

**HİYALURONİK ASİT SAFLAŞTIRILMASI VE
YARA İYİLEŞTİRME AMAÇLI KULLANIMI**

Handan Açelya AKDAMAR

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak-2007

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Handan Açelya Akdamar'ın "**Hyaluronik Asit Saflaştırılması ve Yara İyileştirme Amaçlı Kullanımı**" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 26.12.2006 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danımanı):	Doç.Dr. RIDVAN SAY
Üye	: Prof.Dr. AHMET ÖZATA
Üye	: Yard. Doç. Dr. RANA ARSLAN
Üye	: Yard. Doç. Dr. LÜTF GENÇ
Üye	: Yard. Doç. Dr. NALAN YILMAZ SARIÖZLÜ

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HİYALURONİK ASİT SAFLAŞTIRILMASI VE YARA İYİLEŞTİRME AMAÇLI KULLANIMI

Handan Açelya AKDAMAR

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

**Danışman: Doç. Dr. Rıdvan SAY
2007, 66 sayfa**

Bu çalışmada, hiyaluronik asit (HA) *Streptococcus equi spp.* bakterisinden fermantasyon tekniği kullanılarak üretilmiş, üretilen süpernatantın içerdiği HA tayini Refraktometrik İnterferans Spektroskopisi tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Üretilen HA'nın saflaştırılması amacıyla biyolojik sistemlerle uyumlu ve HA için yüksek seçiciliğe sahip D-glukoronik asit bellekli polimerler (MIP) sentezlenip karakterize edilmiştir. D-glukoronik asit bellekli bu polimerlerin HA ayırımındaki etkinliği, HA'nın sulu çözeltilerinden adsorpsiyon çalışmalarıyla saptanmıştır. Bu amaçla denge adsorpsiyon zamanı ve derişim adsorpsiyon kapasitesi ilişkisi ortaya konulmuş ve D-glukoronik asit bellekli yapay ayırma reseptörlerinin HA molekülüne seçiciliği Scatchard analizi ile ortaya konulmuştur. Ayrıca bu yapay reseptörlerin HA ayırmada tekrar tekrar kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın son aşamasında HA'nın çözelti ve nanofiber formlarının yara tedavisi üzerindeki etkileri incelenmiş ve tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hiyaluronik Asit, D-glukoronik Asit, Moleküler Baskılanmış Polimerler, Elektrik Alanda Nanofiber Üretimi, Yara Tedavisi

ABSTRACT**Master of Science Thesis****PURIFICATION OF HYALURONIC ASID AND ITS USE FOR WOUND HEALING****Handan Açelya AKDAMAR****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Rıdvan SAY
2007, 66 pages**

In this study, hyaluronic asid (HA) was produced from *Streptococcus equi* spp. by using the fermantation technique and then produced supernatant's HA content was determined by Reflectometry Interference Spectroscopy. For the purification of produced HA, D-glucuronic acid imprinted polymers, which are highly selective for HA and cooperative with biological systems, were synthesized and characterized. For HA separation, the efficiency of D-glucuronic acid imprinted polymers was determined with the adsorption studies of HA solutions. For this purpose, the relation between the time of equilibrium- adsorption and the capacity of concentration- adsorption was declared and the D-glucuronic asid imprinted synthetic receptor's selectivity to the HA molecule was clarified with Scatchard analysis. In addition, ability of using these synthetic receptors again and again for HA separation was demonstrated. In the final step of this study, the effects of HA solution and the nanofiber forms on the wound healing were investigated and discussed.

Keywords: Hyaluronic Asid, D-glucuronic Asid, Molecular Imprinted Polymers, Electrospinning, Wound Healing.

TEŞEKKÜR

Çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen, beni yönlendiren ve karşılaştığım sorunlarda fikirleriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Sayın Doç. Dr. Rıdvan SAY'a,

Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ersin YÜCEL'e,

Çalışmamın Mikrobiyoloji kısmında destek aldığım Yrd. Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ'ye,

Yara tedavisi kısmında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Rana ARSLAN'a,

Çalışmalarım esnasında bana destek olan Araş. Gör. Sibel EMİR DİLTEMİZ, Araş. Gör. Ayça ATILIR, Araş. Gör. Özgür ALVER, Araş. Gör. İsmail Özgür ÖZER, Rüstem KEÇİLİ, Sinan PEHLİVANER'e

Bana her konuda büyük destekleri ve hoşgörülerıyla AİLEME en içten teşekkürlerimi sunarım.

Handan Açelya AKDAMAR

Ocak-2007

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Hiyaluronik Asit ve Önemi.....	2
1.2. Moleküler Baskılama Teknolojisi.....	6
1.2.1. Sentetik Reseptörler	7
1.3. Moleküler Baskılama Yöntemi	9
1.3.1. Baskılanacak Molekülün veya İyonun Özellikleri.....	12
1.3.2. Fonksiyonel Monomerler	12
1.3.3. Çapraz Bağlayıcı	14
1.3.4. Çözücü	15
1.3.5. Başlatıcı.....	16
1.4. Moleküler Baskılama Çeşitleri.....	17
1.4.1. Kovalent Bağlanma.....	17
1.4.2. Kovalent Olmayan Bağlanma	18
1.4.3. Kovalent ve Kovalent Olmayan Bağlanmanın Avantajları ve Dezavantajları.....	19
1.5. Polimerizasyon.....	20
1.5.1. Zincir Polimerizasyon	20
1.5.2. Kondenzasyon Polimerizasyonu	21
1.5.3. Polimerizasyon Yöntemleri.....	21
1.5.3.1. Yığın Polimerizasyonu.....	21
1.5.3.2. Çözelti Polimerizasyonu	22

1.5.3.3. Süspansiyon Polimerizasyonu.....	22
1.5.3.4. Emülsiyon Polimerizasyonu.....	22
1.6. Moleküler Baskılı Polimerlerin Özellikleri.....	23
1.7. Moleküler Baskılı Polimerlerin Kullanım Alanları.....	24
1.8. Polimer Karakterizasyonu.....	24
1.8.1. Elementel Analiz.....	25
1.8.2. Fourier – Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR).....	25
1.8.3. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi.....	25
1.8.4. Kuru Haldeki Gözenek Yapısı.....	26
1.8.4.1. Azot Sorpsiyon Porozimetri.....	26
1.8.4.2. Civa Geçirgenliği.....	27
1.8.4.3. Yüzey Alanları.....	27
1.8.4.4. Gözenek Hacmi.....	27
1.8.4.5. Mikroskopi(Taramalı Elektron Mikroskobu gibi).....	27
1.8.5. Şişmiş Haldeki Gözenek Yapısı.....	28
1.9. Elektrik Alandan Fiber Üretim Yöntemi.....	28
1.10. Reklaktometrik İnterferans Spektroskopisi.....	29
1.11. Elektrik Alanda Fiber Üretimi ve Yara Tedavisinde Kullanımı.....	29
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	31
2.1. Materyal.....	31
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	31
2.2. Yöntem.....	31
2.2.1. Metakrilamidohistidin (MAH) monomerinin sentezi.....	31
2.2.2. Metakrilamidohistidin-Cu(II) Metal-Şelat monomeri sentezi.....	32
2.2.3. D-glukoronik Asit Baskılanmış Polimerik Mikrokürelerin Hazırlanışı.....	32
2.2.4. D-glukoronik Asit Baskılanmış Polimerik Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	33
2.2.4.1. Şişme Testi.....	33
2.2.4.2. FTIR Analizi.....	33
2.2.4.3. Elementel Analiz.....	33

2.2.5. Adsorpsiyon- Desorpsiyon Çalışmaları	34
2.2.5.1. Polimerik Mikrokürelere Hiyaluronik Asit Adsorpsiyonu	34
2.2.5.2. Polimerik Mikrokürelere Hiyaluronik Asit Desorpsiyonu	35
2.2.6. <i>Streptococcus equi</i> Fermantasyon Ortamının Hazırlanması	35
2.2.6.1. Mikroorganizma	35
2.2.6.2. İnokulumun Hazırlanışı ve Fermantasyon Ortamı	35
2.2.6.3. Fermantasyon Ortamından Önsafılaştırma İşlemi	36
2.2.7. Refraktometrik İnterferans Spektroskopu Tekniği ile Süpernatant Kaynaklı Hiyaluronik Asit Tayini	36
2.2.7.1. L-Tirozin Molekülünün İmmobilizasyonu	36
2.2.8. Elektrik Alanda HA Nanofiber Eldesi	37
2.2.9. Yara Tedavisi Çalışmaları	38
3. BULGULAR	40
3.1. Polimerik Mikrokürelere Karakterizasyonu	40
3.1.1. Şişme Testi	40
3.1.2. MAH monomerinin karakterizasyonu	40
3.1.3. MAH-Cu(II) monomerinin karakterizasyonu	42
3.1.4. D-glukoronik asit bellekli polimerlerin karakterizasyonu	42
3.1.5. D-glukoronik asit bellekler çıkarılmadan önceki ve D-glukoronik asit molekülleri uzaklaştırıldıktan sonraki MIP'lerin elementel analiz sonuçları	45
3.2. D-glukoronik asit-Baskılı Mikrokürelere Adsorpsiyon Çalışması	45
3.2.1. Adsorpsiyon Denge Zamanı	45
3.2.2. Hiyaluronik Asit Başlangıç Derişiminin Etkisi	46
3.2.3. Adsorpsiyon İzotermi	47
3.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	50
3.4. Refraktometrik İnterferans Spektroskopu Tekniği Tekniği ile Hiyaluronik Asit Tayini	51
3.5. Elektrik Alanda Üretilen HA Nanofiberleri	54

3.6. Yara Tedavisi Sonuçları.....	57
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Hiyaluronik asit'in yapısı.....	2
1.2. Hiyaluronik asit formları.....	3
1.3. Hiyaluronik asit yapısındaki hedef bölgeler.....	4
1.4. Hiyaluronik asitin karboksilik asit ve hidroksil gruplarından gerçekleşen kimyasal modifikasyonlar.....	4
1.5. Grup C Streptokoklarının hiyaluronik asit kapsülü.....	5
1.6. Moleküler Baskılamanın şematik gösterimi.....	10
1.7. Yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler.....	13
1.8. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	15
1.9. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar	16
1.10. Moleküler Baskılama yönteminin sınıflandırılması.....	17
1.11. Kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın şematik gösterimi.....	19
1.12. Reflektometrik İnterferans Spektroskopisinin temeli.....	29
2.1. Elektrik Alanda Fiber Üretim Düzeneği.....	38
3.1. Metakrilamidohistidin monomerinin molekül formülü.....	40
3.2. MAH monomerinin ¹ H-NMR spektrumu.....	41
3.3. MAH monomerinin FT-IR spektrumu.....	41
3.4. D-glukoronik asit bellekler çıkarılmadan önceki çapraz bağlı polimerin FTIR spektrumu.....	43
3.5. D-glukoronik asit'in FTIR spektrumu.....	43
3.6. D-glukoronik asit molekülleri uzaklaştırıldıktan sonraki MIP'lerin FTIR Spektrumu.....	44
3.7. D-glukoronik asit monomeri.....	44
3.8. D-glukoronik asit baskılı mikrokürede Hiyaluronik asit molekülünün adsorpsiyon hızı.....	46
3.9. Polimerik mikrokürelere adsorplanan D-glukoronik asit miktarının Hiyaluronik asit başlangıç derişimi ile değişimi.....	47
3.10. Hiyaluronik asit molekülü için Langmuir Adsorpsiyon Modeli.....	48
3.11. D-glukoronik asit baskılı polimerin Scatchard eğrisi.....	49

3.12. D-glukoronik asit baskılanmış mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği.....	50
3.13. Biyoçip yüzeyinin aktivasyonu ve ligand (L-Tyrozin) molekülünün immobilizasyonu.....	51
3.14. Farklı konsantrasyonlarda Hiyaluronik asit çözeltisi spektrumları.....	52
3.15. Hiyaluronik asit çözeltilerinin kalibrasyon grafiği.....	53
3.16. Nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	55
3.17. 7. gün sonundaki yaraların durumu.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. İyon baskılama çalışmaları.....	11
1.2. Kovalent ve kovalent olmayan bağlanmanın avantajları ve dezavantajları.....	20
1.3. Polimerlerin özellikleri ve karakteristikleri.....	23
3.1. HA çözeltisi ve HA nanofiber çözeltisinin sıçanlarda yara iyileştirme üzerine etkisi.....	57

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIBN	: 2,2'-azobisisobütironitril
BET	: Gözenek boyutu analizörü
CMD	: Karboksimetildekstran
EDMA	: Etilenglikoldimetakrilat
FTIR	: Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi
HA	: Hiyaluronik Asit
Ka	: Bağlanma Sabiti
MAH	: Metakrilamidohistidin
MAH-Cu(II)	: Metakrilamidohistidin-Cu(II)
MIP	: Moleküler Baskılanmış Polimer
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
PVAL	: Poli-vinil alkol
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu

1. GİRİŞ

Son yıllarda insan sağlığını koruma ve hastalıkları önleme amacıyla yapılan büyük yatırımlar, bu alanda geniş çaplı ve disiplinler arası AR-GE faaliyetlerinin hızla artmasını sağlamıştır. Özellikle 21. yüzyılda ortaya çıkan ve oldukça farklılaşan immunolojik hastalıkların teşhisi ve tedavisine yönelik araştırmalar tüm araştırmalara ayrılan kaynaklar içinde büyük oranlara ulaşmıştır. Sağlığa dayalı teknolojilerin en önemlilerinden olan tedavi amaçlı biyokromatografi teknolojisi biyolojik moleküllerin yüksek teknolojiye dayanan akıllı polimerik katı faz sorbentleriyle ultra-yüksek saflıkta saflaştırılarak kullanımına olanak sağlamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, tıbbi alanda artan ilgiyle kullanılan hiyaluronik asit (HA) biyolojik molekülünün ayrılması ve saflaştırılmasına yönelik, biyolojik sistemlerle uyumlu ve HA için yüksek seçiciliğe sahip yeni nesil, molekül bellekli polimerlerin (MIP) hazırlanması ve biyolojik materyallerden HA'nın saflaştırılmasında kullanımıyla HA nanofiberlerin yara tedavi amaçlı kullanımınıdır.

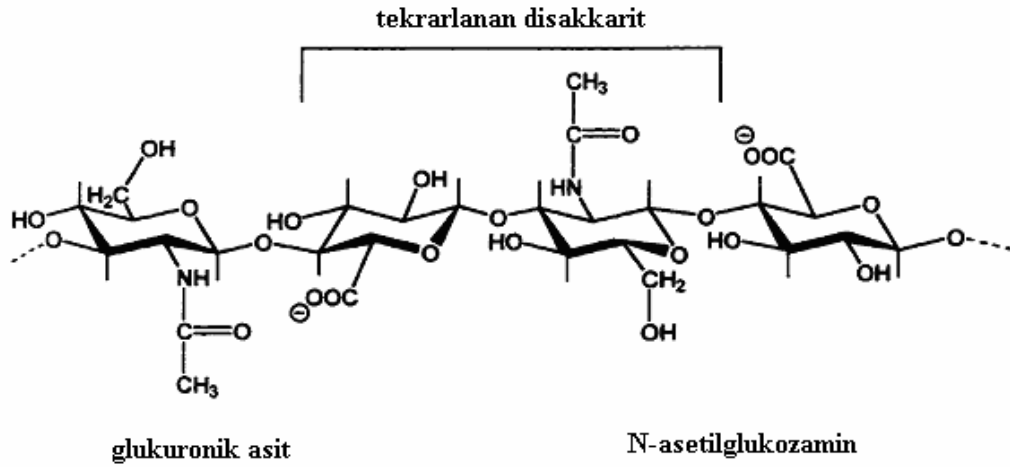
Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilecek çalışmaları üç ana başlık altında toplamak mümkündür:

1. Biyolojik bir materyelden (*Streptococcus equi spp.*) HA üretimi ve izolasyonu
2. D-glukoronik asit Bellekli Sentetik Reseptörlerin Üretimi ve HA Saflaştırılmasında Kullanımları
3. Elektrik alanda nanofiber üretimi ve yara tedavisinde kullanımı

1.1. Hiyaluronik asit ve önemi

HA, ilk olarak gözdeki retinanın saydam sıvısından Meyer tarafından 1934 yılında izole edilmiştir [1]. HA glikozaminoglikanlar olarak bilinen bir polimer sınıfındadır ve uzun zincirli lineer bir polisakkarittir. N-asetil-D-glikozamin ve D-glukoronik asit'in birbiriyle β 1-4 glikozidik bağıyla bağlanmasıyla oluşan disakkaritin tekrarlarından oluşmaktadır. Disakkaritler birbirleriyle β 1-3 bağlarıyla bağlanmıştır (Şekil 1.1.). Genellikle formülü $C_{14}H_{20}NNaO_{11}$ olan ve

kaynağına, izolasyon prosedürüne, tanımlama metoduna göre değişen sodyum tuzu halinde bulunur. Molekül ağırlığının 14×10^6 civarında olduğu bildirilen HA genellikle yüksek molekül ağırlıklıdır, ancak bazen küçük fragmentler ve oligosakkaritler halinde bulunabilir. Doku hidrasyonunda ve hücre fonksiyonlarında görevlidir. Doğal birçok bileşikten daha fazla su tutma kapasitesine sahiptir.



Şekil 1.1 Hiyaluronik asit'in yapısı

HA ve tuzu omurgalı hayvanların bağ dokularından izole edilebilir. HA kollajen fiberler arasındaki hücre dışı boşluklara dolar. Bu özelliğiyle yara tedavisinde kullanılmaktadır.

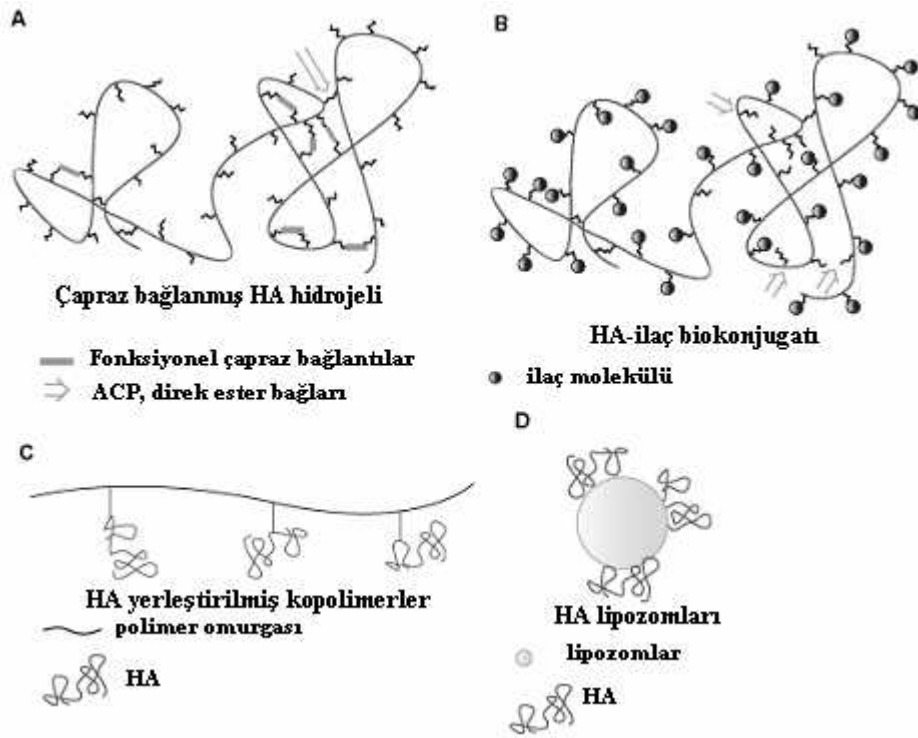
HA'nın görevleri şunlardır:

1. Hücreler arası çimento: Hücreleri birbirine bağlamak,
2. Vurmalara, şoklara karşı tampon ve yastık vazifesi görmek,
3. Kaymayı sağlamak: Esneme ve kıvrılmalarda bağ dokusundaki tüm hücrelerin birbirleri üzerine kaymalarına yardımcı olur.

Kıkırdak hücreleri gibi direk kan temini olmayan hücreler için HA'nın su tutma kapasitesi bu hücrelerde besinin sağlanması ve atıkların hücrelerden

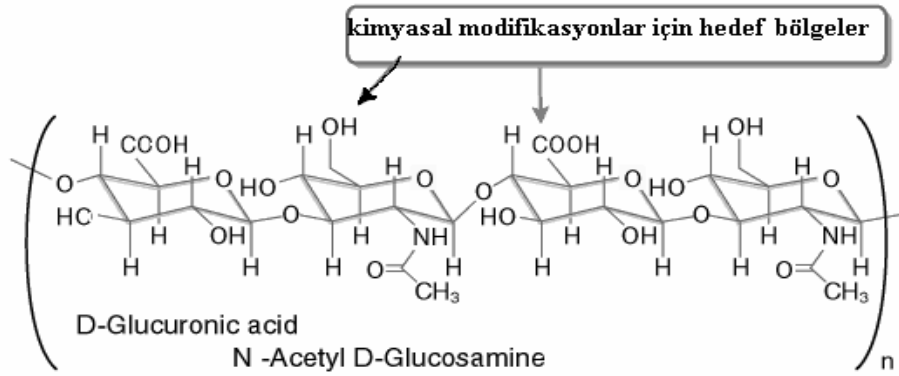
uzaklaştırılması gibi önemli biyolojik fonksiyonların gerçekleşmesine yardımcı olur. Aynı zamanda subkutan dokuların büyümesi, gelişmesi ve tamirinde rol oynayan önemli bir bileşiktir[2].

HA'nın yapısı doku mühendisliğinde ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmak üzere yeni, biyo-uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Şekil 1.2'de bu alanlarda kullanılan HA formları verilmiştir.

