiye edilmiş cam slayt miyoglobin çözeltisi yerine pH 7,4 fosfat tamponunda bekletildi ve kurutulduktan sonra yukarıda anlatıldığı şekilde kullanıldı.

Uygun polimerizasyon karışımının belirlenmesi için MATrp:HEMA:EGDMA oranı 1:1:1, 1:1:3, 1:1:5, 1:1:6 şeklinde değiştirilerek miyoglobin baskılanmış (MIP-myo) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) filmler hazırlandı ve 10 000 ng/mL miyoglobin çözeltisi kullanılarak her biri için baskılama faktörü ($\% \Delta R_{MIP-myo} / \% \Delta R_{NIP}$) hesaplandı.



Şekil 3.2.4.1. Yüzey plazmon rezonans çip yüzeyinde polimerik film hazırlanması. (a) Allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip (b) Protein kalıbının üzerine polimerizasyon karışımının damlatılması (5 µL) (c) Protein kalıbı yüzey plazmon rezonans çip üzerine ters çevrilmesi (d) UV-ışık uygulanması ile polimerizasyonun gerçekleştirilmesi (e) Protein kalıbının polimerik film oluşmuş yüzey plazmon rezonans çip yüzeyinden ayrılması ve polimer üzerinde miyoglobine özgü boşlukların hazırlanması

3.2.5. Poli (HEMA-MATrp) SPR çiplerin yüzey karakterizasyonu

3.2.5.1. FTIR-ATR analizi

Miyogloblin baskılanmış yüzey plazmon rezonans çiplerin yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Peklin Elmer, Spectrum 100, Waltham, MA, ABD) kullanıldı. Poli(HEMA-MATrp) kaplanmış altın çip, cihazın örnek yuvasına yerleştirildi ve 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçüldü.

3.2.5.2. Temas açısı analizi

Altın yüzey, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey, yüzeyinde miyogloblin baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) film hazırlanmış altın yüzeylerin ıslanabilirlik özelliklerinin incelenmesi amacıyla bu yüzeylerin su ve etilen glikol ile yaptıkları temas açıları ölçülmüş ve yüzey serbest enerjileri Owens, Wendt, Rabel ve Kaelble yaklaşımı kullanılarak hesaplandı. Bu amaçla Phonenix 300 cihazının Image XP yazılımı kullanıldı. Yüzey enerjilerinin hesaplanmasında kullanılan sabitler Çizelge 3.2.5.2.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.2.5.2.1. Yüzey enerjilerini hesaplamada kullanılan sabitler

	Su	Etilen glikol
Arayüzey Gerilimi (IFT), mN/m	72,8	48,3
Yayıma Bileşeni Gerilimi, mN/m	22,5	39,3
Kutupsal Bileşen Gerilimi, mN/m	50,3	19
Yoğunluk, g/mL	0,998	1,109
Viskozite, mP	1,002	21,81
Sıcaklık, °C	25	25

3.2.5.3. AFM analizi

Altın yüzey, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey ve miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) altın çiplerin yüzeylerinin karakterizasyonu için yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanıldı. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı değen modda gerçekleştirildi. Salınım rezonans frekansı, 341.30 Hz olarak uygulandı. Titreşim genliği, 1 V_{RMS} ve boş titreşim genliği ise 2 V_{RMS}'dir. Örneklerden 2 µm/s tarama hızında, 256 x 256 piksel çözünürlükte, 2 x 2 µm² 'lik alanların görüntüsü alındı.

3.2.5.4. Elipsometre

Hazırlanan poli(HEMA-MATrp) sensörün yüzeyindeki kalınlık ölçümleri Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile yapıldı. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda, 62 derecelik bir geliş açısında gerçekleştirildi. Yüzeyinde polimerik film içeren altın çip lazer ışık kaynağı altına yerleştirildi. Yüzey kalınlığı hesaplama programı için SF10 cam + 2 nm titanyum katmanı + 42,5 nm altın katmanı veri olarak öngörüldü. Ölçümler sensör yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlandı ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edildi.

3.2.6. Yüzey plazmon rezonans sistemi ile ölçümler

3.2.6.1. SPR sisteminin analiz için hazırlanması

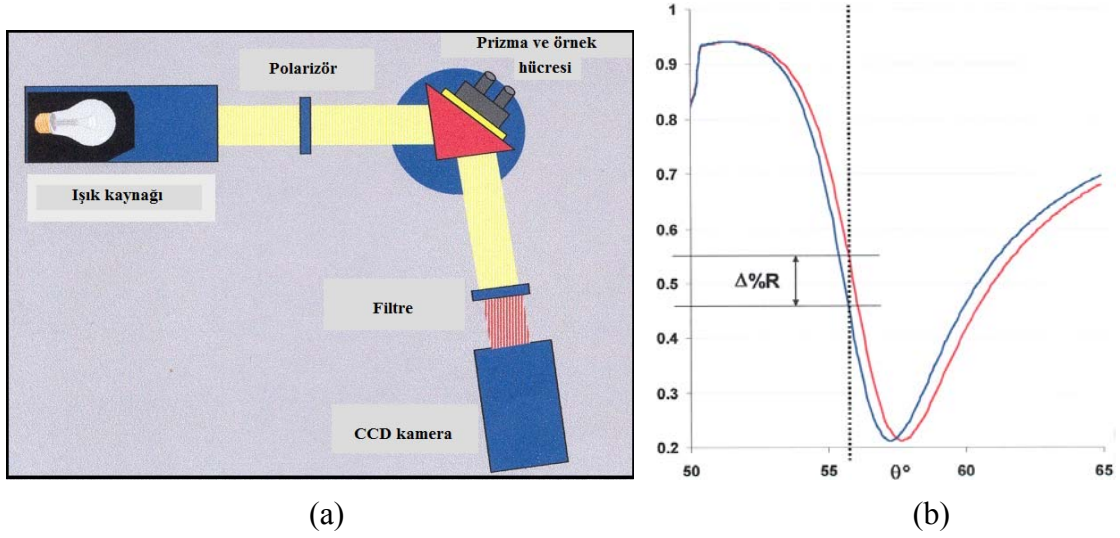
Hazırlanan miyoglobin baskılanmış çipler ile kinetik analizler Şekil 3.2.6.1.1'de gösterilen yüzey plazmon rezonans sistemi SPRimager II (GWC Technologies, Madison, ABD) ile gerçekleştirildi. Sensogramların elde edilmesinde sistem ile birlikte sağlanan Digital Optics V++ görüntüleme yazılımı ve bu yazılımla birlikte çalışan Microsoft Excel programı kullanıldı.



Şekil 3.2.6.1.1 SPRimager II (GWC Technologies, Madison, ABD) yüzey plazmon rezonans sistemi

GWC SPRimager II cihazında yüzey plazmon rezonans etkisi yüzey plazmon rezonans açısına yakın sabit bir açıda uyarılmış olan örnekten yansıyan ışığın ölçülmesi prensibine göre çalışmaktadır (Şekil 3.2.6.1.2 (b)). SPRimager II sisteminde ışığın dalga boyu (800 nm) ve geliş açısı ($40^\circ - 70^\circ$) sabittir. Cihaz ışık kaynağı, kutuplayıcı, örnek hücresi, dar band filtresi, çip yüzeyindeki tüm optik alanı yakalayabilen CCD kameradan oluşan bir dedektör ve sıcaklık değişimini önlemek için bir sıcaklık sensörü içermektedir (Şekil 3.2.6.1.3).

Cihazın çalışma prensibi Şekil 3.2.6.1.2 (a)'da özetlenmiştir. Koşutlanmış polikromatik bir kaynaktan gelen ışık yüzey plazmon rezonans açısına yakın bir bölgedeki açıda bir polarizörden (kutuplayıcı) geçerek prizma/ince altın film/örnek üçlüsünün beraberce oluşturduğu örnek hücresine çarpılmaktadır. Işık, prizma/altın arayüzeyi ile etkileşerek yansıyan ışığın şiddetindeki azalmaya neden olan yüzey plazmonlarını oluşturur. Örnekten yansıyan ışık sadece dedektörün algılayabileceği aralığa denk gelen dar bir band aralığındaki ışığın geçişine izin veren bir filtreden geçer ve bu sayede yansıyan ışığın şiddeti ölçülür.

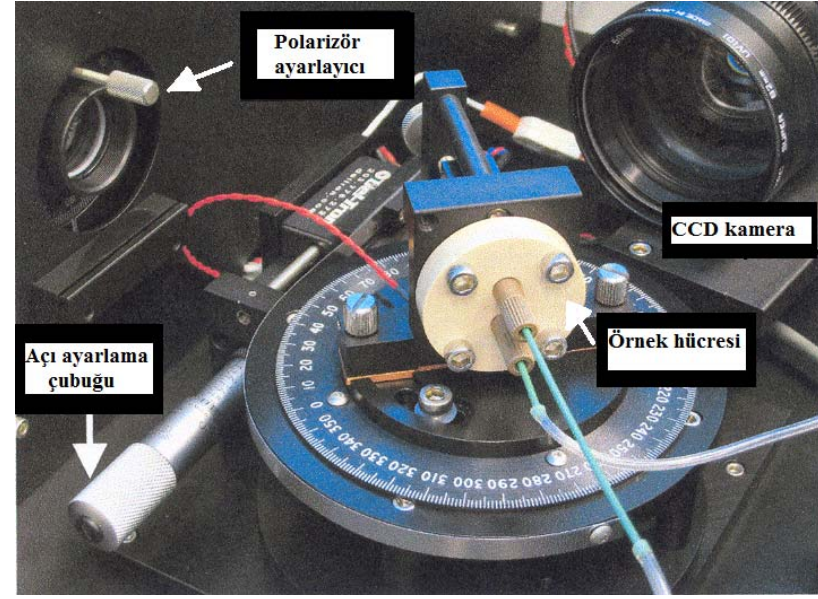
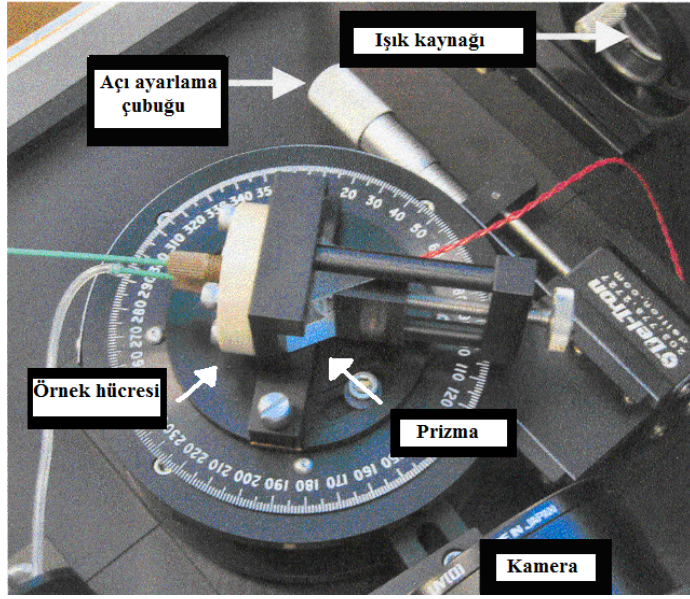


Şekil 3.2.6.1.2. SPRImager II sisteminin (a) çalışma ve (b) sensogram oluşturma prensibi

Miyogloblin baskılanmış yüzey plazmon rezonans çip ile kinetik analizler yapılabilmesi için hazırlanan çip polimerik film kaplı yüzeyi akış hücresi yönünde olacak şekilde örnek tutucuya yerleştirildi ve üzerine kırılma indisi eşitleyici sıvı (kırılma indisi: $1,720 \pm 0,0005$, Cargille Laboratuaries series M fluid) damlatılarak üzerine prizma yerleştirildi. Bu sayede SF-10 cam prizma ile altın çip arasındaki bağlantı sağlanmış oldu (Şekil 3.2.6.1.4). Ardından akış hücresi, giriş ve çıkış uçlarında örnek tutucuya eklenerek örnek hücresi hazırlandı ve kinetik analizlerin gerçekleştirilmesi için cihaza yerleştirildi. Sıcaklık sensörü kullanılarak sıcaklık 25°C 'a sabitlendi ve tüm sensogramlar bu sıcaklıkta alındı.

3.2.6.2 Yüzey plazmon rezonans sistemi ile sensogram alınması

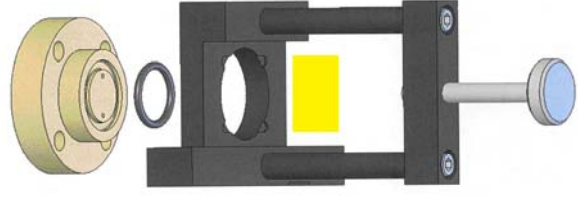
Örnek hücresi hazırlanarak cihaza yerleştirildi. İlk olarak sisteme pH 7,4 fosfat tamponu gönderilerek çip üzerindeki polimer yüzeyinin ıslanması sağlandı ve yüzeyden $150 \mu\text{L}/\text{dakika}$ hızında 30 dakika süre ile pH 7,4 tamponu geçirilmeye devam edildi. Daha sonra geliş açısı yüzey plazmon rezonans açısına yakın bir açıya sabitlenerek sensogram alınmaya başlandı. Sistemden ilk olarak pH 7,4 tamponu geçirildi ve ardından analizi



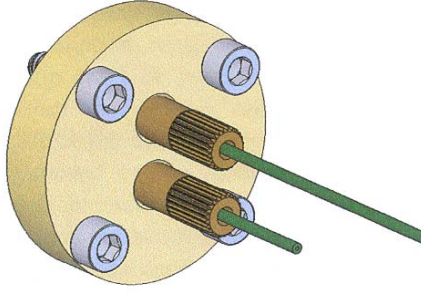
Şekil 3.2.6.1.3. GWC SPRImager II cihazının temel ekipmanları



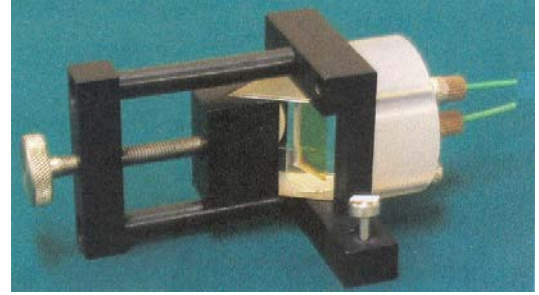
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 3.2.6.1.4. Örnek hücrenin hazırlanması (a) yüzey plazmon rezonans çipin örnek tutucuya yerleştirilmesi (b) akış hücresinin takılması (c) giriş ve çıkış uçlarının yerleştirilmesi (d) prizma ve akış hücresinin bir araya getirilmesiyle örnek hücrenin hazırlanması

yapılacak olan çözelti (miyogloblin içeren sulu çözelti, yarışmacı protein çözeltileri ya da plazma örnekleri) çip yüzeyine gönderilerek yansıyan ışığın şiddetindeki değişim farkı değerleri anlık olarak gözlenerek denge durumuna geldiğinde (yaklaşık 25 dakika) sisteme tekrar pH 7,4 tamponu verilerek spesifik olarak bağlanmayan analit molekülleri yüzeyden uzaklaştırıldı. Ardından yüzeye 10 dakika 1 M etilen glikol karışımı verilerek desorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Desorpsiyon işleminden sonra, yüzey plazmon rezonans sensör yüzeyi 10 dakika su ve tekrar dengeye gelene kadar (yaklaşık 10 dakika) pH 7,4 tamponu ile yıkanarak rejenere edildi. Ardından cihazla birlikte verilen yazılımlar kullanılarak sensogram elde edildi.

3.2.7. Yüzey plazmon rezonans sistemi ile kinetik analizler

Miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör için kalibrasyon eğrisinin hazırlanması amacıyla farklı derişimlerdeki miyogloblin çözeltileri sensör yüzeyine gönderildi. Bu çözeltiler 100-10 000 ng/mL derişim aralığında pH 7,4 fosfat tamponuyla hazırlandı ve her bir derişim değerine ait sensogram alınarak % ΔR değerleri belirlendi.

3.2.7.1. Yarışmalı kinetik analizler

Miyogloblin baskılanmış yüzey plazmon rezonans sensörün seçiciliğini göstermek için lizozim, BSA ve sitokrom c proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar (tekli, ikili, üçlü, dörtlü) yüzey plazmon sistemine gönderilerek yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu çözeltiler, pH 7,4 tamponunda 1000 ng/mL derişiminde hazırlandı ve çip yüzeyine gönderilerek sensogramlar alındı.

3.2.7.2. Poli(HEMA-MATrp) sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi

Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için pH 7,4 fosfat tamponunda 1000 ng/mL derişiminde hazırlanan miyogloblin, lizozim, sığır serum albumini (BSA) ve sitokrom c proteinleri ve bu proteinlerin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar (tekli, ikili, üçlü, dörtlü) baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensör yüzeyine gönderilerek sensogramlar alındı.

3.2.8. Kan örneği ile analizler

Hazırlanan miyogloblin baskılanmış yüzey plazmon rezonans sensörün gerçek örnekler ile kullanılabilirliğinin ve mevcut yöntemler ile uyumluluğunun araştırılabilmesi için kan örnekleri kullanıldı. Kan örnekleri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilimdalı yoğun bakım bölümüne kalp krizi şikayeti ile gelen hastalardan alındı (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu Karar No: 2008-19/30). Kanlar etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) içeren vakumlu tüpler ile toplandı ve kırmızı kan hücrelerinin uzaklaştırılması için oda sıcaklığında 30 dakika 4000 g'de santrifüjlendi.

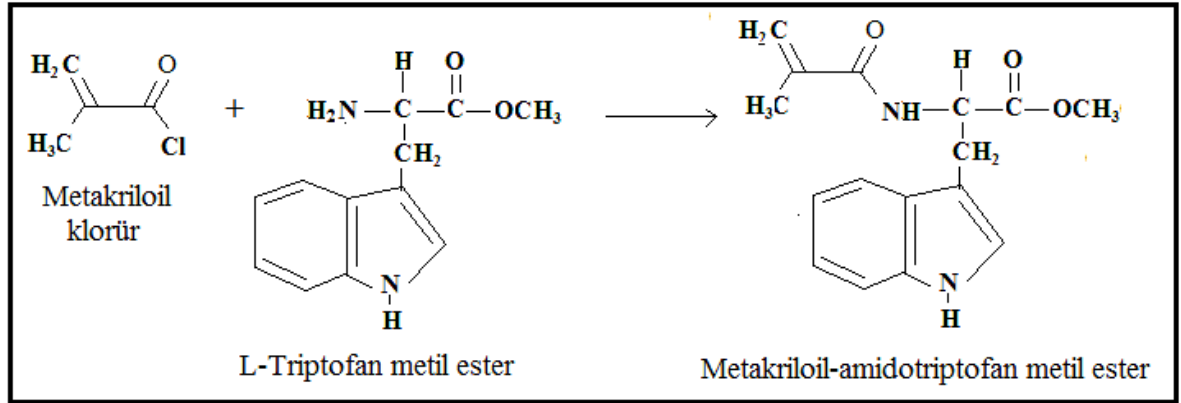
Daha sonra plazma kısmı 3 µm'lik filtreden geçirildi ve -20°C'da dondurularak saklandı. Kullanmadan önce plazma 37°C'da 1 saat bekletilerek tavlandı. Uygulamadan önce, plazma örneklerinin seyreltilmesinde % 0,95 NaCl içeren izotonik çözelti kullanılmıştır. Hazırlanan sensörün etkinliğini göstermek için kan örnekleri ELISA testi (Myoglobin EIA test kit, BioChek, Inc. Foster City, USA) ile analiz edildi. Analizde test ile birlikte verilen yöntem kullanıldı.

Kan örneğinin analizinde kanın kırılma indisi değişiminden gelebilecek hataları azaltmak için standart katma metodu kullanıldı. Kan örneğindeki toplam seyrelme miktarı 1:15 olacak şekilde önce kör örnek, ardından aynı seyrelme oranında, miyoglobin derişimi 300; 500; 700; 900 ve 1000 ng/mL olan çözeltiler % 0,95 NaCl içeren izotonik çözelti kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör yüzeyine gönderilerek % ΔR /zaman değişiminden oluşan sensogramlar alındı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

MATrp monomeri, L-triptofan metil esterinin metakrilil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edildi (Şekil 4.1.1). Elde edilen monomerin karakterizasyonu NMR ve FTIR çalışmaları ile yapıldı.



Şekil 4.1.1. MATrp monomerinin sentez reaksiyonu

MATrp monomerinin kimyasal yapısının belirlenebilmesi için ¹H-NMR kullanılmıştır. Şekil 4.1.2 MATrp'nin ¹H-NMR spektrumunu göstermektedir. MATrp monomerinin yapısında bulunan ilgili protonlara ait pikler spektrum üzerinde işaretlenmiştir. MATrp monomerine ait karakteristik pikler şunlardır: **(1)** δ 8,22 (1H s, br, N-H), **(2)** 7,54-7,09 (4H aromatikler), **(3)** 6,98 (1H d, amid NH J=5,58), **(4)** 5,64 (1H, t CH₂), **(5)** 5,32 (1H, t, CH₂), **(6)** 4,99 (1H, m, CH) **(7)** 3,38(2H, dd, CH₂), **(8)** 6,34 (1H,d, 5'li halka, J=7,6), **(9)** 3,71 (3H, s, OCH₃), **(10)** 1,24 (3H, t, CH₃), (400 MHz, DMSO-d₆).

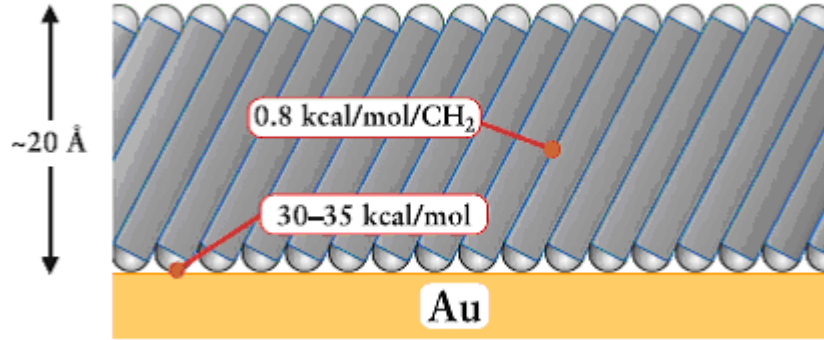
MATrp monomerinin yapısının belirlenmesi için FTIR tekniği de kullanılmıştır. Şekil 4.1.3'de MATrp monomerinin FTIR spektrumu verilmiştir. Spektrum üzerinde bileşiğe ait olan karakteristik bandlar gösterilmiştir. 3100-3000 cm⁻¹ aralığında aromatik C-H, 2952 ve 2853 cm⁻¹'de alifatik C-H gerilmelerinden kaynaklanan absorpsiyon bandları gözlenmektedir. 1734 cm⁻¹ 'de ester karbonil (C=O) grubuna ait gerilme bandı,

1659 cm^{-1} 'de ise amid karbonil grubuna ait gerilme bandı yer almaktadır. N-H gerilme titreşiminden kaynaklanan absorpsiyon bandında 3500 cm^{-1} civarında ortaya çıkmıştır.

4.2. Altın Yüzey Modifikasyonunun Karakterizasyonu

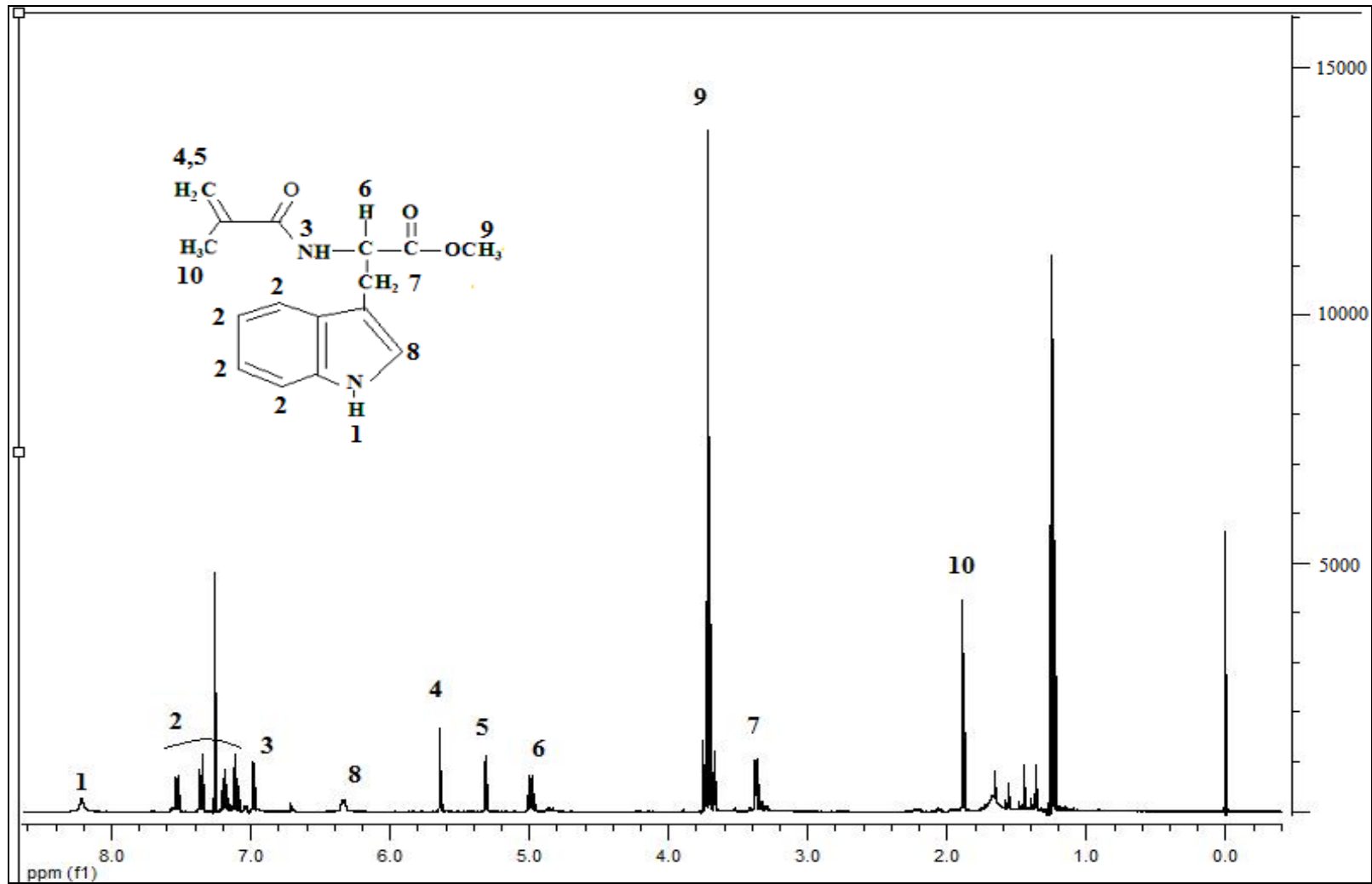
4.2.1. FTIR analizi

Tiyoller (R-SH) Au(111) substratlar üzerinde mükemmel SAM (Self-Assembled Monolayer) oluştururlar. Uç grup altın yüzeyinde kuvvetli ve istemli bir şekilde adsorbe olur. Daha sonra moleküller zincir-zincir etkileşimleri ile tekrar kendi aralarında organize olarak yüzeyde yoğun ve düzenli bir tabaka oluştururlar. Bu düzenlenmede kuyruk kısmında yer alan grup dışa doğru yönelmektedir. Şekil 4.2.1.1 katı yüzey üzerinde SAM oluşumunu şematik olarak göstermektedir.

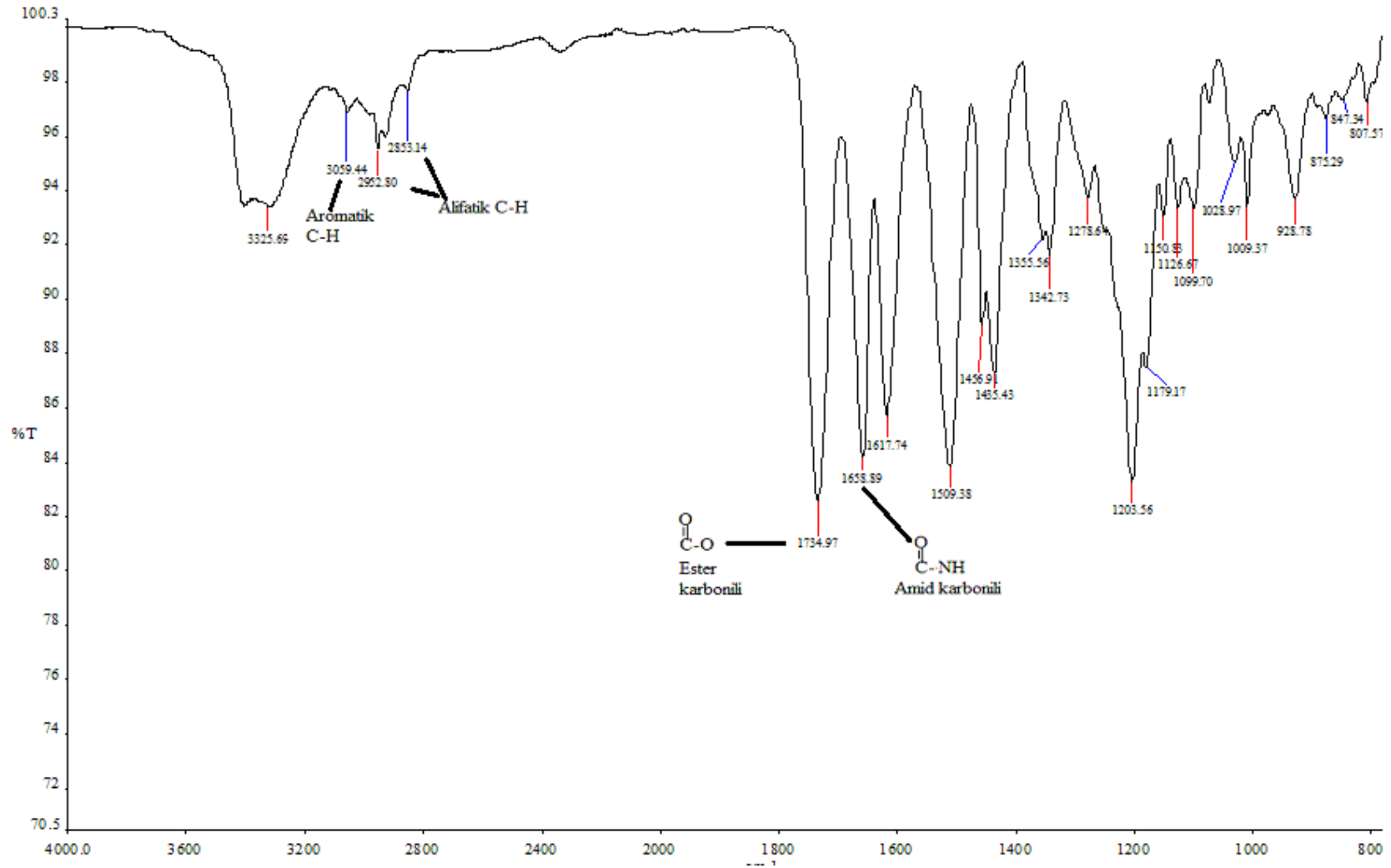


Şekil 4.2.1.1. Altın yüzeyinde SAM oluşumunun şematik gösterimi

Farklı fonksiyonel gruplara (kuyruk) sahip tiyol molekülleri kullanılarak çalışılan yüzeyin kimyasal özelliği ve fonksiyonelliği çok geniş bir aralıkta değiştirilebilir. Hatta SAM oluşumundan sonra kuyruk kısmında yer alan fonksiyonel grup kimyasal olarak modifiye edilebilir. Altının göreceli inertliği, kolay temizlenmesi ve hazırlanmasına olanak sağlayan mikrokristalin yapısı nedeniyle Au (111) üzerine tiyol bağlanması en çok çalışılan model sistemdir. Tiyollerin kolayca SAM oluşturabildiği diğer metaller gümüş, platin, bakır, demir, nikel, civa iken GaS (galyum sülfür), indiyum fosfor (InP) gibi yarı iletken yüzeylerinde bu oluşum kolayca gerçekleşebilmektedir.



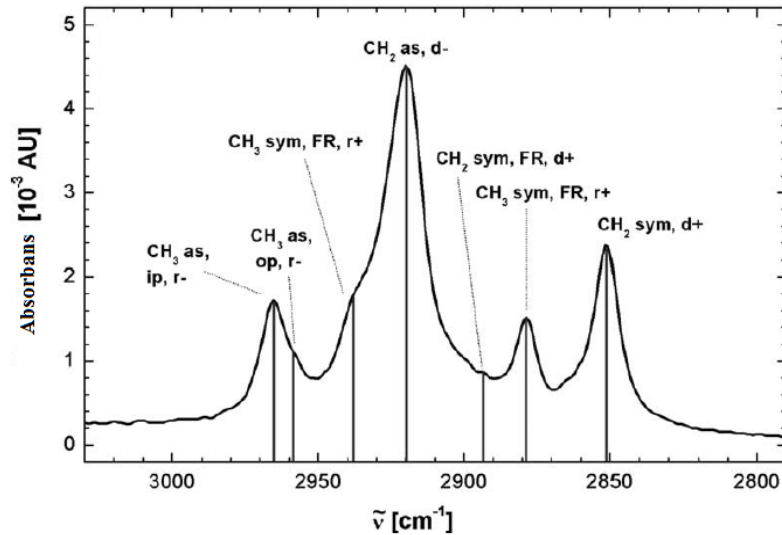
Şekil 4.1.2. MATrp'nin ¹H-NMR spektrumunu



Şekil 4.1.3. MATrp monomerinin FT-IR spektrumu

SAM karakterizasyonu için IR ve fotoelektron spektroskopisi (XPS) gibi spektroskopik teknikleride kapsayan çok sayıda farklı deneysel ve mikroskopik yöntem bulunmaktadır. Ayrıca temas açısı gibi daha dolaylı yöntemler de karakterizasyon için kullanılmaktadır.

SAMlerin karakterizasyonu için su yada başka çözücüler kullanılarak temas açısının ölçülmesi fizikokimyasal özelliklerin ayrıntılı olarak belirlenmesi için tek başına yeterli olmamaktadır. Daha ayrıntılı bir analiz için oluşan tabakanın kimyasal bileşimi ve moleküler yönelmesi belirlenmelidir. Fakat tabaka kalınlığının çok düşük olması bir dezavantajdır ve oldukça hassas tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. IR spektroskopisi SAM karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Rutin IR analizlerinden farklı olarak metal yüzeyinde oluşan SAM analizleri, IR ışığın örnek yüzeyinden yansıtıldığı sıyırma açısında alınan spektrum ile yapılmaktadır. Tabaka kalınlığının çok düşük olması ve absorpsiyon yapan moleküllerin bulunduğu bölgede ışığın aldığı yol kısa olduğundan absorpsiyon değerleri oldukça düşüktür. Bu nedenle sıkça kullanılan detero-triglisinsülfat (DTGS) piroelektrik dedektör yerine, civa-kadmiyum-tellür fotodiyot (MCT) dedektörler kullanılmaktadır. Şekil 4.2.1.2’de onsekiz karbonlu bir alkanotiyolat için C-H gerilme bölgesinde elde edilen absorpsiyon değerleri görülmektedir (Kind ve Wöll 2009)



Şekil 4.2.1.2. Oktadekantiyol kullanılarak hazırlanan altın yüzeye ait IR spektrumu (C-H gerilme bölgesi)

Metal yüzeyinde SAM oluşumunun IR spektroskopisi ile analizinde kimyasal yapının ve moleküler yönelmenin belirlenmesinde çok sayıda absorpsiyon bandına ait değişimden yararlanılmaktadır. Bunlardan en önemlileri, 2800-3000 cm^{-1} frekans aralığındaki C-H gerilme bandlarının oluşması ve serbest tiyollerde 2560 cm^{-1} civarında gözlenen S-H gerilme titreşimine ait bandın kaybolmasıdır.

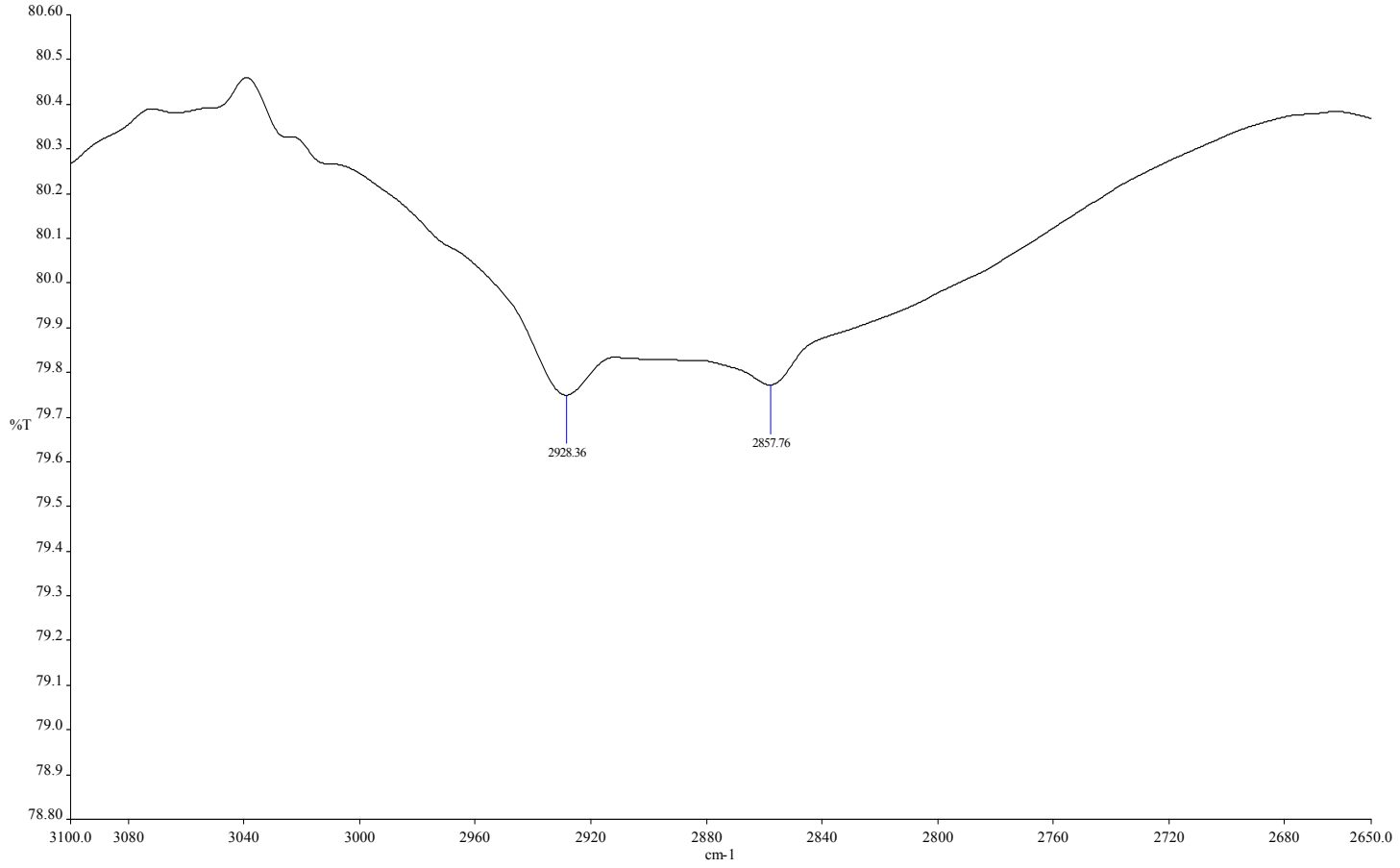
SPR altın çip yüzeyinde poli(HEMA-MATrp) filmin hazırlanabilmesi için ilk olarak yüzey doymamış bağlar içeren allil merkaptan ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SH}$) ile kaplanmıştır. Şekil 4.2.1.3'de allil merkaptan kaplanmış altın çip yüzeyine ait IR spektrumu görülmektedir. Tabaka kalınlığının düşük olması nedeniyle spektrum oldukça gürültülüdür. Ancak C-H gerilme bölgesine bakıldığında 2930 cm^{-1} ve 2857 cm^{-1} de simetrik ve asimetrik C-H gerilme titreşimlerine ait bandlar açıkça görülmektedir. Üç karbonlu bir alkanotiyolat olan propantiyolat için de simetrik ve asimetrik C-H gerilme titreşim bandları 2928 cm^{-1} ve 2856 cm^{-1} 'de gözlenmiştir (Hostetler ve ark. 1996). Altı karbon ve üzeri alkil zincirine sahip alkanotiyolatlar için ise bu değerler simetrik gerilmeler için 2848-2850 cm^{-1} , asimetrik gerilmeler için 2918-2920 cm^{-1} aralığında değişmektedir. Bu açıdan bakıldığında allil merkaptan kaplı altın yüzey için bulunan C-H gerilme titreşim bandlarına ait frekans değerleri literatür ile uyumludur. Ayrıca serbest alkanotiyolatlarda 2560 cm^{-1} civarında gözlenen S-H gerilme titreşim bandı spektrumda gözlenememiştir. Bu sonuç allil merkaptanın altın yüzeyine bağlanması nedeniyle S-H bağının kırıldığını düşündürmüştür.

4.3. Cam Yüzey Modifikasyonunun Karakterizasyonu

Bu çalışmada, miyoglobinin poli(HEMA-MATrp) film yüzeyine baskılanmasında mikrotamas baskılama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde kalıp protein molekülü cam yüzeyine immobilize edilmekte ve bu sayede proteinin polimerizasyon karışımında çözünme problemi ortadan kalkmaktadır (Chou ve ark.2005). Bu güne kadar bu yöntem ile yapılan bütün çalışmalarda, protein damgası olarak kullanılacak cam yüzeyi heksametilendisilazan (HMDS) ile hidrofobik hale getirilerek protein molekülleri yüzeye hidrofobik etkileşimler ile immobilize edilmiştir (Lin ve ark. 2006).



(a)



(b)

Şekil 4.2.1.3. Allil merkaptan kaplanmış altın çipe ait speküler reflektans FTIR spektrumu (a) spektrum (b) 2650-3100 cm^{-1} aralığının yakından görünüşü

Protein molekülleri yüzeye temel olarak iyonik etkileşimler, hidrofobik ve polar etkileşimler aracılığı ile adsorbe olabilirler. Hangi tür moleküller arası etkileşimin etkin şekilde yer aldığı ise yüzeye ve proteine göre değişmektedir. Oluşan tabaka heterojen ve rastgele yönelmiş protein moleküllerinden oluşmaktadır. Çünkü her molekül, substrat ve daha önce adsorplanmış protein molekülleri ile arasındaki itme kuvvetlerini en aza indirecek şekilde farklı yönelmelerde çok sayıda temasta bulunabilir. Ayrıca adsorpsiyon ile immobilizasyonda iyonik şiddet, pH ya da sıcaklık gibi çevresel koşulların değişmesi durumunda adsorplanmış moleküller desorbe olurlar (Sun ve ark. 2006, Frederix ve ark. 2004).

