T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER BASKILAMA YÖNTEMİ İLE LAKTONLARIN BELİRLENMESİNE YÖNELİK KUVARS KRİSTAL MİKROTERAZİ (QCM) TABANLI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Ömür ACET

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

AKSARAY, 2020

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimim de dahil olmak üzere benden desteğini ve bilimsel tarafını hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan, kendisinden lisans eğitimimden bu yana akademik çalışmalarım süresince çok şey öğrendiğim (öğrenmeye de devam edeceğim), gerek bilimsel bakış açısı gerekse hayata bakış açısı ile bize yol gösteren, tez çalışmamın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen değerli hocam, akademik danışmanım Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI'na, engin bilgilerinden her zaman faydalandığımız Prof. Dr. Lokman UZUN, Dr. Öğr. Üyesi Erkut YILMAZ, Dr. Şeyda CEYLAN CÖMERT, Dr. Erdoğan ÖZGÜR, Dr. Demet ERDÖNMEZ'e, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Samir Abbas Ali NOMA, Sema AKAY, Emrah DİKİCİ ve Nurullah BANİ'ye hayatım boyunca her konuda yanımda olan ve maddi, manevi desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşım, sevgili nişanlım Burcu ÖNAL'a annem ve babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, deneysel araştırmalarım için laboratuvar imkanlarından yararlandığım Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (ASÜBTAM)'a teşekkür ederim.

Tezimin gerçekleşmesinde 1002 Projeleri kapsamında 119Z184 numaralı proje ile maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) ve 2018-060 numaralı proje ile maddi destek sağlayan Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Ömür ACET

AKSARAY, 2020

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
ÖZET ..... **v**
ABSTRACT ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
TABLO DİZİNİ ..... **x**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 Quorum Sensing 3
2.2 Homoserin Laktonlar 5
2.3 Klinik Örneklerde AHL'lerin Tespiti 8
2.4 N-Heksanoil-L-homoserin lakton 9
2.5 Moleküler Baskılamanın Geçmişi 10
2.6 Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP) 11
2.6.1 Moleküler baskılama yöntemi 12
2.6.2 Fonksiyonel monomer seçimi 15
2.6.3 Çapraz bağlayıcılar 17
2.6.4 Çözücüler (porojenler) 19
2.6.5 Başlatıcılar 20
2.6.6 Hazırlık işlemleri 20
2.7 Moleküler Baskılama Çeşitleri 21
2.7.1 Kovalent baskılama 22
2.7.2 Non-kovalent baskılama 23
2.7.3 Yarı kovalent baskılama 23
2.7.4 Moleküler baskılanmış polimerlerinspesifik tanıma yeteneğinin arttırılmasında metal iyon-koordinasyon etkisi 24
2.8 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulamaları 25
2.9 Sensörler 29
2.9.1 Biyosensörler ve tarihçesi 29
2.9.2 Bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler 32
2.9.3 Biyosensörlerin endüstriyel boyutu 34

2.10 Akustik Biyosensörler 34
2.10.1 Akustik sensör çeşitleri 35
2.11 Piezoelektrik Etki 36
2.12 Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM) 42
2.13 QCM'nin Geleceği 46
3. MALZEME VE YÖNTEM 48
3.1 Malzemeler 48
3.2 Ön-Organizasyon Komplekslerinin Hazırlanması 48
3.3 QCM Çip Üzerinde Polimerik Membranların Hazırlanması 49
3.3.1 Alil merkaptan modifikasyonu 49
3.3.2 C6-HSL baskılanmış polimerik membranların hazırlanması 50
3.4 C6-HSL Baskılanmış Polimerik Membranların ve Baskılanmamış Membranların Karakterizasyonu 52
3.4.1 FTIR-ATR spektrofotometre analizi 52
3.4.2 Temas açısı ölçümleri 52
3.4.3 Atomik kuvvet mikroskopisi 53
3.4.4 Yüzey morfolojisi 53
3.5 C6-HSL Baskılanmış QCM Çiplerle Eş-Zamanlı Lakton Tayini 53
3.6 Seçicilik Deneyleri 54
4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA 56
4.1 C6-HSL Baskılanmış Polimerik Membranların ve Baskılanmamış Membranların Karakterizasyonu 56
4.1.1 Ön-Organizasyon komplekslerinin spektrofotometrik incelenmesi 56
4.1.2 FTIR-ATR spektrofotometre analizi 57
4.1.3 Temas açısı ölçümleri 58
4.1.4 Atomik kuvvet mikroskopisi 59
4.1.5 Yüzey morfolojisi 60
4.2 C6-HSL Baskılanmış QCM Çiplerde C6-HSL Tayinine pH'nın Etkisi 61
4.3 C6-HSL Baskılanmış QCM Çiplerde C6-HSL Tayinine Derişimin Etkisi 63
4.4 QCM Çip-Analit Etkileşimlerinin Analizi 67
4.4.1 Denge analizi 67
4.4.2 Bağlanma kinetik analizi 68
4.5 Denge İzoterm Modelleri 70
4.6 Yarışmalı Kinetik Analizler 73

4.7 Sensörün Seçicilik Deneyleri 74
4.8 Kompleks Ortamdan C6-HSL Tayini..... 77
SONUÇLAR VE ÖNERİLER 82
KAYNAKLAR 84
ÖZGEÇMİŞ..... 96

DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BASKILAMA YÖNTEMİ İLE LAKTONLARIN BELİRLENMESİNE YÖNELİK KUVARS KRİSTAL MİKROTERAZİ (QCM) TABANLI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Ömür ACET

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

ÖZET

Yüksek canlılar birbirleriyle iletişim için ses ve sözcükleri kullanırken, bakteriler bu işlevi bazı iletişim molekülleri ile sağlamaktadırlar. Bu iletişim molekülleri, "Quorum Sensing" (QS) veya çevreyi algılama sistemi tarafından üretilen ve bakterilerce iletişimde kullanılan kimyasallar olarak ifade edilmektedir. Gram-negatif bakterilerin ana sinyal molekülleri olan N-açil-homoserin-laktonlar (AHL) patojenitede etkin virülans faktörlerini eksprese edebilirler ve dolayısıyla Quorum Sensing sistemi, bu virülans faktörlerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynayabilir. Düşük konsantrasyonlarda üretilen AHL'lerin genel tekniklerle tespit edilmesi oldukça zordur.

Bu çalışma kapsamında; QCM çipler üzerinde 6 karbonlu laktona (C6-HSL) özgü moleküler baskılanmış polimerik membranlar hazırlanıp; moleküler baskılanmış QCM çipler ile sulu ortamdan yüksek hassasiyette C6-HSL tanımlanması yapılmıştır. Moleküler baskılanmış yapıyı oluşturmak için, N-Heksanoil-L-homoserin lakton (C6-HSL) (hedef molekül) ve fonksiyonel monomerin (akrilamid) ikincil kuvvetlerle ön-organizasyonunun ardından, monomer olarak 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), başlatıcı olarak azobisizobutironitril (AIBN) eşliğinde UV başlatıcılı polimerizasyon ile C6-HSL baskılanmış polimerik membranlar sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonu AFM, SEM, temas açısı ve FTIR-ATR spektrofotometre analizleri ile gerçekleştirilmiştir. C6-HSL-akrilamid arasındaki optimum ön organizasyon (çözücü olarak DMF), pH 7.0'da oluşmuştur. C6-HSL baskılanmış QCM çip yüzeyindeki en yüksek lakton adsorpsiyonu ise 1000 ng/mL Ayrıca, GC-MS sonuçları çalışmalarımızın sonuçlarıyla korelasyon göstermiş ve sentezlenen polimerlerin C6-HSL'ye duyarlılığının olduğunu GC-MS ile de konfirme edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sensör, Lakton, Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP), Kuvars Kristal Mikrobalans (QCM)

Mayıs, 2020; 96 sayfa

Ph.D. THESIS

DEVELOPMENT OF QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE (QCM) BASED BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF LACTONS BY MOLECULAR IMPRINTING METHODS

Ömür ACET

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ODABAŞI

ABSTRACT

While high living organisms use sounds and words to communicate with each other, bacteria provide this function with some communication molecules. These communication molecules are expressed as "Quorum Sensing" (QS) or chemicals produced by the environment sensing system and used by bacteria to communicate. N-acyl-homoserine-lactones (AHL) that are the main signaling molecules of Gram-negative bacteria, may express the pathogenic factors, and the Quorum Sensing system may play an important role in the identification of the being virus. AHLs are produced at low concentrations that are difficult to detect with general techniques.

In this study, molecularly imprinted polymeric membranes, which are specific to lactone with 6-carbons (C6-HSL) were prepared on the QCM chips and molecularly imprinted QCM chips were utilized to detect N-Hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) with high sensitivity from the aqueous medium. After pre-oganization of C6-HSL (template molecule) and functional monomer (acrylamide) with the secondary forces to form molecular imprinting structure, C6-HSL imprinted polymeric membrans in the presence of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) as monomer, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as crosslinker, and azobisisobutyronitrile (AIBN) as initiator were polymerized with the aid of UV-initiated polymerization. Characterization of the synthesized polymers were come true by AFM, SEM, contact angle and FTIR-ATR spectrophotometer analyzes. The optimal pre-organization between the C6-HSL-acrylamide (DMF as solvent) was determined at pH 7.0. The maximum C6-HSL adsorption on the C6-HSL imprinted QCM chip surface was observed at 1000 ng/mL concentration, pH 7.0. Moreover, the GC-MS results correlated with the results of our studies, and they confirmed the sensitivity of synthesized the polymers toward C6-HSL.

Keywords: Sensor, Lactone, Molecular Imprinted Polymers (MIP), Quartz Crystal Microbalance (QCM)

May, 2020; 96 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Dört farklı tür sinyal molekülünün bakteri-bakteri iletişimiyle transferi ve alınmasının şekli [17]. 4
Şekil 2.2. Bazı N-açil homoserinlerin laktonların kimyasal yapıları. 5
Şekil 2.3. Lakton moleküllerinin genel kimyasal yapıları. 6
Şekil 2.4. Bakterilerin AHL üretimi, sinyal moleküllerinin bakteri reseptörü ile alınışının ve gen ekspresyonunun şematize edilmiş şekli. 6
Şekil 2.5. C6-HSL yapısı. 10
Şekil 2.6. Moleküler tanıma çalışmaları ile moleküler baskılamanın önünü açan bilim insanları [78]. 11
Şekil 2.7. MIP'lerin çeşitli biyosensörlerle entegrasyonu [91]. 12
Şekil 2.8. Moleküler baskılama oluşum aşaması; 1. Kalıp molekülün uzaklaştırılması; 2. Kalıp molekülün tekrar bağlanması. 13
Şekil 2.9. Moleküler baskılamada kullanılan bazı tipik fonksiyonel monomerler [101]. 16
Şekil 2.10. Moleküler baskılamada fonksiyonel monomerlerin kalıp molekülün etrafında polimerleşmesi. 17
Şekil 2.11. MIP'de çokça yararlanılan çapraz bağlayıcılar [101]. 19
Şekil 2.12. Kovalent baskılama ve nonkovalent baskılamanın şematik gösterimi [101]. 22
Şekil 2.13. Nonkovalent baskılama ve kalıp molekülün spesifik kaviteleri. 24
Şekil 2.14. Dendrimerlerde meydana gelen moleküler baskılama işlemi [118]. 25
Şekil 2.15. Biyosensörün şematik gösterimi. 31
Şekil 2.16. Dalga yayılım tarzları ile karakterize edilen dört yaygın akustik dalga cihazı türü. 36
Şekil 2.17. Bir kuvars kristalindeki piezoelektrik etkisinin açıklaması [155]. 37
Şekil 2.18. Piezoelektrik sisteme sahip bir biyoanalizin [151]. 37
Şekil 2.19. α-kuvarsın birim hücresi [156]. 38
Şekil 2.20. Doğal kuvars kristalinin ekseni tipik dış formu [156]. 39
Şekil 2.21. z ekseninden bakıldığında kuvars z içindeki Si ve O atomu [156]. 39
Şekil 2.22. A: Doğru boyunca piezoelektrik B: Dik piezoelektrik [156]. 40
Şekil 2.23. Ters piezoelektrik [156]. 40
Şekil 2.24. Bir kuvars kristalinin AT ve BT kesim düzlemi [160]. 42
Şekil 2.25. Piezoelektrik sistem için deneysel sistem. 44
Şekil 2.26. Kuvars kristal mikrobalans biyosensörünün mekanizmasının resimsel gösterimi. 45
Şekil 3.1. N-açil-homoserin lakton, akrilamid ve akrilik asit moleküllerinin kimyasal yapıları. 49
Şekil 3.2. Modifikasyon sonucunda allil grupları takılmış altın kaplı QCM çip yüzeyleri. 50
Şekil 3.3. Alil merkaptan modifikasyonundan sonra etil alkol ile yıkanmış ve azot atmosferinde kurutulmuş QCM çip. 50
Şekil 3.4. OCM çipyüzeyinde oluşturulan polimerizasyon aşamaları. 51
Şekil 3.5. Kalıp molekül ve monomerlerin polimerizasyon sonrası olası düzenlenmesi. 52
Şekil 3.6. Kullanılan QCM sistemi. 54
Şekil 3.7. Yarışmacı ajanlar. 55

Şekil 4.1. C6-HSL/Akrilamid komplekslerine ait spektrofotometrik grafikler pH 7.0, T:25 ºC. 57
Şekil 4.2. A. C6-HSL, B. C6-HSLbaskılanmış C.baskılanmamış polimerik membranların FTIR-ATR spektrumu. 58
Şekil 4.3. QCM çiplerin temas açısı görüntüleri. (a) Modifiye edilmemiş; (b) Allilmerkaptan ile modifiye edilmiş; (c) C6-HSL baskılanmış yüzey; (d) Baskılanmamış yüzey görüntüleri. 59
Şekil 4.4. Baskılanmış ve baskılanmamış membranların atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri. 60
Şekil 4.5. C6-HSL baskılanmamış ve baskılanmış membranların FESEM görüntüleri. 61
Şekil 4.6. Eş-zamanlı QCM sonuçlarına pH'nın Etkisi (1/3 C6-HSL:AAm). Delta Frekans ve Delta Kütle Zaman Eğrileri. C6-HSL derişimi: 1000 ng/mL; akış hızı: 0,5 mL/dk; T: 25 ºC. 62
Şekil 4.7. Eş-zamanlı QCM sonuçlarına pH'nın Etkisi (1/3 C6-HSL:AAm). Delta Frekans ve Delta Kütle Zaman Eğrileri.C6-HSL derişimi: 1000 ng/mL; akış hızı: 0,5 mL/dk; T: 25 ºC. 62
Şekil 4.8. 1/3 oranına ait (C6-HSL:AAm) Delta Kütle-pH grafiği. 63
Şekil 4.9. C6-HSLBaskılanmış QCM ÇiplerdeC6-HSL Tayinine Derişimin Etkisi. Delta Frekans-Zaman Grafiği. pH: 7.0; akış hızı: 0.5 mL/dak.;T: 25 ºC. . 64
Şekil 4.10. C6-HSLBaskılanmış QCM Çiplerde C6-HSL Tayinine Derişimin Etkisi. Delta Kütle-Zaman Grafiği. pH: 7.0; akış hızı: 0.5 mL/dak.; T: 25 ºC. 64
Şekil 4.11. Dengeleme-Adsorpsiyon-Desorpsiyon-Rejenerasyon Döngüleri. 65
Şekil 4.12. Derişime karşı Δm değişiminin grafiği. pH: 7.0; akış hızı: 0,5 mL/dak.; T: 25 ºC. 65
Şekil 4.13. C6-HSL baskılanmış QCM sensöre ait derişim ile Delta Kütle (Δm) arasındaki bağıntı. pH: 7.0; akış hızı: 0,5 mL/dak.;sıcaklık: 25 ºC. 66
Şekil 4.14. C6-HSL baskılanmış (A) ve baskılanmamış (B) QCM sensörün derişim grafikleri. 67
Şekil 4.15. C6-HSL baskılanmış QCM sensörün denge kinetik analiz doğrusu (Scatchard). 69
Şekil 4.16. C6-HSL baskılanmış QCM sensörün denge kinetik analiz doğrusu. 69
Şekil 4.17. MIP'lerde bağlanma bölgesi homojenliği ve heterojenliğinin şematik gösterimi. 70
Şekil 4.18. Langmuir adsorpsiyon izotermleri. 71
Şekil 4.19. Freundlich adsorpsiyon izotermleri. 72
Şekil 4.20. Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izotermleri. 72
Şekil 4.21. C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL moleküllerinin C6-HSL baskılanmış (MIP) QCM sensöre verdiği kütle-zaman grafiği; Çözelti derişimleri: 1000 ng/mL. 74
Şekil 4.22. C6-HSL baskılanmış membranların seçicilik grafiği. 74
Şekil 4.23. C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL moleküllerinin baskılanmamış (NIP) QCM sensöre karşı verdiği kütle-zaman grafiği; Çözelti derişimleri: 1000 ng/mL. 75
Şekil 4.24. C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL moleküllerinin C6-HSL baskılanmamış (NIP) QCM sensöre karşı verdiği toplu haldeki kütle-zaman grafiği; Çözelti derişimleri: 1000 ng/mL. 76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Seçicilik deneyleri için dağılma, seçicilik, bağıl seçicilik katsayıları katsayıları. 54
Çizelge 4.1. QCM çip yüzeylerinin ortalama temas açısı değerleri 50
Çizelge 4.2. Bağlanma kinetik analizleri sonucu kinetik parametreler..…… 69
Çizelge 4.3. C6-HSL baskılanmış QCM sensör için Langmuir, Freundlich parametreleri……..…..72
Çizelge 4.4. Seçicilik deneyleri için dağılma, seçicilik, bağıl seçicilik katsayıları……...77
Çizelge 4.5. GC-MS için uygulanan sıcaklık değerleri..…… 77
Çizelge 4.6. Moleküllerin alıkonma süreleri...…… 78
Çizelge 4.7. Moleküllerin GC-MS sonuçlarına göre tutunma yüzdeleri. 78
Çizelge 4.8. A) GC-MS parçalanma ürünleri B) GC-MS kütüphane bulguları 79
Çizelge 4.9. GC-MS parçalanma ürünlerinin ve kütüphane bulguları 80
Çizelge 4.10. Kompleks ortamdaki başlangıç (A) ve sonuç (B) çözeltilerinin GC-MS sonuçları ve baskılanmış film yüzeyinin yarışmacı ajanlara karşı davranışı 81

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. Moleküler baskılamada kullanılan yaygın hedef kalıplar [1]. 14
Tablo 2.2. Farklı hazırlama prosedürleri ve MIP yöntemlerinin karşılaştırılması [1].....21
Tablo 2.3. Moleküler baskılanmış polimerlerin çeşitli uygulamaları. 27
Tablo 2.4. 1970–1992 dönemleri arası biyosensörlerin gelişimindeki önemli kilometre taşları [2].....32

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAm	Akrilamid
AC	Alternatif Akım
A_{el}	Kristal Rezonatör için Elektrot Alanı
AHL	N-Açil-Homoserin-Lakton
AIBN	Azobisizobütironitril
APM	Akustik Plaka Modu
BAL	Bronko Alveolar Lavaj
BAW	Hacim Akustik Dalga
ºC	Santigrat Derece
CF	Kistik Fibrozis
cm	Santimetre
C6-HSL	N-Heksanoil-L-Homoserin Lakton
d_q	Kristal Kalınlığı
Dk	Dakika
DMF	Dimetilformamid
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
EQCM	Elektrokimyasal Kuvars Kristal Mikroterazi
EPS	Ekzopolisakkarit
FPW	Yanal (flexural) Düzlem Dalga
GC	Gaz Kromatografisi
GI	Gastrointestinal
HEMA	2-Hidroksietil metakrilat
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IDT	Birbirine Bağlı Durumda olan Transdüserler
LC	Sıvı Kromatografisi
LD_{50}	Ortalama Öldürücü Doz
QCM	Kuvars Kristal Mikrobalans
MAA	Metakrilik Asit
MIA	Moleküler Baskılama Analizleri
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer
MIT	Moleküler Baskılama Teknolojisi
MS	Kütle Spektrometresi
SAW	Yüzey Akustik Dalga
SH-APM	Kesme-Yatay-Akustik Levha Modlu Rezonatör
TLC	İnce Kağıt Kromatografi
f	Salınım Yapan Kuvars Kristal için Rezonans Frekansı
f_0	Temel Kuvars Rezonatör için Rezonans Frekansı
F_q	Kristal Frekans Sabiti
FTIR	Fourier Transform Infrared
g	Gram
k'	Bağıl Seçiciliğin Katsayısı
k_a	Bağlanma Hız Sabiti
k_d	Ayrılma Hız Sabiti
Ka	Birleşme Sabiti
K_A	Bağlanma Denge Sabiti
K_D	Ayrılma Denge Sabiti
kg	Kilogram
L	Litre

M	Molarite
MALDI	Kütle Spektrofotometreli Matriks Destekli Lazer İyonizasyonu
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitre
Mm	Milimolar
mg	Miligram
m_s	Alan Başına Düşen Kütle
MΩ	Mega ohm
mmHg	Milimetre civa
µg	Mikrogram
μ_q	x-Yönünde Kayma Modülü (kesme modu)
µm	Mikrometre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
η_1	Yüzeye Temas Eden Sıvının Viskozitesi
ppm	mg Çözünen/Litre
QS	Quorum Sensing
R^2	Korelasyon Katsayısı
SPR	Yüzey-Plazmon Rezonansını
UV	Ultraviyole
UV-Vis	Mor Ötesi-Görünür Bölge Spektroskopisi
ρ_q	Kristal Yoğunluğu
ρ_1	Yüzeye Temas Eden Sıvının Yoğunluğu (g/cm^3)
1/n	1/n, Freundlich Yüzey Heterojenite İndeksi
Δf	Kuvars Kristal TSM Rezonatörün Frekansındaki Değişim
Δm	Mutlak Kütle Değişimi

1. GİRİŞ

Yüksek canlılar birbirleriyle iletişim için ses ve sözcükleri kullanırken, bakteriler bu işlevi bazı iletişim moleküller ile sağlamaktadırlar. Bu haberleşme molekülleri, üretimi yapılan hücrelerde ve farklı hücrelerin metabolizmalarında yaptıkları düzenlemeler nedeni ile oto indükleyici veya oto uyarıcı olarak da bilinmektedirler. Sözü edilen bu olay, "Quorum Sensing" (QS) veya çevreyi algılama ya da bakteriyel iletişim olarak ifade edilmektedir. Quorum sensing; bir mikroorganizmanın ortama sinyal molekülünü bırakması ile; mikroorganizmalar için çevreyi algılama olayının ötesine geçer ve zorlu çevre koşullarına uyum sağlayan bakteri geninin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.

Gram-negatif bakterilerin ana sinyal molekülleri olan N-açil-homoserin-laktonlar (AHL) virülans faktörlerini eksprese edebilirler. Quorum Sensing sistemi, patojenitenin belirlenmesinde önemli bir rol oynayabilirler. AHL, bakteriyel virülans genlerinin regülasyonunda önemlidir. Ayrıca, ökaryotik hücre ile etkileşime girebilir, enfeksiyonu kolaylaştırarak bağışıklık yanıtını azaltır [1]. AHL küçük bir organik bileşiktir. Gram-negatif bakteriler genellikle genel tekniklerle tespit edilmesi zor olan düşük konsantrasyonlarda AHL üretirler. AHL'leri tespit etmek için TLC-biyosensörler, genetik mühendisliği ile üretilmiş bakteriyel sensörler de dahil olmak üzere AHL biyosensörleri mevcuttur. Ancak, klinik açıdan önemli bu molekülün tespiti aşırı hassasiyet gerektirmektedir, günümüzdeki yöntemler ise bu hassasiyetten yoksundur. Böyle bir durumda tespit eşiğinin altındaki numuneler için yanlış sonuçlar ortaya çıkar. Diğer bir komplike durum ise, cihazların duyarlılığının kullanılan cihaza bağlı olmasıdır. HPLC, HPLC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, MALDI-MS gibi yöntemler Gram-negatif bakterilerin bakteriyel kültürlerinin hücresiz süpernatantlarında AHL'leri saptayabilir, fakat, bu yöntemlerin geniş bir şekilde uygulanması, cihazların yüksek maliyeti bu analizlerin yapılmasını sınırlandırmıştır. Diğer bir nokta ise, mevcut AHL tespiti yöntemlerinin, zaman alıcı, pahalı olması ve yüksek eğitimli teknik personel gerektirmesidir [1].

Yukarıda anlatılan yöntemlerin kısıtlamaları nedeniyle, AHL'lerin tespiti için basit, hassas, ucuz ve hızlı bir analitik yöntem geliştirmeye ihtiyaç vardır. Dolayısıyla, biyosensör ilişkili biyo-belirteçlerin tanımlanması klinik açıdan önemlidir. Çok sayıda

hastada farklı bakteri araştırma çalışmaları, yüksek doğrulukla çalışan, hızlı ve kolay yöntemlere ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır. Bir ortamda tespit edilen lakton varlığı, ortamdaki bakterilerin bulunma populasyonun yüksek olduğu anlamını taşır. Araştırmamız klinik açıdan önemli AHL moleküllerinin kolay, zahmetsiz tespiti ve tanımlanmasına yönelik kütle duyarlı bir sensör ihtiyacından dolayı tasarlanmıştır [1].

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP), zahmetsiz, kolay hazırlanabilen, stabilitesi yüksek, ucuz ve özgül tanıma kabiliyetleri olan polimerlerdir. Moleküler baskılama, genel olarak hedef (kalıp) molekül, çapraz bağlayıcılar, fonksiyonel monomerler, polimerizasyon başlatıcılar ve solventleri içeren bir tekniktir. Polimerizasyon prosedürü sonrasında hedef molekülün polimerden uzaklaştırılması ile yapıda hedef moleküle spesifik oyuk bölgeler oluşmaktadır. MIP'ler ayırma işlemlerinde, kimyasal tayin ve kataliz gibi önemli kimyasal olaylar için ideal malzemelerdir. En önemli özellikleri; saklama ömrü oldukça uzun olması, dış etkenlere karşı fiziksel ve kimyasal stabiliteleri oldukça yüksek olmasıdır. Mekanik kuvvet, yüksek sıcaklık ve basınca, asit, baz metal iyonlarına ve organik çözücüler gibi ortam etkilerine karşı dayanıklıdır. MIP'lerin hafıza etkisini yitirmeksizin yüz defadan fazla tekrar tekrar kullanılabilme yeteneği olduğu bilinmektedir [2,3]. Son zamanlarda MIP'ler, izolasyon [4], saflaştırma [5], kiral ayırma [6], kataliz [7] ve sensörler [8] gibi birçok uygulama alanında kullanılmaktadır.

QCM sensörler, kullanım kolaylığı, uygulanabilirliliği, ucuz ve simultane ölçüm yapabilme özelliği ile birlikte popüler sensörler arasındadır [9]. QCM sensörler; gıda analizi, klinik ve çevresel analizlerde sıklıkla kullanılmaktadır. QCM bazlı sistemlerde genel teori; çip yüzeyinde meydana gelen etkileşim sonucu kütle artışı ve bunun sonucunda değişen frekansın korele olarak değişimidir [10].

Bu tez çalışması kapsamında, bakterilerin bulunduğu ortamlarda düşük konsantrasyonlarda üretilen mevcut yöntemlerle tayin edilmesi oldukça güç olan bakteri sinyal moleküllerinden biri olan N-Heksanoil-L-Homoserin Lakton (C6-HSL) tayini için moleküler baskılama yöntemiyle kuvars kristal mikroterazi (QCM) sensörlerin hazırlanması hedeflenmiştir. QCM sensör çipleri yüzeyine C6-HSL baskılanmış polimerik membranlar hazırlanarak laktonların yüksek seçicilikte tayininin sağlanması amaçlanmıştır.

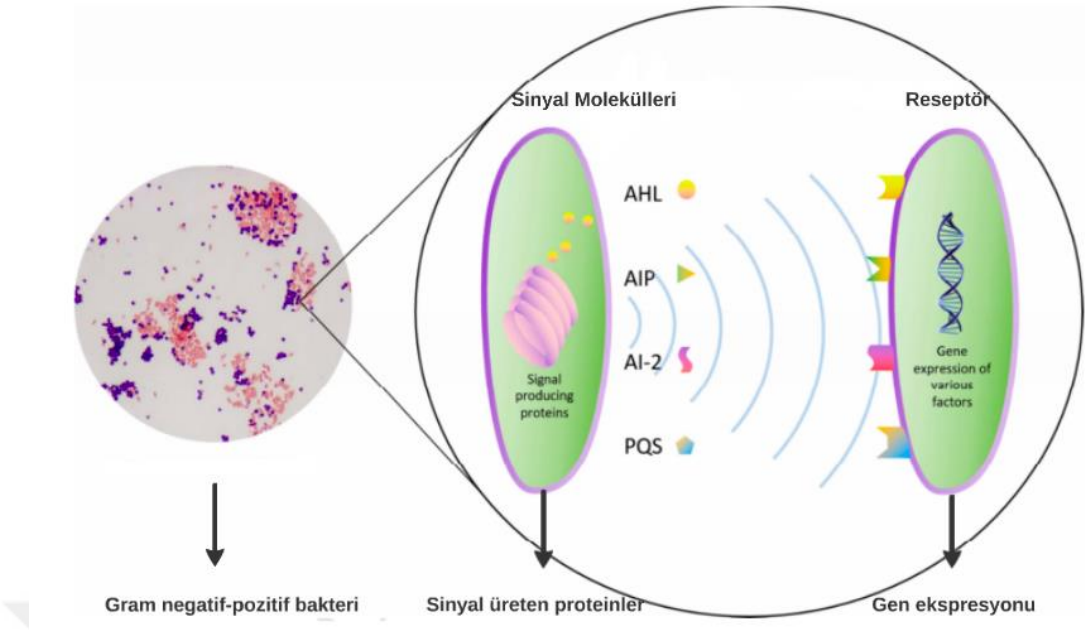
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Quorum Sensing

"Quorum Sensing" olayı bakterilerin dili olarak bilinmektedir. Biyofilm oluşumu, bakteriyel virülans faktörü, antibiyotik üretimi, konjugal plazmid transferi ve pigmentasyon, ekzopolisakkarit (EPS) üretimi gibi fonksiyonların düzenlenmesinde sorumlu olduğundan dolayı, birçok bilim insanının dikkatini çekmiştir. QS, insan sağlığını, tarımı ve çevreyi bir bütün olarak doğrudan etkilediği için bu bağlamda önem arz etmektedir [11].

Günümüzde antibiyotik direnci olan bakteriler dünya genelinde son derece ciddi bir problem teşkil eder. Bakteriler tüm inert ve yaşam yüzeylerinde çok hücreli topluluklar veya biyofilm üreterek yoğun biçimde gelişirler [12]. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, hastanelerde bildirilen enfeksiyonların %60'ından fazlası antibiyotiğe dirençli bakteriler kaynaklıdır [13,14]. Patojenik hastalıkların tedavisinde QS olayına müdahil olan ajanları tanımlamak ve kullanmak, antibiyotik dirençli patojenlerin neden olduğu hastalıkların kontrolü ve buna yönelik yeni tedavilerin geliştirilmesi açısından dikkate değerdir [15].

Bir organizmanın savunma sistemi, QS sisteminin doğru kullanılması ile kontrol altına alınabilir ve virülans faktörlerinin aktive olmasını sağlayan moleküllerinin tespiti ile birçok patojen türün üstesinden gelebilir. Konak sistemindeki koordineli saldırı yani bağışıklık sisteminin savaşı, bakterilerin popülasyon yoğunluğunun artması ile ortaya çıkar. Bakteriyel enfeksiyonları hafifletmek için uygun ve teknik olarak QS sinyallerinin bozulması hedef olabilir. Givskovand ve ark. kistik fibrozis (CF) hastalarında yapılan bir klinik çalışmada sarımsak yağının, QS sinyal moleküllerinde bir inhibitor etkisinin olduğunu ilk kez rapor etmişlerdi. Hastalar üzerinde yapılan araştırmada iyileşme gözlemlenmesine rağmen genel değerlendirmede sarımsak yağının inhibisyon teorisini doğrulamak için çok daha büyük ölçekli klinik çalışma gerektiğini anlamışlardı [16]. QS inhibisyonunun insan sağlığı açısından, ticari bir uygulamaya entegre edilmeden önce daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir [17].



Şekil 2.1. Dört farklı tür sinyal molekülünün bakteri-bakteri iletişimiyle transferi ve alınmasının şekli [17].

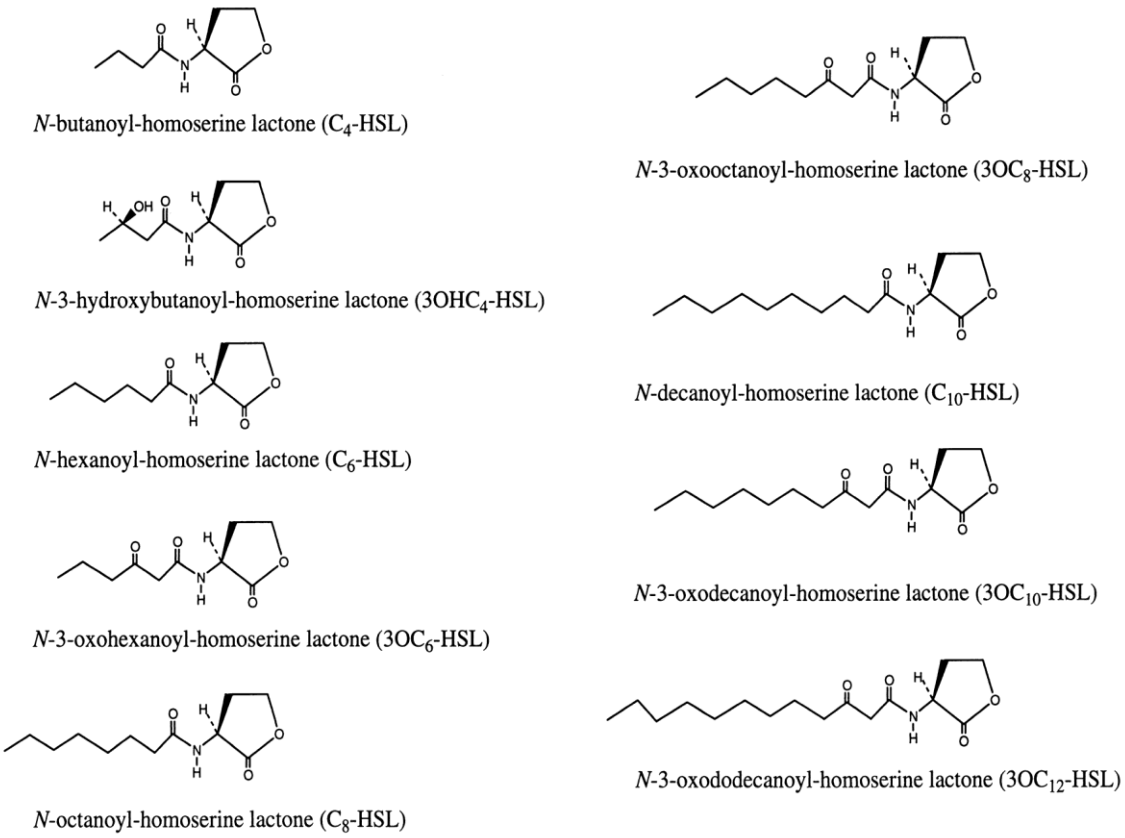
Birçok önemli bitki, hayvan ve insan patojeni, küçük sinyal molekülleriyle bakteriyel hücre-hücre arasındaki iletişim sayesinde virülansı düzenlediği bilinmektedir. Gram negatif bakteriler tarafından üretilen ve sinyal bileşeni olan, N-Açil-homoserin laktonlar (AHL'ler), bakteri populasyonu yoğunluğuna bağlı olarak gen ekspresyonu koordinasyonu ile quorum sensing olayında bulunurlar [18–25].

Bakteriler, belirli kimyasal sinyal moleküllerini üreterek ve bunlara yanıt vererek diğer bakterilerin varlığını algılarlar. Bu moleküllerin konsantrasyonu, ortamdaki bakteri yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Başka bir deyişle, kimyasal sinyal moleküllerinin konsantrasyonu ile belirli bir ortamda bulunan bakterilerin konsantrasyonu arasında doğrudan bir ilişki vardır. Bakteriler bir grup gibi davranmaları için, gerekli olan birkaç genin ekpresyonunu senkronize ederek veya düzenleyerek birbirleriyle iletişim kurarlar. Bu bakteriyel aktiviteler, sadece bir bakteri tarafından eksprese edildiğinde anlamlı olmayabilir, ancak grup bazlı bir tarzda eksprese edildiğinde bir sonuç ortaya koyabilir [26,27]. QS sistemini kullanan bazı bakteri türleri ve virülans faktörleri şöyledir: *Vibrio harveyi* ve *Vibrio fischeri* deniz bakterilerinin biyolüminesansından [28], *Pseudomonas aeruginosa* ve *Burkholderia cepacia* kistik fibrozis (CF) hastalarının akciğerlerinde biyofilm oluşumundan [29], üreme ve motilitede *Serratia*

liquefaciens [33], *Staphylococcus aureus* virülans belirleyicilerinin oluşumundan [34] ve *Bacillus subtilis* sporulasyondan [32] sorumludur.

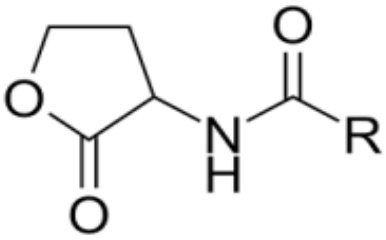
2.2 Homoserin Laktonlar

Gram-negatif bakterilerde kimyasal sinyal molekülleri N-açil homoserin laktonlardır (AHL). Gram-pozitif bakterilerde ise küçük oligopeptidlerdir. Farklı türlerde olan ve Gram negatif bakteriler tarafından üretilen AHL'ler, AHL molekülünün açil yan zincirinin karbon atomlarının sayısı 4C-18C arasında farklılık gösterir [24,33].



