

**ADENOZİN TAYİNİNE YÖNELİK OPTİK TEMELLİ
NANOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF OPTICAL BASED NANOSENSORS
FOR THE DETERMINATION OF ADENOSINE**

ZEHRA TUĞÇE KURT

DOÇ. DR. NİLAY BERELİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

ÖZET

ADENOZİN TAYİNİNE YÖNELİK OPTİK TEMELLİ NANOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Zehra Tuğçe KURT

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nilay BERELİ

Ocak 2022, 79 sayfa

Tez kapsamında canlı yapısında önemli molekül olmakla birlikte idrar ve serum seviyelerinin nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi hastalıklarla doğrudan veya dolaylı olarak bağlantısı bulunan adenozin nükleozidinin allil merkaptan ile yüzeyi aktif hale getirilen altın çip üzerine baskılanması sağlanmıştır. Nanofilm yüzey modifikasyonu moleküler baskılama tekniği yoluyla gerçekleştirilmiştir ve fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA) kullanılmıştır. Adenozin tayini için yüzey plazmon rezonans (SPR) cihazı kullanılmıştır. Adenozin tayini için 3.0 -7.4 aralığında pH taraması yapılmış ve optimum pH 7.4 olarak belirlenmiştir. Kinetik çalışmalarda ise pH 7.4 fosfat tampon çözeltisi ile tespit aralığı için 0.5 nM- 400.0 nM aralığında farklı derişim seviyeleri ile analizler yapılmıştır ve nanosensörün çalışma aralığı belirlenmiştir. Geliştirilen nanosensörün seçicilik analizlerinde guanozin ve sitidin nükleozidleri de kullanılarak farklı oranlarda derişimlerdeki çözeltilerde SPR nanosensörünün seçiciliği belirlenmiştir. Moleküler baskılanmamış polimer (NIP) çip yüzeyi MAA monomeri ile kaplanmış ve pH 7.4 fosfat tampon çözeltisiyle adenozin, guanozin ve sitidin ile farklı derişim ve karışımlarda yapılarak hem kinetik çalışmaları hem de seçicilik tayinleri yapılmıştır. Adenozin baskılanmış nanosensör çipi ile adenozin tayinleri aynı gün içerisinde peşpeşe

yapılmış ve aynı zamanda farklı zaman aralıklarında da adenozin analizleri yapılmıştır. Adenozin baskılanmış SPR çipinin gerçeğe uygun medikal analiz ve araştırmalarda kullanılması amaçlandığından adenozin analizlerinde 1.0 nM- 5.0 nM derişim aralığında yapay idrar ve serum örneklerinde de çalışılarak geri kazanımları hesaplanmıştır. Yapılan çalışmada 0.1 nM- 100.0 nM lineer aralığında sulu çözeltilerde tespit limiti(LOD) değeri 0.018 nM, yapay plazmada tespit limiti değeri 0.015 nM ve yapay idrarda tespit limiti değeri 0.013 nM olarak belirlenmiştir. Ayrıca miktar tayini sınırı (LOQ) değerleri ise sulu çözelti, yapay plazma ve yapay serumda sırasıyla 0.061 nM, 0.052 nM, 0.046 nM olarak hesaplanmıştır. Adenozin baskılanmış SPR çipinin yüzeyi atomik kuvvet mikroskobu, elipsometre ve temas açısı ölçümleri alınarak karakterize edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Adenozin, Moleküler Baskılanmış Polimerler, Nanofilm Yüzey Modifikasyonu, SPR, Nanosensörler

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF OPTICAL BASED NANOSENSORS FOR THE DETERMINATION OF ADENOSINE

Zehra Tuğçe KURT

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Doç. Dr. Nilay BERELİ

January 2022, 79 pages

In this thesis, a novel measurement method is proposed to measure the level of adenosine nucleoside which is a significant molecule utilized as a direct or indirect indicator to detect diseases such as neurodegenerative diseases and cancer in the human body with a novel imprinting technique applied onto a gold chip whose surface is activated with allyl mercaptan. The nanofilm surface modification is implemented by means of the molecular imprinting technique and methacrylic acid (MAA) is utilized as the functional monomer. For the adenosine determination, a surface plasmon resonance (SPR) device is used, pH scanning is performed between 3.0 and 7.4, and the optimum pH is determined as 7.4. During the kinetic studies, on the other hand, an analysis is run with the phosphate buffer solution of pH 7.4 and of different concentrations ranging from 0.5 nM up to 400.0 nM to detect the interval of determination for a proper nanosensor operation. Guanosine and cytidine are also included in the analysis to detect the selectivity of the SPR nanosensor realized. The non-imprinted polymer (NIP) chip surface is covered with the MAA

monomer, in this way, both the kinetic studies and sensitivity tests are performed with the phosphate buffer solution of pH 7.4 and different concentrations and mixtures of adenosine, guanosine and cytidine. By using the adenosine molecular imprinted polymers (MIP) nanosensor chip, adenosine detections are consecutively collected within the same day and analysis are executed within several different time intervals. Since the adenosine imprinting SPR chip is intended to be used in realistic medical analysis and research, its recovery was calculated by working with artificial urine and serum samples in the range of 1.0 nM - 5.0 nM concentration in adenosine analysis. In the study, the limit of detection (LOD) value in aqueous solutions in the linear range of 0.1 nM - 100.0 nM was determined as 0.018 nM, the limit of detection value in artificial plasma was determined as 0.015 nM, and the limit of detection in artificial urine was determined as 0.013 nM. In addition, the limit of quantification (LOQ) values were calculated as 0.061 nM, 0.052 nM, and 0.046 nM in aqueous solution, artificial plasma and artificial serum, respectively. The surface of the adenosine-imprinted SPR chip was characterized by taking atomic force microscopy, ellipsometry, and contact angle measurements.

Keywords: Adenosine, Molecular Imprinted Polymers, Nanofilm Surface Modification, SPR, Nanosensors

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Nükleotidler ve Nükleozidler	4
2.2. Biyobelirteç Nükleozidler	8
2.3. Adenozin	8
2.3.1 Adenozin Reseptörleri.....	10
2.3.2. Adenozin Metabolizması.....	11
2.3.3. Adenozin Seviyeleri ve Adenozine Bağlı Hastalıklar	13
2.3.4. Adenozin ve Nükleozid Tespitinde Gelişmeler.....	14
2.4. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP).....	15
2.4.1. MIP Tanımı	16
2.4.2. MIP Bileşenleri	18
2.4.2.1. Şablonlar.....	18
2.4.2.2. Fonksiyonel Gruplar.....	18
2.4.2.3. Çapraz Bağlayıcılar	18
2.4.3. MIP Stratejileri	20
2.4.4. MIP Polimerizasyon Çeşitleri	21
2.4.5. MIP Yüzey Baskılama	22
2.4.6. MIP Formları.....	22
2.5. Nanoteknoloji ve Nanosensörler	22

2.5.1. Nanobiyosensör Çeşitleri	24
2.5.2. Dönüştürücülerine Göre Nanobiyosensörler	25
2.6. YüzeY Plasmon Rezonans Sensörler	26
2.7. MIP-SPR Sensörlerinin Medikal Uygulamaları	28
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	29
3.1. Kullanılan Kimyasallar	29
3.2. Metakrilik Asit- Adenozin Ön Polimerizasyon Kompleksi Karakterizasyonu... ..	29
3.3. SPR Altın Çip Yüzeyinin Aktifleştirilmesi	29
3.4. Fonksiyonel Monomer ve Kalıp Molekül ile Ön-Polimerizasyon Kompleks Oluşturma	30
3.5. Adenozin Baskılanmış ve Baskılanmamış SPR Çip Yüzey İmmobilizasyonu ...	30
3.6. SPR Çip Yüzeylerinin Karakterizasyon Çalışmaları	31
3.6.1. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)	31
3.6.2. Elipsometre	31
3.6.3. YüzeY Temas Açısı Ölçümleri	32
3.7. Adenozin Baskılanmış SPR Nanosensörlerin Kinetik Analizleri	32
3.7.1. pH Taraması	33
3.7.2. Derişim Taraması	33
3.7.3. Yapay Plazma ve Yapay İdrar Adenozin Teşhisi	34
3.7.3. Tekrar Kullanılabilirlik	34
3.7.4. Seçicilik Testleri	34
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	36
4.1. Karakterizasyon Çalışmaları	36
4.1.1. Elipsometre	36
4.1.2. YüzeY Temas Açısı Ölçümleri	37
4.1.3. Atomik Kuvvet Mikroskopisi	38
4.2. Adenozin Tayini İçin Kinetik Analizler	40
4.2.1. MAA: Adenozin Ön Polimerizasyon Kompleks Oranının Optimizasyonu... ..	40
4.2.2. Optimum pH Değeriinin Bulunması	41
4.2.3. Adenozin Baskılanmış Nanosensör ile Kinetik Analizler	42

4.2.4. Kinetik Hız Sabitlerinin Belirlenmesinde Denge Analizleri ve Bağlanma Kinetiği Yaklaşımları.....	44
4.2.5. Denge İzotermi.....	47
4.2.6. Seçicilik Analizleri.....	51
4.2.6. Yapay Plazma ve Yapay İdrar Örneklerinden Adenozin Tayini.....	55
4.2.7. Tekrar Kullanılabilirliğin İncelenmesi.....	59
5. YORUM.....	62
6. KAYNAKLAR.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nükleozid ve Nükleotid temel moleküler yapısı	5
Şekil 2.2. AR'lerin bağlı olduğu G proteinleri ve uyarıcı etkileri	11
Şekil 2.3. Ado'nun hücre içi ve hücre dışı boşluk metabolizmasının gösterimi.....	12
Şekil 2.4. MIP'lerin polimerleşme mekanizmasındaki aşamalar.....	17
Şekil 2.5. Yüzeyde Moleküler Baskılanmış Polimerler ve Nanoboyutlar	23
Şekil 2.6. Nanosensör bileşenleri ve akışı	24
Şekil 2.7. SPR algılama ve çalışma prensibi	27
Şekil 3.1. SPR çip yüzeyine Adenozin baskılanmış nanofilmin oluşturulması.....	31
Şekil 3.2. GenOptics SPRiLab sistemi	33
Şekil 3.3. Seçicilik analizleri için kullanılan Guo(A) ve Cyd(B) nükleozidlerinin molekül yapısı.....	35
Şekil. 4.1. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş (A), adenozin baskılanmış (B) ve baskılanmamış (C) SPR nanosensörlerin elipsometrik ölçümünde alınmış olan 3 boyutlu görüntüler.....	36
Şekil 4.2. Modifiye edilmemiş SPR altın çip yüzeyi (A), adenozin baskılanmış (B) ve baskılanmamış SPR (C) çiplerin yüzey temas açısı fotoğrafları	37
Şekil 4.3. Adenozin Baskılanmış SPR çip yüzeyinin yarı temas modunda alınan AFM 3B görüntüsü (1x1 μm^2)	39
Şekil 4.4. Adenozin baskılanmamış SPR çip yüzeylerin yarı temas modunda alınan AFM 3B görüntüsü (1x1 μm^2).....	39
Şekil 4.5. Farklı molar oranlarında MAA:Adenozin içeren polimerizasyon karışımları ile hazırlanan adenozin baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR nanosensörlerden elde edilen sensorgramlar (A) ve $IF:\% \Delta R_{MIP}/\% \Delta R_{NIP}$ değerleri (B).....	41
Şekil 4.6. Adenozin SPR nanosensörde etkin pH aralığı çalışması.....	42
Şekil 4.7. Adenozin çözeltisi ile adenozin baskılanmış SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgram grafiği (0.5-400 nM).	43
Şekil 4.8. 0.5- 50 nM ve 100- 400 nM aralığında Adenozin derişimi ile $\% \Delta R$ arasındaki ilişki.	43
Şekil 4.9. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesinde Denge Analiz yaklaşımı grafiği	46

Şekil 4.10. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesinde Bağlanma Kinetik yaklaşımı grafiği	46
Şekil 4.11. Langmuir (A), Freundlich (B) ve Langmuir-Freundlich (C) adsorpsiyon izoterm modelleri	49
Şekil 4.12. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörüne (MIP) ve baskılanmamış SPR nanosensörüne (NIP) ait sensorgramlar	52
Şekil 4.13. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörler ile yapay plazmada adenozin miktarının belirlenmesine ait SPR sensorgramlar (A) ve 0.1 1-0 nM derişim aralığındaki kalibrasyon eğrisi (B).	56
Şekil 4.14. Adenozin baskılanmış SPR sensörler ile yapay idrarda adenozin miktarının belirlenmesine ait SPR sensorgramları (A) ve 0.5-10 nM adenozin derişiminde kalibrasyon grafiği (B)	58
Şekil 4.15. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörün aynı günde tekrar kullanılabilirliği (a: adsorpsiyon, b: desorpsiyon, c: rejenerasyon).	60
Şekil 4.16. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörlerin farklı zamanlarda tekrar kullanılabilirliği	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. DNA ve RNA'da bulunan Temel Baz ve Nükleozidler ve Kısaltılmaları	4
Çizelge 2.2. Temel Nükleobaz ve Nükleozidler moleküler gösterimi.....	6
Çizelge 4.1. Yüzey temas açılarının çiplere yüzeylerinde oluşturduğu temas açısı	38
Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri	47
Çizelge 4.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm parametreleri	50
Çizelge 4.4. Adenozin tayinin için literatürde yer alan farklı sensör çalışmalar	51
Çizelge 4.5. Adenozin (Ado), guanozin (Guo), ve sitidin (Cyd) için seçicilik ve bağlı seçicilik katsayıları	54
Çizelge 4.6. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörlerin yapay plazma ve yapay idrar örneklerindeki bulunan adenozin analiz sonuçları (n: 3).....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

nM	nanomolar
nm	nanometre
μ M	mikrometre
$^{\circ}$ C	derece santigrat
mg	miligram
mL	mililitre
μ L	mikrolitre
C	derişim
K_A	bağlanma sabiti
ka	bağlanma hız sabiti
k_d	ayrılma hız sabiti
K_D	ayrılma sabiti
V	hacim
ΔR	sinyal kayması
S	eğim değeri
m	kütle
1/n	Freundlich yüzey heterojenite indeksi

Kısaltmalar

Ado	Adenozin
Guo	Guanozin
Cyd	Sitidin
Ino	Inozin

ATP	Adenozin Trifosfat
ADP	Adenozin Difosfat
ADK	Adenozin Kinaz
AMP	Adenozin Monofosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimerler
NIP	Baskılanmamış Polimerler
MIT	Moleküler Baskılama Teknikleri
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
LOD	Tespit sınırı
LOQ	Miktar Tayini Sınırı
MAA	Metakrilik asit
HEMA	Hidroksietilmetakrilat
AIBN	Azobisizobütironitril
QCM	Kuvarz Kristal Mikroterazi
SPR	Yüzey Plasmon Rezonans
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ENT	Dengeleyici nükleozid taşıyıcılar
ADA	Adenozin deaminaz
CNT	Konsantre Nükleozid Taşıyıcıları

1. GİRİŞ

Biyoteknolojik çalışmaların son yıllarda hız kazanması, bilim ve teknik alanındaki çalışmaların bütünleşik olarak ilerlemesi tıp,medikal teknikler,genetik alanı gibi sağlık alanlarında bir çok soruna çözüm getirmiştir. Medikal çözümlerde bulunan yeni teknikler hastalık teşhisinde yeni bir dönem başlatmış bulunmaktadır. İnsanlarda hastalığın tedavisinden önce doğru, hızlı ve yerinde bir teşhisin yapılması daha öncelikli olarak gelmektedir. Günümüzde bulaşıcı hastalıklar, kanser ve nörolojik hastalıkların hızlı teşhisine önem verilmektedir. Elbette bu teşhislerde kişilerden patolojik örnek alınmadan, pahalı ve zaman alan cihazlara öncelik verilmeden teşhis etmek sensör teknolojileri ile mümkün olabilmektedir. Sensör teknolojilerinin gelişmesi hızlı tanı kit ve çiplerinin Kuvarz Kristal Mikroterazi (QCM), Yüzey Plazman Rezonans (SPR) veya elektrokimyasal destekli analitik cihazlarla birlikte kullanılması hassas tanı, teşhis ve tedavide etkili olmaktadır.

İnsan vücudu birçok biyolojik madde içermektedir. Bu maddeler sadece kan ve dokuda bulunmamakla birlikte gözyaşı, ter, idrar atıkları olarak vücuttan metabolit olarak atılmaktadır. İnsan vücudundan atılan çoğunluğu nanoboyutlardaki bu metabolik maddelerin her biri tanılar üzerinde bir biyobelirteç olma özelliği taşımaktadır. Böylelikle günümüz biyomedikal teknolojilerinde patolojik doku parçaları ve kan alınmaksızın hastalıkların teşhisini mümkün kılmaktadır. Son yıllarda özellikle idrar ve serum örneklerinde yüksek ve alçak seviye biyolojik metabolit miktarlarına göre araştırma ve değerlendirmeler artmıştır. Tüm canlılar belirli bir genetik yapıdan meydana gelmektedir ve bu genetik yapıların en küçük anlamlı yapıları deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) olarak adlandırılmaktadır. DNA ve RNA'ların en küçük yapı taşı olan nükleotid bazları ise biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır. Fakat nükleotidlerin hücre içi ve hücreler arası anlamlı yapıları nükleozidlerdir. Nükleozidler ve analoglarının idrar ve hücreler arası miktarındaki derişim seviyeleri ise oldukça önemlidir. Adenozin ise bu biyobelirteçlerden biri olan insan vücudundaki temel nükleozidlerden biridir. İnsan sağlığı için önemli bir yaşamsal bileşen olan adenozin, adenozin trifosfat (ATP)'nin ayrılmaz bir bileşenidir ve vücuttaki her doku ve organın işlevini düzenler. Bunun sebebi olarak adenozin direkt olarak vücuttan atılabilen bir nükleozid özelliği taşımasıdır.

Böylelikle idrar ve serum biyobelirteci olarak adenozin nükleozidi bir çok bilimsel çalışmaya konu olmuş ve son yıllarda ise idrar ve serumdaki seviyelerinin nörodejeneratif hastalıklar, kalp, böbrek, akciğer, otoimmün hastalıklarda, bağırsak iltihaplanmalarında, Parkinson hastalığında, beyin iltihaplanmasında ve özellikle günümüz hastalıklarından kanser ile bağlantılı olduğu saptanmıştır.

Bilimsel çalışmalardaki biyolojik materyallere kolay ulaşım ise önemli bir husustur. Polimer teknolojilerinin hızlanması, biyolojik materyallerin baskılanma özelliği ile bu sorunlar ortadan kaldırılmıştır. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP) olarak adlandırılan ve kendine özgü tekniklerle nanoboyutlardaki maddelerin biyobenzetimi sağlanarak çalışmalar kolaylaştırılmıştır. Moleküler baskılama yöntemi ile seçici moleküler tanıma bölgelerine sahip kararlı sentetik polimerler hazırlanmaktadır. Moleküler Baskılama Teknikleri (MIT) ile nano ve mikro boyutlardaki hızlı bozunabilen biyolojik maddeler olan nükleozidlerin ise bilimsel çalışmalarda daha etkili ve kolay şekilde kullanımı yaygınlaşmıştır. MIP tıp, yaşam, farmakoloji, çevre bilimleri ve gıda gibi birçok alanda tanıma elementi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulama alanlarından biri de tanıma elemanı olarak sensörlerin kullanılmasıdır. Biyolojik bir yanıtı ölçülebilir bir sinyale dönüştüren analitik cihazlar olan biyosensörler, bir denemenin biyoanalitik performansından doğrudan sorumlu oldukları için cihazların çok kritik bileşenidir.

Özellikle optik sensörlerden SPR sistemi MIP teknolojisiyle birlikte etkili olarak kullanılmaktadır. Nanosensör alanındaki çalışmalarda sıklıkla kullanılan optik tabanlı SPR sensörler polarize ışığın bir metal yüzeye yansımaya dönüşmesiyle oluşan elektromanyetik dalgaların kırılma indisindeki değişiklikleri ölçen seçici ve duyarlı sensör sistemleridir. Son yıllarda optik sensör çiplerine MIP teknikleri ile yüzey üzerine modifikasyonları uygulanarak bilimsel ve deneysel çalışmaların hız kazanması sağlanmıştır. Hastalıkların erken bir aşamada teşhis edilebildiği için hızlı tıbbi kararlar alınmasını sağlar; bu da hastaların erken tedaviye başlamasını sağlayan sağlık sonuçlarının iyileştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Literatürde son yıllarda MIP olarak ilaç, protein, peptid, amino asit, vitamin gibi biyolojik aktif moleküllerin seçici olarak belirlenmesinde sensörler ile gerçekleştirilen kompleks çalışmalar bulunmaktadır.

Tez kapsamındaki çalışmalarda kalıp molekül olan adenzin için seçici bağlanma bölgelerine sahip SPR nanosensörler hazırlanarak adenzin baskılanmış SPR nanosensörler ile adenzin arasındaki kinetik etkileşimler incelenecektir. MIP tekniği kullanılarak nanofilm SPR altın ip yüzeyine yüzey modifikasyon yöntemi kullanılarak adenzin nükleozidi baskılanmıştır. Yapay idrar ve serum örneklerinden adenzinin gerçek zamanlı olarak tayin edilebilen nanosensör tasarlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

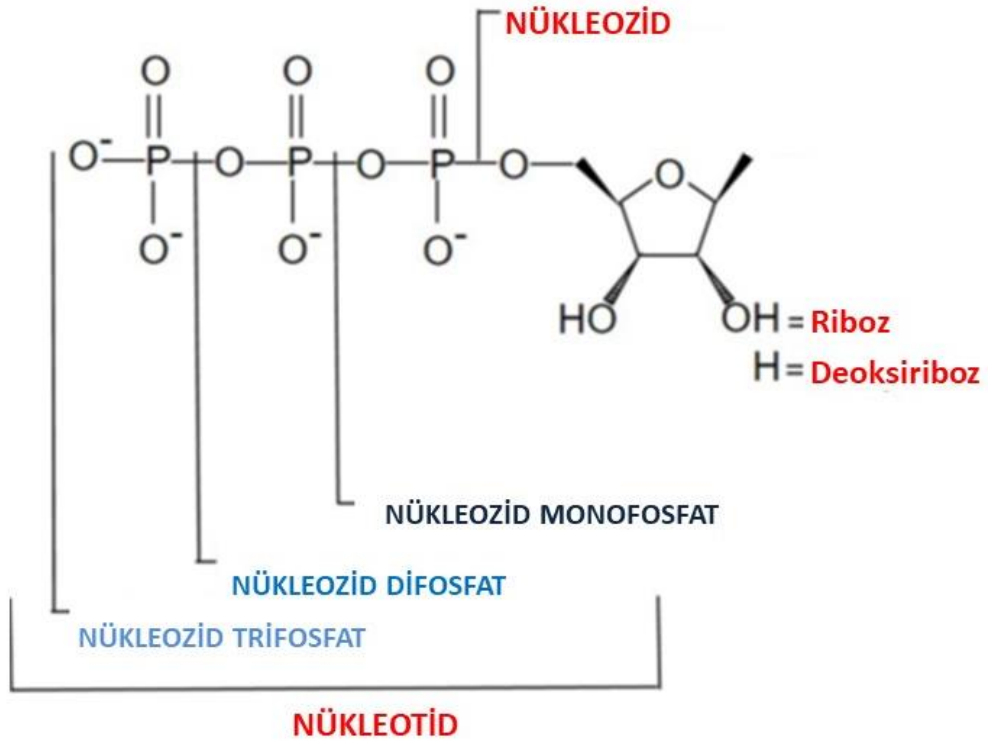
2.1. Nükleotidler ve Nükleozidler

Tüm canlıların hücrelerinde hayati bileşikleri olarak nükleik asitler bulunmaktadır. Nükleik asitlerin ana bileşenleri şekerler, fosfat grupları, pürin ve pirimidin bazlarıdır. Nükleotitler Şekil 2.1’de görüldüğü gibi; azot içeren bir baz, beş karbonlu bir şeker ve bir veya daha fazla fosfat grubundan oluşur. DNA ve RNA, nükleotid adı verilen monomer bileşimlerinden oluşan polimerlerdir. Nükleotitler sırayla nükleozid adı verilen moleküllerden oluşur. Nükleozidler iki şekerden (DNA’da 2-deoksiriboz ve RNA’da riboz) ve pürin veya pirimidin olan heterosiklik bazlardan meydana gelmektedir. DNA, timin (T), adenin (A), sitozin (C) ve guanin (G) RNA ise Timin yerine Urasil bazına sahip olmak üzere dört molekül nükleotid dizilerine sahiptir. Bu moleküller, iki ipliği birbirine bağlayan A-T çift hidrojen bağlı veya G-C üç hidrojen bağlı baz çiftleri olarak eşleştirilir, tamamlayıcı diziler içeren iki nükleik asit polimeri, çok kararlı etkileşimler oluşturabilir ve bu tür eşleşme, genetik materyalin çift sarmallı yapısının temelini oluşturur [1, 2]. Nükleotidler DNA ve RNA biyosentezinin önemli metabolitleridir ve ayrıca çok sayıda biyokimyasal dönüşümün yardımcı substratları ve kofaktörleri olarak işlev görürler. Nükleozidler ise büyük yapısal çeşitlilik ile karakterize edilen geniş bir doğal bileşikler ailesi ve bunların kimyasal olarak değiştirilmiş analoglarıdır. DNA ve RNA’da bulunan ana bazların nükleotid, nükleozid isimleri ve kısaltılmaları Çizelge 2.1’de listelenmiştir.

Çizelge 2.1. DNA ve RNA’da bulunan Temel Baz ve Nükleozidler ve Kısaltılmaları

BAZ İSMİ	KISALTIMASI	NÜKLEOSİD	NÜKLEOSİD KISALTIMASI
Urasil	U(Ura)	Üridin	Urd
Sitozin	C(Cyt)	Sitidin	Cyd
Timin	T(Thy)	Timidin	dThd
Adenin	A(Ade)	Adenozin	Ado
Guanin	G(Gua)	Guanozin	Guo

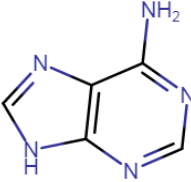
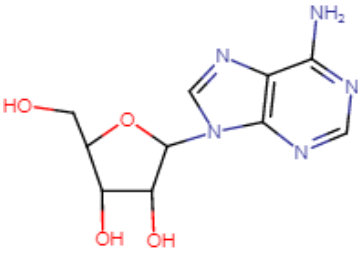
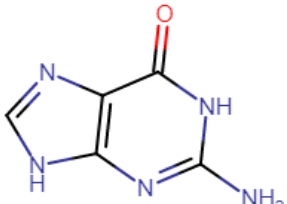
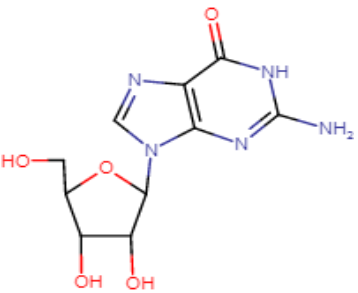
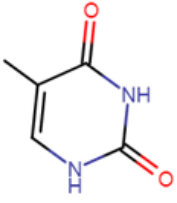
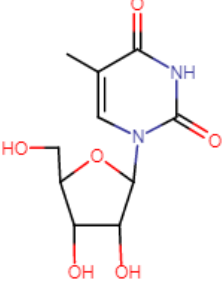
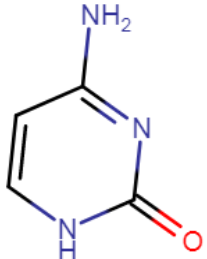
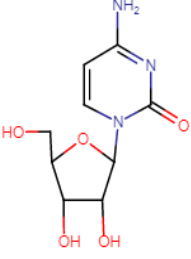
Nükleozitler ve deoksinükleozitler, sırasıyla RNA döngüsünden ve DNA bozulmasından salgılanan endojen metabolitlerdir. Bu metabolitler, beş karbonlu bir şekere (riboz veya deoksiriboz) kovalent olarak bağlı nükleobazlardan oluşur. Çizelge 2.2’de temel nükleozidlerin moleküler gösterimlerimleri listelenmiştir. Çoğunlukla benzer olmasına rağmen, ribonükleozidler timin yerine urasil içerir. Riboza veya deoksiriboza bağlı her nükleobaza sırasıyla nükleozid veya deoksinükleozid denir.

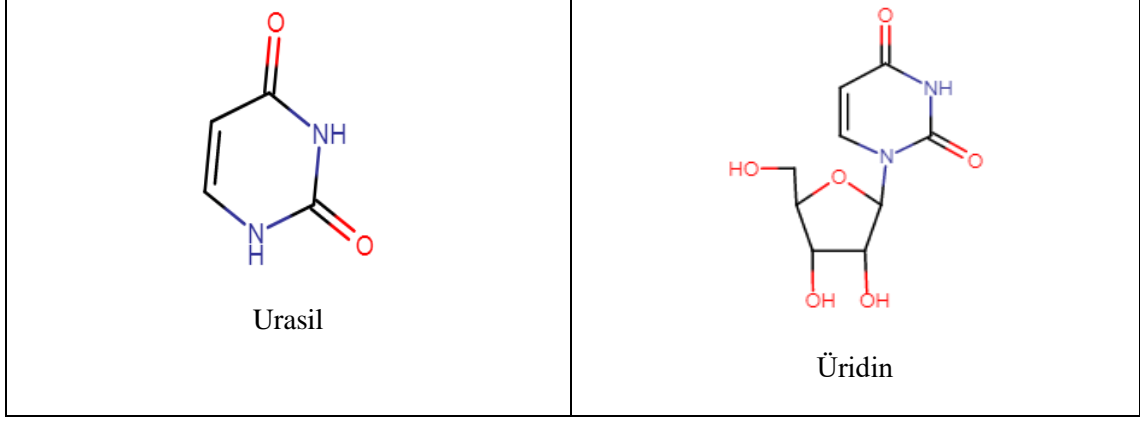


Şekil 2.1. Nükleozid ve Nükleotid temel moleküler yapısı

Nükleozidler genel olarak adenin, sitozin, urasil ve guanin nükleotidlerinden oluşmaktadır. Bu nükleotidlerin nükleozidleri, adenin için adenzin, sitozin için sitidin, urasil için üridin ve guanin için guanozindir [3, 4].

