



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**C-REAKTİF PROTEİN (CRP) TAYİNİ İÇİN
MOLEKÜLER BASKILANMIŞ NANOPOLİMERLER
KULLANILARAK NANOBIYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Hilal ÖZÇELİK

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**C-REAKTİF PROTEİN (CRP) TAYİNİ İÇİN
MOLEKÜLER BASKILANMIŞ NANOPOLİMERLER
KULLANILARAK NANOBIYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Hilal ÖZÇELİK

Danışman: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Biyokimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bölümü Tezli Yüksek Lisans Programın

İzmir
2024

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**C-Reaktif Protein (CRP) Tayini İçin Moleküler Baskılanmış Nanopolimerler Kullanılarak Nanobiyosensörlerin Geliştirilmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

Tarih**İmza****Adı-Soyadı****Hilal ÖZÇELİK**



ÖZET**C-REAKTİF PROTEİN (CRP) TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER
BASKILANMIŞ NANOPOLİMERLER KULLANILARAK
NANOBIYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

ÖZÇELİK, Hilal

Biyokimya A.B.D. Yüksek Lisans Tezi,

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Temmuz 2024, 85 sayfa

Son yıllarda inflamasyon ve enfeksiyon kaynaklı ölümler milyonlarca insanı etkilemektedir. C-Reaktif Protein (CRP), inflamasyon ve enfeksiyon aktivitesinin tespiti için önemli bir biyobelirteçtir ve bu nedenle CRP tayini kritik öneme sahiptir. Mevcut ticari immünoanalizler çeşitli sınırlamalara sahiptir. Buna karşın nanopolimer ve sensörlerin entegre kullanımı, tayin yöntemlerinin hassasiyetini önemli ölçüde artırmıştır. Hedef moleküller için özel tanıma bölgelerine sahip polimerik malzemeler, moleküler baskılama tekniği ile üretilmektedir. Bu tezde, inflamasyon ve enfeksiyon hastalıklarının takibinde yardımcı olan biyobelirteç CRP'nin tayini amacıyla, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanoyapılar sürfaktant içermeyen emülsiyon polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiş ve bu nanoyapılar sensör yüzeyine immobilize edilerek CRP tayininde kullanılmıştır. Nanopolimerlerin karakterizasyonunda FTIR, SEM, zeta boyut ve potansiyel analizi yapılmıştır. Ortalama 319,7 nm boyutundaki CRP baskılanmış nanoyapıların adsorpsiyon koşulları optimize edilmiştir. 1,0 mg/mL CRP içeren ortamda, moleküler baskılanmış nanoyapının CRP'ye spesifik adsorpsiyon değeri Q_{max} 3,5 mg/mg olarak hesaplanmıştır. Baskılanmış nanopolimerin CRP adsorpsiyonu, baskılanmamış polimere oranla 30 kat daha fazladır ve 8 döngü sonrasında dahi adsorpsiyon kapasitesini % 80 koruduğu gösterilmiştir. Elektrokimyasal yöntemler olarak diferansiyel potansiyel voltametri (DPV) ve

dairesel voltametri (CV) kullanılmıştır. DPV ölçümleri, -0.20 ile +0.60 volt aralığında saniyede 60 mV/s hızında gerçekleştirilmiştir. CV yöntemi sonucunda voltamogramlar ile yüzey hakkında bilgi edinilmiştir. Geliştirilen CRP-baskılı nanosensörün tespit sınırı (LoD) 0.080 μM ve belirleme sınırı (LoQ) 0.243 μM olarak belirlenmiştir. Bu tez, biyolojik örneklerde CRP tespiti için yeni, basit, seçici ve hızlı bir CRP-baskılı nanosensör sunmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Enfeksiyonel Hastalıklar, C-Reaktif Protein, Nanopolimer, Moleküler Baskılanmış Polimerler, Sensör



ABSTRACT**DEVELOPMENT OF NANOBIOSENSORS USING
MOLECULAR IMPRINTING NANOPOLYMERS FOR C-
REACTIVE PROTEIN (CRP) DETERMINATION**

Özçelik, Hilal

MSc Thesis, Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

July 2024, 85 pages

In recent years, inflammation and infection-related deaths have affected millions of people. C-reactive protein (CRP) is a crucial biomarker for detecting inflammation and infection activity, making CRP determination of critical importance. Existing commercial immunoassays have various limitations. However, the integrated use of nanoparticles and sensors has significantly enhanced the sensitivity of detection methods. Polymeric materials with specific recognition sites for target molecules are produced using the molecular imprinting technique. In this thesis, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanostructures were synthesized via a surfactant-free emulsion polymerization method for the determination of CRP, a biomarker that aids in monitoring inflammation and infectious diseases. These nanostructures were immobilized on the sensor surface for use in CRP detection. Characterization of the nanoparticles was conducted using FTIR, SEM, and zeta size and potential analysis. The CRP-imprinted nanostructures, with an average size of 319.7 nm, had their adsorption conditions optimized. In an environment containing 1.0 mg/mL CRP, the specific adsorption value (Q_{max}) of the molecularly imprinted nanostructure for CRP was calculated to be 3.5 mg/mg. The CRP adsorption of the imprinted nanopolymer was 30 times higher than that of the non-imprinted polymer, and it retained 80% of its adsorption capacity even after eight cycles. Differential pulse voltammetry (DPV) and cyclic voltammetry (CV) were employed as electrochemical methods.

DPV measurements were conducted within the range of -0.20 to +0.60 volts at a scan rate of 60 mV/s. The CV method provided insights into the surface properties through voltammograms. The developed CRP-imprinted nanosensor exhibited a limit of detection (LoD) of 0.080 μM and a limit of quantification (LoQ) of 0.243 μM . This thesis presents a novel, simple, selective, and rapid CRP-imprinted nanosensor for the detection of CRP in biological samples.

Keywords: Infectious Diseases, C-Reactive Protein, Nanopolymer, Molecularly Imprinted Polymers, Sensor



ÖNSÖZ

Son yıllarda, milyonlarca insanı etkileyen ölümlerin kaynağı inflamasyon ve infeksiyonlardır. Bu bağlamda, inflamasyon ve infeksiyonda aktivite tespitine yardımcı olan C-Reaktif Protein (CRP), biyobelirteç olarak ön plana çıkar ve bu nedenle CRP tayini büyük öneme sahiptir. Ancak, mevcut ticari immünoanalizlerin birçok sınırlaması bulunmaktadır. Bu sebeple, nanopolimer ve sensörlerin entegre kullanımı, tayin yöntemlerini önemli ölçüde arttırarak daha yüksek hassasiyet seviyelerine ulaşmıştır. Kimyasal fonksiyona sahip hedef moleküller için özel tanıma bölgelerine sahip polimerik malzemeler, moleküler baskılama tekniği kullanılarak üretilir.

Bu tez çalışmam kapsamında, inflamasyon ve infeksiyon hastalıklarının takip edilmesinde yardımcı olan bir biyobelirteç CRP' nin tayin edilmesi amacıyla C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanoyapılar sürfaktant içermeyen emülsiyon polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmesi, karakterizasyonu ve bu nanoyapıların sensör yüzeyine immobilizasyonu yapılarak CRP tayininde kullanılmasını amaçlanmaktadır. Bu çalışmada üretilen nanoyapılara CRP adsorpsiyonu ve sensörle tayin çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, nanoteknojinin gelişmesiyle klinikte analiz yöntemlerinde daha hassas ve doğru ölçüm alınması konusunda yardımcı olması düşünülmektedir.

