

**BİLİRUBİN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER BASKILANMIŞ
SENSÖRLERİN HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF MOLECULARLY IMPRINTED SENSOR
FOR BILIRUBIN DETECTION**

ÇİĞDEM ÇİÇEK

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

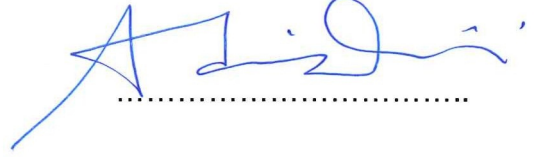
Olarak hazırlanmıştır.

2014

Çiğdem Çiçek'in hazırladığı " Bilirubin tayini için moleküler baskılanmış sensörlerin hazırlanması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan



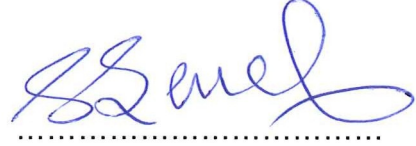
Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Üye (Danışman)



Prof. Dr. Serap ŞENEL

Üye



Doç. Dr. Lokman UZUN

Üye



Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

27/06/2014



Çiğdem ÇİÇEK

Canım Ailem ve Ahmet'e...

ÖZET

BİLİRUBİN TAYİNİ İÇİN BASKILANMIŞ SENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

Çiğdem ÇiÇEK

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Haziran 2014, 81 sayfa

Yapılan çalışmanın amacı hiperbilirubinemili insan serumundan ve bilirubin sulu çözeltisinden bilirubin tayinine yönelik kuvars kristal mikroterazi sensör hazırlanmasıdır. QCM biyosensör, QCM çipin altın yüzeyine bilirubin baskılanmış PHEMATrp nanofilminin tutturulması ile hazırlanmıştır. Kompleksleştirici monomer olarak metakroiltriptofan (MATrp) seçilmiştir. İlk olarak metakroiltriptofan metil esteri ve metakroil klorür reaksiyonundan metakroiltriptofan (MATrp) sentezlenmiş ve FTIR ile karakterize edilmiştir. Daha sonra bilirubin MATrp ile ön kompleksleştirilerek bilirubin baskılanmış poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakroil triptofanmetil esteri) (PHEMATrp) MIP nanofilmi fotopolimerizasyon ile sentezlendi. Ayrıca baskılanmamış PHEMATrp (NIP) nanofilmi aynı yöntemle sadece ortamda kalıp molekül (bilirubin) eklenmeksizin sentezlenmiştir. Bilirubin baskılanmış polimer çözeltisi QCM çipin altın yüzeyine damlatılıp, UV lamba altında 20 dakika polimerleşmesi sağlanmıştır. Hazırlanan QCM sensörler, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre, FTIR-ATR ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir. Kalınlık ölçümleri ve AFM görüntüleri, nanofilmlerin tek

tabakalı olduğunu göstermiştir. Karakterizasyon çalışmalarının ardından elde edilen baskılanmış ve baskılanmamış sensörler QCM sistemine bağlanarak hedef moleküle ait kinetik ve afinite bağlanma çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra kan serumu QCM sensöre gönderilerek serumdaki bilirubin miktarı tayin edilmiştir. Baskılanmış nanofilmin, baskılanmamış nanofilme göre hedef moleküle (bilirubin) daha fazla duyarlılık göstermiştir. Adsorpsiyon kinetikleri farklı derişimlerdeki bilirubin çözeltisinin QCM sisteminden geçirilmesi ile belirlenmiştir. Langmuir adsorpsiyon modeli, bu afinite sistemi için en uygun model olarak bulunmuştur. Bilirubin baskılanmış PHEMATrp nanofilmin seçiciliğini göstermek için bilirubin, kolesterol ve östrodiol yarışmacı adsorbsiyonu araştırılmıştır. Sonuçlar, baskılanmış sensörlerin bilirubin için yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Bilirubin, hiperbilirubinemi, moleküler baskılama, kuvars kristal mikroterazi.

ABSTRACT

PREPARATION OF MOLECULARLY IMPRINTED SENSOR FOR BILIRUBIN DETECTION

Çiğdem ÇİÇEK

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

June 2014, 81 pages

The aim of this study is preparation of quartz crystal microbalance (QCM) biosensor for the detection of bilirubin from hyperbilirubinemic human serum and bilirubin solution. QCM biosensor was prepared by attachment of bilirubin imprinted poly(2-hydroxyethyl methacrylate-N-metacryloyl tryptophan methyl ester) (PHEMATrp) nanofilm on the gold surface of QCM sensor. In the first step, functional monomer MATrp was synthesized by the reaction of tryptophan methylester and metacryloyl chloride and characterized with FTIR. Then, bilirubin was pre-complexed with MATrp and bilirubin-imprinted poly(2-hydroxyethyl methacrylate-N-metacryloyl tryptophan (PHEMATrp) (MIP) nanofilms were produced by fotopolimerization. Non-imprinted PHEMATrp (NIP) nanofilms were synthesized by the same experimental procedure without bilirubin. A small amount of bilirubin imprinted polimer were dropped on the gold surface and then was allowed polimerization 20 minute with UV lamb. Prepared QCM sensors characterized with atomic force microscopy (AFM), ellipsometer, fourier transform infrared spectro-photometry (FTIR) and contact angle measurement. The

thickness measurement and AFM observation indicated that nanofilms were almost monolayer. After the characterization studies, the imprinted and non-imprinted QCM sensors were connected to QCM system to obtain the kinetic and affinity studies for the target molecule. Then human serum of bilirubin was determined with QCM. Imprinted nanofilms showed more sensitivity to bilirubin than non-imprinted ones. Bilirubin solution with different concentration were applied to QCM system to determine the adsorption kinetics. Langmuir adsorption model was found as the most suitable model for this affinity system. In order to show the selectivity of the bilirubin imprinted PHEMATrp nanofilms, competitive adsorption of bilirubin, cholesterol and estradiol was investigated. The results showed that the imprinted nanosensor has high selectivity and sensitivity for bilirubin.

Key Words: Bilirubin, hyperbilirubinemi, molecular imprinting and quartz crystal microbalance.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı yapma fırsatı sunan, problemlerin çözümünde engin bilgilerinden yararlandığım, örnek aldığım ve her zaman alacağım bilim insanı, kıymetli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Her zaman güler yüzüyle enerji veren, sorunların çözümünde gösterdiği ilgi ve samiyeti ile bilimsel katkı ve desteğini hep hissettiğim, tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e

Tez çalışması konusunda her zaman destek olan, teorik ve pratik bilgilerini benimle paylaşarak çalışmamı tamamlamamda çok büyük katkı sağlayan, karşılaştığım sorunların üstesinden gelmeme yardımcı olan hocam Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a

Bilimsel katkı ve destekleri için sevgili hocam Doç. Dr. Lokman Uzun'a

Çalışmam boyunca teorik bilgi ve pratik uygulamalarından yararlandığım Erdoğan Özgür'e

Tez çalışması boyunca bana destek olan arkadaşlarım, Esmâ Sari, Canan Armutçu, Recep Üzek, Mehmet Emin Çorman, Gülsu Şener, Mine Dursun, Fatma Kartal, Lale Bağmanlı Kemal Çetin, Bahar Ergün, Türkan Memmadova, Seda Atay, Mahdi Yar, Sevgi Aslıyüce Çoban, Müge Andaç, Gözde Baydemir, Nilay Bereli, Ali Derazshamshir, Yeşeren Saylan, Duygu Çimen, Emel Tamahkar, Semra Akgönüllü, Daryoush Majidi, Kıvılcım Güler, Sabina Hüseyinli, Monireh Bakhshpour, Erkut Yılmaz, Aykut Arif Topçu, Işık Perçin Demirçelik, Kadir Erol, Kazım Köse, Ilgım Göktürk'e

Her zaman yanımda hissettiğim, her zorlukta bana destek olup yüreklendiren, tez sürecinde en büyük destekçim, yokluğunu asla düşünemediğim, hayat arkadaşım Ahmet'e

Hayatım boyunca desteklerinin hiç esirgemeyen, her koşulda yanımda olan, Annem, Babam ve Abime,

Teşekkürler...

Çiğdem Çiçek

Haziran,2014

İÇİNDEKİLER TABLOSU

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bilirubin	3
2.1.1. Bilirubin metabolizması	5
2.2. Bilirubin Toksisitesi	6
2.3. Bilirubin Belirlenmesi	8
2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi	9
2.4.1. Moleküler baskılama tekniği	10
2.4.1.1. Kalıp (Hedef) Molekül	11
2.4.1.2. Fonksiyonel Monomer	11
2.4.1.3. Çapraz Bağlayıcılar	13
2.4.1.4. Çözücü	14
2.4.1.5. Başlatıcılar	14
2.4.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri	15
2.4.2.1. Kovalent Baskılama	15
2.4.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama	16
2.4.3. Baskılama İşleminin Kontrolü	18
2.4.4. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları	19
2.5. Biyosensörler	20
2.5.1. Biyosensörlerin Kısa Tarihçesi	20
2.6. Piezoelektrik Kristalli Biyosensörler (Kütle Duyarlı Biyosensörler)	24
2.6.1. Sıcaklığın rezonans frekansına etkisi	29
3. DENEYSEL YÖNTEMLER	31
3.1. Kimyasal Maddeler	31
3.2. Bilirubin Baskılanmış PHEMATrp Nanofilmin hazırlanışı	31
3.2.1. Metakroiltriptofan (MATrp) komonomerin sentezi	31

3.2.2. Metakroiltriptofan/bilirubin (MATrp/bilirubin) ön-kompleksin hazırlanışı	31
3.2.3. MATrp Monomerinin Karakterizasyonu.....	32
3.2.3.1. FTIR Analizi	32
3.3. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensörler	32
3.3.1. Kuvars Kristal Mikroterazi Çip Altın Yüzeyinin Allil Merkaptan ile Yüzey Modifikasyonu.....	32
3.3.2. Bilirubin baskılanmış ve baskılanmamış nanofilm hazırlanışı	32
3.3.3. Kalıp Molekülün Desorpsiyonu.....	33
3.3.4. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensörlerin Karakterizasyonu.....	33
3.3.4.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi	33
3.3.4.2. Elipsometre.....	34
3.3.4.3. Temas Açısı Ölçümleri.....	34
3.3.4.4. Atomik Kuvvet Mikroskopisi	34
3.3.5. QCM Sensörle Kinetik Analizler	35
3.3.5.1. QCM Sensörde Bilirubin Sulu Çözelti Çalışmaları	35
3.3.5.2. QCM Sensörde Kan Serumu Çalışması	35
3.3.6. Yarışmalı Kinetik Analizler	36
3.3.7. QCM Sensörün Baskılanma Seçiciliğinin Belirlenmesi	36
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1. MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	37
4.2. Nanofilmin Yüzey Karakterizasyonu.....	38
4.2.1. Elipsometre Analizi	38
4.2.2. Temas Açısı Ölçümleri.....	40
4.2.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi	42
4.2.4. FTIR-ATR Analizi	45
4.3. QCM Sensörlerle Kinetik Analizler	47
4.3.1 QCM Sensörde Kan Serumu Çalışmaları	54
4.4. Denge İzoterm Modelleri	58
4.5. Yarışmalı Kinetik Analizler	61
4.6 QCM Sensörün Baskılanma Seçiciliğinin Belirlenmesi.....	63
4.7. Sensörün kullanılabilirliği.....	65
5. YORUM.....	66
6. KAYNAKLAR.....	69

7. ÖZGEÇMİŞ	81
-------------------	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Hem halkasının açılması ve biliverdinin bilirubine dönüşümü	3
Şekil 2.1. Bilirubin Konjugasyonu	6
Şekil 2.2. Bilirubin izomerleri	7
Şekil 2.3. Moleküler baskılı polimer hazırlama aşamaları.....	11
Şekil 2.5. Kovalent baskılama şekli.	16
Şekil 2.6. Kovalent olmayan baskılama şekli.....	18
Şekil 2.7. Bir biyosensörün konfigürasyonu	22
Şekil 2.8. Silikon oksitin piezoelektrik etkinin şematik gösterimi.	26
Şekil 2.9. Piezoelektrik etki.....	26
Şekil 2.10. Kuvars kristal.	26
Şekil 2.11. AT-BT kesim kuvars kristal düzlemi	27
Şekil 3.1. QCM sensör yüzeyinde nanofilm oluşumu (a) pirana çözeltisi ile yıkanmış QCM sensörün yüzey görüntüsü (b) allil merkaptan ile –SH grupları takılmış QCM sensörün yüzey görüntüsü (c) Bilirubin baskılanmış polimer çözeltisi damlatılmış QCM sensör yüzey görüntüsü.....	33
Şekil 4.1. MATrp komonomerinin molekül formülü.	37
Şekil 4.2. PHEMATrp molekül formülü.	37
Şekil 4.3. MATrp komonomerinin FTIR spektrumu.....	38
Şekil 4.4. Bilirubin (a) baskılanmış ve (b) baskılanmamış QCM sensörün 3B elipsometre görüntüsü.....	39
Şekil 4.5. Modifiye edilmemiş QCM sensör yüzey temas açısı ölçüm fotoğrafı. ...	41
Şekil 4.6. Bilirubin baskılanmış QCM sensör yüzey temas açısı ölçüm fotoğrafı..	41
Şekil 4.7. Bilirubin baskılanmamış QCM sensör yüzey temas açısı ölçüm fotoğrafı.	42

Şekil 4.8. Modifiye edilmemiş QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM 3B görüntüsü.	43
Şekil 4.9. Modifiye edilmemiş QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM yüzey görüntüsü	43
Şekil 4.10. Bilirubin baskılanmış QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM 3B görüntüsü.	44
Şekil 4.11. Bilirubin baskılanmış QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM yüzey görüntüsü.	44
Şekil 4.12. Bilirubin baskılanmamış QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM 3B görüntüsü.	45
Şekil 4.13. Bilirubin baskılanmamış QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM yüzey görüntüsü.	45
Şekil 4.14. HEMA monomerinin FTIR spektrumu.	46
Şekil 4.15. PHEMATrp nanofilmin FTIR spektrumu.	46
Şekil 4.16. Farklı derişimlerdeki bilirubin çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δf değerini gösteren sensorgramlar. (a) 1 $\mu\text{g/ml}$ (b) 5 $\mu\text{g/ml}$ (c) 10 $\mu\text{g/ml}$ (d) 15 $\mu\text{g/ml}$ (e) 20 $\mu\text{g/ml}$ (f) 25 $\mu\text{g/ml}$ (g) 50 $\mu\text{g/ml}$	48
Şekil 4.17. Farklı derişimlerdeki bilirubin çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δm değerini gösteren sensorgramlar (a) 1 $\mu\text{g/ml}$ (b) 5 $\mu\text{g/ml}$ (c) 10 $\mu\text{g/ml}$ (d) 15 $\mu\text{g/ml}$ (e) 20 $\mu\text{g/ml}$ (f) 25 $\mu\text{g/ml}$ (g) 50 $\mu\text{g/ml}$	50
Şekil 4.18. Bilirubin çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. (a) zamana karşı Δf değerini gösteren sensorgram; (b) zamana karşı Δm değerini gösteren sensorgram.	53
Şekil 4.19. İnsan kan serumu ve QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. (a) zamana karşı Δf değerini gösteren sensorgram; (b) zamana karşı Δm değerini gösteren sensorgram.	54
Şekil 4.20. Bilirubin baskılanmış QCM sensöre ait derişim ($C_{\text{bilirubin}}$) ile Δm arasındaki ilişki.	55
Şekil 4.21. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi denge analiz yaklaşımı (Scarthard)	57

Şekil 4.22. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi bağlanma kinetik yaklaşımı.	58
Şekil 4.23. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.....	59
Şekil 4.23.Devamı. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.	60
Şekil 4.24.Devamı. 25µg/mL derişimde (a) Bilirubin (b) kolesterol (c) östradiol, bilirubin baskılanmış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δm değerlerini gösteren sensörgramlardır.....	63
Şekil 4.25. 25µg/ml derişimlerde (a) bilirubin (b) kolesterol (c) östradiol çözeltilerinin bilirubin baskılanmış QCM sensörü arasındaki etkileşime ait zamana karşı Δm değerlerini gösteren sensörgramlar.....	63
Şekil 4.25.Devamı. 25µg/ml derişimlerde (a) bilirubin (b) kolesterol (c) östradiol çözeltilerinin bilirubin baskılanmış QCM sensörü arasındaki etkileşime ait zamana karşı Δm değerlerini gösteren sensorgramlar.....	64
Şekil 4.26. Billirubin baskılanmış QCM sensörün tekrar kullanılabilirliği.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Moleküler baskılı polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler	12
Çizelge 2.2. AT-kesimli ($35^{\circ} 10'$) kuvars kristal rezonatörün sıcaklık etkisiyle frekans kayma değerleri.	30
Çizelge 4.1. Temas açısı sonuçları	40
Çizelge 4.2. Atomik kuvvet mikroskop sonuçları	42
Çizelge 4.3. Kinetik hız sabitleri.....	57
Çizelge 4.4. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.	61
Çizelge 4.5. Bilirubin'e göre kolesterol ve östradiol için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.	64

1. GİRİŞ

Bilirubin yaşlanmış kırmızı kan hücreleri içerisindeki hem proteinin normal metabolizması sırasında oluşturulmuş bir tetrapireol dikarboksilik asittir ve normalde suda çözünür kompleks oluşturmak için albümin ile konjuge edilir [1]. Serum bilirubini çeşitli karaciğer hastalıklarının belirlenmesinde ve karaciğer fonksiyonlarına bakılmakta önemli bir endekstir [2]. Serbest bilirubin toksiktir. yüksek konsantrasyonda serbest bilirubin hepatik ve safra yolu hasarına ve geçirgenliğinden dolayı beyin hasarına yada ölüme sebep olabilir [3]. Eğer serumda bilirubin konsantrasyonu 15 mg/dL' nin üzerine çıkarsa, kernikterus gibi nörolojik bozukluklar ya da bilirubin ensefalopatisi gelişebilir. Yüksek konsantrasyonda bilirubinin geçici ve kalıcı etkilerinin ortadan kaldırılması için, hiperbilirubineminin zamanında tespit ve tedavisi önemlidir. Hiperbilirubinemi tedavisinde kullanılan başlıca yöntemler; fototerapi, kan değişimi, farmakolojik tedavidir [4]. Fototerapi, bilirubini lipofilik özelliği azalmış olan foto-ürünlere çevirerek detoksifiye eder. Daha az lipofilik olmuş bilirubin karaciğerin konjugasyon sistemini atlar. Daha sonra metabolik olaylara gereksinim kalmadan safraya atılır. Bilirubin, ışığı adsorbe ederek fotoizomerlerine dönüşür. Ancak fototerapinin etkili olabilmesi için deriyi en çok geçebilen mavi-yeşil 450-520 nm dalga boyundaki ışığa gereksinim vardır [5,6]. Kan değişimi tekniği ilk kez Wallerstein tarafından ortaya konuldu ve 1951 yılında Diamond ve arkadaşları tarafından geliştirildi. Rh uygunsuzluğu nedeniyle meydana gelen hiperbilirubinemiye kontrol etmek ve kernikterustan korunmak için uygulanan kan değişimi tekniği ilk tedavi yöntemidir. Kan değişimi ile bilirubin düzeylerini düşürmeye ek olarak, maternal antikoları uzaklaştırmak, üzerine antikor bağlı eritrositleri ve diğer toksik maddeleri temizlemek, hemolizin yol açtığı anemiyi düzeltmekte amaçlanmıştır [7].

Yapılan çalışmada hiperbilirubinemiye sebep olan kandaki serbest bilirubin tayini için moleküler baskılama yöntemi ile kuvars kristal mikroterazi (QCM) sensörlerin hazırlanması amaçlanmıştır. QCM sensör yüzeyine tutturmak üzere bilirubin baskılanmış nanofilm hazırlanarak bilirubinin yüksek hassasiyetli ve seçimli tayininin sağlanması çalışmanın temel amacıdır.

QCM sensörler, basitliği, uygulanabilirliği, düşük fiyatı ve eşzamanlı ölçüm gerçekleştirebilme özelliğine sahiptir [8]. Moleküler baskılanmış polimer ile kuvars kristal mikrobals (QCM)'in birleştirelmesiyle yapılan sensör tasarımı ilk olarak Mosbach ve ark. 1997'de gerçekleştirdi. Bu tip QCM sensörleri altın elektrotlar üzerinde baskılanmış polimer tabakası içerirler. QCM direkt moleküler tanıma tayinlerinde oldukça tutarlı bir nicel tekniktir. QCM aparatları elektrot üzerindeki kütle değişimine göre frekans ölçülmesine dayanmaktadır. Baskılanmış polimerlerle birleştirelmiş QCM sensörleri biyomimetik ve kimyasal alanlarda uygulanmaktadır [9].

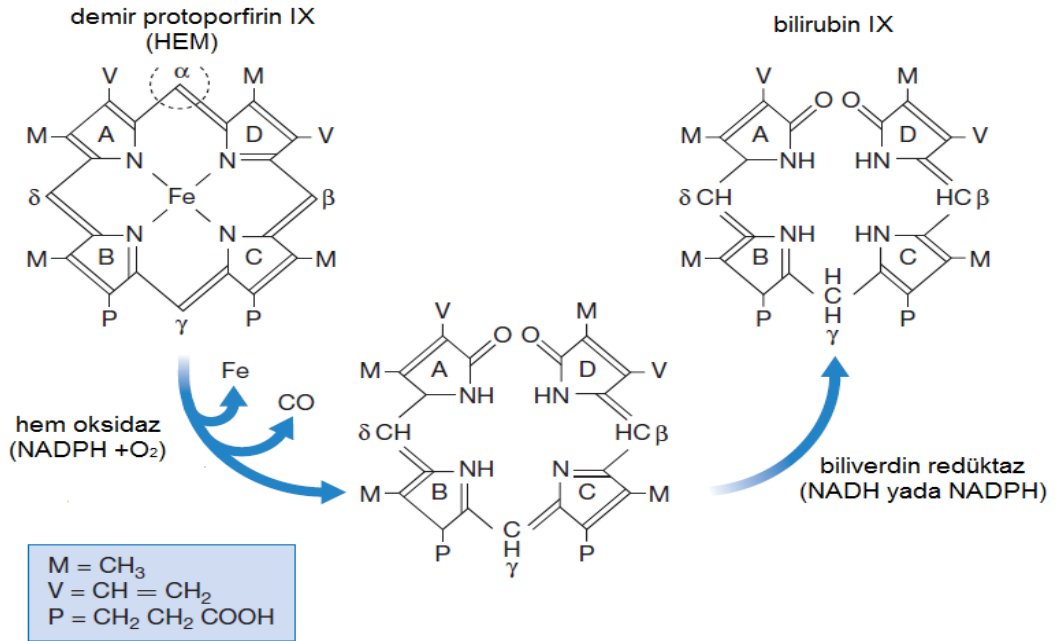
Sunulan çalışma kapsamında kuvars kristal mikroterazi (QCM) biyosensörler hazırlanmıştır. Çalışma 3 ana başlık altında gerçekleştiremiştir.

- i) Bilirubin kalıp molekülle etkileşmek için uygun yapıda fonksiyonel monomer olarak seçilen N-metakriloil-L-triptofan metil ester (MATrp), L-triptofan metil esteri ve metakroil klorürün reaksiyona sokulmasıyla sentezlenmiştir. Daha sonra NMR ve FTIR ölçümleriyle karakterize edilerek bilirubin baskılanmış nanofilm hazırlanmıştır.
- ii) Altın sensör yüzeyler temizlenmiş, karakterize edilmiş, hazırlanan nanofilm yüzeye tutturulmuş ve kinetik-afinite sabitleri belirlenmiştir.
- iii) Sensörün kararlılığı, seçiciliği ve spesifikliği incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Bilirubin

Kırmızı kan hücrelerinin ömürleri yetişkinlerde yaklaşık 120 bebeklerde 70 gündür. Kırmızı kan hücresindeki aktif bileşen hemoglobindir. Hemoglobin demir atomu merkezli porfirin halkasına sahiptir. Bu halka dokulara oksijen ve akciğere karbondioksit aktarımını sağlar. Bilirubin hemoglobin metabolizmasından üretilir. Hem, metan köprüleri ile bağlanmış dört tetrapolar halkaya sahiptir. Bu halkalar, mikrozomal enzim olan hem oksijenaz ile gama-metil köprüsünden açılırlar. Başlangıçta, indirgeyici ajan Fe(II)'ye elektrofilik atak yapar ve NADPH indirgenir. Sırasıyla alfa-metil köprüsündeki karbon, karbon monoksit (CO) olarak ayrılır. Gama-metil köprüsünün yanındaki porfirin halkasına dahil karbon atomu ise iki oksijen alarak oksitlenir. Sonuç olarak bilirubin ve biliverdinde ki iki laktam oksijeni oluşturur. Elektron eklenmesi ile Fe(III), Fe(II)'ye indirgenir daha sonra tetrapolar yapı açılır ve demir serbest kalır [10,11].



Şekil 2.1. Hem halkasının açılması ve biliverdinin bilirubine dönüşümü [12].

Hem oksijenaz enziminin halkayı açmasıyla oluşturduğu ürün, kuş, balık ve birçok amfibik tür için spesifik olan biliverdindir. Biliverdin suda çözünebilen ve non toksik olduğu kabul edilen yeşil bir pigmenttir. Birçok memeli biliverdini, turuncu pigment olan bilirubine dönüştürür. Daha az polar olan bilirubin plasental membranlardan biliverdine göre kolayca geçer [13,14].

Bilirubinun biliverdine indirgenmesi sitozolik enzim ailesinden olan biliverdin redüktaz tarafından katalizlenir. Kofaktör olarak pH 6.7 'de nikotinamin adenin dinükleotit (NADH) ya da pH 8.5'ta (NADPH) kullanılır. Kobay karaciğerde biliverdin redüktaz 70-kDa luk bir proteindir [15,16].

Bilirubinun sistemik ismi 1',8'-dioxo-1,3,6,7-tetrametil-2,8-divinilbiladien-alfa,c-dipropionik asittir. Düz kimyasal yapısını Fisher ve Plieninger belirlemiştir ve x-ışınları kristalografi ile doğrulamışlardır [17]. Bilirubinun sulu çözeltide kararsız ve gergin olmasından dolayı çözünürlüğünü belirlemek zordur. Kolloidal çözeltideki bilirubinun hücre yüzeyi ile etkileşimi sonucu suda çözünmez. Fakat polar çözücü içerisinde, molekül için hidrojen bağlarının bozulmasıyla çözünür hale gelir. Bilirubin ve sülfonamid gibi polar ligandlar albüminin polar bağlanma bölgesini paylaşırlar [18,19,20].

Doğal antioksidan seviyeleri düşük olduğu zaman, bilirubin ve biliverdin özellikle yenidoğan döneminde önemli sayılabilen güçlü antioksidan etkiye sahiptirler. Biliverdin hem kardiyak hemde küçük bağırsak nakillerinde doku reddini azaltmak için görünür [21,22]. Bilirubin yüksek konsantrasyonlarda nörotoksik olmasına rağmen, güçlü antioksidandır ve sitoprotektif aktiviteye sahiptir [23].

Biyolojik öneme sahip hem proteinin yıkımı ile bilirubin üretilir. Bilirubin kantitatif olarak safraya atıldığı için, miktarı safrada belirlenir. Konjuge olmayan bir kısımda safraya atılarak enterohepatik döngüye maruz kalabilir [24,25]. Bilirubin hesaplamada, işaretli radyoizotoplu bilirubinun döngüsü uygun bir metot olarak kullanılabilir. Etiketlenmiş aralıkta plazma bilirubin konsantrasyonu ve radyoaktivite, damar içine enjekte edilen işaretlenmiş albümin bağlı bilirubini takip ederek hesaplanabilir. Bilirubin uzaklaştırılması plazma bilirubin konsantrasyonu ve klirens ile hesaplanır. Kararlı haldeki bilirubin seviyesinde, uzaklaşan bilirubin oranı ile sentezlenen oran aynıdır [26].

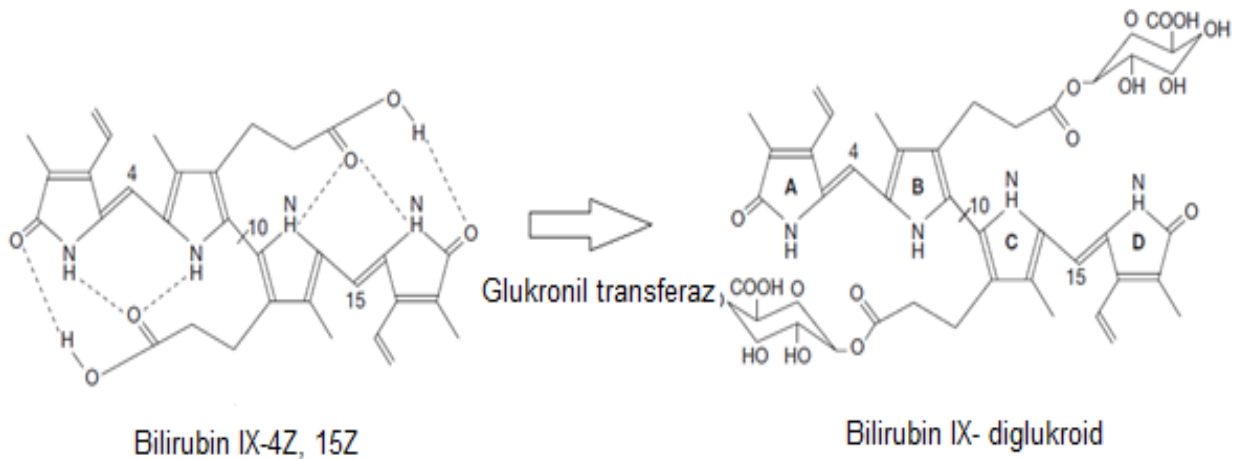
Bilirubin ilk bakışta basit bir molekül gibi gözüksede, kendine has sterokimyasal yapıya sahiptir. Tüm hidrofilik grupların güçlü hidrojen bağına katılımı ile molekül kararlı konformasyona döner [28,29]. Bu hidrojen bağları ankonjuge bilirubini hidrofobik hale getirirler. Ayrıca merkezdeki -CH₂ – koruyarak diazo reaktifi için erişilmez hale getirir. Plazma pH'na bağlı olarak UCB, monoanyon ya da dianyon

olarak yüklenmemiş diasit şeklinde gözlenir. pKa değerleri 8.12 ve 8.44 olarak belirlendiği için iyonize kısımlar alkali ortamda önemli hale gelir [29].

2.1.1 Bilirubin metabolizması

Bilirubin hemoglobindeki hem proteinden türetilmiştir ve yaşlanmış eritrositlerin yıkımı sırasında serbest kalır. Miyoglobin, sitokrom P450 enzimi gibi hem proteini kaynaklı bilirubin günlük ortalama %20 oranında üretilir. Kemik iliği ve dalaktaki monolitik makrofajlarda ve karaciğer kuffer hücrelerinde oluşturulup plazmaya salınır. Normal bir yetişkinde her 24 saatte 3,8 mg/kg ya da ortalama 250-300mg bilirubin oluşturulur. Yenidoğanda bu oluşum daha fazladır [30].

UCB suda çözünmediğinden dolayı, plazmada güçlü bir bağ ile albümine bağlanmış olarak gözlenir. Albüminin ilk bağlanma bölgesindeki ayrışma sabiti $K_d=7 \times 10^7 M^{-1}$ dir . UCB in fizyolojik pH'ta çözünürlüğü, monoanyon yapıda %17 iken dianyon yapıda çok azdır [31]. Bilirubin hepatosiklik mikrozomlarda konjuge edilir ve uridin difosfat şekerleri ester bağına takılır [32,33]. Tepkimeyi katalizleyen UDP-glukoriltransferaz enzimi, bilirubin konjugasyonu temel olarak glukronik asitle yapmasına karşın, daha fazla olarak kedi köpek ve kemirgenlerde glukoz ve xylose ile de safrada konjugasyon yapılır [34,35]. Propiyonik asitidin yan zincirinde bulunan -COOH grubuna bir yada iki şeker parçası eklenerek, sırasıyla monokonjuge ve dikonjuge bilirubin oluşturulur. Esterleşme UCB'in molekül içi hidrojen bağlarını parçalanarak safra ile atılımı sağlanabilen, amfipatik yada suda çözünebilen konjuge bilirubin haline çevirir. Bilirubin, üç tek karbon köprüsüyle birbirine bağlanmış dört pirol halkasından oluşur. Ortadaki karbon köprüsü, orta 2 pirol halkasına tek olarak bağlanır, yanlardaki 2 karbon köprüsü ise diğer iki pirol halkasına çift bağla bağlanır. Bu çift bağlarda 2 farklı konfigürasyon olabilir. Bunlardan birine Z (Almanca zusammen = beraber), diğerine E (Almanca entgegen=karşılıklı) denir. Ana molekül olan hemde bu çift bağlar Z konumunda olduğu için bilirubin de 4Z, 15Z bilirubin IX α adını alır. Bu molekülün üç boyutlu yapısında, bütün polar gruplar molekül içinde bulunduğundan hidrofobik ve lipofilik bir özellik kazanır [36].



Şekil 2.1. Bilirubin Konjugasyonu [37].

