

**ENDOKRİN BOZUCU HORMONLARA ÖZGÜ
GRAVİMETRİK NANOSENSÖRÜN HAZIRLANMASI VE
MOLEKÜLER MODELLENMESİ**

**PREPARATION AND MOLECULAR MODELLING OF
SPECIFIC GRAVIMETRIC NANOSENSOR FOR
ENDOCRINE DISRUPTING HORMONES**

GÜLGÜN AYLAZ

PROF. DR. AYŞE MÜGE ANDAÇ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

ÖZET

ENDOKRİN BOZUCU HORMONLARA ÖZGÜ GRAVİMETRİK NANOSENSÖRÜN HAZIRLANMASI VE MOLEKÜLER MODELLENMESİ

Gülgün AYLAZ

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayşe Müge ANDAÇ

Haziran 2022, 115 sayfa

Doğal östrojenik hormonların kadınlarda hormonal tedavilerde doğum kontrol hapı olarak ve veterinerlikte çiftlik hayvanlarının büyüme öncülleri olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bu bileşenlerin idrarla atılmalarıyla su kaynaklarına ya da toprağa karışması ile insan sağlığını ve yaban hayatını tehdit etmekte ve ayrıca sucul organizmalar üzerinde ciddi yan etkilerin oluşmasına neden olmaktadır. Kadınlar için menopoz sonrası hormon replasman tedavilerinde yaygın olarak kullanılan östrojenik hormonlar, doğal su kaynağı kirleticilerinin başında gelmektedir. ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından 2020 yılında düzenlenen Endokrin Bozucu Kimyasal (EBK) kirleticiler listesinde yer alan östrojenik hormonlar, günümüzde kullanılan tespit yöntemleri ile ancak belirli sınırların üzerinde tespit edilebilmektedir. Equilin (Equ), kimyasal kirleticiler listesinde sağlık risk düzeyi 0.35 µg/L olan östrojenik hormonlardan biridir. Bu tez

alışmasında, endokrin bozucu su kirleticilerinden olan Equ'in, hızlı ve etkin bir şekilde gerçek zamanlı kantitatif tayini için yüksek maliyetli cihazlara ve uzman kullanımına ihtiyaç duyulmadan, yüksek hassasiyette ölçüm yapabilen bir kuartz kristal mikro terazi nanosensör hazırlanmıştır. Bu nanosensör sistemi ile hem Equ'in hem de 17 β -estradiol, estron, estriol östrojenik hormonların etkileşimleri incelenmiştir. Ayrıca bu östrojenik hormonlar ile nanosensör etkileşimleri bilgisayarlı modelleme çalışmaları ile karşılaştırılmıştır. AutoDock moleküler modelleme programının kullanılması, hedef moleküle yüksek seçicilik ve afinite gösteren biyomimetik ligandların tasarımını kolaylaştıran bir araç olmuştur. Östrojenik hormonları üç boyutlu geometrik yapılarına göre seçici olarak tanıyacak ligand molekülleri olarak Tirozin (Tyr), Triptofan (Trp) ve Fenilalanin (Phe) amino asitleri seçilmiştir. Amino asitler ve östrojenik hormonların moleküller arası etkileşimlerinin serbest bağlanma enerjileri hesaplanarak birbirleriyle en çok etkileşim halinde olan moleküller belirlenmiştir. Moleküler modelleme sonuçları ile Equ ve Tyr, Trp ve Phe arasındaki etkileşimler esas olarak hidrofobik etkileşimlere dayandığı görülmüştür. Tyr, Trp ve Phe moleküllerinin sırasıyla fenil halkası, indol grubu ve fenil kısımları, Equ'in halka yapısına hidrofobik etkileşimlerle ynlenmişlerdir. Tez kapsamında, östrojenik hormonlar, QCM nanosensör sisteminde afiniteye dayalı etkileşimler ile kısa sürede hassas bir şekilde tespit edilmişlerdir. QCM nanosensörü 11-merkaptooundekanoik asit (11-MUA) ile kendiliğinden düzenlenen tek tabaka oluşturularak ve daha sonra Tyr, Trp ve Phe amino asitleri ile modifiye edilerek hazırlanmıştır. Bu tez çalışmasında geleneksel QCM sensör sistemlerinden farklı olarak amino asitlerin desorpsiyon mekanizması araştırılmıştır. Algılama işlemi, kuvars kristal yüzeyine bağlanan moleküllerin neden olduğu kütle artışı yerine yüzeyden uzaklaştırılan kütle miktarına bağlı olarak gerçekleşmiştir. Equ ve amino asitler arasındaki afinite etkileşimleri hem moleküler modelleme ile teorik olarak hem de gerçek zamanlı QCM lmleri ile deneysel olarak incelenmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Equ için en düşük tespit limiti, 25-500 nM aralığında lineer dinamik algılama ile Tyr, Trp ve Phe modifiye QCM nanosensör için sırasıyla 4.59, 5.05 ve 6.30 ng/L olarak elde edilmiştir. Hem tespit limiti hem de QCM sensogramlarında meydana gelen rezonans frekansındaki değişimlere göre, Tyr ve Trp modifiye edilmiş QCM nanosensörlerin Phe modifiye edilene kıyasla daha yüksek performansa sahip

oldukları bulunmuştur. Tez çalışması kapsamında QCM nanosensör ile ilk kez Equ analizi ve amino asitlerle olan etkileşimleri moleküler modellenmesi yapılarak bu alanda yapılacak olan birçok çalışmaya ışık tutacak niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: equilin, moleküler modelleme, QCM, endokrin bozucu kimyasallar, afinite temelli sensörler



ABSTRACT

PREPARATION AND MOLECULAR MODELLING OF SPECIFIC GRAVIMETRIC NANOSENSOR FOR ENDOCRINE DISRUPTING HORMONES

Gülgün AYLAZ

Doctor of Philosophy, Nanotechnology and Nanomedicine Division

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Müge ANDAÇ

June 2022, 115 pages

Natural estrogenic hormones are frequently used as birth control drugs in hormonal treatments for women and as growth precursors of farm animals in veterinary practice. These components threaten human health and wildlife when they are excreted in urine and mixed with water resources or soil, and they also cause serious side effects on aquatic organisms. Estrogenic hormones, which are widely used in postmenopausal hormone replacement therapies for women, are among the leading natural water source pollutants. Estrogenic hormones, which are included in the Endocrine Disrupting Chemical (EDC) pollutants list issued by the US Environmental Protection Agency (EPA) in 2020, can only be detected above certain limits with the detection methods used today. Equilin (Equ) is one of the estrogenic hormones with health risk level 0.35 µg/L in the chemical pollutants list. In this thesis study, a quartz crystal microbalance

nanosensor was prepared for the rapid and effective real-time quantitative determination of Equ, which is one of the endocrine disrupting water pollutants, without the need for expensive devices and the use of specialists, which can measure with high precision. The interactions of both Equ and 17β -estradiol, estrone, estriol estrogenic hormones with this nanosensor system were investigated. On the other hand, interactions of these estrogenic hormones and nanosensor were investigated by computer modeling studies. The use of the AutoDock molecular modeling program has been a tool to facilitate the design of biomimetic ligands with high selectivity and affinity for the target molecule. Tyrosine (Tyr), Tryptophan (Trp) and Phenylalanine (Phe) amino acids were chosen as ligand molecules that will selectively recognize estrogenic hormones according to their three-dimensional geometric structures. By calculating the free binding energies of the intermolecular interactions of amino acids and estrogenic hormones, the molecules that interact the most with each other were determined. The molecular modeling results and the interactions between Equ and Tyr, Trp and Phe were mainly based on hydrophobic interactions. The phenyl ring, indole group and phenyl residue of Tyr, Trp and Phe molecules, respectively, were oriented to the ring structure of Equ by hydrophobic interactions. Within the scope of the thesis, estrogenic hormones were detected sensitively in a short time by affinity-based interactions in the QCM nanosensor system. The QCM nanosensor was prepared by forming a self-assembled monolayer with 11-mercaptodecanoic acid (11-MUA) and then modified with the amino acids Tyr, Trp and Phe. In this thesis, the desorption mechanism of amino acids, unlike conventional QCM sensor systems, was investigated. The detection process was based on the amount of mass removed from the surface instead of the mass increase caused by the molecules attached to the quartz crystal surface. Affinity based interactions between Equ and amino acids were investigated both theoretically by molecular modeling and experimentally by real-time QCM measurements, and the results were compared. The lowest detection limit for Equ was obtained as 4.59, 5.05 and 6.30 ng/L for Tyr, Trp and Phe modified QCM nanosensor with linear dynamic detection in the 25-500nM range, respectively. It was found that Tyr and Trp modified QCM nanosensors had higher performance compared to Phe modified one, according to the changes in resonance frequency occurring in both the

detection limit and QCM sensograms. Within the scope of the thesis, Equ analysis and molecular modeling of interactions with amino acids for the first time with QCM nanosensor will shed light on many studies to be done in this field.

Keywords: equilin, molecular modeling, QCM, endocrine disrupting chemicals, affinity-based sensors



TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca sahip olduğu engin akademik bilgi ve tecrübesiyle, yakın ilgisi, sevgisi ve samimiyetiyle her zaman yanımda yer alan, yol göstericiliğini ve imkânlarını hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli danışmanım sayın Prof. Dr. Ayşe Müge Andaç'a teşekkür ederim.

Tez İzleme Komitesi üyeleri sayın Prof. Dr. Gözde Baydemir Peşint ve sayın Doç. Dr. Eylem Güven hocalarıma, tez çalışmalarım sırasındaki katkıları ve yol gösterici tavsiyelerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez konumu yenilikçi ve güncel bularak 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında burs verdiği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Tezimin analitik hesaplamalarında yol gösterici yardımlarından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Ebru Çubuk Demiralay'a teşekkür ederim.

Moleküler modelleme çalışmalarına başlarken benden yardımlarını esirgemeyen kıymetli arkadaşım Seçkin Kılıç'a teşekkür ederim. Hayatıma girdiği günden itibaren her konuda desteğini hissettiğim hem özel hayatımda hem de akademik hayatımda çok önemli bir yere sahip olan canım arkadaşım Meltem Okan Aydın'a teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca moral ve desteğini yanımda hissettiğim, fikirlerine kıymet verdiğim canım arkadaşım İpek Akyılmaz'a teşekkür ederim. Birlikte çalışmaktan keyif aldığım kıymetli laboratuvar arkadaşlarım Melih Zeki Yıldırım'a, Naim Yağız Demir'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca attığım her adımda bana olan desteklerini ve sevgilerini hissettiğim, bana olan güvenleri sayesinde mutlu olmamı sağlayan, eğitimim ve huzurum için her türlü fedakârlıkta bulunan ailem olmalarından dolayı çok büyük onur ve gurur duyduğum, hayatta her şeyden çok değer verdiğim ve sevdiğim canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Gülgün AYLAZ

Haziran 2022, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Endokrin bozucu kimyasallar	4
2.1.1. Equilin	10
2.1.2. 17 β -Estradiol	11
2.1.3. Estriol	13
2.1.4. Estron	14
2.2. Biyosensör Sistemleri, Bileşenleri ve Karakteristik Özellikleri	15
2.3. Endokrin Bozucu Kimyasalların Tespit Yöntemleri	21
2.4. Moleküler Modelleme ve Moleküler Kenetleme	29
2.4.1. Moleküler Modelleme ve Kenetleme Yazılımları	32
2.4.1.1. Chimera	32
2.4.1.2. AutoDock, AutoDockTool ve AutoGrid	32
2.4.1.3. Molecular Modeling Toolkit	33
2.4.2. Endokrin Bozucu Kimyasalların Moleküler Modellemesi	33
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	38
3.1. Kimyasal Malzemeler, Bilgisayar Programları ve Cihazlar	38
3.2. Moleküler Modelleme Çalışmaları	40

3.2.1.	11-MUA ve Amino Asit Etkileşimleri	40
3.2.2.	Amino Asit ve Östrojenik Hormon Etkileşimleri	41
3.3.	QCM Deneyleri	41
3.3.1.	QCM Nanosensör Hazırlanması ve Karakterizasyonu	41
3.3.2.	QCM Nanosensörün Aminoasit ile Modifikasyonu ve Karakterizasyonu	42
3.3.2.1.	Amino Asitlerin Denge İzoterm Modelleri	44
3.3.2.2.	Amino Asitlerin Bağlanma Kinetik Analizleri	45
3.3.3.	QCM Nanosensör ile Equilin Tespiti	46
3.3.3.1.	Equilin Adsorpsiyon İzoterm ve Bağlanma Kinetik Analizleri	47
3.3.3.2.	QCM Sensör Yüzeylerinin Bloklanması	48
3.3.3.3.	Çözelti pH ve İyonik Şiddetinin Equ Adsorpsiyonuna Etkisi	48
3.3.4.	Geliştirilen Nanosensör Sisteminde Farklı Endokrin Bozucu Kimyasalların Kullanılması	49
3.3.5.	QCM Nanosensörün Yeniden Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi	50
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	51
4.1.	Moleküler Modelleme Çalışmaları	51
4.1.1.	11-MUA ve Amino Asit Moleküler Modelleme Çalışmaları	52
4.1.2.	Östrojenik Hormonlar ile Amino Asit Etkileşimlerinin Moleküler Modellemesi	54
4.2.	QCM Nanosensörün Karakterizasyonu	62
4.3.	Amino Asit Konsantrasyon Taraması	65
4.3.1.	Amino Asitlerin Denge İzoterm Modelleri	69
4.3.2.	Amino Asitlerin Denge ve Bağlanma Kinetik Analizleri	71
4.4.	QCM Nanosensör ile Equilin Tespiti	73
4.4.1.	Equ Adsorpsiyon İzoterm ve Bağlanma Kinetik Analizleri	76
4.4.2.	QCM Nanosensörün Bloklanmasının Adsorpsiyona Etkisi	79
4.4.3.	Çözelti pH ve İyonik Şiddetinin Equilin Adsorpsiyonuna Etkisi	80
4.5.	QCM Nanosensörlerin Üç Farklı Endokrin Bozucu Hormon ile Karşılaştırılması	81
4.6.	QCM Nanosensörünün Yeniden Kullanılabilirliğinin Test Edilmesi	85
5.	YORUM	87

KAYNAKLAR	90
EKLER.....	111
EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar.....	111
EK 2 - Tezden Türetilmiş Bildiriler.....	112
EK 3 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	113
6. ÖZGEÇMİŞ	114



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Doğal ve sentetik östrojenik bileşiklerin kimyasal yapıları. Kısaltmalar: E1, Estron; 17 β -E2, 17 β -estradiol; 17 α -E2, 17 α -estradiol; E3, estriol; 17 α -EE2, etinil estradiol.	9
Şekil 2.2. Equ molekülünün 3 boyutlu görüntüsü.	10
Şekil 2.3. 17 β -Estradiol'ün 3 boyutlu görüntüsü.	12
Şekil 2.4. Estriol'ün 3 boyutlu görüntüsü.	13
Şekil 2.5. Estron'un 3 boyutlu görünümü.	14
Şekil 2.6. Tipik bir biyosensörün bileşenleri	15
Şekil 2.7. Elektrotlu (sarı) kuvars kristal (gri) tasarımı; (a) üstten görünüm (b) alttan görünüm. (c) AC voltajının uygulanması sırasında bir AT kesim kristalinde indüklenen gerilimin şematik bir gösterimi. (d) Frekans farkı (ΔF) sensörün zamana bağlı frekans değişiminin şematik bir gösterimi.	25
Şekil 2.8. Tipik bir QCM sensör yüzeyindeki kütle değişimine bağlı frekans değişiminin şematik gösterimi.	27
Şekil 2.9. Altın kaplı yüzeye tek tabakalı kendinden diliminin şematik gösterimi	29
Şekil 2.10. Amino asit adsorplanmış QCM nanosensör ile endokrin bozucu kimyasalların tespit edilmesinin şematik gösterimi.	36
Şekil 3.1. Gerçek zamanlı QCM ölçümlerinin izlendiği açık kaynak openQCM Wi2 yazılımının ara yüz görüntüsü.	40
Şekil 3.2. Altın kaplı quartz kristalin görüntüsü ve OpenQCM ⁻¹ cihazına yerleştirilmesi.	43
Şekil 4.1. 11-MUA (a), Tyr (b), Trp (c), Phe (d), Equ (e), Estriol (f), Estron (g) ve 17 β -estradiolün (h) 3 boyutlu moleküler yapıları.	52
Şekil 4.2. 11-MUA'nın üç farklı amino asit Tyr (a), Trp (b) ve Phe (c) ile moleküler modellemesi.	53
Şekil 4.3. Equilinin, Tyr (a), Trp (b) ve Phe (c) amino asitlerine moleküler kenetlenmesi.	55

Şekil 4.4. 17 β -Estradiolün Tyr (a), Trp (b) ve Phe (c) amino asitlerine moleküler kenetlenmesi.	56
Şekil 4.5. Estriolün Tyr (a), Trp (b) ve Phe (c) amino asitlerine moleküler kenetlenmesi.	60
Şekil 4.6. Estronun Tyr (a), Trp (b) ve Phe (c) amino asitlerine moleküler kenetlenmesi.	61
Şekil 4.7. Altın kaplı yüzeye modifiye edilmiş 11-MUA (a-üst), çözelti ortamındaki 11-MUA (a-alt) ve 11-MUA-Tyr, 11-MUA Trp ve 11-MUA-Phe (b-yukarıdan aşağıya) ile yüzeyi modifiye edilmiş QCM nanosensörünün FTIR spektrumları.....	63
Şekil 4.8. Yalın QCM nanosensör yüzey (a) 11-MUA modifiyeli (b), Tyr (c), Trp (d) ve Phe (e) adsorplanmış QCM nanosensör yüzeylerin su temas açısı görüntüleri.	65
Şekil 4.9. Amino asit (Phe) başlangıç konsantrasyonunun SAM 11-MUA modifiye QCM nanosensörde rezonans frekansında meydana getirdiği değişim; T:20 °C, pH: 7	66
Şekil 4.10. Farklı derişimlerdeki amino asit çözeltilerinin QCM nanosensör sensogramları.....	69
Şekil 4.11. QCM nanosensöre amino asit adsorpsiyonunun Langmuir (a), Freundlich (b) ve Langmuir-Freundlich (c) izoterm grafikleri.	71
Şekil 4.12. Amino asitin QCM nanosensöre adsorpsiyonuna ait Scatchard denge analiz grafiği.	72
Şekil 4.13. Amino asitin QCM nanosensöre adsorpsiyonuna ait bağlanma kinetik analiz grafiği.	73
Şekil 4.14. Tyr, Trp ve Phe ile modifiye edilmiş QCM nanosensörü ile Equ tespit sensogramları. Equ başlangıç konsantrasyonunun etkisi; T:20 °C, pH: 7 (a) ve zaman içinde Equ yanıtı; eşit başlangıç konsantrasyonu: 500nM (b). ..	75
Şekil 4.15. Farklı pH değerleri (a) ve iyonik şiddet etkisi (b) ile izlenen QCM nanosensör sensogramları.	81
Şekil 4.16. Tyr, Trp ve Phe modifiyeli QCM nanosensör üzerindeki hormonların (a) ve Tyr modifiyeli QCM nanosensör üzerinde östrojenik hormonların (b) rezonans frekans değişiminin karşılaştırılması.	83
Şekil 4.17. QCM nanosensörün yeniden kullanımı.	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Tyr, Trp ve Phe ile 11-MUA ve Equ'nin modellemeleri ile elde edilen en düşük bağlanma enerjisi ve serbest enerji sonuçları.	58
Çizelge 4.2. Aminoasitler ile hormonların etkileşimlerine ait mesafe ve etkileşim türü bilgileri.....	58
Çizelge 4.3. Yalın ve Modifiye QCM Yüzeylerinin Temas Açısı Ölçümleri.	65
Çizelge 4.4. QCM nanosensörde farklı amino asit konsantrasyonları ile meydana gelen rezonans frekans değişimleri (Hz)	66
Çizelge 4.5. Amino asit 11-MUA adsorpsiyon izotermi.....	69
Çizelge 4.6. Amino asitin 11-MUA kaplı QCM nanosensöre adsorpsiyon kinetik analizleri sonuçları.....	72
Çizelge 4.7. Equ'in Farklı Amino Asitlerle Bağlanma İzotermi	77
Çizelge 4.8. Equ'in üç farklı amino asitle birliktelik kinetik analizi, LOD ve LOQ değerleri.	78

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ΔF	Frekans farkı (MHz)
ΔG_{bind}	Serbest bağlanma enerjisi
Å	Angström, metrik uzunluk birimi
Hz	Hertz, frekans birimi
C_f	Nominal duyarlılık
Δm	Kütle değişimi (ng)
K_A	Bağlanma denge sabiti (nM)
K_D	Ayrışma denge sabiti (1/nM)
k_a	Bağlanma hız sabiti (nM/s)
k_d	Ayrışma hızı sabiti (1/s)
1/n	Freundlich yüzey heterojenite indeksi
Δt	Zaman farkı (sn)

Kısaltmalar

QCM	Kuartz Kristal Mikrobalans
EBK	Endokrin Bozucu Kirletici
EBH	Endokrin Bozucu Hormon
Equ	Equilin
E1	Estron
17 β -E2	17 β -estradiol
17 α -E2	17 α -estradiol

E3	Estriol
17 α -EE2	Etinil estradiol
Tyr	Tirozin
Trp	Triptofan
Phe	Fenilalanin
11-MUA	11-merkaptoundekanoik asit
EPA	Çevre Koruma Ajansı
HRT	Hormon replasman tedavisi
SAM	Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabakalı
PDB	Protein Veri Bankası
MMTK	Molecular Modeling Toolkit
LGA	Lamarckian Genetik Algoritması
SPE	Katı Faz Ekstraksiyonu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
CA	Temas açısı
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı

1. GİRİŞ

Çok düşük konsantrasyonlarda bile östrojenik kirleticilerin çevreye ve doğal kaynaklara salınımı, hem canlı hayatını hem de doğa organizmalarını olumsuz etkilemekte ve özellikle su kaynaklarında ciddi ekolojik hasara neden olmaktadır. Hayvanlarda doğal olarak bulunan ve kadınlarda menopoza sonrası hormon takviyelerinde yaygın olarak kullanılan equilin ve diğer östrojenik hormonlarla doğal su kaynakları kirlenmektedir. Doğrudan toprağa veya bitkilere karışan bu kimyasallar hızla yeraltı sularına taşınmaktadır. ABD Çevre Koruma Ajansı (United States Environmental Protection Agency, EPA) tarafından 2020 yılında düzenlenen kimyasal kirleticiler listesinde yer alan östrojenik hormonlar, günümüzde kullanılan tespit yöntemleri ile ancak belirli sınırların üzerinde tespit edilebilmektedir. Östrojenik hormonlar geleneksel olarak katı faz ekstraksiyonu (SPE), ardından Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS), Floresans Algılamalı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-FLD), yüksek performanslı sıvı kromatografisine bağlı kütle spektrometresi (HPLC-MS) gibi yöntemler ile tespit edilebilmektedir. Ancak enerji tüketimi, düşük proses verimliliği, toksik yan ürün oluşumu ve tehlikeli kimyasalların eklenmesi gibi etkiler, tüm bu teknolojilerin daha geniş çapta uygulanmasını engellemektedir. Bu nedenle, bu tür kirleticileri temiz su kaynakları ve atık sulardan uzaklaştırmak için etkili, daha sürdürülebilir yöntemler aranmaktadır.

Genel ifade ile sensörler bulundukları ortamdaki fiziksel ya da kimyasal değişimlerden etkilenecek kendi bünyelerinde oluşan değişimleri elektriksel verilere dönüştüren aygıtlardır. Analit miktarına ya da varlığına yanıt olarak, gelen sinyalleri elektriksel, ışığın kırınımı, sıcaklık veya basınç gibi parametrelere dönüştürerek ölçüm yapmaktadırlar. Gravimetrik bir sensör olan Kuvars Kristal Mikro terazi (Quartz Crystal Microbalance, QCM) sensörünün birçok uygulama için geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir. Bu, sensörün tanıyıcı bölümünün ucuz, küçük olmasından ve çok düşük miktarlarda numune ile çalışmaya olanak sağlamasından, çok sayıda farklı sensör yüzeyi hazırlanarak sayısız tayin

yapılabilmesinden, yerinde ölçüm yapmaya olanak vermesi ve kolay uygulanabilir olmasından kaynaklanmaktadır.

Son yıllarda, moleküler modelleme yazılımlarının kullanımı, hedef moleküle yüksek seçicilik ve afinite gösteren biyomimetik ligandların rasyonel tasarımını kolaylaştıran bir araç olmuştur. Hedef molekül ve ligandlar arasında gerçekleşen etkileşimlerin türü ve kuvveti, oluşan kompleksin moleküler tanıma özelliğini belirlemektedir.

Ayırma sistemlerinde son yıllarda ön saflaştırma aşaması olarak amino asit temelli sistemlerin kullanımına artan bir ilgi vardır. Bu yaklaşımı desteklemek için tez kapsamında farklı amino asitler ve endokrin bozucu hormonlar arasındaki ilişkinin AutoDock moleküler modelleme çalışmaları yapılmıştır. Moleküler modelleme teknikleri sayesinde seçilen ligand ve hedef östrojenik hormonlar arasında etkin etkileşimler belirlenerek deneysel çalışmalara ışık tutmuştur. Üç boyutlu geometrik yapılarına göre tanıyıcı ligand molekülleri olarak Tyr, Trp ve Phe amino asitleri kullanılmıştır. Amino asitler ve östrojenik hormonların moleküller arası etkileşimlerinin serbest bağlanma enerjileri hesaplanarak birbirlerine karşı afinite şiddetleri belirlenmiştir. Ayrıca moleküler arası mesafeler hesaplanmış ve etkileşimlerinin türleri belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında, QCM sensör sisteminde afinite tabanlı etkileşimler ile östrojenik hormonların kısa sürede hassas bir şekilde tespit edilmesi amaçlanmıştır. Geleneksel QCM sensör sistemlerinden farklı olarak östrojenik hormonlar kullanılarak amino asitlerin sensör yüzeyinden uzaklaştırılma mekanizması araştırılmıştır. Kuvars kristal sensör, öncelikle kendinden montajlı tek tabakalı 11-merkaptoundekanoik asit (11-MUA) ile ardından da Tirozin (Tyr), Triptofan (Trp) ve Fenilalanin (Phe) amino asitleri ile modifiye edilmişlerdir. Hazırlanmış olan QCM nanosensörler, sırasıyla kimyasal yapılarını ve yüzey hidrofobikliklerini belirlemek için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve sabit damla su temas açısı ile karakterize edilmişlerdir. Algılama işlemi,

kuvars kristal yüzeyine bağlanan amino asit moleküllerin neden olduğu kütle artışı yerine yüzeyden uzaklaştırılan kütle miktarına bağlı olarak gerçekleşmiştir. Östrojenik hormonlarla ile sensör yüzeyinden uzaklaştırılan amino asitler rezonans frekansında artışa sebep olmuştur. Bu artışa bağlı sensör yüzeyindeki kütle değişimi hesaplanmış ve hormonların miktarları tespit edilmiştir. Tez kapsamında Equ başta olmak üzere 17β -estradiol, estron, estriol hormonları ve amino asitler arasındaki afinite etkileşimleri hem teorik hem de deneysel olarak incelenmiş ve sonuçlar birbirleri ile karşılaştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endokrin bozucu kimyasallar

Endokrin sistemi, belirli hedeflerle (reseptörler) etkileşime giren kimyasal haberciler (hormonlar) salgılayan bezlerden oluşmaktadır. Bu etkileşimler; büyüme, gelişme, üreme, enerji dengesi, metabolizma ve vücut ağırlığı düzenlemesi dâhil olmak üzere geniş bir dizi işlevin düzenlenmesine olanak sağlamaktadır [1]. Dış kaynaklı kimyasallar istemeden bu karmaşık iletişim sistemine müdahale edebilmekte ve olumsuz sağlık etkilerine neden olabilmektedir. İnsanlar ve hayvanlar, yaşamları boyunca iş, tüketim ürünleri, ilaçlar, doğal kaynaklar, savunma hizmetleri ve benzer koşullarla karşılaşmaları yoluyla bu endokrin bozucu kimyasalların (EBK) geniş bir yelpazesine maruz kalmaktadır. Bu maruziyet üreme bozukluğu riskini artırabilmektedir [2][3][4], ayrıca bilişsel eksiklikler [5][6][7], metabolik hastalıklar [8] ve bozukluklar ve çeşitli kanserlere sebep olabilmektedir [9][10]. Hormonların ve EBK'lerin aktif olmaları ya da etki mekanizmaları, hücresel ve doku seviyelerindeki belirli eylemlere ve ayrıca sirkadiyen ritimlere, mevsimsel değişikliklere, yaşam evresine ve cinsiyete bağlı olarak değişmektedir [11]. Ayrıca, hormon salgısının gelişimsel, sirkadiyen veya pulsatil modeli, sinyal mekanizmalarının önemli bir bileşeni olabilir ve EBK'lar bu modele müdahale edebilmektedir [12][13][14]. EBK'a maruz kalma dönemleri, erken gelişimde organ sistemlerinin oluşumu ve farklılaşması ile çakıştığında, yaşam boyu olumsuz sağlık etkileri riski artmaktadır [15].

Bir kimyasalın bir EBK olarak tanımlanması tüm araştırma alanlarında birincil endişe olmasa da, EBK özelliklerine sahip kimyasallara maruz kalmanın yönetilmesinde önemli olmakta ve EBK'lara maruz kalma ile potansiyel tehditlerin tanımlanması önemlidir [16][17][18][19]. Bu nedenle, belirli bir kimyasala ilişkin genellikle karmaşık mekanik verileri organize etmek ve değerlendirmek için standart, sistematik yaklaşımlar, farklı yetki alanlarının tehlike değerlendirmeleri için farklı sonuçlara varma olasılığını azaltacaktır [20]. Bu yaklaşım, bazı yetkili kuruluşlar tarafından yaygın olarak uygulanmaktadır. Örneğin özellikle kanser araştırmalarında kilit kimyasalların araştırılması için Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (International Agency for Research on Cancer, IARC) ve

Ulusal Toksikoloji Programı (National Toxicology Program) alışmalar yapmaktadır [17]. Benzer şekilde Uzman Uzlaşı Beyanı'nda (Expert Consensus Statement), hormon etkilerine müdahale eden kimyasalların, hormon sistemlerinin temel düzenleyici adımlarıyla etkileşime girme yetenekleriyle ilgili önemli kimyasalların araştırılması yapılmaktadır [18].

İnsanlar tüketilen yiyecek, içecekler, bitkilere uygulanan pestisitler veya kullanılan kozmetikler yoluyla endokrin bozuculara maruz kalabilmektedirler. Düşük dozlarda endokrin bozucu kimyasallar bile insan ya da hayvan sağlığını riske atabilmektedir. Vücudun normal endokrin işleyişi hormon seviyelerinde çok küçük değişikliklere dayanmaktadır, ancak bu küçük değişikliklerin bile önemli gelişimsel ve biyolojik etkilere neden olabileceğini net şekilde bilinmektedir. Bu gözlem, bilim insanlarının düşük miktarlarda bile endokrin bozucu kimyasal maruziyetlerin vücudun hassas sistemlerini değiştirebileceğini ve sağlık sorunlarına yol açabileceğini düşünmelerine yol açmaktadır [21].

Son yıllarda tüm dünyada farklı türde kimyasalların üretiminde muazzam bir artış olmuştur. Bu kimyasalların modern yaşamın birçok yn için faydalı olduğu kanıtlanırsa da, çevreyi kirletebilecekleri ve insanlara değişen derecelerde zarar verebilecekleri giderek daha fazla kabul görmektedir. Üretilen binlerce kimyasaldan yaklaşık 1000'inin endokrin etkili özelliklere sahip olabileceği tahmin edilmektedir [22].

Hormonların organların oluşumunu ve olgunlaşmasını düzenlediği dönemler olduğundan, fetal gelişim ve çocukluk döneminde yüksek EBK maruziyetleri uzun süreli sağlık etkilerine sahip olabilmektedir. Erken yaşta maruz kalma, gelişimsel anormalliklerle ilişkilendirilmektedir. nemli olarak, çeşitli EBK'ların plasentaya geçtiği ve fetüsün dolaşımında konsantre hale geldiği bulunmuştur. EBK'lar anne sütü yoluyla anneden bebeğe aktarılabilmektedir. EBK'lar birçok farklı kaynaktan geldiğinden, insanlar soludukları hava, tükettikleri yiyecekler ve su dâhil olmak üzere çeşitli şekillerde maruz kalmaktadır. EBK'lar ayrıca vücuda deri yoluyla da girebilmektedir. Endüstriyel kimyasallar ve böcek ilaçları toprağa ve yeraltı sularına sızabilir ve balıklarda, hayvanlarda ve insanlarda birikerek besin

zincirine dâhil olabilmektedirler. İnsanların EBK'lara maruz kalma yolları aşağıdaki gibi sıralanmaktadır.

- Organik olmayan ürünlerdeki pestisit kalıntıları
- Bazı tüketici ürünleri EBK içermektedir veya ev kimyasalları, alev geciktiricilerle işlem görmüş kumaşlar, kozmetikler, losyonlar, kokulu ürünler ve anti-bakteriyel sabunlar
- İşlenmiş gıdalar, imalat, işleme, nakliye ve depolamada kullanılan malzemelerden sızan EBK'lar
- Soya bazlı ürünler, östrojeni taklit eden bitkiler tarafından üretilen kimyasallar olan fitoöstrojenler içermektedir
- Ev tozu, kurşun, alev geciktiriciler gibi EBK'lar ve zorlu hava koşullarına dayanıklı yapı malzemesi veya mobilyalar [22].

Bazı kimyasallar, vücudun homeostatik mekanizmalarını bozmak veya yaşam döngüsünde anormal zamanlarda süreçleri başlatmak için endokrin sistem üzerinde etki etmektedirler. Kimyasallar etkilerini bir dizi farklı mekanizma yoluyla gösterebilirler. Bunlar aşağıdaki şekillerde olabilmektedir.

- Hücresel bir reseptöre bağlanarak bir hormonun biyolojik aktivitesini taklit etmektedirler ve hücrenin doğal olarak oluşan hormona yanlış zamanda veya aşırı derecede uyarısını başlatarak yanlış bir tepkiye yol açmaktadırlar (agonistik etki).
- Reseptörü aktive edemeseler bile reseptöre bağlanabilmektedirler. Bu durumda doğal aktivatörlerin reseptör üzerine tutunmalarını engellemektedirler (antagonistik etki).
- Kandaki taşıma proteinlerine bağlanarak dolaşımda bulunan doğal hormonların miktarlarının değişimine sebep olmaktadır.
- Vücutta doğal hormonların sentezi veya hatalı belirteç üretim miktarını etkileyen metabolik süreçlere sebep olmaktadır [23].

Östrojenler: Esas olarak kadın cinsel gelişimi ve üremesinden sorumlu benzer yapıya sahip bir grup kimyasaldan meydana gelmektedir. Temel olarak

yumurtalıklar tarafından üretilirler, aynı zamanda adrenal bezler ve yağ dokusu tarafından üretilmektedirler.

Androjenler: Erkek cinsel özelliklerinin gelişmesinden ve korunmasından sorumlu kimyasallardır. Yapısal olarak östrojenlere benzerler; aslında östrojenler vücutta androjenik öncülerden üretilmektedir.

Bilinen endokrin bozucuların bağışıklık sistemini etkileyebileceğine ve bazı nörotoksisiteye sahip olabileceğine dair bazı kanıtlar bulunmaktadır. Çevresel kimyasallara maruz kalmanın endokrin fonksiyonunun bozulmasına yol açabileceğini öne süren ana kanıt, bir dizi vahşi yaşam türünde görülen değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Dünyanın çeşitli yerlerinde yumuşakçalar, kabuklular, balıklar, sürüngenler, kuşlar ve memelilerde endokrin bozulma ile ilişkili olduğu öne sürülen etkiler bildirilmiştir. Herhangi bir hayvandan çevreye salınan doğal hormonlar ve bir türün ürettiği ve diğer hayvanlar üzerinde hormonal etkiler uygulayan kimyasallar, örneğin insan atıklarının kanalizasyon atıklarında işlenmesi sırasında kasıtsız olarak yeniden aktive olan insan hormonları, balıklarda göz büyümesi gibi fiziksel değişikliklere neden olabilmektedir [24][25].

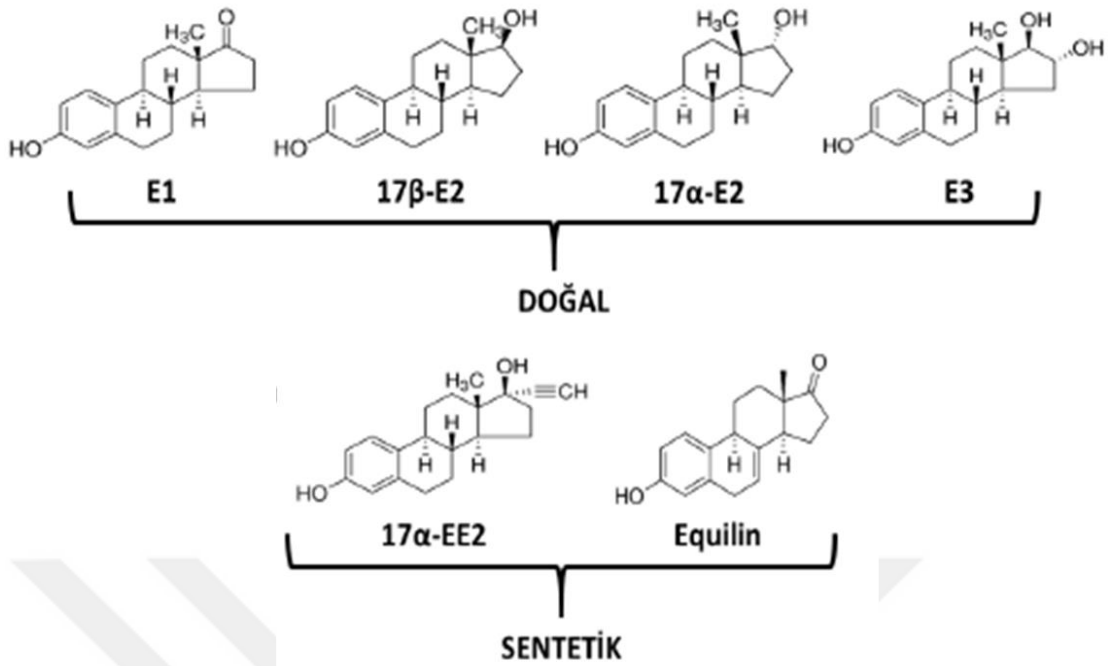
Bitki bileşenleri (genistein veya kumestrol gibi fitoöstrojenler) ve bazı mantarlar tarafından üretilen toksinler dâhil doğal kimyasallar, yüksek düzeyde hormonal olarak aktif olması amaçlanan sentetik olarak üretilmiş farmasötikler (örneğin doğum kontrol hapı ve hormona duyarlı kanserler için tedaviler) de kanalizasyon atıklarında tespit edilebilmektedir [26].

