

**ÖSTRADIOL TANIMA BÖLGELERİNE SAHİP YÜZEY
PLAZMON REZONANS SENSÖRLERİN HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE
SENSORS WITH ESTRADIOL RECOGNITION SITES**

EMİR ALPER TÜRKOĞLU

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

EMİR ALPER TÜRKOĞLU'nun hazırladığı '**Östradiol Tanıma Bölgelerine Sahip Yüzey Plazmon Rezonans Sensörlerin Hazırlanması**' adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan ve Danışman



Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Üye



Doç. Dr. Handan YAVUZ

Üye



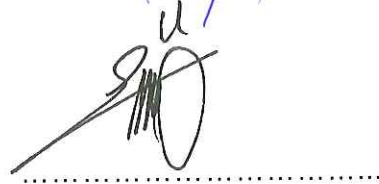
Doç. Dr. Lokman UZUN

Üye



Doç. Dr. Eylem ÖZTÜRK GÜVEN

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA 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 üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

10/03/2014

EMİR ALPER TÜRKÖĞLU

ÖZET

ÖSTRADIOL TANIMA BÖLGELERİNE SAHİP YÜZEY PLAZMON REZONANS SENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

Emir Alper TÜRKOĞLU

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Mart 2014, 112 sayfa

Sunulan çalışmanın amacı, 17- β -östradiol (E2) tayini için E2 baskılanmış yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörün hazırlanmasıdır. Bu amaçla, SPR biyosensör, alil merkaptan ile modifiye edilmiş ve alil gruplarının bağlanması sağlanmıştır. İlk basamakta, E2 ile N-Metakriloil-(L)-lösin metil ester (MALM) monomeri arasında ön kompleks oluşturulmuş ve hazırlanan bu kompleks, HEMA fonksiyonel monomeri ve EGDMA çapraz bağlayıcısı eşliğinde SPR altın çip yüzeyinde UV ışığı altında polimerleştirilmiştir. Elde edilen E2 baskılanmış SPR çip FTIR-ATR, elipsometre, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve temas açısı ölçümleri alınarak karakterize edilmiştir. E2 baskılanmamış çip elde etmek amacıyla, E2 kullanılmadan yeni bir çip yapılmış ve bu çipin karakterizasyonu için elipsometre, AFM ve temas açısı ölçüm aleti kullanılmıştır. Adsorpsiyon çalışmaları pH 11 karbonat tamponuyla, desorpsiyon çalışmaları %20'lik etilen glikol çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. E2 baskılanmış SPR sensörlerin duyarlılığını belirlemek için farklı derişimlerde hazırlanan E2 çözeltileri kullanılmıştır. Farklı derişimlerdeki E2 çözeltileri bağlanma kinetiklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Langmuir adsorpsiyon modeli hazırlanan sensör için en uygun adsorpsiyon modeli olarak bulunmuştur. E2 baskılanmış SPR sensörün seçiciliğini göstermek için E2,

kolesterol ve stigmasterolün yarışmalı adsorbsiyonu araştırılmıştır. SPR çipin baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için E2 baskılanmamış SPR sensör hazırlanmıştır. E2 baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğine bakmak için çip, aynı E2 derişimi kullanılarak 10 kez SPR sisteminde kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: 17- β -östradiol (E2), yüzey plazmon rezonans (SPR), sensör.

ABSTRACT

PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE SENSORS WITH ESTRODIOL RECOGNITION SITES

Emir Alper TÜRKOĞLU

**Doctor of Philosophy, Division of Nanotechnology and
Nanomedicine**

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

March 2014, 112 pages

The aim of this study is the preparation of 17- β -estradiol (E2) imprinted surface plasmon resonance sensor for detecting E2. For this reason, SPR biosensors were modified with allyl mercaptane and the orientation of allyl groups was ensured. In the first step, the complex was prepared using E2 and N-Methacryloyl-(L)-leucine methyl ester (MALM) monomer and prepared complex with functional monomer, HEMA and crosslinker, EGDMA was polymerized on the golden surface of SPR under UV light. E2 imprinted SPR chip was characterized with FTIR-ATR, ellipsometry, atomic force microscopy (AFM) and contact angle measurement. A new chip was prepared without E2 in order to obtain E2 nonimprinted SPR sensor and the chip was characterized with ellipsometry, AFM and contact angle measurement. Adsorption studies were performed using carbonate buffer (pH 11) and desorption studies were performed with 20% ethylene glycol. E2 sensing ability of E2 imprinted SPR sensor was investigated from E2 solutions with different concentrations. E2 solutions with different concentrations were used to determine the adsorption kinetics. Langmuir adsorption model was found as the most suitable model for E2 imprinted SPR chip. Competitive adsorptions of E2, cholesterol and stigmasterol were investigated to show the selectivity of E2

imprinted SPR sensor. E2 nonimprinted SPR sensor was prepared to determine imprinting selectivity of E2 imprinted SPR sensor. E2 imprinted SPR chip was investigated 10 times with same concentrations of E2 solution in order to show reuse of the chip.

Keywords: 17- β -estradiol (E2), surface plasmon resonance (SPR), sensor.

TEŞEKKÜR

2008 yılında yüksek lisans çalışmasıyla başlayan ve 2014'te doktora çalışmasının verilmesiyle son bulan lisansüstü çalışmalarımda;

Huzurlu, sevecen bir laboratuvar ortamı sağlayarak rahat bir şekilde çalışmalarımı yapmamı sağlayıp, sahip olduğu bilgi ve bilinci büyük bir alçakgönüllülikle benimle paylaşan, lisansüstü çalışmalarımda her türlü maddi ve manevi desteği benden esirgemeyen, öğrenci olduğumdan dolayı hayatım boyunca büyük bir onur ve gurur duyacağım değerli danışman hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Lisansüstü tez çalışmalarımda büyük bir sabırla desteğini benden esirgemeyen, huzurlu bir şekilde tez çalışmalarımı bitirmem konusunda her zaman yanımda olan değerli hocam ve bölüm başkanım Doç. Dr. Yücel Ünal'a,

Yaptığım çalışmalarımı büyük bir titizlik ve sevecenlikle takip eden, manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Handan Yavuz'a,

Lisansüstü çalışmalarım süresince karşılaştığım her zorlukta bilgi ve tecrübesine ihtiyaç duyduğum, bilgisi ve sabrına hayran kaldığım değerli hocam Doç. Dr. Lokman Uzun'a,

Doktora tez çalışmamda bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen, çalışmalarımda kendisinden çok şey öğrendiğim, birçok yükü ve zorluğu üstümden alıp beni rahatlatan değerli hocam ve ablam Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a,

Hem tez çalışmalarımda hem de normal hayatta bilgi ve tecrübesinden çok şey kazandığımı düşündüğüm, mükemmel bir sabırla çalışmalarımda bana yardımcı olan Dr. Erkut Yılmaz'a,

Her zaman desteklerini benden esirgemeyen değerli büyüklerim Dr. Nilay Bereli, Dr. Deniz Türkmen, Dr. Müge Andaç, Dr. Gözde Baydemir'e,

On yılı aşkın süredir tanıdığım, her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Kıvılcım Çaktü Güler'e,

Doktora tez çalışmalarımda bilgilerinden istifade ettiğim değerli arkadaşlarım Gülsu Şener ve Erdoğan Özgür'e,

Güler yüzlü sevecen bir ortam sağlayan Daryoush Majidi, Dr. Işık Perçin, Dr. Cemil Aydoğan, Dr. Ali Derazshamshir, Dr. Engin Bayram, İlker Koç, Ahmet Demirçelik, Bahar Ergün, Canan Armutçu, Duygu Çimen, Ilgım Göktürk, Sevgi Aslıyüce, Yeşeren Saylan, Fatma Kartal, Kemal Çetin, Emel Tamahkar, Recep Üzek, Esmâ Sarı, Kadir Erol, Kazım Köse, Mehmet Emin Çorman, Sabina Hüseyinli, Dilara Saçlıgil'e,

Dört yıl aynı odayı paylaştığım bilimsel ve insanı olarak kendisinden çok şey kazandığım inandığım değerli abim Yrd. Doç. Dr. Mucip Genişel'e,

Mesai arkadaşı olmaktan gurur duyduğum, manevi desteklerini her zaman hissettiğim Yrd. Doç. Dr. Kadriye Uruç. Parlak, Yrd. Doç. Dr. Fatih Dadaşoğlu ve Dr. Gina Raluca Kerkman'a,

Tez süresince manevi desteklerini benden esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Eyüp Kul, Yrd. Doç. Dr. Yakup Karataş, Büşra Koçak, Fatma Kopuz'a,

Akademik hayatım süresince üstümde sayısız maddi ve manevi emeği olan sevgili anneannem İclal Öztürk'e,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET..... | i |
| . | |
| ABSTRACT..... | iii |
| TEŞEKKÜR..... | v |
| İÇİNDEKİLER..... | vii |
| ÇİZELGELER..... | x |
| ŞEKİLLER..... | xi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | xiii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 4 |
| 2.1. Nanoteknoloji..... | 4 |
| 2.1.1. Nanoteknolojinin Tarihçesi..... | 6 |
| 2.1.2. Nanoteknoloji Yaklaşımları..... | 7 |
| 2.1.2.1. Top down (Yukarıdan Aşağıya) Yaklaşımı..... | 8 |
| 2.1.2.2. Bottom up (Aşağıdan Yukarıya) Yaklaşımı..... | 8 |
| 2.1.3. Nanoteknoloji ve Diğer Bilimler ile İlişkisi..... | 9 |
| 2.2. Nanobiyoteknoloji..... | 10 |
| 2.2.1. Nanobiyoteknoloji ve Ortaya Çıkan Yeni Disiplinler | 11 |
| 2.2.1.1. Biyomalzeme Bilimi..... | 11 |
| 2.2.1.2. Biyosensörler..... | 12 |
| 2.2.1.3. Biyoçipler..... | 12 |
| 2.2.1.4. Nanotıp | 13 |
| 2.2.2. Türkiye’de Nanobiyoteknolojinin Durumu | 13 |
| 2.3. Biyosensörler | 14 |
| 2.3.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması | 15 |
| 2.3.1.1. Biyotanıma Elemanlarına Göre Sınıflandırmada | 15 |
| 2.3.1.1.1. Enzimler | 15 |
| 2.3.1.1.2. Antibadiler | 18 |
| 2.3.1.1.3. Nükleik Asitler | 18 |
| 2.3.1.2. Dönüştürücülerine Göre Sınıflandırma..... | 18 |

| | |
|---|----|
| 2.3.1.2.1. Optik Sensörler | 18 |
| 2.3.1.2.2. Elektrokimyasal Sensörler | 19 |
| 2.3.1.2.3. Piezoelektrik Sensörler | 20 |
| 2.3.2. Çevresel Görüntülemeye Biyosensörler | 20 |
| 2.3.3. Biyosensör Teknolojisinin Bu Günü ve Geleceği..... | 22 |
| 2.3.3.1. Sürekli Görüntüleme | 24 |
| 2.3.3.2. Çoklu Analit Tespiti | 24 |
| 2.3.3.3. Minyatürleştirme | 24 |
| 2.3.3.4. Yeni Duyu Elemanları | 25 |
| 2.3.4. Ticari Biyosensörler | 25 |
| 2.4. Yüzey Plazmon Rezonans | 26 |
| 2.4.1. Yüzey Plazmon Rezonans Teorisi | 27 |
| 2.4.2. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler | 33 |
| 2.5. Moleküler Baskılama Teknolojisi | 35 |
| 2.5.1. Moleküler Baskılama Tekniği | 37 |
| 2.5.2. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Özelliklerini Etkileyen Faktörler..... | 38 |
| 2.5.2.1. Kalıp Molekül | 39 |
| 2.5.2.2. Fonksiyonel Monomer | 39 |
| 2.5.2.3. Çapraz Bağlayıcılar | 40 |
| 2.5.2.4. Çözücü | 41 |
| 2.5.2.5. Başlatıcılar | 42 |
| 2.5.2.6. Sıcaklık | 42 |
| 2.5.3. Moleküler Baskılama Yöntemleri | 42 |
| 2.5.3.1. Kovalent Baskılama | 43 |
| 2.5.3.2. Kovalent Olmayan Baskılama | 43 |
| 2.5.4. Baskılama İşleminin Kontrolü | 44 |
| 2.5.5. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları..... | 45 |
| 2.6. Endokrin Bozucular | 46 |
| 2.7. 17- β -östradiol | 49 |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR | 51 |
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler..... | 51 |
| 3.2. N-Metakriloil-(L)-lösin Metil Ester (MALM) Monomerinin Sentezi..... | 52 |

| | |
|--|-----|
| 3.3. MALM Monomerinin İnfrared Spektrumu..... | 52 |
| 3.4. Yüzey Plazmon Rezonans Çip Altın Yüzeyinin Allil Merkaptan ile Yüzey Modifikasyonu | 52 |
| 3.5. 17- β -östradiol Baskılanmış PHEMALM-östradiol Baskılanmış ve Baskılanmamış PHEMALM Nanofilmlerin Hazırlanışı | 53 |
| 3.6. Kalıp Molekül 17- β -östradiolün Uzaklaştırılması | 53 |
| 3.7. SPR Sensörlerin Karakterizasyonu..... | 54 |
| 3.7.1. Elipsometre Ölçümleri..... | 54 |
| 3.7.2. Temas Açısı Ölçümleri..... | 55 |
| 3.7.3. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi..... | 56 |
| 3.7.4. Atomik Kuvvet Mikroskopisi..... | 56 |
| 3.8. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Plazmon Ölçümleri..... | 57 |
| 3.9. E2 Baskılanmış SPR Nanosensörle Kinetik Analizler | 57 |
| 3.10. SPR Çipin Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi..... | 58 |
| 3.11. E2 Baskılanmış Sensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.. | 58 |
| 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA | 59 |
| 4.1. N-Metakriloil-(L)-lösin Metil Ester (MALM) Monomerinin Karakterizasyonu | 59 |
| 4.2. MALM-östradiol Ön Kompleksin Hazırlanması | 60 |
| 4.3. SPR Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonu | 62 |
| 4.3.1. Elipsometre Analizi | 62 |
| 4.3.2. Temas Açısı Ölçümleri | 62 |
| 4.3.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi | 65 |
| 4.3.4. FTIR-ATR Analizi..... | 67 |
| 4.4. SPR Nanosensörlerle Kinetik Analizler | 68 |
| 4.5. Denge İzoterm Modelleri..... | 79 |
| 4.6. Yarışmalı kinetik analizler | 83 |
| 4.7. E2 baskılanmış sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi..... | 88 |
| 4.8. E2 baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğinin İncelenmesi | 92 |
| 5. YORUM | 93 |
| 6. KAYNAKLAR | 96 |
| 7. ÖZGEÇMİŞ | 112 |

ÇİZELGELER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Çizelge 2.1. Geleneksel analitik teknikler ile biyosensörler arasındaki özelliklerin karşılaştırılması [4]..... | 16 |
| Çizelge 2.2. Biyosensörlerin tarihçesi [29]..... | 17 |
| Çizelge 2.3. Dönüştürücülerine göre biyosensörler..... | 21 |
| Çizelge 2.4. Çeşitli çevre kirleticilerinin tespitinde kullanılan biyosensörler.. | 23 |
| Çizelge 2.5. Doğada doğal ve sentetik olarak bulunan endokrin bozucular [183]..... | 47 |
| Çizelge 2.6. Endokrin Bozucular için Biyosensörler..... | 48 |
| Çizelge 4.1. Modifiye edilmemiş, E2 baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin yüzey temas açıları..... | 63 |
| Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri..... | 79 |
| Çizelge 4.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri... | 81 |
| Çizelge 4.4. E2'ye göre stigmasterol ve kolesterol için seçicilik ve bağlı seçicilik katsayıları..... | 92 |

ŞEKİLLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 2.1. Nano boyuttaki bazı ilgili örnekler [2]..... | 5 |
| Şekil 2.2. Nanoteknolojinin getirdiği üstün özellikler [3]..... | 5 |
| Şekil 2.3. Nanoteknolojinin birlikte çalıştığı bilim dalları [20]..... | 9 |
| Şekil 2.4. Nanoteknolojinin bilim haritasındaki konumu [22]..... | 10 |
| Şekil 2.5. Dielektrik sınırlarda gerçekleşen toplam iç kırınım..... | 28 |
| Şekil 2.6. Hava, cam ve yüzey plazmonları için dağılıma eğrileri..... | 30 |
| Şekil 2.7. Gümüş ve altına ait yüzey plazmon eğrileri [107]..... | 32 |
| Şekil 2.8. Tipik bir SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi..... | 34 |
| Şekil 2.9. Moleküler baskılama tekniğinin basamakları..... | 38 |
| Şekil 2.10. Endokrin bozucuların etki mekanizmaları..... | 49 |
| Şekil 3.1. Allil merkaptan ile yüzey modifikasyonu ve allil gruplarının bağlanması..... | 54 |
| Şekil 3.2. Nanofilm EP3 elipsometre cihazı..... | 55 |
| Şekil 3.3. Krüss DSA100 temas açısı cihazı..... | 56 |
| Şekil 3.4. GenOptics SPRiLab sistemi..... | 58 |
| Şekil 4.1. N-Metakriloil-(L)-Lösin metil ester (MALM) monomerinin sentezi.... | 59 |
| Şekil 4.2. N-Metakriloil-(L)-lösin metil ester (MALM) monomerinin FTIR spektrumu..... | 60 |
| Şekil 4.3. Kalıp molekül E2: N-Metakriloil-(L)-lösin metil ester (MALM) monomer oranının belirlenmesi; E2:MALM monomerinin mol oranları (1:1; 1:2; 1:3; 1:4)..... | 60 |
| Şekil 4.4. MALM-östradiol ön kompleksi ve HEMA fonksiyonel monomerinin polimerizasyonu..... | 61 |
| Şekil 4.5. E2 tanıma bölgelerine sahip nanofilmin elipsometrik ölçümde alınan 3 boyutlu görüntüsü..... | 63 |
| Şekil 4.6. Boş altın yüzey temas açısı ölçüm fotoğrafı..... | 64 |
| Şekil 4.7. E2 baskılanmış (a) ve baskılanmamış (b) SPR çiplerin yüzey temas açısı fotoğrafları..... | 64 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Şekil 4.8. | Modifiye edilmemiş SPR sensörün yüzey derinliği..... | 65 |
| Şekil 4.9. | E2 baskılanmış SPR çipinin yarı temas modunda alınan AFM görüntüsü..... | 66 |
| Şekil 4.10. | E2 baskılanmamış SPR çipin yarı temas modunda alınan AFM görüntüsü..... | 66 |
| Şekil 4.11. | E2 baskılanmış SPR çipe ait FTIR-ATR spektrumu..... | 67 |
| Şekil 4.12. | Değişik derişimlerde E2 çözeltilerinin nanosensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri: (a) 20 ng/ml; (b) 50 ng/ml; (c) 100 ng/ml; (d) 250 ng/ml; (e) 500 ng/ml; (f) 1000 ng/ml; (g) 2000 ng/ml; (h) 5000 ng/ml; (ı) 7500 ng/ml; (g) 10000 ng/ml..... | 69 |
| Şekil 4.13. | E2 çözeltisi ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait % kırılma zaman grafiği..... | 72 |
| Şekil 4.14. | Farklı derişimlerdeki E2 çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler: (a) 20 ng/ml; (b) 50 ng/ml; (c) 100 ng/ml; (d) 250 ng/ml; (e) 500 ng/ml; (f) 1000 ng/ml; (g) 2000 ng/ml; (h) 5000 ng/ml; (ı) 7500 ng/ml; (g) 10000 ng/ml..... | 73 |
| Şekil 4.15. | Farklı derişimlerdeki E2 çözeltileri ve SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait ΔR zaman grafiği..... | 76 |
| Şekil 4.16. | E2 baskılanmış SPR nanosensör ve ΔR arasındaki ilişki..... | 77 |
| Şekil 4.17. | Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı..... | 80 |
| Şekil 4.18. | Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich..... | 81 |
| Şekil 4.19. | E2, kolesterol ve stigmasterolün tekli, ikili ve üçlü çözeltileri ile SPR sensör arasındaki % kırılma-zaman grafikleri..... | 84 |
| Şekil 4.20. | E2, kolesterol ve stigmasterolün tekli, ikili ve üçlü çözeltileri ile SPR sensör arasındaki % ΔR -zaman grafikleri..... | 86 |
| Şekil 4.21. | E2, kolesterol ve stigmasterol çözeltileri ile E2 baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait % kırılma-zaman grafikleri..... | 89 |
| Şekil 4.22. | E2, kolesterol ve stigmasterol çözeltileri ile E2 baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait ΔR -zaman grafikleri..... | 90 |
| Şekil 4.23. | E2 baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliği..... | 92 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|----|------------------|
| nm | Nanometre |
| µm | Mikrometre |
| °C | Santigrat derece |
| pg | Pikogram |
| ng | Nanogram |
| mg | Miligram |
| g | Gram |
| ml | Mililitre |
| µl | Mikrolitre |

Kısaltmalar

| | |
|------|-------------------------------------|
| MALM | N-Metakriloil-(L)-lösin metil ester |
| SPR | Yüzey plazmon rezonans |

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, nano boyuttaki malzemelerin, aletlerin ve sistemlerin metrenin milyarda biri büyüklüğünde tarif edildiği, üretildiği, uygulamaya konulduğu bir bilim dalıdır [1]. Bu bilim dalı sadece minyatürleşme demek değil, aynı zamanda atom ve moleküllerle oynanarak nanomalzeme ve/veya nanosistemlerin özelliklerinin kontrol edilmesidir [2]. En az bir boyutu 100 nm'den küçük olan malzemeler, boyutlarından kaynaklanan bazı üstün özelliklere sahiptirler. Yüksek emilim, ayrışma, reaktivite ve yüksek yüzey alanı, süperparamanyetizma, yüzey plazmon rezonans ve kuantum etkiler boyuta bağlı özellikler arasında sayılabilirler. Daha fazla absorpsiyon bölgeleri, birçok nanomalzemeyle çeşitli yapıların kendi aralarındaki etkileşimleri, kısa iç difüzyon mesafesi, yüksek kararlılık, geniş adsorpsiyon spektrumu, kullanım kolaylığı ve maliyetin düşük olması sensör ve izleme teknolojilerinde nanoteknolojinin getirdiği özelliklerdendir. Fonksiyonel nanomalzemeler ve bunların geleneksel teknolojilerdeki kullanımında ortaya çıkan sorunlar birçok işi tek bir alette gerçekleştirecek çok fonksiyonlu nanoteknoloji temelli sistemlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Nanoteknoloji temelli bu sistemler yüksek kararlılık, yüksek performans ve sağlamlık gibi birçok özelliği de beraberinde getirmiştir [3].

Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarını içeren reseptörler ve uygun çeviricilerin bir arada bulunduğu analitik cihazlardır. Geleneksel analitik tekniklerle karşılaştırıldığında biyosensörler, hızlı ve gerçek zamanlı tespit, düşük maliyet, taşınabilirlik, basit kullanım, örnek hazırlama işleminin kolaylığı gibi birçok özelliğe sahiptir [4]. Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanları ve dönüştürücülerine göre iki grup altında sınıflandırılmaktadırlar. Biyolojik tanıma elemanlarına göre olan sınıflandırmada; enzim, antikor, nükleik asit temelli biyosensörler olarak [5]; dönüştürücülerine göre yapılan sınıflandırmada ise; elektrokimyasal, optik, piezoelektrik sensörler olarak sınıflandırılır [6].

Yüzey plazmon rezonans (SPR) temelli sensörler, herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan biyomoleküllerin etkileşimlerini inceleyebilirler. Bu özellikleri nedeniyle, moleküler etkileşimlerin anlaşılması için bu cihazların önemi artmıştır. Etkileşimleri eş zamanlı, doğrudan ölçülmek; kinetik, termodinamik

parametrelerin, derişimin veya ligandlarla analitler arasındaki etkileşimlerin belirlenebilmesini sağlamaktadır. SPR temelli biyosensörlerin hızlı cevap süresi ve yüksek seçiciliği vardır. Enzim veya radyoışaretleme yöntemleri gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında SPR biyosensörler sahip oldukları bu özelliklerden dolayı, protein-protein, antikor-antijen, reseptör-ligand etkileşimlerinden, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tanımlanmasına kadar değişen çok çeşitli biyomoleküler mekanizmaların anlaşılmasında kullanılabilir [7].

Moleküler baskılama tekniği, çapraz bağlı polimer matriks içerisinde nano boşluklar oluşturulması temeline dayanmaktadır. Bu oyuklar kalıp molekülün boyut ve şeklini tanıma özelliğine sahiptir. Kalıp molekülün uzaklaştırılması, sabit pozisyonlardaki fonksiyonel grupların ortaya çıkmasını sağlayarak, kalıp moleküle özgül yapı oluşturmaktadır. Hazırlanan polimer, kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanıyarak, herhangi bir ortamda bu kalıbı seçici ve etkin bir şekilde bağlamaktadır. Moleküler baskılanmış polimer (MIP), bir kalıp molekül, fonksiyonel monomer ve bir çözücü içindeki başlatıcı içeren bir karışımdan hazırlanır. Polimerizasyon süresince kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında oluşan kompleks çapraz bağlayıcı monomer ile çevrelenerek polimerleştirilir, böylelikle kalıp molekülün hapsedildiği üç boyutlu polimer ağı oluşturulur. Kalıp molekülün uzaklaştırılması sonucu oluşan nano boşluklar şekil, büyüklük ve moleküler etkileşimler açısından kalıp moleküle özgüdür. Moleküler baskılama için ön koşul kalıp molekül ve monomer arasında kararlı bir kompleks oluşumudur [8].

Endokrin bozucular endokrin sistemin gelişimi ve işlevini etkileyen maddelerdir. Bu maddeler hormonların üretimi, taşınımı, bağlanması, aktivite göstermesi, parçalanması ve vücuttan atılımları üzerine etki göstermektedir. Endokrin bozucu maddeler doğada bulunabildiği gibi sentetik olarak da üretilebilmektedirler [9, 10]. Sudaki çözünürlüğü 3.6 mg/L olan 17- β -östradiol (E2) en aktif östrojen olarak görülen model bir kirleticidir [11]. Yumurtalıklar tarafından ve hamilelik esnasında plasenta tarafından da sentezlenir. Erkeklerde de bulunur; fakat çok düşük derişimlerde. Dişilerde seks hormonlarının gelişimini, ikincil cinsiyet karakterlerinin oluşmasını ve devam etmesini sağlayan 17- β -östradiolün diğer steroid hormon sentezi yapan bezlerdeki gibi, sentezi kolesterol üzerinden başlamaktadır [12]. Sentezlererek kana verilen östrojen hormonu depo

edilememektedir. Serumda E2'nin %97'den fazlası plazma proteinlerine bağlanarak taşınmakta, bunun %60'ı albümine, geri kalanı ise seks hormon bağlayıcı globülinlere (SHBG) bağlanmaktadır. Hormonun sadece % 1-3 kadarı kanda serbest haldedir. E2'nin serbest ve albümine bağlı kısımları biyolojik olarak aktiftir [13].

Sunulan çalışma kapsamında SPR sensörler hazırlanmış ve çalışma aşağıdaki başlıklar altında gerçekleştirilmiştir:

17- β -östradiol (E2) ile etkileştirilmek için fonksiyonel monomer olarak seçilen N-Metakriloil-(L)-Lösin metil ester (MALM), L-lösin metil esterin metakroil klorür ile tepkimesi sonucu elde edilmiştir. Elde edilen monomer FTIR ile karakterize edilmiştir.

Altın sensör yüzeyler karakterize edilmiş, E2 baskılanmış SPR sensör hazırlanmış ve bu sensörün kinetik-afinite sabiti belirlenmiştir.

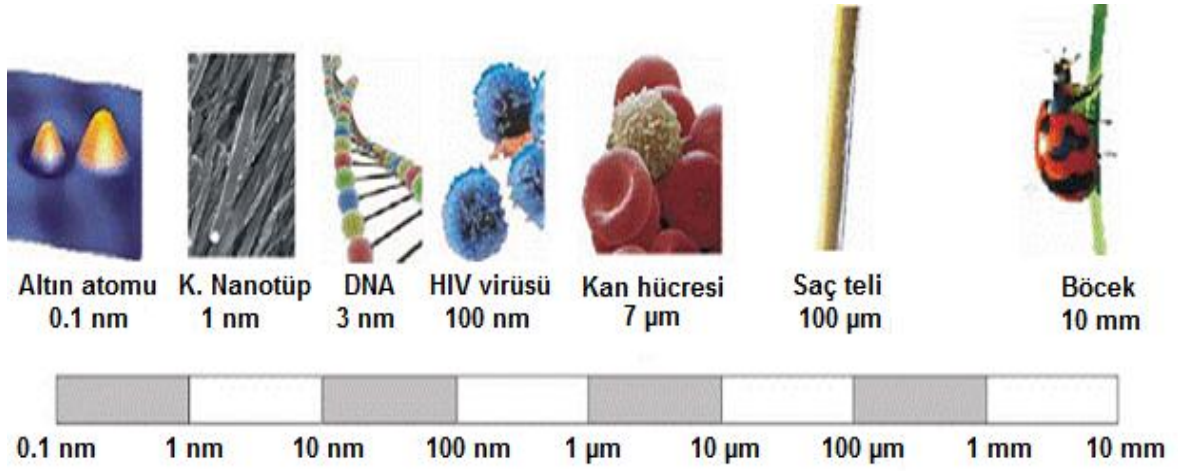
SPR sensörün kararlılığı, seçiciliği ve tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

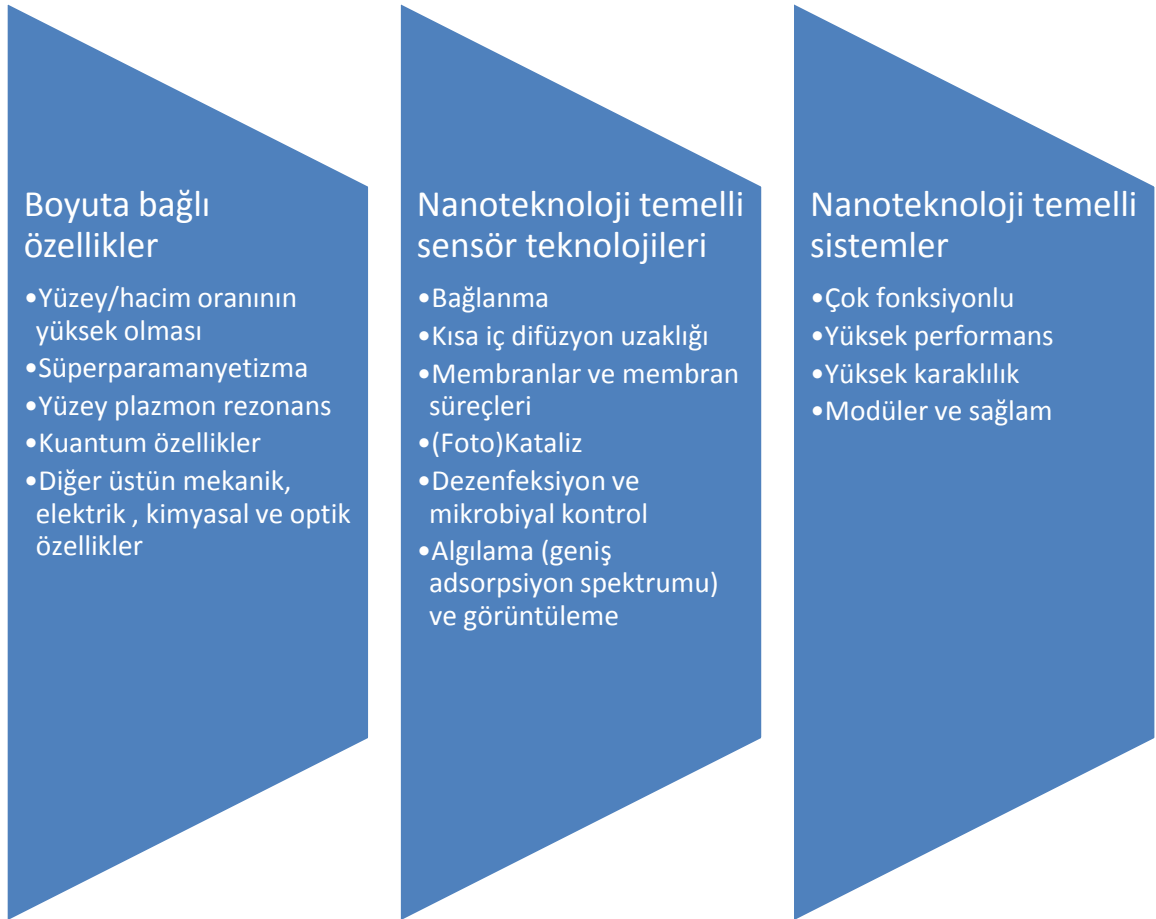
2.1. Nanoteknoloji

Teknolojinin gelişmesiyle birlikte bilim dünyası çevresinde gerçekleşen olayları moleküler boyutta inceleyebilme şansı bulmuştur. Son birkaç on yıldır fizik ve kimya bilimlerindeki gelişmeler sonucu ortaya çıkan teknolojilerle biyomalzeme bilimi, biyoteknoloji, biyokimya ve genetik gibi biyodisiplinlerde etkili çalışmalar yapılmıştır. Bu disiplinlerde daha derine inme ve moleküler düzeydeki yapıların fonksiyonlarını anlama isteği nanoteknoloji biliminin ortaya çıkması için sürükleyici bir etkiye neden olmuştur [14].

Nanoteknoloji, Şekil 2.1'de görüldüğü gibi nano boyuttaki malzemelerin, aletlerin ve sistemlerin metrenin milyarda biri büyüklüğünde tarif edildiği, üretildiği, uygulamaya sokulduğu bir bilim dalıdır [1]. Bu bilim dalı sadece minyatürleşme demek değil, aynı zamanda atom ve moleküllerle oynanarak nanomalzeme ve/veya nanosistemlerin özelliklerinin kontrol edilmesidir [2]. En az bir boyutu 100 nm'den küçük olan malzemeler, boyutlarından kaynaklanan bazı üstün özelliklere sahiptirler. Yüksek emilim, ayrışma, reaktivite ve yüksek yüzey alanı, süperparamanyetizma, yerel yüzey plazmon rezonans ve kuantum etkiler boyuta bağlı özellikler arasında sayılabilirler. Daha fazla adsorpsiyon bölgeleri, birçok nanomalzemeyle çeşitli yapıların kendi aralarındaki etkileşimleri, kısa iç difüzyon mesafesi, yüksek kararlılık, geniş adsorpsiyon spektrumu, kullanım kolaylığı ve maliyetin düşük olması sensör ve görüntüleme teknolojilerinde nanoteknolojinin getirdiği özelliklerdendir. Fonksiyonel nanomalzemeler ve bunların geleneksel teknolojilerdeki kullanımında ortaya çıkan gelişmeler birçok işi tek bir alette gerçekleştirecek çok fonksiyonlu nanoteknoloji temelli sistemlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Nanoteknoloji temelli bu sistemler yüksek kararlılık, yüksek performans ve sağlamlık gibi birçok özelliği de beraberinde getirmiştir (Şekil 2.2) [3].



Şekil 2.1. Nano boyuttaki bazı ilgili örnekler [2].



Şekil 2.2. Nanoteknolojinin getirdiği üstün özellikler [3].

2.1.1. Nanoteknolojinin Tarihçesi

'Bir insanın hayal edebileceği her şeyi başka bir gün öbür insanlar pekâlâ gerçekleştirebilir.'

Jules Verne

Richard Feynman, 29 Aralık 1959'da Amerikan Fizik Cemiyetinin Kaliforniya Teknoloji Enstitüsünde, Pasadena, düzenlediği toplantısında yaptığı 'Aşağıda daha çok yer var' başlıklı konuşmasında her ne kadar nanoteknoloji biliminden bahsetmese ve dinleyenler de böyle bir şey algılamasa da yaptığı konuşmayla bu bilimi kavramsal olarak ortaya atan ilk kişidir. Feynman 24 ciltten oluşan tüm *Britannica* Ansiklopedisinin tamamının bir toplu iğnenin başı büyüklüğündeki alana sığdırılabileceğine inanıyordu. 25 yıl sonra Feynman'ın hayalinden etkilenen Thomas Newman ve Fabian Pease, Stanford Üniversitesi'ndeki laboratuvarlarında elektron ışınlarını kullanarak silikon bir yüzeye Charles Dickens'ın 'A Tale of Two Cities' başlıklı romanının ilk sayfasını yazmayı başardılar [15].

Bu bilimin ortaya çıkması genel bir şekilde kabul görmüş 1959 yılıyla sınırlı değildir. Aslında nanoteknolojinin kökeni MÖ 4. yy'a kadar gitmekte ve ister bilinçli ister bilinçsiz olsun kullanımı birçok dönemde görülmektedir.

Arkeolojik kalıntılar antik çağlarda nanomalzemelerin kullanımı hakkında ipuçları verirler. Londra'daki British Müzesinde bulunan roma döneminden kalma ünlü Lycurgus Kupası bu duruma örnek olarak verilebilir. Lycurgus Kupasının büyük bir bölümü camdan (altın kaplama kaide ve kenar kısımları sonradan eklenmiştir) yapılmıştır ve geçmişi MÖ 4. yy'a dayanmaktadır. Bu kupayı eşsiz kılan özelliği ise dışarıdan ışıklandırıldığında yeşil, içeriden ışıklandırıldığında kırmızı renk vermesidir. Geçirimli elektron mikroskobu kullanılarak yapılan çalışmalarda bu renk değişikliğine camın yapısında bulunan gümüş ve altın nanoparçacıklarının neden olduğu anlaşılmıştır.

Ortaçağ döneminde bazı cam ustaları yakut kırmızısı rengini camın yapısına eklenen altın nanopartiküllerden, sarı rengi ise gümüş nanopartiküllerden elde

etmişlerdir. Benzer bir şekilde Rönesans Dönemi'nde Deruta seramikçileri renklendirme amacıyla nanopartikülleri kullanmışlardır.

1827 yılında nanoteknolojinin ilk endüstriyel örneklerinden biri sayılan ışığa duyarlı gümüş nanopartiküllerin üretimine dayanan fotoğrafçılık sektörü doğmuştur. 1857 yılına gelindiğine her ne kadar nano kelimesi o zamanlar kullanılmasa da Michael Faraday (1791-1867) ilk metalik kolloidlerin farkına varmıştır. Faraday'ın altın kolloidleri karakteristik elektronik ve optik özelliklere sahiptirler ve bunlar birçok ilginç metalik nanopartiküllerden biri olarak bilinirler.

1908 yılında Alman fizikçi Gustav Mie partiküllerden ışık saçılımıyla ilgili bir teori öne sürerek nanoteknolojide önemli bir rol oynamıştır. Gustav'ın ileri sürdüğü Mie Teorisi ve sonradan geliştirilen diğer teoriler araştırmacıların nanopartiküllerin boyutunun tahmin etmesini ve belirlenmesini sağlar. 30'lu yılların hemen başında Max Knott ve Ernst Ruska adlı iki Alman bilim insanı tamamıyla yeni bir dünyanın kapılarını açacak olan elektron mikroskobu adı verilen yeni bir mikroskop türü geliştirdiler. Bu aletin bulunması nano düzeyde araştırma yapacak alet ve enstrümanların gelişimi için önemli bir basamak olarak tarihe geçti. 1947 yılında minyatürleşme adına mikro elektriğin kapısını açan transistörlerin keşfi elektrik endüstrisinde önemli bir basamaktı. 1953 yılında Nature Dergisinde James Watson ve Francis Crick adlı iki araştırmacının DNA'nın ikili sarmal yapısını tarif eden bir makalesi yayınlandı. Keşfedilen nano boyuta sahip bu molekül ileriki yıllarda yaşam bilimlerinde nano düzeyde yapıların geliştirilmesi yönünde ilham kaynağı olacaktı. Bu keşiften beş yıl sonra Sony'de çalışan Japon fizikçi Leo Esaki Taramalı Tünelleme mikroskobunu icat etmiş ve nanoelektronik için önemli bir temel atmıştır [16]. 1959 yılında yukarıda da anlatıldığı gibi Feynman ünlü konuşmasını yapmış ve sonraki yıllarda Feynman'ın düşünceleri meyvelerini vermeye başlamıştır.

2.1.2. Nanoteknoloji Yaklaşımları

Birçok yaklaşım nanoteknolojide başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle de daha fazla yaklaşımın ortaya çıkması muhtemeldir. Yaklaşımlar genellikle uygun teknoloji ve araştırmacıların deneyimleri tarafından belirlenirler.

Nanoteknoloji topluma basite indirgenerek iki ana yaklaşımla (Top down - yukarıdan aşağıya- ve bottom up -aşağıdan yukarıya-) açıklanır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımı nano boyutta monolitik işlemler yoluyla aletlerin yapımını kapsamaktadır. Bu yaklaşım elektronikte kullanılan yarı iletken aletlerde büyük bir başarıyla kullanılmaktadır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımı atomların, moleküllerin veya maddenin diğer temel birimlerinin sistemik bir şekilde kendiliğinden bir araya gelmesiyle aletlerin yapımını tarif etmektedir. Hücrelerin, dokuların, organların ve sistemlerin kendini onarması ve protein sentezi gibi yaşamsal süreçler bu yaklaşıma uymaktadır [17].