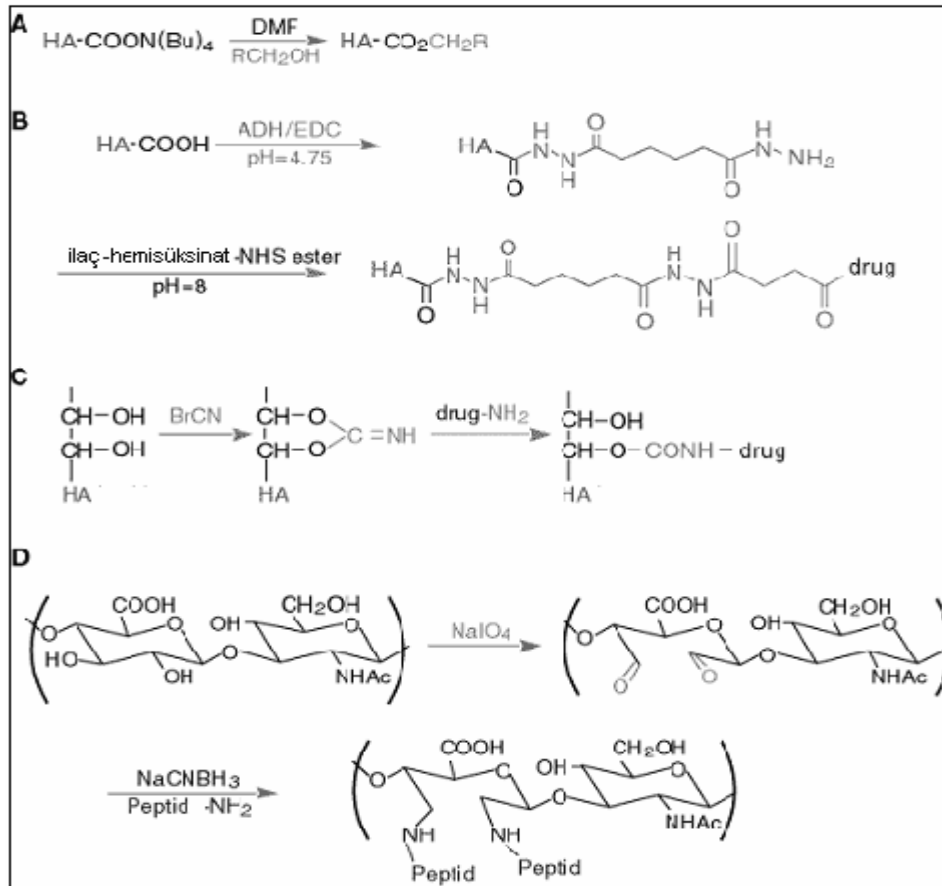


Şekil 1.2. HA formları : (A) Çapraz bağlanmış HA; (B) HA - ilaç biokonjugatı; (C) HA eklenmiş kopolimer; (D) HA -lipozom kompoziti

HA'nın yapısında bulunan karboksilik asit ve hidroksil grupları kimyasal modifikasyonlar için hedef bölgelerdir(Şekil 1.4.). Bu hedef bölgeler kullanılarak HA türevli biyomedikal malzemeler üretilebilmektedir. Bu malzemelerin üretiminde kullanılan kimyasal modifikasyonlar Şekil 1.3'de gösterilmiştir.



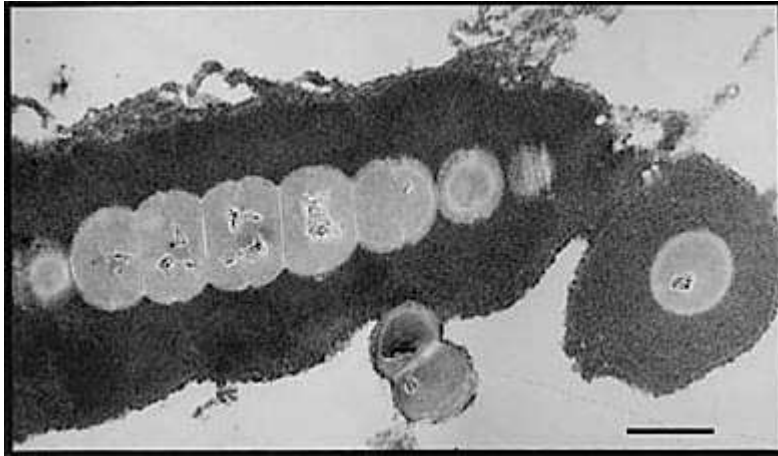
Şekil 1.3. HA yapısındaki hedef bölgeler



Şekil 1.4. HA'nın karboksilik asit ve hidrosil gruplarından gerçekleşen kimyasal modifikasyonlar: (A) esterleşme; (B) bihidrazit modifikasyonu; (C) siyanojen-bromid aktivasyonu; (D) oksidasyon

HA, 1934'te keşfedilmiştir ve 1942 yılından bu yana özellikle tıpta, erken yaşlanma hastalığı olan "acrogeria" tedavilerinde kullanılmaktadır. Bebek cildinin yumuşaklığı, nemliliği ve gerginliği, bebeğin anne karnında yüzdüğü amniotik sıvının HA'dan çok zengin olmasına bağlıdır. Kozmetikte HA geleceğin bir numaralı nemlendiricisi ve yaşlanma karşıtı aktif maddesidir. HA doğal olarak horoz ibiğinden elde edilir veya biyoteknolojik olarak laboratuarda üretilir

HA ayrıca Grup C Streptokok gibi bazı bakterilerin kapsül bileşenidir (Şekil 1.5.). Grup A ve Grup C Streptokoklar glikozu asimile ederek çeşitli çevresel koşullar altında HA'yı ikincil metabolit olarak üretirler. Bu bakterilerin sahip olduğu kalın HA tabakası onlara konaklarının immün sistemlerinden korunmalarını sağladığı gibi aynı zamanda fagositler ve antibadiler tarafından da tanınmalarını sağlar [3]. HA'nın non-immünojenik olması tıpta büyük bir öneme sahip olmasını sağlamıştır. Ayrıca yüksek molekül ağırlıklı olması ona visco-elastik bir özellik kazandırmaktadır. Bu özellik ona klinik alanda yara tedavisinde, göz ameliyatları ve ortopedi ameliyatlarında kullanılmasını sağlar.



Şekil 1.5. Grup C Streptokoklarının HA kapsülü

HA'nın insan kordonundan izolasyon, pürifikasyon ve karakterizasyonu yapılmış, sonuç olarak ürünün deri hastalıkları tedavisi için losyon ve krem olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [4].

Yine başka bir çalışmada HA'nın lamininle modifiye edilmiş hidrojelleri beyin lezyonlarının tamiri için implante edilmiş ve jellerin bir yapı iskelesi oluşturduğu gözlenmiştir [5].

Şu anda piyasada ticari olarak satılan HA horoz ibiğinden elde edilmektedir ancak bu materyalin virüs tarafından kontaminasyon riski vardır. Bu nedenle de kompleks bir pürifikasyon metoduna ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaç, dolayısıyla ürünün fiyatını arttırmaktadır.

İzolasyonda yukarıda bahsedilen sorunlardan dolayı HA üretimi için fermantasyon prosesleri geliştirilmiştir.

HA birçok Streptokok suşundan üretilebilmektedir. *Streptococcus equi*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes* bakterilerinden fermantasyon prosesiyle HA üretimi yapılmıştır.

Streptococcus equi'nin bir kemostat kültürü içinde sürekli fermantasyonuyla büyük miktarlarda yüksek molekül ağırlıklı toksik ajanlarla kontamine olmamış, HA'nın üretimi mümkündür. Bu proses geleneksel Batch kültürlerinden daha avantajlıdır, çünkü Batch kültürlerinde ayrıştırma enzimleri streptokokların hücre duvarlarını parçalayabilir ve hücre bileşenlerini fermantasyon ortamına salıp pürifikasyonda zorluklara neden olabilir.

1.2. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Çevre, ilaç ve biyoteknoloji alanlarında hızlı ve verimli yeni yöntemlere sürekli ihtiyaç duyulması, araştırmacıları, daha iyi, daha seçici ve hassas analitik çalışmaların yapılmasına yöneltmiştir. Moleküler tanıma temeline dayanan ayırma sistemleri arasında "Moleküler Baskılama" yöntemi ile hazırlanan taşıyıcılar hedef moleküle olan yüksek seçicilikleri nedeniyle oldukça ümit vaatmektedirler. İlk defa 1972'de Günter Wulff ve çalışma grubu tarafından tanımlanan moleküler baskılama yöntemi, sentetik polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle, oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla kullanılmıştır [6].

Moleküler baskılama, ilgilenilen analit için seçici tanıma bölgelerine sahip sentetik polimerlerin hazırlanmasında kullanılan bir tekniktir. Moleküler baskılama yönteminde fonksiyonel monomerler baskılanacak molekül veya iyon ile polimerizasyon başlamadan önce ve polimerizasyon esnasında çapraz bağlayıcı varlığında moleküler etkileşime girerler. Polimerizasyon reaksiyonu sonucunda

yüksek oranda çapraz bağlı polimer ağı oluşur. Baskılanan molekülün polimerden uzaklaştırılması sonucunda polimerde baskılanan moleküle veya iyon seçici bellekler elde edilir ve bir karışımda baskılanan molekül veya iyon polimere seçici olarak tekrar bağlanabilir.

1.2.1. Sentetik Reseptörler

Son zamanlarda bilim ve teknolojide reseptörlerin ve moleküler tanımlamanın önemi hızlı bir şekilde gelişmektedir. Moleküler baskılama tekniği çok yönlü reseptörleri verimli, hızlı ve ekonomik olarak sağlamak için geliştirilmiştir.

Moleküler tanıma yaşamın varlığı için önemlidir. Örneğin, hücre membranlarının yüzeyindeki reseptörlere hormonlar bağlanır ve hücreden hücreye iletişimden sorumludur. Reseptör liganta bağlandığında, reseptörlerin konformasyonu değişir ve ligantın mesajı (vücutta glikozun eksikliğinde) bu konformasyonel değişim terimi hücreye geçer. Bu hücre o anda vücutta ne gerekli olduğunu tanır. Hücre karşılık olan biyoreaksiyonları cevaplamak için bu gereksinimi uygun bir şekilde geliştirir. Bu sistemlerde en önemli şey, bir reseptör sadece bir spesifik hormonu kabul eder ve diğerleri ile asla önemli bir şekilde etkilemez. Ayrıca, reseptör/hormon etkileşimi muazzam ölçüde kuvvetlidir. Başka bir deyişle, antibadillerle seçici konuk bağlanması bağışıklık sistemi için önemlidir. Yabancı madde (antijen) vücuda girdiğinde tutulur ve antijenin yok edildiği lizozoma alınır. Beklenildiği gibi hedef antijen ve diğerleri arasında (bir de vücudumuzdaki yabancı maddeler ve asılları arasında) antibadi ile ayırt etme özenli bir şekilde olmalıdır.

İyi bilindiği gibi, enzimler yüksek substrat spesifikliği gösterir. Enzimlerden her biri sadece belirli substratı (spesifik substrat) seçer ve önceden belirlenen ürüne dönüştürür. Bu substrat spesifikliği, esasen enzimlerin substrat-bağlanma bölümleriyle seçici konuk bağlanmasından ileri gelir. Substrat molekülüne göre daha büyük olan bir enzim molekülünün yüzeyinde substrat molekülünün şeklini tamamlayan ve bu şekle oturan yarık ve çukurlar bulunmaktadır. Böylece substrat bir anahtar gibi enzimin aktif konumlarıyla etkileşir.

Doğadaki moleküler tanımlama, çoğu bilim adamlarını onları taklit etmeye teşvik etmektedir. Yapay reseptörlerin en önemli avantajlarından biri moleküler tasarımın serbest doğal oluşmasıdır. Yapılan çalışmalar sonucunda moleküler tanımlama için aşağıdaki faktörlerin uygun olması gerektiği belirlenmiştir:

1. Reseptör ve hedef molekülün fonksiyonel grupları birbirini tamamlayıcı olmalıdır.
2. Her iki bileşimlerin konformasyonel serbestliği minimize edilmelidir.
3. Kimyasal koşullar uygun bir şekilde ayarlanmalıdır.

Hedef molekülünün küçük olması halinde reseptörler başarılı bir şekilde sentezlenebilir. Endüstride, reseptörler reaksiyon karışımından hedef molekülleri ekonomik olarak ayırmak için ve atık sudan tehlikeli kimyasalları uzaklaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Ürünlerin ayrılması ve saflaştırılması bunların üretim ücretlerinin toplamının yarısından fazlasına karşılık gelmektedir. Bununla birlikte, endüstriyel ve günlük yaşamımızdaki pratik uygulamalara bakış açısıyla bu sentetik reseptörler bazı sakıncalara sahiptir. Bunlar; daha az elde edilebilirlik ve endüstriyel uygulamalar için daha pahalı olmalarıdır. İkinci olarak, büyük konuk moleküller için reseptörlerin tasarımı tamamen zordur. Üçüncü olarak, kesin moleküler tanımlama için bu sentetik reseptörlerle uygun reaksiyon ortamını sağlamak zordur.

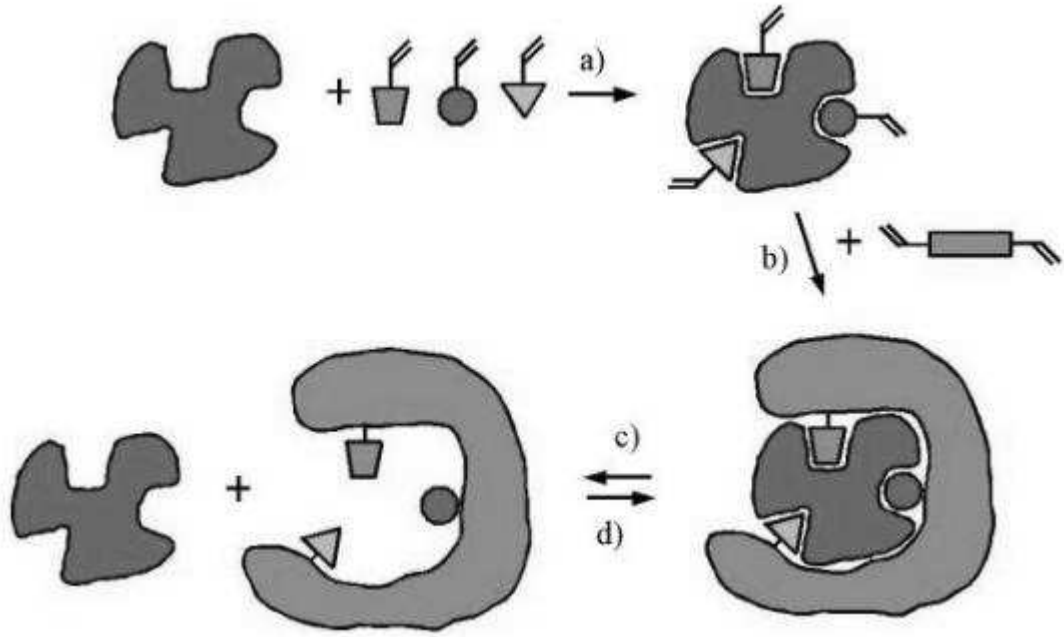
Moleküler baskılama yöntemi bu problemlere en iyi şekilde cevap verebilir. Hedef molekül varlığında uygun fonksiyonel monomerlerin basitçe polimerleştirilmesiyle, arzu edilen reseptörler ucuz bir şekilde ve fazla miktarda hazırlanabilir. Uygun monomerlerin, çapraz bağlayıcı ajanların birleşmesiyle hedef bağlanma bölgelerindeki kimyasal şartlar kolayca düzenlenebilir. Böylece hedef moleküle uygun reseptör kolayca elde edilebilirler. Bu özellikler moleküler baskılama yöntemini en cazip yöntemlerden birisi yapar. Büyüklüklerine bağlı olarak moleküler baskılanmış polimerler binlerce ya da milyonlarca bağlanma bölgelerine sahip iken biyolojik reseptörler bir veya birkaç bağlanma bölgesine sahiptir [7].

1.3. Moleküler Baskılama Yöntemi

Moleküler baskılama, ilgilenilen analit için seçici tanıma bölgelerine sahip sentetik polimerlerin hazırlanmasında kullanılan bir tekniktir. Moleküler baskılama yönteminde fonksiyonel monomerler, baskılanacak molekül ile polimerizasyon başlamadan önce ve polimerizasyon esnasında çapraz bağlayıcı varlığında moleküler etkileşime girerler. Polimerizasyon reaksiyonu sonucunda yüksek oranda çapraz bağlı polimer ağı oluşur. Baskılanan molekülün polimerden uzaklaştırılması sonucunda polimerde baskılanan moleküle kimyasal ve topolojik (büyüklük, şekil ve üç boyutlu yapı) olarak seçici bellekler elde edilir ve bir karışımda baskılanan molekül polimere seçici olarak tekrar bağlanabilir (Şekil 1.6.) [10-15].

Polimerizasyon, baskılanan molekülün uzaklaştırılması ve baskılanan molekülün tekrar bağlanması sırasında aşağıda belirtilen olaylar gelişmektedir:

- (1) Polimerizasyon sırasında;
 - a) Baskılanan molekül ile monomerin baskılama bölümleri arasındaki stokiyometrik etkileşimler gerçekleşmelidir,
 - b) Polimerizasyon süresince bağ kuvvetli olmalıdır,
 - c) Bağın uzayda yönlenmesi sabit olmalıdır.
- (2) Baskılanan molekülün uzaklaştırılması;
 - a) Baskılanan molekülün ayrılması ılımlı şartlarda gerçekleştirilmelidir,
 - b) Baskılanan molekülün mümkün olduğu kadar hepsi uzaklaştırılmalıdır.
- (3) Baskılanan molekülün tekrar bağlanması;
 - a) Çok hızlı ve tersinir etkileşimler gereklidir,
 - b) Bağlanma mümkün olduğunca seçici olmalıdır,
 - c) Bağlanma bölümleri uzayda belirli bir pozisyonda olmalıdır.



Şekil 1.6. Moleküler Baskılamanın şematik gösterimi a) Fonksiyonel monomer ile baskılanan monomer arasında kompleks oluşumu, b) çapraz bağlayıcı monomer ile kopolimerleşme, c) desorpsiyon/ekstraksiyon, d) adsorpsiyon/ tanımlama

Çapraz bağlı polimerlerin baskılanmasında baskılanacak molekül olarak metal katyonu kullanılabilir [9-14, 16-24]. Zayıf asidik çözeltilerden metal iyonunu adsorplayan metal iyon baskılanmış reçineler ilk defa Nishide tarafından hazırlanmıştır [9, 14, 15, 18]. Nishide ve arkadaşları metal iyonlarının varlığında çift fonksiyonlu reaktif ile çapraz bağlı düz polimer zinciri elde etmişlerdir. Metal iyonunun baskılanmasında, metal katyonu fonksiyonel monomer ile karıştırılarak kompleks oluşturulur. Çapraz bağlayıcı ile kopolimerizasyon gerçekleştirilir ve metal katyonu asidik çözeltilerle yıkanarak uzaklaştırılır. Baskılanmış polimerde baskılanan iyon için oyuklar oluşur ve baskılanmış polimer baskılanan iyon için seçicilik gösterir. Baskılanmış molekülün bağlanma bölgeleri analitin büyüklüğüyle ve şekliyle uyumludur ve ard arda kullanımlar analiti tanıma bölgelerini değişikliğe uğratmaz [16-22]. İyon baskılama işleminde polimerik adsorbanın seçiciliği ligandın spesifikliğine, iyonun koordinasyon sayısına ve geometrisine, iyonun yüküne ve büyüklüğüne bağlıdır [21, 23]. Metal iyon baskılanmış polimerler katı faz ekstraksiyonu ile önderiştirme ve diğer iyonların varlığında ayırma işlemlerinde kullanılır. Değişik iyonların hangi fonksiyonel monomerler kullanılarak polimerleştirildiği Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. İyon baskılama çalışmaları (DAAB: Diazoaminobenzen, DTPA: Dietilen triamin pentaasetik asit, VP: Vinilpridin, DMG: Dimetilgloksim)

Baskılanan İyon	Fonksiyonel Monomer	Oluşan Polimer	Kaynak
Cd ²⁺	4-Vinil pridin	p-Cd ²⁺ -DAAB-VP	17
Cd ²⁺	2-metakroilamidosisitein (MAC) 2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA)	p-Cd ²⁺ -HEMA-MAC	18, 15
Hg ²⁺	4-Vinil pridin	p-Hg ²⁺ -DAAB-VP	19
Gd ³⁺	p-Vinilanilin	p-Gd ³⁺ -vinilanilin-DTPA	12
Pd ²⁺	2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA) 4-Vinil pridin	p-Pd ²⁺ -HEMA-VP- quinolinin amino, hidroksi ve merkaptotürevleri	4, 14
Pd ²⁺	4-Vinil pridin-stiren	p-Pd ²⁺ -VP-DMG	8
UO ₂ ²⁺	2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA) 2-metakriloamidoglutamik asit (MAGA)	p-UO ₂ ²⁺ -MAGA-HEMA	20
UO ₂ ²⁺	2-metakriloamidoglutamik asit (MAGA)	p(MAGA- UO ₂ ²⁺ -co-EDMA)	6
Ni ²⁺	Metakriloamidohistidin (MAH)	p(EDMA-MAH/Ni ²⁺)	5
Cu ²⁺	2-Hidroksietilmetakrilat (HEMA) 2-metakrilamidofenilalenin (MAPA)	p-Cu ²⁺ -HEMA-co-MAPA	21
Cu ²⁺	Metakroilamidohistidin (MAH)	p(EDMA-MAH/Cu ²⁺)	7

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP); moleküler tanımlamaya elverişlidir, ucuzdur ve kolayca hazırlanabilir. Ayrıca moleküler baskılanmış polimerler yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlıkları, asitler, bazlar metal iyonlar ve organik çözücüler gibi ekstrem şartların varlığında yüksek kararlılıkları sebebiyle oldukça dayanıklıdır. Birkaç yıl boyunca performansında değişim olmaksızın saklanabilirler [15, 25-27]. Büyüklüklerine bağlı olarak moleküler baskılanmış polimerler binlerce ya da milyonlarca bağlanma bölgelerine sahip iken biyolojik reseptörler bir veya birkaç bağlanma bölgesine sahiptir [28].

Moleküler baskılama teknolojisi ayırma, kataliz çalışmaları, biyosensör teknolojisi ve yapay antibadi üretim alanlarında çalışma imkanı sunmaktadır [27]. Moleküler baskılamada kullanılan baskılanacak molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, çözücü ve başlatıcı etkili bir baskılama elde etmek için birbiri ile uyumlu olmalıdır.