Çizelge 2.2. Temel Nükleobaz ve Nükleozidlerin moleküler gösterimi

Nükleobaz	Nükleozid
 <p data-bbox="427 701 523 734">Adenin</p>	 <p data-bbox="986 723 1098 757">Adenozin</p>
 <p data-bbox="427 1077 523 1111">Guanin</p>	 <p data-bbox="986 1133 1098 1167">Guanozin</p>
 <p data-bbox="435 1462 515 1496">Timin</p>	 <p data-bbox="994 1529 1090 1563">Timidin</p>
 <p data-bbox="427 1910 523 1944">Sitozin</p>	 <p data-bbox="1002 1899 1098 1933">Sitidin</p>



Nükleozidler, DNA ve RNA sentezi, hücre sinyalizasyonu, enzimatik düzenleme ve metabolizma gibi farklı hücresel süreçlerde anahtar rol oynayan endojen bileşiklerdir [5, 6]. Nükleozidler, riboz C1 konumunda bağlı pürin veya pirimidinden oluşur. İlk bileşiğe nükleobaz, ikincisine bir şeker parçası denir. Aynı genel yapı dışında, modifiye edilmiş nükleozidlerin çoğu, genellikle bir nükleozid bazında bulunan (örneğin metillenmiş veya asetillenmiş) ek parçalara sahiptir [7]. Hücre ve organizma içinde nükleotidler, nükleozidler ve bazlar, enerji transferi, metabolizma, sinyalleşme, koenzim aktivitesi ve nükleik asit sentezi gibi önemli işlevleri bulunmaktadır. Nükleik asitlerin ve nükleotid kofaktörlerinin parçalanmasından kaynaklanan pürin ve pirimidin nükleozidleri, hücreler içinde kurtarılır ve nükleik asitlere dahil edilebilen nükleotitler üretilir. Nükleozidler, nükleotidlere çok benzer yapılara sahiptir fakat β -glikosidik bağ olarak da adlandırılan N-glikosidik bağ yoluyla bir şekere bağlanan bazdan oluşur ve yapılarında çoğunlukla fosfat grubu bulunmamaktadır. Her baz, bir nükleozid oluşturan bir şekere bağlıdır ve her bir zincirde nükleozidler fosfatlar ile bağlanır. Bu nükleozid bazlı nükleotidler, çok çeşitli hücre tiplerinde purinerjik reseptörleri aktive edebilir. Benzer şekilde, hücre içi nükleotidler ve nükleozidler, farklı koşullarda hücrelerden salınabilir.

Genel olarak, nükleozid ve nükleotit analogları, birçok hastalığın replikasyon döngülerinde anahtar biyolojik yolları hedeflemektedir. Nükleozidler ve metabolitleri, çeşitli temel biyolojik işlemlerde önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif RNA hasarının incelenmesi, kanserle ilgili araştırmalarda değerlidir. Modifiye edilmiş nükleozidlerin kanser hastalarının idrarında yükseldiği gösterilmiş ve meme kanseri, tiroid kanseri, mesane kanseri ve böbrek kanseri gibi çok çeşitli kanserler için potansiyel göstergeler olduğu öne sürülmüştür [8-10].

2.2. Biyobelirteç Nükleozidler

Nükleozidler son yıllarda özellikle kanser olmak üzere bir çok hastalığın biyobelirteçi olarak araştırma konusu olmuştur. Nükleozidler tekrar nükleotid elde edilmek üzere fosforilasyonda katalize edilemediğinde idrarla dışarı atılmaktadır. Fizyolojik ve patolojik etkiler için hücrel metabolizmada rol oynayan nükleozidler hücre dışında da hareket etmektedir. İltihaplanma ve kötü huylu hastalıkların sürecinde ise RNA döngüsünün hızlı olmasından dolayı kanda ve idrarda nükleozid seviyeleri artmaktadır. Ürogenetik kanser, AIDS, meme kanseri, kolorektal kanseri, karaciğer hastalıkları, Parkinson ve bağışıklıkla ilgili hastalıklarda nükleozid seviyelerinin yükseldiği bildirilmiştir [11-14]. Kanser teşhisinde klinik teşhis ve erken tanı için HPLC, LS/MS-MS, MALDI-TOF ile hasta bireylerden alınan idrar numuneleri üzerine çalışılmıştır ve çalışmalarda genellikle adenozin (Ado), guanozin (Guo), inozin (Ino), ksantin (XO), sitidin (Cyd), üridin (Urd) nükleozidleri ve modifiye nükleozidler üzerine yoğunlaşmıştır [15-18].

2.3. Adenozin

Adenozinin ilk olarak önemi 1930'lu yıllarda Drury ve Szent-Gyorgy tarafından adenozinin kalp ve damar hastalıkları üzerine etkileriyle birlikte rapor edilmiştir. İlerleyen yıllarda Green ve Stoner kan basıncının yükselmemesine rağmen adenozin ve türevlerinin uygulanmasının koruyucu etkilerini bulmuşlardır. Bennet ve Drury, hipoksi ile enerji eksikliğinin miyokardiyal adenin nükleotidlerinin parçalanmasına neden olduğunu ve yıkım ürünlerinin koroner vazodilatasyona yani koroner damarlarında gevşemeye neden olabildiğini göstermiştir [19]. İlerleyen yıllarda ise bilim adamlarının araştırmaları hız kazanarak, adenozinin yalnızca kalp ve damar ile ilgili olmadığı ayrıca hücre metaboliti olarak hücre sinyalleşmesi, hücre ve dokular arası düzenleyici olduğu ve insan vücudunda oluşabilecek birçok hastalık ile ilgili olduğu anlaşılmıştır.

Ado Çizelge 2.2'deki moleküler yapısında görüldüğü gibi bir beta-N9-glikosidik bağ (6-amino-9-bD-ribofuranosil-9-H- purin) yoluyla bir riboz şeker kısmına bağlanan bir adenin molekülünden doğal olarak oluşan endojen pürin nükleozididir. Hem ATP'nin hem de sinyal molekülü siklik adenozin monofosfatın (cAMP) nükleozid tabanıdır. İnsan fizyolojisinde her yerde bulunan temel fonksiyonlara sahip olan Ado, hücre dışı bir sinyal molekülüdür. Kardiyovasküler sistemde önemli bir role sahip olup, hem terapötik hem de tanısal yetenekleri açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir [20].

Omurgalıların merkezi sinir sistemi dahil olmak üzere tüm dokularında bulunur ve çeşitli fizyolojik süreçleri düzenler [21]. Adenozin, çeşitli nörotransmitterlerin etkisinde yerel bir düzenleyici olarak da işlev görmektedir. Ado, hem beyinde hem de periferik sinir sisteminde, çoğu olmasa da birçok nörotransmitterin salınımını düzenler; bu nedenle fizyolojik etkilerin çoğunu adenozinin lokal seviyesi belirlemektedir. Bu, adenozinin, ilgili hücrelere ve belirli dokulara bağlı olarak çok sayıda etkiye sahip olduğu anlamına gelir [22, 23]. Metabolizma, hücresel iletişim ve DNA metilasyonu dahil olmak üzere bir dizi işlevde doğrudan yer alır. Adenozin ve metabolitleri tarafından purinerjik sinyalleme, çeşitli reseptörler aracılığıyla meydana gelebilir ve hücre içi etkilere sahip olabilir. Bu nedenle, beyindeki homeostatik adenozin seviyelerini korumak çok önemlidir [24]. Etkisi, hücre içi etki hipotezi ileri sürülmesine rağmen, hücre dışı varlığı ise sınırlıdır. Adenozinin hücre dışı derişimleri, üretimi ve dönüşümü arasındaki dengeye bağlıdır [25]. Adenozin, hemen hemen tüm hücrelerden salınan endojen bir nükleozid modülatörüdür ve hücre dışı boşlukta, ATP'nin ENTDe (CD39) ve 50-nükleotidaz (CD73) dahil olmak üzere bir dizi enzim yoluyla parçalanmasıyla üretilir. Sonucusu, hücre dışı AMP'yi adenozine defosforile eder ve oluşumunda sınırlayıcı bir adım oluşturur. Hücre dışı adenozin konsantrasyonu, belirli taşıyıcıların etkisi ile çalıştırılan geri alım mekanizmaları tarafından dengede tutulur. Bu nükleozid, A₁, A_{2A}, A_{2B} ve A₃ adlı dört G-protein-bağlı reseptör (GPCR) ailesinin aktivasyonu yoluyla etkilidir. Bu reseptörler, adenozin için afiniteleri, topladıkları G proteinlerinin tipi ve son olarak hedef hücrelerde aktive olan sinyal yollarında farklılık gösterir.

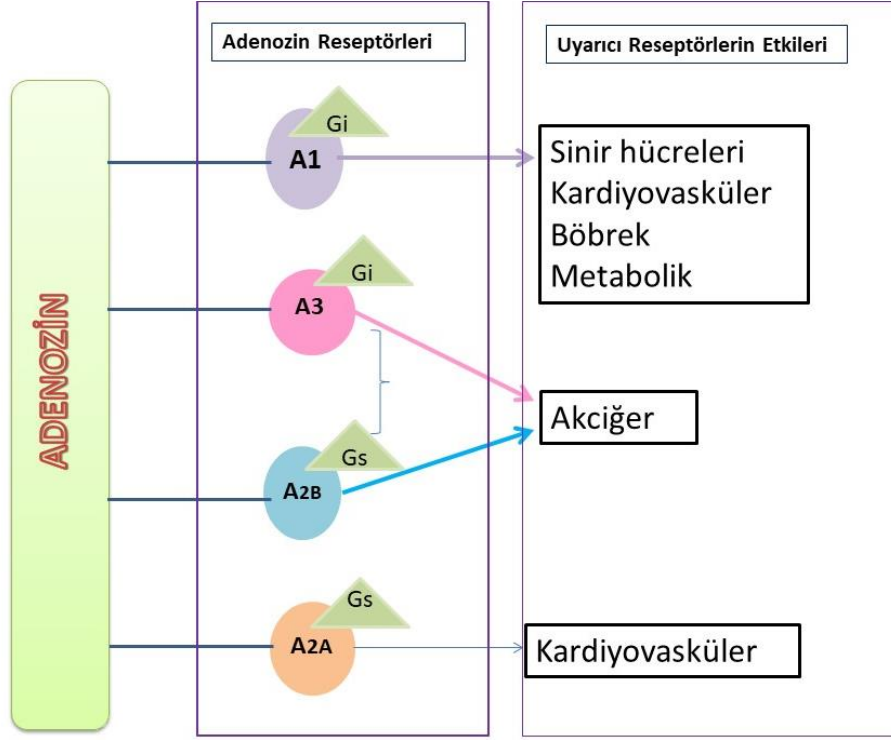
İnterstisyel sıvıdaki adenozin seviyelerinin 20-200 nM aralığında olduğu tahmin edilmektedir. Adenozin derişimleri metabolik olarak elverişsiz koşullar altında artar. Hücre dışı adenozin, iltihaplanma, hipoksi ve ilişkili hücresel hasar ve stres sırasında birikebilir. Örneğin, doku hipoksisi, ATP'nin daha fazla parçalanmasına ve adenozin üretiminin artmasına neden olur. Adenozin, birçok farklı fizyolojik ve farmakolojik sürecin güçlü bir düzenleyicisidir. Adenozin, çoğunlukla doğrudan hücre dışı boşluğa taşınabilmesine rağmen, ATP'nin hücre dışı hidrolizinden üretilir. Adenozin, hemen hemen tüm vücut sıvılarında farmakolojik olarak ilgili derişimlerde bulunurken, derişimi hızla artırılabilir veya azaltılabilir. Reseptörlerinde hareket eden adenozin, patojenlere verilen tepkilere aracılık etmede ve düzenlemede ve eklemdeki homeostazı sürdürmede önemli bir rol oynar. Adenozin reseptörleri vücutta yaygın olarak dağıtılır ve dokular arasında bağışıklık dokuları, kıkırdak, kemik, kalp ve beyin de bulunur [26, 27].

2.3.1 Adenozin Reseptörleri

Hücre dışı boşluktaki adenozin seviyesinin belirlenmesinde ve adenozin döngüsündeki önemli etkenlerden biride adenozin reseptörleridir. Adenozin nükleozidi fizyolojik etkilerine, GPCR'ler ile etkileşim yoluyla aracılık etmektedir. Hücre dışı adenozin tarafından aktive edilen adenozin reseptörleri (AR)'ler A_1 , A_{2A} , A_{2B} ve A_3 olmak üzere dört alt tip olarak sınıflandırılır (Şekil 2.2). A_{2A} ve A_{2B} AR'leri, A_1 ve A_3 AR'lerinde olduğu gibi özdeşliği bakımından yakındır fakat bağlanma durumlarına göre A_1R ve A_{2AR} , en hassas adenozin reseptörleri olup nanomolar aralıkta aktifken, A_{2BR} ve A_3R mikromolar aralıkta aktiftir. Adenozin, A_1 ve A_{2A} AR'lerinin yüksek afiniteli bağlanma bölgelerinde 10-30 nM'lik bir afiniteye sahiptir. A_{2B} , AR arasında adenozin için tüm alt tiplere oranla en düşük afiniteye sahiptir ve A_3 'ün afinitesi orta düzeydedir.

A_{2A} ve A_{2B} alt tipleri Gs proteinleri aracılığıyla adenilat siklazın enzim aktivitesini arttırarak hücre içi cAMP seviyesini arttırır ve A_1 ve A_3 alt tipleri Gi proteinleri yoluyla adenilat siklaz aktivitesini inhibe ederek hücre içi cAMP seviyesini azaltır [22, 27]. Dört AR alt tipi vücudun strese adaptasyonunda, genellikle damar genişliğini arttırarak yerel kan akışını artırma bağlamında önemlidir[23]. A_{2A} ve A_{2B} adenozin reseptörlerinin aktivasyonu, koroner dolaşım dahil miyokardiyal kan akışında bir artışa neden olur. A_1 reseptörleri kardiyovasküler olarak kalp atış hızını düşürürken, böbreklerde sodyum yeniden emilimini arttırır, merkezi sinir sisteminde nörotransmitter madde salınımını azaltırken ,hücre metabolizmasında insülin duyarlılığını arttırır. A_{2A} reseptör aktivasyonu ayrıca anti-enflamatuar etkiler üretir, A_{2B} reseptörleri insan mast hücrelerinde bulunur ve mast hücresi degranülasyonu ve bronşiyal daralma ürettiği düşünülmektedir. A_3 reseptörü ise alerjik durumlarda mast hücrelerinin salınımını sağlamaktadır [28].

Ado, dokuları ve organları hasardan korumada hayati ve önemli roller oynayan neredeyse her yerde bulunan hücresel sinyal araçlarıdır. Özellikle oksijen ile ilgili olarak oranında bir artış, ön koşullandırma, anti-inflamatuar etkiler ve anjiyogenezin uyarılması dahil olmak üzere farklı reseptör aracılı mekanizmalar tarafından doku koruma ve onarımını tetikler [26].

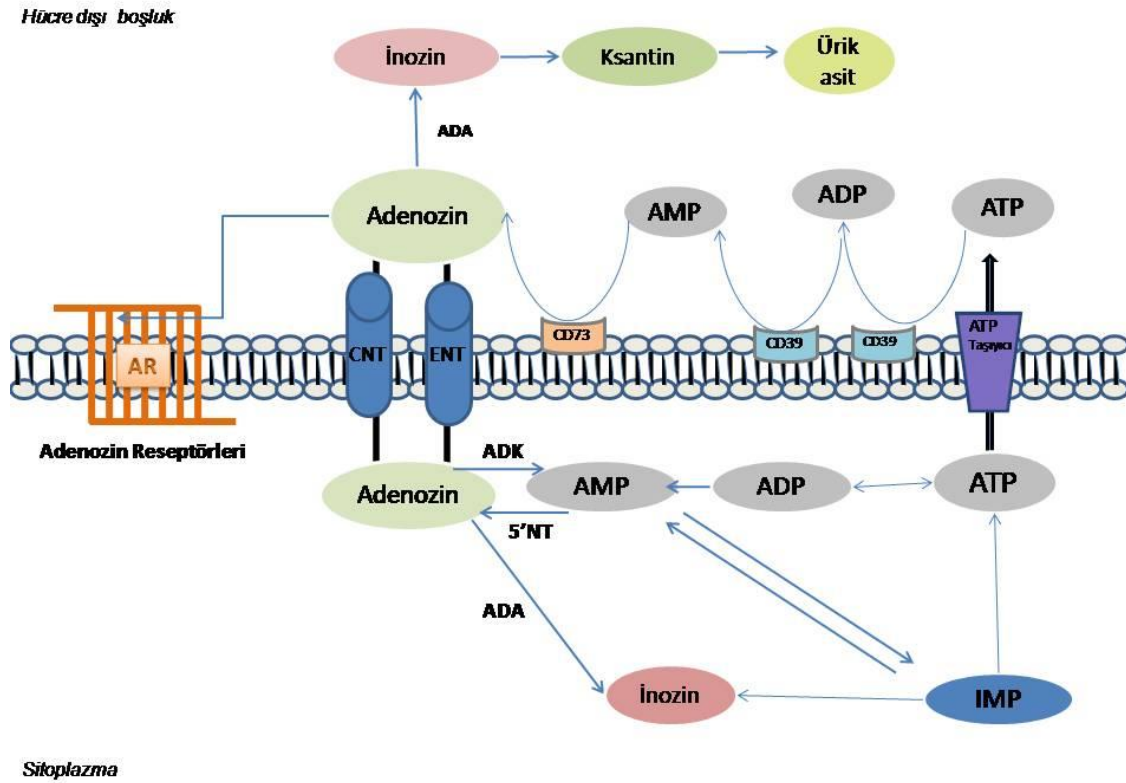


Şekil 2.2. AR'lerin bağlı olduğu G proteinleri ve uyarıcı etkileri

2.3.2. Adenozin Metabolizması

Adenozin metabolizması çok çeşitli enzim ve ara ürünlerin yer aldığı bir döngüdür. Adenozinin döngüsü hem hücre içinde hem de hücre dışında devam etmektedir. Şekil 2.3.'de adenozine ait metabolizma döngüsünün bir kısmı görülmektedir. Hücre içerisindeki döngüsünde adenozin, adenozin kinaz (ADK) enzimi ile fosforilasyona uğrayarak, adenozin monofosfat (AMP) oluşturulur aynı şekilde 5'AMP'den Ado oluşumu ise 5'NT enzimi yoluyla gerçekleşmektedir. Hücre dışı boşlukta ise adenozin konsantrasyonu dengeleyici nükleozid taşıyıcılar (ENT) taşıyıcıları veya dolaylı olarak ATP'nin önce CD39 enzimi yoluyla ADP'ye ve daha sonra AMP ye dönüşmesinin ardından AMP nin CD73 enzimi ile adenozine hidrolize ederek ters reaksiyonu gerçekleştirir. ENT'ler, adenozin dahil olmak üzere nükleozid substratlarını hücreden dışarı çıkarabilir. Adenozinin, adenozin deaminaz (ADA) enzimi tarafından molekülden bir amin grubu çıkararak deaminasyonu sağlayabilir. Daha spesifik olarak, ADA yan ürün olarak amonyak üretirken, hem adenozin hem de 2'-deoksiadenozinin sırasıyla inozin ve 2'-deoksiinozine deaminasyonunu katalize eder. Bu enzimlerin tümü hücre içi ve hücre dışı adenozinin toplam miktarını düzenleyebilir [24].

Ado, ADA tarafından bozduğunda veya hücre dışı ortamdan çıkarıldığında, P1 reseptörlerinin aktivasyon süresini sınırlamak için adenozin sinyallemesi sona erdirilir. Adenozin biyolojik membranlara nüfuz edemediğinden, fosfolipid çift tabakası boyunca taşınması, spesifik adenozin taşıyıcı proteinler aracılığıyla gerçekleşir. Adenozin, ENT'ler ve konsantre nükleozid taşıyıcıları (CNT'ler) adlı iki tip taşıyıcı yoluyla hücre içi pürin-nükleotit sentezi için yeniden kullanılmak üzere hücre dışı ortamdan alınır[8]. Hücre içersinde adenozin önce inozine ve daha sonra hipoksantine ilerler [29]. Hücre dışında ise adenozinin hipoksantineden sonra ürikasit son ürününe dönüşür. Ayrıca hücre dışında adenozin sinyalizasyon görevini sağlamak için 4 alt tipi olan reseptörlerine de bağlanabilir. Adenozin nükleozidine ait bu metabolik olayların ana akışı bu şekilde ilerlerken yukarıda bahsedilen geçişler sinyalizasyon ve dönüşümleri milisaniyelerde meydana gelmektedir. Beyin dokusunda her doku çeşidine ait reseptör ve lokal metabolizma durumundan dolayı net olarak hücre içi ve hücre dışı adenozin seviyelerinden bahsetmek pek mümkün olmamaktadır.



Şekil 2.3. Adenozinin hücre içi ve hücre dışı boşluk metabolizmasının gösterimi

2.3.3. Adenozin Seviyeleri ve Adenozine Bağlı Hastalıklar

Hücre dışı nükleotidler ve nükleozidler, doku homeostazı, yara iyileşmesi, nörodejenerasyon, bağışıklık, iltihaplanma ve kanser gibi temel patofizyolojik süreçler purinerjik sinyal düzenleyicidir. Adenozin de hücre dışı nükleozidlerden önemli bir nükleozittir ve ayrıca idrarda metabolom olarak biyobelirteç özelliği taşımaktadır. Yapılan araştırmalarda epilepsi [30, 31], Alzheimer [32, 33], anksiyete [34], nörolojik hastalıklar [35, 36], diyabet [37], akut böbrek hastalığı, bağışıklık hastalıkları [38] ve kolorektal kanseri [39], meme kanseri [40], prostat kanseri [41], akciğer kanseri [42] gibi bir çok kanser türünde [43, 44] hücreye özgü ve hücre dışı süreçlerinin çeşitli yönlerini düzenlemede adenozin sinyalleşmesinin çok önemli bir rolünü vurgulanmıştır [45]. Adenozin enzimlerinden olan CD73 ve CD39'un yüksek ekspresyonu, tümör bölgesinde adenozinin aşırı üretimi ile ilişkilendirilmektedir. Bu artış, metastaz, anjiyogenez ve hücre proliferasyonu gibi çeşitli tümör özelliklerini geliştiren tümör bölgesindeki bir immüno-supresif durumla ilişkilidir. Adenozin/CD73/CD39/AR ekseninin kolorektal kanserin immüno-patogenezindeki önemli rolü olduğu çalışmalar ile gösterilmiştir [39, 46]. Adenozin seviyelerinin tek bir değerinin bulunmadığı doku tipine, cinsiyete, hamilelik ve hastalık durumuna göre adenozin seviyelerinin plazma ve idrar örneklerinde farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Bazı şartlar altında Ado sinyalleşmesinde farklılaşmış AR'leri ve enzimsel aktivitelerin değişmesinden ötürü hücreler arası Ado seviyelerinin arttığı böylelikle idrar örneklerinde Ado derişiminin da arttığı bildirilmektedir. Ado'nun yarı ömrünü ve dönüşümünü belirlemek için yapılan bir araştırmada sağlıklı gönüllülerden alınan plazma örneklerinde Adenozinin in vitro plazma seviyeleri 82 ± 14 nM olarak bulunmuştur [47]. Cinsiyetlere göre yapılan bir araştırmada kadın (208 ± 90 nM) ve erkek (239 ± 85 nM) denekler arasında plazma Ado seviyelerinde anlamlı bir farklılık gösterilmiştir [48]. Genel olarak, normal insan idrarındaki Ado derişimi 2.0 ila 7.0 μ M aralığındadır ve akciğer kanseri hastasında adenozinin referans limiti 7.0 μ M'den yüksektir [49]. Diyabet hastalığına bağlı olarak yapılan bir araştırmada sağlıklı deneklerde (0.32 ± 0.11 μ mol/mmol Cr) ve Tip 1 diyabet hastalarında üriner adenozin klemplenmiş hiperglisemi sırasında idrar adenozinin arttığı (0.40 ± 0.11 ve 0.45 ± 0.12 μ mol/mmol Cr) değiştiği görülmüştür [50].

Adenozinin kalp hastalıklarıyla da bağlantısını araştırmak üzerine yapılan bir çalışmada plazma Ado seviyeleri iskemik ve iskemik olmayan kalp yetmezliği olan hastalarda Ado derişim seviyesinin arttığı (sırasıyla 218 ± 23 ve 211 ± 21 nmol/L, sağlıklı denekler için 62 ± 3 nmol/L) ve adenozin seviyelerindeki artışların kapsamının, kronik kalp yetmezliğinin ciddiyeti ile bağlantılı olduğunu belirlenmiştir [51]. Hücre dışı sıvılardaki ortalama Ado derişimi , insanların hücre dışı sıvılarında $0,5 \mu\text{M}$ 'dir. Hamilelik döneminde gebelik zehirlenmesine uğramış hamile kadınlarda ve koroner kalp hastalığı olan bireylerde Ado seviyelerinin arttığı görülmüştür [52]. Ayrıca gebe olmayan, tekil gebe ve ikiz gebe kadınlarda ortalama serum Ado seviyeleri sırasıyla 10.7 ± 2.6 IU/L, 9.2 ± 2.3 IU/L ve 11.6 ± 2.8 IU/L olarak yapılan araştırmalarda bulunmuştur [53]. Farklı yayınlar, yaklaşık 10 nmol/L ila $1 \mu\text{mol/L}$ arasında dolaşımdaki konsantrasyonları ve $30 \mu\text{mol/L}$ 'ye kadar yerel konsantrasyonları bildirmiştir. Ado derişimlerini ölçmek, esas olarak kandaki kısa yarı ömrü nedeniyle teknik olarak çok zor olduğundan, rapor edilen konsantrasyonlarda yüksek değişkenlik vardır [25].

2.3.4. Adenozin ve Nükleozid Tespitinde Gelişmeler

Son yıllarda sensör ve malzeme teknolojisinin ilerlemesiyle idrar ve plazmadan adenozin ve nükleozidlerin tespit ve tayini için kullanılan kapiller elektroforez, ELISA, HPLC, LS/MS-MS gibi analitik yöntemlere alternatif olarak sensör üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Kevasan ve ark., melamin kullanarak iki aşamalı bir diazotizasyon stratejisi ile camsı karbon elektrotuna grafen ile modifiye ederek elektrottan elektrokimyasal yöntemle kan ve idrarda adenozin varlığında teofilinin seçici olarak belirlenmesi üzerine çalışmıştır [54]. Hussain ve ark., kanserli hücrelerde Ado ve metabolitlerin tespiti için çoklu enzim yüklü tek elektrotlu sensör (SES) ve çift elektrotlu sensör (DES) tasarlamışlardır. Çalışmada SES, tri-enzimler, adenozin deaminaz, purin nükleozid fosforilaz ve ksantin oksidaz (XO) ile hidrazin (Hyd)'nin işlevselleştirilmiş bir iletken polimere kovalent bağlanmasıyla üretildi. DES'deki enzim reaksiyon elektrotu, XO ve Hyd'nin Au nanopartiküller üzerinde kaplanmış pTTBA'ya kovalent bağlanmasıyla dinamik aralık $0,5 \text{ nM}$ ila $120,0 \mu\text{M}$ iken saptama limitini sırasıyla adenozin, inozin ve hipoksantin için $1,43 \text{ nM} \pm 0,02$, $0,76 \text{ nM} \pm 0,02$ ve $0,48 \text{ nM} \pm 0,01$ olarak bulunmuştur [55].

Lin ve ark., adenozin tespiti için kemilüminesan biyosensör tasarlanmışlardır ve DNA hidrojelini içine Au@HKUST-1 enkapsülasyonunu sağlayarak aptamer tabanlı bir biyosensör elde etmişlerdir. Elde edilen sensörde 4×10^{-13} – 1.5×10^{-13} mol/L lineer aralığında $1,04 \times 10^{-13}$ mol/L kadar düşük bir algılama limitiyle adenozin miktarını belirlemişlerdir [56]. Yousefi ve ark., insan idrar örneklerinde adenozin florometrik aptasensör geliştirilmiştir. Çalışmada aptamer için floresan olarak nitrojen ve kükürt katkılı karbon kuantum noktalarını ve gümüş nanopartikülleri kullanmışlardır. Çalışmalarında lineer aralığı 50-200 nM'da saptama sınırı 13 nM olarak bulmuşlardır. [57].

2.4. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP)

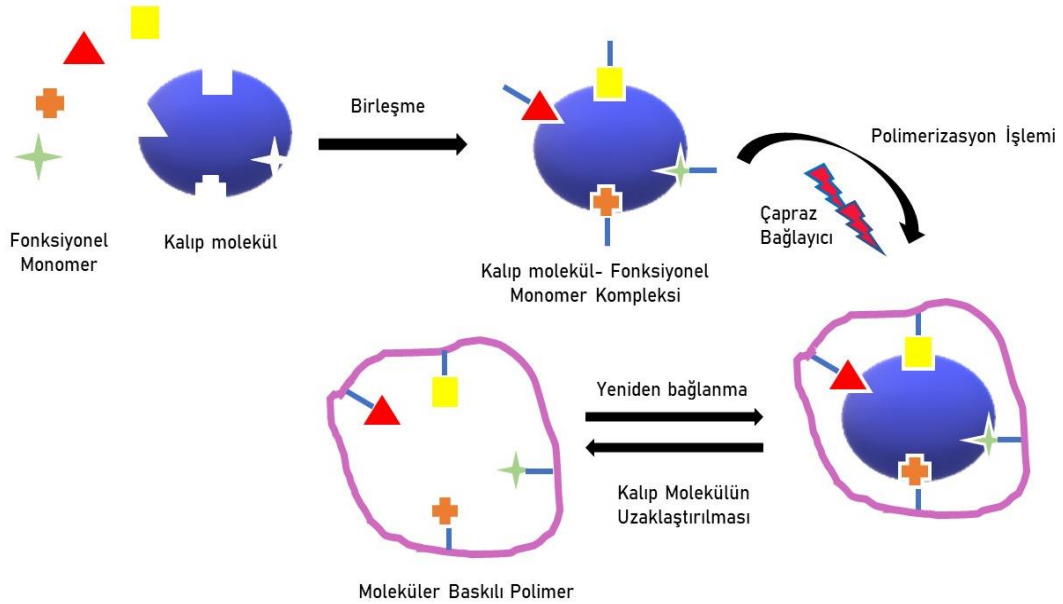
Moleküler baskılama kavramı 1930'lara kadar uzanmaktadır. Tarihsel geçmişinde 1930'ların başında bir katı üzerinde moleküler baskıya yönelik ilk çalışma Poljakov tarafından gerçekleştirilmiştir. Poljakov alkilbenzenlerin varlığında sentezlenen silikanın, bu hidrokarbonların yaklaşık %15 adsorpsiyonu ile artan seçiciliğe sahip olduğunu göstererek bu kavrama dair ilk çalışmaları yapmıştır. İlerleyen zamanlarda Dickey metil ve etil molekülleri için spesifik moleküler tanıma yeteneğine sahip silikanın geliştirilmesine odaklanmıştır ve bir silika jel oluşturma amacıyla şablon olarak metil molekülünü kullanarak şablonun çıkarılmasından sonra, metil adsorpsiyon kapasitesi, etil adsorpsiyon kapasitesinden birkaç kat daha yüksek olduğunu göstermiştir. 1950-70'lerdeki yapılan diğer çalışmalarda, sentez sırasında eklenen şablonun silisin gözenek boyutunu ve adsorpsiyon özelliklerini ve metalik katalizörlerin aktivite ve seçiciliğini etkilediğini gösteren makaleler ortaya çıkmıştır. Bu zamana kadar açıklanan çoğu inorganik matrislere dayalı organize yüzeylerin sentezi için moleküler şablonların kullanılmasına yönelik çalışmaların ortak dezavantajı olarak oluşturulan baskıların stabilitesi düşük olmuştur. Bu durum, önce kovalent (1972) ve sonra kovalent olmayan (1981) baskı ile çeşitli organik bileşiklerin moleküler olarak oluşturduğu izlere sahip polimerik malzemelerin hazırlanmasına yönelik yöntemlerin çıkmasıyla değişmiştir. 1994 yılında, MIP'ler ilk olarak kimyasal analizde kullanılmıştır [58-60]. Moleküler damgalamanın modern çağı, katalitik MIP'lere yönelik öncü çabalara ek olarak MIP malzemelerinin spesifik bağlayıcı yönlerini geliştirmeye devam eden Wulff, Shea ve Mosbach tarafından başlatılmıştır.

