

**BİYONANOKONJUGATLARIN YAPAY KAN AMAÇLI KULLANIMLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Umut ÇELİKOĞLU

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Temmuz 2021

ÖZET

BİYONANOKONJUGATLARIN YAPAY KAN AMAÇLI KULLANIMLARININ ARAŞTIRILMASI

Umut ÇELİKOĞLU

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2021

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Yapay kan, kanın oksijen taşıma görevini yerine getiren, tüm kan grupları ile uyumlu, mikroorganizmalardan arındırılabilen ve kanın oksijen taşıma görevini yerine getiren maddelerdir. Bu amaçla, çalışmanın ilk aşamasında MACys monomeri kullanılarak P(HEMA-ko-MACys) nanoküreleri sentezlenmiştir. Bu nanokürelere, tiyo-ene reaksiyonu esas alınarak Fe^{3+} -Protoporfirin IX kovalent olarak bağlanmıştır. Sentezlenen P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanokürelerinin oksijeni tersinir bir şekilde bağlayıp bırakabilmesi amacıyla bu nanoküreler P(HEMA-ko-MACys- Fe^{2+} -Protoporfirin IX) nanokürelerine dönüştürülüp serum albumini ile kompleks oluşturması incelenmiştir.

Karbonik anhidraz (CA), karbondioksiti bikarbonat ve protona dönüştüren bir metaloenzimdir. Çalışmanın ikinci aşamasında, CA enziminin saflaştırılması için, yeni bir biyokromatografik PHEMA-pABSA kriyojel kolonu sentezlenerek karakterize edilmiştir.

Poli-ε-kaprolakton (PCL), birçok moleküle karşı yüksek geçirgenliğe sahip ve toksik olmayan biyobozunur sentetik bir polimerdir. Çalışmanın üçüncü aşamasında, bu polimer bir fotosensitif amino asit monomeri olan klorobis(2-2'-bipridil)MATyr-Ru(II) ile fonksiyonlandırılıp P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) sentezlenmiştir. Enkapsülleyici ajan olarak bu polimer kullanılıp ANADOLUCA konsepti, çift emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği ve EDC/NHS yöntemiyle yeni bir oksijen taşıyıcı sistem olan P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)- $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX) nanoküreleri sentezlenip karakterize edilmiştir.

Sülükler kan emici canlılar olup geleneksel tıpta kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Çalışmanın son aşamasında, yapay kan amaçlı sentezlenen biyonanokojugatların tıbbi bir sülük türü olan *Hirudo verbana* tarafından besin olarak kullanılması ve hemoglobin türleri (oksiHb, metHb, deoksiHb) üzerindeki etkisi ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Yapay kan, ANADOLUCA, Tiyo-ene reaksiyonu, PCL, CA, Sülük.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE USES OF BIONANOCONJUGATES FOR ARTIFICIAL BLOOD PURPOSES

Umut ÇELİKOĞLU

Department of Chemistry

Programme in Biochemistry

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, July 2021

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Artificial blood is a substance that carries oxygen, is compatible with all blood groups and can be purified from microorganisms. For this purpose, P(HEMA-co-MACys) nanospheres were synthesized using MACys monomer in the first stage of the study. Fe^{3+} -Protoporphyrin IX was covalently bound to these nanospheres based on the thio-ene reaction. In order for the synthesized P(HEMA-co-MACys- Fe^{3+} -Protoporphyrin IX) nanospheres to bind and release oxygen reversibly, these nanospheres were transformed into P(HEMA-co-MACys- Fe^{2+} -Protoporphyrin IX) to form a complex with serum albumin.

Carbonic anhydrase (CA) is a metalloenzyme that converts carbon dioxide into bicarbonate and proton. In the second step of the study, a new cryogel-based chromatographic support material, PHEMA-pABSA, was synthesized for the purification of this enzyme. CA enzyme was purified and characterized using the PHEMA-pABSA cryogel column.

Poly- ϵ -caprolactone (PCL) is a non-toxic biodegradable synthetic polymer with high permeability to many molecules. In the third stage of the study, this polymer was functionalized with chlorobis(2-2'-bipyridyl)MATyr-Ru(II), a photosensitive amino acid monomer, and P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipyridyl)MATyr) was synthesized. Using this polymer as the encapsulating agent, ANADOLUCA concept, double emulsion solvent evaporation technique and EDC/NHS method, a new oxygen carrier system P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipyridyl)MATyr-co-Hb-CA)- $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Protoporphyrin IX nanospheres were synthesized and characterized.

Leeches are bloodsucking creatures and their use in traditional medicine is increasing day by day. In the last phase of the study, the use of bionanoconjugates synthesized for artificial blood purposes by *Hirudo verbana*, a medicinal leech type, and its effect on hemoglobin types (oxyHb, metHb, deoxyHb) were investigated in detail.

Keywords: Artificial blood, ANADOLUCA, Thio-ene reaction, PCL, CA, Leech.



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince yardımını ve desteğiyle her zaman yanımda olan Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ'e

Değerli fikirleri ve tecrübeleriyle desteğini esirgemeyen deneysel çalışmalarımın ilerlemesinde bana ışık tutan Sayın Rıdvan SAY'a

Tezimin değerlendirilmesinde jüri üyesi olarak yer alan ve yardımlarını eksik etmeyen Tez İzleme Komitesi üyelerim Sayın Prof. Dr. Adnan AYHANCI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Özlem ÜNLÜER'e

Tezimin değerlendirilmesinde katkılarını esirgemeyen sayın jüri üyelerim Prof. Dr. Sinan AKGÖL, Prof. Dr. Lokman UZUN ve Doç. Dr. Volkan KILIÇ'a

Deneysel çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım her zaman yanımda olan eşim Arş. Gör. Emine ÇELİKOĞLU'na

Deneysel çalışmalarım esnasında bana laboratuvar imkânları sunan ve maddi-manevi desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Önder İDİL'e

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Canfide Merve YEMİŞ'e

Maddi-manevi destekleriyle hayatımın her anında beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, Annem Fatma ÇELİKOĞLU, Babam Enver ÇELİKOĞLU, Ablam Çiğdem KAYA'ya

Tez çalışmam süresince bana gösterdiği sonsuz sabrından dolayı canım kızım Öykü Ela ÇELİKOĞLU'na

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Umut ÇELİKOĞLU

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Umut ÇELİKOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kan	1
1.1.1. Kanın görevleri	1
1.1.2. Kanın bileşenleri.....	2
1.1.2.1. Kan hücreleri	2
Kırmızı kan hücreleri (Eritrositler)	2
Beyaz kan hücreleri (Lökositler).....	7
1.1.2.2. Kan plazması	11
1.2. Yapay Kan.....	11
1.2.1. Yapay kan olarak kullanılan maddelerin sınıflandırılması	12
1.2.1.1. HTOT	12
HTOT türleri.....	14
1.2.1.2. PFC emülsiyonları	16
1.3. Karbonik anhidraz enzimi (CA).....	17
1.4. Kriyojeller	17
1.4.1. Kriyojelasyon	18
1.4.2. Kriyojellerin özellikleri ve yapısını etkileyen faktörler	18

1.4.2.1. <i>Derişim etkisi</i>	19
1.4.2.2. <i>Donma sıcaklığının etkisi</i>	19
1.4.2.3. <i>Polimerizasyon süresi ve donma hızı</i>	19
1.4.2.4. <i>Çapraz bağlanma derecesi</i>	19
1.4.3. <i>Kriyojellerin avantajları ve uygulama alanları</i>	20
1.5. <i>Polikaprolakton (PCL)</i>	21
1.5.1. <i>PCL'nin fizikokimyasal özellikleri</i>	21
1.5.2. <i>PCL'nin sentezi</i>	22
1.5.3. <i>PCL'nin degradasyonu</i>	22
1.5.4. <i>PCL'nin biyoyumluluğu</i>	23
1.5.5. <i>PCL tabanlı nanoküreler</i>	23
1.6. <i>Polimerlerin karakterizasyonunda kullanılan yöntemler</i>	24
1.6.1. <i>Polimer karakterizasyonunda mikroskopik yöntemler</i>	24
1.6.1.1. <i>Optik mikroskop</i>	24
1.6.1.2. <i>Elektron mikroskobu</i>	24
1.6.1.3. <i>Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)</i>	25
1.6.1.4. <i>Dinamik kuvvet mikroskobu</i>	26
1.6.2. <i>Polimerlerin yapısal karakterizasyon yöntemleri</i>	26
1.6.2.1. <i>Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS)</i>	26
1.6.2.2. <i>Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)</i>	26
1.6.2.3. <i>Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)</i>	27
1.6.2.4. <i>Ultraviyole (UV) ve görünür bölge (VIS) spektroskopisi</i>	27
1.6.2.5. <i>X-ışını floresans spektroskopisi (XRF) ve nötron saçılma yöntemleri</i>	28
1.6.2.6. <i>X-ışını kırınım (XRD) analizi</i>	29
1.6.2.7. <i>Kütle spektroskopisi (MS)</i>	29
1.6.3. <i>Polimerlerin termal karakterizasyon yöntemleri</i>	30
1.6.3.1. <i>TGA</i>	30
1.6.3.2. <i>DSC</i>	31
1.6.3.3. <i>DTA</i>	32
1.6.3.4. <i>TMA</i>	32
1.6.3.5. <i>DMA</i>	33
1.6.3.6. <i>MTA</i>	33

1.7. ANADOLUCA	34
1.8. Sülükler (<i>Hirudinea</i>)	35
1.8.1. Sülüklerin biyolojisi.....	37
1.8.2. Sülüklerde sindirim sistemi ve beslenme	37
1.8.3. Sülüklerde sinir sistemi	39
1.8.4. Sülüklerin tıbbi önemi	39
1.8.5. Tıbbi sülükler.....	40
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
2.1. Materyal	42
2.1.1. Kullanılan kimyasallar	43
2.1.2. Kullanılan cihazlar	44
2.2. Yöntem	44
2.2.1. Hb türlerinin spektroskopik yöntemlerle tayin edilmesi.....	44
2.2.1.1. Toplam Hb (tHb) ve methemoglobin (metHb) derişimlerinin belirlenmesi.....	45
2.2.1.2. Deoksihemoglobin (deoksiHb) ve oksihemoglobin (oksiHb) derişiminin belirlenmesi.....	45
2.2.2. Hb'nin indirgenmesi ve dönüşümü	46
2.2.2.1. $Na_2S_2O_4$ derişiminin metHb'nin indirgenmesi üzerine etkisi	46
2.2.2.2. MetHb'nin deoksiHb'ye dönüşümü	46
2.2.3. Sürfaktanların ve radikalik başlatıcıların Hb üzerine etkisinin belirlenmesi.....	47
2.2.3.1. Sürfaktanların Hb denatürasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi.....	47
2.2.3.2. APS'nin oksihb, deoksiHb ve metHb derişimleri üzerine etkisinin belirlenmesi.....	48
2.2.4. Antioksidanlar varlığında APS'nin oksihb, deoksiHb ve metHb derişimleri üzerine etkisinin belirlenmesi	48
2.2.5. P(HEMA-ko-MACys- Fe^{2+} -Protoporfirin IX) nanokürelerinin yapay kan olarak kullanımlarının araştırılması	48
2.2.5.1. N-metakriloil-L-sistein (MACys) monomerinin sentezi.....	49
2.2.5.2. PHEMA nanokürelerinin sentezi.....	50

2.2.5.3. <i>P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerinin sentezi</i>	50
2.2.5.4. <i>Fe³⁺-Protoporfirin IX'un spektrofotometrik tayini</i>	51
2.2.5.5. <i>P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerine tiyo-ene reaksiyonu ile Fe³⁺-Protoporfirin IX kenetlenmesi</i>	52
2.2.5.6. <i>P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerine tiyo-ene reaksiyonu ile Fe³⁺-Protoporfirin IX bağlanma kapasitesinin incelenmesi</i>	53
2.2.5.7. <i>P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin dönüşümü</i>	54
2.2.5.8. <i>P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin sentezinde kullanılan monomer ve polimerik maddelerin karakterizasyonu</i>	55
2.2.5.9. <i>P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin serum albumine bağlanmasının değerlendirilmesi</i>	55
2.2.6. <i>CA Enziminin Saflaştırılması</i>	56
2.2.6.1. <i>Kan örneklerinin hazırlanması</i>	56
2.2.6.2. <i>Protein tayini</i>	57
2.2.6.3. <i>CA enziminin aktivitesinin tayin edilmesi</i>	57
2.2.6.4. <i>CA enziminin organik çözücü karışımı ile ekstraksiyonu</i>	57
2.2.6.5. <i>CA enziminin saflaştırılması amacıyla matriks tasarlanması</i>	57
2.2.6.6. <i>PHEMA kriyojelinin hazırlanması</i>	57
2.2.6.7. <i>PHEMA kriyojelinin N,N'-Karbonildiimidazol (CDI) ile aktivasyonu ve pABSA'nın kovalent bağlanması</i>	58
2.2.6.8. <i>CA enziminin PHEMA-pABSA kriyojeli ile saflaştırılması</i>	60
2.2.6.9. <i>CA saflaştırılması için sentezlenen maddelerin karakterizasyonu</i>	60
2.2.6.10. <i>SDS-PAGE ile CA enziminin karakterizasyonu</i>	60
2.2.7. <i>Yapay oksijen taşıyıcı P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX sisteminin sentezi, karakterizasyonu ve kullanılabilirliğinin araştırılması</i>	61
2.2.7.1. <i>N-metakroil-L-tirozin sentezi (MATyr)</i>	62
2.2.7.2. <i>Klorobis(2-2'-bipridil)MATyr-Ru(II) sentezi</i>	62
2.2.7.3. <i>P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) sentezi</i>	62

2.2.7.4. <i>ANADOLUCA</i> ve çift çözücü buharlaştırma tekniği ile <i>P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)</i> nanokürelerinin sentezi	63
2.2.7.5. <i>P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)</i> nanokürelerinin <i>CA</i> enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	64
2.2.7.6. <i>P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)</i> nanokürelerine Fe^{3+} -Protoporfirin IX'un EDC/NHS ile konjugasyonu	64
2.2.7.7. <i>P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe^{3+}</i> -Protoporfirin IX nanokürelerinin indirgenmesi	64
2.2.7.8. <i>P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe^{3+}</i> -Protoporfirin IX nanokürelerinden Fe^{2+} -Protoporfirin IX salınımı	65
2.2.7.9. <i>P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe^{3+}</i> -Protoporfirin IX nanokürelerinin sentezinde kullanılan monomer ve sentezlenen polimerlerin karakterizasyonu.....	65
2.2.8. Sülük deneyleri	66
2.2.8.1. <i>Hirudo verbana</i> 'nın beslenmesi için destek materyali hazırlanması	66
2.2.8.2. Yapay kan içeren beslenme destek materyallerinin hazırlanması	67
2.2.8.3. <i>Hirudo verbana</i> 'nın yapay kan ile beslenmesi.....	67
3. BULGULAR	69
3.1. Hb Türlerinin Spektroskopik Yöntemlerle Tayin Edilmesi Bulguları	69
3.1.1. THb ve metHb derişimlerinin belirlenmesi sonuçları	69
3.2. Hb'nin İndirgenmesi ve Dönüşümü Bulguları.....	75
3.2.1. $Na_2S_2O_4$ derişiminin metHb'nin indirgenmesi üzerine etkisi bulguları	75
3.2.2. MetHb'nin deoksiHb'ye dönüşümü bulguları.....	75
3.3. Sürfaktanların ve APS'nin Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları.....	76
3.3.1. SDS'nin Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları.....	76
3.3.2. Sodyum kolatın Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları	77
3.3.3. N-lauroilsarkozinin Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları	78

3.3.4. Sodyum deoksikolatın Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları	78
3.3.5. CTAB'ın Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları	79
3.3.6. Triton X-100'ün Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları	80
3.3.7. Tween 20'nin Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları.....	80
3.3.8. Tween 80'nin Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları.....	81
3.3.9. APS'nin oksihb, deoksiHb ve metHb derişimleri üzerine etkisi bulguları	82
3.3.10. Antioksidanlar varlığında APS'nin oksihb, deoksiHb ve metHb derişimleri üzerine etkisinin belirlenmesi bulguları	84
3.4. P(HEMA-ko-MACys-Fe ²⁺ -Protoporfirin IX) Nanokürelerinin Yapay Kan Olarak Kullanımlarının Araştırılması Bulguları	85
3.4.1. Fe ³⁺ -Protoporfirin IX'un spektrofotometrik tayini bulguları.....	85
3.4.2. P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerine tiyo-ene reaksiyonuyla Fe ³⁺ -Protoporfirin IX bağlanma kapasitesi bulguları.....	86
3.4.3. Fe ³⁺ -Protoporfirin IX'un P(HEMA-ko-MACys) nanopartikülüne bağlanma izotemlerinin incelenmesi bulguları.....	87
3.4.4. P(HEMA-ko-MACys-Fe ³⁺ -ProtoporfirinIX) nanokürelerin P(HEMA-ko-MACys-Fe ²⁺ -Protoporfirin IX)'a dönüşümü bulguları.....	89
3.4.5. MACys, Fe ³⁺ -Protoporfirin IX molekülleri ve PHEMA, P(HEMA-ko-MACys), P(HEMA-ko-MACys-Fe ³⁺ -Protoporfirin IX) nanopartiküllerinin FT-IR ile karakterizasyonu bulguları.....	91
3.4.6. PHEMA, P(HEMA-ko-MACys) ve P(HEMA-ko-MACys-Fe ³⁺ -Protoporfirin IX) nanopartiküllerinin TG/DTA ve DSC ile karakterizasyonu bulguları.....	94
3.4.7. PHEMA, P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerinin TEM ile karakterizasyonu bulguları.....	101
3.4.8. P(HEMA-ko-MACys-Fe ³⁺ -Protoporfirin IX) nanokürelerinin serum albumine bağlanmasının değerlendirilmesi bulguları	103
3.5. CA Enziminin Saflaştırılması Bulguları.....	105
3.5.1. Protein tayini bulguları	105
3.5.2. PHEMA ve PHEMA-pABSA kriyojellerinin TG/DTG ve DSC karakterizasyon bulguları.....	106

3.5.3. PHEMA, PHEMA-pABSA kriyojellerinin ve pABSA molekülünün FT-IR ile karakterizasyon bulguları.....	110
3.5.4. PHEMA ve PHEMA-pABSA kriyojellerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu bulguları	112
3.5.5. CA enziminin PHEMA-pABSA kriyojeli ile saflaştırılması bulguları	113
3.5.6. SDS-PAGE ile CA enziminin karakterizasyonu bulguları.....	115
3.6. Yapay oksijen taşıyıcı P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe ²⁺ -Protoporfirin IX sisteminin sentezi, karakterizasyonu ve kullanılabilirliğinin araştırılması bulguları	115
3.6.1. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) sentezi verim bulguları	115
3.6.2. Sentezlenen monomerlerin ¹ H-NMR bulguları	116
3.6.2.1. MATyr için ¹ H-NMR bulguları.....	116
3.6.2.2. Klorobis(2-2'-bipiridil)MATyr-Ru(II) için ¹ H-NMR bulguları	116
3.6.3. PCL ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) için UV-VIS spektroskopisi bulguları.....	116
3.6.4. PCL ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) için termal gravimetrik analiz bulguları	118
3.6.5. ANADOLUCA ve çift çözücü buharlaştırma tekniği ile P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanopartiküllerinin sentezi bulguları	120
3.6.5.1. Yapay oksijen taşıyıcı nanopartiküllerin görüntüleri	120
3.6.5.2. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe ³⁺ -Protoporfirin IX) nanopartiküllerin indirgenmesi bulguları	121
3.6.5.3. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe ²⁺ -Protoporfirin IX) nanopartiküllerinin CA aktivitesi bulguları	123
3.6.5.4. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe ²⁺ -Protoporfirin IX nanopartiküllerinden Fe ²⁺ -Protoporfirin IX salınımı bulguları	123
3.6.5.5. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanopartiküllerinin SEM bulguları.....	124

3.6.5.6. <i>P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX nanopartiküllerinin TEM bulguları.....</i>	125
3.7. Sülük deneyleri bulguları.....	126
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	129
KAYNAKÇA	137
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. PCL'nin fizikokimyasal özellikleri	22
Tablo 1.2. Sülük taksonomisi	36



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Hb yapısı	4
Şekil 1.2. Heme molekül yapısı	5
Şekil 1.3. Heme b molekül yapısı	6
Şekil 1.4. Heme c molekül yapısı	6
Şekil 1.5. Heme a molekül yapısı	7
Şekil 1.6. Lökosit yapısı	8
Şekil 1.7. Granülositlerin alt tipleri.....	9
Şekil 1.8. Monosit hücre yapısı	10
Şekil 1.9. Lenfosit hücre yapısı	10
Şekil 1.10. Kriyojel oluşum aşaması.....	18
Şekil 1.11. TGA cihazının şematik gösterimi.....	31
Şekil 1.12. Sülüklerin sindirim sistemi	38
Şekil 1.13. Avrupa tıbbi sülük Hirudo'nun yetişkin canlı örneği medicinalis L. 1758.....	40
Şekil 2.1. Fe^{2+} iyonunun peroksidisülfat ile Fe^{3+} iyonuna yükseltgenme reaksiyonu.....	47
Şekil 2.2. MACys monomerinin sentez mekanizması	49
Şekil 2.3. P(HEMA-ko-MACys) sentez düzeneği	51
Şekil 2.4. P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) sentez mekanizması	53
Şekil 2.5. P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX)'un indirgenmesi	54
Şekil 2.6. PHEMA kriyojel kolonu.....	58
Şekil 2.7. PHEMA kriyojelinin CDI ile aktivasyonu ve pABSA'nın kovalent bağlanma mekanizması	59
Şekil 2.8. PHEMA-pABSA kriyojel kolonu	59
Şekil 2.9. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)- Fe^{2+} -Protoporfirin IX sisteminin şematik gösterimi	61
Şekil 2.10. PCL'nin çözeltisine NaOH ilavesi (1), klorobis(2-2'-bipiridil)MATyr- Ru(II) ilavesi (2), reaksiyon sonu (3).....	62
Şekil 2.11. P(CL-Ru(II)-bis(2-2'-bipiridil)MATyr'nin 1. ekstraksiyon işlemi (1), 2. ekstraksiyon işlemi (2), 3. ekstraksiyon işlemi (3) ile saflaştırılması	63
Şekil 2.12. Hirudo verbana için hazırlanmış beslenme destek materyali.....	66

Şekil 2.13. Kriyojele emdirilmiş besiyerleri.....	67
Şekil 2.14. Sülüklere yapay kan emdirme düzeneği	68
Şekil 3.1. Ticari Hb absorbsiyon spektrumu	69
Şekil 3.2. Ticari Hb'nin farklı derişimlerdeki çözeltilerinin renkleri	69
Şekil 3.3. Ticari Hb'nin 576 ve 628 nm'deki derişim-absorbans ilişkisi	70
Şekil 3.4. Ticari Hb + KCN derişime bağı renk değışimi	70
Şekil 3.5. Ticari Hb + KCN absorbsiyon spektrumu	71
Şekil 3.6. Ticari Hb + KCN'nin 541 nm'deki derişim-absorbans ilişkisi	71
Şekil 3.7. Ticari Hb + K ₃ [Fe(CN) ₆] absorbsiyon spektrumu.....	72
Şekil 3.8. Ticari Hb + K ₃ [Fe(CN) ₆] derişime bağı renk değışimi	72
Şekil 3.9. MetHb standart grafiğı.....	73
Şekil 3.10. CNmetHb'nin derişime bağı renk değışimi.....	73
Şekil 3.11. CNmetHb absorbsiyon spektrumu	74
Şekil 3.12. CNmetHb standart grafiğı.....	74
Şekil 3.13. Na ₂ S ₂ O ₄ 'ün metHb derişimi üzerine etkisi	75
Şekil 3.14. Jel filtrasyon kromatografisi ile metHb'nin indirgenmesi.....	76
Şekil 3.15. SDS derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi.....	77
Şekil 3.16. Sodyum kolat derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi	77
Şekil 3.17. N-lauroilsarkozin derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi.....	78
Şekil 3.18. Sodyum deoksikolat derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi	79
Şekil 3.19. CTAB derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi.....	79
Şekil 3.20. Triton X-100 derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi	80
Şekil 3.21. Tween 20 derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi.....	81
Şekil 3.22. Tween 80 derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi.....	81
Şekil 3.23. APS'nin metHb derişimi üzerine etkisi	82
Şekil 3.24. APS'nin deoksiHb derişimi üzerine etkisi	83
Şekil 3.25. APS'nin oksiHb derişimi üzerine etkisi	83
Şekil 3.26. APS varlığında GSH ve askorbik asitin metHb oluşumu üzerine etkisi	84
Şekil 3.27. APS varlığında GSH ve askorbik asitin deoksiHb oluşumu üzerine etkisi	85
Şekil 3.28. APS varlığında GSH ve askorbik asitin oksiHb oluşumu üzerine etkisi.....	85
Şekil 3.29. Fe ³⁺ -Protoporfirin IX standart grafiğı.....	86

Şekil 3.30. PHEMA ve P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerin Fe^{3+} -Protoporfirin IX bağlama grafiği	87
Şekil 3.31. Fe^{3+} -Protoporfirin IX için Langmiur bağlanma modeli.....	88
Şekil 3.32. Fe^{3+} -Protoporfirin IX için Freundlich bağlanma modeli	88
Şekil 3.33. P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) dispersiyonu (A), P(HEMA-ko-MACys- Fe^{2+} -Protoporfirin IX) dispersiyonu (B).....	89
Şekil 3.34. Sodyum ditiyonit ile P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) indirgenmesi (380-450 nm)	90
Şekil 3.35. Sodyum ditiyonit ile P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) indirgenmesi (500-600 nm)	90
Şekil 3.36. MACys monomerinin FT-IR spektrumu	91
Şekil 3.37. Fe^{3+} -Protoporfirin IX FT-IR spektrumu	92
Şekil 3.38. PHEMA nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu	92
Şekil 3.39. P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu	93
Şekil 3.40. P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanopartiküllerinin FT- IR spektrumu	94
Şekil 3.41. MACys TG/DTA ve DTG termogramı	94
Şekil 3.42. MACys DSC termogramı	95
Şekil 3.43. PHEMA TGA/DTA ve DTG termogramı	96
Şekil 3.44. PHEMA nanopartikülü DSC termogramı.....	97
Şekil 3.45. P(HEMA-ko-MACys) TG/DTA ve DTG termogramı.....	98
Şekil 3.46. P(HEMA-ko-MACys) DSC termogramı	99
Şekil 3.47. P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) TG/DTA ve DTG termogramı.....	100
Şekil 3.48. P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) DSC termogramı.....	101
Şekil 3.49. PHEMA nanopartiküllerinin TEM analizi A. 15000X 100 kV, B. 30000X 100 kV	102
Şekil 3.50. P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerinin TEM analizi C. 25000X 100 kV, D. 150000X 100 kV.....	103
Şekil 3.51. Albumin (insan serumundan) florimetrik standart grafiği	104
Şekil 3.52. P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanokürelerine serum albumini bağlanması grafiği	105
Şekil 3.53. Sığır serum albumin standart grafiği	106

Şekil 3.54. PHEMA TG/DTG termogramı.....	107
Şekil 3.55. PHEMA DSC termogramı	108
Şekil 3.56. PHEMA-pABSA TG/DTG termogramı	109
Şekil 3.57. PHEMA-pABSA DSC termogramı.....	110
Şekil 3.58. PHEMA kriyojeline ait FT-IR spektrumu	111
Şekil 3.59. pABSA molekülüne ait FT-IR spektrumu	111
Şekil 3.60. PHEMA-pABSA kriyojeline ait FT-IR spektrumu.....	112
Şekil 3.61. PHEMA kriyojeline ait SEM görüntüsü; 77X, 5kV (A) 290X, 5kV (B) ...	113
Şekil 3.62. PHEMA-pABSA kriyojeli SEM görüntüsü; 160X, 20 kV (A), 300X, 20kV (B).....	113
Şekil 3.63. CA enziminin PHEMA-pABSA kriyojel kolonuyla saflaştırılması kromatogramı.....	114
Şekil 3.64. CA enzimi saflaştırılma verileri	114
Şekil 3.65. SDS-PAGE analizi	115
Şekil 3.66. PCL (A) ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) (B)	116
Şekil 3.67. PCL'nin absorpsiyon spektrumu.....	117
Şekil 3.68. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)'nin absorpsiyon spektrumu	117
Şekil 3.69. PCL'nin TG/DTG termogramı	118
Şekil 3.70. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)'nin TG/DTG termogramı	119
Şekil 3.71. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)'nin DSC termogramı.....	119
Şekil 3.72. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) ile sentezlenen boş nanopartiküller (A), P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) (B), P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe ³⁺ -Protoporfirin IX (C)	120
Şekil 3.73. Sodyum ditiyonit ile P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe ³⁺ -Protoporfirin IX) nanopartiküllerinin indirgenmesi (380-450 nm)	121
Şekil 3.74. Sodyum ditiyonit ile P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe ³⁺ -Protoporfirin IX nanopartiküllerinin indirgenmesi (500-600 nm)	122
Şekil 3.75. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe ³⁺ -Protoporfirin IX (A), P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe ²⁺ -Protoporfirin IX (B)	122

Şekil 3.76. PCL tabanlı nanokürelerin CA aktivitesi	123
Şekil 3.77. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe ²⁺ -Protoporfirin IX'dan Fe ^{2+/3+} -Protoporfirin IX salınımı	124
Şekil 3.78. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80000X, 15 kV)	124
Şekil 3.79. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanopartiküllerinin TEM görüntüsü (40000X, 100 kV)	125
Şekil 3.80. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe ^{2+/3+} - Protoporfirin IX nanopartiküllerinin TEM görüntüsü (120000X, 100 kV)	126
Şekil 3.81. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe ²⁺ -Protoporfirin IX nanopartiküllerinin Hirudo verbana üzerindeki etkisi	126
Şekil 3.82. P(HEMA-ko-MACys-Fe ²⁺ -Protoporfirin IX)'un Hirudo verbana üzerine etkisi	127
Şekil 3.83. P(HEMA-ko-MACys-Fe ²⁺ -Protoporfirin IX)'un Hirudo verbana üzerine etkisi	128

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2,3-DPG	2,3-difosfogliserat
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFM	Atomik Güç Mikroskobu
ALA	5-aminolevulinik asit
APS	Amonyum persülfat
CA	Karbonik anhidraz
CAT	Katalaz
CDI	N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
CNmetHb	Siyanomethemoglobin
CO ₂	Karbondioksit
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromür
Cyt c	Sitokrom c
deoksiHb	Deoksi hemoglobin
DMA	Dinamik Mekanik Analiz
DMS	Dinamik Mekanik Spektroskopi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMTA	Dinamik Mekanik Termal Analiz
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
DTA	Dinamik Termal Analiz
DTG	Diferansiyel Taramalı Gravimetri
EDC	N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
EGDMA	Etilenglikol dimetakrilat
Epo	: Eritropoietin
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
fl	: Femtolitre
FT-IR	Fourier Dönüşümlü-Kızılötesi
Hb	Hemoglobin
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
Heme	Fe ²⁺ -Protoporfirin IX
Hemin	Fe ³⁺ -Protoporfirin IX
HTOT	Hemoglobin Tabanlı Oksijen Taşıyıcı

kDa	Kilodalton
km	: Kilometre
KPS	Potasyum persülfat
M	Molarite
MACys	N-metakriloil-L-sistein
MBAAm	N,N'-metilenbisakrilamit
MES	2-(N-Morfolino)etanesülfonik asit
metHb	Methemoglobin
mmHg	Milimetre civa
MS	Kütle Spektroskopisi
MTA	Mekanik Termal Analiz
NHS	N-hidroksisüksinimit
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NO	Nitrik oksit
O ₂	Oksijen
oksiHb	Oksi hemoglobin
pABSA	p-aminobenzen sülfonamit
PCL	Poli(ε-kaprolakton)
PEG	Poli(etilen glikol)
PFC	Perflorokarbon
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktit-ko-glikolik asit
PoliHb	Poli(Hemoglobin)
PVA	Polivinil alkol
PZTe	Piezoelektrik eleman
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SOD	Süperoksit dismutaz
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
T _g	Camsı geçiş sıcaklığı
TGA	Termal Gravimetrik Analiz

tHb	Toplam hemoglobin
TMA	Termal Mekanik Analiz
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür
XRD	X-ışını Kırınım
XRF	X-ışını Floresans
α	Alfa
β	Beta
λ	Dalga boyu
μm	Mikrometre
π	Pi
ϵ	Molar absorbtivite katsayısı

1. GİRİŞ

Acil durumlarda, uzun ameliyatlarda, kan grubu uyumsuzluklarında ve dini inanışların kan nakline engel olduğu durumlarda verici kanı yerine transfüzyon için kan yerine kullanılabilecek alternatif maddeler geliştirilmektedir. Dünya üzerinde kan naklinin gerekli olduğu hastalıkların çoğalması, kan nakli ile bulaşabilen virüs ve mikroorganizmaların artması, tamamen veya yarı sentetik olarak geliştirilen yapay kanlara olan ihtiyacı büyük oranda arttırmaktadır. Yapılan tez çalışması, tam ve yarı sentetik yapay kan maddelerinin geliştirilip ihtiyaç durumuna göre kullanımını hedeflemektedir.

1.1. Kan

Kan, insan yaşamının temel bir bileşenidir. Yetişkin bedeni içinde, yaklaşık 4 ila 5 litre kan olup kalbin kasılmalarıyla karmaşık bir damar ağında sürekli olarak dolaşır. Kan akciğerlerden ve kalpten uzaklaştıkça büyük arterlerden geçip daha dar ve daha karmaşık küçük damar ağlarına dolarken dokuların hücreleriyle tek tek temas eder. Bu seviyede birincil işlevi, bu hücreleri beslemek ve canlı sağ kalımı için gerekli oksijeni (O_2) sağlamaktır. Kan akciğerlere geri döndükçe vücuttan atılacak olan karbondioksit (CO_2) gibi hücresel atıkları toplayıp taşır. Kanın temel bileşenleri özel hücreler ve sıvılardan oluşur. Bu bileşenlerin her biri, fizyolojik olarak bir veya daha fazla iyi tanımlanmış işlevi yerine getirir. Bileşenlerin her biri bir laboratuvarında izole edilip test edilebilir. Böylece bir kişinin sağlığı hakkında hayati bilgiler sağlanır (Senior, 2010).

1.1.1. Kanın görevleri

Kan, çok çeşitli özelliklere sahip birçok bileşen türünün çok karmaşık bir karışımı olup genellikle "sıvı organ" olarak anılır. Vasküler sistem yoluyla tüm vücuda yayılması, organizmanın varlığı için gereklidir. Kan, çok çeşitli işlevler sergiler. Kanın temel işlevleri şunlardır:

- Birçok bileşen türünün taşınmasını sağlar.
 - Kan hücreleri (örn. O_2 taşımak için eritrositler)
 - Düşük moleküler ağırlıklı bileşikler (örn. tuzlar ve iyonlar)
 - Yüksek moleküler ağırlıklı bileşikler (örn. proteinler)
- Bakteriler, virüsler ve mantarlar gibi düşman patojenlere karşı savunma sistemi görevi görüp organizma ve çevre arasında bir denge sağlar.

- Özel hücreler (örn. lenfositler, monositler ve granülositler, antikorlar)
- Kompleman sisteminin bileşenleri
- Yara kapatma ve yara iyileştirme görevini yerine getirir.
- Kan hücreleri (örn. kan trombositleri)
- Kan pıhtılaşması ve fibrinoliz
- Vücuttaki ısı dağılımının dengesini sağlayıp sabit bir vücut ısısını garanti eder (Schaller vd., 2008, s8).

1.1.2. Kanın bileşenleri

Kan, sedimentasyonla iki ana bölüme ayrılmaktadır. Bunlar, kemik iliğinde sentezlenip tam kanın yaklaşık %45'ini (hacimce) oluşturan kan hücreleri ve tüm kanın yaklaşık %55'ini oluşturan kan plazması veya kanın sıvı kısmıdır (Schaller vd., 2008, s12).

1.1.2.1. Kan hücreleri

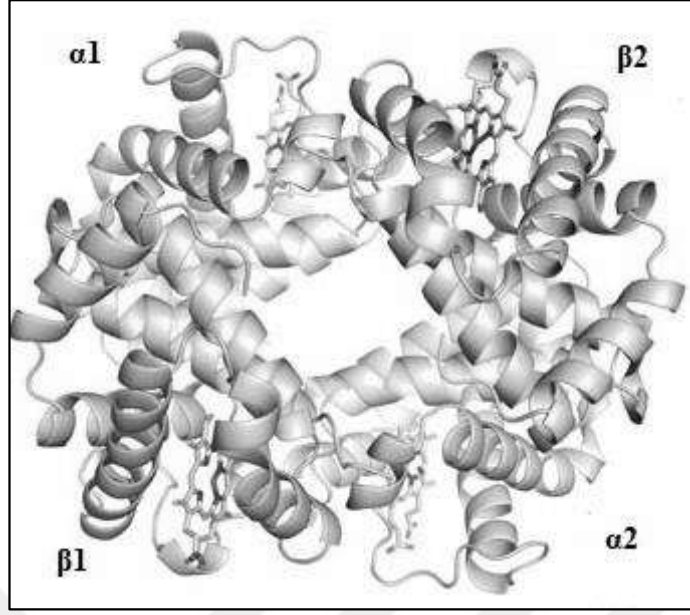
Dört ana kan hücresi türü olup bunlar, kırmızı kan hücreleri (eritrositler), beyaz kan hücreleri (trombositler), lenfositler ve fagositik hücrelerdir. Lenfositler ve fagositik hücreler toplu olarak beyaz kan hücrelerini oluşturur. Her kan hücresi türünün özel bir işlevi bulunmaktadır. Eritrositler, akciğerlerden O₂'yi alıp onu dokulara taşır. Trombositler, kan pıhtılarının oluşumuna katılır. Lenfositler bağışıklık ile ilgili olup fagositik hücreler iki çeşit granülositler ve monositler halinde oluşarak mikroorganizmaları ve yabancı maddeleri parçalar. Kan, eritrositleri O₂ gerektiren dokulara, trombositleri yaralanma bölgelerine, lenfositleri enfeksiyon alanlarına ve fagositik hücreleri mikrobiyal ve iltihaplanma istila alanlarına getiren bir kanal görevi görür (Senior, 2010, s29).

Kırmızı kan hücreleri (Eritrositler)

Eritrositler, solunum için akciğerlerden vücudun her yerine O₂'yi taşıyıp metabolik olarak üretilen CO₂'yi hücrelerden uzaklaştırır. Yetişkinlerde bir litre kanda yaklaşık 5×10^{12} eritrosit bulunur. Eritrositler, ortalama 110 gün yaşam süresine sahip olup bu süre boyunca yaklaşık olarak 250 km yol kat ederler. Eritrositlerin çekirdeği olmadığı için kalp günde fazladan 1000 ton atıl çekirdek pompalamaktan kurtulur. Eritrositler gaz alışverişi için kritik öneme sahip çift içbükey disklerdir. Eritropoietin

(Epo), eritrositlerin üretiminden sorumlu ana hormon olup böbrekler tarafından üretilir. Eritrositlerin ortalama çapı 8 µm olup ortalama hacmi 90 fl'dir (Bull, Breton-Gorius ve Beutler, 1995). Eritrositlerin çift içbükey şekli hücre zarı esnekliği ile hücrelerin 150 fl'ye kadar genişlemesini sağlar. Bu esnekliği sayesinde 8 µm 'den önemli ölçüde daha küçük bir çapa sahip kılcal damarlara girmesini sağlar. Eritrositler yaşlandıkça zarları sertleşip esnekliğini yitirir. Daha sonra makrofajlar tarafından dolaşımdan uzaklaştırılır. Kırmızı kan hücreleri pluripotent hematopoietik hücrelerden üretilir (Quesenberry ve Colvin, 2001). Bu kök hücreler kemik iliğinde bulunur. Çeşitli hormonlardan veya sitokinlerden uygun şekilde uyarıldıktan sonra tamamen işlevsel eritrositler üreten bir dizi olgunlaşma olayına maruz kalır. Bununla birlikte hücre sayısında muazzam bir artış olur. Bu da tek tek kök hücrelerin aktivasyonundan binlerce eritrosit üretilmesine olanak sağlamaktadır. Eritropoezi (eritrosit üretim süreci) düzenleyen birincil hormon Epo'dur (Koury, Bondurant ve Atkinson, 1987; Jelkmann, 1992; Kendall, 2001). Böbrekler ve karaciğer, kandaki O₂ seviyesini algılayabildikleri için yetişkinlerde Epo sentezinin önemli bölgeleridir (Morwenna ve Ratcliffe, 1997).

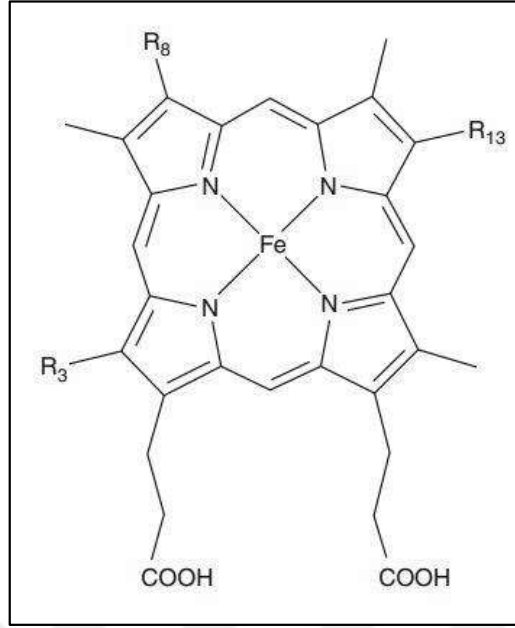
Hemoglobin (Hb) omurgalı eritrositlerinde bulunan, her biri bir polipeptit zinciri içeren ve dört alt birimden oluşan globüler bir proteindir. Yapısında yer alan polipeptit zincirleri α ve β olmak üzere iki tipte olup amino asit dizi ve sayısı bakımından farklılık göstermektedir (Şekil 1.1). Bu alt birimlerden α polipeptit zinciri 141 ve β polipeptit zinciri 146 amino asitten oluşmaktadır. Hb'nin tüm protein yapısı 574 amino asit içermekte olup molekül ağırlığı 64,5 kDa'dur (Perutz, 1969). Hb yapısında yer alan α ve β alt birimleri hidrojen bağları, tuz köprüleri ve polar olmayan etkileşimler gibi kovalent olmayan zayıf etkileşimler ile bir arada durmaktadır. Polar amino asit yan zincirleri genellikle Hb yapısının dış kısmında bulunurken polar olmayan amino asit yan zincirleri iç kısımda ya da alt birimlerin etkileşim bölgelerinde konumlanmaktadır (Perutz ve Lehmann, 1968). α ve β alt birimleri arasında belirgin bazı farklılıklar olmasına rağmen her alt birim bir heme grubu içermektedir (Şekil 1.2). Heme grubu her iki polipeptit zincirinin hidrofobik bölgesinde gömülü halde bulunur. Bu bölgedeki çoğu amino asit heme grubu ile van der Waals etkileşimi içerisindedir. Heme molekülünün vinil grupları gibi polar olmayan yan zincirleri ile bağlanma bölgesindeki amino asitlerin hidrofobik etkileşimi sayesinde heme-globin kompleksi protein yapısında stabil bir şekilde konumlanır (Fanelli, Antonini ve Caputo, 1964).



Şekil 1.1. Hb yapısı (Ahmed, Ghatge ve Safo, 2020)

Hb yapısında yer alan α ve β alt birimleri hidrojen bağları, tuz köprüleri ve polar olmayan etkileşimler gibi kovalent olmayan zayıf etkileşimler ile bir arada durmaktadır. Polar amino asit yan zincirleri genellikle Hb yapısının dış kısmında bulunurken polar olmayan amino asit yan zincirleri iç kısımda ya da alt birimlerin etkileşim bölgelerinde konumlanmaktadır (Perutz ve Lehmann, 1968). α ve β alt birimleri arasında belirgin bazı farklılıklar olmasına rağmen her alt birim bir heme grubu içermektedir (Şekil 1.2). Heme grubu her iki polipeptit zincirinin hidrofobik bölgesinde gömülü halde bulunur. Bu bölgedeki çoğu amino asit heme grubu ile van der Waals etkileşimi içerisindedir. Heme molekülünün vinil grupları gibi polar olmayan yan zincirleri ile bağlanma bölgesindeki amino asitlerin hidrofobik etkileşimi sayesinde heme-globin kompleksi protein yapısında stabil bir şekilde konumlanır (Fanelli, Antonini ve Caputo, 1964).

Heme ($C_{34}H_{32}FeN_4O_4$), molekül ağırlığı 616,5 g/mol olan porfirin halkasına demir koordine olmuş bir moleküldür (Kim, 2018). Heme yapısı temel olarak porfirin halkası, porfirin halkasına bağlı sübstituentler ve demir iyonu olmak üzere üç kısımdan oluşur. Porfirin halkası, metilen ($-CH=$) köprüleri aracılığıyla halkasal bir motifle bağlanmış tetrapirrol makrosiklik yapısını oluşturan dört pirolden oluşur (Şekil 1.2). Pirold halkalarındaki dört azot atomu, demir iyonuna tetradendat ligand sistemi olarak hizmet eder. Yüksek derecede konjuge pozisyonda bulunan 11 çift bağ (22 π elektron, 18 delokalize) yapıya aromatiklik ve düzlemsellik sağlar (Karlson, 1981). Porfirinin dış halkasındaki sübstituentler, protein yapısındaki amino asitler ile etkileşim içerisindedir.

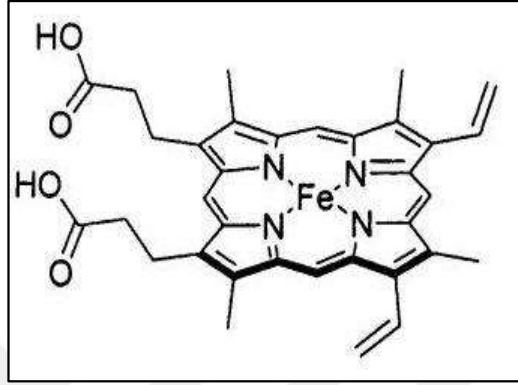


Şekil 1.2. *Heme molekül yapısı*

Heme yapısındaki demir, beş veya altı ligandı koordine edebilir. Bu ligandlardan dördü, metal ile kare düzlemsel bir kompleks oluşturan makrosiklik pirol azotları olup porfirin halkasının düzlemine dik olarak konumlandırılan diğer ligandlar ise proteinin amino asit yan zincirleridir. Porfirin halkası farklı metal porfirinleri oluşturmak amacıyla demir dışındaki farklı metal iyonlarını da merkezi boşluğunda barındırabilir. Porfirin halkasına magnezyum iyonunun şelasyonu ile klorofil için Mg-porfirin, kobalt iyonunun şelasyonu ile B₁₂ vitamini için Co-porfirin, nikel iyonunun şelasyonu ile metanojenik bakterilerde metan biyojenezinde gerekli koenzim Faktör 430 için Ni-porfirin çekirdeği oluşur (Kim, 2018).

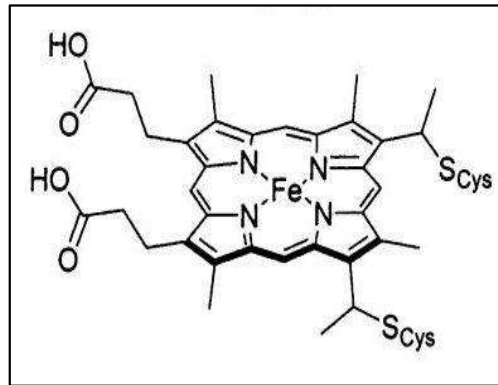
Heme, porfirin halkasının etrafındaki sübstitüenlere göre sınıflandırılmaktadır. Heme'nin en yaygın görülen tipleri heme *a*, heme *b* ve heme *c*'dir. Heme *b* (Şekil 1.3) veya protoheme, biyolojide gözlenen en yaygın kimyasal heme yapısı olup O₂ taşınmasında sorumlu globinlerde, ilaç metabolize eden sitokromlar P450 ve elektron transfer sitokromları *b*'de prostetik grubu oluşturur (Antonini, 1971; Ortiz de Montellano, 1995). Heme *b*'nin çevresi, R₃'te bir metil grubu, R₈ ve R₁₃ konumlarında vinil grupları içerir. Bu protoporfirin IX makrosiklik yapı, tüm canlı organizmalar için evrensel olan altı ardışık enzimatik adım yoluyla 5-aminolevulinik asitten (ALA) biyosentezlenir. Heme *b* biyosentezindeki son adım, demirin ferroşelataz enzimi tarafından eklenmesidir. Heme *b* bir veya iki aksiyal ligand yoluyla heme demirine

bağlanır. Propiyonik asit grupları ve lokal amino asitler arasındaki hidrojen bağı etkileşimleri ve makrosiklik yapı ile proteinin hidrofobik çekirdeği arasındaki hidrofobik etkileşimler aracılığıyla proteinler ile etkileşim içindedir. Heme proteinlerinin biyolojik fonksiyonlarının tamamı sadece heme *b* içeren heme proteinlerinin alt kümesinde gözlemlenir (Reedy ve Gibney, 2004).



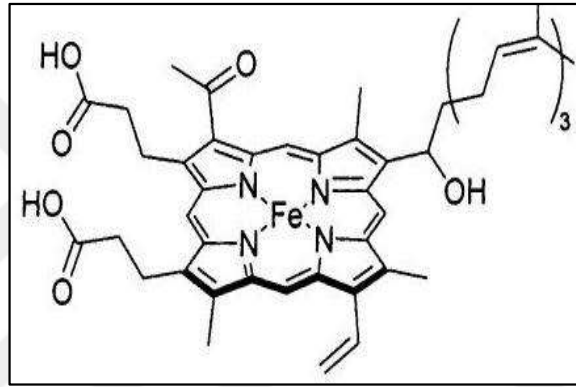
Şekil 1.3. Heme *b* molekül yapısı (Reedy ve Gibney, 2004)

İkinci en yaygın biyolojik heme yapısı, sitokrom *c*'de (cyt *c*) ve sitokrom *b_{6-f}* kompleksinin sitokrom *f*'sinde bulunan heme *c*'dir (Şekil 1.4) (Scott ve Mauk, 1996). Heme *c*, porfirin çevresinin R₈ ve/veya R₁₃ konumlarında sistein kalıntılarına tiyo-eter bağları ile kovalent olarak bağlanmasıyla heme *b*'den farklıdır. Tiyo-eter bağlantılarının çıkarılması sıklıkla eşlik eden protein açılması ile heme ayrışmasına neden olduğundan cyt *c* yapısı ve işlevi için önem taşır. Cyt *c*'deki tiyo-eter bağlantıları, evrimin bir eseri olabilir, protein katlanmasına rehberlik edebilir, elektron transfer fonksiyonlarını kolaylaştırabilecek yüksek heme-protein oranlarına izin verebilir veya zayıf ligandların koordinasyonunu sağlamak için mevcut olabilir (Reedy ve Gibney, 2004).



Şekil 1.4. Heme *c* molekül yapısı (Reedy ve Gibney, 2004)

Heme *a* (Şekil 1.5), iki enzimatik adımda heme *b*'den biyosentetik olarak türetilir. İlk adımda, heme *b*, R₈'deki vinil grubun bir hidroksietilfarnesil grubuna dönüştürülür. İkinci adımda ise R₃'teki metil grubu, heme *a*'yı oluşturmak için bir formil grubuna oksitlenir. Heme *a*'nın hidroksietilfarnesil grubu, terminal oksidaz işlevinde; bir lipofilik çapa olarak hareket etme, elektron transfer yollarını modüle etme, protonların yer değiştirmesinde işlev görme ve ekzojen ligand değişim reaksiyonlarına yardımcı olma görevlerinden bir veya daha fazlasını üstlenebilir. Heme *a* yan zincirinin formil grubu, heme *b* veya heme *o*'ya göre redoks potansiyelini yükselterek onu daha iyi bir elektron alıcısı yapar (Reedy ve Gibney, 2004).



Şekil 1.5. Heme *a* molekül yapısı (Reedy ve Gibney, 2004)

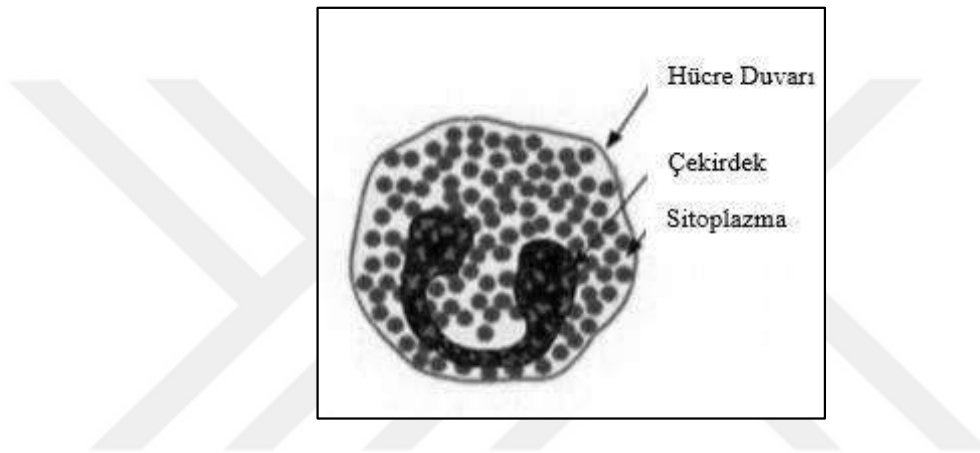
Hb, O₂'yi dokulara taşıyan ve eritrositlerde en çok bulunan proteindir. Hb, O₂ ile tersinir bir bağ oluşturur. Oksijenli durumda, oksihemoglobin (oksiHb) olarak adlandırılır. OksiHb'nin rengi parlak kırmızı olup indirgenmiş durumda morumsu maviye döner. Bu durumda deoksihemoglobin (deoksiHb) olarak adlandırılır. Hb, kemik iliğinde özellikle de eritrositlere dönüşen hücrelerde gelişir. Eritrositlerin kuru ağırlığının yaklaşık %95'i Hb'den oluşur. Eritrositler öldüğünde Hb parçalanır. Parçalanmadan sonra Hb yapısındaki demir transferrin adı verilen proteinler tarafından kemik iliğine taşınıp tekrar yeni eritrositlerin üretiminde kullanılır. Hb'nin geri kalanı, safraya atılan ve dışkıya karakteristik sarı kahverengi rengini veren bir kimyasal olan bilirubinin temelini oluşturur (Senior, 2010, s31-35).

Beyaz kan hücreleri (Lökositler)

Lökositler, bağımsız olarak hareketli, Hb içermeyen ve çekirdeğe sahip hücrelerdir ve yabancı maddeleri, hücre kalıntıları yutmada, bulaşıcı maddeleri,

kanser hücrelerini yok etmekte, antikorlar üreterek vücudu enfeksiyon ve hastalıklara karşı savunmada rol oynamaktadır. Bazı onarıcı işlevlere de sahiptirler. Lökositler, kan dolaşımında hücre bölünmesine (mitoz) uğramazlar. Normal kandaki lökositlerin sayısı mm^3 başına 4,500 ile 11,000 arasında değişmektedir (Senior, 2010, s39-42).

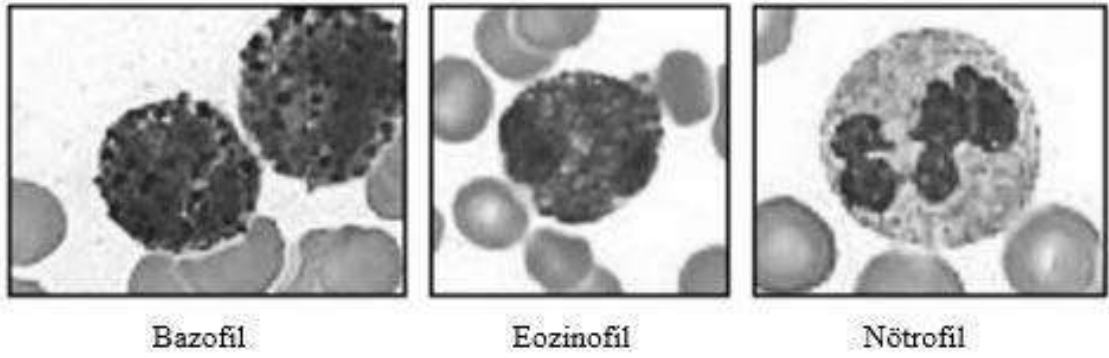
Lökositler kemik iliğinde üretilir. Kanda ve lenfatik sistemde bulunur. Bir lökosit, genellikle büyük ve loblu bir çekirdeğe sahiptir. Bu sebeple diğer kan hücrelerinden kolay bir şekilde ayrılır. Lökositlerin yapısı (Şekil 1.6) bir çekirdek, sitoplazma ve hücre duvarından oluşur (Carleton, Drury ve Wallington, 1980).



Şekil 1.6. Lökosit yapısı (Al-Dulaimi vd., 2016)

Lökositler, granülositler, monositler ve lenfositler olmak üzere 3 ana grupta incelenebilir. Granülositler, nötrofiller, bazofiller ve eozinofiller olarak monositler ise makrofajlar ve dendritik hücreler olarak sınıflandırılabilir. Lenfositler, B- lenfositleri ve T- lenfositleri olarak sınıflandırılmaktadır (Carleton, Drury ve Wallington, 1980; Clark ve Kruse, 1990).

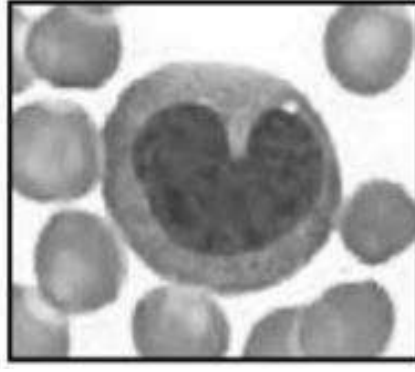
Granülositler, virüsleri, bakterileri ve diğer parazitleri sindirme kabiliyetine sahip fagositlerdir. Sitoplazmalarında görünür granüller bulunur. Geniş, uzun veya loblu çekirdeklere sahiptirler. Hücrenin çapı yaklaşık 12-20 μm arasında olup nükleolleri görülemez. Lökositlerin yaklaşık %60'ını oluştururlar. Granülositlerin alt tipleri (Şekil 1.7) nötrofil, bazofil ve eozinofildir (Standring, 2015).



Şekil 1.7. Granülositlerin alt tipleri (<http1>)

Nötrofiller, bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Bakterilere karşı önemli bir savunma hattıdır. Çekirdeğin şekli, segmentasyondan önce bir "U" veya kıvrılmış bir çubuk gibidir. Aynı zamanda "bant nötrofilleri" olarak da bilinirler. Çapları genellikle 10-18 μm arasında değişir. Nötrofiller, periferik lökositlerin yaklaşık %1-3'ünü oluşturur. Segmentli bir nötrofil hücresinin çapı genellikle 9-16 μm arasında değişir. Çok loblu bir çekirdeğe sahiptirler. Bu loblar üst üste gelebilir veya bükülebilir (Kemal, 2014). Hücre yaşına göre lob sayısı artabilir. Hücre içi granüller, giemsa boyama ve yüksek büyütme ile sitoplazmada görülebilir (Standring, 2015). Bazofiller, kan dolaşımındaki aşırı duyarlılık reaksiyonlarına karşı savaşma kabiliyetine sahip antikoagülan maddeler ve antikorlar salgılar. Dolaşımdaki en küçük granülositlerdir. Bu hücredeki bazofilik granüller büyük olup çok sayıdadır. Bu nedenle çekirdeği gizlerler. Çekirdek genellikle çift loblu veya bölünmemiş halde olup nadiren üç veya dört lob'a ayrılır. Ortalama çap yaklaşık olarak 10-15 μm arasında değişir. Eozinofiller, parazitler ve solucanlar gibi patojenleri öldürmek için granüllerinden toksin salma kabiliyetine sahiptir. Büyük granülleri sayesinde kolaylıkla tanınırlar. Eozinofilin çekirdeğinde genellikle iki lob bulunur. Çap genellikle 9-15 μm arasında değişir. Periferik lökositlerin %1-4'ünü oluştururlar (Clark ve Kruse, 1990).

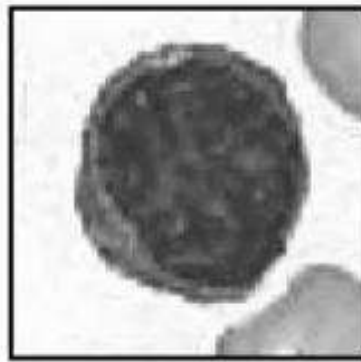
Monositler, en büyük lökosit türüdür. Ortalama çapları 10-30 μm arasında değişmekte olup genellikle çöpçü hücreler veya fagositler olarak adlandırılır. Nadiren loblu olan sadece bir çekirdek içerirler. Monositlerdeki çekirdek şekli genellikle bükülmüş (at nalı) veya böbrek şeklindedir (Şekil 1.8). Monosit hücrelerinden iki tip hücre gelişmekte olup bunlar makrofajlar ve dendritik hücrelerdir (Standring, 2015).



Şekil 1.8. *Monosit hücre yapısı (http2)*

Makrofajlar, vücuttaki her tür ölü hücreyi yiyen fagosit hücreleridir. Daha büyük olup nötrofillerden daha uzun yaşarlar. Genellikle böbrek şeklinde olan büyük boyutlu tek bir çekirdeğe sahiptirler. Ayrıca antijen sunan hücreler olarak da hareket edebilirler. Dendritik hücreler, antijen bağışıklığının gelişmesine yardımcı olur. Çekirdeğin şekli küçük ve yuvarlaktır. Hücre olgunlaştıkça düzensiz yıldız şekli ve sitoplazmik çıkıntıları (dendritler) olan büyük bir çekirdeğe dönüşür (Van Brussel vd., 2013).

Lenfositler (Şekil 1.9), boyut ve sitoplazmik granülerliğe göre tanımlanır. Olgunlaşma aşamasına bağlı olarak küçük veya büyük bir çekirdeğe sahip olabilir. Küçük lenfositler küçük bir çekirdeğe sahip olup çapı 6-9 μm arasında değişirken, büyük bir çekirdeğin çapı yaklaşık olarak 10-15 μm 'dir. Nadiren loblu olan tek bir çekirdek içerir. Çekirdeğin şekli hafif oval veya yuvarlak olup koyu lekeli (Van Brussel vd., 2013; Standring, 2015).



