



**FERRİTİNİN SPESİFİK TANINMASI İÇİN EPİTOP BASKILANMIŞ PDMS
YÜZEYLERİN HAZIRLANMASI VE KULLANILABİLİRLİĞİ**

Recep BÖCEK

**YÜKSEK LİSANS
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Recep BÖCEK

18/02/2021

FERRİTİNİN SPESİFİK TANINMASI İÇİN EPİTOP BASKILANMIŞ PDMS YÜZEYLERİN HAZIRLANMASI VE KULLANILABİLİRLİĞİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Recep BÖCEK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2021

ÖZET

Moleküler baskılama tekniği; bazı hastalıkların teşhisi ve tedavisinde, ilaç salımında, sensörlerde, kromatografide, bazı maddeleri saflaştırma ve ayırma gibi birçok alanda başarı ile uygulanan bir yöntemdir. Proteinler, yüzlerce aminoasitin düzgün bir şekilde bağlanmasıyla bir araya gelen makromoleküllerdir. Makromoleküller yerine onlara ait bir alt parçanın baskılanmasına “epitop baskılama tekniği” adı verilir. Ferritin, 24 homolog alt birimden oluşan bir demir depolama proteinidir. Laktoferrisin B ise özellikle immün sistemde önemli roller oynayan ferritine ait bir alt peptit dizisidir. Çeşitli moleküler baskılama yöntemleri mevcuttur. Bu çalışmada, ferritinin spesifik olarak ayırt edilebilmesi için epitop baskı tekniği kullanılarak Polidimetilsiloksan yüzeyler hazırlandı. UV-GB ile moleküler olarak baskılanmış polimerler yüzeylerimizin (MIP) absorbans değerlerini ölçerek adsorbsiyon kinetiği, yeniden kullanılabilirlik, hedef proteine seçicilik çalışmaları yapıldı. Gerçek numunelerde çalışmamızın verimini denedik.

Bilim Kodu : 20107

Anahtar Kelimeler : MIP, NIP, PDMS, Laktoferrisin B, Ferritin, Moleküler baskılama

Sayfa Adedi : 59

Danışman : Prof. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

PREPARATION AND USABILITY OF EPITOP PRINTED PDMS SURFACES FOR
SPECIFIC RECOGNITION OF FERRITINE

Recep BÖCEK

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2021

ABSTRACT

Molecular imprinting technique is a method successfully applied in many areas such as diagnosis and treatment of some diseases, drug release, sensors, chromatography, purification and separation of some substances. Proteins are macromolecules that come to get their by the proper binding of hundreds of amino acids. The printing of a subpart of macromolecules instead of them is called epitope suppression technique. Ferritin is an iron storage protein composed of 24 homologous sub units. Lactoferricin B (LFB) is a sub-peptide sequence belonging to ferritin, which plays an important role in the immunesystem. Various molecular suppression methods are available. In this study; We have prepared polydimethylsiloxane surfaces using the epitope printing technique to specifically distinguish ferritin. By measuring the absorbance values of our molecularly imprinted polymers (MIP) surfaces with UV-GB spectrophotometer, we conducted adsorption kinetics, reusability, selectivity to target protein. We tried our efficiency of working with real samples.

Science Code : 20107

Key Words : MIP, NIP, PDMS, Lactoferricin B, Ferritin, Molecularly imprinting.

Page Number : 59

Supervisor : Prof. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada; çalışmama büyük bir özveri ile ışık tutan, engin bilgi birikimi ve tecrübelerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim Değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yine bu çalışmamda; hem ilgi ve alakası hem de verdiği moral ve motivasyonun yanında, kendimi geliştirmemde de büyük bir çaba sarf eden Sevgili Hocam Doç. Dr. Eylem TURAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim-öğretim hayatım boyunca üstün bir çaba gösteren, her daim desteklerini üzerimden eksik etmeyen Sevgili Eşim Derya'ya ve Biricik Oğlum Kağan'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
EŞİTLİKLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kovalent Baskılama	5
2.2. Kovalent Olmayan Baskılama.....	6
2.3. Hedef Molekül.....	7
2.4. Fonksiyonel Monomer	10
2.5. Çapraz Bağlayıcı	13
2.6. Çözücü.....	15
2.7. Başlatıcı.....	16
2.8. Epitop Baskılama	16
2.9. Moleküler Baskılanmamış Polimerler (NIP).....	18
2.10. Ferritin	18
2.10.1. Ferritin nedir?	18
2.10.2 Biyomedikal uygulamalarda ferritin.....	21
2.10.3. Ferritin yüksekliği belirtileri nelerdir?	24
2.10.4. Laktoferrisin B.....	25

	Sayfa
3. DENEYSEL KISIM	31
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.2. Kullanılan Cihazlar	34
3.2.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)	34
3.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	34
3.3. PDMS Yüzeylerin Hazırlanması.....	34
3.4. LFB Baskılanmış PDMS Yüzeylerin Hazırlanması.....	35
3.5. Başlangıç LFB Derişimi Etkisinin Belirlenmesi	35
3.6. Adsorpsiyon Kinetiği Çalışmaları	36
3.7. Seçicilik Çalışmaları	36
3.8. MIP Yüzeylerin Tekrar Kullanılabilirlik Sayılarının Belirlenmesi.....	37
3.9. Gerçek Numunelerde Uygulanabilirlik	37
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	39
4.1. Laktoferrisin B Baskılanmış PDMS Yüzeyler	39
4.2. Başlangıç LFB Derişiminin Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi	44
4.3. Adsorpsiyon Kinetiği	45
4.4. Hedef Proteine Seçicilik.....	46
4.5. LFB Baskılanmış PDMS Yüzeylerin Tekrar Kullanılabilirliği.....	48
4.6. Baskılanmış PDMS Yüzeylerin Sentetik Kan Numunelerinde Uygulanabilirliği	49
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. SiNP@SiO ₂ 'e özgü seçici boşluklara sahip MIP'lerin oluşturulması ve geri bağlama yapılması.....	3
Şekil 2.1. Şematik diyagramlar molekül baskılama sürecine ait A) kovalent baskılama B) kovalent olmayan baskılama.	5
Şekil 2.2. Moleküler baskılamada kullanılan bazı fonksiyonel monomerler.....	12
Şekil 2.3. Moleküler baskılamada kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar.....	14
Şekil 2.4. Ferritin yapısı.....	20
Şekil 2.5. Laktoferrisin B peptidinin dizilimi	26
Şekil 2.6. LFB'nin hidrofobik çekirdeğinin yapısı	28
Şekil 2.7. LFB'nin pozitif yan zincirlerinin gösterimi	29
Şekil 3.1. Laktoferrisin B'nin moleküler yapısı.....	31
Şekil 3.2. Dopamin hidroklorürün moleküler yapısı	32
Şekil 3.3. 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol'ün moleküler yapısı	32
Şekil 3.4. Fibrinojen.....	32
Şekil 3.5. Miyogloblin	33
Şekil 3.6. Hemogloblin	33
Şekil 3.7. Ferritin	33
Şekil 3.8. Dopaminin oksidatif olarak kendiliğinden polimerleşmesini gösteren olası reaksiyon	35
Şekil 4.1. PDMS yapısı.....	39
Şekil 4.2. Dopaminin oksidatif olarak kendiliğinden polimerleşmesini gösteren olası reaksiyon.	40
Şekil 4.3. Ferritin spesifik tanınması için hazırlanan LFB baskılanmış PDMS yüzeylerin şematik gösterimi.....	41
Şekil 4.4. Modifiye edilmemiş (a), baskılanmış PDMS yüzeylere ait FT-IR spektrumu	42
Şekil 4.5. Modifiye edilmemiş (a), baskılanmamış (b) ve baskılanmış (c) PDMS yüzeylerin SEM görüntüleri.	43

Şekil	Sayfa
Şekil 4.6. MIP ve NIP PDMS yüzeylerin adsorpsiyon kapasitesine başlangıç LFB derişimi etkisi.	44
Şekil 4.7. MIP ve NIP PDMS yüzeylerin adsorpsiyon kinetiğı.....	46
Şekil 4.8. MIP ve NIP PDMS yüzeylerin hedef proteine seçiciliğı.....	47
Şekil 4.9. MIP ve NIP PDMS yüzeylerin yeniden kullanılabilirliğı.....	48



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Hedef molekül olarak kullanılan NSAID'ler ve fiziko kimyasal özellikleri	9
Çizelge 4.1.MIP ve NIP PDMS yüzeylerin K_d ve Q_{max} değerleri.....	45
Çizelge 4.2. Ferritinin MIP PDMS ile sentetik kan numunelerinden geri kazanımı	49



EŞİTLİKLERİN LİSTESİ

Eőitlik	Sayfa
Eőitlik 4.1. Scatchard eşitliği	45



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Derece Celcius
v/v	Hacimce
kDa	Kilo dalton
m/m	Kütlece
kDa	Kilo dalton
mL	Mililitre
M _A	Mol kütlesi
T	Mutlak sıcaklık
Nm	Nanometre
P _m	Polimer
P _n	Polimer zincirinin bir kısmı

Kısaltmalar	Açıklamalar
¹ H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
AIBN	Azobisisobütironitril
AIDS	İmmün Yetmezlik Sendromu
AMP	Antimikrobiyal Peptitler
DFT	Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi
DMF	Yüzey Pürüzlülük Değeri
Dox	Doksurobusiri
EPR	Tutma Etkisi
Fbn	Fibrinojen
Fn	Ferritin
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektrometresi
Hb	Hemoglobin
HLH	Hemofagositik Lenfhistiyositoz Hastalığı

Kısaltmalar	Açıklamalar
LFB	Laktoferrisin B
Lfcin	Laktoferrisin
MAA	Metakrilik Asit
Mb	Miyoglobin
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimerler
MMIP	Manyetik Olarak Duyarlı MIP'ler
NIP	Moleküler Baskılanmamış Yüzeyler
NSAID	Non Steroid Anti İnflamatuar İlaçlar
TfR1	Transferrin reseptörü 1
THF	Tetrahidrofuran
UV-GB	Ultraviyole-Görünür Bölge
XRD	X-Işını Kırınımı

1. GİRİŞ

İlk olarak 1930'lu yıllarda Sovyet kimyager Polyakov'un çözünür katkı maddelerinin varlığında hazırlanan silika parçacıklarının olağan dışı adsorpsiyon özelliklerini rapor ettiği çalışmasında geçen moleküler baskılanmış polimerler [1], çeşitli uygulamalarda ideal bir malzeme olarak kullanılabilen, belirli bir numune içindeki hedef bir moleküle özgü seçiciliğe sahip reseptörleri olan maddelerdir. 1970'li yıllarda Wulff [2] tarafından önemli çalışmalar yapılsa da 1990'lı yıllarda Mosbach [3] ve arkadaşları kovalent olmayan baskılamayı tanıttığında popüleritesi iyice arttı. Moleküler olarak baskılanmış polimerler kısaca MIP olarak adlandırılmıştır. MIP'lerin son yıllarda üstün özelliklerinden dolayı birçok alanda kullanımı mevcuttur. MIP'ler doğal molekülleri tanıma yetenekleri, fiziksel ve kimyasal olarak sert ortamlarda yüksek stabiliteleri nedeniyle biyo-reseptörlere umut verici alternatifler olarak görülmüşlerdir. MIP'ler için şimdiye kadarki en önemli hedefler herbisitler, metal iyonlar ve katkı maddeleri gibi küçük moleküller olmuştur ancak bakteriler veya toksinler gibi büyük proteinler ve hormonlarda gıda analizleri için önemli hedeflerdendir. Sulu çözeltilerdeki bakteri ve proteinlerin tespiti için özel yapım MIP'lerin geliştirilmesinin önemli bir araştırma yönü olacağı düşünülmektedir. MIP'ler, gıdalardaki çeşitli analitleri tespit etmek için elektrokimyasal, optik ve kütle biyosensörleri gibi biyo algılama platformlarında reseptör olarak kullanılmıştır [4]. Hedef moleküle özgü seçici boşluklara sahip olan MIP'lerin bir diğer kullanım alanının çevresel sular, topraklar, sebzeler gibi çeşitli numunelerde eser miktardaki analizlerin yapılmasıdır [5].

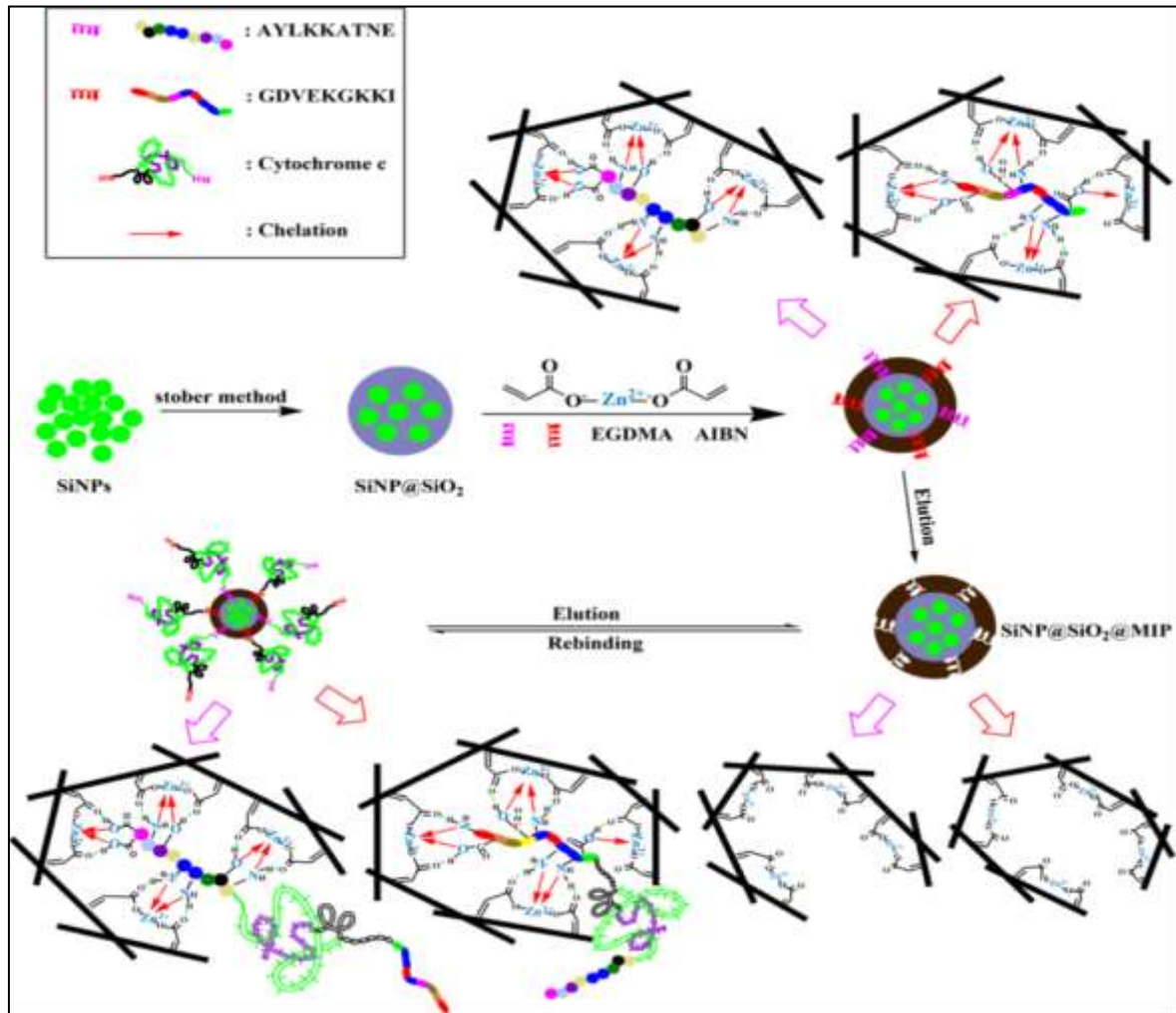
Manyetik bileşenler; moleküler baskılı polimerlere katılarak, bu polimerik malzemelerde elektrot yüzeyine katılarak yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip olmasının yanında düşük maliyetli, tekrarlanabilir ve hızlı test sürecine sahip olan elektrokimyasal sensörlerin tasarımına olanak sağlamıştır. Manyetik olarak duyarlı üretilen MIP'lerin (MMIP); hedef molekülün filtrasyon, santrifüjleme veya herhangi bir karmaşık işlem gerekmeksizin elektrot yüzeyinden kolayca toplanıp ayırt edilmesine olanak sağladığı görülmüştür [6]. Baskılama sonucunda elde edilen MIP'ler kimyasal molekülleri tanıyabildiği gibi, biyolojik hücreleri ve proteinleri yüksek ilgi ve hassasiyetle tanıma gibi üstün özelliklere sahiptir [7]. MIP'ler son yıllarda birçok araştırmaya konu olmuştur bunlardan en önemlisi başta immün sistem olmak üzere canlı vücudundaki bazı aminoasitlerin ve proteinlerin ayırt edilmesidir [8]. Aynı zamanda MIP'lerden kontrollü olarak birçok ilacın salımından da faydalanılmıştır [9]. Genel olarak MIP'lerin uygulama alanları; biyolojik antikolar [7], kataliz [10], sensörler [11], bazı

maddelerin kiral olarak ayırt edilmesi [12], izolasyon [13], ilaç ve gıda endüstrisi [14], kromatografik ayırma [15] olarak genellenmiştir. Son yıllarda özellikle bazı yasa dışı ilaçların, uyuşturucu ve uyarıcı madde içeren maddelerin tespit edilmesi ve miktarının belirlenmesinde de MIP'ler aktif olarak kullanılmıştır[16].

Uygun koşullar altında, seçici olarak karmaşık sistemlerden ayırmak istediğimiz hedef molekülün, fonksiyonel monomerle birlikte bir çapraz bağlayıcı yardımıyla polimerleşmesiyle ve hemen ardından uygun bir çözücü ile üç boyutlu yapıdan geri uzaklaştırılmasıyla hedef moleküle özgü seçici boşluklara sahip olan moleküler olarak baskılanmış polimerler (MIP) elde ederiz. MIP'ler; yüksek seçicilik, yeniden kullanılabilirlik fiziksel sağlamlık, yüksek sıcaklık ve basınçlara karşı direnç, asitlere ve bazlara karşı eylemsizlik, düşük üretim maliyeti, üretim kolaylığı, depolama ömürlerinin yüksek olması ve oda koşulları altında birkaç yıl muhafaza edilebilmesi gibi avantaj sağlayan üstün özelliklere sahiptir [17]. Kemosensör üretimi için tanıma birimleri olarak kullanılırlarsa, dayanıklılıkları, kimyasal stabiliteleri ve düşük üretim maliyetleri gibi özellikleri sayesinde doğal reseptörlerden daha iyi performans gösterirler. İnce filmler, yüzey geliştirme ve ek özelliklerin eklenmesi gibi yeni MIP biriktirme teknikleri, seçici ve hassas kemosensör üretimi açısından çok talep edilmektedir. Bu nedenle, son yıllarda nano yapıları MIP filmlerinin ve MIP nanopartiküllerinin sentezine özel bir önem verilmiştir. Moleküler baskılama, numuneye göre önceden hazırlanmış hedef moleküle göre seçiciliğe sahip sağlam malzemelerin hazırlandığı çok güçlü sentetik bir yöntemdir. MIP'ler birçok analitik ve biyo-analitik uygulamalarda özellikle biyosensörlerin geliştirilmesi ve ilaç deneylerinde antikorlar için çok çekici maddelerdir. Seçici moleküler bağlanmaya ek olarak, sentetik materyalleri farklı çevresel koşullara duyarlı hale getirmek için MIP'lere yeni fonksiyonlar ekleniyor, bu da farklı moleküler hedeflerin bağlanmasını ve salınmasını modüle etmeyi ve seçici ayırmayı basitleştirmeyi mümkün kılıyor. Sinyal iletim işlevselliğinin MIP'lere eklenmesi, önemli analitik hedeflerin tespiti ve miktarının belirlenmesi için yeni, daha kolay çalıştırılan kimyasal sensörler de getirir [18].

Kullanım alanlarına göre çeşitli hazırlanma şekilleri olan MIP'ler genellikle hedef olarak belirlenen bir molekül ve fonksiyonel monomerin yeteri miktarda çapraz bağlayıcıyla birlikte üç boyutlu bir polimer ağı oluşturulmasıyla oluşur. Bağlanma, genellikle hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve zayıf metal koordinasyonu gibi çeşitli kovalent olmayan etkileşimler yoluyla gerçekleşir. Moleküler baskı, bu tür

etkileşimlerin sentetik polimerler tarafından önceden belirlenmiş ligandların tanınması için kullanılabilmesini, böylece biyomoleküler tanıma işlemlerinde gözlenen tanıma olaylarını taklit edebilmesi için geliştirilmiş bir stratejidir. Polimerleşme işleminden sonra hedef molekül polimer yüzeyinde şekil, boyut ve kimyasal işlevsellik açısından tamamlayıcı seçici olarak tanıma bölgeleri bırakarak uzaklaşır. Böylece, sonuçta meydana gelen polimer sadece şablon molekülleri tanır ve bağlar. Moleküler olarak baskılı polimerlerin (MIP'ler) ana avantajları, baskı prosedüründe kullanılan hedef molekül için yüksek seçiciliği ve afinitesidir [19].



Şekil 1.1. SiNP@SiO₂'e özgü seçici boşluklara sahip MIP'lerin oluşturulması ve geri bağlama yapılması [20].