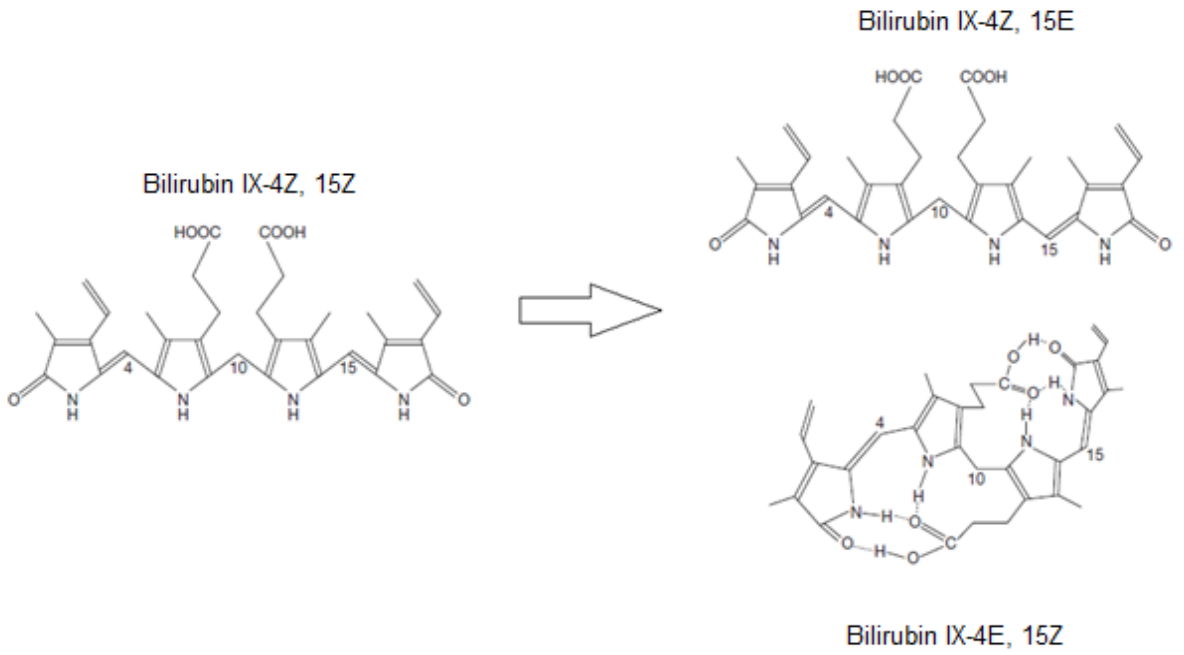
Membranlardan geçişi kolaylaştıran bu lipofilik özellik intramoleküler hidrojen bağları sayesinde ortaya çıkar ve lipofilik özellik intrauterin dönemde plasenta yoluyla temizlenmeyi sağlarken postnatal dönemde kan-beyin bariyerini kolayca geçebilmesine ve zararlı etkilerin ortaya çıkmasına neden olur. Retiküloendotelial sistemde meydana gelen bilirubin, albumine bağlanarak karaciğere taşınır. Her bir albumin molekülüne 2 bilirubin molekülü bağlanabilir. 1 g albuminin teorik olarak bağlama kapasitesi 8,5 mg bilirubindir [38].

Konjugasyon, albümine bağlanma ile azalır ve hidrofilik ajanların intestinal duvardan zor geçişinden dolayı bağırsak geri emilimi konjugasyonla önlenir. Hepatositlerdeki konjuge bilirubin konsantrasyon gradiyentine göre safra ile atılır [35]. Ankonjuge formda ki bilirubin sarı renktedir ve spektrografikal piki 450 nm de verir. Bilirubin ışığa ve oksidasyona çok duyarlı olduğundan dolayı serum örnekleri direk ışıktan korunur ve analizler hemen yapılır [39,40].

2.2. Bilirubin Toksisitesi

Yenidoğan bilirubinin beyine olan toksik etkisi son 5 yüzyıldır bilinmektedir. Bozulmuş beyin hücrelerinin sarı bilirubin pigmentleri ile birleştiği 1949 da rapor edilmiştir [28]. Bilirubinin nörotoksik etkisi, protonlanmış diasite sahip serbest ankonjuge bilirubinin beyin hücrelerine difüz etmesine bağlı olarak gelişir. Hücre seviyesinde, enerji metabolizmasının bozulması ve apoptoza dahi sebep olabilecek mitokondriyal hasara sebep olurlar. Hücre membranının karışması ile nörotransmitterlerin geçişi engellenmiş olur [41].

Sarılık, yetişkin ve çocuklarda genellikle farklı durumlarda ortaya çıkar. Ankonjuge bilirubin safrada baskın olarak bulunur ve sadece %4'ü konjugasyona uğrar. Fazla bilirubin üretildiğinde, ankonjuge oran ve konjuge edilmiş kısımlar total bilirubin seviyesini artırır. Yüksek konsantrasyonlarda bilirubin nörotoksiktir. Daha çok basal ganglionlarını ve beyin hücre fonksiyonlarını etkiler. Fototerapi bilirubini safrada atılabilen geometrik ve yapısal izomerine çevirerek serum bilirubin seviyesini azaltır. Böylelikle bilirubin konjuge edilmeden safra ile atılabilir [42].



Şekil 2.2. Bilirubin izomerleri [43].

Bilirubin plazma albümine bağlı olarak taşınır. Albümin bilirubin bağlama kapasitesinin üzerine çıktığında, intraselüller hücrelerden bilirubinün salınımı artar. Plazma konsantrasyonu 300 μM 'ın üzerine çıktığında, kernikterus diye adlandırılan nörolojik bozukluk yada bilirubin ensefalopati gelişir. Ankonjuge bilirubinün fizyolojik pH' ta çözünürlüğü yok denecek kadar azdır. Plazmada albümine bağlanması ile dokularda çökmesi ve depolanması önlenmiş olur. Kolaylaştırılmış taşıma ile karaciğer gibi organlardan uzaklaştırılır [44,4]. Bilirubin seviyesi 15 mg/dL üzerine çıktığında sarılık kliniği gözlenir [45]. Hiperbilirubinemi iki kategoride sınıflandırılır. Bilirubin konjugasyon bozukluğu yada bilirubinün fazla üretiminden kaynaklı ankonjuge hiperbilirubinemi ve safra bozukluğu yada kanalikular atılım bozukluğundan kaynaklı konjuge hiperbilirubinemi [46]. Ankonjuge hiperbilirubinemi, ektravasküler hemoliz, intravasküler hemoliz, inefektif

eritropoeziz yada büyük hematomdan kaynaklı hem katabolizmasının artması sonucu artan bilirubin üretimidir. Plazma ankonjuge bilirubin seviyesi 4-5 mg/dl olduğu durumda ankonjuge hiperbilirubinemi tanısı konulur [28].

Yenidoğanda, bilirubin fetal döngüsünden dolayı ilk doğduğu an sarılık gözlenmez. Fakat sağlıklı yetişkinlerle karşılaştırıldığında, tüm yenidoğanlar yüksek serum bilirubin konsantrasyonuna sahiptirler. Klinik gözlemlere göre yenidoğanların %50 sinde yaşamların ilk 5 gününde sarılık gelişir. Normalde yenidoğanda yaklaşık 72 saatte serum bilirubin seviyesi 6 mg/dl kadar çıkar fakat 7 ile 10 gün arasında 1 mg/dl nin altına düşer. Fizyolojik sarılık olarak tanımlanan bu klinikte ankonjuge bilirubin baskındır. Fizyolojik sarılığın artması yenidoğanda kernikterus riskini artırır. Fizyolojik sarılık, artan bilirubin üretimi ve yetişkinlere göre karaciğer yıkım kapasitesinin düşük olması durumlarının bir araya gelmesi ile oluşabilir [47].

2.3 Bilirubin Belirlenmesi

Serumda Bilirubin konsantrasyonunu belirlemede kullanılan geleneksel yöntem 1883'te Ehrlich tarafından tanımlanan dizazo reaktifi metotudur. Bu reaksiyonda diazotize edilmiş sülfanik asit (dizazo reaktifi) bilirubinle reaksiyona girerek iki azodipirolleri oluşturur. Oluşan ürünler nötral pH'da morumsu-kırmızımsı; düşük pH'da mavi renk verirler. 1916'da Van den Bergh ve Müller bu reaksiyonu, serumda bilirubin miktarını tespit etmek için kullanmışlardır. İki türlü Van den Bergh reaksiyonu vardır;

1. Direkt Diazo Reaksiyonu (beta ve gama kısmı; glukronat ile konjuge edilmiş bilirubin)

2. İndirekt Diazo Reaksiyonu (alfa kısmı; ankonjuge bilirubin)

Plazma konjuge bilirubin yüksek kalmaya devam edecek olursa, konjuge bilirubin bir kısmı albüminle kovalent olarak birleşerek delta bilirubini oluşturur [48].

Alfa ve delta kısımlar direk reaksiyonda okunabilmesine rağmen çok hassas bir yöntem değildir. Konjuge bilirubin seviyesini belirlemede daha hassas yöntem yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (HPLC). Bu metod normal koşullar altında fareler ve kobay domuzlarda test edildi ve sonra safra kanalına bağlandı. Normal koşullar altında serum konjuge bilirubin 0,006 mg/dl seviyesinde belirlenemedi. Safra kanalına bağlandıktan sonra HPLC kullanılarak konjuge

bilirubin seviyesi 10 dakikada belirlenmesine karşın, geleneksel yöntemlerle bu süre 120 dakikaya kadar yükselmiştir. Misel elektrokinetik kromatografi ile serum bilirubin kısımları (alfa, beta, gama ve delta) ayrılır. Ayrıca bilirubin oksidaz aktivitesi ve katalitik reaksiyonun izlenmesi ile bilirubin belirlenebilir [49,50].

2.4 Moleküler Baskılama Teknolojisi

Antibadi/antijen yada enzim substrat gibi sistemlerin tanıma mekanizmasının polimerik yapılara aktarılması yada birbirleriyle etkileşip yapısal ayırım yapma yöntemi moleküler baskılama olarak adlandırılır. Moleküler tanıma, reseptör ve substrat arasında ki komplekse dayanmaktadır.

Baskılanmış moleküllerin oluşumunu anlatan ilk makale 1931 yılında yayınlandı fakat moleküler baskılanma ile ilgili araştırmalar son yirmi yıldır giderek arttı. Moleküler baskılamada ilk kayıtlar 1930' da Sovyet kimyacı M.V. Polyakov tarafından gerçekleştirildi. Polyakov silika matrikslerle deney yaparken enteresan adsorbsiyon özelliklerini farketti [51]. Dikney etil ve metil turuncu boyası için spesifik bağlanma bölgelerine sahip silika jelleri geliştirdi [52]. 1959'da yayınlanan makalesiyle Morrison seçici adsorbsiyon için önerilerde bulundu [53].

Moleküler baskılanmış sentetik polimerler ilk kez 1972'de tanımlandı. Fonksiyonel grubun üç boyutlu yapısının düzenlenmesi ile sentetik polimerler yüksek seçici bağlanma bölgeleri içerir. Antikor gibi biyoreseptörler, yüksek seçicilikleri nedeniyle antijenleri saflaştırmada popüler ligandlar olmalarına rağmen ortam şartlarından kolay etkilenir ve protein yapıları asidik şartlarda, yüksek sıcaklıklarda ya da proteolitik aktivite sonucunda denatüre olur [54].

Moleküler baskılama, bir polimerizasyon işlemi içerir ve yapay ligand bölgeleri işlemi gören spesifik boşluklar üretilir. Yapılan deneylerle enzim aktivitesini taklit etmeye uygun, fonksiyonize edilmiş kaviteler gösterildi. Moleküler baskılama genellikle kovalent etkileşimler (daha sonra non-kovalent) ile hedef molekülün, fonksiyonel grup içeren monomere uygun bağlanma temeline dayanır. Daha sonra kopolimerizasyonun sonucu olarak, hedef molekül bir çapraz bağlanma ajanı ile spesifik bağlanma bölgelerine sahip rijit makrogözenekli polimer oluşturur. Hedef molekülün uzaklaştırılması ile hedef molekülün spesifik bağlanma bölgelerine, şekline, boyutuna özgü kaviteler içeren polimer elde edilmiş olur [55]. Moleküler baskılanmış polimerler kalıp molekül için yüksek seçiciliğe sahip olup mekanik

stres, ısı, asit, baz, suya ve organik çözücülere dirençlidir [56]. Birkaç yıl performanslarında değişim olmadan saklanabilmeleri, ucuz ve elde edilmelerinin kolay olması bu tarz polimerlerin geniş alanlarda tanıma ve ayırma amaçlı kullanılmalarına olanak sağlamıştır [57].

Ayrıca yüksek kararlılıkları, düşük maliyetli ve polimerizasyon basamaklarının sensör teknolojisinde kullanımı, mikroüretime tamamen uyumlu olması pek çok uygulamada sentetik tanıma elemanı olarak kullanılmalarını sağlamıştır [58]. Tüm bunlardan dolayı kimyasal/biyosensör geliştirilmesinde oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar. Herbisitler, şekerler, nükleik asit ve amino asit türevleri, ilaçlar ve toksinler ve çözücülerde moleküler baskılanmış polimer temelli sensörler geliştirilip uygulanmıştır [59].

Sentetik polimerlerin moleküler baskılanması, yapay makromoleküler reseptörlerin oluşumu için kabul edilen bir tekniktir ve ayırma alanındaki küçük kalıp moleküller için, yapay enzimlerde, kimyasal reseptörler ve tıbbi ilaçlarda başarıyla uygulanmıştır [60]. Moleküler baskılanmış polimerler biyolojik reseptöre göre çok büyük, katı ve çözünmez buna karşın biyolojik reseptör daha küçük, esnek ve çözünme olasılığı daha yüksektir [61].

2.4.1. Moleküler baskılama tekniği

Moleküler baskılama tekniği temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır.

BASAMAK I: Ön-Kompleksleşme

Hem fonksiyonel gruba hemde polimerleşebilecek doymamış bağlara sahip olan uygun monomerler kalıp yada başka bir deyişle hedef moleküle kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanarak kompleks oluşturur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemli bir yer tutar.

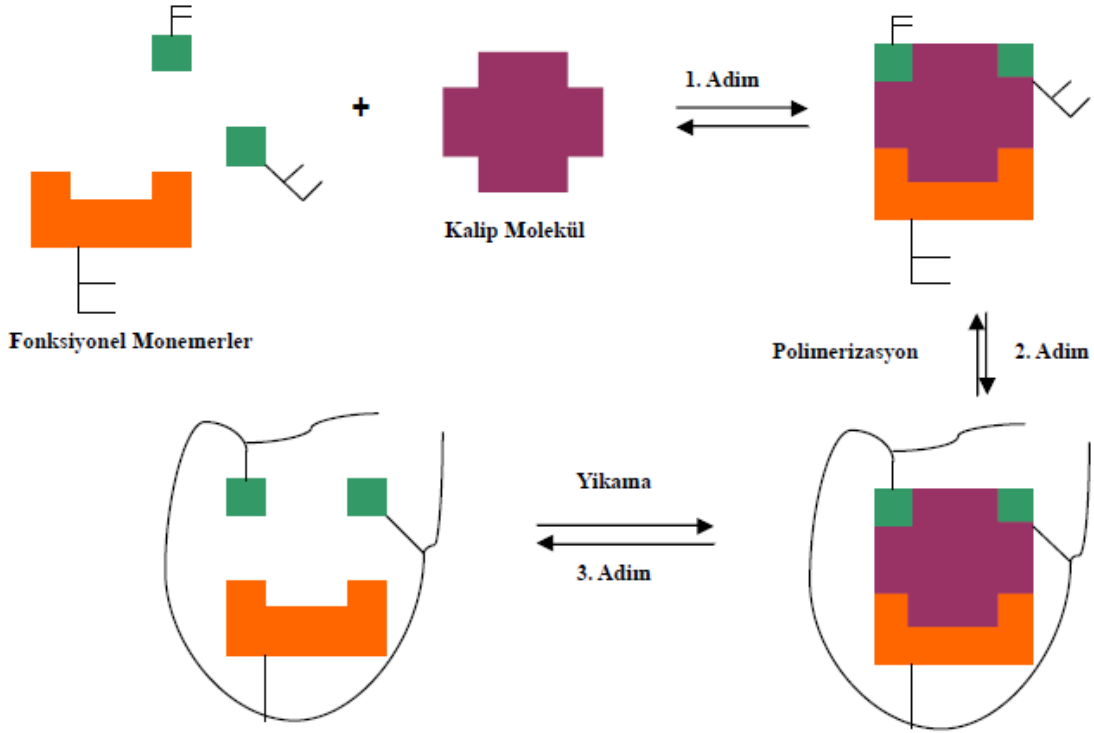
BASAMAK II: Polimerizasyon

Monomer- kalıp kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcının da kullanılmasıyla fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

BASAMAK III: Kalıp (hedef)molekülün uzaklaştırılması

Yapıda hedef molekülün yerini alacak boşlukların oluşturulması amacıyla, kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Uygun koşullar altında, bu boşluklar kalıp

molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanıır, seçici ve etkin olarak kalıp molekülü bağlar [62].



Şekil 2.3. Moleküler baskılı polimer hazırlama aşamaları.

2.4.1.1 Kalıp (Hedef) Molekül

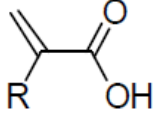
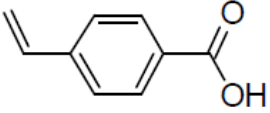
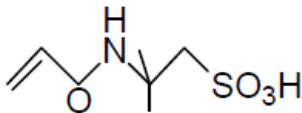
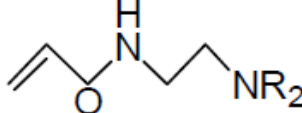
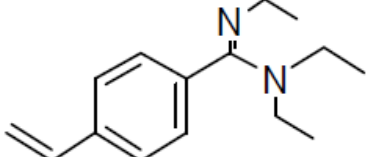
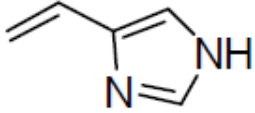
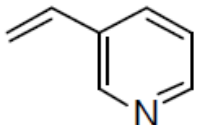
Baskılanan kalıp molekülün fonksiyonel monomerle kompleks yapacak fonksiyonel gruplar içermesi önemli parametrelerden biridir. Kalıp molekülün hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim (karbonil, amino, hidroksil ve amid grupları) yapabilecek bölgeleri kompleks oluşumu için en çok tercih edilen bölgeleridir [63]. Kalıp molekül kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği koşullar altında kararlı kalmalıdır. Kalıp molekülün konformasyonundaki ufak değişiklikler bile baskılanma işleminin başarısını etkilemektedir [64]. Baskılanacak molekül olarak, ilaçlar, aminoasitler, karbohidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler ve iyonlar kullanılabilir [65].

2.4.1.2 Fonksiyonel Monomer

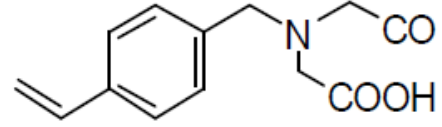
Fonksiyonel monomer, polimer matrisler ile hedef molekül için spesifik bağlanma bölgeleri oluşturmaktan sorumludur. Kompleks oluşumu için baskılama etkinliğinin

artırılması oldukça önemlidir. Daha sonra oluşan bu kaviteleer ile hedef molekülün tekrar bağlanması sağlanır.

Çizelge 2.1. Moleküler baskılı polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler [69].

Fonksiyonel monomer	Monomerin yapısal formülü
Akrilik asitler	
Vinilbenzoik asitler	
Akrilamidosülfonik asitler	
Aminometakril amidler	
N,N'-Dietil-4-vinilbenzamin	
Vinilimidazoller	
Vinilpiridinler	

4-(Vinilbenzil)iminodiasetik asit



Hedef analitin fonksiyonel grupların monomer ile bu fonksiyonel kavitelerin oluşumunu sağlar. Moleküler baskılamanın gelişiminde ve optimizasyonunda fonksiyonel monomer işlevselliğinden dolayı önemli bir husustur. Karim ve ark. literatüre 4000 in üzerinde polimerleşmeye uygun potansiyel fonksiyonel monomer rapor etmiştir [66]. Bu monomerler, elektrik yüklenmiş, asidik, bazik ve nötral olarak gruplandırılır [67,68]. Asidik yapıya sahip olan fonksiyonel monomere metakrilik asit (MAA), P-vinilbenzoik asit, akrilik asit (AA), 2-(triflorometil)-akrilik asit (TFMAA), akriloamido-(2-metil)-propan sülfonik asit (AMPASA) örnek verilebilir. Bazik olarak 4-vinil piridin (2-VP), 4-(5)-vinilimidazol, 1-vinil imidazol, allilamin, N,N'-dietil aminoetil metakrilamit (DEAEM) kabul edilirken, akrilamit, metakrilamit, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), akrilonitril (AN), metilmetakrilat (MMA), stiren, etilstiren nötral olarak kabul edilen fonksiyonel monomerlerdir [62].

2.4.1.3. Çapraz Bağlayıcılar

Mikrojel toz yada makrogözenek, jel-tip gibi polimerlerin oluşumundaki morfolojide temel sorumlulardan biri çapraz bağlayıcılardır. Baskılanmış polimerin rijit olmasını sağlayan çapraz bağlayıcı monomer, analitin fonksiyonel konfigürasyona tekrar bağlanması ve fonksiyonel kavite içinde doğru uzaysal yapısının oluşması ile uygun bağlanmanın artırılması için anahtardır. Polimerin mekanik kararlılığının oluşumunda son nihai rolü çapraz bağlayıcılar sağlar [67]. Fonksiyonel monomerden çok daha az çapraz bağlayıcı kullanımı hiçte azımsanamayacak bir durumdur.[70].

Çapraz bağlayıcılar veya çapraz bağlanma miktarı polimerik matrisin çözücünde çözünmesini engellemesinin yanısıra çapraz bağlayıcı ajanın fonksiyonel monomere oranıda polimerizasyonun istenilen şekilde oluşmasını sağlar [68,71]. Etkin bir baskılama gerçekleştirmek için çapraz bağlayıcılar ile fonksiyonel monomerin uyum içinde olması gerekir aksi durumda ikisinden biri baskın çıkar ve istenilen homojen kopolimerizasyon gerçekleşmez. Çapraz bağlayıcı/fonksiyonel

monomer derişim oranları moleküler baskılanmış polimerdeki farklı sayıda spesifik kaviterler oluşmasını sağlar ve böylece seçicilik etkilenmiş olur [71]. Çapraz bağlayıcı fonksiyonel monomer oranı istenilenden düşük olursa kalıp moleküllerin bağlanma bölgeleri birbirine çok yaklaşır ve komşu bölgeler tarafından kapatılır. Çok büyük mol oranlarında ise çapraz bağlayıcının, fonksiyonel monomerlerle veya kalıp molekülle non-kovalent etkileşimler göstermesi ile baskılanmanın etkinliği azaltılır [62].

2.4.1.4. Çözücü

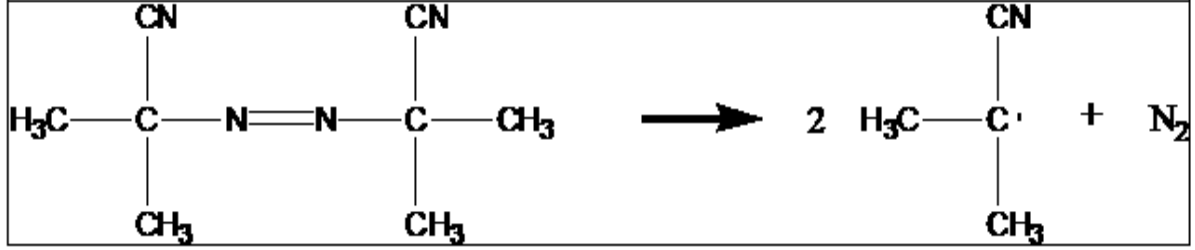
Çözücüler başta sentez olmak üzere moleküler baskılanmış polimerin performansı ve karakterizasyonunun merkezindedirler. Monomer, hedef molekül, başlatıcı gibi tüm bileşenlerin aynı fazda olmasını sağlar [68]. Ön kompleks oluşumunda polimer bileşenlerini bir araya getirmesinin yanı sıra fonksiyonel monomer ve hedef molekül arası etkileşimlerin düzenlenmesinde temel rolü oynar [72]. Ayrıca çözücü, faz ayrımının etkisiyle gözenek derecesinin belirlenmesinden sorumludur [73]. Bu nedenle çözücüye genellikle “gözenek oluşturucu” da denir. Makrogözenekli polimerin hazırlanması aşamasında çözücü, gözeneklerin yapısı ve seviyesi, morfolojisi ve toplam gözenek hacmini kontrol etmek için önemli bir unsurdur ve gözeneklilik bağlanan hedef molekülün polimerden salınmasını kolaylaştırır. Polimerizasyonda çözücü molekülleri polimerin içine dahil edilir ve son bir işlemle uzaklaştırılır [68].

Fonksiyonel monomerin, ön kompleks ve hedef molekül ile maksimum etkileşimde olması gerekir ve oluşan polimerin maksimum afinite göstermesi önemlidir.[74] . Bu etkileşimler, çözücü tarafından karşılanır ve desteklenir. Genellikle baskılama için non-kovalent etkileşimler kullanılır. Çözücü ayrıca polimerizasyon sırasında reaksiyon ısısının eşit olmasını sağlar, ısının eşit olmaması durumunda reaksiyon ısısı bölgesel olarak artabilir ve istenmeyen yan ürünler oluşur. Kovalent baskılamada, tüm bileşenleri iyi çözebilecek birçok çözücü kullanılabilir. Kovalent olmayan baskılamada, etkileşimin oluşumu ve baskılama etkinliğinin artırılması için çözücü seçimi daha önemlidir [62].

2.4.1.5. Başlatıcılar

Peroksit temelli radikalik ürünler ve gama ışımaya ile moleküler baskılama teknolojisinde bir çok çeşit başlatıcı metodları uygulanır [75,76,77]. Radikalik polimerizasyon serbest radikal oluşturan başlatıcıların ısıl bozunması ile

başlatılabilir. Genellikle 2,2'-azobis(izobütironitril) (AIBN), 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (ADV) ve benzoil peroksit (BPO) kullanılır. Bu azo-bileşenleri hem termal hemde fotokimyasal radikalik bozunmaya maruz kalırlar. Hedef molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki non-kovalent etkileşim gibi, etkileşimin zayıf olduğu durumlarda, etkileşimi daha iyi hale getirmek için çok yüksek sıcaklıklara çıkılmaz. Termal bozunma yerine fotokimyasal bozunma tercih edilir [78,79].



Şekil 2.4. AIBN'in termal bozunma reaksiyonu [80].

2.4.2 Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında oluşan bağın çeşidine göre ikiye ayrılır.

2.4.2.1. Kovalent Baskılama

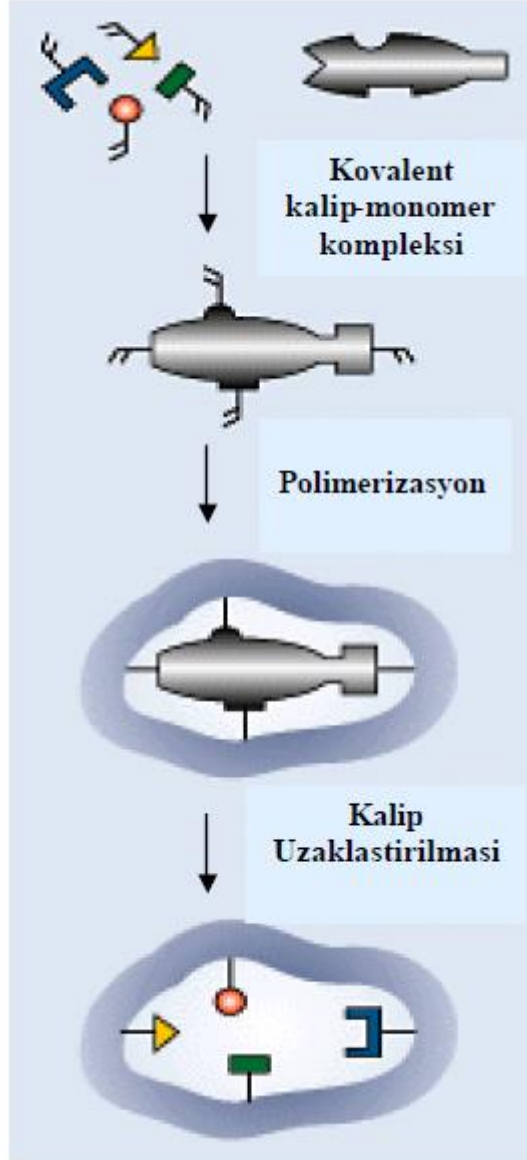
Kovalent baskılama fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasında tersinir kovalent bağları içerir. Hedef-molekül kompleksi kimyasal işlemle polimer matrisi içine dahil edilir. Kalıp molekül ve fonksiyonel monomer polimerizasyondan önce kovalent bağlarla bağlanır ve polimerizasyon bittikten sonra kovalent bağlar kırılır. Daha sonra hidroliz ile fonksiyonel kavimler ile kalıp molekül arasındaki kovalent bağlar kırılır. Kalıp molekül baskılanmış polimerle etkileştiğinde aynı kovalent bağlar tekrar oluşur [81].

Avantajları

Kovalent baskılanmada fonksiyonel monomer ve kalıp molekülün stokiometrik oranlarda gerçekleştirilir ve polimerizasyon boyunca kovalent bağlanma ile monomer-kalıp molekül kompleksinin kararlılığı artırılır ve bağlanma bölgelerinin homojen dağılımı sağlanır [67]. Baskılama kovalent bağlarla oluştuğu için polimerizasyon koşulları istenilen şekilde olabilir.

Dezavantajları

Kalıp molekülün uzaklaşma ve geri bağlanma kinetiği yavaş olduğundan, polimerden kalıp molekülün uzaklaştırılması problemi vardır. Kovalent baskılama yöntemi, kromatografi gibi hızlı bağlanma kinetiği gösteren uygulamalarda, yavaş kinetiğe sahip olduğu için ilgi çekici değildir ve zayıf kromatografik sonuçlar ortaya çıkmasına sebep olur [52].



Şekil 2.5. Kovalent baskılama şekli.

2.4.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama

Kovalent olmayan baskılama, non-kovalent etkileşimlerle (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler hidrofobik etkileşim, dipol-dipol kuvvetler yada π - π etkileşimler ve koordinasyon bağı oluşumu gibi) kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında oluşur. Polimerizasyondan sonra uygun çözücü ile kalıp

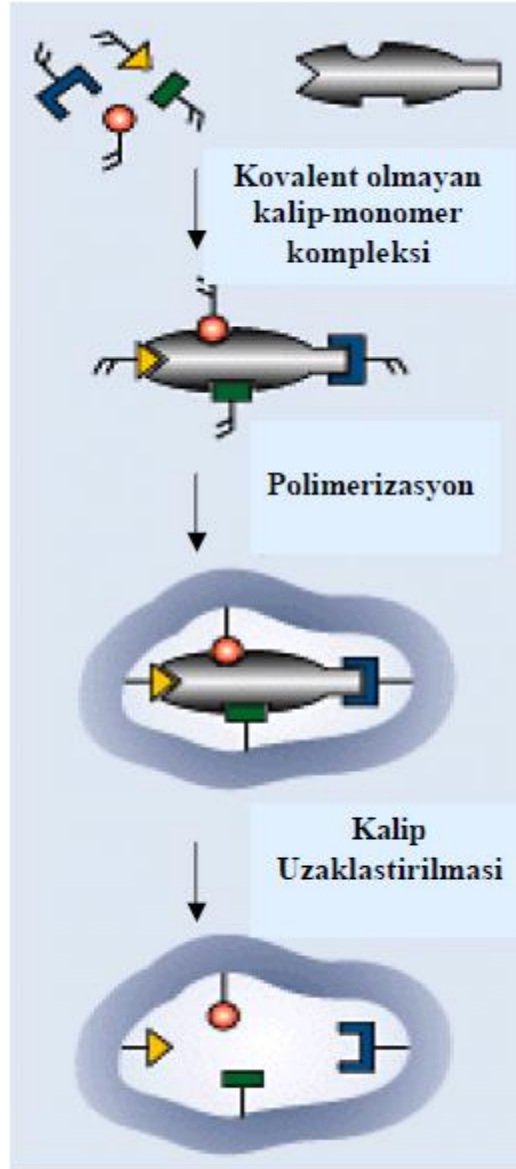
molekül polimerden uzaklaştırılır ve hedef molekül baskılanmış polimere kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır. Kalıp molekül etrafında fonksiyonel monomerlerin düzenlenmesini sağladığı için basit ve sorunsuzdur [55,67,82].

Avantajları

Polimerizasyondan sonra kalıp molekül polimerden, kovalent olmayan etkileşimlerden dolayı kolayca uzaklaştırılır. Hedef molekülün bağlanma kinetiği hızlı olduğundan dolayı, bugün moleküler baskılanmada uygulanma alanı kovalent baskılanmaya oranla daha çoktur. Kovalent monomer–kalıp molekül konjugatına gerek yoktur. Kalıp molekülün polimerizasyon boyunca zarar görme riski düşüktür.