Şekil 1.9. *Lenfosit hücre yapısı (http2)*

Lenfositler, B-lenfositleri ve T-lenfositleri olarak ikiye ayrılır. B-lenfositleri (B hücreleri), vücudun enfekte mikroplarına veya hücrelerine bağlanan ve olgunlaşmamış aşamada bir plazma hücresine dönüşen antikörler ve proteinler üretir. Kemik iliğinde yapılırlar. Oval çekirdeklere, düşük fraktal boyuta ve pürüzsüz hücre yüzeyine

sahiptirler. T-lenfositleri (T hücreleri), diğer hücrelerin tepkisini yönlendirmeye yardımcı olan sitokin adı verilen proteinler üretir. Dairesel çekirdeklere ve buruşuk hücre yüzeyine sahiptirler (Van Brussel vd., 2013; Standring, 2015).

1.1.2.2. Kan plazması

Kan plazmasının yaklaşık %92'si su, %7'si albümin, gama globülin, antihemofilik faktör gibi hayati proteinler ve pıhtılaşma faktörlerinden oluşurken %1'i mineral tuzlar, şekerler, yağlar, hormonlar ve vitaminlerden oluşmaktadır (Mukherjee, 2016). Plazma, besinleri vücudun çeşitli hücrelerine ulaştırmak ve hücrel metabolizmadan türetilen atık ürünleri boşaltım için böbreklere, karaciğere ve akciğerlere taşımak için bir taşıma ortamı görevi görür. Plazmanın diğer bir görevi de kan hücreleri için bir taşıma sistemi olup normal kan basıncının sabit tutulmasını sağlar. Plazma, ısının vücuda yayılmasına, kan ve vücuttaki asit baz dengesi dahil olmak üzere homeostaz veya biyolojik stabilitenin korunmasına yardımcı olur. Plazmadaki su vücut hücreleri ve diğer hücre dışı sıvılarla serbestçe değiştirilebilir olup tüm dokuların normal hidrasyon durumunu sürdürmek için kullanılabilir (Senior, 2010, s23-29).

1.2. Yapay Kan

Acil durumlarda ve uzun ameliyatlarda donör kanı yerine transfüzyon için kan yerine kullanılabilecek alternatif maddeler geliştirilmektedir. Kan yerine kullanılabilecek alternatif maddeler yapay kan olarak adlandırılırlar. Yapay kan geliştirmekle ilgilenen araştırmacılar, ağırlıklı olarak Hb'nin O₂ taşıma kapasitesini taklit etmeye çalışmaktadırlar. Yapay kanın sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- İnsan vücudunda kullanımı güvenli ve uyumlu olmalıdır. Bu, yapay bir kan kullanıldığında farklı kan gruplarının önemli olmaması gerektiği anlamına gelir. Aynı zamanda yapay kanın virüsler ve mikroorganizmalar gibi tüm hastalığa neden olan maddeleri uzaklaştırmak için işlenebileceği anlamına da gelir.
- O₂'yi vücudun her yerine taşıyabilmeli ve ihtiyaç duyduğu yerde serbest bırakabilmelidir.
- Raf ömrü uzun olmalıdır. Kızılay veya benzeri kurumlara bağışlanan kanların aksine, yapay kan bir yıldan uzun süre saklanabilir. Bu bozulmadan önce yalnızca bir ay saklanabilen doğal kanın tersidir. (Sarkar, 2008).

Bu sayılan özelliklerin dışında, yapay kanın sentezi kolay olmalı ve ucuza mal edilmelidir. Bağışlanan kanlarda son kullanım tarihine yaklaşanların Hb'leri saflaştırılıp uygun hale getirildikten sonra yapay kan türevlerine dönüştürülmelidir.

1.2.1. Yapay kan olarak kullanılan maddelerin sınıflandırılması

Yapay kan genel olarak iki ana sınıfta toplanır. Bunlar, Hb tabanlı oksijen taşıyıcıları (HTOT'ler) ve perflorokarbon (PFC) emülsiyonlarıdır (Squires, 2002).

1.2.1.1. HTOT

Hücresiz bir Hb, O₂'yi eritrositlerin dışında taşıma kabiliyetini koruduğu için yapay kan olarak kullanılabilir. HTOT'lerin bir avantajı kan uyumluluk testinin gerekli olmamasıdır. Donör kanının transfüzyonu alıcıda bir hemolitik transfüzyon reaksiyonunun sonuçlarından kaçınmak için dikkatli bir çapraz eşleştirme gerektirir. Bu transfüzyonla ilişkili küçük ancak önemli bir morbidite ve mortalitenin nedenidir. Hücresiz Hb'nin bir başka avantajı da enfeksiyöz ajanları inaktive etmek için ultrafiltrasyon ve düşük ısı ile sterilize edilebilmesidir. Bu durum eritrositlerde mümkün değildir (Squires, 2002).

1970'lerde yapay kan geliştirmeye yönelik ilk girişimler insan Hb'nin hücresiz çözeltileridir (Rabiner vd., 1970). Ancak bu HTOT'lerle ilgili önemli sorunlar baş göstermiştir. Dolaşımda kabul edilemeyecek kadar kısa hayatta kalma süreleri, anormal derecede yüksek O₂ afinitesi, halsizlik, karın ağrısı, hemoglobinüri ve böbrek toksisitesi gibi klinik yan etkiler en önemli sorunlar arasında yer almıştır. HTOT'lerin klinik olarak etkili yapay kan olabilmeleri için iki temel zorluğun üstesinden gelinmesi gerekmektedir. Bunlar, kısa intravasküler bekleme süreleri ve normal Hb'ye göre dokuları oksijenlendirme yeteneklerinin azalmasıdır. İlk zorluk, eritrosit koruyucu ortamında bulunmayan Hb moleküllerinin böbrek tarafından hızlı bir şekilde parçalanmasını ve ortadan kaldırılmasını önlemektir. Hücre içi Hb, eritrosit ile aynı ömre sahip olup bu ömür yaklaşık 120 gündür. Ancak çözelti içinde Hb'nin tetramer yapısı böbrekler tarafından hızla elimine edilen monomerlere ve dimerlere kolayca ayrışır. O₂'nin hücre içi Hb'den ayrışması, 2,3-DPG tarafından modifiye edilmekte olup insan kanı için yaklaşık 27 mmHg'lik bir normal P₅₀ değeri (Hb'nin %50 doymuş olduğu O₂ kısmi basıncı) ile sonuçlanır. Hb çözeltilerinde 2,3-DPG eksikliği O₂ ayrışma eğrisinde bir "sola kaymaya" yani Hb'nin O₂ için afinitesinde bir artışa neden olur. Bu

artan afinite HTOT'lerin O₂'yi taşıma kabiliyetini sınırlamasa da dokulara O₂ "boşaltma" veya verme yeteneklerini sınırlamaktadır (Squires, 2002).

Hücresiz Hb'yi kimyasal olarak değiştirmek bu zorlukların üstesinden gelmek için önemli bir şekilde ele alınmıştır. Birinci sınıf modifiye HTOT'lerde, spesifik Hb tetramerinin ayrışmasını önlemek için Hb polipeptit zincirleri arasında kimyasal çapraz bağlantılar kurulur. Böylelikle renal eliminasyon geciktirilir. 3,5-dibromosalisil fumarat ile tedavi sonucu da Hb tetramerinin bütünlüğünü koruyan güçlü bir kovalent bağ meydana gelir. Bunun sonucunda 12 saate kadar uzun bir intravasküler bekleme süresi sağlanabilir (Chang, 1997; Anderson ve Ness, 2000).

İşlenmemiş hücresiz Hb, böbrek tarafından 6 saatten daha kısa bir sürede elimine edilir. Hb'nin spesifik amino gruplarını hedefleyen ve Hb molekülünü polimerize eden o-rafinoz veya glutaraldehit gibi çapraz bağlama maddeleri ile intramoleküler çapraz bağlanma yolu ile intravasküler bekleme süresi uzatılabilir (Chang, 1997; Anderson ve Ness, 2000).

Hb, dekstran, polietilen glikol (PEG) veya polioksietilen gibi çeşitli daha büyük moleküllere konjuge edilip dolaşımdan atılma hızı 48 saate kadar uzatılabilmektedir (Anderson ve Ness, 2000).

Geliştirilmekte olan yeni HTOT'lar iskemi reperfüzyon hasarını en aza indirmek için süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlere bağlı polihemoglobini (PoliHb) içermektedir. Bazı çalışma grupları, insan Hb'nini biyolojik olarak parçalanabilen polimer nanokapsüller veya lipid veziküllerden yapılan yapay hücrelerde paketlemeye çalışmıştır (Chang, 1997).

İleri düzey klinik deneylerde olan en az üç değiştirilmiş Hb ürünü bulunmaktadır. Northfield Laboratories tarafından polimerleştirilmiş bir insan Hb ürünü olan Polyheme geliştirilmiştir. Biopure, Güney Afrika Cumhuriyeti'nde yapay kan olarak kullanım için onay almış olan ve şu anda Amerika Birleşik Devletleri'nde bir faz III klinik denemenin FDA incelemesini bekleyen sığır kırmızı kan hücrelerinden (Hemopure) polimerize Hb hazırlanmıştır. Hemosol, kısmen polimerize edilmiş bir insan Hb ürünü olan ve yine FDA incelemesine tabi olan Hemolink adlı ürünü geliştirmiştir (Squires, 2002).

Hemopure transfer edilen donörlerde görülen kardiyak arrest, akciğerde sıvı birikmesi ve yüksek tansiyon nedeniyle bu HTOT, Amerika'da insan deneylerinden 2006 yılında FDA tarafından çıkarılırken Avrupa'da kullanımı devam etmiştir ([http4](http://www.fda.gov/oc/ohrt/ohrt.html)).

Şu anda, Güney Afrika'da onaylanmış olup öte yandan ABD'deki katılımcı hastanelerde araştırma amaçlı kullanımı etmektedir.

HTOT türleri

HTOT olarak tasarlanan yapay kanlar Hb'ni temel almaktadır. Sentez özelliklerine ve üretim yöntemlerine göre birçok alt sınıfta toplanabilirler.

Hb, yapay kan olarak kullanılamayacak kadar toksik olduğundan modifiye edilmektedir. Enkapsüle edilmiş ve çapraz bağlı Hb'nin yapay kan kullanımına ilişkin araştırmalar yıllar önce başlamıştır (Chang, 1964; Bunn, Esham ve Bull, 1969; Chang, 1971; Chang, 1972). Değiştirilmiş Hb geliştirmeye yönelik ciddi araştırmalar, bağışlanan kanda bulunan insan immün yetmezlik virüsü, hepatit C virüsü gibi hastalıklar endişesi nedeniyle 1980'lerde başlatılmıştır. Eritrositlerin aksine modifiye edilmiş Hb, AIDS, hepatit ve diğer enfeksiyonlardan sorumlu patojenleri inaktive etmek için pastörizasyon, ultrafiltrasyon ve kimyasal yollarla sterilize edilebilmektedir. Ayrıca değiştirilmiş Hb'de bir hücre zarı olmadığı için kan grubu antijenleri yoktur. Bu yüzden kullanımdan önce çapraz karşılaştırma ve tipleme gerekmemektedir. Zamandan ve kolaylıktan tasarruf sağlamakta olup acil durumlarda gerekli olan anında transfüzyonlara izin vermektedir. Değiştirilmiş Hb'ler, standart yöntemler kullanılarak depolanan bağışlanmış kan için yaklaşık bir ay ile karşılaştırıldığında bir yıldan uzun süre saklanabilmektedir (Chang, 1999).

Birinci nesil değiştirilmiş Hb, kimyasal çapraz bağlama veya rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak Hb'nin moleküler modifikasyonuna dayanmaktadır. Hb, reaktif amino grupları içermekte olup 2,3-DPG cebindekilere ek olarak her Hb molekülünde 40 reaktif lizin grubu ve dört reaktif amino grubu vardır. Lizin gruplarının çoğu molekülün yüzeyinde konumlanmaktadır. Spesifik reaktif amino gruplarının çapraz bağlanması veya rekombinant modifikasyonu sonucu spesifik özelliklere sahip değiştirilmiş Hb'ler oluşur. Birinci nesil değiştirilmiş Hb'nin farklı tipleri arasında çapraz bağlı poliHb, çapraz bağlı tetramerik Hb, konjuge Hb ve rekombinant Hb bulunur (Chang, 1999).

Değiştirilmiş Hb'lerin ilk örneklerinden poliHb'ler üzerinde önemli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 1960'larda Hb molekülü sebakoil klorür ile çapraz bağlanarak poli Hb elde edilmiştir (Chang, 1964; Chang, 1972). Daha sonraki çalışmalarda glutaraldehit ile Hb ve katalaz enzimi (CAT) çapraz bağlanarak poliHb'ler üretilmiştir (Chang, 1971). Glutaraldehit çapraz bağlı poliHb, gelişmiş faz III denemelerinde iki tip

poliHb olarak geliştirilmiştir. Northfield Laboratories, gelişmiş faz III denemelerinde (Chang, 1997; Gould vd., 1998) glutaraldehit çapraz bağlı piridoksallanmış insan poliHb (PolyHeme) geliştirmiştir. Klinik çalışmaları süresince gastrointestinal sıkıntı veya vazokonstriksiyon gözlenmemiş olup böbrek ve diğer organ fonksiyonları normal olarak kalmıştır. Klinik çalışmaların sonuçları PolyHeme'nin karşılık gelen eritrosit hacimlerinin yerini alabileceğini göstermiştir. Biopure Corp, glutaraldehit ile polimerize edilmiş sığır Hb'yi (Hemopure) geliştirmiştir (Chang, 1997; LaMuraglia, vd., 2000; Sprung vd., 2002). Sığır Hb'si kolaylıkla büyük miktarlarda bulunmakta olup insan Hb'sinden farklı olarak 2,3-DPG veya analog piridoksal-fosfat gerektirmez. P₅₀ değeri insan Hb'sinden daha yüksektir. Hemopure, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) veterinerlik tıbbında kullanım için ve Güney Afrika'da rutin insan klinik kullanımı için onaylanmıştır (Lok, 2001). Hemosol Ltd, yaklaşık %30 çapraz bağlı tetramerik Hb içeren o-rafinoz çapraz bağlı insan poliHb (Hemolink) ürününü geliştirmiştir (Adamson ve Moore, 1998). Bu bileşik şu anda koroner arter baypas greftleme cerrahisi için ileri faz III klinik çalışmalarda kullanılmaktadır (Carmichael, 2001).

ABD'de 1 milyondan fazla Dünya'da ise yaklaşık 8,5 milyon Yehova şahidi bulunmaktadır. Bu topluluk kan transferinin reddi ile tanınır. 72 yaşındaki 3.evre nasofarengeal melanoma tanısı ile yoğun bakımda yatan bir Yehova şahidi kadına Hemopure transfüzyonu gerçekleştirilmiş ve hasta postoperatif birinci gün vazopressör desteğinden ayrılmış, ameliyat sonrası dokuzuncu gün yoğun bakım ünitesinden çıkarılıp ameliyat sonrası 16. günde hemoglobini 9 g/dL'ye ulaşmış ve taburcu olana kadar sürdürmüştür. Sonuçlara göre hemopure iyi tolere edilmiş ve yaşamı tehdit eden kritik anemisi olan yaşlı hasta için supratrapötik oksijenasyonu tamamlamıştır (Nellis, Devine ve Young, 2020).

Organ nakillerinde organın taşıma esnasında oksijenlenmesi ve metabolik canlılığını koruması için kana alternatif olarak hemoglobin temelli oksijen taşıyıcıları kullanılmaktadır. Böbrek nakli esnasında HBOC-201 ve kanın kıyaslandığı bir çalışmada HBOC-201, dokularda kana eşdeğer oksijen doygunluğu sağladığı görülmüş olup reperfüzyon üzerine, HBOC-201 ile tedavi edilen böbrekler, kanla tedavi edilen böbreklerle karşılaştırıldığında benzer böbrek kan akışına ve işlevine sahip olduğu görülmüştür (Bhattacharjee vd., 2020)

Hb'nin çapraz bağlanması hem intramoleküler hem de intermoleküler olabilmektedir. Glutaraldehit ve sebakol klorür gibi çapraz bağlayıcılar her iki

bağlanmayı da gerçekleştirirler. Ancak, bis-(N-maleimidometil)-eter Hb'yi sadece intramoleküler olarak çapraz bağlayarak tetramerik Hb oluşturur. Bunun sonucunda Hb'nin dimerlere parçalanması önlenmiş olmaktadır (Bunn, Esham ve Bull, 1969). Benzer şekilde bis-(3,5-dibromosalisil)-fumarat, intramoleküler olarak Hb'nin iki α alt birimini çapraz bağlayıp 2,3-DPG cebini değiştirmektedir (Walder vd., 1979). Bu çapraz bağlı tetramerik Hb kullanılarak faz III klinik denemelerinde diyaliz, felç, aortik anevrizma onarımı, ortopedik, gastrointestinal, genel ve kalp cerrahi, hemorajik ve hipovolemik şok çalışmaları yapılmıştır (Chang, 1997).

Değiştirilmiş Hb'lerin diğer bir türevi rekombinant Hb'lerdir. Yapılan bir çalışmada, genetiği değiştirilmiş *Escherichia coli*'den rekombinant tetramerik insan Hb'si hazırlanmıştır (Hoffman vd., 1990). Somatogen Inc, bu rekombinat ürünü geliştirip klinik çalışmalarını gerçekleştirmiştir (Freitag ve Templeton, 1997). Baxter Healthcare Ltd, bu ürünün klinik çalışma sonuçlarından faydalanılarak nitrik oksidi (NO) ortadan kaldırmayan, vazokonstriksiyona veya diğer düz kas kasılmalarına neden olmayan ikinci nesil bir rekombinant Hb'yi geliştirmiştir (Doherty vd., 1998).

1.2.1.2. PFC emülsiyonları

Dini inançlardan dolayı belirli insan grupları donör kanı veya Hb gibi insan ve hayvan proteinlerinin naklini kabul etmemektedir. Ancak, bu hastalar için hidrokarbonlara yapısal olarak benzeyen PFC molekülleri kan transfüzyonu gerektiğinde tek seçenekleri olabilir. PFC emülsiyonları O₂ ve CO₂ taşıma konusunda bu gazlara fiilen bağlanmadan mükemmel bir kapasiteye sahiptir (Squires, 2002). PFC emülsiyonları O₂ taşınmasında farklı bir yaklaşım sağlar. O₂, kimyasal olarak inert PFC sıvısında kolaylıkla çözünüp O₂'den yoksun dokular tarafından kolaylıkla ekstrakte edilebilir. PFC sulu çözeltiyle karışmadığından yapay kan olarak kullanılmadan önce emülsiyon olarak hazırlanmaktadır. Bir PFC ürünü olan Fluosol DA FDA tarafından kalp cerrahisi için bir yapay kan maddesi olarak onaylanmıştır. Bu cerrahi prosedürde, O₂ iletimini sağlamak için koroner anjiyoplasti sırasında tam O₂'li PFC infüze edilir. PFC, ameliyat sırasında kalp travmasını ve ağrıyı azaltmasına rağmen kullanımı hiçbir zaman hekimler tarafından tam olarak benimsenmemiştir (Anderson ve Ness, 2000). Alliance Pharmaceuticals tarafından geliştirilen bir PFC emülsiyonu olan 'Oksijen', ABD'de faz II ve III klinik denemelerindedir (Squires, 2002).

1.3. Karbonik anhidraz enzimi (CA)

CA enzimi, CO₂'nin tersinir hidrasyonunu katalize eder. Bu enzim ilk olarak 1933'te eritrositlerden saflaştırılmıştır (Meldrum ve Roughton, 1933). CA enziminin bitkilerde CO₂ fiksasyonu için gerekli olduğu (Bradfield, 1947) 1940'lardan beri bilinmesine rağmen az sayıda çalışma bildirilmiştir. 1994 yılına kadar prokaryotlardan sadece beş CA enzimi saflaştırılmış olup yakın zamanda yapılan bir araştırma, enzimin filogenetik ve fizyolojik olarak çeşitli prokaryotlar arasında geniş çapta dağıldığını ortaya koymuştur. Bu durum enzimin doğada daha önce tanınandan çok daha büyük bir role sahip olduğunu göstermektedir (Smith, 1999). Memeli ve bitki enzim dizilerinin ve kristal yapılarının karşılaştırılması, bunların bağımsız olarak evrimleştiğini ve sırasıyla alfa ve beta sınıfı olarak adlandırıldıklarını göstermektedir. Filogenetik analizlerin eski bir kökeni öngördüğü bağımsız olarak evrimleşen ek bir sınıf 1994'te rapor edilmiştir (Alber ve Ferry, 1994).

CO₂ tüm canlı organizmalarda bulunmakta olup hücrelerde anahtar molekül olarak kabul edilmekte ve bikarbonat (HCO₃⁻) ile dengede durmaktadır. HCO₃⁻, lipid membranlarda çözünmez. HCO₃⁻ iyonunun taşınması gerekirken CO₂ daha çözünür olduğundan hem hücre içinde hem de hücre dışında serbestçe yayılır. CO₂-HCO₃⁻ dönüşüm sürecini hızlandırmak için organizmalar CA enzimini üretirler (Geers ve Gros, 2000). CA enzimi, CO₂ ve protonların hücre içi ve hücre dışı boşluklar gibi biyolojik zarlar boyunca taşınmasında önemli bir görevi yerine getirir (Parkkila vd., 2001; Missner vd., 2008). CA enzimi, pH regülasyonu, iyon taşınması, kemik rezorpsiyonu, mide, beyin, omurilik sıvısı ve pankreas sıvılarının salgılanması gibi çeşitli fizyolojik işlevlerde rol oynar (Woolley, 1975). CA'nın en önemli işlevi, çeşitli metabolize edici dokularda CO₂ ve HCO₃⁻ iyonunun solunum ve taşınması ile ilgilidir. Ayrıca, bu enzim elektrolit sekresyonu, CO₂ ve pH homeostazı, CO₂ fiksasyonu, glukoneogenez ve üreajenez gibi biyosentetik reaksiyonlarda rol oynar (Gay vd., 1984; Dodgson ve Forster, 1986; Esbaugh ve Tufts, 2006).

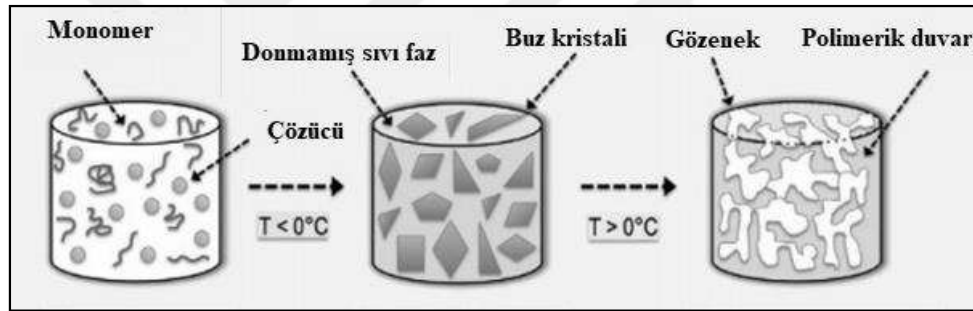
1.4. Kriyojeller

Kriyojeller, monomerlerin radikal polimerizasyonu ile 0 °C'nin altındaki sıcaklıklarda oluşan süper gözenekli hidrojelldir (Dainiak vd., 2006). Polimerik kriyojeller (orta derecede dondurulmuş jelleştirme sistemlerinde oluşturulan jeller) deneysel olarak uzun yıllardır bilinmekte olup çeşitli kriyojeller ve kriyotropik jel

oluşumunun özellikleri üzerine sistematik bilimsel araştırmalar 1980'lerin başında başlamıştır (Lozinsky, 2014).

1.4.1. Kriyojelasyon

Kriyojeller kriyojelasyon yoluyla sentezlenir. Kriyojelasyon terimi ilk kez Lozinsky vd., (1997) tarafından kullanılmıştır. Kriyojelasyon işleminde (Şekil 1.10) monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve katalizör deiyonize su içinde çözülüp karışım hemen donmuş koşullar altında inkübe edilir. 0 °C'nin altındaki sıcaklıkta çözücü donarak buz kristalleri oluşturur. Çözücü veya çözünen moleküllerin bir kısmı donmadan kalır. Monomerler sıvı mikrofazda polimerize olup çapraz bağlanarak jel oluşturur. Buz kristallerinin erimesinden sonra birbirine bağlı kriyojel olarak adlandırılan polimerik ağ oluşur (Lozinsky vd., 2003).



Şekil 1.10. Kriyojel oluşum aşaması (Lakes ve Park, 1992)

Kriyojelasyon işleminde, polimerizasyondan önce sıcaklığın düşmesi ile oluşan buz kristalleri bir şablon görevi görür. Monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı polimerizasyonun meydana geldiği sistemin donmamış sıvı kısmında kalır. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra buz kristalleri eriyerek ortamdan uzaklaştırılır. Buz kristallerinin uzaklaştığı kısımlarda gözenek yapıları oluşur (Lozinsky vd., 2001; Ivanov vd., 2008).

1.4.2. Kriyojellerin özellikleri ve yapısını etkileyen faktörler

Kriyojeller içerisinde çözelti çok düşük akış direncini gösteren birbirine bağlı makro gözenekli yapı nedeniyle bu matriks içerisinde kolayca yayılabilir. Gözenekler kriyojellere benzersiz süngerimsi yapı özelliği kazandırır. Genel olarak, gözenek boyutu 5-100 µm olup monomer derişimine, çapraz bağlayıcı oranına, fizikokimyasal özelliklere ve donma koşullarına bağlıdır (Kumar vd., 2006).

1.4.2.1. Derişim etkisi

Kriyojel yapısı derişimdeki değişikliklere duyarlıdır. Yüksek derişim daha kırılğan matrikslerin oluşumuna neden olur. Derişimin azalması oluşğan matriksleri esnek ve yumuşak hale getirir (Tüzmen vd., 2008).

1.4.2.2. Donma sıcaklığının etkisi

Kriyojel yapısındaki gözenek boyutları donma sıcaklıklarına paralel olarak değişir. Kriyojellerin gözenek boyutları 100 µm'den birkaç µm'ye kadar değişebilir. Düşük donma sıcaklığı, küçük boyutlu çözünmüş kristallerin oluşumuna neden olduğundan bu yüzeydeki gözeneklerin boyutu daha küçüktür (Plieva vd., 2004). Düşük sıcaklıklarda donmamış sıvının hacminin azalmasından dolayı daha ince ve yoğun gözenek duvarları oluşur. Donma sıcaklığı yükseldiğinde buz kristallerinin boyutu büyüyüp daha büyük gözeneklere sahip kriyojeller meydana gelir. Büyük gözeneklere sahip kriyojellerin oluşması için -10 ile -25 °C arasındaki sıcaklıklar ideal olup -10 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda donma gerçekleşmeyebilir (Arvidsson vd., 2003).

1.4.2.3. Polimerizasyon süresi ve donma hızı

Polimerizasyon süresi ve donma hızı en ideal kriyojel üretim süreci için önemli bir faktördür. Süper gözenekli homojen kriyojeller üretmek için çapraz bağlanma hızı çözücü donma hızından daha yavaş olmalıdır. Çapraz bağlanma hızı çözücünün kristalleşmesinden daha hızlı ilerlerse, makro gözenekler ve tipik süper gözenekli kriyojel yapı oluşmayacaktır (Ozmen vd., 2007).

1.4.2.4. Çapraz bağlanma derecesi

Çapraz bağlanma derecesi, kriyojellerin fiziksel özelliklerini etkiler. Kriyojelin sertliği, esnekliği, mekanik özellikleri, su tutma özelliği ile gözenek boyutu çapraz bağlanma derecesinden önemli oranda etkilenmektedir. Çapraz bağlanma derecesinin artması şişme derecesini azaltmaktadır (Henderson vd., 2013).

1.4.3. Kriyojellerin avantajları ve uygulama alanları

Kriyojellerin birçok farklı türünün sentezlenmesiyle son yıllarda biyoteknoloji alanında önemi de artmıştır. Proteinlerin, mikroorganizmaların ve hücrelerin kromatografik ayırma işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Tennikova ve Freitag, 2000; Yılmaz vd., 2009). Kriyojellerin biyoteknolojide kullanımının yaygın olmasının sebebi ozmotik, kimyasal ve mekanik denge ile ilişkilidir (Lozinsky vd., 2001). Kriyojeller biyoteknolojideki kromatografik destek malzemelerine çok iyi bir alternatiftirler (Derazshamshir vd., 2010). Bu alanda kullanılmasını sağlayan en önemli avantajlarından biri kriyojeldeki büyük gözeneklerin nano veya mikro boyutlu partiküllerin kütle transferinde faydalı olması ve verimli difüzyona izin vermesidir (Arvidsson vd., 2002; Derazshamshir vd., 2010). Kriyojel tabanlı kromatografik destek malzemesi, numunenin daha kısa sürede yüksek akış hızlarında fraksiyonlanmasına ve hacimsel elüsyonuna izin verir. Numune, ön işlem olmaksızın kriyojel kolonlara da uygulanabilir (Demiryas vd., 2007). Afinite kromatografisi uygulamalarında kriyojel dolgu maddesinin çok farklı örneklerini görmek mümkündür (Kumar vd., 2003; Keçili vd., 2018). Hücre süspansiyonları dahi kriyojel boyunca hem difüzyon hem de taşıma yoluyla çok düzgün bir şekilde hareket eder (Arvidsson vd., 2002).

Kriyojeller proteinlerin ve hücrelerin immobilizasyonu için de kullanılmışlardır (Doretti vd., 1998; Lozinsky ve Plieva, 1998). Son yıllarda, kriyojelasyon, doku mühendisliğinde oldukça yeni bir yaklaşım haline gelmiştir. Kriyojeller, birçok doku iskele yapısı arasında iyi şablonlar olarak kabul edilip belirtilen doku parçalarının rejenerasyonu için yüksek potansiyele sahiptirler. 3D ve hidrofilik özelliğe sahip birbirine bağlı süper gözenekli polimerik malzemeler olduklarından yüksek hacimde doku sıvılarını absorbe edebilirler. Bunun sonucunda şişme karakteri ve yumuşak biyouyumluluk avantajı ile diğer sentetik polimer ağ gruplarına göre üstünlük sağlarlar. Yüksek gözenekliliğe sahip jel şeklindeki yapıları kimyasal ve mekanik stabiliteyi koruyarak hücre penetrasyonunu, temasını ve migrasyonunu kolaylaştırır (Sell vd., 2010; Bakhshpour vd., 2019).

Kriyojellerin biyouyumluluğu ve kontrol edilebilir geçirgenliği sebebiyle kontrollü ilaç salınım sistemlerinde son yıllardaki kullanımı artmaktadır. Uyarılara duyarlı kriyojeller, çeşitli fiziksel ve kimyasal değişikliklere duyarlı tepkileri nedeniyle araştırmacıların büyük ilgisini çekmiştir. Kriyojellerin yapısı, istenen ilaç salınım

profillerini yerine getirmek için akıllı ilaç salınım sistemi olarak dizayn edilebilmektedir (Bakhshpour, Yavuz ve Denizli, 2018).

1.5. Polikaprolakton (PCL)

PCL'nin ϵ -kaprolaktonun halka açma polimerizasyonu ile sentezi ilk olarak 1934 yılında gerçekleştirilmiştir (Natta, Hill ve Carothers, 1934). Bu sentetik polimerin biyolojik olarak parçalanabilir özelliği ilk olarak 1973'te tanımlanmıştır. Birçok ilaca göre yüksek geçirgenliği ve toksik olmaması nedeniyle kontrollü ilaç salınımı için uygundur (Murthy, 1997). PCL, son zamanlarda çeşitli uygulamalar için kullanılan biyomalzemelerin tasarımında ilgi odağı olmuştur. Alifatik poliester emsallerinin çoğuna göre üstün reolojik ve viskoelastik özellikleri sayesinde biyolojik olarak parçalanabilir malzemelerin üretilmesini ve işlenmesini kolaylaştırmıştır (Guarino vd., 2002).

1.5.1. PCL'nin fizikokimyasal özellikleri

PCL, önemli bir biyomakromolekül sınıfı olan alifatik poliester ailesinin bir parçası olup heksanoat tekrar birimlerinden oluşur. Hidrofobik özellikte olup %69'a ulaşabilen bir kristallik derecesine sahip yarı kristal bir polimerdir (Iroh, 1999). Kristallığı molekül ağırlığı ile ters orantılıdır. Camsı geçiş sıcaklığı (T_g) $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve molekül ağırlığı 3000-80000 g/mol aralığındadır. Düşük erime noktası ($59-64\text{ }^{\circ}\text{C}$), iyi çözünürlük ve diğer polimerlerle harmanlama kapasitesine sahip olması nedeniyle ağırlıklı olarak biyomedikal alana odaklanılmıştır. Düşük sıcaklıklarda kolay şekillendirilebilmesi, viskoelastik ve reolojik özellikleri PCL'nin üretimi için avantaj sağlar. PCL biyolojik olarak parçalanabilir olması yanında biyouyumluk gibi iyi mekanik özelliklere sahiptir. PCL'nin fiziksel, termal ve mekanik özellikleri (Tablo 1.1) molekül ağırlığına ve kristallik derecesine bağlıdır. Biyomedikal alanda kullanılan polimerler arasında bu özellikler PCL'yi avantajlı kılmaktadır (Elzein vd., 2004; Kobayashi ve Makino, 2009; Woodruff ve Hutmacher, 2010).

PCL, oda sıcaklığında kloroform, diklorometan, karbon tetraklorür, benzen, toluen, sikloheksanon ve 2-nitropropan içinde yüksek oranda çözünür. Aseton, 2-bütanon, etil asetat, dimetilformamid ve asetonitril içinde az çözünür. Alkoller, petrol eteri, dietil eter ve suda çözünmez (Sinha, 2004).

Tablo 1.1. PCL'nin fizikokimyasal özellikleri (Labet ve Thielemans, 2009)

Özellikleri	Sembol	Birim	Değer aralığı
Ortalama moleküler ağırlık	Mn	g/mol	530–630 000
Yoğunluk	d	g/cm ³	1,071–1,200
Cam geçiş sıcaklığı	Tg	°C	(-65)–(-60)
Erime sıcaklığı	Tm	°C	56–65
Bozunma sıcaklığı	Td	°C	350
Doğal viskozite	D _{vis}	Cm ³ /g	100–130
İçsel viskozite	Z	Cm ³ /g	0,9
Çekme mukavemeti	s	MPa	4–785
Young modülü	E	GPa	0,21–0,44
Kopmada uzama	e	%	20–1000

1.5.2. PCL'nin sentezi

PCL, ϵ -kaprolaktonun enzimler veya organometalik katalizörler ile halka açılması polimerizasyonu ile sentezlenebilir (Varma vd., 2005).

1.5.3. PCL'nin degradasyonu

PCL gibi ester grupları içeren polimerler hidroliz yoluyla bozunmaya duyarlıdır. Bozunma, farklı koşullar altında meydana gelen her mekanizma için değişken kinetiklerle, kimyasal veya enzimatik yollarla ilerleyebilir. Doğadaki birçok mikroorganizma PCL'yi tamamen degradasyona uğratabilir (Gross ve Kalra, 2002). Genel olarak, enzimatik olmayan rastgele zincir kesilmesi PCL bozunmasının baskın bir faktörü olarak tanımlanmıştır (Pitt, 1990; Shih, 1995). PCL'nin bozunması hem asit hem de baz katalizli ester hidroliziyle ilerleyebilir. PCL zinciri uç grupları hidrolitik bozunma oranında oldukça belirleyicidir. PCL'nin hidroksi grupları ile sonlandırılan zincirleri, karboksilik asitlerle sonlanan zincirlerden çok daha kararlı görünmekte olup bu etki karboksilik asitlerin otokatalitik etkisine dayandırılmaktadır (Ouhadi, Stevens ve Teyssié, 1976). PCL'nin bozunması poliglikolik asit ve diğer polimerlere kıyasla yavaş olup bir yıldan uzun bir süre boyunca devam eder. Bu polimerin biyolojik olarak parçalanması, polilaktik asit ve poliglikolik asit gibi kopolimerlerle artırılabilir (Koleske, 1978).

PCL, birçok polimerle poli(vinil klorür), poli(stiren-akrilonitril), poli(akrilonitril-bütadien-stiren), poli(bisfenol-A), polikarbonatlar, nitroselüloz ve selüloz bütirat gibi nadiren karışabilir. Polietilen, polipropilen, doğal kauçuk, poli(vinil asetat) ve poli(etilen-propilen) gibi polimerlerle mekanik olarak uyumludur. PCL, moleküler ağırlığa, polimerin kristallik derecesine ve bozunma koşullarına bağlı olarak birkaç

aydan birkaç yıla kadar biyolojik olarak bozunur hale getirilebilir (Gross ve Kalra, 2002; Pena vd., 2006).

1.5.4. PCL'nin biyoyumluluğu

PCL, kontrollü ilaç salınım sistemleri, dikişler veya adezyon bariyeri olarak kullanılan belirli uygulamalarda Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Li ve LaBarbera, 2017). PCL'nin üretiminde kullanılan farklı çözücülerin onun biyoyumluluğu üzerinde bir etkisinin olmadığını kanıtlamıştır (Tang vd., 2004). PCL nanokompozit yapı iskelelerine alüminyum oksit (Dong vd., 2012) ve hidroksiapatit (Yu vd., 2009) katıldığında PCL'nin biyoyumluluğu devam etmektedir. Çeşitli hücrelerin kültivasyonu için hazırlanan PCL ve jelatin (Xiang vd., 2011), PCL ve ipek fibroin (Chen vd., 2004), PCL ve kitosan kompozit matriks malzemeleri (Savarino vd., 2007) ile PCL ve bifazik kalsiyum fosfat hibrid kompozit matriks malzemelerinin (Bao, Franco ve Lee, 2012) biyoyumluluğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Endotel hücre büyümesi için fibrin, fibronektin, jelatin, büyüme faktörleri ve proteoglikanlarla kompozit olarak modifiye edilen PCL/PEG matrislerinin biyoyumluluğunun devam ettiği gösterilmiştir (Pankajakshan vd., 2008).

1.5.5. PCL tabanlı nanoküreler

Nanoküreler, boyutları 10 ila 1000 nm arasında değişen, ilaçlar veya diğer aktif moleküller için taşıyıcı bölmeleri olarak işlev gören sistemlerdir. Moleküller özelliğine göre nanoküreler tarafından absorbe veya enkapsüle edilebildiği gibi dispers halde de bulunabilir. Molekülün polimerik bir matriste mi yoksa kabuk içinde mi olduğuna bağlı olarak nanopartiküller veya nanokapsüller olarak da adlandırılırlar (Sinha vd., 2004).

Nanoküreler boyut avantajıyla hem iğneleri hem de kılcal damarları tıkayan birçok koloidal sistemden farklı olarak enjeksiyon yoluyla intravenöz olarak uygulanabilir. Enjekte olabilen nanopartiküller spesifik ilaç dağıtımı ve tıbbi görüntüleme için iyi uygulanabilirliğe sahiptir. Ancak retiküloendotelial sistem tarafından intravenöz enjeksiyondan sonra saniyeler içinde ortadan kaldırıldıkları için genellikle kullanılamazlar. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için hem hidrofilik hem de hidrofobik kopolimerlerden monodispers ve biyobozunur nanoküreler geliştirilmiştir. Bu nanoküreler, farelerin karaciğerinde artmış kan dolaşımı süresi ve azalmış ilaç

birikimi davranışlarını göstermişlerdir (Gref vd., 1994). PCL ile oluşturulan nanokürelerin etkinliği, taşıdığı molekül ve proteinler ile olan etkileşimine bağlıdır.

1.6. Polimerlerin karakterizasyonunda kullanılan yöntemler

Polimer karakterizasyonu, polimerlerin yapısı veya özellikleri hakkında bilgi vermek için kullanılan teknikleri kapsar. Polimer karakterizasyonu, bir polimer malzemenin her türlü özelliğinin ölçülmesini içermektedir. Moleküler ağırlık, mikro yapısal bilgiler, kristallik derecesi vb. gibi moleküler karakterizasyonu ve termal özellikler, mekanik özellikler ile bu özelliklerin zamana bağlılığı vb. gibi makroskopik özellik ölçümünü içerir (Marković vd., 2016).

1.6.1. Polimer karakterizasyonunda mikroskobik yöntemler

1.6.1.1. Optik mikroskop

Optik mikroskop, çift kırılma yoluyla 1 mm çözünürlükte görüntüler ve renk değişiklikleri yoluyla veya belirli boyalar kullanarak kimyasal bilgiler sağlayabilen gelişmiş bir cihazdır. Bu faktörler göreceli olarak numune hazırlama kolaylığı (elektron mikroskobuna göre) ve satın alma maliyeti ile birleştirildiğinde birçok malzemenin özellikle de spektrumun görünür bölgesinde iletilen ışınların incelenmesi için güçlü bir tekniktir. İletilen ışık, ışık mikroskobunda şeffaf bir ortamdan geçer. Genlik, soğurma veya saçılma özelliklerindeki değişikliklerin bir sonucu olarak bir yerden bir yere değiştirilebilir ve bu parlak ve karanlık alan mikroskobu kullanılarak bir görüntü oluşturmak için kullanılabilir. Polimerler dahil olmak üzere saydam ince film örnekleri incelendiğinde içlerindeki yapılar iletilen ışının genliğinde uzamsal değişikliklere değil de fazda uzamsal değişikliklere neden olur. Bunun sonucunda bu tür faz nesneleri çıplak gözle görülemez. Faz kontrast mikroskobunda, bu faz farklılıkları genlik kontrastı oluşturma fazı nesnesini görünür hale dönüştürür. Polimerlerin incelenmesi için muhtemelen en yaygın kullanılan iletim tekniği polarize ışık mikroskobudur (Bunn ve Alcock, 1945; Sutton vd., 1996).

1.6.1.2. Elektron mikroskobu

Elektron mikroskobu, ince numuneleri içeren geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve toplu numuneleri içeren taramalı elektron mikroskobu (SEM) olmak üzere iki

alana ayrılabilir (Davis, 2004). Bir polimer bir elektron ışınına maruz kaldığında, numuneden enerji yayılıp bağlar kopar. Bunun sonucunda numunede kalıcı kimyasal ve fiziksel değişiklikler meydana gelir (Rose, 1987; Billingham, 1989; Papet, Audouin-Jirackova ve Verdu, 1989; Hosier vd., 2004).

TEM, bir elektron demetinin ultra ince bir numuneden geçerken numuneyle etkileşime girerek yüksek enerjili elektronların detektöre iletildiği bir mikroskopi tekniğidir. Numune yoluyla iletilen elektronların etkileşiminden bir görüntü oluşturulur; görüntü büyütülür ve floresan ekran gibi bir görüntüleme cihazına odaklanır, bir fotoğraf filmi tabakası üzerinde veya bir CCD kamera gibi bir sensör tarafından algılanır (Marković vd., 2016). TEM için temel bir gereklilik numunenin elektron ışınının (100 nm) iletimi için yeterince ince olmasıdır. Bu nedenle doğası gereği ince numuneler (Lovinger, 1983; Yase, Inoue ve Okada, 1990; Hosier vd., 2004) doğrudan veya bir destek filminde dispers edildikten sonra incelenebilir.

SEM, odaklanmış bir elektron ışınıyla tarayarak bir numunenin görüntülerini üreten bir tür elektron mikroskobudur (Marković vd., 2016). SEM'de, 10 kV enerji düzeyinde odaklanmış birincil elektron ışını, numunenin yüzeyi boyunca taranıp piksel piksel görüntü oluşturulur. Elektron ışını tarafından numune yüzeyinde biriken yükün polimerler tarafından iletilebilmesi önemli olduğundan numunenin incelenmesinden önce altın ve krom gibi iletken bir filmle püskürtme yoluyla kaplanması yaygın olarak kullanılan prosedürlerdir (Davis, 2004). SEM, TEM çalışması için iyi kopyalar veremeyecek kadar çok pürüzlü olan kazınmış yüzeyleri başarılı bir şekilde inceleyebilir (Shabana vd., 1993). Numuneyi tarayarak ve ikincil elektronları özel bir dedektörle toplayarak yüzeyin topografyasını gösteren bir görüntü oluşturulur (Marković vd., 2016).

1.6.1.3. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

AFM, polimer yüzeyinin topografik görüntüsünü oluşturan ve polimerin yüzey özellikleri hakkında bilgi sağlayabilen rutin bir tekniktir (Caldorera-Moore vd., 2011). Malzemelerin yüzey haritası genellikle temaslı profilometrelerde ve temassız profilometrelerde olmak üzere iki şekilde yapılabilir. AFM bir temas profilometresidir. AFM, iletken olmayan malzemelerin görüntülerini tamamen yeni bir açıdan yakalama yeteneğine sahip olup biyomateryalin görüntülerin yakalanmasına yardımcı olmak için temas modunda veya dokunma modunda çalıştırılabilir (Nge vd., 2004). AFM

cihazında kılavuz çekme modundayken konsolun ucunda bir piezoelektrik eleman (PZTe) bulunur. Konsol PZTe'nin rezonans frekansında salınım yapar. Uç malzemenin yüzeyine yaklaştığında bu yüzey ile uç arasında artan bir etkileşime yol açıp salınımın genliğinde bir azalmaya neden olur. Salınım genliğindeki azalma kaydedildikten ve harici bir referansla karşılaştırıldıktan sonra bu malzemenin yüzey özellikleri hakkında bilgi sağlar. AFM cihazı statik kullanım modunda ise AFM aletinin ucu numune yüzeyi üzerinde sürüklenir. Yüzey üzerinde hareket eden konsolun uç sapması numunenin yüzey özelliklerini ölçer. Uçun sapması ucu tutan konsolun üst yüzeyinden yansıyan lazer ışını algılayan bir lazer ışını detektörü kullanılarak rutin olarak ölçülür. Tahribatsızlık bu yöntemin en önemli avantajlarından biridir (Azeera, 2018).

1.6.1.4. Dinamik kuvvet mikroskobu

Dinamik kuvvet mikroskobu tekniği çözücü ekstraksiyonundan sonra polimer ağ yapısının gelişmiş yapısal görüntülerini ve pH, çözücü ve tuz derişimi gibi farklı çevre koşullarında tercih edilen sistemin geliştirilmiş şişme özelliği ile ilişkisini gösterir (Cheng, 2006).

1.6.2. Polimerlerin yapısal karakterizasyon yöntemleri

1.6.2.1. Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS)

AAS'de numune buharlaştırılıp ilgilenilen element yüksek sıcaklıklarda atomize edilir. Element derişimi, bir ışık kaynağından yayılan karakteristik bir dalga boyunun analit atomları tarafından zayıflatma veya absorpsiyona göre belirlenir. Işık kaynağı tipik olarak ölçülecek elementi içeren içi boş bir katot lambadır. Her eleman için ayrı lambalara ihtiyaç vardır. Dedektör genellikle bir fotoçoğaltıcı tüptür. Element hattını ayırmak için bir monokromatör kullanılır ve detektöre ulaşan istenmeyen radyasyon miktarını azaltmak için ışık kaynağı modüle edilir (Azeera, 2018).

1.6.2.2. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

NMR, kimyasal yapıları belirlemek için kullanılan spektroskopik bir tekniktir. Manyetik momentli bir atom çekirdeği bir manyetik alana yerleştirildiğinde uygulanan alanla hizalanma eğilimindedir. Bu hizalamayı tersine çevirmek için gereken enerji, manyetik alanın gücüne ve küçük ölçüde çekirdeğin çevresine, yani ilgili atom ile

moleküldeki yakın çevresi arasındaki kimyasal bağların doğasına bağlıdır. Bu ters çevirme, rezonans, bir süreç olup yalnızca belirli koşullar altında gerçekleşir. Bir moleküldeki tüm atomlar için enerji geçiş seviyelerini belirleyerek yapısının birçok önemli özelliğini belirlemek mümkündür (Cheremisinoff, 1996). NMR, atomların veya içinde bulundukları moleküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirler. NMR olgusuna dayanıp moleküllerin yapısı, dinamikleri, reaksiyon durumu ve kimyasal ortamı hakkında ayrıntılı bilgi sağlanabilir. Bir moleküldeki bir atomun etrafındaki intramoleküler manyetik alan, rezonans frekansını değiştirir, böylece bir molekülün elektronik yapısının ayrıntılarına erişim sağlanır (Davis, 2004).

1.6.2.3. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

FT-IR, titreşimsel enerji geçişlerini ölçmek için kullanılan farklı kimyasal bağ türleri ilgili atomlar ve bir malzemede bulunan kimyasal ortam hakkında bilgi veren polimerlerin kimyasal yapısını tanımlamak için en yaygın kullanılan tekniktir. Bu tekniğin birçok avantajı olup özellikle de örnekleme yöntemleri açısından esneklik sağlar. Ölçüm modu numune türlerine bağlı olarak seçilir. En yaygın örnekleme yöntemleri arasında transmisyon (yarı ince filmler ve kimyasal bileşiklerin genel analizi), reflektif absorpsiyon (metal numunelerde aşırı ince filmler), dış yansıma (yansıtıcı malzemeler üzerinde ince filmler), iç yansıma (kalın ve yumuşak malzemeler üzerinde kalın ve ince filmler) ve dağınık yansıma (tozlar ve zayıf yansıtma yapan malzemeler) verilebilir (Hug, Chalmers ve Griffith, 2002).

1.6.2.4. Ultraviyole (UV) ve görünür bölge (VIS) spektroskopisi

UV-VIS, ultraviyole ve görünür spektral bölgede absorpsiyon spektroskopisi olarak adlandırılır (Murthy, 2004). UV-VIS spektroskopisinde ilgilendiğimiz dalga boyu aralığı 200-800 nm olup bunun 400-800 nm dalga boyu aralığı görünür bölgeye karşılık gelir (Campbell, Pethrick ve White, 2017). Elektromanyetik radyasyon bir numuneden geçtiğinde dalga boyları numunenin molekülleri tarafından emilir. Radyasyondan numuneye enerji aktarılıp numunenin molekülleri uyarılmış bir enerji durumuna yükselir (Cheremisinoff, 1996).

Kovalent bağlarda yer alan α -elektronları UV bölgesindeki yüksek enerjili fotonları absorblarken, pi elektronları genellikle görünür bölgede daha uzun dalga boylarındaki fotonları absorblar. UV-VIS spektroskopisi organik kimyada yaygın olarak

kullanılan analitik teknik olup tek başına bilinmeyen bir bileşiği tamamen tanımlayamaz. Diğer teknikler başka bilgiler veya ölçümler kullanmayı gerektirir. Bu tekniğin polimer analizinde kullanımı belirli görevleri büyük bir verimlilikle yerine getirmesine rağmen hala sınırlıdır. Çok küçük numuneler kullanma avantajına sahip olup tercih edilen durum seyreltik çözelti halindedir. Birçok polimer ile bu durum uygun şekilde düzenlenemez. Polimer molekülleri hakkında bilgi sağlamanın yanı sıra UV-VIS tekniği polimerlerdeki katkı maddelerinin incelenmesinde de katkı sağlar (Campbell, Pethrick ve White, 2017).

1.6.2.5. X-ışını floresans spektroskopisi (XRF) ve nötron saçılma yöntemleri

XRF, tahribatsız bir element analizi yöntemi olup her bir elementin kendi karakteristik X-ışını çizgi spektrumunu yayması ilkesine dayanmaktadır. Bir X-ışını, bir hedef elemana çarptığında yörünge elektronları dışarı atılır. İç kabuklarda ortaya çıkan boşluklar dış kabuk elektronları tarafından doldurulur. Bu işlem sırasında enerji, floresans olarak bilinen ikincil X-ışınları biçiminde açığa çıkar. Yayılan X-ışını fotonunun enerjisi uyarılmış atomdaki elektronların dağılımına bağlıdır. Her element benzersiz bir elektron dağılımına sahip olduğundan yoğunluğu numunedeki elementin derişimi ile orantılı olan benzersiz bir ikincil X-ışını spektrumu üretir (Cheremisinoff, 1996).

X-ışını saçılması yöntemleri polimerik malzemelerin temel yapı özelliklerinin belirlenmesinde fayda sağlar. Dolgulu polimerler, kompozitler, yarı kristal polimerler, opak numuneler de dâhil olmak üzere karmaşık malzemelerin büyük çoğunluğu kolaylıkla incelenebilir. Ayrıca X-ışını saçılma teknikleri için gereken numune miktarı oldukça azdır. Geniş açılı X-ışını saçılma teknikleri, kristallik, tercih edilen yönelim, faz tanımlama ve kompozisyon analizi gibi temel özellikler hakkında doğrudan bilgi sağlar (Roe, 2000). Hem kristal hem de düzensiz polimerlerde yerel zincir konformasyonları ve paketleme düzenlemelerinin ayrıntılarını verebilir (Mitchell, 1989). X-ışınları, elektronlar tarafından her atom çekirdeğinin etrafına saçılır. Bu saçılmanın gücü bu yüzden atom numarasına bağlıdır. Bu durum, Cl, F, P veya Si gibi nispeten yüksek atom numaralı elementleri içeren polimerler için ortaya çıkan saçılma sinyalinin bu elementlerin atomları arasındaki korelasyonların hâkim olduğu anlamına gelir. Polivinilklorür'den (PVC) X-ışını saçılması bu durumun iyi bir örneğidir. PVC'de bulunan çeşitli zincir kusurları nedeniyle Cl atomları oldukça düzensiz bir şekilde

dağılıp bu ayrıntılı yapısal analizi engellemiştir. Yalnızca C, H, N veya O içeren çoğu polimer için bu etki mevcut değildir. Ayrıca düşük atom numarası bileşimi, X-ışını şeffaflığının yüksek olduğu ve 0,1-2,0 mm arasındaki numune kalınlıklarına sahip iletim geometrisi kullanılarak deneylerin gerçekleştirilebileceği anlamına gelir. İletim geometrisi, anizotropi çalışmasını ve küçük açılı X-ışını saçılma tekniklerinin konuşlandırılmasını önemli ölçüde kolaylaştırır (Davis, 2004).

1.6.2.6. X-ışını kırınım (XRD) analizi

Polimerlerin çoğu doğası gereği amorf olup bazıları doğada yarı kristal olarak bilinen kristal kısımlara sahip dondurma/çözme döngüleri kullanılarak hazırlanmıştır. XRD yönteminde, numune monokromatik X-ışınlarıyla ışınlanır ışınlanmaz ışığın bir kısmı kırılır. Kırılan bu ışınlar kırınım açıları ve kırılan ışınların yoğunluğu temel alınarak analiz edilip yapısallık, kristallik ve kristalit boyutu, düzlemler arası atomik aralık (d-aralığı), yönelim ve polimer/polimer karışımında bulunan gerilmeler hakkında bilgi verir.

Farklı kristallik derecesine sahip polimerler mekanik ve kimyasal özelliklerde bir kontrast sergilemekte olup bunlar da genellikle kristallik yüzdesi veya kristal/amorf oranı olarak ifade edilir (Gupta, Webster ve Sinha, 2011).

1.6.2.7. Kütle spektroskopisi (MS)

MS, bir analitten (M) gaz halindeki iyonların oluşumunu ve ardından bu iyonların kütle-yük oranının (m/z) ölçülmesini içerir (McLafferty ve Turecek, 1993). Kullanılan iyonizasyon yöntemine bağlı olarak, numune moleküler veya kuasi-moleküler iyonlara ve bunların fragmanlarına dönüştürülür. Moleküler iyonlar genellikle M'den elektron çıkarılmasıyla oluşan radikal katyonlardır (M^+). Moleküler anyon (M^-) elde etmek için elektron ilavesi bazen de elektronegatif örnekler kullanılır (Johnstone vd., 1996; Boyd, 1997). MS yöntemleri, yüksek duyarlılıkları ($<10^{-15}$ mol analiz için yeterlidir), seçicilikleri (küçük bileşenler bir karışım içinde analiz edilebilir), özgüllük (kesin kütle ve parçalanma paternleri özellikle spesifik bileşim karakteristikleri olarak hizmet eder) ve hız (saniyeler içinde veri toplama mümkündür) gibi özellikleri nedeniyle polimer analizlerinde giderek artan bir şekilde kullanılmıştır (Schulten ve Lattimer, 1984; Montaudo, 1996). Bir polimerin (veya herhangi bir başka örneğin) MS ile analizi,

polimerin en azından kısmen gaz fazı iyonlarına dönüştürülebileceğini varsaymaktadır (Montaudo ve Lattimer, 2001).

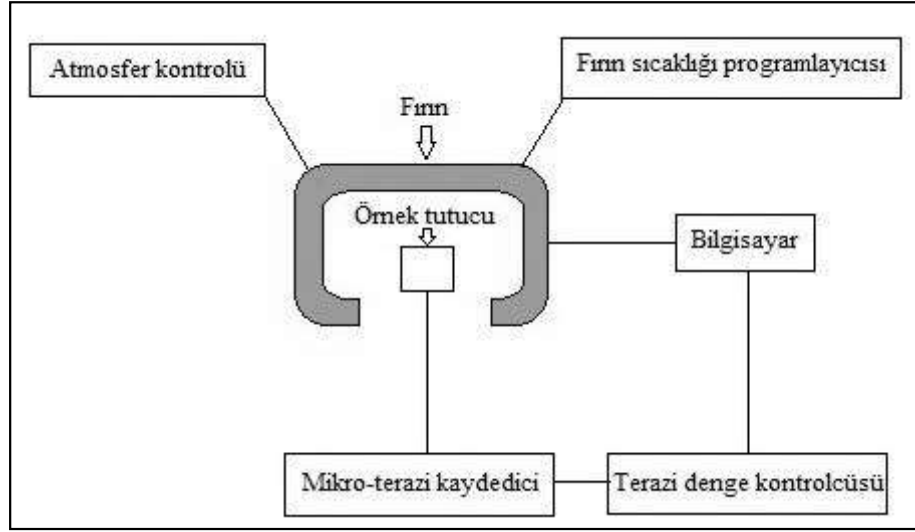
1.6.3. Polimerlerin termal karakterizasyon yöntemleri

Termal analiz, numunenin önceden belirlenmiş bir sıcaklık programına maruz bırakılarak bir özelliğinin sürekli olarak ölçüldüğü çeşitli teknikleri ifade etmektedir (Cheremisinoff, 1996, s17). Termal analizde kullanılan en yaygın teknikler termal gravimetrik analiz (TGA), diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), dinamik mekanik analiz (DMA), termal mekanik analiz (TMA), mikrotermal analiz (MTA) ve dielektrik termal analiz (DTA) olarak bilinir. Bir malzemenin termal analizi, molekülü hem bozarak hem de bozmaksızın gerçekleşebilir. Her iki durumda da incelikli ve keskin değişiklikler termal enerjinin başlamasına eşlik eder. Termal analiz, enerji, küçük numune boyutu, malzemenin fiziksel hali, atmosfer değişkenliği, numune hazırlamanın kontrolü ve cihaz fiyatı konularında avantaj sağlar (Crompton, 2013, s37).

1.6.3.1. TGA

TGA veya termogravimetri (TG), bir polimerin kütlesinin, numunenin kontrollü bir atmosferde kontrollü bir sıcaklık programına tabi tutulurken sıcaklık veya zamanın bir fonksiyonu olarak ölçüldüğü bir tekniktir (Earnest, 1988). Polimer araştırmalarında TGA tekniği uygulama koşulları altında polimerik sistemlerin termal stabilitesini incelemek için çok kullanılan bir yöntemdir. Sıcaklık programı ısıtma, soğutma, izotermal veya bunların birleşimini içerebilir (Vyazovkin vd., 2011). Ticari TGA'lar için sıcaklık aralıkları genellikle ortam sıcaklığından 1000 °C daha fazla olup bu da polimer uygulamaları için yeterli bir üst sınırdır.

TGA analizörü (Şekil 1.11) bir sıcaklık programlayıcı, sıcaklık kontrol cihazı ve örnek tavaşının koyulduğu hassas bir mikro teraziden oluşur (Menczel vd., 2009). Bu hassas mikro terazi boyunca geçirilen gaz nitrojen, argon veya helyum gibi inert olabilen bir atmosfer oluşturabildiği gibi hava ve O₂ gibi yükseltgeyici bir atmosfer de oluşturabilir. Polimer çalışmalarında indirgeyici gaz atmosferine nadiren ihtiyaç duyulur (Menczel ve Prime, 2009, s241).



Şekil 1.11. TGA cihazının şematik gösterimi

TGA cihazı kontrollü bir atmosferde küçük bir miktardaki numunenin (~10 mg) tartımını sıcaklık programı süresince yapar.

1.6.3.2. DSC

DSC, bir maddeye ve bir referans malzemenin enerji girdilerindeki farkın, madde ve referans malzemenin kontrollü bir sıcaklık programına tabi tutulurken sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçüldüğü bir teknik olarak tanımlanır (Lombardi, 1980). DSC, programlanmış ısıtma ve soğutma sırasında boş bir referans alüminyum tavaya karşı polimer örneğinin küçük bir miktarının (~10 mg) bulunduğu kapalı bir alüminyum tavanın arasındaki sıfır sıcaklık farkını devam ettirip birim zamandaki ısı enerjisi farkını ölçer (Cheremisinoff, 1996, s20). DSC tekniğinin ana uygulamaları polimer ve farmasötik alanlar olup inorganik ve organik kimyaya da fayda sağlamaktadır. DSC uygulamaları arasında camsı geçiş sıcaklığının kolay ve hızlı belirlenmesi, camsı geçişteki ısı kapasitesi sıçraması, erime ve kristalleşme sıcaklıkları, füzyon ısısı, reaksiyonların ısısı, çok hızlı saflık tayini, hızlı ısı kapasitesi ölçümleri, termosetlerin karakterizasyonu ve sıvı kristal geçişinin ölçülmesi yer almaktadır (Menczel ve Prime, 2009, s8). DSC tekniği bunların yanı sıra oksidasyon ve dekompozisyon gibi kimyasal reaksiyonların kinetiğini incelemek amacıyla da kullanılmaktadır (Cheremisinoff, 1996, s20).