MIP'lerin sentezinde beş ön polimerizasyon reaktifine ihtiyaç duyulur bunlar; hedef moleküller, fonksiyonel monomer, çapraz bağlanma monomeri, radikal başlatıcı ve parojenik çözücüdür. Baskı tekniğinin başarısı, bu ön polimerizasyon reaktiflerinin dikkatli seçimine bağlıdır [21]. MIP'ler, özellikle hedeflenen üç boyutlu moleküllerin oluşumuyla

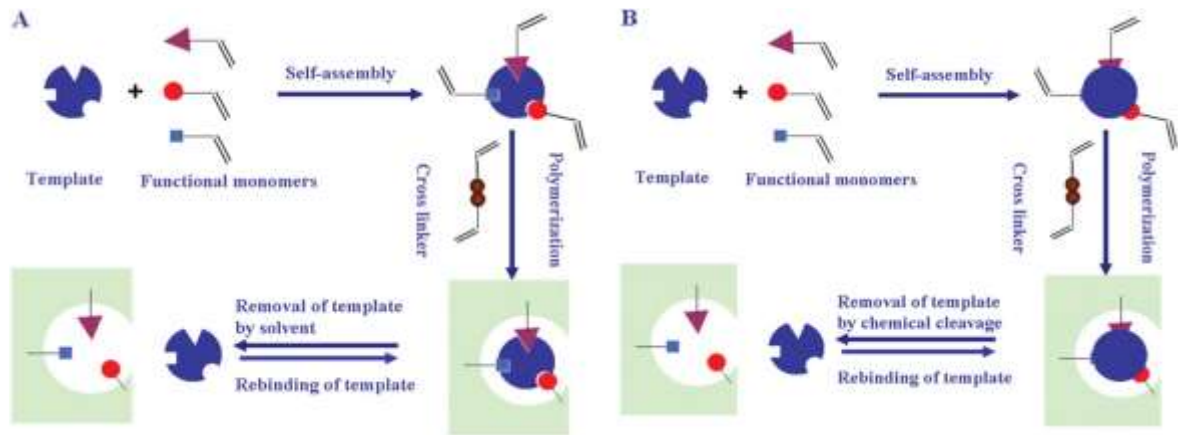
sonuçlanan bir kopolimerizasyon işlemiyle oluşturulan hedef molekül odaklı işlevsel polimerlerdir. Bu süreç temelde üç ana adımdan oluşur. İlk olarak, hedef molekül ve fonksiyonel monomerin aralarında bir ön polimerizasyon işlemi gerçekleşir. İkinci olarak ise kompleks çapraz bağlayıcı tarafından stabil hale getirilir. Üçüncü olarak ise hedef molekül uygun bir ekstraksiyon solüsyonu ile MIP'lerden çıkarılır ve hedef moleküle özgü seçici tanıma bölgeleri böylece oluşturulmuş olur [20].



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kovalent Baskılama

Genel olarak hedef moleküle veya kullanım alanlarına göre çeşitli baskılama teknikleri vardır. Bunlar genellikle; hedef molekül ile fonksiyonel monomerin aralarındaki etkileşime bağlı olarak kovalent baskılama veya non-kovalent baskılama olarak adlandırılır. İlk kez Wulf ve arkadaşları tarafından yapılan kovalent baskılamada polimerizasyon işlemi esnasında fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasında kovalent bağlar oluşur. Hedef molekül kalıptan uzaklaşırken bu kovalent bağlar kırılır ve hedef molekülünde yapıdan uzaklaşması ile moleküle özgü boşlukları olan üç boyutlu polimerik yapı elde edilir. Daha sonra seçici olarak hedef molekül numune ortamından alınmak istenildiğinde bu kovalent bağlar yeniden oluşur. Kovalent baskılama da kovalent olmayan baskılamaya göre daha sağlam bağlar oluştuğu için daha iyi tanıma bölgeleri oluşur. Ayrıca tanıma bölgelerinin yüksek kararlılığından dolayı polimer üzerinde tanıma bölgeleri homojen bir şekilde dağılım gösterir. Hedef molekül ve fonksiyonel monomerin bağlarının kovalent olmasının getirdiği diğer bir avantaj ise çok çeşitli polimerizasyon koşullarının uygulanabilir olmasıdır. Kovalent baskılamada karşılaşılan bir takım istenmeyen koşullarda söz konusudur. Polimerizasyonda bağlanma kovalent olduğu için süreç yavaş ilerler ve yine aynı şekilde bağların kırılması için daha fazla enerji gerekir dolayısıyla bağların kırılması yavaş ve zor olacaktır. Kovalent baskılamanın bir başka istenmeyen dezavantajı hedef molekülün tekrar bağlanma sayısının sınırlı olması ve MIP in yeniden kullanılabilirlik sayısının az olmasıdır [22].



Şekil 2.1. Şematik diyagramlar molekül baskılama sürecine ait A) kovalent baskılama B) kovalent olmayan baskılama [22].

2.2. Kovalent Olmayan Baskılama

Polimerizasyon işlemi sırasında fonksiyonel monomerle hedef molekül arasında kovalent olmayan zayıf etkileşimlerle oluşan baskılama non-kovalent baskılama olarak adlandırılır. Non-kovalent baskılamada Van der Waals, hidrojen bağı, hidrofobik, iyonik veya elektrostatik etkileşimler vardır. Baskılama yapıldıktan sonra hedef molekül uygun bir çözücü ile yapıdan ayrılır ve MIP yapı elde edilir. Hedef molekülü gerçek numunelerden ayırt etmek istediğimiz zaman geri bağlanma tekrar bu zayıf etkileşimlerle olur. Non-kovalent baskılamanın en önemli avantajı prosesin çok hızlı ilerlemesidir. Hedef molekülün yapıdan uzaklaştırılması ve geri bağlanması çok hızlı bir şekilde ilerler. Bunun yanında moleküle özgü tanıma bölgelerinin heterojen olarak dağılması istenilmeyen tanıma bölgelerinin oluşumu ve daha az seçicilik gibi istenilmeyen özelliklerde vardır. Ayrıca tanıma bölgeleri kovalent baskılamaya göre daha az belirgindir [4].

Hedef molekülün bir kısmının yerine ona ait alt bir parçanın veya bir kısmının baskılandığı baskılama türüne ise epitop baskılama tekniği adı verilmiştir [23]. Bununla birlikte baskılamak istediğimiz MIP'lerin kullanım alanlarına veya şekil ve boyutlarına ve hedef molekülün cinsine bağlı olarak çeşitli moleküler baskılama süreçleri de mevcuttur. Bunlar; hedef molekül, fonksiyonel monomer ve diğer bileşenlerin hepsinin bir araya getirilerek baskılama işleminin yapıldığı yüzey baskılama yöntemidir. Hazırlanması ve uygulanabilirlik olarak kolay olmasının verdiği avantaj ile en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde oksijenin vereceği olası hasarlardan kurtulmak için azot gibi bazı atıl gazlar dışarıdan verilerek oksijen uzaklaştırılır. Hazırlanan polimerler blok halindedir, daha da öğütülür ve elenirler. Ancak bu işlem baskılı boşlukları etkileyebilir bu da doğrudan verimi etkileyerek bir takım dezavantajlara neden olur [4].

Uygun bir çözücü içerisinde baskılama işleminin yapıldığı ve oluşturulan polimerin çözünmez olup altta çökelek oluşturulması ile yapılan baskılama işlemi çökelme polimerizasyonu olarak adlandırılır. Bu yöntemde partiküllerin boyutu kontrol edilir ancak şekilleri düzensiz kalır. Bu yöntem, yüksek bir seyreltme faktörüne sahiptir ve yığın polimerizasyonuna kıyasla daha fazla miktarda çözücü kullanılır. Polimerizasyon için gerekli tüm malzemelerin uygun organik bir çözücü içerisinde çözüldüğü ve daha sonra başka bir karışmaz çözücüye eklenerek yapılan polimerizasyon işlemine süspansiyon polimerizasyonu adı verilmiştir. Polimerizasyonun indüksiyonundan sonra, solüsyonun

kuvvetli bir şekilde karıştırılmasıyla küçük damlacıklar üretilir. Sürekli ön polimerizasyon çözücülerini olarak su, mineral yağ veya perflorokarbonlar kullanılır. Bu yöntemle üretilen partiküllerin boyutu 10–100 µm'ye kadar değişir. Yüzey baskı tekniğinde, baskılı polimerler, birçok teknikte gözenekli silika partikülleri (kromatografik sınıf) üzerine veya katı bir ortam etrafına baskılı tabakaların kaplanmasıyla üretilir. Bu yaklaşım basittir ve birçok alanda uygulanabilir ve geniş bir baskılı yüzey, kontrollü boyut ve şekil ve bol bağlanma yerleri elde edilir. Geleneksel polimerizasyona kıyasla, bu yöntem artmış tekrarlanabilirliğe ve yüksek seçicilik ve duyarlılığa sahiptir ancak büyük ölçekte verimi hala sınırlıdır [20].

2.3. Hedef Molekül

MIP'ler doğal molekülleri tanıma yetenekleri, fiziksel ve kimyasal olarak sert ortamlarda yüksek stabiliteleri nedeniyle biyo-reseptörlere umut verici alternatifler olarak görülmüşlerdir. MIP'ler, gıdalardaki çeşitli analitleri tespit etmek için elektrokimyasal, optik ve kütle biyosensörleri gibi biyo algılama platformlarında reseptörler olarak kullanılmıştır [4]. Dolayısıyla baskılama yönteminde hedef molekül olarak büyük boyutlu veya küçük boyutlu olmak üzere birçok molekül veya iyon kullanılmıştır. Hedef olarak numune ortamından seçici olarak ayırt edilmek istenen molekül yerine onunla birebir şekil ve işlev olarak aynı özelliklere sahip olan yapay bir molekül kullanılırsa buna şablon adı verilmiştir. Şablonların daha dayanıklı ve uzun ömürlü oldukları görülmüştür. Şablon seçiminde genellikle kullanılabilirliğe, maliyetine ve fonksiyonel monomerlerle güçlü etkileşimlerin oluşma yeteneğini belirleyen kimyasal işlevselliklerine göre seçilir [24]. Moleküler baskılamada bir şablon olarak seçilen bileşik, polimerizasyon sırasında kimyasal olarak inert ve orta derecede yüksek sıcaklıklarda (>60 °C) veya ultraviyole ışığa maruz kaldığında stabil olmalıdır [25]. Örnek olarak çizelge1 dekisteroidal olmayan intihap önleyici ilaçlar (NSAID) ler bu gereksinimleri karşılayan moleküler baskılama için iyi hedef moleküllerdendir.

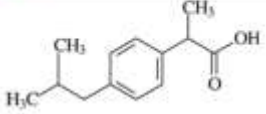
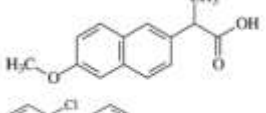
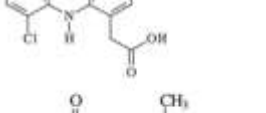
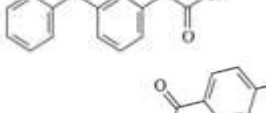
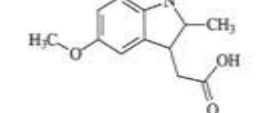
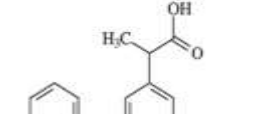
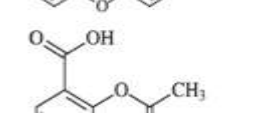
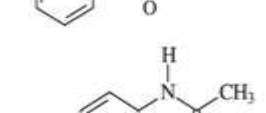
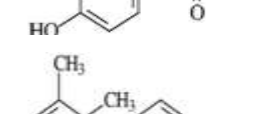
Moleküler baskılama yönteminde hedef molekül olarak büyük boyutlu veya küçük boyutlu olmak üzere birçok molekül kullanılmaktadır. Küçük moleküller olarak;

- Aminoasitler
- Nükleotidler

- Yağ asitleri
- Basit şekerler
- Bazı farmasotik ilaçlar

baskılama molekülü olarak kullanılmaktadır. Şablon olarak kullanılan proteinler, nükleik asitler gibi büyük moleküllerde vardır. Ancak; hedef molekül olarak küçük moleküller kullanmak baskılama açısından daha iyi sonuçlar elde etmemizi sağlamaktadır. Büyük moleküller gerek karmaşık yapıları gerekse de büyük boyutları nedeniyle iyi sonuç vermemektedir. Makromoleküllerin karmaşık yapıları genellikle işlevleri hakkında bilgi vermez. Aminoasitler, nükleik asitler, enzimler gibi biyolojik moleküller, önemli biyolojik aktivitelere sahip olan makromoleküllerdir [26]. Bu gibi biyolojik aktiviteye sahip olan makromoleküllerin tespiti özellikle biyotıp alanı ve biyokimya olmak üzere çok büyük ilgi görmüştür [27, 28]. Ayrıca baskılama yapıldıktan sonra polimerin baskılama molekülüne özgü boşluklara sahip olması için hedef molekülün yapıdan ayrılırken polimerin gözeneklerinden geçebilmesi gerekmektedir. Bu gibi zorluklardan dolayı proteinler gibi büyük moleküller yerine proteinlere ait alt peptit dizileri baskılanır. Hedef molekül bu peptit dizilerindeki bağlanma bölgelerinden bağlanır. Dolayısıyla büyük molekülleri baskılamaya ihtiyaç duymadan onlara ait alt birimler baskılanarak karmaşık ortamlardan ayrılmasını sağlanabilir [21].

Çizelge 2.1. Hedef molekül olarak kullanılan NSAID'ler ve fiziko kimyasal özellikleri [21]

Seçilmiş NSAID'lerin ve analjeziklerin fizikokimyasal özellikleri				
Bileşik adı	Yapı	Suda çözünürlük (mg L ⁻¹)	Log <i>K_{ow}</i>	Besaltım oranı (%)
Ibuprofen		58	3.71	10
Naproxen		44	3.10	70
Diklofenak		10	4.02	10
Ketoprofen		256	3.12	80
Indometacin		0.94	4.27	30
Fenoprofen		81	3.1	3
Asetiklik asit (aspirin)		3000	1.19	1.4
Parasetamol		14,000	0.46	53
Mefenamik asit		20	5.12	11

Hedef moleküllerin ilk önce polimerin yapısına baskılanıp daha sonra da yapıdan tekrar ayrılması gerekir bu yüzden fiziksel ve kimyasal kararlılığı çok önemlidir. Ayrıca hedef molekülün şekli, büyüklüğü ve fiziko kimyasal özellikleri de baskılamanın verimi için dikkat edilmesi gereken hususlardandır. Baskılama ortamında moleküler baskılama tekniğinin verimi için optimum koşullara sahip olması lazım. Mesela hedef molekülü seçici olarak ayırma yapacağımız ortamda hedef moleküle benzer başka maddeler varsa seçicilik verimi

düşecektir. Bu yüzden hedef molekül seçimi çok önemlidir. Ayrıca hedef molekülün maliyeti çok yüksekse hedef moleküle birebir benzeyen şablonlar yapılmıştır. Bu şablonlar yardımıyla baskılama yapılır. Bu baskılama yöntemine ikili baskılama adı verilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda uygun hedef molekülün seçilmesi ile yüzde yüze yakın oranda seçicilik çalışmaları görülmüştür [21].

2.4. Fonksiyonel Monomer

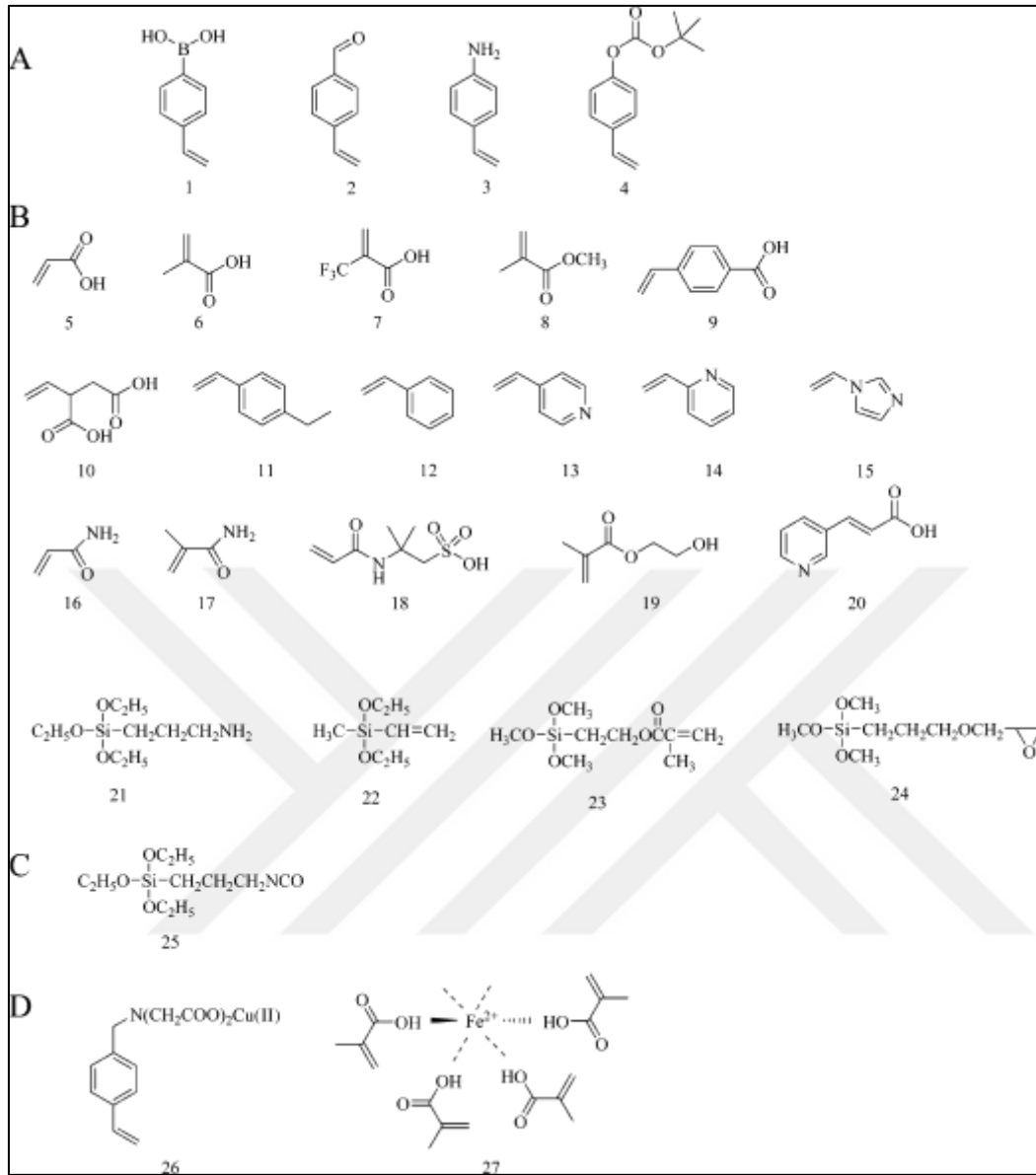
Moleküler baskılama tekniğinde fonksiyonel monomerin rolü, fonksiyonel grupları sayesinde hedef moleküle bir ön polimerizasyon kompleksi oluşturmaktır. Bu yüzden, hedef moleküle güçlü bir şekilde etkileşime girebilen ve polimerizasyondan önce seçici verici-reseptör veya antikör-antijen kompleksleri oluşturabilen uygun bir fonksiyonel monomer seçmek çok önemlidir. Fonksiyonel monomer, baskılama sırasında bağlanma bölgelerindeki etkileşimlerden sorumlu olan bileşiktir. Fonksiyonel monomerler her ne kadar deneme yanılma yöntemi ile seçilse de hedef molekülün fonksiyonelliklerine tamamlayıcı özellikte olması gerekmektedir. Bu durumda hidrojen bağı vericisi, karmaşık oluşumu ve baskı etkisini maksimize etmek için hidrojen bağı alıcısı ile eşleştirilir. Fonksiyonel monomer hedef molekül ile ne kadar güçlü etkileşime girse o kadar sağlam bağlar veya fiziko kimyasal etkileşimler oluşturarak tanıma bölgelerinin daha düzgün ve sağlam çıkmasına neden olurlar. Bunun sonucu olarak ta karmaşık ortamlardan seçici olarak ayırt etmek istediğimiz hedef moleküllerin ayırt edilmesinde verimi artırmış olurlar [25].

Fonksiyonel monomerler hedef molekülün uç gruplarına, bağlanma bölgelerine göre belirlenir veya deneme yanılma yöntemi uygulanarak seçilebilir. En yaygın kullanılan fonksiyonel monomer yapısında hidrojen bağı verici ve alıcı özellikleri nedeniyle metakrilik asit (MAA)'dır. Seçtiğimiz fonksiyonel monomer asidik, bazik veya nötral özellikler gösterebilir. Bazı fonksiyonel monomerler şekil 2 de gösterilmiştir. Bunlar arasında hem hidrojen bağı vericisi hem de hidrojen bağı alıcısı olma özelliklerinden dolayı metakrilik asit (MAA) evrensel bir fonksiyonel monomer olarak görülmüştür. Ayrıca MAA'nın yüksek molar fraksiyonlarının polimerik malzemelerin büyük gözenek boyutuna neden olacağı gösterilmiştir bu da polimerlerin bağlanma kapasitesinin artmasına neden olmaktadır [29].

Moleküler baskılamada kullanılan fonksiyonel monomerlerin sayısı bilindiği üzere baya sınırlıdır. Bunun neticesinde MIP'lerin seçiciliği ve bazı uygulamalarda kullanımlarını

belirli bir dereceye kadar kısıtlar. Bu yüzden ki hedef molekül ile güçlü bir şekilde etkileşime girebilen yeni fonksiyonel monomerler tasarlama ve sentezleme ihtiyacı doğmuştur. Yeni işlevlere sahip dikkatlice tasarlanmış fonksiyonel monomerler üretilerek MIP'lere eklenmiştir. Moleküler baskılamada kullanılan daha geleneksel fonksiyonel monomerlerden (örneğin metakrilik asit, 4-vinilpiridin) farklı olarak, çok fonksiyonlu monomerler yalnızca bir hedef bağlanma grubuna değil, aynı zamanda moleküler bağlanma olayına yanıt verebilen ek bir kısma da sahiptir. Sonuç olarak, sentezlenmiş MIP, zahmetli numune hazırlama adımları gerektirmeden bir hedef analitin varlığını belirtmek için akıllı bir kimyasal sensör (kemosensör) görevi görebilir [30].