Çevreye salınan bu ana ya da yan ürünlere; bazı pestisitler (örneğin dikloro difenil trikloroetan (DDT) ve diğer klorlu bileşikler), bazı tüketici ve tıbbi ürünlerdeki kimyasallar (örneğin plastik katkı maddeleri) ve bir dizi endüstriyel kimyasal (örneğin poliklorlu bifenoller (PCB'ler), dioksinler) dahildir. Bu kimyasalların hormonal aktivitesi, vücudun kendi doğal olarak bulunan hormonlarından oldukça az miktarda ya da konsantrasyonda olsa dahi endokrin bozucu kimyasal maruziyetlerin vücudun hassas sistemlerini değiştirebileceği ve sağlık sorunlarına yol açabileceği bilinmektedir [27][28].

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı'nın (Environmental Protection Agency, EPA) 2017 yılında yayımladığı ve 2020 yılında güncellenen Kimyasal Kirleticiler listesinde insan ve hayvanlardaki hastalıkların tedavilerinde kullanılan antibiyotikler, hormonlar; böcek ve zararlı bitki öldürücü insektisitler, pestisitler; endüstriyel olarak kullanılan katkı maddeleri gibi çeşitli kimyasallar bulunmaktadır [29]. Bu kirleticiler su kaynakları, toprak, hava yoluyla insan sağlığı ve ekolojik denge üzerinde istenmeyen olumsuz hastalık ve değişimlere sebep olmaktadır. Doğal su kaynakları, hayvanlarda doğal olarak bulunan ve kadınlarda menopoz dönemi sonrasında hormon destek ilaçlarında yaygın olarak kullanılan equilin (Equ) ve diğer östrojenik hormonlar nedeniyle kirlenmektedir. EPA kimyasal kirleticiler listesinde yer alan östrojenik hormonlar günümüzde kullanılan tespit yöntemleri ile ancak belirli sınırların üzerinde tespit edilebilmektedirler. EPA'nın sulardaki equilin, estriol, estron için sağlık risk değeri (Health Reference Level, HRL) 0.35 µg/L iken 17α-estradiol için 0.9 ng/L'dir [29].

Öyle ki, küresel sanayileşmenin başlamasından bu yana, steroidal östrojenler ortaya çıkmış ve Dünya çapında estron, estradiol ve estriol içeren steroid östrojenleri toprak, bitki, su kaynakları ve insanlara ciddi tehditler oluşturmaya başlamıştır. Nitekim östrojenler, tüm dünyada toprak ve sudaki hızla artan konsantrasyonları nedeniyle son yıllarda dikkat çekmektedir. Östrojenlerin insan besin zincirine girmesiyle ilgili endişe dile getirilmiştir, bu da bitkilerin bu maddeleri nasıl aldıkları ve metabolizma östrojenleri ile ilgili bir durumdur [30].

Östrojenler, kolesterolden türetilen ve adrenal korteks, testis, yumurtalık ve plasenta tarafından insanlarda ve hayvanlarda salınan biyolojik olarak aktif hormonlardır [31]. Steroid östrojenleri doğal veya sentetik hormonlar olarak sınıflandırılmakta (Şekil 2.1) ve endokrin bozucu kimyasallar olarak değerlendirilmektedirler.



Şekil 2.1. Doğal ve sentetik östrojenik bileşiklerin kimyasal yapıları. Kısaltmalar: E1, Estron; 17β-E2, 17β-estradiol; 17α-E2, 17α-estradiol; E3, estriol; 17α-EE2, etinil estradiol.

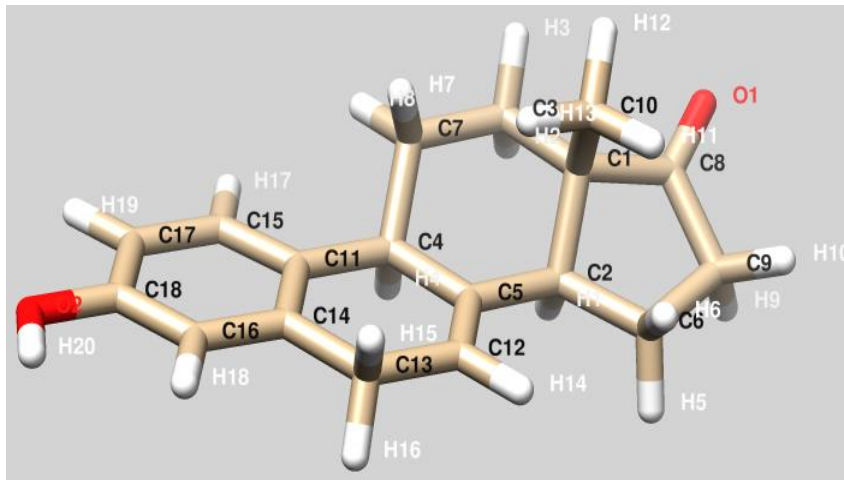
Doğal steroidal östrojenler (C18 steroidal grubu olarak da bilinmektedir), dört halka, bir fenolik grup, iki sikloheksan ve bir siklopentan halkasından oluşan aynı tetrasiklik moleküler çerçeveyi paylaşmaktadırlar (Şekil 2.1). C18 grubu içindeki yapısal farklılıklar, C16 ve C17 konumlarındaki D halkasının konfigürasyonunda yatmaktadır. Örneğin, estron (E1) C17 üzerinde bir karbonil grubuna sahipken, 17β-estradiol (E2) C17 üzerinde bir hidroksil grubuna sahiptir ve estriol (E3) C16 ve C17 üzerinde iki alkol grubuna sahiptir (Şekil 2.1). E2'nin C17 hidroksil grubu, ya α ya da β-bileşiğini oluşturarak moleküler düzlemde aşağı ya da yukarı yönlenebilmektedir. Aynı zamanda potansiyel çevresel tehlikeler olan konjuge östrojenler, serbest östrojenlerin C3 ve/veya C17 pozisyon(lar)ında glukuronid ve sülfat grupları tarafından esterleştirilmesiyle oluşmaktadır [30][32].

Dünya nüfusunun yaklaşık 7 milyar kısmı, yalnızca doğum kontrol hapı uygulamalarından yaklaşık 30.000 kg/yıl doğal steroidal östrojenleri ve ilave 700 kg/yıl sentetik östrojenleri doğaya salmaktadır. Bununla birlikte, östrojenlerin

hayvanlardan çevreye salımı çok daha yüksektir [33]. Ekolojik döngüyle, hayvan ve insan atıklarındaki doğal östrojenler çevre için ciddi bir risk oluşturmaktadır. Bu risk, hayvan gübresi veya tortu biyoidlerinin tarım alanlarına uygulanmasıyla arttırılmakta, organik tarım için alternatif bir besin kaynağı, modern tarımda yaygın olarak kullanılan bir uygulama olmaktadır [34]. Nitekim hayvan gübrelerinin tarım alanlarına uygulanması, çevredeki temel östrojen kaynağı olarak tanımlanmıştır [35].

2.1.1. Equilin

Equilin, atlarda doğal olarak bulunan ve menopoiz sonrası hormon tamamlayıcı bazı ilaçların ikincil etken maddesi olarak kullanılan bir östrojenik seks hormonudur. Equilin doğal olarak kadınlarda bulunmayan ve hayvanlardan elde edilen tek insan östrojen replasman ilacıdır. Konjuge östrojenler (CEE'ler; Premarin® markası (Wyeth/Pfizer, PA, USA)) ve esterlenmiş östrojenler (EE'ler; Estratab, Menest) olarak bilinen östrojen karışımlarında bulunan östrojenlerden biridir. CEE'ler, Amerika Birleşik Devletleri'nde menopoiz semptomları için hormon replasman tedavisinde (HRT) en yaygın kullanılan östrojen şeklidir. Estron sülfat, CEE'lerdeki ana östrojendir (yaklaşık %50), equilin sülfat ise formülasyondaki ikinci ana östrojendir ve toplamın yaklaşık %25'i olarak bulunmaktadır [36][37].

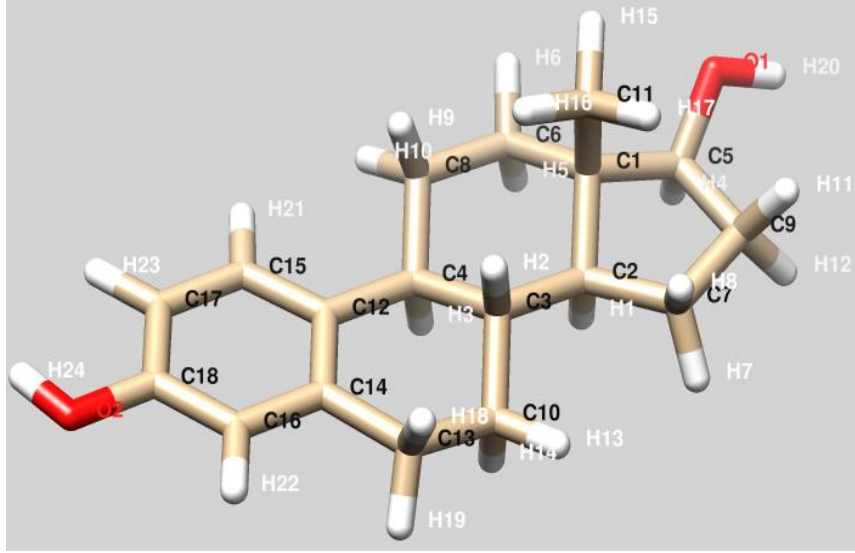


Şekil 2.2. Equi molekülünün 3 boyutlu görüntüsü.

Kanalizasyon arıtma işlemlerinden çıkan atık suların suda yaşayan hayvanlar için östrojenik olabilen kirletici maddeler içerdiği bilinmektedir. Su kaynaklarının kirlenmesinde hormon replasman tedavisinde ve/veya oral doğum kontrol haplarında kullanılan östrojenler, kirletici bileşikler olarak gösterilmektedir. Equilin balıkların safrasında yoğunlaştığı ve yumurta sarısı proteini vitellogenin kan seviyelerini arttırdığı bulunmuştur [38]. Ayrıca at östrojen metabolitlerinin (equilin ve metaboliti 4-dihydroequil) in vitro olarak DNA ile kolayca reaksiyona girerek bir dizi DNA eklentisinin oluşumu ile sonuçlandığı bildirilmiştir [39]. Tüm bu negatif etkilerine rağmen literatürde equilin ile ilgili oldukça az bilimsel çalışma olduğu görülmüştür. Dolayısıyla bu konuya katkı sağlamak adına bu tez çalışmasında equilin odaklı endokrin bozucu hormonların tespiti araştırılmıştır.

2.1.2. 17β-Estradiol

17β-Estradiol, kadın cinsiyet özelliklerinin gelişimini ve korunmasını kontrol eden ve genellikle “kadın hormonu” olarak adlandırılan östrojenik bir hormondur. 17β-Estradiol, üreme ömrü boyunca öncelikle yumurtalıklar tarafından üretilen bir steroid hormondur ve dişi ikincil cinsel özelliklerinin geliştirilmesinden ve dişi üreme sisteminin korunmasından sorumludur. 17β-Estradiol, östrojene duyarlı dokulardaki spesifik reseptörlere bağlanarak etki etmektedir. 17β-Estradiol, endojen estradiolün indirgendiği çeşitli koşullarda terapötik olarak kullanılmaktadır. Estradiol ayrıca oral kontraseptif ilacın bileşeni olarak ve kadınlarda menopozla ilgili semptomların tedavisi için hormon replasman tedavisinde (HRT) yaygın olarak kullanılmaktadır [40].



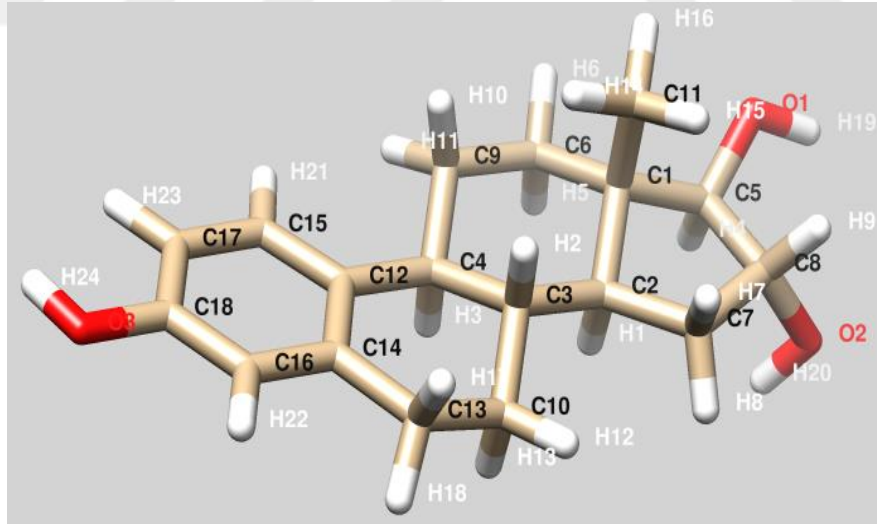
Şekil 2.3. 17β-Estradiol'ün 3 boyutlu görüntüsü.

Aslında 17β-Estradiol (E2), yapısal olarak benzer bir östrojen üçlüsünün (%80 estriol, 10% estron, 10% estradiol) merkez üyesidir. Üçünün en androjenik olan estradiol, iki -OH grubuna sahipken, estron sadece bir -OH ve estriol üç -OH grubuna sahiptir. Menopozda ve hamilelik sırasında estron baskındır. Bununla birlikte, 17β-Estradiol üreme yıllarında birincil östrojendir [41][42]. Tüm steroid hormonları gibi, 17β-Estradiol bir kolesterol türevidir ve esas olarak yumurtalıkların granüloz hücreleri tarafından üretilmektedir. 17β-Estradiol yumurtalıklardan kandaki hedef hücrelere taşınarak burada testosteron gibi esas olarak seks hormonu bağlayıcı globuline bağlanmaktadır. 17β-Estradiol, hedef hücre plazma zarından basitçe difüze olur ve sitozolik östrojen reseptörüne bağlanmaktadır [43]. 17β-Estradiol-reseptör kompleksi daha sonra DNA'ya bağlanıp çekirdeğe girer ve böylece gen transkripsiyonunu düzenlemektedir. 17β-Estradiol, transkripsiyon üzerindeki etkileri sayesinde, vajinal duvar, servikal bezler, fallop tüplerinin duvarları, endometriyum ve miyometriyum dâhil olmak üzere kadın üreme organları için bir büyüme hormonu görevi görmektedir. 17β-Estradiol, yumurtalıktaki oositler için uygun ortamın korunmasından da sorumludur. 17β-Estradiol ayrıca meme gelişimi, vücut şeklindeki değişiklikler ve kemikleri ve yağ birikimini etkileyen ergenlik sonrası kadın ikincil cinsiyet özelliklerini başlatmada ve sürdürmede önemli bir rol oynaması bakımından öneme sahiptir [44]. Bunların yanı sıra 17β-Estradiol belirli onkogenleri, özellikle

de meme kanseri için olanları aktive ettiğinden şüphelenilmektedir. Dolayısı ile su kaynaklarında ya da diğer çevre ortamlarında tespiti sağlıklı hormon düzenlerini olumsuz etkilememeleri bakımından önemlidir [45].

2.1.3. Estriol

Estriol (E3), bir steroid, zayıf bir östrojen ve az miktartlı bir kadın cinsiyet hormonudur [46]. Üç ana endojen östrojenden biridir, diğerleri estradiol ve estrondur. Hamile olmayan kadınlarda estriol seviyeleri neredeyse saptanamaz düzeydedir [47]. Bununla birlikte, hamilelik sırasında, estriol plasenta tarafından çok yüksek miktarlarda sentezlenir ve vücutta açık arayla en çok üretilen östrojendir [48][49]. Estradiol ile karşılaştırıldığında, hem estriol hem de estron, östrojenler olarak çok daha zayıf aktiviteye sahiptir [47][50]. Estriol anne kanında veya idrarda ölçülebilmekte bebeğin sağlık durumunun takibinde kullanılmaktadır. Hamile bir kadında konjuge olmayan estriol (uE3 veya serbest estriol) seviyeleri anormal derecede düşükse, bu Down sendromu veya Edward sendromu gibi kromozomal veya konjenital anomalileri gösterebilmektedir [51].



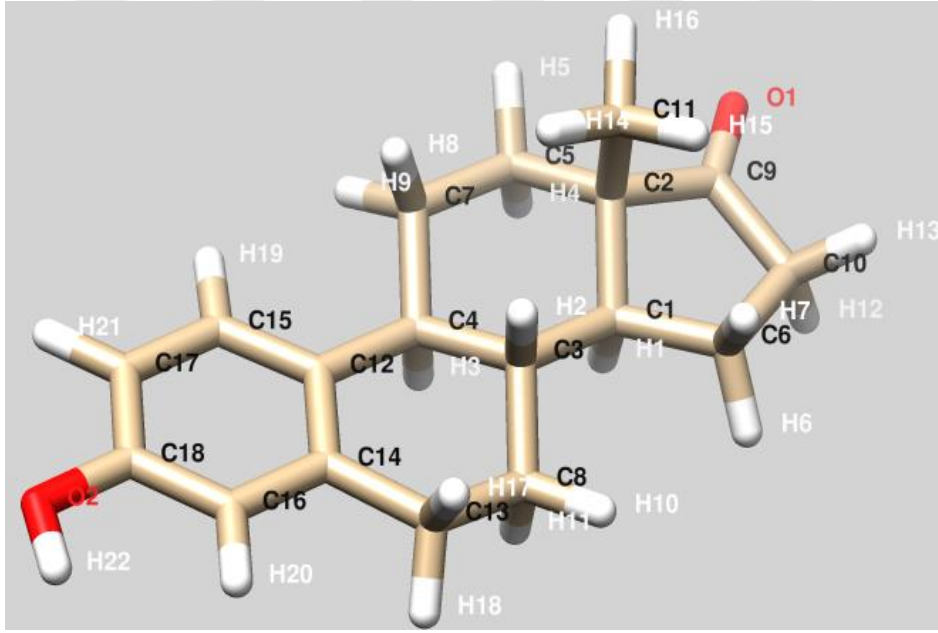
Şekil 2.4. Estriol'ün 3 boyutlu görüntüsü.

Estriolün kontrolsüz/istemsiz şekilde vücuda alınması ile endometriyal hiperplazi (rahim duvarı kalınlaşması) riskinin artması olasılığı mevcuttur. Ayrıca östrojen almanın meme fibrokistik hastalığı, meme kanseri veya kalınlaşmış rahim zarı geliştirme riskini artırabileceğine dair bazı endişeler de mevcuttur. Estriola

muamele, diğer östrojenlere kıyasla daha az riskli gibi görünmekte ancak östrojene bağımlı malign tümörleri olanlarda estriole ihtiyaç duyulduğunu gösteren vakalar bulunmaktadır [52].

2.1.4. Estron

Estron (E1), (E2)'nin bir metabolitidir ve östrojenik aktivite açısından biraz daha zayıftır. Diğer östrojenik hormonlardan farklı olarak estron, yumurtalıkların yanı sıra yağ dokusu ve adrenal bezlerden salgınmaktadır. Menopoz sonrası kadınlarda genellikle daha yüksek miktarlarda bulunan daha zayıf östrojenik etkili bir hormondur [53].



Şekil 2.5. Estron'un 3 boyutlu görünümü.

Düşük östrojenik potansiyeline ek olarak estron, estradiol ve estriolden farklı olarak östrojen hedef dokularında birikmez [36]. Estron'un estradiole dönüştürülebilmesi nedeniyle, estron'un in vivo östrojenik gücünün çoğu veya tamamı aslında estradiole dönüşümden kaynaklanmaktadır [54][55]. Estradiol ve estriolün aksine, estron, G proteinine bağlı östrojen reseptörünün bir ligandı

Gerçek zamanlı uygulama potansiyeline sahip biyosensörler, son yıllarda hem endüstriyel çalışmalarda hem de araştırmacılar arasında en çok araştırılan konulardan biri olmuştur. Literatürde çoğunlukla, biyosensörlerin çok çeşitli biyomoleküller için uygun maliyetli, aşırı duyarlı ve erken tespit araçları olduğunu öne sürmektedir [58]. Biyosensörlerin araştırma tarihi, ilk kez 1916'da bir proteinin katı bir substrat üzerinde immobilizasyonu üzerine yaptıkları çalışma olan Nelson ve Griffin ile başlamıştır. Biyosensör pazarının değeri 2020'de 25 milyar ABD dolarından fazladır ve tüketici, sağlık ve ticari test endüstrisinde hızla artan talep yoluyla 2021'den 2027'ye kadar %7,4 civarında bir büyüme öngörülmektedir. Tespit yöntemlerine göre biyosensörler çeşitli kategorilere ayrılmaktadır (Şekil 2.6). Yöntemlerin çoğu, numunelerin enzim (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, Enzim Bağlantılı İmmünosorbant Testi'ne (ELISA) benzer), floresan molekül, manyetik partikül veya radyoaktif element gibi bir materyal ile etiketlenmesini gerektirmektedir. Bu durum proses karmaşıklığını ve dolayısıyla analiz maliyetini arttırmaktadır [58][59].

- **Analit**

Tespit edilmesi gereken belirli sebeplerle (azlık, toksik etki, atık ürün olma, teşhis, tedavi... vb.) seçilmiş madde. Örneğin, glikozu saptamak için tasarlanmış bir biyosensörde analit glikozdur.

- **Biyoreseptör**

Analiti özel olarak tanımak amacıyla kullanılan moleküldür. Enzimler, hücreler, aptamerler, deoksiribonükleik asit (DNA) ve antikorlar, biyoreseptörlerin bazı örnekleridir. Biyoreseptörün analit ile etkileşimi üzerine sinyal oluşturma süreci ışık, ısı, pH, yük veya kütle değişimi vb. olaylara dayanırken biyo-tanım olarak adlandırılmaktadır.

- **Dönüştürücü**

Dönüştürücü, bir enerji formunu diğerine dönüştüren bileşendir. Bir biyosensörde dönüştürücünün rolü, biyo-tanım olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştürmektir.

Bu enerji dönüşüm süreci sinyalizasyon olarak bilinmektedir. Çoğu dönüştürücü, genellikle analit-biyoreseptör etkileşimlerinin miktarıyla orantılı olan optik veya elektrik sinyalleri üretimi sağlamaktadır.

- **Elektronik**

Dönüştürülen sinyali işleyen ve görüntüleme için hazırlayan biyosensör parçasıdır. Amplifikasyon ve sinyallerin analogdan dijital forma dönüştürülmesi gibi sinyal koşullandırmayı gerçekleştiren karmaşık elektronik devrelerden oluşmaktadır. İşlenen sinyaller daha sonra biyosensörün görüntüleme birimi tarafından nicellendirilmektedir.

- **Ekran**

Ekran, bir bilgisayarın ekranı veya kullanıcı tarafından anlaşılabilir sayılar veya eğriler oluşturan doğrudan yazıcı gibi bir kullanıcı yorumlama sisteminden oluşmaktadır. Ekran genellikle, biyosensörün sonuçlarını kullanıcı dostu bir şekilde üreten bir donanım ve yazılım kombinasyonundan oluşmaktadır. Ekrandaki çıkış sinyali, son kullanıcının gereksinimlerine bağlı olarak sayısal, grafik, tablo veya görüntü şeklinde olabilmektedir.

Her biyosensörün sahip olduğu belirli statik ve dinamik nitelikler bulunmaktadır. Bu özelliklerin optimizasyonu, biyosensörün performansına etki etmektedir. Biyosensörlerin sahip olduğu karakteristik özellikler aşağıda detaylandırılmıştır.

- **Seçicilik**

Seçicilik, bir biyoreseptörün diğer katkı maddeleri ve kirleticiler içeren bir numunedeki belirli bir analiti tespit etme yeteneği olarak tanımlanabilmektedir. Seçicilik belki de bir biyosensörün en önemli özelliğidir. Seçiciliğin en iyi örneği, bir antijenin antikorla olan etkileşimi ile ifade edilebilir.

- **Tekrarlanabilirlik**

Tekrarlanabilirlik, biyosensörün birden fazla kez tekrar edilen deneylerin aynı yanıtları üretme yeteneği olarak ifade edilebilir. Tekrarlanabilirlik, bir biyosensördeki dönüştürücünün ve elektroniğin kesinliği ve doğruluğu ile karakterize edilmektedir. Hassasiyet ise bir numune her ölçüldüğünde sensörün benzer sonuçlar verme yeteneği iken, doğruluk, bir numune birden fazla ölçüldüğünde sensörün gerçek değere yakın bir ortalama değer sağlama kapasitesini göstermektedir. Bu terimler birbiri ile sıklıkla karıştırılan durumlardır. Yeniden üretilebilir sinyaller, bir biyosensörün tepkisinin yüksek güvenilirlik ve sağlamlıkla değerlendirilmesine imkân sağlamaktadır.

- **Kararlılık**

Kararlılık, biyolojik sistem içindeki ve çevresindeki ortam farklılıklarına karşı duyarlılık derecesi ile ifade edilmektedir. Bu ortam farklılıkları, ölçüm altındaki bir biyosensörün çıkış sinyallerinde bir kaymaya neden olabilmektedir. Kaymanın şiddetine bağlı olarak bu durum ölçülen konsantrasyonda bir hataya neden olabilir ve ayrıca biyosensörün kesinliğini ve doğruluğunu etkilemektedir. Bir biyosensörün uzun inkübasyon adımları veya sürekli izleme gerektirdiği uygulamalarda stabilite en önemli özellik olmaktadır. Daha açık bir ifade ile dönüştürücülerin ve elektroniklerin tepkisi, bir biyosensörün kararlılığını etkileyebilecek sıcaklığa duyarlı olabilmektedir. Bu nedenle, sensörün kararlı bir yanıt vermesini sağlamak için elektroniklerin uygun şekilde ayarlanması gerekmektedir. Kararlılığı etkileyebilecek diğer bir faktör, analitin biyoreseptöre bağlanma derecesi olan biyoreseptörün afinitesidir. Yüksek afiniteye sahip biyoreseptörler, bir biyosensörün kararlılığını güçlendiren analitin ya güçlü elektrostatik bağlanması ya da kovalent bağlanması ile ilişkilidir. Ölçümün kararlılığını etkileyen diğer bir faktör, biyoreseptörün belirli bir süre boyunca bozulmadan kullanıma imkân vermesidir.

- **Duyarlılık**

Bir biyosensör tarafından tespit edilebilecek minimum analit miktarı, onun tespit limitini (LOD) veya başka bir ifade ile hassasiyetini tanımlamaktadır. Bir dizi tıbbi ve çevresel izleme uygulamasında, bir numunede eser miktarda analit varlığını

doğrulamak için ng/ml veya hatta fg/ml kadar düşük analit konsantrasyonlarını tespit etmek için biyosensörler gerekmektedir.

- **Doğrusallık**

Doğrusallık, matematiksel olarak $y = mc$ olarak temsil edilen doğrusal bir grafikte, ölçülen tepkinin (analitin farklı konsantrasyonlarına sahip bir dizi ölçüm için) doğruluğunu gösteren niteliktir; burada c analitin konsantrasyonu, y sinyal ve m , biyosensörün hassasiyetidir. Biyosensörün doğrusallığı, biyosensörün çözünürlüğü ve test edilen analit konsantrasyon aralığı ile ilişkilendirilmektedir. Biyosensörün çözünürlüğü, biyosensörün yanıtında bir değişiklik meydana getirmek için gerekli olan bir analitin konsantrasyonundaki en küçük değişiklik olarak tanımlanmaktadır. Uygulamaya bağlı olarak, çoğu biyosensör uygulaması sadece analit tespiti değil, aynı zamanda geniş bir çalışma aralığında analitin konsantrasyonlarının ölçülmesini gerektirdiğinden iyi bir çözünürlük gerekli olmaktadır [60].

Biyoreseptörün analit ile etkileşimi üzerine sinyaller (ışık, sıcaklık, pH, yük veya kütle değişimi vb. şeklinde) üretme işlemine biyo-tanıma olayı ile açıklanmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörlerde biyotanıma, voltaj, akım, empedans, kapasitans ve değişen pH'ın ve dönüştürücü yüzeyinde meydana gelen elektrokimyasal reaksiyonun saptanmasına dayanmaktadır [61]. Optik biyosensörlerde absorpsiyon, iletim, yansıma, faz, genlik, frekans ve/veya ışık polarizasyonundaki değişikliklere dayanmaktadır [62]. Termal biyosensörler ise biyokimyasal reaksiyonlarda açığa çıkan veya emilen ısı enerjisinin (termal enerji) ölçümüne dayalı analiz gerçekleştirmektedir [63]. Bir malzemenin mekanik olarak gerildiğinde voltaj oluşturma yeteneği, piezoelektrik veya piezoelektrik etki olarak adlandırılır. Piezoelektrik sensörler, kendilerine bir elektrik potansiyeli uygulandığında elastik deformasyona (mekanik stres veya salınımlar) uğrayan kristaller sayesinde ölçüm yapmaktadırlar. Gravimetrik dönüşüm en genel anlamda piezoelektrik tabanlı biyosensörler, manyetoelastik tabanlı biyosensörler (MES) ve kuvars kristal mikro terazi (QCM) sensörleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bir biyosensör olarak QCM sensör sistemleri, moleküler

ölçekte kütle değişimlerini (nanogramlar) ve viskoelastik özellikleri izlemek için kullanılan yüzeye duyarlı bir teknolojidir [64].

Kuvars kristali yüzeyinde meydana gelen moleküler etkileşimler veya reaksiyonlar nedeniyle gerçek zamanlı frekans değişiklikleri QCM algılama sistemleri aracılığıyla izlenmektedir. Az miktarda kütlenin eklenmesi veya çıkarılmasından etkilenen frekans bile tespit edilebilmektedir. Farklı özelliklere sahip (kalınlık, çeşitli metal kaplama, frekans (MHz), kesme şekli vb.) kuvars kristalleri, uygun fiyatlı olduğundan kolaylıkla temin edilebilmekte, bu nedenle farklı amaçlar için kullanılabilmektedirler. Ayrıca yerinde ölçüm imkânı sunan, kullanımı kolay, taşınabilir ve hassas QCM sensörlerinin geliştirilmesi de tercih sebebi olmaktadır [65].

Spangler ve ark. (2001), Spreeta® Surface Plasmon Resonance (SPR) ve QCM kullanarak patojenleri ve toksik ürünlerini tespit etmek için yaptıkları çalışmada benzer hassasiyet ve tespit süreleri elde etmişlerdir. Her iki cihaz da kullanım kolaylığı ve güvenilirlik açısından karşılaştırılabilir özellikte olmuştur. Sabit akış hızı altında Spreeta® SPR için LOD değeri 70 pmol iken QCM cihazı için 35 pmol *E. coli* enterotoksin saptanmıştır. Analiz her iki alet üzerinde yaklaşık 20 dakika sürerken, aynı analiz ELISA testi ile 3.5 saat sürmüştür [66].

Kurosawa ve ark. (2006), toksinler ve bisfenol-A gibi düşük moleküler ağırlığa ve çok yüksek toksisiteye sahip çevresel kirleticiler için QCM immünosensörlerinin gelişimini incelemişlerdir. QCM immünosensörün biyo-ara yüzü, antikoru QCM yüzeyinde hareketsiz hale getirmek ve spesifik olmayan bağlanmayı azaltmak için kendi kendine monte edilen bir tek katman olarak hazırlanmıştır. Çevresel izleme uygulamaları için alternatif bir tarama yöntemi olarak QCM, dioksin molekülleri ve bisfenol-A'nın son derece düşük saptama sınırlamaları ile saptanması sayesinde immünosensörün etkinliğine yakın olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar, Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC/MS) ve ELISA gibi çevresel izleme yöntemleriyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Standart kalibrasyon eğrilerinden yola çıkarak QCM

yönteminin dioksin analizi için resmi olarak onaylanmış prosedür yapma fikrini öne sürmüşlerdir. Belediye katı atık yakma tesislerinden alınan uçucu külden elde edilen dioksin numunelerinin tespiti QCM, ELISA ve GC/MS arasındaki korelasyonlar ile doğrulanmıştır. 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) belirlenmiş bir konsantrasyonu için QCM ile ELISA arasındaki lineer korelasyon 0,99 iken, TCDD'nin aynı konsantrasyonu için QCM ve GC/MS ile toksik eşdeğer (TEQ) değeri arasında 0,89 korelasyon bulunmuştur. QCM immünosensör yöntemi, çevresel izleme için alternatif bir tarama yöntemi olarak etkinliğini göstermiştir, çünkü bu sonuçlar GC/MS ve ELISA gibi çevresel izleme yöntemleriyle elde edilen sonuçlarla benzer olmuştur. Bu nedenle QCM, farklı sensör uygulamalarında kullanılabilen yüzeydeki kütle değişimlerine karşı oldukça hassas olan güvenilir bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır [67].

2.3. Endokrin Bozucu Kimyasalların Tespit Yöntemleri

Son yıllarda nanoteknolojik yaklaşımlar sayesinde küçük boyutlarda cihaz üretimlerinin başlaması ile birlikte eş zamanlı olarak birden fazla molekülün tayin edilebildiği, seçiciliği ve hasaasiyeti yüksek, düşük konsantrasyonlarda bile ölçüme imkân sağlayan biyosensör sistemlerine olan ilgi artmaktadır [68]. Biyosensörler ile tespit edilmek istenen molekülün bulunduğu ortamda (katı, sıvı, gaz ortamı) iz miktarlarda olsa bile kolayca, düşük maliyetle, hızlı şekilde, yerinde, uzman personel gerektirmeyen ve güvenilir şekilde tespit edilmesi büyük önem arz etmektedir. Bahsi geçen uygulamalarda ilgi daha çok çevresel kirleticiler, ekolojik dengeyi ve insan sağlığını tehdit eden endüstriyel, ilaç sanayi, tıbbi uygulama atıklarına doğru yönelmektedir. EBK'ların düşük veya iz konsantrasyonlarını belirlemek için uygun bir analitik metodoloji gerekmektedir. Geleneksel olarak, sulu ve katı çevresel numunelerdeki östrojen kalıntıları yaygın olarak kütle spektrometrisi (MS) ile donatılmış gaz kromatografisi (GC) ile analiz edilmiştir; ancak, gerekli türevlendirme adımları sadece zaman alıcı ve zahmetli değil aynı zamanda zordur [69][70].

1990'dan bu yana birçok ülkede östrojenik aktivitelerin tespit edilmesi önem kazanmıştır. Kanalizasyon ve doğal sulardaki östrojenlerin izlenmesi, analitlerin

düşük konsantrasyonundan ve çevresel matrislerin karmaşıklığından dolayı zor bir iştir. Sulu numunelerde östrojene yönelik rapor edilen metotların çoğu katı faz ekstraksiyonu (SPE) [71][72][73], karıştırma çubuğu emici ekstraksiyon (SBSE), katı faz mikroekstraksiyonları (SPME), ve dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon (DLLM) [74].

SPE, ardından genellikle kütle spektrometresi tespiti ile birlikte sıvı kromatografisine dayanan enstrümantal sistemleridir [75][76]. Bu yöntem çevresel numunelerde östrojenleri tespit etmek için sıklıkla kullanılan prosedürdür. UV (HPLC-UV) [77] ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve floresans dedektörü (HPLC-FLD) [78][79], östrojenleri belirlemek için kullanılan HPLC-MS analizine nispeten daha düşük maliyetli alternatifler olarak bildirilmiştir. Atık su ve doğal sulardaki östrojen konsantrasyonuyla uyumlu miktar belirleme sınırları, Lopes ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, E1 ve E2'nin doğal olarak SPE-HPLC-FLD ile (yüzey suyunda 600 ng/L E1, nehir suyunda 6 ng/L E2) ve arıtılmış sularda (6.8 ng/L) saptandığını göstermişlerdir [80]. Bahsi geçen yöntemlerle östrojenik hormonları tespit etmek oldukça zahmetli ve cihazların bakımı için yüksek yatırım maliyetleri gerektiren ekipmanlardan oluşmaktadır. Bu teknikler genellikle yüksek hassasiyete sahiptir, ancak karmaşık ve maliyetlidir, yetenekli teknisyenler ve geniş laboratuvar bazlı enstrümanlar gerektirmektedir. Ek olarak, bu tekniklerin çoğu, sıvı-katı ekstaksiyon (Liquid Solid Extraction, LSE) veya katı faz mikro ayırma (Solid Phase Micro Extraction, SPME) gibi karmaşık ve zaman alıcı ayırma prosedürleri gerektirmektedir [81].

Bahsi geçen zorluklardan dolayı bu tür kirleticilerin tespiti için çalışmalar son yıllarda; enzim inhibisyonu, seçici immünolojik testler ve fotosentetik aktivitenin bloke edilmesi gibi temel biyokimyasal prensiplere dayanan analizlere doğru ilerlemektedir. Bu biyosensörler son derece hassas ve seçici olup çok küçük cihazlara dönüştürülebilmektedir. Bu cihazların genel anlamda, bir indikatörün yansımaları, kemilüminesans veya genel olarak floresans radyasyonunun inhibe edici kapasitesinin toplam iç yansıması ile saptanan asetilkolinesteraz,

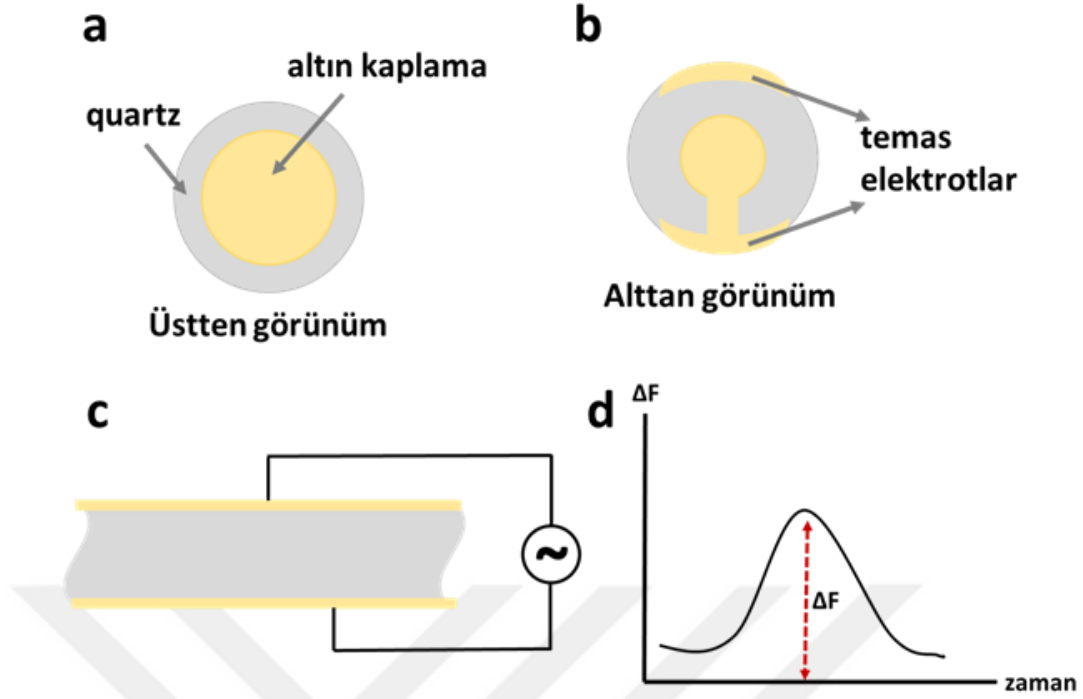
butiriloklinesteraz veya alkalın fosfataz gibi enzimler kullanılarak ve enzim aktivitelerinin fiber optik esaslı tespiti ile yapılmaktadır. Ancak bu cihazların kullanımındaki en büyük problem, enzimlerin saflaştırılmasının zor olması, enzim kararlılıklarının düşük olması ve çoğu zaman duyarlılık ve seçiciliğin malzemeden malzemeye değişkenlik göstermesi kısacası standardizasyonun sağlanamamasıdır. Östrojenik hormonların tespiti için immünolojik test teknikleri de kullanılmaktadır. Genel olarak, bu yöntemler, antijene bağlanan antikorlara dayanan dolaylı tekniklerdir. Bu teknolojilerin dezavantajları, yeniden kullanımı engelleyen antikorların kullanılıyor olması, kararlılıklarının düşük olması ve geri dönüşü olmayan bağlanma ile tespit yapılmasıdır [82][83].