Dezavantajları

Fonksiyonel monomerler, bağ oluşum dengesini artırmak amacıyla, fazlaca kullanılır. Bu da spesifik olmayan bağlanma bölgeleri oluşturarak özgül olmayan bağlanmalara ve kalıp molekülün zayıf moleküler tanınmasına sebep olur [83,84]. Kovalent olmayan polimerlerde bağlanma bölgelerinin dağılımı heterojendir. Kovalent olmayan etkileşimi artırmak için koşullar sınırlıdır. Kovalent olmayan bağlanmalarda hidrofobik etkileşimlerin kinetiği hızlıdır fakat bu seçiciliğin azalmasına neden olur. Kovalent baskılanmaya göre kovalent olmayan etkileşimler birçok bileşiğe uygulanabilmeleri, hızlı kinetikleri, daha uygun koşullarda bağ oluşturmaları ve kırılma özellikleri göstermemeleri nedeniyle moleküler baskılama teknolojisinde daha geniş uygulama alanına sahiptirler [55,85].



Şekil 2.6. Kovalent olmayan baskılama şekli.

2.4.3. Baskılama İşleminin Kontrolü

Moleküler baskılanmış polimerlerin yüksek seçicilikte tanınması ve baskılanmış polimerler tarafından bağlanmasını materyalin fiziksel ve kimyasal özellikleri belirler. Moleküler baskılanmış polimerlerin daha kullanışlı olmaları, substratın seçiciliğinin yanısıra, uygun koşullar altında desorpsiyon ve geri bağlanma kinetiğinin de hızlı olması istenir. Bu nedenle moleküler baskılanmış materyallerin tasarımı yapılırken uygun bağlanma etkileşimlerinin seçimi önemli parametredir. Çoklu bağlanma bölgelerinin olması, monomerin bağlanma bölgeleri ile hedef molekül arasındaki etkileşimlerin daha iyi olması, dolayısıyla moleküler tanımanın daha seçici olmasını sağlar.

Yapılan çalışmalar baskılanmamış polimer ile karşılaştırmalı olarak yürütülür ve polimer kalıp molekülün yokluğunda aynı polimerizasyon işlemi uygulanarak elde edilir. Baskılanmamış polimerler, baskılanmış polimerlerle spesifik boşluklar dışında aynı kimyasal özelliklere sahiptir. Bu yüzden baskılanmış polimerlerle kalıp molekül arasında gelişen etkileşimlerin doğası, baskılanmamış polimerlerle kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin doğasıyla aynıdır. Etkileşimdeki bu hassasiyet, kalıp molekülün üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasından kaynaklanmaktadır. Polimerlerin seçicilikleri, baskılanmış/baskılanmamış polimerlerle etkileştirilmesi; baskılanmış ve baskılanmamış polimerlere ait dağılım katsayılarının (k) hesaplanması ve baskılama faktörü olarak değerlendirilen bağıl dağılım katsayısının (k') belirlenmesiyle gösterilir.

2.4.4. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları

Moleküler baskılanmış polimerler sensörlerde tanıma elemanı olarak, kontrollü salınım sistemlerinde, farmakolojik, biyolojik seçici moleküler tanıma alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar [86]. Sıvı kromatografi, kapiler elektroforez, kapiler elektrokromatografi ve katı faz ekstraksiyon gibi analitik tekniklerde MIP'lerin kullanımına yönelik çalışmalar sürekli artmaktadır [87,88].

Son yapılan çalışmalarda, moleküler baskılanmış polimerlerin immuno deneylerinde tanıma elemanı olarak kullanıldığı ve doğal antibiyotiklerin yapay bağlanma takliti yaptığı gösterilmiştir [89].

Bir diğer uygulama alanı ise sensörlerde tanıma elemanı olarak kullanımlarıdır .Bu sensörlerde kullanılan biyomoleküller çoğunlukla zayıf fiziksel ve kimyasal kararlılık gösterirler. Bu sebeble yapay reseptörlere duyulan ilgi artmaktadır. Özellikle MIP'ler zorlayıcı şartlarda gösterdikleri dayanıklılık ve yüksek seçicilikte tanıma bölgelerine sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedir. MIP temelli ilk sensör baskılı-polimer membran ince filmi içeren bir alan-etki kapasitörüdür ve analitin bağlanmasıyla kapasitansta meydana gelen değişim ölçülmüştür [90].

Moleküler baskılamayla hazırlanan polimerler aminoasit türevleri, ilaçlar ve şeker türevlerinin kiral ayırımı için, organik reaksiyonlarda enzim benzeri olarak ve iyon seçici adsorbanlar olarak başarıyla kullanılmaktadır [91]. Son yıllarda moleküler baskılama temelli elektrokimyasal ve optik sensörler hakkındaki yayınların sayısı ise hızla artmaktadır [92].

2.5. Biyosensörler

Canlıların, çevrelerindeki değişimi algılama ve yanıt verme sistemleri, biyosensörlerin geliştirilmesi için temel teşkil etmekte ve sıklıkla biyojik analizler için kullanılmaktadır [93,94]. Biyosensörler; "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tarafından, "kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar" olarak tanımlanmıştır [95].

2.5.1. Biyosensörlerin Kısa Tarihçesi

Clark ve Lyons (1962) ilk defa biyosensör terimini ifade etmişlerdir. Enzim-elektrot kompleksini imal eden ikili, bu kompleksi glikoz sensörü olarak kullanmışlardır. Sensör, oksido-reduktaz enzim olan glikoz oksidazın platin elektrotuna immobilize olmasından ibarettir. Platin elektrot enzim tarafından üretilen H_2O_2 tarafından $+0.6V'$ da polarize olur. İşte basitçe bu prensibe göre çalışan tarihin ilk biyosensörü 1974 yılında piyasada Yellow Springs Instrument (YSI) olarak görülmüştür. YSI sensörünün geliştirilmesinde ana özellik yeni nesil membranlardır. Clark burada sandviç membran kullanmıştır. Enzim nükleopor polikarbonat membran ve sellüloz asetat membran arasında bırakılmıştır. Bu membranlar normalde ortamın potansiyel yapısını etkileyecek olan diğer faktörleri elimine etmekte ve cihazın duyarlılığını ve özgünlüğünü artırmaktadır. Mesela, Clark'ın kullandığı membran H_2O_2 'ı diffüze ederken askorbat ve diğer parazitik kimyasalların geçişini engellemektedir [34].

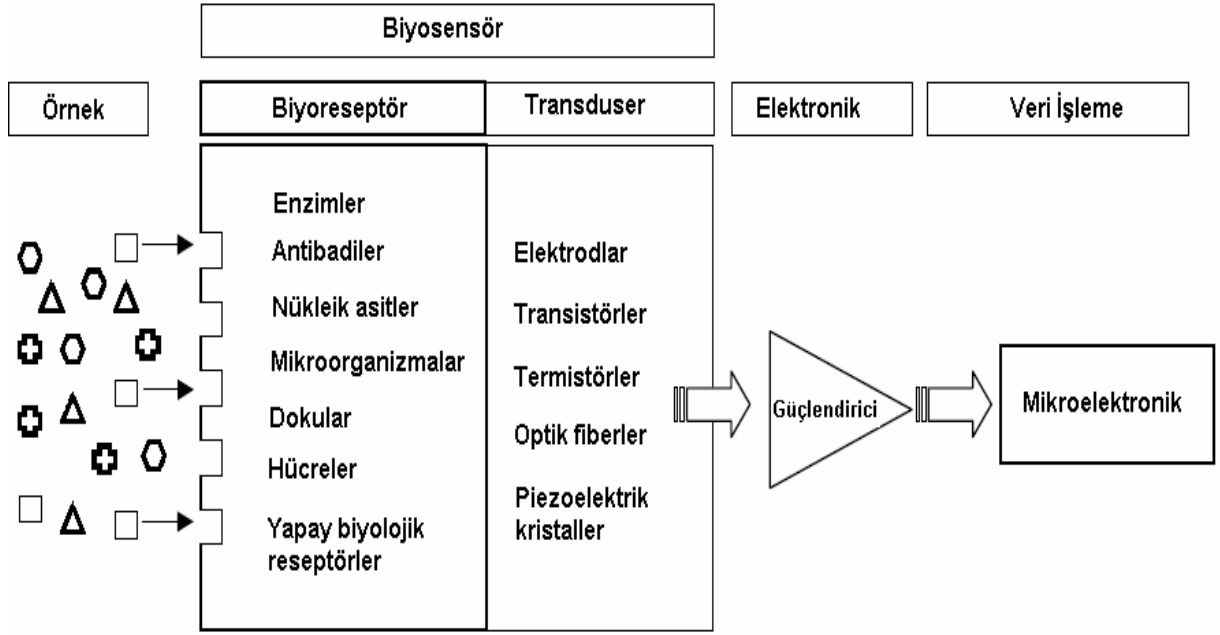
Bir biyosensör, biyolojik algılayıcı elementin seçiciliği ile hedef analitin konsantrasyonuyla orantılı bir şekilde sinyal üretebilen dönüştürücünün birleşiminden oluşan bir cihazdır ve bu sinyal proton konsantrasyonundaki değişimden, amonyak ve oksijen gibi gazların salınması yada yükseltgenmesi, ışık emisyonu, absorpsiyon yada reflektans, ısı emisyonu, kütle değişimi ve bunun gibi değişimlerden kaynaklanır. Sinyal dönüştürücünün yardımıyla akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, ışığın absorpsiyonu yada elektrokimyasal, termal, optik olarak piezoelektrik anlamda kütle artışıyla ölçülebilir forma dönüştürülür. Sinyal ayrıca ileriki analizler için güçlendirilebilir, işlenebilir yada depolanabilir. Prensipite herhangi bir reseptör herhangi bir dönüştürücü ile birleştirilip işleyen bir biyosensör üretilebilir [97].

Biyosensörler biyolojik tepkimelerde, hedef analitleri denetlemek için kullanılan küçük algılayıcılardır, birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısım analizlenecek maddeyle etkileşerek tanımayı sağlar ve bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün oluşmaktadır. İkinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmektedir [98].

Son yıllarda mikroelektronik alanındaki gelişmeler ve biyolojik moleküllerin olağanüstü duyarlılıktaki yanıt verme kapasitelerinin keşfedilmesi, biyosensör teknolojilerinin hızla gelişmesine neden olmuştur, bunun sonucunda; tıp, eczacılık, gıda güvenliği, çevre kirliliği, askeri uygulamalar gibi bir çok alanda kullanılmak üzere farklı tipte biyosensörler geliştirilmiştir [99,100].

Biyosensörde, biyoreseptör (ligand) olarak adlandırılan, hedef molekülün yakalandığı biyolojik bağlanma bölgesi ve gerçekleşen bağlanma sonucunda oluşan, biyokimyasal/fizikokimyasal etkileşimleri ölçülebilir elektronik sinyallere çeviren dönüştürücü (transduser) kısmı vardır . Biyoreseptör ve dönüştürücünün tipi biyosensörün sınıfını belirlemektedir.

Biyoreseptör bir analitin tanınmasında biyosensörün biyolojik hassasiyete sahip kısmıdır ve biyosensörün hassasiyeti ile seçiciliğinde etkilidir ve bu reseptörler tek bir özel substratı bağlayacak ve diğer substratlara bağlanmayacak özellikte olmalıdır; temel olarak biyoreseptörler 3 grup (biyokatalitik, biyoaffinite ve hibrit reseptörleri) altında toplanırlar. Biyokatalitik reseptörler, analiti belirlenmeyen formdan belirlenebilir forma dönüştürerek transdüserle kaydedilebilir ve belirlenebilir kılar [101].



Şekil 2.7. Bir biyosensörün konfigurasyonu [102].

Biyokatalitik tanıma elementleri enzim (mono veya multi enzim) içeren sistemler, hücreler (mikroorganizmalar, örn; bakteriler, mantarlar, ökaryotik hücreler, mayalar), hücre organelleri ve bitki, hayvan doku parçalarından oluşur [103].

Enzimler biyosensörlerde kullanılan ilk biyokomponentlerdir. [104] Biyosensör yapımı için pekçok enzimle çalışılmıştır; oksidoredüktazlar, laktat [105], malat [106], askorbat [107], aminoasitler [108], alkol [109], kolesterol [110], gliserol [106]; transferazlar asetik asitlerin biyosensör analizlerinde [111], kaptan [112] veya atrazin [113] gibi ksenobiyotiklerin belirlenmesinde; hidrolazlar sukroz [114], liyazlar sitrikasit analizlerinde [115]; ligazlar DNA nokta mutasyon tespitinde [116] kullanılırlar. Enzim temelli biyosensörlerin performansına uygun pH'ın kullanımı, kofaktörleri ve sıcaklık etkimesinin yanısıra immobilizasyon metodu ve sensör yüzeyindeki enzim kalınlığı ise elektrot performansını etkileyen parametrelerdendir [106].

Antiadiler, nükleik asitler, lektinler, boyalar, hücre membran reseptörleri ve diğer spesifik bağlayıcı ajanlar gibi biyolojik komponentler biyoafinite reseptörlerine örnektir ve hormonlar, ilaçlar, virüsler, tümör antijenleri, bakteri antijenleri ve diğer birçok protein gibi maddelerin belirlenmesi ve ölçümü, immunolojik teknikler vasıtasıyla düşük konsantrasyonlarda dahi başarılabilir [101].

Affinite bazlı biyosensörler ise belirli bir ligandı termodinamik olarak stabil kompleks formuna dönüştüren seçici etkileşimler oluştururlar [103].

Hibrit reseptörlerde biyosensör uygulamalarında nükleik asit kullanımı rapor edilmiştir . Bu sensörlerin kullanım alanları DNA'da meydana gelen zararları kimyasal olarak belirleme ve DNA'nın türe özgü diziliminin hibridizasyonu ile mikroorganizmaların belirlenmesidir [101].

DNA biyosensörlerinin esası DNA hibridizasyonuna dayanmaktadır. İşlemin ilk aşamasında belirlenmek istenen hedef diziye karşılık gelen kısa bir baz dizimine sahip olan sentetik oligomerin (tek sarmal DNA, prob) elektrot yüzeyine bağlanmaktadır. Sonrasında biyosensörün hedefi içeren bir örnek çözeltisine daldırılmasıyla elektrot yüzeyinde hibrit oluşumu sağlanır. Hibridizasyon, elektrokimyasal veya optik bir dönüştürücü sinyali ile gözlemlenir [117].

Genel olarak biyolojik komponent uygun bir şekilde immobilizasyonla transdusere bağlanır.

İmmobilizasyon metodu immobilize edilecek biyokomponentin yapısına göre belirlenir. Kullanılan transduksiyon elementi ve analitin fiziksel durumu da seçilecek metod için önemli faktörlerdir. Genel olarak 5 yaygın metod bulunmaktadır. Bunlar;

1-Adsorpsiyon

2-Mikroenkapsulasyon

3-Tutuklama

4-Çapraz bağlama

5-Kovalent bağlama'dır [101].

Biyosensörlerle tespit geleneksel analitik tekniklere göre birçok avantajı vardır ve bu avantajlar taşınabilir olmaları, örnek hazırlama işleminin basit olması, örnek kullanımının az olması, kompleks karışımlardan analizin yapılabilir olması, küçük olması, hızlı olması. Fakat bazı biyosensörler hala birkaç dezavantaja sahiptirler. Son zamanlarda birden fazla analiti tespit edebilecek sensörler tasarlanmasına rağmen, çoğunlukla biyosensörler sadece bir analitin tespitine olanak sağlamaktadırlar [118].

Dönüştürücüler temelde dört grup altında toplanırlar;[119].

1-Elektrokimyasal dönüştürücü

- Amperometrik
- Potansiyometrik
- Konduktometrik

2-Optik dönüştürücü

3-Akustik dönüştürücü

4-Termal dönüştürücü

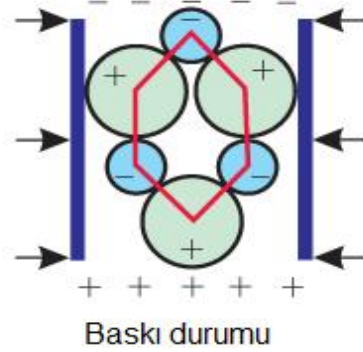
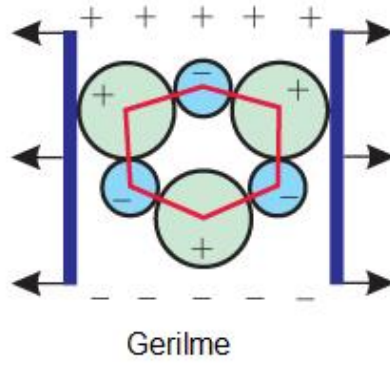
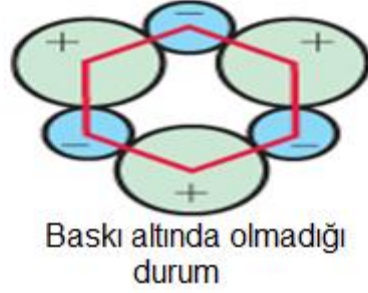
Bundan 40 yıl öncesinde ilk enzim elektrotunun bulunmasından bu yana biyosensör teknolojisinin çok hızlı gelişim gösterdiği belirtilmektedir [120,121].

2.6. Piezoelektrik Kristalli Biyosensörler (Kütle Duyarlı Biyosensörler)

Piezoelektrik etki 1880 yılında Pierre ve Jacques Curie tarafından kuartz kristal içeren bir materyal ile keşfedildi. Piezoelektrik kelimesi yunanca kökenli olup baskı anlamına gelen 'piezin' den gelmektedir. Kristalin üzerine mekanik kuvvet uygulandığı zaman, piezoelektrik etki diye adlandırılan artan bir elektriksel potansiyel farkı oluşur. Çapraz sapmadan dolayı, bükülme, basınç, kırılma yada eğilme kuvvetinden kaynaklanan elektriksel yük meydana gelir. Bu etki simetrik olmayan birimlere sahip materyallerdeki iyon değişimi ile açıklanır. Materyale basınç uygulandığı zaman, herbir birimde iyonlar yer değiştirir ve bu birimler elektrik polarizasyonuna sebep olur. Materyal yapısındaki düzenden dolayı, kristal yüzeyinde toplanarak ölçülebilir elektrik potansiyel farkına sebep olur. Yapılan çalışmalarda elektriksel potansiyel farkının, uygulanan mekanik gerilimin doğrudan değil, bu gerilimin ortaya çıkarttığı kristaldeki boyut değişimi ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Piezoelektrik kristallere mekanik stres uygulandığı zaman,elektriksel alan altındaki yüzeyde polar eksenler oluşur ve elektriksel alan nedeniyle deformasyona uğrarlar [122]. Bu ters piezoelektrik etki olarak Lippman tarafından keşfedilmiş daha sonra Curie kardeşler tarafından onaylanmıştır [123].

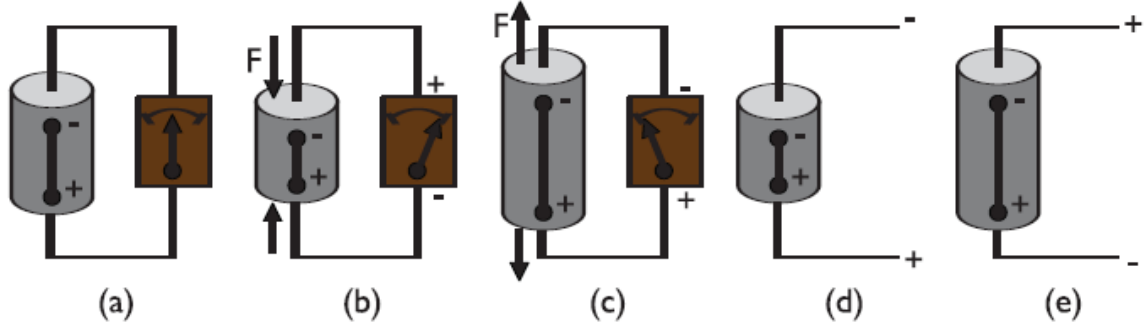
Curie kardeşler sonraki yaptıkları çalışmalarda, piezoelektrik kristalin iki yüzeyi arasında uygulanan elektriksel gerilim farkının kristallerde boyut değiştirmeye ve gerinime sebep olduğu gözlenmiştir. Ters piezoelektrik etki olarak bilinen bu etkiyi

kullanarak, uygulanan elektriksel gerilimin şiddetini değiştirerek, piezo kristalin boyutlarını değiştirmek mümkün olmaktadır. Bu özelliğe sahip kristal uygun bir elektrik devresine bağlanırsa, kristalin kütlesine ve şekline bağlı olan sabit bir frekansta titreşim yapar.



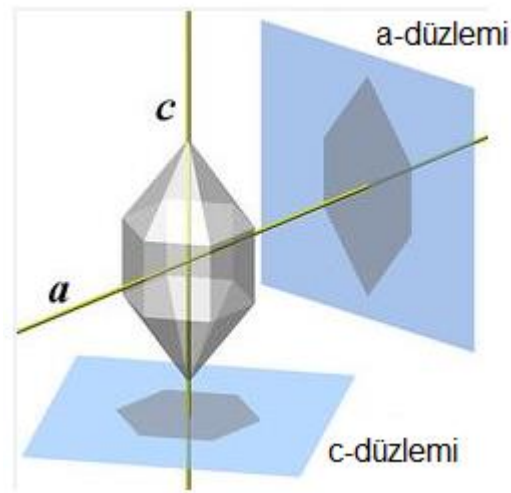
Şekil 2.8. Silikon oksitin piezoelektrik etkinin şematik gösterimi.

Şekilde piezoelektrik etkiye sahip kuartz kristalin x-ekseni doğrultusunda uygulanan itme veya çekme kuvvetleri ile deformasyonu ve y-ekseni doğrultusunda oluşan yük değişimi gösterilmiştir [124].



Şekil 2.9. Piezoelektrik etki.

Piezoelektrik etkinin şematik gösterimi, (a) kristalin mekanik baskı veya elektrik potansiyel uygulanmamış hali (b) mekanik baskı ile sıkıştırılan kristalin pozitif potansiyel üretimi (c) mekanik olarak çekilen kristalin negatif potansiyel üretimi, (d) uygulanan negatif potansiyel ile kristalin sıkışması, (e) uygulanan pozitif potansiyel ile kristalin uzaması.



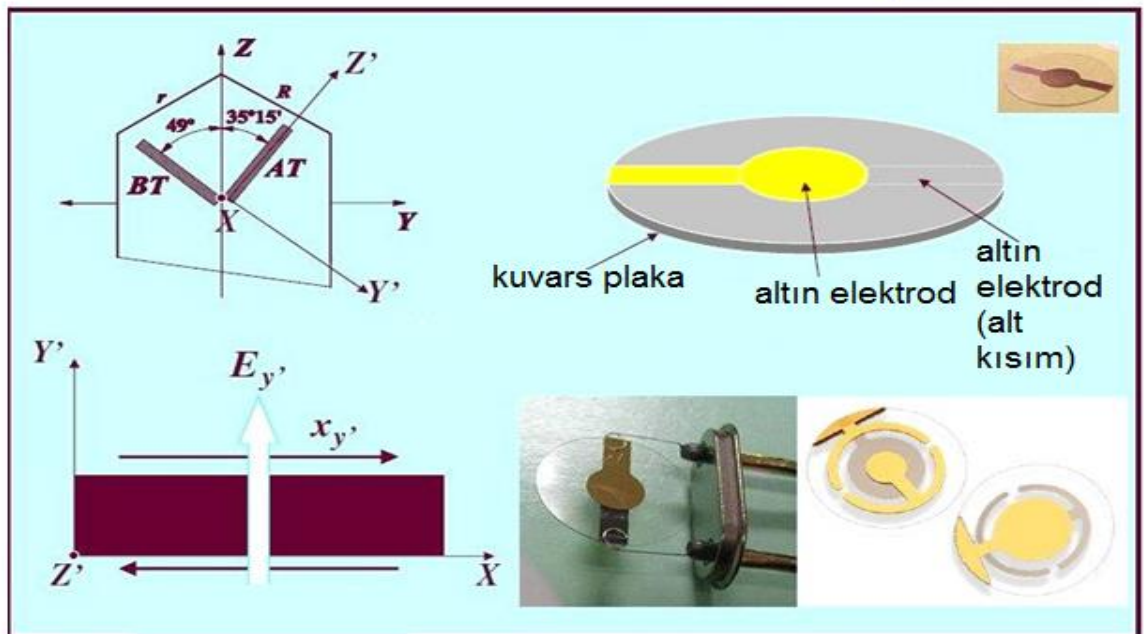
Şekil 2.10. Kuvars kristal.

Kuvars kristali, silikon ve oksijenden elde edilir ve SiO_2 kimyasal formülüne sahiptir. Genellikle silikon diye adlandırılan SiO_2 , İsveçli kimyager Jöns Jakob Berzelius tarafından 1823 yılında keşfedildi. Ticari olarak kullanılan başlıca piezoelektrik maddesi kuvars kristaldir. Üç boyutlu simetrik bir eksene sahiptir ve

merkezi bir simetriye sahip değildir. Gerilmeden yoksun olması, oksijen ve silikon atomlarının hareketine neden olur. Bu deformasyon, şarj merkezlerinin ve elektrik polarizasyonun ayrılması ile sonuçlanır. Kuvars kristal elektriksel, mekanik ve kimyasal özellikleri nedeni ile ticari piezoelektrik malzemelerin en kullanışlısıdır [125].

Kuvars kristal, kimyasal doğasına, şekline, boyutuna ve kütlesine bağlı olan doğal bir titreşim frekansına sahiptir. Kristalin kırılmasının rezonans frekansı üzerinde bir etkisi vardır. Kuvars yüzeyin yüksek ve düşük metal elektrotları boyunca alternatif elektrik alan uygulandığında, kristal karakteristik frekans üretir. Kristalin kırılmasının rezonans frekansı üzerinde bir etkisi vardır [126]. QCM temel olarak bir frekans sayacı, gerilim kaynağı ve bir osilatör devreden oluşur. Kuvars plakaların temel rezonans frekansları 5-30 MHz olmasına rağmen, ticari kullanımları daha çok 5-10 MHz arasındadır [127]. İki metal elektrot arasına sandviç edilmiş kuvars plakalar ters yönde sıyırma modu (TMS) rezonatör olarak adlandırılır [128]. Metal elektrotlar altın, gümüş, alüminyum veya nikel olabilir. Piezoelektrik uygulamalarında kullanılan kristaller genellikle 10-16 mm boyutlarında, 0,15 mm kalınlığında disk, kare veya dikdörtgen şeklindedir. Rezonans frekansları 5, 9, veya 10 MHz olan kuvars kristaller tercih edilir [129].

AT-Kesme



Şekil 2.11. AT-BT kesim kuvars kristal düzlemi [127,130].

Kuvars kristaller belli bir açı ile kesildiğinde, piezoelektrik dedektör özelliği sağlar. AT ve BT kesme açıları sırasıyla 35°15' , -49°00' dir. Kristal yapısının karakteristik düzlemi ile kesme tabakasının arasındaki açı olarak tanımlanır. QCM sensör ince sıyırma mod'da en duyarlı olduğu için bu oryantasyonda kesilir. AT-kesme kristaller $\Delta f/f \sim 10^{-8}$ gibi yüksek frekans kararlılığı ve 0-50° aralığında sifıra yakın sıcaklık katsayısına sahip olmalarından dolayı piezoelektrik uygulamalarında genellikle tercih edilirler. Bu durumda AT- kesme kristallerini pek çok elektronik cihaz için cazip hale getirmektedir [131].

Kuvars kristal mikroterazi piezoelektrik etkiye sahip belli bir açı ile kesilmiş kristal rezonatörler içerir. Alternatif bir elektrik alan uygulandığı zaman, kristal yığın yapısında mekanik stres oluşur. Mekanik stresin etkisi ile kuvars kristalin iki yüzü birbirine paralel olacak şekilde hareket eder. Salınan elektrik alan kristal boyunca yayılan akustik bir dalga oluşturur. Rezonatörün kalınlığının akustik dalga boyunun yarım katları olması halinde minimum dirençle karşılaşır [132]. Bu koşullar altında titreşimin yanal genişliği 1-2 nm'dir.

Kuvars kristal plakalar belli bir oryantasyonda ve düzgün kesildiği zaman (AT-kesme ya da BT-kesme), istenilen titreşim frekansına ulaşılabilir. Alternatif yüksek akımlı bir elektrik alan uygulanması ile QCM mekanik rezonans modunda salınım yapar. Kristalin yüzeyindeki biriken filmin kütlesi ile orantılı olarak rezonatörün frekansı azalır. Çözelti ile temas eden rezonatör, oldukça kararlı sinyal veren bir elektronik devreye bağlanır [127].

QCM kullanımının önemli avantajı, katı filmlerde kütle birikiminin tespit edilebilmesidir. Sensör yüzeyindeki saf kütleler için, doğrusal eşitlik ilk kez Sauerbey tarafından türetildi. Kuvars kristal rezonatörün frekansındaki değişim (Δf) ve kütle birikimi (Δm) Sauerbrey (1959) eşitliğinden elde edilir [133].

$$\Delta f_m = -\frac{f_0^2}{F_q \rho_q} m_s = -\frac{f_0^2}{F_q \rho_q} \frac{\Delta m_s}{A_{el}} \quad 2.1$$

Δf frekans değişimi; f_0 , temel frekans; A , kuvars yüzeydeki metal elektrot alanı; μ_q ve ρ_q kesme modülü ($2.95 \cdot 10^{11}$ dyn/cm²), kuvars yoğunluğu (2.65 g/cm³). Kütle birikimi ve rezonans frekansındaki değişim arasında doğrusal bağlantı kullanılır, Δm nanogram aralığında kütle değişimi verir. Kütlenin kuvars yüzeye bağlanması

ile kristalin salınımı frekansı azalır. Sauerbrey eşitliği sadece rezonatör üzerinde biriken ince katı tabakalar için geçerlidir. Başlangıçta QCM ölçümleri için katı faz kullanılmasına karşın daha sonra uygun salınım devrelerinin geliştirilmesi ile sıvı fazda da ölçüm yapmak mümkün olmuştur [134]. Konash ve Nomura salınım döngüsünü modifiye etti ve sıvı içindeki salınımı seçici olmayan sensör yüzeyini QCM sisteminin algılamasını sağladı [135].

Sıvının yoğunluğu (ρ_1), viskozitesi (η_1), ve kuvars kristalin frekansı arasındaki ilişkiyi açıklayan eşitlik Kanazawa ve Gordon tarafından türetilmiştir [136].

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{P_1 \eta_1}{\pi P q \mu q}} \quad 2.2$$

İki tabakalı bir sistemde frekans değişimi, tüm değişimlerin toplanması ile hesaplanır.

$$\Delta f = \Delta f_m + \Delta f_1 = -f_0^2 \left(\frac{\Delta m_s}{F_q \rho_q A_{el}} + \sqrt{\frac{P_1 \eta_1}{f_0 \pi P q \mu q}} \right) \quad 2.3$$

f_0 (Hz), rezonans frekansı; F_q ($F_q = 1/4 f_0 \cdot d_q$) (Hz.cm²/ng), frekans sabiti; d_q (mm), kristalin kalınlığı ; ρ_q (g/cm³), yoğunluğu; A_{el} (mm²), kristalin rezonatör elektrot boyutu; q_1 (g/cm³), sıvının yoğunluğu; η_1 (kg/m/s), sıvının viskozitesi.

2.6.1. Sıcaklığın rezonans frekansına etkisi

Sıcaklık değişimi birçok maddenin fiziksel sabitlerini etkilediğinden kuvars kristal mikroterazi cihazları üzerinde de önemli etkilere sahiptir. Üretim yönü ve kesimi farklı piezoelektrik malzemeler sıcaklık değişikliklerinde farklı özellik gösterirler [137]. Bu nedenle, sıcaklık sensörlerini baz alan ve pek çok kuvars kristallerinin geliştirilmesine olanak sağlayan, spesifik sıcaklık özelliklerine sahip kuvars kristal rezonans cihazları geliştirmek mümkündür. Sıcaklığın rezonans frekansına olan etkisinin kristalografik yönlenime duyarlı olduğu bulunmuştur .Standart bir AT-kesimli kuvars kristali rezonatörü için rezonans frekansı oda sıcaklığındaki sıcaklık değişimlerine daha az duyarlıdır. Çizelge 2.2'de AT-kesimli (35° 15') kuvars kristal rezonatörünün frekans kaymasının sıcaklık değişimine bağımlılığı verilmiştir [124].

Çizelge 2.2. AT-kesimli (35° 10') kuvars kristal rezonatörün sıcaklık etkisiyle frekans kayma değerleri.

T (°C)	$\Delta f / f$ (ppm)
20	0
30	0
60	4
80	18
100	45

QCM'in kimyadaki uygulamaları oldukça geniş olmakla beraber, kuvars kristal sadece kütle değişimine hassas olmayıp, viskozite ve yoğunluk değişimlerinde hassasiyet gösterir. Toksik gaz sensörü olarak, modifiye metal yüzeyinde, antijen/antibadi spesifik molekül tayinlerinde kullanımı artmıştır. Genellikle sıvı ortamda gerçekleştirilen QCM sensör uygulamalarında, analiz edilecek sıvının yoğunluğu ve viskozitesi titreşen kristalin rezonant davranışını etkiler ve sensör ölçümü gerçekleştirmiş olur [137].