Şekil 2.2. Moleküler baskılamada kullanılan bazı fonksiyonel monomerler [31]
 (A) Kovalent (1) 4-Vinil benzen borik asit (2) 4-Vinil benzaldehit (3) 4-vinil anilin (4) Tert-butyl p-vinilkabonat B Kovalent Olmayan (5) akrilik asit (6) Metakrilik Asit (7) Triflorometil Akrilik asit (8) Metil metakrilat (9) p-vinilbenzoik asit (10) İtakonik asit (11) 4-Etilstiren (12) Stiren (13) 4-vinilpridin (14) 2-vinilpridin (15) 1-Vinilimizadol (16) Akrilamid (17) Metakrilamid (18) 2-Akrilamido-2-metil-1-propan sulfonik asit (19) 2-hidroksietil metakrilat (20) trans-3-(3-pridil)-akrilik asit (21) 3-aminopropiltriethoksilan (22) Metilvinildietoksilan (23) 3-metilakriloksipropiltrimetoksilan (24) Glisidoksipropiltrimetoksilan (C) Yarı Kovalent (25) 3-İsokyanatopropiltriethoksilan (26) Cu(II)-iminodiasetat-deriyatizedvinilmonomer (27) Fe²⁺/MAA kompleks

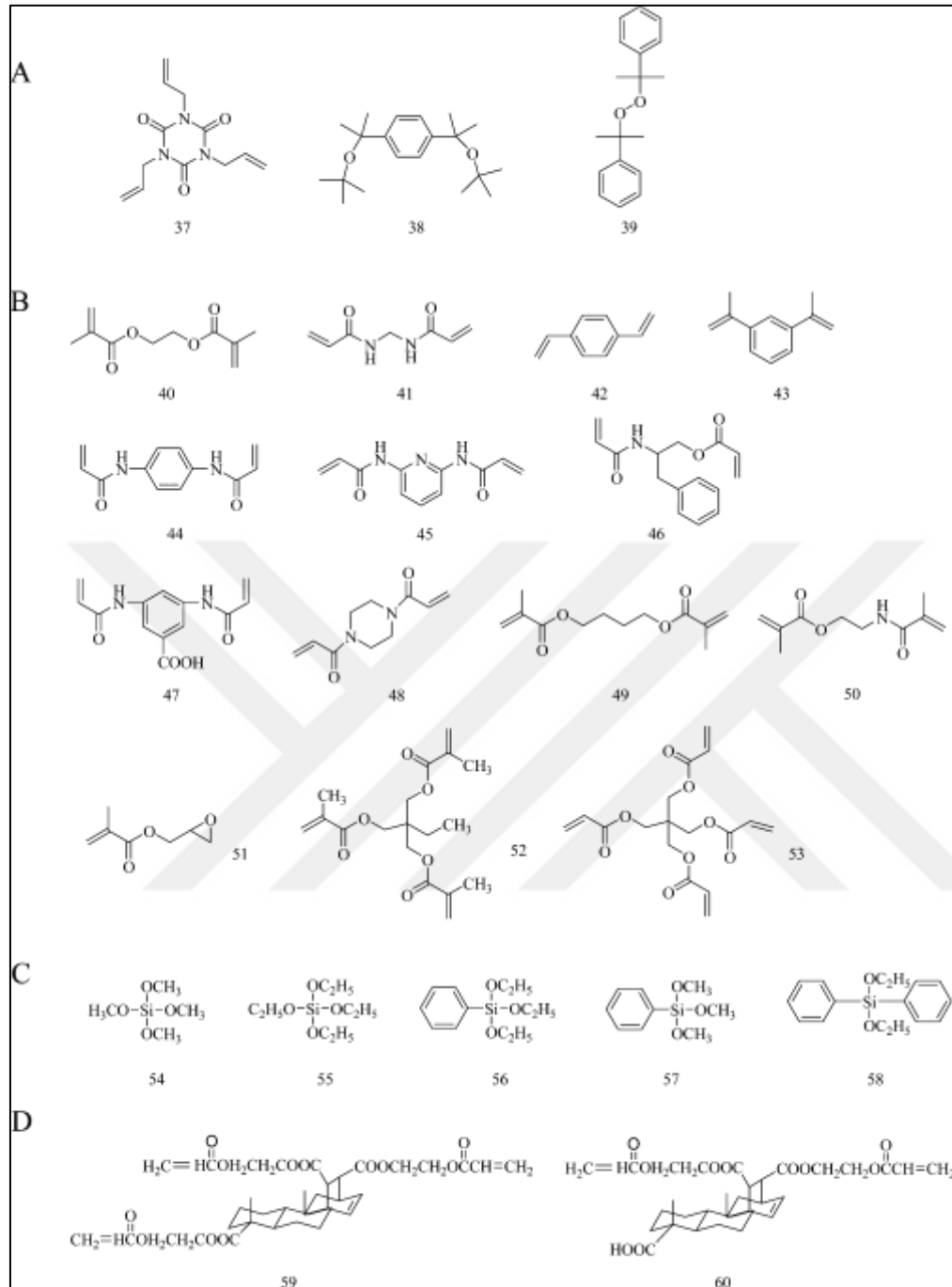
Genel olarak, fonksiyonel bir monomer iki tip birimden oluşur. Biri tanıma birimi ve diğeri, sırasıyla bir vinil çift bağ ve silikon hidroksil gibi polimerize edilebilir birimdir. Bu nedenle, vinil grubu ve silikon hidroksil tarafından modifiye edilen bazı karmaşık ligandlar

tasarlanarak sentezlenmiştir. Ayrıca, kromo ve florojenik MIP'leri sentezlemek için Wagner ve arkadaşları tarafından naftalimid bazlı bir floresan indikatör monomeri tasarlanmıştır [31].

2.5. Çapraz Bağlayıcı

MIP'lerin sentezlenmesi sırasında çapraz bağlayıcıların ana görevi hedef molekül ile etkileşime giren fonksiyonel monomerin sabitlenmesi, baskılama bölgelerinin stabilizasyonu ve polimer matrisine basit mekanik stabilite gibi hayati rollerdir [32]. Hedef molekül yapıdan uzaklaştırıldığında ise çapraz bağlanmış sağlam bir polimerik yapı elde edilir. MIP'ler deki tanıma bölgeleri daha dayanıklı olur ve bununla birlikte MIP'lerin yeniden kullanılabilirlik sayıları ve raf ömürleri de artar. Kullanılan çapraz bağlayıcının türü ve miktarı, MIP'lerin seçiciliği, verimi, dayanıklılığı ve bağlanma kapasitesi üzerinde önemli etkilere sahip olduğu görülmüştür. Çapraz bağlayıcı eğer ki az kullanılırsa tanıma bölgelerinde kararsız mekanik özellikler görülür. Bundan dolayı hedef moleküle özgü boşluklarda kararlı bir yapı görülmez. Tanıma bölgelerinin istediğimiz kararlılıkta oluşmamasından dolayı, kompleks numunelerden seçici olarak ayırt etmek istediğimiz molekülün yüzdesinde azalmaya neden olur. Yüksek miktarda çapraz bağlayıcı kullanımı da istenmeyen olumsuz özelliklere neden olacaktır. Moleküler olarak baskılanmış polimer, yapımında gözeneklerin oluşmasını sağlayan çözücü hedef molekül ile fonksiyonel molekül arasındaki etkileşimi belirlerken, adsorpsiyon özelliklerini olumsuz etkileyebilir ve MIP birim başına tanıma bölgelerinin azalmasına neden olur [31].

Şimdiye kadar kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar şekil 4'te gösterilmiştir. Ancak yine de kullanılan çapraz bağlayıcıların sayısı sınırlıdır ve moleküler yapıları gereği bazı gereksinimleri karşılayamamaktadırlar. Özellikle güçlü difüzyon kontrollü davranışa sahip MIP'leri sentezlemek için acilen yeni çapraz bağlayıcılara ihtiyaç vardır. Son yıllarda tüm bu ihtiyaçları karşılamak için yeni çapraz bağlayıcılar sentezlenmiştir. Örnek olarak Lei vd. Diels-Alder tarafından sentezlenen bileşikler verilebilir [33]. Sentezlenen bu yeni çapraz bağlayıcıların mükemmel sertlik, fenantren iskelet yapısına sahip olmak gibi avantajlarının yanında hedef molekülün baskılı boşluğunun yapısını korumaya yardımcı olmak için polimerizasyon reaksiyonlarına katılabilen ve çapraz bağlanma derecesini iyileştirebilen üç adet çift bağ içerir [31].



Şekil 2.3. Moleküler baskılamada kullanılan bazı çapraz bağlayıcılar [31].

2.6. Çözücü

Moleküler baskılama prosesinde ilk olarak polimerizasyon işlemi yapılırken süreç hedef molekül ile fonksiyonel monomerin bir çapraz bağlayıcı varlığında gözenek yapıcı bir çözücü içinde çözünmesi ile başlar. Polimerizasyon sırasında çözücü molekülleri polimerin içerisine girerek polimer yapının oluşumuna katkıda bulunurlar ve hemen sonrasında yıkama ile geri atılırlar. Porojenik çözücüler MIP'lerin gözenekliliğini ve yüzey alanını kontrol etmede rol alırlar. Polimerizasyon sırasında gözeneklilik, porojen ve büyüyen polimerden faz ayrışmasından kaynaklanır. Düşük çözünürlük fazına sahip olan çözücüler polimerizasyon da erken ayrılır ve daha büyük gözenekler oluşturma eğilimi gösterirler bunun sonucunda daha düşük yüzey alanına sahip MIP'ler oluşur. Yüksek çözünürlük fazına sahip olan çözücüler polimerizasyondan sonra ayrılırlar, böylece daha küçük gözenek boyutu dağılımlarına ve daha büyük yüzey alanına sahip MIP'ler oluşur [34].

Porojenler (porojenik çözücüler) genellikle polimerizasyon sürecinde dispersiyon ortamı ve gözenek oluşturuıcı maddeler olarak işlev görür. Dolayısıyla polimerizasyonda da önemli bir rol oynarlar. Genellikle, MIP sentezi için kullanılan çözücüler 2-metoksietanol, metanol, tetrahidrofuran (THF), asetonitril, dikloroetan, kloroform, N, (DMF), toluen ve N-dimetilformamiddir [55]. Porojenlerin polaritesi, özellikle kovalent olmayan etkileşim sistemlerinde, şablon molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimi ve dolayısıyla MIP'lerin adsorpsiyon özelliklerini etkileyebilir. Toluene, asetonitril ve kloroform gibi polar olmayan ve daha az polar organik çözücüler, polimerlerin adsorpsiyon özellikleri ve morfolojisi kullanılan çözücü türlerine bağlı olduğundan, iyi baskı verimliliği elde etmek için genellikle kovalent olmayan baskı için kullanılır. Moleküler baskı için monomerlerin ve çözücülerin seçim süreçlerini değerlendirmek ve MIP seçiciliği hakkında fikir sahibi olmak için teorik hesaplamaların kullanımı çok önemlidir. Saloni ve arkadaşları, aseton, asetonitril, kloroform ve metanol gibi dört çözücü kullanarak çözücülerin monomer, hedef molekül bağlama enerjisi üzerindeki etkilerini incelediler. Ve yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) tüm yapısal, titreşim frekansı ve çözücü hesaplamaları için kullanılmıştır [35].

İdeal bir çözücü fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasındaki etkileşimi bozmamalıdır [34]. Moleküler dinamik çalışmasında Madikizela ve ark. [36], hesaplamalı ve pratik olarak, yüksek polariteli çözücülerin, “benzer benzeri çözer gibi” kavramına göre yüksek kutuplulukları nedeniyle NSAID'lerle etkileşim oluşturma eğiliminde olduklarını, bu

nedenle bu tür çözücüler porojen olarak kullanılamayacağını gösterdi. Yakın gelecekte yeni porojenik çözücülerin piyasaya sürülmesi bekleniyor. Örneğin, Zhang ve arkadaşlarının [37] son çalışmasında, dimetilformamid-dimetil sülfoksit-1-butil-3-metilimidazolyum tetrafloroboratin üçlü bir karışımı, iki şablon için tasarlanan MIP sentezinde aporojenik çözücü olarak kullanılmıştır.

Ayrıca non-kovalent baskılamada şablon ve fonksiyonel monomer arasında hidrofobik, hidrojen bağı, Van der Waals gibi etkileşimleri destekler. Çözücü seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli parametre ise hedef molekül ile fonksiyonel monomerin polariteleri olmalıdır. Hedef molekül ile fonksiyonel monomerin etkileşimi de dâhil olmak üzere polimerizasyonu desteklemelidir.

2.7. Başlatıcı

Genellikle, MIP'lerin büyük çoğunluğu serbest radikal polimerizasyonu, fotopolimerizasyon veya elektropolimerizasyon ile hazırlanır. Peroksi bileşiklerinin yanında azo bileşikleri en yaygın kullanılan başlatıcılardır. 50-70 °C ayrışma sıcaklığında rahatlıkla kullanılabilen azobisisobütironitril (AIBN) en bilindik olanıdır. Polimerizasyon reaksiyonunu sağlamak için ve vereceği olası hasarı en aza indirmek için çözülmüş oksijenin polimerizasyon solüsyonundan uzaklaştırılması önem arz etmektedir. Oksijen hızlı bir şekilde karıştırılarak hemen arkasından vakum yapılarak veya azot gibi inert bir gaz gönderilerek ortamdan uzaklaştırılabilir [38].

2.8. Epitop Baskılama

Moleküler baskılama, çeşitli maddelerin ayrılması veya saflaştırılması için seçici tanıma bölgelerine sahip polimerlerin hazırlanması için çok yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Küçük moleküller, toksinler, proteinler gibi moleküller farklı polimer ağlarına başarılı bir şekilde baskılanır, ancak proteinler, büyük boyutları ve karmaşık yapıları nedeniyle moleküler baskılama için iyi baskılama molekülleri değildir [39]. Bu nedenle, protein tanıma boşlukları elde etmek için epitop baskılama tekniği kullanmak daha uygundur. Moleküler baskılanmış polimerler üzerinde hedef molekül yerine, hedef moleküle ait alt birimlerin kullanıldığı baskılama yöntemine epitop baskılama adı verilmiştir.

Peptit dizilerinde oluşan epitoplar, kolaylıkla moleküler olarak polimerik tabakalara baskılanabilir. Epitop baskılı polimerler içinde, seçici olmayan bağlanma düşüktür ve epitoplar organik çözücüler içinde kararlı olduğu için reaksiyon koşulları kısıtlanmaz. Ayrıca, epitop baskılı polimerler, iyi seçicilikle yüksek derecede yeniden bağlama kapasitesine sahiptir. Söz konusu tezde de ferritinin büyük ve kompleks yapısından dolayı ferritine ait peptit dizisi olan laktoferrisin B'yi baskılayarak epitop baskılama tekniğini kullanacağız [40].

Moleküler baskılı polimerler (MIP'ler), ilaçlar, metal iyonları, şekerler, steroidler ve aminoasit türevleri gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin ayrılması ve saptanması için sıklıkla kullanılır [41]. Bununla birlikte, büyük biyomakromolekülleri saflaştırmak için MIP'lerin uygulanması (örneğin, proteinler) hala zorlu bir görevdir. Proteinlerin büyük molekül boyutu, çapraz bağlı polimerlerde dağılmalarını zorlaştırır, bu da eksik şablonun çıkarılmasına ve çok yavaş yeniden bağlanma kinetiğine yol açar. Genellikle şablon olarak proteinlerle ilişkilendirilen bir diğer önemli konu, düşük kararlılıklarıdır. Proteinler, yüksek sıcaklıkta veya MIP'leri sentezlemek için sıklıkla kullanılan koşullar olan organik çözücülere maruz bırakılarak kolayca denatüre edilebilir.

Epitop baskı yöntemiyle, tanımlanmış bir üçüncül yapı olmasa bile kısa bir peptit, protein seçici polimerler üretmek için hedef molekül olarak kullanılabilir. O halde asıl zorluk, bir hedef protein üzerindeki en kolay ulaşılabilir ve en uygun tanıma bölgelerine sahip epitopu tanımlamak ve moleküler baskılama işlemi için yeterli miktarda epitopu sentezlemektir. Bilinen yapısal bilgiye sahip proteinler için, epitop tanımlama, biyoinformatik analiz yoluyla sağlanabilir veya kolaylaştırılabilir. Bununla birlikte, peptit epitopunun kimyasal sentezi hala maliyetli olmaya devam etmekte ve büyük miktarlarda MIP'lerin hazırlanmasında kullanılması zordur. İçin güvenilir yapısal bilgiden yoksun proteinler için, moleküler baskı yoluyla protein seçici polimerleri hazırlamak için epitop şablonları olarak kullanılabilen uygun peptitleri tanımlamak zordur [42].

Bu çalışmada, moleküler baskı için peptit epitoplarının tanımlanmasını ve hazırlanmasını basitleştirmek için kullanılabilecek yeni bir yöntem araştırıldı. Model olarak kan plazmasında bulunan proteinlerden ferritin seçildi. Ferritinin büyük boyutu nedeniyle bir alt peptit dizisi olan Laktoferrisin B'yi hedef molekül olarak kullanıldı.

2.9. Moleküler Baskılanmamış Polimerler (NIP)

Moleküler olarak baskılanmış polimerleri kontrol amaçlı olarak baskılama yapılmamış yüzeyler kullanılır. Bunlara da moleküler baskılanmamış polimerler (NIP) adını veriyoruz. MIP'lere hedef molekülün kendine özgü spesifik boşlukları olması sebebiyle hedef molekülün bağlanma yüzdesi çok fazla iken NIP'lerde bu çok düşük orandadır. NIP'lerde hedef moleküle özgü tanıma bölgeleri bulunmaz ama yine de çok az olsa da belirli miktarda fiziksel etkileşimlerden ötürü bağlanmalar olmaktadır [43].

2.10. Ferritin

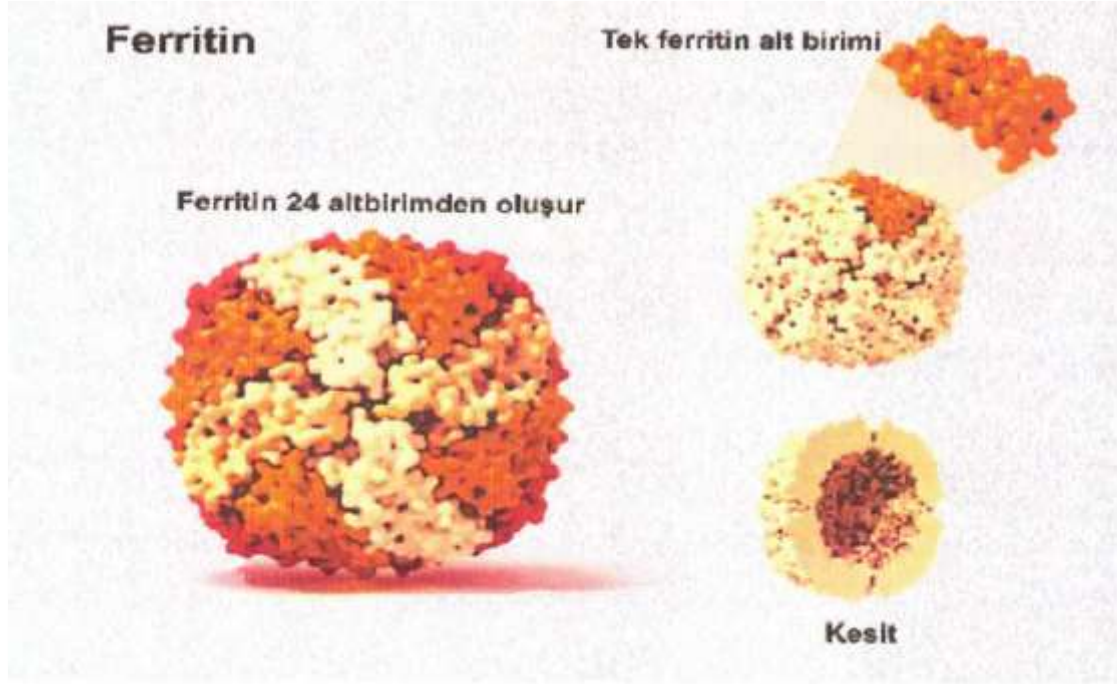
İnsan vücudunda hayati öneme sahip olan birçok mineral ve madde vardır. Bunlardan, oksijen taşıyan kırmızı kan hücrelerinde bulunan demir; hemoglobin (HGB) üretimi için kullanılır. Vücuttaki demir depolarındaki demirin seviyesinin azalması birçok hastalığa neden olmaktadır. Demir eksikliği vücuttaki kan hücrelerinin yeterince oksijenlenememesine ve dolayısıyla daha az üretilmelerine neden olur. Bunun neticesinde doku ve organlarda bulunan oksijen miktarı azalır ve hâlsizlik, yorgunluk, baş dönmesi, konsantrasyon bozukluğu gibi pek çok sıkıntıya yol açar. Hücrenin temel işlevlerini yerine getirebilmesi ve biyolojik olarak canlı kalabilmesi için demir çok önemli bir rol oynar. Nükleotit sentezi, oksijenasyon, trikarboksilik asit döngüsü, steroid üretimi ve aminoasit üretimi gibi metabolizmada çok sayıda hücresel faktörde rol oynar. Fe^{3+} ün oksidatif hasarı katalize edebilme özelliğinden dolayı hemen hemen tüm biyolojik canlıların demiri bağlama bölgeleri vardır [44].

