

**ALTIN NANOPARTİKÜLLER KULLANILARAK
KORTİZOL İÇİN PLAZMONİK SENSÖR SİNYALİNİN
SEÇİCİ YÜKSELTİLMESİ**

**SELECTIVE AMPLIFICATION OF PLASMONIC SENSOR
SIGNAL FOR CORTISOL BY USE OF GOLD
NANOPARTICLES**

GAYE EZGİ YILMAZ

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

ALTIN NANOPARTİKÜLLER KULLANILARAK KORTİZOL İÇİN PLAZMONİK SENSÖR SİNYALİNİN SEÇİCİ YÜKSELTİLMESİ

Gaye Ezgi YILMAZ

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Eş Danışman: Doç. Dr. Fatma YILMAZ

Ocak 2022, 83 sayfa

Kortizol, psikolojik ve fizyolojik strese tepki olarak insan vücudu tarafından salınan bir steroid hormondur. Kortizol, sinir, bağışıklık, kardiyovasküler solunum, üreme, kas-iskelet, örtü sistemleri gibi hemen hemen her organ sistemini etkileyebilir. Bunun yanında kortizol, çok sayıda hastalık için bir biyobelirteçtir ve kan basıncı, glikoz seviyeleri ve kabohidrat metabolizması gibi çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca kardiyovasküler, immün, renal, iskelet ve endokrin sistemin homeostazında önemli bir rol oynar. Kortizolün sağlığa etkileri, hormonun vücutta ne sıklıkta dolaştığına bağlıdır. Kortizolün fazla veya az üretimi vücutta çeşitli hastalıklara neden olabilir. Bu yüzden kortizol tespitine yönelik etkin, duyarlı ve seçici bir yöntemin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada plazmonik sensör ile moleküler baskılama yöntemi ve altın nanopartiküller bir arada kullanılarak, yapay plazma, yapay idrar ve sulu çözeltilerden, kortizolü yüksek hassasiyet ve seçicilik ile tayin edebilen plazmonik bir sensör tasarlanmıştır. Bu amaç ile kortizol baskılanmış N-metakroil-(L)-histidin metil ester-altın nanopartiküller (MIP-AuNP), aynı reçeteyle hazırlanan kortizol baskılanmamış (AuNP-NIP) ve aynı reçeteyle hazırlanan altın nanopartikül eklenmeden kortizol baskılanmış (MIP) olmak üzere 3 adet plazmonik sensör hazırlanmıştır. Altın nanopartiküllerin boyut analizi yapıldıktan sonra hazırlanan her plazmonik sensör AFM, temas açısı ve FTIR-ATR

spektrometre analizleri ile karakterize edilmiştir. Plazmonik sensör yanıtını yükseltmek amacı ile yapıya eklenen AuNP'lerin etki mekanizmasını incelemek için altın nanopartikül eklenmeden hazırlanan MIP plazmonik sensör ile AuNP-MIP plazmonik sensör arasında derişim analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ışığında plazmonik sensörün verdiği sinyal yanıtları karşılaştırılmıştır. AuNP-MIP plazmonik sensör 0.01-100 ppb kortizol derişimleri arasında 0.9744 korelasyon katsayısı ile gerçek zamanlı analiz yaparken MIP plazmonik sensör 1-100 ppb kortizol derişimleri arasında 0.9862 korelasyon katsayısı ile gerçek zamanlı analiz edebildiği gözlenmiştir. AuNP-MIP plazmonik sensörün LOD ve LOQ değerleri 0.0082 ve 0.027 olarak hesaplanmış ve AuNP-MIP plazmonik sensörün Langmuir adsorpsiyon izoterm modeline uyduğu görülmüştür. Bunu yanı sıra AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensörleri ile klobetazol ve flutikazon yarışmacı ajanları ile seçicilik deneyleri yapılmış ve AuNP-MIP plazmonik sensörün klobetazole ve flutikazona göre sırasıyla 6.26 ve 6.11 kat daha seçici olduğu görülmüştür. Ayrıca baskılama etkinliğini belirlemek için ise AuNP-MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensörleri ile aynı yarışmacı ajanlar kullanılmış ve AuNP-MIP plazmonik sensörün kortizol molekülüne AuNP-NIP plazmonik sensöre göre 4.96 ve 4.71 kat daha seçici olduğu görülmüştür. AuNP-MIP plazmonik sensörün beş defa peşpeşe yapılan tekrar kullanılabilirlik analizinde herhangi bir performans kaybı olmadan kortizol tayin edebildiği sonucuna varılmıştır. Buna ek olarak AuNP-MIP plazmonik sensörün sadece sulu ortamda değil yapay plazma ve yapay idrar gibi karmaşık bir ortamda da kortizol tayin edebildiği görülmüştür. Validasyon çalışmaları yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı ile yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Altın nanopartikül, kortizol, moleküler baskılanmış polimer, plazmonik sensör, yüzey plazmon rezonans.

ABSTRACT

SELECTIVE AMPLIFICATION OF PLASMONIC SENSOR SIGNAL FOR CORTISOL BY USE OF GOLD NANOPARTICLES

Gaye Ezgi YILMAZ

Master of Science, Department of CHEMISTRY

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Co-Supervisor: Doç. Dr. Fatma YILMAZ

January 2022, 83 pages

Cortisol is a steroid hormone released by the human body in response to psychological and physiological stress. Cortisol can affect almost every organ system such as nervous, immune, cardiovascular, respiratory, reproductive, musculoskeletal, and covering systems. Besides, cortisol is a biomarker for numerous diseases and plays an important role in regulating various physiological processes such as blood pressure, glucose levels and carbohydrate metabolism. It also plays an important role in homeostasis of the cardiovascular, immune, renal, skeletal and endocrine systems. The health effects of cortisol depend on how often the hormone circulates in the body. High or low level amount of cortisol production can cause various diseases in the body. Therefore, it is very important to develop an effective, sensitive and selective method for the detection of cortisol. In this study, a plasmonic sensor that can detect cortisol from artificial plasma, artificial urine and aqueous solutions with high sensitivity and selectivity was designed by using a combination of plasmonic sensor, molecular imprinting method and gold nanoparticles.

With this purpose; Three plasmonic sensors were prepared: cortisol imprinted N-metacroyl-(L)histidine methyl ester-gold nanoparticles- MIP-AuNP, NIP-AuNP prepared with the same recipe without cortisol imprinting and also cortisol imprinted MIP prepared with the same recipe without adding gold nanoparticles. After the size determination of the gold

nanoparticles, each prepared plasmonic sensor was characterized by AFM, contact angle and FTIR-ATR spectrometry analyses. Concentration analyzes were performed with the MIP plasmonic sensor prepared without adding gold nanoparticles and the AuNP-MIP plasmonic sensor in order to examine the mechanism of action of AuNPs added to the structure in order to increase the plasmonic sensor response. In the light of the data obtained, it was observed that while the AuNP-MIP plasmonic sensor was able to analyze in real time with a correlation coefficient of 0.9744 between 0.01-100 ppb cortisol concentrations, the MIP plasmonic sensor was able to analyze in real time with a correlation coefficient of 0.9862 between 1-100 ppb cortisol concentrations. The LOD and LOQ values of the AuNP-MIP plasmonic sensor were calculated as 0.0082 and 0.027, and it was seen that the cortisol adsorption onto the AuNP-MIP plasmonic sensor fit to the Langmuir adsorption isotherm model. In addition, selectivity experiments were performed with AuNP-MIP, MIP and AuNP-NIP plasmonic sensors using clobetasol and fluticasone selected as competitor agents, and it was found that the AuNP-MIP plasmonic sensor was 6.26 and 6.11 times more selective than clobetasol and fluticasone, respectively. Also, the same competitor agents were applied to the AuNP-MIP and AuNP-NIP plasmonic sensors to determine the imprinting efficiency, and it was observed that the AuNP-MIP plasmonic sensor was 4.96 and 4.71 times more selective to the cortisol molecule than the AuNP-NIP plasmonic sensor. It was concluded that the AuNP-MIP plasmonic sensor was able to detect cortisol without any loss of performance in five consecutive reusability analysis. In addition, it has been observed that the AuNP-MIP plasmonic sensor can detect cortisol not only in aqueous media but also in complex media such as artificial plasma and artificial urine. Validation experiments were performed with high performance liquid chromatography (HPLC) studies.

Keywords: Cortisol, gold nanoparticles, molecularly imprinted polymer, plasmonic sensor, surface plasmon resonance.

TEŞEKKÜR

Lisans hayatıma başladığım andan itibaren büyük hayranlık ile takip ettiğim çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye bana kendisiyle çalışma şansı tanıdığı için, engin bilgi ve tecrübelerini paylaşmasının yanında, aile sıcaklığı yaşattığı için çok teşekkür ederim. Eşsiz gülümsemesi, sıcaklığı, mütevazılığı, çalışkanlığı ve bilgi birikimi ile kendime rol model aldığım, desteğini her zaman hissettiğim, çok değerli hocam Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e çok teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca, her türlü bilgi birikimini benim ile paylaşan, tüm çalışmam boyunca beni bir an bile yalnız bırakmayan, sabrına, enerjisine, çalışkanlığına hayran olduğum, çok değerli hocam Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a yol göstericiliği, desteği ve bana her gün yeni bir şey öğrettiği için sonsuz teşekkür ederim. Pozitif enerjisi ile bulunduğu her ortamı aydınlatan, her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan, desteğini her zaman hissettiğim çok değerli hocam Doç. Dr. Nilay Bereli'ye bana kattığı akademik bilginin yanında, eşsiz sohbetleri, samimiyeti ve yol göstericiliği için sonsuz teşekkür ederim. Yol gösterici fikirleri ile olaylara daha farklı bakmamda büyük katkısı olan, çok değerli hocam Doç. Dr. Deniz Türkmen'e, çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarım boyunca ilk andan itibaren her türlü soruma bıkmadan yanıt veren, bana her zaman destek olan, zaman ayıran çok değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Yeşeren Saylan'a çok teşekkür ederim. Beni her zaman samimiyeti ve güler yüzü ile karşılayan, tez çalışmalarımın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, her sıkıntımı dinleyen, yol gösteren çok değerli hocam Dr. Ilgım Göktürk Başal'a sonsuz teşekkür ederim. Biyokimya bölümüne çalışkanlıkları, enerjileri ile neşe ve ışık saçan, sohbet etmekten, fikir paylaşmaktan mutluluk duyduğum çok değerli hocalarım Dr. Semra Akgönüllü ve Merve Çalışır'a güzel sohbetleri ve fikirleri paylaşmaktan mutlu olduğum Volkan Safran ve Dr. Mitra Jalilzade'ye ve BİOREG ailesinin her ferdine çok teşekkür ederim. Tüm hayatım boyunca her kararında beni destekleyen, yanımda olan canım aileme, verdikleri emek, sınırsız özveri, güven ve destek için, bana her zaman güç verdikleri için sonsuz teşekkür ederim. Desteği ve sevgisiyle daha güçlü olmamı sağlayan yol arkadaşım Ahmet Meriç Özcan'a sonsuz teşekkürler.

Gaye Ezgi YILMAZ

OCAK 2022, ANKARA

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	5
2. 1. Kortizol.....	5
2.1.1. Kortizolün Mekanizması	5
2.1.2. Kortizolün İşlevleri	7
2.1.3. Kortizol Seviyelerindeki Değişime Bağlı Hastalıklar	9
2.1.4. Kortizol Tayin Yöntemleri	12
2.2. Sensörler.....	12
2.2.1. Elektrokimyasal Sensörler.....	13
2.2.2. Kütleye Duyarlı Sensörler	14
2.2.3. Optik Sensörler.....	15
2.2.3.1. Fiber Optik Sensör	18
2.2.3.2. Entegre optik (IO) sensörler	18
2.2.3.3. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)	19
2. 3. Moleküler Baskılama	24
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	29
3.1. Kimyasal Malzemeler	29
3.2. Optik Sistem.....	29
3.3. Fonksiyonel Monomerin Sentezi ve Karakterizasyonu	30
3.4. Altın Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu	30

3.5. Plazmonik Sensör Yüzeyinin Modifikasyonu	31
3.6. Plazmonik Sensör Yüzeylerinin Hazırlanması	32
3.6.1. AuNP-MIP plazmonik sensörün hazırlanması	32
3.6.2. MIP plazmonik sensörün hazırlanması	34
3.6.3. AuNP-NIP plazmonik sensörün hazırlanması	34
3.7. Plazmonik Sensör Yüzeylerinin Karakterizasyonu	35
3.7.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi	35
3.7.2. Temas Açısı Analizi	36
3.7.3. FTIR-ATR Analizi	37
3.8. Plazmonik Sensörler ile Kinetik Analizler	37
3.8.1. Değişim Analizleri	37
3.8.2. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri Analizleri	38
3.8.3. Seçicilik Analizleri	39
3.8.4. Tekrar Kullanılabilirlik Analizleri	40
3.8.5. Karmaşık Ortam Analizleri	40
3.9. Validasyon Analizleri	40
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	42
4.1. Altın Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu	42
4.2. MAH-AuNP-Kortizol Ön-komplekslerin Karakterizasyonu	43
4.3. Plazmonik Sensör Yüzeylerinin Karakterizasyonu	43
4.4. Plazmonik Sensörler ile Kinetik Analizler	48
4.5. Seçicilik Analizleri	58
4.6. Baskılama Etkinliğinin Belirlenmesi	59
4.7. Tekrar Kullanılabilirlik Analizi	61
4.8. AuNP'lerin Plazmonik Sensör Hassasiyetini Artırıcı Etkisi	62
4.9. Karmaşık Ortam Analizleri	63
4.10. Validasyon Analizleri	66
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	68
6. KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sensörlerin sınıflandırılmasının şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.2. Yüzey plazmon rezonans sensörün şematik gösterimi.....	21
Şekil 2.3. Yüzey plazmon rezonans algılama ünitesi.....	21
Şekil 2.4. Şekillerine ve morfolojilerine göre farklı AuNP türleri.....	23
Şekil 2.5. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi.....	26
Şekil 3.1. SPR imager II cihazının görüntüsü.....	29
Şekil 3.2. Zeta-sizer cihazının görüntüsü.....	31
Şekil 3.3. Altın sensör yüzeyine vinil gruplarının bağlanmasının şematik gösterimi.....	32
Şekil 3.4. MAH-AuNP-kortizol, ön-kompleks yapısının şematik gösterimi.....	33
Şekil 3.5. Döndürmeli kaplamanın ve UV lambasının görüntüleri.....	33
Şekil 3.6. AFM cihazının görüntüsü.....	36
Şekil 3.7. Temas açısı cihazının görüntüsü.....	36
Şekil 3.8. FTIR-ATR spektrofotometre cihazının görüntüsü.....	37
Şekil 4.1. AuNP'lerin boyut analizi sonucu.....	42
Şekil 4.2. MAH-AuNP-kortizol ön-komplekslerin FTIR-ATR spektrumları.....	43
Şekil 4.3. Modifiye edilmemiş boş yüzeyin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri.....	44
Şekil 4.4. AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri.....	44
Şekil 4.5. MIP plazmonik sensör yüzeyinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri.....	44
Şekil 4.6. AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeyinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri.....	45
Şekil 4.7. Modifiye edilmemiş boş yüzeyin temas açısı görüntüsü.....	45
Şekil 4.8. AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyinin temas açısı görüntüsü.....	46
Şekil 4.9. MIP plazmonik sensör yüzeyinin temas açısı görüntüsü.....	46
Şekil 4.10. AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeyinin temas açısı görüntüsü.....	46
Şekil 4.11. Plazmonik sensör yüzeylerinin temas açısı değerleri.....	47

Şekil 4.12. AuNP-MIP ve MIP plazmonik sensörlerin FTIR-ATR spektrumları.....	48
Şekil 4.13. AuNP-MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensörlerin FTIR-ATR spektrumları.....	48
Şekil 4.14. 0.01 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.....	49
Şekil 4.15 0.1 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.....	50
Şekil 4.16. 1 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.....	50
Şekil 4.17. 10 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.....	51
Şekil 4.18. 25 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.....	51
Şekil 4.19. 50 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.....	52
Şekil 4.20. 75 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.....	52
Şekil 4.21. 100 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.....	53
Şekil 4.22. Farklı derişimlerdeki kortizol örnekleri için elde edilen sensorgramlar.....	53
Şekil 4.23. Farklı derişimlerdeki kortizol örnekleri için elde edilen kalibrasyon grafiği.....	54
Şekil 4.24. Farklı derişimlerdeki kortizol örnekleri için elde edilen sensorgramlar.....	54
Şekil 4.25. Farklı derişimlerdeki kortizol örnekleri için elde edilen kalibrasyon grafiği.....	55
Şekil 4.26. Denge analiz (Scatchard) yaklaşımı.....	56
Şekil 4.27. Bağlanma kinetik yaklaşımı.....	56
Şekil 4.28. Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli.....	57
Şekil 4.29. Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli.....	58
Şekil 4.30. AuNP-MIP plazmonik sensörün seçicilik sensorgramları.....	59
Şekil 4.31. MIP plazmonik sensörün seçicilik sensorgramları.....	60
Şekil 4.32. AuNP-NIP plazmonik sensörün seçicilik sensorgramları.....	60
Şekil 4.33. Plazmonik sensörlerin sinyal yanıtlarının kıyaslanması grafiği.....	61
Şekil 4.34. AuNP-MIP plazmonik sensörün tekrar kullanılabilirlik sensorgramı.....	62
Şekil 4.35. AuNP'lerin hassasiyet artırıcı etkisinin sensorgramları.....	63
Şekil 4.36. AuNP-MIP plazmonik sensörün karmaşık ortam sensorgramları.....	64
Şekil 4.37. Kortizolün HPLC ile analizi için kullanılan kalibrasyon eğrisi.....	66

Şekil 4.38. Kortizol katkılanmış ve katkılanmamış yapay idrar örneğinin HPLC kromatogramları.....67

Şekil 4.39. Kortizol katkılanmış ve katkılanmamış yapay plazma örneğinin HPLC kromatogramları.....67



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. AuNP-MIP, AuNP-NIP ve MIP plazmonik sensörlerin hazırlanma reçetesi.....	35
Çizelge 4.1. Kinetik sabitler.....	55
Çizelge 4.2. Adsorpsiyon izoterm modeli sabitleri.....	58
Çizelge 4.3. Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.....	61
Çizelge 4.4. Kortizol tayininde kullanılan sensörler ile bu çalışmanın karşılaştırılması.....	65



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ml	Mililitre
L	Litre
μ L	Mikrolitre
ppb	Milyarda bir
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
nm	Nanometre
K_A	Bağlanma Sabiti
K_D	Ayrılma Sabiti
C	Derişim
t	Zaman
g	Gram
mg	Miligram
μ g	Mikrogram

Kısaltmalar

MAH	N-metakroil-(L)-histidin metil ester
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
FTIR-ATR	Fourier dönüşümlü kızılötesi-zayıflatılmış toplam yansıma
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
NIP	Moleküler baskılanmamış polimer
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
AuNP	Altın nanopartikül
TMSPM	3-(trimetoksilil)propil metakrilat
AIBN	Azobisizobutironitril
LOD	En düşük tayin limiti
LOQ	En düşük miktar tayin limiti
UV	Ultraviyole
CBG	Kortikosteroid bağlayıcı globüline
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
CBG	Kortikosteroid bağlayıcı globuline
11- β -HSD1	11-beta-hidroksisteroid dehidrojenaz 1
11- β -HSD2	11-beta-hidroksisteroid dehidrojenaz 2
PVN	Paraventriküler çekirdek
HPA	Hipotalamik-hipofiz-adrenal
ELISA	Enzim bağlı immüno sorbent analiz
SNS	Sempatik sinir sistemi
PNS	Parasempatik sinir sistemi

SERS	Yüzey geliştirilmiş Raman saçılması
CARS	Uyumlu antistokes Raman saçılması
SPM	Yüzey plazmon mikroskobu
MEMS	Mikro elektro mekanik sistem
OWLS	Optik dalga kılavuzu ışık modu spektroskopisi
FO	Fiber optik
PIU	Piksel yoğunluk birimi
SPR	Yüzey plazmon rezonans



1. GİRİŞ

Kortizol, psikolojik ve fizyolojik strese tepki olarak insan vücudu tarafından salınan bir steroid hormondur ve bu nedenle vücudun stres tepkisinde, metabolizma ve bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Yüksek kortizol düzeylerinin yansıttığı kronik stres, yüksek kaygı, depresyon, kardiyovasküler hastalıklar ve zayıflamış bağışıklık tepkisi riskleri ile ilişkilidir (Tang ve ark., 2021). Etkili, hızlı ve güvenilir kortizol tespiti, kapsamlı kendi kendini izleme, sağlık yönetimi ve kişiselleştirilmiş sağlık hizmetlerine yönelik dinamik stres-tepki profili oluşturma için son derece değerlidir (Hogewelst ve ark., 2019, Gatti ve ark., 2009). Kişisel sağlığın ilgi odağı haline geldiği, hızla gelişen bir dünyada, basit, hızlı, merkezi olmayan testler ve kortizolün invaziv olmayan izlenmesi, kişisel stres yönetimi için rehberlik sağlamak için kritik öneme sahiptir.

Kortizol, tükürük, kan, idrar, ter ve interstisyel sıvılar dahil olmak üzere çeşitli biyolojik sıvılarda bulunabilir. Bu biyoakışkanlarda kortizolün merkezi laboratuvar ortamlarında gerçekleştirilen geleneksel tespiti, hedef kortizol ile enzim etiketli analit arasındaki rekabetçi immünoassaylere ve ardından enzimatik reaksiyon ürününün optik veya elektrokimyasal ölçümlerine dayanır (Moreno-Guzmán ve ark., 2010, Raff, Homar, Skoner, 2003). Optik sensörler sınıfından olan yüzey plazmon rezonans sensörleri, iki katmandaki kırılma indisi değişikliklerini ölçen iki ana nesnenin (polarize ışık ve metal katman) ilişkisine dayanır. Yüzey plazmon rezonans sensörleri, farklı molekül türleri arasındaki etkileşimlerin izlenmesi için güçlü araçlardır. Ayrıca moleküllerin bağlanması sırasında özgüllük, afinite ve kinetik parametreler gerçek zamanlı olarak belirlenebilir. Algılayıcı yüzeylerinde yüksek özgüllük, seçicilik ve hassasiyete sahip tanıma bölgeleri oluşturmak gereklidir.

Son yıllarda, hedef moleküllerin iç boşluklarının polimerik matrikslere dönüştürülmesiyle “moleküler baskılama” adı verilen belirgin bir yöntem geliştirilmiştir. Hedefin tanınması, moleküler baskılama ile ayırma, tespit ve saflaştırma için kullanılan birçok çalışmada başarıyla uygulanır (Erdem ve ark., 2019). Moleküler olarak baskılanmış polimerler, kalıp molekülün zor bir şekilde çıkarılması, yavaş kütle transfer hızı ve kalıp molekül için zayıf sitelere erişilebilirlik gibi bazı dezavantajlara sahip olduğundan bu dezavantajların üstesinden gelmek için, tanıma bölgeleri, alt tabaka yüzeyinin üzerine veya yakınına yerleştirilmelidir. Yüzey baskılama tekniği, makromoleküller, özellikle biyolojik olarak ilgili kalıp moleküller (protein, bakteri, virüs vb.) için kullanılır. Makromoleküllerin yüzeylerinde bağlanma bölgeleri oluşturmak için farklı yöntemlerin kullanılması gerekir. Bu

teknikle ayırma ve anlamlandırmadaki önemli sorunlar çözülebilir (Ren ve Zare, 2012; Schirhagl, Ren, Zare, 2012). Yüzey moleküler olarak baskılanmış polimerlerin baskılı boşlukları yüzeyde dağılmıştır. Bu da kalıp moleküllerin kolayca çıkarılmasını ve difüzyonunu kolaylaştırır. Kalıp molekülün çıkarılmasından sonra, baskılı yüzey özel olarak işlevsel hale gelir (Hachuşka ve ark., 2010; Saylan ve ark., 2017, Li ve ark., 2014). Ayrıca, nanoteknoloji kullanılarak moleküler baskılanmış polimerlerin bağlanma kinetiğini iyileştirmek için yeni analitik yöntemler geliştirilmiştir.

Bu çalışmada, altın nanopartiküller ile modifiye edilen kortizol baskılanmış plazmonik sensör hazırlanarak kortizolün hem sulu çözeltiden hem de yapay plazma ve yapay idrar gibi karmaşık bir ortamda gerçek zamanlı kortizol tayini gerçekleştirilmiştir. Kortizol tayin etmek amacıyla kortizole özgü tanıma bölgeleri içeren moleküler baskılanmış plazmonik sensörler hazırlanmış ve kortizolün tayin limitini düşürmek ve plazmonik sensör sinyal yanıtının hassasiyetini arttırmak amacıyla ortama altın nanopartiküller eklenmiştir. Bu çalışma aşğıdaki basamaklar sırasıyla izlenerek gerçekleştirilmiştir:

Plazmonik sensör sinyal yanıtının hassasiyetini arttırmak amacıyla eklenen altın nanopartiküller (AuNP) sentezlenmiş ve Zeta boyut analizi ile karakterizasyonu yapılmıştır.

Hem AuNP ile hem de kortizol ile kompleks yapıcı N-metakroil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomeri sentezlenmiş ve MAH-AuNP ve MAH-AuNP-kortizol ön-kompleksi ayrı ayrı hazırlanarak Fourier dönüşümlü kızılötesi-zayıflatılmış toplam yansıma (FTIR-ATR) spektrofotometresi ile ayrı ayrı karakterize edilmiştir.

Moleküler baskılanmış plazmonik sensör hazırlamak için yüzeyler 3-(trimetoksilil)propil metakrilat (TMSPM) ile modifiye edilerek vinil grupları bağlanmıştır.

Hazırlanan MAH-AuNP-kortizol ön-kompleksine 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomeri eklenerek göreceli hidrofilik karışım elde edilmiştir.

Hazırlanan karışıma etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcısı eklenerek monomer karışımı polimerizasyona hazır hale getirilmiştir.

Hazırlanan monomer karışımına 2,2-azobisisobutironitril (AIBN) başlatıcısı eklenerek TMSPM ile modifiye edilmiş sensör yüzeyine damlatılmış ve döndürmeli kaplayıcı kullanılarak yüzeyin homojen bir şekilde kaplanması sağlanmıştır.

Polimerizasyon işlemi, ultraviyole (UV) ışığı altında monomer karışımının kortizol baskılanmış nanofilme dönüştürülmesi sağlanarak moleküler baskılanmış plazmonik sensör (AuNP-MIP) hazırlanmıştır.

Kortizol kalıp molekülü asetik asit ve metil alkol karışımı desorpsiyon çözeltisi kullanılarak polimerik nanofilmden uzaklaştırılmıştır.

AuNP'in sinyal artırıcı etkisinin doğrulanması için AuNP'ler eklenmeden hazırlanan kortizol baskılanmış (MIP) plazmonik sensör hazırlanarak kinetik ve seçicilik çalışmalarında kullanılmıştır.

Baskılama işleminin etkinliğini tespit edebilmek için baskılanmamış (AuNP-NIP) plazmonik sensörü kortizol kalıp molekülü olmadan AuNP-MIP plazmonik sensör ile aynı koşullarda hazırlanmış ve seçicilik çalışmalarında kullanılmıştır.

AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensörlerin yüzeylerindeki polimerlerin karakterizasyon çalışmaları FTIR-ATR spektrofotometresi, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve temas açısı analizleri yapılarak gerçekleştirilmiştir.

AuNP-MIP plazmonik sensörün kinetik çalışmalarında kullanılmak üzere PBS-etil alkol içerisinde sekiz farklı kortizol derişim (0.01-100 ppb) değerine sahip kortizol örnekleri hazırlanarak adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve gerçek zamanlı kırılma indisi değerlerindeki değişim plazmonik yanıt olarak ölçülmüştür.

AuNP-MIP plazmonik sensörün kinetik çalışmalarından elde edilen veriler ışığında en düşük tayin limiti (LOD) ve en düşük miktar limiti (LOQ) değerleri hesaplanmıştır.

AuNP-MIP plazmonik sensörün kinetik çalışmalarından elde edilen veriler ışığında bağlanma, Scatchard, Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modellerine ait matematiksel hesaplamalar yapılarak uygun adsorpsiyon izoterm modeli belirlenmiştir.

MIP plazmonik sensörün kinetik çalışmalarında kullanılmak üzere PBS-etil alkol içerisinde altı farklı kortizol derişim (1-100 ppb) değerine sahip kortizol örnekleri hazırlanarak adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve gerçek zamanlı kırılma indisi değerlerindeki değişim plazmonik yanıt olarak ölçülmüştür.

AuNP-MIP plazmonik sensörün seçiciliğini test etmek amacıyla, şekil ve boyut gibi özellikler bakımından kortizol ile benzer özellikler gösteren klobetazol ve flutikazon yarışmacı ajan olarak seçilmiş ve kırılma indisi değişiklikleri ölçülmüştür.

Ayrıca MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensörleri ile klobetazol ve flutikazon kullanılarak seçicilik çalışmaları yapılmış ve elde edilen veriler ışığında seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları hesaplanmıştır.

AuNP-MIP plazmonik sensörün tekrar kullanılabilirliğinin anlaşılabilmesi için aynı kortizol örneği beş defa peşpeşe verilerek sinyal yanıtı verme performansında herhangi bir kayıp olup olmadığı araştırılmıştır.

AuNP-MIP plazmonik sensör ile kortizol eklenen yapay plazma ve yapay idrar örnekleri etkileştirilerek sensörün karmaşık ortamdaki çalışabilirliği ölçülmüştür.

AuNP-MIP plazmonik sensör ile kortizol seçici tayininin validasyon çalışmaları yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleriyle yapılmıştır.



2. GENEL BİLGİ

2. 1. Kortizol

Hidrokortizol olarak da bilinen kortizol, memelilerin adrenal bezinde adrenal korteks tarafından üretilen stres yönetiminden sorumlu ana steroid hormondur. Kortizol, düşük moleküler ağırlıklı (~362 Dalton) bir lipofilik steroiddir. Kortizol, bir steroid hormondur ve kolesterolden sentezlenir. Adrenal korteksin zona fasikülata tabakasında sentezlenir. Ön hipofizden salınan adrenokortikotropik hormon (ACTH), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörlerini artırma ve kolesterolü pregnenolona dönüştüren ve kortizol sentezinin hız sınırlayıcı basamağı olan kolesterol desmolaz aktivitesini artırma işlevi görür (Thau, Gandhi, Sharma, 2021). ACTH'nın adrenal korteks hücrelerindeki membran reseptörlerine bağlanmasının ardından kortizol sentezlenir ve kan dolaşımına salınır. Glukokortikoidlerin çoğu, ya kortikosteroid bağlayıcı globuline (CBG) ya da albümine bağlı olarak aktif olmayan bir biçimde dolaşır. İnaktif form, çoğu dokuda 11-beta-hidroksisteroid dehidrojenaz 1 (11- β -HSD1) tarafından aktif formuna dönüştürülürken, 11- β -HSD2 böbrek ve pankreasta kortizolü tekrar kortizona etkisiz hale getirir (Ramamoorthy ve Cidlowski, 2016).

Kortizol aktif (konjuge olmayan) formda iken lipid bariyerlerini kolayca geçebilir. Bu nedenle serbest kortizol beyin omurilik sıvısı, tükürük, ter, semen, idrar, gibi tüm vücut sıvılarında görülür. Kortizol adrenal korteksin orta katman tabakasından salınan ana glukokortikoid hormondur ve kromozom 10, CYP17 bölgesinde bulunan ve P450 enzimleri olarak bilinen spesifik enzimler tarafından üretilir. Etki mekanizmaları, çok çeşitli biyolojik bölgelerde yaygın olarak dağıtılan ve böylece birçok farklı hedef dokuyu içeren spesifik reseptörlere bağlanmalarına bağlıdır.

2.1.1. Kortizolün Mekanizması

Stres hormonu olarak bilinen kortizol hormonu, insanların psikolojik veya fiziksel olarak stresli olduklarında böbrek üstü bezi tarafından salgılanır. Bu salgı, hipotalamus tarafından salgılanan kortikotropin salgılatıcı hormon tarafından uyarıldığında, hipofiz bezi tarafından salgılanan adrenokortikotropik hormon tarafından adrenal bez uyarıldığında meydana gelir. Bu seri kortizol salgılama sistemi, kronik stresten etkilenen ve anormal kortizol

salgılanmasına neden olan hipotalamus-hipofiz bezi-adrenal bez eksenini olarak adlandırılır (Ku ve ark., 2020).