Sensörler en genel ifade ile bulundukları ortamdaki fiziksel ya da kimyasal değişimlerden etkilenererek kendi bünyelerinde oluşan değişimleri elektriksel verilere dönüştüren aygıtlardır. Analit miktarına ya da varlığına yanıt olarak, gelen sinyalleri elektriksel, ışığın kırınımı, sıcaklık veya basınç gibi parametrelere dönüştürerek ölçüm yapmaktadırlar [84]. QCM sensörünün birçok uygulama için geniş bir kullanım potansiyeline sahip olması, bu sensörün düşük maliyetli tanıyıcı bölümünün birçok analiz için kolay ve etkili şekilde hazırlanmaya olanak sağlamasından kaynaklanmaktadır [85].

QCM, birim alan başına kütledeki nanogramdan mikrogram seviyesine kadar olan değişiklikleri ölçen son derece hassas bir kütle terazisidir. Teknolojinin temeli bir kuvars diske dayanmaktadır. Kuvars disk, genellikle metal elektrotlar aracılığıyla uygun bir voltaj uygulanarak belirli bir frekansta salınım yapabilen bir piezoelektrik malzemedir [86]. Salınım frekansı, elektrot yüzeyine küçük miktarlarda kütle eklenmesi veya çıkarılmasından etkilenmektedir. Frekanstaki bu değişiklik, elektrot yüzeyinde meydana gelen film büyümesi, oksidasyon, korozyon/çürüme vb. gibi moleküler etkileşimler veya reaksiyonlar hakkında faydalı bilgiler elde etmek için gerçek zamanlı olarak izlenmektedir. QCM teknolojisi, 60 yıldır gaz fazı için vakum altında kullanılırken yaklaşık 40 yıl önce bu tekniğin sıvı ortamlarda da uygulamaları başlamıştır [87].

Vakum veya gaz fazı yoluyla moleküler adsorpsiyon tipik olarak elektrot yüzeyinin salınımına tam olarak bağlanan sert filmlerle yapılmaktadır. Bu nedenle, bu tür filmlerin kütlesindeki değişiklik, Sauerbrey Denklemi adı verilen bir denklemle tanımlanan salınım frekansındaki değişikliklerle doğrusal olarak ilişkilidir. QCM, frekanstaki gerçek zamanlı değişikliği izleyerek, biriktirilen kütle miktarı ve bu tür filmlerin biriktirme (veya uzaklaştırma) oranı hakkında faydalı bilgiler sağlamaktadır [86]. Bununla birlikte, sıvı ortamda moleküler adsorpsiyon, doğrudan hidrasyon/çözme ve/veya adsorbe edilmiş yüzeyde tutulma gerçekleşmektedir. Adsorpsiyon, kovalent tutturulmuş yumuşak veya viskoelastik filmler üzerinde ya da zayıf etkileşimlerle yüzeye tutturulmuş katmanlarda gerçekleşmektedir. Bazen kuartz kristalin yüzeyi kalın kaplandığında salınımın sönümlenmesine veya enerji kaybına sebep olmaktadır. Bu tür filmlerin kütlesi, tek başına frekans değişimi ölçülerek kesin olarak belirlenememektedir. Viskoelastik bir filmin kütle değişimini doğru bir şekilde belirlemek için hem frekans değişimi (ΔF) hem de enerji kaybı (dağılım değişimi, ΔD olarak ölçülür) ölçülmesi gerekmektedir. Ayrıca, hem ΔF hem de ΔD 'yi izleyerek ek yapısal bilgiler de (örneğin filmdeki konformasyonel değişiklikler, çapraz bağlanma ve şişme) elde edilebilmektedir [88].

Kuvars kristali rezonatörlerini imal etmek için, kristalografik eksene göre belirli yönlerde toplu kuvars kristalinden diskler (plaka) kesilmektedir. QCM'lerde kullanılan kuvars diskler en yaygın olarak, kristalin iki yüzeyinin paralel olmayan bir şekilde hareket ettiği saf kalınlık kesme modu salınımı sağlayan “AT kesimi” şeklinde olmaktadır [89]. Kesimden sonra, kuvars diskin üst ve alt yüzeylerinde bir çift metal elektrot (genellikle altın) doğrudan buharlaştırılır (Şekil 2.6). Kuvars diske alternatif akım uygulandığında, rezonans frekansında salınım başlamaktadır. Rezonans frekansları tipik olarak MHz düzeyindedir ve kristal kalınlığıyla ters orantılıdır. Ortalama 5 MHz kuvars kristal disk, yaklaşık 330 μm 'lik karşılık gelen bir kalınlığa sahiptir [90]. Titreşim alanına aktif yüzey alanı denir ve kütle değişimlerine duyarlıdır.



Şekil 2.7. Elektrotlu (sarı) kuvars kristal (gri) tasarımı; (a) üstten görünüm (b) alttan görünüm. (c) AC voltajının uygulanması sırasında bir AT kesim kristalinde indüklenen gerilimin şematik bir gösterimi. (d) Frekans farkı (ΔF) sensörün zamana bağlı frekans değişiminin şematik bir gösterimi.

AT-kesimli kristaller, oda sıcaklığında (25°C), yani minimum frekans değişikliğinde ($1\text{-}3\text{ Hz}/^{\circ}\text{C}$) iyi stabiliteye sahip olacak şekilde tasarlanmaktadır. QCM'lerdeki frekans değişimi, MHz aralığında temel rezonans frekansına sahip kristallerde 1 Hz veya daha az çözünürlükle ölçülebilmektedir. Bir rezonatör olarak yüksek stabilitesi nedeniyle, kuvars kristalleri 1900'lerin başında elektronik filtreler, frekans kontrol cihazları ve ultrasonik dönüştürücüler gibi çeşitli cihazlarda bileşenler olarak başarıyla dahil edilmiştir. Kuvars kristallerinin hassas kütle ölçücüler olarak uygulanması, Sauerbrey'in çalışmalarının ardından 1950'lerin sonlarında gerçekleştirilmiştir. Sauerbrey 1959'da geliştirdiği denklem ile salınan kuvarsın frekans değişiminin (ΔF), kütle değişimiyle (Δm) lineer olarak ilişkili olabileceğini göstermiştir [91][92].

$$\Delta F = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A(\rho_q \mu_q)^{1/2}} = -n\Delta m / C_f \quad (1)$$

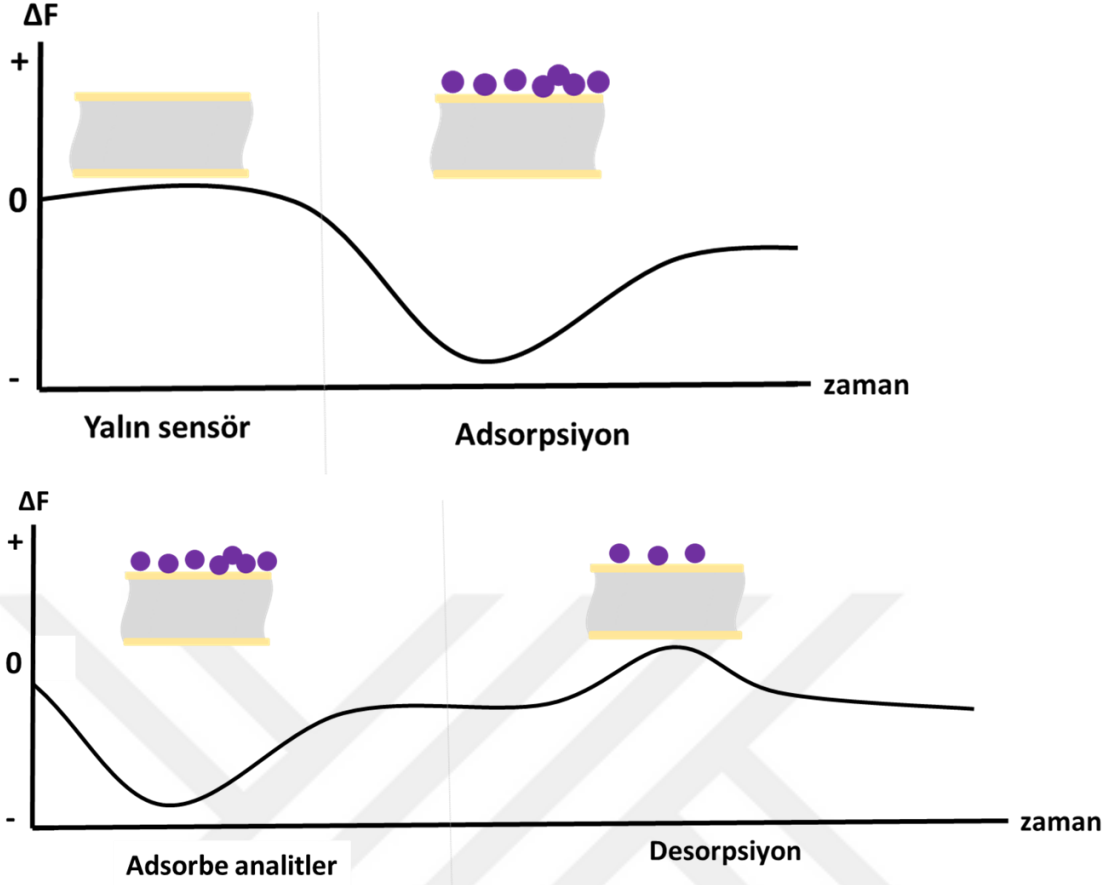
Eşitlik (1)'deki ΔF frekans değişimini (Hz), f_0 rezonans frekansı (MHz), Δm kütle değişimini (gr), ρ_q kuartz yoğunluğu, μ_q AT-kesimli kuartz kristalin kayma modülü, A piezo elektriksel olarak aktif kristal alanı, n over ton sayısını, C_f kullanılan kristalin özelliğine bağlı olan nominal hassasiyeti ifade etmektedir. Oda sıcaklığında 5 MHz kuvars kristal için C_f değeri yaklaşık 17.7 ng/cm².Hz'dir [93].

Sauerbrey denklemi aşağıdaki üç koşulda geçerli olmaktadır: (i) eklenen kütle kristalin kütlesine kıyasla küçüktür

(ii) eklenen kütle kuvvetli şekilde adsorbe olur

(iii) Kristalin aktif alanı üzerinde kütle eşit olarak dağılır

Bu denklem sıvı fazdaki analizlere ilaveten, vakum veya gaz fazı altında metal birikiminin hızını ve kalınlığını izlemek için çeşitli endüstrilerde kullanılmıştır ve halen kullanılmaktadır [94].



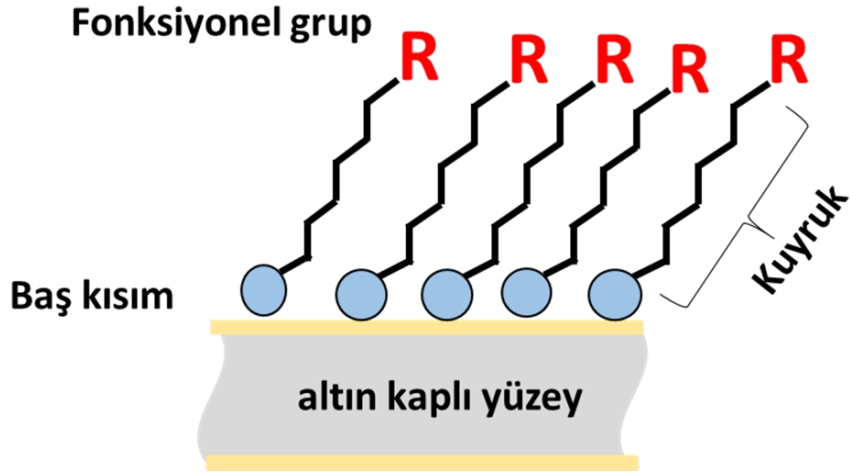
Şekil 2.8. Tipik bir QCM sensör yüzeyindeki kütle değişimine bağlı frekans değişiminin şematik gösterimi.

Kuartz karistal yüzeyin homojen olarak kaplanmasının ve kaplama kalınlığının öneminden dolayı son yıllarda özellikle biyolojik tanıma sistemlerinde oldukça sık kullanılan Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabakalı (Self-Assembled Monolayer, SAM) modifikasyonlar QCM sensör uygulamalarında da kullanılmaktadır. Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalı yapılar, modern nanoteknolojinin önemli unsurlarıdır. Diğer uygulamaların yanı sıra, nm altı ile birkaç nm aralığında belirlenmiş kalınlıkta eş moleküler filmlerin/kaplamaların hazırlanmasında kullanılmaktadırlar [95].

Bazı sistemlerde, tek tabakayı oluşturan moleküller, substrat ile güçlü bir şekilde etkileşime girmezken 3 bazı sistemlerde moleküller, molekülü yüzeye (substrata) güçlü bir afinite ile sabitleyen bir baş gruba sahip olmaktadır [96]. Bir baş grup,

kuyruk ve fonksiyonel uç gruptan oluşan bir SAM Şekil 2.8'de şematize edilmiştir. Yaygın kafa grupları arasında tiyoller, silanlar, fosfonatlar vb. bulunmaktadır. SAM oluşturulurken ilk olarak yüzeydeki küçük moleküler yığılarak düzensiz bir molekül kütlesi oluşturmaktadırlar. Etkileşim süresi arttıkça (dakikalar ile saatler arasında bir süre) baş grupları substrat üzerinde bir araya toplanırken, kuyruk grupları substrattan uzakta toplanmaktadır. Sıkıca yerleşmiş moleküller, substratın yüzeyi tek bir tabaka ile kaplayana kadar devam etmektedir [97].

Baş grup tipinin seçilmesi SAM uygulamasına bağlı olmaktadır. Tipik olarak, baş gruplar genellikle ıslatma ve arayüzey özelliklerini değiştirmek için uç grubun işlevselleştirilebildiği (yani $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$ veya $-SH$ grupları eklenerek) bir moleküler zincire bağlı olmaktadır [98][99]. Ayrıca baş grupla reaksiyona girecek uygun bir substrat seçimi önemlidir. Substratlar, silikon ve metaller gibi düzlemsel yüzeyler veya nanopartiküller gibi kavisli yüzeyler olabilmektedir. Alkanetiyoller, SAM'ler için sıklıkla kullanılan moleküllerdir. Alkanetiyoller, omurga olarak bir alkil zinciri, $(C-C)^n$ zinciri, bir kuyruk grubu ve bir $S-H$ baş grubu olan moleküllerdir [100]. Diğer tercih edilen molekül türleri, alkan zincirinin (kısmen) aromatik halkalarla değiştirildiği moleküler elektronik uygulamalarda ilgi çeken aromatik tiyollerini içermektedir [101]. Sülfürün metallere olan güçlü afinitesi nedeniyle tiyoller, soy metal substratlar üzerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca altın, elde edilmesi kolay, inert ve biyouyumlu bir malzemedir. Ek olarak, sert kimyasal temizleme işlemlerine karşı direnci yüksektir. Son zamanlarda diğer kalkojenit SAM'ler: selenitler ve tellürler, SAM özelliklerini etkileyen ve moleküler elektronik gibi bazı uygulamalarda ilgi çekebilecek substratlara farklı bağlanma özellikleri arayışına olan ilgi artmıştır [102][103]. Silanlar genellikle metalik olmayan oksit yüzeylerde kullanılır; ancak silisyum ile karbon veya oksijen arasındaki kovalent bağlardan oluşan tek tabakalar, geri dönüşümlü olarak oluşmadıkları için kendiliğinden toplanmış olarak kabul edilememektedirler. Soy metaller üzerinde kendiliğinden oluşan tiolat tek tabakaları özel bir durumdur çünkü metal-metal bağları tiolat-metal kompleksinin oluşumundan sonra tersine çevrilebilir hale gelmektedirler [104]. Bu tersine çevrilebilirlik, boşluk adalarına yol açmakta ve alkanetiolatların SAM'lerinin termal olarak desorbe edilebilmesi ve serbest tiyoller ile değiş tokuşa tabi tutulabilmesinin sebebi olarak kabul edilmektedir [105].



Şekil 2.9. Altın kaplı yüzeye tek tabakalı kendinden diliminin şematik gösterimi

2.4. Moleküler Modelleme ve Moleküler Kenetleme

Moleküler modelleme yöntemlerinin başarılı uygulamaları modern fizik, kimya ve biyolojinin hemen hemen her dalında bulunabilir. Bu çok yönlülük ve popülerlik, hem kişisel bilgisayarların hem de özel sunucuların sürekli artan bilgi işlem gücünün yanı sıra moleküler modelleme yazılımlarının kullanılabilirliğinden kaynaklanmaktadır. Doğru bir şekilde tahmin edilebilen özelliklerin ve açıklanabilen olguların yanı sıra bu tür hesaplamalar kullanılarak çözülebilecek problemlerin sayısı oldukça fazladır [106].

Son yıllarda biyoteknolojide yapılan birçok çalışma için bilgisayarlı modelleme tekniklerinin kullanımı temel bir gereklilik olmuştur. Bu nedenle, bu tür ileri tekniklerin kullanılması, araştırmacılar için olumlu bir zaman kazanımını sağlamakta, çünkü bunlar, zahmetli ve maliyeti yüksek deneysel çalışmalardan önce sistemin tasarımı için yeterli bir yol gösterici niteliğinde olmaktadır. Genel olarak bilgisayarlı moleküler modelleme uygulamaları biyofarmasötik ürünleri, yenilikçi çalışmaları, tıbbi geliştirme girişimlerini, biyoteknoloji ürünlerini, moleküler hedef doğrulamayı ve yüksek verimli tarama gibi büyük ölçekli veri analizlerini kapsamaktadır. Genel anlamda ligandlar, makromoleküler yada daha küçük boyutlardaki hedeflerin spesifik bağlanma bölgeleriyle etkileşime girmektedir [107]. Moleküler modelleme ve kenetleme molekülleri 3D (3 dimension, 3 boyutlu) olarak hazırlamak, görselleştirmek ve ayrıca birkaç hedef

molekül ve ligandın üzerinde karmaşık bilgisayar simülasyonları yapmak gibi çok sayıda olasılığı kapsamaktadır. Birçok yazılım paketi moleküler modelleme yapmayı mümkün kılmaktadır. Bu yazılım paketleri aracılığıyla moleküler modeller görselleştirilebilmekte, döndürülebilmekte, 3D olarak değerlendirilebilmekte ve çeşitli algoritmalarla optimize edilebilmektedir. Tabii ki, basit hesaplamalar birkaç saniyede gerçekleştirilebilirken, daha gelişmiş ve karmaşık hesaplamaların tamamlanması, bir süper bilgisayar olsa bile saatler hatta günler alabilmektedir [108][109].

Biyolojik sistemlerin araştırılmasında fonksiyonel bölgelerin keşfine, karşılaştırmalı modellemeye, protein-protein veya protein-ligand kenetleme düzenlemelerinde ligand bağlanma bölgelerinin karakterizasyonuna ve moleküler dinamiklere yönelik hesaplamalı yaklaşımlar giderek daha önemli hale gelmektedir. Hatta bazı sonuçlar deneysel olasılıklardan fazlası hakkında bilgi verirken bazıları deneysel çalışmalara rehberlik sağlamaktadır [110][111]. Moleküler kenetleme, stabil bir etkileşim sağlamak için tercihen protein-ligand veya protein-protein olmak üzere iki veya daha fazla molekülün etkileşimini araştırılması temeline dayanmaktadır. Söz konusu protein ve ligandların etkileşim özelliklerine göre herhangi bir kompleksin 3 boyutlu yapısını, farklı yaklaşımlarla farklı algoritmaların kullanılmasıyla hesaplamak mümkün olmaktadır [112]. Bu ilişkinin davranışı moleküler kenetleme hesaplamaları ile gösterilebilmektedir. Moleküler kenetleme işlemi tamamlandıktan sonra birçok olasılık vardır, ancak sonuçlar yazılım paketindeki bir puanlama işlevi kullanılarak birçok parametre aracılığıyla belirlenmekte ve sıralanmaktadır. Optimum bağlanma modunu ayırt eden sistemin toplam enerjisi ile açıklanmakta ve kenetlenmiş konformasyonun optimize sonucu buradan elde edilmektedir. Burada birkaç potansiyel yol bulunmaktadır. Bunlar, tautomerizm ve iyonizasyon bazlı ligand kimyası, reseptör esnekliğine dayalı katı reseptör hesaplamasının tek konformasyonu ya da skorlama fonksiyonu sınırlamalarıdır. Moleküler modelleme, ligandın bağlanacağı proteinin tercih edilen bağlanma bölgelerini belirleyerek stabil bir kompleks elde etmek için ligandların ve proteinlerin potansiyel aktivitesi ve özgüllüğü etrafında dönen heyecan verici ve sürekli gelişen bir alanda gerçekleşmektedir [113][114]. Moleküler kenetleme yönteminin birincil amacı,

optimum konformasyona sahip bir ligand-protein kompleksi elde etmektir. Kenetlenme sonunda net öngörülen bağlanma serbest enerjisi (ΔG_{bind}), hidrojen bağı ($\Delta G_{\text{H}_{\text{bond}}}$), burulma serbest enerjisi (ΔG_{tor}), elektrostatik (ΔG_{elec}), desolvasyon (ΔG_{desolv}), dağılım ve itme (ΔG_{vdw}), toplam iç enerji (ΔG_{total}) ve bağlı olmayan sistemin enerjisi (ΔG_{unb}) gibi programın hesapladığı veriler değerlendirilmektedir [115][116].

Moleküler kenetleme, hesaplanabilir değişkenlere ve moleküler özelliklere dayalı moleküller arası etkileşimi tahmin etmek için öncelikle bir reseptör ve bir ligand arasındaki bir bilgisayar simülasyonudur. Bir molekülün etkileşim ya da yönelim davranışları ve yapısal özellikleri, potansiyel olarak aktif bir bölge ile doğal biyolojik aktivitesini tahmin etmeye dayanmaktadır. Spesifik çekicilik veya iticilik, biyolojik uygulamalarda moleküler tanımanın temelini oluşturmaktadır [117]. Hesaplamalı simülasyonun birincil amacı, reseptör ve ligand arasındaki etkileşimleri 3 boyutlu yapısal özellikleri aracılığıyla belirlemektir. Bu nedenle moleküler geometriler ve moleküllerin afinite özellikleri etkileşim hesaplamaları için gerekmektedir. Hücre regülasyonu, antikor-antijen tanımlaması ve enzim inhibisyonu veya sinyal iletimi, taşıma, gen ekspresyonu kontrolü ve çok alanlı protein montajı gibi temel biyolojik süreçler önemli moleküler etkileşimleri içermektedir [118]. Kararlı reseptör-ligand komplekslerinin belirlenmesi söz konusu olduğunda, deneysel yöntemler, hesaplamalı moleküler etkileşim hesaplamasına kıyasla genellikle maliyetli ve zahmetlidir. Sonuç olarak, hesaplamalı simülasyonlar kuşkusuz belirli etkileşimler hakkında bilgi edinmek için verimli bir çözüm sunmaktadır. Moleküler kenetleme, laboratuvar uygulamalarını yapmadan önce bir deneyin fizibilitesini belirlemek için bir araç olarak kullanılabilir [119].

Protein Veri Bankası (Protein Data Bank, PDB) neredeyse bir milyon protein ve molekül için yapısal veri sunmaktadır. Dünya çapında birçok araştırmacı tarafından yüklenen 3 boyutlu yapılar, diğer araştırmacıların moleküler yapılarla kolayca ulaşabilmeleri için imkân sunmaktadır. Şu anda mevcut olan ikili karmaşık yapı veritabanları PDDBIND, PLD, AffinDB ve BindDB gibi zamanla bir

önceki veritabanlarına katkı sağlayarak ilerlemektedir. Bu veri tabanlarından alınan moleküller modelleme programları tarafından analiz edilip laboratuvar çalışmalarından önce ya da çalışmalar sırasında oldukça önemli bilgiler vermektedir. Sıklıkla ligand-protein etkileşiminde muhtemel bir enzimin aktivasyonunu veya inhibisyonunun belirlenmesinde ve akılcı ilaç tasarımında bu tür sonuçlardan faydalanılmaktadır [120][121][122].

2.4.1. Moleküler Modelleme ve Kenetleme Yazılımları

2.4.1.1. Chimera

UCSF Chimera, UCSF Resource for Biocomputing, Visualization and Informatics tarafından geliştirilen, kullanıcılara etkileşimli çözümleri görselleştirme ve moleküler yapıların verilerini ve diğer tamamlayıcı bilgileri analiz etme imkânı sunan, oldukça genişletilebilir, kitaplık paketli bir yazılım paketidir. Yazılım içerisinde yoğunluk haritaları, supramoleküler düzenekler, dizi hizalamaları, yerleştirme hesaplamaları, yörüngeler ve konformasyonel düzenlemeler belirlenebilmektedir [123][124]. En son kararlı sürüm, aynı zamanda bu çalışmada kullanılan sürüm olan v.1.15rc'dir.

2.4.1.2. AutoDock, AutoDockTool ve AutoGrid

AutoDock, protein ligand kenetleme prosedürleri için kullanılan bir moleküler modelleme simülasyon yazılımıdır. En son kararlı sürüm, aynı zamanda bu tezde kullanılan sürüm olan v.4.2.6'dır. Kendi web sitesinden indirilerek edinilmiştir (<http://autodock.scripps.edu/downloads/autodock-4-2-x-installation-on-windows/>). AutoDock, GNU Genel Kamu Lisansı altında ve Scripps Araştırma Enstitüsü (GNU General Public License by the Scripps Research Institute) tarafından geliştirilmiştir. AutoDockTools veya kısaca ADT, AutoDock'un kenetleme sürecini 3D görselleştirmeyi ve ligandlarda dönebilen bağlar kurmayı ve kenetleme sonuçları analiz sürecini kolaylaştırmayı mümkün kılan GUI (Graphical User Interface, Grafik Kullanıcı Arayüzü) bileşenidir. AutoGrid, AutoDock için bir kafes hesaplama modulüdür [125]. Bu tez çalışmasında AutoDock v4.2.6, AutoDockTools GUI bileşeni v1.5.6 ile birlikte kullanılmıştır.

2.4.1.3. Molecular Modeling Toolkit

Molecular Modeling Toolkit'in kısaltması olan MMTK, bir açık kaynak kitaplığıdır. MMTK, moleküler modelleme uygulamaları için kullanılırken standart algoritmalara dayalı kenetleme karşılaştırma ve inceleme uygulamalarına imkân sağlamaktadır. Standart ve standart olmayan moleküler modelleme çalışmalarında, MMTK sonuçların yorumlanması, analiz edilmesi ve karşılaştırılması gibi konularda kütüphane görevi görmektedir. MMTK kullanıcı katkıları ile genişletilebilir ve değiştirilebilir bir platformdur [126][127].

2.4.2. Endokrin Bozucu Kimyasalların Moleküler Modellemesi

Birçok araştırmacı tarafından çeşitli EBK molekülleri ve reseptörleri arasındaki etkileşimleri gösteren çeşitli yerleştirme simülasyonları sıklıkla kullanılmaktadır. Moleküler modelleme için MacroModel 9.1, Surflex-Dock, ADT/Autodock tools, Discovery Studio'da CDOCKER modülü, Fred versiyon 2.2.25, Molecular Operating Environment (MOE), GLIDE, Molegro Virtual Docker (MVD, versiyon 4.5.0) ve DOCK programları kullanılmaktadır. Bu programların her biri farklı amaçlarla tercih edilen birbirlerine noksanlık ve üstünlükleri bulunan yazılımlardır [128].

Bisfenol A'nın tiroid hormon reseptörleri ile deneysel bağlanma çalışması Moriyama ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılmıştır. Çalışma, bisfenol A (BPA) molekülünün tiroid reseptörüne antagonistik olarak bağlandığını ve onun transkripsiyonel aktivitesini baskılayarak tiroid hormonu etkisini bozduğunu ortaya koymuştur [129]. In-siliko kenetleme çalışmasına (agonistik/antagonistik diferansiyel yerleştirme yöntemi) dayalı olarak potansiyel endokrin bozucu kimyasalları agonist veya antagonist olarak taramak için Autodock 3 Tool programı kullanılmıştır. Bu durumda hedef moleküller, insan östrojenik reseptörlerinin (Estrogen Receptor, ER) PDB'deki mevcut üç boyutlu yapısından alınmıştır (PDB ID: 1ERE, 3ERD, 1 ERR ve 3ERD). Bu çalışmada, ligand bağlanma bölgesinde (Ligand Binding Domain, LBD) moleküllerin bağlanmasına bağlı olarak meydana gelen ve ligandın konformasyonundaki değişimler izlenmiştir. Kenetleme sonucu daha sonra bağlanma modelinin daha fazla ayırt

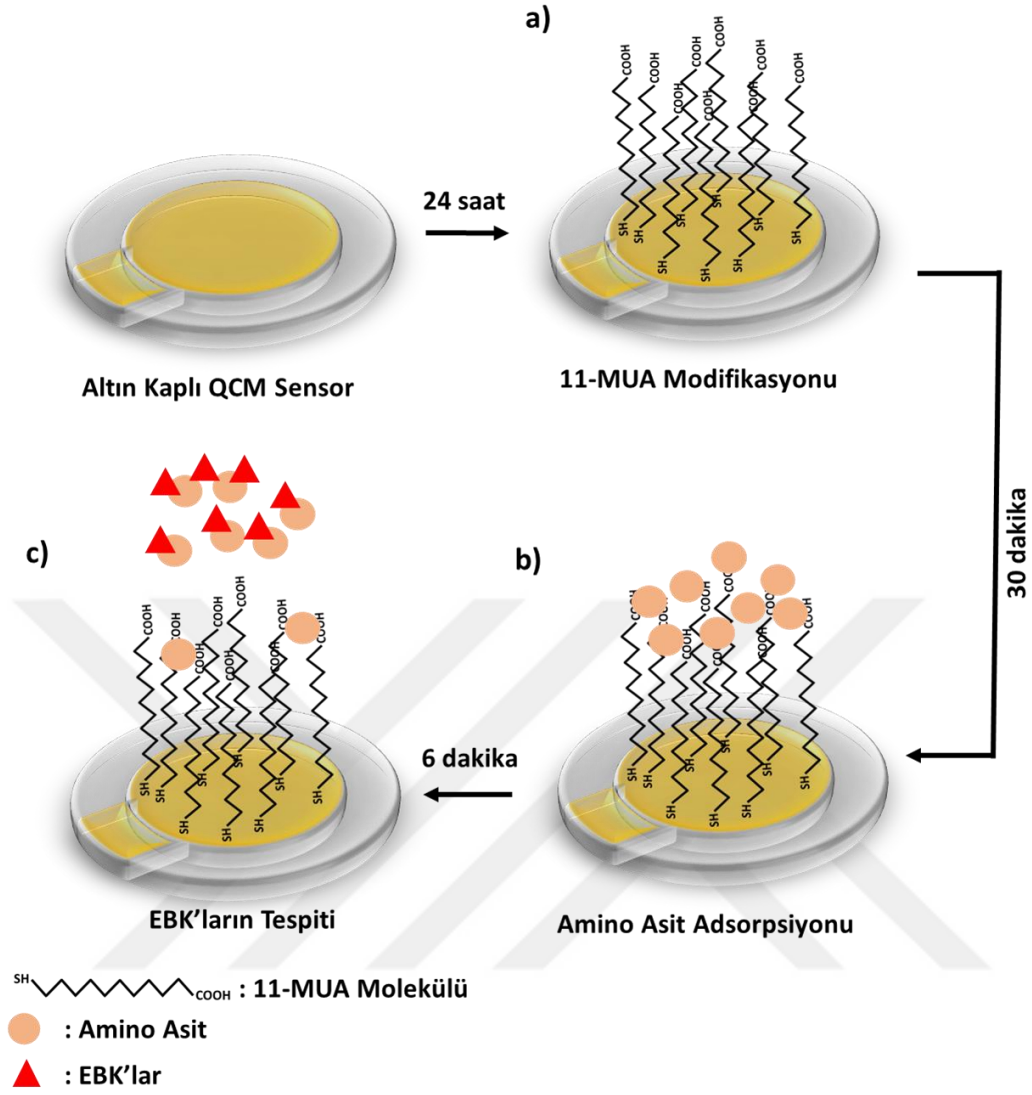
edilmesi için hem agonist/antagonist bağı LBD'lerin kristalografik yapılarıyla karşılaştırılmıştır. Kenetleme ile in vitro östrojen bağlayıcı reseptör tahlili ile desteklenmiş ve lusiferaz gen reseptör testi, 4-(1 Admantil Fenol) ligandının potansiyel bir endokrin bozucu kimyasal olduğunu göstermiştir [130].

Sun ve arkadaşları tarafından ER alfa (hERalpha) ile tasarlanmış küçük moleküllerin kenetlenme çalışması, bu bileşiklerin doğal ligandı (hormon) değiştirme potansiyeline sahip olduğunu ve aktivitesini inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca çalışmada yapılan deneysel gen tahlil yöntemi ve reseptör ile kimyasal olarak sentezlenen ligand molekülleri arasındaki in vitro bağlanma analizi birbirini desteklemiştir [131].

Başka bir çalışmada, polibromlu difenil eter (PBDE) bileşiklerinin insan östrojen reseptörü alfa (hER- α) ile etkileşimi incelenmiş ve beklenenden farklı etkileşimler gözlenmiştir. Anti-östrojenik aktiviteye sahip bazı PBDE bileşiklerinin, anti-östrojenik olmayan bileşiklerin bağlandığı bağlanma boşluğuna bağlanmak yerine ER kanalında sınırlı formda kaldığı bulunmuştur. Bu nedenle, çalışma, PBDE bileşiğinin anti-östrojenik aktivitesinin varlığını göstermek için ligand bağlanma bölgesinin kenetlemede olduğunu öne sürmüştür. hER- α ile PBDE kenetlenmesinde konformasyon oluşturma sayısı (docking run), amino asit kalıntıları ile olan hidrojen bağı etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimlerle gerçekleşmiştir [132][133].

Montes-Grajales ve arkadaşları (2013), endokrin bozucu kimyasal ksenoöstrojen bisfenol A ve farklı biyokimyasal süreçlerle ilgili 271 reseptör proteini arasında kenetleme simülasyonlarını yapmışlardır. Çalışmada endokrin bozucuların, endokrin reseptörleri dışında farklı hedeflerle etkileşime girme potansiyeline sahip olabileceğini ortaya koymuşlardır. Kenetlenmiş konformasyon daha sonra Ligand Scout 3.0 Tool kullanılarak analiz edilip ve bu proteinler ile BPA arasındaki etkileşimler incelenmiştir. Etkileşimlerin amino kalıntıları tarafından oluşturulan hidrofobik ve spesifik hidrojen bağları olarak gözlenmiştir [134]. Butt & Stapleton tarafından yapılan hesaplamalı modelleme çalışmalarında, hidroksillenmiş

PBDE, triklosan ve 2,4,6-trihalojenlenmiş fenol ve BPA'nın klorlu, bromlu ve iyotlu analogları gibi EBK'ların, tiroid hormon metabolizmasının enzimi TH sülfotransferaza karşı inhibitör etkisinde olduklarını kanıtlamışlardır. Buna ek olarak, sonucu doğrulamak adına in vitro sülfotransferaz inhibisyon çalışması yapmışlar ve teorik çalışmalarla uyumlu sonuçlar elde etmişlerdir [135]. Kerdivel ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka moleküler kenetleme çalışmasında, benzofenon (BP) moleküllerinin ER α 'ya sıkıca bağlandığını ve böylece anti-östrojenik aktivite gösterdiklerini kanıtlamışlardır. Bu bağlanma etkileşimi durumunda, ligandın fenil halkasındaki hidroksil (OH) grubunun reseptör molekülünün Glu-353, Arg-394 ve Phe-404 gibi amino asitleri ile tutarlı etkileşimi nedeniyle stabilizasyonun güçlendiği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçların, BP moleküllerinin östrojen hormonu tarafından kontrol edilen ER α -pozitif MCF-7 meme kanseri hücre hattının proliferasyonunu indüklemeye kapasitesini anlamak için proliferatif testten oluşan deneysel çalışma ile tutarlı olduğu da bulunmuştur [136]. Benzer şekilde, Harris ve arkadaşları tarafından hesaplamalı kenetleme analizinde, hER- α ile PCB-30 (2, 4, 6-triklorobifenil) gibi çevresel kirleticilerin bağlanmasından yararlanarak endokrin bozucu özellikleri değerlendirilmiştir. Bu hesaplamalı yöntem sayesinde, fenolün 3 veya 4 konumunda meydana geldiğini hidroksilasyonu ile (PCB-30'un), ana moleküle kıyasla daha güçlü bağlanma afinitesinden sorumlu olduğunu öngörmüştür. *Saccharomyces cerevisiae*'nin PCB-30 ve 4hidroksi-PCB-30 ile inkübe edilmesiyle in vitro P450 muamesi, PCB-30 üzerinde C4 pozisyonunda hidroksil grubunun varlığının östrojenik tepkide yaklaşık 1000 kat artışla sonuçlandığını göstermişlerdir [137].



Şekil 2.10. Amino asit adsorplanmış QCM nanosensör ile endokrin bozucu kimyasalların tespit edilmesinin şematik gösterimi.