İZMİR

TARİH

Hilal ÖZÇELİK



İÇİNDEKİLER

eSayfa

İç Kapak.....	ii
Etik Kurallara Uygunluk Beyanı	iii
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 İnfeksiyonel Hastalıklar ve Teşhis Yöntemleri	1
1.1.1 Biyobelirteçler	1
1.1.2 Proteinler.....	2
1.1.2.1 C-Reaktif Protein.....	2
1.2.1 Moleküler Baskılama Teknolojisi	5
1.2.1.1 Moleküler Baskılama Yöntemleri.....	8
a. Kovalent baskılama	8
b. Nonkovalent baskılama	9
1.2.1.2 Moleküler Baskılama Bileşenleri	10
a. Fonksiyonel monomerler	10
b. Şablon (Kalıp molekül)	11
c. Çapraz bağlayıcı	12
d. Çözücüler.....	13
e. Başlatıcılar	13
1.2.1.3 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları	14
1.3 Nanobiyosensörler	14
1.3.1 Elektrokimyasal Biyosensörler	15
1.4 CRP Tayin Metotları.....	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
2.1 Materyal	24
2.2 Cihazlar	24
2.3 İyileştirilmiş Hummers metodu ile Grafen Oksitin Sentezlenmesi (GO).....	25
2.4 Grafen Oksidin Silanizasyonu (MPTS-GO)	25
2.5 MPTS-GO'nun İndirgenmesi (S-rGO)	25
2.6 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] Nanopolimer Sentezi.....	26

2.7 Sentezlenen Nanopolimerin Karakterizasyonunun Yapılması	28
2.7.1 Baskılanmış ve baskılanmamış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] ve CRP-non-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) ölçümleri	29
2.7.2 CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüleri	29
2.7.3 CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin Zeta Boyut Analizi.....	29
2.7.4 CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin Zeta Potansiyel Analizi.....	29
2.7.5 CRP'nin Belirlenmesi için UV-Spektrofotometre Analizi	30
2.7.6 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] Nanopolimerlerinin Adsorbsiyon Koşullarının Optimizasyonu	31
2.7.6.1 CRP Adsorbsiyonuna Zaman Etkisinin İncelenmesi	31
2.7.6.2 CRP Adsorbsiyonuna pH Etkisinin İncelenmesi	31
2.7.6.3 CRP Adsorbsiyonuna Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi	32
2.7.6.4 CRP Adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi.....	32
2.7.6.5 CRP Adsorpsiyonu Tuz derişimi Etkisi	32
2.8.Nanobiyosensör Yüzeyinin Hazırlanması ve karakterizasyonu.....	33
2.8.1 Nanobiyosensör Geliştirme Çalışmaları	33
2.8.1.1 Ferri-ferro çözeltisinin hazırlanması ve kullanımı.....	33
2.8.1.2 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE Yüzeyinin Hazırlanması	34
2.8.2CRP Tayinine Yönelik Nanobiyosensör Optimizasyon Çalışmaları	34
2.8.2.1.Optimum Tarama Hızı	34
2.8.2.2 Nafyon Konsantrasyonu Etkisi	34
2.8.2.3 Polimer Konsantrasyonu Etkisi.....	34
2.8.2.4 Polimer Film Hacmi Etkisi	35
2.8.2.5 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon ile modifiye edilmiş SPCE'nin analitik performansı.....	35
2.8.2.6 Yapay Kan Örneği Analizi.....	35
2.8.2.7 Seçicilik Çalışması.....	35
2.8.2.8 Tekrarlanabilirlik Denemeleri.....	36

3. SONUÇ	37
3.1 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] Polimer Sentezi ve Karakterizasyonu.....	37
3.1.1 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] Polimer FTIR Analizi	37
3.1.2 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] Polimer SEM Görüntüleri.....	39
3.1.3 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] Polimer Zeta Boyut Analizi	40
3.1.4 CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin Zeta Potansiyel Analizi	41
3.1.5 CRP'nin Belirlenmesi İçin UV-Spektrofotometre Analizi.....	41
3.1.6 CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] polimerin Adsorbsiyon Koşullarının Optimizasyonu	43
3.1.6.1 CRP Adsorbsiyonunda Zaman Etkisinin İncelenmesi.....	43
3.1.6.2 CRP Adsorbsiyonuna pH Etkisinin İncelenmesi	44
3.1.6.3 CRP Adsorbsiyonuna Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi.....	45
3.1.6.4 CRP adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonun etkisinin İncelenmesi.....	47
3.1.6.7 CRP adsorpsiyonu üzerine tuz derişiminin etkisinin incelenmesi.....	49
3.2 Nanobiyosensör Optimizasyon Çalışmaları	50
3.2.1 Optimum Tarama Hızı.....	50
3.2.2 Nafyon Konsantrasyonu Etkisi	51
3.2.3 Polimer konsantrasyonu etkisi.....	52
3.2.4 Polimer Film Hacmi Etkisi	53
3.2.5 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon ile modifiye edilmiş SPCE'nin analitik performansı.....	55
3.2.6 Yapay Kan örneği Analizi	57
3.2.7 Seçicilik Çalışması.....	58
3.2.8 Tekrarlanabilirlik	60
4. DEĞERLENDİRME	61
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	66
TEŞEKKÜR	82
ÖZGEÇMİŞ.....	83



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. 1 Şekil 1.1 Artan CRP üretimine yol açan ana yollar (Vashist vd., 2016).	3
Şekil 1. 2 Moleküler baskılanmış polimer hazırlama prensibinin şeması (Saylan vd., 2019).....	7
Şekil 1. 3 Tipik biyosensörlerin çeşitli modülleri (Kulkarni vd.,2022).....	15
Şekil 1. 4 SPCE Elektrot (Vasiliadou vd.,2016).....	17
Şekil 1. 5 Grafen oksidasyon basamakları (Raji vd., 2019).	20
Şekil 2. 1 GO'in sentezlenmesi, silanizasyonu ve indirgenmesi.	26
Şekil 2. 2 A) CRP ve MMA Ön Kompleks ve B) poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] terpolimerinin kopolimerizasyonun spesifik etkileşiminin şematik gösterimi	27
Şekil 2. 3 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimeri sentezi.....	27
Şekil 2. 4 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE sensör sisteminin hazırlanmasının şematik gösterimi.....	28
Şekil 2. 5 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimeri sentez sonrası fotoğrafları.	28
Şekil 3. 1 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] ve CRP-non-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerlerinin FTIR spektrumları.	37
Şekil 3. 2 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerlerinin SEM fotoğrafları.	39
Şekil 3. 3 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerin ZETA boyut analizi.....	40
Şekil 3. 4 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerin ZETA potansiyel analizi.	41
Şekil 3. 5 CRP'nin spektral tarama grafiği.	42
Şekil 3. 6 CRP'ye ait kalibrasyon grafiği	43
Şekil 3. 7 CRP adsorpsiyonu üzerine zamanın etkisi (CCRP:1,0 mg/mL, pH:7,0 (50 mM, fosfat tamponu) T:25 °C).	44
Şekil 3. 8 CRP adsorpsiyonu üzerine pH etkisi (CCRP:1,0 mg/mL, T:25 °C,tadsorpsiyon: 2 saat).	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