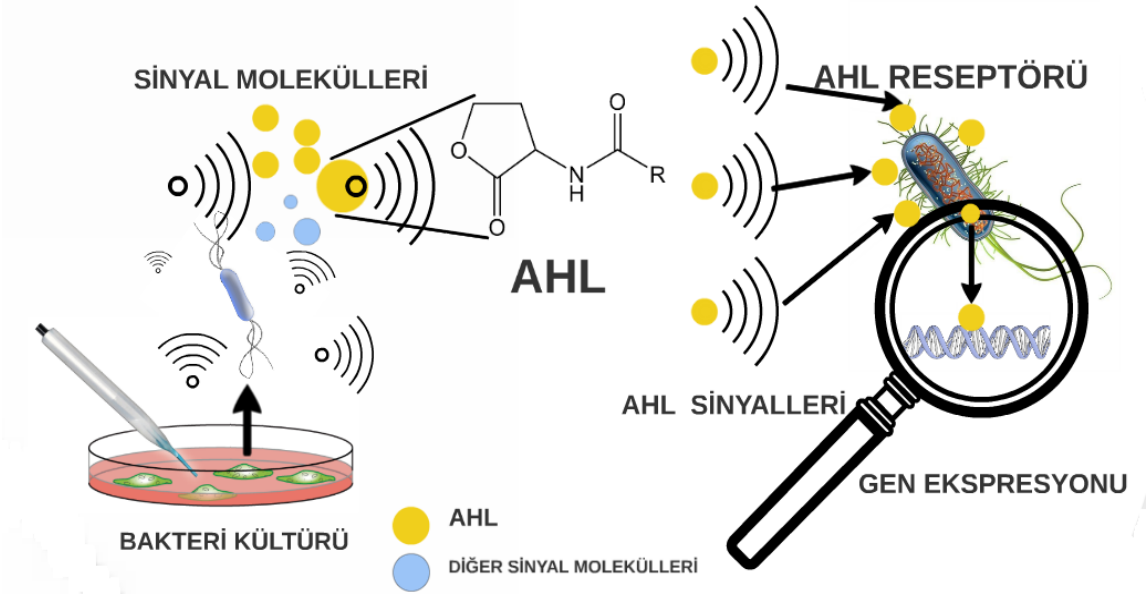
Şekil 2.2. Bazı N-açil homoserinlerin laktonların kimyasal yapıları.

Laktonların genel yapıları Şekil 2.3'ten de görüldüğü gibi bir lakton halkası, amid ve karbonil grupları ile bir tane de hidrokarbon zincirinden oluşmaktadır.



Şekil 2.3. Lakton moleküllerinin genel kimyasal yapıları.

Gram negatif bakterilerde QS olgusunun başlatılması ve düzenlenmesi mekanizması karmaşıktır. Bakterilerin bu çevresel algılamayı yani QS mekanizmasının AHL'ler tarafından düzenlemesinin anlaşılmasındaki son gelişmeler sayesinde, AHL'ler ile iletişimin aydınlatılması, işlevlerinin ve etkilerinin kavranması mümkün olmuştur. İn vitro ve in vivo ortamlarda, virülansın belirlenmesinde QS'in rolünü göstermek için önemli miktarda veri toplanmıştır.



Şekil 2.4. Bakterilerin AHL üretimi, sinyal moleküllerinin bakteri reseptörü ile alınışının ve gen ekspresyonunun şematize edilmiş şekli.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, AHL'lerin biyolojik ve klinik örneklerde saptanmasının önemi daha da anlaşılacaktır. AHL vasıtalı QS'nin, kistik fibrozis (CF) hastalarında akciğer rahatsızlığına neden olan *P. aeruginosa* ve *B. cepacia* tarafından kronik bakteriyel enfeksiyonlara neden olduğu kanıtlanmıştır [34,35].

QS'nin hem cansız yüzeylerde, hem de akciğer dokusunda biyofilm oluşumundan sorumlu olduğu gösterilmiştir [35–37]. Ayrıca, QS'nin bazı gastrointestinal (GI) hastalıklarının patogenezinde rol oynadığı bilinmektedir. QS'nin patojenler tarafından bağırsak kolonizasyonunda ve patojenler üzerinde virülans genlerin düzenlenmesinde önemli bir görevi olduğu kapsamlı olarak kanıtlanmıştır [38–44].

AHL'lerin sitokinleri ve kemokinleri de inhibe ettiği bilinmektedir [45]. Hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda, hem hayvan hem de insan modellerinde, bazı AHL'lerin benzer immüno modülatör etkileri gösterilmiştir [46–51]. Örnek olarak; *P. aeruginosa* patojenitesindeki QS'nin rolü, hem hayvan hem de insan modelleri ile de ispatlanmıştır [33,52–55]. Bir ortamdaki QS olayının bakterilerle olan ilişkisi üzerine yapılan klinik çalışmalar ışığında, bakterilerin iletişiminin yoğun olduğu ortamlarda aşırı şekilde AHL üretiminin olduğu doğrulanmıştır. Biyolojik örneklerde AHL tespiti için, Taylor ve ark. [56], süngerler, makroalg, deniz otları, bryozoanlar, asidiyanlar ve mercanlar gibi farklı deniz organizmaları türlerini analiz etmişlerdir. Sünger dokusunun kimyasal ekstraktları; bakteri hücre algılama sistemi, katı faz ekstraksiyonu ve GC-MS gibi bir yöntemle analiz edilmiştir. Yukarıda belirtilen tüm organizmalarda AHL'ler tespit edilmiştir.

Wu ve ark. [57], farelerin akciğer dokularını *P. aeruginosa* ile enfekte edip deneysel olarak incelemişlerdir. Bu enfekte akciğer dokularının in vivo çalışmalarında AHL tespiti için bakteri algılama sistemi kullanılmıştır. AHL'ler şiddetli patolojik koşullara sahip dokularda tespit edilmiş, böylece QS ve *P. aeruginosa* patojenisitesi arasındaki ilişki doğrulanmıştır. Benzer bir çalışmada, Sokol ve ark. [58], *B. cenocepacia* ile enfekte olmuş farelerin akciğer homojenatlarında AHL'lerin saptanması için bir bakteriyel hücre algılama sistemini kullanmışlardır. Buradaki çalışmada, *B. cenocepacia* enfeksiyonlarının şiddetinde QS'nin rolünü göstermişlerdir. Jacobi ve ark. [59], farelerde yüksek derecede patojen olan *Y. enterocolitica* serotip O8 ile enfekte edilmiş farelerin karaciğer ve dalak homojenatlarında hem in vitro hem de in vivo çalışmalar yapmışlardır. AHL'lerin saptanması için biyolüminesans bir bakteri hücre algılama sistemi kullanmışlardır. Bu deneyde de AHL varlığı saptanmıştır.

2.3 Klinik Örneklerde AHL'lerin Tespiti

İnsanlarda yapılan AHL tespiti için; bronkoalveolar lavaj (BAL), mukopürülan respiratuar sekresyon, akciğer sıvı örnekleri, tükürük, dışkı gibi klinik örnekler baz alınıp bazı çalışmalar yürütülmüştür.

Middleton ve ark. [35], CF hastalarından alınan balgam örneklerinde *P. aeruginosa* ve *B. cepacia* tarafından kolonize olan örnekleri incelemişlerdir. AHL'lerin varlığının tespiti için bakteri hücre algılaması yapılmıştır. Bu amaçla, tespit edilen AHL'lerin tanımlama çalışmaları için yüksek çözünürlüklü LC-MS kullanılmıştır.Burada, *P. aeruginosa* tarafından enfekte edilmiş CF hastalarından alınan balgam örneklerinde, *P. aeruginosa* tarafından üretilen C6-HSL ve N- (3-okso) -dodekanoil-DL-homoserinlakton olduğu saptanmıştır.

Erickson ve ark. [60], yine CF hastalarının balgam örnekleri üzerinde çalışmış olup AHL'lerin tespiti için bakteriyel hücre bazlı biyoalgılayıcı sistemler kullanmışlardır. Erickson ve ark., CF hastalarının akciğerlerinde QS sistemlerinin aktif olduğunu göstermişlerdir.

Başka bir çalışmada, AHL'ler CF hastalarındaki mukopürülan solunum salgılarında tespit edilmiştir [61]. Bu örneklerin ekstraktları LC ile önceden parçalara ayrılıp daha sonra AHL'lerin saptanması için bir bakteriyel hücre algılama sistemi kullanılmıştır.

Favre-Bonte ve ark. [62], iki CF hastasının akciğer dokusunda AHL'leri saptamışlardır. Akciğer dokularından alınan, *P. aeruginosa* tarafından enfekte olan bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvı numuneleri, analize tabi tutulmuştur. Uzun zincirli AHL'ler (C10-C14), belirgin enfeksiyon [63] yokluğunda bile BAL sıvısı numunelerinde saptanmıştır.

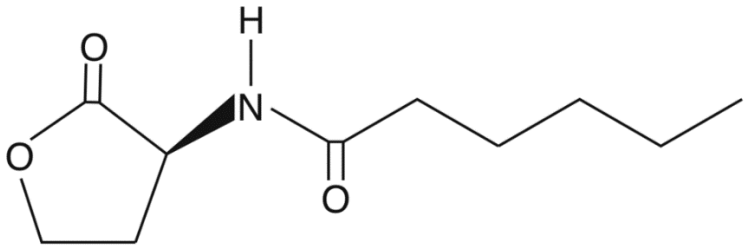
Yukarıda bildirildiği gibi, klinik örneklerde ve aynı zamanda hayvan modellerinden de alınan örneklerde AHL'lerin saptanması için çeşitli analitik yaklaşımlar kullanılmıştır. Ancak, klinik örneklerde AHL'lerin patofizyolojik konsantrasyonları hakkındaki veriler yetersizdir. Spesifik olarak, balgam, mukopürülan respiratuar sekresyon ve akciğer sıvı örnekleri gibi klinik örneklerde CF hastalarında ve GI

hastalıklara sahip deneklerin tükürük ve dışkılarında [33] AHL'ler mikromolar-pikomolar seviyelerinde tespit edilmiştir.

Fiziksel-kimyasal yöntemlerle elde edilebilen bu tespitin sınırları, bazı klinik örneklerde AHL'lerin saptanması için yeterli olabilse de bazı dezavantajları olabilir. Temel problemler arasında, uzun analiz süresi ve bir analitik çalışmada birden fazla örneği analiz edememe, numune hazırlama için gerekli olan uzun ve yorucu prosedürler analitik süreci negatif olarak etkilemektedir [33].

2.4 N-Heksanoil-L-homoserin lakton

N-[(3S)-tetrahidro-2-okso-3-furanil]-heksanamid (199.2 g/mol) olarak adlandırılan kısa adı C6-HSL olan bir moleküldür. En az iki yıl stabilitesini koruyabilmektedir (-20 °C'de olmak şartı ile). C6-HSL, kristal bir katı halde tedarik edilmektedir. C6-HSL'nin DMSO ve dimetilformamid gibi organik çözücüler içinde çözündüğü bilinmektedir. Biyolojik deneyler yapılmadan önce sulu tampon çözeltilerde kullanılması önerilmektedir. C6-HSL molekülü QS sistemlerinde, artan hücre yoğunluğuna cevap olarak gen ekspresyonunu kontrol etmek üzere bakteriler tarafından kullanılır. Gelecek vaat eden bir molekül olup, QS sistemlerini bakteriyel enfeksiyonları kontrol etmede görev alır. Belirli hedef genlerin ekspresyonunda görev alır (LuxIR protein ailesine ait transkripsiyonel regülatörler gibi). C6-HSL, QS'de görev alan gen ekspresyonunu kontrol eden ve hücresel metabolizmayı etkileyen küçük ve yayılabilir bir sinyal molekülüdür [64]. Genel olarak; kistik fibrozda virülansın düzenlenmesi, enfeksiyon önlemede, ticari tarımda balçık ve biyofilm azalmasında, gıda bozulmalarını önlemede ve balıklarda septisemi bu molekülün çeşitli uygulamaları arasındadır [61,65–67].



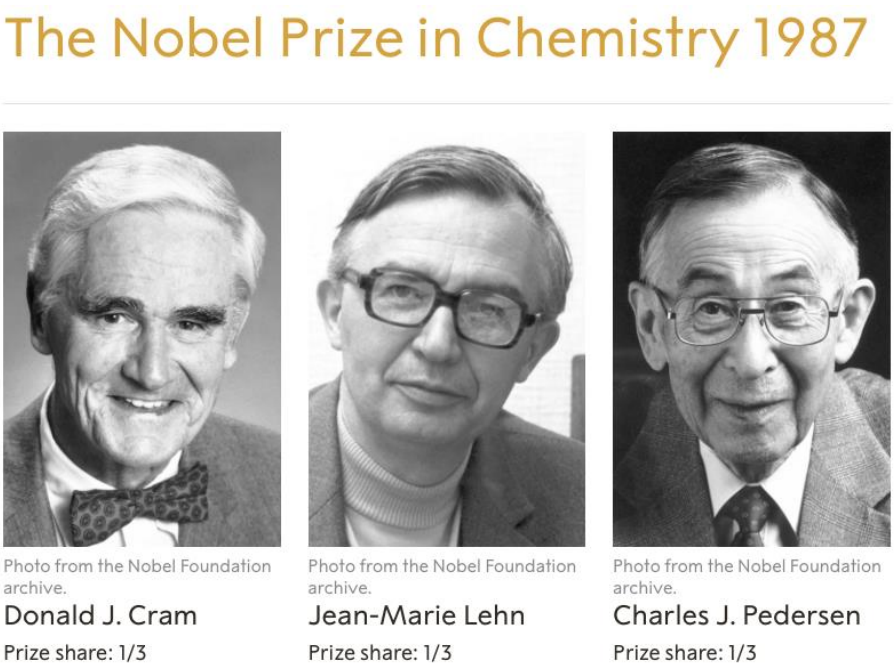
Şekil 2.5. C6-HSL yapısı.

2.5 Moleküler Baskılamanın Geçmişi

Moleküler baskılanmış polimerler, malzeme bilimi ve ayırma tekniği gerektiren uygulamalardaki kullanımlarıyla akademik çalışmalarda araştırmacılar tarafından ilgi görürler. Sentetik olarak üretilen organik polimerler 1972'lerde literatüre sunulsa da [71], sonrasında yürütülen diğer çalışmalarda farklı baskılama metodları denenmiş ve uygun sonuçlar elde edilmiştir [72]. Böylece, moleküler baskılamada yeni yollar geliştirilmiştir.

Günter Wulff ve Mosbach, fonksiyonel gruplara sahip sentetik polimerlerin üç boyutlu yapıların organizasyonu ile, oldukça spesifik bağlanma bölgeleri olan polimerler elde edildiğini ilk kez rapor etmişlerdir [73].

Öte yandan, organik kimya alanında "Supramoleküler kimya" nın kurucuları arasında yer alan Charles J. Pedersen, Donald J. Cram 1987'de "The Design of Molecular Hosts, Guests, and Their Complexes" adlı çalışma ile Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir [74]. Bu çalışmada, Cram, Lehn ve Pederson moleküler tanıma kavramının da önünü açmışlardır. Buradaki çalışmada, katyonlar, anyonlar veya nötr moleküller, özel olarak tasarlanmış bileşiklerin boşluklarına girebildiğini ve moleküller arası kuvvetler tarafından orada tutulduğunu kanıtlamıştır [75]. Böylece, moleküler baskılanmış polimerlerde meydana gelen etkileşimleri de aydınlatmışlardır. Bu konunun esası, yine de ilk kez Fischer tarafından "Anahtar-kilit modeli" olduğu kabul edilir [76]. Moleküler baskılama tekniği son derece popüler bir yöntem olup ve günümüzde halen uygulama alanı bulmaktadır [77].



Şekil 2.6. Moleküler tanıma çalışmaları ile moleküler baskılamanın önünü açan bilim insanları [78].

2.6 Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP)

Moleküler Baskılama Teknolojisi (MIT), günümüzde antikorlar ve biyolojik reseptörler gibi doğal tanıma varlıklarını taklit edebilmesi nedeniyle moleküler tanıma materyallerini tasarlamak için uygun bir sentetik yaklaşımdır [71,72,79–86].

Polimerlerde aranan temel özellikler şöyledir:

1)Baskılanacak moleküle spesifik kalıcı bir hafıza meydana getirmesi için yeteri kadar kararlı olması,

2)Baskılanmış bölgelerden hedef molekülün kolayca desorpsiyonu sağlanması için makro gözenekli yapıda olması önem arz eder [87].

MIP sentez prosedürü için gerekli olan bazı temel bileşenler vardır. Bunlar; hedef molekül (kalıp veya şablon molekül), monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve çözücüdür. Polimerizasyonun ardından, MIP yapısında hedef molekülün üç boyutlu yapısını alacak kavitelerin oluşması için yıkama işlemi ile kalıp molekül polimerden desorbe edilerek uzaklaştırılır.

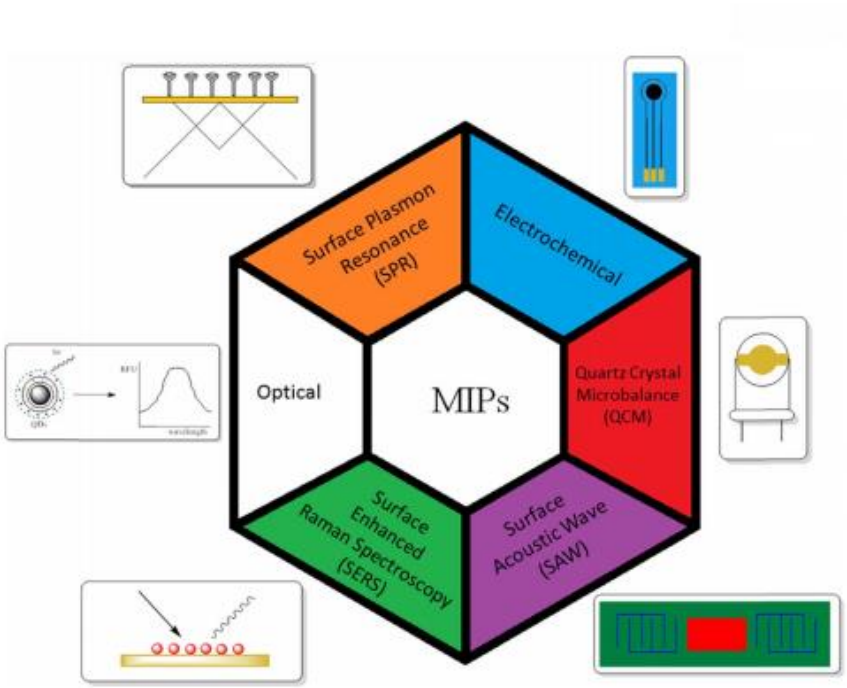
Yıkama işleminden sonra, kaviteler desorbe edilen hedef molekülü boyut, yapı ve kimyasal olarak karakteristiklerini tanır ve optimum koşullarda hedef molekülün bağlanmasına olanak sağlar. Ardından yapılacak deneysel işlemlerde hedef molekül içeren çözelti, moleküler baskılanmış polimere tabi tutulduğunda, aktif tanıma

bölgeleri sayesinde kalıp molekülü tanıyacaktır. Bu durumda kalıp molekülün polimere tekrar bağlanması mümkün olacaktır.

Moleküler baskılanmış polimerler bazı yönleri ile avantaj sağlarlar. Bunlar;
-Seçicilik ve afinite olarak doğal reseptörler kadar yakın seviyede olmaları,
-Doğal moleküllere nispeten daha stabil olmaları,
-Hazırlanma safhalarının ve uygulanmalarının basit ve sade olması nedeni ile araştırmalara kolaylık sağlarlar [88].

2.6.1 Moleküler baskılama yöntemi

Moleküler baskılama metodu; doğal reseptörlerin bazı durumlarda stabil olmamaları ve maliyetleri nedeni ile gereksinim duyulan bir metottur. Moleküler baskılama yöntemi çok amaçlı işlev gören, reseptörleri efektif olan, hızlı ve maliyetleri düşürmek için geliştirilmiştir [89]. Moleküler tanımaya dayanan moleküler baskılama yöntemi, hedef molekül olarak adlandırılan ilgili moleküller çevresinde meydana gelen ve yüksek oranda çapraz bağlı polimerik matrikslerle spesifik kaviteler meydana getiren bir tür polimerizasyon prosesidir [90].

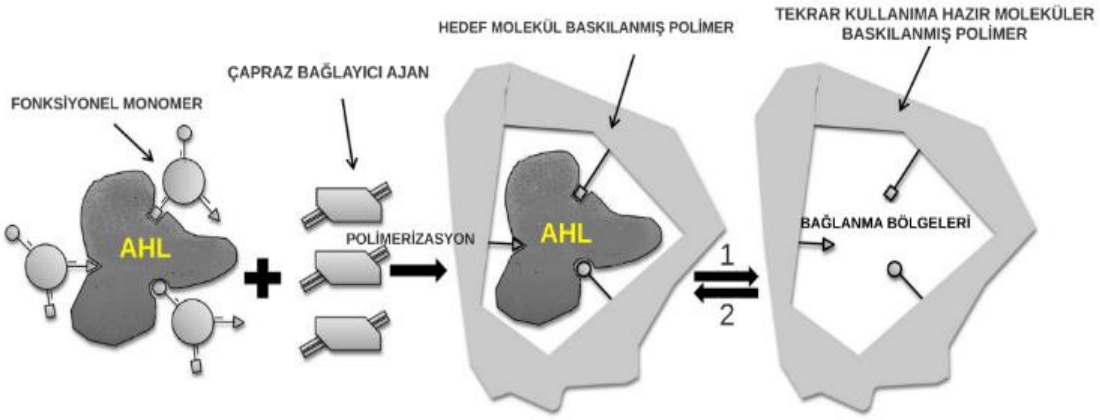


Şekil 2.7. MIP'lerin çeşitli biyosensörlerle entegrasyonu [91].

Moleküler baskılanmış polimer oluşum yöntemi genel olarak üç basamaktan meydana gelir:

-Bağlanma aşamasında, fonksiyonel monomerler ile kalıp molekül arasında bir etkileşim meydana gelir. Hedef molekül ile monomer arasında kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimler oluşur. Kalıp molekül-monomer birbirine bağlanarak bir kompleks oluşur. Bu aşamada, hedef molekül etrafında fonksiyonel monomerlerin bağlandığı bir yapı meydana gelir. Burada meydana gelen etkileşimlerde kalıp molekülün spesifik üç boyutlu yapısı ve kimyasal karakteristikleri önem arz eder .
-Monomer-kalıp molekül kompleksi ile çapraz bağlayıcı polimerleşme işlemine alınır.
-Kalıp molekül yıkama çözeltisi ile polimerden desorbe edilir. Polimerde hedef molekülü tanıyabilen özel bir yapı oluşur. Polimerde oluşturulan boşluklar sayesinde hedef molekül spesifik olarak bağlanır.

Molekülün üç boyutlu yapısını tanıyan polimer, hedef molekül için özeldir. Eğer, MIP hedeflenen molekül ile aynı ortamda karışım halinde etkileşime sokulursa, bağlanma bölgeleri sebebi ile ortamdan sadece baskılanan molekülü tanıyarak o molekülü bağlayacaktır [92,93].



Şekil 2.8. Moleküler baskılama oluşum aşaması; 1. Kalıp molekülün uzaklaştırılması; 2. Kalıp molekülün tekrar bağlanması.

Moleküler baskılamanın temel amacı, biyolojik reseptörler ile karşılaştırılabilir afinite ve özgüllüğe sahip MIP'lerin üretilmesidir. Böylece, son aşamada gerçek uygulamalarda biyolojik varlıkların yerini alabilmiş olacaklardır. Genel olarak, ideal bir kalıp molekül üç gereksinimi karşılamalıdır. Bunlar, polimerizasyonu

engellemeyen fonksiyonel gruplar içermeli; polimerizasyon reaksiyonu sırasında kimyasal stabilitesi mükemmel olmalı, fonksiyonel monomerlerle kompleksler oluşturabilen fonksiyonel gruplar içermelidir [94].

Şimdiye kadar, MIP'ler çok çeşitli küçük organik moleküllerin tanınması ve tespiti için başarıyla uygulanmıştır. Ayrıca, Tablo 2.1'de görüldüğü gibi, birçok iyon baskılanmış polimer (IIP) de hazırlanmıştır. İyon baskılanmış polimerlerden, metal iyonlarının seçimi ve zenginleştirilmesinde yararlanılmıştır. Bununla birlikte, metal iyonlarının aynı yüklere, benzer iyonik yarıçaplara ve özelliklere sahip olması nedeniyle, metal iyonu kendisi bir baskılama şablonu olarak hareket ettiğinde, genellikle düşük seçicilik elde edilmektedir [95]. Günümüzde, metal iyonu ve bir ligand kompleksinin gerçek baskılama kalıbı olarak kullanma yöntemi, iyon baskılamada yeni bir trenddir. Metal iyonu ve ligand kompleksi, fonksiyonel monomerlerle kolaylıkla önceden polimerize edilebilir. Polimerizasyon reaksiyonundan sonra, metal iyonu için yüksek adsorpsiyon verimliliğine ve seçiciliğine katkıda bulunan metal iyonu için spesifik tanıma sahaları bırakarak, elüsyonla çıkarılır.

Bu küçük yapıdaki moleküllere ek olarak, proteinler, virüsler ve hücreler gibi MIP'ler için büyük yapılandırılmış türler de literatürde rapor edilmiştir [41,96–98].Yine de, proteinlerin ve diğer biyomakromoleküllerin baskılanması hala büyük bir sorundur [13,99]. Tablo 2.1, çeşitli hedef kalıp molekül türlerini göstermektedir.

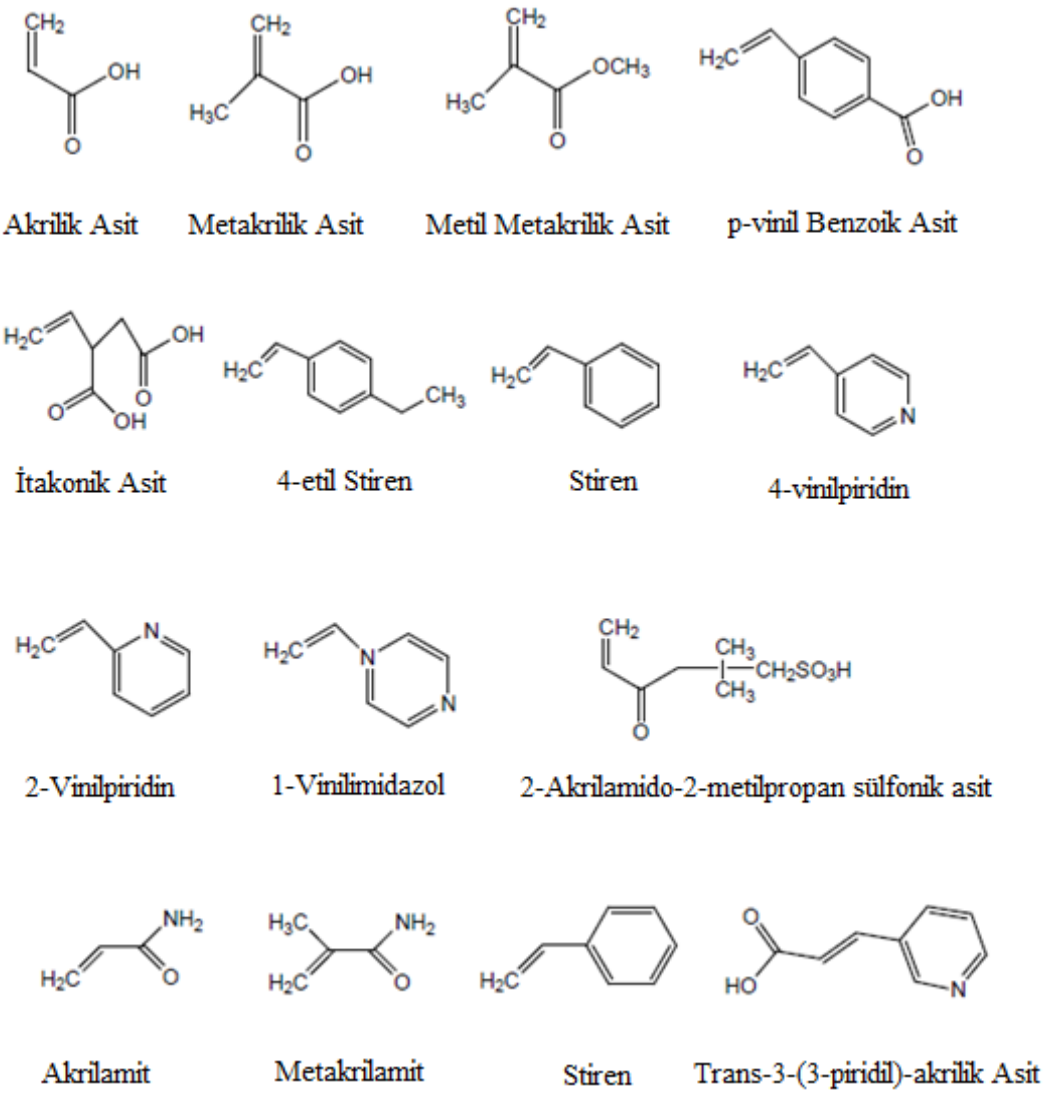
Tablo 2.1. Moleküler baskılamada kullanılan yaygın hedef kalıplar [100].

Tür	**Örnek**
İyonlar	Pb(II),Sr(II),Hg(II),$CH_3Hg(I)$,Cd(II); Cu(II); Cr(III); Fe(III); Ni(II); UO_2^{2+}; Th(IV); Eu(III); As(III); PO_4^{3-}
Organik moleküller	**Pestisitler:**Atrazin; 2,4-diklorofenoksiasetik asit; benzimidazolfungisitler **İlaçlar:**Tetrasiklin;kinolonlar; propranolol; digoksin; sülfonamidler **Endokrin bozucu kimyasallar:**Bisfenol A; estradiol kombinasyonu; östron; polisiklikaromatik hidrokarbon (PAH) **Şekerler:** D-früktoz; D-glükoz; D-galaktoz **Amino asitler ve peptitler:**Tirozin; alanin; tripeptidler; sarmal peptitler; kinkhonaalkaloidleri; Dipeptidlerin N-terminal histidin dizisi

	Şekerler: D-früktoz; D-glükoz; D-galaktoz **Patlayıcı:** 2,4,6,-trinitrotoluen (TNT)
Biyomakromoleküller	Lizozim; adenozin,3,5-siklikmonofosfat (cAMP); sığır serum albümini (BSA)
Hücreler ve virüsler	Tütün mozaik virüsü; sığır lösemivirüsü; dang virüsü; gut-homing T

2.6.2 Fonksiyonel monomer seçimi

Fonksiyonel monomerin rolü, fonksiyonel gruplar sağlayarak hedef molekül ile (kalıp) bir ön polimerizasyon kompleksi oluşturmaktır. Fonksiyonel monomer polimerizasyondan önce spesifik donör-reseptör veya antikor-antijen kompleksleri formu oluşturabilecek ve kalıp molekül ile güçlü bir şekilde etkileşime girebilecek uygun bir fonksiyonel monomer seçmek açısından önemlidir. Bazı tipik fonksiyonel monomerler Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



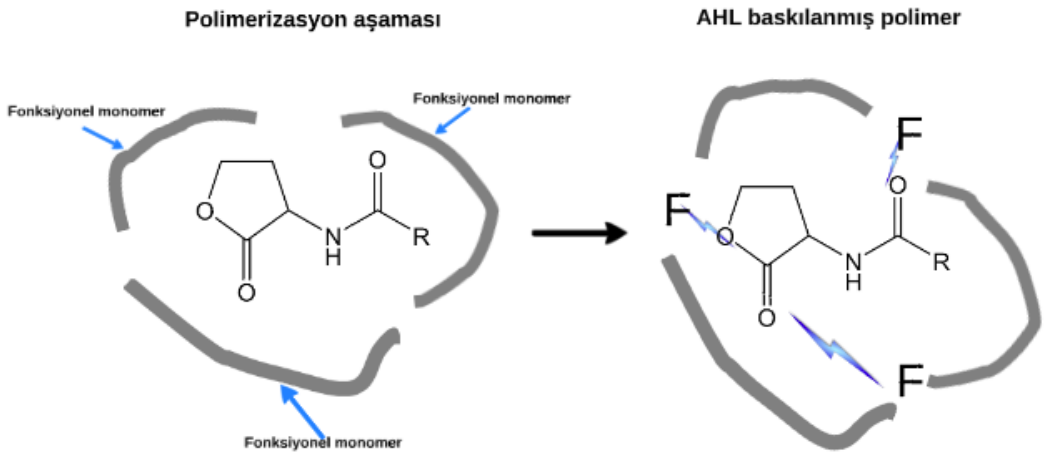
Şekil 2.9. Moleküler baskılamada kullanılan bazı tipik fonksiyonel monomerler [101].

Bunlar arasında MAA, hem hidrojen vericisi ve alıcı özellikleri nedeniyle "evrensel" bir fonksiyonel monomer olarak kullanılmıştır. Zhang ve ark. yaptığı bir çalışmada, MAA'nın neden moleküler baskılama için çok yönlü bir monomer olduğunu açıklamışlardır. MAA'nın dimerizasyonunun baskılama etkisini belirgin şekilde arttırdığı bilinmektedir. MAA'nın yüksek molar fraksiyonlarının polimerik malzemelerin büyük gözenek boyutuna yol açtığı ve ayrıca polimerlerin bağlanma kapasitesini arttırdığı da bilinmektedir [102].

Fonksiyonel monomer-kalıp molekül kompleksinin oluşumu, Le Chatelier prensibine göre meydana gelmektedir. Ön-polimerizasyon işleminde bileşenlerin derişimlerinin arttırılması veya kompleks yapının bağlanma afinitesinin arttırılmasıyla, ön kompleksleşme başarılı bir şekilde sağlanmaktadır. Böylece, bağlanma bölgelerinin

sayısının artışı sonucu polimer yapısının gram başına bağlanmadaki artış ile sonuçlanmaktadır. Kompleksleşme ve baskılama verimliliğini arttırmak için kalıp molekül-fonksiyonel monomer arasında fonksiyonelliğinin uygun olması önem arz eder. Kompleksleşme sırasında birden fazla monomer kullanılacaksa monomerlerin reaktiflik miktarları da uygun olmalıdır [101].

Bilindiği gibi, moleküler baskılamada kullanılan fonksiyonel monomerlerin sayısı sınırlıdır. Bu sınırlılık, MIP'lerin seçiciliğini ve diğer uygulamalarını bir ölçüde sınırlandırmaktadır. Hedef moleküllerle güçlü etkileşimler oluşturabilen yeni fonksiyonel monomerlerin tasarlanması ve sentezlenmesi zorunludur. Genel olarak, fonksiyonel bir monomer iki tip birimden oluşur. Biri tanıma birimi, diğeri sırasıyla bir vinil çift bağ ve silikon hidroksil gibi polimerleştirilebilir birimdir. Bu nedenle, vinil grubu ve silikon hidroksil tarafından modifiye edilen bazı kompleks ligandlar [103–110] tasarlanmış ve sentezlenmiştir.

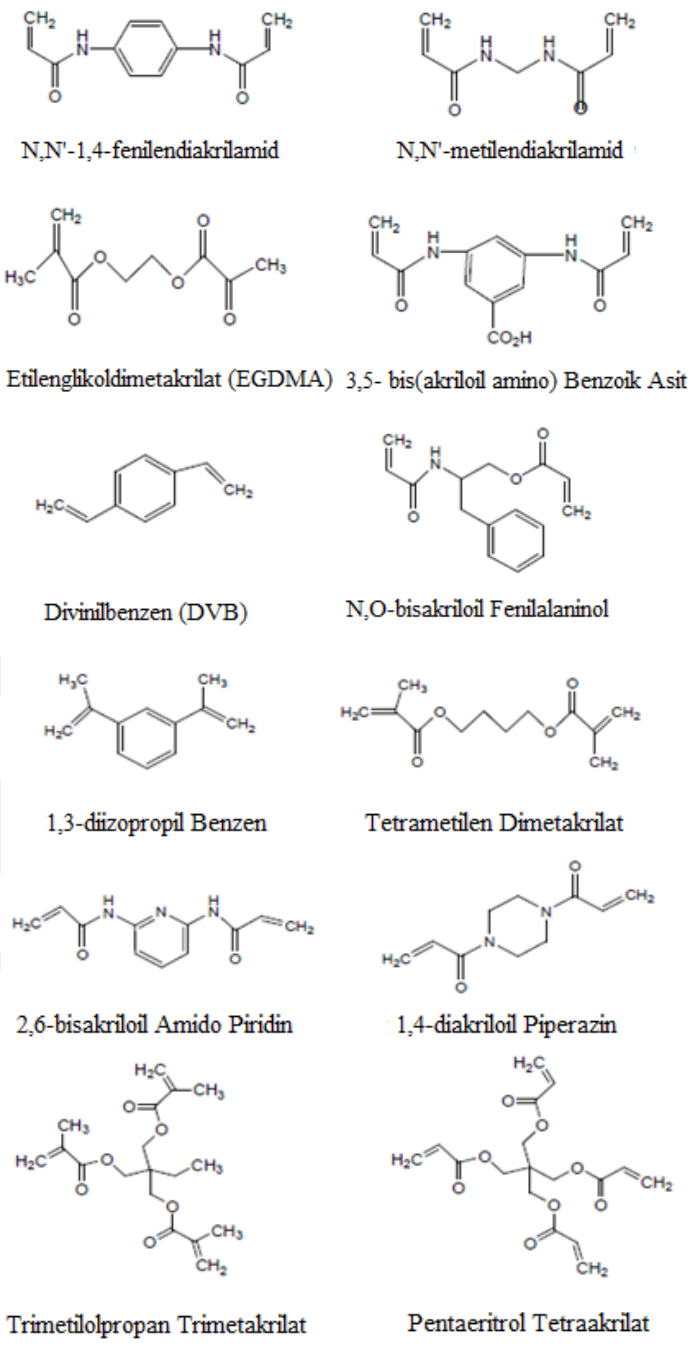


Şekil 2.10. Moleküler baskılamada fonksiyonel monomerlerin kalıp molekülün etrafında polimerleşmesi.

2.6.3 Çapraz bağlayıcılar

Polimerizasyon işleminde, kalıp moleküllerin etrafındaki fonksiyonel monomerleri stabil kılmak için bir çapraz bağlayıcı kullanılır ve böylece hedef moleküllerin uzaklaştırılmasından sonra bile yüksek çapraz bağlanmış bir katı polimer oluşturulur. Çapraz bağlayıcının türü ve miktarı, MIP'lerin seçicilik ve bağlanma kapasiteleri

üzerinde büyük etkileri vardır [101]. Genellikle, çok düşük bir çapraz bağlayıcı miktarı, düşük çapraz bağlama derecesi nedeniyle kararsız mekanik özelliklere sahip bir ürün ile sonuçlanır. Çok yüksek miktarda çapraz bağlayıcı ise, MIP'lerin birim kütlesi başına tanıma alanlarının sayısını azaltacaktır [100]. Bu yüzden çapraz bağlayıcı/monomer miktarları ideal olarak ayarlanmalıdır. Şimdiye kadar, serbest radikal polimerizasyonu ve sol-jel işlemlerinde yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar Şekil 2.11'de gösterilmektedir. Fakat, mevcut çapraz bağlayıcılar sınırlı olduğundan bunların uygulamaları da sınırlıdır. MIP'leri güçlü difüzyon kontrollü davranışlarla sentezlemek için, yeni çapraz bağlayıcılara ihtiyaç vardır.