2.10.1. Ferritin nedir?

Bundan yaklaşık 70 yıl önce; kadmiyum tuzlarıyla birlikte at dalağından kolayca kristalize edilebilen ferritin ısıya dayanıklı olmasının yanında demir açısından da zengin bir protein olarak tanımlandı [45]. Ferritin demirin hemeostazında ve hücrelerin anti-oksidasyonunda önemli rol oynayan bir demir depolama proteindir. 24 homolog alt birimden oluşan ferritin; kendisine özgü benzersiz mimarisi, ilaçları kapsülleyebilen içi boşluk bir yapıya sahip olması ve bunlara ilaveten genetik ve kimyasal olarak modifiye edilebilen bir dış yüzeye sahip olmasının getirdiği avantaj nedeniyle son yıllarda ümit vaat eden bir ilaç dağıtım aracı olarak ortaya çıktı [46]. Kendi kendine montaj yeteneği, simetrik küresel mimarisi ve yüksek

termal kararlılığı, ferritin nano taşıyıcılara olan ilgiyi artıran önemli yönlerdir [47]. Son araştırmalar, modifiye edilmemiş insan ağır zincir ferritininin, akciğer ve meme kanseri dâhil olmak üzere farklı tümör doku türlerinde reseptörü transferrin reseptörü 1'e (TfR1) bağlandığını ve böylelikle tümör hedefleme uygulamaları için ferritinin potansiyel kullanımını vurguladığını göstermiştir. Ayrıca, bir endojen protein olarak ferritin, klinik kullanımda nano taşıyıcılar için oldukça istenen özellikler olan mükemmel biyolojik uyumluluğa, biyolojik olarak parçalanabilirliğe ve düşük toksisiteye de sahiptir. 8 nm çapındaki iç boşluğu sayesinde ferritin, birçok ilaç molekülünü kapsüllemek için potansiyel alana sahiptir, böylece bozulmaya karşı koruma sağlar ve sağlıklı hücreler için oluşabilecek potansiyel yan etkileri sınırlar. Dahası, dış yüzeyindeki 12 nm çapı gelişmiş geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi için uygundur. Ayrıca ferritinin stabil kafes benzeri yapısının pH'a duyarlılığı, çeşitli ilaç yükleme yöntemlerinin uygulanmasını kolaylaştırır [48].

Örneğin, güçlü asidik pH gibi aşırı ortamlar altında, ferritinin kuaterner yapısı çözülür ancak ilginç bir şekilde pH fizyolojik koşullara döndüğünde yeniden bir araya gelir. Böylelikle ferritinin demontajı ve yeniden montajı manipüle edilerek, terapötik ilaçları kendi yapısı içinde kapsüllemek mümkündür. İlaç moleküllerinin kapsüllemesi ve verilmesi için ferritin kullanımına ilişkin ilk rapor, doksorubisini (Dox) protein kafes yapısı içine kapsülleyen Şimşek ve Kılıç tarafından 2005 yılında yapılmıştır [49]. Sonraki yıllarda, çoğu araştırma, bu ilacı kapsülleyen proteinin hedefleme yetenekleri ile nasıl sağlanacağına odaklanmıştır ve genetik ve kimyasal modifikasyon girişimlerinin bir miktar başarıya ulaştığı görülmüştür. Özellikle ilgi çekici olan ferritin, tümör hücrelerini doğal olarak hedefleme kabiliyetine sahip olarak tanımlanmıştır.



Şekil 2.4. Ferritinin yapısı

Ferritin bir protein olarak, özellikle hepatosit olarak bilinen ve karaciğerin yaklaşık olarak % 75'ini oluşturan hücreler başta olmak üzere kemik iliğinde, bağışıklık sistemi hücrelerinde ve vücut hücrelerinde bulunur. Besinler aracılığıyla alınan demirin depolanmasından ve gerekli olduğunda salınımından sorumlu olan ferritin, vücudun demir deposu olarak da tanımlanabilir. Yüksek molekül ağırlığına sahip olmasının yanında, spesifik antikorların kolay üretimi gibi özellikleri sayesinde öküz bakterileri, archea, bitkiler ve hayvanlar gibi şimdiye kadar analiz edilen birçok organizmada tanımlanmaları çok kolay bir şekilde gerçekleştirilmiştir [50]. Ferritin vücutta iki önemli göreve sahiptir; bunlardan birincisi demir hemoostazisini sağlamak ve Fe^{2+} yi bağlayarak demir depolama bileşeni olarak görev yapar ve demirin kofaktör olduğu çeşitli proteinlerin biyolojik sentezi boyunca demir kaynağı olarak kullanılır. Bu demir içeren proteinler, solunum, hidraksilasyon tepkimeleri ve oksijen algılama gibi çeşitli biyolojik süreçlerin önemli bir bileşeni olarak görev yaparlar. İkincisi ise, ferritin demir metabolizmasında önemli bir rol oynayarak oksidatif hasardan hücreleri korur.

Ferritinin yapısı, çok fazla miktarda demiri çözeltide kompakt ve biyolojik olarak yararlanılabilecek bir şekilde tutmak için tasarlanmıştır [50]. Ferritin küresel kabuk benzeri şeklinde düzenlenmiş 24 homolog alt birimden oluşan bir demir depolama proteinidir. Ferritin proteinin üyeleri içi boş bir iç boşluğa sahip çok alt birimli kafes benzeri

proteinlerdir [51]. Ferritin kafes olarak adlandırılan yapıları üç ayrı yüzeye sahiptir; bunlar dış yüzey, iç yüzey ve alt birimler arasındaki ara yüzüdür [52]. Ferritinin iç boşluğa sahip olmasının yanı sıra dış yüzeyi iç özellikleri değiştirilmeden değiştirilebilir. Bu, protein kafeslerini hedeflenen bir dokuya in vivo olarak vermemize veya daha yüksek dereceli yapıları üretmek için katı bir substrat üzerinde kontrollü bir montaj elde etmemize izin verir [51]. Demir depolama proteini ferritin, benzersiz bir biyomineralizasyon sistemidir. Çok aşamalı mineralizasyon işlemine protein kafesi tarafından her düzeyde aracılık edilir. Kafes benzeri mimariye demir girişi, alt birimler arasındaki ara yüzde oluşan kanal (3-kat simetri) ile gerçekleşir [53]. Biyomedikal uygulama bakış açısından dış yüzey, hücreye özgü bir hedefleme ligandını görüntülemek için uygun bir platformdur [54]. İç boşluk ise görüntüleme veya terapötik maddeleri tutabilir. Dış yüzeyin modifikasyonu, kimyasal veya genetik olarak gerçekleştirilebilir. Ferritin ailesindeki birçok proteinin yüksek çözünürlüklü kristal yapıları belirlendiğinden, istenen bir yerde bir modifikasyon sağlayabiliriz. Bu bulgular, hücrenin /dokuya spesifik görüntüleme ve terapötik ajanların proteinin dış yüzeyinin mühendisliği ile gerçekleştirilebileceğini göstermiştir [51].

2.10.2 Biyomedikal uygulamalarda ferritin

Birçok biyolojik aktivitede yer alan ferritin bazı hayati önem taşıyan hastalıkların tanısında, teşhisinde yer aldığı gibi tedavisinde de önemli yer oynamaktadır. Demir eksikliğinin neden olduğu anemi gibi hastalıklar ferritin miktarının ölçülmesi ile bulunabildiği gibi yine demirin aşırı yüklenmesi sonucu oluşan kalıtsal hemakramatoz ve kronik transfüzyon tedavi gibi durumlarda ferritin miktarının tayini ile ölçülebilir. Besinler aracılığıyla alınan ferritin vücudun demir deposunun olmasının yanında, demirin depolanmasından ve gerekli olduğunda salınımından sorumludur. Vücutta ki ferritin miktarı yapılan ferritin testleri ile kolayca belirlenebilir. Eğer vücutta ferritin miktarı yüksekse vücut için gerekli demirin fazlası depolanmış demektir. Eğer ki ferritin miktarı düşükse vücut için gerekli demir miktarı depolanamamıştır demektir. Vücutta bulunan ferritin değerleri yaşa ve cinsiyete göre farklılık gösterirken kadınlarda her ay düzenli olarak görülen adetten dolayı biraz daha düşüklük gösterir. Bu değerler genel olarak erkeklerde 20-500 mL/ng, kadınlarda ise 20-200 mL/ng'dir. Sıklıkla çay veya kahve içilmesi, mide ve bağırsak rahatsızlıkları, aşırı pişirilmiş et, c vitamini eksikliği, kan kaybı, düzensiz beslenme, uyku düzeninin bozulması, kadınlarda adet ve gebelik ile birlikte emzirme dönemlerinde bulunuyor olmak ferritin eksikliğinin temel sebeplerindendir [55].

Ferritin eksikliği vücuttaki demir depolarının boşaldığını gösterir. Hemen hemen bütün dünyada görülen ve oldukça yaygın olan demir eksikliği anemisi vücuttaki demir eksikliği nedeni ile olur. Vücuttaki demir depolarının durumunu dolaylı olarak gösteren serum ferritin aneminin değerlendirilmesinde yer alır. Demir eksikliğinin neden olduğu anemiye karşı oldukça seçici olan düşük serum ferritin altın standart demir tedavisine göre çok daha az yayılmacıdır [55]. Kırmızı kan hücrelerinin, akciğerden aldığı oksijeni dokulara ulaştırmasında önemli bir yere sahip olan demirin vücutta az olması, alyuvar üretimini olumsuz etkiler. Düşük serum ferritinin çocuk ve gençlerde beyine kan akışının azalmasından dolayı kaynaklanan ani, kısa bilinç ve duruş kaybına neden olan birtakım rahatsızlıklarla ilişkili olduğu görülmüştür [56]. Bu tür problemler her ne kadar belirli bir hastalık olarak adlandırılmasa da vücudun normal mekanik ve fiziksel işleyişinde önemli bozukluklara neden olmaktadır, ferritin eksikliği de bunda en önemli etkidir. Yine yetişkin kadın ve erkeklerde, anemik ve hamile hastalarda görülen bir tür rahatsızlık olan huzursuz bacak sendromunda ferritinin rol oynayabileceği tahmin edilmektedir. Elde edilen kanıtlara göre serum ferritinle birlikte BOS ferritin semptomlar arasında karmaşık bir ilişki içinde yer aldıkları görülmüştür. Kırmızı kan hücrelerinde bulunan ve oksijenin taşınmasından sorumlu olan hemoglobin molekülünün üretimi için gerekli olan demirin, vücutta yeterli miktarda bulunmaması sonucunda kırmızı kan hücrelerinin doku ve organlara taşıdığı oksijen miktarı azalır. Buna bağlı olarak yeterince oksijenlenemeyen doku ve organların işleyişi bozulur ve bu durum, bazı rahatsızlıklara yol açar [57].

Normal değerlerin altında olan ferritin miktarı aşağıdaki belirtilere yol açar:

- Hâlsizlik ve yorgunluk
- Uyuşukluk
- Sabahları zor kalkma
- Anksiyete
- İştahsızlık
- Toprak ve kireç yeme isteği
- Baş dönmesi
- Baş ağrısı
- Kulak çınlaması
- Üşüme hissi
- Unutkanlık

- Sinirlilik
- Konsantrasyon bozukluğu
- Kaşıntı
- Saç dökülmesi
- Cilt rengine solgunluk
- Cilt kuruluğu
- Tırnakların kolay kırılması ve tırnaklarda çizgili görünüm
- Nefes darlığı
- Bacak ağrısı
- Cinsel isteksizlik
- El ve ayak parmaklarında uyuşukluk
- Huzursuz bacak sendromu

Tüm bu demir eksikliğinden kaynaklı olan rahatsızlıkların giderilmesi için vücuttaki demir depolarının dengelenmesi lazım. Bu yüzden ilk önce demir eksikliğinin sebebi iyi araştırılması gerekir. Eğer vücutta aşırı derecede kanamaya sebep olan adet bozukluğu veya ülser gibi rahatsızlıklar varsa öncelikle bunların kontrol altına alınması gerekir. Daha sonra ferritin miktarı bol olan yiyeceklerin tüketileceği bir diyet uygulanmakla birlikte oral olarak demir takviyesi içeren ilaçlar, kapsül veya çeşitli şuruplar verilebilir. Bunların yanında direk olarak damardan verilen intravenöz demir takviyesi uygulanabilir. Ferritin miktarının artırılması için C ve B12 vitamini bakımından zengin beslenme, mayalı ekmek tüketimi, kuru baklagil, yumurta, tavuk, balık, kırmızı et, yeşillik, susam, pekmez, üzüm, fındık, fıstık, kayısı ve dut tüketiminin artırılması yönündedir [58].

Vücuttaki demirin eksikliği gibi fazlalığı da birçok sağlık problemine yol açmaktadır. Özellikle vücuda damar yoluyla doğrudan verilen kan sonrası aşırı miktarda artış gösteren demir çeşitli kalp ve damar problemleri başta olmak üzere bazı organların fonksiyonlarındaki bozukluklara da yol açar [59]. Eğer ki serum ferritin seviyesi 1000 ng/mL'den yüksekse çok çeşitli hastalıklar, enfeksiyonlar ve hatta kanserde dahil olmak üzere spesifik olmayan bir hastalık belirtisidir [60]. Yapılan bir araştırmada bir sene boyunca incelenen hiperferritenemi sıklığı hastaneye yatırılmış olan hastalar üzerinde incelenmiştir. Bu hastaların % 6,7' sinin ferritin seviyeleri 1000 ng/mL den yüksek olduğu ve karaciğer hastalığı, bağışıklık sistem hücrelerini hedef alarak enfeksiyon oluşturan ve enfeksiyonun ilerlemesi durumunda Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromuna (AIDS) neden olabilen bir

virüs olan HIV, çeşitli sistematik enfeksiyonlar, böbrek hastalıkları, kronik transfüzyon, kanda oksijen taşımakla görevli olan hemoglobinin yapısının bozulmasıyla beraber, görevini yerine getirememesi ve kandaki kırmızı kan hücrelerinin azalmasıyla meydana gelen genetik bir anemi türü hastalık gibi rahatsızlıklarla ferritin seviyesinin yüksek olmasının ilişkili olduğu gözlemlenmiştir [61]. En yüksek ferritin seviyeleri HLH hastalığında (ortalama olarak 45000 ng/mL) de görülürken yine kronik olarak transfüze edilen hastalarda ve kırmızı kan hücrelerinin vücuttaki işlevini yerine getiremediği hastalıklarda ortaya çıkmıştır [62]. Genellikle genç erişkinlerde gözlenen febril, inflamatuvar ve sistemik bir hastalık olan still hastalığında da ferritin seviyesi yükselir. Ferritin seviyesi still hastalarının benzer bir hastalık çeşidi olan romatoid artrit hastalarından ayırt edilmesinde de kullanılır [55]. Beyindeki demir konsantrasyonu yaşlanma ile artar. Ayrıca nörolojik hastalık çeşitleri olan Alzheimer Parkinson gibi hastalıklarda da demir konsantrasyonunun fazla olduğu tespit edilmiştir. Lakin bunun hastalığa neden olup olmadığı konusunda henüz kesin olarak söylenilebilecek bir şey yoktur. Vücuttaki demir fazlalığı eğer ki ferritin içinde düzgün bir şekilde depolanamazsa hücrelerde çok çeşitli hasarlara neden olabilir. Ferritin yüksekliği genellikle iltihaplı hastalıklara, kronik hastalıklara, aşırı alkol tüketimine bağlı olarak görülen karaciğer rahatsızlıklarına ve kalıtsal ya da sonradan edinilmiş demir metabolizması bozukluğu olarak tanımlanan hemokromatoz gibi hastalıklara bağlı olarak görülür. Tip 2 diyabet, hipertiroidi, lösemi ve hepatit C ferritin yüksekliğine neden olan diğer rahatsızlıklardır [63].

2.10.3. Ferritin yüksekliği belirtileri nelerdir?

Ferritin yüksekliği belirtilerinden bazıları şu şekilde sıralanır:

- Cinsel isteksizlik
- Çarpıntı
- Hâlsizlik ve yorgunluk
- Karın ve göğüs ağrısı
- Eklem ağrısı
- Cilt rengine koyulaşma
- Kilo kaybı

Ferritin miktarının düşürülmesi için hekimlerin kontrolü altında ilaç tedavisi uygulanabilir. Ayrıca beslenme alışkanlıklarında diyet yoluyla da vücuttaki ferritin kontrol altına alınabilir.

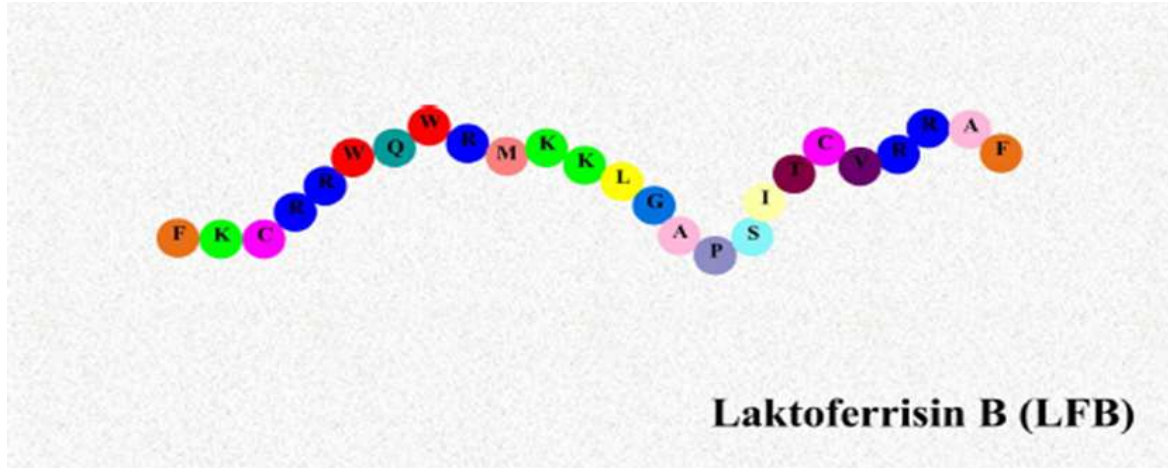
Bu durumda hekim, belirli bir süre kahve, yeşil çay, kalsiyum açısından zengin besinler tüketilmesini; çinko, magnezyum gibi minerallerin alınmasını önerebilir. Ayrıca kan bağışı da vücutta depolanan demirin azalmasını sağlayan bir diğer yöntemdir [42].

2.10.4. Laktoferrisin B

Laktoferrisin B (LFB), memeli sütünde, gözyaşı, tükürük ve idrarda salgılanan 80 kDa demir bağlayıcı glikoproteini olan sığır laktoferrinin proteolitik bölünmesi yoluyla pepsin tarafından serbest bırakılan bir katyonik peptittir. Vücudumuza giren mikrop ve yabancı cisimlere karşı ilk mücadeleyi başlatan granülositlerin yapısında bulunur ve herhangi bir tehlike anında salınır [64]. Vücudumuzda hastalık yapan ve yanlış antibiyotik kullanımı gibi nedenlerle gün geçtikçe direnç kazanan bakterilere karşıda doğal bir savunma sağlayan Laktoferrisin B; antimikrobiyal, antiviral, antioksidan ve immünomodülatör aktiviteler dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik fonksiyon sergiler [65]. Ayrıca yine immün sistemimizde çok çeşitli hastalıklara karşı doğal bir savunma sağlayan laktoferrin özellikle demir tutma kabiliyetiyle mantarlara karşı savunmada da etkilidir. Başlangıçta bilim adamları için Laktoferrinin mikroplara karşı savunması sadece demir tutma kabiliyetiyle orantılı olarak algılanmıştır. Lakin daha sonra; bir polipeptidin sonunda bulunan serbest amin grubuna atıfta bulunan bir protein veya polipeptidin başlangıcı olan N-Terminusuna benzeyen bir peptit fragmanına sahip olması sebebiyle bakterilere karşı beklenildiğinden çok daha fazla ölümcül etkiye sahip olduğu görülmüştür [64]. Laktoferrisin (Lfcin) olarak adlandırılan peptit dizisi bakterilere karşı çok iyi bir savunmaya sahiptir ve ölümcül bir etki yaratır. Bununla birlikte, molekül ağırlığı 3123 g/mol olan 25 aminoasitten oluşan LFB, laktoferrine kıyasla patojenlere karşı daha güçlü öldürücü aktivite gösterir.

Doğal immün sistemin bir parçası demir bağlayıcı bir protein olan ferritinin yapısında bulunan katyonikpeptit LFB demirin bağlanması ve taşınmasında rol oynar [66]. Çok hücreli organizmalar doğuştan gelen ve immün sistemlerinde bulunan çeşitli çevresel mikroplara ve bakterilere karşı savunma sistemi geliştirmişlerdir. Bu savunma mekanizmalarına antimikrobiyal peptitler (AMP) adını veriyoruz. Hayvanlar ve bitkilerde de dahil olmak üzere çok hücreli organizmalarda bulunan bu AMP'ler istilacı parazitlere karşı temel korumada çok önemli roller üstlenirler. Doğal antimikrobiyal peptitler, Laktoferrisin B (Lfcin B) gibi mikroplardan çok hücreli organizmalar için temel koruma sağlar. İki boyutlu nükleer manyetik rezonans spektroskopisi kullanılarak belirlenen sığır laktoferrisinin (LFB)

immün sistemde çok önemli fonksiyonlara sahip 80 kDa demir bağlayabilen bir glikoproteindir. Sığır Lfcin B insanın vücudunda bulunan Laktoferrisine göre bakterilere karşı daha güçlü bir savunma sergiler [64]. LfcinB 25 aminoasit dizisinden oluşur. Bu aminoasit dizilimi FKCRR WQWRM KKLGA PSITC VRRAF şeklindedir.