Bu doğrultuda Şekil 2.9'da şematize edildiği gibi tez çalışması kapsamında östrojenik hormonları (equilin, estron ve 17 β estradiol, estriol) QCM yardımıyla hassas bir şekilde tespit edebilmek amacıyla QCM altın çipin amino asitlerle (tirozin, triptofan ve fenilalanin) yüzey modifikasyonlarına dayanan bir sensör sistemi geliştirilmiştir. Bu amino asitler, Equ ile etkileşime girecek hidrofobik Tyr (fenil), Trp (indol) ve Phe (fenil) kalıntılarına sahip oldukları için seçilmişlerdir. Literatürde Equ'nin insan östrojenik 17 β -hidroksisteroid dehidrojenaz tip 1'e (17 β -HSD1) bağlanmasının incelenmesine yönelik bazı in vitro çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde Equ'in Tyr-155, Val-225 ve Pro-187

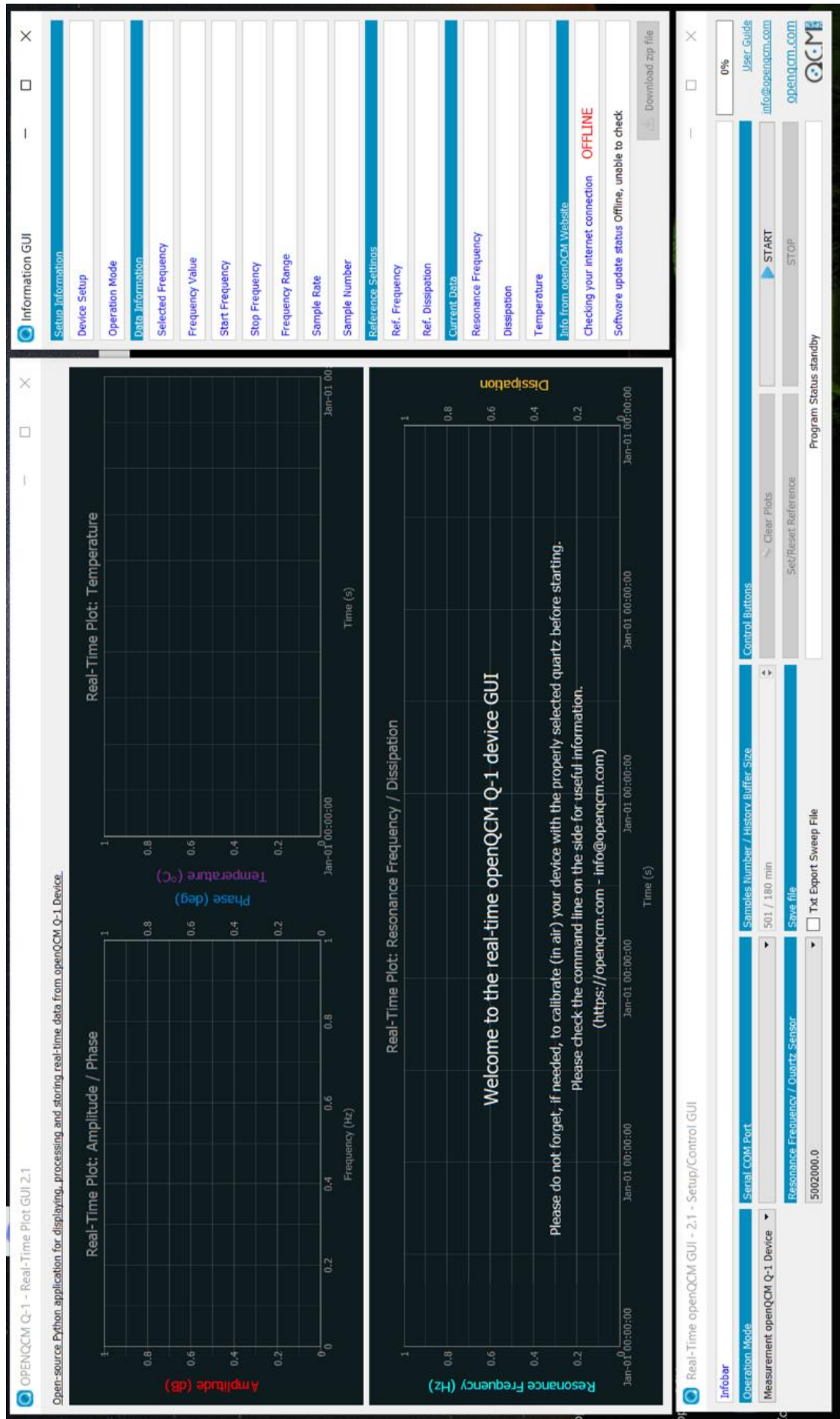
amino asitleri ile kompleks oluşturduğunu göstermişlerdir. Bu etkileşimler sırasında Equ molekülünün elektron yoğunluğuna bağlı olarak proteinlerle hidrojen bağları oluşturduğu da kanıtlanmıştır [138]. 17 β -HSD1 inhibitörleri üzerinde yapılan benzer bir kristal yapı araştırma çalışmasında, 17 β -HSD1'in bağlanma bölgelerinde Leu149, Val225, Phe226, Phe259, His221, Ser142 ve Tyr155 kalıntıları ile özellikle hidrofobik ve katalitik olarak tüneller gözlenmiştir [139]. Bu çalışmalar ile Equ'e afinitesi olduğu zaten kanıtlanmış olan Tyr ve Phe amino asitleri seçilmiş ayrıca bu amino asitlerle rekabet edebilmek için hidrofobik bir yapıya sahip olan Trp da seçilmiştir.

Tez çalışmasında, QCM'nin geleneksel kullanımlarının ötesine geçerek, sensör yüzeyinde artan kütleye değil, nanosensör yüzeyinden uzaklaştırılan kütleyi temel alarak Equ tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki amacımız, hazırlanması kolay, çok düşük maliyetli malzemelerle hazırlanabilen, aynı zamanda kısa sürede kesin sonuç verebilen ve LOD değeri çok düşük olan Equ tespiti için yeni bir nanosensör sistemi geliştirmektir. Ayrıca bilgisayarlı modelleme çalışmaları ile östrojenik hormonlar ve aminoasitler arasındaki etkileşimler incelenmiş ve bağlanma sabitleri hesaplanmıştır. Bu amaçla sensör yüzeyi kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (Self Assambled Monolayer, SAM) 11-MUA (11-Merkaptoundekanoik asit) ile modifiye edilmiş ve ardından üç farklı amino asit ((tirozin (Tyr), triptofan (Trp) ve fenilalanin (Phe)) SAM yüzeyine ayrı ayrı bağlanmıştır. Equ'nin üç farklı amino aside bağlanma tercihi, gerçek zamanlı QCM ölçümleri ve moleküler modelleme çalışmaları ile gözlenmiştir. Deneysel verileri Autodock hesaplamalı modelleme çalışmalarıyla karşılaştırdık. Kısaca, teorik olarak elde edilen veriler ile deneysel çalışmaların verileri karşılaştırılmıştır. Böylece geliştirilen nanosensör kullanarak geleneksel tayin yöntemlerinden daha hızlı, düşük maliyetli, kısa sürede hedef molekülü tanıyan ve nicel analiz yapabilen, basit ve güvenilir bir yöntem elde edilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler, Bilgisayar Programları ve Cihazlar

11-Merkaptoundekanoik asit (11-MUA) (%98), tirozin ($\geq 98\%$), triptofan ($\geq 98.5\%$), fenilalanin ($\geq 98\%$), Equ ($\geq 98\%$), estron ($\geq 99\%$), estriol ($\geq 97\%$), 17β -estradiol ($\geq 98\%$), etanol (%96,0-97,2), di-potasyum hidrojen fosfat (susuz) ve potasyum fosfat monobazik ($\geq 99\%$) Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. Hidrojen peroksit (%30) ve sülfürik asit (%95-97), Merck-Millipore'dan satın alınmıştır. Sulu çözeltilerde Equilinin gerçek zamanlı tespiti, QCM algılama sistemi, OpenQCM⁻¹, Novaetech, Pompeii, İtalya ile yapılmıştır. QCM deneyleri için altın yüzeyli 5MHz AT kesim kuvars kristal sensörler kullanılmıştır (Novaetech, İtalya). Gerçek zamanlı QCM ölçümlerini izlemek için openQCM Wi2 açık kaynak yazılımı kullanılmıştır (Şekil 3.1). Modifiye edilmiş QCM nanosensörünün yapısal ve fiziksel karakterizasyonları, Fourier-Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR, Thermo Fisher-Nicolet is50) ve sabit damla temas açısı (CA, Biolin Scientific-Attension Theta) ile doğrulanmıştır. Bu çalışmada AutoDock v4.2.6, AutoDockTools GUI (Grafik Kullanıcı Arayüzü) bileşeni v1.5.6 ile birlikte kullanılmıştır. AutoGrid, Scripps Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen hesaplama modülü (grid kompleksi) için kullanılmıştır. UCSF Chimera v.1.15rc, Windows 10 Enterprise v.20H2 altında ligand ve protein yapılarının hazırlanması için kullanılmıştır. Intel(R) Core(TM) i7-10750H CPU@2.6 GHz işlemcili, 16-GB RAM ve Windows işletim sistemi çalıştıran 512 GB SSD özelliklerindeki Monster marka dizüstü bilgisayar kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Gerçek zamanlı QCM ölçümlerinin izlendiği açık kaynak openQCM Wi2 yazılımının ara yüz görüntüsü.

3.2. Moleküler Modelleme Çalışmaları

3.2.1. 11-MUA ve Amino Asit Etkileşimleri

Deneyisel QCM sensör yüzeyi modifikasyonları çalışmaları ile paralel olması açısından öncelikle amino asitlerle 11-MUA molekülünün etkileşimleri incelenmiştir.

11-MUA, bir ucunda –SH bir ucunda –COOH grubu bulunan kimyasal formülü $C_{11}H_{22}O_2S$ olan küçük bir moleküldür. Yapısındaki –SH grupları sayesinde altın kaplı QCM sensör yüzeyine kovalent bağlarla bağlandığı bilinmektedir [97]. Böylece 11-MUA molekülünün –SH grubu altın yüzey ile etkileştiği için –COOH grubu ile de aminoasitlerin etkileşmesi beklenmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan PDB dosyaları (PDB ID'leri: Tirozin için 2HDX, Triptofan için 2WEU, Fenilalanin için 3MK2, 11-Merkaptoundekanoik asit için 2QNX) <https://www.rcsb.org/search> adresinden alınmıştır. Deneyisel çalışmalarda 11-MUA molekülünün -SH ucu QCM sensörünün altın yüzeyine tutunacağından bilgisayar modelleme çalışmalarında 11-MUA'nın –COOH ucundan amino asitlerle etkileşmesi beklenmiştir. Moleküler kenetleme için Chimera'da hazırlanan ligandlar ve amino asitler ilk olarak AutoGrid ile işlenmiştir [140][141]. Ardından, liganddaki hangi bağların dönebilen olarak ele alınacağını belirlemek ve konumlarını analiz etmek için AutoDockTools kullanılmıştır. molekül şablonlarını minimize etmek için Moleküler Modelleme Araç Takımı (MMTK) işlemleri kullanılmıştır. Moleküllere hidrojen eklemek ve çıkarmak için sırasıyla AddH ve AddCharge komutları kullanılmıştır. Dönebilen ve durağan atomları belirleyerek yüklerin kısmi uygulanışı için Gasteiger yöntemi kullanılmıştır [142][143].

3.2.2. Amino Asit ve Östrojenik Hormon Etkileşimleri

7 adet PDB dosyası (Equilin için 1EQU, Estron için 5HS6, Estriol için 1X8V, 17 β Estradiol için 1A27, Tirozin için 2HDX, Triptofan için 2WEU ve Fenilalanin için 3MK2 PDB kodları) <https://www.rcsb.org/search> adresinden alınarak Chimera'da kenetleme çalışmaları için hazırlanmıştır.

Moleküler kenetleme için Chimera programında hazırlanan ligandlar ve amino asitler ilk olarak AutoGrid ile hazırlanmıştır. Daha sonra, ligandın hareketli bağları ve bunların bölgelerini tespit etmek için AutoDockTools kullanılmıştır. Moleküllere hidrojen eklemek ve çıkarmak için sırasıyla AddH ve AddCharge komutları kullanılmıştır. Ligand ve amino asitleri minimize etmek için MMTK kullanılmıştır. Hareketli ve durağan atomlar belirlenerek ve bunların yükleri Gasteiger yöntemi ile işlenmiştir [141][143].

AutoDock v4.2.6'da, Tyr, Trp ve Phe amino asitlerinin ve hedef molekül östrojenik hormonlar (equilin, estron, estriol ve 17 β -estradiol) ile etkileşime girecek aktif bölgeleri, Lamarckian Genetik Algoritma v4.2'de çeşitli kenetleme parametreleri kullanılarak incelenmiştir. Kenetleme için, programın varsayılanı olarak gen mutasyon oranı (rate of gene mutation) 0.02, çapraz geçiş oranı (rate of crossover) 0.8 ve 2.5×10^7 değerlendirme sayıları gibi çeşitli konfigürasyonlarla Lamarckian Genetik Algoritması (LGA) kullanılmıştır. Hedef koordinatlar, sırasıyla x, y ve z eksenleri boyunca 0,368 Å aralıklı 40 x 40 x 40 noktalı çalışma çerçevesi (grid box) olarak kullanılmıştır. Tüm konformasyonlar için, hormonlar esnek haldeyken kenetleme işlemi sırasında amino asitler sabit yapı olarak kullanılmıştır. Her hesaplama için kenetleme programı 10 tekrarlı çalıştırılmıştır.

3.3. QCM Deneyleri

3.3.1. QCM Nanosensör Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Tüm altın kaplı kuvars QCM sensör yüzeyleri temizlemek için piranha solüsyonu (konsantre sülfürik asit (H₂SO₄) ve %30'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) (3:1, v/v) karışımı) kullanılmıştır. Kuvars sensörler 3 dakika piranha solüsyonu ile

yıkandıktan sonra sırasıyla deiyonize su ve etanol ile durulanıp kurutulmuştur. Temizlenmiş ve kurutulmuş altın kaplı kuvars sensörler, 4 mM konsantrasyonda etanol içinde taze hazırlanmış 11-MUA çözeltisine daldırılarak SAM oluşumu için 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, QCM sensörü yüzeydeki bağlanmamış veya zayıf bağlı 11-MUA moleküllerini uzaklaştırmak için bir kez etanol ile durulanıp ardından QCM sensörler kurutularak bir sonraki kullanıma kadar +4°C'de saklanmışlardır.

SAM 11-MUA modifiye edilmiş QCM nanosensörler yapısal ve fiziksel doğrulama için Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR) ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir.

3.3.2. QCM Nanosensörün Aminoasit ile Modifikasyonu ve Karakterizasyonu

50 μ M- 2 mM'lik farklı konsantrasyon aralıklarındaki amino asit çözeltileri, 1 mM'lik bir fosfat tamponu içinde hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki amino asit çözeltileri ile etkileşime giren 11-MUA modifiye edilmiş (SAM) QCM nanosensördeki frekans değişiklikleri (ΔF) kaydedilmiştir. Amino asit konsantrasyon değişimine karşı nanosensöre adsorbe olan amino asit kütlesi grafik edilmiştir. Ek olarak, amino asit etkileşim süresini belirlemek için 1 saat boyunca 11-MUA kaplı nanosensör yüzeyinden 1 mM amino asit çözeltisi geçirilmiştir. QCM ölçümleri sırasında sisteme ilk olarak Phe'nin çözücüsü olarak kullandığımız 1 mM pH=6'daki fosfat tamponu verilmiş sistem dengeye ulaştıktan sonra Phe çözeltileri beslenmiştir. İlk 20 dakikada, amino asidin sensör yüzeyinde adsorpsiyonu ile gerçekleşen maksimum frekans değişimi gözlenmiştir. Bu nedenle tüm çalışmalarda kullanılan amino asit kaplı QCM nanosensörler, 1 mM derişimdeki amino asit çözeltileri ile 30 dakika batch sistemde etkileştirilerek hazırlanmıştır. Ayrıca hem Tyr hem de Trp'nın benzer davranışlar göstereceği beklendiği için SAM 11-MUA kaplı QCM nanosensör ile aminoasit etkileşimlerini analiz etmek için sadece Phe ile olan etkileşimi incelenmiştir. Rezonans frekansındaki (ΔF , Hz) değişimden yola çıkarak Sauerbrey eşitliği yardımıyla yüzeye tutunan Phe kütlesi (Δm , ng/cm²) hesaplanmıştır.

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A(\rho_q \mu_q)^{1/2}} = -n c_f \Delta m \quad (2)$$

Eşitlik 2’de ΔF : rezonans frekans değişimi, Hz; f_0 : kuvars kristalinin rezonans frekansı, MHz; Δm : kütle değişimi, g; ρ_q : kuvars yoğunluğu; μ_q : AT kesimli kristal için kuvarsın kesme modülü; A: Piezoelektrik olarak aktif kristal alan. 5 MHz kuvars kristali için, C_f , Nominal Duyarlılık, 17.7 ng/cm²Hz, n: over ton sayısı. Tez kapsamında tüm QCM sensör çalışmaları 7. over tonda yapılmıştır. Phe, Tyr ve Trp ile modifiye edilmiş kuvars sensörleri, yapısal ve fiziksel doğrulama için FTIR ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmişlerdir.



Şekil 3.2. Altın kaplı quartz kristalin görüntüsü ve OpenQCM⁻¹ cihazına yerleştirilmesi.

Amino asit konsantrasyon değişimi ile sensorgramlarda meydana gelen kütle değişimleri yardımıyla adsorpsiyon izoterm hesaplamaları yapılmış ve bağlanma kinetik verileri hesaplanmıştır. Phe'nin 11-MUA kaplı altın yüzeye olan bağlanma enerjisi hesaplanmıştır.

3.3.2.1. Amino Asitlerin Denge İzoterm Modelleri

Adsorpsiyon izotermi, denge çözeltisindeki analit konsantrasyonu ile analit miktarı arasındaki ilişkiyi tanımlamaktadır. Adsorpsiyon olayı, çözeltideki analit miktarı ile adsorbe edilen analit miktarı arasında bir denge oluşana kadar devam etmektedir. Bu denge durumu adsorpsiyon izotermi ile açıklanmaktadır. 11-MUA modifiyeli QCM nanosensörü ile Phe arasındaki etkileşim modelini bulmak için dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır. Bunlar; Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleridir.

$$\text{Scatchard} \quad \Delta m_{eq}/c = K_A(\Delta m_{max} - \Delta m_{eq}) \quad (3)$$

$$\text{Langmuir} \quad \Delta m = (\Delta m_{max}c/K_D + c) \quad (4)$$

$$\text{Freundlich} \quad \Delta m = \Delta m_{max}c^{1/n} \quad (5)$$

$$\text{Langmuir-Freundlich} \quad \Delta m = (\Delta m_{max}c^{1/n}/K_D + c^{1/n}) \quad (6)$$

Yukarıdaki eşitliklerde; Δm_{max} : maksimum QCM sinyal kaymasını (nM/cm^2); Δm_{eq} : denge halindeki QCM sinyal kaymasını (nM/cm^2); c : analit konsantrasyonu (nM); K_A : bağlanma denge sabiti (nM); K_D : ayrışma denge sabiti ($1/\text{nM}$); $1/n$: Freundlich yüzey heterojenlik indeksini ifade etmektedir.

Langmuir adsorpsiyon izotermi, Eşitlik 4 kullanılarak açıklanmaktadır. Bu izoterm, analit moleküllerinin yalnızca tek katmanlı adsorpsiyonunu ve moleküller ve

komşu bölgeler arasında hiçbir etkileşimin olmadığı varsayılarak, her bağlanma bölgesindeki enerjilerinin eşit olduğunu varsaymaktadır. Freundlich adsorpsiyon izotermi, analit moleküllerinin adsorbana çoklu katmanlarda bağlandığını kanıtlamaktadır. Komşu adsorpsiyon bölgelerin dolu olup olmadığına bağlı bir modeldir (Eşitlik 5). Langmuir-Freundlich izoterm modeli ise, adsorpsiyon heterojen yüzeylerin bilgisini içermektedir. Adsorpsiyon enerjisinin adsorbanın heterojen yüzeyine dağılımını tanımlamaktadır. Düşük adsorbat konsantrasyonunda, bu model Freundlich izoterm modeli olurken, yüksek adsorbat konsantrasyonunda Langmuir izotermi olmaktadır [144].

3.3.2.2. Amino Asitlerin Bağlanma Kinetik Analizleri

Deneysel verilerin ışığında yapılan kinetik modelleme çalışmaları adsorpsiyon hızı, modeli, adsorpsiyonun fiziksel ya da kimyasal proseslerle gerçekleştiğini gösteren analizlerdir. Toplam ligand miktarına göre maksimum bağlanma kapasitesi tanımlanması ile diğer tüm analit konsantrasyon değerleri, bir QCM nanosensör sinyali (kütle değişimi) olarak ortaya değerlendirilmektedir.

Akış hücresinde analit konsantrasyonunun sabit kaldığı yalancı birinci derece durumları altında adsorpsiyon aşağıdaki gibi açıklanır:

$$d\Delta m/dt = k_a c \Delta m_{max} - (k_a c + k_d) \Delta m \quad (7)$$

Eşitlik 7'deki $d\Delta m/dt$, QCM'de zamana bağlı kütle oranıdır, Δm ve Δm_{max} anlık adsorpsiyon ve maksimum kaydedilen yanıt sinyalidir, C (nM) analit konsantrasyonudur, k_a ve k_d sırasıyla bağlanma (nM/s) ve ayrışma hızı sabitidir (1/s). K_A bağlama sabitidir ve $K_A = k_a / k_d$ formülü ile hesaplanmaktadır. Sistem dengeye geldiğinde, $d\Delta m/dt = 0$ urumu gerçekleşir ve denklem yeniden yazılabilir:

$$\Delta m_{eq}/c = K_A \Delta m_{max} - K_A \Delta m_{eq} \quad (8)$$

Eşitlik 8'deki K_A ; $\Delta m_{eq}/c$ 'nin karşı Δm_{eq} grafiğinden elde edilmektedir ve ayrışma sabiti $K_D = 1/K_A$ 'den hesaplanmaktadır. Denklem 8 yeniden düzenlenirse:

$$d\Delta m/dt = k_a c \Delta m_{max} - (k_a c + k_d) \Delta m \quad (9)$$

$d\Delta m/dt$ 'ye karşı Δm çizilen grafikten elde edilen doğrunun denkleminde etkileşim kontrollü kinetik $-(k_a c + k_d)$ formülü ile hesaplanmaktadır. Başlangıç bağlanma hızı, analit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Δm_{max} 'ın deneysel olarak belirlenmesi çok zordur çünkü yüzeyi tamamen doyurmak için yüksek bir analit konsantrasyonu gerekmektedir. İleri ve geri analiz hızları, nanosensördeki toplam kütle değişimine (Δm) bağlı olarak zamanla değişen yanıt grafiğinden S hesaplanarak elde edilir:

$$S = k_a c + k_d \quad (10)$$

Eşitlik 10'da gösterilen k_a , S'ye karşı c grafiğinin eğiminden hesaplanmaktadır. Eğer $k_a c \gg k_d$ ise, k_d grafiğin kesme noktasından ($c=0$) güvenilir bir şekilde bulunmaz. Bu nedenle, k_d , analitin tampon çözeltisinin tamamen doymuş olan bağlanma bölgelerinden geçirilmesiyle hesaplanmaktadır:

$$\ln(\Delta m_0/\Delta m_t) = k_d(t - t_0) \quad (11)$$

Eşitlik 11'de m_0 başlangıç kütle miktarını ifade ederken m ve t desorpsiyon eğrisinden elde edilmektedir [145].

3.3.3. QCM Nanosensör ile Equilin Tespiti

Temizlenmiş ve 11-MUA modifiye edilmiş QCM nanosensör yüzeyler 1 mM Phe, Tyr ve Trp çözeltileri ile 30 dakika boyunca ayrı ayrı etkileştirilmiştir. Süre

sonunda, yüzeye tutunmayan amino asitleri uzaklaştırmak için sensör yüzeyleri 1 mM fosfat tampon ile durulanmıştır. Deiyonize (DI) su (pH:7) içerisinde çözünen farklı konsantrasyonlardaki Equ çözeltileri hazırlanmıştır (25-1000 nM). İlk olarak, QCM nanosensörü, kararlı bir rezonans frekans değeri elde etmek için DI su (150 µL/dk akış hızı, yaklaşık 3 dakika) ile yıkanmıştır. Sensör dengeye ulaştıktan sonra, 150 µL/dk sabit akış hızında bir peristaltik pompa yardımıyla akış hücrelerine 1,5 mL Equ çözeltisi beslenmiştir. Equ'in suda gerçek zamanlı (çevrimiçi) tespiti, bir QCM algılama sistemi (OpenQCM⁻¹, Novaetech, İtalya) ile yapılmıştır. QCM nanosensöründe modifiye edilen amino asitlerle (Phe, Tyr ve Trp) etkileşime giren ve amino asitleri sensör yüzeyinden koparmak suretiyle Equ moleküllerinin sebep olduğu negatif rezonans frekans değişiklikleri (ΔF , Hz) çevrimiçi olarak kaydedilmiştir. Phe, Tyr ve Trp'nın 11-MUA ile zayıf etkileşimleri sebebiyle Equ molekülü amino asitleri kolayca sensör yüzeyinden uzaklaştırabilmiştir. Sensör yüzeyinden uzaklaşan amino asit moleküllerinin kütle kaybı sebebiyle meydana gelen rezonans frekansındaki artış miktarından Equ miktarı hesaplanmıştır. Değişen rezonans frekansının izlenmesi, yaklaşık 10 dakika boyunca stabil hale gelene kadar tutulmuştur. Rezonans frekanslarındaki artışlar, farklı Equ konsantrasyonlarına göre değerlendirilmiştir. Maksimum Equ-amino asit etkileşimlerini sağlamak için tüm ölçümler için 20 dakikalık etkileşim süresi uygulanarak üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.1. Equilin Adsorpsiyon İzoterm ve Bağlanma Kinetik Analizleri

QCM nanosensör sisteminden farklı konsantrasyonlarda geçirilen Equ çözeltileri sayesinde QCM nanosensör yüzeyine zayıf etkileşimlerle tutturulmuş olan amino asit moleküllerinin uzaklaştırılması ile meydana gelen rezonans frekansındaki artışları izlenmiştir. Elde edilen bu frekans artışına sebep olan kütle azalmaları hesaplanmıştır. Sensör yüzeyinde azalan kütlelere bağlı olarak Eşitlik 3-11 kullanılarak Equ'nin amino asitlere olan adsorpsiyon izoterm ve kinetik analiz hesaplamaları yapılmıştır. Böylece Equ ve amino asitler arasındaki etkileşimlerinin hangi mekanizmalara dayandığı incelenmiştir.

3.3.3.2. QCM Sensör Yüzeylerinin Bloklanması

Spesifik olmayan bağlanmanın en aza indirilmesi, örneğin klinik tanılama ve immünolojik teste dayalı hastalıkların tespiti gibi, yalnızca saptama sınırı ve doğruluğunun bir sorun olduğu uygulamalar için hayati önem taşımamaktadır ancak biyolojik moleküllere yanıt, kirlilik tespiti, mikrobiyal yük tespiti gibi daha çok biyomedikal uygulamaların başarılı ilerlemesi için spesifik olmayan bağlanmaların optimizasyonu oldukça önemlidir. Bu amaçla algılama sağlanan sensör yüzeylerini bloke edici ajanlar kullanılmaktadır. Literatürde iyi performans gösteren bloklayıcı ajanların biyolojik sıvılar başta olmak üzere etkileşime girdiği sıvılara karşı inert olması gerektiği konusu vurgulanmıştır. Ayrıca bloklayıcı ajanlar derişim reaksiyonları önlemek amacıyla substrat yüzeyine güçlü şekilde bağlanırken başka reaksiyonlara müdahale etmemelilerdir. Örneğin, bloklayıcı ajanın boyutu, hedeflenen analitin yakalayıcı moleküle yaklaşmasını ve onunla reaksiyona girmesini engellemeyecek kadar küçük olması gerekmektedir [146].

Bloklayıcı ajanlar tek başlarına veya kombinasyon halinde (Sığır serum albümin (Bovine Seum Albumin, BSA), süt proteinleri, Tween 20 ve polivinil alkol (PVA)) kullanılmaktadır. Literatürde sıklıkla tercih edilen BSA ve Tween 20 bloklayıcı ajanları kullanılarak spesifik olmayan bağlanmayı en aza indirmek ve sensör yeniden üretilebilirliğini geliştirmek amaçlanmıştır [147]. Bu doğrultuda kendiliğinden düzenlenmiş tek tabakalı 11-MUA modifiyeli altın kaplı QCM çip yüzeyler 1mM fosfat tampon içerisinde %0.02'lik Tween 20 çözeltisi ve 1 mM fosfat tampon içerisinde %1'lik BSA çözeltisi ile ayrı ayrı 30 dakika muamele edildikten sonra deiyonize suyla sensörlerin durulanması ile bloklama işlemi tamamlanmıştır. Bloklanan sensör yüzeyler üzerinden sırasıyla 1 mM fosfat tamponu, 1 mM amino asit çözeltisi, deiyonize su ve 500 nM Equ çözeltisi geçirilmiştir.

3.3.3.3. Çözelti pH ve İyonik Şiddetinin Equ Adsorpsiyonuna Etkisi

Equ'in nanosensör yüzeyi ile olan etkileşimine ortam pH'ının ve iyonik şiddetin etkisini incelemek amacıyla farklı pH değerlerindeki (pH: 2, 4, 7, 9, 11) su içerisinde Equ çözeltileri hazırlanarak nanosensör sisteminden geçirilmiştir. QCM nanosensör sisteminden elde edilen sensogramlar karşılaştırılarak pH'ın

adsorpsiyona olan katkısı değerlendirilmiştir. Benzer şekilde ortam iyonik şiddetinin adsorpsiyona etkisi incelenmiştir. İyonik şiddet hidrofobik, van der Waals etkileşimleri ve elektrostatik etkileşimlerine dayalı sensör sistemleri üzerindeki bağlanma mekanizmalarına olumlu/olumsuz katkı sağladıkları bilinmektedir [148][149]. Örneğin hidrofobik etkileşimlerin olduğu bir sistemde ortamdaki tuz konsantrasyonunun artması hidrofobik etkileşimi arttırırken ortamda elektrostatik etkileşimler yoğunsa tuz konsantrasyonunun artması ile elektrostatik etkileşimler azalmaktadır. Tez kapsamında bu etkileri gözlemleyebilmek için farklı derişimlerdeki tuz çözeltilerinde (1, 10, 100 ve 1000 mM derişimlerinde) hazırlanan Equ çözeltileri ile QCM sensör çalışmaları yapılmıştır.

3.3.4. Geliştirilen Nanosensör Sisteminde Farklı Endokrin Bozucu Hormonların Kullanılması

Yukarıda detaylandırılan çalışmalar sayesinde Equ ve yüzeylerine farklı amino asitlerle (Phe, Tyr ve Trp) adsorplanmış QCM nanosensörlerin etkileşiminden elde edilen maksimum frekans azalma koşulları belirlenmiştir. Buna göre, 20 dakikalık etkileşim süresinde 500 nM Equ konsantrasyonunda bir maksimum frekans değişikliği olduğu gözlenmiştir. QCM nanosensörünün performansı, aynı koşullar altında farklı EBK'lar (estron, estriol ve 17 β estradiol) kullanılarak da incelenmiştir. Equ için bağlanma ve denge analizi çalışmaları, her amino asit ile etkileşime giren diğer östrojenik hormonlar için de tekrarlanmıştır.

Östrojenik hormonlar sadece 11-MUA modifiye sensör yüzeyi ve ardından amino asitlerle etkileştirilmiş sensör yüzeyi ile olan etkileşimleri araştırılmıştır. QCM sensogramında meydana gelen rezonans frekansı değişikliklerine hormonlar ve amino asit etkileşimleri neden olmuştur. Bu fenomeni doğrulamak için, sadece 11-MUA modifiye nanosensörler kullanılarak (amino asitler kullanılmadan) kontrol çalışmaları yapılmıştır.

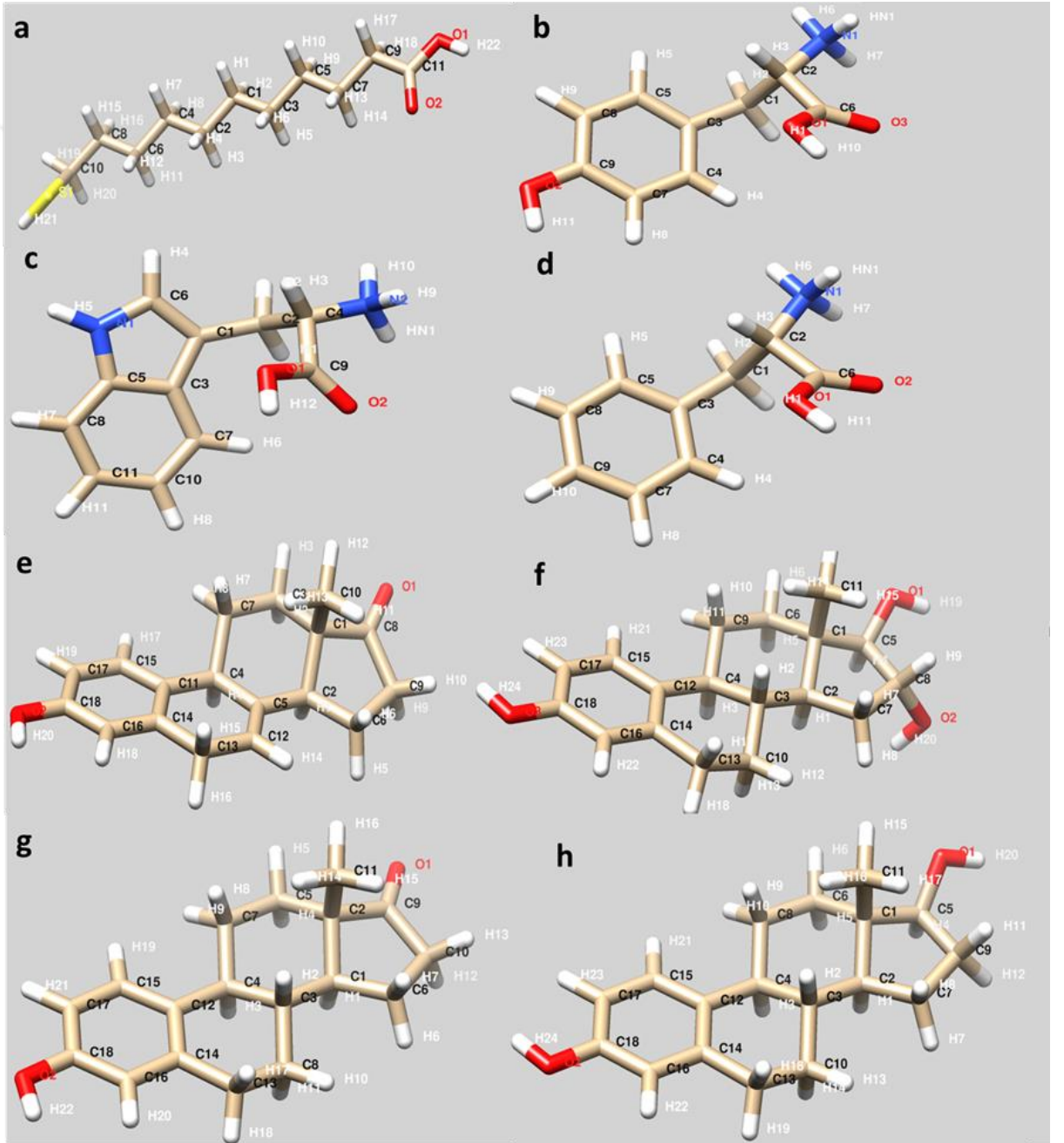
3.3.5. QCM Nanosensörün Yeniden Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi

QCM nanosensörünün tekrar kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla sırasıyla 1000 μ M Tyr ve 500 nM Equ çözeltileri SAM 11-MUA modifiye nanosensör yüzeyinden 150 μ L/dk akış hızı ile geçirilmiştir. Her döngü için önce ortalama 5 dakika Tyr nanosensör üzerinden geçirilmiş, ardından Equ solüsyonu yaklaşık 6-7 dakika geçirilmiştir. Son adımda, sensörü yenilemek (yıkamak) için pH 4'te fosfat tamponu sensör sisteminden ortalama 6 dakika geçirilmiştir. Rezonans frekansındaki artış ve azalmalar, gerçek zamanlı izlemede amino asit bağlama ve uzaklaştırılma adımları ile kaydedilmiştir. SAM 11-MUA modifiye edilmiş QCM nanosensörü, frekansta önemli bir azalma gözlemlenmeyene (4 döngü) kadar bağlanma ve ayrılma döngüleri ile test edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Moleküler Modelleme Çalışmaları

11-MUA molekülünün üç farklı amino asit (Tyr, Trp ve Phe) ile etkileşimi moleküler modelleme ve kenetleme çalışmaları ile araştırılmıştır. Kenetleme çalışmalarında kullanılan, USCF Chimera yazılımında hazırlanan ve minimize edilen moleküllerin yapıları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

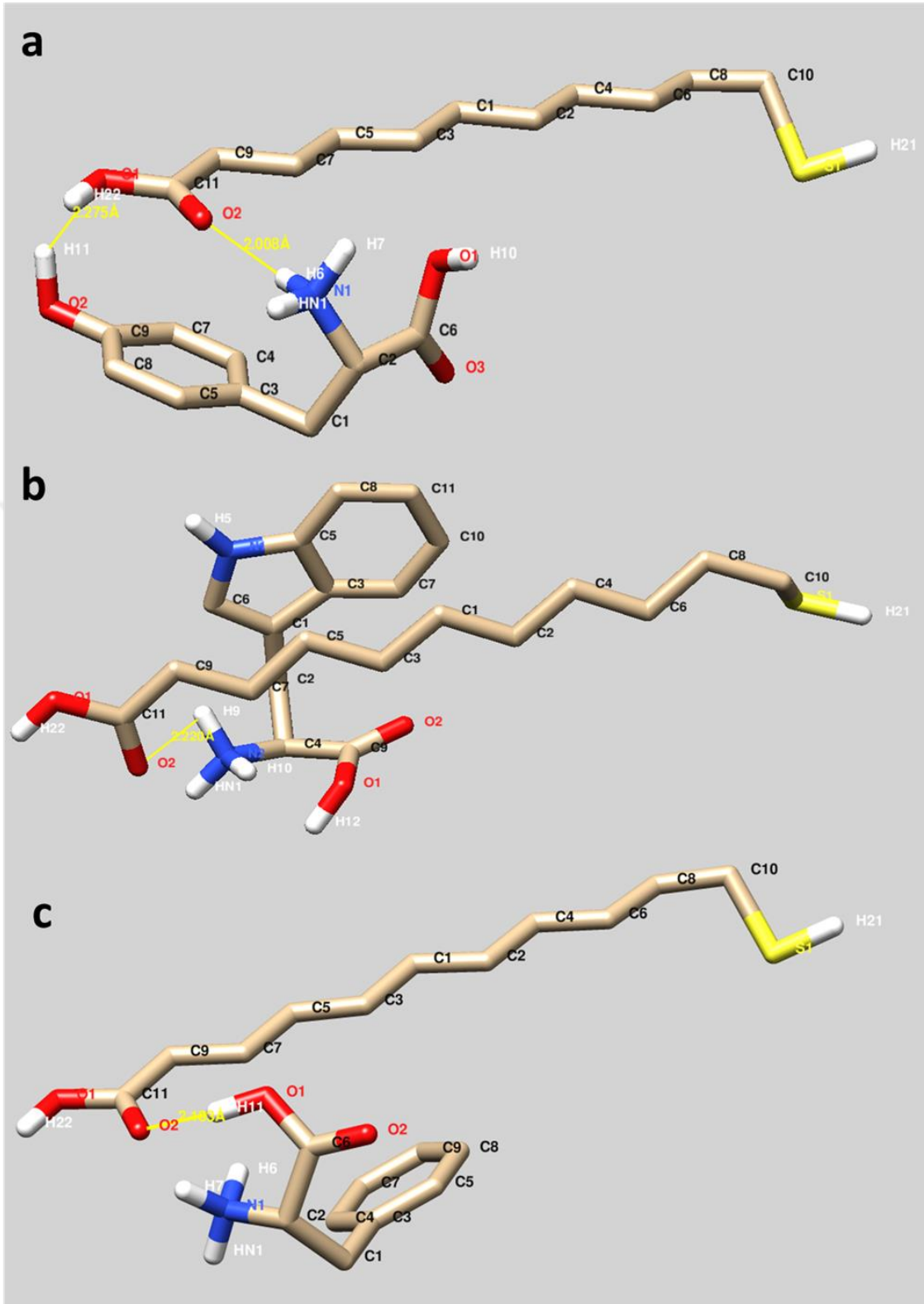


Şekil 4.1. 11-MUA (a), Tyr (b), Trp (c), Phe (d), Equ (e), Estriol (f), Estron (g) ve 17 β -estradiolün (h) 3 boyutlu moleküler yapıları.