Şekil 2.11. MIP'de çokça yararlanılan çapraz bağlayıcılar [101].

2.6.4 Çözücüler (porojenler)

Porojenler (porojenik çözücüler) genellikle polimerizasyon işleminde dispersiyon ortamı ve gözenek oluşturucu maddeler olarak görev yapar. Dolayısıyla, polimerizasyonda da önemli bir rol oynarlar. Genellikle, MIP sentezi için kullanılan çözücüler; 2-metoksietanol, metanol, tetrahidrofuran (THF), asetonitril, dikloroetan,

kloroform, N, N-dimetilformamid (DMF) ve toluendir [111]. Porojenlerin polaritesi, hedef molekülü ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimi ve bu nedenle özellikle kovalent olmayan etkileşim sistemlerinde MIP'lerin adsorpsiyon özelliklerini etkileyebilir. Toluen, asetonitril ve kloroform gibi bazı organik çözücüler, genellikle iyi bir verim elde etmek için kovalent olmayan baskılamada kullanılır. Çünkü polimerlerin adsorpsiyon özellikleri ve morfolojisi kullanılan çözücülerin tiplerine bağlıdır. Monomerlerin ve moleküler baskılama için çözücülerin seçim süreçlerini değerlendirmek ve MIP seçiciliği hakkında bir fikir sahibi olmak için, teorik hesaplamaların kullanılması çok önemlidir [112].

Son zamanlarda, oda sıcaklığında iyonik sıvılar benzersiz özelliklere sahip ilginç bir çözücü sınıfı olarak bildirilmiştir. Bu iyonik sıvılar ihmal edilebilir buhar basıncı, MIP kalıbında oluşabilecek muhtemel daralma problemini azaltmaya yardımcı olabilir. Bu özelliklere ek olarak, polimerizasyon reaksiyonunda gözenek hedef molekül olarak hareket edebilir. Ayrıca, oda sıcaklığında iyonik sıvılar sentez işlemini hızlandırabilir, organik polimerlerin seçiciliğini ve adsorpsiyonunu geliştirebilir.

2.6.5 Başlatıcılar

Bildiğimiz üzere, MIP'lerin büyük çoğunluğu, serbest radikal polimerizasyonu, fotopolimerizasyon ve elektropolimerizasyon ile yaygın olarak hazırlanırlar. Serbest radikal polimerizasyonu, çok çeşitli fonksiyonel gruplar ve kalıp yapıları için termal veya fotokimyasal olarak başlatılabilir. Peroksi bileşiklerinin yanı sıra azo bileşikleri de yaygın olarak başlatıcı olarak kullanılır. Bunlar arasında azobisisobutironitril (AIBN) en uygun olarak 50-70 ºC ayrışma sıcaklıklarında kullanılır. Polimerizasyon reaksiyonunu gereklerini sağlamak için, çözünmüş oksijenin tepkime meydana gelmeden hemen önce polimerizasyon çözeltilerinden uzaklaştırılması çok önemlidir. Çözünmüş oksijen, nitrojen veya argon gibi inert bir gaz kullanılarak temizlenebilir.

2.6.6 Hazırlık işlemleri

Uygun bir hazırlama prosedürünün seçimi, istenen özelliklere sahip MIP'lerin üretimi için kritik öneme sahiptir. Genel olarak, MIP hazırlık mekanizmaları serbest radikal polimerizasyon ve sol-jel süreçlerini içerir. En yaygın kullanılan serbest radikal polimerizasyonu gereği, küçük parçacıkları elde etmek için mekanik öğütme ve eleme aşamalarını içerir. Bu olayda, teorik değerlere göre daha düşük bir MIP bağlanma

kapasitesine yol açar. Ayrıca, bu yöntemde çok fazla miktarda kalıp moleküle de ihtiyaç vardır. MIP'ler, membranlar, monolitler ve moleküler olarak baskılanmış tek tabaka yapılar gibi birçok farklı MIP formunun elde edilmesi için kompleks polimerizasyon teknikleri geliştirilmiştir. Bunlar; süspansiyon polimerizasyonu, emülsiyon polimerizasyonu, çekirdek polimerizasyonu ve çöktürme polimerizasyonudur.

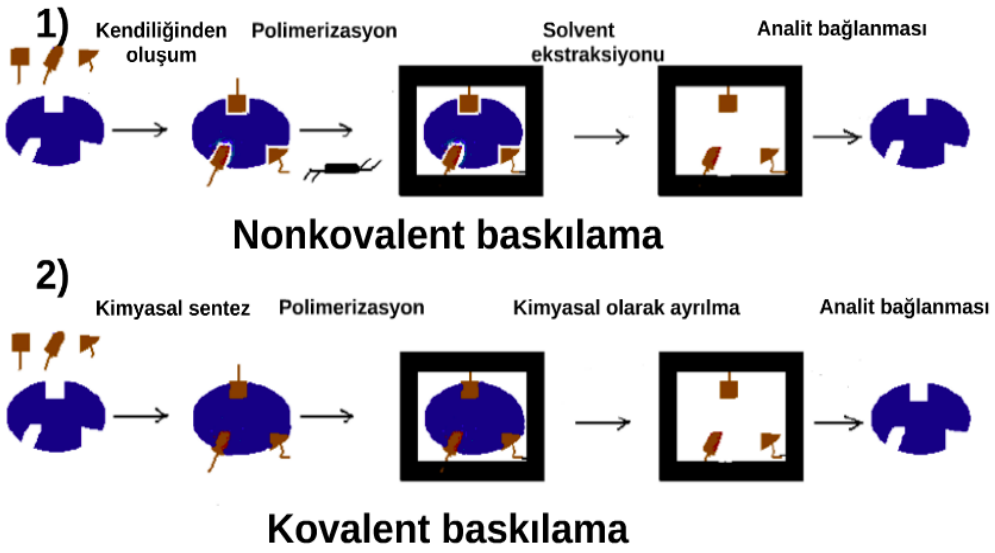
Tablo 2.2. Farklı hazırlama prosedürleri ve MIP yöntemlerinin karşılaştırılması [100].

Mekanizma	Baskılama Methodu	Avantaj	Dezavantaj
Serbest radikal polimerizasyonu	Yığın polimerizasyonu	Hazırlık aşamasındaki hız ve sadelik; gelişmiş veya pahalı enstrümantasyon için gereklilik yok; üretilen MIP'lerin saflığının iyi olması	Öğütme, eleme işlemlerinde zaman alıcı; şekil ve boyutta düzensiz parçacıklar; düşük afinite bölgeleri
Serbest radikal polimerizasyonu	Süspansiyon polimerizasyonu	Tek kademeli polimerizasyon ile basit işlem	Büyük parçacık büyüklüğü (birkaç ile birkaç yüz mikrometre); düşük tanıma
Serbest radikal polimerizasyonu	Emülsiyon polimerizasyonu	Yüksek verim, monodisperspolimerik parçacıklar; suda çözünür polimerler	Sörfektan kalıntılarının varlığı, düşük baskılma kapasitesi
Serbest radikal polimerizasyonu	Çekirdek polimerizasyonu	Kontrol edilebilir düzenli küresel parçacıklar; monodisperslik; HPLC için uygun	İşgücü sürecinde zorluk; zaman tüketimi
Serbest radikal polimerizasyonu	Çöktürme polimerizasyonu	Tek adımda hazırlık; yüksek kaliteli, homojen ve küresel parçacıklar	Büyük miktarda hedef molekül gerekliliği; yüksek seyreltme faktörü
Sol-jel prosesi	Sol-jel	Oda sıcaklığında üretim kolaylığı; çevre dostu reaksiyon çözücüsü	Polimerizasyon yönteminin ve fonksiyonel monomerin eksikliği

2.7 Moleküler Baskılama Çeşitleri

Kalıp moleküle özgü tanıma bölgeleri bulunan, büyüklük ve mekaniksel olarak bütünleyici polimerik maddelerin yapımı için etkin bir metot olan MIP'ler, moleküler baskılama teknolojisi (MIT) ile elde edilen fonksiyonel polimerlerdir. MIP'lerin kalıp moleküle spesifik ve devamlı olarak tanıyabilen bir hafıza oluşturması için yeterli miktarda sağlam olması önem arz eder. Baskılama yapılmış bölgelerden kalıp

moleküllerin uygun bir biçimde ayrılması için ise, makro gözeneklilik miktarı temel unsurlardandır [87]. Moleküler olarak baskılanmış polimerler, kalıp molekülün fonksiyonel monomerle ve daha sonra polimerik bağlanma bölgeleriyle etkileşime girme biçiminden farklı olan birtakım yaklaşımlara göre hazırlanabilir. Dikkate alınan moleküler baskılama yaklaşımları temel olarak; kovalent, kovalent olmayan ve yarı kovalent baskılamadır.



Şekil 2.12. Kovalent baskılama ve nonkovalent baskılamanın şematik gösterimi [101].

2.7.1 Kovalent baskılama

Burada, hedef molekül ve fonksiyonel monomerlerin biraraya gelmesi ile kovalent bağ oluşur. Polimerizasyon süresince oluşan polimer yapısal kararlılığını korur [113]. Kovalent baskılamada, kalıp molekül ve monomer stabil bir yapı oluşturduğundan bağlanma bölgelerinin homojen olarak yayılması sağlanır [114]. Polimerleşme reaksiyonun ardından, hedef molekül baskılanmış polimerden uzaklaştırılır. Kalıp molekül ile baskılanmış polimer arasında etkileşim olduğunda kovalent bağ yeniden oluşur. Kovalent ile nonkovalent baskılamanın temel farklılıklarından biri; polimerizasyonda kullanılan reaktant oranlarının (hedef molekül oranı, monomer ve çapraz bağlayıcı miktarları) farklı olmasıdır. Kovalent baskılama tekniğinde yararlanılan hedef sayısı bir hayli azdır. Polimer oluşturacak monomerlerin tersinir kovalent etkileşimlerin sınırlı sayıdadır. Ayrıca, kalıp ve fonksiyonel monomerin karşılıklı kovalent bağın kırılması için genellikle asit hidrolizine ihtiyaç duyulur. Kısacası, kovalent bağlanma olayında kalıp molekül-monomer arasında oluşan

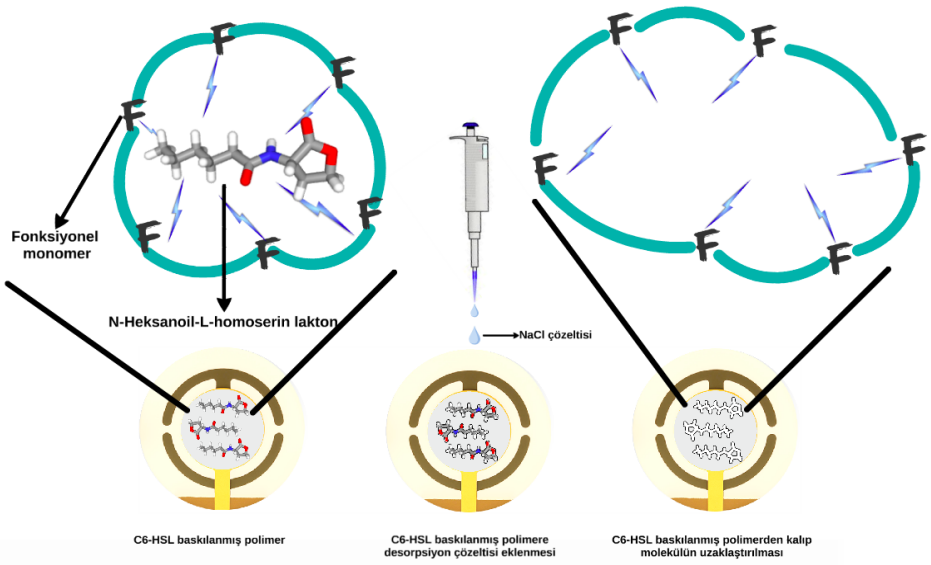
kovalent bağların kırılarak hedef molekülün polimerden uzaklaştırılması prosesi son derece zahmetlidir. Bundan dolayı, kovalent baskılama kullanımı kısıtlıdır [115].

2.7.2 Non-kovalent baskılama

İlk olarak Mosbach ve ark. tarafından geliştirilen kovalent olmayan baskılama, şu anda moleküler tanıma matrisleri üretmek için en yaygın uygulanan yaklaşımdır. Bu teknikte, hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, dipol-dipol etkileşimleri, yük transferi gibi kovalent olmayan etkileşimler mevcuttur. Kovalent olmayan etkileşimler ile hedef molekül ve fonksiyonel monomerler kendiliğinden bir araya gelir. Aynı zamanda, hedef molekül kovalent olmayan etkileşimler yoluyla yeniden bağlanabilme özelliği gösterir. Bu yöntemin avantajı; sadeliği, kolay ve ucuz hazırlanışının yanı sıra, bu yaklaşımla hazırlanan polimerlerin yüksek seçiciliğe sahip olabilmesidir. Bu yöntemde potansiyel kalıp-monomer kompleks stabilizasyonu sorunlarının da yaşanmaması bu yöntemi başarılı kılmaktadır [116].

2.7.3 Yarı kovalent baskılama

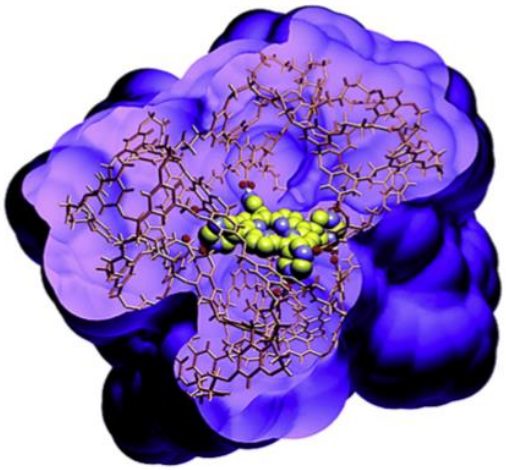
Bu yöntem, kovalent ve non-kovalent etkileşimi birleştirilmesidir. Burada, baskılanmış polimer hazırlanırken fonksiyonel monomerle hedef molekül arasında kovalent etkileşimlerle birbirine bağlanırlar. Kalıp molekülün tekrar bağlanması ise non-kovalent etkileşimler yolu ile oluşur. Bu yolun avantajları, bağlanma alanlarının daha dar bir dağılımı olması ve kinetik kısıtlamaların yaşanmamasıdır [100,117].



Şekil 2.13. Nonkovalent baskılama ve kalıp molekülün spesifik kaviteleri.

2.7.4 Moleküler baskılanmış polimerlerin spesifik tanıma yeteneğinin arttırılmasında metal iyon-koordinasyon etkisi

Metal iyonu, kalıp molekülündeki spesifik fonksiyonel gruplarla koordine olabildiğinden ve daha spesifik bir üç boyutlu yapı oluşturabileceğinden, MIP tarafından daha iyi tanınabilir. Belirli bir polimer sisteminde, metal iyonu başka metal iyonları ile değiştirilirse, MIP'nin seçiciliği ve kombinasyon dinamikleri önemli ölçüde değişebilir. Sulu ortamda, metalin kompleksleşme etkisi; elektrostatik etkileşimlere ve hidrojen bağlama etkisine kıyasla daha az etkilenir. Diğer kovalent olmayan reaksiyonlarla karşılaştırıldığında, metal iyonları substratla kantitatif olarak reaksiyona girer ve aşırı fonksiyonel monomer, belirli bölgelerdeki non-spesifik fonksiyonu azaltır [118].



Şekil 2.14. Dendrimerlerde meydana gelen moleküler baskılama işlemi [118].

2.8 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulamaları

Moleküler baskılanmış polimerler, ekstraksiyon, ayırma, teşhis, kataliz, ilaç salınım ve moleküler tuzaklama sistemleri de dahil olmak üzere birçok uygulama için kullanılmıştır (Tablo 2.2). Bu bölümde, MIP'lerin tespit, ilaç salınım, fotodinamik terapi, moleküler tuzaklama, ekstraksiyon ve katalizindeki birkaç uygulamaya değinilecektir.

Viral aşıların üretilmesi için hücre kültürlerinin kullanılması ve sığır serumunun bir besin kaynağı olarak ortam içine dahil edilmesi gereklidir. Ancak, sığır serumu içinde büyük miktarlarda bulunan albüminin, bir alerjen olarak rol oynadığı bildirilmiştir. Bu nedenle, viral aşılarda sığır serum albümininin kalıntı seviyelerini hızlı bir şekilde saptamak için hassas bir metodolojiye ihtiyaç duyulmaktadır. Li ve ark. sığır serum albümininin saptanması için hassas bir yöntem geliştirmek üzere enzim amplifikasyonuna dayanan epitop baskılama stratejisini kullanmışlardır. Burada, moleküler baskılanmış filmler bir metodoloji geliştirmişlerdir. Sonuçta ortaya çıkan sistem; mükemmel duyarlılık, seçicilik ve tekrarlanabilirlik göstermiştir. Bu sistem ile, insan kuduz aşısında % 98.3-% 102.5'lik bir geri kazanım yapmıştır [119].

Günümüzdeki kokain tespiti için var olan yöntemler, karmaşık analitik teknikleri içerir ve zaman alıcıdır. Bu nedenle, kokain tespiti için ekonomik ve taşınabilir bir sensör geliştirmek için acil ihtiyaç vardır. Smolinska-Kempisty ve ark. moleküler baskılanmış nanopartiküller kullanarak kokain tespiti için bir potansiyometrik bir sensör

geliştirmişlerdir. Buradaki çalışmada ise, cam boncuklar bir katı faz desteği olarak kullanılmıştır. Elde edilen sistem, insan kan serumu içindeki kokain konsantrasyonlarını 1 nM ile 1 mM arasında tahmin edebilmiştir [120].

Liang ve ark. triklosan baskılanmış küresel nano yapıda boncuk küreler üretmişlerdir (200-300 nm). Bu nano yapılar, polimerik iyon seçici elektrot membranında dağıtılmış ve bu sayede daha fazla sayıda bağlanma alanı ve azaltılmış membran empedansı elde edilmiştir. Elde edilen elektrot ile, nano-MIP konfigürasyonuna bağlı olarak triklosan için mükemmel afinite ve triklosan için analoglarına kıyasla daha iyi spesifite göstermiştir.

Zhang ve ark. kurkuminin salınımı ile ilgili bir çalışmada, kalıp molekül olarak çay polifenolü kullanmış ve kurkuminin çözünürlüğünün arttırılması için jelatin-dekstran konjugatlarıyla birlikte oluşan baskılanmış miseller geliştirmişlerdir. Miseller, başarılı bir şekilde kurkumini kapsülleyebilmiş ve sulu çözünürlüğünde 50,000 kat artış ile sonuçlanmıştır. Baskılanmış miseller ayrıca biyolojik tamponlarda kurkuminin sürekli salınımını ve serbest kurkumin ile karşılaştırıldığında hücreye alımının arttırdığını göstermiştir. Ayrıca, sıçanlarda yapılan testlerle serbest kurkumine kıyasla mükemmel biyoyararlanım göstermiştir [121].

Deshmukh ve ark., glikoz baskılanmış β-siklodekstrin nanosünger yapılarını (450-550 nm) geliştirmişlerdir. İn vitro testlerde baskılanmış bu nano yapılar, baskılanmamış nano yapılardan daha fazla bağlanma karakteri göstermiştir. Ayrıca, laboratuvar ortamında sıçanlar üzerinde in vivo çalışmada, moleküler baskılanmış nano süngerlerin glikoza bağlanabilme ve kandaki glikoz seviyelerinin artmasını önleme kabiliyeti ortaya çıkarılmıştır. Böylece geliştirilen nano yapılar, glikoz için moleküler tuzaklar olarak davranmıştır [122].

Nanozimler, fizyolojik koşullar altında enzim benzeri reaksiyonları katalize eden nanoyapılı malzemelerdir. Protein muadillerinden daha düşük maliyet ve daha yüksek stabilite avantajlarına sahiptirler. Demir oksit nanopartiküllerin peroksidaz benzeri aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, 3,3′,5,5′-tetrametilbenzidin (TMB) ve 2,2′-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS) gibi substratlar, demir oksit nano tanecikleri üzerine

baskılanmıştır. Bu olay, reaksiyonun katalitik verimini arttırdığı ve daha iyi özgüllük göstermesine sebep olmuştur [123].

Tablo 2.3. Moleküler baskılanmış polimerlerin çeşitli uygulamaları.

Uygulama Alanı	Temel Özellikler ve Sorunlar	Örnekler
Kromatografik ayırma	Analitleri seçici olarak absorbe etme ve tutma olayı [124],rasemik karışımların kiral ayrımı [80], bağlanma bölgelerinin heterojen özelliği nedeni ile zayıf pik simetrisi [125].	Flavonoid karışımın ayrılması için sabit faz [126],(±) –mandelik asidin kromatografik çözünürlüğü [127]
Katı faz ekstraksiyonu	Analitleri seçici olarak absorbe etme ve tutma kapasitesi [124] .	İnsan idrarından ve serum örneklerinden trifluoperazininekstraksiyonu [105], idrar örneklerinden naproksenekstraksiyonu [106] yeşil çaydan kafein ve teofilinekstraksiyonu [107].
İlaç salınım	İlaç ve polimer arasındaki güçlü ve seçici etkileşimler, yükleme hacminin artması ile salınım süresinin uzaması [128], Uyarana duyarlı MIP'lerin tasarımı için potansiyel, enzimatik bozulmalardan dolayı ilaçların koruma kabiliyeti sorunu [129], oküler sistemde kontrollü ve sürekli ilaç salınımı problemi [130], MIP'ler, ilaç salım hızı ve zamanının, ilaç ve matris arasındaki bağlanma afinitesine göre ayarlanabildiği kontrollü ilaç	Nikotinin transdermal olarak uygulanması [131],olanzapin teslimatı [132],kersetin [133], sülfasalazin [134].

	verme matrisleri olarak işlev görebilir. Hedeflenmiş bölgeye ilaç salınım kullanılabilmesi [2], Bileşenlerin toksisitesi klinik uygulamayı sınırlaması ile; MIP sentezinde kullanılan organik çözücüler hücresel hasara neden olabilme problemi. MIP'lerinbiyolojik sıvılardaki mekanik stres ve enzimatik etkilere dayanabilmesi [79].	
Sensörler	Baskılama tekniğinin ve nanoteknolojinin birleşimi ile, gelişmiş seçicilik ve hassasiyeti ile sonuçlanması [135].	Tükürük örneklerinde l-nikotinin saptanması [136].
Katalizörler	Enzimlerin yerine kullanılabilmesi [2] antikorların ve enzimlerin bağlanma bölgelerinin karşılaştırılabilir seçiciliği ve stereo-özgünlüğü; Organik çözücüler ve asitler ve bazların varlığında yüksek sıcaklık ve basınçta mükemmel stabilitesi olması [79].	MIP'ler ile Benzisoksazol izomerizasyonu [137], Diels-Alder'in MIP tabanlı kataliz reaksiyonu [138].
İmmünotestlerde antikorların yerine kullanılmaları	MIP'ler antikorları taklit ederek işlev görmesi [139], MIP-bazlı yapay immün testler, üstün stabiliteye sahip olması ve biyolojik analizlerle karşılaştırıldığında	

	uygun bir maliyet oluşturması [140], Poliklonal antikorlardan farklı olarak hayvanların kullanılmasını önlemek amaçlı [80], Sınırlamaları ise: MIP'lerinpoliklonal özelliği [83]; MIP'lerin suda zayıf uyumluluğu, bağlanma sitelerinin heterojen özelliği doğrusal olmayan bir olay ile sonuçlanabilir [125].	
Moleküler tuzaklar	Glikoz, kolesterol, safra asitleri, kafein gibi bileşikleri bağlamak ve emilimini gastrointestinal sistemden uzaklaştırmak için [139].	Gastrointestinal sıvılardan kolesterolün selektifadsorpsiyonuiçin baskılı polimerler [141].

2.9 Sensörler

2.9.1 Biyosensörler ve tarihçesi

Biyosensörler çoğunlukla biyolojik, kimyasal ve toksik maddelerin tespiti ve izlenmesi için başvurulan ayrıca maddelerin hızlı analizine izin veren cihazlardır. Biyosensör teknolojisi, geniş ölçekteki uygulamalar için mühendislikle birlikte biyolojik, kimyasal ve fiziksel bilimleri birleştiren, hızla büyüyen bir teknolojidir [142]. Biyosensörlerin tarihi yaklaşık 70 yıl öncesine kadar dayanmaktadır. 1956 yılında, Profesör Leland C. Clark bir oksijen probu geliştirme ile ilgili makalesini yayınlamıştır. Bu ilk araştırması ile ölçümü yapılacak analitlerin yelpazesini de genişletmiştir. 1962'de New York Bilimler Akademisi'nde düzenlenen bir konferansta "elektrokimyasal sensörler (pH, potansiyometrik veya kondüktometrik) nasıl daha akıllı yapılır" fikri ortaya atılmıştır [143]. İlk örnek, bir diyaliz membranında oksijen probu üzerinde glikoz oksidaz enziminin tuzaklanması olmuştur. Glikozun eklenmesine orantılı olarak ortamdaki oksijen konsantrasyonunun azaldığı rapor edilmiştir. Bu ilk biyosensör bir enzim elektrodu olarak tanımlanmıştır [144]. Daha sonra, Updike ve Hicks (1967) [145], oksijen elektrotunun yüzeyinde bir poliakrilamid

jel içinde immobilize edilmiş glikoz oksidaz yardımı ile glikozun hızlı ve kantitatif tayinine yönelik bir cihaz tanımlamışlardır. Amperometrik ölçümlere ek olarak, Guilbault ve Montalvo (1969), [146] üre konsantrasyonunu belirlemek için cam elektrotlar aracılığı ile potansiyometrik ölçümden yararlanmışlardır [147].

O zamandan beri farklı biyolojik bileşenler ve farklı transdüserler ile hızla büyüyen bir biyosensör artışı olmuştur. Bu yoğun araştırmalar bazı cihazların ticari olarak kullanılmasına neden olmuştur. Piyasaya çıkan ilk biyosensör, diyabet hastalığı için kullanılan glikoz biyosensörüdür. Birkaç yıl sonra Medisense Exactech Glucose Meter (glikoz ölçüm cihazı) piyasaya sürülmüş ve dünyanın en çok satan biyosensör ürünü olmuştur. İlk ürün, tek kullanımlık elektrotları olan kalem şekilli bir ölçüm cihazıydı. Aynı yıllarda, Pharmacia'dan araştırmacılar, biyomoleküller arasındaki etkileşimleri izleyebilecek yeni bir biyoanalitik cihaz geliştirmek için İsveç'teki Linkoping Üniversitesi'nde fizik ve biyokimya fakültesi ile birlikte çalışmaya başlamışlardır [148]. Günümüzde geniş bir kullanım yelpazesine sahip biyosensörler birçok disipline hitap etmektedir.

Bir biyosensör genel olarak, reaksiyondaki bir analitin konsantrasyonuna orantılı sinyaller üreterek biyolojik veya kimyasal reaksiyonları ölçen cihazdır. Günümüzde biyosensörler hastalıkların izlenmesi, ilaç salınımı, kirletici maddelerin tespiti, hastalığa neden olan mikroorganizmalar ve vücut sıvılarında (kan, idrar, tükürük, ter) bir hastalığın göstergeleri olan maddelerin üzerindeki uygulamalarda kullanılır. Tipik bir biyosensörün bileşenleri Şekil 2.15'te gösterilmiştir.

-Analit: Tespiti gerektiren ilgili maddedir. Örneğin, glikoz, glikozu tespit etmek için tasarlanmış bir biyosensörde "analittir".

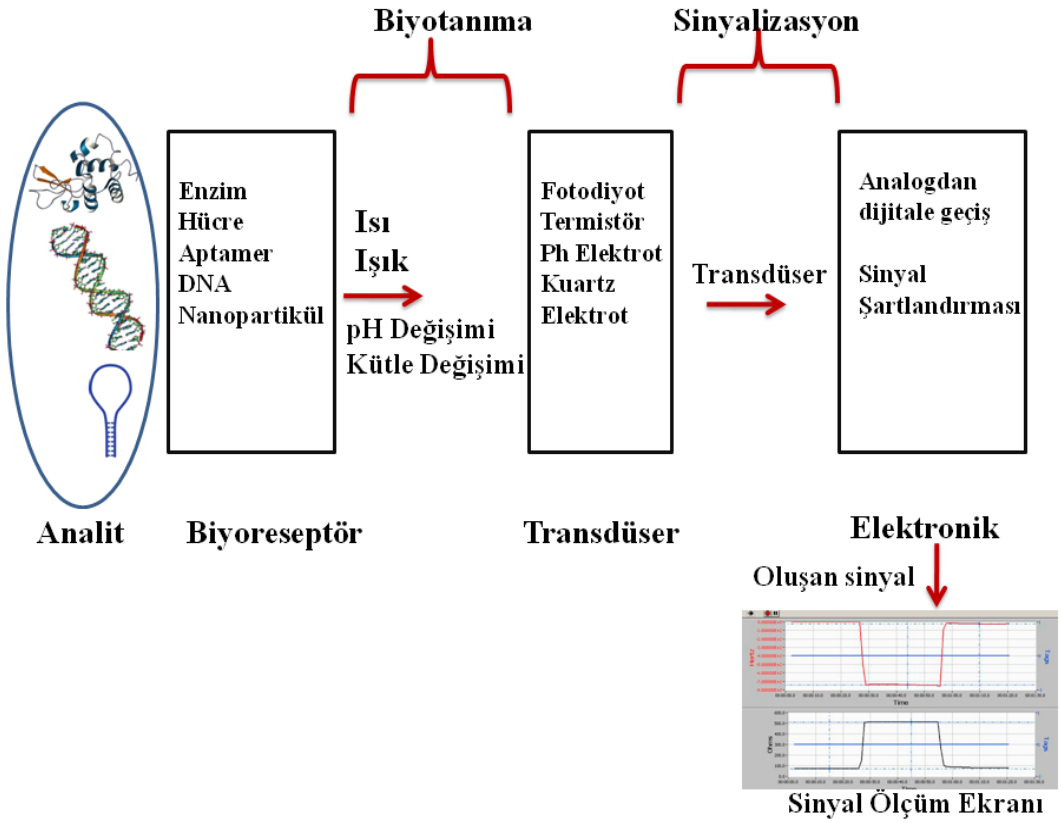
-Biyoreseptör: Analiti spesifik olarak tanıyan molekül biyoreseptör olarak tanımlanır. Enzimler, hücreler, aptamerler, deoksiribonükleik asit (DNA) ve antikorlar, bazı bioreseptör örneklerindendir. Etkileşim üzerine üretilen sinyal (ışık, ısı, pH, yük veya kütle değişimi vb.) bioreseptörün analiti tanıması olup buna biyo-tanıma adı verilir.

-Transdüser: Transdüser, bir enerji formunu başka bir forma dönüştüren bir yardımcı elemandır. Bir biyosensörde, transdüserin rolü, biyo-tanıma olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştürmektir. Bu enerji dönüşümü süreci, sinyalizasyon olarak bilinir. Çoğu

transdüser, genellikle analit-bioreseptör etkileşimleri ile orantılı olarak optik veya elektrik sinyalleri üretir.

-Elektronik: Elektronik, dönüştürülmüş sinyali işleyen ve görüntülemeye hazırlayan biyosensörün parçasıdır. Amplifikasyon ve analogdan gelen sinyallerin dijital forma dönüştürülmesi gibi sinyal koşullandırmalarını gerçekleştirir. Oluşan sinyaller daha sonra biyosensörün ekran biriminden ölçülür.

-Ekran: Ekran, bir bilgisayarın ekranı veya doğrudan yazıcı olarak kullanılabilen cihazdır. Kullanıcı tarafından anlaşılabilen sayı veya eğri oluşturan gibi bir kullanıcı yorumlama sisteminden oluşur. Bu bölüm genellikle kullanıcı dostu bir şekilde biyosensörün sonuçlarını üreten bir donanım ve yazılım kombinasyonundan oluşur. Ekrandaki çıkış sinyali, son kullanıcının gereksinimlerine bağlı olarak sayısal, grafik, tablo veya görüntü olabilir [149].



Şekil 2.15. Biyosensörün şematik gösterimi.

2.9.2 Bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler

Her biyosensörün sahip olduğu belirli statik ve dinamik özellikleri vardır. Bu özelliklerin optimizasyonu, biyosensörün performansına da yansır.

Tablo 2.4. 1970–1992 dönemleri arası biyosensörlerin gelişimindeki önemli kilometre taşları [149].

Yıl	Gelişmeler
1970	İyona duyarlı transistörün keşfi
1975	Karbon dioksit ve oksijen tespiti için fiber optik biyosensör
1975	Glikoz tespiti için ilk ticari biyosensör
1975	İlk mikrop tespitine dayalı immünosensör
1982	Glikoz tespiti için fiber-optik biyosensör
1983	Yüzey plazmonrezonans (SPR) immünosensörü
1984	İlk aracılı amperometrikbiyosensör: glikoz oksidazında glikoz tespiti için kullanılan ferrosen
1990	PharmaciaBiacore tarafından SPR tabanlı biyosensör
1992	Elde taşınabilen kan biyosensörü

-Seçicilik

Seçicilik bir biyosensörün en önemli özellikleri arasındadır. Seçicilik, diğer katkı maddelerini veya kirletici maddeleri içeren bir örnekte spesifik bir şekilde analiti tespit etme kabiliyetidir. Seçiciliğin en iyi örneği olarak, bir antijenin antikorla etkileşimi örneklendirilebilir. Antikorlar, biyoreseptörler gibi hareket eder ve transdüserin yüzeyinde immobilize haldedir. Antijeni içeren bir çözelti (genellikle tuz içeren bir tamponda) antikor-antijen etkileşimi için transdüserde etkileşime mahruz bırakılır. Bir biyosensör oluşturmak için, biyoreseptörün seçiciliği önemlidir [149].

-Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çoklu bir deney düzeneğide aynı yanıtları oluşturmak üzere kurulan sistemdir. Tekrarlanabilirlik, bir biyosensördeki transdüserin ve elektroniklerin

hassasiyeti ve doğruluğu ile karakterize edilir. Sensörün hassaslığı, sensörün her seferinde benzer sonuçlar sağlamasıdır. Tekrarlanabilir sinyaller, bir biyosensörün yanıtı üzerine yapılan çıkarımda yüksek güvenilirlik ve devamlılık sağlar [149].

-Kararlılık (Stabilite)

Kararlılık, biyoalgılama sistemi içindeki ve çevresindeki biyo-algılamayı bozuculara hassasiyet derecesidir. Bu bozukluklar, ölçüm altında bir biyosensörün çıkış sinyallerinde sapmaya neden olabilir. Ölçülen konsantrasyonda bir hataya neden olup biyosensörün hassasiyetini ve doğruluğunu etkileyebilir. Kararlılık, bir biyosensörde uzun inkübasyon aşamaları ya da sürekli olarak izlenmesini gerektiren uygulamalarda önemlidir. Transdüserlerin ve elektroniklerin tepkisi, bir biyosensörün stabilitesini etkileyebilecek sıcaklığa duyarlı olabilir. Bu nedenle, sensörün kararlı bir yanıtını sağlamak için elektroniğin uygun şekilde ayarlanması gerekir. Stabiliteyi etkileyebilen diğer bir faktör ise analitin biyoreseptöre bağlanma derecesi olan biyoreseptöre afinitesidir. Yüksek afinitelere sahip olan biyoreseptörler, bir biyosensörün stabilitesini güçlendiren güçlü elektrostatik bağlanmaya veya analitin kovalent bağına katkıda bulunur. Ölçüm kararlılığını etkileyen diğer bir faktör belirli bir periyottan sonra bioreseptörün degradasyonudur.

-Duyarlılık

Tespit edilebilecek minimum analit miktarı, biyosensörün tespit limitini (LOD: limit of detection) veya duyarlılığını tanımlar. Birçok tıbbi ve çevresel izleme uygulamalarında, bir örnekte analitlerin varlığını doğrulamak için ng/mL kadar düşük bir analit konsantrasyonuna hatta fg/mL'yi saptamak için bir biyosensör gerekebilir. Örneğin, kandaki 4 ng/mL'lik bir konsantrasyonu sahip prostata özgü antijen (PSA), prostat kanseri ile ilişkili olduğundan biyopsi testleri için doktorların önerdiği önemli bir testtir. Dolayısıyla, bu örnekte de olduğu gibi duyarlılık biyosensörün önemli bir özelliğidir.

-Doğrusallık (Doğrusallık)

Doğrusallık, ölçülen yanıtın doğruluğunu gösteren özelliktir (farklı analit konsantrasyonları ile bir dizi ölçüm için) ve matematiksel açıdan $y=mc$ olarak gösterilir. Burada, c analitin konsantrasyonu, y çıkış sinyali ve m, biyosensörün

duyarlılığıdır. Biyosensörün lineerliği, test altındaki biyosensör ve analit konsantrasyonlarının çözünürlüğü ile ilişkilendirilebilir. Bir biyosensördeki çözünürlük, biyosensörün yanıtında bir değişiklik getirmek için gerekli olan bir analitin konsantrasyonundaki en küçük değişiklik olarak tanımlanır. Uygulamaya bağlı olarak, biyosensör uygulamalarının çoğu sadece analit tespitini değil aynı zamanda geniş bir çalışma aralığı boyunca analit konsantrasyonlarının ölçümünü gerektirdiğinden iyi bir çözünürlük gereklidir.