Şekil 3. 9 CRP adsorpsiyonu üzerine sıcaklık etkisi (CCRP:1,0 mg/mL, pH:7,0 (50 mM fosfat tamponu) tadsorpsiyon: 2 saat).	46
Şekil 3. 10 CRP adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonun etkisi (pH:7,0 (50 mM fosfat tamponu)T:37 °C, tadsorpsiyon: 2 saat).....	48
Şekil 3. 11 CRP adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonun etkisi (CCRP:1,0 mg/mL, pH:7,0 (50 mM fosfat tamponu)T:37 °C, tadsorpsiyon: 2 saat).	49
Şekil 3. 12 A) 10 ila 100 mV/s tarama hızlarında kaydedilen çevrimsel voltamogramlar, B) 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} çözeltisinde çıplak Serigrafi Baskılı Karbon Elektrot (SPCE), Nafyon/SPCE ve C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] /Nafyon-SPCE'nin CV'leri.	51
Şekil 3. 13 Farklı konsantrasyonlardaki Nafyon varlığında A) DPV ölçümleri, B) DPV akım pik değerlerinin kıyaslanması.	52
Şekil 3. 14 Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} çözeltisinde, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon ile modifiye edilmiş SPCE'nin DPV pik değerleri, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] konsantrasyonlarının 0 ile 2 mg/mL arasında değişen konsantrasyon sonuçları.....	53
Şekil 3. 15 Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} çözeltisinde, kaydedilen DPV sonuçları üzerinde C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon'un 5 ile 20 µL arasında değişen hacimlerinin etkisi.....	54
Şekil 3. 16 A) pH 7.0 olan 50 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} çözeltisinde CRP miktarının artışına bağlı olarak kaydedilen DPV tepkisi,B) Ag/AgCl'e karşı -0.2≤E≤0.6 V potansiyel aralığında ve 60 mV/s tarama hızında taranmış ve doğrusal çalışma aralığı.	55
Şekil 3. 17 A) Yapay kan örneklerinde farklı CRP konsantrasyonlarının % geri kazanımı B) Yapay kan örneklerinde farklı CRP konsantrasyonlarının DPV'leri.	57

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

Şekil 3. 18 14.50 mM fosfat tamponu (pH: 7,0) 1 mg/mL CRP, ürik asit ve BSA'nın % göreceli yanıtı, $-0.2 \leq E \leq 0.6$ V potansiyel aralığında ve 60 mVs– tarama hızında taranmış sonuçları.	59
Şekil 3. 19 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE modifiye elektrodun, 1 mg/mL CRP içeren yapay kan örneğinde (pH 7.0) tekrarlanabilirliği, 60 mVs– tarama hızında -0.2 ila 0.6 V potansiyel aralığında gerçekleştirilen DPV sonuçları.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİÇizelgeSayfa

Çizelge 2. 1 Çalışmada kullanılan cihaz ve sistemler.....	24
Çizelge 3. 1 Bu çalışmanın daha önce bildirilen voltametrik CRP sensörleri ile karşılaştırması.	56



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

π	π
Q	adsorpsiyon kapasite değeri
G	serbest enerji değişimi
H	entalpi değişimi
T	sıcaklık
ΔS	entropi

Kısaltmalar

Açıklama

CRP	C-Reaktif Protein
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer
İmp	Baskılanmış
GO	Grafen Oksit
S-GO	Silanize Grafen Oksit
S-rGO	İndirgenmiş Silanize Grafen Oksit
PAMP'ler	Patojenle İlişkili Moleküler Modeller
NF κ B	B hücrelerinin nükleer faktör kappa hafif zincir artırıcısı
TLR	Geçiş Benzeri Reseptörler
H-bağ	Hidrojen bağı
FTIR	Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
IL-1 β	İnterlökin 1 beta
IL-18	İnterlökin 18
DAMP'ler	Hasar İlişkili Moleküler Modeller
pCRP	Pentamerik C-Reaktif Protein
hsCRP	Yüksek Duyarlıklı C-Reaktif Protein
DNA	deoksiribo nükleik asit
RNA	ribonükleik asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ELISA	enzim immünoassay
MIT	Moleküler Baskılama Tekniği
UV	ultraviyole
WE	Çalışma elektrodu
RE	Referans elektrodu
CE	Karşı elektrodu
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
CV	Döngüsel voltametri
GO	Grafen Oksit
rGO	İndirgenmiş Grafen Oksit
S-GO	Silanize Grafen Oksit
S-rGO	İndirgenmiş Silanize Grafen Oksit
Fc	Kristalleştirilebilir bölge
FRP	Serbest Radikal Polimerizasyonu
RAFT	Tersinir Katılma-Bölünme Zincir Transfer
ATRP	Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu
MWCNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler
AEDP	2-Akrilamidoetil dihidrojen fosfat
DMAA	N-(4-Dimetilaminofenil)akrilamid
PDA	Polidopamin
DHI	6-Dihidroksiindol
4NPPC	o-(4-Nitrofenilfosforil)kolin
WS ₂	Tungsten Disülfür
LoD	Tespit Limiti
LoQ	Miktar Tayini Sınırı
PVA	polivinilalkol
TEMED	Tetrametiletildiamin
MPTS	(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane
HEMA	2-hidroksi etil metakrilat
MMA	metil metakrilat

EGDMA	etilenglikoldimetakrilat
DMSO	dimetil sülfoksit
APS	amonyum persülfat
WHO	Dünya Sağlık rgt
AGİT	Avrupa Güvenlik ve İşbirliği Teşkilatı





1. GİRİŞ

1.1 İnfeksiyonel Hastalıklar ve Teşhis Yöntemleri

Küresel CRP testi pazar büyüklüğü 2021'de 2,76 milyar seviyelerinde seyretmiş ve 2021-2030 dönemi boyunca %2,4'lük bir yıllık büyüme ile 2030'a kadar 3,42 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Saxena ve Sharma, 2016). Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre CRP, iltihabı veya enfeksiyonu erken dönemde tespit etmek için kullanılabilen bir akut faz proteinidir (Pleabani, 2023). American Heart Association Statistics 2022'ye göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde 874.613 ölüme neden olan kardiyovasküler hastalık ölümünün altında yatan neden olarak bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık olarak her 40 saniyede bir miyokard enfarktüsü meydana gelmekte ve felçli bir kişi ortalama 3,5 dakikada bir ölmektedir (Tsao vd., 2023). Bu senaryolar, CRP testi pazarının büyümesinin ana sebeplerindendir.

CRP belirteçlerinin artan kullanımı ve inflamatuvar bağırsak hastalığı, bakteriyel enfeksiyonlar, romatoid artrit ve osteomiyelit gibi hastalıkların oranlarındaki artış nedeniyle CRP testi pazarının hızla artması beklenmektedir (Sproston ve Ashworth, 2018). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, dünya çapında yılda yaklaşık 17,9 milyon insan kardiyovasküler hastalıklardan ölmektedir (Tsao vd., 2023). CRP testleri, klinisyenlerin kalp krizi durumunda kan damarlarındaki inflamatuvar aktiviteyi tespit etmesine yardımcı olur (Arroyo-Espliguero vd., 2021). Gelecekteki kardiyovasküler olaylarla olan bu güçlü bağlantı, CRP'ye klinik uygulamada yeni bir analitik olasılık sağlamıştır. CRP, sistemik inflamatuvar durumların tanımlanması için büyüyen bir pazar olarak ortaya çıkmış ve klinisyenlere daha spesifik tanı teknikleriyle devam etmeleri için çeşitli ön bilgiler sunmuştur.