1972'de Wulff ve Klotz tarafından organik polimerlerle baskı yapmak için geliştirilmiştir. 1972 yılına kadar Wulff, "moleküler baskılama" kavramını önererek MIT gelişiminde bir atılım olan D-gliserol asit için kiral tanıma yeteneğine sahip moleküler baskılanmış polimeri (MIP) hazırlamıştır. Mosbach grubu tarafından 1980'lerin başında geliştirilen organik polimerlerin kovalent olmayan baskılama, 1990'ların başındaki çalışmaların çoğunda uygulanan en popüler yaklaşım olmuştur. 1993'te Mosbach'ın grubu, önümüzdeki yirmi yılda MIT'nin gelişimini destekleyen MIP teofilin üzerine çalışmalarını yayınlamıştır [61, 62]. 20 yy.'nin başlarında başlayan keşifler yıllar geçtikçe araştırmalar sonucunda günümüz moleküler baskılanmış polimerler kavramını almıştır. Kimyasal ve biyokimyasal alanlardaki sensörlere, kromatografik adsorbanlara ve katalizörlere uygulamaları bu dönemden sonra hızla gelişmiştir. Son yıllarda ise moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), biyoteknoloji için hem modeller hem de analitik araçlar olarak önemli olmuştur. Daha yakın zamanlarda, ilaçlar, biyosensörler veya biyotahlil materyalleri gibi doğrudan uygulama alanlarında da MIP'lerin kullanımı artmıştır [63, 64].

2.4.1. MIP Tanımı

Moleküler baskılanmış polimerler, hedef bir bileşiği veya molekülü spesifik olarak yeniden bağlayabilen yapay olarak oluşturulmuş tanıma bölgelerine sahip olarak hazırlanmış sentetik malzemelerdir. Bu malzemeler, bir şablon molekülün etrafındaki fonksiyonel ve çapraz bağlanan monomerlerin polimerize edilmesiyle elde edilir, bu da yüksek oranda çapraz bağlı üç boyutlu ağ polimerine yol açar [65]. Moleküler Baskılama'da oluşan üç boyutlu polimerik matrislerdeki bu yapay tanıma bölgeleri boyut, şekil ve fonksiyonel grupların uzamsal düzenlenmesi oluşur [66]. Hedef bölgelerdeki spesifik olarak oluşturulmuş polimerik matrisler tanımlanacak bölgeler için fiziksel ve kimyasal olarak da seçici bir şekilde üç-boyutlu biyomimetik boşluklar üretir [67]. Şekil 2.4'de görüldüğü gibi işlemin ilk adımı, şablon, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcının bir porojen (porojenik çözücü) içinde çözünmesi ile bağlantılıdır [68]. MIP'ler, şablon hedef molekül (ilgilenen bir analit) ile kovalent veya kovalent olmayan bağlar kullanılarak fonksiyonel monomer(ler) arasında bir kompleks oluşturularak oluşturulur. Kovalent olmayan baskılama yoluyla hazırlanan MIP'ler, hidrofobik, elektrostatik ve iyonik gibi çeşitli etkileşimler yoluyla hedefleriyle tersinir bir şekilde etkileşime girebilir.

Bir polimerizasyon reaksiyonunda bir çapraz bağlama ajanı kullanılır, ardından şablonun polimerden çıkarılması ve spesifik bağlanma bölgeleri oluşturulur. Üretilen bağlanma bölgeleri, fonksiyonel grupların şekil, boyut ve yönelimi bakımından şablonu (analit) tamamlayıcı niteliktedir [69]. Fonksiyonel monomerler ve şablon molekül arasındaki tamamlayıcı etkileşimler, polimerizasyon işlemi ile üç boyutlu olarak korunur ve polimerin çapraz bağlanmasıyla daha da stabilize edilir. Bu nedenle ortaya çıkan MIP, seçicilik özelliğini kazanmış olur [70]. Kovalent olmayan moleküler baskılama işlemi, genellikle hedef molekül, fonksiyonel bir monomer, bir çapraz bağlayıcı ve porojenik bir çözücü olmak üzere bir şablon gerektirir. Şablon molekül, fonksiyonel grupları veya birleşme yerleri sayesinde fonksiyonel monomer ile bir ön polimerizasyon kümesi oluşturur. Daha sonra bu küme, üç boyutlu bir yapıda fonksiyonel monomerin çapraz bağlayıcı ile radikal polimerizasyon veya kopolimerizasyonu yoluyla birleştirilir. Şablon daha sonra baskılanmış polimerlerden çıkarılır ve şablonla şekil ve işlevsellik açısından tamamlayıcı bir boşluk bırakılır [71]. Moleküler baskılama işlemi; kovalent olmayan, kovalent, yarı kovalent, elektrostatik ve metal aracılı olarak beş gruba ayrılabilir [67].



Şekil 2.4. MIP'lerin polimerleşme mekanizmasındaki aşamalar

2.4.2. MIP Bileşenleri

Şablonda şekil, boyut ve sterik konfigürasyonda şablon molekülleri ile tamamlayıcı olan boşluklar bırakmak için MIT'nin temelleri şunları içerir:

- Moleküllere bağlanan ve tanıma bölgeleri sağlayan fonksiyonel monomerler;
- Şablon-monomer etkileşimlerini yüksek düzeyde çapraz bağlı bir polimerik matris içinde yakalayarak sabitleyen çapraz bağlayıcı;
- Bir polimer oluşturma sürecinde, polimerizasyon sürecini başlatmak için genellikle başlatıcılara (ışık, elektrik, ısı vb.) ihtiyaç duyulur.

2.4.2.1. Şablonlar

Moleküler baskılamada temel amaç, seçilen şablonun moleküllere afinite ile polimer ağı oluşturmasıdır. Şablon moleküller, polimerizasyon sırasında aktif olmayan fonksiyonel grupları ve kararlı kalıp molekül-monomer kompleksleri oluşturabilen fonksiyonel grupları içermelidir. Genel olarak kalıp moleküller; iyonlar, organik moleküller, biyomakromoleküller, hücreler ve virüsler gibidir [72].

2.4.2.2. Fonksiyonel Gruplar

Fonksiyonel monomerler, şablonlarla ön polimerizasyon komplekslerinin oluşturulmasında rol oynamaktadır. Fonksiyonel monomerlerin fonksiyonel grupları etkileşecek ve şablon moleküle bağlanarak oluşan bağlanma bölgeleri tek tip dağılımıyla spesifik boşluklar elde etmeyi sağlar. Doğru fonksiyonel monomerin seçimi, şablon moleküller olarak tasarlanmış özel boşluklar üretmek için esastır. Fonksiyonel monomerlerin asidik, bazik ve nötr olarak farklı şekilde molekülleri bulunmaktadır. Bu monomer seçiminin yapılması tanıma bölgesinin yapısını, kullanılan derişim, bağlanma bölgelerinin sayısını etkilemektedir. Metakrilik asit, MIP'lerin sentezinde en yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerdır [72, 73].

2.4.2.3. Çapraz Bağlayıcılar

MIP'nin bir reaktifi olarak çapraz bağlayıcı, MIP'nin oluşumunda önemli bir role sahiptir. Çapraz bağlayıcının rolü, MIP'de polimerlerin fiziksel özelliklerinin oluşumuna katılmaktır. Polimerizasyon işlemi sırasında fonksiyonel monomerleri kalıp moleküllerin etrafına sabitler, böylelikle yüksek düzeyde çapraz bağlı katı polimer ağının oluşmasıyla sonuçlanır. Polimerizasyon için kullanılan çapraz bağlayıcıların türü ve sayısı da dahil olmak üzere, çapraz bağlayıcıların kullanımında birkaç önemli faktör vardır.

Daha yüksek sayıda çapraz bağlayıcı, kararlı bir gözenekli malzeme etmeyi ve MIP adsorpsiyonunun çapraz bağlayıcının konsantrasyonuyla ilişkilendirilebilir. Fakat optimum koşullara ulaştıktan sonra çapraz bağlayıcının eklenmesi ters etki göstererek adsorpsiyon performansını düşürmektedir. Çapraz bağlayıcının varlığından etkilenen polimerin fiziksel özelliklerine etkisi, emici yapının morfolojik özellikleri, üç boyutlu yapı, optimal sertlik ve MIP'nin dayanıklılığıdır. MIP'lerin sentezinde kullanılan çapraz bağlayıcıların içinde en çok tercih edilen bileşik etilen glikol dimetakrilat, trimetilolpropan trimetakrilat, divinilbenzendir. Çapraz bağlayıcılar, polimer matrisinin morfolojisini ve mekanik özelliklerini etkilerken oluşan MIP'lerin ise seçiciliğini ve bağlama kapasitesini etkiler [68, 74].

2.4.2.4 Porojen ajanlar

Porojen ajanların iki işlevi bulunmaktadır. İlk olarak polimerizasyon aşamasında gözenek oluşturucu ajanlar olarak ikinci olarak ise bir fazda etkileşimlerin gerçekleşmesine izin vermek için şablonu, fonksiyonel monomerleri, çapraz bağlayıcıyı ve başlatıcıyı bir araya getirmek için çözücü olarak işlev görmektedirler [75]. Kullanılan çözücünün tipi, baskılama verimini, şablon ve fonksiyonel monomerler arasında oluşan etkileşimi, adsorpsiyon özelliğini ve polimerlerin morfolojik yapısını etkilemektedir. Kullanılan çözücü miktarının artması, gözeneklerin boyutunda artışa sebep olur, böylelikle uygun miktarda çözücü, şablon molekülleri bağlanmasını sağlamak için tasarlanmış spesifik boşlukların oluşumunda daha etkili olacaktır. Daha az polar çözücüler ise fonksiyonel monomer-şablon komplekslerinin oluşumunu geliştirirken polarlığı yüksek çözücü maddeler oluşan komplekslerdeki etkileşimleri bozmaktadır. Bu nedenle protokollerin bir çoğunda su gibi çözücüler kullanılmamaktadır [76].

2.4.2.5. Başlatıcılar

Başlatıcı, polimerizasyon reaksiyonunun küçük bir bölümünü oluşturur ve genellikle serbest radikallerin oluşumu yoluyla işlev görür. Başlatıcılar, sol-jel silika polimerizasyonundaki asit veya baz reaksiyonlarının yanı sıra termal, fotobaşlatma veya radyasyon başlatma yoluyla çalışabilir. Bu yöntemler arasında termal ve fotobaşlatma en yaygın olarak kullanılanlardır [77]. Peroksi ve azo bileşikleri, serbest radikal polimerizasyonu ile MIP'lerin sentezinde başlatıcı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Başlatıcılardan en çok tercih edilen ise azobisisobütironitrildir (AIBN). AIBN bozunma sıcaklığı 50-70°C'dir. Böylelikle termoliz ve fotoliz ile ayrıştırılabilmektedir. Üretilen

stabilize ve karbon merkezli radikaller polimerizasyonu başlatır. Oksijen ile olası yan reaksiyonlara karşı serbest radikal polimerizasyonu inert gaz atmosferinde gerçekleştirilmelidir [72].

2.4.3. MIP Stratejileri

Son zamanlarda, moleküler baskılanmış polimer (MIP) hazırlamak için kovalent, kovalent olmayan ve yarı kovalent baskılama olarak üç farklı uygulama yöntemi kullanılmıştır. Kovalent yaklaşımda, baskılanmış molekül, polimerize edilebilir bir moleküle kovalent olarak bağlanır. Bu tip polimerin bağlanması, tersine çevrilebilir kovalent bağlara dayanır. Çapraz bağlayıcı ile kopolimerizasyondan sonra baskı molekülü yüksek çapraz bağlı polimerden kimyasal olarak ayrılır. Ayrıca kovalent baskının, kovalent olmayan baskıdan farklı olması özellikle fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve şablon oranları bakımından farklı olmasıdır. Kovalent baskı, spesifik olmayan etkileşimleri önemli ölçüde azaltır, ancak karmaşık yeniden bağlama işlemi, uygulamalarda pratik olmamaktadır.

Kovalent olmayan baskılama, sentez sürecinin göreceli basitliği ve çok çeşitli kimyasalların işlevsellikleri sebebiyle MIP araştırmalarında en yaygın olanıdır. Kovalent olmayan yaklaşım sırasında, şablon ve monomer arasındaki kendi kendine bir araya gelme ve ardından çapraz bağlı bir kopolimerizasyon ile özel bağlanma bölgeleri oluşturulur. Baskı molekülleri, baskılama sırasında ve yeniden bağlama esnasında polimer ile kovalent olmayan etkileşimler (iyonik, hidrofobik ve hidrojen bağı gibi) yoluyla etkileşim haline girer [78, 79].

Baskılanmış polimerlerin kontrolü amacıyla hem kovalent hem de kovalent olmayan stratejilerin avantajını birleştiren yarı kovalent bir yaklaşım da ortaya çıkmıştır. Yarı kovalent strateji, bölünebilir bir bağ ile fonksiyonel bir monomere kovalent olarak bağlanan bir şablonun polimerizasyonuna dayanır. Kopolimerizasyondan sonra, şablonun çıkarılması, yeniden bağlama adımında şablonla kovalent olmayan bir anlamda etkileşime girebilen bir baskı taşıyan fonksiyonel gruplar oluşmasını sağlar [80].

2.4.4. MIP Polimerizasyon Çeşitleri

Moleküler baskılama yöntemlerinde farklı polimerizasyon türlerine ait bilgiler alt başlıklarda verilmiştir. Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanması için polimerizasyon türlerinde yığın, emülsiyon, çökeltme, süspansiyon, yüzey baskılama gibi farklı teknikleri mevcuttur. Bu teknikler arasında farklılıklar mevcuttur. Yapılacak işleme göre tekniklerin belirlenerek uygulanması gerekmektedir [67].

2.4.4.1. Süspansiyon Polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonu, sıvı matris ve monomer damlacıkları olmak üzere iki faz içeren heterojen polimerizasyondur, monomer ve çapraz bağlayıcı çözünmezdir, bu nedenle sıvı matris içinde damlalar oluştururlar [81].

2.4.4.2. Yığın Polimerizasyonu

Geleneksel polimerizasyon, monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve şablonun bir kalıp polimerizasyonunda karıştırılmasını ve ardından şablonun çıkarılmasından sonra öğütülmesini ve elenmesini içeren en kapsamlı kullanılan yöntemdir. Bu yöntemin kolay ve anlaşılır olmasına rağmen, yavaş yeniden bağlanma kinetiği, şablon molekülün potansiyel eksik eliminasyonu, düzensiz parçacık şekilleri ve bağlanma bölgelerinin homojen olmayan tahsisi gibi bazı dezavantajları vardır [82, 83].

2.4.4.3. Emülsiyon Polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu, bir yüzey aktif madde varlığında sürekli bir fazda dağılmış monomerlerin polimerizasyonunu içeren, tek tip küresel polimer parçacıkları elde etmek için etkili bir tekniktir. Heterojen sulu sistem içindeki serbest radikal polimerizasyonu ile hidrofobik bir monomer arasındaki reaksiyondan kaynaklanır.

Sürekli fazların sulu veya yağ özelliklerine göre normal emülsiyon polimerizasyonu ve ters emülsiyon polimerizasyonu olarak ikiye ayrılabilir. Bu yöntemden elde edilen partikül boyutu 10 nm ile 1000 nm arasındadır. Ayrıca emülsiyon haline getirilmiş damlacıkların boyutlarına göre makroemülsiyon, miniemülsiyon ve mikroemülsiyon polimerizasyonları olarak da sınıflandırılabilir. NanoMIP'ler farklı miniemülsiyon ve mikroemülsiyon polimerizasyonları kullanılarak başarıyla hazırlanabilmektedir [84, 85].

2.4.5. MIP Yüzey Baskılama

Yüzey moleküler baskılama, katı fazda bulunan yüzeyde meydana gelen polimerizasyon reaksiyonlarını ifade eder. Yüzey polimerizasyonu sırasında, tanıma bölgeleri katı dış tabaka veya yüzeye dağıtılır. Geleneksel moleküler baskılanmış polimerizasyon yöntemlerinin aksine daha yüksek ayırma verimliliğine ve daha hızlı bağlanma bölgelerine sahiptir. Bu işlem basit, hızlı ve kullanışlıdır. Genel olarak yüzeye baskılanmış MIP hazırlanma süreci fonksiyonel monomer ve şablon arasındaki ön kompleks, çapraz bağlama ajanı ve başlatıcıların eklenmesi, fiziksel ve kimyasal etkiler sonucu yüzeyde oluşan seçici katmanın yıkanması olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilir [86].

Yüzeyde MIP baskılanmasında polimerizasyon işleminde dış fiziksel etkilerine göre termal polimerizasyon [87, 88], fotopolimerizasyon [89] ve elektropolimerizasyon [90] olarak üç şekilde oluşturulabilmektedir.

2.4.6. MIP Formları

Moleküler baskılanmış polimer, uygulama ve polimerizasyon yöntemine göre nanosensör tasarımları için nanopartikül [91], nanoküre [92], nanotel [93, 94], nanofilm [95-97] ve nanokompozit [98] gibi farklı fiziksel formlarda sentezlenebilir.

2.5. Nanoteknoloji ve Nanosensörler

Nanoteknoloji, maddeyi yaklaşık 1-100 nm aralığında atomik ve moleküler seviyelerde kontrol etme ve yeniden yapılandırma yeteneği olan bir alandır. Tek atomlar veya moleküller ile ilişkili olarak bu ölçekte farklı özelliklerden yararlanma olarak belirtilmektedir. Amaç, küçük yapıları tasarlayarak temelde yeni özelliklere ve işlevlere sahip malzemeler, cihazlar ve sistemler oluşturmaktır [99].

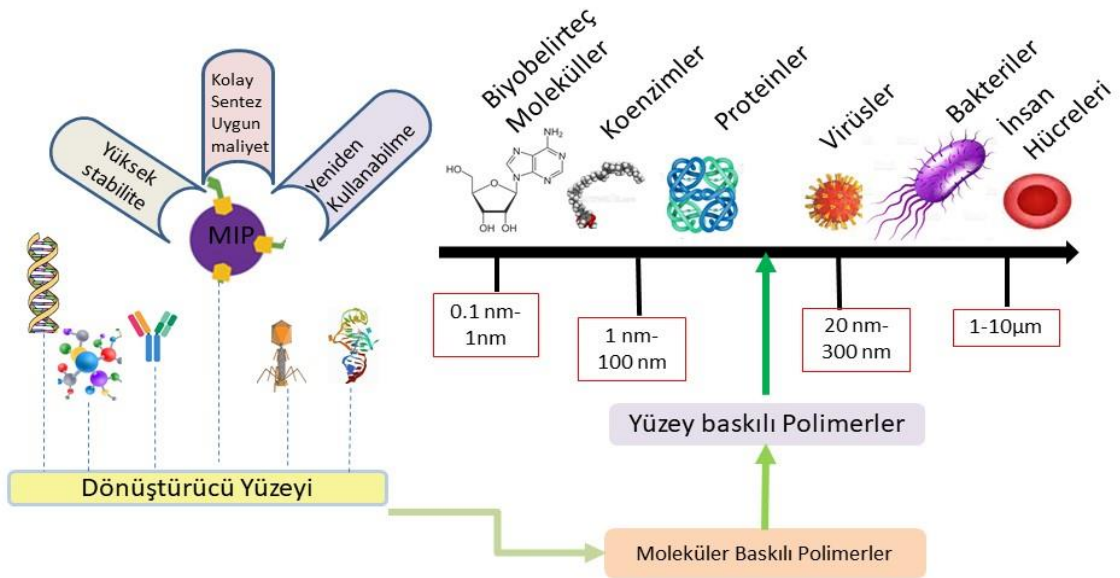
Nanoteknolojideki ilerlemeler, mükemmel hassasiyet ve çok yönlülüğe sahip nano ölçekli biyosensörlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Nanobiyosensörler aynı nanosensör konseptidir ancak herhangi bir numune türündeki kimyasal türlerin konsantrasyonu ile orantılı ölçülebilir bir sinyal üretmek için biyolojik olarak aktif bir elemente sahiptir. Biyolojik tanıma ve algılamaya dayanırlar. Bu nedenle, çoğu geleneksel algılama sistemine göre önemli ölçüde geliştirilmiş biyouyumluluk, duyarlılık ve özgüllük gösterirler [100].

Nanobiyosensörlerin amacı, belirli bir hastalıkla ilişkili herhangi bir biyokimyasal ve biyofiziksel sinyali tek bir molekül veya hücre düzeyinde tespit etmektir. Moleküler teşhisi kolaylaştırmak için çip üzerinde laboratuvar teknolojilerine entegre edilebilirler. Sensör boyutunun küçültülmesi, taşınabilir, giyilebilir ve hatta implante edilebilir tıbbi cihazlara dahil edilmek için çok yönlülük sağlar. Nano ölçekli ultrahassas biyosensörlerin diğer cihazlarla birleşik olarak çalışması, teşhis noktası açısından ve her yerde bulunan sağlık sistemleri dahil olmak üzere gelişmekte olan tıbbi alanları gelişmesini sağlamaktadır (Şekil 2.5). Yeni nesil nanobiyosensör cihazları oluşturmak için farklı stratejiler oluşturmuştur. Bunlar;

- algılama amaçları için tamamen yeni bir nanomalzeme sınıfının kullanılması,
- yeni immobilizasyon stratejileri,
- yeni nanoteknolojik yaklaşımlar olarak farklı çeşitlerde nanosensörlerin oluşturulmasına olanak sağlamıştır [101].

Nanosensörlerdeki kullanılan ve genel olarak nanoparçacıklar veya nanomalzemeler olarak bilinen bu malzemeler, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri sebebiyle özellikle medikalde tıbbi görüntülemelerde, analizlerde ve optik alanlarında geniş bir uygulama alanı bulmuştur [102].

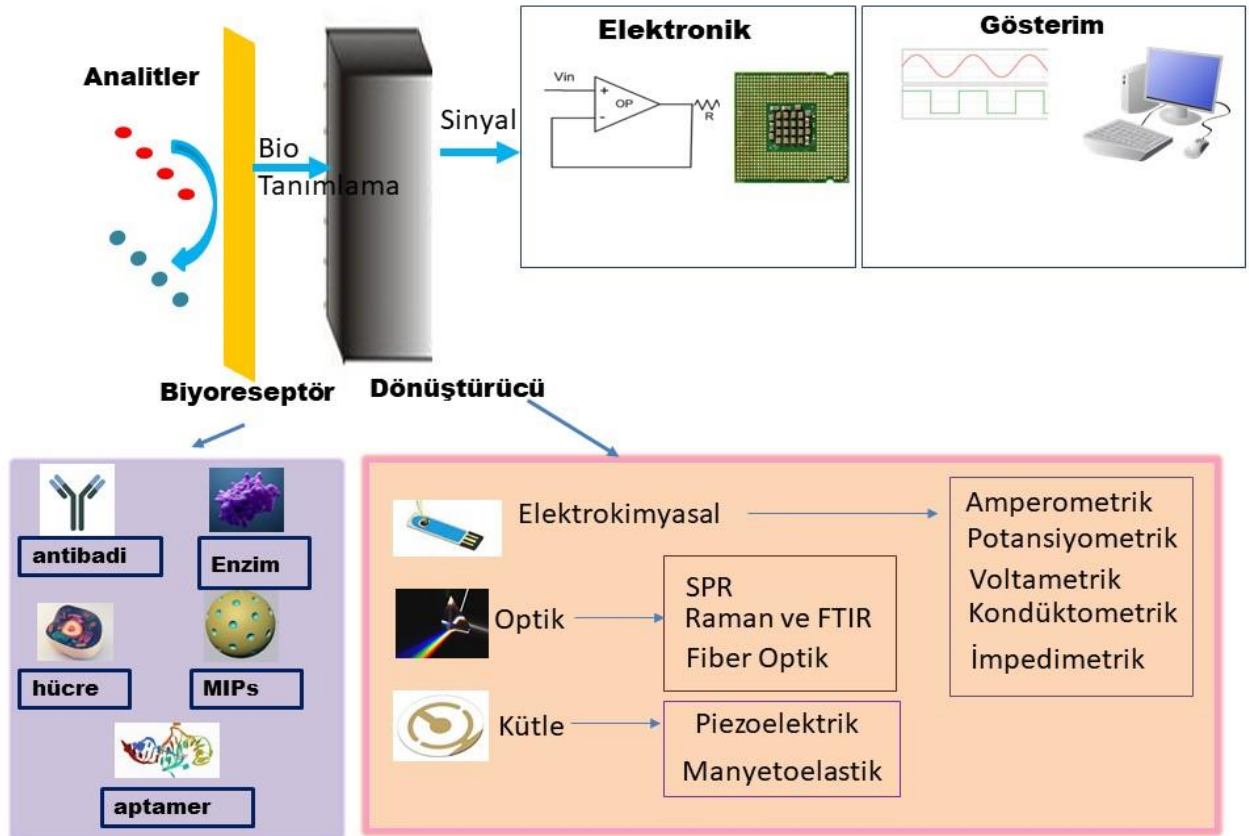
Nanosensörlerin sınıflandırılması, biyoalgılama işlemine dahil edilen nanomalzemelerin dönüştürücülerle birlikte kullanılmasına dayalı olduğu için çeşitli alanlar sunar [103].



Şekil 2.5. Yüzeyde Moleküler Baskılanmış Polimerler ve Nanoboyutlar

2.5.1. Nanobiyosensör Çeşitleri

Bir nanosensörün üç ana modülü vardır: bir dönüştürücü, bir alıcı ve dijital çıkışlı bir dedektör. Hedef molekül, reseptöre bağlanır ve biyolojik tespit bileşeni, bir reaksiyon yoluyla biyolojik bir molekülü tanımlar. Bundan sonra dönüştürücü, değişiklikleri dedektör tarafından nicelenen bir sinyale dönüştürür. Nanosensörler, uygulanabilir çalışma, olağanüstü performans, yüksek özgüllük ve hassasiyet, hızlı yanıt, yoğun boyut, taşınabilirlik ve gerçek zamanlı analiz dahil olmak üzere birçok yetenek sunar [104]. Nanobiyosensörler dönüştürücü ve biyoreseptörlerine göre iki ayrı şekilde çeşitlendirilmektedir. Dönüştürücülerine göre elektrokimyasal, optik, ve mekanik/kütle (piezosensörler) olarak 3 ana başlık altında toplanabilir [100, 105]. Biyoreseptörlerine göre ise DNA, enzim, antibadi, hücre ve nanopartiküller olarak çeşitlendirilmektedir.



Şekil 2.6. Nanosensör bileşenleri ve akışı

2.5.2.Dönüştürücülerine Göre Nanobiyosensörler

2.5.2.a.Elektrokimyasal Nanobiyosensörler

Elektrokimyasal biyosensör, biyolojik sistemden bilgi çıkarmak için temeli bir elektrotta ve elektrotta kullanılan malzemeler temel bileşenidir. Bu sensörün temeli enzim substrat reaksiyonu ve antijen-antikor etkileşimiyle sonucunda oluşan biyokimyasal olayları akım voltaj empedans gibi elektrik sinyallerine dönüştüren analitik cihazlardır. Biyoalgılama cihazları antikorlar, nükleik asitler, hücreler ve mikroorganizmalar gibi çeşitli tanıma öğelerini kullanmasına rağmen, elektrokimyasal saptama teknikleri ağırlıklı olarak enzimleri kullanır [106-108].

2.5.2.b. Piezo Nanobiyosensörler

Piezoelektrik etki, bir malzemenin mekanik olarak gerildiğinde voltaj üretme yeteneğini ifade eden fiziksel bir olgudur. Bir piezoelektrik malzemenin yüzeyine verilen voltaj, voltaj değişken olduğunda mekanik strese veya salınımlara neden olur. Piezoelektrik kristallerin bir elektrik alanının etkisi altında titreşen özelliği ve rezonans frekans değişiklikleri ile kristalin yüzeyinden adsorbe edilen moleküllerin kütlesi arasındaki ilişki, piezoelektrik biyosensörlerdeki transdüksiyon mekanizmasının temelidir. QCM, PQC, TSM, BAW ve SAW, piezo nanobiyosensörler çeşitleridir [109, 110].

2.5.2.c. Optik Nanobiyosensörler

Optik algılama, gözlenen yüzeyin optik özelliklerindeki değişime bağlıdır. Bu değişiklik, meydana gelen algılama olayının meydana gelmesi nedeniyle bir absorpsiyon, adsorpsiyon, geçirgenlik, yansıma, emisyon, saçılma ve kırılma değişikliği olarak ölçülebilir. Optik algılamayı gerçekleştirmenin çeşitli yolları olabilir [111].