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Maddeler

Kalıp molekül bilirubin, MATrp sentezinde kullanılan triptofan metil ester ve metakroil klorür, Sigma firmasından temin edilmiştir (St. Louis, ABD). Monomer 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve başlatıcı azobisizobutironitril (AIBN) Fluka A.G (Buchs,İsviçre) firmasından temin edilmiştir. HEMA polimerizasyon inhibitörünü uzaklaştırmak için düşük basınçta (100 mmHg) damıtılmış ve kullanılana kadar 4⁰ C'de muhafaza edilmiştir. Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıktadır. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROPure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure ® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci, 18 MΩ/cm'dir. Deneylerde kullanılan cam malzemeler, bir gece boyunca 4 M nitrik asitte bekletilmiştir.

3.2. Bilirubin Baskılanmış PHEMATrp Nanofilmin hazırlanışı

3.2.1. N-Metakroil-L-triptofan Metilester (MATrp) komonomerin sentezi

N-Metakroil-L-triptofan Metilester (MATrp) komonomerinin sentezi için uygulanan prosedür şu şekildedir: 5.0 g L-triptofan metilester ve 0.2 g hidrokinon 100 mL diklorometan (CH₂Cl₂) çözeltisi içinde çözüldü. Bu çözelti 0°C'ye soğutulduktan sonra içine 12.74 g trietilamin eklendi. 5.0 mL metakroil klorür yavaş bir şekilde bu çözeltiye azot gazı atmosferinde eklendi. Hazırlanan bu karışım manyetik bir ortamda 2 saat karıştırıldı. Reaksiyon sonunda reaksiyona girmeden kalan metakroil klorür çözeltisi %10'luk NaOH ile ekstrakte edildi. Sulu faz dönen evaporatörde buharlaştırıldı. Katı (MATrp) etanol içinde çözülerek kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.2. N-Metakroil-L-triptofan Metilester/bilirubin (MATrp/bilirubin) ön-kompleksinin hazırlanışı

Kalıp molekül olarak seçilen bilirubin ile MATrp komonomeri arasında oluşan ön-kompleks şu şekilde hazırlanmıştır: 0.87 mg bilirubin (5.95×10^{-3} mmol) 250 µL 0.1M Na₂CO₃ çözeltisi içinde çözüldü. 106.5 µL MATrp (0.035 mmol) komonomeri bu çözelti üzerine eklendi. 2 saat manyetik ortamda güneş ışınlarına maruz kalmayacak şekilde karanlık ortamda karıştırılarak ön kompleksinin oluşması

sağlandı. Kalıp molekül:monomer oranı 1:100 şeklinde belirlendi. Oluşan ön kompleks kullanılmaya hazır bir şekilde karanlık ortamda saklandı.

3.2.3. MATrp Monomerinin Karakterizasyonu

3.2.3.1. FTIR Analizi

MATrp monomerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) kullanılarak elde edilmiştir. MATrp monomeri (2 mg), KBr (98 mg, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılmış, tablet haline getirilmiş ve FTIR spektrumu çekilmiştir.

3.3. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensörler

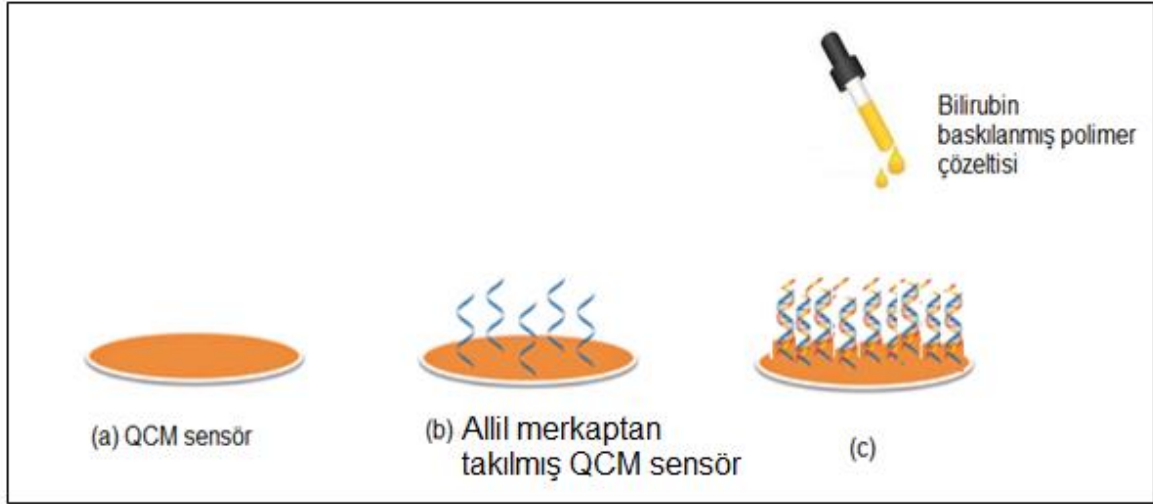
3.3.1. Kuvars Kristal Mikroterazi Çip Altın Yüzeyinin Allil Merkaptan ile Yüzey Modifikasyonu

Kuvars kristal mikroterazi çip altın yüzeyinin modifikasyonu allil merkaptan ($\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$) ile yapılmıştır. Modifikasyon öncesi altın yüzey asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiştir. 20 mL asidik pirana çözeltisi içine daldırılan altın yüzeyler 20 saniye çözelti içinde kalmıştır. Çözeltiden çıkarılan çipler saf etil alkol ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) 3 saat kurutulmuştur. Yüzeyi temizlenen QCM çip yüzeyine 5 µL allil merkaptan damlatılmış ve 12 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda çipler etil alkol ile yıkanmış ve azot atmosferinde kurutulmuştur. Modifikasyon sonucunda altın kaplı QCM çip yüzeyine allil grupları takılmıştır. Allil merkaptan ile modifiye edilen QCM sensörlerinin karakterizasyonu atomik kuvvet mikroskobu ve temas açısı ölçümleriyle sağlanmıştır.

3.3.2. Bilirubin baskılanmış ve baskılanmamış nanofilm hazırlanışı

Hazırlanmış olan (MATrp/bilirubin) ön kompleksine 356 µL (2.94 mmol) HEMA ve 713 µL fosfat pH 7.0 tamponu eklendi. Karışım sonikatörde 10 dakika bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı. Ortamdaki çözünmüş oksijen azot (N_2) gazı ile uzaklaştırıldı. Çözeltiye 5 mg başlatıcı AIBN eklenerek AIBN'nin çözünmesi sağlandı. Daha sonra çözeltiden 2 µL alınarak daha önce allil merkaptan ile allillenmiş QCM çip üzerine damlatılarak homojen bir şekilde yayılması sağlandı. Çip üzerindeki polimer çözeltisi UV ışığı ile muamele edilerek fotopolimerizasyon yöntemi ile polimerleşmesi sağlandı. Reaksiyona girmeyen monomer çözeltisi metanol ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Karışımdaki bilirubin yüzdesi %21 olarak belirlenirken monomer oranı %27 olarak belirlendi. Baskılanmamış PHEMATrp

nanofilm baskılanmış olan film içeriği ile aynı şekilde hazırlanmış, içerisine bilirubin eklenmemiştir.



Şekil 3.1. QCM sensör yüzeyinde nanofilm oluşumu (a) pirana çözeltisi ile yıkanmış QCM sensörün yüzey görüntüsü (b) allil merkaptan ile -SH grupları takılmış QCM sensörün yüzey görüntüsü (c) Bilirubin baskılanmış polimer çözeltisi damlatılmış QCM sensör yüzey görüntüsü.

3.3.3. Kalıp Molekülün Desorpsiyonu

MATrp monomeri ve bilirubin arasında hidrojen bağları ve aromatik halkadan kaynaklanan hidrofobik etkileşimler vardır [138]. Kalıp molekül olan bilirubin'in polimerik yapıdan sökülebilmesi için yukarıdaki etkileşimleri kırabilecek bir desorpsiyon ajanının kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla desorpsiyon ajanı olarak 2M NaOH, 1M Na₂CO₃ ve 25mM EDTA çözeltisi kullanılmıştır [139]. Kalıp molekülün desorpsiyonu sürekli ve kesikli sistemlerde gerçekleştirilmiştir. Kuvars kristal mikroterazi sensör yüzeyine tutturulan bilirubin baskılanmış nanofilm üzerine desorpsiyon çözeltisi (20 ml) eklenmiştir. Çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalanmıştır (200 rpm). Desorbe edilen sensör, deiyonize su ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 25°C) kurutulmuştur.

3.3.4. Kuvars Kristal Mikroterazi Sensörlerin Karakterizasyonu

3.3.4.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi

QCM sensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Ölçüm yapılan örnek haznesinden 10 dk azot gazı geçirilerek havadan kaynaklanan nem ve karbondioksit uzaklaştırılmıştır. QCM sensör,

cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülerek spektrumlar alınmıştır.

3.3.4.2. Elipsometre

Hazırlanan sensörlerin yüzeyindeki kalınlık ölçümleri Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile karakterize edilmiştir. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda, 62°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. QCM sensör lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiştir. Yüzey kalınlığı hesaplama program için BK7 + 50 nm altın + 70 nm polimer katmanı veri olarak öngörülmüştür. Ölçümler sensör yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlanmış ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edilmiştir.

3.3.4.3. Temas Açısı Ölçümleri

Temas açısı ölçümleri için KRÜSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Kuvars kristal mikroterazi (QCM) sensörlerin yüzeyine 1 damla su damlatılarak yapışık damla (Sessile Drop) yöntemi ile temas açısı belirlenmiştir. Çip yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatmak suretiyle 10 ayrı fotoğraf çekilmiş ve her biri için ayrı temas açısı belirlenmiştir. Belirlenen temas açısı değerleri damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı olarak belirlenmiştir. Ayrıca her iki noktanın ortalaması olan ortalama temas açısı değerleri elde edilmiştir. Modifiye edilmemiş ve edilmiş sensör yüzeyleri için temas açısı değerleri alınan 10 ölçümün ortalama değerleri alınarak hesaplanmıştır.

3.3.4.4. Atomik Kuvvet Mikroskopisi

QCM sensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanılmıştır. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096×4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. QCM sensör çift yüzlü karbon bant ile örnek tutturucuya yerleştirilmiştir. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı degen modda gerçekleştirilmiştir. Salınım rezonans frekansı, 341.30 kHz olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği, 1 V_{RSM} ve boş titreşim genliği ise 2 V_{RSM} ' dir. Örnek 2 $\mu\text{m/s}$ tarama hızında, 256 × 256 piksel çözünürlükte, 2×2 μm 'lik bir alanın görüntüsü alınmıştır..

3.3.5. QCM Sensörle Kinetik Analizler

3.3.5.1. QCM Sensörde Bilirubin Sulu Çözelti Çalışmaları

Bilirubin baskılanmış PHEMATrp QCM sensörün hazırlanmasından sonra kinetik çalışmaya geçilmiştir. Kinetik çalışmalar, farklı derişimlerdeki bilirubin çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiler pH 11 karbonat tamponuyla 1.71 - 85.51 μM aralığında hazırlanarak QCM sistemine verilmiştir. QCM sistemi; frekans sayacı, gerilim kaynağı, osilator devre, peristaltik pompa, yalıtım kabini ve bilgisayardan oluşmaktadır. Yüzeyine bilirubin baskılanmış ve baskılanmamış PHEMATrp nanofilm tutturulan QCM sensörler, kinetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır. Bu başlık altında uygulanan deneysel işlem şu şekildedir: QCM sensör yüzeyi deiyonize su (50mL) ile yıkanmıştır. Daha sonra bilirubin baskılanmış sensör, karbonat tamponu ile (pH 11) oda sıcaklığında dengelenmiş ve rezonans frekansı (f_0) belirlenmiştir. Rezonans frekansının belirlenmesinden sonra QCM sisteminden 3 dakika süre ile karbonat tamponu (pH 11) geçirilmiştir. Bu dengeleme basamağının ardından farklı derişimdeki bilirubin çözeltileri teker teker (4 mL, 1.0 mL/dakika akış hızı) sisteme verilmiştir. Rezonans frekansındaki kayma değerleri anlık olarak gözlenmiş ve denge durumuna geldiğinde (yaklaşık 20 dk) sisteme 0.1M NaOH, 0.1M NaCO₃ ve 25mM EDTA çözelti karışımı verilerek desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonra, QCM sensör su ve karbonat tamponu (pH: 11.0) ile tekrar yıkanarak dengelenmiştir. Farklı derişimdeki bilirubin çözeltileri sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-temizleme aşamaları tekrarlanmıştır. Elde edilen veriler, RQCM (Maxtek) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.3.5.2. QCM Sensörde Kan Serumı Çalışması

Bilirubin baskılanmış PHEMATrp QCM sensörün bilirubin sulu çözelti çalışmalarından sonra, kan serumdan bilirubin tayini çalışmalarına geçilmiştir. Antikoagülansız deney tüpüne alınan insan kanı, pıhtılaşması beklendikten sonra 5000 rpm'de santrifüjlenerek serum kısmı hücrelerden ayrılmıştır. Doymun amonyum sülfat çözeltisi ilave edilerek albümin'in çökmesi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 5000 rpm'de santrifüjlenerek serum albüminden ayrılmıştır. Bu başlık altında uygulanan deneysel işlem şu şekildedir: QCM sensör yüzeyi deiyonize su (50 ml) ile yıkanmıştır. Daha sonra bilirubin baskılanmış sensör serum ile oda sıcaklığında dengelenmiş ve rezonans frekansı (f_0) belirlenmiştir. Rezonans

frekansının belirlenmesinden sonra QCM sisteminden 3 dakika süre ile serum geçirilmiştir. Bu dengeleme basamağının ardından farklı derişimdeki kan plazması (4 ml, 1.0 ml/dakika akış hızı) sisteme verilmiştir. Rezonans frekansındaki kayma değerleri anlık olarak gözlenmiş ve denge durumuna geldiğinde (yaklaşık 20 dk) sisteme 1M Na₂CO₃ çözelti karışımı verilerek desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonra, QCM sensör izotonik %0.9'luk serum çözeltisi ile tekrar yıkanarak dengelenmiştir. Elde edilen veriler, RQCM (Maxtek) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.3.6. Yarışmalı Kinetik Analizler

QCM sensörünün yüzeyine tutturulmuş bilirubin baskılanmış PHEMATrp nanofilmin seçiciliğini göstermek için bilirubin, östradiol ve kolesterol çözeltileri QCM sistemine gönderilerek yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Östradiol metanol içerisinde 42.75 µM derişimde hazırlanıp QCM sistemine gönderilmiştir. Kolesterol için yapay intestinal ortam hazırlanmıştır. Yapay intestinal ortam için 125 ml 0.2 mol/L potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi ve 95 ml 0.2 mol/L sodyum hidroksit çözeltisine 200 mL su eklenmiştir. Daha sonra çözeltiye 24.5 g sodyum deoksikolat (NaDC) ve 16.5 g sodyum kolat (NaC) eklenmiştir. Hazırlanan çözeltinin pH'sı 0.2 mol/L hidrojen klorür çözeltisi ile 7.5'e ayarlanmıştır ve son hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltiden 30 dakika süreyle azot gazı geçirildikten sonra oda sıcaklığında ve karanlık ortamda depolanmıştır [140].

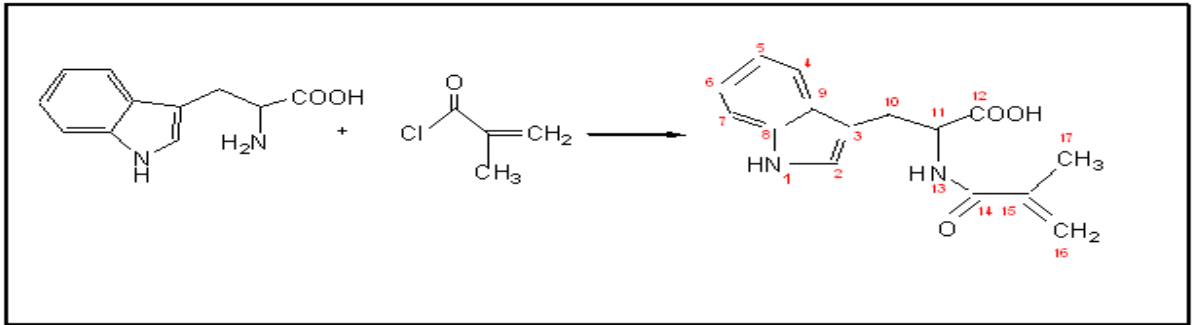
3.3.7. QCM Sensörün Baskılanma Seçiciliğinin Belirlenmesi

Bilirubin baskılanmış sensörün seçiciliğini göstermek için bilirubin baskılanmamış sensör hazırlanmıştır. Bilirubin, östradiol ve kolesterolün kullanılması ile oluşturulan çözeltiler QCM sistemine gönderilmiştir. Bu çözeltiler 42.75 µM derişimde hazırlanmıştır. Seçicilik deneyleri için de yukarıda anlatıldığı gibi rezonans frekansı belirlenmiştir. Çözeltiler QCM sensörle etkileştirilmiş ve kinetik veriler alınarak RQCM (Maxtek) yazılımı ile analiz edilmiştir.

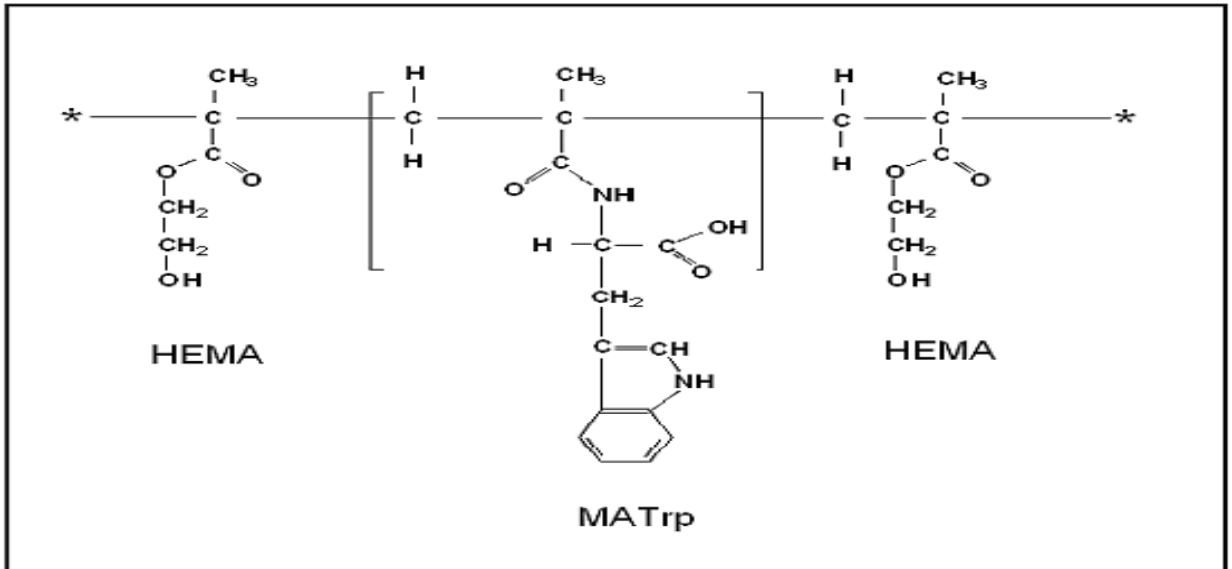
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. MATrp Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Daha önce bahsedildiği gibi MATrp komonomeri bilirubin molekülünün hem sulu çözültiden hem kan örneklerinden spesifik ve seçimli olarak tayin edilebilmesi için ligand olarak kullanılmıştır. MATrp komonomeri L-Triptofan ve Metakroil klorür moleküllerinden sentez edilmiş daha sonra HEMA monomeri ile polimerleştirilerek PHEMATrp polimeri elde edilmiştir. Şekil 4.1 MATrp komonomerinin, Şekil 4.2, PHEMATrp polimerinin molekül şeklini göstermektedir.

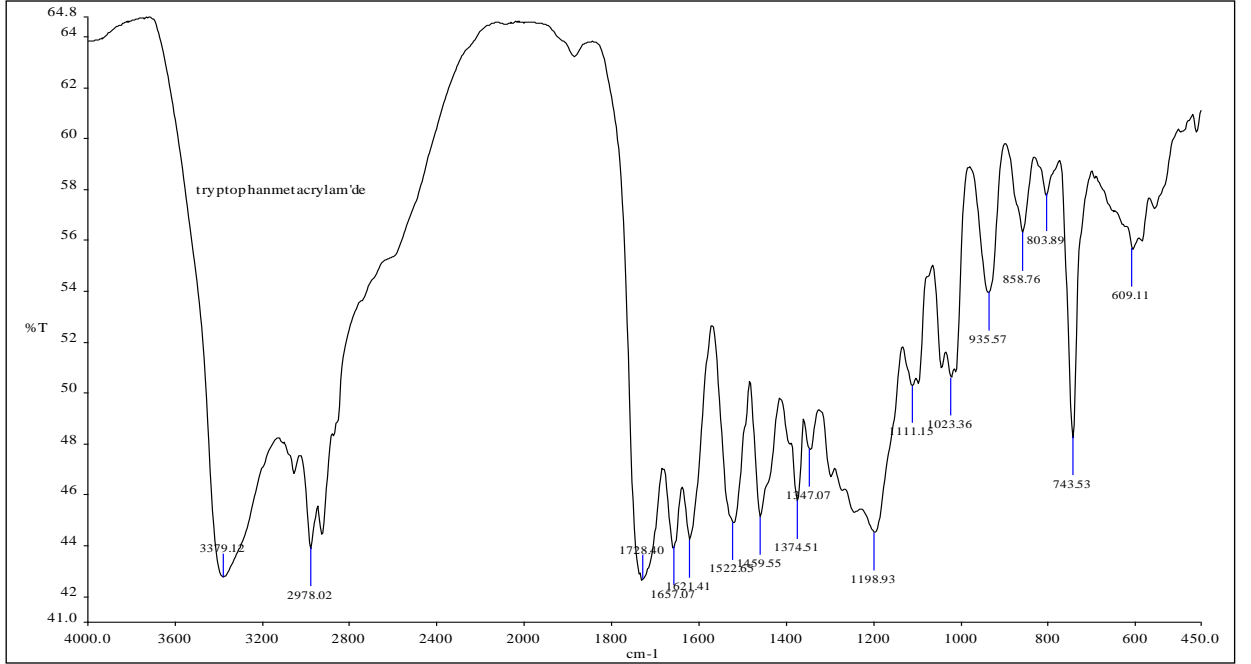


Şekil 4.1. MATrp komonomerinin molekül formülü.



Şekil 4.2. PHEMATrp molekül formülü.

Şekil 4.3'te MATrp komonomerine ait FTIR spektrumunu göstermektedir. 3379 cm^{-1} deki adsorpsiyon bandı NH gerilme bandına aitken aromatik CH gerilme bandları 3100-3000 cm^{-1} arasında görülmektedir. 2978 cm^{-1} deki adsorpsiyon bandı alkil grubundaki CH gerilme bandına aittir. C=C gerilme bandı 1621 cm^{-1} de, NH eğilme bandı 1522 cm^{-1} de, C-N aromatik gerilme bandı 1458-1374 cm^{-1} de görülmektedir. 1347-1198 cm^{-1} deki eğilme bandı asidin C=O grubunun eğilme bandına aittir.

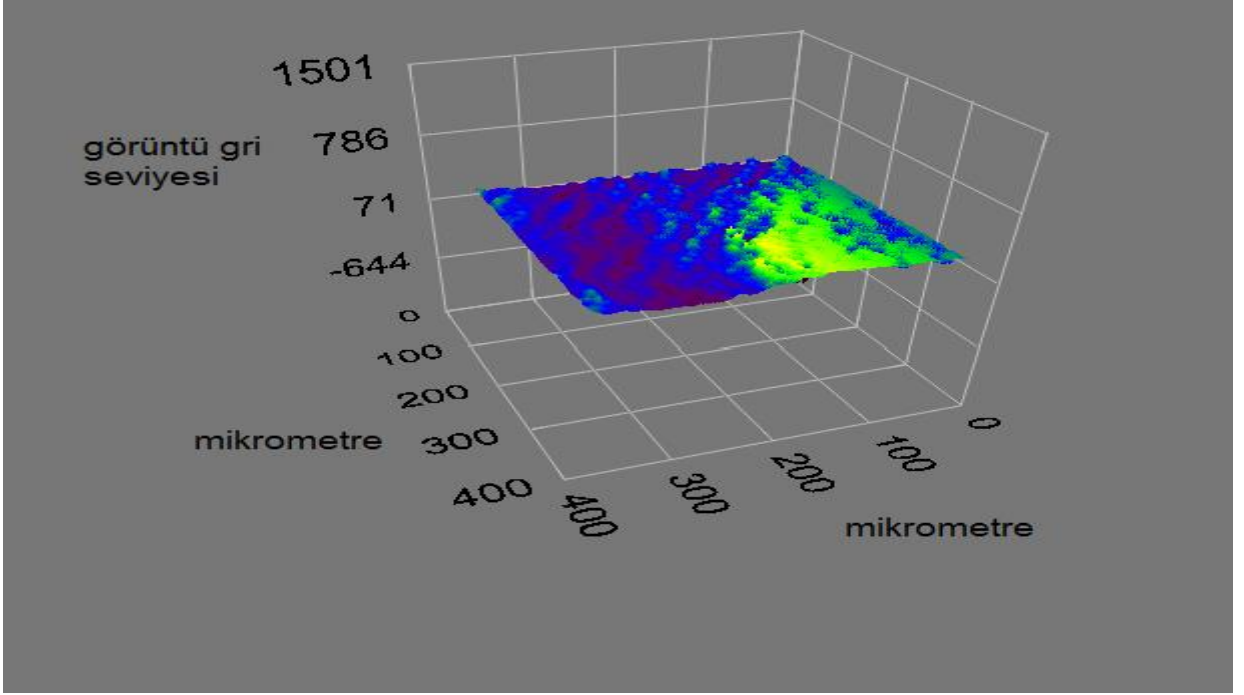


Şekil 4.3. MATrp komonomerinin FTIR spektrumu.

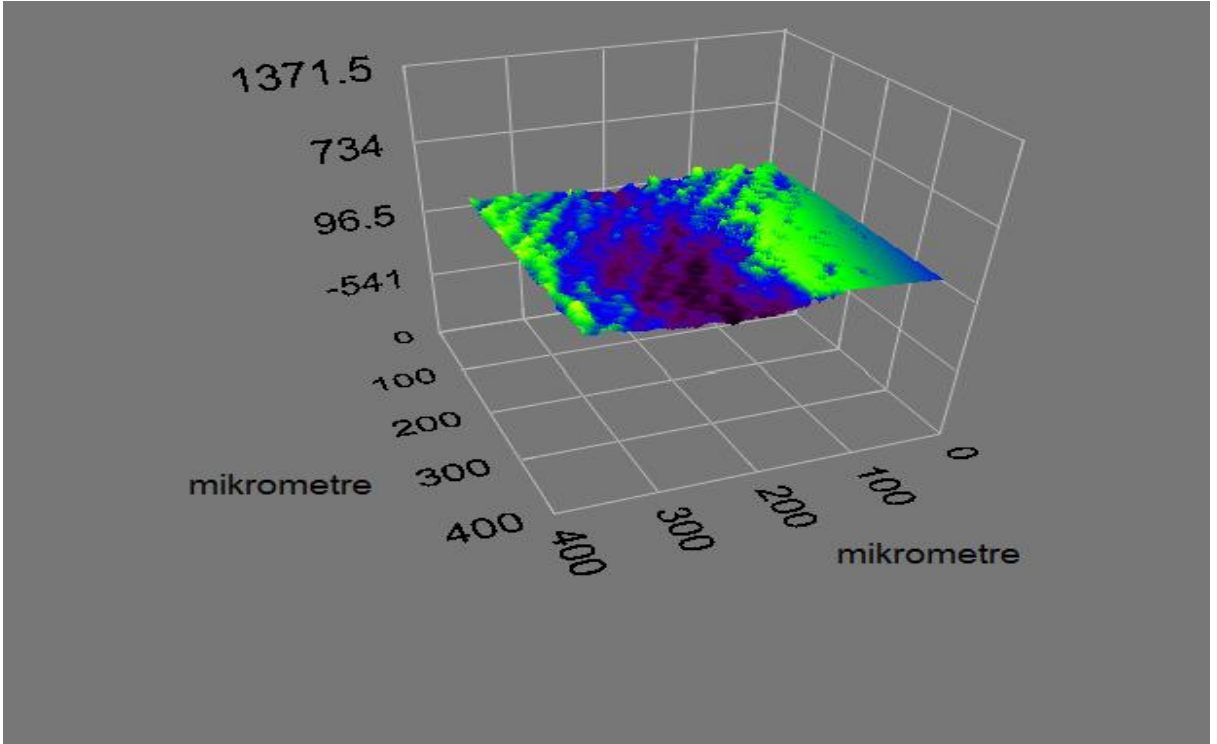
4.2. Nanofilmin Yüzey Karakterizasyonu

4.2.1. Elipsometre Analizi

Modifiye edilmiş QCM sensörlerin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir (Şekil 4.4). Elipsometrik ölçümler 532 nm dalga boyunda, 62°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Bilirubin baskılanmış ve baskılanmamış QCM sensörlerin ortalama kalınlık değeri sırasıyla 15.0 ± 0.04 nm ve 12.0 ± 0.04 nm olarak hesaplanmıştır.



(a)



(b)

Şekil 4.4. Bilirubin (a) baskılanmış ve (b) baskılanmamış QCM sensörün 3B elipsometre görüntüsü.

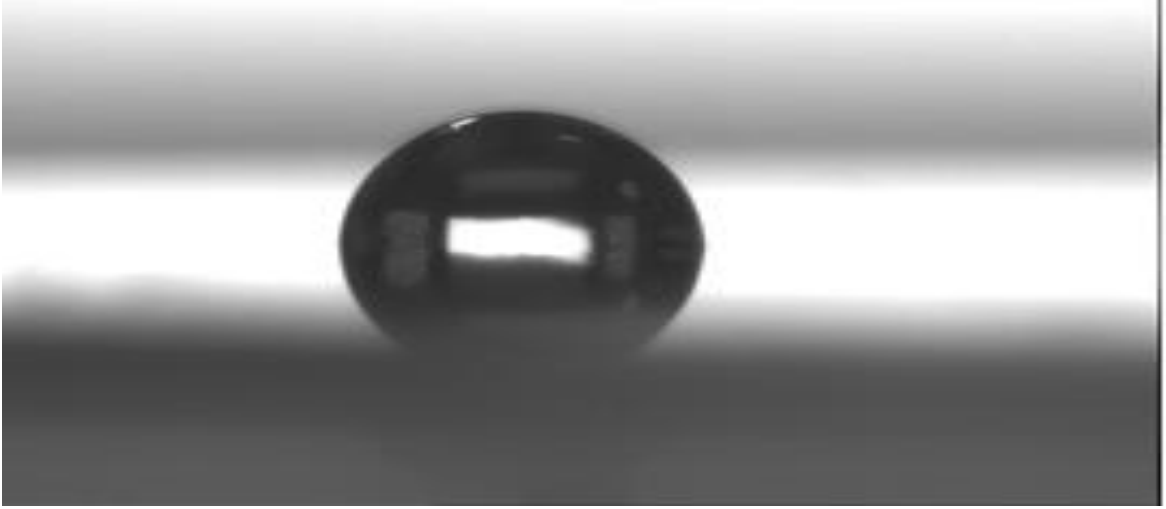
4.2.2. Temas Açısı Ölçümleri

Modifiye edilmemiş QCM sensörün ve bilirubin tanıma bölgelerine sahip QCM nanosensörlerin yüzey karakterizasyonu Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.1'de modifiye edilmemiş QCM sensörün ve bilirubin baskılanmış QCM nanosensörlerin yüzey temas açıları verilmiştir.

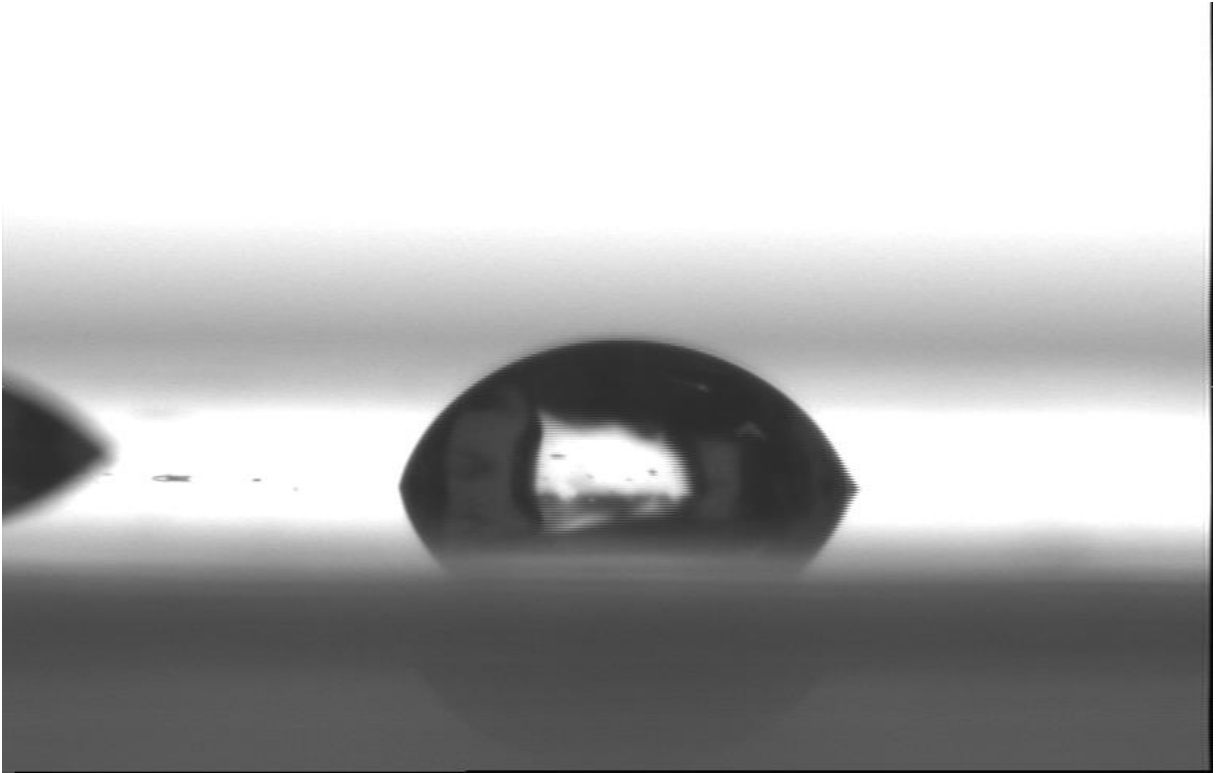
Çizelge 4.1. Temas açısı sonuçları.

