

**PROTEOMİK ÖN HAZIRLIK AMAÇLI
KATI FAZ ZENGİNLEŞTİRME
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Sibel BÜYÜKTİRYAKI
Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Mart 2012

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sibel Büyüktiryaki'nin "Proteomik Ön Hazırlık Amaçlı Katı Faz Zenginleştirme Sistemlerinin Geliştirilmesi" başlıklı Kimya Anabilim Dalındaki, Doktora tezi.....tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. ARZU ERSÖZ	
Üye	: Prof. Dr. MUSTFA ŞENYEL	
Üye	: Yard. Doç. Dr.SİBEL EMİR DİLTEMİZ	
Üye	: Doç. Dr. SİNAN AKGÖL	
Üye	: Yard. Doç. Dr. LOKMAN UZUN	

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

PROTEOMİK ÖN HAZIRLIK AMAÇLI KATI FAZ ZENGİNLEŞTİRME SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Sibel BÜYÜKTİRYAKİ

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

**Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ
2012, 203 sayfa**

Serum proteinleri hastalıkların teşhisini sağlayan biyolojik belirteçlerin belirlenmesi için kullanılır. Kan serumunda albumin ve immunoglobulin G (IgG) oldukça yüksek derişimde olduğundan, bu proteinler düşük derişimde olan biyolojik belirteçlerin tayinini engeller. Bu nedenle; serumun yaklaşık olarak % 80'inini oluşturan albumin ve IgG'nin serumdan uzaklaştırılması önem kazanmaktadır. Bu tez çalışmasında, öncelikle üç farklı nanopartikül sistemi ile kan serumundan albumin ve IgG'nin uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Fe₂O₃ nanopartiküllerine ilkinde Protein A (Pro A), ikincisinde Cibacron Blue F3GA (CB) ve üçüncü olarak da aynı anda hem Pro A hem de CB bağlanmasıyla üç farklı katı faz sistemi hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküller karakterize edilerek, sulu çözeltiden ve serumdan albumin ve IgG uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan katı-faz sistemlerinin albumin ve IgG'yi etkili ve hızlı bir şekilde uzaklaştırabildiği gözlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise, yumurtalık kanseri teşhisinde biyolojik belirteç olarak kullanılan kanser antijen (CA 125) ve lizofosfatidik asit (LPA) tayini için katı-faz sistemleri hazırlanmıştır. Moleküler baskılama yöntemi kullanılarak karbon nanotüp (CNT) ve Fe₂O₃ nanopartikülü katı desteğine fosfoserin ve LPA baskılanmasıyla CA 125 ve LPA'yı tanıyabilen nanosensörler sentezlenmiş, karakterize edilmiş ve nanosensörlerin tayin limitleri belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Albumin Uzaklaştırılması, IgG Uzaklaştırılması, Afinite Kromatografisi, Moleküler Baskılanmış Polimerler, Fe₂O₃ Nanopartikülü, CNT, Biyolojik Belirteç

ABSTRACT**PhD Dissertation****IMPROVEMENT OF SOLID-PHASE ENRICHMENT SYSTEMS FOR
THE PURPOSE OF PROTEOMIC PRE-PREPARATION****Sibel BÜYÜKTİRYAKİ****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Department****Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ
2012, 203 pages**

Serum proteins are used for the determination of biomarkers which provide the diagnosis of diseases. Because albumin and immunoglobulin G (IgG) concentration in blood serum is very high, serum proteins prevent the determination of biomarkers which are at low concentrations. Therefore; the proteins depletion of albumin and IgG which comprises approximately 80 % of the serum, becomes important. In this thesis, primarily, the depletion of albumin and IgG have been carried out with nanoparticle systems. For this purpose; three different nanoparticles with the binding of Protein A (Pro A), Cibacron Blue F3GA (CB) and both Pro A and CB to Fe₂O₃ nanoparticles have been prepared. These nanoparticles have characterized and depletion of albumin and IgG have been carried out from aqueous solutions and serum. It has observed that the solid-phase systems are able to deplete of albumin and IgG effectively and in a short time. In the second stage of the study, the solid phase systems have prepared for the determination of cancer antigen (CA 125) and lysophosphatidic acid (LPA) which are used as biomarkers for ovarian cancer. The nanosensors which have prepared via imprinting of phosphoserine and LPA onto carbon nanotube (CNT) and Fe₂O₃ nanoparticle have synthesized, characterized and detection limits of CA 125 and LPA have determined.

Keywords: Depletion of albumin, Depletion of IgG, Affinity chromatography,
Molecular imprinted polymers, Fe₂O₃ nanoparticle, CNT, Biomarker

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde, bilgisini, sabrını ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bana büyük bir ilgi ve anlayışla yaklaşan Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ’e,

Deneysel çalışmalarım boyunca bilgi birikimi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, sabrını ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, yol göstericiliğinden ve değerli katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY’a,

Çalışmalarım boyunca desteğini, ilgisini eksik etmeyen ve Tez İzleme Komitemde yer alan Sayın Yrd. Doç. Dr. Sibel EMİR DİLTEMİZ’e,

Deneysel çalışmalarım boyunca bilgi birikimi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, desteği ile çalışmaların yönünü değiştiren ve değerli katkılarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Lokman UZUN’a,

Deneysel çalışmalarına değerli katkı ve görüşlerinden dolayı Sayın Doç. Dr. Sinan AKGÖL’e,

Tez çalışmamı destekleyen Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi Müdürü Sayın Doç. Dr. Lütfi GENÇ ve Müdür Yardımcısı Sayın Doç. Dr. Deniz HÜR’e,

Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Adil DENİZLİ’ye ve tüm Biyokimya Araştırma Grubu (BİOREG) Üyeleri’ne,

Yoğun çalışmalarına rağmen deneysel çalışmalarına yardımcı olan Sayın Uzm. Dr. Nilay BERELİ, Sayın Araş. Gör. Canan ARMUTCU ve Sayın Araş. Gör. Gizem ERTÜRK’e,

Deneysel çalışmalarındaki TEM analizlerindeki katkılarından dolayı Biyolog Arzu İŞCAN’a,

Çalışmalarım süresince laboratuvar, malzeme ve diğer imkanlarından istifade ettiğim Kimya Bölümü’ne, Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi’ne ve tüm personeline,

Tez çalışmam süresince destekleri ve yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN, Sayın Yrd. Doç. Dr. Serpil ÖZKARA, Sayın

Yrd. Doç. Dr. Ebru BİRLİK ÖZKÜTÜK, Sayın Yrd. Doç. Dr. Sulhi ÖZKÜTÜK ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Filiz YILMAZ ŞİŞMAN'a,

Tez çalışmam süresince hoşgörü ve desteklerinden dolayı Rüstem KEÇİLİ, Uzm. Şenay ARIKAN ESER, Güner SAKA, Özlem YALÇINKAYA, Araş. Gör. Özlem BİÇEN ÜNLÜER, Meliha KARAMAN YİĞİTALP, Nesrin KARTAN ÖZGEN, Bahar Tuba FINDIK, Ender KÖSE ve laboratuarda birlikte çalıştığım tüm SYNREG grup üyelerine,

BİBAM laboratuvarında birlikte çalıştığım arkadaşlarım Büşra KÖROĞLU ve Didem ARDALI'ya,

Desteği ile bakış açımı genişleten Sayın Recai GÖKSU'ya,

Tez çalışmam süresince yardımcı olan ve desteklerini esirgemeyen tüm hocalarıma,

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan canım abim Mehmet BÜYÜKTİRYAKİ, ablam Ayşe Betül BÜBER BÜYÜKTİRYAKİ ve biricik yeğenim Gazi Onur BÜYÜKTİRYAKİ'ye,

Hayatımın her aşamasında sevgi, emek ve desteğiyle daima yanımda olan canım annem Hafize BÜYÜKTİRYAKİ ve canım babam Gazi BÜYÜKTİRYAKİ'ye,

Yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Sibel BÜYÜKTİRYAKİ

Mart-2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
 1. GİRİŞ	 1
1.1. Proteomik.....	7
1.1.1. Klinik Proteomik ve Biyolojik Belirteçler.....	14
1.1.2. Vücut Sıvılarının Proteomik Analizde Kullanımı	27
1.1.3. Protein Uzaklaştırma Stratejileri.....	37
1.2. Afinite Kromatografisi	46
1.2.1. Matriks Seçimi.....	47
1.2.2. Afinite Ligandının Seçimi	48
1.2.3. Ara Kollar	50
1.2.4. Ligand İmmobilizasyonu	51
1.3. Afinite Kromatografisi Türleri	52
1.3.1. Boya-ligand Afinite Kromatografisi.....	52
1.3.2. Protein A Afinite Kromatografisi	55
1.4. Elektroforetik Yöntemler	57
1.4.1. Elektroforez	57
1.4.2. İzoelektrik Odaklama (IEF).....	59
1.4.3. İki Boyutlu Jel Elektroforezi (2D-PAGE).....	60
1.5. Kütle Spektrometri Yöntemleri	61
1.5.1. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma Yöntemi (MALDI)	61
1.5.2. Yüzey arttırılmış lazer desorpsiyon iyonizasyon (SELDI)....	64

1.5.3. Yüzey Yardımcılı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon.....	65
1.6. Kanser	65
1.6.1. Yumurtalık Kanseri	67
1.6.2. Yumurtalık Kanseri Biyolojik Belirteçleri	73
1.7. Moleküler Baskılama	79
1.8. Nanopartiküller	82
2. MATERYAL VE YÖNTEM	91
2.1. Materyal.....	91
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	91
2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	92
2.2. Fotoduyarlı Şelat Dop Edilen Silika Nanopartikülü ve Süperparamanyetik Silika Nanopartikülün Hazırlanması	93
2.2.1. Metakriloamidotriptofan (MATrp) Monomerinin Sentezi	93
2.2.2. Bis(2-2'-bipiridil)bis(MATrp)-Rutenyum(II) Sentezi.....	94
2.2.3. Fotoduyarlı Şelat Dop Edilen Silika Nanopartikülün Sentezi ve Yüzey Modifikasyonu.....	95
2.2.4. Fotoduyarlı Şelat Dop Edilen Süperparamanyetik Silika Nanopartikülün Sentezi	95
2.3. Albumin ve IgG Uzaklaştırma Sistemlerinin Hazırlanması	96
2.3.1. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin fonksiyonellendirilmesi	96
2.3.2. Protein A (Pro A), Cibacron Blue F3GA (CB) ve Pro A/CB Bağlanmış Fe ₂ O ₃ Nanopartikülerin Hazırlanması.....	96
2.3.3. Fe ₂ O ₃ Nanopartikülü ve Hazırlanan Katı Desteklerin Karakterizasyonu	98
2.3.4. Sulu Çözeltiden Albumin Uzaklaştırılması	99
2.3.5. Sulu Çözeltiden IgG Uzaklaştırılması	101
2.3.6. Kan Serumundan IgG ve Albumin Uzaklaştırılması	101
2.3.7. Ticari albumin ve IgG uzaklaştırma jeli ile albumin ve IgG uzaklaştırılması	104

2.4. Biyolojik Belirteçlerin Tayinini Sağlayan Katı Desteklerin	
Hazırlanması	106
2.4.1. Metakriloamidoantiprin (MAAP) Monomerinin Sentezi	106
2.4.2. Metal-Şelat Monomerlerinin Sentezi.....	106
2.4.3. Karboksillenmiş CNT Sentezi ve Nanopartikülün	
Metal-Şelat Monomerleri İle Etkileştirilmesi.....	107
2.4.4. PS Baskılı CNT ve Fe ₂ O ₃ Nanopartiküllerin Sentezi	108
2.4.5. PS Baskılı CNT ve Fe ₂ O ₃ Nanopartikülleri ile Lüminesans	
Ölçümleri.....	109
2.4.6. LPA Baskılı CNT ve Fe ₂ O ₃ Nanopartiküllerin Sentezi	110
2.4.7. LPA Baskılı CNT ve Fe ₂ O ₃ Nanopartikülleri ile	
Lüminesans Ölçümleri	110
3. BULGULAR	111
3.1. MATrp Monomeri ve Fotoduyarlı Şelat Dop Edilen Silika ve	
Süperparamanyetik Silika Nanopartikülün Karakterizasyonu.....	111
3.1.1. MATrp Monomerinin Karakterizasyonu	111
3.1.2. Bis(2-2'-bipiridil)bis(MATrp)- rutenyum(II)	
karakterizasyonu.....	112
3.1.3. Fotoduyarlı Şelat Dop Edilen Silika ve Süpermanyetik	
Silika Nanopartiküllerin TEM Görüntüleri	113
3.2. Albumin ve IgG Uzaklaştırma Sistemleri	114
3.2.1. Fe ₂ O ₃ ve TMSPM ile fonksiyonellendirilmiş Fe ₂ O ₃	
Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	116
3.2.2. Pro A, CB ve Pro A/CB SPN Karakterizasyonu	119
3.2.3. Pro A/ CB ve CB SPN'ler ile Sulu Çözeltide Albumin	
Adsorpsiyonu.....	124
3.2.4. Pro A/ CB ve CB SPN'ler ile Sulu Çözeltide IgG	
Adsorpsiyonu.....	136
3.2.5. Pro A/ CB, CB ve Pro A SPN'lerin Kullanılması ile Kan	
Serumundan IgG ve Albumin Uzaklaştırılması	145
3.2.6. Ticari Albumin ve IgG uzaklaştırma Jeli ile Albumin ve	
IgG Uzaklaştırma Sonucu	151

3.3. Biyolojik Belirteçlerin Tayinini Sağlayan Nanosensörler.....	152
3.3.1. MAAP ve Metal-Şelat Monomerlerinin Karakterizasyonu..	152
3.3.2. LPA ve PS Baskılı CNT ve Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	156
3.3.3. LPA ve PS Baskılanmış CNT ve Fe ₂ O ₃ nanopartikülleri ile Lüminesans Çalışmaları.....	163
3.3.4. PS Baskılanmış CNT ve Fe ₂ O ₃ Nanosensörler ile PS ve CA 125 Tayini	165
3.3.5. PS Baskılanmış CNT Nanosensörünün Serin ile Etkileşimi	171
3.3.6. LPA Baskılanmış CNT ve Fe ₂ O ₃ Nanosensörler ile LPA Tayini.....	171
4. SONUÇLAR	176
KAYNAKLAR	183

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Plazma proteomu içeriğindeki afinite ayırımı ve zenginleştirme teknolojileri.....	3
1.2. “Omik” bilimlerinin şematik gösterimi	9
1.3. Genom ve proteom arasındaki ilişki	10
1.4. Proteomik türleri ve uygulama alanları	10
1.5. Proteomik akış şeması	12
1.6. Proteomikte aşağıdan-yukarıya ve yukarıdan-aşağıya yaklaşımın şematik gösterimi.....	14
1.7. Kanserin klinik değerlendirilmesinde farklı durumlardaki biyolojik belirteçlerin kullanımı	19
1.8. Kan ve bileşenleri	30
1.9. Plazmadaki proteinlerin bağıl katkısı	32
1.10. IgG yapısı	34
1.11. 70 plazma proteinin derişim aralığı	36
1.12. Farklı uzaklaştırma kolonlarının kıyaslanması.....	44
1.13. 2D-jellerinde yüksek bolluklu proteinlerin uzaklaştırılmasının değerlendirilmesi	45
1.14. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.....	47
1.15. Afinite ligandları.....	48
1.16. Ligandların ayrışma sabitlerinin şematik gösterimi	50
1.17. Bazı triazin boyalarının yapıları	53
1.18. MALDI iyonlaştırma kaynağı.....	62
1.19. Uçuş zamanlı kütle ayırıcı	63
1.20. SELDI sisteminde ayırma amaçlı hazırlanan yüzeylerin şematik gösterimi.....	65
1.21. 1950-2001 ölüm oranlarının değişim nedenleri.....	66
1.22. Ovarium ve yumurtalık kanserinin meydana geldiği hücre.....	68
1.23. MUC16 gen ürününün şematik gösterimi	77
1.24. LPA molekülü ve metabolik oluşumu	78
1.25. Kovalent ve non-kovalent moleküler baskılama yönteminin	

şematik görünümü	80
1.26. Nanopartikül oluşum aşamaları	82
1.27. Zaman ve derişime bağı olarak çekirdekleşme, büyüme ve agregasyon	83
1.28. Karbonun allotropları a) grafit, b) elmas, c) fulleren.....	88
1.29. a) Çok duvarlı nanotüp (MWNT), b) Tek duvarlı nanotüp (SWNT)	88
2.1. Metakriloamidotriptofan (MATrp) monomerinin sentezi	94
2.2. Bis(2-2'-bipyridyl) bis(MATrp)-rutenyum(II) foto duyarlı şelatın sentezi	94
2.3. Manyetik nanopartikülün TMSPM ile fonksiyonellendirilmesi.....	96
2.4. Albumin ve IgG uzaklaştırmak amacıyla kullanılan nanopartiküllerin hazırlanmaları	98
2.5. Serum örneklerinin farklı SPN'lerle etkileşim akım şeması	102
2.6. Ticari albumin ve IgG uzaklaştırma jeli ile albumin ve IgG uzaklaştırma işlemi.....	105
2.7. Metakrilo amidoantipirin (MAAP) monomerinin sentez reaksiyonu.....	106
2.8. (MAAP) ₂ -Tb(III) metal-şelat monomeri	107
2.9. Karboksillenmiş CNT sentezi.....	108
2.10. PS baskılı CNT sentezi	108
2.11. PS molekülü.....	109
3.1. Metakrilamidotriptofan (MATrp) monomerinin molekül formülü ..	111
3.2. Bis(2-2'-bipyridyl) bis(MATrp)-Ru(II) fotoduyarlı şelatın MALDI-TOF-MS spektrumu	113
3.3. Fotoduyarlı şelat dop edilen silika nanopartiküllerin TEM görüntüsü.....	114
3.4. Fotoduyarlı şelat dop edilen süperparamanyetik silika nanopartiküllerin TEM görüntüleri	114
3.5. a) Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerin FT-IR spektrumu b) TMSPM ile modifiye edilmiş Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerin FT-IR spektrumu	117
3.6. A) Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerin TEM görüntüsü b) TMSPM ile fonksiyonellendirilmiş Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerin TEM görüntüsü	118

3.7. Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerin AFM görüntüsü.....	119
3.8. A) Pro A/CB SPN TEM görüntüsü B) CB SPN TEM görüntüsü C) Pro A SPN TEM görüntüsü	120
3.9. A) Pro A/CB SPN zeta boyut grafiği B) CB SPN zeta boyut grafiği C) Pro A SPN zeta boyut grafiği.....	121
3.10. Nanopartiküllerin ESR spektrumu A) Fe ₂ O ₃ nanopartikülü B) Pro A/CB SPN..	124
3.11. Cibacron Blue F3GA	125
3.12. Pro A/CB ve CB SPN ile albumin adsorpsiyonuna pH etkisi	126
3.13. Pro A/CB ve CB SPN ile albumin adsorpsiyonuna derişimin etkisi.....	127
3.14. Pro A/CB SPN ile albumin adsorpsiyonu için Langmuir izotermi	129
3.15. CB SPN ile albumin adsorpsiyonu için Langmuir izotermi	130
3.16. Pro A/CB SPN ile albumin adsorpsiyonu için Freundlich izotermi	132
3.17. CB SPN ile albumin adsorpsiyonu için Freundlich izotermi	132
3.18. Pro A/CB ve CB SPN ile albumin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.....	134
3.19. Pro A/CB ve CB SPN'ye albumin adsorpsiyonuna NaCl Derişiminin etkisi	135
3.20. Albumin desorpsiyonu ve tekrar kullanılabilirlik.....	135
3.21. Pro A bağlı SPN'ye IgG bağlanması.....	136
3.22. Pro A/CB ve Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonuna pH etkisi	137
3.23. Pro A/CB ve Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonuna derişimin etkisi.....	138
3.24. Pro A/CB SPN ile IgG adsorpsiyonu için Langmuir izotermi	139
3.25. Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonu için Langmuir izotermi.....	140
3.26. Pro A/CB SPN ile IgG adsorpsiyonu için Freundlich izotermi.....	141
3.27. Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonu için Freundlich izotermi	141
3.28. Pro A/CB ve Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi.....	143

3.29. Pro A/CB ve Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonuna NaCl derişiminin etkisi	144
3.30. IgG desorpsiyonu ve tekrar kullanılabilirlik.....	145
3.31. Pro A/CB, CB ve Pro A SPN'lerin kullanılması ile serumdan albumin ve IgG uzaklaştırılması sonrasında SDS-PAGE görüntüsü	148
3.32. Pro A/CB SPN'nin kullanılması ile 1/2 serumdan ve sulu çözeltideki karışımdan albumin ve IgG uzaklaştırılması sonrasında SDS-PAGE görüntüsü	148
3.33. Pro A/CB, CB ve Pro A SPN'lerin kullanılması ile 1/5 serumdan albumin ve IgG uzaklaştırılması sonrasında SDS-PAGE görüntüsü	149
3.34. Uzaklaştırma yapılmamış serum, albumin ve IgG uzaklaştırılmış serum örneklerine ait 2D-PAGE görüntüsü	150
3.35. Pierce® Albumin/IgG uzaklaştırma ticari kiti ile 2D-PAGE A) uzaklaştırma öncesi B) uzaklaştırma sonrası.....	152
3.36. MAAP monomerinin ¹ H-NMR spektrumu.....	153
3.37. MAAP monomerinin FT-IR spektrumu	154
3.38. (MAAP) ₂ -Tb (III) metal-şelat monomerinin FT-IR spektrumu	155
3.39. (MAAP) ₂ -Eu (III) metal-şelat monomerinin FT-IR spektrumu	155
3.40. (MAAP) ₂ -Tb (III) metal-şelat monomerinin MALDI-TOF-MS spektrumu	156
3.41. CNT ve karboksillenmiş CNT'ün FT-IR spektrumu.....	157
3.42. CNT-(MAAP) ₂ -Tb-LPA polimerinin FT-IR spektrumu	158
3.43. CNT-(MAAP) ₂ Tb(III)-PS polimerinin FT-IR spektrumu	158
3.44. Fe ₂ O ₃ -TMSPM-(MAAP) ₂ -Tb(III)-LPA FT-IR spektrumu	159
3.45. Fe ₂ O ₃ -TMSPM-(MAAP) ₂ Tb-PS FT-IR spektrumu	159
3.46. CNT TEM görüntüleri A) CNT B) PS baskılı CNT C) LPA Baskılı CNT	160
3.47. PS baskılı CNT AFM görüntüsü	161
3.48. A) PS baskılı Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün TEM görüntüsü B) LPA baskılı Fe ₂ O ₃ nanopartikülünün TEM görüntüsü.....	162

3.49. A) (MAAP) ₂ -Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS Baskılı CNT için lüminesans şiddetlerin değişimi B) (MAAP) ₂ -Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA Baskılı CNT için lüminesans şiddetlerin değişimi C) (MAAP) ₂ -Eu(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA Baskılı CNT için lüminesans şiddetlerin değişimi.....	164
3.50. (MAAP) ₂ -Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT ile farklı derişimlerdeki PS bağlanması sonucu lüminesans şiddetindeki değişim	165
3.51. (MAAP) ₂ -Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT ile farklı derişimlerdeki CA 125 bağlanması sonucu lüminesans şiddetindeki değişim.....	165
3.52. (MAAP) ₂ -Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT nanosensörü ile PS kalibrasyon eğrisi.....	166
3.53. (MAAP) ₂ -Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT nanosensörünün fosfoerin Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	168
3.54. (MAAP) ₂ -Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT nanosensörünün CA 125 Langmuir adsorpsiyon izotermi	168
3.55. (MAAP) ₂ -Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı Fe ₂ O ₃ nanosensörünün CA 125 için Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	169
3.56. (MAAP) ₂ -Tb(III) metal şelat monomeri ve (MAAP) ₂ -Eu (III) metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı nanosensörlere LPA bağlanması sonucu lüminesans şiddetindeki değişim	172
3.57. MAAP ₂ Tb (III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı CNT nanosensörünün LPA için Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	173
3.58. MAAP ₂ Tb (III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen	

LPA baskılı Fe_2O_3 nanosensörünün LPA için Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	173
3.59. MAAP ₂ Eu (III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı CNT nanosensörünün LPA için Langmuir adsorpsiyon izotermi.....	174
4.1. Albumin ve IgG Uzaklaştırmasında kullanılan katı destekler.....	182

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Biyolojik belirteçlerin keşfi için kullanılan “-omik” teknolojileri	16
1.2. Biyolojik belirteçlerin gelişim fazları	18
1.3. Amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA) tarafından onaylanan kanser biyolojik belirteçleri	21
1.4. Protein profillerinin çıkarılması için kullanılan bazı proteomik teknolojilerinin avantajları ve dezavantajları	25
1.5. Geleneksel ve proteomik ayırimda kullanılan teknikler	37
1.6. Grup spesifik ligandlar ve spesifiklik özellikleri	49
1.7. Bakterilerdeki IgG bağlayan proteinler	56
1.8. Epitelyal yumurtalık kanserinin risk faktörlerin oluşumu	70
1.9. Yumurtalık kanserinin FIGO saflandırma sistemi	71
1.10. Yumurtalık kanseri belirteçleri	75
3.1. Langmuir denklemine dayanan R_L değerleri	131
3.2. SPN'lere albumin adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması	133
3.3. Langmuir denklemine dayanan R_L değerleri	140
3.4. SPN'lere IgG adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması	142
3.5. Serum örneğinde farklı SPN'lerin kullanılması ile IgG ve Albumin adsorpsiyon kapasiteleri	147
3.6. Fosfoserin baskılı CNT ve Fe_2O_3 nanosensörlerinin Langmuir analizlerinin ve tayin sınırlarının karşılaştırılması	170
3.7. LPA baskılı CNT ve Fe_2O_3 nanosensörlerinin Langmuir analizlerinin ve tayin sınırlarının karşılaştırılması	174

SİMGE VE KISALTMALAR

1D-PAGE	: Bir boyutlu poliakrilamit jel elektroforez
2D-PAGE	: İki boyutlu poliakrilamit jel elektroforez
AFP	: α -Fetoprotein
CA 125	: Kanser antijen 125
CB	: Cibacron Blue F3GA
CE	: Kapiler elektroforez
CEA	: Karsinoembriyonal antijen
CRP	: C-reaktif protein
CSF	: Serebrospinal sıvı
DIGE	: Diferansiyel jel elektroforezi
EDRN	: Erken Teşhis Araştırma Ağı
ESI-FT-ICR	: Elektrosprey iyonizasyon-fourier transform iyon siklotron rezonans
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FET	: Alan etki transistör
FPLC	: Hızlı protein sıvı kromatografi
HAP	: Yüksek bolluklu proteinler
HGP	: İnsan Genome Projesi
HPP	: İnsan Proteom Projesi
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografi
ICAT	: İzotop kodlu afinite etiketler
İTRAQ	: Rölatif ve tam ölçüm için izotop kodlar
IEC	: İyon değişim kromatografi
IEF	: İzoelektrik odaklama
IgY	: İmmüoglobulin yol
IgG	: İmmüoglobulin G
LC-MS	: Sıvı kromatografi kütle spektrometri
LPA	: Lizofosfatidik asit
MALDI	: Matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon
MIP	: Moleküler baskılanmış polimerler
MARS	: Çoklu afinite uzaklaştırma sistemi

MALDI-TOF-MS	: Matriks yardımcı lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometri
M-LAC	: Çoklu lektin afinite kromatografi
MMA	: Yüksek kütle ölçüm doğruluklu
MudPIT	: Çok boyutlu protein tespit teknolojisi
NCI	: Ulusal Kanser Enstitüsü
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
NPV	: Negatif tahmin değeri
Pro A	: Protein A
PMF	: Peptit kütle parmak izi
PPV	: Pozitif tahmin değeri
PSA	: Prostat spesifik antijen testi
PS	: Fosfoserin
PSD	: Kaynaktan sonra parçalanma
PTM	: Post-translasyonel modifikasyon
ROC	: Alıcı işletim karakteristiği eğrisi
SALDI-TOF-MS	: Yüzey yardımcı lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometri
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez
SELDI-TOF-MS	: Yüzey arttırılmış lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometri
TPP	: Üçlü faz bölümlleme

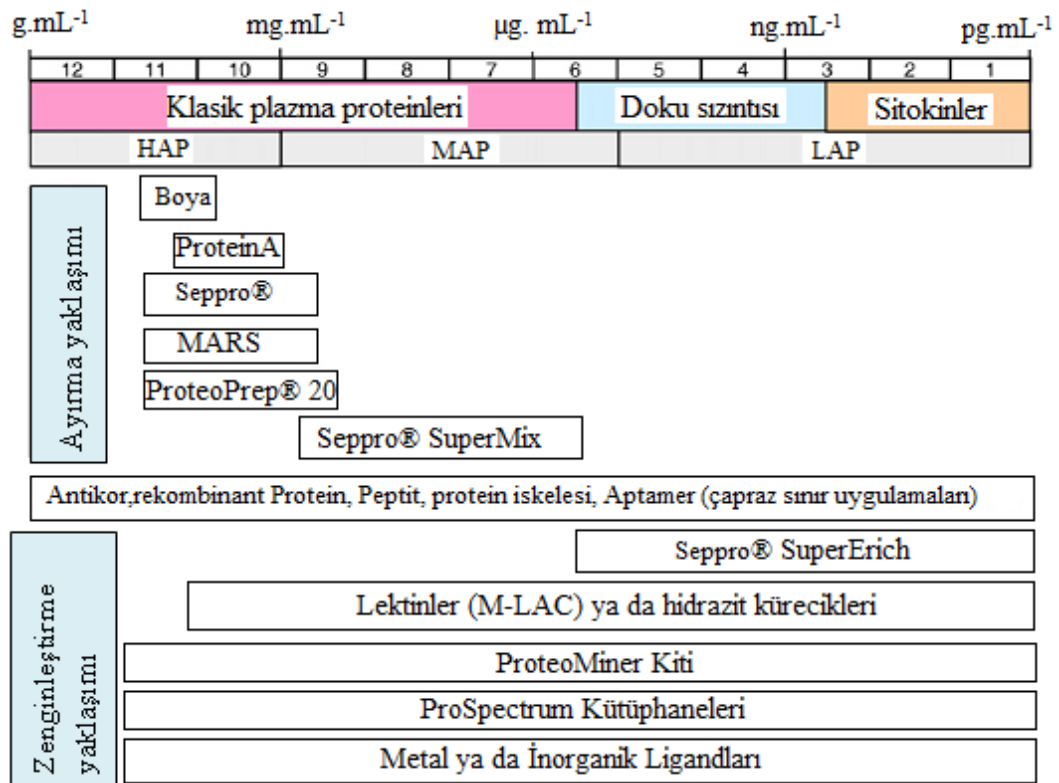
1.GİRİŞ

İnsan vücudu ile ilgili soruları anlamak amacıyla bilim adamları insan gen dizilimini belirlemek için uzun zamandır çalışmaktadır. Genetik bilimi 1865 yılında kalıtımla ilgili temel kanunları öneren Mendel'in öncülüğünde kurulmuştur. Watson ve Crick tarafından 1953 yılında deoksiribonükleik asidin (DNA) çift heliks yapısının keşfiyle kalıtımın moleküler temeli anlaşılmıştır. Bu zamandan sonra teknolojinin de gelişimiyle genomik çalışmalar tahmin edilemeyecek boyutlarda değişmiştir (Denizli 2007).

1990 yılında başlayan İnsan Genom Projesinin (HGP) tamamlanmasıyla proteomik çalışmalarının hastalık mekanizmalarının tanımlanmasında daha etkili rol oynadığı gözlemlendikten sonra İnsan Proteom Projesine (HPP) başlanmıştır. Son zamanlarda, protein örgüsünün analizine dayanan proteomik yaklaşımların teşhis amacı için protein profillerinin değerlendirilmesinde daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Proteomik, bir organizmanın genomu tarafından sentezlenen bütün proteinleri sentez, görev ve etkileşim bakımından inceleyen çalışma alanıdır. Hücrenin, dokunun ya da organizmanın dinamik durumunun daha doğru yansıtılmasından dolayı hastalık belirteçlerinin belirlenmesi ve tedavi için proteomik çalışmalar daha çok önem kazanmaktadır. Proteomik çalışmalarının sonucunda biyolojik belirteçlerin tanımlanması, hastalık ilerleyişinin izlenmesi, proteinlerin yapıları, yerleşimleri, miktarları ve diğer makromoleküllerle etkileşimi aydınlatılabilir. Yüksek verimli proteomik teknolojilerine biyoinformatiğin de desteği ile hastalık belirteçlerinin erken teşhisi mümkün olabilmektedir (Srinivas ve ark. 2002, Hoffman ve ark. 2007, Fang ve Zhang 2008, Çırakoğlu ve ark. 2001, Hodgson 2009, Anonim 2006 ve Anonim 2011). Proteomik çalışmalarda bir boyutlu poliakrilamid jel elektroforez (1D-PAGE), iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforez (2D-PAGE), yüzey arttırılmış lazer desorpsiyon iyonizasyon (SELDI), matriks yardımcılı lazer desorpsiyon iyonizasyon (MALDI), sıvı kromatografi (LC) ve kapiler elektroforez (CE) sıklıkla kullanılmaktadır (Sriyam ve ark. 2007, Xiao ve ark. 2005, Wu ve ark. 2002). 2D-PAGE ve ayrılan proteinlerin belirlenmesi için kütle spektroskopisi (MS) en yaygın kullanılan deneysel tekniklerdir. Bununla birlikte afinite

kromatografisi protein ayırımı için oldukça güçlü ve öncelikli bir tekniktir. MS analizinin potansiyel ayırım gücüne ve tayin duyarlılığına ulaşabilmesi için güçlü ayırım süreçlerinin geliştirilmesine gereksinim vardır (Fang ve Zhang 2008, Lee ve Lee 2004, Sriyam ve ark. 2007, Xiao ve ark. 2005).

Kan, serum, plazma, idrar, tükürük, serresponiyal sıvı ve sinoviyal sıvı proteom çalışmalarında kullanılan örneklerdendir. Plazma, serum ve idrar kolay elde edilebildiğinden ve tekrar örneklerinin alınması kolay olduğundan proteinlerin tayini için rutin olarak kullanılan örneklerdir. İnsan serumu enfeksiyon, inflammasyon, kanser, diyabet, yetersiz beslenme, kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer ve diğer otoimmün hastalıklardaki belirteçlerin belirlenmesi için eşsiz ve zengin bir kaynaktır. Serum ve plazmada oldukça fazla türde ve yüksek miktarda protein bulunmaktadır. Bu proteinler, tüm plazmanın % 99'unu oluştururken; biyolojik belirteçler plazmanın % 1'ini oluşturur. Yüksek derişimde (mgmL^{-1}) yer alan bu proteinler biyolojik belirteçlerle girişim yapmakta ve düşük derişimde (ngmL^{-1} - pgmL^{-1}) bulunan proteinlerin hastalığın teşhisinde tanımlanmasını engellemektedir. Biyolojik belirtecin zenginleşmesini ve belirlenmesini sağlamak için tüm plazmanın yaklaşık olarak % 80'nini oluşturan albumin ve IgG gibi proteinlerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir (Şekil 1.1) (Bodzon-Kulakowska ve ark. 2007, Altıntaş ve Denizli 2006, Linke ve ark. 2007, Ahmed ve ark. 2003, Bereli ve ark. 2010, Jmeian ve Rassi 2007, Karataş ve ark. 2007, Akgöl ve ark. 2007, Govorukhina ve ark. 2006, Sahab ve ark. 2007a, Greenough ve ark. 2004, Fang ve Zhang 2008). Şekil 1.1'de de görüldüğü gibi yüksek bolluklu proteinlerin (HAP) uzaklaştırılması için boya, Protein A, Seppro®, MARS, ProteoPrep®20, Sepro®Supermix gibi çeşitli firmalara ait kolonlar ve kitler bulunmaktadır. Bunun yanında düşük bolluklu proteinlerin zenginleştirilmesi için de Seppro® SuperErich, lektinler (M-LAC) ya da hidrazit kürecikleri, ProteoMiner kit, metal ya da inorganik ligandlar içeren sistemler geliştirilmektedir. Ayırma teknolojileri daha spesifik fonksiyonel alana sahip iken zenginleştirme ve tayin yaklaşımları proteomun tüm alanını kapsar. Bu nedenle; biyolojik belirtecin belirlenmesi için iyi bir ayırma yönteminin yanında uygun zenginleştirme sisteminin geliştirilmesi de önemlidir.



Şekil 1.1. Plazma proteomu içeriğindeki afinite ayırımı ve zenginleştirme teknolojileri (HAP: yüksek bolluklu protein, MAP: orta bolluklu protein, LAP: düşük bolluklu protein, M-LAC: çoklu lektin afinite kromatografi)

Yüksek miktarda bulunan proteinlerin vücut sıvılarından spesifik olarak uzaklaştırılması için kimyasal temelli ekstraksiyon, elektroforetik fraksiyonlama ve farklı kromatografi metotları gibi çeşitli uzaklaştırma metotları geliştirilmiştir. Örnekten immünoglobulin G (IgG) ve albumin uzaklaştırılması için kullanılan en yaygın teknik kromatografidir. Boya afinite ve protein A kromatografisi serumda fazla proteinlerin uzaklaştırılması için kullanılan tekniklerdendir. Kromatografik metotlar, biyolojik bileşiklerin laboratuvar ölçeğinde ayırımı için temel araçtır. Bu metotlar maddelerin biyolojik özelliklerini koruyarak yeterli saflıkta, yüksek spesifiklik ve seçicilikle ayrılmasını sağlar. İyon-değişim kromatografisine oranla biyoafinite kromatografisi daha yaygın kullanılmaktadır ve daha seçici olduğu gözlenmiştir. Biyoafinite kromatografisi, adsorpsiyon kromatografi modelidir ve biyomoleküllerin ayrılması, saflaştırılması ve tanımlanmaları için oldukça etkili bir ayırma yöntemidir. Bu yöntemde spesifik tanımayı sağlayan ligand, bir destek

materyaline immobilize edilir. Ligand olarak; enzimler, koenzimler, kofaktörler, antikorlar, aminoasitler, oligopeptitler, oligonükleik asitler ve nükleik asitlerin de bulunduğu çok sayıda biyofonksiyonel moleküller kullanılabilir. Ligandın kovalent olarak bağlandığı katı destek, kromatografik kolonda sabit faz olarak kullanılır. Ligand olarak kullanılan monoklonal antikorlar yüksek spesifiklik sağlamasına rağmen hedef protein türlerinin tüm formlarını tanımayabilir ve bağlamayabilir. Buna karşılık poliklonal antikorlar genellikle proteinin çoklu bölümlerini tanıyabilir ve bağlayabilir. Poliklonal antikor kullanımının ticari versiyonu çoklu afinite uzaklaştırma sistemi (MARS) dir ve son zamanlarda bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (Echan ve ark. 2005). Son zamanlarda fazla plazma proteinlerinin uzaklaştırılması için immunoafinite kolon yapımında immünoglobulin yol (IgY) antikorların kullanımı da söz konusudur (Linke ve ark. 2007).

Albumin uzaklaştırılması Cibacron Blue F3GA (CB) ve türevleri gibi boya-ligandları ya da spesifik antikorların kullanımı ile gerçekleştirilebilmektedir. Albumin uzaklaştırılması için boya afinite reçinelerinin kullanımı antikor tabanlı sistemlerin kullanımına göre yüksek yükleme kapasitesinden dolayı avantaj sağlarken; spesifiklik bakımından eksik kalmaktadır. Boya-ligand afinite kromatografisi laboratuvar ve büyük ölçekli protein saflaştırma uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Boyalar, farklı türdeki proteinlere farklı afinite ve spesifiklik seviyeleri göstererek bağlanabilir. Bağlanan boya, proteinler için iyonik, hidrofobik, aromatik ya da sterik olarak aktif bağlama bölümü fonksiyonuna sahiptir. Boyalar, matrikse özellikle hidroksil gruplarıyla kolayca immobilize edilebilirler. CB, üç asidik sülfonat grubu ve dört bazik primer ve sekonder amino grubu içeren monoklorotriazine boyadır. Önemli ölçüde spesifiklik ve afinite göstererek enzimlere ve proteinlere bağlanabilmektedir. Boya immobilizasyonu kimyasal olarak modifiye edilebilir grup içeren inert, hidrofilik destek gerektirir. Yaygın olarak kullanılan matriksler dekstran, agaroz ve selüloz gibi polisakkarit polimerlerdir. Bununla birlikte bu materyaller biyolojik yıkıma uğrayabilirler. CB immobilizasyonu polimerin hidroksil grupları ve CB'nin triazin halkası arasındaki kovalent bağlanmayı başlatmak için bazik çözeltide gerçekleştirilir (Denizli ve Pişkin 2001, Ahmed ve ark. 2003, Sahab ve ark. 2007b,

Yavuz ve ark. 2006, Bodzon-Kulakowska ve ark. 2007, Leatherbarrow and Dean 1980).

Gözenekli partiküllere, monolitik sabit fazlara, membranlara, nanopartiküller gibi farklı matrikslere Protein A ve G biyoafinite ligandlarının immobilize edilmesiyle immunoglobulinin (IgG) seçici olarak uzaklaştırılması gerçekleştirilebilir. Protein A ve G staphylococci ve streptococci gibi mikroorganizmaların yüzeyinde ekspres edilir. Protein A/G afinite sorbentleri IgG'nin Fc bölümünü bağlar. Protein G, IgG'nin 4 alt grubunu bağlama özelliğine sahip iken Protein A IgG3'ü bağlayamaz. Biyoligandların yüksek spesifikliği çok yüksek seçicilik sağlamasının yanında Protein A/G ya da antikor taşıyıcı sistemler bazı dezavantaja sahiptirler. Bunlar; materyallerin maliyetinin yüksek olması, uygun oryantasyonda immobilizasyonun zor olması ve matriksten antikorun sızabilmesidir (Karataş ve ark. 2007, Akgöl ve ark. 2007, Fang ve Zhang 2008, Urbas ve ark. 2009, Denizli ve Arica 2000, Garipcan ve Denizli 2002, Altıntaş ve Denizli 2006, Bodzon-Kulakowska ve ark. 2007).

Moleküler baskılama yöntemiyle seçici moleküler tanıma özelliklerine sahip olan oldukça kararlı sentetik polimerler hazırlanmaktadır. Moleküler baskılamada; hedef molekül, çevresi ile etkileşen bir kalıp olarak davranır. Fonksiyonel monomer ile etkileştirilen hedef molekül başlatıcı ve çapraz bağlayıcı varlığında polimerleştirilir. Polimerizasyondan sonra hedef molekül uzaklaştırıldıktan sonra oluşan bağlanma bölgeleri hedef moleküle büyüklük, şekil ve fonksiyonel grupların yerleşimi olarak tamamlayıcıdır. İşlem sonrasında hedef molekülün uzaklaştırılması ile yapıda hedef moleküle özgü bölgeler oluşmakta, ayırma, sensör, kimyasal tayin ve kataliz gibi işlemler için ideal bir malzeme elde edilmektedir (Shea ve Dougherty 1986, Wulff ve Poll 1987, Sellergren ve Shea 1994, Mosbach ve Ramström 1996, Andersson ve ark. 1996). Hedef molekül olarak polipeptitler, proteinler, iyonlar kullanılabilmektedir. Bu yöntemde, hedef molekül ve fonksiyonel monomerler arasında kovalent (Wulff ve Poll 1987, Shea ve Dougherty 1986, Sellergren ve ve Shea 1994, Whitcombe ve ark. 1995), kovalent olmayan (Arshady ve Mosbach 1981; Ramström ve ark. 1993; Spivak ve ve Shea 1998) veya metal-şelat etkileşimleri (Kuchen ve Shram 1988, Dhal ve Arnhold 1992, Say ve ark. 2003a, Say ve ark. 2003b) söz konusudur. Metal-şelat

etkileşimleri, bağlanma gücü, seçiciliği ve yönlenme açısından sulu çözeltilerdeki elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarıyla kıyaslandığında kovalent etkileşimlere daha çok benzemektedir. Bununla birlikte hedef molekülün yapıdan uzaklaştırılması kovalent baskılamada olduğu kadar güç değildir (Dhal ve Arnhold 1992). Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) doğal reseptörlere yakın ölçüde seçicilik ve afiniteye sahiptir. Doğal moleküllere göre kararlılıklarının yüksek, hazırlanmalarının ve birçok farklı uygulamada kullanımının kolay ve ucuz olması nedeniyle MIP'in kullanımı avantaj sağlar. MIP adsorbentler ilaçların katı faz ekstraksiyonunda (Kempe 1996), proteinlerin, amino asitlerin, DNA ve RNA'nın, peptidlerin, hormonların ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılmaktadır (Vlatakis ve ark. 1993). MIP'lerin bir diğer potansiyel kullanım alanı bazı temel araştırmalar, ilaç tasarımı ve kiral bileşiklerin ayrılmasıdır (Ramström ve ark. 1996, Haupt ve ark. 1998, Shi ve ark. 1999).

Nano boyutlu malzemeler, son yıllarda boyutlarına bağlı optik, elektriksel, fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle oldukça büyük ilgi uyandırmaktadırlar (Hodak ve ark. 2000). Bu malzemeler, gelecekte daha ucuz, küçük, hızlı ve akıllı olması beklenen nanoelektronik cihazlar için potansiyel parçalar olarak dizayn edilmektedir (Rao ve ark. 2001). Nanopartiküller, biyomedikal, optik ve elektronik alandaki geniş uygulama alanı nedeniyle ve yığın malzemeler ile atomik ya da moleküler yapılar arasında bir köprü oluştururlar. MIP ve nanopartiküllerin kombinasyonu ile moleküllerin seçici tanımlanmasına yönelik çalışmalar son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Diltemiz ve ark. 2008, Lin ve ark. 2004, Mattoussi ve ark. 2004, Cai ve ark. 2010, Kan ve ark. 2009).

Bu tez çalışmasının birinci aşamasında; kanda yüksek oranda bulunan albumin ve immunoglobulin G (IgG) proteinlerini uzaklaştıracak katı-faz sistemi hazırlanmıştır. Sulu çözeltilerden ve serumdan albumin ve IgG uzaklaştırılması hazırlanan 3 farklı katı destekle gerçekleştirilmiştir. CB bağlanmış Fe_2O_3 nanopartikülü ile albumin, Protein A bağlanmış Fe_2O_3 nanopartikülü ile immunoglobulin G uzaklaştırılmış, CB/Protein A bağlanmış Fe_2O_3 nanopartikülü ile eş zamanlı albumin ve IgG uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise; yumurtalık kanserinde biyolojik belirteç olarak kullanılan

kanser antijen 125 (CA 125) ve lizofosfatidik asidi (LPA) tayin edebilecek katı faz sistemi sentezlenmiştir. Burada hedef molekül olarak fosfoserin (PS) ve LPA kullanılmasıyla karbon nanotüp ve Fe₂O₃ nanopartikülleri yüzeyinde moleküler baskılama gerçekleştirilerek yumurtalık kanseri biyolojik belirteçlerini tanıyan farklı katı-faz sistemleri sentezlenmiştir.

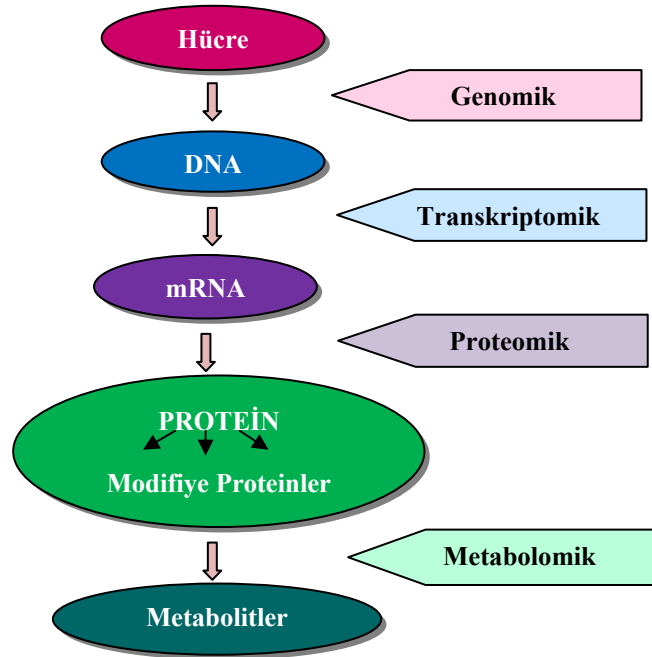
1.1. Proteomik

Genomik çalışmaların tek başına proteinlerin yapısını ve dinamik özelliklerini belirlemede yetersiz kalması proteomik çalışmalarını ortaya çıkarmıştır. Proteom kelimesi ilk kez 1994 yılında, Siena’da iki yönlü elektroforez toplantısında Marc Wilkins tarafından önerilmiş ve kabul görmüştür. Proteom; genom (doku, hücre vb.) tarafından ifade edilen proteinlerin tümünü kapsar. PROTEin ve genOM kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşur. Bir organizmanın bir genomu ama birçok proteomu vardır. Bu sebeple proteom analizi genom analizine göre daha karmaşıktır. Proteomik; daha dinamik bir terimdir ve farklı koşullarda hücre, doku veya vücut sıvılarındaki proteinlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesini ve işlevlerinin aydınlatılmasını sağlar. Proteomik en genel anlamda gen ve hücre fonksiyonlarının doğrudan protein düzeyinde belirlenmesi ile ilgili olan bilim dalıdır. Bu nedenle genlerin regülasyon ağlarının analizinden, proteinlerin nitelik, nicelik, modifikasyon durumu, birbirleri ile etkileşimlerinin analizine kadar geniş bir alanda çalışılmaktadır. Proteom, bir hücre, doku ya da organizma olarak bir genom üzerinde kodlanmış bilgiden oluşan protein gruplarının tümünü ifade eder. Proteom, zamana ve hücreye spesifiktir. Genom durağandır ve zaman içinde değişmez. Genomun durağan yapısının aksine proteomun dinamik yapısı proteomu organizmada gerçekleşen olayların gerçek zamanlı belirteci yapar. Genom bir organizma için çok iyi tanımlanabilirken, proteom iç ve dış uyaranlara yanıt olarak sürekli değişim halindedir. Diğer proteinlerle etkileşime girerler, şeker, yağ ya da fosfat gibi gruplar kazanarak değişime uğrayabilirler. Proteinler ve/veya modifiye (değişmiş) proteinler, hücre tipine ya da farklı hastalık aşamalarına göre, hatta aynı hücrede farklı etkilerle farklılaşabilirler. Proteinlerin miktarları da değişkendir. Genomda bulunan

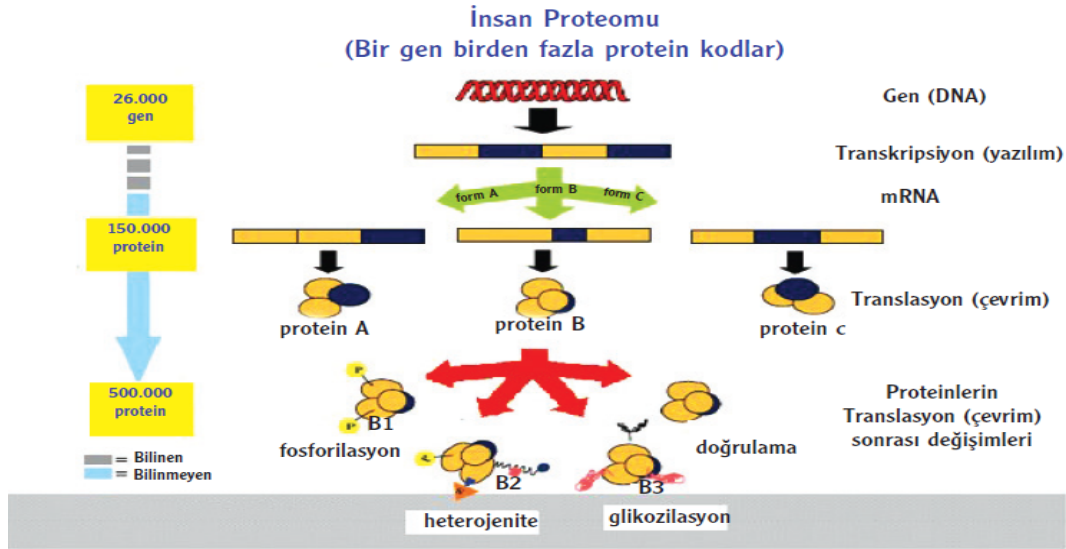
genlerin sayısı ile proteomikteki post-translasyonel değişiklikler de dikkate alındığında ne kadar çok sayıda protein bulunduğu açıktır. Proteomiğin diğer amaçları arasında protein-protein ekileşimine göre hücre içi sinyal iletim yollarını belirleme, hücrenin regülasyonunun anlaşılması, hastalık tedavisinde kullanılacak yeni tedaviler için protein yapılarının aydınlatılması vardır (Veenstra ve ark. 2004, Wulfschle ve ark. 2003, Zhu 2006, Yılmaz ve ark. 2010). “Genom hangi proteinleri kodlamaktadır? Bu proteinler nerede, ne zaman bulunurlar? Bu proteinler ne yapar? Her bir proteinin ne kadarı bulunmaktadır? Bu proteinlerin üç boyutlu yapıları nasıldır? Hangi hızla yapılır ve yıkılırlar? Biyokimyasal aktiviteleri nelerdir? Hangi proteinler birbirleriyle etkileşirler? Translasyon sonrası hangi modifikasyonlara uğrarlar? Fizyolojik ve patolojik koşullarda protein ekspresyonlarında nasıl bir değişiklik olur? Bu proteinler sinyal yolunda nasıl birlikte çalışır? Organizmanın ölümünde, aksaklıkta, onarımında, gelişiminde oluşan aktivite ve protein ekspresyon farklılıkları nedir?” gibi sorular proteomik çalışmalarının cevap aradığı sorulardır. Onkoloji alanında bu soruların cevaplanması ile proteomik çalışmalar kanserde genin fonksiyonu hakkındaki bilgilerimize katkı sağlar ve klinik uygulamalarda kullanımını destekler. Proteomik çalışmalar enfeksiyonel hastalıklar, Alzheimer, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi klinik çalışmalarda oldukça yaygın kullanılmaktadır (Wu ve ark. 2002).

Proteom analiziyle çalışan uzmanlar, bu analizi “DNA’nın analiziyle karşılaştırılamayacak kadar zor” olarak ifade etmektedirler. DNA sadece dört yapı taşından oluşurken doğal proteinler 20 farklı aminoasitten oluşmakta ve proteinlerin üç boyutlu yapısı da proteinin işlevini etkilemektedir. 2003 yılında İnsan Genom Projesinin tamamlanmasıyla 120000 gibi düşünülen insan gen sayısının 20000-26000 civarında olduğu anlaşılmıştır. Fakat bu genlerin işlevlerinin anlaşılabilmesi için bilim dünyası dikkatini bu genlerin kodladığı proteinlere yönlendirmiştir. Çünkü; bu moleküller canlı organizmada gerçekleşen kimyasal tepkimelerin düzenlenmesi, hücre içinde ve hücreler arasındaki iletişimin sağlanması, hücre yapısının ve çeşitliliğinin belirlenmesi gibi birçok önemli olayda görev alarak canlılığın temelini oluşturur. Ayrıca proteinler, koşulların değiştirilmesine bağlı olarak hücredeki yerlerini değiştirebilir, parçalara

ayrılabilir ya da başka moleküllere bağlanabilir. Bir protein, birden fazla sürecin gerçekleşmesinde rol alabilir ya da tersine, birkaç farklı protein benzer işlevleri gerçekleştirebilir. Tüm bu bilgiler protein çözümlemelerinin daha zor olacağını ve daha çok zaman alacağını göstermektedir. Genomik çalışmalarda fizyolojik süreç ile ilgili genler tanımlanmaya çalışılır. Hastalığın farklı aşamalarında bazı genlerin ekspresyonunun artacağı ya da azalacağı düşüncesiyle bu genlerden oluşan mRNA düzeyleri ile hastalığın ilerleyişi arasında bir ilişki kurulmaya çalışılır. Fakat; insan dokularında mRNA'ların ekspresyon düzeyleri ile bu mRNA'lardan kodlanan proteinlerin miktarları arasındaki ilişki ile ilgili şüpheler bulunur. Bunun yanında bir gen birçok biyolojik işleve sahip farklı proteinler kodlamakta ve bu proteinler translasyon sonrası modifikasyonlara uğramaktadır. Çoğu durumda translasyon sonrası modifikasyonlar da gen işlevinden bağımsızdır. Bu nedenlerden dolayı çok fazla miktarda bilimsel veri olmasına karşın genomik çalışmalara dayanan teşhis yaklaşımları klinik kullanım için pratik değildir. Şekil 1.2 ve Şekil 1.3'de genomik, proteomik ve diğer “-omik” çalışmalar arasındaki ilişki şematize edilmiştir. (Denizli 2007, Başaran ve ark. 2010, Kurban ve Mehmetoğlu 2010, Kvalheim 2010, Yılmaz ve ark. 2010, Özen Karataylı ve Bozdayı 2008, Rappsilber ve Mann 2002, Hebestreit 2001, Liebler 2002).

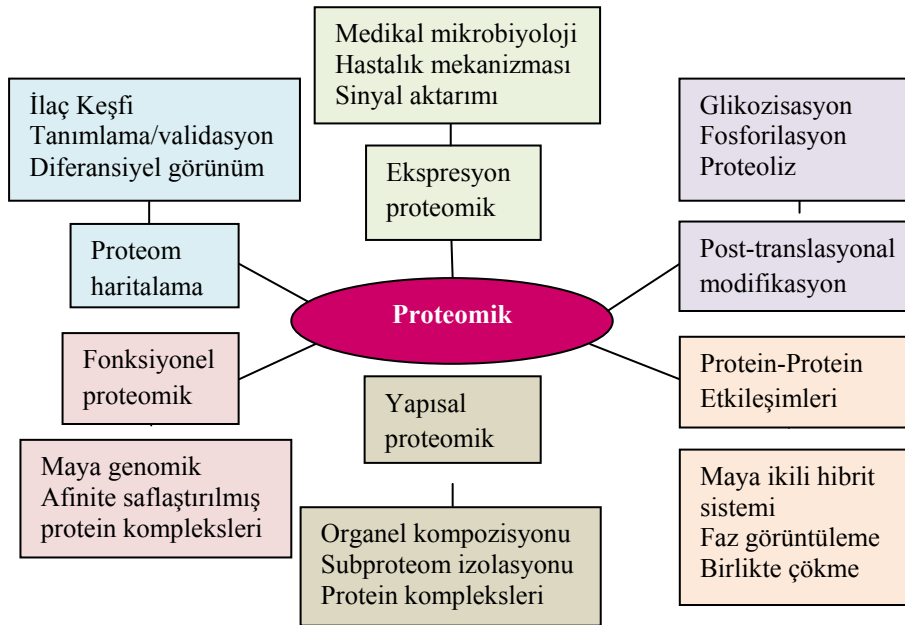


Şekil 1.2. “Omik” bilimlerinin şematik gösterimi



Şekil 1.3. Genom ve proteom arasındaki ilişki (Denizli 2007)

Proteom analizi kendi içinde de ekspresyon proteomik, yapısal proteomik, fonksiyonel proteomik, proteom haritalama, post-translasyonel modifikasyon, protein-protein etkileşimlerini inceleyen bölümlere ayrılır. Proteomik analiz türleri ve bunların uygulamaları Şekil 1.4’de verilmektedir.

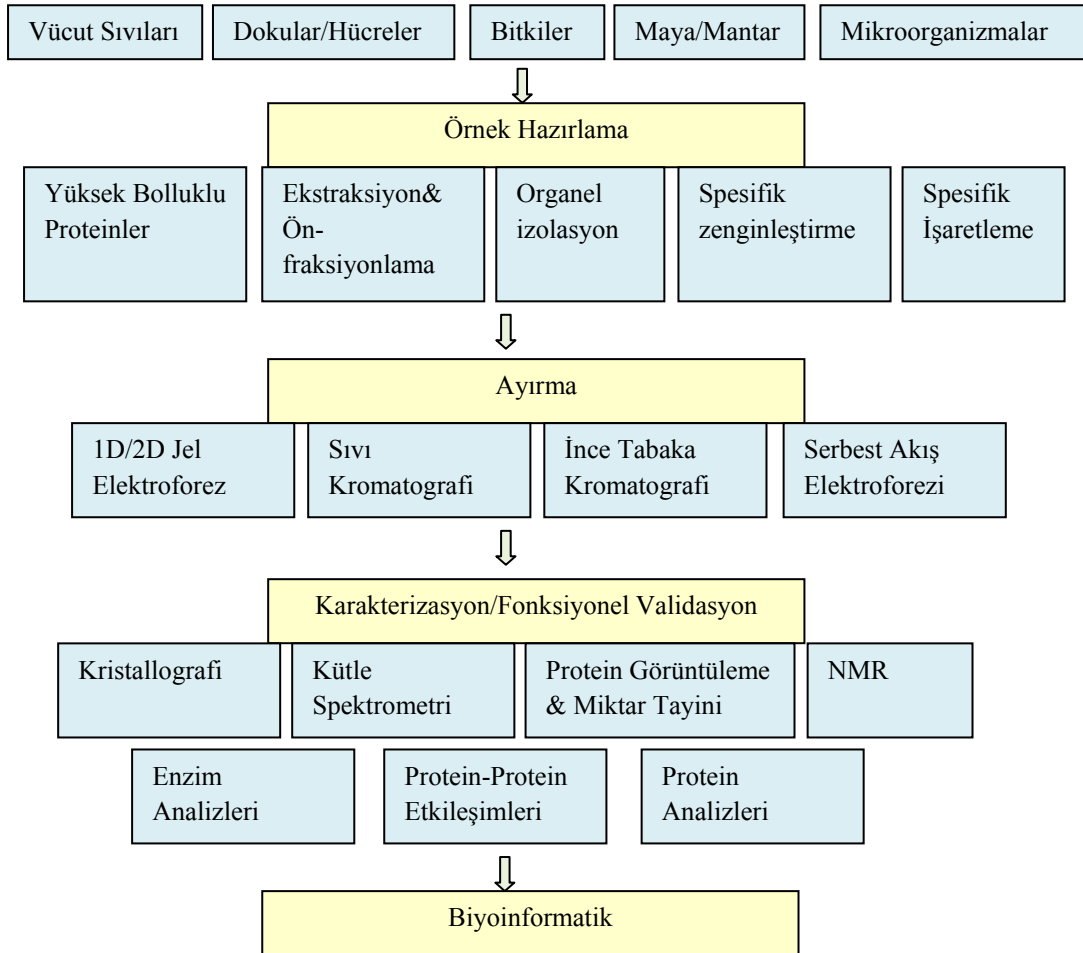


Şekil 1.4. Proteomik türleri ve uygulama alanları (Graves ve Haystead 2002)

Ekspresyon proteomikte normal veya patolojik hücre veya dokudan ekspres edilen proteinler belirlenir. Böylece bir hastalığa neden olan proteinler tanımlanır. Bu yaklaşımla belirli bir hastalık için yeni biyolojik belirteçlerin tanımlanması sağlanır. Burada erken teşhis ve tayin önemli olmakla birlikte tedavinin etkinliğinin izlenmesi ve ilerde yeni tedavilerin tasarlanması da önemlidir. Yapısal proteomik ise hücresel ya da organellerde bulunan farklı proteinlerin ya da protein karışımlarının belirlenmesi ve üç boyutlu yapılarının belirlenmesi ile ilgilenir. Fonksiyonel proteomikte bilinmeyen proteinlerin biyolojik fonksiyonları araştırılır. Bu da hücresel mekanizmalarla ve moleküler seviyedeki etkileşimlerle açıklanır. Fonksiyonel proteomik, kanser hücrelerinin biyolojik sürecindeki bilgimizi arttırırken kanser ilaçlarının geliştirilmesinde büyük etkisi vardır. Protein temelli ve hastalığa özgü hedeflerin tespit edilmesinin geliştirilmesini sağlar. Proteom analizinin en önemli uygulama alanı ise hastalıklara özgü proteinlerin belirlenmesidir. Bunun yanı sıra; hücre biyolojisi, gen işlevi, metabolik yollar gibi genel, yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesinde, teşhis ve tedaviye yönelik çalışmalar gibi geniş bir uygulama alanına sahiptir. Kıyaslamalı proteomik, iki durum arasındaki (normal ve hastalık, yaşlı ve genç) ekspresyondaki farklılıkları tanımlar. Bir proteomu doğru bir şekilde analiz etmek için farklı kompleks teknolojilerin geliştirilerek birleştirilmesine gereksinim vardır (Graves ve Haystead 2002, Bonini 2008, Denizli 2007, Yılmaz ve ark. 2010, Wu ve ark. 2002, Marko-Varga 2004, Veenstra 2007, Zhu 2006).

Teknolojinin gelişimi biyolojik sistemlerin analizine yön vermiştir. Genel olarak kullanılan teknikler tek ve iki boyutlu elektroforez, kapiler elektroforez, kromatografi sistemleri, ultrafiltrasyon ve kütle spektrometreleridir. Çoğu analitik proteomik problemler protein karışımı ile başlar. Bu protein karışımı, farklı fizikokimyasal özelliklerdeki proteinlerden (hidrofilik, hidrofobik, amfilik, yüksek yüklü veya membran bağlı olması, çözünürlük farkı), farklı modifikasyona uğramış ve farklı moleküler kütledeki proteinlerden oluşur. Proteomik çalışmalarda akış şeması yaygın olarak örnek hazırlama ya da ekstraksiyon, protein ayırımı ya da ön-fraksiyonlama, protein ekspresyonlarının karşılaştırmalı profilendirilmesi, proteolitik parçalama ve kütle analizi, veri tabanı eşleştirilmesi ile protein tespiti ve son olarak protein validasyonu ile biyokimyasal

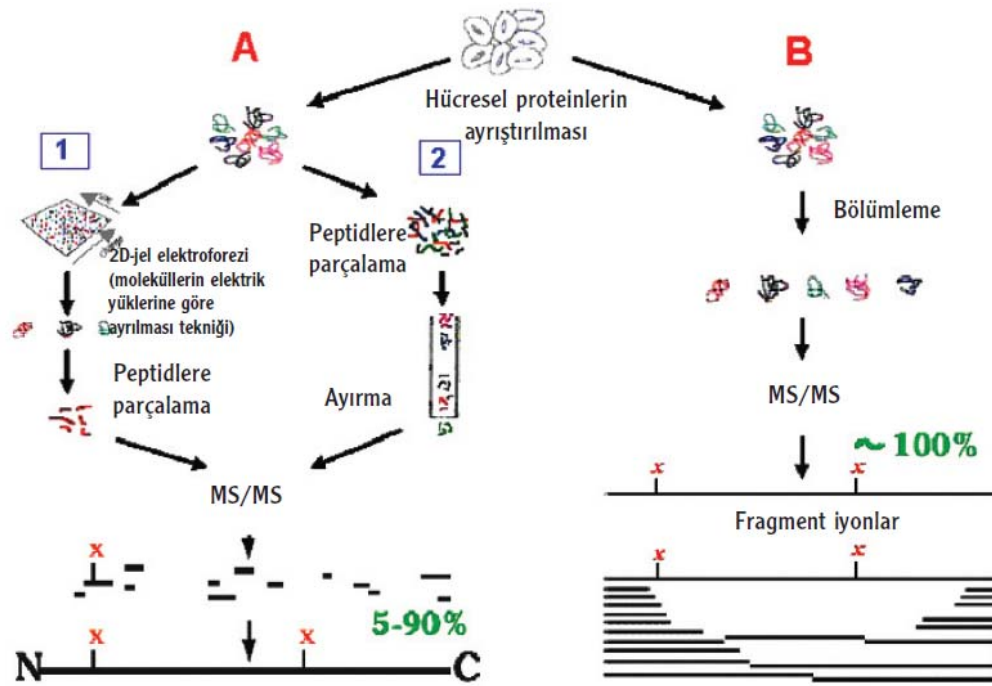
karakterizasyondan oluşur (Şekil 1.5). Proteomik çalışmalarda en önemli aşamalardan biri karmaşık protein karışımlarından tekrar elde edilebilir ekstraksiyon ve ayırma elde edebilmektir (Andrecht ve Hagen 2008, Zhu 2006, Hodgson 2009).



Şekil 1.5. Proteomik akış şeması (Andrecht ve Hagen 2008)

Proteom analizinde aşağıdan yukarıya, yukarıdan aşağıya ve shotgun olmak üzere üç farklı yaklaşım söz konusudur (Şekil 1.6). Aşağıdan yukarıya proteomik yaklaşımında; proteinler proteolitik kimyasal ajanlarla ya da enzimlerle (tripsin ve pepsin gibi) peptidlere bölünür. Bu enzimler spesifik olarak polipeptit zincirini parçalar. Kütle spektrometri teknikleri ile analiz edildiğinde ise peptit haritası diğer bir deyişle peptit kütle parmak izi (PMF) elde edilir ve ideal olarak tüm dizilimlerini kapsar. Aşağıdan yukarıya protein tanımlanması için MALDI-TOF'da yaygın olarak kullanılan PMF ve kaynaktan sonra parçalanma (post

source decay-PSD) analiziyle parçalanmış proteinler analiz edilir. Şekil 1.6 A'da gösterilen aşağıdan yukarıya yaklaşımında iki farklı strateji uygulanabilir. 1. Strateji proteinler saflaştırılır ve her bir protein proteaz enzimi ile parçalanarak oluşan peptit parçacıkları kütle spektroskopisi ile analiz edilir. 2. Stratejide ise tüm proteinleri içeren karışım proteaz enzimi ile peptitlere parçalanır ve ardından ayırma işlemi uygulanarak kütle spektroskopisi ile proteinler tayin edilir. Şekil 1.6 B'de görülen yukarıdan aşağıya yaklaşımında ise örnekteki proteinler uygun yöntemlerle ayrılır, daha sonra her bir protein kütle spektroskopisi ile analiz edilir. Yukarıdan aşağıya proteomik yaklaşımında; tam protein yüksek çözünürlüklü ardışık kütle spektrometrik analizine tabi tutulur. Doğrudan MS/MS analizi ile oluşan parçalanmış iyonlar veri tabanından protein tanımlanmasını sağlar. Yukarıdan aşağıya proteomik yaklaşımı proteinin bolluğu hakkında bilgi verirken, tüm protein diziliminin elde edilmesini; post-translasyonel modifikasyonların karakterize edilmesini ve belirlenmesini sağlar. Bununla birlikte; çok yönlü bu yöntemin kullanımı çok yüklü ana iyonlarından dolayı spektrumun yorumlanmasında karmaşa yaratmaktadır. Bu engel; gaz fazı iyon-iyon etkileşimleri yoluyla yük durumu manipülasyonu ve yüksek kütle ölçüm doğruluklu (MMA) cihazların kullanımı ile giderilebilir. MS donanımındaki gelişmeler yukarıdan aşağıya proteomik yaklaşımının gelişmesini sağlamaktadır. Yukarıdan aşağıya yaklaşım aşağıdan yukarıya yaklaşımı ile (% 5-70) kıyaslandığında; protein dizilimi genellikle % 100 kapsama alanı ile sonuçlanır. Bununla birlikte proteinin ayırma işleminden sonra parçalanma işlemini gerçekleştirmek daha yaygın kullanılan yaklaşımdır. Protein ve peptit ayrımı kromatografik ve jel tabanlı ayırma ile gerçekleştirilebilir (Denizli 2007, Hodgson 2009, Wall 2010, Liebler 2002, Conn 2003, Wilkins ve ark. 2007, Eidhammer ve ark. 2007, Yılmaz ve ark. 2010).



Şekil 1.6. Proteomikte aşağıdan-yukarıya ve yukarıdan-aşağıya yaklaşımın şematik gösterimi (Denizli 2007)

1.1.1.Klinik proteomik ve biyolojik belirteçler

Kanser proteomu; kanser hücreleri ve kanser doku mikroçevresinde geçen tüm biyolojik süreçle ilgili bilgi taşır. Kanser teşhisi, hastalığın ilerlemesinin izlenmesi ve tedavi hedeflerinin belirlenmesi süreçlerinde biyolojik belirteçleri belirlemek proteomik teknolojileri için büyük bir potansiyeldir. Proteom sadece hücrenin esas genetik bilgisini içermez, aynı zamanda hücrelerin yakın çevresine etkisini de içerir. Sağlıklı hücrenin neoplastik hücreye dönüşümü değişen ekspresyonel profiline, diferansiyel protein modifikasyonu ve aktivitelerine neden olur ve buradaki değişim de hücrenin fonksiyonu etkileyebilir. Bu nedenle, kanser proteom araştırmalarının başlangıç noktası biyolojik belirteçlerin belirlenmesidir (Cheng 2009).

Proteomik araştırmalar doğrudan klinik teşhis, tedavinin izlenmesi ve kontrolü ve ilaçların tasarımını amaçlar. Klinik proteomiğin temel amacı; patolojik-biyolojik mekanizmanın anlaşılması, teşhise, prognostik ya da tedaviye yönelik biyolojik belirteçlerin araştırılması ve erken teşhis için hastalıklarda

değişen proteinleri (yapı, fonksiyon, etkileşim ya da ekspresyon) ve biyolojik belirteçleri bulmaktır. En yaygın kullanılan proteomik çalışmaları farklı durumlar altında (örneğin belirli bir hastalık) hücrelerde, dokularda veya biyolojik sıvılardaki proteinlerin tespitidir. Hastalıkların gelişim sürecini kapsayan birçok biyolojik olayda proteinlerin yapısal, işlevsel, etkileşim ya da ekspresyonel çeşitliliği arasında ilişki kurularak, sağlıklı ve hastalıklı durumda farklılaşan proteinler belirlenebilmektedir. (Silberring ve Ciborowski 2010, Engwegen ve ark. 2006, Özen Karataylı ve Bozdayı 2008, Kvalheim 2010, Sahab ve ark. 2007a).

Genomik ve proteomik teknolojilerinin gelişmesi yeni potansiyel belirteçlerin keşfini kolaylaştırmaktadır. Klinik kanser yönetiminin geleceği kanserin teşhis ve tahminine dayalı biyolojik belirteçlere bağlıdır. Yeni tedavilerin geliştirilmesi belirteçlere gereksinimi artırır. Belirteçler, sonucun tahmin edilmesini ve doğrudan hangi tedavi opsiyonunun daha çok etkili olduğunu veya olacağını anlamamızı sağlar (Chatterjee ve Zetter. 2005). Genetik temelli biyolojik belirteçlerin bazı avantajlarına karşın bazı sınırlamalar da bulunmaktadır. Genetik temelli belirteç, örnekte yeterli oranda bulunsa bile dokudan, salgı ya da kandan DNA'ya erişebilirlik sınırlıdır. Genomik analizler proteoliz, glikozlanma, fosforilasyon ve asetilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonları tanımaya elverişli değildir. Proteomik temelli biyolojik belirteçler iltihaplanma ya da anormal tümör çevresiyle oluşan protein parçalanmalarını kapsayan proteinleri içerir (Paci ve ark. 2010). Çizelge 1.1'de farklı “-omik” teknolojilerinde biyolojik belirtecin keşfi için kullanılan teknolojiler, örnek kaynağı ve uygulama alanları verilmektedir.

Çizelge 1.1. Biyolojik belirteçlerin keşfi için kullanılan “-omik” teknolojileri (Jain 2010)

Analiz seviyesi	Doku kaynağı	Teknolojiler	Uygulama
Genomik	Çekirdekli hücreler Patolojik olarak etkilenmiş hücreler	Pozisyonel kopyalama, SNP genotipleme, Ekspresyon dizilişleri	Hastalığın loküs haritası, Hastalık geninin belirlenmesi, Bozulmuş genlerin belirlenmesi
Proteomik	Etkilenmiş dokular Vücut sıvıları: idrar, kan, salya	2D jel elektroforez, Sıvı kromatografi-kütle spektrometri, ICAT-MS	Protein biyolojik belirteçlerinin belirlenmesi
Metabolomik	Vücut sıvıları: idrar, kan, salya	Nükleer manyetik rezonans (NMR), MS	Küçük moleküllerin belirlenmesi
Glikomik	Vücut sıvıları: idrar, kan, salya	NMR, oligosakkarit dizilişleri	Karbonhidratların belirlenmesi, glikoproteinlerin belirlenmesi

Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi’ne (FDA) göre; biyolojik belirteç, normal biyolojik süreçler, patolojik süreçler ya da terapötik müdahaleye farmakolojik cevapların göstergesi olan, objektif bir şekilde ölçülen ve değerlendirilen özelliğe sahip olarak tanımlanır. Hücrenin DNA, RNA, metabolit ya da protein seviyesindeki herhangi belirli moleküler değişiklik moleküler biyolojik belirteci işaret eder. Biyolojik belirteç laboratuvar denemelerinde kullanılabilecek kadar basit, genlerin ya da proteinlerin bir modeli gibi karmaşık olmalıdır. Biyolojik belirteçlerin sınıflandırılması için birçok yol bulunmaktadır. Biyolojik belirteçler, lipidler, steroidler, karbonhidratlar (örneğin glukoz), metabolitler gibi basit moleküller olabilir. Daha basitleri insulin, hemoglobin A ve C, prostat spesifik antijen ve C-reaktif protein gibi peptit ve proteinlerdir. Daha kompleks biyolojik belirteçler ise otoantikörler ve trombositler ya da T hücreleri gibi hücrelerdir. Pratik bakış açısıyla, biyolojik belirteç hastalığın durumunu yansıtacak kadar spesifiklikte ve duyarlılıkta olmalı, teşhis için kullanılmasının yanında tedavi süresince ve sonrasında hastalığın izlenmesini sağlamalıdır. Negatif biyolojik belirteç hastalıkta belirtecin olmadığını veya yetersiz olduğunu ifade eder (Sahab ve ark. 2007a, Paci ve ark. 2010, Jain 2010).