2.1.2.1. Top down (Yukarıdan Aşağıya) Yaklaşımı

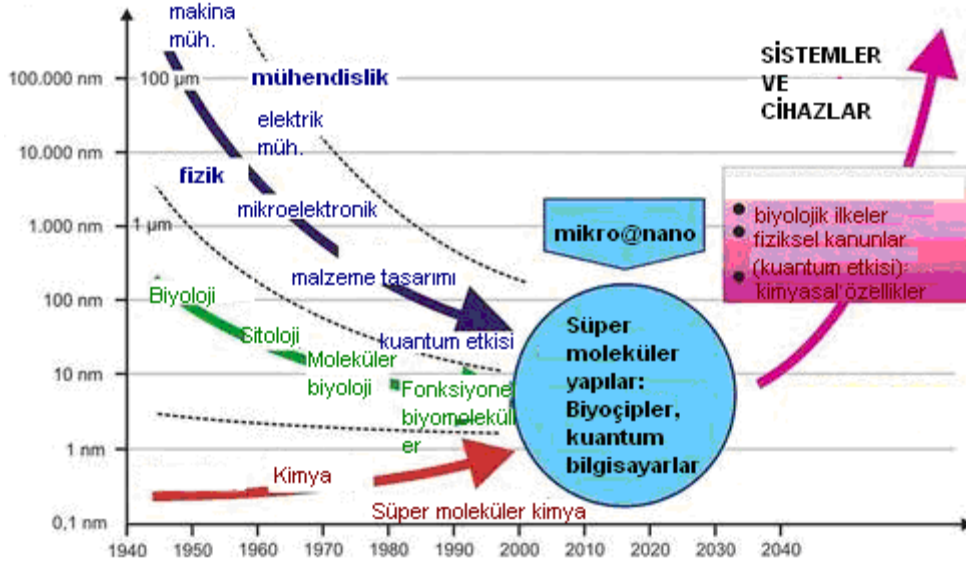
Bu yaklaşımı kullanan en başarılı endüstri elektronik sanayisidir. Bu sanayi kimyasal buhar depolama (CVD), fiziksel buhar depolama (PVD), fotolitografi, elektron ışın litografisi ve X-ışını litografisi gibi birçok tekniği mikro ve nano ölçekte işlevsel yapılar üretmek için kullanmaktadır. Bu teknolojilerdeki gelişmeler ve devinimler dünya çapında yaşam kalitesini arttıracak sayısız elektronik alet ve ürünlerin piyasaya sürülmesini sağlayacaktır. Top down yaklaşımı daha iyi fonksiyonel özellikler vermek için çeşitli kaplamalarda kullanılır. Örneğin, kalp stentleri, biyouyumluluğu ve kan akışını arttırmak için kimyasal buhar depolama teknolojisi kullanarak çok ince elmas benzeri karbonlar ile kaplanırlar [17].

2.1.2.2. Bottom up (Aşağıdan Yukarıya) Yaklaşımı

Aşağıdan yukarıya (bottom up) yaklaşımında nano malzemeler ve yapılar, moleküllerin kendiliğinden bir araya gelip bağ oluşturması gibi termodinamik esaslara dayanan atomların ve moleküllerin bir araya gelmesiyle üretilirler [18]. Örneğin nano boyuttaki tek zincirli DNA molekülleri kullanılarak istenilen özellikte ve şekilde moleküller ortaya çıkarılabilir [19].

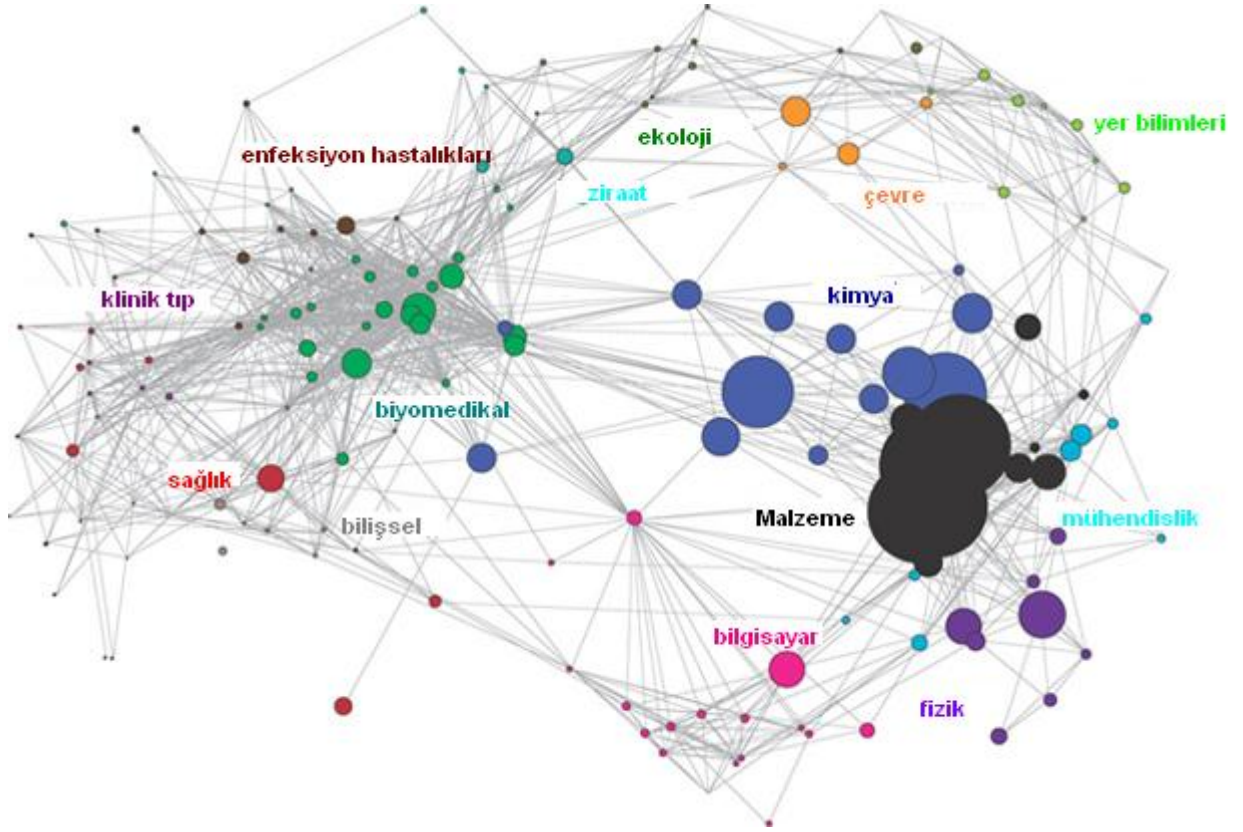
2.1.3. Nanoteknoloji ve Diğer Bilimler ile İlişkisi

Nanoteknoloji fizik, biyoloji ve kimya gibi temel bilim dallarının birleşmesinden ve diğer birçok bilim dalından beslenen yeni ortaya çıkan bir bilim dalıdır (Şekil 2.3). Bu bilim dallarını sınırları (Şekil 2.4) hakkında ciddi tartışmalar olmasına karşın, uygulama da bu sınırları çizmek oldukça güçtür [20].



Şekil 2.3. Nanoteknolojinin birlikte çalıştığı bilim dalları [20].

Her ne kadar nanoteknolojinin en çok uğraştığı alan malzeme bilimleri, kimya ve fizik gibi gözükse de bu bilim dalı yaşam bilimlerini de içine alan çok geniş bir yelpazeye yayılmış durumdadır. Teknolojik ilerlemede önemli yer tutan enformasyon bilimleri, biyoteknoloji, yarı iletkenler ve diğer teknolojiler nanoteknoloji biliminden beslenip aynı zamanda bu bilimi beslemektedirler. Sonuçta bilim dalları arasındaki bu karşılıklı etkileşimler uzay bilimleri, tekstil, seramik, savunma sanayi, elektronik, kâğıt, plastik, yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji, telekomünikasyon ve otomotiv gibi birçok sektörü olumlu yönde etkilemektedir [21].



Şekil 2.4. Nanoteknolojinin bilim haritasındaki konumu [22].

2.2. Nanobiyoteknoloji

Yaşam bilimlerinin anlaşılması güç mekanizmaları bilim insanlarını sürekli olarak nano boyutlarda makineler, sistemler ve robotlar yapmaya zorlamıştır. Nanoteknoloji biliminin atomlarla oynayarak istenilen boyutlarda makineler yapması, bir yandan da birçok bilim insanının yaşam bilimlerinin mekanizmalarını tam olarak çözüp sağlık problemlerinin ortadan kaldırmak istemesi farklı disiplinleri bir araya getirerek yeni bir çalışma alanını doğurmuştur ve bunun neticesinde nanobiyoteknoloji bilimi doğmuştur [23].

Nanobiyoteknoloji bilimi sayesinde tanısı ve tedavisi mümkün olmayan hastalıklar üzerinde bilim insanları çalışmaya başlamış ve önemli sonuçlar elde etmişlerdir. Vücudumuzdaki bir DNA molekülünün çapının yaklaşık 2 nm, kanda dolaşan antibadi moleküllerinin 15 ile 50 nm boyutlarında olduğunu düşünülürse, nanobiyoteknolojinin, nanobilim ve tıp alanına yakın gelecekte getireceği yenilik de kolayca anlaşılabilir. Nanoimplantlardan, ilaç salınım sistemlerine, nanobiyomakinalardan, genomik uygulamalar için DNA çiplerinin yapımına,

mezenşimal kök hücre bazlı organ mühendisliği uygulamalarından, DNA kökenli ligantların nanogörüntüleme amaçlı kuantum noktacılarıyla birlikte kullanımlarına kadar nanobiyoteknoloji çok önemli bir rol üstlenmektedir.

Bilim insanları yeni gelişen bu bilimden çok önemli sonuçlar elde etmeyi düşünmektedirler. Bunlardan bazılarında söz etmek gerekirse: (i) nanobiyoteknolojideki gelişmelerle birlikte hücrelerin çalışma mekanizmaları daha iyi anlaşılabilir, olası bir hasarda çalışmayan yapılar nanoyapılarla değiştirilebilir ve hücre tamiri gerçekleştirilebilir (Hone ve Kam, 2007), (ii) tedavisi bu güne kadar pek mümkün olmayan körlük, sağırlık ve felç durumu gibi rahatsızlıkların görülme sıklığı düşecektir, (iii) AIDS, kanser, diyabet gibi rahatsızlıklar tedavi edilebilir, (iv) çevre dostu, ucuz ve daha verimli kaynaklar kullanılabilir hale gelecektir [24].

2.2.1. Nanobiyoteknoloji ve Ortaya Çıkan Yeni Disiplinler

Biyoteknoloji ve nanoteknolojinin birlikteliğinden doğan nanobiyoteknolojinin birçok farklı disiplinle ortak çalışması sonucu yeni disiplinler ortaya çıkmıştır. Bu disiplinler;

2.2.1.1. Biyomalzeme Bilimi

Nüfus yaşlandıkça kemik, kırık, kan damarları ve hatta organlar gibi yumuşak veya sert dokuları onarma ve yenileriyle değiştirme gereksinimi gün geçtikçe artmaktadır. İnsan yaşamını daha iyi bir hale getirmek için biyomalzemelerin geliştirilmesi de kaçınılmaz hale gelmiştir. Holzapfel ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada biyomalzeme endüstrisinin değeri %15'lik bir büyümeye 28 milyar dolar iken 2014 yılında değerinin 58 milyar dolara çıkması beklenmektedir. Metal, polimer ve seramik gibi biyoyapılar, biyomalzeme piyasasının ana oyuncuları gibi gözükse de, doku mühendisliğindeki önemli gelişmeler bu disiplinin de biyomalzeme pazarında önemli bir oyuncu olacağına işaret eder.

1960 ve 1970'lerde medikal implant ve aletlerde rutin olarak kullanılmak için ilk nesil biyomalzemeler geliştirildi. 1980'li yıllarda 30 farklı malzemedan imal edilen

klinikte kullanılacak 100'den fazla implant ve alet geliştirildi. 1980 ve 1990'larda biyomalzeme sektörü biyoaktif bileşiklerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaştı. 1990'ların ortalarına gelindiğinde biyoaktif malzemeler metal ve biyoseramiklerin çeşitli kompozisyonlarını içeren ortopedik, diş ve kardiyovasküler uygulamalarda kullanıldı. Son on yılda hücrel ve moleküler bilginin ışığı altında ortaya çıkan ana gelişmeler yeni nesil biyomalzemelerin geliştirilmesi için bilimsel bir temel oluşturmuştur. 2000'li yıllarda moleküler biyoloji ve proteomikteki gelişmeler ile birlikte biyoyumluluk konsepti ortaya çıktı. Bu sayılan keşifler biyomalzemelerin sentezi, tasarımı ve kullanımını büyük ölçüde etkilemiş ve neticesinde hem klinik ihtiyaçlar hem de hastaların beklentileri artmıştır [25].

2.2.1.2. Biyosensörler

Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarını içeren reseptörler ve uygun çeviricilerin bir arada bulunduğu basit analitik cihazlardır. Geleneksel analitik tekniklerle karşılaştırıldığında biyosensörler, hızlı ve gerçek zamanlı tayin, düşük maliyet, taşınabilirlik, basit kullanım, örnek hazırlama işleminin kolaylığı gibi birçok özelliğe sahiptir [4]. Biyosensörler genel olarak biyolojik tanıma elemanları ve dönüştürücülerine göre iki sınıf altında sınıflandırılmaktadırlar. Biyolojik tanıma elemanlarına göre olan sınıflandırmada;

- Enzim,
- Antibadi,
- Nükleik asit temelli biyosensörler olarak [5],

Dönüştürücülerine göre yapılan sınıflandırmadaysa;

- Elektrokimyasal,
- Optik,
- Piezoelektrik biyosensörler olarak sınıflandırılır [6].

Biyosensörler, 2.3. nolu bölümde daha detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

2.2.1.3. Biyoçipler

Biyoçipler, biyolojik olarak kullanılabilen mikro işlemciler olarak tanımlanırlar. Biyoçipler pek çok testin aynı anda ve zaman kaybetmeden yapılabilmesine olanak sağlarlar. Milyonlarca matematik işlemini aynı anda gerçekleştiren

bilgisayar işlemcileri gibi, bir biyoçip de binlerce biyolojik tepkimeyi saniyeler içerisinde gerçekleştirebilmektedir. Kullanılan genleri ve gen dizisi değişikliklerini analiz eden biyoçipler yaklaşık 80.000 genden oluşan insan DNA'sının tanımlanmasına yönelik olarak İnsan Genomu Projesi'nde kullanılmış ve işlemi büyük ölçüde hızlandırmışlardır. Biyoçipler, genetik alanında kullanımlara ek olarak, toksikolojide ve biyokimyasal araştırmalarda da kullanılmaktadır. Ayrıca biyolojik savaşta kullanılan kimyasal ajanların hızlı biçimde tespit edilmelerine olanak sağlarlar [24].

2.2.1.4. Nanotıp

Nanotıpın tanımı Atlas Okyanusu'nun her iki tarafında farklı yapılmaktadır. Birleşik Devletler ulusal nanoteknoloji girişimi nanotıptı, 'nanoteknolojinin tıptaki uygulamaları' olarak tanımlarken; Avrupa Bilim Kurumu nanotıpın tanımını 'insan vücudundaki moleküler bilginin yanı sıra moleküler aletleri kullanarak insan sağlığının daha iyileştirilmesi, hastalıkların teşhisi, iyileştirilmesi ve önlenmesiyle ilgilenen bilim ve teknoloji' olarak yapmaktadır.

Nanotıpın ana uygulama alanlarını şu şekilde sıralamak mümkündür:

- Farmasötiklerin taşınımı
- *in vitro*, *on vivo* ve *in vivo* teşhis
- Götüntüleme
- Rejeneratif tıp
- İmplant edilen cihazlar [26]
- Nanorobotik sistemler [27]

2.2.2. Türkiye'de Nanobiyoteknolojinin Durumu

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de temel hedef, hızla artan nüfusa sağlıklı yaşam koşulları hazırlamaktır. Modern bilim bunu sağlamak için biyolojik olaylara moleküler düzeyde yaklaşmakta, özellikle çok hızlı ve art arda devam eden biyolojik reaksiyonları anlamaya ve buradan alacağı bilgiler ile esas olarak yaşam kalitesini artıracak gelişmeler sağlamaya çalışmaktadır. Bu çalışmaların gerçekleştiği en önemli yerlerden bir tanesi Bilkent Üniversitesinde bulunan Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezidir (UNAM). Bu merkezde çalışan bilim insanları

çeşitli konularda çalışmalar yapmış ve önemli sonuçlar elde edilmişlerdir. Bu çalışmalardan bir tanesi nanobiyoteknoloji grubunun yapmış olduğu çalışmadır. Nanobiyoteknoloji grubu farklı bir yöntem geliştirerek kanser tedavisinde önemli başarılar elde etmiştir. Bu yöntem ile DNA moleküllerinin bağışıklık sistemi üzerine olan tetikleyici etkisinden yararlanarak yeni DNA kökenli ilaçlar tasarlanmıştır. Bu yöntem ile insanda baş ve boyunda oluşan ve çok hızlı bir şekilde ilerleyebilen bir kütle kanseri modeli farelerde %90'nın üzerinde bir başarıyla ortadan kaldırılmıştır [24].

2.3. Biyosensörler

Çevre ve besinlerde bulunan kimyasal bileşikler, toksinler ve patojenler gibi kirleticilerin tespiti ve görüntülenmesi insan sağlığı ve çevre için hayati önem taşımaktadır. Kütle spektrofotometresiyle birlikte kullanılan sıvı ve gaz kromatografileri gibi yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip geleneksel analitik teknikler hali hazırda mevcuttur. Fakat söz konusu bu teknikler, zaman alıcı, pahalı ve bu tekniklerle ilgili eğitim almış personele ihtiyaç duyar. Bunun yanı sıra bu tekniklerle çevre ve besinlerdeki kirleticilerin sürekli görüntülenmesi mümkün değildir. İyi bir görüntülemeyi başarmak için duyarlı, basit, hızlı, maliyeti düşük ve taşınabilir metotlara ihtiyaç vardır. Biyosensörler yukarıda bahsedilen pozitif özelliklere sahiptirler ve bu yüzden çevre ve besinlerin görüntülenmesinde idealdirler [4]. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) terminolojisine göre biyosensörler, biyolojik bir tanıma elemanı kullanarak analitik bilgiler ihtiva eden reseptör ve çeviricilerin entegre edildiği cihazlardır. Biyosensörler tanıma elemanlarıyla hedef analit arasındaki reaksiyon ve bağlanmaları uygun bir sinyal dönüştürücü metotla anlamlı bir sinyale dönüştüren tanıma elemanlarıdır. Çizelge 2.1 geleneksel analitik teknikler ile biyosensörler arasındaki özellikleri karşılaştırmaktadır.

Biyosensörlerin besin ve çevredeki kirletici tespiti üzerinde geleneksel analitik tekniklere göre birçok avantajı vardır. Bu avantajlar, biyosensörlerin geleneksel analitik tekniklere göre hızlı, maliyetlerinin düşük, taşınabilir olmaları ve örnek hazırlama işleminin basit olmasıdır. 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 [4].

İlk biyosensör 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından ortaya atılmıştır. Araştırmacılar diyaliz membran kullanılmış oksijen elektroduna glukoz oksidaz enzimini tutturarak kandaki glukoz düzeyini ölçmüşlerdir [28]. Her ne kadar biyosensörler 1962 yılında bilim dünyasına duyurulmuş olsa da, 1962 yılının öncesinde biyosensörlerin icadını destekleyen ve sonrasında gelişimi ve geliştirilmesine katkı sağlayacak birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar Çizelge 2.2'de belirtilmiştir [29].

Biyosensörler, biyoreseptör ve çevirici gibi iki elemanın bir araya gelmesiyle oluşmuş yapılardır. Biyoreseptör, substrat, eşlenik DNA ve antijen gibi analitleri tanıyan immobilize olmuş duyarlı biyolojik yapılardır. Çeviriciler ise biyoreseptörler ile analitler arasında gerçekleşen etkileşimlerden kaynaklanan biyokimyasal sinyalleri dönüştüren elemanlardır. Üretilen sinyalin yoğunluğu direk veya aksine analitin derişimiyle orantılıdır. Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarının ve sinyal dönüştürücülerin temel ilkelerine bağlı olarak sınıflandırılırlar. Dönüştürücülere göre yapılan sınıflandırmada biyosensörler elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik olarak sınıflandırılır [6]. Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarına göre ise enzim, antibadi, nükleik asit temelli biyosensörler olarak sınıflandırılabilirler [5].

2.3.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

2.3.1.1. Biyotanıma Elemanlarına Göre Sınıflandırmada

2.3.1.1.1. Enzimler

Enzimler, biyosensör geliştirilmesinde sıklıkla kullanılan malzemelerdir. Bu tip biyosensörler istenilen molekül için özgül olan enzimleri kullanırlar. Ticari olarak en başarılı biyosensörler dünya biyosensör pazarının yaklaşık %90'lık kısmını oluşturan ve kan örneklerindeki glikoz düzeyini ölçen biyosensörlerdir [30]. Biyosensör yapımı için bugüne kadar birçok enzim kullanılmıştır. Örneğin oksidoredüktazlar, laktat [31], malat [32], askorbat [33], aminoasitler [34], alkol [35], kolestrol [36], gliserol [37]; transferazlar asetik asitlerin biyosensör

analizlerinde [38], kaptan [39] veya atrazin [40] gibi ksenobiyotiklerin belirlenmesinde; hidrolazlar sukroz [41], liyazlar sitrik asit analizlerinde [42]; ligazlar DNA nokta mutasyon tespitinde [43] kullanılırlar. Enzim yükleme, uygun pH'nın kullanımı sıcaklık ve kofaktörleri etkileyen bazı faktörler enzim temelli biyosensörün performansı üzerine etki ederler. İmmobilizasyon metodu ve sensör yüzeyindeki enzimin kalınlığı gibi faktörlerde elektrot performansını etkileyen diğer faktörlerdir [30, 32, 37].

Çizelge 2.1. Geleneksel analitik teknikler ile biyosensörler arasındaki özelliklerin karşılaştırılması [4].

| Biyosensörler | Geleneksel Analitik Teknikler |
|--|--------------------------------------|
| Hızlı ve gerçek zamanlı tespit | Zaman alıcı |
| Maliyeti düşük | Pahalı |
| Taşınabilir | Laboratuvarda görüntüleme |
| Basit kullanım | Eğitimli laboratuvar personeli |
| Basit cihazlar | Yüksek teknolojiye sahip aletler |
| Örnek hazırlamanın işleminin basitliği | Kapsamlı örnek hazırlama gerekliliği |
| Daha az organik çözücü tüketimi | Daha fazla organik çözücü tüketimi |
| Tek analit tespiti | Birden fazla analit tespiti |
| Sınırlı ticari kullanılabilirlik | Ticari kullanılabilirlik |
| Ayarlanmaz | Ayarlanır |
| Duyarlı | Duyarlı |
| Özgül | Özgül |
| Tekrar kullanılabilir | Tekrar kullanılabilir |

Çizelge 2.2. Biyosensörlerin tarihçesi [29].

| Tarih | Bilimsel Gelişme |
|--------------|--|
| 1916 | Proteinlerin immobilizasyonu üzerine ilk rapor |
| 1922 | İlk cam pH elektrodu |
| 1956 | Oksijen elektrodunun bulunması |
| 1962 | İlk biyosensör tanımı: Glukoz için bir amperometrik enzim elektrodu |
| 1969 | İlk potansiyometrik biyosensör: üre tespiti için üreaz immobilize edilmiş elektrot |
| 1970 | İyon seçici alan etki transistörünün bulunması |
| 1972-1975 | İlk ticari biyosensör |
| 1975 | İlk mikroorganizma temelli biyosensör İlk immünoşensor |
| 1980 | <i>in vivo</i> kan gazları için ilk fiber optik pH sensörü |
| 1982 | Glukoz için ilk fiber optik temelli biyosensör |
| 1983 | İlk yüzey plazmon rezonans immünoşensor |
| 1987 | MediSense ExacTech glukoz biyosensör piyasaya sürdü |
| 1990 | Pharmacia BIACore SPR temelli biyosensör sistemi piyasaya sürdü |
| 1992 | i-STAT elde taşınabilen kan analiz edici cihazı piyasaya sürdü |
| 1996 | Abbott MediSense'i 867 milyon dolara satın aldı |
| 2003 | İ-STAT 392 milyon dolar karşılığında Abbott tarafından satın alındı |
| 2004 | Abbott Therasense'i 1.2 milyar dolar karşılığında satın aldı |

2.3.1.1.2. Antiadiler

Antibadi çok dzenli bir sırada dzenlenmiş yzlerce aminoasitten meydana gelmiş kompleks bir biyomoleküdür. Antijene özgül antibadi yüksek bir seçicilikle antijene bağlanır. Antiadilerin bu eşsiz özelliği özgül bir analite olan ilginin inceleneyeği immünosensör kullanımında önemlidir. İmmünosensörler kanser hücrelerinin izlenmesinde [44] veya onların markırlarının tespitinde [45], bakteri ve virüslerinin ve toksinlerin [46] tespiti için tasarlanırlar.

2.3.1.1.3. Nükleik Asitler

Nükleik asit temelli biyosensörler nükleotit iplikleri boyunca sıralı tamamlayıcı bölümler arasındaki güçlü baz eşlerinden dolayı yüksek seçicilik ve hassasiyete sahiptirler. Nükleik asit (nükleik asitin doğal veya biyoesinlenmiş formu) nükleik asit temelli biyosensörlerde biyolojik tanıma elemanı olarak kullanılırlar. Son zamanlarda genellikle yapay oligodeoksiribonükleotitler DNA hibridizasyon sensörlerinde prob olarak kullanılmaktadırlar.

2.3.1.2. Dönüştürücülerine Göre Sınıflandırma

Dönüştürücülerine göre biyosensörler optik, elektrokimyasal ve piezoelektrik biyosensörler olarak sınıflandırılmaktadır (Çizelge 2.3).

2.3.1.2.1. Optik Sensörler

Optik biyosensörler besin sanayi, tıp ve çevrenin görüntülenmesinde kullanılan güçlü cihazlardır [7]. Biyolojik çeşitliliğın modern mikroelettronik ve optoeletrik ile bir araya gelmesi, yukarıda sayılan sektörlerdeki uygulamalarda büyük bir analitik potansiyel sunmaktadır. Çoğu optik biyosensör çip yüzeyindeki ligand analit arasındaki etkileşimlerden kaynaklanan yüzey özelliklerinin değişimindeki ölçümleri temel almaktadır. Adsorpsiyon, flöresans ve yüzey plazmon rezonans gibi çeşitli fiziko-kimyasal olgular farklı biyosensör çeşitlerinde kullanılmaktadır.

Görünür bölge UV adsorpsiyon spektrometrisi makro ölçekli analitik kimyada en anlaşılır tekniktir. Bu uygulamada, besin kirleticilerinin tespiti için kalorimetrik uygulamalar kullanılır. Çoğu durumda teşhis için renkteki ve optik yoğunluktaki değişiklikler yeterlidir.

Flöresan anlaşılabilirliği, yüksek seçiciliği, ayırt edici işaretleme teknikleri ve birçok elde edilebilir florofor gibi özelliklerinden dolayı optik temelli tespit için yaygın şekilde kullanılan bir metottür. Flöresan tespit için diğer tekniklere göre birçok üstünlüğü olsa da, flöresan boyaların kısmen daha pahalı oluşu, sınırlı raf ömrü ve diğer kimyasal faktörlerden sıklıkla etkilenmeleri bu tekniğin dezavantajları arasında sayılabilir [47].

2.3.1.2.2. Elektrokimyasal Sensörler

Elektrokimyasal sensörler sanayi, trafik, çevre ve medikal görüntüleme, metabolizmanın araştırılması ve biyolojik süreçlerin kontrolünde sıklıkla kullanılan sensörlerdir. Bu sensörler örnekleme için ihtiyaç duymadan kimyasalların *in situ* ölçümünde gerçek zamanlı bilgi veren güçlü aletlerdir. Kullanılan elektroda bağlı olarak elektrokimyasal sensörler -30°C ile 1600°C arasındaki sıcaklıklarda kullanılabilirler. Elektrokimyasal sensörler kendi aralarında amperometrik veya potansiyometrik modda kullanılırlar.

Elektrokimyasal sensörler FTIR ve UV spektrometrisi, kütle spektrometrisi ve kromatografik tekniklerle (gaz kromatografisi ve yüksek performans sıvı kromatografisi) karşılaştırıldığında veri alma ve süreçleri yürütmede gerekli olan elektronik aletlerin kurulumu gibi uygulamalarla karşılaştırıldığında daha basit bir tekniktir. Bakımı ve kalibrasyonu için gerekli olan uğraş nispeten daha azdır. Sensör sinyalleri direk *in situ* elde edilebilir ve süreçlerin kontrolü için real time bilgi sağlar. Diğer yandan elektrokimyasal sensörler kararlılık ve tespit sınırı açısından laboratuvarlardaki yukarıda bahsedilen standart metotları değiştiremezler. Elektrokimyasal sensörler basit olmalarına rağmen, bu sensörü kullanan kişilerin sensör sinyalleri üzerine etki edecek sıcaklık, basınç ve kimyasal kompozisyon gibi ölçüm şartlarına etki edecek ileri bilgiye sahip olması gerekmektedir [48].

2.3.1.2.3. Piezoelektrik Sensörler

Quarz kristal mikrobalsans (QCM) fiziksel, kimyasal ve biyolojik sensörlerin ön önemli çeşitlerinden biri olup, maliyeti düşük, yüksek çözünürlükte ve kütleyle duyarlı bir cihazdır [49]. QCM, sensör yüzeyinde biriken kütleden kaynaklanan sallanma frekansındaki değişiklikleri temel alan bir çalışma prensibine sahiptir. Bu aletin en önemli avantajlarından biri, farklı kaplamalar uygulanarak birçok analizi tespit etmek için kolayca adapte edilebilir olmasıdır [50].

Bir kütle sensörü olarak QCM, biyokimya, gıda, çevre ve klinik analizler gibi birçok alanda kullanılır [51]. Bu sensörler aynı zamanda farklı degradasyon süreçlerinin ve kurşun asit pillerinin yük durumlarının görüntülenmesinde de kullanılmaktadırlar [52].

2.3.2. Çevresel Görüntülemeye Biyosensörler

Çevresel görüntülemeye alet ve sistemlere olan gereksinim birçok çevresel öneme sahip analiti mümkün olduğunca hızlı ve ucuz şekilde analiz edebilecek, bunun yanı sıra alanda çalışma imkânı sağlayacak daha uygun metotlar ve yeni teknolojilerin geliştirilmesini tetiklemektedir. Bu bakımdan son yıllarda biyosensörler etkili bir görüntüleme için yukarıda önerilen alet ve sistemler açısından büyük bir potansiyel göstermektedir. Biyosensörler, organik ve inorganik kirleticilerin kimyasal görüntülenmesi için veya biyolojik/ekolojik kalite elemanlarının değerlendirilmesinde çevresel kalite görüntüleme araçları olarak kullanılabilirler [53]. Çizelge 2.4'de çevresel uygulamalar için kullanılan biyosensörler listelenmiştir.

Çizelge 2.3. Dönüştürücülerine göre biyosensörler.

| Sensör | Çeşit | Avantajları | Dezavantajları | Kaynaklar |
|-----------------|------------------------|---|--|--------------|
| Optik | Yüzey plazmon rezonans | Çok sayıda spektroskopik özellik kullanılabilir, Birçok özelliği bulunmaktadır, Elektromanyetik etkileşimlerden etkilenmez, Elektriksel bir tehlikeye maruz kalma ihtimali azdır. | Işık etkileşimlerine maruz kalır, Matriks şismesinden dolayı yön uzunluğu değişkendir. | [54, 55, 56] |
| | Florosan | Doğal bir süreçtir, Çoklu foton uyarılır, Ekzojen bir enzim için ihtiyaç yoktur. | Florofor toksisitesi, Normal biyolojik süreçler ile etkileşim. | [57, 58, 59] |
| Elektrokimyasal | Amperometrik | Yüksek sinyal/ses oranı Düşük analit tüketimi | Analit akış hızına bağımlılık Analitin tüketimi | [60, 61] |

| | | | | |
|-------|-----------------|---|---|----------|
| | Potansiyometrik | Kısa cevap zamanı Doğrusal cevap Renk ve bulanıklılık değişikliklerinden etkilenmez Zararlı değil | Elektrotlarda kirlilik problemi, Referans elektrot gereklidir, Nernst eşitliğinde sapma. | [62, 63] |
| Kütle | Piezoelektrik | Elektromanyetik alan ve radyasyona duyarlı değildir, Hızlı cevap süresi, Azaltılmış etkileşim etkileri. | Artı bir kütle ve frekans değişiklikleri arasında doğru bir ilişkinin olmayışı, Yüksek sıcaklıklar iç rezistansta düşüşe neden olur. | [64, 65] |

2.3.3. Biyosensör Teknolojisinin Bu Günü ve Geleceği

Biyosensör teknolojisi özellikle son 25 yıldır yeni malzemelerin yapım teknikleri, yeni sinyal iletim araçları ve aletleri kontrol eden güçlü bilgisayar programlarıyla gelişmekte olan ve hızlı bir şekilde büyüyen bir alandır [77]. Geçmişten bu güne biyosensörlerin geliştirilmesi üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen, hala daha gelişmiş ve güvenilir aletlerin yapımı konusunda engeller vardır. Aşağıda verilen bölümde biyosensör araştırmalarından beklenen gidişata değinilmiştir [53].

Çizelge 2.4. Çeşitli çevre kirleticilerinin tespitinde kullanılan biyosensörler.

| Çevresel kirletici | Dönüştürücü eleman | Biyotanıma elemanı | Kaynak |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|---------------|
| Endokrin bozucular | Optik (SPR) | Östrojen reseptörü | [66] |
| Endokrin bozucular | Elektrokimyasal (Amperometrik) | Enzimatik (Tirozinaz) | [67] |
| Karbaril | Optik (SPR) | Antikor | [68] |
| PCBs | Optik (floresan) | Antikor | [69] |
| Organofosforlu bileşikler | Elektrokimyasal (Amperometrik) | Enzim (Organofosforlu hidrolaz) | [70] |
| Fenoller | Elektrokimyasal (Amperometrik) | Enzimatik | [71] |
| Propanil | Optik (floresan) | Antikor | [72] |
| Bisfenol A | Optik (floresan) | Antikor | [53] |
| Bisfenol A | Optik (SPR) | Antikor | [73] |
| Nitrat | Optik (floresan) | Rekombinant <i>Escherichia coli</i> | [74] |
| Benzen ve türevleri | Optik (luminesans) | Rekombinant <i>Escherichia coli</i> | [75] |
| Antibiyotikler | Optik (floresan) | Antikor | [72] |
| 17-β-Estradiol | Kütle | Yapay reseptör | [76] |

2.3.3.1. Sürekli Görüntüleme

Su sistemlerinin kirletici konsantrasyonları, su akıntısına giren girdiler ve değişkenler neticesinde sürekli değiştiğinden dinamiktir. Birçok biyosensör kolay, hızlı ve *in situ* ölçüm sağlayabilecek sürekli görüntüleme sistemleri olarak geliştirilmektedir [78, 79]. Bu biyosensörler aynı zamanda çeşitli boşaltma ve kirlilik olaylarında hızlı tespit gerektirecek kirliliklerin haritalanması için yararlıdır [80]. Gu ve arkadaşları 2000'li yılların başında bir su arıtma tesisinin akıntılarının toksisitesini görüntülemek için yeni bir erken uyarı protokolü uygulamışlardır [81].

2.3.3.2. Çoklu Analit Tespiti

Birkaç analiti aynı anda tespit edebilen sensörler daha az zamanda daha az numune ve kimyasal kullandıklarından dolayı çevresel görüntüleme sistemleri için uygun aletlerdir. Yüksek miktarda küçültülmüş sinyal dönüştürücü elemanlara sahip büyük ölçekli sensör platformları birçok numunenin izlenimine paralel olarak gerçek zamanlı ölçüm sağlar ve bu, biyosensör araştırmalarında önemli bir itici güçtür [82]. Son yıllarda *in situ* analiz için tasarlanan taşınabilir bir SPR immünosensör gibi aynı anda benzopiren ve 2-hidroksibifenil çoklu analit tespitlerinin çeşitli örnekleri literatürde görülmektedir [83]. İnce multielektrotlu, tek kullanımlık, çoklu analit tespiti sağlayan enzim biyosensörü, paraoksan ve karbofuran pestisitlerinin bulunduğu bir karışımdan analit ayrımı yapmak için geliştirilmiştir [84]. Farmasötiklerin, antibiyotiklerin, hormonların, endokrin bozucu kimyasalların ve pestisitlerin tespiti çoklu analit tespit eden immünosensörler tarafından başarılmıştır [53, 72, 85]. Son zamanlarda kuantum noktalar çoklu analit tespiti için kullanılmaktadır [86].

2.3.3.3. Minyatürleştirme

Mikroelektronik ve mikroakışkanlardaki gelişmeler analitik sistemlerin boyutlarının küçültülmesine olanak sağlar. Boyutta meydana gelen bu küçülme daha az kimyasal kullanımı ve atık oluşumuna neden olacağı gibi daha düşük hacimlerde çalışmaya da olanak sağlar [87]. Boyutta meydana gelecek küçülmeye biyosensörler ucuz, elde taşınabilen, hızlı ve güvenilir ölçümler alan analitik cihazlar olabilirler. Biyosensörlerdeki küçülme özellikle implante bir biyosensör için sürekli *in vivo* görüntülemede [88] ve farmasötik görüntülemede çok önemli bir yere sahiptir [53]. Çevresel görüntülemede bir sensörün boyutu çok önemli olmasa

da, küçültülmüş bir teknolojinin kullanımı, kullanılan kimyasalın miktarında ve akışkanı kontrol etmek için gerekli enerji kullanımında düşüşe neden olacaktır [88]. Bu aynı zamanda analitik performans üzerinde analiz zamanını düşürme, güvenilirlik ve hassasiyeti arttırarak olumlu bir etki yaratır [89]. Diğer bir taraftan küçük boyut özellikle saha çalışmalarında kullanılan taşınabilir biyosensörlerin tasarımında tercih edilir [53].

2.3.3.4. Yeni Duyu Elemanları

Moleküler tanıma bileşenlerinin afinitesi, özelliği ve toplu üretimindeki gelişmeler tamamen tespit teknolojilerinin başarısı veya başarısızlığına bağlıdır. Çünkü gelecekteki biyosensör gelişmelerindeki hayati yön kolay üretilecek ve geniş bir seçicilik özelliğine sahip olacak yeni duyu elemanlarının üretimine bağlı gibi gözükmektedir. Şu anda, enzim ve antibadi gibi çeşitli biyomoleküller üzerine yapılan üretim ve çalışmalar önemli bir zaman ve bilgi gerektirmektedir [53]. Moleküler baskılanmış polimerler yukarıda bahsi geçen sınırlamaların üstesinden gelen ümit verici alternatifler olarak düşünülür [90].

2.3.4. Ticari Biyosensörler

Araştırma laboratuvarlarında büyük miktarda biyosensör üretilmektedir ve bu alandaki ilgili araştırmalar son derece önemlidir. Fakat çok az uygulamaya yönelik sistem ticari başarı kazanabilmektedir. Bu günlerde tıbbi uygulamalar için birçok ticari biyosensör varken [91], besin, ziraat, savunma sanayi, veterinerlik ve çevresel kontrol gibi alanlarda da oldukça büyük bir pazar vardır. Ancak tıbbi teşhis için geliştirilen aletlerin birçoğu çevre sorunlarına yönelik biyosensör pazarı için kullanılabilir [92]. Çevresel biyosensör talebi tıbbi teşhis için kullanılanlardan büyük ölçüde daha az gibi gözükse de çevre sorunlarına karşı toplumda gelişen hassasiyet ve devlet yatırımları [93] biyosensörlerle kirletici ve diğer çevresel tehditleri ölçmeyi amaçlamaktadır [53].

Yüzey plazmon rezonans biyosensörler çevresel görüntüleme için en başarılı ticari ürünlerdendir. BIACORE AB (Uppsala, İsveç), orijinal BIACore'un çeşitli ürünlerinin yanı sıra değiştirilebilir otomasyon dereceleri ve parametre özelliklerini sunan diğer

yapılandırma sistemlerini içeren birçok biyosensörü piyasaya sürmüştür [94]. Diğer yüzey plazmon rezonans ticari biyosensörler, IBIS sistem (Windor Scientific, Berks, Birleşik Krallık), CELLIA sensör (Nippon Laser and Electronics Labs, Hokkaido, Japonya), Spreeta (Texas Instruments, Dallas, TX, ABD), the BIOS-1 sistem (Windsor Scientific), SENSIA (Madrid, İspanya) [68], BioTul AG (Münih, Almanya) [95], NanoDev (Ankara, Türkiye)'dir [96].

REMEDIOS, hücre temelli bir biyosensör, kirli toprağın tespiti için kullanılabilir. Bu sensör tüm hücre olarak kullanılan organizmanın metabolik aktivitesini etkileyecek herhangi bir zehirli maddeyi tespit eder. Unisense (Aarhus, Danimarka) ve NECi'nin nitrat biyosensörü [97], nitrat tayini için piyasaya sırasıyla mikrobiyal ve enzimatik biyosensörler sürmüşlerdir. CALUX sistem (Amsterdam, Hollanda) dioksin ve dioksin benzeri bileşiklerin tespiti ve ölçümü için kullanılır [98]. Caliper Technologies, Cepheid, Nanogen, ACLARA BioSciences, MICROGEN Systems ve Lawrence Livermore Laboratories gibi firmalar mikrobiyal ajanları tespitini ve tanımlanmasını sağlamak için mikro boyutta sistemler geliştirmektedirler [99].

2.4. Yüzey Plazmon Rezonans

Yüzey plazmon olgusu ilk defa 1902 yılında Wood tarafından gözlenmiştir [100]. Wood yaptığı çalışmada polarize ışığın bir kırınım düzenleyici yüzeyinden bir aynaya yansıttığı zaman aynada karanlık ve aydınlık bantlar tespit etmiştir. Wood'dan sonra sırasıyla Lord Rayleigh ve Fano teorisinin gelişimine katkıda bulunmuşlardır. Ancak yapılan bu çalışmalara rağmen yüzey plazmon rezonans olgusunun tam olarak anlaşılması 1968 yılına kadar mümkün olmamıştır. Bu tarihte Otto ve Kretschmann yüzey plazmon rezonansların oluşumunu rapor etmişlerdir [101]. Elde edilen bu gelişmeler yüzey plazmon rezonans olgusuna dayalı yüksek seçicilikte sensörlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. SPR temelli ilk biyosensörü 1980'lerde Liedberg ve arkadaşları hazırlamışlardır. Bu tarihten sonra bu konuda yapılan çalışmaların sayısı giderek artmıştır [102, 103].