Yüzey	Temas Açısı, °
Modifiye edilmemiş altın yüzey	85.4
Bilirubin baskılanmış QCM sensör	77.1
Bilirubin baskılanmamış QCM sensör	75.3

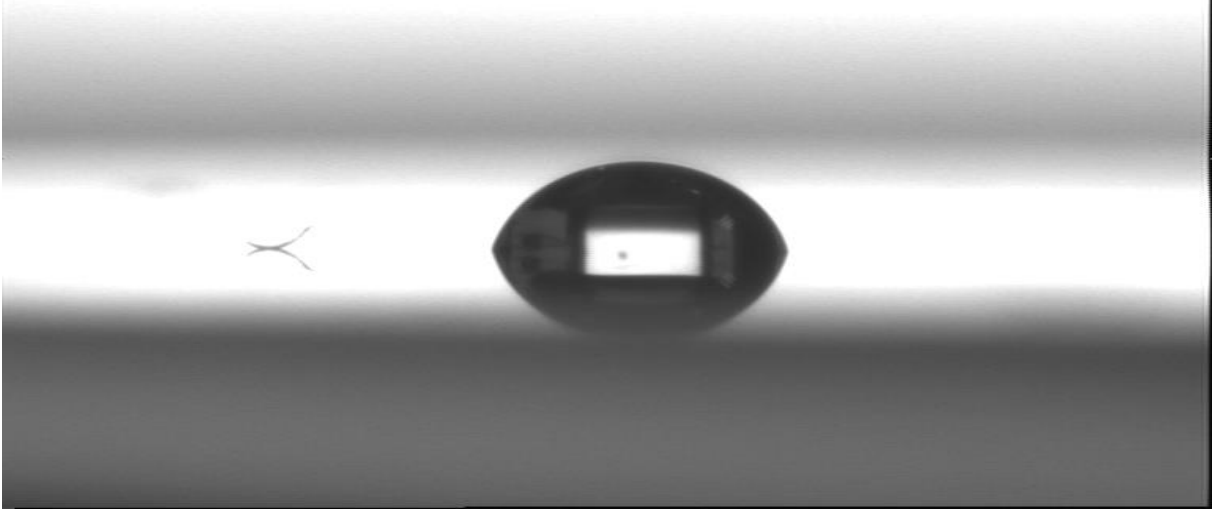
Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi modifiye edilmemiş QCM çip yüzeyinin temas açısı değeri (85.4°), bilirubin baskılanmış QCM çip yüzeyinde 77.1°'ye ve bilirubin baskılanmamış çip yüzeyinde 75.3°'ye düşmüştür. Yüzeyin temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: Bilirubin tayin işlemi için hazırlanan QCM çipleri hazırlanırken HEMA monomeri kullanılmıştır. HEMA hidrofilik karakterde bir malzeme olduğundan dolayı, yüzeye hidrofilik bir polimerin tutturulması yüzey hidrofilitasını arttırmış ve temas açısı değerini düşürmüştür. Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de temas açısı ölçümleri alınan modifiye edilmemiş baskılanmış ve baskılanmamış QCM sensörlere ait temas açısı görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.5. Modifiye edilmemiş QCM sensör yüzey temas açısı ölçüm fotoğrafı.



Şekil 4.6. Bilirubin baskılanmış QCM sensör yüzey temas açısı ölçüm fotoğrafı.



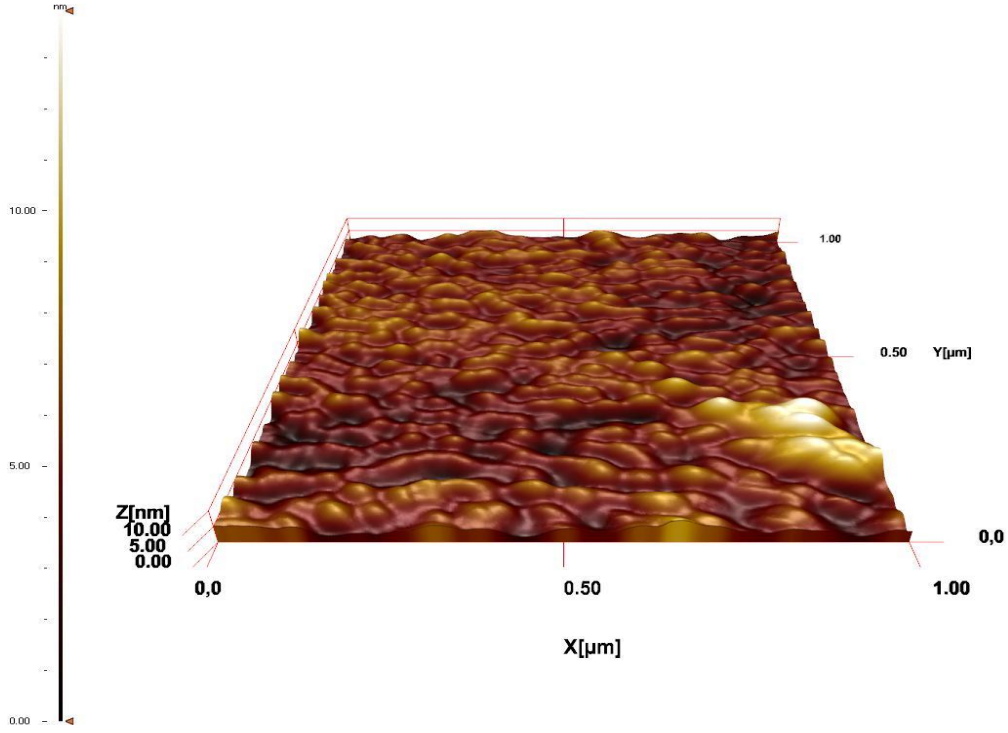
Şekil 4.7. Bilirubin baskılanmamış QCM sensör yüzey temas açısı ölçüm fotoğrafı.

4.2.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi

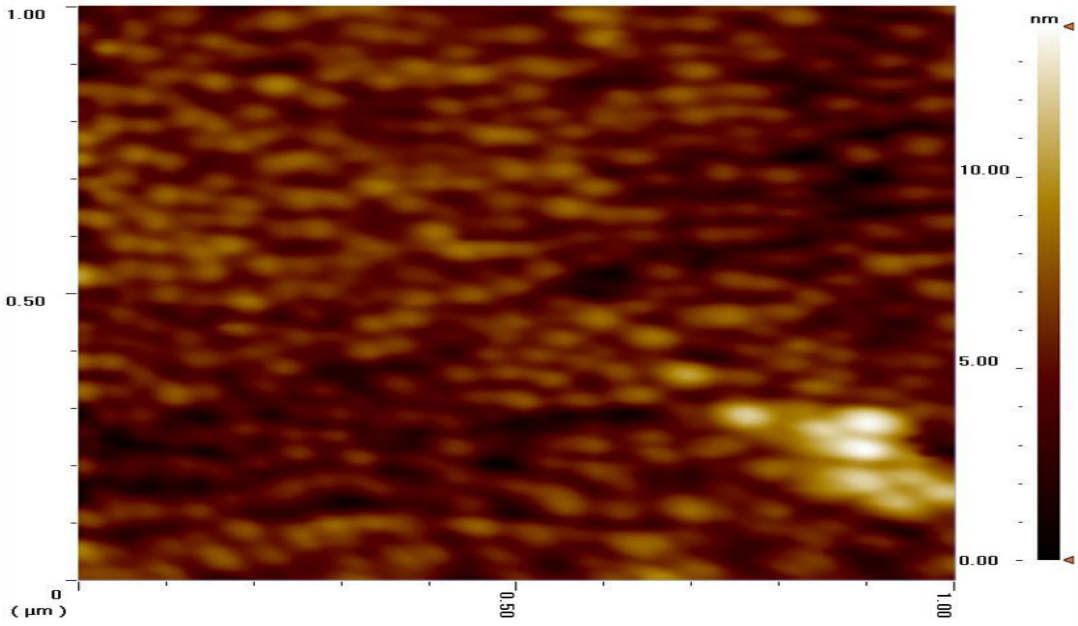
Modifiye edilmemiş ve bilirubin baskılanmış QCM sensörlerin yüzey morfolojisi yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiş modifiye edilmemiş QCM sensörün yüzey derinliği, 10.01 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8). Bilirubin baskılanmış QCM sensörün ortalama pürüzlülüğü 50 nm (Şekil 4.10) ve baskılanmamış sensörün ortalama pürüzlülüğü 20 nm (Şekil 4.12) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar; bilirubin baskılanmış nanofilmin QCM altın yüzeyine başarılı bir şekilde tutunduğunu göstermektedir. Bilirubin baskılanmış QCM sensörlerin yarı degen modda AFM görüntüleri Şekil 4.10 ve 4.11.'de verilmiştir. Bilirubin baskılanmış QCM sensörün yüzey faz görüntüsü Şekil 4.10'de gösterilmiştir. Şekil 4.12'e göre bilirubin baskılanmış nanofilm yüzeye homojen bir şekilde tutturulmuştur.

Çizelge 4.2. Atomik kuvvet mikroskop sonuçları.

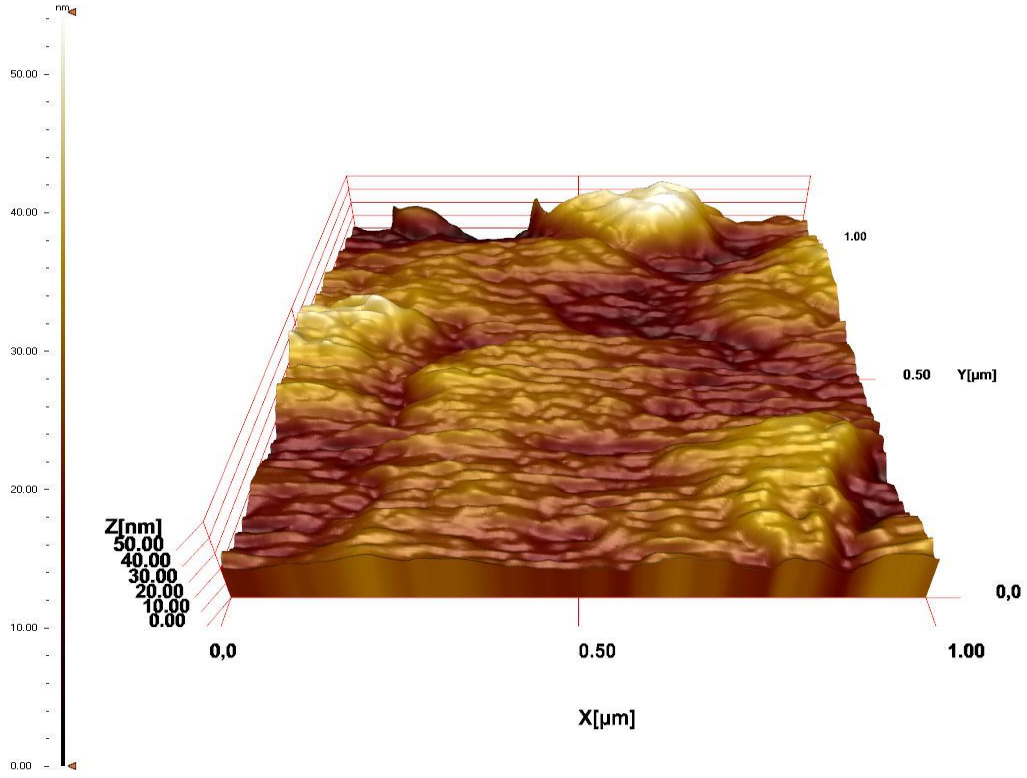
Yüzey	Derinlik, nm
Modifiye edilmemiş altın yüzey	10 nm
Bilirubin baskılanmamış QCM sensör	20 nm
Bilirubin baskılanmış QCM sensör	50 nm



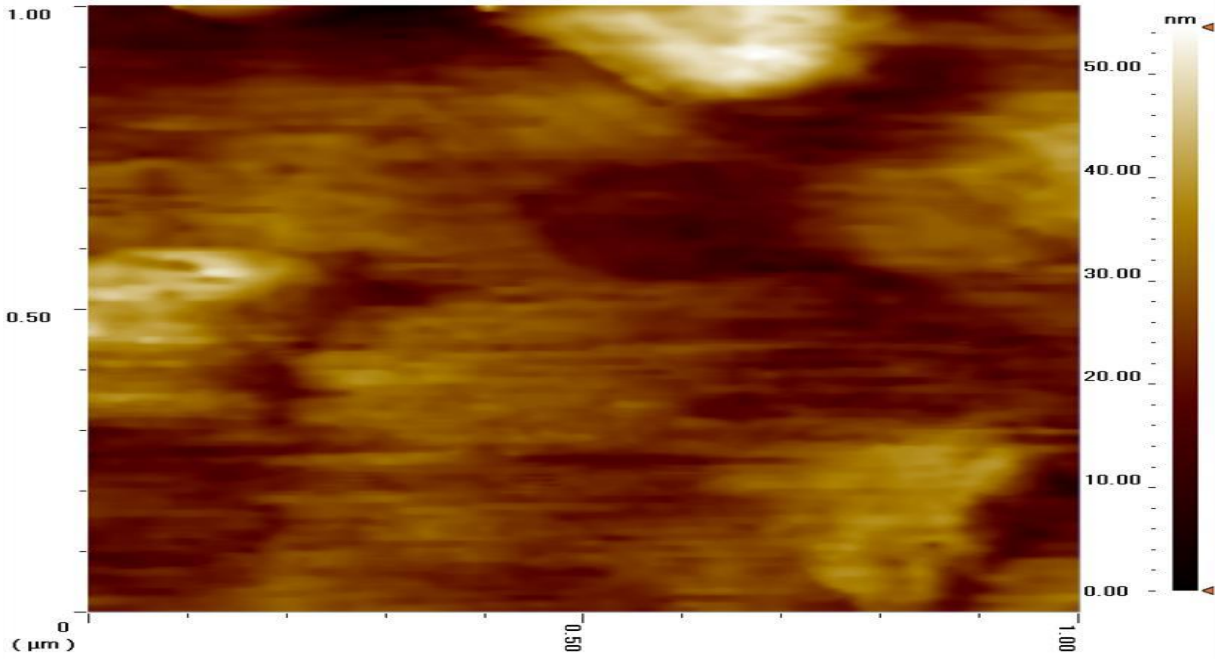
Şekil 4.8. Modifiye edilmemiş QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM 3B görüntüsü.



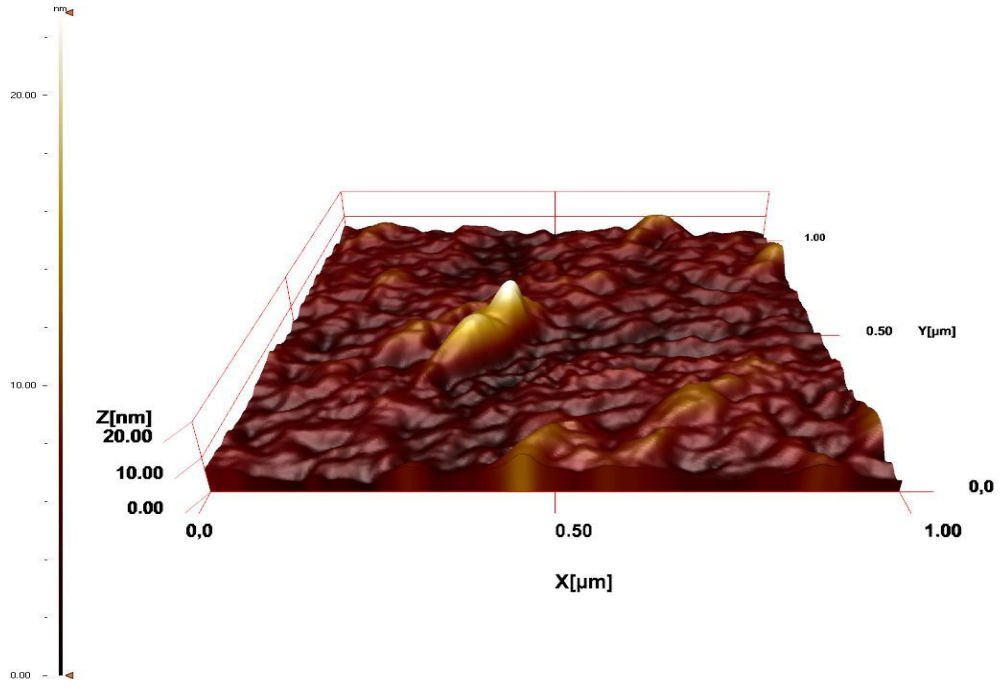
Şekil 4.9. Modifiye edilmemiş QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM yüzey görüntüsü



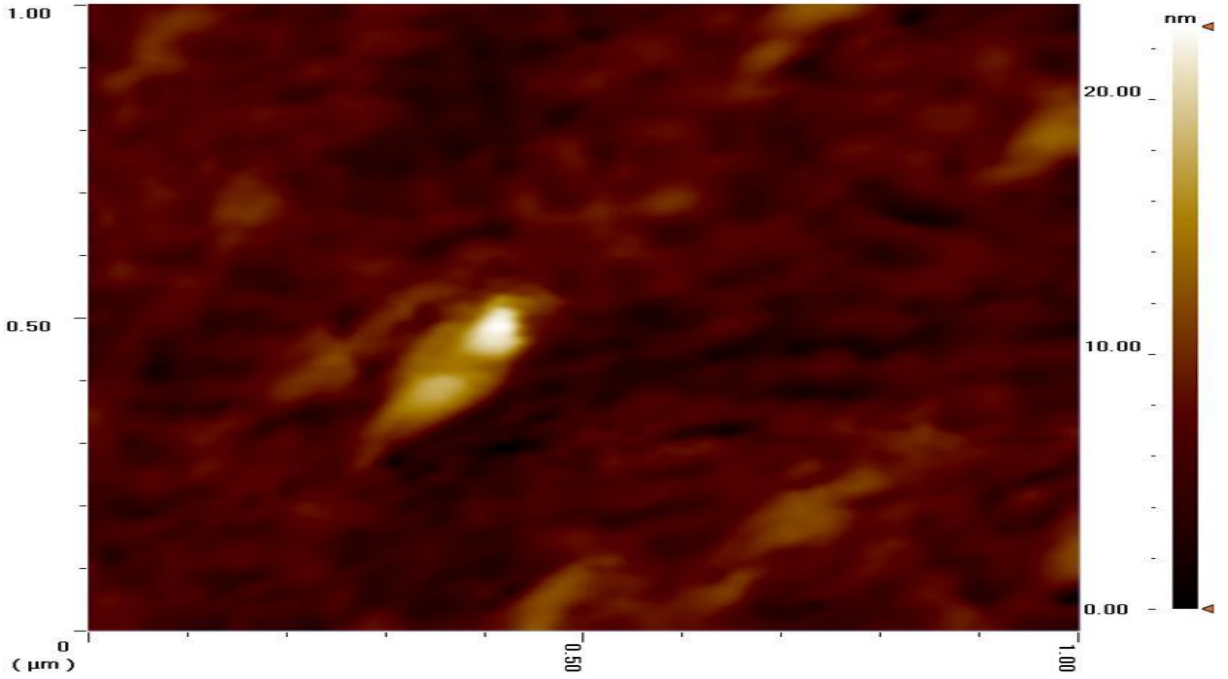
Şekil 4.10. Bilirubin baskılanmış QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM 3B görüntüsü.



Şekil 4.11. Bilirubin baskılanmış QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM yüzey görüntüsü.



Şekil 4.12. Bilirubin baskılanmamış QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM 3B görüntüsü.

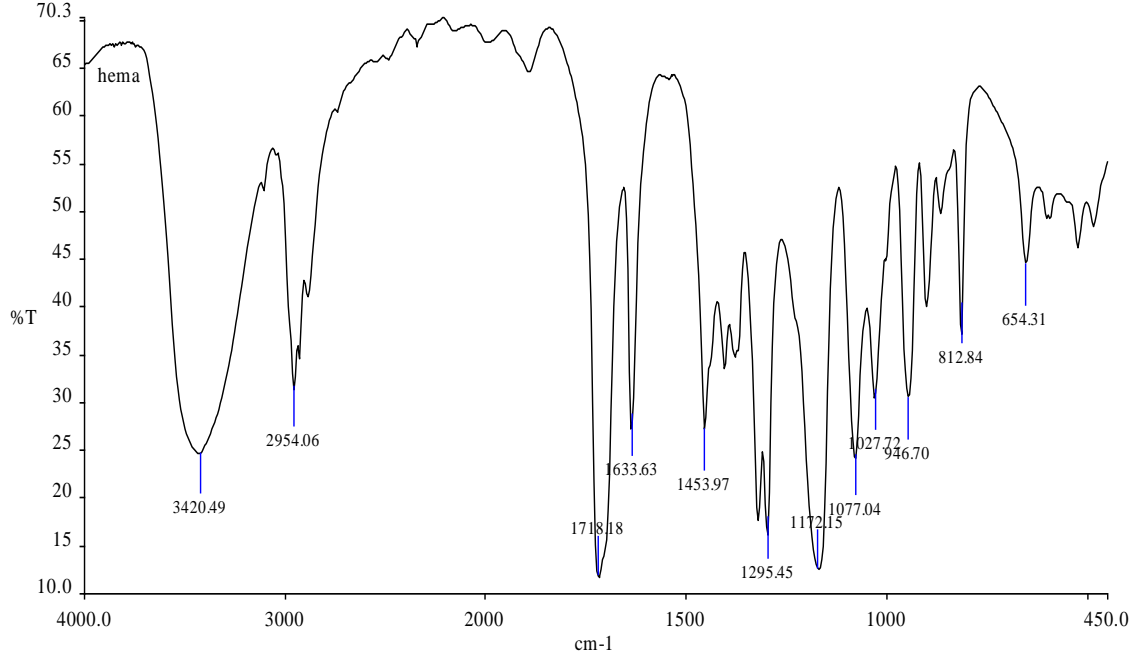


Şekil 4.13. Bilirubin baskılanmamış QCM sensörün yarı değen modda alınan AFM yüzey görüntüsü.

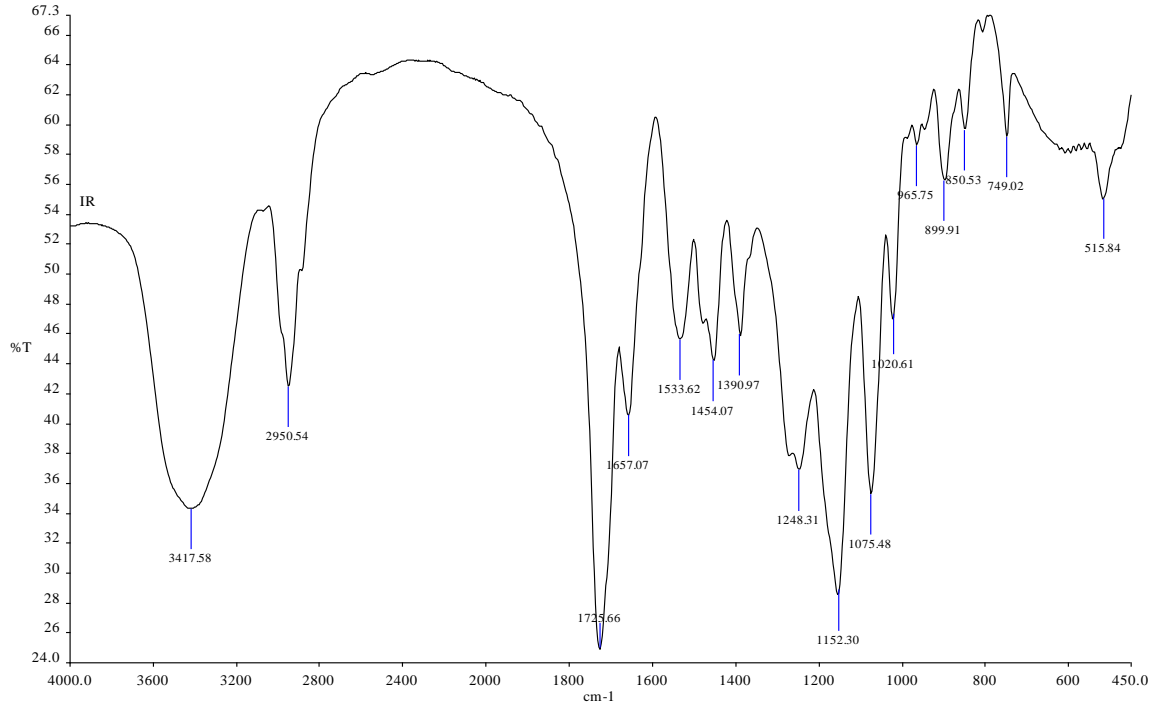
4.2.4. FTIR-ATR Analizi

Nanofilm tutturulmuş QCM sensör yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD)

kullanılmıştır. QCM sensör, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür.



Şekil 4.14. HEMA monomerinin FTIR spektrumu.



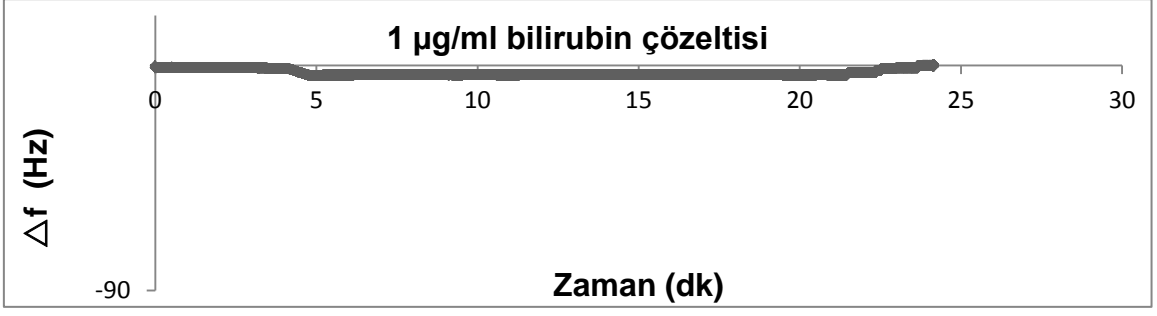
Şekil 4.15. PHEMATrp nanofilmin FTIR spektrumu.

Şekil 4.14 ve Şekil 4.15 sırası ile HEMA monomeri ve PHEMATrp nanofilmine ait FTIR analizini göstermektedir. Şekil 4.14' de görüldüğü gibi HEMA monomeri 3420 cm^{-1} de (OH gerilme), 2954 cm^{-1} de (CH gerilme), 1718 cm^{-1} de (C=O gerilme), 1633 cm^{-1} de (C=C gerilme) bandlarına sahiptir. Şekil 4.15 PHEMATrp nanofilmine ait FTIR spektrumunu göstermektedir. Şekilden görüldüğü üzere MATrp monomerine ait 1533 cm^{-1} de (NH eğilme), 1454-1391 cm^{-1} de (CN aromatik) ve 1657 cm^{-1} de (C=O amit bandları) bandları MATrp monomerinin HEMA'nın yapısına katıldığını göstermektedir. Şekil 4.14'de HEMA monomeri 2954 cm^{-1} de (CH eğilme), 1718 cm^{-1} de (C=O gerilme), 1633 cm^{-1} de (C=C gerillme bandı) bandlar göstermektedir. Şekil 4.15'deki PHEMATrp nanofilme ait FTIR sinyallerinde MATrp monomerinin 1533 cm^{-1} de (NH eğilme), 1454-1391 cm^{-1} (CN aromatik) ve 1657 cm^{-1} (C=O amit) deki bandları yapıya MATrp monomerinin katıldığını göstermektedir.

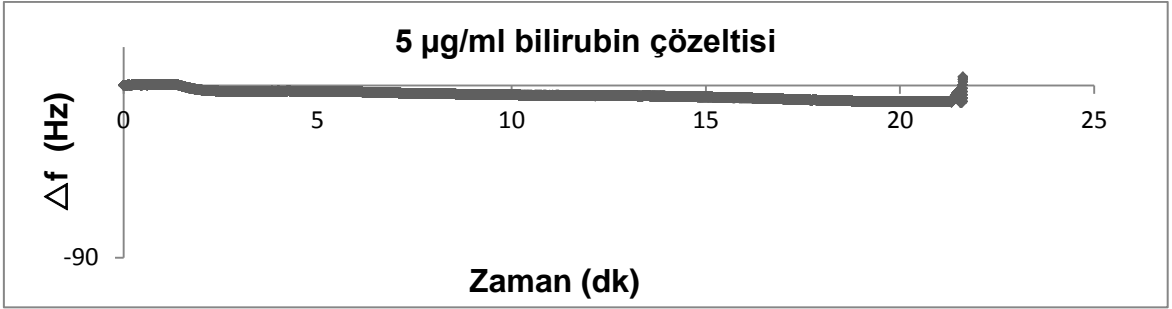
4.3. QCM Sensörlerle Kinetik Analizler

Bu çalışma kapsamında seçici bilirubin tayini için moleküler baskılanmış QCM sensörler hazırlanmıştır. QCM sinyalinin şiddeti ile bilirubin derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi için farklı derişimlerde 1.71 μM - 85.51 μM (1 mg/mL-50 mg/mL) bilirubin çözeltileri hazırlanmıştır. Çalışılan derişim aralığı hiperbilirubinemi tayini göz önüne alınarak seçilmiştir. Çözeltiler peristaltik pompa aracılığı ile QCM sensörlerle etkileştirilmiştir. RQCM (Maxtek) yazılımı elde edilen verileri eş zamanlı olarak izlemiş ve kinetik veriler alınmıştır. Şekil 4.16'da farklı derişimlerde bilirubin çözeltisinden elde edilen sensorgramlar verilmiştir.

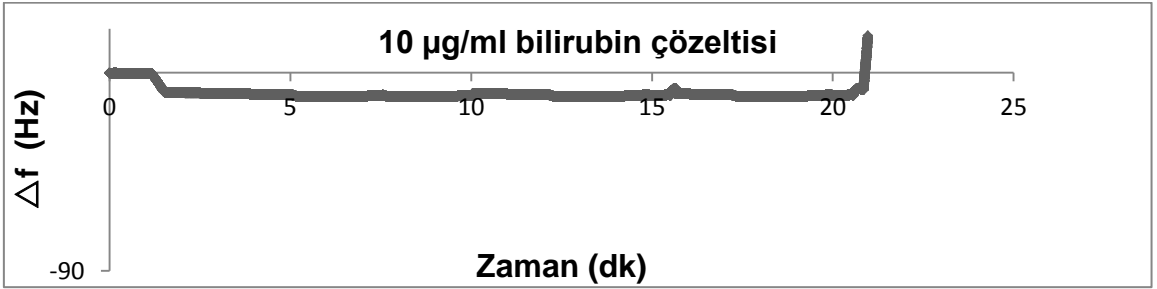
Şekil 4.16'da farklı derişimlerde bilirubin çözeltisinin sensöre uygulanmasıyla elde edilen zamana karşı Δf değişim değerini gösteren ve Şekil 4.17'de zamana karşı Δm değişim değerini gösteren grafikler verilmiştir. Bu şekilde farklı derişimlerde bilirubin çözeltilerine ait tüm grafikler birlikte verilmiştir. Standart bir ölçümde sistemden öncelikle denge tamponu (3 dakika süresince), daha sonra, sistem yeniden dengeye ulaşana kadar bilirubin çözeltisi geçirilmiş (yaklaşık 20 dk süresince) ve son aşamada desorpsiyon çözeltisi kullanılmıştır (yaklaşık 15 dakika süresince). Tüm ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için yaklaşık 50 dakika beklenmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi artan derişimle birlikte sensorgramdaki Δf (Δm) değişimleri doğru orantılıdır.