FDA'ya göre ideal biyolojik belirteç kanserli hücreler tarafından oluşturulmalı ya da sadece onlara cevap vermeli, sağlıklı dokuda ya da iyi huylu hastalıkta bulunmamalı, tümör alt klinik fazdayken ve ulaşılabilen biyolojik maddeden kolayca tayin edilebilmeli ve tümörün büyük kısmıyla, prognoz, hastalığın tedaviye cevap vermesinde ve hastalığın tekrarında doğrudan ilişkili olmalı ve uyarlanabilmelidir. Belirli hastalık ya da hastalık durumu ile ilgili olmasının yanında benzer fizyolojik şartlardan ayırt edilebilmelidir. Duyarlı, spesifik, hızlı, basit ve uygun maliyetli olmalıdır. Biyolojik belirteçlerin belirlenmesi için serum ve idrar gibi standart biyolojik kaynakların kullanılması arzu edilir. Çoğu çalışma her bir biyolojik belirtecin duyarlılığını ve spesifikliğini belirtmektedir. Bu parametreler ters orantılı olarak ilişkilidir ve değerleri kabul edilen kesme değerine ek olarak negatif ve pozitif tahmin değerine (NPV ve PPV) göre ayrılır. Biyolojik belirtecin doğruluğu spesifiklik ve duyarlılık ile bağlantılı olan ve eğrinin altında kalan alanın hesaplanmasıyla gerçekleştirilen alıcı işletim karakteristik eğrisi (receiver operating characteristics, ROC) olarak adlandırılan ROC eğrisi ile en iyi şekilde açıklanır. ROC eğrisi, duyarlılık ve seçicilik değerleri arasındaki ilişkiyi grafiksel olarak gösterir ve yanlış pozitif orana karşın (1-seçicilik) doğru pozitif oran (duyarlılık) değerleri grafiğe geçirilir (Paci ve ark. 2010, Jain 2010). Biyolojik belirteçlerin klinik sonuçları yansıtırma derecesi biyolojik belirtecin etkililiği konusunda karar vermemezi sağlar. Biyolojik belirteçler farklı özelliklere sahip olduğundan, klinik olaylardaki sonuçlar ya da hastalığın ilerlemesinin değerlendirilmesiyle biyolojik belirteçlerin kullanımını değerlendiren istatistiksel gereksinimler olmalıdır. Bu istatistiksel gereksinimler, istatistiksel dağılım, hedef popülasyonu üzerinde detaylı bilgi ve biyolojik belirtecin spesifikliğini içermelidir. Genellikle ideal biyolojik belirtecin belirli hastalığın asıl özelliğini ortaya çıkarması, belirli hastalık olayları tarafından doğrulanması ve geçerli kılınması, kesin olması, bu özgül hastalığın erken evresinde bulunabilmesi, diğer benzer hastalık olaylarından ya da bu hastalığın aile üyelerinden ayrılabilmesi, uygulamanın basit ve güvenilir olması ve mümkünse ucuz olması beklenmektedir (Sahab ve ark. 2007a).

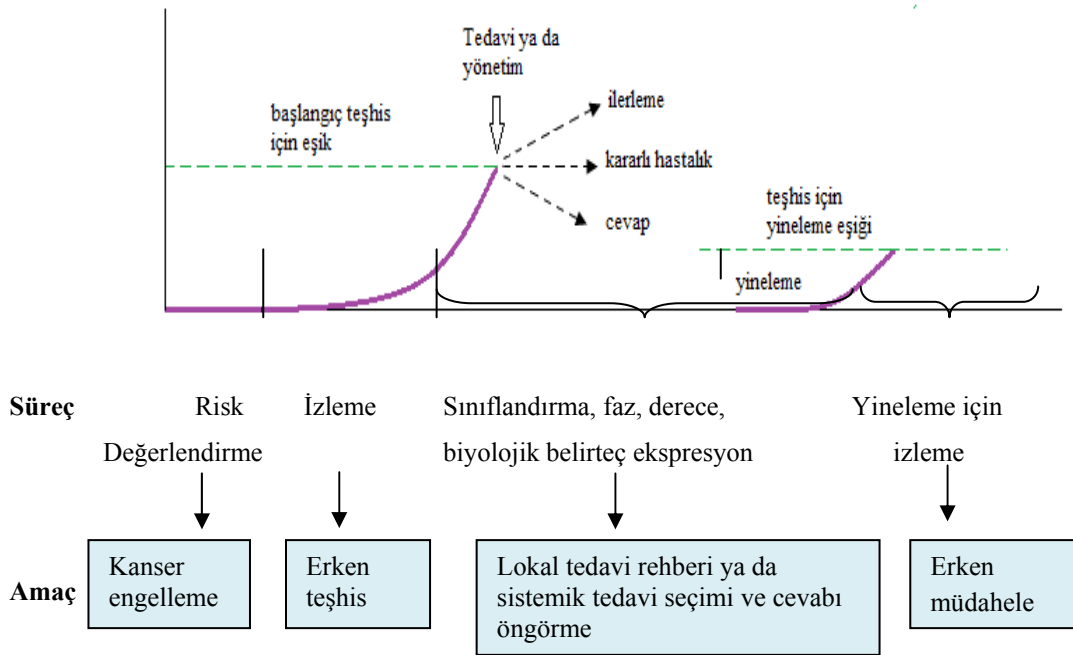
Standardize protokollerinin eksikliği, laboratuvarlar arasında azalan tekrar üretilebilirlik, epidemolojik geçerlilik ya da istatistiksel güç bakımından eksiklik

nedeniyle bilinen biyolojik belirteçlerin çoğunun klinik kullanımı halen sınırlıdır. Düzenli standartların uygulanması yeni bulunan biyolojik belirteçlerin klinik kullanımını kolaylaştırır. Son zamanlarda Amerika Ulusal Kanseri Enstitüsünün (NCI-ABD) kurduğu Erken Teşhis Araştırma Ağı (EDRN) sayesinde biyolojik belirteç araştırma laboratuvarları arasındaki koordinasyon geliştirilmektedir. İdeal olarak biyolojik belirteçler beklenen benzerlikle farklı kurumlar arasında çaprazlama yapılarak birçok hastanın iyi kontrol edilen klinik çalışmalarıyla ve süreçteki tüm adımlar için onaylanmış standartlarla valide edilmelidir. Bu adımlar, örnek toplanması, saflaştırma, amplifikasyon, hibridizasyon ya da ligand bağlama, veri alma, normalizasyon, istatistiksel analiz ve skoreleme gibi işlemleri içerir. Belirtecın gelişiminde rehber olabilecek resmi 5 faz sınıflandırması önerilmiştir. Biyolojik belirteç gelişim sürecinin yapısı Çizelge 1.2’de şematize edilmiştir. Başlangıç keşif fazında, plazmada proteinlerin farklı bollukları belirlenir ve sınıflandırılır. Daha sonra, ümit verici olanlar sınıflandırılır ve geçerli kılınır. Geçerli kılınmış potansiyel biyolojik belirteçler yüksek verimli analizlerle spesifik olarak geliştirilir. Biyolojik belirtecın belirlenmesi ve validasyonunda veri analizi de önemlidir. Belirtecın belirlenmesinde çok yönlü istatistiksel algoritmalar kullanılır (Chatterjee ve Zetter 2005, Schiess 2008, Ludwig ve Weinstein 2005, Kvalheim 2010).

Çizelge 1.2. Biyolojik belirteçlerin gelişim fazları (Chatterjee ve Zetter 2005).

Hastalık belirtilerinin görülmeden önce tanı konulması	Faz 1	Ümit verici yönde teşhis sağlar
Klinik deney ve validasyon	Faz 2	Onaylanan hastalığın klinik analizini tespit eder
Geriye dönük boylam	Faz 3	Klinik ve izleme pozitif kuralı tanımlanmadan önce erkenden hastalık biyolojik belirteci tespit eder
Beklenen izleme	Faz 4	Hastalığın özellikleri ve kapsamı test yoluyla tespit edilir
Kanser kontrolü	Faz 5	Populasyonda hastalığın ağırlığını azaltma etkisinin izlenmesiyle sayısallaştırılır

Daha fazla potansiyel biyolojik belirteçler bulundukça, bu yeni belirteçlerin klinik kullanımı ve keşif fazındaki sınırlandırmalar azalır, belirteçlerin validasyonu artar ve klinik uygulama hızlanır. Kanseri tayin eden, kanser sonucunu öngören ve tedavi seçimini etkileyen biyolojik belirteçler (Şekil 1.7), klinik kanser yönetiminde maliyet etkinliğinin belirlenmesinde önemli rol oynar. Metotlar basit, ucuz, sağlam ve güvenilir olmalıdır. Hastalığın sonucu ve tedavi kararlarının belirlenmesi için tek biyolojik belirteç kullanmak olası değildir. Kanser prognozunun geleceği 6-10 belirtecin sonucuna bağlıdır. Bunlar; metastatik ilginin olasılığını ve hızlı sistemik tedavi için gerekliliğini gösterecek doğru moleküler tedaviye yön vermelidir. Üretilen teknoloji platformlarının gelişmesi belirli bir hastalık için eş zamanlı, çoklu yeni biyolojik belirteçlerin keşfine yardımcı olur. Basit teşhis kitlerinin geliştirilmesiyle doğru ve güvenilir bir şekilde kanser olduğu tahmin edilebilecek ve klinik olarak kullanımı sağlanabilecektir (Chatterjee ve Zetter 2005).



Şekil 1.7. Kanser klinik değerlendirilmesinde farklı durumlardaki biyolojik belirteçlerin kullanımı (Ludwig ve Weinstein 2005)

Tümör belirteçlerinin farklı türlerde tanımlanması bulunmaktadır. Hastalığa yatkınlık belirteci, örneğin genetik faktörler gibi hastalığa eğiliminin

belirlenmesi ve teşhis ile ilgili belirteç (screening, izleme) kanserli hastalığın tespiti için kullanılır. İzleme belirteçleri hastalığa uğrayanları teşhis etmek için kullanılır. Prognostik belirteç (monitoring, kontrol etme) tedavi sonrası hastalığın tekrar oluşum riskinin ölçülmesi için kullanılır. Hastalığın ilerleme durumunu belirlemek için tedaviye yön verici belirteçler ve hastalığın tekrarını belirlemek için ise tekrar kontrol etme belirteçleri kullanılır. Tahmine dayalı (predictive) belirteç, verilen terapiye hastanın cevabını bildirir. Konumlandırma belirteci cerrahi müdahaleyi hazırlamak için konumlandırma ve sitotoksik ajanların hedeflendirilmesi amacıyla kullanılır. Tüm belirteçlerin hastanın sonucunu ve yaşamının kalitesini geliştirmesi ya da bakımın maliyetini azaltması gerekmektedir (Wiesner 2004, Jain 2010).

Kanser biyolojik belirteçlerin belirlenmesi klinik teşhisin en hızlı gelişen alanıdır. Erken teşhis ya da tedavinin başarılı bir şekilde izlenmesi için klinik olarak onaylanmış bazı biyolojik belirteçler Çizelge 1.3’de verilmiştir (Cheng 2009, Ludwig ve Weinstein 2005, Chatterjee ve Zetter 2005). Kanser proteomik çalışmalarından beklenen; erken kanser teşhisi için hastalıkla ilgili biyolojik belirtecin tespiti, tedavinin etkinliğinin ve toksikliği için yeni biyolojik belirtecin tespiti ve aynı zamanda en uygun antikanser ilaç kombinasyonları için rehber olmasıdır. Göğüs kanseri için mamografi, kolorektal kanseri için kolonoskopi, prostat kanseri için prostat spesifik antijen testi (PSA), serviks kanseri için pap smear ve yumurtalık kanseri için transvajinal sonografi ve kanser antijen (CA 125) testi kanserin erken teşhisi için onaylanmış izleme (screening, tarama) gereçleridir. Bununla birlikte Çizelge 1.3’de verilen biyolojik belirteçlerden hiç biri hastalığın tahmini ve belirlenmesi için yeterli duyarlılık, spesifiklik ve izleme popülasyonuna sahip değildir. Örneğin PSA en yaygın kullanılan biyolojik belirteç olmasına rağmen, prostat kanserini belirlemede sınırlı spesifikliğe sahiptir. PSA normal prostat hücreleri tarafından düşük miktarda üretilir. Serumda PSA’nın miktarının fazla olması prostat kanseri bulunması ile ilişkili olabilir. Prostat kanserinin yanı sıra kanser kaynaklı olmayan prostat salgı bezi içindeki enfeksiyonlar ve etkilenen alanın iritasyonu sonucunda da PSA miktarı artış gösterir. CA 125 yumurtalık kanseri riski için biyolojik belirteç olarak kullanılmasının yanında, bu biyolojik belirtecin seviyesi pankreatit, karaciğer ya

da böbrek hastalarında da artmaktadır. İnsan kronik gonadotropin- β yumurtalık kanseri için biyolojik belirteç olarak tanımlanmıştır ve kanser fazının belirlenmesinde klinik olarak kullanılmaktadır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü kolorektal kanseri ve akciğer kanseri için biyolojik belirteç olarak tanımlanmış ve uygun tedavinin belirlenmesini yardım etmede kullanılmaktadır. Karsinoembriyonal antijen (CEA) kolorektal kanseri, pankreas kanseri, akciğer kanseri ve göğüs kanseri biyolojik belirteci olarak tanımlanmıştır. Bazı biyolojik belirteçlerin hedefi ölüm oranını azaltma ve hayatta kalımda artışa katkıda bulunmaktır (Cheng 2009, Schiess 2008).

Çizelge 1.3. Amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA) tarafından onaylanan kanser biyolojik belirteçleri (Cheng 2009, Ludwig ve Weinstein 2005, Chatterjee ve Zetter 2005)

Biyolojik Belirteç	Tipi	Kaynağı	Kanser tipi	Klinik Kullanımı
α -Fetoprotein (AFP)	Glikoprotein	Serum	Nonseminomatous testis ile ilgili	Kötü huylu tümörlerin tedavisine yön vermek (staging)
İnsan koryonik gonadotropin- β	Glikoprotein	Serum	Testis ile ilgili	Kötü huylu tümörlerin tedavisine yön vermek (staging)
CA 19-9	Karbonhidrat	Serum	Pankreatik	Kontrol etme
Pap smear	Servikal simir	Serviks (boyun)	Boyunla ilgili	İzleme (Screening)
CA 125	Glikoprotein	Serum	Yumurtalık	Teşhis, tedavinin kontrol edilmesi, tekrar oluşumu tahmin etme
CA 15-3	Glikoprotein	Serum	Göğüs	Kontrol etme
CA 27-29	Glikoprotein	Serum	Göğüs	Kontrol etme
Sitokeratin	Protein	Göğüs kanseri	Göğüs	Prognoz
Östrojen reseptör ve progesteron reseptör	Protein	Göğüs kanseri	Göğüs	Hormonal tedavinin seçimi

Çizelge 1.3. (Devam) Amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA) tarafından onaylanan kanser biyolojik belirteçleri (Cheng 2009, Ludwig ve Weinstein 2005, Chatterjee ve Zetter 2005)

CEA	Protein	Serum	Kolon	Kontrol etme (tekrar oluşumu belirleme, tedavi etkinliğinin kontrolü)
KIT	Protein	Gastrointestinal tümör	GIST	Teşhis ve tedavinin seçimi
Epidermal büyüme faktörü reseptörü	Protein	Kolon	Kolon	Tedavinin seçimi
Thyroglobulin	Protein	Serum	Tiroit	Kontrol etme
PSA	Protein	Serum	Prostat	Teşhis, izleme ve kontrol etme (screening and monitoring)
Her2/Neu	Protein/DNA	Serum/Göğüs tümörü	Göğüs	Kontrol etme/prognoz ve tedavinin seçimi
NMP22	Protein	İdrar	Mesane	Teşhis, izleme ve kontrol etme
Fibrin/FDP	Protein	İdrar	Mesane	Kontrol etme
BTA (mesane tümörü ile ilintili antijen)	Protein	İdrar	Mesane	Teşhis ve tekrar oluşumu tahmin etme
Yüksek molekül ağırlıklı CEA ve musin	Protein	İdrar	Mesane	Kontrol etme

Gen array teknolojisi, 2D-jel elektroforezi ve yeni kütle spektrometrik tekniklerinin biyoinformatik araçlarındaki gelişmelerle birleşmesiyle genomik ve proteomik teknolojilerindeki yeni gelişmeler, duyarlı ve spesifik yeni biyolojik belirteçlerin farklılığını keşfetme talebini karşılamada umut vericidir. İmmünohistokimya (IHC), enzim bağlı immunosorbent analizi (ELISA) ve protein çip teknolojisi gibi bazı teknikler biyolojik belirteç analizinde sıklıkla kullanılırlar (Chatterjee ve Zetter 2005).

Proteinlerin görüntülenmesi ve ayırımı için bir boyutlu poliakrilamit jel elektroforez (1D-PAGE) ve ilgili proteinlerin ayırımı ve zenginleştirilmesi için kolon kromatografi sisteminin bazı türleri biyomedikal laboratuvarı için gereklidir. PAGE teknolojisi sadece daha bol proteinlerin keşfine izin verirken, daha düşük derişimdeki proteinler jelde nadiren gözlenir. Kolon kromatografi için de benzer sonuç geçerlidir ve günde birkaç yüz karşılaştırmalı analiz için uygun değildir. İki boyutlu (2D-PAGE) yaklaşımında proteinler öncelikle izoelektrik noktalarına göre, daha sonra moleküler kütlelerine göre ayrılır. 2D-PAGE kompleks protein karışımlarının analizinin gücünü arttırmak için geliştirilmiştir. 2D jellerinin artan çözünürlüğü verilen örnekte proteinlerin geniş çeşitliliğini anlamamızda büyük katkı sağlasa da; 1D-PAGE metodundaki gibi bol miktardaki proteinlere öncelik vermesi dezavantajın devam etmesine neden olur. Yüksek hidrofobisite ya da son derece yüksek izoelektrik noktalardaki proteinler genellikle ihmal edilir, bu da potansiyel olarak ilgilenilen proteinlerin kaybı ile sonuçlanır. 2D-PAGE yaklaşımı zaman alıcı ve standardize edilmesi zor olduğundan fazla sayıdaki örneklerin izlenmesi için uygun değildir (Wiesner 2004).

Diferansiyel jel elektroforezi (DIGE) ve çok boyutlu protein tespit teknolojisi (MudPIT) gibi teknolojiler proteinin mikrogram miktarında yüksek verimle profilendirilmesi için kullanılabilir. Ters faz mikroarray ve yüzey arttırılmış lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometri (SELDI-TOF-MS) gibi diğer yüksek verimli teknolojiler, daha duyarlıdır (femto molar aralığında) ve serum protein ekspresyon düzeylerinin 12 kattan daha fazla büyüklük aralığını kapsayabilir. İmmuno-PCR, alan etki transistör (FET)-temelli protein tayini ve kuvantum noktacıkları gibi gelişen nanoteknoloji, protein belirteçlerinin duyarlılığının arttırılması için umut vaat etmektedir (Ludwing ve Weinstein 2005).

Proteomikte şimdiki gelişmeler çoğunlukla kütle spektrometrideki gelişmelerden kaynaklanır. Matriks yardımcılı lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometri (MALDI-TOF-MS), yüzey yardımcılı lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometri (SALDI-TOF-MS) ve sıvı kromatografi kütle spektrometri (LC-MS) gibi bir çok kütle spektrometri teknolojisi proteomik çalışmalarda kullanılmaktadır Mikroarray ve kütle

spektrometri analizleri kısa zamanda binlerce ölçümün gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (Cheng 2009).

Son zamanlarda izotop kodlu afinite işaretleyici prosedürünün gelişimiyle protein ölçümündeki zorlukların üstesinden gelinmektedir. Bu yöntemde, iki protein örnekleri sistein artıklarından farklı olarak işaretlenir ki, burada işaretleme molekülleri farklı izotoplar içerir. Sonradan proteinler proteolitik olarak ayrılır, HPLC ayırımı yapılır ve son olarak kütle spektrometri ile farklı işaretlenmiş peptitler kütledeki belirli kayma ile tanınabilirler. Deneyim gerektiren yaklaşım olmasına rağmen, tamamlanmayan işaretleme nedeniyle bazı pratik sakıncaları bulunmaktadır. Son zamanlarda işaret gerektirmeyen ekstraksiyon-tutunma kromatografi metotları geliştirilmiş ve daha umut verici alternatif bir yöntem olmuştur (Wiesner 2004).

Ekspresyonel proteomikte iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE), ardışık MS sistemi ile birleştirilen sıvı kromatografi (LC-MS-MS) ve protein profillerinin belirlenmesi için MALDI-TOF-MS ve protein çipleri (SELDI protein çip sistemi), daha çok kantitatif yöntem olan izotop kodlu afinite etiketler (ICAT) ve rölatif ve tam ölçüm için izotop kodlar (iTRAQ) kullanılır. Fonksiyonel proteomikte ise fonksiyonel protein komplekslerinin doğrudan analizi için immuno çöktürme, protein çipleri, array temelli yaklaşımlar ile maya iki hibrit sistemi ve post-translasyonal modifikasyonlar (PTM) kullanılır (Wu ve ark. 2002, Engwegen ve ark. 2006). İyi bir ayırım yöntemi ile yeni MS sistemlerinin birlikte kullanılması sonucunda hızlı ve güvenilir bir şekilde düşük seviyedeki proteinlerin tespiti gerçekleştirilebilir. Çizelge 1.4'de protein profillerinin çıkarılması için kullanılan bazı proteomik teknolojilerinin prensipleri, avantajları ve dezavantajları verilmektedir.

Çizelge 1.4. Protein profillerinin çıkarılması için kullanılan bazı proteomik teknolojilerinin avantajları ve dezavantajları (Engwegen ve ark. 2006)

Teknoloji	Prensip	Avantajlar	Dezavantajlar
2D-PAGE	Yüke ve kütleyle bağlı olarak iki boyutta örnekteki protein içeriğinin jelde ayrılması, jel boyanır ve örnekteki spot şiddetleri farklı jeller arasında karşılaştırılır.	Yüksek ayırım (jel başına binlerce protein), PTM elde etme	Düşük üretim (jel başına bir örnek); otomasyon zor; jeller arası tekrar elde edilebilirlik zor; asidik veya bazik proteinler ile yüksek kütleli proteinler için düşük ayırım; doğrudan protein teşhisi yok; diğer tekniklerle kıyaslandığında başlangıç materyalinin miktarının fazla olması (50-100 µg protein)
DIGE	Jel başına üç örneğin 2D-PAGE ölçümü, her biri farklı floresans boya ile işaretlenir ve işaretlenen maddeye spesifik dalgaboyunda her bir örnekteki her bir jel spotunun şiddeti ölçülür.	Bir jelde örneklerin doğrudan kıyaslanması, böylece daha iyi tekrar elde edilebilirlik	Düşük üretim (jel başına üç örnek)
Protein microarray	İleri mikroarrayde spotlanmış probda bir örnekteki hedeflenen proteinin bağlanması; bunun tersine ters mikroarrayde spotlanmış örneklerdeki hedefli proteinlere spesifik problemlerin bağlanması; doğrudan işaretlemeye (floresan) ya da işaretlenmiş ikincil antikorlarla bağlanan proteinlerin tespiti	İleri array başına problemlerin sayısına dayanarak yüksek verim ya da ters array başına örneklerin sayısına dayanarak yüksek verim; biyolojik belirteç kimliği ya da kolayca bilinen sınıf	Çok farklı problemlerin sentezi gereklidir; hedefli proteinlerin kimliği ya da sınıfı bilinmemelidir; problemlerin çapraz reaktivitesi; PTM ile proteinlerin bağlanmasında azalma olası

Çizelge 1.4. (Devam) Protein profillerinin çıkarılması için kullanılan bazı proteomik teknolojilerinin avantajları ve dezavantajları (Engwegen ve ark. 2006)

LC-MS-MS	Bir, iki ya da üç boyutlu LC ile peptit karışımlarının ayrılması (tripsin ile protein parçalanmasından oluşan) ve MS-MS ile peptit kütlelerinin ölçümü	Peptitlerin MS-MS ile örnek başına birkaç yüzden 1000'e (3 boyutlu için) kadar proteinin doğrudan tespiti; PTM elde etme	Düşük verim (çalışma başına tek örnek); zaman alıcı; MS-MS ile tespit çoğu zaman kapsamlı değil, bu nedenle farklı örneklerin kıyaslanması karmaşık
ICAT	Ağır ya da hafif kararlı izotopik işaretli sistein kalıntılarından proteinlerin kimyasal işaretlenmesi (iki farklı örnek için), işaretlemeyen sonra örnekler karıştırılır, proteinler tripsin ile parçalanır ve işaretlenen peptitler afinite kromatografisi ile ayrılır; her iki örnek birlikte LC-MS-MS ile analiz edilir.	Peptitlerin MS-MS ile biyolojik belirteçlerin doğrudan belirlenmesi; bağli miktar tayini; iTRAQ'dan daha az örnek karışıklığı; sadece farklı açılardan eksprese edilen proteinlerin MS-MS analizi	Düşük verim (çalışma başına iki örnek); sadece sistein içeren peptitlerin işaretlenmesi (olası PTM kaçırılır)
MALDI-TOF-MS	Altın tabakaya protein karışımının uygulanması; lazer enerjisiyle tabakadan proteinlerin desorpsiyonu ve uçuş zamanıyla protein kütlelerinin ve kütlelerin pik şiddetlerinin ölçümü; çoklu örnekler arasında pik şiddetlerinin kıyaslanması	Yüksek verim; PTM elde etme	Kompleks örneklerden örnek fraksiyonu gerekir; örnek fraksiyonu için daha fazla başlama materyali gerekir; yüksek moleküler kütleli proteinler için uygun değil (> 100 kDa)

Çizelge 1.4. (Devam) Protein profillerinin çıkarılması için kullanılan bazı proteomik teknolojilerinin avantajları ve dezavantajları (Engwegen ve ark. 2006)

iTRAQ	Aynı kütleli (izobarik) kararlı izotopik işaretlerle amin gruplarından proteinlerin kimyasal işaretlenmesi; dört farklı örnek için dört farklı işaretler kullanılabilir; işaretlemeyen sonra örnekler karıştırılır, proteinler tripsin ile parçalanır ve LC-MS-MS ile birlikte analiz edilir; MS-MS parçalanması süresince miktar tayini için kullanılan her bir örnek için özgün imza değerinde iyonlar elde edilir.	Peptitlerin MS-MS analizi ile biyolojik belirteçlerin doğrudan belirlenmesi; izobarik işaretlerden dolayı aynı tek MS çalışmasında dört örneğin hepsinde aynı peptidin MS-MS analizi için seçimi; kitteki işaretlerden biri ile işaretlenen referans peptidin miktarı bilindiğinde kesin miktar tayini	Düşük verim (çalışma başına dört örnek); imza iyonun oluşumu için örnekteki tüm MS-MS analizi gereklidir (zaman alıcı ve yoğun örnek); PTM izobarik değildir böylece aynı tek MS çalışmasında seçilmez (ana proteinin azalması ile olası yanlış dayandırma); yüksek örnek kompleksliği ve LC'nin sınırlı ayırma gücü (üç boyutluda bile); izobarik peptitlerin birlikte elüsyonuyla karıştırmak
SELDI-TOF-MS	MALDI-TOF-MS'in değişik biçimi, belirli kromatografik yüzeye protein karışımının seçilen bölümü bağlanır ve kalanlar yıkanarak uzaklaştırılır.	Yüksek verim; tüm örneği doğrudan uygulama (çip yüzeyinde örnek temizleme hızlı); PTM elde etme; başlangıç materyalinden az miktar	Yüksek moleküler kütleli proteinler için uygun değil (> 100 kDa); bağlanan proteinlerin tayini sınırlı; örneğin MALDI-TOF'a göre daha az kütle ayırma gücü ve kütle doğruluğu

1.1.2. Vücut sıvılarının proteomik analizde kullanımı

Hastalığın teşhisi ve buna takiben tedavi süresince insan vücut sıvılarının analizi önemli bilgiler verir. İnsan vücut sıvıları, organizmanın durumu ile ilgili bilgiyi taşır. Vücut sıvıları patolojik semptomlar henüz ortaya çıkmadığında

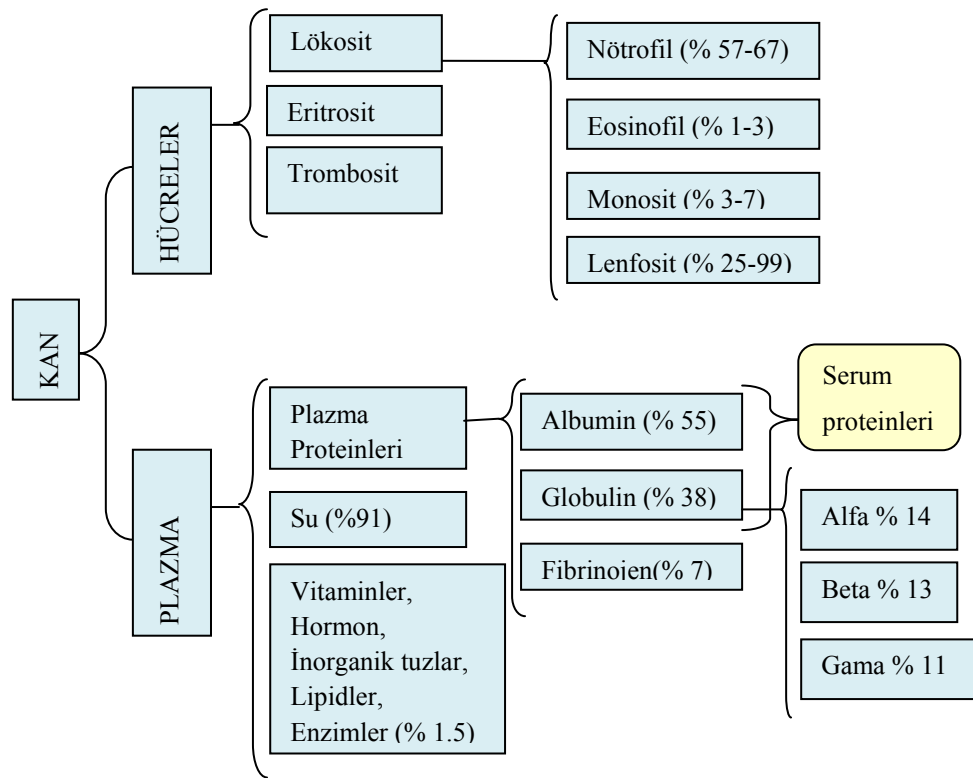
fizyolojik dengesizliklerin tanınmasında yardımcı olur. Devam eden hastalık süreci ve doğal değişim nedeniyle ortaya çıkan bileşimdeki değişkenlik arasındaki ayırımı yapmak zordur. Vücut sıvılarının bileşimi endojenöz, belki de patojenik süreçlerden ve diyet, yaşam tarzı, metabolizma ve detoksifikasyon gibi çoğu çevresel etkilere dolaylı değişebilmektedir. Bu değişim farklı kişilerin örnekleri analiz edildiğinde veya belli bir zaman periyodu sonrası aynı kişinin örneklerinin analiz edilmesiyle anlaşılır. Herhangi bir oranda, vücut sıvılarının bileşimindeki hastalık kaynaklı değişimlerin tespiti hastalardan ve kontrollerden alınan belli sayıda örneklerin çalışılmasını gerektirir ve sonuçların istatistiksel yorumlanması dikkatle yapılmalıdır (Govorukhina ve Bischoff 2007).

Vücut sıvıları hücreleri, proteinleri, peptitleri ve çoğu metabolitleri içeren oldukça kompleks biyolojik örneklerdir. Bileşenlerin miktarları belirlenmeden önce vücut sıvılarının hazırlanması zorunludur. Örneğe uygulanan ön işlemler ve tüm diğer adımlar son analitik sonucu etkileyecektir. Bu nedenle tüm adımların dikkatle kontrol edilmesi ve geçerli kılınması gereklidir. Proteom çalışmalarında beyin, kalp, karaciğer, akciğer, kas, pankreas, dalak, testis gibi insan dokularının yanı sıra beyin sıvısı, idrar, tükürük, hücreler arası sıvı, amniyotik sıvı, foliküler sıvı, kan plazması ve serum gibi biyolojik sıvılar kullanılabilir. Vücut sıvılarının kullanımının yanında doku örneklerinin kullanımı da patolojik değişimi yansıtmaktadır. Bununla birlikte en çok çalışılan biyolojik sıvı kan plazması ve serumdur (Govorukhina ve Bischoff 2007, Yılmaz ve ark. 2010).

Vücut sıvılarının proteomları intraselüler ya da dokudan elde edilmiş proteomlardan önemli ölçüde farklıdır. İdrar vücut sıvısı kana göre daha seyreltiktir. İdrarın bileşimi böbreğin durumundan büyük oranda etkilenir. İdrar, böbrek dışında hastalıklar için biyolojik belirteçlerin araştırılmasında (örneğin koroner arter hastalığı) ve böbrek patolojilerinin teşhisi için de oldukça kullanışlıdır. İdrar, bakteriyel proteinler içerebilir ve yüksek oranda tuz içerir. Proteolitik aktiviteden dolayı idrar proteomunun ilerleyen degradasyonu sadece 2 saate varan depolamayla proteaz inhibitörün eklenmesi ile önlenir. Serebrospinal sıvı (CSF) beyin-omurilik sıvısı kafatası içinde beyni koruyarak destekler ve kan plazması ile benzer protein içeriğine sahiptir. En önemli fark, CSF’de daha düşük derişimde protein (10-100 kat) bulunur. CSF beyin ile direk

temas halinde olduğundan sinir sistemindeki biyokimyasal değişimler sıvıya yansır. Bu nedenle; CSF analizi potansiyel teşhis aracı olur. Nöropeptitleri ve sinir taşıyıcıları çalışmaları için oldukça kullanışlıdır. Tükürükte ise glikoprotein içeriği yüksektir ve kanuna aykırı ilaçların tespit edilmesine uygundur. Tükürük protein bileşimi, günlük ritim, diyet, yaş, cinsiyet ve fizyolojik durumla değişir. Yemek yeme proteoliz aktivitesini arttırdığından öğleden önce örnek toplanımı tavsiye edilir. Proteaz inhibitör eklenmesi proteoliz etkisini azaltsa da tamamen gidermez. Bir katı doku biyopsi örneği patolojinin çeşitli aşamalarından hücreler içerebilir. Homojenlik yönünden eksik olduğu için biyolojik belirteç belirlenmesinde zorluklara neden olur (Silberring ve Ciborowski 2010, Bock ve ark. 2010, Kvalheim 2010).

Kan gibi sistemik vücut sıvıları belirli bir zamanda organizmanın fizyolojik durumunun göstergesidir. Diğer vücut sıvılarından hiçbiri kan gibi vücutla yakın ilişkili değildir, bu nedenle kan vücudun patolojik ve fizyolojik yapısıyla ilgili oldukça zengin bilgiye sahiptir. Kan; hücreler ve plazmadan oluşan viskoz bir sıvıdır. Kanın hücresel elemanları kabaca alyuvarlar (eritrositler), beyaz küreler (lökositler ve lenfositler) ve trombositler olarak üç gruba ayrılır (Şekil 1.8). Kan farklı organlar ve dokular ile temasla bazı proteinlerin ayrılmasına ve var olan proteinlerin modifikasyonuna neden olur. Bu proteinlerin spesifik bir fizyolojik ya da patolojik durumda değişime uğraması gerçekleşebilir (Silberring ve Ciborowski 2010, Bock ve ark. 2010, Kvalheim 2010).



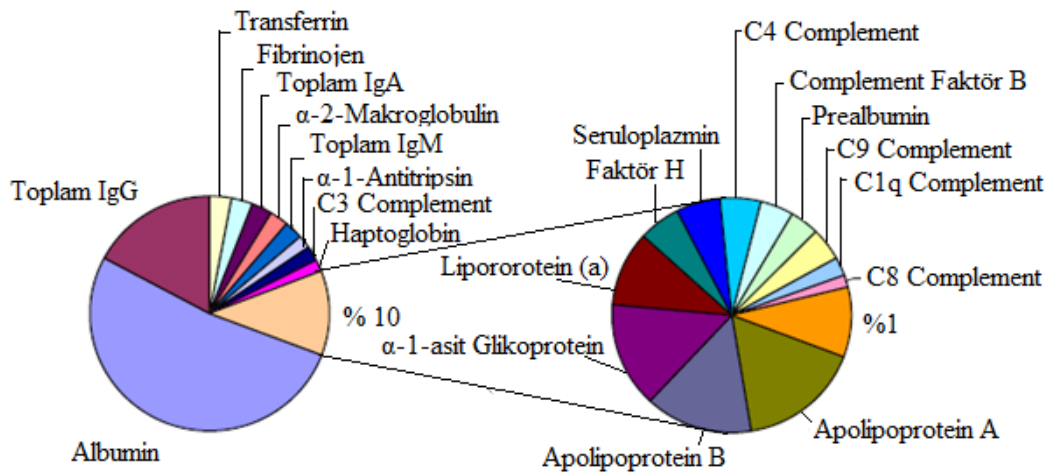
Şekil 1.8. Kan ve bileşenleri (Uzun ve Denizli 2010)

Hastadan kan örneği alındıktan sonra yapılacak ilk adım daha sonraki analiz için uygun koruma işleminin yapılmasıdır. En yaygın başlangıç adım, örneğin düşük hızlı santrifügasyonla çözünebilir bileşenlerden kan hücrelerinin ayrılmasıdır. Örnek alma ve santrifügasyon süresince, hücrelerin aktivasyonundan ya da parçalanmasından kaçınmak çok önemlidir, özellikle kırmızı kan hücrelerinin hemolizi (üst fazın renginin turuncudan kırmızıya dönmesi ile gözlenir) ve trombositlerin aktivasyonu degranülasyona neden olabilir. Toplama ve işlem süresince kırmızı kan hücreleri parçalanırsa, hemogloblin bol miktarda bulunacak ve profil çıkarmada girişime neden olacaktır. Arta kalan üst faz, kan plazması, toplama süresince kan pıhtılaşmasını önlemek için antikoagülanlar eklenerek depolanabilir. Alternatif olarak, kan pıhtılaşması plazmanın oda sıcaklığında birkaç saat bırakılmasıyla başlatılabilir. Plazmanın hazırlanması kolay olsa da, uzun süreli kararlılık için etkili antikoagülanların bulunması gereklidir. Koagülasyon bileşenleri, fibrinolitik ve tamamlayıcı sistemlerinin hepsi plastik kap, cam ya da enjeksiyon iğnesi gibi doğal olmayan yüzeylerle

etkileşime duyarlıdır. Kromatografi ya da katı-faz ekstraksiyon gibi işlem adımlarının bu sistemleri aktive etme riski vardır. Çoğu hastane ve laboratuarda koagülasyon kanın oda sıcaklığında 1-4 saat bekletilmesiyle gerçekleştirilir. Bu süre boyunca endojen koagülasyon sisteminin hareket ettirilmesiyle, kademeli proteolitik olaylara neden olur. Bu da genellikle santrifügasyonla uzaklaştırılan fibrin içeren kan pıhtısının oluşumu ile sonuçlanır. Proteolitik sürecin oluşmasıyla koagülasyon büyük proteinlerden peptit parçaları oluşturur bu da özellikle peptidomun bileşimini etkiler. Bununla birlikte, koagülasyonla ilgili proteolitik olaylar, bazı proteazların (trombin, faktör Xa) dizilim spesifikliğiyle ve koagülasyon yolağındaki yerin iyi tanımlanmasıyla büyük oranda kontrol edilebilir. Koagülasyon zamanının, proteomun son bileşimini önemli ölçüde etkileyip etkilemediği belirli değildir, fakat peptidom olarak adlandırılan düşük molekül ağırlıklı kısmın değiştiğine dair belirtiler vardır (Govorukhina ve Bischoff 2007).

İnsan plazma proteinleri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda vücutta yer alan ana protein kategorilerinin büyük çoğunluğunun kan plazmasında yer aldığını göstermektedir. Plazma ekstrasellüler sıvının bir bölümünü oluşturur. Plazma içinde su, kan proteinleri, tuzlar (elektrolitler), glukoz, hormonlar, çeşitli metabolizma artıkları, lipitler bulunur. Plazma tüm kanın % 55-60'ını oluşturur (Şekil 1.8). Kan plazmasındaki çözünmüş katı maddelerin büyük çoğunluğunu proteinler (albumin, globülinler, fibrinojen) oluşturmaktadır. Protein derişimi 60-80 mg.mL⁻¹'dir. IgG, IgM, IgA, haptoglobulin, albumin, transferrin, α_1 -anti tripsin, fibrinojen, α_2 -makroglobulin, lipoprotein ve tamamlayıcı C₃ gibi miktarı fazla olan 22 protein toplam plazma proteinlerinin % 99'una karşılık gelir (Şekil 1.9). Kan antikoagülan ilave edilmeden bir tüpe alınıp pıhtılaşmaya terk edildiği zaman, oluşan pıhtı yumağından sarı renkte bir sıvının ayrıldığı gözlenir. Bu sıvıya serum adı verilir. Plazma ile serum bir önemli fark dışında, yapı olarak aynıdır. Aralarındaki en önemli fark; serumda kanın pıhtılaşmasında görev alan bazı pıhtılaşma faktörleri veya proteinlerin, özellikle fibrinojen ve trombin bulunmamasıdır. Bu nedenle seruma fibrinojensiz plazma da denir (Şekil 1.8). Fibrinojenin uzaklaştırılmasından dolayı serumun protein derişimi plazmaya göre daha düşüktür. Plazmanın hazırlanması etilen diamin tetra asetik asit (EDTA),

sitrat ya da heparin gibi antikoagülanların eklenmesini gerektirir. Oysa serum ekstra katkı içermez. EDTA, sitrat ya da heparin ile oluşturulan plazma, serumla karşılaştırıldığında protein bileşimi değişim gösterir. Bunun yanında plazma elde etmek için eklenen antikoagülan dikkatle seçilmelidir, örneğin EDTA eklemesi immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) protein bağlanmasında girişime neden olabilir. Plazma serumu göre daha hızlı hazırlanır ve daha fazla hacimdedir. Serumu göre plazmanın SELDI-TOF spektrumu daha az sayıda ve şiddette pikten oluşur (Govorukhina ve Bischoff 2007, Yılmaz ve ark. 2010, Kabir 2009, Bock ve ark. 2010, Anderson ve Anderson 2002).



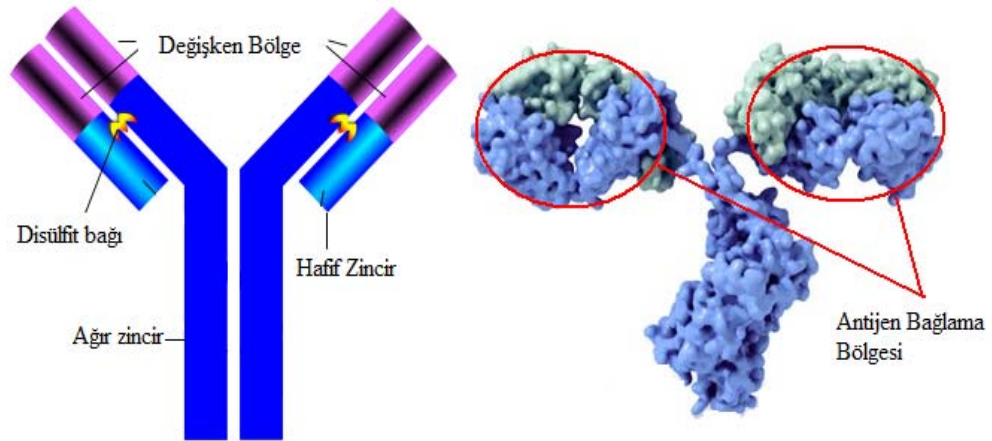
Şekil 1.9. Plazmadaki proteinlerin bağıl katkısı (Kabir 2009)

Serum albumini, insan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasında bulunan en yaygın proteindir. Kanda bulunan proteinlerin % 60'ını oluşturur ve molekül ağırlığı 67.000 Da'dur. İnsan kanında yaklaşık olarak 30-50 mg.mL⁻¹ derişiminde albumin bulunur. Yağ asitleri ve çeşitli başka maddeleri kanda taşımalarının yanı sıra en önemli işlevi, kan ile doku sıvıları arasında suyun dengelenmesini sağlamaktır. Albumin, suda çözünürlükleri düşük olan yağ asitlerinin kandaki başlıca taşıyıcısıdır. Bunun yanı sıra, oksijen serbest radikallerine bağlanarak bunları kontrol altına alır. Ayrıca, bilirubin gibi suda çözünmeyen bazı toksik metabolizma ürünlerine bağlanarak onları zararsız kılar. Albumin, bir kısmı yüksek derişimde zehirli olabilecek olan çinko, bakır,

kadmiyum, civa, altın, gümüş, nikel, kalsiyum ve magnezyum dahil olmak üzere çeşitli iyonları bağlayabilir. Pek çok fizyolojik süreçte yer alan azot oksidin (NO) başlıca taşıyıcısı da yine albumindir. Bu maddelere bağlanması sayesinde albumin hem bu maddelerin kandaki derişimlerini düşük ve zararsız düzeylerde tutar, hem de onların ihtiyaç duyuldukları yerlere ulaşmalarını sağlar. Albuminde uzun yağ asidi moleküllerinin (oleik, linoleik, linolenik, araşidonik, palmitik ve miristik asit gibi) bağlanabildiği, ikisi sıkı, dördü gevşek olmak üzere altı bağlanma yeri vardır. Yağ asitlerinin bağlandıkları yerlerden farklı olarak ayrıca küçük organik iyonların da bağlanabildiği iki yer vardır. Bunlardan biri küçük aromatik karboksilik asitleri tercih eder, diğeri negatif yük içeren çok halkalı bileşikleri tercih eder. Bu yerlerde tiroid hormonu ve diğeri steroid hormonlar ve bilirubin taşınabilir. Tedavi amaçla vücuda alınan çoğu ilaç da bir ölçüde buralarda albumine bağlanırlar (Uzun ve Denizli 2002, Yavuz ve ark. 20002, Uzun ve ark. 2004a, Avcıbaşı ve ark. 2010).

Plazmada bol miktarda bulunan diğeri protein ise immunoglobulin G'dir. İmmünoglobulinler, antikor aktivitesi gösteren ve kendilerinin oluşmasına neden olan antijenlerle özgül olarak birleşebilme, reaksiyonlara yol açabilme özelliğinde olan glikoprotein yapısında moleküllerdir. İmmünoglobulinler (=antikorlar) antijenik uyarım sonucu B-lenfositlerin değişimi ile oluşan plazma hücreleri tarafından sentezlenirler. Antikorlar kimyasal, fiziksel ve immünolojik olarak incelendiklerinde aralarında önemli farklılıklar bulunduğu saptanmıştır. Bu farklılıklar; antikor moleküllerinin karbonhidrat miktarları, elektroforez hızları, molekül ağırlıkları, aminoasit yapıları, taşıdıkları H (=ağır) polipeptid zinciri tipi gibi özelliklere dayanmaktadır. Bu hafif (L) ve ağır (H) zincirler birbirleriyle kovalent bağlarla bağlanmıştır. Hafif zincir iki bölgeden oluşur. Bir amino uç kısmı, ki bu bölge amino asit sıralanmasında antikordan antikora çok değişimler gösterir. Bu bölgeye “değişken bölge” (Variable Light Chain) V_L denir. Diğeri karboksi ucu ise allotip ve izotip değişikliklerin dışında fazla değişiklik göstermez ve bu bölgeye “değişmeyen bölge” (Constant Light Chain) C_L denir. Birbirinden farklı beş ayrı özellikte immünoglobulin grubu ayrılmış ve immünoglobulin G (IgG), immünoglobulin A (IgA), immünoglobulin M (IgM), immünoglobulin D (IgD), immünoglobulin E (IgE) olarak adlandırılmışlardır. IgG normal insan

serumunda bulunan immünoglobulinlerin % 70-75'ini oluşturur ve monomeriktir (Şekil 1.10.). Molekül ağırlığı 150.000 Da'dur ve insan kan serumunda yaklaşık olarak 15 mg.mL^{-1} derişiminde bulunur.



Şekil 1.10. IgG yapısı

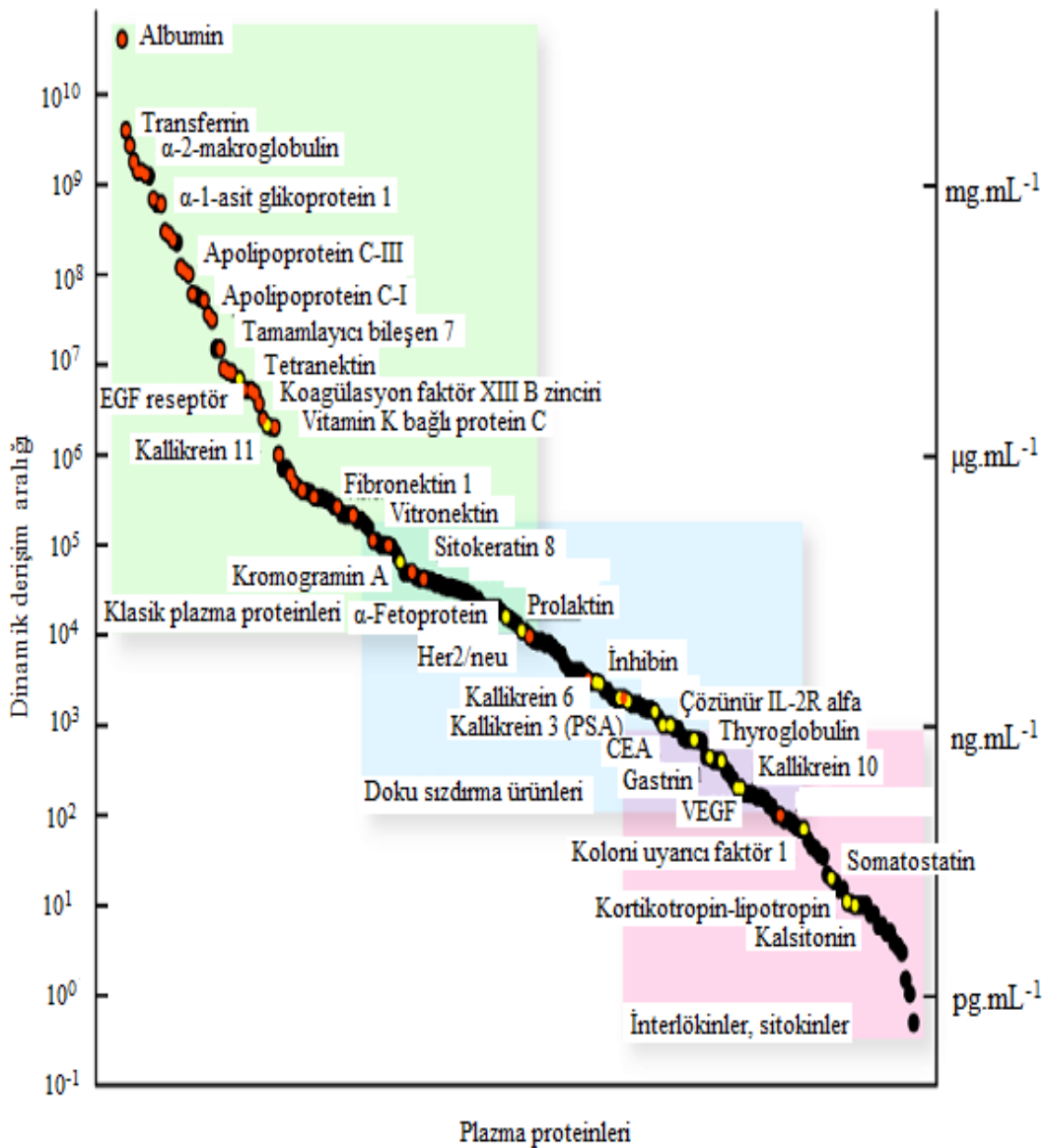
IgG molekülünde bulunan Fab parçasına iki antijen bağlanabilir. Bu nedenle IgG iki değerlidir. IgG moleküllerinde antijenik ve menteşe gölgesinde iki ağır zincir arasındaki disülfid bağının sayısı açısından farklılık gösteren dört alt grup saptanmıştır. IgG₁'de 2, IgG₂'de 4, IgG₃'de 15 ve IgG₄'te 2 disülfid bağı bulunur. Tüm IgG'lerin % 65'i IgG₁'dir. IgG₂ % 23'ünü, IgG₃ % 8'ini, IgG₄ ise % 4'ünü oluşturur.

Serum veya plazmadan bakteriyel enfeksiyonlar, kanser ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıklarda özel fizyolojik hallere tepki olarak beliren ve kan akımına karışan proteinlerin ve biyolojik belirteçlerin hastalıkların erken teşhisinde, hastalığın ilerleyişinde ve tedavi sırasında izlenmesi önemlidir. Fakat; plazma proteomu, yapısında yer alan proteinlerin geniş derişim aralığında bulunması nedeniyle oldukça karmaşıktır. Örneğin kanda albumin ($35\text{-}50 \text{ mg.mL}^{-1}$) ve immünoglobulin ($5\text{-}18 \text{ mg.mL}^{-1}$) derişimi mg.mL^{-1} iken, hastalığa özgü proteinler $\text{ng.mL}^{-1}\text{-pg.mL}^{-1}$ düzeyindedir (Şekil 1.11). Şekil 1.9'da da görüldüğü gibi 22 protein, plazmanın % 99'unu oluştururken biyolojik belirteçler plazmada % 1 oranında bulunur. Albumin ve IgG ise plazmanın % 80'ini oluşturur ve bu proteinler derişimi az olan diğer proteinlerin tayinini maskelerler. Örneğin, iki boyutlu jel elektroforezinden önce bu proteinler

uzaklaştırılmazsa jelde hastalıklara özgü proteinlere ait noktaları tespit etmek neredeyse imkansızdır. MS temelli proteomik analizlerde de serum ve plazmada yer alan yüksek derişimdeki proteinler biyolojik belirteçlerin belirlenmesini engeller. Bu nedenle; başlangıçta bu iki proteinin uzaklaştırılması proteom analizinde çok önemlidir (Denizli 2007, Diamandis 2004, Fountoulakis ve ark. 2004). Uzaklaştırma düşük bolluklu proteinlerden elde edilen peptitlerin tayin kapasitesinde artışı da sağlar. Bununla birlikte, yüksek bolluklu proteinlerin uzaklaştırılması bazı düşük moleküler kütleli proteinlerin ya da peptitlerin kaybına neden olmaz. Biyolojik belirteçlerin belirlenmesi için albuminin uzaklaştırılmasının yanında ilaç endüstrisinde biyoteknolojik yöntemlerle elde edilen albüminin ekonomik ve verimli yöntemlerle izole edilmesi gerekir. Endüstride kullanılan en eski yöntem Cohn yöntemidir. Çeşitli pH, iyonik şiddet ve sıcaklık aralıklarında proteinlerin çöktürülmesine dayanan bu yöntemin ayırıcılığının düşük olmasının yanında işlem sırasında proteinler denatüre olabilirler. Bu nedenle, albumin için uygun ayırma yöntemlerinin geliştirilmesi endüstri açısından önemlidir. Cibacron Blue boyası albumin uzaklaştırılması için oldukça yüksek afinite gösterir. Hedefli yaklaşımlarla hastalıkta rol oynayan farklı türdeki proteinlerle ilgili zenginleştirme için bu proteinlerin uzaklaştırılması kromatografik yöntemlerin kullanılması ile gerçekleştirilebilir (Kassab ve ark. 2000, Uzun ve Denizli 2002, Yavuz ve ark. 2002, Yavuz ve ark. 2003, Yavuz ve Denizli 2004, Uzun ve ark. 2004b, Odabaşı ve Denizli 2004, Demiryas ve ark. 2007, Karakoç ve ark. 2009, Avcıbaşı ve ark. 2010).

Medikal uygulamalar için spesifik immunoglobulinler başlıca çöktürme, moleküler elekleme gibi fizikokimyasal metotlarla birlikte iyon değişim, hidrofobik etkileşim, tiyofilik, immobilize metal-şelat afinite, pseudospesifik ve boya-afinite gibi kromatografik tekniklerin kombinasyonu ile saflaştırılabilirler. Endüstriyel ölçekte insan plazmasından IgG saflaştırılması için en çok etanol çöktürme ile fraksiyonlama kullanılır (27 ton/yıl). Fakat; bu teknik spesifik değildir ve kısmen denatüre olmuş proteinleri de verir (Denizli 2006). İnsan kan serumundan IgG'lerin uzaklaştırılması için Protein A ve Protein G yaygın olarak kullanılmaktadır. Protein A ve Protein G afinite sorbentleri IgG'nin Fc bölgesini bağlar. Biyoligandların yüksek spesifikliğı oldukça iyi seçicilik sağlar. Protein A,

IgG'yi IgG₃ hariç yüksek afinite ile bağlar, IgG₃ ise zayıf olarak bağlanır. Protein A'nın IgG bağlamadaki yüksek seçiciliğinin yanısıra matriksten sızma, fiyatının yüksek olması ve doğru oryantasyonda immobilizasyonun zor olması gibi bazı dezavantajları vardır (Denizli ve Arıca 2000, Denizli 2002, 2007; Garipcan ve Denizli 2002, Gupalova ve ark. 2002, Uzun ve ark. 2005, Yavuz ve ark. 2006, Bereli ve ark. 2006, Petric ve ark. 2007, Akgöl ve ark. 2007, Öztürk ve ark. 2007, Alkan ve ark. 2009, Urbas 2009).



Şekil 1.11. 70 plazma proteininin derişim aralığı (Schiess 2008 ve 2009, Anderson and Anderson 2002)

1.1.3. Protein uzaklaştırma stratejileri

Biyoteknolojide karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi biyomoleküllerin (protein, enzim, hücre vb.) spesifik olarak bulundukları ortamdan kazanılması veya ayrılmasıdır. Bu amaçla birçok yöntem geliştirilmektedir. Günümüzde endüstriyel veya laboratuvar boyutlarındaki protein ayırma yaklaşımlarında, birden fazla ayırma işlemi ard arda kullanılabilir. Çizelge 1.5’de geleneksel ve proteomik ayırma yöntemleri verilmektedir.

Çizelge 1.5. Geleneksel ve proteomik ayırimda kullanılan teknikler (Roy ve ark. 2007)

Geleneksel ayırma 1) Ön-ayırma işlemleri: Katı-sıvı ayırımı a) Süzme b) Santrifüjleme Çöktürme a) Tuz b) Organik çözücü c) Polimer d) Deterjan 2) Kromatografik işlemler: Afinite kromatografisi, Hidrofobik etkileşim kromatografisi, İyon değişim kromatografisi, Jel filtrasyon kromatografisi, Perfüzyon kromatografisi, Yerdeğiştirme kromatografisi 3) Kromatografik olmayan işlemler: Sulu iki faz ekstraksiyon, Üçlü faz bölümlendirme (TPP), Ters miseller ekstraksiyon, Çapraz akışlı ultra filtrasyon, Elektroferez
Proteomik ayırma 1) Ön-ayırma işlemleri: Herhangi bir ayırma tekniğinin kullanımıyla protein fraksiyonlama ya da protein uzaklaştırma Tanımlama işlemleri: 2-boyutlu jel elektroforezi, Kütle spektrometri (LC-MS), Ortogonal kromatografi, 2-boyutlu kromatografi, büyük protein komplekslerinin doğrudan analizi (DALPC), gözenekli olmayan ters faz HPLC kullanılmasıyla izoelektrik odaklama (IEF-NP RP HPLC), Biyogörüntüleme, mikroarray profillemesi

Protein izolasyonu, ayırma ve saflaştırılmasında geleneksel teknolojiler ve metotlar son 30 yıl içerisinde önemli gelişme göstermişlerdir. Proteomik çalışmaların başlangıç zamanlarında geleneksel metotlar büyük miktardaki protein ve peptidin MS analizi için doğrudan ön-fraksiyonlama gereçleri ile adapte edilirdi. Bir ya da iki boyutlu elektroforez (1DE ya da 2DE), izoelektrik odaklama (IEF), iyon değişim kromatografisi (IEC), hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC), yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), kolon kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve kapiler elektroforez nisbeten gelişmiştir ve kolayca uygulanabilir. MS analizi için ayırma gücü potansiyeline ve tayin sınırına ulaşmak için daha güçlü protein ayırma süreçlerine ihtiyaç vardır. Ayırma işlemi kompleks protein karışımları için güçlü, spesifik, tekrarlanabilir ve uyumlu olmalıdır. Online ya da off-line (çok boyutlu) ve seçici ayırma (afinite bağlanma ve işaretleme) gibi 2-3 sürecin kombinasyonunu kullanan metotlar geliştirilmektedir. 2DE'ye ek olarak HPLC-HPLC, HPLC-CE, güçlü katyon değişiminin (SCX) RPLC ile eşleşmesi, IEF'nin RPLC ile eşleşmesi gibi diğer metotlarda da başarı elde edilmiştir. Bununla birlikte bu metotlar proteomik örneğin kompleksliğini azaltmada ve düşük yoğunluklu proteomik örneklerde ayırma gücüne ulaşmada yeterli değildir. Bu nedenle; geleneksel metotlar çok boyutta olsa da MS temelli proteomik analizlerinin gerekliliklerini karşılamada başarısız olur. Bu nedenle afinite ayırma ve zenginleştirme teknolojilerinde ve metotlarında gelişme ve uygulama yüksek öncelikte olmalıdır. Tüm çözülmesi gereken sorunlar yüksek bolluklu proteinlerin (HAP) ayırma, düşük bolluklu proteinlerin zenginleştirilmesi (LAP) ve biyolojik belirtecin keşfini ve validasyonunu sağlamak için hedef protein örneğinin tayinidir. Kompleks protein karışımından ayırma ya da belirli gruplardaki proteinlerin zenginleştirilmesi için kullanılan metotlar aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır:

- a) Yüksek spesifiklik ve doğruluk,
- b) Hedef olmayan proteinlere düşük çapraz reaktivite (düşük spesifik olmayan bağlanma),
- c) Yüksek afinite ve avidite (çoklu bağlanma gücü),
- d) Analiz için bağlanan proteinlerin geri kazanımı (fraksiyonlama ya da kısımlara ayırma için iyi),

- e) Yüksek kapasite (Yükleme başına büyük hacimli işlemek için),
- f) Çapraz türlere uygulama (farklı türlerdeki örnekler için uygulama),
- g) Kullanışlı kullanım (basit ve kolay uygulama),
- h) Otomasyona ya da düzene uygun (diğer cihazlarla on-line),
- i) Yüksek tekrarlanabilirlik (varyasyon katsayısı kabul edilebilir),
- j) Tekrar kullanılabilirlik (rejenerasyon sonrası kullanılabilir),
- k) Doğal şartlarda minimal bozunma,
- l) Kabul edilebilir maliyet (hesaplı).

Protein ayırımı ve zenginleştirmeye dayalı yaklaşımlar moleküler kütle, yoğunluk, hidrofobisite, yüzey yükü, izoelektrik nokta, üçüncül yapı ve aminoasit dizilimi (epitop) gibi biyokimyasal ve biyofiziksel özelliklere bağlı olarak geliştirilirler. Proteomik analizde spesifikklik en önemli etmendir. Hedef proteinlerin ayırımında ve zenginleştirilmesinde spesifikk olmayan bağlanma potansiyeli önemlidir. Spesifikk olmayan bağlanmayı engellemek ve hedef proteinin doğru yakalanması için afinite reaktifleri bu uygulama için geliştirilmelidir. Afinite ayırımı ve zenginleştirme süreçleri hedef proteinler için spesifikk olmalıdır. Antikorlar, proteinler, peptitler, nükleotitler bu amaçlar için kullanılan biyomoleküllerdir (Fang ve ark. 2004, Fang ve Zhang 2008).

Albumin ve immunoglobulinlerin uzaklaştırılması ile ilgili tek bir problem vardır. Bu proteinler düşük bolluklu proteinleri taşıma görevini yerine getirir. Düşük moleküler kütleli proteinlerin çoğu kanserin gelişimi ile ilişkilidir ve bu nedenle önemli biyolojik belirteçtirler. Yüksek bolluklu proteinlere düşük moleküler kütleli proteinlerin bağlanması iki aşamada kullanılabilir. Yüksek bolluklu taşıyıcı proteinler öncelikle spesifikk olarak ilgili afinite kolonuna bağlanır, daha sonra düşük moleküler kütleli taşınan protein gradiyent elüsyonu gerçekleştirilebilir (Govorukhina ve Bischoff 2007, Zhou ve ark. 2004).

Albumin uzaklaştırılması için boya ligandların ya da antikorların, immunoglobulinlerin uzaklaştırılması için ise Protein A ya da G'nin ligand olarak kullanıldığı afinite kolonları bulunmaktadır. Teknik olarak basit bir yaklaşımla albumin ve IgG bağlama spin kolonları ya da filtreler kullanılarak çoklu örnek işlemleri gerçekleştirilebilir. Albumin bağlanması için genellikle CB ve bunların türevleri olan boya ligandları ve albumine karşı spesifikk antikorları bulunan iki tür

sabit faz kullanılmaktadır. Afinite tuzaklarına immobilize edilmiş faz türevli peptitlerin kullanılmasıyla albumin başarılı bir şekilde uzaklaştırılabilmektedir (Sato ve ark. 2002). Protein G'den türevlendirilmiş sentetik peptit plazmadan albuminin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır. Peptidin kararlılığı sayesinde kolon bazik çözelti ile oldukça spesifik ve yüksek kapasitede kolaylıkla rejenere edilebilmektedir (Govorukhina ve Bischoff 2007).

Kimyasal afinite zenginleştirme proteomik analizlerde yaygın olarak kullanılır. Bu metotların bazılarında geleneksel biyokimyasal afinite reaktifleri olan boya ligandları kullanılmaktadır. Atomlar ve moleküller arasındaki çekici etkileşimlerdeki spesifik güç kimyasal bağdır. Kimyasal bileşikler ve hedef moleküller arasındaki bağlanma spesifik birleşmeye ve kararlılığa dayanır. Proteinlere kimyasal afinite, bağlanması kimyasal reaktiflerle hedef proteinler arasındaki kovalent olmayan ya da kovalent bağlanma gibi çeşitli yollarla gerçekleşen kimyasal bağlanmaya dayanır (Fang ve Zhang 2008).

Yüksek bolluklu proteinlerin, selüloz filtreleri ile ultrafiltrasyonla uzaklaştırılmasında 30 kDa kesmesi nedeni ile daha az başarılıdır. Düşük moleküler kütleli çoğu bilinen proteinlerin iki boyutlu jel elektroforezinde kayıplar oluşur. Bununla birlikte ultrafiltrasyon, proteomun düşük moleküler kütle fraksiyonlarını deriştirdiği için avantajlıdır. Güçlü katyon değişirme, HPLC ile önfraksiyonlandıktan sonra LC-MS ile düşük moleküler kütleli proteinlerin analizi için kullanışlıdır. Düşük moleküler kütleli proteinlerin; özellikle albumin gibi serum taşıyıcılarına bağlanmasını engellemek için % 20'lik asetonitril kullanılır. Oluşan fraksiyonlarda Johnson ve arkadaşları diğer metotlarla uzaklaştırma olmaksızın tayini oldukça zor olan düşük bolluklu proteinler olan sitokinleri, büyüme faktörlerini ve transkripsiyon faktörlerini içeren 314 proteini tanımlamışlardır. Bu metotla 10 kDa'da kesilerek örnek hazırlama işlemi yumurtalık kanseri hastalarından alınan serumun düşük moleküler kütle fraksiyonlarını nanoLC elektrosprey iyonizasyon-fourier transform iyon siklotron rezonans (ESI-FT-ICR) MS'de analiz etmek için kullanılmıştır (Govorukhina ve ark., 2006, Govorukhina ve Bischoff 2007, Björhall ve ark. 2005).

Kompleks örnekleri fraksiyonlamak ve yüksek bolluklu proteinleri düşük bolluklu proteinlerden ayırmak için farkı metotlardaki elektroforetik yaklaşımlar

kullanılabilir. Temel prensip; çözeltide hazırlayıcı izoelektrik odaklama ve/veya serbest akışlı elektroforeze dayanır. Ham örnek, farklı elektroforetik hareketler ya da proteinlerin izoelektrik noktalarına bağlı olarak özellikle tasarlanan bölmede önfraksiyonlanır. Albumin bakımından zengin olan kısım ayrılır ve diğer fraksiyonlar ayrıca analiz edilir. Bu metot, 10 yıldan önce kullanılmasına rağmen hala sınırlı kullanıma sahiptir. Elektroforetik ön fraksiyonlama için Weber ve Invitrogen tarafından üretilen Zoom IEF fraksiyonlayıcı gibi ticari ürünler bulunmaktadır (Rothmund ve ark. 2003, Govorukhina ve Bischoff 2007).

Poliklonal IgG ve IgY antikorları immunoafinite ayırım için başlıca bileşenlerdir. İmmobilize IgG ve/veya IgY antikorları ayırma ürünü geliştirmek için kullanılabilirler ve her ikisi belli bazı ortak noktalar içermesine rağmen farklı özelliklere de sahiptirler. Proteomik örnek hazırlığı için uygun sistemin seçimi önemlidir. Ürünün formu, özellikleri ve spesifikasyonları, deneysel başarısı, örnek türü, boyutu ve sayısı kadar metotların ve sonraki işlemlerin uyumluluğuna dikkat edilmelidir. Poliklonal IgG kullanımı olgunlaşmasına rağmen IgY kullanımı nisbeten daha yenidir. Poliklonal IgG kaynağı serumdur ve memeliler için kullanılır. Poliklonal IgY kaynağı ise yumurta sarısıdır ve kuşlar, sürüngenler ve amfibi hayvanlar için kullanılır. Poliklonal IgG'nin afinitesi seçici bir şekilde yüksek iken poliklonal IgY'nin genellikle yüksektir. Poliklonal IgG, pH 3-9 aralığında 70 °C'ye kadar kararlı iken poliklonal IgY pH 4-9 aralığında 65 °C'ye kadar kararlıdır. Poliklonal IgG poliklonal IgY'e göre daha az hidrofobiktir. Poliklonal IgG'de Protein A ya da G, Fc kısmına çapraz bağlanırken, poliklonal IgY'de Fc kısmındaki karbonhidrat gruplarına çapraz bağlanma hidrazit konjugasyon metodu ile gerçekleştirilir (Fang ve Zhang.2008).

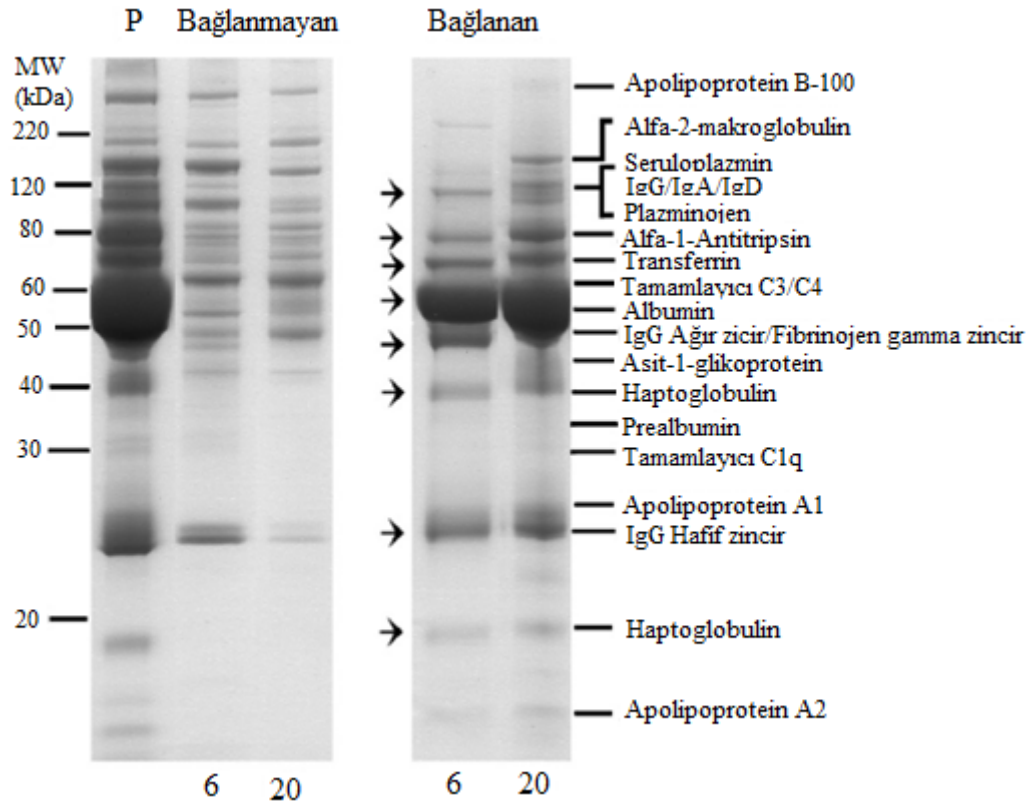
Doğal ya da rekombinant proteinlerinden türetilen ürünler belirli hedef proteinlere spesifik tanıma ve bağlamaya sahiptir. Bakteriyel proteinler (protein A ya da G) immunoglobulinler için ideal ligandlardır. Bu bakteriyel ürünler, IgG'nin Fc bölümüne spesifik olarak bağlanır. Lektinler şeker bağlayan proteinlerdir ve şeker parçaları için oldukça yüksek spesifikliğe sahiptirler. Lektin temelli afinite kolonları spesifik olarak glikoproteinleri yakalamak, zenginleştirmek ve ayırmak için geliştirilirler (Fang ve Zhang 2008).

Antikor ya da tek zincirli antikorlardan farklı olarak peptitler daha küçüktür ve proteomik zenginleştirmede eşsiz avantaj sağlarlar. Bausasant ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, peptit temelli afinite ortamında albumin için etkili bağlama kapasitesi elde edilmiştir. Jelin albumin bağlama kapasitesi 14 mg.mL^{-1} 'dir ve NaOH ile rejenarasyondan sonra 100 kez tekrar kullanılabilirler. Kombinasyonel peptit tekniği immunoafinite ayırım tekniğine alternatif olarak umut verici ve güçlü bir tekniktir. Malzeme çeşitli örnekler ve türler için kullanılabilir. Yüksek kapasitesi sayesinde daha fazla protein tayin edilebilir. Az sayıdaki örneklerle proteom analizinde daha derinlere gitmek için idealdir (Fang ve Zhang 2008).

Son yıllarda plazmadan albumin ve immunoglobulinlerin uzaklaştırılması için polimer destekli birçok ticari ürün kullanılmaktadır. “Aurum Serum Protein Minikit” (Bio-Rad), “Vivapure® Anti-HSA/IgG Kit” (Sartorius Stedim Biotech), “Calbiochem® ProteoExtract™ Removal Kits” (EMD Biosciences), “ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit” (Merck), “Multiple Affinity Removal Column” (Agilent Technologies), POROS Affinity Depletion Cartridges (Applied Biosystems), “Albumin-IgG Removal Kit” (Amersham Biosciences), “Pierce® Antibody-Based Albumin/IgG Removal Kit”, “Pierce ProteoSeek™ Albumin/IgG Removal Kits”, Dye/Protein A-Based Kit, ProteoPrep® Blue Albumin (Thermo Scientific), ve IgG Depletion Kit ve ProteoPrep® 20 Plasma Immunodepletion LC Column (Sigma-Aldrich) bunlardan bazılarıdır. Albumin ve immunoglobulinlerin uzaklaştırılmasında ticari ürünlerin birçoğunda albumine karşı afinitesi yüksek bir tekstil boyası olan Cibacron Blue F3GA, immunoglobulinler için ise Protein A/G kullanılmaktadır.