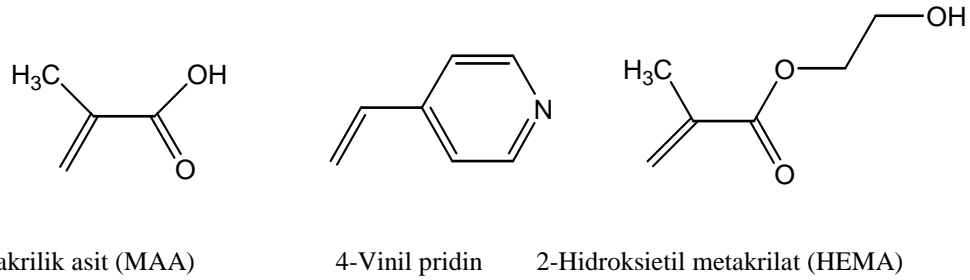
1.3.1. Baskılanacak Molekülün veya İyonun Özellikleri

Tüm moleküler baskılama işleminde baskılanacak molekül veya iyon fonksiyonel monomerdeki fonksiyonel gruplarla doğrudan etkileşeceği için baskılanacak molekül çok önemlidir. Baskılanan molekül için önemli olan parametreler; baskılanan molekülün polimerleşebilecek grup içerip içermediği, serbest radikal polimerizasyonunu engelleyecek veya yavaşlatacak grubun olup olmadığı (tiyol grubu ya da hidrokinon grubu), yüksek sıcaklıklarda baskılanan molekülün kararlı olup olmadığıdır (başlatıcı olarak AIBN kullanılmışsa sıcaklık 60 °C dolaylarında olmalı) [29]. Özellikle eser seviyelerde etkili ayırma ve zenginleştirme için baskılanacak molekülün kantitatif olarak uzaklaştırılması gerekmektedir. Etkili bir ekstraksiyon ile baskılanacak molekülün % 99'u kadarı uzaklaştırılabilir. Geriye kalan % 1'i kuvvetli bir şekilde bağlanmıştır ve materyalin ard arda kullanılması ile yavaşça atılır. Bu analizin duyarlılığını sınırlar. Fakat, MIP hedef analit için yeterli sayıda tanıma bölgesi oluşturur [30]. Baskılanacak molekül olarak, ilaçlar, aminoasitler, karbohidratlar, proteinler, nükleotit bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler ve iyonlar kullanılabilir.

1.3.2. Fonksiyonel Monomerler

Fonksiyonel monomerler baskılanmış bağlanma bölgelerinde bağlanma etkileşimlerinden sorumludur. Kovalent olmayan moleküler baskılamada baskılamanın gerçekleşmesi için genellikle daha fazla miktarda baskılanacak molekül kullanılır. Kovalent olmayan baskılama için baskılanacak molekül fonksiyonel monomer oranı 1:4 oranında yada daha yüksektir. Kompleks oluşumunu ve baskılama etkisini arttırmak için fonksiyonel monomerin

fonksiyonelliği ile baskılanacak molekülünün veya iyonun fonksiyonelliğinin uyuşması çok önemlidir. Bununla birlikte, iki ya da daha fazla monomer ile kopolimerizasyon gerçekleştirilecekse, monomerlerin reaktivite oranlarının kopolimerizasyonu gerçekleştirebilecek özellikte olması gerekmektedir. Fonksiyonel monomer ile baskılanacak molekül arasındaki kompleksleşme monomerin sterik ve elektronik etkisine bağlıdır. Asidik, bazik ve nötral özelliklere sahip bazı fonksiyonel monomerlerin adları aşağıda verilmiştir. Asidik: Metakrilik asit (MAA), p-vinilbenzoik asit, akrilik asit (AA), 2-(triflorometil)-akrilik asit (TFMAA), akriloamido-(2-metil)-propan sülfonik asit (AMPSA), Bazik: 4-vinil pridin(4-VP), 2-vinil pridin (2-VP), 4-(5)-vinilimidazol, 1-vinil imidazol, allilamin, N,N'-dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM), Nötral: Akrilamit, metakrilamit, 2-hidroksi metakrilat (HEMA), akrilonitril (AN), metilmetakrilat (MMA), stiren, etilstiren [29]. Yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler Şekil 1.7'de gösterilmiştir.



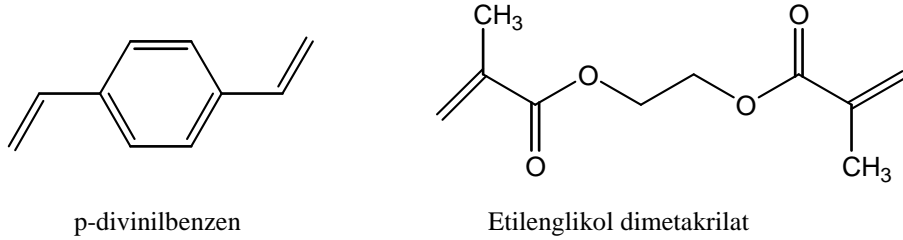
Şekil 1.7. Yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler

Sentezin kolay olması nedeni ile akrilik ve metakrilik asidin esterleri ve amidleri yaygın olarak kullanılır. Ticari olarak pek çok fonksiyonel monomer bulunur. Bununla birlikte ticari monomerler genellikle depolama esnasında istenmeyen polimerleşmelerin olmaması için inhibitör ve stabilizör (hidrokinon ve fenol gibi) içerirler. Bu nedenle ticari monomerler moleküler baskılama deneylerinde kullanılmadan önce damıtılmalıdır [7].

1.3.3. Çapraz Bağlayıcı

Baskılanmış polimerlerde çapraz bağlayıcılar öncelikle polimer matriksinin morfolojisinin (jel tipi, makro gözenekli ya da mikro jel toz halinde olması) kontrol edilmesini, baskılanmış molekülün veya iyonun bağlanma bölümlerinin kararlı olmasını ve polimer matriksinde mekanik kararlılığının olmasını sağlar. Kalıcı gözenekli (makro gözenekli) polimer elde edebilmek ve polimerin yeteri kadar mekanik kararlılığının olması için genellikle yüksek çapraz bağlama oranı tercih edilir. Polimerlerde çapraz bağlama oranı % 80'i aşmaktadır. Yüksek oranda çapraz bağlama, aynı zamanda baskılanmış polimerin çözücüde çözünmesini önler ve baskılanmış polimerlerin kullanımını kolaylaştırır. Etkili bir baskılama için, çapraz bağlayıcının reaktifliği ile fonksiyonel monomerin reaktifliği uyuşmalıdır. Aksi takdirde, fonksiyonel monomer ya da çapraz bağlayıcı ajan baskın olduğunda kopolimerizasyon etkili bir şekilde gerçekleşmez [29]. Fonksiyonel monomerdan oluşan fonksiyonel artıklar polimer ağında düzgün bir şekilde dağılır. Çapraz bağlayıcı ajanın fonksiyonel monomere olan mol oranı önemlidir. Eğer bu oran çok düşük ise, konuk bağlanma bölümleri birbirine çok yakın durumda kurulursa bunlar bağımsız olarak çalışamazlar. Bir taraftaki konuk bağlanma komşusundaki konuk bağlanmasını engeller. Son derece yüksek mol oranlarında ise özellikle çapraz bağlayıcının fonksiyonel monomer ve/veya baskılanan molekül ile non-kovalent etkileşimde baskılama etkisi zarar görür. Fazla miktarda çapraz bağlayıcı olduğunda polimerizasyon baskılanacak molekül etrafında gerçekleşir [31]. Moleküler baskılama için uygun birkaç çapraz bağlayıcı baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer gibi davranarak kendiliğinden kompleksleşebilir. Farklı türde çapraz bağlayıcı ajanının kullanılması ile konuk bağlanma bölgelerinin yapılarını ve bunların etrafındaki çevreyi kontrol edebiliriz. Organik çözücülerde moleküler baskılama için etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve divinil benzen yaygın olarak kullanılır. Suda çözünür çapraz bağlayıcı ajanı ise N, N'-metilenbisakrilamid (MDAA)'dir. p-divinil benzen(DVB), EDMA, tetrametilen dimetakrilat (TDMA), trimetilpropan trimetakrilat (TRIM), MDAA, N, N'-hekzametilen bisakrilamid, 1,3-diisopropenil

benzen (DIP) yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılardır. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar Şekil 1.8'de verilmiştir [32].



Şekil 1.8. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar

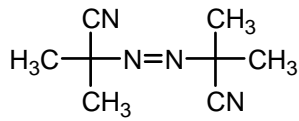
1.3.4. Çözücü

Çözücü polimerizasyonda baskılanacak molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı gibi tüm bileşenlerin tek fazda bulunmasını, gözenekli polimerde ise gözeneklerin oluşmasını sağlar. Bu nedenle çözücüye genellikle 'porogen' denir. Makro gözenekli polimer hazırlandığında, gözeneklerin yapısı ve seviyesi, morfolojisi ve toplam gözenek hacmini kontrol etmek için kullanılabilir. Çözücünün bu iki görevi yanında kovalent olmayan baskılama polimerizasyonunda baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu artırma gibi bir görevi de vardır. Polimerden konuk bağının bırakılmasını gözeneklilik kolaylaştırır. Polimerizasyonda çözücü molekülleri polimerlerin içine dahil edilir ve son işlemle uzaklaştırılır. Bu işlemler süresince, boşluk çözücü molekülleri tarafından polimerde gözenek olarak tutulur [29]. Çözücü bakımından az olarak hazırlanan polimer çok sert ve yoğun olur ve güçlükle baskılanacak molekülü bağlar. Çözücünün diğer bir rolü ise polimerizasyon reaksiyonu oluşurken sıcaklığı dağıtmasıdır. Aksi takdirde, reaksiyon karışımının sıcaklığı bölgesel olarak çok yüksek olur ve istenmeyen yan reaksiyonlar oluşur. Çözücünün seçimi baskılamanın türüne bağlıdır. Kovalent baskılamada tüm bileşenleri iyi bir şekilde çözdüğü müddetçe bir çok çözücü kullanılabilir. Non-kovalent baskılamada ise, fonksiyonel monomer ile baskılanacak molekül arasındaki kovalent olmayan etkileşiminin oluşumunu ve baskılama etkisini

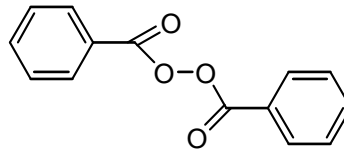
arttırmak için çözücü seçimi daha önemlidir. Kloroform çoğu monomer ve baskılanacak molekülü iyi çözdüğü için ve hidrojen bağlanmasını güçlük önlemesi nedeni ile çok yaygın olarak kullanılan çözücülerden biridir. Bununla birlikte, ticari kloroformda depolama süresince fosgen oluşumundan kurtulmak için etanolle stabilize edilir. Bu etanol monomer ile baskılanacak molekül arasındaki hidrojen bağlanmasını engellemesi nedeni ile çoğu moleküler baskılama için (özellikle kovalent olmayan baskılama için) uygun değildir. İyi bir sonuç elde etmek için kloroform kullanılmadan önce damıtılmalıdır [7]. Polimerizasyon çözücüsü, monomerlerle baskılanacak molekül arasındaki hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler gibi polar etkileşimlerin oluşmasını sağlamak için az polar ve aprotik olmalıdır [31]. Normalde toluen gibi protik olmayan çözücüler hidrojen bağını kararlı kıldığı için tercih edilir. Bununla birlikte, kompleksleşmede hidrofobik kuvvetler kullanılıyor ise çözücü olarak su seçilebilir [29].

1.3.5. Başlatıcı

Kompleksleşmenin hidrojen bağı ile gerçekleştiği durumlarda düşük polimerizasyon sıcaklığı tercih edilir ve bu şartlarda düşük sıcaklıklarda etkili olan fotokimyasal olarak aktif olan başlatıcılar tercih edilir. Azobisisobutironitril (AIBN), benzoilperoksit (BPO), azobisdimetilvaleronitril (ABDV), 4,4'-azo-(4-siyanovalerik asit) yaygın olarak kullanılan başlatıcılardır (Şekil 1.9.) [29].



Azobisisobütironitril



Benzoilperoksit

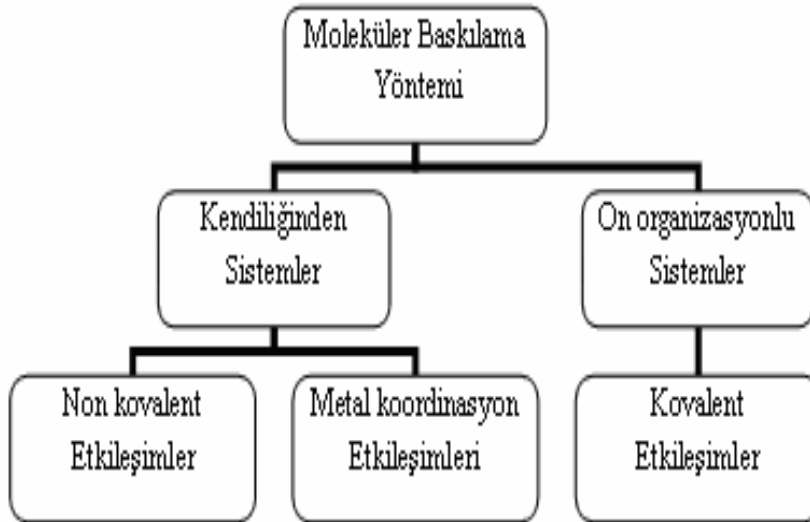
Şekil 1.9. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar

1.4. Moleküler Baskılama Çeşitleri

Günümüzde yapılan MIP çalışmaları iki kategoride sınıflandırılabilir (Şekil 1.10.).

1. Kovalent bağlanma
2. Kovalent olmayan bağlanma

Wulff ve ekibinin yapmış olduğu şekerlerin rasemik çözümü çalışmaları kovalent etkileşimleri içerirken, Mosbach ve ekibinin fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit kullanarak yaptığı polimerler kovalent olmayan etkileşimleri incelemektedir. Wulff ve arkadaşları tersinir kovalent bağlarla polimerizasyondan önce çözeltileri bir araya getirmişlerdir. Mosbach ve arkadaşları ise kendiliğinden olan yaklaşımla fonksiyonel monomer ile baskılanacak molekül arasında önhazırlık aşamasında kovalent olmayan yada metal koordinasyon etkileşimleri gerçekleştirmişlerdir. Her iki yöntemle de önemli ölçüde sağlam ve tamamen çözünmeyen polimer yüksek oranda çapraz bağlayıcı kullanılması ile elde edilir [25].



Şekil 1.10. Moleküler Baskılama yönteminin sınıflandırılması

1.4.1. Kovalent Bağlanma

Ön organizasyonlu moleküler baskılama yaklaşımında, polimerizasyondan önce baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomerler arasında kuvvetli, tersinir

bir kovalent düzenleme gerçekleşir [32]. Wulff ve çalışma arkadaşları 1977'de ilk kovalent baskılamayı gerçekleştirmişlerdir. 2:1 oranında p-vinilbenzenboronik asit ile 4-nitrofenil- α -D-monopyranoside (template)'in kovalent konjugesini sentezlemişlerdir ve bu konjugeyi metilmetakrilat ve etilen dimetakrilat (çapraz bağlayıcı monomer) ile kopolimerize etmişlerdir. Benzer olarak, Shea baskılanacak molekülün karbonil grubu ile fonksiyonel monomerin 1,3-diol grupları arasında ketal konjugesi oluşturmuştur ve bu kovalent konjugeyi moleküler baskılama amacıyla kullanmıştır. Polimerizasyon esnasında etkileşim sağlam ve bozulmamış olmasına rağmen ılımlı şartlarda baskılama etkisini kaybetmeden kolayca çıkarılabilmelidir. Bu bağlar boronik asit esterleri, asetaller, ketaller, schiff bazlar, disülfid bağlarında oluşur [7].

1.4.2. Kovalent Olmayan Bağlanma

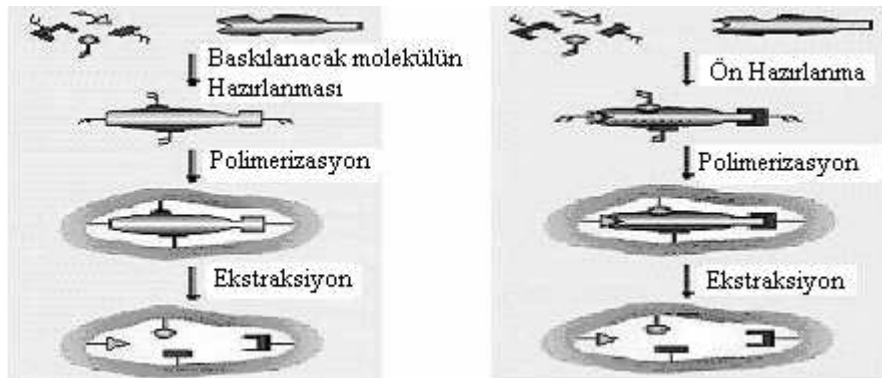
Mosbach ve çalışma arkadaşları moleküler baskılama için fonksiyonel monomer ve baskılanacak molekül arasında sadece kovalent bağların gerekli olmadığını göstermişler. Moleküler baskılamada kovalent olmayan etkileşimler doğadaki biyolojik etkileşimleri temel alır. Üstelik spesifik biyolojik tanıma çoklu etkileşimlerden oluşur. Moleküler baskılamada kalıp ve fonksiyonel monomer arasındaki kovalent olmayan yaklaşım sadece kalıbı tanıma değil aynı zamanda baskılanmış polimerdeki ligand-seçici bölgelerin üretimini de içerir [32].

Baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kovalent olmayan etkileşimler çok yönlüdür. Bu etkileşim türü zayıf olsa da kendiliğinden çoklu etkileşim bölümlerin oluşması ile bunun üstesinden gelinebilir. Bu bağ türlerinin hızlı birleşme-ayrılma kinetikleri sayesinde kısa zamanda çok fazla kombinasyonlar yapılabilir. Baskılamada kovalent olmayan etkileşimlerin kullanılmasıyla doğadakinine benzer tanıma bölgeleri oluşur [25]. Kendiliğinden moleküler baskılama yaklaşımında iyonik, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağı ve metal koordinasyonu gibi zayıf moleküller arası etkileşimler analit ile monomer kompleksi arasında gerçekleşir. Sıvı fazdaki kompleks kendiliğinden oluşur ve çapraz bağlayıcı ile polimerleştirilir [32]. Baskılanan molekül basit ekstraksiyon işlemi ile kolayca uzaklaştırılabilir. Çoğu önemli moleküller

(farmasötikler, herbisitler, biyolojik olarak aktif maddeler ve çevresel kirlilikler) non-kovalent etkileşimler için gerekli olan hidroksil, karboksil, amino, amit gibi polar gruplara sahiptir. Hidrojen bağı, monomer ile baskılanacak molekül arasında uzaklık ve yöne yüksek oranda bağlı olduğu için kesin moleküler tanıma için hidrojen bağı daha çok uygundur. Monomerdeki fonksiyonel gruplar (karboksil, amino, piridin, hidroksil ve amit grupları) seçilen baskılanacak molekül ile uyumlu olmalıdır. Kovalent olmayan etkileşimler her iki bileşenin pK değerlerinin kontrol edilmesi ile kontrol altına alınabilir. Asit ve bazın her ikisi de kuvvetli olduğunda proton asitten baza tamamen transfer olacağı için etkileşim daha çok elektrostatik etkileşim olur. Elektrostatik etkileşim uzaklık ve yöne daha az bağlı olduğundan kesin olarak moleküler tanımlama için çok istenmez. Asit ve bazın kuvveti orta seviyede olduğunda, proton asit ve bazın arasında bulunur ve böylece hidrojen bağı daha baskın özelliktedir. Bu koşullar altında etkili bir baskılama elde edilir. Asit ve bazın her ikisi de zayıf olursa etkileşim çok zayıf olur ve baskılama için uygun değildir.

1.4.3. Kovalent ve Kovalent Olmayan Bağlanmanın Avantajları ve Dezavantajları

Bu iki metottan herhangi biri, ihtiyaca ve bunların çalışma koşullarının durumuna bağlı olarak seçilmelidir. Moleküler baskılama yönteminde kovalent ve kovalent olmayan bağlanma şekli Şekil 1.11’de, avantaj ve dezavantajları ise Çizelge 1.2’de verilmiştir.



Şekil 1.11. Kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın şematik gösterimi

Çizelge 1.2. Kovalent ve kovalent olmayan bağlanmanın avantajları ve dezavantajları

	Kovalent	Kovalent olmayan
Monomer-baskılanacak molekül konjugesinin sentezi	Gerekli, zor	Gereksiz
Polimerizasyon Şartları	Oldukça serbest	Sınırlı
Polimerizasyondan sonra baskılanan molekülün uzaklaştırılması	Zor	Kolay
Baskılanacak molekülün bağlanması ve ayrılması	Yavaş	Hızlı
Baskılama Etkisi	Hedef moleküllerinin uzaklaştırılması sonucunda baskılama etkisi azalır	Fazla miktardaki fonksiyonel monomer spesifik olmayan bağlanma bölgeleri oluşturur ve bağlanma seçiciliği azalır

1.5. Polimerizasyon

Polimerlerin sentezi; zincir ve kondenzasyon polimerizasyonu olmak üzere başlıca iki grupta, polimerizasyon sistemleri ise 4 ana grup altında incelenebilir: Yığın polimerizasyonu, çözelti polimerizasyonu, süspansiyon polimerizasyonu ve emülsiyon polimerizasyonu. Moleküler baskılama için tüm polimerizasyon yöntemleri (radikal, anyon, katyon, kondenzasyon) kullanılabilir. Polimerizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan şey tüm bileşenlerin etkileşim içinde olmalarıdır. Bununla birlikte, radikal polimerizasyonu çok yönlü uygulanabilirliği, deneysel kolaylığı nedeni ile endüstride de ekonomik nedenlerle yaygın olarak kullanılır.

1.5.1. Zincir Polimerizasyonu

Bu yöntemde monomerler doğrudan birbirlerine katılarak makromolekül zinciri oluşturur. Bu türde, genellikle doymamış bağlar içeren etilen, stiren, vinil, klorür vb. dien veya vinil monomerlerinin polimerizasyonu söz konusudur. Zincir

polimerizasyonu serbest radikaller, iyonlar (katyon veya anyon) veya koordinasyon kompleksler üzerinden yürüyebilir. Bu yöntemin en önemli özelliği, polimer zincirinin çok kısa sürede (0.1 sn gibi) yüksek molekül ağırlığına (10^5 - 10^7 gibi) ulaşmasıdır. Reaksiyonun başlamasından çok kısa bir süre sonra dahi, ortamda çok az fakat çok yüksek molekül ağırlıklı polimer ve çok sayıda monomer vardır. Zamanın ilerlemesiyle monomer polimer dönüşümü artar, ancak oluşan polimer zincirinin boyu değişmez.