1.1.1 Biyobelirteçler

Biyobelirteç araştırmaları, çeşitli alanlarda giderek artan bir ilgi görmektedir (Köse ve Maden, 2013). Biyobelirteçler, sağlık ve hastalık durumlarındaki değişiklikleri gösteren ve patolojik durumların belirlenmesine yardımcı olan

biyolojik süreç göstergeleridir (Ahmad vd., 2023). Dünya Sağlık Örgütü ve Avrupa Güvenlik ve İşbirliği Teşkilatı (AGİT) gibi önemli kuruluşlar tarafından da kabul edilen biyobelirteç kavramı, Ulusal Kansere Enstitüsü tarafından kan, vücut sıvıları veya dokularda bulunan, normal veya anormal durum ya da hastalığı gösteren biyolojik moleküller olarak tanımlanmaktadır (Poste, 2011).

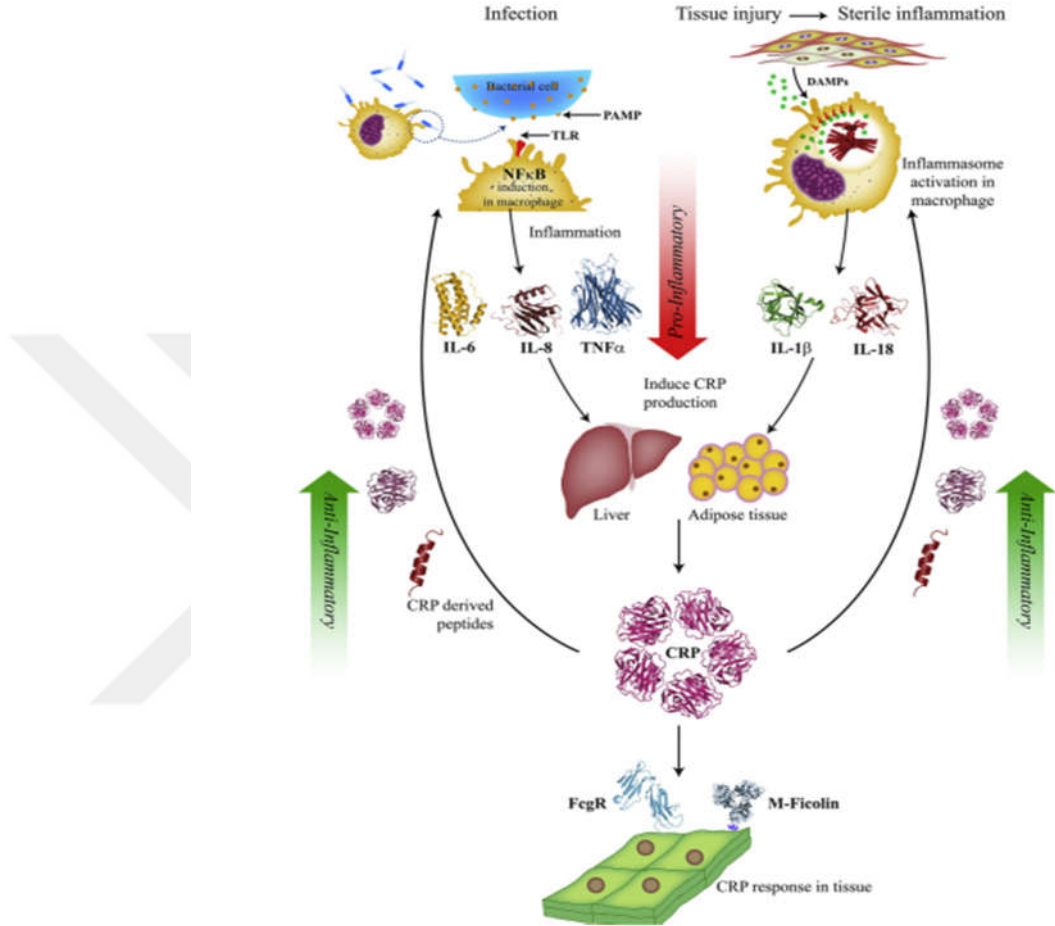
1.1.2 Proteinler

Canlı organizmaların moleküler mekanizmalarını anlamak için, protein fonksiyonları kritik bir öneme sahiptir. Proteinlere ait fonksiyonlar belirlenirken, proteinlerin yapılarından yararlanılır (Avery vd., 2022). Protein fonksiyonları, özellikle karakterize edilmemiş protein dizilimlerinin anotasyonlarını belirleme, canlıların hücresel mekanizmalarını anlama, genlerde ya da proteinlerde hastalığa neden olan fonksiyonel değişiklikleri tespit etme ve hastalıkların önlenmesi, tedavi edilmesi ve teşhisi için yeni yaklaşımlar geliştirme gibi alanlarda kullanılmaktadır (Türkoğlu ve Alakuş, 2022).

1.1.2.1 C-Reaktif Protein

CRP, her biri 206 amino asitten oluşan ve yaklaşık 115.000 moleküler ağırlığa sahip genel bir yapıya sahip düzlemsel bir siklik beşgen disk olarak bağlanan beş özdeş glikosile edilmemiş alt birimden oluşur (Chou vd., 2005). Enfeksiyon biyobelirteci olarak tanımlanan CRP enfeksiyonun ileri evrelerinde başlangıçta olduğundan daha yüksek seviyelere çıkar (Tillett ve Francis, 1930). Son zamanlarda, pentamer simetrisinden yoksun, protrombotik özelliklere sahip bir monomerik CRP de rapor edilmiştir (Molins vd., 2008). CRP, karaciğerde hepatositler tarafından üretilen akut faz inflamatuvar bir proteindir (Ross ve Ballou, 2023). Yaralarda, enfeksiyonlarda ve aşırı duyarlılık reaksiyonları, enflamatuvar hastalıklar, allogreft reddi, malignite, nekroz ve travma gibi diğer enflamatuvar uyarılarda ve ayrıca gebelikte yüksek kan CRP seviyeleri ölçülmüştür (Pandya vd., 2024). Özellikle, kan serum seviyeleri ile kardiyovasküler hastalık riskinin ciddiyeti arasındaki korelasyona çok dikkat edilmiştir (Bryan vd., 2013). Diğer çalışmalar, yüksek kan CRP'sinin gelecekteki daha büyük kardiyovasküler risklerle ilişkili olabileceğini göstermiştir; 1,0 mg L⁻¹ 'in altındaki CRP seviyeleri

düşük risk, 1,0 ila 3,0 mg L⁻¹ orta risk ve 3,0 ila 10,0 mg L⁻¹ yüksek risk'i gösterir (Pfützner ve Forst, 2006). Bu konsantrasyon seviyeleri, viral bir enfeksiyon durumunda 20-40 mg/L'ye, hatta bakteriyel bir enfeksiyon durumunda 500 mg/L'ye kadar çıkabilir (Albrecht vd.,2008).



Şekil 1. 1 Şekil 1.1 Artan CRP üretimine yol açan ana yollar (Vashist vd., 2016).