4.1.1. 11-MUA ve Amino Asit Moleküler Modelleme Çalışmaları

11-MUA ve Tyr, Trp ve Phe'nin kenetlenmesi ile elde edilen konformasyon küme analizinde, farklı konformasyonların elde edildiği kümelerin sayısı 10 etkileşim sayısında (run) sırasıyla 3, 6 ve 3 olarak bulunmuştur. Yapısal olarak benzer kümeler artan enerji sırasına göre sıralanmıştır. Amino asitler 11-MUA ile etkileşime girdiğinde, bağlanma enerjisi açığa çıkmaktadır. Kümeleme histogramına göre 11-MUA ile Tyr, Trp ve Phe arasındaki en düşük bağlanma enerjileri sırasıyla -1.65, -2.08, -1.99 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan serbest bağlanma enerjisi ne kadar büyük olursa, bağlanma afinitesi o kadar büyük olmaktadır. Moleküler kenetleme sonuçlarına ek olarak, 11-MUA ve Tyr, Trp ve Phe'nin istatistiksel mekanik analizindeki serbest enerjiler, 298.15 K'de sırasıyla -1365.63, -1365.68 ve -1366.00 kcal/mol olarak hesaplanmıştır, bu da 11-MUA ve amino asitler enerji açısından bağlanmayı doğrulamaktadır (Çizelge 4.1).

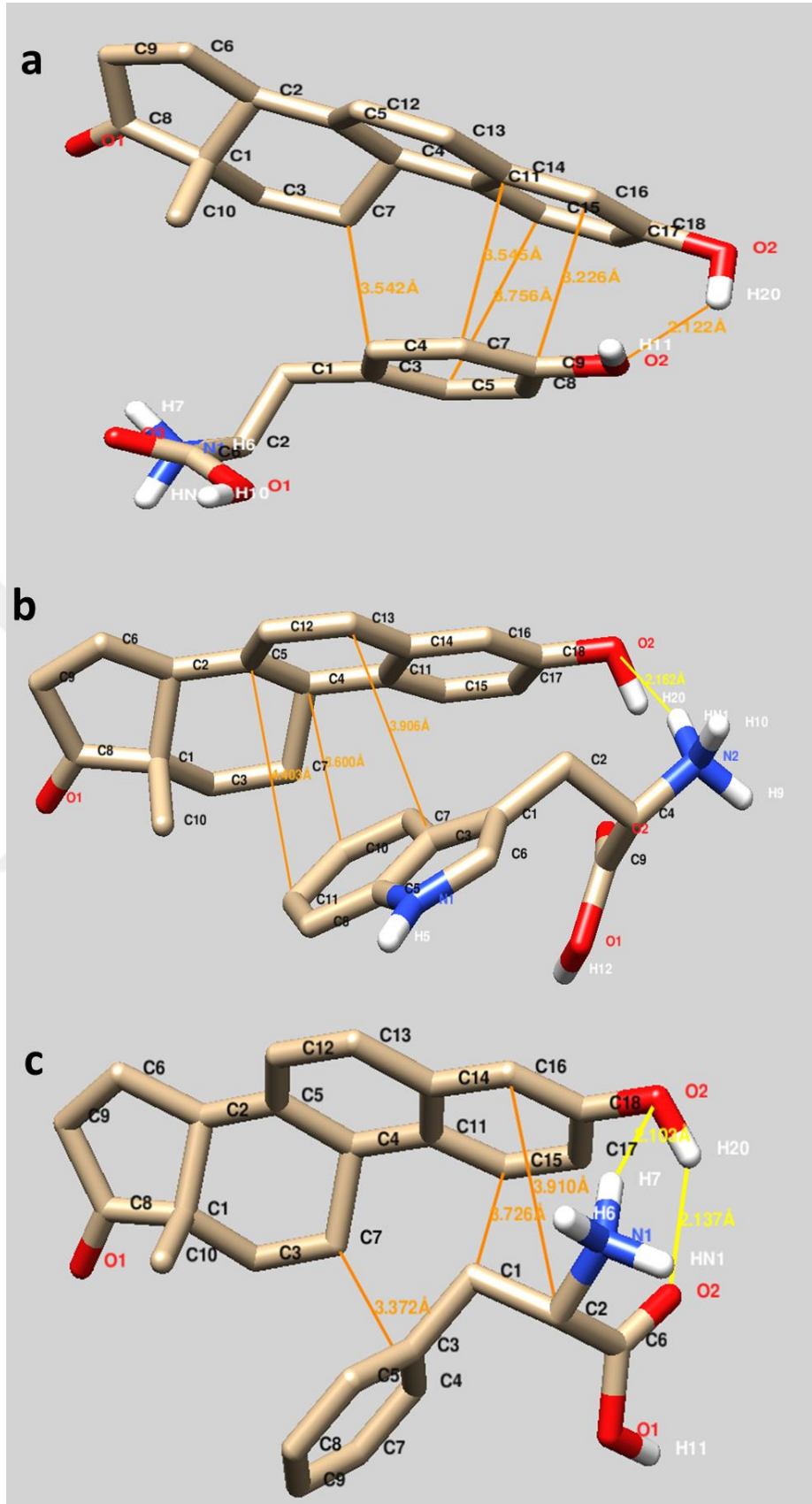
11-MUA'nın Tyr, Trp ve Phe'ye bağlanma modları Şekil 4.2'de görülmektedir. 11-MUA ve üç farklı amino asit arasındaki etkileşimler, esas olarak hidrojen bağında (sarı çizgiler) meydana gelmiştir. Bilindiği gibi hidrojen bağları biyolojik koşullar altında kolay ve hızlı bir şekilde oluşturulup kırıldıkları için zayıf bağlar kategorisindedir. Amino asitlerin 11-MUA molekülünü karboksil ucundan bağlama eğiliminde olduğu da görülmüştür. 11-MUA ve Tyr arasındaki etkileşimler; 11-MUA'nın O1 ve O2'si ile Tyr'nin fenil kalıntısının hidroksil grubu (O2-H11) ve amin grubunun hidrojen atomu (H6) arasında meydana gelmektedir (Şekil 4.2a). Ayrıca, Şekil 4.2b ve 4.2c'de, 11-MUA molekülünün alkil zincirinde yönlendirilen Trp (indol) ve Phe'nin (fenil) hidrofobik kalıntılarının sebep olduğu hidrofobik etkileşimlerin de bağlanmaya katkıda bulunabileceği görülmüştür.



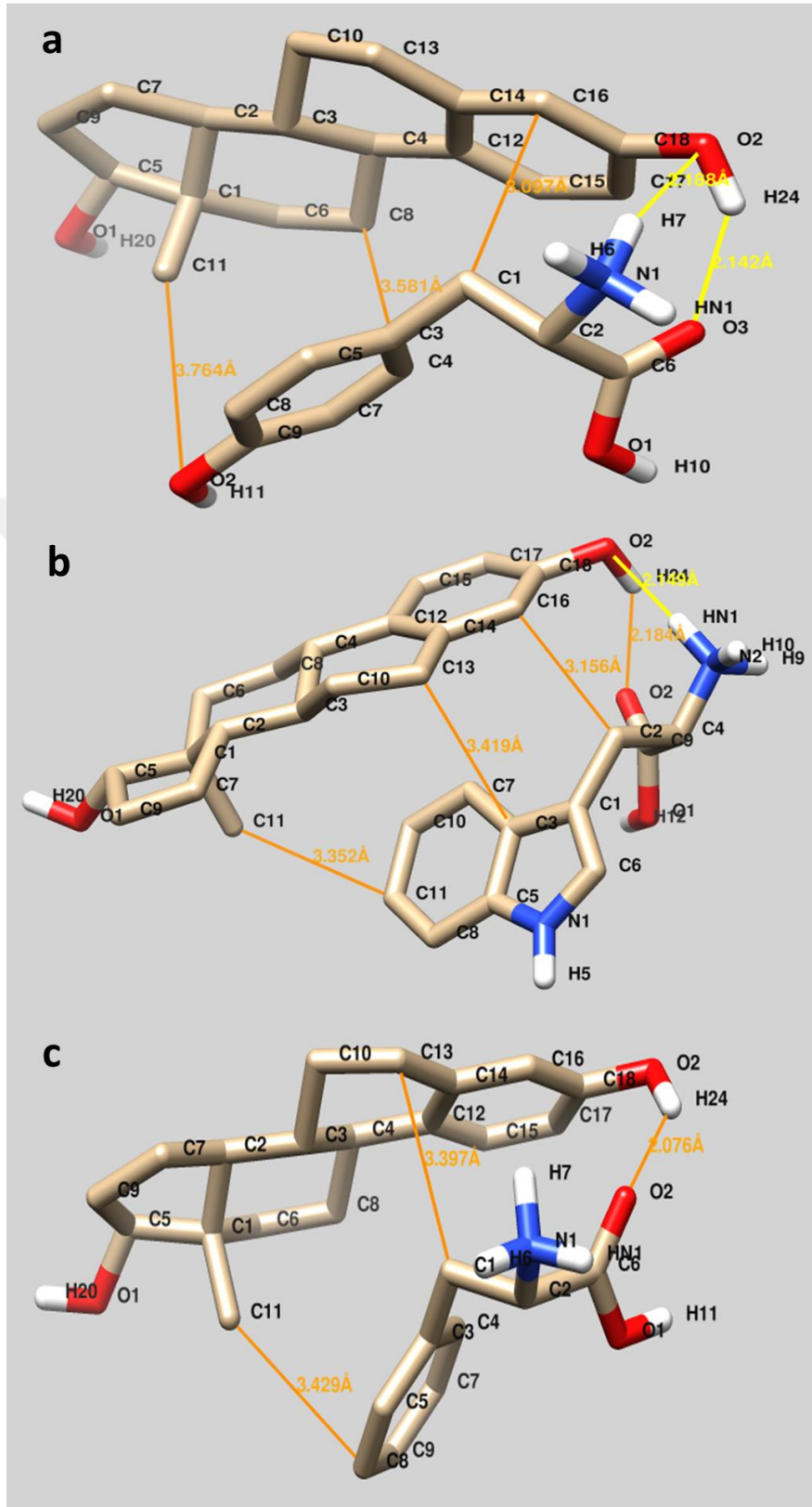
Şekil 4.2. 11-MUA'nın üç farklı amino asit Tyr (a), Trp (b) ve Phe (c) ile moleküler modellemesi.

4.1.2. Östrojenik Hormonlar ile Amino Asit Etkileşimlerinin Moleküler Modellemesi

Equ ve üç farklı amino asidin (Tyr, Trp ve Phe) konformasyonel kümeleme analizine göre, bir kök-ortalama-kare sapma (Root-Mean-Square Deviation, RMSD) 2.0 Å toleransı kullanılarak 10 etkileşim sayısında (run) farklı konformasyonel kümelerin sayısı sırasıyla 2, 3 ve 1 olarak bulunmuştur. Kümeleme histogramında Equ ve Tyr, Trp ve Phe arasındaki en düşük bağlanma enerjileri sırasıyla -2.90, -2.57, -2.76 kcal/mol olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Equ ve Tyr, Trp ve Phe'nin en düşük bağlanma enerjileri, 11-MUA ve amino asit etkileşimlerinden daha düşük olarak hesaplanmıştır. Bağlanma enerjisi ne kadar düşükse, etkileşim o kadar kararlı olmaktadır. Bu durum Equ'nin amino asitlere bağlanma afinitesi, 11-MUA etkileşimlerinden daha yüksek olmasıyla doğrulanmıştır. Ayrıca Tyr için yüksek afiniteli en düşük bağlanma enerjisi -2.90 kcal/mol olarak tahmin edilmiştir ki bu deneysel bağlanma sabitleri ile uyumludur. Bu bulgu, amino asitlerin (Tyr, Trp ve Phe) Equ molekülleri tarafından kolayca tutunup sensör yüzeyinden uzaklaştırılmasını desteklemektedir. Ayrıca, Equ'nin Tyr, Trp ve Phe'ye göre istatistiksel mekanik analizinde elde edilen serbest enerjiler, 298.15 K'de sırasıyla -1367.10, -1366.73 ve -1367.00 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Equ ve Tyr, Trp ve Phe arasındaki etkileşimlerin de enerjisel anlamda kendiliğinden olduğu Çizelge 4.1'de görülmektedir. Equ'in amino asit ile daha güçlü etkileşimi, kuvars kristaline daha zayıf bağlarla bağlanan amino asidin yüzeyden kolayca ayrılacağı ve QCM sinyalinde negatif bir frekans değişikliği ile sonuçlanacağı bir göstergesidir. Moleküler modelleme çalışmalarından elde edilen moleküller arası mesafeler, amino asit ve Equ arasında pi-pi yığının etkileşimleri olduğunu kanıtlamıştır. Amino asitlerin Equ ile etkileşiminden elde edilen serbest bağlanma enerjileri incelendiğinde, Tyr ile etkileşimin en düşük bağlanma enerjisine sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1). Çizelge 4.1 teorik olarak üç farklı amino aside göre 11-MUA ve östrojenik hormonların en düşük bağlanma enerjilerini ve serbest enerjilerini özetlemektedir.



Şekil 4.3. Equilinin, Tyr (a), Trp (b) ve Phe (c) amino asitlerine moleküler kenetlenmesi.



Şekil 4.4. 17β-Estradiolün Tyr (a), Trp (b) ve Phe (c) amino asitlerine moleküler kenetlenmesi.

Equ'nin üç farklı amino aside (Tyr, Trp ve Phe) bağlanma bölgeleri Şekil 4.3'te görülmektedir. Equ ve Tyr, Trp ve Phe arasındaki etkileşimler esas olarak hidrofobik etkileşimlerden (turuncu çizgiler) meydana gelmiştir. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi, Tyr (fenil halkası, Şekil 4.3a), Trp (indol grubu, Şekil 4.3b) ve Phe'nin (fenil kalıntısı, Şekil 4.3c) hidrofobik kalıntıları, hidrofobik etkileşimlerin olabileceği Equ halka sisteminde yönlendirilerek bağlamaya da katkıda bulunmaktadır. Ayrıca Tyr'in fenol grubundan Equ ile etkileşimi, aralarında hidrofobik etkileşimlerin olduğunu kanıtlamaktadır. Bir aromatik fenol yan zincirinin -OH kısmı Tyr'ı kısmen hidrofilik yapsa da, fenol grubu üzerindeki benzen halkası onu hidrofobik yapmaktadır. Hidrofobik etkileşimlerin diğer zayıf etkileşimlerden (Van der Waals, elektrostatik vb.) daha güçlü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, tüm bu bilgiler Tyr ve Equ (diğerlerine kıyasla) arasındaki düşük bağlanma enerjisi ve Gibbs serbest enerji değerini açıklamaktadır [150]. Hem Trp hem de Phe, H₂ bağı yoluyla Equ ile etkileşime girmektedir. Tyr'den farklı olarak, Trp ve Phe, aromatik halkalardan değil, amin ve karboksil gruplarından Equ ile etkileşime girmiştir. Hem hidrojen bağlarının uzunluklarından hem de moleküller arası uzaklıklarından Trp ve Phe'nin Equ ile etkileşimlerinin Van der Waals zayıf etkileşimleri ile gerçekleştiği görülmektedir. Serbest bağlanma enerjisi enerjisi değerleri dikkate alındığında Equ ve Trp ile Phe arasındaki etkileşimin gücü Tyr'den daha zayıf olduğu görülmüştür. Benzer şekilde Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6 incelendiğinde 17β-Estradiol, Estron ve Estradiolün Tyr, Trp ve Phe amino asitleri ile etkileşimlerinde hidrojen bağları (sarı çizgiler) ve hidrofobik etkileşimlerin (turuncu çizgiler) etkili olduğu görülmektedir. Amino asitlerle ile östrojenik hormonların etkileşimlerine bakıldığında, hormonların halka sistemlerine Tyr'nin fenol grubu, Trp'nin indol grubu ve Phe'nin fenil halkasından yönelmeleri ile gerçekleştiği görülmektedir.

Çizelge 4.1. Tyr, Trp ve Phe ile 11-MUA ve Equ'nin modellemeleri ile elde edilen en düşük bağlanma enerjisi ve serbest enerji sonuçları.

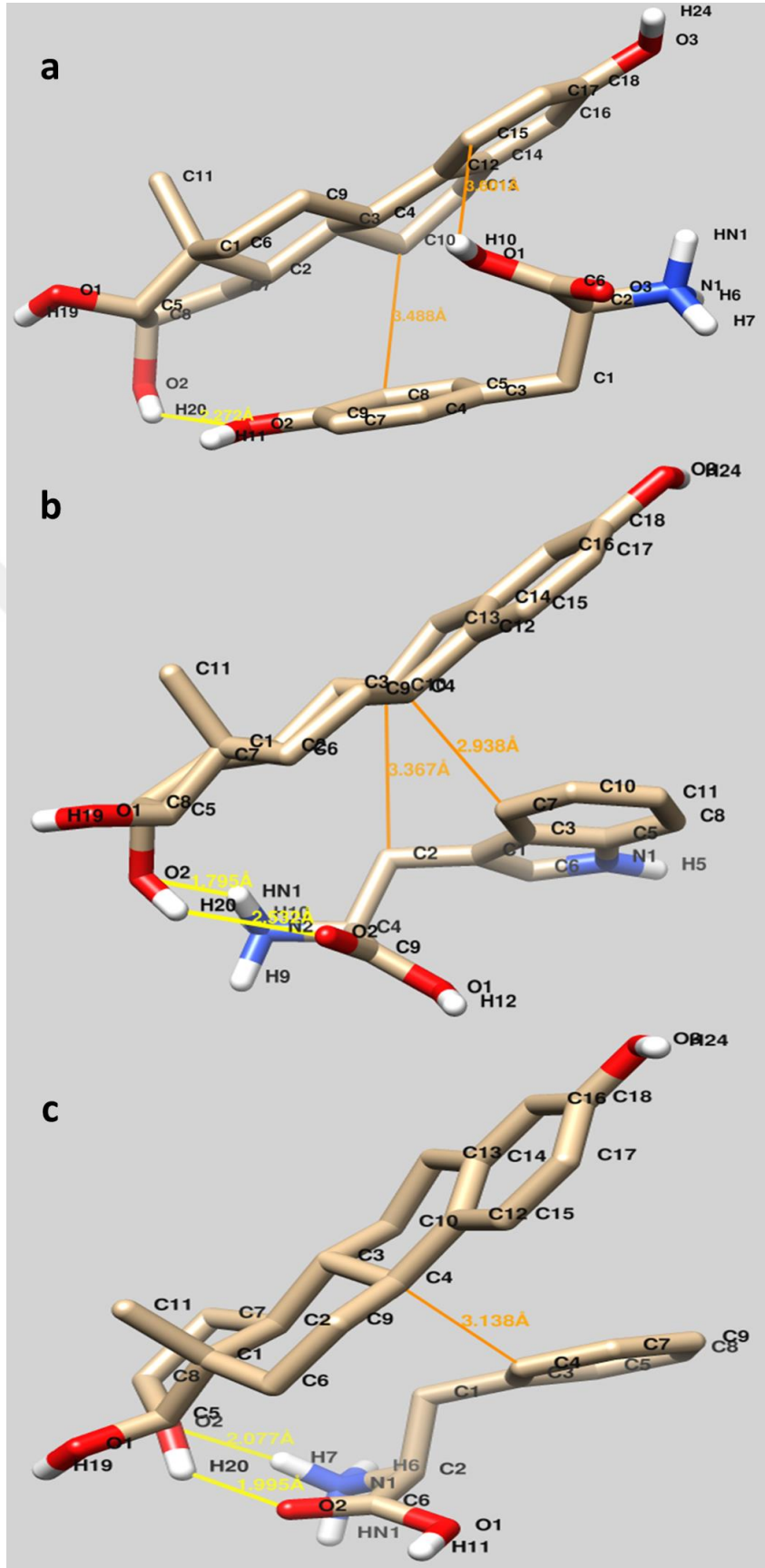
	Tyr		Trp		Phe	
	Minimum Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Serbest Bağlanma Enerjisi (298.15 K) (kcal/mol)	Minimum Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Serbest Bağlanma Enerjisi (298.15 K) (kcal/mol)	Minimum Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Serbest Bağlanma Enerjisi (298.15 K) (kcal/mol)
11-MUA	-1.65	-1365.63	-2.08	-1365.68	-1.99	-1366.00
Equilin	-2.90	-1367.10	-2.57	-1366.73	-2.76	-1367.00
17β-Estradiol	-2.57	-1366.76	-2.62	-1366.73	-2.35	-1366.47
Estriol	-2.23	-1366.50	-1.96	-1366.11	-2.23	-1366.46
Estron	2.79	-1366.92	-2.44	-1367.01	-2.89	-1367.12

Amino asitlerle östrojenik hormonların kenetlenmiş modellerine göre moleküller arası mesafeler Çizelge 4.2'de özetlenmiştir. Hormonlar ile amino asitler arasında hidrojen bağları ve mesafeler sırasıyla sarı ve turuncu renkli çizgilerle Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6'de görülmektedir. Bu etkileşimlerin moleküllerin hangi grup, halka ve atomları arasında olduğu ise Çizelge 4.2'de detaylıca verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü üzere amino asitlerin hidrofobik kısımları östrojenik hormonların halkasal yapılarına yönelenerek hidrofobik etkileşimlere sebep olmuşlardır.

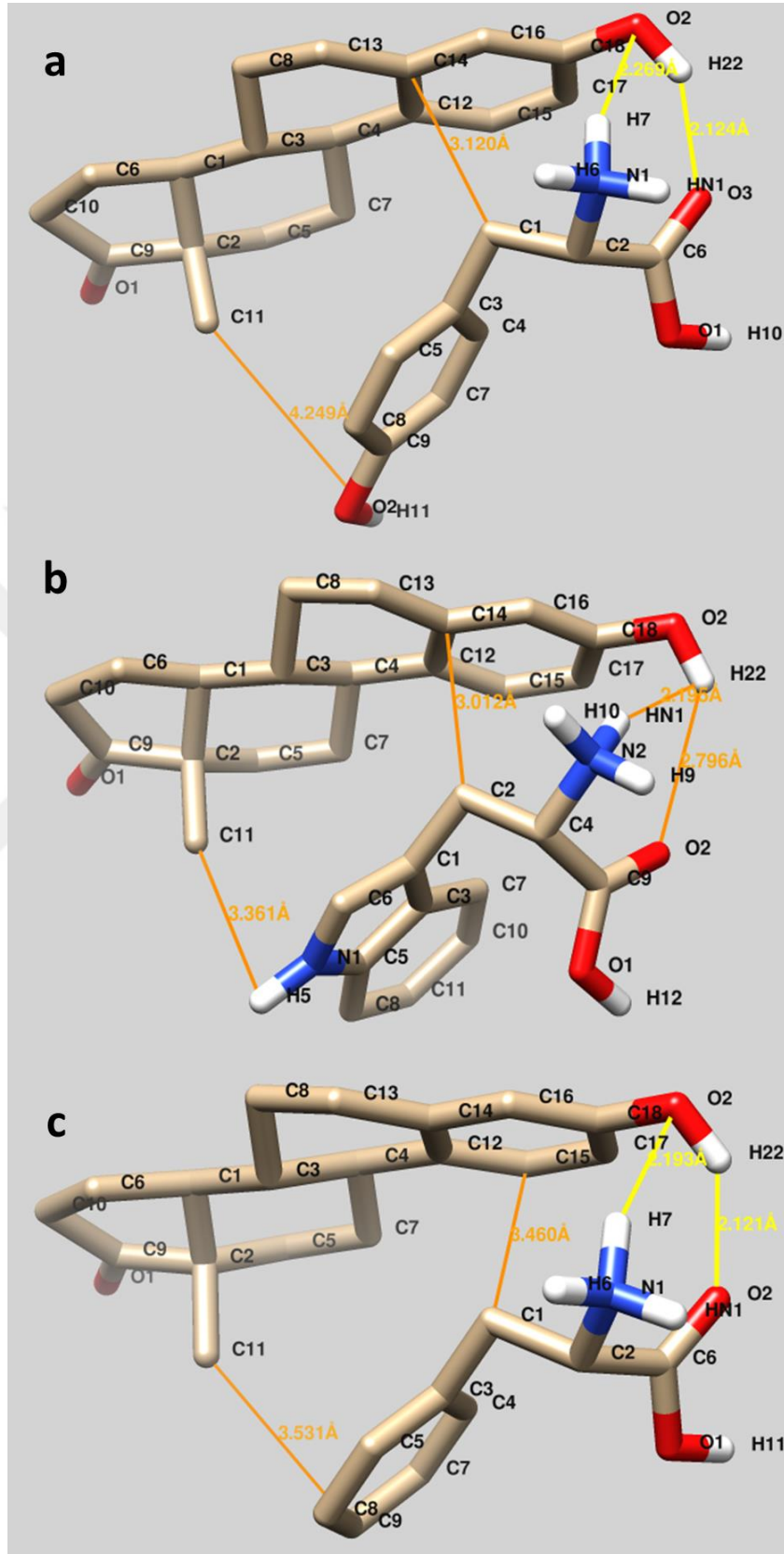
Çizelge 4.2. Aminoasitler ile hormonların etkileşimlerine ait mesafe ve etkileşim türü bilgileri.

	Tirozin		Triptofan		Fenilalanin	
	H-Bağı	Hidrofobik Etkileşimler	H-Bağı	Hidrofobik Etkileşimler	H-Bağı	Hidrofobik Etkileşimler
Equilin	2.122 Å Tyr-C9 ve Equ-C18 H2O	3.226 Å ve 3.542 Å Tyr-fenil halkası ve Equ halka yapısı	2.162 Å Trp-C4 H2O ve Equ-C18 O2	3.906 Å ve 3.600 Å Trp-indol grubu ve Equ halka yapısı	2.103 Å Phe-C6 O2 ile Equ-C18 H2O ve 2.137 Å Phe-C2	3.910 Å ve 3.372 Å Phe-fenil halkası ve Equ halka yapısı

					H7 ile Equ-C18 O2	
17β-Estradiol	2.142 Å ve 2.188 Å Tyr-C6 O3 ile estradiol C18 H24 ve Tyr-C2 H7 ile estradiol C18 O2	2.097 Å ve 3.581 Å Tyr-fenil halkası ve estradiol halka yapısı	2.149 Å Trp-C4 HN1 ve estradiol- C18 O2	2.184 Å ve 3.419 Å Trp-indol grubu ve estradiol halka yapısı	2.076 Å Phe-C6 O2 ve estradiol- C18 H24	3.397 Å ve 3.429 Å Phe-fenil halkası ve estradiol halka yapısı
Estriol	2.272 Å Tyr-C9 O2 ve estriol-C8 H20	3.488 Å ve 3.601 Å Tyr-fenil halkası ve estriol halka yapısı	1.795 Å Trp-C4 HN1 ile estriol-C8 O2 ve 2.532 Å Trp-C9 O2 ile estriol-C8 H20	3.367 Å ve 2.938 Å Trp- indol grubu ve estriol halka yapısı	1.995 Å Phe-C6 O2 ile estriol-C5 H20 ve 2.077 Å Phe-C2 H7 ile estriol-C5 O2	3.138 Å Phe- fenil halkası ve estriol halka yapısı
Estron	2.124 Å Tyr-C6 HN1 ile estron- C18 H22 ve 2.269 Å Tyr-C2 H7 ile estron- C18 O2	2.543 Å Tyr-fenil halkası ve estron halka yapısı	2.796 Å Trp-C9 O2 ve estron- C18 H22	3.361 Å ve 3.012 Å Trp-indol grubu ve estron halka yapısı	2.121 Å Phe-C6 O2 ile estron- C18 H22 ve 2.193 Å estron- C2 H7 ile estron- C18 O2	3.460 Å ve 3.531 Å Phe- fenil halkası ve estron halka yapısı



Şekil 4.5. Estriolün Tyr (a), Trp (b) ve Phe (c) amino asitlerine moleküler kenetlenmesi.



Şekil 4.6. Estronun Tyr (a), Trp (b) ve Phe (c) amino asitlerine moleküler kenetlenmesi.

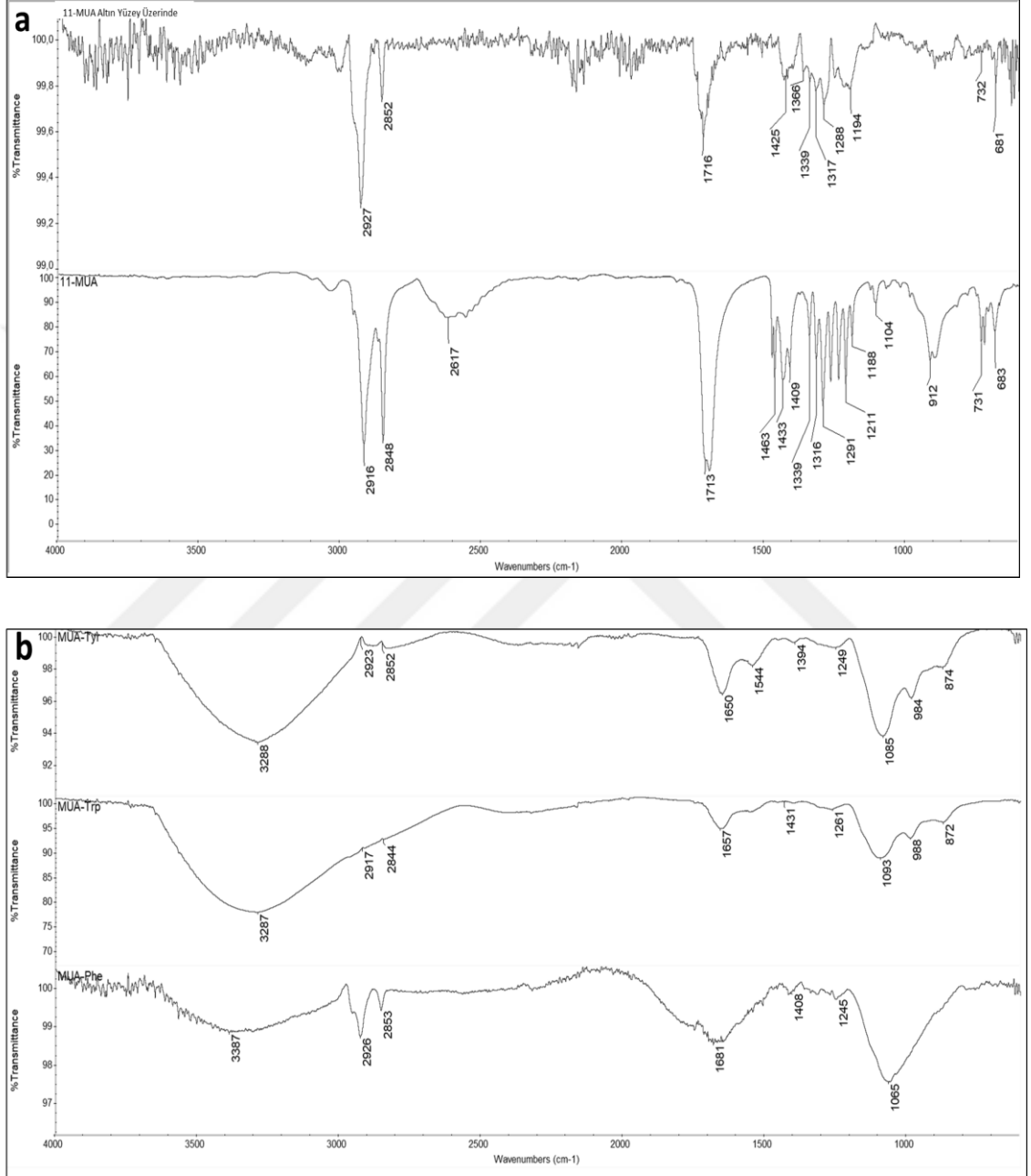
4.2. QCM Nanosensörün Karakterizasyonu

Altın kaplı kuvars kristal QCM sensör yüzeyleri piranha çözeltisi (konsantre sülfürik asit (H_2SO_4) ve %30 hidrojen peroksit (H_2O_2) (3:1, v/v) karışımı) ile temizlendikten sonra 11-MUA ile SAM modifiye edilmişlerdir. 11-MUA üzeri amino asitlerle etkileştirilerek hazırlanan QCM nanosensör yüzeyler sırasıyla yüzey kimyasını ve yüzey ıslanabilirliğini belirlemek için FTIR ve sabit damla temas açısı (CA) ile karakterize edilmişlerdir. 11-MUA modifiye kuvars kristali ve amino asit kaplı kuvars kristallerinin karşılaştırmalı FTIR spektrumları Şekil 4.7'de verilmiştir.

Buna göre, 11-MUA'nın 2617 cm^{-1} 'inde zayıf geniş bir tepe olarak ayırt edici tiyol grubu (-SH), modifiye kuvars kristalinde -SH'nin kovalent bağlanması ve altın yüzeyine Au-S bağı oluşturması nedeniyle kaybolduğu görülmektedir. Ayrıca 11-MUA'nın -COOH grubundan kaynaklanan karboksil gerilmesi ($C=O$ gerilmesi) (en üst spektrum) 1716 cm^{-1} dalga boyunda görülmektedir. 11-MUA'nın 1716 cm^{-1} 'deki karboksil pikinin ($C=O$) yoğunluğu, amino asitler 11-MUA ile modifiye edilmiş yüzeye eklendiğinde azalmış ve pik genişlemiştir. Amino asitlerin 11-MUA'ya tutunması sayesinde yaklaşık 3 cm^{-1} dalga boyu kadarlık (1713 cm^{-1} 'den 1716 cm^{-1} 'e) hafif bir kayma da gözlenmiştir. Bu durum, 11-MUA moleküllerinin tiyol (-SH) gruplarından altın kuvars kristal yüzeyine bağlandığını doğrulamaktadır. Ek olarak, 11-MUA modifiye kuvars kristalinin FTIR spektrumunda 1716 cm^{-1} 'de keskin bir bant, sensör yüzeyinde karbonil gerilmesinin ($C=O$ gerilmesi) olduğunu kanıtlamaktadır. Diğer bir deyişle, amino asitlerin modifikasyonuna izin veren karboksil (-COOH) grupları sensör yüzeyinde serbest halde olduğunu göstermektedir.

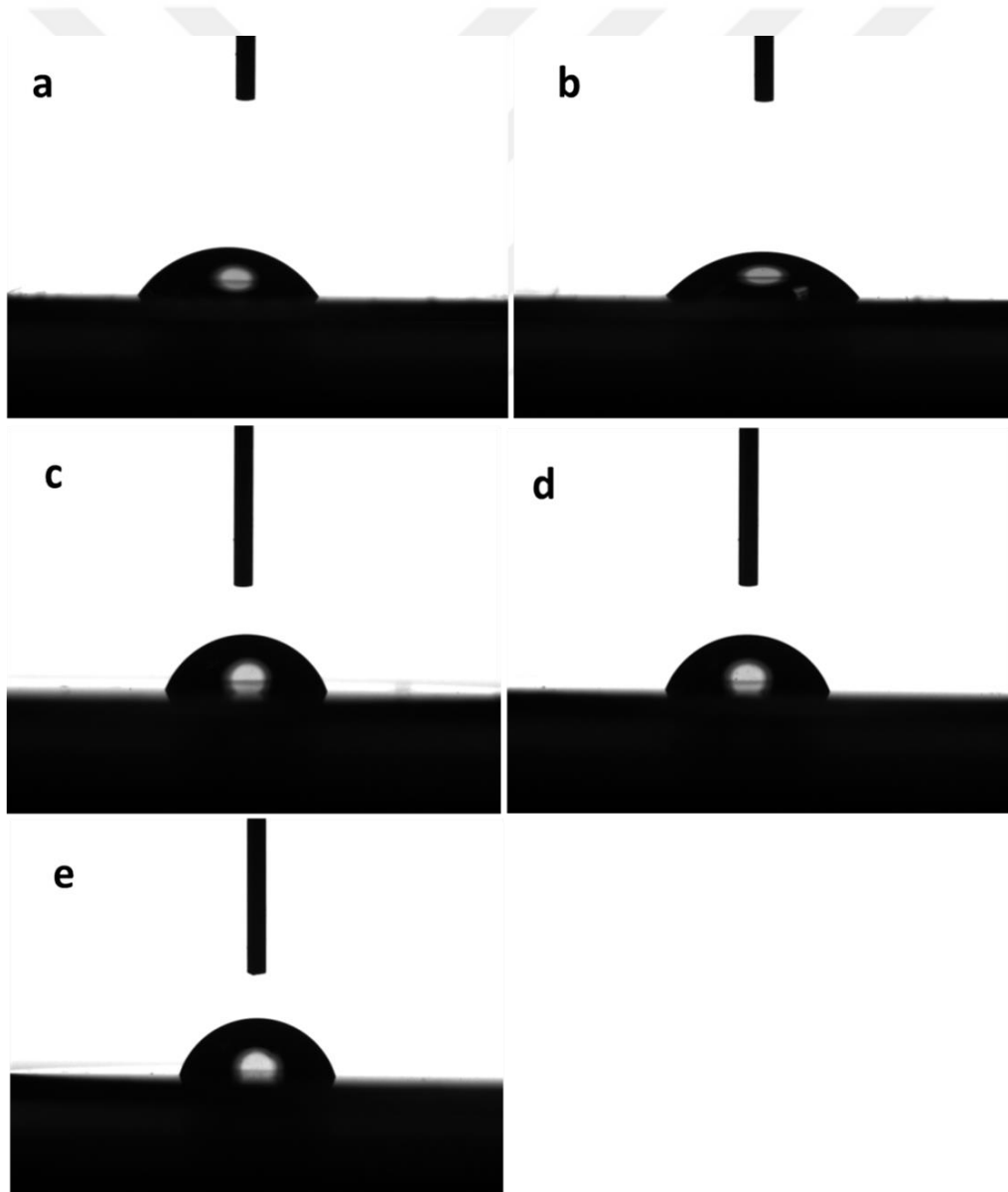
Ayrıca, amino asitlerin 1650 cm^{-1} dalga boyu civarındaki karakteristik amid piki ve yaklaşık 3250 cm^{-1} 'deki hidroksil (OH) gruplarına ait pikler, amino asitlerin 11-MUA modifiye edilmiş yüzeye eklenmesinden sonra ortaya çıkmıştır. 1716 cm^{-1} 'de 11-MUA'nın karbonil bandının ($C=O$) yoğunluğu, amino asitlerin 11-MUA ile modifiye edilmiş yüzeye eklenmesi ile örtülmüştür (Şekil 4.7b). Moleküler yerleştirme çalışmalarının sonuçlarından da görüleceği gibi (Şekil 4.2) amino asitler -COOH grubundan 11-MUA ile etkileşime girmiştir. Bu durum, sensör

yüzeyindeki serbest karboksil gruplarının amino asitlerle kaplandığını doğrulamaktadır. Ayrıca, amino asitlerin 11-MUA modifiye edilmiş yüzeye bağlanmasından sonra, yaklaşık 1650 cm^{-1} 'de amino asitlerin karakteristik amid bandı ve $3550\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ civarında hidroksil (OH) grupları ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.7. Altın kaplı yüzeye modifiye edilmiş 11-MUA (a-üst), çözelti ortamındaki 11-MUA (a-alt) ve 11-MUA-Tyr, 11-MUA Trp ve 11-MUA-Phe (b-yukarıdan aşağıya) ile yüzeyi modifiye edilmiş QCM nanosensörünün FTIR spektrumları.