2.9.3 Biyosensörlerin endüstriyel boyutu

Biyosensörler yaklaşık 50 yıldır bilim dünyası tarafından geliştirilmekte olup bu alanda yapılan araştırmalar, son 10 yılda akademik çevreye büyük katkılar sağlamıştır. Bununla birlikte, gebelik testleri ve elektrokimyasal glikoz biyosensörleri yanında, çok az sayıda biyosensör perakende düzeyde küresel ticari başarıya ulaşmıştır. Bunun nedeni birkaç faktöre bağlanabilir. Bunlar, akademik araştırmayı endüstriyel açıdan ticari olarak uygulanabilir prototiplere dönüştürmede yaşanan zorluklar, klinik uygulamalardaki karmaşık konular, biyosensör teknolojisi vizyonuna sahip araştırmacıları bulmak ya da bilim ve mühendisliğin farklı disiplinlerinden araştırmacıları bir araya getirmenin zorlukları olarak sıralanabilir. Bir başka faktör ise, araştırmaların finans gücüne sahip kurumlar tarafından yönlendirilmesidir. Bir konu çekici ve cezbedilebilir yapılabilirse, daha iyi bir başarı şansı vardır. Bu açıdan, biyosensör teknolojisinin öncelikli olarak yeterince satılması gibi belli bir önceliği vardır. Biyosensörler tasarlanırken kullanımı pratik cihazlar olarak hedeflenmelidir. Biyosensör araştırmaları temel bilimler tarafından kullanılsalar bile, “merak odaklı” bir araştırma olarak gruplandırılamaz. Öte yandan, sektör araştırmaları parayı takip etme eğilimindedir. Ticari glikoz sensörlerinin başarısı göz önüne alındığında, biyosensör araştırmaları endüstrinin uzun vadeli sürdürülebilirliği için çok kazançlıdır. Fakat, akademik açıdan kendini kanıtlamış ticari olarak geçerli bir cihaz üretmek oldukça uzun bir zaman alır [149].

2.10 Akustik Biyosensörler

1970'lerde, akustik dalgaları kullanan bir sensör sınıfı icat edilmiştir ve birçok uygulamayla genişleyerek geniş bir yelpazeye yayılmıştır. Günümüzde, akustik dalga sensörleri katı, sıvı ve gaz fazlarındaki özellikleri ölçme yeteneğine sahiptir [150]. Akustik sensörler teknolojisindeki son gelişmeler ve yeniliklerle birlikte elektrik

mühendisliğinden hücre biyologlarına uzanan disiplinler arası çalışmaları kapsayacaktır [151].

2.10.1 Akustik sensör çeşitleri

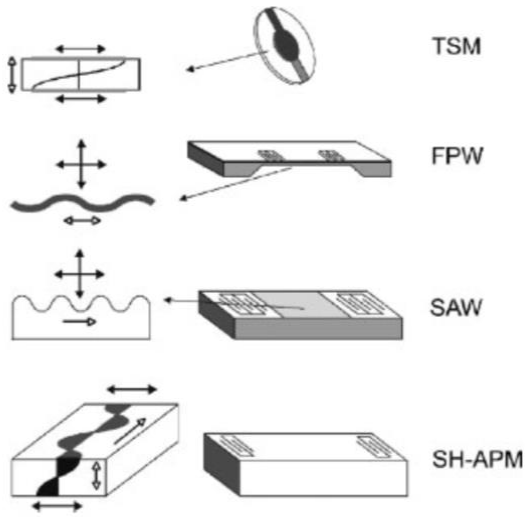
Günümüzde kullanılan akustik sensör çeşitleri aşağıdaki gibidir;

Kalınlık kesmeli mod (TSM) sensörü, iki elektrot arasına yerleştirilmiş bir piezoelektrik alt tabakadan oluşur. Tüm kütle boyunca levhalara dik bir doğrultuda şekilde yayılan kayma dalgaları kullanır. Kütle dalga frekansını değiştirir. Ayrıca toplu akustik dalga (BAW) sensörleri olarak da adlandırılır. Çalışma frekansları 5-10 MHz aralığındadır. Dalga boyları tipik olarak yaklaşık 500 μm'dir.

Yüzey akustik dalga (SAW) sensörleri fiziksel bir fenomeni algılamak için yüzey akustik dalgalarının modülasyonunu kullanır. Yüzey boyunca hareket eden Rayleigh dalgaları üretmek için birbirine bağlı transdüserler (IDT) kullanırlar. Çalışma frekansları 30-300 MHz aralığındadır. Dalga boyları tipik olarak yaklaşık 20 μm'dir.

Yanal (flexural) düzlem dalga (FPW) sensörleri, akustik dalga boyundan çok daha ince plakalardan veya membranlardan oluşur. IDT elektrotları kullanılır. Çalışma frekansı aralığı 2-7 MHz. Dalga boyları tipik olarak yaklaşık 100 μm'dir.

Akustik plaka modu (APM) sensörleri form olarak SAW cihazlarına benzer ancak yalnızca birkaç akustik dalga boyu kalınlığında ince plakalara sahiptir. Hem TSM hem de SAW cihazlarının özelliklerini gösterir. Çalışma frekansları 25-200 MHz'dir. Dalga boyları 50 μm'dir.



Şekil 2.16. Dalga yayılım tarzları ile karakterize edilen dört yaygın akustik dalga cihazı türü.

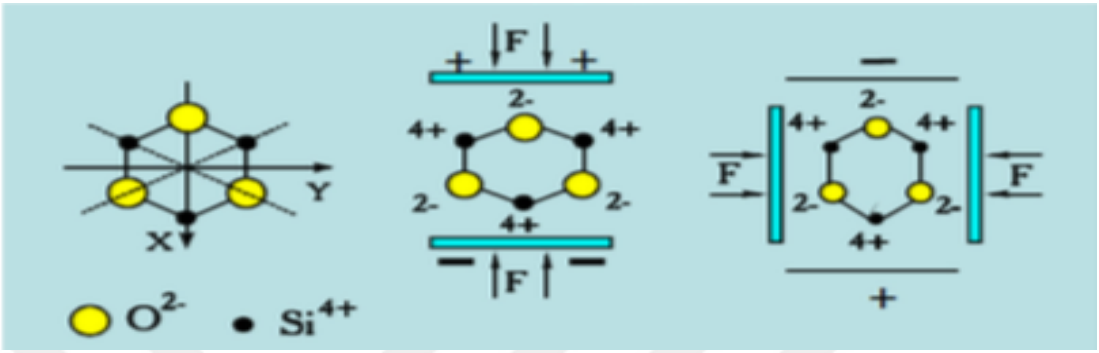
2.11 Piezoelektrik Etki

Teorik olarak, biyoalgılamada yararlanılabilecek çeşitli fiziksel olgular vardır. Başlıcaları; akustik dalgalar, fotonlar, nötronlar, termal kapasite-ısı transferi, iyonlar, elektronlar, radyoaktif parçacıklar, manyetik alanları ve elektrik alanlardır. Son zamanlarda, yoğun uygulama alanı bulması nedeni ile moleküler tanıma ve ilişkili fiziksel durumların uygulamaları için akustik biyosensörlere rağbet artmaktadır [151].

Her yıl milyarlarca kuvars kristal rezonatörlerle ilgili, elektronik cihazlarda mevcut olan akustik dönüştürücüler tasarlanmaktadır. Akustik dalgalar farklı yöntemlerle oluşturulsa da akustik dalga meydana getirmek için en çok piezoelektrik etkiden yararlanılmaktadır [151–154].

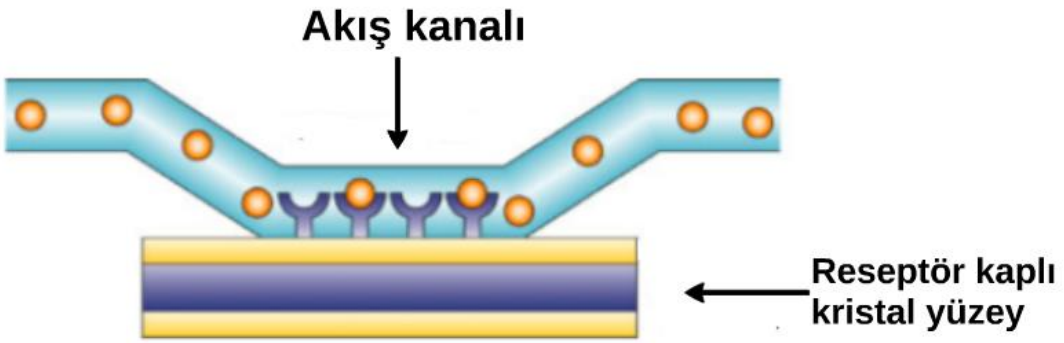
Piezoelektrik etki olarak bilinen bu olgu ilk başlarda piroelektrik ismiyle bilinmekteydi. Fakat daha sonra Hankel, 1881'de “piezoelektrik” adını önerdi. Sonra, Lippmann, piezoelektrik etkisi olarak söylenmesini önermiştir. Piezoelektrik, ters piezoelektrik etkisi denilen durumu, tersi duruma çevrilebilir. Tersine piezoelektrik etkisi denilen bu etki, bir elektrik alan uygulandığında malzemede mekanik deformasyonun üretilmesine neden olur. Malzemede indüklenen mekanik deformasyon uygulanan elektrik alanın kuvveti ile orantılıdır ve indüklenen gerginliğin yönü, elektrik alanın kutupları ters çevrilerek değiştirilebilir. Kristalin kutupsal ekseni yönünde bir elektrik alanının oluşturulması, mekanik bir deformasyona neden olur ve kristal boyunca alternatif bir alan uygulanır. Uygun

cihazlar kullanılarak ölçülmesi mümkün olan mekanik bir salınım uyarılabilir. Bir kuvars kristali mikrobalans (QCM), tersine piezoelektrik etkisine dayanarak çalışır, çünkü piezoelektrik kristalde salınım potansiyeli farkı ile mekanik salınımlar üretilir. Şekil.2.17'de deformasyon ile kuvvetleri ile dipol üretiminin açıklaması resmedilmiştir.



Şekil 2.17. Bir kuvars kristalindeki piezoelektrik etkisinin açıklaması [155].

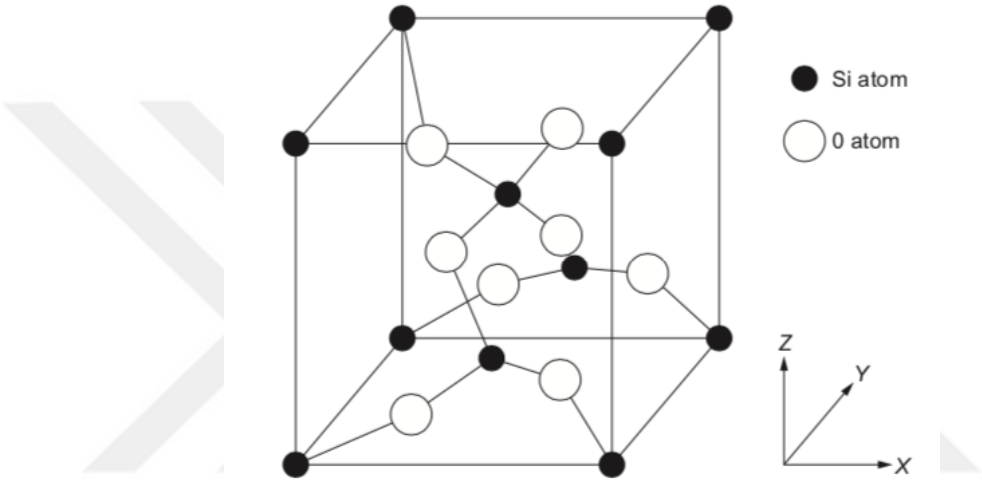
Kütle duyarlı transdüserler, transdüser yüzeyinde meydana gelen değişikliklerin, rezonans davranışındaki değişikliklerin ölçülmesiyle takip edilebildiği akustik dalga sensörleridir. Transdüser malzemenin piezoelektrik etkisi, iki veya daha fazla metal elektrot arasında periyodik olarak değişen elektrik alanları uygulayarak ultrasonik frekanslarda akustik dalgalar üretilmesini sağlar. Dönüştürücü olarak piezolektrik yapıya sahip kristaller kullanılmaktadır. Rezonans frekansı ve üretilen dalgaların sönümlenmesi, kristal özelliklerine, kristal yüzeyine biriken kütle ve yüzey ile çevre sıvı ortamı arasındaki mekanik bağlantıya bağlıdır [155].



Şekil 2.18. Piezoelektrik sisteme sahip bir biyoanalizin [151].

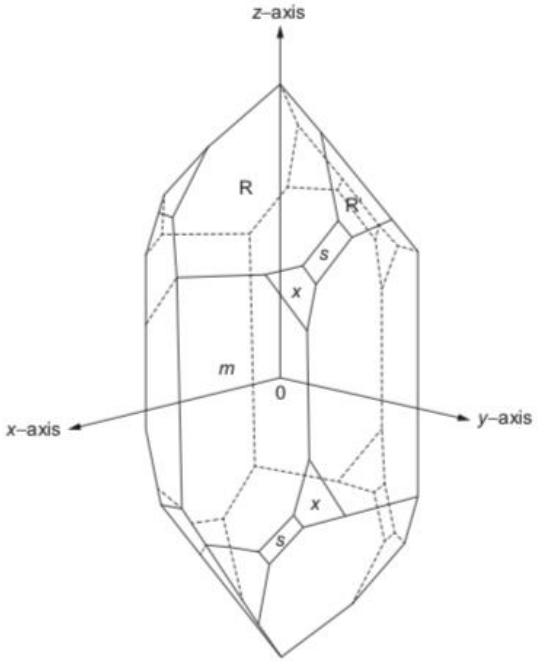
Akustik dalgaların frekans aralığı 10^{-2} ila 10^{12} Hz arasında değişirken, akustik rezonatörlerin frekans aralığı 10^{6} -10^{9} Hz arasında olup çok dardır. Kristallerde bir simetri merkezinin olmaması, piezoelektrikliğin ön şartıdır. Her ne kadar çok sayıda kristal bu gereksinimi yerine getirse de, kuvars kristallerinin benzersiz özellikleri ticari önemine yol açmıştır.

Mekanik titreşim modlarını belirleyen belirli bir açıda kuvars kristali kesilerek farklı rezonatör tipleri elde edilebilir [155].

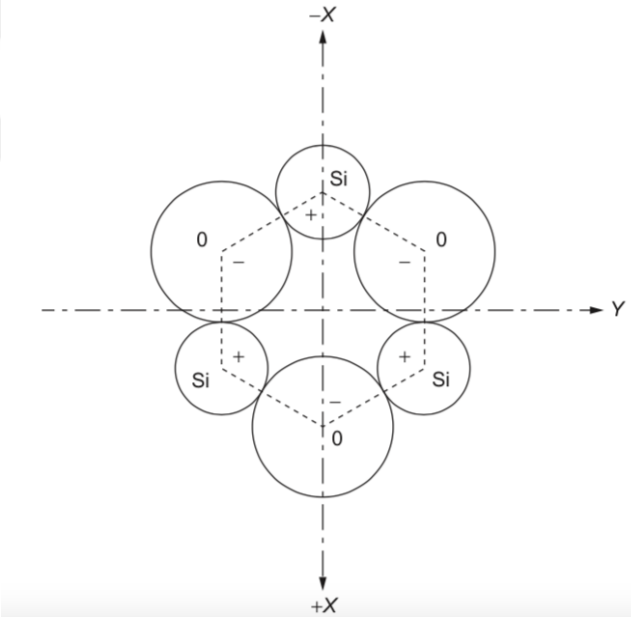


Şekil 2.19. α-kuvarsın birim hücresi [156].

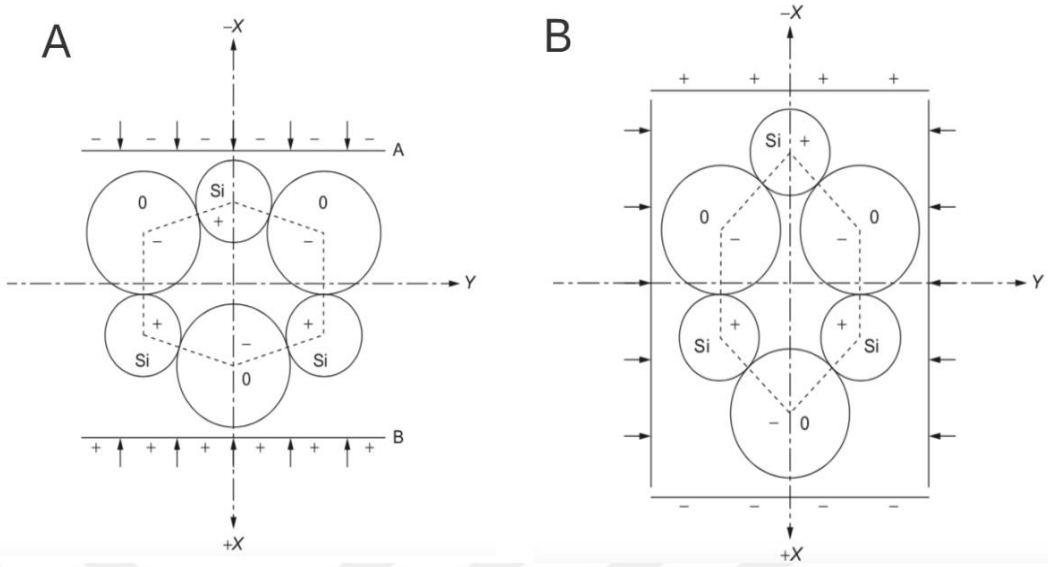
Genellikle piezoelektrik cihazlar kuvarsdan oluşur; diğer piezoelektrik malzemeler lityum niobat veya tantalat, yönlendirilmiş çinko oksit veya alüminyum nitrürdür. Kristal kesim ve elektrot geometrisi; akustik dalga ve cihaz tipini belirler.



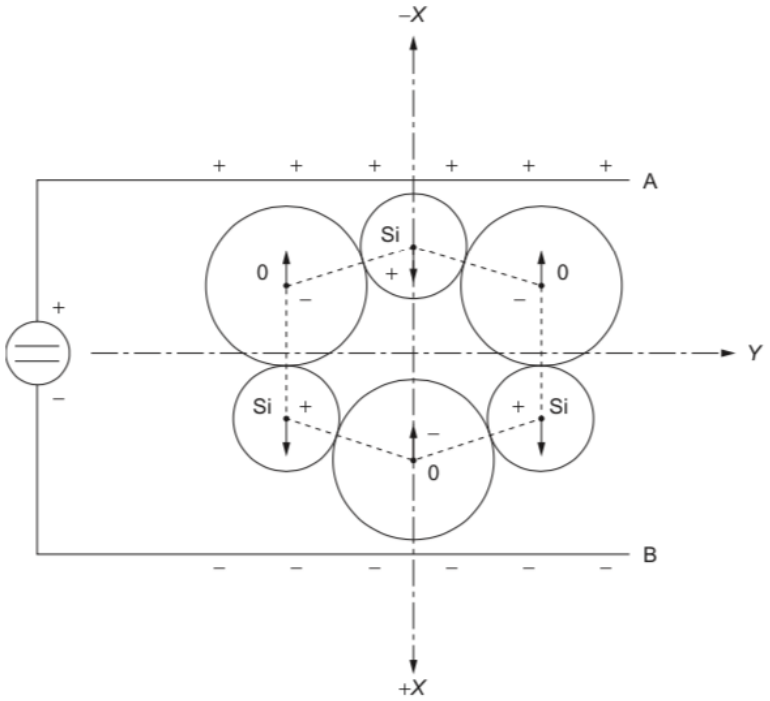
Şekil 2.20. Doğal kuvars kristalinin ekseni tipik dış formu [156].



Şekil 2.21. z ekseninden bakıldığında kuvars z içindeki Si ve O atomu [156].



Şekil 2.22. A: Doğru boyunca piezoelektrik B: Dik piezoelektrik [156].



Şekil 2.23. Ters piezoelektrik [156].

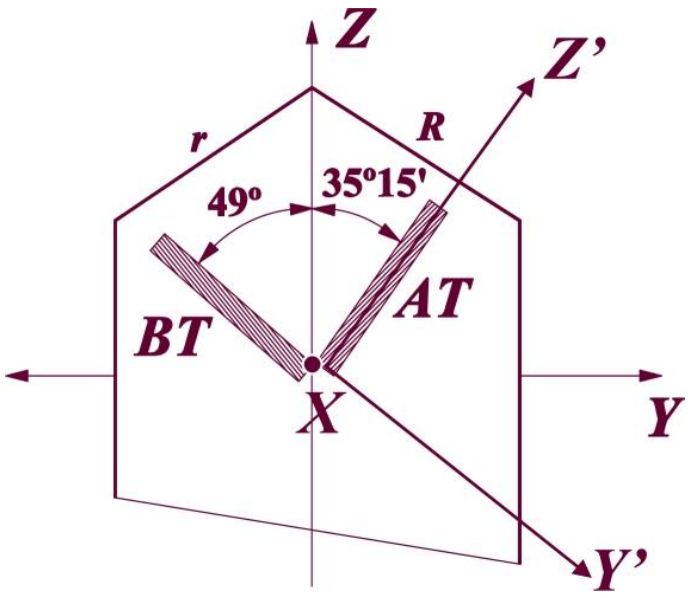
Bir QCM sisteminde kullanılan kuvars kristaller belli açılarla kesilir. Kristal yapısının karakteristik düzlemi ile kesme tabakasının arasında bulunan açı AT ve BT kesmelerde sırasıyla 35˚15′ ve -49˚00′ dır. QCM uygulamalarında sıklıkla z ekseninden 35˚10' açıyla kesilmiş yaklaşık olarak 0,15 mm kalınlığında kuvars kristallerden

yararlanılmaktadır [153,157,158]. En çok altın elektrot kullanılır. Ayrıca, Pt, Ni, Ti elektrotlardan da yararlanılmaktadır.

Kuvars kristal mikrobalans (QCM) transdüserler genellikle AT kesimli kuvarsın ince diskinin iki tarafına elektrotların yerleştirilmesiyle yapılanmaktadır. Bu elektrotlar arasına uygulanan gerilim kuvarsın piezoelektrik özellikleri ve kristalize yönelimi nedeniyle, kristalde makaslama (shear) deformasyonuna neden olur. Kristalin rezonans için uyarılması, uyarım frekansının, kristalin kalınlığı akustik dalga boyunun yarısının tek katı olduğu durumda gerçekleşmektedir.

Oda sıcaklığında kesme tabakasının arasında bulunan açı geometrisi salınan kuvars kristalin rezonans frekansında hemen hemen hiçbir sıcaklık dalgalanması yaşanmadan kararlı bir salınım karakteri göstermektedir. QCM sisteminde AT kesime sahip ince bir kuvars disk çoğunlukla altından yapılmış iki metal elektrotun arasına sandviç edilmiştir. Kuvarsın alt ve üst yüzeyinde lokalize olan elektrotlar, metallerin bir dizisi şeklinde olabilir (youğun bir şekilde Au, Pt'den yararlanılmaktadır) [159].

Kuvars kristal elektrotlar yardımı ile bir osilatör devresine bağlanıp rezonans modunda kristalde rezonans frekansında bağıl kaymalar kaydedilir. Kuvars yüzeyinde kaplanmış olan üst ve alt metal elektrotlar sayesinde kuvars kristaline bir alternatif elektrik alanı meydana gelmesi ile kristalde karakteristik frekansın mekanik salınımıyla kuvars kristalin rezonans frekansı kaydedilir [159].



Şekil 2.24. Bir kuvars kristalinin AT ve BT kesim düzlemi [160].

Rezonans frekansına kristalin kırılma şeklinin ciddi bir tesiri vardır [161]. Kuvars kristal yapı olarak α-kuvars ve β-kuvars olmak üzere iki şekilde bulunurlar. α-kuvars yapısı, 573 ºC inversiyon sıcaklığında tersinir şekilde β-kuvars yapısına dönüşmektedir. Yüksek sıcaklıklara karşı stabil olması, yüksek derecede mekaniksel, piezoelektrik özellik ve suda çözünmemesinden dolayı QCM'de α-kuvars kristallerinden yararlanılmaktadır [162].

Kristale mekaniksel bir basınç uygulanmadığında kristalde bulunan negatif-pozitif yükler birbirilerini dengeleyecek halde bulunur. Bu yüzden kristal nötr durumdadır. Kristal üstüne belirli bir oranda basınç oluşturulduğunda ise kristalde deformasyon olur negatif ve pozitif yükler kendi içlerinde ayrılırlar. Bunun sonucu olarak bir dipol form oluşur. Meydana gelen bu polarizasyon sonucunda da bir elektrik alan meydana gelir. Kristalin deformasyonuyla mekanik enerji, elektrik enerjisine dönüştürülür [163].

2.12 Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM)

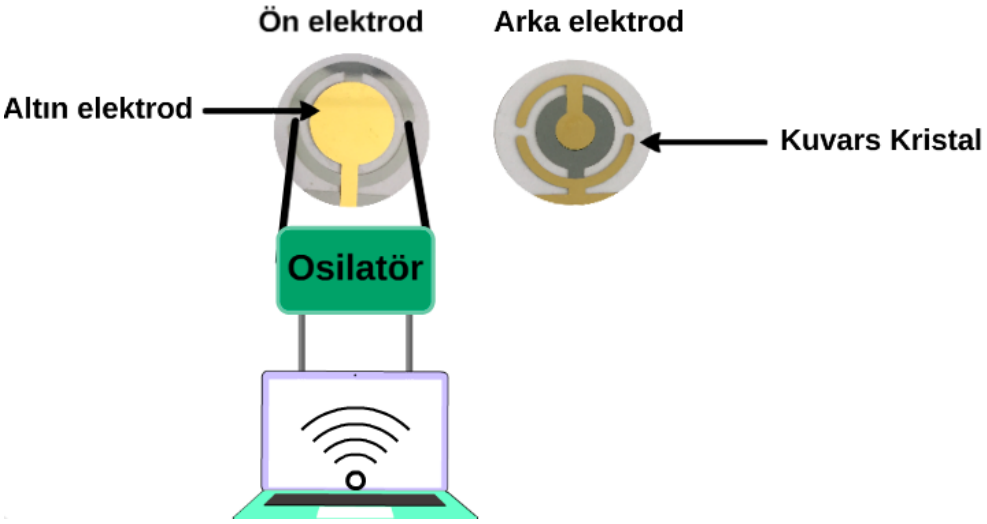
Birçok önemli fiziksel ve kimyasal işlemde kütle değişimleri gözlemlenerek takip edilebilir. Piezoelektrik kullanımı için teorik temele dayanan ilk çalışmalara Raleigh (1885) öncülük etse de ilk kapsamlı araştırma 1880'de Jacques ve Pierre Curie tarafından yapılmıştır [157].

Kütle duyarlı sensörler çalışma doğası gereği; piezoelektrik etkiye bağlı, rezonans frekansındaki değişimi ile (nanogram/cm^2) kütledeki değişikliği ölçebilen basit, düşük maliyetli, yüksek çözünürlüklü [164], çok iyi derecede hassas yüzey sensörleridir [167]. Dönüştürücü sistemlerinde piezolektrik yapıya sahip kristaller kullanılmaktadır [87].

Endüstri, tıp ve ilaç alanındaki gelişmeler, her geçen gün yüksek hassasiyet gerektiren yeni yöntemlere olan ihtiyacı arttırmaktadır [9]. Kuvars Kristal Mikroterazi; gıda, çevre ve klinik gibi yoğun olarak faydalanılmaktadır [166]. Kütle bazlı kimyasal sensörler olan QCM sensörleri, oldukça seçici, uygun maliyetli, kullanım kolaylığına sahip, basit, taşınabilirlik ve stabilite gibi önemli özelliklere sahiptir [167].

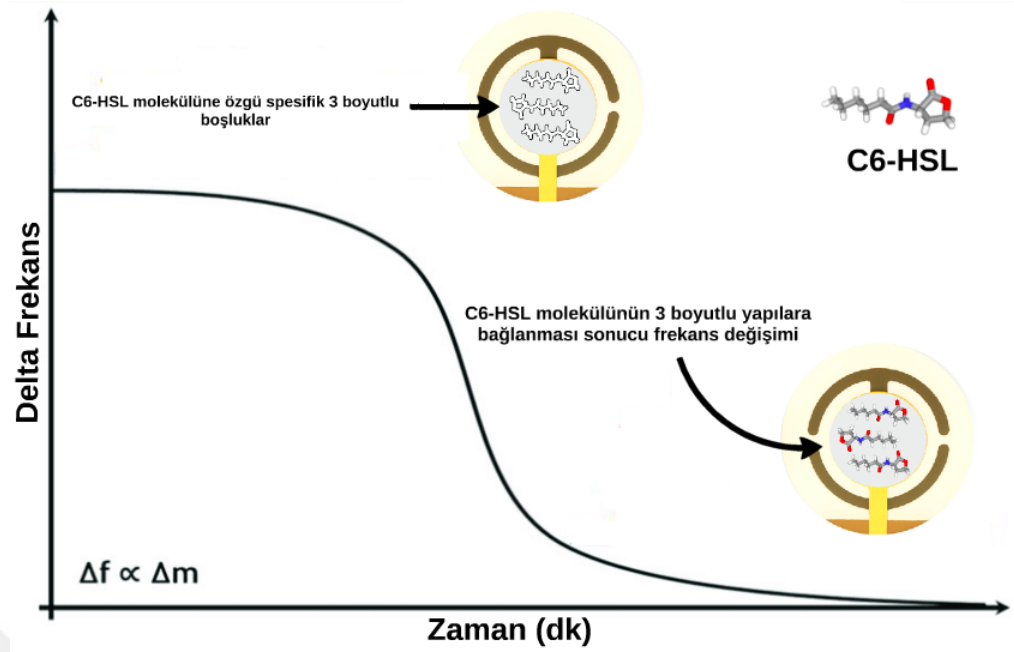
Kuvars kristal mikrobalansın kullanım alanları çok geniş bir yelpazeye sahiptir. QCM'nin hem gaz hem de sıvı faz analizlerinde etkin bir sensör sistemi olarak işlev gördüğü bilinmektedir [168]. Bir QCM sistemi; biyokimya, çevre, gıda ve klinik analizlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Antikorların kristal yüzeyine immobilize edilmesi ile bazı QCM immunosensörler, virüslerin, bakterilerin ve DNA'nın saptanması için kullanılmaktadır [169].

Kuvars kristal mikrobalans teknik olarak geniş bir sensasyon aralığına sahip olduğundan, küçük molekülleri, düşük kütleleri hassas bir şekilde algılayabilir. Üst tarafta bulunan yüzey sayesinde bağlanan büyük kütleleri de algılayabilir. Ayrıca, bağlanacak yüzeyin kütle ve enerji dağılımı nitelikleri hakkında önemli bilgi verebilir ve ölçebilir [159].



Şekil 2.25. Piezoelektrik sistem için deneysel sistem.

Kuvars kristal mikrobalans (QCM) sensörünün ana bileşeni olarak altın elektrotlu bir kuvars kristali Şekil 2.25'te görülmektedir. Elektrotlar bir osilatöre bağlandığında ve voltaj uygulandığında, kuvars kristali, piezoelektrik etkisinden dolayı rezonans frekansında (temel frekans) salınım yapmaya başlar [170]. Kuvars kristal mikrobalansın ilk kez algılama çalışmaları 1959 yılında Sauerbrey tarafından kullanılmıştır. Sauerbrey bu çalışmasında, kristalin yüzeyine yerleşmiş olan metal elektrodun yüzeyinde oluşan kütle artışı ile kuvars kristalin rezonans frekansının azalması arasında doğrusal bir bağlantı olduğunu göstermiştir [171].



Şekil 2.26. Kuvars kristal mikrobalans biyosensörünün mekanizmasının resimsel gösterimi.

Kuvars, akustik bir rezonatördür ve piezoelektrik etkisini oluşturur, yani kuvars kristaline alternatif akım ile akustik dalgaları tetikler. QCM kalınlık kesme modu rezonatörü veya toplu akustik dalga dönüştürücüsü olarak da bilinir. Diğer piezoelektrik sensörler türleri arasında eğilme levhası dalga rezonatörü, yüzey akustik dalga rezonatörü ve kesme yatay akustik plaka modu rezonatörü bulunur [151,172].

Kuvars kristal mikrobalans sensörler, üzerilerine yapılan modifiye özellikler sayesinde seçici olarak eser orandaki yüzey ile etkileşim analitleri algılayabilen sensörler haline gelmişlerdir. Böylece, bilim dünyası eser miktarlardaki kütledeğişimleri ile salınım frekansı arasında doğrusal bir ilişkilendirme yapabilen sensör yapılarını bulmuştur. Sauerbrey eşitliği Eşitlik 2.1'de verilmiştir.

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

Bu eşitlikte, Δm; birim alandaki kütle değişikliği, m_s ise alan başına kütleyi temsil etmektedir. Δf; kuvars kristal TSM rezonatöründe ölçülen frekans değişimini, f_0; kuvars kristalin temel harmonikteki rezonans frekansı (Hz), F_q; kuvars kristalin frekans sabitidir (F_q= ¼ f_0.d_q).

d_q; ise kristalin kalınlığı (mm), ρ_q; kristalin yoğunluğu (g/cm^3) A_{el}; kristal rezonatörün elektrot alanını (mm^2) simgelemektedir. Buradaki model, ince katı filmler için uygulansa da 1997 yılında Kanazawa tarafından Newtonsal viskoz sıvılar için de kapsamı genişletilmiştir. Aşağıda verilen eşitlikte sıvı yüklü sensör yüzeyinde yoğunluk ve viskoziteye bağlı frekans değişimlerini tanımlamaktadır.

$$\Delta f = = -f_0^{3/2}\left(\sqrt{\frac{\eta_1\rho_1}{\pi\mu_q\rho_q}}\right) \quad (2.2)$$

ρ_1; yüzeye temas eden sıvının yoğunluğu (g/cm^3)

η_1; yüzeye temas eden sıvının sıvının viskozitesi (kg/m/s)

μ_q; x-yönündeki kayma modülü (kesme modu)

İki tabakalı sistemde (sabit kütle yüzeyi ve viskoz sıvı) frekans kaymaları toplamı aşağıdaki eşitlikteki gibidir.

$$\Delta f = \Delta f_m + \Delta f_1 = -f_0^2\left(\frac{\Delta m_s}{F_q\rho_q A_{el}} + \sqrt{\frac{\eta_1\rho_1}{f_0\pi\mu_q\rho_q}}\right) \quad (2.3)$$

2.13 QCM'nin Geleceği

QCM, analitlerin gerçek zamanlı olarak izlenebilmesi nedeniyle keşfinden bu yana gıdadan, çevresel ve klinik analizlere kadar geniş bir uygulama alanı bulmuştur [157]. Prosedürü basit, düşük maliyetli, tehlikesi olmayan, az zaman alan ve zahmetsiz bir işlemdir. Devam eden araştırma çalışmaları, hem yüzey-plazmon rezonansını (SPR) hem de QCM algılamasını gerçekleştirebilen yenilikçi biyoanalitik cihazların ortaya çıkmasına neden olmuştur [173]. QCM, analitlerin çevrimiçi izlenmesi için uygun bir algılama platformudur. Q-Sense, çeşitli yüzeylerde gerçek zamanlı, etiketsiz moleküler adsorpsiyon ölçümleri ve etkileşimler sağlayan QCM-D adı verilen yeni bir teknoloji geliştirmiştir. Dağılma parametresi (D) adı verilen adsorbe edilen katmanın viskoelastik özelliklerine dair yeni bilgiler sağlayan bir yöntemdir. Eş zamanlı QCM ve elektrokimyasal ölçümlere dayanan bu cihaz çok faydalı olacaktır. Ancak sadece elektrolizle, buharlaştırılmış veya püskürtülmüş materyalleri incelemek için kullanılabilir.

Bununla birlikte, QCM-tabanlı sensörlerle ilgili bazı zorluklar vardır. Biyoanalitik uygulamalar öncesinde biyoanalitik deneyleri analiz etmek için çok fazla klinik

denemeler gerekmektedir. Son yıllarda katlanarak büyümeye devam eden gerçek zamanlı analitik cihazlar, bakım noktası sistemleri [174] ve akıllı telefon tabanlı cihazlar gibi algılama teknolojilerinin [175,176] üstün performans ve avantajlara sahip olup olmadıkları önceden tespit edilmelidir [177].

QCM, çeşitli algılama teknolojilerinin tek bir sistemde kullanılmasına dayanan biyoanalitik sistemlerin geliştirilmesi için son uygundur. QCM'nin SPR ve QCM'nin elektrokimyasal saptama ile entegrasyonu, çeşitli şirketler tarafından gösterilmiştir [177]. Gelecekte, antijen kaplı kristalleri kullanan piezoimmunosensörler, gıda, çevre ve klinik analizlerde olası uygulamalar için yüksek bir potansiyel ve kullanım sunması beklenmektedir [157].

3. MALZEME VE YÖNTEM

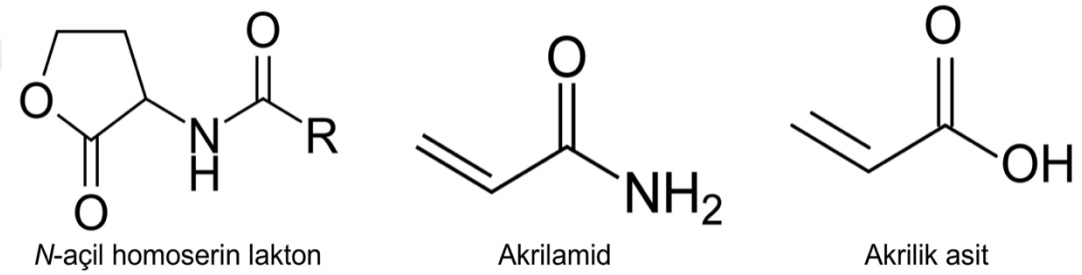
3.1 Malzemeler

N-Heksanoil-L-homoserin lakton (kalıp molekül) Cayman (Ann Arbor, ABD), allilmerkaptan (2-Propen-1-tiol), fonksiyonel monomer olarak akrilamid ve çözücü olarak kullanılan dimetilformamid (DMF) Sigma (St. Louis, ABD)'dan satın alınmıştır. Monomer olarak 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve çapraz bağlayıcı etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), başlatıcı olarak kullanılan azobisizobutironitril (AIBN) Fluka A.G. (Buchs, İsviçre) firmasından temin edilmiştir. HEMA ve EGDMA polimerizasyon inhibitörünü gidermek için düşük basınç değerlerinde (100 mmHg) damıtılmış ve inhibitörü olan ortamda indirgenmiş basınçta damıtılarak kullanılıncaya kadar 4 ºC'de korunarak muhafaza edilmiştir. GC-MS analizleri için stok çözeltiler, metanol ile ihtiyaç duyulan konsantrasyonda hazırlanmıştır. Saf helyum (%99.999) GC-MS sistemine taşıyıcı gaz olarak verilmiştir. Diğer kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Merck AG'den (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır. Deneylerde yararlanılan cam malzemeler 4 M nitrik asitte bir gece boyunca bekletilmiştir. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmos Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ardından Barnstead D3804 NANOpure®organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sisteminden yararlanılarak saflaştırılmıştır. Saf suyun (distile su) direnci 18 MΩ/cm'dir.