DSC cihazları genel olarak iki tip olup birincisi Isı Akışı DSC diğeri ise Güç Dengeleyici DSC olarak bilinir. Isı Akışı DSC, tarihsel olarak DTA'dan gelişmiştir. Isı

Akışı DSC genellikle bir blok ile çevrilmiş ısı sızdırıcı olarak görev alan bir köprü yardımıyla birbirinden ayrılmış örnek ve referans tutucu hücreden oluşur. Blok kısmı ısıtıcı, sensörler ve tutucular içeren muhafaza bölümünden oluşur. Tutucular, numune ve referans tavalarının yerleştirildiği yükseltilmiş platformlardır. Isı sızdırıcı, hızlı bir ısı transferine izin vererek kararlı duruma makul bir süre sağlayan bölümü oluşturmaktadır (Menczel ve Prime, 2009, s21). Isı Akışı DSC sisteminde örnek ve referans tek bir ısıtma kaynağından aynı oranda ısıtılır. Tavalar arasındaki sıcaklık farkı kaydedilip ısı akışındaki farkı veren bir güç farkına dönüştürülür (Kodal vd., 2019).

Güç dengeleyici DSC’de örnek ve referans ayrı ayrı ısıtılır. Tava sıcaklıkları, disk platformlarına takılan termokuplar kullanılarak izlenir. Termokuplar seri olarak bağlanıp diferansiyel ısı akışını Ohm yasasının denklem (1.1)’deki termal eşitliğini kullanarak ölçer.

$$\frac{dq}{dt} = \frac{\Delta T}{RD} \quad (1.1)$$

Burada, dq/dt ısı akışını, ΔT referans ve örnek arasındaki sıcaklık farkını, RD disk platformunun termal direncini göstermektedir. Güç dengeleyici DSC’de fırın sıcaklığı doğrusal olarak artırılırken her tavaya ısı akışı sıcaklık farkını sıfıra yakın tutacak şekilde ayarlanır (http3)

1.6.3.3. DTA

DTA, temel olarak numune ve referans tutucuları ayırmak için bitişik bir fırından oluşur. Sıcaklık programlayıcı numuneyi ve referans tutucuları içeren fırını doğrusal bir ısıtma hızında ısıtır. DTA sensörlerinden gelen sinyaller genellikle termokuplardan sonra bir amplifikatöre beslenir. Bunun sonucunda sinyal seviyesi yükseltilerek veriye dönüştürülür. DTA’da DSC’den farklı olarak numune ve referans tutucular, numuneyi ve referans malzemeyi herhangi bir ilave paketleme olmaksızın doğrudan tutar. Çünkü DSC’de numune ve referans tavalar mevcuttur (Menczel ve Prime, 2009, s19).

1.6.3.4. TMA

TMA, atmosfer basıncı ve yük altında sıcaklık veya zamanın bir fonksiyonu olarak bir numunedeki boyutsal değişikliklerin ölçülmesine dayanan bir termal analiz tekniğidir. Ölçümler ihmal edilebilir yük altında yapılırsa teknik termodilatometri (TD)

olarak da adlandırılır (Bair vd., 2009). TMA yaygın olarak termal genişlemeyi ölçmek amacıyla kullanılsa da polimer veya kompozit malzemelerin Tg değerini ölçmek amacıyla da kullanılmaktadır (Karagiannidis P. G., Stergiou A.C., Karayannidis G. Y., 2008).

1.6.3.5. DMA

DMA, bir numuneye küçük bir döngüsel gerilme empoze etmeyi ve ortaya çıkan gerilme tepkisini ölçmeyi veya eşdeğer bir şekilde, bir numuneye döngüsel bir gerilim uygulamayı ve sonuçta ortaya çıkan gerilim tepkisini ölçmeyi içerir. Çoğu ticari DMA cihazında gerilim, kontrollü girdi olup ortaya çıkan gerilim ölçülür. DMA moleküler hareketlerden veya gevşemelerden kaynaklanan geçişleri, zaman ve sıcaklık spektrumu üzerinden viskoelastik malzemelerin mekanik özelliklerini, yapı özellik ve morfolojik gelişimleri incelemek amacıyla kullanılmaktadır (Chartoff, Menczel ve Dillman, 2009). DMA, dinamik mekanik termal analiz (DMTA), dinamik mekanik spektroskopisi (DMS) veya dinamik termomekanik analiz (DTMA) olarak da adlandırılabilir (Menard K. P., ve Menard, N. 2006).

1.6.3.6. MTA

MTA, taramalı prob mikroskobu teknikleri ailesinin bir üyesi olan taramalı termal mikroskopisi (SThM)'nin bir uzantısıdır (Gmelin, Fischer ve Stitzinger, 1998; Majumdar, 1999). MTA, geleneksel ucun ultra minyatür bir elektrik direnci ile değiştirildiği bir atomik kuvvet mikroskobu kullanır. Bu prob 5 µm çapında platin-rodym (%10) alaşımından oluşan bir çekirdeği çevreleyen 75 µm çapında bir gümüş telden oluşan Wollaston proses telinden yapılmıştır. Tel, keskin bir ilmek oluşturacak şekilde bükülüp bir epoksi reçine boncuğu ile kalıba sabitlenir. Gümüş tabakanın uç kısmı oyulup bir sıcaklık sensörü ve ısıtıcı görevi görmesinin yanısıra ana elektrik direnç elemanını (yaklaşık 2 W) oluşturan platin filamentini ortaya çıkarır. Telin üzerine yapıştırılmış optik ayna lazer için hedef noktası olarak hizmet eder. Sistem, mikroskobun piezoelektrik tarayıcısına mekanik ve elektriksel bağlantı için bir taşıyıcı üzerinde monte edilir. Prob bir numunedeki sıcaklık değişimlerini haritalamak için görüntüleme amacıyla bir direnç termometresi olarak tamamen pasif bir modda çalıştırılabilir. Bununla birlikte daha yaygın olarak aktif bir modda kullanılır. Aktif modda akım, genel olarak ortam sıcaklığının 10 ila 20 °C üzerinde olacak şekilde prob numunenin yüzeyi üzerinde

gezdirilirken akım direnç içinden geçirilir. Bunun sonucunda numune boyunca termal iletkenlikteki farklılıklar haritalanır (Reading vd., 2001).

1.7. ANADOLUCA

ANADOLUCA, AmiNoAsit Dekore Edilmiş Işık Destekli Konjugasyon Yaklaşımı'nın (AmiNoAcid Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach) kısaltmasıdır. ANADOLUCA konsepti, fotosensitif Rutenyum bazlı amino asit monomer ve oligomerlerini, yeni bir protein konjugasyon yöntemini ve bunların çeşitli alanlardaki uygulamalarını kapsamaktadır (Say, 2011).

ANADOLUCA yaklaşımında, proteinler ile monomerlerin çapraz bağlanması ve amino asit monomerlerinin Rutenyum ile oluşturdukları fotoduyarlı monomerleri kullanılarak mikro ve nano yapılarda proteinlerin konjugasyonu gerçekleştirilebilir. Fotoduyarlı amino asit monomerleri kovalent ve biyouyumlu bir şekilde proteinlerle reaksiyon verebilir. Diğer konjugasyon yöntemlerinin (EDC/NHS, CDI vb) aksine pH ve sıcaklıktan daha az etkilenirken proteinlerin konformasyonu ve fonksiyonuna zarar vermez. ANADOLUCA konseptinde, reaksiyon ortamı genellikle su veya tampon olduğu için organik çözücüler ile deformasyona uğrayan yüzeylerde kullanımı büyük avantaj sağlar.

Rutenyum komplekslerinde, bu atomun foto-uyarılması ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Mevcut bir çalışmada, tris(2,2'-bipiridil) diklororutenyum(II) kompleksi görünür ışık altında uyarılmıştır (Gerardi, Barnett ve Lewis, 1999). Bir elektron alıcı varlığında foto-uyarma yapıldığında, Ru^{2+} , Ru^{3+} 'ya yükseltgenir. Ru^{3+} , yakındaki bir protein molekülünden bir elektron ayırabilen, bir protein radikali üreten ve Ru^{2+} 'ye geri dönüşebilen güçlü ve tek elektronlu bir oksitleyici ajandır. Ru^{2+} , daha sonra yeni bir radikal nesil döngüsü başlatır. Radikal oluşumu polipeptit zinciri boyunca herhangi bir yerde meydana gelebilir. Radikal, tercihen aromatik veya komşu grup etkileri (L-tirozin, L-histidin, L-metiyonin vb.) yoluyla stabilizasyon sunan yan zincirlerde oluşmaktadır (Kotzyba-Hibert, Kapfer, ve Goeldner, 1995). Bu yan zincirler, Ru^{3+} oksitleyiciye yakın değilse, daha az reaktif asit zincirlerinden bir elektron çıkarabilir veya reaksiyon ortamı ile reaksiyona girebilir. Protein radikali oluştuğunda, bir moleküller arası çapraz bağ oluşturmak için komşu bir proteine saldırabilir.

ANADOLUCA konseptinin konjugasyon mekanizması temel alınarak çok farklı platformlarda uygulanan çalışmalar mevcuttur. Bu konseptin, nanopartikül sentezi (Say

vd., 2011), birden fazla fonksiyona sahip enzim sistemi sentezi (Yılmaz vd., 2018), protein saflaştırılması için kromatografik materyal geliştirilmesi (Keçili vd., 2018), protein etiketleme (Ünlüer vd., 2013), çok fonksiyonlu enzim sistemi sentezi (Köse, Say ve Ersöz., 2016), biyotinleme için kriyojel matrikslerin hazırlanması (Köse vd., 2019) gibi birçok uygulama alanı vardır.

1.8. Sülükler (*Hirudinea*)

Sülükler, vücutlarını uzatma veya daraltma kabiliyetine sahip kan emici solucanlardır. Antik çağlardan beri kan besleme alışkanlıkları ve flebotomi veya kan alma sanatında kullanımları ile bilinirler. Sülüklerin çoğu kalıcı veya geçici dış parazitler olup kendilerini konukçuya bağlar ve kan emerler. Emilen kan, mahsulün yan divertikülünde depolanır ve kan yutaktan geçerken pıhtılaşmasını önleyen glandüler bir salgı ile karıştırılır. Tek bir öğünde bir sülük, kendi ağırlığının birkaç katı kan yutar ve bu da birkaç ay için yeterli olabilir (Zaidi vd., 2011).

Sülükler, Annelida filumuna (Tablo 1.2) aittirler ve temel planları için az sayıda sabit segment benimseyen tek büyük annelid grubudur. Oligochaetes ve polychaetes'te, bağırsak ile vücut duvarı arasında hidrostatik bir iskelet görevi gören geniş sıvı dolu bir koelom vardır. Sülükler, geniş sıvı dolu koelomdan yoksundur. Çünkü mezenkimatöz dolgu dokusuyla dolmuştur ve geriye yalnızca içinde bir koelomik sıvı dolaşımı olan dar kanallardan oluşan bir sistem bırakmıştır. Sülük sinir sistemi, her segmentte gangliyon oluşturmak için genişleyen eşleştirilmiş bir ventral sinir kordonuna giden bağlayıcılarla birlikte ön dorsal beynin olağan annelid modeli üzerine inşa edilmiştir. Sülükler kafalarında genellikle ikisi dorsal olarak bir çift de yanal bağlayıcılarda olmak üzere altı çift gangliyon bulunur. Sülüklerle en yakından ilgili annelid grubu oligochaetes'tir.

Hem sülükler hem de oligochaetes, yumurtaların alınması için bir koza salgılayan kliteluma sahiptir. Her ikisi de hermafrodit olup dışa açılan kendi kanalları olan iyi tanımlanmış gonadlara sahiptirler. Sülük gelişiminde de görülen oligochaetes embriyolojisinin birçok özelliği vardır. Bu yüzden sülükleri, ekto parazitik bir kan emici yaşam tarzı için özelleşmiş oligochaetes olarak kabul etmek mantıklıdır. Zaman içerisinde solucanların harekette kullandıkları chaetae'yi kaybedip bunun yerine vücudun her iki ucunda bir ventral emici geliştirdiler. Bu düzenleme kan emerken

konağa tutunmayı daha iyi bir şekilde sağlamıştır. Bağırsakları büyük miktarlarda kanın depolanması için değişmiştir.

Tablo 1.2. *Sülük taksonomisi (Zaidi vd., 2011)*

Sınıf	<i>Hirudinea</i>		
Alt sınıf	<i>Euhirudinea</i>		
Takım	<i>Rhynchobdellida</i>	<i>Arhynchobdellida</i>	
Alt takım		<i>Erpobdelliformes</i>	<i>Hirudiniformes</i>
Aile	<i>Glossiphoniidae</i>	<i>Erpobdellidae</i>	<i>Haemadipsidae</i>
	<i>Piscicolidae</i>	<i>Salifidae</i>	<i>Haemopidae</i>
	<i>Ozobanchidae</i>		<i>Cylicobdellidae</i>
			<i>Hirudinidae*</i>

Hem sülükler hem de oligochaetes, yumurtaların alınması için bir koza salgılayan kliteluma sahiptir. Her ikisi de hermafrodit olup dışa açılan kendi kanalları olan iyi tanımlanmış gonadlara sahiptirler. Sülük gelişiminde de görülen oligochaetes embriyolojisinin birçok özelliği vardır. Bu yüzden sülükleri, ekto parazitik bir kan emici yaşam tarzı için özelleşmiş oligochaetes olarak kabul etmek mantıklıdır. Zaman içerisinde solucanların harekette kullandıkları chaetae'yi kaybedip bunun yerine vücudun her iki ucunda bir ventral emici geliştirdiler. Bu düzenleme kan emerken konağa tutunmayı daha iyi bir şekilde sağlamıştır. Bağırsakları büyük miktarlarda kanın depolanması için değişmiştir. Sülükler hermafrodit olmaları bakımından oligochaetes'e benzemelerine rağmen, tek bir erkek gözeneğe ve tek bir dişi gözeneğe sahip olmaları bakımından farklılık gösterirler. Tek bir çift yumurtalıkları varken, normalde on ila yüz çift testis içerirler. Çeneli sülükler, spermelerini tersine çevrilebilir bir penis aracılığıyla başka sülüklere aktarır. Hortumu olanların normalde penisi yoktur ve başka bir sülüğün vücut yüzeyine sperm içeren bir spermatofor yerleştirir. Bundan sonra sperm, alıcının dokularından geçerek yumurtalıklara doğru yol alırlar. Hortumlu sülükler (*Rhynchobdellida*), dorsal ve ventral uzunlamasına damarları olan normal annelid planında bir kan sistemine sahiptir. Ancak çeneli sülükler (*Gnathobdellae*) kan damarlarını tamamen kaybetmiş ve bunun yerine hemoglobin içeren selomik sıvının dolaştığı bir koelomik sinüs sistemine sahiptir. Bir sülüğün doğru bir tanımı yapılmadan önce, segmentlerin sınırlarının belirlenmesi gerekir.

Sülüklerin bağırsaklarının kan emmeye adaptasyonu çeşitli şekillerde gerçekleşmiştir. İlk olarak, konağın dokularını delmek için bir mekanizma bulunmaktadır. Bu ana grup, ağızdan dışa döndürülebilen ve deride Y şeklinde bir kesi yapmak için kullanılan her biri yarım daire testere biçiminde şekillendirilmiş üç kas

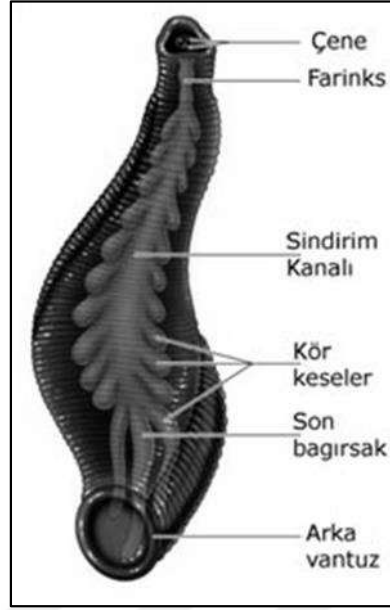
çıkıntısından oluşur. Diğer sülük grubunda konakçı ile temas halinde tutulurken ön emicinin tabanındaki bir gözenekten dışarı çıkmaya zorlanan çok kaslı bir hortum vardır. Bu mekanizma genel olarak eskisinden daha az etkili olup buna sahip olan sülükler bir memelinin derisini delebilmektedir. Kanın pıhtılaşması, çok sayıda tek hücreli tükürük bezinin salgılarıyla engellenir ve kaslı bir farinksin pompalama etkisiyle bağırsağa emilir (Mann, 2013).

1.8.1. Sülüklerin biyolojisi

Sülükler, koruma için bir iskeleti olmayan yumuşak gövdeye sahiptirler (Carter, 2001). Gözleri genellikle türe bağlı olarak bir ila beş çift arasında değişir. Uzun menzilleri 10 ila 35 cm arasında olup ektoparazitler uzun menzillerini 5 mm'den 45 cm'ye çıkarabilirler. Parlak renkli olup sırt yüzeyleri zeytin yeşilidir (Whitlock vd., 1983). Klitellum bölgesi 10-12 segmente uzanır. Erkek ve dişi genital açıklıklar içerir. Sadece yazın görülebilen yumurta kozasını salgılar ve vücutta özel segmentalde bulunan nephridia ile dışarı atılır. Vücut duvarından nefes alırlar. Kanları kırmızıdır. Çünkü hemoglobin kanda çözülmüş olup O₂'nin kılcal ağ yoluyla vücudun tüm bölgelerine taşınmasına yardımcı olur (Nouri vd., 2012). Hermafrodit hayvanlardır, yani her birinin hem yumurtalık hem de testisi vardır. Spermilerin çiftleşme sırasında oluşturdukları spermatoforlar tarafından sülükten diğerine aktarılması şeklindedir. Klitellum yumurtalarını tutar ve üreme sırasında koza salgılar. X-döllenme adı verilen gübreleme türü ile her sülük, eşinin klitellumundaki koza toprağa damlatılan gözeneklere spermatoforu fırlatır (Oh, Hallock ve Hong, 2012). Genç sülükler birkaç gün yumurta sarısı ile beslendikten sonra kozadan çıkarlar. Her koza farklı sayıda döllenmiş yumurta içerir, türlere bağlı olarak yetişkin sülükler 18-27 yıl yaşarlar (Faleh, Hassan ve Shafeeq, 2019).

1.8.2. Sülüklerde sindirim sistemi ve beslenme

Sülüklerin ağız yapılarında birbirlerine açılı olarak ayarlanmış çeneleri ve üç bıçakları vardır. Gövdenin ön ucunda ventral olarak yer alan ağız, konağın derisini Y şeklinde keser. Ağız ardından yutak, yemek borusu, mahsul, taşlık nihayetinde bağırsakta sonlanır. Bağırsakta mahsulün işlevi kanı emen sülük türlerinde mahsul depolanırken kan gönderirken pıhtılaşmayı önleyen bir pıhtılaşma önleyici üretir (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Sülüklerin sindirim sistemi (Worthen, Gode ve Graf, 2006)

Yırtıcı sülüklerde çene yerine hortum olup sülüklerin bazıları küçük omurgasızları veya detritusları besler. Ancak yiyeceklerini ağızla yutarlar (Abdullah vd., 2012). Yırtıcı sülüklerin çoğu solucanlarla, salyangoz ve böcek larvaları ile beslenir. Besinleri sindiren ve zararlı hayvanları öldüren temel besin maddelerini sentezleyen kolonize gibi yaşadıkları birçok bakteri türü vardır (Fields, 1991). *Aeromonas veronii*, *Rikenella* türleri, *Erpobdella punctata*, *Pseudomonas aeromonas*, *P. hirudinicyla*, *Klebsiella spp* ve *Bacterium hirudinicolum* gibi bakteriler sülüklerle zorunlu simbiyotik ilişkidirler. Bu bakteriler birçok vitamin üretmektedirler (Cole, 1985; Adams, 1988). Sülüklerin, beslenmek amacıyla iyi bir yer bulmak için üst dudak bölgesinde çok sayıda dokunma reseptörü mevcuttur. Sülükler beslenmeden önce artere işaret eden titreşimli hareketleri hissedip çenelerini konağın üzerinde konumlandırdıktan ve yaraya tükürük salgıladıktan sonra boşluğa hava pompalamaya başlar. Sülük yaranın içine tükürüğü salgılayarak, dişler cilde derinlemesine nüfuz eder. Mikro pipetler gibi yara içine salgılarını enjekte ettikten sonra 20-60 dk uykuya dalarlar. Bu süre sonunda çenesini açarak konağını serbest bırakırlar. Beslenmek için yaklaşık 6 s konaklamaya devam ederlerse, yaklaşık 5-15 ml vücut sıvısını emebilirler (CW, 2001).

1.8.3. Sülüklerde sinir sistemi

Sülükler, büyük sinir hücreleri içerir. Bu nedenle araştırmacılar, sinir sistemlerini omurgasızların sinir sistemi çalışmasında örnek olarak kullanmaktadırlar (Marshall vd., 1989). Ana sinir merkezi serebral ganglion, ventral ganglion, posterior ganglion ve çeşitli duyu reseptörlerinden oluşmuştur. Dört kaynaşmış gangliyondan oluşan düşük faringeal ganglion ve yedi kaynaşmış gangliyondan oluşan kaudal ganglionları mevcuttur. Gelişmiş hayvanlarda sinirsel performans için model oluşturan büyük nöronlara sahiptirler (Amarprakash, 2012). 2-10 pigment lekeli ocelli var olup her biri duyu hücresi içeren duysal papillalara sahiptir. Hareket başlığı ve sallanan gövdesi ile konaklarının gizlediği yakındaki nesnelere dokunma hareketlerini, titreşimi ve kimyasalları algılayabilirler (Michalsen vd., 2003).

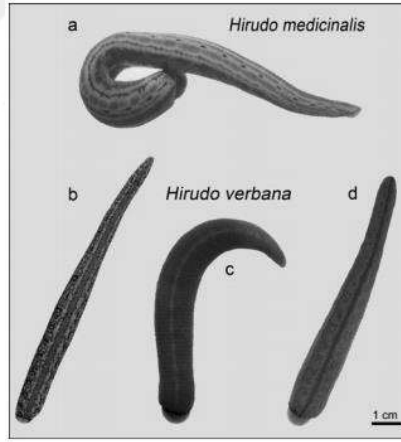
1.8.4. Sülüklerin tıbbi önemi

Sülükler, Batı tıbbının yaklaşık 2000 yıllık belgelenmiş tarihi boyunca insanlarla yakından bağlantılıdır. Antik çağlarda hematofajlı tıbbi sülük (*Hirudo medicinalis*) her derde deva olarak kabul edilirken, günümüzde esas olarak biyoaktif antikoagülan ve anti inflamatuvar maddeler açısından tıbbi ve farmasötik alanda ilgi çekmektedir (Sohn vd., 2001; Whitaker vd., 2004). Ayrıca sülüklerin farklı amaçlarla da olsa (örneğin, rekonstrüktif cerrahiden sonra kan dolaşımını yeniden sağlamak, osteoartriti tedavi etmek) doğrudan terapötik uygulaması bir rönesans yaşamaktadır (Pilcher, 2004).

Sülükler ticari olarak sülük çiftliklerinde yetiştirilmektedir. Ticari olarak kullanılan sülüklerin çoğunun resmi olarak beyan edilen türü sadece *H. medicinalis* olmayıp daha ziyade *H. verbana* ve *H. orientalis* olduğu yakın zamanda anlaşılmıştır. Diğer türlerden özellikle Güneydoğu Asya cinsi *Hirudinaria* tıbbi olarak kullanılmıştır. Hatta bazen gerçek tıbbi sülükler olarak satışa sunulmuştur. Bazı rhynchobdellida'lar (Meksika'da *Haementeria officinalis*, Krym'de *Placobdella costata*) tıbbi kullanımda olmuştur. "Tıbbi sülük", birçok Avrupa ülkesinde korunmakta ve nesli tükenmekte olan türler olarak listelenmektedir. Yüzyıllarca süren sömürü ve yer değiştirme yoluyla, tüm *Hirudo* türlerinin doğal dağılımı muhtemelen büyük ölçüde insanlardan etkilenmiştir. Bununla birlikte, daha dikkat çekici olan Güneydoğu Asya *Hirudinaria manillensis*'in Batı Hint Adalarında bulunması muhtemelen tıbbi amaçlarla kıtalararası tanıtımlarda taşınmanın bir sonucudur (Kutschera ve Roth, 2006).

1.8.5. Tıbbi sülükler

Sülükler, su ekosistemlerinde omurgasız bir avcı veya kan emen bir ektoparazit olarak önemli rol oynar. Türlerin çoğu tatlı su habitatlarında yaşamakta olup filum Annelida'da toplam 680 tür ile küçük bir grup oluşturur. Tıbbi sülük olarak bilinen geleneksel ve modern tıpta kullanılan az sayıda kan emici tür vardır. Batı Palearktik'te (Kafkasya, Avrupa, Anadolu, Kuzey Afrika) *Hirudo* cinsinden sadece 4 tür vardır (Sket ve Trontelj, 2007; Minelli, Sket ve Jong, 2014). *Hirudo* cinsi genel olarak *Hirudo medicinalis* türü ile temsil edilmektedir. Ancak ayrıntılı tür tanımlamalarına ve moleküler genetik çalışmalarına göre bu cins içinde bildirilen 4 tür (Şekil 1.13) bulunmaktadır (Siddall vd., 2007; Utevsky vd., 2010). *Hirudo verbana* (Carena, 1820), İsviçre-İtalya'dan Anadolu ve Özbekistan'a kadar uzanan bir yayılma alanına sahiptir (Sağlam, 2011). Ancak bu türün ayrıntılı ekolojisi ve üreme özellikleri hakkında dağılma bilgileri dışında yeterli bilgi bulunmamaktadır (Neubert ve Nesemann, 1999; Elliott ve Kutschera, 2011).



Şekil 1.13. Avrupa tıbbi sülük *Hirudo*'nun yetişkin canlı örneği *medicinalis* L. 1758 (a), renkli varyant *H. verbana* "var. *verbana* " (aday türler) (b), koyu pigmentli formu *H. verbana* "var. *nigra*" (c), büyük ölçüde pigmentlenmemiş varyant *H. verbana* "var. *monostriata* " (d), Bu üç sülük farklı türlere benzese de, hepsi aynı polimorfik taksona aittir (Kutschera, 2012).

Tıbbi sülükler kozalarını biriktirmek için nemli toprağı veya kıyı bölgelerindeki yapıların altındaki yerleri tercih ederler. Yapay göletlerde tutulan *H. verbana*'nın kozalarını biriktirmek için sucul alan dışına çıktığı, su altında tutulan kozalarda herhangi bir gelişme olmadığı ve karasal ortamın gençlerin gelişimi ve hayatta kalması için bir gereklilik olduğu tespit edilmiştir (Kutschera ve Roth, 2006). Geleneksel tıpta

uzun bir kullanım geçmişine sahip olan hirudoterapinin son zamanlarda modern tıpta yerini aldığı gözlemlenmiştir.

ABD-FDA (ABD-Gıda ve İlaç Dairesi), 2004 yılında plastik ve rekonstrüktif cerrahide sülük kullanımını onaylamıştır (Gödekmerdan vd., 2011; Mumcuoglu, 2014). Türkiye'de sülüklerin tıpta kullanımını içeren “Geleneksel, Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Uygulamaları” mevzuatı 2014 yılında yürürlüğe girmiştir (OG, 2014). Yönetmeliğe göre, tıbbi tedavide sadece kültür edilmiş sülüklerin (*H. medicinalis* ve *H. verbana*) kullanılmasına izin verilmektedir. Doğadan toplanan sülüklerin kullanımının engellenmesi, yapay olarak üretilmiş tıbbi sülük talebini arttırmıştır. Türkiye, küresel sülük pazarında önemli bir paya (~%80) sahiptir (Sağlam, 2011).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Oksijen taşıyıcı bir sistem geliştirilmesi ve yapay kan olarak kullanılabilirliğinin araştırılması kapsamında yapılan deneysel çalışmalar şu ana başlıklar altında toplanmıştır:

1. Hb türlerinin nanoküre ve biyonanokonjugat sentezi öncesi, sentez esnası ve sentez sonrasında doğru tayin edilebilmesi amacıyla mevcut cihazlar kullanılarak derişim denklemlerinin çıkarılması,
2. MetHb'nin indirgenmesi ve Hb türlerinin dönüşüm koşullarının optimize edilmesi,
3. Nanopartikül sentez ortamında kullanılabilecek sürfaktanların Hb denatürasyonu üzerine etkilerinin değerlendirilmesi ve en uygun sürfaktanın seçimi,
4. Radikalik mekanizma üzerinden polimerizasyon başlatıcı olarak kullanılan APS'nin, Hb türleri üzerine etkisinin zamana bağlı incelenmesi ve sentetik antioksidanların Hb türleri üzerindeki koruyucu etkisinin zaman bağımlı olarak değerlendirilmesi,
5. Yeni bir yapay oksijen taşıyıcı sistem geliştirilmesi amacıyla, tiyo-ene reaksiyonu esas alınarak $P(\text{HEMA-ko-MACys-Fe}^{3+}\text{-Protoporfirin IX})$ nanokürelerinin sentezlenmesi, karakterizasyonu, $P(\text{HEMA-ko-MACys-Fe}^{2+}\text{-Protoporfirin IX})$ nanokürelerine dönüşümü ve oksijen taşıyabilmesinin deneysel olarak araştırılması amacıyla insan serum albumini ile bağlanmasının incelenmesi,
6. Yapay oksijen taşıyıcı sistemlerde kullanılacak olan CA enziminin saflaştırılması amacıyla yeni bir kromatografik materyal olan PHEMA-pABSA sentezlenmesi, karakterizasyonu, enzimin saflaştırılması ve saflaştırılmış enzimin karakterizasyonu,
7. Yeni bir yapay oksijen taşıyıcı sistem geliştirilmesi amacıyla fotosensitif amino asit monomeri ile PCL'nin modifikasyonu, ANADOLUCA yöntemiyle çift fazlı emülsiyon çözücü evaporasyon tekniği uygulanarak $P(\text{CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA})\text{-Fe}^{3+}\text{-ProtoporfirinIX}$ sentezi, karakterizasyonu, $P(\text{CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA})\text{-Fe}^{2+}\text{-Protoporfirin IX}$

nanokürelerine dönüşümü, Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX salınımı ve oksijen taşıyabilmesinin deneysel olarak araştırılması,

8. Sentezlenen P(HEMA-ko-MACys-Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX) nanokürelerinin *Hirudo verbana* tarafından emilmesi ve sonrasında Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX durumunun araştırılması
9. Sentezlenen Hb tabanlı P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX nanokürelerinin *Hirudo verbana* tarafından emilmesi ve sonrasındaki oksihb, deoksihb, methb seviyeleri incelenmiştir.

2.1.1. Kullanılan kimyasallar

Amonyum persülfat (APS), Potasyum persülfat (KPS), Sodyum klorür (NaCl), Hemoglobin from bovine serum (methb), Potasyum ferrisiyanür (K₃[Fe(CN)₆]), Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), Polivinil alkol (PVA 13-23K), Polikaprolakton (PCL, Mw: 80 000 Da), L-glutasyon (GSH), N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit (EDC), Hemin (Fe³⁺-Protoporfirin IX), N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), c (MES), Sephadex G-75, Sodyum dodesil sülfat (SDS), Setiltrimetilamonyum bromür (CTAB), Tween 20, Tween 80, Triton X-100, N-lauroil sarkozin, Sephadex G-25, N,N'-metilenbisakrilamit (MBAAm), 2-hidroksi etil metakrilat (HEMA), L-tirozin, Glisin, Sodyum kolat, Sodyum asetat (CH₃COONa), Sodyum hidroksit (NaOH), metakriloil klorür, gallik asit, Sodyum perklorat (NaClO₄), Trizma base ve p-aminobenzen sülfonamit (pABSA) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Sodyum ditiyonit (Na₂S₂O₄), 2-merkaptetanol, N,N'-Karbonildiimidazol (CDI), Coomassie Brilliant Blue G-250, Kloroform (CHCl₃), Etanol (C₂H₅OH), Dimetil sülfoksit (DMSO), Aseton (C₃H₆O), Diklorometan (CH₂Cl₂), Etil asetat (CH₃COOC₂H₅) ve L-sistein hidroklorür Merck firmasından temin edilmiştir.

Sodyum nitrit (NaNO₂), N-hidroksisüksinimit (NHS), Sodyum sülfat (Na₂SO₄) ve Sodyum azid (NaN₃) Fluka firmasından temin edilmiştir.

Potasyum siyanür (KCN) AnalaR, Potasyum karbonat (K₂CO₃) Riedel-de Haen, Hidroklorik asit (HCl) Carlo Erba, Askorbik asit Park Scientific firmasından temin edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar şu şekilde sıralanabilir; UV-VIS mikroplaka okuyucu (Multiskan Go, Thermo), UV-VIS spektrofotometre (Genesys 10S, Thermo), floresans spektrofotometre (G9800A, Agilent), ultrasonik banyo (DA-968, Dadi), ultrasonikatör (Sonoplus HD2070, Bandelin), döner buharlaştırıcı (RV 10, IKA), FT-IR (Perkin Elmer Frontier FT-IR), TG/DTA (Exstar SII 7300), DSC (TA Q20 DSC), TEM (JEM 1220, JEOL), orbital çalkalayıcı (SSL1, Stvart), SEM (FEI/Quanta 450 FEG), SEM (Zeiss Ultra Plus), NMR (UltraShield 500 MHz, Bruker), NMR (400 MHz, Agilent), elemental analiz cihazı (CHNS-932, Leco), reaksiyon sistemi (MR-Hei, Heidolph), soğutmalı sirkülasyonlu su banyosu (PP29R, Polyscience), etüv (Omt Oven, Sanyo), inkübatör (IPP110, Memmert), liyofilizatör (Freezone 6 Plus, Labconco), soğutmalı santrifüj (3-30K, Sigma).

2.2. Yöntem

2.2.1. Hb türlerinin spektroskopik yöntemlerle tayin edilmesi

Tam kandaki tHb derişimi genellikle Drabkin ve Austin (1935) metoduna göre belirlenir. Bu yöntemde tüm Hb biçimleri, $K_3[Fe(CN)_6]$ ve KCN karışımı kullanılarak kararlı siyanomethemoglobiline (CNmetHb) oksitlenir. 540 nm’de absorbans okunup tHb derişimi Lambert-Beer yasası yardımıyla hesaplanır. Her numunenin analizinde tekrarlı deneyler için ayrı tüpler ve fazla miktarda reaktife ihtiyaç duyulmaktadır.

Tam kandaki metHb derişimi genellikle Evelyn ve Malloys (1938) metoduna göre belirlenir. Bu yöntemde numunedeki metHb fazla KCN kullanılarak CNmetHb'ye dönüştürülür. Numunedeki tüm Hb türevleri $K_3[Fe(CN)_6]$ ilavesiyle tamamen metHb'ye dönüştürölüp stabilize edilir. MetHb derişimi 635 nm’de ölçülen absorbansın değişiminden yararlanılarak hesaplanır. Her numunenin analizinde tekrarlı deneyler için ayrı tüpler ve fazla miktarda reaktife ihtiyaç duyulmaktadır.

Hb tarafından ligand bağlanması ve heme demirinin oksidasyonu durumunda absorpsiyon spektrumunda önemli değişiklikler meydana gelir. Spektrofotometrik yöntemler, oksijen ve karbonmonoksit gibi ligandların bağlanmasının yanı sıra $Hb(Fe^{2+})$ ’nin $Hb(Fe^{3+})$ ’e oksidasyonunu takip etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Antonini, 1971). OksiHb ve deoksiHb derişimlerinin aynı anda belirlenmesi spektroskopik metotlar ile mümkündür.

2.2.1.1. Toplam Hb (tHb) ve methemoglobin (metHb) derişimlerinin belirlenmesi

Drabkin ve Austin (1935) ve Evelyn ve Malloys (1938) metotlarında fazla miktarda reaktif ve numune kullanılması sebebiyle, numunedeki tHb ve metHb derişimi aynı reaksiyonları temel alan ve az miktarda numune kullanımına olanak sağlayan Arnaud vd., (2017) metoduna göre belirlenmiştir. Bu amaçla, mikropilaka üzerindeki dört kuyucuğa farklı derişimlerde (0-3 mg/mL) 225 µL numune eklenmiştir. İlk üç kuyucuğa sırasıyla 5'er µL fosfat tamponu (0,1 M, pH 7,4), KCN (%10, a/h), K₃[Fe(CN)₆] (%10, a/h) çözeltisi son kuyucuğa ise 2,5'er µL KCN (%20, a/h), K₃[Fe(CN)₆] (%20, a/h) çözeltileri eklenmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımları oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 dk inkübe edilip mikropilaka okuyucuda her bir kuyucuğun 500-800 nm arasında spektrumu taranmıştır. Elde edilen spektrum verilerinden yararlanılarak CNmetHb ve metHb için molar absorbtivite katsayısı denklem (2.1)'de gösterilen Lambert-Beer eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\epsilon_{CNmetHb}^{\lambda} = A_5 / (L \times C_{CNmetHb}) \quad (2.1)$$

Burada; $\epsilon_{CNmetHb}^{\lambda}$ CNmetHb'nin λ nm'deki molar absorbtivite katsayısı (L M⁻¹ cm⁻¹), A₅ 4. kuyu için A_(540 nm)-A_{kör} absorbans değeri, L ışın yolu (cm⁻¹) ve C_{CNmetHb} CNmetHb'nin derişimi (M) olarak ifade edilmiştir.

Numune içerisinde yer alan metHb derişimi denklem (2.2)'den yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$metHb\% = [(A_1 - A_2) / (A_3 - A_4)] \times 100 \quad (2.2)$$

Burada; metHb% numune içerisindeki metHb yüzdesi (%), A₁, A₂, A₃ ve A₄ sırasıyla 1, 2, 3 ve 4. kuyu için A_(630 nm)-A_{kör} absorbans değeri olarak ifade edilmiştir.

2.2.1.2. Deoksihemoglobin (deoksiHb) ve oksihemoglobin (oksiHb) derişiminin belirlenmesi

Numune içerisindeki deoksiHb ve oksihb derişimleri Benesch, Benesch ve Yung (1973) metoduna göre belirlenmiştir. Bu metoda göre elde edilen absorbans değerleri aşağıda verilen denklem (2.3) ve (2.4)'e girilerek örnekteki oksihb ve deoksiHb derişimleri hesaplanmıştır.

$$[\text{oksiHb}] = (1,154A_{576} - 0,2772A_{630} - 0,742A_{560}) \times 10^{-4} \quad (2.3)$$

$$[\text{deoksiHb}] = (1,335A_{560} - 0,7356A_{576} - 0,6254A_{630}) \times 10^{-4} \quad (2.4)$$

Burada; A_{560} , A_{576} ve A_{630} sırasıyla 560, 576 ve 630 nm'deki absorbans değeri olarak ifade edilmiştir.

2.2.2. Hb'nin indirgenmesi ve dönüşümü

Hb gibi saf Fe^{2+} iyonu içeren proteinlerle yapılan çalışmalarda Fe^{2+} iyonu kendiliğinden ve hızlı bir şekilde Fe^{3+} iyonuna oksitlenir. Bu oksidasyon sonucunda Fe^{2+} formdaki proteinleri yüksek oranda geri elde etmek oldukça zordur (Everse, 1991).

Ticari olarak temin edilen Hb'ler metHb formundadır. Nanaopartikül sentezi esnasında kullanılan oksitleyici moleküllerin varlığı Fe^{2+} iyonunun Fe^{3+} iyonuna yükseltgenmesine neden olacağından sentez sonrasında bu oksitlenmiş katyonun (Fe^{3+}) oksijen taşıyabilmesi amacıyla Fe^{2+} iyonuna indirgenmesi gerekir. Bu amaçla nanopartikül sentezinde kullanılan metHb ve Fe^{3+} -Protoporfirin IX oksijen bağlayabilmesi amacıyla $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ile indirgenmiştir.

2.2.2.1. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ derişiminin metHb'nin indirgenmesi üzerine etkisi

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 'ün farklı derişimlerinin (0-2 mg/ml) metHb'nin indirgenmesi üzerine etkisi Everse (1991) metodunda hafif modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, metHb'nin fosfat tamponundaki (50 mM, pH 7,4) çözeltisinin 4 ml'si $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ çözeltisinin 1 ml'si ile azot atmosferinde 10 dk karıştırılıp metHb derişimi hesaplanmıştır. Deney sonunda ortamda kalan metHb% değeri $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 'ün farklı derişimlerine (0-2 mg/ml) karşı grafiğe geçirilip indirgeme için en uygun $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ derişimi hesaplanmıştır.

2.2.2.2. MetHb'nin deoksiHb'ye dönüşümü

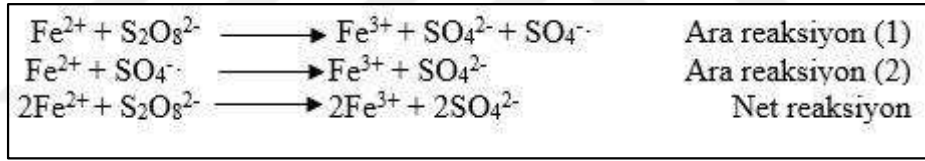
MetHb'nin deoksiHb'ye dönüşümü Dixon ve McIntosh (1967) metodunda hafif değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla çapraz bağlı dekstran jel partikülleri (Sephadex G-75, superfine) ceketli bir kolona (20 x 1 cm) yüklenip 200 ml fosfat tamponu (50 mM, pH 7,4) ile dengelenmiştir. Sıcaklığı 8 °C'ye dengelenmiş kolona sırasıyla $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 'ün 2 ml'si (2 mg/ml) ve metHb'nin 1 ml'si (20 mg/ml) yüklenip deoksiHb'ye dönüşümü gerçekleştirilmiştir.

2.2.3. Sürfactanların ve radikalik başlatıcıların Hb üzerine etkisinin belirlenmesi

Anyonik ve katyonik sürfactanların proteinlerin denatürasyonunda önemli moleküller arasında yer aldığı bilinmektedir (Moosavi-Movahedi, Housaindokht ve Moghaddasi, 1993). Nanopartiküllerin sentez ortamındaki sürfactanlar, nano damlacıkların ara yüzey gerilimini düşürüp damlacığın içi ve dışı arasındaki basınç farkının azalmasını sağlar. Bunun sonucunda daha stabil bir nano-emülsiyon ortamı oluşur (Morsy, 2014).

Hb tabanlı nanopartiküllerinin sürfactan kullanarak ANADOLUCA yöntemiyle sentezinde daha stabil bir emülsiyon ortamı elde ederken Hb denatürasyonu üzerine en az etkiye sahip sürfactan araştırılmıştır.

Peroksidisülfat iyonu ($S_2O_8^{2-}$) hidrojen peroksitin (H_2O_2) simetrik süstitüe türevidir. Peroksidisülfat iyonu Fe^{2+} iyonu ile stokiometrik olarak yükseltgenme reaksiyonu (Şekil 2.1) verip Fe^{3+} iyonunun oluşmasına sebep olmaktadır (Kolthoff, Medalia ve Raaen, 1951).



Şekil 2.1. Fe^{2+} iyonunun peroksidisülfat ile Fe^{3+} iyonuna yükseltgenme reaksiyonu

ANADOLUCA yöntemiyle nanopartiküllerinin sentezinde kullanılan APS'nin (radikalik polimerizasyon başlatıcı) Hb(Fe^{2+}) üzerine yükseltgeyici etkisini en aza indirmek amacıyla APS derişimi ve reaksiyon zamanı incelenip reaksiyon koşulları optimize edilmiştir.

2.2.3.1. Sürfactanların Hb denatürasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi

Nanopartikül sentez ortamında kullanılan sürfactanların Hb denatürasyonu Hayashi vd., (1995) metoduna göre belirlenmiştir. Bu amaçla Hb'nin %0,05 (a/h)'lik çözeltisi fosfat tamponunda (100 mM, pH 7,4), nanopartikül sentez ortamında kullanılan anyonik, katyonik ve noniyonik sürfactanların farklı derişimlerdeki (%0-1, a/h) çözeltileri saf su içerisinde hazırlanmıştır. Denatürasyonu belirlemek amacıyla, Hb'nin 100 µl'si 96 kuyucuklu mikropakanın ilk 4 sütununa yerleştirilip 1, 2 ve 3. sütunlara 100 µl sürfactan, 4. sütuna 100 µl saf su, 5. sütuna ise 100 µl sürfactan ve 100

ul saf su eklenmiştir. 25 °C’de 5 dk inkübe edilip her bir kuyucuğun 380-430 nm arasında spektrumu taranmıştır. Veriler denklem (2.5)’de yerine koyularak Hb denatürasyon oranı (%) hesaplanmıştır.

$$\text{HDR}_{\%} = 100 - [\text{Abs}_{(\text{Hb+S})} - \text{Abs}_{(\text{S+T})}] / [\text{Abs}_{(\text{Hb+W})} - \text{Abs}_{(\text{W+T})}] \times 100 \quad (2.5)$$

Burada, HDR% Hb’nin denatürasyon oranı, $\text{Abs}_{(\text{Hb+S})}$ Hb + sürfaktanın absorbansı, $\text{Abs}_{(\text{S+T})}$ sürfaktan + tamponun absorbansı, $\text{Abs}_{(\text{Hb+W})}$ Hb + saf suyun absorbansı ve $\text{Abs}_{(\text{W+T})}$ saf su + tamponun absorbansı olarak ifade edilmiştir.

2.2.3.2. APS’nin oksiHb, deoksiHb ve metHb derişimleri üzerine etkisinin belirlenmesi

ANADOLUCA yöntemiyle nanopartiküllerinin sentezinde kullanılan APS’nin (radikalik polimerizasyon başlatıcı) oksiHb, deoksiHb ve metHb derişimleri üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, fosfat tamponu (50 mM, pH 7,4) ile dengelenmiş Sephadex G-75 (20 x1,6 cm) kolona sırasıyla 1 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (10 mg/ml) ve 1 ml metHb (50 mg/ml, fosfat tamponunda) yüklenmiştir. Fosfat tamponu (50 mM, pH 7,4) ile dönüşüm ve fraksiyonlama işlemi gerçekleştirilip elde edilen fraksiyon geniş ağızlı bir beherde 30 dk karıştırılarak oksiHb oluşumu sağlanmıştır. APS’nin farklı derişimlerinin (0-1 mg/ml) 100 µl’si deney sonunda elde edilen fraksiyonların 100 µl’si ile oda sıcaklığında inkübe edilip oksiHb, deoksiHb ve metHb derişimleri hesaplanmıştır.

2.2.4. Antioksidanlar varlığında APS’nin oksiHb, deoksiHb ve metHb derişimleri üzerine etkisinin belirlenmesi

GSH ve askorbik asit gibi antioksidan maddelerin farklı derişimlerinin varlığında dönüşümü sağlanmış Hb ortamında, oksiHb, deoksiHb ve metHb derişimleri metot 2.2.1.1 ve metot 2.2.1.2’ye göre belirlenmiştir.

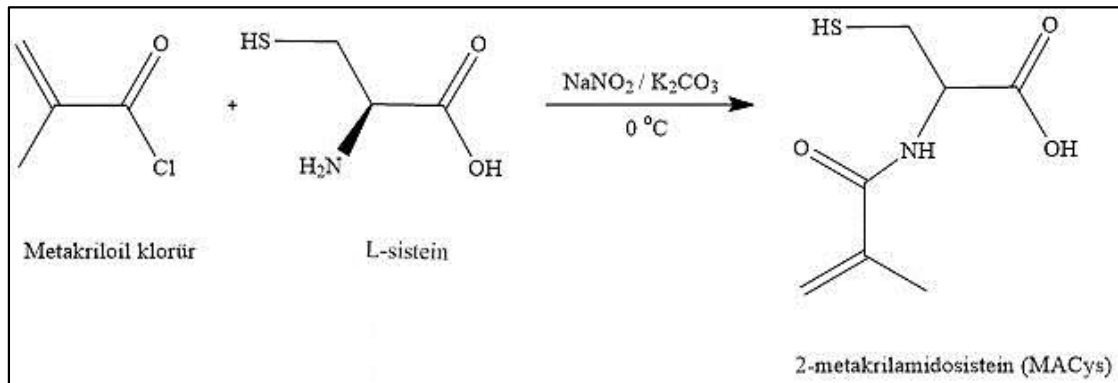
2.2.5. P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin yapay kan olarak kullanımlarının araştırılması

Yeni bir yapay oksijen taşıyıcı sistem geliştirilmesi için tiyo-ene reaksiyonu esas alınarak P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanoküreleri sentezlenip karakterize edilmiştir. Bu amaçla, yapısında tiyol grubu bulundurması ve metakriloil

klorür ile fonksiyonel bir monomer haline getirilmesi sebebiyle L-sistein amino asidi seçilmiştir. Sentezlenen amino asid monomeri, HEMA ve EGDMA çapraz bağlayıcıları kullanılıp emülsiyon polimerizasyonu tekniği ile P(HEMA-ko-MACys) nanoküreler sentezlenmiştir. P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerinin yapısındaki serbest tiyol grupları ile Fe^{3+} -Protoporfirin IX molekülünün vinil uçları arasında tiyo-ene reaksiyonu gerçekleştirilip, P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanoküreleri sentezlenmiştir. P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanoküreleri spektroskopik ve termal analiz yöntemleri ile karakterize edilip kandaki oksijen taşımasının değerlendirilmesi amacıyla albumin ile bağlanması ve yapısındaki Fe^{3+} 'nın Fe^{2+} 'ya indirgenmesi çalışılmıştır.

2.2.5.1. N-metakriloil-L-sistein (MACys) monomerinin sentezi

MACys monomeri Say vd., (2002) metoduna göre sentezlenmiştir. Bu amaçla, 5,0 g L-sistein ve 0,2 g NaNO_2 0 °C'deki K_2CO_3 'ün (%5 a/h) 30 ml'sinde çözülmüştür. 4,0 ml metakriloil klorür damla damla ilave edilip önce 30 dk buz banyosunda daha sonra oda sıcaklığında N_2 atmosferinde 2 s karıştırılıp reaksiyonun tamamlanması sağlanmıştır. Bu süre sonunda çözeltinin pH'ı 7'ye getirilip reaksiyona girmeyen maddeler etil asetat ile ortamdan uzaklaştırılmış ve sulu faz döner buharlaştırıcıda uçurulmuştur. Reaksiyon ürünü MACys, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ve $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ içerisinde kristallendirilerek saflaştırılmıştır. MACys monomerinin sentez mekanizması şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. MACys monomerinin sentez mekanizması

2.2.5.2. PHEMA nanokürelerinin sentezi

PHEMA nanoküreleri emülsiyon polimerizasyonu tekniği temel alınarak Saini, Bajpai J., ve Bajpai A.K. (2012) metoduna göre sentezlenmiştir. Bu amaçla, 0,6 ml HEMA ve 0,1 ml EGDMA %1'lik (a/h) PVA (13-23K) çözeltisinin 50 ml'sine eklenip stabil bir emülsiyon elde etmek amacıyla ultrasonik banyoda (50 W) 30 dk sonike edilmiştir. Reaksiyon ortamına 40 mg KPS ilave edilip bu ortamdaki çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak amacıyla reaksiyon karışımından 5 dk N₂ gazı geçirilmiştir. Reaksiyon ortamı 70 °C'ye ayarlı bir yağ banyosu içerisinde 24 s 300 rpm'de karıştırılmıştır. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra oluşan PHEMA nanoküreler 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edilip reaksiyon ortamından ayrılmıştır. Reaksiyona girmeyen maddeleri ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla PHEMA nanoküreler iki defa metanol ve iki defa deiyonize su ile yıkanmıştır. Sentezlenen PHEMA nanoküreler, vakumlu desikatörde 72 s süreyle oda sıcaklığında kurutulup bir sonraki kullanıma kadar ağzı kapalı cam şişelerde saklanmıştır.

2.2.5.3. P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerinin sentezi

P(HEMA-ko-MACys) nanoküreleri emülsiyon polimerizasyonu tekniği temel alınıp Saini, Bajpai J., ve Bajpai A.K. (2012) metodunda biraz değişiklik yapılarak sentezlenmiştir. Bu amaçla, 0,6 ml HEMA, 0,1 ml MACys ve 0,1 ml EGDMA %1'lik (a/h) PVA (13-23K) çözeltisinin 50 ml'sine eklenip stabil bir emülsiyon elde etmek amacıyla ultrasonik banyoda (50 W) 30 dk sonike edilmiştir. Reaksiyon ortamına 40 mg KPS ilave edilip bu ortamdaki çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak amacıyla reaksiyon karışımından 5 dk N₂ gazı geçirilmiştir. Reaksiyon ortamı 70 °C'ye ayarlı bir yağ banyosu içerisinde 24 s 300 rpm'de karıştırılmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. *P(HEMA-ko-MACys)* sentez düzeneği

Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra oluşan P(HEMA-ko-MACys) nanoküreler 12000 rpm’de 15 dk santrifüj edilip reaksiyon ortamından ayrılmıştır. Reaksiyona girmeyen maddeleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla iki defa metanol ve iki defa deiyonize su ile P(HEMA-ko-MACys) nanoküreler yıkanmıştır. Sentezlenen P(HEMA-ko-MACys) nanoküreler, vakumlu desikatörde 72 s süreyle oda sıcaklığında kurutulup bir sonraki kullanıma kadar ağzı kapalı cam şişelerde saklanmıştır.

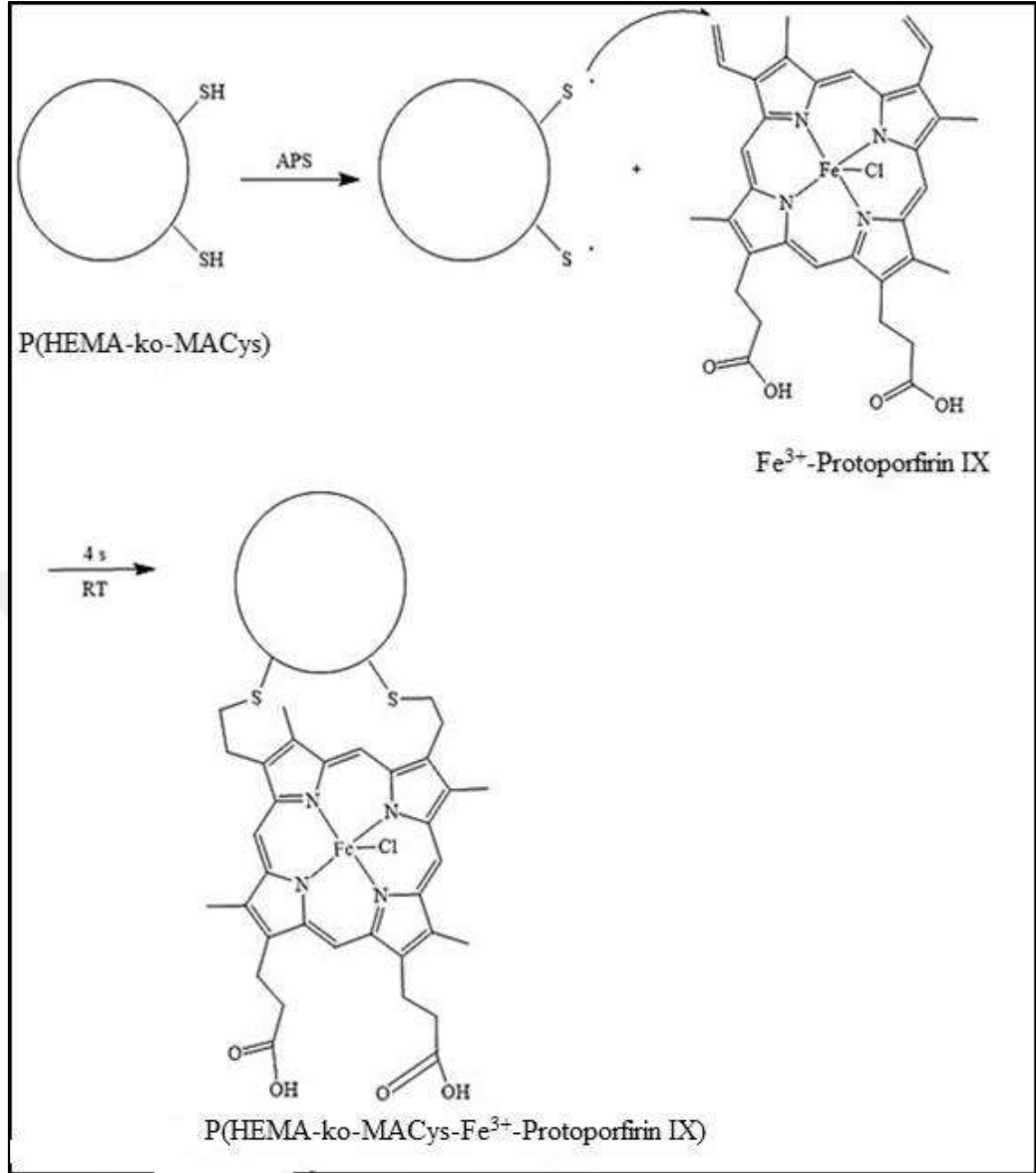
2.2.5.4. *Fe³⁺-Protoporfirin IX’un spektrofotometrik tayini*

Fe³⁺-Protoporfirin IX derişimi Lombardo vd., (2005) metoduna göre belirlenmiştir. Bu amaçla, Fe³⁺-Protoporfirin IX’un farklı derişimlerdeki (0-10 µM) çözeltilerinin 2 ml’si üzerine 1 ml glisin-HCl tamponu (50 mM, pH 2,0), 4 N HCl, 0,1 ml NaCl (5 M) ve 1 ml CHCl₃ eklenip kuvvetlice karıştırılmıştır. Çözelti ortamı 10000 rpm’de 10 dk santrifüj edilip organik faz ortamdan ayrılmıştır. Spektrofotometre yardımıyla ekstrakte edilen Fe³⁺-Protoporfirin IX’un 330, 388 ve 450 nm’deki absorbansları ölçülüp Fe³⁺-Protoporfirin IX’un derişime karşılık 2A₃₈₈-A₃₃₀-A₄₅₀ değeri grafiğe geçirilmiştir. Fe³⁺-Protoporfirin IX derişimi bilinmeyen numunede, standart çözelti yerine numune çözeltisinden aynı hacimde koyulup grafiğin eğiminden Fe³⁺-Protoporfirin IX’un derişimi hesaplanmıştır. A₃₃₀, A₃₈₈ ve A₄₅₀ değerleri, sırasıyla, organik fazın 330, 388 ve 450 nm’deki absorbans değerlerine karşılık olarak verilmiştir.

2.2.5.5. *P(HEMA-ko-MACys)* nanokürelerine tiyo-ene reaksiyonu ile Fe^{3+} -

***Protoporfirin IX* kenetlenmesi**

P(HEMA-ko-MACys) nanoküreleri 8 ml $C_2H_5OH:H_2O$ (1:1, h:h) içerisinde ultrasonik banyoda (50 W) 15 dk süreyle dispers edilmiştir. Fe^{3+} -Protoporfirin IX'un DMSO içerisinde 1 mg/ml'lik çözeltisi hazırlanıp reaksiyon ortamına ilave edilmiştir. Tiyo-ene kenetlenmesi, karışıma APS'nin (10 mg/ml) 1 ml'sinin eklenmesiye başlatılıp manyetik karıştırıcıda (300 rpm, oda sıcaklığı) 4 s süreyle gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucu oluşan P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanoküreler, 12000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip sırasıyla, C_2H_5OH ve dH_2O ile yıkanarak ortamdan ayrılmıştır. P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanokürelerinin tiyo-ene reaksiyonu ile sentez mekanizması şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporphirin IX)* sentez mekanizması

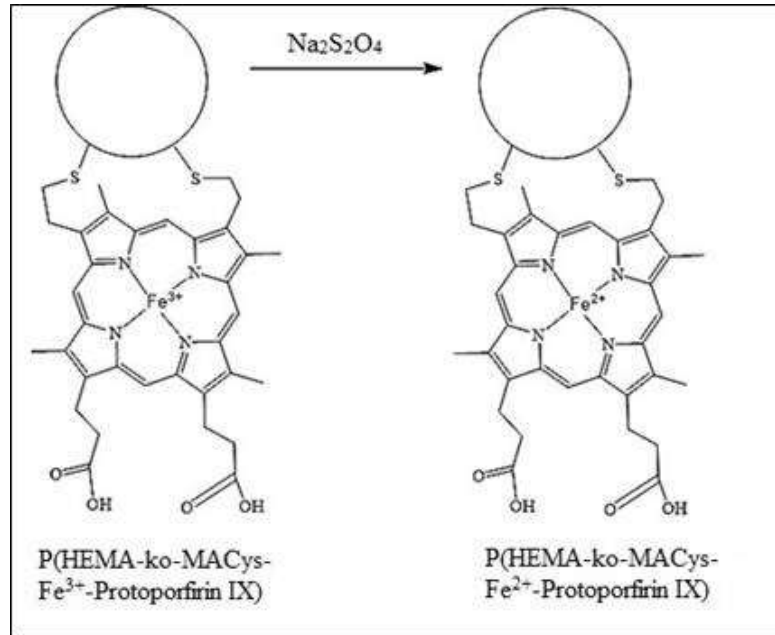
2.2.5.6. *P(HEMA-ko-MACys)* nanokürelerine tiyo-ene reaksiyonu ile Fe^{3+} -Protoporphirin IX bağlanma kapasitesinin incelenmesi

P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerinin tiyo-ene reaksiyonu ile Fe^{3+} -Protoporphirin IX bağlama kapasitesi ve etkinliği ortamdaki Fe^{3+} -Protoporphirin IX derişiminin değıştirilmesi yoluyla çalışılmıştır. Bu amaçla, Fe^{3+} -Protoporphirin IX'un 1 mg/ml'lik çözeltisi (DMSO içerisinde) hazırlanıp *P(HEMA-ko-MACys)* nanokürelerinin dispersiyon ortamının 8 ml'sine farklı miktarlarda ilave edilmiştir. 1 ml APS çözeltisinin (10 mg/ml) ortama ilave edilmesiyle tiyo-ene kenetleme reaksiyonu başlatılıp manyetik karıştırıcıda (300 rpm, oda sıcaklığı) 4 s süreyle gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon sonunda P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanoküreleri 12000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu üst faz ortamdan ayrılıp Fe³⁺-Protoporfirin IX derişimi metot 2.2.5.4'e göre belirlenmiştir.