Optik algılama, analitin konsantrasyonu ile orantılı bir elektrik sinyali üretmek için optik alanın bir biyolojik tanıma elemanı ile etkileşiminden yararlanarak çalışır. Sinyal, absorpsiyon, floresan, kemilüminesans, kolorimetri, interferometri veya yüzey plazmon rezonansı olabilir.

Optik biyosensörler, birçok biyolojik ve kimyasal maddenin doğrudan, gerçek zamanlı tespitine olanak sağladığından dolayı geleneksel analitik tekniklere göre büyük avantajlar sunar. Avantajları arasında yüksek özgüllük, duyarlılık, küçük boyut ve maliyet etkinliği sayılabilir. Optik biyosensör araştırma ve geliştirmesi, temel olarak sağlık [112], çevre [113], gıda [114], tarımsal [115] alanlarına yöneliktir.

Nanosensörler tarafından optik sinyal algılama, nanomalzemelerin aktif bölgelerinin ışık sinyalleriyle ayırt edici bağlantılarının bir sonucu olarak yüksek hassasiyet sağlar. Bununla birlikte hassasiyet, büyük ölçüde optik algılama moduna bağlıdır. Optik sensörler, absorpsiyon, görünür radyasyon, flüoresans, Raman, yüzey geliştirilmiş Raman saçılması (SERS), kırılma ve kalitatif analiz gibi birkaç farklı spektrografik analiz türü için kullanılır [114, 116].

Bir optik biyosensör, bir optik dönüştürücü sistemi ile entegre edilmiş bir biyo-tanıma algılama elemanı içeren kompakt bir analitik cihazdır. Bir optik sensörün temel amacı, ölçülen bir maddenin (analitin) konsantrasyonuyla orantılı bir sinyal üretmektir. Optik sensör, biyotanıma elemanları olarak enzimler, antikolar, antijenler, reseptörler, nükleik asitler, tüm hücreler ve dokular dahil olmak üzere çeşitli biyolojik malzemeleri kullanabilir [117].

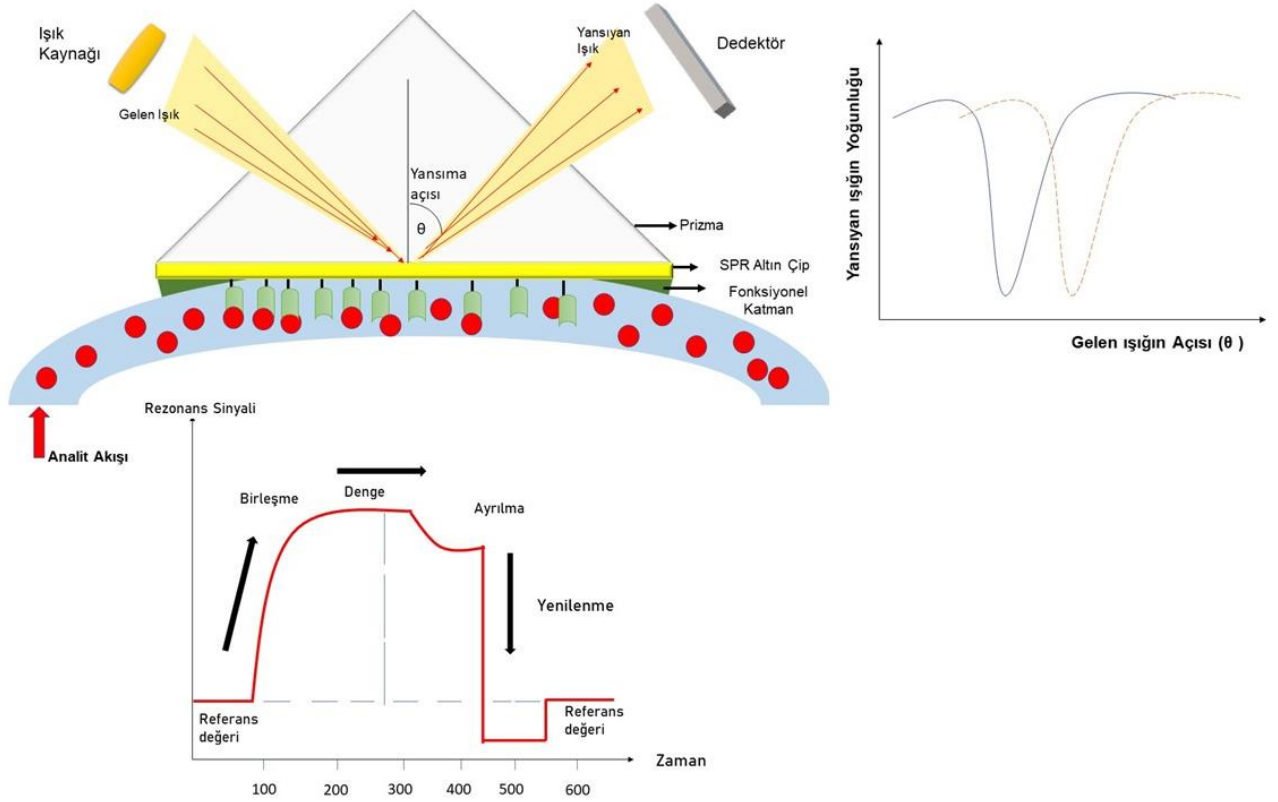
2.6.Yüzey Plasmon Rezonans Sensörler

Serbest yüklü bir metal gibi katı bir malzemenin yüzeyinde, yüzey yükü (çoğunlukla elektronlar) ışık ışıması nedeniyle toplu olarak salınır. Bu oluşuma yüzey SPR denir. SPR kaynaklı yüzey yükü salınımları, belirli koşullar altında elektromanyetik dalgalarla birleştirilir. Bu salınımların kuantumu, yüzey plazmon polariton (SPP) olarak tanımlanır ve SPP'nin uyarılması, SPR biyosensörlerinde önemli bir aşamadır. SPR, ışınlanan ışık ve alt tabaka arasındaki rezonans koşulları ile karakterize edilmektedir [118].

Biyomoleküler etkileşimlerin gerçek zamanlı araştırılmasını sağlayarak, SPR biyosensörleri moleküler biyolojide önemli bir araç haline gelmiştir. Ek olarak, SPR biyosensörlerinin, tıbbi teşhis, çevre analizleri, gıda güvenliği ve analizleri gibi birçok alanda kimyasal ve biyolojik türlerin etiketsiz hızlı tespiti için büyük bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir [119-122].

Bu ilerlemeler, yeni algılama konseptleri ve uygulamalarının kapılarını açmıştır. Plazmonik nanoyapılara dayalı optik biyosensörler, çok sayıda çalışma konusu olmuştur [123]. Işık kaynağı, tipi, spektral renk tercihi ve boyutu SPR sensör platformunun belirli bir konfigürasyonu ve algılama metalindeki yüzey plazmonunu uyarmak için için önemlidir [124]. SPR yönteminin yüksek duyarlılığı ve çok yönlülüğünün yanı sıra gerçek zamanlı okuma ve bağlanma kinetiğinin doğrudan ölçümü olasılığı nedeniyle en gelişmiş ve en çok kullanılan algılama tekniklerinden biridir.

SPR sensörleri, yüzey plazmonları olarak adlandırılan elektromanyetik dalgaların aydınlatma üzerine yayıldığı bir metal filmin yüzeyinde meydana gelen kırılma indisindeki değişiklikleri ölçer. SPR algılama aşaması genel olarak ışık kaynağından gelen ışığın yüksek kırılma indeksi olan cam prizmadan geçerek spesifik bir geliş açısıyla yüzey plazmonunun uyarılmasını sağlar. Bu dalganın altın film yüzeyindeki serbest salınan elektronlarla etkileşimi sağlandıktan sonra yansıyan ışık yoğunluğunda bir azalmaya neden olur ve yansıyan ışık dedektörde algılanır [121].



Şekil 2.7. SPR algılama ve çalışma prensibi

SPR sensörlerinin performansı, kimyasal arayüze ve biyo-işlevselleştirmenin yanı sıra cihazın optik, elektriksel ve yapısal özelliklerine büyük ölçüde bağlıdır. Bir tanıma elemanının seçimi, tespit duyarlılığı ve spesifikliği üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Etkileşime giren molekülün immobilizasyonu çok önemlidir. Sensör yüzeyindeki sağlam bir biyomolekül kaplaması stabil olmalı ve çoğu durumda tercihen yenilenebilir olmalıdır. Yüzey kaplamasının ve immobilizasyonun, tanıma elemanının biyolojik aktivitesini bozmamasını veya birleşmeye engel olmamasını sağlamak kritik öneme sahiptir ve aynı anda spesifik olmayan bağlanmayı en aza indiren güvenilir sinyalleri sağlamak için yeterli sayıda molekül yüzeyde hareketsiz hale getirilmelidir.

Ayrıca, nanoyapılara dayalı birçok tasarım, sensörlerin bazı optik ve biyolojik sınırlamalarının üstesinden gelebilmektedir [125].

2.7. MIP-SPR Sensörlerinin Medikal Uygulamaları

Biyobelirteçlerin sensör ve polimer teknolojileriyle birlikte kullanılması medikal alanındada bir çok yenilikleri beraberinde getirmiştir. Böylelikle medikal alanında biyobelirteçler ile hastalık teşhislerinin yapılmasını mümkün kılmaktadır. Çimen ve ark., moleküler baskılama teknolojisini kullanarak nörotransmitter madde olan L-fenilalainin tespiti için SPR sensörü tasarlayarak MIP polimerik filmler sensör çipinden 5.0–400.0 μM konsantrasyon aralığında kinetik analizinde tespit ve miktar belirleme limiti sırasıyla 0,0085 ve 0,0285 μM olarak elde etmiştir [126]. Topçu ve ark, kan ve idrardaki seviyelerinin insan vücudu için önemli bir bileşeni olan keratininin teşhisi için N-metakriloil-(L)-histidin metil ester fonksiyonel monomerini kullanarak keratinin baskılanmış SPR sensörü tasarlamış ve 1-100mM aralığında karakterize çalışmaları sonucunda keratinin tespit sınırı (LOD) 57.0 μM ve tayin sınırı ise 190.0 μM bulmuştur [127]. Sarıkaya ve ark., insan vücudundaki pürin metabolizmasının son ürünü olan ürik asit tespiti için UA baskılanmış poli(HEMA-MAC)- Fe^{3+} nanoparçacıklarını SPR çipi üzerine immobilizasyonu ile SPR sensörü tasarlamıştır ve çalışmada 0.5-40 mg/L konsantrasyon aralığında UA çözeltilerinde SPR sensörü için LOD değerini ve LOQ değerleri sulu çözelti için sırasıyla 0.247 ve 0.825 mg/L olarak hesaplamıştır [128]. Baldoneschi ve ark., kalp yetmezliği için çok önemli bir biyobelirteç olan Troponin I'nın erken tespiti için polinorepinefrin PNE tabanlı baskılanmış bir SPR biyosensörü geliştirmiştir [129].

3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3. 1. Kullanılan Kimyasallar

Kalıp molekül olarak adenozin, metakrilik asit (MAA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), 2,2'-azobisisobütironitril (AIBN), 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), seçicilik analizleri için guanozin, sitidin nükleozidleri,asetat tamponu, fosfat tamponu, yapay idrar için amonyum klorür (NH₄Cl), dipotasyum fosfat (K₂HPO₄), mono potasyum fosfat (KH₂PO₄), sodyum sülfat (Na₂SO₄), magnezyum sülfat (MgSO₄), kalsiyum klorür (CaCl₂), üre (CH₄N₂O), sodyum bikarbonat (NaHCO₃), sitrik asit (C₆H₈O₇), allil merkaptan Sigma (Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Yapay plazma ise Tokra (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Deneyler sırasında kullanılmış olan su saflaştırma işlemi yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ve ters osmoz Barnstead (Dubuque,IA) Ropure LP® birimi ve Barnstead D2731D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılmıştır.

3. 2. Metakrilik Asit- Adenozin Ön Polimerizasyon Kompleksi Karakterizasyonu

1.33 mg adenozin hassas terazide tartılarak 4 adet farklı molar aralıklarındaki fonksiyonel monomer ve kalıp molekül (MAA:Ado) çözeltileri hazırlanarak UV spektrofotometresi ile UV taraması yapılmış ve nanosensör çalışmaları için 267 nm dalga boyunda spektrumu alınmıştır [130].

3. 3. SPR Altın Çip Yüzeyinin Aktifleştirilmesi

SPR altın çip yüzeyi allil merkaptan (CH₂CHCH₂SH) kimyasalı yoluyla çip yüzeyinin modifikasyona aktif hale gelmesini sağlamaktadır. Bu işlemde öncelikle çip yüzeyi 10 mL asidik pirana çözeltisi (3:1 H₂SO₄:H₂O₂, v/v) ile temizlenmiş ve daha sonrasında saf etil alkol ile yıkandıktan sonra 1 saat etüvde 40°C'de kurutulması sağlanmıştır. Çip yüzeyine 10 µL allil merkaptan damlatılarak 1 gün kadar bekletilmiştir. Son olarak, tiyol (-SH) grupları ile modifiye edilmiş SPR çip yüzeyi etil alkol ile temizlenerek bağlanmayan allil gruplarından arındırılması sağlanmıştır. SPR çip yüzeyi aktif allil grupları ile modifikasyona hazır hale getirilmiştir.

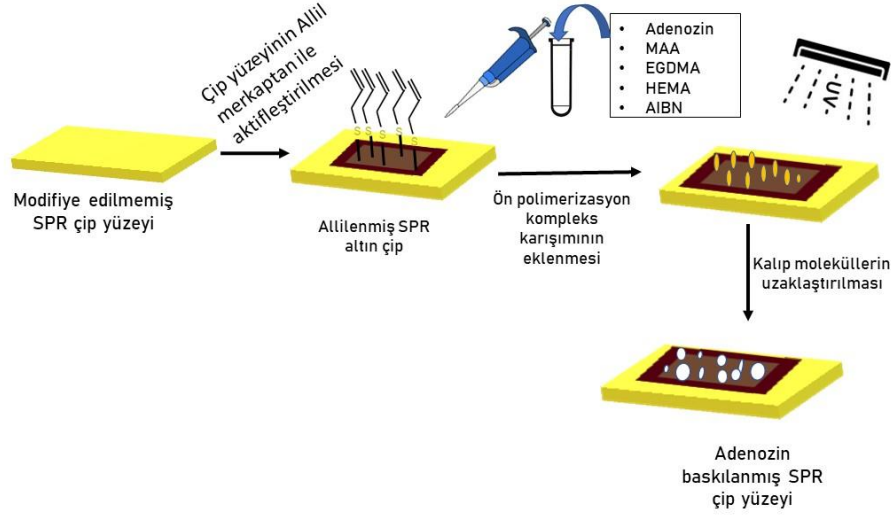
3.4. Fonksiyonel Monomer ve Kalıp Molekül ile Ön-Polimerizasyon Kompleks Oluşturma

Bu tez çalışmasında, adenozin tayini için adenozin baskılanmış ve baskılanmamış SPR temelli nanosensörler hazırlanmıştır. Kalıp molekül olarak kullanılan adenozin monomer olarak metakrilik asit (MAA) ile MAA: Ado ön polimerizasyon kompleksi oluşturulurken stokiometrik birleşme oranlarını tayin etmek için farklı molar oranlarındaki MAA: Ado kompleksleri oluşturulmuştur. Uygun polimerizasyon karışımının belirlenmesi için MAA:Ado molar oranı (1:1, 5:1, 10:1, 20:1 M) şeklinde değiştirilerek adenozin baskılanmış ve baskılanmamış polimerik film hazırlanmıştır. 10 nM adenozin sulu çözeltisi kullanılarak baskılama faktörü (IF: $\% \Delta R_{MIP} / \% \Delta R_{NIP}$) hesaplanmıştır.

3.5. Adenozin Baskılanmış ve Baskılanmamış SPR Çip Yüzey İmmobilizasyonu

HEMA: 1.2 mL, EGDMA: 56.5 μ L, AIBN: 4 mg, adenozin: 1.33 mg, MAA:548 μ L miktarlarındaki kimyasallar tartılmıştır. Adenozin ve MAA tartılarak santrifüj tüpünde vortekslenmiştir. Bu şekilde adenozin baskılanmış SPR nanosensörlerin hazırlanmasında ilk olarak MAA monomeri ile adenozin arasında ön polimerizasyon kompleksi oluşturulmuştur. HEMA ve EGDMA da santrifüj tüpünde vortekslenmekten sonra cam tüpe alınarak karıştırılmıştır. Öncelikle ön polimerizasyon kompleksi ile homojen karışımı sağlanmıştır. AIBN başlatıcısı eklenerek vortekslenmiş ve allillenmiş SPR çip yüzeyine pastör pipet ile 4 μ L polimer karışımından çip üzerine damlatılmıştır. Döndürerek kaplama cihazı (Spin Coater, LAURELL, WS 650Mz-23NPP, USA) ile polimer karışımı çip yüzeyine homojen olarak dağılımı sağlanmıştır. SPR çip yüzeyi UV ışığı ile 30 dakika bekletilerek polimer karışımının fotopolimerizasyon ile polimerleşmesi sağlanmıştır [131] (Şekil 3.1).

MAA monomeri ile adenozin arasında ikincil kuvvetlerden kaynaklı bir etkileşim mevcuttur. Bu etkileşimi kırabilecek bir desorpsiyon ajanı seçilmiştir. Adenozin baskılanmış SPR çip desorpsiyon çözeltisi ile çalkamalı inkübatörde oda sıcaklığında 200 rpm'de 2 saat çalkalanmıştır. Desorbe edilen SPR nanosensör, deiyonize su ile yıkandıktan sonra vakumlu etüvde (200 mmHg, 25°C) kuruması sağlanmıştır. Adenozin baskılanmamış SPR çipler (NIP) de aynı prosedür kullanılarak hazırlanmıştır. Sadece kalıp molekül adenozin eklenmeden polimer karışımı sentezlenmiş ve NIP nanosensör hazırlanmıştır.



Şekil 3.1. SPR çip yüzeyine Adenozin baskılanmış nanofilmin oluşturulması

3.6. SPR Çip Yüzeylerinin Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.1. Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)

SPR sensör altın çip yüzeylerin karakterizasyonu atomik kuvvet mikroskopunda (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) yarı temas modunda kullanılarak elde edilmiştir [132].

AFM cihazı, serbest kantileverlı interferometre özelliği sayesinde çok yüksek çözünürlüklerde (4096 x 4096 piksel) ölçüm alabilmektedir. SPR sensörü görüntüleme çalışmaları hava ortamında gerçekleştirilmiştir. Adenozin baskılanmış ve adenozin baskılanmamış SPR sensör çipleri çift yüzlü karbon bant ile tutucuya yerleştirilerek salınım rezonans frekansı (341.30 kHz) olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği, 1 VRMS ve boş titreşim genliği 2 VRMS'dir ve örnekler 2 $\mu\text{m/s}$ tarama hızı ve 256 x 256 piksel çözünürlükte, 1 x 1 μm^2 lik bir alanın görüntüsü olarak alınmıştır.

3.6.2. Elipsometre

Elipsometre, çip yüzeyini kaplayan nanofilmin kalınlığını ölçmek için kullanılan bir alettir. Prensibi olarak, ışığın farklı yüzeylerdeki yansıması veya iletilmesi arasındaki değişikliklerin ölçülmesine dayanır.

Adenozin baskılanmış ve baskılanmamış SPR çip yüzeylerindeki polimer kalınlığı EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazında ölçülmüştür. Ölçümler 532 nm dalga boyu ve 62°'lik bir geliş açısıyla gerçekleştirilmiştir. SPR çip yüzeylerinin 6 farklı noktasında 3 kere tekrarlanmıştır. Sonuçlar, alınan değerlerin ortalamasıyla rapor edilmiştir [131].

3.6.3.Yüzey Temas Açısı Ölçümleri

Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, adenozin baskılanmış ve baskılanmamış SPR çip yüzeylerinin karakterizasyonu Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı ile hesaplanmıştır [133].

İlk olarak, SPR altın çiplerin yüzeylerinde farklı bölgeler belirlenerek su damlatılmış ve fotoğrafları çekilmiştir. Alınan her görüntü için ayrı temas açısı belirlenmiştir. Temas açısı değerleri, damlacığın sol ve sağ temas noktası olmak üzere alınan her iki bölgenin ortalaması alınarak, temas açılarının ortalama değerleri elde edilmiştir. Adenozin baskılanmış altın çip yüzeyleri ve adenozin baskılanmamış altın çip yüzeyindeki temas açısı değerleri, her biri için alınmış 10 ölçümün ortalama değerlerinin alınmasıyla hesaplanmıştır.

3.7. Adenozin Baskılanmış SPR Nanosensörlerin Kinetik Analizleri

Adenozin baskılanmış SPR nanosensörü hazırlanıp karakterizasyon çalışmalarının ardından kinetik çalışmalar yapılmıştır. Bu aşamada, farklı derişimlerde hazırlanan adenozin çözeltileri ile kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2'de GenOptics SPRiLab sistemi gösterilmektedir. GenOptics SPRiLab, lazer kaynağı, ayna sistemi, CCD kamera sistemi, peristaltik pompa ve bilgisayardan oluşmaktadır.

Çip yüzeyinde adenozin baskılanmasıyla modifikasyonu sağlanarak nanofilm üzerinde tanıma bölgeleri oluşturulmuş ve SPR sensör cihazı kinetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 3.2. GenOptics SPRiLab sistemi

3.7.1. pH Taraması

Kinetik analizlerinin uygun pH aralığının bulunması için farklı asetat ve fosfat tamponları hazırlanmıştır. 0.1 M'lık pH 4.0 ve pH 5.0 aralıklarındaki kinetik çalışmalar için asetat tamponu ve pH 6.0, pH 7.4, pH 8.0 aralıklarındaki kinetik çalışmalar için ise 0.1 M'lık fosfat tamponları kullanılarak 10 nM derişiminde adenozin çözeltisi hazırlanarak kinetik analizler gerçekleştirilmiştir.

3.7.2. Derişim Taraması

Kinetik analizlere başlamadan önce deneysel yöntemde öncelikle SPR çip yüzeyi deiyonize sudan (10 mL) geçirilmiştir. Adenozin baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) nanosensörler hazırlanmıştır. Sistemden pH 7.4 fosfat tamponu geçerken plazmon eğrisi ve rezonans kırılma açısı ($\% \Delta R$) alınmıştır. SPR view yazılımının kinetik görüntüleme programı açılarak SPR sisteminden dengeleme tamponu olarak pH 7.4 fosfat tamponu verilmesine başlanmış ve 3 dakika boyunca dengeleme işlemine devam edilmiştir. Bu aşamanın ardından, pH 7.4 fosfat tamponuyla 0.5 - 400 nM derişim aralığında adenozin çözeltileri hazırlanarak (2 mL/dakika akış hızı) SPR sistemine 8 dakika boyunca verilmiştir. Rezonans frekansında oluşan kayma değerleri anlık olarak takip edilmiş ve denge durumuna ulaştığında 0.1 M NaCl çözeltisi desorpsiyon aşaması için sistemden 3 dakika boyunca geçirilmiştir. Tampon ve desorpsiyon çözeltileri her bir derişim analizinde ayrı şekilde sistemden geçirilmiştir. SPR sensorgramlar alınmış ve $\% \Delta R$ değerleri belirlenmiştir.

3.7.3. Yapay Plazma ve Yapay İdrar Adenozin Teşhisi

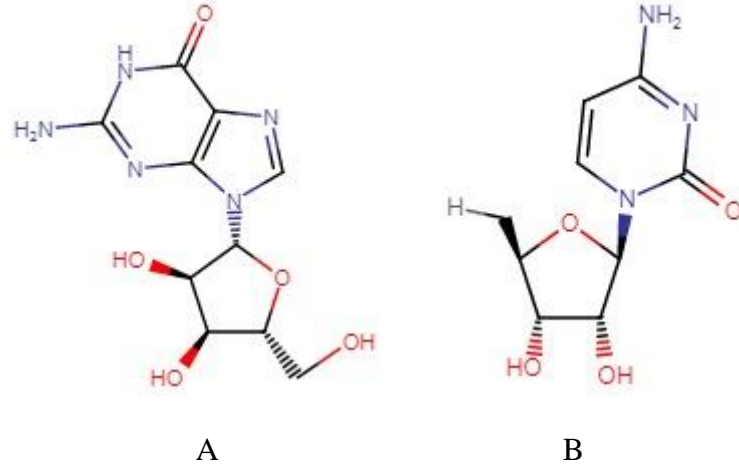
Yapay plazma analitik analizler için hazır olarak temin edilmiştir. Yapay idrar 6.0'da 2.0 mM sitrik asit, 25 mM NaHCO₃, 170 mM üre, 2.5 mM CaCl₂, 90 mM NaCl, 2.0 mM MgSO₄, 10mM Na₂SO₄, 7 mM KH₂PO₄, 7 mM K₂H PO₄ ve 25 mM NH₄Cl saf su içinde çözünerek pH 6.0'a ayarlanmıştır [134]. Yapay plazmada seyreltilme işlemi yapılmış ve hazırlanan 1 nM ve 5 nM derişimlerindeki adenozin çözeltisi eklenmiştir. Yapay idrar ise hazırlandıktan sonra seyreltilmeden 1 nM ve 5 nM derişimlerinde hazırlanmış adenozin çözeltileri eklenmiştir. SPR cihazında adenozin tayini yapılırken öncelikle pH 7.4 fosfat tamponu geçirilmiştir ardından hazırlanan çözeltiler sistemden geçtikten sonra 0.1 M NaCl çözeltisi geçirilerek desorpsiyon işlemi tamamlanmıştır.

3.7.3. Tekrar Kullanılabilirlik

Adenozin baskılanmış SPR nanosensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek için 50 nM pH 7.4 tampon çözeltisiyle hazırlanmış Adenozin çözeltisi aynı günler içerisinde tekrarlı olarak 5 kez okutulmuştur. Nanosensörlerin raf ömürlerinin belirlenmesi amacıyla farklı günlerde tekrar kullanılabilirlik analizi yapılmıştır. 1. gün 4, 2. gün 5 kez olmak üzere farklı zaman aralıklarında 50 nM adenozin çözeltileri (10 mL, 2.0 mL/dak., 25°C) kinetik analizler gerçekleştirilmiştir.

3.7.4. Seçicilik Testleri

Adenozin baskılanmış SPR nanosensör seçiciliğini belirlemek için adenozin baskılanmamış nanosensörler hazırlanmıştır. Bu aşama için Ado (Molekül ağırlığı: 267.24 g/mol), Guo (Molekül ağırlığı:283.241 g/mol) ve Cyd (Molekül ağırlığı:243.217 g/mol) nükleozidleri kullanılarak kinetik analizler yapılmıştır (Şekil 3.3). İlk olarak sistemden 50 nM adenozin çözeltisi (10 mL, 2.0 mL/dak., 25°C) SPR sisteminden geçirilmiş ardından Ado ve Guo (1:1) çözeltilerinden alınarak çözelti sistemden geçirilmiştir. Son olarak Ado: Guo: Cyd (1:1:1) şeklinde hazırlanarak 50 nM'lık bir çözelti elde edilerek seçicilik kinetik analizleri tamamlanmıştır.



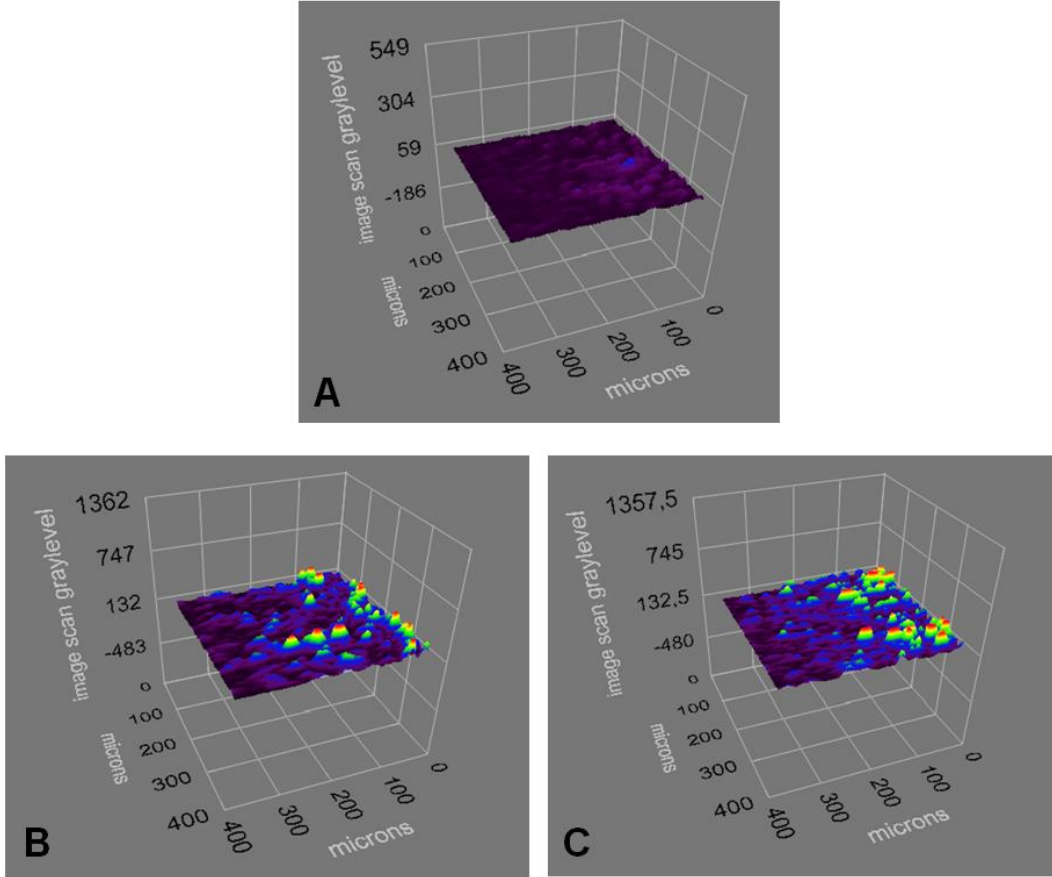
Şekil 3.3. Seçicilik analizleri için kullanılan Guo(A) ve Cyd(B) nükleozidlerinin molekül yapısı.