Chou ve ark. (2007) lizozimi kalıp molekül olarak kullandıkları bir çalışmada, kalıp molekülü içeren camın yüzeyden ayrılması sırasında kalıp molekül lizozimin polimerik film yüzeyine transfer olduğunu rapor etmişlerdir. Proteini yüzeyden uzaklaştırmak için NaOH ile yıkanmış, her bir aşamada temas açısı ölçülmüş ve kalıp molekül lizozimin uzaklaşmasına bağlı olarak temas açısının azaldığı belirlenmiştir. Lin ve ark. (2006) mikrotemas baskılama yöntemi ile miyogloblin, lizozim ve ribonükleaz A için moleküler baskılanmış polimerlerik filmler hazırlamış ve polimerizasyondan sonra kalıp molekülün uzaklaştırılması için % 0,8 NaOH ve % 2 SDS ile 80°C'da 30 dakika yıkama yapıldığını rapor etmiştir.

Proteinler yüzeylere protein yapısında yer alan ulaşılabilir konumdaki aminoasit yan zincirlerindeki fonksiyonel gruplar aracılığı ile kovalent olarak da immobilize edilebilir. Kovalent bağ genellikle yan zincirdeki fonksiyonel grup ile uygun şekilde modifiye edilmiş substrat arasında gerçekleştirilir. Sonuç olarak bağlanmanın tersinmez olduğu ve yüzeyin büyük ölçüde kaplandığı substratlar elde edilir. Kovalent bağlama tekniği bağlanma kararlılığı ve dayanıklılık düşünüldüğünde adsorpsiyona göre çok daha uygun bir tekniktir (Lu ve ark. 2007). Biyosensör yüzeylerine proteinlerin bağlanmasında da sıklıkla tercih edilen yaklaşım kovalent bağlamadır (Duan ve ark. 2007, Zhang ve ark. 2004b, Christiaens ve ark. 2006, Cooper 2002).

Kovalent bağlamada en çok kullanılan yaklaşım protein molekülünde yer alan $-NH_2$ grupları ve aldehid grupları ile türevlendirilmiş substrat arasında Schiff bazı

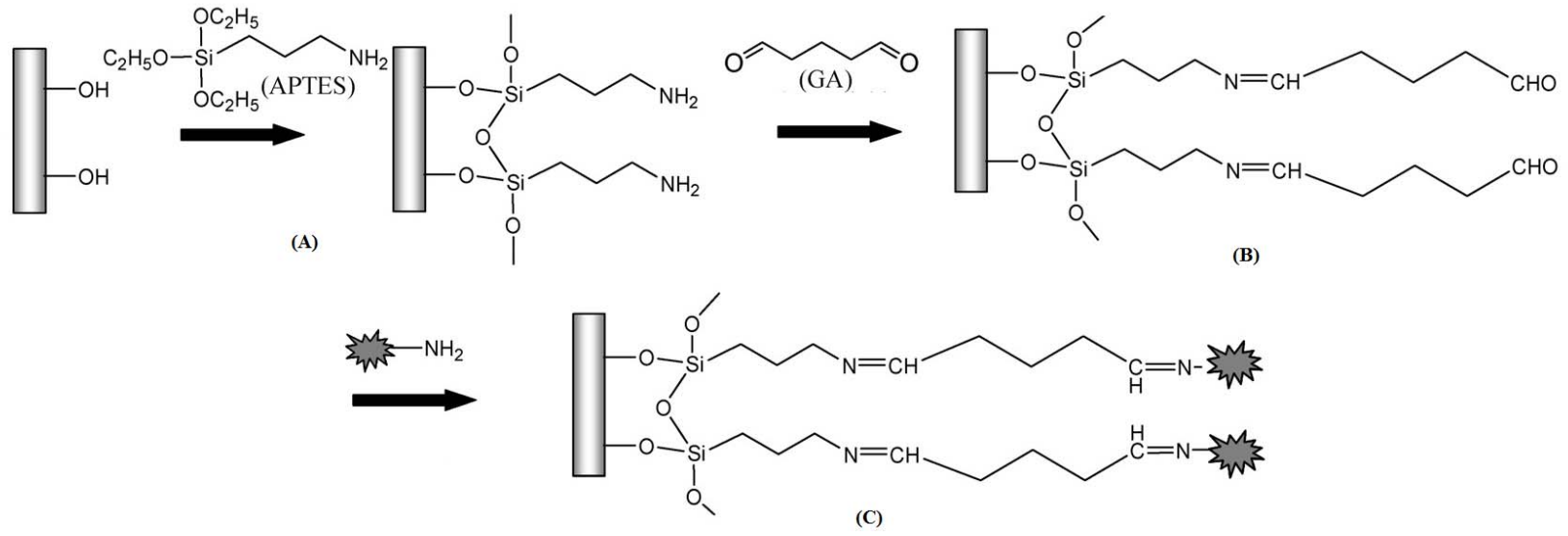
oluşumudur (D'Souza ve Godbole 2002, Choi 2005, Betancor ve ark. 2006). Aldehit-amin kimyası farklı yüzeylere protein immobilizasyonunda yıllardır yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Avseenko ve ark. 2001, Zhang ve ark. 2004b).

Cam yüzeyinde fonksiyonel grup oluşturmak için genellikle protein yüzeyinde yer alan gruplar ile elektrostatik ya da kovalent etkileşimi sağlayacak fonksiyonel gruplar içeren silan bileşikleri kullanılır. Yüzey modifikasyonunda en sık kullanılan iki madde aminopropil trietoksi silan (APTES) ve glutaraldehidtir (Gan ve ark. 2009, Graf ve ark. 2008). APTES kovalent olarak cam yüzeyine bağlanır. $-NH_2$ uçları her iki ucuda aldehid grubu içeren glutaraldehid ile kovalent olarak bağlanarak yüzeyde serbest aldehid grupları oluşturulur (Şekil 4.3.1). Bu aldehid grupları da proteinleri Schiff bazı oluşumu ile kovalent olarak bağlar (Qin ve ark. 2007).

Bu çalışmada, cam yüzeyi ilk olarak APTES ve glutaraldehid ile modifiye edilmiş ve ardından miyoglobin yüzeye kovalent olarak immobilize edilmiştir. Bu sayede proteinin yüzeyden desorpsiyonu engellenmiştir. Bu yöntem ile NaOH/SDS gibi bağlanma bölgelerinin yapısını bozabilecek kimyasallar ile yıkama aşaması da ortadan kaldırılmıştır.

4.3.1. Temas açısı analizi

Miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) filmin hazırlanmasında ilk olarak cam slaytlar temizlenmekte ve daha sonra modifiye edilerek protein kalıbının hazırlanmasında kullanılmaktadır. Bu aşama da cam yüzeyinde bir çok değişim olmaktadır ve bu değişimleri temas açılarındaki farklılıkları izlemek suretiyle belirlemek mümkündür. Bu değişimleri karakterize etmek amacıyla temizlenmiş cam, APTES ile modifiye edilmiş cam, APTES ve ardından glutaraldehit ile modifiye edilmiş cam ve miyoglobin immobilize edilmiş camın (protein kalıbı) su ile yaptıkları temas açıları belirlenmiştir. Çizelge 4.3.1.1'de suyun cam yüzeyler ile yaptığı temas açısı değerleri, Şekil 4.3.1.1'de ise yine bu yüzeylere ait temas açısı görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 4.3.1. (a) Cam yüzeyin APTES ile modifikasyonu **(b)** APTES modifiye camın glutaraldehid aktivasyonu **(c)** Miyoglobinin modifiye cam yüzeyine kovalent olarak bağlanması

Çizelge 4.3.1.1. Cam yüzeylerine ait temas açısı değerleri

Yüzey	Temas Açısı, ° (H ₂ O)
Asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiş cam	44,7 ± 3,5
APTES ile modifiye edilmiş cam	54,3 ± 3,2
APTES + glutaraldehid ile modifiye edilmiş cam	61,8 ± 4,2
Miyoglobın bağlanmış cam (Protein kalıbı)	67,3 ± 2,1

Asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiş cam için temas açısı $44,7^\circ \pm 3,5$ iken APTES ile modifiye edilmiş cam için bu değer $54,3^\circ \pm 3,2$ 'ye yükselmiştir. Bu değişim APTES ile muamele sonucunda cam yüzeyinin daha hidrofobik bir karakter kazandığını göstermektedir. Bu değişim büyük olasılıkla cam yüzeyindeki -OH gruplarının aminopropil segmentleri ile kovalent olarak bağlanmasından kaynaklanmaktadır. APTES ile kaplanmış cam yüzey daha sonra glutaraldehid ile modifiye edilmiş ve temas açısı $65,8^\circ \pm 5,2$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre yüzey biraz daha hidrofobik hale gelmiştir. Çünkü glutaraldehid, APTES den gelen amin uçlarını imin oluşumuyla kapatmış ve içerdiği hidrokarbon zincirinden dolayı da hidrofobik özellik kazandırmıştır. Miyoglobinin kovalent olarak bağlandığı cam yüzeyinde ise temas açısı $67,3^\circ \pm 2,1$ olarak elde edilmiştir. Bu sayede hidrofobisitede az da olsa bir artış olmuştur.

4.3.2. AFM analizi

Cam yüzeyinin morfolojisindeki değişimin ayrıntılı bir şekilde incelenebilmesi için APTES ve glutaraldehid ile modifiye edilmiş cam yüzeyin ve miyoglobın immobilize edilmiş cam yüzeyin AFM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.3.2.1 ve Şekil 4.3.2.2'de bu modifikasyonlardan sonra cam yüzeye ait AFM görüntüleri görülmektedir. Görüldüğü gibi APTES ve glutaraldehid modifikasyonu ile cam yüzeyinde oluşan kalınlık yaklaşık 1,5-2 nm'dır. Miyoglobinin cam yüzeyine immobilizasyonundan sonra yüzey morfolojisi tamamen değişmiş ve kalınlık 6-6,5 nm değerlerine yükselmiştir. Bu sonuç miyoglobinin cam yüzeyine başarıyla immobilize edildiğini göstermektedir.

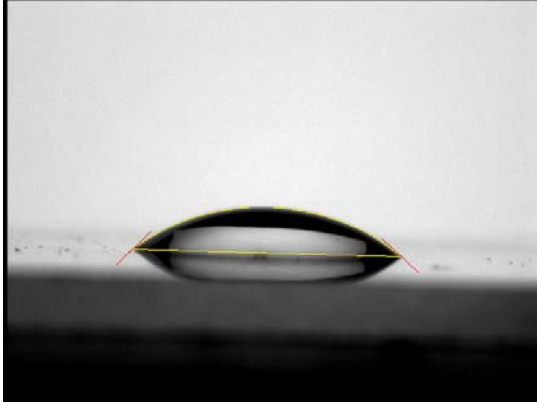
4.4. Miyogloblin Baskılanmış Poli(HEMA-MATrp) Sensörün Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Afinitesi ve seçiciliği yüksek MIPIlerin hazırlanmasında en önemli parametreler; monomer ve çapraz bağlayıcının seçimi ve polimerizasyon koşullarının optimizasyonudur. Ne yazık ki, MIP hazırlanması için genel bir işlem yoktur. Bu nedenle uygulamaya bağlı olarak işlemlerin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir. Uygun yöntemin belirlenmesinden sonra değişkenlerin sürece etkisi optimize edilmelidir. Bununla birlikte polimerizasyondan sonra spesifik olmayan bağlanmanın yüksek olması ve heterojen bağlanma bölgelerinin oluşması önlenmelidir. Eğer polimerizasyondan sonra polimer içerisinde hala uzaklaştırılmayan kalıp molekül kalırsa bağlanma kapasitesi azalacaktır. Bu yüzden kalıbın tamamen uzaklaştırılması için de ilave bir çabaya ihtiyaç duyulmaktadır (Uludağ ve ark. 2007).

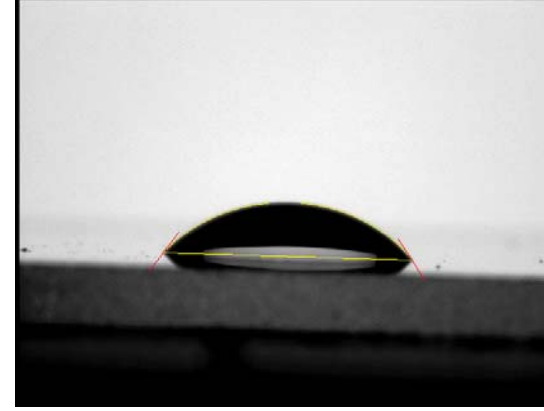
Altın yüzeyinde sensör oluşturacak moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında iki temel yaklaşım vardır. Birincisi tiyol içeren bir molekül ile sensör yüzeyinde aktif bir uç oluşturmak ve polimerik filmin adhezyonunu arttırmaktır. Allil merkaptan (Kugimiya ve Takeuchi 2001, Wu ve Syu 2006, Uzun ve ark. 2009), merkaptolanol (Ling ve ark. 2005), tiyotik asit modifiye glisidil metakrilat (Liu ve ark. 2006a) ve merkaptoundekanoik asit (Piacham ve ark. 2005) bu amaçla kullanılmaktadır.

İkincisi sensör yüzeyinde herhangi bir aktivasyon yapmaksızın polimer sentezini doğrudan altın yüzeyinde gerçekleştirmektir. Bu iki temel yaklaşım dikkate alındığında moleküler baskılanmış polimerler sensör yüzeyine yüzey aşılama (Piacham ve ark. 2005), sıkıştırma (sandwich casting), dönel kaplama (Ling ve ark. 2005) ya da elektropolimerizasyon (Sallacan ve ark. 2002) ile kaplanabilmektedir. Sıkıştırma yöntemi hem altın yüzeyinin aktivasyonundan sonra (Kugimiya ve Takeuchi 2001, Cao ve ark. 2001, Liu ve ark. 2006b) hem de yüzeyi aktive etmeden doğrudan sensör yüzeyinde (Percival ve ark. 2002, Kugimiya ve Takeuchi 2001, Haupt ve ark. 1999b, Percival ve ark. 2001) polimerizasyona olanak vermektedir. Bu açıdan bakıldığında mikrotamas baskılama yöntemine de ilham vermektedir. Çünkü mikrotamas baskılama yönteminde protein molekülleri cam substrat üzerine immobilize edilmekte ve kalıp

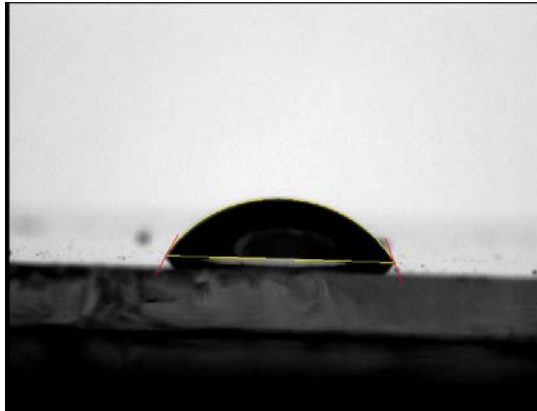
moleköl olarak kullanılmaktadır. Bu durumda hem kalıp molekül proteinin polimerizasyon karışımında çözünme problemi ortadan kalkmakta hem de kalıp molekül varlığında MIP sensör altın yüzeyinde başarıyla sentezlenebilmektedir. Bu çalışmada; ilk olarak maksimum sensör cevabını oluşturacak, seçiciliği yüksek miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) filmin hazırlanması için gerekli optimizasyon yapılmış ve ardından hazırlanan sensör FT-IR, temas açısı, AFM ve SEM analizleri ile karakterize edilmiştir.



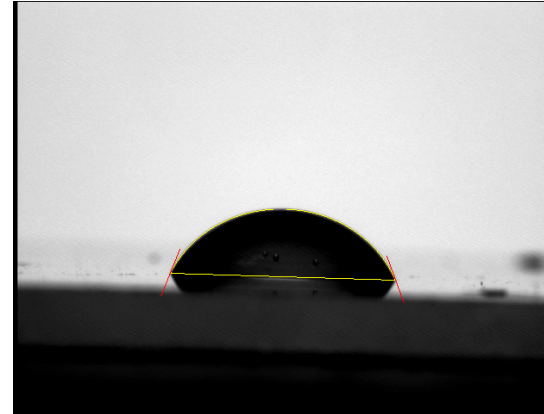
(a)



(b)

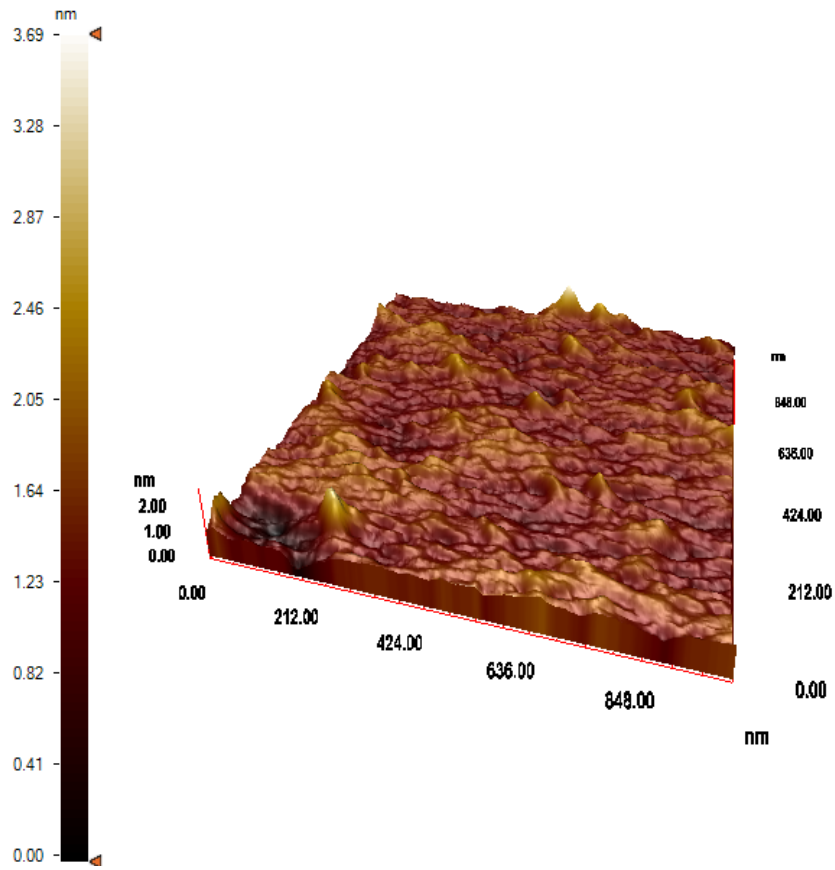
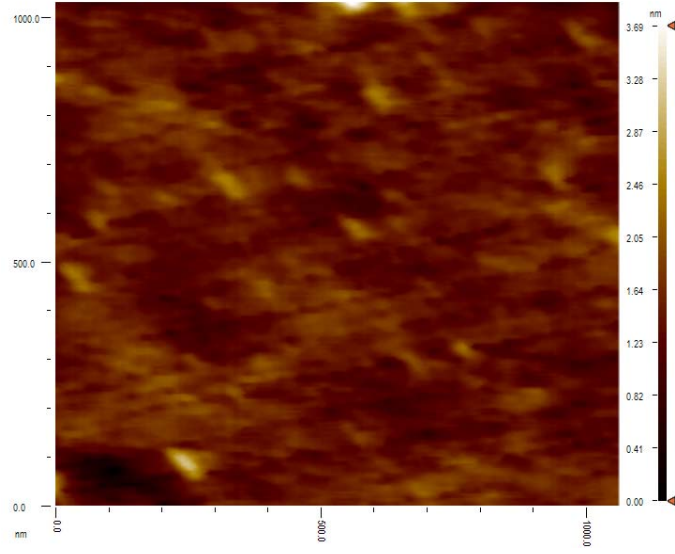


(c)

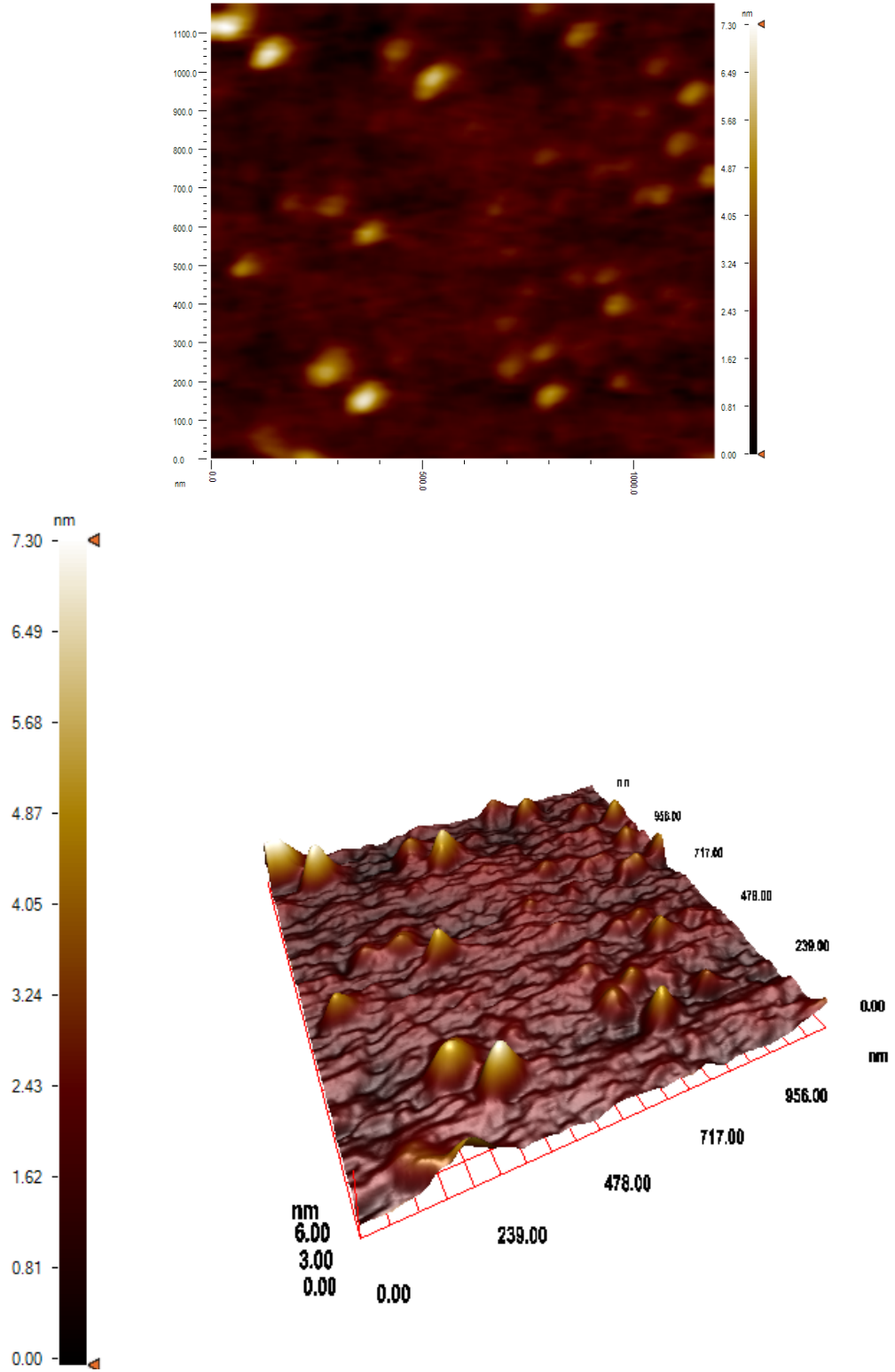


(d)

Şekil 4.3.2.1. Cam slaytların su ile temas açısı ölçümleri; (a) Asidik pirana ile temizlenmiş cam yüzeyi, (b) APTES ile modifiye edilmiş cam yüzeyi (c) APTES + glutaraldehid ile modifiye edilmiş cam yüzeyi (d) Miyogloblin bağlanmış cam (protein kalıbı)



Şekil 4.3.2.2. APTES ve glutaraldehid ile modifiye edilmiş cam yüzeyin yarı degen modda alınan AFM görüntüleri (a) yüzey görüntüsü (b) 3D görüntüsü ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$)



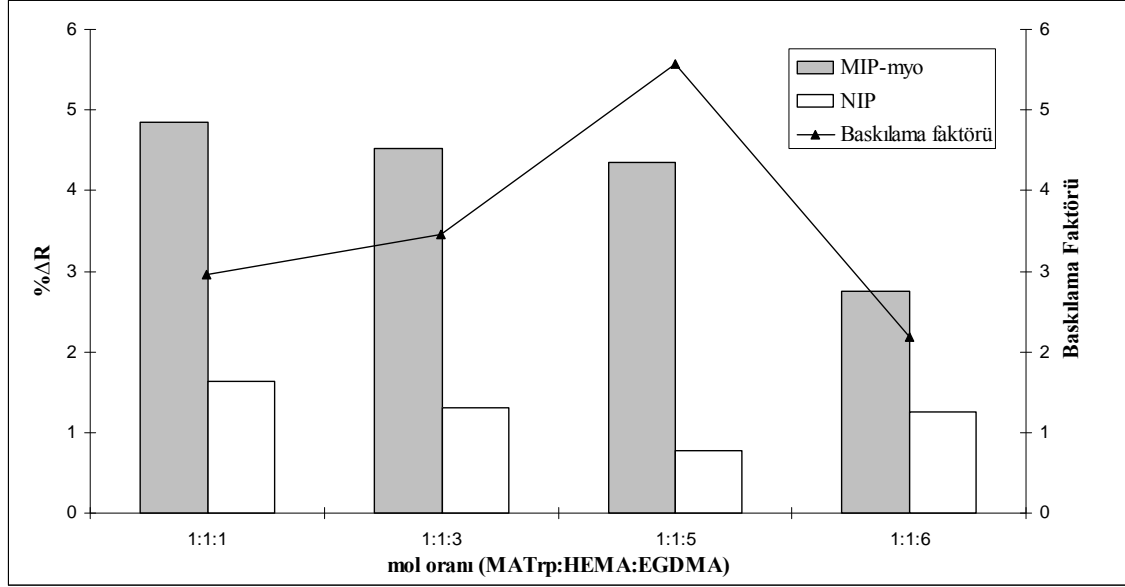
Şekil 4.3.2.3. Miyogloblin bağlanmış modifiye cam yüzeyin (protein kalıbı) yarı degen modda alınan AFM görüntüleri (a) yüzey görüntüsü (b) 3D görüntüsü ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$)

4.4.1. Polimerizasyon karışımının optimizasyonu

Kovalent olmayan baskılama tekniği ile moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında çapraz bağlayıcı/monomer oranının optimizasyonu monomer/kalıp molekül oranının optimizasyonu ile daha da karmaşık bir hal almaktadır (Sellergen 1989). Çalışmada kalıp molekül miyoglobinin cam yüzeyine kovalent olarak bağlanmıştır ve miktarı sabittir. Çünkü hazırlanan cam yüzeyin çalışılan deneysel koşullarda kovalent olarak bağlayacağı miyoglobinin miktarı belirlidir. Protein kalıbı hazırlandıktan sonra cam yüzeyine immobilize olan miyoglobinin miktarı değiştirilemeyeceği için polimerizasyon karışımının optimizasyonu amacıyla fonksiyonel monomer (MATrp), komonomer (HEMA) ve çapraz bağlayıcı (EGDMA) miktarları değiştirilerek hazırlanan baskılanmış (MIP-myo) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) sensörün 10 000 ng/mL derişimindeki miyoglobinin ile SPR sensogramları alınmış ve % ΔR değerleri belirlenmiştir. Karışımında yer alan fonksiyonel monomer, komonomer, çapraz bağlayıcı miktarlarının belirlenmesinde, kullanılan her bir bileşenin reaksiyona girme hızı, polimerizasyon karışımının allil merkaptan kaplı altın yüzeyine adhezyonu göz önünde bulundurulmuştur. Yapılan deneylerde HEMA ve EGDMA'nın MATrp monomerine göre çok daha reaktif olduğu ve bu bileşenlerin ortamda fazla bulunması durumunda hem polimerizasyon karışımının allil merkaptan kaplı altın yüzeye adhezyonunun azaldığı hem de oluşan polimerik film kalınlığının arttığı belirlenmiştir. Tüm bu bilgiler dikkate alınarak sabit miktarda kalıp molekül varlığında fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı miktarı optimize edilmiştir. MATrp:HEMA:EGDMA için mol oranları 1:1:1; 1:1:3; 1:1:5; 1:1:6 şeklinde değiştirilerek hazırlanan baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensörlerin 10 000 ng/mL miyoglobinin ile etkileşimine ait sensogramlar Şekil 4.4.1.1'de, baskılama faktörü (% $\Delta R_{MIP-myo}$ / % ΔR_{NIP}) değerleri de Çizelge 4.4.1.1'de özetlenmiştir.

Sabit miktarda MATrp ve HEMA varlığında çapraz bağlayıcı (EGDMA) miktarının değiştirilmesi (1:1:1; 1:1:3; 1:1:5; 1:1:6) ile MIP-myo ve NIP için elde edilen sinyal değerlerinde değişim gözlenmiştir. Baskılanmış poli(HEMA-MATrp) filmler için baskılanmamış filmlere göre daha yüksek % ΔR değerlerinin elde edilmesi miyoglobine özgü bağlanma bölgelerinin oluştuğunun bir göstergesidir. Baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) filmin yapısında da aynı miktarda fonksiyonel monomer yer almasına karşın

kalıp moleküle özgü bağlanma bölgeleri oluşmadığından elde edilen $\% \Delta R$ değerleri daha düşüktür. Çapraz bağlayıcı miktarı değiştirilerek baskılama faktörünün en yüksek olduğu bileşim belirlenmiştir.

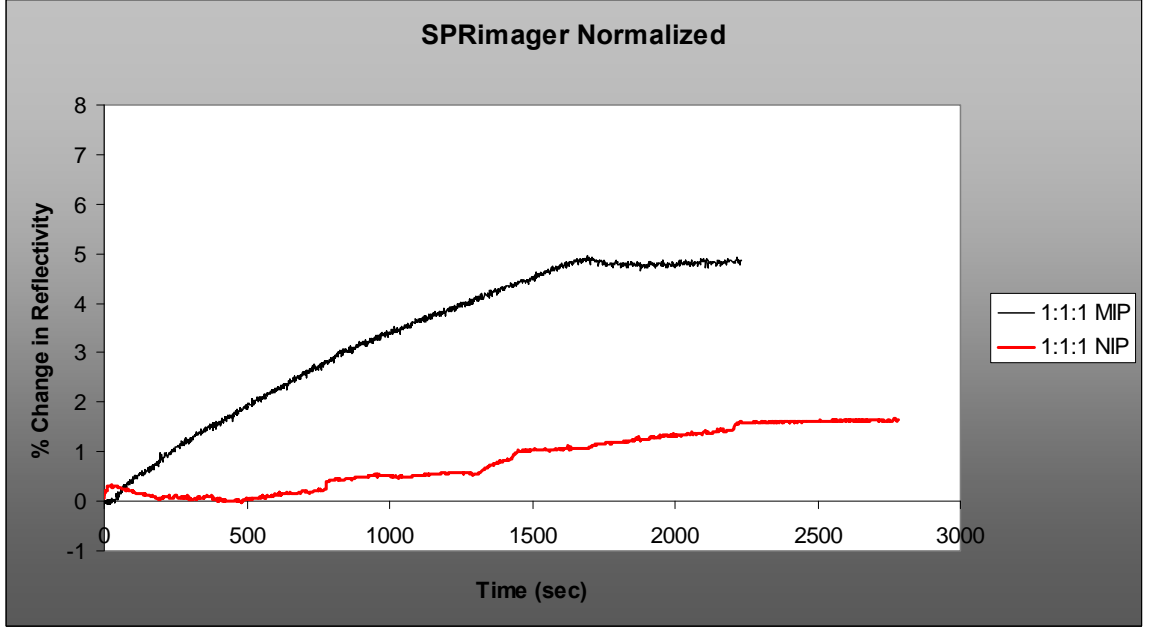


Şekil 4.4.1.1. Farklı oranlarda MATrp:HEMA:EGDMA içeren polimerizasyon karışımları ile hazırlanan miyoglobın baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) poli(HEMA-MATrp) sensörler ile elde edilen $\% \Delta R$ ve baskılama faktörü ($\% \Delta R_{MIP-myo} / \% \Delta R_{NIP}$) değerleri

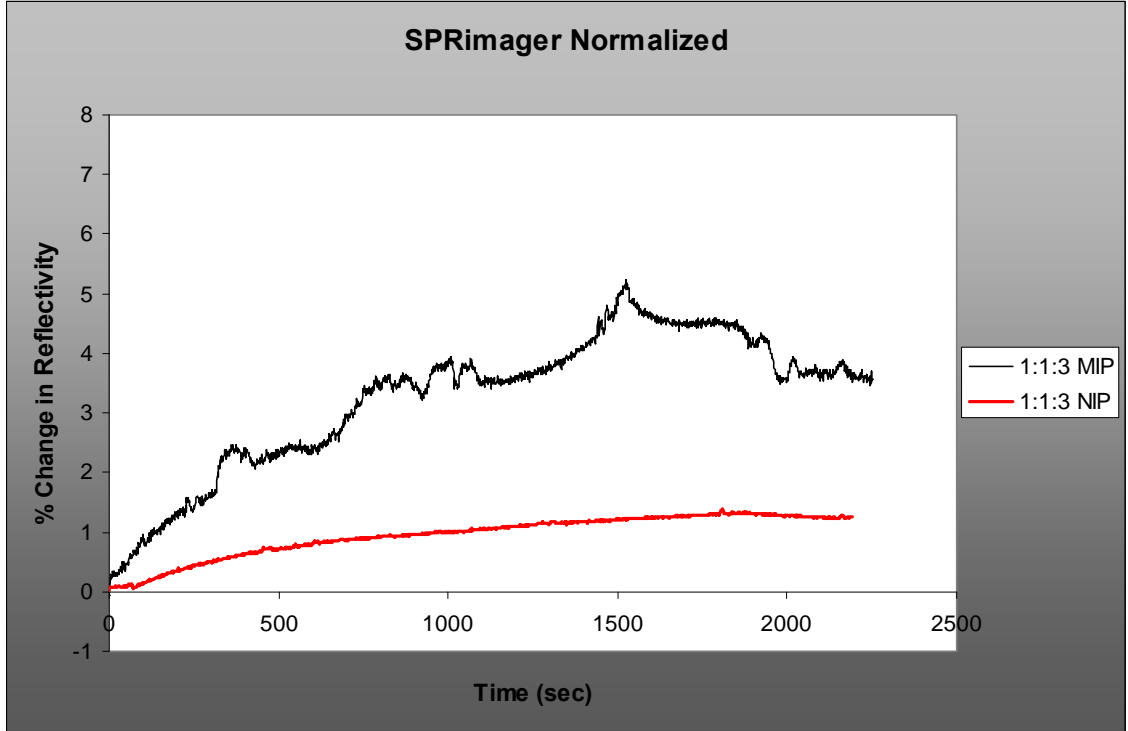
1:1:5 oranı 5,57 değerindeki baskılama faktörü ile en uygun polimerizasyon karışımı olarak belirlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda bu kompozisyon kullanılmıştır. 1:1:6 oranında baskılama faktörü değeri 2,18'e düşmüştür. NIP için elde edilen $\% \Delta R$ değeri diğerleri ile aynı kalırken MIP için elde edilen değer azalmıştır. Bu durumda artan çapraz bağ miktarının miyoglobinin bağlanma bölgelerine ulaşmasını engellediği düşünülebilir.

Çizelge 4.4.1.1. Farklı oranlarda MATrp:HEMA:EGDMA oranları ile hazırlanan baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensör için elde edilen baskılama faktörü değerleri

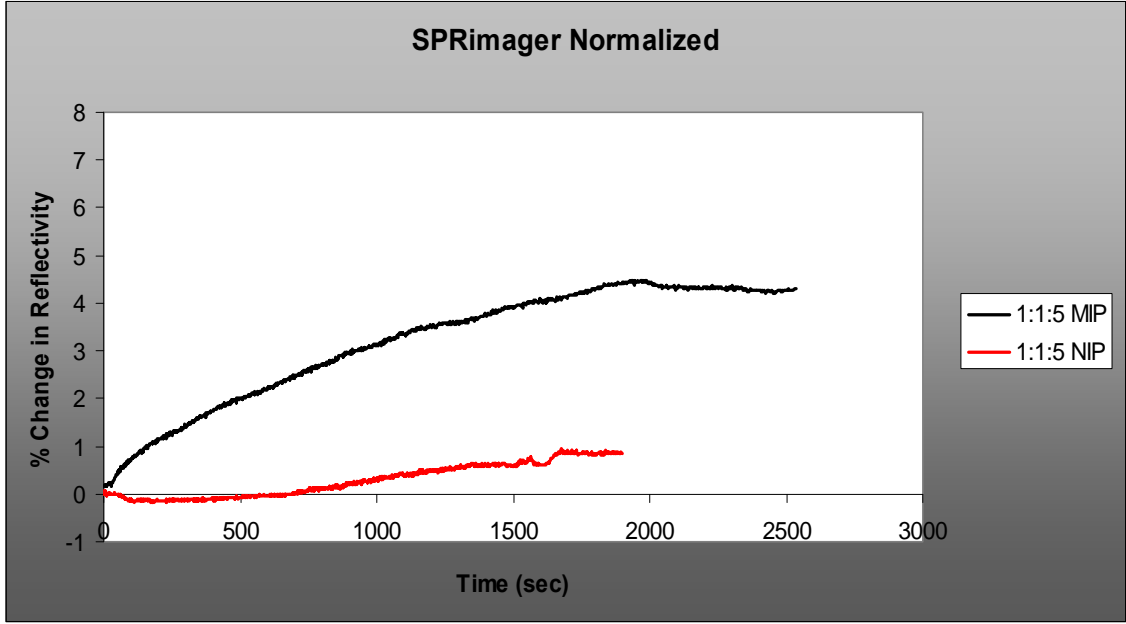
Mol oranı (MATrp:HEMA:EGDMA)	Baskılama faktörü ($\% \Delta R_{MIP-myo} / \% \Delta R_{NIP}$)
1:1:1	2,95
1:1:3	3,45
1:1:5	5,57
1:1:6	2,18



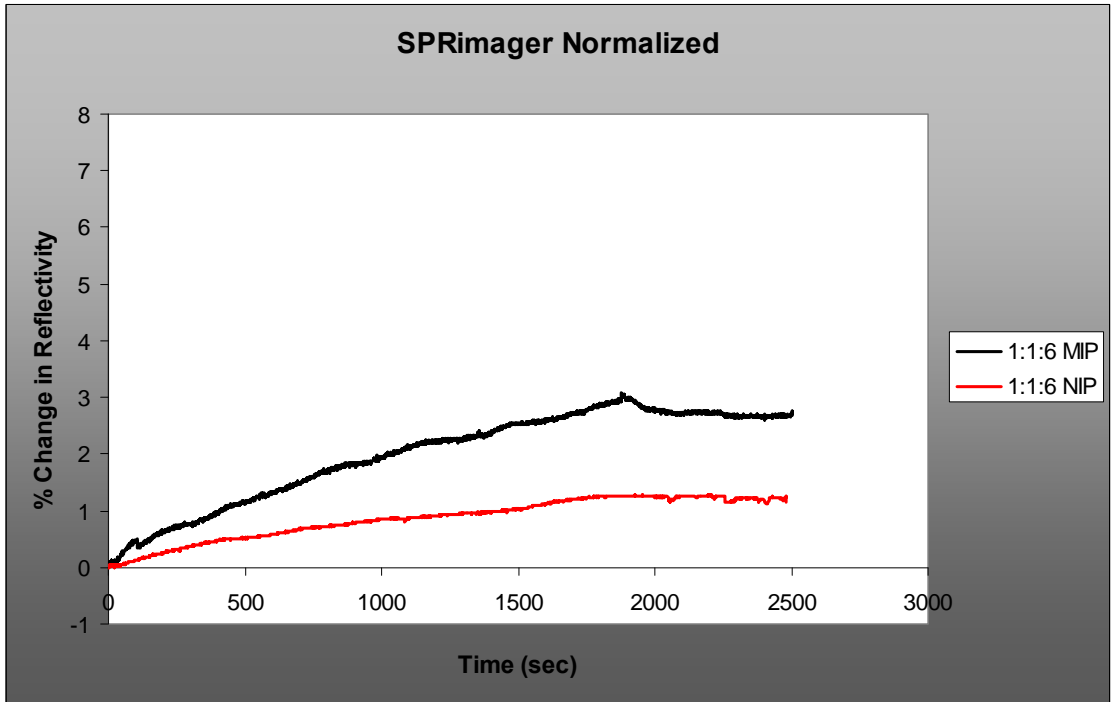
Şekil 4.4.1.2. 1:1:1 mol oranında MATrp:HEMA:EGDMA içeren polimerizasyon karışımı ile hazırlanan miyoglobin baskılanmış (MIP-myö) ve baskılanmamış (NIP) sensör ile 10 000 ng/mL derişimindeki miyoglobin çözeltisinin etkileştirilmesi sonucu elde edilen sensogramlar



Şekil 4.4.1.3. 1:1:3 mol oranında MATrp:HEMA:EGDMA içeren polimerizasyon karışımı ile hazırlanan miyoglobin baskılanmış (MIP-myö) ve baskılanmamış (NIP) sensör ile 10 000 ng/mL derişimindeki miyoglobin çözeltisinin etkileştirilmesi sonucu elde edilen sensogramlar



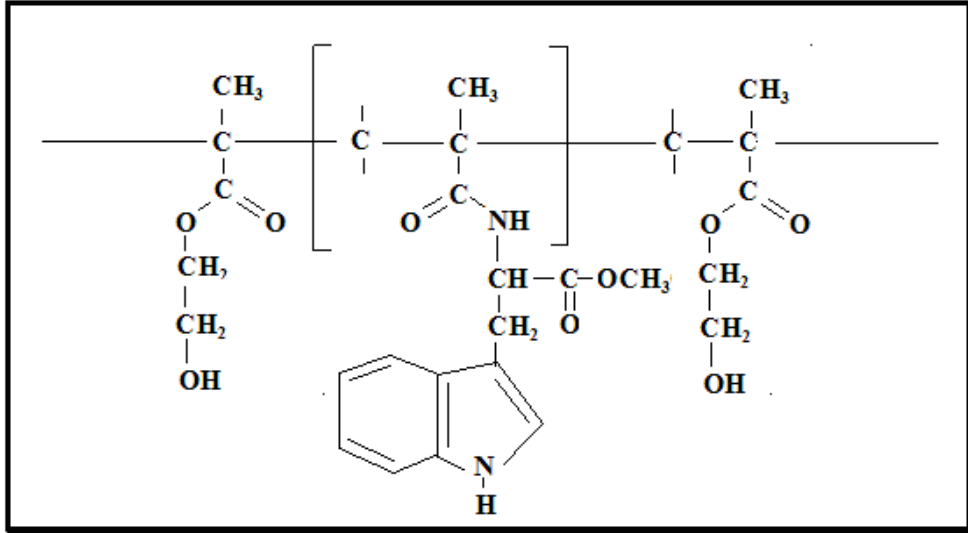
Şekil 4.4.1.4. 1:1:5 mol oranında MATrp:HEMA:EGDMA içeren polimerizasyon karışımı ile hazırlanan miyoglobin baskılanmış (MIP-myö) ve baskılanmamış (NIP) sensör ile 10 000 ng/mL derişimindeki miyoglobin çözeltisinin etkileştirilmesi sonucu elde edilen sensogramlar



Şekil 4.4.1.5. 1:1:6 mol oranında MATrp:HEMA:EGDMA içeren polimerizasyon karışımı ile hazırlanan miyoglobin baskılanmış (MIP-myö) ve baskılanmamış (NIP) sensör ile 10 000 ng/mL derişimindeki miyoglobin çözeltisinin etkileştirilmesi sonucu elde edilen sensogramlar

4.4.2. Poli(HEMA-MATrp) filmin FTIR-ATR analizi

Allil merkaptan ile kaplanmış altın çipler kullanılarak yüzeyde miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) polimerik film sentezlenmiştir. Hazırlanan polimerik filmin yapısı Şekil 4.4.2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4.2.1. Poli(HEMA-MATrp) filmin kimyasal yapısı

Hazırlanan poli(HEMA-MATrp) polimerik filmin karakterizasyonu içinde FTIR-ATR tekniğinden yararlanılmıştır. Şekil 4.4.2.2’de yüzey plazmon rezonans çip yüzeyinde oluşan miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) polimerik filme ait FTIR-ATR spektrumu görülmektedir. Polimerik film sentezlendikten sonra altın yüzeyinde poli(HEMA-MATrp) polimerine ait absorpsiyon bandları oluşmuştur. 1715 cm^{-1} ’de ester karbonil grubu (C=O) gerilmesine, 1662 cm^{-1} ’de amid karbonil grubu (C=O) gerilmesine ait absorpsiyon bandları görülmektedir. 3400 cm^{-1} bölgesinde, MATrp monomerinden gelen N-H ve yapıdaki O-H gruplarından kaynaklanan absorpsiyon bandı beraberce görülmektedir. 2955 cm^{-1} ’de gözlenen absorpsiyon bandı ise polimerik yapı içerisinde tekrar eden alifatik C-H bağlarına ait gerilmelerden kaynaklanmaktadır.