Bazal koşullar altında, kortizol, uyandıktan sonra sabah maksimum 30-50 dakika ile başlayan ve gün boyunca kademeli olarak azalan ve <1 saat gibi kısa bir yarılanma ömrü olan karakteristik bir sirkadiyen sekresyon ritmine sahiptir (Bakke ve ark., 2004). Kortizol, insanda dolaşan başlıca glukokortikoiddir ve nispeten yüksek miktarlarda, 15 mg gün⁻¹ salgılanır. Endojen glukokortikoidler, hipotalamo-hipofiz-adrenal eksenin kontrolü altında adrenal korteksin fasiküler bölgesinde üretilir ve albümin ve spesifik serum protein transkörtin ile protein kompleksleri şeklinde hedef reseptörlerine taşınır. Kortizol dolaşımında bağlı form ve serbest formda bulunur. Serbest kısım biyolojik olarak aktiftir ve toplam kortizol salgılama oranının sadece %1'ini temsil eder.

Kortizol/kortizon derişiminin kontrolü, aktif kortizolün aktif olmayan metabolit kortizona dönüşümünü katalize eden 11-beta-hidroksisteroid dehidrojenazın (11-β-HSD) iki izoformu tarafından çalıştırılır. İki izomerinden biri olan 11-β-HSD tip 1, ağırlıklı olarak bir 11-okso-redüktaz görevi görür (yani, kortizonu kortizole dönüştürür), 11-β-HSD tip 2, 11-β-dehidrojenasyonu katalize eder (kortizolü kortizona dönüştürür) (Frasconi ve ark., 2009). Serbest kortizol kapillerden dokulara pasif difüzyon ile geçebilir. Total kortizol, bağlı kortizol ile serbest kortizolün toplanmasıyla elde edilir (Levine ve ark., 2007).

Glukokortikoidlerin çoğu, ya kortikosteroid bağlayıcı globuline (CBG) ya da albümine bağlı olarak aktif olmayan bir biçimde dolaşır. İnaktif form, çoğu dokuda 11-beta-hidroksisteroid dehidrojenaz 1 (11-β-HSD1) tarafından aktif formuna dönüştürülürken, 11-β-HSD2 böbrek ve pankreasta kortizolü tekrar kortizona dönüştürür. Hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen, kortizolün hem üretimini hem de salgılanmasını düzenler. CBG, kandaki toplam kortizolün yaklaşık %90'ını bağlayan, kortizol için ana taşıma proteindir. Albümin, bazı raporlarda %10'a kadar değişse de, toplamın yaklaşık %4'ü kadar serbest düzeyle birlikte yaklaşık %6 ila %7'sini taşır (Bikle, 2020). Kortizolün ana fraksiyonu, plazma proteini kortikosteroid bağlayıcı globuline (CBG veya transkörtin) ve albümine bağlı olarak dolaşır. Bunlar, hormonun hedef hücrelerin zarına nüfuz etmesini engeller. CBG, kortizol için yüksek afiniteli spesifik plazma taşıma glikoproteindir ve her CBG molekülünün tek bir steroid

bağlanma yeri vardır. CBG'nin birincil rolü, glukokortikoidin biyoygunluğunu ve metabolik klirensini düzenlemektir (Gatti ve ark.,2009).

Kortizol salınımı hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin kontrolü altındadır. Kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH), hipotalamusun paraventriküler çekirdeği (PVN) tarafından salınır. Daha sonra, adrenal kortekse etki eden ACTH serbest bırakmak için ön hipofiz üzerinde hareket eder. Negatif bir geri besleme döngüsünde, yeterli kortizol hem ACTH hem de CRH salınımını engeller. HPA eksenini sirkadiyen bir ritmi takip eder. Böylece kortizol seviyeleri sabahları yüksek, geceleri düşük olacaktır (Ramamoorthy ve Cidlowski, 2016). Kortizol gibi steroid hormonları birincil habercilerdir. Yağda çözünebilir özellikleri nedeniyle sitoplazmik membranı geçebilirler. Hücre zarları fosfolipid çift katmanlarından oluşur; bunlar yağda çözünmeyen moleküllerin geçmesini engeller. Kortizol hücre zarından geçip hücreye girdikten sonra sitoplazmada belirli reseptörlere bağlanır. (Thau ve ark., 2019).

2. 1. 2. Kortizolün İşlevleri

Hücrelerin çoğu kortizol için reseptörler içerdiğinden bu hormon kan dolaşımına salındığında hangi tür hücelere etki ettiğine bağlı olarak birçok farklı eylemin tetikleyicisi olabilir. Glukokortikoid reseptörleri vücuttaki hemen hemen tüm dokularda bulunur. Bu nedenle kortizol sinir, bağışıklık, kardiyovasküler solunum, üreme, kas-iskelet, örtü sistemleri gibi hemen hemen her organ sistemini etkileyebilir (Kadmiel ve Cidlowski, 2013). Bir steroid hormon olan kortizol, çok sayıda hastalık için bir biyobelirteçtir ve kan basıncı, glikoz seviyeleri ve karbohidrat metabolizması gibi çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca kardiyovasküler, immün, renal, iskelet ve endokrin sistemin homeostazında önemli bir rol oynar (Oakley ve Cidlowski, 2013). Gündüz-gece döngüsü dışında, yeme alışkanlıkları ve fiziksel aktivite gibi kontrol edilebilir birkaç faktör kortizol seviyelerini etkileyebilir. Kortizol düzeylerindeki anormal artış, iltihabı engeller, bağışıklık sistemini baskılar, kandaki yağ ve amino asit düzeylerini yükseltir. Kortizol varyasyonu üzerindeki en baskın etki psikolojik/duygusal strese gelir, bu nedenle kortizol halk arasında “stres hormonu” olarak adlandırılır (Kaushik ve ark.,2014). Kortizolün temel görevlerinde biri tehlike, baskı gibi durumlarda ortaya çıkan zihinsel, ruhsal fiziksel strese karşı vücudun savunma mekanizmalarını harekete geçirmektir. HPA

ekseni ve son ürünü olan kortizol, strese yeterli yanıt için gereklidir. Kortizol, stres sonrası homeostazın eski haline gelmesinde rol oynayan önemli bir steroid hormondur. İnsan kan serumundaki seviyesi iyi bilinen bir stres göstergesidir (Mitchell, Lowe ve Ingram 2008). İnsan vücudu sürekli olarak iç ve dış stres faktörlerine tepki verir. Vücut stresli bilgiyi işler ve tehdidin derecesine bağlı olarak bir tepki ortaya çıkarır. Vücudun otonom sinir sistemi, sempatik sinir sistemi (SNS) ve parasempatik sinir sistemi (PNS) olarak ikiye ayrılır. Stres zamanlarında, SNS etkinleştirilir. SNS, bir dizi hormonal ve fizyolojik tepkiye neden olan dövüş ya da kaç tepkisinden sorumludur. Amigdala, uygun yanıtı belirlemek için korku, uyarılma ve duygusal uyarınları işlemekten sorumludur. Gerekirse amigdala hipotalamusa bir stres sinyali gönderir (Hakamata ve ark., 2017). Hipotalamus daha sonra SNS'yi aktive eder ve adrenal bezler epinefrin gibi bir katekolamin dalgalanması salgılar. Bu, artan kalp hızı ve solunum hızı gibi etkilere neden olur. Vücut uyarınları tehdit olarak algılamaya devam ederken, hipotalamus HPA eksenini harekete geçirir. Kortizol, adrenal korteksten salınır ve vücudun yüksek tetikte kalmaya devam etmesini sağlar. Akut olarak kortizolün katabolik mekanizmaları vücuda enerji sağlar (Lee, Kim, Choi, 2015).

Kortizol, her vücut sistemini o kadar büyük ölçüde etkileyen bir glukokortikoiddir ki, eylemlerini kısaca karakterize etmek zordur (Ousova ve ark., 2004). Glukokortikoidlerin temel işlevlerinden biri, amino asitlerin ve hücrelerden gelen yağın, onları enerji olarak ve aynı zamanda yeni bileşiklerde sentez için kullanılabilir hale getiren hızlı mobilizasyonudur. Bu işlev, vücudun fizyolojik ve psikolojik stres faktörlerine tepkisini düzenlemede merkezi bir rol oynar (Mizoguchi, 2004). Glukokortikoidler ayrıca mineralokortikoid aktiviteye sahiptir, ayrıca travmatize dokular üzerinde antiinflamatuvar etkiye sahiptir ve bağışıklık sistemini baskırlar. Merkezi olarak, glukokortikoidler birçok beyin aktivitesinin sürdürülmesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca glukokortikoidlerin prefrontal kortikal bilişsel işlev için, özellikle de işleyen bellek için önemi bildirilmiştir. Ek olarak, glukokortikoidlerin uyku düzeni, ruh hali ve duygusal girdilerin alınması gibi insan davranışı üzerinde birçok etkisi vardır. Kortizol, insan glukokortikoidlerinin en önemlisidir ve kadınlarda erkeklerden daha yüksek seviyelerde bulunur (Levine ve ark., 2007).

Glukokortikoidlerin bağışıklık sisteminde bir takım etkileri vardır. Proinflamatuvar T hücrelerinin apoptozunu indükler, B hücresi antikor üretimini baskırlar ve inflamasyon sırasında nötrofil göçünü azaltırlar (Kadmiel, Cidlowski , 2013). Kortizol, vücudun kan şekeri düzeylerini kontrol etmek ve metabolizmayı düzenlemekle sorumludur. Kan şekeri

seviyesini artırmak için proteini glikoza dönüştürür; sabit tutmak içinse insülin hormonuyla birlikte çalışır. Kortizol, strese ve düşük kan-glikoz derişimine yanıt olarak salınır, bu da glukoneogenez ve bağışıklık sisteminin baskılanması yoluyla kan şekeri seviyesinde bir artışa neden olur. Kortizol gibi glukokortikoidlerin varlığı, kan şekerinin beyne ulaşmasını artırır. Kortizol karaciğer, kas, yağ dokusu ve pankreas üzerinde etkilidir. Karaciğerde yüksek kortizol seviyeleri glukoneogenezini artırır ve glikojen sentezini azaltır (Kuo ve ark., 2015).

Glukoneogenez, glikozu piruvat moleküllerine dönüştürmek için kullanılan glikolizi tersine çevirir. Glikoliz, substrat düzeyinde fosforilasyon ve oksidasyon reaksiyonları yoluyla enerjiyi serbest bırakmak için kullanılır. Glikolizden farklı olarak glukoneogenez, vücut enerjije ihtiyaç duyduğunda aktif hale gelir. Kortizol varlığında kas hücreleri glikoz alımını ve tüketimini azaltır ve protein yıkımını artırır (Exton, 1979). Yağ dokularında kortizol lipolizi artırır. Son olarak, kortizol, insülini azaltmak ve glukagonu artırmak için pankreas üzerinde etki eder. Kortizol, glukagon, epinefrin ve diğer katekolaminlerin aktivitesini artırır. Glikojen, lipidler ve proteinlerin parçalanmasını teşvik ederek karbohidrat, yağ ve protein kullanımını yönetir. Kortizol hafıza oluşumunu etkiler ve hafızayı korur. Kısa süreli olarak artması durumu hafızanın oluşumuna yardımcı olurken, uzun süreli artması hipokampus hücrelerinin zedelenmesine neden olur. Bu hasar öğrenmenin bozulmasına neden olur. Kanda epinefrin ve nörepinefrin artışı damarlarda daralma yaparak kan basıncının artmasına neden olur. Kortizol yetmezliği durumunda vazodilatasyon genel bir tablo olarak ortaya çıkar. Kortizol ayrıca böbreklerden hipotonik idrar üretimine neden olur (Özgöçer, 2016). Kortizol, tuz ve su dengesini kontrol eder. Kortizol, birçok türde doğum sırasında kilit süreçleri tetiklemekten sorumludur. Fetüsün gelişimine yardımcı olur. Uyku-uyanıklık döngüsünü düzenler. Kısa süreli salgılanan kortizol vücut direncini artırır. Kortizol nöronların elektriksel aktivitelerini etkileyerek kişilerin uyarılabilirlik, davranış ve ruhsal durumunu düzenlenmesini sağlar (Aydıncal ve ark.,2014).

2.1.3. Kortizol Seviyelerindeki Değişime Bağlı Hastalıklar

Kortizolün sağlığa etkileri, hormonun vücutta hangi sıklıkta dolaştığına bağlıdır. Kortizolün fazla veya az üretimi vücutta hastalıklara neden olabilir. Psikolojik veya fiziksel strese maruz kalma sıklıkla HPA ekseninin aktivasyonuna neden olur. Stres sırasında yükselen CRH,

ACTH ve kortizol seviyeleri, vücudun allostatik homeostatik tepkileri olarak yorumlanır. HPA aktivitesinin kronik düzensizliği, psikosomatik ve psikiyatrik bozuklukların başlangıcı ve seyri ile ilişkili görünür. Örneğin, majör depresyonda HPA hiperaktivitesi gözlenmiştir ve ayrıca bulaşıcı ve kardiyovasküler hastalıklara duyarlılıkla ilişkili görünür. Öte yandan, HPA hiporeaktivitesinin lupus eritematozus, multiplskleroz veya nörodermit gibi otoimmün süreçlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wust ve ark., 2000).

HPA ekseninin son ürünü olarak glukokortikoid hormon kortizolün anormal salgılanması, kronik psikososyal stres deneyimini sağlık üzerindeki olumsuz etkilere bağlamada çok önemli bir faktör olarak kabul edilir. Akut stres faktörlerine karşı reaktivitenin yanı sıra, kortizol sekresyonunun sirkadiyen düzenlemesindeki değişikliklerin de bu bağlamda önemli olduğu düşünülmektedir (Stalder ve ark., 2015). Kortizol sekresyonu 24 saatlik bir döngü boyunca sirkadiyen bir ritim izler, en yüksek seviyelerin gün doğumu sırasında (uyandıktan 30 dakika sonra), gün içinde orta seviyelerde ve sağlıklı bireylerde gece uykusunda önemli ölçüde düşük seviyelerde olur. Kortizol seviyesi gün içinde değiştiği için kortizol testinin zamanlaması önemlidir. Kan basıncı, glikoz seviyeleri ve karbohidrat metabolizması gibi çeşitli fizyolojik süreçler, bir glukokortikoid hormon ve stres için klinik olarak kanıtlanmış bir biyobelirteç olan kortizol tarafından düzenlenir. Yüksek bir kortizol seviyesinin inflamasyonu engellediği, bağışıklık sistemini baskıladığı ve kandaki yağ ve amino asit seviyelerini arttırdığı bilinir (Khan ve ark., 2019).

Kortizol seviyelerinde beslenme alışkanlıkları ve fiziksel aktivitelere bağlı olarak meydana gelen dalgalanmalar göz önüne alındığında, normal bir aralık 250 ng/mL ile 20 ng/mL arasında olarak tanımlanmıştır. Vücuttaki kortizol fazlalığı, obezite, yorgunluk ve kemik kırılabilirliği ile Cushing sendromuna yol açabilirken; kortizol eksikliği, aşırı kilo kaybı, yorgunluk ve cilt kıvrımlarının koyulaşması ile kendini gösteren Addison hastalığına neden olabilir (Dhull ve ark., 2019). Birçok psikolojik stres biçiminin kortizol sentezini ve salınımını arttırdığına dair tutarlı kanıtlar vardır. Aşırı ve sürekli kortizol salgılanması ciddi yan etkilere neden olabilir. Kortizol seviyelerindeki kronik yükselmeler, beyin yaşlanmasına, hipokampal atrofiye ve bilişsel bozulmaya, kemik mineral yoğunluğu kaybına, sarkopeniye veya immün fonksiyon bozukluğuna yol açabilir. Kortizol derişiminin

mutlak değerini ve sirkadiyen varyasyonunu, bireylerde stresle ilgili hastalıkların tanı indekslerinde kullanmak mümkündür (Yamaguchi ve ark., 2013).

Kortizol seviyeleri, yaralanma ve hastalık gibi fiziksel streslerin yanı sıra depresyon ve yorgunluk gibi psikolojik streslere yanıt olarak artar. Serum kortizol düzeylerinin ölçülmesi, hastaların hastalık durumunun yanı sıra genel stresin de önemli bir tanı göstergesi haline gelmiştir (Stevens ve ark., 2008). Hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenleri tarafından denetlenen ve böbrek üstü bezi korteksinde üretilen glukokortikoid hormonlardan, başlıcası olan kortizolün, glikoz intoleransı, obezite ve hipertansiyona katkısının olduğu bilinir. Artmış kortizol salınımı, özellikle abdominal obezitesi olanlarda glikoz toleransını ve insülin sekresyonunu bozabilir. Yağ ve proteinlerin yıkımı, ve karaciğer dışında bulunan amino asit ve keton cisimlerinin seferber edilmesine neden olan kortizol, insülin antagonisti olarak etkisini gösterir. Pankreas beta hücrelerinden insülin salınımını baskılar. Diğer taraftan glukokortikoidler merkezi etkisiyle insülin salınımı üzerine olan vagal uyarıyı artırır. Bu etkiler ile insülin direncine yol açarak kan glikoz düzeyi yükselir ve karaciğerde glikojen oluşumu artar (Gür ve ark., 2005). Bir dizi kesitsel kohort çalışması, 0.900 saatlik daha yüksek plazma kortizolünün ve/veya artan toplam 24 saatlik idrar kortizol metabolit atılımının insülin direnci, yüksek kan basıncı, hiperlipidemi ve hiperglisemi ile ilişkili olduğunu bulmuştur (Andrews ve ark., 2002).

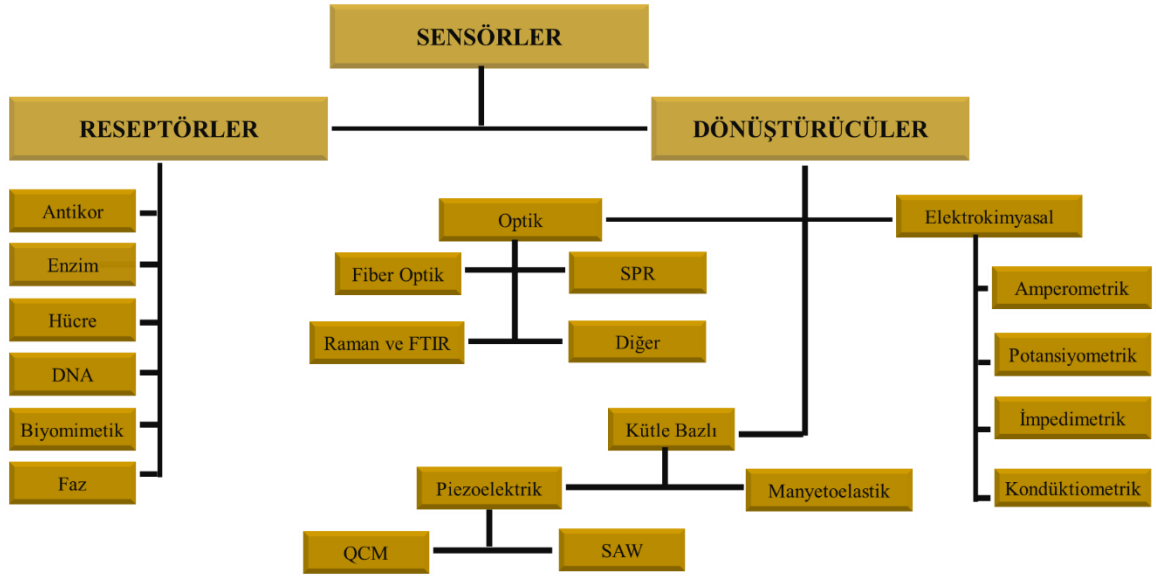
Kritik hastalığa sıklıkla hipotalamik-hipofiz-adrenal eksenin stres kaynaklı aktivasyonuna atfedilen hiperkortizolemi eşlik eder. Bununla birlikte, kritik hastalarda düşük kortizol metabolizmasına bağlı olabilecek düşük kortikotropin seviyeleri de bildirilmiştir. Kritik hastalığa genellikle hastalığın şiddetiyle orantılı olarak hiperkortizolemi eşlik eder. Bu gözlem geleneksel olarak hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin stres kaynaklı aktivasyonuna ve artan kortikotropin kaynaklı kortizol üretimine bağlanmıştır. Ayrıca, kritik hastalık sırasında kortikotropin düzeylerinin yalnızca geçici olarak yükseldiği bildirilmiş ve kortizol düzeyleri yüksek kalırken, diğer stres koşullarında da gözlenen kortizol ve kortikotropin düzeyleri arasında paradoksal bir ayrışma gözlenmiştir. Kritik hastalık esnasında, kortizol metabolize eden enzimlerin baskılanmış ekspresyonu ve aktivitesi ile ilişkili olarak azalan kortizol yıkımı, hiperkortizolemiye ve dolayısıyla kortikotropin baskılanmasına katkıda bulunur (Boonen ve ark., 2013).

2.1.4. Kortizol Tayin Yöntemleri

Kortizol düzeylerinin geleneksel klinik değerlendirmesi, kromatografik teknikler, florimetrik testler, radyoimmünoassayler, akış immünoassayler ve enzim bağlı immüno sorbent testleri (ELISA) gibi çeşitli tayin yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilir. Günümüzde, kortizol seviyelerinin belirlenmesi için Raman spektroskopisi, kuvars kristal mikro terazisi, amperometrik algılama, kimyasal dirençler ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi gibi son teknoloji ölçüm yöntemleri tanıtılmıştır. Bu analitik yöntemler, normal fizyolojik varyasyonlar aralığında kortizol saptamasını mümkün kılsa bile, düşük duyarlılık, özgülük eksikliği, uzun saptama süresi, birden fazla adımın dahil olması nedeniyle prosedürel karmaşıklık ve maliyet nedeniyle kortizolün etkin bir şekilde saptanamamasıyla sınırlıdır. Bu nedenle kortizol tayini için etkin, duyarlı ve seçici bir yöntemin geliştirilmesi önemlidir (Jo ve ark., 2020).

2.2. Sensörler

Sensörler, yüksek seçicilik ve hassasiyet sağlayan minyatür, tam otomatik, gelecek vaat eden analitik araçlardır. Enzimler, antikor, nükleik asit, lektin, hücreler veya dokular gibi spesifik bileşenler kullanılır. Sensörler; optik algılama yöntemleri, elektrokimyasal algılama yöntemleri ve kütle algılama yöntemleri olarak sınıflandırılır (Das, Kumar, Swain, 2013). 1967'de Updike ve Hicks ilk sensörü önermişlerdir. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi günümüzde, optik, elektrokimyasal, termometrik, piezoelektrik veya manyetik gibi algılama için birçok yöntem vardır (Zhao ve ark., 2018).



Şekil 2.1. Sensörlerin sınıflandırılmasının şematik gösterimi.

2.2.1. Elektrokimyasal Sensörler

Elektrokimyasal sensörler, elektroanalitik yöntemlerin duyarlılığını biyolojik bileşenin doğal biyoseçiciliği ile birleştirir. Sensördeki biyolojik bileşen, analitini tanır ve sonuçta analit derişimiyle orantılı olan bir dönüştürücü tarafından izlenen bir elektrik sinyali üreten bir katalitik veya bağlanma olayıyla sonuçlanır. Bu sensör cihazları klinik, çevresel, endüstriyel ve tarımsal uygulamalarda rutin olarak kullanılır (Guth, Vonau, Zosel, 2009). Elektrokimyasal sensörler, elektrokimyasal dönüştürücülerin düşük algılama limitleri ile duyarlılığını biyolojik tanıma süreçlerinin yüksek özgülüğü ile birleştirir. Bu cihazlar, hedef analit ile seçici olarak reaksiyona giren ve çalışılan analitin derişimi ile ilgili bir elektrik sinyali üreten bir biyolojik tanıma elemanı (enzimler, proteinler, antikorlar, nükleik asitler, hücreler, dokular veya reseptörler) içerir. Elektrokimyasal sensörler, tanıma sürecinin doğasına göre, katalitik cihazlar ve afinite sensörleri olmak üzere iki ana kategoriye ayrılabilir. Katalitik cihazlar, hedef analiti tanıyan ve elektroaktif türler üreten enzimleri, tüm hücreleri veya doku dilimlerini içerir. Algılama cihazlarında birçok türde biyotanıma elemanı kullanılmış olmasına rağmen, elektrokimyasal sensörler, yüksek katalitik aktiviteleri ve özgülükleri nedeniyle öncelikle enzimleri kullanır (Grieshaber, 2008).

Tanıma elemanı olarak enzimleri kullanan katalitik sensörler genellikle nispeten basit tasarımlara sahiptir ve pahalı enstrümantasyon gerektirmez. Bu tür sensörler tipik olarak kullanımı kolay, kompakt ve ucuz cihazlardır. Sabit örnek çözeltisine karşı akış koşulları veya toplu numune çözeltisine karşı bir mikroelettrot kullanılarak saptanan bir mikro damla gibi farklı algılama konfigürasyonları kullanılabilir. Katalitik sensörler ayrıca otomatik klinik laboratuvara ve/veya endüstriyel analize kolayca uyarlanabilir. Kişisel kan şekeri izleme cihazları, katalitik sensörlerin en başarılı ticari uygulamasıdır. Katalitik sensörler, hedef analiti tanıyan ve elektroaktif türler veya başka tespit edilebilir sonuçlar üreten enzimler, tam hücreler veya doku dilimleri gibi biyolojik bileşenleri içerir (Wang, 2006). Afinite sensörleri, analit ile bir antikor, nükleik asit veya bir reseptör gibi biyolojik bir bileşen arasındaki seçici bir bağlanma etkileşimine dayanır. İmmüno-sensörler ve elektrokimyasal algılamalı DNA hibridizasyon sensörleri, afinite sensörlerine örnek olarak verilebilir. Afinite sensörleri, ölçülebilir bir elektrik sinyali üretmek için antikorlar (Ab), membran reseptörleri veya oligonükleotitler gibi biyomoleküllerin bir hedef analit ile seçici ve güçlü bağlanmasını kullanır. Afinite sensörlerinde moleküler tanıma, esas olarak, ilgili analite bağlanma bölgesinin tamamlayıcı boyutu ve şekli ile belirlenir. Biyomolekülün ligandı için yüksek afinite ve özgüllüğü, bu sensörleri çok hassas ve seçici hale getirir. DNA hibridizasyonu veya antikor-antijen (Ab-Ag) kompleksleşmesi gibi bağlanma süreci, termodinamik hususlar tarafından yönetilir (Ronkainen ve ark., 2010).

2.2.2. Kütleye Duyarlı Sensörler

Piezoelektrik sensörler olarak da bilinen kütleye duyarlı sensörler, çok hassas olan ve kütledeki küçük değişiklikleri algılayan piezoelektrik kristalleri kullanır. Bu sensörün temeli, sabit frekanslı alternatif bir elektrik akımı uygulandığında piezoelektrik kristallerin belirli bir frekansta titreşmesine dayanmaktadır. Bu frekans kristal kütlelerine bağlıdır. Kimyasal etkileşimler, çıkış sinyali olarak ölçülen salınımların frekansını etkiler. İki ana kütleye duyarlı sensör, i) yığın dalga cihazları ve ii) yüzey akustik dalga cihazlarıdır (Bereli ve ark., 2020). Kütle tabanlı algılama, kullanımı nispeten kolaydır, uygun maliyetlidir ve artırılmış hassasiyet ve özgüllük ile doğrudan etiketsiz analiz sunar (Velusamy ve ark., 2010).

Piezoelektrik sensörler, temel bir frekansta rezonansa giren salınımlı bir piezoelektrik kuvars kristaline dayanan kütleye duyarlı dedektörlerdir. Piezoelektrik etkiden yararlanmak için genel yaklaşım, bir piezoelektrik kristali, hedef molekül için yüksek seçiciliğe sahip antikorlar veya enzimler gibi biyolojik malzemelerle kaplamaktır. Kaplanmış kristal ilgili maddeye maruz bırakıldığında, adsorpsiyon meydana gelir ve absorbe edilen malzeme miktarını belirlemek için kullanılabilen bir frekans değişikliğine neden olur (Babacan ve ark., 2000). Piezoelektriklik veya piezoelektrik etki, bir malzemenin mekanik olarak gerildiğinde voltaj üretme yeteneğini ifade eden fiziksel bir olgudur. Etki, zıt durumda da çalışır. Bir piezoelektrik malzemenin yüzeyine verilen voltaj, voltaj değişken olduğunda mekanik strese veya salınımlara neden olur. Anizotropik kristaller, yani simetri merkezi olmayan kristaller, piezoelektrik uygulayan tipik malzemelerdir. Alüminyum fosfat, alüminyum nitrit, çinko oksit, kristalize topaz, baryum ve kurşun titanat, galyum ortofosfat, kuvars, tartarat tetrahidrat, poliviniliden florür, polilaktik asitler tipik piezoelektrik malzemeler olarak bahsedilebilir (Zu, Wu, Wang, 2016). Herhangi bir spesifik reaktif uygulama gerekliliği olmaksızın afinite etkileşimlerini basitçe kaydedebilir. Öte yandan, salınımlarda ölçülebilir bir değişiklik yapmak için gerekli olan mikrogramlardaki hassasiyet ve kırılgenlik gibi bazı spesifik yönler dikkate alınmalıdır. Piezoelektrik platformların sayısı oldukça fazladır. Adaptasyon sayısı fazla olduğu için kullanılan biyotanıma parça sayısı ve sensörlerin tasarımları da fazladır (Pohanka, 2018).

2.2.3. Optik Sensörler

Optik sensörler, birçok biyolojik ve kimyasal maddenin doğrudan, gerçek zamanlı ve etiketsiz olarak saptanmasını sağladıklarından, geleneksel analitik tekniklere göre büyük avantajlar sunar. Avantajları arasında yüksek özgülük, duyarlılık, küçük boyut ve maliyet etkinliği sayılabilir. Yeni optik sensörlerin uygulanmasında mikroelektronik, mikroelektromekanik sistemler (MEMS'ler), mikro/nano-teknolojiler, biyoteknoloji, kimya, moleküler biyoloji, dahil olmak üzere çok sayıda ileri kavram ve çok disiplinli yaklaşımlar uygulanmaktadır (Kooyman ve Lechuga, 1997; Freeman ve ark., 1995). Optik sensörlerin araştırma ve teknolojik gelişimi, son on yılda üstel bir büyüme yaşamıştır. Optik sensör araştırma ve geliştirmesi, temel olarak sağlık, çevre uygulamaları ve biyoteknoloji endüstrisine yöneliktir. Sensörlerin tıp, çevre ve biyoteknoloji alanlarındaki potansiyel uygulamaları çoktur (Dey, Goswami, 2011).

Sensör, ölçülecek analitin derişimi, çıktının gerekli hassasiyeti, gereken numune derişimi, probun tamamlanması için geçen süre, sensörün yeniden kullanılması için gereken süre ve cihazın temizleme gereksinimleri açısından kendi gereksinimlerine sahiptir. Optik sensörler, en yaygın olarak bildirilen sensör sınıfıdır. Optik algılama, optik alanın bir biyolojik tanıma elemanı ile etkileşiminden yararlanılarak gerçekleştirilir. Optik biyoalgılama genel olarak iki genel moda ayrılabilir: Etiketsiz ve etiket tabanlı. Etiketsiz mod, algılanan sinyal, doğrudan analiz edilen materyalin dönüştürücü ile etkileşimi ile üretilir. Buna karşılık, etiket tabanlı algılama, bir etiketin kullanımını içerir ve optik sinyal daha sonra kolorimetrik, floresan veya ışıldayan bir yöntemle üretilir. Glikoz gibi basit moleküller, etiket destekli algılama kullanılarak enzimatik oksidasyon ile tespit edilebilir. Kanın glikoz analizi, bir sensörün, yani şeker hastaları tarafından kullanılan el tipi glikoz ölçerin ticari olarak (şimdiye kadar) en başarılı uygulamasıdır. Ancak bazı durumlarda, örneğin bir etiketin biyoreaktanlardan biriyle konjuge olduğu antikör-antijen etkileşimi, etiketleme bağlanma özelliklerini değiştirebilir ve bu nedenle sensör analizine sistematik hata getirebilir.