3.2 Ön-Organizasyon Komplekslerinin Hazırlanması

Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlık aşamasında en dikkate değer ve kritik safhalardan biri, kalıp molekül/fonksiyonel monomer(ler) arasındaki optimal etkileşim oranlarının bulunmasıdır. Bu aşamada hazırlanan polimerdeki etkileşimler, çok fazla ise yüksek seçicilik, fakat çok düşük geri kazanım elde edilirken; aksi durumlarda ise seçicilik faktörünün çok düşük olduğu bilinmektedir. Bu kapsamda, uygulama metoduna göre kalıp molekül/fonksiyonel monomer etkileşimlerin uygun olarak seçilmesi ve uygulanması, üretilecek moleküler baskılanmış polimerlerin başarısı ve sonucunu belirlemektedir. N-açil-homoserin laktonların (C6-HSL) baskılanmasında, uygun monomer ve etkileşim oranlarının belirlenmesi için, öncelikle moleküllerin en iyi çözündüğü ortamlar saptanmış, ardından uygun çözünme ortamında optimum

etkileşim oranları incelenmiştir. Bu kapsamda, pH 7.0'da saf su+dimetilformamid (DMF) (1/1) karışımı (seyreltik HNO_3 ile ayarlanmış); monomer olarak akrilamid (tez önerisinde kullanılması düşünülen metakrilik asit ile yapılan ön çalışmalarda, çip üzerinde sıyrılma yaşanması probleminden dolayı deneylere akrilamid ile devam edilmiştir) kullanılarak kompleksleşme miktarları irdelenmiştir. Her çözelti içerisinde farklı oranlarda (C6-HSL/monomer: 1/1, 1/2, 1/3; V/V) ön-organizasyon kompleksleri hazırlanarak, UV-Vis spektrofotometresinden yararlanılarak 190-800 nm dalga boyu skalasında absorbans değerleri ölçülmüş ve karşılaştırmalı olarak grafikleri elde edilmiştir. N-açil-homoserin lakton, akrilamid ve akrilik asit moleküllerinin kimyasal yapıları, Şekil 3.1'de verilmiştir.

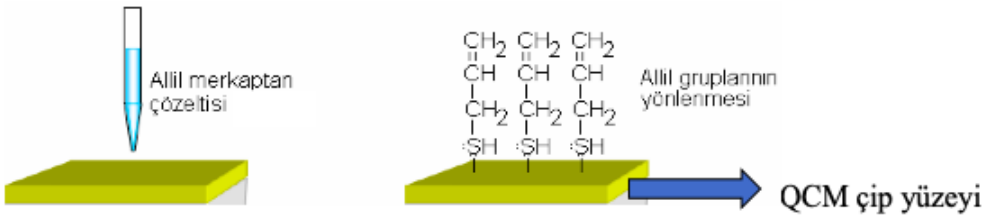


Şekil 3.1. N-açil-homoserin lakton, akrilamid ve akrilik asit moleküllerinin kimyasal yapıları.

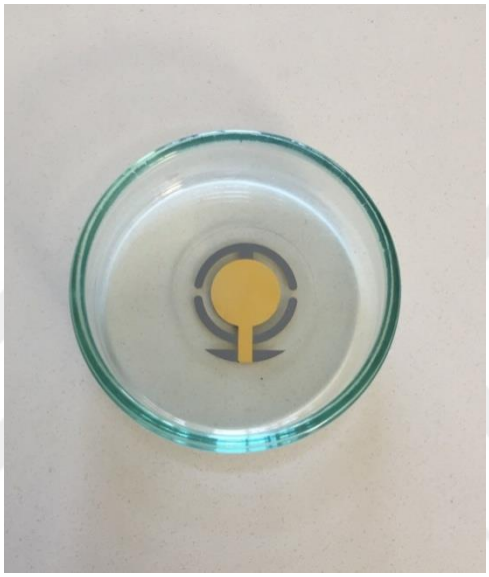
3.3 QCM Çip Üzerinde Polimerik Membranların Hazırlanması

3.3.1 Alil merkaptan modifikasyonu

Yüzeydeki polimerleşmeyi sağlamak için, polimerleştirilebilir alil grupları, QCM altın yüzeyi ile etkileştirilmiştir. Bu amaçla; QCM çip yüzeyindeki tek katmanlı yapılar, altın yüzeyle etkileşime giren alil merkaptan (3-tiyol propiyonik asit) molekülleri yardımı ile oluşturulmuştur. Alil merkaptan modifikasyonundan önce, QCM çip yüzeyleri alkali pirana çözeltisi (3:1 NH_4OH:H_2O_2, V/V) ile temizlenmiş, deiyonize su ve etil alkol ile yıkanmış ve 3 saat boyunca vakum etüvünde (200 mmHg, 40 °C) kurutulmuştur. QCM çiplerinin ve alil gruplarının altın yüzeyinin etkileşimini oluşturmak için, QCM çiplerinin altın yüzeyleri, etil alkol içeren bir 3.0 M alil merkaptan çözeltisine daldırılmıştır. Çipler, bu çözelti içinde 24 saat süreyle inkübe edilmiş ve çip yüzeyinde kendiliğinden tek tabakalı aktif bir katman oluşturulmuştur. (Şekil 3.2) QCM çipleri, merkaptan kokusu giderilene kadar etil alkol ile yıkanmış ve azot atmosferinde kurutulmuştur [1].



Şekil 3.2. Modifikasyon sonucunda alil grupları takılmış altın kaplı QCM çip yüzeyleri.



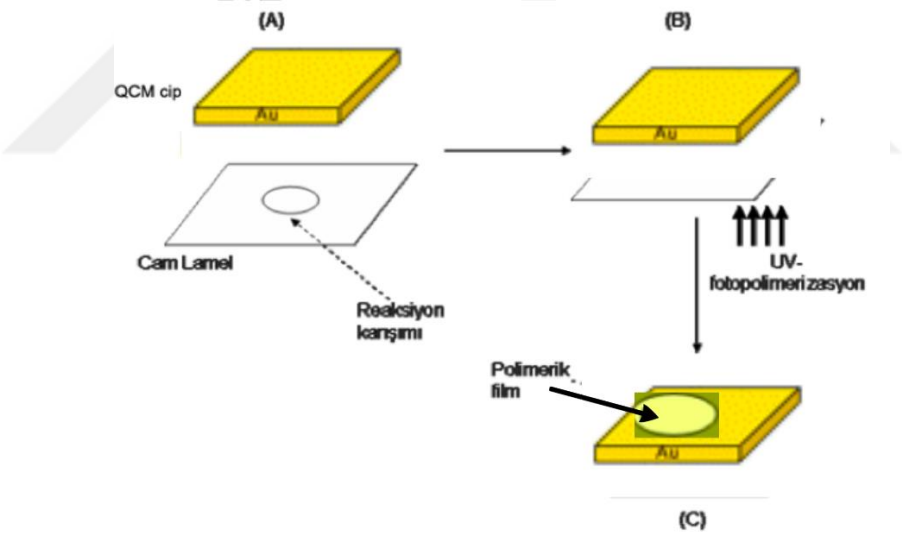
Şekil 3.3. Alil merkaptan modifikasyonundan sonra etil alkol ile yıkanmış ve azot atmosferinde kurutulmuş QCM çip.

3.3.2 C6-HSL baskılanmış polimerik membranların hazırlanması

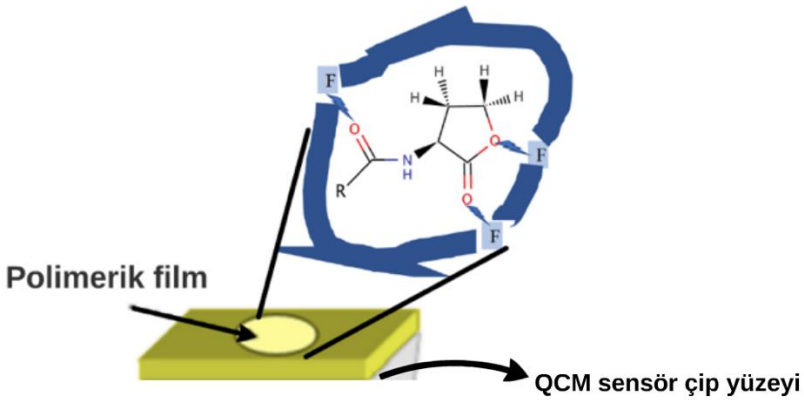
Yapılan ön organizasyon absorbans değerlerinin irdelenmesi ile optimal C6-HSL/akrilamid kompleksleşme oranlarının 1/2 ve 1/3 (mol/mol) olabileceği görülmüştür. Bundan sonraki aşamalardaki ön optimizasyon çalışmalarında 1/2 ve 1/3 oranlarının MIP'lerin performansına etkisinin daha iyi anlaşılması açısından bu iki oran göz önünde bulundurularak polimerlerin sentezlenmesi düşünülmüş, bu amaçla; optimum ön organizasyon kompleksleri, sabit C6-HSL miktarının, değişken akrilamid oranları ile kompleksleştirilmesi yoluyla hazırlanmıştır.

QCM çipi üzerinde polimerik bir membran oluşturulurken aşağıdaki koşullar dikkate alınmıştır:

Hedef molekülün (C6-HSL) fonksiyonel monomer (akrilamid) ile farklı oranlardaki karışımı ile çiplerin hazırlanması için 1/2 ve 1/3 (mol/mol) oranlarında ön organizasyon kompleksleri hazırlanıp dimetilformamid (DMF) (20 µL) içinde çözülmüş ve hazırlanmış olan karışımlar etkili kompleks oluşması için 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Bundan sonraki işlemler her bir oran için ayrı ayrı yapılmıştır: Stok monomer çözeltisi hazırlamak için, 5,0 mg AIBN (başlatıcı), 50 µL HEMA (monomer) içinde çözülmüş, daha sonra 100 µL EGDMA (çapraz bağlayıcı) ile karıştırılmıştır. Önceden hazırlanan C6-HSL: akrilamid karışımı monomer çözeltisine ilave edilmiş ve çözelti azot gazı içinden 15 dakika muamele edildikten sonra, stok monomer çözeltilerinden gelen 20 µL çözelti, spin kaplama tekniği ile QCM çip yüzeylerine bırakılmıştır. Bu işlemden sonra, polimerizasyon UV polimerizasyon ışığı altında (100 W, 365 nm) başlatılmış, 1 saat beklendikten sonra polimer kaplı QCM çipleri, birkaç kez etil alkol ile yıkanıp, azot gazından geçirilerek kurutulmuştur (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5). Moleküler baskılanmamış polimer membranlar da QCM çipler üzerinde kalıp molekül olmaksızın benzer yöntemlerle hazırlanmıştır.



Şekil 3.4. OCM çip yüzeyinde oluşturulan polimerizasyon aşamaları.



Şekil 3.5. Kalıp molekül ve monomerlerin polimerizasyon sonrası olası düzenlenmesi.

3.4 C6-HSL Baskılanmış Polimerik Membranların ve Baskılanmamış Membranların Karakterizasyonu

3.4.1 FTIR-ATR spektrofotometre analizi

N-Heksanoil-L-homoserin lakton baskılanmış ve baskılanmamış polimerik membranların yapı analizi FTIR-ATR spektrofotometresiyle (Perkin Elmer, Spectrum 100, USA) incelenmiştir. Bu amaçla örnekler vakum etüvünde kurutulup, daha sonra, havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Ardından, örnekler FTIR-ATR cihazının örnek haznesinde preslenip, böylece yüzeyden gelen toplam ışık yansıması 650-4000 cm^{-1} dalga boyu aralıklarında ve 2 cm^{-1} çözünürlükle ölçülmüştür.

3.4.2 Temas açısı ölçümleri

QCM çiplerin alil merkaptan ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş durumlarındaki altın yüzeyleri, temas açısı ölçüm metoduyla incelenmiştir. Modifiye edilmemiş ve alil merkaptan ile modifiye edilmiş altın çip yüzeyine 1 damla su damlatılarak yapışık damla (SessileDrop) yöntemiyle temas açısı belirlenip çip yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatmak suretiyle belirli sayıda fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen su damlacıklarının yüzeyle oluşturdukları temas açılarının ortalamasından da yüzeyin durumu hakkında fikir alınmıştır ve yüzey gerilimi hesaplanmıştır. Temas açısı ölçümlerinde KRÜSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazından yararlanılmıştır.

3.4.3 Atomik kuvvet mikroskobu

Sensör çiplerin altın yüzeylerinin topografyasını belirlemek için Atomik Kuvvet Mikroskobundan (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) yararlanılmıştır. Baskılanmış ve baskılanmamış QCM çipler, örnek tutucuya monte edilmiş ve görüntüleme çalışmaları hava ortamında ve yarı değen modda yapılmıştır. Probe tarafından yüzeye belirli bir kuvvet uygulanarak, örnekler üzerinde 1 x 1 μm'lik bir alana sahip görüntü alınmıştır. Yüksek çözünürlükte ölçüm gücüne sahip (4096 x 4096 piksel) serbest kantileverli interferometre özellikli atomik kuvvet mikroskobu ile karakterizasyonlar gerçekleştirilmiştir. QCM çipler 341.30 kHz salınım rezonans frekansında işlem görmüşlerdir. Titreşim genliği olarak 1 VRMS ve boş titreşim genliği ise 2 VRMS'dir. Numuneler 256 x 256 piksel çözünürlükte, 2 μm/s tarama hızında, birim alanların görüntüsü alınarak gerçekleştirilmiştir.

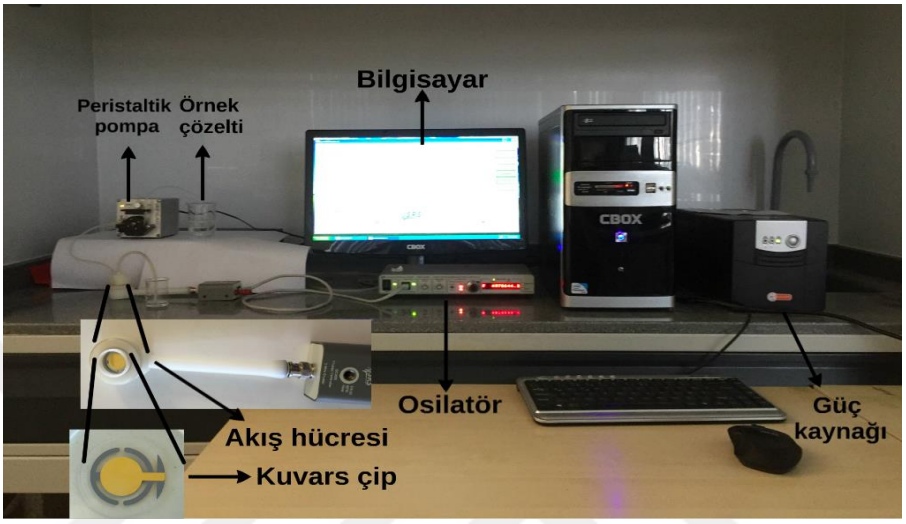
3.4.4 Yüzey morfolojisi

N-Heksanoil-L-homoserin lakton baskılanmış ve baskılanmamış polimerik membranların morfolojik yapıları alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM) (ZEİSS GEMİNİ 500) kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla; polimerik membranlar altın kaplama için cihaz haznesine yerleştirilmiş, ve vakum altında çok ince bir altın tabaka ile kaplandıktan sonra çip yüzeylerinin farklı bölgelerinin yüzey morfolojileri incelenmiştir.

3.5 C6-HSL Baskılanmış QCM Çiplerle Eş-Zamanlı Lakton Tayini

Moleküler baskılama ve QCM sensör performansının yüksek hassasiyete sahip olduğu literatürde mevcuttur [169]. AHL baskılanmış QCM çiplerin laktona karşı tanıma hassasiyetlerini belirlemek için önce pH taraması yapılmıştır. Hazırlanan AHL baskılanmış QCM çipler akış hücresine bağlanmış, frekanstaki kayma ve kütledeki artış değerleri kaydedilmiştir. Eş-zamanlı lakton tayin sistemi; bütün komponentlerden birer adet olmak üzere, peristaltik pompa, akış hücresi, anlık frekans kaymasını ölçen osilatör ve sinyal analizini yapan bilgisayardan oluşmaktadır. Bu deney kapsamında; hedef (kalıp) molekül (C6-HSL) ile sentezi yapılan polimerik membran arasında oluşan etkileşime pH faktörünün etkileri incelenmiştir. Bu amaçla; 1:2 ve 1:3 oranına sahip C6-HSL: AAm ile hazırlanan membranların sensör performansları çözelti pH'sı 5.0-8.0 aralığında değiştirilerek incelenmiştir. Bu aşamada, lakton derişimi 1000

ng/mL ve akış hızı 0,5 mL/dakika olarak belirlenmiştir. Başlangıç C6-HSL derişiminin etkisi incelenirken ise; C6-HSL derişimi 0,025-1000 ng/mL aralığında değiştirilmiştir. Ortam şartları çözelti pH'sı 7.0 ve akış hızı ise 0,5 mL/dakika olarak sabit tutulmuştur. Ayrıca, C6-HSL baskılanmamış membranlar üzerine derişim etkisi incelenmiş ve sensörün verdiği sinyaller kaydedilmiştir.



Şekil 3.6. Kullanılan QCM sistemi.

3.6 Seçicilik Deneyleri

Moleküler baskılanmış polimerler "Plastik Antikor" olarak adlandırılmakta ve doğal antikorlarla rekabet edebilecek performans göstermektedir. Moleküler baskılanmış polimerlerin, bu özelliklerinin incelenmesi için uygun deneyler özel olarak tasarlanmalıdır. Bu deney grubu, Seçicilik Deneyleri olarak adlandırılır ve üç temel öğeyi içerir: (i) tüm polimerizasyon formülü aynı olan baskılanmamış polimerler (NIP) (kalıp molekül eklenmeden hazırlanır); (ii) yarışmacı moleküller (hedef moleküle şekil, büyüklük ve afinite yönleriyle benzer moleküller) ve (iii) dağılma, seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

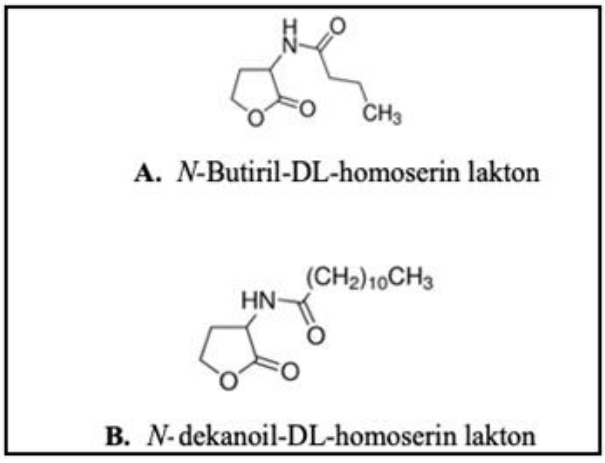
Çizelge 3.1. Seçicilik deneyleri için dağılma, seçicilik, bağıl seçicilik katsayıları.

Dağılma Katsayısı (K_d) :	$\Delta m/C = \Delta m/K_d - \Delta m_{eq}/K_d$
Seçicilik Katsayısı (k):	$k' = K_{d,\ kalıp} / K_{d,\ yarışmacı}$
Bağıl Seçicilik Katsayısı (k'):	$k' = b_{baskılanmış} / b_{baskılanmamış}$

Burada; K_d, dağılma katsayısı (mL/mg); Δm, herhangi bir andaki kütle artışı (μg/cm^2); Δm_{eq}, denge anındaki kütle artışı (μg/cm^2); ve C, kalıp molekül derişimini (mg/mL) belirtmektedir. Bu değerler hem her bir analit molekülü (hedef ve yarışmacı) hem de her polimer türü (baskılanmış veya baskılanmamış) için ayrı ayrı hesaplanır.

Tez kapsamında; C6-HSL için seçici moleküler baskılanmış QCM sensörlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Araştırma kapsamında; seçicilik özelliklerinin belirlenmesi için baskılanmamış polimerler de hazırlanmıştır. Bu işlemde, kalıp molekül olmayacağından, ön kompleksleşme işlemi atlanmıştır. Yarışmacı moleküller olarak ise, seçilen kalıp molekülden bir uzun, bir tane de kısa açil grubuna sahip olan türev iki molekülden seçilmiştir (Şekil 3.7). Böylelikle hem boyut hem de kimyasal yapıdaki değişikliklerin etkisi incelenmiştir. Bu aşamada; hem yarışmasız (tekli çözeltilerden) hem de yarışmalı (C4, C6, C10 karışımı içeren kompleks çözeltilerden) koşullar altında seçicilik deneyleri gerçekleştirilmiştir. Buradaki amaç; sensörün hedef moleküle olan özgüllüğünü belirlemek olduğu kadar, kompleks ortamda diğer yarışmacı ajanlara karşı davranışlarının da incelenmesidir. Böylelikle hem tek C6-HSL teşhisi hem de toplam C6-HSL teşhisi için koşulların optimizasyonu araştırılmıştır. Dağılma, seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları Çizelge 3.1'deki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

Kompleks ortamdan Quartz Kristal Mikroterazi sensör yüzeyinde oluşturulan C6-HSL baskılanmış membranların seçiciliğini karşılaştırmak/konfirme etmek için gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) cihazından yararlanılmıştır. Yöntem ve geliştirilen metot hakkında bilgiler sonuçlar ve tartışma bölümünde yer almaktadır.



Şekil 3.7. Yarışmacı ajanlar.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

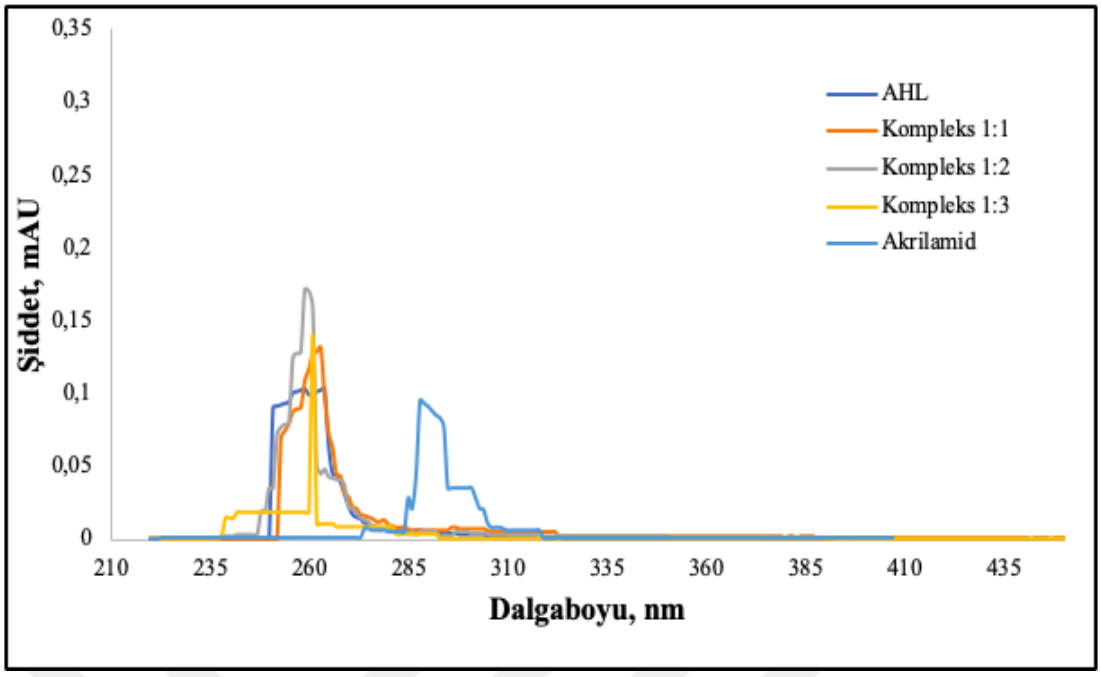
4.1 C6-HSL Baskılanmış Polimerik Membranların ve Baskılanmamış Membranların Karakterizasyonu

4.1.1 Ön-organizasyon komplekslerinin spektrofotometrik incelenmesi

Akrilamid, basit bir moleküler yapıya sahiptir ve buna bağlı olarak belirgin bir absorbans bandı yoktur. Yapılan spektrofotometrik incelemede akrilamid için maksimum absorbans bandı, 300 nm dolaylarında görülmüştür. C6-HSL molekülünün ise yaklaşık 260 nm civarlarında bir absorbansa sahip olduğu deneysel olarak belirlenmiştir.

Yaklaşık 260 nm dalga boyunda geniş bir pik veren N-açil-homoserin lakton molekülünün kimyasal yapısı incelendiğinde iki karboksil, bir epoksi ve bir tane de amid grubu olmak üzere toplamda 4 adet hidrojen bağı yapabilecek fonksiyonel gruba sahip olduğu bilinmektedir. Monomer olarak kullanılan akrilamid molekülleri, lakton molekülleri ile etkileşime girebilecek potansiyeli olan karboksil ve amid fonksiyonel gruplarına sahiptir.

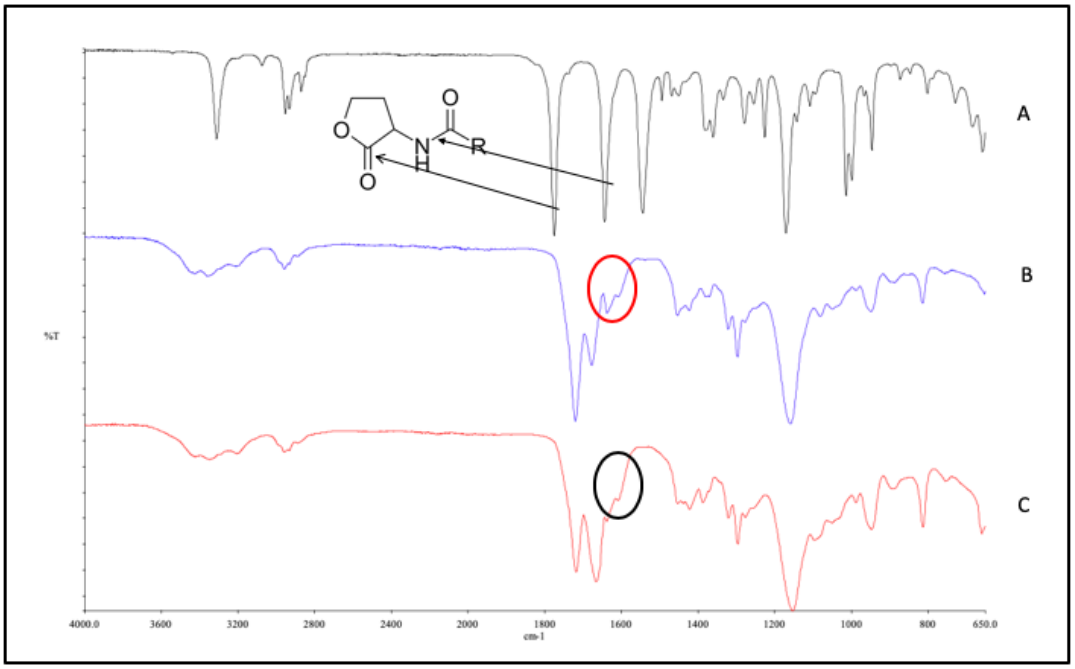
C6-HSL ve akrilamid moleküllerinin farklı oranlardaki etkileşim komplekslerinin spektrofotometrik incelenmesi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, 260 nm'de geniş bir pik veren C6-HSL moleküllerini çevreleyen akrilamid moleküllerinin sayısı arttıkça (1:1, 1:2, 1:3) pikin genişliği azalmakta ve 1:3 (C6-HSL/AAm) oranında ise dar bir pik elde edilmektedir. C6-HSL moleküllerinin üzerinde bulunan fonksiyonel gruplardaki elektron bulutlarının oluşturduğu geniş pik, optimal ön kompleksleşmenin oluşumundan sonra daralmakta ve bu durum da elektronların stabilitesinin arttığı anlamını taşımaktadır. Elde edilen grafikten yola çıkarak; C6-HSL/akrilamid maksimum kompleksleşme oranının 1/2 ve 1/3 oranlarında olduğu ve bundan sonraki aşamalarda C6-HSLtayinine pH'nın ve derişiminin etkisinde bu oranlar göz önünde bulundurularak devam edilmiştir.



Şekil 4.1. C6-HSL/Akrilamid komplekslerine ait spektrofotometrik grafikler pH 7.0, T:25 ºC.

4.1.2 FTIR-ATR spektrofotometre analizi

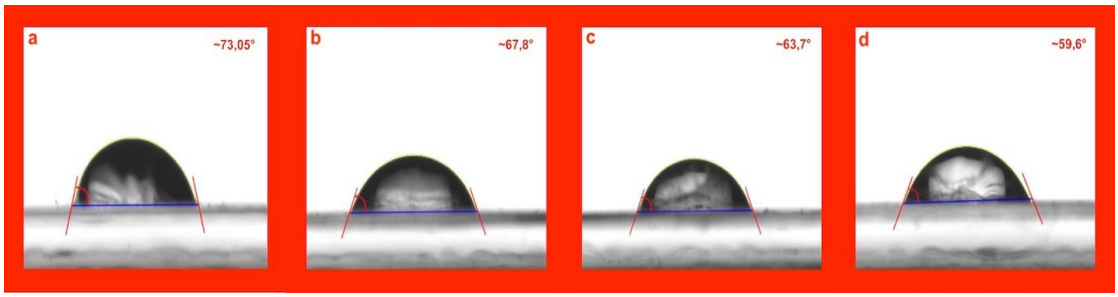
C6-HSL baskılanmış ve baskılanmamış polimerik membranların karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresinden yararlanılmıştır. Hazırlanan polimerik membranlar, cihazın numune haznesine yerleştirilmiş, 650-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında yüzeyde oluşan yansıma miktarları ölçülüp FTIR-ATR spektrumu Şekil4.2'de verilmiştir. Burada 1774.4 cm^{-1}'de görülen pikler, gerek polimerik membranların ve gerekse C6-HSL yapısındaki lakton halkasında bulunan C=O bandına atfedilmiştir. Ayrıca, amid gruplarına atfedilen 1643.3cm^{-1}'deki gerilme bantlarının şiddeti, C6-HSL spektrumunda yüksek iken, baskılanmış membranda bu miktar azalmıştır. Baskılanmamış membranda ise bir omuz şeklinde aynı bölgede görülen zayıf pik ise akrilamiddeki amid gruplarına atfedilebilir. Sonuç olarak, kalıp molekülün yapıya girdiği ve polimerik membranların başarılı bir biçimde sentezlendiği söylenebilir.



Şekil 4.2. A. C6-HSL, B. C6-HSLbaskılanmış C. baskılanmamış polimerik membranların FTIR-ATR spektrumu.

4.1.3 Temas açısı ölçümleri

Alil merkaptan ile modifiye edilmiş ve edilmemiş yüzeyler ile lakton baskılanmış ve baskılanmamış sensör yüzeylerinin temas açısı ölçümleri Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir ve Şekil 4.3'te verilmiştir. QCM çiplerin yüzey temas açısı ölçüm değerleri yapışık damla metodu ile gerçekleştirilmiştir. Burada kullanılan yöntemde sıvı faz olarak su kullanılmıştır. Temas açısı açısal değerinin sıfıra yakın olması veya sıfırdan uzak olması yüzeyin karakteri hakkında bilgi verir. Çizelge 4.1'de görüleceği üzere; altın yüzeyin sıvı temas açısı 73,05° iken, alil merkaptan modifikasyonundan sonra temas açısının 67,8°'ye düştüğü görülmektedir. Bu durum, alil merkaptanın spontane düzenlenen tek tabaka formasyonu ile yüzeyin hidrofilisitesinin artmasına katkı sağladığı söylenebilir. Moleküler baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin temas açısında ise, 4° derecelik bir fark bulunmaktadır. Burada oluşan 4° derecelik fark, beklentilerimiz doğrultusunda MIP yapısında bulunan kalıp molekülün (N-Heksanoil-L-homoserin Lakton), hidrofobik bölgesinin, yüzeyin hidrofilisitesine yaptığı etkiye atfedilebilir.



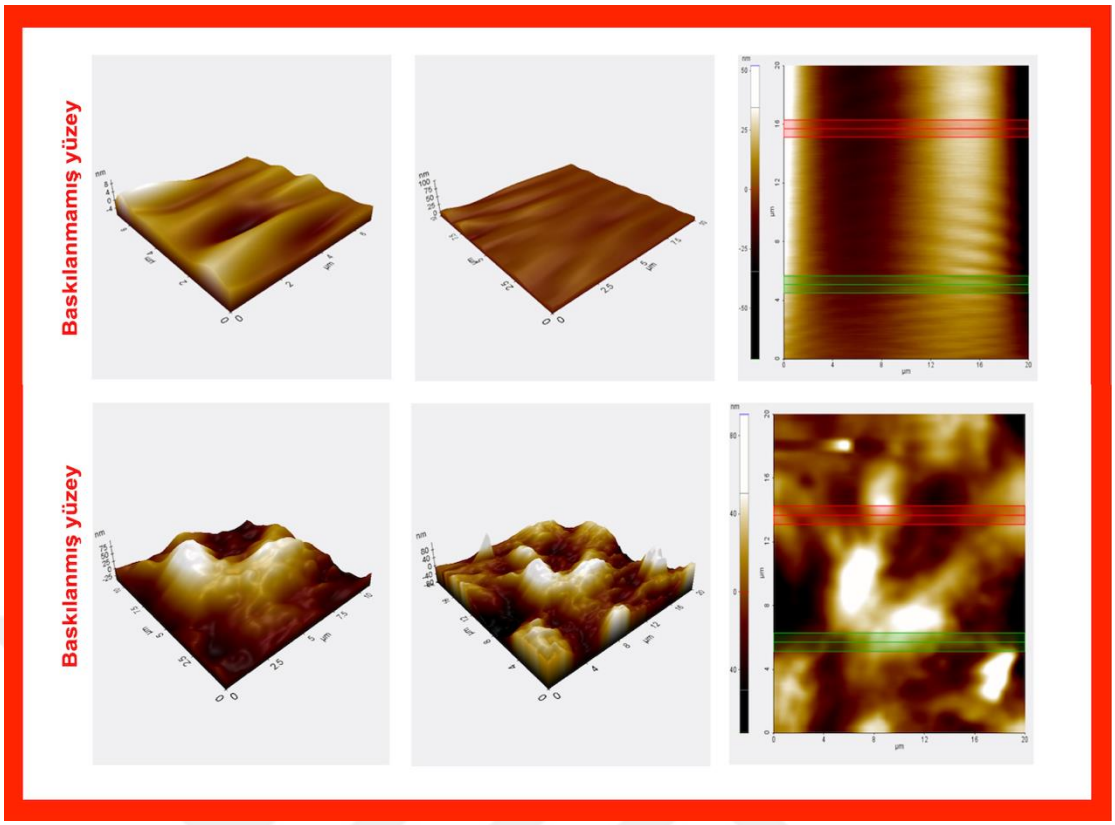
Şekil 4.3. QCM çiplerin temas açısı görüntüleri. (a) Modifiye edilmemiş; (b) Allilmerkaptan ile modifiye edilmiş; (c) C6-HSL baskılanmış yüzey; (d) Baskılanmamış yüzey görüntüleri.

Çizelge 4.1. QCM çip yüzeylerinin ortalama temas açısı değerleri.

Yüzey	Ortalama Temas Açısı, °
Altın yüzey	~73,05°
Allil modifiye yüzey	~67,8°
Moleküler baskılanmış yüzey	~63,7°
Baskılanmamış yüzey	~59,6°

4.1.4 Atomik kuvvet mikroskobu

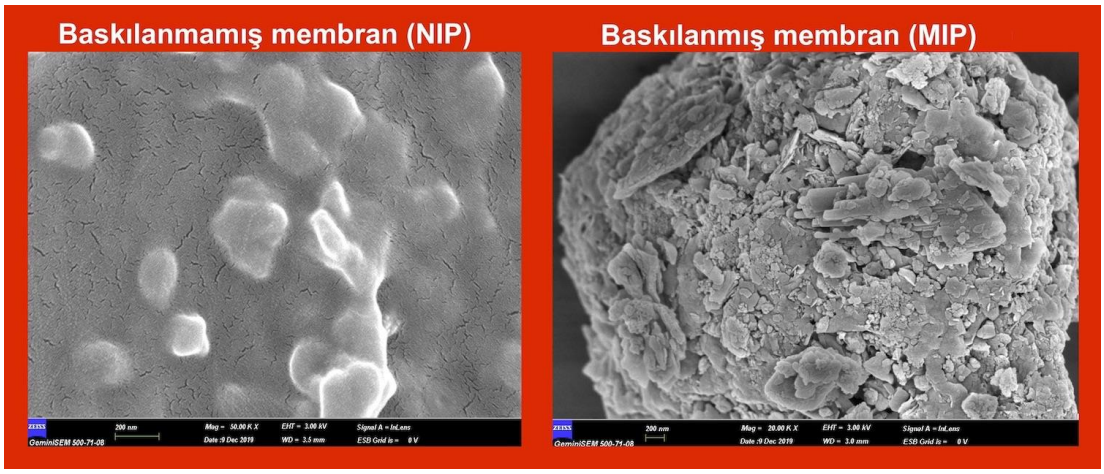
Baskılanmış ve baskılanmamış membranların yüzey topografyasını incelemek için yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılmış ve elde edilen topografik görüntüler Şekil 4.4'te verilmiştir. Görüntülerden, baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) membranlar için elde edilen topografik sayısal veriler sırasıyla ±40 nm ve ±18 nm olarak ölçülmüştür. Baskılanmış yüzeyde meydana gelen yükselti ve alçaltı benzeri yapılar, yüzeyin topografik sayısal değerlerinin artmasına neden oluşmuş ve meydana gelmiş topografik değişimler de moleküler düzenlemelere atfedilmiştir. NIP membranın topografik sayısal değeri daha düşük ve MIP membrana göre yapı itibariyle nispeten düz bir yapıdadır. MIP membranların daha yüksek sayısal değerlere sahip olması, C6-HSL'nin başarılı bir şekilde yüzeye baskılandığını göstermektedir.



Şekil 4.4. Baskılanmış ve baskılanmamış membranların atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri.