Yüzey plazmon rezonans, metal yüzeye yakın kırılma indisindeki değişimi ölçerek basit ve doğrudan ölçüm yapan bir tekniktir [7]. Yüzey plazmon rezonans

yönteminde geçirgen ve farklı kırılma indisli iki ortam arasında (cam prizma ve çözelti) ince bir metal film kullanılır. Metal film genellikle altın veya gümüştür. Kritik bir açının üzerinde düzlem polarize ışık, daha yüksek kırılma indisli bir ortama girdiğinde (cam prizma) toplam iç yansımaya uğrar. Bu durumda kendiliğinden sönümlü dalga (evanescent wave) adı verilen ışık, metal filmin içine doğru nüfuz eder. Belirli bir kırılma açısında bu dalga, metal yüzeydeki serbest elektronların yüzey plazmonları oluşturmasına sebep olur ve yansıyan ışığın yoğunluğu düşer. Bu olaya yüzey plazmon rezonans denir ve sadece rezonans açısı denilen belirli bir açıda gözlenir. Rezonans açısı, yüzeye analit eklenmesiyle değiştirilebilir. Bu değişim yüzeyin hedef moleküle göre modifiye edilmesiyle seçici hale getirilebilir. Bu da SPR biyosensörlerin temelini oluşturmaktadır [104].

2.4.1. Yüzey Plazmon Rezonans Teorisi

Yüzey plazmon rezonans teorisi, enerji taşıyan ışık fotonunun metalin elektronları ile birleşmesi veya enerji transferi ilkesine dayanmaktadır. Birleşmenin (veya enerji transferinin) gerçekleştiği ışığın geliş açısı her metal ve metal yüzeyinin çevresine göre değişmektedir. Işık fotonları ve metal yüzeyindeki elektronlar arasında bir eşleşme ve/veya rezonans yakalandığında enerji transferi gerçekleşir. Bu enerji transferi, metal filmin alt yüzeyinden yansıyan ışığın miktarının ölçülmesiyle belirlenebilir. Her ışık birçok açıda yansırken, ışığın bir bölümü rezonans açısında absorplanmaktadır.

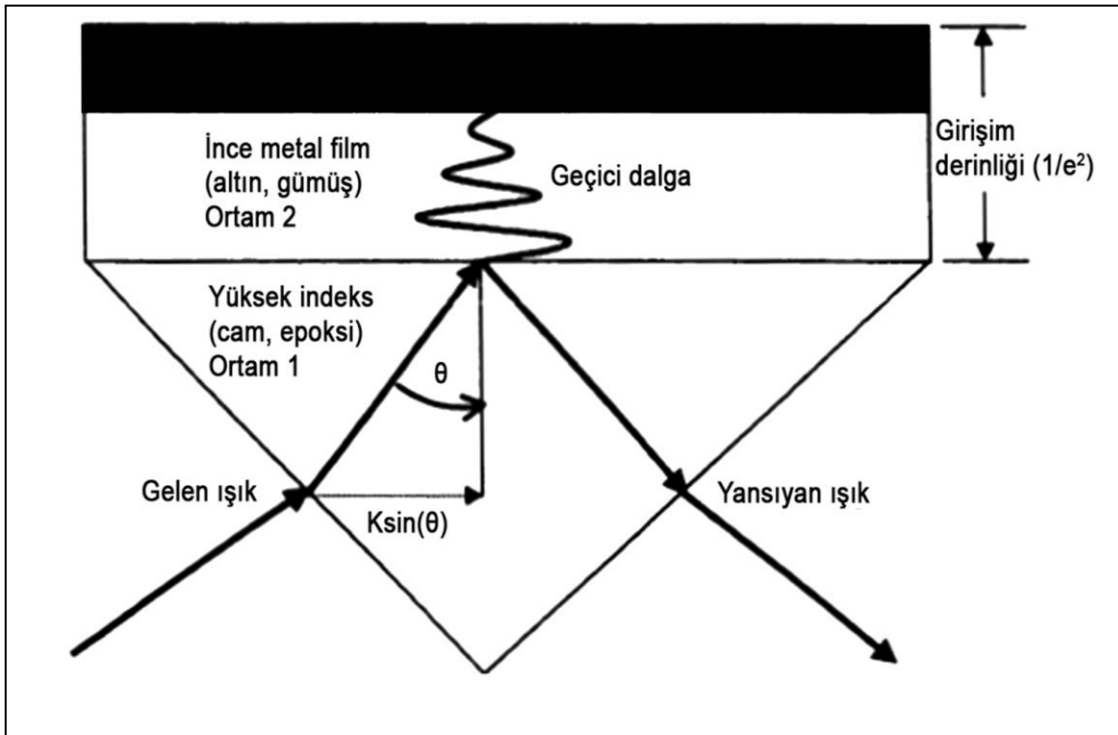
Kretschmann prizma yapısı, yüzey plazmon rezonans prizmalarının hazırlanmasında en sık kullanılan tasarımdır. Şekil 2.5'de görüldüğü gibi, metal film yüzeyindeki yük yoğunluk salınımını uyaran ışık demetinin toplam iç kırılması ile oluşan kendiliğinden sönümlü dalganın kullanıldığı bir yaklaşım vardır. Bu elektron salınımları, yüzey plazmonları olarak adlandırılmaktadır. Geçici alanın girişim derinliği ışığın dalga boyuna, ışığın geldiği ortam ile çevresinin kırınım açısı indekslerinin oranına ve fotonun parlaklığına bağlıdır. Enerji alanı yüzeyden uzaklaştıkça üstel olarak azalmaktadır. Bundan dolayı, girişim derinliği aniden düşmektedir (Şekil 2.5).

Girişim derinliği aşağıdaki eşitlikle tanımlanmaktadır:

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{\eta_1^2 \sin^2 \theta - \eta_2^2}} \quad (2.1)$$

Burada;

- η_1 ve η_2 , birinci ve ikinci ortamın kırınım açısı indeksi,
- θ , ışığın metal yüzeye geliş açısıdır.



Şekil 2.5. Dielektrik sınırlarda gerçekleşen toplam iç kırınım.

Metal yüzeye uygun p-polarize ışık, metal film ile birleşmek için prizmanın içerisine girer. Sadece p-polarize ışık plazmon oluşumuna sebep olmaktadır. Bunun nedeni sadece bu polarizasyonun metal film normaline uygun elektrik alan vektör salınımına sahip olmasıdır. Bu özellik, metal yüzeyindeki elektron plazmalarının transvers manyetik (TM) dalgası olarak adlandırılmaktadır [105, 106]. Oysa s-polarize, transvers elektrik (TE) polarizasyonu yüzey plazmonlarını oluşturamamaktadır. Çünkü s-polarize ışığın elektrik alan vektörü, metal filme

paralel olarak oluşmaktadır. Salınımların dalga vektörü (K_{sp}) aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_m + \epsilon_s}} \quad (2.2)$$

Burada;

- ω , salınımın frekansı,
- c , ışık hızı,
- ϵ_s , metal yüzeyine temas eden örnek ortamının dielektrik fonksiyonu,
- ϵ_m , metalin dielektrik fonksiyonudur.

Gelen ışığın bir bileşenine ait dalga vektörü aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

$$K_x = \frac{\omega}{c} \eta_p \sin \theta \quad (2.3)$$

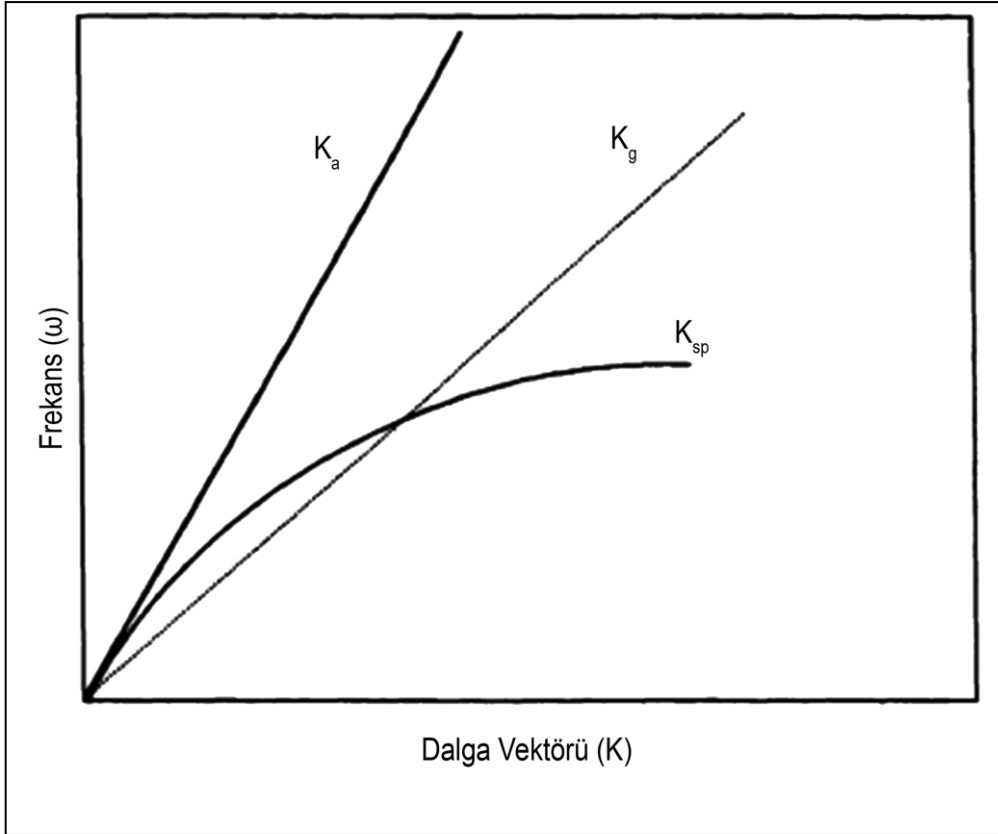
Burada;

- θ , ışığın metal film yüzeyine geliş açısı,
- η_p , prizmanın kırınım açısıdır.

Metal filmin üst yüzeyinde salınan ve toplanan yüzey plazmonları, p-polarize ışığı absorplar ve toplam iç kırınımına uğrayan ışığın parlaklığını (I_r) değiştirir. Bu nedenle, I_r 'e karşı geliş (veya kırınım) açısı (θ_r) grafiğe geçirildiğinde açısal parlaklık profili elde edilir. Bu profile ait grafikte, rezonans açısında keskin bir azalma gözlenir.

Bu olayın gerçekleşmesi, yüksek kırınım indeksine sahip bir prizma gerektirmektedir. Bu tip bir prizmaya gereksinim, havadaki ışık yayılması ile yüzey

plazmonların üretilmemesinden kaynaklanmaktadır. Yüzey plazmon rezonans sırasında, gelen ışığın ve yüzey plazmonun dalga vektörleri eşit olmalıdır. Fakat Şekil 2.6'da görüldüğü gibi, ışığın havadaki ($K_a: \omega/c$) ve metalin plazmonundaki (K_{sp}) dağılma eğrisi kesişmemektedir. Bundan nedenle, dalga vektörü ve frekansı eş zamanlı olarak çakıştırılmasına imkân yoktur. Bunun tersine; K_{sp} ve cam yüzeyin (K_g) dağılma eğrilerinin kesişmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Hava, cam ve yüzey plazmonları için dağılma eğrileri.

Yüzey plazmon dalga vektörü, metal filme yakın bölgedeki ortamın kırınma indeksi ile ilişkilidir. Bundan dolayı, K_{sp} eşitliği şu şekilde basitleştirilebilir:

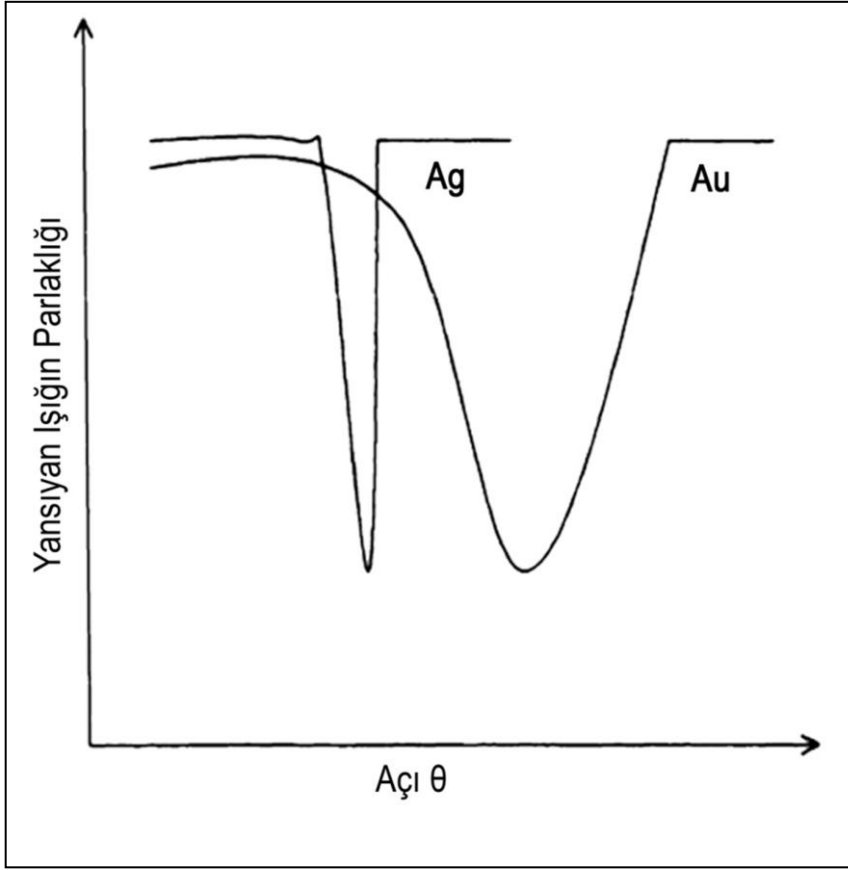
$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\eta_m^2 \eta_s^2}{\eta_m^2 + \eta_s^2}} \quad (2.4)$$

Bu formülde;

- η_m , metalin,
- η_s , örneğin kırınım indeksleridir.

Kompleks kırınım indeksi teriminin karmaşık bileşeni, absorbans ile ilişkilidir.

Yüzey plazmon rezonansın profili, seçilen metale göre değişiklik göstermektedir. Çünkü her metal, dielektrik geçirgenlik gibi farklı özgül optik özelliklere sahiptir. Şekil 2.7'de altın ve gümüş film için, yansıyan ışığın parlaklığına karşı gelen ışığın açısını gösteren eğriler verilmiştir. Gümüş daha keskin bir rezonans pikine sahiptir. Bu rezonans piki, metal filmdeki yüzey plazmon salınımlarının kendiliğinden azalması nedeniyle olmaktadır. Tüm yüzey plazmon metalleri, uyarılma ışığının elektrik alanının saçılmasına bağlı olarak bu salınımları azaltma eğilimindedir. Birçok metal yüzey plazmon üretebilir. Yüzey plazmon rezonans için kullanılacak olan metal, uygun açılı ışıkla rezonansa girebilecek iletkenlik bandı elektronlarına ve sensör olarak kullanılabilme için gerekli kimyasal modifikasyonlar için uygun özelliklere sahip olmalıdır. Altın belirtilen iki temel özelliğe birden sahip olan nadir metallere biridir. Bu özelliklere sahip olan diğer metallerde göre uygulaması oldukça kolaydır. Örnek olarak, indiyum gibi bazı elementler çok pahalıdır; sodyum gibi elementler oldukça reaktiftir; bakır, alüminyum gibi bazılarının yüzey plazmon cevapları çok geniştir veya gümüş gibi bazı elementler oksitlenmektedir [107].



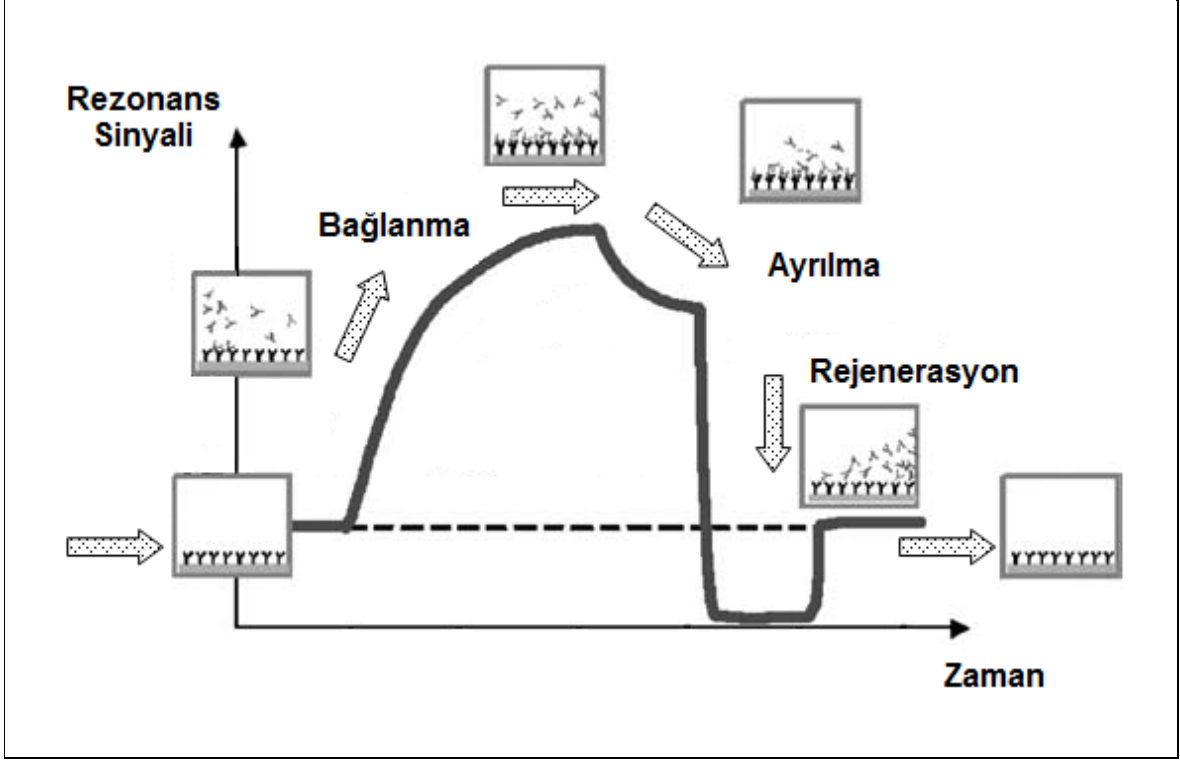
Şekil 2.7. Gümüş ve altına ait yüzey plazmon eğrileri [107].

Yüzey plazmon rezonansının (SPR) analitik bir cihaz olarak kullanılması, plazmon alanı aralığındaki çevrenin kimyasal bileşimindeki değişimin sebep olduğu ışığın rezonans açısındaki kaymanın ölçülmesine dayanmaktadır. Kimyasal bileşenlerdeki değişim absorplanan ışığın geliş açısında kaymaya neden olmaktadır. Açı kaymasının büyüklüğü, nicel olarak kimyasal değişimle ilgilidir. Bir sensörde, ince metal film üzerine substrat bağlanmış bir prizma (genel olarak cam ve plastik) üzerine uygulanır. Daha sonra özel bir analite (hormon, ilaç, tümör belirteci vb.) özgül moleküller metal film üzerine spesifik olmayan bir şekilde adsorplanır. Sensöre analit içeren örnek uygulandığında gerçekleşen etkileşim (antibadi ve analit bağlanması gibi) gelen ışığın rezonans açısındaki kaymanın ölçüldüğü metal yüzeyindeki kimyasal bileşen değişimine neden olur. Rezonans açısındaki kaymanın boyutu, örnek içerisindeki analitin miktarı ile orantılıdır. Moleküller arasındaki ilişki oldukça özgül olduğundan dolayı diğer moleküller sensör tarafından ölçülememekte ve çapraz-reaktivite gözlenmemektedir.

2.4.2. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler

SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan biyomoleküllerin etkileşimlerini ölçebilirler. Bu özellikleri nedeniyle, moleküler etkileşimlerin anlaşılması için bu cihazların önemi artmıştır. Etkileşimleri eş zamanlı, doğrudan ölçebilmek; kinetik, termodinamik parametrelerin, derişimin veya ligandlarla analitler arasındaki etkileşimlerin belirlenebilmesini sağlamaktadır. SPR temelli biyosensörlerin hızlı cevap süresi ve yüksek seçiciliği vardır. Enzim veya radyoışaretleme yöntemleri gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında SPR biyosensörler sahip oldukları bu özelliklerden dolayı, protein-protein, antibadi-antijen, reseptör-ligand etkileşimlerinden düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tanımlanmasına kadar değişen çok çeşitli biyomoleküler mekanizmaların anlaşılmasında kullanılabilir [7].

Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörler, metal yüzeyinde biyo-tanımayı sağlayacak bölgelerin oluşturulmasıyla elde edilir. Biyo-tanımayı sağlamak için antibadiler [108] ya da nanopartiküller kullanılabilir [109]. Hedef molekülü içeren çözelti biyosensörle etkileştiğinde hedef molekül sensör yüzeyine bağlanır ve yüzeyin yoğunluğunun artmasına neden olur. Yüzeydeki yoğunluk artışı yüzeyin kırılma indisinin artmasına neden olur. Kırılma indisindeki bu artış ise rezonans açısının kayması ile sonuçlanır. Bu etki zamana bağlı olarak incelenirse Şekil 2.8'dekine benzer bir sensorgram elde edilir. Şekil 2.8'de görüldüğü gibi, yüzeye analit bağlanması ile rezonans açısı artmaktadır. Desorpsiyon çözeltisinin sisteme verilmesiyle analit, yüzeyden ayrılmaya başlar ve belli süre sonra sinyal tekrar eski seviyesine döner.



Şekil 2.8. Tipik bir SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi.

Yaşam bilimlerinde ve farmasötik çalışmalarda makromoleküllerin ve onların etkileşimlerinin araştırılması için SPR biyosensörlerden yararlanılmaktadır. Ayrıca SPR biyosensörler çevresel kirleticilerin tespitinde [110, 111, 112], gıda teknolojisinde [113, 114, 115], hastalıkların teşhisinde [116, 117, 118] kullanılmaktadır.

Son yıllarda besin ve su kaynaklı patojenik bakterilerinin tespiti için immünosensör geliştirilmesine yönelik birçok çalışma yapılmıştır [94, 119, 120]. Yüze plazmon rezonans temelli biyosensörler, bu tip tespiti yönelik hazırlanan immüsensörlerden biridir. Önemli zirai patojenlerden biri olan *Phytophthora infestans*'ın tespitine yönelik hazırlanan SPR temelli biyosensörde tespit sınırı 2.2×10^6 spor/ml olarak tespit edilmiştir [121]. Yapılan başka bir çalışmada 1×10^6 ml'de *Salmonella Typhimurium*'un varlığı tespit edilmiştir [122]. Mauriz ve arkadaşları SPR temelli taşınabilir immünosensör ile doğal su örneklerinden karbonil analizi yapmışlardır [68]. Ortalama 15 nm büyüklüğündeki kolloid altın nanopartiküllerle güçlendirilmiş SPR temelli biyosensör ile 7.5 dakika gibi kısa bir sürede 14 pg/ml konsantrasyonunda estrol-16-glusuronit tespiti sağlanmıştır [123]. Yapılan diğer bir

çalışmada sudan profenofos tespiti için SPR temelli moleküler baskılanmış çok ince bir film tanıma elemanı olarak kullanılmıştır [124].

2.5. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Çevresel faaliyetleri görüntüleme, biyoterörizm tespiti ve besinlerdeki toksik kirleticilerin analizi için hedef moleküle özgü, önceden belirlenmiş seçicilik ve afiniteye sahip biyolojik ve kimyasal moleküllere olan ihtiyaç her zamankinden daha fazladır. Organizmalar söz konusu olduğunda moleküler yapılar “moleküler tanıma” olarak adlandırılan yapısal ayırım yapabilme yeteneğini kullanarak birbirleriyle etkileşip reaksiyona girerler. Bilim insanları bunun altındaki mekanizmayı anlamaya antijen-antibadi, enzim-substrat, hormon-reseptör, DNA ve RNA arasındaki etkileşimleri ortaya koyarak çalışmaktadırlar. Protein ve nükleik asit gibi yapıların, ligand seçiciliği özellikleri yanında kararlılık problemleri abiyotik çevrelerde kullanımını kısıtlamaktadır. Bu durum doğal eşlenikleriyle aynı seçiciliğe ve etkinliğe sahip yapay biyo-tanıma sistemlerinin geliştirilmesini tetiklemiştir. “Moleküler Baskılama” yapay moleküler tanıma için alternatif sağlamak için ortaya çıkan yeni bir teknolojidir. Moleküler baskılama yöntemi farklı matrikslerden iyonlar, organik moleküller ve biyomoleküllerin yüksek seçicilikte ayrılabilmesi için, akıllı polimerlerin üretilerek farklı uygulamalarda kullanılmasını yaygınlaştıran yeni bir teknolojidir [125].

Enzimatik kataliz ya da afiniteye dayalı ayırım gibi biyotanıma esaslı süreçlerde moleküller arası etkileşimler önemlidir. Moleküler baskılama yöntemi aracılığı ile farklı bileşikler için seçici istenilen özelliklerde polimer yapımı mümkündür. Bu teknik kalıp moleküllerin kullanımıyla özgül katalitik ve tanıma bölgelerinin oluşumuna olanak sağlar [126].

Moleküler baskılama tekniği, çapraz bağlı polimer matriks içerisinde boşluklar oluşturulması temeline dayanmaktadır. Bu boşluklar kalıp molekülün boyut ve şeklini tanıma özelliğine sahiptir. Kalıp molekülün herhangi bir desorpsiyon yöntemi ile uzaklaştırılması, sabit pozisyonlardaki fonksiyonel grupların ortaya çıkmasını sağlayarak, kalıp moleküle eşlenik yapı oluşturmaktadır. Hazırlanan

polimer, kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanıyarak, herhangi bir ortamda bu kalıbı seçici ve etkin bir şekilde bağlamaktadır. Moleküler baskılanmış polimer (MIP), bir kalıp molekülü, fonksiyonel monomer ve bir çözücü içindeki başlatıcıyı içeren bir karışımdan hazırlanır. Polimerizasyon boyunca kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında oluşan kompleks çapraz bağlayıcı monomer ile çevrelenerek polimerleştirilir. Böylelikle kalıp molekülün hapsedildiği üç boyutlu polimer ağı oluşturulur. Kalıp molekülün uzaklaştırılması oluşan boşluklar şekil, büyüklük ve moleküler etkileşimler açısından kalıp moleküle özgüdür. Moleküler baskılama için ön koşul kalıp molekül ve monomer arasında kararlı bir kompleks oluşumudur [127].

Moleküler baskılanmış polimerler, kalıp molekül için eşsiz seçiciliğe sahip olmalarının yanı sıra mekanik stres, ısı, asit, baz, su ve organik çözücülere karşı oldukça dirençlidirler [128]. Bu teknik; kromatografi, saflaştırma, kataliz, sensör, ilaç salınımı ve ön örnek uygulamaları gibi oldukça geniş bir alanda tanıma ve ayırma amaçlı kullanılmaktadır. Elde edilmeleri kolay ve ucuzdur. Performansında değişiklik olmaksızın bir kaç yıl boyunca saklanabilirler [129, 130, 131].

Moleküler baskılanmış polimerler, şekilsiz öğütülmüş partikül, düzgün şekilli partikül, nanopartikül, çelik kolonda monolit, kapiler kolondo monolit, açık boru kapilerde katman, yüzey tutturulmuş ince tabaka, membran ve kompozit şeklinde olabilir. Moleküler baskılama ile ilgili çalışmaların karakterizasyonu, optimizasyonu ve sonuçları hakkında birçok derleme yazılmıştır. Bu derlemelerin çoğu kiral tanıma ve [132, 133], kapiler elektrokromatografi (CEC) [134, 135, 136] hakkındadır. MIP'de monolit, partikül ve membran kullanımı gibi spesifik formlar ile ilgili derlemeler yazılmıştır [137]. MIP katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile zenginleştirme işlemlerinde [138], ilaç salınım sistemlerinde [139], antibadiler için reseptör ya da yapay enzim olarak [140, 141] kullanılmaktadır. Bütün bunların dışında matrikse iletken polimerlerin sokulduğu MIP'nin farklı çalışma konuları da çalışılmıştır [138].

MIP'nin sensörlerde kullanımı ise oldukça devasa ticari pazar alanına sahip olması nedeni ile güncel bir konudur. MIP temelli oldukça fazla sensör çalışması olmasına

rağmen, bazı çalışmalar elektrokimyasal ve optik sensörler gibi belirli konular üzerine yoğunlaşmıştır. Bu polimerlerin bazıları monoklonal antibadiler ve reseptörler gibi doğal tanıma sistemleriyle karşılaştırılabilir ölçüde yüksek seçicilik ve afiniteye sahiptirler. Buda onları oldukça uygun bir kimyasal sensör üyesi yapmaktadır. Sentetik reseptörler için kullanılan pek çok polimerin kaotik yapısı, heterojen gözenek büyüklüğü dağılımı ve bağlanma bölgelerinin matriks boyunca yer alması genellikle kütle aktarımını yavaşlatır. Her zaman problem olmamasına karşın bu özellikler moleküler baskılanmış polimerlerin genel uygulamalarda doğal reseptörlerin yerini almalarını önlerler. Bu problemi aşmak için nano yapılar devreye sokulmaya başlanmıştır. Nanopartiküller, biyomedikal, optik ve elektronik alandaki geniş uygulama alanı nedeni ile yığın malzemeler ile atomik ya da moleküler yapılar arasında bir köprü oldukları için çok büyük ilgi uyandırmaktadır [142].

2.5.1. Moleküler Baskılama Tekniği

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.9).

BASAMAK I: Ön-kompleksleşme

Fonksiyonel grup içeren polimerleşebilen uygun monomerler, kalıp moleküle kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanarak kompleks oluşturur. Bu basamakta, kalıp etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir yapı oluşumu söz konusudur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemli bir yer tutar.

BASAMAK II: Polimerizasyon

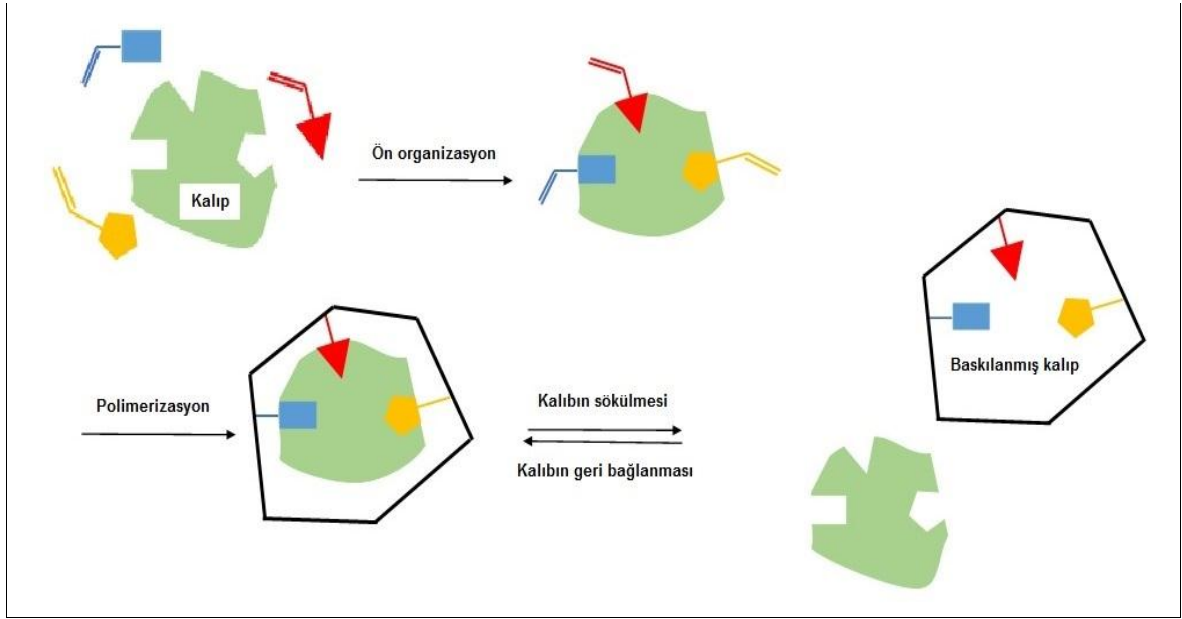
Monomer-kalıp kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcının da kullanılmasıyla fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

BASAMAK III: Kalıp 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 [143].

Kalıp molekülün, fonksiyonel monomerin, çapraz bağlayıcının, çözücünün ve başlatıcının seçimin etkin bir şekilde yapılması moleküler baskılama için çok önemlidir.



Şekil 2.9. Moleküler baskılama tekniğinin basamakları.

2.5.2. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Özelliklerini Etkileyen Faktörler

Polimer matriksin yapısı moleküler baskılamada çok önemlidir. Boşlukların özgül yapısı sadece düşük molekül ağırlıklı kalıpların etkisi ile değil, polimer zincirinin düzenlenişi ile de ilgilidir. Polimerin sertliği boşlukların kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra şekillerini korumasına olanak sağlar. Bu da yüksek oranda çapraz bağlayıcının kullanılması ile gerçekleşir. Kalıp molekülün polimere bağlanması baskılanacak substratı yönlendirir. Optimum spesifiklik ve seçiciliğe sahip polimerler uygun monomer ve çapraz bağlayıcı seçimi ile elde edilir.

Matriks yapısı, matriks konfigürasyonu, matriksin doğası, kullanılan kalıp, çapraz bağlanmanın derecesi gibi matriksin karakteristik özelliklerini belirleyen etkenler yeniden bağlanma üzerinde oldukça etkilidir. Polimer matriksdeki fonksiyonel monomerin polimerin yapısına rastgele girişi özgüllüğü azaltır. Polimerizasyon

sırasında kalıp ve monomer arasındaki etkileşim oldukça kuvvetli olmalıdır. İdeal olan kovalent etkileşimlerdir. Fakat desorpsiyonda yaşanan sıkıntılar ve yavaş bağlanma kinetiği tercih edilmesini engellemektedir. Moleküler baskılanmış polimerlerin en ideali desorpsiyon ve tekrar bağlanma için ılımlı koşulların olduğu non-kovalent bağlanmadır.

2.5.2.1. Kalıp Molekül

Baskılanan kalıp molekülün, fonksiyonel monomerle kompleks yapacak fonksiyonel grupları içermesi en önemli parametrelerden biridir. Kalıp molekülün hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim (karboksil, amino, hidroksil ve amid grupları) yapabilecek bölgeleri kompleks oluşumu için en çok tercih edilen bölgelerdir. Ayrıca kalıp molekül kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği koşullar altında kararlı kalmalıdır. Örneğin ısı bir başlatıcı seçildiği takdirde kalıp molekülün (ve/veya ön polimerizasyon kompleksin) yüksek sıcaklıklarda yapısında parçalanma olmaması yada UV ile başlatılan polimerizasyon koşullarında oluşturulan ön organizasyon kararlılığı göz önüne alınmalıdır. Kalıp molekülün konformasyonundaki ufak değişiklikler bile baskılama işleminin başarısını etkilemektedir [144]. Baskılanacak molekül olarak ilaçlar, aminoasitler, karbonhidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler ve iyonlar kullanılabilir [145].

2.5.2.2. Fonksiyonel Monomer

Moleküler baskılama ile ilgili çalışmaların çoğunluğu vinil ya da akrilik grup içeren monomerlerin serbest radikal polimerleşmesi ile oluşan organik polimerleri içerir. Diğer çalışmalar ise polistiren ve polisiloksan ağırlıklıdır.

Fonksiyonel monomerler bağlanma bölgelerindeki bağlanma etkileşimlerinden sorumludur. Moleküler baskılanmış polimerlerde kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki geri-bağlanma basamağı çok önemli olduğu için fonksiyonel monomerlerin seçimi kritiktir. Fonksiyonel monomer için anahtar eleman, etkileşimin gerçekleşmesi için uygun bağlanma bölgelerinin sayısıdır. Kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki sterik ve elektronik etki sayesinde kopolimerizasyon gerçekleşir. Asidik bazik ve nötral özelliklere sahip

yaygın olarak kullanılan bazı fonksiyonel monomerler vardır. Kovalent baskılamada, kalıp molekül vinil gruplarına kovalent olarak bağlanır. Akrilik asit amitleri ve esterleri veya metakrilik asit en sık kullanılan monomerlerdir. Kovalent olmayan baskılamada, uygun fonksiyonel gruplara bağlı vinil monomerleri kullanılır.

Rijit ve çözünmez yapıdaki baskılanmış polimerler oldukça fazla bağlanma bölgelerine sahipken, biyolojik reseptörler esnek, çözünür ve tek bağlanma bölgesine sahiptir. Genellikle polar olmayan çözücülerde hazırlanan polimerlerde farklı fonksiyonel monomerler kullanılabilmesine rağmen, polar çözücülerde kuvvetli hidrojen bağları yapan akrilamidler kullanılabilir.

Moleküler baskılamada organik çözücü kullanıldığı durumlarda çapraz bağlayıcı olarak genellikle divinil benzen (DVB) ve etilen glikol dimetakrilat (EDMA) kullanılmaktadır.

2.5.2.3. Çapraz Bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcılar hem bağlanma bölgelerini sabitleyerek hem de mekanik kararlılık sağlayarak morfolojinin kontrolüne imkân verirler. Çapraz bağlayıcılar aynı zamanda polimerlerin çözücüde çözünmesini zorlaştırdıkları için pratikteki kullanımlarını kolaylaştırır.

MIP hazırlanırken bir diğer önemli nokta çapraz bağlayıcının seçimidir. Çapraz bağlayıcı, kalıbın polimerden uzaklaştırılmasından sonra kararlı ve analiti hafızasında tutan polimer ağ örgüsü oluşturmak için kullanılır [146]. Çapraz bağlayıcı, matriksin morfolojisinin kontrol edilmesini (jel tipi, makro gözenekli ya da mikro jel halinde olması), baskılanmış molekülün veya iyonun bağlanma bölümlerinin kararlı olmasını, polimer matriksin mekanik kararlılığının yüksek olmasını sağlar. Yüksek oranda çapraz bağlanma, polimer matriksin çözücüde çözünmesini önler ve kullanımı kolaylaştırır. Etkili bir baskılama için çapraz bağlayıcının reaktifliği ile fonksiyonel monomerin reaktifliğinin uygunluğu, çapraz bağlayıcı ajanın fonksiyonel monomere olan mol oranı önemlidir. Aksi takdirde

fonsiyonel monomerden veya çapraz bağlayıcıdan biri polimerizasyon sırasında baskın çıkabilir ve homojen kopolimerizasyon gerçekleşemez. Farklı çapraz bağlayıcı/fonksiyonel monomer derişim oranları moleküler baskılanmış polimerlerdeki farklı sayıda bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olur ve bu da seçiciliği etkiler [147]. Eğer mol oranları çok küçükse, kalıp molekülün bağlanma bölgeleri birbirlerine çok yaklaşır. Hedef molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından kapatılır ve etkin bir sonuç elde edilemez. Çok büyük mol oranlarında da çapraz bağlayıcılar fonksiyonel monomerlerle veya kalıp molekülle kovalent olmayan etkileşimler göstermesi sonucu baskılamanın etkinliği yine azalmaktadır [143, 148]. Organik çözücülerde moleküler baskılama için etilen glikol dimetakrilat (EDMA) ve divinil benzen (DVB) en sık kullanılan çapraz bağlayıcıdır. Etkin bir baskılama için çapraz bağlayıcının reaktivitesi fonksiyonel monomerin reaktifliğine yakın olmalıdır.

2.5.2.4. Çözücü

Moleküler baskılamada çözücüler polimerleşme süresince gözenek yapıcı ve yeniden bağlanma ortam sağlayıcısı olarak görev yaparlar. Oluşturulan gözeneklerin görevi yeniden bağlanmanın kolay gerçekleşmesini sağlayan kütle aktarımına olanak sağlamasıdır.

Çözücüler, polimerizasyonda baskılanacak molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı gibi tüm bileşenlerin tek fazda bulunmasını ve polimerde gözeneklerin oluşmasını sağlar. Makrogözenekli polimerin hazırlanması aşamasında; çözücü, gözeneklerin yapısı ve seviyesi, morfolojisi ve toplam gözenek hacmini kontrol etmek için önemli bir unsurdur. Çözücünün baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu artırma gibi bir görevi de vardır. Gözeneklilik bağlanan hedef molekülün polimerden salınmasını kolaylaştırır. Çözücünün baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu artırma gibi bir görevi de vardır. Çözücülerin bir diğer görevi de polimerizasyon sırasında reaksiyon ısısını eşit olarak yaymaktır. Aksi takdirde, polimerizasyon sırasında reaksiyon sıcaklığı bölgesel olarak artar ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna neden olur. Çözücü seçimi baskılamanın türüne bağlıdır. Kovalent baskılamada, tüm bileşenleri iyi çözebilecek birçok çözücü kullanılabilir.

Kovalent olmayan baskılamada, etkileşimin oluşumunu ve baskılama etkisini artırmak için çözücü seçimi daha önemlidir [143]. Polimerizasyon çözücüsü, monomerlerle baskılanacak molekül arasındaki hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler gibi polar etkileşimlerin oluşmasını sağlamak için az polar ve aprotik olmalıdır. Genellikle sentez için polar olmayan organik çözücülerin kullanıldığı MIP'ler polar organik çözücülerin kullanıldığı MIP'lerden daha iyi seçiciliğe sahiptir [149]. Hazırlanan polimerin analite seçiciliği ile oluşan kavitenin analite tam uygun boyutta olması yani ne çok dar ne de çok gevşek olması çözücü seçimine bağlıdır.