Yalın halindeki altın kaplı kuartz kristal sensör yüzey ile SAM 11-MUA modifiyeli, Tyr, Trp ve Phe ile etkileştirilmiş QCM sensör yüzeylerin su temas açısı ölçüm görüntüleri Şekil 4.8'de görülmektedir. Ayrıca su temas açısı değerleri sırasıyla 59.87 ± 1.63 , 55.28 ± 3.80 , 74.89 ± 2.27 , 76.27 ± 0.96 ve 80.67 ± 1.28 teta (θ) olarak Çizelge 4.3' te verilmiştir. Literatürde, Diferansiyel tarama kalorimetrisi (Differential scanning calorimetry, DSC) verileri Trp'nin en hidrofobik amino asit kalıntılarına sahip olduğunu, Phe'nin ise geçiş ısısı temelinde en hidrofobik ikinci amino asit olduğunu göstermiştir. Tyr için fenolik ve fenoksit anyonik durumları arasında önemli farklılıklar gözlenmektedir. Tyr'in protonlandığı pH 7'de, hem triptofan hem de fenilalanin'den daha az hidrofobik olmaktadır [151].



Şekil 4.8. Yalın QCM nanosensör yüzey (a) 11-MUA modifiyeli (b), Tyr (c), Trp (d) ve Phe (e) adsorplanmış QCM nanosensör yüzeylerin su temas açısı görüntüleri.

Temas açısı ölçüm sonuçlarının pH 7'de Tyr, Trp ve Phe'nin hidrofobiklik indeks değerleri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Tyr, Trp ve Phe için hidrofobiklik indeks değerleri sırasıyla 63, 97 ve 100'dür [152]. Bu değerler amino asitlerle etkileşmiş QCM yüzeylerinin, çıplak yüzeyden daha hidrofobik hale getirdiğinin kanıtıdır. Tyr-11-MUA ve Trp-11-MUA'nın temas açısı değerleri, hidrofobisite indeksi ile uyumlu olmayan bir şekilde birbirine yakın çıkmıştır. Bu durum, Şekil 4.3a'da verilen modelleme sonucuna göre, Tyr'nin hidrofobikliğini değiştirebilen fenil hidroksit (OH) grubu aracılığıyla 11-MUA'ya yönelmesi ile meydana gelmiştir. Sonuç olarak 11-MUA, Tyr, Trp ve Phe modifikasyonları ile artan temas açısı değerleri yüzeyin hidrofobikliğini kanıtlamaktadır.

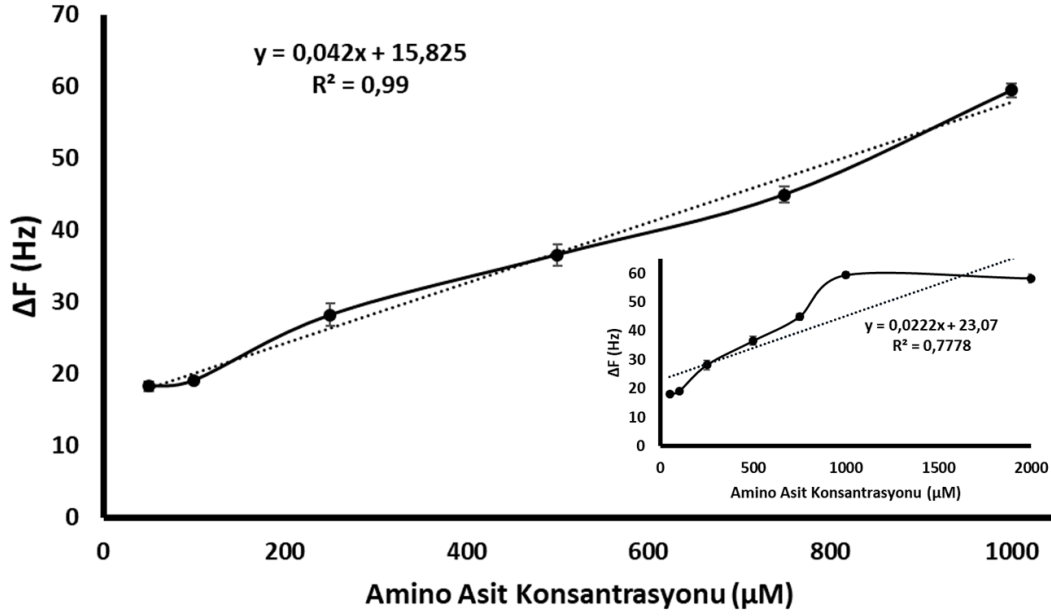
Çizelge 4.3. Yalın ve Modifiye QCM Yüzeylerinin Temas Açısı Ölçümleri.

	Altın Kaplı Yalın QCM Sensor (θ)	SAM 11- MUA Kaplı QCM Nanosensör (θ)	Tyr Modifiye QCM Nanosensör (θ)	Trp Modifiye QCM Nanosensör (θ)	Phe Modifiye QCM Nanosensör (θ)
Temas Açısı	59.87±1.63	55.28±3.80	74.89±2.27	76.27±0.96	80.67±1.28

4.3. Amino Asit Konsantrasyon Taraması

Amino asit başlangıç konsantrasyonunun etkisi, SAM 11-MUA modifiye QCM nanosensörü kullanılarak 50 µM–2000 µM aralığındaki farklı amino asit konsantrasyonları ile tespit edilmiştir. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, nanosensör rezonans frekansındaki değişim, artan konsantrasyona karşı doğrusal olarak 1000 µM'a kadar artmıştır. 2000 µM'lık bir konsantrasyonda elde edilen frekans değişikliğinin 1000 µM'dakine yakın olduğu gözlenmiştir (doğrusal çizgi platoya ulaştı). Bu nedenle, tüm QCM deneylerinde amino asit konsantrasyonu 1000 µM'da (1 mM) tutulmuştur. Amino asit türünün önemli bir fark yaratmadığı

kimyasal olarak benzer davranışlar gösterdiği bilindiğinden model amino asit olarak Phe kullanılmıştır.

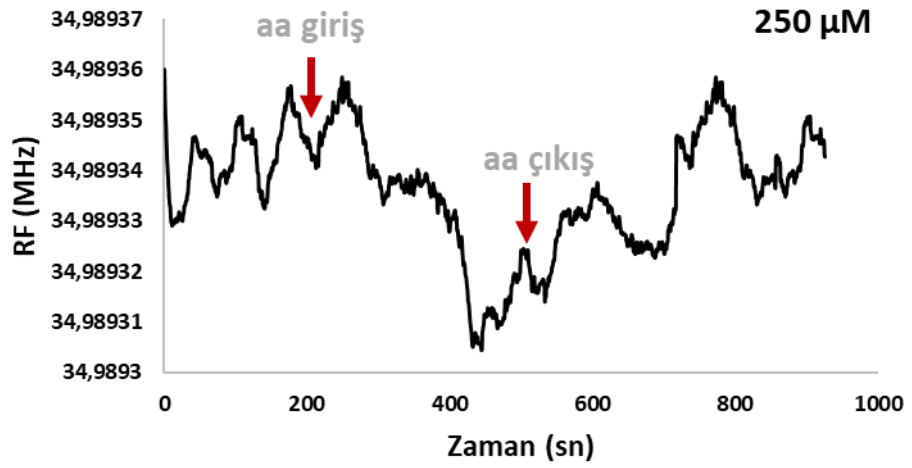
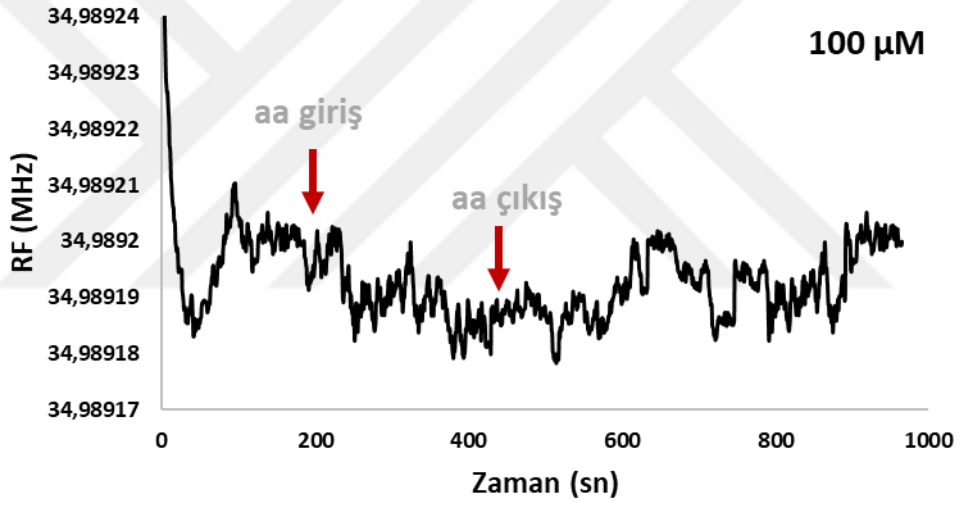
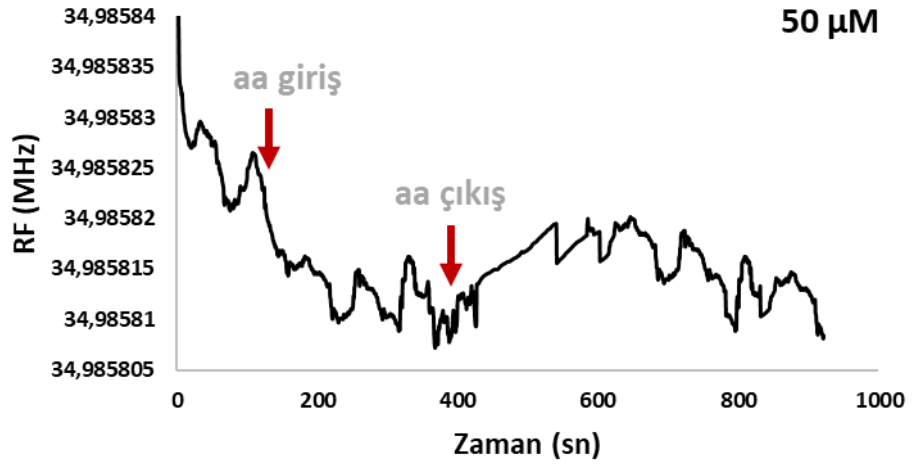


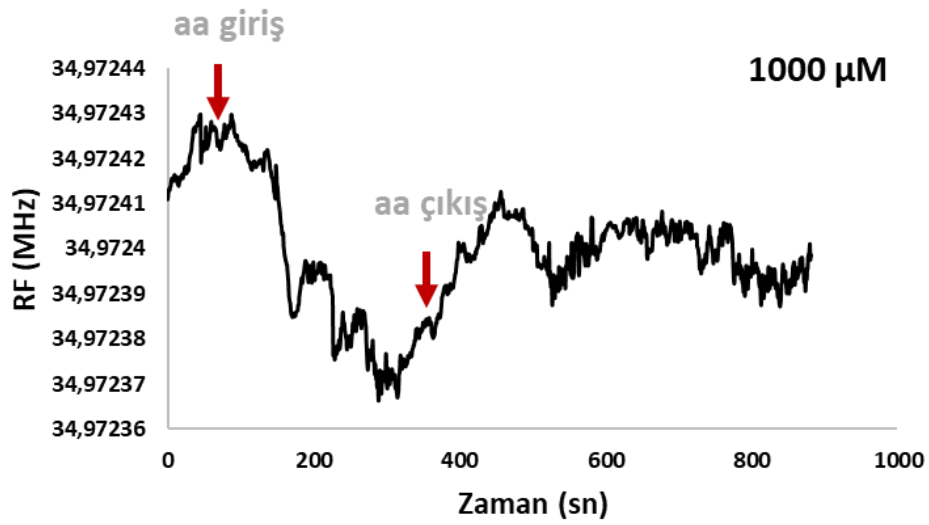
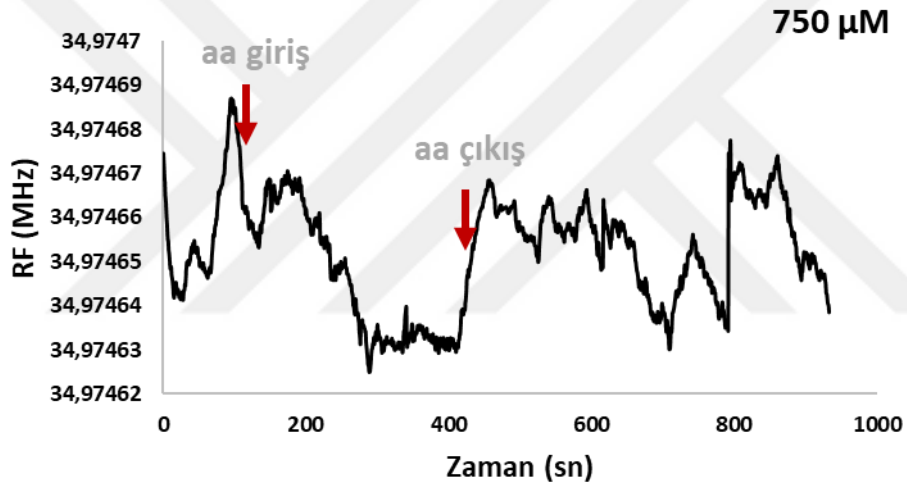
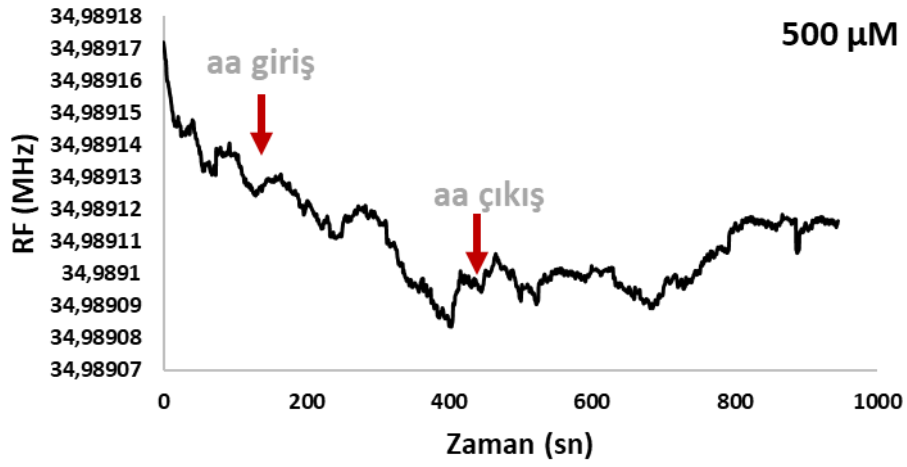
Şekil 4.9. Amino asit (Phe) başlangıç konsantrasyonunun SAM 11-MUA modifiye QCM nanosensörde rezonans frekansında meydana getirdiği değişim;
T:20 °C, pH: 7

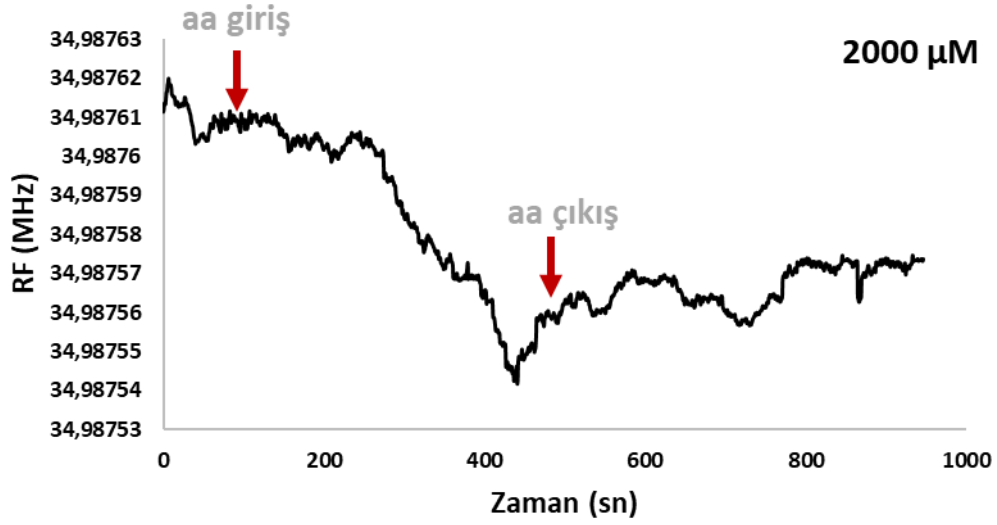
Çizelge 4.4. QCM nanosensörde farklı amino asit konsantrasyonları ile meydana gelen rezonans frekans değişimleri (Hz)

Phe Konsantrasyonu	50 μM	100 μM	250 μM	500 μM	750 μM	1000 μM	2000 μM
ΔF (Hz)	18.22±0.69	19.03±0.17	28.15±1.57	36.55±1.52	44.92±1.12	59.43±0.97	58.27±1.51

Şekil 4.10'da, QCM nanosensöründe sırasıyla 50, 100, 250, 500, 750 1000 ve 2000 μM konsantrasyonlarındaki başlangıç amino asit çözeltisi ile muamelesi sonucu meydana gelen rezonans frekansı düşüşün gerçek zamanlı ölçümlerini göstermektedir. Amino asit konsantrasyonuna bağlı olarak meydana gelen frekans artış miktarları Çizelge 4.4'te görülmektedir.







Şekil 4.10. Farklı derişimlerdeki amino asit çözeltilerinin QCM nanosensör sensogramları.

4.3.1. Amino Asitlerin Denge İzoterm Modelleri

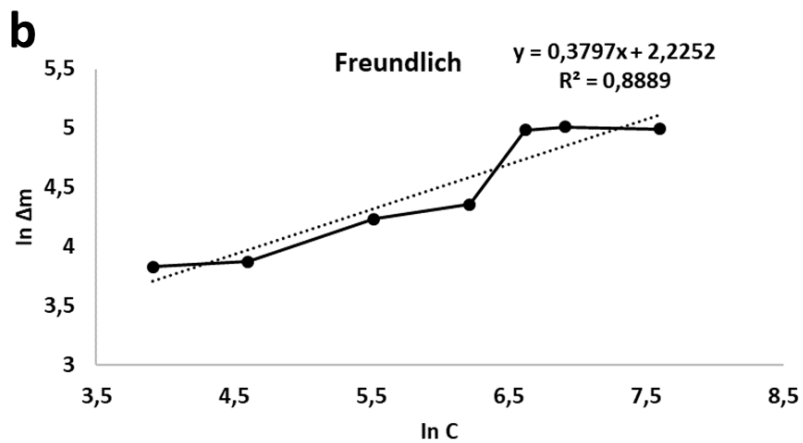
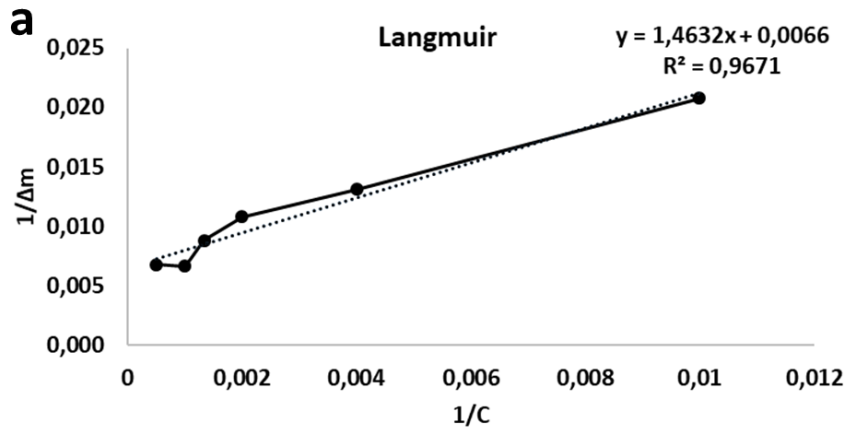
Langmuir izoterm modelinde sensör yüzeyinde adsorplanan analitin homojen şekilde tek tabakalı olarak adsorplandığı varsayılmaktadır (Şekil 4.11a). Sensör yüzeyindeki adsorpsiyon bölgelerinin hepsinin eş enerjide olduğu ve adsorplanan moleküller arasında etkileşim olmadığı varsayılmaktadır. Freundlich izoterm modelinde adsorpsiyonun heterojen şekilde yani tekli ve çoklu tabakalardan meydana geldiği varsayılmaktadır (Şekil 4.11b). Eşitlik 3-6 kullanılarak hesaplanan amino asitlerin izoterm modelleri Çizelge 4.5’de verilmiştir.

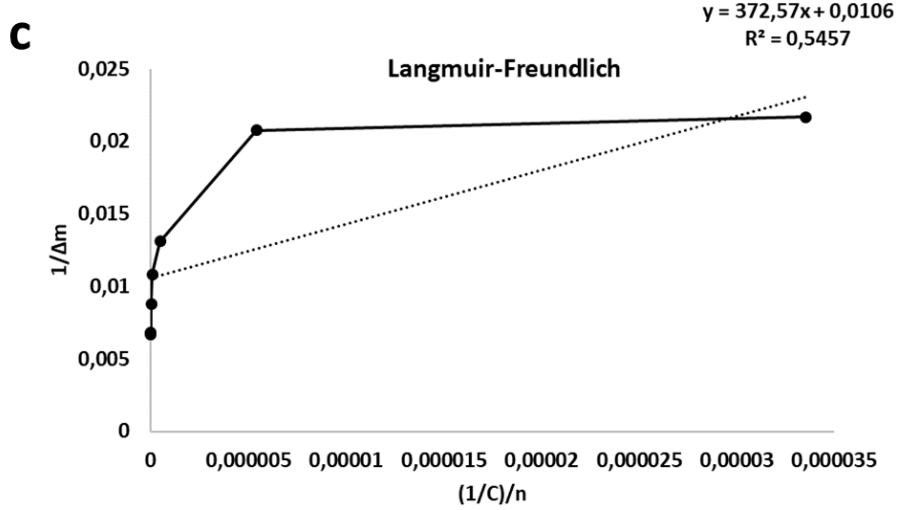
Çizelge 4.5. Amino asit 11-MUA adsorpsiyon izotermi.

Deneyisel		Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
Δm_{max} (ng/cm ²)	150.281	Δm_{max} (ng/cm ²)	151.515	Δm_{max} (ng/cm ²)	9.255	Δm_{max} (ng/cm ²)	94.339
R^2	0.9815	K_D (1/nM)	221.696	$1/n$	0.3797	$1/n$	0.3797

		K_A (nM)	0.0045	R^2	0.8889	K_D (1/nM)	35148.11
		R^2	0.9671			K_A (nM)	2,84E-05
						R^2	0.5457

11-MUA SAM modifiye edilmiş QCM sensör sistemine amino asit adsorpsiyonu Langmuir izoterm modeline uygun gerçekleşmiştir. Δm_{max} değerleri karşılaştırıldığında deneysel olarak elde ettiğimiz 150.281 ng/cm^2 değerine en yakın değer Langmuir izoterm modelinde hesaplanmıştır. Bu da amino asitlerin QCM nanosensör yüzeyine tek tabakalı ve homojen olarak tutunduğunun kanıtı olmuştur.

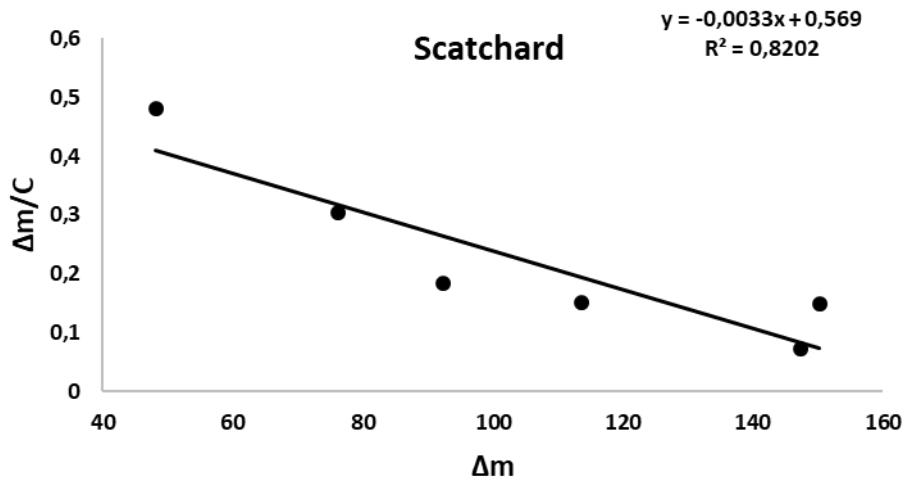




Şekil 4.11. QCM nanosensöre amino asit adsorpsiyonunun Langmuir (a), Freundlich (b) ve Langmuir-Freundlich (c) izoterm grafikleri.

4.3.2. Amino Asitlerin Denge ve Bağlanma Kinetik Analizleri

Amino asitlerin QCM nanosensöre adsorpsiyonundaki denge analizleri Scatchard izoterm hesaplamaları (Eşitlik 7-11) ile incelenmiştir. Scatchard analizi ile sensör yüzeyindeki amino asit adsorpsiyonu ile kapanan ve kapanmayan ligand değişim miktarı belirlenmektedir. QCM sensör yüzeyine adsorplanan ve adsorplanmayan madde değişimini ve buna bağlı rezonans frekans değişimini esas alarak belirlemektedir (Şekil 4.12).



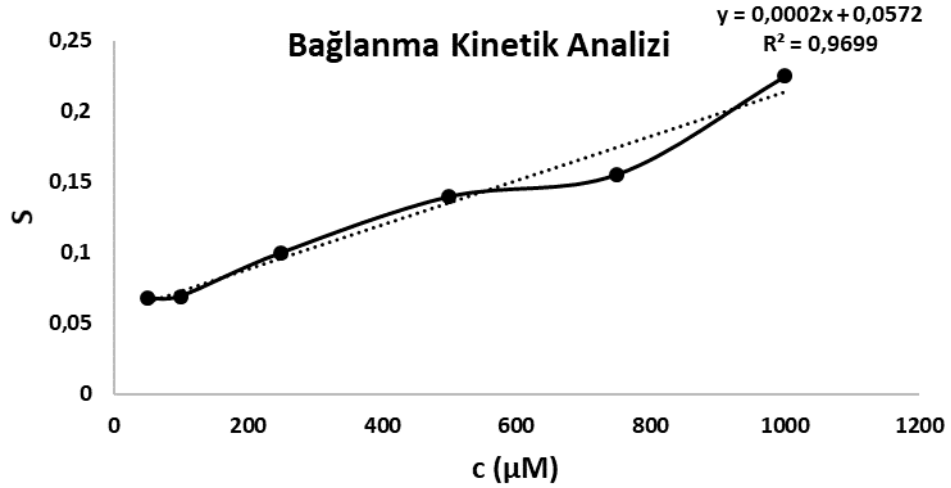
Şekil 4.12. Amino asitin QCM nanosensöre adsorpsiyonuna ait Scatchard denge analiz grafiği.

Scatchard analizi ile geri dönüşümlü ligand reseptör bağlanma ve ayrılmasının ilişkisi incelenmektedir. Scatchard analizi ile bağlananın yorumu bağlanma bölgelerinin sayısından yararlanılarak yapılmaktadır. $K_D < K_A$ durumunda ligand ve analit arasındaki bağlanma 1'den fazla noktada meydana geliyor demektir. Eğer $K_A < K_D$ ise bağlanmanın tek bir noktadan gerçekleştiği yorumu yapılmaktadır. Çizelge 4.6'da verilen sonuçlara göre 11-MUA molekülü ile amino asit arasındaki adsorpsiyonun 1 noktadan gerçekleştiği anlaşılmıştır.

Çizelge 4.6. Amino asitin 11-MUA kaplı QCM nanosensöre adsorpsiyon kinetik analizleri sonuçları.

Scartchard		Bağlanma Kinetik Analizi		LOD (μM)	LOQ (μM)
$\Delta m_{\max}$ (ng/cm^2)	153.767	k_a (nM/s)	0.0002	0.859	2.604
K_D (1/nM)	178.571	k_d (1/s)	0.0572		
K_A (nM)	0.0056	K_A (nM)	0.0034		
R^2	0.8202	K_D (1/nM)	286		
		R^2	0.9699		

Şekil 4.13'te görülen bağlanma kinetik analizi eğrisine göre, adsorpsiyon hızını, ligand reseptör arasındaki bağlanmanın kimyasal ya da fiziksel etkileşimler sayesinde gerçekleştiğini belirlemek mümkündür. Bağlanma kinetik analizi sonuçlarına göre K_A değerinin yüksek olması (K_D 'ye göre) adsorpsiyonun daha kuvvetli bir etkileşimle gerçekleştiğinin kanıtıdır. Çizelge 4.6'daki değerlere göre K_A 'nın K_D 'den daha düşük olması aminoasitin 11-MUA modifiye QCM sensör yüzeyine zayıf etkileşimlerle adsorplandığının göstergesidir. Bu durum tez kapsamında hedeflenen bir durumdur.



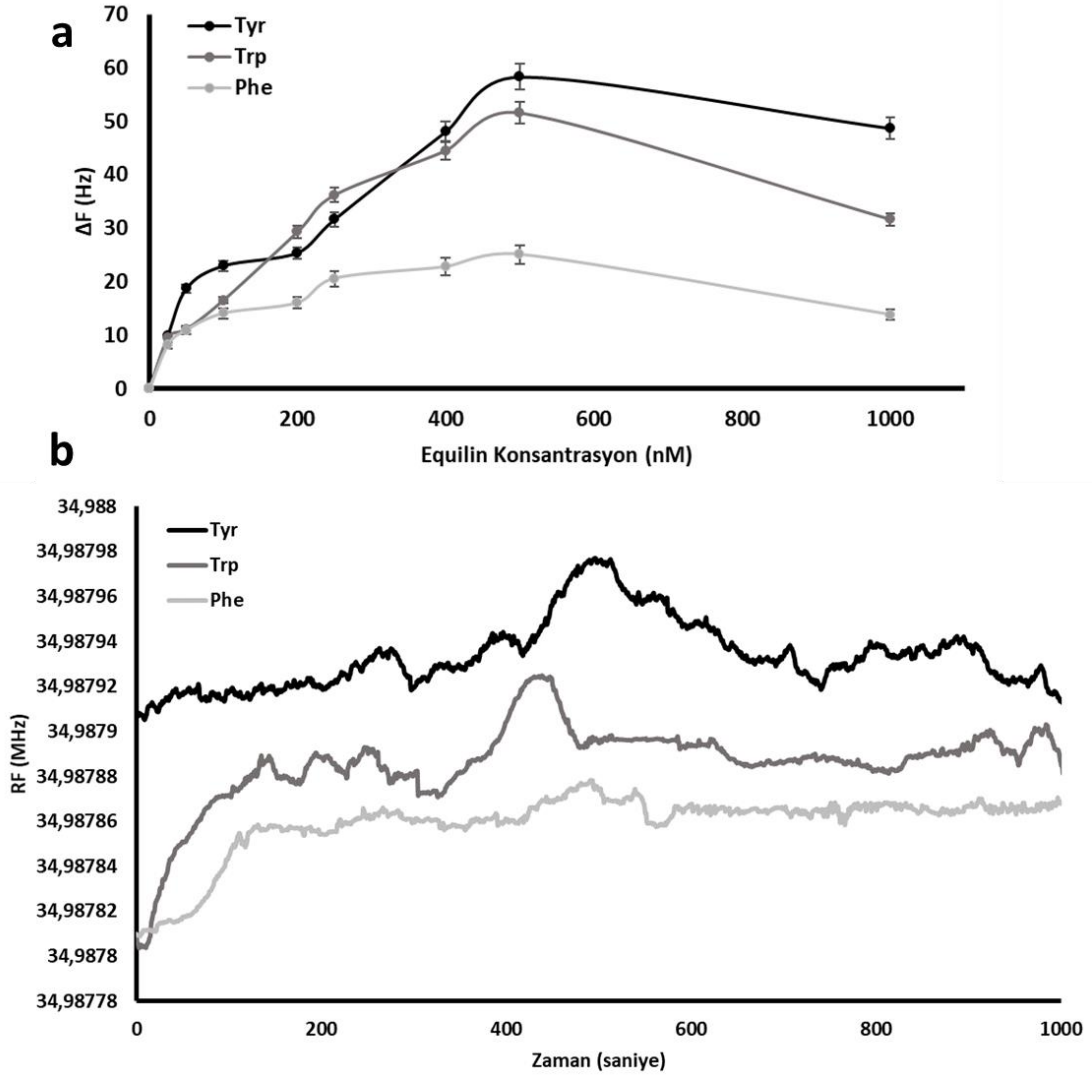
Şekil 4.13. Amino asitin QCM nanosensöre adsorpsiyonuna ait bağlanma kinetik analiz grafiği.

4.4. QCM Nanosensör ile Equilin Tespiti

11-MUA modifiye edilmiş ve ardından da Phe, Tyr ve Trp amino asitleri ile etkileştirilen QCM nanosensör yüzeyler oda şartlarında kurutulup hormon tespiti için hazır hale getirilmiştir. Amino asit ve hormon etkileşimi nedeniyle sensogramda frekans değişimi kaydedilmektedir. Bu frekansa bağlı Sauerbrey denklemleri ile kütle değişimi hesaplanmıştır. Buradaki kütle değişimi yüzeye zayıf etkileşimlerle adsorbe olan amino asitleri, hormonların daha güçlü bağlarla yakalayıp nanosensör yüzeyinden uzaklaştırmasına dayanmaktadır. Başka bir deyişle, QCM nanosensör sistemindeki rezonans frekansı, yüzeyden desorbe edilen amino asit miktarına bağlı olarak artmaktadır. Nanosensör yüzeyindeki kütle azaldıkça nanosensörün salınım hareketi artmakta ve dolayısıyla frekans artışı olmaktadır.

Equ'in sulu ortamdan gerçek zamanlı ölçümü için Tyr, Trp ve Phe modifiyeli QCM nanosensörleri kullanılmıştır. Şekil 4.14a, 25 nM–1000 nM aralığında artan Equ konsantrasyonlarına bağlı olarak QCM rezonans frekansı artışını (ΔF) göstermektedir. Artan Equ konsantrasyonuna bağlı olarak frekans değiştiği için konsantrasyon artışı ile nanosensörün tepkisi de artmaktadır. Equ akışı ile

nanosensör yüzeyinden amino asitlerin uzaklaştırılması sırasında, rezonans frekansındaki değişim 500 nM derişime kadar lineer olmuştur. Bu konsantrasyondan sonra artış yavaşlamış ve ardından hafif bir düşüş gözlenmiştir. Rezonans frekansındaki kaymanın azalması, zamanla sensör yüzeyinden uzaklaştırılacak amino asit moleküllerinin azalmasından kaynaklanmıştır. Ek olarak, amino asit molekülleri sensör yüzeyinden süpürüldükten sonra, maruz kalan 11-MUA molekülleri ile Equ arasında zayıf bir etkileşim oluşur ve bu da nanosensörde kütle artışına ve dolayısıyla frekansın azalmasına neden olmuştur. Equ ve Tyr amino asidi arasındaki bağlanma afinitesinin daha yüksek olması nedeniyle, amino asidin maksimum frekans değişimi Tyr için akışın 300-420. saniyesinde 58.31 Hz (ΔF) olarak gözlendi. Teorik moleküler yerleştirme sonuçları, diğer amino asitlere kıyasla Equ ve Tyr arasındaki daha yüksek afinite ile uyumludur. Tüm konsantrasyonlarda maksimum frekans değişiklikleri ortalama 300-420. saniye içinde gözlenmiş ve Şekil 4.14a'daki gibi grafik edilmiştir. Tespit limiti (Limit of Detection, LOD) ve miktar tayin limiti (Limit of Quantification, LOQ), Equ kalibrasyon eğrisinden elde edilen standart sapma ve eğim değerleri ile hesaplanmıştır. Tespit sınırı hesaplaması için $LOD=3*s/b$ denklemi ve tayin sınırının belirlenmesi için $LOQ=10*s/b$ denklemi kullanılmıştır. Bu denklemlerde kullanılan s değeri, kalibrasyon eğrisinden elde edilen standart sapmayı, b değeri ise bu eğrinin eğimini temsil etmektedir. Tyr, Trp ve Phe modifiye QCM nanosensör sinyali kullanılarak LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 4.59, 5.05, 6.30 ve 15.31, 16.84, 21.01 ng/L olarak bulunmuştur. Ayrıca hazırlanan sensör sisteminin lineer dinamik algılama aralığı 25-500 nM'dır. Doğrusal dinamik aralık değeri, analit konsantrasyonu ile QCM sensogramındaki ΔF arasında bir orantının olduğu konsantrasyon aralığını temsil etmektedir. Sensör algılama sisteminin bir ölçüm sırasında ölçebileceği ΔF miktarı anlamına gelmektedir.



Şekil 4.14. Tyr, Trp ve Phe ile modifiye edilmiş QCM nanosensörü ile Equ tespit sensogramları. Equ başlangıç konsantrasyonunun etkisi; T:20 °C, pH: 7 (a) ve zaman içinde Equ yanıtı; eşit başlangıç konsantrasyonu: 500nM (b).