2.2.5.7. *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin dönüşümü*

P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerine dönüşümü, Na₂S₂O₄ ile Fe³⁺-Protoporfirin IX'un Fe²⁺-Protoporfirin IX'a indirgenmesi (Şekil 2.5) esas alınarak gerçekleştirilmiştir (Mahler ve Cordes, 1969; Itoh vd., 2001). Bu amaçla, 5 mg P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanoküreleri fosfat tamponunda (50 mM, pH 7,4) süspanse edilip ultrasonik banyo (50 W) yardımıyla 10 dk dispers edilmiştir. Taze olarak hazırlanmış Na₂S₂O₄'ün NaOH (1 M) içindeki 1 mg/ml'lik çözeltisi hazırlanıp P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerini içeren dispersiyon ortamına ilave edilmiştir. Dispersiyon ortamı orbital çalkalayıcı yardımıyla 50 rpm'de 15 dk inkübe edilip P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerine indirgenmesi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.5. *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX)'un indirgenmesi*

2.2.5.8. *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin sentezinde kullanılan monomer ve polimerik maddelerin karakterizasyonu*

MACys monomeri, Fe³⁺-Protoporfirin IX molekülü, PHEMA, P(HEMA-ko-MACys) ve P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin fonksiyonel grup analizi ATR modülü kullanılarak FT-IR spektrofotometre yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

MACys monomerinin, PHEMA, P(HEMA-ko-MACys) ve P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin termal kararlılıkları ile MACys ve Fe³⁺-Protoporfirin IX moleküllerinin bağlanma etkinliği TG/DTA ve DSC ile gerçekleştirilmiştir. TG analizleri, seramik pan kullanılarak 200 ml/dk akış hızındaki N_{2(g)} atmosferi altında, 30-750 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dk sıcaklık artışı ile gerçekleştirilmiştir. DSC, -30-550 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dk sıcaklık programıyla gerçekleştirilmiştir.

PHEMA, P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerinin morfolojik analizleri ve boyutları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi ARUM biriminde, TEM kullanılarak karakterize edilmiştir.

2.2.5.9. *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin serum albumine bağlanmasının değerlendirilmesi*

Kanda ~0,6 mM civarında bulunan serum albümini, esterleşmemiş yağ asitleri, bilirubin, steroid hormonlar, safra tuzları, triptofan, tiroksin, çeşitli vitaminler, hematin, metal iyonları ve çok sayıda farmasötik maddeyi bağlama ve taşıma özelliğine sahiptir (Peters, 1995). Fizyolojik koşullar altında, Fe³⁺-Protoporfirin IX, kan plazmasında bulunan hemopeksin adlı proteine bağlanır. Hemopeksin, intravasküler veya ciddi ekstrasvasküler hemoliz gibi belirli koşullar altında, hemoglobinden ayrılmış Fe³⁺-Protoporfirin IX tarafından doyurulduktan sonra Fe³⁺-Protoporfirin IX'un fazlası serum albümini bağlar. Daha sonra metabolizma ve atılım için karaciğere taşınır (Rosenfeld ve Surgenor, 1950; Liang, 1957; Adams ve Berman, 1980; Adams, Goold ve Thumser, 1989). Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX, fizyolojik şartlarda oksijeni geri dönüşümlü olarak bağlayamaz. Ancak sentetik heme bileşiklerinden tetrafenilporfino demir (II)'nin serum albümini ile kompleks oluşturup oksijeni tersine çevrilir bir şekilde bağlayıp bırakabildiği gösterilmiştir (Komatsu vd., 1998). Sentezlenen P(HEMA-ko-MACys-

Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin oksijeni tersinir bir şekilde bağlayıp bırakabilmesi serum albumini ile kompleks oluşturmaya bağlıdır.

P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin serum albuminine bağlanması Kamal ve Behere (2005) metoduna göre belirlenmiştir. Bu amaçla, ilk olarak serum albuminin florimetrik olarak standart grafiği hazırlanmıştır. Reaksiyon ortamındaki son derişimi 0,225 µM'ye ayarlanan serum albuminin florimetrik titrasyonu P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin farklı derişimleri ile gerçekleştirilmiştir. Serum albumini ve P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin çözeltileri DMSO/fosfat tamponu (3:5, h:h) içinde hazırlanmıştır. Uyarma dalga boyu (λ_{ex}), tirozin ve fenilalaninden gelen girişimleri önlemek amacıyla 295 nm'ye ayarlanmıştır. Emisyon dalga boyu (λ_{em}) 300-500 nm arasında ayarlanıp en yüksek emisyonun gerçekleştiği dalga boyundaki sönümlenmeden P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX)/serum albumin (µg/µmol) oranı hesaplanmıştır.

2.2.6. CA Enziminin Saflaştırılması

Yapay oksijen taşıyıcı sistemlerde kullanılacak olan CA enzimi aşağıda açıklanan aşamalar sonrası, saflaştırılıp karakterize edilmiştir.

2.2.6.1. Kan örneklerinin hazırlanması

Kan örnekleri Meldrum ve Roughton (1933) metoduna göre hazırlanmıştır. Bu amaçla, gönüllü vericiden alınan taze kan örneği pıhtılaşmayı engelleyici madde (antikoagulant) olarak sitrat-fosfat-dekstrozu-adenin içeren steril bir cam tüp içerisine alınmıştır (Kan:antikoagulant madde, 1:7, v:v). Kan örneği beyaz kan hücreleri ve plazma kısmını uzaklaştırmak amacıyla 4700 g ve 4 °C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonunda elde edilen kırmızı kan hücreleri izotonik tuz çözeltisi ile yıkanıp (5 defa) hücreleri lizis amacıyla deiyonize su ilave edilerek su buz banyosunda bekletilmiştir. Hemolizattan plazma membranını uzaklaştırmak amacıyla 0,45 µm'lik şırınga filtreden (selüloz asetat) geçirilip daha sonraki çalışmalar için 4 °C'de saklanmıştır.

2.2.6.2. Protein tayini

CA enziminin saflaştırılma aşamalarındaki protein derişimi Bradford (1976) metoduna göre belirlenmiştir.

2.2.6.3. CA enziminin aktivitesinin tayin edilmesi

CA aktivitesi Wilbur ve Anderson (1948) metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 0,05 ml enzim aktivitesi bakılacak çözelti veya dispersiyon ortamı, daha önceden 0-3 °C arasına soğutulmuş Trizma tamponu (20 mM, pH 8,3, 25 °C) içerisine eklenip 1 dk süreyle 300 rpm’de karıştırılmıştır. Reaksiyon ortamına 2 ml CA içeren çözelti ilave edilip tampon pH’sinin 8,3’ten 6,3’e düşmesine kadar geçen zaman kaydedilmiştir. Kör çözelti için CA içeren çözelti yerine dispersiyon çözeltisi (deiyonize su) kullanılmıştır.

Bir Wilbur-Anderson ünitesi, 0 °C sıcaklıkta, bir dakikada Trizma tamponunun (20 mM) pH değerini 8,3’ten 6,3’e düşüren CA enzimi miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.2.6.4. CA enziminin organik çözücü karışımı ile ekstraksiyonu

CA enzimi Meldrum ve Roughton (1933) metoduna göre ekstrakte edilmiştir. Bu amaçla, hemolizatın her 1 ml’si için H₂O:C₂H₅OH:CHCl₃ (0,6:0,4:0,5, v:v:v) organik çözücü karışımı kullanılıp CA enzimini içeren çözelti ekstrakte edilmiştir.

2.2.6.5. CA enziminin saflaştırılması amacıyla matriks tasarlanması

4-aminobenzen sülfonamit (pABSA) CA enzimi için bilinen en iyi inhibitörlerden biridir (Meldrum ve Roughton, 1933). Bu inhibitörün kolon matriksine –NH₂ grubundan kolay bir şekilde bağlanabilmesi ve ucuz olması tercih sebebi olmuştur. Makro gözenekli yapısı, yüksek akış hızına olanak vermesi ve türevlendirilebilecek bol miktarda –OH içermesi sebebiyle, pABSA, PHEMA kriyojeline bağlanmıştır.

2.2.6.6. PHEMA kriyojelinin hazırlanması

PHEMA kriyojeli Türkmen ve Denizli (2014) metoduna göre hazırlanmıştır. Bu amaçla 2,6 ml HEMA ve 0,566 g MBAAm 40 ml deiyonize su içerisinde çözüldükten sonra çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak amacıyla çözüldükten 15 dk süreyle N_{2(g)} geçirilmiştir. Çözelti buz banyosu içerisine alınıp sıcaklığı 0-1°C’ye düşürülmüştür.

Çözelti ortamına 33,4 mg APS ve 43 µl TEMED ilave edilip çözelti 1 dk buz banyosu içinde karıştırılmıştır. Karışım hemen enjektörlere (5 cm x 0.8 cm, iç çap) 5'er ml olacak şekilde dökülüp ağzı kauçuk tıpa ile kapatılmıştır. Reaksiyon ortamı -16 °C'de 24 s bekletilip PHEMA kriyojeli (Şekil 2.6) sentezlenmiştir.

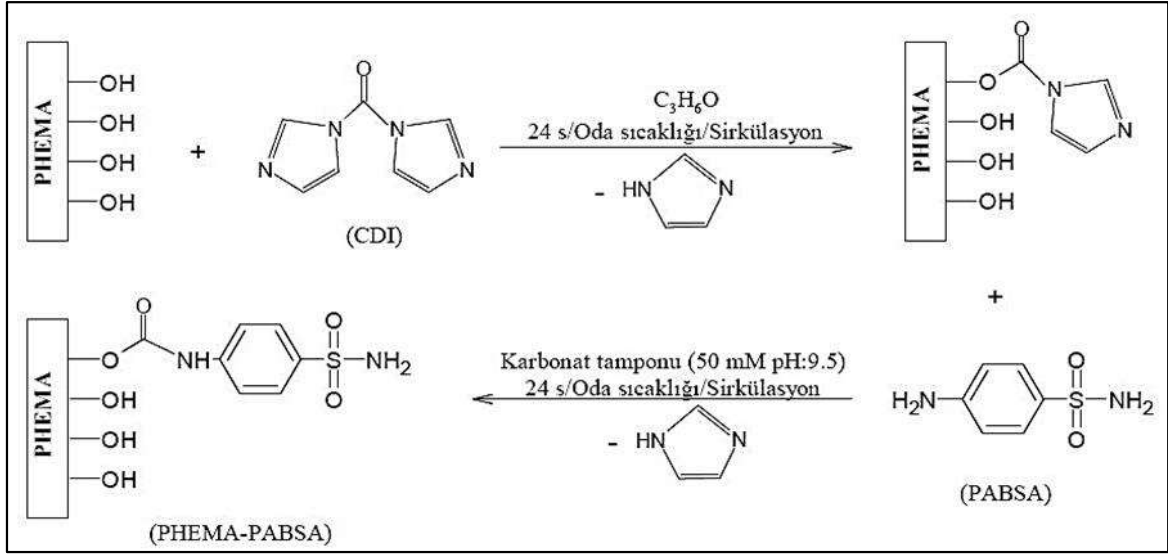


Şekil 2.6. PHEMA kriyojel kolonu

Reaksiyon tamamlandıktan reaksiyona girmemiş maddeleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla kriyojel matriksi hacminin 20 katı deiyonize su ile yıkanıp bir sonraki kullanıma kadar NaN_3 (%0,02, a/h) çözeltisi içerisinde +4 °C'de bekletilmiştir.

2.2.6.7. PHEMA kriyojelinin *N,N'*-Karbonildiimidazol (CDI) ile aktivasyonu ve pABSA'nın kovalent bağlanması

PHEMA kriyojeline pABSA'nın kovalent olarak bağlanması (Şekil 2.7) amacıyla kriyojel yapısındaki -OH grupları CDI ile aktive edilmiştir. CDI aktivasyonu Bethell vd., (1979) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 2 g CDI $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ içinde çözülüp bir peristaltik pompa yardımıyla 24 s oda sıcaklığında PHEMA kriyojel kolonundan geçirilmiştir. CDI ile aktive edilmiş PHEMA kriyojeli hacminin 20 katı $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ile yıkanıp etüvde (50 °C) kurutulmuştur. pABSA'nın son derişimi % 2 (a/h) olacak şekilde karbonat tamponu (50 mM, pH 9,5) içerisinde çözülüp bir peristaltik pompa yardımıyla 24 s süreyle oda sıcaklığında CDI aktive PHEMA kriyojelinden geçirilmiştir.



Şekil 2.7. PHEMA kriyojelinin CDI ile aktivasyonu ve pABSA'nın kovalent bağlanma mekanizması

Reaksiyon süresinin sonunda sentezlenen PHEMA-pABSA kriyojeli (Şekil 2.8) hacminin 20 katı karbonat tamponu (50 mM, pH 9,5) ile yıkanmıştır.



Şekil 2.8. PHEMA-pABSA kriyojel kolonu

PHEMA-pABSA kriyojel kolonu saflaştırma işlemlerinde kullanılmak üzere deiyonize su ile yıkayıp 4 °C'de saklanmıştır.

2.2.6.8. CA enziminin PHEMA-pABSA kriyojeli ile saflaştırılması

CA enziminin pABSA inhibitörüne bağlanma ve elüsyon koşulları Ozensoy, Arslan ve Sinan, (2004) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, CA enzimi içeren çözelti Tris-HCl/Na₂SO₄ (10/22 mM, pH 8,5) ile dengelenmiş PHEMA-pABSA kriyojel kolonuna yüklenmiştir. Kolon akış hızı, serum damla ayar seti yardımıyla 2 ml/dk olacak şekilde ayarlanıp Tris-HCl/Na₂SO₄ (10/22 mM, pH 8,5) ile bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldıktan sonra CH₃COONa/NaClO₄ (0,1/0,5 M pH 5,6) ile CA enzimi elüe edilmiştir. Saflaştırma esnasında toplanan fraksiyonların 280 nm'deki absorbansları ölçülüp fraksiyon numarasına karşılık grafiğe geçirilmiştir.

2.2.6.9. CA saflaştırılması için sentezlenen maddelerin karakterizasyonu

CA enziminin saflaştırılması için kriyojel materyal geliştirilmesi aşamasında kullanılan pABSA ve geliştirilen PHEMA-pABSA kriyojellerinin fonksiyonel grup analizleri ATR modülü kullanılarak FT-IR spektrofotometre yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

PHEMA ve PHEMA-pABSA kriyojellerinin termal karakterizasyonları TG ve DSC analizleri ile gerçekleştirilmiştir. PHEMA ve PHEMA-pABSA kriyojellerinin TG analizleri, seramik pan kullanılarak 200 ml/dk akış hızındaki N_{2(g)} atmosferi altında, 30-1000 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dk sıcaklık artışı ile gerçekleştirilmiştir. PHEMA ve PHEMA-pABSA kriyojellerinin DSC analizleri -30-550 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dk sıcaklık programıyla gerçekleştirilmiştir.

PHEMA kriyojelinin gözenek morfolojisi ve gözenek boyutları Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesinde bulunan SEM kullanılarak, PHEMA-pABSA kriyojellerinin morfolojik analizleri ve gözenek boyutları ise Hitit Üniversitesi HÜBTUAM biriminde bulunan SEM kullanılarak karakterize edilmiştir.

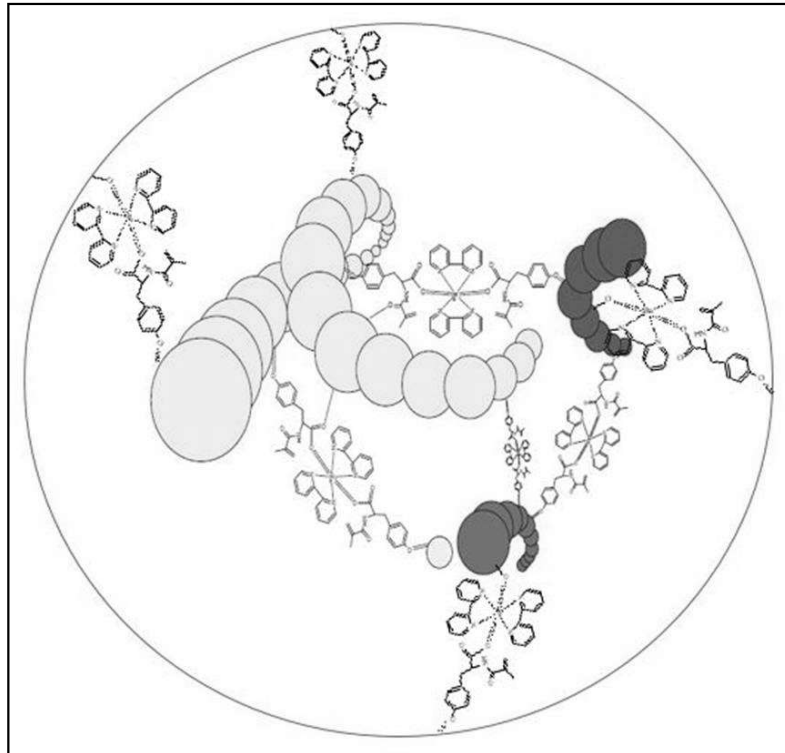
2.2.6.10. SDS-PAGE ile CA enziminin karakterizasyonu

CA enziminin saflık kontrolü SDS-PAGE yöntemiyle Laemmli (1970) metoduna göre yapılmıştır. Yükleme jeli %5, ayırma jeli %12 olarak belirlenmiştir. Yükleme jeli ve ayırma jelinde yürütme esnasındaki akım, sırasıyla 10 mA ve 35 mA olarak ayarlanmıştır. Proteinlerin jelde fiksasyonundan sonra jel Coomassie Brilliant Blue ile boyanmıştır.

Jel üzerindeki fazla miktardaki boya fiksatif ve yıkama çözeltisiyle ortamdan uzaklaştırılıp beyaz ışık altında görüntülenmiştir.

2.2.7. Yapay oksijen taşıyıcı *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX* sisteminin sentezi, karakterizasyonu ve kullanılabilirliğinin araştırılması

Yeni bir yapay oksijen taşıyıcı sisteminin geliştirilmesi amacıyla biyodegradasyon özellikli PCL, fotosensitif amino asit monomeri olan klorobis(2-2'-bipiridil)MATyr-Ru(II) ile fonksiyonlandırılmıştır. Çift emülsiyon çözücü buharlaştırılması tekniği ve ANADOLUCA yöntemi birleştirilip sentezlenen P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) polimeri ile Hb ve CA nanokapsül içinde polimerize edilmiştir. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanokapsülünün yüksek miktarda oksijen bağlaması amacıyla Fe³⁺-Protoporfirin IX, EDC/NHS konjugasyon metodu ile nano yapıya kovalent olarak bağlanıp indirgenmiştir. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX yapay oksijen taşıyıcı sistemin (Şekil 2.9) karakterizasyonu yapıp kullanılabilirliği incelenmiştir.



Şekil 2.9. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX* sisteminin şematik gösterimi

2.2.7.1. *N-metakroil-L-tirozin sentezi (MATyr)*

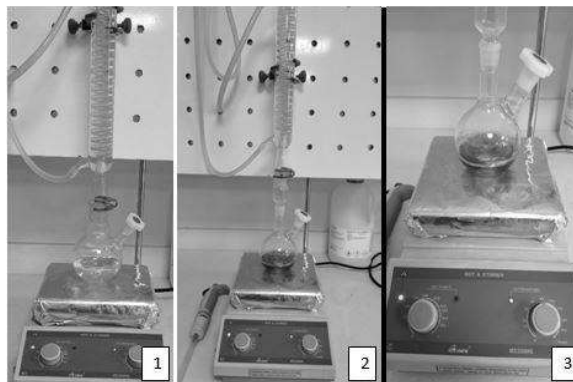
5,52 mmol L-tirozin NaOH (1 M) içerisinde çözünüp 5,52 mmol metakroil benzotriazolün 25 ml'si L-tirozin çözeltisine yavaşça ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 10-20 dk karıştırılmıştır. Reaksiyon sonucunda elde edilen kalıntı dH₂O ile seyreltilip 1H-benzotriazolu ortamdan uzaklaştırmak için üç kez 50 ml etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işleminin sonucunda birleştirilen sulu fazlar HCl (%10) kullanılarak nötrleştirilmiştir. Döner buharlaştırıcı yardımıyla su ortamdan uzaklaştırılmıştır (Hur, Ekti ve Say, 2007).

2.2.7.2. *Klorobis(2-2'-bipridil)MATyr-Ru(II) sentezi*

1 eşdeğer RuCl₂(bipy)₂ CH₃OH içerisinde çözülüp çözelti 0 °C'ye soğutulmuştur. Reaksiyon ortamına NEt₃ ilave edilip üzerine damla damla 1,2 eşdeğer MATyr eklenmiştir. Çözelti oda sıcaklığında 30 dk karıştırılıp 55 °C sıcaklıkta 48 s reflüks edilmiştir. Reaksiyon sonunda CH₃OH döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılıp kalıntı CH₂Cl₂ içerisinde alınmıştır. Üç kez dH₂O ile yıkama yapıp MgSO₄ ile kurutulmuştur. Elde edilen ürün (CH₃CH₂)₂O ile yıkanıp vakum altında kurutulmuştur (Hur, Ekti ve Say 2007).

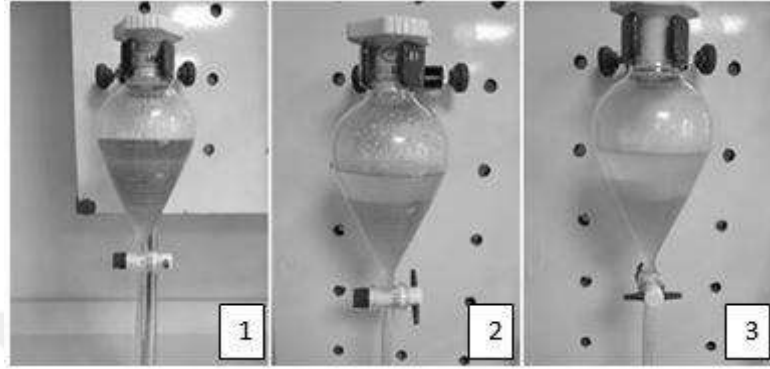
2.2.7.3. *P(CL-Ru(II))bis(2-2'-bipiridil)MATyr sentezi*

5 g PCL 80 ml CH₂Cl₂:C₃H₆O (1:1) içinde çözülüp ortam hafif bazik oluncaya kadar NaOH (2 M) çözeltisinden damla damla ilave edilmiştir. Reaksiyon ortamına 3 ml klorobis(2-2'-bipiridil)MATyr-Ru(II) (1.5 mg/ml, CH₂Cl₂ içinde) eklenip oda sıcaklığında 4 s süreyle manyetik karıştırıcıda 500 rpm'de karıştırılmıştır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. PCL'nin çözeltisine NaOH ilavesi (1), klorobis(2-2'-bipiridil)MATyr-Ru(II) ilavesi (2), reaksiyon sonu (3)

Reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyona girmeyen NaOH ve klorobis(2-2'-bipiridil)MATyr-Ru(II) eşit hacimde dH₂O ile üç kez ekstrakte edilip ortamdan uzaklaştırılmıştır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. *P(CL-Ru(II)-bis(2-2'-bipiridil)MATyr'nin 1. ekstraksiyon işlemi (1), 2. ekstraksiyon işlemi (2), 3. ekstraksiyon işlemi (3) ile saflaştırılması*

Ortamdaki CH₂Cl₂ ve C₃H₆O düşük vakum altında uçurulup katı halde P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr elde edilmiştir.

2.2.7.4. ANADOLUCA ve çift çözücü buharlaştırma tekniği ile *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)* nanokürelerinin sentezi

MetHb derişimi %13,6 olan Hb örneği vakum altında 45 dk tutulduktan sonra vakum çemberinin içerisindeki basınç atmosfer basıncına eşit oluncaya kadar vakum çemberine CO gazı gönderilmiştir. Elde edilen 2 ml HbCO çözeltisi CA enziminin 2 ml'si ile karıştırılıp (%1 sodyum kolat içinde) bu karışıma sentetik antioksidan çözeltisinin 1 ml'si eklenmiştir. Bu çözeltinin 0,5 ml'si içerisinde 50 mg P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr içeren 4 ml CH₂Cl₂ içine bir vorteks üzerinde aktarılıp problu bir ultrasonikatör yardımıyla (%30 amplitude, 15 sn) emülsüfiye edilmiştir (w/o). Birinci emülsiyon çözeltisi PVA'nın (%2, a/h) 5 ml'si içerisine yavaşça ilave edilip buz banyosunda 90 sn süre ile emülsifiye edilmiştir (w/o/w). Emülsiyon ortamına 25 mg APS ilave edildikten sonra çift emülsiyon sistemi manyetik karıştırıcıda (24 s, 200 rpm) karıştırılmıştır. Sentezlenen P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanoküreler reaksiyona girmemiş diğer maddelerden Sephadex G-25 (superfine, 5*2 cm) kolon kromatografisi yoluyla ayrılmıştır.

2.2.7.5. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanokürelerinin CA enzim aktivitesinin belirlenmesi*

P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)-ko-Hb-CA) nanokürelerinin CA enzim aktivitesi metot 2.2.6.3'de verilen metoda göre belirlenmiştir.

2.2.7.6. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanokürelerine Fe³⁺-Protoporfirin IX'un EDC/NHS ile konjugasyonu*

P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanokürelerine EDC/NHS yöntemiyle Fe³⁺-Protoporfirin IX'u kovalent bağlamak amacıyla, 1 mg Fe³⁺-Protoporfirin IX, DMSO/MES tamponu (% 50, h/h) içerisinde çözülüp çözeltinin her ml'si için 8,82 mg EDC ve 5,30 mg NHS eklenmiştir (Fe³⁺-Protoporfirin IX:EDC:NHS, mol oranı 1:30:30). Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 15 dk süreyle orbital çalkalayıcıda (100 rpm) karıştırılmıştır. Reaksiyon ortamına EDC'yi inaktive etmek amacıyla 1,4 µl 2-merkaptetanol eklenmiştir. Reaksiyon ortamından 2-merkaptetanolün fazlasını uzaklaştırmak amacıyla reaksiyon karışımı PBS tamponu (100 mM, pH 7,4) ile dengelenmiş Sephadex G-25 (superfine, 5*2 cm) kolondan geçirilmiştir. Aktif fraksiyonlar birleştirilip PBS tamponunda (100 mM, pH 7,4) dispers edilmiş P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanokürelerin 1 ml'sine eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 2 s inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonunda oluşan P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanoküreleri Sephadex G-25 (superfine, 5*2 cm) kolondan geçirilip saflaştırılmıştır (Grabarek ve Gergely, 1990; Bozinovic vd., 2020).

2.2.7.7. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanokürelerinin indirgenmesi*

P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanokürelerinin P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX nanokürelerine dönüşümü, Na₂S₂O₄ ile Fe³⁺-Protoporfirin IX'un Fe²⁺-Protoporfirin IX'a indirgenmesi esas alınarak gerçekleştirilmiştir (Mahler ve Cordes, 1969; Itoh vd., 2001). Bu amaçla, 5 mg P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanoküreleri fosfat tamponunda (50 mM, pH 7,4) süspanse edilip ultrasonik banyo (50 W) yardımıyla 10 dk dispers edilmiştir. Taze olarak Na₂S₂O₄'ün NaOH (1 M)

içindeki 10 mg/ml’lik çözeltisi hazırlanıp P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-ProtoporfirinIX nanokürelerini içeren dispersiyon ortamına ilave edilmiştir. Dispersiyon ortamı orbital çalkalayıcı yardımıyla 50 rpm’de 15 dk inkübe edilip P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanokürelerinin P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX nanokürelerine indirgenmesi gerçekleştirilmiştir.

2.2.7.8. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanokürelerinden Fe²⁺-Protoporfirin IX salınımı*

Fosfat tamponu (100 mM, pH 7,4) içinde dispers edilmiş P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX’un 3 ml’si 47 ml fosfat tamponu (100 mM, pH 7,4) içerisine eklenip sıcaklık bir su banyosu yardımıyla 37 °C’ye getirilmiştir. Deney ortamından belirlenen zaman aralıklarında 0,5 ml örnek alınıp Fe²⁺-Protoporfirin IX derişimi Lombardo vd., (2005) metoduna göre tayin edilmiştir. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX’dan salınan Fe²⁺-Protoporfirin IX 15 g süreyle takip edilmiştir.

2.2.7.9. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanokürelerinin sentezinde kullanılan monomer ve sentezlenen polimerlerin karakterizasyonu*

MATyr ve klorobis(2-2'-bipridil)MATyr-Ru(II) bileşiklerinin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları NMR (UltraShield 500 MHz, Bruker) cihazı yardımıyla elde edilmiştir. Monomerleri çözmek amacıyla DMSO-D6 kullanılmış olup kimyasal kayma (δ, ppm) değerleri DMSO-D6 referans alınarak verilmiştir.

MATyr ve klorobis(2-2'-bipridil)MATyr-Ru(II) bileşiklerinin C, H, O ve N yüzdeleri elemental analiz cihazı (CHNS-932, Leco) kullanılarak analiz edilmiştir.

PCL ve yapıya Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr katılmasıyla sentezlenen P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) polimerlerinin absorbsiyon spektrumları (280-780 nm) CHCl₃ çözücüsü içinde UV-VIS spektrofotometre yardımıyla elde edilmiştir.

PCL ve PCL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr polimerlerinin termal özellikleri TG ve DSC analizleri ile gerçekleştirilmiştir. PCL ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) polimerlerinin TG analizleri, seramik pan kullanılarak 200 ml/dk akış hızındaki N_{2(g)} atmosferi altında, 30-1000 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dk sıcaklık artışı ile

gerçekleştirilmiştir. PCL ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) polimerlerinin DSC analizleri, -30-550 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dk sıcaklık programıyla gerçekleştirilmiştir.

P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanopartiküllerinin boyut ve morfolojik analizleri SEM ve TEM cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.8. Sülük deneyleri

Yapay oksijen taşıyıcı sistem olarak sentezlenen maddelerin *Hirudo verbana* tarafından kullanımları incelenmiştir.

2.2.8.1. *Hirudo verbana*'nın beslenmesi için destek materyali hazırlanması

Hirudo verbana'nın yapay kanları emmesi amacıyla makrogözenekli yapısı ve su tutma kapasitesinin yüksek olması sebebiyle PHEMA kriyojeli destek malzemesi olarak seçilmiştir. PHEMA kriyojeli Türkmen ve Denizli (2014) metoduna göre hazırlanmıştır. Bu amaçla, 13 ml HEMA ve 2,83 g MBAAm 200 ml dH₂O içerisinde çözülüp çözeltiden 15 dk süreyle N_{2(g)} geçirilerek çözünmüş oksijen ortamdan uzaklaştırılmıştır. Çözelti buz banyosu içerisine alınıp sıcaklığı 0-1°C'ye düşürülmüştür. Çözelti ortamına 167 mg APS ve 215 µl TEMED ilave edilip çözelti 1 dk buz banyosu içinde karıştırılmıştır. Karışım petri plaklarına (60 x 15 mm) dökülüp reaksiyon ortamı -16 °C'de 24 s bekletilerek PHEMA kriyojeli (Şekil 2.12) sentezlenmiştir.

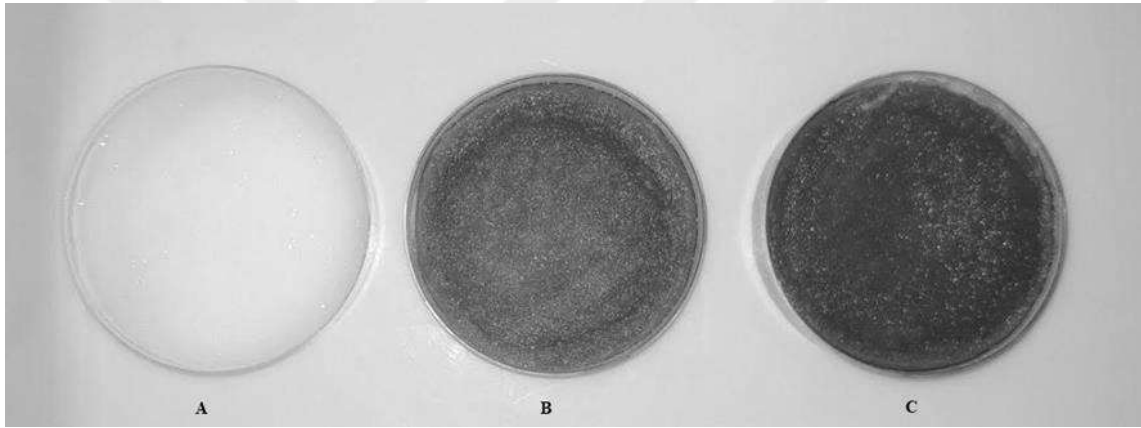


Şekil 2.12. *Hirudo verbana* için hazırlanmış beslenme destek materyali

Sentez sonunda petri plaklarındaki kriyojeller dH₂O ile yıkanıp etüvde 40 °C’de kurutulmuştur.

2.2.8.2. Yapay kan içeren beslenme destek materyallerinin hazırlanması

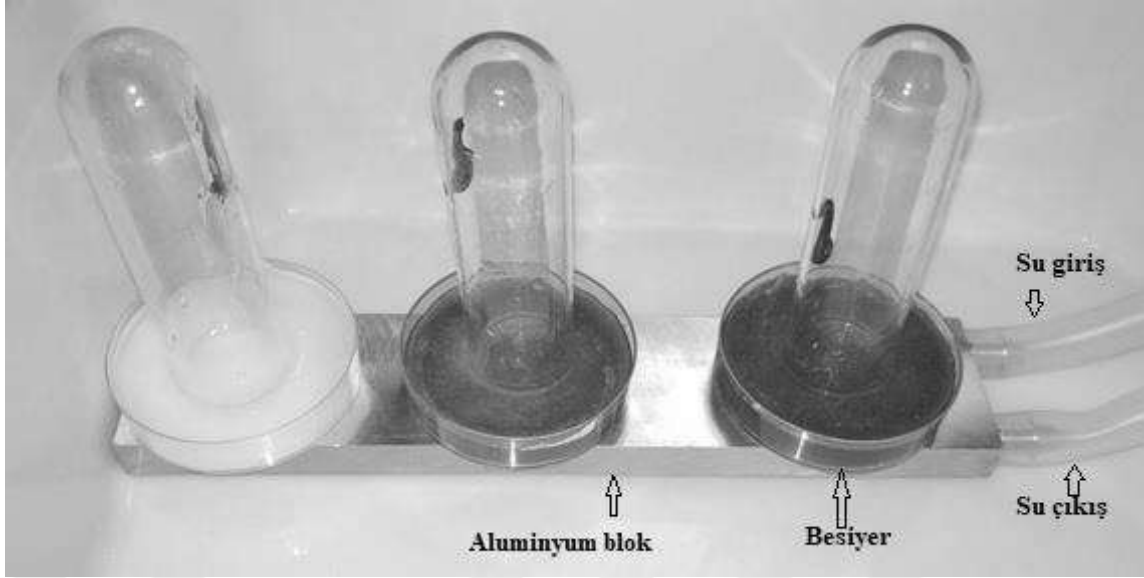
Sentezlenen yapay kanlardan, P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX)-albumin kompleksi ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX çözeltileri petri plaklarında bulunan kriyojellere tam şişme sağlanana kadar emdirilmiştir (Şekil 2.13). Şekilde, A saf su emdirilmiş besiyeri, B P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX) emdirilmiş besiyeri ve C ise P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX emdirilmiş besiyerini göstermektedir.



Şekil 2.13. Kriyojele emdirilmiş besiyerleri

2.2.8.3. Hirudo verbana'nın yapay kan ile beslenmesi

Petri plaklarında bulunan yapay kan emdirilmiş beslenme destek materyalleri bir alüminyum blok üzerine koyularak petrilerin sıcaklıkları 30-35 °C’ye gelmesi sağlanmıştır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Sülüklere yapay kan emdirme düzenneği

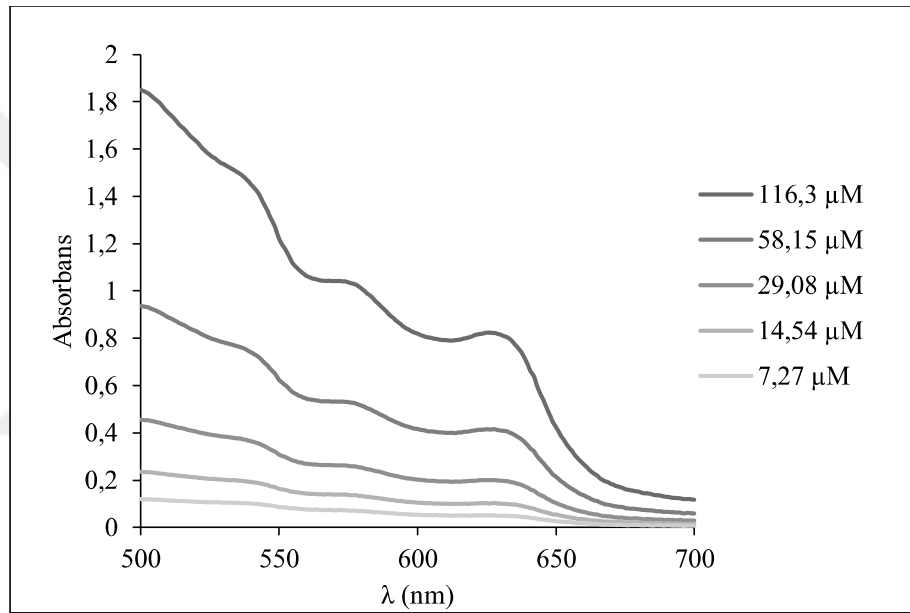
Sülükler bir cam tüp içerisine alınıp petri plağındaki kriyojelin üstüne ters bir şekilde kapatılarak yapay kan emmesi için beklenmiştir. Emme işlemi tamalandıktan sonra sülükler saf su ile yıkanıp içme suyu içerisinde 3 gün süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda, sülüklerin sindirim kanalı çıkarılıp emdirilen kandaki CA enzimi, oksihb, deoksiHb, metHb seviyeleri ve Fe²⁺-Protoporfirin IX'un stabilitesi ölçölmüştür.

3. BULGULAR

3.1. Hb Türlerinin Spektroskopik Yöntemlerle Tayin Edilmesi Bulguları

3.1.1. THb ve metHb derişimlerinin belirlenmesi sonuçları

Ticari Hb'nin farklı derişimlerinde hazırlanan çözeltilerinin fosfat tamponundan (100 mM, pH 7,4) oluşan kör numuneye karşı 500-700 nm dalga boyu arasındaki absorpsiyon spektrumu Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Ticari Hb absorpsiyon spektrumu

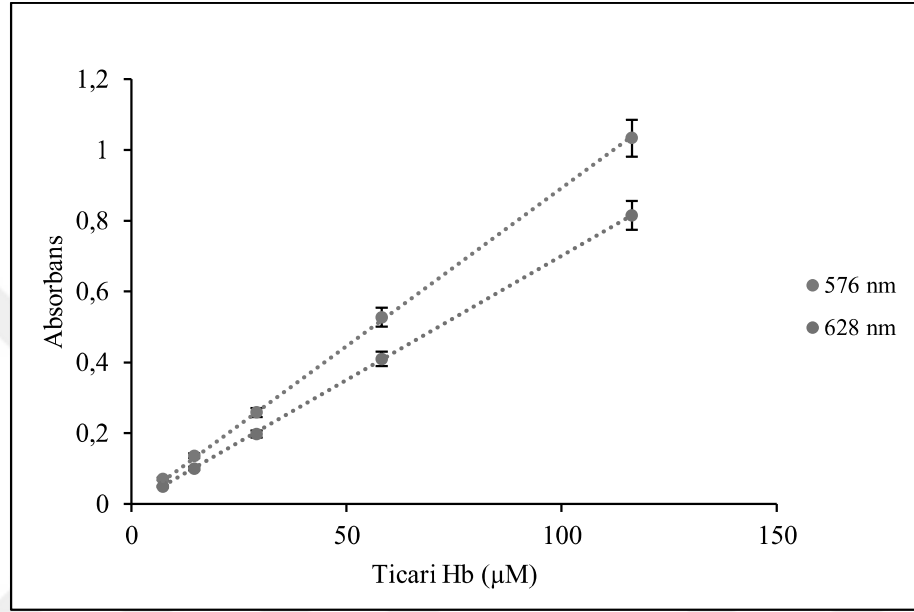
Şekil 3.1'deki absorpsiyon spektrumu incelendiğinde 576 ve 628 nm'de belirgin absorpsiyon bantları gözlenmektedir. Ticari Hb'den doğrudan hazırlanan çözeltilerin derişimlerini net olarak belirlemek, tartım ve seyreltmelerden kaynaklanabilecek hataları önlemek amacıyla Hb'nin farklı derişimlerine (7,27-116,3 µM) (Şekil 3.2) karşı 576 ve 628 nm'deki absorbans değerleri grafiğe geçirilip (Şekil 3.3) ϵ_{576} ve ϵ_{628} değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Ticari Hb'nin farklı derişimlerdeki çözeltilerinin renkleri

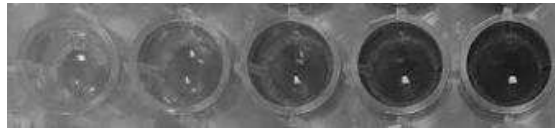
Ticari Hb'nin 576 ve 628 nm'deki derişim-absorbans grafiklerine ait R^2 değerleri sırasıyla 0,9997 ve 0,9999 olarak bulunmuştur (Şekil 3.3).

230 µl Hb çözeltisinin mikropilaka içerisindeki yüksekliği $0,45917 \pm 0,00215$ cm olarak bulunmuş olup ϵ_{576} ve ϵ_{628} değerleri, sırasıyla $2,003 \pm 0,074$ ve $1,530 \pm 0,021$ ($10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır.



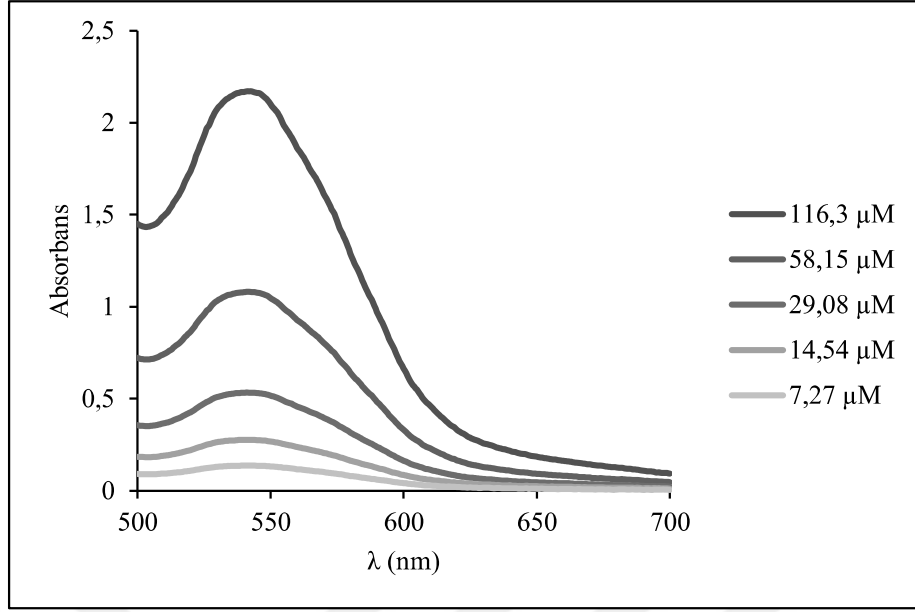
Şekil 3.3. Ticari Hb'nin 576 ve 628 nm'deki derişim-absorbans ilişkisi

Ticari Hb'nin farklı derişimlerdeki (7,27-116,3 µM) çözeltilerinin üzerine KCN ilave edilmesiyle birlikte renk kahverengiden kırmızıya dönüşmüştür (Şekil 3.4). Ticari Hb'nin büyük çoğunluğunun metHb olmasından dolayı KCN ilavesi ile metHb'ler CNmetHb'e dönüşmüş olup absorbsiyon bandı 628 nm'den daha düşük dalga boyuna kaymıştır.



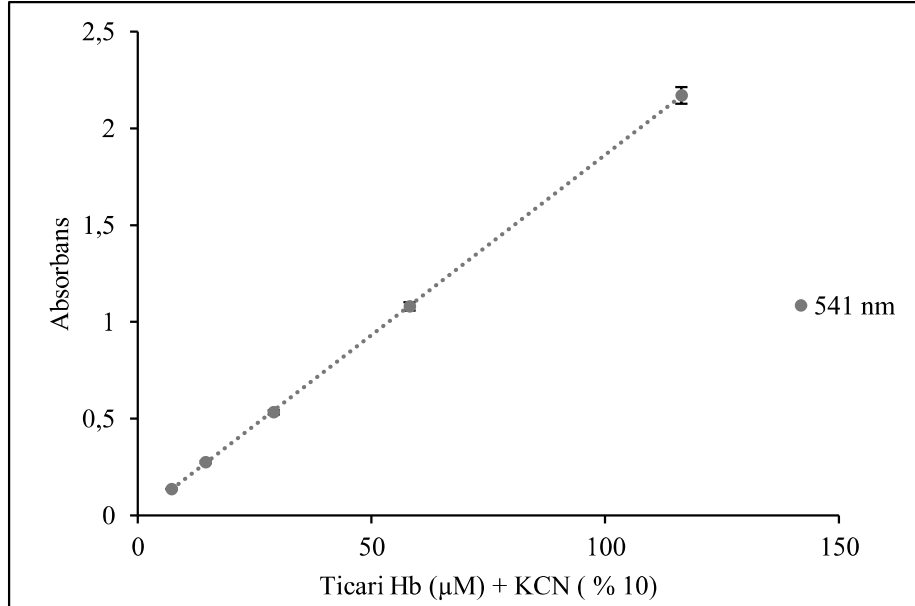
Şekil 3.4. Ticari Hb + KCN derişime bağlı renk değişimi

KCN ilavesinden sonra absorbsiyon bandının daha düşük dalga boyuna kaymasından dolayı numunelerin fosfat tamponundan (100 mM, pH 7,4) oluşan kör numuneye karşı 500-700 nm dalga boyu arasında spektrumları taranmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Ticari Hb + KCN absorpsiyon spektrumu

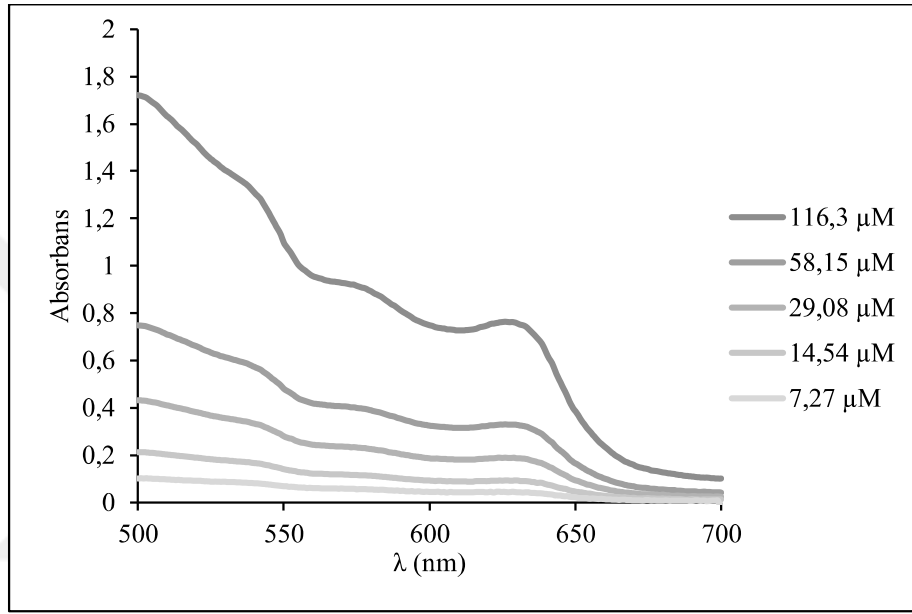
Şekil 3.5'teki absorpsiyon spektrumu incelendiğinde 541 nm'de en yüksek absorpsiyonun olduğu görülmüştür. Ticari Hb'nin antioksidan ilavesi veya ortama bağlı olarak metHb içeriği değişebilmektedir. Bu amaçla KCN ilave edilmiş ticari Hb'nin farklı derişimlerine karşı 541 nm'deki absorbans değerleri grafiğe geçirilerek (Şekil 3.6) ϵ_{541} değeri hesaplanmıştır.



Şekil 3.6. Ticari Hb + KCN'nin 541 nm'deki derişim-absorbans ilişkisi

Şekil 3.6'daki grafiğe ait R^2 değeri 1 olarak bulunmuş olup ϵ_{541} değeri $4,065 \pm 0,046$ ($10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır.

MetHb standart grafiği hazırlamak amacıyla ticari Hb'nin farklı derişimlerdeki (7,27-116,3 μM) çözeltilerinin üzerine $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ilave edilip Hb yapısında bulunan her Fe^{2+} iyonu Fe^{3+} iyonuna yükseltgenmiş ve şekil 3.7'deki absorbsiyon spektrumu elde edilmiştir. Şekil 3.7'deki absorbsiyon spektrumu incelendiğinde 626 nm'de belirgin absorbsiyon bandı gözlenmiş olup metHb derişimine bağılı olarak renk değışimi şekil 3.8'de gösterilmiştir.

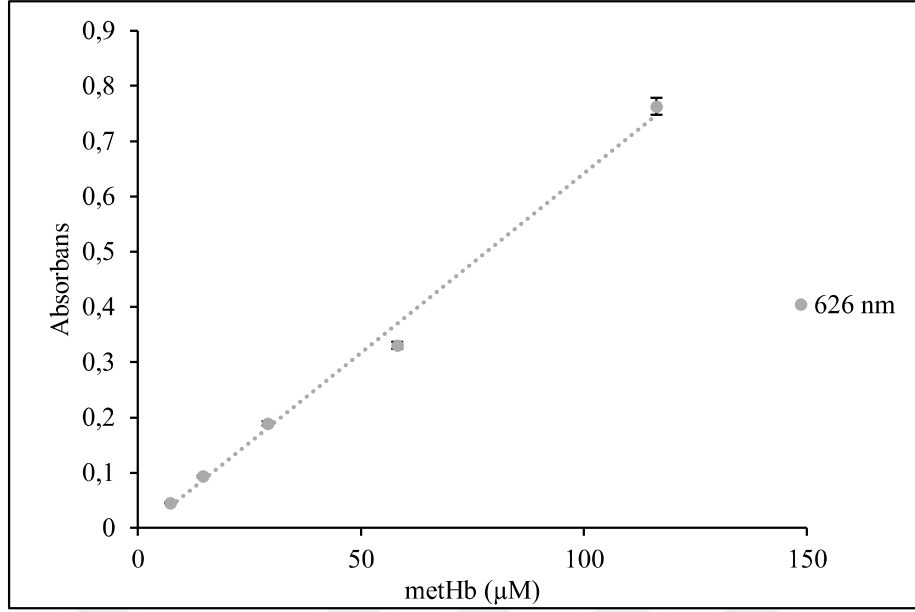


Şekil 3.7. Ticari Hb + $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ absorbsiyon spektrumu



Şekil 3.8. Ticari Hb + $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ derişime bağılı renk değışimi

Taze alınan kan örneklerindeki metHb içeriğı hesaplamak amacıyla metHb'nin farklı derişimlerine (7,27-116,3 μM) (Şekil 3.8) karşı 626 nm'deki absorbans değıerleri grafiğı geçirilerek (Şekil 3.9) metHb için ϵ_{626} değıeri hesaplanmıştır. Şekil 3.9'daki metHb standart grafiğıne ait R2 değıeri 0,9942 olarak bulunmuş olup ϵ_{626} değıeri $1,364 \pm 0,069$ ($104 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır.



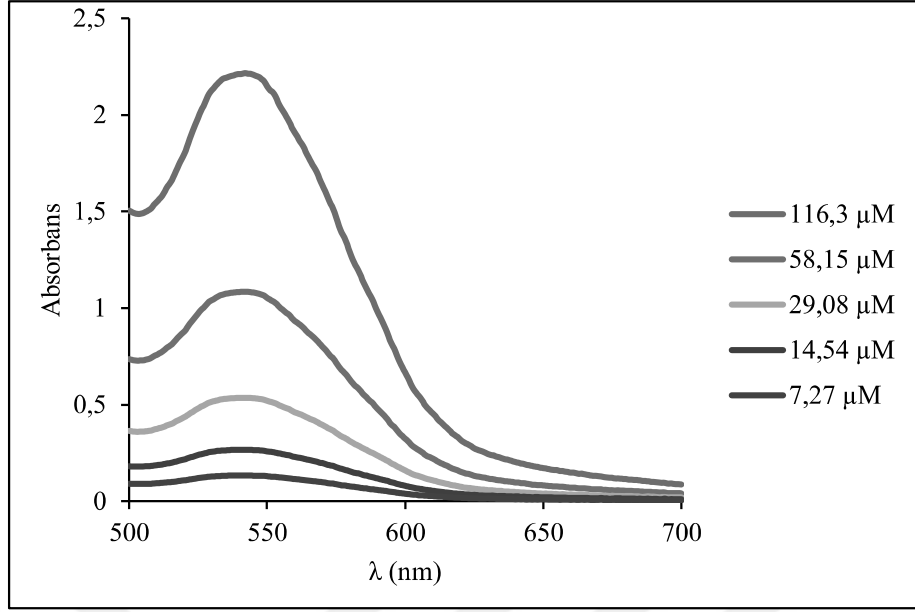
Şekil 3.9. *MetHb standart grafiği*

Kandaki tHb derişimi ticari Hb'e KCN ve $K_3[Fe(CN)_6]$ 'nın eklenip oluşan CNmetHb'nin standart grafiğinden hesaplanmıştır. Ticari Hb'nin farklı derişimlerine karşı oluşan CNmetHb'nin renk değışimi şekil 3.10'da gösterilmiştir.



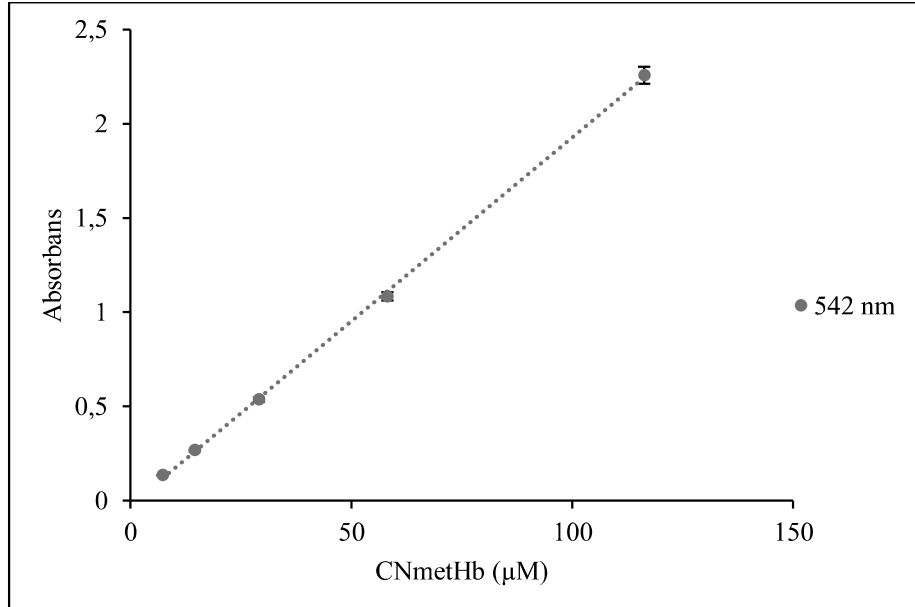
Şekil 3.10. *CNmetHb'nin derişime bağı renk değışimi*

CNmetHb'e ait spesifik dalga boyunu tespit etmek amacıyla 500-700 nm arasında absorbsiyon spektrumu taranmış olup şekil 3.11'de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. *CNmetHb absorbsiyon spektrumu*

Şekil 3.11’de gösterilen absorbsiyon spektrumu incelendiğinde CNmetHb’nin 542 nm’de en yüksek absorbsiyon yaptığı gözlenmekte olup CNmetHb’nin farklı derişimlerine karşı 542 nm’deki absorbsans değerleri grafiğe geçirilerek şekil 3.12’deki standart grafiği çizilmiştir. Şekildeki CNmetHb standart grafiğine ait R^2 değeri 0,9996 olarak bulunmuş olup ϵ_{542} değeri $4,037 \pm 0,063 (10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ olarak hesaplanmıştır.

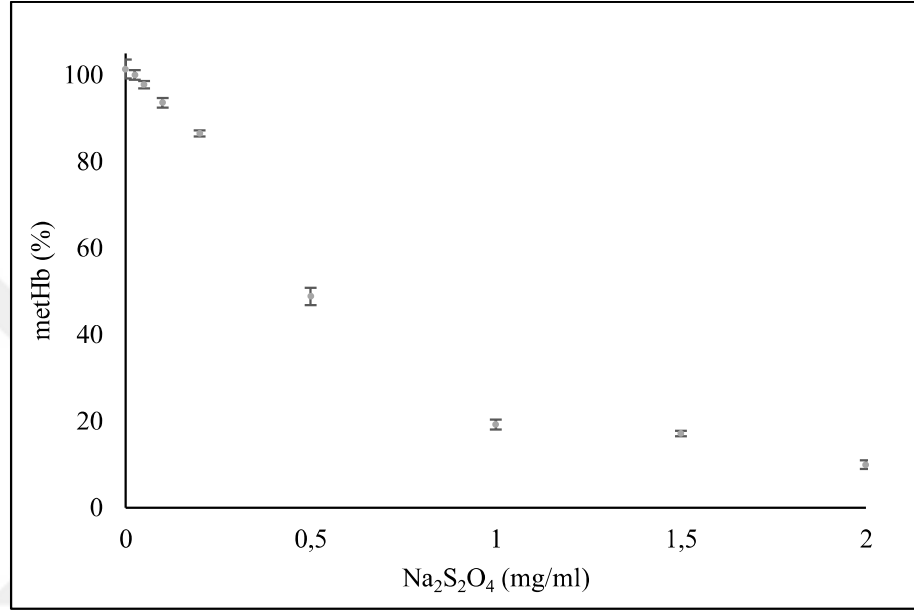


Şekil 3.12. *CNmetHb standart grafiği*

3.2. Hb'nin İndirgenmesi ve Dönüşümü Bulguları

3.2.1. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ derişiminin metHb'nin indirgenmesi üzerine etkisi bulguları

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 'ün farklı derişimlerinin (0-2,0 mg/ml), ortamdaki metHb yüzdesi üzerine etkisi şekil 3.13'te gösterilmiştir.

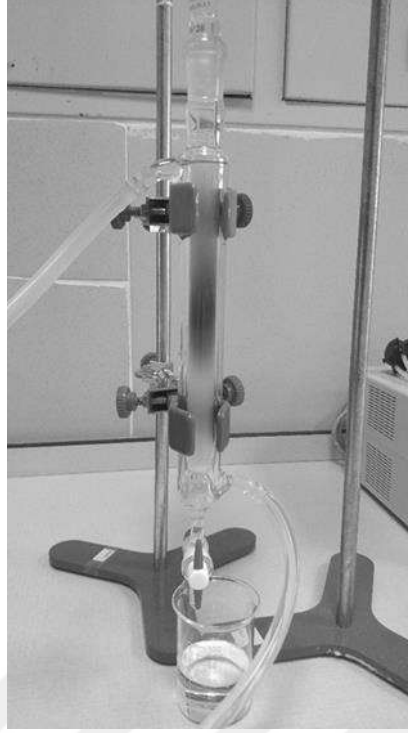


Şekil 3.13. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 'ün metHb derişimi üzerine etkisi

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 'ün 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0 (mg/ml) derişimine karşılık metHb(%) değerleri sırasıyla, 101,36 ± 2,19, 100,00 ± 1,10, 97,73 ± 0,85, 93,55 ± 1,10, 86,47 ± 0,70, 48,81 ± 2,01, 19,20 ± 1,12, 17,13 ± 0,62 ve 9,93 ± 0,97 olarak hesaplanmıştır. MetHb(%), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 'ün 0-1,0 (mg/ml) derişim aralığında doğrusal olarak azalmakta olup bu bölgeye ait R^2 değeri 0,9813 olarak bulunmuştur.

3.2.2. MetHb'nin deoksiHb'ye dönüşümü bulguları

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 'ün 2 ml'si (2 mg/ml) ve metHb'nin 1 ml'si (20 mg/ml) yüklenip deoksiHb'ye dönüşümü şekil 3.14'te gösterilmiştir.



Şekil 3.14. *Jel filtrasyon kromatografisi ile metHb'nin indirgenmesi*

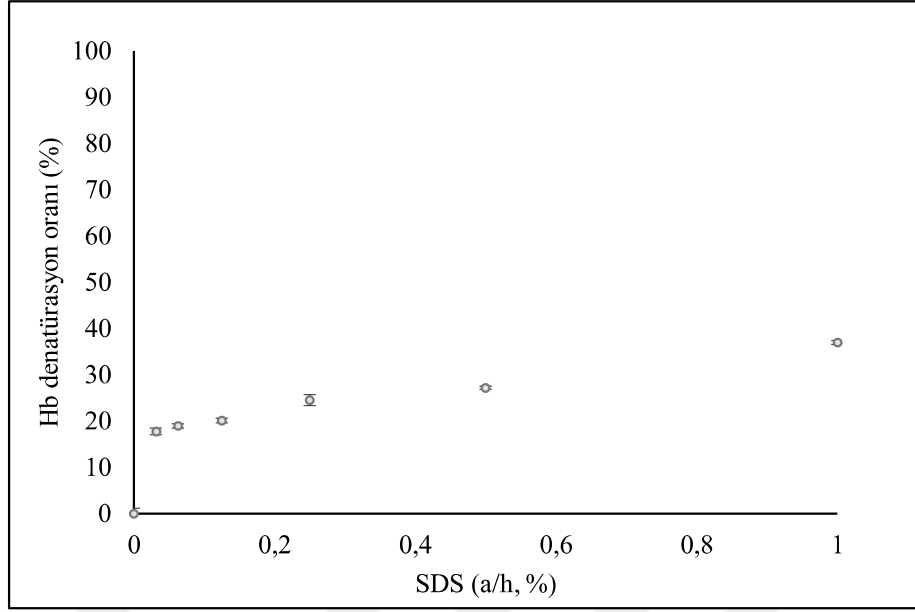
Dönüşüm sonrası birleştirilen aktif fraksiyonlardaki metHb'nin dönüşüm yüzdesi 91,6 olarak hesaplanmıştır.