(a)

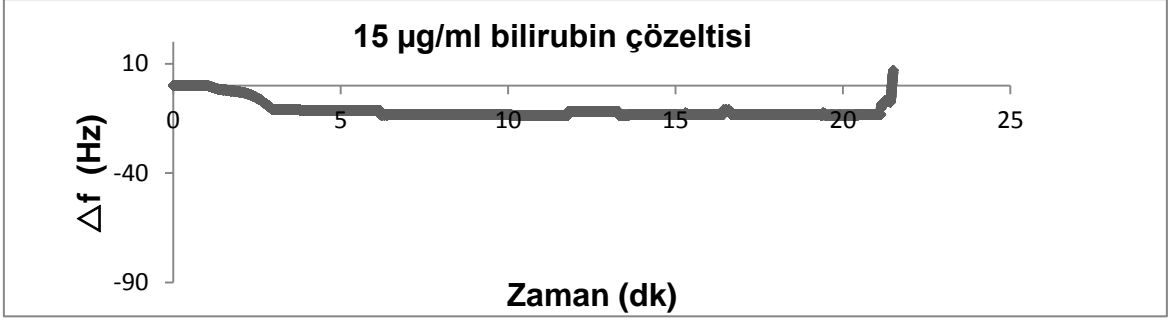


(b)

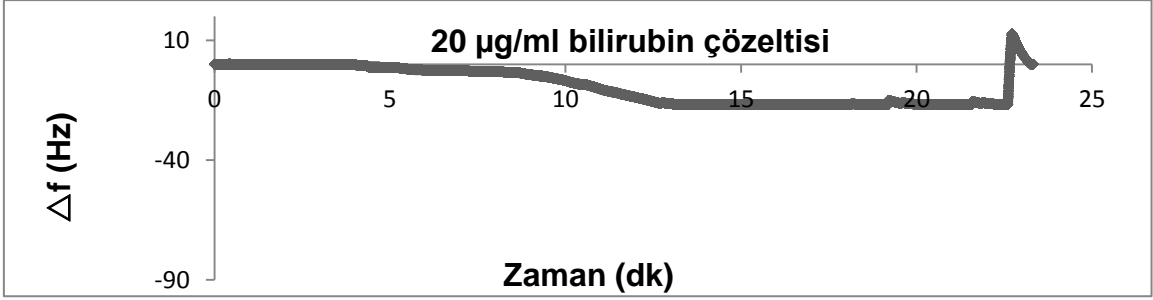


(c)

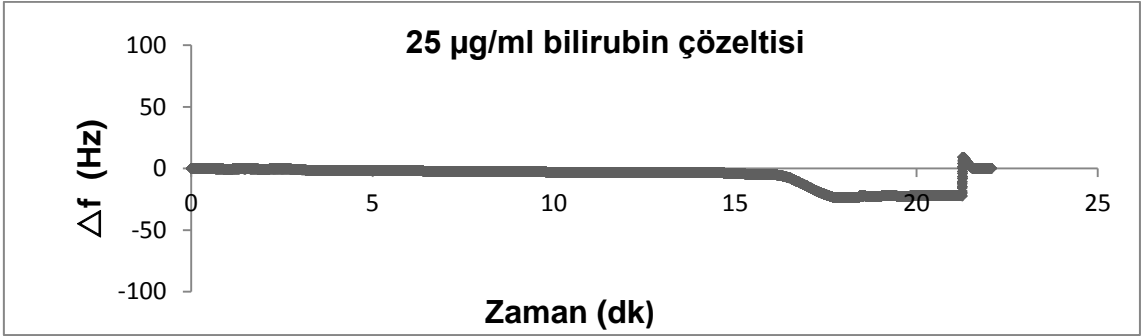
Şekil 4.16. Farklı derişimlerdeki bilirubin çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δf değerini gösteren sensorgramlar. (a) 1 μg/ml (b) 5 μg/ml (c) 10 μg/ml (d) 15 μg/ml (e) 20 μg/ml (f) 25 μg/ml (g) 50 μg/ml



(d)

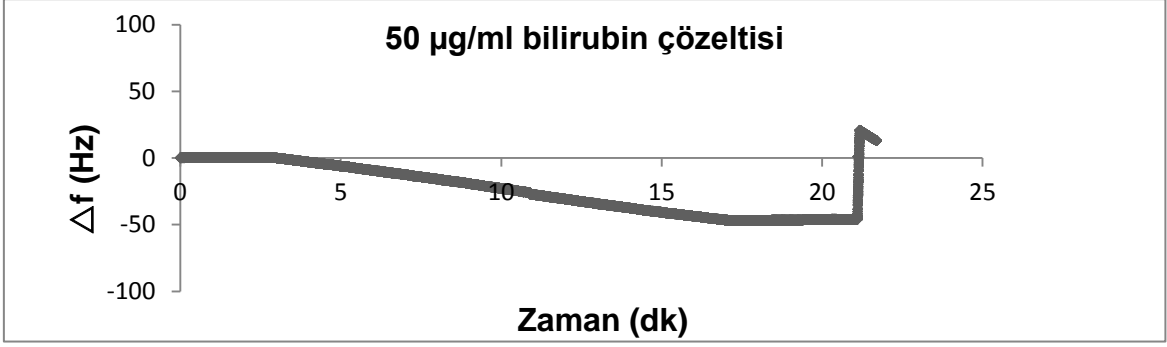


(e)



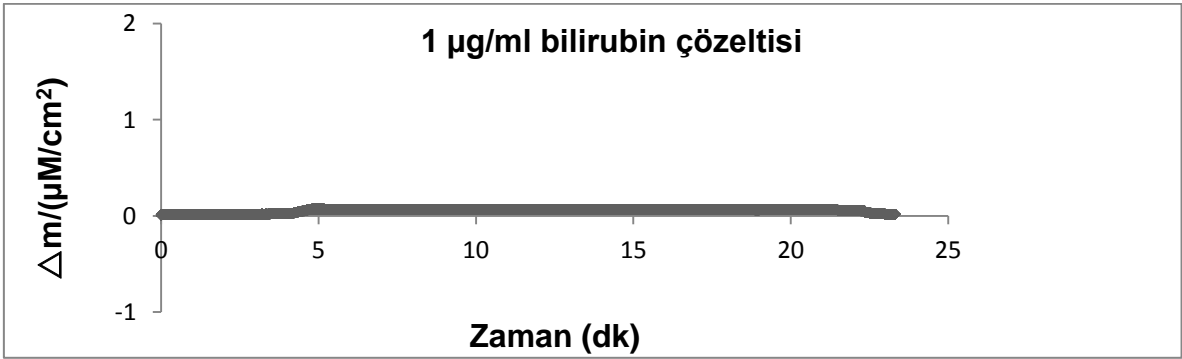
(f)

Şekil 4.16.Devamı. Farklı derişimlerdeki bilirubin çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δf değerini gösteren sensorgramlar. (a) 1 µg/ml (b) 5 µg/ml (c) 10 µg/ml (d) 15 µg/ml (e) 20 µg/ml (f) 25 µg/ml (g) 50 µg/ml

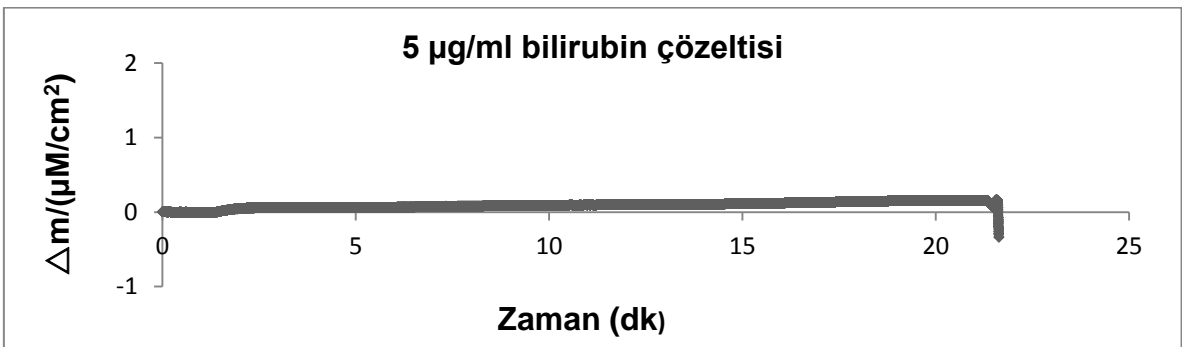


(g)

Şekil 4.16.Devamı. Farklı derişimlerdeki bilirubin çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δf değerini gösteren sensorgramlar. (a) 1 µg/ml (b) 5 µg/ml (c) 10 µg/ml (d) 15 µg/ml (e) 20 µg/ml (f) 25 µg/ml (g) 50 µg/ml

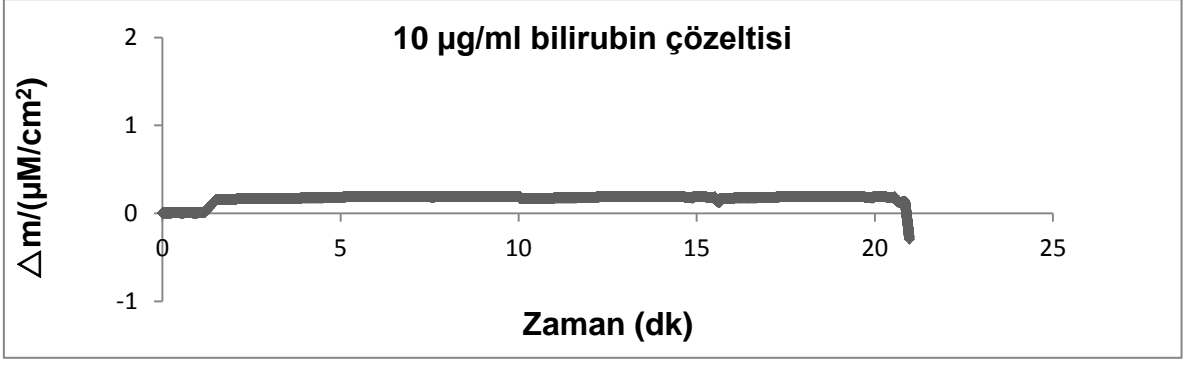


(a)

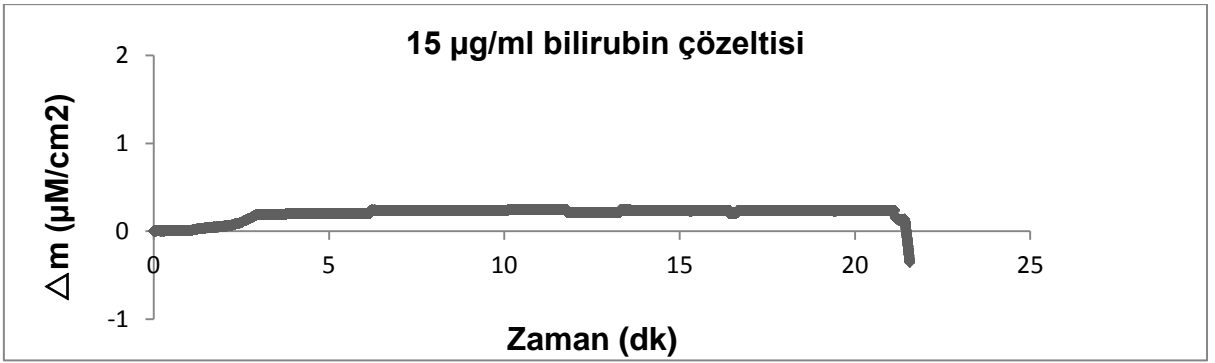


(b)

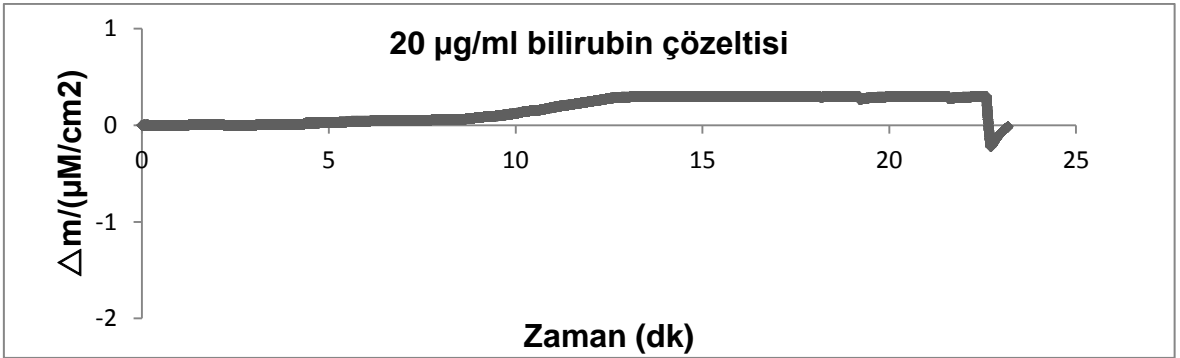
Şekil 4.17. Farklı derişimlerdeki bilirubin çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δm değerini gösteren sensorgramlar (a) 1 µg/ml (b) 5 µg/ml (c) 10 µg/ml (d) 15 µg/ml (e) 20 µg/ml (f) 25 µg/ml (g) 50 µg/ml.



(c)

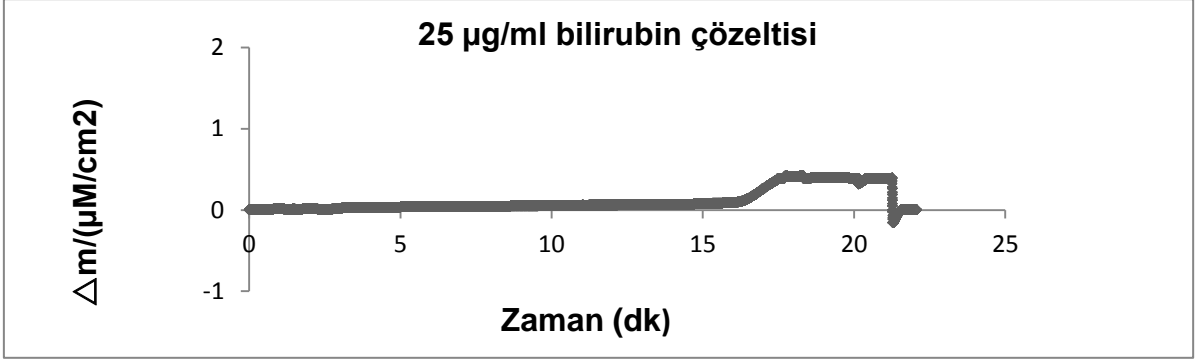


(d)

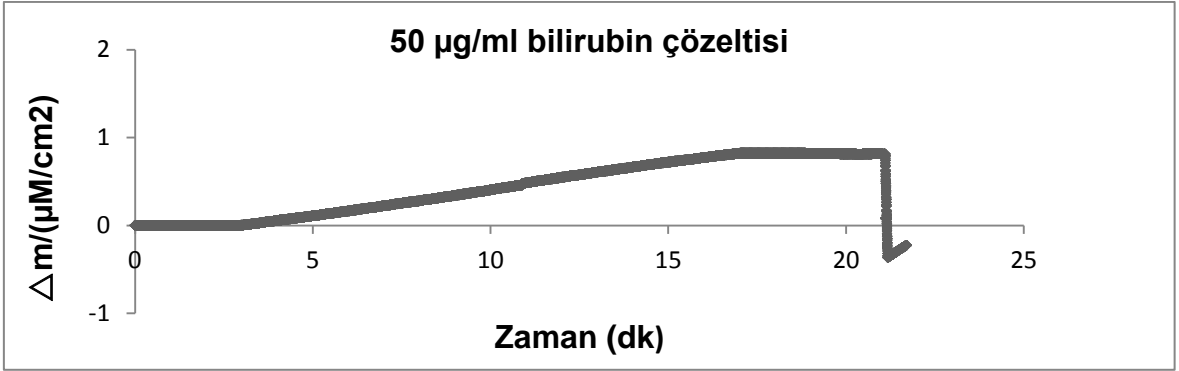


(e)

Şekil 4.17.Devamı. Farklı derişimlerdeki bilirubin çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δm değerini gösteren sensorgramlar (a) 1 $\mu\text{g/ml}$ (b) 5 $\mu\text{g/ml}$ (c) 10 $\mu\text{g/ml}$ (d) 15 $\mu\text{g/ml}$ (e) 20 $\mu\text{g/ml}$ (f) 25 $\mu\text{g/ml}$ (g) 50 $\mu\text{g/ml}$.

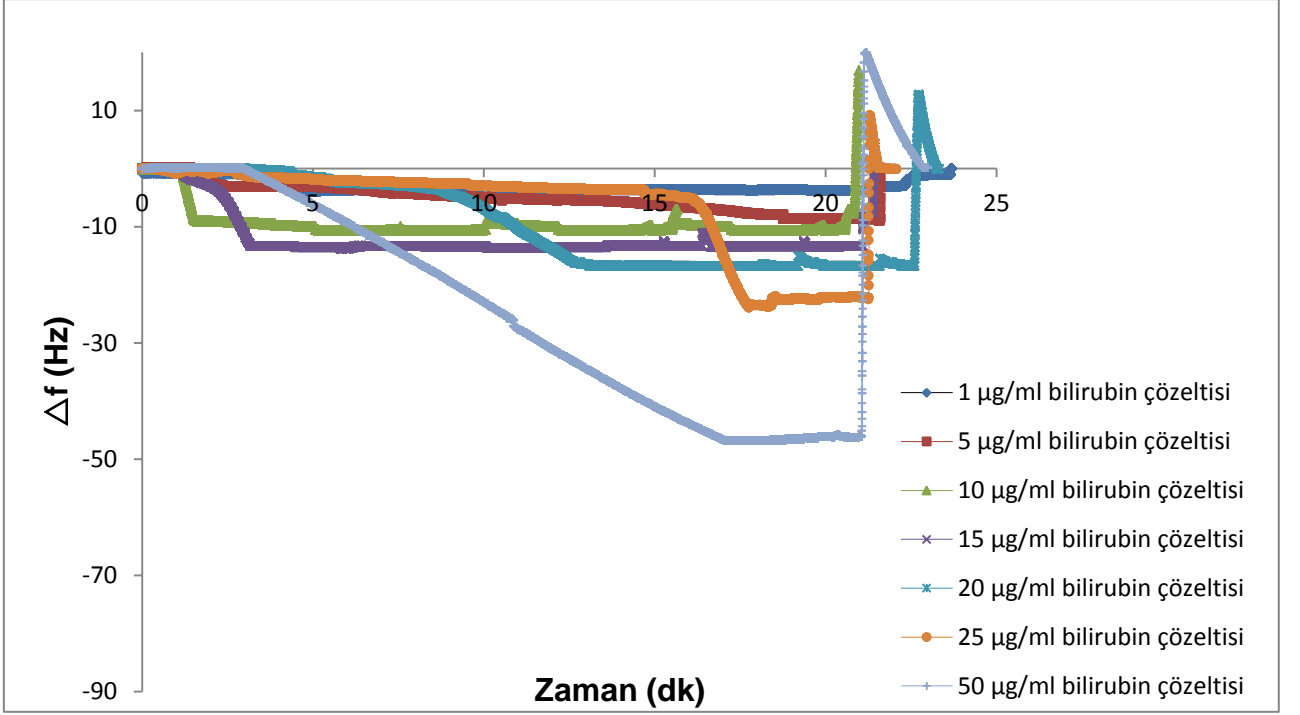


(f)

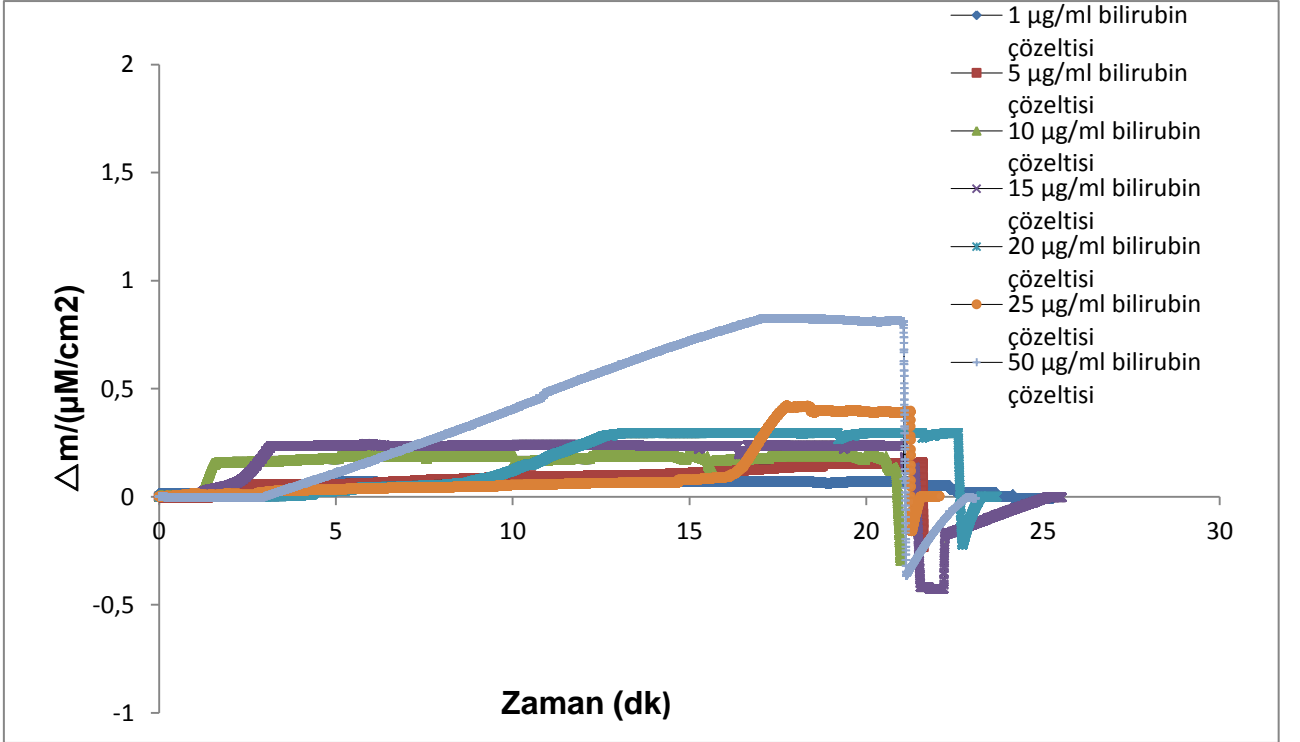


(g)

Şekil 4.17.Devamı. Farklı derişimlerdeki bilirubin çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δm değerini gösteren sensorgramlar (a) 1 µg/ml (b) 5 µg/ml (c) 10 µg/ml (d) 15 µg/ml (e) 20 µg/ml (f) 25 µg/ml (g) 50 µg/ml.



(a)

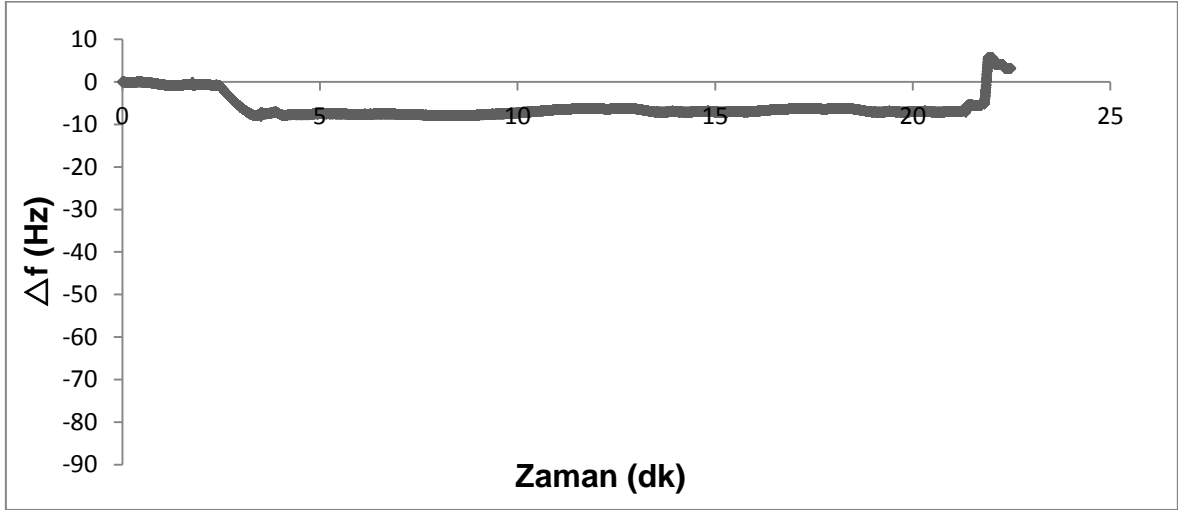


(b)

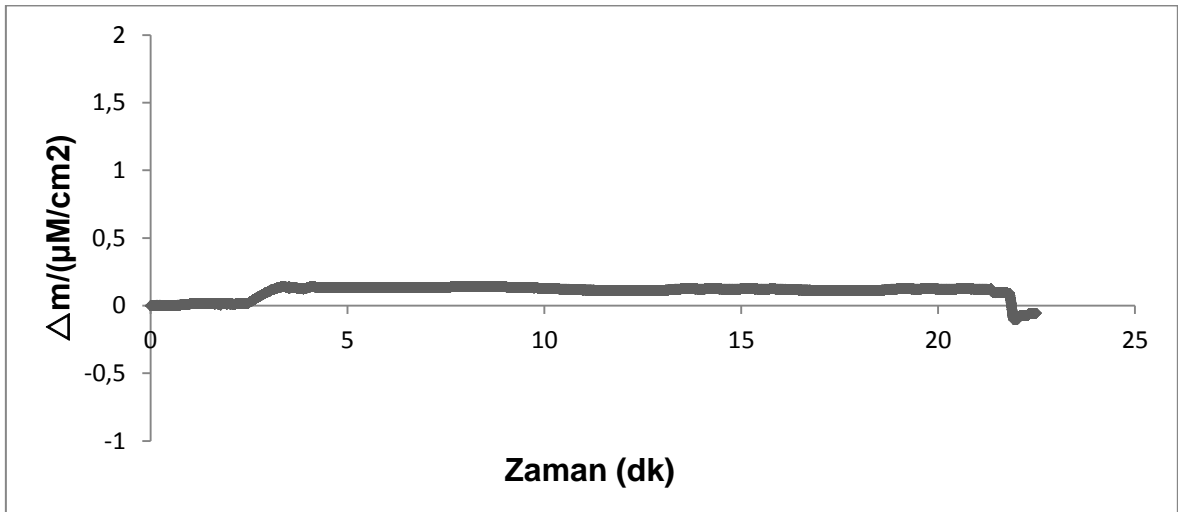
Şekil 4.18. Bilirubin çözeltileri ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. (a) zamana karşı Δf değerini gösteren sensorgram; (b) zamana karşı Δm değerini gösteren sensorgram.

4.3.1 QCM Sensörde Kan Serumu Çalışmaları

Sağlıklı bir bireyden alınan kan örneğinden elde edilen serum, bilirubin baskılanmış QCM sensör yüzeyine gönderildi ve kütlede $\Delta m=0.135$ 'lik bir artış oldu ve $11.31 \mu\text{M}$ 'lik ($6.60 \mu\text{g/ml}$) bilirubin içerdiği tespit edildi.

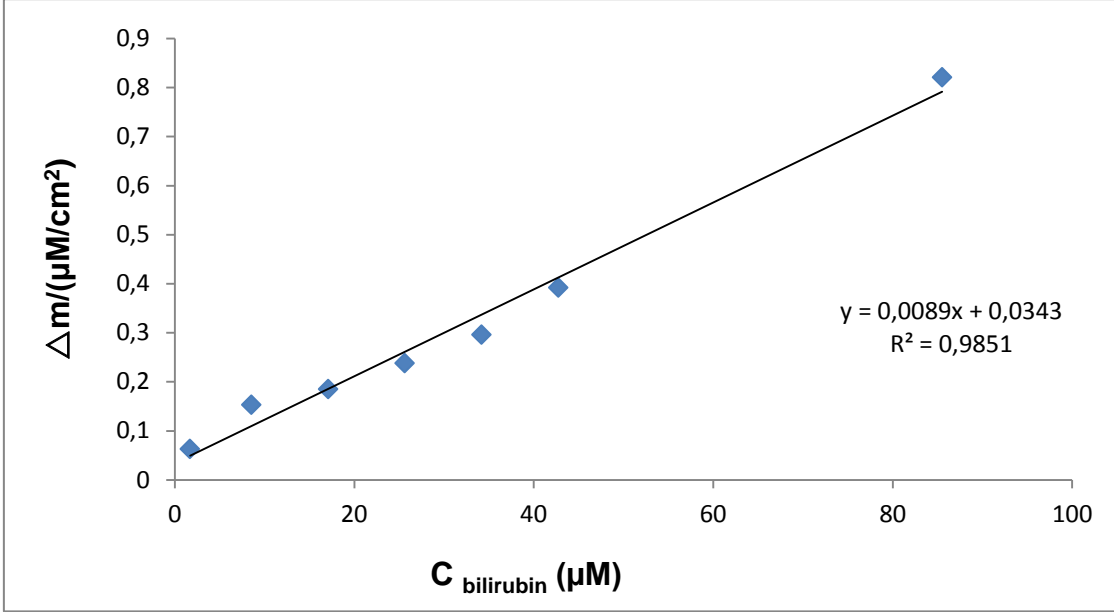


(a)



(b)

Şekil 4.19. İnsan kan serumu ve QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. (a) zamana karşı Δf değerini gösteren sensorgram; (b) zamana karşı Δm değerini gösteren sensorgram.



Şekil 4.20. Bilirubin baskılanmış QCM sensöre ait derişim ($C_{\text{bilirubin}}$) ile Δm arasındaki ilişki.

Şekil 4.20'de görüldüğü gibi Δm değeri artan bilirubin derişimiyle artmaktadır. QCM sensör 1.71 μM - 85.51 μM derişim aralığında derişim sinyal doğrusallığı göstermektedir. 1.71 μM - 85.51 μM aralığındaki alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ($y = 0.0089x + 0.0343$) ve doğrusallığı (R^2) 0.9851 olarak hesaplanmıştır. Bu elde edilen verilerle, hazırlanan QCM sensor %98 doğrulukta ölçüm yapmaktadır.

- Denge Analizi

Toplam ligand miktarı ($[B]_0$), yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak tanımlanırsa diğer tüm derişim değerleri QCM sinyali olarak ifade edilebilir. Böylelikle kütle derişime dönüştürülme işleminin yapılmasına gerek kalmayacaktır. Serbest analit derişiminin akış hücresinde sabit kaldığı yalancı-birinci derece koşulu altında bağlanma şu şekilde ifade edilir:

$$d\Delta m/dt = k_a C \Delta m_{\text{maks}} - (k_a C + k_d) \Delta m \quad (4.1)$$

Burada, $d\Delta m/dt$, QCM sinyalinin değışim hızı; m ve Δm_{maks} bağlanma ile ölçülen ve kütle artışından kaynaklanan maksimum sinyal ($\mu\text{M}/\text{cm}^2$); C , analit derişimi (μM); k_a , bağlanma hız sabiti ($\mu\text{M}/\text{s}$) ve k_d , ayrılma hız sabiti ($1/\text{s}$)'dir. Bağlanma

sabiti K_A (μM), k_a ve k_d sabitlerinin oranından hesaplanır. ($K_A=k_a /k_d$). Denge durumunda, $d\Delta m/dt=0$ alınarak eşitlikler basitleştirilir:

$$\Delta m_{denge}/C = K_A \Delta m_{maks} - K_A \Delta m_{denge} \quad (4.2)$$

Bundan dolayı, bağlanma sabiti K_A , $\Delta m_{denge}/C$ 'ye karşı Δm_{denge} grafiğinden hesaplanır. Ayrılma sabiti K_D ise; $1/ K_A$ eşitliği ile hesaplanabilir.

- Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 4.1 tekrar düzenlendiğinde;

$$d\Delta m/dt = k_a C \Delta m_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta m \quad (4.3)$$

eşitliği elde edilir. Buradan etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta m/dt$ 'ye karşı Δm grafiğinin, eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bir doğru verdiği görülmektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusal bir ilişki içerisindedir ve kantitatif olarak derişim belirlenmesinde kullanılır. Eğer Δm_{maks} değeri biliniyorsa, tek bir sensorgam kullanılarak k_a ve k_d değerleri hesaplanabilir. Yüzeyi tamamen doygunluğa eriştirmek için çok yüksek analit derişimleri gerekli olduğu için Δm_{maks} 'ın deneysel olarak belirlenmesi zordur. Tercih edilen yaklaşım, birçok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensorgramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta m/dt$ 'ye karşı Δm grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri (S) vermektedir.

$$S = k_a C + k_d \quad (4.4)$$

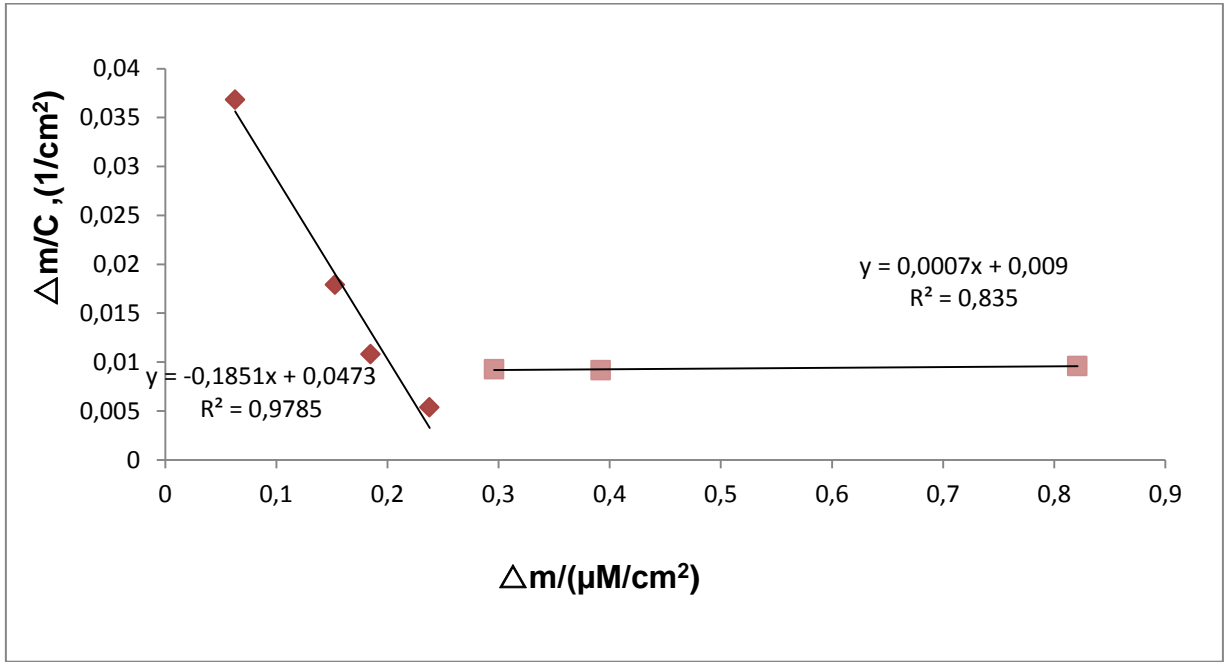
S 'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası k_d değerini vermektedir. Fakat $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda k_d hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

$$\ln (\Delta m_0 / \Delta m_t) = k_d (t - t_0) \quad (4.5)$$

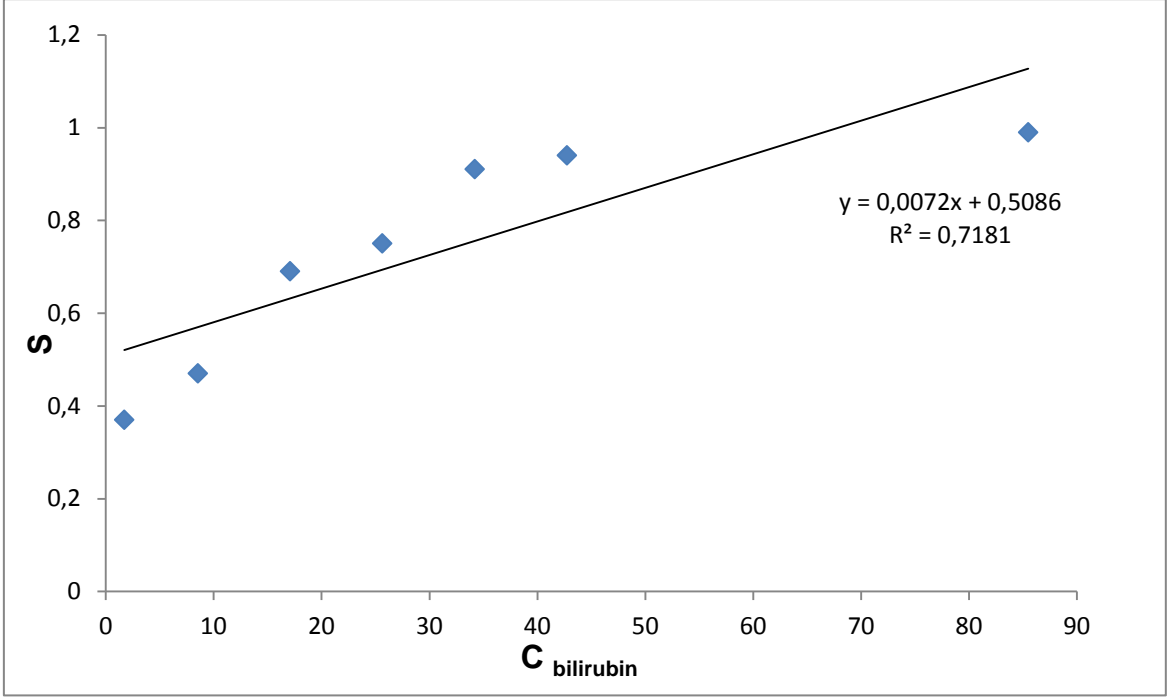
Burada; Δm_0 ve Δm_t ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki QCM sinyal değerleridir. Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.3'de özetlenmiştir.

Çizelge 4. 3. Kinetik hız sabitleri.

Denge Analizi (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
Δm_{maks} , $\mu\text{M}/\text{cm}^2$	0.255	k_a , $\mu\text{M}/\text{s}$	0.0072
K_A , μM	0.1851	k_d , $1/\text{s}$	0.5086
K_D , $1/\mu\text{M}$	5.4024	K_A , μM	0.014
R^2	0.97	K_D , $1/\mu\text{m}$	71.42
		R^2	0.71



Şekil 4.21. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi denge analiz yaklaşımı (Scarthard)



Şekil 4.22. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi bağlanma kinetik yaklaşımı.

4.4. Denge İzoterm Modelleri

Bilirubin baskılanmış QCM sensör ile bilirubin arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Scarthard, Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri.

Scarthard $\Delta m_{\text{denge}}/[C] = K_A(\Delta m_{\text{maks}} - \Delta m_{\text{denge}})$

Langmuir $\Delta m = \{ \Delta m_{\text{maks}}/[C]/(K_D+[C]) \}$

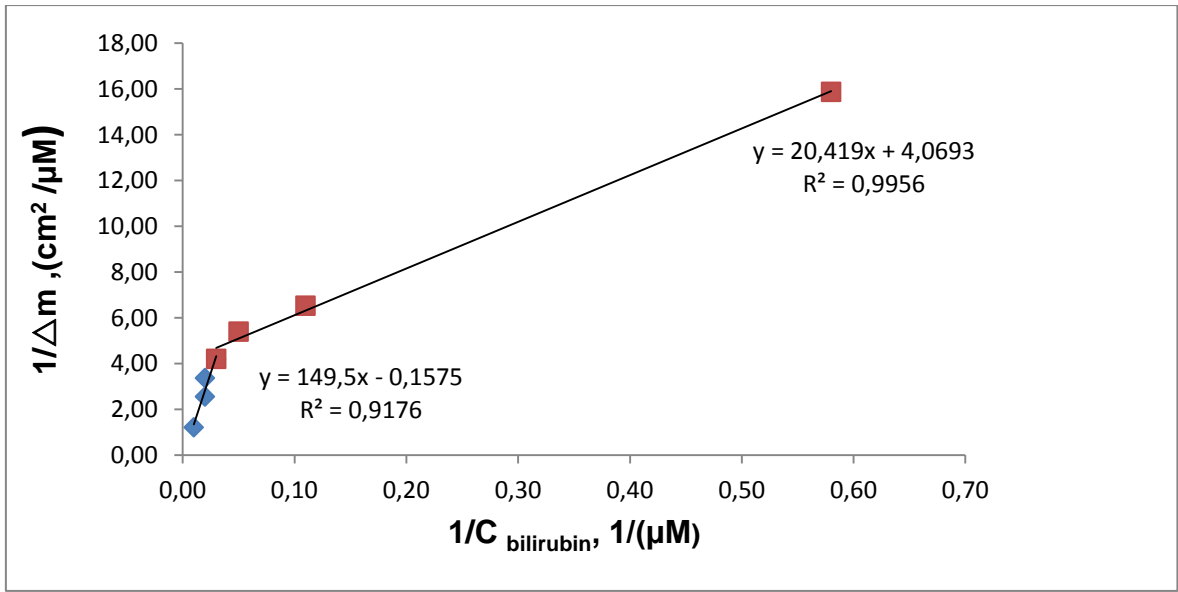
Freundlich $\Delta m = \Delta m_{\text{maks}}[C]^{1/n}$

Langmuir-Freundlich $\Delta m = \{ \Delta m_{\text{maks}}[C]^{1/n} / K_D+[C]^{1/n} \}$

Burada; Δm_{maks} ($\mu\text{M}/\text{cm}^2$), maksimum QCM sinyal kayması; Δm_{denge} , denge halindeki QCM sinyal kayması; $[C]$, analit derişimi (μM); K_A (μM), bağlanma denge sabiti; K_D ($1/\mu\text{M}$), ayrılma denge sabiti; $1/n$, Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.

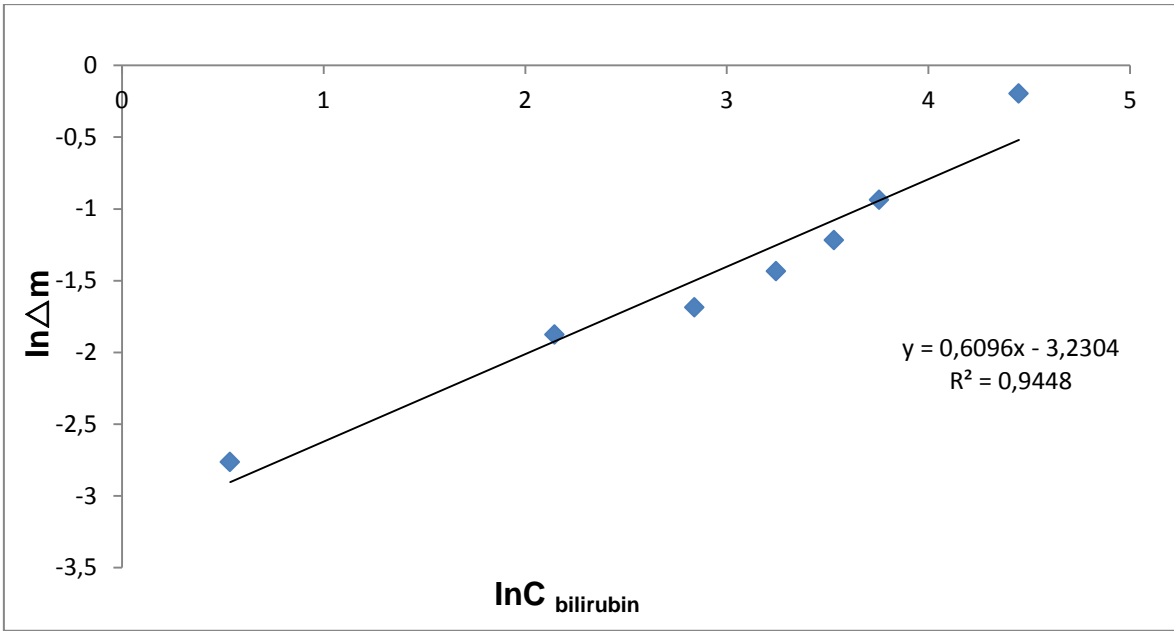
Langmuir adsorpsiyon modeli homojen, Freundlich adsorpsiyon modeli ise heterojen bağlanma varsayımına dayanır. Langmuir modeli, moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı bağlanma izotermine yaygın olarak

kullanılmıştır [141]. Moleküler baskılanmış polimerlerin heterojen bağlanma bölgeleri de içerdiği rapor edilmiştir [142,143]. Freundlich adsorbsiyon modeli, özellikle düşük derişimlerde MIP sistemlerine uygunluk göstermektedir [142]. Fakat bu model, yüksek derişim değerlerinde bazı sapmalar göstermektedir. Bu sapmaları engellemek için Langmuir-Frendlich ikili modeli kullanılabilir. Bu model, heterojenite olduğu durumda çok düşük derişimlerden doygunluğa kadar MIP sistemleriyle uygunluk göstermektedir [143]. Şekil 4.23'de Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich modellerine ait grafikler verilmiştir.

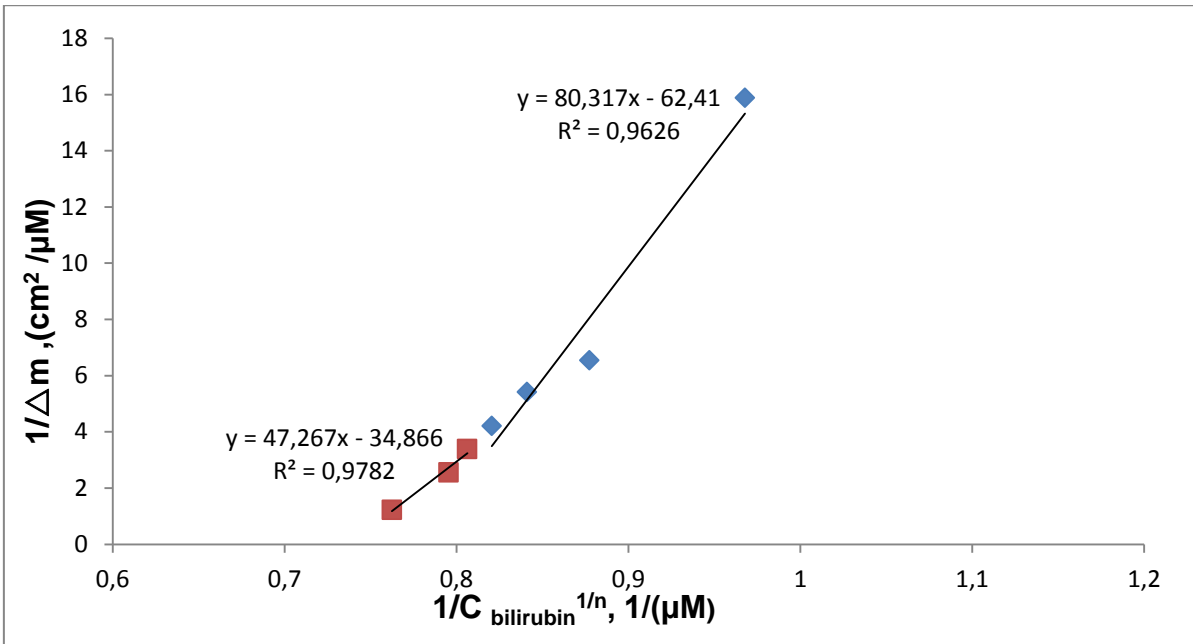


(a)

Şekil 4.23. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.



(b)



(c)

Şekil 4.23.Devamı. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.

Çizelge 4.4. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
Δm_{maks}	0.228	Δm_{maks}	0.039	Δm_{maks}	0.0186
$K_A, \mu M$	0.215	1/n	0.6096	1/n	0.6096
$K_D, 1/\mu M$	4.65	R^2	0.9448	$K_A, \mu M$	1.31
R^2	0.9956			$K_D, 1/\mu M$	0.76
				R^2	0.9782

Şekil 4.23'te göre deneysel olarak elde edilen veriler Langmuir modeli ile uyumludur ($R^2 = 0.9956$). Bu sonuçlar; hazırlanan bilirubin baskılanmış sensör bağlanma bölgelerinin eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmektedir.

4.5. Yarışmalı Kinetik Analizler

Kolesterol ve östradiol için bilirubin moleküllerine göre dağılıma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (4.6)$$

Eşitlikte K_d , dağılıma katsayısını (1/nM); C_i ve C_f , biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini (nM); V , kullanılan çözelti hacmini (mL) ve m , polimerin ağırlığını (g) ifade etmektedir. QCM sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşımdaki temel sebepler; başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi; polimerin kütesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin Δm ile doğrusal ilişkide olmasıdır.

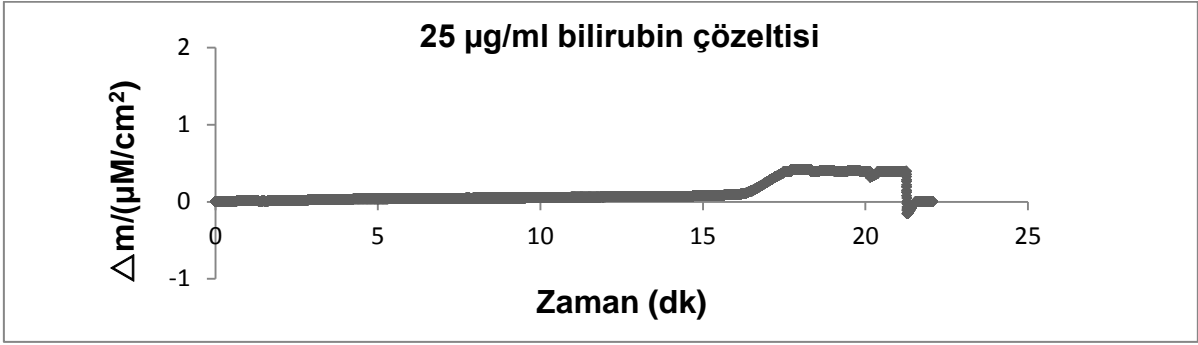
Bu durumda; seçicilik katsayısı,

$$k = \Delta m_{kalıp} / \Delta m_{girişimci} \quad (4.7)$$

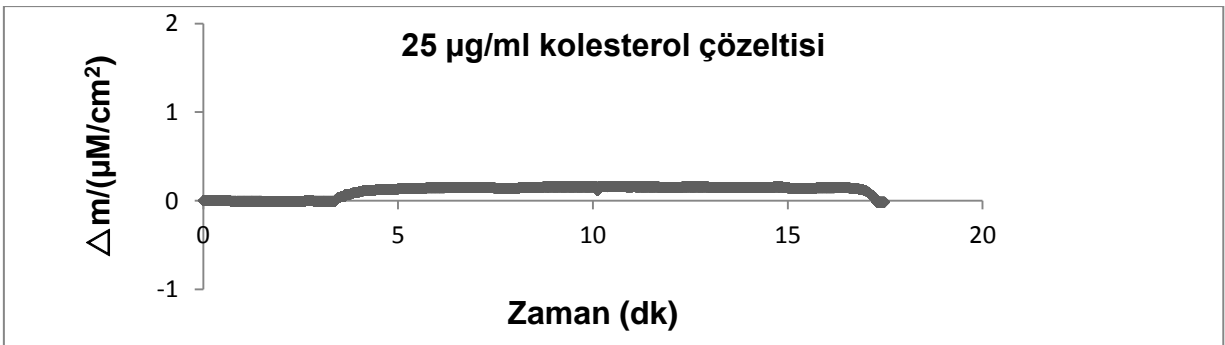
şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için ise;

$$k' = k_{baskılanmış} / k_{kontrol} \quad (4.8)$$

şeklinde ifade edilebilir. Hazırlanan bilirubin baskılanmış sensörün bilirubine karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri kolesterol, östradiol ve bilirubin molekülerinin çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sensörün bu karışımlara gösterdiği tepki, Şekil 4.24'de $\Delta m/zaman$ ilişkilerine ait sensorgramlarda görülmektedir. Kolesterol ve östradiol molekül yapıları ve ağırlıkları bilirubine oldukça yakındır. Bilirubin baskılanmış sensörlerin kolesterol ve östradiole verdiği sensorgram sinyal değerleri ise (Δm) sırasıyla 0.151 ve 0.081'dir. Aynı derişimdeki bilirubin için elde edilen sinyal ise 0.392'dir. Bu sonuçlara göre baskılanmış sensör bilirubin'i, kolesterol'e göre 2.59 kat, östradiol' göre 4.83 kat daha duyarlı tayin edebilmektedir. Etkileşimdeki bu hassasiyet, kalıp molekül olan bilirubin'in üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasından kaynaklanmaktadır.

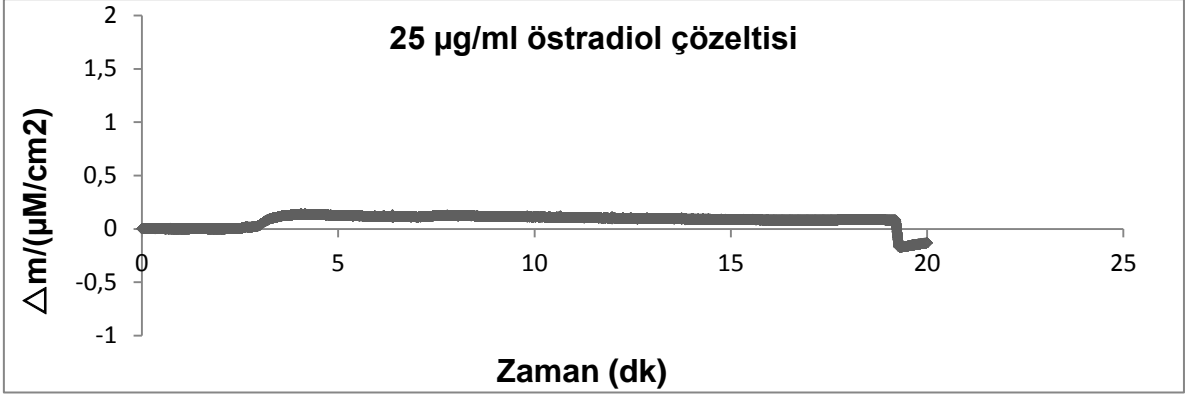


(a)



(b)

Şekil 4.24. 25 µg/mL derişimde (a) bilirubin (b) kolesterol (c) östradiol, bilirubin baskılanmış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δm değerlerini gösteren sensörgramlardır.

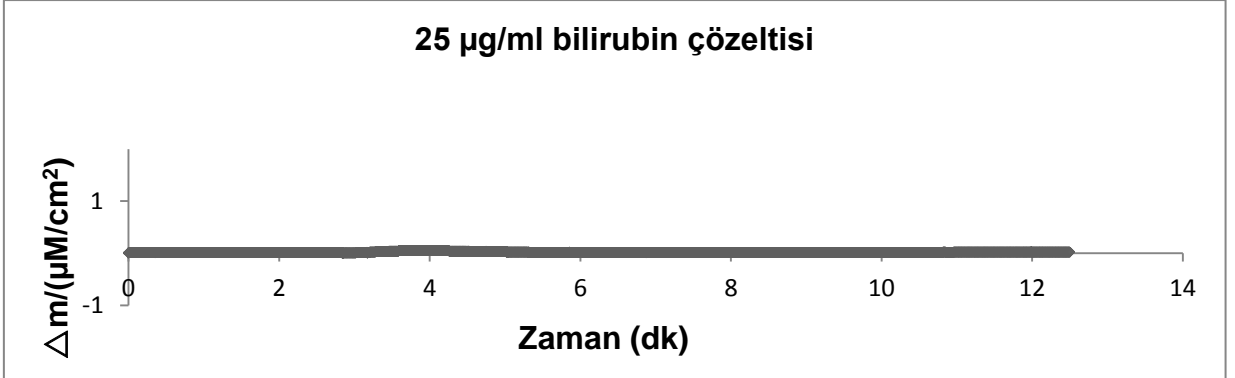


(c)

Şekil 4.24.Devamı. 25µg/mL derişimde (a) Bilirubin (b) kolesterol (c) östradiol, bilirubin baskılanmış QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı Δm değerlerini gösteren sensörgramlardır.

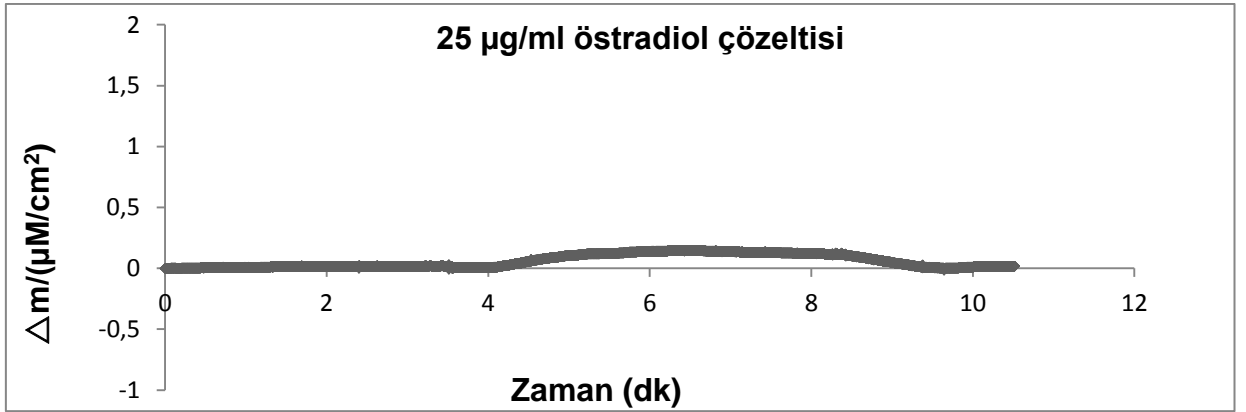
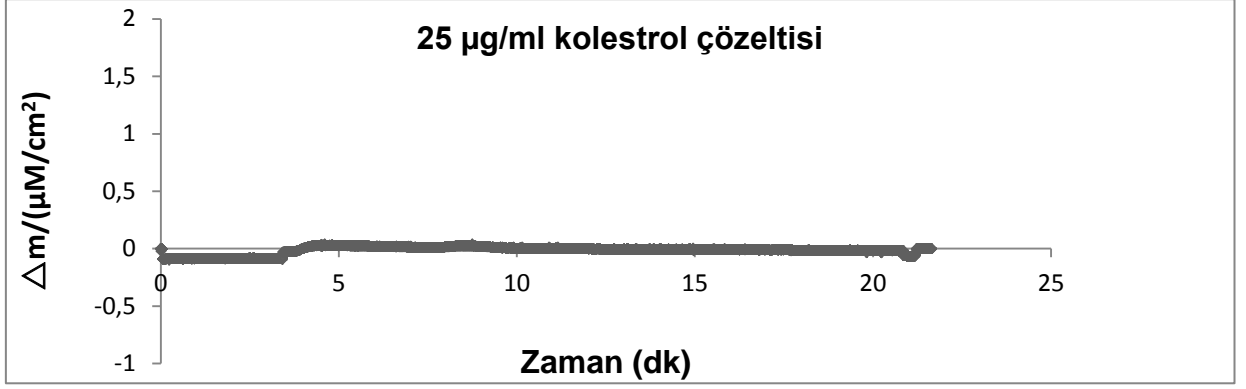
4.6. QCM Sensörün Baskılanma Seçiciliğinin Belirlenmesi

Bilirubin baskılanmış sensörün baskılama seçiciliğini göstermek için bilirubin baskılanmamış sensör de hazırlanmıştır. 25 µg/ml derişiminde kolesterol ve östradiol çözeltileri QCM sistemine gönderilmiştir. Baskılanmamış sensörün bu çözeltilere verdiği sinyal Şekil 4.25’de gösterilmiştir.



(a)

Şekil 4.25. 25µg/ml derişimlerde (a) bilirubin (b) kolesterol (c) östradiol çözeltilerinin bilirubin baskılanmış QCM sensörü arasındaki etkileşime ait zamana karşı Δm değerlerini gösteren sensörgramlar.



Şekil 4.25.Devamı. 25μg/ml derişimlerde (a) bilirubin (b) kolesterol (c) östradiol çözeltilerinin bilirubin baskılanmış QCM sensörü arasındaki etkileşime ait zamana karşı Δm değerlerini gösteren sensorgramlar.

Çizelge 4.5. Bilirubin'e göre kolesterol ve östradiol için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

	MIP		NIP		
	Δm	k	Δm	k	k'
Bilirubin	0.392	-	0.060	-	-
Kolesterol	0.152	2.59	0.069	0.86	3.01
Östradiol	0.081	4.83	0.055	2.85	1.68

Bilirubin baskılanmamış sensörün aynı derişimdeki bilirubin, kolesterol ve östradiole verdiği sensorgram sinyal değerleri (Δm) 0.060, 0.069 ve 0.021'dir.

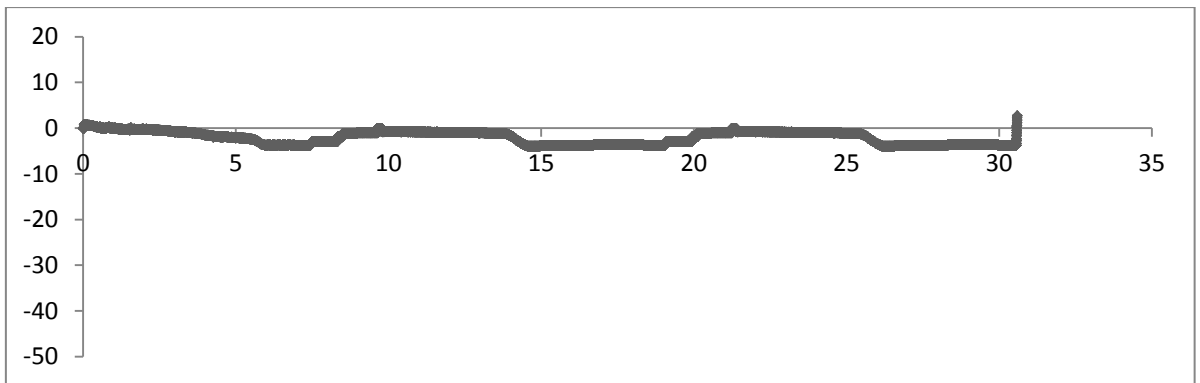
Şekil 4.25 incelendiğinde bilirubin baskılanmamış QCM sensörün aynı derişimdeki bilirubin, kolesterol ve östradiol çözeltilerine verdiği sinyal artışının oldukça az olduğu görülmektedir. Baskılanmış ve baskılanmamış QCM sensörler karşılaştırıldığında bilirubin sinyal duyarlılığının 2.59 kattan 0.86 kata düştüğü görülmektedir.

Eşitlik 4.7 ve 4.8 kullanılması ile hesaplanan seçicilik katsayıları kolesterol için 2,59 (baskılanmış), 0,86 (baskılanmamış) olarak östradiol için 4.83 (baskılanmış), 2.85 (baskılanmamış) olarak bulunmuştur. Baskılama seçiciliğini gösteren bağıl seçicilik katsayısı 3.01 (Bilirubin/kolesterol) ve 1.68 (Bilirubin/östradiol) olarak hesaplanmıştır.

Sonuçlara bakıldığında, bilirubin baskılanmış sensör; bilirubin'i kolesterole göre 3.01 kat, östradiole göre 1.68 kat seçicilikle tanımaktadır. Molekül yapılarının ve molekül ağırlıklarının birbirine çok yakın olduğu bu moleküller arasında yaklaşık 3.01 katlık ayırma faktörünün başarılı bir sonuç olduğu söylenebilir.

4.7. Sensörün Kullanılabilirliği

Bilirubin baskılanmış QCM sensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 1 $\mu\text{g/ml}$ derişimlerde bilirubin içeren çözeltiler QCM sistemine tekrarlı (3 kez) bir şekilde enjekte edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.25'de verilmiştir



Şekil 4. 26. Billirubin baskılanmış QCM sensörün tekrar kullanılabilirliği

5. YORUM

- MATrp monomeri, triptofan metilesterin, metakroil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir. Elde edilen monomer FTIR çalışması ile karakterize edilmiştir.
- MATrp monomerinin FTIR spektrumunda MATrp monomerine ait karakteristik 1533 cm^{-1} de (NH eğilme), $1454\text{-}1391\text{ cm}^{-1}$ de (CN aromatik) ve 1657 cm^{-1} de (C=O amit bandları) bandları görülmektedir.
- QCM sensörün altın yüzeylerin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılmıştır. FTIR-ATR spektrumunda MATrp monomerine ait 1533 cm^{-1} de (NH eğilme), $1454\text{-}1391\text{ cm}^{-1}$ de (CN aromatik) ve 1657 cm^{-1} de (C=O amit bandları) bandları MATrp monomerinin HEMA'nın yapısına katıldığını göstermektedir. Ayrıca PHEMATrp nanofilme ait FTIR sinyallerinde MATrp monomerinin 1533 cm^{-1} de (NH eğilme), $1454\text{-}1391\text{ cm}^{-1}$ (CN aromatik) ve 1657 cm^{-1} (C=O amit) deki bandları yapıya MATrp monomerinin katıldığını göstermektedir.
- Modifiye edilmemiş, bilirubin baskılanmış ve baskılanmamış PHEMATrp nanofilm tutturulmuş QCM sensörün yüzey morfolojisi yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiş QCM sensörün yüzey derinliği 10 nm olarak belirlenmiştir. Bilirubin baskılanmış ve baskılanmamış PHEMATrp nanofilmi tutturulmuş QCM sensörün yüzey derinlikleri sırasıyla 50 nm ve 20 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar; nanofilmin yüzeye başarılı ve tek tabakaya yakın bir şekilde kaplandığını göstermektedir.
- Bilirubin baskılanmış ve baskılanmamış PHEMATrp nanofilm tutturulmuş QCM sensörlerin ortalama yüzey kalınlıkları elipsometre cihazı ile incelenmiştir. Bilirubin baskılanmış ve baskılanmamış sensörlerin ortalama kalınlık değerleri sırasıyla 15 nm ve 12 nm olarak hesaplanmıştır.
- Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi modifiye edilmemiş QCM sensör yüzeyinin temas açısı değeri 85.4° , bilirubin baskılanmış nanofilm tutturulmasıyla 77.1° ve bilirubin baskılanmamış nanofilm tutturulmasıyla 75.3° ye düşmüştür.