2.5.2.5. Başlatıcılar

Radikalik polimerizasyon, radikal başlatıcıların ısı bozunmasıyla başlatılabilir. Monomer ile kalıp molekül arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin çok zayıf olduğu durumlarda çok yüksek sıcaklıklara çıkılmaz. Düşük sıcaklıklarda etkili olan fotokimyasal başlatıcılar tercih edilir. Genellikle 2,2'-azobis(izobütironitril) (AIBN) ve 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (ADVN) kullanılır. Bu koşullarda, ısı bozunma yerine UV bozunma tercih edilmektedir.

2.5.2.6. Sıcaklık

Kalıp molekül ve monomer arasındaki denge pozisyonu hem sıcaklığın hem de basıncın ürünüdür [150].

Önceki çalışmalar göstermiştir ki düşük sıcaklıklar, oldukça kuvvetli olan elektrostatik etkileşimler yüzünden MIP'de tercih edilmektedir. Düşük sıcaklıklarda polimerleşme yavaş ve zincir oluşumu monomer-kalıp oluşumuna müdahale etmemektedir.

2.5.3. Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak, fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında oluşan bağın çeşidine göre ikiye ayrılır. Kovalent ve kovalent olmayan baskılama.

2.5.3.1. Kovalent Baskılama

Ön organizasyonlu moleküler baskılama yaklaşımında, polimerizasyondan önce baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomerler arasında kuvvetli, tersinir bir kovalent düzenleme oluşur. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp oluşturmak amacıyla polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül baskılanmış polimerlerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağ yeniden oluşur [151, 152].

Avantajları:

Monomer-kalıp kompleksi oldukça kararlıdır ve sitokiyometrik oranlarda gerçekleşir. Polimerizasyon koşulları (yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve polar solventler gibi) istenildiği gibi uygulanabilir. Çünkü konjugatlar kovalent bağlarla oluşturulmuştur ve oldukça kararlıdır [153].

Dezavantajları:

Monomer-kalıp molekül konjugatının sentezinde sık sık sorunlar çıkabilir ve sentez süreci pek ekonomik değildir. Hedef molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısı sınırlıdır. Kovalent bağ oluşumu nedeni ile bağlanma kinetiği yavaştır [154].

2.5.3.2. Kovalent Olmayan Baskılama

Fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması kovalent olmayan (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler, koordinasyon bağ oluşumu) etkileşimlerle gerçekleşir. Polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül ile baskılanmış polimerler kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır [155].

Avantajları:

Kovalent monomer-kalıp konjugatının sentezine gerek yoktur. Polimerizasyondan sonra kalıp molekül polimerden kolayca uzaklaştırılır. Çünkü kovalent olmayan etkileşimler daha zayıftır. Hedef molekülün bağlanma kinetiği hızlıdır [156].

Dezavantajları:

Polimerizasyon koşulları, kovalent olmayan etkileşimleri artırmak amacıyla sınırlıdır. Fonksiyonel monomerler, bağ oluşum dengesini artırmak amacıyla

fazlaca kullanılır ve özgül olmayan bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olabilir [157]. Moleküler etkileşimlerin farklılığı, seçiciliğin ve tersinirliğin derecesini etkiler. Örneğin kovalent bağlarla oluşturulan etkileşimler oldukça özgüldür. Ancak geri bağlanma kinetiği yavaştır. Bununla beraber, hidrofobik etkileşimlerin kinetiği daha hızlıdır. Fakat seçiciliğinde azalma gösterir. Genel olarak kovalent olmayan etkileşimler birçok bileşiğe uygulanabilir olmaları, hızlı kinetiği ve daha uygun koşullarda bağ oluşumu ve kırılma özellikleri göstermeleri nedeniyle daha geniş uygulama alanlarına sahiptir. Dahası π - π etkileşimleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi non-kovalent etkileşimler yeni moleküler baskılanmış fonksiyonel polimerlerin tasarımı için gelecek vaat etmektedirler.

2.5.4. Baskılama İşleminin Kontrolü

Moleküler baskılanmış polimerlerin yüksek seçicilikte tanınması ve baskılanmış polimerler tarafından bağlanması, materyalin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Moleküler baskılanmış polimerlerin daha kullanışlı olmaları için, substratın seçiciliğinin önemi yanında, uygun koşullar altında desorpsiyon ve geri bağlanma kinetiğinin de hızlı olması gerekir. Bu yüzden moleküler baskılanmış materyallerin tasarımı yapılırken uygun bağlanma etkileşimlerinin seçimi çok önemlidir. Birden fazla bağlanma bölgesinin olması, monomerin bağlanma bölgeleri ile kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin daha iyi olması, dolayısıyla moleküler tanımanın daha seçici olmasını sağlar.

Yapılan çalışmalar baskılanmamış polimer ile karşılaştırmalı olarak yürütülür. Bu 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. Fark bu etkileşimlerin gücü arasındadır. Eğer polimerizasyon basamağı esnasında iyi tanımlanmış boşluklar oluşturulmuşsa baskılanmış polimerdeki etkileşimler daha güçlüdür. Etkileşimdeki bu hassasiyet, kalıp molekülün üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasından kaynaklanmaktadır. Boşlukların varlığı bağlanma deneyleri ve kromatografik ölçümler gibi çeşitli yöntemlerle incelenebilir. 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. Bu yaklaşım sıvı kromatografisi (LC) ve katı faz ekstraksiyonu (SPE) uygulamalarında baskılanmış polimerlerin karakterizasyonu içinde kullanılır [158].

2.5.5. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları

Moleküler baskılanmış polimerler farmakolojik, analitik ve biyolojik seçici moleküler tanıma alanları, kontrollü salınım sistemleri sensörlerde tanıma elemanı olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar [159]. Sıvı kromatografi, kapiler elektroforez, kapiler elektrokromatografi ve katı faz ekstraksiyon gibi analitik tekniklerde MIP'lerin kullanımına yönelik çalışmalar sürekli artmaktadır [126, 160].

Kimya ve ilaç endüstrisindeki artan pazar fırsatlarına bağlı olarak moleküler baskılanmış polimerlerin su saflaştırma ve atık malzeme değerlendirme işlemleri gibi ayırma alanındaki uygulamaları giderek artmaktadır. Sadece kromatografi kolonlarının satışının yılda 500 milyon ABD dolarına yaklaştığı ve membran ayırma teknolojisi pazarında yıllık 1 milyar ABD doları civarında büyüme olduğu tahmin edilmektedir. Moleküler baskılanmış malzemelerin afinite ayırma, katı faz ekstraksiyonu ve sert şartlar altında (organik ve toksik ortamlar, düşük ya da yüksek pH'lar, yüksek sıcaklıklar ve basınç gibi) ayırma alanında bu pazarda %1-3 oranda yer alması beklenmektedir [161].

MIP adsorbentler, ilaçların katı faz ekstraksiyonunda, proteinlerin, amino asitlerin, DNA ve RNA'nın, peptidlerin, hormonların ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılmaktadır [162]. MIP'lerin bir diğer potansiyel kullanım alanı olan bazı temel araştırmalar, ilaç tasarımı, optik gibi alanlarda önemli olan kiral bileşiklerin ayrılmasıdır [163, 164, 165].

Bir diğer uygulama alanı ise sensörlerde tanıma elemanı olarak kullanımlarıdır. Bir kimyasal veya biyosensör, bir tanıma elementi ve onunla bağlantılı çevirici içerir ve bu çeviricilerin görevi, analitin bağlanmasıyla oluşan değişimi, ölçülebilir bir sinyale dönüştürmektedir. Bu sensörlerde kullanılan biyomoleküller çoğunlukla zayıf

fiziksel ve kimyasal kararlılık gösterirler. Bu nedenle 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 sensor baskılı-polimer membran ince filmi içeren bir alan-etki kapasitörüdür ve analitin bağlanmasıyla kapasitansta meydana gelen değişim ölçülmüştür [166]. Daha sonra ise elektrokimyasal [167, 168] ve optik [169, 170] çeviricilere dayalı başka sensörler geliştirilmiştir [171].

Moleküler baskılamayla hazırlanan polimerler aminoasit türevleri, ilaçlar ve şeker türevlerinin kiral ayırımı için, organik reaksiyonlarda enzim benzeri olarak ve iyon seçici absorbanlar olarak başarıyla kullanılmaktadır [149]. Son yıllarda moleküler baskılama temelli elektrokimyasal ve optik sensörler hakkındaki yayınların sayısı hızla artmaktadır [172, 173].

2.6. Endokrin Bozucular

Endokrin bozucular endokrin sistemin gelişimi ve işlevini etkileyen maddelerdir. Bu maddeler hormonların üretim, taşınım, bağlanma, aktivite gösterme, parçalanma ve vücuttan atılımları üzerine etki göstermektedir. Endokrin bozucu bu maddeler doğada bulunabildiği gibi sentetik olarak da elde edilmektedirler [174, 175]. Çizelge 2.5'de doğada doğal ve sentetik olarak bulunan endokrin bozucular verilmiştir. Endokrin bozucuların tayini için farklı araştırmacılar tarafından birçok biyosensör hazırlanmıştır (Çizelge 2.6) [66, 67, 176, 177, 178].

17 β -östradiol (E2), östron (E1) gibi doğal östrojenler ve 17 α -etinilöstradiol gibi sentetik östrojenler, insan ve hayvan tarafından idrar yoluyla çevreye ve atık sulara ulaşır. İnsan ve hayvan dışkıları kayda değer miktarda doğal östrojen ihtiva etmektedir [179]. Geleneksel biyolojik atık su arıtma tesislerinden ayrılan sudaki östrojenik hormon (özellikle 17 β -östradiol, östron, östriol) derişimleri litrede birkaç nanogram (ng/L) ile birkaç mikrogram (μ g/L) aralığındadır. Bu mikrokirleticiler endokrin bozucu kimyasal özelliğe sahiptir ve pek çok türün (insanlarda dâhil) endokrin sistemine ng/L seviyesinde bile zarar verdiği saptanmıştır [180]. Doğal steroid östrojen adı verilen insan ve hayvan kaynaklı steroid hormonlar, dışsal

endokrin bozucu kimyasallar (EDC) ve sentetik kimyasallarla karşılaştırıldığında oldukça yüksek östrojenik aktiviteleri ile karakterize edilmiş ve içsel steroid endokrin bozucu kimyasallar olarak sınıflandırılmıştır [181]. İçsel steroid östrojenlerin dışsal endokrin bozucu kimyasallara göre 10,000-100,000 kat daha fazla östrojenik aktiviteye sahip olduğunu rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra hayvan atıklarının uygulandığı toprak arazileri çevresel östrojenlerin bir diğer kaynağıdır [182].

Çizelge 2.5. Doğada doğal ve sentetik olarak bulunan endokrin bozucular [183].

| | |
|------------------------------|-----------------------------|
| A. SENTETİK KÖKENLİ | Ftalat |
| HORMONLAR | Bisfenol A |
| 17 α -Etinilöstradiol | p-Nonfenol |
| Dietilbestrol | PCB'ler |
| 17 β -Trenbolon | Tribütin |
| BİTKİ ÖLDÜRÜCÜLER | B. BİYOLOJİK KÖKENLİ |
| Atrazin | HORMONLAR |
| Simazin | 17- β -Östradiol |
| Metaklor | Östriol |
| BÖCEK ÖLDÜRÜCÜLER | Östron |
| DDT | Progesteron |
| Dieldrin | Testesteron |
| Endosülfan | Fitoösteron |
| Lindan | Sesquiterpen |
| ENDÜSTRİYEL KAYNAKLAR | Fitosterol |

Çizelge 2.6. Endokrin Bozucular için Biyosensörler.

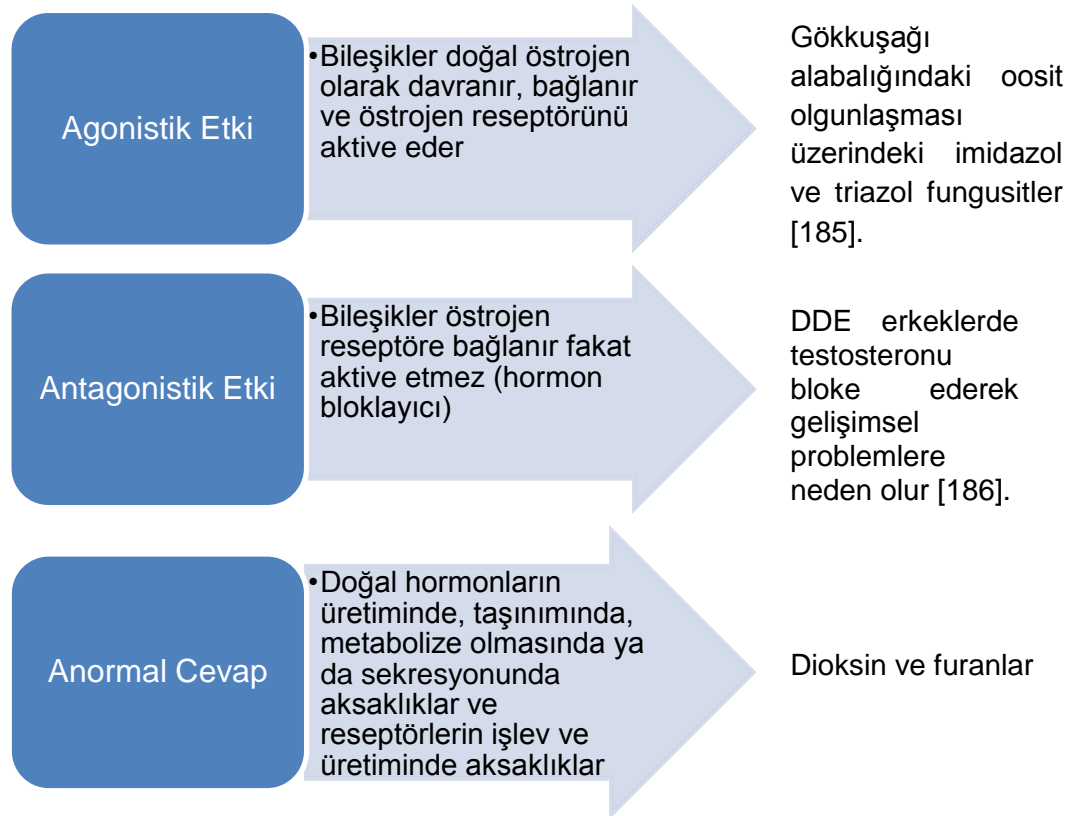
| Çevirici Sistem | Biyolojik Tanıma Materyali | Özellik | Kaynak |
|-----------------|----------------------------|--------------------------|--------|
| Optik | Rekombinant maya | | [176] |
| Optik (SPR) | Östrojen reseptörü | 0.1 µg/L (östradiol) | [66] |
| Elektrokimyasal | Enzimatik (tirozinaz) | | [67] |
| Elektrokimyasal | Östrojen reseptörü | 0.02 µg/L (östradiol) | [177] |
| Optik (SPR) | Östrojen reseptörü | | [178] |

Kümes hayvanlarının çöplerinin döküldüğü üretim arazilerinde östrojen derişimi araziye bitişik gölcük/havuz ve akarsularda 2350 ng/L'ye, toprakta ise 675 ng/kg'a yükseldiği tespit edilmiştir [182]. Atık su temizleme işlemleri de bir diğer östrojen kaynağıdır [184]. Bu kirleticilerin yüksek düzeylerinin biyokatıllardan geldiği ve daha sonra biyokatı uygulama arazilerine geçtiği düşünülmektedir. Atık su arıtma işlemleri sonucunda uzaklaştırılamamış östrojen ng/L seviyelerinde sulara geçtiğinde yüksek sorpsiyon özelliklerinden dolayı nehirlerde çökelti oluşturur [182].

Endokrin bozucular kimyasal yapılarına göre değil, endokrin sistem üzerindeki etkilerine bakılarak tanımlanır. Endokrin bozucuların oluşturacağı olumsuz etkiye maruz kalınan doz ve etkilenme süresi de ortaya çıkacak etki için önemli faktörlerdendir. Etkilenme süresi uzadıkça veya doz arttıkça oluşabilecek olumsuz etki daha da şiddetli olabilmektedir [10]. Endokrin bozucu maddelerin etki mekanizmaları çok karmaşıktır. Şekil 2.10'da endokrin bozucuların etki mekanizmaları ve örnekleri özetlenerek sunulmuştur.

2.7. 17-β-östradiol

Sudaki çözünürlüğü 3.6 mg/L olan 17-β-östradiol en aktif östrojen olarak görülen model bir kontaminanttır [11]. Yumurtalıklar tarafından ve hamilelik esnasında plasenta tarafından da sentezlenir. Erkeklerde de bulunur; fakat çok daha düşük derişimlerde. Dişilerde seks hormonlarının gelişimini, ikincil cinsiyet karakterlerinin meydana gelmesini ve devam etmesini sağlayan E2'nin diğer steroid hormon sentezi yapan bezlerdeki gibi, sentezi kolesterol üzerinden başlamaktadır [12]. Sentez edilerek kana verilen östrojen hormonu depo edilememektedir. Serumda E2'nin %97'den fazlası plazma proteinlerine bağlı olarak taşınmakta olup, bunun %60'ı albümine, geri kalanı ise seks hormon bağlayıcı globülinlere (SHBG) bağlı haldedir. Hormonun sadece %1-3 kadarı kanda serbest şekildedir. E2'in serbest ve albümine bağlı kısımları biyolojik olarak aktiftir [13].



Şekil 2.10. Endokrin bozucuların etki mekanizmaları.

17-β-östradiol anabolik etkilerinden dolayı hayvanların besiyeye çekilmesinde [187] illegal olarak kullanılır. Bunun yanı sıra hayvanlarda meydana gelen enfeksiyonları önlemek ve tedavi etmek amacıyla da kullanılmaktadır [188]. Endokrin sistemdeki

değişiklikler 17-β-östradiole maruz kalmış hayvanlarda büyüme, gelişme ve üremenin değişmesine neden olabilir. Bu değişiklikler daha sonra herhangi bir yaşam döneminde ifade edilebileceği gibi gelecek nesillerde bile ortaya çıkabilir [189, 190]. Kanalizasyonlarda östrojenik bileşiklerin bulunması plazma vitollogeninin indüklenmesi ve nehir ağzına yakın habitatlarda bu bileşiklere maruz kalmış balıklarda cinsiyet değişikliklerine yol açabilir [190, 191].

17-β-östradiol bir karsinogen olarak düşünülür. Çünkü bu molekül hem tümör başlatıcı hem de tümör arttırıcı etkiler ortaya çıkarır [188]. Son birkaç on yıldır insan dişi doğurganlığında düşüş gözlenmiştir [192]. Bunun yanı sıra;

- Göğüs kanseri
- Cinsel davranışta değişiklikler
- Erkek ve dişide doğurganlık problemleri
- Erkek üreme sistemi üzerine ters etkiler
- Öğrenmede gecikme ve yetersizlik
- Testis kanseri
- Prostat kanseri
- Bağışıklık sistemi etkileri
- Tiroid etkiler
- Endometriosis [192] gibi rahatsızlıklar ve sağlık problemleri insanlarda görülebilir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

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

- Fonksiyonel monomer N-Metakriloil-(L)-lösin metil ester (MALM) monomerinin sentezi,
- MALM-östradiol önkomplesinin hazırlanması,
- Poli (2-hidroksietil metakrilat-MALM)-östradiol nanofilm (PHEMALM-östradiol) hazırlanması,
- MALM, MALM-östradiol önkomplesinin karakterizasyonu
- PHEMALM nanofilmin karakterizasyonu,
- Östradiol baskılanmış PHEMALM-östradiol nanofilm ve baskılanmamış PHEMALM nanofilm sensörün sulu çözeltilerden farklı derişimlerdeki östradiol bağlanması için SPR analizlerinin gerçekleştirilmesi,
- Östradiol baskılanmış nanofilm PHEMALM-östradiol sensörün stigmasterol ve kolesterolün bulunduğu ortamda seçiciliğinin incelenmesi.
- PHEMALM-östradiol sensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

PMALM-östradiol nanofilmin hazırlanmasında kullanılan temel bileşenlerden 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), L-lösin metil ester, metakriloil klorür, 2,2'-azobisisobütironitril (AIBN), etilenglikoldimetakrilat (EDMA), kalıp molekül olarak kullanılan 17- β -östradiol, asetonitril (ACN), toluen, seçicilik çalışmalarında kullanılan stigmasterol ve kolesterol (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Reaktifler kullanılabildiği kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir ve analitik saflıktadır.

Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat zar (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve iyon değıştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun direnci 18M Ω /cm'dir. Deneylerde kullanılan cam malzemeler bir gece boyunca 4.0 M nitrik asitte bekletilerek temizlenmiştir.

3.2. N-Metakriloil-(L)-lösin Metil Ester (MALM) Monomerinin Sentezi

N-Metakriloil-(L)-lösin metil ester (MALM) monomerinin sentezi kısaca şöyledir: L-Lösin metil ester (5.0 g) ve hidrokinoon (0.2 g) diklorometan (CH_2Cl_2) (100 ml) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C 'a soğutulmuştur. Trietilamin (12.7 g) bu çözeltiye ilave edilmiştir. Metakroil klorür (5.0 ml) yavaşça bu çözeltinin üzerine dökülmüştür. Tepkime karışımı azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda tepkimeye girmeyen metakroil klorür, %10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MALM) etil alkolde çözülmüştür [193].

3.3. MALM Monomerinin İnfared Spektrumu

FTIR spektrofotometresi (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) kullanılarak MALM monomerinin FTIR spektrumu elde edilmiştir. MALM monomeri (2 mg), KBr (98 mg, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen bir şekilde karıştırılmış ve tablet haline getirilmiştir. $4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında FTIR spektrumu çekilmiştir.

3.4. Yüzey Plazmon Rezonans Çip Altın Yüzeyinin Allil Merkaptan ile Yüzey Modifikasyonu

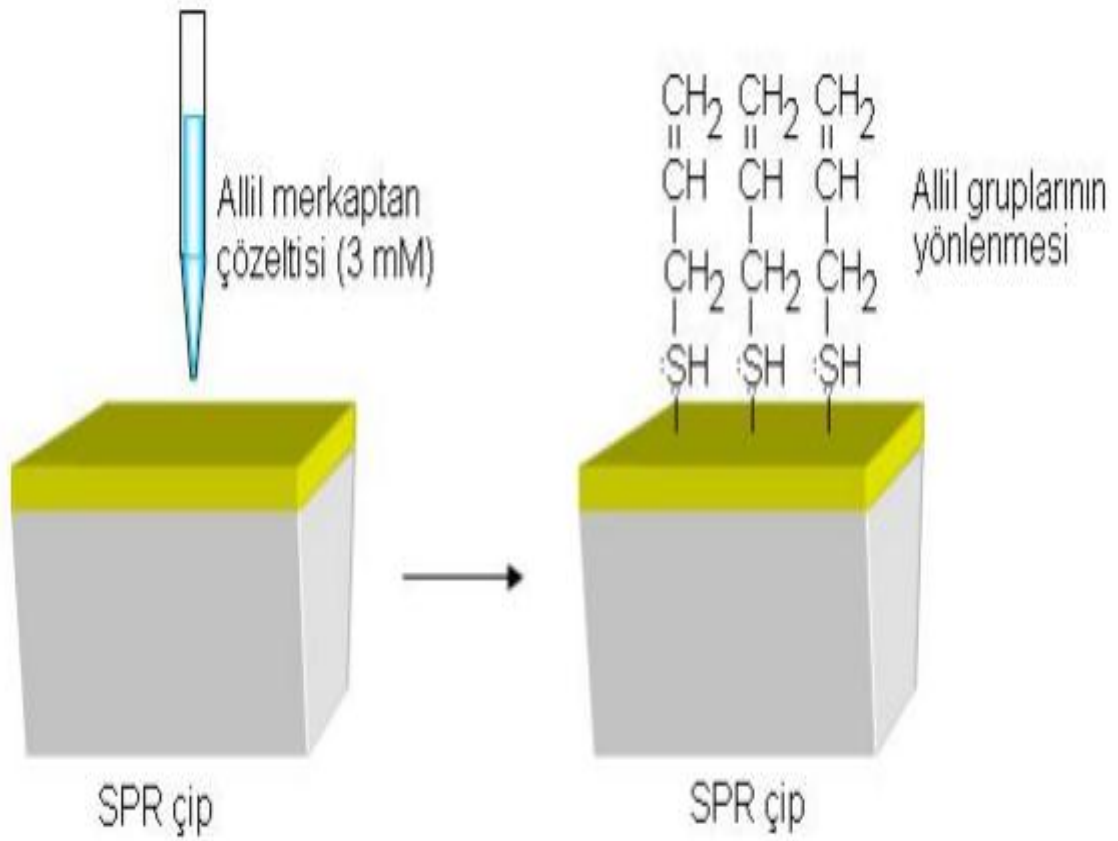
Yüzey plazmon rezonans çip altın yüzeyinin modifikasyonu allil merkaptan ($\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$) ile yapılmıştır (Şekil 3.1). Modifikasyon öncesi altın yüzey asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiştir. 20 ml asidik pirana çözeltisi içine daldırılan altın yüzeyler 20 saniye çözelti içinde kalmıştır. Çözeltiden çıkarılan çipler saf etil alkol ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) 3 saat kurutulmuştur. Temizlenen SPR 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 SPR çip yüzeyine allil grupları bağlanmıştır.

3.5. E2 Baskılanmış PHEMALM-östradiol Baskılanmış ve Baskılanmamış PHEMALM Nanofilmlerin Hazırlanışı

E2 seçici moleküler baskılanmış nanofilm, MALM-östradiol ön kompleksinin HEMA fonksiyonel monomeri ve EGDMA çapraz bağlayıcısı eşliğinde polimerleştirilmesinden elde edilmiştir. MALM-östradiol ön kompleksi kalıp molekül olarak östradiol, fonksiyonel monomer olarak MALM monomerinin etkileşimiyle hazırlandı. Bunun için 28 mg 17- β -Östradiol, 210 μ l MALM ile 1:4 (mmol) kalıp molekül, fonksiyonel monomer oranı sağlanarak kompleksleştirildi. MALM-E2 ön kompleksine 700 μ l toluen ve 1000 μ l ACN aprotik çözücü karışımı eklenerek ön kompleksin homojen çözeltisi hazırlanmıştır. Çözölmüş olan MALM-E2 ön kompleksine 150 μ l HEMA monomeri ve 470 μ l EDMA çapraz bağlayıcı eklenerek sonikatörde 10 dakika çözümleri sağlandı. Polimer çözeltisinden 5 dakika N₂ gazı geçirilerek çözönmüş O₂ ortamdan uzaklaştırıldı. Başlatıcı olarak 10 mg AIBN eklendikten sonra daha önceden alımlanmış çip üzerine 1 μ l çözelti damlatılmıştır. Hazırlanan çip, UV lamba altına konularak 40 dakika fotopolimerizasyon ile polimerleşme sağlanmıştır. Reaksiyona girmeyen monomer etil alkol ile uzaklaştırılmıştır. Kalıp molekül, monomer ve çapraz bağlayıcı oranı 1:15:24'dür. Çözelti içindeki monomer yüzdesi %30 (w/v) olarak belirlenmiştir. E2 baskılanmamış nanofilm, baskılanmış polimer çözeltisi içine östradiol eklenmeden aynı şekilde hazırlanmıştır.

3.6. Kalıp Molekül E2'nin Uzaklaştırılması

Oluşan polimerik nanofilmden kalıp molekül E2'nin uzaklaştırılması için %20'lik etilen glikol çözeltisi kullanılmıştır. E2 baskılanmış nanofilm oda sıcaklığında %20'lik etilen glikol çözeltisiyle her on dakikada bir desorpsiyon çözeltisi yenilenerek bir saat boyunca yıkanmıştır. Bu işlem kalıp molekül E2'nin 279 nm'de UV spektrofotometresiyle tayin edilmeyene kadar tekrarlanmış, desorpsiyon çözeltisi ile uzaklaştırılan E2'nin oranı %87 olarak tespit edilmiştir.

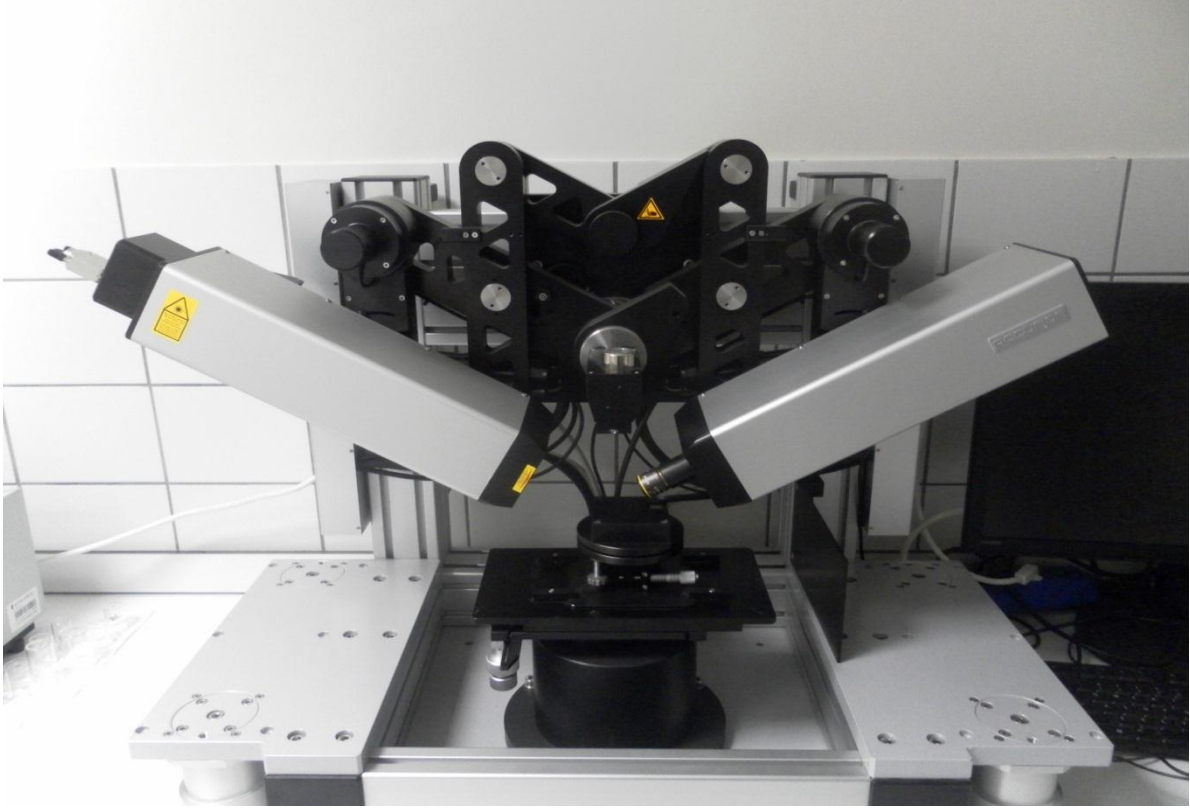


Şekil 3.1. Allil merkaptan ile yüzey modifikasyonu ve allil gruplarının bağlanması.

3.7. SPR Sensörlerin Karakterizasyonu

3.7.1. Elipsometre Ölçümleri

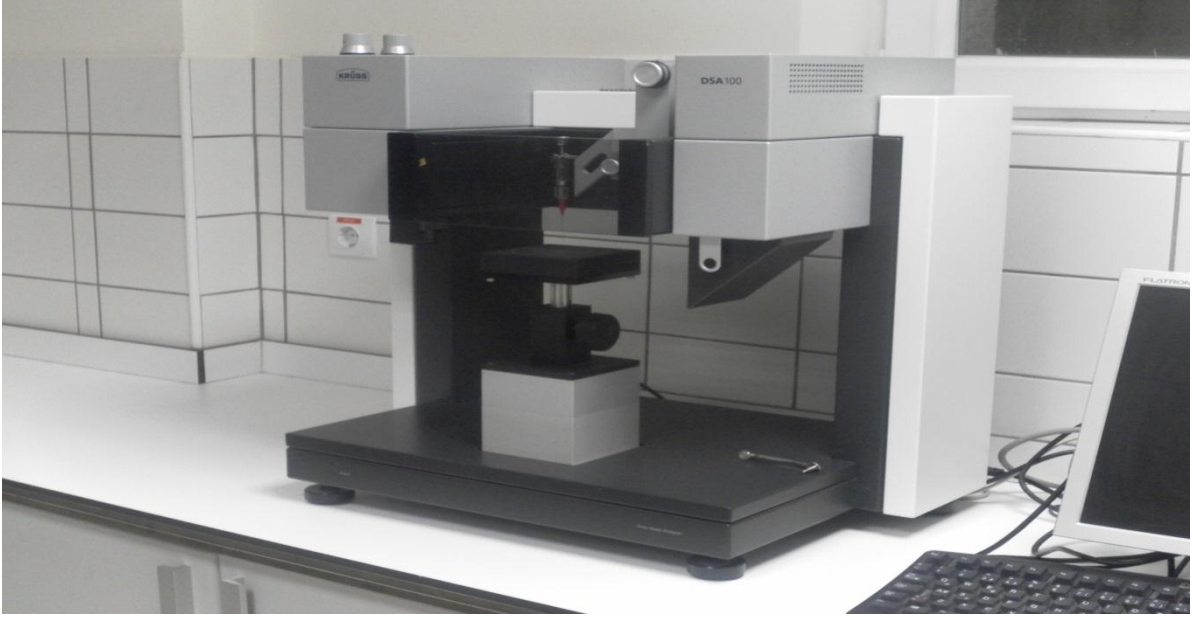
Hazırlanan SPR sensörünün yüzeyindeki nanofilmin kalınlığı görüntüleme yapan elipsometre (Şekil 3.2) ile ölçülmüştür. Kalınlık ölçümleri 658 nm dalga boyunda, 65°'lik bir geliş açısında, 10x büyütme ve %2'lik lazer gücünde gerçekleştirilmiştir. SPR çipi lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiş ve yüzey kalınlığı hesaplama programı için SF10 prizma+45 nm altın veri olarak öngörülmüştür. Ölçümler sensör yüzeyinde yaklaşık 350 µm x 350 µm'lik bir alanda, 3 farklı noktada 3 kere tekrarlanmış ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edilmiştir. E2 baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin analiz etmek için 4 faz modeli (hava/polimerik tabaka/altın/krom ve SF10 cam) kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Nanofilm EP3 elipsometre cihazı.

3.7.2. Temas Açısı Ölçümleri

Modifiye edilmemiş SPR sensörün, E2 baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin yüzey karakterizasyonu Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Yüzey plazmon rezonans (SPR) nanosensörlerin yüzeyine 1 damla su damlatılarak yapışık damla yöntemiyle statik ölçüm alınarak temas açısı belirlenmiştir. Çip bölgelerinin farklı bölgelerine su damlatmak suretiyle fotoğraflar çekilmiş ve her biri için ayrı temas açısı belirlenmiştir. Belirlenen temas açı 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 boş altın yüzeyin, E2 baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensör yüzeyleri için temas açısı değerleri alınan 10 ölçümün ortalama değerleri hesaplanmıştır. Temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Krüss DSA100 temas açısı cihazı.

3.7.3. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi

SPR nanosensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. SPR sensör, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür.

3.7.4. Atomik Kuvvet Mikroskopisi

SPR nanosensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için yarı temas modunda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanılmıştır. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverlı interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. SPR nanosensör çift yüzlü karbon bant ile örnek tutucuya yerleştirilmiştir. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı temas modunda gerçekleştirilmiştir. Salınım rezonans frekansı, 341.30 Hz olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği, 1 V_{RMS} ve boş titreşim genliği ise 2 V_{RMS} 'dir. Örnekler 2 $\mu\text{m/s}$ tarama hızında, 256 x 256 piksel çözünürlükte, 1 x 1 μm^2 'lik bir alanın görüntüsü olarak alınmıştır.

3.8. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Plazmon Ölçümleri

SPR nanosensörlerin karakterizasyonu için yüzey plazmon eğrileri yüzey plazmon rezonans sistemi SPRiLab (GenOptics, Orsay, Fransa) ile alınmıştır. Altın kaplanmış SPR sensör GenOptics firmasından (Orsay, Fransa) temin edilmiştir. SPR sensörler, 25.0 x 12.5 mm yüzey alanına sahip 50 nm kalınlıkta altın kaplanmış olarak temin edilmiştir. Görüntü alınması sırasında ışığın SPR nanosensöre ulaşma açısı değiştirilerek (48.7-56.7°) ışığın % kırılma değerleri alınmıştır. Elde edilen değerler incelenmiş ve yüzey plazmon eğrileri ışığın geliş açısına karşı % kırılma miktarı ve eğimi grafiğe geçirilerek rapor edilmiştir.

3.9. E2 Baskılanmış SPR Nanosensörle Kinetik Analizler

E2 baskılanmış SPR nanosensörün hazırlanmasından sonra kinetik çalışmalara geçilmiştir. Kinetik çalışmalar, farklı derişimlerdeki E2 çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiler pH 11 karbonat tamponuyla 20 ng/ml-10000 ng/ml arasında hazırlanarak SPR sistemine verilmiştir. Şekil 3.4'de GenOptics SPRiLab sistemi gösterilmektedir. GenOptics SPRiLab, lazer kaynağı, ayna sistemi, CCD kamera sistemi, peristaltik pompa ve bilgisayardan oluşmaktadır. Yüzeyine E2 baskılanmış nanofilm tutturulan SPR sensör, kinetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır. Bu aşamada kullanılan deneysel yöntem şu şekildedir: SPR nanosensör yüzeyi deiyonize su (50 ml) ile yıkanmıştır. Sistemden karbonat tamponu (pH 11.0) geçerken yüzey plazmon eğrileri alınmış ve rezonans kırılma açısı belirlenmiştir. Cihaz bu kırılma açısına ayarlanmış ve kinetik çalışmalar bu açı değerinde gerçekleştirilmiştir. Kinetik analiz çalışmalarında SPRview yazılımının kinetik görüntüleme programı kullanılmıştır. Bu program, dakikada yaklaşık 150 kırılma miktarı değerini ölçmekte ve anlık olarak % kırılma miktarı değişimini gözlenmesine olanak sağlamaktadır. Plazmon eğrileri alınması ve aynanın rezonans açısı değerine ayarlanmasının ardından, SPR sisteminden 5 dakika süreyle karbonat tamponu (pH: 11.0) geçirilmeye devam edilmiştir. Bu dengeleme basamağından sonra, farklı derişimlerdeki E2 çözeltileri teker teker (10 ml, 2.0 ml/dakika akış hızı) sisteme verilmiştir. Rezonans frekansındaki kayma değerleri anlık olarak gözlenmiş ve denge durumuna geldiğinde sisteme %20'lik gliserol çözeltisi (10 ml, 2.0 ml/dak. Akış hızı, 25°C) verilerek desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonra, SPR nanosensör su ve

karbonat tamponu (pH 11.0) ile yıkanmıştır. Farklı derişimlerdeki E2 çözeltileri sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-temizleme aşamaları tekrarlanmıştır.

3.10. SPR Çipin Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

E2 baskılanmış SPR çipin seçiciliğini göstermek için E2 baskılanmamış SPR çip hazırlanmıştır. E2, kolesterol ve stigmasterol moleküllerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar (1000 ng/ml, 10 ml, 2.0 ml/dak. Akış hızı, 25°C) sisteme verilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin sisteme enjeksiyonundan sonra grafikler elde edilmiştir.



Şekil 3.4. GenOptics SPRiLab sistemi.

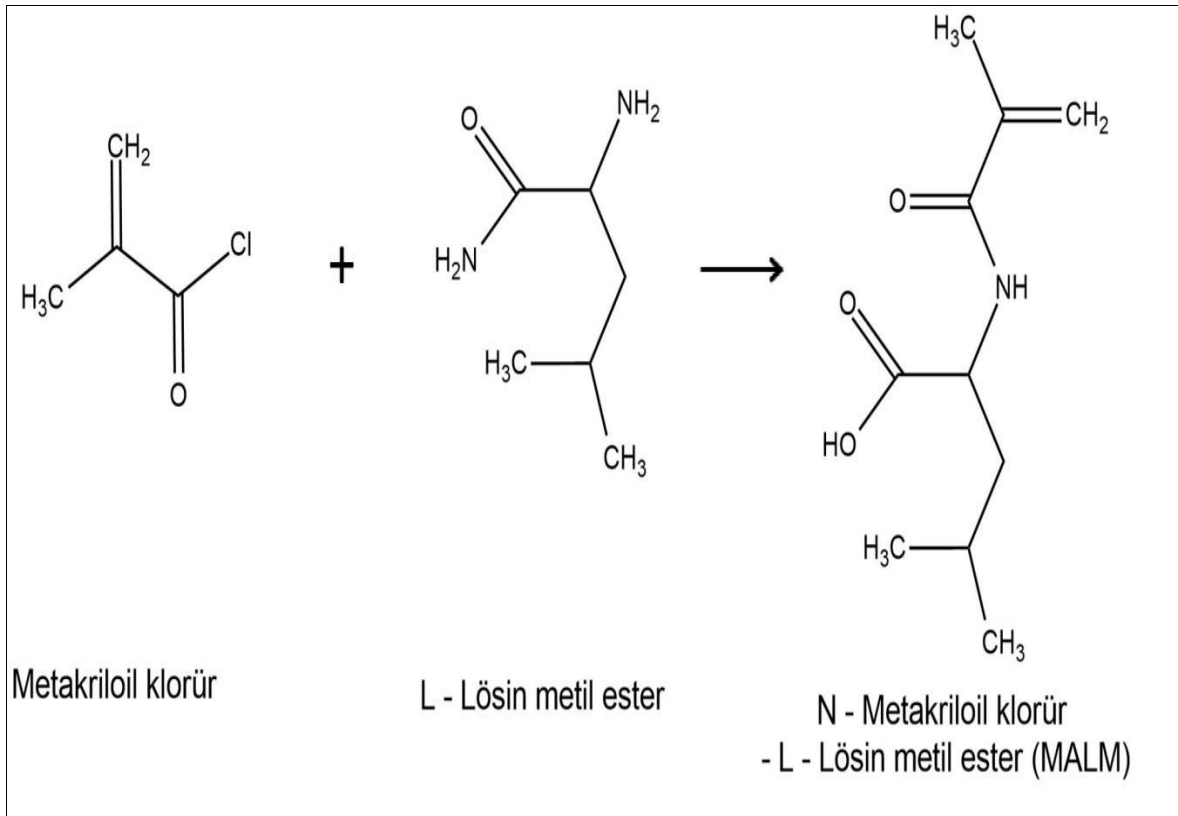
3.11. E2 Baskılanmış Sensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

E2 baskılanmış sensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmek amacıyla 1000 ng/ml derişimlerde hazırlanmış E2 içeren çözeltiler (1000 ng/ml, 10 ml, 2.0 ml/dak. Akış hızı, 25°C) SPR sistemine verilmiştir. Bu işlem on kez tekrar edilmiştir.