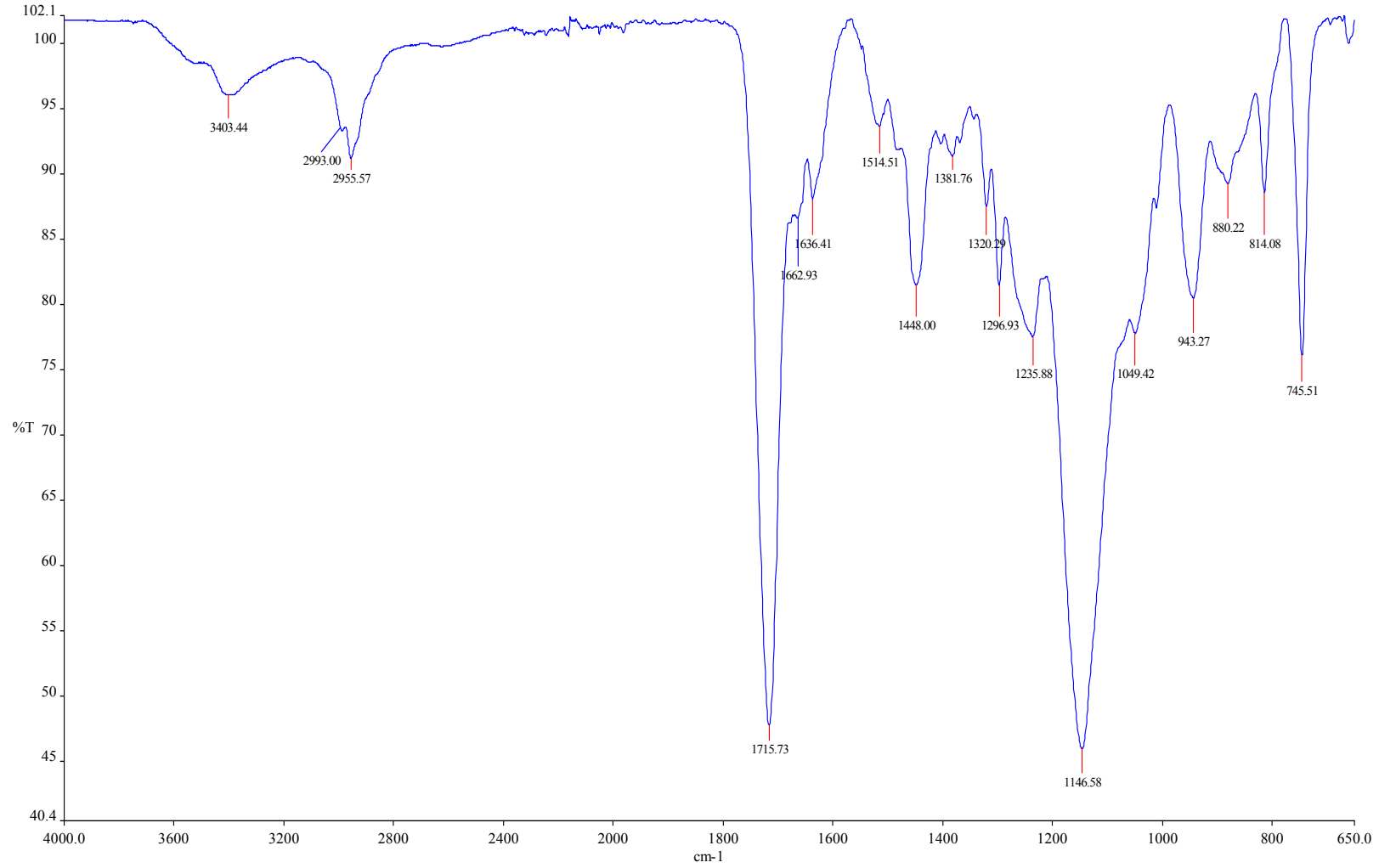
Poli(HEMA-MATrp) filmin FTIR-ATR spekturumu, sadece MATrp, HEMA ve EGDMA ın başlatıcı varlığında tek başına polimerizasyonu ile hazırlanan poli(MATrp), poli(HEMA) ve poli(EGDMA) polimerlerinin FTIR-ATR spektrumları ile

karşılaştırılmıştır (Şekil 4.4.2.3-4.4.2.5). Poli(HEMA-MATrp) filme ait spektrum, poli(MATrp), poli(HEMA) ve poli(EGDMA) için elde edilen spektrumlardan farklıdır ve MATrp monomerine ait karakteristik bandlar göstermektedir. Bu sonuç fonksiyonel monomer olan MATrp'ın HEMA ve EGDMA varlığında yapıya başarıyla dahil edildiğinin bir kanıtıdır.

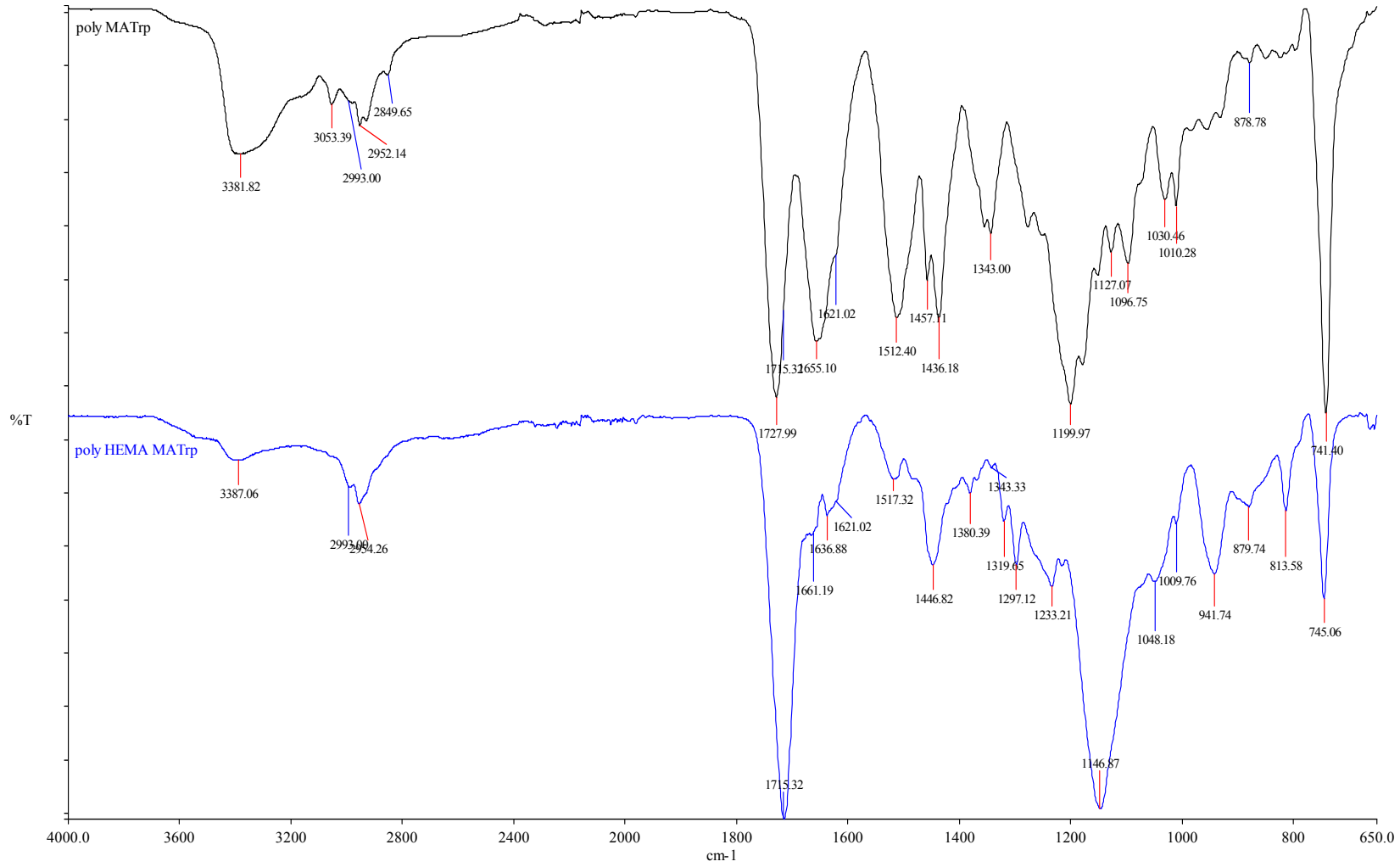
4.4.3. Temas açısı analizi

Herhangi bir ürünün hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardan biri kullanılacak olan malzemenin uygun şekilde seçilmesidir. Bu seçim sadece elde edilecek ürünün özelliklerini değil aynı zamanda ilgili teknolojik sürecin doğasını ve işleyişini de etkilemektedir. Polimerik malzemelerin kullanım alanlarının artması nedeniyle ürün hazırlanmasında kullanılacak malzemelerin fizikokimyasal özellikleri ve fonksiyonel niteliklerinin tanınmasına olan ihtiyaçta hızlı bir şekilde artmaktadır. İslanabilirlik (wettability) ve bununla ilgili olan yüzey serbest enerjisi (SFE) sözü edilen bu nitelikler arasında yer almakta ve kimya, fizik, biyomühendislik ve biyoloji gibi bir çok bilim dalında büyük bir ilgi görmektedir.

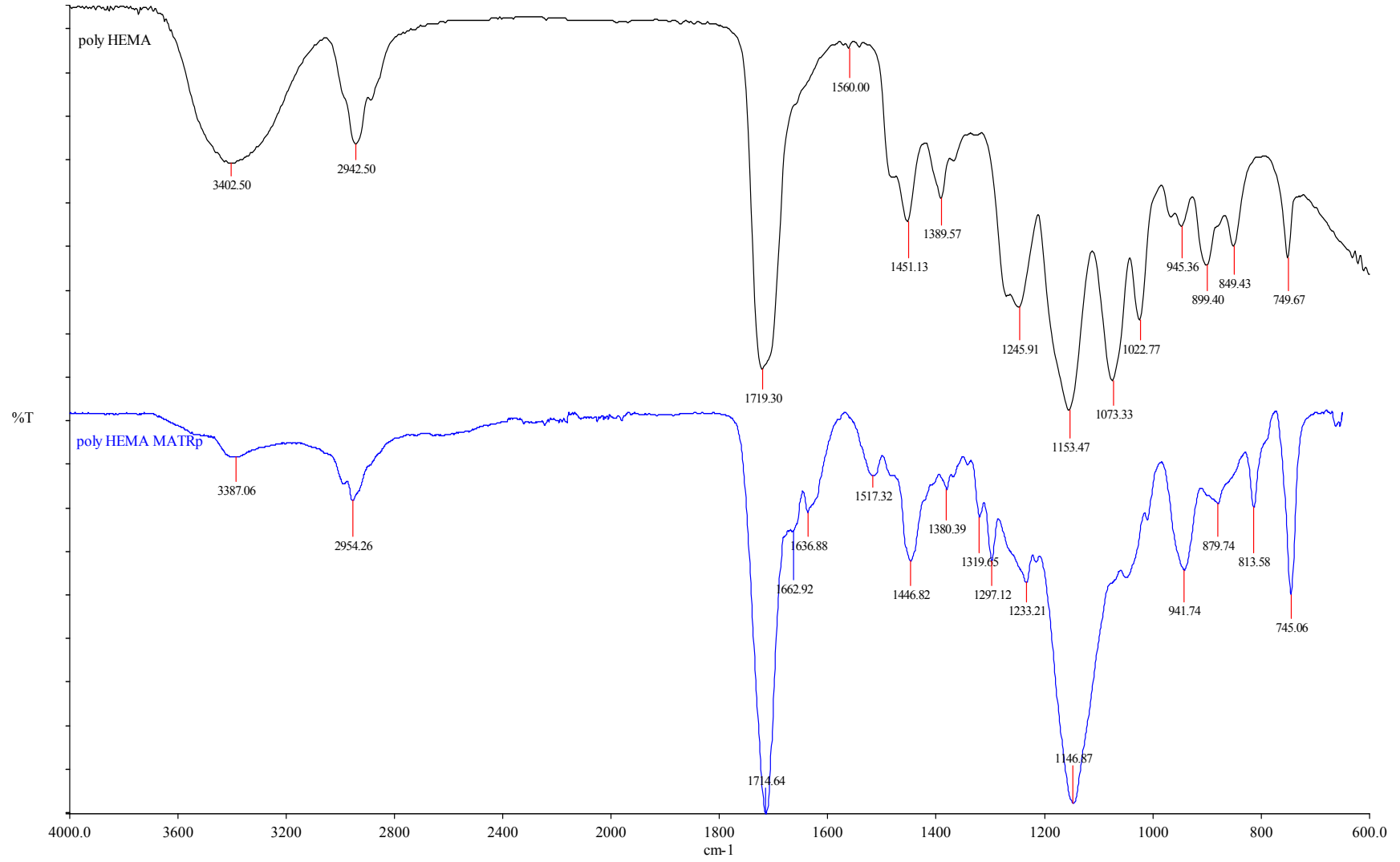
Biyomalzemelerin ıslanabilirliğinin ölçülmesi ve yorumlanması günümüzde arayüzey kimyasında kullanılan en modern yaklaşımdır. Hazırlanan polimerik malzemeleri biyomedikal amaçla kullanabilmek için yığın (bulk) ve yüzeyin özelliklerinin ve özellikle de sulu ortamdaki arayüzey özelliklerinin bilinmesi önemlidir. Suyun yüzey ile oluşturduğu temas açısı hazırlanan malzemenin canlı organizma ile biyoyumunun değerlendirilmesi için de yararlı bilgiler vermektedir. Malzemenin yüzey serbest enerjisi γ , doğrudan ıslanabilirlik ve diğer fizikokimyasal özellikler ile ilgilidir (Zenkiewicz 2007).



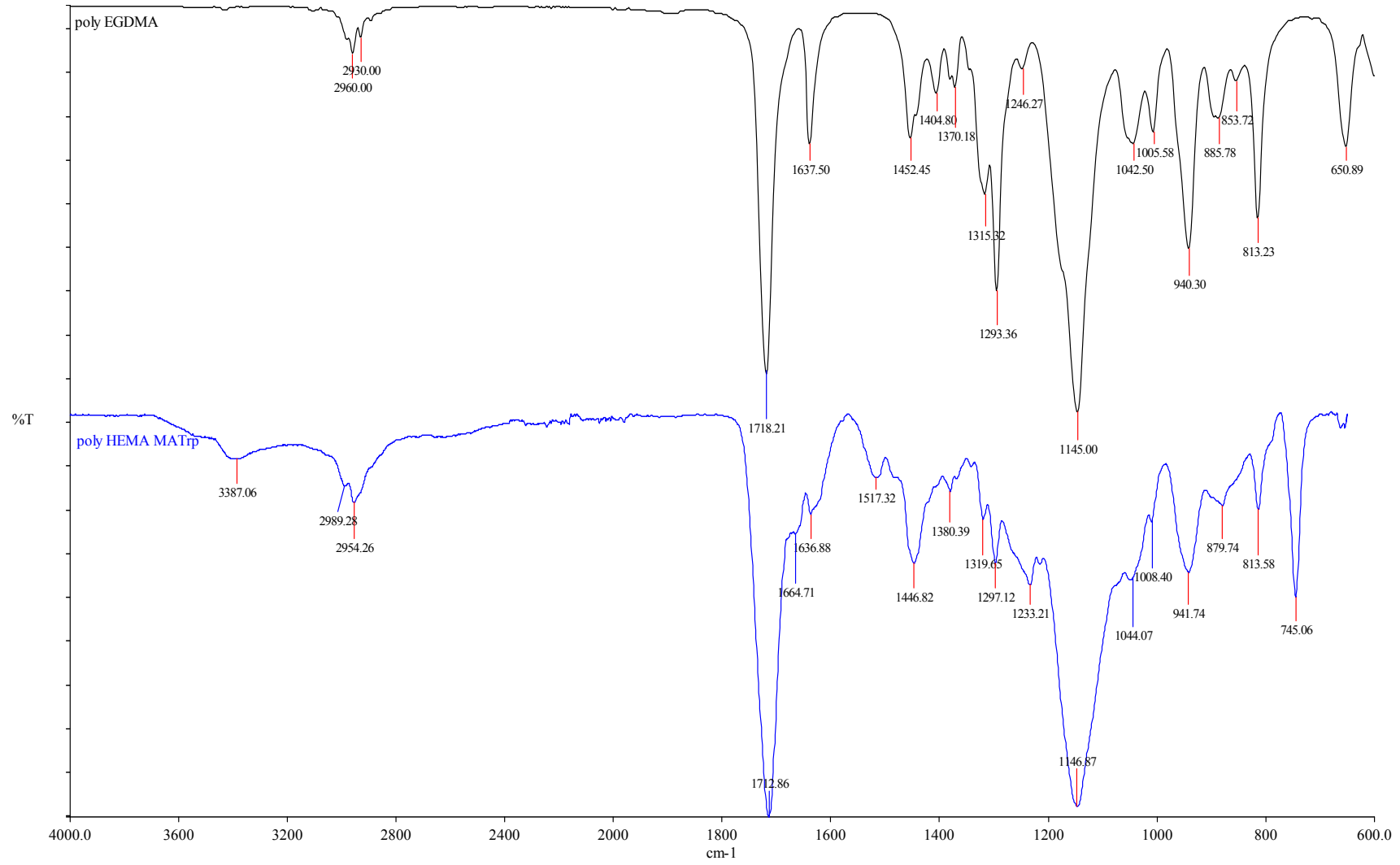
Şekil 4.4.2.2. Miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) filmin FTIR-ATR spektrumu



Şekil 4.4.2.3. Poli(MATrp) ve poli(HEMA-MATrp) filmin FTIR-ATR spektrumu

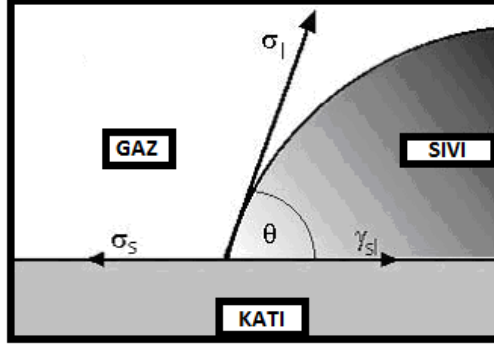


Şekil 4.4.2.4. Poli(HEMA) ve poli(HEMA-MATrp) filmin FTIR-ATR spektrumu



Şekil 4.4.2.5. Poli(EGDMA) ve poli(HEMA-MATrp) filmin FTIR-ATR spektrumu

Üç fazın (katı-sıvı-gaz) etkileşimde olduğu durumdaki arayüzey gerilimleri arasındaki ilişki Şekil 4.4.3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.4.3.1. Katı yüzeyinde temas açısının oluşumu

Burada s ve l sırasıyla katı ve sıvı fazı ifade etmektedir. σ_s ve σ_l , her iki fazın yüzey gerilimlerini, γ_{sl} iki faz arasındaki arayüzey gerilimini ve σ_l ile γ_{sl} vektörleri arasındaki θ açısı da, temas açısını göstermektedir. Young bu büyüklükler arasındaki ilişkiyi Eşitlik 4.4.3.1 ile ifade etmiştir :

$$\sigma_s = \gamma_{sl} + \sigma_l \cdot \cos \theta \quad 4.4.3.1$$

Owens, Wendt, Rabel ve Kaelble yaklaşımına göre her bir fazın yüzey gerilimi kutupsal (polar) ve yayılma (dispersive) bileşenlerine ayrılabilir:

$$\sigma_l = \sigma_l^P + \sigma_l^D \quad 4.4.3.2$$

$$\sigma_s = \sigma_s^P + \sigma_s^D \quad 4.4.3.3$$

Owen ve Wendt, yüzey gerilimi için Eşitlik 4.4.3.4’ü temel alarak bu eşitliği Young eşitliği ile birleştirmiş ve bu eşitliği yüzey enerjilerinin yayılma ve kutupsal bileşenleri bilinen iki ayrı sıvının temas açılarını kullanarak çözmüşlerdir.

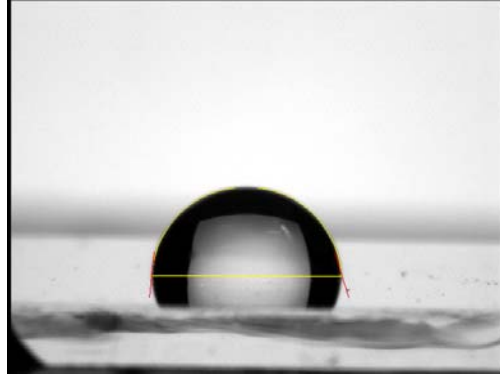
$$\gamma_{sl} = \sigma_s + \sigma_l - 2 \left(\sqrt{\sigma_s^D \cdot \sigma_l^D} + \sqrt{\sigma_s^P \cdot \sigma_l^P} \right) \quad 4.4.3.4$$

Kaelbe, eşitliği iki sıvının bileşimi için çözmüş ve yüzey enerjisi için elde ettiği değerlerin ortalamasını hesaplamıştır. Rabel ise bu eşitliği çeşitli sıvıların temas açısı değerlerinden yararlanarak hazırladığı tekli lineer regresyon yardımıyla yüzey enerjisinin kutupsal ve yayılma bileşenlerinin hesaplanmasında kullanılabilir hale getirmiştir. 4.4.3.1 ve 4.4.3.4 nolu eşitliklerin birleştirilmesi ile elde edilen eşitliği doğru denklemi olarak ifade etmiştir. Elde edilen bu ifade Eşitlik 4.4.3.5'te gösterildiği gibidir.

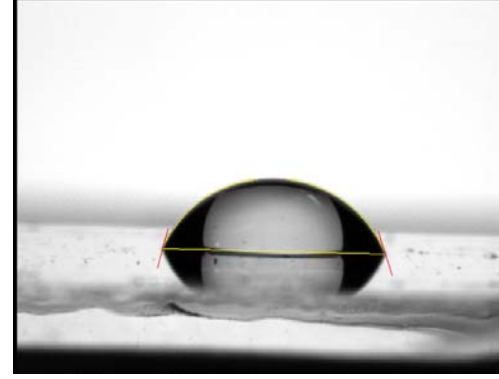
$$\frac{(1 + \cos \theta) \cdot \sigma_l}{2\sqrt{\sigma_l^D}} = \sqrt{\sigma_s^P} \sqrt{\frac{\sigma_l^P}{\sigma_l^D}} + \sqrt{\sigma_s^D} \quad 4.4.3.5$$

Bu denklemde m , eğim değerinin karesi σ_s^P değerini, doğrunun y ekseninin kestiği nokta olan b değerinin karesi ise σ_s^D değerini vermektedir.

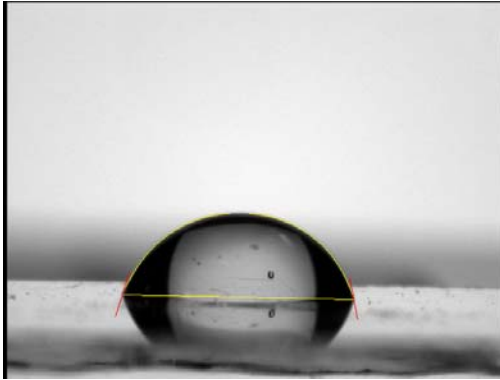
Altın yüzey, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey, yüzeyinde miyogloblin baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) film hazırlanmış altın yüzeylerin ıslanabilirlik özelliklerinin incelenmesi amacıyla bu yüzeylerin su ve etilen glikol ile yaptıkları temas açıları ölçülmüş ve yüzey serbest enerjileri Owens, Wendt, Rabel ve Kaelble yaklaşımı kullanılarak hesaplanmış ve Çizelge 4.4.2.1'de özetlenmiştir. Şekil 4.4.3.2 ve Şekil 4.4.3.3'de ise sırasıyla su ve etilen glikol ile alınan temas açısı görüntüleri verilmiştir.



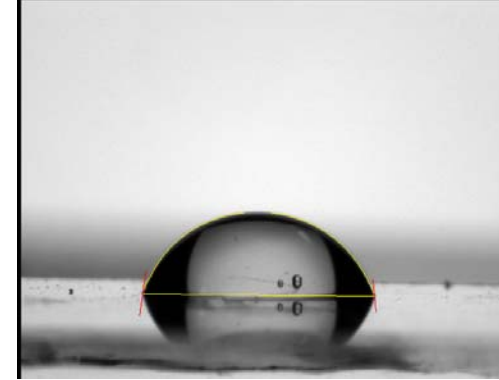
(a)



(b)

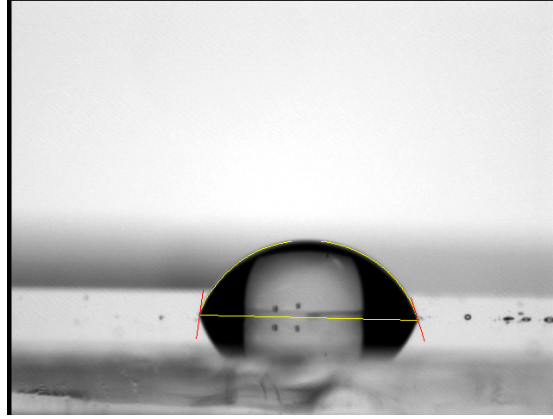


(c)

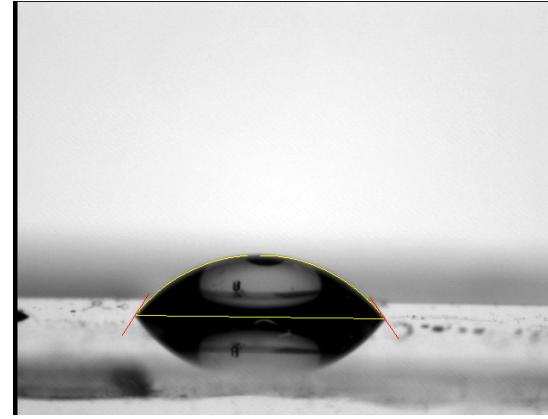


(d)

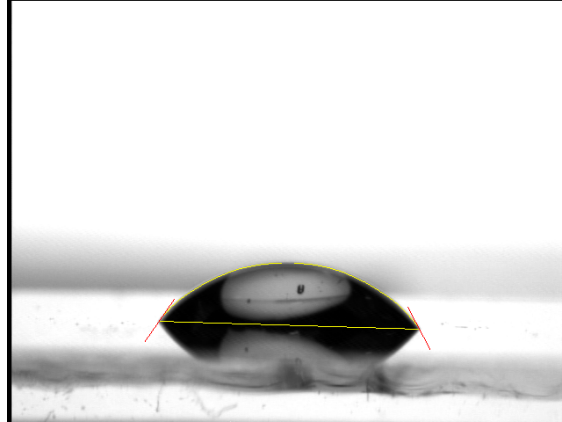
Şekil 4.4.3.2. Su ile temas açısı ölçümleri; (a) altın yüzey, (b) allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey, (c) miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulan altın yüzey (d) miyogloblin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulan altın yüzey



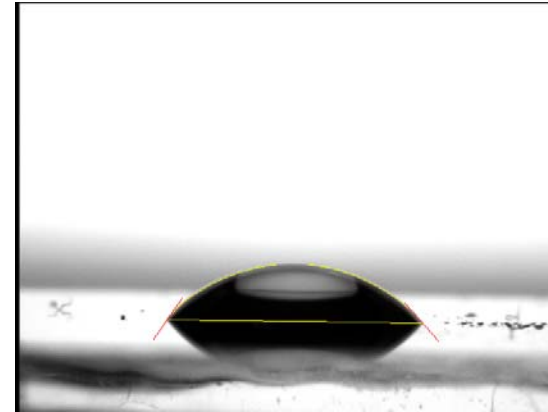
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.4.3.3. Etilen glikol ile temas açısı ölçümleri; (a) altın yüzey, (b) allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey, (c) miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulan altın yüzey , (d) miyogloblin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulan altın yüzey

Çizelge 4.4.3.1. Altın yüzey, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey, miyoglobın baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) film hazırlanmış altın yüzeylerin su ve etilen glikol ile elde edilen temas açıları ve birim alandaki yüzey enerjileri.

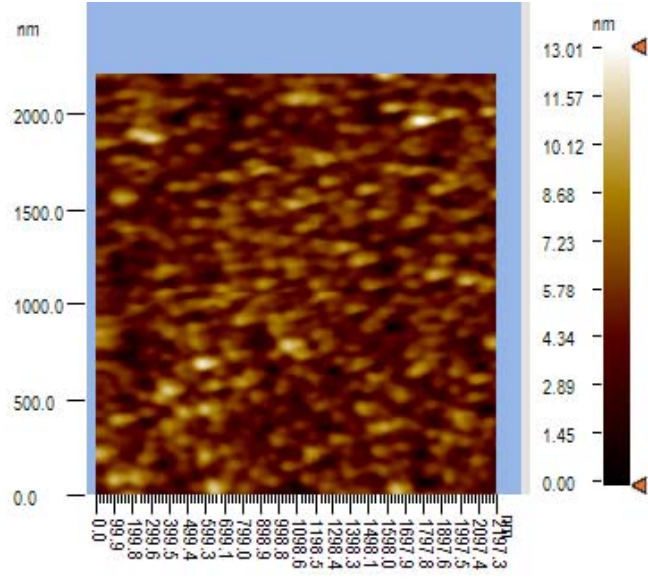
Yüzey	Temas Açısı, [°] (H ₂ O)	Temas Açısı, [°] (Etilen Glikol)	Yüzey Serbest Enerjisi, (mN/m)
Altın yüzey	85,3±4,9	75,7±3,6	30,17
Allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey	71,1±3,4	56,3±3,2	43,69
Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulan altın yüzey	75,0±4,8	59,3±2,1	38,08
Miyoglobın baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulan altın yüzey	73,2±5,7	57,1±2,6	40,22

Su ile yapılan temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi altın yüzeyin temas açısı değeri ($85,3^{\circ} \pm 4,9$), allil merkaptan modifikasyonu ile $71,1^{\circ} \pm 3,4$ 'e düşmüştür. Yüzeyin temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını ve altın kaplı yüzey plazmon rezonans çip yüzeyinin allil merkaptan ile kaplandığını göstermektedir. Temas açısının azalması ile birlikte yüzey serbest enerjisi $30,17 \text{ mN/m}$ 'den $43,69 \text{ mN/m}$ 'ye yükselmiştir. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzeyde gerçekleştirilen polimerizasyon sonucu temas açısı değeri $75,0^{\circ} \pm 4,8$ 'e yükselmiş ve yüzey serbest enerjisi $38,08 \text{ mN/m}$ 'ye düşmüştür. Bu sonuç, allil merkaptan kaplı yüzeyde poli(HEMA-MATrp) film oluştuğunu ve hidrofobisitenin arttığını göstermektedir. Hidrofobisitedeki bu artış bir ölçüde metakriloil-amidotriptofan metil ester (MATrp) monomerinin hidrofobisitesinden kaynaklanmaktadır. Altın yüzeyin temas açısı ($85,3^{\circ} \pm 4,9$) ile karşılaştırıldığında polimerik film oluşumuyla temas açısında bir azalma ($75,0^{\circ} \pm 4,8$) gözlenmiştir. Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-

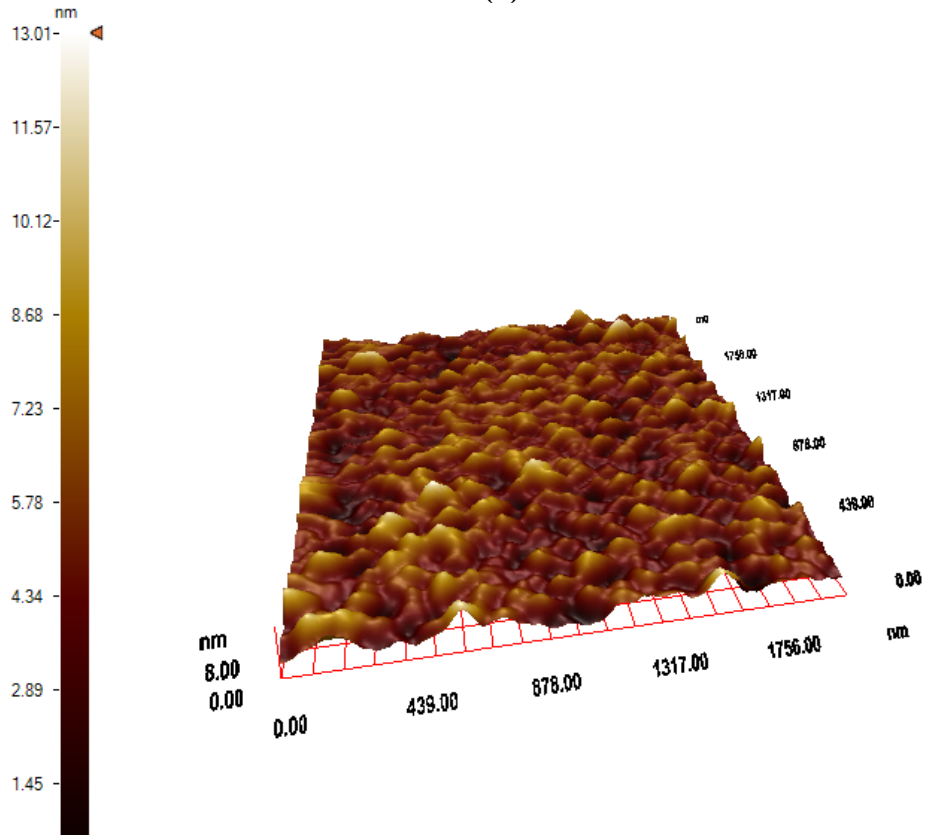
MATrp) film durumunda temas açısının ($75,0^\circ \pm 4,8$), miyoglobin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) film durumunda ($73,2 \pm 5,7$) değerine sahip olması, poli(HEMA-MATrp) yapısı içerisinde miyoglobin kalmadığının göstergesidir.

4.4.4. AFM analizi

Altın yüzey, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey ve miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) polimerik film hazırlanmış altın yüzeyin morfolojik karakterizasyonu için AFM görüntüleri alınmıştır. Yüzeyle ait atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri Şekil 4.4.4.1-3.4.4.4'de gösterilmiştir. Şekil 4.4.4.1'de modifiye edilmemiş altın yüzeyin , Şekil 4.4.4.2 'de allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzeyin $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ yüzey morfolojisi görülmektedir. Görüldüğü gibi kalınlık değeri artmış ve yüzey homojen bir şekilde allil merkaptan ile kaplanmıştır. Şekil 4.4.4.3'de ise miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) kaplı altın yüzeyin $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ 'lik alanına ait AFM görüntüsü verilmiştir. Görüldüğü gibi polimerik film altın yüzeyinde başarıyla hazırlanmıştır. Yüzey morfolojisindeki değişimin daha yakından görülebilmesi için poli(HEMA-MATrp) kaplı altın yüzeyinde $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ 'lik bir alanına ait AFM görüntüsü alınmış ve Şekil 4.4.4.4'te gösterilmiştir. Allil merkaptan ile kaplanmış altın yüzey ile karşılaştırıldığında polimerik filmin altın yüzeyinde homojen bir şekilde hazırlandığı görülmektedir.