Equ tespitinde etkileşim süresinin tespiti Şekil 4.14b'de gösterilmektedir. Rezonans frekansının zaman içindeki değişimini izlemek amacıyla Equ tespit çalışmaları 15-20 dakika kadar devam ettirilmiştir. Denge çözeltisi su ile kararlı taban çizgisi elde edildikten sonra QCM sensör sistemine Equ çözeltisi (500nM) enjekte edilmiştir. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi, Tyr ve Equ molekülü arasındaki etkileşim hidrofobik etkileşimlere dayanırken, Trp ve Phe'de hidrojen bağlarına ve nadir hidrofobik etkileşimlere dayanmaktadır. Trp ve Phe sırasıyla amino ve karboksil gruplarından yönlendirildiklerinden, Equ ile zayıf hidrojen bağları ile

etkileşmişlerdir. Ek olarak, Phe fonksiyonel gruplarının Equ'e karşı yönelimi, Trp'a kıyasla daha zayıf etkileşimlere neden olmaktadır. Bu nedenle, Şekil 4.12b'deki Tyr ve Trp ile karşılaştırıldığında Phe sensogramında Equ akışı ile daha düşük bir frekans kayması gözlenmiştir. Tyr, Trp ve Phe sensörleri için Equ çözeltisi sırasıyla 110, 120 ve 130. saniyelerde nanosensör sistemine girmiştir. Bu nedenle sensogramlardaki frekans değişimi belirlenirken Equ'nun nanosensör sistemine girişi ile maksimuma ulaştığı anlar arasındaki frekans farkı değerlendirilmiştir. Sensogramın 100. saniyesine kadar görülen frekanstaki ani artış, kuru nanosensör yüzeyinin suyla ıslanmasından kaynaklanan taban çizgisi kaymasına dayanmaktadır. Rezonans frekansındaki artış, Equ molekülü tarafından amino asidin uzaklaştırılmasına bağlı olarak ortalama 300-420 saniye sonra gözlenmiştir.

4.4.1. Equ Adsorpsiyon İzoterm ve Bağlanma Kinetik Analizleri

Tez çalışması kapsamında geleneksel QCM sensör sistemlerinden farklı olarak Equ ile amino asit desorpsiyon mekanizması araştırılmıştır. Algılama işlemi, kuvars kristal yüzeyine bağlı moleküllerin neden olduğu kütle değişimi yerine yüzeyden uzaklaştırılan kütle miktarına bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, Equ ve üç farklı amino asit arasındaki etkileşimler ayrı ayrı incelenmiştir. Equ molekülleri tarafından amino asitlerin uzaklaştırılmasıyla kütle azalması gözlenmiştir. Equ molekülleri tarafından nanosensör yüzeyinden uzaklaştırılan Tyr, Trp ve Phe miktarları sırasıyla 147.44, 130.39 ve 63.44 ng/cm² olarak elde edilmiştir. Üç farklı amino asit (Tyr, Trp ve Phe) ile Equ etkileşimlerinin, hesaplanan Equ-Tyr, Equ-Trp, Equ-Phe miktarının sırasıyla 434.78, 312.50 ve 303.03 ng/cm² olarak elde edildiği ve Langmuir-Freundlich izoterm modeline iyi uyduğu görülmüştür (Çizelge 4.7). Bu izoterm modeli ile heterojen yüzey etkileşiminden bahsedilmektedir. Ayrıca, bu adsorpsiyon modeli, nanosensör yüzeyinde heterojen adsorpsiyon enerjisinin dağılımını açıklamaktadır. Düşük adsorbat konsantrasyonlarında Freundlich modeliyle uyumlu bir etkileşim varken, yüksek konsantrasyonlarda Langmuir izotermiyle uyumlu bir etkileşim vardır. Bilgisayarlı modelleme çalışmalarında tartışıldığı gibi, Equ ve amino asitler (Tyr, Trp ve Phe) arasındaki etkileşim, Equ halka sistemi ile sırasıyla Tyr, Trp ve Phe'nin indol, fenil ve benzen grupları arasındaki hidrofobik etkileşimlerle

ilişkilidir. Equ'e göre amino asitlerin bağlanma ve uzaklaştırma tercihi, denge (Scatchard) ve birleşme kinetik analizi (Çizelge 4.8) ile incelenmiştir. Scatchard analizi ayrıca tersinir Equ-amino asit bağlanması arasındaki ilişkinin anlaşılmasını sağlamaktadır. Scatchard analizi ile bağlanma mekanizması, bağlanma bölgelerinin sayısı kullanılarak açıklanmaktadır. K_D 'nin K_A 'dan küçük olması ligand ile analit arasında birden fazla noktada etkileşim olduğunu göstermektedir. K_A , K_D 'den küçükse, bağlanmanın tek bir noktadan güçlü bir şekilde gerçekleştiği anlaşılmaktadır. K_D ne kadar yüksek olursa, hedef molekül ve ligand arasındaki afinite ve adsorpsiyon o kadar zayıf olmaktadır [153][154]. Çizelge 4.8'deki değerlerimiz de Equ ve amino asitlerin tek bir noktadan ve oldukça güçlü bağlanma tercihini göstermektedir. Ayrıca, Equ'nin en düşük LOD ve LOQ değerleri (sırasıyla 4,59 ve 15,31 ng/L) Tyr modifiyeli QCM nanosensörde elde edilirken, en yüksek değerler (sırasıyla 6,30 ve 21,01 ng/L) Phe modifiyeli nanosensörde elde edilmiştir. Bu çalışmada, LOD ve LOQ değerleri, EPA tarafından belirlenen Equ (0.35 µg/L) maksimum kirletici seviyesinin (MCL) altındadır. Bu sonuçlar, su numunelerinde Equ'nin hassas tespitini doğrulamaktadır.

Çizelge 4.7. Equ'in Farklı Amino Asitlerle Bağlanma İzotermi

	Deneysel		Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
	Δm_{max} (ng/cm ²)	147.44	Δm_{max} (ng/cm ²)	128.20	Δm_{max} (ng/cm ²)	6.50	Δm_{max} (ng/cm ²)	434.78
	R^2	0.9904	K_D (1/nM)	93.89	1/n	0.48	1/n	0.48
Equ-Tyr			K_A (nM)	0.01	R^2	0.9432	K_D (1/nM)	56.08
			R^2	0.8655			K_A (nM)	0.02
							R^2	0.9408
	Δm_{max} (ng/cm ²)	130.39	Δm_{max} (ng/cm ²)	99.00	Δm_{max} (ng/cm ²)	5.49	Δm_{max} (ng/cm ²)	312.5
	R^2	0.9935	K_D (1/nM)	89.01	1/n	0.46	1/n	0.46
Equ-Trp			K_A (nM)	0.01	R^2	0.8236	K_D (1/nM)	66.09
			R^2	0.8843			K_A (nM)	0.01

							R^2	0.9662
	Δm_{max} (ng/cm ²)	63.44	Δm_{max} (ng/cm ²)	53.19	Δm_{max} (ng/cm ²)	8.97	Δm_{max} (ng/cm ²)	303.03
	R^2	0.9912	K_D (1/nM)	37.87	1/n	0.28	1/n	0.28
Equ-Phe			K_A (nM)	0.03	R^2	0.9096	K_D (1/nM)	37.45
			R^2	0.8785			K_A (nM)	0.03
							R^2	0.9806

Çizelge 4.8. Equ'in üç farklı amino asitle birliktelik kinetik analizi, LOD ve LOQ değerleri.

	Denge Analizi (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi		LOD	LOQ
	Δm_{max} (ng/cm ²)	169.19	k_a (nM/s)	0.0002	4.59 ng/L (11.41 nM)	15.31 ng/L (38.05 nM)
Equ-Tyr	K_D (1/nM)	178.57	k_d (1/s)	0.041		
	K_A (nM)	0.005	K_A (nM)	0.005		
	R^2	0.6122	K_D (1/nM)	204		
			R^2	0.9966		
	Δm_{max} (ng/cm ²)	225	k_a (nM/s)	0.0003	5.05 ng/L (12.56 nM)	16.84 ng/L (41.86 nM)
Equ-Trp	K_D (1/nM)	400	k_d (1/s)	0.02		
	K_A (nM)	0.002	K_A (nM)	0.01		
	R^2	0.8334	K_D (1/nM)	72		
			R^2	0.9995		
	Δm_{max} (ng/cm ²)	67.37	k_a (nM/s)	0.00007	6.30 ng/L (15.66 nM)	21.01 ng/L (52.21 nM)

Equ-Phe	K_D (1/nM)	96.15	k_d (1/s)	0.032
	K_A (nM)	0.01	K_A (nM)	0.002
	R^2	0.7041	K_D (1/nM)	457.14
			R^2	0.9988

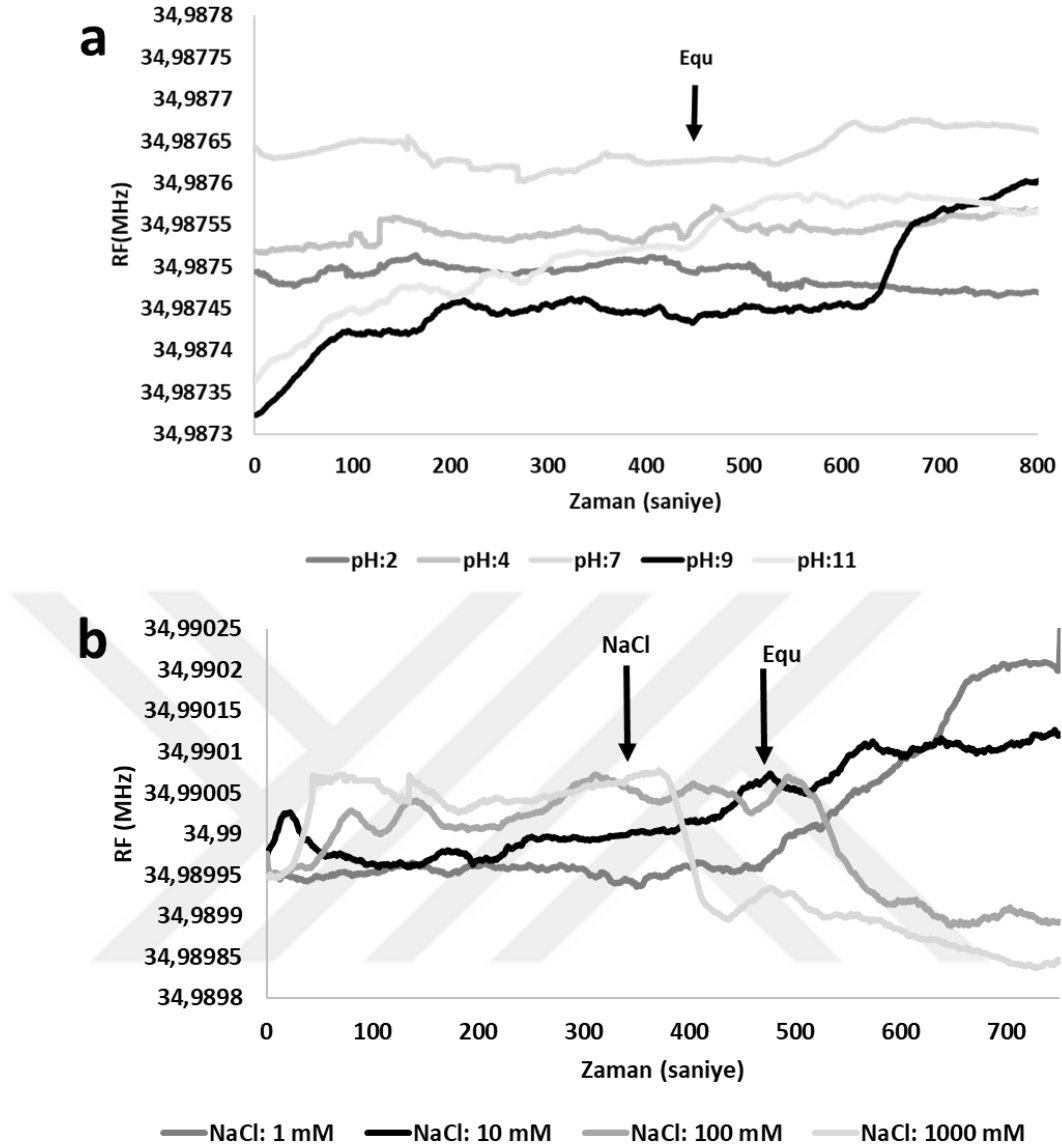
4.4.2. QCM Nanosensörün Bloklanması ve Adsorpsiyona Etkisi

Spesifik olmayan bağlanmaları en aza indirmek ve nanosensörün yeniden kullanılabilirliğini iyileştirmek amacıyla kendiliğinden düzenlenmiş tek tabakalı 11-MUA modifiyesinden sonra altın kaplı QCM sensörler Tween 20 ve BSA çözeltileri ile ayrı ayrı bloklanmışlardır. Bloklanmış QCM sensörlerin yüzeyinden sırasıyla 1 mM fosfat tamponu, 1 mM amino asit çözeltisi, deiyonize su ve 500 nM Equ çözeltisi geçirilmiştir. Tween 20 kullanılarak bloklanmış çiplerin kullanıldığı deneyler sırasında QCM sensör sistemine giren ve çıkan bağlantı hortumlarından sıvı taşmaları meydana gelmiştir. Bu durum deterjanlar sınıfından olan Tween 20'nin sensör yüzeyinin hidrofobikliğini düşürüp daha kolay ıslanabilir hale getirmesinden ve bağlantı noktalarındaki yüzey gerilimini düşürmesinden kaynaklanmıştır [155][156]. Dolayısı ile Tween 20 ile bloklanan nanosensör sisteminden anlamlı bir sensogram kaydedilememiştir. BSA kullanılarak bloklanmış nanosensör yüzeyler de Tween 20'deki gibi önce amino asit tamponu sonra amino asit çözeltisi ve Equ çözeltisi ile muamale edilmiştir. Ancak bu yüzeylerde de adsorpsiyona pozitif katkı gözlenmemiştir. Ölçüm sırasında OpenQCM⁻¹ sistem ara yüzü 7.overtunun dışına çıkıldığı uyarısı vermiş ve frekans değişimi takip edilememiştir. Hazırlanan 6 adet nanosensör yüzeyi ile işlemler tekrar edilmiş ancak anlamlı bir sensogram kaydedilememiştir. Bu durum 66.46 kDa moleküler ağırlığa sahip BSA proteinin 181.19 Da molekül ağırlığındaki Tyr amino asitinin sensör yüzeyine adsorpsiyonuna engel olmasından kaynaklanabilmektedir. Sonuç olarak hem Tween 20 hem de BSA kullanılarak bloklanmış QCM nanosensör sistemlerinde Equ tespiti sırasında meydana gelen frekans değişim miktarında anlamlı bir sonuç elde edilememiş ve çalışmalara bloklama işlemi yapılmadan devam edilmiştir.

4.4.3. Çözelti pH ve İyonik Şiddetinin Equilin Adsorpsiyonuna Etkisi

Equ'nin sensör yüzeyine adsorpsiyonuna ortam pH'nın etkisini incelemek amacıyla farklı pH değerlerindeki (pH: 2, 4, 7, 9, 11) su içerisinde çözünmüş Equ çözeltileri hazırlanarak sensör sisteminden geçirilmiştir. QCM sensör sisteminden elde edilen sensogramlar Şekil 4.15a'da görülmektedir. Sensogramlara göre pH:7'deki Equ çözeltisi ile en yüksek ΔF değerine ulaşılmış ve yüzeyden en yüksek kütlede Phe uzaklaştırılmıştır. Dolayısıyla maksimum adsorpsiyon pH:7 de sağlanmıştır.

İyonik şiddet sensör sistemimizde etkili olan hidrofobik, van der waals etkileşimleri ve elektrostatik etkileşimleri etkileyebilmektedir. Örneğin hidrofobik etkileşimlerin olduğu bir sistemde ortamdaki tuz konsantrasyonunun artması hidrofobik etkileşimi arttırmaktadır. Ancak ortamda elektrostatik etkileşimler yoğunsa tuz konsantrasyonunun artması ile hidrofobik etkileşimler azalmaktadır. Biz de bu etkileri gözlemleyebilmek için farklı tuz çözeltilerinde (1, 10, 100 ve 1000 mM derişimlerinde) hazırlanan Equ çözeltileri ile QCM tespit çalışmalarını tekrar edilmiştir. QCM sensogramları Şekil 4.15b'de görülmektedir. 1 ve 10 mM tuz çözeltisinin sebep olduğu fazlaca frekans artışı yüzeyden sadece amino asit değil 11-MUA'nın da uzaklaştırmış olabileceğini düşündürürken 100 ve 1000mM derişimlerdeki tuz çözeltileri nanosensör üzerinde birikerek frekansta ciddi düşüşlere sebep olmuştur.



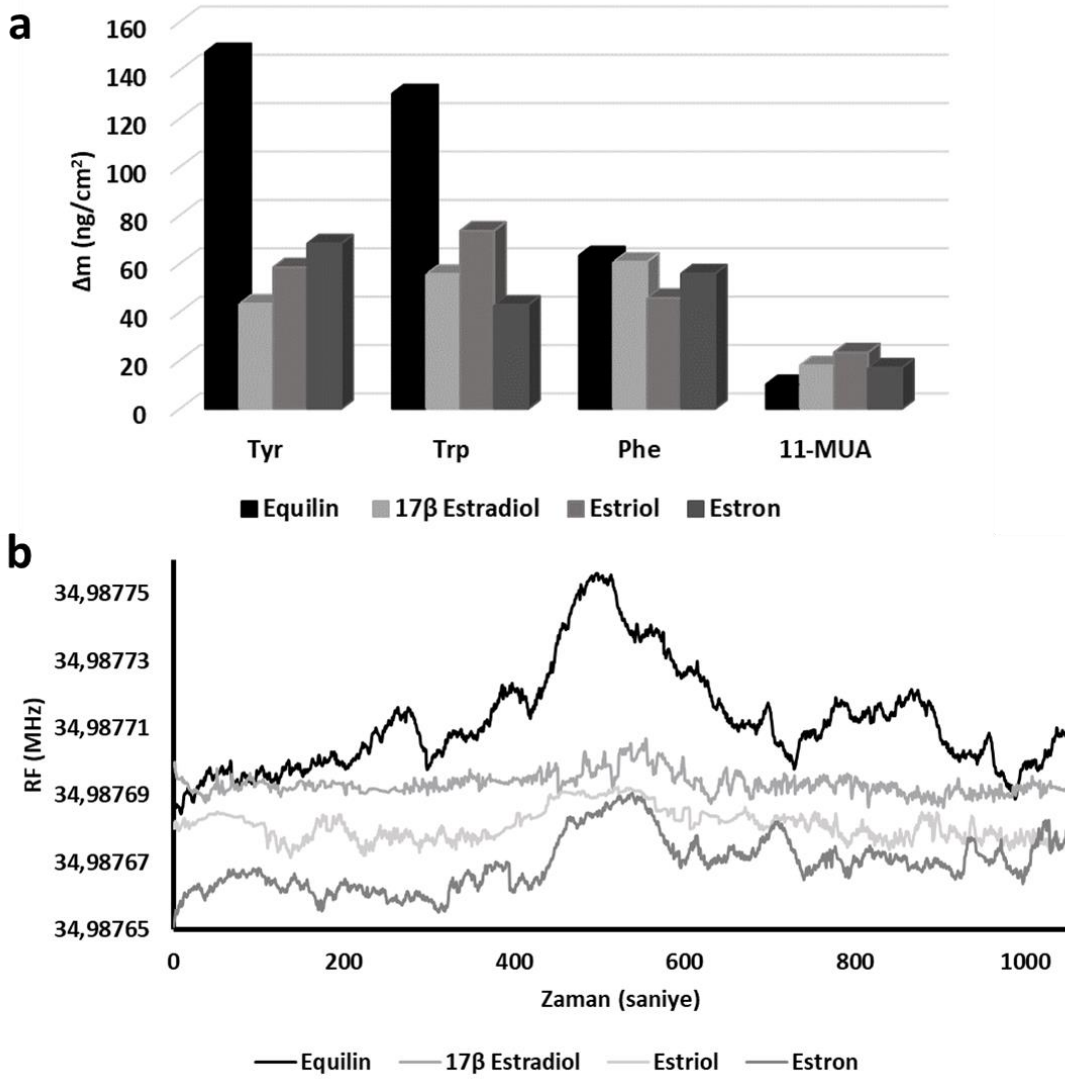
Şekil 4.15. Farklı pH değerleri (a) ve iyonik şiddet etkisi (b) ile izlenen QCM nanosensör sensogramları.

4.5. QCM Nanosensörlerin Üç Farklı Endokrin Bozucu Hormon ile Karşılaştırılması

Equ konsantrasyon taramasında, amino asitle modifiye edilmiş QCM nanosensörünün Equ etkileşimi ile elde edilen maksimum frekans azalması, 420 saniyelik etkileşim süresinde 500 nM Equ konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, üç farklı endokrin bozucu hormonların (estron, estriol ve 17 β -estradiol) etkileşimleri aynı koşullar altında test edilmiştir. QCM tespitinde, diğer

hormonlar sebep olduğu kütle değişimleri Equ'nunki ile karşılaştırıldığında, Equ'nin en yüksek frekans değişimine sahip olduğu gözlenmiştir. Hormonların 3 boyutlu kimyasal yapıları incelendiğinde, diğerlerinden farklı olarak Equ'nun yapısında C12'de hidrojenlenmemiş bir çift bağa sahip olduğu görülmektedir. Delokalize pi-elektron, C=C çift bağındaki lokalize pi bağından daha düşük elektron yoğunluğuna sahiptir, bu da Equ'ni diğer hormonlara kıyasla daha reaktif hale getirmiştir (moleküllerin 3 boyutlu yapıları Şekil 4.1'de görülmektedir).

Ayrıca, kontrol deneylerinde hormonların 11-MUA ile etkileşimleri araştırılmıştır. Şekil 4.16a'da görüldüğü gibi, 11-MUA ve hormon etkileşimlerinin kütle değişiminde önemli bir frekans değişikliği meydana gelmemiştir. Bu bulgunun, sensör yüzeyinde dizilmiş 11-MUA'nın –COOH grupları ile hormonların –OH grupları arasındaki zayıf etkileşimlere (elektrostatik ve Van der Waals etkileşimleri gibi) dayandığına inanılmaktadır. Equ ve amino asitler arasındaki etkileşimlerin moleküler modelleme çalışmalarına göre (Şekil 4.3), Tyr, Trp ve Phe (sırasıyla fenil halkası, indol grubu ve fenil kalıntısı) ile Equ halkası sistemi arasında hidrofobik etkileşimler gözlenmiştir. Moleküller arası hidrofobik etkileşimler, Van der Waals, elektrostatik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimlerden daha güçlüdür. Hormonlar ve 11-MUA arasındaki afinite etkileşimleri, hormonlar ve amino asitler arasındaki afiniteden daha az olduğu için deneysel sonuçlar, hormonlar ve 11-MUA arasındaki zayıf etkileşimi doğrulamıştır. Kısacası, hormonlar ve 11-MUA arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin varlığında, nanosensör yüzeyine çok az miktarda hormon tutunmuş ve az miktarda kütle değişimine neden olmuştur [150][157]. Equ, 17 β -Estradiol, Estriol ve Estron ile 11-MUA etkileşimlerindeki kütle değişimi sırasıyla 10.11, 17.97, 23.33 ve 17.04 ng/cm² olmuştur. Bu sonuçlar, Equ ve Tyr arasındaki etkileşimin diğer hormon moleküllerinden daha yüksek olduğunu göstermiştir. En yüksek kütle değişikliği (147.44 ng/cm²), Tyr ile modifiye edilmiş QCM nanosensör üzerinde Equ tespitinde meydana gelmiştir.



Şekil 4.16. Tyr, Trp ve Phe modifiyeli QCM nanosensör üzerindeki hormonların (a) ve Tyr modifiyeli QCM nanosensör üzerinde östrojenik hormonların (b) rezonans frekans değişiminin karşılaştırılması.

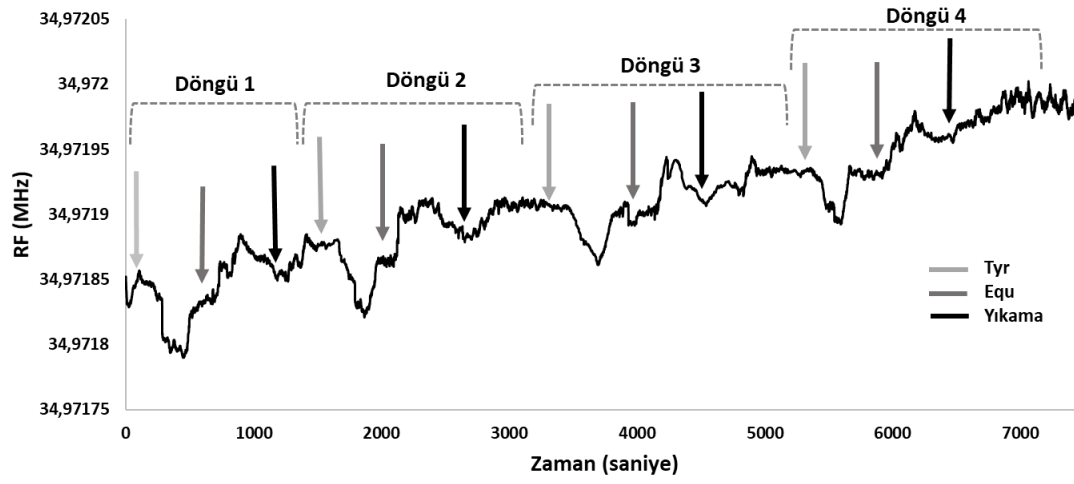
Moleküler kenetlenme sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde Tyr'in fenil halkası Equ ile hidrofobik bağlar yapma isteği neden olmuş olabilir. Şekil 4.16b, Tyr modifiye QCM nanosensörde Equ, 17β Estradiol, Estriol ve Estron moleküllerinin zaman içindeki frekans değişikliklerini göstermektedir. Hormonlar sensör yüzeyine ulaştığı anda, sensogramın rezonans frekansında bir artışa neden olmaktadır. Bu frekans artışı, Tyr moleküllerini hormon molekülleri yoluyla uzaklaştırarak sensör yüzeyindeki kütlenin azalmasının kanıtı niteliğindedir. Ortalama 360-420 saniye içerisinde hormonlar sensör yüzeyinden maksimum Tyr

moleküllerini süpürmüş ve en yüksek frekans değerine ulaşmıştır. Daha sonra, sıvı akışının yüzey üzerindeki etkisi ve 11-MUA'nın sensör yüzeyindeki -COOH grupları ile hormonlar arasındaki etkileşim, frekansın azalmasına neden olmuştur.

Literatürde östrojenik hormonların tespiti ile ilgili birçok rapor bulunmasına rağmen, Equ'in seçici ve duyarlı tespiti için literatürde sınırlı sayıda makale bulunması bu tez çalışmasının motivasyonu olmuştur. Bu çalışmalardan Ito ve ark. 0.1 pg/mL ila 100 pg/mL LOD [158] ile antikor-antijen etkileşimine dayalı QCM sensöründe kortizolü tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada, Li ve ark. Bisfenol A (BPA), E1, E2 ve sülfametoksazol (SMZ) tespiti için QCM sensör sisteminde bir zeolit filtresi kullanmışlardır. Bu sistem sorbat-sorbent etkileşimlerine (fonksiyonel gruplara dayalı) dayalı olup 0.85-1.58 ng/ng adsorpsiyon kapasitesine ulaşmıştır [159]. Jia ve diğerleri, E2'yi tespit etmek için bir yüzey plazmon rezonans (SPR) sensör sistemi geliştirmiştir. Anti-östradiol monoklonal antikor (E2-mAb) kaplı manyetik nanopartiküller kullanarak LOD değerini 0.81 ng/mL bulmuşlardır [160]. Chen ve ark., afinite temelli antikor modifikasyonu ile E2 antijenini tanımak için bir immün QCM-algılayıcı çip geliştirmişlerdir. Rezonans frekansının değişimi, antijenin konsantrasyonu orantılı olmuştur. Sonuçlar, yuvarlama modunda model olarak estradiol ile, iyi stabilize edilmiş QCM çipinin algılama sınırının tekrarlanabilirlik ile 40 ng/mL seviyesine ulaştığını göstermiştir. Ayrıca, 60 ng/mL LOD ile dinamik modda algılama sonuçları cihazın yanıt süresinin birkaç saniyeye kısaltılabileceğini göstermiştir. Hedeflenen uygulamalar için her iki algılama modunun da kullanılabileceğini kanıtlamışlardır [161]. Bu sonuçlara göre bazı LOD değerleri bizim elde ettiğimiz LOD değerinden daha düşük iken bazıları daha yüksektir. Buradaki en kritik nokta, önceki çalışmaların spesifik afinite sensör sistemlerine dayanmasıdır. Kullandıkları tanı materyali (moleküler baskılı polimerik yapılar, aptamer, antikor vb.) tespit edilecek maddeye özgü olduğundan, her molekül incelenirken sistem parametrelerinin yeniden düzenlenmesi gerekmektedir. Ancak bu tez çalışmasında, hormonlar tek adımda gerçek zamanlı izlemede farklı amino asitlere olan afinitelerine göre doğrudan ve tespit edilebilmektedir.

4.6. QCM Nanosensörünün Yeniden Kullanılabilirliğinin Test Edilmesi

Amino asit modifiye ederek hazırlanan QCM nanosensörünün kaç kez kullanılabileceğini test etmek amacıyla Tyr ve Equ ile etkileşimleri 4 döngüde gerçek zamanlı olarak izlenmiştir (Şekil 4.17). İlk döngü için, Tyr QCM nanosensörden geçirilirken, rezonans frekansı yaklaşık 4 dakika sonra 56.01 Hz kadar düşmüştür. Sensogramın 3 dakika boyunca stabil hale gelmesi beklenmiş ve ardından Equ solüsyonu sisteme beslenmiştir. 5 dakika sonra Equ, Tyr moleküllerini yakalayıp sensör yüzeyinden süpürdüğü için rezonans frekansında 49.46 Hz kadarlık bir artışa sebep olmuştur. Sensör yıkanması için sensör yüzeyinden fosfat tamponu geçirilmiştir. Yıkama sırasında sensogramda rezonans frekansı 32.75 Hz artış görülmüştür. Ardından ikinci, üçüncü ve dördüncü döngüler için Tyr çözeltisi nanosensör yüzeyinden aynı sırayla tekrar geçirilmiştir. Bu durum her bir döngüde yaklaşık 4 dakikada içerisinde 49.25, 45.71 ve 41.46 Hz'lik bir frekans düşüşüne neden olmuştur. Nanosensör dengeye ulaştıktan sonra sisteme Equ solüsyonu gönderilmiş ve ikinci, üçüncü ve dördüncü döngüler için sırasıyla 5-6 dakikada 47.27, 42.42 ve 39.94 Hz'lik bir frekans artışı gözlenmiştir. Daha sonra yıkama adımında sırasıyla ikinci, üçüncü ve dördüncü döngü için 29.26, 28.12 ve 27.49 Hz'lik frekans artışı kaydedilmiştir. Dördüncü döngünün sonunda önemli bir rezonans frekansı değişikliği gözlenmediği için analiz sonlandırılmıştır. Tüm sensogram incelendiğinde, nanosensör yüzeyine bağlanan Tyr sayesinde rezonans frekansı azalırken, Tyr'ı yüzeyden uzaklaştıran Equ sayesinde rezonans frekansı artmaktadır. Sonuç olarak, sürekli rejenerasyon koşullarında Equ tespiti için 11-MUA modifiyeli QCM nanosensörün %80.75 verimle 4 kez kullanılabileceği görülmüştür.



Şekil 4.17. QCM nanosensörün yeniden kullanımı.

5. YORUM

Tez çalışmasında, hormon yerine koyma tedavilerinde ya da doğal hormonal süreçlere bağlı olarak kanalizasyon sularına ve ardından da doğal su kaynaklarına aktararak sucul canlıları, suda yaşayan organizmaları yaşamsal faaliyetlerini olumsuz etkileyen östrojenik hormonların tespiti için gravimetrik temelli bir sensör sistemi geliştirilmiştir. Östrojen etkilerinin su kaynakları başta olmak üzere tüm ekolojik alanlarda gözlenmesi ile sucul organizmalar çoğalması, besin kaynağı kaybı yoluyla doğrudan/dolaylı olarak zarar görmektedir. EPA su kaynaklarındaki maksimum kirletici miktarı olarak Equ, 17 β -Estradiol, Estriol ve Estron östrojenik hormonları için sırasıyla 0.35 μ g/L, 0.7 ng/L, 4.37 ng/L ve 65 ng/L seviyelerini belirlemiştir. Tez kapsamında Equ başta olmak üzere farklı östrojenik hormonların tespiti için kullanımı kolay, diğer tespit yöntemlerine kıyasla düşük maliyetli ekipmanlarla hazırlanabilen ve aynı zamanda yüksek hassasiyette ölçüm yaparak oldukça kısa sürede (yaklaşık 6 dakika) sonuç veren yeni bir nanosensör sistemi geliştirilmiştir.

Tyr modifiyeli QCM nanosensör için Equilin LOD değeri 4.59 ng/L (11.41 nM) kadarken Trp ve Phe modifiyeli nanosensörlerde sırasıyla bu değer 5.05 (12.56 nM) ve 6.30 (15.66 nM) ng/L'dır. Tez kapsamında, QCM'in geleneksel kullanımının ötesine geçerek, Equ molekülleri tarafından QCM nanosensör yüzeyinden uzaklaştırdığı adsorbe amino asitlerle Equ tespit edilmiştir. Bir sensör sisteminde analiz edilebilecek minimumdan maksimuma kadar olan konsantrasyon aralığını ifade eden lineer dinamik aralık değeri tez kapsamında hazırlanan QCM nanosensör sisteminin östrojenik hormon tespiti için 25 – 500 nM'dır.

Bağlanma izoterm çalışmaları sonucunda Tyr, Trp ve Phe modifiye nanosensör yüzeyi ile Equ arasındaki etkileşimin Langmuir-Freundlich bağlama izotermine uyduğu görülmüştür.

Tyr, QCM nanosensörünün modifikasyonu için kullanıldığında, Equ kütle değişimi, 17 β -Estradiol, Estriol ve Estron gibi üç farklı östrojenik hormona kıyasla en yüksek değere ulaşmıştır (LOD (4.59 ng/L) ve LOQ (15.31 ng/L)).

AutoDock bilgisayarlı modelleme programı kullanılarak deneysel veriler simüle edilmiş moleküler docking çalışmalarıyla karşılaştırılmıştır. Tyr ve Equ arasındaki serbest enerji değeri -1367.10 kcal/mol iken, diğer amino asitler Trp ve Phe için sırasıyla -1366.73 ve -1367.00 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Tyr (fenil halkası), Trp (indol grubu) ve Phe'nin (fenil kalıntısı) hidrofobik kalıntıları ile Equilin halka sistemindeki hidrofobik kalıntıları ile yönlendirilmiştir. Bu sonuçlar deneysel verilerle iyi bir uyum içindedir.

Sonuç olarak, Tyr modifiyeli QCM nanosensörünün Equ tespiti için en yüksek hassasiyet ve seçiciliği gösterdiği bulunmuştur.

Bu konuyla ilgili çeşitli araştırmalar, endokrin bozucu kimyasalların tespiti için kütle tabanlı sensör sistemlerinin yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir; bununla birlikte, karmaşık olmaları, yüksek maliyetli kimyasallar gerektirmesi ve bazen ön saflaştırma veya zenginleştirme prosedürleri gibi sınırlamaları vardır [162][163]. Bildiğimiz kadarıyla, bu tez çalışması Equ tespiti için geliştirilen ilk QCM tabanlı sensör sistemini temsil etmektedir.

Tez çalışması ile hazırlanan Equ tespit sensör sisteminin bildiğimiz kadarıyla literatürde benzeri bulunmamaktadır. Ayrıca elde edilen sonuçlar, geliştirilen QCM nanosensör ile su içerisinde östrojenik hormonların tayini için kullanılan geleneksel Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS), Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve spektrofotometrik tespit yöntemlerine kıyasla oldukça kullanışlı bir tespit cihazı olabileceğini göstermiştir. Bahsei geçen hassasiyeti yüksek yöntemlerde her analit yada proses için farklı bir kolon, bağlantı ekipmanları, uçucu gaz ortamına ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak

QCM sensörlerde kullanılan altın kaplı quartz kristal yüzeyler piranha çözeltisi gibi kuvvetli çözücülerle muamale edilmesine rağmen birden fazla kez stabil şekilde kullanılabilir. Geliştirilen nanosensör sistemi ile geleneksel tespit yöntemlerine kıyasla düşük maliyet, kısa sürede sonuç alma, az hacimde numune ile analiz imkanı sağlama gibi üstünlükler elde edilmiştir.

Tamamlanan Doktora tez çalışması ile hazırlanan modifikasyon temelli QCM nanosensör sistemi hem deneysel olarak hem de teorik olarak başka çevre kirleticilerine uyarlanıp farklı araştırma alanlarına ışık tutacak niteliktedir. Farklı araştırma ve tespit alanlarına uygulanarak tıp, temel bilim, mühendislik konularında birçok farklı disipline uyarlanabilecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

- [1] M. Axelstad, U. Hass, M. Scholze, S. Christiansen, A. Kortenkamp, J. Boberg, EDC IMPACT: Reduced sperm counts in rats exposed to human relevant mixtures of endocrine disrupters, *Endocr. Connect.* 7 (2018) 139–148. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0307>.
- [2] H.K.L. Johansson, T. Svingen, P.A. Fowler, A.M. Vinggaard, J. Boberg, Environmental influences on ovarian dysgenesis-developmental windows sensitive to chemical exposures, *Nat. Rev. Endocrinol.* 13 (2017) 400–414. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.36>.
- [3] N.E. Skakkebaek, A brief review of the link between environment and male reproductive health: Lessons from studies of testicular germ cell cancer, *Horm. Res. Paediatr.* 86 (2016) 240–246. <https://doi.org/10.1159/000443400>.
- [4] I. Amano, Y. Takatsuru, M.A. Khairinisa, M. Kokubo, A. Haijima, N. Koibuchi, Effects of Mild Perinatal Hypothyroidism on Cognitive Function of Adult Male Offspring, *Endocrinology.* 159 (2018) 1910–1921. <https://doi.org/10.1210/en.2017-03125>.
- [5] A. Ghassabian, L. Trasande, Disruption in thyroid signaling pathway: A mechanism for the effect of endocrine-disrupting chemicals on child neurodevelopment, *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00204>.
- [6] W.N. Jefferson, H. Karimi Kinyamu, T. Wang, A.X. Miranda, E. Padilla-Banks, A.A. Suen, C.J. Williams, Widespread enhancer activation via ER α mediates estrogen response in vivo during uterine development, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 5487–5503. <https://doi.org/10.1093/nar/gky260>.
- [7] P. Alonso-Magdalena, E. Vieira, S. Soriano, L. Menes, D. Burks, I. Quesada, A. Nadal, Bisphenol a exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring, *Environ. Health Perspect.* 118 (2010) 1243–1250. <https://doi.org/10.1289/ehp.1001993>.