Agilent firması 2004 yılında çoklu affinite uzaklaştırma sistemiyle (MARS) serum/plazmadan albumin, IgG, IgA, transferrin, haptoglobin ve alfa-1-antitripsin gibi oldukça yüksek bollukta bulunan proteinlerin immuno depleksiyonunu gerçekleştirirken, 2007 yılında MARS Human 14 ürünüyle bu proteinlere ilaveten fibrinojen, alfa2-makroglobulin, alfa1asit glikoprotein, IgM, Apolipoprotein A1, Apolipoprotein AII, tamamlayıcı C3 ve transthyretini uzaklaştıran LC kolon ve spin tüp formatındaki ürünleri hazırlamıştır. Ürünün formuna ve kolon büyüklüğüne bağlı olarak bir işlemde 8-160 µL serum veya

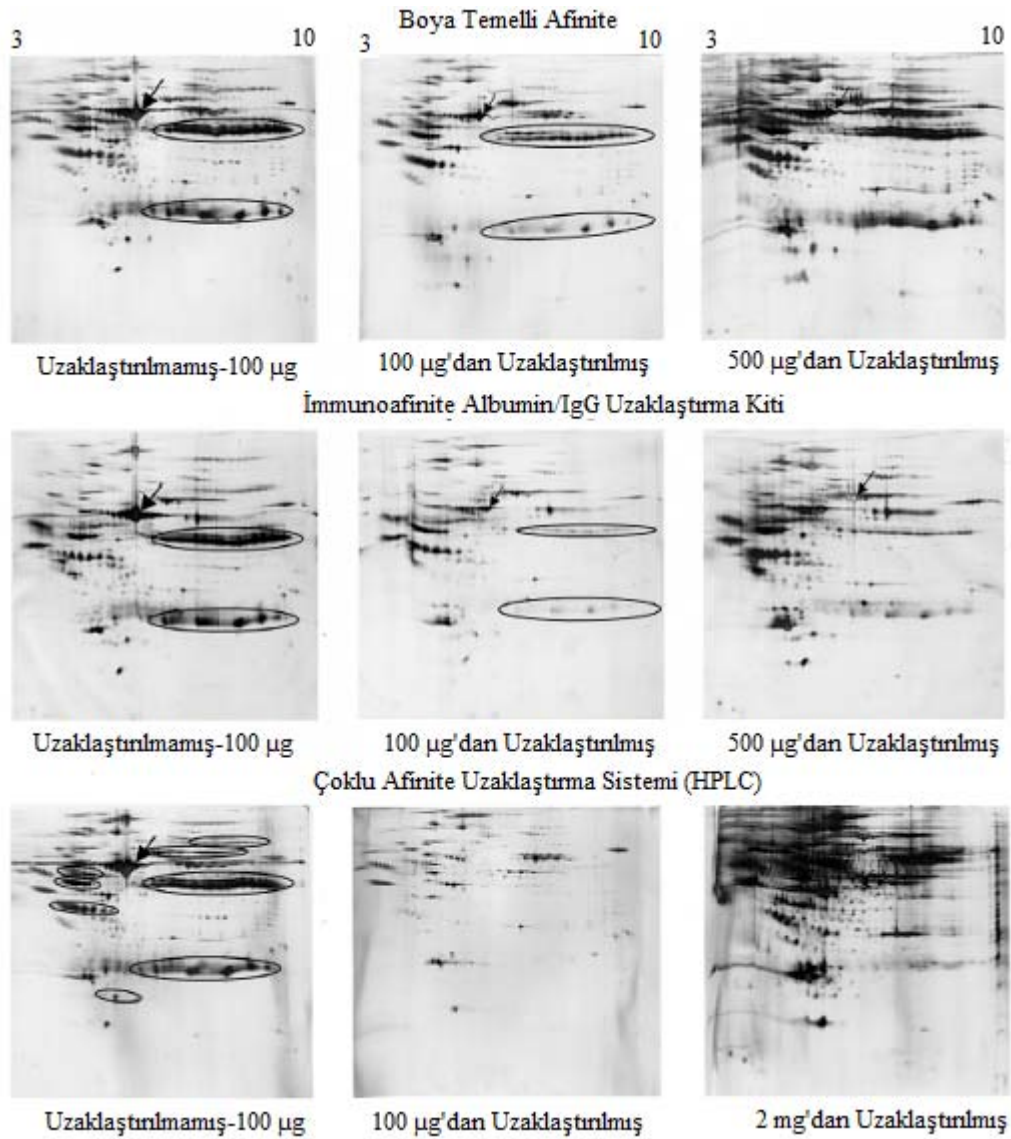
plazma kullanılabilir. MARS sistemi 200 kez ve daha fazla kullanılabilir. Hedef proteinlerin uzaklaştırılma etkinliği % 95-99'dur. Farede albumin, IgG ve transferin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır. MARS sisteminin yüksek basınç toleransı ve daha fazla kullanım avantajı vardır. Sigma-Aldrich firmasının benzer ürünü olan ProteoPrep® 20 plazma immunodepletion kiti ile albumin, IgG, IgA, IgM, IgD, transferrin, alfa2-makroglobin, alfa1-antripsin, haptogloblin, alfa1-asit glikoprotein, seruloplazmin, apolipoprotein A-I, apolipoprotein A-II, apolipoprotein B, complement C1q, complement C3, complement C4, plazminojen ve prealbumin proteinleri uzaklaştırılmıştır. ProteoPrep® 20 spin kolon kiti ve LC kolon şeklinde üretilmektedir. Ürünün türüne bağlı olarak bir işlemde 8 µL ve 100 µL kapasitesinde serum veya plazma kullanılabilir. ProteoPrep® 20 spin kolon kiti proteinlerin ayırımı için 100 kez kullanılabilir. ProteoPrep® 20'nin ortalama etkinliği % 98 olmakla birlikte albumin ve IgG için etkinliği > % 99 ve diğer kalan 18 protein için etkinliği ise > % 85'dir. Tek bir üründe daha fazla hedef proteinin uzaklaştırılması, tekrar kullanılabilirliği ve düşük basınç toleransı bulunmaktadır. Her iki firmanın yüksek bolluklu proteinleri uzaklaştırma etkinliği Şekil 1.12'de görülmektedir. GenWay Biotech ürünü olan Seppro® IgY mikroküreciklerinin hedef proteinleri albumin, IgG, IgM, IgA, transferrin, α2-makroglobin, α1-antripsin, haptogloblin, α1-asit glikoprotein, apolipoprotein A-II, apolipoprotein B ve complement C3 proteinleri uzaklaştırılmıştır. LC kolonları, spin kolon kitleri, SepproTip sistemi ve mikrokürecik sistemleri bulunur. Ürünün formuna bağlı olarak bir işlemde 20-500 µL serum/plazma kullanılabilir. Seppro® IgY mikrokürecikleri 100'den daha fazla kullanılabilir ve hedef proteinleri uzaklaştırma etkinliği % 95-99.5 arasındadır. Bu ürünün çok yönlü türleri bulunması, yüksek kapasitesi, tekrar kullanılabilirliği, orta derecede basınca dayanıklılığı, hayvanlar için doğrudan kullanımı avantajları arasındadır.



Şekil 1.12. Farklı uzaklaştırma kolonlarının kıyaslanması, 50 μ L insan plazmasından Agilent firmasının Multiple Affinity Removal System HPC kolonu (Top 6, 4.6 mmx100 mm) ile uzaklaştırma yapılmıştır. Bu kolonun kullanılması ile albumin, IgG, transferin, IgA, alfa1-antitripsin ve haptoglobulinin etkili bir şekilde uzaklaştırılması oklarla gösterilmiştir. Bununla birlikte diğer yüksek bolluklu proteinler örneğin yüklenmesini ve düşük bolluklu proteinlerin tayinini sınırlamaktadır. Benzer deney 100 μ L insan plazmasından Sigma ProteoPrep-20 immunodepletion spin kolonunun kullanılması ile gerçekleştirilmiştir (en fazla 20 uzaklaştırma). Örnekler % 12 bis-tris 1D jel ile ayrılmış ve koloidal Comassie blue ile boyanmıştır (Hoffman ve ark. 2007).

Şekil 1.13’de boya temelli afinite, immunoafinite albumin/IgG uzaklaştırma kiti ve çoklu afinite uzaklaştırma sisteminin uzaklaştırma yapılmamış plazmanın ve farklı miktarlardaki plazmadan uzaklaştırma sonrası 2D-jel görüntüleri görülmektedir. Boya afinite metodunun kullanılmasından önce ve sonra insan plazmasından uzaklaştırma fraksiyonlarındaki (ortadaki sütun) albumin (okla gösterilen) ve IgG (elips ile gösterilen) uzaklaştırılması tamamlanmamıştır. Aynı örnekle iki yönlü uzaklaştırma (orta satır) kitiyle albumin ve IgG ayırımı yapıldığında uzaklaştırma daha iyi görülmektedir. En alt

satırda ise MARS HPLC kolonundan ayırım görülmektedir. Albumin okla gösterilirken, proteolitik ürünler ve agregatları içeren 5 diğer önemli protein elipsle gösterilmiştir. MARS sistemi ile toplam protein içeriğinin yaklaşık olarak % 85'i etkili şekilde uzaklaştırılmıştır (BCA analiz sonuçlarına göre). Burada 10-20 kat fazla protein yüklemesine izin verilirken bu noktada diğer yüksek bolluklu proteinlerin problem olur.

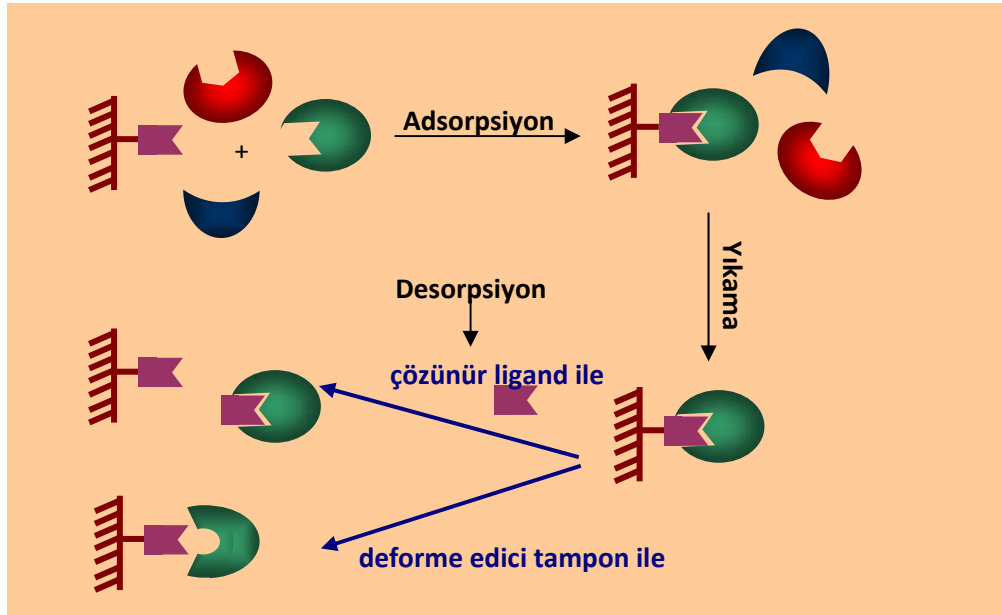


Şekil 1.13. 2D-jellerinde yüksek bolluklu proteinlerin uzaklaştırılmasının değerlendirilmesi (Echan ve ark. 2005)

Tüm bu çalışmalara rağmen çoklu protein uzaklaştırma stratejilerinde aşılacak bazı teknik problemler vardır. Küçük kolonlar için toplam plazma hacmi 15-25 μL iken daha büyük kolonlarda 30-40 μL 'dir. Bu nedenle çok sınırlı yükleme kapasitesi vardır. Takip eden analizler için yeterli örnek oluşturmak için bir örnek için çoklu uzaklaştırma adımları yapılması gereklidir. 1 mL plazmada uzaklaştırma gerçekleştirmek için 20-40 HPLC işlemi gerçekleştirilmelidir. Her bir kolonun ömrünün 100-200 işleminden oluştuğu düşünüldüğünde, çok sınırlayıcı olduğu görülmektedir. Her bir kolonun maliyeti de çok fazladır. Buna rağmen düşük bolluklu proteinlerin tayininde ilerleme sağlanması için daha fazla proteomik uygulamalara ihtiyaç bulunmaktadır.

1.2. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi (Şekil 1.14), bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, ayrılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir katı destek materyaline kovalent olarak immobilize edilmiş bir tamamlayıcı bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Kullanılacak ligandın ayrılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Ligand olarak enzimler, koenzimler, kofaktörler, antikorlar, aminoasitler, oligopeptidler, oligonükleik asitler ve nükleik asitlerin de (DNA, RNA) bulunduğu çok sayıda biyofonksiyonel molekül kullanılabilir. Bu sistemde sadece istenilen molekül kolondaki liganda bağlanır. Ligand ile etkileşime girecek uygun grupları olmayan diğer moleküller bağlanmadan ayrılır. Daha sonra adsorplanan biyomolekül pH, iyonik şiddet, sıcaklık, üre veya guanidin klorür gibi ayrıştırıcı ajanların ilavesi gibi ortam koşullarının değiştirilmesiyle veya ligandın kendi çözeltisi ile yıkanması sonucu kolondan ayrılır. Ligand ile ayrılan biyomolekül arasındaki kompleks oluşumu iyon etkileşim, hidrofobik kuvvetler, London dağılma kuvveti, dipol-dipol etkileşimi veya yük-aktarım etkileşimleri gibi genel moleküler kuvvetlerle gerçekleşir. Afinite kromatografi yöntemi çok güçlü ve yüksek seçiciliğe sahip bir yöntemdir. Buradaki seçiciliği ve etkinliği belirleyen en temel etken bu kuvvetlerden bir kaçının aynı anda gerçekleşmesidir (Denizli ve Pişkin 1995, Uzun ve Denizli 2010, Ghadge 2000).



Şekil 1.14. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi

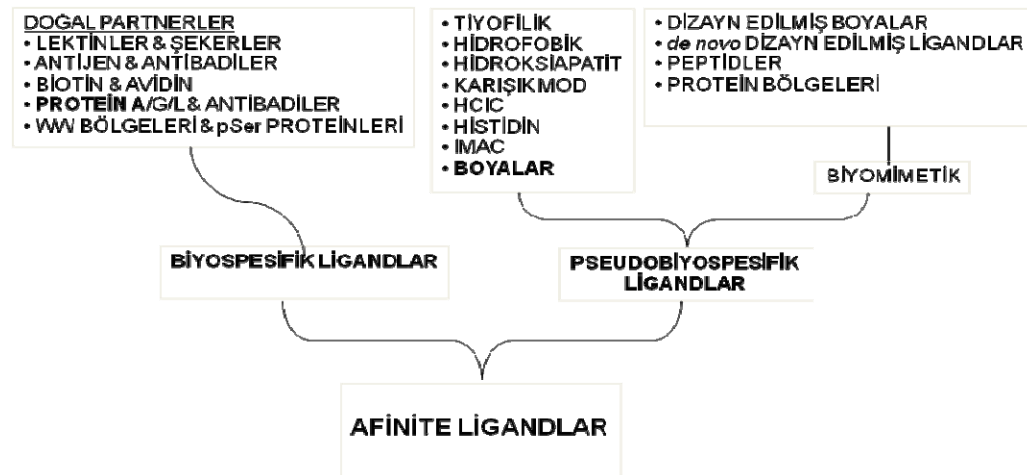
1.2.1. Matriks seçimi

Afinite sisteminde en önemli olaylardan biri de destek matriksin seçimidir. Matriks, biyospesifik ligandın üzerine kovalent olarak bağlandığı materyaldir. Matriks seçiminde dikkat edilmesi gereken ilk husus matriksin fiziksel ve kimyasal olarak kararlı olmasıdır. Spesifik olmayan adsorpsiyon düşük olmalıdır. Çünkü; afinitenin adsorpsiyon gücü immobilize ligand ve hedef molekülün adsorpsiyon ortamında spesifik etkileşimine dayanır. Matriks, uygun geçirgenliğe ve büyük iç yüzey alanına sahip olmalıdır. Bu geniş yapı hedef molekülün ayırma süreci boyunca kolayca difüze olmasına, hızlı adsorpsiyona ve elüsyona olanak sağlar. Böylece yüksek adsorpsiyon kapasitesi hedeflenir. Matriksin yüksek akış hızlarında rijit olması gerekir. Matriks, ligandın immobilizasyonu ve türevlendirilebilmesi için fonksiyonel gruplar içermelidir, hidrofilik karakterde olmalıdır, mikrobiyal ve enzimatik olaylara karşı dayanıklı olmalıdır. Ayrıca; matriks ucuz olmalı ve tekrar kullanılabilir. Katı destek bazı durumlarda lektinlerin saflaştırılmasında polisakkaritlerin kullanılması gibi ligandın kendisi de olabilmektedir. Destek materyali olarak agaroz, dekstran, selüloz, poliakrilamit gibi sentetik polimerler, demir oksit, silika ve farklı organik

polimerler kullanılabilir. Ticari olarak çok sayıda farklı türde destek malzemeleri mevcuttur. Yüzey alanları oldukça büyük olmasından dolayı son zamanlarda nanopartiküller matriks malzemesi olarak kullanılmaktadır.

1.2.2. Afinite ligandının seçimi

Ligand (Şekil 1.15), matrikse kovalent olarak bağlanan ve ayrılması veya saflaştırılması istenen biyomoleküle özel, seçimli afinite gösteren ve onu spesifik olarak tanıyıp bağlayan maddelerdir. Proteinler gibi yüksek molekül ağırlıklı moleküllerin yanında daha düşük molekül ağırlıklı bileşikler de afinite ligandı olarak kullanılabilir. Ayrıca herhangi bir biyolojik işlevi olmayan basit moleküllerin kullanımı da mümkündür.



Şekil 1.15. Afinite ligandları (Roque ve Lowe 2006)

Biyomoleküllerin ayrılmasında birçok ligand kullanılmaktadır. İmmobilize edilmiş lektin birçok glikoproteinin ayrılmasında, reseptörler hormonların, hormonlar da reseptörlerin ayrılmasında ve immünoafinite ile antikorlar antijenlerin ayrılmasında kullanılır. Afinite kromatografisinde kullanılacak ligandın seçiminin yanı sıra destek matriksinin seçimi ve uygulanacak kimyasal yöntemin seçimi de önemlidir.

Kullanılacak ligandın seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli nokta ligandın proteine karşı spesifikliğinin fazla olması ve bağlanmanın geri dönüşümlü olmasıdır (Çizelge 1.6). Kromatografi sırasında uygulanacak kimyasal

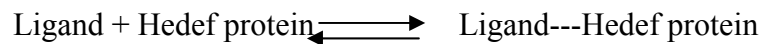
işlemlere karşı ligandın kararlı olması da gerekir. Birçok biyomolekülün ligand olarak kullanılması düşünülse de çok pahalı olmaları ve kararlılıklarının düşük olması sebebi ile tercih edilmezler. Pseudo-spesifik ligandların geliştirilmesi ile bu tip dezavantajlar büyük ölçüde giderilmiştir.

Çizelge 1.6. Grup spesifik ligandlar ve spesifikklik özellikleri

Grup spesifik ligand	Spesifikklik
Protein A	IgG'nin Fc bölgesi
Protein G	IgG'nin Fc bölgesi
Concanavalin A	Glukopiranozil ve mannopiranozil gruplar
Cibacron blue	Geniş aralıktaki enzimler ve Serum albumin
Procion Red	NADP+ bağlı enzimler
Lizin	Plazmonijen, ribozomal RNA
Arjinin	Serin proteaz
Benzamidine	Serin proteaz
Heparin	Koagülasyon faktörleri, lipoproteinler, lipazlar, hormonlar, steroid reseptörleri, protein sentez faktörleri, nükleik asit bağlama enzimleri
Geçiş metal iyonları	Ulaşılabilir histidin içeren proteinler ve peptitler

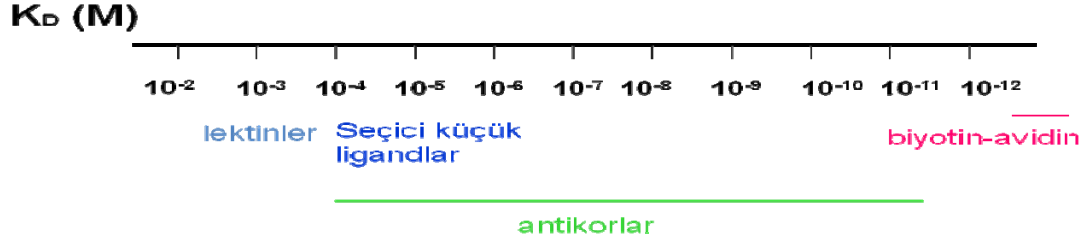
Dar bir seçicilik aralığına sahip ligand veya monospesifik bir ligandın kullanılması yüksek etkinlik ve saflıkta tek bir bileşiğin ayrılmasını sağlar. Bu da ayrılacak her madde için özel bir ligand-matriks birleşimi gerektireceğinden dezavantajdır. Bu nedenle; grup spesifik ligandlar tek matriks ile çok çeşitli maddelerin ayrılmasını sağladığından daha çok önemlidir.

Ligand ve hedef protein arasındaki etkileşim aşağıdaki denklemdeki gibi tersinirdir. Bağlanma sabiti (K_A) 1.1'deki ve ayrışma sabiti (K_D) 1.2'deki (Şekil 1.16) denklemlerle bulunabilir.



$$K_A = [\text{Ligand-Hedef protein}] / [\text{Ligand}][\text{Hedef protein}], M^{-1} \quad (1.1)$$

$$K_D = [\text{Ligand}][\text{Hedef protein}] / [\text{Ligand-Hedef protein}], M \quad (1.2)$$



Şekil 1.16. Ligandların ayrışma sabitlerinin şematik gösterimi

İmmobilize ligandın derişimi afinite matriksinin performansını etkilemektedir. Optimum ligand yoğunluğunun seçimi biyomoleküllerin etkili ayırımını sağlar. Ligand moleküllerinin yoğunluğu oldukça düşük ise afinite matriksi ile etkileşim zayıf olur. Ligand derişiminin fazla olması spesifik olmayan etkileşimleri ve bağ kuvvetini artırır ve bu da hedef moleküllerinin elüsyonu için şartları zorlaştırır. Elüsyon sıklıkla bu durumda denatüre edici şartlarda gerçekleştirilir. Yüksek ligand yoğunluğu gözenekliliği azaltması nedeni ile yükleme kapasitesini etkileyebilir. Küçük ligandların yüksek derişimleri matriksin aktif bölümlerini bloklayabilir, bu da bağlanma etkinliğini azaltır.

1.2.3. Ara kollar

Ara kollar, ligandla matriks arasındaki karbon zincirleridir. Biyolojik maddelerin aktif bölgelerinin molekülün derin kısımlarında olması durumlarında destek matriksiyle liganda tutunan maddeler arasındaki istenmeyen etkileşimleri önlemek amacıyla matriksle ligand arasına bir kol yerleştirilir. Bu arakolun uzunluğu eğer çok kısa olursa beklenen etkiyi gösteremez ve ligand örnek içindeki hedef maddeleri bağlayamaz. Eğer ara kol çok uzun olursa ayırma işleminin seçiciliği azalır ve ara kol ile örnekteki maddeler hidrofobik etkileşime girerler.

1.2.4. Ligand immobilizasyonu

Ligandı matrikse bağlamak için genelde kimyasal immobilizasyon yöntemleri kullanılır. Ligandın destek materyaline immobilizasyonu sonucunda ligand moleküllerinin aktif bölgeleri güvence altına alınmalıdır. Ligand moleküllerinin aktif bölgeleri korunmazsa ligandın hedef molekülle etkileşimi azalır. Biyolojik moleküllerin aktif bölgeleri molekülün üç boyutlu yapısında sıklıkla iç kısımlarda yerleşmiştir. Burada iki yaklaşımla ligand immobilize edilebilir. İlk yaklaşımda matriks aktive edildikten sonra matriks ile ligand arasında hedef molekülün bağlanabileceği bir uzaklıkta kısa alkil zincirleri bağlanır. Diğer yaklaşımda ise ligand ile uzatma kolu öncelikle konjuge edilir, daha sonra taşıyıcı matrikse bağlanır. Birçok reaktif boya ise matriks üzerine matriks üzerindeki çoklu –OH grupları ve triazin grupları arasındaki direkt etkileşim ile immobilize edilir. Reaktif boyanın matriksle direkt eşleşmesi basit, ucuz ve güvenli bir metottur. Eşleşme bazik şartlarda boya molekülü üzerindeki Cl^- ve OH^- lerin nükleofilik süstitüsüyonu ile gerçekleşir. Nükleofiller, yüksek pH’larda oluşur. $\text{pH} > 12$ ’de sulu ortamda klorotriazin hidroliz olabilir. Bu sebeple; çok yüksek pH’lardan kaçınılması gerekir. Matriksteki –OH ile reaktif boyayı eşleştirmek için matriks içine % 2’lik NaCl ilave edilir, böylece hidroliz ve immobilizasyon gerçekleşir. Kullanma öncesi 6 M üre, 0.5 M NaOH çözeltisi ile muamele edilerek zayıf bağlanmış boya artıkları adsorbandan çıkarılmalıdır. Reaktif olmayan boyalar matriksle aktivasyon prosedürü yapılarak eşleşebilir (Denizli ve Pişkin, 2001).

Ligand ile bağlanan proteini ortamdan uzaklaştırmak için ise elüsyon tamponunun kompozisyonu değiştirilir ve proteinin immobilize liganda olan afinitesi azaltılır. Birçok durumda kullanılan tamponun pH ya da iyonik gücü, bazı durumlarda ise etilen glikol benzeri kimyasalları kullanarak çözeltinin polaritesi değiştirilir ve protein böylece malzemeden uzaklaştırılır.

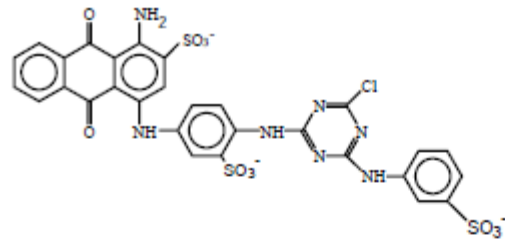
1.3. Afinite Kromatografisi Türleri

1.3.1. Boya-ligand afinite kromatografisi

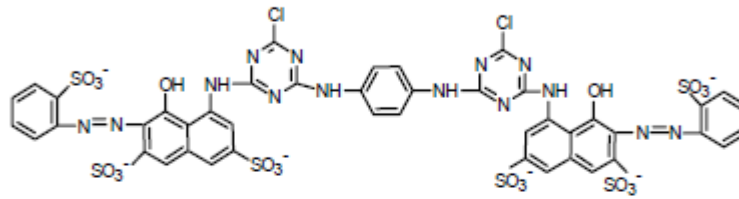
Boya-ligand afinite kromatografisi, afinite ligandları olarak boya moleküllerinin kullanıldığı pseudo-afinite kromatografi yöntemlerinden biridir. İmmobilize triazin boyalar, biyolojik makromoleküllerin saflaştırılmasında afinite ligandları olarak kullanılmaktadır. Triazin boyaları ile proteinlerin etkileşimi ilk olarak 1968’de incelenmiş ve Cibacron Blue F3GA boyasının bazı enzimlere bağlandığı gözlenmiştir. Boyaların grup spesifik doğası sayesinde dehidrogenazlar, kinazlar, albumin, interferonlar saflaştırılabilir. İmmobilize boyalar özellikle oksidoredüktaz, fosfokinaz, hidrolazlar, transferazlar, oligo ve polinükleotit bağlı enzimler, hidroksilazlar, glikolitik enzimler ve kan proteinlerinin saflaştırılması için etkili adsorbanlardır.

Triazin boyalar, proteinlerle etkileşime girecek aromatik halkalara, negatif ve pozitif yük içeren gruplara sahip kompleks moleküllerdir. Boya-afinite sistemlerindeki çoğu boyalarda kromofor grup (azo boyaları, antrokinon ya da fitolosiyenin) reaktif grupla (mono ya da diklorotriazin halkası) bağlanır. Klorotriazin grubu katı desteğe boyanın kovalent bağlanmasını sağlar. Boyalar sulu ortamda molekülün çözünürlüğünü sağlayan sülfonik asit gruplarına da sahiptirler. Bazı boyalar karboksil, amino, klorür ya da metal kompleksleştirici gruplar içerir. Şekil 1.17’de yaygın olarak kullanılan boyaların yapıları görülmektedir (Labrou ve ark.ları 2006).

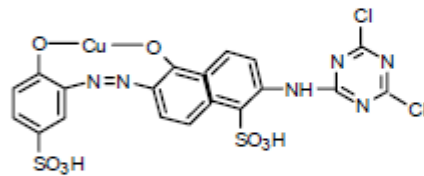
(a) Cibacron Blue 3GA



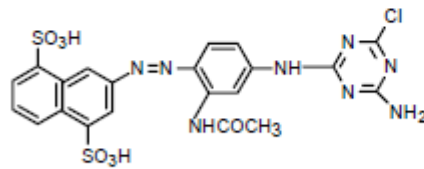
(b) Procion Red HE-3B



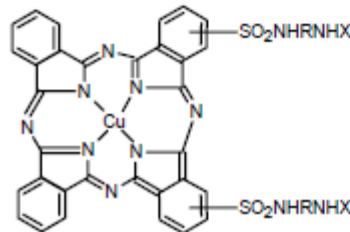
(c) Procion Rubine MX-B



(d) Procion Yellow H-A



(e) Turquoise MX-G



Şekil 1.17. Bazı triazin boyalarının yapıları

Boyalar çoğu polimerle nükleofilik süstitüsyon reaksiyonlarına izin verecek derecede yüksek reaktivitede olduğu için biyolojik ligandlarla

karşılaştırıldığında polimerik destek materyal üzerine immobilize edilmeleri daha kolaydır. Kompleks bir karışımdan hedef molekülün yüksek saflıkta elde edilmesi hazırlanan destek materyalin spesifikliği ile yakından ilişkilidir. Boya ligandlar birçok proteine, aynı biyomoleküllerde olduğu gibi spesifik olarak bağlanabilmektedir. Uzaklaştırma sistemlerinde boyaların uygulanabilirliği, maliyet, boyanın destek materyel yüzeyine kolay tutunup, kalıcı olması (küçük moleküller) ve tekrar kullanılabilir olmalarından dolayı da tercih edilen bir yöntemdir. Boya yerine enzim gibi protein yapılı biyolojik moleküllerin bağlanması hem daha zor bir tekniği hem de maliyeti beraberinde getirir. Bunun yanında; protein tabanlı bu tip maddelerin işlem süresince bozunma riski de yüksektir. Bununla birlikte; pseudospesifik ligandların afinite sabitleri (10^{-4} – 10^{-6} M⁻¹) düşüktür ve zayıf afinite ligand ailesine aittirler. Buna rağmen elektrostatik, hidrofobik, hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimlerin toplam etkileri seçici ve kuvvetli bir etkileşime neden olmaktadır. Pseudo-spesifik ligandların (örneğin aminoasit bazlılar) uygulama esnasında matriksten sızma durumunda herhangi bir immün cevaba neden olmalarını biyoligandlara göre önemli avantajlar sağlamaktadır (Huang ve Carbonell 1999; Baumbach ve Hammond 1992). Ayrıca bu ligandlar, biyoligandlara göre daha kararlı olup yüksek miktarlarda ve düşük maliyette üretilebilmektedirler. Bu nedenle boya-ligand afinite kromatografisi kullanışlı ve verimli bir uygulamaya sahiptir (Denizli ve Pişkin 1995, Demiryas ve ark. 2007, Denizli ve Pişkin 2001).

Klorotriazin boyaları agoroz, Sephadex, metal oksitler, poliakrilamit, agaroz-poliakrilamit gibi destek materyallerine kovalent olarak bağlanabilmektedir. Boya immobilizasyonu tuz ve alkali ortamda gerçekleştirilir. Tuz adımı reaksiyonu hızlandırdığı için önemlidir ve alkali şartlarda boya ile destek arasında eter bağı oluşumunu kolaylaştırır. Triazin halkasındaki klorür atomunun nükleofilik yer değiştirmesiyle eter bağı oluşur. Matrikse bağlanma siyonojen bromür metoduyla ya da desteğin periyodat oksidasyonu ile boyanın direk kovalent bağlanmasıyla gerçekleştirilebilir. Bağlanma, her iki durumda da boya molekülünün antrokinon halkasındaki -NH₂ grubu üzerinden gerçekleşir. Boya immobilizasyonundan sonra kovalent olmayan bağlanmayla bağlanan boyayı uzaklaştırmak için destekler önce su ile daha sonra 1-2 M tuz, 6 M üre

(0.5 M NaOH'de), 8 M üre, dimetilsülfoksit, etilen glikol ya da % 20 etanol çözeltilerinden biri ile yıkanır. İmmobilize adsorbanlar pH 8-9 seyreltik tampon çözeltilisinde saklanır (% 25 etanol ve % 0.02 sodyum azit). İmmobilize boya farklı proteinleri bağlayabilir. Boya ligand saflaştırılmasının gelişiminde ve optimizasyonunda immobilize ligandın derişimi, hareketli faz pH'ı, iyonik şiddet, bileşim, sıcaklık, örnek miktarı önemli parametrelerdir. Bu parametreler boya-ligand kolonuna hedef proteinlerin adsorpsiyonunu ve elüsyonunu etkiler. pH ve iyonik şiddet etkisi boya ligandlarının katyon-değişirici (boyalardaki negatif yüklü sülfonik grupların varlığından) karakterinden ortaya çıkar. Proteinin elüsyonu spesifik (ligand eklenmesi) ve spesifik olmayan (pH, iyonik güç) yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Spesifik olmayan elüsyon, hareketli fazın pH (glisin-HCl pH 2.8) ya da iyonik şiddetinin değiştirilmesi ile gerçekleşir. Hareketli fazın iyonik şiddeti genellikle KCl ya da NaCl gibi tuzların eklenmesi ile artırılır. Etilen glikol ya da diğer organik çözücülerin eklenmesi ile hareketli fazın polaritesi değiştirilerek elüsyon artırılır. Spesifik olmayan elüsyon ekonomik olmasına rağmen bağlanan proteinlerin de deformasyonuna neden olur (Labrou ve ark. 2006, Denizli ve Pişkin 2001).

Denizli ve arkadaşlarının çalışmasında (2000), poli(EDMA-HEMA) mikroküreciklerine CB boyası bağlanmış ve insan plazmasından bilirubin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır. Aynı mikrokürecikler, başka bir çalışmada Al^{3+} ve Fe^{3+} iyonlarının uzaklaştırılmasında da kullanılmıştır (Denizli ve ark. 1997, 1998, Denizli ve Pişkin 2001). Yavuz ve arkadaşlarının çalışmasında poli(hidroksil metakrilat) jel küreciklerine Reactive Green HE kimyasal olarak bağlanmış ve bu küreciklerin IgG alt türlerini bağlama etkinliği incelenmiştir (Yavuz ve ark. 2006).

1.3.2. Protein A afinite kromatografisi

1970'den önce Protein A ligandı, IgG ve alt türlerinin ayırımı için hızlı ve basit bir yaklaşım sunması nedeni ile oldukça ilgi görmüştür. Protein A kromatografisi büyük ölçüde antikör saflaştırılması için en yaygın tekniktir. Protein A *Staphylococcus aureus*un bakteriyel hücre duvarına kovalent olarak

bağlanır. Tüm bakteri bu ligand için katı faz matriksi olarak kullanılabilir. Afinite ligandı olarak kullanımında saf halinin kullanımı daha uygundur. Protein A'nın moleküler kütlesi 42000 Da'dur, tekli polipeptit zinciri içerir ve önemli miktarda karbonhidrat içermez. Çeşitli kaynaklardaki IgG'nin Fc kısmına afinite gösterir. İnsan, tavşan ve domuz IgG'sine yüksek afinite gösterirken, at ve inek IgG'sine afinitesi daha düşüktür ve fare IgG'sine oldukça zayıf bağlanır. Çizelge 1.7'de doğal olarak IgG bağlayan proteinler verilmektedir.

Çizelge 1.7. Bakterilerdeki IgG bağlayan proteinler

Protein	Kaynak	Bağlanma
Protein A	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kuvvetli, Fc bölgesi
Protein G	Grup C ve G streptococci	Kuvvetli, Fc bölgesi
Protein L	<i>Peptococcus magnus</i>	κ hafif zincirlerini bağlar
Protein P	<i>Clostridium perfringens</i>	κ hafif zincirlerini bağlar
Protein D	<i>Branhamella catarrhalis</i>	IgG, az miktarda IgG bağlar
Protein P	Grup A streptococci	IgA, IgG zayıf bağlar

Etkileşim, hidrofobik etkileşimlerle birlikte hidrojen bağları ile karakterize edilebilir. Protein A birbirine benzer beş IgG bağlama alanı içerir. Protein A'nın üç boyutlu yapısı hidrofobik dolgu ile stabilize olur. Protein A molü başına iki mol IgG bağlar. IgG'ye oldukça yüksek spesifiklik sergilediği için tek adımda IgG saflaştırılması için kullanılabilir. Protein A'nın başlıca dezavantajı protein ligandın düşük derecede sızmasıdır. Bu nedenle terapötik uygulamalar için ek saflaştırma adımı gereklidir. Buna ilaveten protein A taşıyıcıları pahalıdır ve sterilize edilmesi ve korunması zordur. Protein A ligandının IgG bağlamadaki artan kapasitesine ek olarak; protein A ligandının temizleme ajanlarına kararlılığı da önemlidir. Protein A'daki asparajin artıkları işleminden geçirildiğinde bazik şartlarda deaminasyonu azaltılabilir. Desteğin rejenerasyonu için daha etkili bir protokolün geliştirilmesi desteğin kararlılığını artırır.

Denizli ve Arıca'nın çalışmasında (2000) protein A içeren mikrogözenekli membran kullanılması ile insan plazmasından yaklaşık olarak 500 µg IgG uzaklaştırılmıştır. Protein A yüksek performans immunoafinite kromatografi katı desteklerine antikorların bağlanması için ikincil ligand olarak kullanılabilir. Katı faz protein A IgG alt türlerini ya da Fc parçalarını ayırmak için kesikli teknikler de kullanılabilir. Protein A kolonlarından adsorplanan antikorların geri kazanımı yumuşak asit şartlarında (pH 3.1) gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte protein A kolonunun pH 7.0 ve 7.4 fosfat tamponlarıyla uzun süre muamele edilmesi sonucunda IgG₁ elue edilebilmiştir. Asit-tuz gradiyentinin kullanılması ile de (pH 7'den 3'e) IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} ve IgG₃ elue edilebilmiştir. 0-3 M sodyum tiyosiyanat gradiyentinin kullanılması daha iyi sonuç vermiştir.

Protein G protein A'dan daha fazla bağlama aralığına sahip olduğu için antikor saflaştırması için daha çok yönlü reaktiftir. Protein G, IgG bağlamasının yanında farklı bölümlerde oluşan bağlama olayları ile IgG Fab ve Fc parçalarını da bağlar. Protein G farklı türlerden IgG bağlama yeteneğine sahiptir.

Protein L, *Peptococcus magnus*'dan elde edilen bakteriyel duvar proteindir ve insan immunoglobulin hafif zincirlerine afinite gösterir. Bağlanma oldukça birbirine benzer beş alan aracılığıyla gerçekleşir. Bağlanma mekanizması çalışmaları sonucunda özellikle tirozin-53'ün fenol grubunun etkili olduğu görülmüştür. Protein L, insan IgG, IgA, IgM ve IgE'ye oldukça güçlü olarak bağlanmaktadır. Protein L'nin diğer türlerdeki immunoglobulinlere de bağlandığı görülmüştür. Protein L, poliklonal ve monoklonal antikorların üretimi için yaygın olarak kullanılır (Phillips 2006, Denizli 2011).

1.4. Elektroforetik Yöntemler

1.4.1. Elektroforez

Elektroforez; boyut, elektrik yükü ve diğer fiziksel özelliklerine bağlı olarak nükleik asitler ve proteinler gibi makromolekülleri ayıran metottur. Yüklü moleküllerin ayırımı uygulanan elektrik alanındaki göçlerine dayanır. Bu elektrik

alan altında pozitif yük taşıyan proteinler katoda, negatif yük taşıyan proteinler anoda doğru göç ederler. Bu elektrik alanında göç etme olayına elektroforez denir. Yüklü bir parçacığın elektriksel bir alanda göçü, elektriksel hareketlilik formülü ile verilir.

$$\mu = v/E \quad (1.3)$$

$$\mu = q/f \quad (1.4)$$

Burada; v : göç hızı (cm s^{-1}), E : elektrik alanı (volt cm^{-1}), q : molekülün yükü (coulomb), f : molekülün kütle ve şekline bağlı sürtünme katsayısı, μ : elektriksel hareketliliği ($\text{cm}^2\text{v}^{-1}\text{s}^{-1}$) gösterir.

Bu göçün hızı çeşitli faktörlerden etkilenir;

- a- Yükün büyüklüğü: Net yük arttıkça proteinlerin göç hızları da artar.
- b- Molekül büyüklüğü: Proteinin büyüklüğü arttıkça göç hızı azalır. Burada proteinin molekül ağırlığı önemli olduğu kadar molekülün şekli de önemlidir.
- c- Destek ortamının özelliği: Destek ortamındaki gözeneklerin boyutu küçüldükçe, proteinin göç hızı azalır.
- d- Elektrik alanın büyüklüğü: Voltaj arttıkça göç hızı da artar.
- e- Tamponun iyonik gücü: İyonik kuvvet azaldıkça proteinlerin hareketliliği azalmaktadır. Tamponlar, protein moleküllerinin jeldeki hareketini sağlayan itici gücü oluşturmaktadır.
- f- Sıcaklık: Sıcaklık arttıkça göç hızı artar.
- g- Elektroforez sırasında akım düşük tutulursa süre uzayacaktır. Sürenin uzun tutulması proteinlerin daha iyi ayrılmasını sağlayabilir; ancak bazen çok uzun süre jelde kalan proteinler stabilitesini kaybedebilir.

Elektroforezin kullanım amaçları; saflaştırma, saflık kontrolü, molekül ağırlığı saptanması, kalıtsal ya da kalıtsal olmayan bir hastalığın tanısı, bir enzimin izomerlerinin saptanması, immünoloji ve moleküler biyoloji çalışmalarıdır (Özer ve Ögüş 2000).

Elektroforezde bir hareketli bir de hareketsiz faz vardır. Sabit faz olarak asetat, selüloz, poliakrilamid, agaroz gibi dolgu maddeleri kullanılır. Sabit ortamdaki en önemli özellik moleküllerin porlardan kolaylıkla geçmesine dayanır.

Hareketli faz olarak genellikle tamponlar kullanılır. Elektroforezin diğer yöntemlerden farkı; bir elektriksel alan yaratılmasıdır. Protein çözeltisi bu elektriksel alanda farklı hızlarla bir elektrottan diğerine hareket ederek molekül ağırlıklarına ve taşıdıkları elektrik yüklerine göre birbirlerinden ayrılırlar. Daha sonra boyama yapılarak protein bantları görünür hale gelir.

Günümüzde proteinlerin analitik tayinleri için en çok kullanılan yöntemlerden biri poliakrilamid jel elektroforezidir. Bu yöntemde destek maddesi olarak poliakrilamid polimerinden yararlanılır. Poliakrilamid jel uzun polimer zincirleri oluşturan, aktive edilmiş akrilamid moleküllerinin reaksiyonu ile oluşur. Çözeltide bu zincirler tek başlarına birleşemezler. Jelin oluşumunda zincirlerin çapraz bağlanması için N,N'-metilenbisakrilamid kullanılır. PAGE, jelin biçimine, konumuna, bileşimine, gözenek dağılımına, türüne göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir.

Doğal şartlarda PAGE: Ayırma analizlenen proteinin yük ve boyutuna göre yapılır. Genellikle alkali (pH 8–9) tampon sistemleri kullanılır. Proteinler denatüre olmadan yürütüldükleri için elektroforez sonunda proteinler aktivitelerini kaybetmezler ve geri kazanılabilirler.

Denatüre edici şartlar altında SDS-PAGE: SDS anyonik bir deterjandır. Negatif yüklü SDS molekülleri protein molekülünü kaplar ve proteinlerin net yükünü maskeler. Tüm proteinler negatif yükle kaplanmış olduklarından ayırma yüke göre değil sadece molekül boyutuna bağlıdır.

1.4.2. İzoelektrik odaklama (IEF)

Bu metotta önce taşıyıcı materyal üzerinde bir pH gradiyenti oluşturulur; daha sonra protein karışımı uygulanır. Bu durumda her protein izoelektrik pH'sına karşılık gelen pH gradiyentindeki yerine göç eder ve orada odaklanır. Bu metodla ayırım daha iyidir. İnsan kan plazmasının proteinleri, 40 veya daha fazla bant oluştururlar.

Bu yöntemde; yüksek hareketliliğe sahip sentetik poliamino-polikarboksilik asitlerin karışımları olan amfoterik bileşikler içeren jel polimerleştirilir. pH gradiyenti oluşturmak için sisteme akım verilir ve amfolitler

izoelektrik noktalarına göre jelde düzenlenirler. En asidik olan anoda, en bazik olanda katoda doğru ilerler. Daha sonra örnek proteinler jele uygulanır ve yüklerine göre anoda ve katoda doğru hareket ederler. Proteinler jel üzerinde net yüklerinin sıfır olduğu pH değerine (pI) kadar göç ederler ve bu noktada hareketsiz kalarak dururlar. En son aşamada protein bantlarının gözlenmesi için boyama yapılır.

Proteinin izoelektrik noktasında hareket etmemesine dayanılarak izoelektrik odaklama bir saflaştırma ve analiz yöntemi olarak geliştirilmiştir. İzoelektrik noktaları 0.02 pH ünitesi fark olan iki proteini bu yöntemle ayırmak olasıdır. Birçok başka yöntemde tek band veren saflaştırılmış örnek bu yöntemle birçok banda ayrılabilir. Bu yöntem yük izomerlerini, konformasyon izomerlerini, prostetik grup içeriği farklı aynı proteinleri, primer yapılarında çok küçük farklılıkları olan proteinleri, proteinlerin doğal ve denatüre formlarını ayırmada kullanılabilir.

1.4.3. İki boyutlu jel elektroforezi (2D-PAGE)

İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi kompleks protein karışımlarının ayrılması ve karakterizasyonunda kullanılan en önemli tekniklerden biridir. İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezinde proteinler izoelektrik odaklama (IEF) ve SDS-PAGE yöntemleri kullanılarak ayrılırlar. Bu yöntemlerin her biri jel başına 100 bileşeni ayırma gücüne sahipken, birleştiklerinde yaklaşık 10000 bileşenin ayrılmasını sağlarlar. IEF yönteminde, pH gradyanı oluşturan çeşitli amfolitler kullanılarak proteinler önce izoelektrik noktalarına göre ayrılır. IEF sonrası tüplerden çıkarılan jeller dengeleme tamponu içerisinde bekletildikten sonra ikinci yönde SDS jel sisteminin ayırma jeli üzerine yerleştirilir ve agaroz ile fikse edilir. Elektroforez başlatıldığında SDS bağlı proteinler molekül büyüklüklerine göre ayrılırlar. 2D-PAGE ayırma gücü en iyi tekniklerden biri olmakla birlikte, tekrarlanabilirlik problemidir.

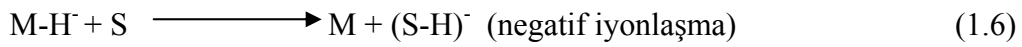
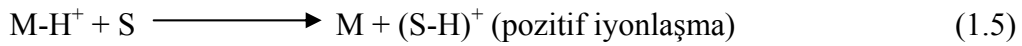
1.5. Kütle Spektrometri Yöntemleri

1.5.1. Matriks yardımcı lazer desorpsiyon/ionlaştırma yöntemi (MALDI)

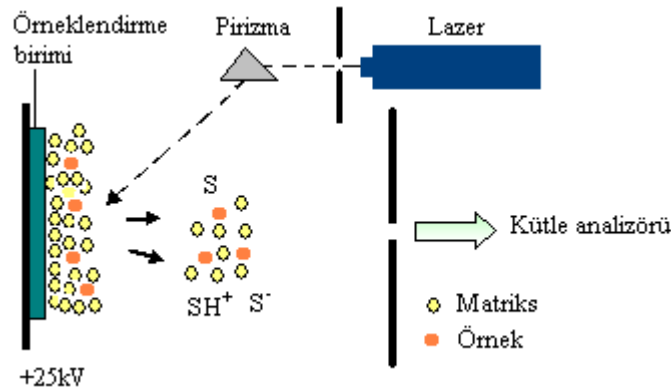
1988 yılında Karas ve Hillenkamp'ın çalışma grubu tarafından yüksek kütle ayırım gücüyle makromoleküler analitlerin moleküler kütesinin doğru olarak tayin edilmesi için geliştirilmiş hızlı bir analiz yöntemidir. Farklı türdeki lazerlerin matriks içine dop edilmiş makromoleküler analitlerle etkileşmesi sonucunda matriksin etkisiyle daha az parçalanmaya uğrayan analit iyonlarının iyonlaşmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem ile proteinler, peptitler, glikoproteinler, oligosakkaritler, oligonükleotitler ve polimerler gibi yüksek moleküler kütleyle sahip malzemelerin analizi gerçekleştirilebilir. Ayrıca MALDI yöntemi ile büyük moleküllerin moleküler kütesinin belirlenmesinin yanında; PSD (kaynaktan sonra parçalanma) yöntemi ile dizilimin belirlenmesiyle moleküllerin yapısal bilgisi hızlı, kesin ve duyarlı bir şekilde tanımlanabilir.

MALDI kaynağındaki süreç iki adımda gerçekleştirilir (Şekil 1.18.). Analiz edilecek bileşik, matriks maddesi ile karıştırılmadan önce uygun uçucu çözücü ile çözülür, eğer pozitif iyonlaştırma gerçekleştirilecek ise eser oranda trifloroasetik asit eklenir. İlk adımda, uygun çözücüde çözülen analiz edilecek bileşik küçük organik bileşikler içeren matriks adı verilen çözelti ile karıştırılır. Analiz edilecek bileşik matriks maddesine göre çok az oranda bulunur. Bu karışım, farklı örnek hazırlama teknikleri uygulanarak analizin gerçekleştirileceği örneklendirme birimine uygulanır. Örneklendirme biriminde analit molekülleri baştan başa matriks maddesi ile sarılmıştır ve tamamen birbirinden ayrı olarak yer alırlar. İkinci adım, kütle spektrometrenin iyon kaynağının içinde belli bir vakum altında gerçekleşir. Bu adımda, katı çözeltinin hacimli kısmının kısa zamanlı yoğun lazer pulslarıyla aşındırılması gerçekleşir. Lazer ile aşındırma gerçekleştirildiğinde matriks moleküllerinin uyarılmasıyla yoğun fazda büyük miktardaki enerjinin birikmesi sonucu kristaller hızla ısınır. Hızlı ısınma matriks kristallerinin süblimleşmesine, kristal yüzeyinin belli bir bölümünün aşınmasına ve matriksin gaz fazına yayılarak genişleyen matriks buharında analitin parçalanmadan desorpsiyonuna neden olur. MALDI sürecinin mekanizması

tamamen açıklanamamakla birlikte kimyasal ve fiziksel iyonlaşma yolları arasında MALDI için gaz-fazı fotoiyonlaşma, uyarılmış hal proton transferi, iyon-molekül reaksiyonları ve oluşan iyonların desorpsiyonu önerilir. İyon oluşum mekanizması arasında en çok kabul edilen; desorpsiyondan önce katı fazdan proton transferi ya da fotoiyonlaşmış matriks moleküllerinden gaz-fazı proton transferidir. Örnek molekülleri matriks iyonlarından proton transferi ile aşağıdaki gibi iyonlaşır.



Burada $M-H^+$, $M-H^-$ matriks maddesini, S ise analiti ifade etmektedir.

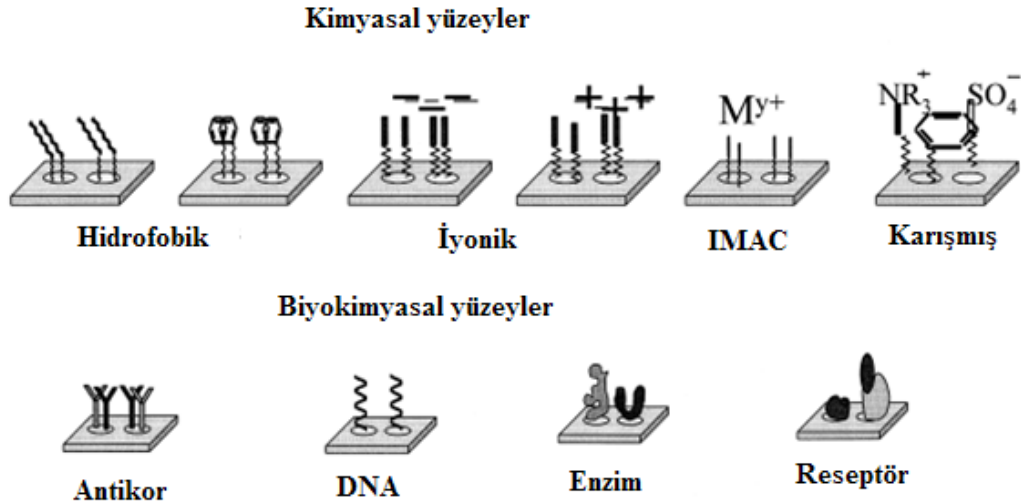


Şekil 1.18. MALDI iyonlaştırma kaynağı

Matriks moleküllerinin sayısı analit moleküllerine göre çok fazladır, böylece analit molekülleri kolayca ayrılır ve moleküler iyon oluşumunu engelleyen örnek kümelenmelerinin oluşumu önlenir. Matriks aynı zamanda lazer pulsundan gelen enerjinin büyük kısmını absorplamasıyla örneğin bozunmasını en aza indirir ve lazerden analite enerji transferinin verimli olmasını sağlar. Böylece duyarlılık büyük ölçüde artar. Lazer atışını (puls) absorplayan matriks olduğu için her bir analit için absorpsiyon frekansı ile eşleşen dalgaboyunu ayarlamaya gerek yoktur. Gaz fazındaki iyonlar elektrostatik alanla kütle analizörüne doğru hızlandırılırlar. Kütle duyarlılığı kütle spektrometrenin analizörünün performansına ve türüne göre değişim göstermektedir. MALDI kaynağının pulslu doğası uçuş zamanlı kütle analizörü (TOF) ile iyi uyum sağlar. MALDI ile oluşturulan protein

1.5.2. Yüzey arttırılmış lazer desorpsiyon iyonizasyon (SELDI)

SELDI, protein zenginleştirme için kullanışlı yöntemdir. Örnek hazırlama prosedürü protein karışımlarının yüzeyde fraksiyonlanmasını içerir. SELDI sisteminde makromoleküllerin örnek ekstraksiyonu kolaydır ve biyolojik belirteç araştırmalarını etkili bir şekilde kolaylaştırır. Bu protein analiz platformu, örnek hazırlamayı çip üzerinde bağlanmayla ve tayinle birleştirmektedir. MALDI hedef yüzeylerinden farklı olarak SELDI sistemi (Şekil 1.20) kompleks karışımdan spesifik özelliklerine göre proteinlerin tutulması için geliştirilen protein çip kromatografik yüzeyleridir. Her bir yüzey, proteinlerin genel ve spesifik fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak tasarlanmıştır. Kimyasal yüzeyler klasik kromatografik ayırım hareketlerine göre türevlendirilirler. MALDI hedef yüzeylerinin türevlendirilmesiyle hedef yüzey üzerinde saflaştırma ve biyolojik belirteçlerin belirlenmesi gerçekleştirilebilir. Bu teknikte, örneklendirme birimindeki yüzey, analit iyonlarının hidrofobik veya elektrostatik etkileşimler gibi etkileşimlerle bağlanması için aktif rol oynarken, yüzeye bağlanmayan iyonlar uzaklaştırılır. Daha sonra, az oranda matriks maddesi eklenerek MALDI analizi gerçekleştirilir. Bu teknikle idrar veya plazmada bulunan özel antikorlar veya antijenler yüzeyde yakalanarak hastalıkların teşhisi gerçekleştirilebilir. Bunlar protein profili ve biyolojik belirteç belirlenmesinde kullanılabilirler. Tüm örneğin direkt uygulanması en önemli avantajıdır. Yüksek molekül ağırlıklı proteinler için uygun değildir, bağlanmış proteinlerin tayini ile sınırlıdır ve çözünürlük ile kütle doğruluğu MALDI sistemine göre daha azdır (Ahmed 2003, Hortin 2006) .



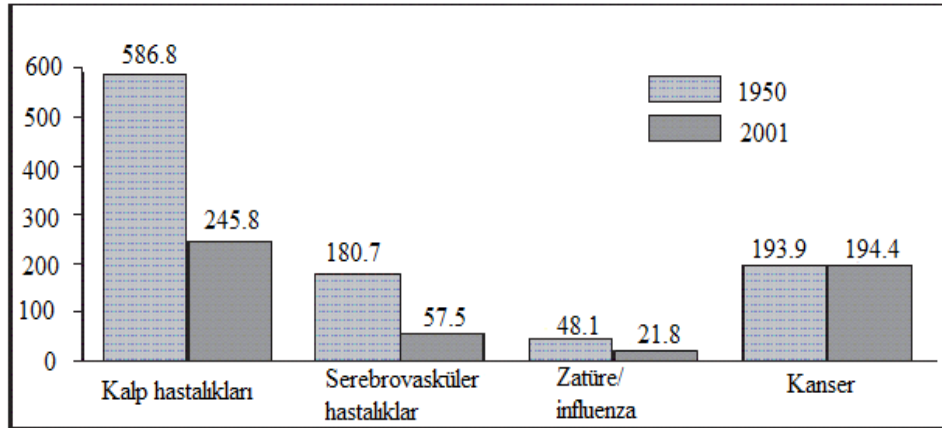
Şekil 1.20. SELDI sisteminde ayırma amaçlı hazırlanan yüzeylerin şematik gösterimi

1.5.3. Yüzey yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon

Kütle spektrometri, analitik teknikler arasında en önemlilerinden biridir ve nanopartiküllerle birleşimi sonucunda tayin duyarlılığı, kesinliği ve esnekliğinde gelişmeler olmuştur. Nanopartikül destekli LDI-MS ilk olarak, yüzey yardımcı lazer desorpsiyon/iyonizasyon (SALDI-MS) ile, Tanaka ve grubu tarafından 30 nm ince kobalt tozlarının kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Fulleren, karbon nanotüpler ve okside olmuş karbon nanotüpler beyin dokularından ve standart peptid karışımlarından peptid ve lipid iyonlarının tayini için SALDI-MS substratı olarak değerlendirilebilir. Tam enerji transfer yolu tamamen aydınlatılamamıştır, bu da desorpsiyon ve iyonizasyon etkileşimini etkileyen çoklu faktörlerin kısmen kompleks olmasından kaynaklanmaktadır. SALDI-MS'in en önemli yönünün yüzey özelliklerinin termal, elektronik ve kimyasal özelliklerine bağlı olduğuna inanılmaktadır.

1.6. Kanser

Kanser önemi giderek artan sağlık ve yaşam sorunu durumundadır. Ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir (Şekil 1.21). Batı toplumlarında her yıl 250-350 kişiden biri kansere yakalanmaktadır.



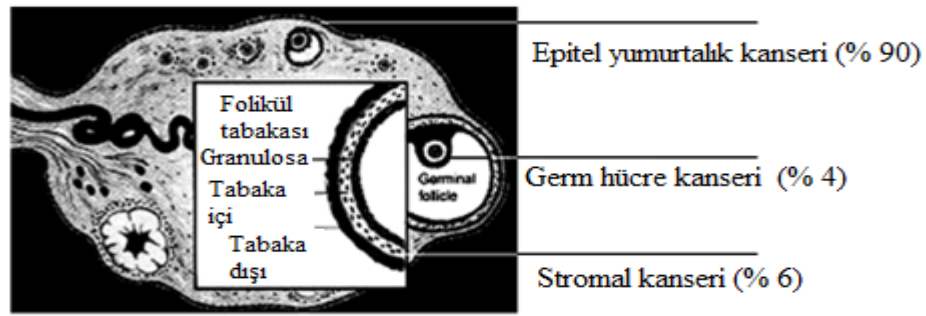
Şekil 1.21. 1950-2001 ölüm oranlarının değişim nedenleri

Vücudumuzda milyonlarca hücre bulunur. Normal vücut hücreleri düzenli bir şekilde büyür, bölünür ve ölür. Kişinin hayatının erken evresi süresince normal hücreler hızla bölünürler. Yetişkin olduğunda ise çoğu hücreler sadece eski ya da ölen hücrelerin ya da yaraların iyileştirilmesinde yer değiştirerek bölünür. Normalde hücreler belli bir kontrol altında, ihtiyaca göre bölünerek çoğalırlar. Hücreler bir taraftan programlı ölüm ya da "apoptoz" denen olay ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Birçok kanser türü bulunmakla birlikte, kanser vücudun bir bölümündeki anormal hücrelerin kontrol dışı büyümesi ile başlar. Kontrol dışı büyüme ve diğer dokulara istila hücreyi kanser hücresi yapar. Kanserli hücre normal hücre büyümesinden farklı olarak, büyümeye devam eder ve yeni anormal hücreler oluşur. Normal hücrede DNA hasar gördüğünde; hücre hasarı iyileştirir ya da ölür. Kanserli hücrelerde, DNA hasarı iyileştirilmez fakat normal hücrelerde olduğu gibi ölmez. Bunun yanında, bu hücre vücudun ihtiyacı olmayan yeni hücrelerin oluşumuna neden olur. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına "metastaz" adı verilir. Kanser yayıldığı bölgeden ziyade her zaman başladığı yere göre isimlendirilir. Örneğin, göğüs kanseri karaciğere yayılsa da göğüs kanseri olarak isimlendirilir. Farklı kanser türleri farklı büyüme hızına sahiptir. Kanser tedavisi ve tanısı birçok

uzmanlık dalının işbirliğini gerektirmektedir. Başarılı bir tedavi için erken teşhis çok önemlidir. Bu nedenle; erken evre hastalık biyolojik belirteçlerine acil ihtiyaç duyulmaktadır. Cerrahi ve radyoterapi lokal tedavi yöntemleri olup, ardından kemoterapi ve immünoterapi gibi sistemik tedaviler uygulanmaktadır. Kemoterapi sitotoksik ilaçlarla yapıldığı için özel bir ihtisas konusudur. Etkili dozlarda, fakat hastayı yan tesirlerden koruyarak yapılması gereklidir (Anonim 2012).

1.6.1. Yumurtalık kanseri

Cinsiyete özgü kanser türleri rahim, uterin sarkom, yumurtalık kanseri ve prostat kanseridir. Yumurtalık kanseri bayanlarda tüm kanser türleri arasında % 5 oranında gözlenen 5. en yaygın kanserdir ve dünya çapında en önemli öldürücü jinekolojik malignitelerden biridir. Hormon ve yumurta üretiminden sorumlu olan yumurtalıklarda ortaya çıkar. Diğer kanser türleri gibi mutasyona uğrayan hücrenin klon seçimi ile ortaya çıktığına inanılmaktadır. Bayanlarda pelvisdeki uterusun her bir yanında olmak üzere iki yumurtalık bulunur. Yumurta oluşumunun ve bayanlarda östrojen ve progesteron hormonlarının ana kaynağı yumurtalıklardır. Yumurtalıklar üç tür doku içerir: Yumurtalığı kaplayan epitelyum hücreleri, yumurtalığın içinde yumurtanın yapıldığı germ hücreleri ve yumurtalığın birlikte tutulduğu ve çoğu hormonun yapıldığı doku olan stromal hücreleri. Yumurtalıklarda birçok türde tümör oluşabilir. Bazıları kanser değildir ve yumurtalığa yayılmaz. Bu türden tümöre sahip olanlar yumurtalığın ya da tümörlü bölümün alınmasıyla tedavi edilebilir. Diğer tür tümörler kanserlidir ve vücudun diğer bölümlerine yayılabilir. Yumurtalık kisti yumurtalıkta biriken sıvıdır. Bu kistlerin çoğu zararsızdır. Tümör orijinindeki hücre tipine bağlı olarak isimlendirilen üç tür yumurtalık kanseri bulunmaktadır (Şekil 1.22). En yaygını yumurtalık yüzey epitelyumunda ortaya çıkan epitelyum kanseridir (% 90). Epitelyum kanseri yumurtalığın dış yüzeyini saran hücrelerde başlayan tümördür. Germ hücre kanseri yumurtayı oluşturan hücrelerde başlar. Stromal kanseri ise yumurtalığı bir arada tutan ve bayan hormonlarını oluşturan hücrelerde başlar (Anonim 2012, Helleman 2006).



Şekil 1.22. Ovarium ve yumurtalık kanserinin meydana geldiği hücre türleri

Yumurtalık kanseri nedenlerinin yaklaşık olarak % 90'ı belirlenememiştir. Bununla birlikte aile geçmişi yumurtalık kanserinde önemlidir. Göğüs-yumurtalık kanseri sendromu, kalıtsal polipoz olmayan kolorektal kanser sendromu, yeri belli yumurtalık kanseri sendromu, Li-Fraumeni sendromu ve Cowden sendromu bazı kalıtsal sendromlarla ilintilidir. Göğüs-yumurtalık kanseri sendromu, BRCA1 genindeki (kromozom 17q) kalıtsal mutasyonuyla karakterize edilir. Bu mutasyon bayanların % 40'ında yumurtalık kanserinin gelişimine neden olur. BRCA2 genindeki (kromozom 13q) mutasyonu daha düşük derecede (% 10) yumurtalık kanseri riskini artırır. Bu genlerdeki nokta mutasyonu, gen amplifikasyon ve kromozomal yer değiştirme gibi mutasyonlar sonucunda tümör baskılama yeteneklerinin fonksiyonlarında azalma oluşur. Bunun yumurtalık kanserinin gelişimine neden olan ilk somatik genetik durum olduğu düşünülmektedir. Kalıtsal yumurtalık kanseri Lynch Sendromu (kalıtsal polipoz olmayan kolorektal kanser HNPCC) ile de ilintilidir. Bu MLH1, MSH2, MSH6 ve PSM2 genleri gibi onarma genlerindeki yanlış eşleşmeden (MMR) kaynaklanır.

Yumurtalık kanserini arttıran diğer faktör 50 yaşından daha büyük olmaktır. Tüm yumurtalık kanserlerinin % 50'si 63 yaşından sonra ortaya çıkmıştır. Çocuk doğurmama ya da kısırlık tedavi ilaçlarını kullanma yumurtalık kanserinin gelişim riskine katkıda bulunur. Klomifen sitrat doğurganlık ilaçlarının özellikle hamilelik olmaksızın uzun süre kullanımı yumurtalık kanseri riskini artırır. Bunun yanında ovulasyon yumurtalık kanserinin oluşumunu engeller. Hayvansal yağ ve kırmızı etin aşırı tüketiminin epitelyum yumurtalık kanseri riskini arttırdığı gözlenirken, balık ve sebze rejiminin uygulanmasının koruyucu role sahip olduğu ileri sürülmüştür. Menopoz olan bayanlarda östrojen

yerdeğiştirme tedavisinin kullanımının yumurtalık kanserini arttıracasını gösteren çalışma mevcut olmakla birlikte bazı çalışmalar da ilintili olmadığını göstermektedir. Folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinik hormon (LH) menopozal dönemde en yüksek seviyededir. Bu gonadotropinlerle birlikte östrojen, progesteron ve androjen gibi diğerk steroidler yumurtalık kanserinde ilgilidir. Gonadotropinler her ovulasyonu başlatır ve menopoz sonrasında da bulunur. Bu hormonlar, ovulasyon benzeri süreci uyarmakla birlikte yüzey epitelyuma sitokinleri ve proteolitik enzimleri eksprese eder. Siklin D1, kalikreinler ve katepsin-D gibi östrojenle ayarlanan proteinler yumurtalık kanserinin çoklu kanserojenik süreçlerinde kullanılmaktadır. Asbestoz ve talk kullanımı, endometriyoz ve pelvik inflamatuvar hastalık da diğerk risk faktörleridir. Bu risk faktörleri doğrudan ovulasyon ile ilgili olmasa da lokal pelvik iltihaplanmaya neden olur. Ovulasyonla ilintili olmayan diğerk faktörler tübel bağlanma ya da rahmin alınmasıdır. Bu faktörlerle ilgili risklerin azaltılması yumurtalıkların çevresel başlatıcılarla iltihaplanmasını azaltır. Proliferasyon (üreme-çoğalma), gonadotropinler tarafından teşvik edilen ya da ovulasyon süresince salınan östrojen tarafından ve olası inflamatuvar yanıt tarafından uyarılır. Artan proliferasyon yanında tahriş ediciler (talk, asbestos), ovulasyon ve inflamasyon DNA hasarına neden olur. Bu nedenle; bir ya da birkaç risk faktörünün kombinasyonu proliferasyonu ve DNA hasarını tetikler ve yumurtalık yüzey epitelinin kanser dönüşümü eğilimine neden olabilir. İnflamatuvar belirteç olan devridaim C-reaktif proteininin (CRP) bayanlarda oldukça yüksek derişimde olması ile yumurtalık kanseri riskinin arttığı gözlenmiştir. Diğerk bilinen risk faktörlerine rağmen hamileliği önleyici hapların kullanımı yumurtalık kanserine karşı korur. Gelişmiş ölkelerde yaşayan bayanlarda, gelişmekte olan ölkelerde yaşayan bayanlara göre yumurtalık kanseri oluşum derecesi daha fazladır. Bu farktaki kesin mekanizma bilinmemekle birlikte çevresel ya da diyet faktörü ile ilintili olabildiği düşünölmektedir. Bunun yanı sıra yumurtalık kanseri Yahudi soyundaki bayanlarda çok yaygındır. Çizelge 1.8’de epitelyal yumurtalık kanseri risk faktörleri özetlenmektedir (Anonim 2012, Toriola 2010, Kabir 2009, Changqing 2008, Chu ve Rubin 2006, Helleman 2006, Gubbles 2010, DeRycke 2010, Horvath 2006).

Çizelge 1.8. Epitelyal yumurtalık kanserinin risk faktörlerin oluşumu

Risk faktörünün tipi	Spesifik risk faktörü
Ailesel eğilim	Kalıtsal göğüs ve yumurtalık kanser sendromu BRCA1, BRCA2 mutasyonu, Lynch sendromu (kalıtsal polipoz olmayan kolorektal kanser sendromu), DNA yanlış eşleşme gen mutasyonunu onarmak
Yaş	> 50 yaş
Demografik	Beyaz ya da Avrupalı soya sahip Endüstriyel ülkelerde oturan (Japonya hariç)
Çoğalma faktörleri	Erken ergenlik, geç menopo, kısırlık, doğum yapmamış olmak (emzirmek ve doğum kontrol hapı koruyucu olarak kullanılır)
Diyet	Yağ oranı yüksek beslenme ve kahve, lif ve vitamin A azlığı
Çevresel maruz kalma	Perineal bölgede pudra kullanımı, asbest, radyasyon, viral enfeksiyon (kızamıkçık, kabakulak)

Tüm yumurtalık kanserleri 1985’de Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu tarafından geliştirilen safha şemasına (FIGO) (Çizelge 1.9) göre sınıflandırılmaktadır. Tümör safhası, yumurtalıklarda tümörün nerede başladığından nereye kadar yayıldığını tanımlar. Histolojik dereceleme de yumurtalık kanseri için önemli prognostik faktördür. 1, 2, 3 dereceleme sırası ile iyi, ılımlı ve zayıf ayrımı gösterir. Derece 1, epitel yumurtalık kanserinde normal yumurtalık dokusuna daha benzerdir. Yumurtalık kanseri bir kez safhalandırıldığında, kanser tekrarlasa ya da vücutta diğer bölümlere metastaz olduğunda dahi sınıflandırma değişmez. Kanser Amerikan Birleşik Kurul tarafından da (AJCC, TNM sistemi) olası prognozu göstermek ve tedavinin tanımlanması için sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir. Prognoz için düşük safha daha avantajlıdır.

Çizelge 1.9. Yumurtalık kanserinin FIGO saflandırma sistemi

Safha		Tanımı
I	I	Tümör yumurtalıklarda sınırlanır (Yumurtalıkların yüzeyinde bulunabilir)
	IA	Tek yumurtalık içerir, tam kapsül, yumurtalık yüzeyinde tümör yok, karın sıvısında kötü huylu hücre yoktur.
	IB	İki yumurtalıkta içerir, tam kapsül, yumurtalık yüzeyinde tümör yok, karın sıvısında kötü huylu hücre yoktur.
	IC	Bir ya da iki yumurtalık içerir, dağılan kapsül ya da yumurtalık yüzeyinde tümör ya da karın sıvısında ya da pelvisteki sıvıda kötü huylu hücre bulunur.
II	II	Pelvik yayılma (bir ya da iki yumurtalıkta, yumurtalık dışında, uterus ya da fallopi tüplerine ve pelvik dokularına yayılma olur)
	IIA	Uterus ve/ya da tüplere pelvik yayılma, karın sıvısında kötü huylu hücre yoktur.
	IIB	Diğer pelvik organlarına pelvik yayılma, karın sıvısında kötü huylu hücre yoktur.
	IIC	Faz IIA ya da IIB tümörünün her biri fakat bir ya da iki yumurtalık yüzeyinde tümör ya da dağılan kapsül ya da yumurtalık yüzeyinde tümör ya da karın sıvısında ya da pelvisteki sıvıda kötü huylu hücre bulunur.
III	III	Pelvis dış tarafında peritoneal metastaz, karınsal organlara yayılma ve/ya da bölgesel lenf nodülleri metastazı
	IIIA	Mikroskobik peritoneal metastaz, nodüller yoktur.
	IIIB	2 cm'i aşmayan mikroskobik peritoneal metastaz, nodüller yoktur.
	IIIC	2 cm çapını aşan mikroskobik peritoneal metastaz, bölgesel lenf nodülleri pozitifdir.
IV	IV	Peritoneal boşluğunun ötesinde uzakta metastaz; karınsal boşluğun dışında yayılır; karaciğer, parankimal ya da plevral alanı içerir.

FIGO safhası I'den IIA'ya hastalığın erken evresi olarak görülürken, IIB safhasından IV'e ilerlemiş safha olarak görülür. Teşhiste FIGO safhası en önemli klinik veridir. 5 yıl yaşama oranı erken safhadan geç safhaya doğru azalmaktadır. Yumurtalık kanseri göğüs kanserine göre daha az oranda gözlenmesine rağmen göğüs kanserinde hayatta kalma oranı daha yüksektir. Yumurtalık kanserinde bu oran % 42 iken göğüs kanserinde % 82'dir. Her iki kanser türünde teşhis erken tanı ile iyileştirilebilir. Yumurtalık kanserinde erken teşhis belirti vermeyebilir. I ve II aşamadaki hastalarda 5 yıl yaşama oranı sırası ile % 80 ve % 55'dir. İlerlemiş III ve IV aşamalarda ise bu oran % 12'dir. Hastalığın erken safha semptomlarının olmaması nedeni ile çoğu hastada ilerlemiş safhada teşhis edilir ve 5 yıl yaşama oranı da sadece % 30'dur.

Yumurtalıkların anatomik konumu nedeniyle; yumurtalıklar önemli ölçüde büyüyene kadar ya da metastatik hastalık izlenene kadar çevresel yapı ile yumurtalıklar karışmaz. Bunun yanında hastalığın erken evresinde spesifik semptomların olmaması ve yumurtalık kanserinin anlaşılmasındaki sınırlar erken evrede tayini zorlaştırır. Semptomlar oluştuğunda, bunlar spesifik olmadığından genellikle çoklu araştırma istenir. Hastalarda belirsiz ağrı, abdominal şişkinlik, azalan iştah, devamlı mide bulantısı ya da hazımsızlık, açıklanamayan ishal ya da kabızlık, vajinal kanama ve gastrointestinal rahatsızlıklar gibi şikayetler bulunur. Fiziksel tespitler ise elle muayenede yumurtalık kitlesi olabilirken; bu karın sıvısından dolayı da kaynaklanabilir. Bazen hatalı erken evresinde yumurtalık bükülmesinden pelvik ağrı gözlenir. Bununla birlikte çoğu hastada belirti oluşmaz. Yumurtalık kanseri olan veya yumurtalık kanseri olma riski yüksek kadınlarda, transvajinal ultrasonografi ve kan testlerinin taranması gerçekleştirilir. Yumurtalık kanseri ile ilgili kan testleri arasında CA 125 düzey ölçümü bulunur. Yumurtalık kanseri olan kadınlarda bu proteinin kandaki düzeyi yükselir. Bu test yüksek bulunduğunda, ileri tetkikler yapılarak (görüntüleme yöntemleri), karın boşluğu içinde sıvı tespit edilirse bu sıvıdan örnek alınıp incelenerek veya doğrudan yumurtalıklardan parça örneği alınarak kanserin var olup olmadığı araştırılmalıdır. Ultrasonografi iyi huylu tümörden kötü huylu tümörün ayrımında kullanılabilir. Kötü huylu yumurtalık tümörleri genellikle çoklu bölgede yer alır ve kalın septal katı alanları daha fazladır. Ultrason değerlendirilmesiyle

ascites ve metastaz malignite kolaylıkla belirlenebilir. Erken evre yumurtalık kanserleri ile yumurtalık kistini ayırmak için greyscale ultrason ve renkli Doppler özellikleri kullanılır. Ultrason ve CA 125 derişiminin kombinasyonu ile malignite indeks riskini skorlayan sistemler geliştirilmiştir. Bu metotla yumurtalık kitlesinin kötü huylu olup olmadığı anlaşılır. Transvajinal ultrasonografi ve CA 125 testi kesin güvenilir olmamakla birlikte, ailesinde yumurtalık kanseri olan yüksek riskli kadınlarda yapılması önerilir. Kesin tanı için ise biyopsi olarak isimlendirilen, şüpheli dokudan alınan örneklerin mikroskop altında incelenmesi ile belirlenen patolojik inceleme gereklidir. Bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans, ultrasonografi, renkli dopler akımı gibi görüntüleme yöntemleri kasıklarda bir kitle olup olmadığını saptamada kullanılan radyolojik tetkiklerdir (Anonim 2012, Kabir 2009, Changqing 2008, Chu ve Rubin 2006, Helleman 2006).

Yumurtalık kanseri tedavisi için kanserli dokunun uzaklaştırılmasında ameliyat, kanser hücrelerinin yıkılmasında kemoterapi ve yüksek enerjili radyasyon kullanılır. Tedavinin başarısı faz, hastalığın derecesi, histopatolojik türü, hastanın yaşı ve tüm sağlığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Yumurtalık kanserinin şu anki tedavisi ameliyat ile kemoterapinin birlikte uygulanmasıdır. Hastalığın erken evresindeki bayanlarda doğurganlığın korunması için belirli tümörün uzaklaştırılması gerçekleştirilebilir. Ameliyat sonrasında hastalar platin (karboplatin, cisplatin) ve taxane (paclitaxel) temelli ajanlar içeren kemoterapi alırlar. Çoğunlukla tekrar oluşum CA 125 seviyesi ile takip edilir. (Horvath 2006, DeRycke 2010, Helleman 2006)

1.6.2. Yumurtalık kanseri biyolojik belirteçleri

Yumurtalık kanseri için genetik biyolojik belirteçler; genetik mutasyonlar, heterizigosite kaybı, DNA metillenmesi ve gen ekspresyonlarındaki değişimlerdir. Kanser genetik anormallik olarak sınıflandırılmasına rağmen fonksiyonel olarak proteomik hastalıktır. Genetik mutasyonlar protein sinyal yollarını modifiye edebilir. Böylece inhibitör sinyallerin baskılanmasıyla kanser hücreleri için yaşamsal avantaj sağlar. Proteomik teknoloji ise post-translasyonal modifikasyon ve protein-protein etkileşimi içeren ek kalitatif bilgi sağlar. Kist

sıvısındaki protein belirteçleri calgranulinler, büyüme faktörleri ve sitokinler, çözünebilir hücre-hücre adhezyon molekülleri, gonadotropinler, proteolitik enzimler, doku polipeptit spesifik antijen (TPS) ve kanser antijenleridir. Periferiyal kandaki protein belirteçleri ise; CA 125 ve kanser antijenleri (alfa-fetoprotein, karsinoembriyonik antijen (CEA), CA 19-9, CA-153, CA 72-4 gibi), lizofosfatidik asit (LPA), prostasin, osteopontin, büyüme faktörleri ve sitokinler (vasküler epidermal büyüme faktörü (VEGF), inhibin, TNF- α ve makrofaj koloni uyarıcı faktör (MCSF) gibi diğer epitel yumurtalık kanseri ile ilintili moleküllerdir.