Bir optik sensör, bir optik dönüştürücü sistemi ile entegre edilmiş bir biyolojik tanıma algılama elemanı içeren kompakt bir analitik cihazdır. Bir optik sensörün temel amacı, ölçülen bir maddenin (analitin) derişimiyle orantılı bir sinyal üretmektir. Optik sensör, biyotanıma elemanları olarak, antikörler, antijenler, reseptörler, nükleik asitler, enzimler, tüm hücreler ve dokular dahil olmak üzere çeşitli biyolojik malzemeleri kullanabilir. Yüzey plazmon rezonansı (SPR), kaybolan dalga floresansı ve optik dalga kılavuzu interferometrisi, biyo-tanıma elemanının analit ile etkileşimini saptamak için sensör yüzeyine yakın olan geçici alanı kullanır (Damborský, Švitel, Katrlík, 2016).

Optik sensörler, biyolojik algılama elemanının seçiciliği, kapsamlı numune ön işleme veya büyük numune hacimlerine ihtiyaç duymadan karmaşık karışımlarda gerçek zamanlı analiz için oldukça spesifik cihazların geliştirilmesi için fırsat sunar. Optik sensörler son derece hassas, hızlı, tekrarlanabilir ve kullanımı kolay analitik araçlardır. Optik sensörlerin potansiyeline yönelik olumlu özelliklerine rağmen, araştırma laboratuvarından piyasaya çıkışları yavaş olmuştur. Buradaki engeller temel olarak şunlarla ilgilidir: Sensörde biyomalzeme varlığı (dönüştürücüler üzerindeki biyomoleküllerin immobilizasyonu, enzimlerin ve antikörlerin kararlılığı), sensör cihazının geliştirilmesi (hassasiyet ve tekrarlanabilirlik sorunları) ve optik sensörlerin eksiksiz sistemlere entegrasyonu. Sensörün üretimi için bir diğer önemli sorun da maliyet faktörüdür (Chumanov, Malynych, 2006).

Günümüze kadar geliştirilen bazı ana optik sensörler şu şekilde sıralanabilir. Optik fiberler, yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörleri, dalga kılavuzu tabanlı SPR, entegre interferometreler (Mach-Zehnder ve Young interferometreler), diferansiyel mod interferometrisi, rezonans ayna, ızgara kuplörü, bidifraktif kuplörler, optik dalga kılavuzu ışık modu spektroskopi sistemi (OWLS), refraktometrik girişim spektroskopisi (RIFS) (Wang ve ark., 2011). Gelen ışık huzmesindeki reseptör-analit etkileşimi tarafından üretilen etkinin türüne göre optik sensörleri sınıflandırmak yaygın bir uygulamadır. İki ana yaklaşım kullanılmıştır: Kırılma indisinin gerçek kısmındaki değişimin tahmini veya kırılma indisinin sanal kısmındaki değişimin tahmini. Optik sensörlerdeki çoğu gelişme, analit ile temas halinde olan optik ortamın kırılma indisinin gerçek kısmındaki değişimden yararlanır . Bu büyüklükteki herhangi bir değişiklik, belirli bir dalga kılavuzu modunun yayılma sabitinde karşılık gelen bir değişikliğe neden olur. Bu nedenle, esas olarak bir faz kayması nedeniyle yönlendirilen ışık özelliklerinde ölçülebilir bir değişiklik üretir.

Kılavuzlu ışığın yayılımındaki değişikliklere dayanan dönüştürücüler, ulaşılabilen hassasiyet için daha ilginçtir. İlgili etkiler arasında faz değişimi, dalga kılavuzu yapıları arasındaki birleştirme etkileri, yüzey plazmon rezonansı, ızgara kuplörleri, çift ışın ve mod vuruş interferometrisi yer alır. Ayrıca ince filmlerde ya elipsometri ya da çoklu yansıma girişimi (beyaz ışık girişimi) gibi refraktometrik teknikler uygulanabilir. Kırılma indisinin sanal kısmının değişimine dayanan bazı optik sensörler (absorbans sensörleri olarak) da rapor edilmiştir. Ancak bu sensörler genel olarak daha az duyarlılığa sahiptir ve referans kullanılmıyorsa zayıf seçicidir. İçsel optik sensörlerin önemli bir grubu, algılama bölgesinde üretilen ışıldayan radyasyona dayanmaktadır. Bu sensörlerde, algılama katmanı, dalga kılavuzundan somut bir dalga boyundaki ışığı emer ve daha sonra aynı dalga kılavuzu tarafından toplanan farklı bir dalga boyunda ışık yayar. Algılayıcı tabakayı oluşturan malzemenin lüminesan özellikleri, analit ile etkileşiminin bir sonucu olarak değişir. Bu nedenle, yayılan radyasyonun özellikleri analitin doğası ve derişimi ile ilgilidir ve sonuç olarak bu radyasyonun analizi istenen analitik bilgiyi verir (Lechuga, 2005). SPR'de reseptörler, ince bir metalin yüzeyinde hareketsiz hale getirilir. Belirli bir dalga boyundaki elektromanyetik radyasyon, ince metalin elektron bulutu ile etkileşir ve güçlü bir rezonans üretir. Hedef analit metal yüzeye bağlandığında, bu etkileşim kırılma indisini değiştirir ve elektron rezonansı için gerekli dalga boyunun değişmesine neden olur (Law ve ark., 2015).

2.2.3.1. Fiber Optik Sensör

1980'lerin başından beri, fiber optik (FO) sensörlerin geliştirilmesine, potansiyel hassasiyetleri, algılama hızları ve çok çeşitli test koşullarına uyarlanabilirlikleri nedeniyle önemli araştırma çalışmaları yapılmıştır. Optik fiber sensörlerin alanı oldukça geniştir ve literatürde, özellikle kaybolan dalga algılama yoluyla çok sayıda uygulama tanımlanmıştır. FO algılama için bir dizi olasılık önerilmiş ve bunlardan bazıları ticari gelişime ulaşmıştır (Ligler, Taitt, 2002). Fiber optik sensörler, ışığın bir fiber iplik boyunca analiz yerine iletilmesine dayanır. FO sensörleri iki ana grupta sınıflandırılabilir: Dışsal ve içsel. Dışsal sensörler, yalnızca gelen ve giden ışığı yönlendirmek için tek bir fiber kullanır ve içsel sensörler, kaybolan dalga algılamasına dayanır. Dışsal teknikte, uygun bir kaynaktan gelen ışık, FO boyunca hareketsiz bir algılama katmanının bulunduğu uzak uca doğru hareket eder. Yansıyan, saçılan veya yayılan ışık, ikinci bir lif veya orijinal lifin çatallanması yoluyla numuneden geri döner. Yayılan ışık dedektörde yorumlanır ve ilgilenilen analitin derişiminin bir ölçüsüdür. En basit FO sensörü, belirli bir dalga boyunu emen analitin derişimindeki herhangi bir değişikliği belirlemek için absorbans ölçümlerini kullanır. Bir etiket kullanarak floresan ölçümü yapmak da mümkündür. İçsel sensörlerde, genellikle, üzerinde ve çekirdeğin soyulmasından sonra, belirli biyolojik reseptörlerin iyi kurulmuş bir kimyasal prosedür yoluyla hareketsiz hale getirildiği, konik, kaynaşmış bir silika lifi kullanılır. Absorbans, lüminesans, polarizasyon veya kırılma indisindeki değişiklikler tespit edilir. Ancak doğrudan ölçüm genellikle mümkün değildir ve flüoresan etiketler kullanılarak rekabetçi konfigürasyonlar kullanılır. Optik dönüştürücülerin, daha iyi elektroniklerin ve gelişmiş immobilizasyon yöntemlerinin ortaya çıkmasıyla birlikte, FO sensörleri endüstriyel proses ve çevresel izleme, gıda işleme ve klinik uygulamalara giderek daha fazla uygulanmaktadır. Fiber optik sensörler kolayca minyatürleştirilebilir ve farklı hedef bileşiklerin belirlenmesi için entegre edilebilir. Bu, ticari FO sensörlerinin geliştirilmesini mümkün kılmıştır (Wolfbeis, 2000).

2.2.3.2. Entegre optik (IO) sensörler

IO sensörlerini, aynı alt tabaka üzerinde ve ışık yönlendirme yapısı ile birlikte ızgara, bölücüler, birleştiriciler vb. gibi bazı diğer optik bileşenleri içerebilen düzlemsel/kanal dalga kılavuzlarına dayalı sensörler olarak tanımlanır. FO sensörlerinin aksine, entegre optik sensörler, örneğin SPR sensörlerinin imalatında kullanılanlardan daha karmaşık teknikler kullanılarak, amaca uygun olarak tasarlanmalı ve üretilmelidir. İnterferometrik cihazlar,

ızgaralı kuplör cihazları ve rezonans ayna cihazları olmak üzere 3 ana sınıf entegre optik sensör vardır (Campbell, McCloskey, 2002).

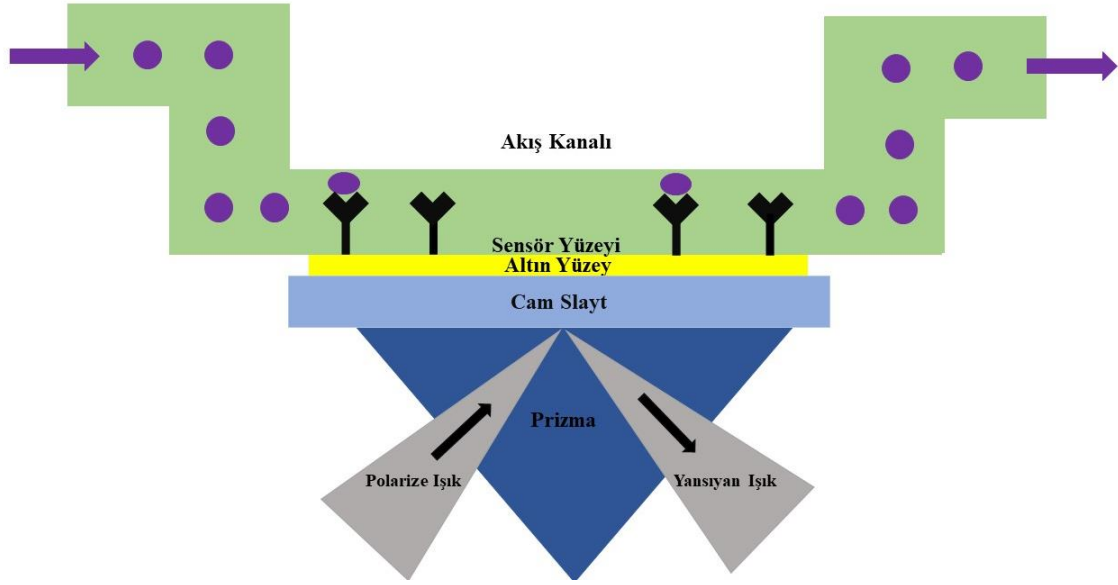
2.2.3.3. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)

SPR, Wood (1902) tarafından optik fenomenin kullanılmasıyla ilk gözleminden bu yana kapsamlı bir büyüme görmüştür. Başlangıçta gelişmiş holografî (Cowan, 1972), yüzey geliştirilmiş Raman saçılması (SERS) veya uyumlu antiStokes Raman saçılması (CARS) ve ince dielektrik filmlerin yüksek kontrastlı görüntülenmesi için yüzey plazmon mikroskobu (SPM) dahil olmak üzere çeşitli spektroskopik ve fiziksel karakterizasyonlar için kullanılmıştır. İnce bir metal film yüzeyinin çevresinde meydana gelen kırılma indisi (n) değişiklikleri, basit ve doğrudan algılamalı SPR tekniği ile problemler. Bu teknik, optik bir sensör yüzeyi olarak işlev görmek için farklı kırılma indeksine sahip iki şeffaf ortam (yani cam prizma ve örnek çözeltisi) arasında tipik olarak altın veya gümüş olmak üzere ince bir metal film kullanır. Daha yüksek kırılma indeksli ortama (cam prizma) giren düzlem polarize bir ışık demeti, kritik açı aşıldığında toplam iç kırılmaya maruz kalabilir. Işığın elektromanyetik alan bileşeni olan kaybolan dalganın altın filme nüfuz etmesi bu koşullar altında gerçekleşir. Spesifik bir geliş açısında, yüzey plazmonunun uyarılması, bu dalganın altın film yüzeyindeki serbest salınan elektronlarla etkileşimi ile gerçekleşir ve ardından yansıyan ışık yoğunluğunda bir azalmaya neden olur. SPR fenomeni, yalnızca altın film yüzeyine analitin eklenmesiyle modifiye edilen ve böylece bağlanma olaylarının izlenmesine izin veren belirli bir açıda meydana gelir (Yılmaz ve ark., 2017).

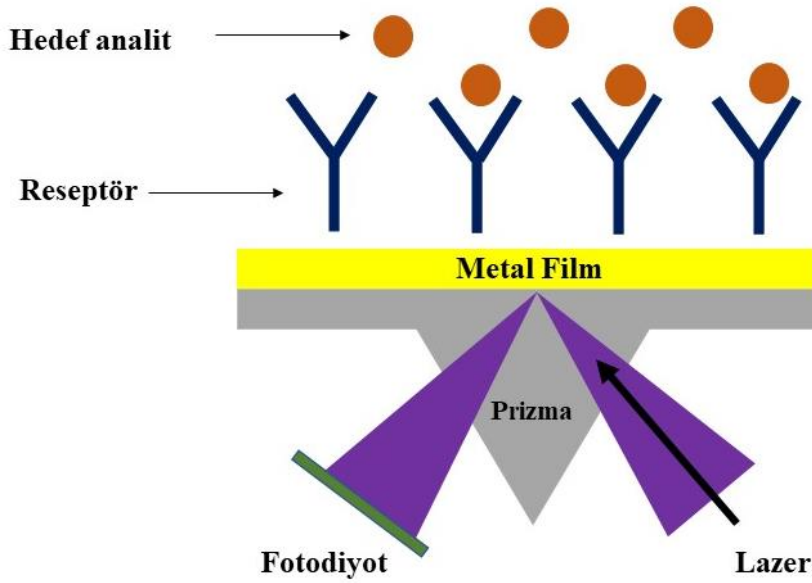
Yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörleri, sensör yüzeyinin yakınındaki kırılma indisi değişiklikleri nedeniyle bağlanma olaylarının hızlı, etiketsiz eşzamanlı izlenmesini sağlayan bir optik sistem teknolojisidir. SPR sensörleri, immünoassay, klinik analiz ve hastalık teşhisi, ilaç, hastalık taraması, endüstriyel işleme, izleme ve çevre kirliliği kontrolü, veterinerlik, gıda ve tarım uygulamaları gibi birçok alanda geniş bir uygulama alanına sahiptir (Jalilzadeh ve ark., 2019). Kromatografi yöntemleri, kemilüminesan enzim immunoassay, radyo immunoassay uygulamaları gibi klasik analitik yöntemlere kıyasla yüzey plazmon rezonans sensörleri gerçek zamanlı izleme, hızlı, analiz süresi, duyarlılık ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptir (Çimen ve ark., 2020). 1983'te Liedberg, SPR'ye dayalı ilk sensörü önermiştir. Bununla birlikte, SPR'ye dayalı geleneksel prizma sensörleri,

noktadan noktaya algılamada pratik uygulamayı sınırlayan hacimli algılama cihazından muzdariptir. Ancak optik fiber sensör, biyo-algılamada çok dikkat çeken küçük hacimli, hafif, anti-elektromanyetik girişim, uzun mesafeli iletim, yerinde izleme ve benzeri gibi büyük avantajlara sahiptir. 1996 yılında Kao, hafif kuvars optik fiberlerin iletim özelliklerini ve kaybını ayrıntılı olarak incelemiş ve teorik olarak düşük kayıplı optik fiberler yapma olasılığını kanıtlamıştır. 1970 yılında, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Corning Corporation, optik fiberin bir ışık iletim ortamı olarak uygulanabilirliğini kanıtlayan, kelimenin ilk düşük kayıplı kuvars optik fiberini başarıyla geliştirmiştir. 1993 yılında Jorgenson, ilk olarak SPR'ye dayalı fiber optik probu önerdi. Optik fiberin çeşitli algılama yapısı nedeniyle, SPR tabanlı fiber optik sensör çok dikkat çekmiş ve tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir (Zhao ve ark., 2018). Yüzey plazmon rezonans yöntemi, bir metal üzerine adsorbe edilen çok ince malzeme katmanlarının kırılma indisini ölçmek için kullanılır.

Şekil 2.2'deki gibi keskin bir şekilde tanımlanmış bir açıyla gelen ışık enerjisinin bir kısmı, metal filmdeki (plazmon) delokalize elektronlarla etkileşime girebilir, böylece yansıyan ışık yoğunluğunu azaltır. SPR tekniği, belirli şartlar altında metal film üzerinde bulunan yüzey plazmonlarının fotonlar tarafından uyarılabilmesi ve böylece bir fotonu yüzey plazmonuna dönüştürmesi gerçeğine dayanır. Bu olay, adsorbatlığın kırılma indisine bağlıdır. Bir plazmon uyarıldığında, bir foton kaybolur ve bu belirli açıda yansıyan ışıkta bir düşüş meydana gelir. Adsorbatın kırılma indisine bağlı olan açı, yüklü bir çift cihaz (CCD) çipi ile ölçülür. SPR sinyalindeki değişimin boyutu, hareketsiz hale getirilen kütle ile doğru orantılıdır ve bu nedenle, etkileşimin stokiyometrisi açısından kabaca yorumlanabilir. Sinyaller, çok düşük miktarlarda (bir mikrogramdan daha az) malzemedan kolayca elde edilir. SPR sinyali yalnızca hareketsizleştirilmiş kalıp moleküle bağlanmaya bağlı olduğundan, moleküllerden bağlanma olaylarını incelemek de mümkündür (Pattnaik, 2005).



Şekil 2.2. Yüzey plazmon rezonans sensörünün şematik gösterimi.



Şekil 2.3. Yüzey plazmon rezonans algılama ünitesi.

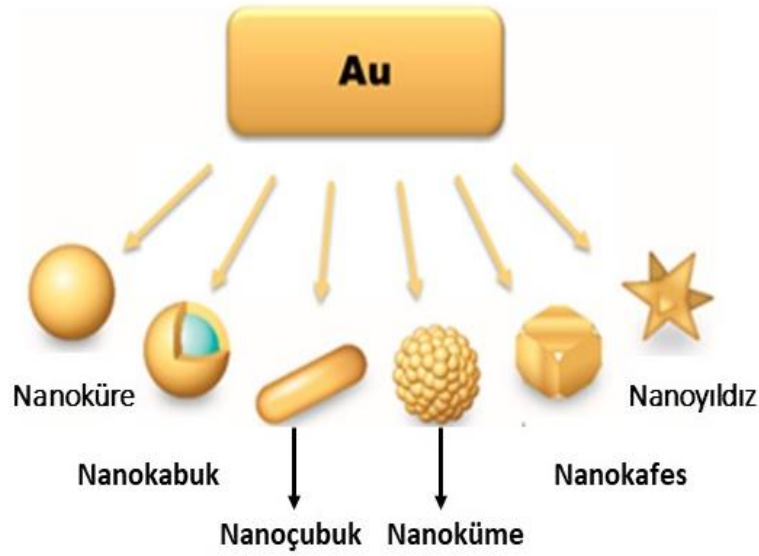
Gerçek zamanlı ve etiketsiz izleme ile algılama yüzeyinin yakınında kırılma indisindeki değişimi ölçen SPR tabanlı sensörler, ilgilenilen klinik analit de dahil olmak üzere çeşitli moleküllerin daha yüksek algılama kabiliyeti nedeniyle oldukça ilgi çekmiştir (Masson, 2017; Sankiewicz, ve ark., 2018; Marian ve Minunni, 2014). SPR sensörün algılama yüzeyinde analite özel reseptör oluşumu veya antijen/antikor immobilizasyonu gibi bazı yüzey modifikasyonlarının uygulanması, SPR tabanlı sensörlerin antibiyotikler,

nörotransmitterler ve biyobelirteçler gibi hedef moleküllere karşı seçicilik performansını da artırabilir (Şekil 2.3).

Son zamanlarda, altın (Au) ve gümüş (Ag) nanopartiküller (NP) gibi asil metal bazlı NP'lerin SPR sensörleri üzerinde uygulanması, SPR tepkilerini artırma yetenekleri nedeniyle SPR sensörlerinin duyarlılığını artırabilir (Bereli ve ark., 2021). Nanoteknolojideki son gelişmelerle birlikte, nanomalzemeler, kimyasal ve biyolojik algılamadaki mükemmel hassasiyetleri nedeniyle sensörler alanında büyük ilgi görmüştür. Metal nanopartiküller, oksit nanopartiküller, yarı iletken nanopartiküller ve nanoboyutlu iletken polimerler dahil olmak üzere birçok türde nanopartikül sensörlerde kullanılmıştır. Örneğin, sensör substratları olarak Au- ve Ag- NP'lerin veya gümüş-silika hibrit nanoyapıların kullanımı birkaç araştırma grubu tarafından rapor edilmiştir. MnO₂ ve CdS nanopartiküller gibi bazı oksit ve yarı iletken nanopartikülleri de sensör oluşturmak için uygulanır. Bu benzersiz özellikler sayesinde, farklı türde nanopartiküller, farklı algılama sistemlerinde her zaman farklı roller oynar. Genel olarak, metal nanopartiküller her zaman “elektronik tellerin” bileşenleri olarak kullanılır. Oksit nanopartiküller genellikle molekülleri immobilize etmek için kullanılırken, yarı iletken nanopartiküller genellikle etiketler veya izleyiciler olarak kullanılır. Sensörlerde bileşen olarak kullanılan nanomalzemeler arasında, AuNP'ler, çeşitli ilginç özelliklere sahip oldukları için en büyük ilgiyi çekmiştir. 1-100 nm çapındaki AuNP'ler, aktivitelerini koruyan büyük miktarda molekülün kararlı bir immobilizasyonunu sağlamak için yüksek yüzey-hacim oranına ve yüksek yüzey enerjisine sahiptir. Ayrıca, AuNP'ler, çok çeşitli elektroaktif türler ve elektrot malzemeleri arasında hızlı ve doğrudan elektron transferine izin verme yeteneğine sahiptir. Ek olarak, yerel elektromanyetik alanın ışık yayma özellikleri ve son derece büyük geliştirme yeteneği, AuNP'lerin çeşitli sensörlerde sinyal amplifikasyon etiketleri olarak kullanılmasını sağlar (Li, Schluesener, Xu, 2010).

Nanopartiküllerin biyolojik sonu ve potansiyel toksisitesi de tıbbi uygulamalar için kullanımlarını kısıtlayabilecek çok önemli konulardır. Bazı nanopartiküllerin (örneğin, kuantum noktaları), doğal toksisite potansiyel bir dezavantajdır, ancak diğerleri (örneğin, demir oksit ve AuNP'ler) için toksisite sorunları daha az orandadır. Nanopartikül biyo-dağılımı, partikülün tipine ve boyutuna ve ayrıca yüzey kimyasına bağlı olarak büyük ölçüde

değişebilir (Hoshyar, ve ark., 2016; Zein, Sharrouf, Selting, 2020). Biyomedikal uygulamalar için, AuNP'ler, biyomolekülleri hedefleyerek çok yönlü bir işlevselleştirme imkânı sunarak, daha kesin teşhis ve lokalize terapötik etkilere izin verir. Ayrıca, Şekil 2.4'te de gösterildiği gibi farklı biyomedikal kullanımlara uyarlanmış AuNP'ler elde etmek için nanoküreler nanokabuklar, nanoçubuklar, nanokafesler ve nanoyıldızlar gibi şekillerden altın nanopartiküllerinin boyut ve şeklini manipüle etmek için farklı yöntemler vardır (Silva, Cabral Campello.Paulo, 2020).



Şekil 2.4. Şekillerine ve morfolojilerine göre farklı AuNP türleri (Silva Cabral Campello.Paulo, 2020'den uyarlanmıştır).

Optik sensörlerde farklı algılama teknikleri uygulansa da hepsinin sıvı-katı arayüzündeki etkileri ölçmesi gerekir. Daha sonra alıcı molekülün sensör yüzeyinde immobilizasyonu sensörün performansı için kilit noktadır. Seçilen immobilizasyon yöntemi, bağlı biyolojik reseptörün stabilitesini ve aktivitesini korumalıdır. Genel olarak, doğrudan adsorpsiyon yeterli değildir ve biyolojik aktivitede önemli kayıplara ve reseptörlerin rastgele yönelimine neden olur. Bu zorluklara rağmen, basit, hızlı ve özel reaktifler gerektirmediği için doğrudan adsorpsiyon yaygın olarak kullanılmaktadır. Mevcut immobilizasyon yöntemleri genel olarak ikiye ayrılır: (i) Kovalent bağlanma ve (ii) afinite kovalent olmayan etkileşimler. Kovalent bağlanma, reseptörler yüzeyden ayrılmadığı veya çözeltideki diğer proteinlerle değiş tokuş etmediği için stabil bir immobilizasyon sağlar. Afiniteye immobilizasyon

ve/veya kovalent bağlanmaya dayalı olarak çeşitli yüzey kimyaları geliştirilmiştir. Afinite bağlamada, yüksek afiniteli yakalama ligandı sensör yüzeyinde geri dönüşümsüz olarak hareketsiz hale getirilir. Afinite bağlanması, avidin, streptavidin veya nötravidin ile modifiye edilmiş yüzeylere biyotin-konjuge ligandlar ile gerçekleştirilebilir. Bu yöntemin avantajı, eşit bağlanma bölgeleri sağlayan yönlendirilmiş bir bağlanmadır. Kaybolan dalga sensörleri için, kaybolan alanın tüm hacmini daha verimli bir şekilde kullanarak, üç boyutlu bir matriste daha fazla alıcıyı hareketsiz hale getirerek sensörün hassasiyetini artırmak mümkündür. Ek olarak, üç boyutlu bir ağda ligand, reseptörü doğru yönde bağlama konusunda daha fazla özgürlüğe sahiptir. Bir polimer matrisinin kullanılması, yüzey kapasitesini ve dolayısıyla cihazın hassasiyetini büyük ölçüde artırarak, kaybolan alan tarafından problemlenerek etkileşim hacmini en üst düzeye çıkarır (Löfas ve ark., 1995). Son yıllarda, moleküler baskılanmış polimer (MIP) nanopartikül veya nanofilmleri ile entegre SPR nanosensörleri, biyolojik tanıma elemanları olarak büyük ilgi görmüştür (Kim ve ark., 2009, Sener ve ark., 2011).

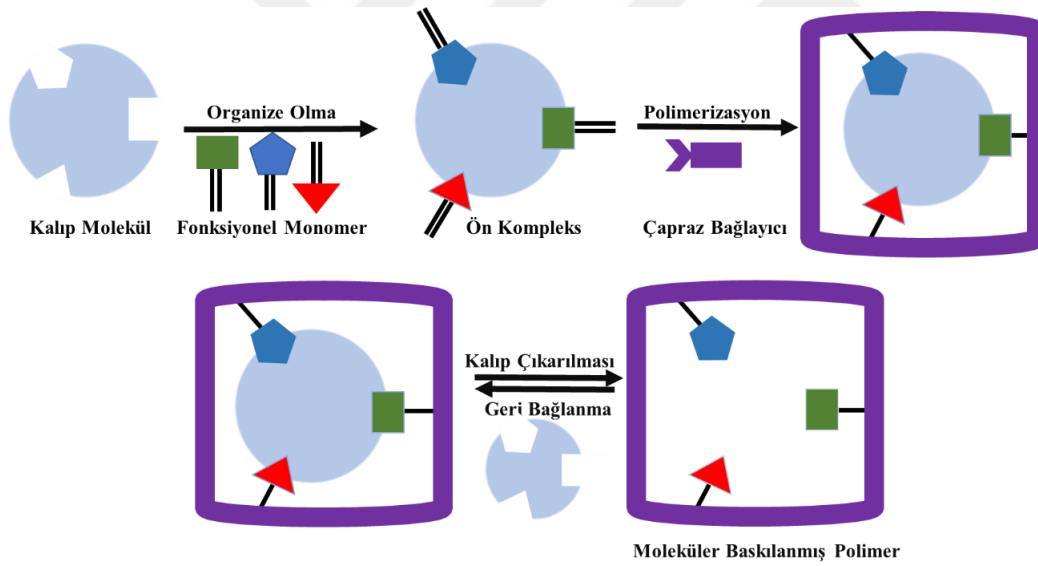
2. 3. Moleküler Baskılama

Moleküler baskılama, moleküler bir kalıp kullanarak bir makromoleküler matriste tanıma bölgeleri oluşturmaya yönelik bir teknolojidir (Odabaşı, Say, Denizli, 2007). Moleküler baskılama yöntemi, temel olarak bir kalıp molekülün spesifik moleküler tanınmasına dayanır (Saylan ve Denizli, 2020). Kalıp molekülün şekil görüntüsü ve kalıp molekül ile etkileşime girecek fonksiyonel kısımların hizalanması, polimerik malzemelerin oluşumu sırasında kalıp molekülün tanınması veya ayrılması için makromoleküler matriste hafızaya alınır (Aşır ve ark., 2005). Moleküler baskılama tekniği, şekil tanıma, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler nedeniyle kalıp molekülün belleği ile bir polimer matrisinde seçici bölgeler oluşturan antijen ve antikor arasındaki etkileşimi in vivo olarak simüle ederek geliştirilen bir teknolojidir (Zeng ve ark., 2012). MIP'ler, kararlı fiziksel ve kimyasal özellikler ve mekanik özellikler, yüksek sıcaklık ve yüksek basınca dayanma kabiliyeti, asitlere, alkalilere karşı güçlü direnç, yüksek derişimlerde iyon ve organik çözücüler, kolay sentez, uzun performans ömrü, tekrarlanan ve geri dönüşüm kullanımı gibi birçok mükemmel özelliğe sahiptir (Yan, Row, 2006). MIP'lerin pek çok avantajı olmasına rağmen, performans için bazı eksiklikleri de vardır, örneğin, homojen olmayan morfoloji popülasyonu ve baskı bölgeleri, yavaş aktarım hızı, bağlanma bölgelerinin zayıf tekrarlanabilirliği ve daha da iyileştirilmesi gereken düşük afinite (Zimmerman, Lemcoff, 2004).

Algılama alanı, farklı matrikslerdeki çeşitli analitleri saptamak için yüksek yeteneklere ve çok yönlülüğe sahip, gelişmekte olan bir teknolojiyi temsil eder ve algılama performansı, birçok sistemdeki birkaç temel prosedürde önemli bir işlev görür. Doğal tanıma elemanları hedeflerine karşı yüksek afiniteye sahiptir ancak yüksek basınçta, sıcaklıkta ve organik çözücülerde zayıf dayanıklılıkları ve yüksek veya düşük pH tamponlarında düşük kararlılıkları nedeniyle pratik uygulamalarda kullanılamazlar (Saylan ve ark., 2019). Son zamanlarda, bu dezavantajları ortadan kaldırmak için en önemli modifikasyon yöntemlerinden biri moleküler baskılama yöntemidir. Bu yöntem ilk olarak 1970'lerin başında Wulff ve Sarhan tarafından rapor edilmiştir (Wulff, Sarhan 1972). Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), bir kalıp molekülün etrafındaki monomerlerin polimerize edilmesiyle oluşturulur. Seçilen monomerler genellikle ön polimer bağlama kompleksleri oluşturmak için kalıp molekülün özelliğini tamamlar. Polimerizasyon üzerine, kalıp molekül, çapraz bağlı polimer matriksi tarafından basılır. Kalıp molekülü çıkardıktan sonra, yeniden bağlamak için kalıp moleküle özgü bir boşluk üretilir. MIP'lere, spesifik bağlanmalarını ve uygun maliyetli polimerik doğalarını vurgulamak için plastik antikorlar da denir (Zhang ve ark., 2017). Moleküler baskılama, yüksek tanıma kabiliyetine sahip kararlı ve seçici malzemeler yaratmak için oldukça umut verici bir tekniktir. Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), bir kalıp molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve bir başlatıcıdan oluşan reaksiyon ortamının polimerizasyonu yoluyla hazırlanabilir. İlk olarak, kalıp molekülün ve fonksiyonel monomerin karmaşık oluşumu mevcuttur. İkinci olarak, monomerler içinde tutulan kalıp molekül ve belirli miktarda çapraz bağlayıcıya sahip üç boyutlu bir yapı elde etmek için polimerizasyon gerçekleşir. Son olarak, kalıp molekülleri şekil, boyut ve işlevsellik açısından tamamlayıcı olan hedef molekülün tanıma bölgeleri, kalıp molekülün polimer yapısından çıkarılmasıyla üretilebilir (Andaç ve ark., 2020).