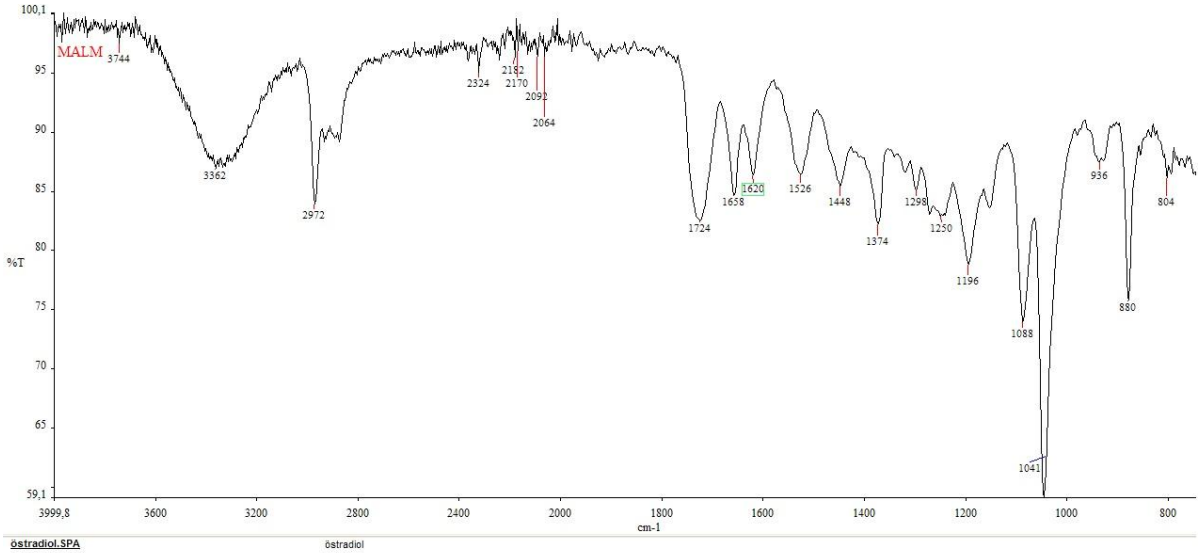
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. N-Metakriloil-(L)-lösin Metil Ester (MALM) Monomerinin Karakterizasyonu

N-Metakriloil-(L)-lösin metil ester (MALM) monomeri (Şekil 4.1) ilk basamakta FTIR ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.2). 1724 cm^{-1} 'deki band MALM monomerinden kaynaklanan C=O bandına aittir. 1298 cm^{-1} 'deki band lösin aminoasidindeki C-O bandından gelmektedir. 2800-3000 cm^{-1} 'deki geniş band lösinde kaynaklanan $-\text{CH}_3$ grubuna aittir. 1020-1250 cm^{-1} arasındaki geniş band lösindeki C-N titreşim bandına, 1620 cm^{-1} 'deki keskin band RNH_2 grubundaki eğilme bandlarına aittir. Yapıya ait titreşim, gerilme ve eğilme bandları, N-Metakriloil -(L)-Lösin metil ester (MALM) monomerinin sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir [194, 195].



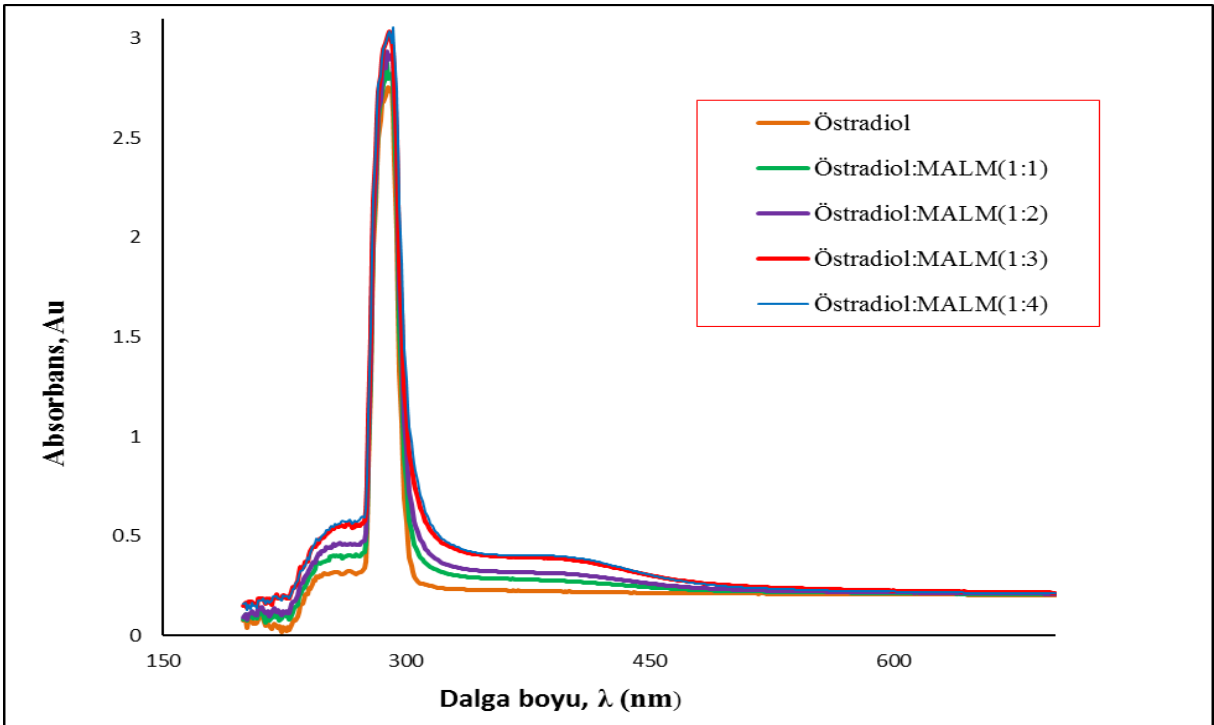
Şekil 4.1. N-Metakriloil-(L)-Lösin metil ester (MALM) monomerinin sentezi.



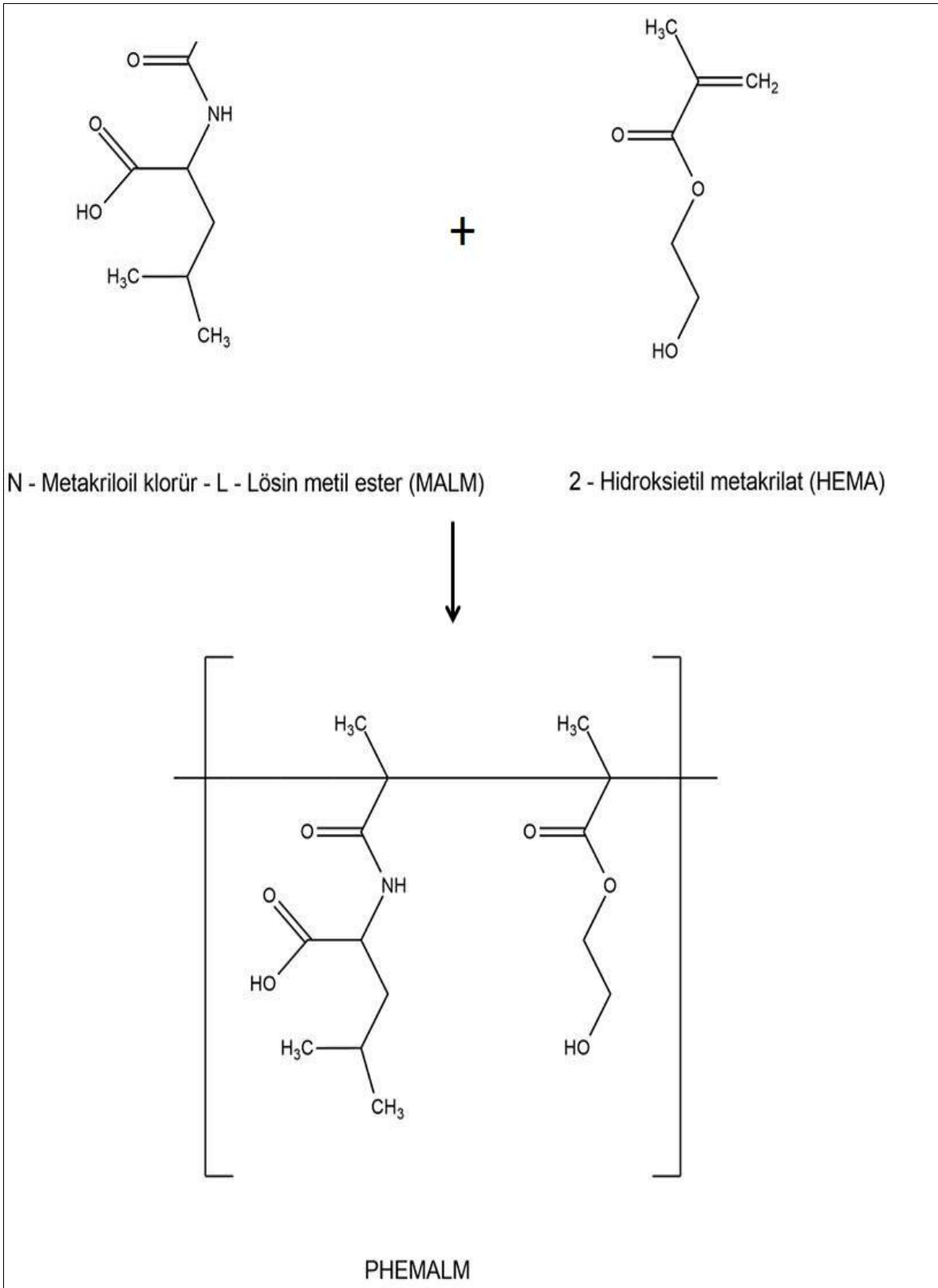
Şekil 4.2. N-Metakriloil-(L)-lösün metil ester (MALM) monomerinin FTIR spektrumu.

4.2. MALM-östradiol Ön Kompleksin Hazırlanması

MALM-östradiol ön kompleksi (Şekil 4.3) kalıp molekül olarak östradiol, fonksiyonel monomer olarak MALM monomeri kullanılarak hazırlanmıştır (Şekil 4.4)



Şekil 4.3. Kalıp molekül E2: N-Metakriloil-(L)-lösün metil ester (MALM) monomer oranının belirlenmesi; E2:MALM monomerinin mol oranları (1:1; 1:2; 1:3; 1:4).



Şekil 4.4. MALM-östradiol ön kompleksi ve HEMA fonksiyonel monomerinin polimerizasyonu.

Kalıp molekül olarak kullanılan E2'nin N-Metakriloil-(L)-lösin metil ester (MALM) monomeri ile MALM-E2 ön kompleksini oluştururken stokiyometrik olarak birleşme oranlarını tayin etmek için farklı mol oranlarındaki E2:N-Metakriloil-(L)-lösin metil ester (MALM) (1:1; 1:2; 1:3; 1:4) kompleksleri oluşturulmuştur. E2 miktarı sabit tutularak artan MALM oranının kompleksleşmeye etkisi UV mini 1240 SHIMADZU model spektrofotometre cihazı kullanılarak incelenmiştir. MALM-E2 ön komplekslerinin 200-700 nm dalga boyu aralığındaki absorpsiyonları ölçülmüş, absorpsiyonunun gittikçe artan MALM mol oranı ile arttığı 1:4 E2:N-Metakriloil-(L)-lösin metil ester (MALM) oranında absorpsiyon değerinin değişiklik göstermediği tespit edilerek kalıp molekül:monomer oranı 1:4 olarak belirlenmiştir.

4.3. SPR Sensörlerin Yüzey Karakterizasyonu

4.3.1. Elipsometre Analizi

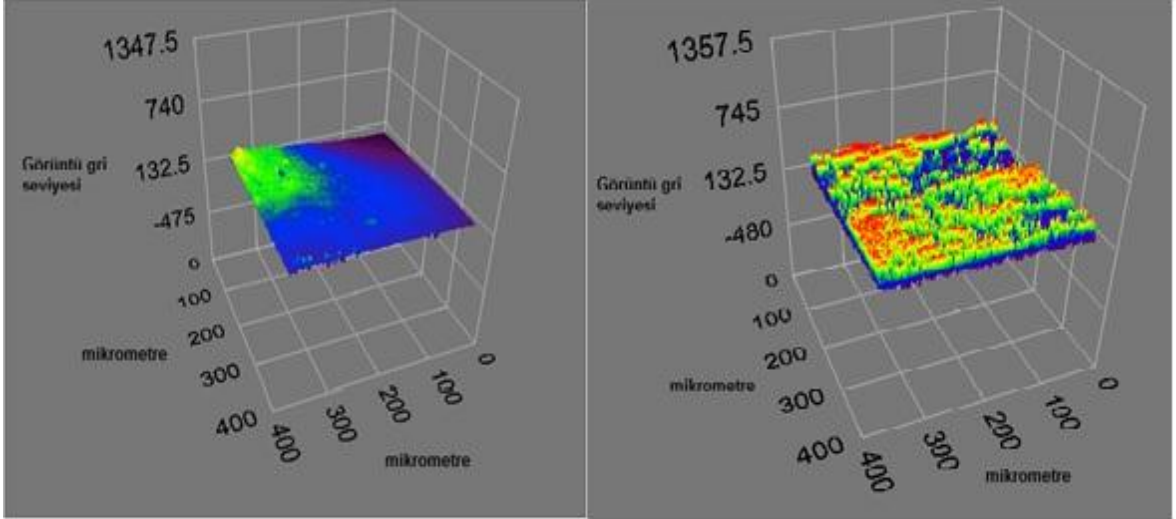
E2 baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörün ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir (Şekil 4.5). Elipsometrik ölçümler 658 nm dalga boyunda, 65°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. E2 baskılanmış SPR sensörün ortalama kalınlık değeri 24.20 nm, E2 baskılanmamış SPR sensörün ortalama kalınlığı 29.00 nm olarak hesaplanmıştır.

4.3.2. Temas Açısı Ölçümleri

Modifiye edilmemiş SPR sensörün, E2 baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin yüzey karakterizasyonu Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.1'de modifiye edilmemiş SPR sensörün, E2 baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin yüzey temas açıları verilmiştir.

Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyinin temas açısı değeri (81.4°), E2 baskılanmış SPR çip yüzeyinde 65.6°'ye düşmüştür. E2 baskılanmamış SPR sensörün temas açısı değeri 63.3° olarak belirlenmiştir. Yüzeyin temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: E2 tayin işlemi için hazırlanan SPR çiplerinde PHEMA kullanılmıştır. PHEMA hidrofilik karakterde bir

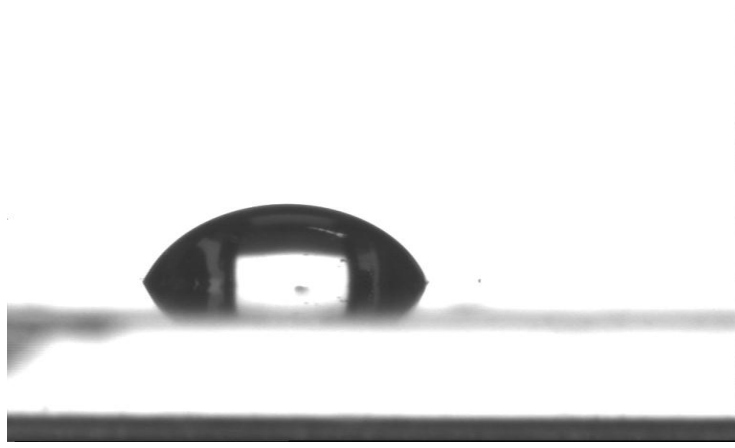
malzeme olduğundan dolayı, yüzeye hidrofilik bir polimerin tutturulması yüzey hidrofilitasını arttırmış ve temas açısı değerini düşürmüştür. Şekil 4.6'da modifiye edilmemiş altın yüzeyin, 4.7.'de E2 baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlere ait temas açısı görüntüleri verilmiştir.



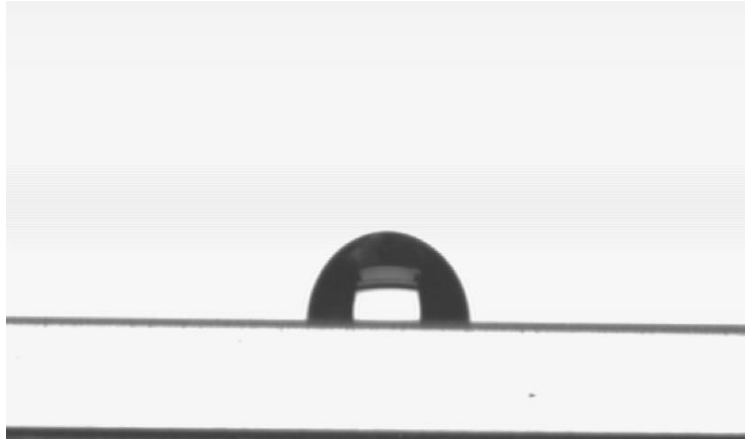
Şekil 4.5. E2 tanıma bölgelerine sahip nanofilmin elipsometrik ölçümde alınan 3 boyutlu görüntüsü.

Çizelge 4.1. Modifiye edilmemiş, E2 baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin yüzey temas açıları.

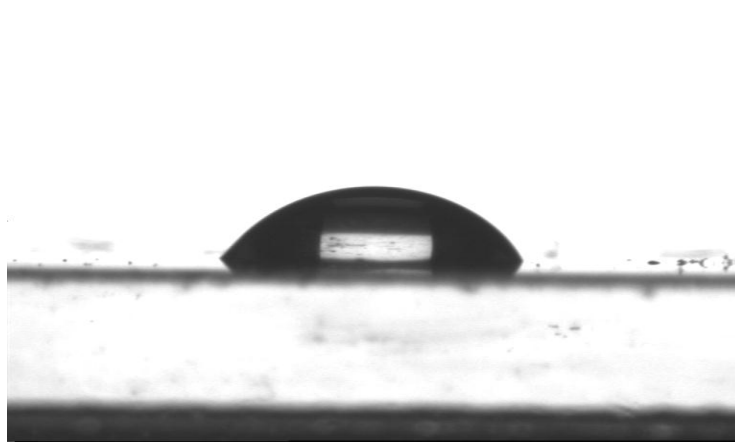
| Yüzey | Temas Açısı° |
|------------------------------------|--------------|
| Modifiye edilmemiş altın yüzey | 81.4° |
| E2 baskılanmış SPR sensor yüzeyi | 65.6° |
| E2 baskılanmamış SPR sensor yüzeyi | 63.3° |



Şekil 4.6. Boş altın yüzey temas açısı ölçüm fotoğrafı.



(a)

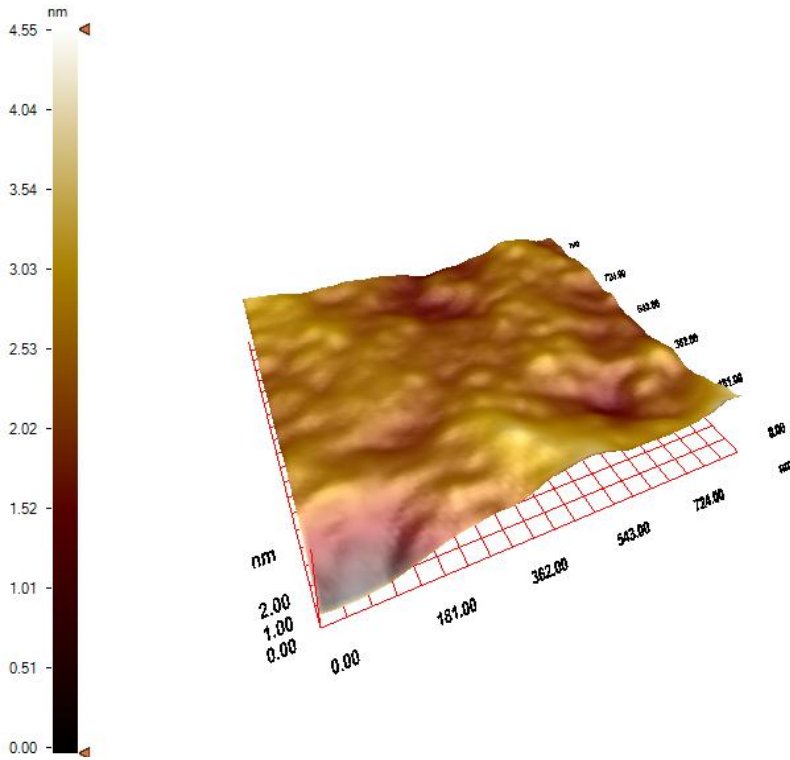


(b)

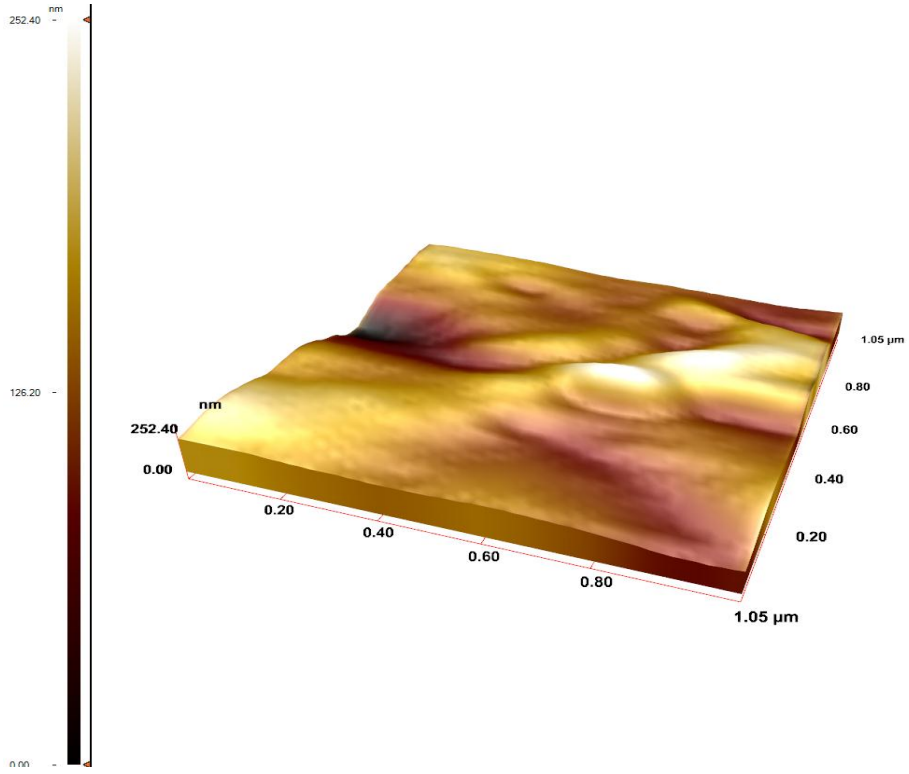
Şekil 4.7. E2 baskılanmış (a) ve baskılanmamış (b) SPR çiplerin yüzey temas açısı fotoğrafları.

4.1.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi

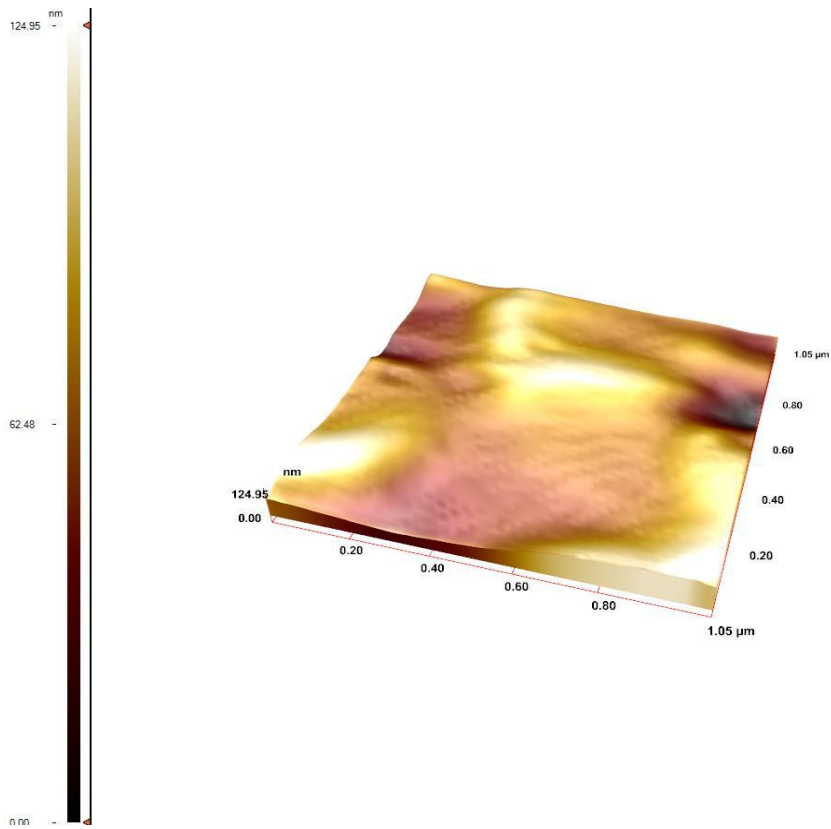
Modifiye edilmemiş ve E2 baskılanmış SPR nanosensörlerin yüzey morfolojisi yarı temas modunda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiş SPR çipin yüzey derinliği, 4.55 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8). E2 baskılanmış SPR nanosensörün ortalama pürüzlülüğü 30.02 nm (Şekil 4.9) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar; E2 baskılanmış nanofilmin SPR altın yüzeyine başarılı bir şekilde tutunduğunu göstermektedir. E2 baskılanmamış SPR çipin AFM görüntüsü Şekil 4.10'da verilmiştir. E2 baskılanmamış SPR çipin ortalama pürüzlülüğü 16.45 nm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8. Modifiye edilmemiş SPR sensörün yüzey derinliği.



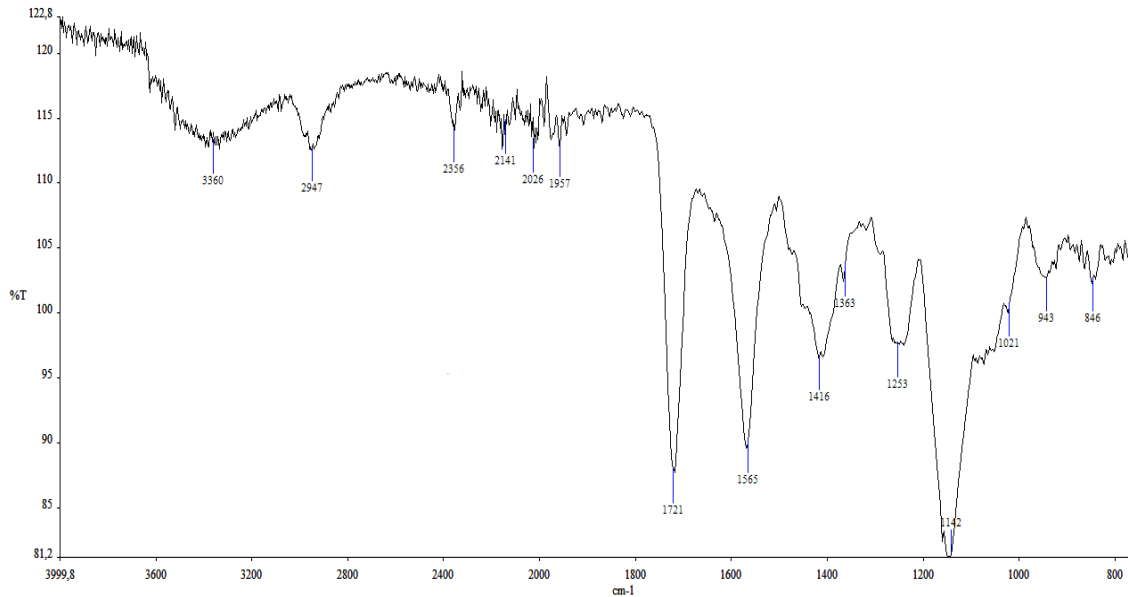
Şekil 4.9. E2 baskılanmış SPR çipinin yarı temas modunda alınan AFM görüntüsü.



Şekil 4.10. E2 baskılanmamış SPR çipin yarı temas modunda alınan AFM görüntüsü.

4.1.4. FTIR-ATR Analizi

SPR nanosensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. SPR sensör, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür. E2 baskılanmış SPR sensör yüzeyine ait FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.11.'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi 3360 cm^{-1} 'deki geniş pik $\nu(\text{N-H})$ asimetrik gerilim bandına ait iken; 2927 cm^{-1} deki keskin band alifatik $\nu(-\text{CH}_3)$ bandına ait olup; 1721 cm^{-1} 'deki pik $\nu(\text{C=O})$ bandına aittir. 1565 cm^{-1} 'deki sinyal $\nu(\text{COOH})$ 'daki asimetrik gerilimden kaynaklanırken 1416 cm^{-1} 'deki sinyal $\nu(\text{COOH})$ 'daki simetrik gerilimden kaynaklanmaktadır. 1253 cm^{-1} 'deki sinyal $\nu(\text{CN})$ titreşim bandına aittir. 1633 cm^{-1} 'deki monomere ait $\nu(\text{C=C})$ bandının yok olması polimerleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.11. E2 baskılanmış SPR çipe ait FTIR-ATR spektrumu.

4.4. SPR Nanosensörlerle Kinetik Analizler

Biyomoleküllerin tayininde sıklıkla kullanılan enzim, radyo veya floresan işaretleme yöntemlerinden farklı olarak SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretleme gerek duyulmadan kullanılabilirler [196]. İşaretleme işleminin yapılmaması hem zaman kazandırmakta hem de maliyeti düşürmektedir. İşaretleyici moleküllerin ortamda bulunan diğer moleküllerle etkileşiminden dolayı yanlış sonuçlar elde edilebilmektedir. SPR temelli sensörlerin kullanılmasıyla bu sorunlar giderilebilmektedir. Ayrıca bu sensörlerde analit ve yüzey etkileşimi gerçek zamanda ve doğrudan ölçülebilmektedir. Bu özellik nicel olarak kinetik, termodinamik ve derişim parametrelerinin belirlenmesini veya nitel olarak ligand ile analit arasındaki ilişkinin karakterize edilmesini sağlamaktadır [7].

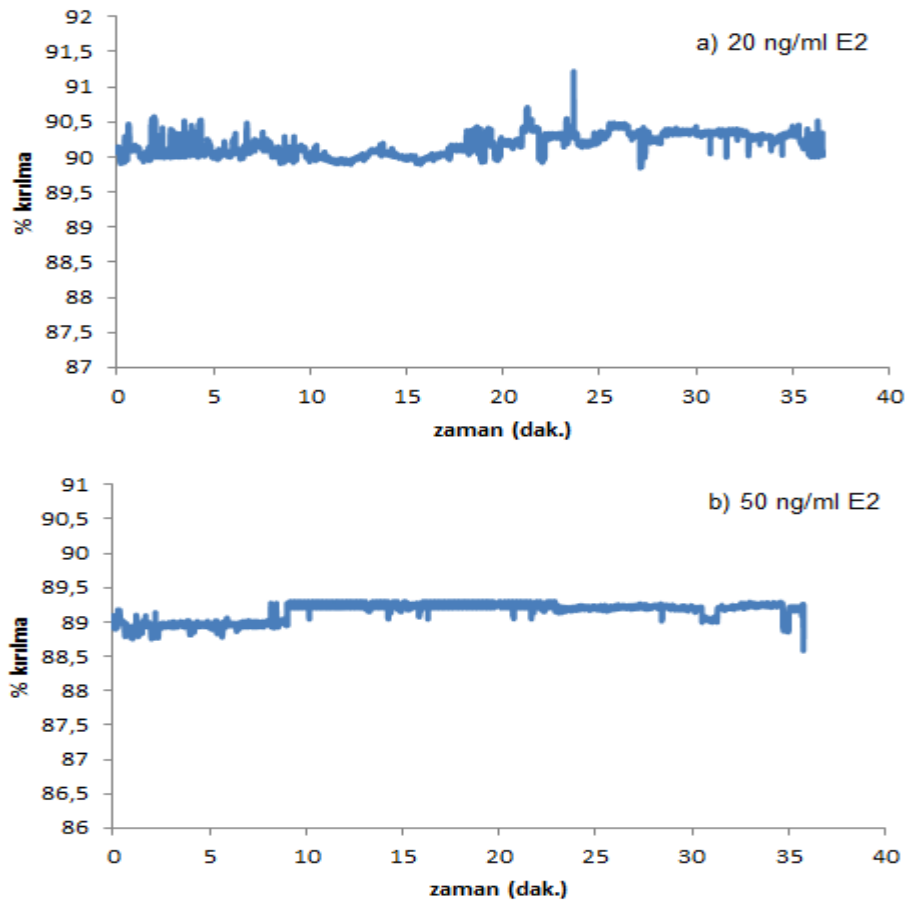
Bu çalışma kapsamında E2 baskılanmış SPR nanosensörler hazırlanmıştır. SPR sinyali ile E2 derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde (20-10.000 ng/mL) E2 çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler peristaltik pompa ile SPR nanosensörler ile etkileştirilmiş ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler alınmıştır. Şekil 4.12'de farklı derişimlerde hazırlanan E2 çözeltilerinden elde edilen grafikler verilmiştir.

Çeşitli ortamlarda E2 tayinine yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Auberšek ve arkadaşları hastane atık suyunda 4.2 ng/l, atık su arıtım tesisinden aldıkları örneklerde 2.4 ng/l-12.7 ng/l E2 tayin etmişlerdir [197]. McAvoy, atık su arıtım tesisi ve çöp toplama alanından aldığı su örneklerini gaz kromatografisi-kütle spektrometrisine uygulamış ve atık su arıtım tesisinden aldığı örneklerde 7.22 ng/l, çöp toplama alanından aldığı örneklerde ise 0.557 ng/l E2 tayin etmiştir [198].

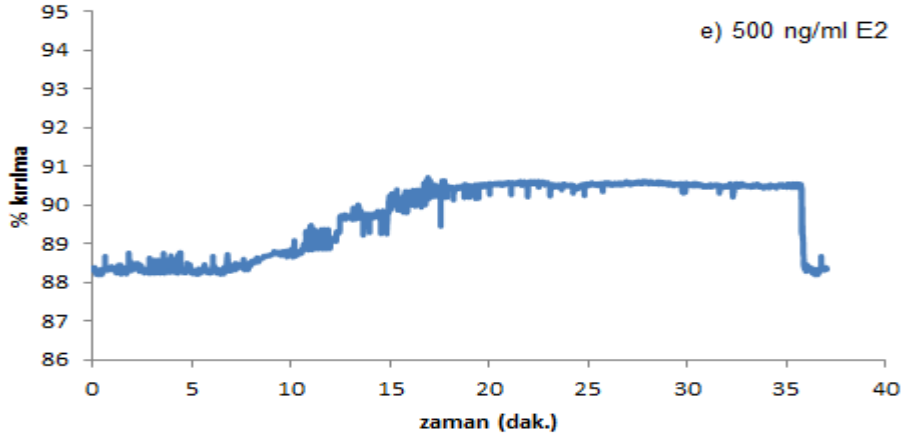
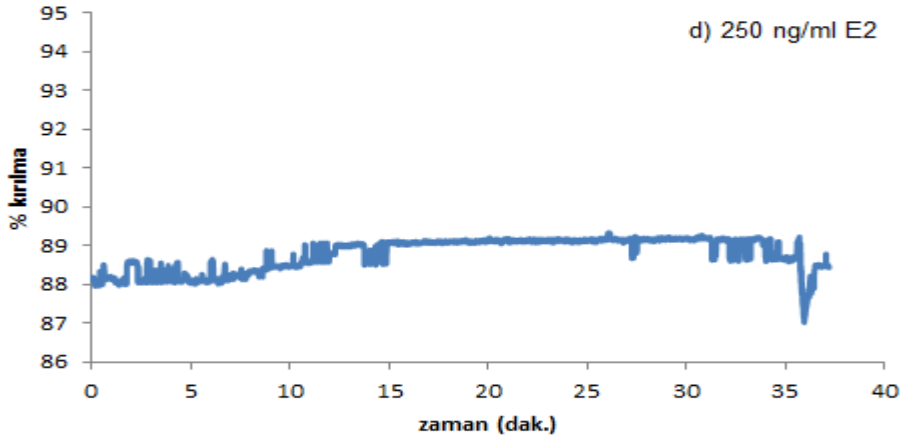
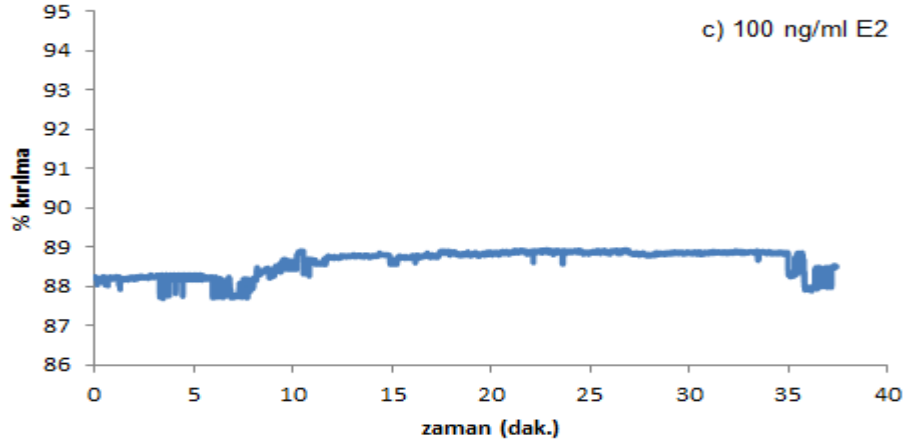
E2'nin biyosensörlerle tayinine yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Zhang ve arkadaşları optik dalgaboyu spektrometrisi kullanarak 50 pg/ml tayin sınırına [199], Liu ve Wong elektrokimyasal biyosensör ile 6 pg/ml tayin sınırına inmişlerdir [200]. Hui-Bin ve arkadaşlarının insan idrarından 0.75-135 µg/ml derişimlerde E2 tayin etmişlerdir [201]. Yapılan başka bir çalışmada flöresan duyu sistemi moleküler baskılanmış polimerin sıvı kromatografisinde kullanıldığı analitik bir sistemde E2'yi 30-5000 ng/ml'de tayin etmiştir [202].

Şekil 4.12'de farklı derişimlerde E2 çözeltilerinin nanosensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi sensör yüzeyine E2 uygulanmasıyla birlikte % kırılma değeri artmaktadır.

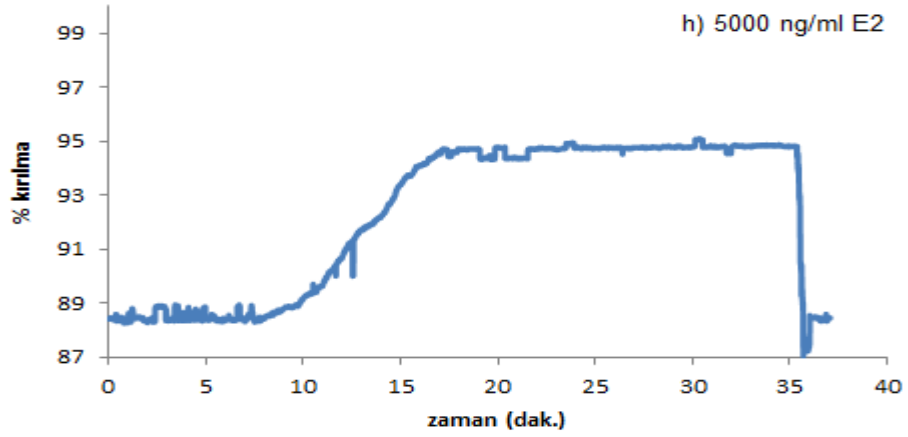
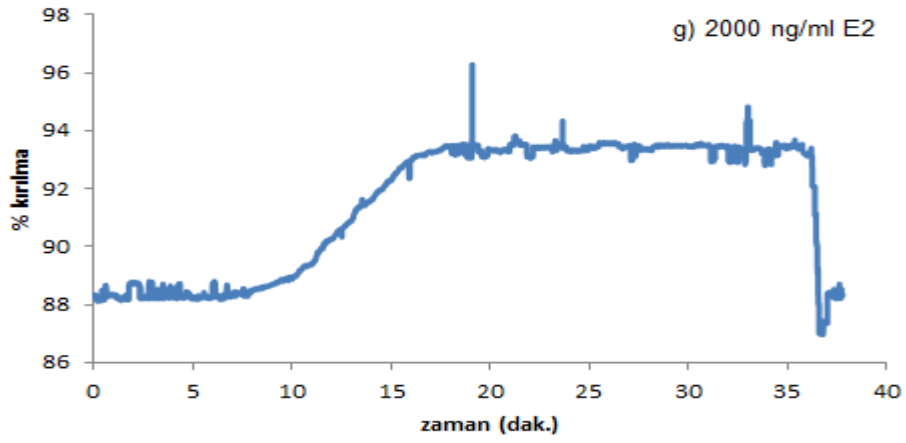
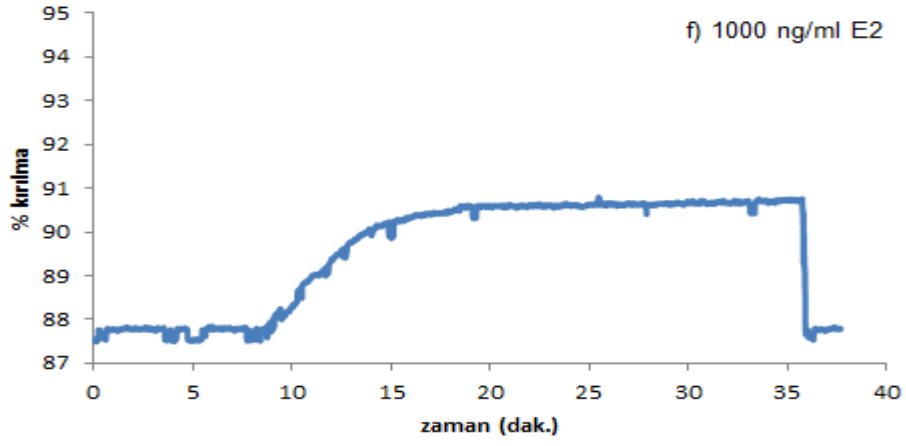
Şekil 4.13'de tüm grafikler bir arada verilmiştir. Standart bir ölçümde, sistemden öncelikle denge tamponu daha sonra sistem yeniden dengeye ulaşana kadar E2 çözeltisi geçirilmiş ve son aşamada desorpsiyon çözeltisi kullanılmıştır. Bütün ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için 35 dakika beklenilmiştir. Desorpsiyon ve rejenerasyon işlemleri yaklaşık 15 dakika içinde gerçekleştirilmiştir.