1.5.2. Kondenzasyon Polimerizasyonu

“OH”, “COOH”, “NH₂” vb. gibi fonksiyonel gruplardan en az iki tane taşıyan monomerler esterleşme, amitleşme vb. reaksiyonlarda genellikle H₂O, NH₃, CO₂, N₂ vb. küçük moleküller çıkararak kondenzasyon polimerlerini oluştururlar.

Kondenzasyon polimerizasyonu basamaklı polimerizasyon olarak da adlandırılır. Çünkü bu tür polimerizasyonda, önce monomerler birleşir ve dimerler oluşur. Daha sonra monomerler dimerle birleşerek trimerleri oluştururlar ve böylece adım adım oluşan zincirin boyu uzar. Bu özellik kondenzasyon ve zincir polimerizasyonları arasındaki en önemli farktır. Bu türde, her uzunluktaki polimer zinciri, reaksiyon süresince, aynı olasılıkla boyunu uzatarak büyür. Polimerizasyonun başlatılmasından bir süre sonra örneğin, ortalama molekül ağırlığı yaklaşık 10.000'e ulaştığında, ortamdaki monomerlerin tamamına yakın bir bölümü reaksiyona girmiştir. Ancak polimerizasyonun sonuna doğru polimer zinciri son boylarına ulaşılabilir [33].

1.5.3. Polimerizasyon Yöntemleri

1.5.3.1. Yığın Polimerizasyonu

Monomerlerin doğrudan doğruya veya pek az katkı maddesi ile polimerizasyonuna dayanır. Kondenzasyon polimerizasyonuna uğratan monomerler genellikle bu yöntemle polimerleştirilir. Yabancı maddelerin

polimerizasyon ortamına girme olasılığı düşük olduğundan polimerik ürünün ayrılması kolaydır.

1.5.3.2 Çözelti Polimerizasyonu

Polimerizasyona uğrayan monomer, reaksiyona katılmayan bir çözücü içinde polimerleştirilirse yığın polimerizasyonunun bir çok sakıncası önlenmiş olur. Çözücü, polimerizasyon ortamını seyrelttiği için viskozite düşer, karıştırma kolaylaşır ve daha etkin bir ısı transferi sağlanmış olur.

1.5.3.3. Süspansiyon Polimerizasyonu

Bu işlemde monomer uygun bir dağıtma ortamında süspansiyon haline getirilir. Dağıtma ortamı genellikle sudur. Başlatıcı monomer su damlacıkları içinde çözülür. Ortam sürekli olarak karıştırılarak süspansiyonun devamlılığı ve uygun bir sıcaklık programı ile monomer damlacıklarının küresel polimer partikülleri haline dönüşmesi sağlanır. Süspansiyon polimerizasyonu ile 10 µm'den 10 mm'ye kadar çok değişik boy aralığı ve dağılımında polimer üretilebilmektedir. Her monomer damlacığı başlatıcı içerir ve ısıtılınca diğerlerinden bağımsız olarak polimerleşir. Reaksiyon hızı yığın polimerizasyonuna göre daha hızlıdır. Sonlanma ve zincir transferi yavaş olduğundan, daha büyük molekül ağırlıklarına ulaşılır. Yığın prosesine göre en önemli avantajı, düşük ortam viskozitesi ve iyi karıştırma nedeniyle sıcaklık kontrolünün mükemmel olmasıdır. Dahası dağıtma ortamı olarak kullanılan su ucuzdur ve yanma, patlama ve toksiklik gibi yan etkileri yoktur.

1.5.3.4. Emülsiyon Polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu radikal zincir polimerizasyonu için önemli bir yöntem sağlar. Bunun için suda çözünmeyen bir monomerin önce emülsiyon halinde dağılması gerekir. Bu tür polimerizasyon süspansiyon polimerizasyonundan farklıdır, polimerizasyon mekanizması tümüyle değişiktir [33].

1.6. Moleküler Baskılı Polimerlerin Özellikleri

MIP'ler, yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlamlılıkları, asitler, bazlar, metal iyonlar ve organik çözücüler gibi ekstrem şartların varlığında kararlılıkları nedeniyle oldukça dayanıklıdırlar. Ayrıca polimerlerin depolama dayanıklılıkları da çok yüksektir. Dönüşümlü derecelerde onlarca yıl muhafaza edilebilme performansı gösterir yani polimer uzun süre özelliğini kaybetmeden tekrar tekrar kullanılabilir. Çizelge 1.3'de polimerlerin özellikleri ve karakteristikleri verilmiştir.

Çizelge 1.3. Polimerlerin özellikleri ve karakteristikleri

Özellikleri	Karakteristikleri
Fiziksel Dayanıklılığı	Mekanik baskıya, yüksek basınca ve yüksek ısıya dayanıklı
Kimyasal Dayanıklılığı	Asitlere, bazlara, çeşitli organik çözücülere ve metal iyonlara dirençli.
Depolama Dayanıklılığı	Performansı kaybetmeden çok uzun süre dayanabilir.
Kapasitesi	0.1-1 mg baskılanmış molekül/g polimer
Geri Dönüşümlülüğü	>99%

1.7. Moleküler Baskılı Polimerlerin Kullanım Alanları

Yapılan çalışmalar sonucunda MIP'lerin tanıma olayları başta olmak üzere başlıca kullanım alanları;

1. Moleküler tanımlama çalışmalarında kullanımı
2. MIP'lerin ayrılması ve izolasyonunda kullanımı
 - Kiral ayırmalar
 - Substrat-seçici ayırmalar
3. Polimerin antibadi ve reseptör taklidi olarak bağışıklık sistemi analizlerinde kullanımı
 - Ligand bağlı analizlerde rakip olarak
 - Tanı kullanımlarında
4. Polimerlerin katalitikte enzim taklidi olarak kullanımı
5. Biyosensör olarak kullanımı

1.8. Polimer Karakterizasyonu

Makroskopik ağı polimerler zorlu yapıları ve çözünemedikleri için karakterizasyonu zordur. Fonksiyonel grupların çevresini ve ulaşılabilirliğini belirlemek için ve bağlanma bölgelerinin tanımlanması nedeni ile polimerlerin karakterizasyonu gereklidir. Yapılması gereken karakterizasyon deneyleri ve uygulanan yöntemler aşağıda verilmiştir:

- Por sistemi, Yüzey alanı
 - Porozimetri
 - Mikroskopi (SEM)
 - Şişme ve çözücü alımı
- Konformasyonel geçişler, termo kararlılık
 - Termal Analiz (TGA, DSC)

- Polimer verimi, kompozisyon
 - Elementel Analiz
 - Katı hal NMR
- Kimyasal ve yapısal bilgi
 - Potansiyometrik titrasyonlar
 - FTIR
 - Katı hal NMR
 - Floresans

Zorlu yapıları ve çözünemedikleri için baskılanmış polimerlerin karakterizasyonunun çözelti halinde yapılması uygun değildir [7, 29].

1.8.1. Elementel Analiz

Elementel analiz bilinmeyen maddenin elementel bileşimi hakkında bilgi edinmek için kullanılan klasik metodlardan biridir. Elementel analiz, örneklerde bulunan C, H, N ve Cl'un kütle yüzdesi olarak ölçülmesinde kullanılır. Azot, halojen, sülfür, fosfor gibi elementleri içeren türlerin eklenmesi ya da uzaklaştırılması kolayca tayin edilebilir [29].

1.8.2. Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)

Çözünmeyen polimerlerin infrared spektrumu polimerlerin KBr peletlerinin hazırlanması ile kolayca elde edilir. Monomerlerin bandları ile polimerlerinkilerinin karşılaştırılması ile monomerlerin birleşmesinin boyutu belirlenebilir. Baskılanmış polimerlerin FTIR spektrumu elementel analiz gibi polimerin bileşimi hakkında ve örnek, fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı farklı çevrelerde olduğunda önemli bilgi verir [29].

1.8.3. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)

^1H -NMR ve ^{13}C -NMR çözülebilir polimerlerin düzeninin belirlenmesi için kullanışlı bir metottur. Çözünmeyen türler katı hal NMR ile analiz edilebilir. Ağ polimerleri için örnekteki farklı kimyasal çevre hakkında bilgi verir. Çapraz

polarizasyon sihirli aç ı spin, (cross-polarisation magic angle spinning, CP-MAS) ile farklı türdeki karbon atomlarının yaptığı ba ğ ıl miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. Bu özellikle divinil monomerlerinin polimerizasyonundan sonra geriye kalan reaksiyona girmemiş çift ba ğ ların miktarını belirlemek için yaygın olarak kullanılan tekniktir. Bununla birlikte baskılanmış polimerlere ba ğ lanmayı izlemek için de kullanılır [29].

1.8.4. Kuru Haldeki Gözenek Yapısı

Gözenekli maddelerin gözenek yapısı spesifik yüzey alanı, S (m^2/g), spesifik gözenek hacmi, V (ml/g), ortalama gözenek ç apı (A^o), gözenek büyüklü ğ ü dağılımı ile belirlenebilir. Bu parametreler genellikle azot ya da civa geçirgenlik ölçümleri gibi gaz adsorpsiyon-desorpsiyon ölçümleri ile belirlenebilir [29].

1.8.4.1. Azot Sorpsiyon Porozimetri

Azot sorpsiyon porozimetride belirli basınç serilerinde gaz belirli kütledeki kuru polimere uygulanır. Basıncın fonksiyonu olarak emilen gazın miktarının ölçülmesi yüzey alanı ve gözenek boyutu analizörü (BET) ve matematik modellerin uygulanması ile sorpsiyon izotermelerinden spesifik yüzey alanı (m^2/g), spesifik por hacmi (ml/g), ortalama gözenek ç apı ve gözenek büyüklük dağılımı elde edilebilir. Bu metod orta büyüklükteki ve küçük gözenekli polimerlerin analizi için kullanışlıdır. IUPAC'ın tanımına göre mikrogözenekli polimerler < 2 nm, orta gözenekli polimerler 2 nm-50 nm arası, makrogözenekli polimerler ise > 50 nm olarak belirlenmiştir. Her bir ekleme sonrası denge basıncının ve eklenen gaz miktarının kaydedilmesi sonucu adsorpsiyon izotermeleri adsorplanan gaz miktarının $0 < p/p_o < 1$ aralığında ba ğ ıl basıncın fonksiyonu olarak çizilir. (p : denge basıncı, p_o : saf sıvı emicinin doygunluk buhar basıncı). Gaz adsorpsiyonun mekanizması moleküler ç ap ile gözenek ç apı arasındaki orana ba ğ lıdır [29].

1.8.4.2. Civa Geçirgenliği

Belirli kütledeki kuru polimere çeşitli basınçlarda civa uygulanmasıdır. Bu metodla makro gözenekli yapılarda daha duyarlı sonuçlar elde edilmesine karşın azot sorpsiyon porozimetri ile benzer bilgiler elde edilir. Civa geçirgenliği yıkıcı bir teknik olduğundan dolayı materyalin mekanik olarak sağlam olması gerekmektedir.

1.8.4.3. Yüzey Alanları

Gözenek büyüklüğünün azalması ile yüzey alanı artar. Mikrogözenekli adsorbanlar: $> 500 \text{ m}^2/\text{g}$, ortagözenekli adsorbanlar: $10\text{-}500 \text{ m}^2/\text{g}$, makrogözenekli adsorbanlar: $< 10 \text{ m}^2/\text{g}$. Adsorbanların por büyüklüğüne bağlı olarak yüzey alanlarının hesaplanmasında farklı modeller uygulanır. Orta ve makro gözenekli adsorbanlar izotermin $0.05 < p/p_0 < 0.35$ bölgesinde en iyi BET ile ölçülür.

1.8.4.4. Gözenek Hacmi

Makro polimerler kuru haldeyken bile sürekli gözeneklidir ve gözenek ağını değerlendirmek için çözücü kullanılabilir. Alınan çözücü miktarının ölçülmesi ile polimerin spesifik por hacmi ölçülebilir (ml/g).

Eğer adsorban orta gözenekli ya da mikrogözenekli ise azot adsorpsiyon ölçümlerinden spesifik por hacmi ölçülebilir. Gözenek çapı 1000 \AA 'dan büyük olan makrogözenekli adsorbanlar için por hacmi, basınç-hacim eğrisinin integre edilmesi ile civa geçirgenliği ölçümleri ile belirlenebilir.

1.8.4.5. Mikroskopi (Taramalı Elektron Mikroskobu gibi)

Mikroskopi çeşitli büyüklük derecelerde baskılanmış polimerlerdeki farkı incelemede kullanılır. Örneğin ışık mikroskopi polimer mikrokürelerinin yapısal bütünlüğünü doğrulamada kullanılırken taramalı elektron mikroskobu makro gözenekleri görüntülemek için kullanılır.

1.8.5. Şişmiş Haldeki Gözenek Yapısı

Gözenekli adsorbanlar genellikle sıvı ortamında kullanıldıkları için şişme oranları önemlidir. Adsorbanlar belirli çözücü için polimerin ilgisine ve çapraz bağlayıcıların dağılımına ve derecesine bağlı olarak şişerler. Kuru polimer tüpe koyularak yüksekliği ölçülür. Ardından çözücü koyulur ve mikroküreler oda sıcaklığında şişerler [7, 29]. Mikrokürelerin yüksekliği işaretlenerek şişme oranı aşağıdaki eşitlik ile hesaplanır.

$$\text{Şişme oranı (\%)}: [(h_{\text{şişme}} - h_{\text{kuru}}) / h_{\text{kuru}}] \times 100 \quad (1.1.)$$

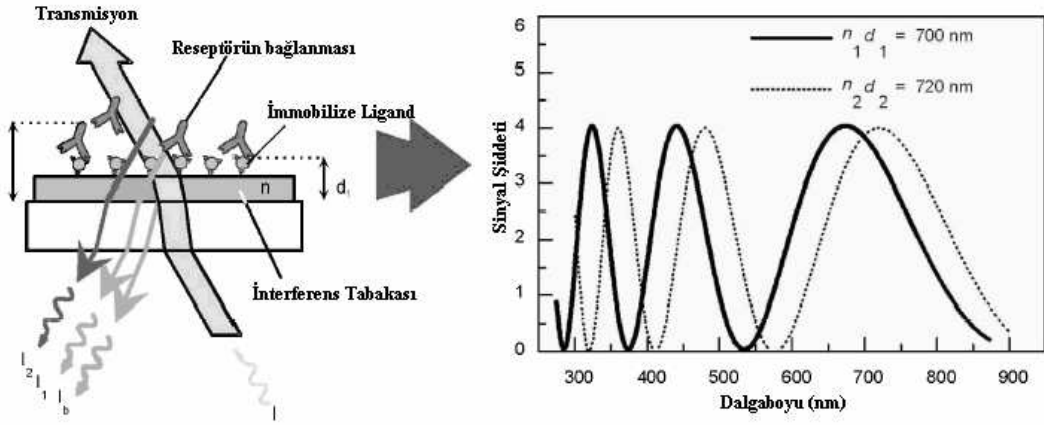
$h_{\text{şişme}}$: şişen kürelerin yüksekliği, h_{kuru} : kuru kürelerin yüksekliği

1.9. Elektrik Alanda Fiber Üretim Yöntemi

Elektrik alanda fiber üretim yöntemi , yüksek elektrostatik alana maruz bırakılan polimer çözeltisinin benzer yükler ile yüklenerek ayrışma ve incelme gösterip, çok ince fibril yapılar oluşturmasıdır. Bu yöntemde, en basit şekliyle bir polimer çözeltisi şırınga içine konur ve bu şırıngadan belirli bir mesafe uzağa toplayıcı-metal bir plaka yerleştirilir. Yüksek gerilim sağlayacak güç kaynağının artı ucu şırınganın metal olan ucuna bağlanırken, toplayıcı plaka topraklanır. Böylece şırınga ve toplayıcı plaka arasında yüksek bir elektrik alan elde edilmiş olur. Güç kaynağı tarafından sağlanan gerilim arttırıldıkça, yeterince yüksek bir değere ulaşan elektrik alan kuvvetleri çözelti üzerindeki viskoelastik ve yüzey gerilimi kuvvetlerini yener ve polimer molekülleri bir jet halinde şırıngadan toplayıcıya doğru taşınır. Toplayıcıda biriken lifler incelendiğinde, gözle görülemeyecek derecede hızlı bir şekilde gerçekleşen bu olayla mikron altı çaplara sahip liflerin üretildiği görülmektedir. Elektrik alanda fiber üretim olayı sırasında ister jet benzer yüklerin etkisiyle ayrışma gösterebilir, ister toplamda uzun bir yörünge takip ederek incelmış bir jet olsun, sonuçta toplayıcı plaka üzerinde nanoboyutta çaplara sahip liflerin oluşturduğu ağ vardır [34].

1.10. Reflaktometrik İnterferans Spektroskopisi

Bu optik tayin yöntemi ince, geçirgen bir tabakadaki beyaz ışığın yansımalarını kullanarak bu tabakanın optik kalınlığını belirlemek için kullanılır. Böylece çok düşük miktarlarda sensör çip yüzeyine bağlanan moleküllerin duyarlı ve zaman-bağımlı tayini gerçekleştirilebilir. Şekil 1.12 yöntemin temellerini özetlemektedir. Reflaktometrik interferans spektroskopisi, hızlı ve basit bir yöntemdir ve yüzeye bağlanan molekül etkileşimlerini belirlemek için kullanışlı bir tekniktir.



Şekil 1.12. Reflaktometrik İnterferans Spektroskopisinin temeli

Reflaktometrik interferans spektroskopisinde kullanılan biyoçipler cam yüzeye sahiptir. Böylelikle yüzeyde fonksiyonel grupların oluşturulması kolaylaşır ve biyoyumlu, spesifik olmayan bağlanmaların minimum olduğu yüzeyler elde edilebilir. Proteinler, peptitler, nükleik asitler ve DNA-oligonükleotitleri, karbonhidratlar, lipitler ve küçük ilaçlar karboksil, amino veya tiol grupları aracılığıyla yüzeye kovalent olarak immobilize edilebilir.

1.11. Elektrik Alanda Fiber Üretimi ve Yara Tedavisinde Kullanımı

Elektrik alanda fiber üretim yöntemiyle elde edilen nanofiberlerin doku mühendisliği, ilaç taşıma sistemleri, filtrasyon, koruyucu giysiler, sensörler gibi birçok alanda potansiyel uygulamaları vardır. Elektrik alanda fiber üretim

yönteminde uygulanan elektrik alanı, çözeltinin ortama verilmiş hızı, çözücünün uçma kapasitesi, polimer çözeltisinin konsantrasyonu, çözeltinin sıcaklığı gibi birçok parametrenin kontrol altında tutulma zorunluluğu yöntemi kompleksleştirmektedir. Ancak günümüzde birçok polimer bu metodla başarılı bir şekilde fiber haline getirilmektedir. Bu polimerlerden biri de HA'dır.

HA polianyonik bir asittir ve bu yüzden belli fizikokimyasal özelliklere ve önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Bağ dokusunun ekstrasellüler matriksinin bir bileşenini üreten, mikrobiyal biyoteknoloji ile elde edilen bir mukopolisakkarit olan bu molekülün en önemli fizyolojik fonksiyonu viskoz-elastik bir çözeltinin oluşumuna imkan vererek suyu tutmasıdır. Bu çözelti, esnekliğin daha az veya daha çok olmasından sorumlu olan kolajen liflerinin arasındaki boşluğu doldurur. İnsan cildinin yaşlanması, aynı zamanda su içeriğinde paralel bir azalma anlamına da gelen, HA içeriğinin azalması ile birlikte gerçekleşmektedir. HA, kozmetik formülasyonlarda yüzey nemlendirici olarak etki eder ve anti-ageing preparatlarda kullanılır. Epidermis içinde nemi tutar, nemlenmeyi düzenler, hücre kohezyonunu güçlendirir ve cildin çevresel saldırılara karşı daha dirençli olmasına yardımcı olur. Özellikle göz ameliyatları sırasında bu biyomateryalin kullanılmasıyla göz merceğinin olası hasarları önlenmektedir [35].

Elektrik alanda fiber üretim metoduyla oluşturulan HA nanofiberlerin polimer çözeltilerinin üstünlükleri, daha fazla yüzey alanına sahip olmaları, çok küçük por çaplarında yüksek poroziteye sahip olmaları ki bu sayede ekstrasellüler matriksi taklit etmeleri ve hücre göçünü ve çoğalmasını arttırmalarıdır [36].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

D-glukoronik asit ve metakroilklorür Sigma (St Louis, MO, USA) firmasından elde edilmiştir. Etilenglikoldimetakrilat Fluka AG (Buchs, Switzerland) firmasından alınmış ve etilenglikoldimetakrilat hidrokinonin inhibitörü ile vakum altında distile edilerek kullanılmadan önce 4°C'da saklanmıştır. Poly (vinyl alkol) (PVAL; MW: 100.000, 98% hidrolize) ve Azobisisobutironitril (AIBN) Aldrich (Milwaukee, WI, USA) firmasından temin edilmiştir. Tüm cam malzemeler kullanımdan önce seyreltilmiş nitrik asitle yıkanmıştır. Diğer bütün kimyasallar ve biyokimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Deneylede kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Tampon ve örnek çözeltileri 0.2 µm membran'dan (Sartorius, Göttingen, Germany) geçirilerek filtre edilmiştir. Histidin fonksiyonel monomeri, Metakrilamidohistidin (MAH) ve metal şelat monomeri, MAH-Cu(II), yayınlanmış prosedürlere göre sentezlenmiştir [37, 38].

2.2. Yöntem

2.2.1. Metakrilamidohistidin (MAH) monomerinin sentezi

2-metakriloamidohistidin monomerinin sentezi için uygulanan yöntemde; 5.0 g histidin ve 0.2 g NaNO₂, 30 mL K₂CO₃ (% 5, v/v) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C'a soğutulmuş ve 4.0 mL metakroilklorür, yavaşça bu çözeltiliye ilave edilmiştir. Karışım azot atmosferi altında, manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyonun sonunda, çözeltinin

pH'ı 7.0'ye ayarlanmış ve etilasetat ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz, döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAH), etanol ve etilasetat ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır.