Şekil 2.5. Laktoferrisin B peptidinin dizilimi

Lfcin'in antimikrobiyal etkileri çok iyi tanımlanmış ve gözlemlenmiş olmasına rağmen etki mekanizması şu anda tam olarak anlaşılamamıştır. Laktoferrisin B'nin birincil yapısı birçok hidrofobik ve pozitif yüklü kalıntı içerir; H -Phe - Lys - Cys - Arg - Arg - Trp - Gln - Trp - Arg - Met - Lys - Lys - Leu - Gly - Ala - Pro - Ser - Ile - Thr - Cys - Val - Arg - Arg - Ala - Phe - OH (S - S bağı) ve buda biyolojik zarlarla etkileşebileceğini düşündürmektedir. Gerçektende yapılan deneylerde Lfcin'le etkileşime sokulan bakterilerde membran kabarcıklar gözlemlenmiştir. Ayrıca gram negatif bakterilerinde liposakkarite etki ederek antibakterisyal etki gösterirler.

İnsan ve sığır laktoferrinin pepsin ile proteolitik yarılmasıyla Lfcin H ve Lfcin B elde edilir. Bu nedenle bebeklerin gastrointestinal sistemi içerisinde Laktoferrisinin önemli bir immünolojik rol oynayacağı düşünülmektedir [64]. Konakçı savunmasında daha önemli roller oynadığı düşünülen laktoferrinin antimikrobiyal aktivitesinin yanında vücudun savunma sisteminde de önemli işlevleri vardır. Sistemik inflamasyonda yer alan hücre sinyal sistemlerinin yapısında ve akut faz reaksiyonlarında hücrelerdeki resöptörlere bağlanarak hücrelerin çoğalmasını sağlayan sitokinlerin yapısında bulunur. Ayrıca enfeksiyonlara veya steril hakaretlere karşı bağışıklık ve enflamatuar yanıtların düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayan 11 sitokin grubu olan interlökin-1'in yapısında bulunurlar. Bu interlökinin

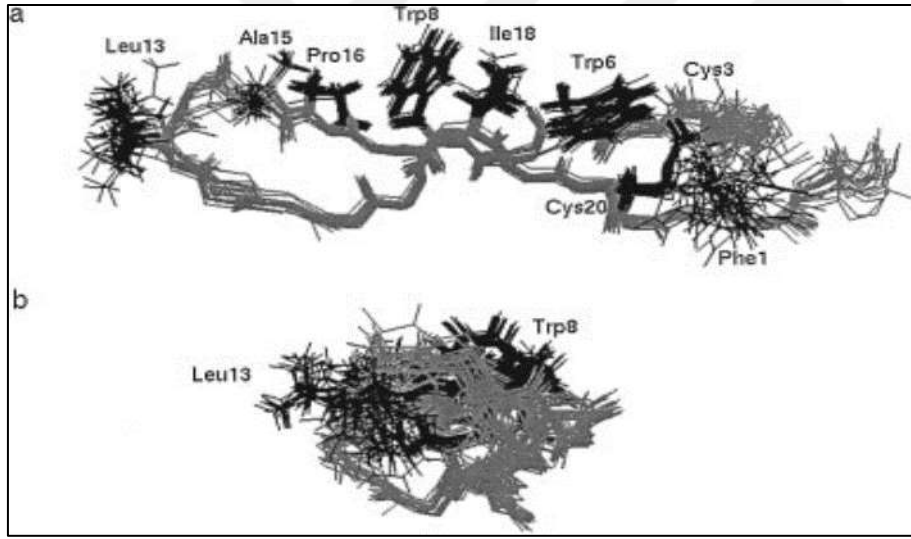
üretimini inhibe ederek inflamasyonu sınırlarlar. Tüm bu işlevler bize laktoferrisin ile liposakkarit bağlanmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca bunlara ek olarak Laktoferrin doğal öldürücü hücreler başta olmak üzere birçok immünolojik hücrenin uyarılmasında rol oynarlar. Bağışıklık sisteminde yer alan kemik iliğindeki kök hücreler tarafından üretilen bir çeşit beyaz kan hücresi olan lenfositlerin ve diğer bağışıklık sistemi elemanlarının aktivasyonu yakın zamanda keşfedilen laktoferrin tarafından baskılanan tümör büyümesinin durdurulması ile de ilişkili olabilir [67]. Laktoferrisin B'nin tümör büyümesini baskıladığı tespit edilmiştir ancak bunun bağışıklık sistemi üzerinde herhangi bir kan hücresi veya diğer bağışıklık sistemi elemanları ile uyarıcı etki ile mi yoksa daha fazla mikrop öldürücü etkiyle mi yaptığı henüz belirlenememiştir [68]. Lfcin, çok çeşitli katyonik, parazitleri ve bakterileri öldürücü etkiye sahip olan immün sistemde yer alan peptitlerden birisidir. Yapılan çalışmalarda *Pseudomonas Aeruginosa* bakterilerine karşı Laktoferrisin B'nin ölümcül bir etkiye sahip olduğu görülmüştür [69]. Gram negatif bakterilerine karşıda N-terminusu sayesinde bakterilerin dış zarına yapışarak zar bozulması neticesinde öldürücü bir etkiye sahip olduğu düşünülse de henüz kanıtlanamamıştır. Laktoferrisin, çok çeşitli patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip amfipatik bir katyonik peptittir ve asidik koşullar altında laktoferrinin pepsin sindirimi ile üretilebilir. Sığır ve insan laktoferrisinleri, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere, maya, ipliksi mantarlara ve parazitik protozoaya karşı etkilidir [70]. Sığır laktoferrisini bakterisidal ve insan laktoferrisini, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip bakteriostatiktir; bu, laktoferrisinin, genelleştirilmiş bir hücre yapısını hedeflediğini ve muhtemelen hücre zarlarındaki fosfolipidlerin hedeflendiğini düşündürmektedir [71]. Diğer araştırmalar, laktoferrisinin belirli hedef sistemlerle nasıl çalıştığını belirlemeye odaklanmıştır. Örneğin; laktoferrisin porinler ve DNA ile etkili bir şekilde etkileşime girebilir, lipopolisakkarit ve teyikoik aside bağlanabilir, bakteriyel membrandaki şarj potansiyelini ve pH gradyanını azaltabilir ve antiviral özellikler gösterebilir. Laktoferrisin B'nin ayrıca, eylemlerini uygulayabileceği bakteriyel stoplazmaya yer değiştirdiği bulunmuştur. Etki tarzına bağlı olarak, ilk adım Laktoferrisin peptidinin işlevi, hücre zarı üzerine olduğu düşünülmektedir [72].

Lfcin tek bir disülfür köprüsü içerir. LfcinB'deki iki trp tortusu, triptofan açısından zengin anti bakteriyel peptitler, indolisidin ve tritriptisin ile benzer bir etki şekli önerilebilir. Tüm antimikrobiyal peptitlerin etki şekli halen tartışmalıdır ve dolayısıyla LfcinB içinde kesin bir

mekanizma önerilememektedir ancak katyonik antimikrobiyal peptitlerin birden fazlasıyla benzer özellikler içerebilir.

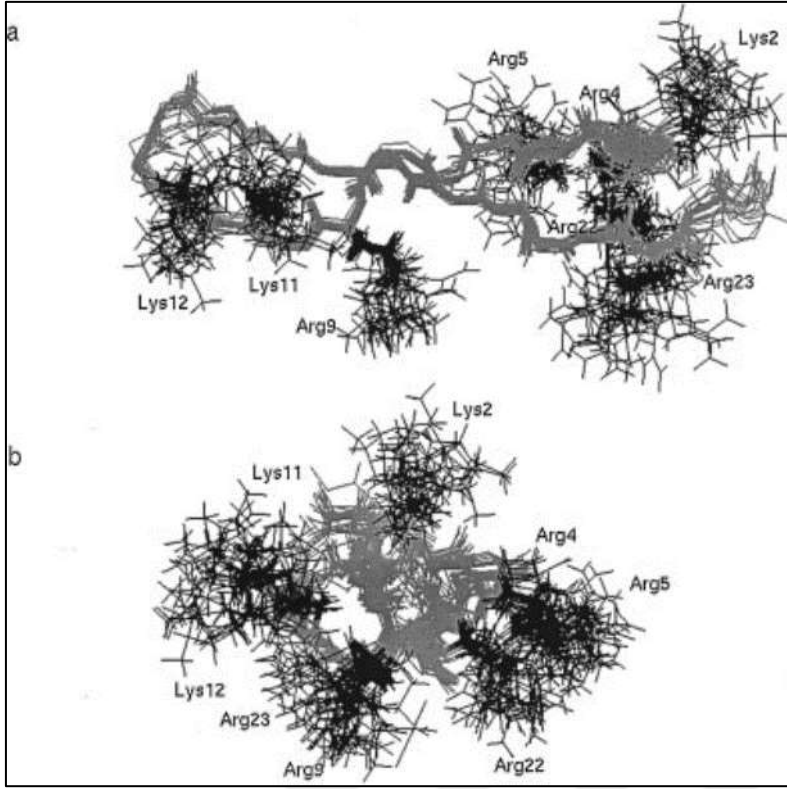
Sığır laktoferrinin yapısı kısa zaman önce x ışını kırınımı ile çözülmüştür. Yapısına bakıldığı zaman insan laktoferrinin yapısına çok benzediği görülmüştür. Bozulmamış sığır laktoferrinde, LfcinB'e karşılık gelen bölge kısmen çözücüye maruz kalmaktadır, burada potansiyel olarak lipopolisakkarit veya hücre reseptörler gibi hücre zar bileşenleri ile etkileşime girebilmektedir [73].

Laktoferrisin B'nin membranlarla etkileşimi çözelti yapısında gözlenen hem hidrofilik hem hidrofobik özellikler taşıyan biyolojik zarlar ile etkileşime girebileceğini göstermektedir.



Şekil 2.6. LFB'nin hidrofobik çekirdeğinin yapısı [64].

Şekil 2.6'ya baktığımızda hidrofobik tottruların çoğunun bir tarafta biriktiğini görürken, Şekil 2.7'ye baktığımızda Lys2 hariç pozitif yüklü yan zincirlerin çoğu bu alanın dışında konumlandırılmıştır.



Şekil 2.7. LFB'nin pozitif yan zincirlerinin gösterimi [64].

Membran bağlanması için hidrofobik ve hidrofilik artıkların daha da verimli bir şekilde bölünmesini bekleyebiliriz. Phe1, Lys2, Met10, Ala24 ve Phe25, uzun Lys ve Arg yan zincirleriyle birlikte membran ortamına uyum sağlayabilir. Laktoferrisinin bakteri ve parazitlerle nasıl mücadele ettiğinin mekanizmasının öğrenilmesi için lipid zarında nasıl konumlandığının anlaşılması gerekmektedir. Dolayısıyla Lfcin B'nin zarları bağlayabileceği iki olası mod düşünülmektedir. Membrana doğru genişletilmiş uçları membran yüzeyine dik olacak şekilde yerleştirilir ve bu şekilde etkileşime girerler.

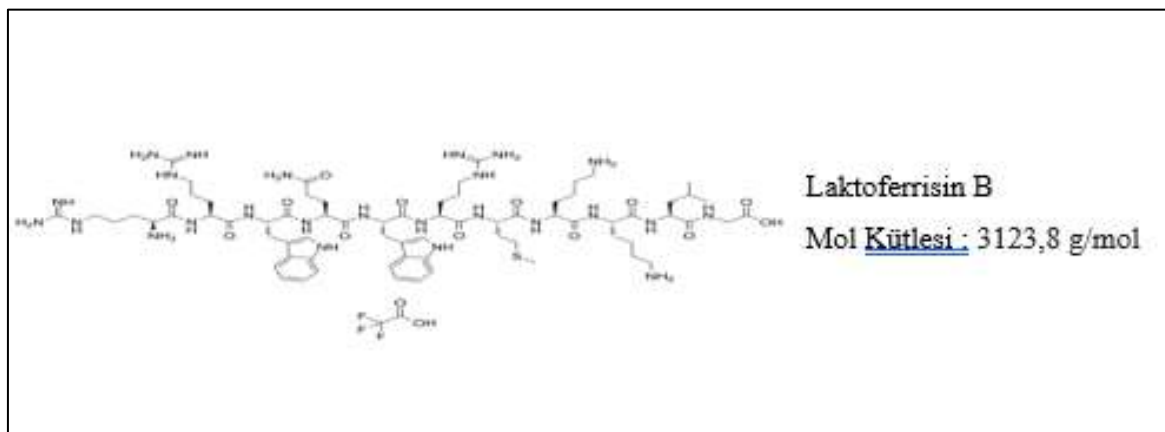


3. DENEYSEL KISIM

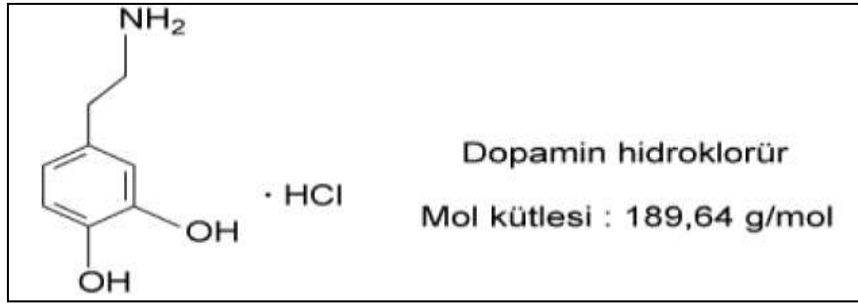
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda hedef molekül olarak kan plazmasında bulunan ferritine ait bir alt peptit dizisi olan Laktoferrisin B'yi ($C_{141}H_{224}N_{46}O_{29}S_3$) kullanıldı. Hazırlamış olduğumuz epitop baskılı PDMS yüzeylerin seçiciliğini ve antijen bağlama kapasitelerini ölçmek için fibrinojen (Fbg), hemoglobin (Hb), miyoglobin (Mb) ve ferritin (Fn) proteinleri kullanılmıştır. Bu biyomoleküllerin her biri Sigma firmasından temin edilmiştir. PDMS yüzeylerin kaplamasında kullandığımız dopaminhidroklorür (% 95,0), çapraz bağlayıcı olarak kullandığımız 2-amino-2(hidroksimetil)-1,3-propandiol (Tris bazı) (primer standart ve tampon, $\geq$ % 99,9),hidroklorik asit (HCl, % 36,5-38,0), sodyum hidroksit (NaOH, % 99,99), mutlak etanol (susuz, $\geq$ % 99,5)ve aseton (HPLC saflığında, $\geq$ 99,9) Aldrich firmasından temin edilmiştir. İmmünoensör çalışmaları fosfat tampon çözeltisinde (PBS, pH=7,4) gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Aldrich firmasından satın alınan fosfat tampon tabletleri kullanılmıştır. Kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıktadır ve hiçbir saflaştırma işlemine tabi tutulmamışlardır. Ayrıca çalışmaların her aşamasında deiyonize su kullanılmıştır.

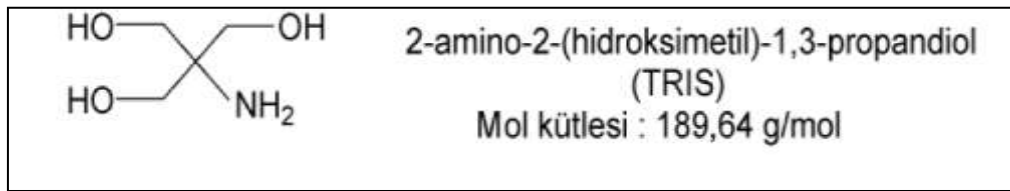
Kullanılan maddelere ait kimyasal yapılar aşağıda gösterilmiştir.



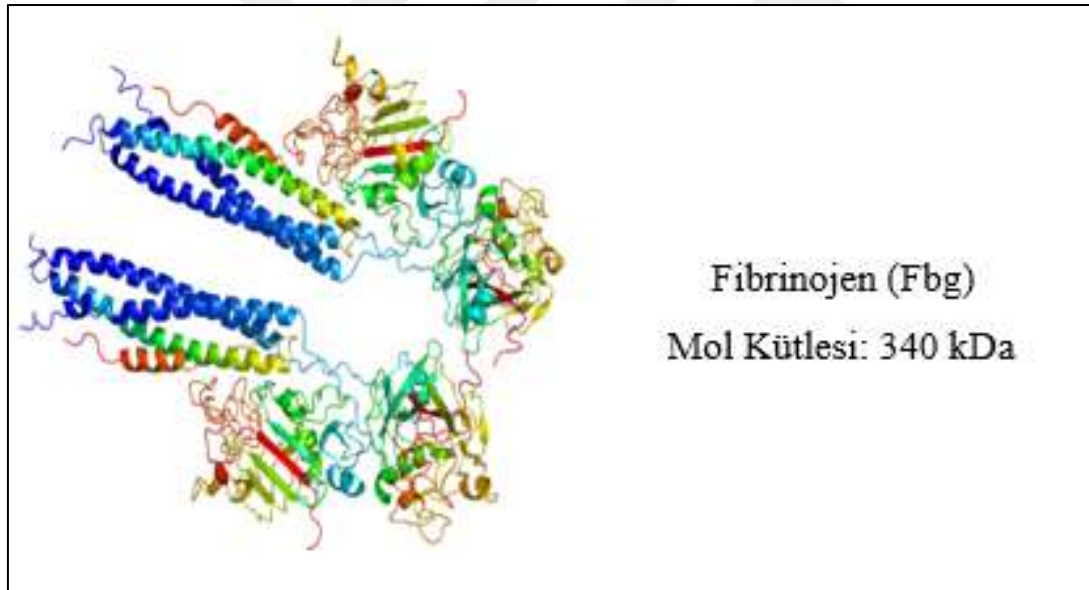
Şekil 3.1. Laktoferrisin B'nin moleküler yapısı



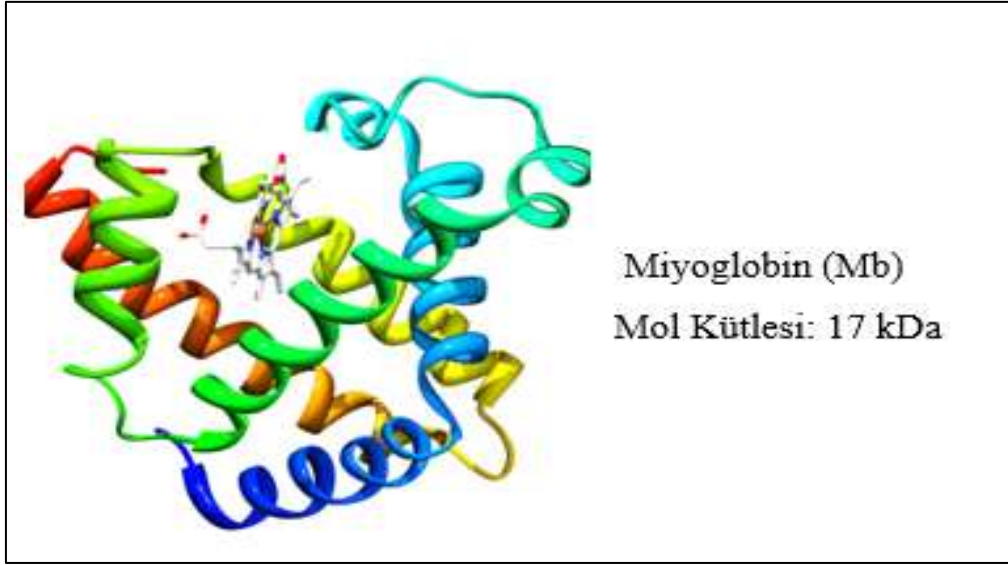
Şekil 3.2. Dopamin hidroklorürün moleküler yapısı



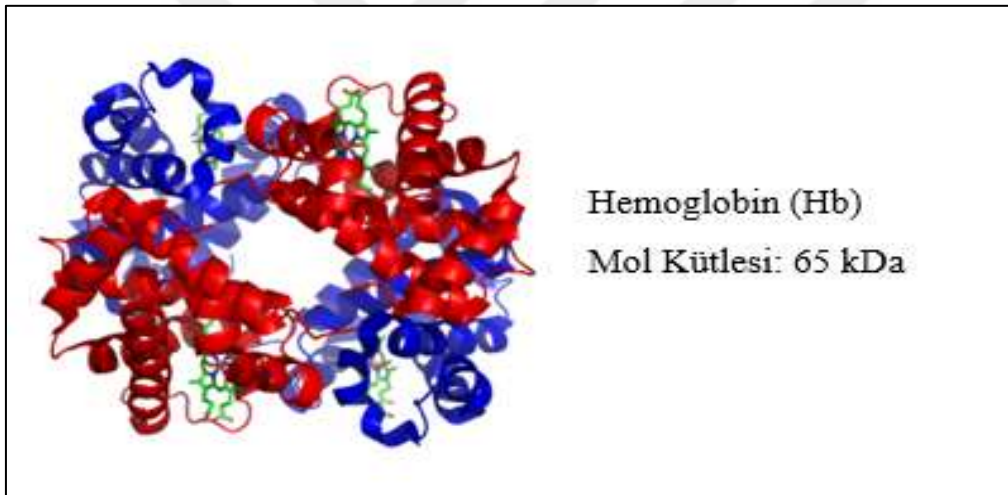
Şekil 3.3. 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol'ün moleküler yapısı



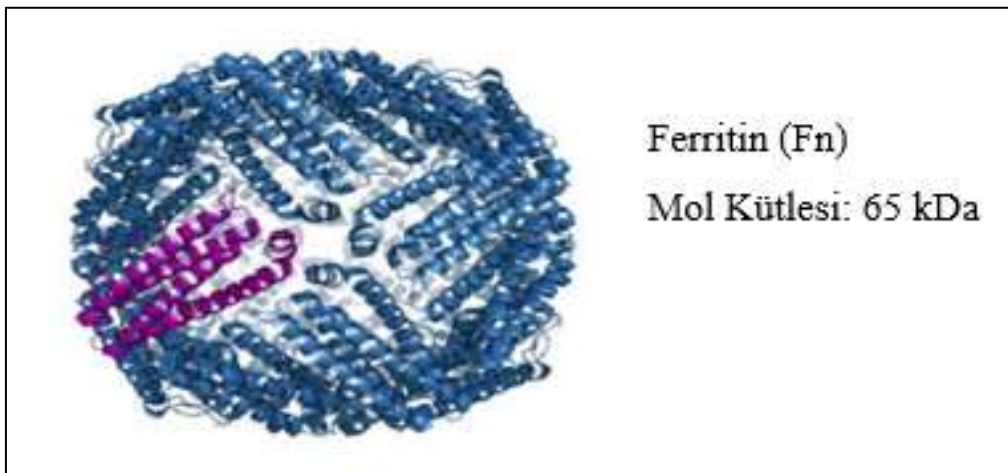
Şekil 3.4. Fibrinojen



Şekil 3.5. Miyoglobin



Şekil 3.6. Hemoglobin



Şekil 3.7. Ferritin

3.2. Kullanılan Cihazlar

3.2.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

MIP ve NIP yüzeylerin ATR-FT-IR spektrumları, ThermoNicolet 6700 marka spektrometre kullanılarak elde edildi. 2 cm^{-1} çözünürlük ve 128 tarama ile spektrumlar alındı.