4.1.5 Yüzey morfolojisi

Lakton baskılanmış ve baskılanmammış polimerik membranların QCM çip yüzeyleri, alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ile görüntülenmiştir (Şekil 4.5). FESEM analizleri sonucunda; baskılanmış membran yüzeyinde amorf bir yapı görülmekteyken, baskılanmamış polimerik membranda ise daha düzenli bir polimerik yapı oluşmuştur. Baskılanmış polimerik membrandaki amorf yapı; kalıp molekülün polimerizasyon sırasında monomerler ile etkileşimde bulunduğunu, böylece heterojen bir membranın meydana geldiği şeklinde yorumlanabilir.



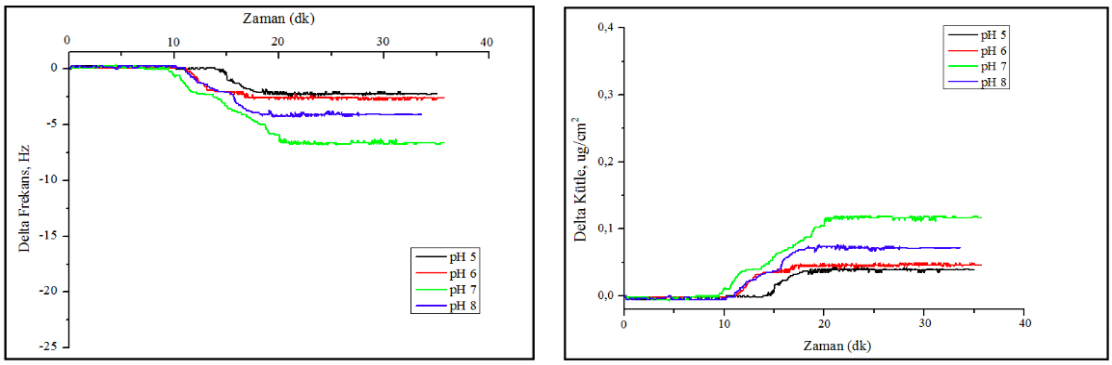
Şekil 4.5. C6-HSL baskılanmamış ve baskılanmış membranların FESEM görüntüleri.

4.2 C6-HSL Baskılanmış QCM Çiplerde C6-HSL Tayinine pH'nın Etkisi

Çalışmanın ilk aşamasında, 1/2 oranında (C6-HSL/akrilamid) baskılanmış QCM çipler, 1000 ng/mL C6-HSL derişimine sahip (%2'lik DMF çözeltisinde çözünmüş halde bulunan) çözeltilerle sürekli sistemde etkileşime bırakılmıştır. Böylece, simultane olarak hem QCM'in titreşim frekansındaki azalma değeri hem de çipin üzerinde biriken maddenin miktarı ölçülmüştür (Şekil 4.6). pH etkisi incelenirken, pH 5,0-6,0 aralığı için ortam 0,05 M asetat tamponu ile pH 7.0-8.0 aralığı için ise 0,05 M fosfat tamponu ile dengelenmiştir. Tampon çözeltiler %2'lik DMF çözeltisinde hazırlanmıştır. Deneyler sırasında 0,5 M NaCl (%2'lik DMF çözeltisinde hazırlanan) çözeltisi desorpsiyon ajanı olarak kullanılmıştır. pH taramasında sensör sistemine ilk olarak dengeleme çözeltisi gönderildikten sonra farklı pH'lardaki lakton çözeltileri sisteme verilmiştir. Akış hücresine lakton çözeltisi verilmesi ile birlikte anlık olarak frekans değerinde kayma görülmektedir. Lakton molekülleri, moleküler baskılanmış olan bölgeler ile hızlıca etkileşmekte ve sensör yüzeyine bağlanmaktadır. Bu etkileşimle birlikte eş-zamanlı olarak hem QCM'in titreşim frekansındaki azalma hem de çip yüzeyinde biriken madde miktarı ölçülmüş ve aşağıdaki grafik elde edilmiştir. Frekansın kayma değeri yüzeye bağlanan madde miktarıyla ters orantılıdır.

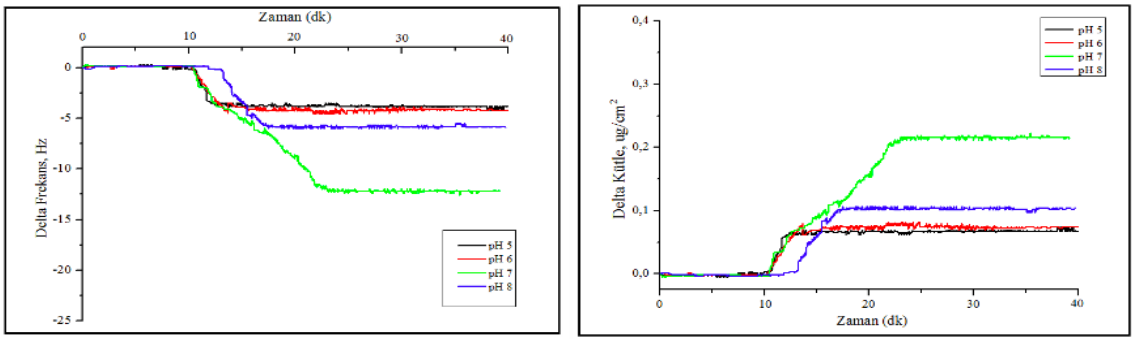
Belirli bir bağlanma süresinin ardından desorpsiyon ajanı (0,5 M NaCl) sisteme verilmiş ve çiplerden desorpsiyon aşamasında ayrılan laktonlar QCM sensörün doğası gereği Δm değerinde (toplam kütle) azalma, Δf (toplam frekans) değerinde ise artış olarak kaydedilmiştir. Frekans kayması ile pH arasındaki ilişkiye göre maksimum bağlanma pH 7.0'da kaydedilmiştir. Bu durum, hazırlanan kalıp molekül (C6-HSL) ile

fonksiyonel monomer (akrilamid) arasındaki oluşan etkileşimin en iyi pH 7.0'da gerçekleşmiş olabileceği sonucuna ortaya çıkarmaktadır.

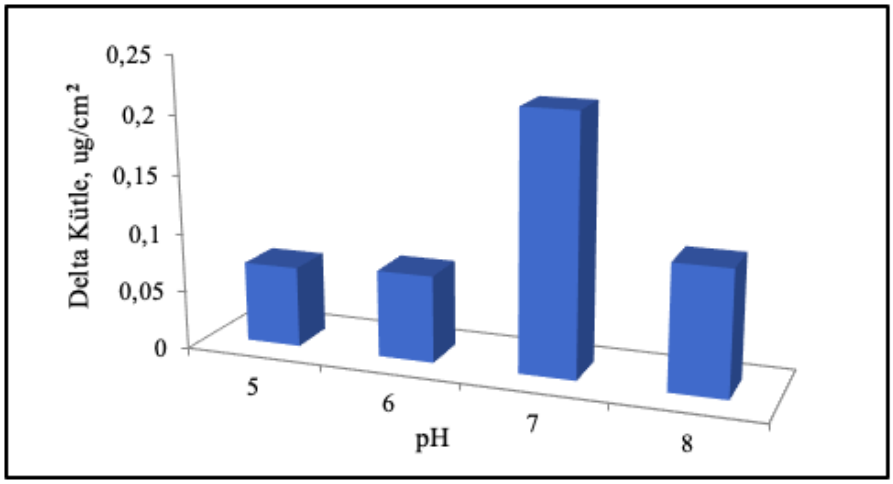


Şekil 4.6. Eş-zamanlı QCM sonuçlarına pH'nın Etkisi (1/3 C6-HSL: AAm). Delta Frekans ve Delta Kütle Zaman Eğrileri. C6-HSL derişimi: 1000 ng/mL; akış hızı: 0,5 mL/dk; T: 25 ºC.

pH'nın etkisi incelenirken 1/3 oranında C6-HSL baskılanmış QCM çipler, 1000 ng/mL lakton derişimine sahip (%2'lik DMF çözeltisinde çözünmüş halde bulunan) çözeltilerle sürekli sistemde etkileşime bırakılmıştır. Bu etkileşimle, eş-zamanlı olarak hem QCM'in titreşim frekansında meydana gelen azalma hem de çip üzerinde biriken madde miktarı ölçülmüştür (Şekil 4.7). pH etkisi incelenirken 1/2 oranında kullanılan tampon sistemi ve desorpsiyon çözeltileri kullanılmıştır. Lakton çözeltisi sisteme verildikten sonra birlikte frekansta gözle görülür bir kayma görülmektedir. Lakton molekülleri, moleküler baskılanmış olan kaviteler ile 1/2 oranından daha yüksek bir etkileşim gösterdiği sensör grafiğinden anlaşılmaktadır.



Şekil 4.7. Eş-zamanlı QCM sonuçlarına pH'nın Etkisi (1/3 C6-HSL: AAm). Delta Frekans ve Delta Kütle Zaman Eğrileri.C6-HSL derişimi: 1000 ng/mL; akış hızı: 0,5 mL/dk; T: 25 ºC.



Şekil 4.8. 1/3 oranına ait (C6-HSL: AAm) Delta Kütle-pH grafiği.

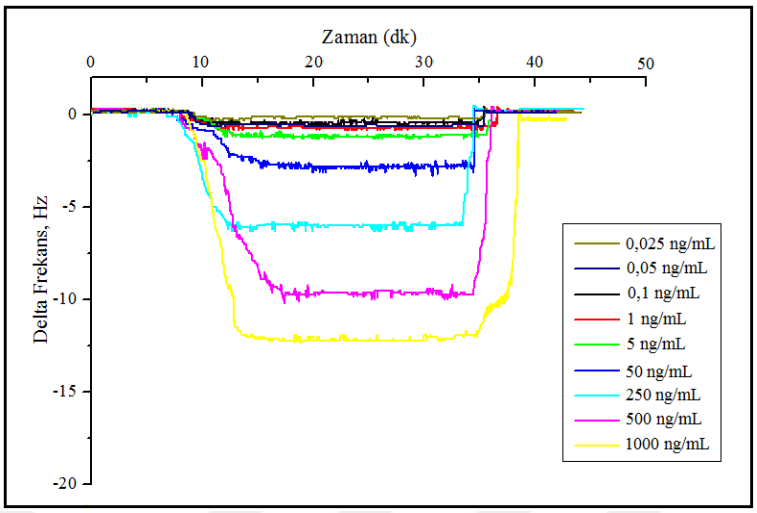
1/3 ve 1/2 (C6-HSL: AAm) oranına ait pH incelemesi yapılırken C6-HSL baskılanmış QCM çipler üzerindeki etkisi, pH 5.0-8.0 aralığında incelenmiştir. Sonuç olarak C6-HSL molekülünün çözünürlüğü ve kararlılığı maksimum 1/3 oranında pH 7.0'de olduğu gözlenmiştir. Bu aşamadan sonra deneylere 1/3 oranına sahip baskılanmış membranlar ile devam edilmiştir.

4.3 C6-HSL Baskılanmış QCM Çiplerde C6-HSL Tayinine Derişimin Etkisi

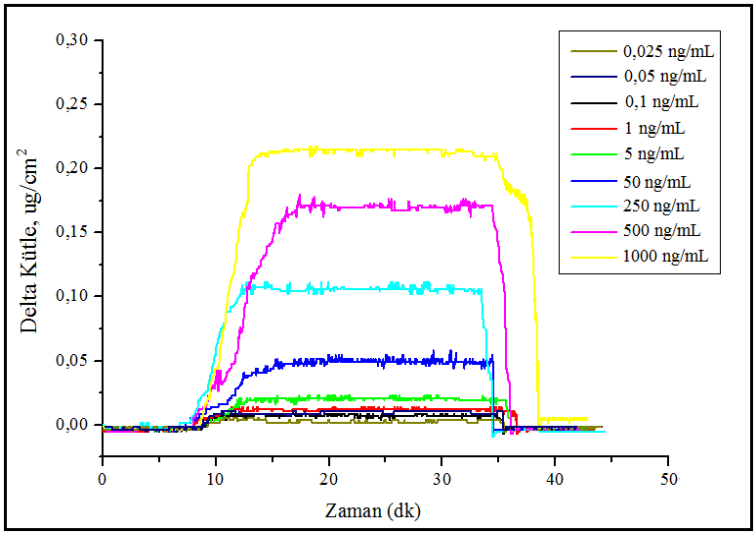
Lakton moleküllerinin QCM çiplerde başlangıç derişiminin etkisini saptamak amacıyla, farklı derişimlerde (0,025-1000 ng/mL) lakton çözeltileri hazırlanarak QCM sistemine verilmiştir. Çalışılan derişim aralığı, düşük derişimden yüksek derişime doğru artan oranları göz önüne alınarak seçilmiştir. Hazırlanan lakton çözeltileri peristaltik pompa aracılığıyla QCM sensörlerle etkileştirilmiştir. Elde edilen veriler eş zamanlı olarak izlenmiş ve kaydedilmiştir (Şekil 4.9). Farklı derişimlerdeki lakton çözeltilerinin sensöre gönderilmesi ile zamana karşı elde edilen frekanstaki sinyal değişim (Δf) değerlerini ve kütle artışını (Δm) gösteren grafikler verilmiştir.

Sisteme ilk olarak dengeleme tamponu yaklaşık 10 dakika boyunca gönderilmiş, Ardından, ortalama 20 dakika boyunca sistemden C6-HSL çözeltisi gönderilip QCM çiplerle etkileştirilmiştir. Son adımda ise, yaklaşık 15 dakika boyunca desorpsiyon çözeltisi (0,5 M NaCl; %2'lik DMF çözeltisinde hazırlanan) kullanılmıştır. Grafiklerden anlaşılacağı üzere, artan C6-HSL derişimi ile birlikte sensördeki Δf düşüşü, Δm artışı ile sonuçlanmıştır. QCM çiplerin kalıp moleküle (N-Heksanoil-L-homoserin lakton) karşı duyarlı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, kısa bir zaman içerisinde

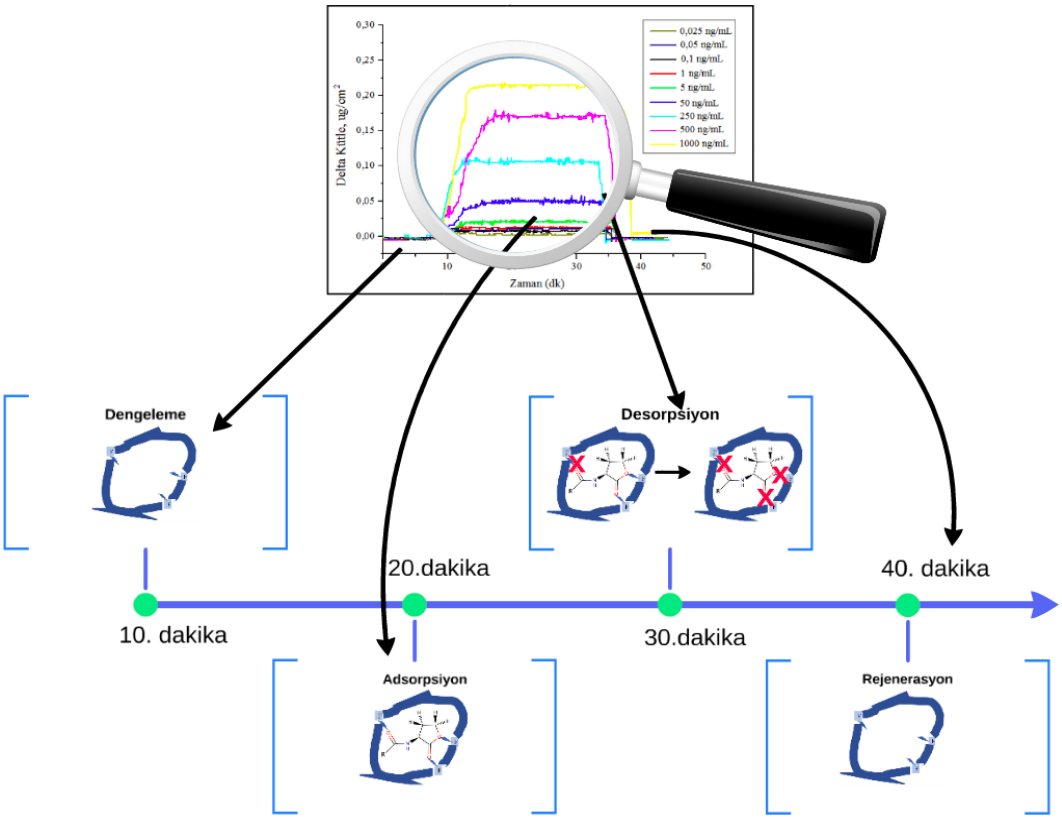
sistemin düşük derişimlerde de hızlı yanıt verdiği sensörgramdan alınan sinyallerde görülmektedir.



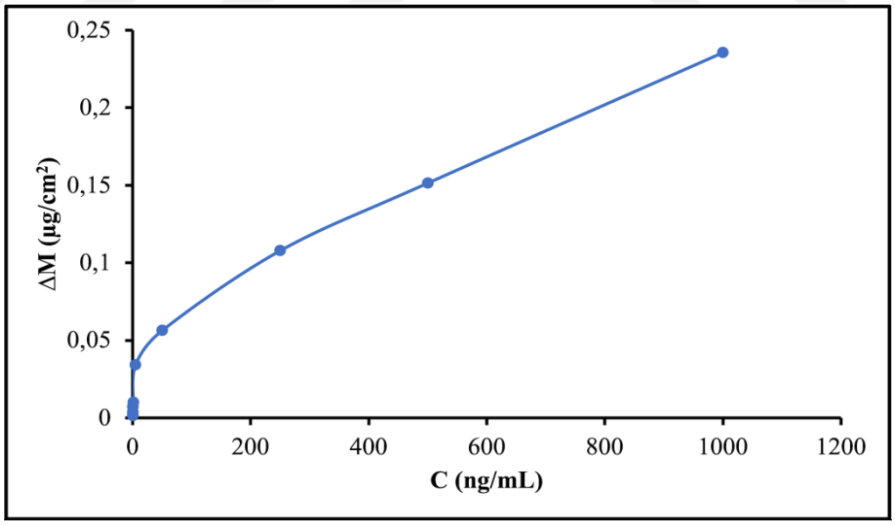
Şekil 4.9. C6-HSLBaskılanmış QCM ÇiplerdeC6-HSL Tayinine Derişimin Etkisi. Delta Frekans-Zaman Grafiği. pH: 7.0; akış hızı: 0.5 mL/dak.;T: 25 ºC.



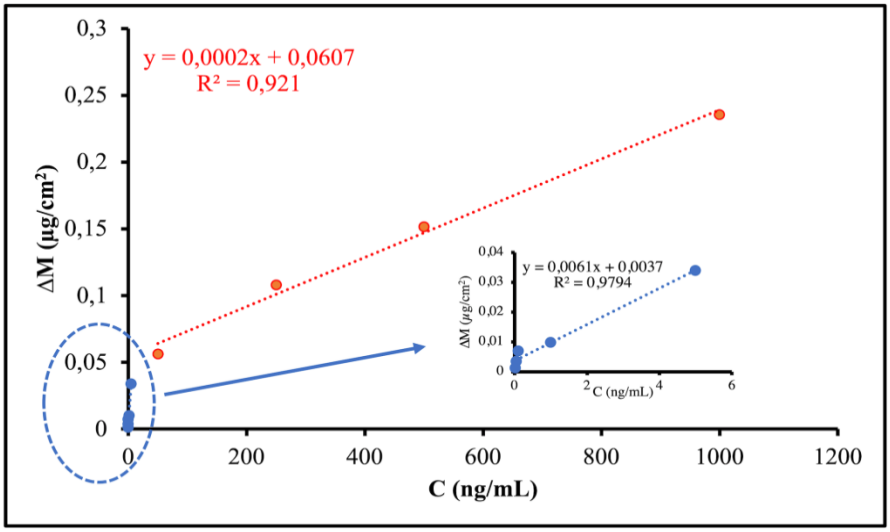
Şekil 4.10. C6-HSLBaskılanmış QCM Çiplerde C6-HSL Tayinine Derişimin Etkisi. Delta Kütle-Zaman Grafiği. pH: 7.0; akış hızı: 0.5 mL/dak.; T: 25 ºC.



Şekil 4.11. Dengeleme-Adsorpsiyon-Desorpsiyon-Rejenerasyon Döngüleri.



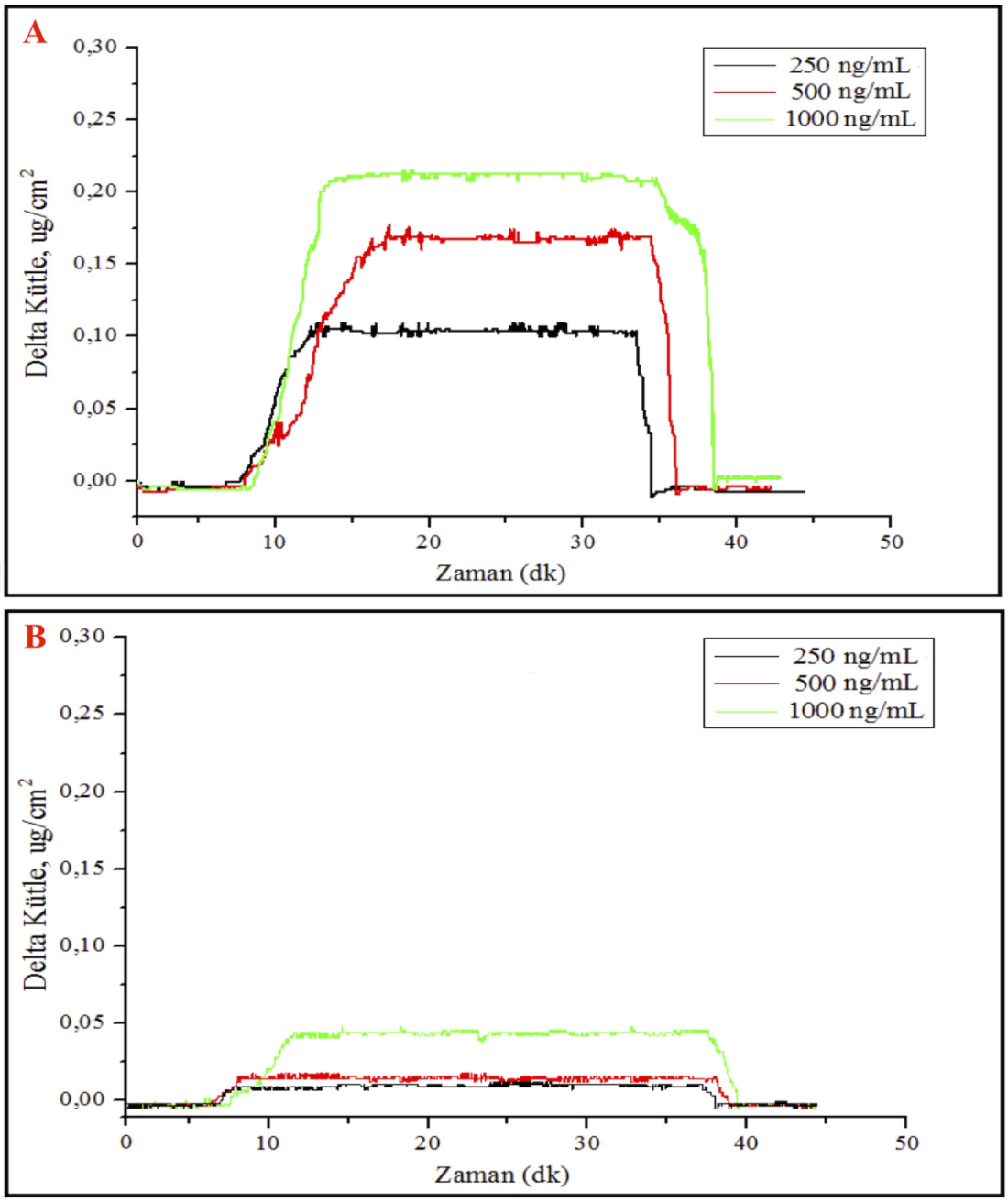
Şekil 4.12. Derişime karşı Δm değişiminin grafiği. pH: 7.0; akış hızı: 0,5 mL/dak.; T: 25 ºC.



Şekil 4.13. C6-HSL baskılanmış QCM sensöre ait derişim ile Delta Kütle (Δm) arasındaki bağıntı. pH: 7.0; akış hızı: 0,5 mL/dak.;sıcaklık: 25 ºC.

C6-HSL derişiminin artışı ile delta kütledeki (Δm) değişim Şekil 4.13'te verilmiştir. Farklı C6-HSL derişim aralıkları için iki farklı derişim doğrusallığı da hesaplanmıştır. 0,025-0,05 ng/mL ile 0,1-1000 ng/mL aralıkları için doğruların denklemleri sırasıyla (y = 0,0061x + 0,0037) ve (y = 0,0002x + 0,0607) ve doğrusallıklarıysa (R^2) sırasıyla 0,9794 ve 0,921 olarak bulunmuştur. Böylece, yüzeyin düşük derişimdeki çalışma aralığının afinitesi yüksek derişime oranla daha fazla olduğu görülmektedir.

C6-HSL baskılanmamış membranlar üzerine derişim etkisi de farklı derişimlerde (250-500-1000 ng/mL) incelenmiş ve sensörün verdiği sinyaller kaydedilmiştir. Şekil 4.14'te görüleceği üzere, ortamın derişimi arttıkça spesifik olmayan tutunmanın arttığı fakat C6-HSL baskılanmış membranlardan elde edilen yanıtlara nazaran oldukça düşük bir bağlanma kapasitesiyle sonuçlanmıştır.



Şekil 4.14. C6-HSL baskılanmış (A) ve baskılanmamış (B) QCM sensörün derişim grafikleri.

4.4 QCM Çip-Analit Etkileşimlerinin Analizi

4.4.1 Denge analizi

Total ligand miktarı, yüzeydeki maksimum analit bağlama kabiliyeti olarak belirtildiğinde; diğer bütün derişim değerleri QCM yanıtı olarak değerlendirilebilir. Böylece, kütlenin derişime çevrilme sürecinin yapılmasına ihtiyaç duyulmayacaktır. Serbest analitin derişimi akış hücresinde sabit olduğu yalancı-birinci derece koşullarda bağlanma ifadesi aşağıdaki gibidir:

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

Bu eşitlikte; $d\Delta m/dt$, QCM sinyalindeki değişimin hızı; m ve m_{max}, bağlanmayla ölçülen ve maksimum kütle artış sinyalleri (ug/cm^2); C, analitin derişimi (ng/mL), k_a, bağlanma hız sabiti (mL/ng.s) ve k_d, ayrılma hız sabiti (1/dk)'dir. Bağlanma sabiti K_A (mL/ng), k_a ve k_d sabitlerinin oranından hesaplanır ($K_A=k_a/k_d$). Denge durumunda ise, $d\Delta m/dt = 0$ alınarak eşitlik basitleştirilir:

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

Buradan, bağlanma sabiti olan K_A, $\Delta m_{denge}/C$'ye karşı Δm_{denge} grafiği yardımı ile bulunur. $1/K_A$ eşitliği üzerinden ayrılma sabiti K_D bulunur.

4.4.2 Bağlanma kinetik analizi

Eşitlik 4.1 tekrardan düzenlenirse aşağıdaki Eşitlik.4.3 elde edilir.

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

Böylece, etkileşim kontrollü kinetikler için elde edilen $d\Delta m/dt$'ye karşı ΔR grafiğinin, eğimi $-(k_aC + k_d)$ olan bir doğru oluşturduğu görülmektedir. Başlangıçtaki bağlanma hızının analit derişimi ile doğrusal bir korelasyon içerisindedir, kantitatif açıdan derişimin saptanmasında kullanılır. m_{max} değerinin bilinmesi koşulu ile sadece bir tane sensorgramdan yararlanılarak k_a ve k_d parametreleri hesaplanabilir. Yüzeyin tümüyle doygunluğa ulaşması için yüksek analit derişimlerine ihtiyaç olduğundan m_{maks}'ın deneysel açıdan belirlenmesi güçtür. Öncelikle tercih edilen girişim, birçok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensorgramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların incelemesi için oluşturulan grafikler ($d\Delta m/dt$'ye karşı Δm), ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile korele bir eğim (S) değeri vermektedir:

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

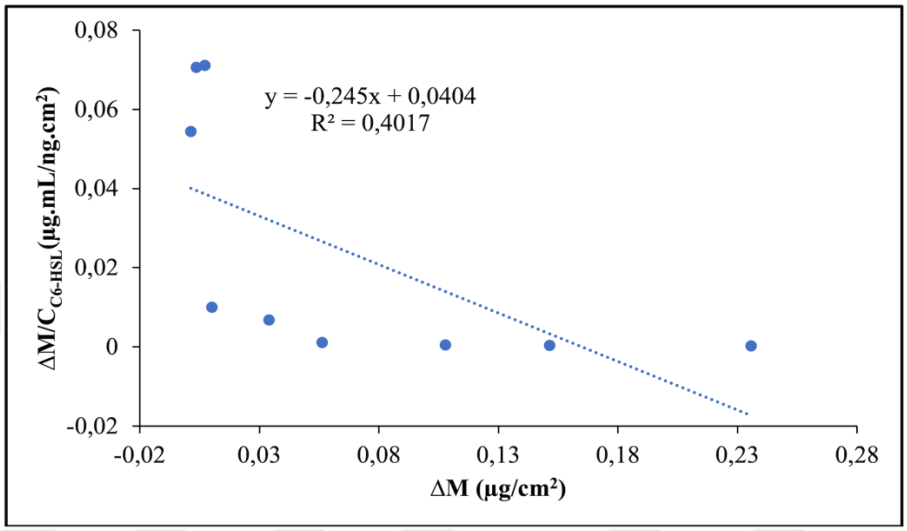
Eğim değeri k_a olan doğru, S'ye karşı C grafiğinden elde edilmektedir. Teorikte kesim noktası k_d değerini vermektedir. Ancak, k_d'nin hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir ($k_aC >> k_d$ olduğu şartlarda) Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

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

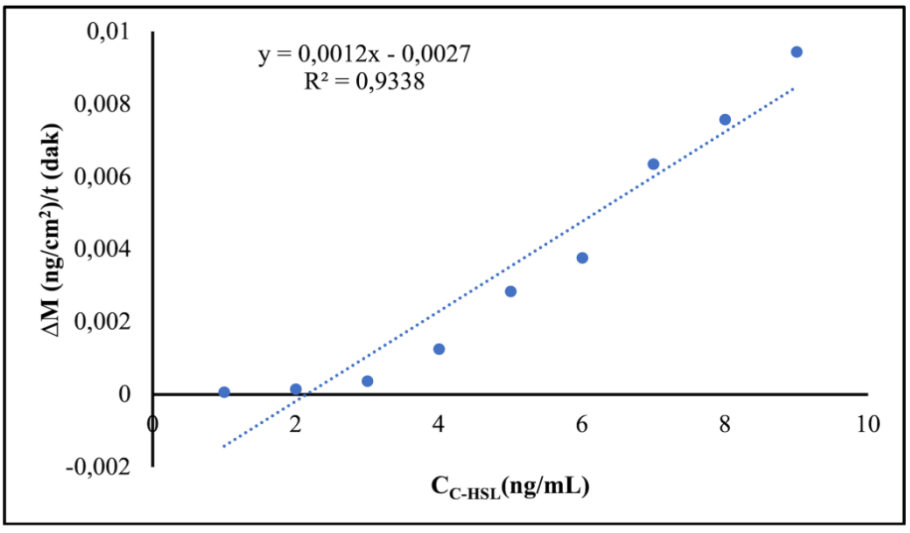
Bu eşitlikte; Δm_o ve Δm_t, ayrılma eğrisinde bulunan t_o ve t esnalarındaki QCM sinyallerinin değerleridir. Şekil 4.15'te denge analizi, Şekil 4.16'da ise bağlanma kinetik analizinin doğruları verilmiştir. Bu doğrulardan hesaplanan Δm_{maks}, k_a, k_d, K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Bağlanma kinetik analizleri sonucu kinetik parametreler.

Kinetik parametreler			
Bağlanma kinetik analizi		**Denge analiz (Scatchard)**	
k_a, ng/mL.dak.	0,0559	ΔM_{maks}, µg/cm^2	6,05
k_d, 1/dak	7,07	K_D, ng/mL	4,08
K_A, ng/mL	3,5 x 10^{-5}	K_D, M	2,5 x 10^{-5}
K_D, mL/ng	0,9687	R^2	0,4017
R^2	0,9338		



Şekil 4.15. C6-HSL baskılanmış QCM sensörün denge kinetik analiz doğrusu (Scatchard).



Şekil 4.16. C6-HSL baskılanmış QCM sensörün denge kinetik analiz doğrusu.

4.5 Denge İzoterm Modelleri

Lakton baskılanmış QCM sensör ve lakton molekülleri arasında meydana gelen etkileşim modelini tanımlamak amacıyla aşağıda verilen izoterm modelleri utgulanmıştır.

Scatchard	$\Delta m_{denge} /[C] = K_A(\Delta m_{maks} - \Delta m_{denge})$	(4.6)
Langmuir	$\Delta m = \{\Delta m_{maks}[C]/K_D+[C]\}$	(4.7)
Freundlich	$\Delta m = K_F[C]^{1/n}$	(4.8)
Langmuir-Freundlich	$\Delta m = \{\Delta m_{maks}[C]^{1/n}/K_D+[C]^{1/n}\}$	(4.9)

Δm_{maks}: QCM'deki maksimum sinyal kayması

Δm_{denge}: denge durumundaki QCM sinyal kayması

$[C]$ (ng/mL): mevcut analitin derişimi

K_A (ng/mL): bağlanma denge sabiti

K_D (mL/ng) : ayrılma denge sabiti

$1/n$: Freundlich yüzey heterojenite indeksi

Tanıma kabiliyetine sahip yüzeyler homojen ve heterojen olmak üzere iki kategoriye ayrılabilirler. Homojen sistemlerde, bütün bağlanma bölgeleri, bağlanma boşluklarının derinlikleri aynı ve şekilleriyle gösterildiği gibi aynı afiniteye ve seçiciliğe sahiptir. Buna karşılık, heterojen sistemlerde ise, değişen derinlik ve şekillerde değişken afinite ve seçiciliğe sahip bağlayıcı bölgeler içerebilirler. MIP'lerde yüzey heterojenliğini azaltmak için, baskılama işleminin optimizasyonu veya yüzeyin kimyasal modifikasyonu gibi çeşitli yöntemler uygulanmıştır [178]. En başarılı yol stokiyometrik veya kovalent baskı mekanizmalarını kullanmak olmuştur [179].



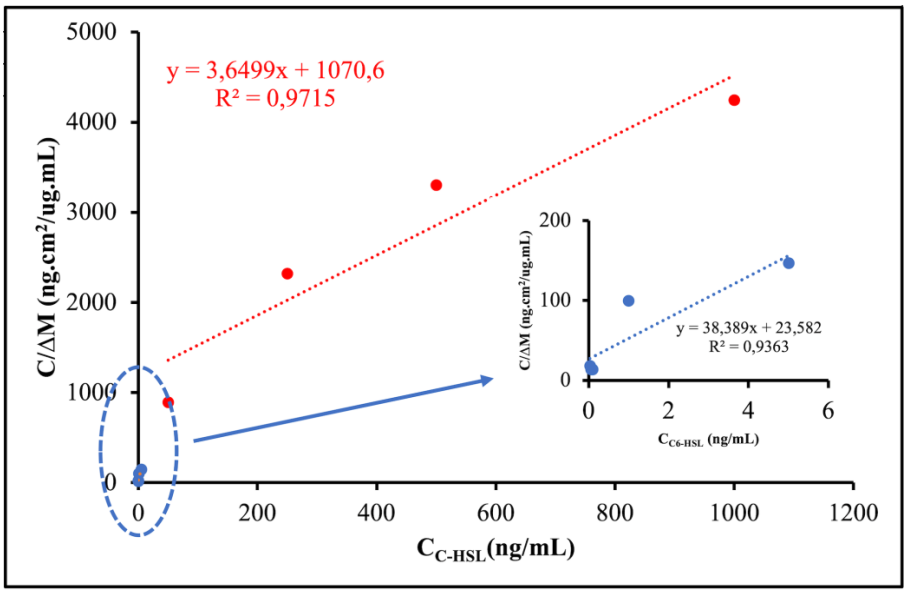
Şekil 4.17. MIP'lerde bağlanma bölgesi homojenliği ve heterojenliğinin şematik gösterimi.

Langmuir izoterm modeli, adsorbentin dış yüzeyinde tek tabakalı adsorbant yüzey oluşumunu kantitatif olarak açıklar ve mevcut tabakada başka bir adsorpsiyon

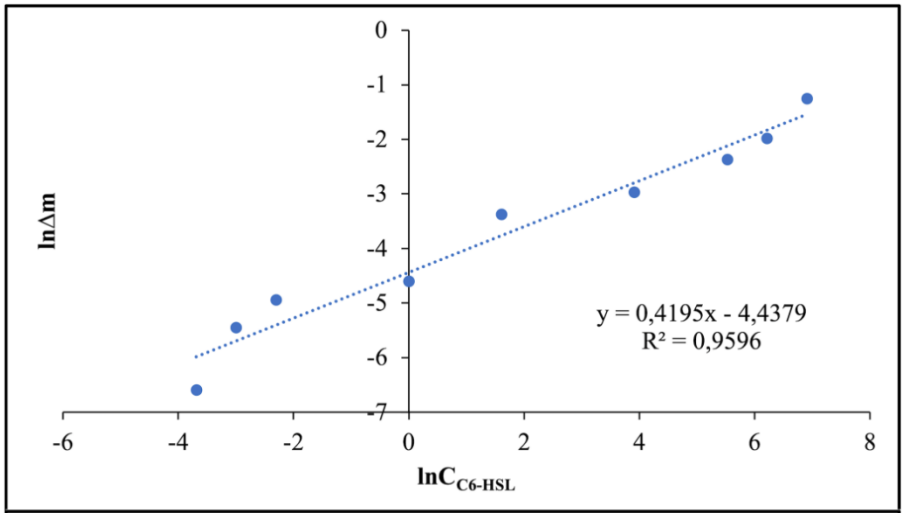
olmadığı esasına dayanır. Adsorbent yüzeyinde eşit enerjiye sahip belirli bir sayıda aktif tanıma bölgesinin bulunduğu ve burada oluşan adsorpsiyonun tersinir olduğu izoterm şeklidir [180].