- Yüzey temas açısının önemli miktarda düşmesi yüzeyin hidrofilik özelliğinin artmasını göstermektedir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; hem baskılanmış hem baskılanmamış nanofilm sentezinde monomer olarak HEMA monomeri kullanılmıştır. HEMA monomerinin yapısındaki hidroksil grubundan dolayı hidrofilik karaktere sahiptir. Bu sebeple, yüzeye hidrofilik bir monomerin tutturulması yüzey hidrofilitasını artırmış ve temas açısı değerini de düşürmüştür. Baskılanmamış nanofilmde hidrofobik karaktere sahip bilirubin bulunmaması, baskılanmış nanofilme göre daha hidrofilik yapmış ve temas açısı değeri baskılanmış göre daha düşük olmuştur.
- Bilirubin baskılanmış QCM sensörlerle değişik derişimlerde bilirubin çözeltileri etkileştirilmiştir. Derişimdeki artış ile birlikte Δm değerindeki artışın daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun sebebi olarak çözelti ile yüzey arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artması gösterilebilir.
- Δm 'ye karşılık zaman grafikleri birlikte çizildiğinde elde edilen sensorgramlar daha kolay incelenebilmektedir. Bilirubin derişimi artıkça Δm değerinin de arttığı daha açık şekilde belirlenmiştir
- QCM sensör tek derişim aralığında doğrusallık göstermektedir. $1.71\mu\text{M}$ - $85.51\mu\text{M}$ ($1\ \mu\text{g/ml}$ – $50\ \mu\text{g/ml}$) aralığında alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun deklemleri $y = 0.0089x + 0.0343$ ve doğrusallığı $R^2 = 0.9851$ olarak hesaplanmıştır. Bu elde edilen verilerle, hazırlanan QCM sensörün $1.71\mu\text{M}$ - $85.51\mu\text{M}$ derişim aralığında % 98.5 doğrusallıkla ölçüm yapmaktadır.
- Langmuir modelinin hazırlanan sensörlere en uygun izoterm modeli olduğu görülmüştür. Buradan hesaplanan Δm_{maks} değeri deneysel değere ($0.228\ \mu\text{M}$) oldukça yakındır. Langmuir denkleminde hesaplanan K_A ve K_D değerleri sırasıyla $0.215\ \mu\text{M}$ ve $4.65\ 1/\mu\text{M}$ dır.
- Hazırlanan bilirubin baskılanmış sensörün bilirubine karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri kolesterol ve östradiol moleküllerinin çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bilirubin baskılanmış sensörlerin kolesterol ve östradiole verdiği sensorgram sinyal değerleri (Δm) sırasıyla 0.152 ve 0.081 'dir. Aynı derişimdeki bilirubin için elde edilen sinyal değeri ise 0.392 'dir. Bu sonuçlara göre baskılanmış sensör bilirubini, kolesterole göre 2.59 kat, östradiole göre 4.83 kat daha

duyarlı tayin edebilmektedir. Etkileşimdeki bu hassasiyet, kalıp molekül olan bilirubin'in üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasından kaynaklanmaktadır.

- Bilirubin baskılanmış sensörün baskılama seçiciliğini göstermek için bilirubin baskılanmamış sensörde hazırlanmıştır. 42.75 μM (25 μml) derişimindeki bilirubin, kolesterol ve östradiol çözeltileri QCM sistemine gönderilmiştir. Bilirubin baskılanmamış QCM sensörün aynı derişimdeki bilirubin, kolesterol ve östradiol çözeltilerine verdiği sinyal artışının oldukça az olduğu görülmektedir. Eşitlik 4.7 ve 4.8 kullanılmasıyla hesaplanan seçicilik katsayıları kolesterol için 2.59 (baskılanmış), 0.86 (baskılanmamış) olarak ve östradiol için 4.83 (baskılanmış), 2.85 (baskılanmamış) olarak bulunmuştur. Baskılama seçiciliğini gösteren bağıl seçicilik kat sayısı 3.01 (bilirubin/kolesterol) ve 1.68 (bilirubin/östradiol) olarak hesaplanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Lee, K.H., Wendon, J., Lee, M., Costa, M.D., Lim, S.G., Tan, K.C., Predicting the decrease of conjugated bilirubin with extracorporeal albumin dialysis MARS MARS using the predialysis molar ratio of conjugated bilirubin to albumin, *Liver Transplantation*, 8 , 156, **2002**.
- [2] Kurosaka, K., Senba, S., Tsubota, H., Kondo, H., Clin, A new enzymatic assay for selectively measuring conjugated bilirubin concentration in serum with use of bilirubin oxidase, *Chimica Acta*, 269, 125–136, **1998**.
- [3] Tiribelli, C. J., Ostrow, D., The molecular basis of bilirubin encephalopathy and toxicity, *Journal Hepatology*, 43, 156, **2005**.
- [4] Sideman, S., Mor, L., Mordohovich, D., Mihich, M., Zinder, O., Brandes, J.M., In vivo hemoperfusion studies of unconjugated bilirubin removal by ion exchange resin, *Transaction American Society for Artificial Interal Organs*, 27, 434, **1981**.
- [5] Ennever, J.F., Blue light, green light, white light, more light: Treatment of neonata jaundice, *Clin Perinatol*, 17, 467-481 **1990**.
- [6] De Carvalho, M., De Carvalho, D., Trzmielina, S., Lopes, J., Hansen, T.W., Intensified phototherapy using daylight fluorescent lamps. *Acta Paediatr*, 88(7), 768-77, **1999**.
- [7] Watchko, J.F., Exchange transfusion in the management of neonatal hyperbilirubinemia. In: Maisels M.J., Watchko J.F. Neonatal jaundice monographs in clinical pediatrics, *Harward Academic Publishers*, 169-176, **2000**.
- [8] Liu, F., Liu, X., Ng, S.-C., Chan, H.S.O., Enantioselective molecular imprinting polymer coated QCM for the recognition of l-tryptophan, *Sensors and Actuators B*, 113, 234, **2006**.
- [9] Gültekin, A., Sentetik Reseptörlere Dayalı Nano Algılama Sistemleri, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü **2009**.
- [10] Brown, SB., King, RFGJ., The mechanism of heme catabolism: bilirubin formation in living rats by oxygen labeling, *Biochemical Journal* , 170, 297, **1978**.
- [11] Yoshida, T., Kikuchi, G., Features of the reaction of heme degradation catalyzed by the reconstituted microsomal hemeoxygenase system, *Journal of Biological Chemistry*, 53, 4230, **1978**.

- [12] Roy-Chowdhury, J., Roy-Chowdhury, N., Peter L.M.j., Disorders of bilirubin metabolism, *Liver: Biology and Pathobiology, Fifth Edition* ,251-256, **2009**.
- [13] Yoshinaga, T., Sassa, S., Kappas, A., The occurrence of molecular interactions among NADPH-cytochrome C reductase, heme oxygenase and biliverdin reductase in heme degradation, *Journal Biological Chemistry*, 257,7778, **1982**.
- [14] Cornelius, CE., Comparative bile pigment metabolism in vertebrates, *Bilepigments and jaundice*, (eds: Ostrow, JD.), Marcel Dekker, New York, 601, **1986**.
- [15] Roy Chowdhury, N., Roy Chowdhury, J., Arias, IM., Bile pigment composition and hepatic UDP-glucuronyl transferase activity in adult and fetal dogfish shark *Squalus acanthias*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 73B, 651, **1982**.
- [16] Huang, T.J., Trakshel, GM., Maines, MD., Detection of ten variants of biliverdin reductase in rat liver by two-dimensional gel electrophoresis, *Journal Biological Chemistry*, 264, 7844, **1989**.
- [17] Engel, RR., Alternative sources of carbon monoxide, *Bile pigments chemistry and physiology*, (eds: Berk, PD., Berlin, NI.), Department of Health, Education, and Welfare publication, 77-110, 148-155, **1977**.
- [18] Brodersen, R., Aqueous solubility albumin binding and tissue distribution of bilirubin. In: Ostrow JD, ed. Bile pigments and jaundice, *Marcel Dekker*, 157, **1986**.
- [19] Brodersen, R., Free bilirubin in the blood plasma of the newborn Effects of albumin, fatty acids, pH, displacing drugs and phototherapy. Appendix A: Provisional survey of the bilirubin displacing effect of 150 drugs. In: Stern L, ed., *Intensive care of the newborn*, 2, 331, **1978**.
- [20] Fog, J., Jellum, E., Structure of Bilirubin, *Nature*, 198,88, **1963**.
- [21] Nakao, A., Otterbein, LE., Overhaus, M., Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel, *Gastroenterology*, 127, 595-606, **2004**.
- [22] Yamashita, K., McDaid, J., Ollinger, R., Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts, *FASEB Journal*, 18, 765–767, **2004**.

- [23] Breimer, LH., Wannamethee, G., Ebrahim, S., Serum bilirubin and risk of ischemic heart disease in middle-aged British men, *Clin Chem*, 41, 1504–1508, **1995**.
- [24] Jones, EA., Shrager, R., Bloomer, JR., Quantitative studies of the delivery of hepatic synthesized bilirubin to plasma utilizing d-aminolevulinic acid-4-14C and bilirubin-3H in man, *The journal of Clinical Investigation*, 51, 2450, **1972**.
- [25] Dhar, GJ., Enterohepatic circulation and plasma transport of urobilinogen. In: Berk PD, Berlin NI, eds. Bile pigments: chemistry and physiology.: *Department of Health, Education, and Welfare publication*, 526, **1977**.
- [26] Berk, PD., Rodkey, FL., Blaschke Collison, HA., Comparison of plasma bilirubin turnover and carbon monoxide production in man, *Journal Laboratory Clinical Medicine*, 83-29, **1974**.
- [27] Bonnett, R., Davies, JE., Hursthouse, MB., Structure of Bilirubin, *Nature*, 262, 326–8, **1976**.
- [28] Ostrow, JD., Mukerjee, P., Tiribelli, C., Structure and binding of unconjugated Bilirubin relevance for physiological and pathophysiological function, *Journal Lipid Research*, 35,1715–37, **1994**.
- [29] Lee, KS., Gartner, LM., Spectrophotometric characteristics of Bilirubin, *Pediatr Research*, 10, 782, **1976**.
- [30] Berk, PD., Howe, RB., Bloomer, JR., Berlin, NI., Studies of bilirubin kinetics in normal adults, *Journal Clinical Investigation*, 48, 2176–2190, **1969**.
- [31] Brodersen, R., Bilirubin Solubility and interaction with albumin and phospholipid, *Journal Biological Chemistry*, 254, 2364–2369, **1979**.
- [32] Schmid, R., Direct-reacting bilirubin, bilirubin glucuronide, in serum, bile and urine, *Science*, 124, 76–77, **1956**.
- [33] Talafant, E., Properties and composition of the bile pigment giving a direct diazo reaction, *Nature*, 178, 312, **1956**.
- [34] Bosma, PJ., Seppen, J., Goldhoorn, B., Bilirubin UDP glucuronosyl transferase 1 is the only relevant Bilirubin glucuronidating isoform in man, *Journal Biological Chemistry*, 269, 17960–17964, **1994**.
- [35] Fevery, J., Van de Vijver, M., Michiels, R., Heirwegh, KP., Comparison in different species of biliary bilirubin-IX alpha conjugates with the activities of

- hepatic and renal bilirubin-IX alpha-uridine diphosphate glycosyltransferases, *Biochemical Journal*, 164, 737–746, **1977**.
- [36] Jansen, PL., Strautnieks, SS., Jacquemin, E., Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis, *Gastroenterology*, 117, 1370–1379, **1999**.
- [37] Compernelle, F., Gustaaf P., Hees, V., Blanckaert, N., Karel, P., Heirwegh, M., Glucuronic acid conjugates of bilirubin-IXa in normal bile compared with post-obstructive bile, Transformation of the 1-O-acylglucuronide into 2-, 3-, and 4-O-acylglucuronides, *Biochemical Journal*, 171, 185–201, **1978**.
- [38] Stoll, B.J., Kliegman, R.M., Jaundice and hyperbilirubinemia in the newborn. In Behrman R.E., Kliegman R.M., *Nelson Textbook of Pediatrics*, (eds: Jenson H.B.), 17, 592-596, **2003**.
- [39] Heirwegh, KPM., Fevery, J., Blanckaert, N., Chromatographic analysis and structure determination of biliverdins and bilirubins, *Journal Chrom*, 496, 1–26, **1989**.
- [40] Mollison PL, Cutbush M. Hemolytic disease of the newborn: criteria of severity, *British Medical Journal*, 1, 123, **1949**.
- [41] Hsia, DYY., Allen, FH., Gellis, SS., Erythroblastosis fetalis, VIII. Studies of serum bilirubin in relation to kernicterus, *New England Journal of Medicine*, 247, 668, **1952**.
- [42] Maisels, MJ., McDonagh, AF., Phototherapy for neonatal jaundice, *New England Journal of Medicine*, 358, 920–928, **2008**.
- [43] Myara, A., Sender, A., Valette, V., Rostoker, C., Paumier, D., Capoulade, C., Loridon, F., Bouillie, J., Milliez, J., Brossard, Y., Trivin, F., Early Changes in Cutaneous Bilirubin and Serum Bilirubin Isomers during Intensive Phototherapy of Jaundiced Neonates with Blue and Green Light, *Biological Neonate*, 71, 75–82, **1997**.
- [44] Stocher, R.I., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., Ames, B.N., *Science*, 37, 1043, **1987**.
- [45] Zhu, X.X., Brown, G.R., St-Pierre, L.E., Adsorption of Bilirubin with polypeptide-coated resins, *Biomaterial, Artificial Cells, and Artificial Organs*, 18, 75, **1990**.
- [46] Gourley, G.R., Bilirubin metabolism and kernicterus. *Advances in Pediatrics*, 44, 173, 346, **1997**.
- [47] Gartner, LM., Lee, K., Vaisman, S., Development of Bilirubin transport and metabolism in the newborn Rhesus monkey, *Journal Pediatr*, 90, 513, **1977**.

- [48] Heirwegh, KPM., Fevery, J., Blanckaert, N., Chromatographi analysis and structure determination of biliverdins and bilirubins. *Journal Chrom*, 496, 1–26, **1989**.
- [49] Lauff, JJ., Kasper, ME., Ambrose, RT., Separation of bilirubin species in serum and bile by high-performance reversed-phase liquid chromatography. *Journal Chromatography*, 226, 391-402, **1981**.
- [50] Adachi, Y., Inufusa, H., Yamashita, M., Clinical application of serum 146 S.F., Lo and B.T., Dumas bilirubin fractionation by simplified liquid chromatography, *Clinical Chem*, 34, 385-388, **1988**.
- [51] Polyakov, MV., Adsorption properties and structure of silica gel adsorption properties on the character of its porosity, *Zhurnal Fizieskoj Khimii*, 2, 799-805, **1931**.
- [52] Dickey, F.H., The preparation of spesifik adsorbents, *Proceeding of National Academy of Sciences of USA*, 35 , 227-229, **1949**.
- [53] Whitcombe, MJ., Predicting the selectivity of imprinted polymers, *Chromatographia*, 47, (7-8), 457-464, **1998**.
- [54] Mosbash, K., Ramström, O., The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, *Nature Biotechnology*, 14, 163-170, **1996**.
- [55] Alexander, C., Anderson, HS., Anderson, LI., Ansell, RJ., Kirsch, N., Nicholls, IA., O'Mahony, J., Whitcombe, MJ., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literatüre fort he years up to and including 2003, *Journal of molecular recognition*, 19, 106-180, **2006**.
- [56] Wulff, G., Molecular recognition in polymers prepared by imprinting with templates, *Reactive Polymers*, 15, 233, **1991**.
- [57] Yavuz, H, Karakoc, V., Türkmen, D., Say, R., Denizli, A., Synthesis of Cholestrol imprinted polymeric particles, *Internation Journal Biological Macromolecules*, 41, 8-15, **2006**.
- [58] Piletsky, S. A., Alcock, S., Turner, A. P. F., Molecular imprinting: aat the edge of the third millennium, *Trends in Biotechnology*, 19, 9-12, **2001**.
- [59] Guan, G., Liu, B., Wang, Z. Zhang, Z., Imptinting of Molecular Regognition Sites on Nanostructures and Its Application in Chemosensor, *Sensors*, 8, 8291-8320, **2008**.
- [60] Kryscio, D.R., Peppas, N.A., Critical review and perspective of macromoleculary imprinted polymers, *Acta Biomaterialia*, 8, 461-473, **2012**.

- [61] Özcan, A., *Biyomoleküller için Moleküler Baskılanmış Polimerik Yapay Reseptör Geliştirilmesi ve Biyokromatografi Uygulamaları*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, **2007**.
- [62] Komiya, M., Takeuchi, T., Mukawa, T. And H., *Molecular Imprinting (From Fundamentals To Application)*, Wiley-VCH Verlag, **2003**.
- [63] Wulff, G., The role of binding-site interactions in the molecular imprinting of polymers, *Trends Biotechnol*, 11, 3, 85-87, **1993**.
- [64] Davies, M.P., De Biasi, V., Perrett, D., Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta*, 504, 7-14, **2004**.
- [65] Cormack, P.A.G., Mosbath, K., Molecular imprinting: recent developments and the road ahead, *Reactive and Functional Polymers*, 41, 115-124, **1999**.
- [66] Karim, K., Breton, F., Rouillon, R., Piletska, E.V., Guerreiro, A., Chianella, I., Piletsky, S.A., How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1795, **2005**.
- [67] Mayes, A.G., Whitcombe, M.J., Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1742-1748, **2005**.
- [68] Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z., Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation, *Journal of chromatography B-Analytical Technologies in the biomedical and life science*, 804, 173-182, **2004**.
- [69] Dmitrienko, S. G., Irkha, V. V., Yu, Kuznetsova, A. Yu., Zolotov, Yu. A., Use Of Molecular Imprinted Polymers for The Separation And Preconcentration of Organic Compound, *Journal Of Analytical Chemistry*, 59, 9, 808-817, **2004**.
- [70] Laurence Fitzhenry, *Development of Molecularly Imprinted Polymers for Corticosteroids*, Doktora tezi, Pharmaceutical and Molecular Biotechnology Research Centre Department of Chemical and Life Sciences Waterford Institute of the Technology Waterford, Ireland, **2011**.
- [71] Dickert, F.L., Hayden, O., Imprinting with sensor development on the way to synthetic antibodies, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 364, 506-511, **1999**.
- [72] Spivak, D.A., Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers, *Advanced drug delivery review*, 57, 1779, **2005**.
- [73] Batra, D., Shea, K.J., Combinatorial methods in molecular imprinting, *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, 434, **2003**.

- [74] Osmani, Q., Hughes, H., Flavin, K., Hedin-Dahlstrom, J., Allender, C.J., Frisby, J., McLoughlin, P., The use of FTIR and NMR spectroscopies to study prepolymerisation interactions in nitrogen heterocycles, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1229-1236, **2008**.
- [75] Sreenivasan, K., The effect of polymerisation methods on the adsorption capacity of HEMA based molecularly imprinted polymers, *Journal of polymer research*, 8, 197-20, **2001**.
- [76] Qin, L., He, XW., Yuan, X., Li, WY., Zhang, YK., Molecularly imprinted beads with double thermosensitive Gates for selective recognition of proteins, *Analytical and bioanalytical Chemistry*, 399, 3375-3385, **2011**.
- [77] Li, JY., Zu, BY., Zhang, Y., Guo, XZ., Zhang, HQ., One-Pot Synthesis of surface- Functionalized Molecular Imprinting Polymers Microspheres by Iniferter-Induced "Living" Radical Precipitation Polymerization, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 48, 3217-3228, **2010**.
- [78] Rebelo, SCN., Almerida, SAA., Guerreiro, JRL., Montenegro, MCAoBSM, Sales MGF, Trimethoprim-selective electrodes with molecularly imprinted polymers acting as ionophores and potentiometric transduction on graphite solid-contact, *Microchemical Journal*, 98, 21-28, **2011**.
- [79] Gong, X-Y., Cao, X-J., Preparation of molecularly imprinted polymers for artemisinin based on the surfaces of silica gel, *Journal of Biotechnology*, 153, 8-14, **2011**.
- [80] Krstina, J., Moad, G., Willing, R.L., Danek, S.K., Kelly, D, Jones, S., Solomon, D., Further studies on the thermal decomposition of AIBN-implications concerning the mechanism of termination in methacrylonitrile polymerization, *European Polymer Journal*, 29, 2-3, 379-388, **1993**.
- [81] Wulff, G., Sarhan, A., The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates, *Angewandte chemi-international edition*, 11, 364, **1972**.
- [82] Sellergen, B., The non-covalent approach to molecular imprinting, *In Molecular Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry*, Elsevier, 23, **2001**.
- [83] Kart, A., Davis, M.E., Investigation into the Mechanisms of Molecular Recognition with Imprinted Polymers, *Macromolecules*, 32, 4113-4121, **1999**.
- [84] Dong, X.C., Sun, H., Lu, X.Y., Wang, H.B., liu S.X. ve Wang, N., Separation of ephedrine stereoisomers by molecularly imprinted polymers influence of synthetic condition and mobile phase composition on the chromatographic performance., *Analyst*, 127, 1427-1432, **2002**.

- [85] Wulff, G., Knorr, K., Stoichiometric noncovalent interaction in molecular imprinting, *Bioseparation*, 10, 257-276, **2001**.
- [86] Zhong, N., Byun, H., Bittman, R., Hydrophilic Cholesterol-binding molecular imprinted polymers, *Tetrahedron Letter*, 42, 10, 1839-1841, **2001**.
- [87] Andersson, L.I., Molecular imprinting: development and applications in the analytical chemistry field, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 745, 1, 3-13, **2000**.
- [88] Haupt, K., Ye, L., Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1887-1897, **2004**.
- [89] Piletsky, S.A., Turner, N.W., Laitenberger, P., Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics-future potential and existing problems. *Medical Engineering Physics*, 28, 971-977, **2006**.
- [90] Hedborg, E., Winquist, F., Lundström, I., Andersson, L.I., Mosbach, K., Some studies of mole Some studies of molecularly-imprinted polymer membranes in combination with field-effect devices, *Sensors and Actuators A: Physical*, 37-38, 796-799, **1993**.
- [91] Mayes, G. A., Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 16, 321-332, **1997**.
- [92] Riskin, M., Tel-Vered, R., Bourenko, T., Granot, e., Willner, I., Imprinting of molecular recognition sites thorough electropolymerization of functionalized Au nanoparticles: development of electrochemical TNT sensor based on π -donor-acceptor interactions, *Journal of the American Chemical Society*, 130, 15911-15918, **2008**.
- [93] Arshak, K., Mohamed, Z., Souna, E., Anthony, T., Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. *New York: Springer Science and Business Media*, **2008**.
- [94] Ozlem, H., *Biyosensör hazırlamada enzim kaynağı olarak değerlendirilmek üzere bazı bitkisel dokuların incelenmesi*, Yüksek lisans tezi, Edirne, Trakya Üniversitesi, **2008**.
- [95] Rasooly, A., ANALYSIS I Biosensors, *Encyclopedia of Dairy Science*, 85-93, **2002**.
- [96] Gooding, JJ., 'Biosensor technology for detecting biological warfare and future trends, *Analytica Chimica Acta*, 559, 137, **2006**.
- [97] Junhui, Z., Hong, C. ve Ruifu, Y., DNA based biosensors. *Biotechnology Advances*, 15 (1), 43-58, **2008**.

- [98] Koyun, A., Ahlatcioğlu, E. ve Koca İpek, Y., Biosensors and Their Principles, *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*, (eds: Kara, S., 978-953-51-0609-8, **2012**.
- [99] Bhunia, A.K., Biosensors and bio-based methods for the separation and detection of foodborne pathogens, *Advances in Food and Nutrition Research*, 54, 1-44, **2008**.
- [100] Mehrvar, M., Bis, C., Scharer, J. M., Moo-Young, M., Luong, J. H., Fiber-optic biosensors- Trends and advances, *Analytical Science*, 677-692, **2000**.
- [101] Uludağ, Y., Piletsky, S.A., Turner, A.P.F. ve Cooper, M.A., Piezoelectric sensors based on molecular imprinted polymers for detection of low molecular mass analytes. *FEBS Journal*, 274, 5471-5480, **2007**.
- [102] Mello, L. D., Kubota, L. T., Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries, *Food Chemistry*, 77, 237-256, **2002**.
- [103] Thevenot, DR., ,Toht K., Drust RA., Wilson GS., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensor Bioelektron*, 16, 121-131, **2001**.
- [104] Huang, J., Li, J., Yang, Y., Wang, X., Wu, B., Anzai, J.I., Osa, T., Chen, Q., Development of an amperometric L-lactate biosensor based on L-lactate oxidase immobilized through silica sol-gel film on multi-walled carbon nanotubes/platinum nanoparticle modified glassy carbon electrode, *Materials Science and Engineering: C*, 28, 1070-1075, **2008**.
- [105] Monošík, R., Stred'ansky, M., Greif, G., Šturdik, E., Comparison of biosensors based on gold and nanocomposite electrodes for monitoring of malic acid in wine, *Central European Journal of Chemistry*, 10, 157-164, **2012**.
- [106] Wang, X., Watanabe, H. ve Uchiyama, S., Amperometric L-ascorbic acid biosensors equipped with enzyme micelle membrane, *Talanta*, 74, 1681-22 1685, **2008**.
- [107] Pollegioni, L., Piubelli, L., Sacchi, S., Pilone, M.S., Molla, G., Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1373-1394, **2007**.
- [108] Smutok, O., Ngounou, B., Pavlishko, H., Gayda, G., Gonchar, M., Schuhmann, W., A reagentless bienzyme amperometric biosensor based on alcohol oxidase/peroxidase and an Os-complex modified electrodeposition paint, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113, 590-598, **2006**.

- [109] Umar, A., Rahman, M.M., Vaseem, M. ve Hahn, Y.B., Ultra-sensitive cholesterol biosensor based on low-temperature grown ZnO nanoparticles, *Electrochemistry Communications*, 11, 118-121, **2009**.
- [110] Mieliauskiene, R., Nistor, M., Laurinavicius, V., Csoregi, E., Amperometric determination of acetate with a tri-enzyme based sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113, 671-676, **2006**.
- [111] Choi, J.W., Kim, Y.K., Song, S.Y., Lee, I.H., Lee, W.H., Optical biosensor consisting of glutathione-S-transferase for detection of captan, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 1461-1466, **2003**.
- [112] Andreou, V.G., Clonis, Y.D., Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol-gel entrapped bromocresol green for the determination of atrazine, *Analytica Chimica Acta*, 460, 151-161, **2002**.
- [113] Soldatkin, O.O., Peshkova, V.M., Dzyadevych, S.V., Soldatkin, A.P., Jaffrezic-1 Renault, N., Elskaya, A.V., Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor, *Materials Science and Engineering: C*, 28, 959-964, **2008**.
- [114] Maines, A., Prodromidis, M.I., Tzouwara-Karayanni, S.M., Karayannis, M.I., 1 Ashworth, D., Vadgama, P., An Enzyme Electrode for Extended Linearity 2 Citrate Measurements Based on Modified Polymeric Membranes, *Electroanalysis*, 12, 1118-1123, **2000**.
- [115] Pang, L., Li, J., Jiang, J., Shen, G., Yu, R., DNA point mutation detection based on DNA ligase reaction and nano-Au amplification: A piezoelectric approach, *Analytical Biochemistry*, 358, 99-103, **2006**.
- [116] Wang J, Rivas G, Cai x, Palecek E, Nielsen P, Shiraishi H, Dontha N, Luo D, Parrodo C, Chicharro M, *Anal Chem Acta*, 347, 1-8 **1997**.
- [117] Van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E., De Coen, W., Dubruel, P., 7 Blust, R., Robbens, J., Recent advances in recognition elements of the food 8 and environmental biosensors: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 9 1178-1194, **2010**.
- [118] Parellada, J., Narvaez, A., Lopez, MA., Domingue, E., Fernandez, JJ., Pavlov, V., *Katakis Anal Chim Acta*, 362, 47-57 **1998**.
- [119] Junhui, Z., Hong, C., Ruifu, Y., DNA based biosensors, *Biotechnology Advances*, 15 (1), 43-58, **1997**.
- [120] Lippmann, G., Principe de conservation de l'électricité, *Annales Chimie Physique*, 24, 145-178, **1881**.
- [121] Curie, J., Curie, P., Acad, C.R., An oscillating quartz crystal mass detector, *Rendu*, 91, 294-297, **1881**.

- [122] Schäfgen, H., *Vergleich von akustischen Mikrosensoren mit makromolekularer Beschichtung für die Gasanalytik*, Doktora tezi, Rheinische Friedrich-Wilhelms Üniversitesi, Matematik Fen Bilimleri Fakültesi, **2004**.
- [123] Lu, C., Czanderna, A.W., *Application of piezoelectric quartz microbalances*, Elsevier, **1984**.
- [124] Sykes, R.A., *Quartz crystals for electrical circuits, Their design and manufacture*, (eds: Heising, R.A.), Van Nostrand, New York, **1946**.
- [125] Marx K.A., Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution–Surface Interface, *Biomacromolecules*, 4(5), 1099-1120, **2003**.
- [126] Smith, A.L., The Quartz Crystal Microbalance a, *Chapter for Volume 5 of the Handbook Of Thermal Analysis and Calorimetry*, **2008**.
- [127] Richard, F.T., Jerome, S.S., *Handbook of chemical and biochemical sensors*, DC: Institute of Physics Publishing, Washington, **1996**.
- [128] O'sullivan, Guilbault, GG., Commercial quartz crystal microbalances-theory and applications, *Biosensors and Bioelectronics*, 14 (8), 663-670, **1999**.
- [129] Pavey KD., Quartz crystal analytical sensors: the future of label-free, real-time diagnostics, *Expert review of Molecular Diagnostics*, 2, 173-186, **2002**.
- [130] Wudy, F., Stock, C., Gores, H. J., Basics: Measurement techniques: Electrochemical quartz crystal microbalance, *Encyclopedia of Electrochemical Power Sources*, (eds: Garche, J.), Elsevier, **2009**.
- [131] Saurbrey, G., *Z.Phys.*,155, 206, **1959**.
- [132] Nomura, T., Okuhara, M., Frequency-shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids, *Analytica Chimica Acta*, 142, 281-284, **1982**.
- [133] Landau, LD., Lifshitz, EM., *Fluid mechanics*, Pergamon, 88-90, **1959**.
- [134] Schneider, T.W., Frye, G.C., Martin, S.J., Kottenstette, R.J., Osbourn, G.C., Bartholomew, J.W., Weisenbach, L., Bohuszewicz, T.V., Doughty, D.H., *Quartz crystal microbalance (QCM) arrays for solution analysis*, sandia report, United States, **1997**.
- [135] Thompson, P., Stone, L.S., Contrast affects flicker and speed perception differently, *Vision Research*, 37, 1255-1260, **1997**.
- [136] Neumeister, J., Thum, R. Ve Lüder, E., A saw delay-line oscillator as a high-resolution temperature sensor, *Sens. Actuators A*, 21-23, 670, **1990**.

- [137] Behling, C., Luucklum, R. ve Hauptmann, P., "Response of quartz crystal resonators to gas and liquid analyte exposure," *Sensors and Actuators A*, 68, 388-398, **1998**.
- [138] Lipsett, D., Bertha K. Madras, Richard J. Wurtman, Hamish N. Munro, Serum tryptophan level after carbohydrate ingestion: Selective decline in non-albumin-bound tryptophan coincident with reduction in serum free fatty acids, *Life Sciences*, 12, 2,(2), 22, 57–64, **1973**.
- [139] Baydemir, G., Bereli, N., Andac, M., Say, R., Galaevc, I.Y., Denizli, A., Bilirubin recognition via molecularly imprinted supermacroporous cryogels, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68, 33–38, **2009**.
- [140] Sellergren, B., Lepistö, M., Mosbach, K., Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions - NMR and chromatographic studies on the nature of recognition, *Journal of American Chemical Society*, 110, 5853–5860, **1988**.
- [141] Li, X., Husson, S.M., Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: a surface plasmon resonance study. *Biosens. Bioelectron*, 22, 336-348, **2006**.
- [142] Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Chen,Y., Shah, R.N., Shimizu, K.D., Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir–Freundlich isotherm, *Analytical Chemistry*, 73, 4584–4591, **2001**.
- [143] Wei, X., Samadi, A., Husson, S.M., Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for chromatographic separations, *Separation Science and Technology*, 40, 109–129, **2005**.
- [144] Li, X., Husson, S.M., Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: a surface plasmon resonance study. *Biosens. Bioelectron*, 22, 336-348, **2006**.
- [145] Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Chen,Y., Shah, R.N., Shimizu, K.D., Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir–Freundlich isotherm, *Analytical Chemistry*, 73, 4584–4591, **2001**.
- [146] Wei, X., Samadi, A., Husson, S.M., Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for chromatographic separations, *Separation Science and Technology*, 40, 109–129, **2005**.

7.ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyad : Çiğdem ÇİÇEK

Doğum yeri : Yozgat

Medeni hali : Evli

e-posta : cigdem.cicek@hacettepe.edu.tr

Adres : Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü, Biyokimya ABD 06800
Beytepe Çankaya/Ankara/TÜRKİYE

Eğitim

Lise : 2003-2007 Aydın Adnan Menderes Anadolu Lisesi, Aydın

Lisans : 2007-2012 Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü, Trabzon

Yüksek Lisans : 2012-2014 Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya
Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İyi düzeyde

İş Deneyimi

Deneyim Alanları

Sensörler, Moleküler Baskılama,

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

014D04601001 numaralı "Bilirubin Tayini İçin Moleküler Baskılanmış Sensörlerin Hazırlanması" adlı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Destek Projesi, 18899 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Ulusal Kromatografi Kongresi 2014, Çeşme İzmir.