Moleküler tanıma, polimerik ağ boyunca kalıp molekül etrafındaki fonksiyonel grupların düzenlenmesiyle kalıp molekül ve monomerlerin ön-kompleksleştirilmesinden kaynaklanan baskılama etkisine dayanır. Bu nedenle şekil ve boyut açısından ve hatta sıcaklık ve pH belleği açısından bile kalıp molekülü tamamlayıcı olarak yüksek seçiciliğe sahip kararlı bağlanma bölgeleri oluşturulur (Fu ve ark., 2015; Özkahraman, 2018). MIP'lerin bağlanma afinitesi, fonksiyonel monomerlerin, çapraz bağlayıcıların, başlatıcıların ve solvent sisteminin tipine ve ayrıca başlatma ve polimerizasyon yöntemine bağlıdır (Çorman ve ark., 2016). Kalıp molekülün bağlanma bölgesine bağlanması, ön-kompleksleştirme adımı

meydana gelebilecek elektrostatik, H-bağlama, van der Waals ve metal koordinasyonu gibi ikincil etkileşimlerin gücü ve kimyası tarafından belirlenir. Ayrıca, bu kalıp molekül ve bağlanma yeri etkileşimleri, pH ve sıcaklık belleği ve polimerizasyon işleminde kullanılan fonksiyonel monomer ve komonomerlerin doğası ile geliştirilebilir. Ek olarak, tanıma bölgelerinin özellikleri, kalıp moleküller etrafında iyi tanımlanmış kafesler oluşturan çapraz bağlanma süreciyle güçlü bir şekilde ilişkilidir (Murray ve Örmeci, 2017). Moleküler baskılanmış polimerler, ortamda bulunan başka moleküllere karşılık kalıp molekülü yüksek özgüllükte bağlayabilir. MIP'ler, çeşitli çapraz bağlayıcılar, fonksiyonel monomerler ve çözücüler kombinasyonu ile elde edilebilir (Algieri ve ark., 2014). MIP'lerin kalitesi ve bağlanma özelliklerini, yalnızca karışımın kombinasyonu etkilemez, Buna ek olarak, başlatıcı türü ve miktarı, polimerizasyon sıcaklığı, etkileşim mekanizmaları vb. gibi deneysel koşullar da etkiler. Genellikle kalıp molekülün kritik bir molekül gibi davrandığı varsayılır ve diğer bileşimler kalıp molekülün kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre seçilmelidir (Saylan ve ark., 2017).



Şekil 2.5. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi (Saylan ve ark., 2019'dan uyarlanmıştır.)

Moleküler baskılama, moleküler kalıp kullanılarak sentetik polimerlerde seçici bağlanma bölgeleri yapmak için bir yöntemdir. Polimerin seçiciliği, boşluğun boyutu ve şekli ve yeniden bağlanma etkileşimleri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Kovalent etkileşimler, kovalent olmayan etkileşimler, elektrostatik etkileşimler ve metal iyon koordinasyonu,

fonksiyonel monomerleri kalıp molekül etrafında düzenlemek için kullanılabilir. Esasen, kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasındaki kovalent bağlara veya kovalent olmayan etkileşimlere dayalı olarak iki tür moleküler baskılama stratejisi oluşturulmuştur. Her iki durumda da, baskılı molekülün fonksiyonel grupları ile etkileşimlere izin verecek şekilde seçilen fonksiyonel monomerler, baskılı molekül varlığında polimerize edilir. Özel bağlanma bölgeleri, baskı kalıbının fonksiyonel grubu ile monomer arasındaki kovalent veya daha yaygın olarak kovalent olmayan etkileşim ve ardından çapraz bağlı bir kopolimerizasyon ile oluşturulur (Takeda, Kobayashi, 2005). İki stratejiden kovalent olmayan yaklaşım, aşağıdaki üç nedenden dolayı daha yaygın olarak kullanılmıştır:

- (1) Kovalent olmayan protokol kolayca yürütülür ve ön polimerizasyon kompleksinin sentezinden kaçınılır.
- (2) Kalıp molekülün çıkarılması genellikle çok daha kolaydır, genellikle sürekli ekstraksiyon ile gerçekleştirilir.
- (3) Kovalent olmayan yöntemler kullanılarak MIP bağlanma bölgesine daha fazla çeşitlilikte işlevsellik katılabilir.

Kovalent yaklaşımda, baskılı molekül, polimerize edilebilir bir moleküle kovalent olarak bağlanır. Bu tip polimerin bağlanması, tersine çevrilebilir kovalent bağlara dayanır. Çapraz bağlayıcı ile kopolimerizasyondan sonra baskı molekülü, yüksek düzeyde çapraz bağlı polimerden kimyasal olarak ayrılır. Ayrıca, kovalent baskının gereklilikleri, özellikle fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı ve kalıp molekül oranları bakımından, kovalent olmayan baskıdan farklıdır. Bununla birlikte, tersinir kovalent etkileşimlerin seçimi ve potansiyel kalıp moleküllerin sayısı büyük ölçüde sınırlı olduğundan, polimerize edilebilir monomerlerle tersinir kovalent etkileşimlerin sayısı daha azdır ve kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kovalent bağları parçalamak için sıklıkla bir asit hidroliz işlemi gerektirir.

Kovalent olmayan yaklaşım, MIP hazırlamak amacıyla oldukça sık kullanılan bir methodur.. Bu yaklaşım sırasında, kalıp molekül ve monomer arasındaki kendi kendine bir araya gelme ve ardından çapraz bağlı bir kopolimerizasyon ile özel bağlanma bölgeleri oluşturulur (Svenson, Karlsson, Nicholls, 2004, Ekberg, Mosbach, 1989). Baskı molekülleri, hem baskılama prosedürü hem de yeniden bağlama sırasında polimer ile kovalent olmayan

etkileşimler yoluyla etkileşime girer. Bu yaklaşım, kovalent bağlanma yapmayan bileşik çeşitliliğin oldukça fazla sayıda olmasından dolayı; moleküler baskılamanın geleceği için diğer yaklaşımlara kıyasla daha fazla potansiyele sahip gibi görünmektedir (Michael ve ark., 1995, Sellergren, Kenneth, 1993). Kovalent olmayan moleküler baskılamanın sınırları, özel moleküler tanıma şartları ile belirlenir. Çoğunlukla, monomerler ve kalıp molekül arasındaki etkileşimler hidrofobik ortamlarda stabilize olurken, polar ortamlar onları kolayca bozar. Başka bir sınır, birkaç farklı etkileşim noktası ihtiyacı ile temsil edilir: İzole edilmiş bir karboksil gibi tek bir etkileşimli grup ile karakterize edilen bazı moleküller, genellikle pratik uygulamalarda çok az ilgi çeken çok sınırlı moleküler tanıma özelliklerine sahip baskılı polimerler verir. Kovalent olmayan yöntemlerin temel optimizasyonunu anlamak iki nedenden dolayı önemlidir: Metodoloji, kovalent yöntemlere göre daha basittir ve daha yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri üretir. Kovalent olmayan baskılı polimerlerdeki bağlanma ve seçicilik eğilimleri, en yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri için çoklu fonksiyonel monomerlerin dahil edilmesiyle en iyi şekilde açıklanır. Polimer bağlama sahasındaki artan sayıda bağlanma etkileşimi, sahanın daha fazla aslına uygunluğundan sorumlu olabilir ve dolayısıyla sahaya daha fazla afinite ve seçicilik kazandırabilir. Bu, polimer bağlanma bölgesindeki fonksiyonel grupların sayısının doğrudan çözelti fazı ön-polimer kompleksi tarafından belirlenmediğini gösterir; daha ziyade, polimerizasyon sırasında belirlenir. Polimerizasyon sırasında ve sonrasında bağlanma bölgesi yapılarını karakterize etmenin zorluğu nedeniyle, nihai bağlanma bölgesi yapısını belirleyen gerçek olaylar hala ana zorluktur.

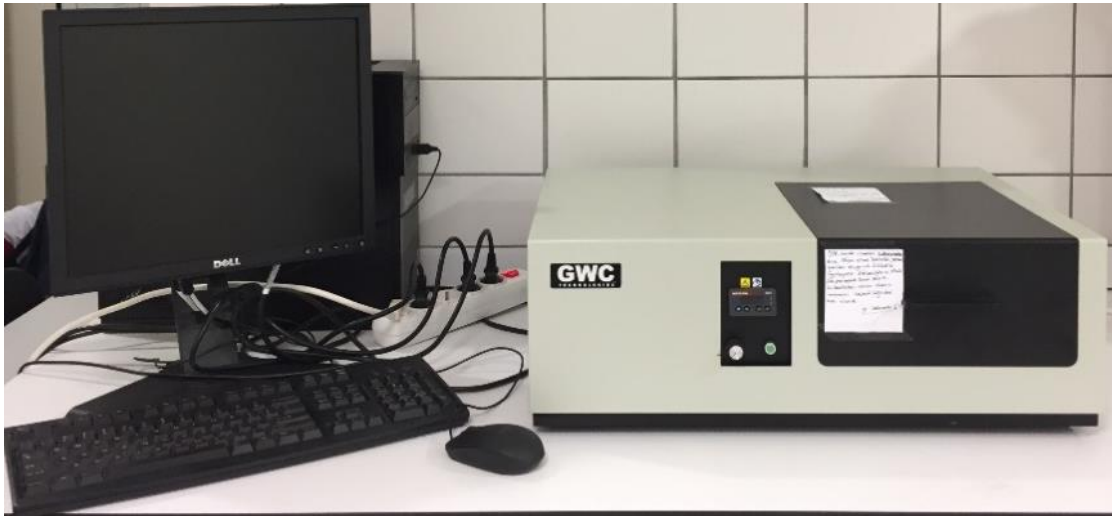
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

N-Metakroil-L-histidin metil ester (MAH) monomerinin sentezinde kullanılan L-histidin metil ester ve metakroil klorür Merck firmasından temin edilmiştir. Sodyum sitrat tribazik dihidrat ve altın (III) klorür trihidrat, 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), azoizobisbütironitril (AIBN) ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) Sigma firmasından temin edilmiştir. Kortizol Merck firmasından satın alınmıştır. Plazmonik sensör yüzeyler Genoptics firmasından satın alınmıştır. Analitik saflıkta olan diğer tüm kimyasallar Merck firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan, 18 MΩ/cm dirence sahip deiyonize suyu elde etmek amacıyla yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731), ters osmoz Barnstead ROpure LP® birimi, Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemleri kullanılmıştır.

3.2. Optik Sistem

Optik temelli yüzey plazmon rezonans sensör sistemi için SPR imager II (GWC Technologies) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.1). 1 mm x 18 mm x 18 mm boyutlarına ve 50 nm yüzey kalınlığına sahip altın sensörleri Genoptics firmasından satın alınmıştır. Sistemin lazer ışık kaynağı Quartz Halogen Lamps (6 volts 10 watt 2000 H) kullanılmıştır. SF10 equilateral prizma kullanılmıştır. Prizma yüzeyleri Fisherbrand lens kâğıdı kullanılarak temizlenmiştir.



Şekil 3.1. SPR imager II cihazının görüntüsü.

3.3. Fonksiyonel Monomerin Sentezi ve Karakterizasyonu

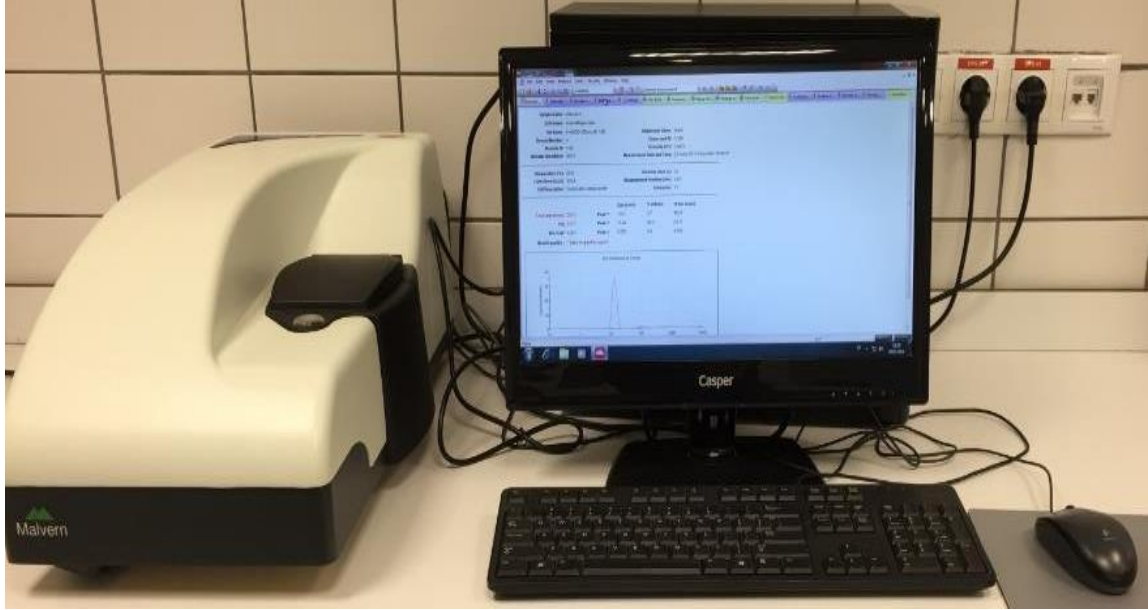
N-Metakroil-L-histidin metil ester (MAH) fonksiyonel monomerin sentezi sırasıyla şu adımlar izlenerek gerçekleştirilmiştir: 5.0 g L-histidin metil ester ve 0.2 g hidrokinon, 100 mL diklorometan çözeltisi içerisinde çözüldükten sonra, çözelti 0°C'a soğutulmuştur. 12.7 g trietilamin bu çözeltiliye ilave edilmiştir. Daha sonra 5.0 mL metakriloil klorür yavaş bir şekilde bu çözeltinin üstüne dökülmüştür. Bu reaksiyon karışımı azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyonun sonunda, reaksiyona girmeyen metakriloil klorür, % 10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan kısım etanolde çözülmüştür. Daha sonra kristallendirme işlemi ile saf N-metakroil-L-histidin metil ester katı halde elde edilmiştir (Garipcan ve Denizli, 2002). Elde edilen MAH monomeri ile birlikte hazırlanan MAH-AuNP ve MAH-AuNP-kortizol ön-kompleksin içerdiği fonksiyonel grupların analizi için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, ABD) kullanılmıştır. Cihazın örnek yuvasına ayrı ayrı yerleştirilen örnekler 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında FTIR spektrumu çekilmiş ve örneklerde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür.

3.4. Altın Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu

Kortizol-baskılanmış (AuNP-MIP) ve baskılanmamış (AuNP-NIP) plazmonik sensörler poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakroil-(L)-histidin metil ester-altın nanopartiküllerin altın yüzeyine bağlanması ile elde edilmiştir. Moleküler baskılama etkinliğini ve AuNP'in sinyal artırma özelliğini test etmek amacıyla monomer karışımına kortizol ve AuNP eklenmeden plazmonik sensörler hazırlanmıştır. AuNP'ler, Turkevich yöntemine göre sodyum sitrat kullanılarak HAuCl₄ tuzunun Au'ya indirgenmesiyle hazırlanmıştır. (Enustun, Turkevich, 1963). AuNP'lerin derişimi, zeta boyutu ölçümü ile belirlenen AuNP'lerin ortalama boyutu kullanılarak tahmin edilmiştir (Liu ve ark., 2007).

AuNP'lerin boyutlarını ölçmek için Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.2). Analizde deiyonize suyun yoğunluğu 0.88 mPa.s ve kırınma indeksi 1.33 olarak ayarlanmıştır. Sentezlenen nanopartiküllerin çözeltisi boyut analizörünün örnek haznesine yerleştirilerek zeta boyut analizi işlemi yapılmıştır. Oda

sıcaklığındaki ışık saçılmasının 90°'lik geliş açısında ölçülmesi ile partikül sayısı hesaplanmış ve ölçümler üç kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.2. Zeta-sizer cihazının görüntüsü.

$$N = \frac{\pi \rho D^3}{6 M} \quad (3.1)$$

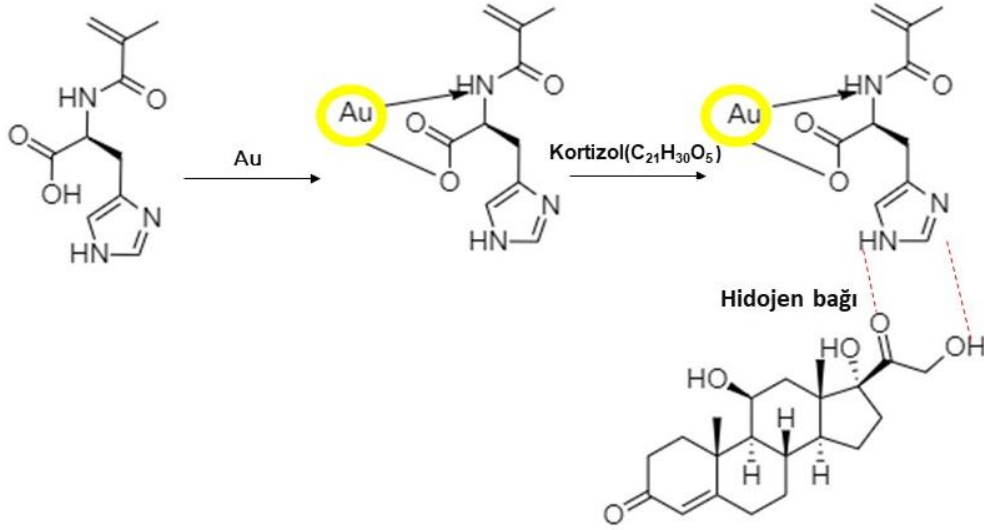
$$C = \frac{N_{total}}{NVN_A} \quad (3.2)$$

Eşitlik 3.1, nanopartikül (N) başına Au atomlarının sayısını hesaplamak için kullanılırken, Eşitlik 3.2, AuNP derişimi (C) hesaplamak için kullanılır. Denklemlerde ρ , Au'nun yoğunluğuna, M Au'nun atom ağırlığına ve D AuNP'lerin çapına, N toplam Au atom miktarına, V çözelti hacmine ve N_A Avogadro sayısına karşılık gelir (Liu, 2007).

3.5. Plazmonik Sensör Yüzeyinin Modifikasyonu

Plazmonik sensör yüzeyi, kortizol baskılanmış nanofilm ile kaplanmadan önce asidik pirana çözeltisi (3:1, $H_2SO_4:H_2O_2$, v/v) ile yıkanmıştır. Altın yüzeyler pirana çözeltisiyle yıkandıktan sonra sırasıyla deiyonize su ve etil alkol ile yıkanmış ve etüvde (40°C) 3 saat kurutulmuştur. Bir sonraki aşama olan vinil gruplarının bağlanması basamağına geçilmiştir. Vinil gruplarının yüzeye bağlanması işlemi şu şekilde gerçekleşmiştir: Altın yüzey pirana çözeltisi ile aktifleştirildikten sonra 3-(trimetoksilil)propil metakrilat (TMSPM)'ın metil

kaplama cihazı kullanılmıştır. Yüzeyinde nanofilm oluşması için UV lamba (365 nm, 100 W) altında 1 saat boyunca polimerleşme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. MAH-AuNP-kortizol ön-kompleks yapısının şematik gösterimi (Elnour ve ark.,2017).



Şekil 3.5. Döndürmeli kaplamanın ve UV lambasının görüntüleri.

Kalıp molekül kortizol desorpsiyon çözeltisi metil alkol (CH₃OH) ve asetik asit (CH₃COOH) karışımı (1:1) kullanılarak nanofilm yüzeyinden uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla, 20 mL desorpsiyon çözeltisi içinde çalkalamalı inkübatörde 90 rpm hızında ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalanarak yıkanmıştır. Sonrasında, desorbe edilen sensör yüzeyi deiyonize su ve saf etil alkol karışımında 2 saat süreyle bekletilerek yıkanmış ve etüde (40°C) kurutulmuştur.

3.6.2. MIP plazmonik sensörün hazırlanması

MIP plazmonik sensörün hazırlanması için ilk olarak MAH fonksiyonel monomeri kortizol ile etkileştirilerek MAH-kortizol ön-kompleksi hazırlanmıştır. Bunun için ilk olarak 0.4 mmol MAH monomeri kalıp molekül 0.05 mmol hidrokortizol, 1 saat süreyle 20 rpm hızla rotatörde etkileştirilerek ön-kompleks oluşturulmuştur. Daha sonra ön-kompleks karışımına 0.4 mmol etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcı ve hidrofiliği sağlaması için 0.2 mmol 2-hidroksi etilmetakrilat (HEMA) ko-monomeri eklenmiştir. Monomer karışımına başlatıcı olarak 2.5 mg 2,2-azobisisobutironitril (AIBN) başlatıcısı eklenmiştir. 3-(trimetoksilil)propil metakrilat (TMSPM) eklenerek modifiye edilen sensör yüzeyine hazırlanan monomer çözeltisinden 10 µL hacminde damlatılmıştır. Nanofilmin sensör yüzeyinde homojen olarak dağılması için döndürmeli kaplama cihazı kullanılmıştır. Yüzeyinde nanofilm oluşması için UV lamba (365 nm, 100 W) altında 1 saat boyunca polimerleşme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Kalıp molekül kortizol desorpsiyon çözeltisi metil alkol (CH₃OH) ve asetik asit (CH₃COOH) karışımı (1:1) kullanılarak nanofilm yüzeyinden uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla, 20 mL desorpsiyon çözeltisi içinde çalkalamalı inkübatörde 90 rpm hızında ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalanarak yıkanmıştır. Sonrasında, desorbe edilen sensör yüzeyi deiyonize su ve saf etil alkol karışımında 2 saat süreyle bekletilerek yıkanmış ve etüvde (40°C) kurutulmuştur.

3.6.3. AuNP-NIP plazmonik sensörün hazırlanması

AuNP-NIP plazmonik sensörün hazırlanması için AuNP-MIP plazmonik sensörün hazırlanma sürecindeki tüm basamaklar aynen gerçekleştirilmiş, sadece kalıp molekül olan kortizol kullanılmamıştır. Bu amaçla, ilk olarak MAH-AuNP kompleksi oluşturulmuş ve AuNP'lerin fonksiyonel monomere koordine olması sağlanmıştır. Bunun için ilk olarak 0.4 mmol MAH monomeri, 0.01 nmol AuNP ile 1 saat süreyle 20 rpm hızla rotatörde karıştırılmıştır. Daha sonra ön-kompleks karışımına 0.4 mmol etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcı ve hidrofiliği sağlaması için 0.2 mmol 2-hidroksi etilmetakrilat (HEMA) ko-monomeri eklenmiştir. Monomer karışımına başlatıcı olarak 2.5 mg 2,2-azobisisobutironitril (AIBN) başlatıcısı eklenmiştir. 3-(trimetoksilil)propil metakrilat (TMSPM) eklenerek modifiye edilen sensör yüzeyine hazırlanan monomer çözeltisinden 10 µL hacminde damlatılmıştır. Nanofilmin sensör yüzeyinde homojen olarak dağılması için döndürmeli kaplama cihazı kullanılmıştır. Yüzeyinde nanofilm oluşması için

UV lamba (365 nm, 100 W) altında 1 saat boyunca polimerleşme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Sonrasında, sensör yüzeyi deiyonize su ve saf etil alkol karışımında 2 saat süreyle bekletilerek yıkanmış ve etüvde (40°C) kurutulmuştur. Tüm plazmonik sensörlerin hazırlanması reçetesi Çizelge 3.1’de detayları ile gösterilmiştir.

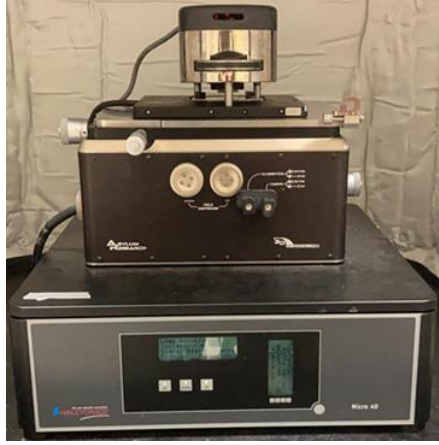
Çizelge 3.1. AuNP-MIP, AuNP-NIP ve MIP plazmonik sensörlerin hazırlanma reçetesi.

AuNP-MIP	AuNP-NIP	MIP
0.05 mmol HC	-	0.05 mmol HC
0.4 mmol MAH	0.4 mmol MAH	0.4 mmol MAH
0.4 mmol EGDMA	0.4 mmol EGDMA	0.4 mmol EGDMA
0.2 mmol HEMA	0.2 mmol HEMA	0.2 mmol HEMA
0.01 nmol AuNP	0.01 nmol AuNP	-

3.7. Plazmonik Sensör Yüzeylerinin Karakterizasyonu

3.7.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi

Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerindeki nanofilmlerin pürüzlülük ve derinlik karakterizasyonu AFM analizleri ile incelenmiştir. Şekil 3.6’da gösterilen Asylum Research 3D Standalone (Oxford Instruments) cihazında atomik boyutlara kadar inceltip sivriltilmiş iğne ucu ölçüm yaparken kullanılmıştır. Plazmonik sensörlerin yüzeyi yüksek çözünürlük ile taranarak iki ve üç boyutlu görüntüler elde edilmiştir. Yüzeylerin, hava ortamında milimetrelük boyutlara sahip bir çap içerisine yerleştirilerek ve yarı değen modda görüntüsü alınmıştır. Görüntülerin tarama hızı 1 $\mu\text{m/s}$ iken 1x1 μm^2 ’lik bir alandan görüntü elde edilmiştir.



Şekil 3.6. AFM cihazının görüntüsü.

3.7.2. Temas Açısı Analizi

AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerindeki nanofilmlerin hidrofilitelerini belirlemek için ıslanabilirliği ölçen temas açısı değerleri KRÜSS DSA100 cihazı ile belirlenmiştir (Şekil 3.7). İşlem sırasında yapışık damla metodu ile temas açısı elde edilmiş ve plazmonik sensörlerin ıslanabilirliği yüzeylerine 1 damla su damlatılarak ölçülmüştür. 10 farklı bölgeye su damlatıldıktan sonra her bölgedeki görüntüler alınmış ve farklı temas açıları belirlenmiştir. Belirlenen temas açısı ölçümleri plazmonik sensör yüzeyi ile damlacığın sol temas noktasından alınan temas açısı ve sağ temas noktasından alınan temas açısı değerleri baz alınarak, bu değerlerin ortalaması ile ortalama temas açısı tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. Temas açısı ölçüm cihazının görüntüsü.

3.7.3. FTIR-ATR Analizi

AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerindeki nanofilmlerin içerdiği fonksiyonel grupların analizi için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10) kullanılmıştır. Plazmonik sensör yüzeylerin 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında FTIR-ATR spektrumu çekilmiş ve yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. FTIR-ATR spektrofotometre cihazının görüntüsü.

3.8. Plazmonik Sensörler ile Kinetik Analizler

AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensörlerin kinetik analiz çalışmaları sonucu elde edilen yüzey plazmon eğrilerini görüntülemek için SPR imager II cihazı kullanılmıştır. Plazmonik sensörlerin yüzeyine ışık ulaştığında ışığın %kırılma indisi değişimi (ΔR) değerlerini tespit etmek amacıyla görüntü alınması sırasında plazmonik sensörlere ulaşma açısı değiştirilmiştir. Her bir örnek için ışığın geliş açısına karşı elde edilen ΔR değerleri grafiklere geçirilerek rapor edilmiştir.

3.8.1. Derişim Analizleri

AuNP-MIP ve MIP plazmonik sensörlerin SPR cihazı kullanılarak farklı derişimlerdeki örnekler üzerinde kinetik çalışmalar yapılmıştır. İlk olarak AuNP-MIP plazmonik sensör ile 0.01-100 ppb derişim aralığında kortizol örnekleri hazırlanmıştır. Çözelti örneklerinde

adsorpsiyon tamponu olarak PBS-etil alkol çözeltisi (50:50, v/v) kullanılmıştır. Ayrıca, AuNP'lerin plazmonik sensör sinyal yanıtının artışına sebep olduğunu göstermek için 1-100 ppb derişim aralığında kortizol örnekleri ile MIP plazmonik sensörü de etkileştirilmiştir. Optimum bir rezonans açısı ayarlandıktan sonra belirlenen kırılma açısı, çalışma açısı olarak belirlenmiştir. Yapılan kinetik analizler için kinetik görüntüleme programını içeren SPR view yazılımı kullanılmıştır. Rezonans açısının tespitinden sonra her derişim için denge-adsorpsiyon-desorpsiyon adımları izlenerek analizler gerçekleştirilmiştir. Rezonans açısına ayarlanan sensör sisteminden ilk olarak 180 saniye boyunca denge çözeltisi geçirilmiştir. Sistem dengeye geldikten sonra farklı derişimlerde hazırlanan kortizol çözeltileri sırası ile 300 saniye boyunca 0.2 mL/dk akış hızında sensör sistemine peristaltik pompa aracılığıyla verilmiştir. Rezonans frekansındaki gözlemlenen kayma değerleri anlık olarak rapor edilmiştir. Kayma açısındaki değişim gözlemlendikten sonra desorpsiyon çözeltisi metil alkol ve asetik asit (50:50, v/v) 120 saniye süreyle sisteme verilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonra sisteme 10 dakika süreyle deiyonize su verilmiş ve denge tampon çözeltisi ile sistem tekrar dengeye getirilmiştir. Bu işlemler her derişim için tekrarlanmıştır.

3.8.2. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri Analizleri

AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyi ile kortizol arasındaki etkileşimin kinetik ve izoterm analizi, kalıp molekül ve polimerik nanofilm etkileşimlerini belirlemek için kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak denge (Scatchard) ve bağlanma analizleri yapılarak farklı adsorpsiyon izoterm modelleri incelenmiştir. Toplam ligand miktarı ($[B]_0$), yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak tanımlanmış ve diğer tüm derişim değerleri sensör sinyali olarak belirtilmiştir. Serbest kortizol derişiminin akış hücresinde sabit olarak kaldığı şartlar altında bağlanma Eşitlik 3.3'deki gibi ifade edilmiştir:

$$d\Delta R / dt = k_a C (\Delta R_{maks} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte $d\Delta R/dt$, sensör sinyalinin değişim hızı; ΔR ve ΔR_{maks} , bağlanma esnasında ölçülen ve maksimum elde edilen sinyal; C kortizol derişimi (ppb), k_a , bağlanma hız sabiti ($ppb^{-1} \cdot s^{-1}$) ve k_d , ayrılma hız sabiti (s^{-1})'dir. Bağlanma sabiti K_A (ppb^{-1}), k_a ve k_d değerlerinin oranından hesaplanmıştır. Denge durumunda, $d\Delta R/dt=0$ alınarak Eşitlik 3.4'deki gibi sadeleştirilmiştir:

$$\Delta R_{denge} / C = K_A \Delta R_{maks} - K_A \Delta R_{denge} \quad (3.4)$$

Bağlanma sabiti K_A , $\Delta R_{\text{denge}}/c$ 'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinden hesaplanmıştır. Ayrılma sabiti K_D ise; $1/K_A$ eşitliği ile elde edilmiştir. Eşitlik 3.3 düzenlendiğinde Eşitlik 3.5 elde edilmiştir.

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{\text{maks}} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (3.5)$$

Eşitlikte, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiğinin, eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bir doğru verdiği görülmüştür. Başlangıç bağlanma hızı kortizol derişimi ile doğrusal bir ilişkili olduğu görülmüş ve nicel olarak derişim hesaplanmasında kullanılmıştır. ΔR_{maks} 'ın deneysel olarak tespit edilmesi zor olduğundan takip edilen yaklaşım, birçok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensorgramlarının alınması olmuştur. Eşitlik 3.6'deki gibi ileri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile alakalı bir eğim değeri (s) vermiştir:

$$s = k_a C + k_d \quad (3.6)$$

s 'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru ve teorik olarak da kesim noktası k_d değerini vermiştir. Fakat $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda k_d hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir olmadığından Eşitlik 3.7'deki gibi ayrılma kinetiğinin incelenmesi yöntemi seçilmiştir:

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (3.7)$$

Burada ΔR_0 ve ΔR_t , ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki sensör sinyal değerlerini vermiştir.