Yüzeydeki adsorpsiyon hızı ile desorpsiyon hızın eşitlendiğinde dengeye ulaşılır. Langmuir tek tabakada adsorpsiyonun gerçekleştiğini ve yüzeyin homojen bir yapıda olduğunu varsayan izoterm modelidir. Yüzey denge anında en yüksek adsorplama miktarına ulaşır.

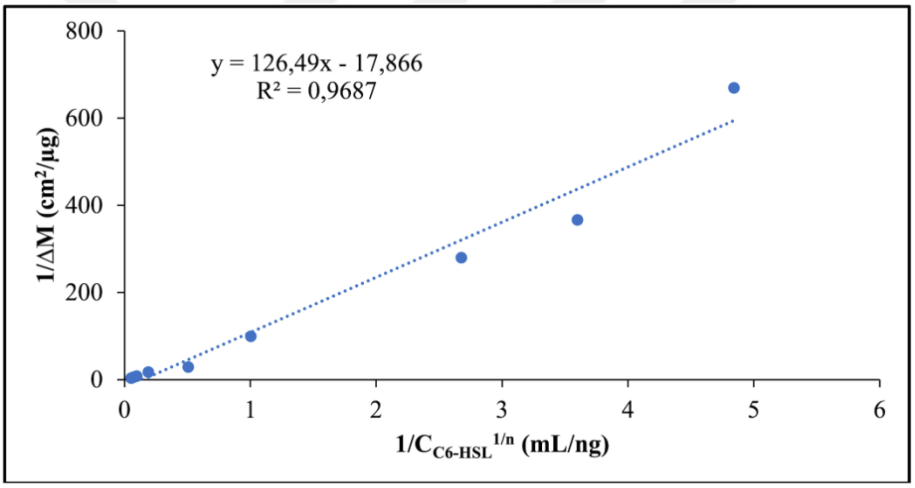
Freundlich izotermine göre, bir adsorbanın yüzeyinde var olan adsorpsiyon alanları heterojen olup farklı yapıdaki adsorpsiyon alanlarından oluşmuştur [181]. Düşük derişimlerde Freundlich izoterm modeli MIP'lere uygunluk gösterdiği bilinmektedir [182]. Langmuir-Freundlich modeli, heterojenite durumlarda düşük derişimlerde doygunluğa ulaşana kadar MIP sistemleriyle uygunluk gösterdiği literatürde mevcuttur. Ancak, Freundlich modeli, yüksek derişimlerde bazı sapmalara neden olmaktadır. Meydana gelen sapmaları önlemek amacı ile Langmuir- Freundlich modeli kullanılmaktadır [181]. Langmuir (Şekil 4.18), Freundlich (Şekil 4.19) ve Langmuir-Freundlich (Şekil 4.20) modellerine ait grafikler aşağıda çizilmiştir.



Şekil 4.18. Langmuir adsorpsiyon izotermleri.



Şekil 4.19. Freundlich adsorpsiyon izotermleri.



Şekil 4.20. Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izotermleri.

Çizelge 4.3. C6-HSL baskılanmış QCM sensör için Langmuir, Freundlich parametreleri.

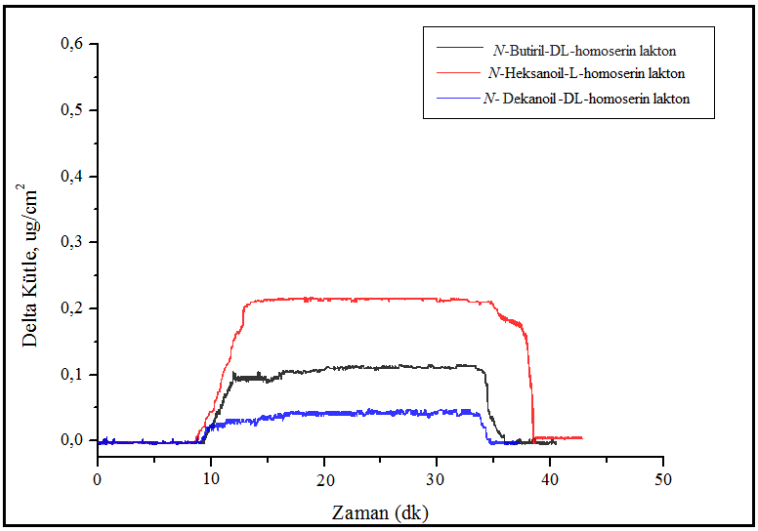
İzotermler							
Langmuir		**Freundlich**		**Langmuir-Freundlich**		**Scatchard**	
ΔM_{maks}, µg/cm²	0,274	ΔM_{maks}, µg/cm²	0,118	ΔM_{maks}, µg/cm²	0,0559	ΔM_{maks}, µg/cm²	6,05
KD, ng/mL	293,4	1/n	0,4195	KD, ng/mL	7,07	KD, ng/mL	4,08
K_D, M	1,5 x 10^{-3}	R^2	0,9596	K_D, M	3,5 x 10^{-5}	K_D, M	2,5 x 10^{-5}
R^2	0,9715			R^2	0,9687	R^2	0,4017

Çizelge 4.3'teki adsorpsiyon izotermlerine göre, etkileşimlerin Langmuir modeline uyumlu olduğu (R^2=9715) sonucu ortaya çıkmıştır. Bu bilgiler ışığında; hazırlanan C6-HSL baskılanmış QCM çipin çalışma aralığının Langmuir modelinde düşük derişimlerde %93'lük bir oranda iken yüksek derişimlerde ise %97 doğrulukta olduğu belirlenmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucu; Langmuir ve Freundlich korelasyon

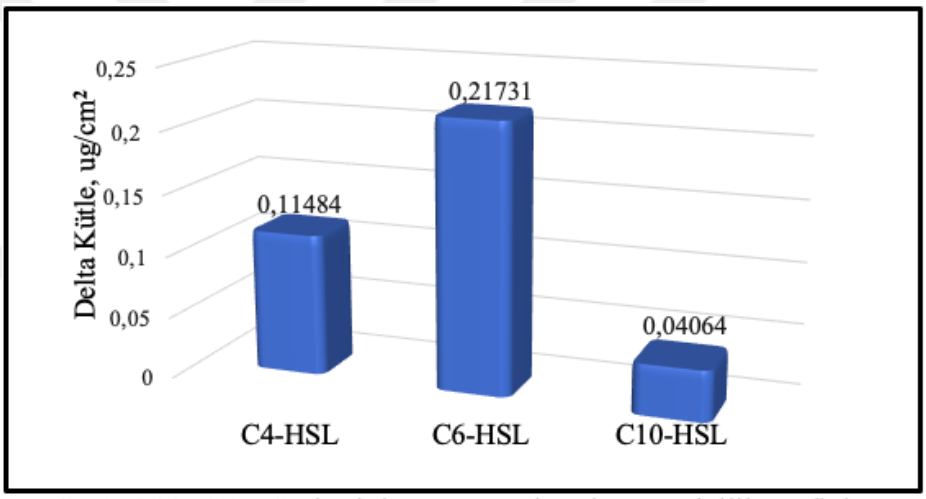
katsayısı (R^2) değerleri birbirine yakın olması sebebiyle Langmuir-Freundlich adsorpsiyon modeline de başvurulmuştur. Langmuir-Freundlich modelinde ise R^2 değerinin %96 doğrulukta olması etkileşimlerin hem Langmuir hem de Freundlich modeline uygun olduğu sonucunu doğurmuştur.

4.6 Yarışmalı Kinetik Analizler

Kuvars Kristal Mikroterazi sensör yüzeyinde oluşturulan C6-HSL baskılanmış membranların seçiciliğini göstermek için çalışmamızda kullanmış olduğumuz C6-HSL yapısına benzer olan N-Bütiril-DL-Homoserin Lakton (C4-HSL) ve N-Dekanoil-DL-Homoserin Lakton (C10-HSL) moleküllerinin çözeltileri (1000 ng/mL, pH 7.0, %2'lik DMF çözeltisinde çözünmüş halde bulunan) hazırlanıp QCM sistemine gönderilerek yarışmalı adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çözeltiler QCM sensörlerle etkileştirilip veriler kaydedilmiştir. C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL molekülleri için dağılma katsayısı (K_d), seçicilik katsayısı (k)ve bağıl seçicilik katsayısı (k') Çizelge 3.1 eşitliğine göre hesaplanmıştır. Sensörün C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL çözeltilerine verdiği cevap Şekil 4.21'de Δm/zaman grafiğinde görülmektedir. Yarışmacı molekülleri seçerken, kalıp molekülden (C6-HSL) bir uzun (C10-HSL), bir tane de kısa açil grubuna sahip olan (C4-HSL) iki molekül seçilmiştir. Bundan dolayı hem boyut hem de kimyasal yapıdaki değişikliklerin etkisi incelenmiştir. C6-HSL baskılanmış sensörden alınan C4-HSL ve C10-HSL için sensörgram sinyal yanıtları ise (Δm) sırasıyla 0,11484 ve 0,04064'tür. Aynı derişime sahip C6-HSL için sensörden alınan yanıt ise 0,21731'dir. Bu veriler ışığında C6-HSL baskılanmış sensörün C6-HSL'yi, C4-HSL'ye karşı 1,892 kat; C10-HSL'ye karşı 5,347 kat daha hassas olduğu sonucunu ortaya çıkmıştır. Etkileşimdeki bu duyarlılık, kalıp molekül olan C6-HSL molekülündeki karakteristik üç boyutlu yapının polimerik hafızaya alınması nedeniyledir.



Şekil 4.21. C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL moleküllerinin C6-HSL baskılanmış (MIP) QCM sensöre verdiği kütle-zaman grafiği; Çözelti derişimleri: 1000 ng/mL.

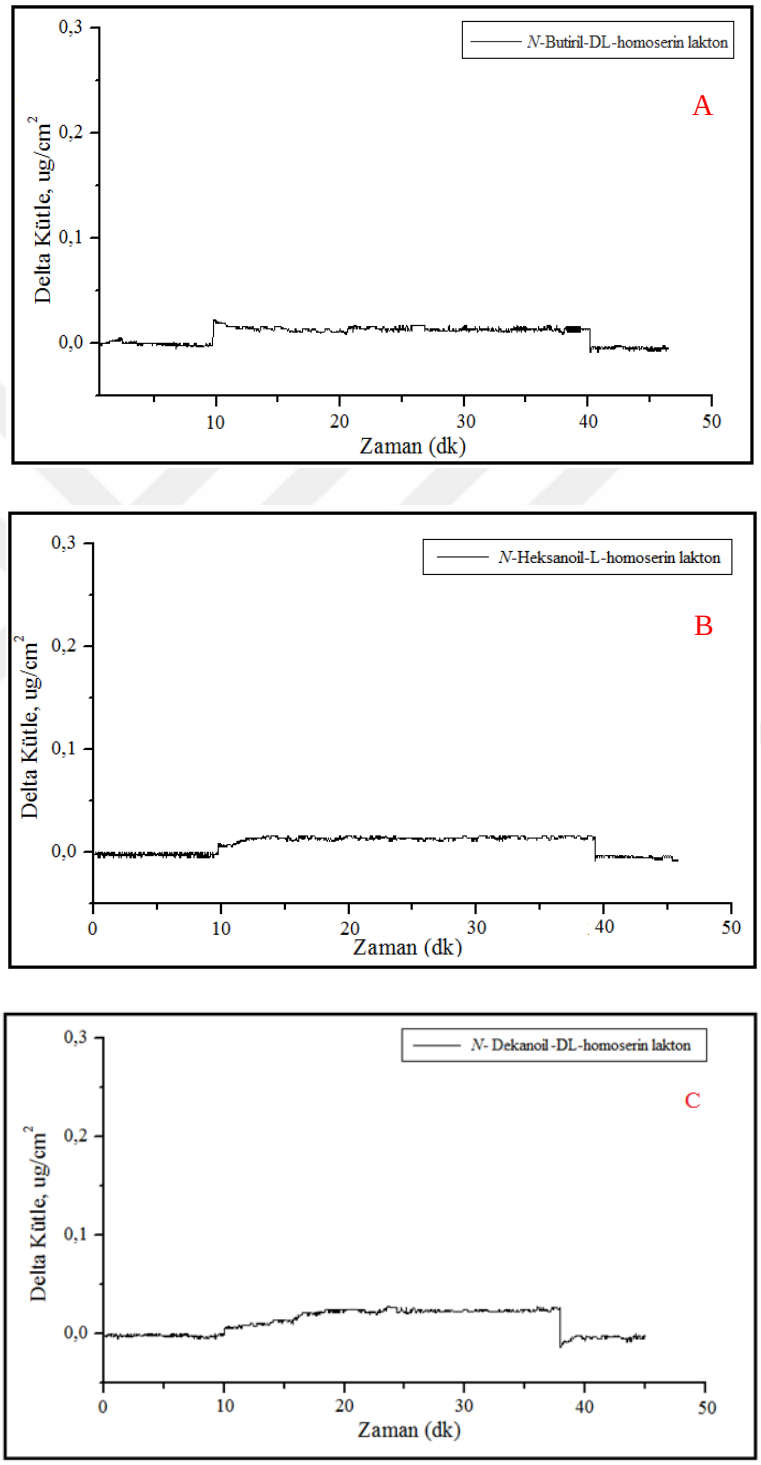


Şekil 4.22. C6-HSL baskılanmış membranların seçicilik grafiği.

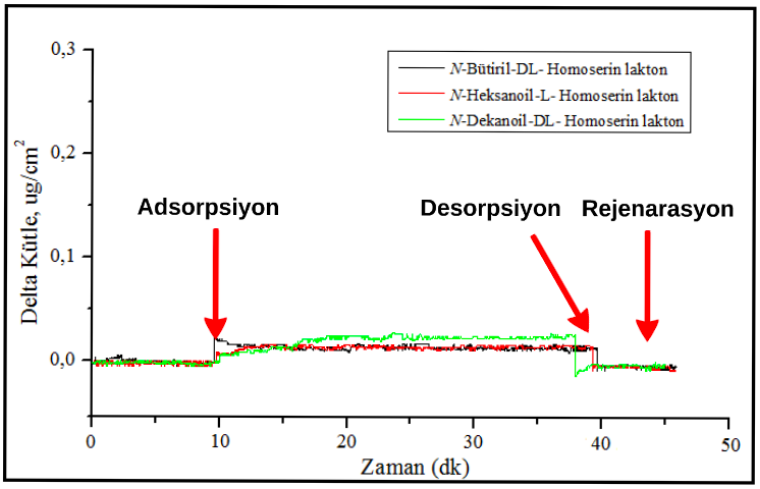
4.7 Sensörün Seçicilik Deneyleri

Lakton baskılanmış sensörün seçiciliğini göstermek için C6-HSL baskılanmamış sensör de hazırlanmıştır. Bu amaçla, pH 7.0, 1000 ng/mL derişimlerindeki C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL çözeltileri lakton baskılanmamış QCM düzeneğine peristaltik pompa yardımı ile gönderilmiştir. Baskılanmamış sensörün C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL çözeltilerine verdiği yanıt Şekil 4.23'te gösterilmiştir. Lakton baskılanmamış sensörün çözeltilerle sistemden alınan sinyalin değerleri sırasıyla (Δm) 0,02297,

0,0159 ve 0,02897'dir. Sistemin aynı derişimdeki C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL çözeltilerine karşı sinyal artışı bir hayli düşük olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.23. C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL moleküllerinin baskılanmamış (NIP) QCM sensöre karşı verdiği kütle-zaman grafiği; Çözelti derişimleri: 1000 ng/mL.



Şekil 4.24. C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL moleküllerinin C6-HSL baskılanmamış (NIP) QCM sensöre karşı verdiği toplu haldeki kütle-zaman grafiği; Çözelti derişimleri: 1000 ng/mL.

Sensörgramdan elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında; C10-HSL molekülüne karşı alınan sinyalin değeri C4-HSL ve C6-HSL çözeltilerinden daha fazladır. Bunun nedeni; C10-HSL yapısında bulunan hidrofobik yüzeylerin diğer iki moleküle göre daha fazla non-spesifik etkileşim alanına sahip olmasındandır. Bu durum ikincil etkileşimlerin artmasına (Van der Waals etkileşimleri gibi) dolayısı ile daha fazla non-spesifik adsorpsiyona neden olmaktadır.

Bu sonuçlar ışığında; C6-HSL baskılanmış sensör; C6-HSL'yi C4-HSL'ye göre 1,892 kat, C10-HSL'ye göre 5,347 kat daha fazla seçicilikle tanımaktadır. Bu sonuçlara göre, N-Heksanoil-L-homoserin lakton baskılanmış sensörün 6C'lu lakton moleküllerine karşı oldukça seçici olduğu görülmektedir. MIP ve NIP QCM sensörler için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları sonuçları Çizelge 4.4'te görülmektedir. C4-HSL sinyal duyarlılığı 1,892 kattan 0,692'ye, C10-HSL için ise 5,347 kattan 0,548'e düştüğü görülmektedir. Baskılama seçiciliğine atfedilen bağıl seçicilik katsayısı ise (k') C4-HSL ve C10-HSL için sırası ile 2,734 ve 9,757 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, molekül yapıları ve ağırlıkları bakımından birbirilerine yakın olan bu iki molekül arasında 2,734 ve 9,757 katlık ayırma faktörü ile etkili bir değere sahip olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

Çizelge 4.4. C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

	MIP		NIP		
	Δm	k	Δm	k	k'
C4-HSL	0,11484	1,892	0,02297	0,692	2,734
C6-HSL	0,21731	-	0,0159	-	
C10-HSL	0,04064	5,347	0,02897	0,548	9,757
k: Seçicilik katsayısı: $\Delta M_{template}/\Delta M_{competitor}$ k': Bağıl seçicilik katsayısı:k_{MIP}/k_{NIP}					

4.8 Kompleks Ortamdan C6-HSL Tayini

Kompleks ortam deneyi için, metanolde hazırlanan C4-HSL, C6-HSL, C10-HSL karışımı içeren çözeltilerden (pH 7.0, 1000 ng/mL) seçicilik deneyleri gerçekleştirilmiştir. Buradaki hedef, sensörün hedef moleküle olan spesifikliğini saptamak ve kompleks bir ortamda diğer yarışmacı ajanlara karşı davranışlarını belirlemektir. Bu amaçla, C4-HSL, C6-HSL, C10-HSL karışımı içeren toplam 30 mL'lik çözelti QCM düzeneğine peristaltik pompa yardımı ile gönderilmiştir. Baskılanmış sensörün C6-HSL çözeltilerine verdiği yanıt Şekil 4.25'te gösterilmiştir.

QCM cihazından elde edilen sonuçlar GC-MS (7890N/5975, Agilent, USA) cihazı kullanılarak sonuçlar analiz edilmiştir. Analizler için yeni bir metot geliştirilip uygulanmıştır. Burada, birçok deneme sonucunda elde edilen seçicilik ve analiz süresi açısından en iyi sonuçlar şöyledir; AHL'lerin kromatografik olarak ayrılması için bir HP-5 MS kapiler kolonu (30 m uzunluk × 0.25 mm iç çap × 0.25 μm film kalınlığı) kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi, 10 μL, splitless modda (0.8 mL/dk) ayarlanmıştır. Saf helyum (%99,999), 20 mL/dk akış hızında GC taşıyıcı gazı olarak kullanılıp, GC enjektör sıcaklığı 150 ºC'ye ayarlanmıştır. Sıcaklık artışları aşağıdaki çizelgedeki gibidir.

Çizelge 4.5. GC-MS için uygulanan sıcaklık değerleri.

	ºC/dk	ºC	Süre /dk
Başlangıç		150	0
1. kademe	10	150	7
2. kademe	5	220	13
3. kademe	0,5	252,5	18

Kütle spektrometrisi koşulları ise; iyonizasyon kaynağı 70 eV, MS Quad 150 ºC, emisyon akımı 500 μA olarak ayarlanmış. MS Source 230 ºC, veriler tam tarama modu

(m/z 35-800) ve seçilen iyon izleme (SIM) modu (m/z 143) kullanılarak elde edilmiştir.

Yukarıda belirtilen metotlar uygulanarak 1 ppm'lik başlangıç konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltilerin alıkonma zamanları sırasıyla belirlenmiştir (Çizelge 4.6.). Başlangıç olarak 1 ppm konsantrasyona sahip çözeltiler sırasıyla GC-MS cihazında analiz edilmiş (Şekil 4.25); ardından, QCM sistemden geçirilen üçlü karışım GC-MS cihazında analiz edilmiştir. GC-MS'den elde edilen alıkonma süreleri aşağıdaki gösterilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Moleküllerin alıkonma süreleri.

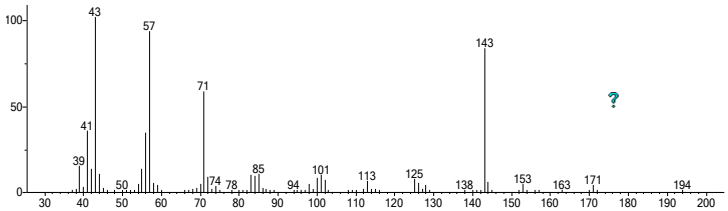
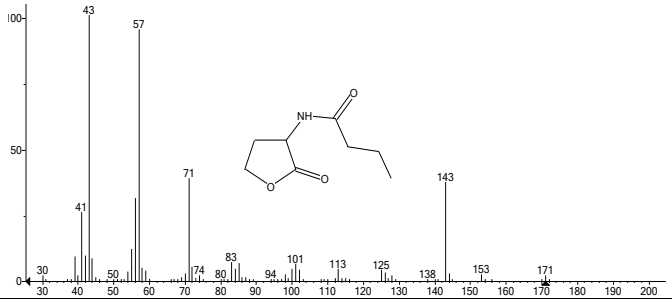
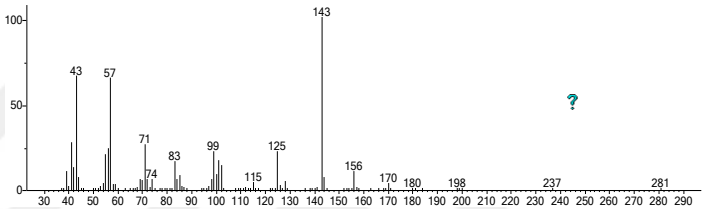
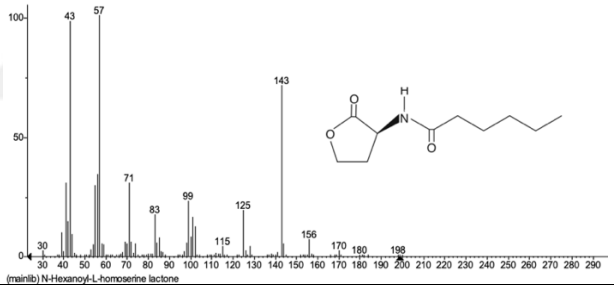
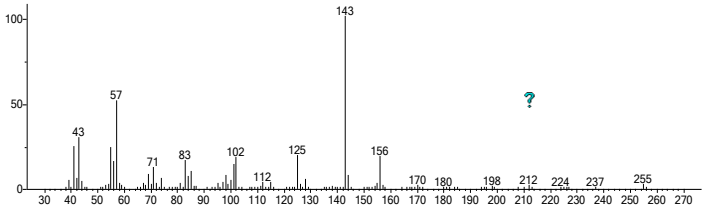
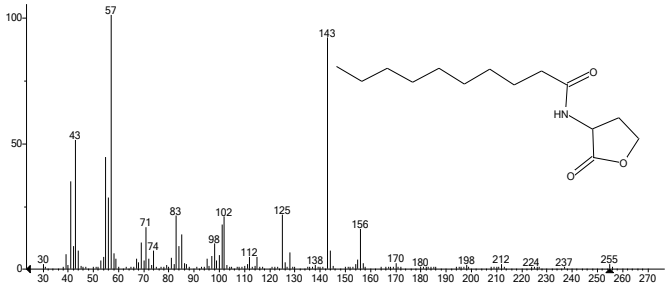
Madde	Alınkonma süresi /dk
C4-HSL	2,781
C6-HSL	4,310
C10-HSL	8,120

Başlangıç derişimleri 1 ppm konsantrasyona sahip her bir çözeltinin başlangıç ve son kromatogramları karşılaştırıldığında; kompleks ortamda, C6-HSL baskılanmış polimerik membranın %74,81 ile C6-HSL molekülüne son derece duyarlı olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Etkileşimdeki bu duyarlılık, kalıp molekül olan C6-HSL'nin üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasındandır. %32,26 ile C4-HSL molekülü C10-HSL'ye nazaran (%3,76) fazla tutması ise 10C'lu molekülün yüzeydeki moleküler kavitelere sterik engel ve molekül büyüklüğünden bağlanmamasına atfedilebilir. Sonuç olarak, 6C'lu moleküle nazaran 4C'lu ve 10C'lu moleküller bağlanma sonucunda çok daha az seviyelerdeyken, sentezlenen moleküler baskılanmış polimerin C6-HSL sinyal molekülüne karşı son derece hassastır. Ayrıca, C6-HSL baskılanmış membranların seçiciliğini göstermek için yaptığımız çalışmada (Şekil 4.24) olduğu gibi tutunma miktarları GC-MS sonuçları ile koreledir. Bu sonuçlar, polimerik membranımızın başarılı bir şekilde sentezlendiği, QCM sensör ile efektif olarak çalıştığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

Çizelge 4.7. Moleküllerin GC-MS sonuçlarına göre tutunma yüzdeleri.

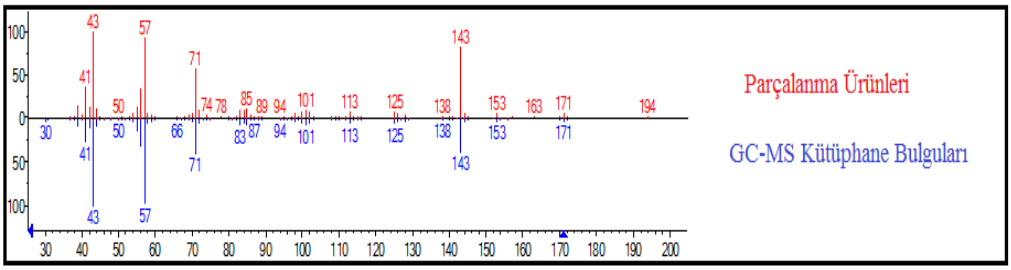
	Başlangıç Konsantrasyonu	İşlem Sonrası Kalan Konsantrasyon	Yüzde Tutunma
C4-AHL	1 ppm	0,6774 ppm	%32,26
C6-AHL	1 ppm	0,7481 ppm	%74,81
C10-AHL	1 ppm	0,0376 ppm	%3,76

Çizelge 4.8. A) GC-MS parçalanma ürünleri B) GC-MS kütüphane bulguları.

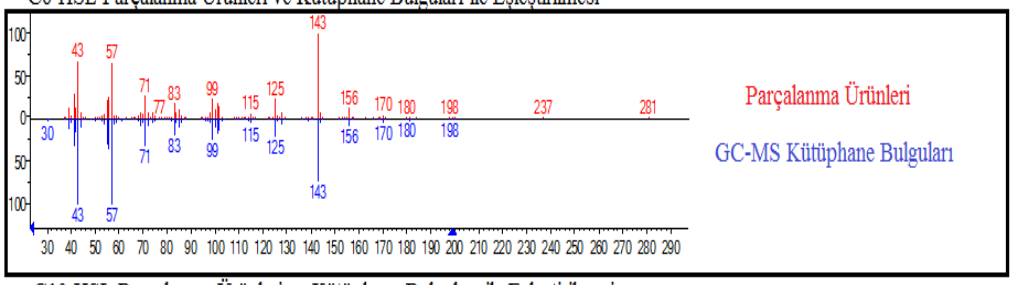
Madde	A) GC-MS Parçalanma ürünleri B) GC-MS Kütüphane bulguları
C4-HSL **A)**	
B)	
C6-HSL **A)**	
B)	 (mainlib) N-Hexanoyl-L-homoserine lactone
C10-HSL **A)**	
B)	

Çizelge 4.9. GC-MS parçalanma ürünleri ve kütüphane bulguları ile eşleştirilmesi.

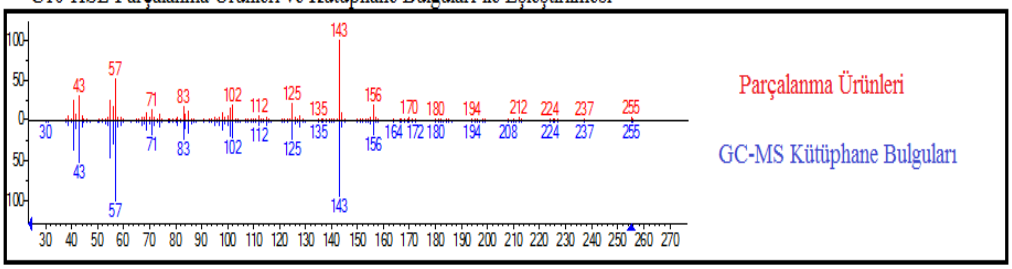
C4-HSL Parçalanma Ürünleri ve Kütüphane Bulguları ile Eşleştirilmesi



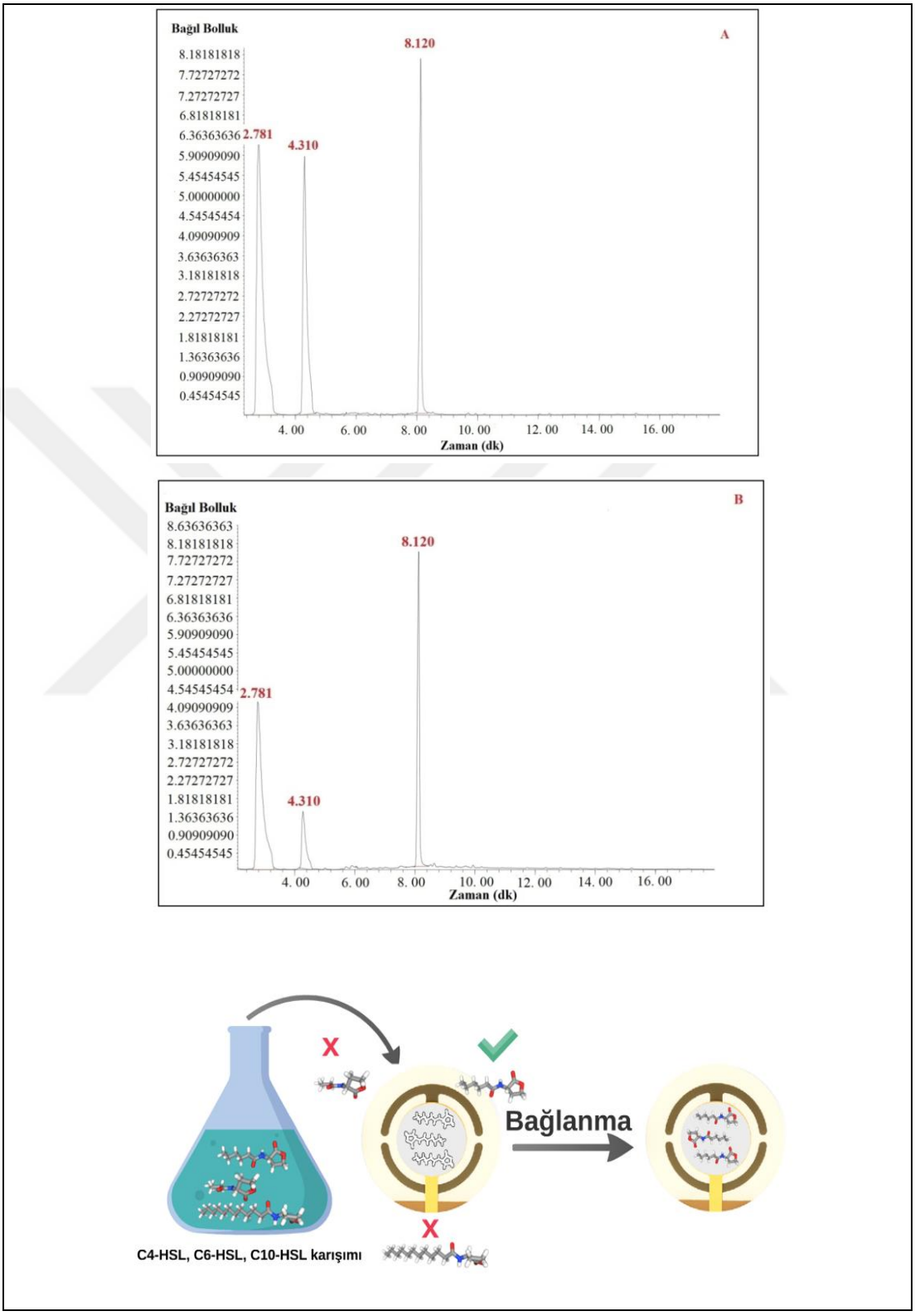
C6-HSL Parçalanma Ürünleri ve Kütüphane Bulguları ile Eşleştirilmesi



C10-HSL Parçalanma Ürünleri ve Kütüphane Bulguları ile Eşleştirilmesi



Çizelge 4.10. Kompleks ortamdaki başlangıç (A) ve sonuç (B) çözeltilerinin GC-MS sonuçları ve baskılanmış film yüzeyinin yarışmacı ajanlara karşı davranışı.



SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan deneyler sonucunda optimal C6-HSL/akrilamid kompleksleşme oranları belirlenmiştir. 1/2 ve 1/3 kompleksleşme oranındaki QCM/MIP performansları değerlendirilmiştir. En yüksek tutunma 1/3 kompleksleşme oranında gözlenmiş ve sonraki deneylere bu oran üzerinden devam edilmiştir. Hazırlanan C6-HSL baskılanmış polimerik filmlerin FTIR-ATR speftrofotometre analizi sonucu alınan spektrumdan kalıp molekülün yapıya girdiği ve polimerik membranların başarılı bir biçimde sentezlendiği görülmüştür. Moleküler baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin temas açısı deneylerinde ise, baskılanmış ve baskılanmamış polimerik filmler arasında 4° derecelik bir fark saptanmıştır. Bu fark, kalıp molekülde bulunan hidrofobik bölgenin yüzeyin hidrofilisitesine yorumlanmıştır. Baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) membranlar için elde edilen yüzeyin topografik değerleri sırasıyla ±40 nm ve ±18 nm olarak ölçülmüştür. Baskılanmış yüzeydeki meydana gelen tepe ve çukur benzeri yapılar, yüzeyin anatomisinde artışa neden olmuştur. Bu değişimler moleküler düzeydeki düzenlemelere atfedilmiştir. NIP yüzeyin topografik sayısal değeri daha düşük seviyelerde oluşmuş formdadır. Bu sonuçlar, baskılanmış yüzeye C6-HSL'nin başarılı bir şekilde yüzeye baskılandığını göstermektedir. FESEM analizleri ile baskılanmış membran yüzeyi düzensiz bir görünümdeyken, baskılanmamış polimerik membranda ise daha düzenli bir yüzey oluşmuştur. Bu amorf yapı; baskılanmış polimerik membranın polimerizasyon esnasında monomerler ile etkileşimde bulunduğunu, bundan dolayı membranın yüzeyinin düzensiz bir duruma geldiği şeklinde yorumlanabilir.

Karakterizasyon çalışmalarının ardından, QCM çiplerde C6-HSL tayinine pH'nın etkisi incelenmiştir. C6-HSL baskılanmış QCM çip yüzeyindeki en yüksek lakton adsorpsiyonu ise 1000 ng/mL C6-HSL derişiminde, pH 7.0'da görülmüştür. C6-HSL moleküllerinin QCM çiplerde başlangıç, derişiminin etkisi incelenirken, farklı derişimlerde (0,025-1000 ng/mL) çözeltiler hazırlanarak QCM sistemine verilmiştir. Artan C6-HSL derişimi sonucu sensörde Δf düşüşü (Δm artışı) ile sonuçlanmıştır. C6-HSL baskılanmış QCM çipler ile pH 7.0'da yürütülen deneyler sonucunda, 0,025-0,05 ng/mL ile 0,1-1000 ng/mL aralıkları için doğrusallıklar (R^2) sırasıyla 0,9794 ve 0,921 olduğu hesaplanmıştır. Bu sonuçlar; hazırlanan baskılanmış QCM çip çalışma

aralığının geniş tutulduğu ve düşük derişimlerde Freundlich modeline yüksek derişimlerde ise Langmuir modeline daha uygun olduğunu göstermektedir.

Baskılanmış membranların seçiciliğini göstermek için çalışmamızda kullanmış olduğumuz C6-HSL yapısına benzer, C4-HSL, C10-HSLmoleküllerininin çözeltileri (1000 ng/mL, pH 7.0) hazırlanıp QCM sistemine gönderilerek yarışmalı adsorpsiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, C6-HSL'nin, C4-HSL'e göre 1,892 kat; C10-HSL'e göre 5,347 kat daha hassas olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır. Etkileşimdeki bu duyarlılık, kalıp molekül olan C6-HSL'nun üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınması nedeniyledir.

Lakton baskılanmış sensörün seçiciliğini göstermek için C6-HSL baskılanmamış bir sensör hazırlanmıştır. Bu amaçla, pH 7.0'de hazırlanan 1000 ng/mL derişimlerindeki C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL çözeltileri lakton baskılanmamış, QCM düzeneğine peristaltik pompa yardımı ile gönderilmiştir. Sistemden elde edilen sonuçlara göre C4-HSL, C6-HSL ve C10-HSL çözeltilerinin sinyal değerlerinin çok düşük olduğu ve bu üç çözelti arasından en yüksek sinyal değerinin ise C10-HSL'ye ait olduğu kaydedilmiştir. Bu durum; C10-HSL'deki hidrofobik yüzeylerin diğer iki moleküle göre daha fazla non-spesifik etkileşim alanına sahip olmasındandır. Böylece, ikincil etkileşimlerin artması (Van der Waals etkileşimleri gibi) ve dolayısı ile daha fazla non-spesifik adsorpsiyona neden olmaktadır.

Kompleks ortamdan C6-HSL tayini için, C4-HSL, C6-HSL, C10-HSL karışımı içeren çözeltilerden (pH 7.0, 1000 ng/mL koşulları altında) seçicilik deneyleri gerçekleştirilmiş GC-MS ile analiz edilmiştir. Başlangıç çözeltileri, C6-HSL baskılanmış polimerik membran ile etkileştirilmiş son çözeltilerin GC-MS sonuçları karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, kompleks ortamda, C6-HSL baskılanmış polimerik membranının %74,81 tutunma oranı ile C6-HSL molekülüne karşı son derece hassas olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR

[1] Jiang, H., Jiang, D., Shao, J., ve Sun, X., 2016. Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles based electrochemical sensor for the measurement of Gram-negative bacterial quorum signaling molecules (N-acyl-homoserine-lactones), Biosensors and Bioelectronics, 75, 411–419.