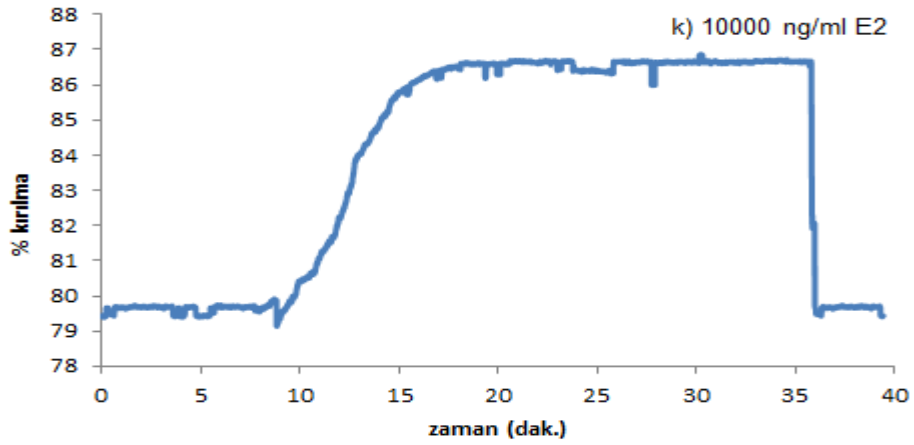
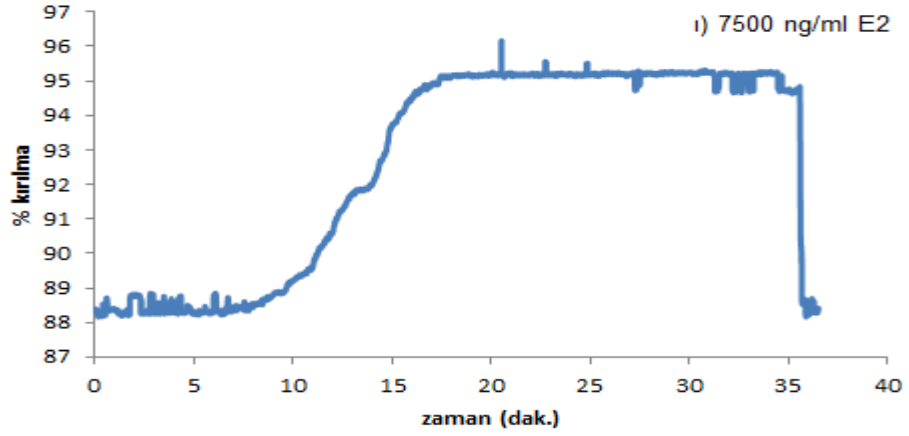
Şekil 4.12. Değişik derişimlerde E2 çözeltilerinin nanosensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri: (a) 20 ng/ml; (b) 50 ng/ml; (c) 100 ng/ml; (d) 250 ng/ml; (e) 500 ng/ml; (f) 1000 ng/ml; (g) 2000 ng/ml; (h) 5000 ng/ml; (i) 7500 ng/ml; (g) 10000 ng/ml.



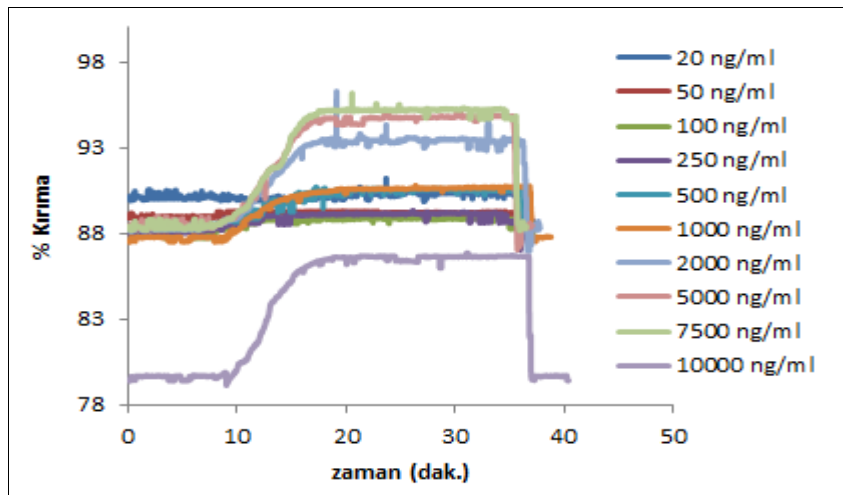
Şekil 4.12. Değişik derişimlerde E2 çözeltilerinin nanosensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri: (a) 20 ng/ml; (b) 50 ng/ml; (c) 100 ng/ml; (d) 250 ng/ml; (e) 500 ng/ml; (f) 1000 ng/ml; (g) 2000 ng/ml; (h) 5000 ng/ml; (ı) 7500 ng/ml; (g) 10000 ng/ml (devam).



Şekil 4.12. Değişik derişimlerde E2 çözeltilerinin nanosensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri: (a) 20 ng/ml; (b) 50 ng/ml; (c) 100 ng/ml; (d) 250 ng/ml; (e) 500 ng/ml; (f) 1000 ng/ml; (g) 2000 ng/ml; (h) 5000 ng/ml; (i) 7500 ng/ml; (g) 10000 ng/ml (devam).



Şekil 4.12. Değişik derişimlerde E2 çözeltilerinin nanosensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri: (a) 20 ng/ml; (b) 50 ng/ml; (c) 100 ng/ml; (d) 250 ng/ml; (e) 500 ng/ml; (f) 1000 ng/ml; (g) 2000 ng/ml; (h) 5000 ng/ml; (i) 7500 ng/ml; (g) 10000 ng/ml (devam).

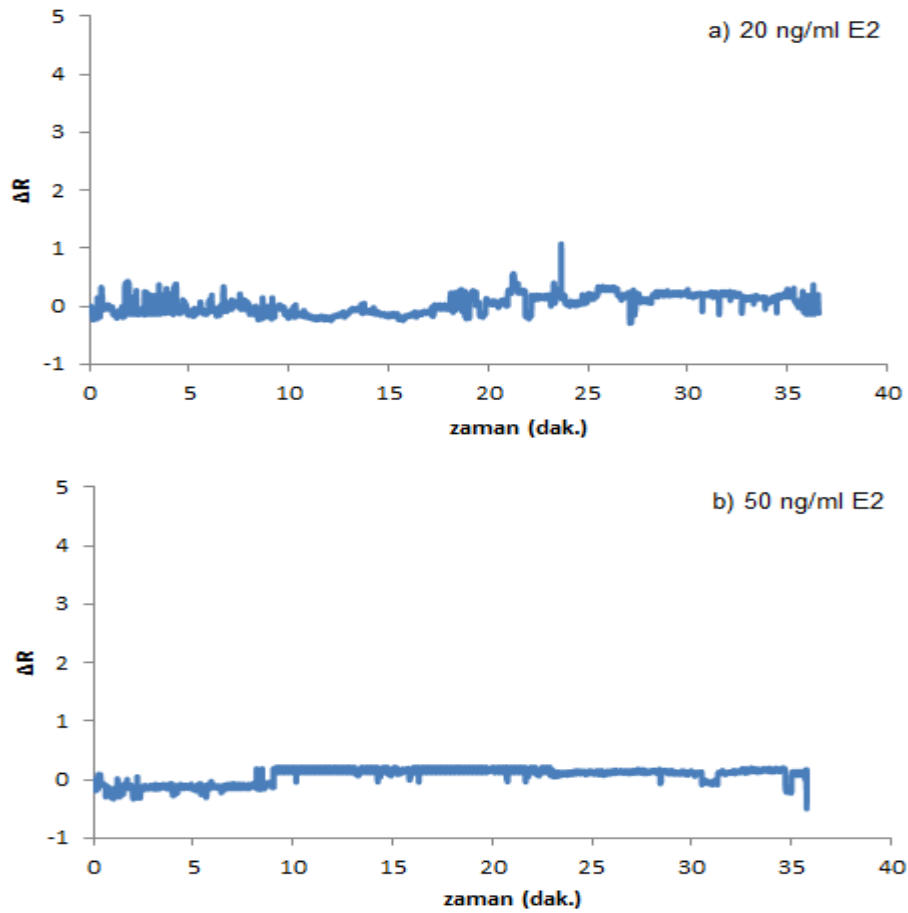


Şekil 4.13. E2 çözeltisi ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait % kırılma zaman grafiği.

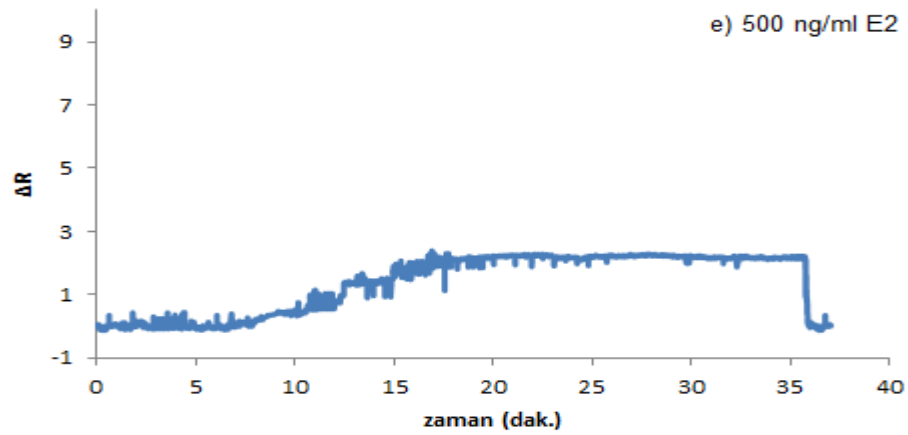
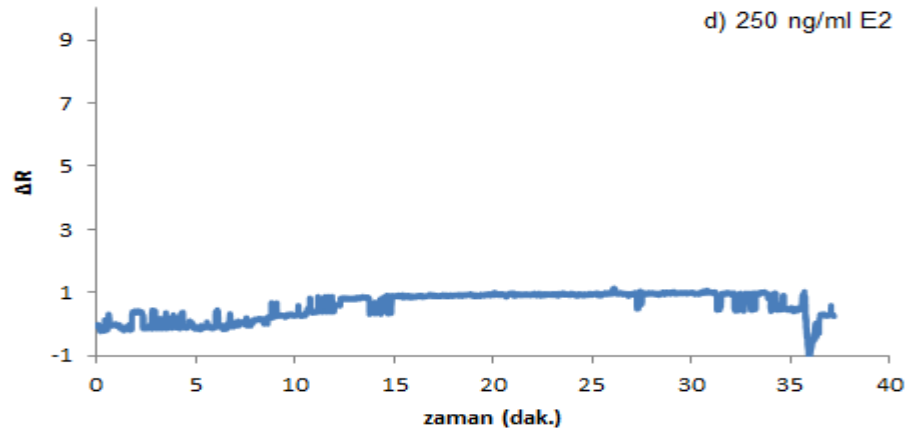
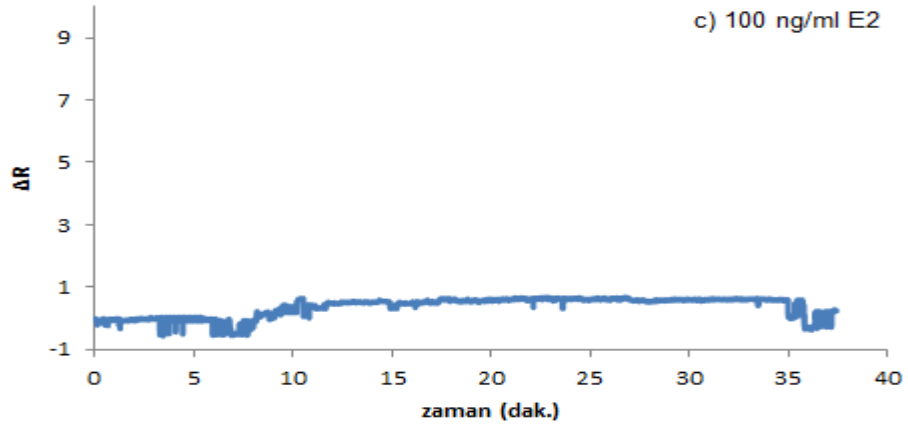
Derişimdeki artışla birlikte % kırılma değerindeki artışın daha fazla olduğu görölmektedir. Bunun sebebi olarak çözelti ile yüzey arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artması gösterilebilir.

Şekil 4.14'da farklı derişimlerdeki E2 çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler verilmektedir.

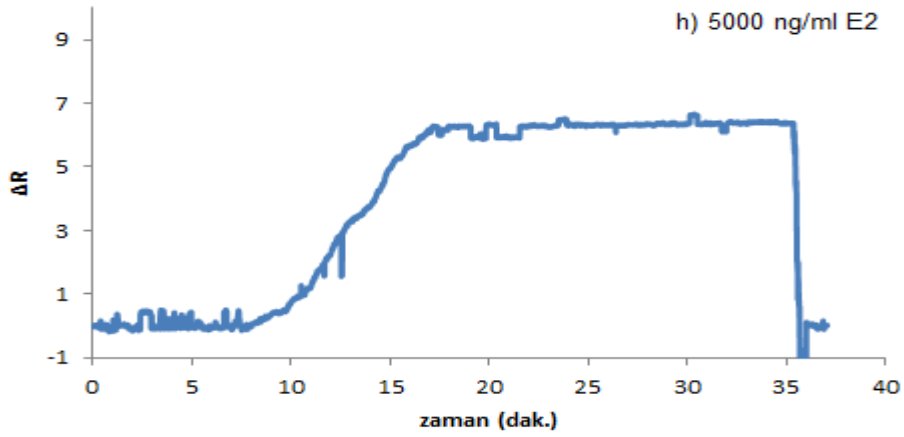
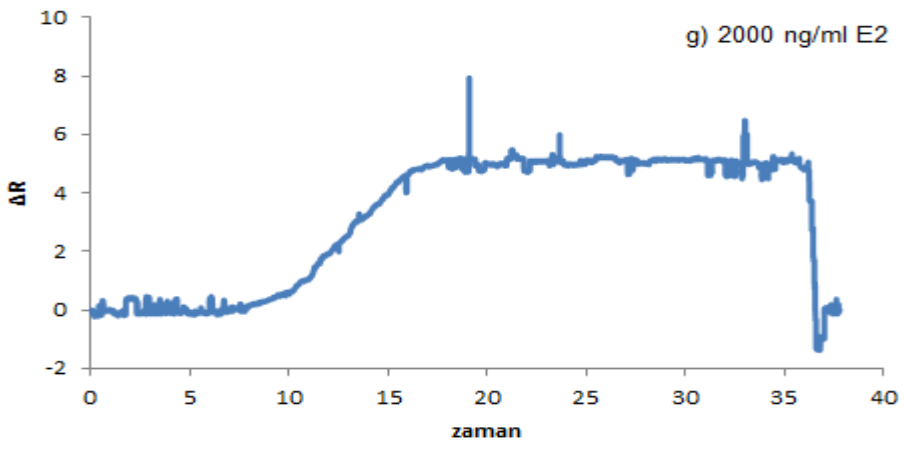
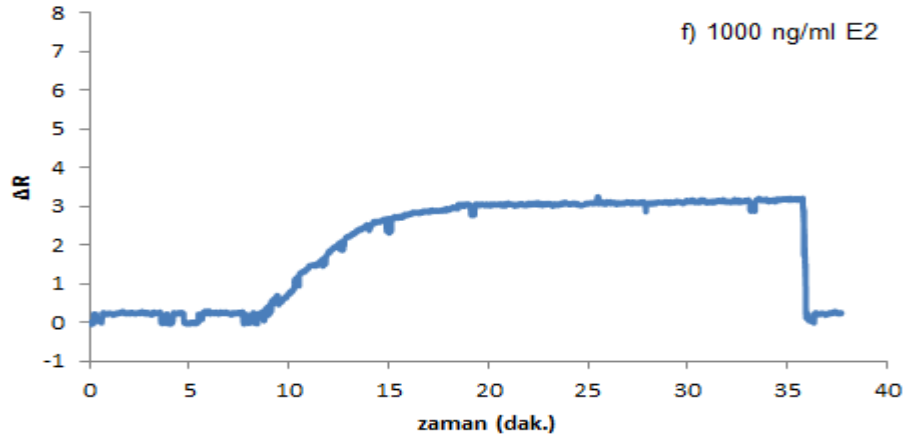
Şekil 4.15'de farklı derişimlerdeki E2 çözeltileri ve SPR temelli sensör arasındaki etkileşimlere ait ΔR zaman grafiği verilmiştir.



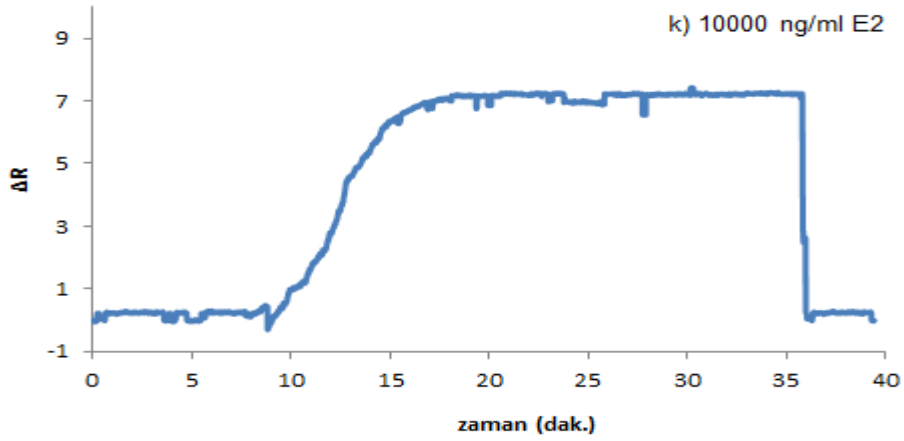
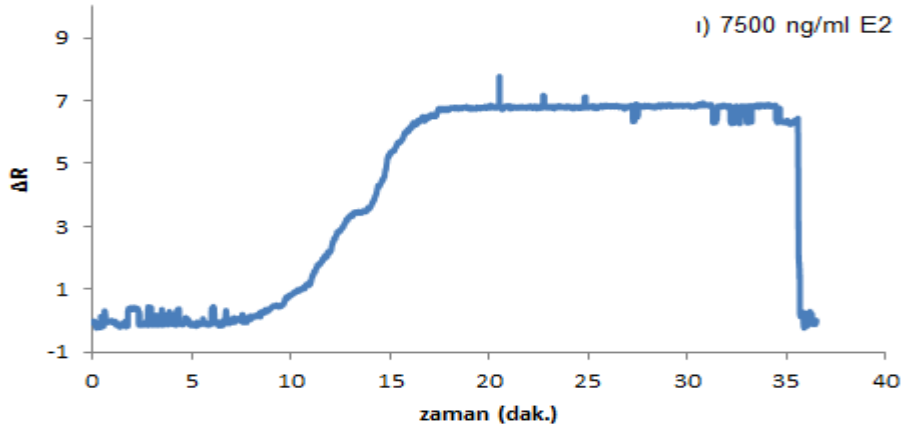
Şekil 4.14. Farklı derişimlerdeki E2 çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler: (a) 20 ng/ml; (b) 50 ng/ml; (c) 100 ng/ml; (d) 250 ng/ml; (e) 500 ng/ml; (f) 1000 ng/ml; (g) 2000 ng/ml; (h) 5000 ng/ml; (ı) 7500 ng/ml; (g) 10000 ng/ml.



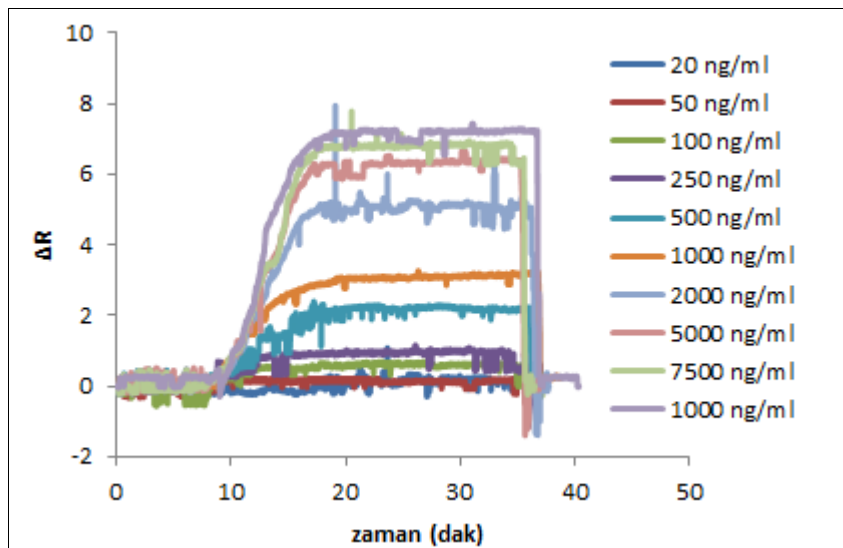
Şekil 4.14. Farklı derişimlerdeki E2 çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler: (a) 20 ng/ml; (b) 50 ng/ml; (c) 100 ng/ml; (d) 250 ng/ml; (e) 500 ng/ml; (f) 1000 ng/ml; (g) 2000 ng/ml; (h) 5000 ng/ml; (ı) 7500 ng/ml; (g) 10000 ng/ml (devam).



Şekil 4.14. Farklı derişimlerdeki E2 çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler: (a) 20 ng/ml; (b) 50 ng/ml; (c) 100 ng/ml; (d) 250 ng/ml; (e) 500 ng/ml; (f) 1000 ng/ml; (g) 2000 ng/ml; (h) 5000 ng/ml; (i) 7500 ng/ml; (g) 10000 ng/ml (devam).

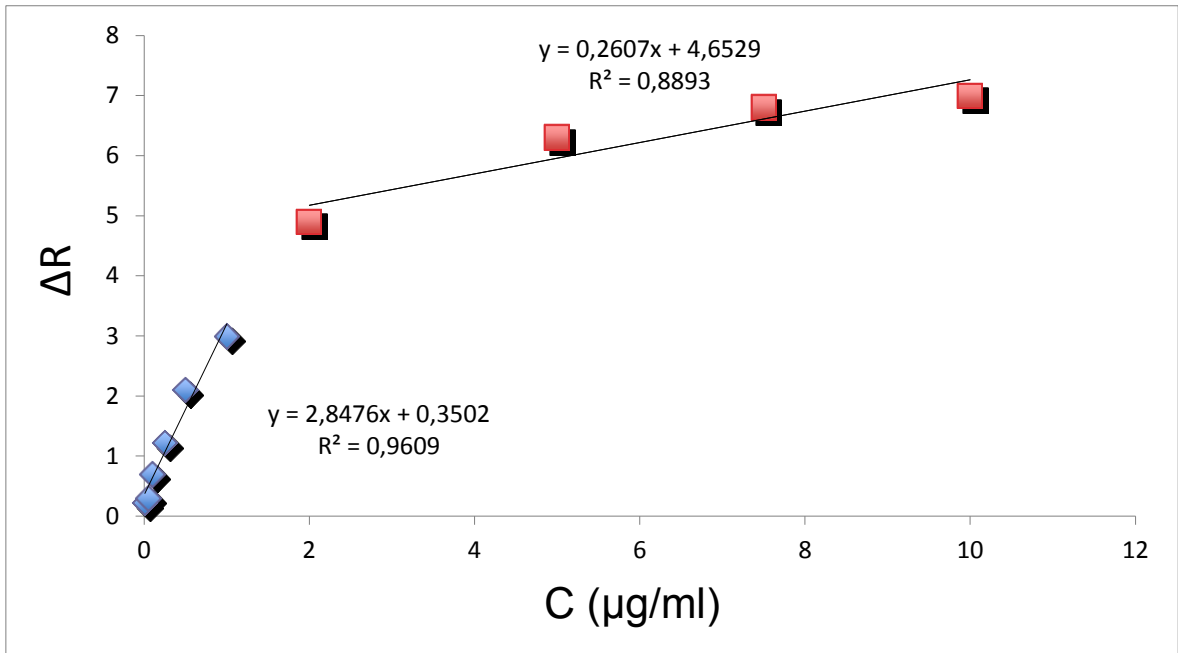


Şekil 4.14. Farklı derişimlerdeki E2 çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR derişimlerini gösteren grafikler: (a) 20 ng/ml; (b) 50 ng/ml; (c) 100 ng/ml; (d) 250 ng/ml; (e) 500 ng/ml; (f) 1000 ng/ml; (g) 2000 ng/ml; (h) 5000 ng/ml; (i) 7500 ng/ml; (g) 10000 ng/ml (devam).



Şekil 4.15. Farklı derişimlerdeki E2 çözeltileri ve SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait ΔR zaman grafiği.

Şekil 4.16'da görüldüğü gibi SPR nanosensör, iki farklı derişim aralıında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi 20-1000 ng/ml aralıındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ($y = 2.8476x - 0.3502$) ve doğrusallığı (R^2) 0.9609 olarak hesaplanmıştır. 2000-10000 ng/ml aralıındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ($y=0.2607x-4.6529$) ve doğrusallığı (R^2) 0.8893 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre; E2 molekülleri iki farklı bölgede yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Başka bir ifadeyle; hazırlanan SPR nanosensör, 20-1000 ng/ml aralıında % 96, 2000-10000 ng/ml aralıında derişim değerini ise % 88.9 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir.



Şekil 4.16. E2 baskılanmış SPR nanosensör ve ΔR arasındaki ilişki.

Denge Analizi

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

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

Burada; $d\Delta R/dt$, SPR sinyalinin değişim hızı; R ve R_{maks} , bağlanma ile ölçülen maksimum sinyal; C , analit derişimi ($\mu\text{g/ml}$), k_a , bağlanma hız sabiti ($\text{ml}/\mu\text{g}\cdot\text{s}$) ve k_d , ayrılma hız sabiti ($1/\text{s}$)'dir. Bağlanma sabiti K_A ($\text{ml}/\mu\text{g}$), k_a ve k_d sabitlerinin oranından hesaplanır ($K_A=k_a/k_d$). Denge durumunda, $d\Delta R/dt=0$ alınarak eşitlik basitleştirilir:

$$\Delta R_{denge} / C = K_A \Delta R_{mak} - K_A \Delta R_{denge} \quad (4.2)$$

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

Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 4.1 tekrar düzenlendiğinde;

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

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

hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrışma kinetiğinin incelenmesidir.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (4.5)$$

Burada; ΔR_0 ve ΔR_t , ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir [203]. Şekil 4.17’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 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri.

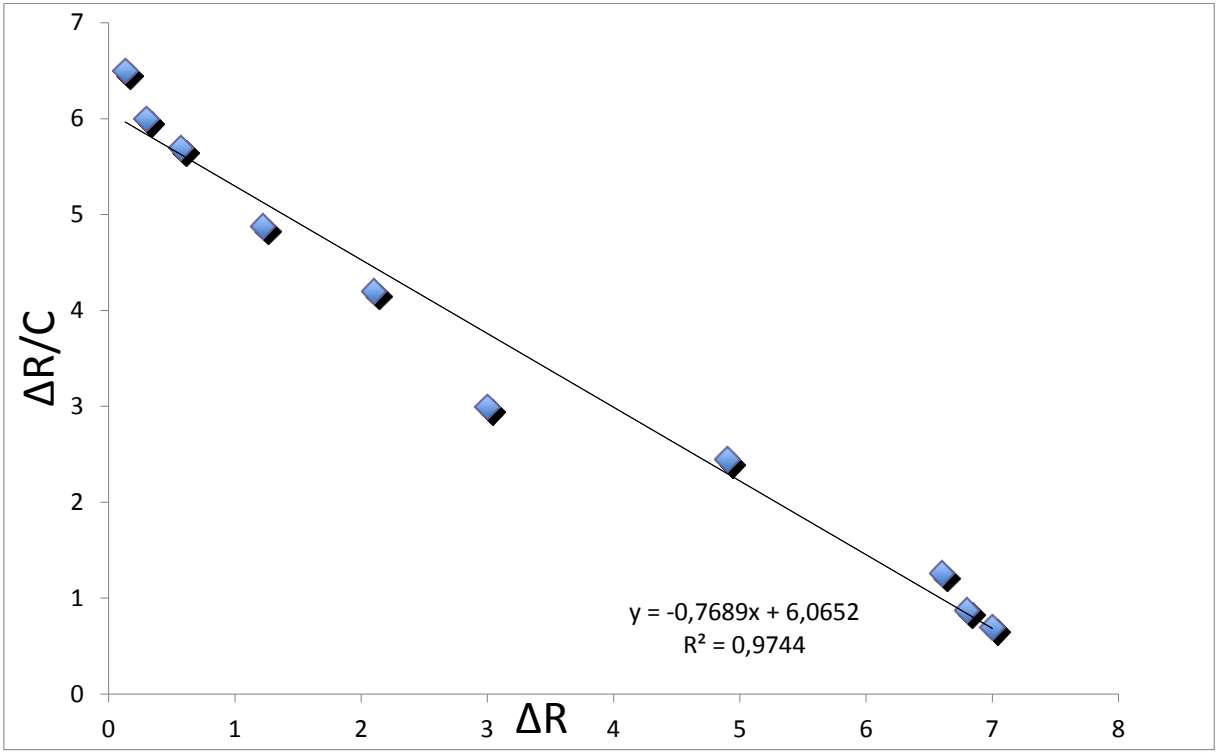
| Denge Analizi (Scatchard) | | Bağlanma Kinetik Analizi | |
|---------------------------|--------|----------------------------|--------|
| ΔR_{maks} | 7.88 | k_a , $\mu\text{g/ml.s}$ | 0.046 |
| K_A , $\mu\text{g/ml}$ | 0.7689 | k_d , 1/s | 0.075 |
| K_D , ml/ μg | 1.30 | K_A , $\mu\text{g/ml}$ | 0.615 |
| R^2 | 0.9744 | K_D , ml/ μg | 1.63 |
| | | R^2 | 0.9659 |

4.6. Denge İzoterm Modelleri

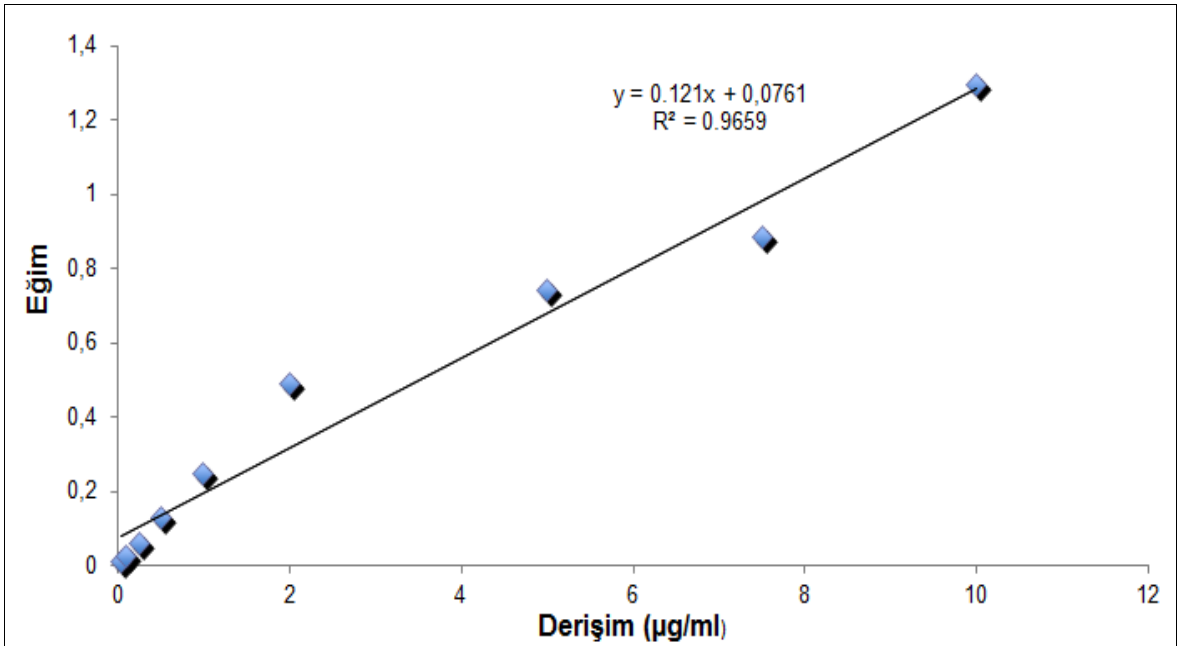
E2 baskılanmış SPR nanosensör ile E2 arasındaki etkileşimi incelemek amacıyla dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Scatchard, Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri.

| | |
|---------------------|---|
| Scatchard | $\Delta R_{denge} / [C] = K_A (\Delta R_{maks} - \Delta R_{denge})$ |
| Langmuir | $\Delta R = \{\Delta R_{maks} [C] / K_D + [C]\}$ |
| Freundlich | $\Delta R = \Delta R_{maks} [C]^{1/n}$ |
| Langmuir-Freundlich | $\Delta R = \{\Delta R_{maks} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n}\}$ |

Burada; ΔR_{maks} , maksimum SPR sinyal kayması; ΔR_{denge} , denge halindeki SPR sinyal kayması; $[C]$, analit derişimi ($\mu\text{g/ml}$); K_A ($\mu\text{g/ml}$), bağlanma denge sabiti; K_D (ml/ μg), ayrışma denge sabiti; $1/n$, Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.



(a)



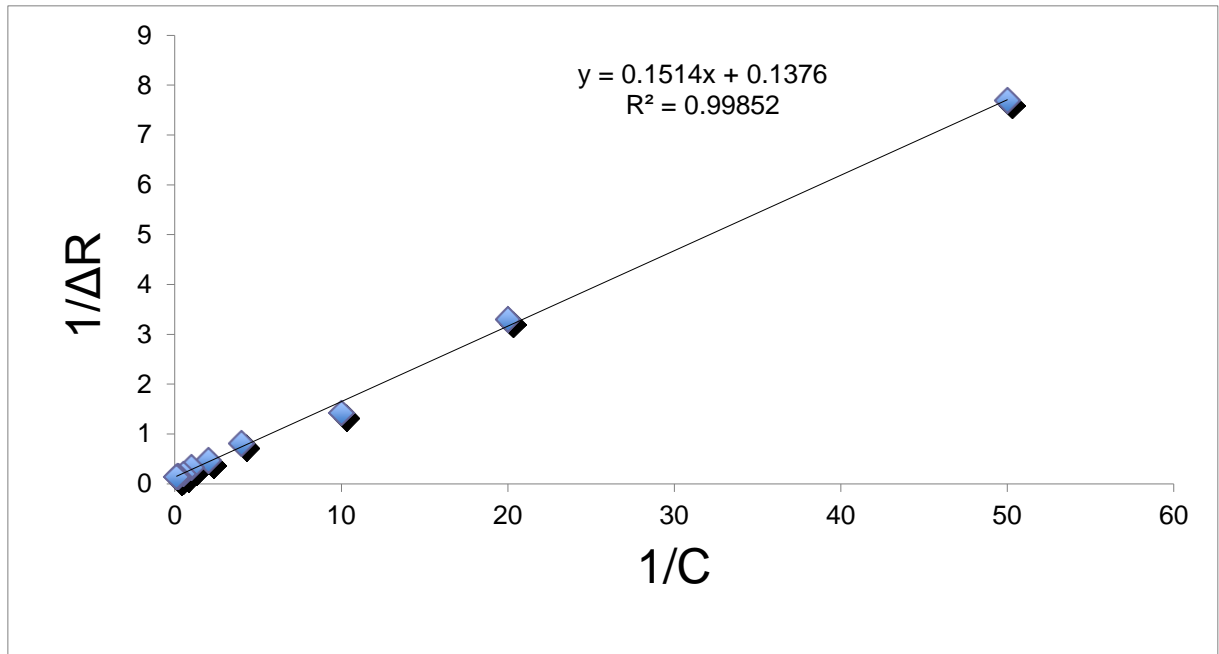
(b)

Şekil 4.17. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı.

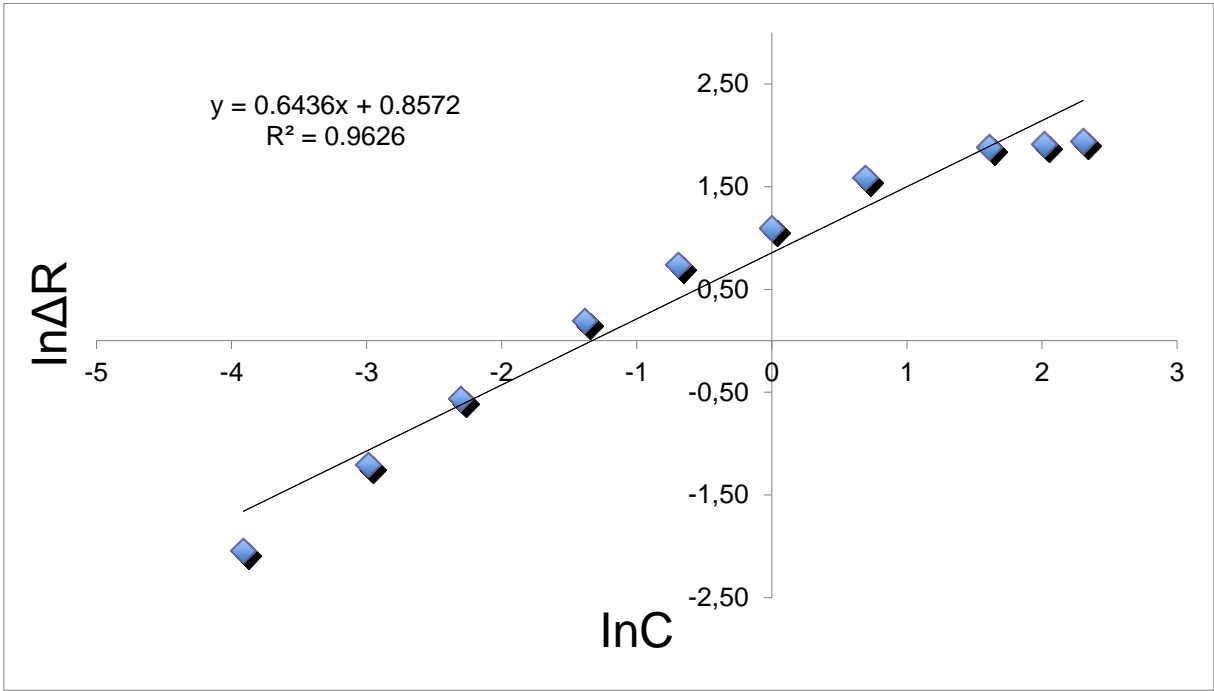
Şekil 4.18'e göre deneysel olarak elde edilen veriler E2 tayinine en uygun model Langmuir modelidir ($R^2= 0.9985$). Bu sonuç, hazırlanan sensör yüzeyindeki E2 bağlanma özelliklerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

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

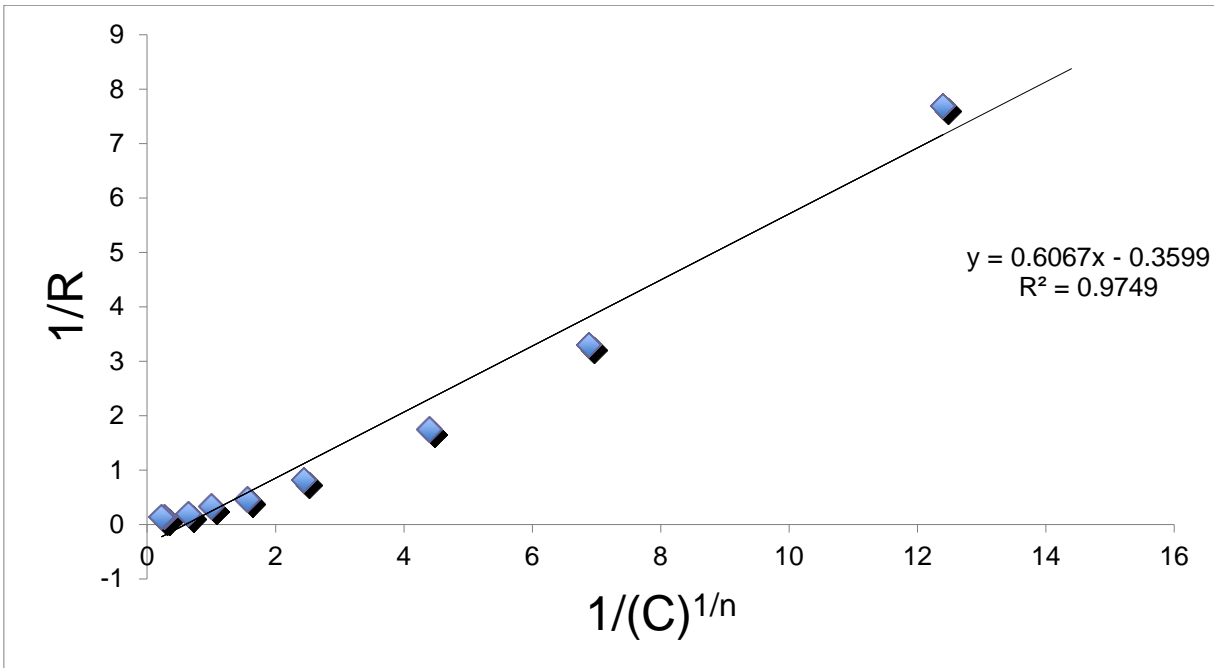
| Langmuir | | Freundlich | | Langmuir-Freundlich | |
|--------------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|
| ΔR_{maks} , $\mu\text{g/ml}$ | 7.28 | ΔR_{maks} , $\mu\text{g/ml}$ | 2.356 | ΔR_{maks} , $\mu\text{g/ml}$ | 2.78 |
| K_D , $\text{ml}/\mu\text{g}$ | 0.1354 | $1/n$ | 0.6436 | $1/n$ | 0.1150 |
| K_A , $\mu\text{g/ml}$ | 7.39 | R^2 | 0.9626 | K_D , $\text{ml}/\mu\text{g}$ | 1.69 |
| R^2 | 0.9985 | | | K_A , $\mu\text{g/ml}$ | 0.592 |
| | | | | R^2 | 0.9749 |



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.18. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.