3.3. Sürfaktanların ve APS'nin Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları

SDS, sodyum kolat, N-lauroilsarkozin ve sodyum deoksikolat anyonik sürfaktanlarının CTAB katyonik sürfaktanının, Triton X-100, Tween 20 ve Tween 80 non-iyonik sürfaktanlarının Hb denatürasyonu üzerine etkisi HDR_(%) üzerinden değerlendirilmiştir.

3.3.1. SDS'nin Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları

SDS anyonik sürfaktanının deney ortamındaki farklı derişimlerinin (%0-1, a/h) Hb denatürasyonu üzerine etkisi şekil 3.15'te gösterilmiştir.

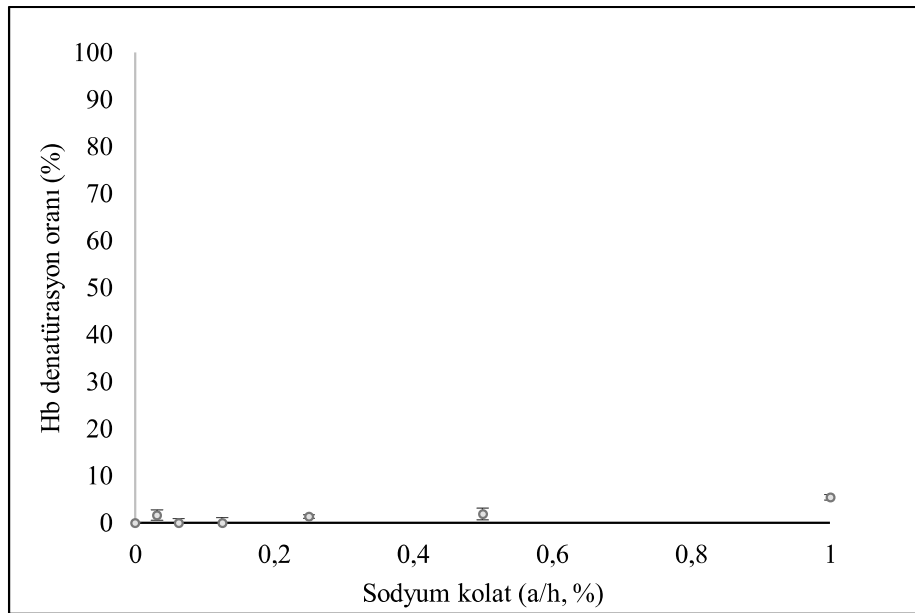


Şekil 3.15. SDS derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi

SDS'nin % (a/h) 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 derişimine karşılık HDR(%) değerleri sırasıyla, % 36,99 ± 0,37, 27,21 ± 1,19, 24,52 ± 0,54, 20,10 ± 0,42, 18,93 ± 0,74, 17,74 ± 1,12 olarak hesaplanmıştır.

3.3.2. Sodyum kolatın Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları

Anyonik sürfaktan olarak kullanılan sodyum kolatın deney ortamındaki farklı derişimlerinin (%0-1, a/h) Hb denatürasyonu üzerine etkisi şekil 3.16'da gösterilmiştir.

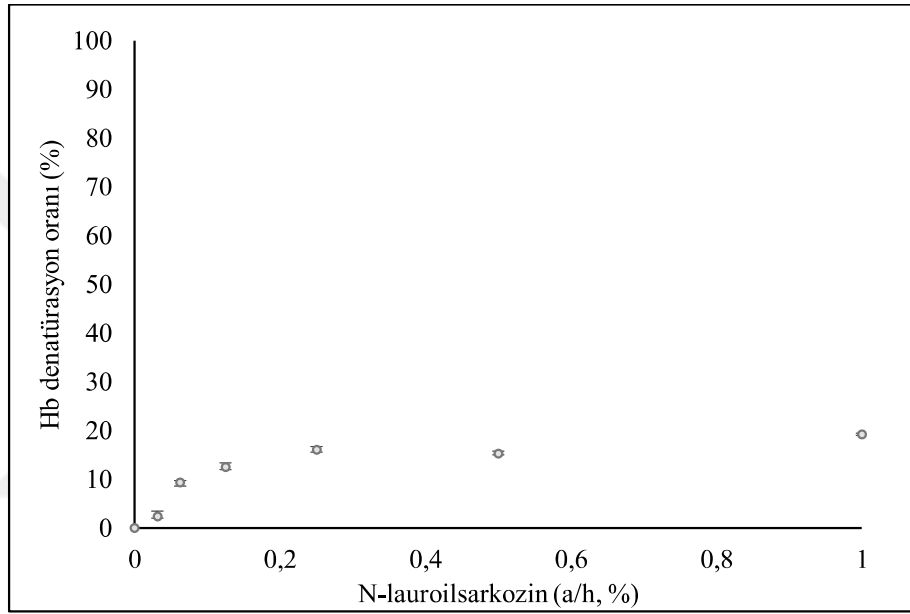


Şekil 3.16. Sodyum kolat derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi

Sodyum kolatın % (a/h) 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 derişimine karşılık HDR(%) değerleri sırasıyla, % $5,38 \pm 0,59$, $1,84 \pm 1,28$, $1,29 \pm 0,35$, $0 \pm 1,04$, $0 \pm 0,86$, $1,59 \pm 1,08$, olarak hesaplanmıştır.

3.3.3. N-lauroilsarkozinin Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları

N-lauroilsarkozin anyonik sürfaktanının deney ortamındaki farklı derişimlerinin (%0-1, a/h) Hb denatürasyonu üzerine etkisi şekil 3.17’de gösterilmiştir.

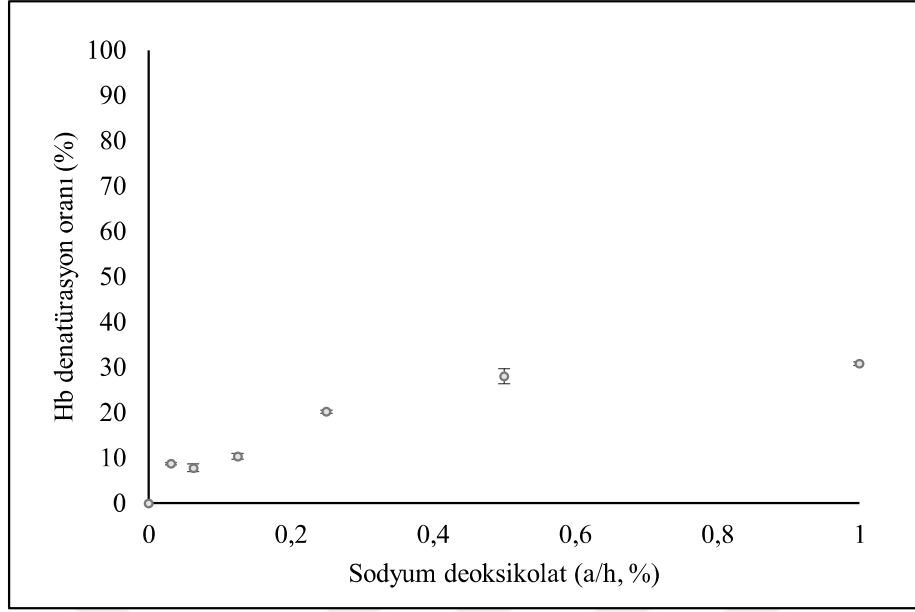


Şekil 3.17. N-lauroilsarkozin derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi

N-lauroilsarkozinin % (a/h) 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 derişimine karşılık HDR(%) değerleri sırasıyla, % $32,01 \pm 0,28$, $28,18 \pm 0,50$, $28,75 \pm 0,61$, $25,47 \pm 0,78$, $19,03 \pm 0,38$, $16,17 \pm 1,06$ olarak hesaplanmıştır.

3.3.4. Sodyum deoksikolatın Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları

Sodyum deoksikolatın deney ortamındaki farklı derişimlerinin (%0-1, a/h) Hb denatürasyonu üzerine etkisi şekil 3.18’de gösterilmiştir.

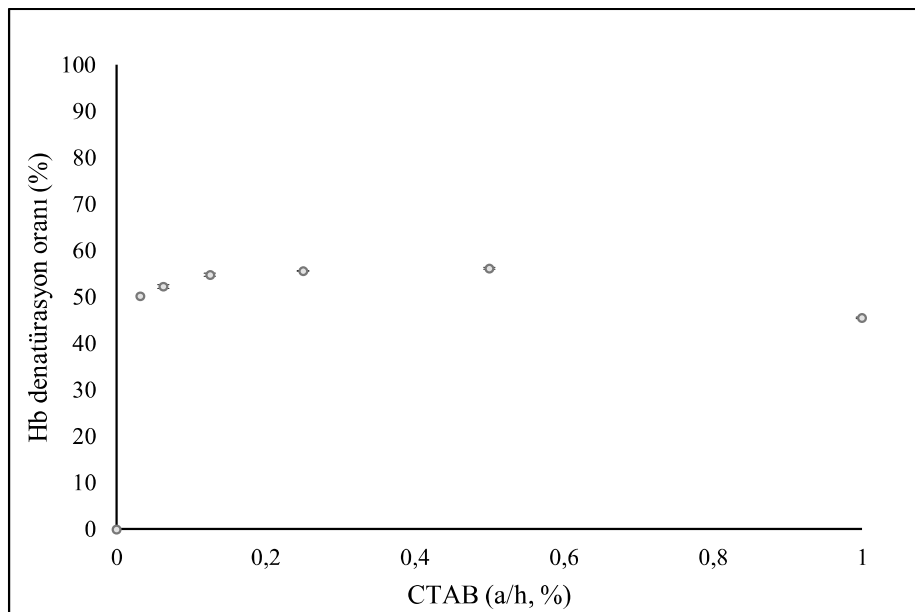


Şekil 3.18. Sodyum deoksikolat derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi

Sodyum deoksikolatın % (a/h) 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 derişimine karşılık HDR_(%) değerleri sırasıyla, % 30,80 ±1,66, 28,02 ±0,35, 20,20 ±0,63, 10,34 ±0,83, 7,81 ±0,22, 8,69 ±1,54 olarak hesaplanmıştır.

3.3.5. CTAB'ın Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları

CTAB katyonik sürfaktanının deney ortamındaki farklı derişimlerinin (%0-1, a/h) Hb denatürasyonu üzerine etkisi şekil 3.19'da gösterilmiştir.

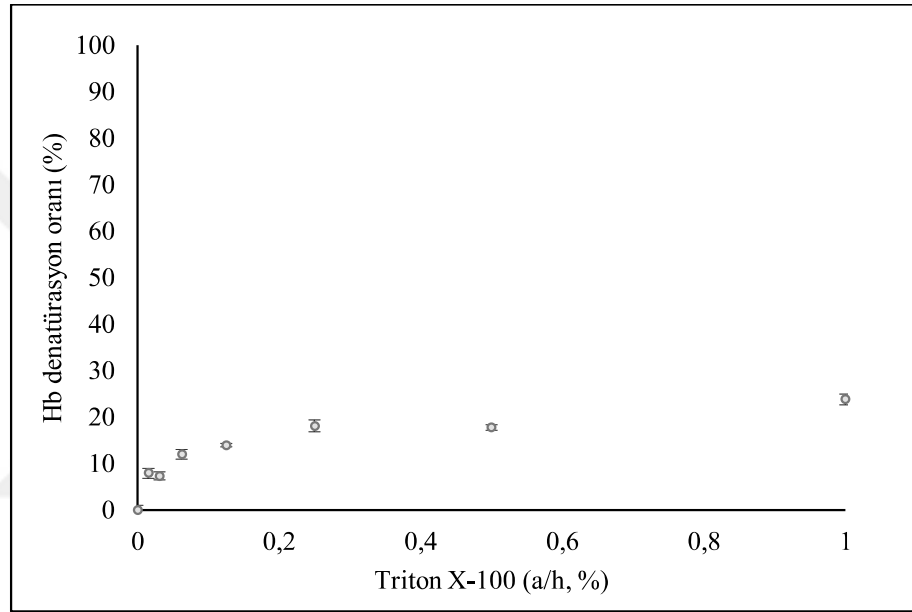


Şekil 3.19. CTAB derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi

CTAB'ın % (a/h) 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 derişimine karşılık HDR($\%$) değerleri sırasıyla, % 45,48 $\pm$ 0,02, 56,15 $\pm$ 0,16, 55,60 $\pm$ 0,22, 54,77 $\pm$ 0,06, 52,22 $\pm$ 0,33, 50,16 $\pm$ 0,43 olarak hesaplanmıştır.

3.3.6. Triton X-100'ün Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları

Triton X-100 noniyonik sürfaktanının deney ortamındaki farklı derişimlerinin (%0-1, a/h) Hb denatürasyonu üzerine etkisi şekil 3.20'de gösterilmiştir.

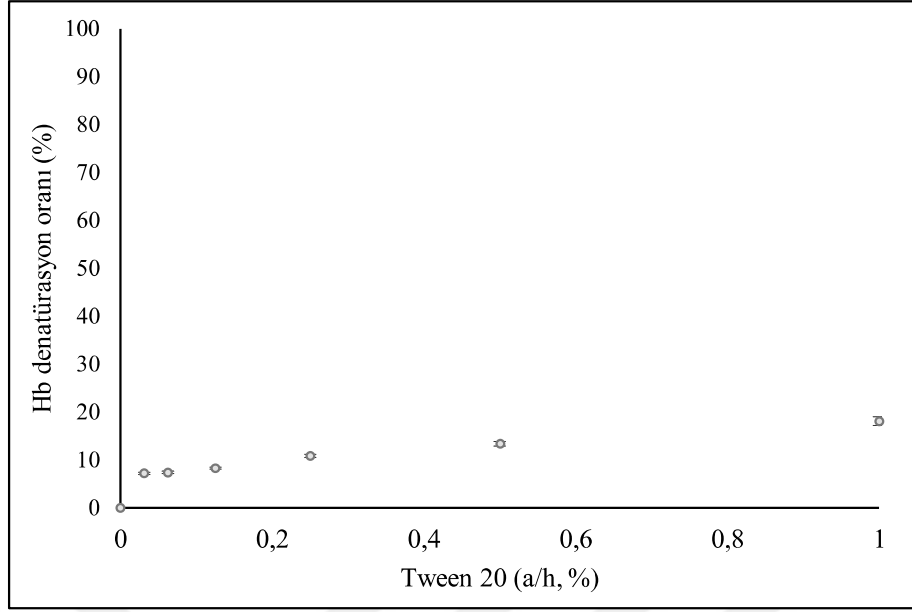


Şekil 3.20. Triton X-100 derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi

Triton X-100'ün % (a/h) 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 derişimine karşılık HDR($\%$) değerleri sırasıyla, % 23,79 $\pm$ 0,59, 17,76 $\pm$ 1,28, 18,07 $\pm$ 0,35, 13,94 $\pm$ 1,04, 12,00 $\pm$ 0,85, 7,30 $\pm$ 1,08 olarak hesaplanmıştır.

3.3.7. Tween 20'nin Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları

Tween 20 noniyonik sürfaktanının deney ortamındaki farklı derişimlerinin (%0-1, a/h) Hb denatürasyonu üzerine etkisi şekil 3.21'de gösterilmiştir.

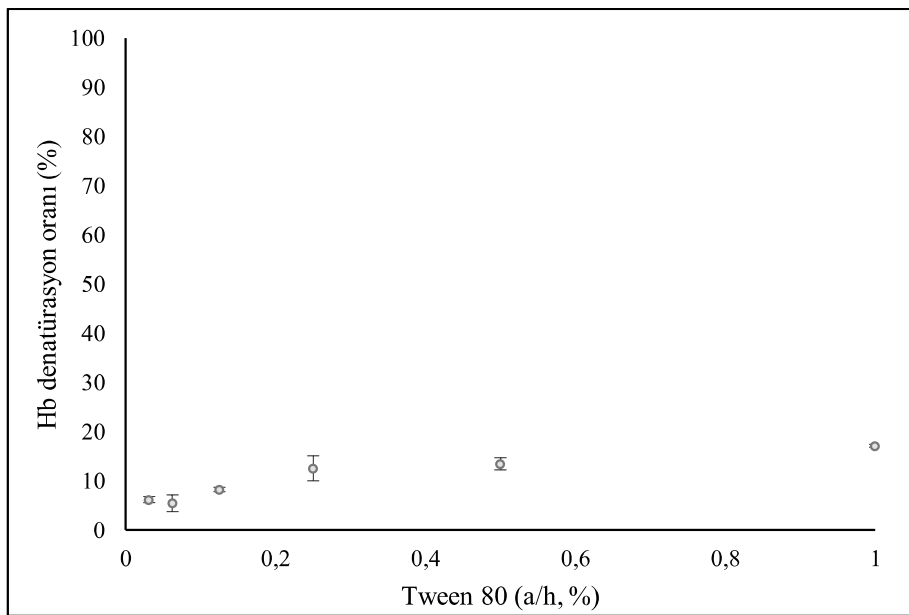


Şekil 3.21. Tween 20 derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi

Tween 20'nin % (a/h) 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 derişimine karşılık HDR_(%) değerleri sırasıyla, % 18,11 ±0,90, 13,38 ±0,46, 10,82 ±0,34, 8,28 ±0,17, 7,42 ±0,26, 7,19 ±0,22 olarak hesaplanmıştır.

3.3.8. Tween 80'nin Hb denatürasyonu üzerine etkisi bulguları

Tween 80 noniyonik sürfaktanının deney ortamındaki farklı derişimlerinin (%0-1, a/h) Hb denatürasyonu üzerine etkisi şekil 3.22'de gösterilmiştir.

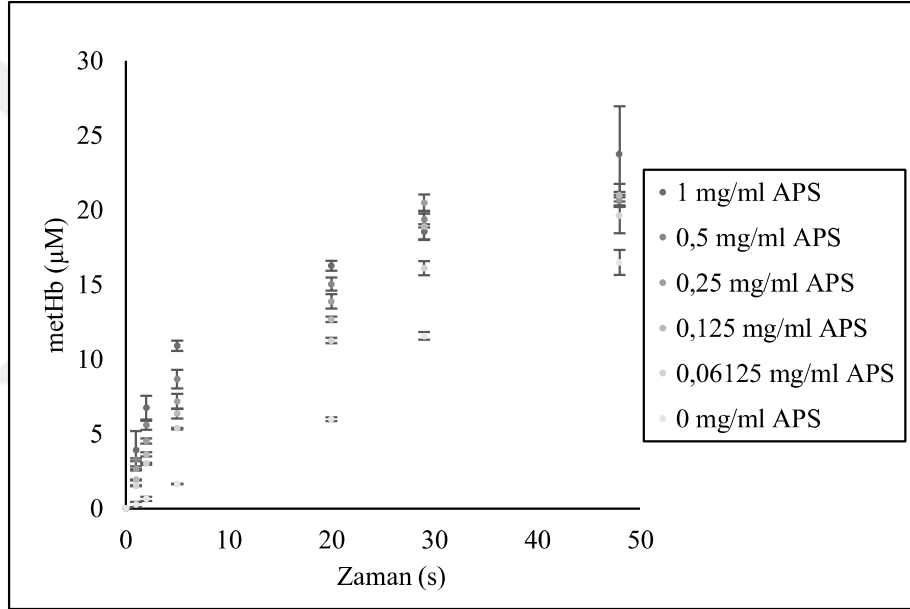


Şekil 3.22. Tween 80 derişiminin Hb denatürasyonu üzerine etkisi

Tween 80'nin % (a/h) 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 derişimine karşılık HDR(%) değerleri sırasıyla, % 17,13 $\pm$ 0,30, 13,45 $\pm$ 1,22, 12,56 $\pm$ 2,53, 8,25 $\pm$ 0,44, 5,45 $\pm$ 1,68, 6,19 $\pm$ 0,61 olarak hesaplanmıştır.

3.3.9. APS'nin oksiHb, deoksiHb ve metHb derişimleri üzerine etkisi bulguları

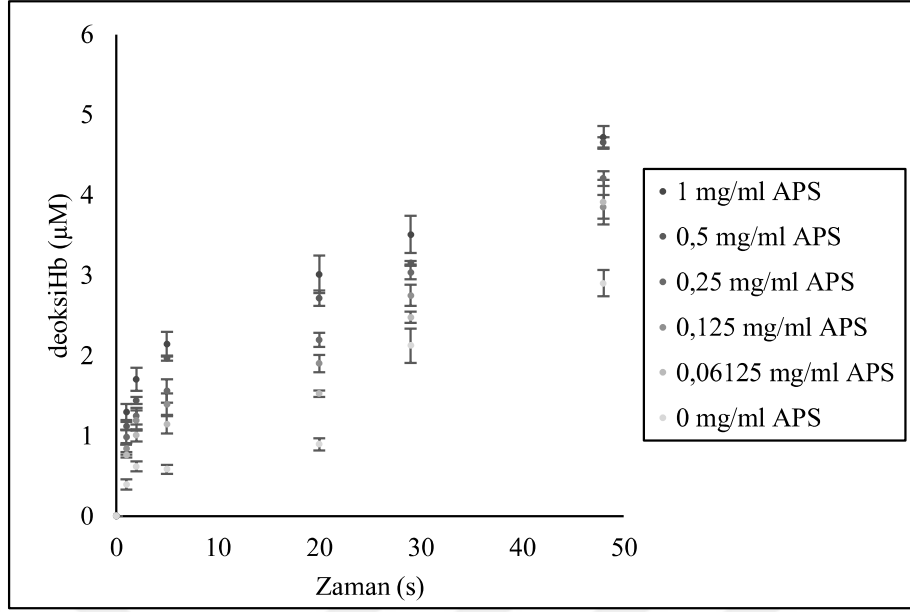
ANADOLUCA konseptinde radikalik polimerizasyon başlatıcı olarak kullanılan APS'nin farklı derişimlerinin (0-1 mg/ml), zamana bağılı oluşan metHb, deoksiHb ve zamana bağılı azalan oksiHb derişimleri üzerine etkisi, sırasıyla, şekil 3.23, şekil 3.24 ve şekil 3.25'te gösterilmiştir.



Şekil 3.23. APS'nin metHb derişimi üzerine etkisi

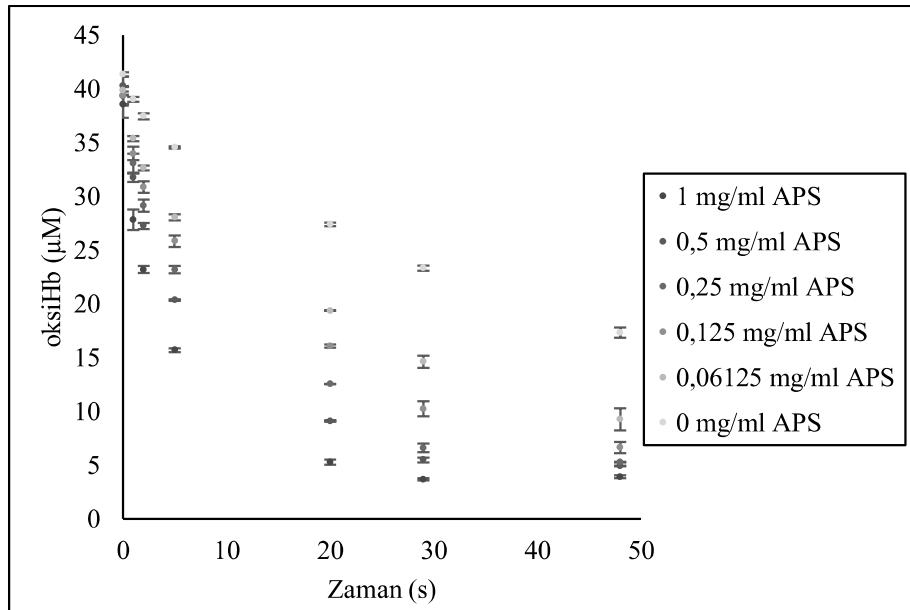
Reaksiyon ortamında bulunan APS, HbFe(II)'yi HbFe(III)'e yükseltgediğinden dolayı metHb derişimi reaksiyon süresince artış göstermiştir. Şekil 3.23 incelendiğinde, 48 s'lik reaksiyon süresi sonunda 0, 0,06125, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 mg/ml'lik APS içeren ortamda, sırasıyla 16,48 $\pm$ 0,83, 19,64 $\pm$ 1,20, 20,99 $\pm$ 0,74, 20,760 $\pm$ 0,45, 20,62 $\pm$ 0,40 ve 23,76 $\pm$ 3,18 µM metHb oluşumu hesaplanmıştır.

Şekil 3.24 incelendiğinde, başlangıçtaki deoksiHb derişimi reaksiyon süresince artış göstermiştir. 48 s'lik reaksiyon süresi sonunda 0, 0,06125, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 mg/ml'lik APS içeren ortamda, sırasıyla 2,90 $\pm$ 0,16, 3,91 $\pm$ 0,27, 3,85 $\pm$ 0,14, 4,20 $\pm$ 0,91 4,65 $\pm$ 0,06 ve 4,71 $\pm$ 0,14 µM deoksiHb oluşumu hesaplanmıştır.



Şekil 3.24. APS'nin deoksiHb derişimi üzerine etkisi

Şekil 3.25 incelendiğinde, APS'nin artan derişimi ile oksihb miktarı zamana bağlı olarak azalma göstermiştir. Reaksiyon ortamında APS'nin 0 mg/ml'lik derişiminde dahi 48 s'lik sürede oksihb miktarı ciddi azalış göstermiştir. APS'nin 0, 0,06125, 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 mg/ml'lik derişimine karşılık 48 s'lik süre sonunda ortamda bulunan oksihb derişimi sırasıyla $17,33 \pm 0,47$, $9,25 \pm 1,02$, $6,64 \pm 0,52$, $5,27 \pm 0,03$, $4,92 \pm 0,03$ ve $3,91 \pm 0,13$ μM bulunmuştur.

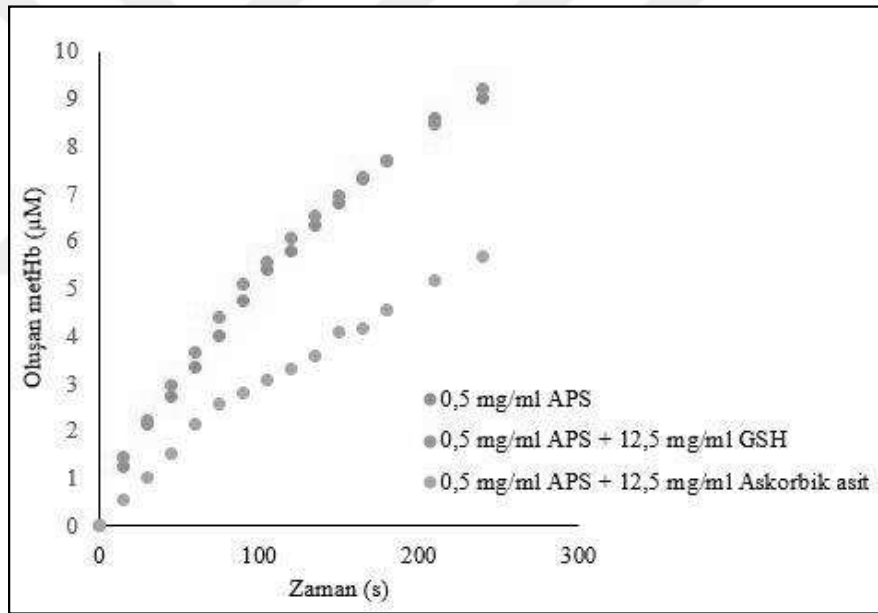


Şekil 3.25. APS'nin oksihb derişimi üzerine etkisi

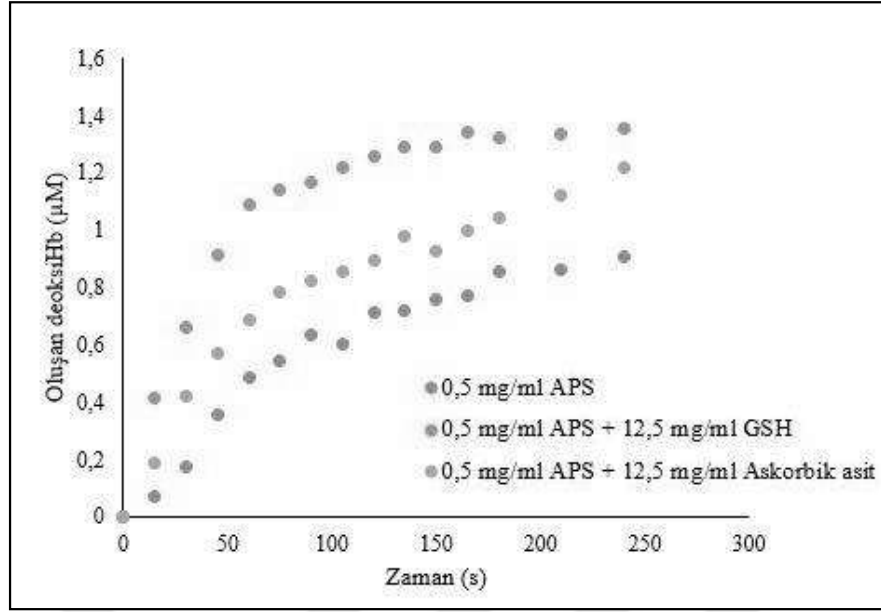
3.3.10. Antioksidanlar varlığında APS'nin oksihb, deoksihb ve methb derişimleri üzerine etkisinin belirlenmesi bulguları

ANADOLUCA yönteminde radikalik başlatıcı olarak kullanılan APS'nin (0,5 mg/ml) varlığında GSH ve askorbik asitin methb, deoksihb ve oksihb derişimi üzerine etkisi, sırasıyla şekil 3.26, şekil 3.27 ve şekil 3.28'de gösterilmiştir.

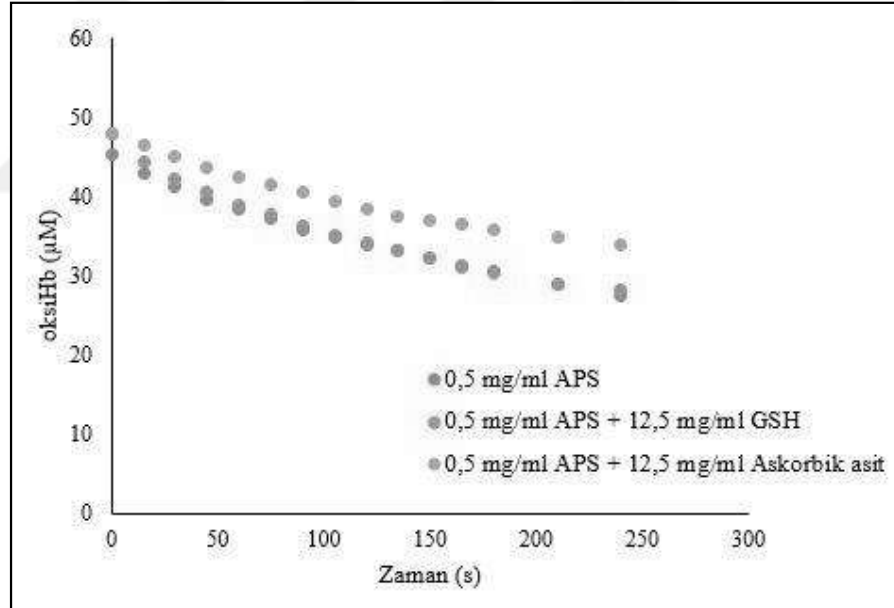
Şekil 3.26'daki grafik incelendiğinde, APS varlığında methb oluşum sürecinde, GSH'nin bir etkisinin olmadığı askorbik asitin methb oluşumunu ciddi oranda azalttığı bulunmuştur. Şekil 3.27'deki deoksihb derişimi incelendiğinde, APS varlığında GSH'nin etkisi askorbik asitten daha fazla görülmüştür. Şekil 3.28'deki oksihb grafiğı incelendiğinde, APS varlığında GSH'nin bir koruyucu rolünün bulunmadığı askorbik asitin ise oksihb'nin yükseltgenmesini yavaşlattığı bulunmuştur.



Şekil 3.26. APS varlığında GSH ve askorbik asitin methb oluşumu üzerine etkisi



Şekil 3.27. APS varlığında GSH ve askorbik asitin deoksiHb oluşumu üzerine etkisi

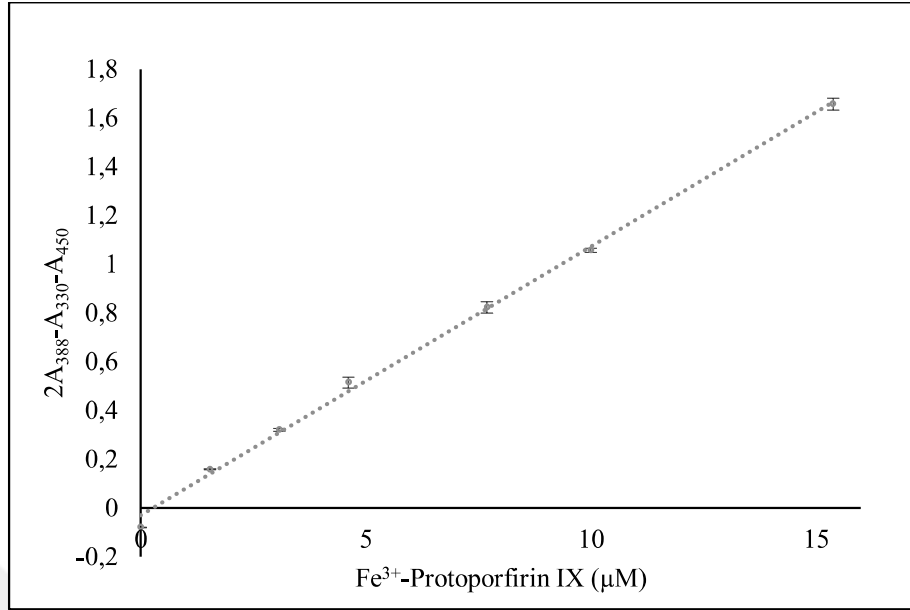


Şekil 3.28. APS varlığında GSH ve askorbik asitin oksihb oluşumu üzerine etkisi

3.4. P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX) Nanokürelerinin Yapay Kan Olarak Kullanımlarının Araştırılması Bulguları

3.4.1. Fe³⁺-Protoporfirin IX'un spektrofotometrik tayini bulguları

Fe³⁺-Protoporfirin IX'un farklı derişimlerinin (0-15,384 µM) 2A₃₈₈-A₃₃₀-A₄₅₀ değerine karşı grafiği şekil 3.29'da gösterilmiştir.



Şekil 3.29. Fe^{3+} -Protoporfirin IX standart grafiği

Şekil 3.29’da verilen Fe^{3+} -Protoporfirin IX standart grafiği derişim ile doğrusal olarak artmakta olup bu standart grafiğine ait R^2 değeri 0,9978 ($\pm 0,0008$) olarak bulunmuştur. Deney ortamındaki Fe^{3+} -Protoporfirin IX derişimi grafikten elde edilen denklem (1.7)’ye göre hesaplanmıştır.

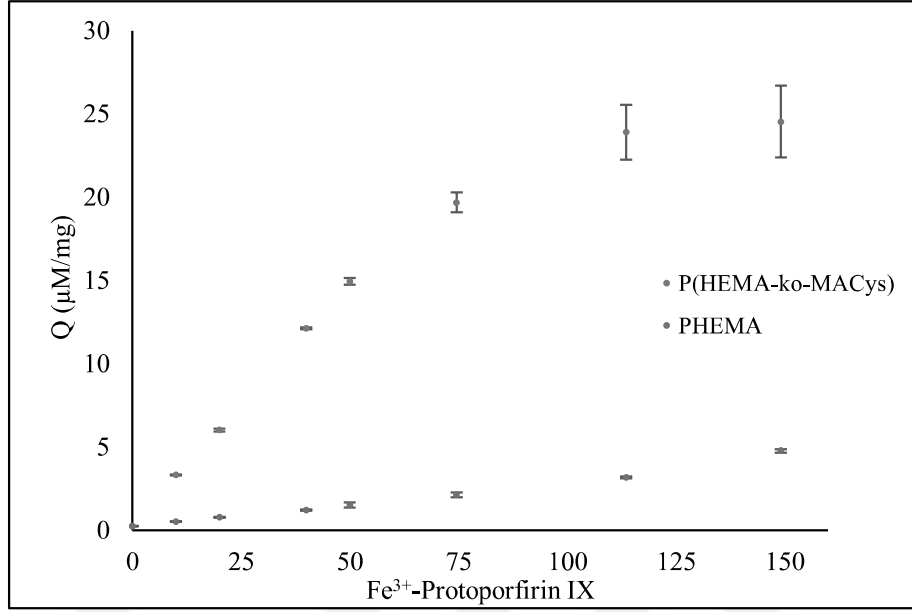
$$2A_{388}-A_{330}-A_{450} = 0,1102 \times [Fe^{3+}\text{-Protoporfirin IX}] - 0,0306 \quad (1.7)$$

3.4.2. P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerine tiyo-ene reaksiyonuyla Fe^{3+} -

Protoporfirin IX bağlanma kapasitesi bulguları

PHEMA ve P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerinin tiyo-ene reaksiyonuyla Fe^{3+} -Protoporfirin IX bağlama kapasitesi şekil 3.30’da gösterilmiştir.

Şekil 3.30’daki Fe^{3+} -Protoporfirin IX bağlanma grafiği incelendiğinde, Fe^{3+} -Protoporfirin IX derişiminin artmasıyla P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllere bağlanan miktarı Fe^{3+} -Protoporfirin IX’un $\sim 150 \mu M$ derişimine kadar artış göstermiştir. P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerin deneysel $Q_{(maksimum)}$ değeri $24,5 \mu M/mg$ ($\pm 2,15$) olarak hesaplanmıştır.

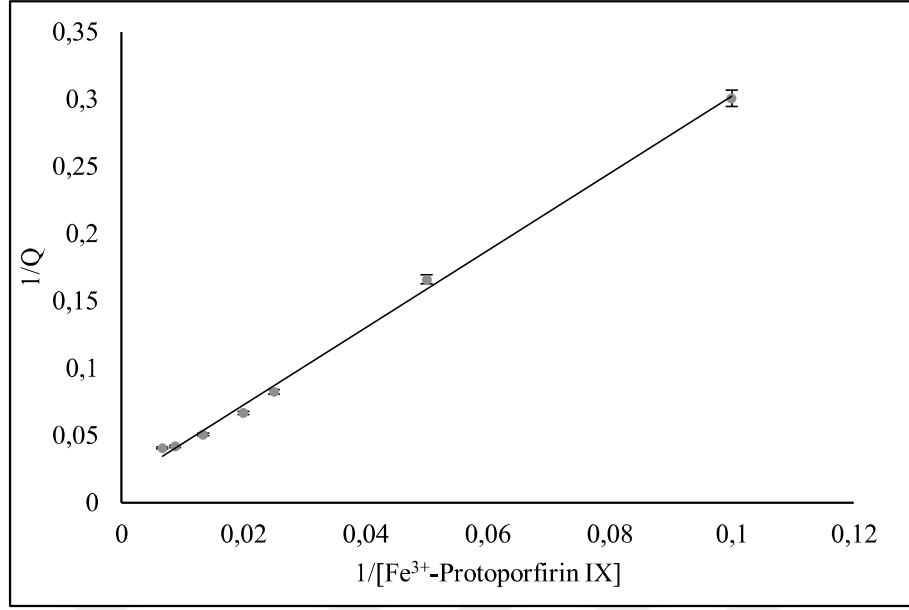


Şekil 3.30. PHEMA ve P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerin Fe^{3+} -Protoporfirin IX bağlama grafiği

PHEMA nanokürelerin Q değeri Fe^{3+} -Protoporfirin IX derişiminin artmasıyla önemli bir değışiklik göstermemektedir. Küçük miktarlardaki bağlanmaların ikincil etkileşimler vasıtasıyla olduğu düşünülmektedir.

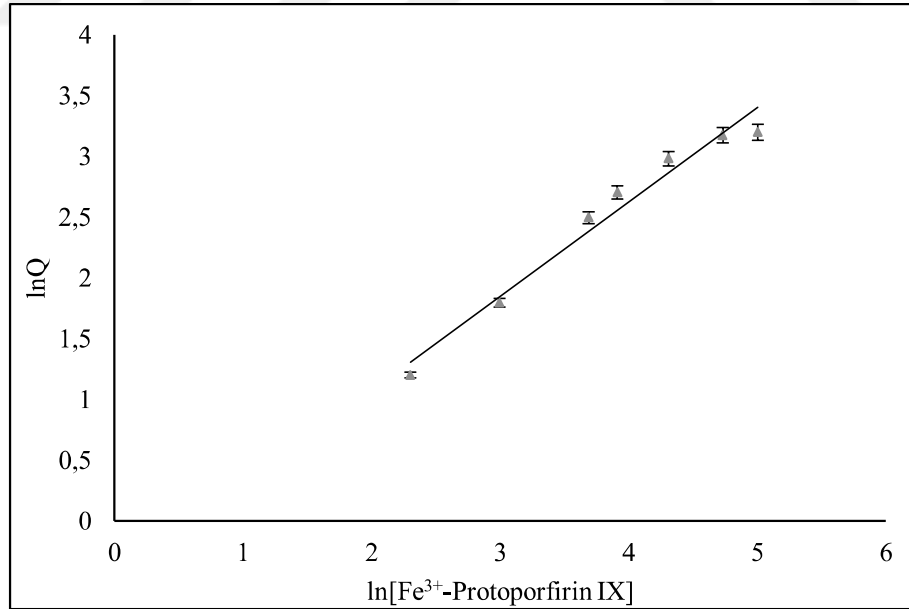
3.4.3. Fe^{3+} -Protoporfirin IX'un P(HEMA-ko-MACys) nanopartikülüne bağlanma izotemlerinin incelenmesi bulguları

Fe^{3+} -Protoporfirin IX'un P(HEMA-ko-MACys) nanopartikülüne bağlanmasına ilişkin Langmiur izotermi şekil 3.31'de gösterilmiştir. Şekil 3.31'deki Langmiur bağlanma modeli incelendiğinde korelasyon katsayısı 0,9971 hesaplanmıştır.



Şekil 3.31. Fe^{3+} -Protoporfirin IX için Langmiur bağlanma modeli

Fe^{3+} -Protoporfirin IX'un P(HEMA-ko-MACys) nanopartikülüne bağlanmasına ilişkin Freundlich izotermi şekil 3.32'de gösterilmiştir. Şekildeki Freundlich bağlanma modeli incelendiğinde korelasyon katsayısı 0,9696 olarak hesaplanmıştır.



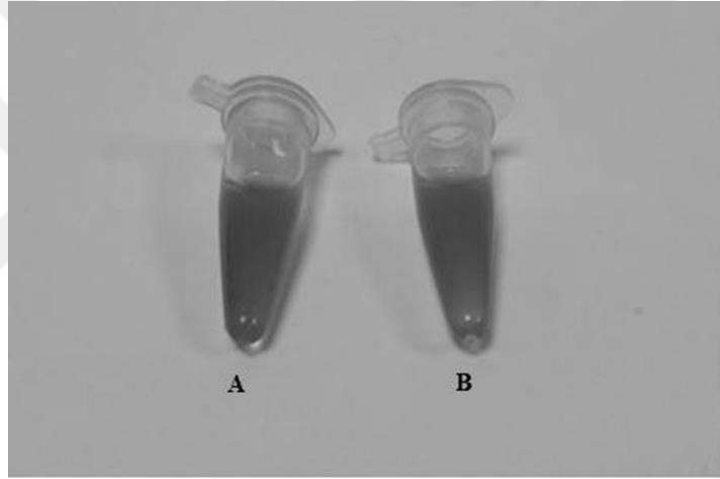
Şekil 3.32. Fe^{3+} -Protoporfirin IX için Freundlich bağlanma modeli

Fe^{3+} -Protoporfirin IX'un P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerine tiyo-ene reaksiyonu ile bağlanması Langmiur ve Freundlich izotermine şekil 3.31 ve şekil 3.32 korelasyon katsayıları incelendiğinde Fe^{3+} -Protoporfirin IX bağlanmasının Langmiur izotermine uyduğu belirlenmiştir. Fe^{3+} -Protoporfirin IX'un P(HEMA-ko-

MACys) nanopartiküllerine maksimum bağlanma kapasitesi, Q_{maks} , 65,3 $\mu\text{M}/\text{mg}$ ve Langmiur sabiti 187,54 μM olarak hesaplanmıştır. P(HEMA-ko-MACys) nanopartikül yüzeyindeki bağlanma bölgeleri (-SH) sınırlı olup tek tabaka bağlanma olduğu düşünülmektedir.

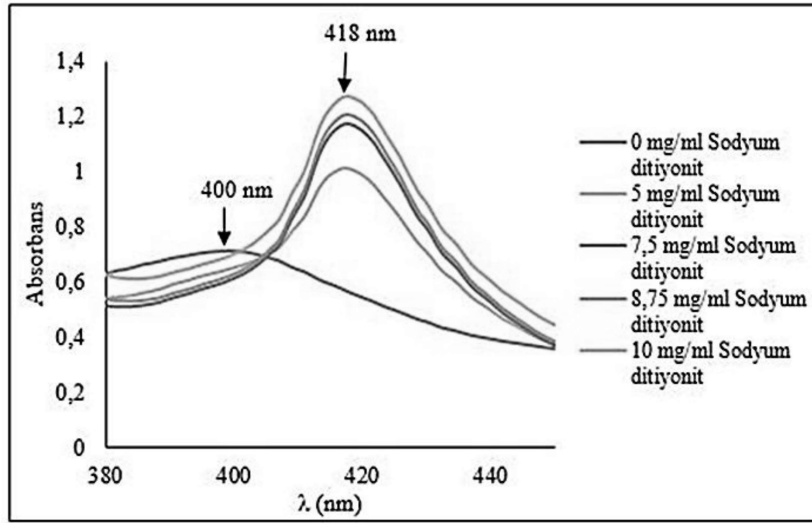
3.4.4. P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanokürelerin P(HEMA-ko-MACys- Fe^{2+} -Protoporfirin IX)'a dönüşümü bulguları

P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanopartiküllerinin yapısındaki Fe^{3+} iyonu sodyum ditiyonit ile indirgendiğinde nanopartiküllere ait dispersiyon ortamının rengi yeşil-kahverengiden kırmızı-kahverengiye dönmüştür (Şekil 3.33).



Şekil 3.33. *P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) dispersiyonu (A), P(HEMA-ko-MACys- Fe^{2+} -Protoporfirin IX) dispersiyonu (B)*

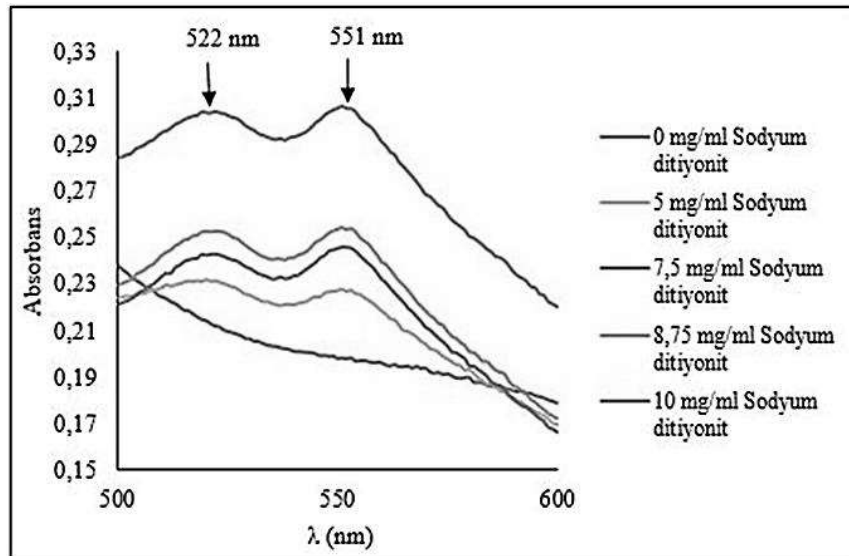
P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanokürelerinin farklı derişimlerdeki (0-10 mg/ml) sodyum ditiyonit ile indirgenmesine ilişkin 380-450 nm arasındaki spektrum şekil 3.34'de gösterilmiştir.



Şekil 3.34. Sodyum ditiyonit ile *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX)* indirgenmesi (380-450 nm)

Şekil 3.34’deki absorpsiyon spektrum incelendiğinde, *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX)* nanopartiküllerinin 400 nm’de bir soret bandı meydana getirdikleri görülmüştür. Sodyum ditiyonitin farklı derişimleri ile indirgenen *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX)* nanopartiküllerinin *P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX)* nanopartiküllerine dönüşüm sonrası soret bandı 418 nm’ye kaymış olup şiddeti artmıştır.

P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin farklı derişimlerdeki (0-10 mg/ml) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ile indirgenmesine ilişkin 500-600 nm arasındaki spektrum şekil 3.35’de gösterilmiştir.

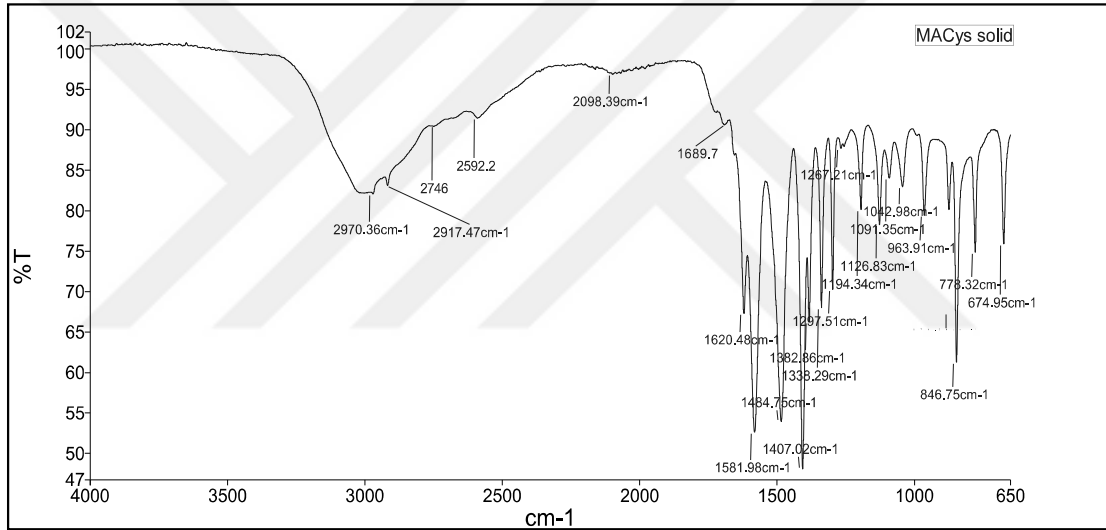


Şekil 3.35. Sodyum ditiyonit ile *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX)* indirgenmesi (500-600 nm)

Şekil 3.35'deki absorpsiyon spektrum incelendiğinde, P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanopartiküllerine ait Q bantları gözlenmemiştir. Sodyum ditiyonit ile indirgenme sonrası oluşan P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX) nanopartiküllerinde 522 ve 551 nm'de Q bantları ortaya çıkmış olup Na₂S₂O₄ derişiminin artması ile şiddeti artmıştır.

3.4.5. MACys, Fe³⁺-Protoporfirin IX molekülleri ve PHEMA, P(HEMA-ko-MACys), P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanopartiküllerinin FT-IR ile karakterizasyonu bulguları

MACys monomerinin FT-IT spektrumu şekil 3.36'da gösterilmiştir.



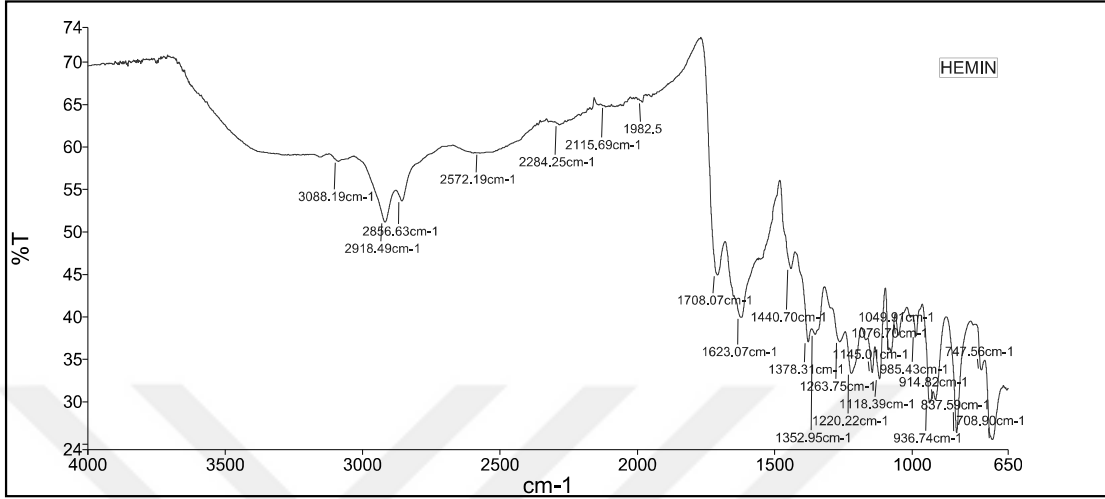
Şekil 3.36. MACys monomerinin FT-IR spektrumu

MACys monomerinin FT-IR spektrumu incelendiğinde, 2592,2 cm⁻¹'de görülen zayıf bant S-H gerilmesine ait titreşim bandının karakteristik özelliğidir. 1689,7 cm⁻¹'de görülen band, monomerin yapısındaki sekonder amide ait C=O gerilme titreşimidir. 1620,48 cm⁻¹'de görülen orta şiddetteki bant ve 963,91 cm⁻¹'de görülen orta şiddetteki bant sırasıyla, C=C gerilme ve C=C eğilme titreşimleridir.

Fe³⁺-Protoporfirin IX molekülüne ait FT-IR spektrumu şekil 3.37'de gösterilmiştir.

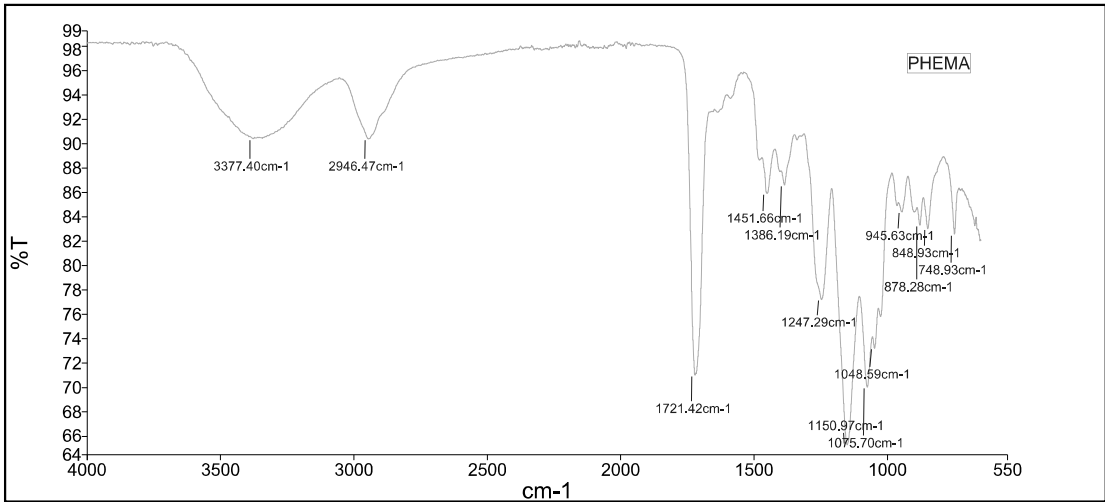
Şekil 3.37'deki FT-IR spektrumu incelendiğinde 1708,07 cm⁻¹'de görülen orta şiddetteki bant Fe³⁺-Protoporfirin IX yapısındaki C=O gerilme titreşimine aittir.

1623,07 m^{-1} 'de görülen orta şiddetteki bant yapıda yer alan konjuge alkenlere ait C=C gerilme titreşimi bantıdır.



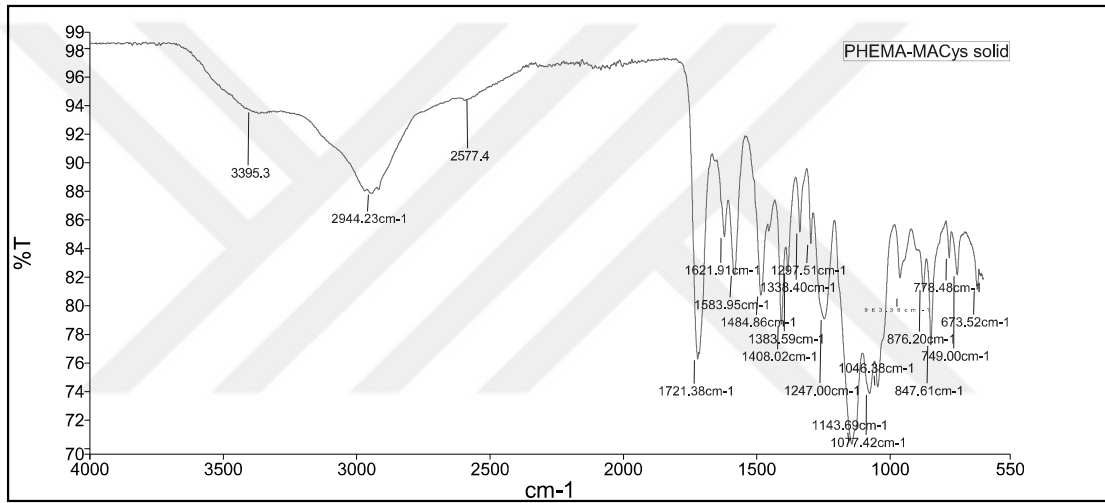
Şekil 3.37. Fe^{3+} -Protoporfirin IX FT-IR spektrumu

PHEMA nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu şekil 3.38'de gösterilmiştir. Şekil 3.38'deki FT-IR spektrumu incelenerek yapıda bulunması gereken fonksiyonel gruplara ait bantlar 3377,40 cm^{-1} 'de O-H gerilme titreşimi, 2946,47 cm^{-1} 'de C-H gerilmesi, 1721,42 cm^{-1} 'deki güçlü absorbsiyon bandı ester grubuna ait C=O gerilmesi, 1247,29 cm^{-1} 'deki orta şiddetli absorbsiyon bandı EGDMA yapısındaki C-O gerilme titreşimi ve 1150.97 cm^{-1} 'de güçlü absorbsiyon bandı ester yapısındaki C-O gerilme titreşimi olarak yorumlanmıştır.



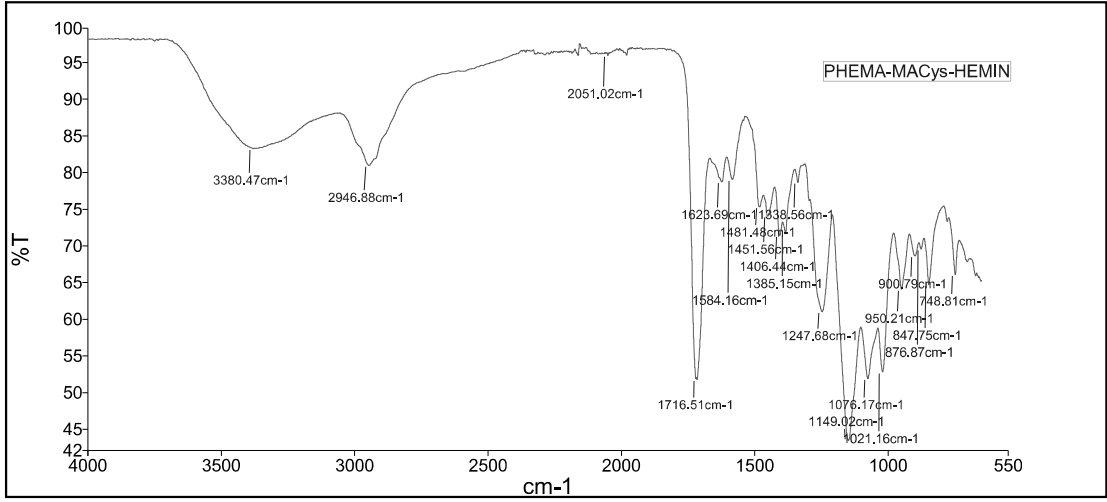
Şekil 3.38. PHEMA nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu

P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu şekil 3.39’da gösterilmiştir. Şekil 3.39’daki spektrum incelendiğinde, 3395,3 cm^{-1} ’deki geniş bant O-H gerilme titreşimi, 2944,23 cm^{-1} ’deki bant C-H gerilme titreşimini göstermektedir. 2577,4 cm^{-1} ’deki zayıf bant S-H gerilme titreşimine ait bantı göstermektedir. MACys monomerine ait FT-IR spektrumunda 2592,2 cm^{-1} ’de görülen S-H zayıf bantı 2577,4 cm^{-1} ’e dalga boyuna kaymıştır. 1721,38 cm^{-1} ’deki güçlü absorpsiyon bandı ester grubuna ait C=O gerilme titreşimini göstermektedir. 1247,00 cm^{-1} ’deki orta şiddetli absorpsiyon bandı EGDMA yapısındaki C-O gerilme titreşimi ve 1143,69 cm^{-1} ’de güçlü absorpsiyon bandı ester yapısındaki C-O gerilme titreşimi olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.39. P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu

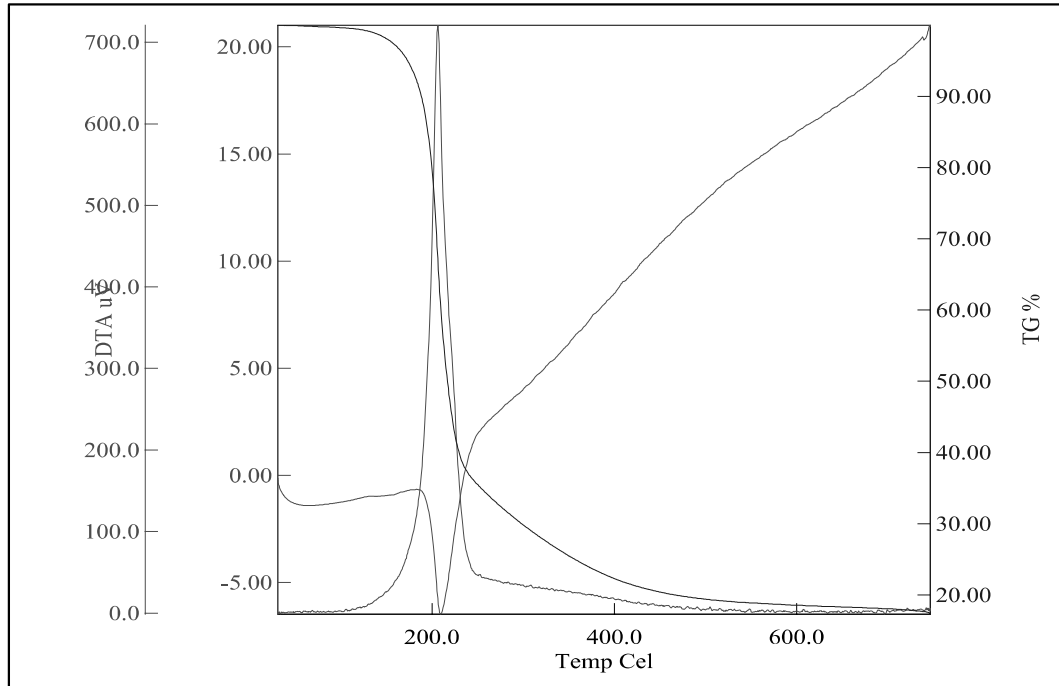
P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) ait FT-IR spektrumu şekil 3.40’da gösterilmiştir. Şekil 3.40’daki spektrum incelendiğinde, MACys’de 2592,2 cm^{-1} ’de ve P(HEMA-ko-MACys)’da 2577,4 cm^{-1} ’de gözlenen S-H bantı tiyo-ene reaksiyonu sonucu S-C bağına dönüştüğü için bu banda ait gerilme titreşimi kaybolmuştur.