2.2.2. Metakrilamidohistidin-Cu(II) Metal-Şelat Monomeri Sentezi

Metakrilamidohistidin-Cu(II) metal-şelat monomeri sentezi için MAH monomeri (1.0 mmol) 15 mL etanolde çözülmüştür. Üzerine 1.0 mmol bakır(II) sülfat penta hidrat yavaşca sürekli karıştırılarak eklenmiştir. Bu çözelti 3 saat karıştırma sonunda berrak mavi renk olur ve döner buharlaştırıcıda çözücüsü uzaklaştırılarak etanol/asetonitril karışımından kristallendirilmiştir.

2.2.3. D-glukoronik Asit Baskılanmış Polimerik Mikrokürelerin Hazırlanışı

Metakroil-(L)-histidin-Cu(II)-D-glukoronik asit ligand ön-organize monomerinin hazırlanışı MAH-Cu(II) ve kalıp D-glukoronik asit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MAH-Cu(II) (1.0 mmol) ve D-glukoronik asit (1.0 mmol), 3.0 mL etanol'de 20 dakika karıştırılarak çözülmüştür. Ardından D-glukoronik asit baskılanmış mikroküreler süspansiyon polimerizasyon tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Dispersiyon ortamı 60 mL suda 0.2 g poly(vinyl alkol) çözülerek sağlanmıştır. Önorganizasyonu yapılmış MAH-Cu(II)- D-glukoronik asit monomer kompleks (1.0 mmol) çözeltisine 8.0 mL EDMA/12.0 mL toluen-asetonitril çözeltisi eklenmiş ve 0.09 g AIBN monomer karışımında çözülmüştür. Bu çözelti daha sonra termostatik bir su banyosunun içinde bulunan cam bir polimerizasyon reaktöründe (100 mL) manyetik karıştırıcıyla (sürekli karışım oranı 600 rpm) karıştırılır.

Reaktör nitrojen kabarcıkları oluşturur ve daha sonra kararlı hale geçer. Reaktörün sıcaklığı 6 saat boyunca 75°C'de tutulur. Sonrasında 3 saat boyunca 90°C'de tutularak polimerizasyon tamamlanır.

Polimerizasyon sonunda D-glukoronik asit baskılanmış mikroküreler polimerizasyon ortamından ayrılır. Atıklar (bağlanmamış monomer, başlatıcı ve

çözücü) yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Oluşan mikroküreler 60/40 (v/v) etanol/su çözeltisiyle 24 saat boyunca muamele edilerek belleklerden D-glukoronik asit uzaklaştırılır. Su-etanol karışımıyla yıkanan mikroküreler 70°C’de etüvde 48 saat boyunca kurutulmaya bırakılır. Aynı yöntemle baskılanmamış mikroküreler MAH-Cu(II) ve EDMA kullanılarak hazırlanır.

2.2.4. D-glukoronik Asit Baskılanmış Mikrokürelerin Karakterizasyonu

2.2.4.1. Şişme Testi

D-glukoronik asit baskılanmış mikrokürelerinin su tutma oranı, deiyonize su kullanılarak volumetrik yöntemle belirlenmiştir. Bu işlemde 100 mg kuru polimer mezüre koyulup en üst noktası tüpe işaretlenmiştir. Daha sonra tüp deiyonize su ile doldurularak kürelerin oda sıcaklığında şişmesi her 30 dakikada mikrokürelerin yüksekliğinin işaretlenmesi ile belirlenmiştir. Tüpteki şişmiş kürelerin yüksekliği şişme oranının hesaplanmasında kullanılmıştır.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(h_{\text{şişmiş}} - h_{\text{kuru}}) / h_{\text{kuru}}] \times 100 \quad (2.1.)$$

$h_{\text{şişmiş}}$: şişen küreciklerin yüksekliği, h_{kuru} : kuru küreciklerin yüksekliği

2.2.4.2. FTIR Analizi

D-glukoronik Asit baskılanmış ve baskılanmamış mikrokürelerinin FTIR spektrumları, FTIR spektrometresi (Perkin Elmer Model 2000) kullanılarak elde edilmiştir. Kuru mikroküreler KBr ile karıştırılarak tablet hazırlanmış ve FTIR spektrumu çekilmiştir.

2.2.4.3. Elementel Analiz

Elementel analiz sonuçlarının belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. 1 mg monolitik polimer elementel analiz cihazının (Leco, CHNS-932, ABD) alimünyum hücreesine yerleştirilerek $\pm 0,0001$ g duyarlılıkla tartılmıştır.

Polimerik örnek cihaza koyularak yakma işlemi sonucunda örneğin karbon, hidrojen, oksijen ve azot analizi yapılmıştır.

2.2.5. Adsorpsiyon-Desorpsiyon Çalışmaları

2.2.5.1. Polimerik Mikrokürelere HA Adsorpsiyonu

Sulu çözeltilerden, HA adsorpsiyonu kesikli sistemde çalışılmıştır. Süspansiyonlar 200 mM NaCl ve 50 mM NaOAc tamponunda istenen pH aralığına (pH=6) 0.1 M NaOH ve 0.1 M HNO₃ eklenerek hazırlanmış ve pH \pm 0.1 birim aralığında dengede olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm deneylerde polimer konsantrasyonu 50mg/10 ml olacak şekilde sabit tutulmuştur. Süspansiyon ortamına belli miktarda Hiyaluronidaz enzimi ilave edilmiş ve HA'nın adsorpsiyonu için denge adsorpsiyon süresi 1 saat 600 devir/dakika hızda karıştırılarak elde edilmiştir. Bu süre sonunda sulu çözeltideki polimerik mikrokürelere santrifüj edilmesiyle sulu çözeltideki HA derişimi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (232nm). Cihazın cevabı bilinen derişimdeki HA standart çözeltileri ile periyodik olarak kontrol edilmiştir. Deneyler 3 kez gerçekleştirilmiş ve örnekler de 3 kez analiz edilmiştir. Her bir veri takımı için, ortalama ve standart sapmayı belirlemede standart istatistik metot kullanılmıştır. Hata payını belirlemek için her bir örnek takımı için değerler % 95 güven aralıklarında hesaplanmıştır. Birim kütle başına, mikrokürelere adsorplanan HA miktarının hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$Q = [(C_0 - C) \times V] / m \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte Q, birim polimer mikroküre başına adsorplanan HA miktarını (mg/g), C₀ ve C sulu çözeltideki HA'nın başlangıç ve son derişim değerlerini (mg/L), V sulu çözelti hacmi (mL) ve m ise kullanılan mikrokürelere kütlesini (g) vermektedir.

2.2.5.2. Polimerik Mikrokürelerden HA Desorpsiyonu

Adsorplanan HA, 1 M NaOH çözeltisinin kullanılması ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca 600 rpm hızında karıştırılarak desorbe edilmiştir. Sulu fazda son kalan HA derişimi spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Desorpsiyon oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon(\%)} = \frac{\text{Desorpsiyon ortamına salınan HA}}{\text{Adsorplanan HA}} \times 100 \quad (2.3.)$$

D-glukoronik asit baskılanmış mikrokürelerinin tekrar kullanılabilirliği, HA adsorpsiyon-desorpsiyon işleminin 20 kez aynı baskılanmış mikrokürelerin kullanılması ile belirlenmiştir.

2.2.6. *Streptococcus equi* Fermantasyon Ortamının Hazırlanması

2.2.6.1. Mikroorganizma

Streptococcus equi (RSSKno: 679, Kaynak: Liverpool) Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Kültür Koleksiyonu'ndan (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir.

2.2.6.2. İnokulumun Hazırlanışı ve Fermantasyon Ortamı

M17 Broth (polipepton, fitonpepton, yeast extract, nütrient broth, askorbik asit ve sodyum gliserofosfat içeren) içine Litre'ye 5g olacak şekilde glikoz ilave edilip inokulum ortamı hazırlanır ve deney tüplerinde mikroorganizma ekimi

gerçekleştirilerek 1 gece inkübasyona bırakılır. Fermantasyon ortamı 100 mL besiyeri için 2 g glikoz, 1 g yeast extract, 0.25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içerir.

Ardından 250 ml'lik erlenlere fermantasyon ortamını oluşturan besiyeri konular ve inokulumlardan 2'şer ml aktarılır. 20 saat 37 °C'de çalkalamalı etüvde 250 rpm'de inkübasyon gerçekleştirilir.

2.2.6.3. Fermantasyon Ortamından Önsaflştırma İşlemi

% 10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS) hazırlanır ve kültürün 100mL'sine 0,1mL olacak şekilde fermantasyon ortamına eklenerek 15 dakika muamele edilir. %10'luk Heksadesiltrimetilamonyum bromür hazırlanır ve kültüre 100'er µl olacak şekilde titrasyon işlemiyle ilave edilir. Dipte beyaz bir tortu oluşana kadar titrasyon işlemine devam edilir. 1 saat oda sıcaklığındaki muameleden sonra çökelti santrifüjle toplanır. 2M CaCl_2 hazırlanır ve kültürün 1 / 20'si kadar ortama eklenerek 4 saat 4° C'de muamele edilir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant toplanır.

2.2.7. Reflaktometrik İnterferans Spektroskopi Tekniği ile Süpernatant Kaynaklı HA Tayini

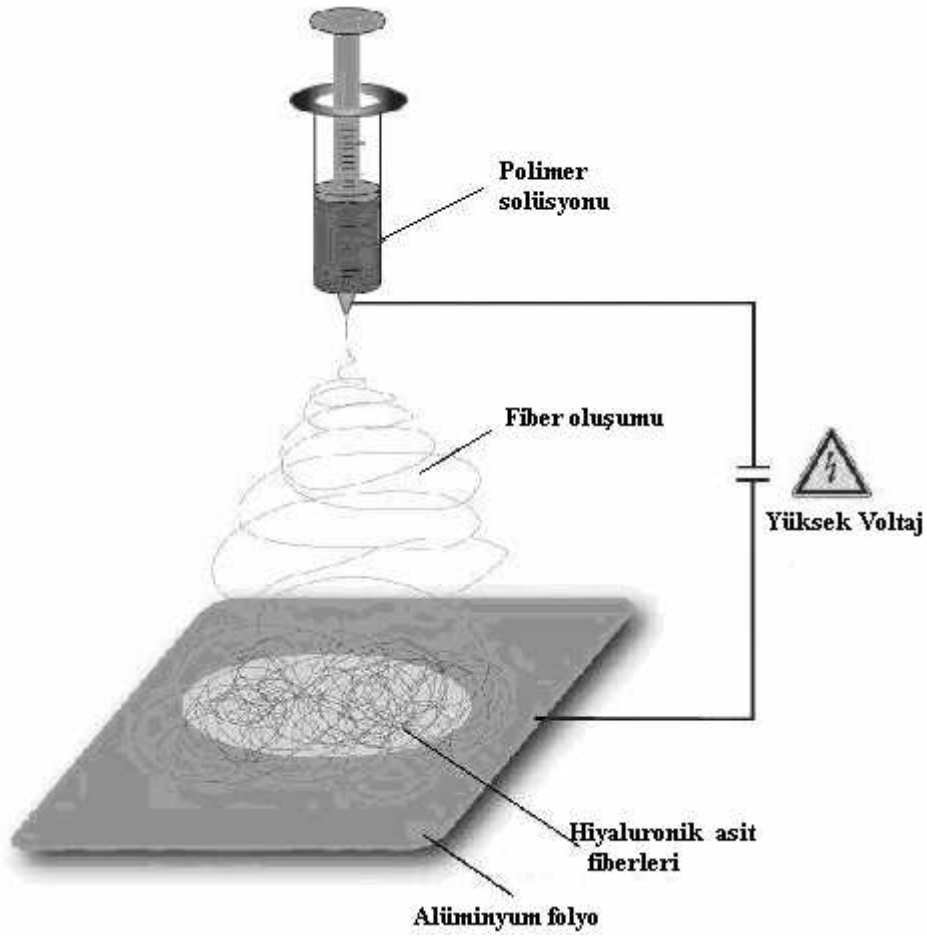
2.2.7.1. L-Tirozin Molekülünün İmmobilizasyonu

Karboksimetildekstran (CMD) kaplı biyosensör yüzeyine L-Tirozin molekülünün immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla L-Tirozin molekülünün 10 mM HBS (HEPES tampon tuzu) tamponunda 0.5 mg/mL'lik çözeltisi hazırlanmıştır. CMD biyoçipin aktivasyonu için 0.1 M NHS/EDC (*N*-

hidroksisüksinimid / 1-etil-3-(dimetilamino)-propilkarbodimid) (1:1) karışımı kullanılmıştır. L-Tirozin molekülünün immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50 ppm) HA çözeltileri hazırlanmış ve çip yüzeyi ile etkileştirilmiştir. Daha sonra süpernatant örnekleri derişimleri kalibrasyon doğrusundan hesaplanmıştır.

2.2.8. Elektrik Alanda HA Nanofiber Eldesi

0.1 g Hiyaluronik asit 10 mL distile suda manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözülmüştür. Şırıngaya çekilen çözelti Şekil 2.1'de gösterilen sisteme bağlanmıştır. Şırınga ucunun alüminyum tablaya uzaklığı 25 cm olacak şekilde ayarlanmıştır. Yüksek voltaj kaynağı'ndan (Model CZE 1000 R, Spellman) çıkan 22 kV'lik ve 15 kV'lik 2 farklı pozitif voltaj %0.1,% 0.5 ve %1 olan 3 farklı derişimde polimer çözeltilerine uygulanmıştır. Polimer çözeltisinin akış hızı dakikada 30 µL olacak şekilde ayarlanmıştır. Oluşan fiberler alüminyum tabla üzerinde toplanmıştır. Alimünyum folyolar temiz bir cam petri içerisinde alınmış ve üzerlerine belli oranlarda hazırlanan Etanol-su çözeltisi dökülmüştür. Etanol-su çözeltisi çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. 5 dakika bu çözelti ile muamele olan fiberler alüminyum folyodan ayrılmıştır. Oda sıcaklığında petriler etanolün uzaklaşması için kurutulmaya bırakılmıştır. Bu şekilde hazırlanan HA fibeleri çözelti içerisinde buzdolabında 1 hafta korunabilmektedir.



Şekil 2.1. Elektrik Alanda Fiber Üretim Düzenegi

2.2.9. Yara Tedavisi Çalışmaları

Yara tedavisi çalışması kapsamında 180–200 g ağırlığında albino Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar tek başlarına ayrı kafeslerde 22°C oda sıcaklığında barındırılmıştır. Her grupta beşer sıçan bulunacak şekilde deney hayvanları üç gruba ayrılmıştır.

Öncelikle hayvanlar Ketamin (45mg/kg) ve Sodyum Pentobarbütal (30mg/kg) ile anestezi edilmiş daha sonra sırt bölgesindeki tüyleri tıraş edilmiştir. Tıraş edilen bölgeler betadin ve %70'lik alkolle temizlenip sterilize edildikten sonra yara oluşturulacak bölge belirlenip işaretlenmiştir. İşaretlenen bölgede bistüri ile 2cm uzunluğunda yara oluşturulmuştur. Grup I'e HA çözeltisi, grup II'ye HA nanofiber çözeltisi ve grup III'e ise kontrol grubu olarak kullanılmak

üzere serum fizyolojik (0.2 mL) uygulanmıştır. Yaraların üzeri piyasada bulunan sterilize elastik yara bandı ile kapatılmıştır. Oluşan yaralar 7. günün sonunda kumpas ile ölçülmüştür. Yara boyutuna göre yara iyileşmesi değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

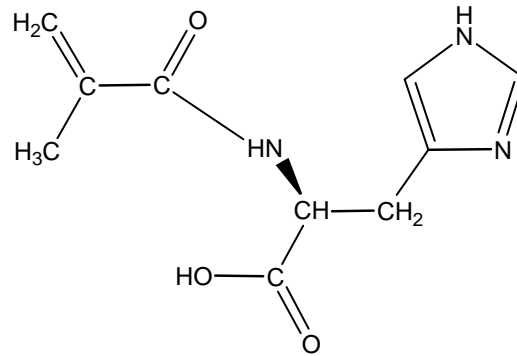
3.1. Polimerik Mikrokürelerin Karakterizasyonu

3.1.1. Şişme Testi

Baskılanmamış ve baskılanmış mikrokürelerin denge şişme değerleri sırası ile % 30 ve % 42'dir. D-glukoronik asit baskılanmamış mikroküreler ile D-glukoronik asit baskılanmış mikrokürelerin su tutma oranları kıyaslandığında baskılanmış mikrokürelerin su tutma oranları artmıştır. Polimer yapısında baskılama ile boşlukların oluşumu sayesinde polimer zincirinde daha fazla hidrodinamik hacim nedeni ile polimer matrisi daha fazla su tutmaktadır.

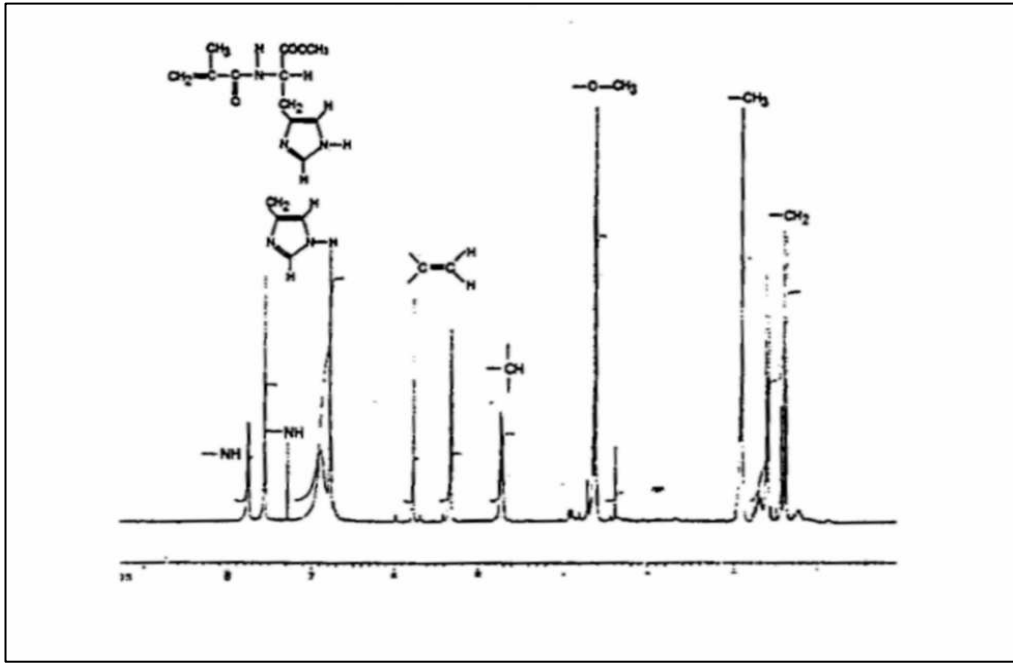
3.1.2. MAH monomerinin karakterizasyonu

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



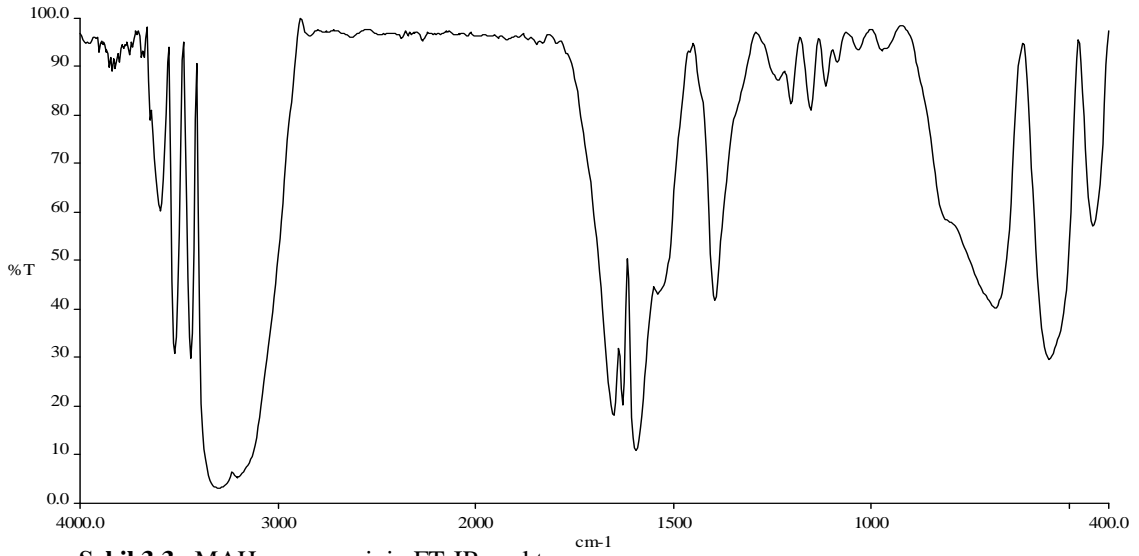
Şekil 3.1. Metakrilamidohistidin monomerinin molekül formülü