AuNP-MIP plazmonik sensörü ile kortizol arasında gerçekleşen etkileşimi tayin etmek amacıyla iki farklı adsorpsiyon izoterm modeli uygulanmıştır. Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinde homojen bağlanma varsayımına dayanırken Freundlich adsorpsiyon izoterm modelinde ise heterojen bağlanma varsayımına dayanır.

$$\Delta R = \{\Delta R_{\text{maks}} [C] / K_D + [C]\} \quad (3.8)$$

$$\Delta R = \Delta R_{\text{maks}} [C]^{1/n} \quad (3.9)$$

Bu eşitlikte ΔR_{maks} maksimum sensör sinyal kayması; ΔR_{denge} , denge halindeki sensör sinyal kayması; $[C]$, kortizol derişimi (ppb); K_A (ppb⁻¹), bağlanma denge sabiti K_D (ppb), ayrılma denge sabiti; $1/n$, Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.

3.8.3. Seçicilik Analizleri

AuNP-MIP plazmonik sensörünün kortizol molekülüne karşı seçiciliğini göstermek için PBS-etil alkol (50:50, v/v) tamponunda hazırlanan yarışmacı ajanlar flutikazon (100 ppb) ve

klobetazol (100 ppb) çözeltileri ayrı ayrı sisteme verilerek adsorpsiyon çalışmaları değerlendirilmiştir. Yarışmalı analizlerde de kinetik analizler basamağında izlenen denge-adsorpsiyon-desorpsiyon adımları aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, AuNP-MIP plazmonik sensörün baskılama seçiciliğini ve AuNP'lerin sinyal yanıtına etkilerini belirlemek için MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensörler ile 100 ppb derişimdeki kortizol çözeltisi etkileştirilmiş ve elde edilen veriler ışığında seçicilik (k) ve bağıl seçicilik (k') katsayıları hesaplanmıştır. k ve k' değerlerinin hesaplanması için kullanılan eşitlikler Eşitlik 3.10 ve 3.11'de verilmiştir.

$$k = \Delta R_{kortizol} / \Delta R_{yarışmacı} \quad (3.10)$$

$$k' = k_{MIP} / k_{NIP} \quad (3.11)$$

3.8.4. Tekrar Kullanılabilirlik Analizleri

AuNP-MIP plazmonik sensörün tekrar kullanılabilirliğini göstermek amacıyla adsorpsiyon çözeltisi içerisinde 100 ppb derişimdeki kortizol örneği hazırlanmış ve beş tekrarlı bir şekilde sensör yüzeyi ile etkileştirilmiştir. İlk olarak adsorpsiyon çözeltisi olarak PBS-etil alkol çözeltisi 180 saniye süreyle sisteme verilmiş ve sistem dengeye getirilmiştir. Daha sonra her 180 saniye aralıkta kortizol örneği ve desorpsiyon çözeltisi peşpeşe sisteme verilmiştir. Bu işlemleri içeren adımlar beş tekrarlama yapılarak gerçek zamanlı sinyal yanıtı gözlemlenmiştir.

3.8.5. Karmaşık Ortam Analizleri

AuNP-MIP plazmonik sensörün karmaşık ortamda kullanılabilir olduğunun anlaşılabilmesi için yapay plazma ve yapay idrar örnekleri hazırlanmıştır. Bu amaçla adsorpsiyon çözeltisinde 100 ppb derişimde kortizol örneği hazırlamak için yapay plazma ve yapay idrar örneklerinin her birinden 10 µL alınarak örnek çözeltilerine eklenmiştir. Örnekler sırası ile sensör sistemine verilerek AuNP-MIP plazmonik sensör ile etkileştirilmiştir.

3.9. Validasyon Analizleri

Kortizol molekülünün örneklerden AuNP-MIP plazmonik sensör ile tayini HPLC sistemi kullanılarak doğrulanmıştır. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak amacıyla 1-100 ppb kortizol

zelteleri kullanılmıştır. zelteler hazırlanırken tampon zeltisi olarak 10 mM metil alkol:asetonitril:su (21:25:54, V/V) iinde 1 mg/mL derişimdeki stok kortizol zeltisinden hazırlanmıştır. Hazırlanan 10 mM'lık tampon zelti rneklere HPLC sisteminde mobil faz olarak kullanılmıştır. Kortizol ieren zelteler, yapay plazma ve yapay idrar ile 100 ppb derişiminde hazırlanmıştır. Hazırlanan rneklere analizi C18 kolonu kullanılarak 220 nm dalga boyunda gerekleştirilmiştir (Gallego, Arroyo, 2002).

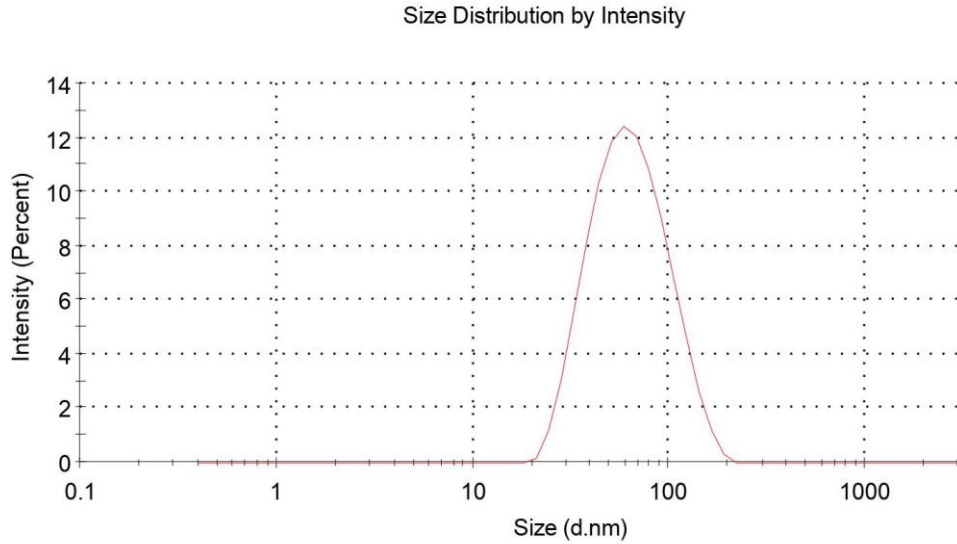


4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Altın Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Plazmonik sinyal yanıtını arttırmak amacıyla eklenen AuNP'lerin derişimini tespit etmek için ilk olarak AuNP'in boyut dağılımı analizi Nano Zetasizer boyut cihazı ile yapılmıştır. Şekil 4.1 AuNP'lerin zeta boyut analiz cihazı ile boyut ölçümünü gösterir. Şekilden de görüldüğü üzere düşük polidispersite indeks değerinden (PDI=0.154), homojen bir ortalama boyut dağılımına sahip eş boyutlu AuNP'lerin elde edildiği ve farklı boyutlardaki partiküllerin olmaması nedeniyle sistemde agregasyonun görülmediği tespit edilmiştir. AuNP'lerin ortalama boyutu üç kez (n=3) tekrarlanan ölçümler ile 56.61 nm olarak tespit edilmiştir. Daha sonra AuNP'lerin derişimi, tespit edilen ortalama boyut değeri kullanılarak 2.5×10^{-8} M olarak hesaplanmıştır.

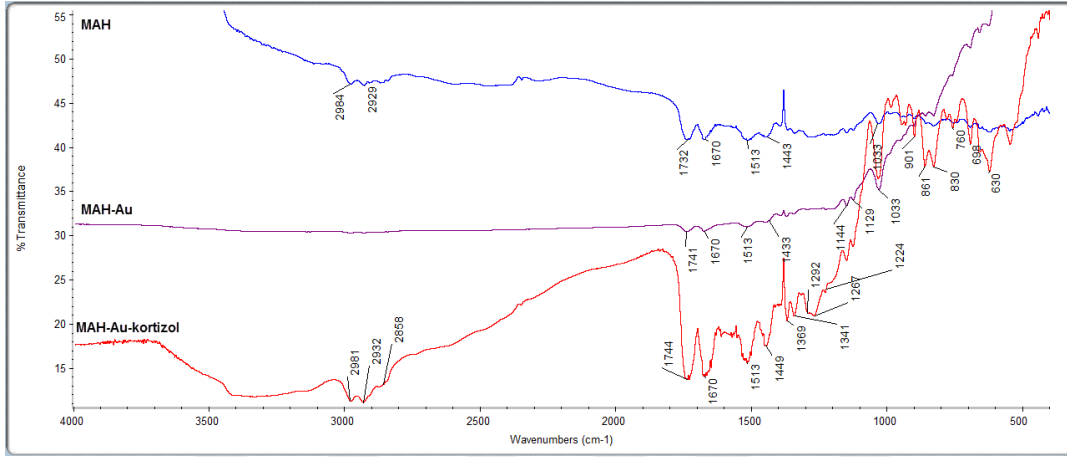
	Size (d.nm):	% Intensity:
Z-Average (d.nm): 56.61	Peak 1: 67.91	100.0
Pdl: 0.154	Peak 2: 0.000	0.0
Intercept: 0.936	Peak 3: 0.000	0.0
Result quality : Good		



Şekil 4.1. AuNP'lerin boyut analizi sonucu.

4.2. MAH-AuNP-Kortizol Ön-komplekslerin Karakterizasyonu

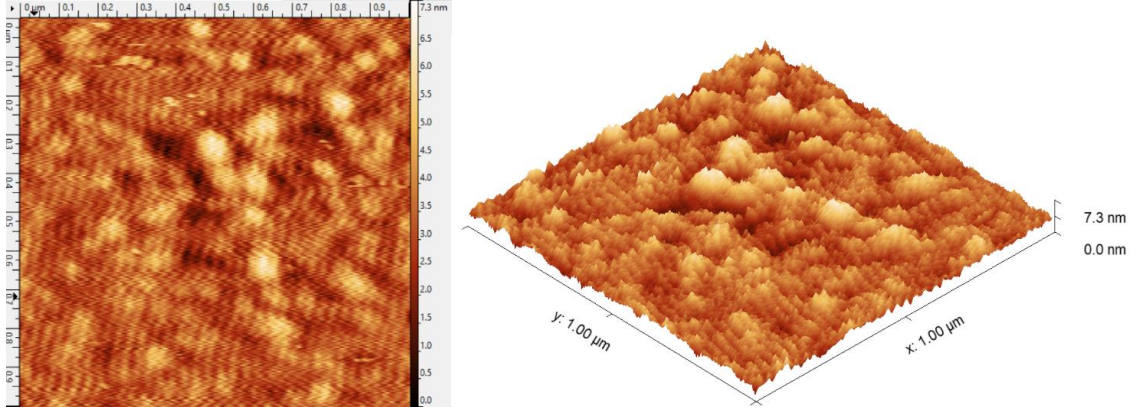
Şekil 4.2 incelendiğinde MAH monomerine ait spektrumundaki 1732 cm^{-1} de C=O bağına ait olan pikin dalga sayısının AuNP bağlandıktan sonra 1732 cm^{-1} den 1741 cm^{-1} e kaymış olması AuNP lerin MAH monomeriyle koordine olduğunu gösterir. MAH-AuNP-kortizol ön-kompleksine ait spektrumda 1369 cm^{-1} dalga boyunda görülen C-O bağına ait pikin belirgin bir şekilde gözlemlenmesi ve 1292 cm^{-1} dalga boyunda görülen C-N bağına ait pikin görünür hale gelmesi kortizolün yapıya entegre olduğunu gösterir.



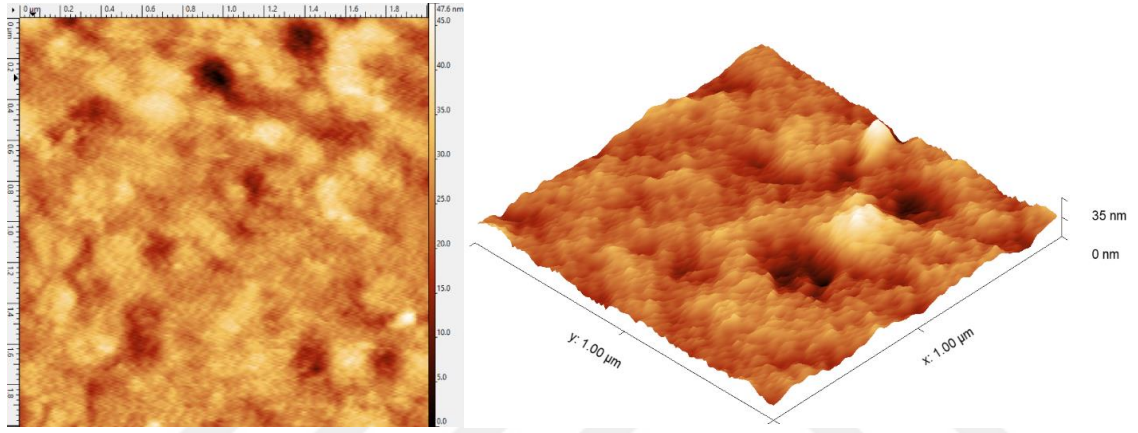
Şekil 4.2. MAH-AuNP-kortizol ön-komplekslerin FTIR-ATR spektrumları.

4.3. Plazmonik Sensör Yüzeylerinin Karakterizasyonu

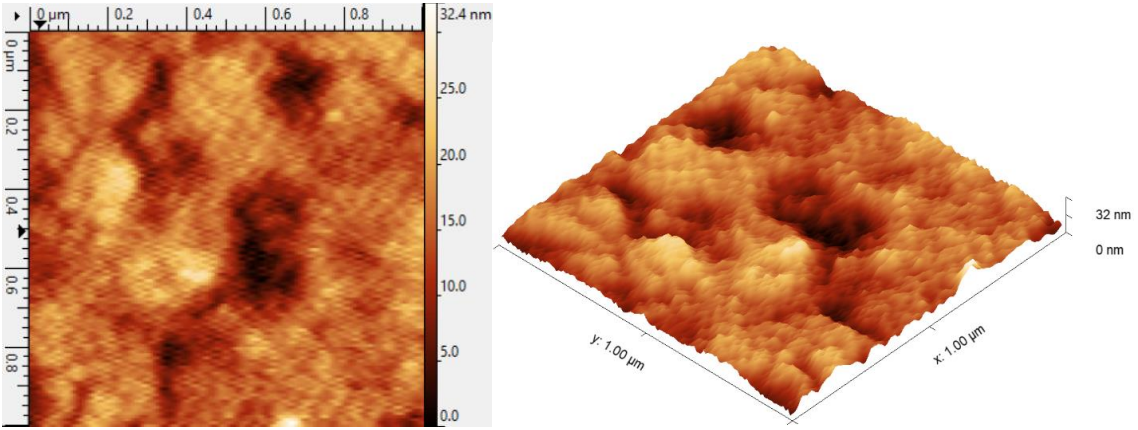
Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerindeki nanofilmlerin morfolojik özellikleri AFM analizleri ile incelenmiştir. Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerindeki nanofilmlerin ortalama pürüzlülük değerleri sırasıyla $0.8 \pm 0.2\text{ nm}$ (Şekil 4.3), $4.1 \pm 1.1\text{ nm}$ (Şekil 4.4), $3.7 \pm 2.3\text{ nm}$ (Şekil 4.5) ve $2.4 \pm 1.9\text{ nm}$ (Şekil 4.6) olarak ölçülmüştür. Ayrıca Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerindeki nanofilmlerin ortalama derinlik değerleri sırasıyla 3.4 nm , 16.59 nm , 14.87 nm ve 12.36 nm olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar plazmonik sensörlerin altın yüzeylerine nanofilmlerin başarılı ve homojen bir şekilde bağlandığını göstermiştir.



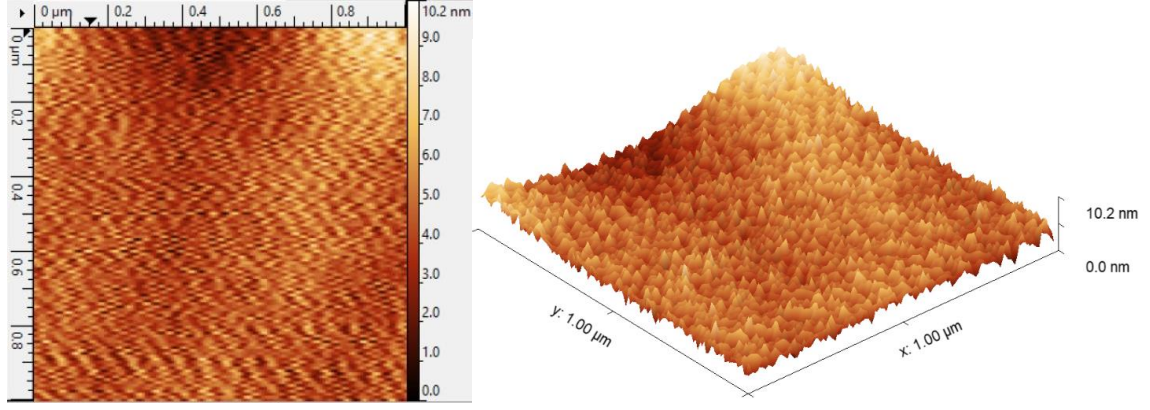
Şekil 4.3. Modifiye edilmemiş boş yüzeyin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri.



Şekil 4.4. AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri.

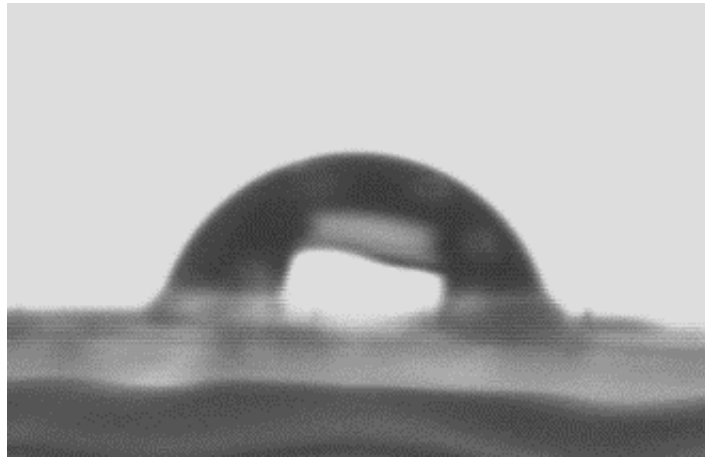


Şekil 4.5. MIP plazmonik sensör yüzeyinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri.

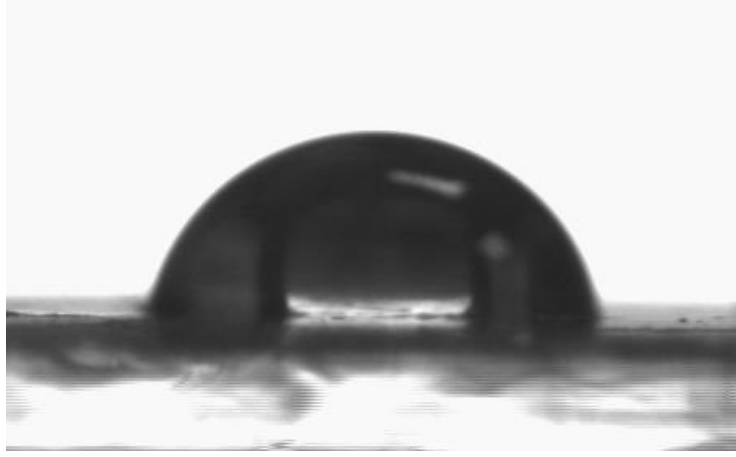


Şekil 4.6. AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeyinin iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri.

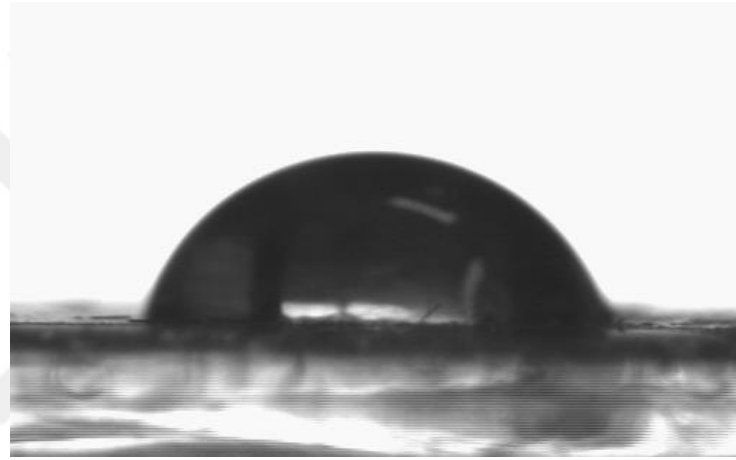
Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerinin su ile yaptığı temas açıları ölçülmüştür. Şekil 4.7’de görüldüğü üzere modifiye edilmemiş yüzeyin temas açısı değeri $79.2^{\circ} \pm 0.3$ iken AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyinin temas açısı değeri $76.3^{\circ} \pm 0.7$ olarak ölçülmüştür (Şekil 4.8). Temas açısındaki bu azalmanın nedeni, sensör yüzeyinin su sevmeye (hidrofilik) özelliğinin arttığı anlamına gelir. AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyi hazırlanırken kullanılan fonksiyonel monomer ve kalıp molekülden kaynaklı kısmi hidrofiliktir. Ayrıca, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’de sırasıyla gösterilen MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerinin temas açısı değerleri sırasıyla $77.9^{\circ} \pm 1.2$ ve $73.6^{\circ} \pm 1.1$ olarak ölçülmüştür. AuNP’lerin varlığı plazmonik sensör yüzeylerinin hidrofilik karakterinin artmasına sebep olmuştur. Her bir yüzeyin temas açısı değerlerinin kıyaslanması Şekil 4.11’de verilmiştir.



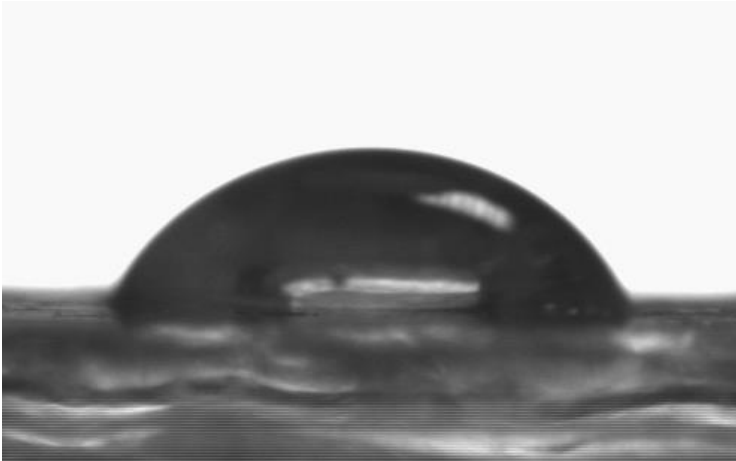
Şekil 4.7. Modifiye edilmemiş boş yüzeyin temas açısı görüntüsü.



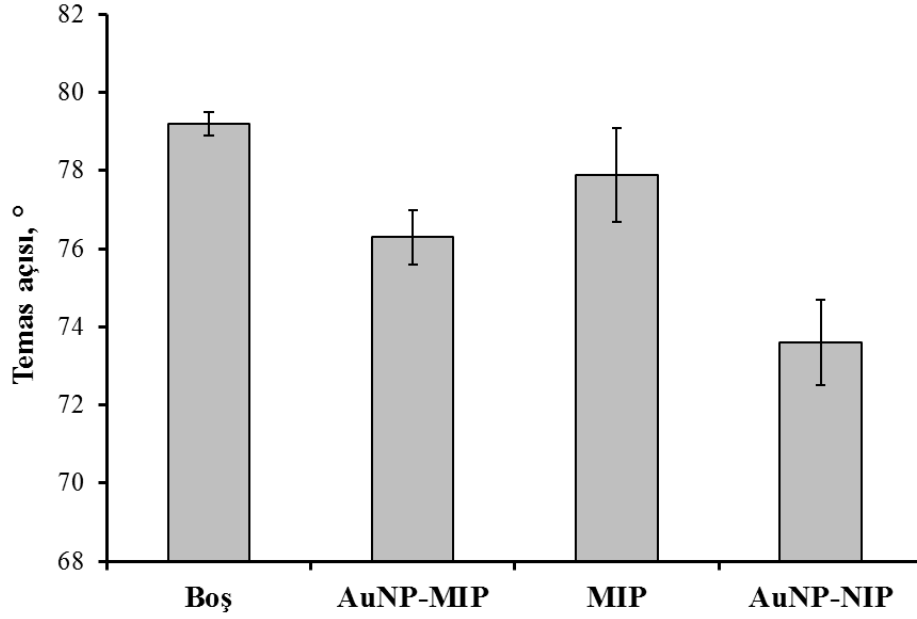
Şekil 4.8. AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyinin temas açısı görüntüsü.



Şekil 4.9. MIP plazmonik sensör yüzeyinin temas açısı görüntüsü.



Şekil 4.10. AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeyinin temas açısı görüntüsü.

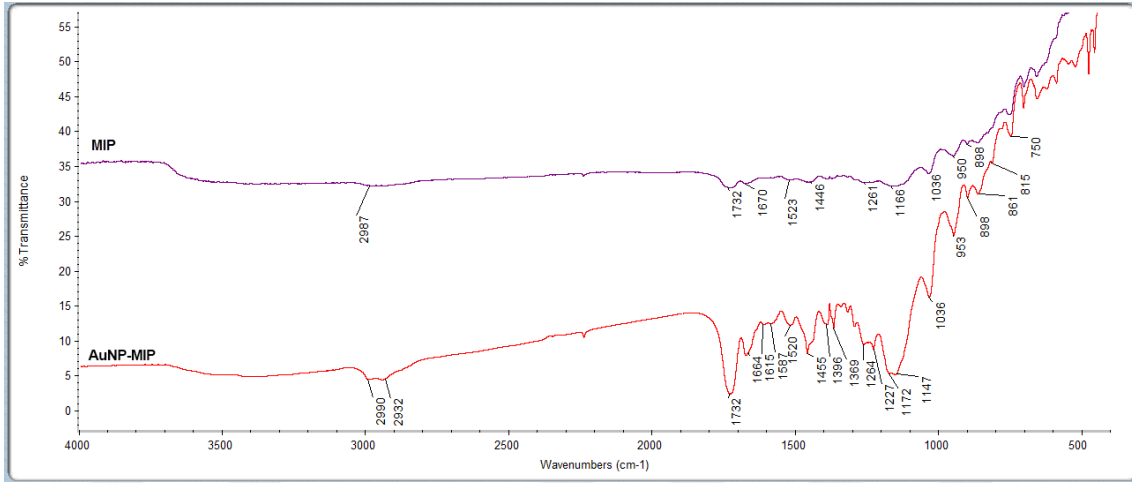


Şekil 4.11. Boş, AuNP-MIP, MIP, AuNP-NIP sensör yüzeylerinin temas açısı değerleri.

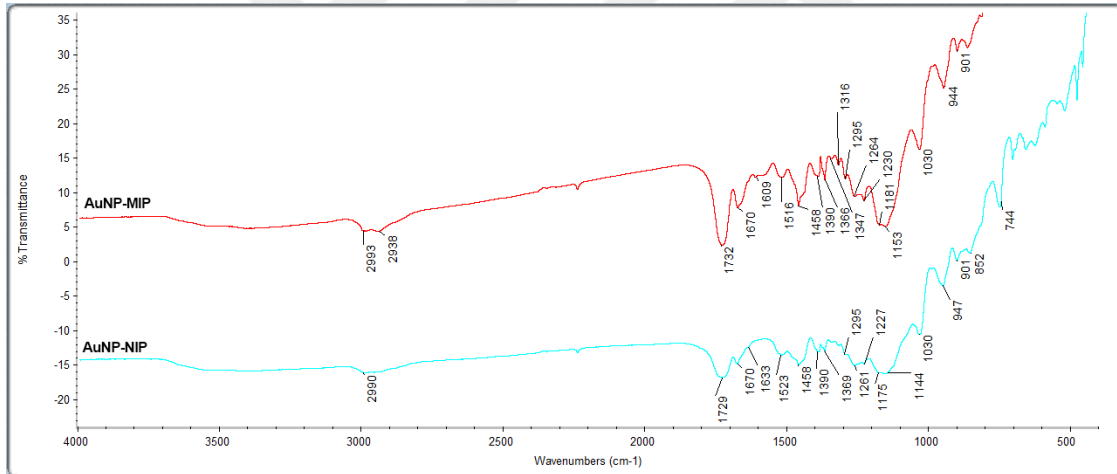
AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerinde bulunan polimerik nanofilmlerinin yapı analizi FTIR-ATR ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak plazmon sinyali arttırmak amacıyla yapıya eklenen AuNP'lerin yapıya dahil olup olmadığını belirlemek için AuNP-MIP ve MIP plazmonik sensörleri Şekil 4.12'de görülen FTIR-ATR spektrumları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Daha sonra baskılama etkinliğini belirlemek amacıyla AuNP-MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensörlerin Şekil 4.13'de görülen FTIR-ATR spektrumları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Buna göre AuNP-MIP plazmonik sensörüne ait spektrumda belirgin hale gelen 1664 cm^{-1} ve 1587 cm^{-1} dalga sayılarında görülen N-H bağları yapının AuNP ile koordinasyon gerçekleştirerek belirgin hale geldiğini gösterir. AuNP-MIP plazmonik sensöründe 1732 cm^{-1} dalga sayısında görülen C=O bağına ait pik şiddetinin artması ve MIP plazmonik sensöründeki 1670 cm^{-1} dalga sayısında görülen amid I bağına ait pikin AuNP-MIP plazmonik sensöründe 1664 cm^{-1} dalga sayısına kayması, AuNP'lerin başarılı bir şekilde yapıya dahil olduğunu gösterir.

Şekil 4.13 incelendiğinde AuNP-MIP plazmonik sensör için 2938 cm^{-1} dalga sayısında görülen C=O bağı ve 1316 cm^{-1} dalga sayısında görülen C-N bağına ait piklerin belirgin bir şekilde görünür hale gelmesi kortizolün yapıya başarılı bir şekilde entegre olduğunu gösterir. Buna ek olarak AuNP-MIP plazmonik sensöre ait spektrumda 1732 cm^{-1} dalga sayısında

görülen C=O bağına ait pik şiddetinin AuNP-NIP plazmonik sensör 1729 cm^{-1} dalga sayısına kayması ve şiddetinin belirgin bir şekilde azalması kortizolün yapıya dahil olduğunu gösterir.



Şekil 4.12. AuNP-MIP ve MIP plazmonik sensörlerin FTIR-ATR spektrumları.

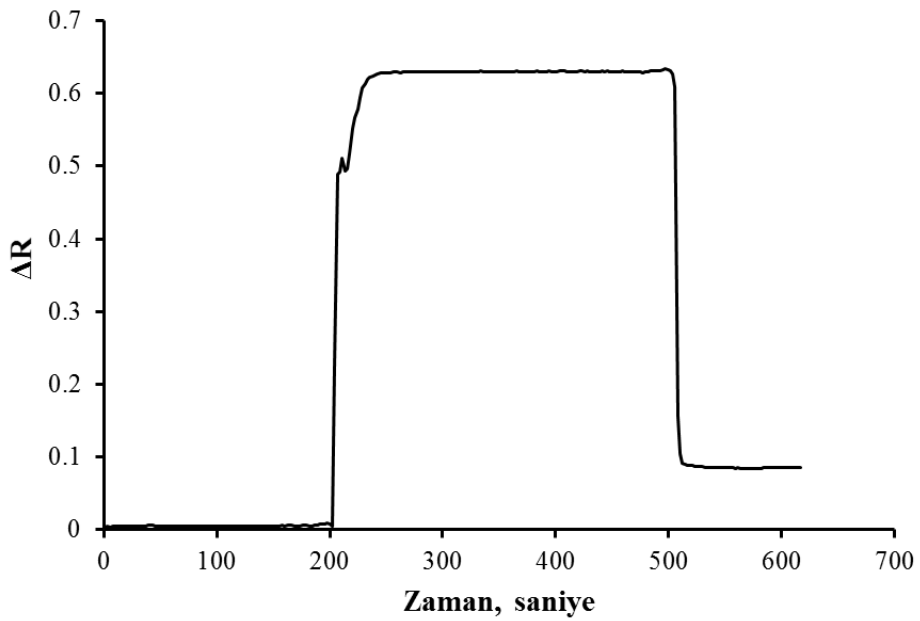


Şekil 4.13. AuNP-MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensörlerin FTIR-ATR spektrumları.