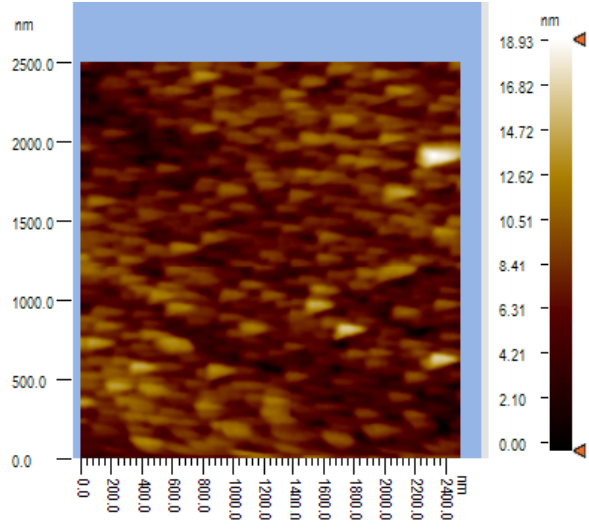


(a)

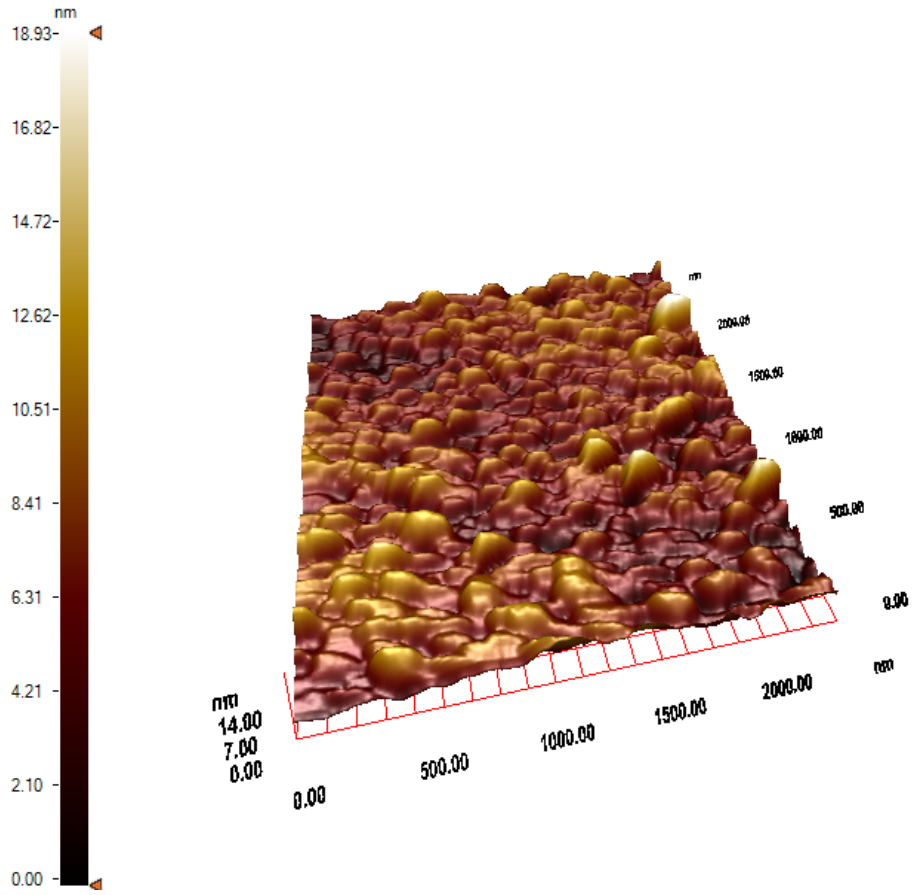


(b)

Şekil 4.4.4.1. Modifiye edilmemiş altın çipin yarı degen modda alınan AFM görüntüleri (a) yüzey görüntüsü (b) 3D görüntüsü ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$)

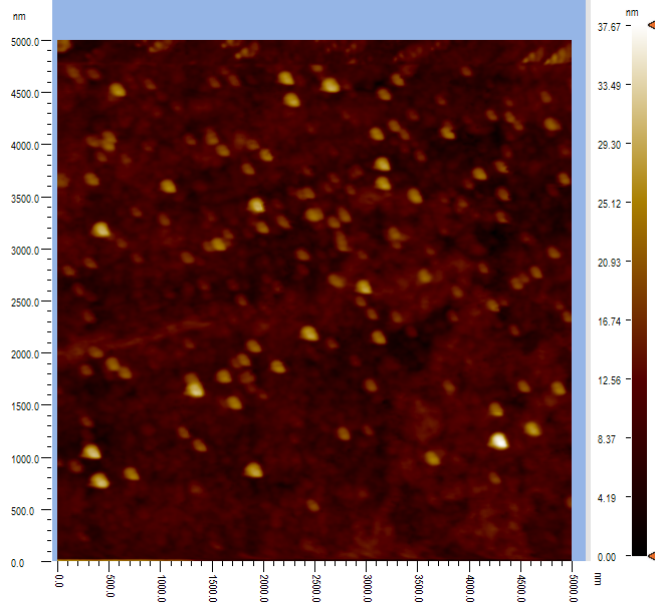


(a)

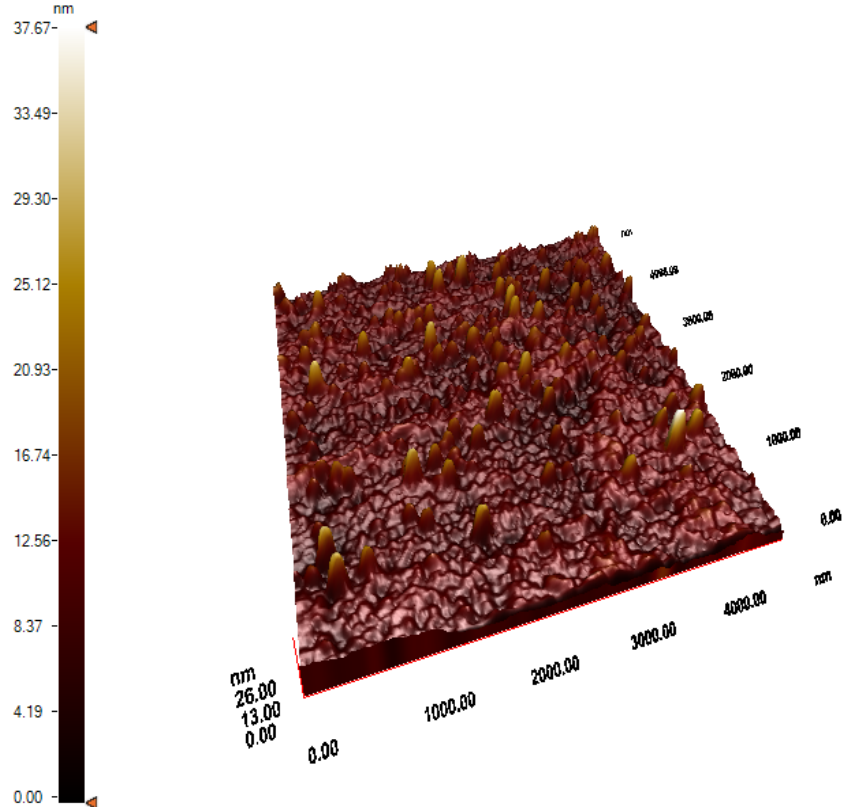


(b)

Şekil 4.4.4.2. Alil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çipin yarı degen modda alınan AFM görüntüleri (a) yüzey görüntüsü (b) 3D görüntüsü ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$)

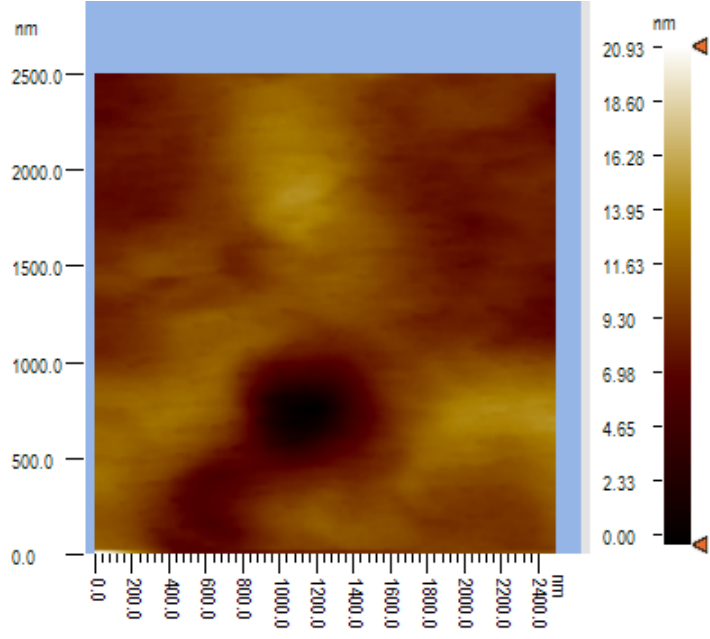


(a)

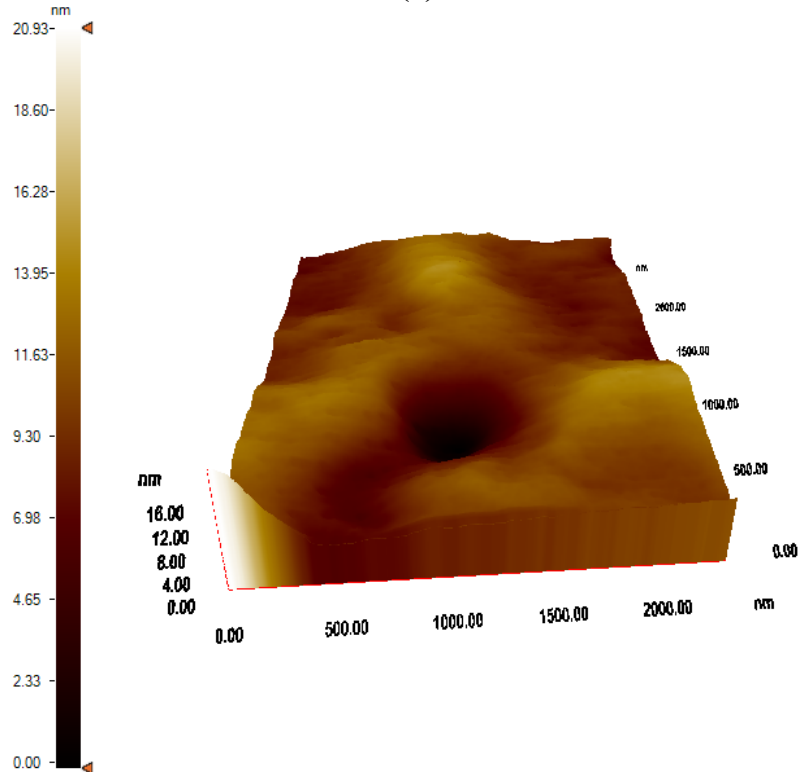


(b)

Şekil 4.4.4.3. Miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulmuş altın çipin yarı değen modda alınan AFM görüntüleri (a) yüzey görüntüsü (b) 3D görüntüsü ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$)



(a)



(b)

Şekil 4.4.4.4. Miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) film oluşturulmuş altın çipin yarı değen modda alınan AFM görüntüleri (a) yüzey görüntüsü (b) 3D görüntüsü ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$)

4.4.5. Elipsometri

Geleneksel olarak moleküler baskılanmış polimerler yığın polimer monolitler olarak hazırlanır ve mikrometre boyutlarındaki partiküller elde etmek için parçalanarak elenir. Bu yöntem ile MIP hazırlama birçok uygulama için halen yararlı iken diğer bazı uygulamalar (özellikle sensörler) için hazırlanacak moleküler baskılanmış polimerlerin film yada nanopartiküller gibi belirli bir fiziksel formda hazırlanması gerekmektedir. Bu durumda özel olarak adapte edilmiş sentez metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca difüzyonun hızlandırılması ve cevap süresinin kısaltılması için baskılama bölgelerinin yüzeyde yada yüzeye çok yakın bölgede oluşturulması gerekmektedir (Haupt ve Belmont 2007). Dolayısıyla sensör olarak kullanılacak moleküler baskılanmış film yada membranın kalınlığının 100 nm den kalın olmaması ve hatta 50 nm den küçük olması istenir (Piacham ve ark. 2005). Özellikle kaybolan dalga prensibini kullanan optik transdüserlerde bu durum daha da büyük önem kazanmaktadır.

Hazırlanan miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) filmin kalınlık ölçümleri için Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı kullanıldı. Ölçümler 532 nm dalga boyunda, 60,5°'lik bir geliş açısında gerçekleştirildi. SPR sensör lazer ışık kaynağı altına yerleştirildi. Yüzey kalınlığı hesaplama programı için SF10 cam + 2 nm titanyum tabaka ve 42,5 nm altın tabaka olarak öngörüldü. Ölçümler sensör yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlandı ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edildi. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan film $12,85 \pm 1,5$ nm kalınlıktadır. Bu sonuç AFM sonuçları ile de örtüşmekte olup polimerik filmin altın yüzeyinde başarıyla hazırlandığını göstermektedir. Ayrıca hazırlanan sensör 50 nm'den daha düşük bir kalınlık değerine sahip olduğundan optik transdüser prensibi ile çalışan SPR sistemi ile büyük bir uyum göstereceği öngörülmektedir.

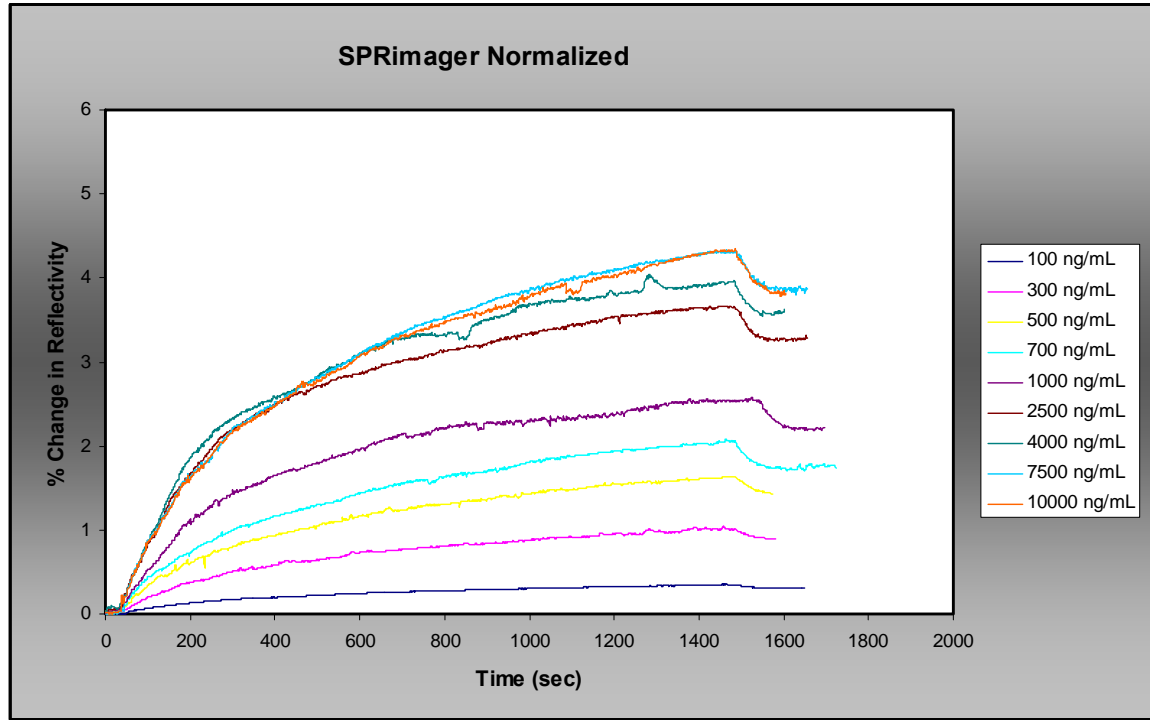
4.4.6. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

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

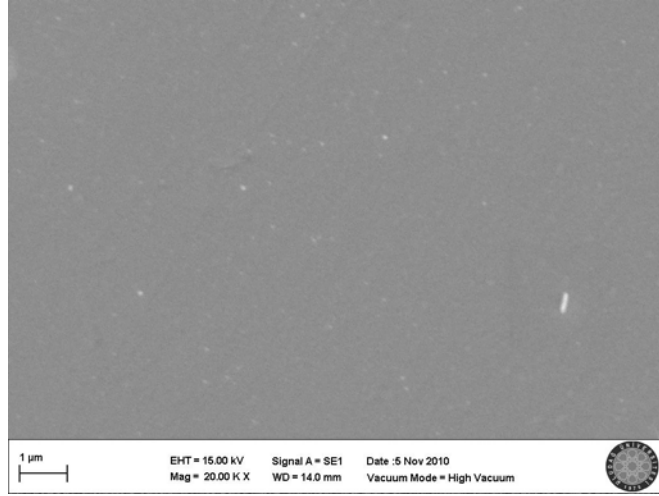
alındı. Altın ve miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) filme ait yüzey görüntüleri Şekil 4.4.6.1’de verilmiştir. SEM görüntüleri altın yüzeyin polimerik film ile kaplandığının kanıtıdır. Şekil 4.4.6.2’de ise poli(HEMA-MATrp) film kaplanmış altın çipin kesit görüntüsü 50 000 kat büyütme yapılarak alınmıştır. Görüldüğü gibi polimerik film altın çip yüzeyinde başarıyla sentezlenmiştir.

4.5. Miyoglobin baskılanmış poli (HEMA-MATrp) SPR sensör ile kinetik analizler

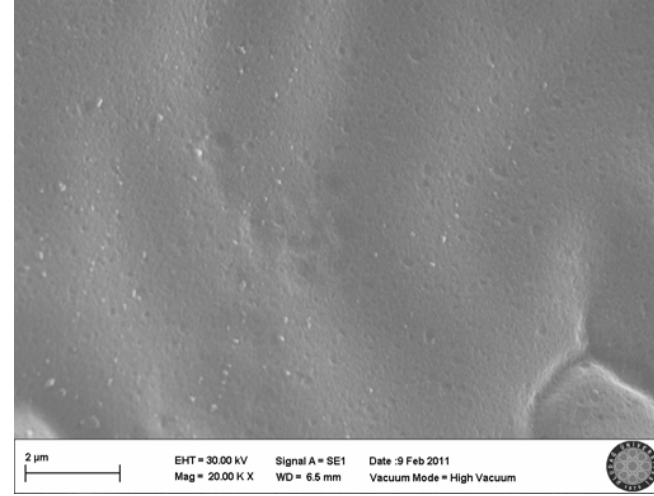
Bu çalışmada miyoglobin baskılanmış SPR sensör hazırlanmıştır. Miyoglobin derişimi ile SPR sinyali arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde (100-10 000 ng/mL) miyoglobin çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler peristaltik pompa aracılığıyla poli(HEMA-MATrp) sensörle etkileştirilerek sensogramlar alındı. Şekil 4.5.1’de farklı derişimlerde miyoglobin çözeltileri ile etkileşimden elde edilen sensogramlar toplu halde görülmektedir.



Şekil 4.5.1. Miyoglobin çözeltileri ile poli(HEMA-MATrp) sensör arasındaki etkileşimlere ait sensogramlar



(a)



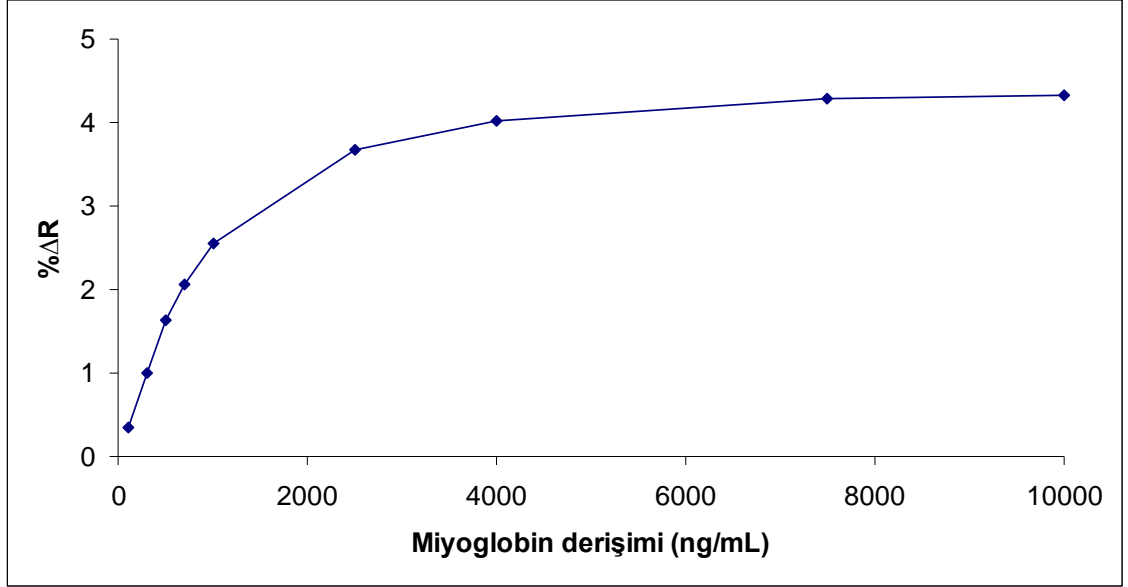
(b)



(c)

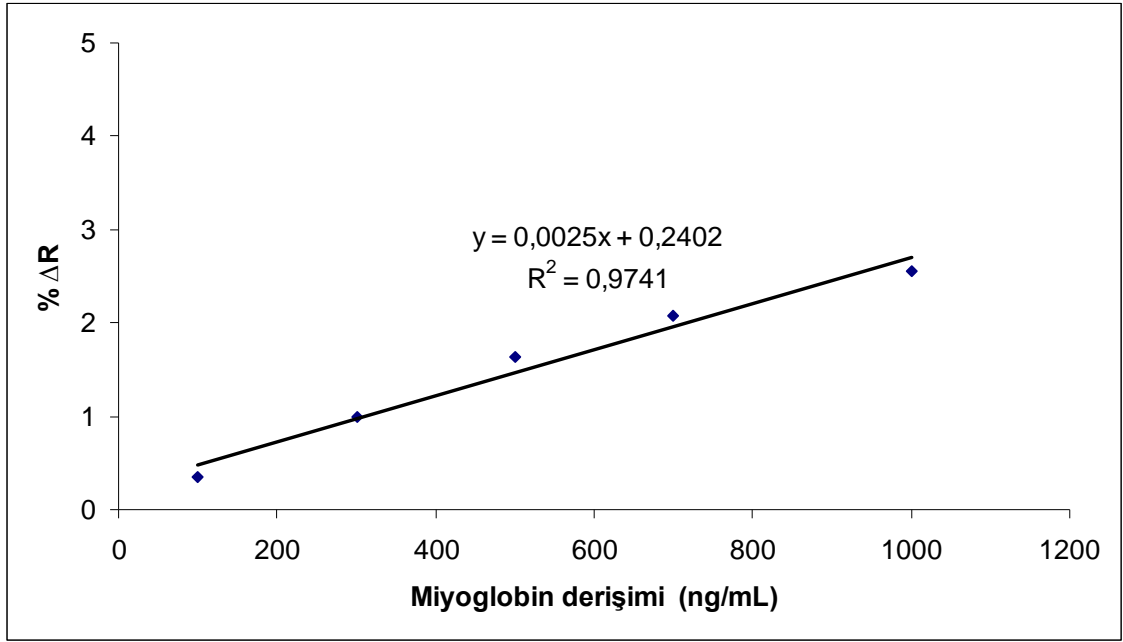
Şekil 4.4.6.1. (a) Altın yüzeyi (b) miyogloblin baskılanmış poli(HEMA-MATRp) yüzeye ait SEM görüntüleri (c) kesit görüntüsü

Şekil 4.5.1 de görüldüğü gibi yüzeye miyogloblin gönderilmesi ile birlikte birlikte % ΔR değeri artmaktadır. Standart bir ölçümde; sistemden öncelikle denge tamponu, daha sonra, sistem yeniden dengeye ulaşana kadar miyogloblin çözeltisi geçirilmiş ve son aşamada tekrar denge tamponu kullanılmıştır. Bütün ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için yaklaşık 25 dakika beklenmiştir.



Şekil 4.5.2. Miyogloblin derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki

Şekil 4.5.2'de görüldüğü gibi % ΔR değeri, derişim arttıkça artmaktadır. Bu değer yaklaşık 7500 ng/mL civarında dengeye ulaşmış ve denge değeri 4,33 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.5.3'de görüldüğü gibi SPR sensör, 100-1000 ng/mL derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Bu aralıktaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ($y=0,0025x+0,2402$) ve doğrusallığı 0,9741 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5.3. 100-1000 ng/mL aralığında miyoglobin derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki

Hazırlanan poli(HEMA-MATrp) sensör için elde edilen veriler kullanılarak tayin sınırı (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri de belirlendi. Tayin sınırının (LOD) hesaplanması için $3s/m$ denklemi kullanıldı. Bu eşitlikte, s değeri sensör yüzeyinden denge çözeltisi (kör çözelti) geçerken alınan sinyal değeri (ΔR) ölçümlerine ait standart sapma değeri ve m de kalibrasyon grafiğinin eğimidir. Kör çözelti için ΔR değeri 10 ölçümün ortalaması alınarak, ölçümlere ait standart sapma değeri ile birlikte $0,030896 \pm 0,0219$ olarak belirlenmiştir. Buna göre kalibrasyon grafiğine ait yukarıdaki denklem kullanılarak tayin sınırı (LOD) 26,3 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Tayin limitinin (LOQ) hesaplanması için ise $10s/m$ eşitliğinden yararlanıldı ve tayin limiti 87,6 ng/mL olarak belirlendi.

Sağlıklı bir insanda kandaki miyoglobin düzeyi 12-100 ng/mL aralığında değişmektedir. Kalp krizi durumunda bu değer hızla yükselmektedir (Wong 1996). Miyoglobin derişiminin belirlenmesinde kullanılacak bir tayin yöntemi için en yararlı klinik aralık ise 80-800 ng/mL olarak rapor edilmiştir (O'Regan 2002). Hazırlanan poli(HEMA-MATrp) sensörün tayin limiti 87,6 ng/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca 100-1000 ng/mL miyoglobin derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Bu sonuçlara

göre poli(HEMA-MATrp) kalp krizi durumunda miyogloblin tayinini başarıyla gerçekleştirebilecek sensör özelliklerine sahiptir.

4.6. Denge ve Bağlanma Kinetik Analizleri

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



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

İdeal koşullar altında, ne analitin sensör yüzeyine aktarımı ne de yüzeyden çözeltiliye aktarımı bağlanma kinetiğini etkilememektedir. Bu durum, aktarımın bağlanmaya göre daha hızlı gerçekleştiği durumlarda gerçekleşmektedir. Böylelikle analit derişimi çözeltide sabit kalmakta, ve ayrıca başlangıç derişimi ($[B]_0$) etkilenmemektedir (Glaser, 1993). Bu koşullar altında kompleks oluşum hızı şu şekilde tanımlanır:

$$d[AB]/dt = k_a[A]([B]_0 - [AB]) - k_d[AB] \quad 4.6.2$$

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

- Denge Analizi

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

$$d\Delta R / dt = k_a C(\Delta R_{maks} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad 4.6.3$$

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

$$\Delta R_{denge} / C = K_A \Delta R_{maks} - K_A \Delta R_{denge} \quad 4.6.4$$

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

-Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 4.6.3 tekrar düzenlendiğinde;

$$d\Delta R / dt = k_a C \Delta R_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad 4.6.5$$

eşitliği elde edilir. Buradan, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta R / dt$ 'ye karşı ΔR grafiğinin, eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bir doğru verdiği görülmektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusal bir ilişki içerisindedir ve kantitatif olarak

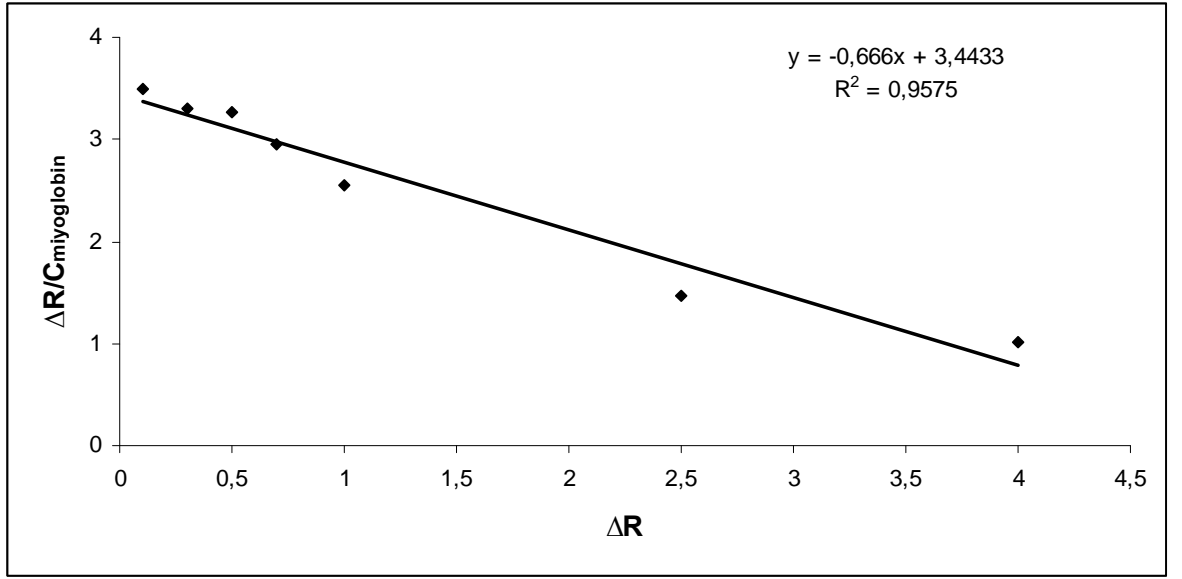
derişim belirlenmesinde kullanılır. Eğer R_{maks} değeri biliniyorsa, tek bir sensorgram kullanılarak k_a ve k_d değerleri hesaplanabilir. Yüzeyi tamamen doygunluğa eriştirmek için çok yüksek analit derişimleri gerekli olduğu için R_{maks} 'un deneysel olarak belirlenmesi zordur. Tercih edilen yaklaşım, birçok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensogramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri (S) vermektedir:

$$S = k_a C + k_d \quad 4.6.6$$

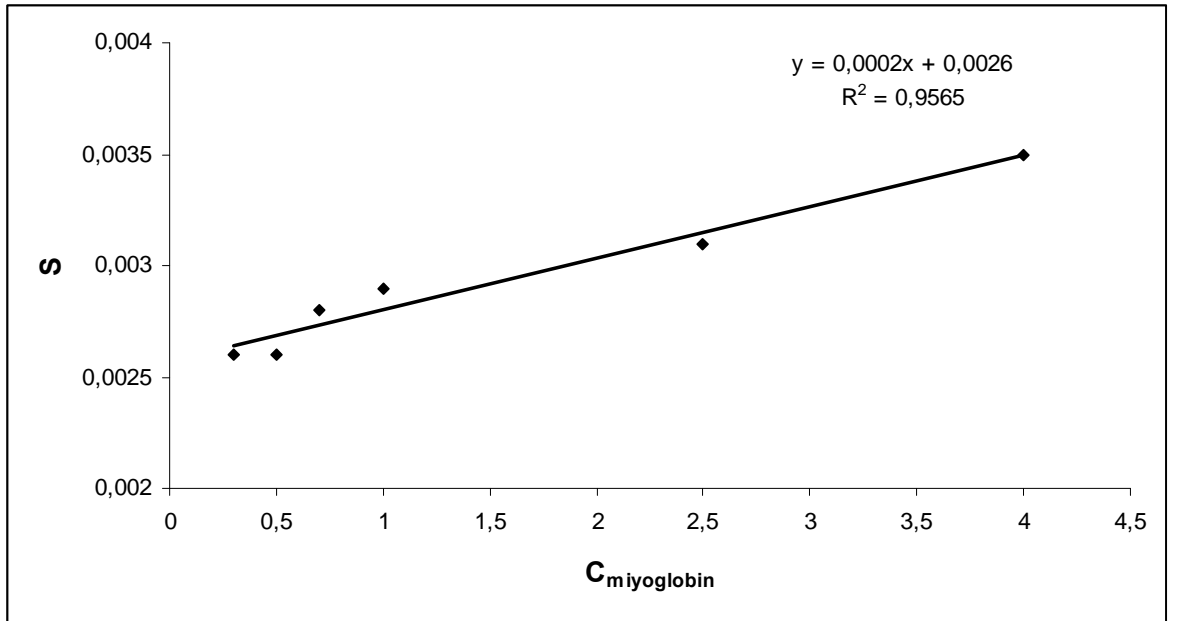
S 'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası k_d değerini vermektedir. Fakat, $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda k_d hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad 4.6.7$$

Burada; ΔR_0 ve ΔR_t , ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir (Lin ve ark. 2005). Şekil 4.6.1'de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.6.1'de özetlenmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.6.1. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı; (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı

Çizelge 4.6.1. Kinetik hız sabitleri

Denge Analiz (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
ΔR_{maks}	5,19	$k_d, \mu\text{g/ml.s}$	2.10^{-4}
$K_A, \mu\text{g/ml}$	0,667	$k_d, 1/\text{s}$	$2,6.10^{-3}$
$K_D, \text{ml}/\mu\text{g}$	1,499	R^2	0,9565
R^2	0,9575		

4.7. Denge izoterm modelleri

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

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

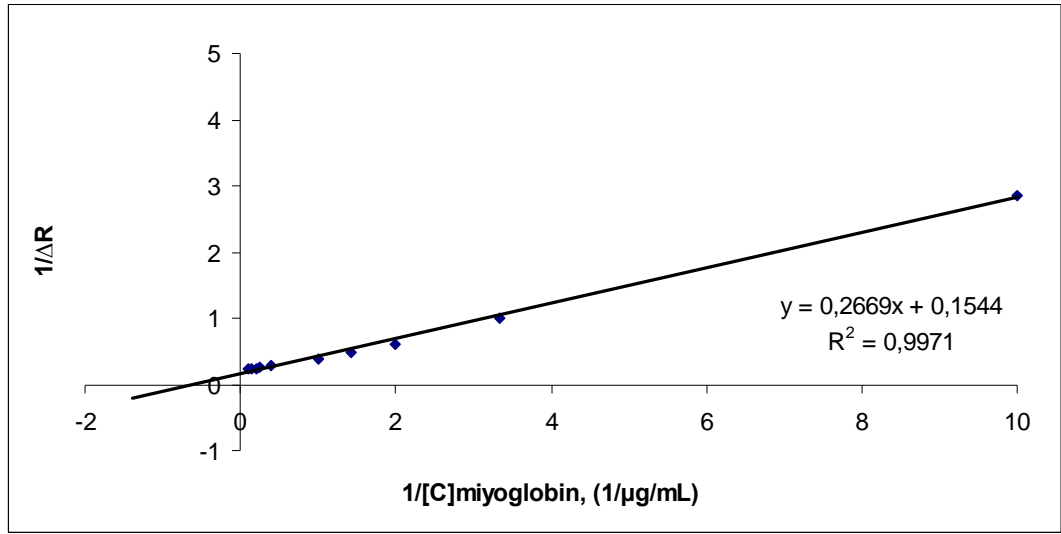
$$\text{Freundlich} \quad \Delta R = \Delta R_{maks} [C]^{1/n}$$

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

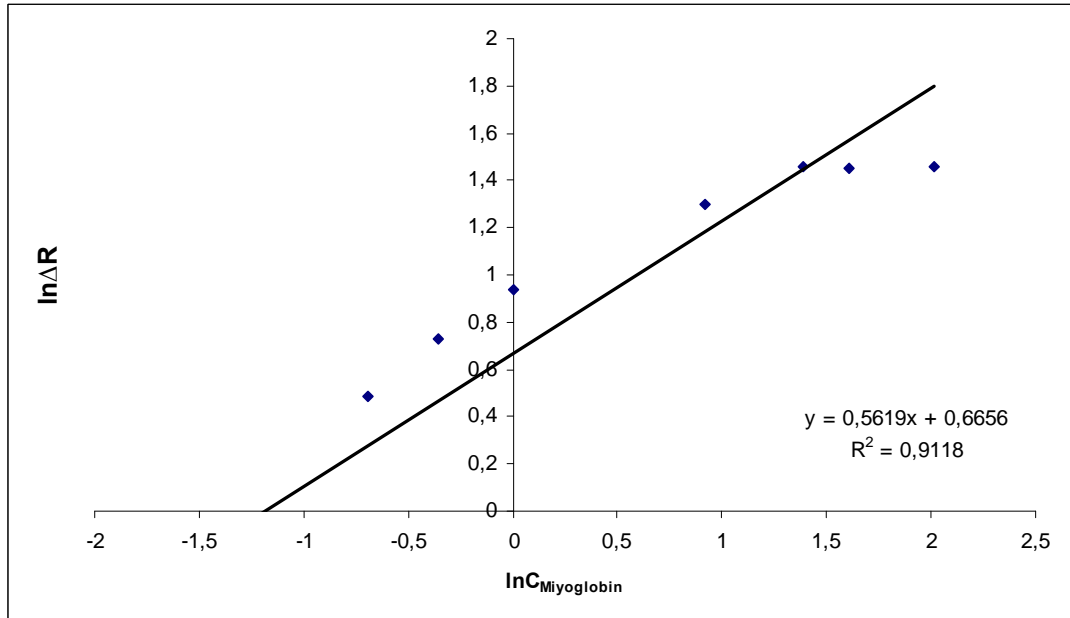
Burada; ΔR_{maks} , maksimum SPR sinyal kayması; ΔR , denge halindeki SPR sinyal kayması; $[C]$, analit derişimi ($\mu\text{g/ml}$); K_A ($\mu\text{g/ml}$), bağlanma denge sabiti; K_D ($\text{ml}/\mu\text{g}$), ayrılma denge sabiti; $1/n$, Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.

Homojen bağlanma bölgeleri modeli olan Langmuir modeli moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı bağlanma izotermelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Li ve Husson, 2006). Fakat, son dönemlerde artan raporlara göre MIP'ler bir miktar heterojen bağlanma bölgelerine de sahiptirler (Umpleby ve ark., 2001; Wei ve ark., 2005).

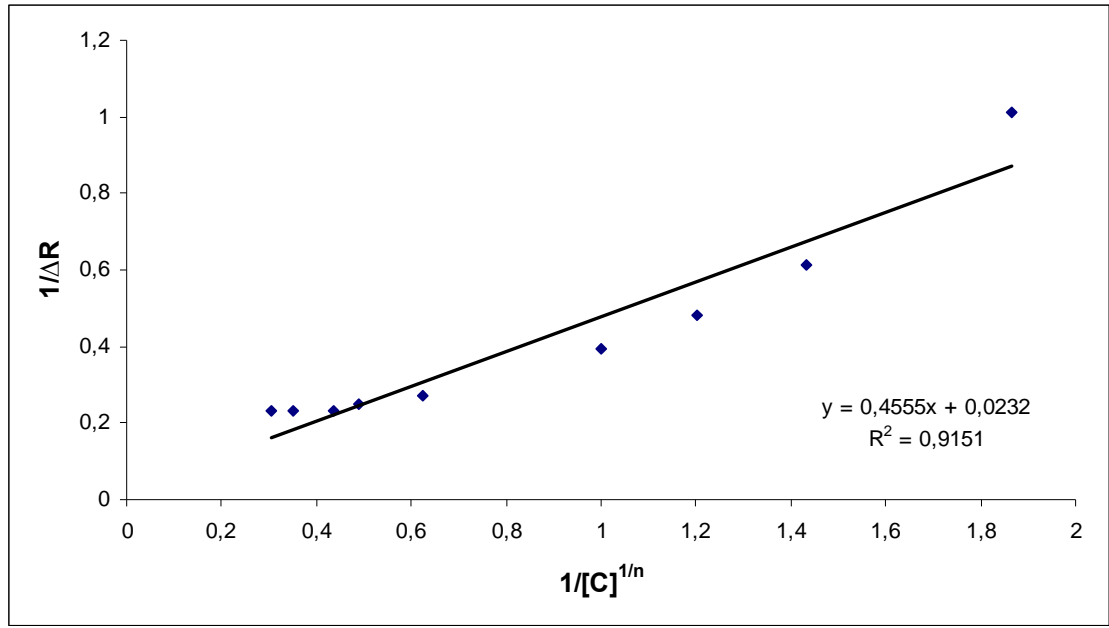
Freundlich modeli heterojen bir modeldir (Umpleby ve ark., 2004). Langmuir-Freundlich modeli (LF), doyunluğa kadar geniş derişim aralığında heterojenite ile bilgi sağlamakta ve adsorpsiyon davranışı daha tutarlı tanımlamaktadır. Şekil 4.7.1’de Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich modellerine ait grafikler verilmiştir. Bu grafiklerin çizilmesinde daha önce belirtildiği gibi kütle-derişim dönüşümlerini önlemek amacıyla bazı parametre değişimleri yapılmıştır ($Q_{maks} = \Delta R_{maks}$, $Q = \Delta R$) gibi.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.7.1. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich

Çizelge 4.7.1. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri

<i>Langmuir</i>		<i>Freundlich</i>		<i>Langmuir-Freundlich</i>	
ΔR_{maks} , $\mu\text{g/ml}$	6,31	ΔR_{maks} , $\mu\text{g/ml}$	1,95	ΔR_{maks} , $\mu\text{g/ml}$	39,68
K_D , $\text{ml}/\mu\text{g}$	1,681	$1/n$	0,5619	$1/n$	0,5619
K_A , $\mu\text{g/ml}$	0,594	R^2	0,9118	K_D , $\text{ml}/\mu\text{g}$	8,154
R^2	0,9971			K_A , $\mu\text{g/ml}$	0,1174
				R^2	0,9256

Şekil 4.7.1(a)'ya göre deneysel olarak elde edilen veriler Langmuir modeli ile en uyumludur ($R^2=0.9971$). Bu sonuç; hazırlanan baskılanmış sensör yüzeyindeki miyogloblin bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7.1'de verilmiştir. Buradan hesaplanan ΔR_{maks} değeri deneysel

değere (4,33 µg/ml) yakındır. Langmuir denkleminde hesaplanan K_A ve K_D değerleri sırasıyla 0,594 µg/mL ve 1,681 mL/µg olarak hesaplanmıştır.

4.8. Yarışmalı kinetik analizler

Sığır serum albumini (BSA), sitokrom c ve lizozim için miyoglobine göre dağılım ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = \left[\frac{C_i - C_f}{C_f} \right] \times V/m \quad 4.8.1$$

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

$$k = \Delta R_{\text{kalıp}} / \Delta R_{\text{girişimci}} \quad 4.8.2$$

şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için ise;

$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad 4.8.3$$

şeklinde ifade edilebilir. Hazırlanan miyoglobine baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün miyoglobine karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri 1000 ng/mL derişimindeki BSA, sitokrom c, lizozim ve miyoglobine proteinlerinin tekli, ikili, üçlü ve dördü karışım çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sensörün bu karışımlara gösterdiği tepki, Şekil 3.8.1'de % ΔR /zaman ilişkilerine ait sensorgramlarda görülmektedir. Sitokrom c ve lizozim; miyoglobine yakın molekül ağırlığı olmasından, BSA ise boyut, molekül ağırlığı ve yük

bakımından miyoglobinden oldukça farklı olmasından dolayı yarışmacı proteinler olarak seçilmişlerdir. Yarışmalı kinetik analizlerde kullanılan proteinler ve özellikleri Çizelge 4.8.1 de özetlenmiştir (Zhang ve ark. 2010).

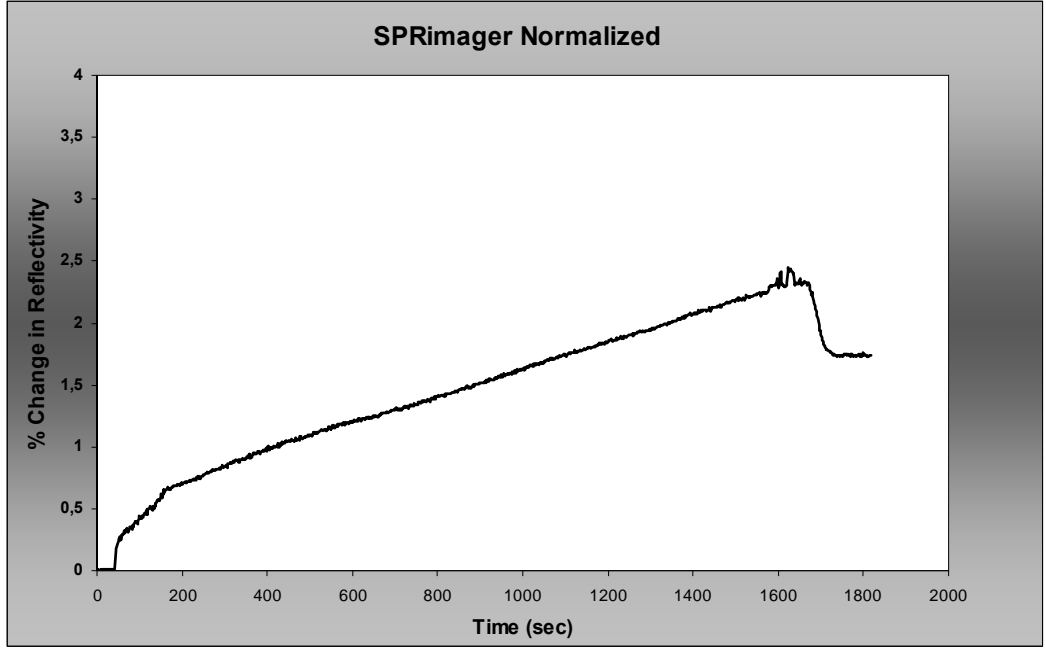
Çizelge 4.8.1. Kalıp ve yarışmacı proteinlerin molekül ağırlığı , izoelektrik nokta ve moleküler boyutları

Protein	Molekül Ağırlığı	İzoelektrik nokta	Moleküler boyut
Miyoglobin	17.600	7,3	2,5 nm x 3,4 nm x 4,2nm
BSA	66.430	4,7	5 nm x 7 nm x 7 nm
Sitokrom c	12.327	10,2	2,6 nm x 3,2 nm x 3nm
Lizozim	14.307	11,3	3 nm x 3 nm x 4,5 nm

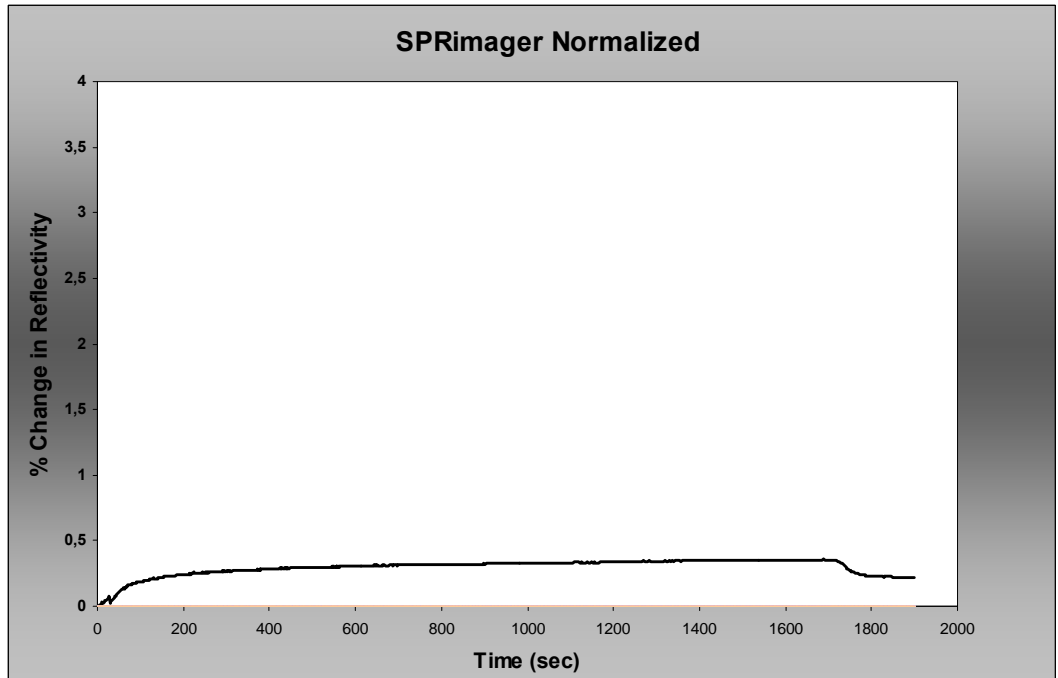
Şekil 4.8.1 incelendiğinde; miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün BSA ile herhangi bir etkileşime girmediği ve anlamlı bir sinyal vermediği ($\% \Delta R = 0,06$) belirlenmiştir. BSA molekül ağırlığı büyük (≈ 67000 Da) ve izoelektrik noktası (pI) 4,7 değerinde olan bir proteindir. Proteinlerin sulu çözeltilerden maksimum adsorpsiyonları izoelektrik noktalarında gerçekleşir. Çünkü elektrostatik açıdan pozitif ve negatif yük sayısı dengededir. Çalışma pH değeri olan 7,4 'te BSA molekülü negatif yüklüdür. Elektrostatik yük dengesinin bozulması, albumin moleküllerinin yüzeye bağlanmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca moleküler büyüklük açısından bakıldığında BSA için elde edilen bu düşük sinyal değeri, poli(HEMA-MATrp) sensör yüzeyinde hazırlanan moleküler boşlukların kalıp molekül miyoglobine özgü olduğu sonucunu desteklemektedir. Çünkü hazırlanan sensör moleküler ağırlığı ve moleküler boyut açısından kalıp molekül miyoglobinden büyük olan bir proteine karşı herhangi bir sinyal oluşturmamaktadır.