3.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

SEM görüntüleri için JEOL JSM-6060 LV sistemi kullanıldı. Öncelikle MIP ve NIP PDMS yüzeyler altın ile kaplandı. Elektron kaynağı olarak K-tipi tungsten filamanın kullanıldığı 30 kV hızlandırıcı voltajı ve 8 mm çalışma aralığı koşullarında 3,5 nm çözünürlükle SEM görüntüleri elde edildi

3.3. PDMS Yüzeylerin Hazırlanması

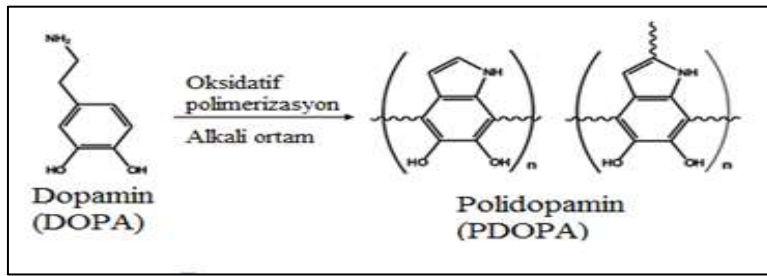
Temiz derecelendirilmiş bir tüpe gerekli miktarda 5 g silikon elastomer ölçülerek alındı. Daha sonra elde edilen miktarı ölçmek için tüm yüksek viskoziteli elastomerin tüpün dibine yerleşmesi beklenildi. Daha sonra silikon elastomere 1/10 oranında 0,5 g çapraz bağlayıcı ekleyerek hızlı bir şekilde yaklaşık beş dakika karıştırıldı. Böylelikle yapının içindeki oksijen bağlarının kırılması sağlanmış oldu. Hemen arkasından yaklaşık yarım saat boyunca çözeltiden tüm kabarcıklar kaybolana kadar vakum etüvde bekletildi. Vakumlanan PDMS 100x15 mm petri kabına her tarafına eşit dağıtılacak şekilde dikkatlice konuldu. $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat boyunca vakumlanmış etüve konularak beklemeye alındı. Eğer çok yüksek sıcaklıklarda kurumaya alınırsa PDMS'deki kabarcıkların yükselmediğinden veya genişlemediğinden emin olmak için sürekli kontrol etmek gerekir. Dikkat edilmezse, kabarcıklar PDMS kalıbında kuruyabilir ve PDMS kalıbımızda delikler oluşabilir. Vakumdan alınan PDMS yüzey istenilen boyut ve şekilde kesilerek hazırlandı. Hazırlanan yüzeyler su banyosunda 2 saat saf su ile yıkanarak üzerinde oluşabilecek herhangi bir kirliliğin giderilmesi amaçlandı. Yıkanan PDMS yüzeyler 2 saat vakum etüvde tekrar kurutularak kullanıma hazır hale getirildi. PDMS, oda sıcaklığında yaklaşık 24 saat içinde kendi başına kuruyabilir, bu nedenle daha uzun süre daha düşük sıcaklıklarda yüzeyi kurutmak daha iyidir. Çok yüksek bir sıcaklıkta kurumaya bırakırsak PDMS yüzeyimizdeki küçük kabarcıkların genişleyerek yüzeyimize zarar verebilir.

3.4. LFB Baskılanmış PDMS Yüzeylerin Hazırlanması

LFB baskılanmış PDMS yüzeylerin hazırlanması için, dopamin derişimi 4 mg/mL olacak şekilde, Tris-HCl (10 mM, pH=8,5) tampon çözeltisinde çözöldü ve 0,5 mg LFB 25 mL dopamin çözeltisinde dağıtıldı. Ardından, bu çözeltiye piranha çözeltisinde temizlenmiş olan PDMS yüzeyler konuldu ve 4 saat boyunca kendiliğinden polimerleşmenin tamamlanması beklendi. Bu sürenin sonunda çözeltiden alınan PDMS yüzeyler saf su ile yıkandı ve sonrasında metanol ve asetik asitten oluşun (9:1, v/v) eluent ile 45 dakika boyunca muamele edilerek LFB'ye özğü boşluklara sahip olan baskılanmış PDMS yüzeyler elde edildi.

Kontrol numunesi olarak kullanılacak olan baskılanmamış PDMS yüzeyler dopaminin alkali ortamda PDMS yüzeyinde LFB olmaksızın polimerleşmesi ile hazırlandı.

Dopamin çözeltisi hazırlandığında renksiz ve şeffaftır. Dopaminin oksidatif kendiliğinden polimerleşmesi boyunca şeffaf ve renksiz olan dopamin çözeltisinin rengi katekolün benzokinona yükseltgenmesinden dolayı hızlı bir şekilde pembeye döner ve ardından pembe renkli çözelti yavaş yavaş koyu siyaha döner. Bu durum, polimerleşmenin tıpkı melanin oluşumu gibi takip edilebilir olduğunu göstermektedir [79]. Bununla birlikte, dopamin ile oranik yüzey arasında geri dönüşü olmayan kovalent bir bağlanmanın olduğu düşünülmektedir. Net reaksiyon bilinmemekle birlikte, dopaminin oksidatif kendiliğinden polimerleşmesi için önerilen olası reaksiyon mekanizması Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.8. Dopaminin oksidatif olarak kendiliğinden polimerleşmesini gösteren olası reaksiyon [79].

3.5. Başlangıç LFB Derişimi Etkisinin Belirlenmesi

Daha önce hazırlanan 0,1 ile 0,9 mg mL⁻¹ derişim aralığındaki dokuz adet MIP yüzey LFB çözeltilerine yerleştirildikten sonra 2 saat boyunca su banyosunda inkübe edildi. Bu esnada metanol ve asetik asitten oluşun (9:1, v/v) elüsyon prosesi hazırlanarak 280 nm de başlangıç

absorbansı ölçüldü. İki saatin sonunda; yüzeyler, çözeltiden alındı. Her biri 45 dakika boyunca ayrı ayrı elüe edilerek elde edilen elüentlerin, absorbansları ölçüldü. Başlangıç absorbans değeri ile elüentlerin ölçülen absorbans değerlerinin arasındaki farkın, Beer-Lambert eşitliğinde kullanılmasıyla geri bağlanan LFB miktarı belirlendi.

3.6. Adsorpsiyon Kinetiği Çalışmaları

Adsorpsiyon kinetiği çalışmaları 0,5 mg mL⁻¹ başlangıç LFB derişim aralığında 0'dan 60 dakikaya değışen farklı inkübasyon zamanlarında yürütüldü. Metanol ve asetik asitten oluşan (9:1, v/v) oranında elüsyon prosesi hazırlanarak 280 nm de başlangıç absorbansı ölçüldü. MIP yüzeyler üzerindeki safsızlıkların giderilmesi amacıyla yaklaşık 10 dakika boyunca saf suda inkübe edildi. 5 mL elüsyon çözeltisine alınan MIP yüzey, yaklaşık 60 dakika boyunca her 15 dakikada bir UV cihazı ile absorbans değeri ölçüldü ve geri bağlanan LFB miktarı tayin edildi.

3.7. Seçicilik Çalışmaları

LFB baskılanmış PDMS yüzeylerin hedef protein olan ferritine seçiciliğinin ölçülmesi için, Ferritinle birlikte farklı plazma proteinler olan Hemoglobin, Miyoglobin ve Fibrinojenin 0,5 mg mL⁻¹ lik derişimleri hazırlandı. Daha sonra MIP ve NIP yüzeyler her bir proteinin çözeltisine ayrı ayrı konuldu. Oda sıcaklığında 40 dakika boyunca su banyosunda inkübe edilen çözeltilerden MIP ve NIP yüzeyler alındı. Daha sonra elüe edilen MIP ve NIP yüzeylerin absorbansları ölçüldü ve geri bağlanan LFB miktarları tayin edildi.

Ek olarak, MIP ve NIP yüzeylerin baskılama faktörü (BF) ve seçicilik katsayıları (SK) hesaplanarak bu yüzeylerin baskılama molekülüne karşı seçicilik özellikleri belirlendi.

$$BF = Q_{MIP}/Q_{NIP} \quad (3.1)$$

$$SK = BF_{TEMP}/BF_{NONTEMP} \quad (3.2)$$

Burada,

Q_{MIP} ve Q_{NIP} (mg g⁻¹) MIP ve NIP yüzeylerin ferritin adsorpsiyon kapasitesini, BF_{TEMP} ve $BF_{NONTEMP}$ baskılama molekülü ile diğer antikorların baskılama faktörlerini göstermektedir [49].

3.8. MIP Yüzeylerin Tekrar Kullanılabilirlik Sayılarının Belirlenmesi

Baskılanmış PDMS yüzeylerin yeniden kullanılabilirliğini ölçmek için MIP ve NIP yüzeyler adsorpsiyon desorpsiyon döngüsünde incelendi. İlk olarak metanol ve asetik asitten oluşan(9:1, v/v) oranında elüsyon prosesi hazırlandı. Daha sonra ayrı ayrı eluentin içine konulan MIP ve NIP yüzeyler 45 dakika boyunca su banyosunda düşük hızda oda sıcaklığında çalkalanarak disperse edildi. Su banyosundan alınan yüzeyler $0,5 \text{ mg/mL}^{-1}$ derişimindeki LFB çözeltisine konularak su banyosunda düşük hızda 45 dakika boyunca inkübe edildi. Bu adsorpsiyon desorpsiyon döngüsü laboratuvar ortamında 10 defa tekrar edilerek LFB baskılanmış PDMS yüzeylerin yeniden kullanılabilirlik değerleri ölçüldü.

3.9. Gerçek Numunelerde Uygulanabilirlik

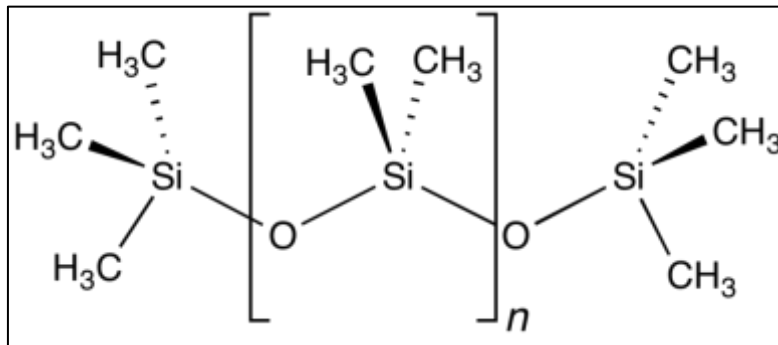
Önerilen yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini kanıtlamak için, sentetik kan numuneleri ferritin derişimi 5,0 , 10,0 , 15,0 ve 20,0 mg mL^{-1} derişiminde olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra bu numunelerden MIP ve NIP yüzeyler için 5'er mL'lik çözeltilere konuldu ve oda sıcaklığında düşük hızda su banyosunda 45 dakika boyunca inkübe edildiler. Daha sonra absorbans değerleri ölçülerek hedef molekül ferritin bu yüzeylerden geri kazanımı belirlendi.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Laktoferrisin B Baskılanmış PDMS Yüzeyler

Moleküler olarak baskılanmış polimerler, ilgili numunedeki hedef olarak belirlenen moleküle tamamlayıcı ve spesifik özellikler göstererek yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri oluşturabilen sentetik reseptörlerdir. Hedef olarak belirlenen numunelerin hassas ve seçici bir şekilde spesifik ortamlardan ayırt edilmesi için şekli, boyutu ve işlevselliği kullanırlar. Genel olarak MIP'ler hedef olarak belirlenen bir molekülü karmaşık bir karışımdan ayırt etmek için kullanımlarının yanında, katı faz ayrımı, saflaştırma, kataliz, sensörler, ilaç dağıtımı ve terapötik uygulamalarda dahil olmak üzere makromoleküller ve küçük biyomoleküllerin ayırt edilmesinde kullanılırlar. Düşük maliyetli ve basit sentez süreçlerine sahip olmaları, sınırsız raf ömürleri, kimyasal ve termal olarak kararlı kalabilmeleri ve sağlam yapıları sayesinde biyomimetik sensörlerde son yıllarda oldukça popülerlik kazanmışlardır. PDMS; polioksan grubunun en yaygın kullanılan üyesi olmakla birlikte geniş bir molar hacminin olması, kohezif enerji yoğunluğunun az olması ve yüksek esnekliğe sahip olması en önemli fiziksel özellikleri arasında yer alır. Bunlara ek olarak PDMS, görünür ve UV ışığına karşı saydam, ozon ve korona karşı çok dirençli olmakla birlikte atomik oksijen ve hatta oksijen plazmalara karşıda kararlıdır [60].



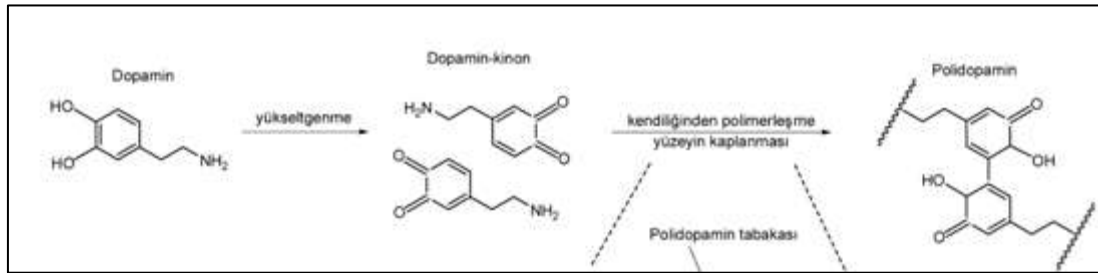
Şekil 4.1. PDMS yapısı

Diğer üstün özellikleri ise film şekillendirme yeteneği, çeşitli gazlara karşı yüksek geçirgenliği, su sevmeyen (hidrofob) yapıda olması, serbest hareket yeteneği, yüzey aktivitesi, kimyasal ve fiziksel etkilere karşı etkisiz olmasıdır.

Yapılan termodinamik değerlendirmelerde sert olmayan hedef molekül kullanımının MIP'lerde daha az net tanıma alanına yol açtığı görülmüştür [67]. Dolayısıyla filmlerin

kalınlığı, morfolojisi ve topografyası, her hedef molekül için özel olarak değiştirilebilir. MIP'ler çeşitli çapraz bağlayıcılar, fonksiyonel monomerler ve çözücü kombinasyonları ile üretilirler. MIP'leri kalitesi ve bağlanma özellikleri, sadece karışımın kombinasyonu yoluyla değil, aynı zamanda başlatıcı tipi ve miktarı, polimerizasyon sıcaklığı, etkileşim mekanizmaları ve benzeri deneysel koşullar ile de değiştirilebilir [62,63]. Genel olarak hedef molekül kritik bir rol oynarken diğer bileşiklerin (çapraz bağlayıcılar, fonksiyonel monomerler ve çözücüler) hedef molekülün kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre seçilir. Ayrıca baskılanmış polimerlerin hedef molekülünün bağlanma gücü olarak stabilite, monomer ve çapraz bağlayıcı bileşimi değiştirilerek en uygun hale getirilebilir [64].

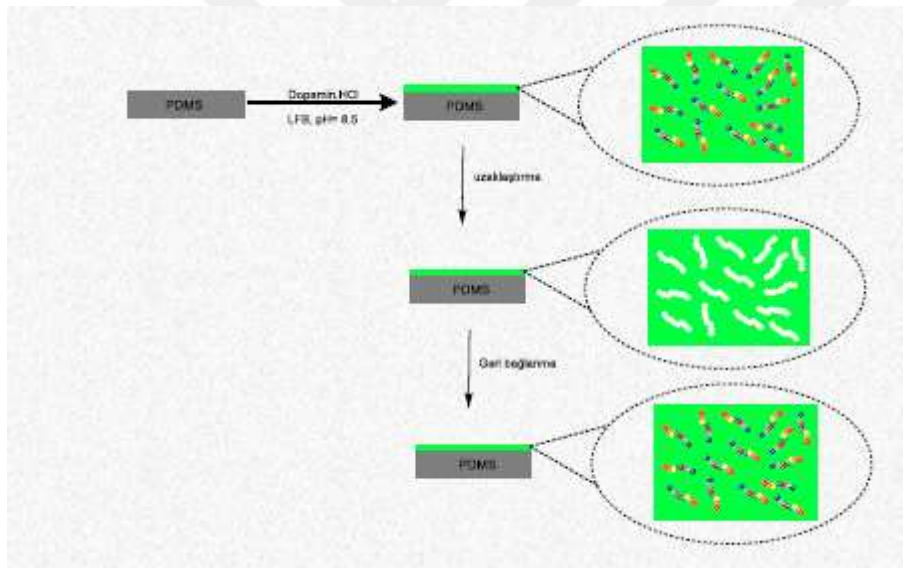
Dopamin çözeltisi hazırlandığında renksiz ve şeffaftır. Dopaminin oksidatif kendiliğinden polimerleşmesi boyunca şeffaf ve renksiz olan dopamin çözeltisinin rengi katekolün benzokinona yükseltgenmesinden dolayı hızlı bir şekilde pembeye döner ve ardından pembe renkli çözelti yavaş yavaş koyu siyaha döner. Bu durum, polimerleşmenin tıpkı melanin oluşumu gibi takip edilebilir olduğunu göstermektedir [65]. Bununla birlikte, dopaminin kendiliğinden gerçekleşen polimerleşme mekanizması açıkça anlaşılamamaktadır. Bu amaçla, dopaminin oksidatif kendiliğinden polimerleşmesi için önerilen olası reaksiyon mekanizması Şekil 4.2' de gösterilmektedir.



Şekil 4.2. Dopaminin oksidatif olarak kendiliğinden polimerleşmesini gösteren olası reaksiyon [66].

MIP'leri oluşturmak için birçok baskı yöntemi vardır. MIP'ler, yüzey baskısı, mikro-temas baskısı ve epitop baskısı dahil olmak üzere farklı tipte moleküler baskı yöntemleri kullanılarak başarıyla sentezlenmiştir. Makro ve mikro boyutta birçok molekül başarıyla sentezlenmiştir. Makromoleküller on binlerce Dalton veya daha fazla moleküler ağırlığa sahip molekülleri ifade eder. Çoğu büyük moleküller basit moleküllerden oluşur. Örneğin, protein birimleri aminoasitlerdir ve nükleotid, nükleik asitlerin temel birimidir. Makromoleküllerin tespiti de biyotıp ve proteomiklerin hızlı gelişimi ile büyük bir endişe

kaynağı olmuştur. Makromoleküller için hızlı, basit, spesifik ve yüksek verimli bir algılama yaklaşımı oluşturmak, analitik bilimindeki araştırma odaklarından biri haline geldi. Küçük molekül baskısı ile karşılaştırıldığında, makromoleküler baskı tekniği daha fazla zorluk sunar [66]. Her şeyden önce, şablon moleküllerin ayrıştırılması ve tanınması, büyük moleküler boyutlarından dolayı şablonların düşük elüsyon verimliliği nedeniyle makromoleküler baskı teknolojisindeki başlıca konulardır. Bu arada, yüksek oranda çapraz bağlı ağ yapısı genellikle hedef molekülün difüzyonunu sınırlandırarak düşük bağlanma kapasitesi ve uzun dengeleme sürelerine yol açar. Dolayısıyla hedef molekül olarak belirlenen moleküllerin tanımlanması ve ayrılması için epitop baskısı adı verilen yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu baskılama yöntemine göre, baskılama işlemi esnasında makromolekülün tamamı yerine herhangi bir alt birimi hedef olarak belirlenir. Laktoferrisin B (LFB) baskılanmış yüzeylerin hazırlanması Şekil 4.3’ de şematize edilmiştir.