[2] Ramström, O. ve Ansell, R.J., 1998. Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future, Chirality, 10, 3, 195–209.

[3] Marty, J.D. ve Mauzac, M., 2005. Molecular imprinting: State of the art and perspectives, Advances in Polymer Science, 1–35.

[4] Cai, X., Li, J., Zhang, Z., Yang, F., Dong, R., ve Chen, L., 2014. Novel Pb^{2+} ion imprinted polymers based on ionic interaction via synergy of dual functional monomers for selective solid-phase extraction of Pb^{2+} in water samples, ACS Applied Materials and Interfaces, 6, 1, 305-313.

[5] Hadizadeh, F., Hassanpour Moghadam, M., ve Mohajeri, S.A., 2013. Application of molecularly imprinted hydrogel for the preparation of lactose-free milk, Journal of the Science of Food and Agriculture, 93, 2, 304-309.

[6] Suedee, R., Srichana, T., Saelim, J., ve Thavonpibulbut, T., 2001. Thin-layer chromatographic separation of chiral drugs on molecularly imprinted chiral stationary phases, Journal of Planar Chromatography - Modern TLC, 14, 3, 194-198.

[7] Alexander, C., Smith, C.R., Whitcombe, M.J., ve Vulfson, E.N., 1999. Imprinted polymers as protecting groups for regioselective modification of polyfunctional substrates, Journal of the American Chemical Society, 121, 28, 6640-6651.

[8] Xu, S., Lu, H., Li, J., Song, X., Wang, A., ve Chen, L., 2013. Dummy molecularly imprinted polymers-capped CdTe quantum dots for the fluorescent sensing of 2,4,6-trinitrotoluene, ACS Applied Materials and Interfaces, 5, 16, 8146-8154.

[9] Sener, G., Ozgur, E., Yilmaz, E., Uzun, L., Say, R., ve Denizli, A., 2010. Quartz crystal microbalance based nanosensor for lysozyme detection with lysozyme imprinted nanoparticles, Biosensors and Bioelectronics, 26, 2, 815-821.

[10] Ferreira, G.N.M., da-Silva, A.C., ve Tomé, B., 2009. Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance, Trends in Biotechnology, 27, 12, 689-697.

[11] Turan, N.B., Chormey, D.S., Büyükpınar, Ç., Engin, G.O., ve Bakirdere, S., 2017. Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination, TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 91, 1–11.

[12] Liu, S., Gunawan, C., Barraud, N., Rice, S.A., Harry, E.J., ve Amal, R., 2016. Understanding, monitoring, and controlling biofilm growth in drinking water distribution systems, Environmental Science and Technology, 50, 17, 8954-8976.

[13] Wilson, A.P.R., Livermore, D.M., Otter, J.A., Warren, R.E., Jenks, P., ve Enoch, D.A., 2016. Prevention and control of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria: Recommendations from a Joint Working Party, Journal of Hospital Infection, 92, 1-44.

[14] G. Ducel, J. ve Fabry, L.N., 2002 . Prevention of hospital-acquired infections. A practical guide. 2nd edition., World Health Organization, Ed. 2.

[15] Defoirdt, T., 2018. Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence

Therapy, Trends in Microbiology, 26, 4, 313–328.
[16] Smyth, A.R., Cifelli, P.M., Ortori, C.A., Righetti, K., Lewis, S., ve Erskine, P., 2010. Garlic as an inhibitor of pseudomonas aeruginosa quorum sensing in cystic fibrosis - A pilot randomized controlled trial, Pediatric Pulmonology, 45, 4, 356–362.
[17] Turan, N.B., Chormey, D.S., Büyükpınar, Ç., Engin, G.O., ve Bakirdere, S., 2017. Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination, TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 91, 1-11.
[18] Soares, J.A. ve Ahmer, B.M.M., 2011. Detection of acyl-homoserine lactones by Escherichia and Salmonella, Current Opinion in Microbiology, 14, 2, 188-193.
[19] Cataldi, T.R.I., Bianco, G., Palazzo, L., ve Quaranta, V., 2007. Occurrence of N-acyl-l-homoserine lactones in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography-mass spectrometry, Analytical Biochemistry, 361, 2, 226-235.
[20] Pinto, U.M., de Souza Viana, E., Martins, M.L., ve Vanetti, M.C.D., 2007. Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk, Food Control, 18, 10, 1322–1327.
[21] Hou, H.M., Zhu, Y.L., Wang, J.Y., Jiang, F., Qu, W.Y., ve Zhang, G.L., 2017. Characteristics of N-Acylhomoserine lactones produced by Hafnia alvei H4 isolated from spoiled instant sea cucumber, Sensors (Switzerland), 17, 4, 772.
[22] Habimana, J. de D., Ji, J., Pi, F., Karangwa, E., Sun, J., ve Guo, W., 2018. A class-specific artificial receptor-based on molecularly imprinted polymer-coated quantum dot centers for the detection of signaling molecules, N-acyl-homoserine lactones present in gram-negative bacteria, Analytica Chimica Acta, 1031, 134–144.
[23] Kumari, A., Pasini, P., ve Daunert, S., 2008. Detection of bacterial quorum sensing N-acyl homoserine lactones in clinical samples, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 5, 1619-1627.
[24] Erdönmez, D., Rad, A.Y., ve Aksöz, N., 2017. Quorum sensing molecules production by nosocomial and soil isolates Acinetobacter baumannii, Archives of Microbiology, 199, 10, 1325-1334.
[25] Erdönmez, D., Türkmen, K.E., ve Aksöz, N., 2017. A new approach for quorum sensing system in several halophilic bacteria isolated from Salt Lake in Central Anatolia, Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 46, 2, 177–185.
[26] Schauder, S. ve Bassler, B.L., 2001. The languages of bacteria, Genes and Development, 15, 12, 1468-1480.
[27] Bassler, B.L. ve Losick, R., 2006. Bacterially Speaking, Cell, 125, 2, 237-246.
[28] Nealson, K.H., Platt, T., ve Hastings, J.W. , 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system., Journal of Bacteriology, 104, 1, 313-322.
[29] Middleton, B., Rodgers, H.C., Cámara, M., Knox, A.J., Williams, P., ve Hardman, A., 2002. Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum, FEMS Microbiology Letters, 207, 1, 1–7.
[30] Eberl, L., Winson, M.K., Sternberg, C., Stewart, G.S.A.B., Christiansen, G., ve Chhabra, S.R., 1996. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of Serratia liquefaciens, Molecular Microbiology, 20, 1, 127–136.
[31] Miller, M.B. ve Bassler, B.L., 2001. Quorum Sensing in Bacteria, Annual

Review of Microbiology, 55, 1, 165-199.
[32] Kleerebezem, M., Quadri, L.E.N., Kuipers, O.P., ve De Vos, W.M., 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria, Molecular Microbiology, 24, 5, 895-904.
[33] Kumari, A., Pasini, P., ve Daunert, S., 2008. Detection of bacterial quorum sensing N-acyl homoserine lactones in clinical samples, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 5, 1619-1627.
[34] Chambers, C.E., Visser, M.B., Schwab, U., ve Sokol, P.A., 2005. Identification of N-acylhomoserine lactones in mucopurulent respiratory secretions from cystic fibrosis patients, FEMS Microbiology Letters, 244, 2, 297–304.
[35] Middleton, B., Rodgers, H.C., Cámara, M., Knox, A.J., Williams, P., ve Hardman, A., 2002. Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum, FEMS Microbiology Letters, 207, 1, 1-7.
[36] Kjelleberg, S. ve Molin, S., 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms?, Current Opinion in Microbiology, 5, 3, 254-258.
[37] Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J.B., Heydorn, A., ve Mathee, K., 2000. Detection of N-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with Pseudomonas aeruginosa, Microbiology, 146, 10, 2481–2493.
[38] Surette, M.G., Miller, M.B., ve Bassler, B.L., 1999. Quorum sensing in Escherichia coli, Salmonella typhimurium, and Vibrio harveyi: A new family of genes responsible for autoinducer production, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96, 4, 1639-1644.
[39] Reading, N.C. ve Sperandio, V., 2006. Quorum sensing: The many languages of bacteria, FEMS Microbiology Letters, 254, 1, 1-11.
[40] Sperandio, V., Mellies, J.L., Nguyen, W., Shin, S., ve Kaper, J.B., 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96, 26, 15196–15201.
[41] Falcão, J.P., Sharp, F., ve Sperandio, V., 2004. Cell-to-cell signaling in intestinal pathogens, Current Issues in Intestinal Microbiology, 5, 1, 9-18.
[42] Sircili, M.P., Walters, M., Trabulsi, L.R., ve Sperandio, V., 2004. Modulation of Enteropathogenic Escherichia coli Virulence by Quorum Sensing, Infection and Immunity, 72, 4, 2329–2337.
[43] Kaper, J.B. ve Sperandio, V., 2005. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract, Infection and Immunity, 73, 6, 3197-3209.
[44] Kendall, M.M. ve Sperandio, V., 2007. Quorum sensing by enteric pathogens, Current Opinion in Gastroenterology, 23, 1, 10-15.
[45] Smith, K.M., Bu, Y., ve Suga, H., 2003. Induction and inhibition of Pseudomonas aeruginosa quorum sensing by synthetic autoinducer analogs, Chemistry and Biology, 10, 1, 81–89.
[46] DiMango, E., Zar, H.J., Bryan, R., ve Prince, A., 1995. Diverse Pseudomonas aeruginosa gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8, Journal of Clinical Investigation, 96, 5, 2204–2210.
[47] Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P.T., Appleby, P., ve Sewell, H., 1998. The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity, Infection and Immunity, 66, 1, 36–42.
[48] Smith, R.S., Fedyk, E.R., Springer, T.A., Mukaida, N., Iglewski, B.H., ve

Phipps, R.P., 2001. IL-8 Production in Human Lung Fibroblasts and Epithelial Cells Activated by the Pseudomonas Autoinducer N -3-Oxododecanoyl Homoserine Lactone Is Transcriptionally Regulated by NF-κB and Activator Protein-2, The Journal of Immunology, 167, 1, 366–374.

[49] Song, Z., Rygaard, J., Høiby, N., Worlitzsch, D., Mathee, K., ve Doring, G., 2001. Pseudomonas aeruginosa mutations in lasI and rhlI quorum sensing systems result in milder chronic lung infection, Microbiology, 147, 5, 1105–1113.

[50] Smith, R.S., Harris, S.G., Phipps, R., ve Iglewski, B., 2002. The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo, Journal of Bacteriology, 184, 4, 1132–1139.

[51] Miyairi, S., Tateda, K., Fuse, E.T., Ueda, C., Saito, H., ve Takabatake, T., 2006. Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone-protein conjugate protects mice from lethal Pseudomonas aeruginosa lung infection, Journal of Medical Microbiology, 55, 10, 1381–1387.

[52] Tang, H.B., Dimango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B.H., ve Goldberg, J.B., 1996. Contribution of specific Pseudomonas aeruginosa virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection, Infection and Immunity, 64, 1, 37–43.

[53] Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Iglewski, B.H., ve Hamood, A.N., 1999. Contribution of quorum sensing to the virulence of Pseudomonas aeruginosa in burn wound infections, Infection and Immunity, 67, 11, 5854-5862.

[54] De Kievit, T.R. ve Iglewski, B.H., 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships, Infection and Immunity, 68, 9, 4839-4849.

[55] Rumbaugh, K.P., Hamood, A.N., ve Griswold, J.A., 2004. Cytokine induction by the P. aeruginosa quorum sensing system during thermal injury, Journal of Surgical Research, 116, 1, 137–144.

[56] Taylor, M.W., Schupp, P.J., Baillie, H.J., Charlton, T.S., De Nys, R., ve Kjelleberg, S., 2004. Evidence for acyl homoserine lactone signal production in bacteria associated with marine sponges, Applied and Environmental Microbiology, 70, 7, 4387–4389.

[57] Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J.B., Heydorn, A., ve Mathee, K., 2000. Detection of N-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with Pseudomonas aeruginosa, Microbiology, 146, 10, 2481-2493.

[58] Sokol, P.A., Sajjan, U., Visser, M.B., Gingues, S., Forstner, J., ve Kooi, C., 2003. The CepIR quorum-sensing system contributes to the virulence of Burkholderia cenocepacia respiratory infections, Microbiology, 149, 12, 3649–3658.

[59] Jacobi, C.A., Bach, A., Eberl, L., Steidle, A., ve Heesemann, J., 2003. Detection of N-(3-Oxohexanoyl)-L-Homoserine Lactone in Mice Infected with Yersinia enterocolitica Serotype O8, Infection and Immunity, 71, 11, 6624-6626.

[60] Erickson, D.L., Endersby, R., Kirkham, A., Stuber, K., Vollman, D.D., ve Rabin, H.R., 2002. Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis, Infection and Immunity, 70, 4, 1783–1790.

[61] Chambers, C.E., Visser, M.B., Schwab, U., ve Sokol, P.A., 2005. Identification of N-acylhomoserine lactones in mucopurulent respiratory secretions from cystic fibrosis patients, FEMS Microbiology Letters, 244, 2, 297-304.

[62] Favre-Bonté, S., Pache, J.C., Robert, J., Blanc, D., Pechère, J.C., ve Van

Delden, C., 2002. Detection of Pseudomonas aeruginosa cell-to-cell signals in lung tissue of cystic fibrosis patients, Microbial Pathogenesis, 32, 3, 143–147.
[63] Ward, C., Cámara, M., Forrest, I., Rutherford, R., Pritchard, G., ve Daykin, M., 2003. Preliminary findings of quorum signal molecules in clinically stable lung allograft recipients, Thorax, 58, 5, 444–446.
[64] Gould, T.A., Herman, J., Krank, J., Murphy, R.C., ve Churchill, M.E.A., 2006. Specificity of acyl-homoserine lactone synthases examined by mass spectrometry, Journal of Bacteriology, 188, 2, 773-783.
[65] Morohoshi, T., Inaba, T., Kato, N., Kanai, K., ve Ikeda, T., 2004. Identification of quorum-sensing signal molecules and the LuxRI homologs in fish pathogen Edwardsiella tarda, Journal of Bioscience and Bioengineering, 98, 4, 274-281.
[66] Ulrich, R.L., Hines, H.B., Parthasarathy, N., ve Jeddeloh, J.A., 2004. Mutational analysis and biochemical characterization of the Burkholderia thailandensis DW503 quorum-sensing network, Journal of Bacteriology, 186, 13, 4350-4360.
[67] Wang, L.H., Weng, L.X., Dong, Y.H., ve Zhang, L.H., 2004. Specificity and Enzyme Kinetics of the Quorum-quenching N-Acyl Homoserine Lactone Lactonase (AHL-lactonase), Journal of Biological Chemistry, 279, 14, 13645-13651.
[68] Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., ve Sockett, R.E., 2002. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of Yersinia pseudotuberculosis and Pseudomonas aeruginosa, Infection and Immunity, 70, 10, 5635-5646.
[69] Luo, Z.Q., Su, S., ve Farrand, S.K., 2003. In situ activation of the quorum-sensing transcription factor TraR by cognate and noncognate acyl-homoserine lactone ligands: Kinetics and consequences, Journal of Bacteriology, 185, 19, 5665-5672.
[70] Christensen, A.B., Riedel, K., Eberl, L., Flodgaard, L.R., Molin, S., ve Gram, L., 2003. Quorum-sensing-directed protein expression in Serratia proteamaculans B5a, Microbiology, 149, 2, 471-483.
[71] Takagishi, T. ve Klotz, I.M., 1972. Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross–linkages, Biopolymers, 11, 2, 483-491.
[72] Wulff, G., 1972. The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates, Angrew. Chem. Internat. Edit., 11, 4, 341.
[73] Wulff, G. ve Poll, H.-G., 1987. Enzyme-analogue built polymers. XXIII: Influence of the structure of the binding sites on the selectivity for racemic resolution, Die Makromolekulare Chemie, 188, 4, 741–748.
[74] Cram, D.J., 1988. The Design of Molecular Hosts, Guests, and Their Complexes (Nobel Lecture), Angewandte Chemie International Edition in English, 27, 8, 1009-1020.
[75] Pedersen, C.J., 1988. The Discovery of Crown Ethers (Noble Lecture), Angewandt Chemie International Edition in English, 27, 8, 1021-1027.
[76] Wulff, G., 1995. Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates— A Way towards Artificial Antibodies, Angewandte Chemie International Edition in English, 34, 17, 1812–1832.
[77] Hepokur, C., 2012. Bazı model biyomoleküller için moleküler baskılanmış polimerlerin sentezi, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas, 2012.

[78] URL-1 < https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1987/summary/>Erişim tarihi: 13.04.2020.
[79] Vasapollo, G., Sole, R. Del, Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., ve Scorrano, S., 2011. Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective, International Journal of Molecular Sciences, 12, 9, 5908-5945.
[80] Mosbach, K. ve Ramström, O., 1996. The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, Bio/Technology,. 14, 2, 163-170.
[81] Aguilar, M.R. ve. San Román, J., 2014. Smart Polymers and their Applications, Second Edition, Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge, England.
[82] Yan, S., Fang, Y., ve Gao, Z., 2007. Quartz crystal microbalance for the determination of daminozide using molecularly imprinted polymers as recognition element, Biosensors and Bioelectronics, 22, 6, 1087-1091.
[83] Mulay, S.R., Desai, J., Kumar, S. V., Eberhard, J.N., Thomasova, D., ve Romoli, S., 2016. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, Nature Communications, 19, 2, 106-180.
[84] Ye, L. ve Mosbach, K., 2008. Molecular imprinting: Synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors, Chemistry of Materials, 20, 3, 859-868.
[85] Piletska, E. V., Guerreiro, A.R., Whitcombe, M.J., ve Piletsky, S.A., 2009. Influence of the polymerization conditions on the performance of molecularly imprinted polymers, Macromolecules, 42, 14, 4921-4928.
[86] Poma, A., Turner, A.P.F., ve Piletsky, S.A., 2010. Advances in the manufacture of MIP nanoparticles, Trends in Biotechnology, 28, 12, 629-637.
[87] Cömert, Ş., 2015. Melamin teşhisi için moleküler baskılanmış kuvars kristal mikrobalans (QCM) çiplerin hazırlanması ve uygulamaları, Doktora Tezi, Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray, 2015.
[88] Odabaşi, M., Say, R., ve Denizli, A., 2007. Molecular imprinted particles for lysozyme purification, Materials Science and Engineering C, 27, 1, 90-99.
[89] Uzun, L. ve Turner, A.P.F., 2016. Molecularly-imprinted polymer sensors: Realising their potential, Biosensors and Bioelectronics, 76, 131-144.
[90] Özcan, A.A., Say, R., Denizli, A., ve Ersöz, A., 2006. L-histidine imprinted synthetic receptor for biochromatography applications, Analytical Chemistry, 78, 20, 7253-7258.
[91] Ashley, J., Shahbazi, M.A., Kant, K., Chidambara, V.A., Wolff, A., ve Bang, D.D., 2017. Molecularly imprinted polymers for sample preparation and biosensing in food analysis: Progress and perspectives, Biosensors and Bioelectronics, 91, 606-615.
[92] Ersöz, A., Say, R., ve Denizli, A., 2004. Ni(II) ion-imprinted solid-phase extraction and preconcentration in aqueous solutions by packed-bed columns, Analytica Chimica Acta, 502, 1, 91-97.
[93] Spivak, D.A., 2005. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers, Advanced Drug Delivery Reviews, 57, 12, 1779-1794
[94] Chen, L., Xu, S., ve Li, J., 2011. Recent advances in molecular imprinting technology: Current status, challenges and highlighted applications, Chemical Society Reviews, 40, 5, 2922-2942.
[95] Zhang, Z., Li, J., Song, X., Ma, J., ve Chen, L., 2014. Hg2+ ion-imprinted polymers sorbents based on dithizone-Hg2+ chelation for mercury speciation analysis in environmental and biological samples, RSC Advances, 4, 87, 46444-

46453.
[96] Sircili, M.P., Walters, M., Trabulsi, L.R., ve Sperandio, V., 2004. Modulation of Enteropathogenic Escherichia coli Virulence by Quorum Sensing, Infection and Immunity, 72, 4, 2329-2337.
[97] Kaper, J.B. ve Sperandio, V., 2005. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract, Infection and Immunity, 73, 6, 3197-3209.
[98] Kendall, M.M. ve Sperandio, V., 2007. Quorum sensing by enteric pathogens, Current Opinion in Gastroenterology, 23, 1, 10-15.
[99] Smith, K.M., Bu, Y., ve Suga, H., 2003. Induction and inhibition of Pseudomonas aeruginosa quorum sensing by synthetic autoinducer analogs, Chemistry and Biology, 10, 1, 81-89.
[100] Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., ve Li, J., 2016. Molecular imprinting: perspectives and applications, Chemical Society Reviews, 45, 8, 2137–2211.
[101] Yan, H. ve Kyung, H.R., 2006. Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer, International Journal of Molecular Sciences, 7, 5, 155-178.
[102] Golker, K., Karlsson, B.C.G., Olsson, G.D., Rosengren, A.M., ve Nicholls, I.A., 2013. Influence of composition and morphology on template recognition in molecularly imprinted polymers, Macromolecules, 46, 4, 1408-1414.
[103] Fasihi, J., Ammari Alahyari, S., Shamsipur, M., Sharghi, H., ve Charkhi, A., 2011. Adsorption of uranyl ion onto an anthraquinone based ion-imprinted copolymer, Reactive and Functional Polymers, 71, 8, 803-808.
[104] Shamsipur, M., Besharati-Seidani, A., Fasihi, J., ve Sharghi, H., 2010. Synthesis and characterization of novel ion-imprinted polymeric nanoparticles for very fast and highly selective recognition of copper(II) ions, Talanta, 83, 2, 674-681.
[105] Otero-Romaní, J., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P., ve Martin-Esteban, A., 2009. Ionic imprinted polymer for nickel recognition by using the bi-functionalized 5-vinyl-8-hydroxyquinoline as a monomer: Application as a new solid phase extraction support, Microchemical Journal, 93, 2, 225-231.
[106] James, D., Gladis, J.M., Pandey, A.K., Naidu, G.R.K., ve Prasada Rao, T., 2008. Design of two-dimensional biomimetic uranyl optrode and its application to the analysis of natural waters, Talanta, 74, 5, 1420-1427.
[107] Xu, S., Chen, L., Li, J., Guan, Y., ve Lu, H., 2012. Novel Hg2+-imprinted polymers based on thymine–Hg2+–thymine interaction for highly selective preconcentration of Hg2+ in water samples, Journal of Hazardous Materials, 237, 347–354.
[108] Wagner, R., Wan, W., Biyikal, M., Benito-Peña, E., Moreno-Bondi, M.C., ve Lazraq, I., 2013. Synthesis, spectroscopic, and analyte-responsive behavior of a polymerizable naphthalimide-based carboxylate probe and molecularly imprinted polymers prepared thereof, Journal of Organic Chemistry, 78, 4, 1377-1389.
[109] Banerjee, S. ve König, B., 2013. Molecular imprinting of luminescent vesicles, Journal of the American Chemical Society, 135, 8, 2967-2970.
[110] Wu, H.G., Ju, X.J., Xie, R., Liu, Y.M., Deng, J.G., ve Niu, C.H., 2011. A novel ion-imprinted hydrogel for recognition of potassium ions with rapid response, Polymers for Advanced Technologies, 22, 9, 1389-1394.
[111] Gladis, J.M. and Rao, T.P., 2004. Effect of porogen type on the synthesis of uranium ion imprinted polymer materials for the preconcentration/separation of traces of uranium, Microchimica Acta, 146, 3-4, 251-258.

[112] Saloni, J., Walker, K., and Hill, G., 2013. Theoretical investigation on monomer and solvent selection for molecular imprinting of nitrocompounds, Journal of Physical Chemistry A, 117, 7, 1531-1534.
[113] Wulff, G., Grobe-Einsler, R., Vesper, W., ve Sarhan, A., 1977. Enzyme-analogue built polymers, 5. On the specificity distribution of chiral cavities prepared in synthetic polymers, Die Makromolekulare Chemie, 178, 10, 2817-2825.
[114] Ikegami, T., Mukawa, T., Nariai, H., ve Takeuchi, T., 2004. Bisphenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting, Analytica Chimica Acta, 504, 1, 131-135.
[115] Molinelli, A.L., 2004. Molecularly imprinted polymers: Towards a rational understanding of biomimetic materials, Doktora Tezi, Georgia Teknoloji Enstitüsü, ABD, 2004.
[116] Arshady, R. ve Mosbach, K., 1981. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization, Die Makromolekulare Chemie, 182, 2, 687-692.
[117] Turiel, E. and Martín-Esteban, A., 2010. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review, Analytica Chimica Acta, 668, 2, 87-99.
[118] Li, J., Zhang, L., ve Fu, C., 2016. The Recognizing Mechanism and Selectivity of the Molecularly Imprinting Membrane. in: Molecularly Imprinted Catalysts: Principles, Syntheses, and Applications, 159-182.
[119] Li, M.X., Wang, X.H., Zhang, L.M., ve Wei, X.P., 2017. A high sensitive epitope imprinted electrochemical sensor for bovine serum albumin based on enzyme amplifying, Analytical Biochemistry, 530, 68-74.
[120] Smolinska-Kempisty, K., Ahmad, O.S., Guerreiro, A., Karim, K., Piletska, E., ve Piletsky, S., 2017. New potentiometric sensor based on molecularly imprinted nanoparticles for cocaine detection, Biosensors and Bioelectronics, 96, 49-54.
[121] Zhang, L., Qi, Z., Huang, Q., Zeng, K., Sun, X., ve Li, J., 2014 . Imprinted-like biopolymeric micelles as efficient nanovehicles for curcumin delivery, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 123, 15-22.
[122] Deshmukh, K., Tanwar, Y.S., Shende, P., ve Cavalli, R., 2015. Biomimetic estimation of glucose using non-molecular and molecular imprinted polymer nanosponges, International Journal of Pharmaceutics, 494, 1, 244-248.
[123] Zhang, Z., Zhang, X., Liu, B., ve Liu, J., 2017. Molecular Imprinting on Inorganic Nanozymes for Hundred-fold Enzyme Specificity, Journal of the American Chemical Society, 139, 15, 5412-5419.
[124] Alvarez-Lorenzo, C. ve Concheiro, A., 2006. Molecularly imprinted materials as advanced excipients for drug delivery systems, Biotechnology Annual Review, 12, 225-268.
[125] Allender, C.J., Brain, K.R., ve Heard, C.M., 1999. 6 Molecularly Imprinted Polymers-Preparation, Biomedical Applications and Technical Challenges, Progress in Medicinal Chemistry, 235.
[126] Xiao, H., Peng, J., Peng, H., Bu, L., Pan, Z., ve He, Y., 2016. Preparation and evaluation of surface molecularly imprinted polymers as stationary phase columns for high performance liquid chromatography, Analytical Methods, 8 , 44, 7951–7958.
[127] Hung, C.Y., Huang, H.H., ve Hwang, C.C., 2005. Chiral separations of mandelic acid by HPLC using molecularly imprinted polymers, Ecletica Quimica, 30, 4, 67-73.
[128] Puoci, F., Iemma, F., ve Picci, N., 2008. Stimuli-Responsive Molecularly

Imprinted Polymers for Drug Delivery: A Review, Current Drug Delivery, 5, 2, 85-96.
[129] da Silva, M.S. ve Casimiro, T., 2012. High Affinity Polymers by Molecular Imprinting for Drug Delivery. in: Polymerization, Edited by Ailton De Souza Gomes, 145.
[130] Kryscio, D.R. ve Peppas, N.A., 2009. Mimicking biological delivery through feedback-controlled drug release systems based on molecular imprinting, AIChE Journal, 55, 6, 1311-1324.
[131] Ruela, A.L.M., Figueiredo, E.C., and Pereira, G.R., 2014. Molecularly imprinted polymers as nicotine transdermal delivery systems, Chemical Engineering Journal, 248, 1-8.
[132] Jafary Omid, N., Morovati, H., Amini, M., Dehpour, A.R., Partoazar, A., ve Rafiee-Tehrani, M., 2016. Development of Molecularly Imprinted Olanzapine Nano-particles: In Vitro Characterization and In Vivo Evaluation, AAPS PharmSciTech,. 17, 6, 1457-1467.
[133] Curcio, M., Cirillo, G., Parisi, O.I., Iemma, F., Picci, N., ve Puoci, F., 2012. Quercetin-Imprinted Nanospheres as Novel Drug Delivery Devices, Journal of Functional Biomaterials, 3, 2, 269-282.
[134] Puoci, F., Iemma, F., Muzzalupo, R., Spizzirri, U.G., Trombino, S., ve Cassano, R., 2004. Spherical Molecularly Imprinted Polymers (SMIPs) via a Novel Precipitation Polymerization in the Controlled Delivery of Sulfasalazine, Macromolecular Bioscience, 4,1, 22-26.
[135] Irshad, M., Iqbal, N., Mujahid, A., Afzal, A., Hussain, T., ve Sharif, A., 2013. Molecularly Imprinted Nanomaterials for Sensor Applications, Nanomaterials, 3, 4, 615-637.
[136] Alenus, J., Ethirajan, A., Horemans, F., Weustenraed, A., Csipai, P., ve Gruber, J., 2013. Molecularly imprinted polymers as synthetic receptors for the QCM-D-based detection of l-nicotine in diluted saliva and urine samples, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405, 20, 6479-6487.
[137] Liu, X.C. ve Mosbach, K., 1998. Catalysis of benzisoxazole isomerization by molecularly imprinted polymers, Macromolecular Rapid Communications, 19, 12, 671-674.
[138] Kirsch, N., Hedin-Dahlström, J., Henschel, H., Whitcombe, M.J., Wikman, S., ve Nicholls, I.A., 2009. Molecularly imprinted polymer catalysis of a Diels-Alder reaction, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58, 1-4, 110-117.
[139] Yan, M., 2004. Molecularly imprinted materials: science and technology. CRC press.
[140] Gagliardi, M. ve Mazzolai, B., 2015. Molecularly imprinted polymeric micro- and nano-particles for the targeted delivery of active molecules, Future Medicinal Chemistry, 7, 2, 123-138.
[141] Sellergren, B., Wieschemeyer, J., Boos, K.S., ve Seidel, D., 1998. Imprinted polymers for selective adsorption of cholesterol from gastrointestinal fluids, Chemistry of Materials, 10, 12, 4037-4046.
[142] Umasankar, Y., Ashok Kumar, S., ve Chen, S.M., 2009. Nanostructured materials for electrochemical biosensors, Nova Science Publ.
[143] Qlark, L.C., 1956. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions, Transactions - American Society for Artificial Internal Organs, 2, 1, 41-48.
[144] Clark, L.C. ve Lyons, C., 1962. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Electrode Systems for Surgery, Annals of the New York Academy of Sciences, 102, 1, 29-45.

[145] Hicks, G.P. ve Updike, S.J., 1966. The Preparation and Characterization of Lyophilized Polyacrylamide Enzyme Gels for Chemical Analysis, Analytical Chemistry, 38, 6, 726-730.
[146] Guilbault, G.G. ve Montalvo, J.G. , 1969. A Urea-Specific Enzyme Electrode, Journal of the American Chemical Society, 91, 8, 2164-2165.
[147] Palchetti, I. ve Mascini, M., 2010. Biosensor technology: A brief history. in: Lecture Notes in Electrical Engineering, 15-23.
[148] Dogru, E., 2017. Karbon fiber esaslı DNA biyosensör tasarımı, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2017.
[149] Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., and Estrela, P., 2016. Introduction to biosensors, Essays in Biochemistry, 60, 1, 69-80.
[150] Hoshino, K., 2014. Mechanical transducers: cantilevers, acoustic wave sensors, and thermal sensors, Molecular Sen-Sors and Nanodevices, William Andrew Publishing, Oxford, 321–414.
[151] Cooper, M.A. ve Singleton, V.T., 2007. A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: Applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions, Journal of Molecular Recognition, 20, 3, 154-184.
[152] Čavić, B.A., Hayward, G.L., ve Thompson, M., 1999. Acoustic waves and the study of biochemical macromolecules and cells at the sensor-liquid interface, Analyst,. 124, 10, 1405-1420.
[153] Janshoff, A., Galla, H.J., ve Steinem, C., 2000. Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors?, Angewandte Chemie - International Edition, 39, 22, 4004-4032.
[154] Coté, G.L., Lec, R.M., ve Pishko, M. V., 2003. Emerging biomedical sensing technologies and their applications, IEEE Sensors Journal, 3, 3, 251-266.
[155] Dickert, F.L. ve Latif, U., 2017. Quartz Crystal Microbalances: Chemical Applications,. 201-211.
[156] Saigusa, Y., 2017. Quartz-based piezoelectric materials. in: Advanced Piezoelectric Materials, Elsevier, 197–233.
[157] O'Sullivan, C.K. ve Guilbault, G.G., 1999. Commercial quartz crystal microbalances - Theory and applications, Biosensors and Bioelectronics,. 14, 8-9, 663-670.
[158] Pavey, K.D., 2002. Quartz crystal analytical sensors: The future of label-free, real-time diagnostics?, Expert Review of Molecular Diagnostics, 2, 2, 173-186.
[159] Marx, K.A., 2003. Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-Surface interface, Biomacromolecules, 4, 5, 1099-1120.
[160] Rocha-Gaso, M.I., March-Iborra, C., Montoya-Baides, Á., ve Arnau-Vives, A., 2009. Surface generated acoustic wave biosensors for the detection of pathogens: A review, Sensors, 9, 7, 5740-5769.
[161] Heising, R.A., 1946. Quartz crystals for electrical circuits, their design and manufacture, D. Van Nostrand Co. Inc., New York, USA
[162] di Roio, M., Marco F., Giuseppe F., Fabrizio M., ve Pietro di R., 1995. Sensors For Domestic Applications-Proceedings of The 1st European School Of Sensors (Ess' 94), World Scientific Co. Pte. Ltd., Singapur.
[163] Dineva, P., Gross, D., Müller, R., ve Rangelov, T., 2014. Dynamic fracture of piezoelectric materials, AMC, 10, 12.
[164] Höök, F. and Rudh, M., 2005. Quartz crystal microbalances (QCM) in biomacromolecular recognition, Bio Tech International, 8-13.

[165] Lucklum, R., Behling, C., ve Hauptmann, P., 2000. Gravimetric and non-gravimetric chemical quartz crystal resonators, Sensors and Actuators, B: Chemical, 65, 1-3, 277-283.
[166] Jones, J., 1997. Core carbonyl chemistry. Oxford University Press, USA.
[167] Battal, D., Akgönüllü, S., Yalcin, M.S., Yavuz, H., ve Denizli, A., 2018. Molecularly imprinted polymer based quartz crystal microbalance sensor system for sensitive and label-free detection of synthetic cannabinoids in urine, Biosensors and Bioelectronics, 111, 10-17.
[168] Tokuyama, H., Kitamura, E., ve Seida, Y., 2016. Detection of Au (III) ions using a poly (N, N-dimethylacrylamide)-coated QCM sensor, Talanta, 146 507–509.
[169] Yang, Z. peng ve Zhang, C. jing, 2009. Designing of MIP-based QCM sensor for the determination of Cu(II) ions in solution, Sensors and Actuators, B: Chemical, 142, 1, 210-215.
[170] Bragazzi, N.L., Amicizia, D., Panatto, D., Tramalloni, D., Valle, I., ve Gasparini, R., 2015. Quartz-Crystal Microbalance (QCM) for Public Health: An Overview of Its Applications. in: Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, 101, 149-211.
[171] Sauerbrey, G., 1959. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, Zeitschrift Für Physik, 155 , 2 , 206–222.
[172] Buck, R.P., Lindner, E., Kutner, W., ve Inzelt, G., 2004. Piezoelectric chemical sensors (IUPAC Technical Report), Pure and Applied Chemistry, 76, 6, 1139-1160.
[173] Kim, J., Kim, S., Ohashi, T., Muramatsu, H., Chang, S.M., ve Kim, W.S., 2010. Construction of simultaneous SPR and QCM sensing platform, Bioprocess and Biosystems Engineering, 33, 1, 39.
[174] Vashist, S.K., Luppa, P.B., Yeo, L.Y., Ozcan, A., ve Luong, J.H.T., 2015. Emerging Technologies for Next-Generation Point-of-Care Testing, Trends in Biotechnology, 33, 11, 692-705.
[175] Vashist, S.K. ve Luong, J.H.T., 2016. Trends in in vitro diagnostics and mobile healthcare, Biotechnology Advances, 34, 3, 137.
[176] Vashist, S., Schneider, E., ve Luong, J., 2014. Commercial Smartphone-Based Devices and Smart Applications for Personalized Healthcare Monitoring and Management, Diagnostics, 4, 3, 104-128..
[177] Luong, J.H.T., Male, K.B., ve Glennon, J.D., 2008. Biosensor technology: Technology push versus market pull, Biotechnology Advances, 26, 5, 492-500.
[178] Wulff, G., 1995. Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates— A Way towards Artificial Antibodies, Angewandte Chemie International Edition in English, 34, 17, 1812-1832.
[179] Wulff, G. ve Knorr, K., 2001. Stoichiometric noncovalent interaction in molecular imprinting, Bioseparation, 10, 6, 257-276.
[180] Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Rampey, A.M., Rushton, G.T., Chen, Y., ve Shimizu, K.D., 2004. Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers, Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 804, 1, 141-149.
[181] Samadi, A. ve Husson, S.M., 2005. Synthesis and Characterization of Molecularly Imprinted Polymers for Chromatographic Separations AU - Wei, Xiaolin, Separation Science and Technology, 40 , 1–3 , 109–129.
[182] Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Chen, Y., Shah, R.N., ve Shimizu, K.D., 2001.

Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir−Freundlich Isotherm, Analytical Chemistry, 73 , 19 , 4584–4591.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı **:** Ömür ACET

Adres **:** Pamucak Mah. Hatipoğlu Apt. Kat:2/11 AKSARAY

E-posta adresi **:** omuracetbio@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans **:** Aksaray Üniversitesi, 2009-2013

Yüksek Lisans **:** Aksaray Üniversitesi, 2013- 2015

Doktora **:** Aksaray Üniversitesi, 2016-

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Petrolyum Petrol Ürünleri Paz. Dağ. San.Tic. Ltd. Şti/ Yaz Stajı
2. Girişimcilik iş planı ödülleri yarışması birinciliği, 5 Haziran 2013, Aksaray

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
2006

Evrensel düşünen
yerel gözeten...