Şekil 3.40. *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu*

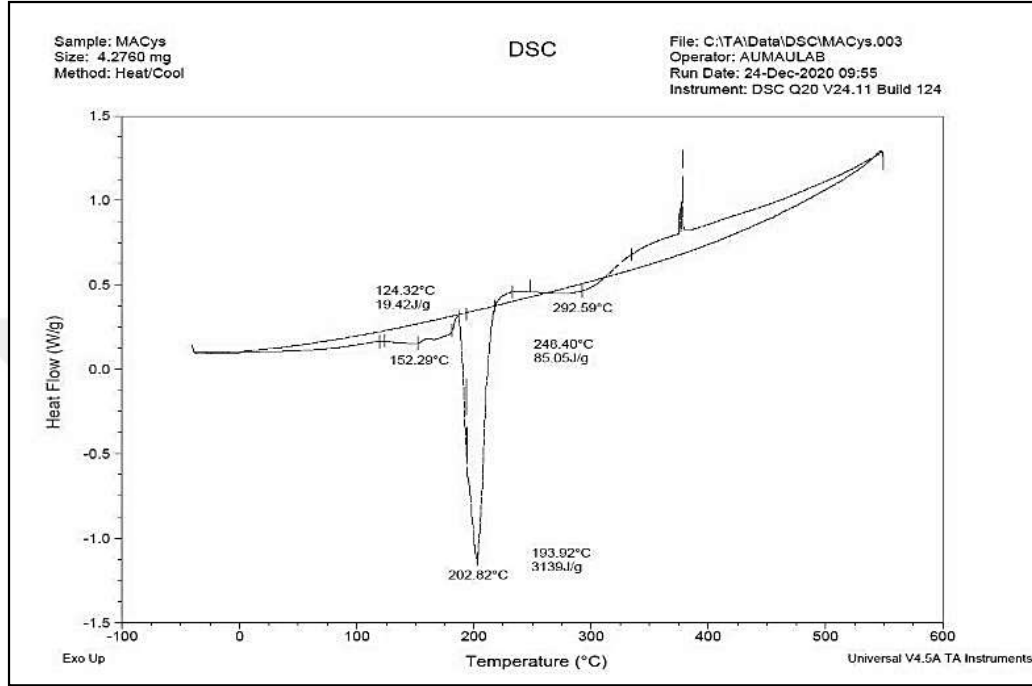
3.4.6. PHEMA, P(HEMA-ko-MACys) ve P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanopartiküllerinin TG/DTA ve DSC ile karakterizasyonu bulguları

MACys molekülüne ait TG/DTA ve DTG termogramı şekil 3.41’de gösterilmiştir. Şekil 3.41 incelendiğinde, MACys molekülü 183,6 °C’den 244,8 °C’ye kadar çok hızlı bir şekilde degradasyona uğramıştır. Kütle kaybı hızı en yüksek 206,7 °C’de belirlenmiş olup 244,8 °C’ye kadar MACys molekülünün %63,7’si degradasyona uğramıştır. DTG eğrisi incelendiğinde degradasyonun tek basamakta gerçekleştiği görülmektedir.



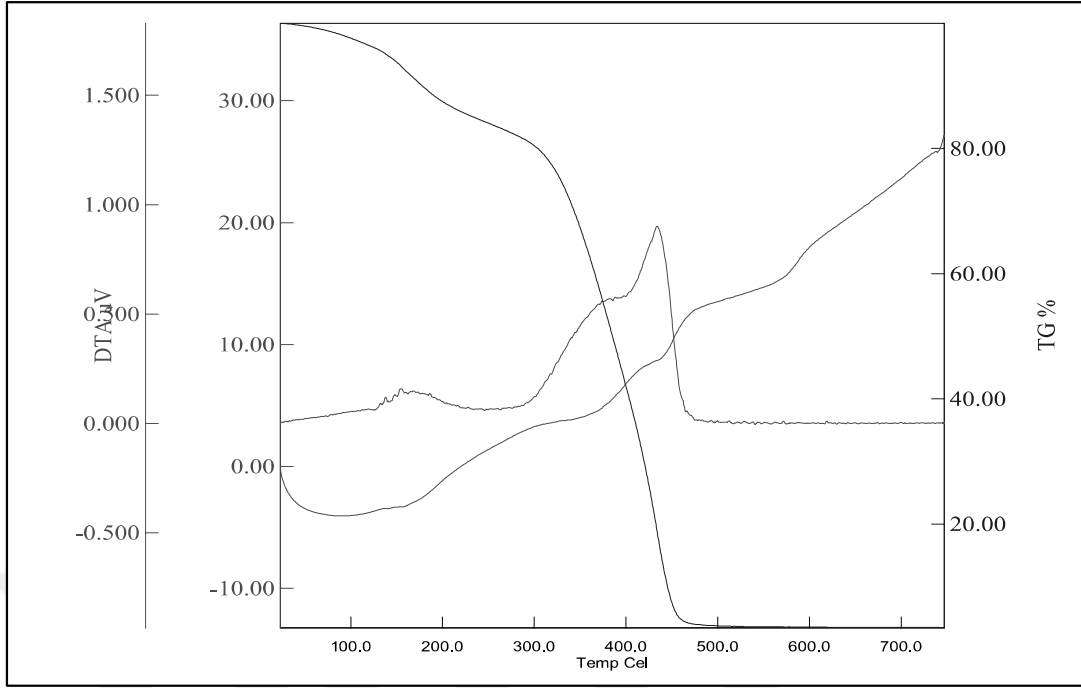
Şekil 3.41. *MACys TG/DTA ve DTG termogramı*

MACys molekülüne ait DSC termogramı şekil 3.42’de gösterilmiştir. Şekil 3.42’deki MACys monomerine ait DSC termogramı incelendiğinde 202,82 °C’de erime sıcaklığından kaynaklanan keskin bir endotermik pik meydana gelmiştir.



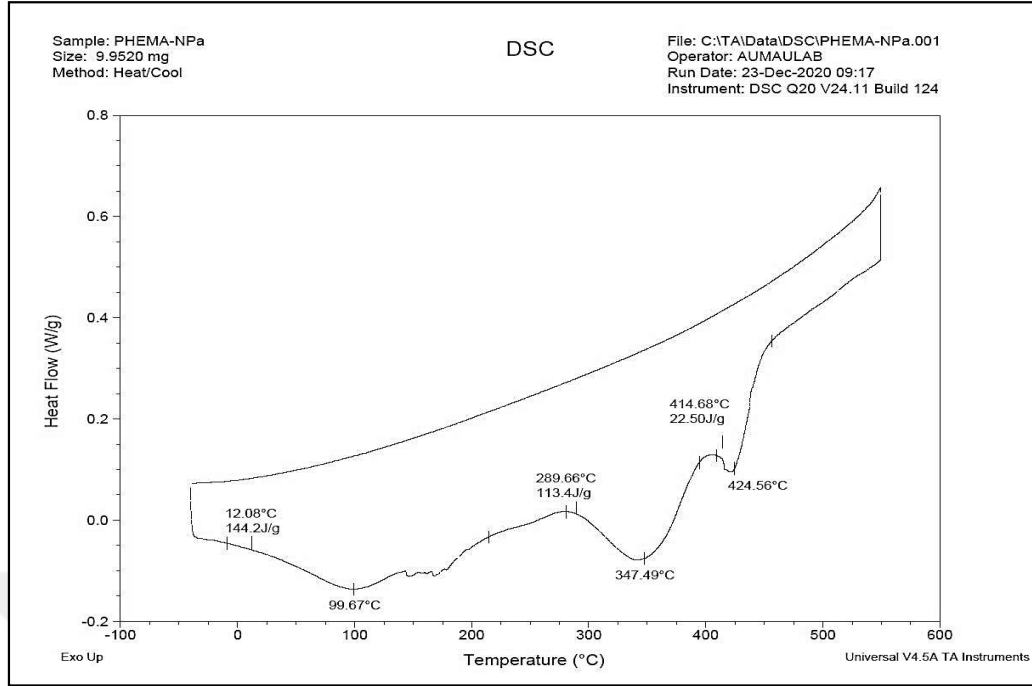
Şekil 3.42. MACys DSC termogramı

PHEMA nanopartikülüne ait TG/DTA ve DTG termogramı şekil 3.43’te gösterilmiştir. Şekil 3.43 incelendiğinde PHEMA nanopartikülü 275,5 °C’den 475,2 °C’ye kadar çok hızlı bir şekilde degradasyona uğramıştır. Kütle kaybı hızı en yüksek 433,4 °C’de belirlenmiş olup 475,2 °C’ye kadar PHEMA nanopartikülünün %96’sı degradasyona uğramıştır. DTG eğrisi incelendiğinde degradasyonun üç basamakta gerçekleştiği görülmektedir.



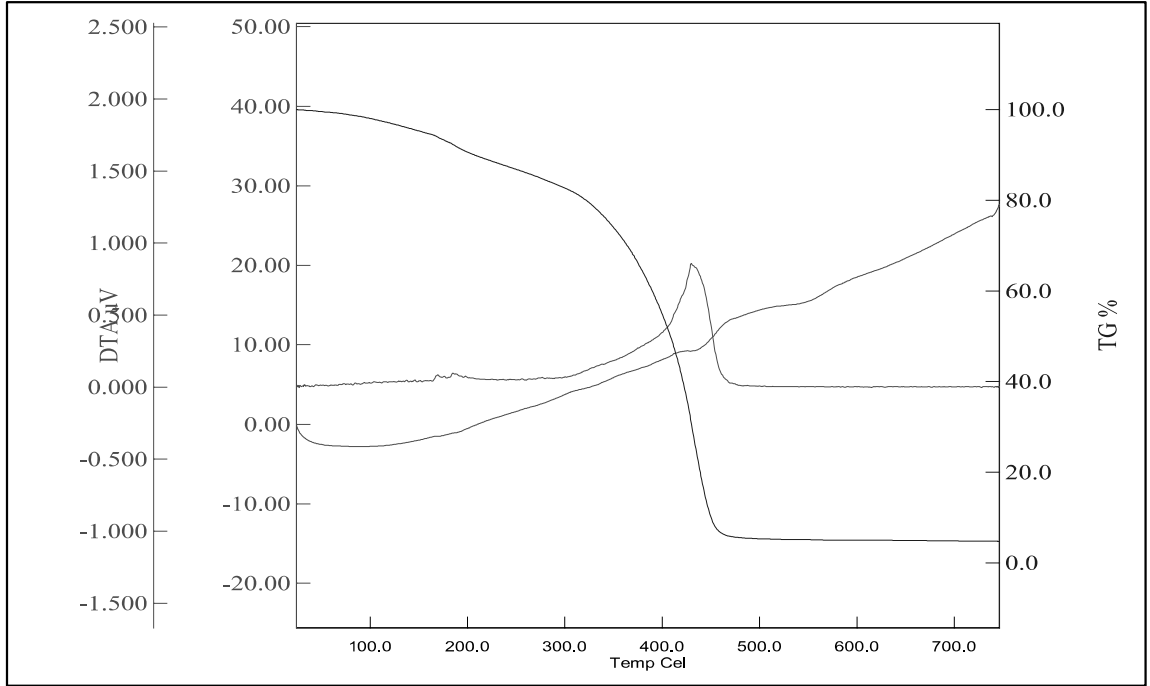
Şekil 3.43. PHEMA TGA/DTA ve DTG termogramı

PHEMA nanopartikülüne ait DSC termogramı şekil 3.44'te gösterilmiştir. PHEMA nanopartiküllerinin DSC termogramı incelendiğinde, T_g değeri 96,67 °C olarak DSC programı tarafından hesaplanmıştır. PHEMA nanopartikülleri 289,66 °C'de hızlı bir şekilde bozunmaya başlamıştır. DSC analizi azot atmosferinde gerçekleştiğinden yükseltgenme piki gözlenmemiştir. DSC eğrisi incelendiğinde 347,49 °C sıcaklıkta görülen endoterm termal degradasyon sebebiyle meydana gelmiştir. DTA termogramı ile kıyaslandığında degradasyon sıcaklıklarının başlangıç noktaları benzerlik göstermekte olup birbirini desteklemektedir.



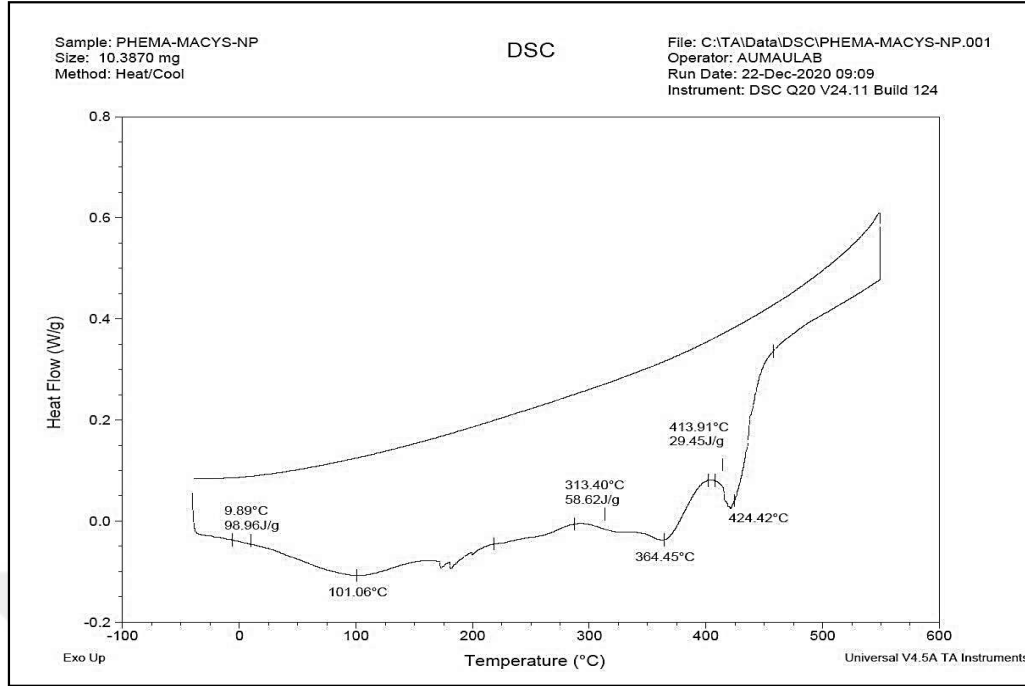
Şekil 3.44. PHEMA nanopartikülü DSC termogramı

P(HEMA-ko-MACys) nanopartikülüne ait TG/DTA ve DTG termogramı şekil 3.45'te gösterilmiştir. Şekil 3.45 incelendiğinde, P(HEMA-ko-MACys) nanopartikülü 303,7 °C'den 480,5 °C'ye kadar çok hızlı bir şekilde degradasyona uğramıştır. Kütle kaybı hızı en yüksek 429,9 °C'de belirlenmiş olup 480,5 °C'ye kadar P(HEMA-ko-MACys) nanopartikülünün %94,4'ü degradasyona uğramıştır. DTG eğrisi incelendiğinde degradasyonun 2 basamakta gerçekleştiği görülmektedir. HEMA monomeri ve MACys aminoasit ko-monomeri polimerizasyonu sonucu sentezlenen P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerinin kararlılığı PHEMA nanopartikülüne göre artmıştır.



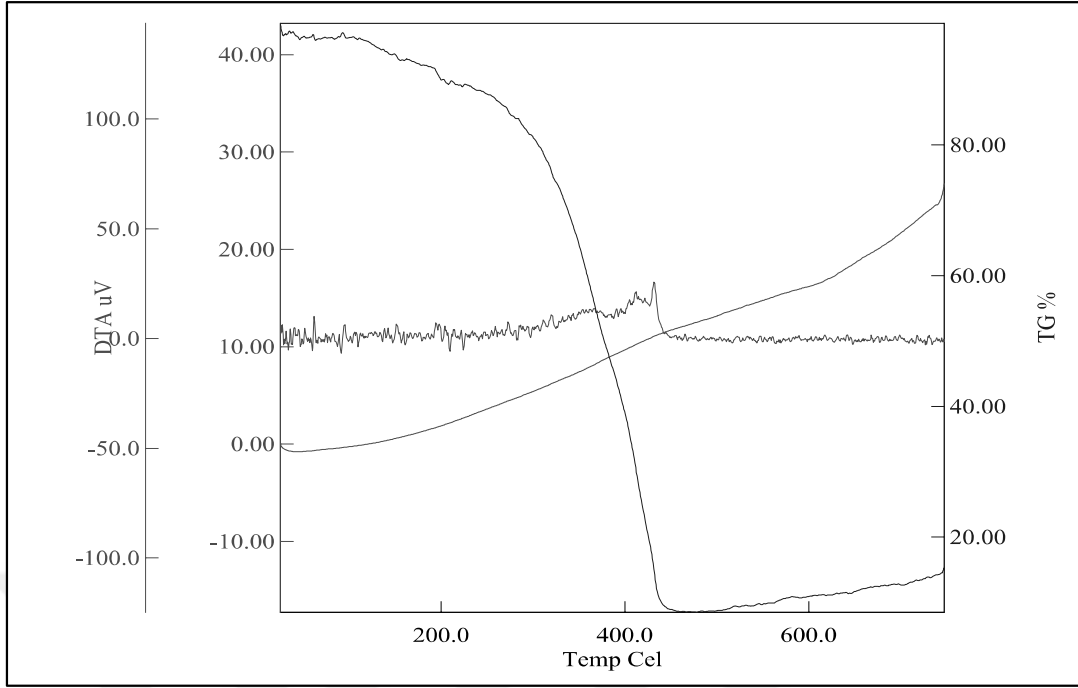
Şekil 3.45. *P(HEMA-ko-MACys)* TG/DTA ve DTG termogramı

P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerine ait DSC grafiği şekil 3.46’de gösterilmiştir. Şekil 3.46’daki P(HEMA-ko-MACys) nanopartikülüne ait DSC termogramı incelendiğinde, bu nanopartiküllerin T_g değeri 101,06 °C olarak ölçülmüştür. PHEMA ile kıyaslandığında T_g değerindeki bu artışın, sentez esnasında kullanılan MACys komonomerinin komşu polimer zincirleri arasındaki hidrojen bağı oluşumunu arttırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. P(HEMA-ko-MACys) nanopartikülleri 313,40 °C’de bozunmaya başlamış olup 365,45 °C’de görülen endoterm termal degradasyon sonucu meydana gelmiştir.



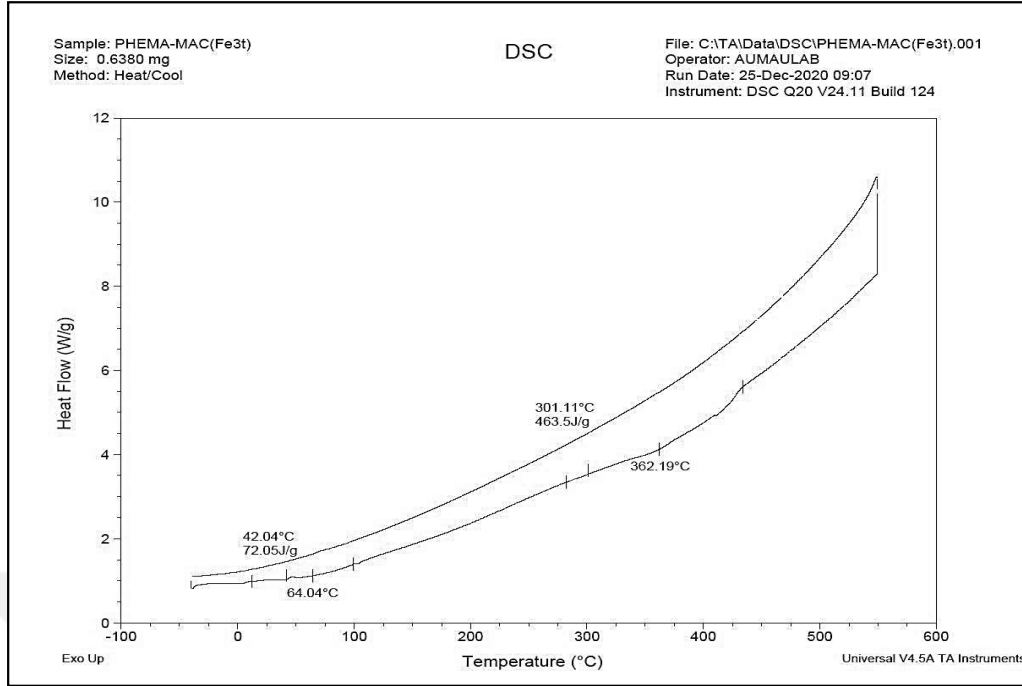
Şekil 3.46. P(HEMA-ko-MACys) DSC termogramı

P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanopartikülüne ait TG/DTA ve DTG termogramı şekil 3.47’de gösterilmiştir. Şekil 3.47 incelendiğinde, P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanopartikülü 298,1 °C’den 460,3 °C’ye kadar çok hızlı bir şekilde degradasyona uğramıştır. Kütle kaybı hızı en yüksek 431,7 °C’de belirlenmiş olup 460,3 °C’ye kadar P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanopartikülünün % 91.3’ü degradasyona uğramıştır. DTG eğrisi incelendiğinde degradasyonun 2 basamakta gerçekleştiği görülmektedir. Fe³⁺-Protoporfirin IX’un termal stabilitesinin düşük olması sebebiyle P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanopartiküllerinin kararlılığı PHEMA ve P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerine göre düşük çıkmıştır.



Şekil 3.47. *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) TG/DTA ve DTG termogramı*

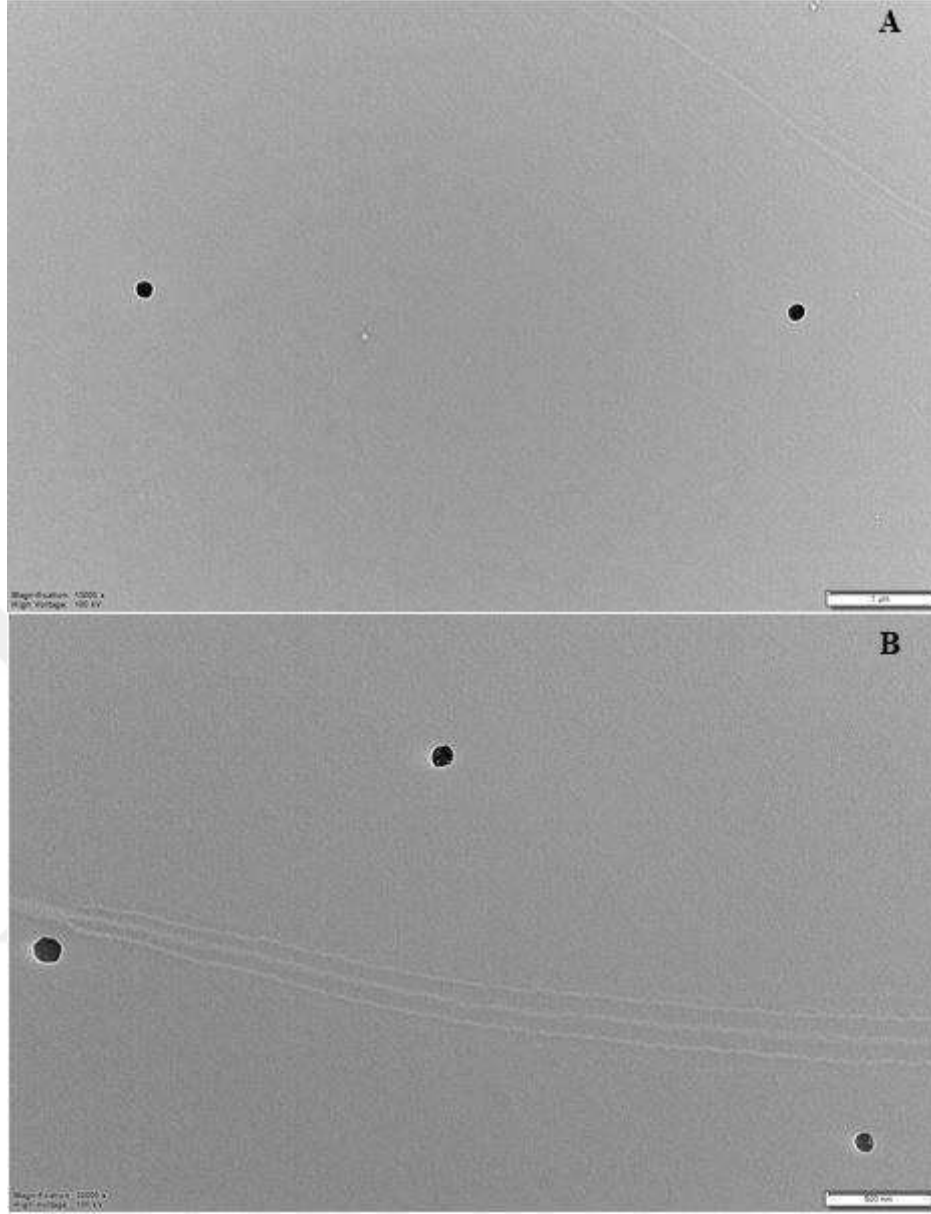
P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanopartikülüne ait DSC termogramı şekil 3.48’da gösterilmiştir. Şekil 3.48’deki P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanopartikülüne ait DSC termogramı incelendiğinde nanopartiküle ait T_g değeri 64,04 °C olarak ölçülmüştür. PHEMA ve P(HEMA-ko-MACys) ile kıyaslandığında T_g değerinde meydana gelen bu düşüşün P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanopartikül yapısında bulunan Fe³⁺-Protoporfirin IX molekülünden kaynaklandığı düşünülmektedir. DSC eğrisinde P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanopartikülleri 301,11 °C’de bozunmaya başlamıştır. DTA verileri ile kıyaslandığında bozunmaya başladığı sıcaklık 298,1 °C olup DSC eğrisi ile birbirini desteklemektedir. Termal degradasyon sebebiyle 362,19 °C’de endoterm gözlenmiştir.



Şekil 3.48. *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX)* DSC termogramı

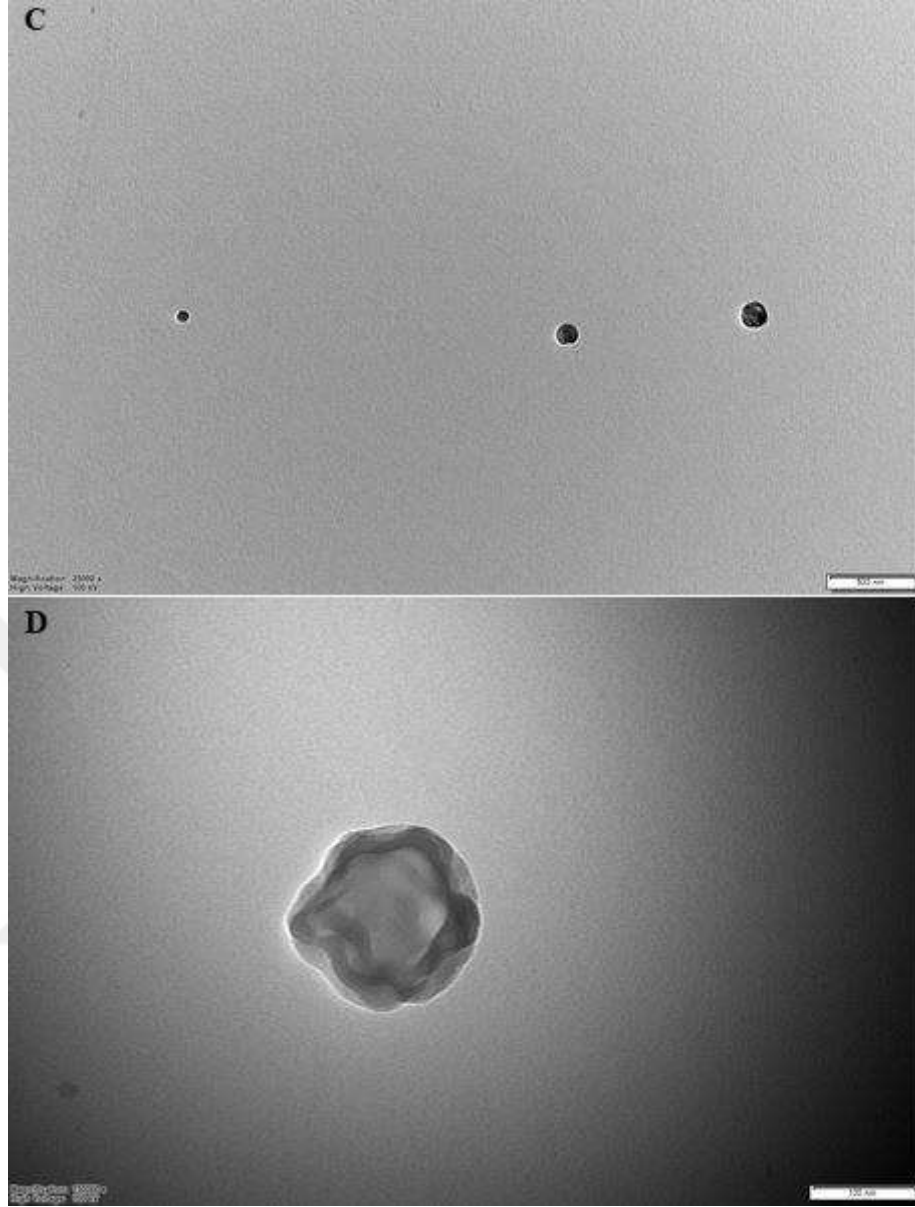
3.4.7. PHEMA, P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerinin TEM ile karakterizasyonu bulguları

PHEMA nanopartiküllerine ait TEM görüntüsü şekil 3.49’da gösterilmiştir. PHEMA nanopartiküllerinin farklı büyütmelemlerle (A; 15000X 100 kV, B; 30000X 100 kV) yapılan TEM incelemeleri sonucunda morfolojik görüntülerinin küresel yapıda olduğu görülmüştür. PHEMA nanopartiküllerinin incelenen görüntülerinde agregasyon bulgularına rastlanmamıştır. PHEMA nanopartiküllerinin çapı 84-173 nm arasında bulunmuştur.



Şekil 3.49. *PHEMA nanopartiküllerinin TEM analizi A. 15000X 100 kV, B. 30000X 100 kV*

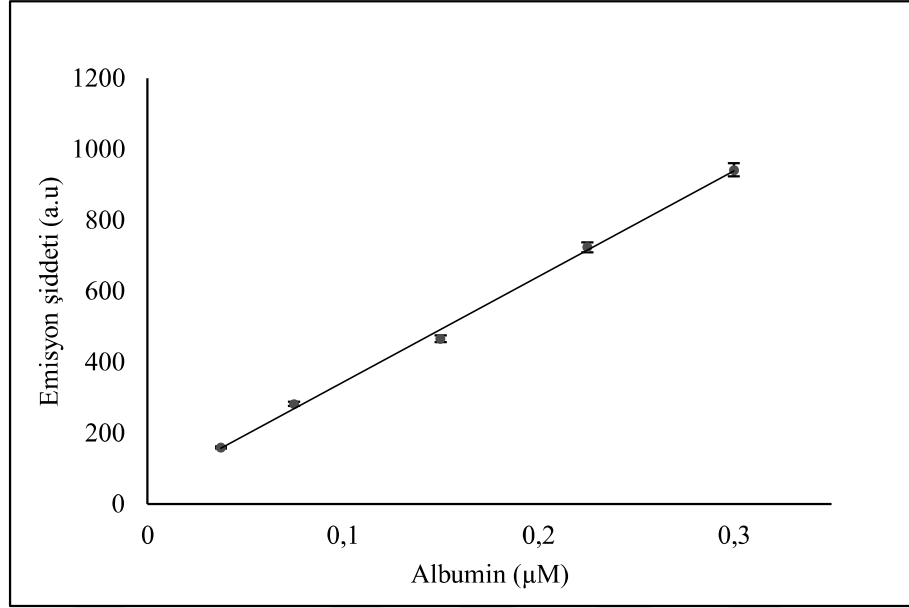
P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri şekil 3.50’de gösterilmiştir. P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerinin farklı büyütmelemlerle (C; 25000X 100 kV, B; 150000X 100 kV) yapılan TEM incelemeleri sonucunda morfolojik görüntülerinin küresel yapıda olduğu görülmüştür. P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerinin çapı 79-158 nm arasında bulunmuş olup agregasyon bulgularına rastlanmamıştır.



Şekil 3.50. P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerinin TEM analizi C. 25000X 100 kV, D. 150000X 100 kV

3.4.8. P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin serum albumine bağlanmasının değerlendirilmesi bulguları

Albuminin (insan serumundan) florimetrik olarak çizilen standart grafiği şekil 3.51’de gösterilmiştir. Şekil 3.51’de verilen albuminin florimetrik standart grafiğinde korelasyon katsayısı 0,9976 olarak bulunmuş olup grafiğe ait matematiksel ifade denklem (1.8)’de gösterilmiştir.

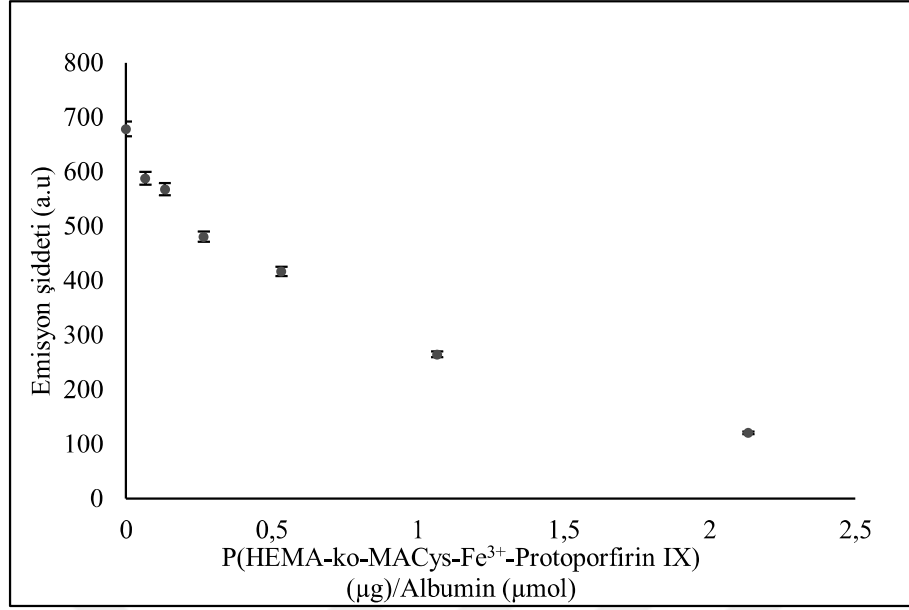


Şekil 3.51. Albumin (insan serumundan) florimetrik standart grafiği

$$Em_{(355)} = 2976,7 \times C_{Al} + 45,782 \quad (1.8)$$

Burada, $Em_{(355)}$ numunenin 355 nm'deki emisyonunu, C_{Al} numudeki serbest serum albumin derişimini (μM) ifade etmektedir.

P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanokürelerinin serum albuminine bağlanmasına ilişkin grafik şekil 3.52'de gösterilmiştir. Şekil 3.52'deki grafik incelendiğinde, reaksiyon ortamındaki P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanokürelerinin derişimi arttığında nanokürelere bağlanan albumin miktarında artış olmuştur. Reaksiyon ortamındaki serbest haldeki albumin derişiminin azalmasıyla floresans şiddetinde azalma meydana gelmiş olup 2,13 μg P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanoküre, 1 μmol albumin bağlayabilmiştir.

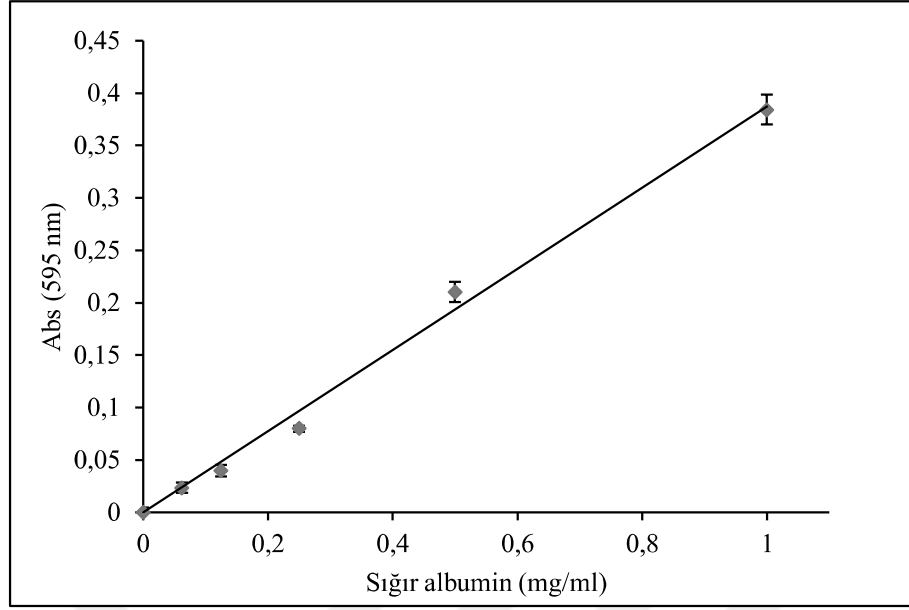


Şekil 3.52. *P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporphirin IX)* nanokürelerine serum albumini bağlanması grafiği

3.5. CA Enziminin Saflaştırılması Bulguları

3.5.1. Protein tayini bulguları

Bradford yöntemiyle sığır serum albumin kullanılarak çizilen standart grafik şekil 3.53'te gösterilmiştir. Şekil 3.53'teki sığır serum albumin standart grafiğine ait R^2 değeri 0,9941 olarak bulunmuş olup grafiğe ait matematiksel ifade denklem (1.9)'da gösterilmiştir.



Şekil 3.53. Sığır serum albumin standart grafiği

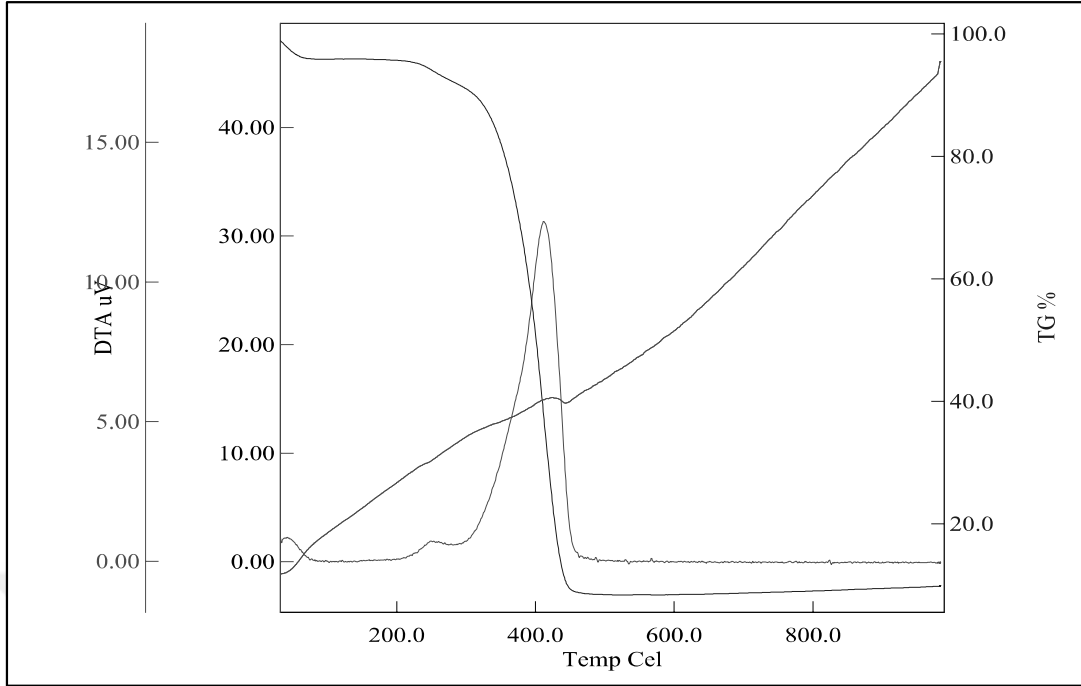
$$\text{Abs}_{(595)} = 0,3875 \times C \quad (1.9)$$

Burada, $\text{Abs}_{(595)}$ bilinmeyen numunenin 595 nm'deki absorbasını, C bilinmeyen numudedeki protein derişiminin (mg/ml) sığır albumini cinsinden değeri ifade etmektedir.

3.5.2. PHEMA ve PHEMA-pABSA kriyojellerinin TG/DTG ve DSC

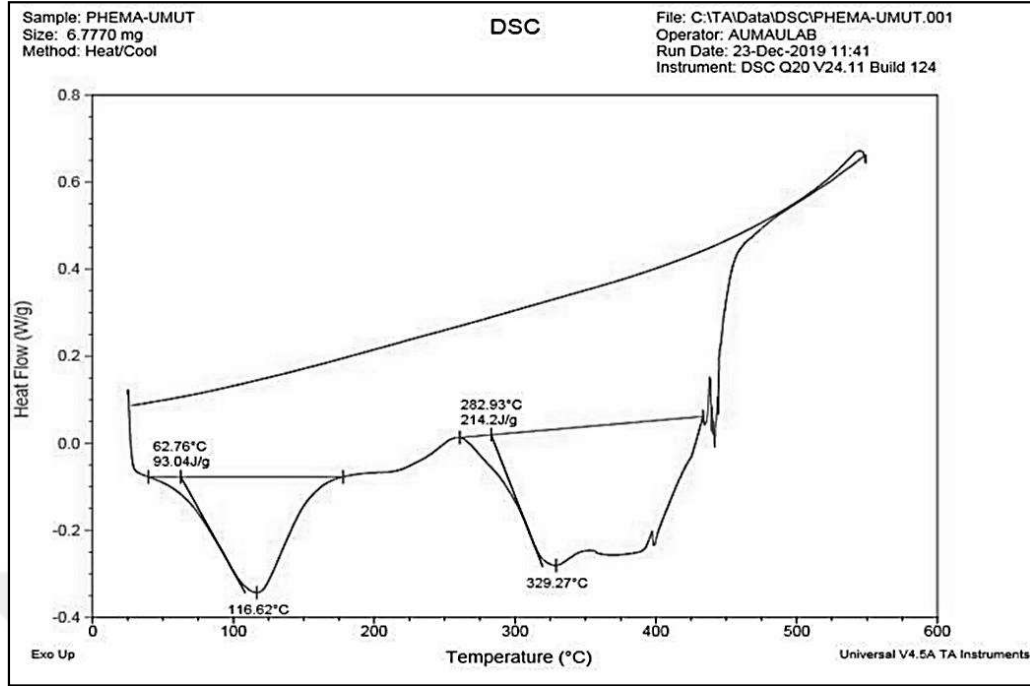
karakterizasyon bulguları

PHEMA'nın TG/DTG termogramı şekil 3.54'te gösterilmiştir. Şekil 3.54'te verilen PHEMA'nın TG/DTG termogramı incelendiğinde, 100 °C'ye kadar %4,2'lik bir kütle kaybı görülmüş olup bunun makro gözeneklerde bulunan ve fiziksel olarak adsorbe edilmiş su moleküllerinin uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. PHEMA kriyojeli 295.1 °C'den 453.5 °C'ye kadar çok hızlı bir şekilde degradasyona uğramıştır. Kütle kaybı hızı en yüksek 412.4 °C'de belirlenmiş olup %12,86/dk olarak hesaplanmıştır. 453.5 °C'ye kadar PHEMA'nın %90,9'u degradasyona uğramıştır. DTG eğrisi incelendiğinde degradasyonun iki basamakta gerçekleştiği görülmektedir.



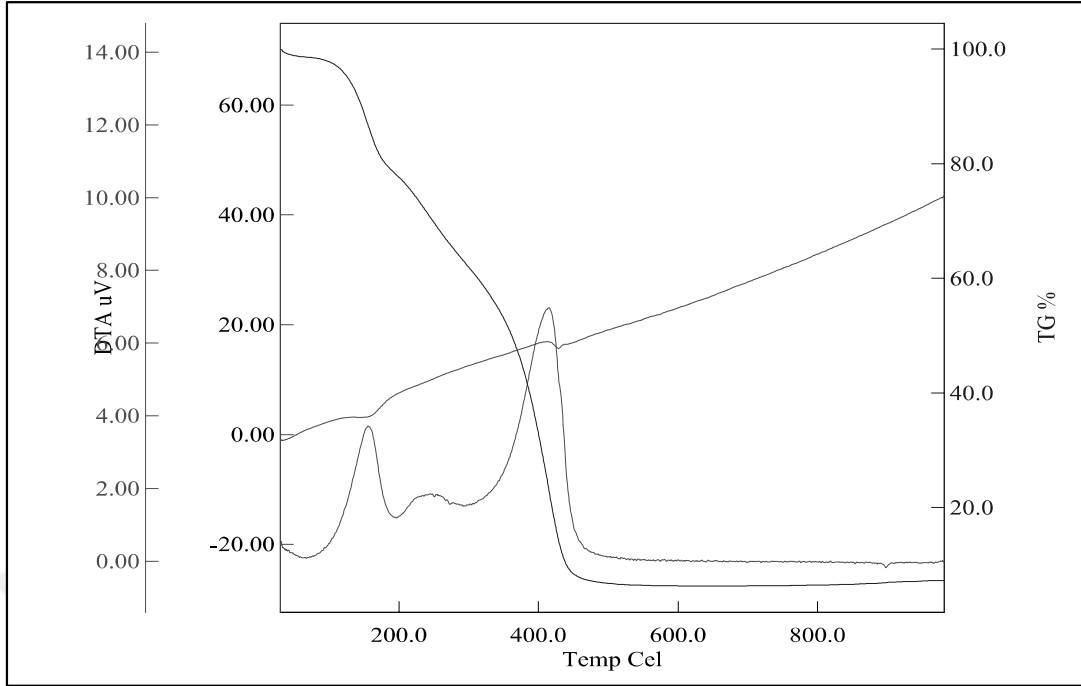
Şekil 3.54. PHEMA TG/DTG termogramı

PHEMA'nın DSC termogramı şekil 3.55'te gösterilmiştir. Şekilde verilen PHEMA'nın DSC termogramı incelendiğinde, T_g değeri 62,76 °C'dir. 116,62 °C'deki endotermik pik polimerizasyonu göstermekte olup polimerizasyon entalpisi (ΔH) 93,04 J/g olarak DSC programı tarafından hesaplanmıştır. PHEMA 282,93 °C sıcaklıkta hızlı bir şekilde bozunmaya başlamıştır. DSC analizi azot atmosferinde gerçekleştiğinden yükseltgenme piki gözlenmemiştir. DSC eğrisi incelendiğinde 329,27 °C sıcaklıkta görülen endoterm termal degradasyon sebebiyle meydana gelmiştir.



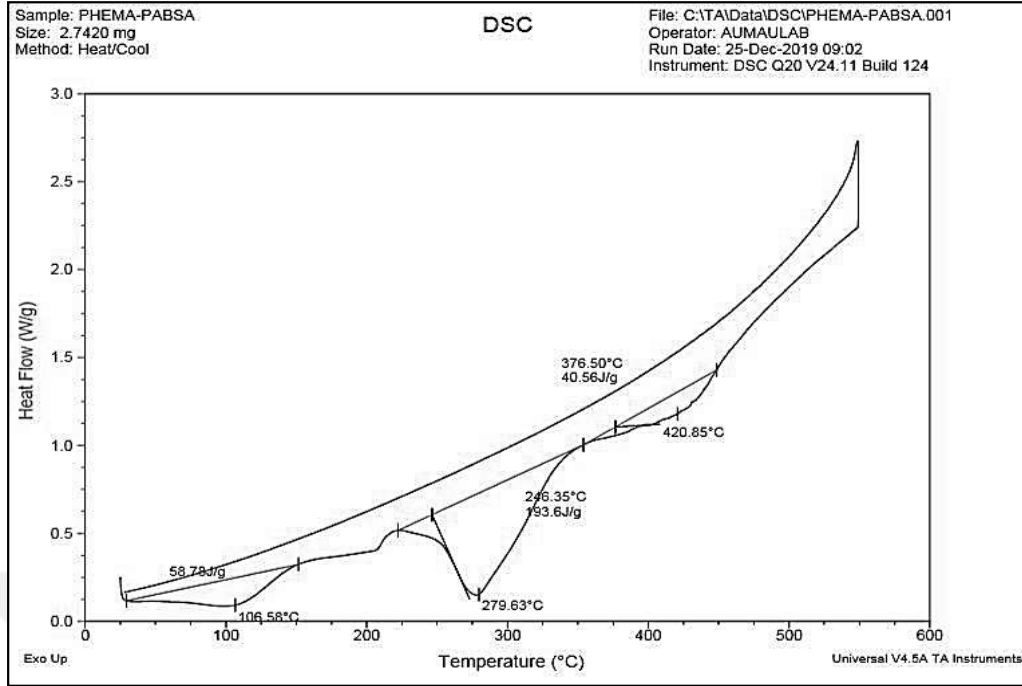
Şekil 3.55. PHEMA DSC termogramı

PHEMA-pABSA'nın TG/DTG termogramı şekil 3.56'da gösterilmiştir. Şekil 3.56'daki PHEMA-pABSA'nın TG/DTG termogramı incelendiğinde 100 °C'ye kadar %2,3'lük bir kütle kaybı görülmüş olup bunun makro gözeneklerde bulunan ve fiziksel olarak adsorbe edilmiş su moleküllerinin uzaklaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. PHEMA-pABSA kriyojeli 102,5 °C'den sonra hızlı bir degradasyona uğramıştır. 459,8 °C'de kriyojelin %92'si degrede olmuştur. 102,5 °C'den 192,2 °C'ye kadar degradasyon hızındaki artışın PHEMA yapısına katılan pABSA'nın termal stabilitesinin düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kütle kaybı hızı pABSA'dan dolayı 153,6 °C'de %3,66 olarak hesaplanmıştır. 415,3 °C'de kütle kaybı hızı %6,97/dk olarak hesaplanmış olup PHEMA kriyojelinin bu sıcaklıklarda degradasyonu gerçekleşmektedir. DTG eğrisi incelendiğinde degradasyonun üç basamakta gerçekleştiği görülmektedir.



Şekil 3.56. PHEMA-pABSA TG/DTG termogramı

PHEMA-pABSA kriyojelinin DSC termogramı şekil 3.57’de gösterilmiştir. Şekil 3.57’deki PHEMA-pABSA’nın DSC termogramı incelendiğinde, T_g değeri 55 °C olarak hesaplanmıştır. 106,58 °C’deki endotermik pik polimerizasyonu göstermekte olup ΔH değeri 58,78 J/g olarak DSC programı tarafından hesaplanmıştır. PHEMA-pABSA 246,35 °C sıcaklıkta hızlı bir şekilde bozunmaya başlamıştır. DSC analizi azot atmosferinde gerçekleştiğinden yükseltgenme piki gözlenmemiştir. DSC eğrisi incelendiğinde 279,63 °C sıcaklıkta görülen endoterm termal degradasyon sebebiyle meydana gelmiştir.

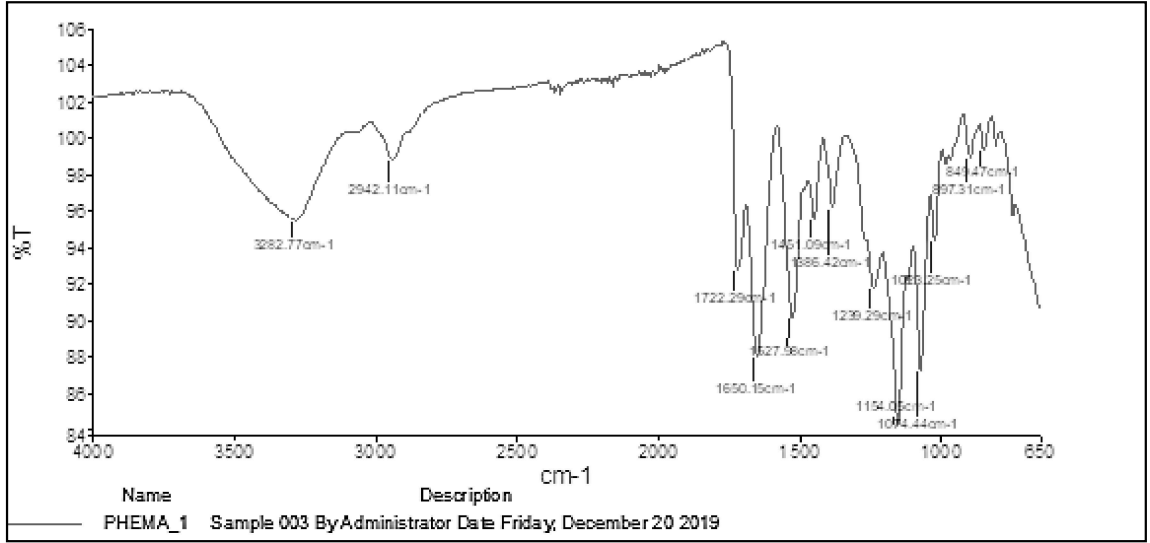


Şekil 3.57. PHEMA-pABSA DSC termogramı

DSC ve TG/DTG eğrileri kıyaslandığında PHEMA-pABSA'nın termal stabilitesi azalmıştır. T_g değerinde meydana gelen düşüş PHEMA yapısına oranla daha sert ve kırılkan bir polimer yapısına işaret etmektedir.

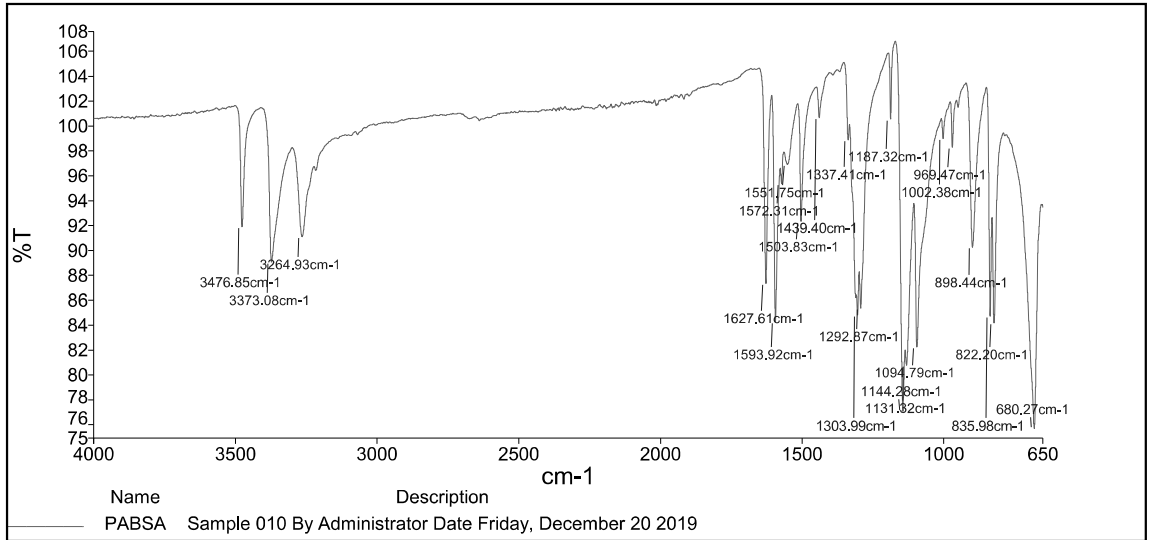
3.5.3. PHEMA, PHEMA-pABSA kriyojellerinin ve pABSA molekülünün FT-IR ile karakterizasyon bulguları

PHEMA kriyojel örneğine ait FT-IR spektrumu Şekil 3.58'de gösterilmiştir. Şekil 3.58'de verilen PHEMA kriyojelinin FT-IR spektrumu incelendiğinde, yapıda bulunması gereken fonksiyonel gruplara ait bantlar $3282,77\text{ cm}^{-1}$ 'de O-H gerilme titreşimi, $2942,11\text{ cm}^{-1}$ 'de C-H gerilmesi, $1722,29\text{ cm}^{-1}$ 'deki güçlü absorpsiyon bandı ester grubuna ait C=O gerilmesini göstermektedir. Bunun yanı sıra $1650,15\text{ cm}^{-1}$ 'deki güçlü absorpsiyon bandı MBAAm yapısındaki C=O gerilmesi, $1527,98\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen güçlü absorpsiyon bandı MBAAm yapısındaki N-H gerilmesi, $1451,09\text{ cm}^{-1}$ 'de C-H eğilme titreşimi, $1239,29\text{ cm}^{-1}$ 'deki orta şiddetli absorpsiyon bandı MBAAm yapısındaki C-N gerilme titreşimi ve $1154,06\text{ cm}^{-1}$ 'de güçlü absorpsiyon bandı ester yapısındaki C-O gerilme titreşimi olarak yorumlanmıştır.



Şekil 3.58. PHEMA kriyojeline ait FT-IR spektrumu

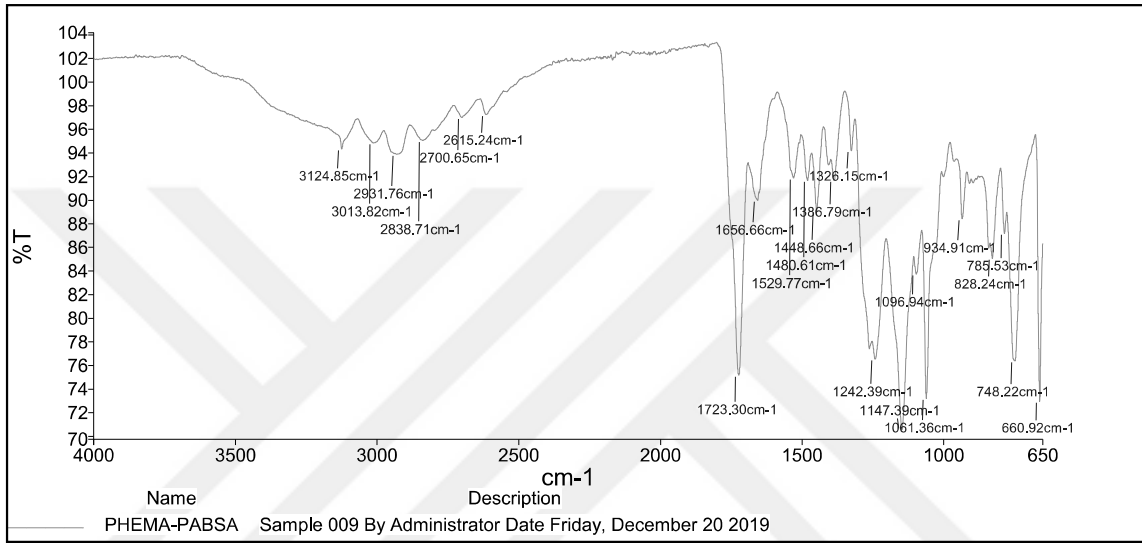
Şekil 3.59’da pABSA molekülüne ait FT-IR spektrumu gösterilmiştir. Şekil 3.59’da verilen pABSA’nın FT-IR spektrumu incelendiğinde, bu moleküle ait 3476,85 cm^{-1} ve 3373,06 cm^{-1} ’deki keskin orta şiddetteki bandlar N-H gerilme titreşimini göstermektedir. Bunun yanı sıra 1337,40 cm^{-1} ’deki bant sülfonamid yapısındaki S=O gerilme titreşimi ve 1292,87 cm^{-1} ’deki bant C-N gerilme titreşimi olarak yorumlanmıştır.