4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Karakterizasyon Çalışmaları

4.1.1. Elipsometre

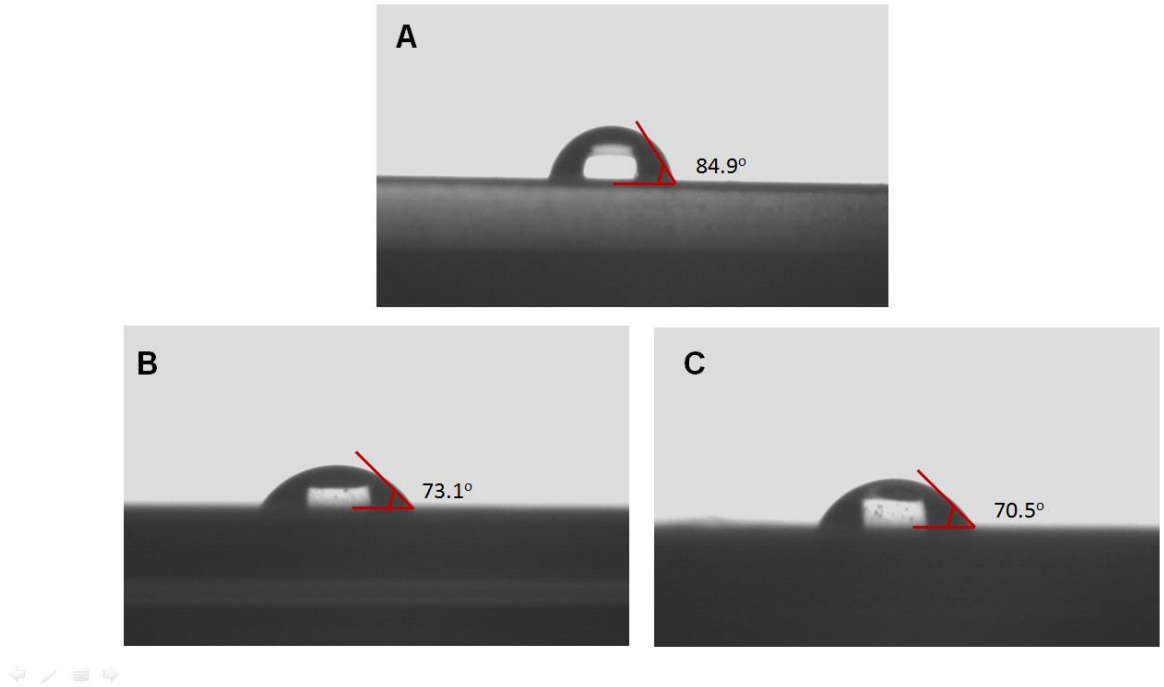
Elipsometre, bilinen bir polarizasyon durumunda bir ışık huzmesi oluşturmayı ve bunu düzlemsel bir yüzeye sahip bir numuneden yansıtmayı içeren bir optik ölçüm tekniğidir. Çok ince filmlerin veya malzemelerin katmanlarının kalınlığını ve optik özelliklerini ölçmek için optik bir tekniktir. Adenozin baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensörlerin yüzey kalınlıklarının ölçümleri elipsometre cihazı ile elde edilmiştir. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR nanosensörünün ortalama kalınlığı 64.4 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.1.A). Adenozin baskılanmış SPR çipinin ortalama kalınlığı 119.2 nm (Şekil 4.1.B), baskılanmamış SPR çipinin ortalama kalınlığı 115 nm (Şekil 4.1.C) olarak ölçülmüştür.



Şekil. 4.1. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş (A), adenozin baskılanmış (B) ve baskılanmamış (C) SPR nanosensörlerin elipsometrik ölçümünde alınmış olan 3 boyutlu görüntüleri

4.1.2. Yüzey Temas Açısı Ölçümleri

Temas açısı, polimer membran yüzeyinin hidrofilitik özelliğini belirlemek için önemli bir parametredir. Temas açısı, yüzeylerdeki kaplamalarda hidrofobik veya hidrofilitik etkileşim değerlendirilmeleri için gereklidir. Modifiye edilmemiş SPR nanosensör çipi, adenozin baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensör çip yüzey karakterizasyonu Krüss DSA100 temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmemiş altın yüzeyinin, adenozin baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensörlerin yüzey temas açısı değerleri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Şekil 4.2.A’da modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, Şekil 4.2.B’de adenozin baskılanmış (MIP) SPR çip yüzeyi ve Şekil 4.2.C’de adenozin baskılanmamış (NIP) SPR çip yüzeyinin temas açısı görüntüleri verilmiştir. Modifikasyon yapılmamış SPR çipinin altın yüzeyinin temas açısı değeri 84.9° iken, adenozin baskılanmış çip de temas açısı 73.1° ’ye düşmüştür. Adenozin baskılanmamış NIP çipin temas açısı değeri ise 70.5° olarak belirlenmiştir. SPR yüzeylerinin hidrofilitikliğinin artmasına bağlı olarak yüzey temas açılarında azalma gözlemlenmiştir. MAA monomerinin hidrofilitik fonksiyonel grupları nedeniyle yüzeyin hidrofilitik karakterinin artması beklenmektedir [135].



Şekil 4.2. Modifiye edilmemiş SPR altın çip yüzeyi (A), adenozin baskılanmış (B) ve baskılanmamış SPR (C) çiplerin yüzey temas açısı fotoğrafları

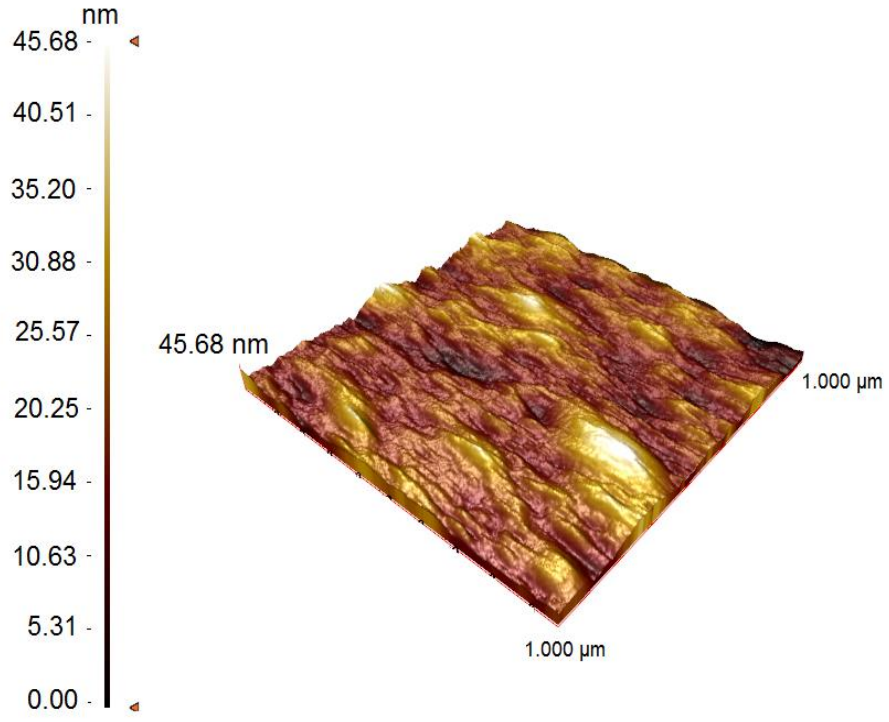
Çizelge 4.1. Yüzey temas açılarının çiplere yüzeylerinde oluşturduğu temas açısı

Yüzey Çeşidi	Temas Açısı
Modifiye edilmemiş SPR altın çip yüzeyi	89.9°
Adenozin Baskılanmış SPR çip yüzeyi	73.1°
Adenozin Baskılanmamış SPR çip yüzeyi	70.5°

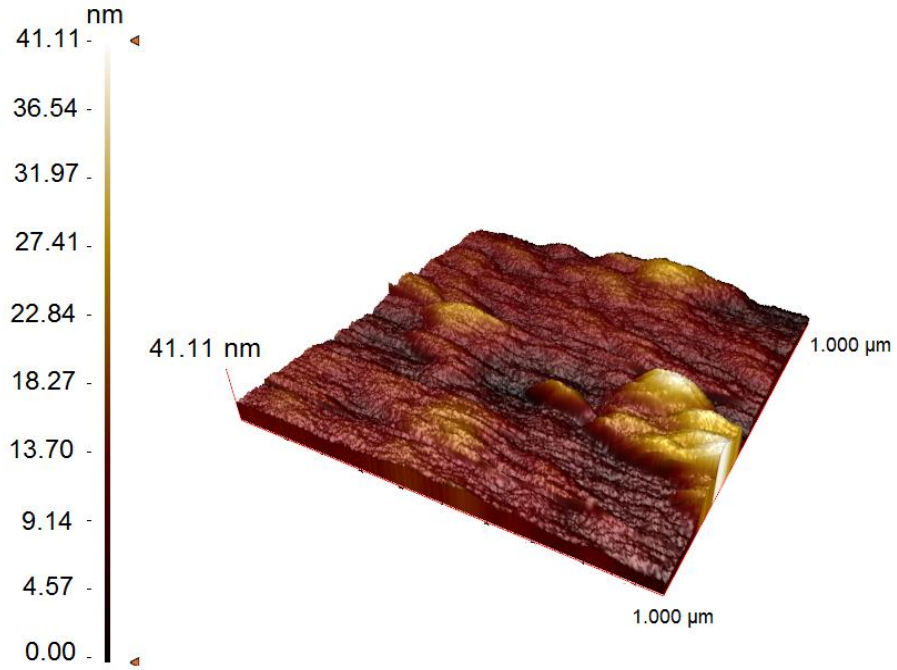
4.1.3. Atomik Kuvvet Mikroskopisi

AFM, polimerler, seramikler, kompozitler, cam ve biyolojik örnekler dahil olmak üzere hemen hemen her tür yüzeyi görüntüleyebilen bir tekniktir. Yapışma kuvveti, manyetik kuvvetler ve mekanik özellikler dahil olmak üzere birçok kuvveti ölçmek ve niteliğini belirlemek için kullanılmaktadır. AFM gerçek bir üç boyutlu yüzey profili sağlar. AFM tarafından görüntülenen numuneler, numuneyi geri döndürülemez şekilde değiştirecek veya numuneye zarar verecek hiçbir özel işlem gerektirmemektedir.

Çip yüzey karakterizasyonunun AFM görüntüleme aşamasında adenozin baskılanmış ve baskılanmamış SPR çip yüzeylerinin morfolojisini yarı temas modunda elde edilmiştir. AFM görüntüleme sonuçlarında adenozin baskılanmış SPR çip yüzey pürüzlülüğü 45.68 nm (Şekil 4.3) iken, adenozin baskılanmamış SPR çip yüzeyi (Şekil 4.4) ise yüzey pürüzlülüğü 41.11 nm olarak belirlenmiştir. Böylelikle adenozin baskılanmış ve baskılanmamış nanofilmlerin SPR altın yüzeyinde modifikasyonun oluşturulduğu görülmüştür.



Şekil 4.3. Adenozin Baskılanmış SPR çip yüzeyinin yarı temas modunda alınan AFM 3B görüntüsü ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$)



Şekil 4.4. Adenozin baskılanmamış SPR çip yüzeylerin yarı temas modunda alınan AFM 3B görüntüsü ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$).

4.2. Adenozin Tayini İçin Kinetik Analizler

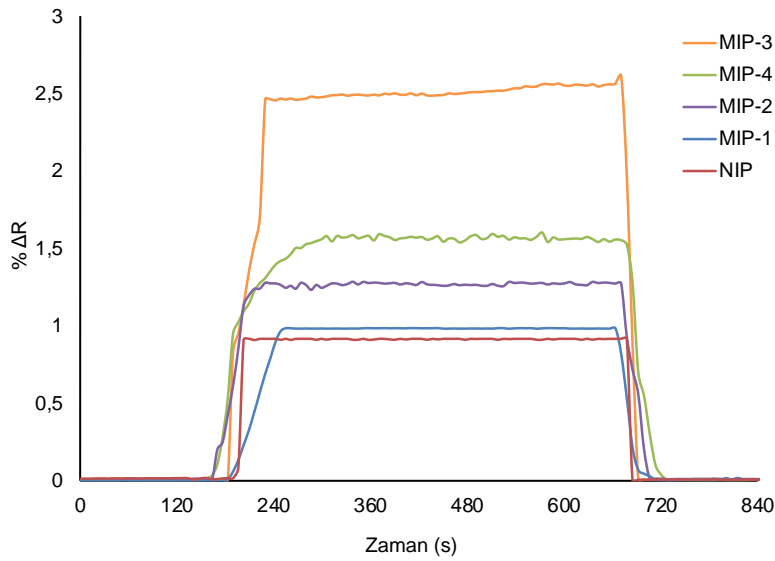
4.2.1. MAA:Adenozin Ön Polimerizasyon Kompleks Oranının Optimizasyonu

MAA:Adenozin ön polimerizasyon kompleksi, kalıp molekül olarak adenozin fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA) monomeri kullanılarak hazırlanmıştır. MAA:Adenozin ön polimerizasyon kompleksini oluşturmadan stokiometrik birleşme oranlarını tayin etmek amacıyla farklı molar oranlarında MAA:Ado (1:1, 5:1, 10:1, 20:1 M) kompleksleri hazırlanmıştır.

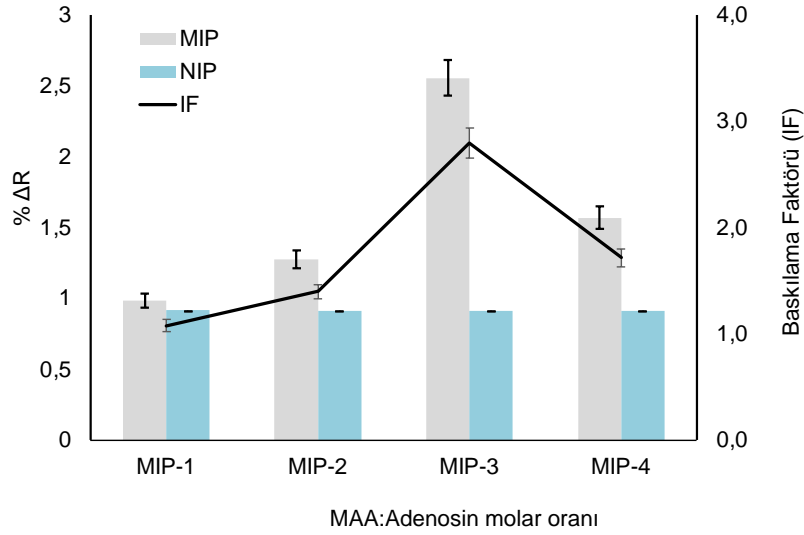
Kalıp molekül adenozin oranı sabit tutulup monomer MAA miktarı değiştirilerek hazırlanan adenozin baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR çipler hazırlanmıştır. 10 nM adenozin sulu çözeltisi ile SPR sensorgramları alınarak % ΔR değerleri belirlenmiş ve şekil 4.5A'de verilmiştir.

Analiz sonuçlarıyla kalıp molekül:monomer oranı 10:1 olarak çalışmalara devam edilmiştir. Şekil 4.5B' de bu oranlar (MIP-1; 1:1, MIP-2; 5:1, MIP-3; 10:1, MIP-4; 20:1) olarak görülmektedir.

A



B

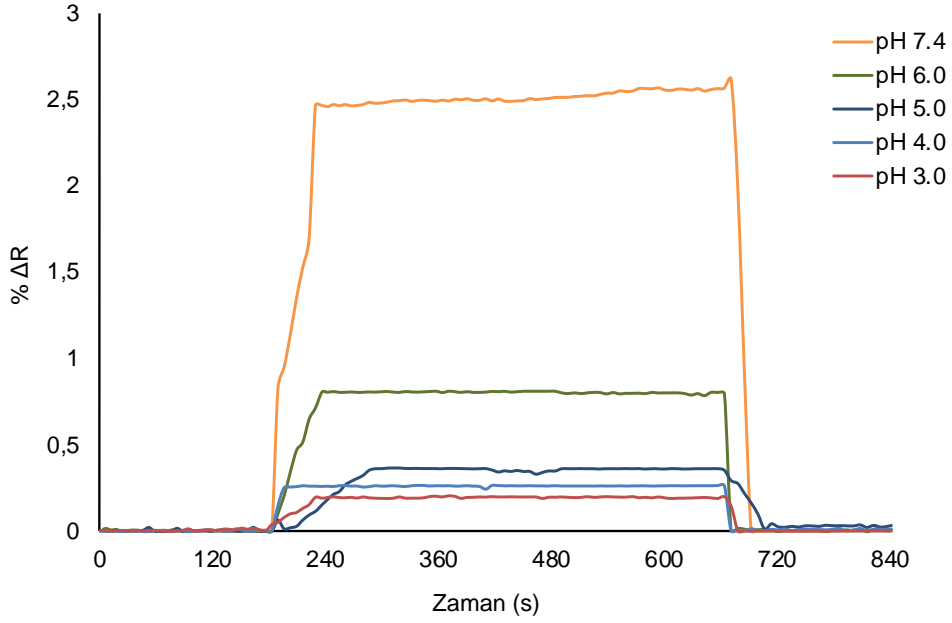


Şekil 4.5. Farklı molar oranlarında MAA:Adenosin içeren polimerizasyon karışımları ile hazırlanan adenosin baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR nanosensörlerden elde edilen sensorgramlar (A) ve $IF: \% \Delta R_{MIP} / \% \Delta R_{NIP}$ değerleri (B).

4.2.2. Optimum pH Değerinin Bulunması

Adenosin baskılanmış SPR nanosensörlerin çalışmasında uygun çalışma etkinliğini belirlemek için farklı pH aralıklarında (pH 3.0-7.4) kinetik analizler yapılmıştır (Şekil 4.6). pH çalışmaları farklı asetat tamponu ve fosfat tamponlarında 10 nM derişiminde adenosin sulu çözeltileri hazırlanmış ve kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Kinetik analiz için SPR sisteme çalışılacak tampon çözeltisi 3 dakika boyunca 2mL/dakika akış hızında verilmiş ve SPR çip yüzeyinin dengeye gelmesi sağlanmıştır. Bütün kinetik analiz çalışmalarında kinetik görüntüleme için SPRview yazılımı kullanılmıştır.

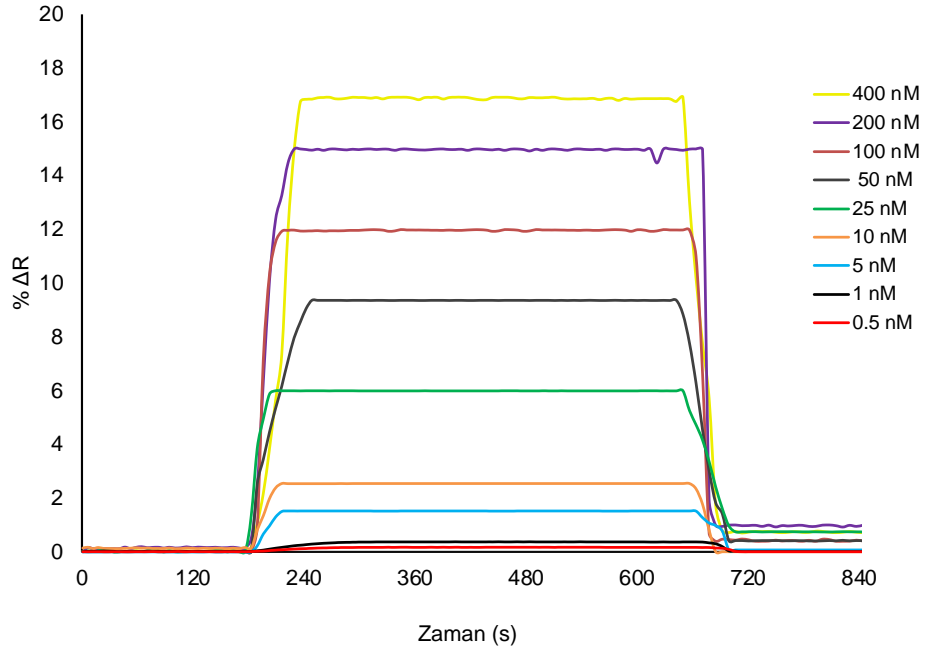
Sistem dengeye geldikten sonra hazırlanan adenosin sulu çözeltisi sisteme 8 dakika boyunca 2 mL/dakika akış hızında verilmiştir. Sistem dengeye geldikten sonra 0.1 M NaCl çözeltisi ile 3 dakika boyunca 2 mL/dakika akış hızında desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Her kinetik analiz için toplam analiz süresi 14 dakikadır. Adenosin baskılanmış SPR nanosensörle en yüksek kırılma indisi ile SPR sensorgramlardan alınan çalışma sonuçlarına göre pH 7.4 fosfat tamponunda elde edilmiş ve çalışmaların devamında pH 7.4 fosfat tamponu ile devam edilmiştir.



Şekil 4.6. Adenozin SPR nanosensörde etkin pH aralığı çalışması

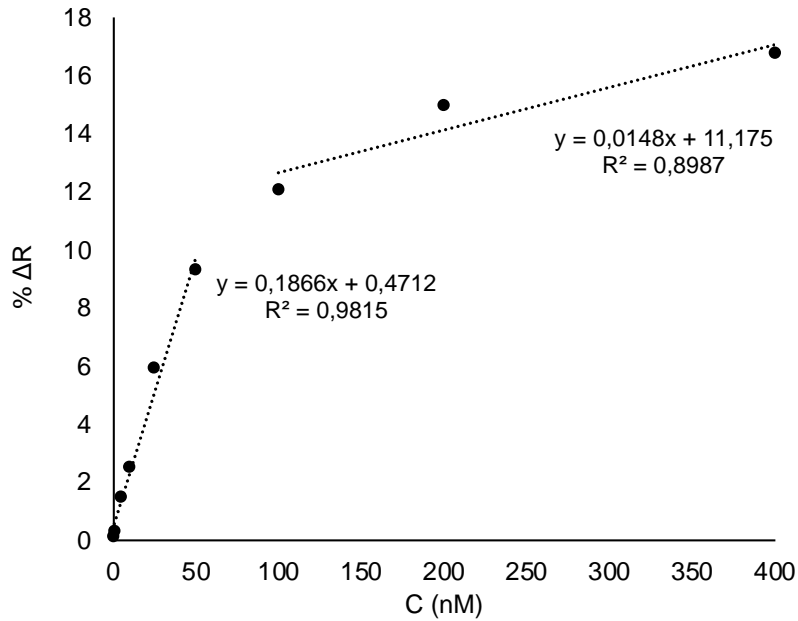
4.2.3. Adenozin Baskılanmış Nanosensör ile Kinetik Analizler

Bu tez çalışmasında, adenozin baskılanmış ve baskılanmamış nanofilm temelli SPR nanosensörler hazırlanmıştır. SPR sinyali ile adenozin derişimlerinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde (0.5- 400 nM) adenozin sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Adenozin çözeltileri SPR cihazından alınan prizma ışınının yansımaları ve etki sonuçlarında SPR view yazılımıyla veriler hesaplanmıştır. Farklı derişimlerde hazırlanan adenozin sulu çözeltilerinden elde edilen sensorgramlar şekil 4.7’de verilmiştir. Ayrıca farklı derişimlerde uygulanan adenozin çözeltilerinin nanosensörlerde % kırılma indisi- zaman grafikleri görülmektedir. Nanosensör çipi yüzeyine adenozin çözeltisi uygulanmasıyla % kırılma indisinde artış görülmektedir. SPR sisteminde adenozin çözeltisini sistemden geçirmeden önce denge çözeltisi olan pH 7.4 fosfat tamponu geçirilerek 3 dakika boyunca SPR sisteminin dengeye getirilmesi sağlanmıştır. SPR sisteminin dengeye gelmesinin ardından adenozin çözeltisi 8 dakika boyunca sistemden geçirilerek farklı derişimler için sensorgramlar elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra sisteme 0.1 M NaCl desorpsiyon çözeltisi 3 dakika boyunca verilerek işlemler farklı derişimlerde devam etmiştir. Analizlerin yerinde ve doğru bir sonuç vermesi ve sistem dengesi için bir analiz döngü süresi 14 dakika içerisinde yapılmıştır.



Şekil 4.7. Adenosin çözeltisi ile adenosin baskılanmış SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgram grafiği (0.5-400 nM).

Şekil 4.7’de 0.5nM-400 nM adenosin derişim aralığında SPR nanosensör kinetik analizlerinden elde edilen sensorgram grafiğindeki sonuçlarda 400 nM’ da yüksek kırılma indisi verdiği derişim düştükçe grafiklerdeki kırılma indisinde azalma olduğu görülmektedir.



Şekil 4.8. 0.5- 50 nM ve 100- 400 nM aralığında Adenosin derişimi ile %ΔR arasındaki ilişki

Şekil 4.8'deki grafikte görüldüğü üzere derişim miktarı arttıkça % ΔR değeri gitgide artmaktadır. SPR nanosensörler için farklı adenozin derişim aralıklarında derişim-sinyal linerliği aynı grafikte verilmiştir. 0.5-50 nM adenozin derişim aralığındaki verilere bakıldığında elde edilen derişim- ΔR grafiklerinden $y=0.1866x+0.4712$ denklemiyle elde edilmiştir. Doğrusallık katsayısı hesaplandığında (R^2) 0.9815 olarak elde edilmiş ve buradan yola çıkarak tasarlanan nanosensörün %98 doğrulukta ölçüm yaptığı ve 100-400 nM da ise $y=0.0148x+11.175$ denklemi elde edilerek R^2 değerinin 0,8987 olduğu ve yaklaşık %90 doğrulukta ölçüm yaptığı görülmüştür. Aynı şekilde elde edilen verilerden yola çıkarak adenozin baskılanmış SPR nanosensörlerin kinetik analizlerinden tespit sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırı (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Tespit sınırının (LOD) hesaplanması için $3s/m$ denklemi ve miktar tayin sınırının (LOQ) hesaplanması için ise $10s/m$ denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır. Bu denklemlerde, s değeri denge çözeltisi (kör çözelti) nanosensör yüzeyinden geçerken alınan sinyal değeridir. (ΔR) ölçümlere ait standart sapma değeri ve m değeri ise kalibrasyon grafiğinde oluşan eğimi ifade etmektedir.

Denge çözeltisi için (ΔR) değeri 10 ölçümün ortalaması alınmıştır. Ölçümlere ait standart sapma değeri ile birlikte SPR nanosensörler için 0.0011 olarak belirlenmiştir. Böylelikle kalibrasyon grafiğine ait $y=0.1866x+0.4712$ denklemiyle tespit sınırı (LOD) 0.018 nM ve miktar tayin sınırı (LOQ) 0,061 nM olarak hesaplanmıştır [131].

4.2.4. Kinetik Hız Sabitlerinin Belirlenmesinde Denge Analizleri ve Bağlanma Kinetiği Yaklaşımları

Serbest analitin derişiminin akış hücresinde sabit kaldığı birinci derece koşulları altında bağlanması şu şekilde ifade edilmektedir:

$$d\Delta R /dt = k_a C (\Delta R_{maks} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad \text{(Eşitlik 4.1)}$$

Eşitlik 4.1'de, $d\Delta R/dt$, SPR sinyalindeki değişim hızı; R ve R_{maks} , bağlanma ile ölçülen maksimum sinyal; C , analit derişimi ($\mu g/mL$); k_a = bağlanma hız sabiti ($mL /\mu g.s$) ve k_d , ayrılma hız sabiti ($1/s$)'dir.

Bağlanma sabiti K_A (mL/ μ g), k_a ve k_d sabitlerinin oranıyla hesaplanmaktadır

$$K_A = k_a / k_d \quad (\text{Eşitlik 4.2})$$

Denge durumundayken, $d\Delta R/dt=0$ alır ve Eşitlik 4.2 ile birlikte Eşitlik 4.1 basitleştirilirse,

$$\Delta R_{\text{denge}} / C = K_A \Delta R_{\text{maks}} - K_A \Delta R_{\text{denge}} \quad (\text{Eşitlik 4.3})$$

Eşitlik 4.3'de bağlanma sabiti K_A 'ya bağlı bir denklem elde edilmiş olur böylelikle K_A , $\Delta R_{\text{denge}} / C$ 'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinden hesaplanır.

Ayrılma sabiti K_D ise $1/K_A$ eşitliği ile hesaplanabilir. Eşitlik 4.3 ve Eşitlik 4.2'den yola çıkarak K_D yerine k_d/k_a yazılarak tekrar düzenlenirse;

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{\text{maks}} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (\text{Eşitlik 4.4})$$

eşitliği elde edilmektedir.

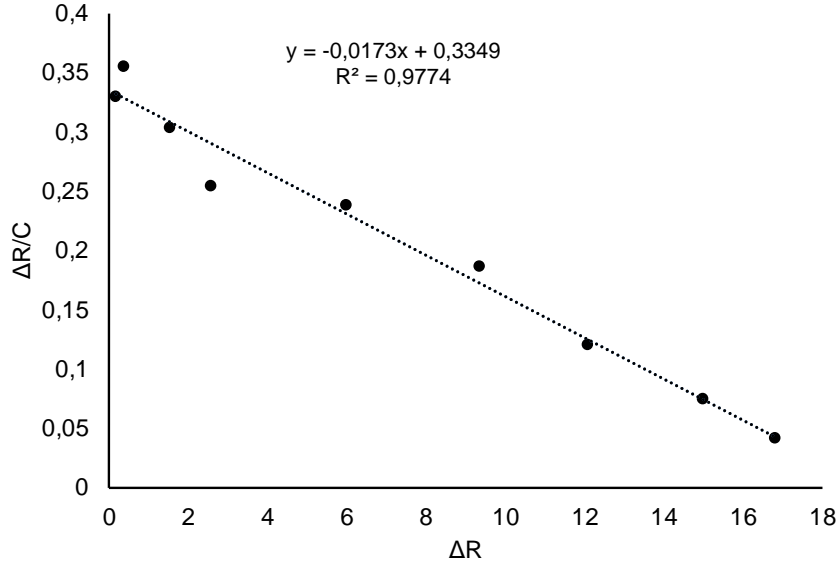
Buradan, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiğinin, eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bir doğru verdiği görülmektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusallık sağladığından dolayı kantitatif derişim belirlenirken kullanılmaktadır. Eğer R_{maks} değeri biliniyorsa, tek bir sensorgram ile k_a ve k_d değerleri bulunabilir fakat yüzey doyunluğu için yüksek konsantrasyonlar gerektiğinden deneysel olarak R_{maks} 'ın belirlenmesi zor olmaktadır. Burada, farklı analit konsantrasyonlarında bağlanma sensorgramlarının alınması tercih edilen bir yaklaşımdır. $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleriyle ilişkili olan bir eğim değerini (S) vermektedir:

$$S = k_a C + k_d \quad (\text{Eşitlik 4.5})$$

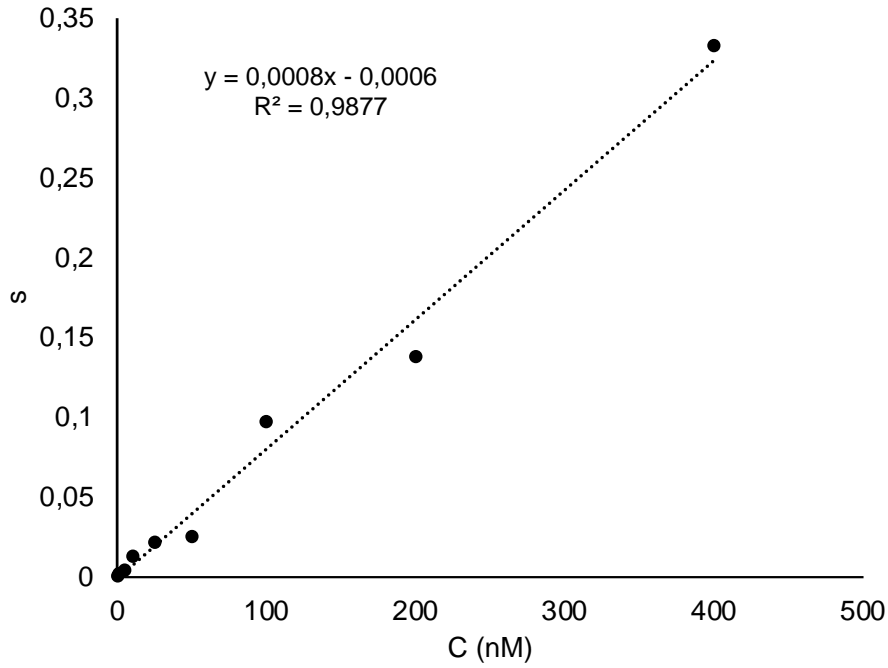
S'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası k_d değerini verir. Bu yaklaşım, k_d 'nin hesaplanması için her zaman kesin ve doğru sonuçlar vermeyebilir. Bu sebeple ayrışma kinetiğinin incelenmesi gerekir.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (\text{Eşitlik 4.6})$$

Burada; ΔR_0 ve ΔR_t , ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir.