Sitokrom C ve lizozimin molekül ağırlığı hem de izoelektrik noktası miyoglobine benzerlik göstermektedir. Miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün sitokrom c'ye verdiği sensorgram sinyal değeri ($\% \Delta R$); 0,22, lizozime verdiği sinyal değeri ($\% \Delta R$); 0,35'tir. Aynı derişimdeki miyoglobin için elde edilen sinyal değeri ($\% \Delta R$) ise 2,35'tir. Bir başka deyişle; baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör

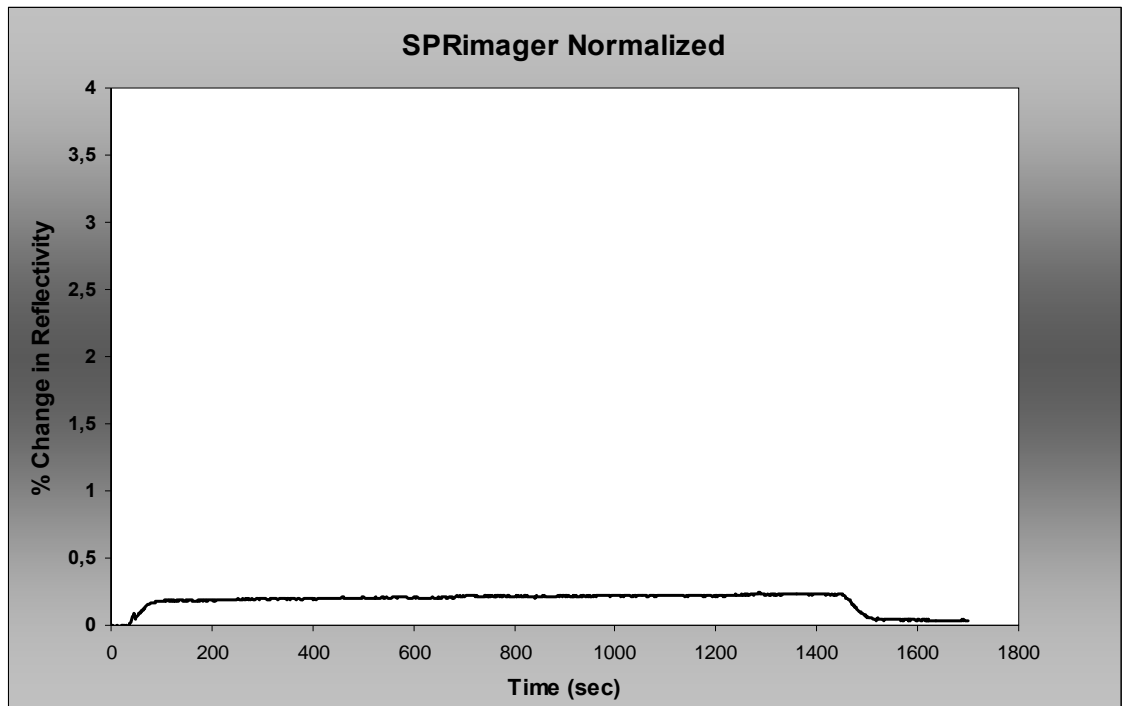
miyoglobini; sitokrom c'ye göre 10,68 kat, lizozime göre 6,71 kat daha duyarlı tayin edebilmektedir. İkili, üçlü ve dördü karışımların sinyal değerleri incelendiğinde; poli(HEMA-MATrp) sensörün sinerjik bir etki ile cevap verdiği görülmüştür. Karışımların SPR sinyallerinin, bileşenlerin tekli çözeltilerindeki sinyallerinin toplamından daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



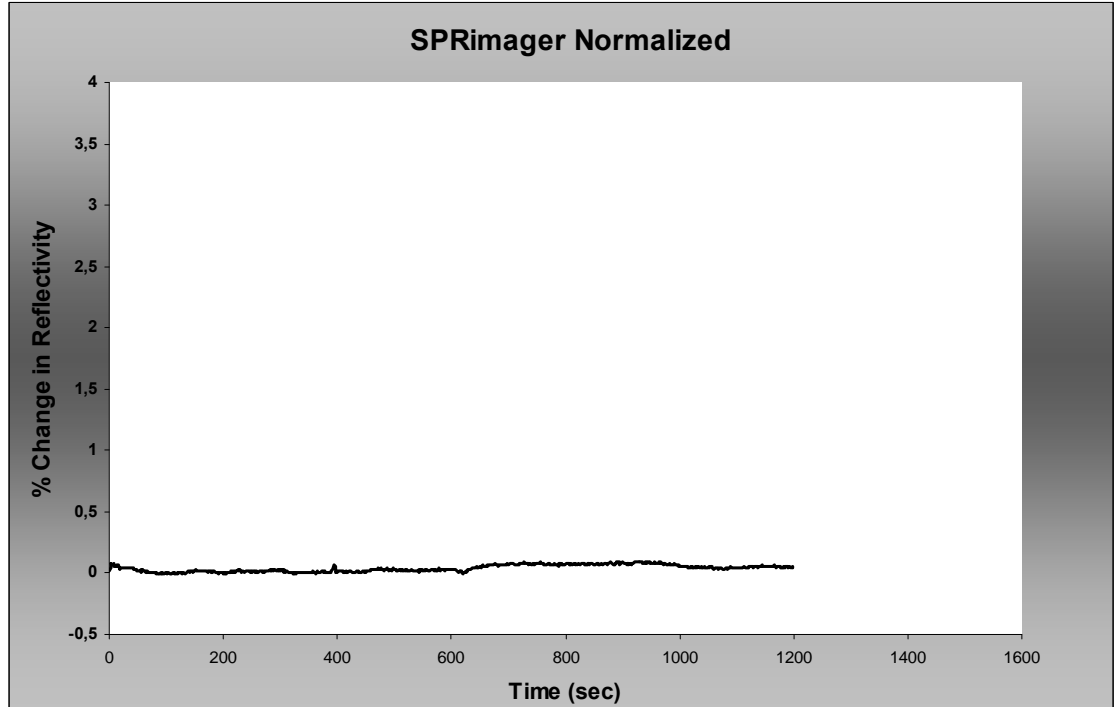
(a) Miyoglobin



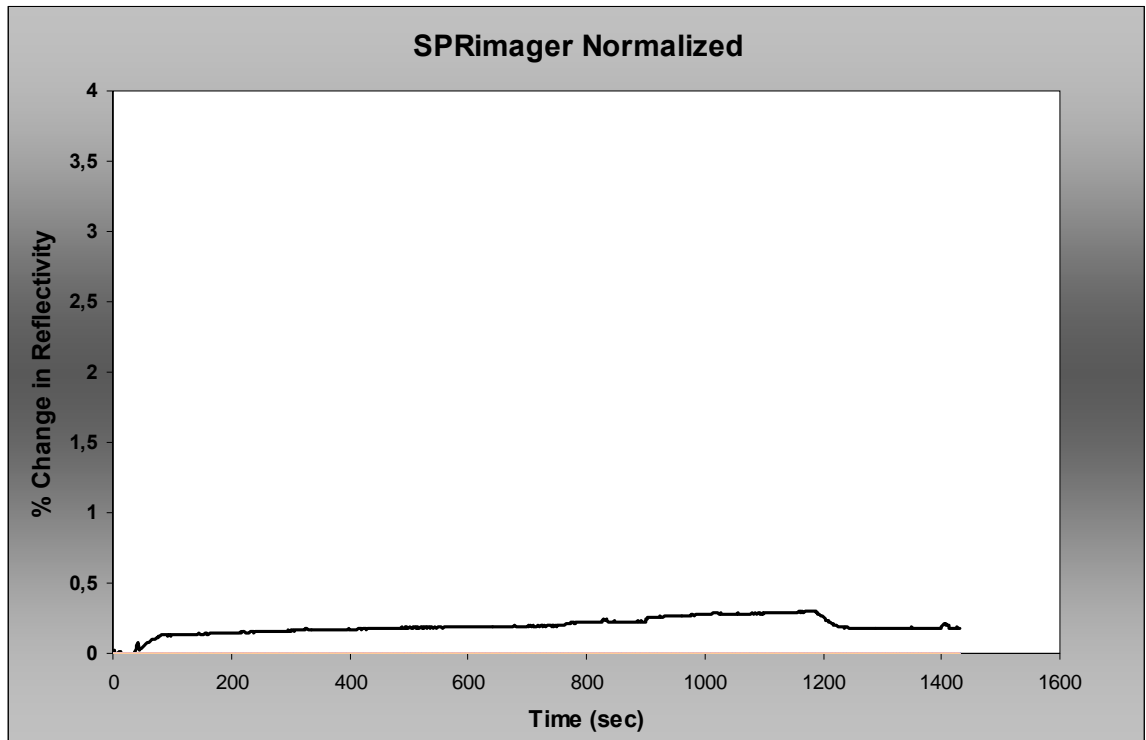
(b) Lizozim



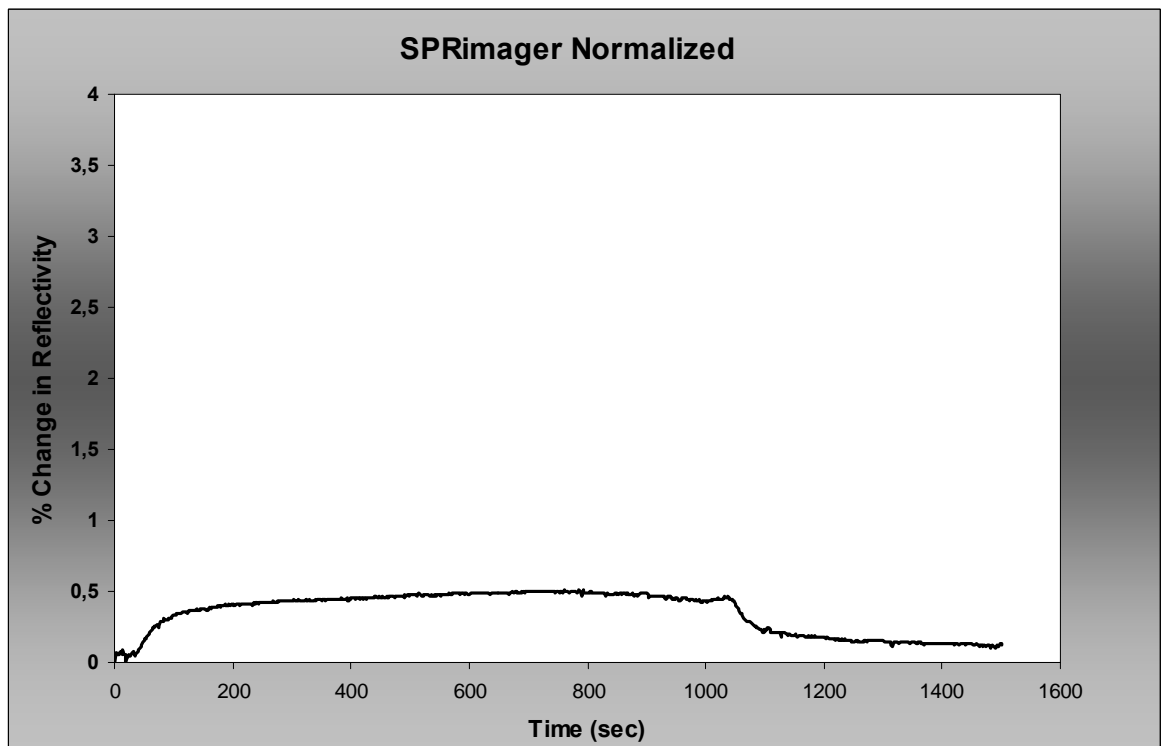
(c) Sitokrom c



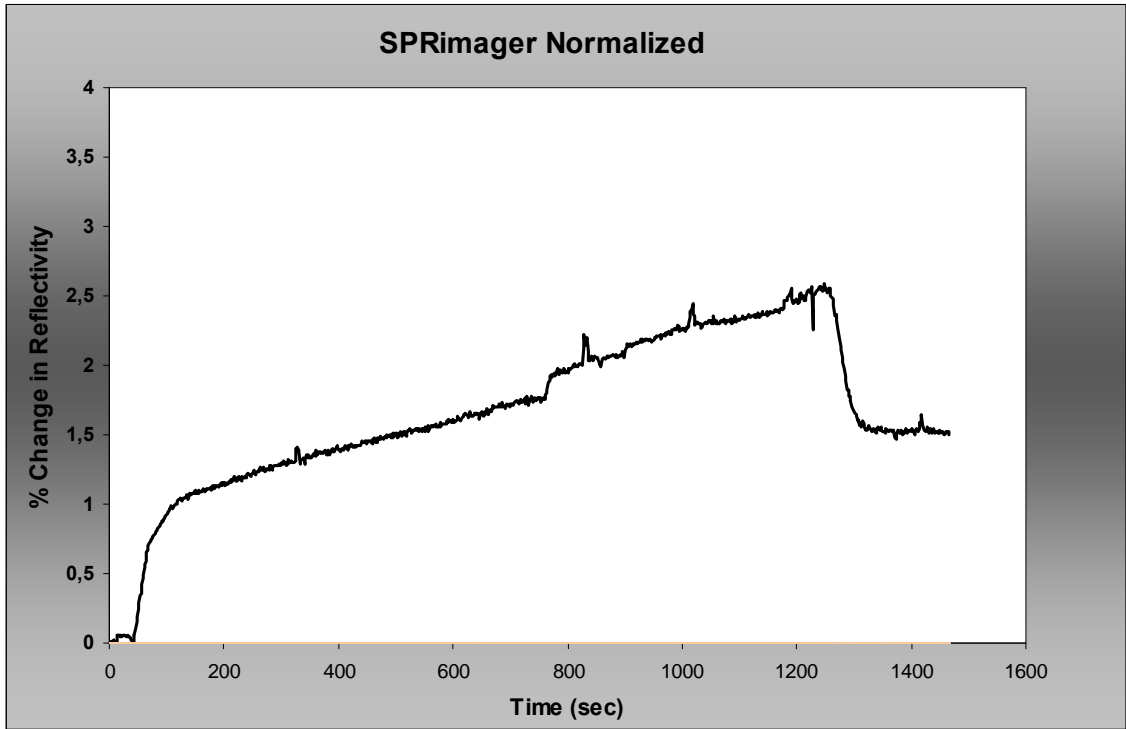
(d) BSA



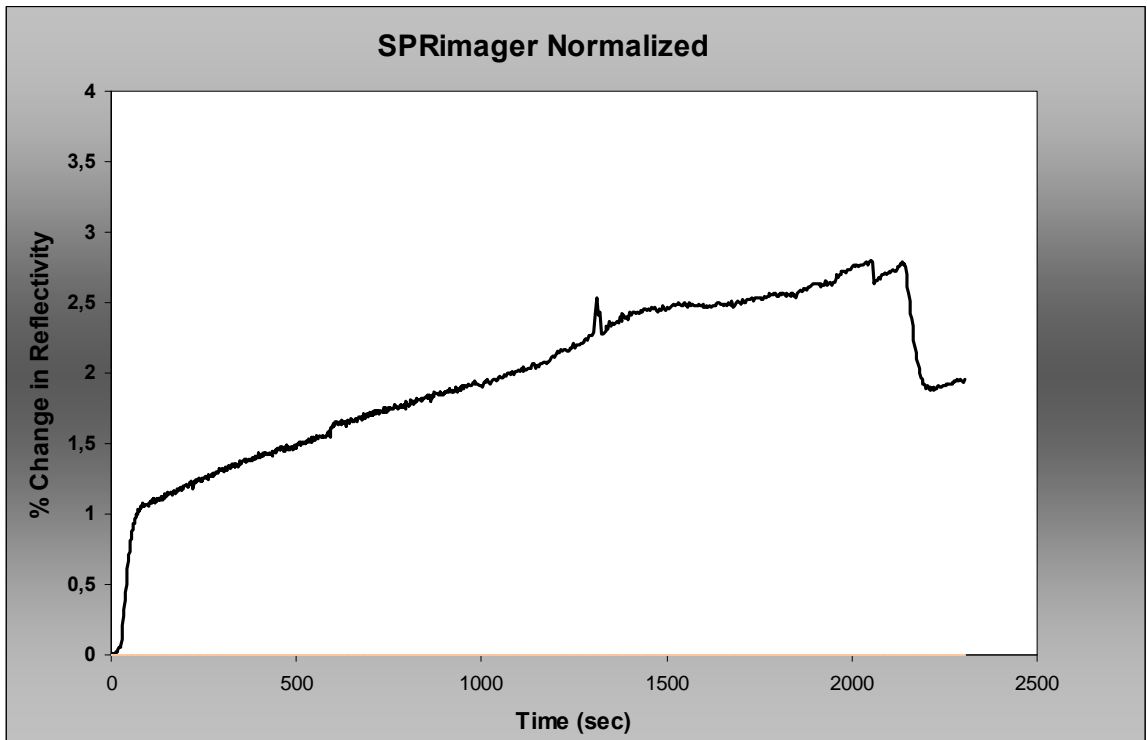
(e) BSA-Sitokrom c



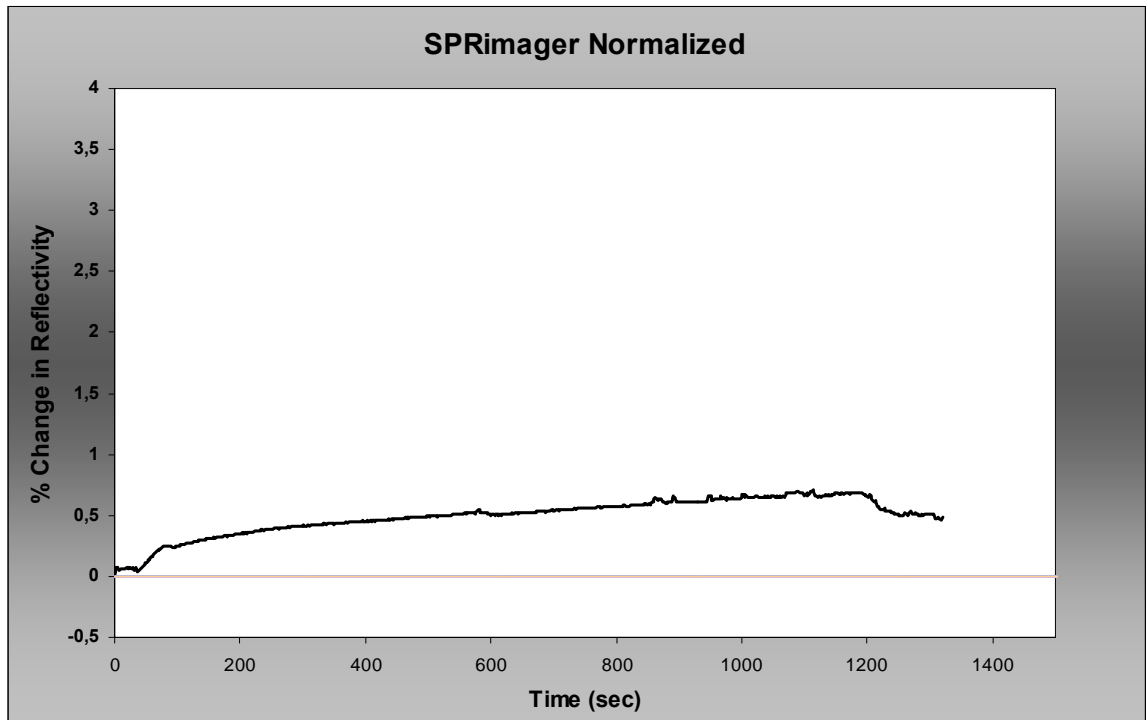
(f) BSA- Lizozim



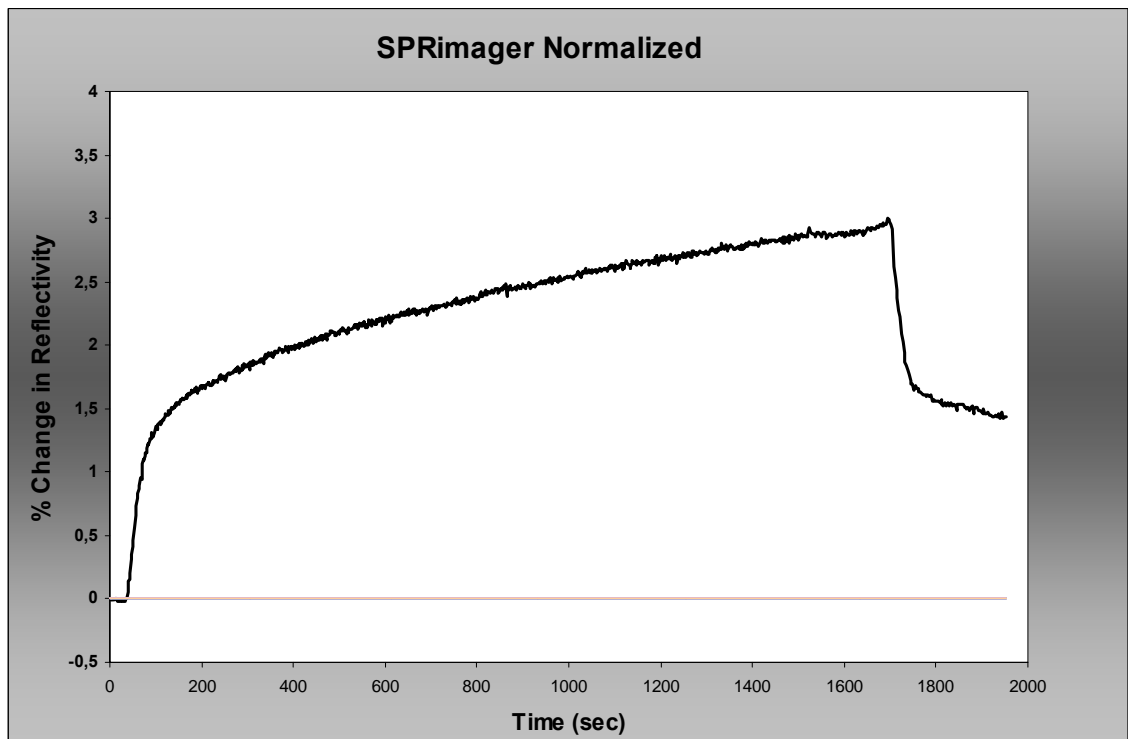
(g) BSA-Miyoglobin



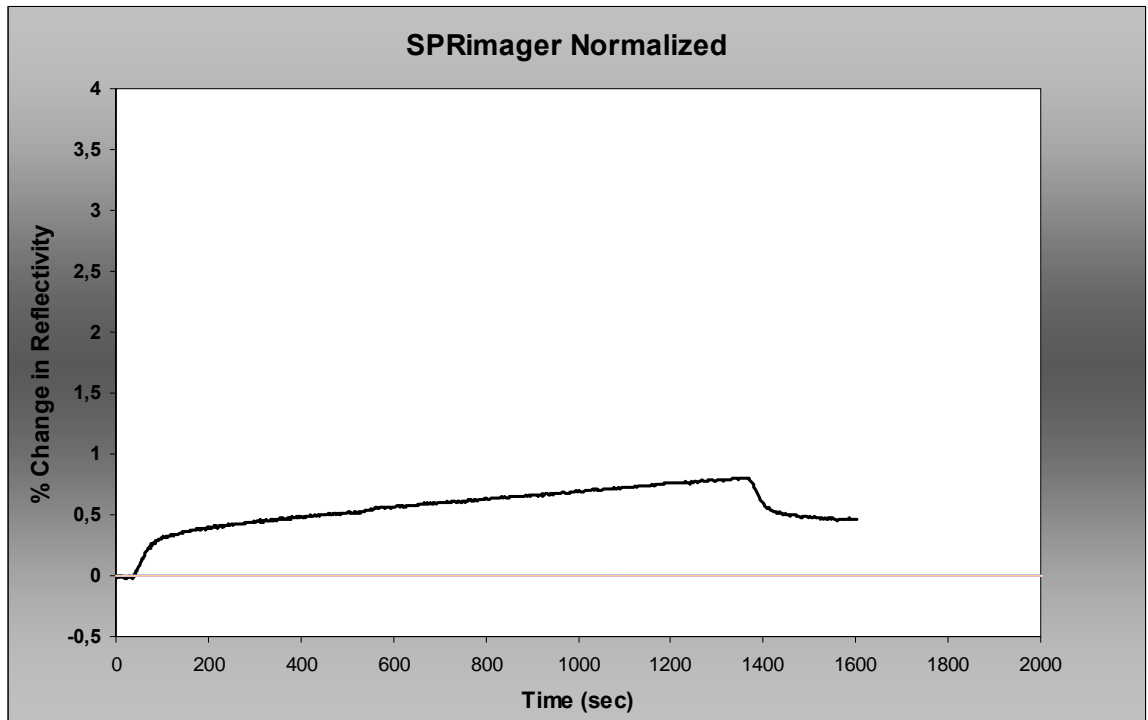
(h) Sitokrom c-Miyoglobin



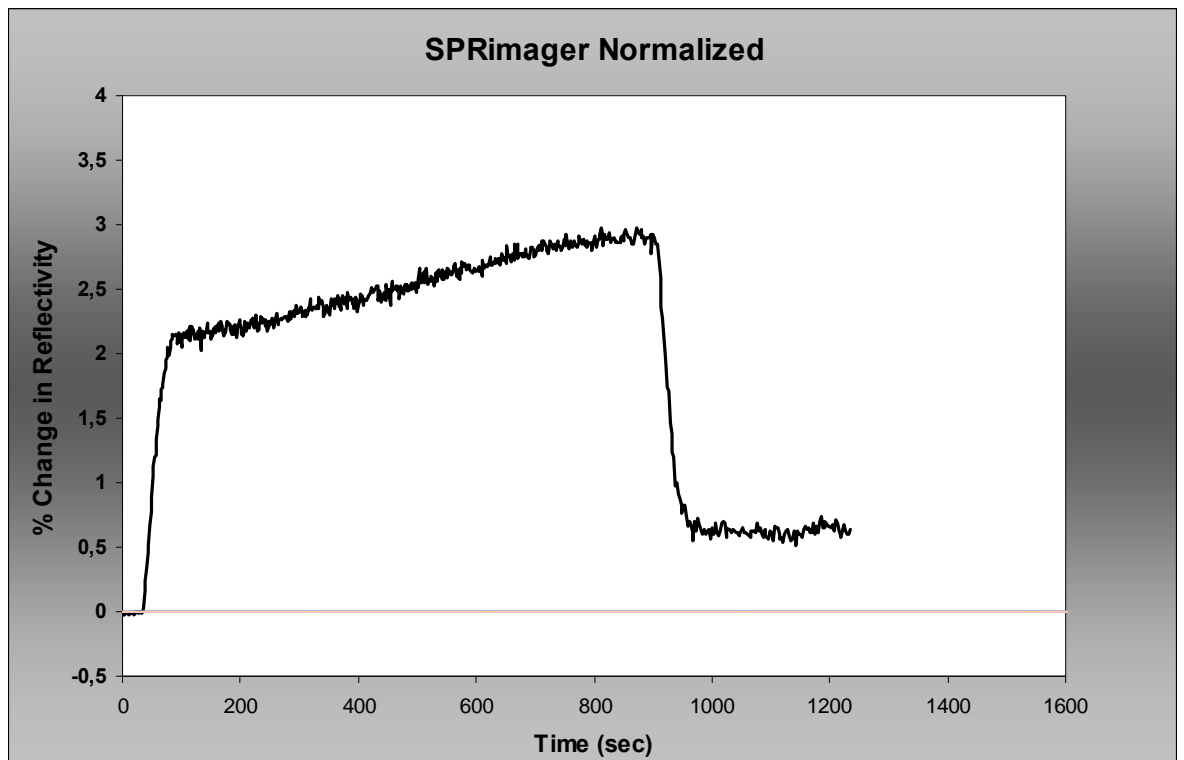
(i) Lizozim-Sitokrom c



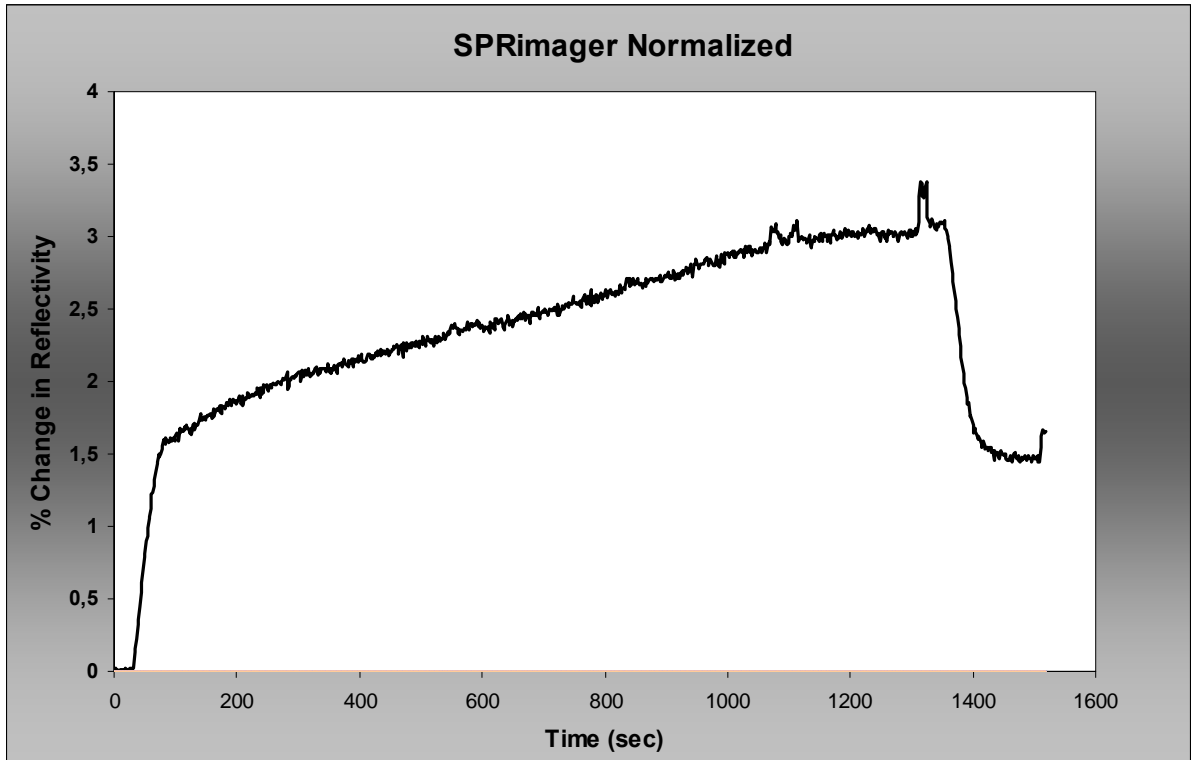
(j) Miyoglobin-Lizozim



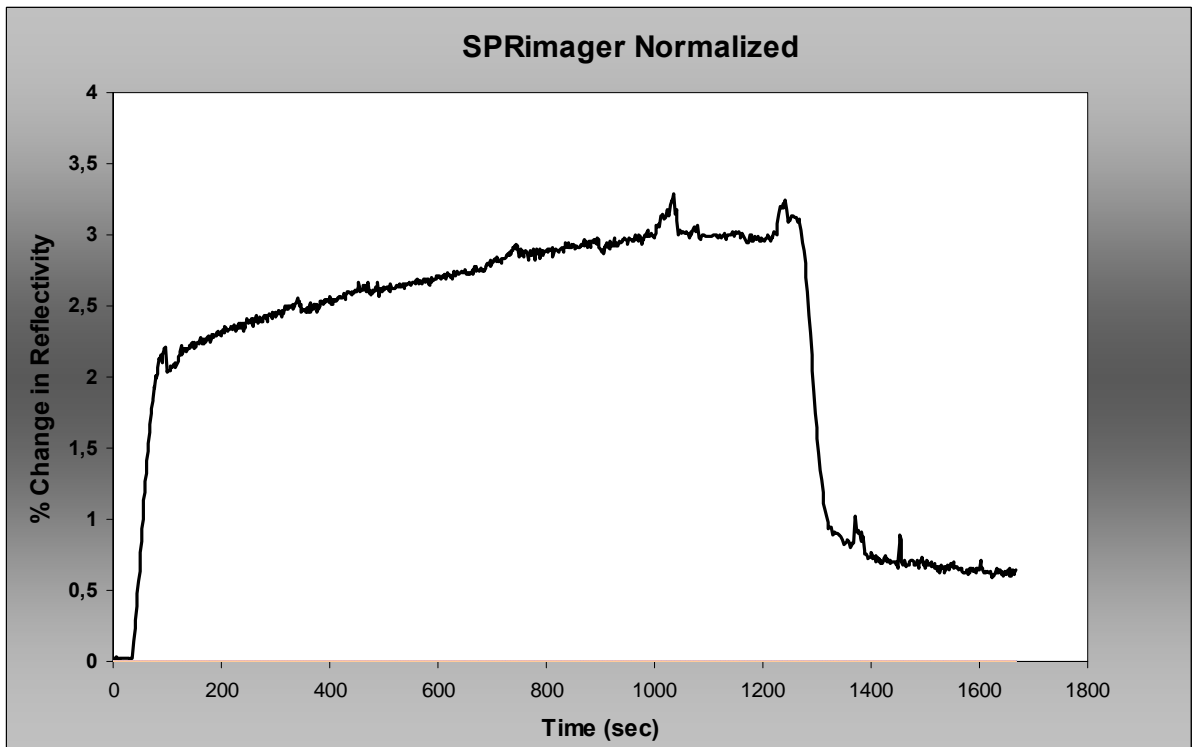
(k) BSA- Sitokrom c-Lizozim



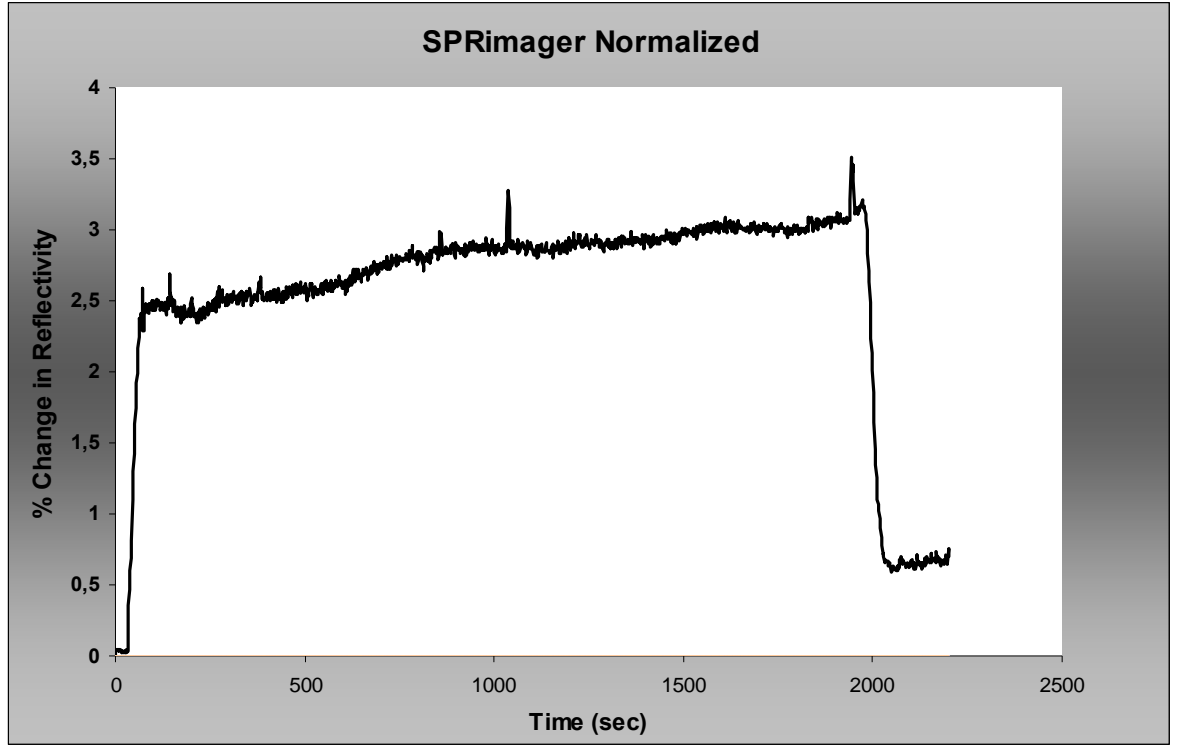
(l) BSA-Sitokrom c-Miyoglobin



(m) Miyoglobin-Lizozim-Sitokrom c



(n) BSA-Miyoglobin-Lizozim

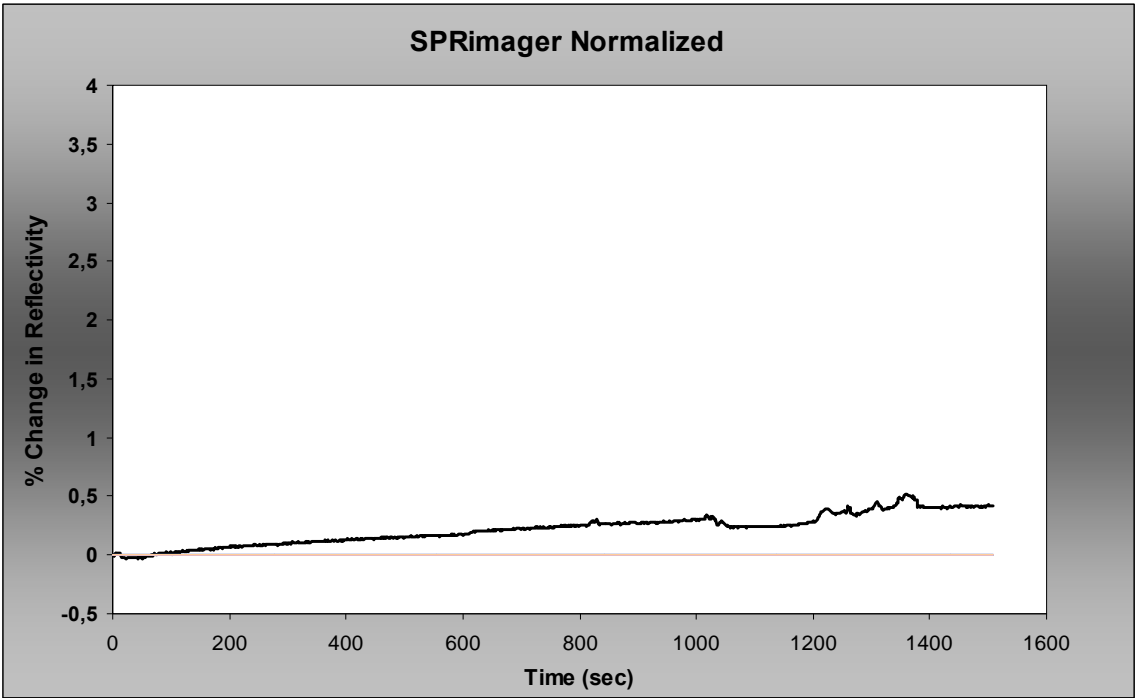


(o) BSA-Miyoglobin-sitokrom c-Lizozim

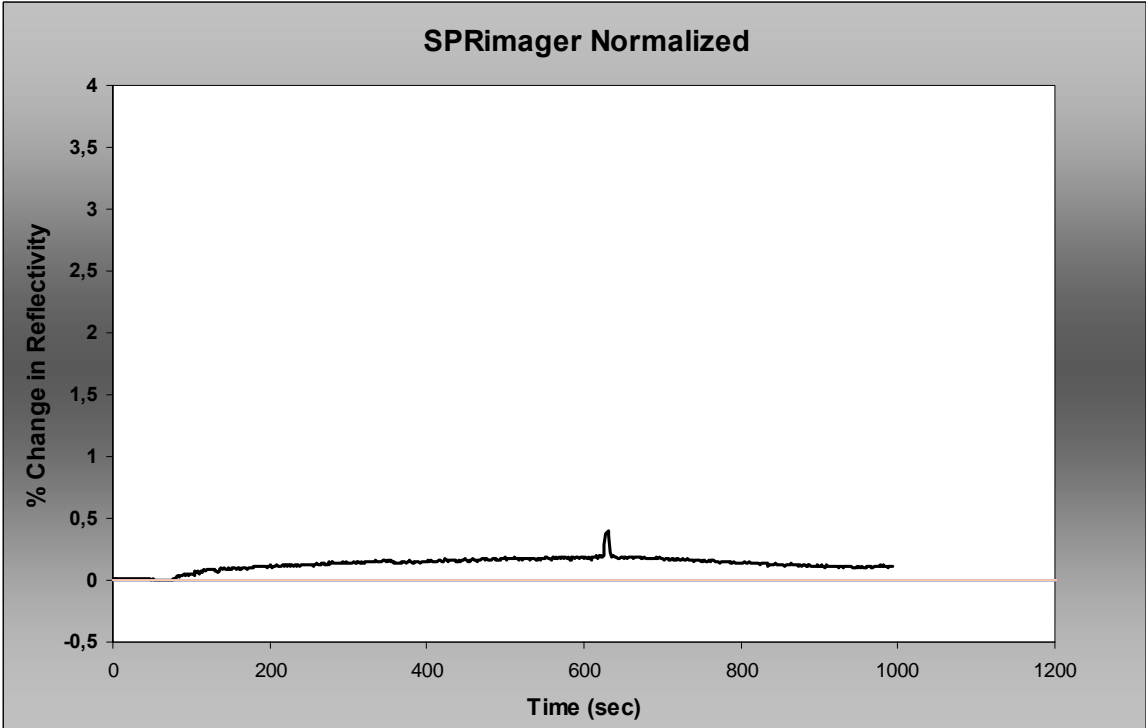
Şekil 4.8.1 1000 ng/ml derişiminde miyoglobin, lizozim, sitokrom c ve sığır serum albumini (BSA) proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar: (a) Miyoglobin, (b) Lizozim, (c) Sitokrom c, (d) BSA, (e) BSA-Sitokrom c, (f) BSA-Lizozim, (g) BSA-Miyoglobin, (h) Sitokrom c-Miyoglobin, (ı) Lizozim-Sitokrom c, (j) Miyoglobin-Lizozim, (k) BSA-Sitokrom c, (l) BSA-Sitokrom c-Miyoglobin, (m) Miyoglobin-Lizozim-Sitokrom c, (n) BSA-Miyoglobin-Lizozim-Sitokrom c.