Şekil 3.59. pABSA molekülüne ait FT-IR spektrumu

PHEMA-pABSA kriyojeline ait FT-IR spektrumu şekil 3.60’ta gösterilmiştir. Şekil 3.60’ta verilen FT-IR spektrumu incelendiğinde, PHEMA yapısından gelen 1723,30 cm^{-1} ’deki güçlü absorbsiyon bandı ester grubuna ait C=O gerilmesi, 1656,66

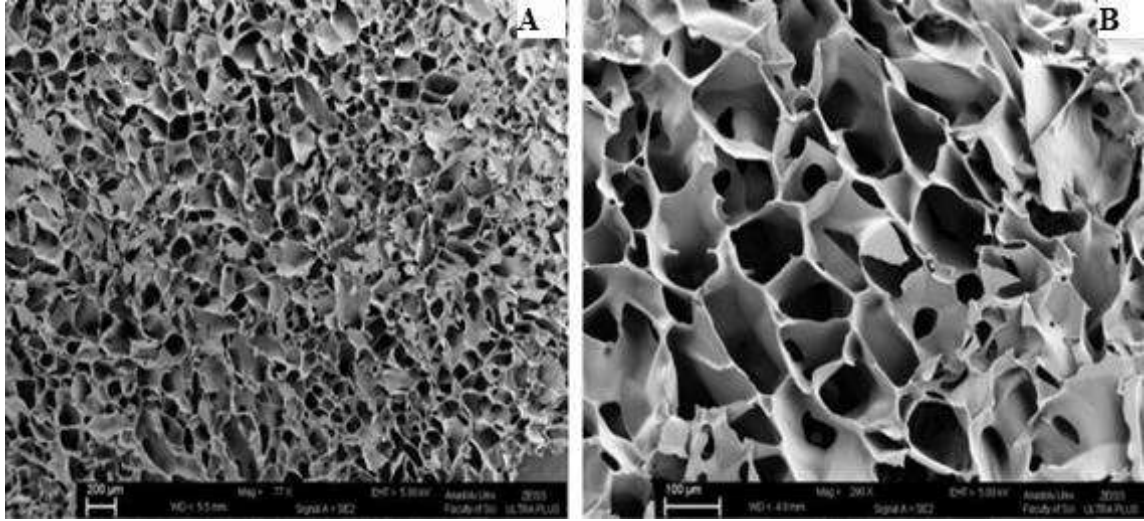
cm^{-1} 'deki güçlü absorpsiyon bandı PHEMA-pABSA yapısında bulunan sekonder amide ait $\text{C}=\text{O}$ gerilmesini göstermektedir. $1326,15 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülen absorpsiyon bandı sülfonamide ait $\text{S}=\text{O}$ gerilme titreşimi olarak yorumlanmıştır. PHEMA (Şekil 3.58) ve pABSA (Şekil 3.59) FT-IR spektrumları göz önüne alındığında karakteristik bantların titreşimleri görülmüş olup pABSA'nın PHEMA'ya kovalent olarak bağlandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.60. PHEMA-pABSA kriyojeline ait FT-IR spektrumu

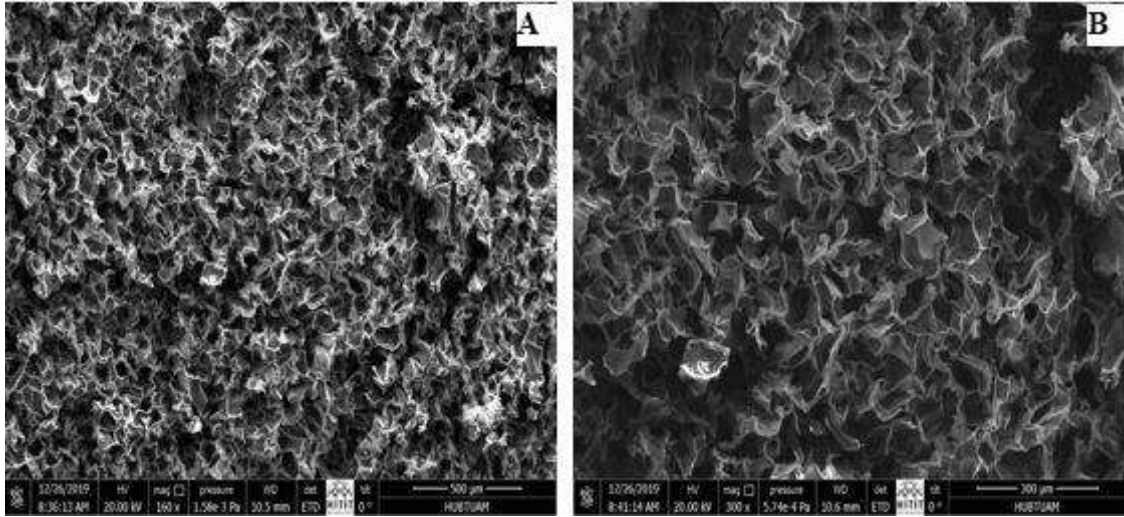
3.5.4. PHEMA ve PHEMA-pABSA kriyojellerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu bulguları

PHEMA kriyojeline ait farklı büyütme ile yapılan SEM görüntüleri Şekil 3.61'de gösterilmiştir. Şekilde verilen SEM görüntüleri incelendiğinde, makro gözenekli kriyojelin olduğu ve duvar yapılarının düz olduğu gözlemlenmektedir.



Şekil 3.61. PHEMA kriyojeline ait SEM görüntüsü; 77X, 5kV (A) 290X, 5kV (B)

PHEMA-pABSA kriyojeline ait farklı büyütme (160 ve 300X) ile yapılan SEM inceleme görüntüleri Şekil 3.62’de gösterilmiştir. Şekil 3.62’deki PHEMA-pABSA kriyojeline ait farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri incelendiğinde, gözenek yapılarının homojen dağıldığı ve her gözenek duvarının pürüzsüz bir yapıda olduğu gözlenmiştir. PHEMA-pABSA kriyojeline ait gözenek boyutları 35,84-59,79 µm olarak belirlenmiş olup kriyojelin makro gözenekli olduğu gözlenmiştir.

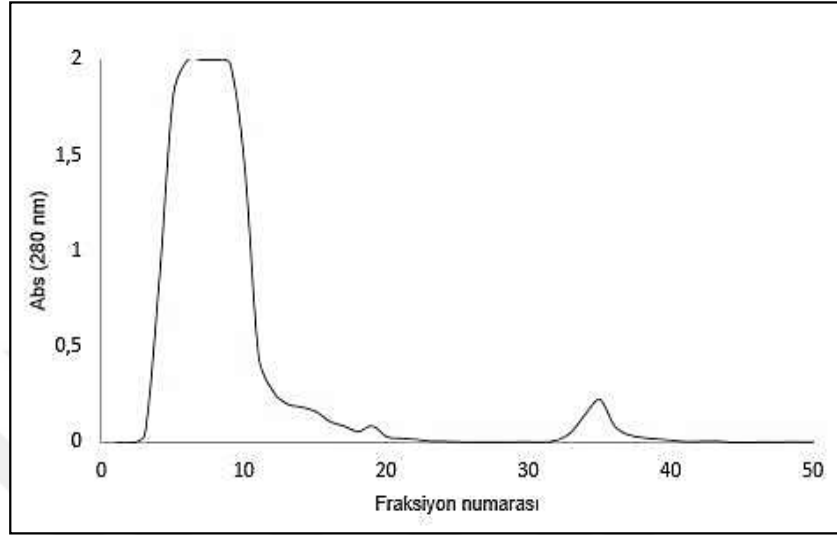


Şekil 3.62. PHEMA-pABSA kriyojeli SEM görüntüsü; 160X, 20 kV (A), 300X, 20kV (B)

3.5.5. CA enziminin PHEMA-pABSA kriyojeli ile saflaştırılması bulguları

CA enziminin PHEMA-pABSA kriyojel kolonuyla saflaştırılmasına ilişkin kromatogram Şekil 3.63’te gösterilmiştir. Şekil 3.63’teki kromatogram incelendiğinde

absorbsiyonun yüksek olduğu tüm fraksiyon grupları incelenmiştir. $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{NaClO}_4$ (0,1/0,5 M pH 5,6) elüsyon tamponu ile elüe edilen 33-38 numaralı fraksiyonlarda en yüksek spesifik aktiviteye rastlanmıştır.



Şekil 3.63. CA enziminin PHEMA-pABSA kriyojel kolonuyla saflaştırılması kromatogramı

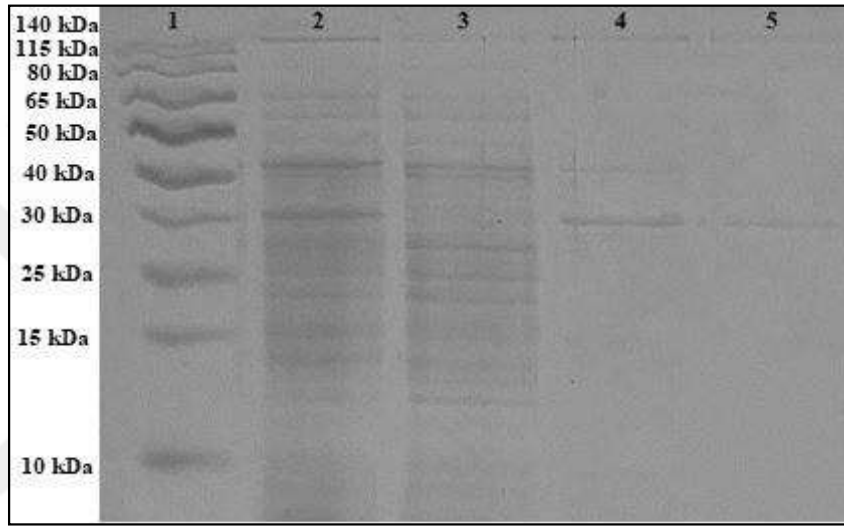
CA enziminin saflaştırılma aşamalarındaki saflaştırma verileri Şekil 3.64'te gösterilmiştir. Şekil 3.64'te verilen CA saflaştırma tablosuna ilişkin veriler incelendiğinde eritrositlerin parçalanması sonucu ortamda Hb içeriği çok yoğun olduğu için protein miktarı 44,442 mg/ml olarak ölçülmüş olup CA'nın toplam aktivitesi 869 U olarak belirlenmiştir. Organik çözücü ekstraksiyonu ile protein miktarı 0,245 mg/ml olarak ölçülüp toplam CA aktivitesi 817 U olarak belirlenmiştir. PHEMA-pABSA kriyojel kolonundan elde edilen 5 fraksiyondaki protein derişimi 0,054 mg/ml olarak ölçülmüş olup toplam CA aktivitesi 278 U olarak bulunmuştur. Saflaştırma sonucu spesifik aktivite 0,489 U/mg'dan 129 U/mg'a çıkmış olup saflaştırma katsayısı 263 ve saflaştırma verimi %32 olarak hesaplanmıştır.

Örnek	Aktivite (U/ml)	Protein derişimi (mg/ml)	Spesifik aktivite (U/mg)	Toplam aktivite (U)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
Hemolizat	21,739	44,442	0,489	869,565	1	100
Çözücü ekstraktı	20,435	0,245	83,560	817,391	170,824	94
PHEMA-pABSA	6,957	0,054	129,033	278,261	263,784	32

Şekil 3.64. CA enzimi saflaştırılma verileri

3.5.6. SDS-PAGE ile CA enziminin karakterizasyonu bulguları

CA enziminin saflaştırılma basamaklarında elde edilen numunelerin SDS-PAGE fotoğrafı şekil 3.65'te gösterilmiştir. Şekil 3.65'deki SDS-PAGE görüntüsünde, 1. hat protein marker, 2. hat hemolizat, 3. hat filtre edilmiş hemolizat, 4. hat H₂O:C₂H₅OH:CHCl₃ (0,6:0,4:0,5, v:v:v) organik çözücü karışımı ile ekstrakte edilmiş CA enzimi ve 5. hat PHEMA-pABSA kriyojel kolon ile saflaştırılmış CA enzimini göstermektedir.



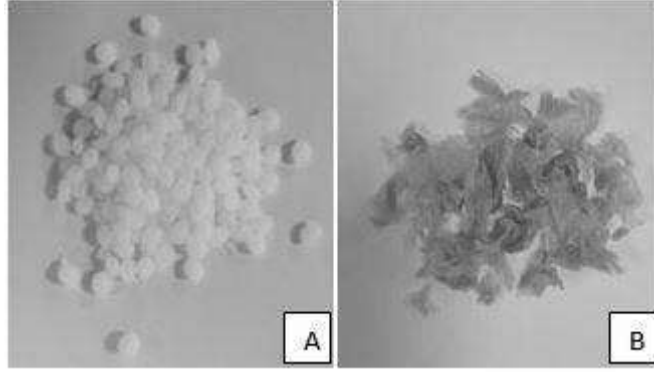
Şekil 3.65. SDS-PAGE analizi

PHEMA-pABSA kriyojel kolon ile CA enzimi saf bir şekilde elde edilmiş olup molekül ağırlığı ~30 kDa civarında bulunmuştur.

3.6. Yapay oksijen taşıyıcı P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX sisteminin sentezi, karakterizasyonu ve kullanılabilirliğinin araştırılması bulguları

3.6.1. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) sentezi verim bulguları

PCL (Şekil 3.66-A) ve klorobis(2-2'-bipiridil)MATyr-Ru(II) arasında gerçekleşen reaksiyon sonucunda 4,864 g pembe renkli P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) (Şekil 3.66-B) elde edilmiştir.



Şekil 3.66. *PCL (A) ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) (B)*

Reaksiyon verimi %97 olarak hesaplanmış olup verimdeki kaybın ekstraksiyon işleminden olduğu düşünülmektedir.

3.6.2. Sentezlenen monomerlerin $^1\text{H-NMR}$ bulguları

3.6.2.1. *MATyr için $^1\text{H-NMR}$ bulguları*

^1H (500 MHz, DMSO- d_6), δ : 7,35 (d, $J = 8,05$ Hz, 2H), 7,05 (d, $J = 8,40$ Hz, 2H), 6,29 (s, 1H), 5,90 (s, 1H), 3,15 (dd, $J = 4,49, 14,25$ Hz, 1H), 3,02 (dd, $J = 4,02, 14,12$ Hz, 1H), 2,90 (dd, $J = 7,75, 14,20$ Hz, 1H), 2,00 (s, 3H) ppm.

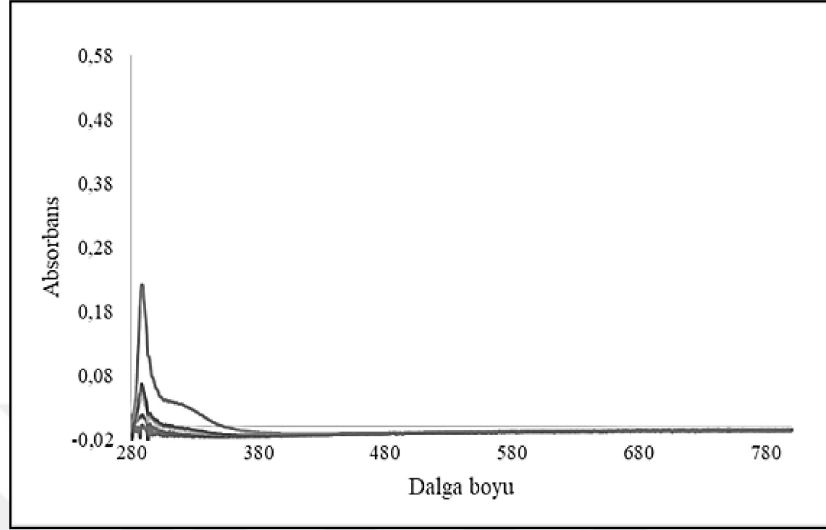
3.6.2.2. *Klorobis(2-2'-bipiridil)MATyr-Ru(II) için $^1\text{H-NMR}$ bulguları*

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ : 9,7 (d, 4H, $^3J = 5,08$ Hz), 8,56 (d, 4H, $^3J = 7,92$ Hz), 7,92 (t, 4H, $^3J = 7,82$ Hz), 7,3 (t, 1H, $^3J = 7,4$ Hz), 7,23 (t, 2H, $^3J = 7,47$ Hz), 7,18 (d, 2H, $^3J = 7,46$ Hz), 7,12 (t, 4H, $^3J = 6,30$ Hz), 5,3 (d, 1H, $^2J = 1,52$ Hz), 5,3 (d, 1H, $^2J = 1,54$ Hz), 1,8 (s, 3H) ppm.

3.6.3. PCL ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) için UV-VIS spektroskopisi bulguları

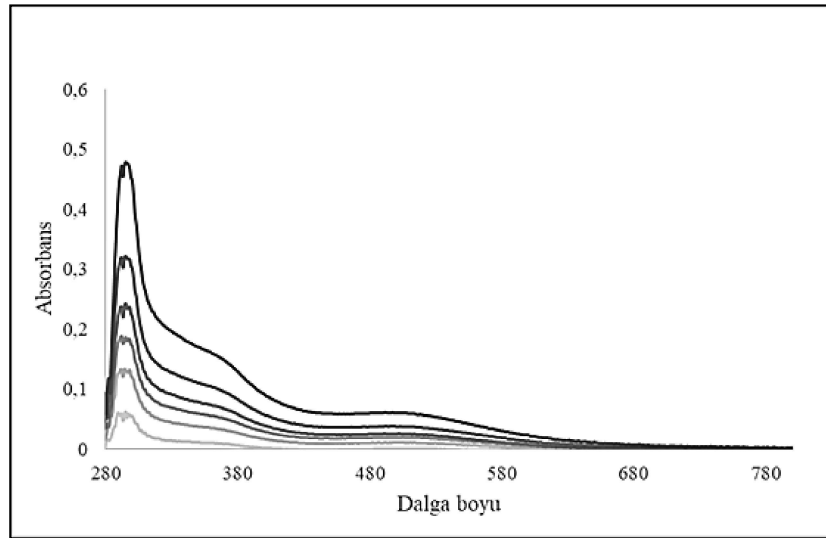
PCL ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)'ın CHCl_3 'de farklı derişimlerdeki çözeltileri hazırlanıp spektrofotometre yardımıyla Şekil 3.67 ve Şekil 3.68'de görülen spektrumları elde edilmiştir. Şekil 3.67'deki PCL'nin CHCl_3 içerisindeki absorpsiyon spektrumu incelendiğinde, 290 nm civarında derişime bağlı absorpsiyon artışı

gözlenmiştir. 310 nm ile 350 nm arasında yüksek derişimlerde absorbsiyon piki gözlenmiştir.



Şekil 3.67. PCL'nin absorbsiyon spektrumu

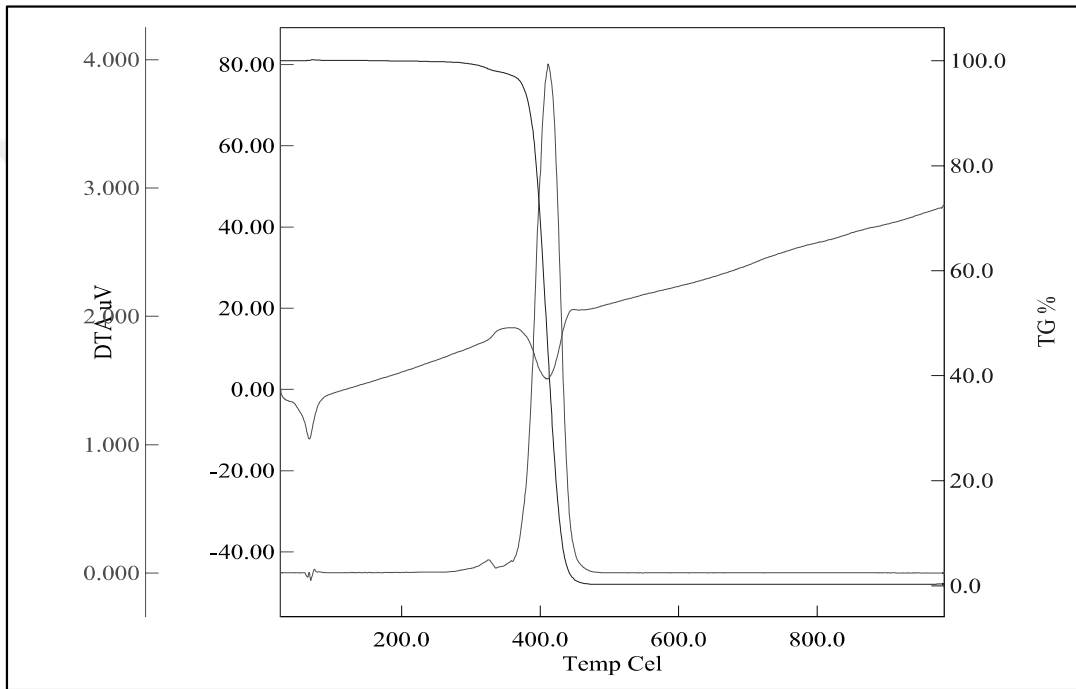
Şekil 3.68'deki $P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)$ 'nin $CHCl_3$ içerisindeki absorbsiyon spektrumu incelendiğinde, yapısındaki PCL'den dolayı 290 nm civarında ve 310 nm ile 350 nm arasındaki absorbsiyon pikleri gözlenmiş olup şiddetlerinde artış gözlenmiştir. 520 nm civarında görülen absorbsiyon pik yapıya katılan $bis(2-2'-bipiridil)MATyr-Ru(II)$ 'den kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.68. $P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)$ 'nin absorbsiyon spektrumu

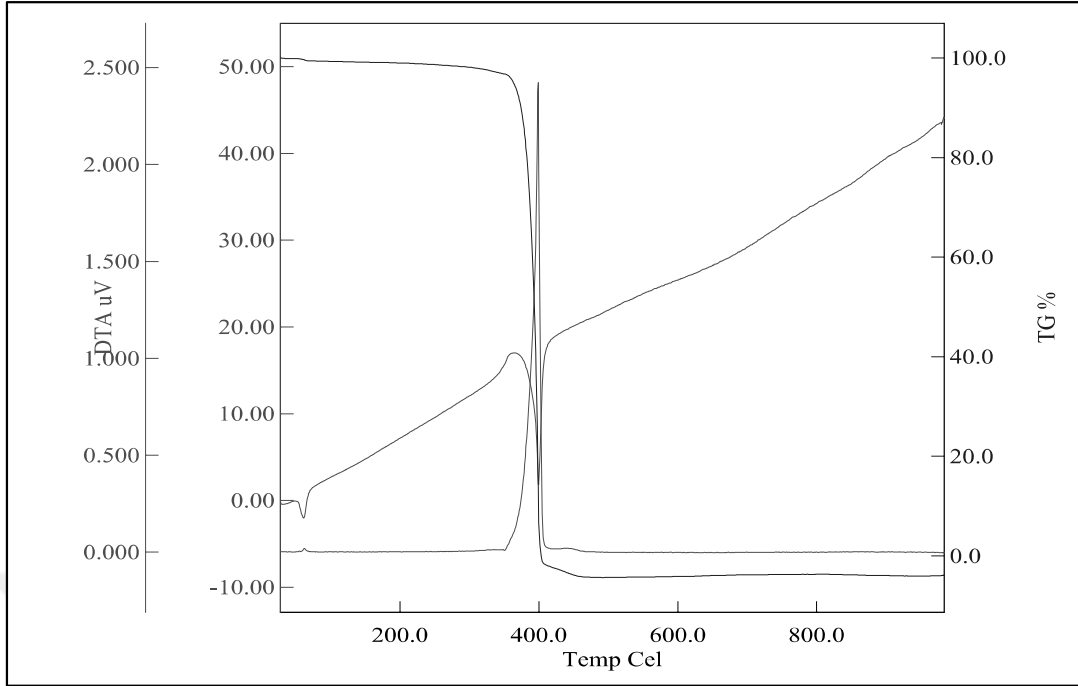
3.6.4. PCL ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) için termal gravimetrik analiz bulguları

PCL'nin TG/DTG termogramı şekil 3.69'da gösterilmiştir. Şekil 3.69'daki PCL'nin termogramı incelendiğinde 300 °C'ye kadar degradasyon izlenmemiştir. DTG eğrisinde degradasyonun tek basamakta gerçekleştiği görülmekte olup PCL'nin %95'inden daha fazlası degradasyona uğramıştır. 412,1 °C'de bozunma hızı %24,33/dk olarak hesaplanmıştır.



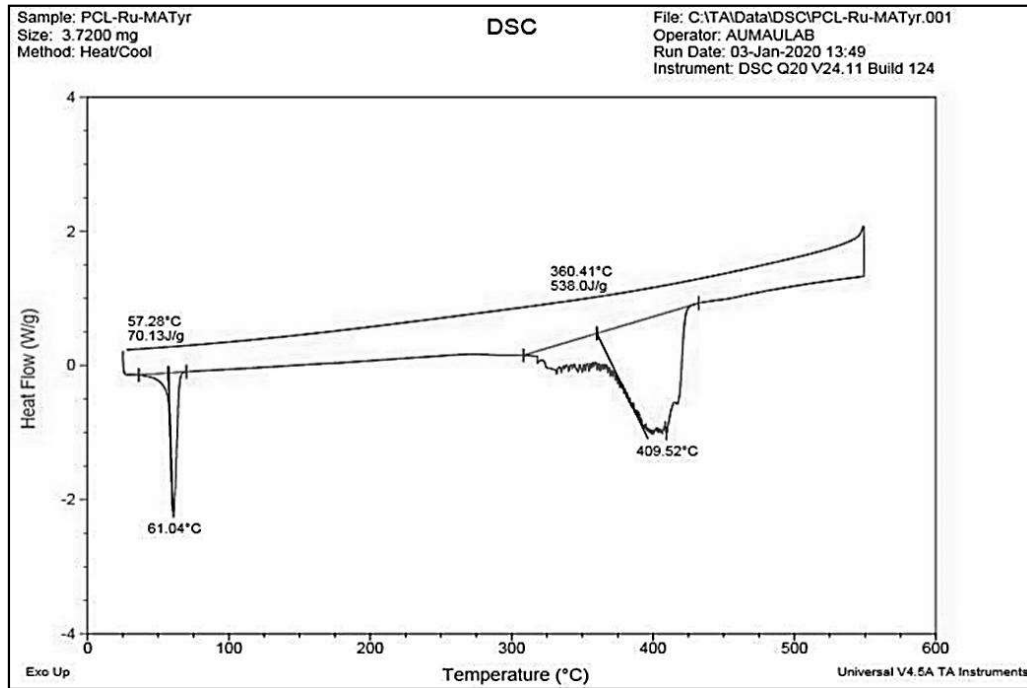
Şekil 3.69. PCL'nin TG/DTG termogramı

P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)'nin TG/DTG termogramı şekil 3.70'de gösterilmiştir. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)'nin TG/DTG termogramı şekil 3.70'de gösterilmiştir. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)'nin termogramı incelendiğinde, 352,9 °C'ye kadar %3,3'ü degradasyona uğramış olup 402,8 °C sıcaklıkta P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)'nin %99,5'i degrede olmuştur. DTG eğrisi incelendiğinde 399,2 °C'de kütle kaybı %68,83/dk olarak hesaplanmış olup PCL ile kıyaslandığında degradasyon hızında belirgin artış gözlenmiştir. PCL ile kıyaslandığında degradasyon sıcaklığında 51,2 °C'lik bir düşüş gözlenmekte olup bu durumun P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) bağlanmadan önce serbest -OH uçları oluşturmak amacıyla polimerin hafif alkali hidrolizi sonucu meydana gelen zincir kısalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 3.70. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)* 'nin TG/DTG termogramı

Literatür bilgileri ışığında PCL'nun erime sıcaklığı 59-60 °C arasında değişmekte olup *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)*'nin 61,04 °C olarak bulunmuştur. Şekil 3.71 incelendiğinde, *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)* için T_g değeri 57,28 °C olarak bulunmuş olup ΔH_e 70.13 J/g olarak hesaplanmıştır.



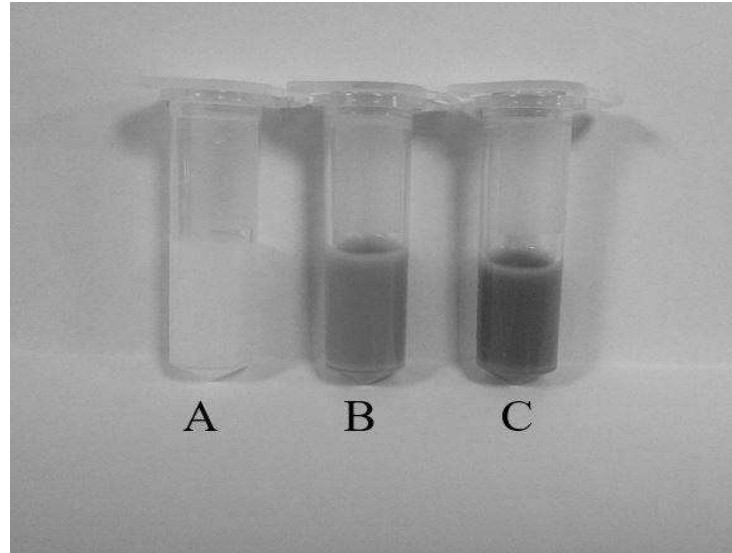
Şekil 3.71. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)* 'nin DSC termogramı

Bu veriler ışığında, P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) ile oluşturulmuş P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX vücut sıcaklığında (36-38 °C) sertliğini, şeklini koruyabilecektir.

3.6.5. ANADOLUCA ve çift çözücü buharlaştırma tekniği ile P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanopartiküllerinin sentezi bulguları

3.6.5.1. Yapay oksijen taşıyıcı nanopartiküllerin görüntüleri

P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) kullanılıp sentezlenen P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) ve EDC/NHS ile Fe³⁺-Protoporfirin IX bağlanıp sentezlenen P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX şekil 3.72'de gösterilmiştir. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) ile sentezlenen boş nanopartiküller beyaz ve opak görünümlü olmuştur (Şekil 3.72-A). P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanopartikülleri pembe-turuncu ve opak görünümlü (Şekil 3.72-B) ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanopartikülleri (Şekil 3.72-C) kahverengi-yeşil renkli görünüme sahip olmuştur.

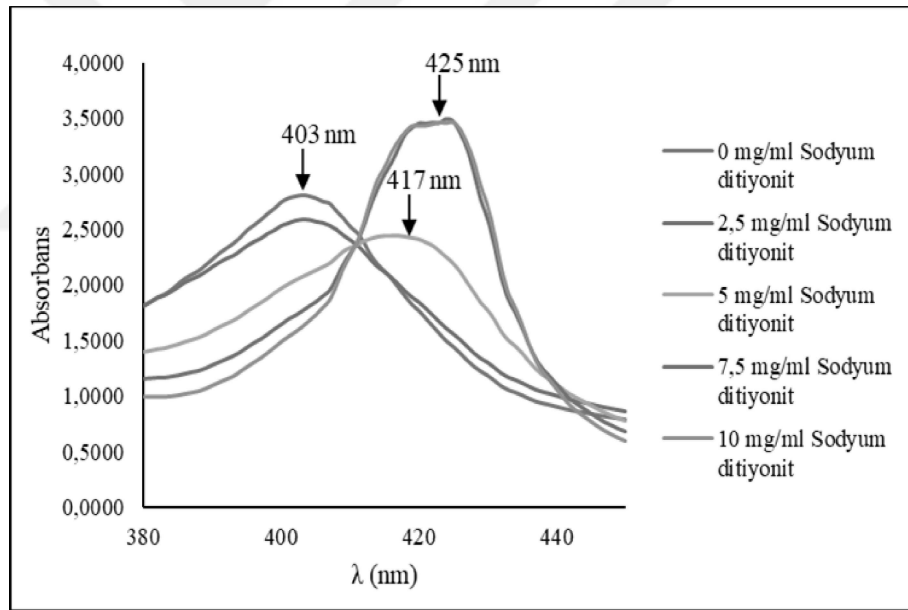


Şekil 3.72. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) ile sentezlenen boş nanopartiküller (A), P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) (B), P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX (C)

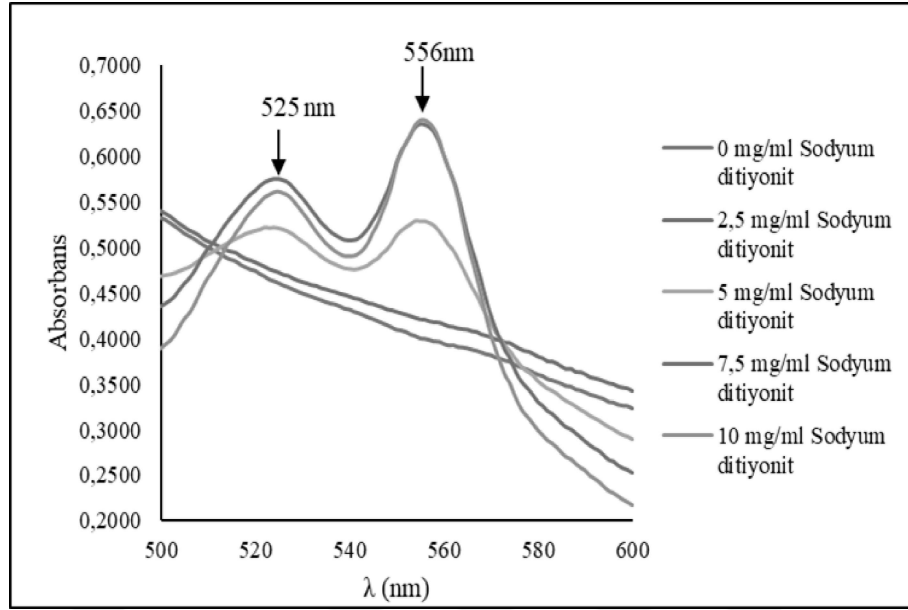
3.6.5.2. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX* nanopartiküllerin indirgenmesi bulguları

P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX yapay sisteminde Hb(Fe³⁺) ve Fe³⁺-Protoporfirin IX'un sodyum ditiyonitin farklı derişimleri ile indirgenmesine ilişkin Soret bantları gösteren absorbsiyon spektrumu şekil 3.73'de ve Q bantlarını göstere absorbsiyon spektrumu şekil 3.74'de gösterilmiştir.

Şekil 3.73 incelendiğinde, P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanopartiküllerinin 403 nm'de bir soret bandı meydana getirdikleri görülmüştür. Sodyum ditiyonitin farklı derişimleri ile indirgenen P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanopartiküllerinin P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX nanopartiküllerine dönüşüm sonrası soret bandı 425 nm'ye kaymıştır.



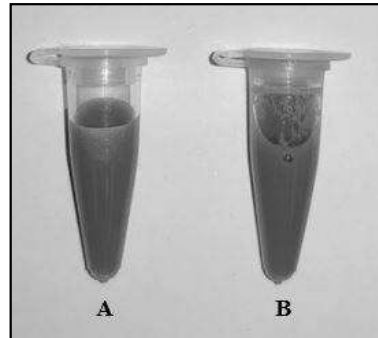
Şekil 3.73. Sodyum ditiyonit ile *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX* nanopartiküllerinin indirgenmesi (380-450 nm)



Şekil 3.74. Sodyum ditiyonit ile *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX* nanopartiküllerinin indirgenmesi (500-600 nm)

Şekil 3.74 incelendiğinde, *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX* nanopartiküllerine ait Q bantları gözlenmemiştir. 5 mg/ml ve daha üstü derişimlerde sodyum ditiyonit ile indirgenme sonrası oluşan *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX* nanopartiküllerinde 525 ve 556 nm'de Q bantları ortaya çıkmıştır.

P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanopartiküllerinin indirgenme öncesi ve sonrasına ilişkin görsel şekil 3.75'de gösterilmiştir. Şekil 3.75 incelendiğinde, kahverengi olan nanopartiküllerinin rengi indirgenme sonrası kırmızı-kahverengine dönmüştür. 5 mg *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX* nanopartikülü için 7,5 mg/ml'lik sodyum ditiyonit derişimi yeterli gelmiştir.

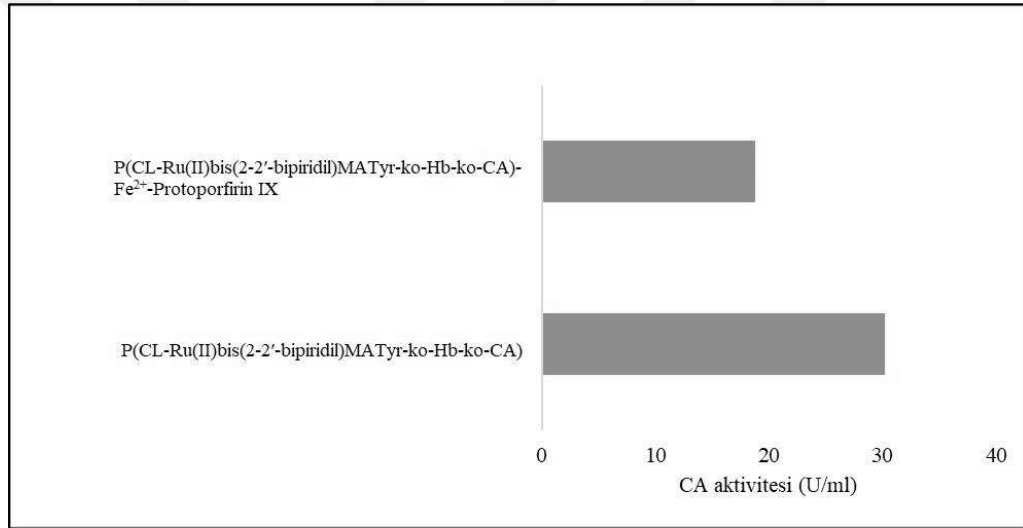


Şekil 3.75. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX* (A), *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX* (B)

3.6.5.3. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX* nanopartiküllerinin CA aktivitesi bulguları

P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX nanokürelerinin CA aktiviteleri şekil 3.76'da gösterilmektedir.

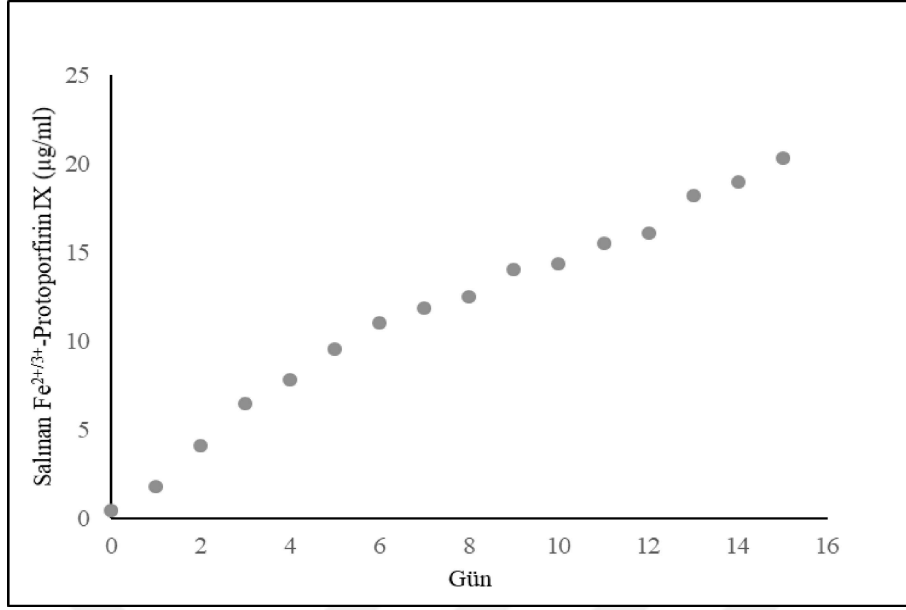
Şekil 3.76 incelendiğinde, P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX nanokürelerinin CA aktiviteleri, sırasıyla 30,23 ±1,7 ve 18,83 ±1,2 olarak bulunmuş olup EDC/NHS aktivasyonu ile Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX bağlanmasından sonra CA enzim aktivitesi düşmüştür.



Şekil 3.76. PCL tabanlı nanokürelerin CA aktivitesi

3.6.5.4. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX* nanopartiküllerinden Fe²⁺-Protoporfirin IX salınımı bulguları

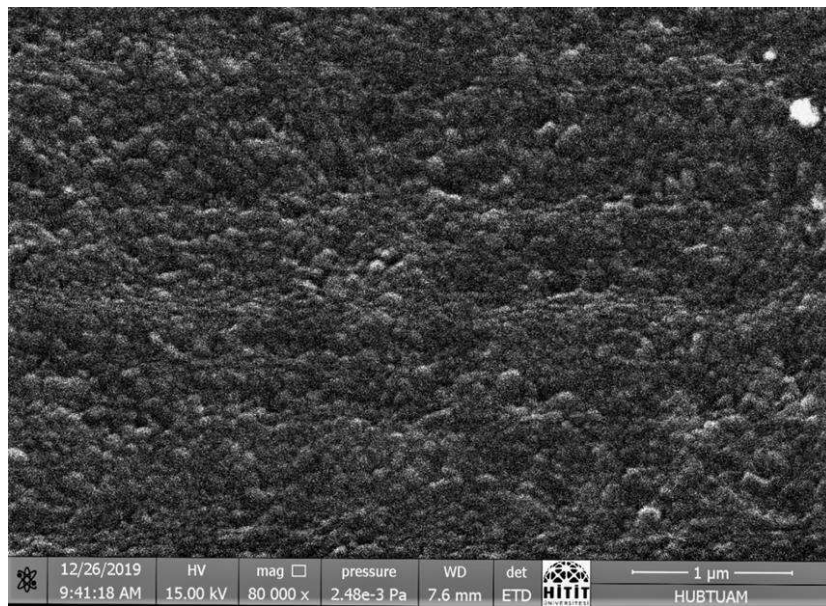
P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX nanopartiküllerinden Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX molekülünün salınımı şekil 3.77'de gösterilmiştir. Şekil 3.77'deki salınım grafiği incelendiğinde salınan Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX, o güne kadar olan toplam salınımı ifade etmekte olup 15. günün sonunda 20,29 (µg/ml) Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX salınımı gerçekleşmiştir.



Şekil 3.77. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX'dan Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX salınımı*

3.6.5.5. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanopartiküllerinin SEM bulguları*

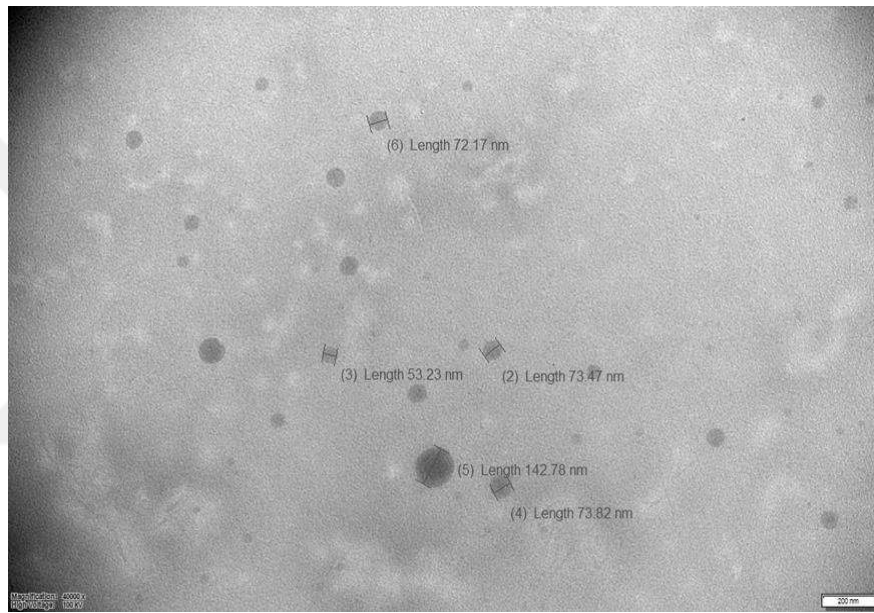
P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanopartiküllerinin SEM görüntüsü şekil 3.78'de gösterilmiştir. Şekil 3.78'deki SEM görüntüleri incelendiğinde, küre biçiminde, sınırlar belirgin 50-100 nm arasında değişen küre çapına sahip nanopartiküller gözlenmiştir.



Şekil 3.78. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80000X, 15 kV)*

3.6.5.6. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)* ve *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX* nanopartiküllerinin TEM bulguları

P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) nanopartiküllerinin TEM ile yapılan aydınlık alan inceleme görüntüsü şekil 3.79'da gösterilmiştir. Şekil 3.79'daki P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) yapay kan hücresinin TEM görüntüsü incelendiğinde, küre biçiminde, 53-143 nm arasında değişen nanopartikül çapı görülmüştür. Görüntülerde agregasyon ya da aglomerasyon bulgusuna rastlanmamıştır.



Şekil 3.79. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)* nanopartiküllerinin TEM görüntüsü (40000X, 100 kV)

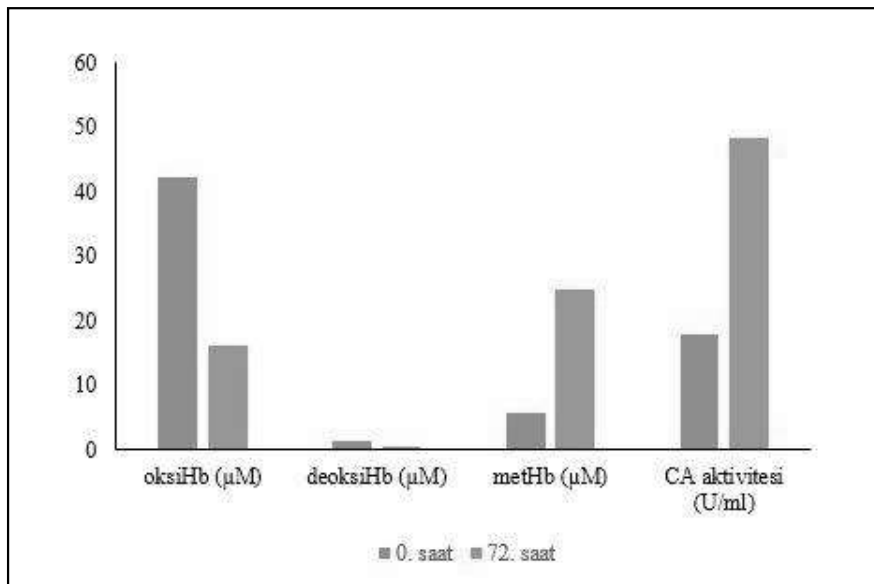
P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX nanopartiküllerinin TEM ile yapılan aydınlık alan inceleme görüntüsü şekil 3.80'de gösterilmiştir. Şekil 3.80'deki P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX nanopartiküllerinin TEM görüntüsü incelendiğinde, küre biçiminde, dış kabuk yapısında bozulmalar mevcut olup büyük çoğunluğu 200 nm'nin altında nanopartiküller gözlenmiştir. Küreler arasında sınırlar mevcut olsa da kümeleşmeler gözlenmiştir. Bu durum aglomerasyonu düşündürmekte olup numune hazırlanmadan önce çökme gerçekleşmemiştir.



Şekil 3.80. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺/³⁺-Protoporfirin IX nanopartiküllerinin TEM görüntüsü (120000X, 100 kV)*

3.7. Sülük deneyleri bulguları

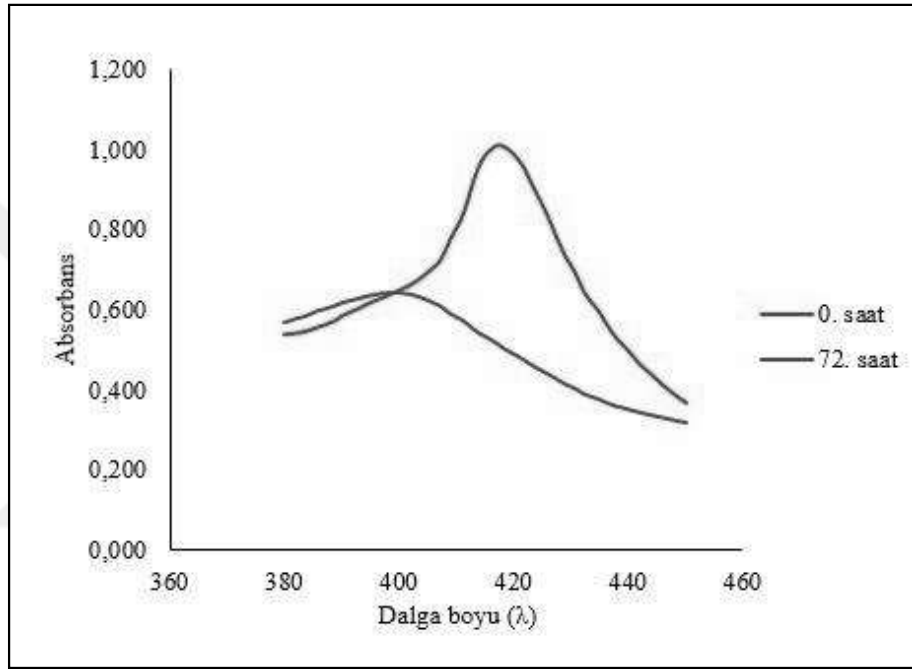
Hirudo verbana tarafından *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX* nanopartiküllerinin emilmesinden 72 s sonraki veriler şekil 3.81’de gösterilmektedir. Şekil 3.81 incelendiğinde, 72 s’lik süre sonunda oksihb ve deoksihb derişiminin azaldığı methb derişiminin ve CA enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir.



Şekil 3.81. *P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX nanopartiküllerinin Hirudo verbana üzerindeki etkisi*

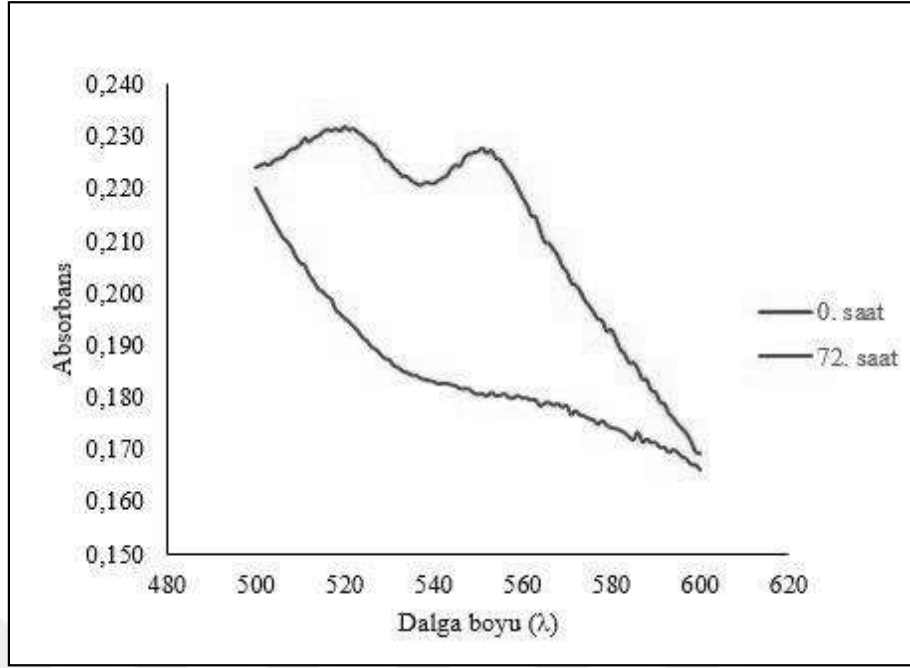
P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX)-albümin kompleksini alan *Hirudo verbana*'nın 72 saatlik süre sonundaki Fe²⁺-Protoporfirin IX'a ait soret bantları şekil 3.82'de gösterilmiştir.

Şekil 3.82 incelendiğinde, başlangıçta 418 nm'de görülen Fe²⁺-Protoporfirin IX'a ait soret bant 72 s'lik süre sonunda tamamen kaybolmuş olup Fe³⁺-Protoporfirin IX'a dönüşmüştür.



Şekil 3.82. P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX)'un *Hirudo verbana* üzerine etkisi

P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX)-albümin kompleksini alan *Hirudo verbana*'nın 72 saatlik süre sonundaki Fe²⁺-Protoporfirin IX'a ait Q bantları şekil 3.83'de gösterilmiştir. Şekil 3.83 incelendiğinde, başlangıçta 525 ve 556 nm'de görülen Fe²⁺-Protoporfirin IX'a ait Q bantları 72 s'lik süre sonunda tamamen kaybolmuş olup Fe²⁺-Protoporfirin IX yükseltgenmiştir.



Şekil 3.83. *P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX)*'un *Hirudo verbana* üzerine etkisi

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Kan, çok farklı özelliklere sahip vücudun her noktasındaki hücrelere ulaşan kompleks sıvı karışımdır. Yapay kan, kanın oksijen taşıma fonksiyonunu yerine getiren maddeler olarak tanımlanabilmekte olup Hb tabanlı veya sentetik bileşenlerden oluşabilir. Hb yapısında bulunan Fe^{3+} -Protoporfirin IX'un oksijen bağlayabilme özelliği, bu molekülün farklı formlarının yapay kan olarak kullanılmasındaki en büyük faktörlerden bir tanesidir.

Tez çalışmasının ilk bölümünde, nanoküre ortamında sürfaktan olarak kullanılabilecek maddelerin ve radikalik polimerizasyon başlatıcının (APS) sırasıyla, Hb denatürasyonu ve Hb türleri üzerine etkileri incelenmiş olup sentetik antioksidanlar varlığında bu etkileri en aza indirmek hedeflenmiştir. Literatürde, çift emülsiyon çözücü buharlaşma tekniğinde nanopartiküllerin stabilizasyonunun sağlanması amacıyla sentez ortamında sürfaktanlar kullanılmaktadır (Ding vd., 2019). SDS, sodyum kolat, N-lauroilsarkozin ve sodyum deoksikolat anyonik sürfaktanlarının CTAB katyonik sürfaktanının, Triton X-100, Tween 20 ve Tween 80 non-iyonik sürfaktanlarının Hb denatürasyonu üzerine etkisi $HDR_{(%)}$ üzerinden değerlendirilmiş olup denatürasyona en az sodyum kolatın sebep olduğu bulunmuştur. Sodyum kolatın %1 (a/h) derişimine karşılık $HDR_{(%)}$ değeri sadece % 5,38 $\pm$ 0,59 olarak hesaplanmış olup çift emülsiyon çözücü buharlaşma tekniğinde sürfaktan olarak bu madde kullanılmıştır. Literatürde, peroksidisülfat iyonunun Fe^{2+} iyonu ile stokiyometrik olarak yükseltgenme reaksiyonu verip Fe^{3+} iyonunun oluşmasına sebep olduğu bilinmektedir (Kolthoff, Medalia ve Raaen, 1951). Tez çalışmamızda, ANADOLUCA yöntemiyle nanopartiküllerinin sentezinde kullanılan APS'nin Hb(Fe^{2+}) üzerine yükseltgeyici etkisi incelenmiştir. Zaman bağımlı incelenen reaksiyonlarda oksihb ve deoksiHb seviyeleri düşerken metHb seviyesi yükselmiş olup literatür bilgisi ile paralellik göstermektedir.

Yapılan tez çalışmasının ikinci bölümünde, oksijeni tersinir bir şekilde bağlama özelliğine sahip P(HEMA-ko-MACys- Fe^{2+} -Protoporfirin IX) nanoküreler sentezlenmiştir. $Fe^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX molekülünün vinil grupları gibi polar olmayan yan zincirleri ile bağlanma bölgesindeki amino asitlerin hidrofobik etkileşimi sayesinde $Fe^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX-globin kompleksi protein yapısında stabil bir şekilde konumlanır (Fanelli, Antonini ve Caputo, 1964). Serbest halde bulunan $Fe^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX molekülünün vinil grupları açıkta olduğundan bir radikalik ajan varlığında tiyol grupları ile tiyo-ene reaksiyonu verebilir. Amino asit monomerlerinin en

önemli özelliği, kullanılacak platforma göre (kriyojel, nanopartikül, mikropartikül, hidrojel vb.) polimerleştirilebilir olmalarıdır. Tez çalışması kapsamında, tiyo-ene reaksiyonu esas alındığından amino asit monomeri olarak MACys seçilmiştir. MACys monomeri polimerleştirilebilir olması yanında serbest halde tiyol (-SH) grubu içermektedir.

Tez çalışmasında, emülsiyon polimerizasyonu tekniği ile kontrol grubu olarak çapı 84-173 nm arasında değişen PHEMA nanoküreleri ve çapı 79-158 nm arasında değişen P(HEMA-ko-MACys) nanoküreleri sentezlenmiştir. Literatürde, emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen PHEMA nanokürelerin 150 nm ortalama çapa sahip olduğu bildirilmiş olup çalışma verileri ile uyumlu bulunmuştur (Öztürk vd.,2008). Literatürde, P(HEMA-ko-MACys) nanokürelerinin sentezine ilişkin ürik asit baskılanmış (PHEMA-MAC)-Fe³⁺ nanoküreleri sentezlenmiş olup ortalama çaplarının 100 nm civarında olduğu bildirilmiştir (Sarıkaya vd., 2017).

PHEMA, P(HEMA-ko-MACys) ve P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin T_g değerleri, sırasıyla 96,67, 101,06 ve 64,04 °C olarak bulunmuştur. MACys monomerinin yapıya katılmasıyla birlikte zincirler arası hidrojen bağı oluşumunun artmasından dolayı T_g değerinde artış meydana gelmiştir. P(HEMA-ko-MACys) yapısına tiyo-ene reaksiyonu ile bağlanan Fe³⁺-Protoporfirin IX'un hidrofobik yapısından dolayı zincirler arasındaki hidrojen bağı miktarını azaltıp T_g değerini düşürmüştür. Literatürde, P(HEMA-ko-MACys) ve P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerine ait termogravimetrik analiz sonucu mevcut değildir. Ancak, PHEMA nanopartikülleri ve kompozitleri ile yapılan DSC analizi sonucunda PHEMA'ya ait T_g değeri 92 °C olarak bulunmuş olup (Benlikaya, Alkan ve Kaya, 2009) bizim çalışmamız ile benzerlik göstermektedir. PHEMA, P(HEMA-ko-MACys) ve P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-Protoporfirin IX) nanokürelerinin termal bozunmalarının en yüksek olduğu sıcaklıklar, sırasıyla, 275,5-475,2 °C, 303,7-480,5 °C ve 298,1-460,3 °C'tir. PHEMA yapısına kovalent olarak MACys katılmasıyla hidrojen bağı oluşumu arttığından termal bozunma sıcaklığı artmıştır. Her üç nanokürenin de 480 °C'ye %90'ı degradasyona uğramıştır. Literatürde, PHEMA'nın termal bozunmasının 190-405 °C aralığında gerçekleştiği ve %95'inin degradasyona uğradığı bildirilmiştir (Demirelli, Coşkun ve Kaya, 2001). Termal degradasyon değerleri tez çalışmamızdaki PHEMA ile benzerlik göstermekte olup P(HEMA-ko-MACys) ve P(HEMA-ko-MACys-Fe³⁺-

Protoporfirin IX) nanokürelerine ait literatür bilgisi bulunamadığından kıyaslanamamıştır.

Fe^{3+} -Protoporfirin IX'un P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerine tiyo-ene reaksiyonu ile bağlanmasının Langmiur izotermine uyduğu belirlenmiştir. Fe^{3+} -Protoporfirin IX'un P(HEMA-ko-MACys) nanopartiküllerine maksimum bağlanma kapasitesi, Q_{maks} , 65,3 $\mu\text{M}/\text{mg}$ ve Langmiur sabiti 187,54 μM olarak hesaplanmıştır. P(HEMA-ko-MACys) nanopartikül yüzeyindeki bağlanma bölgeleri (-SH) sınırlı olup tek tabaka bağlanma olduğu düşünülmektedir. PHEMA nanokürelerin Q değeri Fe^{3+} -Protoporfirin IX derişiminin artmasıyla önemli bir değişiklik göstermemiştir. Küçük miktarlardaki bağlanmaların ikincil etkileşimler vasıtasıyla olduğu düşünülmektedir. Literatürde, MACys veya L-sisteinin Fe^{3+} -Protoporfirin IX'a tiyo-ene reaksiyonu ile bağlanma parametrelerini içeren çalışmaya rastlanmadığından bağlanma parametreleri kıyaslanamamıştır.

Serbest $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX, fizyolojik şartlarda oksijeni geri dönüşümlü olarak bağlayamaz. Ancak sentetik heme bileşiklerinden tetrafenilporfinato demir (II)'nin serum albumini ile kompleks oluşturup oksijeni tersine çevrilir bir şekilde bağlayıp bırakabildiği gösterilmiştir (Komatsu vd., 1998). Bu bağlamda, sentezlenen P(HEMA-ko-MACys- $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX) nanokürelerinin oksijeni tersinir bir şekilde bağlayıp bırakabilmesi insan serum albumini ile kompleks oluşturmaya bağlı olduğu düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada, stokiyometrik olarak 1:1 oranında olan heme/albumin bağlanmasında albuminin floresansının ciddi oranda sönümlendiği bildirilmiştir (Kamal ve Behere, 2005). Tez çalışması kapsamında, florimetrik titrasyon ile yapılan insan serum albumini bağlama deneyi sonucunda, 2,13 μg P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanokürelere 1 μmol albumin bağlanmıştır. Literatürde, doğrudan P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanokürelere albumin bağlama çalışması yoktur. Ancak, sentezlenen P(HEMA-ko-MACys- Fe^{3+} -Protoporfirin IX) nanokürelerinin yüksek albumin bağlama kapasitesine sahip olduğu, yapıdaki $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX'un albumin yapısındaki amino asitlerle kompleks oluşturabildiği ve biyolojik özelliğini koruduğu gösterilmiştir.

Tez çalışmasının üçüncü bölümünde, yapay kan bünyesinde CO_2 metabolizmasını kontrol etmesi amacıyla CA enziminin saflaştırılması için kromatografik materyal geliştirilmiştir. CA enzimi için bilinen en iyi inhibitörlerden biri pABSA'dır (Meldrum ve Roughton, 1933). pABSA, CDI ile aktive edilmiş makro gözenekli PHEMA kolon

matriksine $-NH_2$ grubundan kolay bir şekilde bağlanmıştır. Eritrositlerin parçalanması, organik çözücü ekstraksiyonu ve PHEMA-pABSA kriyojel kolonundan saflaştırma sonucunda elde edilen CA enziminin spesifik aktivitesi 129 U/mg, saflaştırma katsayısı 263 ve saflaştırma verimi %32 olarak hesaplanmıştır. Literatürde, CA enziminin saflaştırılmasına ilişkin çok sayıda çalışma mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, pABSA molekülü, amid bağlarıyla ticari EUPERGITR C250L matriks materyaline (oksiran grupları aracılığıyla) bağlanmıştır. Bu materyal aracılığıyla, insan CA enzimi 258 kat, sığır CA enzimi 478 kat saflaştırılmıştır (Ozensoy, Arslan ve Sinan, 2004). Tez çalışmamızda bulunan saflaştırma değerleri, aynı inhibitör ile hazırlanan EUPERGITR C250L matriks materyali ile yapılan saflaştırma sonuçlarıyla büyük benzerlik göstermektedir. Tez çalışması kapsamında hazırlanıp karakterizasyonu tamamlanan PHEMA-pABSA kriyojel matriks materyali CA enziminin saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır.