Şekil 4.9. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesinde Denge Analiz yaklaşımı grafiği



Şekil 4.10. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesinde Bağlanma Kinetik yaklaşımı grafiği

Yukarıdaki Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'daki grafikler ve analiz yaklaşımlarında kullanılan formüller aracılığıyla Kinetik Hız sabitlerindeki değerler hesaplanmıştır. Bulunan değerler Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri

Denge Analizi (Scatchard)	Bağlanma Kinetik Analizi
ΔR_{maks} : 19.358	k_a , (nM.s): 0.0008
K_A , (nM): 0.0173	k_d , (1/s): 0.0006
K_D , (1/nM): 57.803	K_A , (nM): 1.333
R^2 : 0.9774	K_D , (1/nM): 0.75
	R^2 : 0.9877

4.2.5. Denge İzotermi

İzoterm modelleri, hem heterojen hem de homojen bağlanma bölgelerinin malzemelerle adsorbant bağlanmasını hesaba katmak için geliştirildiğinden, bu modeller MIP'lere uygulanabilir. Adsorpsiyon izoterm modelleri, adsorpsiyon kimyasının anlaşılmasını geliştirmek ve performansın karşılaştırılması için MIP bağlama özelliklerinin sayısal tanımlayıcılarını sağlamak için analitler ve MIP yüzeyleri arasındaki etkileşimleri karakterize etmek için kullanılmaktadır. MIP'lere uygulanan modeller arasında Langmuir (LI), Freundlich (FI) ve Langmuir–Freundlich (L-FI) izotermidir. Adenozin baskılanmış SPR nanosensör bu 3 denge izoterm modelleriyle de analiz sonuçlarına göre hesaplamalar yapılarak değerlendirilmiştir. Bu üç modelin eşitlikleri aşağıdaki gibidir;

$$\text{Langmuir } \Delta R = \Delta R_{max} C / K_D + C \quad (\text{Eşitlik 4.7})$$

$$\text{Freundlich } \Delta R = \Delta R_{max} C^{1/n} \quad (\text{Eşitlik 4.8})$$

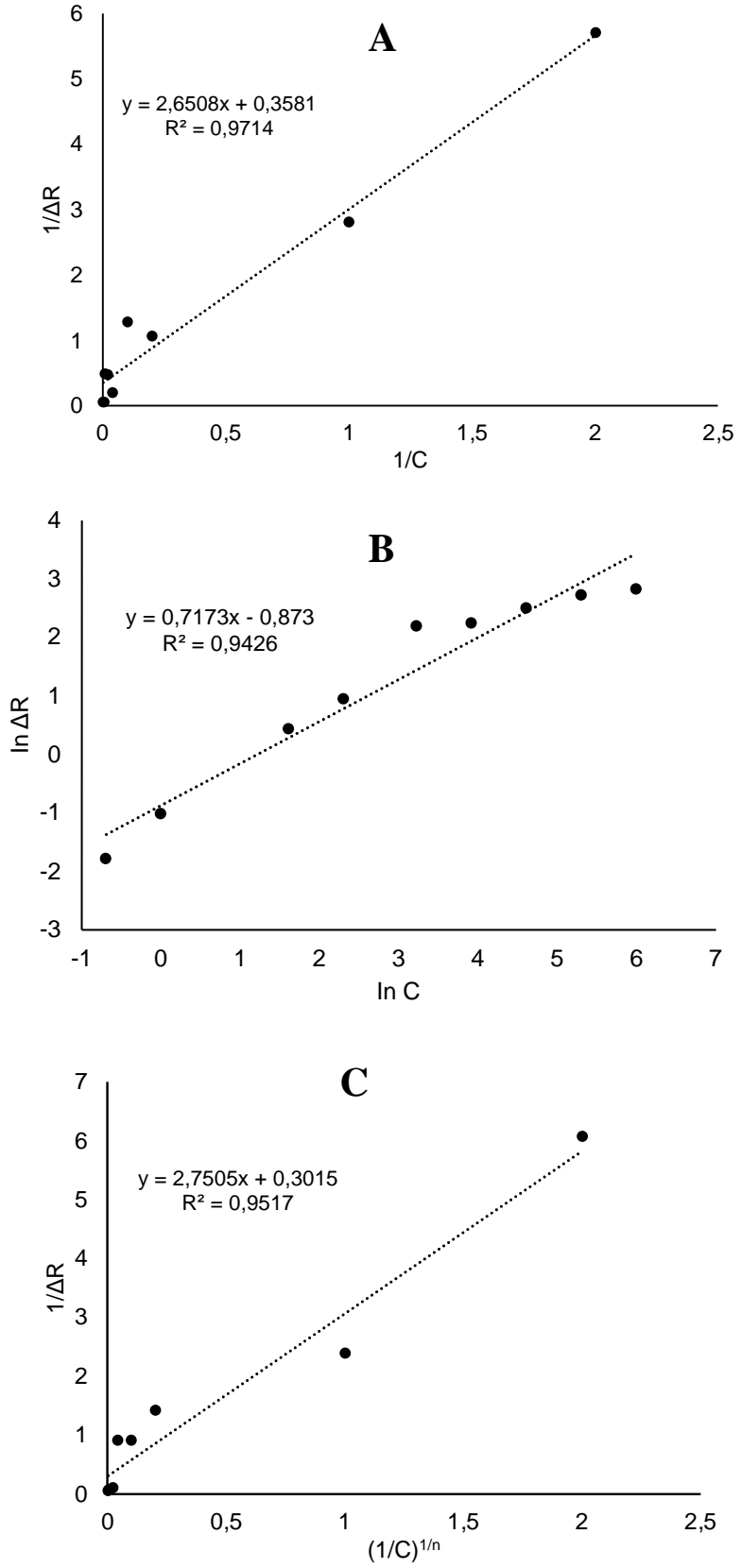
$$\text{Langmuir–Freundlich } \Delta R = \Delta R_{max} C^{1/n} / K_D + C^{1/n} \quad (\text{Eşitlik 4.9})$$

Kinetik analizde en yüksek SPR sinyal kayması: ΔR_{maks} ,
 $d\Delta R/dt$: sinyal değişimin hızı,
 ΔR_{denge} : denge halinde sinyal kayması,
 C (nM): analit derişimi,
 K_A (1/nM): bağlanma denge sabiti,
 K_D (nM): ayrışma denge sabiti,
 $1/n$: Freundlich yüzey heterojenite indeksini ifade etmektedir.

Adsorpsiyon izoterm modelleri, SPR nanosensörde baskılanmış ve baskılanmamış çip yüzeyinin homojen ve heterojenliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Homojen bağlanma bölgeleri modeli olan Langmuir izoterm modeli, ilk olarak gaz-katı faz adsorpsiyonunu tanımlamak için tasarlansada çeşitli adsorbanların adsorpsiyon kapasitesini ölçmek ve karşılaştırmak için de kullanılır.

Langmuir izotermi, adsorpsiyon ve desorpsiyonun (dinamik denge) belli oranlarını dengeleyerek homojen bir katı yüzeyi çevreleyen adsorbant moleküllerinin kaplamasını açıklar. Çip yüzeyi en yüksek seviyede doyma noktasına ulaştığında tek bir tabaka oluşur böylelikle madde miktarı sabit kalır. Freundlich izotermi, heterojen yüzeylerde meydana gelen adsorpsiyon işlemlerinde uygulanabilir. Bu izoterm, yüzey heterojenliğini ve aktif bölgelerin üstel dağılımını ve enerjilerini tanımlayan bir ifade verir. Langmuir-Freundlich izotermi, adsorpsiyon heterojen yüzeylerin bilgisini içerir. Adsorpsiyon enerjisinin adsorbanın heterojen yüzeyine dağılımını tanımlar. Düşük adsorbat konsantrasyonunda bu model Freundlich izoterm modeli olurken, yüksek adsorbat konsantrasyonunda Langmuir izotermi olur [136, 137].

Yukarıda verilen modellere ait Eşitlik 4.7, Eşitlik 4.8, Eşitlik 4.9 uygulandığında farklı izotermelere göre aşağıda bulunan grafikler, denklemler ve R^2 değerleri elde edilmiştir.



Şekil 4.11. Langmuir (A), Freundlich (B) ve Langmuir-Freundlich (C) adsorpsiyon izoterm modelleri

Çizelge 4.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich izoterm parametreleri

Langmuir	ΔR_{maks} , (nM): 2.793 K_D , (1/nM): 7.402 K_A , (nM): 0.135 R^2 : 0.9714
Freundlich	ΔR_{maks} , (nM): 2.394 1/n: 0.7173 R^2 : 0.9426
Langmuir-Freundlich	ΔR_{maks} , (nM): 3.317 1/n: 0.7173 K_D , (1/nM): 9.123 K_A , (nM): 0.109 R^2 : 0.9517

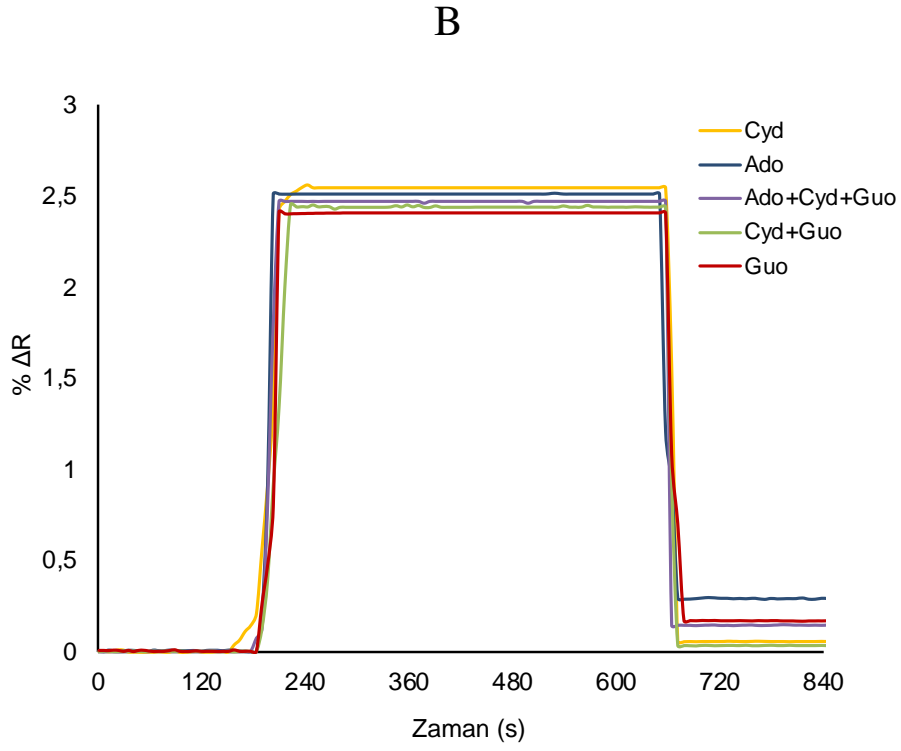
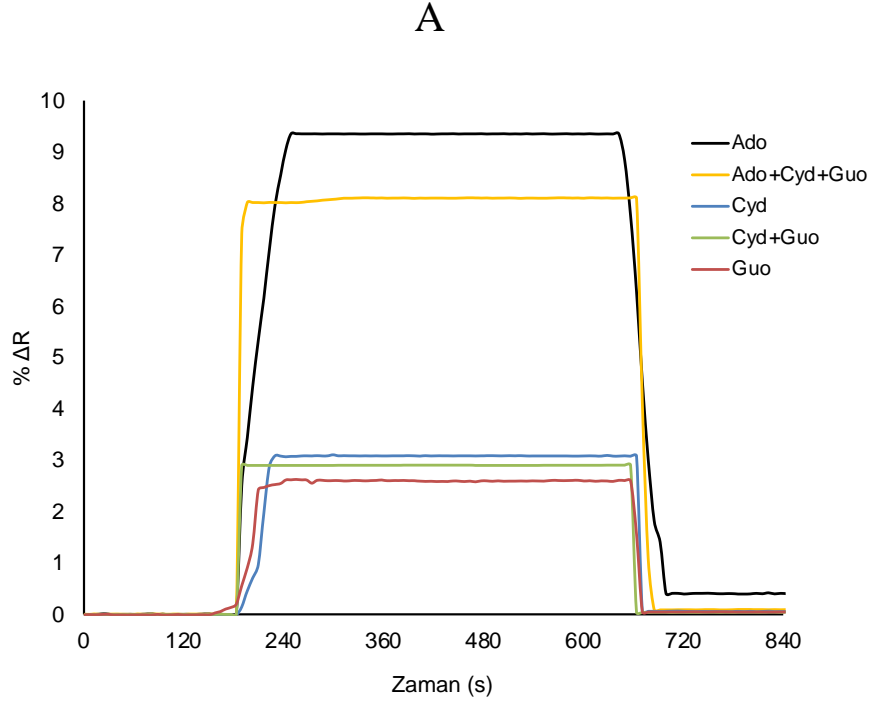
Çizelge 4.3’de korelasyon katsayısı (R) değerleri incelendiğinde adenzin ile adenzin baskılanmış SPR sensörler arasındaki etkileşimin Langmuir izotermi modeline uyduğu gözlemlenmiştir. Langmuir izoterm modeli için ΔR_{maks} değeri 2.793 nM ve R^2 değeri 0.9714’dür.

Çizelge 4.4. Adenozin tayinin için literatürde yer alan farklı sensör çalışmalar

Kullanılan Yöntem	Derişim Aralığı	Tespit Sınırı (LOD)	Kaynak
Elektrokimyasal Sensör	5 nM - 2000nM	5nM	[138]
Elektrokimyasal Sensör	0.37 -37.4 µM	0.21 µM	[139]
Optik Sensör	4×10^{-13} - 1.5×10^{-14} M	1.04×10^{-13} M	[140]
Optik Sensör	60 nM -280 nM	21 nM	[57]
Optik Sensör	1.0 µM –5.0 µM	45nM	[141]
Optik Sensör	10 µM - 600 µM	0.30 µM	[142]
SPR nanosensör	0.5-400 nM(sulu çözelti)	0.018 nM	Tez Çalışmasında

4.2.6. Seçicilik Analizleri

Seçicilik analizleri çalışması adenozin baskılanmış SPR nanosensörün adenozine karşı seçiciliğın belirlenebilmesi amacıyla yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları sitidin (Cyd), guanozin (Guo) yarışmacı molekülleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.12). Adsorpsiyon seçicilik çalışmalarında Ado, Cyd, Guo, ikili Guo+Cyd ve üçlü Ado+Guo+Cyd çözeltileri hazırlanarak kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Adenozin baskılanmış SPR nanosensör ile en yüksek kırılma noktası ve sinyal cevabı görülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde hazırlanan adenozin baskılanmış SPR nanosensörde en yüksek kırılma indisi adenozin molekülünde elde edilmiştir. Sitidin ve guanosen ile adenosen içeren çözeltilere kıyasla daha az etkileşime girdiği gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörüne (MIP) ve baskılanmamış SPR nanosensörüne (NIP) ait sensorgramlar

MIP'ye özgü olmayan bağlanmanın büyüklüğünü bilmek de önemlidir. Bu amaçla, her MIP için karşılık gelen bir baskılanmamış polimer (NIP) yapılır. Bunun için bu MIP ve NIP'de yüzeyde seçici olan ve seçici olmayan polimerik filmin nanosensör yüzeyine sabitlenmesi gerekir. Optimum nanosensör performansı için, ölçümler sırasında MIP ve NIP polimerik tabakanın sensör yüzeyine bağlanması önemlidir. Adenosin baskılanmış SPR nanosensörlerin baskılama seçiciliğini belirlemek için Adenozin baskılanmamış SPR sensörler de hazırlanmıştır. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörlerde yapıldığı gibi 50 nM adenozin, guanozin ve sitidin sulu çözeltiler hazırlanmış ve kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 50 nM derişimde olacak şekilde Guo + Cyd olmak üzere ikili çözelti ve son olarak da Ado + Guo + Cyd olarak üçlü çözelti hazırlanarak kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Sensorgramlar incelendiğinde yalnızca adenozin içeren çözeltiye göre diğer nükleozidleri içeren çözeltilerin ΔR değerinin daha az olduğu görülmektedir.

Adenozin, guanozin ve sitidin molekülerine göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıda yer alan eşitlik ile saptanmıştır;

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad \text{(Eşitlik 4.10)}$$

$$k = \Delta R_{\text{adenozin}} / \Delta R_{\text{yarışmacı}} \quad \text{(Eşitlik 4.11)}$$

$$k' = k_{\text{MIP}} / k_{\text{NIP}} \quad \text{(Eşitlik 4.12)}$$

Yukarıdaki denklemlerde kullanılan fonksiyon değişkenleri

K_d (1/nM): dağılma katsayısı,

C_i ve C_f (nM): kullanılan nükleozidlerin ilk ve son derişimleri,

V (mL): kullanılan çözelti hacmi,

m (g): polimerin kütlesini göstermektedir.

Eşitlik 4.11 denklemini seçicilik katsayısını (k) ve Eşitlik 4.12 bağıl seçicilik katsayılarını (k') şeklinde belirlenebilmektedir.

SPR sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerçekleştirilmektedir. Bu dönüşümlerin yapılmasının sebepleri, başlangıç ve son derişimler arasında önemli bir fark gözlenmemesi, polimer kütlesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin ΔR ile doğrusal ilişkide olmasından dolayıdır.

Adenozin baskılanmış SPR nanosensörün adenozin molekülleriyle spesifik bir etkileşime girmeyerek sinyal vermediği görülmüştür. Böylelikle adenozin baskılanmış çipin, adenozin molekülüne seçici olduğu belirlenmiştir. Adenozin harici iki nükleozidle oluşturulan çözelti dikkate alındığında, adenozinle oluşturulan karışımın gösterdiği ΔR kayma değerlerine göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum, nükleozid moleküllerinin karışım halinde bir yarışmacı ajan olarak davrandığını ve ΔR kayma değerinde azalmaya sebep olduğunu göstermektedir.

Adenozin baskılanmış ve baskılanmamış SPR nanosensörler karşılaştırıldığında Adenozin SPR sinyalinin 10.43'den 2.52'ye düştüğü görülmüştür. Sonuçlar, adenozin baskılanmış SPR nanosensörünün Cyd ve Guo için tepkisinin Şekil 4.12'deki adenozinden daha düşük olduğunu göstermektedir. Ado/Cyd ve Ado/Guo için adenozin baskılanmış SPR nanosensörünün bağıl seçicilik katsayıları (k'), sırasıyla 3.836 ve 3.427 katıdır (Çizelge 4.5). Ayrıca adenozin baskılanmış SPR nanosensörünün adenozin baskılanmamış SPR nanosensöre göre seçiciliği, $\Delta R_{MIP}/\Delta R_{NIP}$ olarak belirlenen baskılama faktörü (IF) ile hesaplanmıştır. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörün, Ado, Guo ve Cyd moleküllerine karşı baskılama faktörleri sırasıyla 4.14, 1.07 ve 1.21 olarak hesaplanmıştır. Adenozin için baskılama faktörü, diğer yarışmacı moleküllerin IF'lerinden daha yüksek olduğu görünmektedir. Bu sonuçlar, moleküler baskılanmış nanofilmin adsorpsiyon seçiciliğini önemli ölçüde artırabileceğini ve spesifik tanıma bölgelerinin diğer moleküller için uygun olmadığını göstermektedir [143].

Çizelge 4.5. Adenozin (Ado), guanozin (Guo), ve sitidin (Cyd) için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları

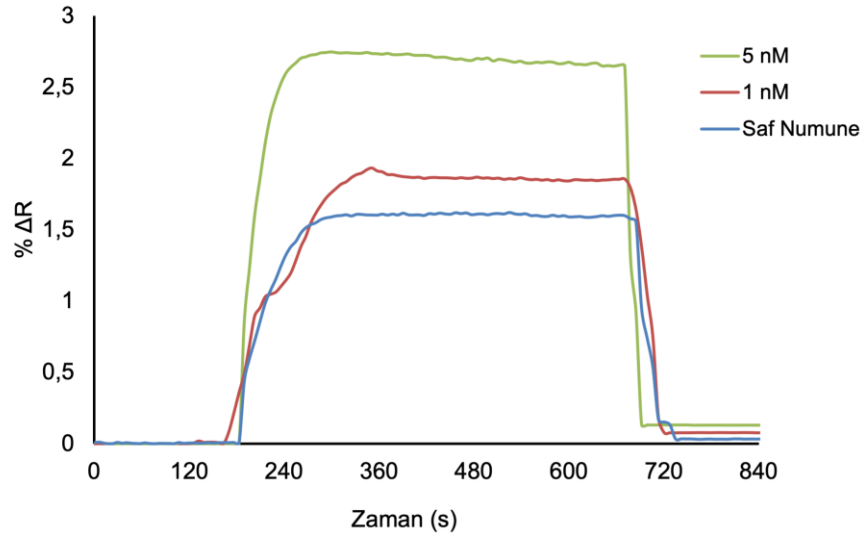
Molekül Adları	MIP Sensör		NIP Sensör		k'
	ΔR	k	ΔR	k	
Ado	10.43	-	2.52	-	-
Guo	2.59	4.011	2.41	1.046	3.836
Cyd	3.08	3.386	2.55	0.988	3.427
Cyd+Guo	2.90	3.597	2.44	1.033	3.482
Ado+Cyd+Guo	8.09	1.289	2.47	1.020	1.264

4.2.6. Yapay Plazma ve Yapay İdrar Örneklerinden Adenozin Tayini

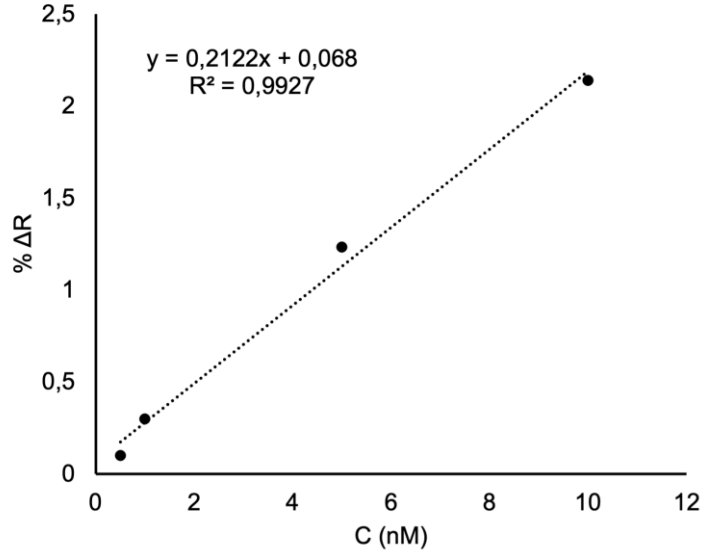
Son yıllarda hem idrar hem de kan örneklerinden adenozin bileşiklerinin hızlı, güvenilir ve gerçek zamanlı tayini için çeşitli yöntemler araştırılmaktadır. Tasarlanan SPR nanosensörlerin gerçeğe yakın ölçümlerde doğruluğunu ve algılama sisteminin değerlendirilmesini ortaya koymak için yapay plazmalarda örnek denemeleri yapılmıştır. Yapay plazma pH 7.4 fosfat tamponu ile 1/10 oranında seyreltilmiştir. 1/10 oranında seyreltilen yapay plazma örneklerine 1 nM ve 5 nM adenozin sulu çözeltileri ilave edilerek SPR sistemine verilmiştir. Yapay idrarda analizler ise direk olarak 1nM ve 5 nM adenozin derişimlerdeki sulu çözeltiler yapay idrar içine karıştırılmıştır.

SPR sisteminden öncelikle denge için pH 7.4 fosfat tamponu geçirilerek 3 dakika boyunca SPR sistemi dengeye getirilmiştir. SPR sisteminin dengeye gelmesinin ardından hazırlanan adenozin eklenmiş yapay plazma yapay ve adenozin eklenmiş yapay idrar örnekleri 8 dakika boyunca sistemden geçirilerek farklı derişimler için sensorgramlar elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra sisteme 0.1 M NaCl desorpsiyon çözeltisi 3 dakika boyunca verilerek kinetik analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13A).

A



B



Şekil 4.13. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörler ile yapay plazmada adenozin miktarının belirlenmesine ait SPR sensorgramlar (A) ve 0.1 1-0 nM derişim aralığındaki kalibrasyon eğrisi (B).

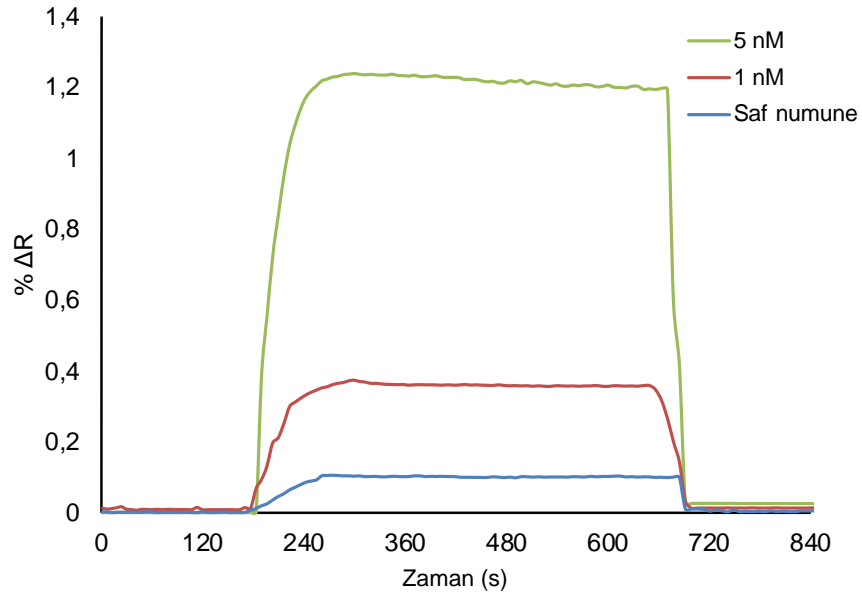
SPR sensorgramlardan elde edilen verilerden $\% \Delta R$ değerleri $y=0.2122x+0.068$ denkleminde yapay plazmada bulunan Ado miktarları hesaplanmıştır. Şekil 4.13.B'deki yapay plazma kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Yapay plazmada Ado tayinine yönelik verilerin doğruluğu $R^2 = 0.9927$ olarak bulunmuştur. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörlerin yapay plazma örneklerinde kinetik analizlerinden tespit sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırı (LOQ) değerleri de hesaplanmıştır. Kör çözelti için (ΔR) değeri 10 ölçümün ortalamasının alınmasıyla, ölçümlere ait standart sapma değeri ile birlikte SPR nanosensörler için 0.0010 olarak belirlenmiştir. Kalibrasyon grafiğine ait $y=0.2122x+0.068$ denkleminde yapay plazmada adenozin tespit sınırı (LOD) 0.015 nM ve miktar tayin sınırı (LOQ) 0.052 nM olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6'da ise yapay plazma ve yapay idrar örneklerindeki bulunan adenozinin, SPR sistemindeki analiz sonuçları ve karşılaştırılması sonucunda ortaya çıkan veriler bulunmaktadır. SPR yönteminde 1 nM ve 5 nM ile hazırlanan farklı Ado miktarlarındaki % geri kazanımları karşılaştırılmıştır. Yapay plazma örneklerinde Ado'nun belirlenmesi için iyi bir geri kazanım göstermektedir.

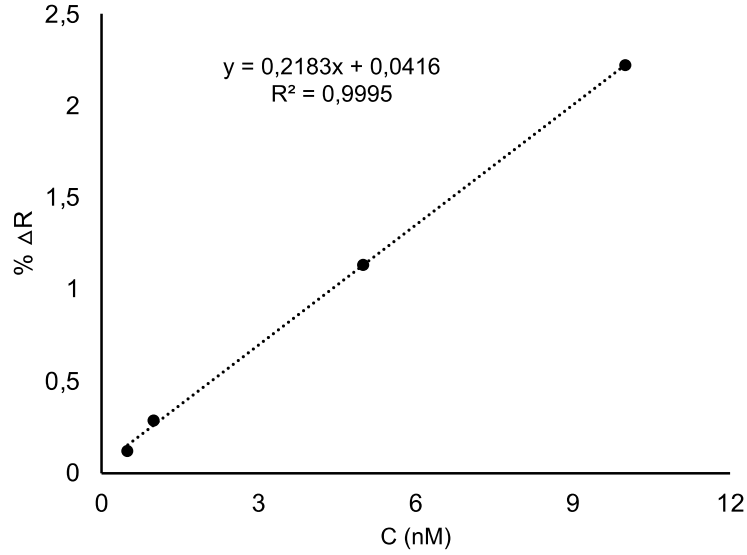
Sonuçlar, geliştirilen nanosensör sisteminde kompleks yapay plazmada çalıştığı gibi gerçek numunelerden alınan örneklerde de çalışabileceğini ve klinik ve medikal araştırma ve teşhislerde adenozin tayini için umut verici olabileceğini göstermiştir.