Şekil 1.1'de görüldüğü üzere, solda patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP'ler), Aktive B hücrelerinin nükleer faktör kappa hafif zincir artırıcısı (NFκB) aktivasyonunu ve yüzeyde ifade edilen geçiş benzeri reseptörler (TLR) tarafından diğer enflamatuar yolları yönlendirir ve makrofajlardan enflamatuar sitokinlerin salınmasını uyarır (Vashist vd., 2016). PAMP yolu, karaciğerden CRP salınımını düzenlemede daha aktiftir. Şekil 1'de sağda görüldüğü üzere paralel bir aktivasyon yolunda, majör doku yaralanması, Interlökin 1 beta (IL-1β) ve Interlökin 18'in (IL-18) enflamasyon aracılı işlemlerini etkinleştirmek için hasar (veya tehlike) ile ilişkili moleküler modellerin (DAMP'ler) salınmasıyla "steril

inflamasyon yolunu" aktive eder (Kang ve Tang, 2017). Endozomal reseptörlere bağlanır. Pentamerik CRP (pCRP) daha sonra kristalleştirilebilir bölge (Fc reseptörleri) ve M-fikolin gibi diğer bağlayıcı moleküller yoluyla hedef dokulara (şematik alt uç) bağlanır (Thiele vd., 2015). pCRP, proinflamatuvar bir ortamda proteolitik bölünmeden türetilen monomerik CRP'ye veya daha küçük peptitlere modifiye edilebilir (Zeller vd., 2023). CRP, proinflamatuvar etkilerine ek olarak, PAMP- ve DAMP ile aktive olan makrofajların geri bildirim düzenlemesi yoluyla bir anti-inflamatuvar aracı olarak da işlev görebilir (Ruiz-Fernández vd., 2023).

Şekil 1.1'den de görüldüğü gibi CRP inflamasyonda ve enfeksiyonda önemli bir rol oynar. Yüksek düzeyde duyarlı CRP'nin (hsCRP) yüksek seviyeleri, doğrudan kardiyovasküler risk (Ridker, 2003, Ridker, 2004), aterosklerotik hastalık (Ridker, 2003, Sung vd., 2014), akut miyokard enfarktüsü (Tanaka vd., 2005) ve akut koroner sendromlar ile ilişkilidir (De Servi vd., 2005). Gelecekteki miyokard enfarktüsünü öngörmede hsCRP'nin merkezi rolünü doğrulayan dönüm noktası niteliğindeki bir raporun ardından (Ridker vd., 1997), hsCRP, ateroskleroz ve sekellerinin önemli bir biyobelirteç olarak geniş çapta kabul görmüştür. hsCRP'nin aterogenezdaki rolü gelecekteki çabaların konusu olarak belirsizliğini korusa da, CRP ilgi, umut ve derinlemesine araştırma yaratan birkaç biyobelirteçten biridir (Denegri ve Boriani, 2021).

1.2 Nanobiyoteknoloji ve Nanopolimerler

Nanobiyoteknoloji, nanometre ölçeğindeki materyallerin ve cihazların biyoloji ve tıp alanlarındaki uygulamalarını inceleyen, tasarlayan ve geliştiren bir multidisipliner bilim dalıdır. Bu teknoloji, biyolojik sistemlerin moleküler düzeyde manipülasyonunu ve kontrolünü hedefler (Sahu vd., 2023). Moleküler seviyede çalışarak, nanobiyoteknoloji, özellikle yapay enzimler, moleküler aygıtlar ve biyosensörler gibi yenilikçi nanomalzemelerin geliştirilmesine odaklanır. Ayrıca, hastalıkların erken teşhisinden tedavi yöntemlerine kadar geniş bir yelpazede uygulamalara sahiptir. Bu alanda yapılan çalışmalar, nanobiyoteknolojinin biyomedikal alanda önemli ilerlemeler sağlayabileceği umudunu taşımaktadır (Joseph vd., 2023).

Nanopolimerler, nanometre ölçeğinde boyuta sahip olan polimer yapılarıdır. Genellikle 1 ila 100 nanometre arasındaki boyutlarıyla karakterize edilirler (Marangoz ve Yavuz, 2020). Polimerler, tekrarlayan yapı birimlerinden (monomerler) oluşan büyük moleküler bileşiklerdir. Nanopolimerler, bu polimer zincirlerinin nanoölçek boyutlarda düzenlendiği ve özel özelliklere sahip olduğu bir alt küme olarak öne çıkar (Vasapollo vd., 2011). Nanopolimerlerin özellikleri, büyük ölçüde nanoölçek boyutlarından kaynaklanır. Bu küçük boyut, yüksek yüzey alanı, büyük reaktivite ve çeşitli uygulamalarda kullanılabilme yetenekleri gibi avantajlar sağlar (Oyar, 2014).

Birden fazla türde monomerden türetilmiş polimerlere kopolimer denir. İki monomer türünün kopolimerizasyonu ile elde edilen kopolimerler bazen bipolimer olarak adlandırılır. Üç monomer türünden elde edilenler terpolimer, dört monomer türünden elde edilenler ise kuaterpolimer olarak adlandırılır (IUPAC, 2008).

Nanopolimerler, nanobiyoteknoloji alanında önemli bir rol oynayan ve çeşitli avantajlar sunan bir bileşendir. Bu özel türdeki polimerler, biyolojik ve tıbbi uygulamalarda nanoteknoloji prensiplerini kullanarak çeşitli malzemelerin tasarımı, üretimi ve uygulanmasını içeren nanobiyoteknoloji kapsamında çeşitli uygulamalara hizmet eder (Malik vd., 2023). Özellikle ilaç salımı konusunda, nanopolimer tabanlı sistemler ilaçları hedeflenen hücrelere veya dokulara taşıyarak tedavi edici etkiyi artırabilir ve yan etkileri azaltabilir (Patra vd., 2018). Bu nanopolimerler aynı zamanda biyomedikal görüntüleme, doku mühendisliği ve biyosensörler gibi alanlarda da kullanılarak çeşitli biyomedikal uygulamalara yönelik inovatif çözümler sunar. Bu entegrasyon, nanopolimerlerin nanobiyoteknoloji bağlamında biyomedikal alandaki potansiyelini artırarak tedavi yöntemlerini geliştirmeye ve biyolojik analizlerde ilerleme kaydetmeye olanak tanır (Valavanidis ve Vlachogianni, 2016).

1.2.1 Moleküler Baskılama Teknolojisi

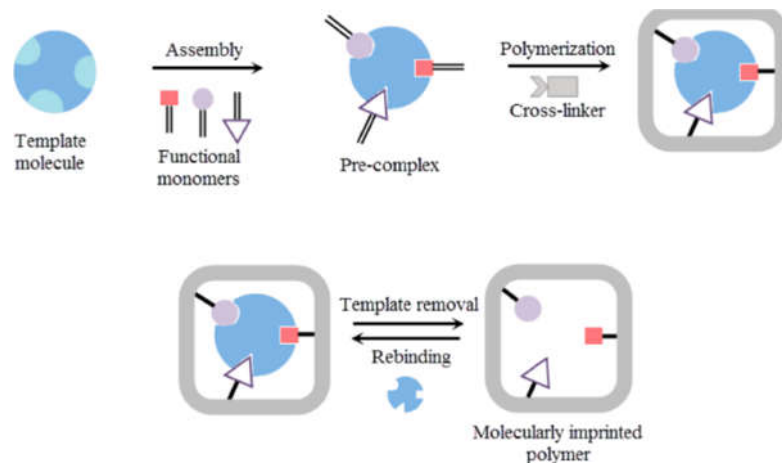
Son yıllarda, sentetik polimer hazırlığı için moleküler baskılama yöntemi, makromoleküler yapay reseptörler elde etmek için en fazla ilgi gören