Tez çalışmasının dördüncü bölümünde, PCL polimeri bir fotosensitif amino asit monomeri olan klorobis(2-2'-bipiridil)MATyr-Ru(II) ile türevlendirilip nanokapsülant olarak kullanılmıştır. Yüksek geçirgenliğe ve toksik olmama özelliğine sahip olan PCL'den P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) sentezlenmiştir. Tez kapsamında, P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) polimeri kullanılarak, literatürde ilk defa ANADOLUCA konsepti ve çift emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği birleştirilip yapay kan özellikli nanoküreler sentezlenmiştir. Çalışma kapsamında, ilk aşamada Hb ve CA enzimi çift emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniğiyle P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) içerisine alınmıştır. İkinci aşamada, ANADOLUCA yöntemiyle bu iki farklı protein nanokapsülanta çapraz bağlanıp stabilizasyonu artırılmıştır. Üçüncü aşamada, Fe^{3+} -Protoporfirin IX EDC/NHS yöntemiyle nanokapsül içindeki proteinlere kovalent olarak bağlanmıştır.

Literatürde, çift emülsiyon çözücü buharlaşma tekniği ile Hb'nin PCL içine hapsedildiği çalışma mevcuttur. Zhao vd., (2007), Hb'ni PCL içine enkapsüle edip boyutları 70-200 nm arasında değişen oksijen taşıyıcı nanoküreler sentezlemiştir. Tez çalışması kapsamında sentezlenen P(CL-Ru(II)-bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) ve P(CL-Ru(II)-bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)-ko-Hb-CA)- $Fe^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX nanokürelerinin boyutları 53-200 nm arasında değişmekte olup mevcut çalışma ile uyumludur. Fe^{3+} -Protoporfirin IX'un kovalent bağlanması esnasında çözünürlük

sorunlarından dolayı DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı yüksek olmasa da P(CL-Ru(II)-bis(2-2'-bipiridil)MATyr) yapısında bozulmalara sebep olmuştur.

Termogravimetrik analizler sentezlenen P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)'nin fizikokimyasal davranışları hakkında bilgi vermektedir. Tez çalışması kapsamında, PCL'nin 412,1 °C'de bozunma hızı %24,33/dk olarak hesaplanmıştır. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)'nin 402,8 °C sıcaklıkta %99,5'i degrede olmuştur. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)'nin 399,2 °C'de kütle kaybı %68,83/dk olarak hesaplanmış olup PCL ile kıyaslandığında degradasyon hızında artış gözlenmiştir. PCL ile kıyaslandığında degradasyon sıcaklığında 51,2 °C'lik bir düşüş gözlenmekte olup bu durumun P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) bağlanmadan önce serbest -OH uçları oluşturmak amacıyla polimerin hafif alkali hidrolizi sonucu meydana gelen zincir kısalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde, PCL'nun erime sıcaklığı 59,9 °C olarak bulunmuştur (Jana vd., 2014). P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr)'nin 61,04 °C olarak bulunmuştur. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) için T_g değeri 57,28 °C olarak bulunmuş olup erime entalpisi 70.13 J/g olarak hesaplanmıştır. Tez çalışma kapsamında, P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) ile oluşturulmuş, P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA) ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX vücut sıcaklığında (36-38 °C) sertliğini ve şeklini koruyabilecektir.

P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanopartikülleri 403 nm soiret bandı meydana getirmiştir. Literatürde, Fe³⁺-Protoporfirin IX'a ait soiret bant 404 nm'de gözlenmiş olup bizim çalışmamızla uyumlu bulunmuştur (Chen vd., 2017). Bu durum nanoküre bünyesinde bulunan Hb yapısındaki hemin ve kovalent bağlı hemin molekülünün yükseltgenmiş formda bulunmasından kaynaklanmaktadır. Sodyum ditiyonit ile indirgenme sonucu soiret bant 425 nm'ye kaymış olup indirgenme başarıyla gerçekleştirilmiştir. Zijlstra ve Buursma, (1997) yaptıkları bir çalışmada sığır oksiHb'ye ait Q bandını 554 nm'de bulmuşlardır. Tez çalışmasında P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX nanopartiküllerinde 525 ve 556 nm'de Q bantları ortaya çıkmış olup mevcut çalışma ile uyumlu olduğu ve dönüşümün tamamen gerçekleştiği gösterilmiştir. 5 mg P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanopartikülü için 7,5 mg/ml'lik sodyum ditiyonit derişimi yeterli gelmiştir.

P(CL-Ru(II)-bis(2-2'-bipiridil)(MATyr)-ko-Hb-CA) ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe³⁺-Protoporfirin IX nanokürelerinin CA aktiviteleri, sırasıyla 30,23 ±1,7 ve 18,83 ±1,2 (U/ml) olarak bulunmuştur. EDC/NHS aktivasyonu ile Fe^{2+/3+}-Protoporfirin IX bağlanmasından sonra CA enzim aktivitesi düşmüştür.

Tez çalışmasının son aşamasında, yapay kan olarak sentezlenen P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin) IX-albumin kompleksi ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX'un nanopartiküllerinin *Hirudo verbana* tarafından kullanılması ve metabolik faaliyeti araştırılmıştır. *Hirudo verbana*'nın doğal ortamının oluşturulması amacıyla alüminyum blok ile besiyerleri ısıtılıp içerisinden sirkülasyon pompası ile 30 °C'de su geçirilmiştir. Böylece, sülüklerin algılayabileceği ısı ve titreşim hareketi oluşturulup yapay kan ile beslenmesi sağlanmıştır. Sülükler, ısıtılmamış ya da titreşim hareketi olmadan sadece ısıtılmış kriyojel besiyerinden beslenme gerçekleştirmemiştir. P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX)-albumin kompleksi ile beslenen sülüklerden elde edilen numunelerde, Fe²⁺-Protoporfirin IX'a ait soret ve Q bantları 72 s'lik süre sonunda tamamen kaybolmuş olup P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX)-albumin kompleksi yapısındaki Fe²⁺-Protoporfirin IX, Fe³⁺-Protoporfirin IX'a dönüşmüştür. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX ile beslenen sülüklerden elde edilen numunelerde, 72 s'lik süre sonunda oksihb ve deoksihb derişimlerinin azaldığı metHb ve CA enzim seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç, sülüklerin emme sonrası kanı bulundurdıkları sindirim kanalında Hb'i indirgeyici maddelerin bulunmadığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, 72 s'lik süre sonunda CA enzim aktivitesinin artması, bu bölgede CA enziminin bulunabileceğini ya da mevcut CA enziminin aktvitesinin artmasını sağlayan fizyolojik şartların sağlandığını düşündürmektedir. Literatürde benzer çalışmalar mevcut olmadığı için karşılaştırma yapılamamış olup elde edilen numunenin az olması çalışma parametrelerini kısıtlamıştır.

Tez çalışması kapsamında geliştirilen P(HEMA-ko-MACys-Fe²⁺-Protoporfirin IX)-albumin kompleksi ve P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)-Fe²⁺-Protoporfirin IX'a ait veriler değerlendirildiğinde, stabilitesi yüksek, oksijeni taşıyabilmek amacıyla kolay bir şekilde indirgenebilen, uzun süre korunması amacıyla liyofilize edilip saklanabilen yapay kan ürünleri sentezlenip literatüre kazandırılmıştır.

Serbest $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX'un fizyolojik şartlarda oksijeni geri dönüşümlü olarak bağlayamaması ve vücut için toksik etki oluşturması kullanımını sınırlandırmaktadır. Literatürde, $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX'un türevlerinin albumin ile kompleks oluşturup oksijen taşıyabilmesi sağlansa da bu tip çalışmalarda toksitesini hakkında bilgi bulunmamaktadır. Ancak, $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX'un kovalent olarak stabilitesi yüksek bir yapıya bağlanmaması onun hızlı bir şekilde metabolize olup toksik etkisini sürdüreceğini düşündürmektedir. Tez çalışması kapsamında geliştirilen P(HEMA-ko-MACys- Fe^{2+} -Protoporfirin IX) nanokürelerinde, $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX'un vinil grupları tiyo-ene reaksiyonu ile sistein amino asidinin tiyol grupları ile kovalent bağ oluşturmuştur. Bu nanokürelerin termal stabilitesi oldukça yüksek olup boyutları 200 nm'nin altındadır. Felçli bölgelere ya da damar çapının çok daraldığı tromboz durumlarında eritrositlerin giremediği bölgelere girip oksijen sağlayabilecek boyutlarda olmaları, vücut sıcaklığındaki yüksek stabiliteleri, albumin ile kompleks oluşturabilmeleri, kolay indirgenmesi ve *H. verbana* tarafından emilip kullanılması P(HEMA-ko-MACys- Fe^{2+} -Protoporfirin IX) nanokürelerinin önemini vurgulamaktadır.

Tez çalışması kapsamında, P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)- Fe^{2+} -Protoporfirin IX yapay oksijen taşıyıcı sisteminin sentezinde uygulanan yöntem, ANADOLUCA konsepti ile çift emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniğinin ilk kez birleştirildiği yöntemdir. Uygulanan bu metot, proteinlerin boyut kontrollü bir şekilde nanokapsül içine alınmasını sağlamasının yanında kullanılan fotosensitif amino asit monomerinin türüne göre PCL, PLA (polilaktik asit) ve PLGA (polilaktit-ko-glikolik asit) gibi biyouyumlu ve kontrollü salınım sistemlerinde enkapsülant olarak kullanılan polimerik malzemelere de uygulanabilme niteliği taşımaktadır.

Literatürde Hb'nin PCL içerisinde enkapsüle edildiği çalışmalar mevcut olup serbest Hb'e göre stabilitesinin arttırıldığı bildirilmiştir (Zhao vd., 2007; Zhang vd., 2008). Ancak, stabilite artışı sadece PCL ile sağlanmış olup Hb herhangi bir çapraz bağlayıcı ile bağlanmamıştır. Tez çalışması kapsamında, Hb ve CA enzimi fotosensitif amino asit ile modifiye edilmiş P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr) ile enkapsüle edilip çapraz bağlanıp $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX konjuge edilmiştir. P(CL-Ru(II)bis(2-2'-bipiridil)MATyr-ko-Hb-CA)- Fe^{2+} -Protoporfirin IX nanokapsüllerinde stabilitesinin arttırılması amacıyla çapraz bağlanan Hb ve CA fonksiyonlarını yerine getirmekte olup kontrollü bir şekilde $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Protoporfirin IX salınımı yapabilmektedir. Çok fonksiyonlu

bu nanokapsüllerin *H. verbana* tarafından kullanılmaları kan ile biyolojik olarak benzerlik taşıdığını göstermektedir.



KAYNAKÇA

- Abdullah, S., Dar, L. M., Rashid, A., and Tewari, A. (2012). Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. *Archives of Clinical and Experimental Surgery*, 1(3), 172-180.
- Adams, P. A., and Berman, M. C. (1980). Kinetics and mechanism of the interaction between human serum albumin and monomeric haemin. *Biochemical Journal*, 191(1), 95-102.
- Adams, P. A., Goold, R. D., and Thumser, A. A. (1989). Heme-peptide/protein interactions: the binding of heme octa and undecapeptides, and microperoxidase-8 and-11, to human serum albumin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 37(2), 91-103.
- Adams, S. L. (1988). The medicinal leech: a page from the annelids of internal medicine. *Annals of Internal Medicine*, 109(5), 399-405.
- Adamson, J. G., and Moore, C. (1998). Hemolink, an o-raffinose crosslinked hemoglobin-based oxygen carrier. *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials*, 2, 62-79.
- Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., and Safo, M. K. (2020). Hemoglobin: structure, function and allostery. *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins*, 345-382.
- Alber, B. E., and Ferry, J. G. (1994). A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 6909-6913.
- Al-Dulaimi, K., Tomeo-Reyes, I., Banks, J., and Chandran, V. (2016). White blood cell nuclei segmentation using level set methods and geometric active contours. In *2016 International Conference on Digital Image Computing: Techniques and Applications (DICTA)* (pp. 1-7). IEEE.
- Amarprakash, P. D. (2012). Case study of leech application in diabetic foot ulcer. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 3(5).
- Anderson, K. C., and Ness, P. M. (Eds.). (2000). *Scientific basis of transfusion medicine: Implications for clinical practice*. Saunders.
- Antonini, E. (1971). Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands. *Frontiers of Biology*, 21, 27-31.
- Arnaud, F., Higgins, A., McCarron, R., and Moon-Massat, P. F. (2017). Determination of methemoglobin and hemoglobin levels in small volume samples. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(1), 58-62.

- Arvidsson, P., Plieva, F. M., Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., and Mattiasson, B. (2003). Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. *Journal of Chromatography A*, 986(2), 275-290.
- Arvidsson, P., Plieva, F. M., Savina, I. N., Lozinsky, V. I., Fexby, S., Bülow, L., ... and Mattiasson, B. (2002). Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *Journal of Chromatography A*, 977(1), 27-38.
- Azeera M., Vaidevi S., Ruckmani K. (2018) Characterization Techniques of Hydrogel and Its Applications. In: Mondal M. (eds) Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels. *Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0_25-1
- Bair, H. E., Akinay, A. E., Menczel, J. D., Prime, R. B., and Jaffe, M. (2009). Thermomechanical analysis (TMA) and thermodilatometry (TD). *Thermal Analysis of Polymers*, 319.
- Bakhshpour, M., Idil, N., Perçin, I., and Denizli, A. (2019). Biomedical applications of polymeric cryogels. *Applied Sciences*, 9(3), 553.
- Bakhshpour, M., Yavuz, H., and Denizli, A. (2018). Controlled release of mitomycin C from PHEMAH–Cu (II) cryogel membranes. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup1), 946-954.
- Bao, T. Q., Franco, R. A., and Lee, B. T. (2012). Preparation and characterization of a novel 3D scaffold from poly (ϵ -caprolactone)/biphasic calcium phosphate hybrid composite microspheres adhesion. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 76-83.
- Benesch, R. E., Benesch, R., and Yung, S. (1973). Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Analytical Biochemistry*, 55(1), 245-248.
- Benlikaya, R., Alkan, M., and Kaya, İ. (2009). Preparation and characterization of sepiolite-poly (ethyl methacrylate) and poly (2-hydroxyethyl methacrylate) nanocomposites. *Polymer Composites*, 30(11), 1585-1594.
- Bethell, G. S., Ayers, J. S., Hancock, W. S., and Hearn, M. T. (1979). A novel method of activation of cross-linked agaroses with 1, 1'-carbonyldiimidazole which gives a matrix for affinity chromatography devoid of additional charged groups. *Journal of Biological Chemistry*, 254(8), 2572-2574.
- Bhattacharjee, R. N., Patel, S. V., Sun, Q., Jiang, L., Richard-Mohamed, M., Ruthirakanthan, A., ... and Luke, P. P. (2020). Renal protection against ischemia reperfusion injury: hemoglobin-based oxygen carrier-201 versus blood as an oxygen carrier in ex vivo subnormothermic machine perfusion. *Transplantation*, 104(3), 482-489.

- Billingham, N. C. (1989, May). Localization of oxidation in polypropylene. In *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia* (Vol. 28, No. 1, pp. 145-163). Basel: Hüthig and Wepf Verlag.
- Boyd, R. K. (1997). Book Review: Mass Spectrometry: Principles and Applications. E. de Hoffman, J. Charette and W. Stroobant. Wiley, Chichester 1996. ISBN 0 471 96697 5. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(8), 948-948.
- Bozinovic, N., Noé, R., Kanyavuz, A., Lecerf, M., and Dimitrov, J. D. (2020). Method for identification of heme-binding proteins and quantification of their interactions. *Analytical Biochemistry*, 607, 113865.
- Bradfield, J. R. G. (1947). Plant carbonic anhydrase. *Nature*, 159(4040), 467-468.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid sensitive method of quantitation microgram quantities of proteins utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bunn, C. W., and Alcock, T. C. (1945). The texture of polythene. *Transactions of the Faraday Society*, 41, 317-325.
- Bunn, H. F., Esham, W. T., and Bull, R. W. (1969). The renal handling of hemoglobin I. Glomerular filtration. *Journal of Experimental Medicine*, 129(5), 909-924.
- Caldorera-Moore, M., Kang, M. K., Moore, Z., Singh, V., Sreenivasan, S. V., Shi, L., ... and Roy, K. (2011). Swelling behavior of nanoscale, shape-and size-specific, hydrogel particles fabricated using imprint lithography. *Soft Matter*, 7(6), 2879-2887.
- Campbell, D., Pethrick, R. A., and White, J. R. (2017). *Polymer Characterization: Physical Techniques*. CRC press.
- Carleton, H. M., Drury, R. A. B., and Wallington, E. A. (1980). Carleton's histological technique: Oxford University Press
- Carmichael, F. L. (2001). Recent developments in hemoglobin-based oxygen carriers—an update on clinical trials. *Transfusion and Apheresis Science*, 24(1), 17-21.
- Carter, K. C. (2001). Leechcraft in nineteenth century British medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 94(1), 38-42.
- Chang, T. M. (1964). Semipermeable microcapsules. *Science*, 146(3643), 524-525.
- Chang, T. M. (1971). Stabilisation of enzymes by microencapsulation with a concentrated protein solution or by microencapsulation followed by cross-linking with glutaraldehyde. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 44(6), 1531-1536.

- Chang, T. M. S. (1972). *Artificial cells* Charles C Thomas. *Publisher, Springfield, Illinois.*
- Chang, T. M. S. (1997). *Blood substitutes: principles, methods, products and clinical trials.* Karger Publishers.
- Chang, T. M. (1999). Future prospects for artificial blood. *Trends in Biotechnology*, 17(2), 61-67.
- Chartoff, R. P., Menczel, J. D., and Dillman, S. H. (2009). Dynamic mechanical analysis (DMA). *Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications*, 387-495.
- Chen, G., Zhou, P., Mei, N., Chen, X., Shao, Z., Pan, L., and Wu, C. (2004). Silk fibroin modified porous poly (ϵ -caprolactone) scaffold for human fibroblast culture in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(6), 671-677.
- Chen, H., Wu, Y., Yang, W., Zhan, S., Qiu, S., and Zhou, P. (2017). Ultrasensitive and selective detection of isocarbophos pesticide based on target and random ssDNA triggered aggregation of hemin in polar organic solutions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 243, 445-453.
- Cheng, P. C. (2006). The contrast formation in optical microscopy. In *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (pp. 162-206). Springer, Boston, MA.
- Cheremisinoff, N. P. (1996). *Polymer characterization: laboratory techniques and analysis.* William Andrew.
- Clark, V. L., and Kruse, J. A. (1990). Clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations. *Jama*, 264(21), 2808-2809.
- Cole, D. (1985). Clinical hirudology: Revival of an ancient art. *The New Zealand Medical Journal*, 98(771), 28-29.
- Crompton, T. R. (2013). *Thermal methods of polymer analysis.* Smithers Rapra.
- CW, F. (2001). Leech Therapy: Current Uses for an Old Treatment. *Delaware Nurses Association (DNA) Reporter*, 26, 16-17.
- Dainiak, M. B., Kumar, A., Galaev, I. Y., and Mattiasson, B. (2006). Detachment of affinity-captured bioparticles by elastic deformation of a macroporous hydrogel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 849-854..
- Davis, F. J. (Ed.). (2004). *Polymer chemistry: a practical approach.* Oxford University Press on Demand.

- Demirelli, K., Coşkun, M., and Kaya, E. (2001). A detailed study of thermal degradation of poly (2-hydroxyethyl methacrylate). *Polymer Degradation and Stability*, 72(1), 75-80.
- Demiryas, N., Tüzmen, N., Galaev, I. Y., Pişkin, E., and Denizli, A. (2007). Poly (acrylamide-allyl glycidyl ether) cryogel as a novel stationary phase in dye-affinity chromatography. *Journal of Applied Polymer Science*, 105(4), 1808-1816.
- Derazshamshir, A., Baydemir, G., Andac, M., Say, R., Galaev, I. Y., and Denizli, A. (2010). Molecularly imprinted PHEMA-based cryogel for depletion of hemoglobin from human blood. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211(6), 657-668.
- Ding, S., Serra, C. A., Vandamme, T. F., Yu, W., and Anton, N. (2019). Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective. *Journal of Controlled Release*, 295, 31-49.
- Dixon, H. B. F., and McIntosh, R. (1967). Reduction of methaemoglobin in haemoglobin samples using gel filtration for continuous removal of reaction products. *Nature*, 213(5074), 399-400.
- Dodgson, S. J., and Forster 2nd, R. E. (1986). Carbonic anhydrase: inhibition results in decreased urea production by hepatocytes. *Journal of Applied Physiology*, 60(2), 646-652.
- Doherty, D. H., Doyle, M. P., Curry, S. R., Vali, R. J., Fattor, T. J., Olson, J. S., and Lemon, D. D. (1998). Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nature biotechnology*, 16(7), 672-676.
- Dong, Z., Wu, Y., Wang, Q., Xie, C., Ren, Y., and Clark, R. L. (2012). Reinforcement of electrospun membranes using nanoscale Al₂O₃ whiskers for improved tissue scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(4), 903-910.
- Doretto, L., Ferrara, D., Gattolin, P., Lora, S., Schiavon, F., and Veronese, F. M. (1998). PEG-modified glucose oxidase immobilized on a PVA cryogel membrane for amperometric biosensor applications. *Talanta*, 45(5), 891-898.
- Drabkin, D. L., and Austin, J. H. (1935). Spectrophotometric studies: II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 112(1), 51-65.
- Earnest, C. M. (Ed.). (1988). *Compositional analysis by thermogravimetry* (Vol. 997). ASTM International.
- Elliott, J. M., and Kutschera, U. (2011). Medicinal leeches: historical use, ecology, genetics and conservation. *Freshwater Reviews*, 4(1), 21-41.

- Elzein T., Eddine M.N., Delaite C., Bistac S., and Dumas P., (2004). FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces, *Journal of Colloid and Interface Science*, 273, 381-387.
- Esbaugh, A. J., and Tufts, B. L. (2006). The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. *Respiratory physiology and neurobiology*, 154(1-2), 185-198.
- Evelyn, K. A., and Malloy, H. T. (1938). Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin, and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *Journal of Biological Chemistry*, 126(2), 655-662.
- Everse, J. (1991). *A New Method for the Reduction of Methemoglobin and Methemoglobin Derivatives*. LETTERMAN ARMY INST OF RESEARCH PRESIDIO OF SAN FRANCISCO CA.
- Faleh, N., Hassan, Z. N., and Shafeeq, M. A. A. (2019). Leeches Review: Biology, Ecology and Medical Important. *Indian Journal of Public Health*, 10(10), 3275.
- Fanelli, A. R., Antonini, E., and Caputo, A. (1964). Hemoglobin and myoglobin. *Advances in protein chemistry*, 19, 73-222.
- Fields, W. S. (1991). The history of leeching and hirudin. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 21(Suppl. 1), 3-10.
- Freytag, J. W., and Templeton, D. (1997). Optro™ (recombinant human hemoglobin): a therapeutic for the delivery of oxygen and the restoration of blood volume in the treatment of acute blood loss in trauma and surgery. *Red cell substitutes*, 325-334.
- Gay, C. V., Schraer, H. A. R. A. L. D., Anderson, R. E., and Cao, H. A. N. M. I. N. (1984). Current studies on the location and function of carbonic anhydrase in osteoclasts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 429, 473-478.
- Geers, C., and Gros, G. (2000). Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiological Reviews*, 80(2), 681-715.
- Gerardi, R. D., Barnett, N. W., and Lewis, S. W. (1999). Analytical applications of tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (III) as a chemiluminescent reagent. *Analytica Chimica Acta*, 378(1-3), 1-41.
- Gmelin, E., Fischer, R., and Stitzinger, R. (1998). Sub-micrometer thermal physics—An overview on SThM techniques. *Thermochimica Acta*, 310(1-2), 1-17.
- Gould, S. A., Sehgal, L. R., Sehgal, H. L., DeWoskin, R., and Moss, G. S. (1998). The clinical development of human polymerized hemoglobin. *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials*, 2, 12-28.

- Gödekmerdan, A., Arusan, S., Bayar, B., and Sağlam, N. (2011). Tıbbi sülükler ve hirudoterapi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 35, 234-9.
- Grabarek, Z., and Gergely, J. (1990). Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Analytical Biochemistry*, 185(1), 131-135.
- Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., and Langer, R. (1994). Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, 263(5153), 1600-1603.
- Gross, R. A., and Kalra, B. (2002). Biodegradable polymers for the environment. *Science*, 297(5582), 803-807.
- Guarino, V., Gentile, G., Sorrentino, L., and Ambrosio, L. (2002). Polycaprolactone: synthesis, properties, and applications. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 1-36.
- Gupta, S., Webster, T. J., and Sinha, A. (2011). Evolution of PVA gels prepared without crosslinking agents as a cell adhesive surface. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(7), 1763-1772.
- Hayashi, T., Itagaki, H., Fukuda, T., Tamura, U., Sato, Y., and Suzuki, Y. (1995). Hemoglobin denaturation caused by surfactants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(4), 540-543.
- Henderson, T. M., Ladewig, K., Haylock, D. N., McLean, K. M., and O'Connor, A. J. (2013). Cryogels for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(21), 2682-2695.
- Hoffman, S. J., Looker, D. L., Roehrich, J. M., Cozart, P. E., Durfee, S. L., Tedesco, J. L., and Stetler, G. L. (1990). Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(21), 8521-8525.
- Hosier, I., Vaughan, A. S., Mitchell, G. R., Siripitayananon, J., and Davis, F. J. (2004). Polymer characterization. *The Practical Approach in Chemistry Series*, 1.
- Hug, W., Chalmers, J. M., and Griffith, P. R. (2002). Handbook of vibrational spectroscopy. (John Wiley and Son Ltd., Chichester 2002).
- Hur, D., Ekti, S. F., and Say, R. (2007). N-Acylbenzotriazole mediated synthesis of some methacrylamido amino acids. *Letters in Organic Chemistry*, 4(8), 585-587.
- Iroh, J. O. (1999). Polymer Data Handbook, Editor JE Mark.
- Ivanov, R. V., Lozinsky, V. I., Noh, S. K., Lee, Y. R., Han, S. S., and Lyoo, W. S. (2008). Preparation and characterization of polyacrylamide cryogels produced

- from a high-molecular-weight precursor. II. The influence of the molecular weight of the polymeric precursor. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(1), 382-390.
- Jana, S., Leung, M., Chang, J., and Zhang, M. (2014). Effect of nano-and micro-scale topological features on alignment of muscle cells and commitment of myogenic differentiation. *Biofabrication*, 6(3), 035012.
- Jelkmann, W. (1992). Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiological Reviews*, 72(2), 449-489.
- Johnstone, R. A., Johnstone, R. A. W., Johnstone, R. A., and Rose, M. E. (1996). *Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists*. Cambridge university press.
- Kamal, J. K., and Behere, D. V. (2005). Binding of heme to human serum albumin: Steady-state fluorescence, circular dichroism and optical difference spectroscopic studies.
- Karagiannidis, P. G., Stergiou, A. C., and Karayannidis, G. P. (2008). Study of crystallinity and thermomechanical analysis of annealed poly (ethylene terephthalate) films. *European Polymer Journal*, 44(5), 1475-1486.
- Karlson, P. (1981) The nomenclature of tetrapyrroles. A report. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 19: 43–47.
- Keçili, R., Çelikoğlu, U., Mil, S., Ersöz, A., and Say, R. (2018). Concanavalin A photocross-linked affinity cryogels for the purification of horseradish peroxidase. *Adsorption Science and Technology*, 36(3-4), 1199-1212.
- Kemal, J. (2014). Laboratory manual and review on clinical pathology. *OMICs Group eBooks, California, EUA*.
- Kendall, R. G. (2001). Erythropoietin. *Clinical and Laboratory Haematology*, 23(2), 71-80.
- Kim, H.J. (2021). Haem Structure and Function. In *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.).
- Kobayashi S., Makino A., 2009. Enzymatic polymer synthesis: an opportunity for green chemistry, *Chemical Reviews*, 109, 5288-5353.
- Kodal, M., Karakaya, N., Wis, A. A., and Ozkoc, G. (2019). Thermal properties (DSC, TMA, TGA, DTA) of rubber nanocomposites containing carbon nanofillers. In *Carbon-based Nanofiller and Their Rubber Nanocomposites* (pp. 325-366). Elsevier.
- Koleske, J. V. (1978). Blends Containing Poly (ϵ -caprolactone) and Related Polymers. In *Polymer Blends* (pp. 369-389). Academic Press.

- Kolthoff, I. M., Medalia, A. I., and Raaen, H. P. (1951). The reaction between ferrous iron and peroxides. IV. Reaction with potassium persulfate. *Journal of the American Chemical Society*, 73(4), 1733-1739.
- Komatsu, T., Hamamatsu, K., Takeoka, S., Nishide, H., and Tsuchida, E. (1998). Human serum albumin-bound synthetic hemes as an oxygen carrier: determination of equilibrium constants for heme binding to host albumin. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 26(5-6), 519-527.
- Kotzyba-Hibert, F., Kapfer, I., and Goeldner, M. (1995). Recent trends in photoaffinity labeling. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(12), 1296-1312.
- Koury, M. J., Bondurant, M. C., and Atkinson, J. B. (1987). Erythropoietin control of terminal erythroid differentiation: maintenance of cell viability, production of hemoglobin, and development of the erythrocyte membrane. *Blood cells*, 13(1-2), 217-226.
- Köse, E., Say, R., and Ersöz, A. (2016). A new approach for the construction of dual character in nanosystems. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 222, 1012-1017.
- Köse, S. Ö., Öziç, C., Yılmaz, F., Ersöz, A., and Say, R. (2019). DNA ligase photocrosslinked cryogenic column based biotinylation kit for viral hybridization and detection. *Process Biochemistry*, 84, 213-219.
- Kumar, A., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., and Mattiasson, B. (2003). Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. *Journal of Immunological Methods*, 283(1-2), 185-194.
- Kumar, A., Bansal, V., Nandakumar, K. S., Galaev, I. Y., Roychoudhury, P. K., Holmdahl, R., and Mattiasson, B. (2006). Integrated bioprocess for the production and isolation of urokinase from animal cell culture using supermacroporous cryogel matrices. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(4), 636-646.
- Kutschera, U., and Roth, M. (2006). Notes on the ecology of the Asian medicinal leech *Hirudinaria manillensis* (Hirudinea: Hirudinidae). *Lauterbornia*, 56, 9-13.
- Kutschera, U. (2012). The *Hirudo medicinalis* species complex. *Naturwissenschaften*, 99(5), 433-434.
- Labet, M., ve Thielemans, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*, 38(12), 3484-3504.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227 (5259), 680-685.

- LaMuraglia, G. M., O'Hara, P. J., Baker, W. H., Naslund, T. C., Norris, E. J., Li, J., and Vandermeersch, E. (2000). The reduction of the allogenic transfusion requirement in aortic surgery with a hemoglobin-based solution. *Journal of Vascular Surgery*, 31(2), 299-308.
- Li, L., and LaBarbera, D. V. (2017). 3D High-content screening of organoids for drug discovery. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*.
- Liang, C. C. (1957). The formation of complexes between haemoglobins and plasma proteins in a variety of animals. *Biochemical Journal*, 66(4), 552.
- Lok, C. (2001). Blood product from cattle wins approval for use in humans.
- Lombardi, G. (1980). For Better Thermal Analysis, Special Edn. of the Intern. *Confederation for Thermal Analysis, University of Rome*.
- Lombardo, M. E., Araujo, L. S., Ciccarelli, A. B., and Batlle, A. (2005). A spectrophotometric method for estimating hemin in biological systems. *Analytical Biochemistry*, 341(2), 199-203.
- Lovinger, A. J. (1983). Microstructure and unit-cell orientation in α -polypropylene. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, 21(1), 97-110.
- Lozinsky, V. I., Kalinina, E. V., Grinberg, V., Grinberg, N. V., and Chupov, V. V. (1997). Thermoresponsible cryogels based on cross-linked poly (N, N-diethylacrylamide). *Polymer Science. Series A*, 39(12), 1300-1305.
- Lozinsky, V. I., and Plieva, F. M. (1998). Poly (vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(3-4), 227-242.
- Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., and Mattiasson, B. (2001). The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*, 10(4), 163-188.
- Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H., and Mattiasson, B. (2003). Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *TRENDS in Biotechnology*, 21(10), 445-451.
- Lozinsky, V. I. (2014). A brief history of polymeric cryogels. *Polymeric Cryogels*, 1-48.
- Majumdar, A. (1999). Scanning thermal microscopy. *Annual Review of Materials Science*, 29(1), 505-585.
- Mann, K. H. (2013). *Leeches (Hirudinea): their structure, physiology, ecology and embryology* (Vol. 11). Elsevier.

- Marković, G., Marinović-Cincović, M., Jovanović, V., Samaržija-Jovanović, S., and Budinski-Simendić, J. (2016). Polymer characterization (II). *Polymer Science: Research Advances, Practical Applications and Educational Aspects*, 397-403.
- Marshall, J., Blackmun, J., O'Connor, J. S. J., Scalia, J., and Kennedy, J. Retirement System of Ohio v. Betts, 492 US-(1989). No. 88-2034. George F. Denton, et al., Petitioners t: Mike Hernandez. On petition for writ of certiorari to the United States Court of Appeals for the Ninth Circuit. The motion of respondent for leave to proceed in forma pauperis is granted. The petition for writ of certiorari.
- McLafferty, F. W., and Turecek, F. (1993). Interpretation of mass spectra. 4th (ed.) University Science Books. *California, USA*, 226-236.
- Meldrum, N. U., and Roughton, F. J. (1933). Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *The Journal of physiology*, 80(2), 113-142.
- Menard, K. P., and Menard, N. (2006). Dynamic mechanical analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, 1-25.
- Menczel, J. D., and Prime, R. B. (Eds.). (2009). Thermal analysis of polymers.
- Menczel, J. D., Judovits, L., Prime, R. B., Bair, H. E., Reading, M., and Swier, S. (2009). Differential scanning calorimetry (DSC). *Thermal analysis of polymers: Fundamentals and applications*, 7-239.
- Michalsen, A., Klotz, S., Ldtke, R., Moebus, S., Spahn, G., and Dobos, G. J. (2003). Effectiveness of leech therapy in osteoarthritis of the knee: a randomized, controlled trial. *Annals of internal medicine*, 139(9), 724-730.
- Minelli, A., Sket, B., and de Jong, Y. (2014). Fauna Europaea: Annelida–Hirudinea, incl. Acanthobdellea and Branchiobdellea. *Biodiversity Data Journal*, (2).
- Missner, A., Kügler, P., Saparov, S. M., Sommer, K., Mathai, J. C., Zeidel, M. L., and Pohl, P. (2008). Carbon dioxide transport through membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25340-25347.
- Mitchell, G. R. (1989). X-ray scattering from non-crystalline and liquid crystalline polymers. *Pergamon Press plc, Comprehensive Polymer Science: the Synthesis, Characterization, Reactions and Applications of Polymers.*, 1, 687-729.
- Montaudo, G. (1996). Mass Spectrometry of Synthetic Polymers-Mere Advances or Revolution?. *Trends in Polymer Science*, 3(4), 81-86.
- Montaudo, G., and Lattimer, R. P. (Eds.). (2001). *Mass spectrometry of polymers*. CRC press.

- Moosavi-Movahedi, A. A., Housaindokht, M. R., and Moghaddasi, J. (1993). Thermodynamic studies of the interaction of glucose oxidase with anionic and cationic surfactants. *Thermochimica Acta*, 219, 143-150.
- Morsy, S. M. (2014). Role of surfactants in nanotechnology and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(5), 237-260.
- Morwenna, S., and Ratcliffe, W. P. J. (1997). Mammalian oxygen sensing and hypoxia inducible factor-1. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29(12), 1419-1432.
- Mukherjee, B. (2016). *Step by step technical manual of: Blood components preparation*. The Health Sciences Publisher.
- Mumcuoglu, K. Y. (2014). Recommendations for the use of leeches in reconstructive plastic surgery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- Murthy, R.S.R., (1997). Biodegradable polymers. In: Jain, N.K.(Eds.), *Controlled and Novel Drug Delivery*. CBS Publisher, New Delhi, pp. 27–51.
- Murthy, N. S. (2004). Recent developments in polymer characterization using x-ray diffraction. *The Rigaku Journal*, 21(1), 15-24.
- Natta, F. J. V., Hill, J. W., and Carothers, W. H. (1934). Studies of polymerization and ring formation. XXIII. 1 ϵ -Caprolactone and its polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 56(2), 455-457.
- Nellis JR, Devinney MJ, Young CC (2020) Hemopure, HBOC-201, for Life Threatening Anemia in a Jehovah's Witness. *Int J Blood Res Disord* 7:052.
- Neubert, E. and Nesemann, H. (1999). Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea. Süßwasserfauna von Mitteleuropa 6/2 Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, 178 pp
- Nge, T. T., Hori, N., Takemura, A., and Ono, H. (2004). Swelling behavior of chitosan/poly (acrylic acid) complex. *Journal of Applied Polymer Science*, 92(5), 2930-2940.
- Nouri, M., Karimi-Yarandi, K., Etezadi, F., and Amirjamshidi, A. (2012). Leech therapy for pain relief: Rational behind a notion. *Surgical Neurology International*, 3.
- OG (Official Gazette of the Republic of Turkey) (2014). Traditional and Complementary Health Practices Regulation, Date: October 27, 2014, Number: 29158

- Oh, T. S., Hallock, G., and Hong, J. P. (2012). Freestyle propeller flaps to reconstruct defects of the posterior trunk: a simple approach to a difficult problem. *Annals of plastic surgery*, 68(1), 79-82.
- Ouhadi, T., Stevens, C., and Teyssié, P. (1976). Study of poly- ϵ -caprolactone bulk degradation. *Journal of Applied Polymer Science*, 20(11), 2963-2970.
- Ozensoy, O., Arslan, O., and Sinan, S. O. (2004). A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Biochemistry (Moscow)*, 69(2), 216-219.
- Ozmen, M. M., Dinu, M. V., Dragan, E. S., and Okay, O. (2007). Preparation of Macroporous Acrylamide-Based Hydrogels: Cryogelation Under Isothermal Conditions. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 44(11), 1195-1202.
- Öztürk, N., Bereli, N., Akgöl, S., and Denizli, A. (2008). High capacity binding of antibodies by poly (hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67(1), 14-19.
- Pankajakshan, D., Philipose, L. P., Palakkal, M., Krishnan, K., and Krishnan, L. K. (2008). Development of a fibrin composite-coated poly (ϵ -caprolactone) scaffold for potential vascular tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 87(2), 570-579.
- Papet, G., Audouin-Jirackova, L., and Verdu, J. (1989). Diffusion controlled radiochemical oxidation of low density polyethylene—II. Kinetic modelling. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 33(4), 329-335.
- Parkkila, S., Parkkila, A. K., Rajaniemi, H., Shah, G. N., Grubb, J. H., Waheed, A., and Sly, W. S. (2001). Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1918-1923.
- Pena, J., Corrales, T., Izquierdo-Barba, I., Doadrio, A. L., and Vallet-Regí, M. (2006). Long term degradation of poly (ϵ -caprolactone) films in biologically related fluids. *Polymer Degradation and Stability*, 91(7), 1424-1432.
- Perutz, M. F. (1969). The Croonian Lecture, 1968-The haemoglobin molecule. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 173(1031), 113-140.

- Perutz, M. F., and Lehmann, H. (1968). Molecular pathology of human haemoglobin. *Nature*, 219(5157), 902-909.
- Peters Jr, T. (1995). *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*. Academic press.
- Pilcher, H. (2004). Stuck on you. *Nature*, 432, 10–11
- Pitt, C. G. (1990). Poly-ε-caprolactone and its copolymers. *Drugs and The Pharmaceutical Sciences*, 45, 71-120.
- Plieva, F. M., Andersson, J., Galaev, I. Y., and Mattiasson, B. (2004). Characterization of polyacrylamide based monolithic columns. *Journal of Separation Science*, 27(10-11), 828-836.
- Quesenberry, P. J., and Colvin, G. A. (2001). Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. *Williams Hematology*, 338, 153-174.
- Rabiner, S. F., O'Brien, K., Peskin, G. W., and Friedman, L. H. (1970). Further studies with stroma-free hemoglobin solution. *Annals of Surgery*, 171(4), 615.
- Reading, M., Price, D. M., Grandy, D. B., Smith, R. M., Bozec, L., Conroy, M., ... and Pollock, H. M. (2001, March). Micro-thermal analysis of polymers: current capabilities and future prospects. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 167, No. 1, pp. 45-62). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Roe, R. J. (2000). *Methods of X-ray and neutron scattering in polymer science*. Oxford University Press on Demand
- Rose, M. F. (1987). Electrical Insulation and Dielectrics in the Space Environment. *IEEE Transactions On Electrical Insulation*, (5), 555-571.
- Rosenfeld, M., and Surgenor, D. M. (1950). Methemalbumin: interaction between human serum albumin and ferriprotoporphyrin IX. *Journal of Biological Chemistry*, 183(2), 663-677.
- Sağlam, N. (2011). Bazı tıbbi sülüklerin (*Hirudo medicinalis* L. 1758 ve *Hirudo verbana* Carena, 1820) ihracatı, korunması ve sürdürülebilirliği. *Journal of Fisheries Sciences*, 5, 1-15.
- Saini, R., Bajpai, J., and Bajpai, A. K. (2012). Synthesis of poly (2-hydroxyethyl methacrylate)(PHEMA) based nanoparticles for biomedical and pharmaceutical applications. In *Nanoparticles in Biology and Medicine* (pp. 321-328). Humana Press, Totowa, NJ.
- Sarıkaya, A. G., Osman, B., Çam, T., and Denizli, A. (2017). Molecularly imprinted surface plasmon resonance (SPR) sensor for uric acid determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 251, 763-772.

- Sarkar, S. (2008). Artificial blood. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 12(3), 140.
- Savarino, L., Baldini, N., Greco, M., Capitani, O., Pinna, S., Valentini, S., ... and Netti, P. A. (2007). The performance of poly- ϵ -caprolactone scaffolds in a rabbit femur model with and without autologous stromal cells and BMP4. *Biomaterials*, 28(20), 3101-3109.
- Say, R., Garipcan, B., Emir, S., Patır, S., and Denizli, A. (2002). Preparation of poly (hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylamidohistidine) beads and its design as a affinity adsorbent for Cu (II) removal from aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 196(2-3), 199-207.
- Say, R., Keçili, R., Biçen, Ö., Şişman, F. Y., Hür, D., Denizli, A., and Ersöz, A. (2011). A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase. *Process Biochemistry*, 46(8), 1688-1692.
- Say, R., *Photosensitive aminoacid-monomer linkage and bioconjugation applications in life sciences and biotechnology*, TR. Patent No: 0311505 A1, 2011.
- Schaller, J., Gerber, S., Kaempfer, U., Lejon, S., and Trachsel, C. (2008). *Human blood plasma proteins: structure and function*. John Wiley and Sons.
- Schulten, H. R., and Lattimer, R. P. (1984). Applications of mass spectrometry to polymers. *Mass Spectrometry Reviews*, 3(2), 231-315.
- Sell, S. A., Wolfe, P. S., Garg, K., McCool, J. M., Rodriguez, I. A., and Bowlin, G. L. (2010). The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polymers*, 2(4), 522-553.
- Senior, K. R. (Ed.). (2010). *Bone and Muscle: Structure, Force, and Motion*. The Rosen Publishing Group, Inc.
- Shabana, H. M., Guo, W., Olley, R. H., and Bassett, D. C. (1993). Electron microscopic observation of spinodal decomposition in blends of tetramethyl polycarbonate and polystyrene. *Polymer*, 34(6), 1313-1315.
- Shih, C. (1995). Chain-end scission in acid catalyzed hydrolysis of poly (D, L-lactide) in solution. *Journal of controlled release*, 34(1), 9-15.
- Siddall, M. E., Trontelj, P., Utevsky, S. Y., Nkamany, M., and Macdonald III, K. S. (2007). Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1617), 1481-1487.

- Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., and Trehan, A. (2004). Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International journal of pharmaceutics*, 278(1), 1-23.
- Sket, B., and Trontelj, P. (2007). Global diversity of leeches (Hirudinea) in freshwater. In *Freshwater animal diversity assessment* (pp. 129-137). Springer, Dordrecht.
- Smith, K. S., Jakubzick, C., Whittam, T. S., and Ferry, J. G. (1999). Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 15184-15189.
- Sohn, J., Kang, H., Rao, K., Kim, C., Choi, E., Chung, B., and Rhee, S. (2001). Current status of the anticoagulant hirudin: its biotechnological production and clinical practice. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(5), 606-613.
- Sprung, J., Kindscher, J. D., Wahr, J. A., Levy, J. H., Monk, T. G., Moritz, M. W., and O'Hara, P. J. (2002). The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure®) in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial. *Anesthesia and Analgesia*, 94(4), 799-808.
- Squires, J. E. (2002). Artificial blood. *Science*, 295(5557), 1002-1005.
- Standring, S. (Ed.). (2015). *Gray's anatomy e-book: the anatomical basis of clinical practice*. Elsevier Health Sciences.
- Sutton, S. J., Vaughan, A. S., and Bassett, D. C. (1996). On the morphology and crystallization kinetics of monodisperse polyethylene oligomers crystallized from the melt. *Polymer*, 37(25), 5735-5738.
- Tang, Z. G., Black, R. A., Curran, J. M., Hunt, J. A., Rhodes, N. P., and Williams, D. F. (2004). Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly [ϵ -caprolactone] films. *Biomaterials*, 25(19), 4741-4748.
- Tennikova, T. B., and Freitag, R. (2000). An introduction to monolithic disks as stationary phases for high performance biochromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*, 23(1), 27-38.
- Türkmen, D., and Denizli, A. (2014). PHEMA based composite cryogels with loaded hydrophobic beads for lysozyme purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 859-865.
- Tüzmen, N., Bereli, N., Andaç, M., Akgöl, S., and Denizli, A. (2008). Supramacroporous support having dye for reuseable enzyme immobilization. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 36(1), 9-19.
- Utevsky, S., Zagmajster, M., Atemasov, A., Zinenko, O., Utevska, O., Utevsky, A., and Trontelj, P. (2010). Distribution and status of medicinal leeches (genus *Hirudo*) in

- the Western Palaearctic: anthropogenic, ecological, or historical effects?. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 20(2), 198-210.
- Ünlüer, Ö. B., Ersöz, A., Say, R., Tomsuk, Ö., and Sivas, H. (2013). Novel nanoimaging approach: Antibodious polymeric nanolabel for intracellular alpha-fetoprotein targeted monitoring. *Biotechnology progress*, 29(2), 472-479.
- Van Brussel, I., Bult, H., Martinet, W., De Meyer, G. R., and Schrijvers, D. M. (2013). Dendritic Cells in Atherogenesis: From Immune Shapers to Therapeutic Targets. *Current Trends in Atherogenesis*, 55.
- Varma I.K, Albertsson A.C, Rajkhowa R., Srivastava R.K., (2005). Enzyme catalyzed synthesis of polyesters, *Progress in Polymer Science*, 30, 949-981.
- Vyazovkin, S., Burnham, A. K., Criado, J. M., Pérez-Maqueda, L. A., Popescu, C., and Sbirrazzuoli, N. (2011). ICTAC Kinetics Committee recommendations for performing kinetic computations on thermal analysis data. *Thermochimica Acta*, 520(1-2), 1-19.
- Walder, J. A., Zaugg, R. H., Walder, R. Y., Steele, J. M., and Klotz, I. M. (1979). Diaspirins that crosslink. Beta chains of hemoglobin: bis (3, 5-dibromosalicyl) succinate and bis (3, 5-dibromosalicyl) fumarate. *Biochemistry*, 18(20), 4265-4270.
- Whitaker, I. S., Rao, J., Izadi, D., and Butler, P. E. (2004). Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 42(2), 133-137.
- Whitlock, M. R., O'hare, P. M., Sanders, R., and Morrow, N. C. (1983). The medicinal leech and its use in plastic surgery: a possible cause for infection. *British Journal of Plastic Surgery*, 36(2), 240-244.
- Wilbur, K. M., and Anderson, N. G. (1948). Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176(1), 147-154.
- Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W., (2010). The return of a forgotten polymerpolycaprolactone in the 21st century, *Progress in Polymer Science*,35,1217-1256.
- Woolley, P. (1975). Models for metal ion function in carbonic anhydrase. *Nature*, 258(5537), 677-682.
- Worthen, P. L., Gode, C. J., and Graf, J. (2006). Culture-independent characterization of the digestive-tract microbiota of the medicinal leech reveals a tripartite symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4775-4781.

- Xiang, P., Li, M., Zhang, C. Y., Chen, D. L., and Zhou, Z. H. (2011). Cytocompatibility of electrospun nanofiber tubular scaffolds for small diameter tissue engineering blood vessels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(3), 281-288.
- Yase, K., Inoue, T., and Okada, M. (1990). Direct observation of cadmium arachidate thin films with lateral and normal molecular orientations by superconducting cryo-electron microscopy. *Microscopy*, 39(6), 454-458.
- Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., and Denizli, A. (2009). Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography. *Biochemical Engineering Journal*, 43(3), 272-279.
- Yılmaz, F., Ünlüer, Ö. B., Ersöz, A., and Say, R. (2018). Multifunctional nanoenzymes from carbonic anhydrase skeleton. *Process Biochemistry*, 72, 71-78.
- Yu, H., VandeVord, P. J., Mao, L., Matthew, H. W., Wooley, P. H., and Yang, S. Y. (2009). Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. *Biomaterials*, 30(4), 508-517.
- Zaidi, S. M., Jameel, S. S., Zaman, F., Jilani, S., Sultana, A., and Khan, S. A. (2011). A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Alternative Medicine Review*, 16(1), 59-65.
- Zhang, X., Liu, C., Yuan, Y., Shan, X., Sheng, Y., and Xu, F. (2008). Reduction and suppression of methemoglobin loaded in the polymeric nanoparticles intended for blood substitutes. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 87(2), 354-363.
- Zhao, J., Liu, C. S., Yuan, Y., Tao, X. Y., Shan, X. Q., Sheng, Y., and Wu, F. (2007). Preparation of hemoglobin-loaded nano-sized particles with porous structure as oxygen carriers. *Biomaterials*, 28(7), 1414-1422.
- Zijlstra, W. G., and Buursma, A. (1997). Spectrophotometry of hemoglobin: absorption spectra of bovine oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118(4), 743-749.
- http1: https://pic.weblogographic.com/img/news/380/difference-between-granulocytes-and-agranulocytes_1.jpg
- http2: https://pic.weblogographic.com/img/news/380/difference-between-granulocytes-and-agranulocytes_2.jpg
- http3: <https://polymerscience.physik.hu-berlin.de/docs/manuals/DSC.pdf>

[http4: https://www.wsj.com/articles/SB115282855429206224](https://www.wsj.com/articles/SB115282855429206224)



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Umut ÇELİKOĞLU

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Geçmişi:

- 2009, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü
- 2015, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya, Yüksek Lisans
- 2021, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyokimya, Doktora

Mesleki Denevim

- 2011, Amasya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Araştırma Görevlisi
- 2013, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Araştırma Görevlisi
- 2018, Amasya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Araştırma Görevlisi (Devam ediyor)

Yayınları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

Bilimsel Yayınlar

- Zülfikaroğlu Ayşin, Yüksektepe Ataoğlu Çiğdem, Çelikoğlu Emine, Çelikoğlu Umut, İdil Önder (2020). New Cu(II), Co(III) and Ni(II) metal complexes based on ONO donortridentate hydrazone: Synthesis, structural characterization, and investigation of some biological properties. *Journal Of Molecular Structure*, 127012 (Yayın No: 6452599)
- Kaplan Alevcan, Çelikoğlu Umut (2020). Evaluation Of Phytochemical Constituents In The Whole Plant Parts Of Hexane Extract Of Some Traditional Medicinal Plants By Gc-MS Analysis. *Middle East Journal of Science* (Kontrol No: 6886925)
- Ayar Elif, Kandemir Nezahat, Kandemir Şevket, Çelikoğlu Umut, İdil Önder (2020). Investigation of Some Biological Activities of Extracts Centranthus longiflorus subsp. longiflorus. *International Journal of Secondary Metabolite*,

Doi: doi.org/10.21448/ijsm.648072 (Kontrol No: 6886908)

- Keçili Rüstem, Çelikoğlu Umut, Mil Sevgi, Ersöz Arzu, Say Rıdvan (2018). Concanavalin A photocross-linked affinity cryogels for the purification of horseradish peroxidase. *Adsorption Science Technology*, 1-14. (Yayın No: 4381570)
- Yılmaz Cankılıç Meral, Çelikoğlu Emine, Çelikoğlu Umut (2017). Screening of Hydrolytic Enzyme Production and FAME (Fatty Acid Methyl Esters) Analysis of Thermophilic Bacteria From Hot Springs. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(10), 5865-5872. (Yayın No: 3586438)
- Gül Melek, Öztürk Çalı İlkay, Cansaran Arzu, İdil Önder, Kulu İrem, Çelikoğlu Umut (2017). Evaluation of phytochemical content, antioxidant, antimicrobial activity and DNA cleavage effect of endemic *Linaria corifolia* Desf. (Plantaginaceae). *Cogent Chemistry*, 3(1), Doi: 10.1080/23312009.2017.1337293 (Yayın No: 3541841)
- Sercan Ozbek Yazici, Ismail Ozmen, Umut Celikoglu, Hasan Ozcelik, Hasan Genç (2012). In vitro Antioxidant Activities of Extracts From Some *Nepeta* Species. *International Journal of Health and Nutrition*, 3(1), 8-12. (Yayın No: 916948)
- Karipcin Fatma, Ozmen Ismail, Culcu Burcin, Celikoglu Umut (2011). Synthesis Characterization Thermal Behavior and DNA Cleaving Studies of Cyano Bridged Nickel II Copper II Complexes of 4 Pyridinyl resorcinol. *Chemistry & Biodiversity*, 8(10), 1871-1879. (Yayın No: 917485)

Projeler

- HEME Sentezi İçin Tekrar kullanılabilir Yarı Sentetik Ferroselataz Enzim Platformları Geliştirilmesi, Tübitak 3001, Bursiyer: Umut Çelikoğlu, 02/08/2018-29/06/2020 (Ulusal)
- 3. Organik Elektronik Çalıştayı, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 14/06/2018-17/01/2019 (Ulusal)
- Mavi Yeşil Alglerin Şelataz Enzimi Üretme Kapasitelerinin Belirlenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 15/05/2018-15/05/2019 (Ulusal)
- İmmunoglobulin G saflaştırılması için moleküler baskılanmış kriyojel kolonların geliştirilmesi, Proje No: 1705S177, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 01/06/2017-01/06/2018 (Ulusal)
- Albümin Tabanlı Esneklik Sensörü Geliştirilmesi ve Biyometrik Uygulamaları, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 02/06/2017-02/06/2018
- BiNanoenzim Sentezi ve Karbondioksitin Formik Aside Dönüşümünün İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma

projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 03/06/2016-03/06/2017 (Ulusal)

- *Centhranthus longiflorus* ssp *longiflorus* un Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 15/05/2014-19/04/2016 (Ulusal)
- *Centhranthus longiflorus* ssp *longiflorus* un Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 30/09/2014-13/04/2016 (Ulusal)
- *Leucojum aestivum* Ekstraktlarının Antioksidan Antimikrobiyal ve Plazmid DNA Üzerine Aktivitelerinin Belirlenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 15/04/2015-24/12/2015 (Ulusal)
- Sürdürülebilirlik İçin Altyapının Güçlendirilmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 14/12/2018-13/12/2019 (Ulusal)
- Endemik *Iris taochia* Iridaceae Woronow Ex Grossh Ekstraktlarının Antioksidan Antimikrobiyal ve Plazmid DNA Üzerine Aktivitelerinin Belirlenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 01/04/2015-30/12/2016 (Ulusal)
- Protein G Tabanlı Ön Deriştirme Malzemeleri Geliştirilmesi ve Histon Antikor Bağlanma Etkinliklerinin İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 02/06/2014-02/06/2015 (Ulusal)
- Tavuk Göğüs Kıkırdadığından Kolajen Tip 2 Saflaştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 01/06/2017-01/06/2018 (Ulusal)
- Hemogloblin Tabanlı Biyonanobellek Geliştirilmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 03/06/2016-03/06/2017 (Ulusal)
- Tekrar Kullanılabilir Pektinaz İmmobilize Manyetik Karakterli Nanopartiküllerin Geliştirilmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 21/05/2018-05/09/2019 (Ulusal)
- 2023 Vizyonunda Üniversitelerin Araştırma Laboratuvarları alıştayı-V, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 08/03/2019-08/05/2019 (Ulusal)
- Endemik *Iris taochia* Iridaceae Woronow Ex Grossh Ekstraktlarının Antioksidan Antimikrobiyal ve Plazmid DNA Üzerine Aktivitelerinin Belirlenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 01/04/2015-29/12/2016 (Ulusal)
- Amasya/Yeşilırmak Siyanobakteri eşitliliğinin Belirlenmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı:

Çelikoğlu Umut, 15/05/2018-15/05/2019 (Ulusal)

- Çevreden izole edilen mikroorganizmalarda pektinaz enziminin karakterizasyonu, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 15/05/2015-14/07/2017 (Ulusal)
- Topraktan İzole Edilen Bacillus thuringiensis Bakterisinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterize Edilmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Çelikoğlu Umut, 15/06/2014-26/12/2014 (Ulusal)

Ödülleri

- Tübitak Yurtiçi Yüksek Lisans Bursu

Bildiriler

- Konar Vahit, İdil Önder, Çelikoğlu Umut (2020). Mavi Yeşil alglerin şelataz enzimi üretme kapasitelerinin belirlenmesi. 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:6160816)
- Çelikoğlu Umut (2020). Tekrar kullanılabilir pektinaz immobilize manyetik karakterli nanopartiküllerin geliştirilmesi. 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020) (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:6160560)
- Kaplan Alevcan, Çelikoğlu Umut (2019). Determination of Bioactive Composition of Some Aromatic Plants that Grown Naturally in the Batı Raman Campus of Batman University. 1st International Aromatic Plants and Cosmetics Symposium (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:5510350)
- İdil Önder, Çelikoğlu Emine, Çelikoğlu Umut (2018). Fatty Acid Profiles of Yeşilırmak/Amasya Filamentous Cyanobacteria. 2nd International Unıdokap Black Sea Symposium on Biodiversity (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4564566)
- Çelikoğlu Umut, Karahan Meltem, Say Rıdvan, Ersöz Arzu (2017). Development of Chromatographic material for Bromelain Purification. 2nd International Conference in Natural and Applied Sciences (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4073009)
- Çelikoğlu Umut, Karahan Meltem, Ünlüer Özlem, Say Rıdvan, Ersöz Arzu (2017). Purification of Magnesium Chelatase Enzyme From Plant Leaves. International conference on Advances in Natural and Applied Sciences (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:4152648)
- Çelikoğlu Umut, Keçili Rüstem, Hür Deniz, Ersöz Arzu (2016). Site Specific Recognition of IgG by using Mannose Imprinted Polymers. MIP2016 (/)(Yayın No:3046164)
- Yılmaz Cankılıç Meral, Çelikoğlu Umut (2016). The Analysis of

Physicochemical Properties and Cyanobacterial Morphotypes of Kozyaka and Hamidiye. Symposium on EuroAsian Biodiversity (/)(Yayın No:3045842)

- İsmail Ozmen, Umut Celikoğlu, Sercan Özbek Yazıcı (2011). Effects Of Ankyropetalum reuteri Fenzl Extract on Plasmid DNA. 2nd International Non-Wood Forest Products Symposium, 2(1), 191-193. (Tam Metin Bildiri/)(Yayın No:917007)
- Sercan Özbek Yazıcı, İsmail Ozmen, Umut Çelikoğlu (2011). Determination of Antioxidant Activity of Gypsophila pilulifera Boiss Hausskn Extract. 2nd International Non-Wood Forest Products 10. 3 Symposium (/)(Yayın No:917237)
- I. Ozmen, U. Celikoglu, S. Ozbek Yazıcı, H. Ozelik, H. Genc (2011). Antioxidant Activities of Extracts Obtained From Some Nepeta Species. 2nd International Non-Wood Forest Products Symposium, 106-106. (Tam Metin Bildiri/)(Yayın No:917206)
- İsmail Ozmen, Umut Celikoglu, Hasan Ozelik, Sercan Ozbek Yazıcı (2011). In vitro Antioxidant Activity of Extract of Ankyropetalum reuteri Fenzl. 2nd International Non-Wood Forest Products Symposium, 2(1), 102-105. (Tam Metin Bildiri/)(Yayın No:917158)
- Sercan Özbek Yazıcı, İsmail Özmen, Umut Çelikoğlu (2011). Effects of Gypsophila pilulifera Boiss Hausskn Extract on Plasmid DNA. 2nd International Non-Wood Forest Products Symposium, 104- 104. (/)(Yayın No:917225)
- Fevziye Özdemir Şimşek, İsmail Özmen, Umut Çelikoğlu Gypsophila Gypsophila Arrostii Var Nebulosa Ekstresinin Kolon Kromatografisi İle Ayrılması Ve Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi. 6. Ulusal Afinité Teknikleri Kongresi (Özet Bildiri/)(Yayın No:917191)
- Fevziye Özdemir Şimşek, İsmail Özmen, Umut Çelikoğlu Gypsophila Gypsophila Arrostii Var Nebulosa Ekstresinin Plazmid DNA Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. 6. Ulusal Afinité Teknikleri Kongresi (Özet Bildiri/)(Yayın No:917175)
- Alev Yağmur, Çelikoğlu Umut, Say Rıdvan, Ersöz Arzu (2017). Zn(II) Bağlı Makro Gözenekli p(HEMA-MAH) Kriyojeli İle Hemoglobın Saflaştırılması. 11. Ulusal Afinité Teknikleri Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3726209)
- Gül Melek, Kulu İrem, Öztürk Çalı İlkay, Cansaran Arzu, Çelikoğlu Umut, Çelikoğlu Emine, İdil Önder (2013). Endemik Linaria corifolia Desf. (Scrophulariaceae) Bitki Ekstrelerinin Eldesi ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları. I.Ulusal Organik Kimya Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3560483)