Adenozin seviyesinin plazmada tayini kadar idrarda da önemi çok büyüktür. Endojen bir nükleozid olan adenozin normal şartlar altında idrardaki seviyesi çok düşüktür. Bunun sebebi adenozinin vücuttan atılırken öncelikle inozin ardından hipoksantin ve en son olarak ürik asit yoluyla idrarla vücuttan atılması sağlanmaktadır Normal bir insanın idrar örneğindeki Ado konsantrasyonu (2.0×10^{-6} mol/L den 7.0×10^{-6} mol/L ye kadar) kanser hastalarınınkinden önemli ölçüde düşüktür. İdrar seviyesindeki artış ise bir hastalığın belirteci olarak görülmektedir. Bu sebeple çok düşük miktarlarda analiz yapılması nanosensör hassasiyeti ve etkin kullanımı açısından önemlidir.

A



B



Şekil 4.14. Adenozin baskılanmış SPR sensörler ile yapay idrarda adenozin miktarının belirlenmesine ait SPR sensorgramları (A) ve 0.5-10 nM adenozin derişiminde kalibrasyon grafiği (B)

Adenozin biyobelirtecinin 5 nM ve 1 nM değerlerindeki yapay idrarlı çözeltileri sistemden geçirilmiştir. Sistemden çıkan sonuçlarda sensorgramlar alınmıştır ve farklı konsantrasyonlarda yapay idrardaki adenozin seviyelerinin zamana bağlı kırılma indisleri ise Şekil 4.14'de görülmektedir. Adenosin baskılanmış nanosensör SPR sisteminde yapay idrar örneklerinden kalibrasyon grafiği ve çıkarılmış ve $y=0.2183x + 0.0416$ denkleminde değerler yerine konulduğunda R^2 değeri 0,9995 olarak bulunmuştur. Yöntemin LOD' u ile ilgili olarak, normal bir insanın idrar örneğinde Ado'nun saptanması mümkündür. Adenozinin hastalık biyobelirteç olarak belirlemeye yönelik yöntemin pratik uygulamasını göstermek için yapay idrarda adenozin konsantrasyonu belirlenmiştir. Numuneler deney bölümünde açıklanan prosedüre göre hazırlanarak analiz edilmiştir. Numunelere iki konsantrasyon seviyesinde (1 nM ve 5 nM) adenozin eklenmiş ve geri kazanımlar hesaplanmıştır. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörlerin yapay idrar örneklerinde kinetik analizlerinden tespit sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırı (LOQ) değerleri de hesaplanmıştır. Kör çözelti için (ΔR) değeri 10 ölçümün ortalaması alınarak, ölçümlere ait standart sapma değeri ile birlikte SPR nanosensörler için sırasıyla 0.0010 olarak belirlenmiştir.

Kalibrasyon grafiğine ait $y=0.2183x+0.0416$ denklemi kullanılarak yapay idrarda adenozin tespit sınırı (LOD) 0.013 nM ve miktar tayin sınırı (LOQ) 0.046 nM olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörlerin yapay plazma ve yapay idrar örneklerindeki bulunan adenozin analiz sonuçları (n: 3)

Eklenen Adenozin Miktarı (nM)	Bulunan Adenozin Miktarı (nM)		Geri Kazanım (%)	
	Yapay Plazma	Yapay İdrar	Yapay Plazma	Yapay İdrar
1.0 nM	0.988±0.0008	0.982±0.0006	98.8±0.082	96.9±0.058
5.0 nM	4.97±0.0009	4.98±0.0082	99.36±0.019	98.7±0.115

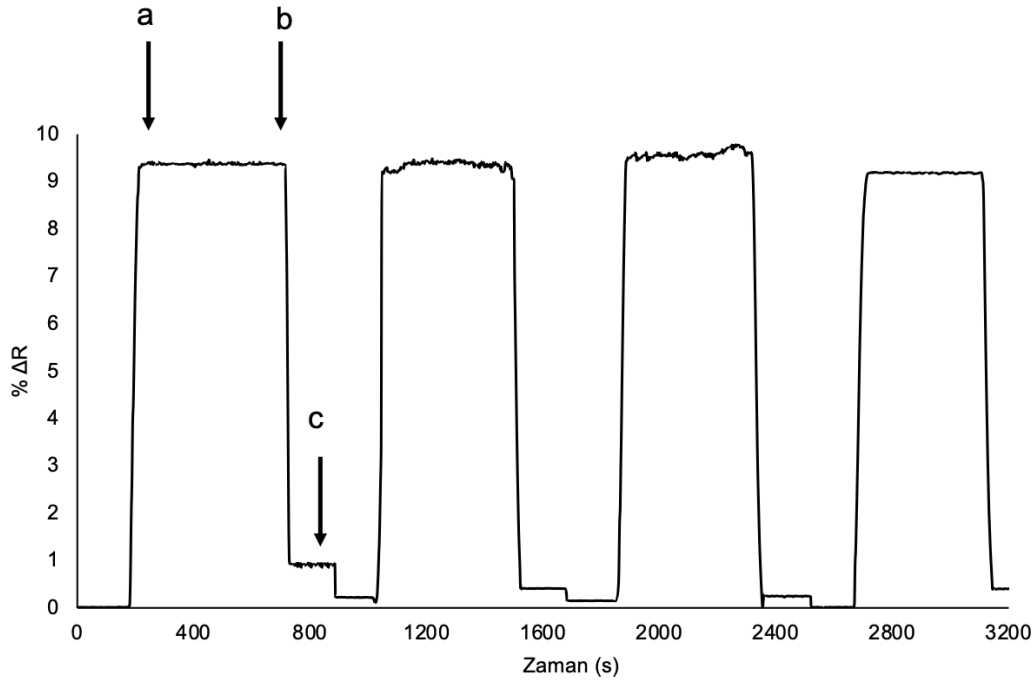
Sonuçlar, idrar analizi ve plazma analizleri için yöntemin yeterli kesinliğini ve doğruluğunu göstermiştir. Ayrıca standart yöntemler, geliştirilen yöntemle göre bir numunenin hazırlanması ve analiz süresi olarak karşılaştırıldığında çok daha zahmetli görülmektedir.

4.2.7. Tekrar Kullanılabilirliğin İncelenmesi

SPR temelli nanosensörlerde en önemli avantaj tasarlanan nanosensör çipinin raf ömürlerinin uzun ve tekrar kullanılabilme yanında tanıma elemanı olarak biyolojik moleküllerin kullanılması durumunda tekrar kullanımı için oldukça avantajlıdır. Bunun başlıca sebebi kullanılan çözeltilerdeki biyolojik moleküllerin hızlı bozunmaya sebep olarak üç boyutlu yapısının bozulması ve nanosensör tanıma kapasitesinin değişmesidir. Tasarlanan çipin ve kullanılan çözeltilerin bozunmadan dolayı zaman içerisinde tekrarlanabilirliğinin azalmasıdır. Tasarlanan nanosensör çipinde MIP yöntemiyle biyolojik maddenin yapısal kavitelelerinin baskılanmasıyla sağlamlık ve dış koşullara dayanıklılığı artmaktadır ve böylelikle tekrar kullanılabilirlikleri uzun süre sağlanmaktadır [144].

Adenozin baskılanmış nanosensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek için öncelikle sistem dengesini sağlamak için pH 7.4 fosfat tamponu geçirilmiş ardından adenozin içerikli 50 nM derişimindeki çözeltiler sistemden gün içerisinde tekrarlı olarak ardarda 4 kere geçirilmiştir. Her bir adenozin içerikli çözeltiler sistemden geçtikten sonra 0.1 M NaCl çözeltisi desorpsiyon amacıyla sisteme verilmiştir.

Cihazdan alınan zamana bağlı sensorgram sonuçları Şekil 4.15’de görülmektedir. Kinetik analiz sonrasında elde edilen veriler SPRview yazılım programı ile belirlenerek elde edilen kinetik analiz sonuçları SPR sensorgramlarında $\% \Delta R$ değerleri olarak hesaplanmıştır. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörlerde art arda yapılmış olan bu analize sırasında SPR sinyalinde bir azalma gözlenmemiş ve verimlilik değeri %98.06 olarak belirlenmiştir.

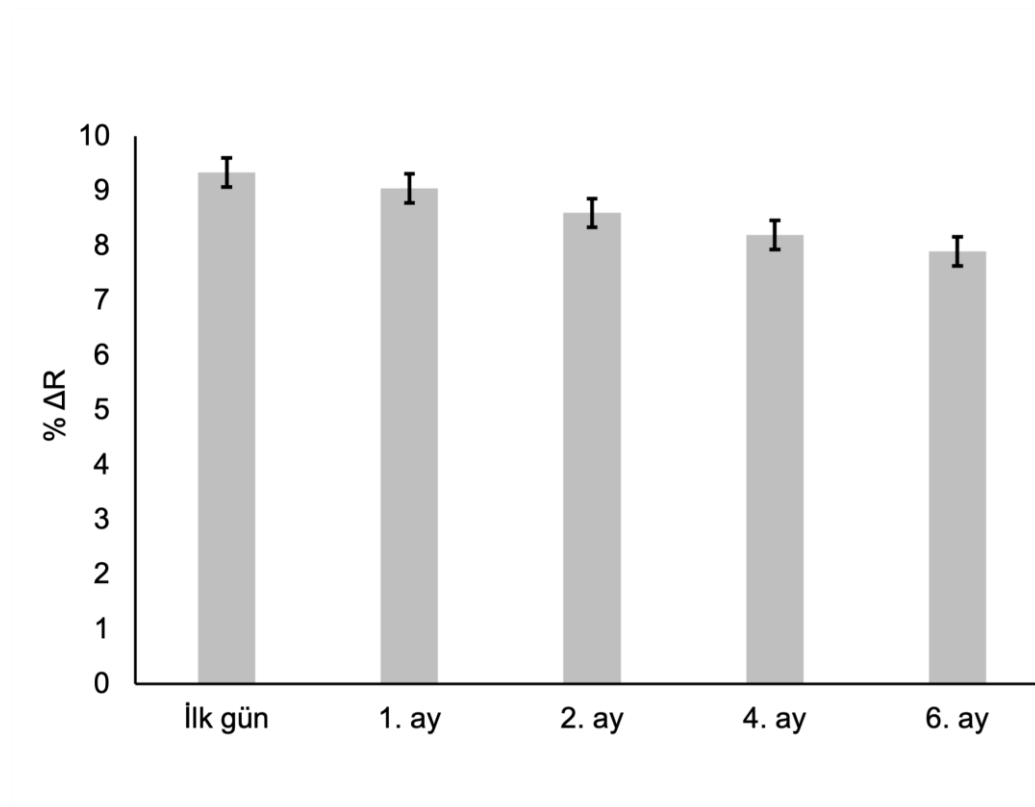


Şekil 4.15. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörün aynı günde tekrar kullanılabilirliği (a: adsorpsiyon, b: desorpsiyon, c: rejenerasyon).

SPR sisteminde aynı gün içerisinde alınan sonuçlar kadar raf ömrü de kullanılacak bir nanosensör çipinin hem maliyeti hem de güvenilirliği için oldukça önemlidir. Tekrar kullanılabilirlik deney sonuçlarının SPR zamana bağlı kırılma indisleri Şekil 4.16’da görülmektedir.

50 nM adenozin varlığında ilk gün, 1. ay, 2. ay, 4. ay ve 6. ay olarak belirlenmiş farklı zaman aralıklarında tekrar kullanıldıklarında SPR nanosensörlerin verimliliğinde ciddi bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir. Tasarlanan SPR nanosensörün 180 gün boyunca 4 °C'de saklanarak bu süre sonunda tekrar ölçüm alındığında %84.58 olarak stabilitesini koruduğunu göstermektedir.

SPR nanosensör yüzeyinde adenosinin seçici MIP tabakası üzerinde yüzey immobilizasyonundan kaynaklanan bir stabilite seviyesine sahiptir. Stabilitenin bu şekilde korunaklı olması ise MIP tekniğinin yüzeyde kullanılarak adenoze yönelik seçici boşlukların polimerlerden dolayı korunaklı olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.16. Adenozin baskılanmış SPR nanosensörlerin farklı zamanlarda tekrar kullanılabilirliği

5. YORUM

Tez çalışmasında tasarlanan nanosensörde şablon molekül olan adenozin insan vücudu için hayati öneme sahiptir ve plazma ve idrar seviyelerinin ise birçok hastalığın belirteci olduğu bir nükleozittir. Çalışmada SPR nanosensör ve MIP avantajları nanoboyuttaki biyomolekül olan adenozin tayini amacıyla kullanılmıştır. Biyomoleküller çabuk bozunma özelliğine sahip olduğundan genellikle analizlerde sorun yaşanmasına sebep olmaktadır. MIP teknolojisi adenozinin seçici boşluklarının bir kopyasını çıkararak SPR nanosensör çipi yüzeyine fotopolimerizasyon yöntemiyle iş yoğunluğunu azaltıcı, maliyeti düşürücü ve nanoboyutlarda hassas ölçüm yapmayı sağlayan bir MIP nanofilm oluşturmayı sağlamıştır. Çip yüzeyi karakterizasyon çalışmaları, kinetik, denge, bağlanma, seçicilik, hassaslık ve tekrar kullanılabilirlik analizleri yapılmıştır. Adenozin tayinine yönelik analizler SPR cihazına bağlı olarak sürdürülmüştür.

- **MAA-Adenozin Ön Polimerizasyon Kompleks Oranının Optimize Edilmesi**

Adenozin baskılanmış nanofilm oluşturulurken ilk olarak polimerizasyon karışımının bileşimi ve adenozinin molekülün yapısı dikkate alınmıştır. Çalışmalarda, MAA molekülünün veya şablon molekülleriyle koordinasyonlu bağların oluşturma yeteneğine göre fonksiyonel monomer olarak seçilmiştir. Polimer matrisi, moleküler tanımanın elde edildiği, baskılama bölgelerinin kararlı bir 3 boyutlu yapısının oluşmasını sağlamak amacıyla çapraz ajan kullanılmıştır. Bu MIP'nin seçiciliğini ve bağlanma kabiliyetini güçlü bir şekilde etkiler. Literatür çalışmaları sonucu çapraz bağlayıcı olarak MAA'ya dayalı MIP'lerin sentezinde en sık kullanılan EGDMA'dır ve çapraz bağlayıcı seçimi monomere göre yapılmıştır. Adenozin ve MAA arasında oluşabilecek kovalent olmayan etkileşimlerin fazla olması, ön polimerizasyon kompleksinin stabilitesi, MIP'lerin afinitesini ve adenozin moleküllerin tanınmasındaki seçiciliğini belirlemektedir. Bu sebeplerle adenozin ile MAA arasındaki molar oran, yüzey baskılarının sayısını, polimerizasyon bileşiminin özelliklerini ve MIP tarafından absorbe edilen adenozinin miktarını önemli ölçüde etkilemektedir. Ayrıca ön polimerizasyon karışımındaki şablon molekülünün miktarı, kaplamanın yapısı, baskı sayısı, stabilitesinde önemli bir faktör olduğundan dolayı sensörün analitik sinyalini önemli ölçüde etkilemektedir.

Bu sebeple ilk olarak baskılama faktörü belirlenmesi için MAA:Adenozin (1:1, 5:1, 10:1, 20:1) molar oranlarına bakılarak 1:1'de en düşük baskılama faktörü bulunurken 10:1'de en yüksek baskılama faktörü bulunmuştur. 1:1'den 10:1'e kadar baskılama faktörü artarken 20:1'de baskılama faktörü tekrar düşmüştür bunun sebebinin metakrilik asidin

fazla miktarlarda kullanılmasının kopolimerizasyona veya homopolimerizasyona sebep olabileceğinden dolayı hidrojen bağlarında ve kalıp ile etkileşimde azalmasına sebep olmasından dolayıdır. MAA:Ado molar optimizasyonunda 10:1 temel alınarak polimerizasyona başlanmıştır ve UV-VIS analiz sonuçlarında 267 nm olarak belirlenmiştir. Polimerizasyon fiziksel etkeninden fotopolimerizasyonda yaklaşık 1 saat tutulmuştur. Bu süre fazla tutulduğunda ters etki yapabilmektedir. Bu yüzden kristal UV lamba altında çok uzun süre maruz bırakılmaya gayret edilmiştir. MAA-adenozin baskılanmış (MIP) ve adenozin baskılanmamış (NIP) nanosensör çipleri elde edilmiştir. İmmobilizasyon yapılırken aynı işlemler gerçekleştirilmiş sadece baskılanmamış NIP çipine şablon molekül olan adenozin eklenmeden immobilizasyon sağlanmıştır.

- **SPR Nanosensör Çiplerinin Yüzey Karakterizasyonları İncelemesi**

İmmobilizasyonun başarılı olarak gerçekleşmesini anlamak amaçlı analizlere başlamadan önce yüzey karakterizasyonu çalışmaları AFM, elipsometre ve yüzey temas ölçümleriyle yapılmıştır. Yapılan elipsometre çalışması sonucunda sadece allil merkaptan modifiye edilmiş çip yüzeyinde 64.4 nm, adenozin baskılanmış çip yüzeyinde 119.2 nm ve adenozin baskılanmamış çip yüzeyinde ise 115 nm yüzey kalınlığı bulunmuştur. Adenozin baskılanmış ve baskılanmamış çiplerde yüzey kalınlığının allilenmiş çip yüzeyinden fazla olduğu böylelikle yüzeyde oluşan polimerizasyon işlemin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini görülmektedir. AFM sonuçları incelendiğinde ise çip yüzeyinin 3 boyutlu morfolojik sonuçlarında adenozin baskılanmış çip yüzeyinin 45.68 nm , adenozin baskılanmamış çip yüzeyinin ise 41.11 nm olduğu görülmektedir. Bu sonuç bize adenozinin yüzeyde oluşturduğu adenozin seçici boşlukların oluştuğunu bu sebeple adenozin baskılanmamış çip yüzeyinden kalın olduğunu göstermektedir. Üçüncü olarak yapılan yüzey temas açısı karakterizasyon çalışmasında sadece allil merkaptan ile modifiye edilmiş çip yüzeyinde 84.9° iken adenozin baskılanmış çip yüzeyinde 73.1° ve adenozin baskılanmamış yüzeyde ise 70.9°'lik bir açı bulunmuştur. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzeyle adenozin baskılanmış yüzey kıyaslandığında temas açısı değerindeki bu azalma baskılanmış yüzeyin MAA molekülünün oluşturduğu hidrofilik özelliğinden kaynaklı MIP nanofilmde olarak seçici bir şekilde hidrofilik yapı ve dağılım oluşturduğunu göstermektedir.

- **Kinetik Analizlerde pH Değerinin Belirlenmesi**

Adenozin tayini için kinetik çalışmalara başlamadan önce adenozin tayin edilecek tampon çözeltisinin pH değerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle literatür taraması yapılmıştır. Yapılan benzer adenozin çalışmalarında pH tampon değeri en yüksek değerinde 7.5 ve en

alt değerde 7.0 olarak belirlenmiştir. Ayrıca pH idrar ve plazmada adenozin analizi yapılacağı için önemlidir. Çünkü insan idrar pH'ı 4.5-8.0 arasında değişirken, plazma pH'ı ise 7.4 fosfat tamponudur. Adenozin baskılanmış SPR nanosensör çiplerinde pH taraması için 3.0-7.4 aralığında 10 nM adenozin derişiminde çalışmalar yapılmış ve alınan sensorgram sonuçlarında en yüksek kırılma indisinin pH 7.4 e ait olduğu görölmüş ve çalışmalar için pH 7.4 fosfat tampon kullanılmasına karar verilmiştir.

- **Adenozin Baskılanmış Nanosensörde Kinetik Analizlerin Değerlendirilmesi**

Adenozin baskılanmış nanosensör çipinin kinetik çalışmalarında 0.5 nM-400 nM aralığındaki derişimlerde çalışılarak SPR sensorgramları elde edilmiştir. SPR çalışma süresi sadece bir konsantrasyon çalışması için tampon, analit, desorpsiyon süresi olarak toplam 14 dakika olarak belirlenmiştir. Yapılan konsantrasyon analizleri sonucunda adenozin çözeltileriyle adenozin baskılanmış nanosensör arasındaki etkileşimlerin sensorgramları elde edilmiştir. Elde edilen değerler incelendiğinde nanosensörün 0.5 nM -50 nM konsantrasyon aralığında adenezine ve kırılma indisleri grafikleri elde edilmiştir. Elde edilen bu sensorgramlar ve grafiklerden, tasarlanan adenozin baskılanmış nanosensörde analizlerin doğrusallık aralığı ve doğrusallık % si bulunmuştur. Grafikler incelendiğinde 0.5-50 nM aralığında $y=0.1866x+0.4712$ denklemi ve R^2 değeri 0.9815, 50-400 nM aralığındaki analiz sonuçlarında $y=0.0148+11.175$ denklemi ve R^2 değeri ise 0,8987 olarak bulunmuştur. Bu değerlerde 0.5 nM-50 nM konsanstrasyonu aralığında nanosensörün adenezini %98 doğrulukta ve 50 nM-400 nM aralığında ise yaklaşık %90 doğrulukta ölçüm yaptığını göstermektedir.

- **Kinetik Hız Sabitlerinin Belirlenmesinde Denge Analizi ve Bağlanma Kinetiği Yaklaşımlarının İncelenmesi**

Hedef molekül adenezinin oluşturulan polimer nanofilm ile etkileşimlerinde oluşan denge ve bağlanmanın incelenmesi amacıyla konsantrasyonlar ve denge sabitleri belirlenen formüller kullanılarak grafikleri çizilmiştir. Elde edilen grafiklere göre denge analizi grafiğinde $y=-0.0173x+0.3349$ denklemi ve $R^2=0,9774$ elde edilmiştir.

Buradan yola çıkarak denge sabiti için $R_{maks}= 19.358$, $K_A=0.0173$, $K_D=57.803$ olarak bulunmuştur. Bağlanma kinetiği değerleri için elde edilen grafikte $y=0.0008x-0.0006$ denklemi ve $R^2=0,9877$ bulunmuştur. Bağlanma kinetiği için grafik göz önüne alınarak $k_a=0.0008$, $k_d=0.0006$, $K_A=1.333$, $K_D=0.75$ olarak bulunmuştur. Ayrıca, denge İzotermi yoluyla LI, FI, L-FI olmak üzere 3 farklı model uygulanmıştır. Oluşturulan grafik ve denklemler yoluyla R_{maks} , R^2 değerleri sırasıyla 2.793 nM ve 0.9714 bulunarak adenezin ile adenezin baskılanmış SPR sensörler arasındaki etkileşimin Langmuir

izotermi modeline uyduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, adenozin baskılanmış SPR nanosensör yüzeyindeki adenozin moleküllerinin bağlanma özellikleri ile ilgili tek tabakalı, eşit enerjiye sahip, minimum yanıl etkileşimli ve homojen dağılımlı olduğu bilgilerini ifade etmiştir.

- **Nanosensörde Adenozinin Seçicilik Analizinin İncelenmesi**

Seçicilik analizleri oluşturulan nanosensör için büyük önem arz etmektedir. Nükleozid yapıları genelde yapısal olarak birbirlerini andıran fakat birbirlerinden farklı moleküllerdir. Seçicilik analizlerinde guanozin ve sitidin nükleozidleri kullanılmıştır. Bu nükleozidler ayrıca idrar ve serumda bulunan ve adenozin gibi bir biyobelirteç özelliği taşımaktadır. Seçicilik analizleri böylelikle adenozinin seçici olarak tespit edilmesini sağlamıştır. Böylelikle, adenozin baskılanmış ve adenozin baskılanmamış olarak hazırlanan nanosensörlerde Ado, Guo ve Cyd nükleozidleri farklı derişim ve oranlarda karıştırılarak analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarında, adenozin baskılanmış (MIP) nanosensörden ve adenozin baskılanmamış (NIP) nanosensöründen alınan sensorgramlardan ilk olarak adenozin baskılanmış nanosensörde yüksek bir sensorgram piki oluştuğu görülmektedir. Ayrıca adenozinin seçiciliğini belirlemek için alınan sonuçlar seçicilik analiz denklemlerinde kullanılarak seçicilik katsayısı ve bağıl seçicilik hesaplanmıştır.

Sonuçlar incelendiğinde Ado baskılanmış (MIP) ΔR değeri 10.43, Ado baskılanmamış (NIP) ΔR değerinin 2.52 olduğu bulunmuştur. Diğer nükleozid değerlerinde incelendiğinde nanosensörün Ado nükleozidine karşı seçici bir analiz yaptığını göstermektedir.

- **Yapay plazma ve Yapay idrar örneklerinde Adenozin Tayinin İncelenmesi**

Tasarlanan adenozin nanosensörünün amacına uygun bir şekilde analiz yapmasını kanıtlamak için gerçeğe uygun olarak yapay idrar ve yapay plazma örneklerinde Adenozin analizleri yapılmıştır. 1 nM, 5 nM ve saf numunelerle yapılan analizlerden sensorgramlar elde edilmiştir. Sonuçlardan elde edilen grafikler ve denklemlerden yola çıkarak yapay plazmada adenozin için $y = 0.2122x + 0.068$ denklemi (n:3) ve R^2 değeri 0,9927 olarak bulunmuştur. Yapay idrar örneğinde ise $y = 0.2183x + 0.0416$ denklemi (n:3) ve R^2 değeri ise 0,9995 olarak bulunmuştur. Bulunan değerler sonucunda yapay plazmada ve idrarda adenozin doğruluğu %99 olduğu görülmüştür. Bu aşamada geri kazanımlar incelendiğinde tasarlanan adenozin nanosensörünün medikal ve analitik araştırmalar için umut verici olduğu görülmektedir.

- **Tekrar Kullanılabilirliğin Değerlendirilmesi**

Çalışma sonucunda elde edilmiş seçiciliği yüksek adenozin baskılanmış nanosensörün tekrar kullanılabilirliğini değerlendirmek için aynı gün içerisinde peşpeşe ve farklı zaman aralıklarında olmak üzere analizler yapılmıştır. Bu analiz nanosensörün maliyet ve bir zaman sonra bile ortalama hassasiyetini göstermek için önemlidir. 1. ay, 2. ay, 4. ay ve 6. aylarda alınan analizlerin % kırılma indisleri incelendiğinde 6. ayın sonunda %84.58 olarak yapısal formunu koruduğu görülmektedir. Adenozin MIP teknolojisi kullanılmadan direkt kullanılsaydı biyolojik materyal olduğundan dolayı bozunması kısa sürede gerçekleşecekti. Tekrar kullanılabilirlik adenozin baskılanmış nanosensörünün MIP sayesinde uzun süre raf ömrüne sahip olduğunu göstermiştir. Böylelikle tasarlanan adenozin baskılanmış SPR nanosensörün tekrar kullanılabilirliğinin yüksek olduğunu medikal uygulama ve araştırmalarda uzun süreli bir şekilde kullanılabileceğini gösterilmiştir.

- **Diğer Adenozin Sensörleri ve Tasarlanan Nanosensörün Karşılaştırılması**

Literatürde adenozin tespitine dayalı birçok sensör çalışması bulunmaktadır özellikle son yıllara doğru adenozinin özellikle kanser hastalığı başta olmak üzere birçok hastalık teşhisleri üzerine sensörleri ve analitik yöntemleri üzerine çalışılmıştır. Elektrokimyasal, florometrik, enkapsülasyon partikül, aptamer, kolorimetrik gibi yöntemlerle insan serum ve idrar örnekleri üzerine analizler yapılmıştır. Ado molekülünün plazma seviyesi in vivo olarak saniyeler içerisinde değiştiğinden ve in vitro çalışmalarda da hızlı bozunma gösterdiğinden dolayı analizlerde düşük konsantrasyonlarda ve gerçek zamanlı olarak hızlı analiz yapılması önemlidir. Tez kapsamında tasarlanan nanosensörde SPR ve MIP teknolojilerinin avantajları göz önüne alarak hem bozunma engellenmesi hem de gerçek zamanlı hızlı bir analiz yapılması sağlanmıştır. Çalışmalardaki analiz sonuçlarına göre 0.1 nM - 100 nM lineer derişim aralığında, sulu çözeltilerde, yapay plazmada, yapay idrarda adenozin tespit sınırı (LOD) sırasıyla 0.018 nM, 0.015 nM, 0.013 nM olarak bulunmuştur. Miktar tayini sınırı olan LOQ değerleri ise sulu çözeltide 0.061 nM, yapay plazmada 0.052 nM, yapay idrarda 0.046 nM olarak hesaplanmıştır. Bu değerler literatürdeki birçok adenozin sensör ve tespit çalışmalarından çıkan sonuçlara göre çok daha hassas bir değere sahip olmuştur. Tasarlanan nanosensörün medikal ve araştırma alanlarında ilerleyen zamanlarda etkili olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] E.A. Carrey, D. Perrett, H.A. Simmonds, *Nucleic Acids, Purine, and Pyrimidine Nucleotides and Nucleosides: Physiology, Toxicology, and Dietary Sources*, 2013, pp. 189-196.
- [2] R. Ouellette, D. Rawn, *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 2018, pp. 973-1000.
- [3] I.A. Mikhailopulo, A.I. Miroshnikov, *New trends in nucleoside biotechnology*, *Acta Naturae*, 2 (2010) 36-59.
- [4] M. Patejko, W. Struck-Lewicka, D. Siluk, M. Waszczuk-Jankowska, M.J. Markuszewski, *Urinary Nucleosides and Deoxynucleosides*, *Adv Clin Chem*, 83 (2018) 1-51.
- [5] M.J. Lapponi, C. Rivero, M. Zinni, C. Britos, J. Trelles, *New developments in nucleoside analogues biosynthesis: A review*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133 (2016).
- [6] J.-P. Schermann, 4.1 - Nucleobases, Nucleosides and Oligonucleotides, in: J.-P. Schermann (Ed.) *Spectroscopy and Modeling of Biomolecular Building Blocks*, Elsevier, Amsterdam, 2008, pp. 211-249.
- [7] W. Struck-Lewicka, R. Kaliszan, M.J. Markuszewski, *Analysis of urinary nucleosides as potential cancer markers determined using LC–MS technique*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101 (2014) 50-57.
- [8] A.L. Giuliani, A.C. Sarti, F. Di Virgilio, *Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules*, *Immunol Lett*, 205 (2019) 16-24.
- [9] K. Seley-Radtke, *Discovery, Design, Synthesis, and Application of Nucleoside/Nucleotides*, *Molecules*, 25 (2020).
- [10] W.Y. Hsu, W.T. Chen, W.D. Lin, F.J. Tsai, Y. Tsai, C.T. Lin, W.Y. Lo, L.B. Jeng, C.C. Lai, *Analysis of urinary nucleosides as potential tumor markers in human colorectal cancer by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*, *Clin Chim Acta*, 402 (2009) 31-37.
- [11] G. Zhang, *Nucleoside/Nucleotide Biomarkers, Targeted Biomarker Quantitation by LC–MS*, (2017) 389-406.
- [12] S. Dulong, Q. Huang, P. Innominato, A. Karaboue, M. Bouchahda, A. Pruvost, F. Théodoro, L. Agrofoglio, R. Adam, B. Finkenstädt, *Circadian and chemotherapy-related changes in urinary modified nucleosides excretion in patients with metastatic colorectal cancer*, *Scientific Reports*, 11 (2021) 1-13.
- [13] C. Guo, Y. Hu, X. Cao, Y. Wang, *HILIC-MS/MS for the Determination of Methylated Adenine Nucleosides in Human Urine*, *Analytical Chemistry*, (2021).