yöntemlerden biri haline gelmiştir. Moleküler etkileşim kavramı, Fischer'in 1894'te ilk defa ortaya attığı ünlü "anahtar-kilit" modeli ile tarihlenir ve zamanla modern fikirlerle gelişmiştir. Bu modelde, enzim molekülünün yüzeyinde, substrat molekülünün şeklini tamamlayan uygun yapılar bulunmaktadır ve substrat, bir anahtar gibi enzimin aktif bölgeleriyle etkileşime geçer (Tripathi ve Bankaitis, 2017). Moleküler etkileşim kavramının günümüzdeki en önde gelen ve yaygın uygulamalarından biri de moleküler baskılama yöntemidir (Mosbach ve Ramström, 1996). Yasa dışı ilaçlar ve kimyasal savaş ajanlarının tespiti, modern biyoteknoloji alanında önemli bir konu olup, bunun yanı sıra klinik teşhisler, çevresel analizler, gıda analizi ve üretiminde ortaya çıkan yeni talepler ve fırsatlar, hedef moleküle özgü şekilde bağlanabilen biyomimetik reseptör sistemlerini içeren hassas ve seçici uygulama alanlarını ortaya çıkarmıştır (Haupt ve Mosbach, 2000). Moleküler baskılama yöntemi ile oluşturulan taşıyıcılar, yüksek seçicilik özellikleri sayesinde hedef moleküle karşı büyük bir potansiyel sergilemektedir. Bu yöntem, ilk kez 1972'de Günter Wulff ve ekibi tarafından tanımlanmış olup, sentetik polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle özel bağlanma bölgeleri oluşturmak amacıyla kullanılmıştır (Wulff vd., 1987).

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP), biyolojik reseptörlerin özgülüğü ve seçiciliği gibi avantajlarıyla birlikte çevresel direnç ve düşük maliyet gibi özellikleri potansiyel olarak içermektedir (Dar vd., 2020). Örneğin, doğal reseptörler genellikle insan vücut sıcaklığı aralığında depolama ve uygulama gerektirirken, MIP'leri içeren polimer konakçılar genellikle süresiz depolanabilir, genellikle özel çevresel koşullara ihtiyaç duymazlar ve çok daha geniş bir sıcaklık aralığında kullanılabilirler (BelBruno, 2018). MIP'ler, belirli bir monomer ve çapraz bağlama maddesinin varlığında polimerleşmeye dayalıdır (Dong vd., 2023). Bu kalıplama süreci, kullanılan şablon molekülüne özgü olan seçici bir yapı oluşturur. Ayrıca, MIP'lerdeki baskı sonrası değişiklikler, sadece polimerin özel uyarlamalarına izin vermekle kalmaz, aynı zamanda hedef molekül ile MIP arasındaki etkileşimi artırabilir (Wang vd., 2022; Sun vd., 2023; Matsumoto vd., 2019).

MIP'lerin temel avantajları, yüksek seçicilikleri ve baskılama sürecinde kullanılan hedef moleküle olan ilgileridir. Baskılı polimerler, biyolojik sistemlere göre daha yüksek fiziksel dayanıklılığa, dirence, yüksek sıcaklık, basınç, asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücülere karşı dirence sahiptir (Hasanah vd., 2021). Bunun yanı sıra, daha ekonomiktirler ve polimerlerin depolama ömrü çok uzun olabilir; bu nedenle tanıma yetenekleri oda sıcaklığında birkaç yıl boyunca korunabilir (Vasapollo vd., 2011).

Şablon ile fonksiyonel monomer ile arasında kovalent veya kovalent olmayan bir kompleks oluşumu, üç temel aşamadan geçer (Takeuchi ve Haginaka, 1999). Şekil 1.2'de görüldüğü üzere, ilk olarak ön-kompleks oluşumu aşamasında fonksiyonel monomer ve şablon, kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle birbirine bağlanır. Sonrasında, polimerizasyon aşamasında, bu komplekslerin yapıları polimerin üç boyutlu ağında sabitlenir. Fonksiyonel monomere gelen fonksiyonel gruplar, şablonla topoğrafik olarak uyumludur (Sajini ve Mathew, 2021). Son aşamada ise kalıp molekülün polimerden çıkarılması gerçekleşir ve kalıp molekülleri polimerden uzaklaştırılır. Bu süreç sonucunda, polimerde şablonun kapladığı bölgeler boşluk olarak kalır. Uygun şartlar altında, bu alanlar şablonun boyutunu, yapısını ve diğer fizikokimyasal özelliklerini hatırlar ve molekülü veya benzerini etkili ve seçici bir şekilde bağlar (Mayers ve Whitcombe, 2005).



Şekil 1. 2 Moleküler baskılanmış polimer hazırlama prensibinin şeması (Saylan vd., 2019).

Moleküler baskılama işlemi için çeşitli polimerizasyon teknikleri (radikal, anyon, katyon ve kondenzasyon) tercih edilebilir (Karim vd., 2005). Seçilecek polimerizasyon koşulları, bileşenlere (kalıplar, çapraz bağlayıcı ajanlar, monomerler ve non-kovalent etkileşimler gibi diğer unsurlar) zarar vermemelidir. Ancak, hem hazırlama hem de uygulama süreçlerindeki kullanım kolaylığı nedeniyle genellikle radikal polimerizasyon tekniği tercih edilmektedir (Vlatakis vd., 1993).

Moleküler baskılama polimeri üretimine yönelik temel stratejiler, ön polimerizasyon evresinde kalıp molekül ile monomerlerin fonksiyonel grupları arasındaki etkileşim türüne bağlı olarak kovalent ve kovalent olmayan olarak iki kategoriye ayrılabilir (Hashim vd., 2014).

1.2.1.1 Moleküler Baskılama Yöntemleri

a. Kovalent baskılama

Günter Wulff ve ekibi, kovalent imprinting tekniği olarak da bilinen ön-organizasyon yaklaşımı geliştirdi. Bu yöntemde, polimerizasyon öncesinde çözeltide şablon-monomer kompleksi, tersinir kovalent bağlarla bağlanır ve bu nedenle moleküler tanıma, bu bağların oluşturulması ve kırılmasıyla gerçekleştirilir (Wulff vd., 1977).

Moleküler baskılama içindeki bazı kovalent etkileşim örnekleri arasında, polimer sentezi öncesinde Schiff bazı bağlarının, boronik ester bağlarının, ketal bağlarının veya asetal bağlarının kurulması bulunmaktadır (Wulff vd., 1984). Bu noktada, çapraz bağlayıcı ajanın bol miktarda bulunduğu bir ortamda polimerizasyon gerçekleşir ve çözünmeyen, sert bir ağ elde edilir. Kovalent bağlar, kimyasal etkileşim yoluyla şablonun çıkarılması için çözümleri gereken, hedef moleküle uygun sterk ve fonksiyonel topoğrafiye sahip belirgin bağlanma boşluklarına neden olur (Yılmaz vd., 2000).

Bu yöntemin bir avantajı, şablon-monomer komplekslerinin tam stokiyometrisi sayesinde spesifik olmayan etkileşim olasılığını azaltarak, yalnızca baskılı boşluklarda bulunan bağlanma gruplarına sahip polimerlerin hazırlanmasına izin vermesidir (Martin-Esteban, 2004). Polimerizasyon

esnasındaki komplekslerin yüksek stabilitesi sayesinde elde edilen polimer ağları, kovalent olmayan bir yaklaşım kullanılarak hazırlanan MIP'ye göre homojen bir bağlanma alanı dağılımına sahip olup üstün seçicilik gösterir (Sajini ve Mathew, 2021).