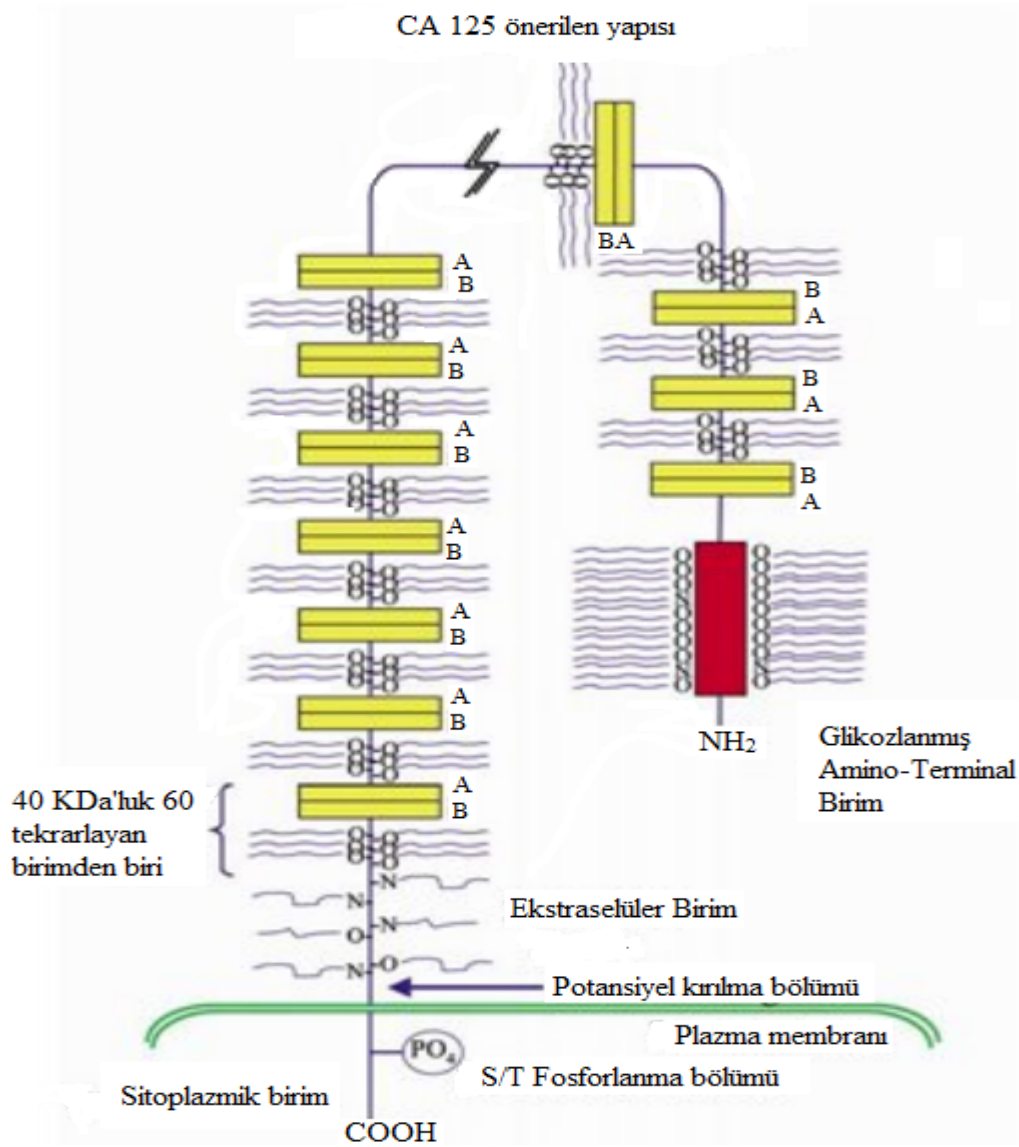
Birçok çalışmada yumurtalık kanserinin belirlenmesi için CA 125 biyolojik belirteci kullanılmakla birlikte Çizelge 1.10'da yumurtalık kanseri için kullanılan biyolojik belirteçler verilmektedir. CA 125 yumurtalık kanseri için bilinen en iyi belirteç olmakla birlikte endometrium kanseri, fallop tüp kanseri, akciğer kanseri, pankreatik kanser, göğüs kanseri ve gastrointestinal sistem gibi başka kanserler de bulunup yumurtalığa spesifik değildir. CA 125 molekülünün yumurtalık kanseri dışında diğer yükselme nedenleri ise menstürasyon, hamilelik, endometriozis, perikardit, pelvis enflamasyonu, pankreatit, kronik karaciğer hastalığı, siroz plevral, peritoneyal ve perikardiyal sıvı birikmesi, akciğer kanseri, pankreas kanseri, mide kanseri ve kolorektal kanseridir. İleri evredeki yumurtalık kanseri hastalarının yaklaşık olarak % 80'inde CA 125 seviyesi önemli ölçüde artarken, birinci fazdaki hastaların % 50'sinde CA 125 seviyesi artar.

Çizelge 1.10. Yumurtalık kanseri belirteçleri

İnhibin	CA 125	CA 195	CA 19-9
CA 54-61	CA72-4	CA 15-3	CA 50
Prostasin	Alfa-I-antitripsin	Hepcidin	BHCG
Cathepsin L	Osteopontin	Ceruloplasmin	CRP
Galaktoziltransferaz	IL-2 reseptör	IL-6	IL-8
IL-10	Kallekrein-6	Kallekrein-10	Lizofosfatidik asit
OVXI	Tetranektin	MCSF	Mezotelin
Transferrin (TFR)	Sialil TN	Transhyretin (TTR)	Apolipoprotein A1
Karsinoembryonik antijen	Matriks metaloproteinaz 2	Çözünabilir Fas ligand	Müsin benzeri karsinoma antijen
Plasental alkaline fosfataz	Yumurtalık serum antijeni	Tümör ile ilgili tripsin inhibitörü	İdrar gonadotropin peptit
Haptogloblin alfa fragmanı	Tümör nekrozis faktör reseptörü	Haptogloblin-β-zinciri	P110 epidermal büyüme faktörü reseptörü
N terminal kesilmiş transhyretin	Sialik asit ile ilgili lipid (lipid-associated sialic acid)	İnter-alfa (globulin) inhibitör H4 (ITIH4)	CTAPIII (connective tissue-activating peptide)

CA 125 yüksek moleküler kütleli (>200 kDa) müsin benzeri bir glikoproteindir ve 1981'de Bast tarafından farelerin OC 125 monoklonal antikorunun kullanılması ile tanımlanmıştır. Hücrelerin yüzeyinde oluşur ve kan dolaşımına karışır. CA 125, rutin olarak monoklonal antikor OC 125 ile belirlenir ve tedaviden sonra hastalığın tekrarlanması izlenir. CA 125 yumurtalık kanserinin teşhisinde ve yönetiminde başlıca 3 role sahiptir. Bunlar; yumurtalık kanseri teşhisi yapılan hastalarda terapötik etkinliğin değerlendirilmesi, ameliyatı takiben tedavinin izlenmesi ve tedavi sonrası gözetim süresince hastalığın tekrar oluşumunun belirlenmesidir. CA 125 testi yumurtalık kanseri erken tanısında önerilen bir testtir. CA 125 epitelyal yumurtalık kanserlerinin % 80-90'ında yüksek oranda saptanır. Evre I olguların sadece % 40-50'sinde yüksektir. Yüksek moleküler kütleli müsinin (MUC16) ardı ardına tekrarlayan bölümünde epitop bulunur. Bu müsin büyük ölçüde yumurtalık tümör hücrelerinde salgılanmakla birlikte biyolojik fonksiyonu büyük ölçüde bilinmemektedir. Müsinler, büyük,

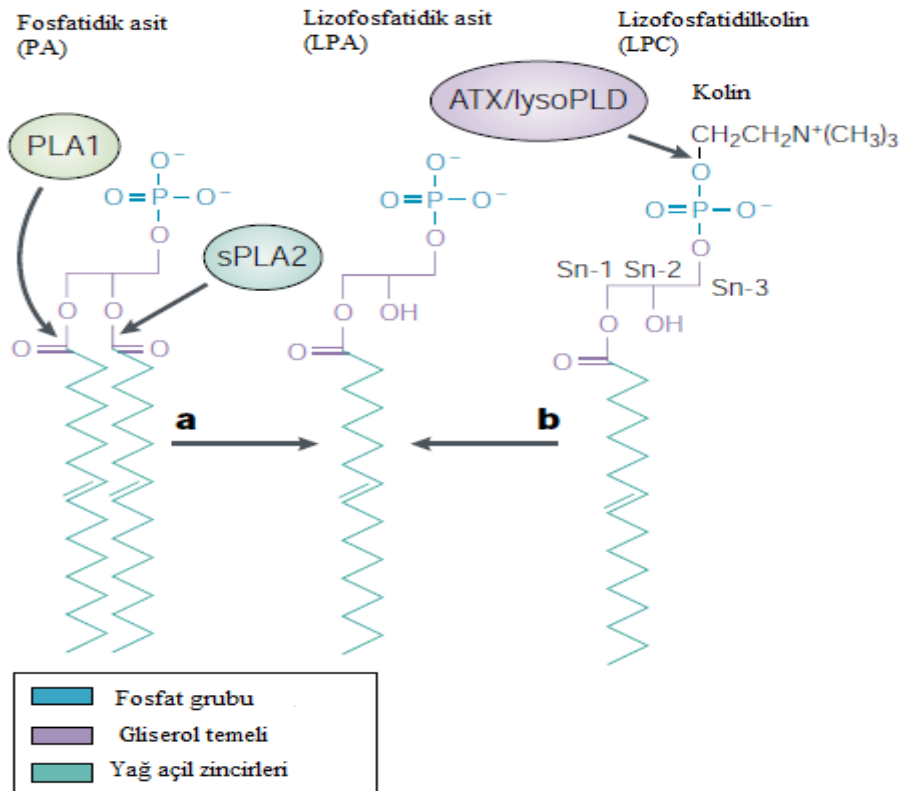
multifonksiyonel glikoproteinlerdir ve sıklıkla büyük sayıda O-bağlı ve N-bağlı oligosakkarit zincirleri eksprese ederler. MUC16'nın salgılanma mekanizması bilinmemekle birlikte proteolitik kırınma takiben sitoplazmik fosforilasyona bağlı olduğu ileri sürülmüştür. MUC16 geni tarafından CA 125 proteini kodlanır ve CA 125 MUC 16 müsin ailesi glikoproteinlerinden biridir. MUC16 genindeki değişim CA 125 proteininde değişimlere neden olur. MUC16 molekülü 3 farklı birim içerir: Amino terminal birim, değişken sayıdaki tekrarlayan birim ve kısa sitoplazmik uçlu transmembran çapayı içeren karboksi terminal birim. **Amino terminal birim**; Serin/treonin yönünden zengindir, oldukça fazla N-glikozlanma ve O-glikozlanma bölümleri bulunur ve CA 125 epitopu yoktur. **Tekrarlayan birim de**; 9-60 kez tekrarlanan ve her bir tekrarlayan domain 156 aminoasitten oluşur. Tekrarlayan birim birçok CA 125 epitopları içerir. Anti-CA 125 antikorları için epitoplar (M11 ve OC 125) bu tekrarlayan birimlerin her birinin içinde yer alır. 156 aminoasidin her biri 19 aminoasitte bir disülfid köprüsü ile bağlanır. **Karboksi terminal birim de** intraselüler sitoplazmik uç ve transmembran bölümünden oluşur. Sitoplazmik uç serin/tirozin fosforlanma bölümü ve potansiyel proteolitik kırınım bölümü içerir. Sitoplazmik zincir ise nispeten kısadır, 256 aminoasitten oluşur ve fosforlanmış bölüme sahiptir. Salgılanmadan önce CA 125 protein omurgasında serin ve treoninin her ikisi fosforilizasyona uğrar. Daha sonra bu molekül defosforilizasyona uğrar. MUC16 SEA (sea urchin, enterokinaz, agrin) modüllerini de içerir. Bu da MUC16'nın diğer müsinlerden ayrılmasını sağlar. Molekül N-bağlı şeker zincirlerini içeren karbonhidratların % 28'ini içerir. Oligosakkarit birimleri galaktoz, N-asetilglikozamin, N-asetilagalaktoz amin, mannoz, sialik asit ve füköz yönünden zengin farklı karbonhidrat birimlerinden oluşur. Şekil 1.23'de MUC16 gen ürününün şematik gösterimi verilmektedir. Serum seviyesi $> 35 \text{ U.mL}^{-1}$ üzerinde olması anormalliği göstermekle birlikte birçok ileri safhadaki yumurtalık kanseri hastalarının serumunda $100-1000 \text{ U.mL}^{-1}$ seviyelerinde bulunur. Peritoneal sıvı değerleri $20000-100000 \text{ U.mL}^{-1}$ aralığındadır.



Şekil 1.23. MUC16 gen ürününün şematik gösterimi (O Brien 2001)

Yumurtalık kanseri biyolojik belirteçlerinden biri olan lizofosfatidik asit (LPA) önemli ekstraselüler biyoaktif lipid ve duyarlı biyolojik belirteçtir. Evre I yumurtalık kanseri olgularında da saptanabildiği için yumurtalık kanserinde yeni bir belirteçtir. Serum tümör belirteçlerinin çoğu protein veya karbonhidrat yapısında olduklarından lizofosfatidik asit gibi lipid belirteçlerin gelecekte önem kazanacağı düşünülmektedir. LPA ve metabolitleri lipid temelli sinyal molekülleridir. Fosfat grubu reseptör aktivasyonu için önemli olurken, lipofilik uç biyolojik aktiviteden sorumludur. Bunun yanında LPA'da bir de bağlayıcı bölüm bulunur (Şekil 1.24). LPA'nın önemli ekstraselüler aktiviteleri G-protein bağlı reseptörlerine bağlanmasıyla düzenlenir. LPA; DNA sentezinde, hücrenin

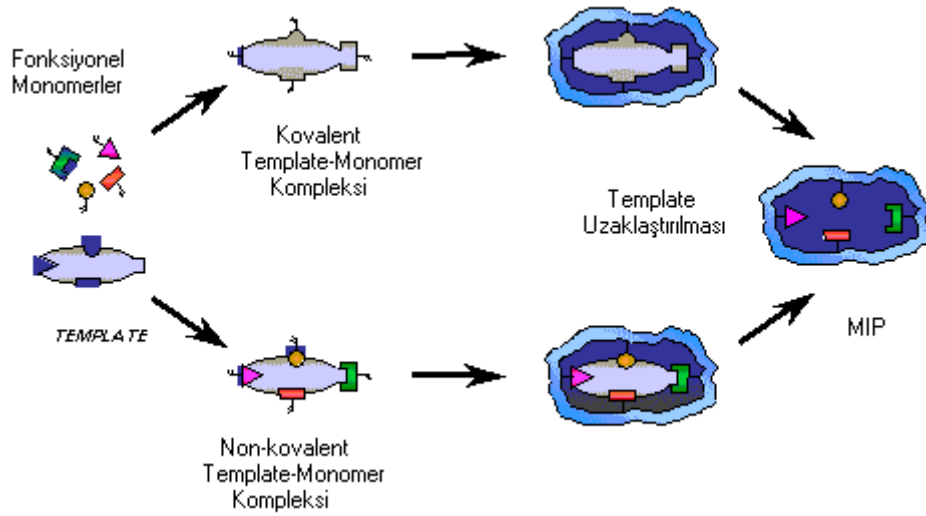
kontROLSÜZ büyümesinin düzenlenmesinde, hücre iskeletinin tekrar organizasyonunda, hücrenin yaşamını sürdürmesinde, ilaç direncinde, hücre adhezyonunda, yer değiştirimde (hücreler arası göç), sitokin üretiminde ve iyon taşınımında rol oynar. Mitojenik ve büyüme faktörüne benzer etkisiyle yumurtalık tümörlerinin büyümesini uyarır. Yumurtalık kanseri hastalarının karın sıvılarında bol miktarda bulunur. Peritoneal boşlukta yumurtalık kanseri hücrelerinin sayısı artar ve yumurtalık kanseri hücreleri mezotel hücreleriyle LPA üretimini uyarır. Yumurtalık kanseri olgularının % 90'nının plazmasında lizofosfatidik asidin yükseldiği saptanmıştır. Aynı çalışmada; hastaların % 59'unda CA 125 pozitif olarak bulunmuştur. Serumda < 100 nM'dan düşük derişimde bulunur, inflamasyon, yara iyileşimi ve tümörleşme durumunda derişimi > 1000 nM artar (Budnik ve Mukhopadhyay 2002, Chun ve ark. 2002, Mills ve Moolenaar 2003, Schot 2010).



Şekil 1.24. LPA molekülü ve metabolik oluşumu a) çözünür fosfolipaz A2 (sPLA2) ile fosfatidik asidin hidrolizi ya da fosfolipaz A1 (PLA1) ile hidroliz b) ATX/lizoPLD ile lizofosfotidil kolinin hidrolizi (kolin hidrofilik grubu serbest kalır, Mills ve Moolenaar 2003)

1.7. Moleküler Baskılama

Moleküler etkileşim kavramı oldukça eski bir kavram olup ilk kez 1894’de Fischer’in enzim-substrat etkileşimini ortaya koyan ünlü “anahtar-kilit” modelini ortaya atmasıyla birlikte konuyla ilgili modern fikirler ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu tanıma göre; enzim molekülünün yüzeyinde substrat molekülünün şeklini tamamlayan ve bu şekle uygun yapılar bulunmaktadır. Böylece substrat bir anahtar gibi enzimin aktif bölgeleriyle etkileşir. Moleküler etkileşim kavramının en yeni ve büyük çapta ilgi gören uygulamalarından biri de moleküler baskılama yöntemidir. Moleküler baskılama yöntemi çok yönlü reseptörleri verimli, hızlı ve ekonomik olarak üretmek için geliştirilmiştir. Moleküler baskılama yöntemi, farklı matrikslerden iyonlar, organik moleküller ve biyomoleküllerin seçiciliği yüksek olarak ayrılması için akıllı polimer elde edilmesi ve bunun farklı uygulamalarda kullanılmasını yaygınlaştıran yeni bir malzeme geliştirme yöntemidir. Bu yöntemde, baskılanmış moleküller veya iyonlar, fonksiyonel ve çapraz bağlayıcı monomerlerin hedef ligand varlığında polimerizasyonu ile polimer yüzeyinde baskılanırlar. Baskılanacak molekül veya iyon bir veya daha fazla fonksiyonel monomer ile kovalent, kovalent olmayan etkileşimler ve metal-şelat etkileşimlerine dayanan ön-kompleks oluşturur ve polimerizasyon işlemi sonunda katı polimer içinde veya yüzeyinde sabitleşir. Baskılanmış iyon veya molekülün yapıdan uzaklaştırılması ile bir çözelti içindeki hedef molekül veya iyonun seçici olarak tekrar polimere bağlanmasını sağlayacak şekilde antijen-antikor etkileşimiyle yarışabilecek seçicilikte yuvalar oluşur. Bu yöntemin temeli Şekil 1.25’de şematize edilmiştir (Büyüktiryaki 2005, Diltemiz Emir 2006).



Şekil 1.25. Kovalent ve non-kovalent moleküler baskılama yönteminin şematik görünümü

Baskılanan molekülün polimerden uzaklaştırılması sonucunda polimerde baskılanan moleküle kimyasal, büyüklük, şekil ve üç boyutlu olarak seçici bellekler elde edilir. Bir karışımda baskılanan molekül polimere seçici olarak tekrar bağlanabilir.

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

- Reseptör ve hedef molekülün fonksiyonel grupları birbirini tamamlayıcı olmalıdır.
- Her iki bileşimlerin konformasyonel serbestliği minimize edilmelidir.
- Kimyasal koşullar uygun bir şekilde ayarlanmalıdır (Büyüktiryaki 2005).

Hedef molekülünün küçük olması halinde reseptörler başarılı bir şekilde sentezlenebilir. Endüstride, reseptörler reaksiyon karışımından hedef molekülleri ekonomik olarak ayırmak için ve atık sudan tehlikeli kimyasalları uzaklaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Ürünlerin ayrılması ve saflaştırılması bunların üretim ücretlerinin toplamının yarısından fazlasına karşılık gelmektedir. Bununla birlikte, endüstriyel ve günlük yaşamımızdaki pratik uygulamalara bakış açısıyla bu reseptörler bazı sakıncalara sahiptir. Bunlar; daha az elde edilebilirlik ve

endüstriyel uygulamalar için daha pahalı olmalarıdır. İkinci olarak, büyük konuk moleküller için reseptörlerin tasarımı tamamen zordur. Üçüncü olarak, kesin moleküler tanımlama için bu sentetik reseptörlerle uygun reaksiyon ortamını sağlamak zordur (Büyüktiryaki 2005).

Moleküler baskılama yöntemi bu problemlere en iyi şekilde cevap verebilir. Hedef molekül varlığında uygun fonksiyonel monomerlerin basitçe polimerleştirilmesiyle, arzu edilen reseptörler ucuz bir şekilde ve fazla miktarda hazırlanabilir. Uygun monomerlerin, çapraz bağlayıcı ajanların birleşmesiyle hedef bağlanma bölgelerindeki kimyasal şartlar kolayca düzenlenebilir. Böylece hedef moleküle uygun reseptör kolayca elde edilebilir. Bu özellikler moleküler baskılama yöntemini en cazip yöntemlerden birisi yapmaktadır. Molekül baskılanmış polimerler biyolojik reseptörlerin en önemli iki özelliğine yani; tanıma yeteneği ve spesifik hedef molekülleri bağlama yeteneğine sahiptirler. Fakat; molekül baskılanmış polimerler biyolojik reseptörlerden şu açılardan farklıdırlar.

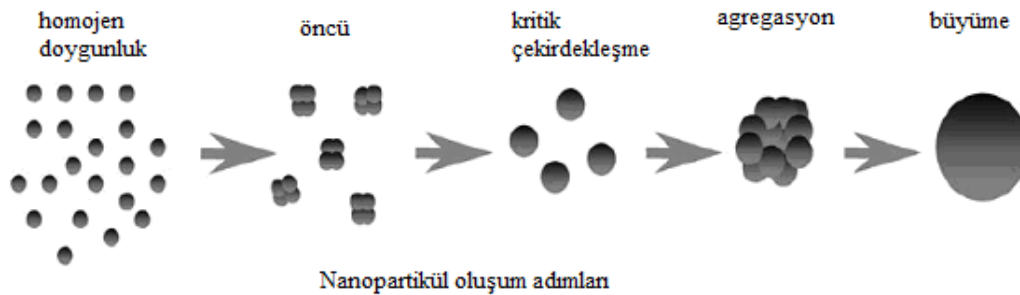
- Molekül baskılanmış polimerler çok büyüktür, katıdır ve çözünmezler.
- Buna karşın bunların doğal karşılıkları daha küçüktür, esnektir ve çoğu durumlarda çözünürdürler.
- Büyüklüklerine bağlı olarak molekül baskılanmış polimerler binlerce veya milyonlarca bağlanma bölgesine sahiptirler.
- Buna karşın biyolojik reseptörler çok az veya sadece bir tane bağlanma bölgesine sahiptirler.
- Buna ek olarak molekül baskılanmış polimerlerdeki bağlama bölgelerinin popülasyonu heterojendir (Diltemiz Emir 2006, Özcan Atılır 2007).

Molekül baskılanmış polimerler katı faz ekstraksiyonu, sıvı kromatografisi, kapiler elektroforez, kapiler elektrokromatografi, kimyasal sensör geliştirilmesi alanlarında kullanılmaktadırlar. Son zamanlarda molekül baskılanmış polimerler kimyasal sensör sistemlerinde molekül tanıma membranı veya tabakası olarak kullanılmaktadırlar.

1.8. Nanopartiküller

Nanoteknoloji, nanometre ölçeğindeki malzemelerin tasarımı, üretimi, montajı, karakterizasyonu ve bu malzemelerden elde edilmiş minyatür fonksiyonel sistemlerin uygulamalarını inceleyen ve hızla gelişen disiplinlerarası araştırma geliştirme faaliyetlerinin tümünü temsil etmektedir. Nanoteknoloji 1-100 nanometre boyutlarındaki maddelerin anlaşılması, kontrol edilmesi ve atomsal seviyede değiştirilip, işlevsel hale getirilmesidir.

Nanopartiküllerin yüksek performansa sahip olması küçük boyutta olmalarının yanında düzenli boyut dağılımı göstermesi ile de ilintilidir. Monodispers nanopartikül üretimi için aşırı doymuş çözeltiden nanokristallerin çekirdeklenmesini yavaş büyüme fazı takip eder (Cui ve ark. 2009). Tüm nanokristaller eş zamanlı olarak çekirdeklenmişse hepsi benzer büyüme hızına sahip olacaklardır ve oluşan nanokristallerin popülasyonu dar büyüklük dağılımı gösterecektir. Nanokristallerin büyüklüğü büyüme fazının süresine bağlı olarak değişir. Çekirdeklenme olayı başladığında büyüme başlar ve derişim çekirdeklenme eşiğinin altına düşer. Çekirdeklenme fazı boyunca çok az büyüme gerçekleşirse büyüklük dağılım oranı az olur ve monodispers nanokristaller elde edilir (Şekil 1.26).



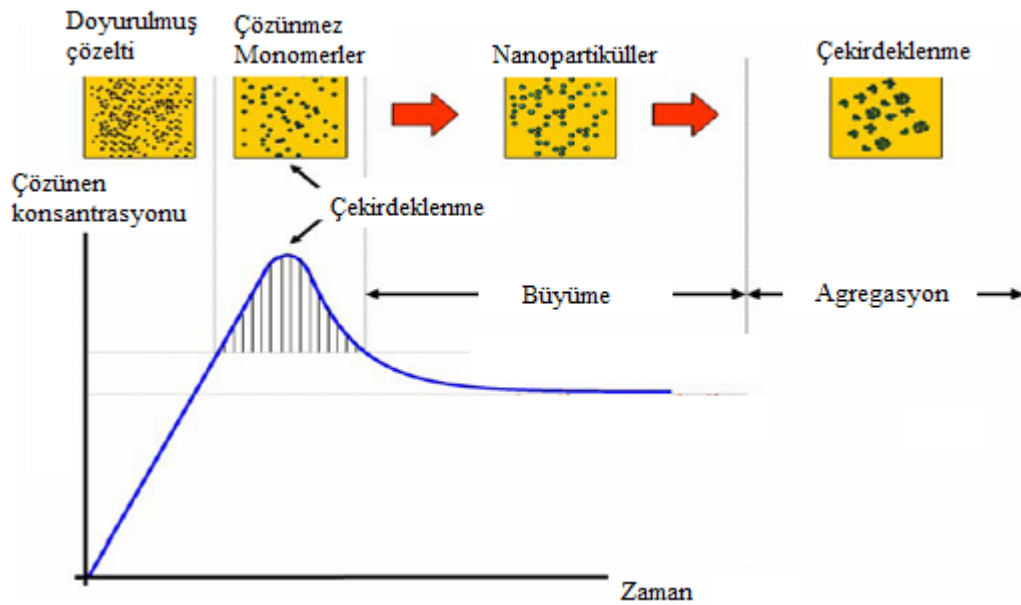
Şekil 1.26. Nanopartikül oluşum aşamaları

Partikül büyüklüğünü etkileyen etmenler; doğal olmayan partiküllerin varlığı (partiküllerin büyümesine neden olur), elektrostatik enerji bariyeri (kolloidal partiküller yüklü olabilir, benzer yüklü partiküllerin birbirini itmesi ile koagülasyon önlenabilir) ve sterik itmedir (surfaktan eklenmesi ile kolloidler

stabilize edilebilir, nanopartiküller için tercih edilen bir yöntemdir ve nanopartiküllerin optoelektronik özelliklerini etkiler). Nanopartikül oluşum dinamiği türlerin çözücünde çözünmesine dayalı olarak çözücünün dielektrik sabitine, sıcaklık ve çözeltilerin derişimine bağıdır. Seyreltik çözeltiler kullanıldığında partiküller arası çarpışma azalacağından aglomerasyon ve çökelme gerçekleşmez (He ve ark. 2007, Park ve ark. 2007).

Nanopartiküllerin büyüklük dağılımını geliştirmek için (Şekil 1.27);

- Hızlı çekirdekleşmeyi yavaş büyüme takip etmelidir,
- Belirli bir reaksiyon ortamı sağlanmalıdır (sıcaklık eğilimi, reaksiyon ortamındaki kimyasal bileşim değişimi ayarlanarak),
- Homojen reaksiyon ortamı elde etmek için reaktiflerin hızlı karıştırılması gerekir,
- Karıştırma reaksiyon süresinden daha kısa zamanda olmalıdır ve
- Reaksiyon şişesinde termal homojenlik sağlanmalıdır.



Sekil 1.27. Zaman ve derişime bağı olarak çekirdekleşme, büyüme ve agregasyon

Son yıllarda nanometre aralığında manyetik nanopartiküllerin hazırlanması için bir kaç metot önerilmiş ve geliştirilmiştir. Manyetik nanopartiküller fiziksel ve kimyasal yöntemlerle hazırlanabilir. Manyetik nanopartiküller lazer buharlaştırma, termal buharlaştırma, ark boşalım ve plazma buharlaştırma gibi kondenzasyon metotların kullanılması ile fiziksel yöntemlerle hazırlanabilir. Burada çeşitli yollarla oluşturulan metal buharlarıyla nanopartiküller hazırlanır. Çözeltilerden kimyasal sentez ise nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal sentez; partikül boyutu, morfoloji, dağılım ve yapının yanısıra manyetik özellikleri açısından da avantajlar sağlar. Nanopartiküller, sulu ya da organik çözeltilerde kararlı kolloidal süspansiyonları olarak hazırlanabilirler. Bu yöntemlerin kullanımıyla Fe_3O_4 (magnetit), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemite), Fe ve Co gibi saf metaller, MgFe_2O_4 , MnFe_2O_4 ve CoFe_2O_4 gibi spinel türü ferromagnet, CoPt_3 ve FePt gibi alaşımlar farklı bileşimler ve fazlardan farklı türdeki manyetik nanopartiküller sentezlenebilmektedir. Manyetik nanopartiküllerin hazırlanması için çöktürme, sol-jel, hidrotermal, mikroemülsiyon ve organik öncülerin termal bozunması gibi bazı kimyasal yaklaşımlar kullanılabilir. Sulu fazda, birlikte çökme süreci ile sentezlenen ve kaplama tabakası ile kaplanan Fe_3O_4 ve Fe_2O_3 nanopartikülleri son zamanlarda klinik araştırmalarda manyetik rezonans görüntüleme (MRI) kontrast ajanları olarak kullanılmaktadır. Bu hidrolitik süreç metal-iyonları çözeltilerinin pH'ının artırılması ile istenen bileşimdeki nanopartiküllerin çökmesi ile sonuçlanan süreçtir. Manyetik nanopartiküllerinin boyut, büyüklük ve bileşimi kullanılan tuzun türü (klorürler, sülfatlar, nitratlar), $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ oranı, reaksiyon sıcaklığı, pH değeri ve ortamın iyonik kuvvetinden çok fazla etkilenir. Co, Zn ve Mn'ı içeren ferrit yapılarındaki diğer manyetik nanopartiküller de bu metot ile hazırlanabilirler. Son zamanlarda, farklı boyutlardaki monodispers manyetik nanopartiküllerin hazırlanmasında polivinil alkol (PVA) ve tetrametilamonyum hidroksit (TMAOH) gibi stabilizasyon ya da indirgeme ajanları olarak organik katkılarının kullanılması önemli gelişme sağlamıştır. Bu metotla, nanometre aralığındaki boyutta fakat büyük boyut dağılımında küresel nanopartiküller elde edilebilir. Bu teknik, tek adımda maliyeti az olarak büyük

miktarda nanopartiküllerin hazırlanmasını sağlar (Fornara 2008, Indira ve Lakshmi 2010, Frey ve ark 2009, Gubin ve ark. 2005).

Manyetik nanopartiküllerin özellikle oksitlerinin hazırlanması için bir diğer yol sol-jel metodudur. Bu metot, saf, stokiometrik ve monodispers oksit nanopartiküllerin sentezi için çözelti kimyasına dayanan bir tekniktir. Metal öncülerinin yavaş hidrolizi ile başlar ve polikondenzasyon reaksiyonları sol adı verilen kolloidal sistemi oluşturur. Bu metotla, sol jel adı verilen sıvı fazı içeren ağın oluşumu sağlanır. 10-100 nanometre aralığında nispeten dar boyut dağılımında ve büyük boyuttaki nanopartiküller elde edilebilir ve sentez düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir (Fornara 2008).

Nanomateriyallerin hazırlanması için üçüncü kimyasal yol hidrotermal metodudur ve yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilir. Esas olarak ferrit nanopartiküllerin sentezi için kullanılmaktadır. Bu strateji, yüksek sıcaklık ve basınçta sulu ya da organik sistemlerdeki sentez süresince oluşan sıvı, katı ve çözelti fazlarının ara yüzeyinde oluşan genel faz transferi ve ayırım mekanizmasına dayanır. Monodispers nanopartiküller hazırlamak için metal tuzları, etilen glikol, sodyum asetat ve polietilen glikol kullanılmasıyla hidrotermal şartlar altında gerçekleştirilir. Tipik olarak reaksiyon karışımı berrak çözelti oluşturmak için karıştırılır, daha sonra Teflon kaplı paslanmaz çelik otoklava koyulur ve 72 saat 200-300 °C kadar yüksek sıcaklıkta tutulur. Boyut, dağılım ve nanopartikülün oluşumunun kontrolü için uygun çözücülerin karışımının seçimiyle, sıcaklık, basınç ve reaksiyon zamanı gibi parametrelerin değiştirilmesiyle elde edilebilir. Bu süreç yüksek basınç ve zaman periyodu için yüksek sıcaklık gerektirir. Bu nedenle verimi yükseltmek kolay değildir (Fornara 2008, Indira ve Lakshmi 2010, Frey ve ark. 2009, Gubin ve ark. 2005, Lu ve ark. 2007).

Nanopartikül hazırlamak için bir diğer yol mikroemülsiyon sisteminde reaksiyonun gerçekleştirilmesidir. Mikroemülsiyon iki karışmayan sıvının termodinamik olarak kararlı izotropik dispersiyonudur. Burada sıvıların her birinin ya da her ikisinin mikrodinamiği surfaktan moleküllerin arayüz filmiyle stabilize edilir. Bağlı derişimlere bağlı olarak, çözücü karışımında surfaktan molekülleri misel, bilayer ya da kesecik gibi farklı yapılara kendiğinden toplanır.

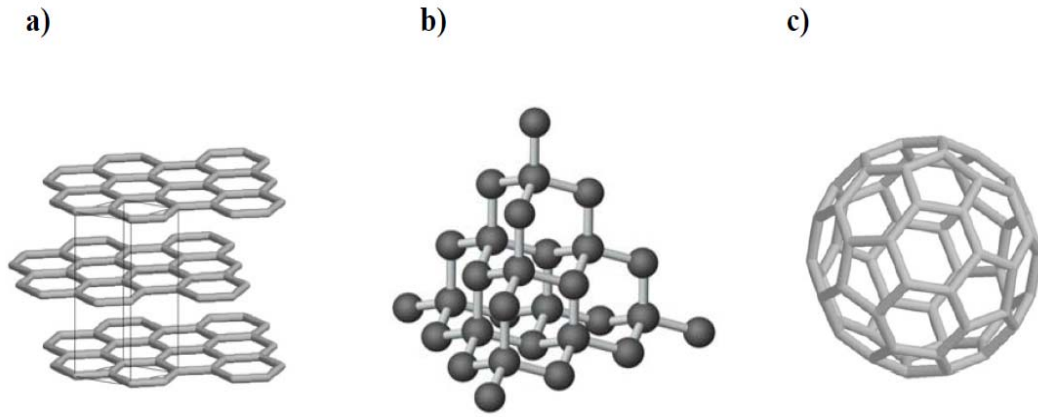
Nanopartikül sentezinde en yaygın olarak ters (yağda su) ya da normal (suda yağ) yapıdaki misellerin her biri kullanılır. Her iki durumda da, dispers faz 2-100 nm boyut aralığındaki monodispers damlalardan oluşur. Dispers faz sentez ve nanopartiküllerin oluşumu için sınırlı çevre sağlar. Mikroemülsiyon tekniğinin kullanılmasıyla metalik Co, Co/Pt alaşımları, altın kaplı Co/Pt nanopartikülleri ve spinel ferritler sentezlenebilmektedir. Nanopartikül sentezinin gerçekleştiği nanoreaktörlere CTAB, SDS ve polietoksilatlar (Tween) gibi bazı surfaktanlar eklenmektedir. Emülsiyon metodunun başlıca avantajı misellerin boyutunun değiştirilmesiyle ve nanoreaktörlerin birbirinden ayrılmasıyla partikül büyümesi sınırlandırılması ve partikül boyutunun kolayca kontrol edilebilmesidir.

Yüksek kalite yarı iletken nanokristaller ve oksitlerin sentezi için kullanılan manyetik nanopartiküller termal bozunma metodu ile de sentezlenebilir. Bu süreç, yüksek sıcaklıklarda sulu olmayan ortamda gerçekleşir. Farklı boyut ve şekildeki farklı manyetik nanopartiküller sentezlenebilir. Küçük boyutlu monodispers manyetik nanokristaller başlıca stabilize edici surfaktanları içeren yüksek kaynama noktalı organik çözücülerde organometalik bileşiklerin termal bozunmasıyla sentezlenebilirler. Organometalik bileşikler olarak metal asetilasetonatlar $[M(acac)_n]$ ($M=Fe, Mn, Co, Ni, Cr, n=2$ ya da 3 , $acac=asetilasetonat$), metal kupferronatlar $[M_xCup_x]$ ($M=$ metal iyonu, $Cup= N$ -nitrozfenilhidroksilamin, $C_6H_5N(NO)O^-$) ya da karboniller kullanılabilir. Yağ asitleri, oleik asit, olilamin ve hegzadesilamin yaygın olarak kullanılan surfaktanlardır. Organometalik bileşikler, surfaktan ve çözücüyü içeren başlama reaktiflerinin oranları bu metotla hazırlanan manyetik nanopartiküllerin morfolojisini ve büyüklüğünü kontrol için nihai parametredir. Reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon zamanı, bunun yanında olgunlaşma periyodu boyut ve morfolojinin kesin kontrolü için daha önemlidir (Fornara 2008).

Manyetik naopartiküller, yüksek yüzey/hacim oranına sahip olduklarından yüksek yüzey enerjilerine sahiptirler. Bu nedenle, yüzey enerjilerini azaltmak için agrege olma eğilimindedirler. Manyetik nanopartiküller, havaya maruz kaldığında kolaylıkla okside olur. Bu da manyetik ve dispers olma özelliklerinin kaybolmasına neden olur. Manyetik nanopartiküllerin kararlılığını sağlamak ve devam ettirmek için uygun yüzey kaplama işlemi

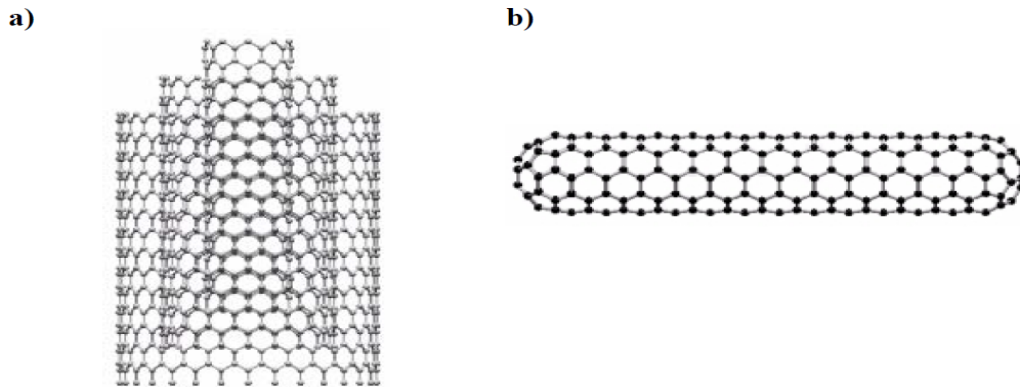
gerçekleştirilmelidir. Küçük organik moleküller, surfaktanlar, polimerler ve biyomoleküller gibi organik moleküllerle ya da silika, metal ya da metal oksit (ya da metal sülfür) gibi inorganik tabaka ile kaplanabilirler. Fonksiyonel moleküller, partiküller veya polimerlerle nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmesi ile çözeltide nanopartiküller stabilize edilir. Daha sonraki uygulamalar için yüzeyde fonksiyonel gruplar sağlanır (Dios ve Diaz-Garcia 2010, Varanda ve ark. 2011).

Bu tez çalışmasında kullanılan bir diğer nanopartikül karbonun allotroplarından biri olan CNT'tür. Karbon, yapabildiği bileşiklerin sayısı ve çeşitliliği yönünden, diğer elementlerden farklı ve özgün bir yapıdadır. Grafit, elmas ve fulleren karbonun allotroplarındır. Bir grafit katmanında her bir karbon atomu diğer 3 karbon atomuna sp^2 hibritleşmesi ile bağlanır. Grafit tabakaları da iki boyutlu düzlemde birbirlerine bağlanır. Çok kararlı, güçlü ve esnek bir yapıda olan her bir grafit katmanı kendi başına da kararlılığını koruyabildiğinden, komşu katmanlara çok zayıf bağlarla bağlanır. Bu nedenle tabakalar birbiri üzerinde kolayca kayabilirler ve grafitin iyi bir yağlayıcı olma özelliği buradan kaynaklanmaktadır. Elmasta ise bir karbon atomu diğer 4 karbon atomuna sp^3 hibritleşmesi yaparak bağlanır. Karbon atomları arasındaki bu bağların çok kuvvetli olması nedeniyle elmas çok sert ve kararlı bir yapıya sahiptir ve ısı iletkenliği çok yüksektir. Son yıllarda gerçekleşen gelişmelerle karbonun önemi daha da artmıştır. Bu gelişmelerin en önemlisi 1985 yılında Kroto ve arkadaşları tarafından 60 karbon atomunun simetrik biçimde sıralanmasıyla elde edilen futbol topu şeklindeki “buckminster fullerene” molekülünün keşfidir (Şekil 1.28). 1 nm büyüklüğündeki bu moleküller çelikten daha güçlü, plastikten daha hafiftir ve ısı ve elektriği iletirler (Bozkaya 2008).



Şekil 1.28. Karbonun allotropları a) grafit, b) elmas, c) fulleren

Diğer bir önemli gelişme de 1991 yılında Japon bilim adamı Sumio Iijima tarafından fulleren molekülünün esnetilmiş bir şekli olan ve fullerenlerden daha üstün özellikler gösteren çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWNT) keşfedilmesidir (Şekil 1.29 a). Tek duvarlı nanotüpler (SWNT) ise 1993 yılında üretilmiştir (Şekil 1.29 b). SWNT'lerin çapları 1-5 nm arasında değişirken, MWNT'lerin dış çapları genellikle $\geq 30-40$ nm ve duvarlar arasındaki mesafe de 0,34 nm'dir (Bozkaya 2008).



Şekil 1.29. a) Çok duvarlı nanotüp (MWNT), b) Tek duvarlı nanotüp (SWNT)

Karbon nanotüp (CNT), grafitin bal peteğini andıran atom düzleminin bir silindir üzerine hiçbir kusur oluşturmada kesiksiz olarak sarılmış bir şekli olarak düşünülebilir. Nanotüpler bilinen en güçlü fiberlerdir. Tek bir nanotüp, birim alanda taşıyabildiği yük göz önüne alındığında, çelikten kat kat daha güçlüdür.

Karbon nanotüpler genellikle ark boşaltma, lazer aşındırma ve kimyasal buhar çökeltme yöntemleri ile sentezlenebilir.

Son zamanlarda CNT, MALDI analizinde matriks olarak kullanılmaktadır (Ren ve Guo 2005, Chen ve ark. 2004). CNT, lazer ışığı altında analite enerji transfer eder; böylelikle analit kolayca desorbe olur ve iyonlaşır. Ayrıca; matriks iyonlarının girişi ve analitin parçalanmasının giderilmesiyle iyi bir duyarlılık ve tekrarlanabilirlik elde edilir. Çalışmanın biyolojik belirteç belirlenmesi kısmında CNT katı destek olarak kullanılmıştır. CNT'ün yanı sıra MALDI çalışmalarında Au, Si, Ag, QD (kuantum noktaları) gibi nanopartiküller de kullanılmaktadır (Pan ve ark. 2005, Bailes ve ark. 2009, Taira ve ark. 2008, Jagtap ve Ambre 2005).

MIP ve nanopartiküllerin kombinasyonu ile moleküllerin seçici tanımlanmasına yönelik çalışmalar son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Diltemiz ve ark. 2008; Lin ve ark. 2004; Cai ve ark. 2010, Kan ve ark. 2009). Ansell ve Mosbach (1998) molekül baskılanmış polimer-magnetik demir oksit kompozit materyalinin kullanımı ile (S)-propranol ligandının bağlanma analizini gerçekleştirmişlerdir. Ji ve arkadaşları (2009) hedef molekül olarak bisfenol A (BPA), fonksiyonel monomer olarak vinilpridin (VP) ve çapraz bağlayıcı olarak etilenglikol metakrilat (EDMA) kullanarak miniemülsiyon polimerizasyonu sonucunda manyetik molekül baskılanmış polimer sentezlemişlerdir. Daha sonra, hazırlanan malzemeye çevresel sudan ve süt örneğinden BPA'nın ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Su örneği için BPA'nın tayin limiti 14 ngL^{-1} olarak bulunurken, süt örneğinde $0.16 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Lin ve arkadaşları (2004) CdSe/ZnS çekirdek kabuk nanopartiküllerini türevlendirerek metakrilik asit (MAA), 4-vinilpridin (VP) ve EDMA kullanarak molekül baskılanmış polimer hazırlamışlar ve urasil ve kafein moleküllerin bağlanmasını çalışmışlardır. Cai ve arkadaşlarının çalışmasında (2010) CNT kullanarak elektropolimerizasyon ile molekül baskılanmış polimer hazırlamışlar ve insan ferritin ve papillomavirus türevlendirilmiş E7 proteinleri için spesifik sensör hazırlamışlardır. Kan ve arkadaşlarının çalışmasında ise (2009) Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeyinde aspirin hedef molekülünü kullanarak MAA, trimetilpropan trimetakrilatın (TRIM) kopolimerizasyonu ile molekül baskılanmış

polimer hazırlamışlar, hazırlanan baskılanmış nanopartikülün aspirine seçiciliği ve aspirinin kontrollü salınımı çalışılmıştır.

Proteomik çalışmalarında nanoteknoloji uygulaması için iki yaklaşım bulunmaktadır. İlk yaklaşımda proteinlerin ayrımı için nanosistemlerin hazırlanmasıdır. Burada amaç bu proteinlerin belirlenmesi ve tanımlanmasıdır. Nanoelektroforetik sistemler, LC için nanokolonlar ve manyetik kürecikler gibi sistemler bağlanan materyalin geri kazanımını ve saflaştırılmasını kolaylaştırır. Kompleks karışımlardan proteinler eş zamanlı deriştirilir ve ayrılır. İkinci yaklaşım ise bireysel molekülleri ve bunların komplekslerini sayan moleküler dedektörlerin uygulamasıdır. Bunlar taramalı atomik mikroskopi, optik mikroskoplar ve kroyokütle dedektörleridir. Elektroforetik ve kromatografik ayırım prosedürlerinde nanoteknolojinin uygulanması sonucunda nanohacimler ya da nanoakış hızının kullanılması ile örnekten daha az miktar kullanımı mümkündür. Analiz daha kısa sürede gerçekleşir. Nanokromatografik kolonlarının MS'in nanoelektrosprey iyon kaynağı ile kombinasyonu sonucunda kullanımıyla nano miktardaki proteinlerin belirlenmesi mümkündür. Çözücü akış hızı olarak dakikada birkaç nanolitre kullanılması çözücü kullanımını azaltır ve duyarlılıkta 100 kat artışa neden olmaktadır (Ivanov ve ark. 2006, Johnson ve ark. 2008).

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Sunulan çalışma kapsamında yapılan deneysel çalışmaları aşağıdaki başlıklar altında toplamak mümkündür:

1. Metakriloamidotriptofan (MATrp), foto duyarlı aminoasit monomeri [Bis(2-2'-bipiridil)bis(MATrp)-Rutenyum(II); (MATrp)₂-Ru-(bpy)₂], foto duyarlı şelat dop edilen silika nanopartikülü ve süperparamanyetik silika nanopartikülün sentezi ve karakterizasyonu,
2. Albumin ve immunoglobulin G (IgG) uzaklaştırılması için Cibacron Blue F3GA (CB), Protein A ve hem CB hem de Protein A bağlı Fe₂O₃ nanopartiküllerin hazırlanması ve karakterizasyonu,
3. Hazırlanan her üç katı faz sistemi ile sulu çözeltiden ve kan serumundan albumin ve IgG uzaklaştırılması,
4. Ticari uzaklaştırma sistemi ile kan serumundan albumin ve IgG uzaklaştırılması,
5. (MAAP)₂-Tb(III) ve (MAAP)₂-Eu(III) metal-şelat monomerlerinin hazırlanması, CNT ve Fe₂O₃ nanopartiküllerinin fonksiyonellendirilmesi ve karakterizasyonu,
6. Hazırlanan katı destekler kullanılarak fosfoerin ve lizofosfatidik asit baskılama,
7. Hazırlanan katı desteklerin (nanosensör) kullanılmasıyla CA 125 ve LPA tayin limitlerinin belirlenmesi.

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Azobisisobutyronitril (AIBN), etilenglikoldimetakrilat (EDMA), europiyum nitrat pentahidrat (Eu(NO₃)₃.5H₂O), fosfoerin (PS), Cibacron blue F3GA (CB), protein A, immunoglobulin G (IgG), trimetoksisililpropil metakrilat (TMSPM), α -siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) ve sinapinik asit (SA) Fluka AG (Buchs, Switzerland) firmasından alınmıştır. EDMA hidrokinonin inhibitörü

ile vakum altında distile edilerek kullanılmadan önce 4 °C'da saklanmıştır. Yumurtalık tümör antijeni (kanser antijen 125; CA 125), oleoil-L- α -lizofosfatidik asit sodyum tuzu (LPA), Triton X-100, serum albumin, Tb(NO₃)₃.5H₂O ve tetraetilortosilikat (TEOS) Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA) firmasından alınmıştır. Diğer bütün kimyasallar ve biyokimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

Deneylerde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP[®] ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure[®] organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi ve Human UP 900 kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm.cm⁻¹'dir.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

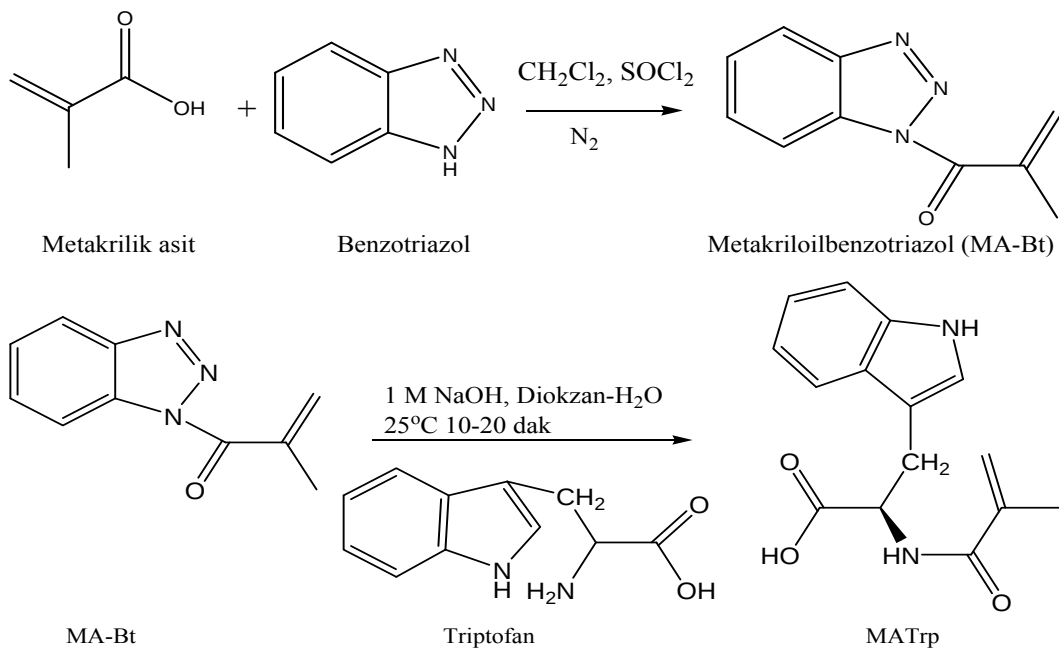
FT-IR spektrumları Perkin Elmer Spectrum 100 ve 2000 FT-IR Spectrometre cihazları ile alınmıştır. pH ölçümleri WTW Series InoLab pH730 model pH metre ile yapılmıştır. ¹H ve ¹³C NMR spektrumları Bruker 500 MHz NMR cihazıyla, Geçirimli Emisyon Mikroskobu (TEM) görüntüleri FEI-Tecnai G² Sprit mikroskobu ile (20-120 kV) ve metal-şelat monomerlerinin karakterizasyonu için MALDI-TOF-MS spektrumları Applied Biosystems Voyager STR ile elde edilmiştir. Kesikli sistemde albumin ve immunoglobulin G adsorpsiyon ve desorpsiyon işlemleri Shimadzu 2401 PC UV-Görünür Bölge Taramalı Spektrofotometresi ile elde edilmiştir. PS ve LPA baskılı CNT nanopartiküllerin uyarılma ve emisyon dalgaboyları arasındaki ayırım için floresans ölçümleri Varian Cary Eclipse marka spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AFM görüntüleri standart silikon uçlu (kuvvet sabiti ~40 Nm⁻¹, rezonans frekansı ~ 137 kHz) Q-Scope 250 (Quesant) cihazı ile 4 Hz tarama hızında temassız durumda (non-contact moda) alınmıştır. Zeta boyutu ve boyut dağılımı ölçümleri ZEN 3600 Model Zetasizer Nano-ZS (Malvern Inst. Ltd., UK) zetametre cihazı ile yapılmıştır. Optik aygıt 5 mW'luk He-Ne (638 nm) lazer içermektedir. Manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu Varian E-Line 9 spektrometresi ile alınmıştır.

2.2. Fotoduyarlı Şelat Dop Edilen Silika Nanopartikülü ve Süperparamanyetik Silika Nanopartikülün Hazırlanması

Metakriloamidotriptofan (MATrp) monomeri sentezlenmesi sonrasında fotoduyarlı aminoasit monomeri sentezlenmiştir. Fotoduyarlı aminoasit monomeri; fotoduyarlı şelat dop edilen silika nanopartikülü ve süperparamanyetik silika nanopartikülün sentezinde kullanılmıştır. Fotoduyarlı aminoasit monomeri daha sonra 2.3.2 bölümünde verilen trimetoksi silyil propil metakrilat (TMSPM) ile fonksiyonellendirilen Fe_2O_3 nanopartikülüne Protein A ve Cibacron Blue F3GA bağlanması amacıyla kullanılmıştır. Monomerlerin, fotoduyarlı şelat dop edilen silika nanopartikülü ve süperparamanyetik silika nanopartikülün sentezi aşağıdaki bölümlerde verilmektedir.

2.2.1. Metakriloamidotriptofan (MATrp) monomerinin sentezi

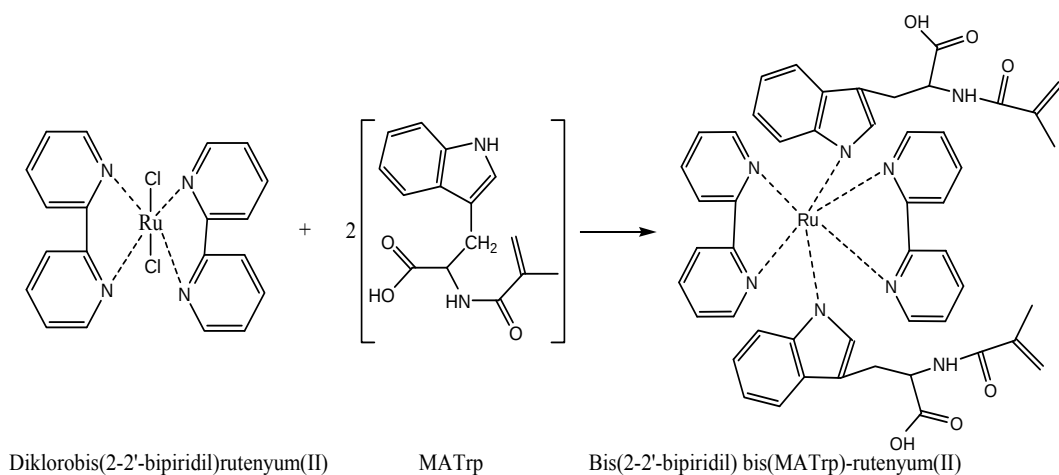
2-Metakriloamidotriptofan monomerinin sentezi için uygulanan yöntemde; triptofan (1 eq) aminoasidi 1 M NaOH çözeltisi ile çözülmüştür. Metakriloilbenzotriazol (MA-Bt) (1 eq) 25 mL 1,4-diokzanda çözüldükten sonra yavaşça aminoasit çözeltisine eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 10-20 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyonun tamamlandığı TLC ile gözlenmiştir ve reaksiyon tamamlandıktan sonra 1,4-diokzan vakum altında buharlaştırılmıştır. Arta kalan tortu su ile seyreltildikten sonra 1H-benzotriazolü uzaklaştırmak için etil asetat (3x 50 mL) ile ekstrakte edilmiştir. Toplanan su fazı % 10'luk HCl çözeltisinin kullanılması ile pH=6-7'ye nötralize edilmiştir (metakroil grubunun asidik ortamda olası polimerizasyonunu engellemek için pH 6-7 civarında tutulmalıdır). Su döner buharlaştırıcıda buharlaştırıldıktan sonra MATrp monomeri (Şekil 2.1) % 85 verimle elde edilmiştir (Hür ve ark. 2007, Say 2009).



Şekil 2.1. Metakriloamidotriptofan (MATrp) monomerinin sentezi

2.2.2. Bis(2-2'-bipiridil)bis(MATrp)-Rutenyum(II) sentezi

$\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2$ (1eq) suda çözülmüş ve çözelti 0°C 'ye soğutularak trietil amin (NEt_3) eklenmiştir. Hazırlanan bu çözeltiye MATrp (2 eq) sulu çözeltisi damla damla eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra karışım 80°C 'de 24 saat reflüks edilmiştir. Oluşan kahve renkli kompleks (Şekil 2.2) süzülüş, eterle yıkanmış ve vakumda kurutulmuştur (Say 2009).



Şekil 2.2. Bis(2-2'-bipyridyl) bis(MATrp)-rutenyum(II) foto duyarlı şelatın sentezi

2.2.3. Fotoduyarlı şelat dop edilen silika nanopartikülün sentezi ve yüzey modifikasyonu

W/O mikroemülsiyonu, 1.77 mL Triton X-100, 7.5 mL siklohekzan, 1.8 mL n-hekzanol ve 340 µL deiyonize su eklenmesi ile hazırlanmıştır. Foto duyarlı şelat çözeltisinden ((MATrp)₂-Ru-(bpy)₂) 1 mL alınarak 17.7 mL deiyonize su eklenmesiyle W/O oranı 10 olacak şekilde ayarlanmıştır (Santra ve ark. 2001). Daha sonra 100 µL tetraetilortosilikat (TEOS) ile 60 µL NH₃ eklenerek polimerizasyon reaksiyonu 24 saatte gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra 50 mL aseton ilave edilerek nanopartiküller ayrılmış, daha sonra santrifüjleme yapılarak nanopartiküllerin etanol ve deiyonize su ile yıkanmasıyla surfaktan molekülleri uzaklaştırılmıştır.

Nanopartiküller 5 mL aseton ile dispers edilerek alındıktan sonra 0.5 mL 3-(trimetoksi sillil) propil metakrilat (TMSPM) eklenmiş ve 24 saat karıştırılmıştır. TMSPM eklenmesiyle yüzeyde sillilleme gerçekleştirilerek monomerin bağlanabileceği metakrilat grubu oluşturulmuştur. Daha sonra nanopartiküller santrifüjlenerek 5 mL aseton ile dispers edilmiştir.

2.2.4. Foto duyarlı şelat dop edilen süperparamanyetik silika nanopartiküllerin sentezi

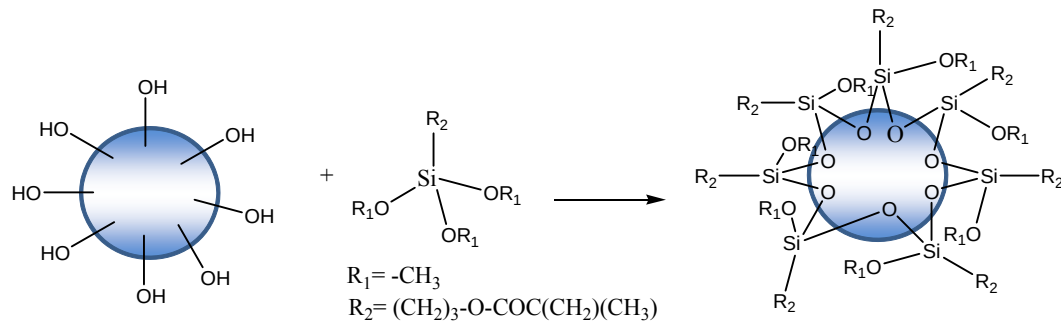
0.2 mL manyetik demir oksit nanopartikülleri 5 mL aseton ile birkaç kez yıkanmıştır ve daha sonra demir oksit nanopartikülleri toluen içerisinde dispers edilmiştir. Toluene süspansiyonuna 40 mL izopropanol, 7 mL deiyonize su ve 1 mL NH₃ içeren çözelti eklenerek N₂ atmosferinde 10 dakika ve daha sonra foto duyarlı şelat çözeltisi eklenerek 1 saat karıştırılmıştır. 0.125 mL TEOS eklenip 1 dakika daha karıştırılmış ve 12 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Manyetik silika nanopartikülleri santrifüj edilerek etanolle yıkanmıştır (Zou ve ark. 2008).

2.3. Albumin ve IgG Uzaklaştırma Sistemlerinin Hazırlanması

Albumin ve IgG uzaklaştırılması için Cibacron Blue F3GA (CB), Protein A (Pro A) ve hem CB hem de Pro A bağlı Fe_2O_3 nanopartikülleri (CB SPN, Pro A SPN ve Pro A/CB SPN) olmak üzere üç farklı katı faz desteği hazırlanmıştır.

2.3.1. Fe_2O_3 nanopartiküllerinin fonksiyonellendirilmesi

0.6 g Fe_2O_3 nanopartiküllerine 3 mL TMSPM ve 15 mL toluen eklenip 1 gün boyunca karıştırılmasıyla Fe_2O_3 nanopartiküllerinin yüzeyi modifiye edilmiştir (Keçili ve ark. 2011). Fe_2O_3 nanopartiküllerine bağlanmadan kalan TMSPM toluen ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. TMSPM ile fonksiyonellendirilen Fe_2O_3 nanopartiküllerin yapısı Şekil 2.3'de görülmektedir. Daha sonra Fe_2O_3 nanopartikülleri 2 mgmL^{-1} derişimindeki $(\text{MATrp})_2\text{-Ru-(bpy)}_2$ fotoduyarlı şelat ile 4 saat etkileştirilmiştir. Fe_2O_3 nanopartikülüne bağlanmadan kalan fotoduyarlı şelat uzaklaştırıldıktan sonra, bu nanopartiküller üçe ayrılarak albumin ve IgG ayırımı gerçekleştirmek amacıyla nanopartiküllere Pro A ve CB bağlanmıştır.



Şekil 2.3. Manyetik nanopartikülün TMSPM ile fonksiyonellendirilmesi

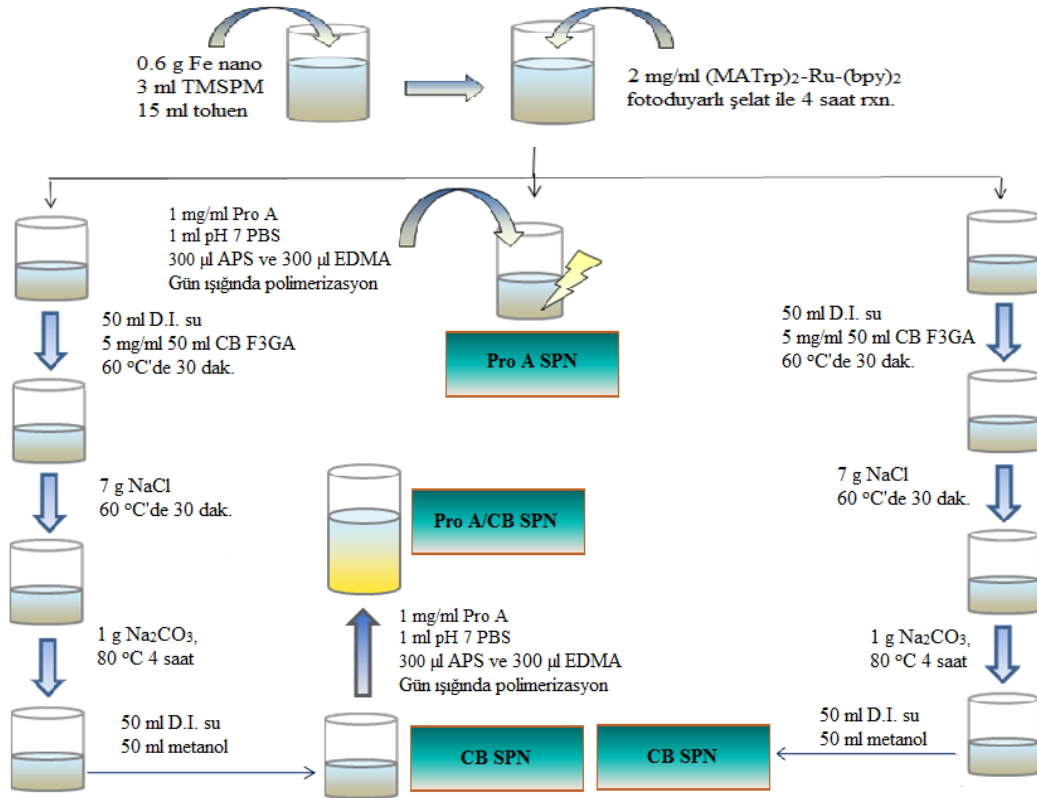
2.3.2. Protein A (Pro A), Cibacron Blue F3GA (CB) ve Pro A/CB bağlanmış Fe_2O_3 nanopartiküllerin hazırlanması

Pro A bağlı Fe_2O_3 nanopartikülü (Pro A SPN) IgG ayırımında kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bunun için yüzeyi modifiye edilen 0.2 g Fe_2O_3 nanopartikülü önce pH 7 PBS tamponunda hazırlanan 1 mgmL^{-1} derişimindeki

Pro A çözeltisi ile 30 dakika etkileştirilmiştir. Daha sonra 300 µL APS ve 300 µL EDMA eklenmiş ve gün ışığında polimerizasyonun gerçekleştirilmesiyle çapraz bağlı Pro A SPN hazırlanmıştır (Şekil 2.4).

Albumin ayırımında kullanılmak üzere CB bağlı Fe₂O₃ nanopartikülü (CB SPN) ise aşağıdaki gibi hazırlanmıştır. Yüzeyi modifiye edilen 0.4 g Fe₂O₃ nanopartikülü 50 mL deiyonize su ve 5 mg mL⁻¹ derişiminde CB eklenerek 60 °C’de 30 dakika ısıtılmıştır. Daha sonra nanopartiküllerin yüzeyine boyanın bağlanmasını sağlamak için 7 g NaCl eklenmiş ve 30 dakika aynı sıcaklıkta ısıtılmıştır. Son aşamada; boya ile nanopartikül arasındaki reaksiyonu hızlandırmak için 1 g Na₂CO₃ eklenmiş ve sıcaklık 80 °C’ye yükseltilerek 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra spesifik olmayan bağlanmayla bağlanan boya moleküllerinin uzaklaştırılması için CB SPN, metanol ve deiyonize su ile yıkanmıştır (Kassab ve ark. 2000, Uzun ve Denizli 2002, Yavuz ve ark. 2003). CB SPN mikrobiyal kirlenmeyi önlemek amacıyla % 0.02 sodyum azitte toplanarak 4 °C’de saklanmıştır. Bağlanan CB miktarı 630 nm’de UV absorbansındaki azalma ile ölçülmüştür. Kullanılan adsorpsiyon/desorpsiyon ortamında CB bağlı Fe₂O₃ nanopartiküllerinden CB sızması 630 nm’de spektrofotometrik olarak kontrol edilmiştir.

Elde edilen CB SPN ikiye ayrılarak birincisi, sadece albumin adsorpsiyonunda, diğeri ise hem albumin hem de IgG adsorpsiyonunda kullanılmak üzere Pro A SPN sentezinde de gerçekleştirildiği gibi Pro A ile bağlanmıştır. 0.2 g CB SPN’ye 1 mgmL⁻¹ derişimindeki Pro A çözeltisi, 300 µL APS ve 300 µL EDMA eklenerek gün ışığında polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.4’de albumin ve IgG uzaklaştırmak amacıyla kullanılan nanopartiküllerin hazırlanmaları şematize edilmiştir. Nanopartiküllere bağlanan Pro A miktarı 730 nm’deki UV absorbansındaki azalma ile belirlenmiştir.



Şekil 2.4. Albumin ve IgG uzaklaştırmak amacıyla kullanılan nanopartiküllerin hazırlanmaları

2.3.3. Fe₂O₃ nanopartikülü ve hazırlanan katı desteklerin karakterizasyonu

Fe₂O₃ nanopartikülünün fonksiyonellendirilip fonksiyonellendirilmediği hakkında bilgi edinmek için TMSPM ile fonksiyonellendirilen nanopartikülün FT-IR spektumu alınmış ve Fe₂O₃ nanopartikülünün FT-IR spektrumu ile kıyaslanmıştır. Her iki nanopartikülün FT-IR karakterizasyonu 4000-450 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında Perkin Elmer 100 FT-IR spektrometresinin kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Kuru nanopartiküller (1 mg), KBr (0.1 g) ile iyice karıştırıldıktan sonra preslenerek tablet hale getirilmiş ve spektrumlar kaydedilmiştir.

Yüzey alanının belirlenmesine aşağıdaki denklem (3.1) kullanılmıştır.

$$N=6 \times 10^{10} S / \pi p_s d^3 \quad (2.1)$$

Burada N ml başına nanopartikül sayısı, S katının %'si, ρ_s nanopartiküllerin yoğunluğu (gml^{-1}) ve d nanopartiküllerin çapıdır (nm). N ml süspansiyondaki nanopartiküllerin sayısı nanopartiküllerin kütle-hacim grafiğinin kullanılması ile belirlenir. Bu verilerden nanopartiküllerin spesifik yüzey alanı; N ile bir nanopartikülün yüzey alanının çarpılması ile hesaplanır (Öztürk ve ark. 2008).

Fe_2O_3 nanopartikülünün şekil ve boyutu AFM cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Deiyonize suda dispers edilen Fe_2O_3 nanopartikülleri lam yüzeyine damlatılmış ve lam yüzeyi kuruduktan sonra AFM cihazı ile temassız (non-contact) modda 4 Hz tarama hızında görüntülenmiştir.

Fe_2O_3 nanopartikülünün, TMSPM ile fonksiyonellendirilen Fe_2O_3 nanopartikülünün, CB SPN, Pro A SPN ve ProA/CB SPN'nin şekil ve boyutları TEM cihazı ile ölçülmüştür. TEM görüntülerinin alınması için nanopartiküller deiyonize suda dispers edildikten sonra 30 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur. Nanopartiküller karbon kaplı bakır gridlere damlatılmış ve gridler kuruduktan sonra FEI-TecnaTM G² Sprit marka TEM cihazında görüntülenmiştir. CB SPN, Pro A SPN ve ProA/CB SPN'nin boyutları Zetasizer cihazı ile de ölçülmüştür. Zeta boyut analizi için de CB SPN, Pro A SPN ve ProA/CB SPN nanopartikülleri deiyonize suda dispers edilmiş ve 30 dakika ultrasonik cihazında bekletilmiştir. Nanopartiküllerin boyutları 30 ölçümün ortalamasıdır ve boyut dağılımı tekrarlayan ölçümlerin donanım tarafından otomatik olarak kaydedilmesiyle belirlenmiştir.

ProA/CB SPN ve Fe_2O_3 nanopartikülünün manyetik özelliği ESR spektrumlarının alınması ile belirlenmiştir.

2.3.4. Sulu çözeltiden Albumin uzaklaştırılması

Pro A/CB SPN ve CB SPN ile albumin adsorpsiyonu kesikli sistemde çalışılmıştır. Bu çalışmalarda her iki SPN ile albumin adsorpsiyonuna pH, derişim, tuz, sıcaklık ve tekrar kullanılabilirliğin etkisi incelenmiştir. Derişim çalışması her bir nanopartikülden 5 mg alınarak $0.25\text{-}10 \text{ mgmL}^{-1}$ albumin derişiminde pH 7.4 PBS tamponunda 3 saat etkileştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra, Pro A/CB SPN ve CB SPN uzaklaştırılarak çözeltideki albumin derişimi 280 nm’de absorpsiyonun ölçülmesiyle belirlenmiştir. Adsorplanan albumin miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

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

Bu formüldeki Q Pro A/CB SPN ve CB SPN’ye adsorbe olan albumin miktarını (mg g^{-1}), C_0 ve C sırası ile başlangıç albumin derişimini ve adsorpsiyon sonrası sulu fazdaki albumin derişimini (mg mL^{-1}), V sulu fazın hacmini (mL) ve m kullanılan Pro A/CB SPN ve CB SPN miktarını (g) gösterir.

pH çalışması 6 mg mL^{-1} albumin derişiminde pH 4.5-8.0 PBS tamponunda yaklaşık 5 mg Pro A/CB SPN ve CB SPN kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Adsorpsiyon sonrası Pro A/CB SPN ve CB SPN uzaklaştırılarak çözeltideki adsorplanmadan kalan albumin derişimi 280 nm’de UV absorpsiyonun ölçülmesiyle belirlenmiştir.

Albumin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini incelemek için, adsorpsiyon çalışmaları 4-45 °C sıcaklık aralığında 1 mg mL^{-1} albumin derişiminde pH 7.4 PBS tamponunda gerçekleştirilmiştir.

İyonik kuvvetin etkisini gözlemlemek için; adsorpsiyon deneyleri farklı NaCl derişimlerinde 1 mg mL^{-1} albumin derişiminde pH 7.4 PBS tamponunda gerçekleştirilmiştir.

Albumin desorpsiyonu % 10’luk etilen glikol çözeltisi içeren 0.1 M asetat tamponunda (pH 4.0) 2 saat oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon ortamındaki albumin derişimi 280 nm’de absorpsiyonun ölçülmesiyle belirlenmiştir. Albumin desorpsiyon oranı Eşitlik 2.3’e göre belirlenmiştir. SPN’lerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri 10 defa tekrarlanmıştır.

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \frac{\text{Desorbe edilen albumin miktarı}}{\text{Adsorplanan albumin miktarı}} \times 100 \quad (2.3)$$

2.3.5. Sulu çözeltiden IgG uzaklaştırılması

Pro A/CB SPN ve Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonu da kesikli sistemde çalışılmıştır. Bu çalışmalarda; her iki SPN ile IgG adsorpsiyonuna pH, derişim, tuz, sıcaklık ve tekrar kullanılabilirliğin etkisi incelenmiştir. Derişim çalışması her bir nanopartikülden 5 mg alınarak $0.25-10 \text{ mgmL}^{-1}$ IgG derişiminde pH 7.4 PBS tamponunda 3 saat etkileştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Pro A/CB SPN ve Pro A SPN uzaklaştırılarak çözeltideki IgG derişimi 280 nm'de absorpsiyonun ölçülmesiyle belirlenmiştir.

pH çalışması, 6 mgmL^{-1} IgG derişiminde pH 4.5-8.0 PBS tamponunda yaklaşık 5 mg Pro A/CB SPN ve Pro A SPN kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde Pro A/CB SPN ve Pro A SPN uzaklaştırılarak çözeltideki IgG derişimi 280 nm'de absorpsiyonun ölçülmesiyle belirlenmiştir. Adsorplanan IgG miktarı Eşitlik 2.3'de verilen formüle göre hesaplanmıştır.

IgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisini incelemek için, adsorpsiyon çalışmaları 4-45 °C sıcaklık aralığında 1 mgmL^{-1} IgG derişiminde pH 7.4 PBS tamponunda gerçekleştirilmiştir.

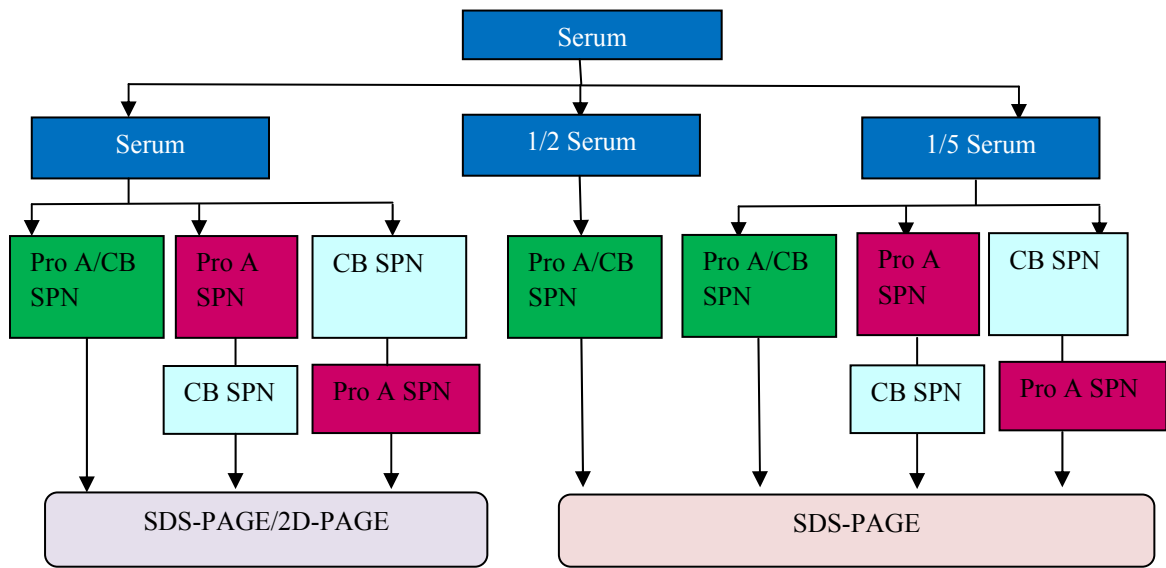
İyonik kuvvetin etkisini gözlemlemek için; adsorpsiyon deneyleri NaCl içeren çözeltilerde 1 mgmL^{-1} IgG derişiminde pH 7.4 PBS tamponunda gerçekleştirilmiştir.

IgG desorpsiyonu, % 10'luk etilen glikol çözeltisi içeren 0.1 M asetat tamponunda (pH 4.0) 2 saat oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon ortamındaki IgG derişimi 280 nm'de absorpsiyonun ölçülmesiyle belirlenmiştir. IgG desorpsiyon oranı da Eşitlik 2.3'e göre belirlenmiştir. SPN'lerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için adsorpsiyon-desorpsiyon deneyleri 10 defa tekrarlanmıştır.

2.3.6. Kan serumundan IgG ve Albumin uzaklaştırılması

Serum örnekleri Anadolu Üniversitesi Hastanesinden temin edilmiş ve herhangi bir koruyucu madde eklenmeden % 0.9 NaCl içeren pH 7.4 PBS tamponuyla 1/2 ve 1/5 oranında seyreltilmiştir. Seyreltilmemiş serum, 1/2 ve 1/5

oranında seyreltilen serum, hazırlanan ProA/CB SPN, Pro A SPN ve CB SPN ile çaprazlama yapılarak 1 saat etkileştirilmiş ve kesikli sistemde aynı anda hem IgG ve hem de albumin uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.5’de verilen akım şemasında IgG ve albumin uzaklaştırması gösterilmiştir. Tüm işlem adımlarında başlangıç ve uzaklaştırma sonrasında serumdaki toplam protein ve albumin miktarı ölçülerek katı desteklerin albumin ve IgG adsorpsiyon kapasiteleri belirlenmiştir. Başlangıç serum örnekleri ve katı desteklerle uzaklaştırma sonrası, serum örnekleri için SDS-PAGE ve 2D-PAGE yapılarak albumin ve IgG uzaklaştırılması gözlenmiştir.



Şekil 2.5. Serum örneklerinin farklı SPN’lerle etkileşim akım şeması

Elektroforez, protein ve nükleik asitler gibi yüklü taneciklerin belirli bir pH’da elektriksel bir alanda ve iyonize ortamda molekül büyüklüğü veya yük farklarına göre ayrılması ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Elektrik alan altında pozitif yük taşıyan proteinler katoda, negatif yük taşıyan proteinler anoda doğru göç ederler. Bu göçün hızı, yükün büyüklüğü, molekül büyüklüğü, destek ortamının özelliği, elektrik alanın büyüklüğü, tamponun iyonik gücü ve sıcaklık gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Moleküller elektrik alanında yük, şekil ve büyüklüklerine bağlı hızla hareket ettiklerinden moleküler ayırma için yaygın olarak kullanılmaktadır.

SDS-PAGE, % 10 akrilamit ayırma jelinde ve % 10 sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren jelde yürütme tamponu olarak 1.5 M Tris (pH 8.3) kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Jel, % 30'luk akrilamit-bisakrilamit karışım, % 10'luk amonyum persülfat başlatıcısı ve TEMED çapraz bağlayıcısı varlığında % 10'luk SDS çözeltisi ve 1.5 M Tris tamponu (pH 8.3) kullanılarak polimerleştirilmiştir. Jele yüklenen toplam protein miktarı 20 µg olacak şekilde, serum örnekleri izotonik çözelti ile seyreltilmiştir. Daha sonra, serum örnekleri % 0.1 bromtimol mavisi içeren boya çözeltisi (% 0.5 merkapt etanol ve % 10'luk gliserin içeren bromtimol mavisi) ile boyanmış ve daha önce hazırlanmış jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Örnekler % 0.1 SDS içeren pH 8.3 tris-glisin yürütme tamponunda yürütülmüştür. Elektroforez işlemi 26.7 mA akımında 5 saatte gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonrasında jeller Comassie Blue G-250 boya çözeltisinde 1 gün boyunca bekletilmiştir. Daha sonra boya çözeltisi etanol-su çözeltisi ile yıkanmıştır.

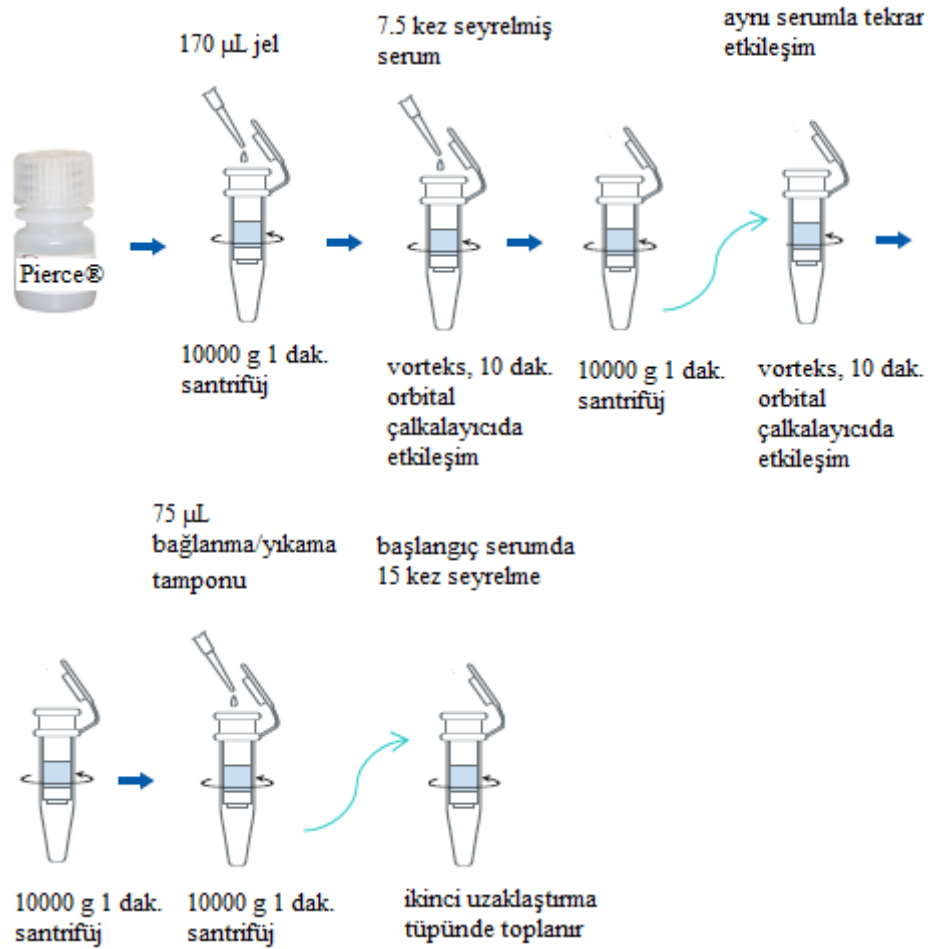
2D-PAGE, proteinlerin izoelektrik noktalarına ve moleküler ağırlıklarına göre ayırımına olanak sağlayan protein profillemesi metodudur. Birinci boyutta yüke bağlı IEF (izoelektrik odaklama) gerçekleştirilir. IEF, proteinlerin bir pH gradiente izoelektrik noktalarına göre ayrılması prensibine dayanır. IEF için pH 4-7 aralığındaki (24 cm, Biorad) immobilize pH gradiyent (IPG) şerit kullanılmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin IPG şeride protein girişini arttırmak amacıyla, şeride aktif rehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (12 saat süreyle 50 V, 20 °C). Rehidrasyon Tamponu olarak; 7 M üre, 2 M tiyoüre, % 0,5 amfolit, % 4 CHAPS ve 20 mM DTT kullanılmıştır. Protein derişimi 300 µg/şerit olacak şekilde örnekler uygulanmıştır. IEF işlemi, 1 saat 500 V, 1 saat 1000 V, 3 saat 10000 V ve 4 saat 10000 V'da gerçekleştirilmiştir (Protean IEFCell, Biorad). Proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayırımı tamamlandıktan sonra, şeritler – 80 °C'de bekletilmiştir. IEF sonrası şeritler dengeleme tamponu içerisinde bekletilmiş sonra ikinci yönde SDS jel sisteminin ayırma jeli üzerine yerleştirilmiştir. Şeritler önce indirgeme işlemi için; 6 M üre, 50 mM Tris HCl (pH 8,8), % 30 (h/h) gliserol, % 2 SDS, eser miktarda bromofenol mavisi ve % 1 DTT dengeleme tamponunda 15 dakika orbital çalkalayıcıda bekletilmiş; daha sonra alkilleme basamağı için 6 M üre, 50 mM Tris HCl (pH 8,8), % 30 (h/h)

gliserol, % 2 SDS, eser miktarda bromofenol mavisi ve iodoasetamid (% 2,5) içeren ikinci dengeleme tamponunda 15 dakika orbital çalkalayıcıda bekletilmiştir. İkinci boyutta ayırma için SDS-PAGE işlemindeki gibi % 10'luk poliakrilamid jeller hazırlanmıştır. IPG şeritler, SDS-poliakrilamid jel üzerine yerleştirilip, agaroz çözeltisi (% 0.5) ile sabitlenmiştir. Jeller; taze hazırlanmış 25 mM Tris baz, 192 mM glisin ve % 0,1 SDS (pH 8.3) içeren yürütme tamponunda 20 °C'de 1,5 saat jel başına 10 mA'de yürütülmüş, daha sonra jel başına 20 mA'de yürüme tamamlanmıştır. Jel boyama için Coomassie kullanılmıştır. Fiksatif çözeltisi olarak % 40 metanol, % 10 asetik asit kullanılmış ve 40 dakika süreyle orbital çalkalayıcıda işleme tabi tutulmuştur. 3 kez ultrasaf suyla yıkanan jeller üzerine, 250 mL/jel hacimde boya eklenerek gece boyunca orbital çalkalayıcıda bırakılmıştır. Boyanın fazlasının uzaklaştırılması amacıyla 3 kez ultrasaf suyla yıkanmış ve jeller Image Quant 350 görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

2.3.7. Ticari albumin ve IgG uzaklaştırma jeli ile albumin ve IgG uzaklaştırılması

Hazırlanan nanopartiküllerin serumdan albumin ve IgG uzaklaştırma etkinliğini karşılaştırmak amacıyla Thermo Scientific firmasının Pierce® Albumin/IgG uzaklaştırma ticari kiti kullanılmıştır. Albumin ve IgG uzaklaştırılması için; Thermo Scientific firmasına ait immobilize Cibacron Blue/Protein A jeli ve immobilize anti-Albumin/anti-IgG jeli olmak üzere iki tür kit bulunmaktadır. Uzaklaştırma etkinliği hazırlanan nanopartiküllere benzer yapıda olan Pierce® Albumin/IgG uzaklaştırma ticari kiti ile karşılaştırılmıştır. Bu kit, antikör temelli olan diğer kite göre daha ucuzdur. Serumda albumin ve IgG derişimi çok fazla olduğundan firmanın prosedürüne göre 170 µL jel 10 µL serumla etkileştirilebilmektedir. 170 µL jel spin kolonuna eklenmiş ve 10000 g'de 1 dakika santrifüjlenerek depolama tamponu uzaklaştırılmıştır. 10 µL seruma 65 µL bağlanma/yıkama tamponu eklenmiştir. Jelin bulunduğu kolonun ucu kapatılarak bağlanma tamponu ile seyreltilen serum spin kolonuna eklenmiştir. Spin kolondaki jelle seyreltilen serumun etkileşmesi için spin kolon önce

vortekslenmiş, daha sonra oda sıcaklığında 10 dakika orbital çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Kolonun ucu açılarak mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 10000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası serum mikrosantrifüj tüpünde toplanmıştır. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan serum tekrar kolondaki jelle aynı şekilde 10 dakika etkileştirilmiştir. İkinci etkileştirme işleminden sonra kolon mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek tekrar 10000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve albumin ve IgG uzaklaştırılmış serum mikrosantrifüj tüpünde toplanmıştır. Spin kolonunda kalan jelle, 75 µL bağlanma/yıkama tamponu eklenmiş ve 10000 g'de 1 dakika santrifüjlenerek uzaklaştırma yapılarak serumun bulunduğu mikrosantrifüj tüpünde toplanmıştır (Şekil 2.6). Uzaklaştırma işlemlerindeki serumlar birleştirilerek uzaklaştırma sonrası ve öncesi toplam protein miktarı ve albumin miktarı ölçülmüştür.

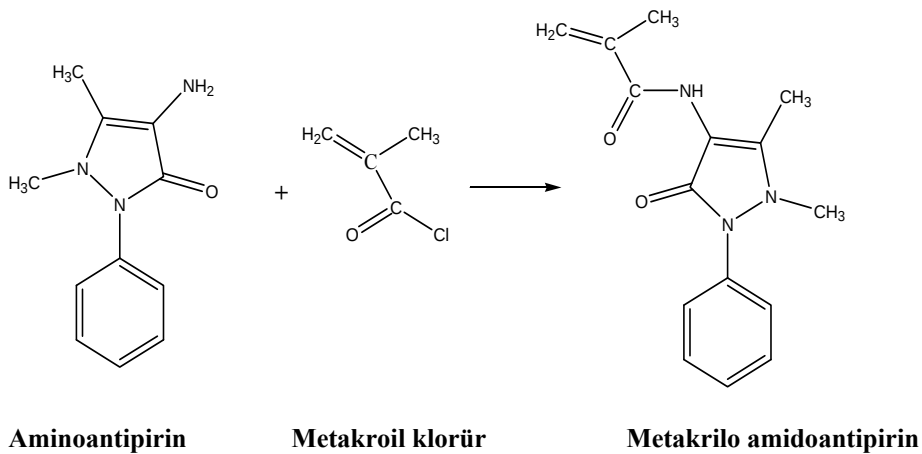


Şekil 2.6. Ticari albumin ve IgG uzaklaştırma jeli ile albumin ve IgG uzaklaştırma işlemi

2.4. Biyolojik Belirteçlerin Tayinini Sağlayan Katı Desteklerin Hazırlanması

2.4.1. Metakriloamidoantiprin (MAAP) monomerinin sentezi

Metakriloamidoantiprin (MAAP) monomeri Ersöz ve arkadaşlarının daha önceki çalışmalarına göre sentezlenmiştir (Ersöz ve ark. 2004, Keçili ve ark. 2006). 4-aminoantipirin (0.5 g; 2.463 mmol), 0.2 mL (2.46 mmol) piridin ve 100 mL kuru CHCl_3 içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C 'ye soğutulmuş, daha sonra metakroil klorür (0.26 mL; 2.46 mmol) yavaşça bu çözeltiye eklenmiş ve 2 saat oda sıcaklığında azot atmosferi altında karıştırılmıştır. Bu kimyasal reaksiyon periyodu sonrasında, çözelti seyreltik 50'şer mL HCl ve NaOH çözeltileri ile yıkanmış ve organik faz, döner buharlaştırıcıda buharlaştırılmıştır. Kalan kısım (MAAP) (Şekil 2.7), petrolbenzeni ve etil asetatla kristallendirilerek saflaştırılmıştır (Verim: 70 %).

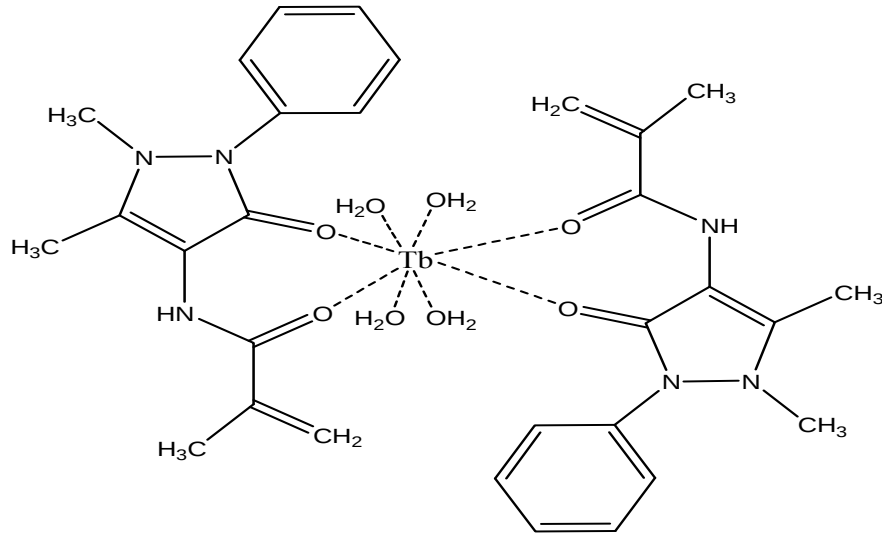


Şekil 2.7. Metakrilo amidoantipirin (MAAP) monomerinin sentez reaksiyonu

2.4.2. Metal-Şelat monomerlerinin sentezi

(MAAP)₂-Tb(III) metal-şelat monomeri (Şekil 2.8.); MAAP (0.1 mmol) monomeri ve Tb(NO₃)₃·5H₂O'ın (0.05 mmol) 5'er mL DMSO'da çözülerek 24 saat karıştırılması ile sentezlenmiştir. Oluşan metal-şelat monomeri kristallendirilerek saflaştırılmıştır. FT-IR ve MALDI spektrumu ile gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları, MAAP ve (MAAP)₂-Tb (III) monomerlerinin sentezlendiğini göstermiştir.

(MAAP)₂-Eu(III) metal-şelat monomeri, (MAAP)₂-Tb(III) metal-şelat monomerinin sentezlendiği gibi MAAP (0.1 mmol) monomeri ve Eu(NO₃)₃.5H₂O'nun (0.05 mmol) 5'er mL etanolde çözülerek 24 saat karıştırılması ile sentezlenmiştir.

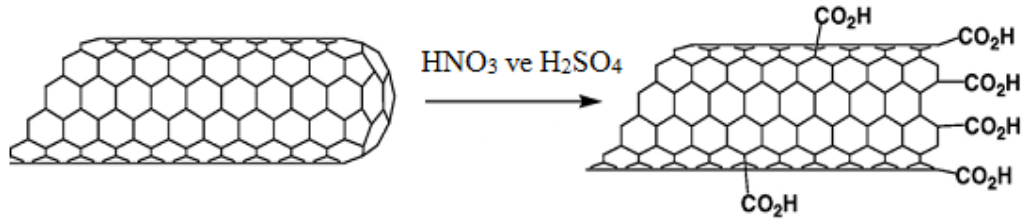


Şekil 2.8. (MAAP)₂-Tb(III) metal-şelat monomeri

2.4.3. Karboksillenmiş CNT sentezi ve nanopartikülün metal-şelat monomerleri ile etkileştirilmesi

Karbon nanotüp (CNT, 0.02 g), 20 mL 1:3 derişik HNO₃ ve H₂SO₄'in 4 saat ultrasonikte karıştırılmasıyla karboksillenmiştir (Najam-ul-Haq 2006). Santrifüjleme işleminden sonra geriye kalan katı, FT-IR ile karakterize edilmiştir.

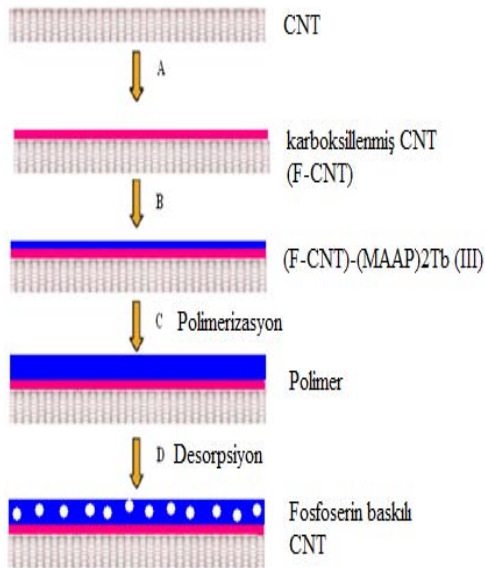
Daha sonra karboksillenmiş CNT (Şekil 2.9), 5'er mL 0.05 mmol (MAAP)₂-Tb(III) ve (MAAP)₂-Eu(III) metal-şelat monomerleri ile etkileştirilerek katı desteğin yüzeyinde fosfoserin (PS) ve lizofosfatidik asit (LPA) baskılamanın yapılması için fonksiyonellendirme işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.9. Karboksillenmiş CNT sentezi

2.4.4. PS baskılı CNT ve Fe_2O_3 nanopartiküllerin sentezi

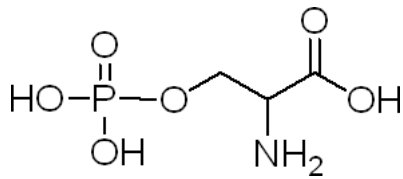
CNT-(MAAP)₂-Tb(III) nanopartikülü, 5 mL 20 mM PS çözeltisi ile 3 saat etkileştirilmiştir. Daha sonra, CNT nanopartikülü 0.4 mL EDMA ve 0.4 mL 2,2-dimetoksi-2-asetofenon çözeltisi (1:1 ACN/H₂O) eklenmesi ile 4 saat UV ışığında polimerleştirilmiştir (Lee ve Lee 2007). PS desorpsiyonu (3/1, v/v) metanolik fosforik asit ve KOH ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.10'da (MAAP)₂-Tb(III) metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT sentezi verilmektedir.



2.10. PS baskılı CNT sentezi

PS baskılı CNT sentezine benzer yaklaşımla; PS baskılı Fe_2O_3 nanopartikülü de hazırlanmıştır. Bunun için, Fe_2O_3 nanopartikülleri daha önce de gerçekleştirildiği gibi TMSPM ile sillillenmiştir. Bu amaçla; 0.2 g Fe_2O_3 nanopartikülünün 1 mL TMSPM ve 5 mL toluen ile 1 gün boyunca

etkileştirilmesiyle Fe_2O_3 nanopartiküllerinin yüzeyi modifiye edilmiştir. Elde edilen Fe_2O_3 nanopartikülü; 5 mL (0.05 mmol) MAAP₂-Tb(III) metal-şelat monomeri ile 1 gün boyunca ve daha sonra da 20 mM PS çözeltisi ile 3 saat etkileştirilmiştir. PS ile ön-organizasyonu gerçekleştirilen Fe_2O_3 nanopartikülü 0.4 mL EDMA ve 0.4 mL 2,2-dimetoksi-2-asetofenon çözeltisi (1:1 ACN/H₂O) eklenmesi ile 4 saat UV ışığında polimerleştirilmiştir. Metanolik fosforik asit (3/1, v/v) çözeltisi ile gerçekleştirilen PS desorpsiyonu sonucunda PS baskılı Fe_2O_3 nanoyapı hazırlanmıştır.



Şekil 2.11. PS molekülü

2.4.5. PS baskılı CNT ve Fe_2O_3 nanopartikülleri ile lüminesans ölçümleri

Desorbe edilen nanopartiküllerden PS baskılı CNT, 10^{-10} - 10^{-3} M arasında değişen farklı derişimlerdeki 5 mL PS çözeltisi ile 600 rpm'de 5 dakika etkileştirilmiştir. PS baskılanmış CNT, aynı şekilde 10^{-5} M serin çözeltisi ve 3.25-200 UmL^{-1} arasında değişen farklı derişimlerdeki CA 125 ile de 600 rpm'de 5 dakika etkileştirilmiştir.

(MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı Fe_2O_3 nanosensörü ise sadece 3.125-125 UmL^{-1} arasında değişen farklı derişimlerdeki CA 125 ile 600 rpm'de 5 dakika etkileştirilmiştir.

Etkileşim sonrası PS baskılı CNT ve Fe_2O_3 ayrılarak, nanosensörlerin PS ve CA 125 ile etkileşimi floresans spektrofotometresi ile incelenmiştir. CNT ve Fe_2O_3 nansosensörlerinin uyarılma daldaboyu 350 nm olarak belirlenirken, emisyon dalgaboyu 701.2 nm'de gözlenmiştir.

2.4.6. LPA baskılı CNT ve Fe₂O₃ nanopartiküllerin sentezi

LPA baskılı CNT sentezi için; karboksilenmiş CNT önce (MAAP)₂-Tb(III) ve (MAAP)₂-Eu(III) metal-şelat monomerleri ile etkileştirilmiştir. Daha sonra, PS baskılı CNT hazırlanmasına benzer yaklaşımla; (MAAP)₂-Tb(III) ve (MAAP)₂-Eu(III) metal-şelat monomerleri ile fonksiyonellendirilen CNT'ler; 20 mM LPA çözeltisi ile 3 saat etkileştirilmiştir. Ön-organizasyon işleminden sonra her iki CNT'de EDMA ve 2,2-dimetoksi-2-asetofenon varlığında polimerleştirilmiştir. LPA desorpsiyonu metanolik fosforik (3/1, v/v) asit ile gerçekleştirilmiştir.

LPA baskılı Fe₂O₃ nanopartikülleri sadece (MAAP)₂-Tb(III) metal-şelat monomerinin kullanılmasıyla hazırlanmıştır. Bunun için Fe₂O₃ nanopartikülleri önce TMSPM ile fonksiyonellendirilmiş, polimerizasyon reaksiyonu sonrasında desorpsiyon gerçekleştirilmiştir.

2.4.7. LPA baskılı CNT ve Fe₂O₃ nanopartikülleri ile lüminesans ölçümleri

İki farklı metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilmiş LPA baskılı CNT, $5 \cdot 10^{-6}$ - $4 \cdot 10^{-5}$ M arasında değişen farklı derişimlerdeki 5 mL LPA çözeltisi ile 600 rpm'de 5 dakika etkileştirilmiştir.

LPA baskılanmış Fe₂O₃ nanopartikülü de $5 \cdot 10^{-6}$ - $4 \cdot 10^{-5}$ M arasında değişen farklı derişimlerdeki 5 mL LPA çözeltisi ile aynı şekilde 600 rpm'de 5 dakika etkileştirilmiştir.

Etkileşim sonrası LPA baskılı CNT ve Fe₂O₃ ayrılarak, nanosensörlerin LPA ile etkileşimi floresans spektrofotometresi ile incelenmiştir. CNT ve Fe₂O₃ nansosensörlerinin uyarılma daldaboyu 350 nm olarak belirlenirken, emisyon dalgaboyu 701.2 nm'de gözlenmiştir.

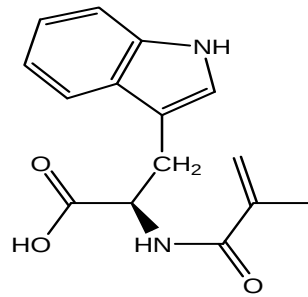
3. BULGULAR

3.1. MATrp Monomeri ve Fotoduyarlı Şelat Dop Edilen Silika ve Süperparamanyetik Silika Nanopartikülün Karakterizasyonu

MATrp monomeri, ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR, fotoduyarlı şelat ^1H -NMR, elementel analiz ve MALDI, fotoduyarlı şelat dop edilen silika nanopartikülleri ise TEM ile aşağıda verildiği gibi karakterize edilmiştir.

3.1.1. MATrp monomerinin karakterizasyonu

Şekil 3.1’de açık yapısı verilen MATrp monomerinin karakterizasyonu için belirlenmesinde ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kullanılmıştır.



MATrp

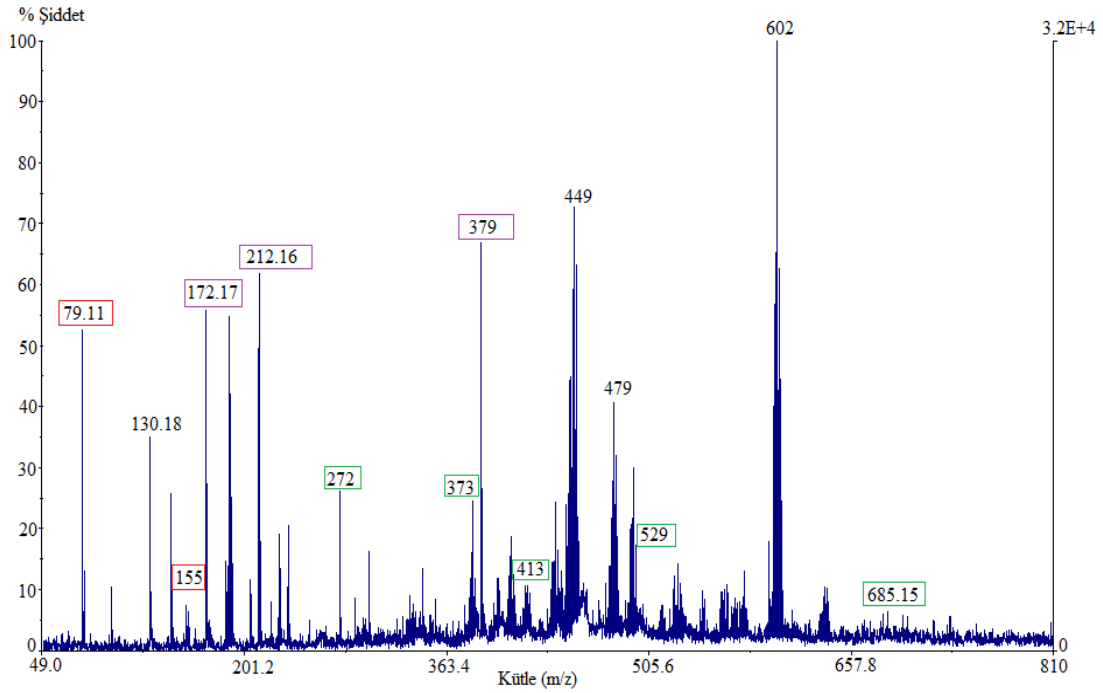
Şekil 3.1. Metakrilamidotriptofan (MATrp) monomerinin molekül formülü

MATrp monomerinin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumunda MATrp’de bulunan gruplara ait karakteristik pikler görülmektedir. Bu karakteristik pikler: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 10.7 (s, 1H, N-H), 7.45 (d, 1H, N-H), 7.22-7.38 (m, 2H, Ar-H), 6.96-7.1 (m, 2H, Ar-H), 6.87 (t, 1H, , Ar-H), 5.48 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-$), 5.21 (s, 1H, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)$), 4.05 (dd, 1H, 1H, $\text{HOCH}_2-\text{CH}-\text{NH}$), 3.28 (dd, 1H, $\text{HOCH}_2-\text{CH}-\text{NH}$), 3.09 (dd, 1H, $\text{HOCH}_2-\text{CH}-\text{NH}$), 1.78 (s, 3H, CH_3); ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 19.0, 27.5, 55.5, 111.5, 112.0, 118.5, 119.0, 119.5, 121.0, 124.0, 129.0, 136.0, 141.0, 166.0, 173.5 olarak bulunmuştur.

3.1.2. Bis(2-2'-bipiridil)bis(MATrp)- rutenyum(II) karakterizasyonu

Bis(2-2'-bipyridyl) bis(MATrp)-Ru(II) fotoduyarlı şelatın yapısının belirlenmesinde ^1H -NMR, elementel analiz ve MALDI-TOF-MS kullanılmıştır. ^1H -NMR spektrumunda bis(2-2'-bipyridyl) bis(MATrp)-Ru(II)'da bulunan gruplara ait karakteristik pikler görülmektedir. Bu karakteristik pikler: ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 10.74 (d, 2H, $J=14.9$ Hz), 9.76 (s, 1H), 7.99 (d, 1H, $J=7.68$ Hz), 7.91 (d, 1H, $J=7.57$ Hz), 7.54 (d, 2H, $J=7.94$ Hz), 7.46 (d, 1H, $J=8.2$ Hz), 7.31 (t, 4H, $J=6.76$ Hz), 7.16 (s, 1H), 7.1 (d, 2H, $J=11.7$ Hz), 7.07-7.00 (q, 5H, $J=8.0$ Hz), 5.6(d, 2H, $J=6.6$ Hz), 5.3 (s, 2H), 4.57 (m, 1H), 4.39 (m, 2H), 1.24 (s, 3H) olarak bulunmuştur.

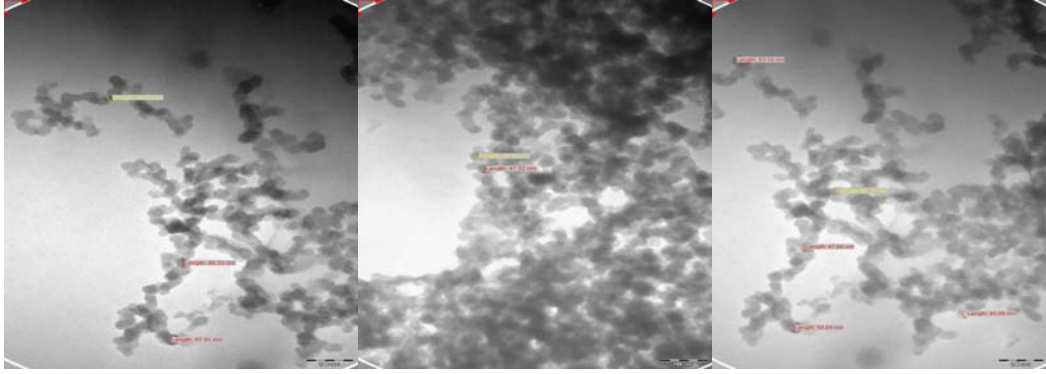
Elementel analiz sonuçlarına göre ise ($\text{C}_{50}\text{H}_{46}\text{N}_8\text{O}_6\text{Ru}$); C % 61.9, H % 4.3, N % 10.8 olarak bulunmuştur. Teorik hesaplama sonucu (C % 62.82, H % 4.85, N % 11.72) bulunan değerlere göre de fotoduyarlı şelatın sentezlendiği gözlenmektedir. Ayrıca Şekil 3.2'de verilen MALDI-TOF-MS spektrumu da fotoduyarlı şelatın sentezlendiğini desteklemektedir. Fotoduyarlı şelatın karakterizasyonu için kullanılan MALDI-TOF-MS analizlerinin karakteristik pikleri ise şöyledir: m/z 101'de gözlenen iyon piki Ru'a, m/z 79, 128 ve 155 bipiridil'e, m/z 413 ve m/z 448'deki iyon pikleri sırası ile $\text{Ru}(\text{bpy})_2$ ve $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}$ komplekslerine, m/z 272'deki iyon piki MATrp monomerine, m/z 373'deki iyon piki Ru-MATrp kompleksine, 529'daki iyon piki $\text{Ru}(\text{bpy})$ -MATrp kompleksine ve m/z 685'deki iyon piki $\text{Ru}(\text{bpy})_2$ MATrp'ye aittir.



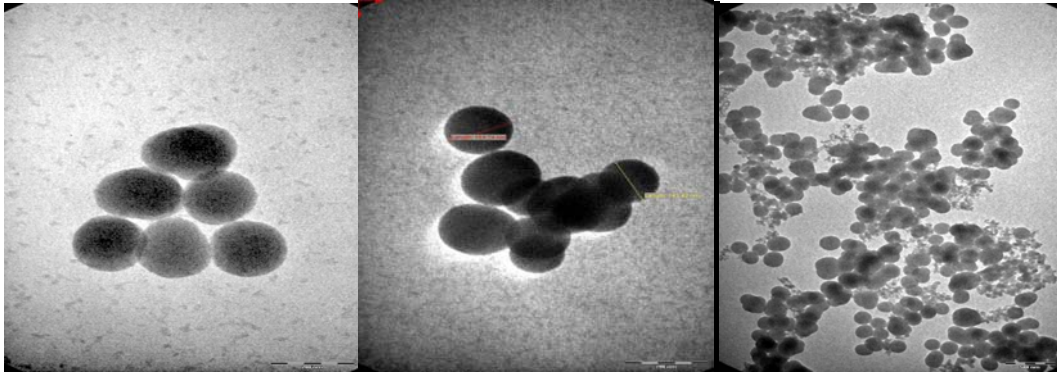
Şekil 3.2. Bis(2-2'-bipyridyl) bis(MATrp)-Ru(II) fotoduyarlı şelatın MALDI-TOF-MS spektrumu

3.1.3. Fotoduyarlı şelat dop edilen silika ve süperparamanyetik silika nanopartiküllerin TEM görüntüleri

Fotoduyarlı şelat dop edilmiş silika nanopartiküllerin (Şekil 3.3) büyüklükleri 45-50 nm arasındadır. Fotoduyarlı şelat dop edilmiş süperparamanyetik silika nanopartiküllerin (Şekil 3.4) büyüklüğü ise yaklaşık 150 nm'dir. Sentez süresince karıştırma uygulandığında Fe_2O_3 nanopartikülleri üzerinde silisyum çekirdeklemeye başlar ve küresel partiküller büyür. Karıştırma olmadığında ise silisyum partikülleri çöker, partikül agregasyonu eş zamanlı olarak oluşur ve küresel olmayan partiküller oluşur. Yüzey alanının artması ile birlikte küresel olmayan nanopartiküller küresel nanopartiküllere göre iç kısımda daha fazla Fe_2O_3 içerir, bu nedenle de manyetik özelliği daha fazladır. Fotoduyarlı şelat dop edilen silika nanopartikül ve süperparamanyetik silika nanopartikülleri çok az miktarda, büyük boyutta sentezlendiği için ve ayrıca nanopartiküllerin ayırımı zor olduğu için daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere foto duyarlı şelat dop edilen silika nanopartiküllerinin yerine Fe_2O_3 ve CNT nanopartikülleri ile çalışılmıştır.



Şekil 3.3. Fotoduyarlı şelat dop edilen silika nanopartiküllerin TEM görüntüsü



Şekil 3.4. Fotoduyarlı şelat dop edilen süperparamanyetik silika nanopartiküllerin TEM görüntüleri

3.2. Albumin ve IgG Uzaklaştırma Sistemleri

Süperparamanyetik Fe_2O_3 nanopartikülleri, manyetik alanın uygulanması ile matriksden kolaylıkla ayrılabilmesi nedeniyle analitik nanoteknoloji uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Manyetik alan kaldırıldığında manyetik özelliklerini korurlar ve aglomerasyon gözlenmez. Fe_2O_3 nanopartikülleri, yüksek yüzey alana sahiptir ve biyouyumluluğu yüksektir. Manyetik nanopartiküller deriştirme, ayırma, saflaştırma gibi işlemlerde ve moleküllerin ve spesifik hücrelerin belirlenmesinde kullanılabilmektedir. Manyetik nanopartiküller fonksiyonellendirilmediğinde bazı sınırlandırmalara bağlı kalır:

- Büyük yüzey/hacim oranına ve bu nedenle yüksek yüzey enerjilerine sahip olmaları nedeni ile yüzey enerjilerini azaltmak amacıyla agregasyona eğilimlidirler.
- Fe_2O_3 nanopartiküllerinin kimyasal aktivitesi yüksektir ve havaya maruz kaldığında kolaylıkla okside olur. Bu da manyetik ve dispers olma özelliklerinin kaybolmasına neden olur.
- Biyodegradasyona uğrayabilirler (daha sonra manyetik özelliklerinde değişim olur).

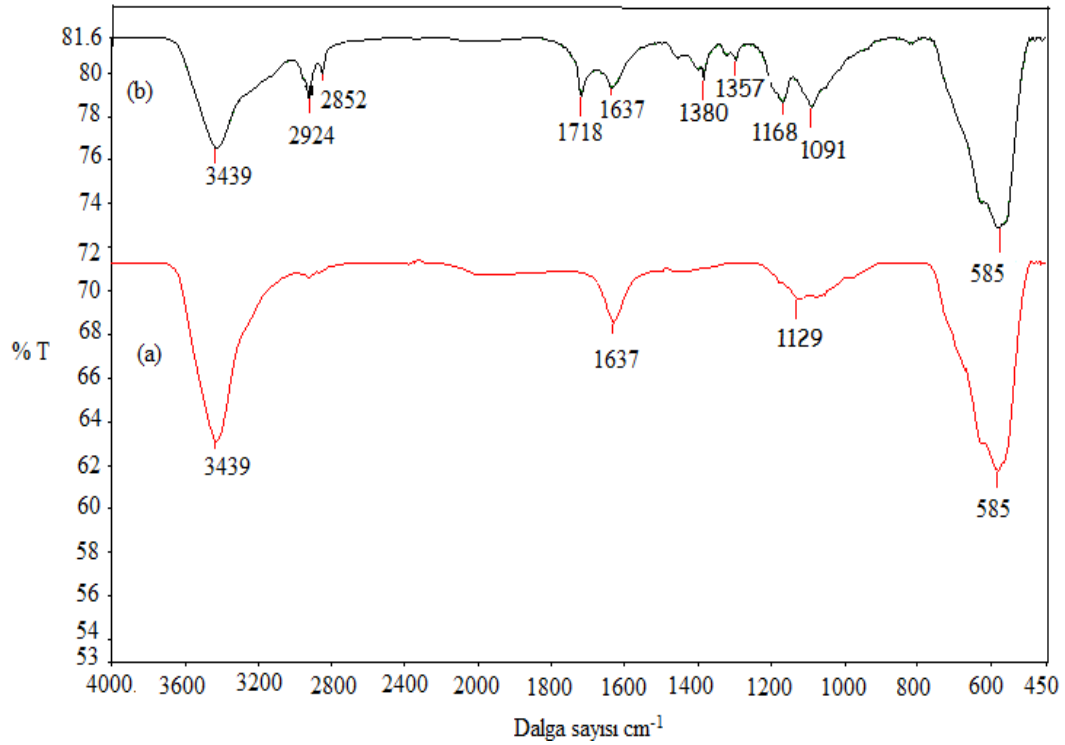
Bu nedenlerden dolayı manyetik Fe_2O_3 nanopartiküllerin kararlılığını sağlamak ve devam ettirmek için uygun yüzey kaplama işlemi gerçekleştirilmelidir. Küçük organik moleküller, surfaktanlar, polimerler ve biyomoleküller gibi organik moleküllerle ya da silika, metal ya da metal oksit (ya da metal sülfür) gibi inorganik tabaka ile kaplanabilirler. Nanopartiküllerin yüzeyini kaplamada silika sıklıkla kullanılır. Silika, nanopartikülün dispersiyonunu sağlar. Yüksek yüzey silanol derişimi çeşitli yüzey reaksiyonlarını ve antijenler, antikorlar, peptiler, proteinler, nükleik asitler, enzimler gibi biyomoleküllerin, metaller ve polimerlerin bağlanmasını kolaylaştırır. Fe_2O_3 nanopartiküllerin yüzeyindeki hidroksi grupları silan moleküllerindeki alkoksi grupları ile reaksiyona girer ve Si-O bağlarının oluşumunu sağlar. Ayrıca; diğer moleküllerin immobilizasyonu için fonksiyonel gruplar bulunur. Silika ile kaplanmış manyetik nanopartiküllerin tutumu silika tabakalarının ayrı ayrı kalınlığı ile ilintilidir. İnce silika tabakası, partikül arası etkileşimi azaltır ve süperparamanyetizm korunur. Doygunluk manyetizasyon (M_s) değerindeki azalma silanlanmış nanopartikül örneğindeki manyetik bileşimin yoğunluğunun azalmasından kaynaklanır. Örneğin; Fe_3O_4 nanopartikülüne 15 nm silika kaplanması doyunluk manyetizasyon değerinin 81.2 emug^{-1} 'den 49.7 emug^{-1} değerine düşmesine neden olmuştur. 3-aminopropiltrietoksisilan (APTEOS), p-aminofeniltrimetoksisilan (APTS) ve 3-trimetoksisililpropil metakrilat sıklıkla kullanılan (TMSPM) reaktiflerdir (Iijima ve Kamiya 2009; Dios ve Diaz-Garcia 2010; Varanda ve ark. 2011, Frey ve ark. 2009; Gubin ve ark. 2005; Corr ve ark. 2008; Lu ve ark. 2007).

Fonksiyonel moleküller, partiküller veya polimerlerle nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmesi ile çözeltide nanopartiküller stabilize edilir. Daha sonraki uygulamalar için yüzeyde fonksiyonel gruplar sağlanır. Çeşitli çözücülerle nanopartiküllerin çözünürlüğünün artırılmasıyla nanopartiküllerin uygulamalardaki yetenekleri genişletilir. Kaplama tabakası, partiküllerin elektronik, optik, spektroskopik ve kimyasal özelliklerini modifiye edebilir. Nanopartiküllerin, spesifik işlemlerle fonksiyonellendirilmesiyle istenen kimyasal, fiziksel ya da biyolojik çevre sağlanır. Oksidasyondan koruma gibi nanopartikül yüzeyinin kimyasal ve mekanik performansı geliştirilir ve bazı durumlarda da toksisitesi azaltılabilmektedir (Dios ve Diaz-Garcia 2010, Varanda ve ark. 2011).

3.2.1. Fe₂O₃ ve TMSPM ile fonksiyonellendirilmiş Fe₂O₃ nanopartiküllerin karakterizasyonu

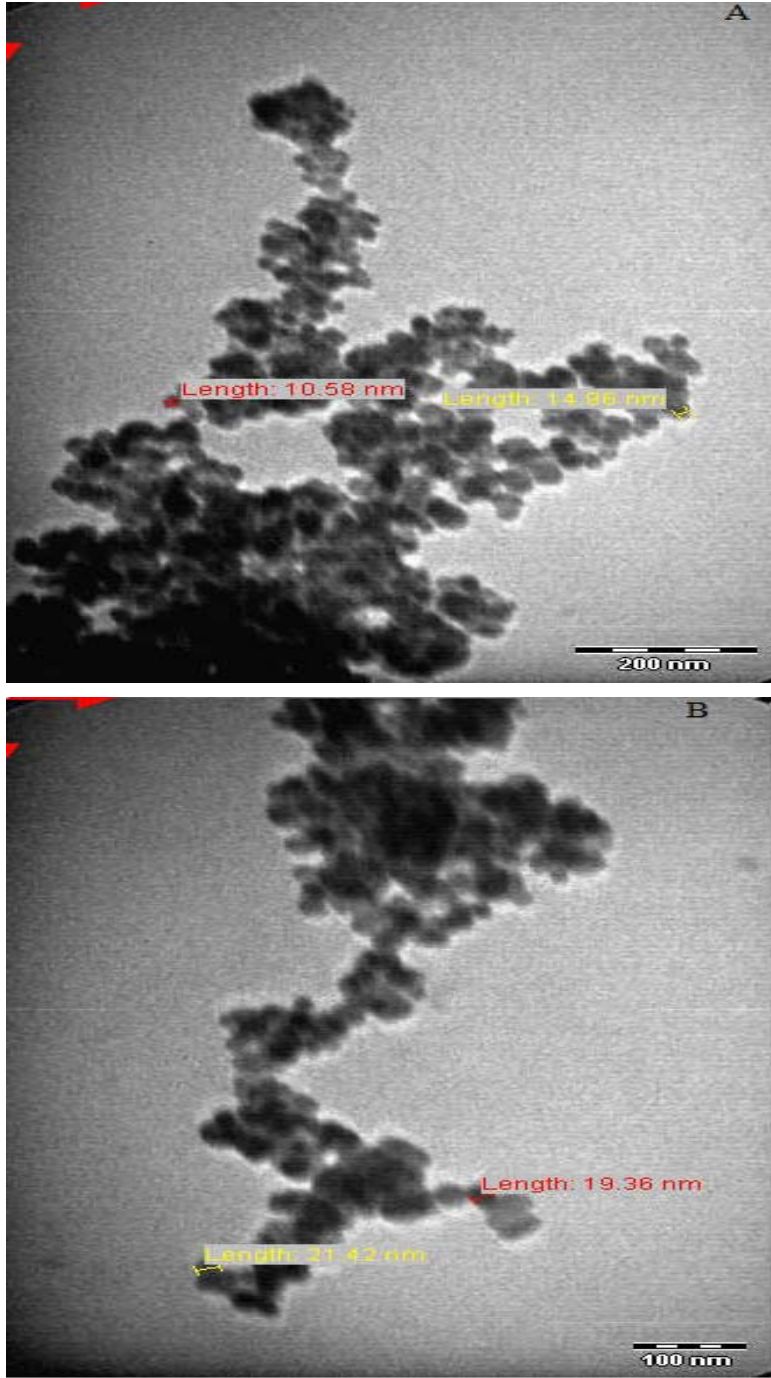
Fe₂O₃ nanopartiküllerin yüzeyinin TMSPM ile fonksiyonellendirilmesi FT-IR (Şekil 3.5.) ve TEM (Şekil 3.6) ile karakterize edilmiştir. Şekil 3.5’de Fe₂O₃ nanopartiküllerin FT-IR spektrumu incelendiğinde (KBr, cm⁻¹); 3439 cm⁻¹’de Fe₂O₃ nanopartikülüne adsorplanan su molekülünün -OH gerilimine, 2924 cm⁻¹’de -CH₃ ve -CH₂’deki -CH simetrik gerilme titreşimine, 2852 cm⁻¹’de ise O’ye bağlı -CH₂ grubundaki -CH gerilimine, 1718 cm⁻¹’de C=O grubunun gerilimine, 1637 cm⁻¹’de sudaki -OH grubunun deformasyonuna ait bandlar görülmektedir. 1168 cm⁻¹ ve 1091 cm⁻¹ deki bandlar ise Si-O-C ve Si-O-Si gerilme titreşimlerine ait olup TMSPM yapısına ait karakteristik piklerdir. TMSPM yapısındaki CH gerilme titreşimlerinin de gözlenmesi Fe₂O₃ nanopartikülüne TMSPM’nin bağlandığını destekler. Yamaura ve arkadaşlarının çalışmasında (2004) manyetik nanopartiküllerin varlığında Fe-O bağına karşılık gelen 570 cm⁻¹ dalga sayısındaki bandın yarılmaması sonucu 632 ve 585 cm⁻¹ dalga sayısı civarında iki güçlü absorpsiyon bandı gözlenmiştir. Silika ağı manyetik yüzeye Fe-O-Si bağları ile adsorbe olur. FT-IR spektrumunda, Fe-O-Si bağları nedeni ile oluşan absorpsiyon bandı, 585 cm⁻¹’de gözlenen Fe-O titreşimi ile örtüşmesi nedeni ile gözlenmemektedir. Manyetik nanopartiküllerin yüzeyine silika ağının

bağlanması, 1168 cm^{-1} ve 1091 cm^{-1} dalga sayısındaki Si-O-H ve Si-O-Si gruplarının bandları ile doğrulanmaktadır (Yamaura ve ark. 2004, Guo ve ark. 2008, Cakic ve ark. 2002).



Şekil 3.5. a) Fe₂O₃ nanopartiküllerin FT-IR spektrumu b) TMSPM ile modifiye edilmiş Fe₂O₃ nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

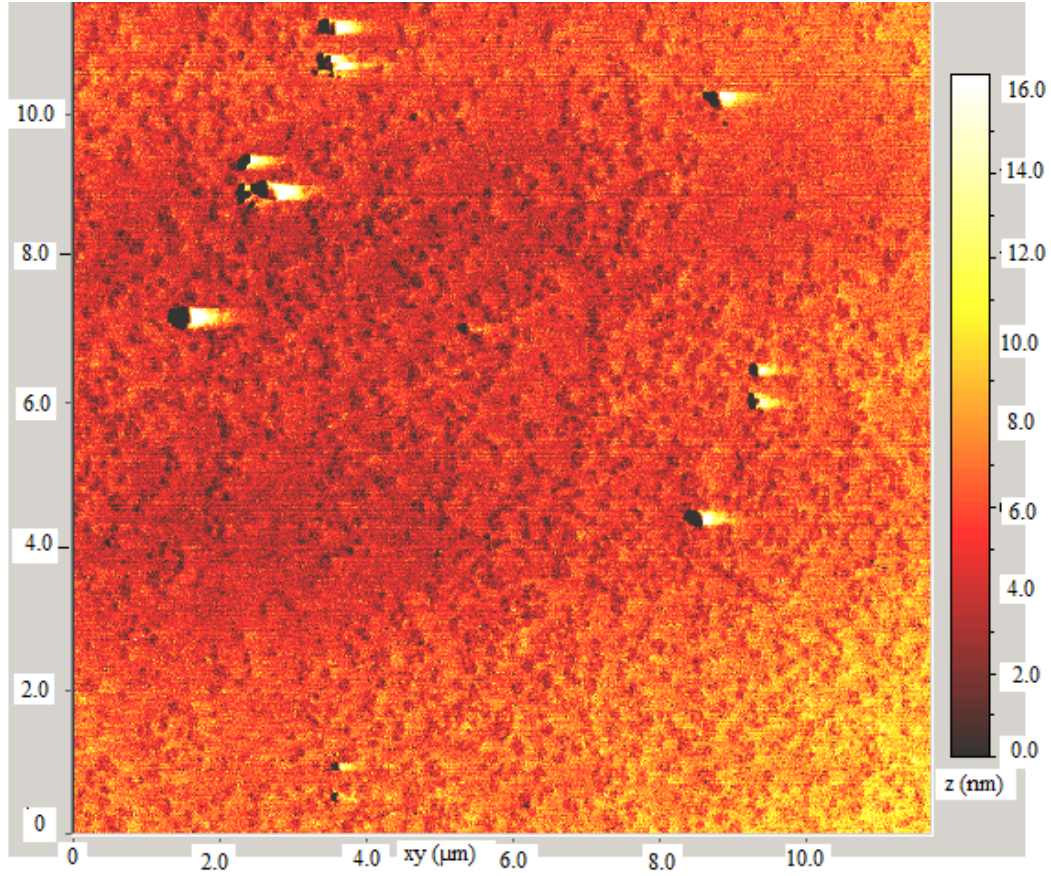
Şekil 3.6 A'daki Fe₂O₃ nanopartiküllerinin TEM görüntüsünden nanopartiküllerin küresel yapıda olduğu gözlenmiştir. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin boyutu yaklaşık olarak 10-15 nm civarındadır. Şekil 3.6 B'deki TEM görüntüsü ise sillilenmiş Fe₂O₃ nanopartiküllerine aittir ve boyutu yaklaşık olarak 22 nm'dir. Sillillenmiş Fe₂O₃ nanopartiküllerin homojen bir yapıda olduğu gözükmemektedir. TEM görüntülerindeki nanopartikülün boyut artışı Fe₂O₃ nanopartiküllerin sillillendiğini desteklemektedir.



Şekil 3.6. A) Fe_2O_3 nanopartiküllerin TEM görüntüsü b) TMSPM ile fonksiyonellendirilmiş Fe_2O_3 nanopartiküllerin TEM görüntüsü

Şekil 3.7’de Fe_2O_3 nanopartiküllerinin AFM görüntüsünden de görüldüğü gibi Fe_2O_3 nanopartiküllerinin boyutu 16 nm olmakla birlikte daha düşük boyuttaki Fe_2O_3 nanopartikülleri de bulunmaktadır. Fe_2O_3

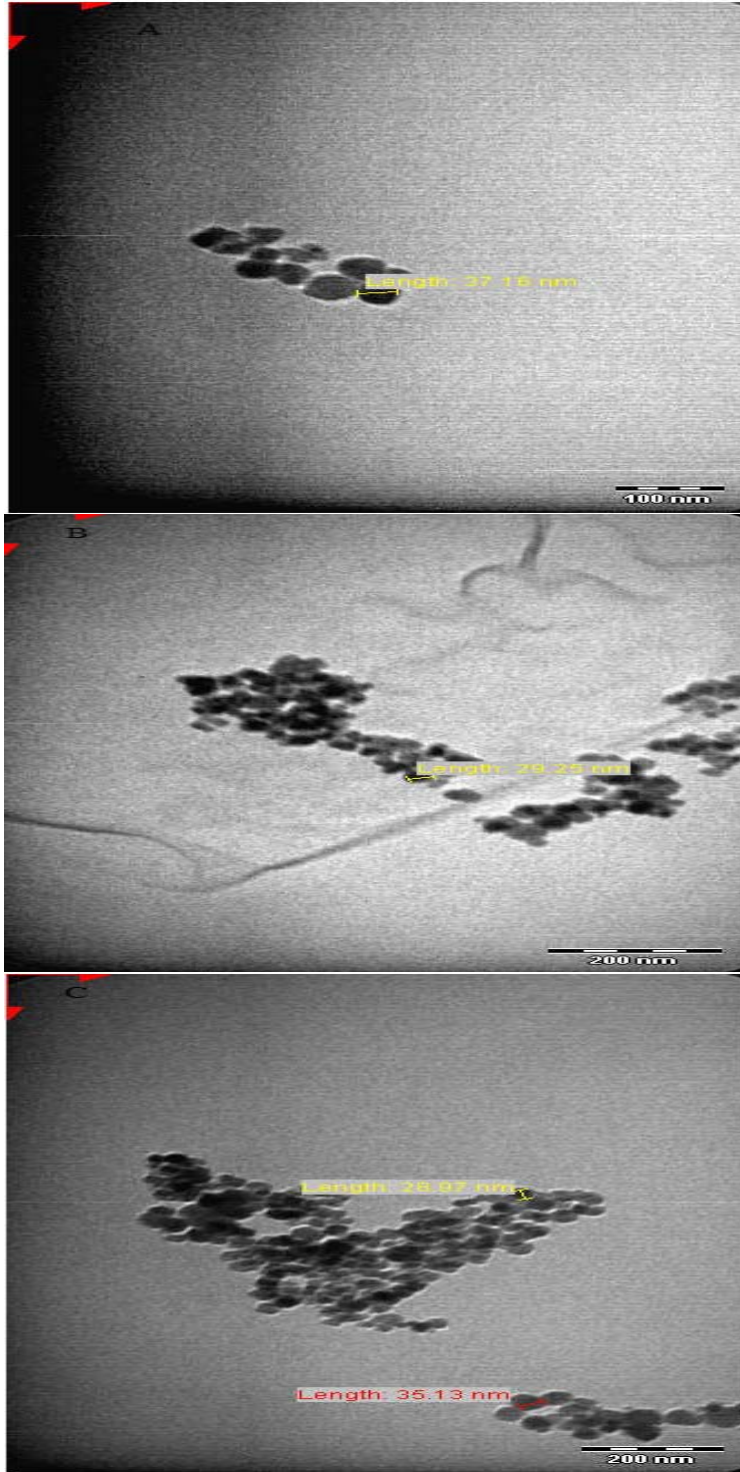
nanopartiküllerinin AFM görüntüsü Şekil 3.6 A' da verilen TEM görüntüsündeki boyut ve şekli desteklemektedir.



Şekil 3.7. Fe₂O₃ nanopartiküllerin AFM görüntüsü

3.2.2. Pro A, CB ve Pro A/CB SPN karakterizasyonu

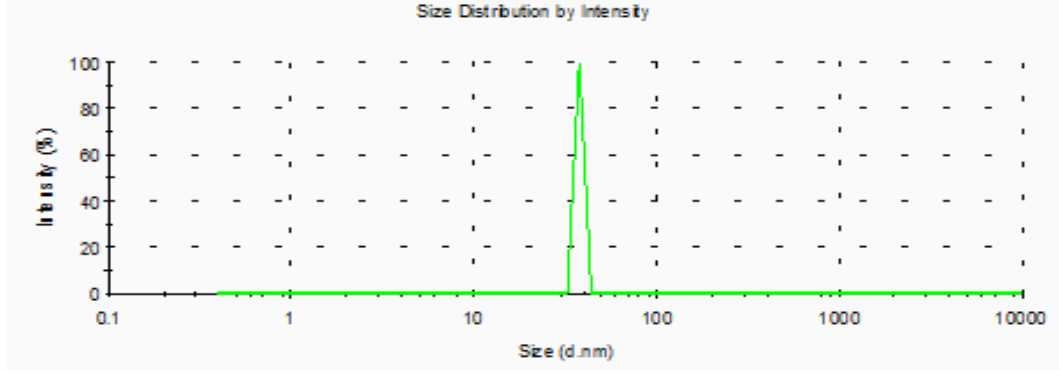
Şekil 3.8’de verilen TEM görüntülerinde, Pro A/CB SPN 37.16 nm, CB SPN 29.25 nm ve Pro A SPN 30 nm boyutunda küresel nanopartiküller bulunmaktadır. Sillilenmiş Fe₂O₃ nanopartiküllerine göre boyuttaki artış sillilenmiş Fe₂O₃ nanopartiküllerine protein A ve CB bağlanmasını desteklemektedir. Küçük boyuttaki nanopartiküller, albumin ve IgG bağlanabilmesi için daha fazla yüzey alanına sahip olduğundan kullanımı avantajlıdır.



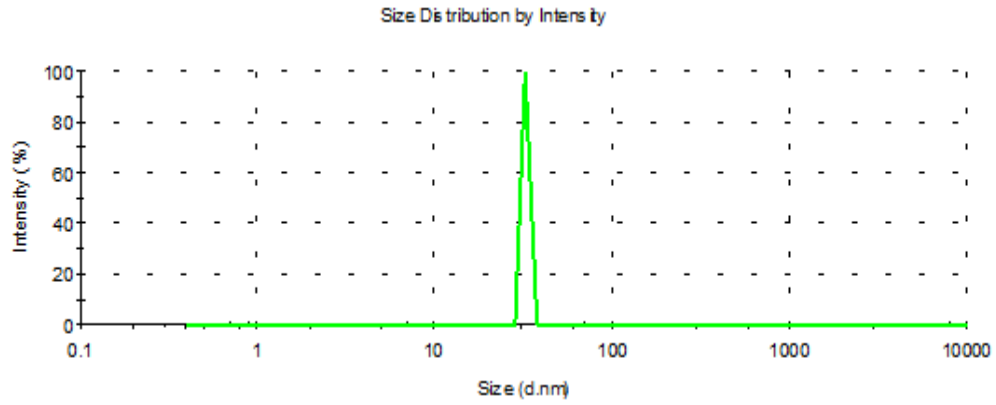
Şekil 3.8. A) Pro A/CB SPN TEM görüntüsü B) CB SPN TEM görüntüsü C) Pro A SPN TEM görüntüsü

Zeta boyut analizinde görüldüğü gibi Pro A/CB SPN 43.82 nm, CB SPN 32.67 nm ve Pro A SPN 37.84 nm boyutundadır (Şekil 3.9). Yaklaşık olarak 22

nm olan sillilenmiş Fe_2O_3 nanopartiküllerin boyutundaki artış sillilenmiş Fe_2O_3 nanopartiküllerine protein A ve CB bağlanmasını desteklemektedir. Nanopartiküllerin zeta boyut analizinden elde edilen sonuçlar TEM görüntülerinden elde edilen boyutlarla yaklaşık olarak uyumludur.

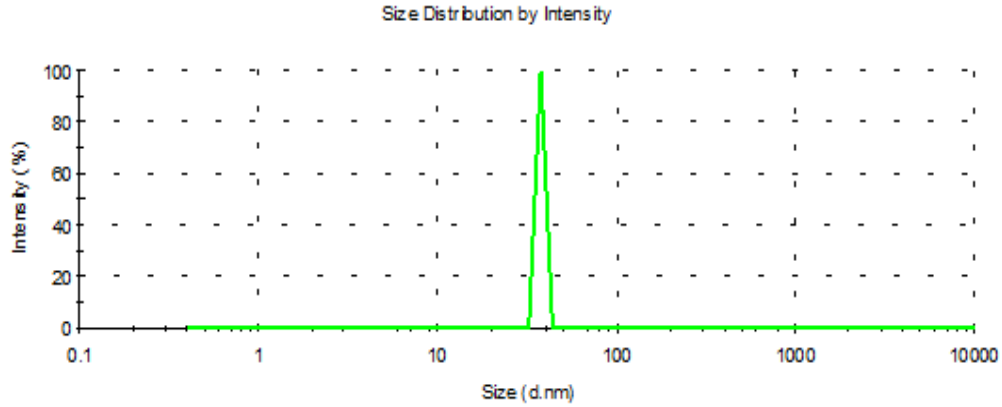


A



B

Şekil 3.9. A) Pro A/CB SPN zeta boyut grafiği B) CB SPN zeta boyut grafiği C) Pro A SPN zeta boyut grafiği



C

Şekil 3.9. (Devam) A) Pro A/CB SPN zeta boyut grafiği B) CB SPN zeta boyut grafiği C) Pro A SPN zeta boyut grafiği

Manyetik nanopartiküllerin varlığı elektron spin rezonans (ESR) ile doğrulanmıştır. ESR, elektromanyetik spektrumun mikrodalga bölgesini kullanan, çiftlenmemiş elektrona sahip kuantum sistemlerini tanımamıza yardımcı olan spektroskopik bir tekniktir. ESR'nin temelinde manyetik rezonans kavramı yatar. Sabit bir manyetik alan uygulandığında manyetik momentlerin her biri birer mıknatıs gibi davranır ve elektronların sahip oldukları spin değerlerine göre mümkün olan enerji seviyelerine yarıma gözlenir. Bu seviyeler arasındaki enerji farkı Larmor frekansı ile orantılıdır. Mikrodalga frekansı, Larmor frekansına eşit olduğunda rezonans gerçekleşir ve enerjisi soğurularak enerji seviyeleri arasında geçiş meydana gelir. Bu durumdaki frekansa 'rezonans frekansı' ve buna karşılık gelen sabit manyetik alana da 'rezonans alanı' denir. Örneğe dış manyetik alanın uygulanması örnekte iç manyetik alan oluşturur. Elektronik manyetik moment ile oluşturulan bölgesel manyetik alanın (H_{lokal}) vektörel olarak dış manyetik alanla (H_{ext}) toplanması etkili alanı (H_{eff}) verir (Eşitlik 3.1).

$$H_{\text{eff}} = H_{\text{ext}} + H_{\text{lokal}} \quad (3.1)$$

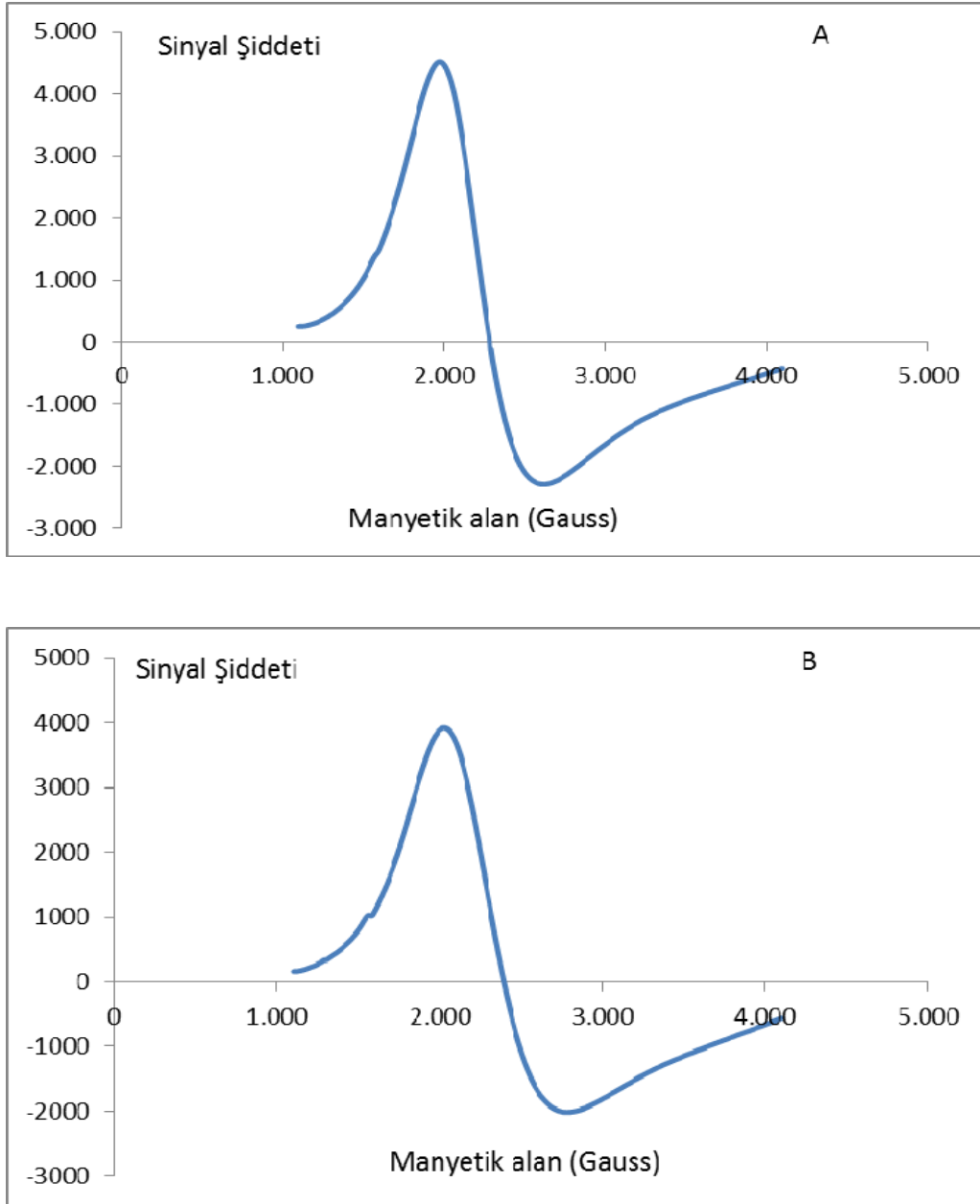
ESR'de genellikle mikrodalga frekansı sabit tutulup, manyetik alan değiştirilir. Manyetik alanla etkileşme sonucunda elde edilen ESR sinyali soğurma şiddetinin birinci türevidir. Rezonans durumunda maximum enerji soğurulduğu için soğurma şiddeti grafiğinin maximum noktasına karşılık gelen manyetik alan;

rezonans alanı olarak tanımlanır. Nanopartiküllerin manyetik alana (gauss) karşı manyetik pik şiddeti Şekil 3.10'da görülmektedir. Fe_2O_3 nanopartikülü uygulanan manyetik alan 1974 Gauss olduğunda 4518 civarında maksimum sinyal şiddeti vermiştir. Fe_2O_3 nanopartikülüne Pro A ve CB bağlandığında manyetik Pro A/CB SPN'nin bağıl şiddetinde azalma (fark 596 birim) gözlenmiştir. Aynı zamanda; şiddetin maksimum olduğu noktadaki manyetik alan değeri 3922 Gauss'a kaymıştır.

g faktör (spektroskopik yarıma çarpanı), eşleşmemiş elektronları bulunan moleküllerin özelliği olarak kabul edilir ve Eşitlik 3.2'den hesaplanabilir. Bilinmeyen sinyalin g değerinin ölçümü sinyalin kökeninin belirlenmesinde faydalı olur. Literatürde, düşük spin Fe^{3+} kompleksleri için g faktörü 1.4-3.1; yüksek spin Fe^{3+} kompleksleri için ise 2.0-9.7 olarak belirlenmiştir (Öztürk ve ark. 2007, Öztürk ve ark. 2010).

$$g = h\nu/bH_r \quad (3.2)$$

Burada; h Planck sabitini ($6.626 \cdot 10^{-27} \text{ erg.s}^{-1}$), b Bohr manyetonu, ($9.274 \cdot 10^{-21} \text{ erg.g}^{-1}$), ν rezonans frekansı ($9.707 \cdot 10^9 \text{ Hz}$) ve H_r rezonans manyetik alanı gösterir. Eşitlik 3.2'den Fe_2O_3 nanopartikülünün g faktörü 2.87, Pro A/CB SPN'nin ise 2.74 olarak bulunmuştur. Fe_2O_3 nanopartikülünün rezonans manyetik alanı 2386 Gauss, Pro A/CB SPN'nin rezonans manyetik alanı ise 2549 Gauss olarak bulunmuştur. Rezonansa geline manyetik alandaki artış ve g faktöründeki düşme nanopartikülün manyetik özelliğinde azalmayı göstermekle birlikte nanopartiküllerin manyetik olduğunu göstermektedir.

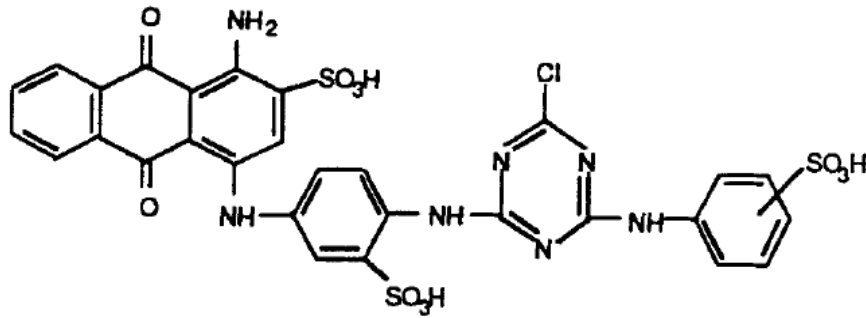


Şekil 3.10. Nanopartiküllerin ESR spektrumu A) Fe_2O_3 nanopartikülü B) Pro A/CB SPN

3.2.3. Pro A/ CB ve CB SPN'ler ile sulu çözeltide albumin adsorpsiyonu

CB triazin halkasındaki klorür ile Fe_2O_3 nanopartikülün yüzeyindeki hidroksil grupları arasındaki nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu yoluyla Fe_2O_3 nanopartiküllerine kovalent olarak bağlanır. Biyomimetik boya ligandlarının ekonomik, immobilizasyonunun kolay olması, kararlı ve adsorpsiyon

kapasitelerinin yüksek olmasından dolayı biyolojik ligandlara göre avantajları vardır. CB, albuminin spesifik bağlanması için kullanılan biyomimetik boya ligandır (Şekil 3.11). SO_3H , NH_2 ve NH gibi olası aktif bölümler proteinlerle bağlandığından CB boya ligandı çoğu türdeki proteinlere bağlanabilir. Boya ligandı ve proteinler arasındaki etkileşim elektrostatik, hidrofobik ve hidrojen bağlanmanın kombinasyonu olabilir. Araştırmalara göre CB'nun biyokimyasal sistemlerde herhangi bir yan etkisine rastlanmamıştır (Yavuz ve ark. 2003, Uzun ve ark. 2004a, Odabaşı ve Denizli 2004). Nanopartiküle bağlanan CB miktarı $980,95 \text{ mgg}^{-1}$ SPN ($13,31 \text{ mmolg}^{-1}$ SPN), Pro A miktarı ise $3,759 \text{ mg Pro A g}^{-1}$ SPN ($0,089 \text{ } \mu\text{mol Pro A g}^{-1}$ SPN) olarak bulunmuştur. CB ve ProA/CB bağlanmış SPN ile çalışılan ortamlarda boya ve Pro A sızması gözlenmemiştir.