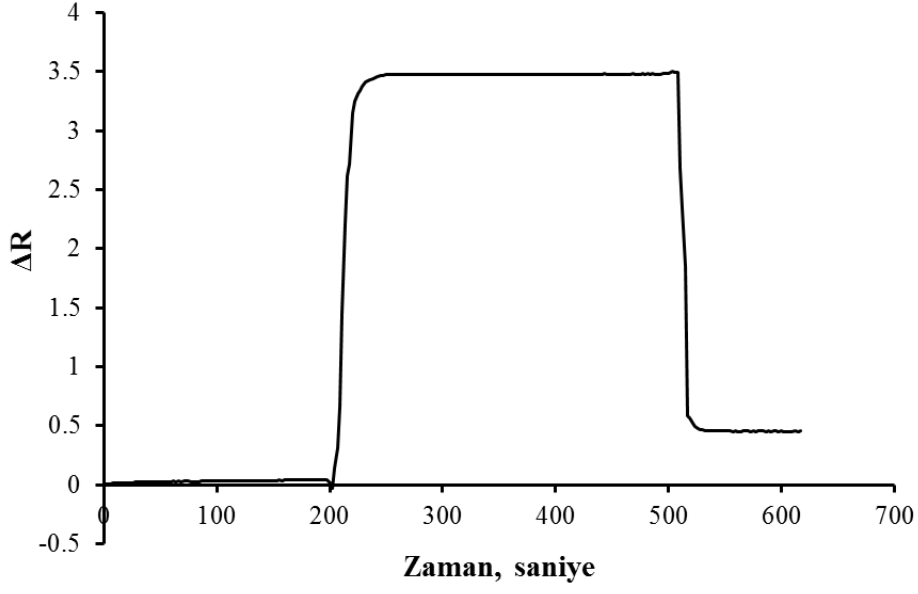
4.4. Plazmonik Sensörler ile Kinetik Analizler

Bu tez çalışmasında AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensörleri hazırlanmış ve kinetik analizler sonucunda sensorgramlar elde edilmiştir. Sensorgramlar elde edilirken, sensör sisteminden ilk olarak denge çözeltisi, sonra farklı derişimlerdeki kortizol örnekleri ve son olarak desorpsiyon çözeltisi geçirilerek her derişim için bu basamaklar aynen tekrarlanmıştır. AuNP-MIP plazmonik sensör ile gerçek zamanlı kortizol tayini için 0.01-100 ppb derişim aralığında hazırlanan kortizol örnekleri kullanılarak kinetik analizler

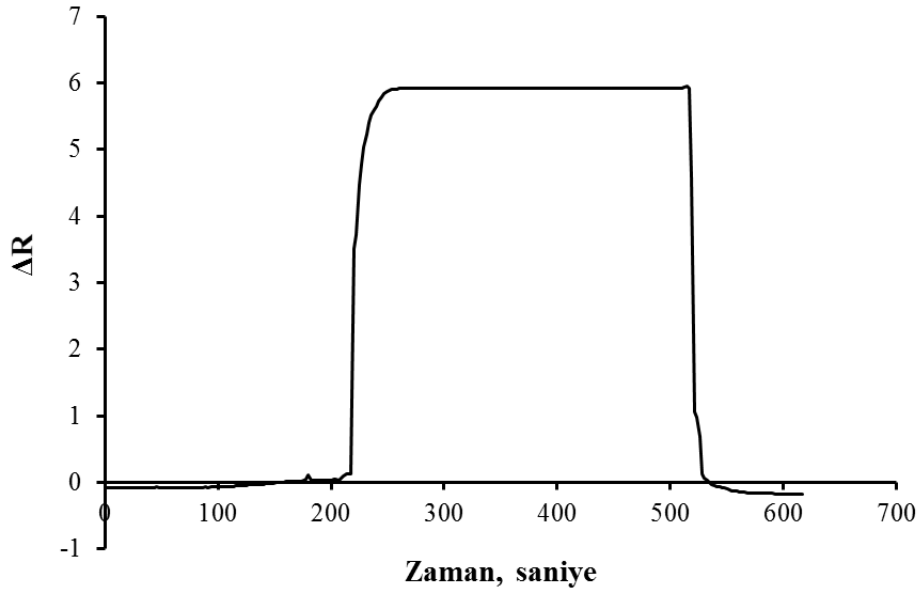
gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.14-Şekil 4.21 arasında farklı derişimlerde hazırlanmış kortizol çözeltilerinin AuNP-MIP plazmonik sensör tarafından verilen sensör yanıtlarının sensorgramları gösterilmiştir. Ayrıca Şekil 4.22’de tüm sensorgramların çakışık hali elde edilmiş ve kortizol derişimi arttıkça sensör tepkisinin arttığı rahat bir şekilde gözlenmiştir. Bununla birlikte Şekil 4.23’de elde edilen kalibrasyon grafiğine bakıldığında $y=0.2561x+3.3624$ eşitliği ile birlikte AuNP-MIP plazmonik sensörün 0.01-100 ppb kortizol derişimi aralığında 97% doğrulukta tayin yapabildiği söylenebilir. Elde edilen veriler ışığında AuNP-MIP plazmonik sensörün en düşük tayin limiti (LOD) ve en düşük miktar limiti (LOQ) değerleri 0.0082 ppb ve 0.027 ppb olarak hesaplanmıştır.



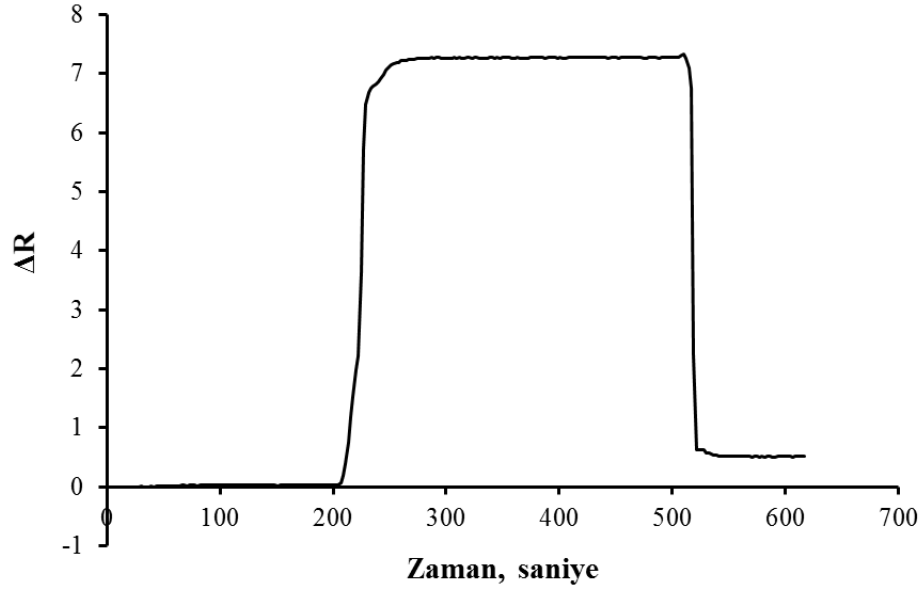
Şekil 4.14. 0.01 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.



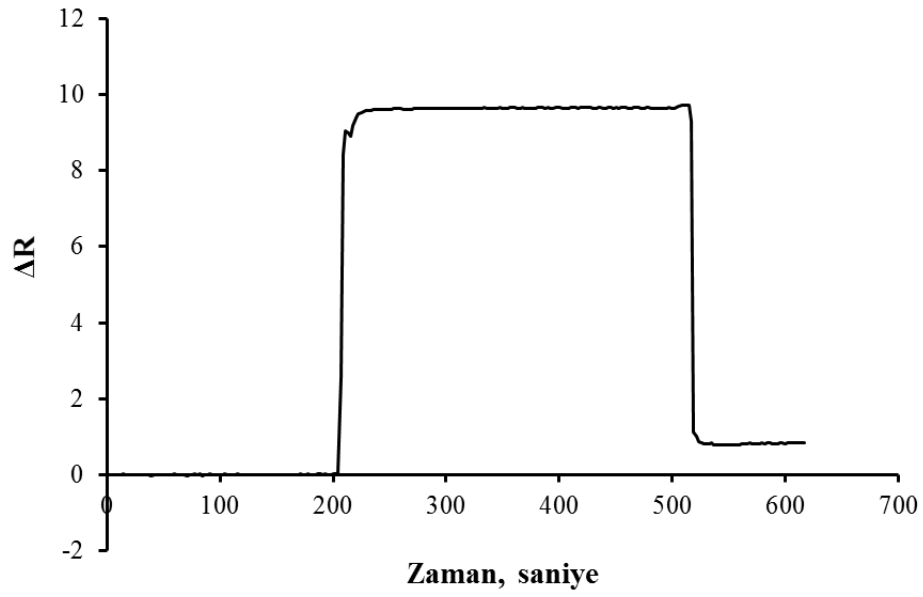
Şekil 4.15 0.1 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.



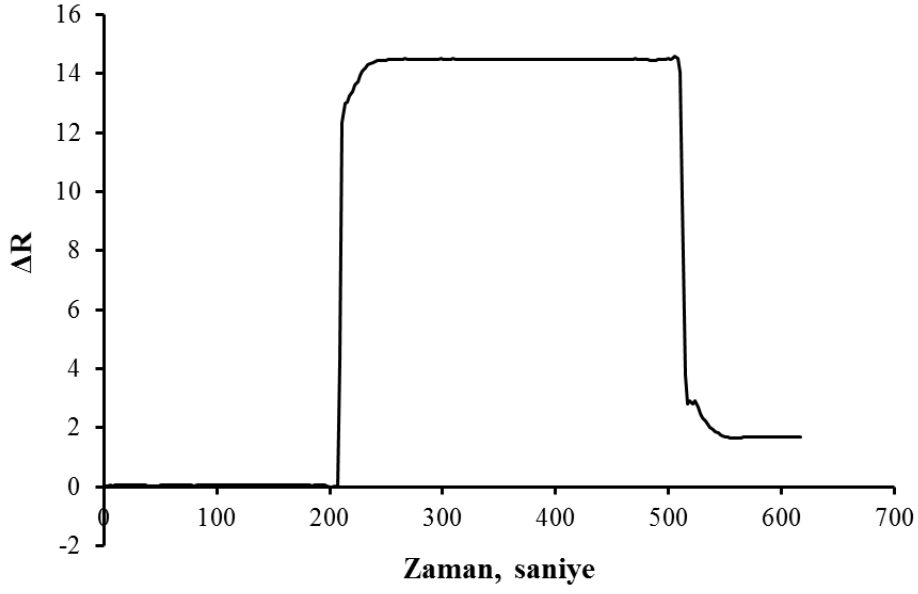
Şekil 4.16. 1 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.



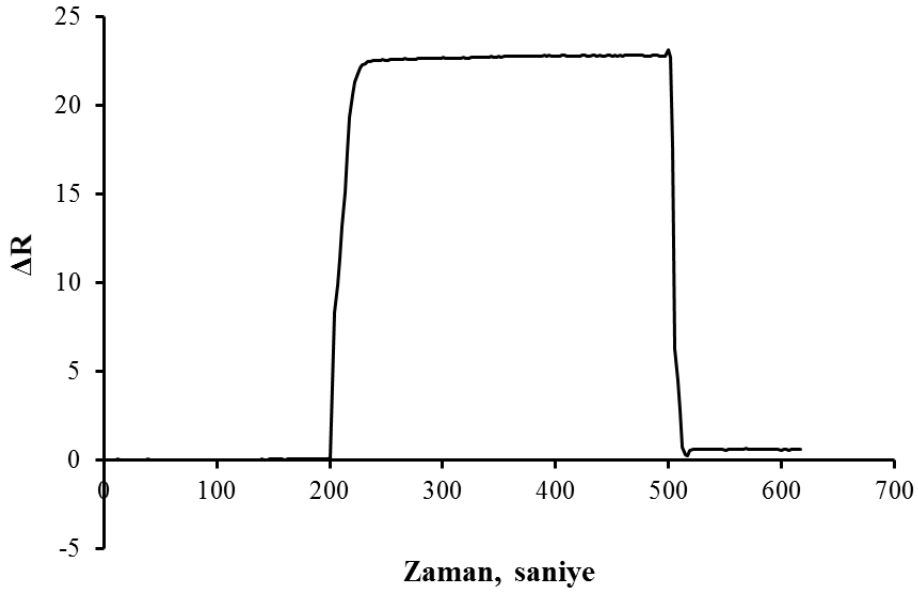
Şekil 4.17. 10 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.



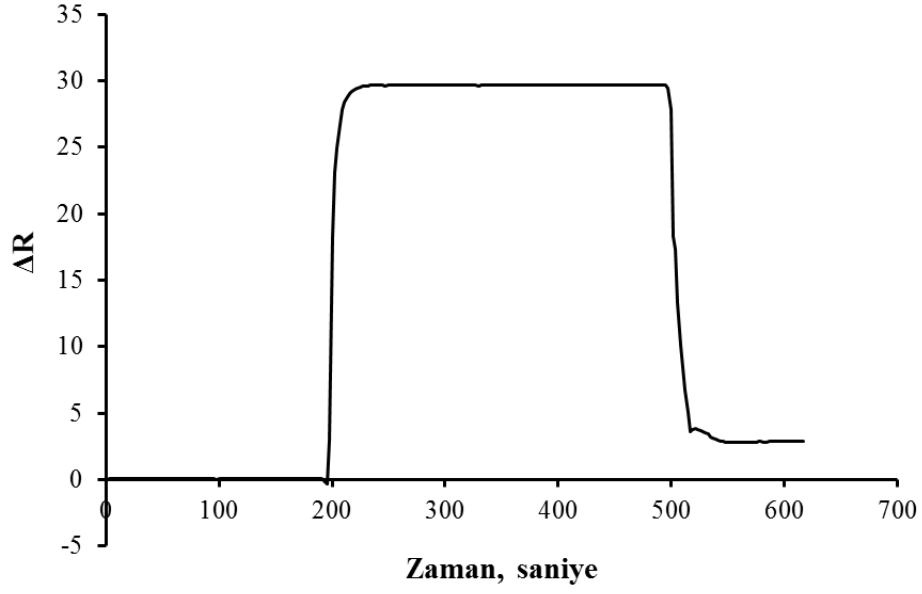
Şekil 4.18. 25 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.



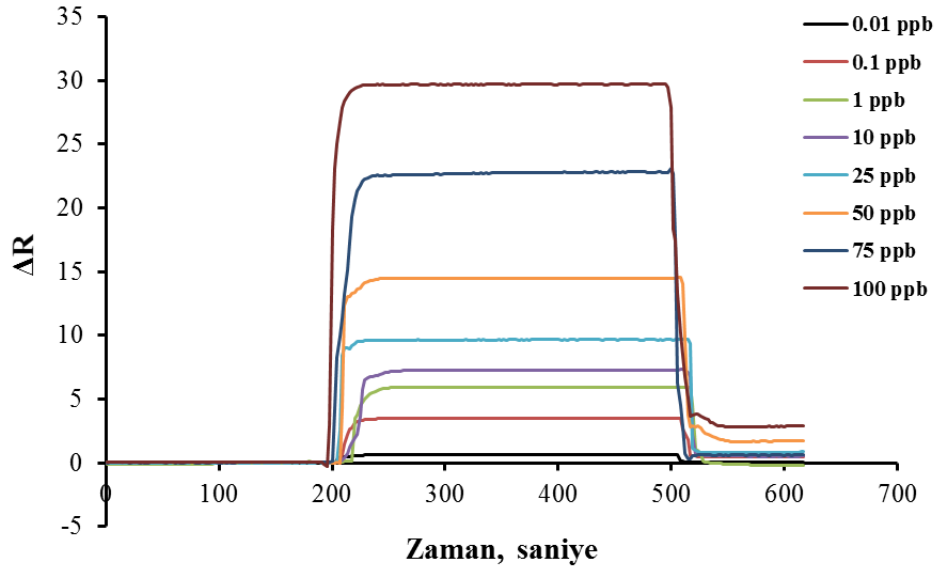
Şekil 4.19. 50 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.



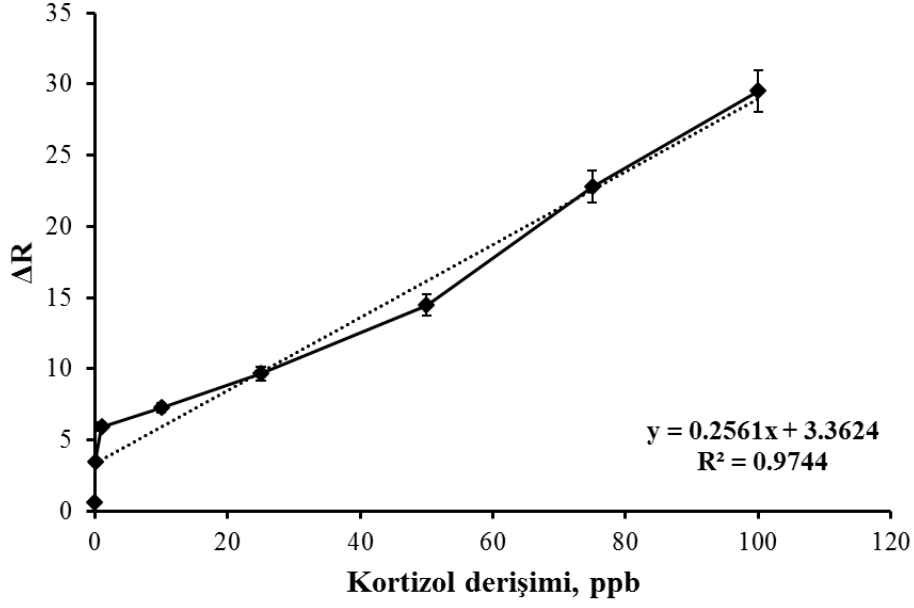
Şekil 4.20. 75 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.



Şekil 4.21. 100 ppb kortizol derişimi için elde edilen sensorgram.

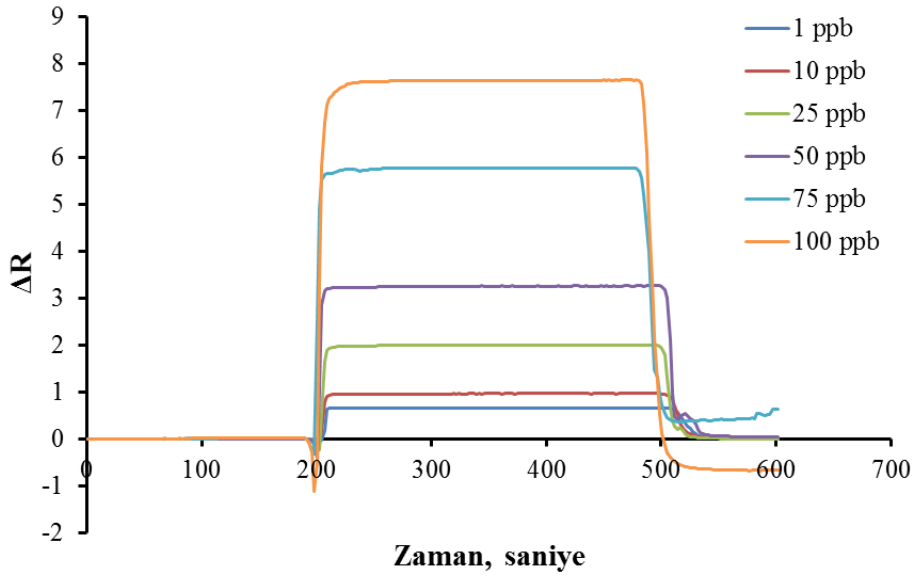


Şekil 4.22. Farklı derişimlerdeki kortizol örnekleri için elde edilen sensorgramlar.

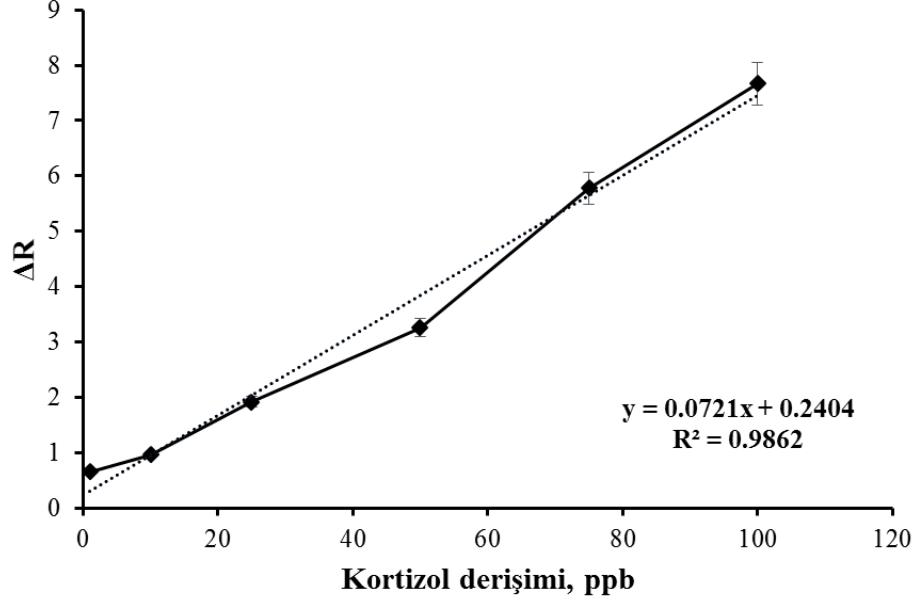


Şekil 4.23. Farklı derişimlerdeki kortizol örnekleri için elde edilen kalibrasyon grafiği.

MIP plazmonik sensör ile gerçek zamanlı kortizol tayini için 1-100 ppb derişim aralığında hazırlanan kortizol örnekleri kullanılarak kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'te farklı derişimlerde hazırlanmış kortizol çözeltilerinin MIP plazmonik sensör tarafından verilen sensör yanıtlarının sensorgramları ve kalibrasyon grafiği gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Farklı derişimlerdeki kortizol örnekleri için elde edilen sensorgramlar.

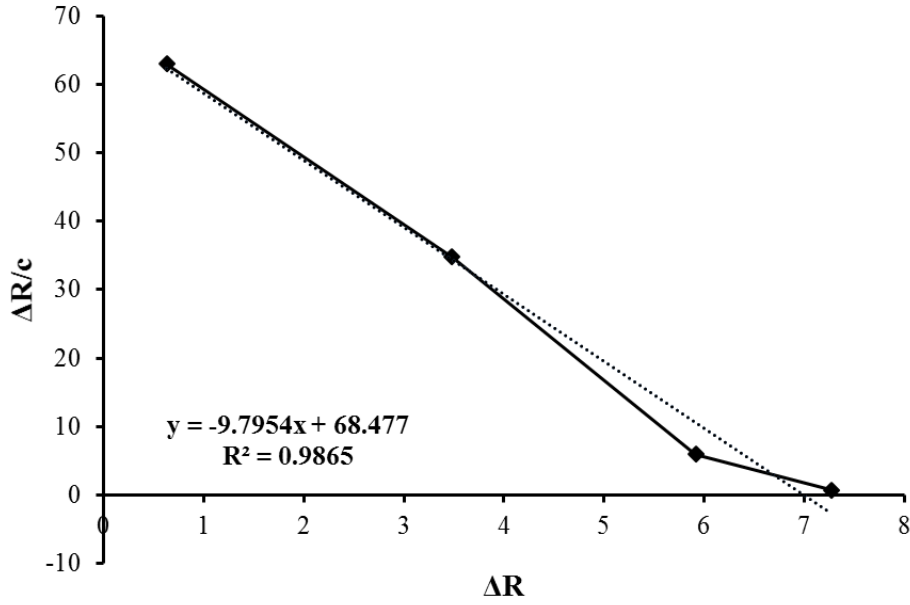


Şekil 4.25. Farklı derişimlerdeki kortizol örnekleri için elde edilen kalibrasyon grafiği.

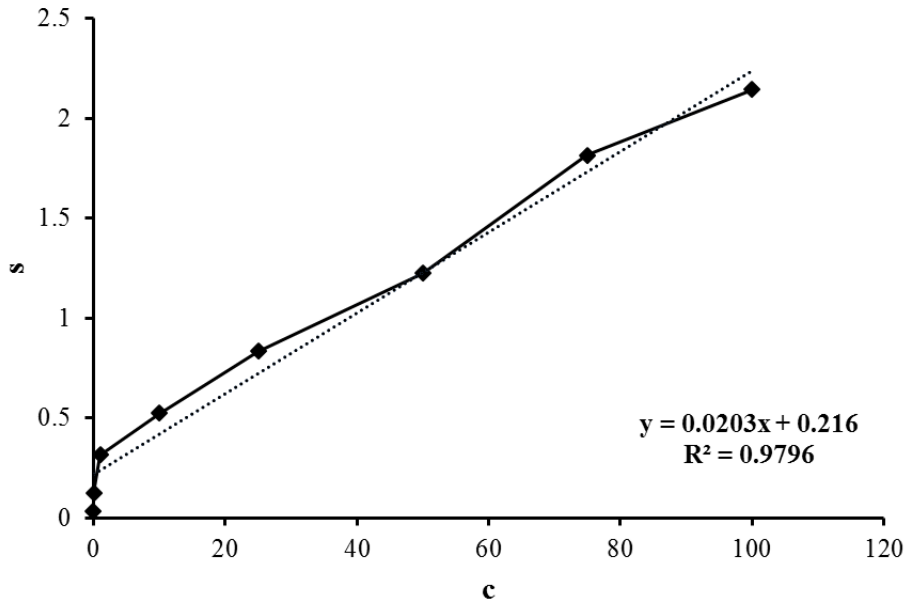
AuNP-MIP plazmonik sensörün farklı kortizol derişimleri analizinden elde edilen veriler ışığında Şekil 4.26 ve Şekil 4.27’de denge ve bağlanma kinetik analizleri için grafikler çizilmiştir. Bu grafiklere ait ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D kinetik sabitleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, denge analiz yaklaşımı Scatchard’da hesaplanan teorik ΔR_{maks} değerinin (6.991), 0.01-10 ppb kortizol derişimi aralığında deneysel elde edilen ΔR_{maks} değerine (7.270) oldukça yakın olduğu görülmüştür. Aynı şekilde bağlanma analiz sonucuna göre de kortizolün AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyin %98 doğrulukta bağlandığı görülmüştür.

Çizelge 4.1. Kinetik sabitler.

Denge Analizi (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
ΔR_{maks}	6.991	k_a	0.0203
K_A	9.795	k_d	0.216
K_D	0.102	K_A	0.094
R^2	0.987	K_D	10.64
		R^2	0.980



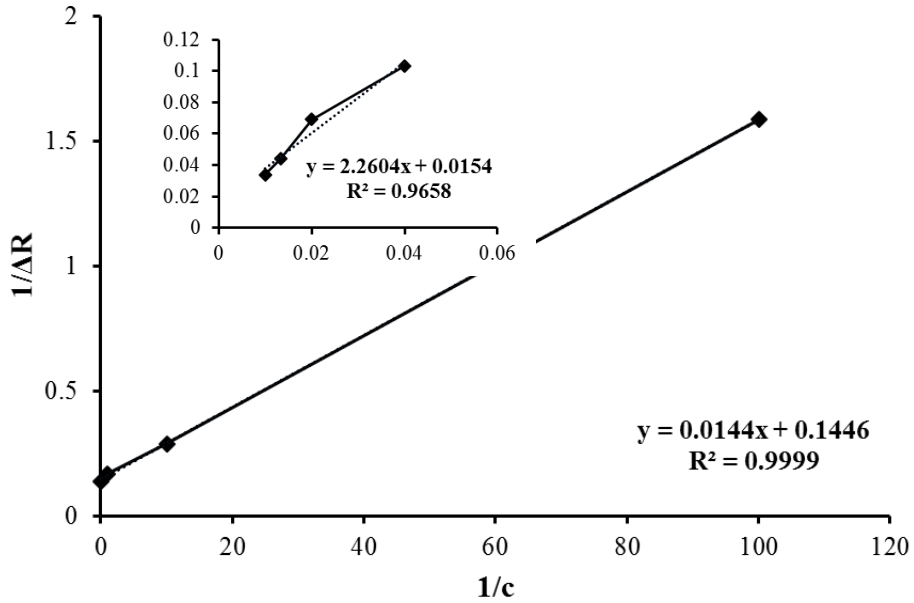
Şekil 4.26. Denge analiz (Scatchard) yaklaşımı.



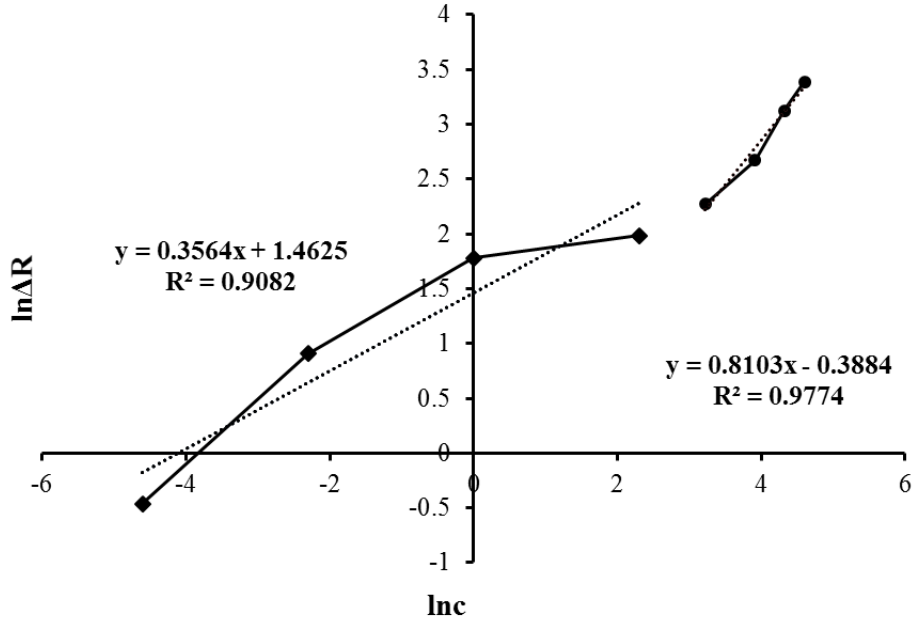
Şekil 4.27. Bağlanma kinetik yaklaşımı.

AuNP-MIP plazmonik sensörü ile kortizol örnek çözeltisi arasında meydana gelen etkileşimin türünü belirlemek amacıyla iki farklı izoterm modeli (Langmuir ve Freundlich) uygulanmıştır. Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'a göre deneyler sonucu olarak elde edilen veriler ile kortizol tayinine en uygun model Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli olduğu

görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında, hazırlanan AuNP-MIP plazmonik sensörü yüzeyine kaplanan nanofilmin kortizol bağlanma özelliklerinin minimum yanal etkileşimli, homojen dağılımlı, eş enerjili ve tek tabakalı olduğunu gösterir. Bu grafiklerden hesaplanan ΔR_{maks} , K_A , K_D ve $1/n$ kinetik sabitleri Çizelge 4.2’de özetlenmiştir. Çizelge incelendiğinde de elde edilen sabitler ile Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinde hesaplanan teorik ΔR_{maks} değerinin (6.916) 0.01-10 ppb derişim aralığında deneysel elde edilen ΔR_{maks} değerine (7.270) oldukça yakın olduğu görülmüş, bu da Langmuir modelinin hazırlanan AuNP-MIP plazmonik sensöre en uygun adsorpsiyon izoterm modeli olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca, matematiksel hesaplamalara göre elde edilen korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinde ($R^2=0.9999$) Freundlich adsorpsiyon izoterm modeline ($R^2=0.9082$) göre daha yüksek bir korelasyon katsayısına sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.28. Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli.



Şekil 4.29. Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli.