- [8] G. Cano-Sancho, A.G. Salmon, M.A. La Merrill, Obesity: Integrated Systematic Review and Meta-Analysis, *Env. Heal. Perspect.* (2017) 1–15. https://ehp.niehs.nih.gov/wp-content/uploads/2017/09/EHP527.alt_.pdf.
- [9] J.J. Heindel, L.A. Skalla, B.R. Joubert, C.H. Dilworth, K.A. Gray, Review of developmental origins of health and disease publications in environmental epidemiology, *Reprod. Toxicol.* 68 (2017) 34–48. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.11.011>.
- [10] S. Sifakis, V.P. Androutsopoulos, A.M. Tsatsakis, D.A. Spandidos, Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 51 (2017) 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.024>.
- [11] M. Giulivo, M. Lopez de Alda, E. Capri, D. Barceló, Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review, *Environ. Res.* 151 (2016) 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.011>.
- [12] S. Scsukova, E. Rollerova, A. Bujnakova Mlynarcikova, Impact of endocrine disrupting chemicals on onset and development of female reproductive disorders and hormone-related cancer, *Reprod. Biol.* 16 (2016) 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2016.09.001>.
- [13] R. Thomas Zoeller, T.R. Brown, L.L. Doan, A.C. Gore, N.E. Skakkebaek, A.M. Soto, T.J. Woodruff, F.S. Vom Saal, Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from the Endocrine Society, *Endocrinology.* 153 (2012) 4097–4110. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1422>.
- [14] R. Kopp, I.O. Martínez, J. Legradi, J. Legler, Exposure to endocrine disrupting chemicals perturbs lipid metabolism and circadian rhythms, *J. Environ. Sci. (China)*. 62 (2017) 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.10.013>.
- [15] R.T. Zoeller, S.W. Tan, R.W. Tyl, General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis, *Crit. Rev. Toxicol.* 37 (2007) 11–53. <https://doi.org/10.1080/10408440601123446>.

- [16] S. Shantanam, Polluted Pathways: Mechanisms of Metabolic Disruption by Endocrine Disrupting Chemicals, *Physiol. Behav.* 176 (2018) 139–148. <https://doi.org/10.1007/s40572-017-0137-0.Polluted>.
- [17] G.G. Ying, Endocrine Disrupting Chemicals. What? Where?, 2012. <https://doi.org/10.1002/9781118346747.ch1>.
- [18] N. Andersson, M. Arena, D. Auteri, S. Barmaz, E. Grignard, A. Kienzler, P. Lepper, A.M. Lostia, S. Munn, J.M. Parra Morte, F. Pellizzato, J. Tarazona, A. Terron, S. Van der Linden, Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009, *EFSA J.* 16 (2018) 1–135. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5311>.
- [19] U.S.E.P. Agency, Contaminant Information Sheets (CISs) for the Final Fourth Contaminant Candidate List (CCL 4), 2016. <https://www.epa.gov/ccl/chemical-contaminants-ccl-4>.
- [20] C. Rudén, What influences a health risk assessment?, *Toxicol. Lett.* 167 (2006) 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.09.008>.
- [21] E. Diamanti-Kandarakis, J.P. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, R.T. Zoeller, A.C. Gore, Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement, *Endocr. Rev.* 30 (2009) 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>.
- [22] A. Gore, Andrea C.; Crews, David; Doan, Loretta L.; Merrill, Michele La; Patisaul, Heather; Zota, INTRODUCTION TO ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS (EDCs) A GUIDE FOR PUBLIC INTEREST ORGANIZATIONS AND POLICY-MAKERS, 2014. <https://www.endocrine.org/-/media/endosociety/files/advocacy-and-outreach/important-documents/introduction-to-endocrine-disrupting-chemicals.pdf>.
- [23] C. Botham, P. Harrison, P. Holmes, K. Koller, P. Rumsby, Information Exchange and International Co-ordination on Endocrine Disrupters, 2003.
- [24] S. Patel, A. Homaei, A.B. Raju, B.R. Meher, Estrogen: The necessary evil for human health, and ways to tame it, *Biomed. Pharmacother.* 102 (2018)

- 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.078>.
- [25] S.R. Hammes, E.R. Levin, Impact of estrogens in males and androgens in females, *J. Clin. Invest.* 129 (2019) 1818–1826. <https://doi.org/10.1172/JCI125755>.
 - [26] N. Fuentes, P. Silveyra, Estrogen receptor signaling mechanisms, 1st ed., Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>.
 - [27] B. Yilmaz, H. Terekeci, S. Sandal, F. Kelestimur, Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 21 (2020) 127–147. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09521-z>.
 - [28] J. Gingrich, E. Ticiani, A. Veiga-Lopez, Placenta Disrupted: Endocrine Disrupting Chemicals and Pregnancy, *Trends Endocrinol. Metab.* 31 (2020) 508–524. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.03.003>.
 - [29] EPA, Chemical Contaminants - CCL 4 Final CCL 4 Chemical Contaminants, 2017. <https://www.epa.gov/ccl/chemical-contaminants-ccl-4>.
 - [30] M. Adeel, X. Song, Y. Wang, D. Francis, Y. Yang, Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review, *Environ. Int.* 99 (2017) 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>.
 - [31] H. Hamid, C. Eskicioglu, Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix, *Water Res.* 46 (2012) 5813–5833. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.002>.
 - [32] S.K. Khanal, B. Xie, M.L. Thompson, S. Sung, S.K. Ong, J. Van Leeuwen, Fate, transport and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 6537–6546. <https://doi.org/10.1021/es0607739>.
 - [33] S.L. Shrestha, F.X.M. Casey, H. Hakk, D.J. Smith, G. Padmanabhan, Fate and transformation of an estrogen conjugate and its metabolites in agricultural soils, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 11047–11053. <https://doi.org/10.1021/es3021765>.

- [34] R. Xuan, A.A. Blassengale, Q. Wang, Degradation of estrogenic hormones in a silt loam soil, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 9152–9158. <https://doi.org/10.1021/jf8016942>.
- [35] S. Arnon, O. Dahan, S. Elhanany, K. Cohen, I. Pankratov, A. Gross, Z. Ronen, S. Baram, L.S. Shore, Transport of testosterone and estrogen from dairy-farm waste lagoons to groundwater, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 5521–5526. <https://doi.org/10.1021/es800784m>.
- [36] H. Kuhl, Pharmacology of estrogens and progestogens: Influence of different routes of administration, *Climacteric.* 8 (2005) 3–63. <https://doi.org/10.1080/13697130500148875>.
- [37] B.R. Bhavnani, F.Z. Stanczyk, Pharmacology of conjugated equine estrogens: Efficacy, safety and mechanism of action, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 142 (2014) 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.10.011>.
- [38] C.R. Tyler, A.L. Filby, L.K. Bickley, R.I. Cumming, R. Gibson, P. Labadie, Y. Katsu, K.E. Liney, J.A. Shears, V. Silva-Castro, H. Urushitani, A. Lange, M.J. Winter, T. Iguchi, E.M. Hill, Environmental health impacts of equine estrogens derived from hormone replacement therapy, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3897–3904. <https://doi.org/10.1021/es803135q>.
- [39] L. Shen, S. Qiu, Y. Chen, F. Zhang, R.B. Van Breemen, D. Nikolic, J.L. Bolton, Alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA by the premarin metabolite 4- hydroxyequilenin semiquinone radical, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (1998) 94–101. <https://doi.org/10.1021/tx970181r>.
- [40] K.F. Roby, 17 Beta Estradiol, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.98019-x>.
- [41] M.U. Ahmad, S.M. Ali, I. Ahmad, Bioactive lipids, *Lipids Categ. Biol. Funct. Metab. Nutr. Heal.* (2011) 153–180. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63772-7.00020-8>.
- [42] A.Y. Ting, J. Xu, R.L. Stouffer, Differential effects of estrogen and progesterone on development of primate secondary follicles in a steroid-depleted milieu in vitro, *Hum. Reprod.* 30 (2015) 1907–1917. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev119>.

- [43] K. Dahlman-Wright, V. Cavailles, S.A. Fuqua, V.C. Jordan, J.A. Katzenellenbogen, K.S. Korach, A. Maggi, M. Muramatsu, M.G. Parker, J.Å. Gustafsson, International union of pharmacology. LXIV. Estrogen receptors, *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 773–781. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.8>.
- [44] P. Li, Y. Gan, Y. Xu, L. Wang, B. Ouyang, C. Zhang, L. Luo, C. Zhao, Q. Zhou, 17beta-estradiol attenuates TNF- α -induced premature senescence of nucleus pulposus cells through regulating the ROS/NF- κ B pathway, *Int. J. Biol. Sci.* 13 (2017) 145–156. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16770>.
- [45] H. Lyytinen, E. Pukkala, O. Ylikorkala, Breast cancer risk in postmenopausal women using estradiol-progestogen therapy, *Obstet. Gynecol.* 113 (2009) 65–73. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31818e8cd6>.
- [46] F.P. Chen, Hormone therapy and cardiovascular disease, *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 45 (2006) 287–293. [https://doi.org/10.1016/S1028-4559\(09\)60245-X](https://doi.org/10.1016/S1028-4559(09)60245-X).
- [47] A.L. Hirschberg, P. Sánchez-Rovira, J. Presa-Lorite, M. Campos-Delgado, M. Gil-Gil, E. Lidbrink, J. Suárez-Almarza, C. Nieto-Magro, Efficacy and safety of ultra-low dose 0.005% estriol vaginal gel for the treatment of vulvovaginal atrophy in postmenopausal women with early breast cancer treated with nonsteroidal aromatase inhibitors: a phase II, randomized, double-blind, placebo-contr, *Menopause.* 27 (2020) 526–534. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001497>.
- [48] A. Escande, A. Pillon, N. Servant, J.P. Cravedi, F. Larrea, P. Muhn, J.C. Nicolas, V. Cavaillès, P. Balaguer, Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta, *Biochem. Pharmacol.* 71 (2006) 1459–1469. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.02.002>.
- [49] R. Lappano, C. Rosano, P. De Marco, E.M. De Francesco, V. Pezzi, M. Maggiolini, Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 320 (2010) 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.02.006>.

- [50] G.M. Chen, George G; Zeng, Qiang; Tse, Estrogen and Its Receptors in Cancer, *Med. Res. Rev.* 28 (2008) 954–974. <https://doi.org/10.1002/med>.
- [51] A.A. Musey, Paul I; Kirdan,, Rashed Y; Bhanalaph, T; Sandberg, ESTRIOLE METABOLISM IN THE BABOON: ANALYSIS OF URINARY AND BILIARY METABOLITES, *Roswell Park Meml. Inst.* (1973) 795–817.
- [52] M. Klein-Patel, K. Gergen-Barnett, J. Balk, Managing Menopausal Symptoms, *Integr. Med. Fourth Ed.* (2018) 550-559.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35868-2.00055-4>.
- [53] K.A. Maroufan, H. Mirzaei, A.A. Matin, A. Javadi, A. Amani-gadim, Environmental Monitoring of 17 beta-estradiol and Estrone in Ardabil's Drinking Water Source as Endocrine Disrupting Chemicals, *Arch. Pharm. Pract.* 10 (2019) 98–106.
- [54] M. Wahab, F. Al-Azzawi, Trimegestone: Expanding therapeutic choices for the treatment of the menopause, *Expert Opin. Investig. Drugs.* 10 (2001) 1737–1744. <https://doi.org/10.1517/13543784.10.9.1737>.
- [55] K.M. Wooding, J.A. Hankin, C.A. Johnson, J.D. Chosich, W. Sung, A.P. Bradford, R.C. Murphy, N. Santoro, M. Campus, N. Carolina, HHS Public Access, *Steroids.* 96 (2016) 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.01.007.Measurement>.
- [56] W. Iwasaki, C. Kataoka, K. Sawadaishi, K. Suyama, N. Morita, M. Miyazaki, A simple, low cost, sensitive, and portable electrochemical immunochromatography sensing device to measure estrone-3-sulfate, *Sensors (Switzerland).* 20 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.3390/s20174781>.
- [57] R.J. Ruggiero, F.E. Likis, Estrogen: Physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy, *J. Midwifery Women's Heal.* 47 (2002) 130–138. [https://doi.org/10.1016/S1526-9523\(02\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S1526-9523(02)00233-7).
- [58] J. P J, K. Prabakaran, J. Luo, D.H. M G, Effective utilization of quartz crystal microbalance as a tool for biosensing applications, *Sensors Actuators A Phys.* 331 (2021) 113020. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2021.113020>.
- [59] W.H.· K.L. WolframWersing, Piezoelectricity Evolution, 2008.

<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>.

- [60] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, P. Estrela, Introduction to biosensors, *Essays Biochem.* 60 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- [61] M. Park, Surface display technology for biosensor applications: A review, *Sensors (Switzerland)*. 20 (2020). <https://doi.org/10.3390/s20102775>.
- [62] C. Chen, J. Wang, Optical biosensors: An exhaustive and comprehensive review, *Analyst*. 145 (2020) 1605–1628. <https://doi.org/10.1039/c9an01998g>.
- [63] T. Kharewal, N. Verma, A. Gahlaut, V. Hooda, Biosensors for penicillin quantification: a comprehensive review, *Biotechnol. Lett.* 42 (2020) 1829–1846. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02970-6>.
- [64] V. Naresh, N. Lee, A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors, *Sensors (Switzerland)*. 21 (2021) 1–35. <https://doi.org/10.3390/s21041109>.
- [65] S. Akgönüllü, D. Çimen, M. Bakhshpour, N. Bereli, H. Yavuz, A. Denizli, Commercial sensors for pathogen detection, *Commer. Biosens. Their Appl.* (2020) 89–106. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818592-6.00005-0>.
- [66] B.D. Spangler, E.A. Wilkinson, J.T. Murphy, B.J. Tyler, Comparison of the Spreeta® surface plasmon resonance sensor and a quartz crystal microbalance for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin, *Anal. Chim. Acta*. 444 (2001) 149–161. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01156-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01156-4).
- [67] S. Kurosawa, J.W. Park, H. Aizawa, S.I. Wakida, H. Tao, K. Ishihara, Quartz crystal microbalance immunosensors for environmental monitoring, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 473–481. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.030>.
- [68] P. Mehrotra, Biosensors and their applications - A review, *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 6 (2016) 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>.
- [69] M. Huerta-Fontela, M.T. Galceran, F. Ventura, Fast liquid chromatography-

- quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 4212–4222. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.007>.
- [70] M. Huerta-Fontela, M.T. Galceran, F. Ventura, Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment, *Water Res.* 45 (2011) 1432–1442. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.036>.
- [71] M.J. López de Alda, D. Barceló, Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water, *J. Chromatogr. A.* 938 (2001) 145–153. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01223-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01223-7).
- [72] L. Ciofi, D. Fibbi, U. Chiuminatto, E. Coppini, L. Checchini, M. Del Bubba, Fully-automated on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis at sub-ng/L levels of selected estrogens in surface water and wastewater, *J. Chromatogr. A.* 1283 (2013) 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.084>.
- [73] W. Chen, M. Xue, F. Xue, X. Mu, Z. Xu, Z. Meng, G. Zhu, K.J. Shea, Molecularly imprinted hollow spheres for the solid phase extraction of estrogens, *Talanta.* 140 (2015) 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.02.048>.
- [74] C.P. Silva, M. Otero, V. Esteves, Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review, *Environ. Pollut.* 165 (2012) 38–58. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.02.002>.
- [75] N.H. Torres, M.M. Aguiar, L.F.R. Ferreira, J.H.P. Américo, Â.M. Machado, E.B. Cavalcanti, V.L. Tornisielo, Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*, *Environ. Monit. Assess.* 187 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4626-z>.
- [76] R. Guedes-Alonso, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, Determination of steroid hormones in fish tissues by microwave-assisted extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 237 (2017) 1012–1020.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.065>.

- [77] J. Gañán, D. Pérez-Quintanilla, S. Morante-Zarcero, I. Sierra, Comparison of different mesoporous silicas for off-line solid phase extraction of 17 β -estradiol from waters and its determination by HPLC-DAD, *J. Hazard. Mater.* 260 (2013) 609–617. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.016>.
- [78] M.V. De Liz, B. Do Amaral, S. Stets, N. Nagata, P. Peralta-Zamora, Sensitive estrogens determination in wastewater samples by HPLC and fluorescence detection, *J. Braz. Chem. Soc.* 28 (2017) 1453–1460. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160324>.
- [79] N.S. Lisboa, C.S. Fahning, G. Cotrim, J.P. Dos Anjos, J.B. De Andrade, V. Hatje, G.O. Da Rocha, A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disrupters determination in marine waters, *Talanta*. 117 (2013) 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.08.006>.
- [80] L. Miranda, M.L. Felsner, Y.R. Torres, I. Hoss, A. Galli, S.P. Quinária, Validação intralaboratorial da determinação de metiltestosterona em águas naturais por voltametria usando eletrodo de gota pendente de mercúrio, *Quim. Nova*. 38 (2015) 419–426. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150014>.
- [81] L. Smy, J.A. Straseski, Measuring estrogens in women, men, and children: Recent advances 2012–2017, *Clin. Biochem.* 62 (2018) 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.05.014>.
- [82] A.P. Vonderheide, B. Boyd, A. Ryberg, E. Yilmaz, T.E. Hieber, P.E. Kauffman, S.T. Garris, J.N. Morgan, Analysis of permethrin isomers in composite diet samples by molecularly imprinted solid-phase extraction and isotope dilution gas chromatography-ion trap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1216 (2009) 4633–4640. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.077>.
- [83] S. Könnemann, R. Kase, E. Simon, K. Swart, S. Buchinger, M. Schlüsener, H. Hollert, B.I. Escher, I. Werner, S. Aït-Aïssa, E. Vermeirssen, V. Dulio, S. Valsecchi, S. Polesello, P. Behnisch, B. Javurkova, O. Perceval, C. Di Paolo, D. Olbrich, E. Sychrova, R. Schlichting, L. Leborgne, M. Clara, C. Scheffknecht, Y. Marneffe, C. Chalon, P. Tušil, P. Soldàn, B. von Danwitz,

- J. Schwaiger, M.I. San Martín Becares, F. Bersani, K. Hilscherová, G. Reifferscheid, T. Ternes, M. Carere, Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 102 (2018) 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.008>.
- [84] A.K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*. 26 (2005) 3995–4021. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>.
- [85] O.R. Heravizadeh, M. Khadem, R. Nabizadeh, S.J. Shahtaheri, Synthesis of molecularly imprinted nanoparticles for selective exposure assessment of permethrin: Optimization by response surface methodology, *J. Environ. Heal. Sci. Eng.* 17 (2019) 393–406. <https://doi.org/10.1007/s40201-019-00358-x>.
- [86] J. Bender, J.W; Krim, Applications of the Piezoelectric Quartz Crystal Microbalance for Microdevice Development, in: *Microscale Diagnostic Tech.*, 2005: pp. 227–251.
- [87] C.K. McGinn, Z.A. Lamport, I. Kymissis, Review of Gravimetric Sensing of Volatile Organic Compounds, *ACS Sensors*. 5 (2020) 1514–1534. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c00333>.
- [88] M. Rodahl, B. Kasemo, A simple setup to simultaneously measure the resonant frequency and the absolute dissipation factor of a quartz crystal microbalance, *Rev. Sci. Instrum.* 67 (1996) 3238–3241. <https://doi.org/10.1063/1.1147494>.
- [89] L. Xiao, Z. Zheng, K. Irgum, P.L. Andersson, Studies of Emission Processes of Polymer Additives into Water Using Quartz Crystal Microbalance-A Case Study on Organophosphate Esters, *Environ. Sci. Technol.* 54 (2020) 4876–4885. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07607>.
- [90] J. Ruterling, M. Ilmer, A. Recio, M. Coleman, J. Vykoukal, E. Alt, N. Orleans, Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review Christina, *Nat. Rev Drug Discov.* 5 (2016) 1–8.
- [91] J. Hu, X. Huang, A. Knoll, Measurement of QCM Mass Sensitivity Using

- Electrodeposition Method, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* 31 (2021) 1–4. <https://doi.org/10.1109/TASC.2021.3107828>.
- [92] S. Gopalakrishna, A. Langhoff, G. Brenner, D. Johannsmann, Soft Viscoelastic Particles in Contact with a Quartz Crystal Microbalance (QCM): A Frequency-Domain Lattice Boltzmann Simulation, *Anal. Chem.* 93 (2021) 10229–10235. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01612>.
- [93] M. Jafari, A. D'haese, J. Zlopasa, E.R. Cornelissen, J.S. Vrouwenvelder, K. Verbeken, A. Verliefde, M.C.M. van Loosdrecht, C. Picioreanu, A comparison between chemical cleaning efficiency in lab-scale and full-scale reverse osmosis membranes: Role of extracellular polymeric substances (EPS), *J. Memb. Sci.* 609 (2020) 118189. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2020.118189>.
- [94] W.D. Liu, Y. Jaiswal, A. Poggi, MA; Wilson, Crystal Microbalance Methods for Detection, in: Binghe Wang and Eric V. Anslyn (Ed.), *Chemosens. Princ. Strateg. Appl.*, John Wiley & Sons, Inc., 2011: pp. 329–344.
- [95] G. Nagy, A. V. Walker, Dynamics of the interaction of vapor-deposited copper with alkanethiolate monolayers: Bond insertion, complexation, and penetration pathways, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 12543–12554. <https://doi.org/10.1021/jp055040+>.
- [96] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, 2005. <https://doi.org/10.1021/cr0300789>.
- [97] D. Cetin, M. Okan, E. Bat, H. Kulah, A comparative study on EpCAM antibody immobilization on gold surfaces and microfluidic channels for the detection of circulating tumor cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 188 (2020) 110808. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110808>.
- [98] V. Rubio-Giménez, S. Tatay, F. Volatron, F.J. Martínez-Casado, C. Martí-Gastaldo, E. Coronado, High-Quality Metal-Organic Framework Ultrathin Films for Electronically Active Interfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 2576–2584. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b09784>.
- [99] X. Zhang, Y. Liu, B. Zheng, J. Zang, C. Lv, T. Zhang, H. Wang, G. Zhao,

- Protein interface redesign facilitates the transformation of nanocage building blocks to 1D and 2D nanomaterials, *Nat. Commun.* 12 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25199-x>.
- [100] O. Carr, P.A. Raymundo-Pereira, F.M. Shimizu, B.P. Sorroche, M.E. Melendez, R. de Oliveira Pedro, P.B. Miranda, A.L. Carvalho, R.M. Reis, L.M.R.B. Arantes, O.N. Oliveira, Genosensor made with a self-assembled monolayer matrix to detect MGMT gene methylation in head and neck cancer cell lines, *Talanta*. 210 (2020) 120609. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120609>.
- [101] R.P. Andres, T. Bein, M. Dorogi, S. Feng, J.I. Henderson, C.P. Kubiak, W. Mahoney, R.G. Osifchin, R. Reifengerger, “Coulomb staircase” at room temperature in a self-assembled molecular nanostructure, *Science* (80-.). 272 (1996) 1323–1325. <https://doi.org/10.1126/science.272.5266.1323>.
- [102] A. Shaporenko, J. Miller, T. Weidner, A. Terfort, M. Zharnikov, J. Mu, Balance of Structure – Building Forces in Balance of Structure-Building Forces in Selenium-Based Self-Assembled, *Communication*. (2007) 2232–2233.
- [103] S. Subramanian, S. Sampath, Enhanced stability of short- and long-chain diselenide self-assembled monolayers on gold probed by electrochemistry, spectroscopy, and microscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 312 (2007) 413–424. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.03.021>.
- [104] A. Venäläinen, K. Meinander, M. Räisänen, V. Tuboltsev, J. Räisänen, Metallization of self-assembled organic monolayer surfaces by Pd nanocluster deposition, *Surf. Sci.* 677 (2018) 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2018.06.006>.
- [105] H. Kang, Y. Kim, I. Choi, R. Chang, W.-S. Yeo, Determination of self-exchange rate of alkanethiolates in self-assembled monolayers on gold using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 843 (2014) 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.028>.
- [106] J.P.B. Lopes, L. Silva, G. da Costa Franarin, M. Antonio Ceschi, D. Seibert Lüdtkke, R. Ferreira Dantas, C.M.C. de Salles, F. Paes Silva-Jr, M. Roberto

- Senger, I. Alvim Guedes, L. Emmanuel Dardenne, Design, synthesis, cholinesterase inhibition and molecular modelling study of novel tacrine hybrids with carbohydrate derivatives, *Bioorganic Med. Chem.* 26 (2018) 5566–5577. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.003>.
- [107] M.S. Ali, M.A. Farah, H.A. Al-Lohedan, K.M. Al-Anazi, Comprehensive exploration of the anticancer activities of procaine and its binding with calf thymus DNA: A multi spectroscopic and molecular modelling study, *RSC Adv.* 8 (2018) 9083–9093. <https://doi.org/10.1039/c7ra13647a>.
- [108] S.M. El-Messery, E.S.E. Habib, S.T.A. Al-Rashood, G.S. Hassan, Synthesis, antimicrobial, anti-biofilm evaluation, and molecular modelling study of new chalcone linked amines derivatives, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 33 (2018) 818–832. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1461855>.
- [109] F.A. Qais, I. Ahmad, In vitro interaction of cefotaxime with calf thymus DNA: Insights from spectroscopic, calorimetric and molecular modelling studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149 (2018) 193–205. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.016>.
- [110] J.T. Bagalkoti, S.D. Joshi, S.T. Nandibewoor, Spectral and molecular modelling studies of sulfadoxine interaction with bovine serum albumin, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 382 (2019) 111871. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.111871>.
- [111] M.M. Alam, F. Abul Qais, I. Ahmad, P. Alam, R. Hasan Khan, I. Naseem, Multi-spectroscopic and molecular modelling approach to investigate the interaction of riboflavin with human serum albumin, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 36 (2018) 795–809. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1298470>.
- [112] L. Pinzi, G. Rastelli, Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.
- [113] I.A. Guedes, C.S. de Magalhães, L.E. Dardenne, Receptor-ligand molecular docking, *Biophys. Rev.* 6 (2014) 75–87. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>.
- [114] R. Rohs, I. Bloch, H. Sklenar, Z. Shakked, Molecular flexibility in ab initio

- drug docking to DNA: Binding-site and binding-mode transitions in all-atom Monte Carlo simulations, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 7048–7057. <https://doi.org/10.1093/nar/gki1008>.
- [115] S. Agarwal, D. Chadha, R. Mehrotra, Molecular modeling and spectroscopic studies of semustine binding with DNA and its comparison with lomustine-DNA adduct formation, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33 (2015) 1653–1668. <https://doi.org/10.1080/07391102.2014.968874>.
- [116] A.J. Rahman, D. Sharma, D. Kumar, M. Pathak, A. Singh, V. Kumar, R. Chawla, H. Ojha, Spectroscopic and molecular modelling study of binding mechanism of bovine serum albumin with phosmet, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 244 (2021) 118803. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118803>.
- [117] S.Y. Huang, X. Zou, Advances and challenges in Protein-ligand docking, *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 3016–3034. <https://doi.org/10.3390/ijms11083016>.
- [118] G. Pujadas, M. Vague, A. Ardevol, C. Blade, M. Salvado, M. Blay, J. Fernandez-Larrea, L. Arola, Protein-ligand Docking: A Review of Recent Advances and Future Perspectives, *Curr. Pharm. Anal.* 4 (2008) 1–19. <https://doi.org/10.2174/157341208783497597>.
- [119] H.M. Deeks, R.K. Walters, S.R. Hare, M.B. O'Connor, A.J. Mulholland, D.R. Glowacki, Interactive molecular dynamics in virtual reality for accurate flexible protein-ligand docking, *PLoS One.* 15 (2020) 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228461>.
- [120] X. Tao, Y. Huang, C. Wang, F. Chen, L. Yang, L. Ling, Z. Che, X. Chen, Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review, *Int. J. Food Sci. Technol.* 55 (2020) 33–45. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14325>.
- [121] K.M. Dnyandev, G.V. Babasaheb, K.V. Chandrashekhar, M.A. Chandrakant, O.K. Vasant, A Review on Molecular Docking, *Int. Res. J. Pure Appl. Chem.* 22 (2021) 60–68. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2021/v22i330396>.

- [122] A.S. Abdelsattar, A. Dawoud, M.A. Helal, Interaction of nanoparticles with biological macromolecules: a review of molecular docking studies, *Nanotoxicology*. 15 (2021) 66–95. <https://doi.org/10.1080/17435390.2020.1842537>.
- [123] S.S. Butt, Y. Badshah, M. Shabbir, M. Rafiq, Molecular Docking Using Chimera and Autodock Vina Software for Nonbioinformaticians, *JMIR Bioinforma. Biotechnol.* 1 (2020) e14232. <https://doi.org/10.2196/14232>.
- [124] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, E.C. Meng, G.S. Couch, T.I. Croll, J.H. Morris, T.E. Ferrin, UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers, *Protein Sci.* 30 (2021) 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>.
- [125] A. Allouche, Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares, *J. Comput. Chem.* 32 (2012) 174–182. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- [126] S. Pirhadi, J. Sunseri, D.R. Koes, Open source molecular modeling, *J. Mol. Graph. Model.* 69 (2016) 127–143. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.07.008>.
- [127] K. Hinsén, The Molecular Modeling Toolkit: A New Approach to Molecular Simulations, *J. Comput. Chem.* 21 (2000) 79–85. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(20000130\)21:2<79::AID-JCC1>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(20000130)21:2<79::AID-JCC1>3.0.CO;2-B).
- [128] J. Jeong, H. Kim, J. Choi, In silico molecular docking and in vivo validation with *Caenorhabditis elegans* to discover molecular initiating events in adverse outcome pathway framework: Case study on endocrine-disrupting chemicals with estrogen and androgen receptors, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20051209>.
- [129] K. Moriyama, T. Tagami, T. Akamizu, T. Usui, M. Saijo, N. Kanamoto, Y. Hataya, A. Shimatsu, H. Kuzuya, K. Nakao, Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 5185–5190. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020209>.
- [130] T. Nose, T. Tokunaga, Y. Shimohigashi, Exploration of endocrine-

- disrupting chemicals on estrogen receptor α by the agonist/antagonist differential-docking screening (AADS) method: 4-(1-Adamantyl)phenol as a potent endocrine disruptor candidate, *Toxicol. Lett.* 191 (2009) 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.08.001>.
- [131] A. Sun, T.W. Moore, J.R. Gunther, M.S. Kim, E. Rhoden, Y. Du, H. Fu, J.P. Snyder, J.A. Katzenellenbogen, Discovering Small-Molecule Estrogen Receptor α /Coactivator Binding Inhibitors: High-Throughput Screening, Ligand Development, and Models for Enhanced Potency, *ChemMedChem*. 6 (2011) 654–666. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000507>.
- [132] W. Yang, S. Wei, H. Liu, H. Yu, Insights into the structural and conformational requirements of polybrominated diphenyl ethers and metabolites as potential estrogens based on molecular docking, *Chemosphere*. 84 (2011) 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.010>.
- [133] W.H. Yang, Z.Y. Wang, H.L. Liu, H.X. Yu, Exploring the binding features of polybrominated diphenyl ethers as estrogen receptor antagonists: Docking studies, *SAR QSAR Environ. Res.* 21 (2010) 351–367. <https://doi.org/10.1080/10629361003773971>.
- [134] D. Montes-Grajales, J. Olivero-Verbel, Computer-aided identification of novel protein targets of bisphenol A, *Toxicol. Lett.* 222 (2013) 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.08.010>.
- [135] C.M. Butt, H.M. Stapleton, Inhibition of thyroid hormone sulfotransferase activity by brominated flame retardants and halogenated phenolics, *Chem. Res. Toxicol.* 26 (2013) 1692–1702. <https://doi.org/10.1021/tx400342k>.
- [136] G. Kerdivel, R. Le Guevel, D. Habauzit, F. Brion, S. Ait-Aissa, F. Pakdel, Estrogenic Potency of Benzophenone UV Filters in Breast Cancer Cells: Proliferative and Transcriptional Activity Substantiated by Docking Analysis, *PLoS One*. 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060567>.
- [137] J.B. Harris, M.L. Eldridge, G. Sayler, F.M. Menn, A.C. Layton, J. Baudry, A computational approach predicting CYP450 metabolism and estrogenic activity of an endocrine disrupting compound (PCB-30), *Environ. Toxicol.*

Chem. 33 (2014) 1615–1623. <https://doi.org/10.1002/etc.2595>.

- [138] M.W. Sawicki, M. Erman, T. Puranen, P. Vihko, D. Ghosh, Structure of the ternary complex of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 with 3-hydroxyestra-1,3,5,7-tetraen-17-one (equilin) and NADP⁺, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 840–845. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.840>.
- [139] T. Kaserer, K.R. Beck, M. Akram, A. Odermatt, D. Schuster, P. Willett, Pharmacophore models and pharmacophore-based virtual screening: Concepts and applications exemplified on hydroxysteroid dehydrogenases, *Molecules*. 20 (2015) 22799–22832. <https://doi.org/10.3390/molecules201219880>.
- [140] C.A. Andac, M. Andac, A. Denizli, Predicting the binding properties of cibacron blue F3GA in affinity separation systems, *Int. J. Biol. Macromol.* 41 (2007) 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.06.008>.
- [141] D. Salha, M. Andaç, A. Denizli, Molecular docking of metal ion immobilized ligands to proteins in affinity chromatography, *J. Mol. Recognit.* 34 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1002/jmr.2875>.
- [142] J. Wang, W. Wang, P.A. Kollman, D.A. Case, Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations, *J. Mol. Graph. Model.* 25 (2006) 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2005.12.005>.
- [143] M. V. Shapovalov, R.L. Dunbrack, A Smoothed Backbone-Dependent Rotamer Library for Proteins Derived from Adaptive Kernel Density Estimates and Regressions, *Structure*. 19 (2011) 844–858. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.03.019>.
- [144] N. Ayawei, A.N. Ebelegi, D. Wankasi, Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms, *J. Chem.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/3039817>.
- [145] L.P. Lin, L.S. Huang, C.W. Lin, C.K. Lee, J.L. Chen, S.M. Hsu, S. Lin, Determination of binding constant of DNA-binding drug to target DNA by surface plasmon resonance biosensor technology, *Curr. Drug Targets Immune, Endocr. Metab. Disord.* 5 (2005) 61–72.

<https://doi.org/10.2174/1568008053174697>.

- [146] S. Rodphukdeekul, M. Tabata, C. Ratanaporncharoen, Y. Takeuchi, P. Somboon, W. Boonlue, Y. Miyahara, M. Sriyudthsak, Quantitative assessment of periodontal bacteria using a cell-based immunoassay with functionalized quartz crystal microbalance, *Chemosensors*. 9 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9070159>.
- [147] R. D'Aurelio, I. Chianella, J.A. Goode, I.E. Tothill, Molecularly imprinted nanoparticles based sensor for cocaine detection, *Biosensors*. 10 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.3390/bios10030022>.
- [148] I. Jelesarov, E. Dür, R.M. Thomas, H.R. Bosshard, Salt effects on hydrophobic interaction and charge screening in the folding of a negatively charged peptide to a coiled coil (leucine zipper), *Biochemistry*. 37 (1998) 7539–7550. <https://doi.org/10.1021/bi972977v>.
- [149] J.T. McCue, *Theory and Use of Hydrophobic Interaction Chromatography in Protein Purification Applications*, 1st ed., Elsevier Inc., 2009. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63025-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63025-1).
- [150] A.K. Singh, *Structure, Synthesis, and Application of Nanoparticles*, 2016. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801406-6.00002-9>.
- [151] C. -H Luan, T.M. Parker, D.C. Gowda, D.W. Urry, Hydrophobicity of amino acid residues: Differential scanning calorimetry and synthesis of the aromatic analogues of the polypentapeptide of elastin, *Biopolymers*. 32 (1992) 1251–1261. <https://doi.org/10.1002/bip.360320914>.
- [152] O.D. Monera, T.J. Sereda, N.E. Zhou, C.M. Kay, R.S. Hodges, Relationship of sidechain hydrophobicity and α -helical propensity on the stability of the single-stranded amphipathic α -helix, *J. Pept. Sci.* 1 (1995) 319–329. <https://doi.org/10.1002/psc.310010507>.
- [153] yongson hong, K.-R. Sin, Y.-U. Ri, J.-S. Pak, Y. Jon, C.-S. Kim, C.-S. Jang, H.-R. Ju, S.-H. Ri, A New Kinetic Model for Multicomponent Adsorption in Batch Systems, (2018). <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.5899393>.
- [154] C.R. Sanders, *Binding_Principles_2010*, Vanderbilt University, 2010. http://structbio.vanderbilt.edu/sanders/Binding_Principles_2010.pdf.

- [155] C. Clarke, F. Spyropoulos, I.T. Norton, A flow velocity dependence of dynamic surface tension in Plateau borders of foam, *J. Colloid Interface Sci.* 573 (2020) 348–359. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.04.028>.
- [156] M. Hisatomi, M. Abe, N. Yoshino, S. Lee, S. Nagadome, G. Sugihara, Thermodynamic study on surface adsorption and micelle formation of a hybrid anionic surfactant in water by surface tension (drop volume) measurements, *Langmuir*. 16 (2000) 1515–1521. <https://doi.org/10.1021/la990332l>.
- [157] S. Yu, L. Pu, *Fluorescent Sensing of Chirality*, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12623-X>.
- [158] T. Ito, N. Aoki, A. Tsuchiya, S. Kaneko, K. Akiyama, K. Uetake, K. Suzuki, Detection of Stress Hormone in the Milk for Animal Welfare Using QCM Method, *J. Sensors*. 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/6486891>.
- [159] W.M. Li, Y.J. Tang, L. Chen, Y.P. Chen, P. Yan, Quartz crystal microbalance-based method to study adsorption of endocrine disruptor compounds on zeolite, *Environ. Technol. (United Kingdom)*. 0 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1720308>.
- [160] Y. Jia, Y. Peng, J. Bai, X. Zhang, Y. Cui, B. Ning, J. Cui, Z. Gao, Magnetic nanoparticle enhanced surface plasmon resonance sensor for estradiol analysis, *Sensors Actuators, B Chem.* 254 (2018) 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.061>.
- [161] D. Chen, X. Wei, Y. Yang, Y. Tu, The dual-modes of QCM immunosensing for estradiol analysis via dynamic or round-off calibration, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 96 (2016) 1389–1401. <https://doi.org/10.1080/03067319.2016.1264582>.
- [162] A. Fulgione, M. Cimafronte, B. Della Ventura, M. Iannaccone, C. Ambrosino, F. Capuano, Y.T.R. Proroga, R. Velotta, R. Capparelli, QCM-based immunosensor for rapid detection of *Salmonella Typhimurium* in food, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34285-y>.
- [163] V.C. Ozalp, G. Bayramoglu, Z. Erdem, M.Y. Arica, Pathogen detection in complex samples by quartz crystal microbalance sensor coupled to

aptamer functionalized core-shell type magnetic separation, *Anal. Chim. Acta.* 853 (2015) 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.010>.



EK 2 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

Sözlü Sunum:

Gülgün Aylaz, Müge Andaç, “Molecular Modeling of Endocrine Disrupting Chemicals and Amino Acids”, 3rd Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress (EBAT), 4-7 Kasım 2021, Antalya, Türkiye.