- [14] P. Gątarek, J. Kałużna-Czaplińska, M. Pawełczyk, K. Jastrzębski, J. Giebułtowicz, A. Głąbiński, B. Bobrowska-Korczak, LC-MS/MS Determination of Modified Nucleosides in The Urine of Parkinson's Disease and Parkinsonian Syndromes Patients, *Molecules*, 25 (2020) 4959.
- [15] A. Seidel, S. Brunner, P. Seidel, G. Fritz, O. Herbarth, Modified nucleosides: an accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control, *British journal of cancer*, 94 (2006) 1726-1733.
- [16] B. Kammerer, A. Frickenschmidt, C.H. Gleiter, S. Laufer, H. Liebich, MALDI-TOF MS analysis of urinary nucleosides, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16 (2005) 940-947.
- [17] S.H. Lee, B.H. Jung, S.Y. Kim, B.C. Chung, A rapid and sensitive method for quantitation of nucleosides in human urine using liquid chromatography/mass spectrometry with direct urine injection, *Rapid communications in mass spectrometry*, 18 (2004) 973-977.
- [18] W.-Y. Hsu, C.-J. Chen, Y.-C. Huang, F.-J. Tsai, L.-B. Jeng, C.-C. Lai, Urinary nucleosides as biomarkers of breast, colon, lung, and gastric cancer in Taiwanese, *PloS one*, 8 (2013) e81701.
- [19] B.B. Fredholm, Adenosine and metabolism—a brief historical note, *Adenosine*, Springer2013, pp. 3-19.
- [20] J. Layland, D. Carrick, M. Lee, K. Oldroyd, C. Berry, Adenosine: physiology, pharmacology, and clinical applications, *JACC Cardiovasc Interv*, 7 (2014) 581-591.
- [21] A. dos Santos-Rodrigues, M.R. Pereira, R. Brito, N.A. de Oliveira, R. Paes-de-Carvalho, Chapter Fifteen - Adenosine Transporters and Receptors: Key Elements for Retinal Function and Neuroprotection, in: G. Litwack (Ed.) *Vitamins & Hormones*, Academic Press2015, pp. 487-523.
- [22] K.A. Jacobson, Z.-G. Gao, *Adenosine*☆, Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology, Elsevier2017.
- [23] K.A. Jacobson, M.L. Reitman, Adenosine-Related Mechanisms in Non-Adenosine Receptor Drugs, *Cells*, 9 (2020).
- [24] J. Hubbard, D. Binder, *Adenosine Metabolism*, 2016, pp. 225-263.
- [25] L. Löfgren, S. Pehrsson, G. Hägglund, H. Tjellström, S. Nylander, Accurate measurement of endogenous adenosine in human blood, *PloS one*, 13 (2018) e0205707.
- [26] S. Gessi, S. Merighi, K. Varani, P. Borea, Chapter 2. Adenosine Receptors in Health and Disease, *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif.), 61 (2011) 41-75.
- [27] G. Haskó, L. Antonioli, B.N. Cronstein, Adenosine metabolism, immunity and joint health, *Biochem Pharmacol*, 151 (2018) 307-313.
- [28] S. Manjunath, P.M. Sakhare, Adenosine and adenosine receptors: Newer therapeutic perspective, *Indian J Pharmacol*, 41 (2009) 97-105.

- [29] P. Nygaard, H.H. Saxild, Nucleotide Metabolism, in: M. Schaechter (Ed.) *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, Academic Press, Oxford, 2009, pp. 296-307.
- [30] F.C. Tescarollo, D.M. Rombo, L.K. DeLiberto, D.E. Fedele, E. Alharfoush, Â.R. Tomé, R.A. Cunha, A.M. Sebastião, D. Boison, Role of adenosine in epilepsy and seizures, *Journal of caffeine and adenosine research*, 10 (2020) 45-60.
- [31] L. Weltha, J. Reemmer, D. Boison, The role of adenosine in epilepsy, *Brain Research Bulletin*, 151 (2019) 46-54.
- [32] L. Cellai, K. Carvalho, E. Faivre, A. Deleau, D. Vieau, L. Buée, D. Blum, C. Mériaux, V. Gomez-Murcia, The adenosinergic signaling: a complex but promising therapeutic target for Alzheimer's disease, *Frontiers in neuroscience*, 12 (2018) 520.
- [33] A. Rahman, The role of adenosine in Alzheimer's disease, *Current neuropharmacology*, 7 (2009) 207-216.
- [34] D. van Calker, K. Biber, K. Domschke, T. Serchov, The role of adenosine receptors in mood and anxiety disorders, *Journal of neurochemistry*, 151 (2019) 11-27.
- [35] T.W. Stone, S. Ceruti, M.P. Abbracchio, Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration, *Adenosine receptors in health and disease*, (2009) 535-587.
- [36] C.-P. Chang, K.-C. Wu, C.-Y. Lin, Y. Chern, Emerging roles of dysregulated adenosine homeostasis in brain disorders with a specific focus on neurodegenerative diseases, *Journal of Biomedical Science*, 28 (2021) 1-25.
- [37] L. Antonioli, C. Blandizzi, B. Csóka, P. Pacher, G. Haskó, Adenosine signalling in diabetes mellitus—pathophysiology and therapeutic considerations, *Nature reviews endocrinology*, 11 (2015) 228-241.
- [38] J.D. Bauerle, A. Grenz, J.-H. Kim, H.T. Lee, H.K. Eltzschig, Adenosine generation and signaling during acute kidney injury, *Journal of the American Society of Nephrology*, 22 (2011) 14-20.
- [39] F. Hajizadeh, A. Masjedi, S.H. Asl, F.K. Kiani, M. Peydaveisi, G. Ghalamfarsa, F. Jadidi-Niaragh, A. Sevbitov, Adenosine and adenosine receptors in colorectal cancer, *International immunopharmacology*, 87 (2020) 106853.
- [40] A. Bahreyni, S.S. Samani, F. Rahmani, R. Behnam-Rassouli, M. Khazaei, M. Ryzhikov, M.R. Parizadeh, A. Avan, S.M. Hassanian, Role of adenosine signaling in the pathogenesis of breast cancer, *Journal of cellular physiology*, 233 (2018) 1836-1843.
- [41] M. Aghaei, F. Karami-Tehrani, M. Panjehpour, S. Salami, F. Fallahian, Adenosine induces cell-cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent and-independent prostate cancer cell lines, LNCap-FGC-10, DU-145, and PC3, *The Prostate*, 72 (2012) 361-375.
- [42] Y. Inoue, K. Yoshimura, N. Kurabe, T. Kahyo, A. Kawase, M. Tanahashi, H. Ogawa, N. Inui, K. Funai, K. Shinmura, Prognostic impact of CD73 and A2A adenosine receptor expression in non-small-cell lung cancer, *Oncotarget*, 8 (2017) 8738.

- [43] D. Vijayan, A. Young, M.W. Teng, M.J. Smyth, Targeting immunosuppressive adenosine in cancer, *Nature Reviews Cancer*, 17 (2017) 709-724.
- [44] D. Boison, G.G. Yegutkin, Adenosine metabolism: emerging concepts for cancer therapy, *Cancer cell*, 36 (2019) 582-596.
- [45] N. Riksen, G. Rongen, D. Yellon, P. Smits, Human in vivo research on the vascular effects of adenosine, *European journal of pharmacology*, 585 (2008) 220-227.
- [46] D. Allard, B. Allard, P.-O. Gaudreau, P. Chrobak, J. Stagg, CD73–adenosine: a next-generation target in immuno-oncology, *Immunotherapy*, 8 (2016) 145-163.
- [47] G. Möser, J. Schrader, A. Deussen, Turnover of adenosine in human and dog blood, *The American journal of physiology*, 256 (1989) C799-806.
- [48] K.C. Agarwal, Modulation of vasopressin actions on human platelets by plasma adenosine and theophylline: gender differences, *J Cardiovasc Pharmacol*, 21 (1993) 1012-1018.
- [49] J. You, Z. You, X. Xu, J. Ji, T. Lu, Y. Xia, L. Wang, L. Zhang, S. Du, A split aptamer-labeled ratiometric fluorescent biosensor for specific detection of adenosine in human urine, *Microchimica Acta*, 186 (2018).
- [50] H. Rajasekeran, Y. Lytvyn, A. Bozovic, J. Lovshin, E. Diamandis, D. Cattran, M. Husain, B. Perkins, A. Advani, H. Reich, V. Kulasingam, D. Cherney, Urinary Adenosine Excretion in Type 1 Diabetes, *American journal of physiology. Renal physiology*, 313 (2017) ajprenal.00043.02017.
- [51] H. Funaya, M. Kitakaze, K. Node, T. Minamino, K. Komamura, M. Hori, Plasma adenosine levels increase in patients with chronic heart failure, *Circulation*, 95 (1997) 1363-1365.
- [52] R. G Krishnan, R. Rejithamol, B. Saraswathyamma, Non-Enzymatic Electrochemical Sensor for the Simultaneous Determination of Adenosine, Adenine and Uric Acid in Whole Blood and Urine, *Microchemical Journal*, 155 (2020) 104745.
- [53] S. Suzuki, Y. Yoneyama, R. Sawa, T. Araki, Relation between maternal serum adenosine deaminase and plasma adenosine levels in twin pregnancies, *Clin Biochem*, 35 (2002) 417-419.
- [54] S. Kesavan, N. Gowthaman, S. Alwarappan, S.A. John, Real time detection of adenosine and theophylline in urine and blood samples using graphene modified electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 278 (2019) 46-54.
- [55] K.K. Hussain, M.H. Akhtar, M.-H. Kim, D.-K. Jung, Y.-B. Shim, Performance comparison between multienzymes loaded single and dual electrodes for the simultaneous electrochemical detection of adenosine and metabolites in cancerous cells, *Biosensors and Bioelectronics*, 109 (2018) 263-271.
- [56] Y. Lin, X. Wang, Y. Sun, Y. Dai, W. Sun, X. Zhu, H. Liu, R. Han, D. Gao, C. Luo, A chemiluminescent biosensor for ultrasensitive detection of adenosine based on target-

responsive DNA hydrogel with Au@HKUST-1 encapsulation, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 289 (2019) 56-64.

[57] S. Yousefi, M. Saraji, Developing a fluorometric aptasensor based on carbon quantum dots and silver nanoparticles for the detection of adenosine, *Microchemical Journal*, 148 (2019) 169-176.

[58] N. Katada, M. Niwa, Re-birth of molecular imprinting on silica, *Molecular imprinting of polymers*, (2006) 26-40.

[59] S. Dmitrienko, V. Apyari, 9. Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis, Properties, and Application in Analysis of Real Samples: Nanoobjects and Nanotechnologies in Analytical Chemistry, 2018.

[60] Z. Zhang, J. Liu, Molecular Imprinting with Functional DNA, *Small*, 15 (2019).

[61] X.-H. Ma, J. Li, W. Chao, G.-B. Xu, A Review on Bio-macromolecular Imprinted Sensors and Their Applications, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44 (2016) 152-159.

[62] T. Cowen, E. Stefanucci, E. Piletska, G. Marrazza, F. Canfarotta, S. Piletsky, Synthetic Mechanism of Molecular Imprinting at the Solid Phase, *Macromolecules*, 53 (2020).

[63] J. Lowdon, H. Diliën, P. Singla, T. Cleij, B. van Grinsven, K. Eersels, M. Peeters, MIPs for commercial application in low-cost sensors and assays – An overview of the current status quo, *Sensors and Actuators B Chemical*, 325 (2020) 128973.

[64] D. Çimen, M.A. Özbek, N. Bereli, A. Denizli, Proteomic Applications of Plasmonic Sensors, *Plasmonic Sensors and their Applications*, (2021) 137-156.

[65] E. Turiel, A.M. Esteban, 8 - Molecularly imprinted polymers, in: C.F. Poole (Ed.) *Solid-Phase Extraction*, Elsevier2020, pp. 215-233.

[66] G. Ertürk, B. Mattiasson, Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors, *Sensors (Basel)*, 17 (2017) 288.

[67] Y. Saylan, Ö. Erdem, F. Inci, A. Denizli, Advances in Biomimetic Systems for Molecular Recognition and Biosensing, *Biomimetics*, 5 (2020) 20.

[68] M. Włoch, J. Datta, Synthesis and polymerisation techniques of molecularly imprinted polymers, 2019.

[69] I. Tothill, M. Abdin, Nano Molecular Imprinted Polymers (NanoMIPs) for Food Diagnostics and Sensor, 2017, pp. 131-151.

[70] O. Sheej Ahmad, T. Bedwell, C. Esen, A. Garcia-Cruz, S. Piletsky, Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors, *Trends in Biotechnology*, 37 (2018).

- [71] K.F. Lim, C.I. Holdsworth, Effect of Formulation on the Binding Efficiency and Selectivity of Precipitation Molecularly Imprinted Polymers, *Molecules* (Basel, Switzerland), 23 (2018) 2996.
- [72] M. Włoch, J. Datta, Synthesis and polymerisation techniques of molecularly imprinted polymers, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier 2019, pp. 17-40.
- [73] K.F. Pratama, M.E.R. Manik, D. Rahayu, A.N. Hasanah, Effect of the molecularly imprinted polymer component ratio on analytical performance, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 68 (2020) 1013-1024.
- [74] A.N. Hasanah, N. Safitri, A. Zulfa, N. Neli, D. Rahayu, Factors Affecting Preparation of Molecularly Imprinted Polymer and Methods on Finding Template-Monomer Interaction as the Key of Selective Properties of the Materials, *Molecules*, 26 (2021) 5612.
- [75] I.E. Tothill, M.J. Abdin, Nano molecular imprinted polymers (nanoMIPs) for food diagnostics and sensor, *Nanotechnology*, Springer 2017, pp. 131-151.
- [76] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li, Molecular imprinting: perspectives and applications, *Chemical Society Reviews*, 45 (2016) 2137-2211.
- [77] H. Yang, H.-B. Liu, Z.-S. Tang, Z.-D. Qiu, H.-X. Zhu, Z.-X. Song, A.-L. Jia, Synthesis, performance, and application of molecularly imprinted membranes: A review, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9 (2021) 106352.
- [78] P. Qi, J. Wang, L. Wang, Y. Li, J. Jin, F. Su, Y. Tian, J. Chen, Molecularly imprinted polymers synthesized via semi-covalent imprinting with sacrificial spacer for imprinting phenols, *Polymer*, 51 (2010) 5417-5423.
- [79] Y. Hongyuan, K. Row, Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, *International Journal of Molecular Sciences*, 7 (2006).
- [80] P. Curcio, C. Zandanel, A. Wagner, C. Mioskowski, R. Baati, Semi-covalent surface molecular imprinting of polymers by one-stage mini-emulsion polymerization: glucopyranoside as a model analyte, *Macromol Biosci*, 9 (2009) 596-604.
- [81] Y. Cai, Y. Chen, X. Hong, Z. Liu, W. Yuan, Porous microsphere and its applications, *Int J Nanomedicine*, 8 (2013) 1111-1120.
- [82] S. Cao, J. Chen, W. Sheng, W. Wu, Z. Zhao, F. Long, The Fabrication and Development of Molecularly Imprinted Polymer-based Sensors for Environmental Application, 2012, pp. 57-72.
- [83] Q. Liu, Y. Feng, S. Huang, Q. Wu, J. He, Preparation of ordered macroporous cinchonine molecularly imprinted polymers and comparative study of their structure and binding properties with traditional bulk molecularly imprinted polymers, *Polymer International*, 64 (2015) 1594-1599.
- [84] H. Zhang, Molecularly imprinted nanoparticles for biomedical applications, *Advanced Materials*, 32 (2020) 1806328.

- [85] H.B. Yamak, Emulsion polymerization: effects of polymerization variables on the properties of vinyl acetate based emulsion polymers, *Polymer science*, IntechOpen2013.
- [86] C. Dong, H. Shi, Y. Han, Y. Yang, R. Wang, J. Men, Molecularly imprinted polymers by the surface imprinting technique, *European Polymer Journal*, 145 (2021) 110231.
- [87] F. Cui, Z. Zhou, H.S. Zhou, Molecularly Imprinted Polymers and Surface Imprinted Polymers Based Electrochemical Biosensor for Infectious Diseases, *Sensors (Basel)*, 20 (2020).
- [88] M. Guć, G. Schroeder, Application of Molecularly Imprinted Polymers (MIP) and Magnetic Molecularly Imprinted Polymers (mag-MIP) to Selective Analysis of Quercetin in Flowing Atmospheric-Pressure Afterglow Mass Spectrometry (FAPA-MS) and in Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS), *Molecules*, 24 (2019).
- [89] E.I. Paruli, O. Soppera, K. Haupt, C. Gonzato, Photopolymerization and Photostructuring of Molecularly Imprinted Polymers, *ACS Applied Polymer Materials*, 3 (2021) 4769-4790.
- [90] A. Abo Dena, A. Ali, I. El-Sherbiny, Surface-Imprinted Polymers (SIPs): Advanced Materials for Bio-Recognition, 8 (2020) 1-19.
- [91] B. Fresco-Cala, A.D. Batista, S. Cárdenas, Molecularly imprinted polymer micro- and nano-particles: A review, *Molecules*, 25 (2020) 4740.
- [92] Y. Zhao, Y. Ma, H. Li, L. Wang, Composite QDs@ MIP nanospheres for specific recognition and direct fluorescent quantification of pesticides in aqueous media, *Analytical chemistry*, 84 (2012) 386-395.
- [93] S. Suriyanarayanan, S. Mandal, K. Ramanujam, I.A. Nicholls, Electrochemically synthesized molecularly imprinted polythiophene nanostructures as recognition elements for an aspirin-chemosensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 253 (2017) 428-436.
- [94] T. Chu, V.-P. Vu, H.-T. Tran, T. Tran, T. Thinh, T. Manh, Molecularly Imprinted Polyaniline Nanowire-Based Electrochemical Biosensor for Chloramphenicol Detection: A Kinetic Study of Aniline Electropolymerization, *Journal of The Electrochemical Society*, 167 (2020) 027527.
- [95] M.E. Çorman, A. Cetinkaya, G. Ozcelikay, E. Özgür, E.B. Atici, L. Uzun, S.A. Ozkan, A porous molecularly imprinted nanofilm for selective and sensitive sensing of an anticancer drug ruxolitinib, *Analytica Chimica Acta*, 1187 (2021) 339143.
- [96] H. Munawar, J.S. Mankar, M.D. Sharma, A. Garcia-Cruz, L.A.L. Fernandes, M. Peacock, R.J. Krupadam, Highly selective electrochemical nanofilm sensor for detection of carcinogenic PAHs in environmental samples, *Talanta*, 219 (2020) 121273.
- [97] Ç. Çiçek, F. Yılmaz, E. Özgür, H. Yavuz, A. Denizli, Molecularly imprinted quartz crystal microbalance sensor (QCM) for bilirubin detection, *Chemosensors*, 4 (2016) 21.

- [98] M. Yu, L. Wu, J. Miao, W. Wei, A. Liu, S. Liu, Titanium dioxide and polypyrrole molecularly imprinted polymer nanocomposites based electrochemical sensor for highly selective detection of p-nonylphenol, *Analytica Chimica Acta*, 1080 (2019) 84-94.
- [99] F.A. Dar, G. Qazi, T.B. Pirzadah, Nano-Biosensors: NextGen Diagnostic Tools in Agriculture, *Nanobiotechnology in Agriculture*, Springer, Cham2020, pp. 129-144.
- [100] A.E.D. Mahmoud, M. Fawzy, Nanosensors and Nanobiosensors for Monitoring the Environmental Pollutants, *Waste Recycling Technologies for Nanomaterials Manufacturing*, (2021) 229-246.
- [101] A. Touhami, *Biosensors and Nanobiosensors: Design and Applications*, 2014, pp. 374-403.
- [102] N.M. Noah, P.M. Ndagili, Current Trends of Nanobiosensors for Point-of-Care Diagnostics, *J Anal Methods Chem*, 2019 (2019) 2179718.
- [103] P. Malik, V. Katyal, V. Malik, A. Asatkar, G. Inwati, T.K. Mukherjee, *Nanobiosensors: concepts and variations*, *International Scholarly Research Notices*, 2013 (2013).
- [104] Y. Saylan, A. Denizli, Virus detection using nanosensors, *Nanosensors for Smart Cities*, Elsevier2020, pp. 501-511.
- [105] Y. Dahman, *Nanosensors***By Yaser Dahman, Amira Radwan, Boris Nestic, and Jason Isbister, 2017, pp. 67-91.
- [106] I.-H. Cho, D.H. Kim, S. Park, Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis, *Biomaterials research*, 24 (2020) 1-12.
- [107] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures, *Sensors*, 8 (2008) 1400-1458.
- [108] A. Yang, F. Yan, Flexible electrochemical biosensors for health monitoring, *ACS Applied Electronic Materials*, 3 (2020) 53-67.
- [109] M. Pohanka, Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications, *Materials (Basel)*, 11 (2018).
- [110] S. Tombelli, Piezoelectric biosensors for medical applications, *Biosensors for Medical Applications*, Elsevier2012, pp. 41-64.
- [111] G. Bhatt, S. Bhattacharya, Biosensors on chip: a critical review from an aspect of micro/nanoscales, *Journal of Micromanufacturing*, 2 (2019) 198-219.
- [112] S.M. Mousavi, S.A. Hashemi, M. Zarei, A.M. Amani, A. Babapoor, Nanosensors for chemical and biological and medical applications, *Med Chem (Los Angeles)*, 8 (2018) 2161-0444.1000515.
- [113] M. Rabbani, M.E. Hoque, Z.B. Mahbub, Nanosensors in biomedical and environmental applications: Perspectives and prospects, *Nanofabrication for Smart Nanosensor Applications*, Elsevier2020, pp. 163-186.

- [114] D. Manoj, S. Shanmugasundaram, C. Anandharamakrishnan, Nanosensing and nanobiosensing: Concepts, methods, and applications for quality evaluation of liquid foods, *Food Control*, (2021) 108017.
- [115] E. Omanović-Miklićanina, M. Maksimović, Nanosensors applications in agriculture and food industry, *Bull Chem Technol Bosnia Herzegovina*, 47 (2016) 59-70.
- [116] A. Munawar, Y. Ong, R. Schirhagl, M.A. Tahir, W.S. Khan, S.Z. Bajwa, Nanosensors for diagnosis with optical, electric and mechanical transducers, *RSC advances*, 9 (2019) 6793-6803.
- [117] P. Damborský, J. Švitel, J. Katrlík, Optical biosensors, *Essays in biochemistry*, 60 (2016) 91-100.
- [118] K. Takemura, Surface plasmon resonance (SPR)-and localized SPR (LSPR)-based virus sensing systems: Optical vibration of nano-and micro-metallic materials for the development of next-generation virus detection technology, *Biosensors*, 11 (2021) 250.
- [119] S. Faalnouri, D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, Surface Plasmon Resonance Nanosensors for Detecting Amoxicillin in Milk Samples with Amoxicillin Imprinted Poly (hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-(L)-glutamic acid), *ChemistrySelect*, 5 (2020) 4761-4769.
- [120] D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, Patulin Imprinted Nanoparticles Decorated Surface Plasmon Resonance Chips for Patulin Detection, *Photonic Sensors*, (2021) 1-13.
- [121] Y. Saylan, S. Akgönüllü, D. Çimen, A. Derazshamshir, N. Bereli, F. Yılmaz, A. Denizli, Development of surface plasmon resonance sensors based on molecularly imprinted nanofilms for sensitive and selective detection of pesticides, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241 (2017) 446-454.
- [122] D. Çimen, N. Bereli, S. Günaydın, A. Denizli, Detection of cardiac troponin-I by optic biosensors with immobilized anti-cardiac troponin-I monoclonal antibody, *Talanta*, 219 (2020) 121259.
- [123] B. Špačková, P. Wrobel, M. Bocková, J. Homola, Optical biosensors based on plasmonic nanostructures: a review, *Proceedings of the IEEE*, 104 (2016) 2380-2408.
- [124] B.A. Prabowo, A. Purwidyantri, K.-C. Liu, Surface plasmon resonance optical sensor: A review on light source technology, *Biosensors*, 8 (2018) 80.
- [125] R. Peltomaa, B. Glahn-Martínez, E. Benito-Peña, M.C. Moreno-Bondi, Optical biosensors for label-free detection of small molecules, *Sensors*, 18 (2018) 4126.
- [126] D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, Surface Plasmon Resonance Based on Molecularly Imprinted Polymeric Film for l-Phenylalanine Detection, *Biosensors (Basel)*, 11 (2021).
- [127] A.A. Topçu, E. Özgür, F. Yılmaz, N. Bereli, A. Denizli, Real time monitoring and label free creatinine detection with artificial receptors, *Materials Science and Engineering: B*, 244 (2019) 6-11.

- [128] A.G. Sarıkaya, B. Osman, T. Çam, A. Denizli, Molecularly imprinted surface plasmon resonance (SPR) sensor for uric acid determination, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 251 (2017) 763-772.
- [129] V. Baldoneschi, P. Palladino, M. Banchini, M. Minunni, S. Scarano, Norepinephrine as new functional monomer for molecular imprinting: An applicative study for the optical sensing of cardiac biomarkers, *Biosensors and Bioelectronics*, 157 (2020) 112161.
- [130] M. Jalilzadeh, D. Çimen, A. Denizli, Adenosine-imprinted magnetic core-shell polyvinylbutyral microbeads for quantification of adenosine in plasma, *Journal of Chromatography B*, 1147 (2020) 122149.
- [131] N. Bereli, D. Çimen, A. Denizli, Optical Sensor-Based Molecular Imprinted Poly (Hydroxyethyl Methacrylate-N-Methacryloyl-(L)-Histidine Methyl ester) Thin Films for Determination of Tartrazine in Fruit Juice, *IEEE Sensors Journal*, 21 (2021) 13215-13222.
- [132] O. Payton, A. Champneys, M. Homer, L. Picco, M. Miles, Feedback-induced instability in tapping mode atomic force microscopy: theory and experiment, *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 467 (2011) 1801-1822.
- [133] E. Bormashenko, Contact angles of rotating sessile droplets, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 432 (2013) 38-41.
- [134] Q. Zhang, L. Jing, J. Zhang, Y. Ren, Y. Wang, Y. Wang, T. Wei, B. Liedberg, Surface plasmon resonance sensor for femtomolar detection of testosterone with water-compatible macroporous molecularly imprinted film, *Anal Biochem*, 463 (2014) 7-14.
- [135] D. Çimen, A. Denizli, Development of rapid, sensitive, and effective plasmonic nanosensor for the detection of vitamins in infant formula and milk samples, *Photonic Sensors*, 10 (2020) 316-332.
- [136] N. Ayawei, A.N. Ebelegi, D. Wankasi, Modelling and interpretation of adsorption isotherms, *Journal of chemistry*, 2017 (2017).
- [137] G.F. Abu-Alsoud, K.A. Hawboldt, C.S. Bottaro, Comparison of four adsorption isotherm models for characterizing molecular recognition of individual phenolic compounds in porous tailor-made molecularly imprinted polymer films, *ACS applied materials & interfaces*, 12 (2020) 11998-12009.
- [138] C. Sun, X. Liu, K. Feng, J. Jiang, G. Shen, R. Yu, An aptazyme-based electrochemical biosensor for the detection of adenosine, *Analytica chimica acta*, 669 (2010) 87-93.
- [139] L.-E. Gliga, B.-C. Iacob, B. Cheşcheş, A. Florea, L. Barbu-Tudoran, E. Bodoki, R. Oprean, Electrochemical platform for the detection of adenosine using a sandwich-structured molecularly imprinted polymer-based sensor, *Electrochimica Acta*, 354 (2020) 136656.

- [140] Y. Lin, X. Wang, Y. Sun, Y. Dai, W. Sun, X. Zhu, H. Liu, R. Han, D. Gao, C. Luo, A chemiluminescent biosensor for ultrasensitive detection of adenosine based on target-responsive DNA hydrogel with Au@ HKUST-1 encapsulation, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 289 (2019) 56-64.
- [141] J. Du, H. Ge, S. Long, W. Sun, J. Fan, X. Peng, Gold nanoparticle-based plasmonic probe for selective recognition of adenosine, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 296 (2019) 126591.
- [142] H. Liu, Y. Bai, J. Qin, H. Wang, Y. Wang, Z. Chen, F. Feng, Exonuclease I assisted fluorometric aptasensor for adenosine detection using 2-AP modified DNA, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 256 (2018) 413-419.
- [143] N. Bereli, D. Çimen, S. Hüseyinli, A. Denizli, Detection of amoxicillin residues in egg extract with a molecularly imprinted polymer on gold microchip using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance methods, *Journal of Food Science*, 85 (2020) 4152-4160.
- [144] D. Çimen, S. Ashyüce, T.D. Tanalp, A. Denizli, Molecularly imprinted nanofilms for endotoxin detection using an surface plasmon resonance sensor, *Analytical Biochemistry*, (2021) 114221.