Monomer-kalıp molekül arasındaki kovalent bağların polimer ağ yapısında oluşturulması ve bunların kırılmasıyla kalıbın polimerden ayrılma süreci oldukça zor ve maliyetli bir süreçtir (Steinke vd., 1995; Caro vd., 2002).

Aynı zamanda, polimeri kullanarak şablon tanıma sürecinde, genellikle şablon ile polimer arasında kovalent bağ oluşumu yavaş bir şekilde gerçekleşir ve kromatografik ayrımlarda polimer sabit fazı ile analit arasında hızlı bir etkileşim olduğundan, zayıf kromatografik sonuçlar elde edilir (Zhong vd., 2001; Sellergren vd., 1988).

b.Nonkovalent baskılama

Kovalent olmayan baskılama yöntemi, Mosbach ekibi tarafından geliştirilen şablon ile polimer ağı arasındaki kovalent olmayan bağlanmaya dayanmaktadır (Arshady ve Mosbach, 1981). Bu aşamada, şablon ve fonksiyonel monomer kompleksi, van der Waals kuvveti, hidrojen bağı, π - π etkileşimleri, dipol-dipol etkileşimi, iyon-dipol etkileşimleri gibi kovalent olmayan güçlü etkileşimlerin yardımıyla oluşturulur. Şablon moleküller, basit çıkarma teknikleri kullanılarak polimer matrisinden kolayca alınır (Shah vd., 2012).

Nonkovalent baskılamanın birkaç avantajı vardır. Kovalent monomer-şablon konjugatının oluşturulması gerekli değildir, çünkü polimerizasyon sonrasında şablon molekülü kolayca çıkarılabilir (Pirzada ve Altintas, 2021). Kovalent olmayan etkileşimler, kovalent etkileşimlere kıyasla daha zayıf olduğundan, hedef molekülün yeniden bağlanma kinetiği hızlıdır. Kovalent olmayan baskılama yöntemi, kovalent baskılama yöntemine göre daha kullanımı kolaydır ve aynı zamanda kovalent bağlanmaya göre daha yüksek afiniteye sahip bağlanma bölgeleri geliştirir (Komiya vd., 2003).

Nonkovalent baskılamanın avantajları olduğu gibi bunun yanısıra dezavantajları da bulunmaktadır. İlk olarak, oluşturulan seçici bölgedeki çeşitliliktir (Zhang vd., 2006). Polimerizasyon öncesinde bulunan çeşitli fonksiyonel monomer(ler) ve şablonun seçici bölgedeki heterojen dağılımı genellikle yüksek afiniteden düşük afiniteye doğru değişir. Bu şekilde afinitenin sıralanması seçici bölgede yararlı olabilir, ancak tasarlanan polimerin çalışılması zorlaşır (Kubo vd., 2015).

Diğer bir husus; polimer ağ yapısı çevresindeki monomerlerin seçici bölge dışında serbestçe dağılmış olabileceğidir. Bu durumda, polimerle çevredeki diğer analitler arasında özelleşmemiş bağlanmalar meydana gelebilir (Nasraoui vd., 2022). Bu özelleşmemiş bağlanmalar, monomerin polimer yüzeyinin hidrofobisitesiyle birleşerek hidrojen bağı oranını artırırken, van-der Waals etkileşimleriyle oluşturulan bağlanmaları azaltabilir. Bu etkileşimlerin denge noktası polimer ağ yapısına bağlıdır (Hasanah vd.,2021).

Sonuç olarak, non-kovalent baskılama ile ilgili olarak, polimerizasyon öncesindeki karışımında bulunan hedef molekül miktarına bağlı olarak istenen yüksek afiniteli spesifik bölgelerin oluşumunda verimde azalma görülebilir (Verheyen vd., 2011). Bu durumun tam nedeni bilinmemekle birlikte, polimerizasyon öncesinde şablon ile monomerler arasındaki özel etkileşimlerin düşük afiniteli ve yüksek afiniteli bölgeleri oluşturmak için kullanılan çapraz bağlayıcının yeterli rijitlikte olmamasından kaynaklanan konformasyonel ve termal etkilerle bağlantılı olabileceği düşünülebilir (Kriz vd., 1997).

1.2.1.2 Moleküler Baskılama Bileşenleri

a. Fonksiyonel monomerler

Fonksiyonel monomerin temel görevi, hedef moleküllerin ve substratların fonksiyonel gruplarını bağlayarak uygun bir tamamlayıcı ön polimerizasyon kompleksi oluşturmaktır (Chen vd., 2016). Kalıp ile güçlü etkileşime sahip ve polimerizasyon öncesinde seçici donör-alıcı veya antikör-antijen kompleksleri oluşturabilen uygun fonksiyonel monomerin bulunması, MIP sentezi sürecinde hayati bir adımdır. Kovalent moleküler baskılama sürecinde, şablonun fonksiyonel monomer stokiometrik oranına olan etkisi ihmal edilebilir, çünkü

şablon, kovalent bağ oluşumu için gerekli olan fonksiyonel monomerlerin sayısını belirler ve fonksiyonel monomer ile kalıp molekülleri stokiometrik bir şekilde birleşir (Shen ve Ren, 2014). Ancak, kovalent olmayan baskılamada, optimal şablon-fonksiyonel monomer oranı, artan şablon molekülüyle çeşitli polimerlerin bağlanma özelliklerinin ampirik veya hesaplamalı olarak değerlendirilmesiyle belirlenir (Kim ve Spivak, 2003).

Genellikle moleküler baskılama çalışmalarında tek fonksiyonel monomer tercih edilse de tanıma kapasitesini geliştirmek amacıyla iki veya daha fazla fonksiyonel monomerin eş zamanlı kullanımına sıkça başvurulmaktadır (Yang vd., 2023). Bu durumda, monomerlerin reaktivite oranlarının kopolimerizasyonu başarabilecek nitelikte olması önemlidir. Baskılama işleminden istenilen sonuçları elde edebilmek için şablon ve fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimlerin, monomerler arası etkileşimlerden daha güçlü olması gerekmektedir (Fu vd., 2015). Fonksiyonel monomer ile baskılanacak molekül arasındaki kompleksleşme, monomerin sterik ve elektronik etkilerine bağlıdır. Örneğin, şablon asidik bir grup taşıyorsa, seçilen monomerin bazik bir grup içermesi önemli bir faktördür (Komiya vd., 2003).

b. Şablon (Kalıp molekül)

Şablonun özellikleri ve işlevleri, MIP sentezi sürecinde hayati öneme sahiptir çünkü bu, her baskılama yönteminde şablon molekülü ile seçilen fonksiyonel monomerlere bağlı pendent gruplar arasındaki etkileşimi yönlendirir (Kang vd., 2023). Şablonun, belirli özelliklere sahip olması gerekir, örneğin: (i) düşük maliyetle büyük miktarlarda temin edilebilmesi, (ii) baskılama koşullarında çözünürlük göstermesi ve (iii) hedef analit veya analitlerle iyi çapraz reaktivite gösteren siteleri oluşturması gerekmektedir. Şablon, hedef analit veya analitlerle etkileşime girecek ve seçilen fonksiyonel monomerlerin pendent grupları ile bağlantı kuracak şekilde özelliklere sahip olmalıdır (Sajini ve Mathew, 2021).

c. Çapraz bağlayıcı

MIP polimerizasyon sürecinde, çapraz bağlayıcı, şablon moleküllerin etrafına fonksiyonel monomerleri sabitlemek için kullanılır ve böylece şablonların eliminasyonu sonrasında dahi yüksek derecede rijit bir çapraz bağlı polimer oluşturur (Akgönüllü vd., 2023). Baskılama süreci sırasında çapraz bağlayıcı, üç temel görevi yerine getirir: (i) polimer ağının morfolojisini kontrol etmek, makroporöz veya mikrojel tozu veya jel tipinde olup olmadığını belirlemek, (ii) baskılanmış bağlanma bölgesini stabilize etmek ve (iii) polimer ağına mekanik stabilite kazandırmak (Xu vd., 2015).