4.9. Poli(HEMA-MATrp) Sensörün Baskılama Seçiciliği

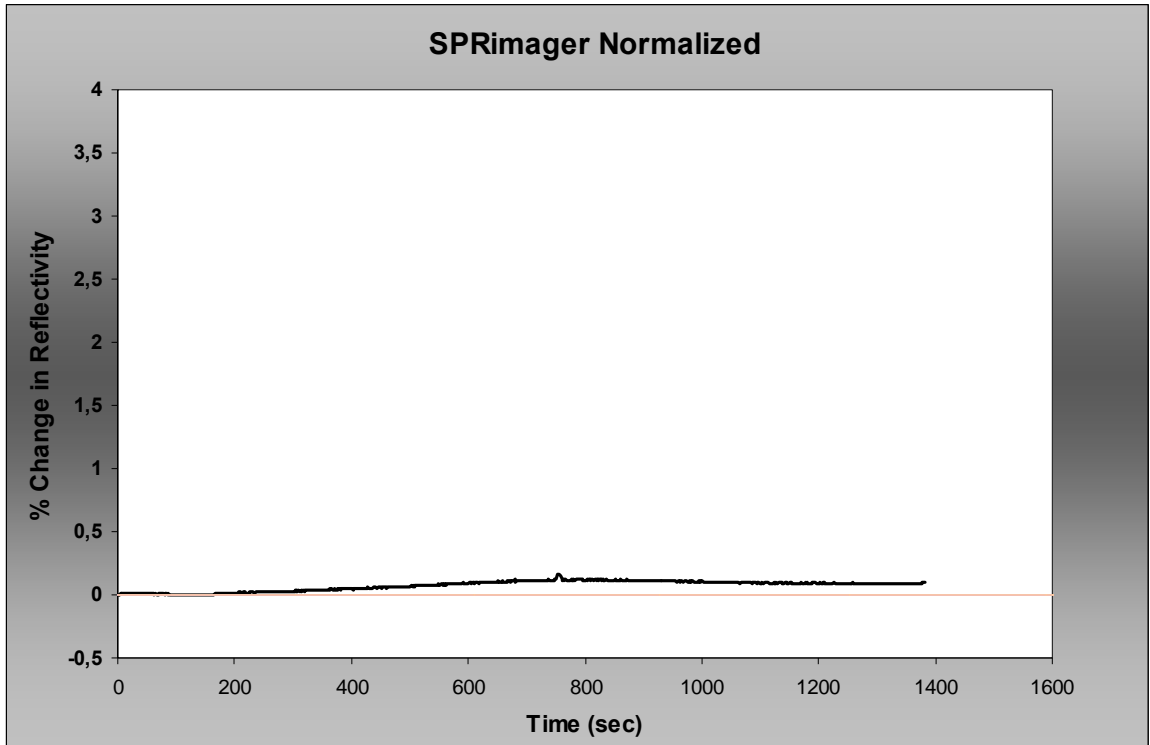
Miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün baskılama seçiciliğini göstermek için miyoglobin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensörde hazırlanmıştır. Miyoglobin, BSA, sitokrom c ve lizozim ile hazırlanan karışımlar SPR sistemine gönderilmiştir. Bu çözeltiler fosfat tamponunda (pH: 7.4) 1000 ng/ml derişiminde hazırlanmıştır. Baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensörün bu karışımlara gösterdiği tepki, Şekil 4.9.1'de % ΔR /Zaman fonksiyonu olarak verilmiştir.



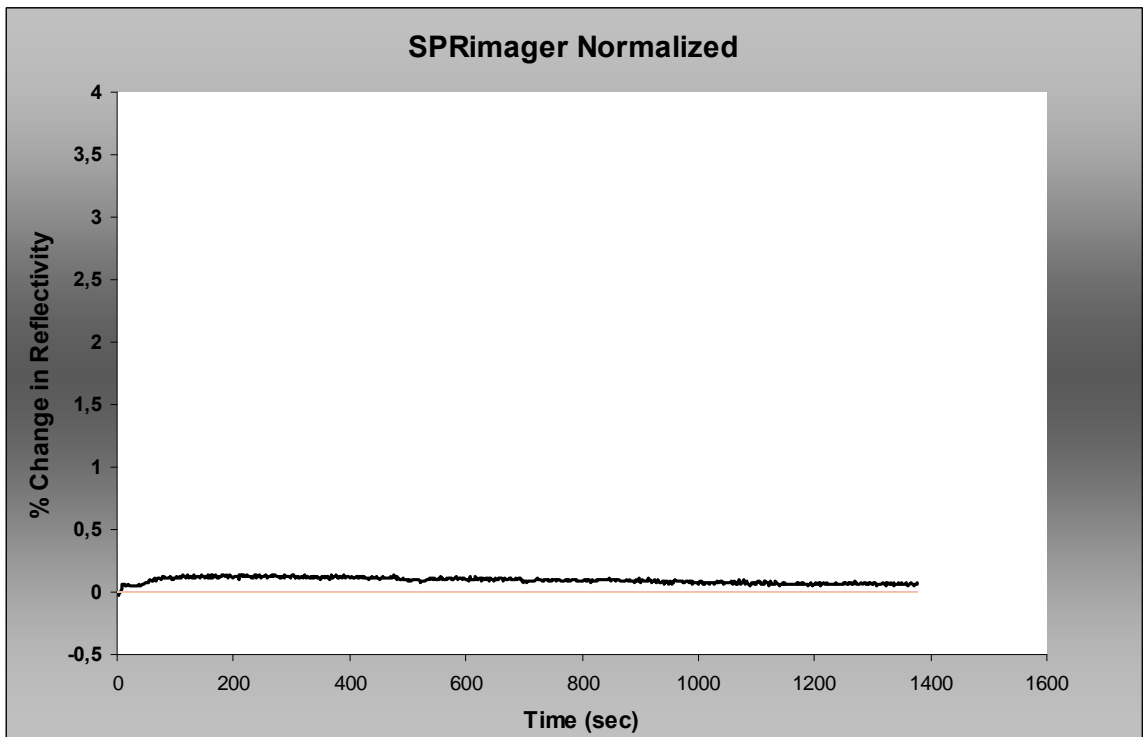
(a) Miyoglobin



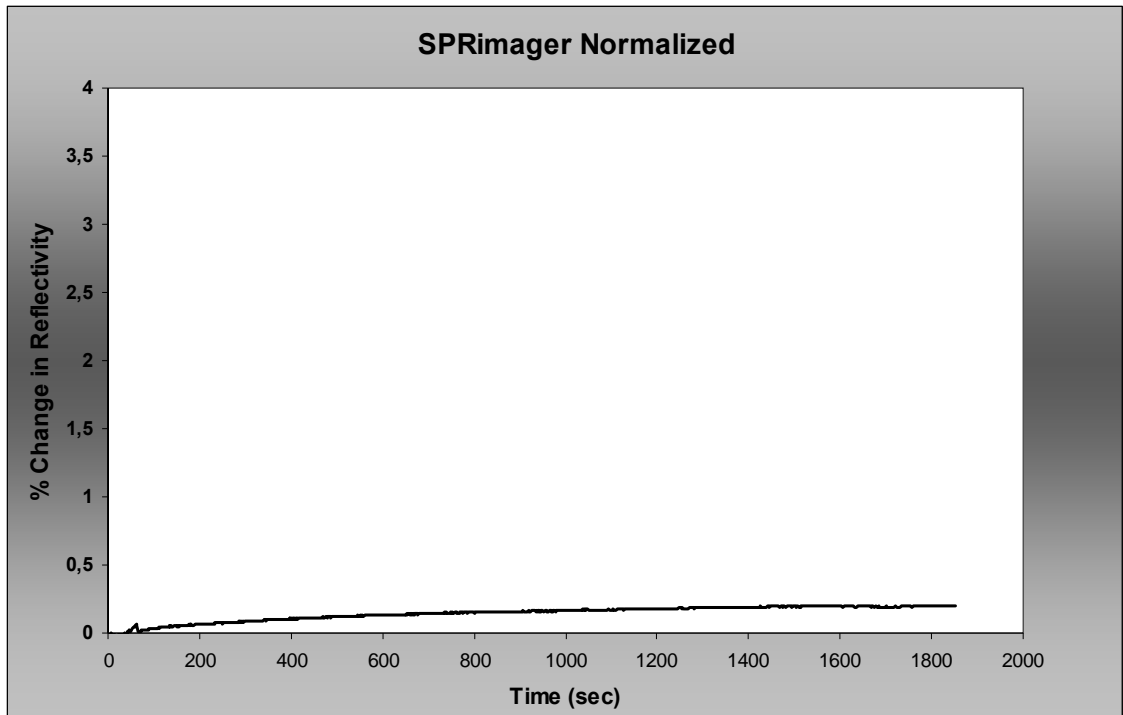
(b) Liozime



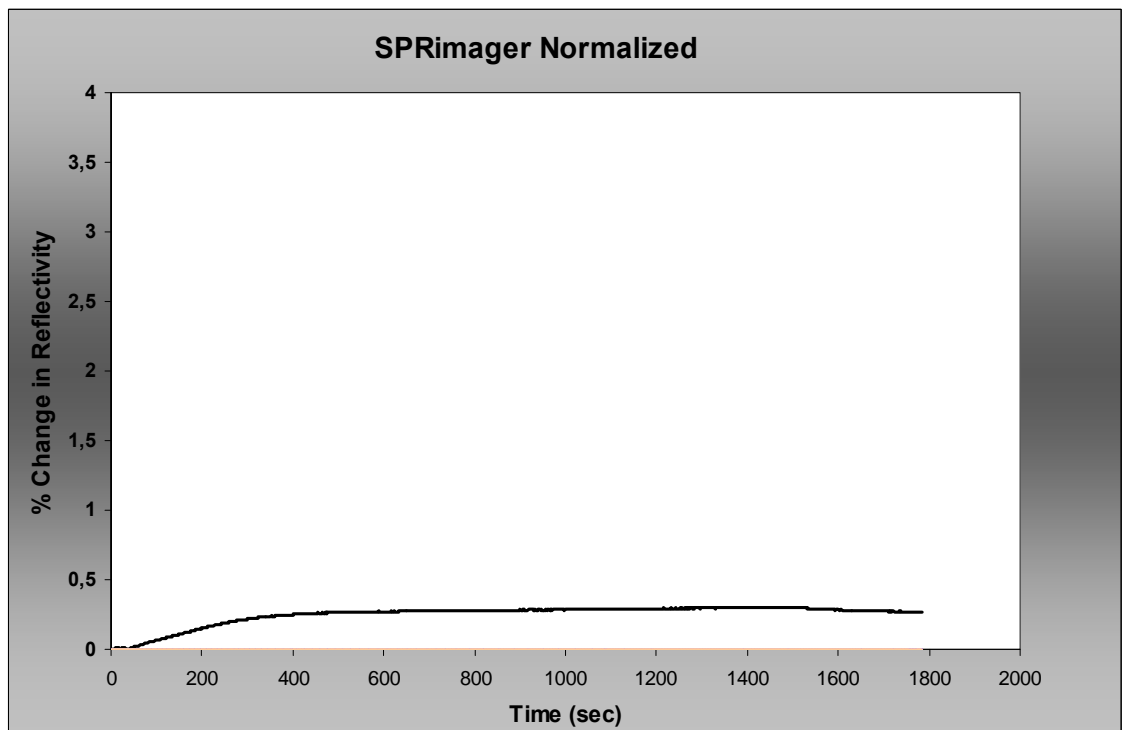
(c) Sitokrom c



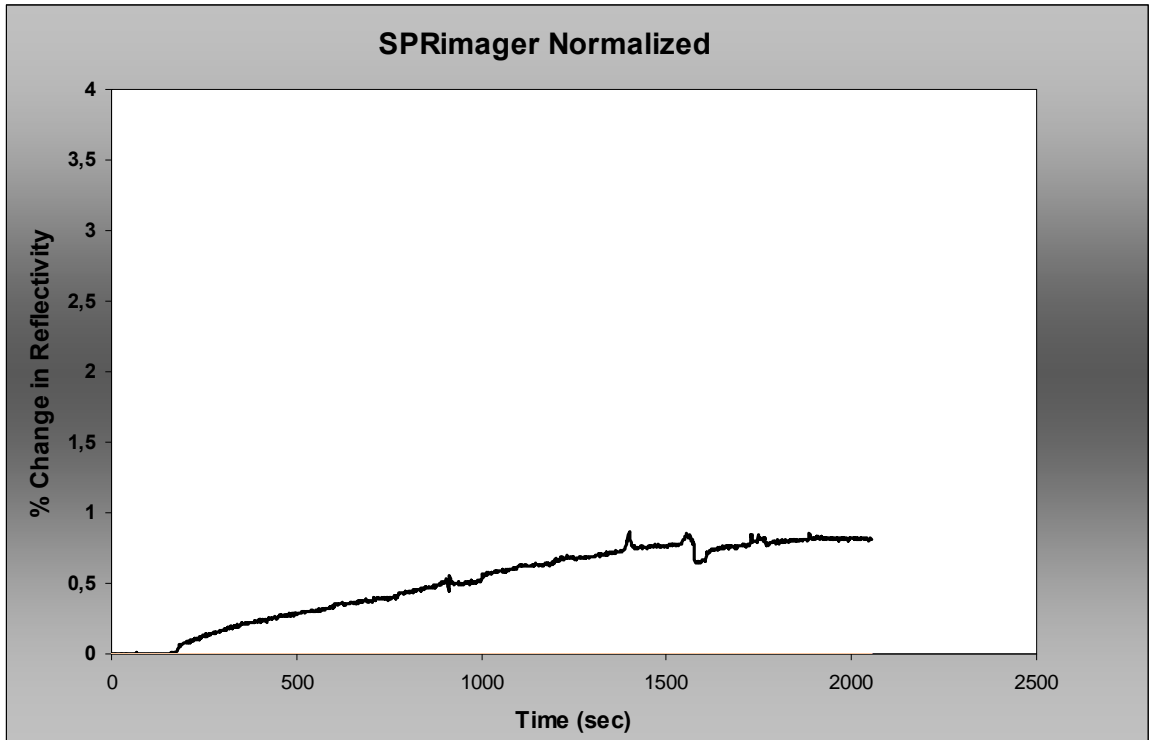
(d) BSA



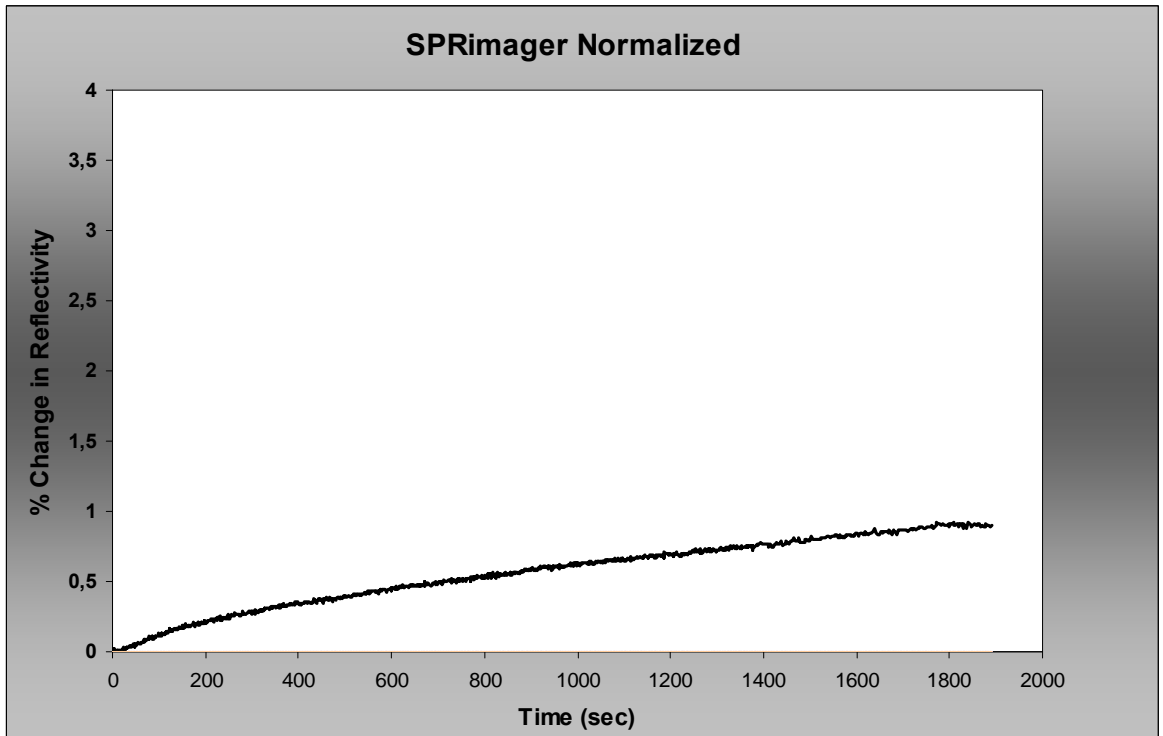
(e) BSA- Sitokrom c



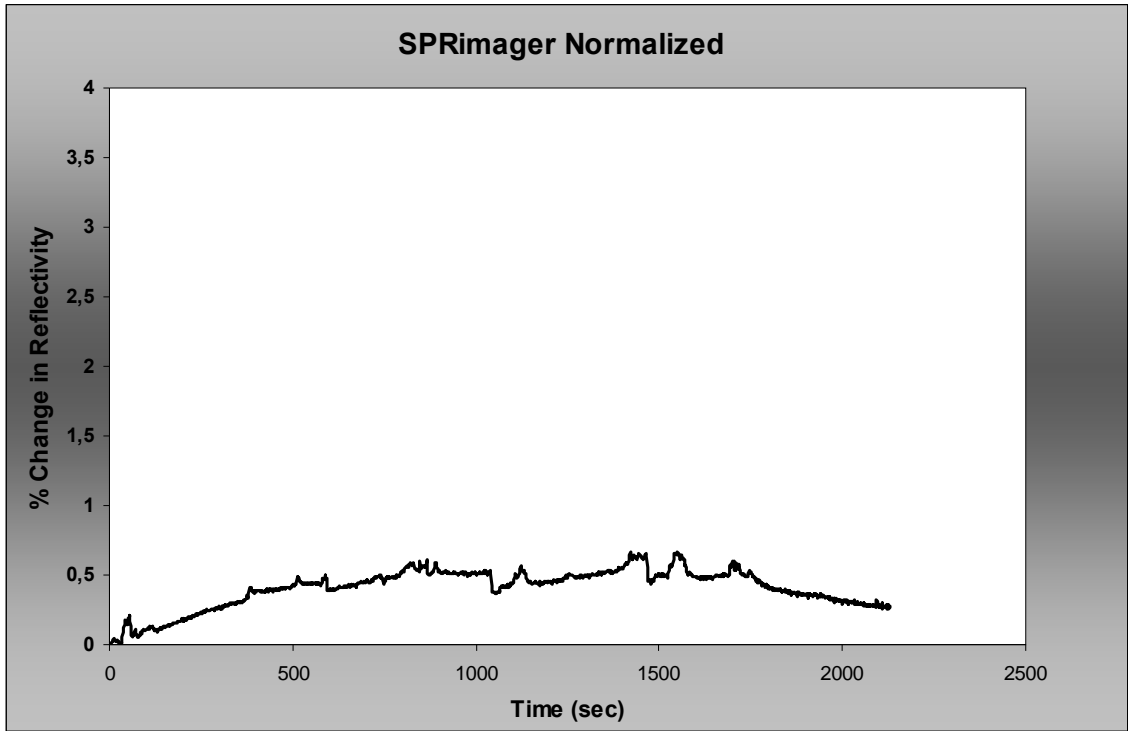
(f) BSA-Lizozim



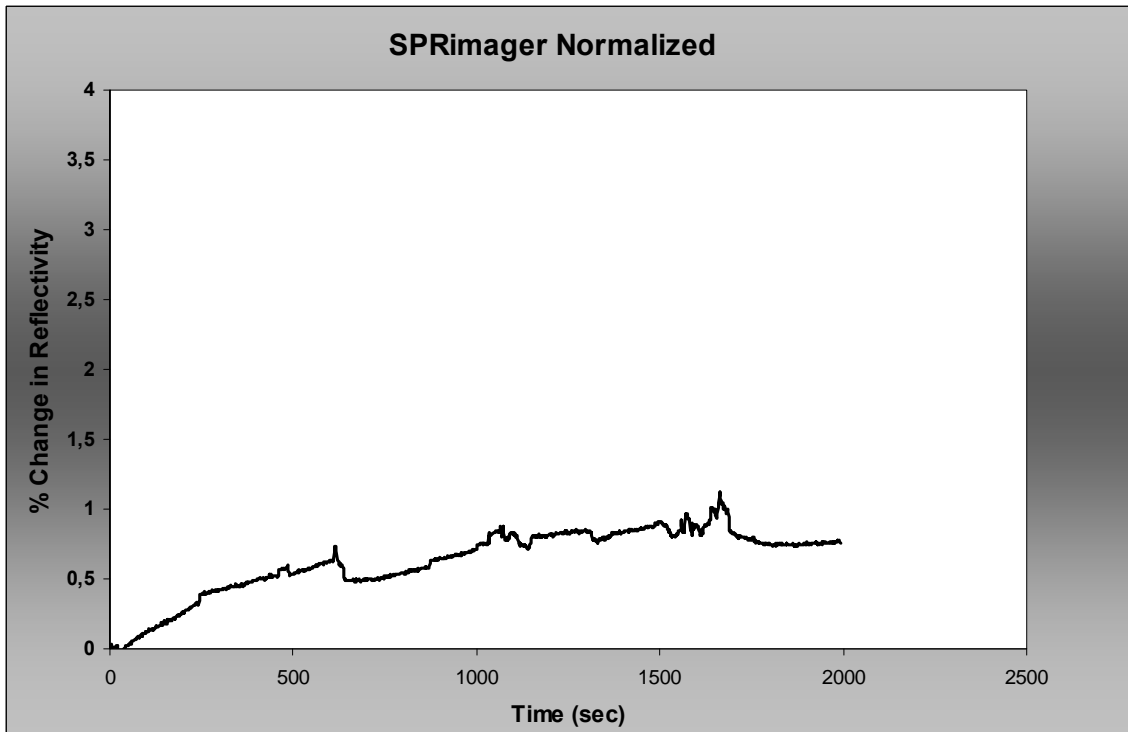
(g) BSA-Miyoglobin



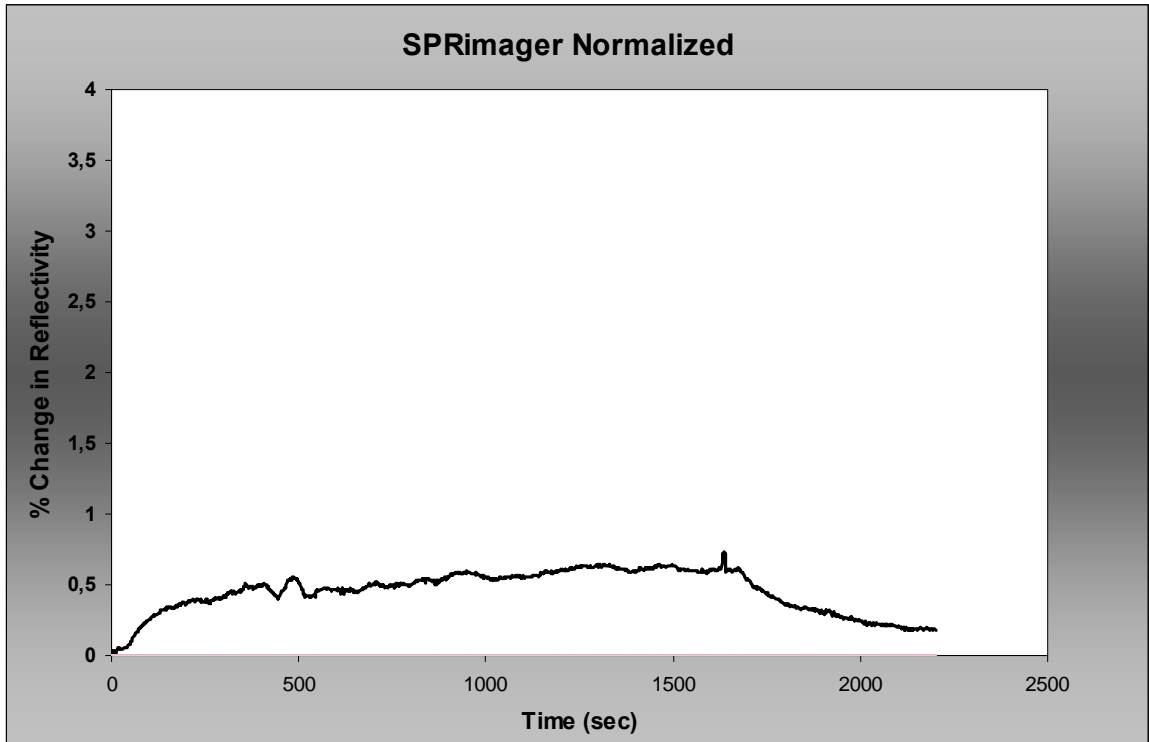
(h) Sitokrom c- Miyoglobin



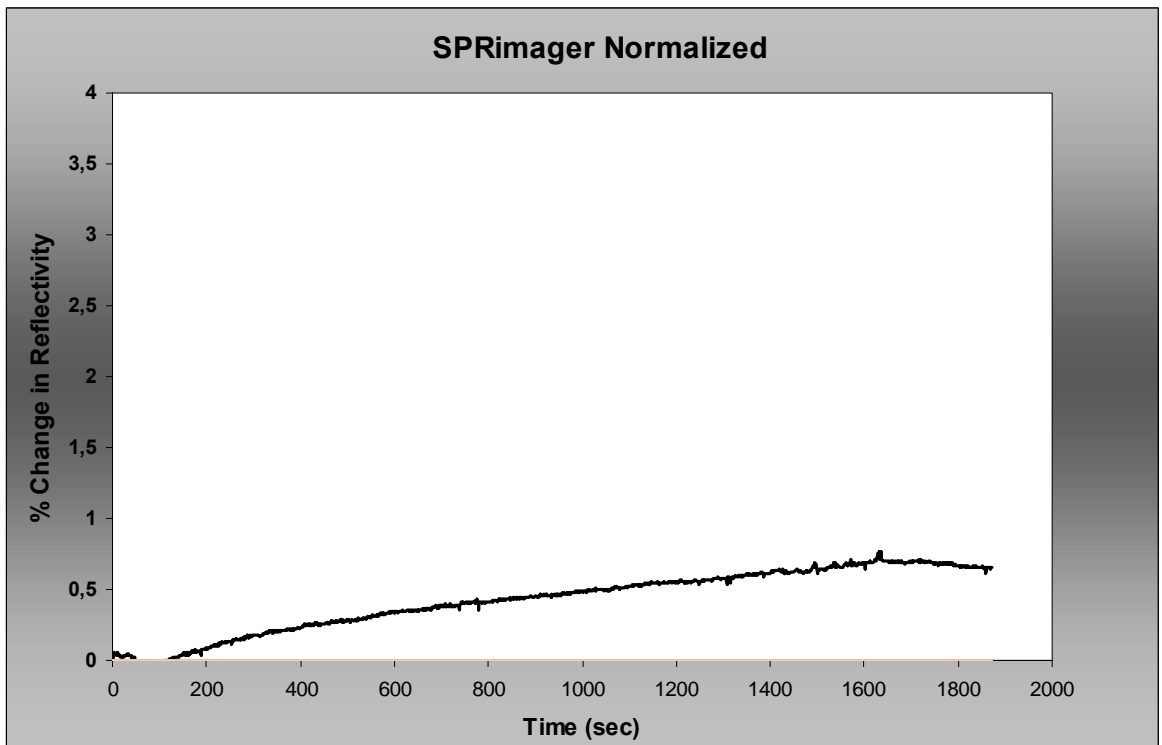
(i) Lizozim-Sitokrom c



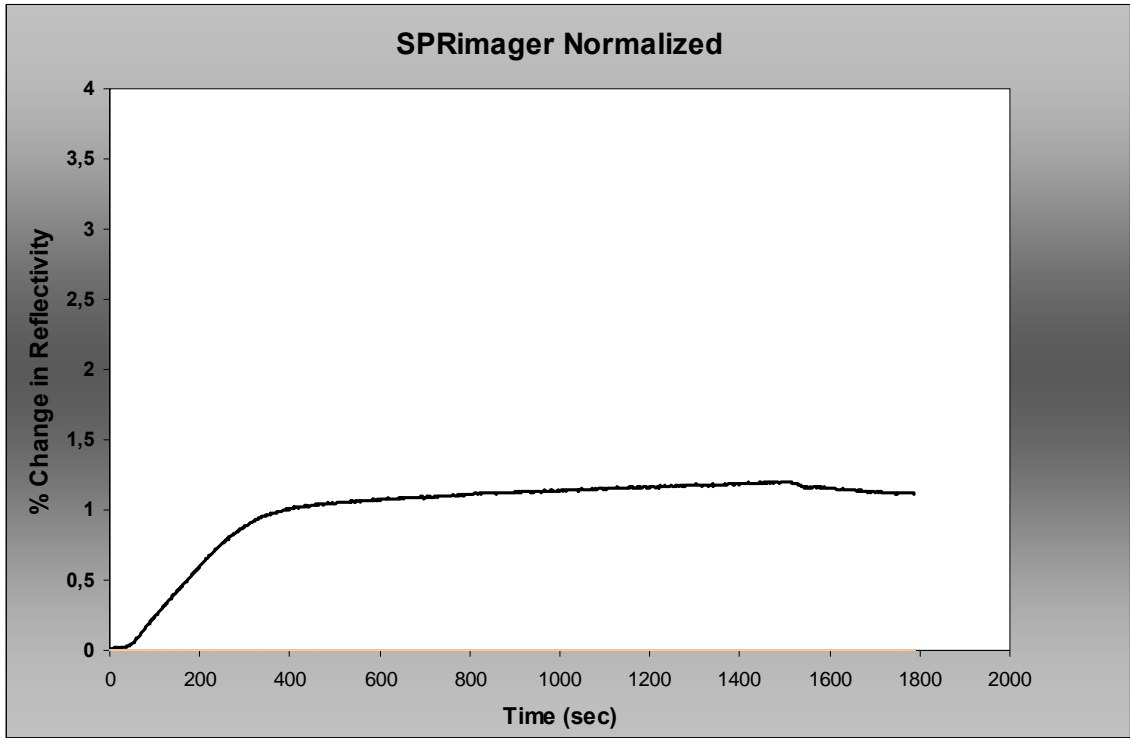
(j) Myoglobin-Lizozim



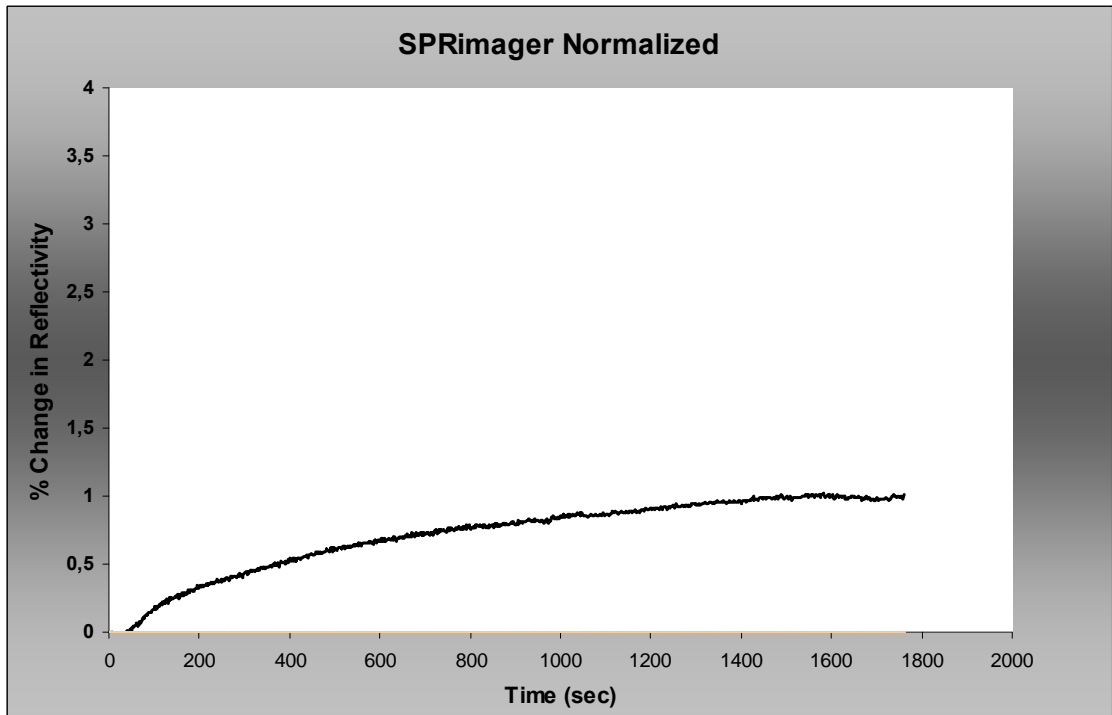
(k) BSA-Sitokrom c-Lizozim



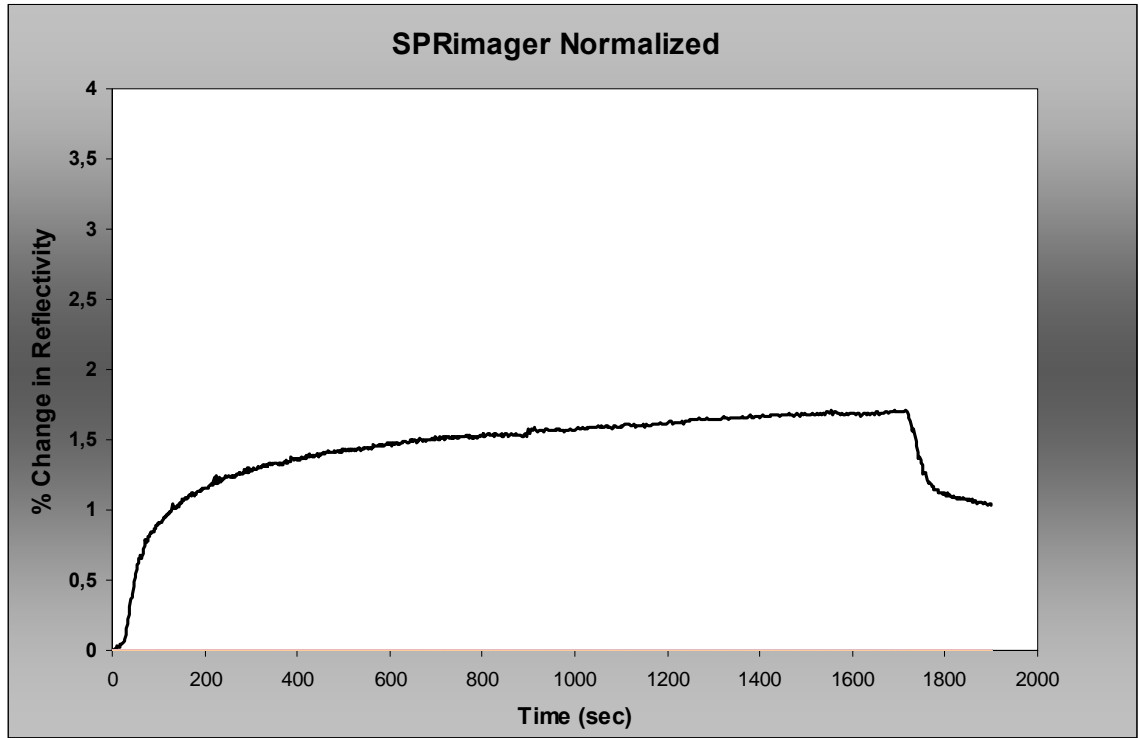
(l) BSA-Sitokrom c-Miyoglobin



(m) Miyoglobin-Lizozim-Sitokrom c



(n) BSA-Miyoglobin-Lizozim



(o) BSA-Miyoglobin-Lizozim-Sitokrom c

Şekil 4.9.1. 1000 ng/mL derişiminde miyoglobin, lizozim, sitokrom c ve sığır serum albumini (BSA) proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile miyoglobin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar: (a) Miyoglobin, (b) Lizozim, (c) Sitokrom c, (d) BSA, (e) BSA-Sitokrom c, (f) BSA-Lizozim, (g) BSA-Miyoglobin, (h) Sitokrom c-Miyoglobin, (ı) Lizozim-Sitokrom c, (j) Miyoglobin-Lizozim, (k) BSA-Sitokrom c, (l) BSA-Sitokrom c-Miyoglobin, (m) Miyoglobin-Lizozim-Sitokrom c, (n) BSA-Miyoglobin-Lizozim-Sitokrom c.

Şekil 4.9.1. incelendiğinde; miyoglobin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensörün BSA ile herhangi bir etkileşime girmediği ve sinyal vermediği belirlenmiştir ($\Delta R_{maks} = 0,04$). Sitokrom c ve lizozim sinyal değerlerinin ise miyoglobin için alınan sinyal değerine yakın olduğu ($\Delta R_{sitokrom\ c} = 0,15$; $\Delta R_{lizozim} = 0,20$ ve $\Delta R_{miyoglobin} = 0,42$) belirlenmiştir. İkili ve üçlü karışımlarda; baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör ile elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edildiği ve karışımların sinyal değerlerinde sinerjik bir etki olduğu görülmektedir. Baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensörler karşılaştırıldığında; miyoglobin sinyalinin duyarlılığının düştüğü görülmektedir. Eşitlik 4.8.2 ve 4.8.3 kullanılarak hesaplanan seçicilik katsayıları

Çizelge 4.9.1’de özetlenmiştir. Baskılama seçiciliğini gösteren bağıl seçicilik katsayısı ise 3,81 (miyoglobin/sitokrom c) ve 3,19 (miyoglobin/lizozim) olarak hesaplanmıştır. Bir başka tanımla; miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör, miyoglobini sitokrom c’ye göre 3,81 kat , lizozime göre 3,19 kat seçicilikte tanımaktadır. Bağıl seçicilik değeri, 1’in ne kadar üzerinde ise baskılama işleminin o kadar etkin olduğu bilinmektedir (Zhang ve ark. 2002). Hem molekül ağırlığı ve boyutu hem de izoelektrik noktası birbirine çok yakın olan iki molekül arasında 3,81 ve 3,19 katlık ayırma faktörünün oldukça başarılı bir sonuç olduğu belirtilmelidir. Tirozin amino asidinin baskılandığı bir çalışmada; tirozin ile fenilalanin amino asitleri arasındaki bağıl seçicilik katsayısının 1.82 olduğu rapor edilmiştir (Zhang ve ark. 2002). Bereli ve ark 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada lizozim baskılanmış kriyojeller hazırlamışlar ve lizozimin BSA ve sitokrom c’ye göre bağıl seçicilik katsayılarını 4.6 (lizozim/BSA) ve 3.2 (lizozim/sitokrom c) olarak rapor etmişlerdir. Hemoglobin baskılanmış kriyollerin hazırlandığı bir çalışmada ise hemoglobinin miyoglobin ve BSA e göre bağıl seçicilik katsayıları 38 (hemoglobin/miyoglobin) ve 12 (hemoglobin/BSA) olarak belirlenmiştir. (Derazshamsir ve ark. 2010)

Çizelge 4.9.1. Miyoglobine göre BSA, sitokrom c ve lizozim için seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları

Protein	MIP		NIP		k'
	ΔR	k	ΔR	k	
Miyoglobin	2,35	-	0,42	-	
BSA	0,06	$\approx\infty$	0,06	$\approx\infty$	$\approx\infty$
Sitokrom c	0,22	10,68	0,15	2,8	3,81
Lizozim	0,35	6,71	0,20	2,1	3,19

4.10. Poli(HEMA-MATrp) SPR Sensörün Tekrar Kullanımı

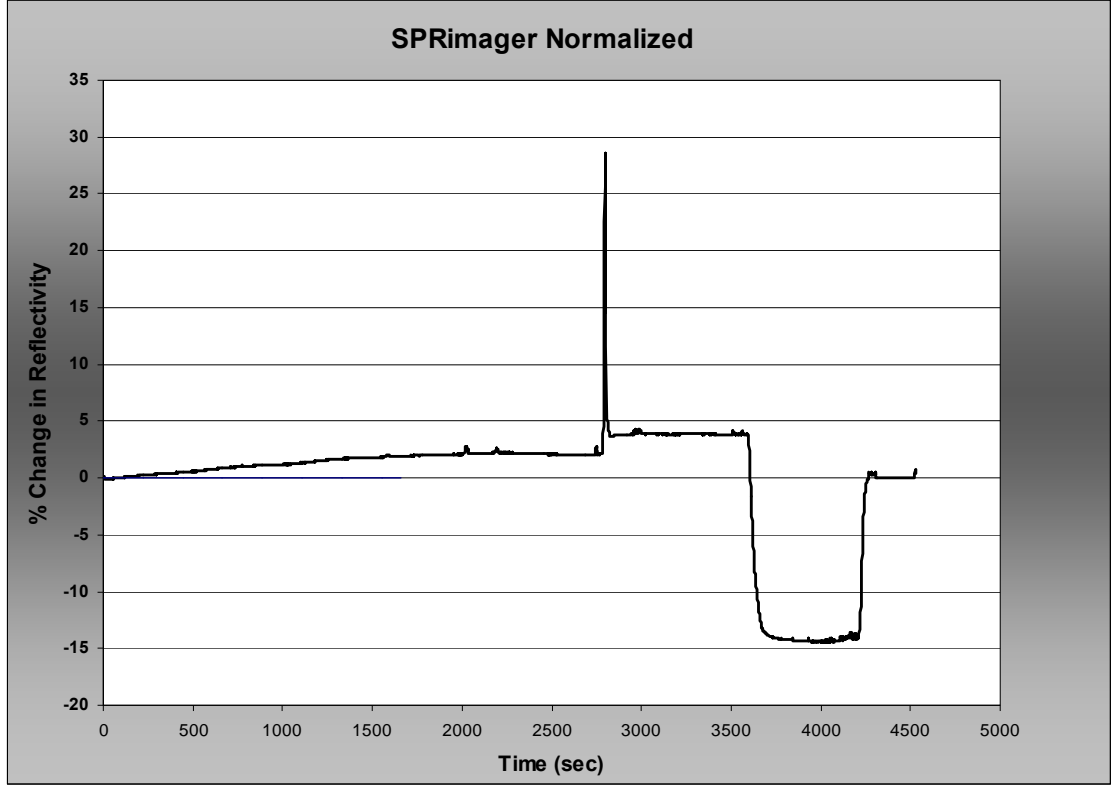
SPR temelli biyosensörlerin kullanımda sağladığı en büyük avantajlardan biri tekrar kullanımdır. Tanıma elementi olarak biyolojik moleküllerin kullanılması durumunda tekrar kullanım sınırlıdır. Çünkü rejenerasyon için kullanılan çözeltiler biyolojik molekülün üç boyutlu yapısını bozarak sensörün tanıma kapasitesini değiştirmekte ve sensör zamanla kullanılamaz hale gelmektedir. Moleküler baskılanmış polimerler ile hazırlanan sensörler ise polimerik yapının sağlamlığı ve çevresel koşullara karşı dayanıklılığı nedeniyle biyomoleküller ile hazırlanan sensörlere göre çok daha uzun süre tekrar kullanılabilme kapasitesine sahiptir.