Şekil 3.11. Cibacron Blue F3GA

Yapılan tüm adsorpsiyon işlemlerinde adsorplanan madde miktarları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

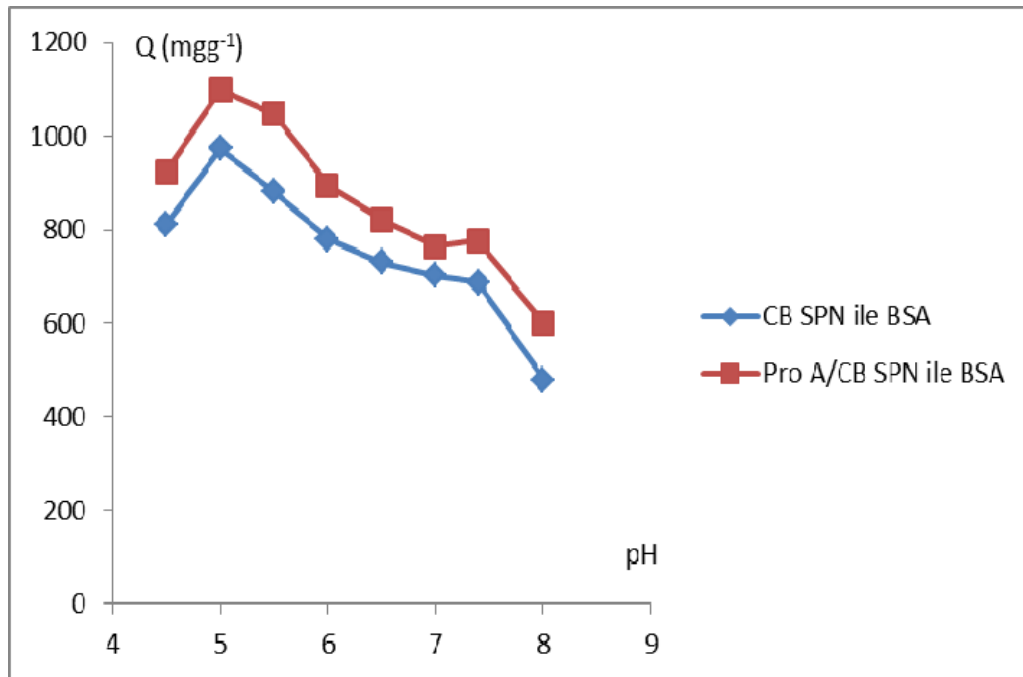
$$Q = [(C_0 - C) V] / m \quad (3.3)$$

Burada, Q mikrokürelerin birim miktarı başına adsorplanan madde miktarıdır (mgg^{-1}); C_0 ve C , albumin çözeltisinin sırasıyla, başlangıç ve adsorpsiyon sonucu süzültüde kalan derişimleridir (mgmL^{-1}); V sulu faz hacmi (mL) ve m de kullanılan SPN ağırlığıdır (g).

Şekil 3.12'de Pro A/CB ve CB SPN ile albumin adsorpsiyonuna pH etkisi görülmektedir. Her iki SPN'de de albuminin maksimum adsorpsiyonu izoelektrik noktası olan pH 5'de gözlenmiştir. pH artışı ile albumin adsorpsiyonu azalmaktadır. Albumin adsorpsiyonundaki düşüş benzer yüklü gruplar arasındaki

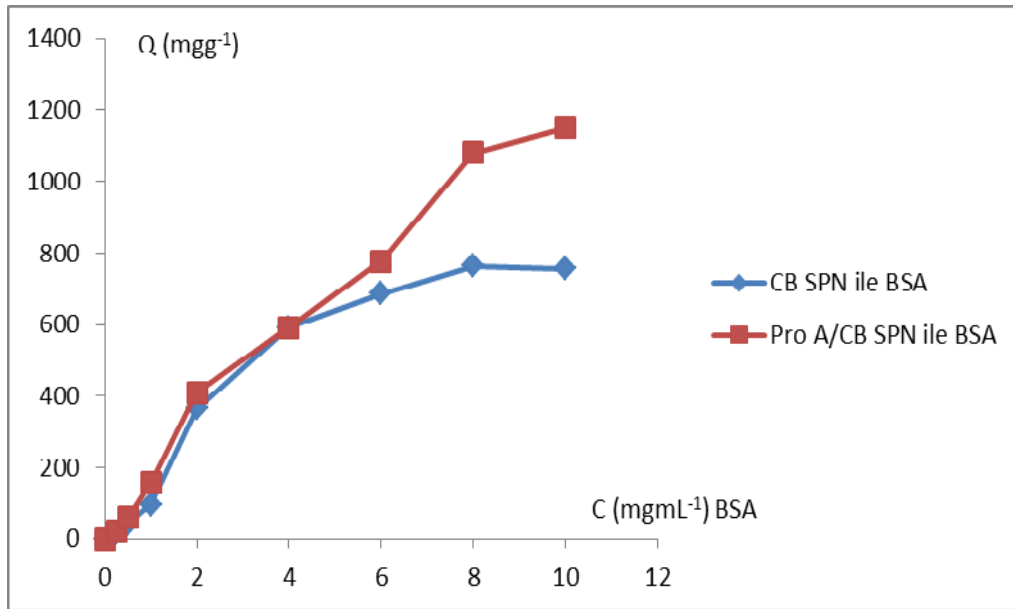
elektrostatik itmenin etkisiyle yorumlanabilir. İzoelektrik noktasında proteinler net yüke sahip değildir ve bu nedenle genellikle sulu çözeltiden maksimum adsorpsiyon bu noktada gözlenir. Buna ek olarak, boya ve protein molekülleri arasındaki bu etkileşimler ligandların ve albumin yapısındaki aminoasit yan zincirindeki bazı grupların iyonlaşma hallerinden ve bu pH'da albuminin konformasyonal durumundan kaynaklanabilir. pH 5'de maksimum albumin adsorpsiyon kapasitesi CB SPN için 973.19 mgg^{-1} ve Pro A/CB SPN için ise 1100.69 mgg^{-1} olarak elde edilmiştir.

Kassab ve arkadaşları (2000) CB poliamid membranı ile pH 5'de maksimum albumin adsorpsiyon kapasitesini 150 mgHSAg^{-1} , Altıntaş ve Denizli (2006) CB poli(GMA) kürecikleri ile pH 5'de maksimum albumin adsorpsiyon kapasitesini 120 mg HSAg^{-1} ve Tamahkar ve arkadaşları (2010) CB bağlı bakteriyel selüloz nanofiber ile pH 5'de maksimum albumin adsorpsiyon kapasitesini 600 mg HSAg^{-1} olarak bulmuşlardır.



Şekil 3.12. Pro A/CB ve CB SPN ile albumin adsorpsiyonuna pH etkisi (Albumin derişimi: 6 mgmL^{-1} , $V_{\text{albumin}}: 5 \text{ mL}$, $m_{\text{Pro A/CB ve CB SPN}}: 5 \text{ mg}$, $T: 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

Şekil 3.13’de Pro A/CB ve CB SPN ile albumin adsorpsiyonuna derişim etkisini görölmektedir. Şekilden de göröldüğü gibi; her iki SPN’de adsorpsiyon, albuminin başlangıç derişiminin artmasıyla artmış ve 10 mgmL⁻¹ albumin derişiminde doygunluğa ulaşılmıştır. Albumin bağlama kapasitesindeki bu artış; CB’nun asidik grupları ve aromatik yapısıyla ve albumin moleküllerinde bulunan aminoasitlerdeki yan zincirlerdeki grupların arasındaki hidrofobik, elektrostatik ve hidrojen bağı gibi farklı etkileşim mekanizmalarının toplam etkisinden kaynaklanmaktadır. pH 7.4’de maksimum adsorplanan albumin miktarı ise CB SPN için 763.62 mgg⁻¹ (11.40 µmolg⁻¹) ve Pro A/CB SPN için ise 1149 mgg⁻¹ (17.16 µmolg⁻¹) olarak bulunmuştur.



Şekil 3.13. Pro A/CB ve CB SPN ile albumin adsorpsiyonuna derişimin etkisi (pH 7.4 PBS, V_{çözelti}: 5 mL, m_{Pro A/CB ve CB SPN}: 5 mg, T: 25 °C)

Literatürde farklı sorbentlerle albumin adsorpsiyonu için farklı adsorpsiyon kapasiteleri elde edilmiştir. Denizli ve arkadaşları (1997) PVA partiküllerine CB bağlanmasıyla 35 mg BSAg⁻¹ adsorpsiyon kapasitesi elde etmiştir. Zeng ve Ruckenstein (1996) kitosan sorbentlerine polietersülfon desteklemesi ile ve CB bağlanmasıyla adsorpsiyon kapasitesini 10.2 mg HSAg⁻¹ olarak bulmuşlardır. Denizli ve arkadaşları (1999) poli(EDMA-HEMA) polimerik

mikroküreciklere CB bağlanmasıyla 57.3 mg BSAg⁻¹ adsorpsiyon kapasitesi elde etmiştir. Kassab ve ark.ları (2000) mikrogözenekli poliamit fiber afinite membranlarını CB ile türevlendirerek kullandığında ise adsorpsiyon kapasitesini 147 mg HSA g⁻¹ olarak elde etmiştir. Odabaşı ve Denizli (2004) manyetik p(HEMA) küreciklerine CB bağlanmasıyla adsorpsiyon kapasitesini 94.5 mg HSAg⁻¹ olarak elde ederken, Uzun ve ark.ları (2004b) poli(stiren-HEMA) monodispers mikroküreciklerine Reactive green HE-4BD boyası ile bağladıklarında adsorpsiyon kapasitesini 221 mgg⁻¹ olarak bulmuştur. Unsal ve arkadaşları (2005) p(HEMA-co-EDM) küreciklerine CB bağladıklarında 60 mg BSAg⁻¹, Qu ve arkadaşları (2009) CB bağlı mag PMMA nanopartikülleri ile 121.98 mg BSAg⁻¹, Karakoç ve arkadaşları (2009) PHEMA-IMEO -Cu²⁺ nanopartikülleri ile 600 mg HSAg⁻¹, Tamahkar ve arkadaşları (2010) CB bağlı bakteriyel selüloz nanofiber ile pH 5’de 1800 mg HSA.g⁻¹ adsorpsiyon kapasitesi elde etmişlerdir.

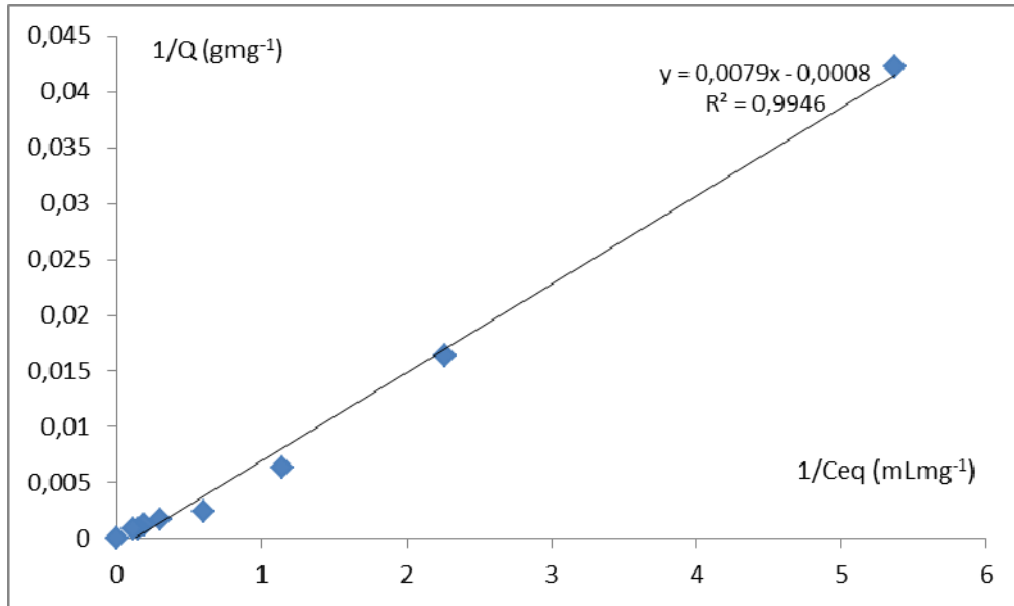
Adsorpsiyon izotermi, her bir molekülün adsorbanlarla etkileşimlerinin karakterizasyonu için kullanılır. Adsorpsiyon izotermi, iki faz dengede iken katı faza adsorbe olan madde miktarı ve çözeltideki moleküllerin derişimi arasında ilişki kurulmasını sağlar. Langmuir adsorpsiyon modeli, her biri yalnız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

$$Q = Q_{\max} b C_{\text{eq}} / (1 + b C_{\text{eq}}) \quad (3.4)$$

Bu denklemde Q: adsorbana bağlanan albumin miktarını (mgg⁻¹), C_{eq}: çözeltideki denge albumin derişimini (mgmL⁻¹), b: tek tabakalı bağlanmayı yansıtan Langmuir sabitini (mLmg⁻¹), Q_{max}: maksimum adsorpsiyon kapasitesi (mgg⁻¹) ni gösterir. Bu deklemler lineerize edildiğinde aşağıdaki denklem elde edilir.

$$1/Q = [1/(Q_{\max} b)] [1/C_{\text{eq}}] + [1/Q_{\max}] \quad (3.5)$$

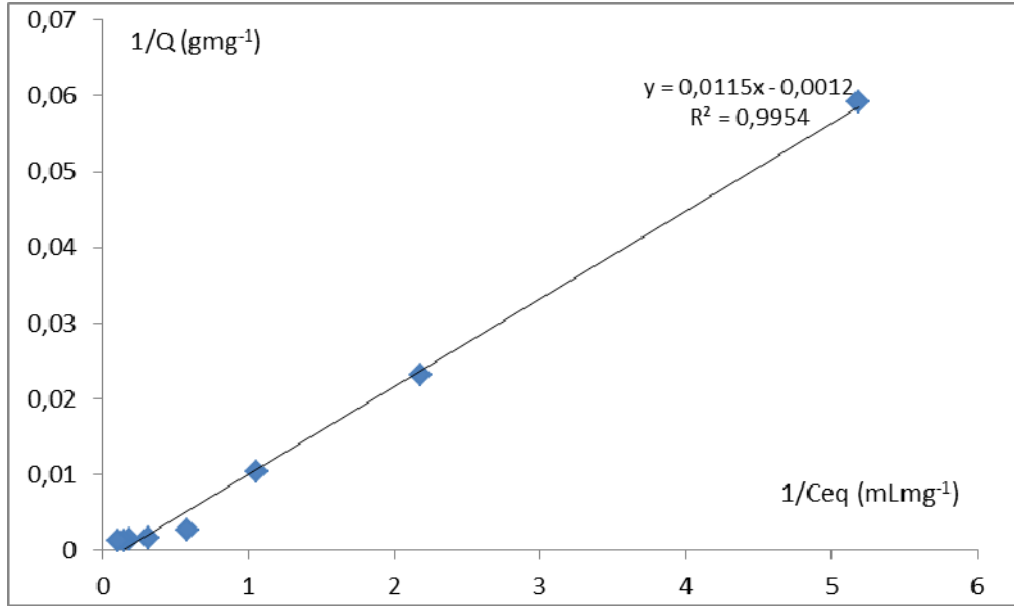
$1/C_{eq}$ 'ya $1/Q$ grafiği çizildiğinde kesim $1/Q_{max}$, eğim ise $1/Q_{max}b$ 'dir. Şekil 3.14 ve 3.15'de albumin adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir. Deneysel verilerden albumin adsorpsiyonu için maksimum kapasite (Q_{max}) elde edilir. Her iki SPN için denge verileri denklemde dönüştürüldüğünde lineer bir grafik elde edilmiştir. R^2 değerinin 0.9946 ve 0.9954 olması bu afinite adsorbanlarının Langmuir adsorpsiyon modeline uygulanabileceğini göstermiştir (Şekil 3.14 ve 3.15). Pro A/CB SPN için maksimum adsorpsiyon kapasitesi 1250 mgg^{-1} , Langmuir sabiti ise 0.101 mLmg^{-1} (6784.81 M^{-1}) ve CB SPN için ise maksimum adsorpsiyon kapasitesi 833.33 mgg^{-1} , Langmuir sabiti ise 0.104 mLmg^{-1} (6991.3 M^{-1}) olarak bulunmuştur.



Şekil 3.14. Pro A/CB SPN ile albumin adsorpsiyonu için Langmuir izotermi

Lagercrantz ve Larson (1983) çalışmasında Blue sefaroza albumin bağlanma sabiti $2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olduğu belirtilmiştir. Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında (2001) CB ve BSA arasındaki bağlanma sabiti $1.18 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Demiryas ve arkadaşlarının çalışmasında (2007) CB bağlı P(AAM-AGE) kriyojel ile BSA arasındaki bağlanma sabiti $4.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, maksimum adsorpsiyon kapasitesi 43.9 mgg^{-1} olarak bulunmuştur. Qu ve arkadaşlarının

çalışmasında (2009) CB-mag PMMA nanopartikülü ile BSA arasındaki bağlanma sabiti $5.85 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ maksimum adsorpsiyon kapasitesi ise 121.98 mgg^{-1} olarak bulunmuştur.



Şekil 3.15. CB SPN ile albumin adsorpsiyonu için Langmuir izotermi

Ngah ve arkadaşları (2002) adsorpsiyon sisteminin adsorplanan madde için uygulanabilir olup olmadığını tahminde bulunmak amacıyla izoterm şeklinin etkisini incelemiştir. Langmuir izoterminin temel özelliği; sabit ayırma faktörü ya da denge parametresi (R_L) ile ifade edilmektedir. R_L aşağıdaki denklemlerle tanımlanmaktadır.

$$R_L = 1 / (1 + bC_0) \quad (3.6)$$

Burada C_0 başlangıç albumin derişimi (mgmL^{-1}) ve b ise Langmuir adsorpsiyon denge sabitidir (mLmg^{-1}).

$R_L > 1$ ise adsorpsiyonun uygun olmadığını,

$R_L = 1$ ise adsorpsiyonun doğrusal olduğunu;

$0 < R_L < 1$ ise adsorpsiyonun uygun olduğunu;

$R_L = 0$ olması ise adsorpsiyonun tersinmez olduğunu gösterir (Nghah ve ark. 2002, Ayar ve ark. 2008).

Çizelge 3.1’de her iki SPN’ye farklı başlangıç albumin derişimi için R_L değerleri hesaplanmıştır. R_L değerleri iki SPN’de albumin adsorpsiyonunun uygun olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.1. Langmuir denklemine dayanan R_L değerleri

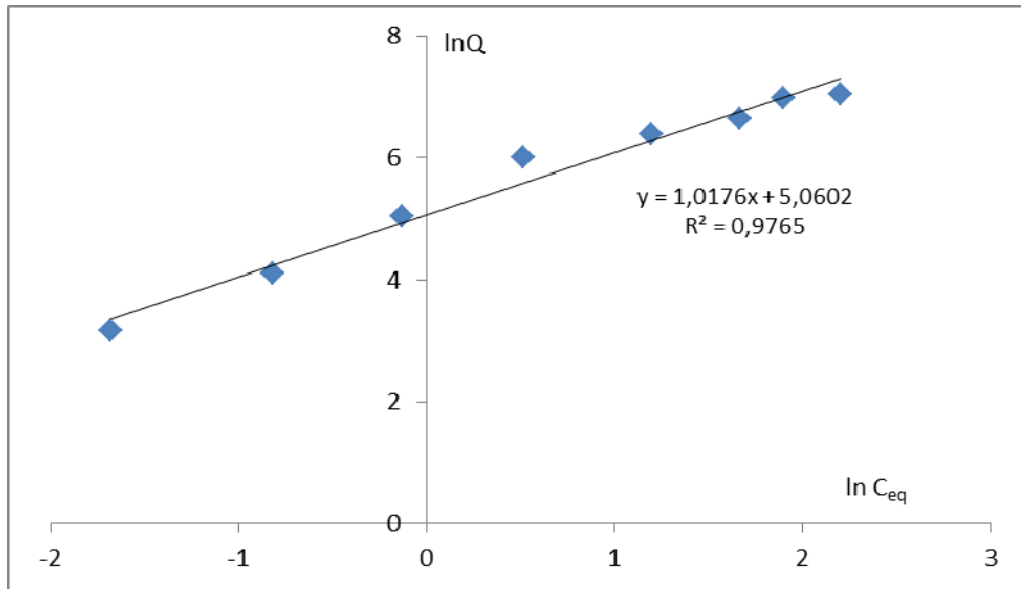
Başlangıç albumin derişimi (mgmL ⁻¹)	R_L (Pro A/CB SPN)	R_L (CB SPN)
0.25	0.9753	0.9747
0.5	0.9518	0.9506
1.0	0.9080	0.9058
2.0	0.8315	0.8278
4.0	0.7116	0.7062
6.0	0.6220	0.6157
8.0	0.5524	0.5458
10.0	0.4968	0.4902

Sisteme uygulanan diğer bir adsorpsiyon modeli ise Freundlich izotermidir. Freundlich denklemi ideal olarak temiz ve homojen olmayan katı yüzeylerdeki adsorpsiyonlar için Alman fizikokimyacı Herbert Max Finlay Freundlich tarafından deneysel çalışmalara bağlı olarak türetilmiştir (Sarıkaya 1993). Freundlich izotermi aşağıdaki denklemle ifade edilir.

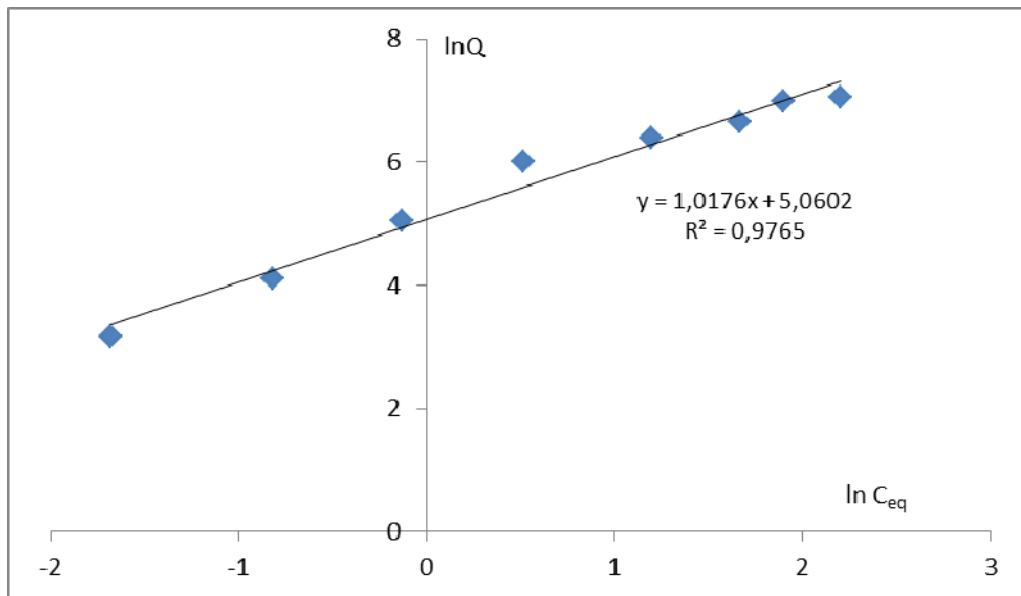
$$\ln Q_e = 1/n(\ln C_{eq}) + \ln K_F \quad (3.7)$$

Burada K_F Freundlich sabiti olup adsorpsiyon kapasitesinin göstergesi, n ise adsorpsiyon şiddeti ile ilgili sabittir. $1/n$ sistemin heterojenliğini gösterir. Freundlich izotermi tersinir adsorpsiyonu tanımlar ve adsorpsiyonu tek tabaka oluşumuyla sınırlamaz. n değeri 0’a yaklaşıyorsa sistem daha fazla heterojendir. $\ln C_{eq}$ ’ya karşı $\ln Q_e$ grafiğe geçirildiğinde kesimden K_F ve eğimden de n sabitleri bulunabilir. Şekil 3.16 ve 3.17’de albumin adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir. Pro A/CB SPN ile albumin

adsorpsiyonuna Freundlich izotermi uygulandığında n 0.98 ve K_F ise 157.62 olarak bulunmuştur. CB SPN ile albumin adsorpsiyonuna Freundlich izotermi uygulandığında n 0.96, K_F ise 114 olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.16. Pro A/CB SPN ile albumin adsorpsiyonu için Freundlich izotermi



Şekil 3.17. CB SPN ile albumin adsorpsiyonu için Freundlich izotermi

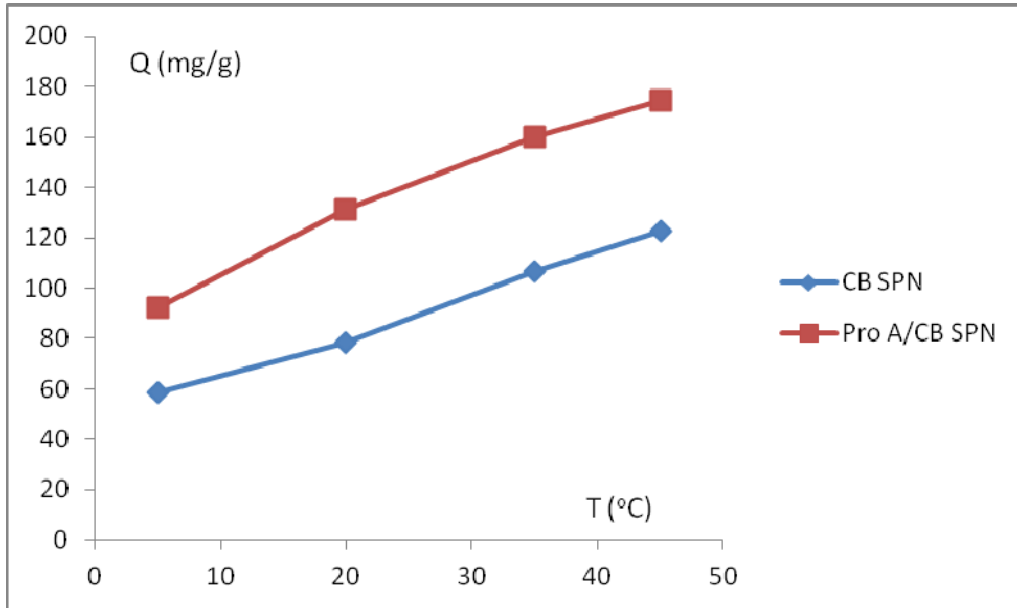
Albumin adsorpsiyon verileri sırasıyla Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermine uygulandığında her iki SPN için albumin adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Elde edilen grafiklerin regresyon sabitlerine (R^2) bakıldığında; Pro A/CB SPN’de Langmuir için hesaplanan değer (0.9946), Freundlich için hesaplanan değerden (0.9765) daha yüksek çıkmıştır. Aynı şekilde CB SPN için her iki izotermde elde edilen regresyon sabitlerine bakıldığında; Langmuir için hesaplanan değer (0.9954), Freundlich için hesaplanan değerden (0.9452) daha yüksek çıkmıştır. İki izotermi kıyaslanmasıyla; sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyonun gerçekleştiği söylenebilir. Ayrıca Çizelge 3.1’den elde edilen R_L değeri Langmuir adsorpsiyonunu desteklemektedir. Langmuir adsorpsiyon izotermi ile elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi (Q_{max}) de deneysel olarak elde edilen adsorpsiyon kapasitesi ile uyumludur. Bu izotermiler ile ilgili elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. SPN'lere albumin adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması

Deneysel		Langmuir			Freundlich		
SPN	Q (mgg ⁻¹)	Q _m (mgg ⁻¹)	b (mLmg ⁻¹)	R ²	K _F	n	R ²
Pro A/CB SPN	1149	1250	0.1013 (6784 M ⁻¹)	0.9946	157.62	0.98	0.9765
CB SPN	763.62	833.33	0,104 (6991 M ⁻¹)	0.9954	114	0.96	0.9452

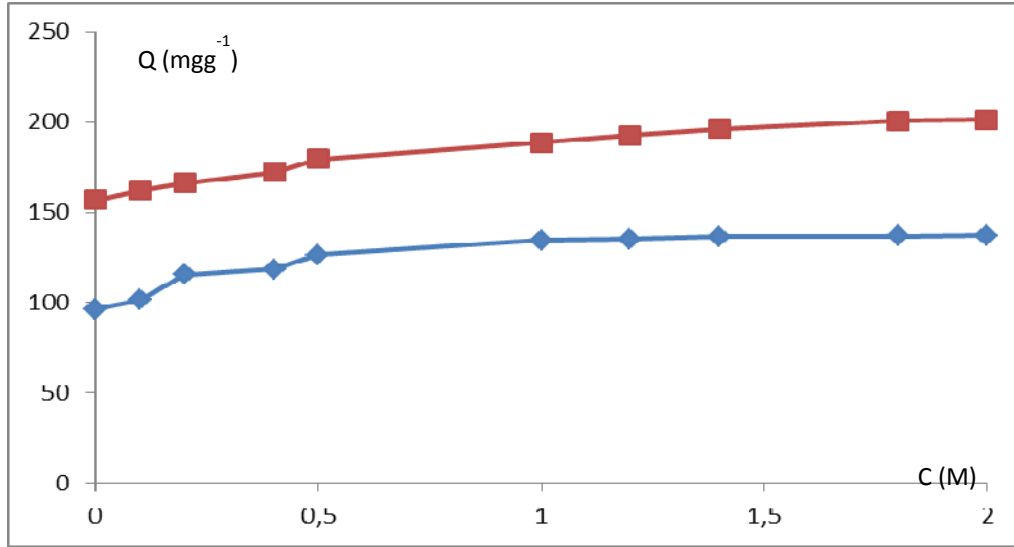
Şekil 3.18’de CB SPN ve Pro A/CB SPN ile albumin adsorpsiyon kapasitesi üzerine sıcaklığın etkisi görülmektedir. Sıcaklığın artması ile her iki SPN’nin albumin adsorpsiyon kapasitesi artmaktadır. Maksimum albumin adsorpsiyonu 45 °C’de CB SPN için 152.90 mgg⁻¹, Pro A/CB SPN için ise 194.3 mgg⁻¹ olarak elde edilmiştir. CB’nun aromatik grupları protein molekülleri ile hidrofobik etkileşimlerle etkileşmektedir. Sıcaklık arttıkça albuminin hidrofobik grupları CB’nun antrokinon gruplarıyla etkileşmektedir. Hidrofobik etkileşim, entropi ile yürütülmektedir. Entalpi değişimi, küçük değerlerde pozitif veya negatif değerlerde olduğundan, serbest enerji değişimi pozitif entropi değişimiyle kontrol

edilir ve sıcaklıkla artar. Serbest enerji değişimindeki negatif değer hidrofobik protein-ligand etkileşiminin termodinamik olarak istenen bir olay olduğunu gösterir. Bunun yanında hidrofobik etkileşimleri çalıştıran Van der Waals etkileşim kuvvetleri sıcaklık artışıyla artmaktadır (Builder 1993, Querioz ve ark. 2001, Özkara 2010).



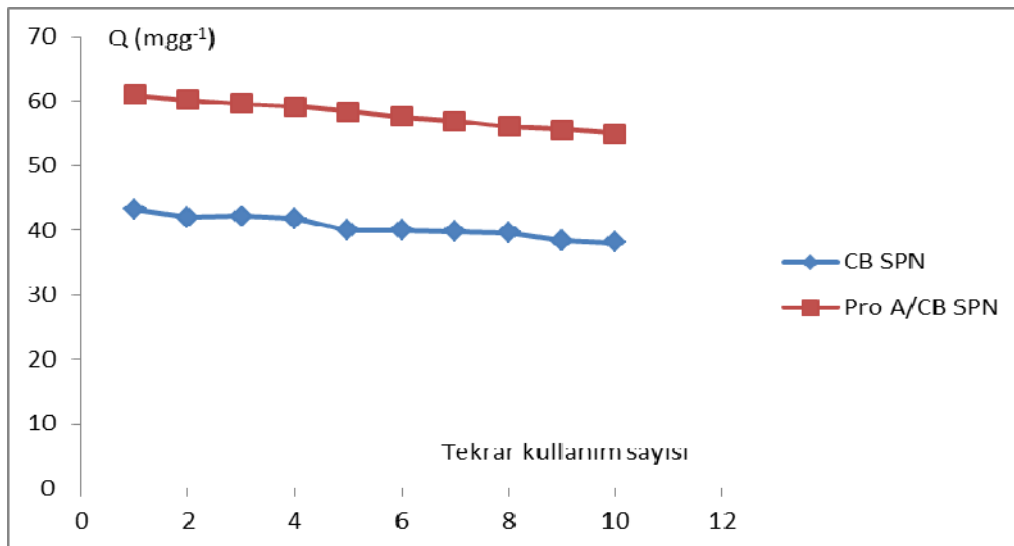
Şekil 3.18. Pro A/CB ve CB SPN ile albumin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi (Albumin derişimi: 1 mg mL^{-1} , $V_{\text{çözültü}}$: 3 mL, $m_{\text{Pro A/CB ve CB SPN}}$: 5 mg, pH: 7.4 PBS)

İyonik etkileşimler tanıma ve bağlanma süreçlerinin anlaşılmasını sağlar. Pro A/CB SPN ve CB SPN'ye albumin bağlanmasına NaCl derişiminin etkisi Şekil 3.19'da verilmektedir. İyonik şiddetin artışı her iki SPN'nin albumin adsorpsiyon kapasitesinde artmaya neden olmaktadır. NaCl derişiminin artmasıyla albumin adsorpsiyon kapasitesi CB SPN'de 122 mg g^{-1} 'ye, Pro A/CB SPN'de ise 175 mg g^{-1} 'ye artış göstermiştir. Eklenen tuz, su molekülleri ile etkileşerek albumin ve CB'nin etkileşmesi için sürücü kuvvet oluşturmaktadır. Ortama eklenen tuzun iyonik gücü, proteinlerin çözünürlüğünü etkilemektedir.



Şekil 3.19. Pro A/CB ve CB SPN'ye albumin adsorpsiyonuna NaCl derişiminin etkisi (Albumin derişimi: 1 mg mL^{-1} , $V_{\text{çözelti}}$: 3 mL, $m_{\text{Pro A/CB ve CB SPN}}$: 4 mg, pH: 7.4 PBS)

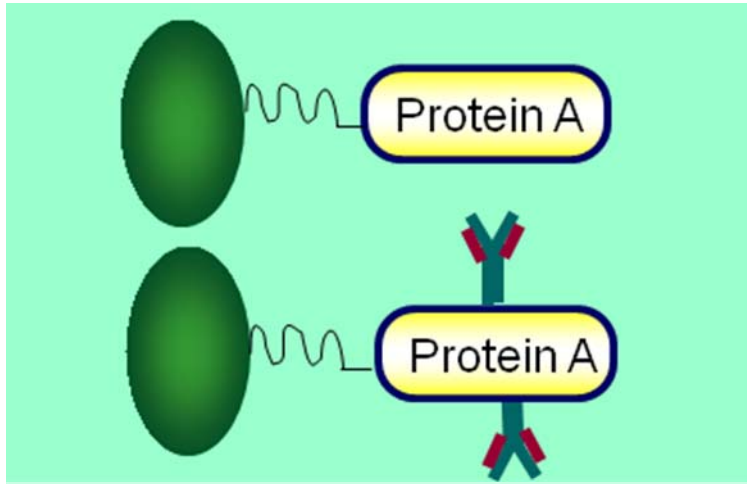
Katı desteklerin rejenerasyonu ve tekrar kullanımı (Şekil 3.20) laboratuvar ve ticari uygulamalarda maliyet açısından önemlidir. Pro A/CB SPN'nin desorpsiyon oranı % 93 olarak bulunurken; CB SPN'nin desorpsiyon oranı % 95 olarak bulunmuştur ve 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrasında adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir değişim görülmemiştir.



Şekil 3.20. Albumin desorpsiyonu ve tekrar kullanılabilirlik (Albumin derişimi: 0.5 mg mL^{-1} , V_{albumin} : 3 mL, $m_{\text{Pro A/CB ve CB SPN}}$: 5 mg, pH: 7.4 PBS, Desorpsiyon tamponu: % 10 Etilen glikol içeren 0.1 M asetat tamponu pH4.0)

3.2.4. Pro A/ CB ve Pro A SPN'ler ile sulu çözeltide IgG Adsorpsiyonu

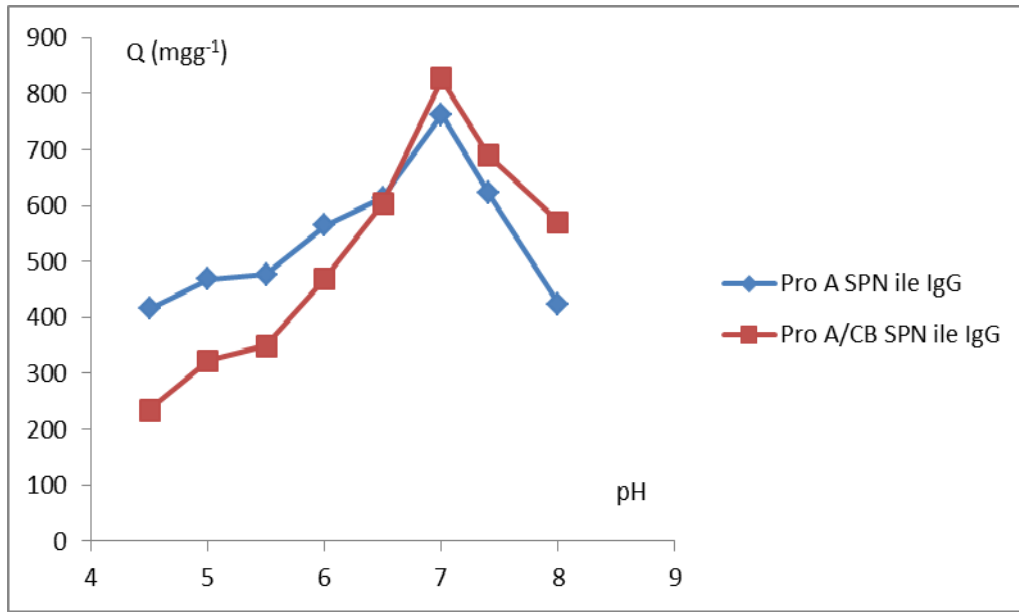
Pro A'nın IgG'ye karşı afinitesi oldukça yüksektir. IgG Pro A'ya Fc bölümünden bağlanır. Etkileşim hidrofobik etkileşim ile birlikte hidrojen bağı ile karakterize edilebilir. Pro A beş benzer IgG bağlama bölümleri içerir. Pro A daki beş bölümden her biri α -heliks yığına anti paralel olarak yerleşir ve üç boyutlu yapı hidrofobik merkezle stabilize olur. Protein A maliyeti oldukça yüksek olmakla birlikte doğru oryantasyonda bağlanması oldukça önemlidir. Pro A kovalent bağlanması başka bir çalışmada pH 9.5'da gerçekleştirilmiş ve 3.12 mgg^{-1} bağlanma elde edilmiştir (Çakmak ve ark. 2009, Alkan ve ark. 2009). Nanopartiküle bağlanan CB miktarı $980,95 \text{ mgg}^{-1}$ SPN ($13,31 \text{ mmolg}^{-1}$ SPN) olarak bulunmuştur. SPN'lere bağlanan Pro A miktarı ise $3.759 \text{ mg Pro A g}^{-1}$ SPN ($0,089 \text{ } \mu\text{mol Pro A g}^{-1}$ SPN) olarak elde edilmiştir. Adsorpsiyon çalışmaları süresince nanopartiküllerden CB ve Pro A sızması gözlenmemiştir. Şekil 3.21'de Pro A bağlanmış katı desteğe IgG bağlanması şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.21. Pro A bağlı SPN'ye IgG bağlanması

Şekil 3.22, Pro A/CB ve Pro A SPN'ye IgG adsorpsiyonuna pH etkisini göstermektedir. pH 7'de maksimum adsorpsiyon gözlenmiştir, bu nedenle derişim çalışması da bu pH'daki PBS tamponunda gerçekleştirilmiştir. pH 7'de maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesi Pro A/CB SPN için 825.9 mgg^{-1} ve Pro A

SPN için ise 762.75 mgg^{-1} olarak elde edilmiştir. IgG'nin izoelektrik noktası 6.2'dir ve maksimum adsorpsiyonun pH 7.0'de gözlenmesi IgG'nin her iki SPN'ye bağlanmasında hidrofobik etkileşimlerle birlikte diğer etkileşimlerin rol oynadığını göstermiştir. İzoelektrik noktasında proteinlerin net yükü sıfırdır. Aminoasit bileşimine bağlı olarak izoelektrik noktasında protein bazı yüklü gruplar içerebilir.

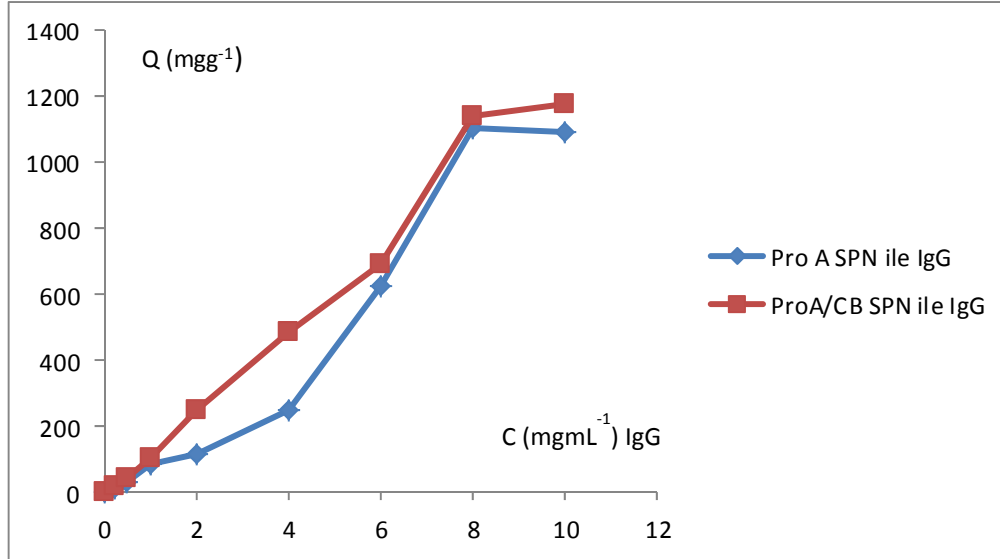


Şekil 3.22. Pro A/CB ve Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonuna pH etkisi (IgG derişimi: 6 mgmL^{-1} , $V_{\text{IgG}} \text{ çözeltisi: } 5 \text{ mL}$, $m_{\text{Pro A/CB ve Pro A SPN: } 5 \text{ mg}$, $T: 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

Akerstrom ve Bjorck'un açılışmasında (1986) Sefaroz ProA'ya IgG bağlanması pH 8'de maksimum olarak bulunmuştur. Yavuz ve arkadaşlarının çalışmasında (2006) P(HEMA-Reactive Green) partiküllerine IgG bağlanması pH 7'de maksimum olarak gözlenmiş ve maksimum adsorpsiyon kapasitesi 20 mgg^{-1} olarak bulunmuştur. Türkmen ve arkadaşlarının (2008) çalışmasında ise P(HEMA-MAPA) nanokürecikleri ile IgG bağlanması pH7'de maksimum olarak gözlenmiş ve maksimum adsorpsiyon kapasitesi 800 mgg^{-1} olarak bulunmuştur.

Şekil 3.23, Pro A/CB ve Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonuna derişim etkisini göstermektedir. Her iki katı desteğe adsorplanan IgG miktarı (Q) Eşitlik 3.3'e göre hesaplanmıştır. Şekil 3.23'de de görüldüğü gibi her iki SPN'de

adsorpsiyon IgG başlangıç derişiminin artmasıyla artmış ve 10 mgmL⁻¹ IgG derişimde doygunluğa ulaşılmıştır. pH 7.4’de maksimum adsorplanan IgG miktarı Pro A SPN için 1102 mgg⁻¹ (7.35 µmolg⁻¹) ve Pro A/CB SPN için ise 1175 mgg⁻¹ (7.83 µmolg⁻¹) olarak bulunmuştur.

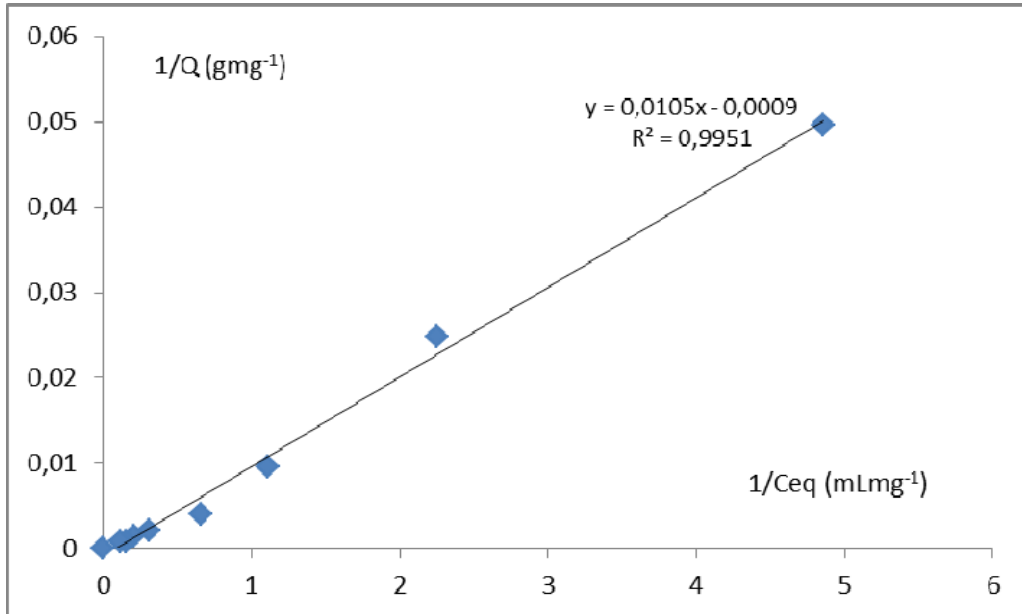


Şekil 3.23. Pro A/CB ve Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonuna derişimin etkisi (IgG derişimi: 6 mgmL⁻¹, V_{IgG} çözeltisi: 5 mL, m_{Pro A/CB} ve m_{Pro A SPN}: 5 mg, pH 7.4)

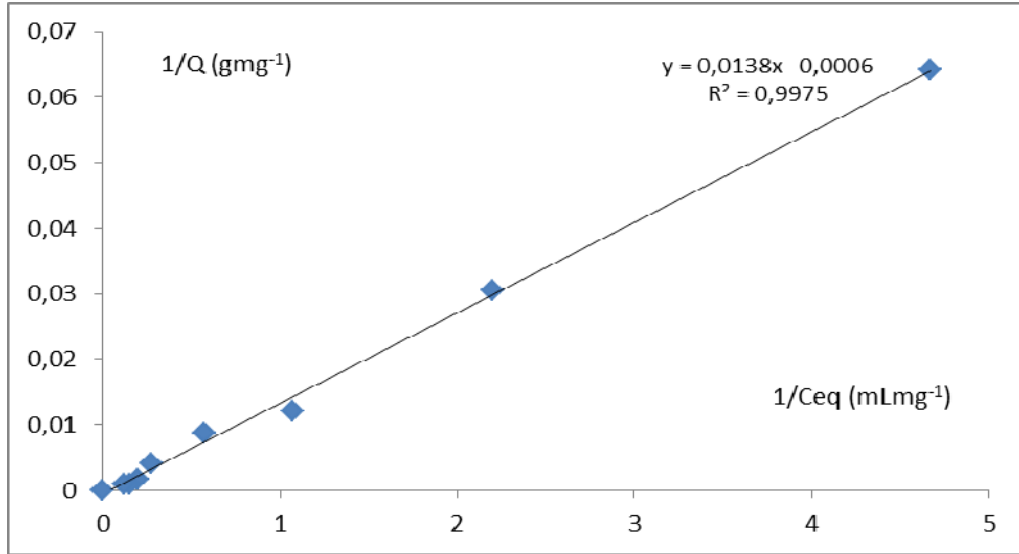
Literatürde farklı sorbentlerle IgG adsorpsiyonu için farklı adsorpsiyon kapasiteleri elde edilmiştir. Füglistaller (1989) Affi-gel, Eupergit, Ultragel ve Sepharose serileri gibi farklı ticari Pro A afinite kromatografi matrikslerinin IgG’yi dinamik bağlama kapasitelerini 0.7-20 mg IgG₃ g⁻¹ olarak belirlemiştir. Klein ve arkadaşları (1994) mikrogözenekli poli(kaprolaktam) oyuk fiberlerine Pro A spesifik biyolojik ligandını bağladığında IgG adsorpsiyon kapasitesini 12.4-28.3 mgcm⁻³ olarak elde etmişlerdir. Denizli ve arkadaşlarının çalışmasında (1995b) PHEMA mikrokürelerine Pro A immobilize edilmesiyle IgG adsorpsiyon kapasitesini 24 mgg⁻¹ olarak elde etmiştir. Garipcan ve Denizli (2002) P(HEMA-MAH) küreciklerinin kullanmasıyla 73.7 mg IgGg⁻¹ adsorpsiyon kapasitesine ulaşmış, Yavuz ve arkadaşları (2006) ise Reactive Green HE 4BD boyasını P(HPMA) jel küreciklerine bağladıklarında IgG adsorpsiyon kapasitesini 71 mgg⁻¹ olarak bulmuşlardır. Akgöl ve arkadaşları (2007), poli(EDMA-MAH)

pseudospesifik manyetik afinite küreciklerinin IgG adsorpsiyon kapasitesini sulu çözeltide 46.8 mgg^{-1} olarak bulmuşlar, insan serumunda ise adsorpsiyon değeri 85.7 mgg^{-1} 'a yükselmiştir. Türkmen ve arkadaşları (2008), P(HEMA-MAPA) nanoküreciklerini IgG ayırımı için kullandıklarında 780 mgg^{-1} adsorpsiyon kapasitesi elde etmişlerdir. Öztürk ve arkadaşlarının (2008) çalışmasında p(HEMA-IMEO) nanokürecikleri kullanıldığında plazmada maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesi 843 mgg^{-1} , Alkan ve arkadaşlarının (2009) çalışmasında p(HEMA)-Protein A kriyojellerine IgG bağlanması maksimum olarak pH 7.4'de ve maksimum adsorpsiyon kapasitesi ise 60 mgg^{-1} bulunmuştur.

IgG adsorpsiyon verileri, Langmuir adsorpsiyon denkleminde (Eşitlik 3.5) dönüştürüldüğünde lineer bir grafik elde edilmiş ve bu sistemin Langmuir adsorpsiyon izotermine uyduğu gözlenmiştir (Şekil 3.24 ve 3.25). R^2 değerinin 0.9951 ve 0.9975 olması bu afinite adsorbanlarının Langmuir adsorpsiyon modeline uygulanabileceğini göstermiştir. Pro A/CB SPN için IgG maksimum adsorpsiyon kapasitesi 1111 mgg^{-1} , Langmuir sabiti ise 0.086 mLmg^{-1} (12857.14 M^{-1}) ve Pro A SPN için IgG maksimum adsorpsiyon kapasitesi 1666.67 mgg^{-1} , Langmuir sabiti ise 0.043 mLmg^{-1} (6521.74 M^{-1}) olarak bulunmuştur.



Şekil 3.24. Pro A/CB SPN ile IgG adsorpsiyonu için Langmuir izotermi



Şekil 3.25. Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonu için Langmuir izotermi

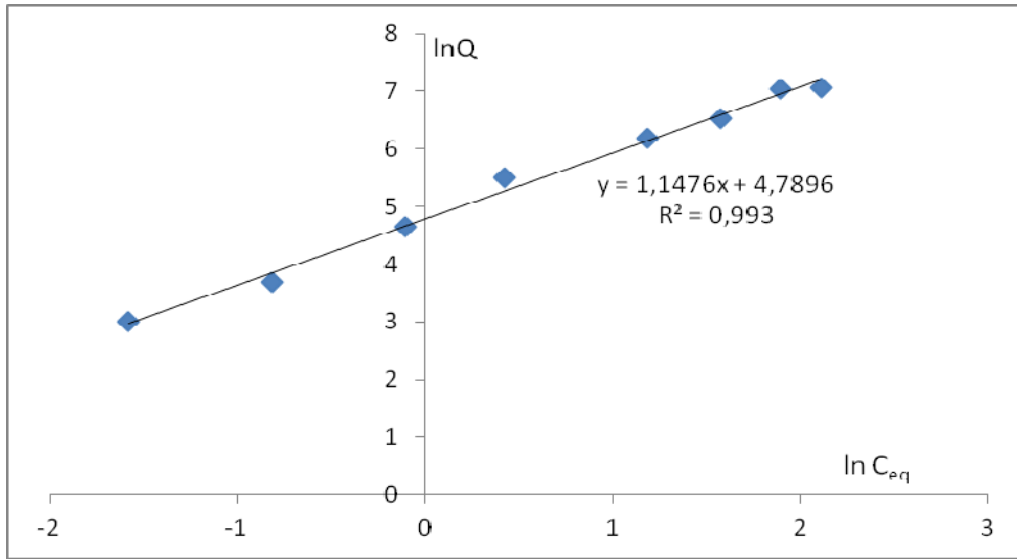
Eşitlik 3.6'dan Ngah ve arkadaşlarının (2002) adsorpsiyon sisteminin uygulanabilir olup olmadığını tahmin etmek için kullandıkları sabit ayırma faktörü ya da denge parametresi (R_L) farklı başlangıç IgG derişimlerinde Pro A ve Pro A/CB SPN'ler için de hesaplanmıştır. Çizelge 3.3'de, R_L değerleri iki SPN'de de IgG adsorpsiyonunun tercih edildiğini göstermektedir.

Çizelge 3.3. Langmuir denkleminde dayanan R_L değerleri

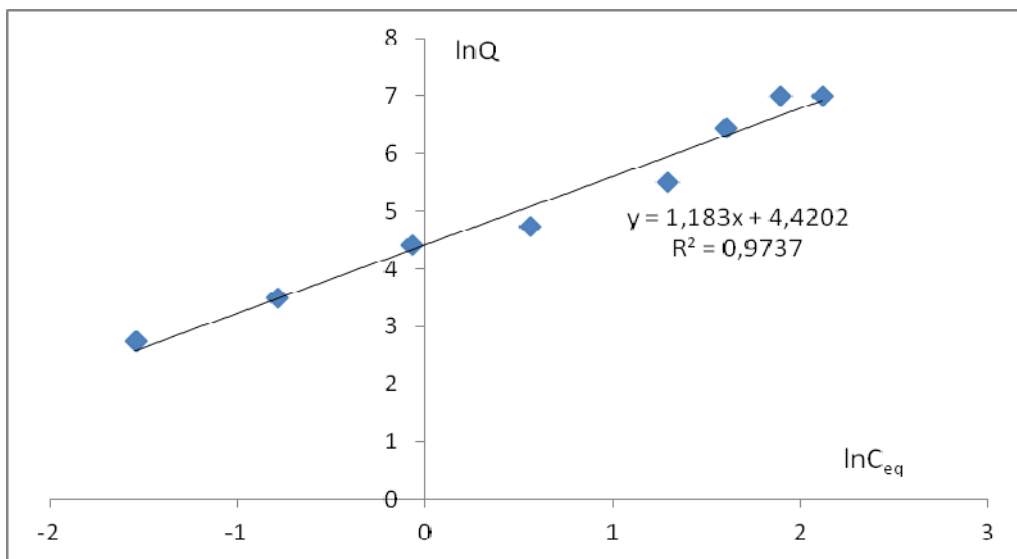
Başlangıç IgG derişimi (mgmL ⁻¹)	R_L (Pro A/CB SPN)	R_L (Pro A SPN)
0.25	0.9790	0.9893
0.5	0.9589	0.9787
1.0	0.9210	0.9583
2.0	0.8537	0.92
4.0	0.7447	0.8518
6.0	0.6604	0.7931
8.0	0.5932	0.7419
10.0	0.5385	0.6970

Eşitlik 3.7'den de elde edilen değerlere göre Şekil 3.26 ve 3.27'de IgG adsorpsiyonu için Freundlich adsorpsiyon modelinin grafiği verilmiştir. $\ln C_{eq}$ 'ya

karşı $\ln Q_e$ grafiğe geçirildiğinde kesimden K_F ve eğimden de n sabitleri bulunabilir. K_F Freundlich sabiti olup adsorpsiyon kapasitesinin göstergesi, n ise adsorpsiyon şiddeti ile ilgili sabittir. $1/n$, sistemin heterojenliğini gösterir. Pro A/CB SPN ile IgG adsorpsiyonuna Freundlich izotermi uygulandığında n değeri 0.871, K_F ise 120.25 olarak bulunmuştur. Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonu için Freundlich izotermi uygulandığında ise n değeri 0.845, K_F ise 83.11 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.26. Pro A/CB SPN ile IgG adsorpsiyonu için Freundlich izotermi



Şekil 3.27. Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonu için Freundlich izotermi

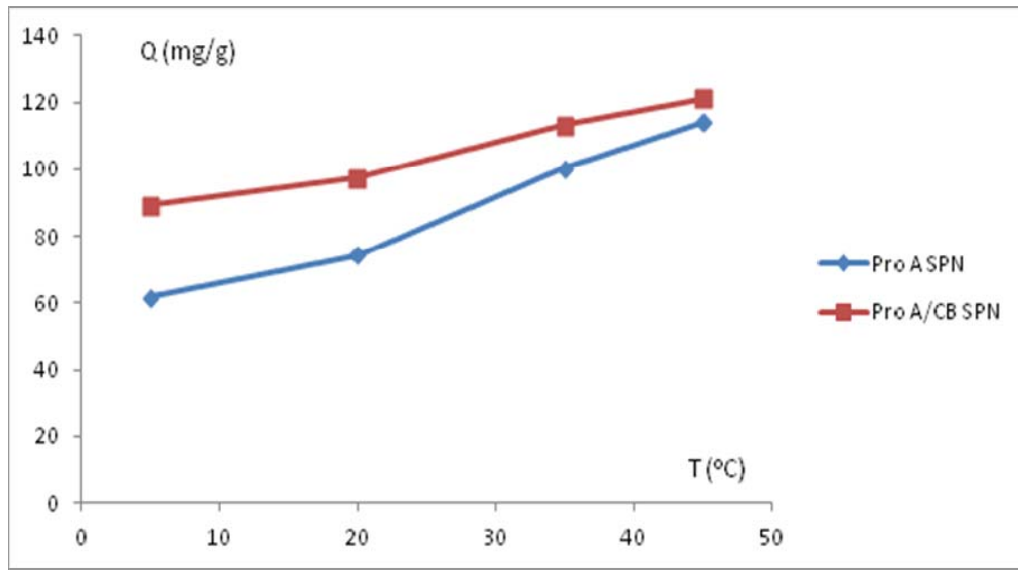
IgG adsorpsiyon verileri sırasıyla Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermine uygulandığında her iki SPN için IgG adsorpsiyonunun Langmuir izotermine uyduğu bulunmuştur. Elde edilen grafiklerin regresyon sabitlerine (R^2) bakıldığında; Pro A/CB SPN’de Langmuir için hesaplanan değer (0.9951), Freundlich için hesaplanan değerden (0.993) daha yüksek çıkmıştır. Aynı şekilde Pro A SPN için her iki izotermde elde edilen regresyon sabitlerine bakıldığında; Langmuir için hesaplanan değer (0.9975), Freundlich için hesaplanan değerden (0.9737) daha yüksek çıkmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda sınırlı sayıda bağlanma bölgesi içeren bir yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyonun gerçekleştiği söylenebilir. Ayrıca Çizelge 3.3’den elde edilen R_L değeri Langmuir adsorpsiyonunu desteklemektedir. Bu izoterm ile ilgili elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 3.4’de toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 3.4. SPN’lere IgG adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modellerinin karşılaştırılması

Deneyisel		Langmuir			Freundlich		
SPN	Q (mgg^{-1})	Q_m (mgg^{-1})	b (mLmg^{-1})	R^2	K_F	n	R^2
Pro A/CB SPN	1175	1111.11	0.0857 (12857 M^{-1})	0.9951	120.25	0.871	0.993
Pro A SPN	1102	1666.67	0.0435 (6521 M^{-1})	0.9975	83.11	0.845	0.9737

Şekil 3.28’de Pro A SPN ve Pro A/CB SPN ile IgG adsorpsiyon kapasitesine sıcaklığın etkisi görülmektedir. Sıcaklığın artması ile her iki SPN’nin IgG adsorpsiyon kapasitesi artmaktadır. Bu artış; SPN’lere IgG bağlanma etkileşimlerinin hidrofobik etkileşimlerle olmasından kaynaklanmaktadır. Pro A-IgG etkileşimlerinde hidrofobik kuvvetler baskındır. Sıcaklık artışı daha kuvvetli hidrofobik etkileşimlere neden olduğundan protein adsorpsiyonunu arttırır. Sıcaklığın artışı, dengeyi düzenli su formundan serbest su formuna kaydırır, böylece suya maruz kalan hidrofobik yüzeyler azaltılır. Hidrofobik adsorbanlara bağlanma entropi ile yürütülür. Hidrofobik etkileşimleri çalıştıran Van der waals

etkileşim kuvvetleri sıcaklık artışıyla artmaktadır (Builder 1993, Querioz ve ark. 2001, Öncel ve ark 2005, Türkmen ve ark. 2008, Yılmaz ve ark. 2009). Altıntaş ve arkadaşları (2007), IgG uzaklaştırmak amacıyla p(GMA) metal-şelat kürecikleri hazırlamışlar ve sıcaklığın artmasıyla bu küreciklere IgG adsorpsiyonunun da arttığını gözlemlemişlerdir. Alkan ve arkadaşlarının çalışmalarında (2009) da Pro A bağlı PHEMA kriyojeline IgG adsorpsiyonu sıcaklıkla artmıştır.



Şekil 3.28. Pro A/CB ve Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi (IgG derişimi: 1 mgmL⁻¹, V_{çözelti}: 3 mL, m_{Pro A/CB ve Pro A SPN}: 5 mg, pH: 7.4 PBS)

Pro A/CB SPN ve Pro A SPN ile IgG bağlanmasına tuz derişiminin etkisi Şekil 3.29’da verilmektedir. Tuz derişiminin artmasıyla IgG adsorpsiyon kapasitesi Pro A/CB SPN ve Pro A SPN’de artmaktadır. Eklenen tuz, su molekülleri ile etkileşerek IgG ve protein A’nın etkileşmesi için sürücü kuvvet oluşturmaktadır. Ortama eklenen tuzun iyonik gücü, proteinlerin çözünürlüğünü etkiler. İyonik gücü, tuzu oluşturan katyon ve anyonların yük sayısı ve derişimi belirler. “Salting-out”, yüksek tuz derişimlerinde proteinlerin çöktürülmesidir. Yüksek derişimlerde eklenen tuz kendi hidratasyonu için ortamdaki suyu tutarak, proteinlerin çözünürlüğünü azaltır. Salting-out etkisi ile çöktürülen proteinler, doğal yapılarını koruduklarından, denatüre olmaksızın tekrar çözünür hale

gelebilirler. “Salting-in” ise; tampondaki tuz derişiminin azaltılması (iyonik gücün düşürülmesi) ile proteinlerin çözünürlüğünün artırılmasıdır. Proteinler üzerindeki yük etkileşimleri korunur ve düşük tuz derişimi proteinlerin agregasyonunu ve çökmesini önler. Hidrofobik etkileşim kromatografide (HIC) tuzların etkileri, proteinlerin çöktürülmesi veya bunların suyun molal yüzey gerilimini artırıcı olumlu etkileri Hofmeister serileri ile açıklanabilir. Bu etkiler, hidrofobik etkileşmeyi başlatan kozmotropik tuzlara (örneğin amonyum sülfat) ve hidrofobik etkileşmeyi azaltan kaotropik tuzlara bağlıdır.

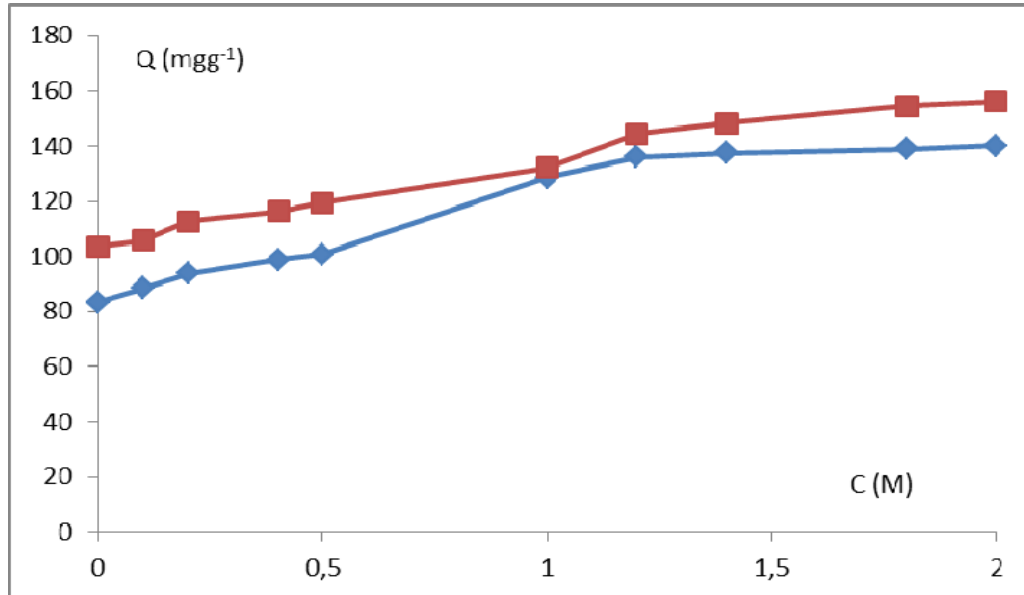
← Çöktürme (salting-out) etkinin artışı

Anyon: PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^-
Kasyon: NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}

kaotropik (salting-in) etkinin artışı →

Etkileşimleri artırma kabiliyetlerine göre sırasıyla hidrofobik etkileşimleri artıran tuzlar aşağıda verilmiştir (Özkara 2010).

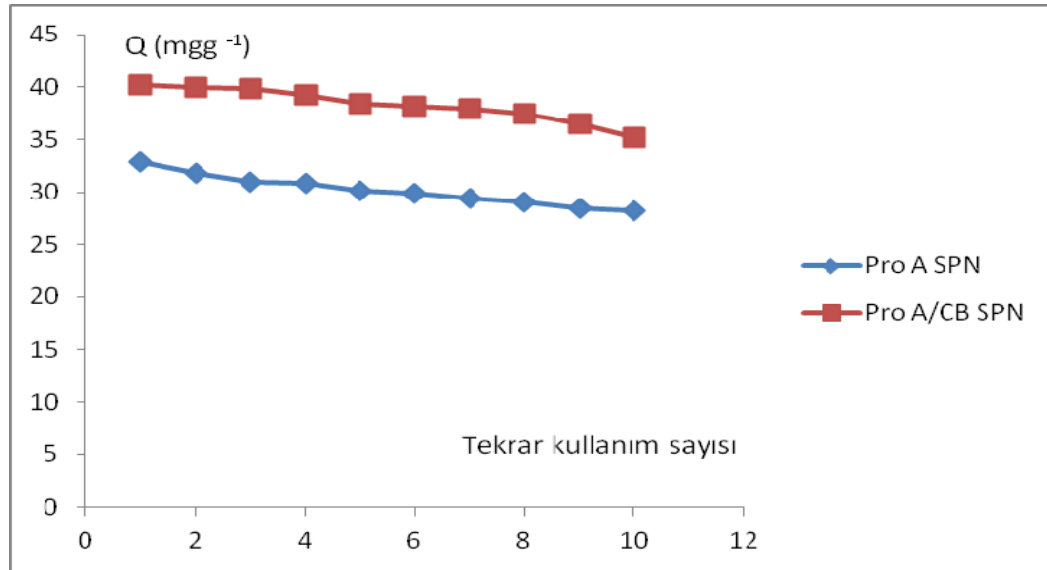
$\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{K}_2\text{SO}_4 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{Na}_2\text{HPO}_4 > \text{NaCl} > \text{LiCl} > \text{KSCN}$



Şekil 3.29. Pro A/CB ve Pro A SPN ile IgG adsorpsiyonuna NaCl derişiminin etkisi (IgG derişimi:

1 mg mL^{-1} , $V_{\text{çözültü}}: 3 \text{ mL}$, $m_{\text{Pro A/CB ve Pro A SPN}}: 4 \text{ mg}$, pH: 7.4 PBS)

Katı desteklerin rejenerasyonu ve tekrar kullanımı laboratuvar ve ticari uygulamalarda maliyet açısından önemlidir. Pro A/CB SPN'nin desorpsiyon oranı % 95 olarak bulunurken; Pro A SPN'nin desorpsiyon oranı % 90 olarak bulunmuştur ve 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrasında adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir değişim görülmemiştir (Şekil 3.30).



Şekil 3.30. IgG Desorpsiyonu ve tekrar kullanılabilirlik (IgG derişimi: 0.5 mgmL⁻¹, V_{çözelti}: 3 mL, m_{Pro A/CB ve Pro A SPN}: 5 mg, pH: 7.4 PBS, Desorpsiyon tamponu: % 10'luk etilen glikol çözeltisi içeren 0.1 M asetat tamponunda pH 4.0)

3.2.5. Pro A/CB, CB ve Pro A SPN'lerin kullanılması ile kan serumundan IgG ve Albumin uzaklaştırılması

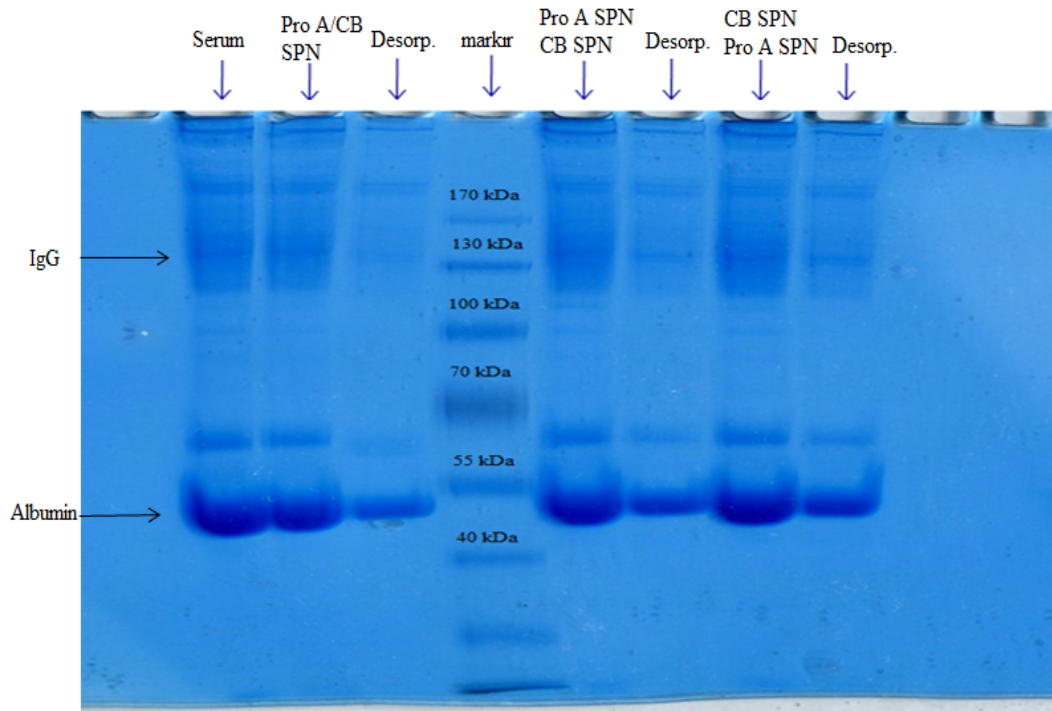
Serumda albumin derişimi, yaklaşık olarak 50 mgmL⁻¹ iken; IgG derişimi 15 mgmL⁻¹'dir. Serum proteinlerinin analizi için bol miktarda bulunan proteinlerin uzaklaştırılması önem kazanmaktadır. Hazırlanan SPN'lerin adsorpsiyon etkinliği kesikli sistemde sulu çözeltide incelenmesinin yanında serum örneklerinde de incelenmiştir. Sulu çözeltide, Pro A/CB SPN'nin kullanılması ile albumin adsorpsiyon kapasitesi 1149 mgg⁻¹ olarak elde edilirken, IgG adsorpsiyon kapasitesi 1102 mgg⁻¹ olarak elde edilmiştir. Sulu çözeltide CB SPN'nin albumin adsorpsiyon kapasitesi 763 mgg⁻¹ iken, Pro A SPN'nin IgG adsorpsiyon kapasitesi

1175 mgg⁻¹'tir. Serum örnekleri ile çalışıldığında, Pro A/CB SPN'nin kullanılması ile sulu çözeltiye göre albumin adsorpsiyon kapasitesi 3 kat artarken, IgG adsorpsiyon kapasitesi 2 kat artmıştır. Çizelge 3.5'de görüldüğü gibi; serum örneği önce Pro A SPN ile etkileştirildiğinde hem albumin hem de IgG uzaklaştırılması meydana gelmiştir. Pro A SPN'den sonra CB SPN ile etkileştirilen serum örneğinde, sulu çözeltiye göre albumin adsorpsiyon kapasitesi yaklaşık olarak 6 kat artmıştır. Serum örneği önce CB SPN ile etkileştirildiğinde ise hem albumin hem de IgG uzaklaştırılmış olup, CB SPN'nin albumin adsorpsiyon kapasitesi daha yüksektir. Önce CB SPN daha sonra Pro A SPN'nin kullanıldığı sistemde sulu çözeltiye göre IgG adsorpsiyon kapasitesi de 2.5 kat artmıştır. Sulu çözeltiye göre serumda adsorpsiyon kapasitelerinde gözlenen bu artış; albumin ve IgG'nin konformasyonel yapısının kendi doğal ortamında Pro A/CB, CB ve Pro A SPN'ler ile daha uygun spesifik etkileşmesiyle açıklanabilir. Serum örneklerinin seyreltilmesiyle hazırlanan SPN'lerin adsorpsiyon kapasitesinde azalma görülmüştür. Pro A SPN 1/5 oranında seyreltilen serum örneği ile etkileştirildiğinde, Pro A SPN seçicilik özelliği göstererek IgG uzaklaştırmasının ve CB SPN ile etkileştirildiğinde ise albumin uzaklaşmasının daha fazla olduğu gözlenmiştir. Çizelge 3.5'de de görüldüğü gibi sulu çözeltide iki farklı derişimde IgG ve albumin karışımları hazırlanmış ve Pro A/CB SPN kullanılarak aynı anda hem IgG hem de albumin uzaklaştırılmıştır.

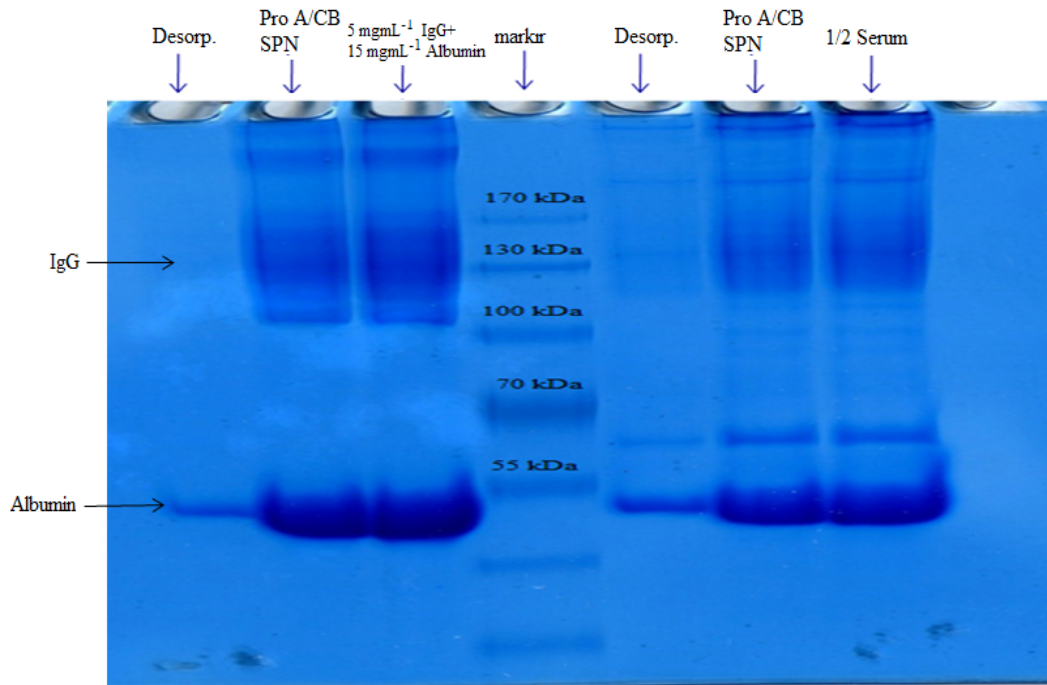
Çizelge 3.5. Serum örneğinde farklı SPN'lerin kullanılması ile IgG ve Albumin adsorpsiyon kapasiteleri

	Madde	Q Albumin (mgg ⁻¹)	Q IgG (mgg ⁻¹)
Serum	Pro A/CB SPN	3461.54	2307.69
	Pro A SPN	2068.97	1034.48
	CB SPN	2647.06	2647.06
	CB SPN	3000	1500
	Pro A SPN	2500	1500
1/5 Serum	ProA/CB SPN	612.25	612.25
	Pro A SPN	93.75	843.75
	CB SPN	882.35	882.35
	CB SPN	1588.23	176.47
	Pro A SPN	90.90	363.63
½ Serum	ProA/CB SPN	923.08	923.08
1 mgmL ⁻¹ IgG+3 mgmL ⁻¹ Albumin	ProA/CB SPN	576.92	576.92
5 mgmL ⁻¹ IgG+ 15 mgmL ⁻¹ Albumin	ProA/CB SPN	1132.07	566.04

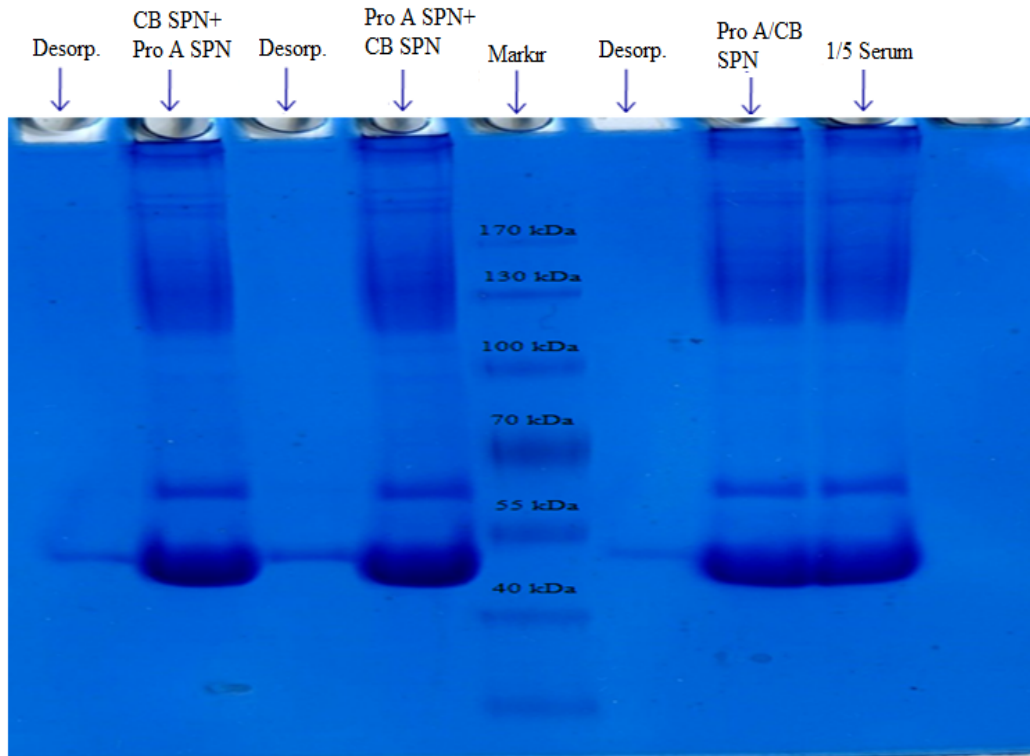
Albumin ve IgG uzaklaştırmasının gerçekleştiği SDS-PAGE ile de doğrulanmıştır (Şekil 3.31). Sulu çözeltideki albumin ve IgG karışımından, 1/2 ve 1/5 oranında seyreltilen serum örneklerinden IgG ve albumin uzaklaştırılması SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 3.32 ve 3.33). Tüm SDS-PAGE görüntülerinde serumda ve seyreltilmiş serum örneklerinde bulunan IgG ve albumin derişimlerinin SPN'lerle etkileştirildikten sonra azaldığı görülmektedir. Desorpsiyon örneklerinde de IgG ve albumine ait bantlar görüldüğünden etkili bir desorpsiyonun gerçekleştiği belirlenmiştir.