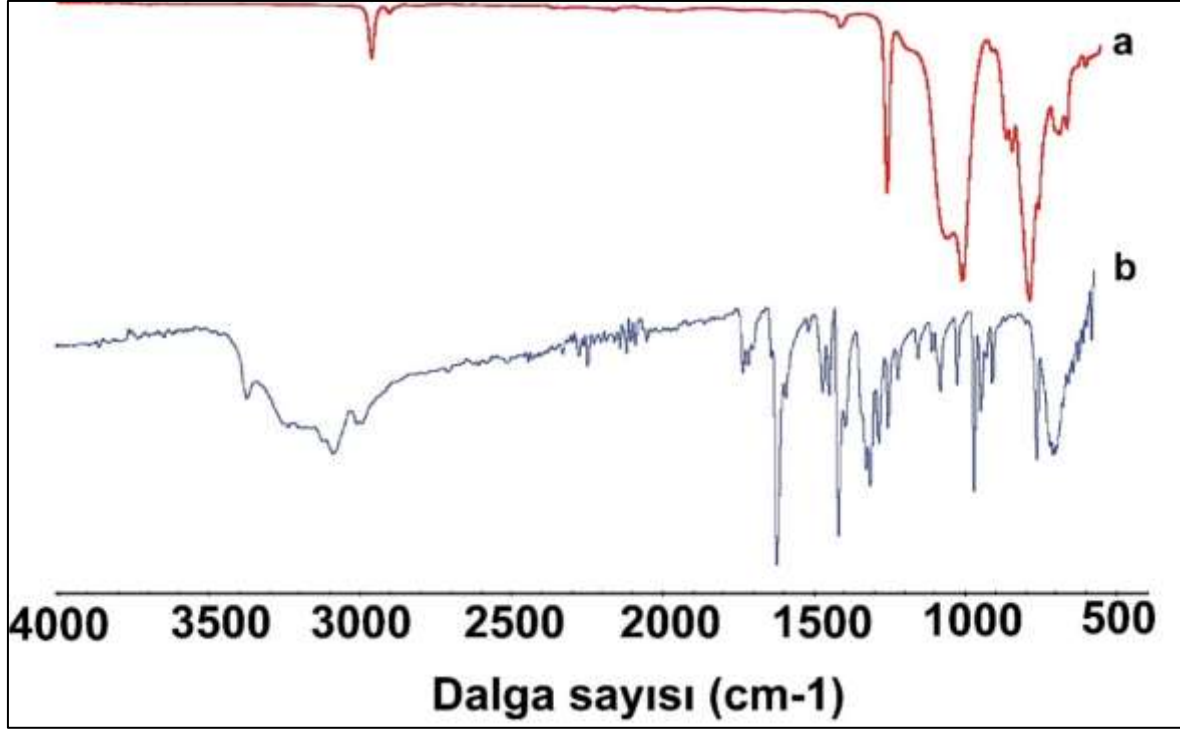


Şekil 4.3. Ferritinin spesifik tanınması için hazırlanan LFB baskılanmış PDMS yüzeylerin şematik gösterimi.

Sıvı PDMS ve çapraz bağlayıcı kullanılarak hazırlanan PDMS yüzeyler piranha çözeltisinde birkaç dakika bekletilerek temizlenmiş ve ardından LFB içeren dopamin çözeltisi içine konulmuştur. 4 saat süren dopaminin alkali ortamda kendiliğinden polimerleşmesi neticesinde PDMS yüzeyler çözeltilerden alınarak saf su ile yıkanmıştır. Ardından LFB’ye özgü boşlukların oluşması amacıyla modifiye PDMS yüzeyler metanol:asetik asit (9:1, v/v)çözücü karışımında 45 dakika boyunca muamele edilmesiyle LFB polimer yapısından uzaklaştırıldı. Böylece LFB’ ye özgü boşluklara sahip olan baskılanmış PDMS yüzeyler elde

edildi. Aynı yöntemle ortamda baskılama molekülü olmaksızın baskılanmamış PDMS yüzeyler de hazırlandı.

Hazırlanan baskılanmış ve baskılanmamış PDMS yüzeylerin yapısal karakterizasyonu ATR-FT-IR ile gerçekleştirildi. Hazırlanan yüzeylerin FT-IR spektrumları Şekil 4.4’de verildiği gibidir.



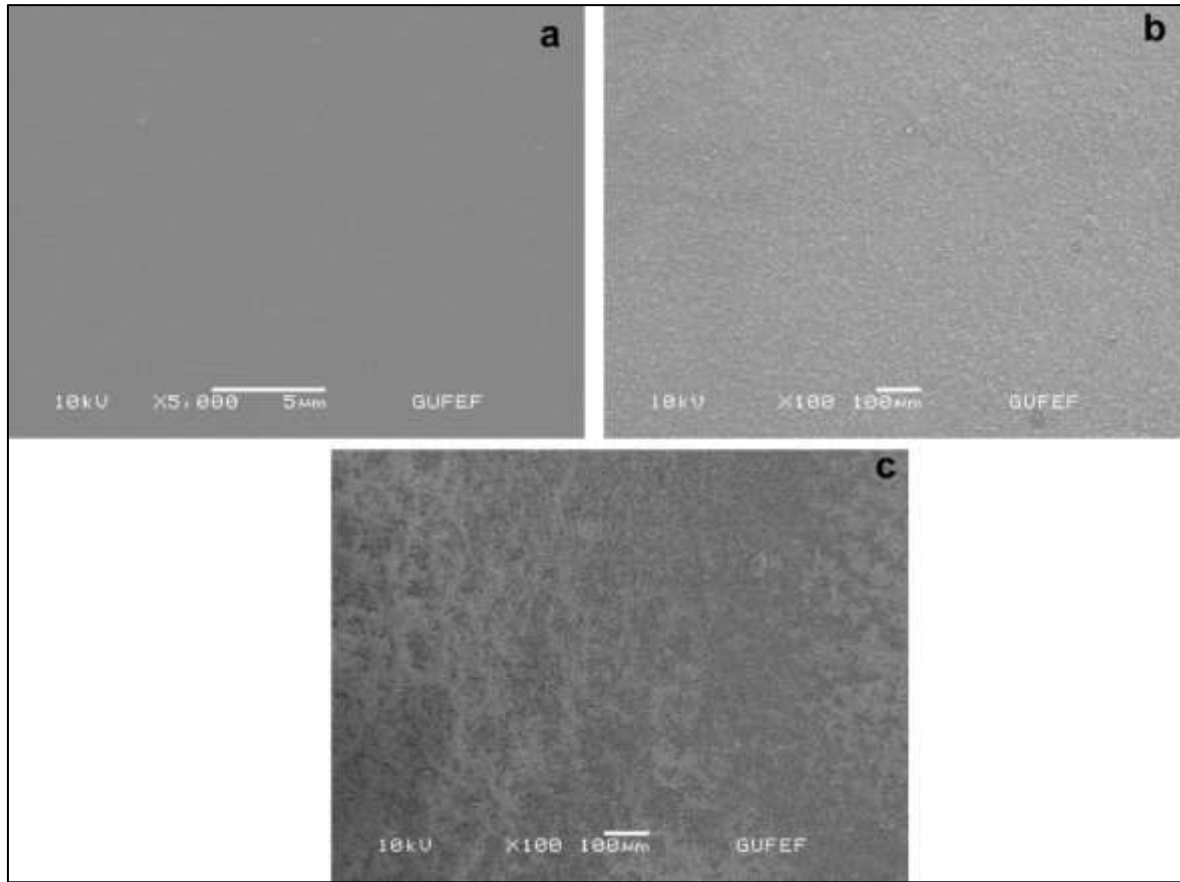
Şekil 4.4. Modifiye edilmemiş (a), baskılanmış PDMS yüzeylere ait FT-IR spektrumu

Modifiye edilmemiş PDMS yüzeye ait FT-IR spektrumu incelendiğinde, 2904 ve 2962 cm^{-1} ’de gözlenen bandların sırasıyla PDMS yapısındaki Si-CH₃ gruplarına ait simetrik ve asimetrik gerilme titreşimlerine ait olduğu düşünülmektedir. 1257 cm^{-1} ’de ortaya çıkan band Si-CH₃ yapısındaki deformasyon titreşimlerinden ve 1008 cm^{-1} ’de gözlenen band ise Si-O-Si gerilme titreşimlerinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca 786 cm^{-1} ’deki band ise -CH₃ sallanma ve Si-C gerilme titreşimlerinden dolayı ortaya çıkmış olabilir. LFB baskılanmış PDMS yüzeyin FT-IR spektrumu incelendiğinde ise, 3455 cm^{-1} ’de gözlenen geniş band dopamin yapısındaki katekol gruplarından kaynaklanmaktadır. 1614 cm^{-1} civarındaki band ise polidopamin yapısındaki aromatik halkaya aittir.

Moleküler baskılı sensörler "moleküler anahtar ve kilit" prensibine sahiptir, bu nedenle araştırmacılara hedef moleküllerin hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlar.

Herhangi bir antijen üzerinde meydana gelen spesifik bir antijenik determinanta ‘‘epitop’’ ismi verilirken antikor üzerindeki bağlanma bölgesine ise ‘‘paratop’’ ismi verilir. Ayrıca, antikorlar, B hücreleri ve T hücreleri de dahil olmak üzere bağışıklık sistemi bileşenleri, paratop belirli bir epitopa bağlanırken epitopları tanır [67].

Hazırlanan PDMS yüzeylerin yüzey karakterizasyonu SEM ile gerçekleştirildi. Hazırlanan yüzeylerin SEM görüntüleri Şekil 4.5’de verildiği gibidir.

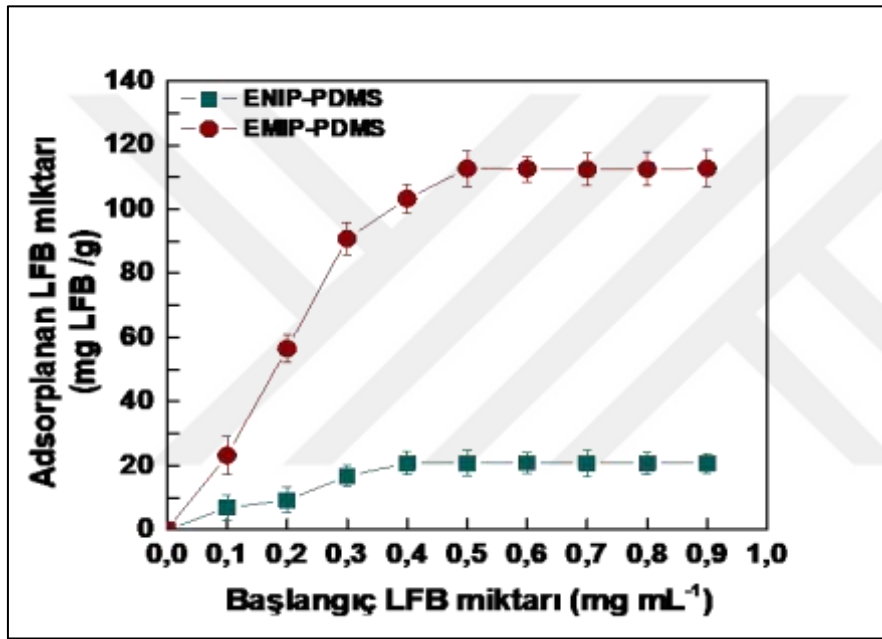


Şekil 4.5. Modifiye edilmemiş (a), baskılanmamış (b) ve baskılanmış (c) PDMS yüzeylerin SEM görüntüleri.

Hazırlanan PDMS yüzeylerin SEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.5), baskılanmış ve baskılanmamış yüzeylerin morfolojilerinin birbirlerine benzediği tekdüze bir şekilde yüzeyin polimer tabakası ile kaplandığı açıkça görülmektedir. Ayrıca modifiye edilmemiş PDMS yüzeyin morfolojisine göre hem baskılanmış hem de baskılanmamış PDMS yüzeylerin morfolojilerinin değişimi de yüzeyde polimerleşmenin gerçekleştiğine bir kanıt olarak gösterilebilir.

4.2. Başlangıç LFB Derişiminin Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi

Adsorpsiyon çalışmaları 0,1-0,9 mg mL⁻¹ derişim aralığındaki LFB çözeltilerinde yürütüldü. Serbest protein-antijen çözeltilerinin absorbansları UV-GB spektrofotometresi ile ölçüldü. Antikor bağı nanotaneciklerin adsorpsiyon kapasiteleri okunan absorbans değerleri kullanılarak belirlendi. Baskılanmış PDMS yüzeylerin adsorpsiyon kapasiteleri, baskılanmamış PDMS yüzeylerin adsorpsiyon kapasiteleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen veriler ile çizilen adsorpsiyon izotermi Şekil 4.6’da gösterildi.



Şekil 4.6. MIP ve NIP PDMS yüzeylerin adsorpsiyon kapasitesine başlangıç LFB derişimi etkisi.

Başlangıçta adsorplanan LFB miktarı doğrusal bir artış gösterirken 0,3 mg/mL derişimden sonra adsorplanan LFB miktarında azalma gözlemlenmiştir. 0,5 mg/ml lik derişimden sonra düz bir plato şeklini almıştır. Adsorbsiyon derişimi çalışmaları bize gösterdi ki, MIP yüzeylerimize 0,5 mg/ml lik derişiminde maksimum adsorbe edeceği LFB miktarına ulaşmıştır, bu derişimden sonra ne kadar LFB eklersek ekleyelim herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Kontrol amaçlı kullandığımız NIP yüzeylerimize baktığımızda ise belirli miktarda adsorpsiyon olmuştur ancak MIP lerinkinin yanında bu oran çok düşüktür. Bunun sebebi ise NIP’lerin tanıma bölgeleri olmamalarına rağmen çeşitli fiziksel etkileşimlerden ötürü bağlanmalar olmuştur.

LFB baskılanmış PDMS yüzeylerin adsorpsiyon özellikleri Scatchard eşitliği kullanılarak değerlendirildi ve sonuçlar Çizelge 4.1’de verildi. Scatchard eşitliği aşağıdaki gibidir:

$$\frac{Q}{C_e} = \frac{Q_{max}}{K_d} - \frac{Q}{K_d}$$

Q (mg g⁻¹) MIP ve NIP PDMS yüzeyler tarafından adsorplanan LFB miktarı

Q_{max} (mg g⁻¹) MIP ve NIP PDMS yüzeyler tarafından maksimum adsorplanan LFB miktarı

C_e hedef molekülün denge derişimi(mg mL⁻¹),

K_d ayrılma (bağlanma) sabiti(mg mL⁻¹).

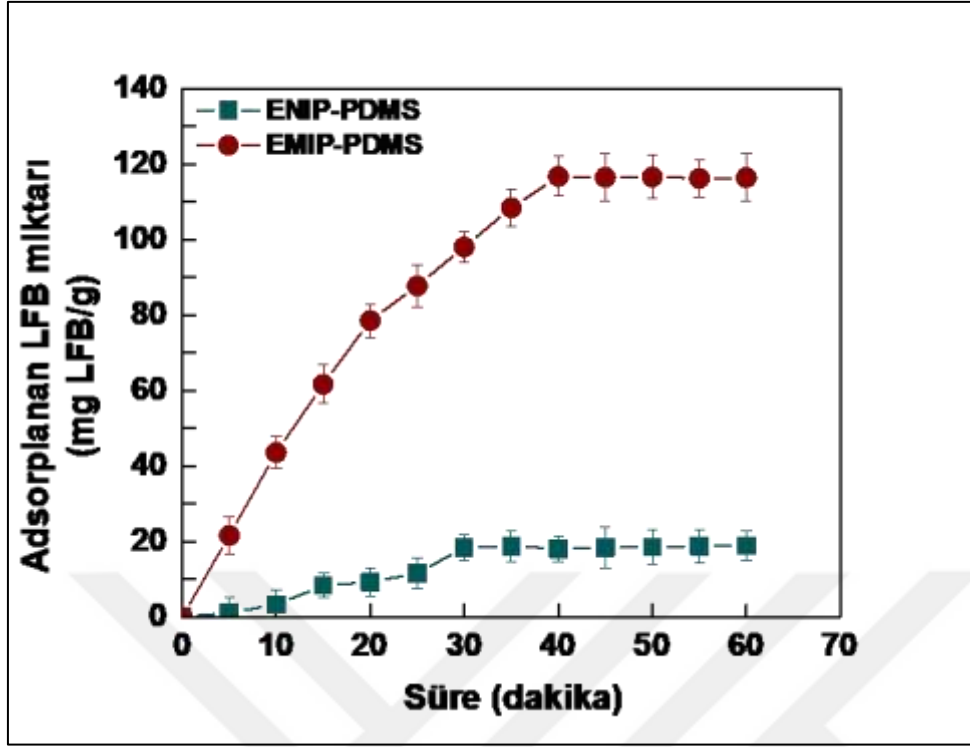
Çizelge 4.1.MIP ve NIP PDMS yüzeylerin K_d ve Q_{max} değerleri

	K_d (mg mL ⁻¹)	Q_{max} (mg g ⁻¹)
NIP	0,193	48,71
MIP	0,512	121,56

Q_{max} değerlerine baktığımız zaman MIP yüzeylerin kontrol amaçlı kullandığımız NIP yüzeylerine nazaran daha yüksek değerlere sahip olduğunu görüyoruz. Buda bize maksimum adsorblanan LFB miktarının MIP yüzeylerde daha fazla olduğunu göstermektedir.

4.3. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon kinetiği çalışmaları 0,5 mg mL⁻¹ başlangıç LFB derişiminde 0’dan 60 dakikaya değişen farklı inkübasyon zamanlarında yürütüldü ve elde edilen adsorpsiyon kinetik eğrileri Şekil 4.7’ de gösterildi.



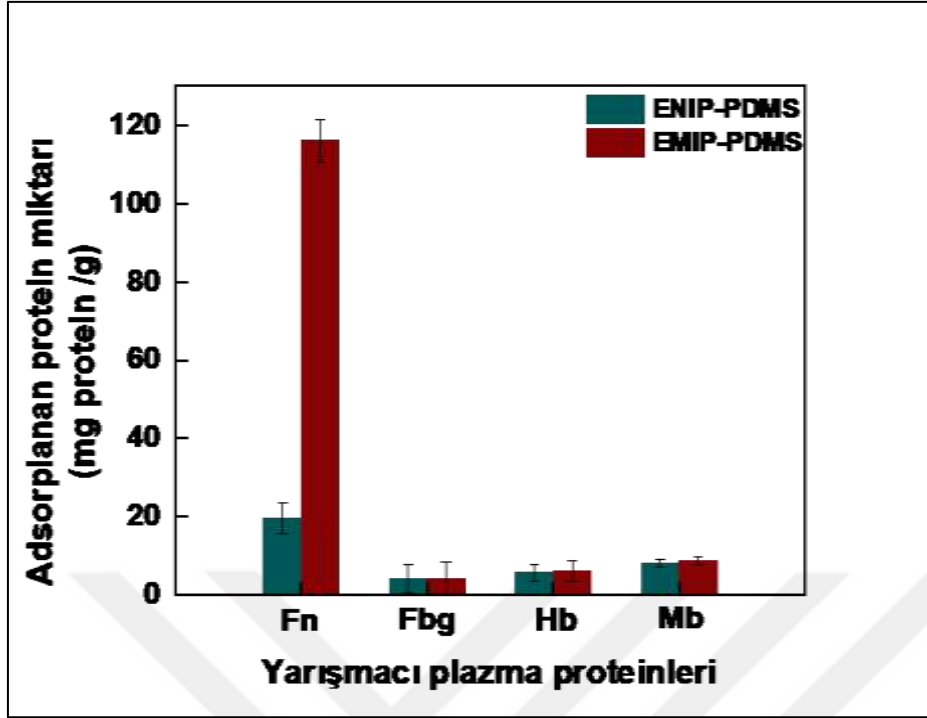
Şekil 4.7. MIP ve NIP PDMS yüzeylerin adsorpsiyon kinetiği

MIP yüzeylerimizin bağlanma kinetiğini ölçmek için 60 dakika boyunca her 5 dakika da bir serbest antijen çözeltisinin UV-GB spektrofotometresi ile absorbansı ölçülerek antikora özgül bağlanan antijen miktarı ve süresi belirlendi. MIP yüzeyimizde 0 ila 30 dakika arasında bağlanan antijen miktarında hızlı bir artış görülürken 30 dakikadan sonra bağlanan antijen miktarı yine artarken hızla yavaşlama olmuştur. Kırkıncı dakikaya ulaştığımızda ise maksimum bağlanan LFB miktarına ulaşılmıştır.

Kontrol amaçlı kullandığımız NIP yüzeylerde ise MIP yüzeylere göre, az miktarda bağlanmalar olmuştur ancak bunlar çeşitli fiziksel etkileşimlerden kaynaklı bağlanmalardır.

4.4. Hedef Proteine Seçicilik

Farklı plazma proteinler (Fbg, Fn, Hb, Mb) kullanılarak LFB baskılanmış PDMS yüzeylerin hedef protein seçiciliği incelendi. Bu amaçla öncelikle, antikora özgül antijeni ve bu proteinlerden birini içeren protein karışımları hazırlandı. Seçicilik çalışmaları, oda sıcaklığında 40 dakika boyunca baskılanmış ve baskılanmamış PDMS yüzeylerin başlangıç derişimi $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ olan farklı protein ile muamale edilmesi ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar; Şekil 4.8’de gösterildi.

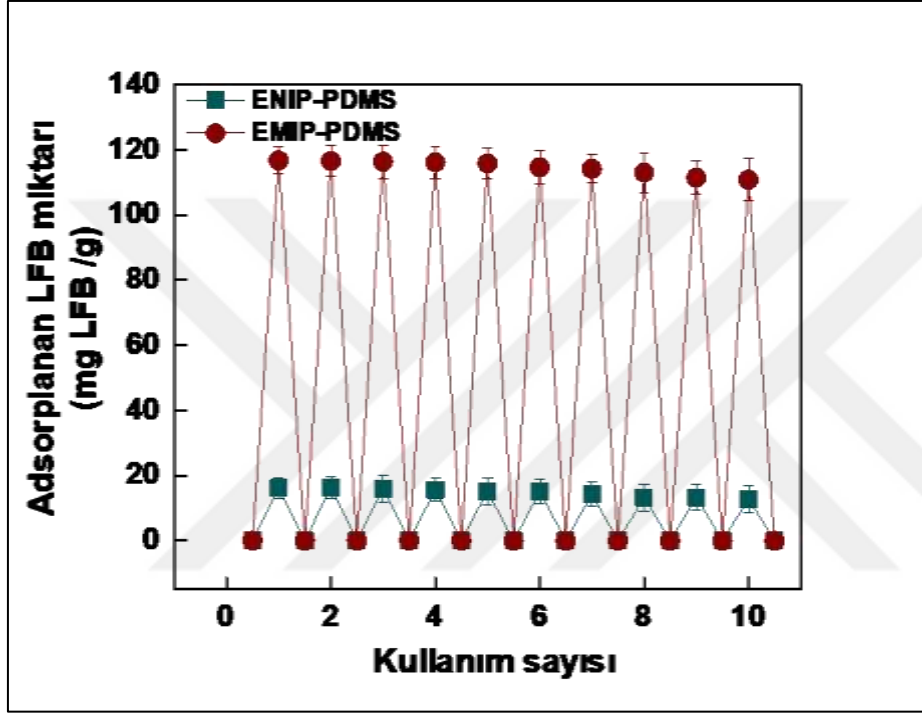


Şekil 4.8. MIP ve NIP PDMS yüzeylerin hedef proteine seçiciliği

Antikorlar yüzlerce aminoasitin düzenli bir sırayla bağlanmasıyla oluşan, vücutta geçirilen bir enfeksiyona karşı vücudun savunma amacıyla ürettiği, kanda bulunan karmaşık biyomoleküllerdir. Bu biyolojik moleküller antijen olarak adlandırılan özel yapılara bağlanabilme yeteneğine sahiptirler. Teşhis edilmesi istenen antijenin antikora bağlanması anahtar-kilit mekanizması ile açıklanabilir. Bu özel etkileşimlerden faydalanılarak tasarlanan immünosensörlerle antikora özgü antijenlerin analizi mümkündür. Çalışmanın amacı doğrultusunda, antikor bağlı manyetik nanotaneciklerin protein-antijen karışımından kendilerine özgü antijenleri etkili ve seçici bir şekilde bağlama kapasiteleri incelenmiştir. Şekil 4.8’de gösterildiği gibi adsorplanan ferritin miktarının diğer kan proteinlerine nazaran çok daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun nedeni ise MIP’lerde ferritin bir alt peptid dizisi olan LFB’ye özgü tanıma bölgelerinin olmasıdır. Bu tanıma bölgeleri sayesinde ferritin molekülü seçici olarak tanınır ve kompleks ortamdan ayırt edilir. Diğer proteinlerde kısmi olarak bağlanmışlardır ancak bunlar fiziksel etkileşimlerden ötürü az miktardadır. Yine kontrol amaçlı NIP yüzeylerde de çeşitli fiziksel etkileşimlerden ötürü çok az miktarda bağlanma olmuştur.