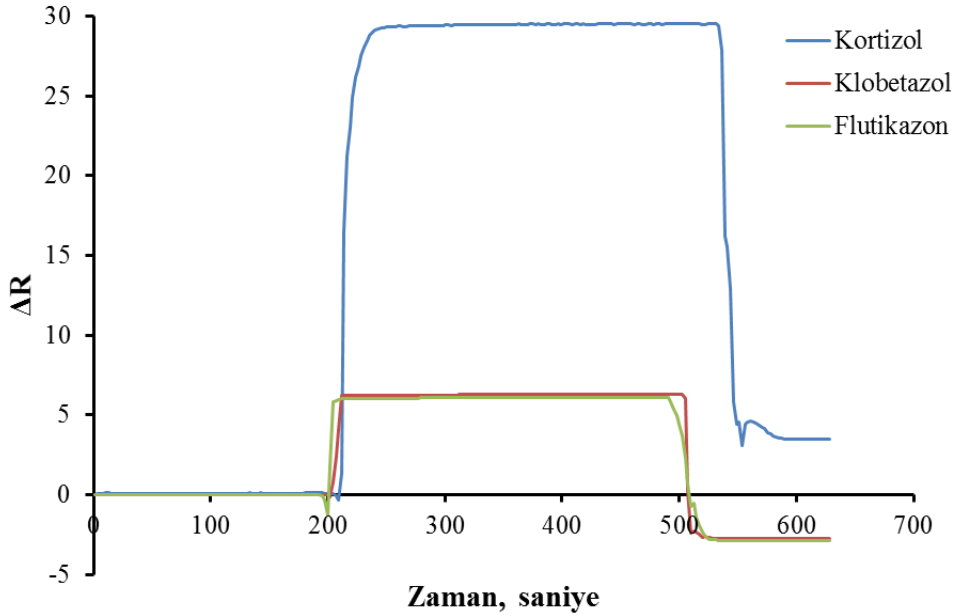
Çizelge 4.2. Adsorpsiyon izoterm modeli sabitleri.

Langmuir		Freundlich	
ΔR_{\max}	6.916	ΔR_{\max}	4.32
K_A	480.3	$1/n$	0.356
K_D	0.002	R^2	0.908
R^2	0.999		

4.5. Seçicilik Analizleri

Bu tez çalışması kapsamında düşük maliyetle gerçek zamanlı kortizol tayini için hassas ve seçici plazmonik sensör hazırlanmıştır. Bu amaçla AuNP'lerin etkileşimi için imidazol grubu sağlayıcısı histidin amino asitini içeren MAH fonksiyonel monomeri ile etkileştirilmiştir. Amino asit temelli yeniden kullanılabilir AuNP-MIP plazmonik sensörün kortizol molekülü ppb derişim düzeyinde tayin edebildiği tespit edilmiştir. Moleküler baskılanmış polimerler, polimerik bir yapıdaki bir kalıp molekülün yapısı için spesifik bir boşluk ve seçici tanıma bölgeleri oluşturmak için kullanılır (Bakhshpour ve ark., 2020). Şekil 4.30'da gösterildiği üzere, AuNP-MIP plazmonik sensörün kortizolün seçici tayinini incelemek amacıyla, flutikazon ve klobetazol ile yarışmacı adsorpsiyon çalışmaları

yapılmıştır. Bu amaçla, ayrı ayrı hazırlanan klobetazol (100 ppb) ve flutikazon örnekleri (100 ppb), AuNP-MIP plazmonik sensörü ile etkileştirilmiş ve spesifik olmayan etkileşimlerin kısmen düşük olduğu gözlenmiştir.

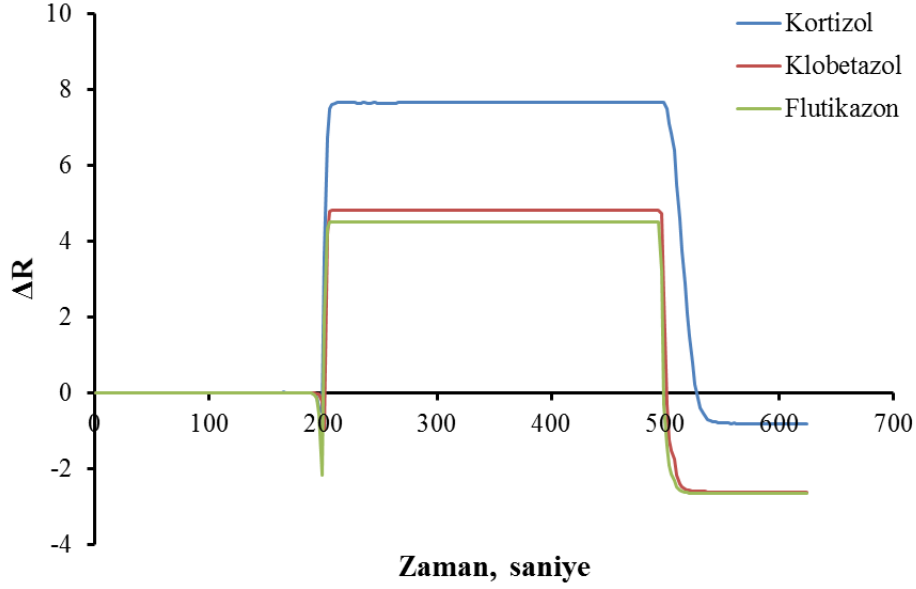


Şekil 4.30. AuNP-MIP plazmonik sensörün seçicilik sensorgramları

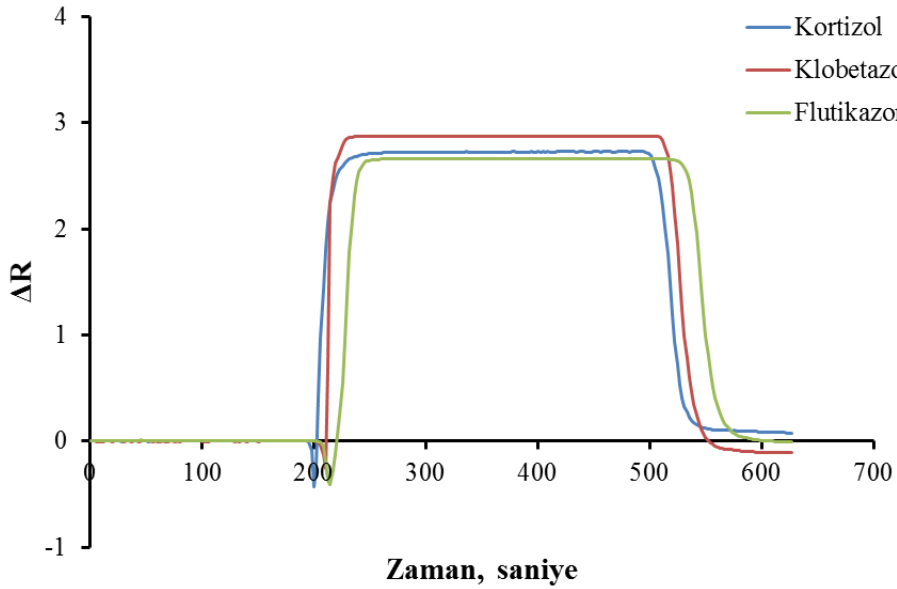
4.6. Baskılama Etkinliğinin Belirlenmesi

MIP plazmonik sensör ile ayrı ayrı hazırlanan klobetazol (100 ppb) ve flutikazon örnekleri (100 ppb) etkileştirilerek Şekil 4.31'deki sensorgramlar elde edilmiştir. Ayrıca, AuNP-MIP plazmonik sensörünün baskılama etkinliği için kortizol kullanılmadan hazırlanan AuNP-NIP plazmonik sensör ile gösterilmiştir. AuNP-NIP plazmonik sensör ile yapılan 100 ppb derişimli kortizol tayininde ΔR değerinin 29.52'ten 2.73'e düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.32). Böylece, AuNP-NIP plazmonik sensörün kortizol ile kayda değer bir etkileşime girmediğini sinyal şiddetinde meydana gelen azalma ile gözlemlenmiştir. Ayrıca, flutikazon ve klobetazol yarışmacı ajanları kullanılarak hazırlanan çözeltiler AuNP-NIP plazmonik sensör ile etkileştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre AuNP-NIP plazmonik sensör yarışmacı ajanlara karşı spesifik olmayan düşük sinyaller verdiği gözlenmiştir. Yapılan seçicilik (k) ve bağıl seçicilik (k') katsayıları hesaplamaları Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Buna göre AuNP-MIP plazmonik sensörün kortizol molekülüne AuNP-NIP plazmonik sensöre göre 4.96 ve

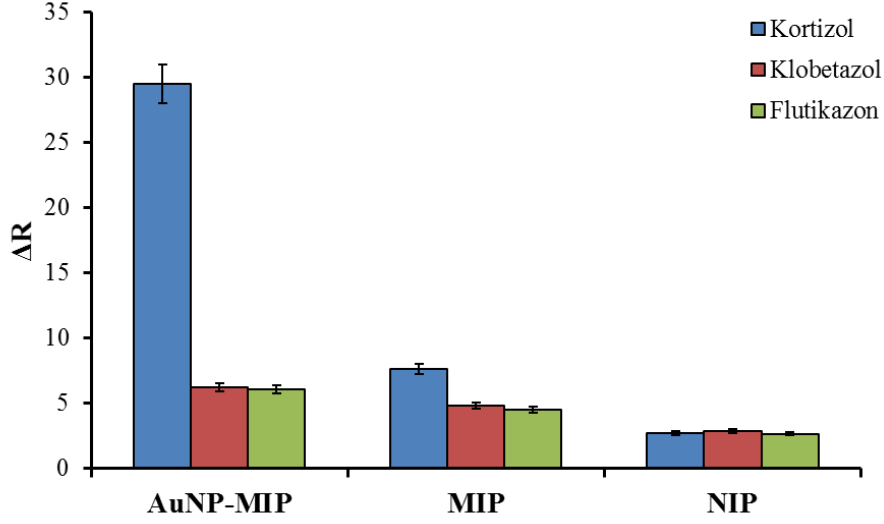
4.71 kat daha seçici olduğu görülmüştür. Sonuç olarak AuNP-MIP plazmonik sensörün, kortizolu seçici olarak tayin ettiği görülür.



Şekil 4.31. MIP plazmonik sensörün seçicilik sensorgramları.



Şekil 4.32. AuNP-NIP plazmonik sensörün seçicilik sensorgramları.



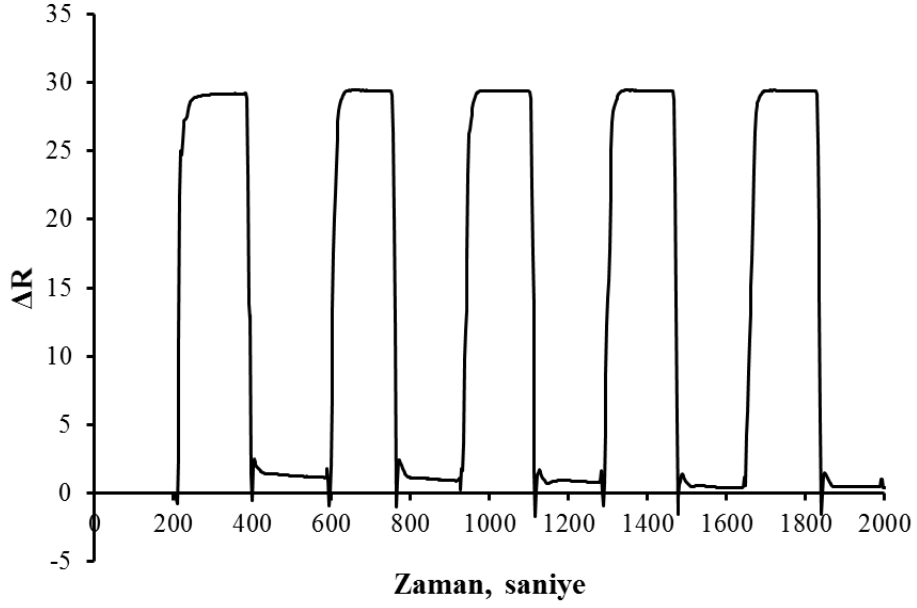
Şekil 4.33. Plazmonik sensörlerin kıyaslama grafiği.

Çizelge 4.3. Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

	AuNP-MIP		AuNP-NIP		
	ΔR	k	ΔR	k	k'
Kortizol	29.52		2.73		
Klobetazol	6.26	4.72	2.87	0.95	4.96
Flutikazon	6.11	4.83	2.66	1.03	4.71

4.7. Tekrar Kullanılabilirlik Analizi

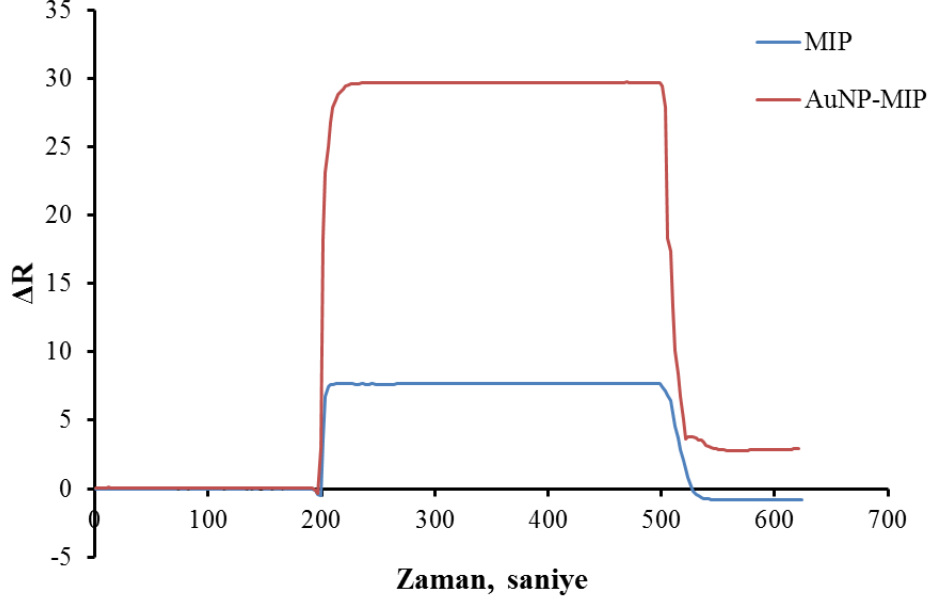
AuNP-MIP plazmonik sensörün tekrarlanabilirlik çalışmaları 100 ppb kortizol çözeltisinin sensör sistemine beş tekrardan oluşan denge adsorpsiyon-desorpsiyon adımlarının uygulanmasıyla incelenmiş ve sensör yanıtı Şekil 4.34'te gösterilmiştir. Elde edilen sonuçta göre bağlanma bölgelerinde herhangi bir bozulma ve dolayısıyla herhangi bir performans kaybı olmaksızın AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyi tekrar tekrar kullanılabilir.



Şekil 4.34. AuNP-MIP plazmonik sensörün tekrar kullanılabilirlik sensorgramı.

4.8. AuNP'lerin Plazmonik Sensör Hassasiyetini Artırıcı Etkisi

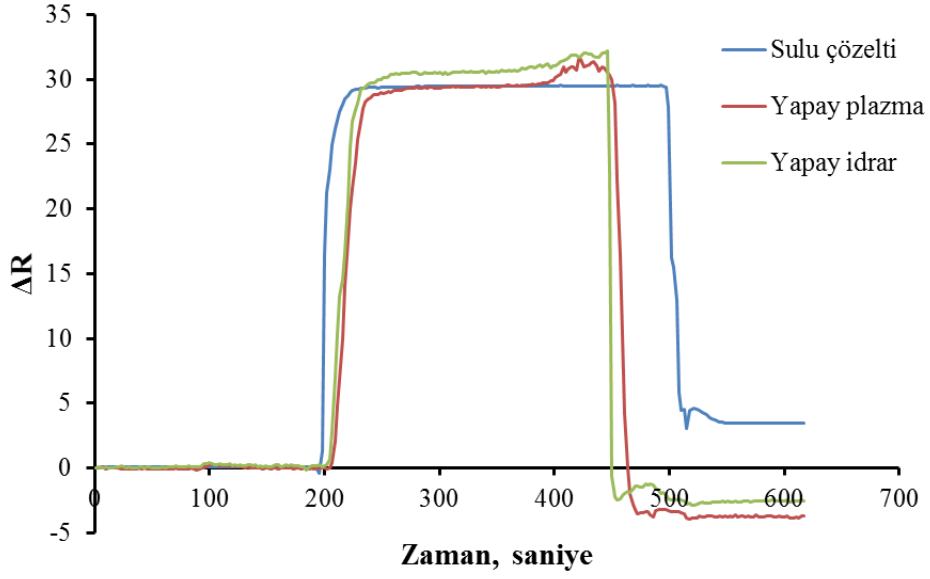
AuNP gibi iletken polimerler, sinyal yanıtını artırmak amacı ile yaygın olarak kullanılır. AuNP-MIP plazmonik sensör, artan kortizol derişimine karşılık artan bir plazmon açısı yanıtı vermiştir. Ayrıca, 100 ppb derişiminde kortizol örneği tayini analizinde AuNP-MIP plazmonik sensör ile AuNP eklenmeden hazırlanan MIP plazmonik sensör karşılaştırıldığında, AuNP'in sinyal şiddetini arttırmada etkili olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. AuNP'lerin hassasiyet artırıcı etkisinin sensorgramları.

4.9. Karmaşık Ortam Analizleri

AuNP-MIP plazmonik sensörün gerçek örneklerde kullanılabilir olduğunun anlaşılabilmesi için yapay plazma ve yapay idrar örnekleri hazırlanmıştır. Şekil 4.36'da görüldüğü gibi AuNP-MIP plazmonik sensör ile yapay plazma ve yapay idrar örneklerinden kortizol tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ışığında AuNP-MIP plazmonik sensörün sadece sulu çözelti ortamında değil yapay plazma ve/veya yapay idrar gibi kompleks ortamlarda da kortizol tayini gerçekleştirebileceğini göstermiştir. Aynı ortamda bulunan diğer moleküller AuNP-MIP plazmonik sensörün bağlanma bölgelerinde deformasyon oluşturmadığı ve tayin performansında herhangi bir kayıp olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.36. AuNP-MIP plazmonik sensörün karmaşık ortam sensorgramları.

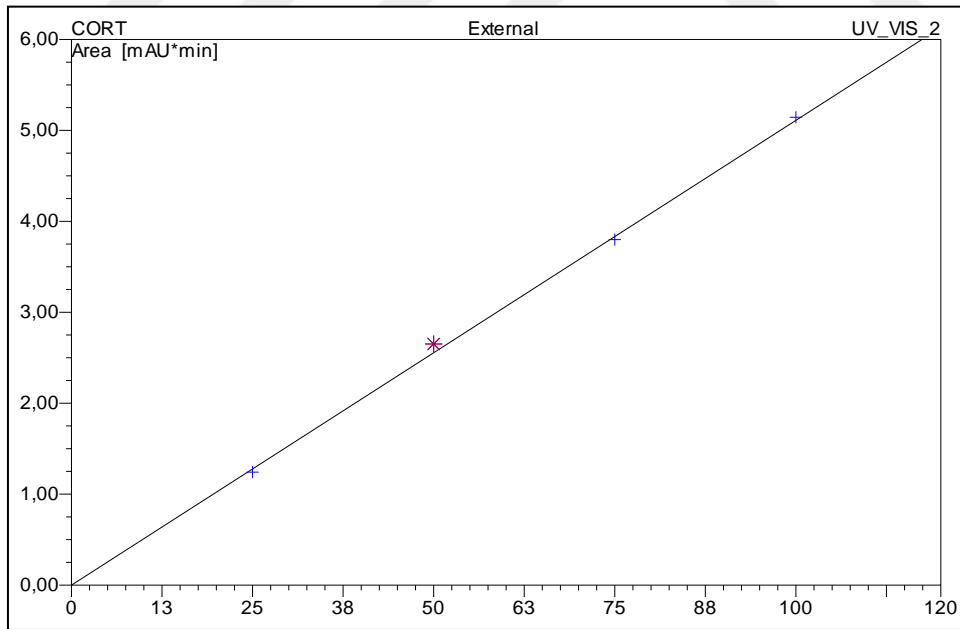
İnsan vücudu için önemli olan kortizol molekülünün tayini oldukça önemlidir. Kortizol tayini için birçok sensör tipi geliştirilmiştir. Son yirmi yılda sensörlere yönelik çalışmaların artmasının nedenlerinden bazıları düşük tespit limiti, seçicilik, tekrar kullanılabilirlik gibi farklı parametrelere sahip olması ve başka yöntemler ile birleştirilebilir olmasıdır. Çizelge 4.4’de farklı sensör tiplerinin, kortizol tayini için kullanılmasından oluşan sensör yanıtları karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.4. Kortizol tayininde kullanılan sensörler ile bu çalışmanın karşılaştırılması.

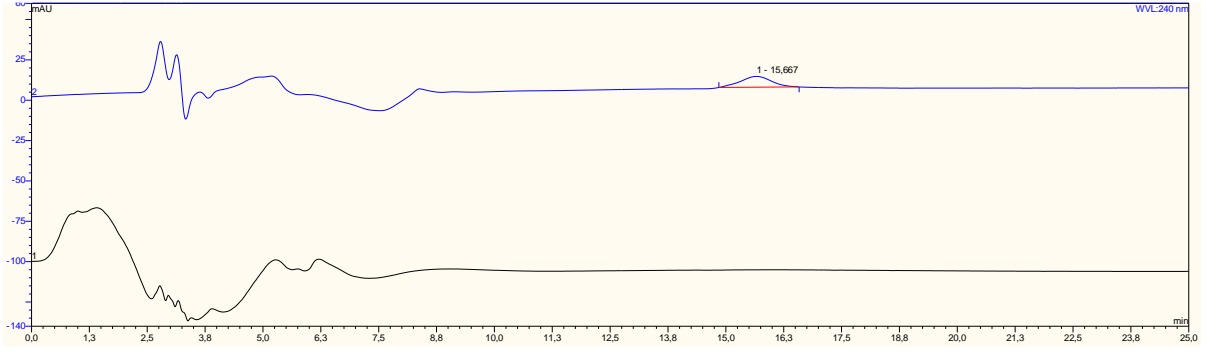
Kaynak	Sensör Tipi	Tespit Aralığı	Tayin Limiti	Gerçek Örnek
Frasconi ve ark., 2009	SPR	9-132 µg/L	3 µg/L	Tükürük,İ
Stevens ve ark., 2008	SPR	1.5-10 ng/mL	1.0 ng/mL	Tükürük
Yamaguchi ve ark., 2013	İmmunosensör	0.1-10 ng/mL	-	Tükürük
Khan ve ark., 2019	Elektrokimyasal	1 pg /m-10 ng/mL	0.87 pg/ mL	Tükürük
Munje ve ark., 2015	Elektrokimyasal	10 -200 ng/mL	1 pg/mL	İnsan ve Yapay Ter
Manickamve ark., 2018	Elektrokimyasal	1.81-36.2 ng/mL	18 fg/mL	Tükürük
Parlak ve ark., 2019	Elektrokimyasal	3.6-3624 ng/mL	-	Ter
Kinnamon ve ark, 2017	Elektrokimyasal	0.5-500 ng/mL	0.5 ng/mL	Ter
Vasudev ve ark., 2013	Elektrokimyasal	0.003-36 ng/mL	10 pg/mL	-
Cruz ve ark., 2014	Elektrokimyasal	0.003-181 ng/mL	0.36 pg/mL	-
Manickam ve ark, 2016	Elektrokimyasal	0.36 pg/mL-3624 ng/mL	3624 ng/mL	-
Nandhakumar ve ark., 2018	İmmunosensör	10.8 pg/mL- 0.36 µg/mL	10.8 pg/mL	Serum
Kämäräinen ve ark., 2018	Elektrokimyasal	0.5- 55.1 ng/mL	1.7 ng/mL	Tükürük
Lee ve ark., 2019	Elektrokimyasal	1-100 ag/mL	2 ag/mL	İdrar
Abdulsattar ve ark., 2020	Elektrokimyasal	0.001-50 ng/mL	1.03 pg/mL	Yapay tükürük
Sun ve ark., 2017	Elektrokimyasal	0.1-1000 ng/mL	0.05 ng/mL	Serum
Liu ve ark., 2020	Elektrokimyasal	0.18-72 ng/mL	40 pg/mL	Tükürük
Kumar ve ark., 2007	Elektrokimyasal	3.6-28.9 µg/mL	7.4 µg/mL	Serum
Kumar ve ark, 2007	Elektrokimyasal	3.7-12 µg/mL	3.7 µg/mL	Serum
Bu çalışma	SPR	0.01-1 ppb	0.0082 ppb	Yapay plazma ve idrar

4.10. Validasyon Analizleri

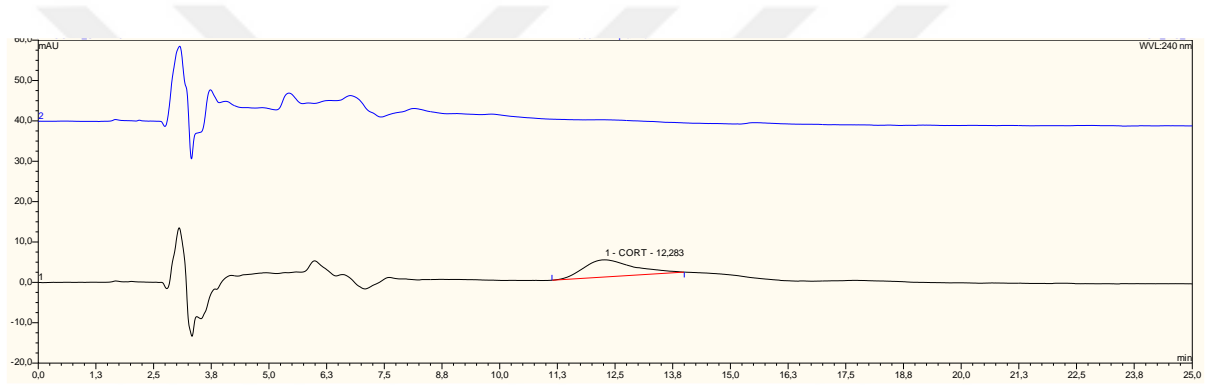
AuNP-MIP plazmonik sensör kullanılarak yapay plazma ve yapay idrar numunelerindeki kortizolün seçici olarak tayin edilmesi, HPLC sistemi kullanılarak doğrulanmıştır. Bu amaçla, kalibrasyon eğrisi oluşturmak için 1, 25, 50, 75 ve 100 ppb derişimlerdeki kortizol çözeltileri hazırlanarak HPLC sistemine verilmiştir (Şekil 4.37). Kortizol içeren yapay plazma ve yapay idrar çözeltileri, kortizol eklenerek hazırlanmış ve ters fazlı C18 kolonu ile analiz edilmiştir. Kortizolün stok olarak hazırlanan çözeltisi, 10 mM asetonitril:metilalkol:su (25:21:54) karışımı içinde 1 mg/mL derişiminde hazırlanmıştır. Kalibrasyonda kullanılan çözeltiler, stok çözeltinin asetonitril:metilalkol:su (21:25:54) karışımı ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. HPLC sistemi kullanılarak 220 nm'de yapılan analizler ile kortizol miktarı izokratik elüsyon sistemi ile belirlenmiştir. 100 ppb derişiminde olacak şekilde kortizol eklenmiş yapay plazma ve yapay idrar çözeltilerindeki kortizol miktarının, AuNP-MIP plazmonik sensör tarafından tahmin edilen sonuçlarla doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin kromatogramları ve 100 ppb kortizol katkılanmış yapay idrar Şekil 4.38'de ve yapay plazma Şekil 4.39'de gösterilmiştir.



Şekil 4.37. Kortizolün HPLC ile analizi için kullanılan kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.38. Kortizol katkılanmış ve katkılanmamış yapay idrar örneğinin HPLC kromatogramları.



Şekil 4.39. Kortizol katkılanmış ve katkılanmamış yapay plazma örneğinin HPLC kromatogramları.

Şekil 4.38 ve 4.39 da görüldüğü üzere kortizol katkılanmış yapay idrar ve yapay plazma örneklerinin alan değerlerinden hesaplanan konsantrasyon değerlerinin katkılanan miktara karşılık geldiği hesaplanmıştır.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada kortizol analizi için kullanılan AuNP-MIP plazmonik sensör, sinyal yanıtını artırıcı olarak AuNP'lerin eklenmesi ile elde edilmiştir.

AuNP'lerin derişimini tespit etmek amacıyla, ilk olarak AuNP'lerin boyut dağılımını Nano Zetasizer boyut analizi cihazı ile belirlenmiştir.

Düşük polidispersite indeks değerinden (PDI=0.154) homojen ortalama boyut dağılımına sahip monodispers AuNP'ler elde edilmiştir

AuNP'lerin ortalama boyutu 56.61 nm ölçülmüş ve derişimi $2,5 \times 10^{-8}$ M olarak hesaplanmıştır.

Kortizol analizi için hazırlanan AuNP-MIP plazmonik sensör için kullanılan MAH-AuNP-kortizol ön-kompleks oluşumu FTIR-ATR spektrometre ile doğrulanmıştır.

MAH-AuNP-kortizol ön-kompleksinin, FTIR-ATR spektrofotometrik ölçümleri incelendiğinde MAH monomerine ait spektrumundaki 1732 cm^{-1} de C=O bağına ait olan pikin dalga sayısının AuNP bağlandıktan sonra 1732 cm^{-1} den 1741 cm^{-1} e kaymış olması AuNP lerin MAH monomeriyle koordine olduğunu gösterir. MAH-AuNP-kortizol ön-kompleksine ait spektrumda 1369 cm^{-1} dalga boyunda görülen C-O bağına ait pikin belirgin bir şekilde gözlemlenmesi ve 1292 cm^{-1} dalga boyunda görülen C-N bağına ait pikin görünür hale gelmesi kortizolün yapıya entegre olduğunu göstermiştir.

AuNP-MIP plazmonik sensörü hazırlamak için, MAH-AuNP-kortizol ön-kompleksine, hidrofilik monomer HEMA, çapraz bağlayıcı EGDMA ve başlatıcı olarak AIBN eklenmiş ve nanofilm elde edilmiştir.

Kalıp molekül olan kortizolün yapıdan uzaklaştırılması amacı ile desorpsiyon çözeltisi olarak metil alkol:asetik asit karışımı kullanılmıştır.

Kortizol baskılanmamış AuNP-NIP plazmonik sensör, kortizol baskılanmış AuNP-MIP plazmonik sensör hazırlanması için kullanılan reçeteye göre hazırlanmıştır. Yalnızca kalıp molekül kortizol eklenmemiştir.

AuNP-NIP ve AuNP-MIP plazmonik sensörlerin FTIR-ATR spektrumları karşılaştırıldığında, AuNP-MIP plazmonik sensör için 2938 cm^{-1} dalga sayısında görülen C=O bağı ve 1316 cm^{-1} dalga sayısında görülen C-N bağına ait piklerin belirgin bir şekilde görünür hale gelmesi kortizolün yapıya başarılı bir şekilde entegre olduğunu göstermiştir.

Buna ek olarak AuNP-MIP plazmonik sensöre ait spektrumda 1732 cm^{-1} dalga sayısında görülen C=O bağına ait pik şiddetinin AuNP-NIP plazmonik sensör 1729 cm^{-1} dalga sayısına kayması ve şiddetinin belirgin bir şekilde azalması kortizolün yapıya başarılı bir şekilde dahil olduğu görülmüştür.

Kortizol baskılanmış MIP plazmonik sensör, AuNP-MIP plazmonik sensör hazırlanmasında kullanılan reçeteye göre hazırlanmış, sadece AuNP eklenmemiştir. Sinyal yanıtını artırıcı olarak yapıya eklenen AuNP'lerin yapıya dahil olup olmadığını belirlemek için, bu iki plazmonik sensörün FTIR-ATR spektrumları karşılaştırılmıştır.

FTIR-ATR spektrumları karşılaştırıldığında AuNP-MIP plazmonik sensörüne ait spektrumda belirgin hale gelen 1664 cm^{-1} ve 1587 cm^{-1} dalga sayılarında görülen N-H bağları yapının AuNP ile koordinasyon gerçekleştirilerek belirgin hale geldiğini gösterir. AuNP-MIP plazmonik sensöründe 1732 cm^{-1} dalga sayısında görülen C=O bağına ait pik şiddetinin artması ve MIP plazmonik sensöründeki 1670 cm^{-1} dalga sayısında görülen amid I bağına ait pikin AuNP-MIP plazmonik sensöründe 1664 cm^{-1} dalga sayısına kayması, AuNP'lerin başarılı bir şekilde yapıya dahil olduğunu göstermiştir.