Poli(HEMA-MATrp) sensörün tekrar kullanımı için yüzey analizden sonra rejenerasyon edilmiştir. MATrp monomeri ve miyoglobinin arasındaki etkileşim, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarının ortak etkisi temeline dayanmaktadır. Ancak temel etkileşim triptofan amino asidinde bulunan aromatik halka ve protein yapısındaki hidrofobik amino asitler arasındaki hidrofobik etkileşimlerdir. Hidrojen bağlarının da bu kompleks oluşumuna önemli bir katkısı olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla miyoglobinin polimerik yapıdan uzaklaştırılması için polar ve hidrofobik etkileşimleri kırabilecek bir desorpsiyon ajanı kullanılmalıdır. Bu amaçla desorpsiyon ajanı olarak 1 M etilen glikol kullanılmıştır.

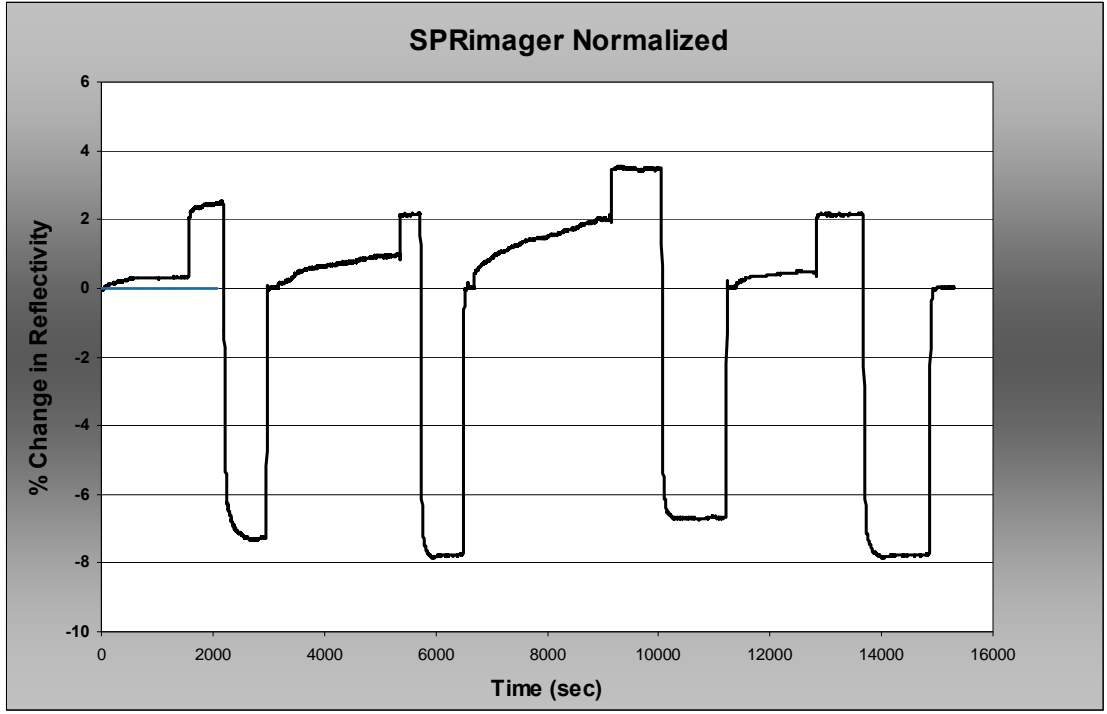
Şekil 4.10.1’de 1000 ng/mL derişimindeki miyoglobinin çözeltisi poli(HEMA-MATrp) sensör yüzeyinden geçirilerek kinetik analiz tamamlanmış ve ardından yüzeye onar dakikalık süreler ile sırasıya 1M etilen glikol, saf su ve denge tamponu (pH 7,4) gönderilmiştir. Görüldüğü gibi 30 dakikalık bir süre içerisinde rejenerasyon gerçekleşmiştir.

Şekil 4.10.2’de de poli(HEMA-MATrp) sensör üzerine sırasıyla 100, 300, 700 ve tekrar 100 ng/mL derişimde miyoglobinin çözeltileri gönderilmesi ile elde edilen sensogram görülmektedir. Görüldüğü gibi rejenerasyon çözeltisi olarak 1 M etilen glikol çözeltisinin kullanılması ile bağlanma bölgelerinde herhangi bir bozulmaya neden olmaksızın yüzey dört kez tekrar kullanılabilir. Ayrıca hazırlanan sensörün 4 ay

süre ile oda sıcaklığında bekletilmesi sonrasında tekrarlanabilir olarak kullanıldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.10.1. 1000 ng/mL derişimde miyoglobin ile yapılan kinetik analiz ve rejenerasyon



Şekil 4.10.2. Poli (HEMA-MATrp) sensörün tekrar kullanımı

4.11. Kan Örneği ile Kinetik Analizler

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

SPR temelli sistemlerde sıcaklık etkisi birkaç farklı şekilde görülebilir. İlk olarak, metal/örnek ara yüzeyine bitişik olarak bulunan hacimdeki etkin kırılma indisine duyarlı olan yüzey plazmonları örneğin sıcaklığa bağlı kırılma indisi değişiminden etkilenir. Örneğin çözücü kısmı en büyük sıcaklık bağımlılığı olan kısımdır. Örneğin sudaki 0,1°C lik sıcaklık değişimi 10^{-5} RIU lik değişime neden olur ki bu değer bugüne kadar SPR temelli cihazlar için rapor edilen tayin sınırına yakın ya da ondan daha büyüktür (Homola ve ark. 1999).

İkincisi , metal tabakasında meydana gelecek sıcaklık değişimleri yüzey plazmonlarının oluşumunu büyük ölçüde etkiler. Yüksek sıcaklıklarda yüzey plazmonları metaldeki

artan fonon-elektron saçılımı nedeniyle sönümlenebilir (Chiang ve ark. 2001). Sonuç genişlemiş bir SPR eğrisi ve dR/dn değerinde artan sıcaklık ile gözlenen azalmadır.

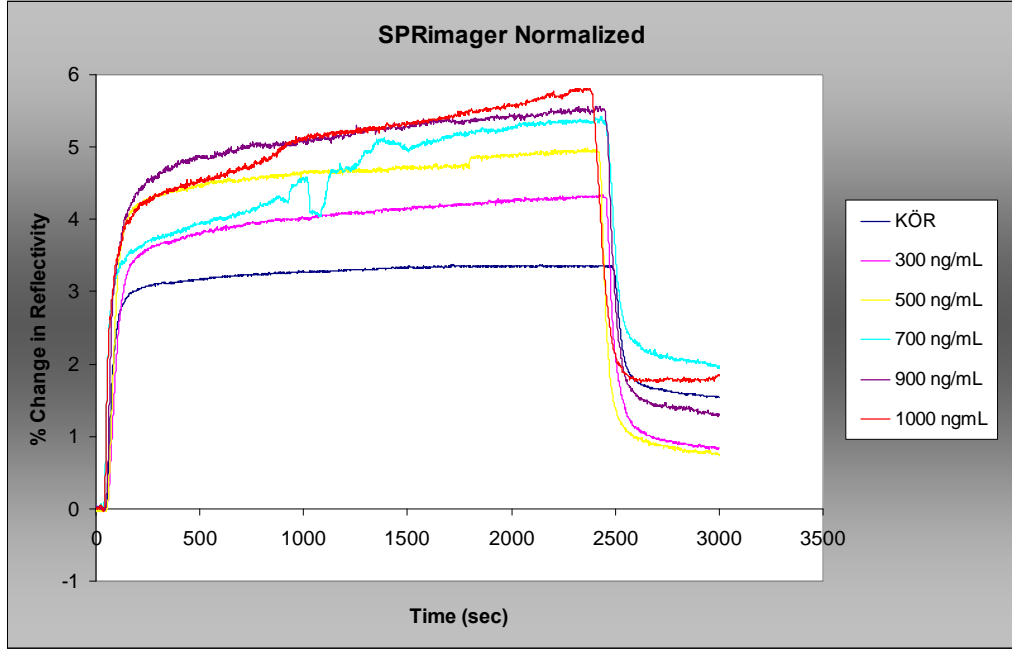
Üçüncüsü, sıcaklıktaki değişimler sistemin ışık kaynağı, dedektör cevabı ve sensör geometrisi gibi kritik bileşenleri de etkileyebilir. Son olarak ortam sıcaklığının değişmesi ilgilenilen bağlanma olayının hızını ve/veya etkinliğini etkileyebilir. Örneğin Zeder-Lutz ve arkadaşları (1997) antijen-antikor bağlanma olayında sıcaklığın 5-30°C olarak değişmesi ile assosiasyon hızının dissosiasyon hızına oranının 10 kat değiştiğini rapor etmişlerdir.

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

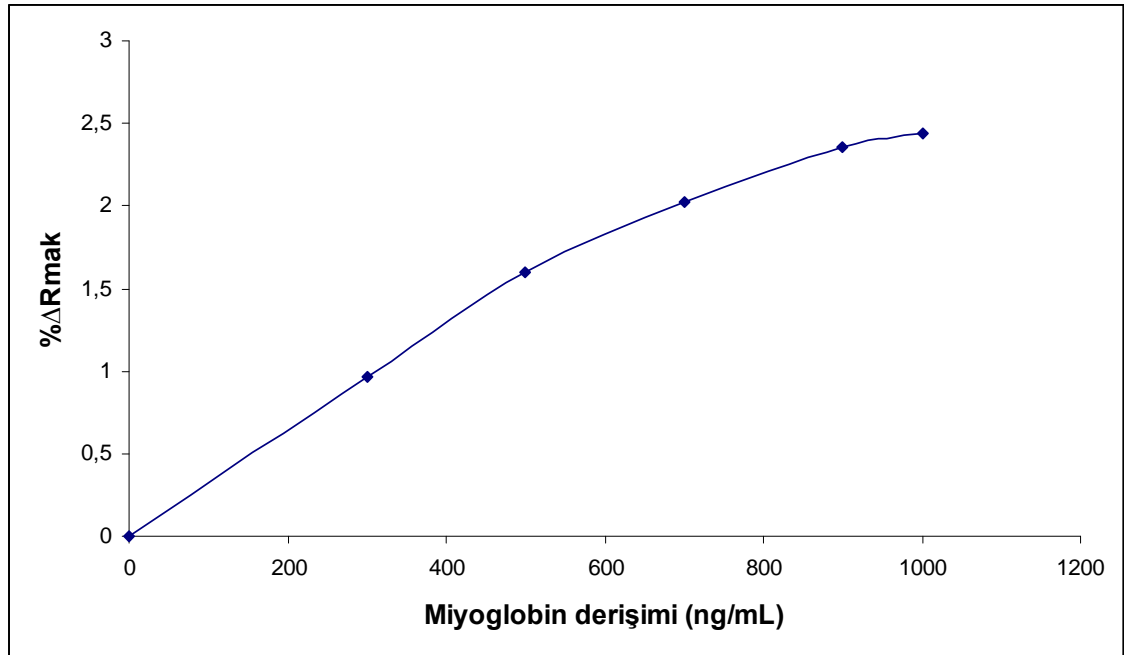
Sıcaklık değişiminin yanı sıra örnek bileşimindeki değişim kırılma indeksi değişimine neden olan diğer bir etmendir. Klinik bir tanı sistemi söz konusu olduğunda kompleks insan örneklerinin kırılma indisinde olabilecek doğal değişimler özellikle dikkat edilmesi gereken bir konudur. Kanın kırılma indisini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

Bu çalışmada kalp krizi şikayetiyle acil servise başvuran bir hastadan alınan kan örneğindeki miyogloblin derişimi hazırlanan poli(HEMA-MATrp) sensör ile tayin edildi. Kan örneğindeki miyogloblin miktarının tayininde standart katma yöntemi kullanıldı. Standart katma yönteminin kullanılması ile kan örneğinin içeriğinden kaynaklanan kırılma indisini etkisi ortadan kaldırılmıştır. Kan örneğindeki toplam seyrelme miktarı 1:15 olacak şekilde önce kör örnek, ardından da aynı seyrelme oranında, ilave miyogloblin derişimi 300; 500; 700; 900 ve 1000 ng/mL olacak şekilde kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan örnekler poli(HEMA-MATrp) sensör

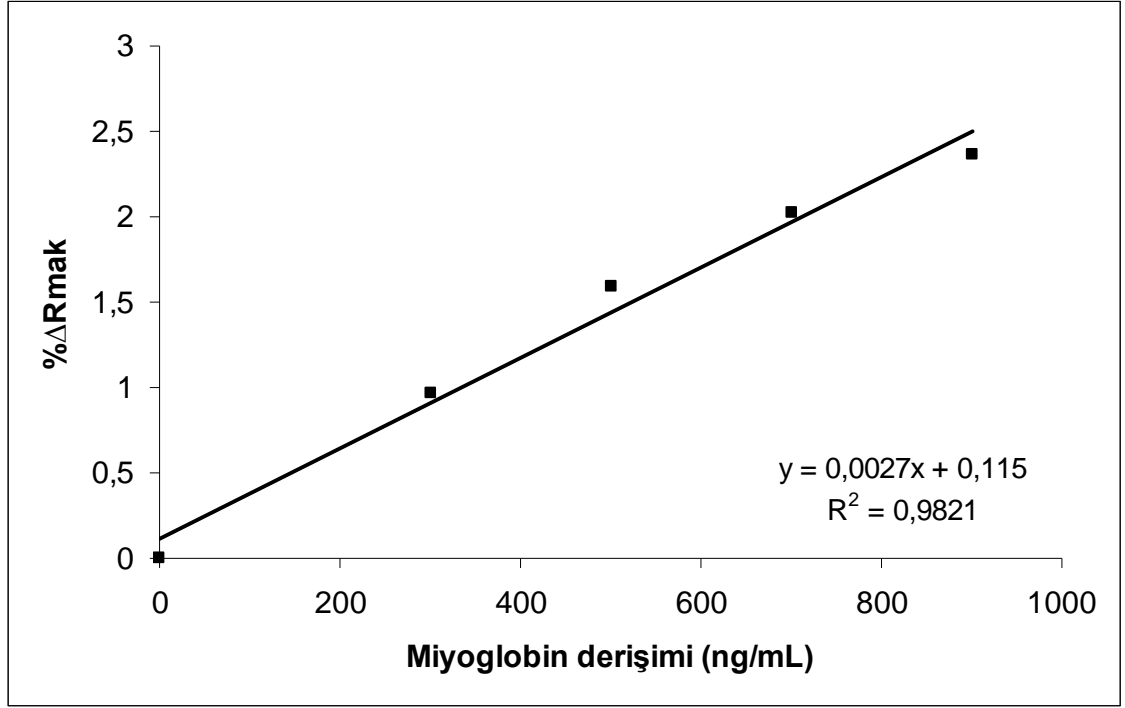
yüzeyine gönderilerek sensogramlar alındı. Elde edilen $\% \Delta R$ /zaman değişimleri Şekil 4.11.1 ve 'de görülmektedir.



Şekil 4.11.1. Kör örnek ve 300, 500, 700, 900, 1000 ng/mL miyoglobin derişimindeki kan örneklerinin poli(HEMA-MATrp) ile etkileştirilmesi ile elde edilen sensogram



Şekil 4.11.2. Standart katma yöntemi ile elde edilen miyoglobin derişimi-sinyal grafiği



Şekil 4.11.3. Standart katma yöntemi ile elde edilen miyoglobin derişimi / % ΔR grafiği

Şekil 4.11.2 ve 4.11.3’de miyoglobin derişimi ile %ΔR değerleri arasındaki ilişki gösterilmiştir. Görüldüğü gibi poli(HEMA-MATrp) sensör 100-900 ng/mL ilave miyoglobin derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Bu aralıktaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ($y=0,0027x+0,115$) ve doğrusallığı 0,9821 olarak hesaplanmıştır. Bu denklemden 1/15 oranında seyreltilmiş örnekteki miyoglobin derişimi 42,6 ng/mL, seyrelme yapılmamış başlangıç kan örneğindeki miyoglobin derişimi ise 639 ng/mL olarak belirlenmiştir. Aynı kan örneği için ELISA testi ile belirlenen miyoglobin derişimi ise $964,16 \pm 81,73$ ng/mL dir. Bu sonuç göstermektedir ki hazırlanan miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör kan örneği içerisindeki miyoglobin derişimini ELISA yöntemi ile karşılaştırıldığında % 66 doğrulukla tayin edebilmektedir.

5. SONUÇ

- MATrp monomeri, L-triptofan metil esterinin metakroil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir. Elde edilen monomer NMR ve FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir
- MATrp monomerinin kimyasal yapısının belirlenebilmesi için ¹H-NMR kullanılmıştır. MATrp monomerine ait karakteristik pikler şunlardır: **(1)** δ 8,22 (1H s, br, N-H), **(2)** 7,54-7,09 (4H aromatikler), **(3)** 6,98 (1H d, amid NH J=5,58), **(4)** 5,64 (1H, t, CH₂), **(5)** 5,32 (1H, t, CH₂) **(6)** 4,99 (1H, m, CH), **(7)** 3,38 (2H, dd, CH₂) **(8)** 6,34 (1H, d, 5'li halka, J=7,6), **(9)** 3,71 (3H, s, OCH₃), **(10)** 1,24 (3H, t, CH₃), (400 MHz, DMSO-d₆).
- MATrp monomerinin yapısının belirlenmesi için FTIR tekniği de kullanılmıştır. 3100-3000 cm⁻¹ aralığında aromatik C-H , 2952 ve 2853 cm⁻¹'de alifatik C-H gerilmelerinden kaynaklanan absorpsiyon bandları gözlenmektedir. 1734 cm⁻¹'de ester karbonil grubuna ait gerilme bandı, 1659 cm⁻¹'de ise amid karbonil grubuna ait gerilme bandı yer almaktadır. N-H gerilme titreşiminden kaynaklanan absorpsiyon bandı ise 3500 cm⁻¹ civarında ortaya çıkmıştır. FTIR ve NMR sonuçları monomerin başarıyla sentezlendiğini göstermiştir.
- SPR altın çip yüzeyinde poli(HEMA-MATrp) filmin hazırlanabilmesi için ilk olarak yüzey doymamış bağlar içeren allil merkaptan (CH₂=CH-CH₂-SH) ile kaplanmıştır. Yüzeye ait speküler reflektans IR spektrumunda C-H gerilme bölgesinde, 2930 cm⁻¹ ve 2857 cm⁻¹ de simetrik ve asimetrik C-H gerilme titreşimlerine ait bandlar açıkça görülmektedir. Ayrıca serbest alkanotiyolatlarda 2560 cm⁻¹ civarında gözlenen S-H gerilme titreşim bandı spektrumunda gözlenememiştir. Bu sonuç allil merkaptanın altın yüzeyine bağlandığını göstermektedir.
- Protein kalıbının hazırlanmasında kullanılacak cam yüzey temas açısı analizleri ile karakterize edilmiştir. Asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiş cam için temas açısı 44,7° ± 3,5 iken APTES ile modife edilmiş cam için bu değer 54,3° ± 3,2'ye yükselmiştir. Bu değişim APTES ile muamele sonucunda cam yüzeyinin daha hidrofobik bir karakter kazandığını göstermektedir. APTES ile kaplanmış

cam yüzey daha sonra glutaraldehid ile modifiye edilmiş ve temas açısı $65,8^\circ \pm 5,2$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre yüzey biraz daha hidrofobik hale gelmiştir. Çünkü glutaraldehid, APTES den gelen amin uçlarını imin oluşumuyla kapatmış ve içerdiği hidrokarbon zincirinden dolayı da hidrofobik özellik kazandırmıştır. Miyoglobinin kovalent olarak bağlandığı cam yüzeyinde ise temas açısı $67,3^\circ \pm 2,1$ olarak elde edilmiştir. Bu değişimler miyoglobin proteinin cam yüzeyine bağlandığını gösteren sonuçlardan biridir.

- Miyoglobinin cam yüzeyine immobilize edilmesi ile cam yüzeyinin morfolojisindeki değişimin ayrıntılı bir şekilde incelenebilmesi için APTES ve glutaraldehid ile modifiye edilmiş cam yüzeyin ve miyoglobin immobilize edilmiş cam yüzeyin AFM görüntüleri alınmıştır. APTES ve glutaraldehid modifikasyonu ile cam yüzeyinde oluşan kalınlık 1,5-2 nm iken, miyoglobinin cam yüzeyine immobilizasyonundan sonra yüzey morfolojisi tamamen değişmiş ve kalınlık 6-6,5 nm değerlerine yükselmiştir. Bu sonuç miyoglobinin cam yüzeyine başarıyla immobilize edildiğini göstermektedir.
- Hazırlanan poli(HEMA-MATrp) filmin karakterizasyonu için de FTIR-ATR tekniğinden yararlanılmıştır. Polimerik film sentezlendikten sonra altın yüzeyinde poli(HEMA-MATrp) polimerine ait absorpsiyon bandları oluşmuştur. 1715 cm^{-1} 'de ester karbonil grubu gerilmesine , 1662 cm^{-1} de amid karbonil grubu gerilmesine ait absorpsiyon bandları spektrumda açık şekilde görülmüştür. 3400 cm^{-1} bölgesinde, MATrp monomerinden gelen N-H ve yapıdaki O-H gruplarından kaynaklanan absorpsiyon bandı beraberce görülmektedir. 2955 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bandı ise polimerik yapı içerisinde tekrar eden alifatik C-H bağlarına ait gerilmelerden kaynaklanmaktadır.
- Poli(HEMA-MATrp) filmin başarıyla sentezlendiğini göstermek için ayrıca poli(HEMA-MATrp) filmin FTIR-ATR spektrumunu, sadece MATrp , HEMA ve EGDMA'ın başlatıcı varlığında tek başına polimerizasyonu ile hazırlanan poli(MATrp), poli(HEMA) ve poli(EGDMA) polimerlerinin FTIR-ATR spektrumları ile karşılaştırılmıştır. Poli(HEMA-MATrp) filme ait spektrum, poli(MATrp), poli(HEMA) ve poli(EGDMA) için elde edilen spektrumlardan farklıdır ve MATrp monomerine ait karakteristik bandlar göstermektedir. Bu

sonuç fonksiyonel monomer olan MATrp' ın HEMA ve EGDMA varlığında yapıya başarıyla dahil edildiğinin bir kanıtıdır.

- Sabit miktarda MATrp ve HEMA varlığında çapraz bağlayıcı (EGDMA) miktarının değiştirilmesi (1:1:1; 1:1:3; 1:1:5; 1:1:6) ile MIP ve NIP için elde edilen sinyal değerlerinde değişim gözlenmiştir. Baskılanmış poli(HEMA-MATrp) filmler için baskılanmamış filmlere göre daha yüksek % ΔR değerlerinin elde edilmesi miyoglobine özgü bağlanma bölgelerinin oluştuğunun bir göstergesidir. 1:1:5 karışım oranının 5,57 değerinde baskılama faktörü ile en uygun en uygun oran olduğu belirlenmiştir.
- Altın yüzey, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey, yüzeyinde miyoglobin baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) film hazırlanmış altın yüzeylerin ıslanabilirlik özelliklerinin incelenmesi amacıyla bu yüzeylerin su ve etilen glikol ile yaptıkları temas açıları ölçülmüş ve yüzey serbest enerjileri Owens, Wendt, Rabel ve Kaelble yaklaşımı kullanılarak hesaplanmıştır.
- Su ile yapılan temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi altın yüzeyin temas açısı değeri ($85,3^\circ \pm 4,9$), allil merkaptan modifikasyonu ile $71,1^\circ \pm 3,4$ 'e düşmüştür. Yüzeyin temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını ve altın kaplı yüzey plazmon rezonans çip yüzeyinin allil merkaptan ile kaplandığını göstermektedir. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzeyde gerçekleştirilen polimerizasyon sonucu temas açısı değeri $75,0^\circ \pm 4,8$ 'e yükselmiş ve yüzey serbest enerjisi $38,08 \text{ mN/m}$ 'ye düşmüştür. Miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) film durumunda temas açısının $75,0^\circ \pm 4,8$ değerine yükselmesi altın yüzeyinde poli(HEMA-MATrp) filmin başarıyla sentezlendiğini göstermiştir. Altın yüzey, allil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzey ve miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) altın yüzeyin morfolojik karakterizasyonu için AFM görüntüleri alınmıştır. Her bir yüzey için morfolojik değişimler incelendiğinde polimerizasyonun altın yüzeyinde başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.
- Elipsometri sonuçlarına göre hazırlanan film $12,85 \pm 1,5 \text{ nm}$ kalınlıktadır. Bu sonuç AFM sonuçları ile de örtüşmekte olup polimerik filmin altın yüzeyinde başarıyla hazırlandığını göstermektedir. Ayrıca hazırlanan sensör 50 nm 'den

daha düşük bir kalınlık değerine sahip olduğundan optik transdüser prensibi ile çalışan SPR sistemi ile büyük bir uyum göstereceği açıktır.

- SEM görüntüleri ile altın yüzeyin polimerik film ile kaplandığı kanıtlanmış ve polimerik filmin yüzey morfolojisi belirlenmiştir.
- Miyoglobın derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki incelenmiştir. Görüldüğü gibi miyoglobın derişimi arttıkça % ΔR değerleri artmaktadır. Yaklaşık 2500 ng/ml derişim değerinden sonra yüzeydeki aktif bölgelerin dolmasına bağlı olarak bu artış hızı azalmakta ve yaklaşık 7500 ng/mL değerinde dengeye ulaşılmaktadır. Bu derişimde elde edilen % ΔR değeri 4,33'tür.
- Hazırlanan poli(HEMA-MATrp) SPR sensör, 100-1000 ng/mL derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Bu aralıktaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi, $y=0,0025x+0,2402$ ve doğrusallığı 0,9741 olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan poli(HEMA-MATrp) sensör için elde edilen veriler kullanılarak tayin sınırı (LOD) 26,28 ng/mL ve tayin limiti (LOQ) 87,6 ng/mL olarak belirlenmiştir.
- Elde edilen verilerin Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich adsorpsiyon modellerine uygunluğu araştırıldı. $R^2 = 0,9971$ değeri ile en uygun adsorpsiyon modelinin Langmuir adsorpsiyon modeli olduğu belirlendi. Bu sonuç; hazırlanan baskılanmış sensör yüzeyindeki miyoglobın bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermiştir. Buradan hesaplanan ΔR_{maks} değeri deneysel değere (4,33 $\mu\text{g/ml}$) yakındır. Langmuir denkleminde hesaplanan K_A ve K_D değerleri sırasıyla 0,594 $\mu\text{g/mL}$ ve 1,681 mL/ μg olarak belirlenmiştir.
- Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün miyoglobine karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri 1000 ng/mL derişimindeki BSA, sitokrom c, lizozim ve miyoglobının tekli, ikili, üçlü ve dörtlü karışım çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün BSA ile herhangi bir etkileşime girmediği ve anlamlı bir sinyal vermediği (% $\Delta R= 0,06$) belirlenmiştir.
- Miyoglobın baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün sitokrom c'ye verdiği sensorgram sinyal değeri (% ΔR); 0,22, lizozime verdiği sinyal değeri (% ΔR); 0,35'tir. Aynı derişimdeki miyoglobın için elde edilen sinyal değeri (% ΔR) ise

2,35'tir. Bir başka deyişle; baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensör miyoglobini; sitokrom c'ye göre 10,68 kat, lizozime göre 6,71 kat daha duyarlı tayin edebilmektedir.

- Miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün baskılama seçiciliğini göstermek için miyoglobin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensör de hazırlanmıştır. Miyoglobin, BSA, sitokrom c ve lizozimin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar SPR sistemine gönderilmiştir. Miyoglobin baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensörün BSA ile herhangi bir etkileşime girmediği ve sinyal vermediği belirlenmiştir ($\Delta R_{maks} = 0,04$). Sitokrom c ve lizozim sinyal değerlerinin ise miyoglobin için alınan sinyal değerine yakın olduğu ($\Delta R_{sitokrom\ c} = 0,15$; $\Delta R_{lizozim} = 0,20$ ve $\Delta R_{miyoglobin} = 0,42$) belirlenmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) sensörler karşılaştırıldığında; miyoglobin baskılanmış poli(HEMA-MATrp) sensörün, miyoglobini sitokrom c'ye göre 3,81 kat, lizozime göre 3,19 kat seçicilikte tanıdığı belirlenmiştir.
- Sensör yüzeyinin rejenerasyonu için 1M etilen glikol kullanılmış ve yaklaşık 30 dakika içerisinde tüm rejenerasyon işlemleri başarıyla tamamlanmıştır. Ayrıca yüzey tekrarlanabilir bir şekilde tekrar tekrar kullanılmıştır. Hazırlanan poli(HEMA-MATrp) sensörün etkinliği miyoglobin düzeyi yüksek hasta kanı kullanılarak araştırılmıştır. 1:15 seyrelme oranındaki kan kullanılarak standart katma metodu ile kandaki miyoglobin düzeyi belirlenmiştir. ELISA yöntemi standart referans kabul edildiğinde hazırlanan sensör kandaki miyoglobin derişimini %66 doğrulukla tayin etmiştir.
- Dört kez tekrar kullanımda yüzey başarıyla rejenere edilebilmiş ve bağlanma kapasitesinde bir kayıp olmamıştır. Hazırlanan sensörün 4 ay süreyle oda sıcaklığında bekletilmesinin ardından miyoglobin bağlama kapasitesinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

KAYNAKLAR

Andresson, L., Sellergren, B., Mosbach, K. 1984. Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymer. *Tetrahedron Lett.*, 25: 5211-5214.

Andersson, L., Mandenius, C. F., Mosbach, K. 1988. Studies on guest selective molecular recognition on an octadecyl silylated silicon surface using ellipsometry. *Tetrahedron Lett.*, 29:5437-5440.

Andersson, L.I., Miyabayashi, A., O'Shannessy, D.J., Mosbach, K. 1990. Enantiomeric resolution of amino acid derivatives on molecularly imprinted polymers as monitored by potentiometric measurements. *J. Chromatogr. A*, 516: 323-331.

Anderson, L., Muller, R., Vlatakis, G., Mosbach, K. 1995. Mimics of the binding sites of opioid receptors obtained by molecular imprinting of enkephalin and morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92(11):4788-4792.

Ansell, R.J., Ramstrom, O., Mosbach, K. 1996. Towards Artificial Antibodies Prepared by Molecular Imprinting. *Clin. Chem.*, 42(9): 1506-1512.

Arshady, R., Mosbach, K. 1981. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Makromol. Chem.-Rapid.*, 182: 687-692.

Avseenko, N.V., Morozova, T.Y., Ataulakhanov, F.I. 2001. Immobilization of proteins in immunochemical microarrays fabricated by electrospray deposition. *Anal. Chem.*, 73: 6047-6052.

Baltus, R.E., Carmon, K.S., Luck, L.A. 2007. Quartz Crystal Microbalance (QCM) with immobilised protein receptors: comparison of response to ligand binding for direct protein immobilisation and protein attachment via disulfide linker. *Langmuir*, 23:3880-3883.

Banerji, S., Peng, W., Kim, Y.C., Booksh, K.S. 2006. In *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* Boston, MA; p: 6380.

Bereli, N., Andaç, M., Baydemir G., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli A. 2008. Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels. *J. Chromatogr. A.*, 1190: 18-26.

Bergman, M.N.2005. Molecularly imprinted polyacrylamide polymers and copolymers with specific recognition for serum proteins. *Ph.D. Thesis.* Faculty of the graduate school of the university of Texas, Austin, USA.

Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. 2006. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb. Technol.*, 39: 877-882.

Britschgi, M., Von Greyerz, S., Burkhart, C., Pichler, W. J. 2003. Molecular Aspects of Drug Recognition by Specific T Cells. *Current Drug Targets*, 4 (1): 1-11.

Brogan, G.X., Friedman, S., McCuskey C., Cooling D.S., Berrutti, L., Thode, H.C., Bock, J.L., 1994. Evaluation of a New Rapid Quantitative Immunoassay for Serum Myoglobin Versus CK-MB for Ruling Out Acute Myocardial Infarction in the Emergency Department.,*Ann.Emerg. Med.*, 24: 665-671.

Bossi, A., Piletsky, S.A., Piletska, E.V., Righetti, P.G, Turner, A.P.F . 2001. Surface-grafted molecularly imprinted polymers for protein recognition. *Anal. Chem.*, 73(21): 5281-5286.

Burow, N., Minoura, N. 1996. Molecular imprinting: synthesis of polymer particles with antibody-like binding characteristics for glucose oxidase. *Biochem. Biophys. Res.Commun.*, 227(2): 419-422.

Califf, R.M., Ohman, E.M. 1992. The diagnosis of acute myocardial infarction. *Chest.*,101(4 suppl):106-115.

Cao, L., Zhou, X.C., Li, S.F.Y.2001. Enantioselective sensor based on microgravimetric quartz crystal microbalance with molecularly imprinted polymer film. *Analyst.* 126: 184–188.

Char, D.M., Israel, E., Ladenson, J. 1998. Early laboratory indicators of acute myocardial infarction. *Emerg. Med. Clinics. North. Am.*, 16: 519-539.

Chen, G. H., Guan, Z. B., Chen, C. T., Fu, L.T., Sundaresan, V., Arnold, F. H. 1997. A glucose sensing polymer. *Nat. Biotechnol.*, 15: 354-357.

Chen, B. N., Piletsky, S., Turner, A. P. F. 2002. Molecular Recognition: Design of "Keys". *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 5 (6): 409-427.

Chiang, H., Wang, Y., Leung, P., Tse, W. 2001. A theoretical model for the temperature-dependent sensitivity of the optical sensor based on surface plasmon resonance*Opt. Commun.*, 188: 283-289.

Choi, H. J., Kimb, N. H., Chung, B. H., Seong, G. H. 2005. Micropatterning of biomolecules on glass surfaces modified with various functional groups using photoactivatable biotin. *Anal. Biochem.*, 347: 60-66.

Chou, P.C., Rick, J., Chou, T.C. 2005. C-reactive protein thin-film molecularly imprinted polymers formed using a micro-contact approach. *Analytica Chimica Acta*, 542: 20-25.

Chou, T.C., John Rick, J., Yu-Ching Weng, Y.C. 2007. Nanocavity Protein Biosensor - Fabricated by Molecular Imprinting. Proceedings of the 7th IEEE International Conference on Nanotechnology, 2 – 5 August, 2005, Hong Kong, Japan.

Christenson, R.H., Azzazy, H.M., 1998. Biochemical markers of the acute coronary syndromes. *Clin. Chem.*, 44(8): 1855-1864.

Christiaens, P., Vermeeren, V., Wenmackers, S., Daenen, M., Haenen, K., Nesladek, M., vandeVen, M., Ameloot, M., Michiels, L., Wagner, P. 2006. EDC-mediated DNA attachment to nanocrystalline CVD diamond films. *Biosens. Bioelectron.*, 22: 170-177.

Cooper, M. 2002. Optical biosensors in drug discovery. *Nature Rev.*, 1: 515-528.

Cormack, PAG., Elorza, A.Z. 2004. Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterization. *J Chromatogr. B*, 804:174-182.

Cudic, P., Behenna, D.C., Kranz, J. K., Kruger, R.G., Wand, A.J., Veklich, Y.I., Weisel, J.W., McCafferty, D.G. 2002. Functional Analysis of the Lipoglycopeptide Antibiotic Ramoplanin. *Chem. Biol.*, 9(8): 897-906.

Cunliffe, D., Kirby, A., Alexander, C. 2005. Molecularly imprinted drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57: 1836-1853.

D’Orazio, P. 2003. Biosensors in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta.*, 334: 41-69.

D’Souza, S.F., Godbole, S.S. 2002. Immobilization of invertase on rice husks using polyethyleneimine. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 52: 59-62.

Derazshamshir, A., Baydemir, G., Andac, M., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A. 2010. Molecularly imprinted pHEMA-based cryogel for depletion of hemoglobin from human blood. *Macromol. Chem. Phys.*, 211: 657-668.

Devanathan, S., Salamon, Z., Nagar, A., Narang, S., Schleich, D., Darman, P., Hruby, V., Tollin, G. 2005. Subpicomolar sensing of delta-opioid receptor ligands by molecular-imprinted polymers. *Anal. Chem.*, 77: 2569-2574

Dickert, F. L., Forth, P., Lieberzeit, P., Tortschanoff, M. 1998. Molecular imprinting in chemical sensing-Detection of aromatic and halogenated hydrocarbons as well as polar solvent vapors. *Fresenius’J. Anal. Chem.*, 360: 759-762.

Dickert, F. L., Tortschanoff, M., Bulst, W. E., Fischerauer, G. 1999. Molecularly Imprinted Sensor Layers for the Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water. *Anal. Chem.*, 71:4559-4563.

Dickert, F.L., Hayden, O. 2002. Bioimprinting of Polymers and Sol-Gel Phases “Selective Detection of Yeasts with Imprinted Polymers”. *Anal. Chem.*, 74(6):1302-1306.

Duan, L., He, Q., Yan, X., Cui, Y., Wang, K., Li, J. 2007. Hemoglobin protein hollow shells fabricated through covalent layer-by-layer technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354: 357-362.

Frederix, F., Bonroy, K., Reekmans, G., Laureyn, W., Campitelli, A., Abramov, M.A., Dehaen, W., Maes, G. 2004. Reduced nonspecific adsorption on covalently immobilized protein surfaces using poly(ethylene oxide) containing blocking agents. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 58: 67-74.

Gan, S.H., Yang, P., Yang, W.T. 2009. Photoactivation of alkyl C-H and silanization: a simple and general route to prepare high-density primary amines on inert polymer surfaces for protein immobilization. *Biomacromolecules*, 10: 1238-1243.

Gill, I., Ballesteros, A. 2000a. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 2): Non sol-gel protein-polymer biocomposites. *Trends Biotechnol.*, 18: 469-479.

Gill, I., Ballesteros, A. 2000b. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulation biologicals. *Trends Biotechnol.*, 18: 282-296.

Gill, I. 2001. Bio-doped nanocomposite polymers: Sol-gel bioencapsulates. *Chem. Mater.*, 13: 3404-3421.

Gitlin, G., Bayer, E.A., Wilchek, M. 1987. Studies on the Biotin-Binding Site of Avidin - Lysine Residues Involved in the Active-Site. *Biochem. J.*, 242 (3): 923-926.

Gitlin, G., Bayer, E. A., Wilchek, M. 1988. Studies on the Biotin-Binding Site of Avidin - Tryptophan Residues Involved in the Active-Site. *Biochem. J.*, 250(1): 291-294.

Glad, M., Norrlov, O., Sellergren, B., Siegbahn, N., and Mosbach, K. 1985. Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica. *J. Chromatogr.*, 347(1): 11-23.

Glaser, R.W. 1993. Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: a two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics. *Analyt. Biochem.*, 213 (1):152-161.

Graf, N., Yegen, E., Lippitz, A., Treu, D., Wirth, T., Unger, W.E.S. 2008. Optimization of cleaning and amino-silanization protocols for Si wafers to be used as platforms for biochip microarrays by surface analysis (XPS, ToF-SIMS and NEXAFS spectroscopy). *Surf. Interface Anal.*, 40: 180-183.

Guan, G., Liu, B., Wang, Z., Zhang, Z. 2008. Imprinting of molecular recognition sites on nanostructures and its applications in chemosensors. *Sensors*, 8:8291-8320.

Guo, T. Y., Xia, Y. Q., Hao, G. J., Song, M. D., Zhang, B.H. 2004. Adsorptive separation of hemoglobin by molecularly imprinted polymers. *Biomaterials*, 25: 5905-5912.

- Guo, T.Y., Xia, Y.Q., Wang, J., Song, M.D., Zhang, B.H. 2005.** Chitosan beads as molecularly imprinted polymer matrix for selective separation of proteins. *Biomaterials*, 26: 5737-5745.
- Hall, A.J., Emgenbroich, M., Sellergren, B. 2005.** Imprinted polymers. *Top. Curr. Chem.*, 249: 317-349.
- Haupt, K., Mosbach, K. 1998.** Plastic Antibodies: Developments and Applications. *Trends. Biotechnol.*, 16:(11), 468-475.
- Haupt, K., Noworyta, K., Kutner, W. 1999a.** Imprinted polymers in chemical and biological sensing. *Anal. Commun.*, 36: 391-393.
- Haupt, K., Noworyta, K., Kutner, W. 1999b.** Imprinted polymer-based enantioselective acoustic sensor using a quartz crystal microbalance. *Anal Commun.*, 36: 391-393.
- Haupt, K., Mosbach, K. 2000.** Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chem. Rev.*, 100, 2495-2504.
- Haupt, K., Belmont, A.S. 2007.** Handbook of Biosensors and biochips: Molecularly imprinted polymers as recognition elements in sensors. Ed.: John Wiley and Sons,Ltd. Chapter 14 , pp: 8-9.
- Hawkins, D.M., Trache, A., Ellis, E.A., Stevenson, A., Holzenburg, A., Meininger, G.A., Reddy, S.M. 2006.** Quantification and confocal imaging of protein specific molecularly imprinted polymers. *Biomacromolecules* 7, 2560-2564.
- Hedborg, E., Winqvist, F., Lundstrom, I., Andersson, L.I., Mosbach, K. 1993.** *Sens. Actuators A*, 796: 36-38.
- Hillberg, A.L., Brain, K.R., Allender, C.J. 2005.** Molecular imprinted polymer sensors: implications for therapeutics. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 57: 1875-1889.
- Hirayama, K., Burow, M., Morikawa, Y., Minoura, N. 1998.** Synthesis of polymer-coated silica particles with specific recognition sites for glucose oxidase by the molecular imprinting technique. *Chem. Lett.*, 27(8): 731-732.
- Hirayama, K., Sakai, Y., Kameoka, K. 2001.** Synthesis of polymer particles with specific lysozyme recognition sites by a molecular imprinting technique. *J. Appl. Polym. Sci.*, 81(14):3378-3387.
- Hjerten, S., Liao, J.L., Nakazato, K., Wang, Y., Zamaratskaia, G., Zhang, H.X. 1997.** Gels mimicking antibodies in their selective recognition of proteins. *Chromatographia*, 44:227-234.
- Hock , B. 1997.** Antibodies for immunosensors:a review. *Anal. Chim. Acta.* 347:177-186.