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



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

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



Şekil 3.3. MAH monomerinin FT-IR spektrumu

3.1.3. MAH-Cu(II) monomerinin karakterizasyonu

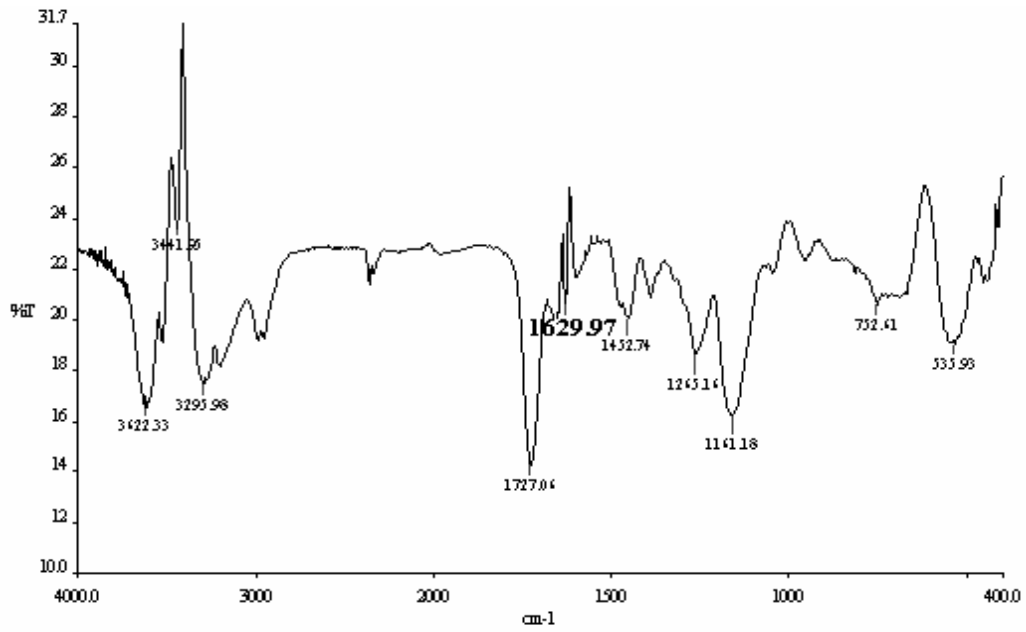
MAH-Cu(II) metal-şelat monomerinin karakterizasyonu için kullanılan FT-IR analizlerinin karakteristik pikleri şöyledir: Bozunma: ≥ 350 °C; FT-IR (KBr, cm^{-1}): $\nu = 3400$ ve 3250 (-CONH-); 3095 (vinyl C-H gerilme); 1680 (C=O karbonil gerilme); 1550 ve 1420 (C=C karboksilat gerilme, sim. ve antisim.);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

3.1.4. D-glukoronik asit bellekli polimerlerin karakterizasyonu

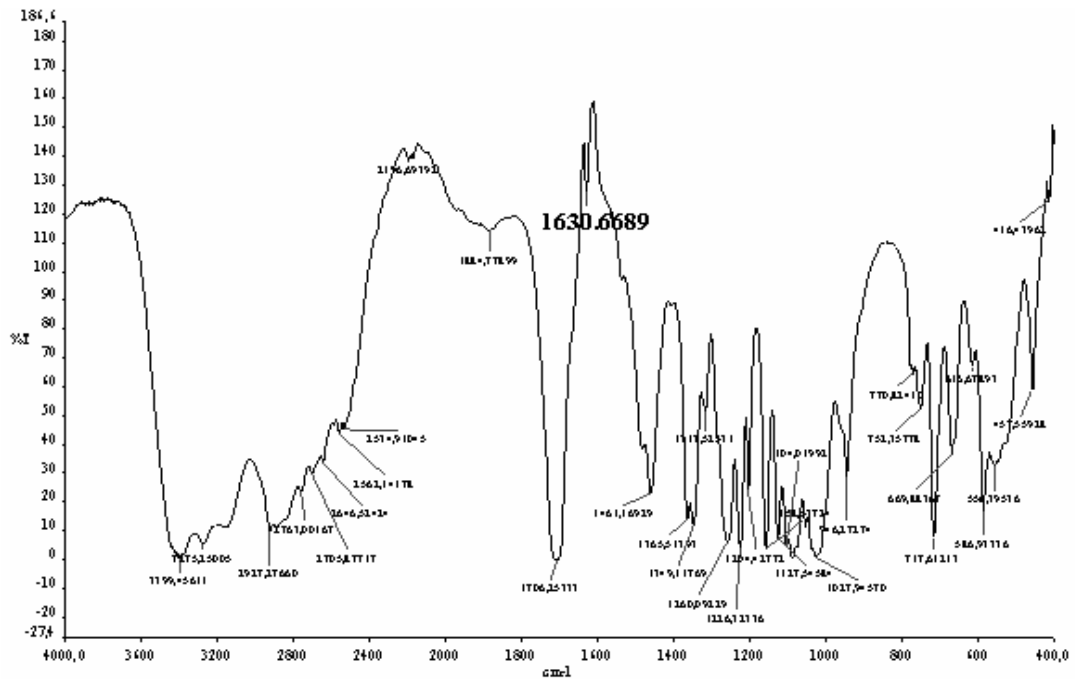
HA, yüzlerce D-glukoronik asit ve asetilglukozaminden oluşan bir yapıdır. Glukoz yapısındaki glukoronik asit molekülü hidroksillerinden metal-şelat etkileşimine girmektedir [24].

Bu bilgi ışığında biyo-uyumluluğa sahip polimerik mikrokürelerin yüzeyinde D-glukoronik asit bağlanma bölgesi ve yuva (D-glukoronik asit bellekli) hazırlanması için ilk aşamada D-glukoronik asit Cu(II) metal iyonları içeren histidin monomeri (MAH) iel muamale edilmiş ve D-glukoronik asit MAH-Cu(II) monomerine bağlanmıştır.

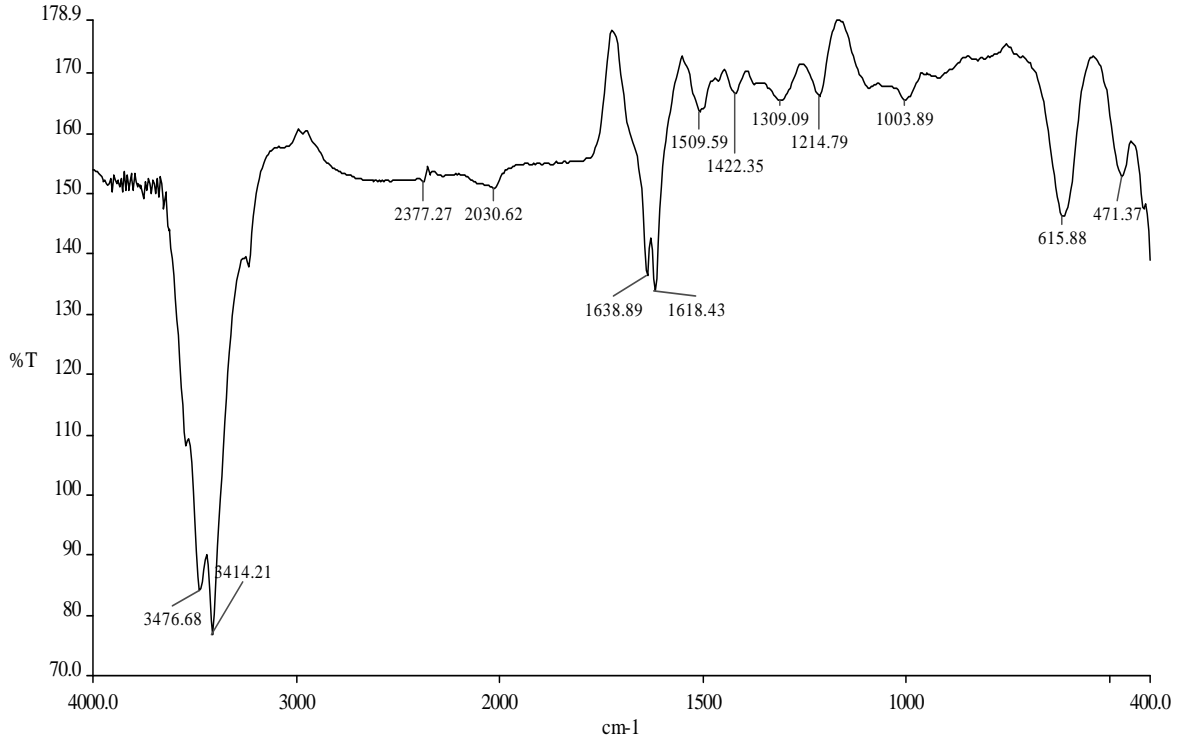
İkinci aşamada, D-glukoronik asit hedef bellekler eşliğinde metal-şelat monomerleri yüksek oranda çapraz bağlayıcı etilen dimetakrilat (EDMA) eşliğinde ısı yoluyla polimerleştirilerek baskılanmış ve D-glukoronik asit bellekli MIP biyoadsorbentler elde edilmiştir. D-glukoronik asit belleklerin oluşması için ise elde edilen MIP biyosorbentler metanolik KOH (potasyum hidroksit) çözeltisiyle yıkanarak D-glukoronik asit tanımlayan bölgeler boşaltılmıştır.



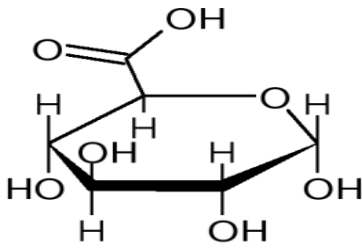
Şekil 3.4. D-glukuronik asit bellekler çıkarılmadan önceki çapraz bağlı polimerin FTIR spektrumu



Şekil 3.5. D-glukuronik asit'in FTIR spektrumu



Şekil 3.6. D-glukoronik asit molekülleri uzaklaştırıldıktan sonraki MIP'lerin FTIR Spektrumu



Şekil 3.7. D-glukoronik asit monomeri

D-glukoronik asit bellekler çıkarılmadan önceki çapraz bağlı polimerin FTIR spektrumu (Şekil 3.4.) ve D-glukoronik asit molekülleri uzaklaştırıldıktan sonraki MIP'lerin FTIR Spektrumu (Şekil 3.6.) karşılaştırıldığında ilk spektrumda gözlenen 1727 cm^{-1} 'deki bandın diğer spektrumda kaybolduğu gözlenmiştir. 1727 cm^{-1} 'deki bu bant D-glukoronik asit yapısında bulunan

karboksil grubundan kaynaklanmaktadır (Şekil 3.5.). Bu karboksil grubu Şekil 3.7'de görülmektedir. Ayrıca ilk spektrumda (D-glukoronik asit bellek öncesi) Cu-O titreşimine ait bant $\sim 536 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülmekle birlikte, bellek oluşumu sonrası yani D-glukoronik asit çıkarıldıktan sonra bu titreşime ait bant kaybolmuştur. Bu sonuçlar D-glukoronik asit belleklerin KOH ile yıkama sonrasında uzaklaştığını ve D-glukoronik asit yuvalarının oluştuğunu göstermektedir.

3.1.5. D-glukoronik asit bellekler çıkarılmadan önceki ve D- glukoronik asit molekülleri uzaklaştırıldıktan sonraki MIP'lerin elementel analiz sonuçları

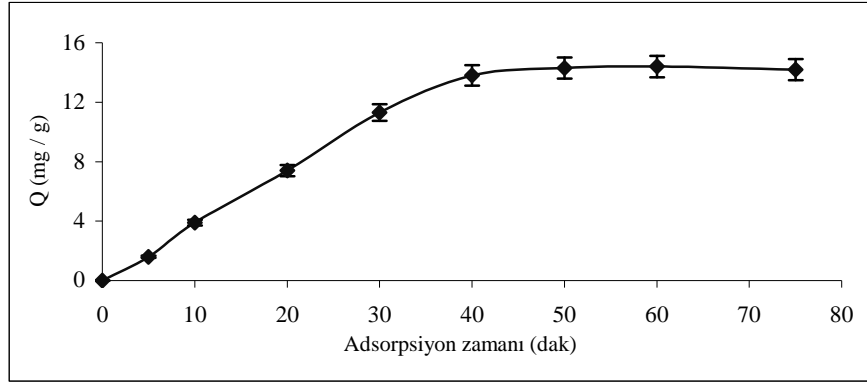
Elementel analiz sonuçlarına bakıldığında analitik olarak hesaplanan D-glukoronik asit bellekler çıkarılmadan önceki MIP'lerin C, H, ve N yüzdeleri: C, 24,00; H, 6,536; N, 0,031 şeklinde olup D-glukoronik asit molekülleri uzaklaştırıldıktan sonraki MIP'lerin C, H ve N yüzdeleri: C, 41,46; H, 6,680; N, 0,059 şeklindedir. D-glukoronik asit moleküler belleklerin çıkarılması sonrasında karbon, hidrojen ve azot yüzdelerindeki artış beklenen bir durumdur ve bellek oluşumunu desteklemektedir.

3.2. D-glukoronik asit-Baskılı Mikrokürelere Adsorpsiyon Çalışması

3.2.1 Adsorpsiyon Denge Zamanı

Baskılanmış mikrokürelere D-glukoronik asit adsorpsiyonunun denge adsorpsiyon zamanını bulmak için; oda sıcaklığında 10 ppm'lik HA çözeltisi pH: 7'de farklı süreler tutularak (5-75 dakika) polimerik yapı ile muamele edilmiştir. Şekil 3.8.'de polimerik mikrokürelere D-glukoronik asit adsorpsiyonunun zamanla değişim grafiği verilmiştir. Mikrokürenin yapısındaki D-glukoronik asit boşlukları ile D-glukoronik asit molekülünün geometrik şekil belleği nedeniyle HA adsorpsiyonu ilk 40 dakikada hızla gerçekleşmiş ve 50 dakikada doygunluğa

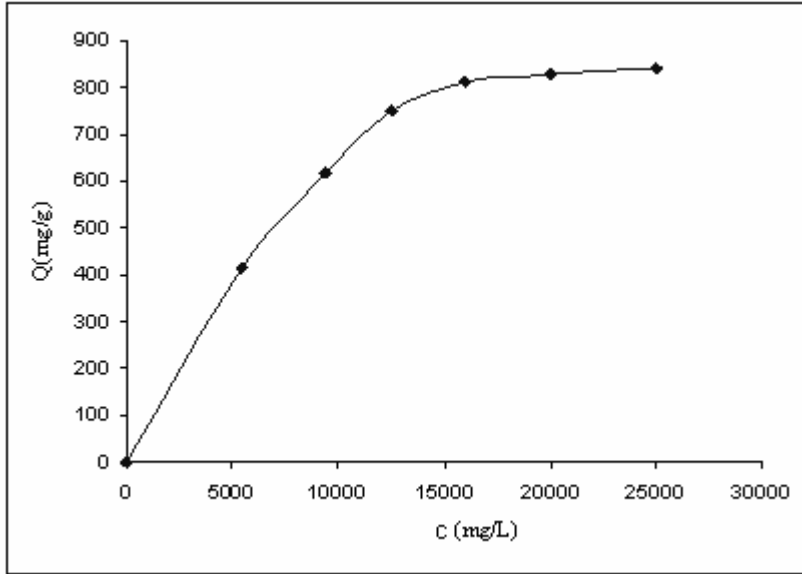
ulaştığı gözlenmiştir. Polimerin yapısından D-glukoronik asit molekülünün uzaklaştırılması ile D-glukoronik asit'in büyüklüğüne, şekline ve kimyasal yapısına uyumlu boşluklar oluşmaktadır. Bu çalışma sonucunda, HA molekülünün adsorpsiyonunun çok hızlı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.8. D-glukoronik asit baskılı mikrokürede HA molekülünün adsorpsiyon hızı

3.2.2. HA Başlangıç Derişiminin Etkisi

Şekil 3.9'da D-glukoronik asit baskılanmış mikrokürelere adsorplanan D-glukoronik asit molekülünün HA başlangıç derişimine etkisi verilmiştir. Polimerin birim kütlesi başına adsorplanan D-glukoronik asit miktarı, HA başlangıç derişiminin artması ile artmaktadır. D-glukoronik asit baskılanmış mikrokürelerin aktif bağlanma boşluklarının doygunluğa ulaşması, HA derişiminin 20000 mg/L değerine ulaşmasına kadar devam etmektedir. Baskılı mikrokürelerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 810 mg/g olarak bulunmuştur.



Şekil 3.9. Polimerik mikrokürelere adsorplanan D-glukoronik asit miktarının HA başlangıç derişimi ile değişimi

3.2.3. Adsorpsiyon İzotermi

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

$$Q = \frac{Q_{\max} b C_{\text{eq}}}{1 + b C_{\text{eq}}} \quad (3.1.)$$

Q = Adsorbana adsorplanmış HA derişimi (mmol/g)

C_{eq} = Çözeltideki HA denge derişimi (mg/L)

b = Langmuir sabiti (L/mg)

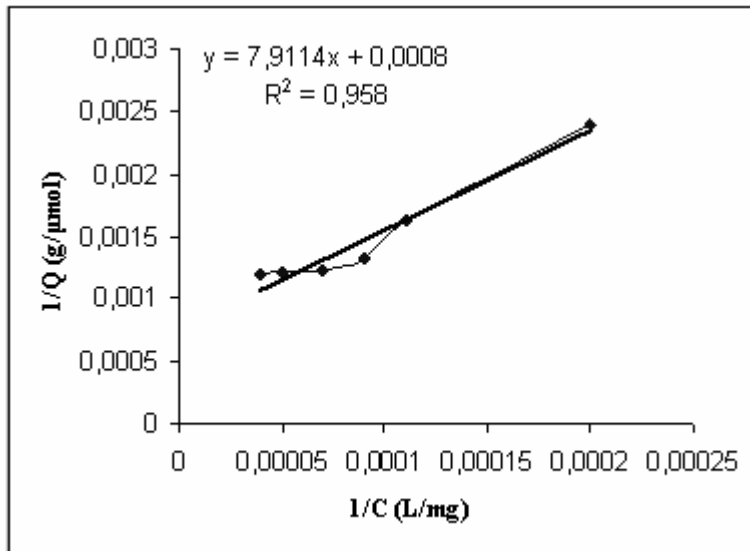
Q_{\max} = Maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mmol/g)

Bu denklem aşağıdaki gibi lineerleştirilebilir.

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

$1/Q$ 'ya karşı $1/C_{eq}$ grafiğe geçirildiğinde; kesim $1/Q_{\max}$, eğim ise $1/Q_{\max}b$ 'yi verir Şekil 3.10'da HA molekülünün adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir.

Adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyon özelliklerini değerlendirmek amacıyla yapılan kesikli deneylerle belirlenmiştir. Bu sistemler göz önüne alındığında, D-glukoronik asit baskılanmış mimik reseptör küreciklere HA adsorpsiyonu için Langmuir modelinin uygulanabilir olduğu gözlenmiştir. Deneysel veriler sonucunda, HA 'nın adsorpsiyonu için maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{\max}) elde edilmiştir. D-glukoronik asit baskılanmış mikroküreler için, korelasyon katsayısı (R^2) 0.958 gibi yüksek bir değer, maksimum adsorpsiyon kapasitesi 1250 mg/g ve Langmuir sabiti ise $1,01 \times 10^{-4}$ L/mg olarak bulunmuştur.



Şekil 3.10. HA molekülü için Langmuir Adsorpsiyon Modeli

Baskılı polimer ve D-glukoronik asit kalıp arasındaki bağlanma etkileşimleri ve eşitlikleri Scatchard analizi yöntemi ile elde edilmiştir. Bu analizde aşağıdaki eşitlik kullanılmaktadır.

$$\frac{B}{[F]} = \frac{B_{maks}}{K_D} - \frac{B}{K_D} \quad (3.3.)$$

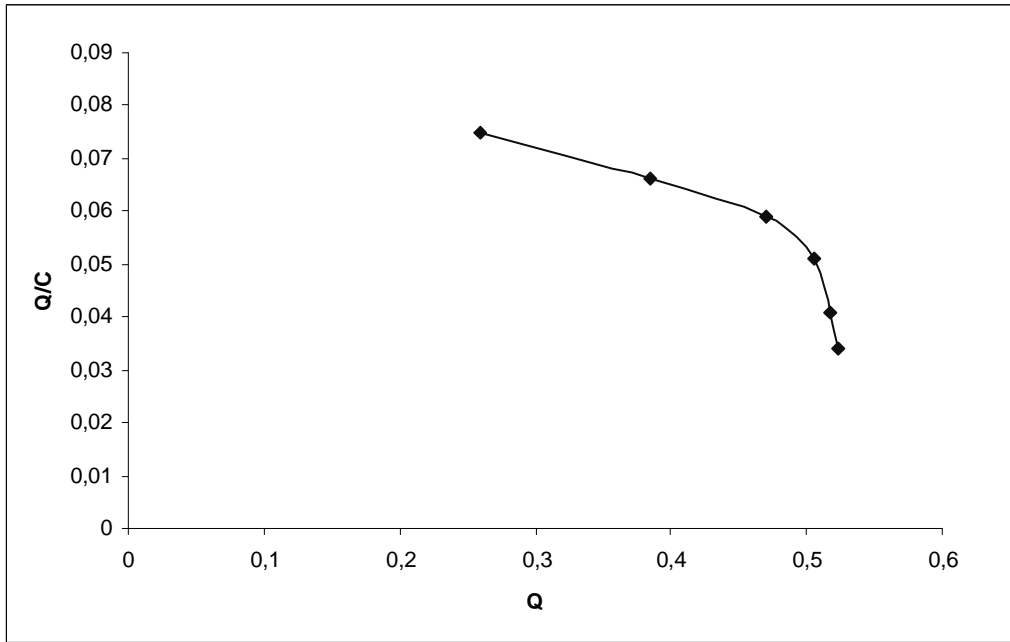
Bu eşitlikte;

B : Polimere bağlanan D-glukoronik asit miktarını

[F] : Serbest HA derişimini

B_{max} : Bağlanma bölgelerinin maksimum sayısını

K_D : Ligand-değişim temelli metal-şelat kopolimerinin ayrışma sabitini ifade etmektedir.



Şekil 3.11. D-glukoronik asit baskılı polimerin Scatchard eğrisi

Şekil 3.11’de görüleceği üzere iki farklı affinite bölgesi söz konusudur. Bunlardan

birisi $\frac{B}{[F]} = -0,0759B + 0,0949$ regresyon eşitliğiyle verilen, Ka’sı $75900M^{-1}$ ve

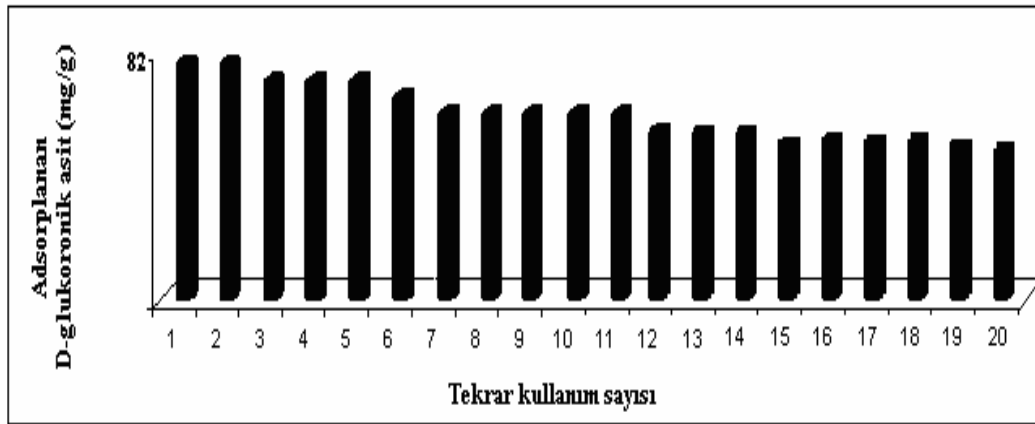
ligand-değişim bölgelerinin sayısı, B_{max} 1,250 µmol/g (2000 mg/g) olan bölgedir.