4.7. Yarışmalı kinetik analizler

Hazırlanan E2 baskılanmış sensörün E2'ye karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları E2, kolesterol ve stigmasterol biyomoleküllerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Kolesterol ve stigmasterol için E2 molekülerine göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

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

Eşitlikte K_d , dağılma katsayısını (ml/g); C_i ve C_f , biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini ($\mu\text{g/ml}$); V , kullanılan çözelti hacmini (ml) ve m , polimerin kütlesini (g) ifade etmektedir. SPR sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerçekleştirilmektedir [203]. Bu yaklaşımdaki temel sebepler; başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi; polimerin kütlesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin ΔR ile doğrusal ilişkide olmasıdır.

Bu durumda seçicilik katsayısı,

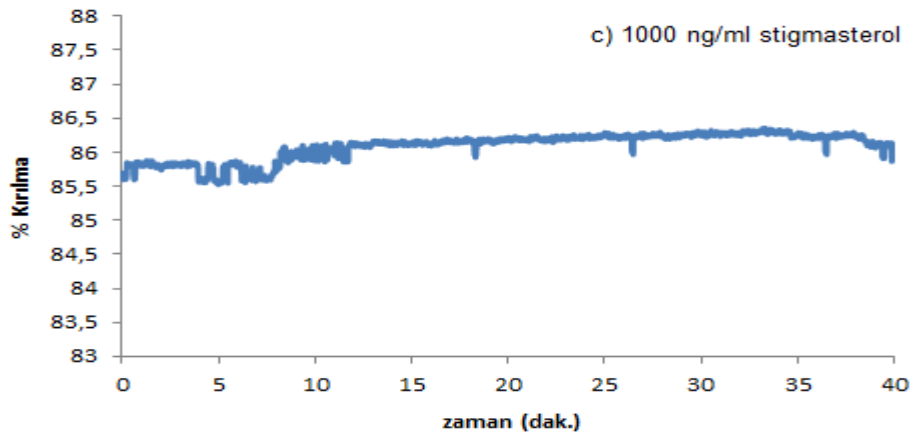
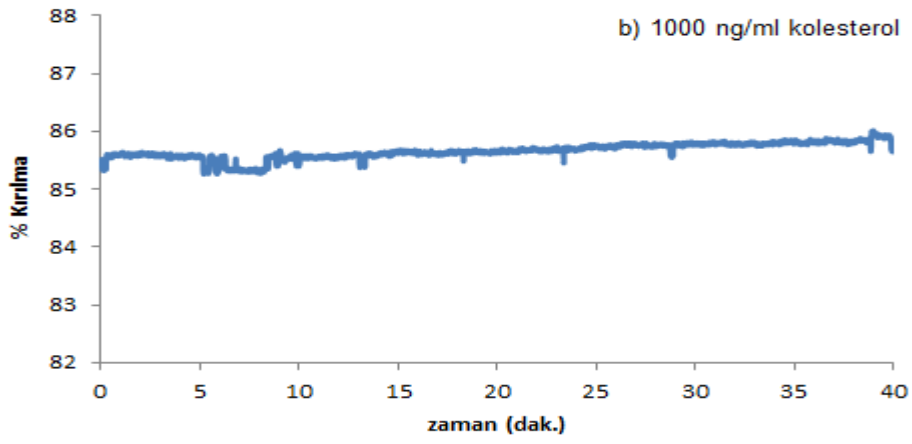
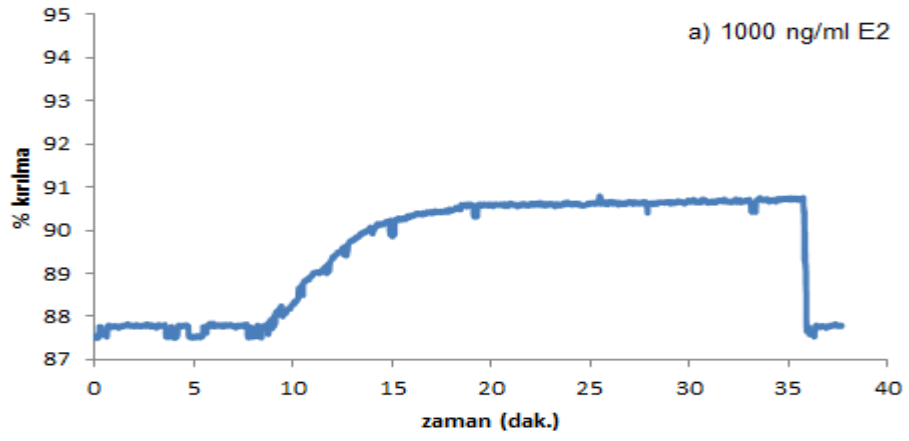
$$k = \Delta R_{\text{kalıp}} / \Delta R_{\text{girişimci}} \quad (4.7)$$

şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi ise;

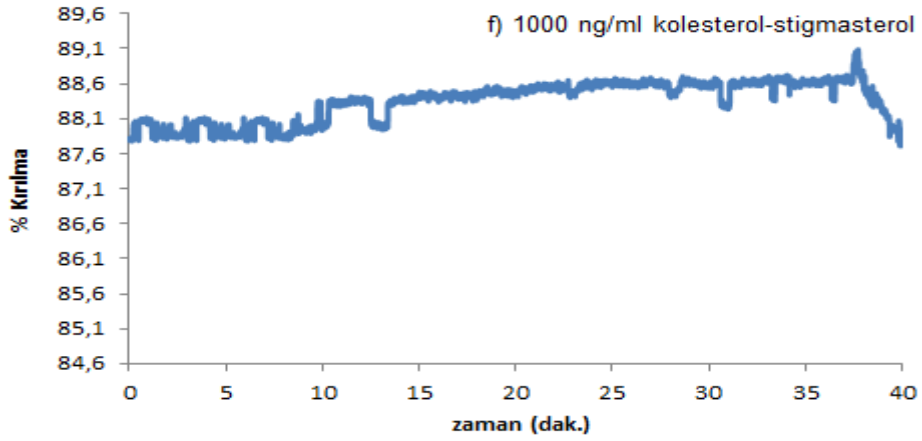
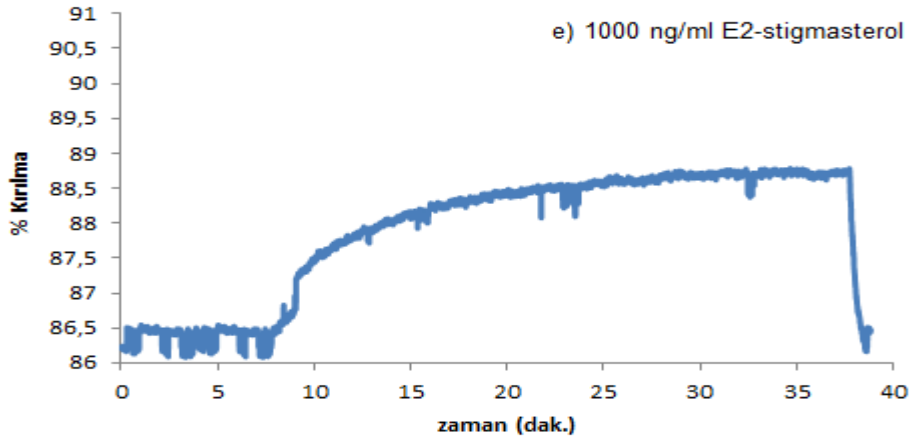
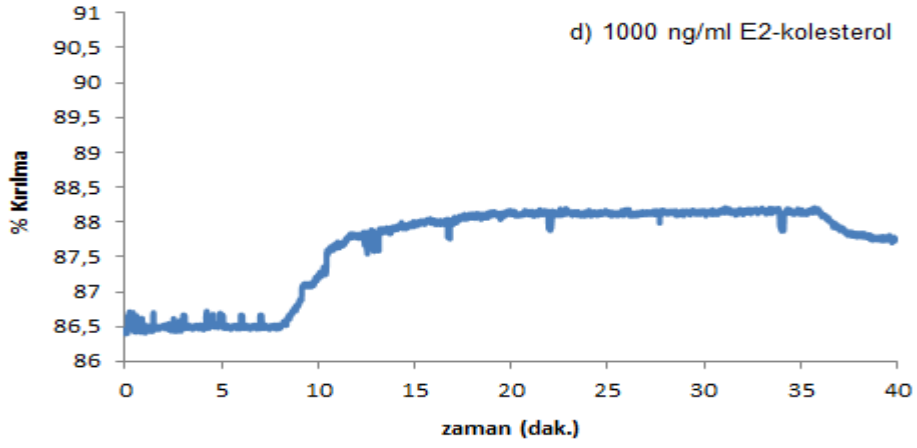
$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad (4.8)$$

şeklinde ifade edilebilir.

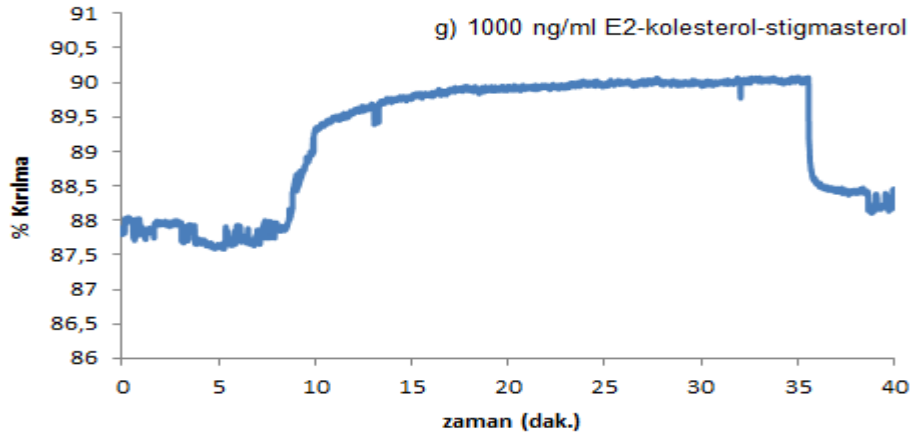
Şekil 4.19 ve 4.20 ((a) 1000 ng/ml E2; (b) 1000 ng/ml kolesterol; (c) 1000 ng/ml stigmasterol; (d) 1000 ng/ml E2-kolesterol; (e) 1000 ng/ml E2-stigmasterol; (f) 1000 ng/ml kolesterol-stigmasterol; (g) 1000 ng/ml E2-kolesterol-stigmasterol) incelendiğinde; E2 baskılanmış SPR nanosensörün kolesterol ve stigmasterol molekülleriyle spesifik bir etkileşime girmediği ve sinyal vermediği belirlenmiştir. Bu durum E2 baskılanmış çipin, E2 molekülüne seçici olduğunu göstermektedir. İkili ve üçlü karışımlar dikkate alındığında, E2 karışımlarının gösterdiği ΔR kayma değerleri, tekli çözeltilere göre daha düşüktür. Bu durum, moleküllerin karışım halinde bir yarışmacı ajan olarak davrandığı ve ΔR kayma değerinde azalmaya sebep olduğunu göstermektedir.



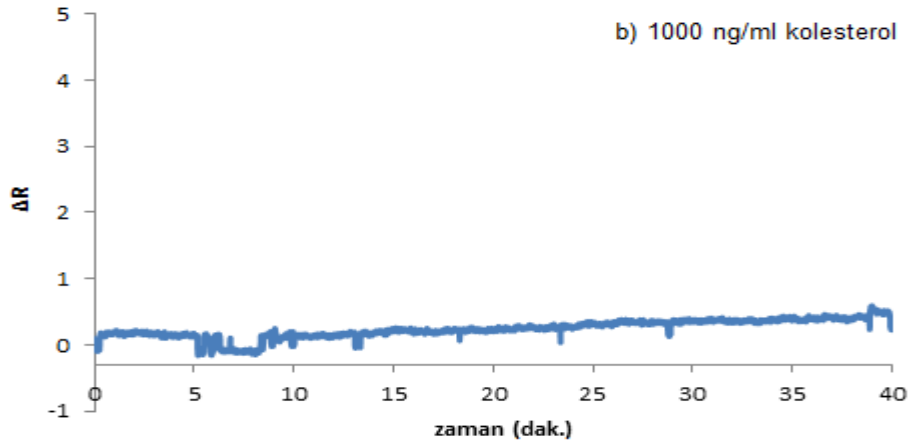
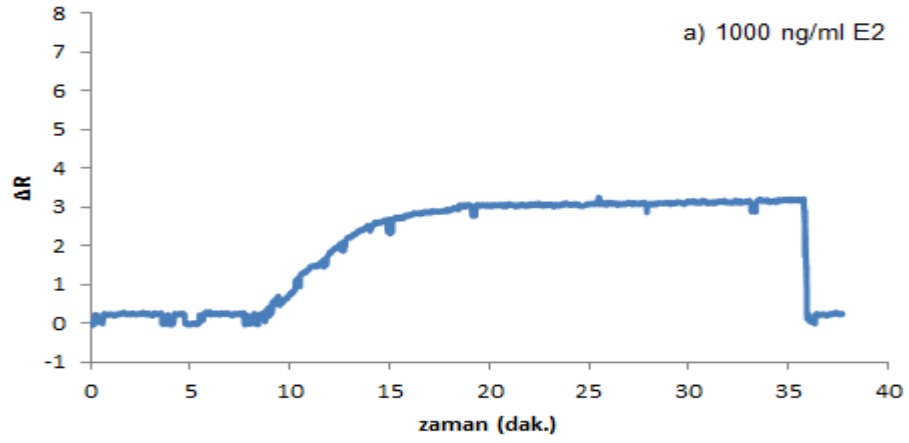
Şekil 4.19. E2, kolesterol ve stigmasterolün tekli, ikili ve üçlü çözeltileri ile SPR sensör arasındaki % kırılma-zaman grafikleri.



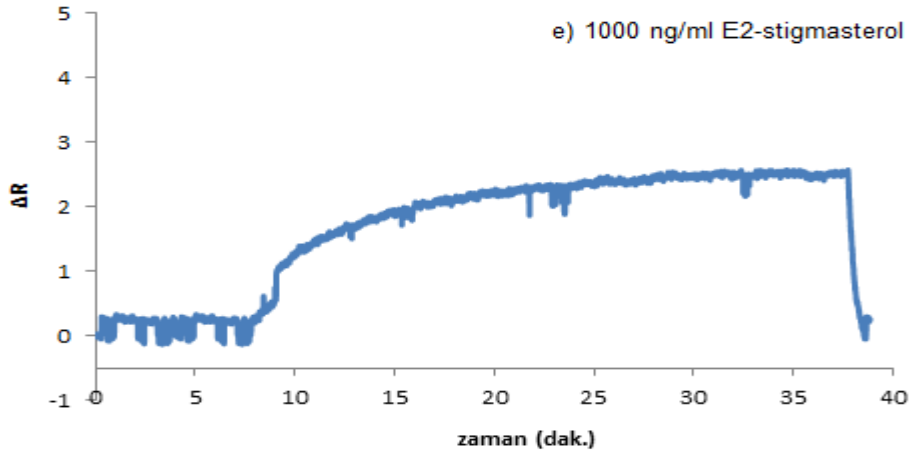
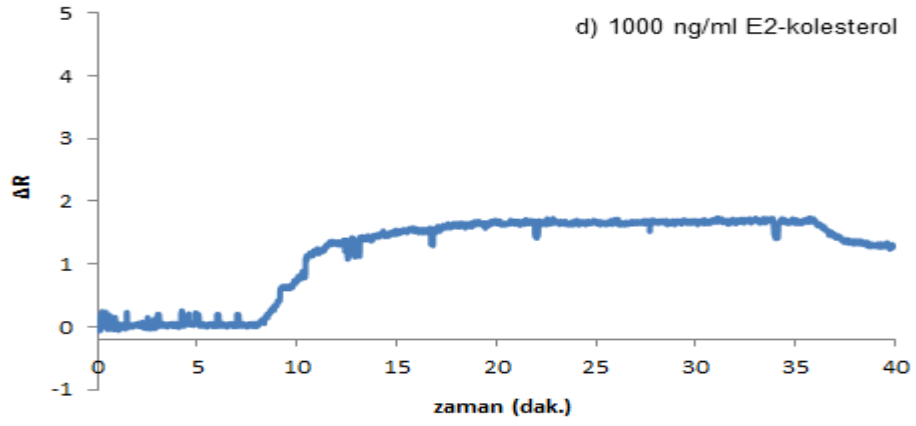
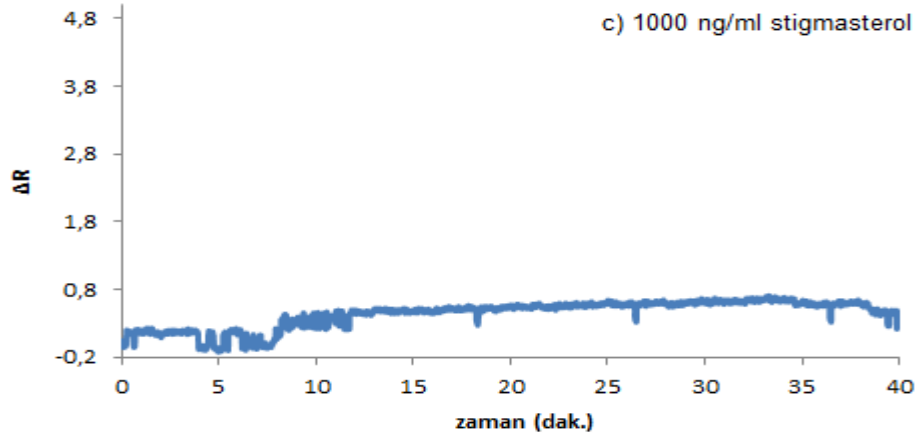
Şekil 4.19. E2, kolesterol ve stigmasterolün tekli, ikili ve üçlü çözeltileri ile SPR sensör arasındaki % kırılma-zaman grafikleri (devam).



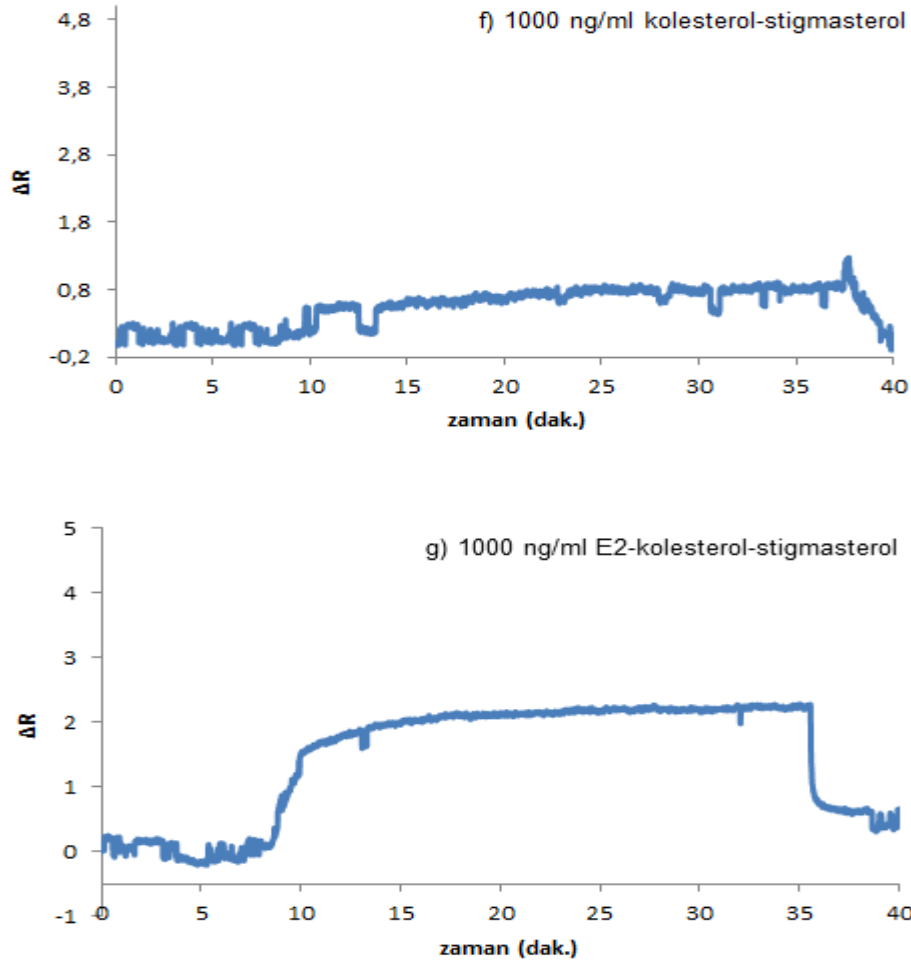
Şekil 4.19. E2, kolesterol ve stigmasterolün tekli, ikili ve üçlü çözeltileri ile SPR sensör arasındaki % kırılma-zaman grafikleri (devam).



Şekil 4.20. E2, kolesterol ve stigmasterolün tekli, ikili ve üçlü çözeltileri ile SPR sensör arasındaki % ΔR-zaman grafikleri.



Şekil 4.20. E2, kolesterol ve stigmasterolün tekli, ikili ve üçlü çözeltileri ile SPR sensör arasındaki % ΔR -zaman grafikleri (devam).

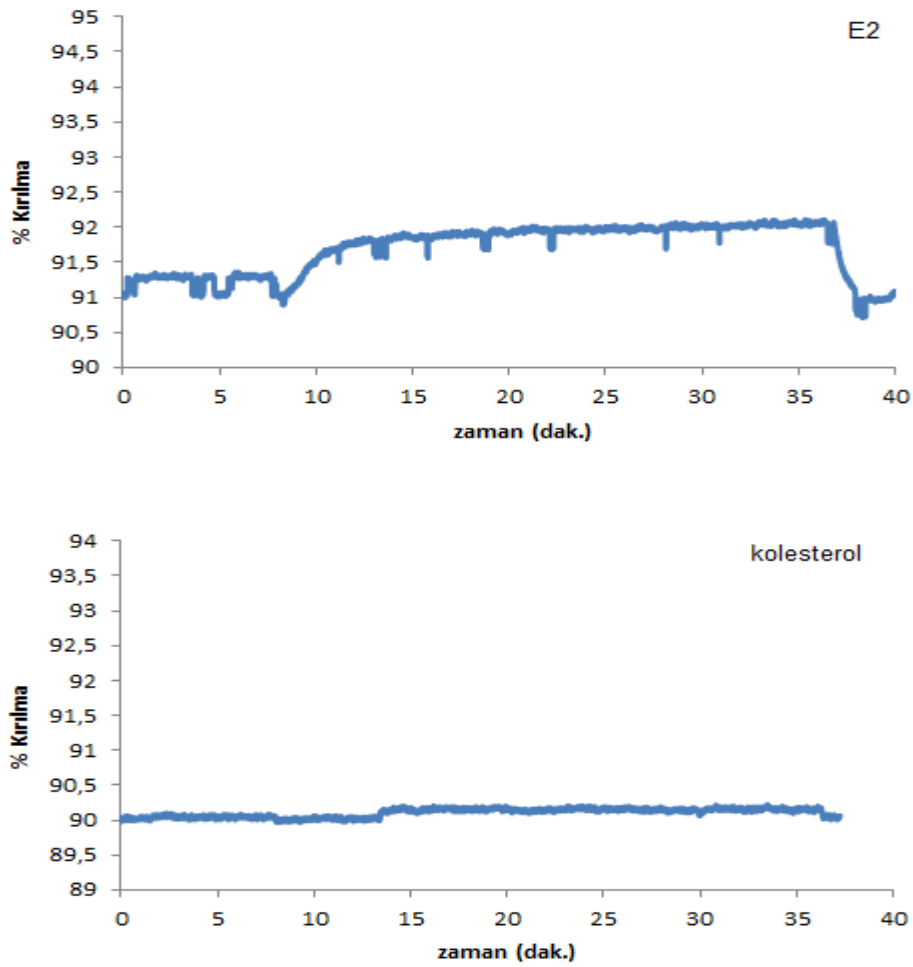


Şekil 4.20. E2, kolesterol ve stigmasterolün tekli, ikili ve üçlü çözeltileri ile SPR sensör arasındaki % ΔR -zaman grafikleri (devam).

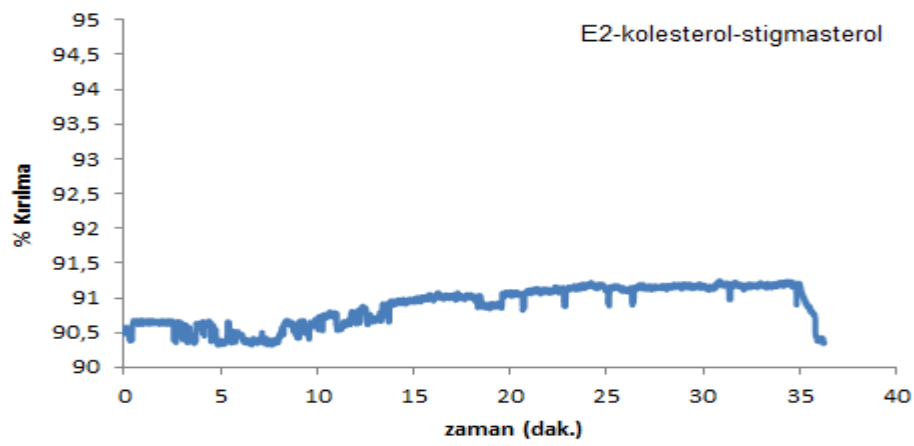
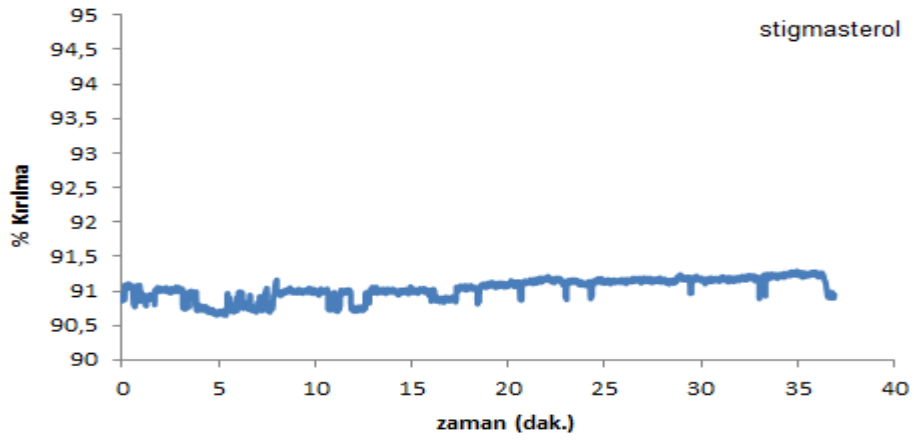
4.6. E2 baskılanmış sensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi

E2 baskılanmış sensörün baskılama seçiciliğini göstermek için E2 baskılanmamış SPR çip hazırlanmıştır. E2, kolesterol ve stigmasterol biyomoleküllerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar SPR sistemine verilmiştir. Bu çözeltiler karbonat tamponunda (pH 11) 1000 ng/ml derişimde hazırlanmışlardır. Şekil 4.21'de % kırılma/zaman, Şekil 4.22'de ΔR /zaman grafikleri verilmiştir. Şekil 4.22 incelendiğinde; E2 baskılanmamış SPR nanosensörün kolesterol ve stigmasterol ile herhangi bir etkileşime girmediği ve sinyal vermediği gözlenmiştir. Tekli ve üçlü karışımlarda; E2 baskılanmış SPR sensörlere benzer sonuçlar elde edildiği ve karışımların sinyal değerlerinde antagonistik bir etki olduğu görülmektedir. E2, kolesterol ve stigmasterolün bulunduğu ortamda daha az ΔR değeri vermesinin sebebi; bu moleküllerin yarışmacı ajan olarak davranıp E2'nin bağlandığı bölgelere bağlanmak istemesidir. Diğer bir muhtemel sebepte üçlü karışımın bulunduğu

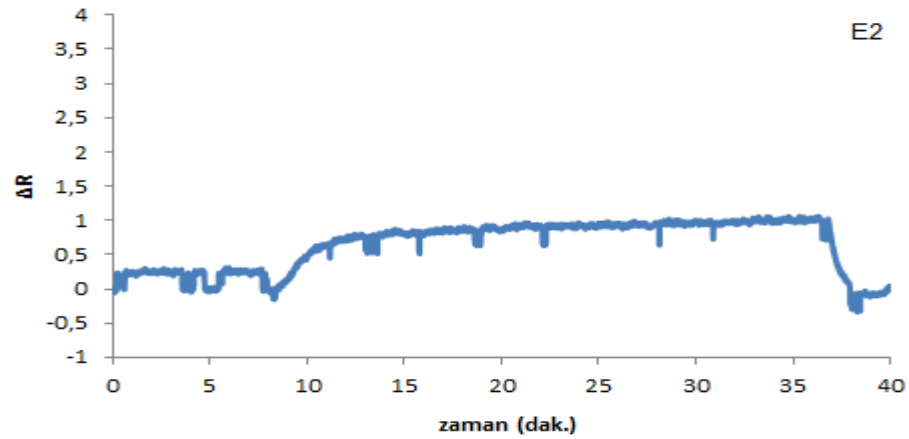
ortamdaki sterik engellerin oldukça fazla olması ve E2 moleküllerinin bağlanması gereken boşluklara ulaşamamasıdır. E2 baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler karşılaştırıldığında; E2 sinyalinin 3.00'den 1.05'e düştüğü görülmektedir (Çizelge 4.4). Eşitlik 4.7 ve 4.8 kullanılarak hesaplanan seçicilik katsayıları, stigmasterol için 5.0 (baskılanmış), 4.20 (baskılanmamış); kolesterol için 10.00 (baskılanmış), 8.07 (baskılanmamış) olarak bulunmuştur. Bağlı seçicilik değeri, 1'in ne kadar üzerindeyse baskılama işleminin o kadar etkin olduğu bilinmektedir [204]. E2 tayini için hazırlanan QCM temelli sensörün E2 sinyal duyarlılığının 2.2 (baskılanmış)'den 0.8 (baskılanmamış)'e düştüğü görüşmüştür [76].



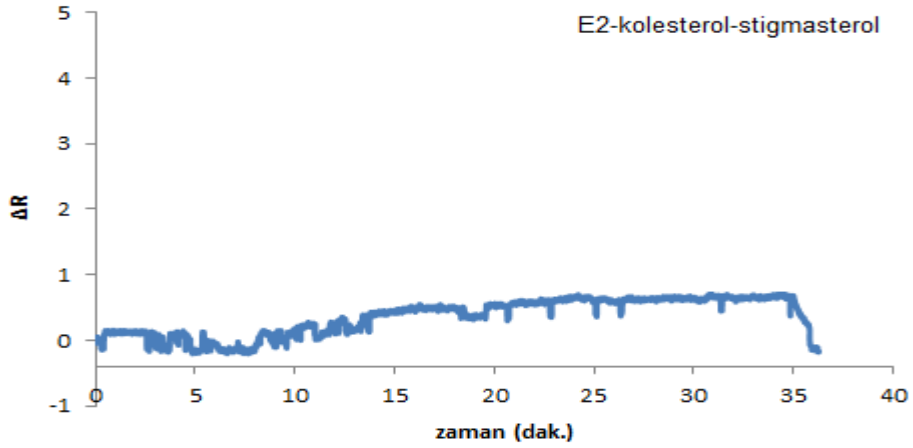
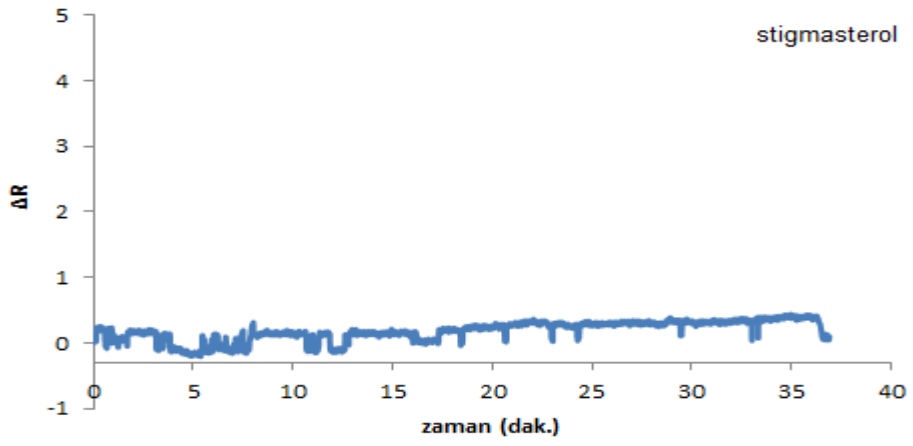
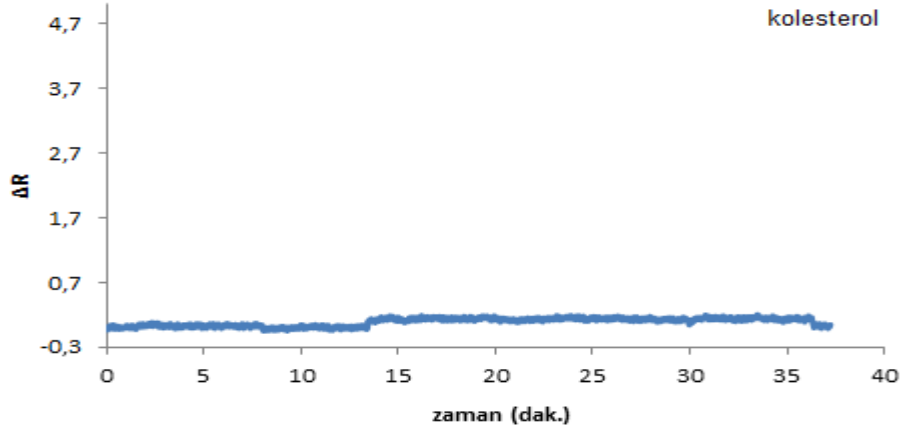
Şekil 4.21. E2, kolesterol ve stigmasterol çözeltileri ile E2 baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait % kırılma-zaman grafikleri.



Şekil 4.21. E2, kolesterol ve stigmasterol çözeltileri ile E2 baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait % kırılma-zaman grafikleri (devam).



Şekil 4.22. E2, kolesterol ve stigmasterol çözeltileri ile E2 baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait ΔR-zaman grafikleri.



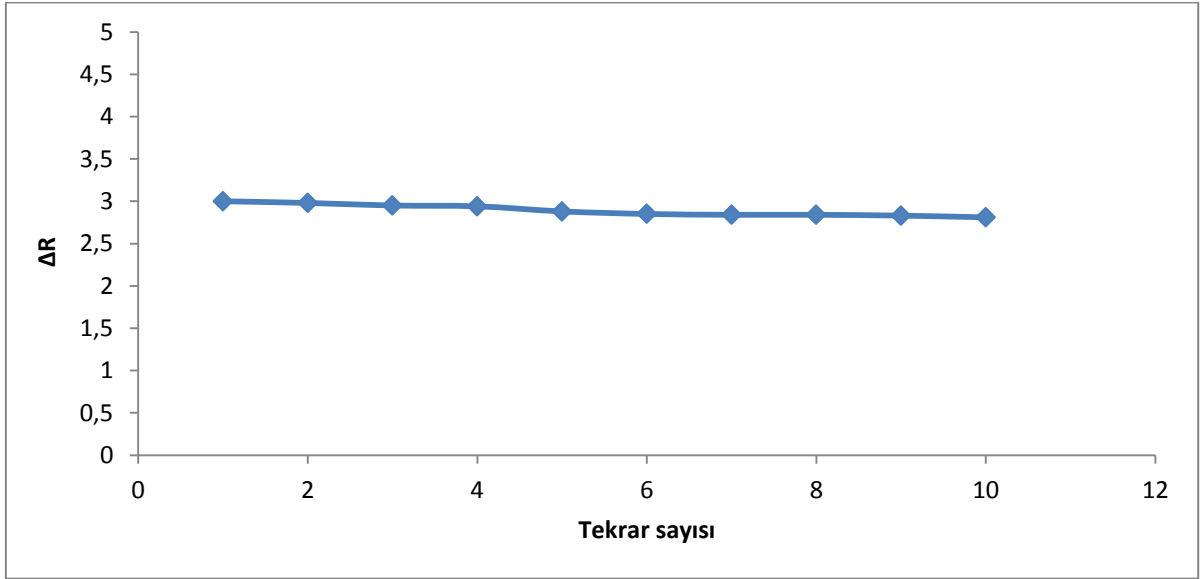
Şekil 4.22. E2, kolesterol ve stigmasterol çözeltileri ile E2 baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait ΔR -zaman grafikleri (devam).

Çizelge 4.4. E2'ye göre stigmasterol ve kolesterol için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

| Biyomolekül | MIP | | | NIP | |
|--------------|------------|-------|------------|------|------|
| | ΔR | k | ΔR | k | k' |
| E2 | 3.00 | - | 1.05 | - | - |
| Stigmasterol | 0.60 | 5.00 | 0.25 | 4.20 | 1.20 |
| Kolesterol | 0.30 | 10.00 | 0.13 | 8.07 | 1.23 |

4.7. E2 baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

E2 baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 1000 ng/ml derişimlerde E2 içeren çözeltiler SPR sistemine tekrarlı (10 kez) bir şekilde enjekte edilmiş ve sonuçlar şekil 4.23'de verilmiştir.



Şekil 4.23. E2 baskılanmış SPR sensörün tekrar kullanılabilirliği.

5. YORUM

- MALM monomeri, L-lösin metil esterinin metakroil klorür ile tepkimesi sonucu elde edilmiştir. Elde edilen monomer FTIR ile karakterize edilmiştir.
- MALM monomerinin FTIR spektrumunda 1724 cm^{-1} 'deki band MALM monomerinden gelen C=O bandına aittir. 1298 cm^{-1} 'deki band lösin aminoasidindeki C-O bandından kaynaklanmaktadır. $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ 'deki geniş band lösinde kaynaklanan $-\text{CH}_3$ grubuna aittir. $1020-1250\text{ cm}^{-1}$ arasındaki geniş band lösindeki C-N titreşim bandına, 1620 cm^{-1} 'deki keskin band RNH_2 grubundaki eğilme bandlarına aittir.
- Boş SPR çip, E2 baskılanmış ve baskılanmamış SPR çiplerin temas açısı ölçümlerinden görüldüğü üzere; boş SPR çipin yüzey temas açısı değeri 81.4° iken, E2 baskılanmış SPR çipin temas açısı değeri 65.6° 'ye, E2 baskılanmamış SPR çipin temas açısı değeri de 63.3° 'ye düşmüştür. Temas açısında meydana gelen düşüşün nedeni şu şekilde açıklanabilir: HEMA hidrofilik karakterde bir malzeme olduğundan dolayı, yüzeyde hidrofilik bir polimerin bulunması yüzey hidrofilitesini arttırmış ve temas açısı değerini düşürmüştür.
- E2 baskılanmış SPR sensörün ortalama yüzey kalınlığı elipsometre ile elde edilmiştir. E2 baskılanmış SPR sensörlerin yüzey kalınlığı 24.20 nm , E2 baskılanmamış SPR çipin yüzey kalınlığı 29.00 nm olarak tespit edilmiştir.
- E2 baskılanmış SPR sensörün yüzey morfolojisi yarı temas modunda atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. E2 baskılanmış SPR sensörün ortalama yüzey pürüzlülüğü 30.02 nm , E2 baskılanmamış SPR çipin ortalama yüzey pürüzlülüğü 16.45 nm olarak tespit edilmiştir.
- SPR sensörlerin yüzey karakterizasyonu FTIR-ATR spektrofotometresiyle yapılmıştır. 3360 cm^{-1} 'deki geniş pik $\nu(\text{N-H})$ asimetric gerilim bandına ait iken; 2927 cm^{-1} 'deki keskin band alifatik $\nu(-\text{CH}_3)$ bandına ait olup; 1721 cm^{-1} 'deki pik $\nu(\text{C=O})$ bandına aittir. 1565 cm^{-1} 'deki sinyal $\nu(\text{COOH})$ 'daki asimetric gerilimden, 1416 cm^{-1} 'deki sinyal $\nu(\text{COOH})$ 'daki simetric gerilimden kaynaklanmaktadır. 1253 cm^{-1} 'deki sinyal $\nu(\text{CN})$ titreşim bandına aittir. 1633 cm^{-1} 'deki monomere ait $\nu(\text{C=C})$ bandının yok olması polimerleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir.