- Holthoff, E.L., Bright, F.V. 2007.** Molecularly templated materials in chemical sensing. *Anal. Chim. Acta.*, 594: 147-161.
- Homola, J., Yee, S., Gauglitz, G. 1999.** Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens. Actuators B*, 54: 3-15.
- Hostetler, M.J., Stokes, J.J., Murray, R.W. 1996.** Infrared spectroscopy of three-dimensional self-assembled monolayers: N-alkanethiolate monolayers on gold cluster compounds. *Langmuir.*, 12:3604-3612.
- Huang, J., Zhang, J., Zheng, S. 2005.** Template imprinting amphoteric polymer for the recognition of proteins. *J. Appl. Polym.Sci.*, 95: 358-361.
- Huang, S.C., Lee, G.B., Chien, F.C., Chen, S.J., Chen, W.J., Yang, M.C. 2006.** A microfluidic system with integrated molecular imprinting polymer films for surface plasmon resonance detection. *J. Micromech. Microeng.*, 16: 1251-1257.
- Jakusch, M., Janotta, M., Mizaikoff, B., Mosbach, K., Haupt, K. 1999.** Molecularly imprinted polymers and infrared evanescent wave spectroscopy. A chemical sensors approach. *Anal. Chem.*, 71: 4786-4791.
- Jimenez, R., Salazar, G., Baldrige, K.K., Romesberg, F.E. 2003.** Flexibility and Molecular Recognition in the Immune System. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(1): 92-97.
- Kandimalla, V.B., Ju, H. 2004.** Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry. *Anal.Bioanal.Chem.*, 380: 587-605.
- Karmalkar, R.N., Kulkarni, M.G., Mashelkar, R.A. 1996.** Molecularly imprinted hydrogels exhibit chymotrypsin-like activity. *Macromolecules*, 29: 1366-1368.
- Katz, A., Davis, M.E. 2000.** Molecular imprinting of bulk, microporous silica, *Nature*, 403 (6767), 286-289.
- Keffer, J.H. 1996.** Myocardial markers of injury. Evolution and insights. *Am. J. Clin. Pathol.*, 105:305-320.
- Kempe, M., Glad, M., Mosbach, K. 1995.** An approach towards surface imprinting using the enzyme ribonuclease A. *Journal of Molecular Recognition*, 8: 35-39.
- Kempe, M., Mosbach, K. 1995.** Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins on Molecularly Imprinted Stationary Phases. *J Chrom. A*, 691(1/2): 317-323.
- Kilpatrick, W.S., Wosornu, J.B., McGuines, J.B., Glen, A.C.A. 1993.** Early diagnosis of acute myocardial infarction: CK-MB and myoglobin compared. *Ann.Clin.Chem.*, 30: 435-438.

Kind, M., Woll, C. 2009. Organic surfaces exposed by self-assembled organothiol monolayers: Preparation, characterization, and application. *Progress in Surface Science.*,84:230-278.

Koesslinger, C., Uttenthaler, E., Drost, S., Aberi, F., Wolf, H., Brink, K., Stanglmaier, A., Sackman, E. 1995. Comparison of the QCM and the SPR method for surface studies and immunological applications. *Sens. Actuators B Chem.*, 24/25: 107-112.

Kretschmann, E., Raether, H. 1968. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. *Z. Naturforsch.*, 23A: 2135–2136.

Kriz, D., Mosbach, K. 1995. Competitive Amperometric Morphine Sensor Based on an Agarose Immobilised Molecularly Imprinted Polymer. *Anal. Chim. Acta*, 300: 71-75.

Kroger, S., Turner, A.P.F., Mosbach, K., Haupt, K. 1999. Imprinted polymer-based sensor system for herbicides using differential-pulse voltammetry on screen-printed electrodes. *Anal. Chem.*, 71: 3698-3702.

Kugimiya, A., Takeuchi, T. 2001. Surface plasmon resonance sensor using molecularly imprinted polymer for detection of sialic acid. *Biosens. Bioelectron.*, 16: 1059-1062.

Laricchia-Robbio, L., Revoltella, R.P. 2004. Comparison between the surface plasmon resonance (SPR) and the quartz crystal microbalance (QCM) method in a structural analysis of human endothelin-1. *Biosens. Bioelectron.*, 19:1753-1758.

Lai, E.P.C., Fafara, A., Vandernoot, V.A., Kono, M., Polsky, B. 1998. Surface Plasmon Resonance Sensors using Molecularly Imprinted Polymers for Sorbent Assay of Theophylline, Caffeine and Xanthine. *Can. J. Chem.*, 76: 265-273.

Lavine, B.K., Westover, D.J., Kaval, N., Mirjankar, N., Oxenford, L., Mwangi, G.K. 2007. Swellable molecularly imprinted polyN-(N-propyl)acrylamide particles for detection of emerging organic contaminants using surface plasmon resonance spectroscopy. *Talanta*, 72:1042-1048.

Lee, T.H., Juarez, G., Cook, E.F. 1991. Ruling out acute myocardial infarction. A prospective multicenter validation of a 12-hour strategy for patients at low risk. *N. Engl. J. Med.*, 324: 1239-1246.

Lee, K.H., Su, Y.D., Chen, S.J., Lee, G.B. 2006. In *Proceedings of the 19th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) Istanbul*, p 430.

Levi, R., McNiven, S., Piletsky, S. A., Cheong, S. H., Yano, K., Karube, I. 1997. Optical Detection of Chloramphenicol Using Molecularly Imprinted Polymers *Anal. Chem.*, 69: 2017-2021.

- Li, P., Huang, Y., Hu, J., Yuan, C., Lin, B. 2002.** Surface Plasmon Resonance Studies on Molecular Imprinting. *Sensors*, **2(1)**: 35-40.
- Li, X. Husson, S.M. 2006a.** Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: A surface plasmon resonance study *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 336-348.
- Li, X., Husson, S.M. 2006b.** Two-Dimensional Molecular Imprinting Approach to Produce Optical Biosensor Recognition Elements. *Langmuir*, **22**, 9658-9663.
- Li, Y., Yang, H.H., You, Q.H., Zhuang, Z.X., and Wang, X.R. 2006c.** Protein recognition via surface molecularly imprinted polymer nanowires. *Anal. Chem.*, **78** (1): 317.
- Liao, J.L., Wang, Y., Hjerten, S. 1996.** Novel support with artificially created recognition for the selective removal of proteins and for affinity chromatography. *Chromatographia*, **42**:259-262.
- Lin, L.P., Huang, L.S., Lin, C.W., Lee, C.K., Chen, J.L., Hsu, S.M., Lin, S. 2005.** Determination of binding constant of DNA-binding drug to target DNA by surface plasmon resonance biosensor technology. *Current Drug Target*, **5**: 61-72.
- Lin, H.Y., Hsu, C.Y., Thomas, J.L., Wang, S.E., Chen, H.C., Chou, T.C. 2006.** The micro-contact imprinting of proteins: the effect of cross-linking monomers for lysozyme, ribonuclease A and myoglobin. *Biosensors & Bioelectronics*, **15**: 534-543.
- Lin, H.Y., Rick, J., Chou, T.C. 2007.** Optimising the formulation of a myoglobin molecularly imprinted thin-film polymer-formed using a micro-contact imprinting method. *Biosensors & Bioelectronics*, **22**: 3293-3301.
- Ling, T.R, Yau, Z.S., Tasi, Y.C., Chou, T.C., Liu, C.C. 2005.** Size-selective recognition of catecholamines by molecular imprinting on silica–alumina gel. *Biosens Bioelectron.*, **21**: 901–907.
- Liu, K., Wei, W.Z., Zeng, J.X., Liu, X.Y., Gao, Y.P. 2006a.** Application of a novel electrosynthesized polydopamine-imprinted film to the capacitive sensing of nicotine. *Anal Bioanalyt Chem.*, **385**: 724–729.
- Liu, F., Liu, X., Ng, S.C., Chan, H.S.O. 2006b.** Enantioselective molecular imprinting polymer coated QCM for the recognition of L-tryptophan. *Sens Actuators B Chem.*, **113**: 234–240.
- Lotierzo, M., Henry, O.Y.F., Piletsky, S., Tothill, I., Cullen, D., Kania, M., Hock, B., Turner, A.P.F. 2004.** Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer. *Biosens. Bioelectron.*, **20**: 145-152.

- Luppa, P.B., Sokloll, L.J., Chan, D.W. 2001.** Immunosensors-principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta.*, 314: 1-26.
- Lu, S., Cheng, G., Pang, X. 2006.** Protein-imprinted soft-wet gel composite microspheres with magnetic susceptibility II. Characteristics. *J. Appl. Polym. Sci.*, 99: 2401–2407
- Lu, Z., Li, C.M., Z, Q., Bao, Q., Cui, X. 2007.** Covalently linked DNA/protein multilayered film for controlled DNA release. *J. Coll. Inter. Sci.*, 314: 80-88.
- Malitesta, C., Losito, I., Zambonin, P.G. 1999.** Molecularly imprinted electrosynthesized polymers: new materials for biomimetic sensors. *Anal. Chem.*, 71, 1366-1370.
- Mallik, S., Jhonson, R.D., Arnold, F.H. 1994a.** Synthetic bismetal ion receptors for bis-imidazole protein analogs. *Journal of The American Chemical Society* 116: 8902-8911.
- Mallik, S., Plunkett, S.D., Dhal, P.K., Johnson, R.D., Pack, D., Shnek, D., Arnold, F.H. 1994b.** Towards materials for the specific recognition and separation of proteins. *New Journal of Chemistry* 18: 299-304.
- Matsui, J., Akamatsu, K., Hara, N., Miyoshi, D., Nawafune, H., Tamaki, K., Sugimoto, N. 2005.** SPR Sensor Chip for Detection of Small Molecules Using Molecularly Imprinted Polymer with Embedded Gold Nanoparticles *Anal. Chem.*, 77: 4282-4285.
- Matsunaga, T., Takeuchi, T. 2006.** Crystallized protein-imprinted polymer chips. *Chem Lett*;35:1030–1031.
- Matsunaga, T., Hishiya, T., Takeuchi, T. 2007.** Surface plasmon resonance sensor for lysozyme based on molecularly imprinted thin films. *Anal. Chim. Acta*, 591: 63-67.
- McCullough PA, Nowak RM, Foreback C. 2002.** Performance of multiple cardiac biomarkers measured in the emergency department in patients with chronic kidney disease and chest pain. *Acad Emerg Med.*, 9:1389-1396.
- McGlennen, R.C. 2001.** Miniaturization technologies for molecular diagnostics. *Clin. Chem.*, 47:393-402.
- Mirsky, V.M., Hirsch, T., Piletsky, S.A., Wolfbeis, O.S. 1999.** Spreader-bar approach to molecular architecture: formation of artificial chemo-receptors. *Angewandte Chemie (International ed. In English) Links*, 38: 1108-1110.
- Morgan, C.L., Newman, D.J., Price, C.P. 1996.** Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine, *Clin. Chem.*, 42: 193-209.
- Mosbach, K., Ramstrom, O. 1996.** The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology. *Bio/Technology*, 14(2): 163-170.

Nathalie, L., Christopher, J.A., Keith, R.B. 2004. Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays. *Anal. Chim. Acta*, 510: 139-145.

Nicholls, I.A., Rosengren, J.P. 2002. Molecular imprinting of surfaces. *Bioseparations*, 10: 301-305.

Nishino, H., Huang, C.S., Shea, K.J. 2006. Selective protein capture by epitope imprinting. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45(15): 2392-2396.

O'Mahony, J., Molinelli, A., Nolan, K., Smyth, M.R., Mizaikoff, B. 2004. Anatomy of a successful imprint: analysing the recognition mechanisms of a molecularly imprinted polymer for quercetin. *Biosens. Bioelectron.*, 2:1383–1392

O'Regan, T.M., O'Riordan, L.J., Pravda, M., O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G. 2002. Direct detection of myoglobin in whole blood using a disposable amperometric immunosensor. *Anal. Chim. Acta.*, 460: 141-150.

Odabaşı, M., Say, R., Denizli, A. 2007. Molecular imprinted particles for lysozyme purification. *Mater. Sci. & Engin. C*, 27: 90–99.

Otto, A. 1968. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z. Phys.*, 216: 398-410.

Ou, S.H., Wu, M.C., Chou, T.C., Liu, C.C. 2004. Polyacrylamide gels with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of lysozyme. *Anal. Chim. Acta*, 504:163-166.

Özcan, A.A., Say, R., Denizli, A., Ersöz, A. 2006. L-histidine imprinted synthetic receptor for biochromatography applications. *Anal. Chem.* 78: 7253–7258.

Panasyuk, T. L., Mirsky, V. M., Piletsky, S. A., Wolfbeis, O. S. 1999. Electropolymerized molecularly imprinted polymers as receptor layers in capacitive chemical sensor. *Anal. Chem.*, 71: 4609-4613.

Pang, X., Cheng, G., Li, R., Lu, S., Zhang, Y. 2005. Bovine serum albumin-imprinted polyacrylamide gel beads prepared via inverse-phase seed suspension polymerization. *Anal. Chim. Acta*, 550: 13–17

Pang, X., Cheng, G., Lu, S., Lang, E. 2006a. Synthesis of polyacrylamide gel beads with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of bovine serum albumin. *Anal. Bioanal. Chem.*, 384: 225–230

Pang, X., Cheng, G., Zhanga, Y., Lu, S. 2006b. Soft-wet polyacrylamide gel beads with the imprinting of bovine serum albumin. *React. & Func. Polym.*, 66: 1182–1188

Parmpi, P., Kofinas, P. 2004. Biomimetic glucose recognition using molecularly imprinted polymer hydrogels. *Biomaterials* , 25(10):1969-1973.

Pauling, L. 1940. A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies. *J. Am. Chem. Soc.*, 62: 2645-2655.

Peppas, N.A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J.H., Zhang, J. 2000. Physiocochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2: 9-29.

Peppas, N. A. 2002. Intelligent biomaterials in protein delivery, molecular imprinting and micropatterning. *Proc. Controlled Release Soc.*, 29: 162-163.

Percival, C.J., Stanley, S., Galle, M., Braithwaite, A., Newton, M.I., McHale, G., Hayes, W. 2001. Molecular-imprinted, polymer-coated quartz crystal microbalances for the detection of terpenes. *Anal Chem.*, 73: 4225–4228.

Percival, C.J., Stanley, S., Braithwaite, A., Newton, M.I., McHale, G. 2002. Molecular imprinted polymer coated QCM for the detection of nandrolone. *Analyst*, 127: 1024–1026.

Peter, C., Meusel, M., Grawe, F., Katerkamp, A., Cammann, K., Borchers, T. 2001. Optical DNA-sensor chip for real-time detection of hybridisation events. *Fresenius J Anal Chem.*, 371:120-127.

Piacham, T., Josell, A., Arwin, H., Prachayasittikul, V., Ye, L. 2005. Molecularly imprinted polymer thin films on quartz crystal microbalance using a surface bound photo-radical initiator. *Anal Chim Acta.*, 536: 191–196.

Piletsky, S.A., Piletska, E.V., Bossi, A., Karim, K., Lowe, P., Turner, A.P.F. 2001. Substitution of antibodies and receptors with molecularly imprinted polymers in enzyme-linked and fluorescent assays. *Biosensors & Bioelectronics*, 16: 701-707.

Piletsky, S.A., Turner, A.P.F. 2002. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. *Electroanalysis*, 14: 317-323.

Piletsky, S.A., Turner W.N., Laitenberger, P. 2006. Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics-Future potential and existing problems. *Medical Engineering & Physics.*, 28: 971-977.

Pugliese, L., Coda, A., Malcovati, M., Bolognesi, M. 1993. 3-Dimensional Structure of the Tetragonal Crystal Form of Egg-White Avidin in Its Functional Complex with Biotin at 2.7-Angstrom Resolution. *J. Mol. Biol.*, 231(3): 698-710.

Qin, M., Hou, S., Wang, L.K., Feng, X.Z., Wang, R., Yang, Y.B., Wang, C., Yu, L., Shao, B., Qiao, M.Q. 2007. Two methods for glass surface modification and their application in protein immobilization. *Colloids Surf. B.*, 60: 243–249.

Rachkov, A., Minoura, N. 2000. Recognition of oxytocin and oxytocin-related peptides in aqueous media using a molecularly imprinted polymer synthesised by the epitope approach. *Journal of Chromatography A*, 889: 111-118.

Rachkov, A., Minoura, N. 2001. Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Biochimica and Biophysica Acta. Protein Structure and Molecular Enzimology*, 1544: 255-266.

Rachkov, A., Hu, M.J., Bulgarevich, E. 2004. Molecularly imprinted polymers prepared in aqueous solution selective for [Sar(1),Ala(8)]angiotensin II. *Analytica Chimica Acta*, 504: 191-197.

Raitman, O.A., Arslanov, V.V., Pogorelova, S.P., Kharitonov, A.B. 2003. Molecularly imprinted polymer matrices for analysis of the cofactor NADH: a surface plasmon resonance study. *Dokl. Phys. Chem.*, 392: 256-258.

Raitman, O.A., Chegel, V.I., Kharitonov, A.B., Zayats, M., Katz, E., Willner, I. 2004. Analysis of NAD(P)⁺ and NAD(P)H cofactors by means of imprinted polymers associated with Au surfaces: A surface plasmon resonance study. *Anal. Chim. Acta*, 504: 101-111.

Ramanavicius, A., Herberf, F.W., Hutschenreiter, S., Zimmermann, B., Lapenaite, I., Kausaite, A., Finkelsteinas, A. 2005. Biomedical application of surface plasmon resonance biosensor. *Acta Medica Lituanica*, 12:1-9.

Ramstrom, O., Ye, L., Mosbach, K. 1996. Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting. *Chem. Biol.*, 3: 471-477.

Rick, J., Chou, T.C. 2005. Imprinting unique motifs formed from protein-protein associations. *Analytica Chimica Acta*, 542: 26-31.

Rick, J., and Chou, T.C. 2006. Using protein templates to direct the formation of thin-film polymer surfaces. *Biosens. Bioelectron.*, 22: 544-549.

Sallacan, N., Zayats, M., Bourenko, T., Kharitonov, A.B., Willner, I. 2002. Imprinting of nucleotide and monosaccharide recognition sites in acrylamidephenylboronic acid-acrylamide copolymer membranes associated with electronic transducers. *Anal Chem.*, 74: 702-712.

Schlehuber, S., Beste, G., Skerra, A. 2000. A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digohigenin. *J. Mol. Biol.*, 297:1105-1120.

Sellergren, B. 1989. Molecular imprinting by noncovalent interactions. Enantioselectivity and binding capacity of polymers prepared under conditions favoring the formation of template complexes. *Makromol. Chem.*, 190: 2703-2711.

Sellergren, B. 2001. Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 906: 227-252.

Sener, G., Özgür, E., Yılmaz, E., Uzun, L., Say, R., Denizli, A. 2010. Quartz crystal microbalance based nanosensor for lysozyme detection with lysozyme imprinted nanoparticles. *Biosensors & Bioelectronics* 26(2): 815-821.

Sergeyeva, T. A., Piletsky, S. A., Brovko, A. A., Slinchenko, E. A., Sergeeva, L. M., Panasyuk, T. L., Elskaya, A. V. 1999. Conductimetric sensor for atrazine detection based on molecularly imprinted polymer membranes. *Analyst*, 124: 331-334.

Shi, H.Q., Tsa, W.B.I., Garrison, M.D., Ferrari, S., Ratner, B.D. 1999. Template imprinted nano-structured surface for protein recognition. *Nature*, 398:593-597.

Shiomi, T., Matsui, M., Mizukami, F., Sakaguchi, K. 2005. A method for the molecular imprinting of hemoglobin on silica surfaces using silanes. *Biomaterials*, 26 (27): 5564-5571.

Singh-Zocchi, M., Hanne, J., Zocchi, G. 2002. Plastic Deformation of Protein Monolayers. *Biophys. J.*, 83: 2211-2218.

Slinchenko, O., Rachkov, A., Miyachi, H., Ogiso, M., Minoura, N. 2004. Imprinted polymer layer for recognising double-stranded DNA. *Biosensors & Bioelectronics* 20: 1091-1097.

Spivak, D.A. 2005. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 57: 1779-1794.

Stephenson, C.J., Shimizu, K.D. 2007. Colorimetric and fluorometric molecularly imprinted polymer sensors and binding assays. *Polym. Int.*, 56: 482-488.

Storrow, A.B., Lindsell, C.J., Collins, S.P., Ferman, G.J., Blomkalns, A.L., Williams, J.M., Goldsmith, B., Gibler, W.B. 2006a. Emergency department multimarker point-of-care testing reduces time to cardiac marker results without loss of diagnostic accuracy. *Point of Care.*, 5:132-136.

Storrow, A.B., Lindsell, C.J., Han, J.H. 2006b. Discordant cardiac biomarkers: frequency and outcomes in emergency department patients with chest pain. *Ann Emerg Med.*, 48:660-665.

Straface, A.L., 1 John, M.D., Myers, H., 2 Howard, M.D., Kirchick, J.,Blick, K.E. 2008. A Rapid Point-of-Care Cardiac Marker Testing Strategy Facilitates the Rapid Diagnosis and Management of Chest Pain Patients in the Emergency Department. *Clin. Chem.*, 129: 788-795.

Sun, Y., Yan, F., Yang, W., Sun, C. 2006. Multilayered construction of glucose oxidase and silica nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment. *Biomaterials*, 27:4042-4049.

Sundberg, E.J., Mariuzza, R.A. 2003. Molecular Recognition in Anti Body- Antigen Complexes. *Protein Modules and Protein-Protein Interactions*, 61: 119-160.

Takeuchi, T., Goto, D., Shinmori, H. 2007. Protein profiling by protein imprinted polymer array. *Analyst*, 132: 101–103.

Tamayo, F.G., Turiel, E., Martín-Esteban, A. 2007. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *J. Chromatogr. A*, 1152: 32-40.

Tan, C.J., Tong, Y.W. 2007. Preparation of superparamagnetic ribonuclease A surface-imprinted submicrometer particles for protein recognition in aqueous media. *Anal Chem.*, 79:299–306.

Taniwaki, K., Hyakutake, A., Aoki, T., Yoshikawa, M., Guiver, M.D., Robertson, G.P. 2003. Evaluation of the recognition ability of molecularly imprinted materials by surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, 489: 191-198.

Tao, Z.Y., Tehan, E.C., Bukowski, R.M., Tang, Y., Shughart, E.L., Holthoff, W.G., Cartwright, A.N., Titus, A.H., Bright F.V. 2006. Templated xerogels as platforms for biomolecule-less biomolecule sensors. *Anal. Chim. Acta.*, 564: 59–65.

Tietz, N.W. 1995. Clinical Guide to Laboratory Tests., Ed., 3rd Edition, W.B. Saunders, Co., 482.

Titirici, M.M., Hall, A.J., Sellergren, B. 2002. Hierarchically imprinted stationary phases: Mesoporous polymer beads containing surface-confined binding sites for adenine. *Chem. Mater.* 14: 21–23.

Titirici, M. M., Hall, A. H., Sellergren, B. 2003. Hierarchical imprinting using crude solid phase peptide synthesis products as templates. *Chem. Mater.* 15: 822–824.

Tokareva, I., Tokarev, I., Minko, S., Hutter, E., Fendler, J.H. 2006. Ultrathin molecularly imprinted polymer sensors employing enhanced transmission surface plasmon resonance spectroscopy. *Chem. Commun.*, 31: 3343-3345.

Tong, D., Hetenyi, C., Bikadi, Z., Gao, J. P., Hjerten, S. 2001. Some studies of the chromatographic properties of gels ('artificial antibodies/ receptors') for selective adsorption of proteins. *Chromatographia*, 54:7-14.

Tulinsky, A. 1996. Molecular Interactions of Thrombin. *Semin. Thromb. Hemost.*, 22 (2): 117-124.

Turiel, E., Martín-Esteban, A. 2005. Molecular imprinting technology in capillary electrochromatography. *J. Sep. Sci.*, 28: 719-728.

Turkewitsch, P., Wandelt, B., Darling, G. D., Powell, W.S. 1998. Fluorescent Functional Recognition Sites Through Molecular Imprinting. A Polymer-Based Fluorescent Chemosensor for Aqueous cAMP. *Anal. Chem.*, 70(10): 2025-2030.

Turner, N.W., Wright, B.E., Hlady, V., Britt, D.W. 2007a. Formation of protein molecular imprints within Langmuir monolayers: A quartz crystal microbalance study. *J. Colloid Interface Sci.*, 308: 71–80.

Turner, N.W., Liu, X., Piletsky, S., Hlady, V., Britt, D. 2007b. Recognition of conformational changes in α -lactoglobulin by molecularly imprinted thin films. *Biomacromolecules*, 8: 2781-2787.

Uludag, Y., Piletsky, A.S., Turner, A.P.F., and Matthew A. Cooper, A.M. 2007. Piezoelektrik sensors based on molecular imprinted polymers for dedection of low molecular mass analytes. *FEBS Journal*, 274: 5471-5480.

Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Chen, Y., Shah, R.N., Shimizu, K.D., 2001. Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir–Freundlich isotherm. *Anal. Chem.*, 73: 4584–4591.

Uzun, L., Say, R., Ünal, S., Denizli, A. 2009. Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (9): 2878–2884.

Vaidya, A.A., Lele, B.S., Kulkarni, M.G., Mashelkar, R.A. 2001. Creating a macromolecular receptor by affinity imprinting. *J. Appl. Polym. Sci.*, 81:1075-1083.

Venton, D.L., Gudipati, E. 1995a. Influence of protein on polysiloxane polymer formation: evidence for induction of complementary protein-polymer interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1250(2): 126-136.

Venton, D.L., Gudipati, E. 1995b. Entrapment of enzymes using organo-functionalized polysiloxane copolymers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1250 (2): 117-125.

Vlatakis, G., Andersson, L.I., Muller, R., Mosbach, K. 1993. Drug Assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting. *Nature*, 361:(6413), 645-647.

Watanabe, M., Akahoshi, T., Tabata, Y., Nakayama, D. 1998. Molecular specific swelling change of hydrogels in accordance with the concentration of guest molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 5577-5578.

Wei, X., Samadi, A., Husson, S.M., 2005. Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for chromatographic separations. *Sep. Sci. Technol.*, 40: 109–129.

Wei, S., Molinelli, A., Mizaikoff, B. 2007. Imprinted micro- and nanospheres for β -estradiol. *Anal. Chem., Biosens. and Bioelectron.*, 23:201–209.

Whitcombe, M.J., Alexander, C., Vulfson, E.N. 2000. Imprinted polymers: Versatile new tools in synthesis. *Synlett*, 911-923.

Wizeman, W. J.; Kofinas, P. 2001. Molecularly imprinted polymer hydrogels displaying isomerically resolved glucose binding. *Biomaterials*, 22: 1485-1491.

Wolf, A., Pillay, V. 1969. Renal concentration tests; osmotic pressure, specific gravity, refraction and electrical conductivity compared. *Am. J. Med.*, 46: 837-843.

Wong, S.S. 1996. Strategic utilization of cardiac markers for diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 26:301-312,.

Wu, A.H., Syu, M.J. 2006. Synthesis of bilirubin imprinted polymer thin film for the continuous detection of bilirubin in an MIP/QCM/FIA system. *Biosens Bioelectron.*, 21: 2345–2353.

Wulff, G., Sarhan, A. 1972. Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung. *Angew. Chem.*, 84(8): 364.

Wulff, G. 1995. Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates-a way towards artificial antibodies. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34:1812-1832

Wulff, G. 2002. Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chem. Rev.*, 102: 1-27.

Xia, Y.Q., Guo, T.Y., Song, M.D., Zhang, B.H., Zhang, B.L. 2005. Hemoglobin recognition by imprinting in semi-interpenetrating polymer network hydrogel based on polyacrylamide and chitosan. *Biomacromolecules*, 6: 2601–2606.

Yan, H., Row, H.K. 2006. Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *Int. Jour. Mol. Sci.*, 7: 155-178

Ye, L., Haupt, K. 2004a. Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 1887-1897.

Ye, L., Haupt, K. 2004b. Molecularly imprinted polymers as recognition elements in sensors. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378: 1887-1897.

Yilmaz, E., Haupt, K., Mosbach, K. 2000. The use of immobilized templates-a new approach in molecular imprinting. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39(12): 2115-2118.

Yilmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A. 2009. Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. *Biochemical Engineering Journal*, 43(3):272-279.

Yoshikawa, M., Guiver, M.D., Robertson, G.P. 2005a. Molecularly imprinted films derived from Torlon® polyamide-imide. *J. Mol. Struct.*, 739, 41-46.

Yoshikawa, M., Hotta, N., Kyoumura, J., Osagawa, Y., Aoki, T. 2005b. Chiral recognition sites from carbonyl-dioxyglyceryl moiety by an alternative molecular imprinting. *Sens. Actuat. B Chem.*, 104: 282-288.

Yu, J.C.C., Lai, E.P.C. 2005. Interaction of ochratoxin A with molecularly imprinted polypyrrole film on surface plasmon resonance sensor *React. Funct. Polym.*, 63: 171-176.

Zeder-Lutz, G., Zuber, E., Witz, J., Van Regenmortel, M. 1997. Thermodynamic analysis of antigen-antibody binding using biosensor measurements at different temperatures *Anal. Biochem.*, 246: 123-132.

Zenkiewicz, M. 2007. Methods for the calculation of surface free energy of solids. *Journal of Achievements in Materials and manufacturing Engineering*, 24(1): 137-145.

Zhang, L., Cheng, G., Fu, C. 2002. Molecular selectivity of tyrosine-imprinted polymers prepared by seed swelling and suspension polymerization. *Polym. Int.*, 51(8): 687-692.

Zhang, S., Yang, W., Niu, Y., Sun, C. 2004a. Multilayered construction of glucose oxidase on gold electrodes based on layer-by-layer covalent attachment. *Anal. Chim. Acta*, 523: 209-217.

Zhang, Q.Y., Tao, M.L., Shen, W.D., Zhou, Y.Z., Ding, Y., Ma, Y., Zhou, W.L. 2004b. Immobilization of L- asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. *Biomaterials*, 25: 3751-3759.

Zhang, F.J., Cheng, G.X., Ying, X.G. 2006a. Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres. *React. & Func. Polym.*, 66: 712-719.

Zhang, Z.H., Long, Y.M., Nie, L.H., Yao, S.Z. 2006b. Molecularly imprinted thin film self-assembled on piezoelectric quartz crystal surface by the sol-gel process for protein recognition. *Biosens. Bioelectron.*, 21, 1244-1251.

Zhang, M., Wu, Y., Feng, X., He, X., Chen, L., Zhang, Y. 2010. Fabrication of mesoporous silica-coated CNTs and application in size-selective protein separation. *J. Mater. Chem.*, 20: 5835-5842.

EKLER

Ek-1: Protein baskılama alanında yapılmış çalışmalar

Ek:2: Protein baskılamanın tarihsel gelişimi

Ek-1. Protein baskılama alanında yapılmış çalışmalar

Tür	Referans	Protein	Polimer bileşimi	Fonksiyonel etkileşim	Baskılama yöntemi	Ayırma/ Tayin yöntemi	Afinite	Seçicilik
Akrilat kimyası	Hjerten ve ark. 1997, Liao ve ark. 1996	Hemoglobin Lizozim Sitokrom c İnsan büyüme hormonu Transferin miyoglobin	Akrilamid, N,N'-metilenbisakrilamid	Çok sayıda zayıf elektrostatik bağ	Poliakrilamid jel temelli polimerler	Kromatografi	Değişken	Değişken
	Burow ve Minoura 1996, Hirayama ve ark. 1998, Hirayama ve ark. 2001	Glukoz oksidaz Lizozim	N,N'-1,2 dihidroksi-etiIn-bis(akrilamid), N,N'-metilen bisakrilamid, akrilamid, akrilik asid	Yoğun elektrostatik etkileşim	Silika kürelerin akrilat temelli polimer ile modifikasyonu	Kesikli bağlanma Enzim aktivitesi testi QCM	0,577 mg glukoz oksidaz/g polimer; 0,8 mg/mL lizozim (QCM)	Glukoz oksidaz için denenmemiştir. Lizozimin seçiciliği hemoglobin ile denenmiştir
	Ou ve ark. 2004	Lizozim	Akrilamid, metakrilik asit, 2-(dimetilamino) etil metakrilat	Elektrostatik etkileşim	Poliakrilamid jel temelli polimerler	Çözelti deplesyonu	%12,5-43,8	1,34-3,38
	Vaidya ve ark. 2001	Tripsin Kimotripsin	Akrilamid, N,N'-metilenbisakrilamid, N-akriloil para-aminobenzamidin	Enzim ligand etkileşimleri ve çok sayıda zayıf elektrostatik etkileşim	Afinite ayırma ve moleküler baskılamanın birleşimi	Çözelti deplesyonu	0,7 mg /g polimer	Tripsin için 2,92

	Huang ve ark. 2005	Sığır serum albumini Lizozim	Metakrilik asit, N-[3-(dimetil amino) propil] metakrilamid	Ortak elektrostatik etkileşimler	HPLC ile doğrudan ayırma için amfoterik polimer	Kromatografi	Kalıp molekülün geri bağlanma oranı yüksektir	Düşük oranda bile çapraz reaksiyon gözlenmiştir.
	Guo ve ark.2004, Muzzarelli ve ark. 1998, Guo ve ark. 2005	Hemoglobin	Akrilamid	Elektrostatik etkileşim	Akrilamid matriks içeren makrogözenekli kitosan küreler	HPLC, çözelti azalması	Adsorbsiyon kapasitesi 12 mg/g	42,7 (hemoglobin) 1,41 (sığır serum albumini)
Sol-jel	Glad ve ark. 1985	Transferrin	Borat-silan kompleksi	Çoklu hidrojen bağları	Direkt olarak silan kaplı silika partiküller üzerine protein baskılama	Kromatografi	Gösterilmemiş	Sığır albumini ile karşılaştırıldığında baskılama faktörü 2,16
	Venton ve Gudipati 1995a	Üreaz Sığır serum albumini	3-aminopropil trietoksilan, tetraetilortosilikat	Çoklu hidrojen bağları	Geleneksel baskılanmış monolit	Çözelti azalması	% 60-90 geri bağlanma	Bağlanma faktörü 1,5
	Shiomi ve ark. 2005	Hemoglobin	3-aminopropil trietoksilan, propiltri-metoksi silan	Çoklu hidrojen bağları	Modifiye silika yüzeyi	Çözelti depleasyonu	Doğrudan ölçülmemiştir	Hemoglobin ile bir çok yarışmacı protein denenmiştir

Metal şelat yaklaşımı	Kempe ve ark. 1995	Ribonükleaz A, Lizozim	Metal-şelat oluşturucu monomer, N-(4-vinil)-benzil iminodiasetikasit	Metal-şelat	Silika pariküllerin spesifik monomer ile kaplanması	Kromatografi	Kapasite faktörü 5,79	Ribonükleaz A ve lizozim arasında 2,35
Mikroplak yüzeyine aşılama	Piletsky ve ark. 2001 Bossi ve ark. 2001	Hemoglobin Horse radish peroksidaz Mikoperoksidaz Laktoperoksidaz	3-aminofenil boronik asit	Tersinir kovalent ve elektrostatik etkileşimler	Moleküler baskılanmış polimerler polistiren plaklar üzerine graft edilmesi	Çözelti azalması	Değişken	Değişken
Mikroplak yüzeyine aşılama	Rick and Chou 2005	Lizozim Sitokrom c	3-aminofenil boronik asit	Tersinir kovalent ve elektrostatik etkileşimler	QCM sensör yüzeyine graftlama	QCM mikrokalerimetri	Değişken	Değişken

	Chou ve ark. 2005 Shi ve ark. 1999 Shi ve ark. 2000	C-Reactive protein, Lizozim, İnsan serum albumini, Sığır serum albumini, Lizozim, Ribonükleaz A, IgG, Fibrinogen	O-(4-nitrofenil- posforil) kolin/ PEG400dimetakrilat disakkarit kaplanmış hekzafloropropilen	Enzim ligand etkileşimi, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals kuvvetleri	Disakkarit tabakalı ile kaplı proteinler ile mikro-temas yaklaşımı	ELISA ve radio işaretleme	3,78 ng/cm ² CRP 2,66 µg/ cm ² HSA	0,08 ng/cm ² HSA 0,27 µg/ cm ² CRP
Nanoteknikler ve epittpo yaklaşımı	Li ve ark. 2006	Sığır serum albumini Hemoglobin Sitokrom C Horse radish peroksidaz	Akrilamid , N,N'-metilenbisakrilamid	Elektrostatik etkileşimler	Yüzey baskılama metoduyla nanotellerinm hazırlanması	Çözelti azalması	Baskılanmış % 50 hemoglobin Kontrol % 6,8	Sığır albumini ile insan albuminini ayırabilmektedir
	Özcan ve ark. 2006	Sitokrom c	N-metakrilolil-(L)-histidin, etilenglikol dimetakrilat	Metal-şelat etkileşimi	Yüzey baskılama	Çözelti azalması	Sitokrom c- Ribonükleaz (FPLC) ayırma faktörü 1,39	Ribonükleaz kullanılmıştır

	Rachkov ve Minoura 2000, Rachkov ve Minoura 2001, Rachkov ve ark. 2004	Anjitenin oktapeptid	Sodyum akrilat/poli(etilen glikol) diakrilat	Antijen antibadi etkileşimi	Anjiyotensinin peptid zincir seçiciliği ve epitop yaklaşımı	Kromatografi	0,4 µg /mL	Ortam koşullarına bağlı olarak 19,2-2,10
	Nishino ve ark. 2006	Sitokrom c Sığır serum albumini Alkol dehidrojenaz	Akrilamid, N,N'-metilenbisakrilamid, polietilen glikol 200-diakrilat	Kolektif hidrojen bağları	Peptid epitop ile baskılanarak hazırlanmış ince film	SDS-PAGE, kütle spektromertesi	22,4 pmol/cm ² sitokromc, diğerleri için gösterilmemiştir	Hedef protein ve protein karışımı için gösterilmiştir

Ek-2. Protein baskılamının tarihsel gelişimi

Yıl	Ülke	Baskılama metodu	Sonuç	Referans
1985	İsveç	2D Sol jel	Protein baskılamaya yönelik ilk çalışma olup silan modifiye silika partiküller yüzeyine doğrudan baskılama işlemi yapılmıştır.	Glad ve ark. 1985
1994	USA	2D Metal-Şelat	Metal iyonları taşıyan fonksiyonel kollardan hazırlanan sentetik reseptörlerin proteinlerin fonksiyonel gruplarına seçici olarak bağlandığı kanıtlanmıştır.	Malik ve ark. 1994
1995	İsveç	2D Metal-Şelat	Silika partiküller metal-şelat oluşturma yeteneğine sahip monomerler ile kaplandı.	Kempe ve ark. 1995
1995	USA	3D Sol-jel	Organik silan monomerleri kullanılarak geleneksel metodla baskılanmış monolit hazırlanmıştır.	Venton ve Gudipati 1995b
1996	İsveç	3D Akrilat kimyası	Poliakrilamid jel temelli polimerler hazırlanmıştır.	Liao ve ark. 1996
1996	Japonya	2D Akrilat Kimyası	Silika kürelerin akrilat temelli polimer ile modifikasyonu yapılmıştır.	Burow ve Minoura 1996
1999	USA	Nanoyapılı ince filmler	Disakkarit tabakası ile kaplı protein varlığında nanofilm hazırlanmıştır.	Shi ve ark. 1996
2000	İngiltere	2D APBA kimyası	Moleküler baskılanmış polimerler polistiren mikroplaklara graft edilmiştir.	Piletsky ve ark. 2000
2000	Japonya	2D Epitop yaklaşımı	Proteinin yüzeyinde yer alan peptid kalıp olarak kullanılmıştır.	Rachkov ve Minoura 2000
2001	Hindistan	3D Akrilat kimyası	Seçiciliği arttırmak için çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun optimizasyonu	Vaidya ve ark. 2001
2001	İsveç	3D Akrilat kimyası	Potansiyel monomerler/jeller ile protein etkileşimlerin UV ile hızlı bir şekilde izlenmesine ilişkin öncü çalışmalar yapılmıştır.	Tong ve ark. 2001
2002	Çin (Tayvan)	3D Akrilat kimyası	Yüklü fonksiyonel monomerler bir araya getirilmiştir.	Ou ve ark. 2004

2004	Çin	3D Akrlat kimyası	Düşük kararlılık ve düşük yoğunluklu polimerin elde edilmesi gibi problemleri ortadan kaldırmak için poliakrilamid jel ile modifiye edilmiş gözenekli kitosan küreler kullanılmıştır.	Guo ve ark. 2004
2005	İngiltere	3D Akrlat kimyası	Protein kalıbı yapıdan uzaklaştırmadaki zorlukları ortadan kaldırmak için yıkama işleminin optimizasyonu yapılmıştır.	Hawkins ve ark. 2005
2005	Çin	3D Akrlat kimyası	Seçiciliği arttırmak için gözenek yapıcı maddeler kullanılmıştır	Huang ve ark. 2005
2005	Çin (Tayvan)	2D APBA kimyası	İki protein aynı anda baskılanmıştır.	Rick ve Chou 2005
2005	Çin (Tayvan)	2D APBA kimyası	İnce polimerik filmlerin hazırlanmasında mikrotemas baskılama yöntemi geliştirilmiştir.	Chou ve ark. 2005
2005	Japonya	2D sol-jel	Yüzey baskılama yöntemi kalıp molekülün sabit bir yüzeye immobilizasyonu yöntemi ile birleştirilmiştir.	Shiomi ve ark. 2005
2006	Çin	3D Akrlat kimyası	Seçiciliği arttırmak için ters faz süspansiyon polimerizasyonu proteinlerin baskılamaya uyarlanmıştır.	Pang ve ark. 2005
2006	Çin	Polimerik nanoteller	Yüzey baskılama tekniği kullanılarak polimer nanoteller hazırlanmıştır.	Li ve ark. 2006
2006	Çin (Tayvan)	2D Akrlat kimyası	Proteinlerin baskılanmasında uygun çapraz bağlayıcının seçilmesi için izotermal titrimetrik kalorimetri kullanılmıştır.	Hsu ve ark. 2006

ÖZGEÇMİŞ	
Adı ve Soyadı	Bilgen OSMAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Bursa, 1978
Yabancı Dili	İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)	
Lise	Yıldırım Beyazıt Lisesi, 1994
Lisans	U.Ü. Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü,1998
Yüksek Lisans	U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 2004
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl	U.Ü. Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü, 2000- Devam ediyor
İletişim (e-posta)	bilgeno@uludag.edu.tr

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Bilgen OSMAN
Tez Adı	Miyogloblin Tayinine Yönelik Moleküler Baskılanmış Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensör Hazırlanması
Enstitü	Fen Bilimleri
Anabilim Dalı	Kimya
Tez Türü	Doktora
Tez Danışman(lar)ı	<i>Prof.Dr.Necatî Beşirli , Prof.Dr.Adil Denizli (2.Danışman)</i>
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) izni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama izni	<input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin Veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasının ertelenmesini istiyorum 1 yıl <input type="checkbox"/> 2 yıl <input type="checkbox"/> 3 yıl <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin vermiyorum

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih :

İmza :