İkinci bölgenin ise regresyon eşitliği ise; $\frac{B}{[F]} = -0,4265B + 0,2613$, Ka değeri 426500 M^{-1} ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, B_{\max} $0,612 \text{ } \mu\text{mol/g}$ ($980,25 \text{ mg/g}$) olarak bulunmuştur. Bu Ka değerleri biyolojik reseptörlere ($10^5 - 10^7$) oldukça yakın değerler olup, HA bağlayan yapay reseptörlerin elde edildiğinin bir göstergesidir.

3.3. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

Adsorplanan HA, 1 M NaOH çözeltisinin kullanılması ile oda sıcaklığında 2 saat boyunca 600 rpm hızında karıştırılarak desorbe edilmiştir. Sulu fazda son kalan HA derişimi spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir.

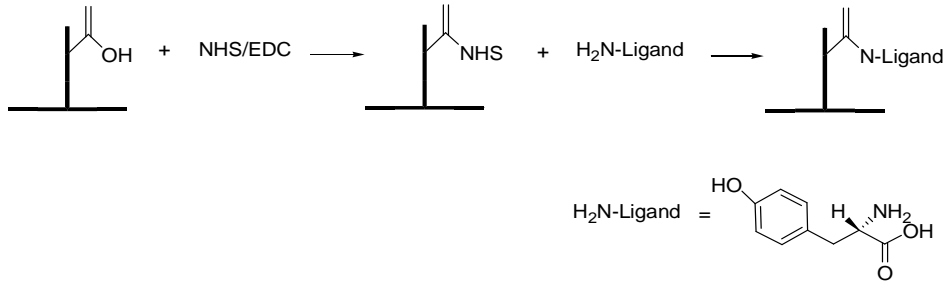
D-glukoronik asit baskılı mikrokürelerinin tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla aynı adsorbent 20 kez ardarda adsorpsiyon-desorpsiyon işlemine tabi tutulmuştur. Sonuç olarak, Şekil 3.12 'de görüldüğü gibi D-glukoronik asit baskılı mikrokürelerin adsorpsiyon kapasitesinde çok fazla kayıp olmaksızın tekrar tekrar HA ayrılmasında kullanılabilir olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.12. D-glukoronik asit baskılanmış mikrokürelerin tekrar kullanılabilirliği

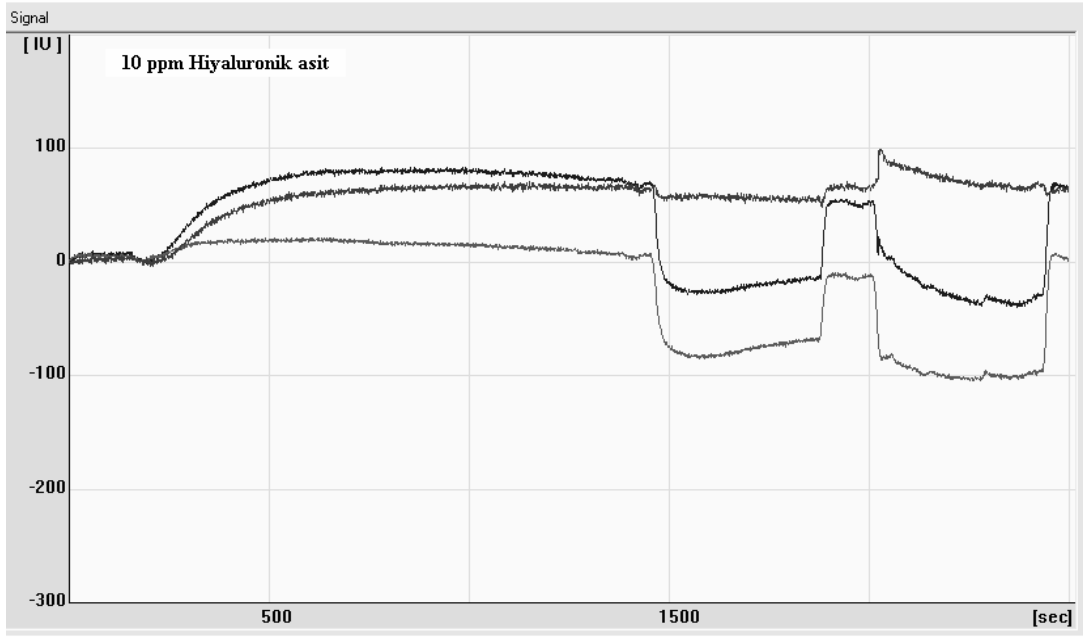
3.4. Refraktometrik İnterferans Spektroskopi Tekniği ile HA Tayini

Karboksimetildekstran (CMD) kaplı biyosensör yüzeyine L-Tirozin molekülünün immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çip yüzeyinin aktivasyonu ve ligand bağlanma reaksiyonu Şekil 3.13 'de verilmiştir.

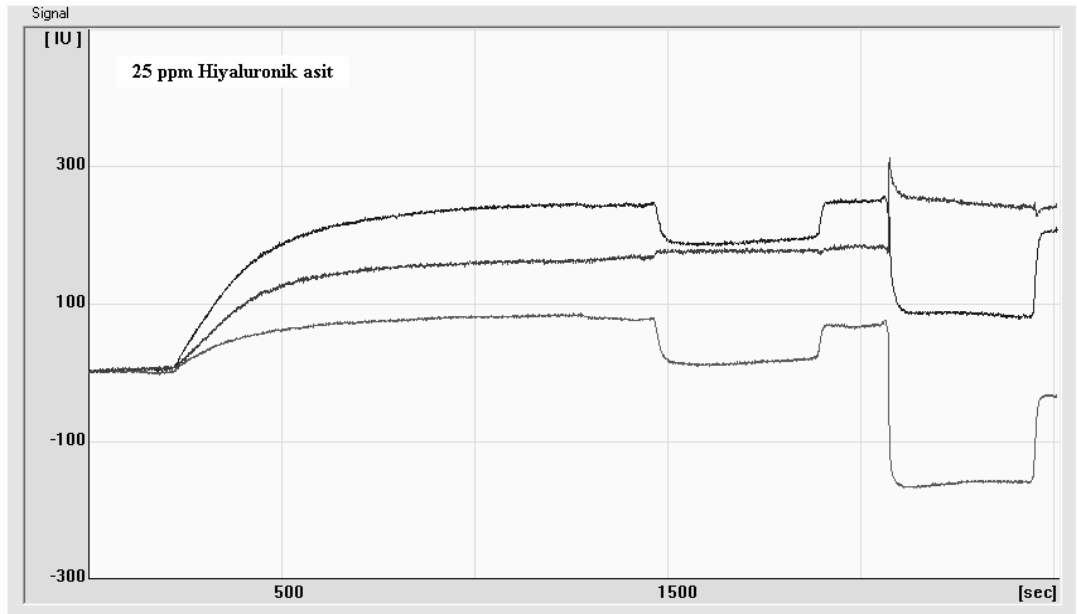


Şekil 3.13. Biyoçip yüzeyinin aktivasyonu ve ligand (L-Tyrozine) molekülünün immobilizasyonu

L-Tirozin molekülünün immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50 ppm) HA çözeltileri hazırlanmış ve çip yüzeyi ile etkileştirilmiştir. Artan HA konsantrasyonu ile bağlanma miktarının arttığı bulunmuştur. Şekil 3.14.'de sırasıyla 10, 25 ve 50 ppm konsantrasyonlarındaki HA çözeltilerinin spektrumları görülmektedir.

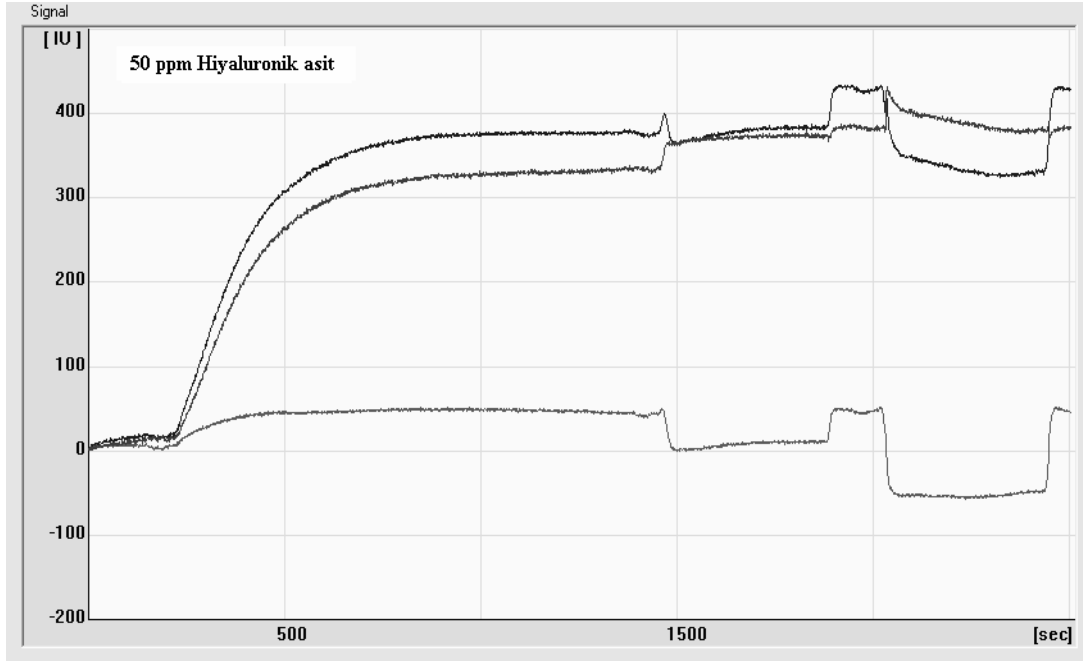


(a)



(b)

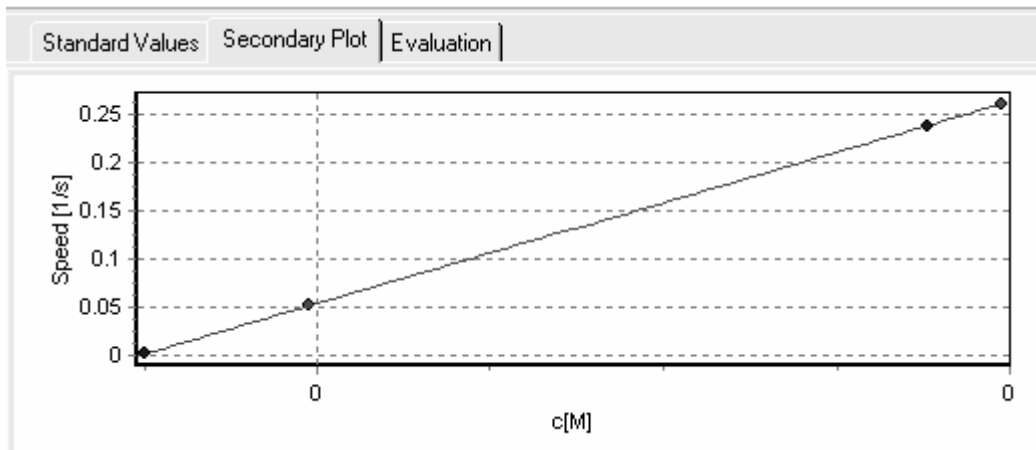
Şekil 3.14. Farklı konsantrasyonlarda HA çözeltisi spektrumları (a) 10 ppm HA çözeltisi spektrumu, (b) 25 ppm HA çözeltisi spektrumu, (c) 50 ppm HA çözeltisi spektrumu



(c)

Şekil 3.14. (Devam) Farklı konsantrasyonlarda HA çözeltisi spektrumları (a) 10 ppm HA çözeltisi spektrumu, (b) 25 ppm HA çözeltisi spektrumu, (c) 50 ppm HA çözeltisi spektrumu

Elde edilen bu spektrumlar kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 3.15'de görülmektedir.



Şekil 3.15. HA çözeltilerinin kalibrasyon grafiği

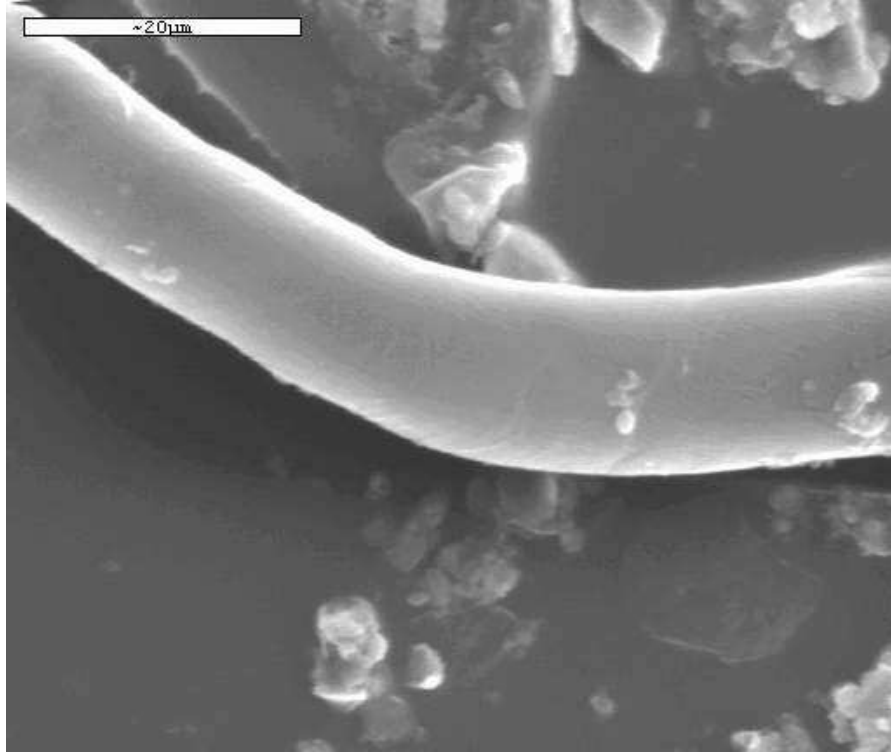
Oluşturulan kalibrasyon grafiği kullanılarak konsantrasyonu bilinmeyen HA çözeltileri (süpernatant) üçer kez ölçülerek analiz edilmiş ve örneğin derişimi 2268 ± 33 mg/L olarak belirlenmiştir.

3.5. Elektrik Alanda Üretilen HA Nanofiberleri

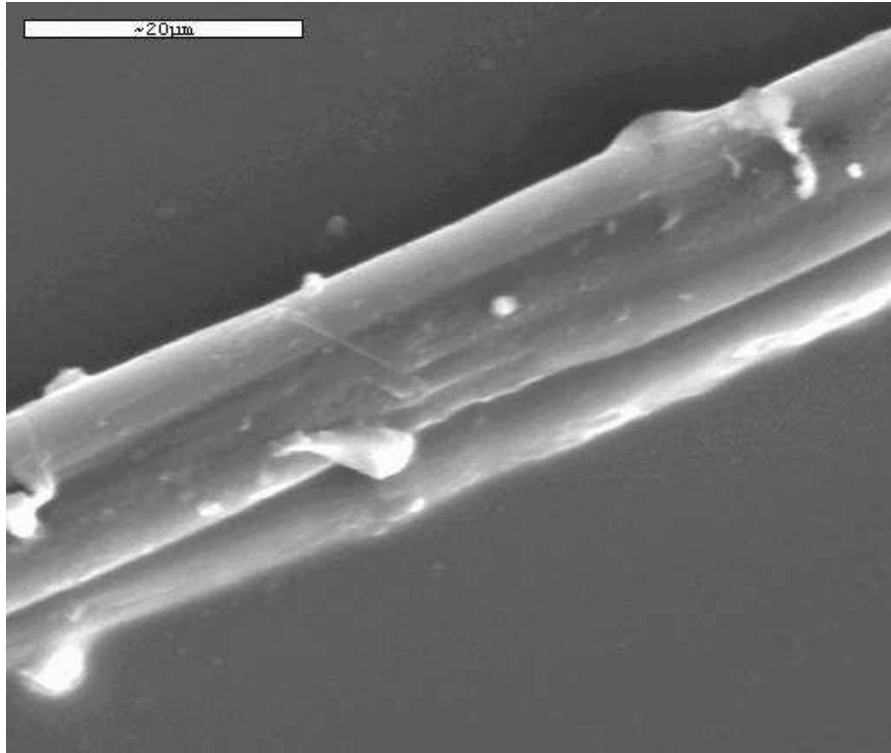
HA nanofiberlerinin morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. 22 kV'lık ve 15 kV'lık 2 farklı pozitif voltaj %0.1,% 0.5 ve %1 olan 3 farklı derişimde polimer çözeltilerine uygulanmıştır. Ayrıca nanofiberlerin çapları üzerinde tuz (NaCl) etkisi de incelenmiştir. Uygulanan voltaj 22 kV değerine ulaştığı zaman elektrik alanda polimer çözeltilisinin nanofiber yapısına dönüşümü gerçekleşmiştir. Bu kritik voltaj değeri çözeltili derişimi ile yakından ilişkilidir (%1 HA).

Şekil 3.16(a) ve 3.16(b)'ye bakıldığında HA fiber çaplarının polimer derişimi arttıkça arttığı gözlenmektedir. Şekil 3.16(a) ve 3.16(c)'ye bakıldığında nanofiber çaplarının uygulanan voltaj arttıkça arttığı da gözlenmektedir. Bu beklenen bir sonuçtur; çünkü artan voltajla birlikte şırınga ucundan toplayıcıya daha fazla polimer çözeltilisi nanofiber formda ulaşır ve bu da nanofiberlerin çaplarını arttırır.

%1'lik tuz eklenmesiyle çözeltilinin yüzeyi daha fazla negatif yük ile yüklendiği için bu durumda nanofiber çaplarında bir küçülmeye neden olduğu görülmüştür (Şekil 3.16(d)).

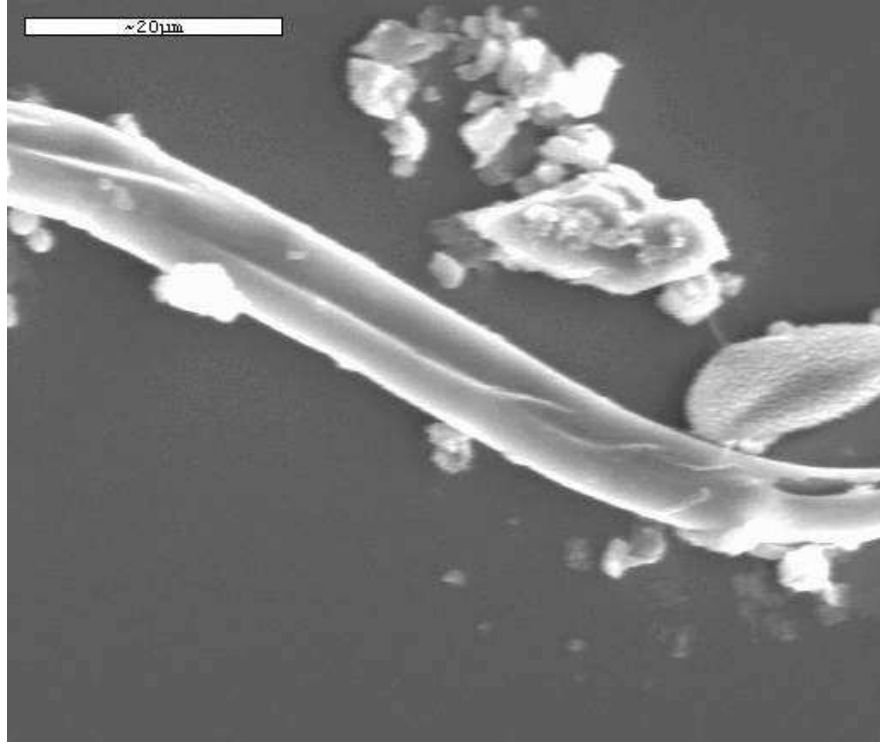


(a)

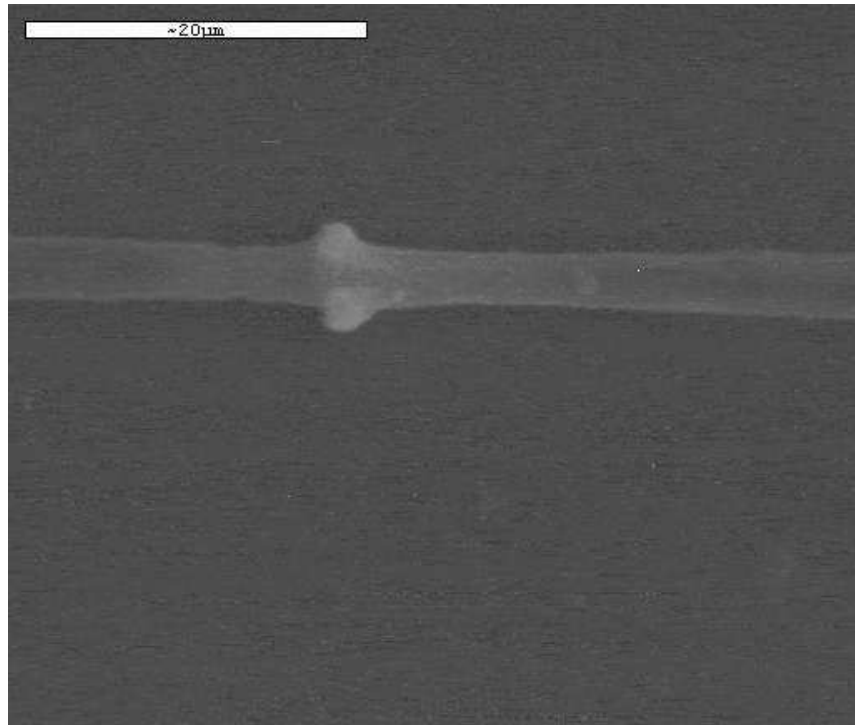


(b)