- E2 baskılanmış SPR sensör artan derişimlerde hazırlanmış E2 çözeltileriyle etkileştirilmiştir. Artan derişimlerle birlikte ΔR değerlerinde de bir artış görülmüştür. Bunun nedeni; sensör yüzeyi ile çözeltili arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artmasıdır.
- ΔR 'ye karşılık zaman grafikleri bir arada çizildiğinde derişimin artmasıyla ΔR değerlerinin arttığı açık bir şekilde görülmektedir.
- SPR sensör iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. 20 ng/ml – 1000 ng/ml derişim aralığında alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi $y=2.8476x+0.3502$ ve doğrusallığı (R^2) 0,9609; 2000 ng/ml – 10000 ng/ml derişim aralığında alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi $y=0.2607x+4.6529$ ve doğrusallığı (R^2) 0.8893 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu verilerle SPR sensör, 2000 ng/ml – 10000 ng/ml aralığında %96, 2000 ng/ml – 10000 ng/ml aralığında %88 doğrulukta ölçüm yapmaktadır.
- Langmuir modelin hazırlanan SPR sensöre en uygun izoterm model olduğu görülmüştür. Hesaplanan ΔR_{maks} değeri (7.28) deneysel değere (7.0) oldukça yakındır. Langmuir denkleminde hesaplanan K_A ve K_D değerleri sırasıyla 7.39 ve 0.13 olarak hesaplanmıştır.
- Hazırlanan E2 baskılanmış SPR sensörün E2'ye karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı bağlanma çalışmaları E2, kolesterol ve stigmasterol çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. E2 baskılanmış SPR sensörün E2'ye verdiği sinyal değeri (ΔR) 3.0 iken, aynı derişimlerde hazırlanan stigmasterol ve kolesterol çözeltilerine verdiği sinyal değeri sırasıyla 0.6 ve 0.3'tür. Bu sonuçlara göre hazırlanan sensör E2'yi stigmasterole göre 5, kolesterole göre 10 kat daha duyarlı tayin etmektedir. Etkileşimdeki bu hassasiyet kalıp molekül olan E2'nin üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasından kaynaklanmaktadır.
- E2 baskılanmış SPR sensörün baskılama seçiciliğini göstermek için E2 baskılanmamış SPR sensör hazırlanmış ve seçicilik çalışmalarında olduğu gibi aynı derişimlerde E2, kolesterol ve stigmasterol SPR sistemine enjekte edilmiştir. E2 baskılanmamış SPR sensörün aynı derişimlerdeki E2, kolesterol ve stigmasterol çözeltilerine verdiği tepki daha az olmuştur. E2 baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler karşılaştırıldığında E2 sinyal

duyarlılığının 3.00'ten 1.05'e düştüğü görülmektedir. Eşitlik 4.7 ve 4.8 kullanılarak hesaplanan seçicilik katsayıları, stigmasterol için 5.00 (baskılanmış), 4.20 (baskılanmamış); kolesterol için 10.00 (baskılanmış), 8.07 (baskılanmamış) olarak bulunmuştur.

- E2 baskılanmış PHEMALM SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek için; aynı derişimde E2 içeren çözeltiler 10 kez SPR sistemine verilmiş ve hazırlanan SPR sensörün E2 tayin miktarında önemli bir düşüş olmadan E2'yi tayin ettiği görülmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M.Y., Hagens, W.I., Bulder, A.S., de Heer, C., ten Voorde, S.E.C.G., Wijnhoven, S.W.P., Marvin, H.J.P., Sips, A.J.A.M., Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53, 52-62, **2009**.
- [2] Serrano, E., Rus, G., García-Martínez, J., Nanotechnology for sustainable energy, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 2373-2384, **2009**.
- [3] Qu, X., Alvarez, P.J.J., Li, Q. Application of nanotechnology in water and wastewater treatment, *Water research*, 47, 3931-3946, **2013**.
- [4] van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E., De Coen, W., Dubruel, P., Blust, R., Robbens, J., Recent advances in recognition elements of the food and environmental biosensors: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1178-1194, **2010**.
- [5] Luong, J.H.T., Male, K.B., Glennon, J.D., Biosensor technology: Technology push versus market pull, *Biotechnology advances*, 26, 492-500, **2008**.
- [6] Koyun, A., Ahlatcıoğlu, E., Koca İpek, Y., Biosensors and Their Principles, A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones, Prof. Sadik Kara (Ed.), ISBN: 978-953-51-0609-8, *InTech*, **2012**, <http://www.intechopen.com/books/a-roadmap-of-biomedical-engineers-and-milestones/biosensor-and-theirprinciples>
- [7] Homola, J., Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species, *Chemical Reviews*, 108, 462-493, **2008**.
- [8] Mayers, A.G., Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry, *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 321–332, **1997**.
- [9] Bigsby, R., Chapin, R.E., Daston, G.P., Davis, B.J., Gorski, J., Gray, L.E., Howdeshell, K.L., Zoeller, R.T., vom Saal, F.S., Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environmental Health Perspectives*, 107, 613-8, **1999**.
- [10] Lee M.M., Endocrine Disrupters. A Current Review of Pediatric Endocrinology, 109-18, **2007**.
- [11] Le Noir, M., Lepeuple, A-S., Guieysse, B., Mattiasson, B., Selective removal of 17 β -estradiol at trace concentration using a molecularly imprinted polymer, *Water Research*, 41, 2825-2831, **2007**.
- [12] Weigel, N.L., Rowan, B.G., Estrogen and progesteron action, "Endocrinology" (Ed. L. J. DeGroot ve J.L. Jameson)'de, 4.Baskı, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2053-2061, **2001**.

- [13] Menteş, G., Gonadlar ve steroid hormonları, “İnsan Biyokimyası” (Ed. T. Onat, K. Emerk., E.Y. Sözmen)’nda, Palme Yayıncılık, Ankara, 491-500, **2002**.
- [14] Türkoğlu, E.A., Yavuz, H., Uzun, L., Akgöl, S., Denizli, A., The fabrication of nanosensor-based surface plasmon resonance for IgG detection, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 41; 213-221, 2013.
- [15] Toumey, C., Plenty of room, plenty of history, *Nature*, 4, 783-784, **2009**.
- [16] DiscoverNANO TIMELİNE, <http://www.discovernano.northwestern.edu/whatis/History/HistoryPopup>, **2010**.
- [17] Ahmed, W., Jackson, M.J. ve Hassan, I.Ul. Nanotechnology to nanomanufacturing, *Emerging Nanotechnologies for Manufacturing*, Elsevier, **2009**.
- [18] Khademhosseini, A., Langer, R., Microengineered hydrogels for tissue engineering, *Biomaterials*, 28, 5087-5092, **2007**.
- [19] Rothmund, P.W.K., Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns *Nature*, 440, 297-302, **2006**.
- [20] Hyder, M.A.H., Potential applications and environmental implications of nanotechnology, Technical University of Hamburg-Harburg, Yüksek Lisans Tezi, **2003**.
- [21] Bhat, J.S.A., Concerns of new technology based industries—the case of nanotechnology, *Technovation*, 25, 457-462, **2005**.
- [22] Porter, A.L., Youtie, J., Where does nanotechnology belong in the map of science? *Nature Nanotechnology*, 4, 534-536, **2009**.
- [23] Jones, R., What can Biology Teach Us?, *Nature Nanotechnology*, 1, 85-86, **2006**.
- [24] Nanoteknoloji Strateji Grubu, Vizyon 2023 Projesi Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri, Ankara, **2004**.
- [25] Holzapfel, B.M., Reichert, J.C., Schantz, J-T., Gbureck, U., Rackwitz, L., Nöth, U., Jakob, F., Rudert, M., Groll, J. ve Hutmacher, D.W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 581-603, **2013**.
- [26] Boisseau, P., Loubaton, B., Nanomedicine, nanotechnology in medicine, *Comptes Rendus Physique*, 12, 620-636, **2011**.
- [27] Cavalcanti, A., Shirinzadeh, B., Kretly, L.C., Medical nanorobotics for diabetes control, *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 4, 127-138, **2008**.
- [28] Clark, LC Jr., Lyons, C., Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102,

29-45, **1962**.

- [29] Setford, S.J., Newman, J.D., Enzyme Biosensors. Bölüm 2; 29-60. Barredo, J.L. Microbial Enzymes and Biotransformations. Springer, **2005**.
- [30] Monošík, R., Stred'ansky, M., Šturdik, E., Application of Electrochemical Biosensors in Clinical Diagnosis, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 26, 22-34, **2012**.
- [31] Huang, J., Li, J., Yang, Y., Wang, X., Wu, B., Anzai, J.I., Osa, T. ve 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**.
- [32] 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**.
- [33] Wang, X., Watanabe, H., Uchiyama, S., Amperometric L-ascorbic acid biosensors equipped with enzyme micelle membrane, *Talanta*, 74, 1681-1685, **2008**.
- [34] 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**.
- [35] Smutok, O., Ngounou, B., Pavlishko, H., Gayda, G., Gonchar, M., Schuhmann, W., A reagentless bienzyme amperometric biosensor based on alcohol oxidase/oxidase and an Os-complex modified electrodeposition paint, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113, 590-598, **2006**.
- [36] Umar, A., Rahman, M.M., Vaseem, M., Hahn, Y.B., Ultra-sensitive cholesterol biosensor based on low-temperature grown ZnO nanoparticles, *Electrochemistry Communications*, 11, 118-121, **2009**.
- [37] Monošík, R., Ukropcova, D., Stred'ansky, M., Šturdik, E., Multienzymatic amperometric biosensor based on gold and nanocomposite planar electrodes for glycerol determination in wine, *Analytical Biochemistry*, 421, 256-261, **2012**.
- [38] 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**.
- [39] Choi, J.W., Kim, Y.K., Song, S.Y., Lee, I.H. Ve Lee, W.H., Optical biosensor consisting of glutathione-S-transferase for detection of captan, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 1461-1466, **2003**.
- [40] 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**.
- [41] Soldatkin, O.O., Peshkova, V.M., Dzyadevych, S.V., Soldatkin, A.P., Jaffrezic-Renault, N. ve Elskaya, A.V., Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor, *Materials Science and Engineering: C*, 28, 959-964, **2008**.
- [42] Maines, A., Prodromidis, M.I., Tzouwara-Karayanni, S.M., Karayannis, M.I., Ashworth, D. ve Vadgama, P., An Enzyme Electrode for Extended Linearity Citrate Measurements Based on Modified Polymeric Membranes, *Electroanalysis*, 12, 1118-1123, **2000**.
- [43] 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**.
- [44] Mathotra, R., Patel, V., Vaque, J.P., Gutkind, J.S. ve Rusling, J.F., Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Oral Cancer Biomarker IL-6 Using Carbon Nanotube Forest Electrodes and Multilabel Amplification, *Analytical Chemistry*, 82, 3118-3123, **2010**.
- [45] Mani, V., Chikkaveeraiah, B.V., Patel, V., Gutkind, J.S. ve Rusling, J.F., Ultrasensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Proteins Using Gold Nanoparticle Film Electrodes and Multienzyme-Particle Amplification, *ACS Nano*, 3, 585-594, **2009**.
- [46] Kadir, M.K.A., Tothill, I.E., Development of an Electrochemical Immunosensor for Fumonisin Detection in Foods, *Toxins*, 2, 382-398, **2010**.
- [47] Pilolli, R., Monaci, L., Visconti, A., Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management, *Trends in Analytical Chemistry*, 47, 12-26, **2013**.
- [48] Guth, U., Vonau, W., Zosel, J., Recent developments in electrochemical sensor application and technology—a review, *Measurement Science and Technology*, 20, 1-14, **2009**.
- [49] Lucklum, R., Hauptmann, P., Acoustic microsensors—the challenge behind microgravimetry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 667–682, **2006**.
- [50] Kimmel, D., LeBlanc, G., Meschievitz, M., Cliffl, D., Electrochemical Sensors and Biosensors, *Analytical Chemistry*, 84, 685–707, **2012**.
- [51] Yang, Z-p., Zhang, C-j., Designing of MIP-based QCM sensor for the determination of Cu(II) ions in solution, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 142, 210-215, **2009**.
- [52] Casteleiro-Roca, J.L., Calvo-Rolle, J.L., Meizoso-Lopez, M.C., Pinón-Pazos, A. ve Rodríguez-Gómez, B.A., New approach for the QCM sensors characterization, *Sensors and Actuators A: Physical*, 207, 1-9, **2014**.

- [53] Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M., Barceló, D., Analysis of bisphenol A in natural waters by means of an optical immunosensor, *Water Research*, 39, 5071-5079, **2005**.
- [54] Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., Ohba, M., Inouye, K., Screening of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin on the artificial phospholipid monolayer incorporated with brush border membrane vesicles of *Plutella xylostella* by optical biosensor technology, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 47, 177–188, **2001**.
- [55] Parab, H.J., Jung, C., Lee, J.H., Park, H.G., A gold nanorod-based optical DNA biosensor for the diagnosis of pathogens, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 667–673, **2010**.
- [56] Wang, Y., Knoll, W., Dostalek, J., Bacterial Pathogen Surface Plasmon Resonance Biosensor Advanced by Long Range Surface Plasmons and Magnetic Nanoparticle Assays, *Analytical Chemistry*, 84 (19), 8345–8350, **2012**.
- [57] Goh, Y.Y., Frecer, V., Ho, B., Ding, J.L., Rational design of green fluorescent protein mutants as biosensor for bacterial endotoxin, *Protein Engineering*, 15, 493–502, **2002**.
- [58] Bateman, R.M., Hodgson, K.C., Kohli, K., Knight, D., Walley, K.R., Endotoxemia increases the clearance of mPEGylated 5000-MW quantum dots as revealed by multiphoton microvascular imaging, *Journal of Biomedical Optics*, 12 (6), 064005–064008, **2007**.
- [59] Li, N., Cheng, X.R., Brahmendra, A., Prashar, A., Endo, T., Guyard, C., Terebiznik, M., Kerman, K., Photonic crystals on copolymer film for bacteria detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 354–358, **2013**.
- [60] Velusamy, V., Arshak, K., Korosynska, O., Oliwa, K., Adley, C., An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors, *Biotechnology Advances*, 28, 232–254, **2010**.
- [61] Miao, P., Han, K., Qi, J., Zhang, C., Liu, T., Electrochemical investigation of endotoxin induced limulus amoebocyte lysate gel-clot process, *Electrochemistry Communications*, 26, 29–32, **2013**.
- [62] Inoue, K.Y., Ino, K., Shiku, H., Matsue, T., Electrochemical detection of endotoxin using recombinant factor C zymogen, *Electrochemistry Communications*, 12, 1066–1069, **2010**.
- [63] Zelada-Guillen, G.A., Sebastian-Avila, J.L., Blondeau, P., Riu, J., Rius, F.X., Label-free detection of *Staphylococcus aureus* in skin using real-time potentiometric biosensors based on carbon nanotubes and aptamers, *Biosensors and Bioelectronics*, 31, 226–232, **2012**.

- [64] Guo, X., Lin, C., Chen, S., Ye, R., Wu, V.C.H., A piezoelectric immunosensor for specific capture and enrichment of viable pathogens by quartz crystal microbalance sensor, followed by detection with antibody-functionalized gold nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 38, 177–183, **2012**.
- [65] Ren, J., Ma, L., Li, Z., Lin, Q., Huang, H., Yi, S., Simultaneous and early detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to antituberculosis drugs using an indirect series piezoelectric system, *Biosensors and Bioelectronics*, 43, 115–119, **2013**.
- [66] Seifert, M., Haindl, S., Hock, B., Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens, *Analytica Chimica Acta*, 386, 191-199, **1999**.
- [67] Dempsey, E., Diamond, D. ve Collier, A., Development of a biosensor for endocrine disrupting compounds based on tyrosinase entrapped within a poly(thionine) film, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 367-377, **2004**.
- [68] Mauriz, E., Calle, A., Abad, A., Montoya, A., Hildebrandt, A., Barceló, D., Lechuga, L.M., Determination of carbaryl in natural water samples by a surface plasmon resonance flow-through immunosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2129–2136, **2006**.
- [69] Endo, T., Okuyama, A., Matsubara, Y., Nishi, K., Kobayashi, M., Yamamura, S., Morita, Y., Takamura, Y., Mizukami, H., Tamiya, E., Fluorescence-based assay with enzyme amplification on a micro-flow immunosensor chip for monitoring coplanar polychlorinated biphenyls, *Analytica Chimica Acta*, 531, 7-13, **2005**.
- [70] Prakash Deo, R., Wang, J., Block, I., Mulchandani, A., Joski, K.A., Trojanowicz, M., Scholz, F., Chen, W., Lin, Y., Determination of organophosphate pesticides at a carbon nanotube/organophosphorus hydrolase electrochemical biosensor, *Analytica Chimica Acta*, 530, 185-189, **2005**.
- [71] Nistor, C., Rose, A., Farre, M., Stoica, L., Wollenberger, U., Ruzgas, T., Pfeiffer, D., Barcelo, D., Gorton, L. ve Emneus, J., In-field monitoring of cleaning efficiency in waste water treatment plants using two phenol-sensitive biosensors, *Analytica Chimica Acta*, 456, 3-17, **2002**.
- [72] Tschmelak, J., Proll, G. ve Gauglitz, G., Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example, *Talanta* 65, 313–323, **2005**.
- [73] Marchesini, G.R., Meulenberg, E., Haasnoot, W., Irth, H., Biosensor immuno assays for the detection of bisphenol A, *Analytica Chimica Acta*, 528, 37-45, **2005**.
- [74] Taylor, C.J., Bain, L.A., Richardson, D.J., Spiro, S., Russell, D.A., Construction of a whole-cell gene reporter for the fluorescent bioassay of nitrate, *Analytical Biochemistry*, 328, 60-66, **2004**.

- [75] Berno, E., Pereira Marcondes, D.F., Ricci Gamalero, S., Eandi, M., Recombinant *Escherichia coli* for the biomonitoring of benzene and its derivatives in the air, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, 118-122, **2004**.
- [76] Özgür, E., Yılmaz, E., Şener, G., Uzun, L., Say, R., Denizli, A., A new molecular imprinting-based mass-sensitive sensor for real-time detection of 17 β -estradiol from aqueous solution, *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 32, 1164-1169, **2013**.
- [77] Sheehan, D.A., Quinn, J., Daly, C.L., Dillon, P., O’Kennedy, R., The Development of Novel Miniaturized Immuno-sensing Devices: A Review of a Small Technology with a Large Future, *Analytical Letters*, 36, 511–537, **2003**.
- [78] Bhattacharyya, J., Read, D., Amos, S., Dooley, S., Killham, K., Paton, G.I., Biosensor-based diagnostics of contaminated groundwater: assessment and remediation strategy, *Environmental Pollution*, 134, 485–492, **2005**.
- [79] Han, T-S., Sasaki, S., Yano, K., Ikebukuro, K., Kitayama, A., Nagamune, T., Karube, I., Flow injection microbial trichloroethylene sensor, *Talanta*, 57, 271–276, **2002**.
- [80] Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, D.W., Roig, B., Gonzalez, C., A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive, *Talanta*, 69, 302–322, **2006**.
- [81] Gu, M.B., Kim, E.J., Cho, J., Hansen, P.D., The Continuous Monitoring of Field Water Samples with a Novel Multi-Channel Two-Stage Mini-Bioreactor System, *Environmental Monitoring and Assessment*, 70, 71–81, **2001**.
- [82] Haes, A.J., Van Duyne, R.P., A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles, *Journal of American Chemical Society*, 124, 10596–10604, **2002**.
- [83] Kawazumi, H., Gobi, V., Ogino, K., Maeda, H., Miura, N., Compact surface plasmon resonance (SPR) immunosensor using multichannel for simultaneous detection of small molecule compounds, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108, 791–796, **2005**.
- [84] Bachmann, T.T., Schmid, R.D., A disposable multielectrode biosensor for rapid simultaneous detection of the insecticides paraoxon and carbofuran at high resolution, *Analytica Chimica Acta*, 401, 95–103, **1999**.
- [85] Barzen, C., Brecht, A., Gauglitz, G., Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 289–295, **2002**.
- [86] Goldman, E.R., Clapp, A.R., Anderson, G.P., Uyeda, H.T., Mauro, J.M., Medintz, I.L., Mattoussi, H., Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents, *Analytical Chemistry*, 76, 684–688, **2004**.

- [87] Sequeira, M., Bowden, M., Minogue, E., Diamond, D., Towards autonomous environmental monitoring systems, *Talanta*, 56, 355–363, **2002**.
- [88] Suzuki, H., Microfabrication of chemical sensors and biosensors for environmental monitoring, *Materials Science and Engineering: C*, 12, 55–61, **2000**.
- [89] Bange, A., Halsall, H.B., Heineman, W.R., Microfluidic immunosensor systems, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2488–2503, **2005**.
- [90] Çaktü, K., Baydemir, G., Ergün, B., Yavuz, H., Cholesterol removal from various samples by cholesterol-imprinted monosize microsphere-embedded cryogels, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, xxx, xxx-xxx, **2014**.
- [91] Alocilja, E.C., Radke, S.M., Market analysis of biosensors for food safety, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 841–846, **2003**.
- [92] Tothill, I.E., Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector, *Computers and Electronics in Agriculture*, 30, 205–218, **2001**.
- [93] Kroger, S., Piletsky, S., Turner, A.P.F., Biosensors for marine pollution research, monitoring and control, *Marine Pollution Bulletin*, 45, 24–34, **2002**.
- [94] Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O’Kennedy, R., Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 3–13, **2003**.
- [95] Rich, R.L., Myszka, D.G., Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis, *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 54–61, **2000**.
- [96] NanoDev İnternet Sitesi: <http://www.nanodev.com.tr/>
- [97] Glazier, S.A., Campbell, E.R., Campbell, W.H., Construction and Characterization of Nitrate Reductase-Based Amperometric Electrode and Nitrate Assay of Fertilizers and Drinking Water, *Analytical Chemistry*, 70, 1511–1515, **1998**.
- [98] Behnisch, P.A., Hosoe, K., Sakai, S-i., Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds — a review of bioassay/biomarker technology, *Environment International*, 27, 413–439, **2001**.
- [99] Iqbal, S.S., Mayo, M.W., Bruno, J.G., Bronk, B.V., Batt, C.A., Chambers, J.P., A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents, *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 549–578, **2000**.
- [100] Wood, R.W., On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical Magazine*, 4, 396-402, **1902**.
- [101] Schasfoort R.B.M., Tudos A.J., (eds), Handbook of surface plasmon resonance. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2008**.

- [102] Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators*, 4, 29-304, **1983**.
- [103] Nylander, C., Liedberg, B., Lind, T., Gas detection by means of surface plasmons resonance, *Sensors and Actuators B*, 3, 79-88, **1982**.
- [104] Şener, G., Nanopartiküllerle duyarlılığı artırılmış yüzey plasmon rezonans biyosensörlerin hazırlanması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, **2009**.
- [105] Szentirmay, Z., Surface plasmon spectroscopy of metal/dielectric structures. *Spectrochimica Acta*, 48, 9-17, **1991**.
- [106] Welford, K., Surface plasmon-polaritons and their uses, *Optical and Quantum Electronics*, 23, 1-27, **1991**.
- [107] Earp, R.L., Dessy, R.E., Commercial Biosensors: Applications to Clinical Bioprocess and Environmental Samples. John Wiley and Sons: New York, Chapter 4, **1996**.
- [108] Holford, T.R.J., Davis, F., Higson, S.P.J., Recent trends in antibody based sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 34, 12-24, **2012**.
- [109] Türkoğlu, E.A., Yavuz, H., Uzun, L., Akgöl, S., Denizli, A., The fabrication of nanosensor-based surface plasmon resonance for IgG detection, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 41; 213-221, **2013**.
- [110] Nakamura, C., Hasegawa, M., Nakamura, N., Miyake, J., Rapid and specific detection of herbicides using a self-assembled photosynthetic reaction center from purple bacterium on an SPR chip, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 599-603, **2003**.
- [111] Miura N., Sasaki, M., Gobi, K.V., Kataoka, C., Shoyama, Y., Highly sensitive and selective surface plasmon resonance sensor for detection of sub-ppb levels of benzo[a]pyrene by indirect competitive immunoreaction method, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 953-959, **2003**.
- [112] Strong, A., Stimpson, D.I., Bartholomew, D.U., Jenkins, T.F., Elkind, J.L., Detection of trinitrotoluene (TNT) extracted from soil using a surface plasmon resonance (SPR)-based sensor platform. *SPIE*, 3710, 362-372, **1999**.
- [113] Oh, B.K., Kim, Y.K., Bae, Y.M., Lee, W.H., Choi, J.W., Detection of Escherichia coli O157, H7 using immunosensor based on surface plasmon resonance, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 780-786, **2002**.
- [114] Taylor, A.D., Ladd, J., Yu, Q., Chen, S., Homola, J., Jiang, S., Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 752-758, **2006**.
- [115] Lotierzo, M., Henry, O.Y.F., Piletsky, S., Tothill, I., Cullen, D., Kania, M., Hock, B., Turner, A.P.F., Surface plasmon resonance sensor for domoic

- acid based on grafted imprinted polymer, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 145-152, **2004**.
- [116] Uzun, L., Say, R., Ünal, S., Denizli, A., Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2878–2884, **2009**.
- [117] Ladd, J., Boozer, C., Yu, Q., Chen, S., Homola, J., Jiang, S., DNA-directed protein immobilization on mixed self-assembled monolayers via a Streptavidin bridge, *Langmuir*, 20, 8090-8095, **2004**.
- [118] Stigter, E.C., Jong, G.J., Van Bennekom, W.P., An improved coating for the isolation and quantitation of interferon-gamma in spiked plasma using surface plasmon resonance (SPR), *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 474-482, **2005**.
- [119] Bokken, G.C.A.M., Corbee, R.J., van Knapen, F., Bergwerff, A.A., Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor, *FEMS Microbiology Letters*, 222, 75–82, **2003**.
- [120] Vaughan, R.D., O`Sullivan, C.K., Guilbault, G.G., Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 635–638, **2001**.
- [121] Skottrup, P., Nicolaisen, M., Justesen, A.F., Rapid determination of *Phytophthora infestans* sporangia using a surface plasmon resonance immunosensor, *Journal of Microbiological Methods*, 68, 507–515, **2007**.
- [122] Lan, Y-b., Wang, S-z., Yin, Y-g., Hoffmann, W.C., Zheng, W-z., Using a Surface Plasmon Resonance Biosensor for Rapid Detection of *Salmonella Typhimurium* in Chicken Carcass, *Journal of Bionic Engineering*, 5, 239–246, **2008**.
- [123] Jiang, X., Waterland, M., Blackwell, L., Wu, Y., Jayasundera, K.P., Partridge, A. Sensitive determination of estriol-16-glucuronide using surface plasmon resonance sensing, *Steroids*, 74, 819–824, **2009**.
- [124] Dong, J., Gao, N., Peng, Y., Guo, C., Lv, Z., Wang, Y., Zhou, C., Ning, B., Liu, M., Gao, Z., Surface plasmon resonance sensor for profenofos detection using molecularly imprinted thin film as recognition element, *Food Control*, 25, 543-549, **2012**.
- [125] Sönmezler, M., Kuartz Kristal Mikroterazi (QCM) Temelli Histidin Sensörler, H.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.
- [126] Haupt, K., Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry, *Analyst*, 126, 747-756, **2001**.
- [127] Mayers, A.G., Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry, *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 321–332, **1997**.

- [128] Wulff, G., Poll, H.G., Enzyme-analogue built polymers, 23. Influence of the structure of the binding sites on the selectivity for racemic resolution, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 188, 4, 741-748, **1987**.
- [129] Rao, T.P., Daniel, S., Gladis, J.M., Tailored materials for preconcentration or separation of metals by ion-imprinted polymers for solid-phase extraction (IIP-SPE), *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 28-35, **2004**.
- [130] Haupt, K., Molecularly imprinted polymers: The next generation, *Analytical Chemistry*, 75, 376A-383A, **2003**.
- [131] Yavuz, H., Karakoc, V., Turkmen, D., Say, R., Denizli, A., Synthesis of cholesterol imprinted polymeric particles, *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 8-15, **2006**.
- [132] Owens, P.K., Karlsson, L., Lutz, E.S.M., Andersson, L.I., Molecular imprinting for bio- and pharmaceutical analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 146-154, **1999**.
- [133] Ansell, D.J., Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1809-1835, **2005**.
- [134] Schweitz, L., Spégel, P., Nilsson, S., Approaches to molecular imprinting based selectivity in capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 22, 4053-4063, **2001**.
- [135] Liu, C., Lin, C., An insight into molecularly imprinted polymers for capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 25, 3997-4007, **2004**.
- [136] Liu, Z., Zheng, C., Yan, C., Gao, R., Molecularly imprinted polymers as a tool for separation in CEC, *Electrophoresis*, 28, 127-136, **2007**.
- [137] Ulbricht, M., Membrane separations using molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography B*, 804, 113-125, **2004**.
- [138] Dias, A.C.B., Figueiredo, E.C., Grassi, V., Zagatto, E.A.G., Arruda, M.A.Z., Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis, *Talanta*, 76, 988-996, **2008**.
- [139] Byrne, M.E., Park, K., Peppas, N.A., Molecular imprinting within hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 149-161, **2002**.
- [140] Lavignac, N., Allender, C.J., Brain, K.R., Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays, *Analytica Chimica Acta*, 510, 139-145, **2004**.
- [141] Fernandez-Gonzalez, A., Guardia, L., Badia-Lainio, R., Diaz-Garcia, M.E., Mimicking molecular receptors for antibiotics-analytical implications, *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 949-957, **2006**.
- [142] Blanco-Lopez, M.C., Lobo-Castanon, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tunon-Blanco, P., Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers, *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 36-48, **2004**.
- [143] Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H., Molecular imprinting (from fundamentals to applications), Wiley-VCH Verlag, **2003**.

- [144] Davies, M.P., De Biasi, V., Perrett, D., Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta*, 504, 7-14, **2004**.
- [145] Cormack, P.A.G., Mosbach, K., Molecular imprinting: recent developments and the road ahead, *Reactive and Functional Polymers*, 41, 115-124, **1999**.
- [146] Idziak, L., Benrebouh, A., Deschamps, F., Simple NMR experiments as a means to predict the performance of an anti-17 alpha-et hynylestradiol molecularly imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta*, 435, 137-140, **2001**.
- [147] Dickert, F., Hayden, O., Imprinting with sensor development on the way to synthetic antibodies, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 364, 506-511, **1999**.
- [148] Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z., 2004. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, *Journal of Chromatography B*, 804, 173-182, **2004**.
- [149] Yu, C., Mosbach, K., Molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymers, *The Journal of Organic Chemistry*, 62, 4057-4064, **1997**.
- [150] Andersson, L.I., Ekberg, B., Mosbach, K., Synthesis of a New Amino Acid Based Cross-Linker for Preparation of Substrate Selective Acrylic Polymers, *Tetrahedron Letters*, 26, 3623-3624, **1985**.
- [151] Shea, K.J., Dougherty, T.K., Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces. The influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition, *Journal of America Chemical Society*, 108, 1091-1093, **1986**.
- [152] Molinelli, A., Molecular imprinted polymers: towards a rational understanding of biomimetic materials, Georgia institute of technology. In partial fulfillment of the requirement for the degree of the doctor of philosophy in chemistry, **2004**.
- [153] Ikegami, T., Mukawama, T., Nariai, H., Takeuchi, T., Bishenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting, *Analytica Chimica Acta*, 504, 131-135, **2004**.
- [154] Steinke, j., Sherrington, D.C., Dunkin, I.R., Imprinting of synthetic polymers using molecular templates, *Advances in Polymer Science*, 123, 80-125, **1995**.
- [155] Ersöz, A., Denizli, A., Özcan, A., Say, R., Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2197-2202, **2005**.
- [156] Sellergen, B., Lepistö, M., Mosbach, K., Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing non-covalent interaction-NMR and chromatographic studies on the nature of recognition, *Journal of America Chemical Society*, 110, 5853-5860, **1988**.
- [157] Katz, A., Davis, M.E., Investigation into the mechanism of molecular recognition with imprinted polymers, *Macromolecules*, 32, 4113-4121, **1999**.

- [158] Pichon, V., Chapuis-Hugon, F., Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants, *Analytica Chimica Acta*, 622, 48-61, **2008**.
- [159] Zhong, N., Byun, H.S, Bittman, R., Hydrophilic cholesterol-binding molecular imprinted polymers, *Tetrahedron Letter*, 42,1839-41, **2001**.
- [160] Anderson, L.I., Molecular imprinting for drug bioanalysis a review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay, *Journal of Chromatography B*, 739, 163-173, **2000**.
- [161] Piletsky, S.A., Alcock, S., Turner, A.P.F., Molecular imprinting; at the edge of the third millennium, *Trends in Biotechnology*, 19, 9-12, **2001**.
- [162] Odabaşı, M., Denizli, A., Polyhydroxyethylmethacrylate based magnetic DNA-affinity beads for anti-DNA antibody removal from systemic lupus erythematosus patient plasma, *Journal of Chromatography B*, 760, 137-148, **2001**.
- [163] Sellergen, B., Imprinted dispersion polymers: a new class of easily accessible affinity stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 673, 133-141, **1994**.
- [164] Takeuchi, T., Haginaka, J., Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography B*, 728, 1-20, **1999**.
- [165] Haginaka, J., Kagawa, C., Retentivity and enantioselectivity of uniformly sized molecularly imprinted polymers for d-chlorpheniramine and d-brompheniramine in hydro-organic mobile phases, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1907-1912, **2004**.
- [166] Hedborg, E., Winqvist, F., Lundstrom, I., Andersson, L.I., Mosbach, K., Some studies of molecularly-imprinted polymer membranes in combination with field-effect devices, *Sensors and Actuators A-Physical*, 37, 8, 796-799, **1993**.
- [167] Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., Elgersma, A.V., Yano, K., Karube, I., Parhometz, Yu, P., El'skaya, A.V., Atrazine sensing by molecularly imprinted membranes, *Biosensors and Bioelectronics*, 10, 959-964, **1995**.
- [168] Kriz, D., Mosbach, K., Competitive amperometric morphine sensor based on agarose immobilized molecularly imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta*, 300, 71-75, **1995**.
- [169] Kriz, D., Ramström, O., Svenson, A., Mosbach, K., Introducing biomimetic sensor based on molecularly imprinted polymers as a recognition elements, *Analytical Chemistry*, 67, 2142-2144, **1995**.
- [170] Levi R., McNiven S., Piletsky S.A., Cheong, S.H., Yano, K., Karube, I., Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers, *Analytical Chemistry*, 69, 2017-2021, **1997**.
- [171] Haupt, K., Mosbach, K., Plastic antibodies: developments and applications, *Tiptech*, 16, 468-475, **1998**.
- [172] Riskin, M., Tel-Vered, R., Bourenko, T., Granot, E., Willier, I., Imprinting of molecular recognition sites through electropolymerization of functionalized

- Au nanoparticles; development of electrochemical TNT sensor based on π -donor acceptor interactions, *Journal of America Chemical Society*, 130, 9726-9733, **2008**.
- [173] McDonagh, C., Burke, C.S., MacCraith, B.D., Optical chemical sensors, *Chemical Reviews*, 108, 400-422, **2008**.
- [174] Bigsby, R., Chapin, R.E., Daston, G.P., Davis, B.J., Gorski, J., Gray, L.E., Howdeshell, K.L., Zoeller, R.T., vom Saal, F.S., Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environmental Health Perspectives*, 107, 613-8, **1999**.
- [175] Lee M.M., Endocrine Disrupters. A Current Review of Pediatric *Endocrinology*, 109-18, **2007**.
- [176] Wozei, E., Hermanowicz, S.W., Holman, H-Y.N., Developing a Biosensor for Estrogens in Water Samples: Study of the Real-time Response of Live Cells of the Estrogen-sensitive Yeast Strain RMY/ER-ERE Using Fluorescence Microscopy, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1654-1658, **2006**.
- [177] Hock, B., Seifert, M., Kramer, K., Engineering receptors and antibodies for biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 239–249, **2002**
- [178] Usami, M., Mitsunaga, K., Ohno, Y., Estrogen receptor binding assay of chemicals with a surface plasmon resonance biosensor, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 81, 47–55, **2002**.
- [179] Khanal, S.K., Xie, B., Thompson, M.L., Sung, S., Ong, S., Leeuwen J.V., Fate, Transport, and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems, *Environmental Science and Technology*, 40(21), 6537-6546 **2006**.
- [180] Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., Estrogenic effects of effluents from sewage treatment Works, *Chemistry and Ecology*, 8, 275-285, **1994**.
- [181] Water 21, Disruptive Influences. Magazine of the International Water Association, 20-22, Nisan, **2004**.
- [182] Özgür, E. Östradiol tayini için moleküler baskılanmış sensörlerin hazırlanması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, **2011**.
- [183] Falconer, IR., Chapman, HF., Moore, MR., Ranmuthugala, G., Endocrine-Disrupting compounds: A review of their challenge tu sustainable and safe water supply and water reuse, *Environmental Toxicology*, 21, 181-191, **2006**.
- [184] Layton, A.C., Gregory, B.W., Seward, J.R., Schultz, T.W., Sayler, G.S., Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee USA, *Environmental Science and Technology*, 34, 3925-3931, **2000**.

- [185] Monod, G., Rime., H., Bobe, J., Jalabert B., Agonistic effect of imidazole and triazole fungicides on in vitro oocyte maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Marine Environmental Research*, 58 (2-5), 143-146, **2004**.
- [186] Birkett, J.W.A.L., J.N., Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process, Lewis publishers, London, **2003**.
- [187] Jiang, T., Zhao, L., Chu, B., Feng, Q., Yan, W., Lin, J-M., Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17 β -estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography, *Talanta*, 78, 442-447, **2009**.
- [188] Volpe, G., Fares, G., delli Quadri, F., Draisci, R., Ferretti, G., Marchiafava, C., Moscone, D. and Palleschi, G., A disposable immunosensor for detection of 17 β -estradiol in non-extracted bovine serum, *Analytica Chimica Acta*, 572, 11-16, **2006**.
- [189] Lister, A.L., van der Kraak, G.J., Endocrine Disruption: Why is it so complicated? *Water Quality Research Journal of Canada*, 36, 175-190, **2001**.
- [190] Servos, M.R., Bennie, D.T., Burnison, B.K., Jurkovic, A., McInnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S.A., Ternes T.A., Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants, *Science of the Total Environment*, 336, 155-170, **2005**.
- [191] Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Widespread sexual disruption in wild fish, *Environmental Science and Technology*, 32, 2498-2506, **1998**.
- [192] Golden, R.J., Noller, K.L., Titus-Ernstoff, L., Kaufman, R.H., Mittendorf, R., Stillman, R., Reese, E.A., Environmental endocrine modulators and human health: An assessment of the biological evidence, *Critical Reviews in Toxicology*, 28, 109-227, **1998**.
- [193] Garipcan, B., Denizli, A., A Novel Affinity Support Material for the Separation of Immunoglobulin G from Human Plasma, *Macromolecular Bioscience*, 2; 135-144, **2002**.
- [194] Colthup, N.B., Daly, L.H., Wiberley, S.E., Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, 3rd ed, Academic Press: New York, **1990**.
- [195] Lin-Vein, D., Colthup, N, Fateley, W.G., Grasselli, J., The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules, Academic Press, San Diego, Kaliforniya, **1991**.
- [196] Homola J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 337, 528-539, **2003**.
- [197] Avberšek, M., Sömen, J., Heath, E., Dynamics of steroid estrogen daily concentrations in hospital effluent and connected waste water treatment plant, *Journal of Environmental Monitoring*, 13, 2221-2226, **2011**.

- [198] McAvoy, K., Occurrence of estrogens in wastewater treatment plant and waste disposal site water samples, *Clearwaters*, 38, 28-34, **2008**.
- [199] Zhang, Q., Wang, Y., Mateescu, A., Sergelen, K., Kibrom, A., Jonas, U., Wei, T., Dostalek, J. Biosensor based on hydrogel optical waveguide spectroscopy for the detection of 17 β -estradiol, *Talanta*, 104, 149-154, **2013**.
- [200] Liu, X., Wong, D.K.Y., Picogram-detection of estradiol at an electrochemical immunosensor with a gold nanoparticle|Protein G-(LC-SPDP)-scaffold, *Talanta*, 77, 1437-1443, **2009**.
- [201] Hui-Bin, W., Jin-Ming, L., Dan-Ning, W., Li-Xia, Z., Zhen-Jia, L., Xi-Tang, Y., Detection of 17 β -Estradiol in River Water and Human Urine by Highly Sensitive Chemiluminescence Enzyme Immunoassay, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 35, 320-324, **2007**.
- [202] Rachkov, A., McNiven, S., El'skaya, A., Yano, K., Karube, I., Fluorescence detection of β -estradiol using a molecularly imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta*, 405, 23-29, **2000**.
- [203] Lin, L.P., Huang, L.S., Lin, C.W., Lee, C.K., Chen, J.L., Hsu, S.M., Lin, S., Determination of binding constant of DNA-binding drug to target DNA by surface plasmon resonance biosensor technology, *Current Drug Target*, 5, 61-72, **2005**.
- [204] Zhang, L., Cheng, G., Fu, C., Molecular selectivity of tyrosine-imprinted polymers prepared by seed swelling and swelling and suspension polymerization, *Polymer International*, 51; 687-692, **2002**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Emir Alper Türkoğlu

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Bekâr

E-posta: turkoglualper@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı, Beytepe, Ankara.

Eğitim

Lise: Ayrancı Lisesi (YDAL)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Doktora: Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce (İleri Düzeyde)

İş Deneyimi

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2009-....)

Deneyim Alanları

Yüzey plazmon rezonans (SPR) temelli biyosensörler

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-