Şekil 3.31. Pro A/CB, CB ve Pro A SPN'lerin kullanılması ile serumdan albumin ve IgG uzaklaştırılması sonrasında SDS-PAGE görüntüsü



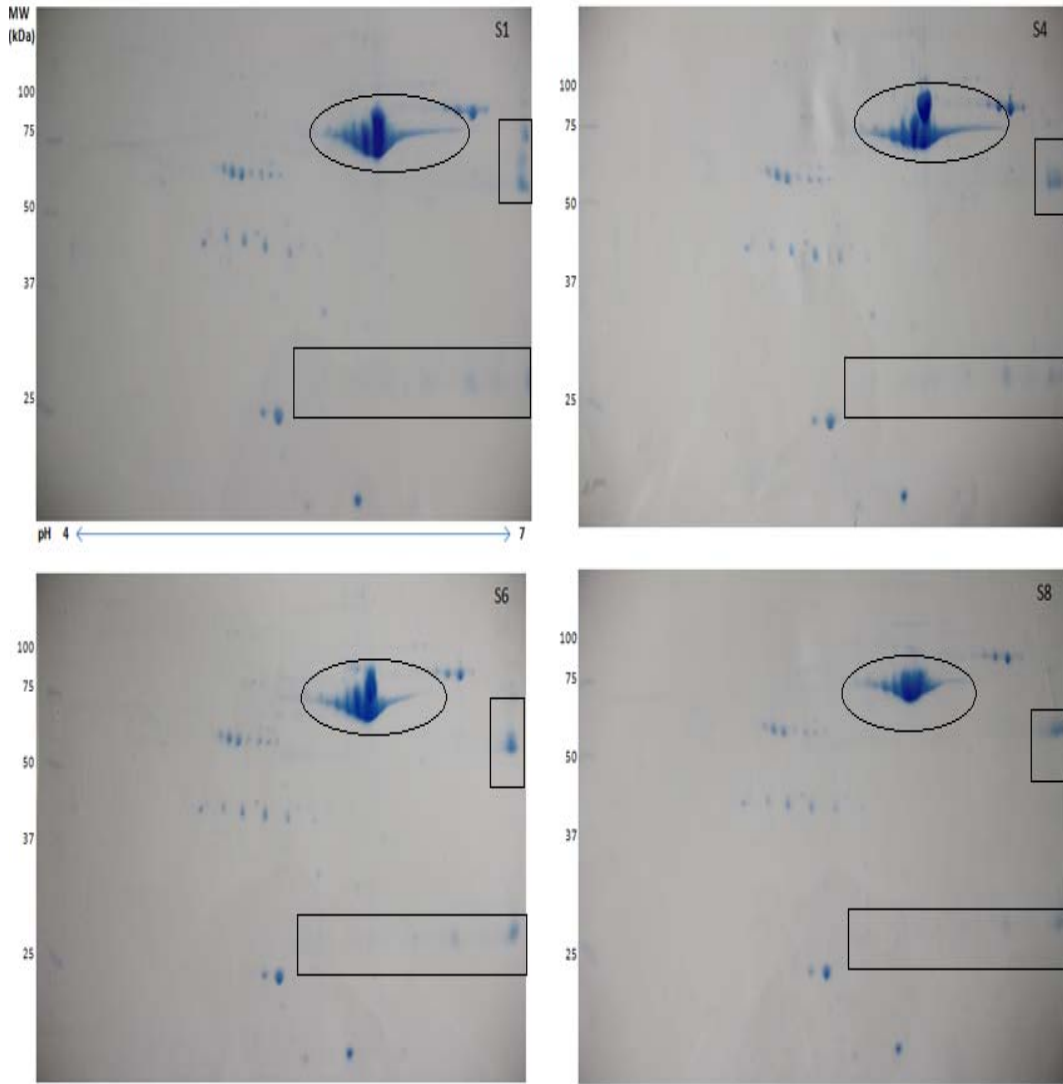
Şekil 3.32. Pro A/CB SPN'nin kullanılması ile 1/2 serumdan ve sulu çözeltideki karışımdan albumin ve IgG uzaklaştırılması sonrasında SDS-PAGE görüntüsü



Şekil 3.33. Pro A/CB, CB ve Pro A SPN'lerin kullanılması ile 1/5 serumdan albumin ve IgG uzaklaştırılması sonrasında SDS-PAGE görüntüsü

Hazırlanan her üç destekle albumin ve IgG uzaklaştırmasının gerçekleştiği 2D-PAGE ile de doğrulanmıştır (Şekil 3.34). Şekil 3.34'de S1 kodlu örnek uzaklaştırma yapılmamış serumu, oval şekil albumini, albumin yakınındaki dikdörtgen ağır zincir IgG'yi ve daha düşük kütledeki dikdörtgen şekli ise IgG hafif zinciri göstermektedir. IgG ağır zincirine ait bandlar daha yüksek pH'larda da devam ettiğinden IgG ağır zincirindeki uzaklaştırma gözlenememektedir. Şekil 3.34'deki S4 kodlu 2D-PAGE görüntüsü serumun Pro A/CB SPN ile albumin ve IgG uzaklaştırılmasına aittir. S1 ile S4 karşılaştırıldığında; albumin bandında azalma gözlemlendiğinden uzaklaştırmanın gerçekleştiği anlaşılmaktadır. S6 kodlu örnekte, önce Pro A SPN IgG uzaklaştırılması, daha sonra CB SPN ile de albumin uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir. S1 ile S4 ve S6 kodlu örneklerin 2D-PAGE görüntüleri karşılaştırıldığında; S6 kodlu örnekte albumin uzaklaştırılması daha net olarak gözlenmiştir. S6 kodlu örnekte IgG ağır zinciri için de uzaklaştırma gerçekleşmiştir. S8 kodlu örnekte ise önce CB SPN ile albumin uzaklaştırılması daha sonra Pro A SPN ile de IgG uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir. Tüm 2D-

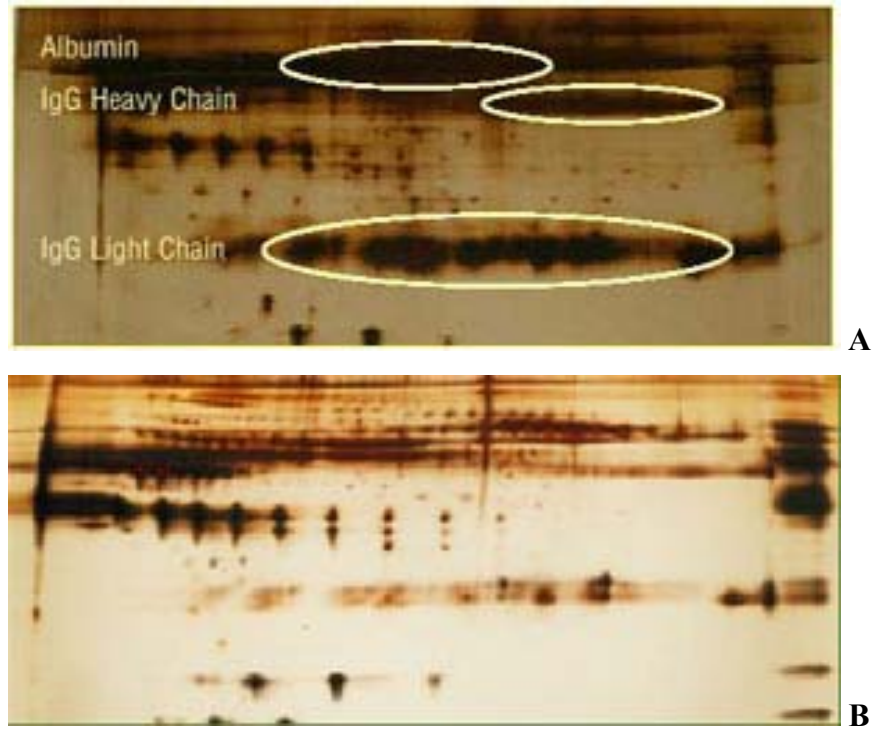
PAGE görüntüleri karşılaştırıldığında; en fazla miktarda albumin ve IgG uzaklaştırılması S8 kodlu örnekte gözlenmiştir. Elde edilen 2D-PAGE görüntülerindeki albumin ve IgG uzaklaştırma görüntüsü Çizelge 3.5’de verilen albumin ve IgG adsorpsiyon miktarlarıyla da örtüşmektedir. Serumda albumin miktarı çok fazla olduğundan önce albumin uzaklaştırılmasının, daha sonra ise IgG uzaklaştırılmasının gerçekleştirilmesi daha iyi sonuç vermiştir.



Şekil 3.34. Uzaklaştırma yapılmamış serum, albumin ve IgG uzaklaştırılmış serum örneklerine ait 2D-PAGE görüntüsü (S1: Uzaklaştırma yapılmamış serum, S4: Pro A/CB SPN ile aynı anda albumin ve IgG uzaklaştırılmış serum, S6: Önce Pro A SPN ile IgG uzaklaştırılması, daha sonra CB SPN ile de albumin uzaklaştırılması yapılmış serum, S8: Önce CB SPN ile de albumin uzaklaştırılması, daha sonra Pro A SPN ile IgG uzaklaştırılması yapılmış serum)

3.2.6. Ticari albumin ve IgG uzaklaştırma jeli ile albumin ve IgG uzaklaştırma sonucu

Thermo Scientific firmasına ait immobilize Cibacron Blue/Protein A jeli ile toplam protein içeriği 600 µg olan 25 örnek çalışılabilmektedir. Şekil 3.35’de bu ürünle gerçekleştirilmiş albümin ve IgG uzaklaştırılmasına ait 2D-PAGE görüntüsü verilmektedir. Şekil 3.35 A’daki 2D-PAGE görüntüsü seyreltilmemiş serumla, Şekil 3.35 B’de ise 2D-PAGE görüntüsünde serumdan uzaklaşmadan kalan albümin ve IgG’ye ait bandlar görülmektedir. Bu ürünün düşük örnek yükleme kapasitesinden dolayı firmanın prosedürüne göre, serum 15 kez seyreltilmektedir. Seyreltilen serumdan albumin ve IgG uzaklaştırılması 6 farklı spin kolonunda gerçekleştirilip uzaklaştırma öncesi ve sonrası toplam protein ve albümin derişimi bellirlenmiştir 15 kez seyreltilen serumda albümin için uzaklaştıma oranı % 62 bulunurken, IgG için uzaklaştırma oranı % 70 olarak bulunmuştur. Firmanın prosedürüne göre albümin ve IgG uzaklaştırılması 50 dakikada (150 µl serumla etkileştirilmiş) gerçekleştirilmektedir. Pro A SPN, CB SPN ve Pro A/CB SPN’lerle albümin ve IgG uzaklaştırması 60 dakikada gerçekleştirilmiş (5 ml serumla etkileştirilmiş) olup, hazırlanan nanopartiküllerle ayırım nanopartiküllerin manyetik özelliğinden dolayı daha kolay olmaktadır. CB/Pro A jelinin düşük serum yükleme kapasitesi ve serumun seyreltilmesi; uzaklaştırma sonrası düşük miktardaki biyolojik belirteçlerin analizleri için sorun oluşturmaktadır. Pro A SPN, CB SPN ve Pro A/CB SPN’lerle serumdan albümin ve IgG uzaklaştırılması, bir defada daha fazla serumun yüklenebilmesi açısından avantajlıdır. Pro A SPN, CB SPN ve Pro A/CB SPN daha az miktarda malzeme ile tek etkileşimle oldukça yüksek adsorpsiyon kapasitesi (örneğin 5 mg Pro A/CB SPN 5 ml seyreltilmemiş serumla etkileştirildiğinde albumin için Q_{max} : 3461.54 mgg^{-1} , IgG için ise Q_{max} : 2307.69 mgg^{-1} olarak bulunmuştur. 5 mg Pro A/CB SPN 5 kez seyreltilmiş serumla etkileştirildiğinde ise albumin için Q_{max} : 612.25 mgg^{-1} , IgG için ise Q_{max} : 612.25 mgg^{-1} olarak bulunmuştur. Ticari uzaklatırma sistemi ile daha çok miktarda malzeme ile (170 µl ticari destek yaklaşık olarak 33.6 mg’dır) düşük adsorpsiyon kapasitesi elde edilmiştir.

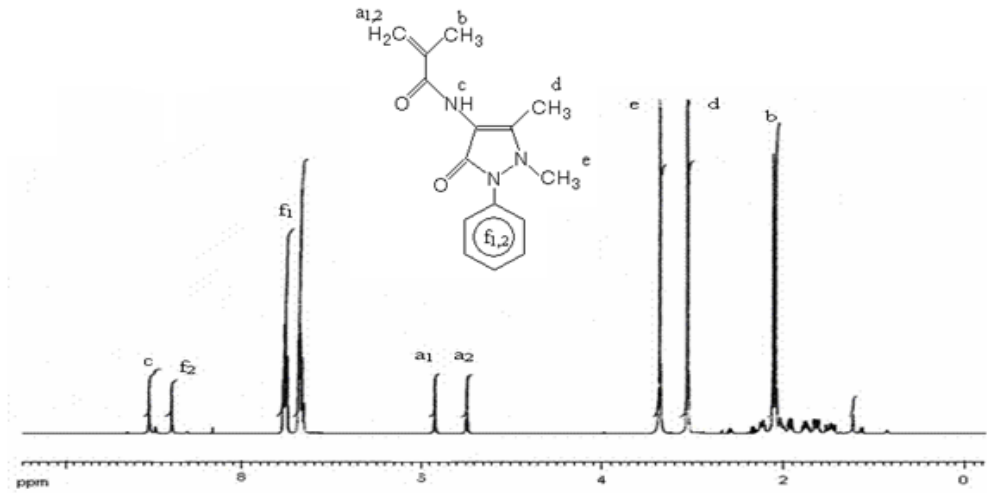


Şekil 3.35. Pierce® Albumin/IgG uzaklaştırma ticari kiti ile 2D-PAGE A) uzaklaştırma öncesi B) uzaklaştırma sonrası

3.3. Biyolojik Belirteçlerin Tayinini Sağlayan Nanosensörler

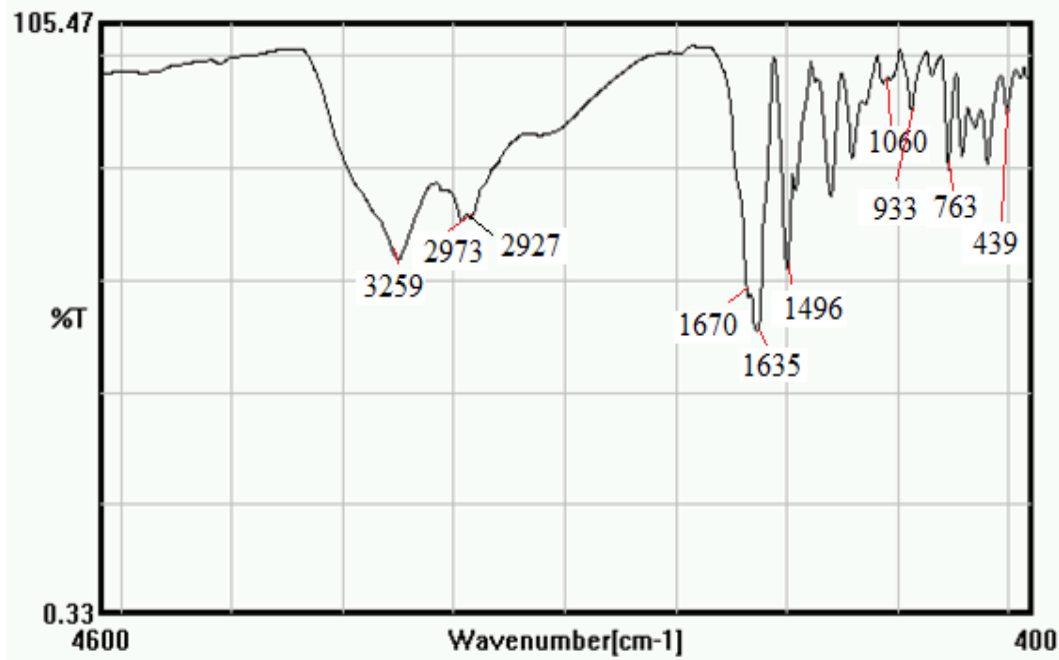
3.3.1. MAAP ve Metal-Şelat monomerlerinin karakterizasyonu

MAAP monomeri, NMR ve FT-IR ile $(MAAP)_2-Tb(III)$ ve $(MAAP)_2-Eu(III)$ metal-şelat monomerleri ise MALDI-TOF-MS ve FT-IR ile karakterize edilmiştir. MAAP monomerinin ^1H -NMR spektrumu alındığında elde edilen karakteristik pikler şunlardır (Şekil 3.36): 2.05 ppm 3H singlet ($-C=C-CH_3$, vinil metil), 3.0 ppm 3H singlet ($-C-CH_3$), 3.35 ppm 3H singlet ($-N-CH_3$), 5.5 ppm 1H singlet ($-CH_a=C-$), 5.8 ppm 1H singlet ($-CH_b=C-$), 7.25–8.80 ppm 4H multiplet (aromatik, 7.3 ppm’de $CDCl_3$ pikide aromatik pikler içine karışmış durumdadır), 8.80 ppm 1H singlet (aromatik), 9.1 ppm 1H singlet (N-H) (Şekil 3.36).



Şekil 3.36. MAAP monomerinin ^1H -NMR spektrumu

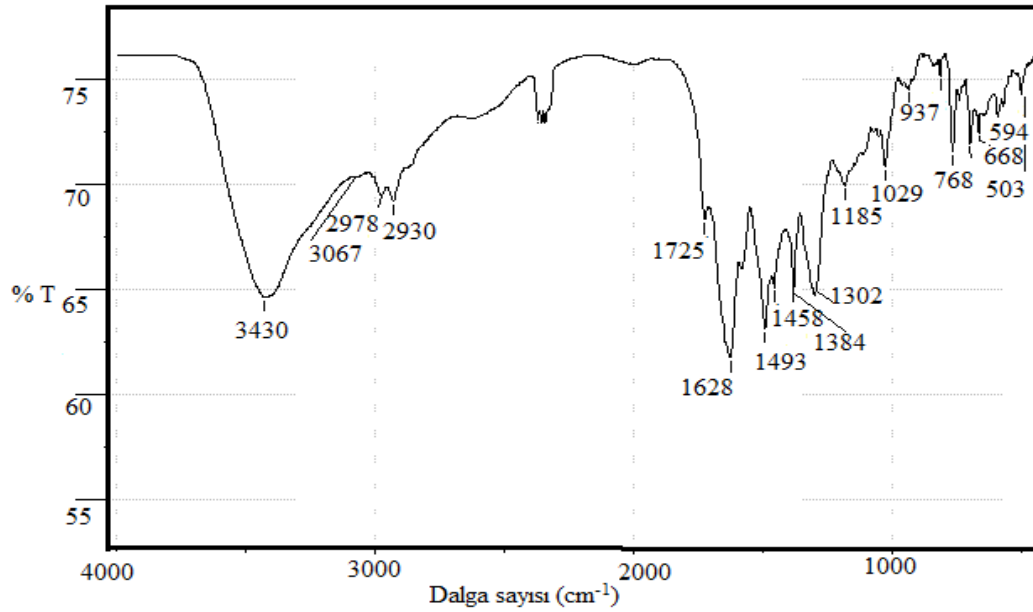
Şekil 3.37’de MAAP monomerinin karakterizasyonu için kullanılan FT-IR analizinin karakteristik pikleri verilmiştir: FT-IR (KBr, cm^{-1}): 3259 cm^{-1} N-H gerilme bandından, 2973 cm^{-1} aromatik C-H gerilme bandı, 2927 cm^{-1} alifatik gruplardaki C-H bandı simetrik ve antisimetrik gerilmeden, 1670 cm^{-1} ve 1635 cm^{-1} amid karbonil bandı, 1496 cm^{-1} ’de keskin band benzen halkasındaki halka titreşiminden, 1457 cm^{-1} ’deki band CH_2 makaslama titreşiminden ve CH_3 antisimetrik deformasyonundan, 1060 cm^{-1} ’deki band C-N geriliminden, 933 cm^{-1} ’deki band CH_2 düzlem dışı sallanmadan, 763 cm^{-1} ’deki band monosubstitüe benzen halkasından ve 439 cm^{-1} ’deki band C-N-C eğilmesinden kaynaklanmaktadır.



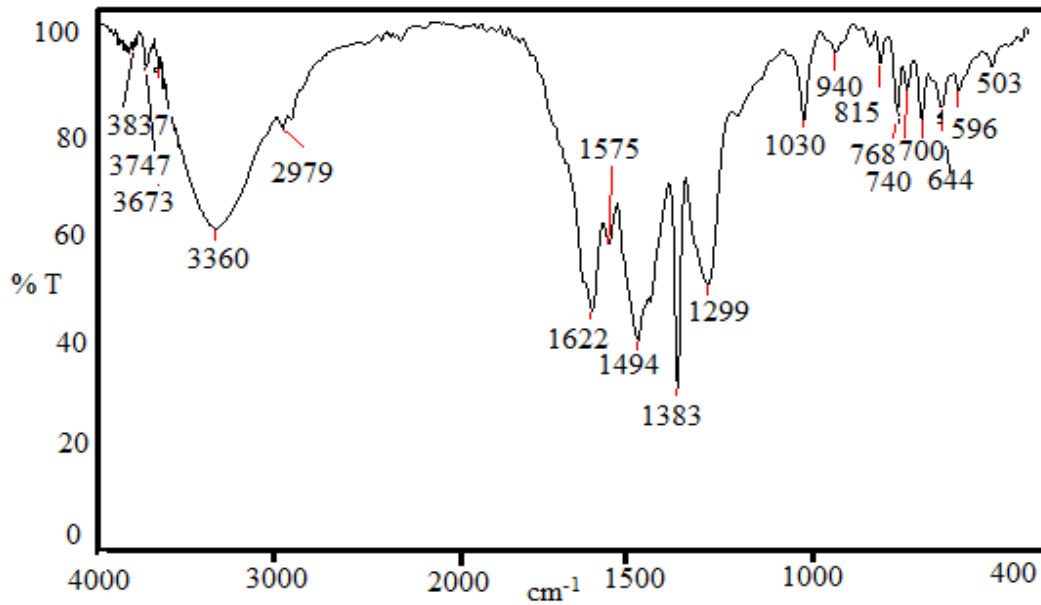
Şekil 3.37. MAAP monomerinin FT-IR spektrumu

Şekil 3.38 ve 3.39'daki (MAAP)₂-Tb (III) ve (MAAP)₂-Eu (III) metal-şelat monomerlerinin FT-IR (KBr, cm⁻¹) spektrumları incelendiğinde; MAAP monomerinde bulunan aromatik C-H gerilme bandı ve alifatik gruplardaki simetrik ve antisimetrik gerilmeden oluşan C-H bandı sırası ile 2979 cm⁻¹ ve 2930 cm⁻¹'de görülmektedir. 1670 cm⁻¹ ve 1635 cm⁻¹'de gelen amid karbonil bandının 1628 cm⁻¹ ve 1622 cm⁻¹'e kayması metallerle etkileşiminden kaynaklanmaktadır. 1494 cm⁻¹'deki band benzen halkasındaki halka titreşiminden, 1458 cm⁻¹'deki band CH₂ makaslama titreşiminden ve CH₃ antisimetrik deformasyonundan, 1384 cm⁻¹'deki band alifatik bölümlerdeki CH₃ simetrik deformasyonundan kaynaklanmaktadır. MAAP monomerinde 1060 cm⁻¹'de oluşan C-N gerilimi metal-şelat monomerlerinde 1030 cm⁻¹'e kaymıştır. 937 cm⁻¹'deki band CH₂ düzlem dışı sallanmayı, 768 cm⁻¹'deki band monosubstitüe benzen halkasını ve 503 cm⁻¹'deki band halka deformasyon bantlarını göstermektedir. Yang ve arkadaşları (2005) ve Qin (2003) ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda lantanit-oksijen titreşim bandının 416-420 cm⁻¹'de gözleendiği belirtilmiştir. MAAP monomerinde 416-420 cm⁻¹'de gözlenen benzen halkasındaki düzlem içi ve düzlem dışı halka deformasyonları nedeniyle metal-şelat monomerlerinin FT-

IR spektrumlarında bu band ayırt edici değildir. Calinescu ve arkadaşlarının (2011) sentezledikleri maddeye ait lantanit-oksijen titreşim bandının $647\text{-}636\text{ cm}^{-1}$ 'de olduğu belirtilmiştir. Bu titreşim bandı ise MAAP monomerindeki $=\text{CH}_2$ bükülme titreşim bandı ile çakışır.

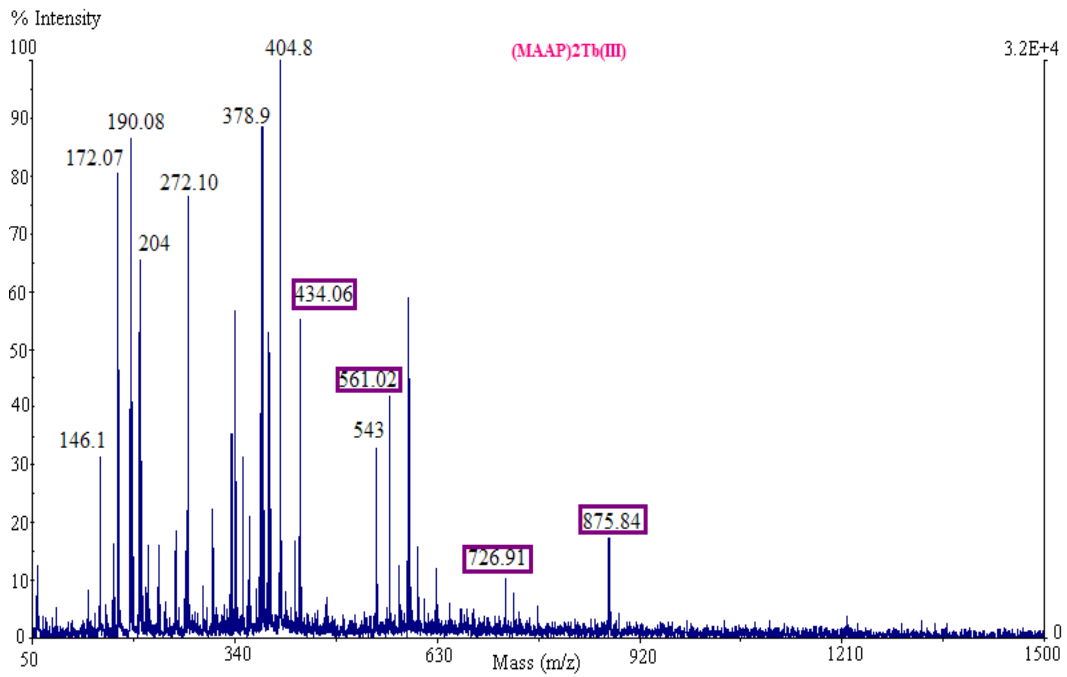


Şekil 3.38. $(\text{MAAP})_2\text{-Tb (III)}$ metal-şelat monomerinin FT-IR spektrumu



Şekil 3.39. $(\text{MAAP})_2\text{-Eu (III)}$ metal-şelat monomerinin FT-IR spektrumu

Şekil 3.40’da, $(\text{MAAP})_2\text{-Tb(III)}$ metal-şelat monomerinin karakterizasyonu için MALDI-TOF-MS analizi sonucu elde edilen karakteristik pikler şöyledir: m/z 172, 190 ve 378’de gözlenen iyon pikleri matriks olarak kullanılan CHCA’ya ait piklerdir. m/z 434’da gözlenen iyon piki MAAP-Tb(III) kompleksine, m/z 561’deki iyon piki $2(\text{MAAP})\text{-H}^+$ dimerine, m/z 726 daki iyon piki $(\text{MAAP})_2\text{-Tb(III)}$ kompleksine, m/z 875 deki iyon piki ise $(\text{MAAP})_2\text{-Tb(III)}$ kompleksine koordine olan DMSO’ya aittir.



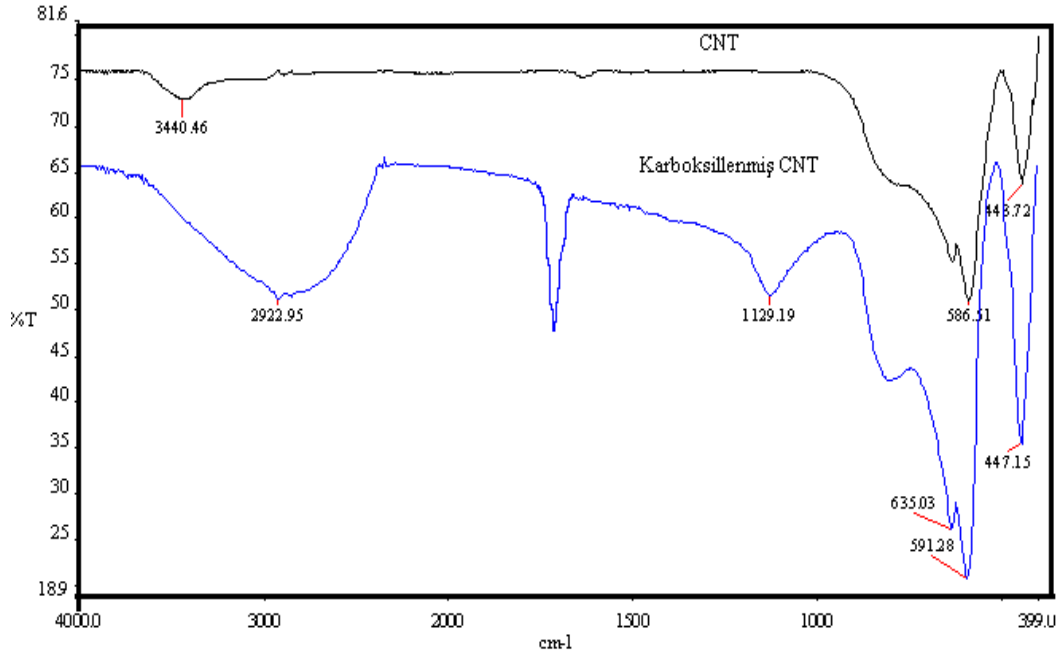
Şekil 3.40. $(\text{MAAP})_2\text{-Tb(III)}$ metal-şelat monomerinin MALDI-TOF-MS spektrumu

$^1\text{H-NMR}$ spektrumu ve FT-IR spektrumu MAAP monomerinin, FT-IR spektrumu ve MALDI-TOF-MS spektrumları ise metal-şelat monomerlerinin sentezlendiğini desteklemektedir.

3.3.2. LPA ve PS Baskılı CNT ve Fe_2O_3 nanopartiküllerinin karakterizasyonu

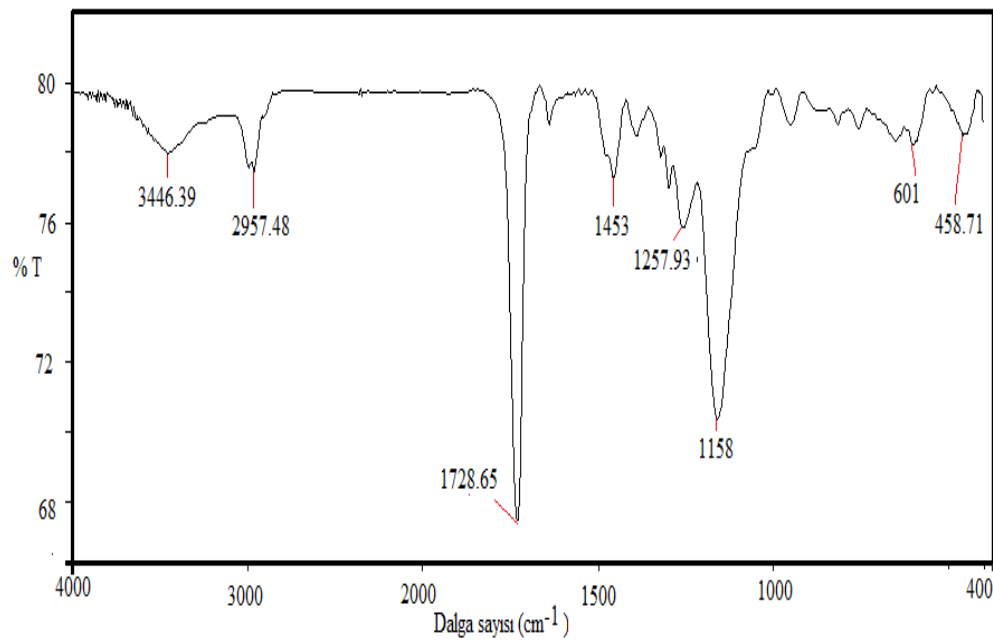
Karboksillenmiş CNT, FT-IR spektrofotometresiyle karakterize edilmiştir. Şekil 3.41’deki FT-IR (KBr , cm^{-1}) spektrumu incelendiğinde 1700 cm^{-1} ’de karboksilik asit karbonil bandı, 2922 cm^{-1} ’de karboksilik asitteki OH

gerilme titreşim bandı ve 1129 cm^{-1} 'de C-O gerilme titreşim bandı görülmektedir. Karboksillenmiş CNT'ün FT-IR spektrumunda karboksilik aside ait titreşim bandlarının bulunması CNT'e karboksilik asidin bağlandığını göstermektedir.

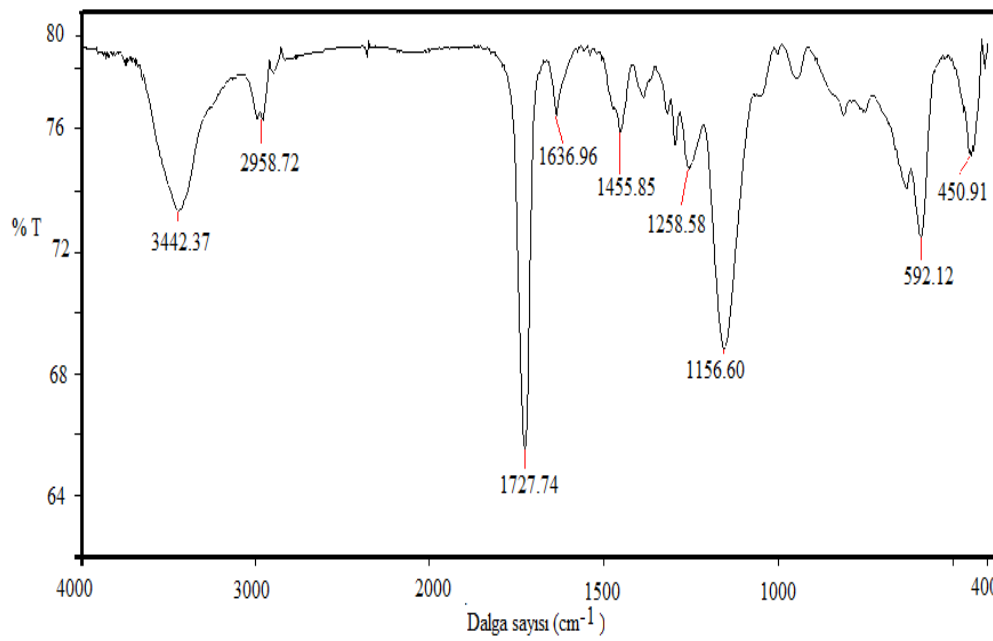


Şekil 3.41. CNT ve karboksillenmiş CNT'ün FT-IR spektrumu

Şekil 3.42 ve 3.43'de $(\text{MAAP})_2\text{Tb (III)}$ metal-şelat monomerinin LPA ve PS ile önorganizasyonu sonrası katı desteklere bağlanması FT-IR (KBr, cm^{-1}) ile karakterize edilmiştir. FT-IR spektrumları incelendiğinde; 3440 cm^{-1} 'de $(\text{MAAP})_2\text{-Tb(III)}$ metal-şelat monomerinin yapısında bulunan NH gerilme bandı, 2958 cm^{-1} 'de alifatik bileşiklerdeki CH anti simetrik ve simetrik gerilme bandı, 1728 cm^{-1} 'de C=O gerilme bandı, 1455 cm^{-1} 'de alifatik bileşiklerde CH_2 makas titreşim bandı, 1258 cm^{-1} 'de P=O gerilim bandı görülmektedir. Her iki spektrumda da P=O gerilme titreşim bandı ve $(\text{MAAP})_2\text{-Tb(III)}$ metal-şelat monomerine ait titreşim bandlarının görülmesi, PS ve LPA bağlı metal-şelat monomerinin CNT'e bağlandığını göstermektedir.



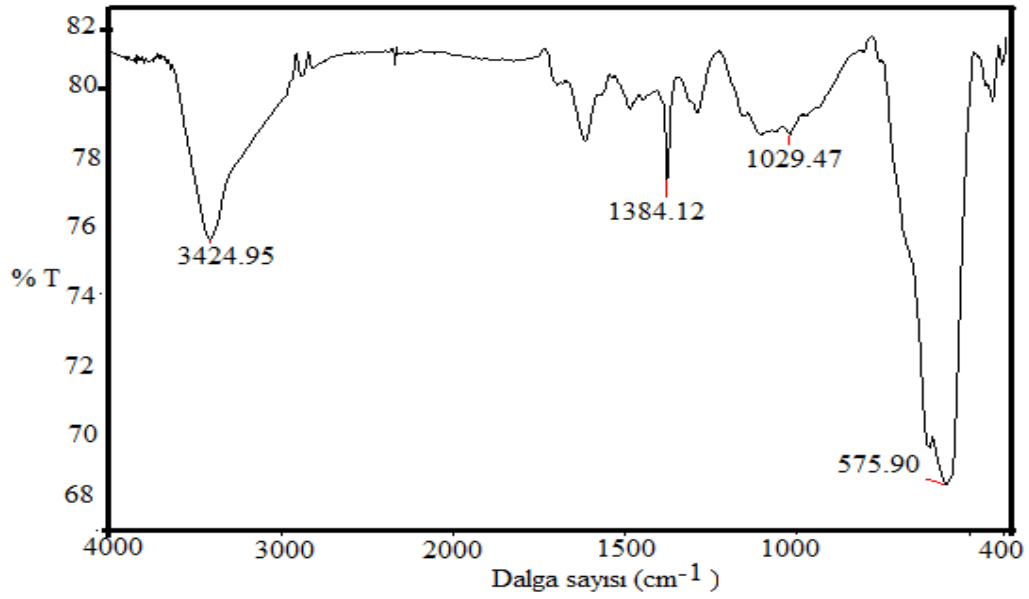
Şekil 3.42. CNT-(MAAP)₂-Tb-LPA polimerinin FT-IR spektrumu



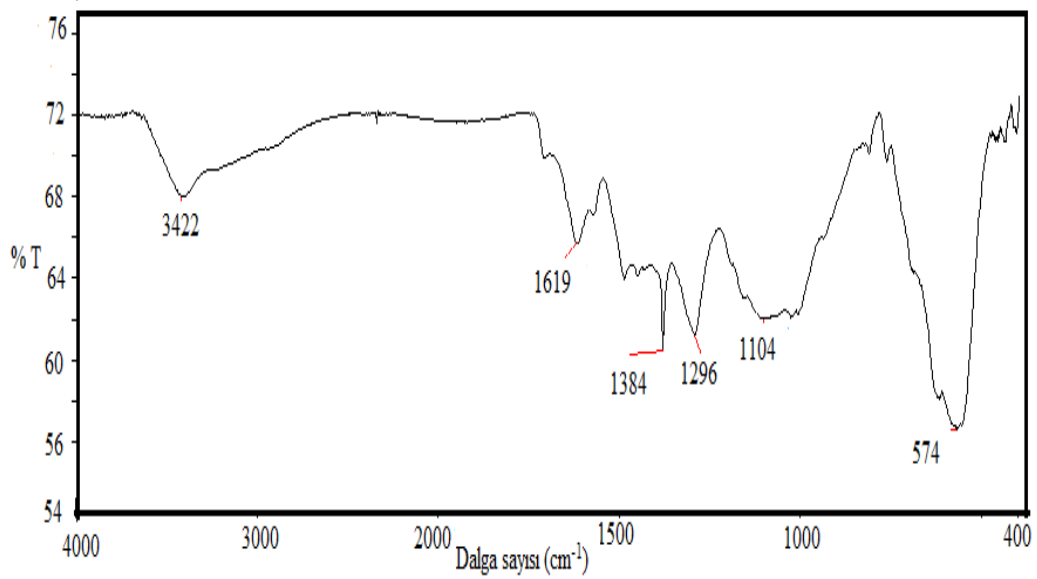
Şekil 3.43. CNT-(MAAP)₂Tb(III)-PS polimerinin FT-IR spektrumu

Şekil 3.44 ve 3.45’de (MAAP)₂Tb (III) metal-şelat monomerinin LPA ve PS ile önorganizasyonu sonrası fonksiyonellendirilmiş Fe₂O₃ nanopartikülüne bağlanması FT-IR (KBr, cm⁻¹) ile karakterize edilmiştir. Şekil 3.44’de; 3424 cm⁻¹ (MAAP)₂-Tb(III) metal-şelat monomerinin yapısında bulunan NH gerimle bandını ve 1384 cm⁻¹ CH₃ grubunun simetrik deformasyonunu ve

1029 cm^{-1} LPA'nın yapısında bulunan P-O-C antisimetrik gerilme bandını göstermektedir. Fe-O titreşim bandı 575 cm^{-1} 'de, P=O gerilim titreşim bandı 1258 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Her iki spektrumda da P=O gerilme titreşim bandı, (MAAP)₂-Tb(III) metal-şelat monomerine ait titreşim bandlarının ve Fe-O titreşim bandının görülmesi, Fe₂O₃ nanopartikülüne PS ve LPA bağlı metal-şelat monomerinin bağlandığını göstermektedir.

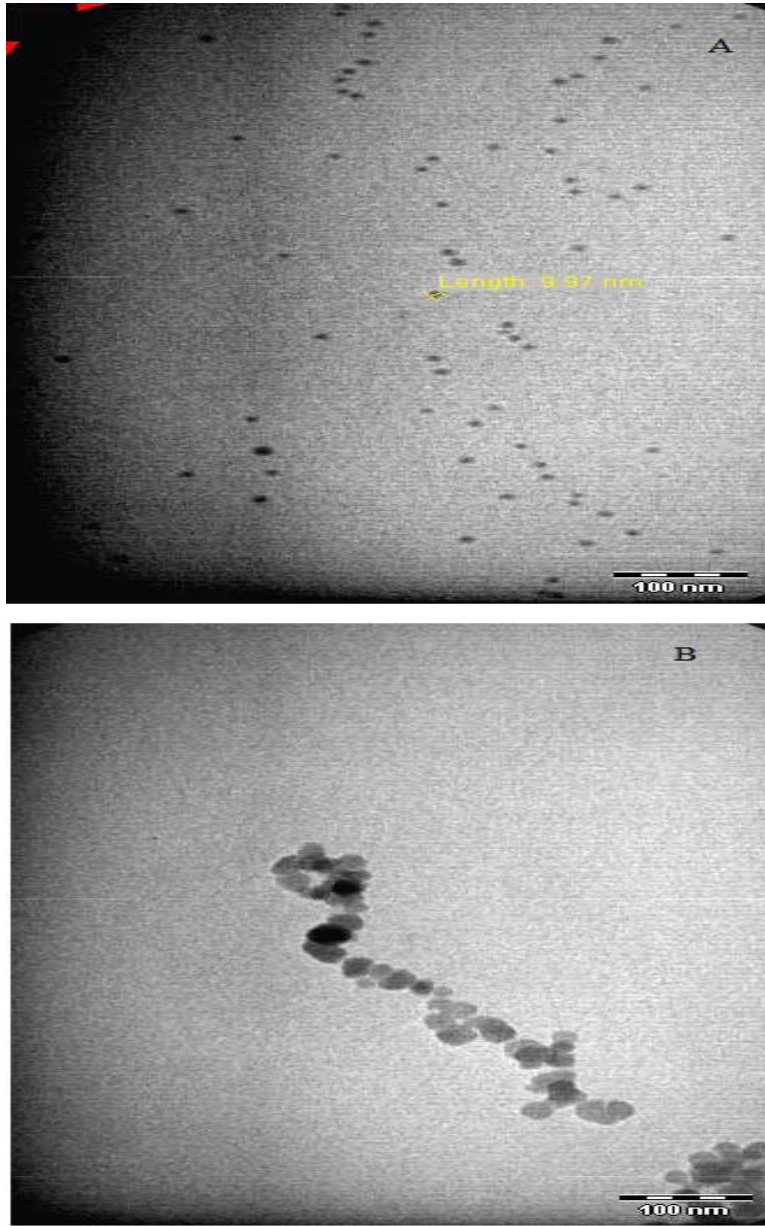


Şekil 3.44. Fe₂O₃-TMSPM-(MAAP)₂-Tb(III)-LPA FT-IR spektrumu



Şekil 3.45. Fe₂O₃-TMSPM-(MAAP)₂Tb-PS FT-IR spektrumu

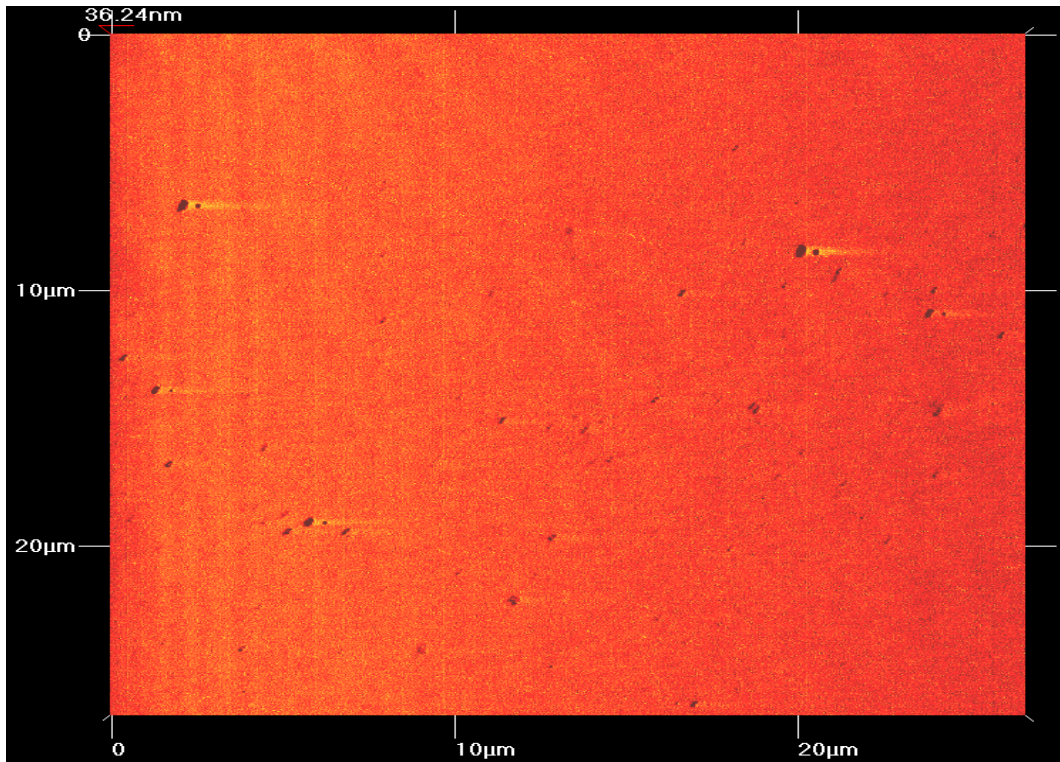
Şekil 3.46’da CNT, PS ve LPA baskılı CNT’lerin TEM görüntüleri verilmektedir. TEM görüntüsünde CNT’ün boyutu 10 nm olarak ölçülürken PS ve LPA baskılanmış CNT’lerin boyutu yaklaşık olarak 30 nm olarak ölçülmüştür. Nanopartiküllerin boyutundaki artış, PS ve LPA bağlı metal-şelat monomerlerinin CNT’e bağlandığını desteklemektedir. Şekil 3.47’de verilen PS baskılı CNT’ün AFM görüntüsü de nanopartikülün boyutunun yaklaşık olarak 30 nm olduğunu desteklemektedir.



Şekil 3.46. CNT TEM görüntüleri A) CNT B) PS baskılı CNT C) LPA Baskılı CNT



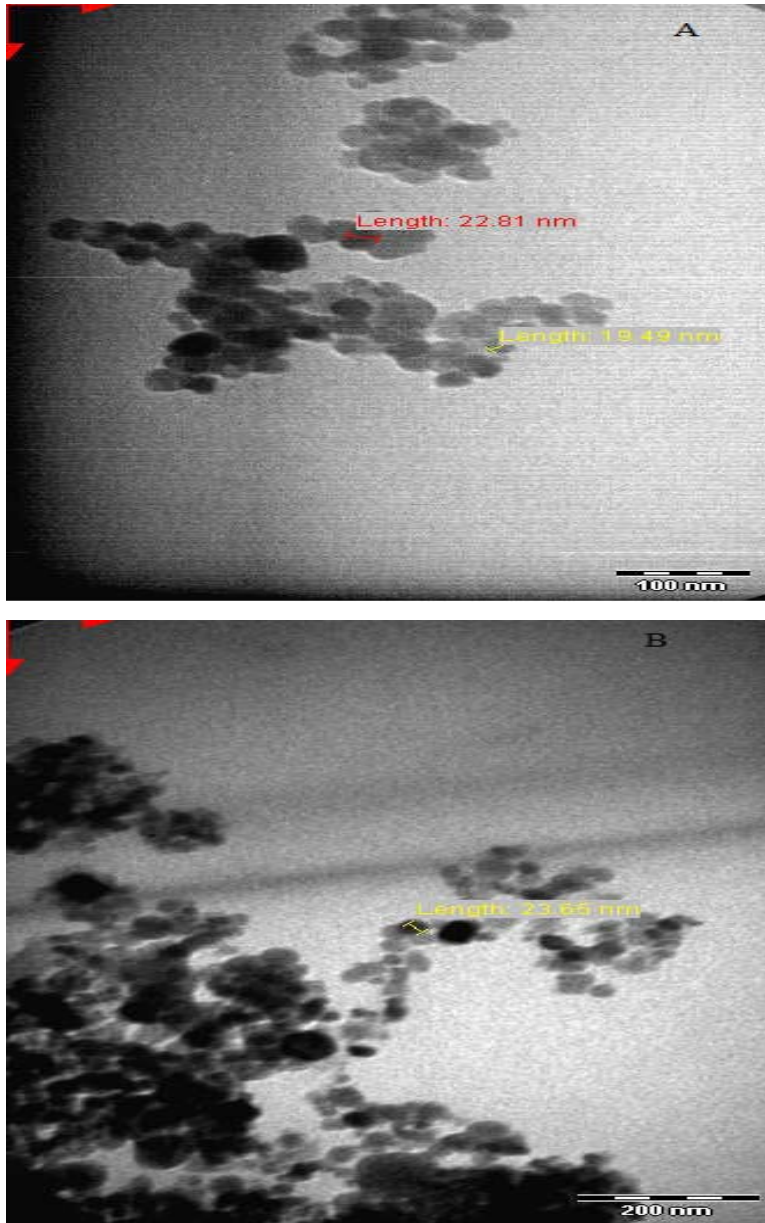
Şekil 3.46 (Devamı). CNT TEM görüntüleri A) CNT B) PS baskılı CNT C) LPA Baskılı CNT



Şekil 3.47. PS baskılı CNT AFM görüntüsü

Şekil 3.48’de ise PS ve LPA baskılı Fe_2O_3 nanopartiküllerinin TEM görüntüleri verilmektedir. Şekil 3.6’da verilen Fe_2O_3 nanopartiküllerinin TEM

görüntüsüne göre Fe_2O_3 nanopartiküllerinin boyutu yaklaşık olarak 15 nm'dir. Şekil 3.7'deki AFM görüntüsü de Fe_2O_3 nanopartiküllerinin boyutunu desteklemektedir. Şekil 3.45'deki PS ve LPA baskılı Fe_2O_3 nanopartiküllerinin TEM görüntüsü nanopartiküllerin boyutunun 23 nm olduğunu göstermektedir. Fe_2O_3 nanopartiküllerin boyutundaki artış Fe_2O_3 nanopartiküllerine PS ve LPA bağlı metal-şelat monomerlerinin bağlandığını desteklemektedir.

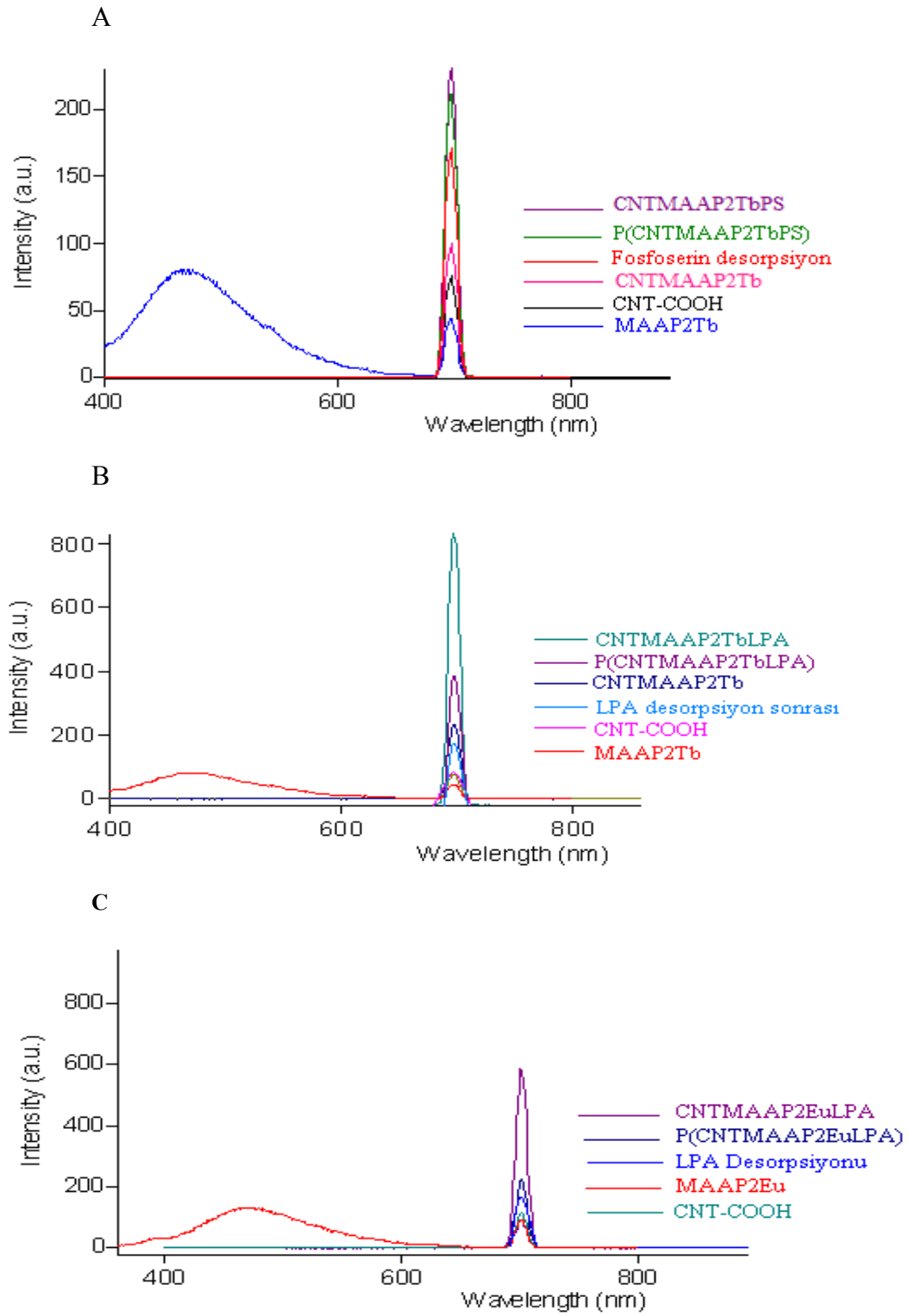


Şekil 3.48. A) PS baskılı Fe_2O_3 nanopartikülünün TEM görüntüsü B) LPA baskılı Fe_2O_3 nanopartikülünün TEM görüntüsü

3.3.3. LPA ve PS baskılanmış CNT ve Fe₂O₃ nanopartikülleri ile lüminesans çalışmaları

Lantanit kompleksleri lüminesans özellikleri nedeni ile kimyasal ve biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle Tb (III) ve Eu (III) iyonları 4f enerji seviyeleri arasındaki elektronik geçişlerinden dolayı eşsiz lüminesans özellik gösterirler. Tb (III) ve Eu (III) iyonları yayılan uyarılmış hal ile temel hal arasında uygun enerji aralığına ve emisyonu büyük Stokes kaymaya sahiptir. Büyük Stokes kaymasına sahip olmaları sayesinde emisyon bandları ile absorpsiyon banları örtüşmez. Fakat, bu iyonların görünür ve ultraviyole bölgede absorpsiyon katsayıları çok küçüktür. Bu eksiklik lantanit iyonlarının ligandlarla şelat oluşturulmasıyla giderilir. Bunun sonucunda lantanit kompleksleri yoğun absorpsiyon bandları oluştururlar. Organik ligandların güçlü absorpsiyonu ve ligandların triplet halden merkez nadir toprak iyonlarına etkili enerji transferi ile lantanitlerin fotoreaktif nadir toprak organik kompleksleri yoğun lüminesans özellik gösterir (Lianshe ve ark. 2000, Calinescu ve ark. 2011, Yang ve ark. 2005).

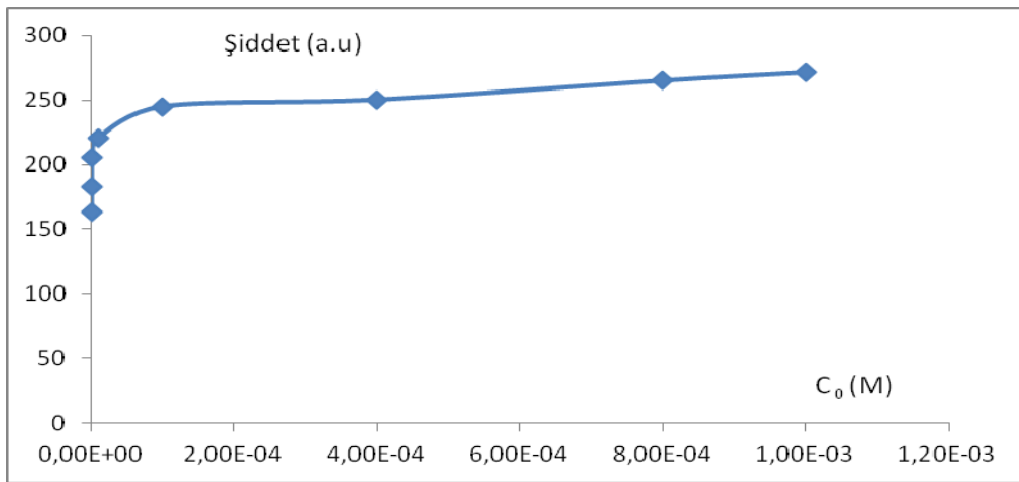
(MAAP)₂-Tb(III) ve (MAAP)₂-Eu(III) metal-şelat monomerleri ve bu monomerlerle fonksiyonellendirilen, LPA ve PS baskılanmış CNT nanopartikülleri 350 nm’de uyarıldığında 701.2 nm’de emisyon vermiştir. Emisyon dalga boyu ve absorpsiyon dalga boyu yüksek Stokes kaymasına sahiptir. Lüminesans ölçümlerinin herbiri en az üç kez yapılmıştır. Şekil 3.49’da verilen lüminesans spektrumlarında da görüldüğü gibi metal-şelat monomerinin lüminesans şiddeti CNT nanopartikülü ile etkileştiğinde artmaktadır. En yüksek emisyon şiddetine ise metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen CNT’ün PS veya LPA etkileşimi sonrasında ulaşılmıştır. Tüm polimerizasyon işlemleri sonrasında lüminesans şiddetinde bir miktar düşüş gözlenmiştir. Polimerlerden LPA ve PS uzaklaştırılması sonrasında ise lüminesans şiddetinde azalma gözlenmiştir. Lüminesans şiddetlerindeki bu değişimler PS ve LPA baskılı Fe₂O₃ nanopartiküllerinde de aynı şekilde gözlenmiştir.



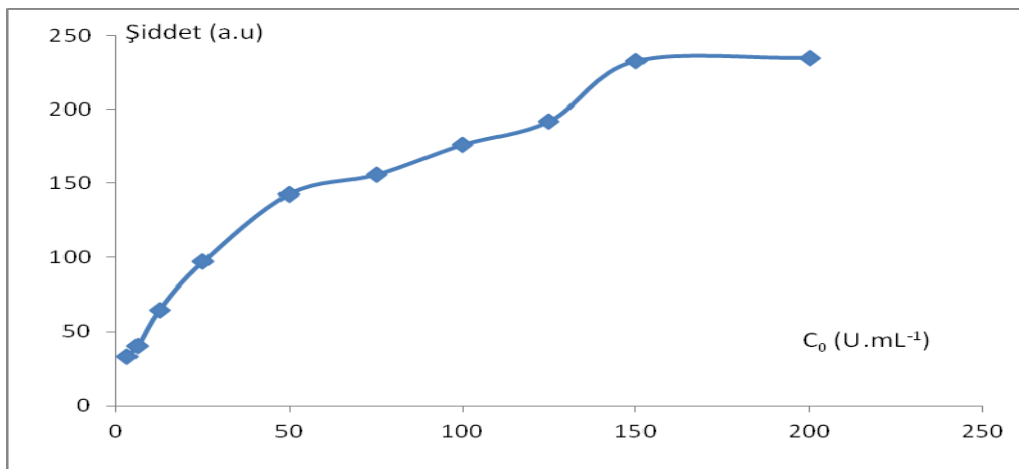
Şekil 3.49. A) $(\text{MAAP})_2\text{-Tb(III)}$ metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS Baskılı CNT için lüminesans şiddetlerin değişimi **B)** $(\text{MAAP})_2\text{-Tb(III)}$ metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA Baskılı CNT için lüminesans şiddetlerin değişimi **C)** $(\text{MAAP})_2\text{-Eu(III)}$ metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA Baskılı CNT için lüminesans şiddetlerin değişimi

3.3.4. PS baskılanmış CNT ve Fe₂O₃ nanosensörler ile PS ve CA 125 tayini

(MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı nanopartikül, 10⁻¹⁰-10⁻³ M derişim aralığında hazırlanan PS çözeltisi ve 3.25 U_{mL}⁻¹-200 U_{mL}⁻¹ derişim aralığındaki CA 125 molekülü ile etkileştirilmiş ve lüminesans şiddetleri ölçülmüştür. Şekil 3.50 ve 3.51’de de görüldüğü gibi PS ve CA 125 derişimi arttıkça CNT nanosensörle PS ve CA 125 arasında bağlanmanın gerçekleşmesi ile lüminesans şiddetinde de artma görülmüştür.



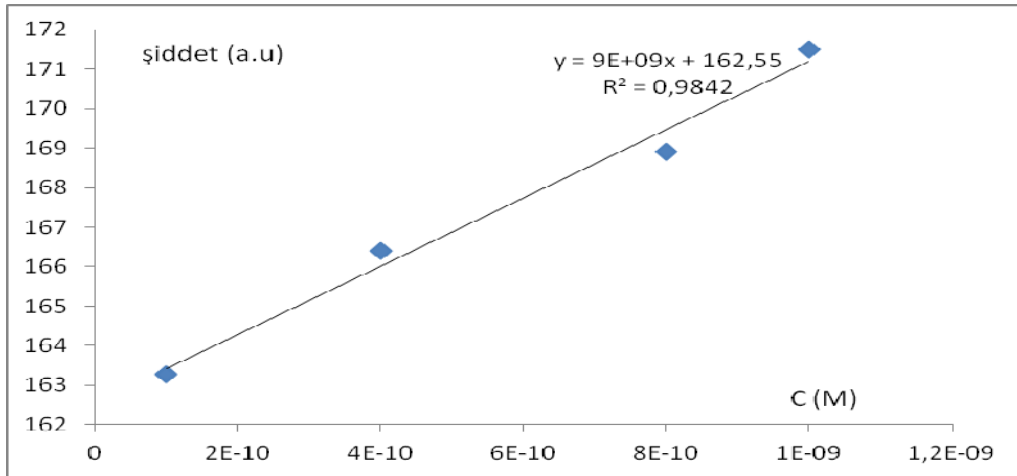
Şekil 3.50. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT ile farklı derişimlerdeki PS bağlanması sonucu lüminesans şiddetindeki değişim



Şekil 3.51. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT ile farklı derişimlerdeki CA 125 bağlanması sonucu lüminesans şiddetindeki değişim

Şekil 3.50 ve 3.51’de de görüldüğü gibi (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT nanosensörü geniş derişim aralığında PS ve CA 125 bağlama özelliğine sahiptir.

(MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT nanosensörü için daha düşük derişim aralığındaki 10^{-10} - 10^{-9} M arasında değişen PS derişimine bağlı olarak CNT nanosensörünün lüminesans kalibrasyon grafiğinden (Şekil 3.52, $R^2=0.9842$) yararlanılarak PS için tayin sınırı bulunmuştur. Aynı CNT sensörüyle 3.125-150 UmL⁻¹ arasında değişen CA 125 derişimine bağlı olarak CNT nanosensörünün lüminesans kalibrasyon grafiği çizilmiştir ($R^2=0.922$). Bu kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak da CNT nanosensörünün CA 125 tayin sınırı bulunmuştur. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı Fe₂O₃ nanosensörü için 3.125-125 UmL⁻¹ arasında değişen CA 125 derişimine bağlı olarak nanosensörün lüminesans kalibrasyon grafiği çizilmiştir ($R^2=0.9712$). Bu kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak da Fe₂O₃ nanosensörünün CA 125 tayin sınırı bulunmuştur.



Şekil 3.52. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT nanosensörü ile PS kalibrasyon eğrisi

Teşhis sınırı; analit sinyalinin gözlenebildiği fakat kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte analit tayin sınırları içerisine girmeyen en düşük derişimdir. Tayin sınırı ise; analitin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırının en alt derişimini oluşturan

derişimdir. Teşhis sınırı kör çözeltilisinin standart sapmasının (SS) kalibrasyon eğrisinin eğimine oranının 3,3 katı iken, tayin sınırı bu oranın 10 katıdır (Eşitlik 3.8). Belirli sayıdaki verinin kesinliğinin bir ölçüsü olan numune standart sapması da Eşitlik 3.9 yardımı ile hesaplanır (Kılıç 1998).

$$\text{Tayin sınırı: } 10 \times \text{SS}/m \quad (3.8)$$

$$SS = \sqrt{\frac{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}{n-1}} \quad (3.9)$$

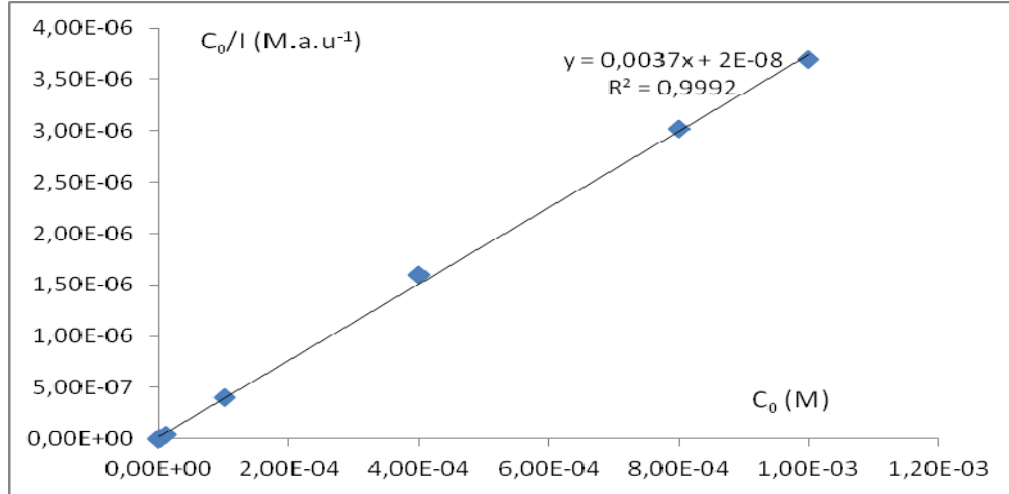
(MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT nanosensörünün CA 125 için teşhis sınırı 0.4922 UmL⁻¹, tayin sınırı ise 1.4914 UmL⁻¹ olarak bulunmuştur. Bu CNT nanosensörünün PS için teşhis sınırı 1.76 10⁻¹⁰ M, tayin sınırı ise 5.33 10⁻¹⁰ M olarak bulunmuştur. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı Fe₂O₃ nanosensörünün CA 125 için teşhis sınırı 2.0506 UmL⁻¹, tayin sınırı ise 6.2140 UmL⁻¹ olarak bulunmuştur. Yumurtalık kanseri hastalarının kan serumunda CA 125 derişimi > 35 UmL⁻¹ olarak bulunmaktadır. Hazırlanan bu nanosensörlerle daha düşük derişimlerdeki CA 125 tayin edilebilmektedir.

(MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT ve Fe₂O₃ nanosensörünün PS ve CA 125 bağlanma afinitesi Langmuir adsorpsiyon izotermi ile incelenmiştir. Langmuir izotermi lineerize edilmiş ve derişimin fonksiyonuna karşılık derişim/lüminesans şiddetleri grafiğe geçirilmiştir (Diltemiz ve ark. 2008). Bu analiz için Eşitlik 3.10 kullanılmıştır.

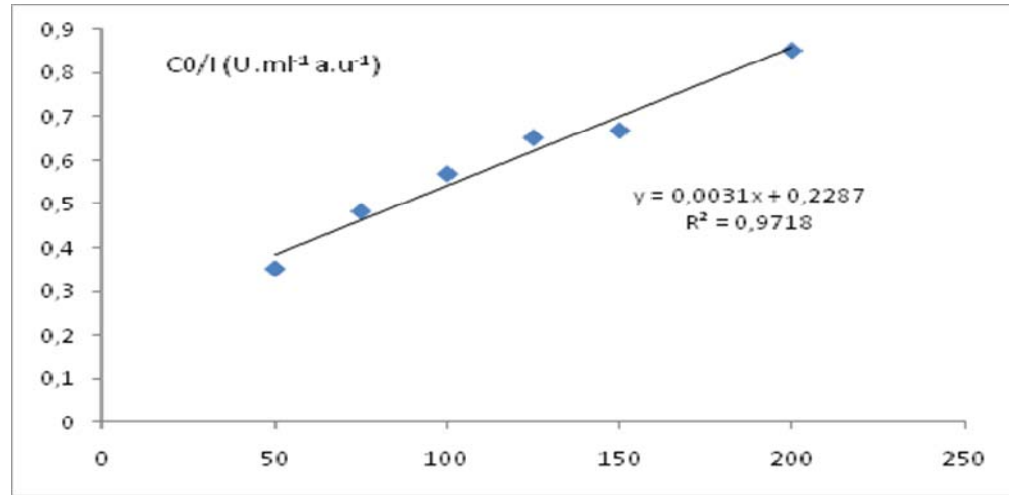
$$C_0/I = 1/I_{\max} b + C_0/I_{\max} \quad (3.10)$$

Burada; I floresans şiddetini (a.u), I_{maks} maksimum floresans şiddetini (a.u), C₀ nanopartikülle etkileştirilen maddenin derişimini (M ya da UmL⁻¹) ve b (K_a) ise bağlanma sabitini (Langmuir sabiti, M⁻¹) vermektedir. Elde edilen denklemden kesim 1/I_{max}b'yi ve eğim ise 1/I_{max}'ı verir. Langmuir izotermiyle PS

ve CA 125 ile baskılanmış nanopartikül arasındaki spesifik etkileşim K_a ve $I_{\max}$ değerlerinin hesaplanmasıyla belirlenmiştir. Şekil 3.53 ve 3.54’de (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT nanosensörünün PS ve CA 125 için Langmuir adsorpsiyon izotermi verilmiştir.

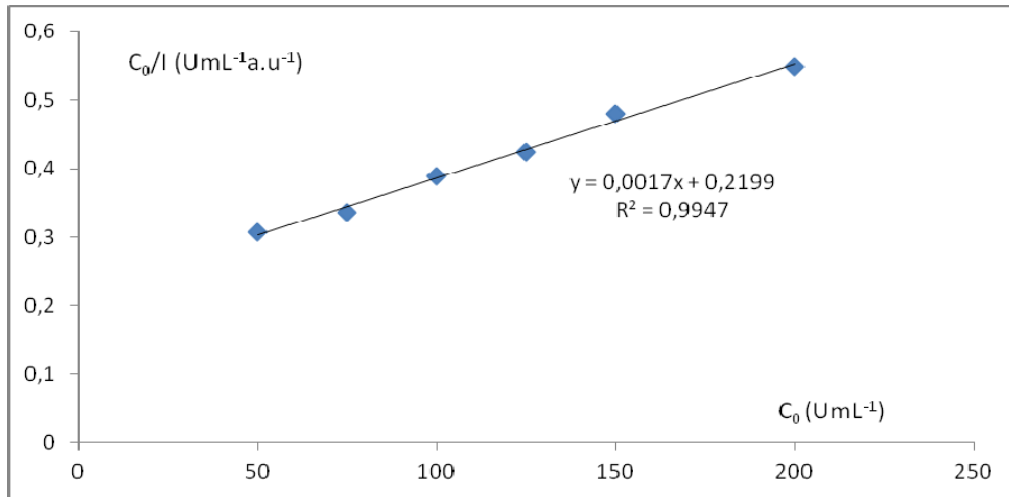


Şekil 3.53. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT nanosensörünün fosfoserin Langmuir adsorpsiyon izotermi



Şekil 3.54. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT nanosensörünün CA 125 Langmuir adsorpsiyon izotermi

Elde edilen grafiğin (Şekil 3.53) regresyon sabitine bakıldığında (R^2 : 0.9992); CNT nanosensörüne PS adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izoterminde uyduğu görülmektedir. Fosfoserin için $I_{\max}$ 270.27 a.u., K_a ise $1.85 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur. PS baskılanmış CNT nanosensörünün CA 125 için Langmuir izoterminden $I_{\max}$ 322.58 a.u., K_a ise 0.0135 mLU^{-1} olarak bulunmuştur (Şekil 3.54).