4.5. LFB Baskılanmış PDMS Yüzeylerin Tekrar Kullanılabilirliği

Baskılanmış PDMS yüzeylerin yeniden kullanılabilirliği hedef epitopun karmaşık ortamlardan spesifik tanınması ve ayrılması için çok önemli bir özelliktir. Bu sebeple, moleküler baskılanmış yüzeylerin yeniden kullanılabilirliği 10 defa adsorpsiyon/desorpsiyon döngüsünde incelendi ve sonuçlar Şekil 4.9’da gösterildi.



Şekil 4.9. MIP ve NIP PDMS yüzeylerin yeniden kullanılabilirliği

Biyofonksiyonel malzemelerin en önemli özelliklerinden bir tanesi raf ömürlerinin yüksek olması, maliyetlerinin düşük olması ve tekrar kullanılabilirliğidir. MIP yüzeylerimizin tekrar kullanılabilirliğini ölçmek için laboratuvar ortamında her 40 dakikada bir absorbans değerlerini UV-GB spektrofotometresi ile ölçtük. Daha sonra absorbe edilen LFB hacimce 1/9 metanol asetik asit çözeltisinde su banyosuna bırakılarak adsorbe edilen LFB lerin tekrar desorbsiyon edilmesi sağlanmıştır. Yapılan işlemler tekrar edildiğinde elimizdeki MIP yüzeylerin 10 kez kullanılabildiği görülmüştür ancak onuncu seferden sonra tanıma bölgelerinde meydana gelen bozulmalardan dolayı adsorplanan LFB miktarının azaldığı görülmüştür.

4.6. Baskılanmış PDMS Yüzeylerin Sentetik Kan Numunelerinde Uygulanabilirliği

Bu yöntemde ferritinin büyük molekül kütlesi nedeniyle ferritine ait bir peptit dizisi olan LFB baskılandı. LFB tanıma bölgeleri oluşturarak ferritinin spesifik numunelerden seçici olarak ayırt edilmesine olanak sağlanması amaçlanmıştır.

Önerilen yöntemin doğruluğunu ve güvenilirliğini kanıtlamak için, sentetik kan numuneleri 5,0, 10,0, 15,0 and 20,0 mg mL⁻¹derişiminde olacak şekilde hazırlandı ve MIP-PDMS yüzeyler ile bu çözeltilerden ferritinin geri kazanımı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de özetlendi.

Çizelge 4.2. Ferritinin MIP PDMS ile sentetik kan numunelerinden geri kazanımı ($n = 7$)

Eklenen ($\mu\text{g/mL}$)	Fn	Bulunan Fn ($\mu\text{g /mL}$)	Geri Kazanım (%)	B.S.S (%)
5		$4,97 \pm 0,11$	99,4	2,21
10		$9,98 \pm 0,17$	99,8	1,70
15		$14,96 \pm 0,21$	99,7	1,40
20		$19,88 \pm 0,23$	99,4	1,16

Önerilen yöntemin pratikliğini ve güvenilirliğini doğrulamak için tasarlanan baskılanmış PDMS yüzeyler, 4 farklı derişimde ferritin içeren sentetik kan numenlerinde ferritin saptamak için uygulandı.

Çizelge 4.2’ ye göre, sentetik kan örneklerinde LFB baskılanmış PDMS yüzeyler ile elde edilen geri kazanımlar, % 4,97 ile % 19,88 arasında değişen bağıl standart sapma ile % 99,4 ile % 99,8 arasında değişmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi % 95 güven düzeyinde t-testine uygulanmıştır. Sonuçlar, önerilen yöntemin güvenilir ve gerçek numunelerde ferritini tespit etmek için yeterince doğru olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara göre, epitop baskılanmış PDMS yüzeyler yüksek bir ilgi, seçicilik ve adsorpsiyon kapasitesi ile gerçek numunelerden ferritin ekstraksiyonu için kullanılabilir. Ayrıca, bu yüzeyler iyi bir afinite malzemesi olarak değerlendirilebilir. Sonuç olarak, hazırlanan LFB baskılanmış

PDMS yüzeyler ile ferritinin kompleks sistemlerden tespiti, spesifik tanınması, saflaştırılması, ayrılması için iyi bir işlem olabilir.



KAYNAKLAR

1. Polyakov M. (1931). Adsorption properties and structure of silica gel. *Zhurnal Fizicheskoi Khimii*, 2(1), 799–805.
2. Wulff, G. (2002). Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chemical Reviews* 102(1), 27.
3. Vlatakis, G., Andersson, L.I., Müller, R. and Mosbach, K. (1993). Drug as say using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature*, 361, 645–647.
4. Ashley, J., Shabbazi, M. A., Kant, K., Chidambara, V. A., Wolff, A., Bangb, D. D. and Sun Y. (2017). Molecularly imprinted polymers for sample preparation and biosensing in food analysis: Progress and perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 91(1), 606–615.
5. Boulanouar, S., Mezzache, S., Combes, A. and Pichon, V. (2018). Molecularly imprinted polymers for the determination of organophosphorus pesticides in complex samples. *Talanta*, 176, 465–478.
6. Sadeno, P. Y., Campuzano, S. and Pingarron J. M. (2017). Electrochemical sensors based on magnetic molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta* 960, 1-17.
7. Vasapollo, G., Sole R. D., Mergola L., Rosaria M., Scardino A. and Mele G. (2011). Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 5908-5945.
8. Takagishi T. and Klotz, I. M., (1972). Macromolecule-small molecule interactions; of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages. *Biopolymers*, 11(2), 483–491.
9. Baggiani C., Anfossi L. and Giovannoli C., (2007). Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 591(1), 29–39.
10. Vidyasankar, S. and Arnold, F. H. (1995). Molecular imprinting: Selective materials for separations, sensors and catalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(2), 218–224.
11. Gupta, B.D., Shrivastav, A.M. and Usha, S. P. (2016). Surface plasmon resonance-based fiber optic sensors utilizing molecular imprinting. *Sensors*, 16(9), 1381.
12. Kempe, M. and Mosbach, K. (1995). Molecular imprinting used for chiral separations. *Journal of Chromatography A*, 694(1), 3–13.
13. Zhang, H., Ye, L. and Mosbach, K. (2016). Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development. *Journal of Molecular Recognition*, 19(4), 248–259.

14. Chen L., Xuand S. and Li J., (2011). Recent Advances in molecular imprinting technology: Current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, 40(5), 2922–2942.
15. Li, R., Feng, Y., Pan G. and Liu L. (2019). Advances in Molecularly Imprinting Technology for Bioanalytical Applications. *Sensors*, 19(1), 177.
16. Xiao, D., Jiang, Y. and Bi, Y. (2018). Molecularly imprinted polymers for the detection of illegal drugs and additives. *Microchimica Acta*, 185, 247.
17. Li, Z., Qin, C., Li, D., Hou, Y., Li, S. and Sun, J. (2014). Molecularly imprinted polymer for specific extraction of hypericin from *Hypericum perforatum*. *Journal of Pharmacetucial Biomedical Analysis* 98(1), 210–220.
18. Dabrowski, M., Lach, P., Cieplak, M. and Kutnera W. (2018). Nano structed molecularly imprinted polymers for protein chemosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 17–26.
19. Xu, L., Huang, Y., JinZhu, Q. and Ye, C. (2015). Chitosan in Molecularly-Imprinted Polymers: Current and Future Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18328-18347.
20. Farooq, S., Nie, J., Cheng, Y., Yan, Z., Li, J., Bacha, S. A. S., Mushtaq A. and Zhang, H. (2018). Molecularly imprinted polymers application in pesticide residue detection. *Analyst*, 143(17), 3971, 3989.
21. Madikizela, L. M., Tavengwa, N. T. and Chimuka, L. (2018). Applications of molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs and analgesics from environmental waters and biological samples. *Journal of Pharmaceutica land Biomedical Analysis*, 147, 624–633.
22. Wang, P., Sun, X., Su, X. and Wangb, T. (2016). Advancements of molecularly imprinted polymers in the food safety field. *The Royal Society of Chemistry Analyst*, 2016, 141(12), 3540–3553.
23. Turan, E. (2018). His-Tag-Epitope Imprinted Thermoresponsive Magnetic Nanoparticles for Recognition and Separation Thyroid PeroxidaseAntigens from Whole Blood Samples. *Chemistry Select*, 3(42), 11963– 11969.
24. Pichon, V. and Chapuis-Hugon, F. (2008). Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants. *Analytica Chimica Acta*, 622(1-2), 48–61.
25. Cormack, P. A. G. and Elorza, A. Z., (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B*, 804(1), 173–182.
26. Sali, A., Glaeser, R., Earnest, T. and Baumeister, W. (2003). From word stoliteratures in structural proteomics. *Nature*, 422, 216–225.

27. Meyer, E. (1992). Internal water molecules and H-bonding in biological macromolecules: A review of structural features with functional implications. *Protein Science*, 1(12), 1543–1562.
28. Karplus, M. (2003). Molecular dynamics of biological macromolecules: A brief history and perspective. *Biopolymers*, 68(3), 350–358.
29. Golker, K., Karlsson, B. R. C., Olsson, G. D., Rosengrenand, A. M. and Nicholls I. A., (2013). Influence of composition and morphology on template recognition in molecularly imprinted polymers. *Macromolecules*, 46(8), 1408–1414.
30. Ye, L. (2016). Molecularly imprinted polymers with multi-functionality. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 1727–1733.
31. Chen, L., Wang, X., Wu, X., and Lu, W. (2016). Molecular imprinting: Perspectives and applications. *Chemical Society Reviews*, 45(8), 2137–2211.
32. Figueiredo, L., Erny, G. L., Santos, L. and Alves, A. (2016). Applications of molecularly imprinted polymers to the analysis and removal of personal care products: areview. *Talanta*, 146, 754–765.
33. Walsh, R., Osmani, Q., Hughes, H., Dugganand, P. and Loughlin, P. M., (2011). Synthesis of imprinted beads by aqueous suspension polymerisation for chiral recognition of antihistamines. *Chromatogr, Journal of Biomedical: Analytical Technology Biomedical Life Sciences*, 879(30), 3523–3530.
34. Deilami, S. A., Abdouss, M. and Seyedib, R. S. (2010). Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymer for controlled release of tramadol. *Central European Journal of Chemistry*, 8, 687–695.
35. Pan, G., Guo, Q., Ma, Y., Yangand Y. and Li, B., (2013). Thermo responsive hydrogel layers imprinted with RGDS peptide: a system for harvesting cell sheets. *Angewantde Chemie International Edition*, 52(27), 6907–6911.
36. Zhang, Z., Li, J., Song, X., Maand, J. and Chen, L. (2014). Hg²⁺ ion-imprinted polymers sorbents based on dithizone- Hg²⁺ chelation for mercury speciation analysis in environmental and biological samples. *RSC Advances* 4(87), 46444–46453.
37. Li, X., Li, M., Li, J. Lei, F., Su, X., Liu, M., Li, P. and Tan, X. (2014). Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers with modified rosin as a cross-linker and selective SPE-HPLC detection of basic orange II in foods *Analytical Methods*, 6(16), 6397–6406.
38. Kempe, M. and Mosbach, K. (1995). Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases. *Journal Chromatography*, 691(1-2), 317–323.
39. Lin, Z., Sun, L., Liu, J. W., Xia, Z., Yang, H., Chen, G. and Mater, J. (2014). Synthesis of boronic acid-functionalized molecularly imprinted silica nanoparticles for glycoprotein recognition and enrichment. *Chemistry B*, 2(6), 637–643.

40. Li, H., Zhao, L., Xu, Y., Li, Y., Ding, L., Liu, H., Huang, N., Ding, J. and Huang, N. (2018). Single-hole hollow molecularly imprinted polymer embedded carbon dot for fast detection of tetracycline in honey. *Talanta*, 185, 542-549.
41. Zhou, T., Jørgensen, L., Matthebjerg, M. A., Chronakisand, I. S. and Ye, L. (2014). Molecularly imprinted polymer beads for nicotine recognition prepared by RAFT precipitation polymerization: a step forward towards multi-functionalities. *RSC Advances*, 4(57), 30292–30299.
42. Bagan, H., Zhou, T., Eriksson, N. L., Bulow, L. and Ye L. (2017). Synthesis and characterization of epitope imprinted polymers for purification of human hemoglobin. *The Royal Society of Chemistry*, 7, 41705-41712.
43. Burow, M. and Minoura, N. (1996). Molecular imprinting: Synthesis of polymer particles with antibody-like binding characteristics for glucose oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 227(2), 419–422.
44. Winzerling, j., Pham, J. and Daphne Q.D. (2010). Insect ferritins: Typical or a typical ?. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800(8), 824–833.
45. V. Laufberger, (1937). On the Crystallization of Ferritin. *Bulletin Social Chim Biology* 19 1575–1582.
46. He, J., Fan, K. and Yan X. (2019). Ferritin drug carrier (FDC) for tumor targeting therapy. *Journal of Controlled Release*, 311–312, 288–300.
47. Truffi, M., Fiandra, L., Sorrentino, L., Monieri, M., Corsi, F. and Mazzhuccelli, S. (2016). Ferritin nanocages: a biological platform for drug delivery, imaging and the ranostics in cancer. *Pharmacological Research* 107, 57-65.
48. Dreher, M. R., Liu, W., Dewhirst, M. W., Yuan, F., Chilkoti, A. and Michelich, C. R. (2006). Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *Journal of National Cancer Institue*, 98(5), 335–344.
49. Simsek, E. and Kilic, M. A. (2005). Magic ferritin: A novel chemotherapeutic encapsulation bullet. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293 (1), 509–513.
50. Paolo, A, and Sonia L. (2010). Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800(8), 783–792
51. Masaki, U., Sebyung, K., Courtney, R., Kevin, H., and Trevor, D., (2010). The ferritin superfamily: Supra molecular templates for material ssynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1800(8), 834–845
52. Douglas, T. and Young, M. (2006). Viruses: making friends with old foes. *Science*, 312(5775), 873–875.
53. Theil, E. C., Takagi, H., Small, G. W., He, L., Tipton, A.R, and Danger, D. (2000). The ferritin iron entry and exit problem. *Inorganica Chimica Acta* 297(1-2), 242–251.

54. Flenniken, M. L., Willits, D. A., Harmsen, A. L., Liepold, L. O., Harmsen, A. G., Young, M. J., and Douglas, T., (2006). Melanoma and lymphocyte-specific targeting incorporated in to a heat shock protein cage architecture. *Chemistry and Biology*, 13(2), 161–170.
55. Wang, W., Knovich, M. A., Coffman, L. G., Torti, F. M., and Suzy V., (2010). Serum ferritin: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800(8), 760–769.
56. Jarjour I. T. and Jarjour L. K., (2008). Low iron storage in children and adolescents with neurally mediated syncope. *Journal of Pediatrics*, 153(1), 40–44.
57. Krieger J. and Schroeder C., (2001). Iron, brain and restlesslegs syndrome. *Sleep Medicine Reviews*, 5, 277–286.
58. Özata M., Özdemir İ. Ç., Licinio J., and Leptin H. (1999). Deficiency Caused by a Missense Mutation: Multiple Endocrine Defects, Decreased Sympathetic Tone, and Immune System Dysfunction Indicate New Targets for Leptin Action, Greater Central than Peripheral Resistance to the Effects of Leptin, and Spontaneous Correction of Leptin-Mediated Defects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(10), 3686–3695.
59. Ueda, N. and Takasawa, K. (2018). Impact of Inflammation on Ferritin, Hepcidin and the Management of Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease. *Nutrients*, 10(9), 1173.
60. Zhang, H., Ye, L. and Mosbach, K. (2016). Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development. *Journal of Molecular Recognition*, 19(4), 248–259.
61. Lee, M. H. and Means R. T., (1995). Extremely elevated serum ferritin levels in a university hospital: associated diseases and clinical significance. *American Journal of Medicine*, 98(6), 566–571.
62. Olive, A. and Junca, J. (1996). Elevated serum ferritin levels: associated diseases and clinical significance. *American Journal of Medicine*, 101, 120–122.
63. Quintana, C. and Gutierrez, L. (2010). Could a dysfunction of ferritin be determinant factor in the aetiology of some neuro degenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1800(8), 770–782.
64. Peter M., Hwang, N., Zhou, X., Shan, C. H., Arrow, S., and Vogel H. J., (1998). Three-Dimensional Solution Structure of Lactoferricin B, an Antimicrobial Peptide Derived from Bovine Lactoferrin. *Biochemistry*, 37(12), 4288–4298.
65. Chen, R., Cole, N., Dutta, D., Kumar, N. and Willcox, P. (2016). Antimicrobial activity of immobilized lactoferrin and lactoferricin. *Society For Biomaterials*, 105(8), 2612–2617.

66. Lee, M. H., Thomas, J. L., Liao, C. L., Jurcevic, S. and Lin, H. Y. (2018). Epitope recognition of peptide-imprinted polymers for Regenerating protein 1 (REG1). *Separation and Purification Technology*, 192, 213-219.
67. Algieri, C., Drioli, E., Guzzo, L. and Donato, L. (2014). Bio-mimetic sensors based on molecularly imprinted membranes. *Sensors*, 14(8), 13863–13912.
68. Yan, M. and Ramstrom, O. (2004). *Molecularly Imprinted Materials. Science and Technology*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 757.
69. Williams T. J., Schneider, R. P. and Willcox, M. D. (2003). The effect of protein coated contact lenses on the adhesion and viability of gram negative bacteria. *Current Eye Research*, 27(4), 227–235.
70. Wakabayashi, H., Takase, M. and Tomita, M. (2003). Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1277–1287.
71. Gifford, J. L., Hunter, H. N. and Vogel, H. J. (2005). Lactoferricin: A lactoferrin derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2588–2598.
72. Ho, Y. H., ChengSung, T. and ShengChen, C. (2012). Lactoferricin B Inhibits the Phosphorylation of the Two-Component System Response Regulators. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(4), M111.014720–10.
73. Moore, S. A., Anderson, B. F., Groom, C. R., Haridas, M. and Baker, E. N. (1997). Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 274(2), 222-236.
74. Crapnell, R. D., Hudson, A., Foster, C. W., Eersels, K., Grinsven, B., Cleij, T.J., Craig E. and Peeters, M. (2019). Recent Advances in Electro synthesized Molecularly Imprinted Polymer Sensing Platforms for Bioanalyte Detection. *Sensors*, 19(5), 1204.
75. Nicholls, I. A. (1995). Thermo dynamic considerations for the design of and ligand recognition by molecularly imprinted polymers. *Chemistry Letters*, 24(11), 1035–1036.
76. Hoshino, Y., Urakami, T., Kodama, T., Koide, H., Oku, N., Okahata, Y. and Shea, K. J. (2009). Design of synthetic polymer nanoparticles that capture and neutralize a toxic peptide. *Small*, 5(13), 1562–1568.
77. Mosbach, K. (2006). The promise of molecular imprinting. *Scientific American*, 295(4), 86–91.
78. Zeng, Z., Hoshino, Y., Rodriguez, A., Yoo, H. and Shea, K. J. (2010). Synthetic polymer nanoparticles with antibody-like affinity for a hydrophilic peptide. *ACS Nano*, 4(1), 199–204.
79. Lee, H., Dellatore, S. M., Miller, W. M. and Messersmith, P. B., (2007). Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multi functional Coating. *Science*, 318(5849), 426-430.

80. Alexander, C., Andersson, H. S., Andersson, L. I., Ansell, R. J., Kirsch, N., Nicholls, I. A., Mahony, O. and Whitcombe, J., (2016).Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including. *Journal of Molecular Recognition*, 19(2), 106–180.
81. Menger, M., Yarman, A., Yildiz, H. B., Gyurcsanyi, R. E. and Scheller, F. W. (2016). MIPs and aptamers for recognition of proteins in biomimetic sensing. *Biosensors*, 6(3), 35.
82. Goto, Y., Matsuno, R., Konno, T., Takai, M., Ishihara, K. (2008). Polymer Nanoparticles Covered with Phosphorylcholine Groups and Immobilized with Antibody for High-Affinity Separation of Protein. *Biomacromolecules*, 9(3), 828-833.







GAZİ GELECEKTİR..