Şekil 3.16. Nanofiberlerin SEM görüntüleri; (a) %0.5 HA-22kV, (b) %1 HA-22kV, (c) %1 HA-15kV, (d) %1 HA+%1 NaCl-22kV



(c)



(d)

Şekil 3.16. (Devamı) Nanofiberlerin SEM görüntüleri; (a) %0.5 HA-22kV, (b) %1 HA-22kV, (c) %1 HA-15kV, (d) %1 HA+%1 NaCl-22kV

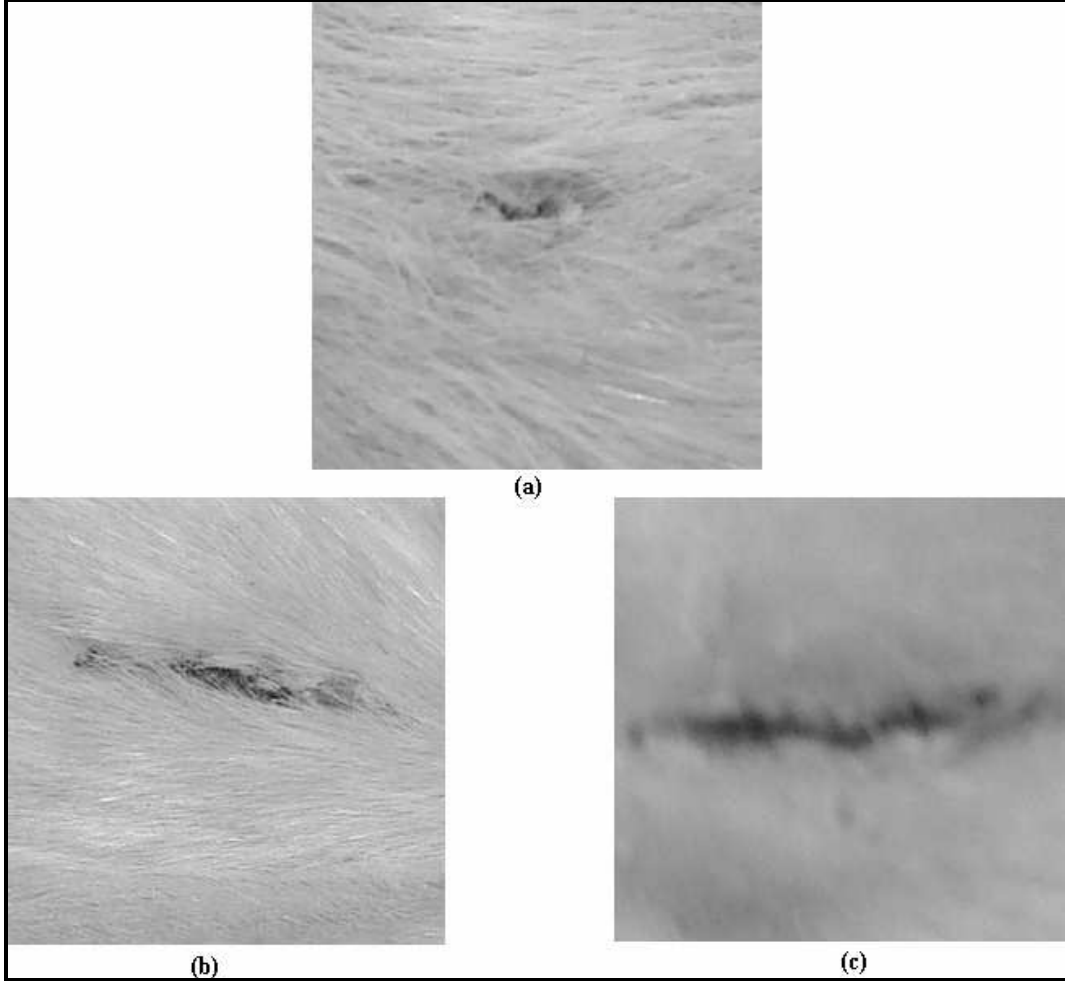
3.6. Yara Tedavisi Sonuçları

HA çözeltisi ve HA nanofiber çözeltisinin sıçanlarda yara iyileştirme üzerine etkisi araştırılmak üzere her birinde 5 hayvan olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. Grup I'e HA çözeltisi, grup II'ye HA nanofiber çözeltisi ve grup III'e ise kontrol grubu olarak kullanılmak üzere serum fizyolojik (0.2 mL) uygulanmıştır. Uygulamadan sonraki 7. günün sonunda yaralar kumpasla ölçülmüş ve çizelge 3.1'deki sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grupları ile beraber SPSS programında *student-t* testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Yaraların uzunluklarının ortalamaları 'ortalama±standart hata' şeklinde verilmiştir.

Çizelge 3.1. HA çözeltisi ve HA nanofiber çözeltisinin sıçanlarda yara iyileştirme üzerine etkisi (7. gün) n=5, *p < 0.05

Kontrol (Serum Fizyolojik)	HA çözeltisi (3g/L)	HA nanofiber çözeltisi (3g/L)
12.2±0.86 mm	7.8±1.56*mm	11.4±0.87 mm

Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi HA çözeltisinin yara iyileştirici etkisi kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. Buna karşılık HA nanofiber çözeltisinin yara iyileştirici etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hemen hemen aynı çıkmıştır. Şekil 3.17'ye bakıldığında da HA çözeltisinin uygulandığı yaranın hemen hemen kapandığını HA nanofiber çözeltisinin uygulandığı yaranın ise kontrol grubuyla aynı özellikte olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin HA nanofiber çözeltisinin seyreltik olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. HA nanofiber yapılarını kullanmamızın nedeni HA nanofiberlerin HA polimer çözeltilerinden daha fazla yüzey alanına sahip olmaları, çok küçük por çaplarında yüksek poroziteye sahip olmaları ki bu sayede extraselüler matriksi taklit etmeleri ve hücre göçünü ve çoğalmasını arttırmalarıdır. İleriki çalışmalarda, nanofiber yapının yara iyileştirici özelliğinin tespiti açısından nanofiberlerin bir sıvı ortamıyla değil de doğrudan yaraya temas ettirilerek farmakolojik ve histolojik açıdan yeniden değerlendirilmesi planlanmaktadır.



Şekil 3.17. 7. gün sonundaki yaraların durumu (a) HA çözeltisinin uygulandığı yara, (b) Serum fizyolojik (kontrol grubu) uygulanan yara, (c) HA nanofiber çözeltisinin uygulandığı yara

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ilk aşamada, tıbbi alanda artan ilgiyle kullanılan HA *Streptococcus equi spp.* bakterisinden üretilmiş ve ayrılması ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için biyolojik sistemlerle uyumlu ve HA için yüksek seçiciliğe sahip yeni nesil, MIP katı destekler kullanılmış ve saflaştırılan HA elektrik alanda nanofiber yapısına dönüştürülerek bu nanofiberlerin ve HA çözeltisinin yara tedavisinde etkileri incelenmiştir.

Öncelikle, HA üretimi fermantasyon tekniğiyle *Streptococcus equi spp.* bakterisi kullanılarak uygun besiyerinde gerçekleştirilmiş, ardından yapılan önsaflaştırma işlemi sonunda elde edilen süpernatanttan Refraktometrik İnterferans Spektroskopisi Tekniği ile HA tayini yapılmıştır. Bu teknikte öncelikle Karboksimetildekstran (CMD) kaplı biyosensör yüzeyine L-Tirozin molekülünün immobilizasyonu gerçekleştirilmiş, sonra kalibrasyon grafiğinin oluşturulması için farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50 ppm) HA çözeltileri hazırlanarak çip yüzeyi ile etkileştirilmiştir. Artan HA konsantrasyonu ile bağlanma miktarının arttığı bulunmuştur. Daha sonra süpernatant örnekleri derişimleri kalibrasyon doğrusundan hesaplanmış ve örneğin derişimi 2268 ± 33 mg/L olarak belirlenmiştir.

Polimerik mikrokürelerin yüzeyinde D-glukoronik asit bağlanma bölgesi ve yuva (D-glukoronik asit bellek bölgesi) hazırlanması için ilk aşamada D-glukoronik asit Cu(II) metal iyonları içeren histidin monomeri (MAH) ile muamele edilmiş ve D-glukoronik asit MAH-Cu(II) monomerine bağlanmıştır. İkinci aşamada, D-glukoronik asit hedef bellekler eşliğinde metal-şelat monomerleri yüksek oranda çapraz bağlayıcı etilen dimetakrilat (EDMA) eşliğinde ısı yoluyla polimerleştirilerek baskılanmış ve D-glukoronik asit bellekli MIP biyoadsorbentler elde edilmiştir. D-glukoronik asit belleklerin oluşması için ise elde edilen MIP biyosorbentler metanolik KOH çözeltisiyle yıkanarak D-glukoronik asit tanımlayan bölgeler boşaltılmıştır.

Sentezlenen MAH ve MAH-Cu(II) monomerlerinin karakterizasyonları $^1\text{H-NMR}$ ve FTIR spektrumlarıyla desteklenmiştir.

Ayrıca D-glukoronik asit bellekler çıkarılmadan önceki çapraz bağlı polimerin ve D-glukoronik asit molekülleri uzaklaştırıldıktan sonraki MIP'lerin FTIR spektrumları karşılaştırılarak D-glukoronik asit belleklerin KOH ile yıkama sonrasında uzaklaştığı ve HA bağlanmasına uygun D-glukoronik asit yuvalarının olduğu gösterilmiştir.

Sentezlenen D-glukoronik asit bellekli MIP bazlı katı sorbentin HA ayrılmasındaki etkinliği adsorpsiyon denge zamanı ve derişime bağlı olarak ortaya konulmuştur. Adsorpsiyon-denge zamanı çalışmasında mikrokürenin yapısındaki D-glukoronik asit boşlukları ile D-glukoronik asit molekülünün geometrik şekil belleği nedeniyle HA adsorpsiyonu ilk 40 dakikada hızla gerçekleşmiş ve 50 dakikada doygunluğa ulaştığı gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, HA molekülünün adsorpsiyonunun çok hızlı olduğu belirlenmiştir.

HA başlangıç derişimine etkisinde ise polimerin birim kütlesi başına adsorplanan D-glukoronik asit miktarı, HA başlangıç derişiminin artması ile artmakta olduğu bulunmuştur. D-glukoronik asit baskılanmış mikrokürelerin aktif bağlanma boşluklarının doygunluğa ulaşması, HA derişiminin 20000 mg/L değerine ulaşmasına kadar devam etmektedir. Baskılı mikrokürelerin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 810 mg/g olarak bulunmuştur.

Derişim etkisi çalışmalarından yola çıkarak adsorpsiyon izotermeleri, adsorpsiyon özelliklerini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışma göz önüne alındığında, D-glukoronik asit baskılanmış mimik reseptör küreciklere hiyaluronik asit adsorpsiyonu için Langmuir modelinin uygulanabilir olduğu gözlenmiştir. Deneysel veriler sonucunda, hiyaluronik asit'in adsorpsiyonu için maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{max}) elde edilmiştir. D-glukoronik asit baskılanmış mikroküreler için, korelasyon katsayısı (R^2) 0.958 gibi yüksek bir değer, maksimum adsorpsiyon kapasitesi 1250 mg/g ve Langmuir sabiti ise $1,01 \times 10^{-4}$ L/mg olarak bulunmuştur.

Ayrıca baskılı polimer ve D-glukoronik asit kalıp arasındaki bağlanma etkileşimleri ve HA bağlanma affinite sabiti Scatchard analizi yöntemi ile saptanmıştır. D-glukoronik asit baskılı polimerde iki farklı affinite bölgesi bulunmuştur. Bunlardan birisi bağlanma sabiti (K_a) $75900 M^{-1}$ ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, B_{max} 1,250 $\mu mol/g$ (2000 mg/g) olan bölge, diğeri bağlanma

sabiti (K_a) 426500 M^{-1} ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, B_{\max} $0,612 \text{ } \mu\text{mol/g}$ ($980,25 \text{ mg/g}$) olan bölge olarak bulunmuştur. Bu K_a değerleri biyolojik reseptörlere ($10^5 - 10^7$) oldukça yakın değerler olup, bu tez kapsamında sentezlenen hiyaluronik asit bağlayan yapay reseptörlerin literatürlerle yarışabilir olduğunu söyleyebiliriz. Örneğin Takeuchi ve çalışma arkadaşları 2005'te kinkonidin (sıtmaya karşı etkili molekül) baskılanmış polimerler sentezlemişler ve bu polimerler için bağlanma bölgesi affinite sabitini (K_a) 1.1×10^5 olarak bulmuşlardır [39].

Çalışmaların devamında, D-glukoronik asit baskılı mikrokürelerin HA ayrılmasında tekrar tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla aynı adsorbent 20 kez ardarda adsorpsiyon-desorpsiyon işlemine tabi tutulmuştur. Sonuç olarak D-glukoronik asit baskılı mikrokürelerin adsorpsiyon kapasitesinde çok fazla kayıp olmaksızın tekrar tekrar HA ayrılmasında kullanılabilir olduğu gözlenmiştir.

Elektrik alanda HA nanofiberleri oluşturulmuş ve morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. 22 kV'lık ve 15 kV'lık 2 farklı pozitif voltaj %0.1, % 0.5 ve %1 olan 3 farklı derişimde polimer çözeltilerine uygulanmıştır. Ayrıca nanofiberlerin çapları üzerinde tuz (NaCl) etkisi de incelenmiştir. Sonuç olarak HA fiber çaplarının polimer derişimi ve uygulanan voltaj arttıkça arttığı bulunmuştur. %1'lik tuz eklenmesiyle çözeltinin yüzeyi daha fazla negatif yük ile yüklendiği için bu durumunda nanofiber çaplarında bir küçülmeye neden olduğu görülmüştür.

Üretilen ve saflaştırılan HA'nın kullanıldığı yara tedavisi amaçlı çalışmalar sonucunda, HA çözeltisinin yara iyileştirici etkisi kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. Buna karşılık HA nanofiber çözeltisinin yara iyileştirici etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hemen hemen aynı çıkmıştır. HA çözeltisinin uygulandığı yaranın hemen hemen kapandığını HA nanofiber çözeltisinin uygulandığı yaranın ise kontrol grubuyla aynı özellikte olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin HA nanofiber çözeltisinin seyreltik olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İleriki çalışmalarda nanofiber yapının yara iyileştirici özelliğinin tespiti açısından nanofiberlerin bir sıvı ortamıyla değılde

doğrudan yaraya temas ettirilmesi ve farmokolojik ve histolojik açıdan yeniden değerlendirilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Meyer, K., Palmer, J.W., *J. Biol. Chem.*, **34**, 607, 1934.
- [2] Luo, H., Li, N.B., Lio, S.P., "Resonance Rayleigh scattering study of interaction of hiyaluronik acid with ethyl violet dye and its analytical application," *Biosensors and Bioelectronics*, **45**, 81-86, 2005.
- [3] Kendall, F. I., Heidelberger, M. ve Dawson, M. H., "A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A Streptococcus," *J. Biol. Chem.*, **118**, 61-69, 1937.
- [4] Lago, Guillermo., Oruna, Loida., Cremata, J. A., " Isolation, purification and characterization of hyaluronan from human umbilical cord residues," *Carbohydrate polymers*, **62**, 321-326, 2005.
- [5] Hou, S., Tian, W., Xu, Q., Cui, F., Zhang, J., Lu, Q., "The enhancement of cell adherence and inducement of neurite outgrowth of dorsal root ganglia co-cultured with hiyaluronik acid hydrogels modified with Nogo-66 receptor antagonist in vitro," *Neuroscience* , **137**, 519–29, 2006.
- [6] Wulff, G., Poll, H.G., *Makromol. Chem.*, **188**, 741, 1987.
- [7] Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa T. ve Asanuma, H., *Molecular Imprinting from Fundamentals to Applications*, WILEY-VCH, 2003.
- [8] Sellergren, B., "Molecularly Imprinted Polymers Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry," *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, **23**, 2001.
- [9] Daniel, S., Babu, P. E. J. ve Rao, T.P., " Preconcentrative separation of palladium (II) using palladium (II) ion-imprinted polymer particles formed with different quinoline derivatives and evaluation of binding parameters based on adsorption isotherm models, " *Talanta*, **65**, 441-452, 2005.
- [10] Biju, V. M., Gladis, J. M. Ve Rao, T. P., " Ion imprinted polymer particles: synthesis, characterization and dysprosium ion uptake properties suitable for analytical applications," *Analytica Chimica Acta*, **478**, 43-51, 2003.
- [11] Ersöz, A., Say, R. ve Denizli, A., "Ni(II) ion-imprinted soid-phase extraction and preconcentration in aqueous solutions by packed-bed columns, " *Analytica Chimica Acta*, **502**, 91-97, 2004.

- [12] Say, R., Ersöz, A. ve Denizli, A., " Selective Separation of Uraium Containing Glutamic Acid Molecular-Imprinted Polymeric Microbeads, " *Separation Science and Technology*, **38**, 3429-3445 , 2003.
- [13] Say,R., Birlik, E., Ersöz, A., Yılmaz, F., Gedikbey, T. ve Denizli, A., "Preconcentration of copper ion-selective imprinted polymer microbeads, " *Analytica Chimica Acta*, **480**, 251-258, 2003.
- [14] Daniel,S., Gladis, J. M., ve Rao, T.P., "Synthesis of imprinted polymer material with palladium ion nanopores and its analytical application, " *Analytica Chimica Acta*, **488**, 173-182, 2003.
- [15] Rao, T. P., Daniel, S. Ve Gladis, J. M., " Tailored materials for preconcentration or separation of metals by ion-imprinted polymers for solid-phase extraction (II-SPE), " *Trends in Analytical Chemistry*, **23**, 28-35, 2004.
- [16] Bae, S. Y., Southard, G. L. ve Murray, G. M., "Molecularly imprinted ion exchange resin for purification and determination of UO_2^{+2} by spectrophotometry and plasma spectrometry, " *Analytica Chimica Acta*, **397**, 173-181, 1999.
- [17] Wu, L. ve Li, Y., "Metal ion-mediated molecular-imprinting polymer for indirect recognition of formate, acetate, propionate, " *Analytica Chimica Acta*, **517**, 145-151, 2004.
- [18] Garcia, R., Pinel, C., Madic, C. ve Lemaire, M., " *Ionic imprinting effect in gadolinium/lanthanum separation*, " *Tetrahedron Letters*, **39**, 8651-8654, 1998.
- [19] Kanekiyo, Y., Inoue, K., Ono, Y. ve Shinkai, S., " Facile design of a metal-imprinted surface from a poly(vinyl Chloride-co-Acrylic Acid) / Poly(propylene Glycol) Blend, " *Tetrahedron Letters*, **39**, 7721-7724, 1998.
- [20] Daniel, S., Rao, P. P. ve Rao, T. P., "Investigation of different polymerization methods on the analytical performance of palladium (II) ion imprinted polymer materials, " *Analytica Chimica Acta*, **536**, 197-206, 2005.
- [21] Andaç, M., Say, R. ve Denizli, A., " Molecular Recognition based cadmium removal from human plasma, " *Journal of Chromatography* , **811**, 119-126, 2004.

- [22] Vigneau, O., Pinel, C. ve Lemaire, M., "Ionic imprinted resins based on EDTA and DTPA derivatives for lanthanides (III) separation, " *Analytica Chimica Acta*, **435**, 75-82, 2001.
- [23] Liu, Y., Chang, X., Wang, S., Guo, Y., Din, B. Ve Meng, S, "Solid-phase extraction and preconcentration of cadmium (II) in aqueous solution with Cd (II)-imprinted resin (poly-Cd(II)-DAAB-VP) packed columns, " *Analytica Chimica Acta*, **519**, 173-179, 2004.
- [24] Denizli, A., Garipcan, B., Karabakan, A., Say, R. Ve Emir, S., Patır, S., " Metal-complexing ligand methacryloamidocysteine containing polymer beads for Cd (II) removal, " *Separation and Purification Technology*, **30**, 3-10, 2003.
- [25] <http://www.smi.tu-berlin.de/story/MIT.htm>
- [26] Ensing, K., Berggren, C. ve Majors; R. E., "Selective Sorbents for Solid-Phase Extraction Based on Molecularly Imprinted Polymers, " *LC GC*, **19**, 943-954, 2001.
- [27] Piletsky, S. A., Alcock, S. ve Turner, A. P. F., "Molecular imprinting at the edge of the third millennium, " *Trends in Biotechnology*, **19**, 9-12, 2001.
- [28] Haupt, K., " Imprinted Polymers: The Next Generation, " *Analytical Chemistry*, 377A-383A, 2003.
- [29] Cormack, P. A. G. ve Elorza A. Z., "Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation, " *Journal Chromatography B*, **804**, 173-182, 2004.
- [30] <http://ak-sellergren.infu.uni-dortmund.de/>
- [31] Chapuis, F., Pichon, V. ve Hennion, M. C., " Molecularly Imprinted polymers: Developments and applications of New selective Solid-Phase Extraction Materials; " *LC.GC Europe* **17** , 408-417, 2004.
- [32] Kriz, D., Ramström, O. ve Mosbach; K., "Molecular imprinting-based biomimetic sensors could provide an alternative to often unstable biosensors for industry, medicine, and enviromental analysis, " *Analytical Chemistry*, **69**, 345A-349A, 1997.
- [33] <http://www.kimyaevi.org/polimer.asp>
- [34] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Elektro-%C3%BCretim>

- [35] www.optimersaglik.com/pic_lib/ciltsagligi_icin_yararli_etken_maddeler.doc
- [36] Li, J., He, A., Han, C.C., Fang, D., Hsiao, B. S., Chu, B., "Elektrospinning of Hiyaluronik Acid and HA/ Gelatin Blends," *Macromolecular Rapid Communications*, 726, 114-120, 2005.
- [37] Say, R., Birlik, E., Ersöz, A., Yılmaz, F., Gedikbey, T., Denizli, A., *Anal. Chem., Acta*, 480, 251-258, 2003.
- [38] Say, R., Garipcan, B., Emir, S., Patır, S., Denizli, A., *Macromol. Mater. Eng.*, 287, 539-545, 2002.
- [39] Takeuchi, T., Mukawa, T. ve Shinmari, M., " Signaling Molecularly Imprinted Polymers: Molecular Recognition- Based Sensing Materials, " *The Chemical Record* ,5, 263-275, 2005.