Şekil 3.55. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı Fe₂O₃ nanosensörünün CA 125 için Langmuir adsorpsiyon izotermi

(MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı Fe₂O₃ nanosensörünün CA 125 bağlanma afinitesi Langmuir adsorpsiyon izotermi ile incelendiğinde (Şekil 3.55); $I_{\max}$ 588.23 a.u., K_a ise $7.73 \cdot 10^{-3} \text{ mLU}^{-1}$ olarak bulunmuştur. İki nanosensörün Langmuir adsorpsiyon izotermelerinden bulunan afinite sabitleri ve tayin sınırları Çizelge 3.6'da karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.6. Fosfoserin baskılı CNT ve Fe₂O₃ nanosensörlerinin Langmuir analizlerinin ve tayin sınırlarının karşılaştırılması

	Langmuir K _A	Langmuir I _{max} (a.u)	Langmur grafiğinin R ²	Tayin sınırı	Kalibrasyon grafiğinin R ²
PS Baskılanmış CNT-PS	1.85 10 ⁵ M ⁻¹	270.27	0.9992	5.33 10 ⁻¹⁰ M	0.9842
PS Baskılanmış CNT-CA125	0.0135 mLU ⁻¹	322.58	0.9718	1.4914 UmL ⁻¹	0.922
PS Baskılanmış Fe ₂ O ₃ -CA125	7.73 10 ⁻³ mLU ⁻¹	588.23	0.9947	6.2140 UmL ⁻¹	0.9712

Çizelge 3.6'da da görüldüğü gibi; PS baskılanmış CNT nanosensörüne PS adsorpsiyonu Langmuir izotermine uyarken, CA 125 adsorpsiyonu Langmuir izotermine uymamaktadır (R² değerinde azalma). Bu da PS baskılanmış CNT nanosensörüne CA 125 bağlanmasının tek tabakalı olmadığını ve PS baskılı CNT nanosensörünün yakın bölümlerine adsorbe olan CA 125 molekülleri arasında etkileşim olduğunu göstermektedir. PS baskılanmış Fe₂O₃ nanosensöründe ise; aynı miktardaki nanosensörle CA 125 etkileşimi daha yüksek lüminesans şiddeti vermiş ve CA 125 adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermine uyduğu gözlenmiştir. Langmuir izoterminden hesaplanan bağlanma sabitlerinden PS baskılanmış CNT nanosensörünün CA 125 bağlama afinitesi daha yüksek elde edilmiştir. Bununla birlikte, PS baskılanmış CNT nanosensörünün CA 125 tayin limiti 1.49 UmL⁻¹, PS baskılanmış Fe₂O₃ nanosensörünün ise 6.214 UmL⁻¹ olarak bulunmuştur. PS baskılanmış CNT ile PS tayin sınırı ise; 0.53 nM olarak bulunmuştur.

Sok ve arkadaşlarının (2009) çalışmalarında floresans immunoanaliz yöntemi geliştirilerek CA 125 tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada; kuyucuklar 2 saat poli(metilmetakrilat) (PMMA) ile bağlandıktan sonra, 4 °C'de 1 gün boyunca Protein G ile kaplanmıştır. Daha sonra kuyucuklardaki reaksiyon sonlandırılarak fare monoklonal OC 15 antikoru ile 4 °C'de 1 gün boyunca etkileştirilmiştir. Ardından kuyucuklar CA 125 atijeni ile 2 saat etkileştirilmiş ve renk değişiminin gözlenmesi amacıyla floresan izotiyosiyanatla etiketlenmiş anti-CA 125 ile 1 saat oda sıcaklığında etkileştirildikten sonra floresans şiddetindeki

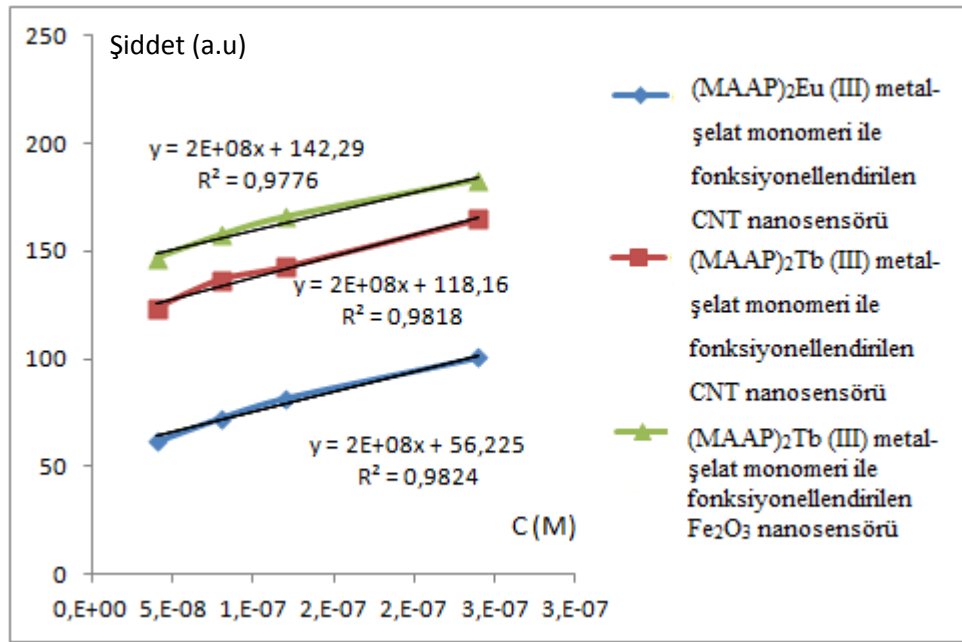
değişimler ölçülmüştür. Bu çalışmada ticari CA 125 ELISA kiti kullanıldığında CA 125 tayin limiti 15 U mL^{-1} bulunurken, geliştirilen immunoanaliz yöntemi ile 1.5 U mL^{-1} bulunmuştur. Chang ve arkadaşları (2011) In_2O_3 nanotel temelli biyoalgılayıcı sistemine anti-CA 125 bağlamış, CA 125 tayin sınırını 0.1 U mL^{-1} ve langmuir adsorpsiyon izoterminden ayrışma sabitini ise 35.7 U mL^{-1} bulmuşlardır. CA 125 tayini için hazırlanan her iki nanosensörle literatürde kapsamlı çalışma bulunmamakla birlikte, yapılan çalışmayla literatürdeki değerlere yakın olarak tayin gerçekleştirilirken, bu nanosensörlerin kullanılması ile daha hızlı sonuç alınmaktadır.

3.3.5. PS baskılanmış CNT nanosensörünün serin ile etkileşimi

PS baskılı CNT nanosensöründe PS için seçici bir oyuk oluşturulmaktadır. PS baskılı CNT'ün 10^{-5} M PS ile etkileşimi sonucu floresans şiddeti 855.013 a.u. iken, 10^{-5} M serin ile etkileşimi sonucunda floresans şiddeti 552.117 a.u.'ya düşmüştür. PS baskılı CNT'ün fosfoerin ve serin ile etkileşimi sonucu floresans şiddetinde gözlenen değişim PS ile etkileşiminin serine göre daha fazla olduğunu göstermektedir.

3.3.6. LPA baskılanmış CNT ve Fe_2O_3 nanosensörler ile LPA tayini

LPA baskılı CNT ve Fe_2O_3 nanopartikülleri artan derişimlerdeki ($4.0 \cdot 10^{-8}$ - $2.4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) LPA ile etkileştiğinde nanosensörlerin lüminesans şiddetlerinde artış gözlenmiştir. Lüminesans şiddetindeki artış baskılı nanosensörlere LPA bağlanmasını destekler (Şekil 3.56).

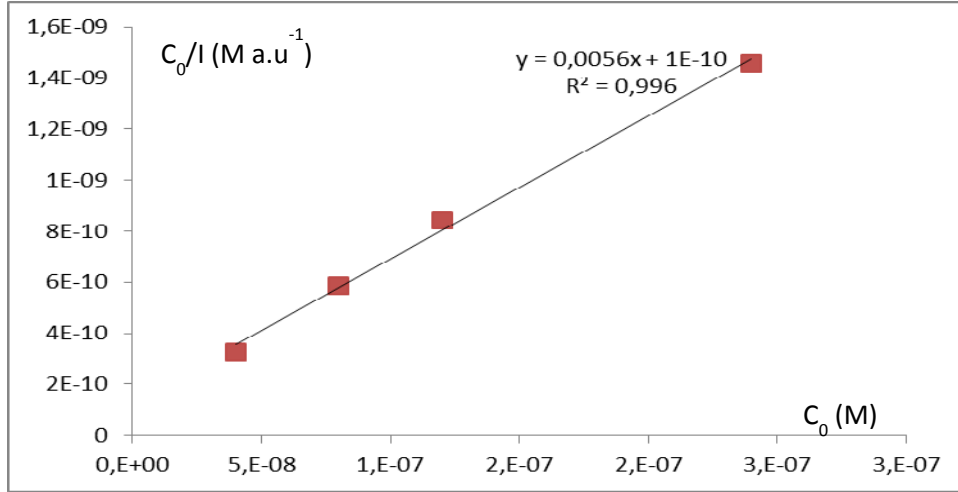


Şekil 3.56. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ve (MAAP)₂-Eu (III) metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı nanosensörlere LPA bağlanması sonucu lüminesans şiddetindeki değişim

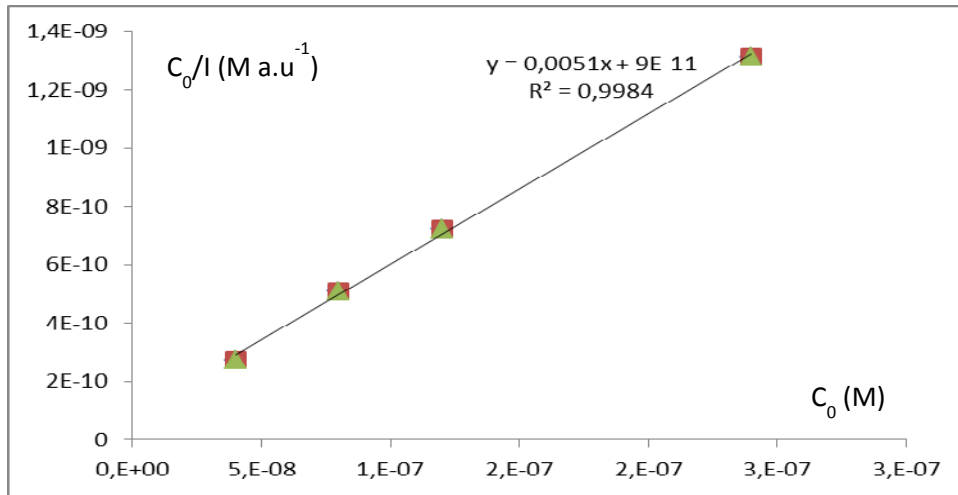
Metal şelat monomerleri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı CNT ve Fe₂O₃ nanosensörü için $4.0 \cdot 10^{-8}$ - $2.4 \cdot 10^{-7}$ M arasında değişen LPA derişimine bağlı olarak nanosensörün lüminesans kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak her bir nanosensör için LPA tayin sınırı bulunmuştur (Eşitlik 3.8). (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı CNT nanosensörünün LPA için teşhis sınırı $1.023 \cdot 10^{-8}$ M, tayin sınırı ise $3.1 \cdot 10^{-8}$ M olarak bulunmuştur. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı Fe₂O₃ nanosensörünün LPA için teşhis sınırı $3.6 \cdot 10^{-8}$ M, tayin sınırı ise $1.21 \cdot 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur. (MAAP)₂-Eu (III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı CNT nanosensörünün LPA için teşhis sınırı $2.23 \cdot 10^{-8}$ M, tayin sınırı ise $6.75 \cdot 10^{-8}$ M olarak bulunmuştur.

LPA baskılamada kullanılan nanosensörlerin bağlanma sabitlerinin değerlendirilmesi ve nanosensörlerin adsorpsiyon özelliklerini değerlendirmek amacıyla Langmuir adsorpsiyon izotermi uygulanmıştır. Şekil 3.57 ve 3.58’de (MAAP)₂Tb (III) metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılanmış CNT ve Fe₂O₃ nanosensörlerin LPA adsorpsiyonu için Langmuir

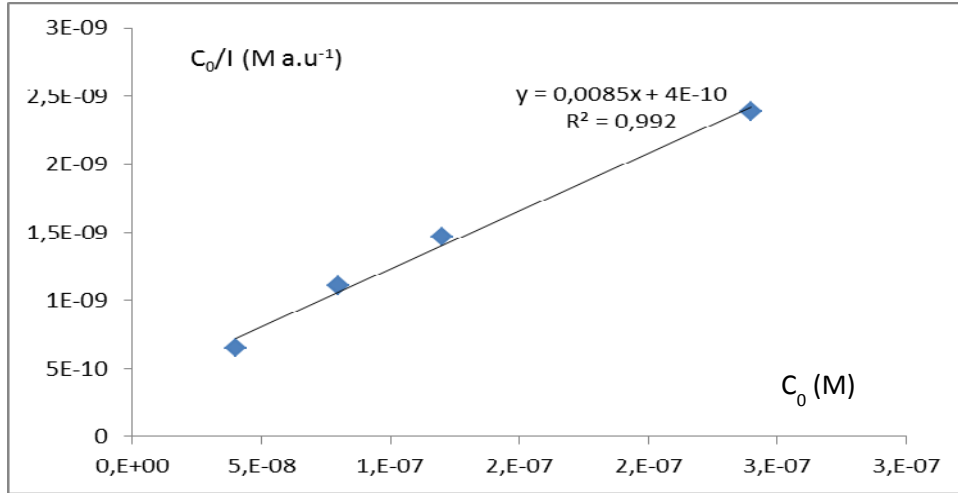
adsorpsiyon izotermi verilmiştir. Şekil 3.59’da ise (MAAP)₂Eu (III) metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılanmış CNT nanosensörünün LPA adsorpsiyonu için Langmuir adsorpsiyon izotermi verilmiştir. Langmuir adsorpsiyon izoterminden elde edilen LPA bağlanma sabiti ve nanosensörlerin LPA tayin sınırları Çizelge 3.8’de verilmektedir.



Şekil 3.57. (MAAP)₂Tb (III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı CNT nanosensörünün LPA için Langmuir adsorpsiyon izotermi



Şekil 3.58. (MAAP)₂Tb (III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı Fe₂O₃ nanosensörünün LPA için Langmuir adsorpsiyon izotermi



Şekil 3.59. (MAAP)₂Eu (III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı CNT nanosensörünün LPA için Langmuir adsorpsiyon izotermi

Çizelge 3.7. LPA baskılı CNT ve Fe₂O₃ nanosensörlerinin Langmuir analizlerinin ve tayin sınırlarının karşılaştırılması

	Langmuir K_A	Langmuir $I_{\max}$ (a.u)	Tayin sınırı
(MAAP) ₂ Tb (III) metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen CNT nanosensör	$5.6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$	178.57	$3.1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$
(MAAP) ₂ Tb (III) metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen Fe ₂ O ₃ nanosensör	$5.67 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$	196.08	$1.21 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
(MAAP) ₂ Eu (III) metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen CNT nanosensör	$2.125 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$	117.65	$6.75 \cdot 10^{-8} \text{ M}$

Elde edilen grafiklerin (Şekil 3.57-59) regresyon sabitlerine bakıldığında her üç nanosensör için LPA adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermine uyduğu görülmektedir. Buna göre nanosensörlerde yüzey enerji olarak eşdeğerdir ve bu bölümlerin yakın bölümlerde adsorbe olan LPA molekülleri arasında

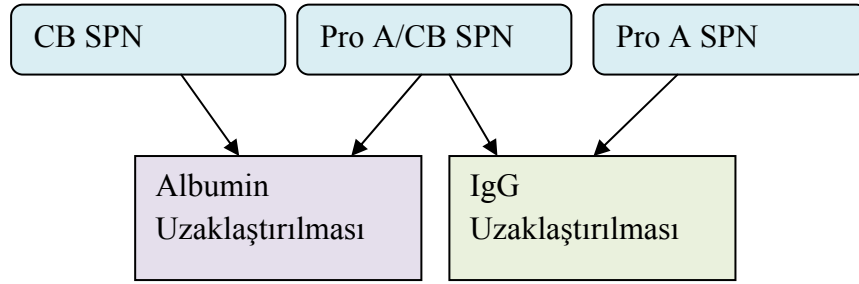
etkileşim olmadığını gösterir. Çizelge 3.7’den de görüldüğü gibi; (MAAP)₂Tb (III) metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen Fe₂O₃ nanosensörünün LPA bağlama afinitesi daha yüksek olmakla birlikte, (MAAP)₂Eu (III) metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen CNT nanosensörünün kullanılması ile daha düşük derişimdeki LPA tayin edilebilmektedir. Hazırlanan her üç nanosensörün bağlanma sabitlerinin yüksek olması nanosensörlerle LPA etkileşiminin güçlü olduğunu göstermektedir.

Serum normal şartlar altında 2-20 µM LPA içermektedir. LPA yumurtalık tümörlerinin gelişimi, ilerlemesi ve metastazında etkili olmakta ve yumurtalık kanserli hastaların plazmasında 80 µM gibi yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Tomar ve arkadaşlarının (2009) çalışmasında LPA’nın vilin proteinle bağlanması floresans şiddetindeki değişim ile belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrışma sabiti 22 µM (bağlanma sabiti $4.54 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) olarak bulunmuştur. Hazırlanan nanosensörlerle daha düşük derişimlerde LPA tayini gerçekleştirilebilmektedir.

4. SONUÇLAR

Serum ve plazma, hastalık durumunu yansıtmaya derecesi ve örneklerin kolay alınması nedeni ile hastalık biyolojik belirteçlerinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılan kaynaklardandır. İnsan serum proteinleri % 80 oranında albumin ve immunoglobulin G (IgG) içermekle birlikte oldukça düşük oranda da enfeksiyon, kanser, kardiyovasküler ve Alzheimer hastalıklarının belirlenmesini sağlayan biyolojik belirteçleri içerir. Yüksek derişimde (mgmL^{-1}) yer alan bu proteinler, biyolojik belirteçlerle girişim yapmakta ve düşük derişimde (ngmL^{-1} - pgmL^{-1}) bulunan proteinlerin hastalığın teşhisinde tanımlanmasını engellemektedir. Biyolojik belirtecin zenginleşmesini ve belirlenmesini sağlamak için albumin ve IgG proteinlerinin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. İnsan serumundan bu proteinlerin uzaklaştırılması için geliştirilen yöntemler arasında bulunan afinite kromatografisi seçici ve tek basamakta ayırımı sağlaması açısından avantajlıdır. Afinite ligandı olarak CB ligandının ve Pro A'nın kullanılması sırası ile albumin ve IgG için yüksek seçicilik sağlar. Ayrıca; bu afinite ligandlarının nanopartikül yüzeyine immobilizasyonu bu proteinler için oldukça yüksek adsorpsiyon kapasitesine ulaşılmasını sağlamaktadır.

Fe_2O_3 nanopartiküllerin yüzeyinin TMSPM ile fonksiyonellendirilmesiyle nanopartiküllerin aggregasyonu önlenmiş ve nanopartiküllerin dispersiyonu sağlanmıştır. Fe_2O_3 nanopartiküllerin fonksiyonellendirilmesi FT-IR ve TEM ile karakterize edilmiştir. Daha sonra; Fe_2O_3 nanopartiküllerine Pro A afinite ligandı ile CB boyasının bağlanmasıyla üç farklı albumin ve IgG uzaklaştırma katı desteği hazırlanmıştır (Şekil 4.1). Hazırlanan katı desteklere Pro A ve CB bağlanması, çözeltide adsorplanmadan kalan Pro A ve CB miktarının UV ile ölçülmesi sonucu belirlenmiştir. Pro A ve CB bağlanmasıyla Fe_2O_3 nanopartiküllerinin boyutundaki artış, TEM ve zeta boyut analizi ile desteklenmiştir. Fe_2O_3 nanopartiküllerinin Pro A ve CB bağlanmasıyla manyetik özelliklerini koruduğu ESR ile karakterize edilmiştir.



Şekil 4.1. Albumin ve IgG uzaklaştırılmasında kullanılan katı destekler

CB SPN ile sadece albumin uzaklaştırılması, Pro A SPN ile IgG uzaklaştırılması ve Pro A/CB SPN ile aynı anda hem albumin hem de IgG uzaklaştırılması kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. CB boyası, albumin uzaklaştırılmasında ekonomik, immobilizasyonu kolay, adsorpsiyon kapasitelerinin yüksek ve kararlı olması nedeni ile avantajlıdır. CB SPN ve Pro A SPN'ye maksimum albumin adsorpsiyonu albuminin izoelektrik noktası olan pH 5'de gözlenmiştir. İzoelektrik noktasında proteinler net yüke sahip değildir ve bu nedenle sulu çözeltide maksimum adsorpsiyon bu noktada gözlenmektedir. CB SPN ve Pro A SPN'nin sulu çözeltide albumin adsorpsiyonu incelendiğinde; CB SPN'nin maksimum adsorpsiyon kapasitesi 763.62 mgg^{-1} , Pro A/CB SPN'nin maksimum adsorpsiyon kapasitesi ise 1149 mgg^{-1} olarak bulunmuştur. Pro A/CB SPN'nin albumin adsorpsiyon kapasitesindeki artış Pro A afinite ligandına albuminin de bağlandığını göstermiştir. Her iki SPN de de albumin derişiminin artması ile adsorpsiyon miktarı artmış ve 8 mgmL^{-1} albumin derişiminde adsorpsiyon doygunluğa ulaşmıştır. Bu aşamada elde edilen C_{eq} (dengedeki derişim) ve Q (adsorpsiyon miktarı) değerleri kullanılarak her iki katı faz için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermi oluşturulmuştur. Albumin adsorpsiyonu bu izotermilere uygulandığında; elde edilen grafiklerin R^2 değerleri daha yüksek olduğundan albumin adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermine uyduğu bulunmuştur. Buna göre; belirli sayıda bağlanma bölgesi içeren yüzey üzerine tek tabakalı bir adsorpsiyon gerçekleştiği ve bu bölümlerin birbiri ile etkileşmeyecek kadar birbirinden uzak olduğu söylenebilir. Langmuir adsorpsiyon izotermi grafiğinden elde edilen eğim ve kesim değerlerinden bağlanma sabiti ve maksimum adsorpsiyon kapasitesi bulunmuştur. Langmuir

adsorpsiyon izotermi grafiğinden elde edilen maksimum adsorpsiyon kapasitesi deneysel olarak elde edilen adsorpsiyon kapasitesi ile de uyum göstermektedir. Langmuir adsorpsiyon izoterminden elde edilen bağlanma sabiti değerleri, CB SPN için 6991 M^{-1} ve Pro A SPN için 6784 M^{-1} olarak bulunmuştur. Her iki SPN’de albumin adsorpsiyonu için elde edilen R_L değerleri de albumin adsorpsiyonun uygun olduğunu göstermiştir. Sıcaklık artışı her iki SPN’nin adsorpsiyon kapasitesinde artışa neden olmuştur. Sıcaklık arttıkça albuminin hidrofobik grupları ile CB ve Protein A’nın hidrofobik grupları etkileşmektedir. Albumin adsorpsiyonunda ortama eklenen NaCl derişiminin artması, adsorpsiyon miktarını artırmıştır. Eklenen tuz, su molekülleri ile etkileşerek albuminin CB ve Pro A ile etkileşmesi için sürücü kuvvet oluşturmuştur. Desorpsiyon tamponu olarak % 10 etilen glikol içeren 0.1 M asetat tamponu (pH 4.0) kullanılmıştır. Pro A/CB SPN’nin albumin desorpsiyon oranı % 93 olarak bulunurken; CB SPN’nin albumin desorpsiyon oranı % 95 olarak bulunmuştur ve 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrasında adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir değişim görülmemiştir.

Pro A’nın IgG’ye karşı afinitesi oldukça yüksek olmakla birlikte Pro A’nın maliyeti oldukça yüksektir ve doğru oryantasyonda bağlanması oldukça önemlidir. Pro A ligandının katı desteğe bağlanması pH 7.0 PBS tamponunda fotoduyarlı metal-şelat monomeri yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Pro A/CB ve Pro A SPN’ye IgG adsorpsiyonu pH 7’de maksimum olarak gözlenmiştir. pH 7.0’de maksimum IgG adsorpsiyon kapasitesi Pro A/CB SPN için 825.9 mgg^{-1} ve Pro A SPN için ise 762.75 mgg^{-1} olarak elde edilmiştir. Her iki SPN’de de adsorpsiyon, IgG başlangıç derişiminin artmasıyla artmış ve 10 mgmL^{-1} IgG derişimde doygunluğa ulaşılmıştır. pH 7.4’de maksimum adsorplanan IgG miktarı Pro A SPN için 1102 mgg^{-1} ve Pro A/CB SPN için ise 1175 mgg^{-1} olarak bulunmuştur. Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm denklemlerinden yararlanılarak adsorpsiyonun hangi izoterme uyduğu belirlenmiştir. Elde edilen grafiklerin R^2 değerlerinden IgG adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermine uyduğu bulunmuştur. Pro A/CB SPN için IgG maksimum adsorpsiyon kapasitesi 1111 mgg^{-1} , Langmuir sabiti ise 12857.14 M^{-1} ve Pro A SPN için IgG maksimum adsorpsiyon kapasitesi 1666.67 mgg^{-1} , Langmuir sabiti ise

6521.74 M⁻¹ olarak elde edilmiştir. Her iki SPN’de IgG adsorpsiyonu için elde edilen R_L değerleri de IgG adsorpsiyonunun uygun olduğunu göstermiştir. Sıcaklığın artması ile her iki SPN’nin IgG adsorpsiyon kapasitesi de artmaktadır. Pro A-IgG etkileşimlerinde hidrofobik kuvvetler baskındır. Sıcaklığın artışı ile suya maruz kalan hidrofobik yüzeyler azaltılır ve IgG ile destek arasında daha kuvvetli hidrofobik etkileşimlere neden olduğundan protein adsorpsiyonunu artmaktadır. NaCl derişiminin artması ile her iki SPN’de de IgG adsorpsiyon miktarı artmıştır. IgG desorpsiyon tamponu olarak % 10 etilen glikol içeren 0.1 M asetat tamponu (pH 4.0) kullanılmıştır. Pro A/CB SPN’den IgG desorpsiyon oranı % 95 olarak bulunurken; CB SPN’den IgG desorpsiyon oranı % 90 olarak bulunmuştur. Hazırlanan SPN’lerin 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonrasında adsorpsiyon kapasitelerinde önemli bir değişim görülmemiştir.

Hazırlanan SPN’lerden albumin ve IgG uzaklaştırılması serum örneklerinde de incelenmiştir. Sulu çözeltide, Pro A/CB SPN’nin kullanılması ile albumin adsorpsiyon kapasitesi 1149 mgg⁻¹ olarak elde edilirken, IgG adsorpsiyon kapasitesi 1102 mgg⁻¹ olarak elde edilmiştir. Serum örneği ile çalışıldığında, Pro A/CB SPN albumin adsorpsiyon kapasitesi 3461 mgg⁻¹ iken, IgG adsorpsiyon kapasitesi 2307 mgg⁻¹ olarak elde edilmiştir. Sulu çözeltide CB SPN’nin albumin adsorpsiyon kapasitesi 763 mgg⁻¹ iken, Pro A SPN’nin IgG adsorpsiyon kapasitesi 1175 mgg⁻¹’tir. Serum örneği önce Pro A SPN ile etkileştirildiğinde albumin adsorpsiyon kapasitesi 2068 mgg⁻¹ olarak bulunurken, IgG adsorpsiyon kapasitesi 1034 mgg⁻¹ olarak bulunmuştur. Serum örneği, önce CB SPN ile etkileştirildiğinde albumin adsorpsiyon kapasitesi 3000 mgg⁻¹ olarak bulunurken, IgG adsorpsiyon kapasitesi 1500 mgg⁻¹ olarak bulunmuştur. Serum örnekleri seyreltiğinde hazırlanan katı desteklerin albumin ve IgG adsorpsiyon kapasitelerinde azalma gözlenmiştir. Serumda katı desteklerin adsorpsiyon kapasitelerinde gözlenen artış; albumin ve IgG’nin konformasyonel yapısının kendi doğal ortamında Pro A/CB, CB ve Pro A SPN’ler ile daha uygun spesifik etkileşmesiyle açıklanabilir. Pro A SPN 1/5 oranında seyreltilen serum örneği ile etkileştirildiğinde, Pro A SPN daha fazla miktarda IgG uzaklaştırmıştır. Aynı şekilde; 1/5 oranında seyreltilen serum önce CB SPN ile etkileştirildiğinde de albumin uzaklaşması daha fazla miktarda gerçekleşmiştir. Serum ve uzaklaştırma

gerçekleştirilen serum örneklerinin SDS-PAGE görüntülerine bakıldığında; IgG ve albumin proteinlerine ait bandların miktarının azalması uzaklaştırmanın gerçekleştiğini göstermektedir. Desorpsiyon örneklerinde de IgG ve albumine ait bantlar gözlemlendiğinden albumin ve IgG desorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan her üç destekle albumin ve IgG uzaklaştırmasının gerçekleştiği 2D-PAGE ile de doğrulanmıştır. 2D-PAGE görüntülerinden önce CB SPN'nin daha sonra Pro A SPN'nin kullanılmasının albumin uzaklaştırılmasında daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Hazırlanan katı destekler ile Thermo Scientific firmasına ait immobilize Cibacron Blue/Protein A jelinin albumin ve IgG uzaklaştırma etkinliği karşılaştırılmıştır. Ürünün protein uzaklaştırma prosedürüne göre; serum örnekleri 15 kez seyreltildiğinde albumin için uzaklaştırma oranı % 62 olarak bulunurken, IgG için uzaklaştırma oranı % 70 olarak bulunmuştur. Serumun seyreltilmesi düşük miktarda olan biyolojik belirteçlerin de seyrelmesine neden olacağı için biyolojik belirteç analizlerinde sorun oluşturacaktır. Ticari ürünle daha az hacimde serum etkileştirilirken, hazırladığımız katı desteklerle daha fazla hacimde serum etkileştirilebilmektedir. Düşük hacimde serumla etkileştirme işlemlerinde, daha sonra biyolojik belirteç analizi yapılacaksa örnek miktarı yeterli olmayacağından için uzaklaştırma işlemlerinin tekrarlanması gerekecektir. Bu durum ise ilave zaman ve iş gücüne neden olacaktır. Ticari ürünle albumin ve IgG uzaklaştırma 50 dakikada gerçekleştirilirken, hazırladığımız katı desteklerle 60 dakikada gerçekleştirilmektedir. Ancak; katı desteklerimiz serumun ayırımını daha kolay sağlarken, ticari örneklerde santrifüjleme işlemi gerekmektedir.

Çalışmanın son aşamasında ise; yumurtalık kanseri biyolojik belirteçleri olan CA 125 ve LPA biyolojik belirteçlerinin belirlenmesini sağlayan nanosensörler hazırlanmıştır. Bunun için önce Fe_2O_3 ve CNT nanoyapılarının yüzeyi metal şelat monomerleri ile fonksiyonellendirilmiştir. MAAP monomeri NMR ile karakterize edilirken, $(\text{MAAP})_2\text{-Eu (III)}$ metal-şelat monomeri FT-IR ile ve $(\text{MAAP})_2\text{-Tb (III)}$ metal-şelat monomeri ise MALDI-TOF-MS ve FT-IR ile karakterize edilmiştir. Moleküler baskılama yöntemi kullanılarak nanopartiküllere LPA ve PS baskılanmıştır. Baskılanmış nanopartiküller, FT-IR ve TEM ile karakterize edilmiştir. $(\text{MAAP})_2\text{-Tb(III)}$ ve $(\text{MAAP})_2\text{-Eu(III)}$ metal-şelat

monomerleri ile fonksiyonellendirilen, LPA ve PS baskılanmış CNT ve Fe₂O₃ nanopartikülleri 350 nm’de uyarıldığında 701.2 nm’de emisyon vermiştir.

(MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı CNT nanosensörü 10⁻¹⁰-10⁻⁹ M derişim aralığındaki PS ile etkileştirilmiş ve lüminesns değerleri ölçülmüştür. PS için teşhis sınırı 1.76 10⁻¹⁰ M, tayin sınırı ise 5.33 10⁻¹⁰ M olarak bulunmuştur. Aynı CNT nanosensörü 3.125-150 UmL⁻¹ arasında değişen derişimlerdeki CA 125 ile etkileştirilmiş ve lüminesans değerleri ölçülmüştür. Aynı CNT nanosensörünün CA 125 için teşhis sınırı 0.4922 UmL⁻¹, tayin sınırı ise 1.4914 UmL⁻¹ olarak bulunmuştur. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen PS baskılı Fe₂O₃ nanosensörü için 3.125-125 UmL⁻¹ arasında değişen CA 125 ile etkileştirilmiş ve Fe₂O₃ nanosensörünün CA 125 için teşhis sınırı 2.0506 UmL⁻¹, tayin sınırı ise 6.2140 UmL⁻¹ olarak bulunmuştur. Yumurtalık kanseri hastalarının kan serumunda CA 125 derişimi > 35 UmL⁻¹ olarak bulunmaktadır. Hazırlanan bu nanosensörlerle daha düşük derişimlerdeki CA 125 tayini gerçekleştirilebilmektedir.

LPA baskılı CNT ve Fe₂O₃ nanoyapılar, 4.0 10⁻⁸-2.4 10⁻⁷ M derişim aralığındaki LPA ile etkileştirildiğinde nanosensörlerin lüminesans şiddetlerindeki artış baskılı nanosensörlere LPA bağlanmasını desteklemektedir. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı CNT nanosensörünün LPA için teşhis sınırı 1.023 10⁻⁸ M, tayin sınırı ise 3.1 10⁻⁸ M olarak bulunmuştur. (MAAP)₂-Tb(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı Fe₂O₃ nanosensörünün LPA için teşhis sınırı 3.6 10⁻⁸ M, tayin sınırı ise 1.21 10⁻⁷ M olarak bulunmuştur. (MAAP)₂-Eu(III) metal şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen LPA baskılı CNT nanosensörünün LPA için teşhis sınırı 2.23 10⁻⁸ M, tayin sınırı ise 6.75 10⁻⁸ M olarak bulunmuştur. (MAAP)₂Eu(III) metal-şelat monomeri ile fonksiyonellendirilen CNT nanosensörünün kullanılması ile daha düşük derişimdeki LPA tayin edilebilmektedir. Tarafımızdan hazırlanan her üç nanosensörün bağlanma sabitlerinin yüksek olması nanosensörlerle LPA etkileşiminin güçlü olduğunu göstermektedir. Yumurtalık kanserli hastaların plazmasında LPA 80 µM gibi yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Tarafımızdan hazırlanan nanosensörlerle daha düşük derişimlerde LPA tayini gerçekleştirilebilmektedir.

Özetle, proteomik çalışmalarda hızlı, tekrar kullanılabilir ve adsorpsiyon kapasitesi yüksek ve ticari örneklerle yarışabilir süperparamanyetik nanopartiküller, ilk defa bu çalışmada uygulanan fotosensitif biyokonjugasyon yoluyla üretilmiştir. Ayrıca Pro A denatürasyonu önlenmiş, CB konjugasyonu da gerçekleştirilmiş ve bu yöntemle proteomik katı desteklerin hazırlanmasına yeni bir yaklaşım getirilmiştir. Diğer taraftan, ucuz ve kararlı paramanyetik nanopartiküller ve CNT sensörler geliştirmek amacıyla yumurtalık kanseri biyolojik belirteçlerinden CA 125 ve LPA yapılarını tanıyacak LPA ve PS baskılanmış yüzeyler, yine ilk defa bu tezde düşünülmüş ve hazırlanmıştır. Her iki nanosensörün kullanılabilirlikleri analitik kimya açısından değerlendirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Ahmed N., Barker G., Oliva, K., Talmadge, K., Georgiou H., Quinn, M., Rice, G., (2003), "An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum", *Proteomics*, **3**, 1980-1987.
- Akgöl, S., Özkara, S., Uzun, L., Yılmaz, F., Denizli, A., (2007), "Pseudospecific magnetic affinity beads for immunoglobulin G depletion from human serum", *Journal of Applied Polymer Science*, **106**, 2405-2412.
- Alkan, H., Bereli, N., Baysal, Z., Denizli, A. (2009), "Antibody purification with Protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethyl metacrylate)cryogel", *Biochemical Engineering Journal*, **45**, 201-208.
- Altıntaş, E.B., Denizli, A., (2006), "Efficient removal of albumin from human serum by monosize dye-affinity beads", *Journal of Chromatography B*, **832**, 216-223.
- Altıntaş, E.B., Tüzmen, N., Uzun, L., Denizli, A. (2007) "Immobilized metal affinity adsorption for antibody depletion from human serum with monosize beads", *Ind. Eng. Chem. Res.* **46**, 7802-7810.
- Andersson, H.S., Koch-Schmidt, A.C., Ohlson, S., Mosbach, K. (1996), "Study of the nature of recognition in molecular imprinted polymers," *J. Mol. Recogn.* **9**, (5-6) 675-682.
- Anderson N.L. and Anderson, N.G. (2002), "The Human Plasma Proteome History, Character and Diagnostic Prospects", *Molecular&Cellular Proteomics*, 845-867.
- Andrecht, S. And Hagen, J. (2008), "General Aspects of Sample Preparation for Comprehensive Proteome Analysis", *Proteomics Sample Preparation Kitabı* (Ed: Hagen, J.), Wiley-VCH, Weinheim, Almanya, 5-15.
- Anonim (2006), "Protein depletion for plasma and serum proteomic analysis", http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/AlbuminRemoval/SIGMA_ProteinDepletGuide.pdf.
- Anonim (2011), National Human Genome Research Institute, <http://www.genome.gov/12011238>.
- Anonim (2012), American Cancer Society <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003070-pdf.pdf>

- Ansell, R.J. ve Mosbach, K., (1998), "Magnetic molecularly imprinted beads for drug radioligand binding assay", *Analyst*, **123**, 1611-1616.
- Arshady, R. ve Mosbach, K. (1981), "Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization," *Macromol. Chem*, **182**, 687-692.
- Avcıbaşı, N., Uygun, M., Çorman, M.E., Akgöl, S., Denizli, A. (2010), "Application of supermacroporous Monolithic Hydrophobic Cryogel in Capturing of Albumin", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **162**, 2232-2243.
- Ayar, A., Gürsal, S., Gürten, A.A. ve Gezici, O. (2008), "On the removal of some phenolic compounds from aqueous solutions by using a sporopollenin-based ligand-exchange fixed bed-Isotherm analysis", *Desalination*, **219**, 160-170.
- Bailes, J., Vidal, L., Ivanov D, A. and Mikhail Soloviev (2009), "Quantum dots improve peptide detection in MALDI MS in a size dependent manner", *Journal of Nanobiotechnology*, **7:10**, 1-12.
- Başaran, E., Aras, S., Cansaran-Duman, D., (2010), "Genomik, Proteomik, Metabolomik Kavramlarına Genel Bakış ve Uygulama Alanları", *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*; **67** (2), 85-96.
- Baumbach, G.A., Hammond, D.J. (1992), "Protein purification using affinity ligands deduced from peptide libraries", *Biopharm.*, **5**, 24-35.
- Bereli, N., Uzun, L., Yavuz, H., Elkak, A., Denizli, A. (2006), "Antibody Purification using porous metal-chelated monolithic columns", *Journal of Applied Polymer Science*, **101**, 395-404.
- Bereli, N., Şener, G., Altıntaş, E.B., Yavuz, H., Denizli, A., (2010), "Poly(glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albumin and immünoglobulin G", *Materials Science and Engineering C*, **30**, 323-329.
- Björhall, K., Miliotis, T., Davidsson, P., (2005), "Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples", *Proteomics*, **5**, 1, 307-317.
- Bock, M. D., Seny, D., Meuwis, M-A., Chapelle, J-P., Louis, E., Malaise, M., Merville, M-P., Fillet, (2010), "Challenges for Biomarker Discovery in

- Body Fluids Using SELDI-TOF-MS”, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-15.
- Bodzon-Kulakowska, A., Bierczynska-Krzsik, A., Dylag T., Drabik A., Suder P., Noga M., Jarzebinska J., and Silberring J., (2007), “Methods for samples preparation in proteomic research”, *Journal of Chromatography B*, **849**, 1-2, 1-31.
- Bonini, F. (2008), *Molecularly Imprinted Polymers for Proteome Analysis*, Doktora Tezi, Cranfield University, İngiltere.
- Bozkaya, Y. (2008), *Karbon nanotüp sentezinde kullanılmak üzere Fe-katkılı Al_2O_3 seramik tozarlarının ve altlıklarının üretimi*, Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Budnik, L. T. ve Mukhopadhyay, A. K. (2002), “Lysophosphatidic Acid and its role in Reproduction”, *Biology of Reproduction*, **66**, 859-865.
- Builder, S.E., (1993) “Hydrophobic Interaction Chromatography principles and methods” Amersham Pharma Biotech.
- Büyüktiryaki, S. (2005), *“Metilciva Belleklere Sahip Polimerik Mikrokürelerle Civa Önderiştirilmesi ve Tayini”*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Cai, D., Ren, L., Zhao, H., Xu, C., Zhang, L., Yu, Y., Wang, H., Lan, Y., Roberts, M. F., Chuang, J. H., Naughton, M. J., Ren, Z., Chiles T. C., (2010), “A molecular-imprint nanosensor for ultrasensitive detection of proteins”, *Nature Nanotechnology*, **5**, 597-601.
- Cakic, M. D., Nikolic, G. S., Ilic L. A., (2002), “FT-IR Spectra of iron(III) complexes with dextran, pullulan and inulin oligomers” *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, **21(2)**, 135–146.
- Calinescu, M., Manea, D. and Pavelescu, G. (2011), “Synthesis and spectroscopic properties of new complex compounds of europium (III) and terbium (III) with 2-hydroxy-1-naphtaldehyde acetylhydrazone and heterocyclic bases”, *Revue Roumaine de Chimie* **56(3)**, 231-237.
- Chang, H.-K., Ishikawa, F. N., Zhang, R., Datar, R., Cote, R. J., Thompson, M. E. and Zhou, C.(2011), “Rapid, Label-Free, Electrical Whole Blood Bioassay Based on Nanobiosensor System” *ACS Nano*, **5**, **12**, 9883-9891.

- Changqing Z. 2008 “*Proteomics-based identification of potential protein biomarkers for epithelial ovarian cancer*” Doktora tezi, National University of Singapore, Department of Obstetrics & Gynaecology, Singapur.
- Chatterjee, S.K., Zetter, B. R., (2005), “Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future”, *Future Oncology*, **1**, 37-50.
- Chen, W-Y., Wang, L-S., Chiu, H-T., Chen, Y-C., and Lee C-Y., (2004), “Carbon nanotubes as affinity probes for peptides and proteins in MALDI MS analysis”, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **15**, 11, 1629-1635.
- Cheng, Y., (2009), “*Analysis of SELDI Mass spectra for biomarker discovery and cancer classification*”, Doktora Tezi, University of Birmingham, CRUK Cancer Studies, Medical School, İngiltere.
- Chu, C.S. and Rubin, S.C. (2006), “Screening for ovarian cancer in the general population”, *Best Practice&Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, **20**, 2, 307-320.
- Chun, J., Goetzl, E., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K. R., Moolenaar, W., Pyne, S., Tigyi, G. (2002), “International Union of Pharmacology XXXIV. Lysophospholipid Receptor Nomenclature”, *Pharmacological Reviews*, **54**, **2**, 265-269.
- Conn, P. M., (2003), “Handbook of Proteomic Methods”, Humana Press Inc., Belçika.
- Corr, S.A., Rakovich, Y.P., Gun’ko, Y.K, (2008), “Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications”, *Nanoscale Res Lett*, **3**, 87-104.
- Cui, H., Feng, Y., Ren, W., Zeng, T., Lv, H. and Pan, Y. (2009), “Strategies of Large Scale Synthesis of Monodisperse Nanoparticles”, *Recent Patents on Nanotechnology*, **3**, 32-41.
- Çakmak, S., Gümüşderelioğlu, M., Denizli, A. (2009), “Biofunctionalization of magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres with protein A: Characterization and cellular interactions”, *Reactive and Functional Polymers*, **69**, 586-593.

- Çırakoğlu, B., Özer, Z., Balkız, Ö., Yiğit, A., Güney, Ö., (Mart 2001), “*İnsan Genomu*”, Bilim ve Teknik Dergisi Eki
- Denizli, A. ve Pişkin, E. (1995a), “DNA-immobilized polyhydroxyethylmethacrylate microbeads for affinity sorption of human immunoglobulin G and anti-DNA antibodies” *J. Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **666**, 215-222.
- Denizli, A., Rad, A. Y. ve Pişkin, E. (1995b). “Protein A immobilized polyhydroxyethylmethacrylate beads for affinity sorption of human immunoglobulin-G”, *J. Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **668**: 13-19.
- Denizli, A., Tuncel, A., Kozluca, A., Ecevit, K., Pişkin, E. (1997), “Cibacron Blue F3G-A Attached Poly(Vinyl Alcohol) Particles for Specific Albumin Adsorption” *Separation Sci. Technol.*, **32**, 1003-1015.
- Denizli, A., Kocakulak, M., Pişkin, E., (1998), “Bilirubin removal from human plasma in a packed-bed column system with dye-affinity microbeads” *J. Chromatography B*, **707**, 25-31.
- Denizli, A., Köktürk, G., Yavuz, H., Pişkin, E. (1999), “Dye-ligand column chromatography: albumin adsorption from aqueous media and human plasma with dye –affinity microbeads”, *Journal of Applied Polymer Science*, **74**, 2803-2810.
- Denizli, A. ve Arıca, Y. (2000), “Protein A-immobilized polyhydroxyethylmethacrylate affinity membranes for selective sorption of human-immunoglobulin-G from human plasma, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, **11**, 4, 367-382.
- Denizli, A. ve Pişkin, E. (2001) “Dye-ligand affinity systems”, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **49**, 391-416.
- Denizli, A. (2002) “Proteinlerin bugünü ve geleceği”, *Popüler Bilim*, Eylül, 50-54.
- Denizli, A. , (2007) “Protein Analizi”, *Bilim ve Teknik Dergisi*, Temmuz, 66-69.
- Denizli, A. (2011) “Purification of Antibodies by affinity chromatography”, *Hacettepe J. Biol.&Chem.* **39**, (1), 1-18.

- Demiryas, N., Tüzmen, N., Galaev, I., Pişkin, E., Denizli, A. (2007). Poly(acrylamide-allyl glycidyl ether) Cryogel as a Novel Stationary Phase in Dye-Affinity Chromatography, *Wiley InterScience*, **105**, 1808–1816.
- DeRycke, M. S., (2010), "S100A1 and Nectin 4 Biomarkers in Ovarian Cancer", Doktora tezi, University of Minnesota.
- Dhal, P.K. ve Arnhold, F.H. (1992), "Metal-coordinated interactions in the template-mediated synthesis of substrate-selective polymers: Recognition bis(imidazole) substrates by copper(II) iminodiacetate containing polymers," *Macromolecules*, **25**, 7051-7059.
- Diamandis, E.P., (2004), "Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool", *Molecular&Cellular Proteomics*, **3**, 367-378.
- Diltemiz, S. E. (2005), "*DNA'yı Tanıma Bölgelerine Sahip Moleküler Baskılanmış Polimer Tekniğine Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi*" Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Diltemiz, E. S., Say, R., Büyüktiryaki S., Hür, D., Denizli, A., Ersöz, A., (2008) Quantum dot nanocrystals having guanosine imprinted nanoshell for DNA recognition", *Talanta*, **75**, 4, 890-896.
- Dios, A. S. ve Diaz-Garcia, M. E. (2010), "Multifunctional nanoparticles: Analytical Prospects", *Analytica Chimica Acta*, **666**, 1-22.
- Echan, L.A., Tang, H-Y., Ali-Khan, N., Lee, K., Speicher D.W., (2005), "Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma", *Proteomics*, **5**, 3292-3303.
- Eidhammer I., Flikka K., Martens L., Mikalsen S.-O., (2007), Computational Methods for Mass Spectrometry Proteomics", John Wiley & Sons Ltd,e-book
- Engwegen, J.Y.M.N., Gaast, M.W., Schellens, J.H.M., Beijnen, J.H. (2006), "Clinical proteomics: searching for tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry", *Trends in Pharmacological Sciences*, **27**, 5, 251-259.

- Ersöz, A., Denizli, A., Şener, İ., Atılır, A., Diltemiz Emir, S., Say, R. (2004), "Removal of phenolic compounds with nitrophenol-imprinted polymer based on π - π and hydrogen-bonding interactions", *Separation and Purification Technology*, **38**, 2, 173-179.
- Fang, X., Huang, L., Feitelson, J.S., Zhang, W-W. (2004), "Affinity separation:divide and conquer the proteome", *Drug Discovery Today: Technologies*, **1**, 2, 141-148.
- Fang, X., Zhang W-W. (2008), "Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis", *Journal of Proteomics*, **71**, 284-303.
- Fornora, A. (2008), *Magnetic nanostructured materials for advanced bio-applications*, Lisans Tezi, Royal Institue of Technology, Department of Microelectronics and Applied Physics, Division of Functional materials, Stockholm.
- Fountoulakis, M., Juranville,J.-F., Jiang, L., Avila, D., Röder, D., Jakob, P., Berndt, P., Evers S., and Langen, H. (2004), "Depletion of the high-abundance plasma proteins", *Amino Acids*, **27**, 249-259.
- Frey, N. A., Peng, S., Cheng, K., Sun, S. (2009), "Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage", *Chem Soc Rev.*, **38** (9), 2532-2542.
- Füglister, P. (1989), "Comparison of immunoglobulin binding capacities and ligand leakage using eight different protein A affinity chromatography matrices" *J. Immunol. Methods*, **124**, 171-177.
- Garipcan, B. ve Denizli, A. (2002), "A novel affinity support material for the separation of Immunoglobulin G from human plasma", *Macromol. Biosci.*, **2**, 135-144.
- Ghadge, V.B. (2000), "Synthetic polymer based affinity matrices: seperation of Penicillin G acylase and penicillinase" , PhD Thesis, University of Pune, India.
- Govorukhina, N.I., Reijmers, T.H., Nyangoma,S.O., Van der Zee, A.G.H., Jansen, R.C., Bischoff, R. (2006), "Analysis of human serum by liquid chromatography-mass spectrometry: Improved sample preparation and data analysis", *Journal of Chromatography A.*, **1120**, 142-150.

- Govorukhina, N. ve Bischoff, R., (2007)“Sample Preparation of Body Fluids for Proteomic Analysis”, *Proteomics of Body Fluids Kitabı* (Ed.: Thongboonkerd, V.), Humana Press. Inc., New Jersey, USA, 10-48.
- Graves, P.R. ve Haystead T. A. J. (2002), “Molecular Biologist’s Guide to Proteomics”, *Microbiol Mol Biol Rev.*, **66(1)**, 39–63.
- Greenough, C., Jenkins, R.E., Kitteringham, N.R., Pirmohamed, M., Park, B.K., Pennington S.R. (2004), “A method for the rapid depletion of albumin and immunoglobulin from human plasma”, *Proteomics*, **4**, 3107-3111.
- Gubbles, J.AA, Claussen, N., Kapur, A.K., Cannor, J. P., Patankar, M.S., (2010) “The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer”, *Journal of Ovarian Research*,**3:8**,1-11.
- Gubin, S.P., Koksharov, Y.A., Khomutov, G.B., Yurkov, G.Y. (2005), “Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties”, *Russian Chemical Reviews*, **74 (6)**, 489-520.
- Guo Z., Lei, K., Li, Y., Ng H. W., Prikhodko, S., Hahn, H. T. (2008), “Fabrication and characterization of iron oxide nanoparticles reinforced vinyl-ester resin nanocomposites” *Composites Science and Technology*, **68**, 1513–1520.
- Gupalova, T.V., Lojkina, O.V., Palagnuk, V.G., Totolian, A.A., Tennikova, T.B., “Quantitative investigation of the affinity properties of different recombinant forms of Protein G by means of high-performance monolithic chromatography”, *Journal of Chromatography A*, **949**, 185-193.
- Haupt, K., Dzgoev, A., Mosbach, K. (1998), “Assay system for the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a molecularly imprinted polymer as an artificial recognition element,” *Anal. Chem.*, **70 (3)**, 628-631.
- He, Y. T., Wan, J., Tokunaga, T., “Kinetic stability of hematite nanoparticles: the effect of particle sizes” *J Nanopart Res.*
- Hebestreit, H. F., (2001), “Proteomics: an holistic analysis of nature’s proteins”, *Current Opinion in Pharmacology*, **1**, 513-520.
- Helleman, J. (2006), “Expression profiling of ovarian cancer:markers and targets for therapy”, Erasmus Universiteit Rotterdam, Hollanda.

- Hodak, J.H.; Henglein, A.; Hartland, G.V. (2000), "Photophysics of Nanometer Sized Metal Particles: Electron-Phonon Coupling and Coherent Excitation of Breathing Vibrational Modes." *J. Phys. Chem. B*, **104**, 9954-9965.
- Hodgson, L. J., (2009), "*A Microdevice for the improved presentation of biological samples for the MALDI-TOF mass spectrometry*", Doktora Tezi, RMIT Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Okulu, Bilim, Mühendislik ve Sağlık Bölümü, Avustralya.
- Hoffman, S.A., Joo, W., Echan L.A., Speicher D.W., (2007), Higher dimensional (Hi-D) separation strategies dramatically improve the potential for cancer biomarker detection in serum and plasma", *Journal of Chromatography B*, **849**, 43-52.
- Hortin, G.L., (2006), "The MADI-TOF Mass Spectrometric View of the Plasma Proteome and Peptidome", *Clinical Chemistry*, **52:7**, 1223-1237.
- Horvath, V. (2006), "High effectiveness of platium complexes with adamantylamine in overcoming resistance to cisplatin and suppressing proliferation of ovarian cancer cells in vitro", Doktora Tezi, Masaryk University, Faculty of Science
- Huang, P.Y. ve Carbonell, R.G. (1999), "Affinity chromatographic screening of soluble combinatorial peptide libraries", *Biotechnol.Bioeng.*, **63**, 633-641.
- Hür, D., Ekti Dal, S.F., Say, R. (2007), "*N-Acylbenzotriazole Mediated Synthesis of Some Methacrylamido Amino Acids*" *Letters in Organic Chemistry*, **4**, 585-587.
- Iijima, M. ve Kamiya, H., (2009), "Surface modification for improving the stability of nanoparticles in liquid media", *KONA Powder and Particle Journal*, **27**, 119-129.
- Indira, T.K. ve Lakshmi, P.K., (2010), "Magnetic naoparticles", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, **3, 3**, 1035-1042
- Ivanov, Y. D., Govorun, V.M., Bykov, V.A., Archakov, A.I., (2006). "Nanotechnologies in proteomics", *Proteomics*, **(6)** 1399-1414.

- Jagtap, R.N., Ambre, A.H., (2005), "Overview literature on matrix assisted laser desorption ionization mass spectroscopy (MALDI MS): basics and its applications in characterizing polymeric materials", *Bull. Mater. Sci.*, **28**, 6, 515-528.
- Jain, K.K., (2010) *The Handbook of Biomarkers*, Humana Press, Basel, İsviçre
- Ji, Y., Yin, J., Xu, Z., Zhao, C., Huang, H., Zhang, H., Wang, C. (2009), "Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for rapid determination of bisphenol A in environmental water and milk samples" *Anal Bioanal Chem.* **395**, 1125–1133.
- Jmeian, Y., Rassi, Z., (2007), "Tandem affinity monolithic microcolumns with immobilized protein A, Protein G' , and Antibodies for depletion of high abundance proteins from serum samples: Integrated microcolumn-based fluidic system for simultaneous depletion and tryptic digestion", *Journal of Proteome Research*, **6**, 947-954.
- Johnson, C. J., Zhukovsky, N., Cass, A.E.G., Nagy, J. M., (2008) "Proteomics, nanotechnology and molecular diagnostics" *Proteomics*, **8**, 715-730.
- Kabir, M. (2009), *Ovarian cancer serum biomarker discovery using proteomics*, Doktora Tezi, University College London, Department of Gynaecological Oncology, Londra, İngiltere.
- Kan, X., Geng, Z., Zhao, Y., Wang, Z., and Zhu J.-J., (2009), "Magnetic molecularly imprinted polymer for aspirin recognition and controlled release", *Nanotechnology*, **20**, 1-7.
- Karakoç, V. Yılmaz, E., Türkmen, D., Öztürk, N., Akgöl, S., Denizli, A. (2009), "Selective separation of human serum albumin with copper(II) chelated poly(hydroxyethyl methacrylate) based nanoparticles", *Int. J. of Biol. Macromolecules*, **45**, **2**, 188-193.
- Karataş, M., Akgöl, S., Yavuz, H., Say, R., Denizli, A., (2007), "Immunoglobulin G depletion from human serum with metal-chelated beads under magnetic field, *International Journal of Biological Macromolecules*, **40**, 254-260.
- Kassab, A., Yavuz, H., Odabaşı, M., Denizli, A., (2000), "Human serum albumin chromatography by Cibacron Blue F3GA-derived microporous polyamide

- hollow-fiber affinity membranes”, *Journal of Chromatography B*, **746**, 123-132.
- Keçili, R., Say, R., Yavuz, H., (2006), “Synthesis and characterization of pseudo-affinity ligand for penicilin acylase purification”, *International Journal of Biological Macromolecules*, **39**, 4-5, 250-255.
- Keçili, R., Atılır Özcan, A., Ersöz, A., Hür, D., Denizli, A., Say R., (2011), “Superparamagnetic nanotraps containing MIP based mimic lipase for biotransformations uses”, *J. Nanopart Res* **13**:2073–2079.
- Kempe, M. (1996), “Antibody-Mimicking polymers as chiral stationary phases in HPLC,” *Anal. Chem.*, **68**, (11), 1948-1953.
- Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H. (1998) “ Enstrümantal Analiz İlkeleri “ Douglas A. Skoog - F. James Holler - Timothy A. Nieman, Bilim Yayıncılık.
- Klein, E., Eichholtz, Yeager, D.H., (1994), “Chitosan modified sulfonated poly (ethersulfone) as a support for affinity separations “ *J. Membr. Sci.*, **95**, 199-204.
- Kuchen, W. ve Shram, J. (1988), “Metal-ion selective exchange resins by matrix with methacrylates,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27(12)**, 1695-1697.
- Kurban, S., Mehmetoğlu, İ., (2010), “Proteomik”, *Yeni Tıp Dergisi*, **27**: 70-75.
- Kvalheim, T. A. R., (2010), “Mass spectral profiling and multivariate analysis for detection of biomarker signatures”, Doktora Tezi, University of Bergen, Norveç.
- Labrou, N.E, Mazitsos, K., Clonis, Y.D. (2006), “Dye-ligand and Biomimetic Affinity Chromatography” *Handbook of Affinity Chromatography*, Second Edition, Taylor and Francis Group, (editör David S. Hage) 231-255.
- Lagercrantz, C. ve Larson, T. (1983), “Comparative studies of the binding of some ligands to human serum albumin non-covalently attached to immobilized Cibacron Blue, or covalently immobilized on Sepharose, by column affinity chromatography” *Biochem. J.*, **213**, 387-390.

- Leatherbarrowand, R.L., Dean, P.D.G., (1980), "Studies on the mechanism of binding of serum albumins to immobilized cibacron blue F3GA" *Biochem. J.*, **189**, 27-34.
- Lee, E., Park, D.-W., Lee, J.-O., Kim, D.S., Lee, B.H., Kim., B.S., (2007), "Molecularly imprinted polymers immobilized on carbon nanotube", *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng. Aspects*, **313-314**, 202-206.
- Lee, W. C. and Lee, K. H., (2004), "Applications of affinity chromatography in proteomics", *Analytical Biochemistry*, **324**, 1–10.
- Lianshe, F., Qingguo, M., Hongjie, Z., Shubin, W., Kuiyue, Y., Jiazuan, N. (2000) "In situ synthesis of terbium-benzoic acid complex in sol-gel derived silica by a two-step sol-gel method" *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 61 1877-1881.
- Liebler, D.C., 2002, "Introduction to Proteomics Tools for the New Biology" Humana Press Inc.
- Lin, C.I., Joseph, A.K., Chang, C.K. ve Lee, Y.D. (2004), "Synthesis and photoluminescence study of molecularly imprinted polymers appended onto CdSe/ZnS core-shells," *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 127-131.
- Linke T., Doraiswamy S., Harrison E.H., (2007), "Rat plasma proteomics: Effects of abundant protein depletion on proteomic analysis", *Journal of Chromatography B*, **849**, 273-281.
- Lu, A-H., Salabas, E.L. ve Schüth, F. (2007), "Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application", *Angew Chem. Int. Ed.*, **46**, 1222-1244.
- Ludwig, J. A., Weinstein, J.N., (2005), "Biomarkers in Cancer Staging, Prognosis and Treatment Selection", *Nature Reviews Cancer*, **5**, 845-856.
- Marko-Varga, G., (2004), "Proteomics principles and challenges", *Pure and Applied Chemistry*, **76**, 4, 829-837.
- Mattoussi, H., Igor, L.M., Aaron, R.C., Ellen, R.G., Jyoti, K.J., Sanford, M.S. ve Matthew, J.M. (2004), "Luminescent quantum dot-bioconjugates in immunoassays, FRET, *Biosensing, and Imaging Applications*," *JALA*, 28-32.

- Mills, G. B. Ve Moolenaar, W.H. (2003), “The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer”, *Nature Reviews Cancer*, **3**, 582-591.
- Mosbach, K., Ramström, O. (1996), “The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology” *Nature Biotechnology*, **14**, 163-170.
- Najam-ul-Haq, M., Rainer, M., Schwarzenauer, Huck, C.W., Bonn, G.K., (2006), “Chemically modified carbon nanotubes as material enhanced laser desorption ionisation (MELDI) material in protein profiling”, *Analytica Chimica Acta*, **561**, 32-39.
- Odabaşı, M. ve Denizli, A. (2004), “Cibacron Blue F3GA-attached magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) beads for human serum albumin adsorption”, *Polymer International*, **53**, 332-338.
- Öncel, Ş., Uzun, L., garipcan, B., Denizli, A., (2005), “Synthesis of phenylalanine containing hydrophic beads for lysozyme adsorption”, *Ind. Eng. Chem. Res.* **44**, 7049-7056.
- Özcan, A. A. (2007), “Biyomoleküller için Molekül Baskılanmış Polimerik Yapay Reseptör Geliştirilmesi ve Biyokromatografi Uygulamaları” Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Özen Karataylı, S. C., Bozdayı, A.M., (2008), “Proteomiks ve Gastroenteroloji”, *Güncel Gastroenteroloji* **12/2**, 72-75.
- Özer, N. ve Ögüş, İ.H. (2000), “Elektroforez ve İzoelektrik Odaklama” *Biyokimada Temel ve Moleküler Teknikler Kitabı* (Ed: Telefoncu, A., Salnikov, J., Zihnioğlu, F., Kılınç, A Ege Üniversitesi, İzmir, 251-267.
- Öztürk, N., Günay, M. E., Akgöl, S. ve Denizli A., (2007), “Silane-Modified Magnetic Beads: Application to Immunoglobulin G Separation”, *Biotechnol. Prog.*, **23**, 1149-1156.
- Öztürk, N., Bereli, N., Akgöl, S. ve Denizli A., (2008), “High capacity binding of antibodies by poly(hydroxyethyl methacrylate) nanoparticles”, *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces*, **67**, 14-19.
- Öztürk, N., Tğrkmen, D., Karakoç, V., Akgöl, S. (2010), “Manyetik Polimerler”, Editör: Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., 73-99.

- Özkara, S. (2010), “Hidroforbik Etkileşim Kromatografisi” (2010), Editör: Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., 29-37.
- Paci, M., Rapicetta, C., Maramotti, S., (2010), “New biomarkers for lung cancer”, *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, **4**, 3, 201-224.
- Pan, C., Xu, S., Zou, H., Guo, Z., Zhang, Y., and Guo, B., (2005), “Carbon Nanotubes as Adsorbent of Solid-Phase Extraction and Matrix for Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry” *J Am Soc Mass Spectrom*, **16**, 263–270.
- Park, J., Joo, J., Gu Kwon, S., Jang, Y. and Hyeon, T. (2007), “Synthesis of Monodisperse Spherical Nanocrystals” *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 4630-4660.
- Petric, T.C., Brne, P., Gabor, B., Govednik, L., Barut, M., Strancar, A., Kralj, L.Z. (2007), “Anion-exchange chromatography using short monolithic columns as a complementary technique for human serum albumin depletion prior to human plasma proteome analysis”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43**, 243-249.
- Phillips, T.M., (2006) “Affinity Chromatography in antibody and antigen purification”, Handbook of Affinity Chromatography kitabı, (Editör David S. Hage) Taylor&Francis Group, 367-397.
- Queiroz, J.A., Tomaz, C.T., Cabral, J.M.S. (2001) “Hydrophobic interaction chromatography of proteins” *Journal of Biotechnology*, **87**, 143-159.
- Qin, W., Zhang, Y., Liu, W., Tan, M. (2003), “Synthesis and infrared and fluorescence spectral properties of luminescent terbium and europium complexes with open-chain carboxylate crown ethers”, *Spectrochimica Acta Part A* **59**, 3085- 3092.
- Qu, F., Guan, Y., Ma Z. and Zhang, Q. (2009), “Synthesis of Cibacron Blue F3GA-coupled magnetic PMMA nanospheres and their use for protein affinity separation”, *Polymer International*, **58**, **8**, 888-892.
- Ramström, O., Andersson, L.I. ve Mosbach, K. (1993), “Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting,” *J. Org.Chem.*, **58**, 7562-7564.

- Ramström, O., Ye, L., Mosbach, K. (1996), "Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting", *Chem. Biol.* **3** (6), 471-477.
- Rao, C.N.R.; Cheetham, A.K. (2001), "Science and technology of nanomaterials: current status and future prospects" *J. Mater. Chem.*, **11**, 2887-2894.
- Rappsilber J, Mann M., (2002), "What does it mean to identify a protein in proteomics?", *Trends in Biochemical Sciences*, **27**, 2, 74-78.
- Ren,S-F., and Guo,Y-l., (2005), "Oxidized carbon nanotubes as matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of biomolecules", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**: 255–260.
- Rothmund D. L., Locke, V. L., L. Audrey, Thomas, T. M., Wasinger, V., Rylatt, D. B., (2003), "Depletion of the highly abundant protein albumin from human plasma using the GradiFlow", *Proteomics*, **3** , 279–287.
- Roy, I., Mondal, K., Gupta, M.N., (2007), "Leveraging protein purification strategies in proteomics", *Journal of Chromatography B*, **849**, 32-42.
- Roque, A.C.A., Lowe, C.R., (2006), "Advances and applications of de novo designed affinity ligands in proteomics", *Biotechnology Advances*, **24**, 17-26.
- Sahab, Z.J., Semaan, S. M., Sang, Q-X.A., (2007a), "Methodology and Applications of Disease Biomarker Identification in Human Serum", *Biomarker Insights*, **2**, 21-43.
- Sahab, Z. J., Iczkowski, K.A., Sang, Q-X.A., (2007b), "Anion Exchange fractionation of serum proteins versus albumin elimination", *Analytical Biochemistry*, **368**, 24-32.
- Santra, S., Zhang, P., Wang, K., Tapeç, R., Tan, W., (2001), "Conjugation of Biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers", *Analytical Chemistry*, **73**, 4988-4993.
- Sarikaya, Y. (1993), Fizikokimya, Gazi Büro Kitabevi, Ankara.
- Sato, A. K., Sexton, D. J., Morganelli, L. A., Cohen, E. H., Wu, Q. L., Conley, G. P., Streltsova, Z., Lee, S. W., Devlin, M., DeOliveira, D. B., Enright, J., Kent, R. B., Wescott, C. R., Ransohoff, T. C., Ley, A. C. and Ladner, R.

- C., (2002) "Development of Mammalian Serum Albumin Affinity Purification Media by Peptide Phage Display" *Biotechnol. Prog.*, **18**, 182-192.
- Say, R., Birlik, E., Ersöz, A., Yılmaz, F., Gedikbey, T. ve Denizli, A. (2003a), "Preconcentration of copper on ion-selective imprinted polymer microbeads," *Anal. Chim. Acta*, **480(2)**, 251-256.
- Say, R., Ersöz, A. ve Denizli, A. (2003b), "Selective separation of uranium containing glutamic acid molecular imprinted polymeric microbeads," *Sep. Sci. and Technol.*, **38(14)**, 3429-3447.
- Say R. (2009) "*Photosensitive aminoacid-monomer linkage and bioconjugation applications in life sciences and biotechnology*", PCT/IB2009/055707.
- Schiess R., (2008), "*Proteomic strategy for biomarker discovery*", Doktora Tezi, ETH Zurich Üniversitesi, İsviçre
- Schiess, R., Wollscheid, B., Aebersold, R., (2009), "Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery", *Molecular Oncology*, **3**, 33-44.
- Schot, J.G. (2010) "*The role of lysophosphatidic acid-induced signaling in inflammation and tumorigenesis*" Master Tezi, Utrecht University, The Netherlands Cancer Institute (NKI), Division of Cell Biology 1, Amsterdam
- Sellergren P. ve Shea, K.J. (1994), "Enantioselective ester hydrolysis catalyzed by imprinted polymers" *Tetrahedron: Asymmetry*, **5**, 1403-1406.
- Shea, K. I., Dougherty, T. K. (1986), "Molecular Recognition on Synthetic Amorphous Surfaces. The Influence of Functional Group Positioning on the Effectiveness of Molecular Recognition," *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 1091-1093.
- Shi, H., Tsai, W., Garrison, M.D., Ferrari, S., Ratner, B.D. (1999), "Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition," *Nature* **398**, 593-597.
- Silberring, J., Ciborowski, P. (2010), "Biomarker discovery and clinical proteomics", *Trends in Analytical Chemistry*, **29**, 2, 128-140.

- Sok, D., Clarizia L.-Jo A., Farris, L. R., McDonald M. J. (2009), "Novel fluoroimmunoassay for ovarian cancer biomarker CA-125" *Anal Bioanal Chem*, **393**, 1521–1523.
- Spivak, D. A. ve Shea, K.J. (1998) "Binding of Nucleotide Bases by Imprinted Polymers," *Macromolecules*, **31** (7), 2160-2165.
- Srinivas, P.R., Verma, M., Zhao, Y., Srivastava, S., (2002), "Proteomics for cancer biomarker discovery", *Clinical Chemistry*, **48:8**, 1160-1169.
- Sriyam, S., Sinchaikul, S., Tantipaiboonwong, P., Tzao, C., Phutrakul, S., Chen, S-T., (2007), "Enhanced detectability in proteome studies", *Journal of Chromatography B*, **849**, 91-104.
- Taira, S., Sugiura, Y., Moritake, S., Shimma, S., Ichiyanagi, Y., Setou, M., (2008), "Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization Based Mass Imaging with Cellular Resolution", *Anal. Chem.*, **80** (12), 4761–4766.
- Tamahkar, E., Babaç, C., Kutsal T., Pişkin T., Denizli, A. "Bacterial cellulose nanofibers for albumin depletion from human serum", *Process Biochemistry*, **45**, 10, 1713-1719.
- Tomar, A., George, S. P., Mathew, S. and Khurana, S. (2009), "Differential Effects of Lysophosphatidic Acid and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate on Actin Dynamics by Direct Association with the Actin-binding Protein Villin" *J Biol Chem*. **18**; 284 (51): 35278–35282.
- Toriola, A.T. (2010), "Epidemiological study of the role of vitamin D in the aetiology of ovarian cancer" National Institute for Health and Welfare, Helsinki, Finlandiya Research 47/2010.
- Türkmen, D., Denizli, A., Öztürk, N., Akgöl, S., (2008), "Phenylalanine Containing Hydrophobic nanospheres for antibody purification", *Biotechnol. Prog.*, **24**, 1297-1303.
- Unsal, E., Durdu, A., Elmas, B., Tuncel, M., Tuncel, A. (2005), "A new affinity-HPLC packing for protein separation: Cibacron blue attached uniform porous poly(HEMA-co-EDM) beads", *Anal.Bioanal. Chem.* **383**, 930-937
- Urbas, L., Brne, P., Gabor, B., Barut, M., Strlic, M., Petric, T.C., Strancar, A., (2009), "Depletion of high abundance proteins from human plasma using a

- combination of an affinity and pseudo-affinity column”, *Journal of Chromatography A*, **1216**:2689-2694.
- Uzun, L. ve Denizli, A., (2002), “Metal-chelated polyamide hollow fibers for human serum albumin separation”, *Journal of Applied Polymer Science*, **86**, 3346-3354.
- Uzun, L., Yavuz, H., Say, R., Ersöz, A., Denizli, A. (2004a), “Poly(ethylene dimethacrylate-glycidyl methacrylate) monolith as a stationary phase in dye-affinity chromatography”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **43**, 6507-6513.
- Uzun, L., Odabaşı, M., Arıca, Y., Denizli, A. (2004b), “Poly(styrene-hydroxyethyl methacrylate) monodisperse microspheres as spesific sorbent in dye affinity adsorption of albumin”, *Separation Science and Technology*, **39**, 10, 2401-2418.
- Uzun, L., Say, R., Denizli, A. (2005), “Porous poly(hydroxyethyl methacrylate) based monolith a new adsorbent for affinity chromatography”, *Reactive&Functional Polymers*, **64**, 93-102.
- Uzun, L., Denizli, A., (2010), “Protein kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, Proteomikler”, Editör: Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö. İ., 1-19.
- Varanda L. C., Júnior, M. J. and Júnior, W. B. (2011), “Magnetic and multifunctional magnetic nanoparticles in nanomedicine: challenges and Trends in synthesis and surface engineering for diagnostic and theraphy applpications” *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*, 397-424.
- Veenstra, T.D., Prieto, D., Conrads, T.P., (2004), “Proteomic patterns for early cancer detection”, *Drug Disvovery Today*, **9**, 20, 889-897.
- Veenstra, T.D.,(2007), “Global and targeted quantitative proteomics for biomarker discovery” , *Journal of Chromatography B*, **847**, 3-11.
- Vlatakis, G., Andersson, L.I., Muller R. ve Mosbach, K. (1993), “Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting,” *Nature*, **361**, 645–647.
- Wall, M. J. (2010), “Towards The Development of a Proteomics Workflow for High-Throughput Protein Biomarker Discovery”, Doktora Tezi, Dalhousie Üniversitesi, Kimya Bölümü, Kanada.

- Ngah, W.S., Endud, C.S., Mayanar, R., (2002), "Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads" *React. Funct. Polym.* **50**, 181-190.
- Whitcombe, M.J.; Rodriquez, M. E.; Villar, P. ve Vulfson, E. N. (1995), "A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol," *J. Am.. Chem. Soc.*, **117**, 7105-7111.
- Wiesner, A., (2004), "Detection of Tumor Markers with ProteinChip Technology", *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **5**, 45-67.
- Wilkins, M. R., Appel, R. D., Williams, K. L., Hochstrasser, D. F., (2007), "Proteome Research Concepts, Technology and Application", Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Second edition.
- Wu, W., Hu, W., Kavanagh, J. J., (2002), "Proteomics in Cancer Research", *International Journal of Gynecological Cancer*, **12**, 409-423.
- Wulff, G. ve Poll, H.G. (1987), "Influence of the Structure of the Binding Sites on the Selectivity for Racemic Resolution." *Makromol. Chem.*, **188**, 741-748.
- Wulfschle, J.D., Liotta, L.A., Petricoin, E.F., (2003), "Early detection: Proteomic applications for the early detection of cancer", *Nature Reviews Cancer*, **3**, 4, 267-275.
- Yang, T. L., Qin, W. W., Xiao, Z. F. and Liu W. S. (2005), "Synthesis and Infrared and Fluorescence Spectra of Europium and Terbium Complexes with a Novel Bis-Schiff Base Ligand Derived from 2,6-Diaminopyridine and Indole-2-carbaldehyde", *Chem. Pap.* **59 (1)**, 17-20.
- Yamaura, M., Camilo, R.L., Sampaio, L.C., Macedo, M.A., Nakamura, M., Toma, H.E. (2004), "Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **279**, 210-217.
- Yavuz, H., Patir, S., Say, R., Arica, Y., Denizli, A. (2002), "Affinity Separation of plasma proteins using a newly synthesized methacrylamidoalanine incorporated porous PHEMA membranes", *Separation Science and Technology*, **37 (9)**, 2077-2095.

- Yavuz, H., Duru, E., Genç, Ö., Denizli, A. (2003), "Cibacron Blue F3GA incorporated poly(methylmethacrylate) beads for albumin adsorption in batch system", *Colloids and Surfaces A:Physicochem. Eng. Aspects*, **223**, 185-193.
- Yavuz, H. ve Denizli, A. (2004), "Dye Affinity Hollow Fibers for Albumin Purification", *Macromolecular Bioscience*, **4**, 84-91.
- Yavuz, H., Akgöl, S., Say, R., Denizli, A., (2006), "Affinity separation of immunoglobulin G subclasses on dye attached poly(hydroxypropyl methacrylate) beads, *International Journal of Biological Macromolecules*, **39**, 303-309.
- Yılmaz, E., Osman, B., Denizli, A., (2010), "Protein kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, Proteomikler", Editör: Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., 29-37.
- Yılmaz, F., Bereli, N., Yavuz, H., Denizli, A. (2009), "Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography" *Biochemical Engineering Journal*, **43**, 272-279.
- Zeng, X., Ruckenstein, E., (1996), "Supported chitosan-dye affinity membranes and their protein adsorption", *J. Membr. Sci*, **117**, 271-278.
- Zhang, T.-X., Liu, H.-Z. AND Chen, J.-Y. (2001) "Fluorescence Investigation of Affinity Interaction Between Bovine Serum Albumin and Triazine Dye in Reversed Micelles", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **95** 163-174.
- Zhou M., Lucas D.A., Chan K.C., Issaq H.J., Petricoin III E.F., Liotta L.A., Veenstra T.D., Conrads T.P., (2004), "An investigation into the human serum "interactome", *Electrophoresis*, **25**, 1289–1298.
- Zhu, R. (2006), "*ProteinChip SELDI-TOF-MS technology to identify serum biomarkers for neuroblastoma and hepatites B virus-induced hepatocellular carcinoma*", Master Tezi, The University of Hong Kong, The Faculty of Medicine, Hong Kong
- Zou, Z., Ibisate, M., Zhou, Y., Aebersold, R., Xia, Y., Zhag, H., (2008), "Synthesis and evaluation of superparamagnetic silica particles for extraction of glycopeptides in the microtiter plate format", *Analytical Chemistry*, **80**, 1228-1234.

Xiao, Z., Prieto, D., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Issaq, H., (2005), "Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis", *Molecular and Cellular Endocrinology*, **230**, 95-106.