AuNP-MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensörlerin morfolojik özellikleri ise AFM ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir.

Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerindeki nanofilmlerin ortalama pürüzlülük değerleri sırasıyla $0.8 \pm 0.2\text{ nm}$, $4.1 \pm 1.1\text{ nm}$, $3.7 \pm 2.3\text{ nm}$ ve $2.4 \pm 1.9\text{ nm}$ olarak ölçülmüştür.

Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerindeki nanofilmlerin ortalama derinlik değerleri sırasıyla 3.4 nm , 16.59 nm , 14.87 nm ve 12.36 nm olarak ölçülmüştür.

Bu sonuçlar plazmonik sensörlerin altın yüzeylerine nanofilmlerin başarılı ve homojen bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir.

Modifiye edilmemiş boş yüzeyin, AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerinin su ile yaptığı temas açıları ölçülmüştür. Modifiye edilmemiş yüzeyin temas açısı değeri $79.2^\circ \pm 0.3$ iken AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyinin temas açısı değeri $76.3^\circ \pm 0.7$ olarak ölçülmüştür.

Temas açısındaki bu azalmanın nedeni, sensör yüzeyinin su sevme (hidrofilik) özelliğinin arttığı anlamına gelir. AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyi hazırlanırken kullanılan fonksiyonel monomer ve kalıp molekülden kaynaklı kısmi hidrofiliktir.

Ayrıca, gösterilen MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensör yüzeylerinin temas açısı değerleri sırasıyla $77.9^{\circ} \pm 1.2$ ve $73.6^{\circ} \pm 1.1$ olarak ölçülmüştür. AuNP'lerin varlığı plazmonik sensör yüzeylerinin hidrofilik karakterinin artmasına sebep olmuştur.

AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP plazmonik sensörler hazırlandıktan sonra farklı derişimlerdeki kortizol çözeltisine karşılık verilen sinyal yanıtının karşılaştırılabilmesi için AuNP-MIP plazmonik sensörler ile kinetik çalışmalar yapılmıştır.

AuNP-MIP plazmonik sensörlere farklı derişim değerlerine sahip kortizol çözeltileri uygulanmıştır. Derişimler arttığında sensör yanıtı ΔR değerlerinde arttığı tespit edilmiştir.

AuNP-MIP plazmonik sensörün 0.01-100 ppb kortizol derişimi aralığında alınan ΔR derişimi doğrusallığı incelendiğinde ve doğrunun denklemi ile doğrusallığı edilen kalibrasyon grafiğine bakıldığında $y=0.2561x+3.3624$ eşitliği ile birlikte AuNP-MIP plazmonik sensörün 0.01-100 ppb kortizol derişimi aralığında 97% doğrulukta tayin yapabildiği söylenebilir.

Deneyler sonucu olarak elde edilen veriler ile kortizol tayinine en uygun model Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli olduğu görülmüştür.

ΔR_{maks} değerinin (6.991), 0.01-10 ppb kortizol derişimi aralığında deneysel elde edilen ΔR_{maks} değerine (7.270) oldukça yakın olduğu görülmüştür.

Bağlanma analiz sonucuna göre de kortizolün AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyin %98 doğrulukta bağlandığı görülmüştür. Langmuir denkleminde hesaplanan bağlanma ve ayrılma sabitleri olan K_A ve K_D değerleri sırasıyla 480.3 ve 0.002 olarak hesaplanmıştır.

AuNP-MIP plazmonik sensörün kortizol tayini için seçiciliğini tespit etmek amacıyla, kortizole büyüklük ve şekil bakımından benzer yarışmacı moleküller, klobetazol ve flutikazon molekülleri kullanılmış ve AuNP-MIP plazmonik sensörün verdiği sinyal yanıtı değerlendirilmiştir.

AuNP-MIP plazmonik sensör ve AuNP-NIP plazmonik sensörün kortizole karşı seçiciliğinin belirlenmesi amacıyla yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları flutikazon ve klobetazol çözeltileri uygulanarak yapılmıştır.

AuNP-MIP plazmonik sensörün kortizol için verdiği sinyal yanıtı (ΔR) 29.52 iken, klobetazol ve flutikazon çözeltilerine verdiği sinyal değeri sırasıyla 6.26 ve 6.11'dir.

AuNP-MIP plazmonik sensörün kortizolü klobetazole göre 4.72, flutikazona göre 4.83 kat hassas tayin edebildiği belirlenmiştir.

Baskılamanın kortizolü seçici tayinine olan etkisi, AuNP-NIP plazmonik sensörün kortizol ve yarışmacı ajanlar, klobetazol ve flutikazonu tayin ederken hesaplanan seçicilik katsayıları ile belirlenmiştir. AuNP-MIP plazmonik sensör kortizolü, AuNP-NIP plazmonik sensörün kortizolü klobetazol ve flutikazona göre sırası ile 4.96 ve 4.71 kat daha seçici tayin etmiştir

AuNP-MIP plazmonik sensör sisteminin tekrarlanabilirlik çalışmaları 100 ppb kortizol çözeltilisinin sensör sistemine beş tekrardan oluşan denge adsorpsiyon-desorpsiyon adımlarının uygulanmasıyla incelenmiş ve sensör yanıtı değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuca göre bağlanma bölgelerinde herhangi bir bozulma ve dolayısıyla herhangi bir performans kaybı olmaksızın AuNP-MIP plazmonik sensör yüzeyi tekrar tekrar kullanılabilir.

AuNP-MIP plazmonik sensör, artan kortizol derişimine karşılık artan bir plazmon açısı yanıtı vermiştir. Ayrıca, 100 ppb derişiminde kortizol örneği tayini analizinde AuNP-MIP plazmonik sensör ile AuNP eklenmeden hazırlanan MIP plazmonik sensör karşılaştırıldığında, AuNP'in sinyal şiddetini arttırmada etkili olduğu gösterilmiştir.

AuNP-MIP plazmonik sensörün karmaşık ortamda kullanılabilir olduğunun anlaşılabilmesi için yapay plazma ve yapay idrar örnekleri hazırlanmıştır. AuNP-MIP plazmonik sensör ile yapay plazma ve yapay idrar örneklerinden kortizol tayini gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen veriler ışığında AuNP-MIP plazmonik sensörün sadece sulu çözeltili ortamında değil yapay plazma ve/veya yapay idrar gibi karmaşık ortamlarda da kortizol tayini gerçekleştirebileceğini göstermiştir. Aynı ortamda bulunan diğer moleküller AuNP-MIP plazmonik sensörün bağlanma bölgelerine gösterilen afiniteyi engellemediği için tayin performansında herhangi bir kayıp olmadığı gözlenmiştir.

AuNP-MIP plazmonik sensör kullanılarak yapay plazma ve yapay idrar numunelerindeki kortizolün seçici olarak tayin edilmesi, HPLC sistemi kullanılarak doğrulanmıştır.

Bu amaçla, kortizol içeren yapay plazma ve yapay idrar çözeltileri hazırlanmış ve ters fazlı C18 kolonu ile analiz edilmiştir. HPLC sistemi ile 220 nm dalga boyunda yapılan analizler ile kortizol miktarı izokratik elüsyon sistemi aracılığıyla belirlenmiştir.

Yapay plazma ve yapay idrar çözeltilerindeki kortizol miktarının, AuNP-MIP plazmonik sensör tarafından tahmin edilen sonuçlarla doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir.



6. KAYNAKLAR

- Abdulsattar, J. O., Greenway, G. M., Wadhawan, J. D. Electrochemical immunoassay for the detection of stress biomarkers. *Heliyon*, 6 (3), (2020), e03558.
- Algieri C., Drioli E., Guzzo L., Donato L. Bio-mimetic sensors based on molecularly imprinted membranes. *Sensors*. 14,(2014), 13863–13912.
- Andaç, M., Tamahkar, E., Denizli, A. Molecularly imprinted smart cryogels for selective nickel recognition in aqueous solutions, *Journal of Applied Polymer Science*, 138 (4), (2021), 49746
- Aydıncal- Semiz, E., Hizmetli, S., Semiz, M., Karadağ, A., Alım, B., Adalı, M., Tunçay, M. S., Çöpoğlu, Ü. S. Fibromiyalji Hastalarında Serum Kortizol Düzeyinin Depresyon ile İlişkisi. *Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi Cilt 5, Sayı 19, Yıl 2014*
- Andrews, R. C., Herlihy, O., Livingstone, D. E. W., Andrew, R., Walker B. R. Abnormal Cortisol Metabolism and Tissue Sensitivity to Cortisol in Patients with Glucose Intolerance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(12), (2002), 5587–5593.
- Aşır, S., Uzun, L., Türkmen, D., Say, R., Denizli, A. Ion-selective Imprinted Superporous Monolith for Cadmium Removal from Human Plasma. *Separation Science and Technology*, 40 (15), (2005), 3167–3185.
- Babacan, S., Pivarnik, P., Letcher, S., Rand, A. G. Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. *Biosensors & Bioelectronics*, 15 (11-12), (2000), 615-621.
- Bakhshpour, M., Göktürk, I., Bereli, N., Denizli, A. Molecularly imprinted cryogel cartridges for the selective recognition of tyrosine. *Biotechnology Progress*, 36 (5), (2020).
- Bakke M., Tuxen A., Carsten, Thomsen C.E., Bardow A, Alkjaer T., Jensen B.R Salivary cortisol level, salivary flow rate, and masticatory muscle activity in response to acute mental stress: a comparison between aged and young women. *Gerontology*, 50, (2004), 383-92.
- Bereli, N., Akgönüllü, S., Ashyüce, S., Çimen, D., Göktürk, I., Türkmen, D.,Yavuz, H., Denizli A. Molecular Imprinting Technology for Biomimetic Assemblies. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 48 (5), (2020), 575-601.
- Bereli, N.; Bakhshpour, M.; Topçu, A.A.; Denizli, A. Surface Plasmon Resonance-Based Immunosensor for Igm Detection with Gold Nanoparticles. *Micromachines*, 12(9), (2021), 1092.
- Bikle D. D., The Free Hormone Hypothesis: When, Why, and How to Measure the Free Hormone Levels to Assess Vitamin D, Thyroid, Sex Hormone, and Cortisol Status. *JBMR Plus*, 5, (2020), 10418.

- Boonen, E., Vervenne, H., Meersseman, P., Andrew, R., Mortier, L., Declercq, P. E., Vanwijngaerden, Y. M., Spriet, I., Wouters, P. J., Vander Perre, S., Langouche, L., Vanhorebeek, I., Walker, B. R., Van den Berghe, G. Reduced cortisol metabolism during critical illness. *The New England journal of medicine*, 368 (16), **(2013)**, 1477–1488.
- Campbell, D. P., McCloskey, J. *Optical Biosensors: Present and Future*. Ligler F., Rowe Taitt, C. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 277-304, **2002**.
- Cardinell, B. A., Spano, M. L., La Belle, J. T. Toward a Label-Free Electrochemical Impedance Immunosensor Design for Quantifying Cortisol in Tears. *Critical reviews in biomedical engineering*, 47 (3), **(2019)**, 207–215.
- Cowan J. J. The surface ace plasmon resonance effect in holography. *Optics Communications*, 5 (2), **(1972)**, 69-72.
- Chumanov, G., Malynych,, S. Coupled planar silver nanoparticle arrays as refractive index sensors. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 8 (4), **(2006)**, 144–147.
- Cruz, A. F. D., Norena, N., Kaushik, A., Bhansali, S. A low-cost miniaturized potentiostat for point-of-care diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 62, **(2014)**, 249–254.
- Çimen, D., Bereli, N., Günaydın, S., Denizli, A. Detection of cardiac troponin-I by optic biosensors with immobilized anti-cardiac troponin-I monoclonal antibody. *Talanta*, 219 **(2020)**, 121259.
- Çorman, M. E., Armutcu, C., Uzun, L., Say, R., Denizli, A. Reversible and Easy Post-crosslinking Method for Developing Surface Ion-imprinted Hypercrosslinked Monolith for Specific Cd(II) Ion Removal from Aqueous Solutions. *RSC Advances* **6** (91), **(2016)**, 88777-88787.
- Damborský, P., Švitel, J., Katrlík, J. Optical biosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), **(2016)**, 91–100.
- Das, A. P., Kumar, P. S., Swain, S. Recent advances in biosensor based endotoxin detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 51, **(2014)**, 62–75.
- Dey, D., Goswami, T. *Optical Biosensors: A Revolution Towards Quantum Nanoscale Electronics Device Fabrication*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011 **(2011)**, 1–7
- Dhull, N., Kaur, G., Gupta, V., Tomar, M. Highly sensitive and non-invasive electrochemical immunosensor for salivary cortisol detection. *Sensors & Actuators B: Chemical*, 293,

- Ekberg, B., Mosbach, K. Molecular imprinting: A technique for producing specific separation materials. *Trends in Biotechnology*, 7 (4), (1989), 92–96.
- El-Nour, K., Salam, E., Soliman, H. M., & Orabi, A. S. Gold Nanoparticles as a Direct and Rapid Sensor for Sensitive Analytical Detection of Biogenic Amines. *Nanoscale research letters*, 12(1), (2017), 231
- Enustun, B.V., Turkevich, J. *Journal of the American Chemical Society*. 85, (1963), 3317-3328.
- Exton, J. H. Regulation of gluconeogenesis by glucocorticoids. *Monographs on endocrinology*, 12, (1979), 535–546.
- Frasconi M., Mazzarino M., Botrè F., Mazzei F., Surface plasmon resonance immunosensor for cortisol and cortisone determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, (2009), 2151–2159.
- Freeman, R. G., Grabar, K. C., Allison, K. J., Bright, R. M., Davis, J. A., Guthrie, A. P., Hommer, M. B., Jackson, M. A., Smith, P. C., Walter, D. G. Self-Assembled Metal Colloid Monolayers: An Approach to SERS Substrates. , 267(5204), (1995), 1629–1632.
- Fu, J., Chen, L., Li, J., Zhang, Z. Current status and challenges of ion imprinting *Journal of Materials Chemistry A* 3 (26), (2015), 13598.
- Gallego, J. L., Arroyo, J. P. Comparison of HPLC and multivariate regression methods for hydrocortisone and lidocaine analysis of pharmaceutical preparations. , 374(2), (2002), 282–288.
- Garipcan, B., Denizli, A. A Novel Affinity Support Material for the Separation of Immunoglobulin G from Human Plasma. *Macromolecular Bioscience*, 2, (2002), 135-144.
- Gatti, R., Antonelli, G., Prearo, M., Spinella, P., Cappellin, E., De Palo, E. F. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. *Clinical biochemistry*, 42 (12), (2009), 1205–1217.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös J., Reimhult, E. Electrochemical Biosensors -Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8 (3), (2008), 1400-1458.
- Guth, U., Vonau W., Zosel, J. Recent developments in electrochemical sensor application and technology a review. *Measurement Science and Technology*, 20 (4), (2009), 042002.
- Gür, C., Boz, M., Müderrisoğlu, C., Polat, H. İnsülin Direnci ve Kortizol Düzeyleri Arasındaki İlişkiler. *İstanbul Medical Journal*, 16, (2015), 73-76
- Hachułka, K., Lekka, M., Okrajni, J., Ambroziak, W., Wandelt, B. Polymeric sensing system molecularly imprinted towards enhanced adhesion of *Saccharomyces cerevisiae*, 26 (1), (2010), 50–54.
- Hakamata, Y., Komi, S., Moriguchi, Y., Izawa, S., Motomura, Y., Sato, E., Mizukami, S., Kim, Y., Hanakawa, T., Inoue, Y., & Tagaya, H. Amygdala-centred functional

- connectivity affects daily cortisol concentrations: a putative link with anxiety. *Scientific reports*, 7 (1), (2017), 8313.
- Hogenels, K., Soeter, M., Kallen, V. Ambulatory measurement of cortisol: Where do we stand, and which way to follow?, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 22 (2019), 100249.
- Hoshyar, N.; Gray, S.; Han, H.; Bao, G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine*, 11, (2016), 673–692.
- Jalilzadeh, M., Çimen, D., Özgür, E., Esen, C., Denizli, A. Design and preparation of imprinted surface plasmon resonance (SPR) nanosensor for detection of Zn(II) ions. *Journal of Macromolecular Science*, 56 (9), (2019), 1–10.
- Jo, S., Lee, W., Park, J., Kim, W., Kim, W., Lee, G., Lee, H. J., Hong, J., Park, J. Localized surface plasmon resonance aptasensor for the highly sensitive direct detection of cortisol in human saliva. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 304, (2020), 127424.
- Kadmiel, M., Cidlowski, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in pharmacological sciences*, 34 (9), (2013), 518–530.
- Kämäräinen, S., Mäki, M., Tolonen, T., Palleschi, G., Virtanen, V., Micheli, L., & Sesay, A. M. Disposable electrochemical immunosensor for cortisol determination in human saliva. *Talanta*, 188, (2018), 50–57.
- Kaushik, A., Vasudev, A., Arya, S. K., Pasha, S. K., Bhansali, S. Recent advances in cortisol sensing technologies for point-of-care application, *Biosensors & bioelectronics*, 53, (2014) 499–512.
- Khan, M. S., Dighe, K., Wang, Z., Srivastava, I., Schwartz-Duval, A .S., Misra, S. K., Pan, D. Electrochemical-digital immunosensor with enhanced sensitivity for detecting human salivary glucocorticoid hormone. *Analyst*, 144 (4), (2019), 1448-1457.
- Kim, Y. H.; Kim, J. P.; Han, S. J.; Sim, S. J. Aptamer Biosensor for Lable-Free Detection of Human Immunoglobulin E Based on Surface Plasmon Resonance. *Sens. Actuators. B Chem.* 139, (2), (2009), 471–475.
- Kinnamon, D., Ghanta, R., Lin, K.C., Muthukumar, S., Prasad, S. Portable biosensor for monitoring cortisol in low-volume perspired human sweat. *Scientific Reports*, 7, (2017), 13312.
- Kooyman, R. P. H., Lechuga, L. M. “Handbook of Biosensors: Medicine,” in *Food and the Environment*, Kress-Rogers, E. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1997.
- Ku, M., Kim, J., Won, J. E., Kang, W., Park, Y. G., Park, J., Lee, J. H., Cheon, J., Lee, H. H., & Park, J. U. Smart, soft contact lens for wireless immunosensing of cortisol. *Science advances*, 6 (28), (2020), eabb2891.
- Kumar, A., Aravamudhan, S., Gordic, M., Bhansali, S., & Mohapatra, S. S. Ultrasensitive detection of cortisol with enzyme fragment complementation technology using

- functionalized nanowire. *Biosensors and bioelectronics*, 22 (9-10), **(2007)**, 2138–2144.
- Kumar, A., Aravamudhan, S., Gordic, M., Bhansali, S., & Mohapatra, S. S. Ultrasensitive detection of cortisol with enzyme fragment complementation technology using functionalized nanowire. *Biosensors & bioelectronics*, 22 (9-10), **(2007 a)**, 2138–2144.
- Kuo, T., McQueen, A., Chen, T. C., & Wang, J. C. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. *Advances in experimental medicine and biology*, 872, **(2015)**, 99–126.
- Law, J.W.F., Ab Mutalib, N.S., Chan, K.G., Lee, L.H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations, *Frontiers in Microbiology*, 5, **(2015)**, 1–19.
- Lechuga, L.M. *Comprehensive Analytical Chemistry, Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, Gorton L. (Eds), Vol. 44, Elsevier, Chapter 5, **2005**.
- Lee, D. Y., Kim, E., Choi, M. H. (2015). Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB reports*, 48 (4), **(2015)**, 209–216.
- Lee, M. H., Thomas, J. L., Liu, WC. et al. A multichannel system integrating molecularly imprinted conductive polymers for ultrasensitive voltammetric determination of four steroid hormones in urine. *Microchim Acta* 186, (11), **(2019)**, 695.
- Lee, M. H., Thomas, J. L., Liu, W. C., Zhang, Z. X., Liu, B. D., Yang, C. H., Lin, H. Y. A multichannel system integrating molecularly imprinted conductive polymers for ultrasensitive voltammetric determination of four steroid hormones in urine. *Microchimica Acta*, 186 (11), **(2019)**, 695.
- Levine A., Zagoory-Sharon O., Feldman R., Lewis J. G., Weller A., Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiology and Behavior* 90, **(2007)**, 43–53.
- Li, S., Cao, S., Whitcombe, M. J., Piletsky, S. A. Size matters: Challenges in imprinting macromolecules. *Progress in Polymer Science*, 39 (1), **(2014)**, 145–163.
- Li, Y., Schluesener, H.J., Xu, S. Gold nanoparticle-based biosensors, *Gold Bull*, 43 (1), **(2010)**, 29–41.
- Ligler, F. S. and Rowe Taitt, C. (Eds.), *Optical Biosensors: Present and future*. Elsevier, Amsterdam, **2002**.
- Liu, X., Atwater, M., Wang, J., Huo, Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58, **(2007)**, 3–7.
- Liu, J., Xu, N., Men, H., Li, S., Lu, Y., Low, S. S., Li, X., Zhu, L., Cheng, C., Xu, G., Liu, Q. Salivary Cortisol Determination on Smartphone-Based Differential Pulse Voltammetry System. *Sensors*, 20, (5), **(2020)**, 1422.

- Löfas, S., Johnsson, B., Edström, A., Hansson, A., Lindquist, G., Mfiller Hillgren, R. M., Stigh, L. Biosensensör Bioelectron., 10, (1995), 813-822.
- Lupien, S. J., Clow, A. Assessment of the cortisol awakening response: Expert consensus guidelines. Psychoneuroendocrinology, 63, (2016), 414-432.
- Manickam, P., Edwin Fernandez, R., Umasankar, Y., Gurusamy, M., Arizaleta, F., Urizar, G., Bhansali, S. Salivary cortisol analysis using metalloporphyrins and multi-walled carbon nanotubes nanocomposite functionalized electrodes. Sensors and Actuators: B, Chemical, (2018), 1-14.
- Manickam, P., Pasha, S. K., Snipes, S. A., & Bhansali, S. A Reusable Electrochemical Biosensor for Monitoring of Small Molecules (Cortisol) Using Molecularly Imprinted Polymers. Journal of The Electrochemical Society, 164 (2), (2016), B54–B59.
- Mariani, S.; Minunni, M. Surface plasmon resonance applications in clinical analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, (2014), 2303–2323.
- Masson, J.F. Surface Plasmon Resonance Clinical Biosensors for Medical Diagnostics. ACS Sensor, 2, (2017), 16–30.
- Mateescu A, Wang Y, Dostalek J, Jonas U. Thin Hydrogel Films for Optical Biosensor Applications. Membranes, 2 (1), (2012), 40-69.
- Michael, J., Whitecome, M., Rodrigue, E., Villar, P. A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. Journal of the American Chemical Society, 117 (27), (1995), 7105–7111.
- Mitchell, J. S., Lowe, T. E., Ingram, J. R. Rapid ultrasensitive measurement of salivary cortisol using nano-linker chemistry coupled with surface plasmon resonance detection, Analyst, 134, (2009), 380-386.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Takeda, S., Aburada, M., & Tabira, T. Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 24 (24), (2004), 5492–5499.
- Moreno-Guzmán, M., Eguílaz, M., Campuzano, S., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J. M. Disposable immunosensor for cortisol using functionalized magnetic particles. The Analyst, 135(8), (2010), 1926–1933.
- Munje, R., Muthukumar, S., Panneer Selvam, A., Prasad S. Flexible nanoporous tunable electrical double layer biosensors for sweat diagnostics, Scientific Reports, 5, (2015), 14586.
- Murray, A., Örmeci, B. Application of molecularly imprinted and non-imprinted polymers for removal of emerging contaminants in water and wastewater treatment: a review. Environmental Science and Pollution Research 19, (2012), 3820–3830

- Nandhakumar, P., Haque, A.-M. J., Lee, N.-S., Yoon, Y. H., & Yang, H. Washing-Free Displacement Immunosensor for Cortisol in Human Serum Containing Numerous Interfering Species. *Analytical Chemistry*, 90 (18), (2018), 10982-10989.
- Oakley, R. H., Cidlowski, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 132 (5), (2013), 1033–1044.
- Odabaşı, M., Say, R., Denizli, A. Molecular imprinted particles for lysozyme purification. *Materials Science and Engineering: C*, 27(1), (2007), 90–99.
- Ousova, O., Guyonnet-Duperat, V., Iannuccelli, N., Bidanel, J. P., Milan, D., Genêt, C., Llamas, B., Yerle, M., Gellin, J., Chardon, P., Emptoz-Bonneton, A., Pugeat, M., Mormède, P., & Moisan, M. P. Corticosteroid binding globulin: a new target for cortisol-driven obesity. *Molecular endocrinology*, 18 (7), (2004), 1687–1696.
- Özgöçer T. Menstrual Döngü, Kortizol Uyanma Yanıtı ve Otonom Sinir Sistemi Aktivitesi, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2016.
- Özkahraman, B. Synthesis of Ion-Imprinted Bioadsorbents Based on Chitosan and its Usage in Al(III) Removal. *J Polym Environ* 26, (2018), 1113–1120.
- Parlak, O., Keene, S. T., Marais, A., Curto, V. F., Salleo, A. Molecularly selective nanoporous membrane-based wearable organic electrochemical device for noninvasive cortisol sensing. *Science advances*, 4 (7), (2018), 2904.
- Pattnaik, P. Surface plasmon resonance. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 126 (2005), 79–92.
- Pohanka, M. Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications. 11(3), (2018), 448.
- Raff, H., Homar, P. J., Skoner, D. P. New enzyme immunoassay for salivary cortisol. *Clinical Chemistry*, 49(1), (2003), 203-204.
- Ramamoorthy, S., Cidlowski, J. A. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 42 (1), (2016), 15–31.
- Ren, Kangning; Zare, Richard N. Chemical Recognition in Cell-Imprinted Polymers. *ACS Nano*, 6 (5), (2012), 4314–4318.
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., Heineman, W. R. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39 (5), (2010), 1747–1763.
- Sankiewicz, A.; Romanowicz, L.; Pyc, M.; Hermanowicz, A.; Gorodkiewicz, E. SPR imaging biosensor for the quantification of fibronectin concentration in blood samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 150, (2018), 1–8.
- Saylan, Y., Yilmaz, F., Özgür, E., Derazshamshir, A., Yavuz, H., Denizli, A. Molecular Imprinting of Macromolecules for Sensor Applications. *Sensors*, 17 (4), (2017), 898-928.

- Saylan, Y., Akgönüllü S., Yavuz H., Ünal S., Denizli A. Molecularly Imprinted Polymer Based Sensors for Medical Applications, *Sensors*, 19 (6), (2019), 1279.
- Saylan, Y., Denizli, A., Advances in molecularly imprinted systems: materials, characterization methods and analytical applications. *Current Analytical Chemistry*, 16 (3), (2020), 196-207.
- Schirhagl, R., Ren, K. Zare, R.N. Surface-imprinted polymers in microfluidic devices. *Science China Chemistry* 55, (2012), 469–483.
- Sellergren, B., Kenneth, J. S. Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers. *Journal of Chromatography A*, 635 (1), (1993), 31–49.
- Silva, F., Cabral Campello, M. P., Paulo, A. Radiolabeled Gold Nanoparticles for Imaging and Therapy of Cancer. *Materials*, 14 (1), (2020), 4.
- Stalder, T., Kirschbaum, C., Kudielka, B. M., Adam, E. K., Pruessner, J. S., Wüst, S., Dockray, S., Smyth, N., Evans, P., Hellhammer, D. H., Miller, R., Wetherell, M. A., Free cortisol levels after awakening: a reliable biological marker for the assessment of adrenocortical activity. *Life Sciences*, 61 (26), (1997), 2539-2549
- Stevens, R. C., Soelberg, S. C., Near, C., Furlong C. E. Detection of Cortisol in Saliva with a Flow-Filtered, Portable Surface Plasmon Resonance Biosensor System. *Analytical Chemistry*, 80 (17), (2008), 6747–6751.
- Sun, B., Gou, Y., Ma, Y., Zheng, X., Bai, R., Ahmed Abdelmoaty, A. A., Hu, F. Investigate electrochemical immunosensor of cortisol based on gold nanoparticles/magnetic functionalized reduced graphene oxide. *Biosensors and bioelectronics*, 88, (2017), 55–62.
- Svenson, J.; Karlsson, J.G.; Nicholls, I.A. ¹H nuclear magnetic resonance study of the molecular imprinting of (–)-nicotine: template self-association, a molecular basis for cooperative ligand binding. *Journal of chromatography. A*, 1024 (1-2), (2004), 39–44.
- Sener, G., Uzun, L., Say, R., Denizli, A. Use of Molecular Imprinted Nanoparticles as Biorecognition Element on Surface Plasmon Resonance Sensor. *Sensor and Actuators B: Chemical*, 60, (2011), 791– 799
- Takeda, K.; Kobayashi, T. Bisphenol A. imprinted polymer adsorbents with selective recognition and binding characteristics. *Science and Technology of Advanced Materials*, 6 (2), (2005), 165–171.
- Tang, W., Yin, L., Sempionatto, J. R., Moon, J., Teymourian, H., Wang, J. Touch-Based Stressless Cortisol Sensing. *Advanced Materials*, 33 (18), (2021), 2008465.
- Thau L, Gandhi J, Sharma S. *Physiology, Cortisol*. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2020.

- Vasudev, A., Kaushik, A., Tomizawa, Y., Norena, N., Bhansali, S. An LTCC-based microfluidic system for label-free, electrochemical detection of cortisol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 182, (2013), 139–146.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors, *Biotechnology Advances*, 28 (2), (2010), 232-254.
- Yamaguchi, N., Matsuda, Y., Sasaki, S., Sasaki, M., Kadoma, Y., Imai, Y., Niwa, D., Shetty V. Immunosensor with fluid control mechanism for salivary cortisol analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 41, (2013), 186–191.
- Yan, H., Row, K. Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *International Journal of Molecular Sciences*, 7, (2006), 155-178.
- Yılmaz, F., Saylan, Y., Akgönüllü, S., Derazshamshir, A., Bereli, N., Denizli, A. Surface plasmon resonance based nanosensors for detection of triazinic pesticides in agricultural foods, Grumezescu, A. M. (Eds.), *New Pesticides and Soil Sensors*, Chapter 18, Academic Press, 679–718, 2017.
- Zein, R.; Sharrouf, W.; Selting, K. Physical Properties of Nanoparticles That Result in Improved Cancer Targeting. *Journal of Oncoogy*, 2020, (2020), 5194780.
- Zeng, H., Wang, Y., Liu, X., Kong, J., Nie, C. Preparation of molecular imprinted polymers using bi-functional monomer and bi-crosslinker for solid-phase extraction of rutin. *Talanta*, 93 (2012), 172-181.
- Zhang, Z., Zhang, X., Liu, B., Liu, J. Molecular Imprinting on Inorganic Nanozymes for Hundred-fold Enzyme Specificity, *Journal of the American Chemical Society*, 139 (15), (2017), 5412–5419.
- Zhao, Y., Tong, R., Xia, F., Peng, Y. Current status of optical fiber biosensor based on surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 142, (2019), 111505
- Zu, H., Wu, H., Wang, Q. High-Temperature Piezoelectric Crystals for Acoustic Wave Sensor Applications. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 63 (3), (2016), 486-505.
- Wang, J., *Analytical Electrochemistry*, Wiley, J. & VCH, S., Hoboken, New Jersey, USA, 2006.
- Wang, Pengfei; Brambilla, Gilberto; Ding, Ming; Semenova, Yuliya; Wu, Qiang; Farrell, Gerald High-sensitivity, evanescent field refractometric sensor based on a tapered, multimode fiber interference. *OPTICS LETTERS*, 36 (12), (2011), 2233-2235.
- Wolfbeis, O. S. Fiber-optic chemical sensors and biosensors. *Analytical chemistry*, 72 (12), (2000), 81R–89R.
- Wulff, G. and Sarhan, A. The Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for the Resolution of Racemates. *Angewandte Chemie International Edition*, 11, (1972), 341-344.

Wust, S., Wolf, J., Hellhammer, D. H., Federenko, I., Schommer, N., Kirschbaum, C. The cortisol awakening response - normal values and confounds, *Noise Health*, 2 (7), (2000), 79-88.