Çapraz bağlayıcının türü ve miktarı, MIP'nin seçiciliği ve bağlanma kapasitesi üzerinde yansıyan etkilere sahiptir (Klejn vd., 2015). Az miktarda çapraz bağlayıcı, düşük çapraz bağlama derecesi nedeniyle istikrarsız mekanik özelliklere yol açar, çok yüksek miktarda çapraz bağlayıcı ise birim kütle başına MIP'nin tanıma sitelerinin sayısını azaltır (Zuo vd., 2023). Moleküler baskı için uygun olan birçok çapraz bağlayıcı bilinmektedir ve bunlardan bazıları, şablon molekülle anında kompleks oluşturabilir ve dolayısıyla fonksiyonel monomerler gibi hareket edebilir (Lusina ve Ceglowski, 2022). Etkili bir baskılama prosedürü için, çapraz bağlayıcılar ile fonksiyonel monomerler arasında uyum sağlanmalıdır. Aksi takdirde, fonksiyonel monomer veya çapraz bağlayıcıdan biri polimerizasyon sırasında baskın hale gelir ve kopolimerizasyon gerçekleşmez (Elugoke vd., 2021).

Yüksek mol oranlarında, çapraz bağlayıcılar fonksiyonel monomerler veya şablon molekül ile kovalent olmayan etkileşimler göstererek baskılamanın etkinliğini azaltır (Yoshimatsu vd., 2012).

Düşük mol oranlarında, şablon moleküllerin bağlanma bölgeleri birbirine çok yakın olur. Bu durumda, hedef molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından kapatılır ve etkili bir sonuç elde edilmez (Chapuis vd., 2004).

d. Çözücüler

Çözücüler, moleküler baskı polimerinin oluşumunda kritik bir rol oynarlar. Bu bileşenler, kalıp molekülü, monomer, çapraz bağlayıcı ve inisiyatör gibi unsurların tek bir faz halinde çözünmesini sağlamanın yanı sıra, polimer içinde kavitelerin veya gözeneklerin oluşumundan da sorumludurlar (Vlakh vd., 2015). MIP terminolojisinde bu nedenle "porojen" olarak adlandırılırlar. Özellikle makroporöz polimerlerde, çözücü doğrudan polimerin morfolojisini ve gözeneklerin boyutunu etkiler. Ayrıca, kalıp molekülü ile monomer arasındaki non-kovalent etkileşimin türünü belirleyen porojen kullanılır (Schmidt vd., 2005).

Çözücüler aynı zamanda polimerizasyon sürecinde de önemlidir. Hidrojen bağı oluşumu, çözücünün polaritesine ve hidrojen bağı oluşturma yeteneğine, iyonik etkileşimler ise düşük sıcaklıkta gerçekleşirken, dipolar etkileşimler polar çözücülerde meydana gelir (Murdaya vd., 2022). Genellikle, kalıp molekülünün yapısına ve çözünürlüğüne bağlı olarak uygun ve yüksek bağlanma afinitesi sağlayacak çözücüler seçilir. Örneğin, hidrojen bağı oluşumuna dayalı polimerlerde asetonitril, kloroform, diklorometan, toluen, tetrahidrofuran gibi çözücüler tercih edilebilirken, hidrofobik etkileşimlere dayalı bir polimer hazırlanacaksa en uygun çözücü su olacaktır (Maranata vd., 2021).

Kovalent olmayan baskılama polimerizasyonunda, fonksiyonel monomer ile şablon arasında kompleks oluşumu artırılır. Çözücüler, polimerizasyon sırasında reaksiyon ısını eşit şekilde dağıtarak yan reaksiyonların oluşumunu engellerler (Bitas ve Samanidou, 2018).

e. Başlatıcılar

Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezinde başlatıcılar kritik bir rol oynar (Panagiotopoulou vd., 2015). Moleküler baskılanmış polimerlerin oluşturulması sırasında, monomerlerin polimerizasyonunu başlatmak ve süreci kontrol etmek için başlatıcıların kullanımı zorunludur. Başlatıcıların seçimi, polimerin son özelliklerini etkileyebilir; örneğin, başlatıcı tipi ve konsantrasyonu,

polimerin çapraz bağlanma yoğunluğunu ve gözenekliliğini belirleyebilir (Wulff, 1995).

Başlatıcılar, polimerizasyon reaksiyonunu başlatmak için kullanılır ve radikal oluşturarak vinil grubundaki çift bağa atak yaparlar. Bu sayede polimer zincirleri oluşur (Mijangos vd., 2006). Başlatıcı olarak çeşitli peroksitler, diazo bileşikler ve redoks çiftleri kullanılabilir. Örneğin, benzoil peroksit gibi peroksit başlatıcıları sıkça tercih edilir. Bu başlatıcılar ısı ile kolaylıkla parçalanarak serbest radikal oluştururlar (Zakaria vd., 2009).

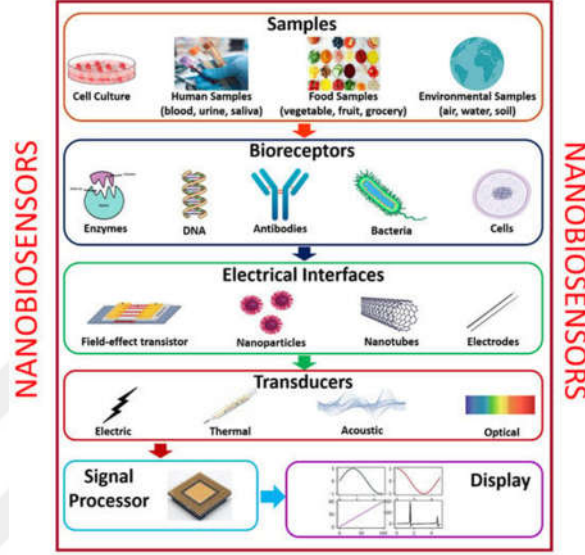
1.2.1.3 Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları

Moleküler Baskılama Tekniği (MIT), amino asitler ve proteinler, nükleotid türevleri, kirleticiler, ilaçlar ve gıda dahil olmak üzere hem biyolojik hem de kimyasal molekülleri tanıyabilen çok yönlü ve umut verici bir teknik olarak kabul edilmektedir. MIP'ler geniş ve çeşitli bir uygulama alanı bulunmaktadır (Vasapollo vd., 2011). MIP'ler, spesifik moleküllerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında önemli rol oynar ve elektrokimyasal sensörlerde belirli analitlerin tanınması ve tespiti için kullanılır. Ayrıca, katalizör olarak belirli kimyasal reaksiyonların hızlandırılmasında ve ilaç taşıma sistemlerinde hedef bölgelere kontrollü ilaç salınımında uygulanır. Biyolojik antikorlar veya reseptörler gibi davranarak biyomolekülleri tanıma ve bağlama kapasitesi ile tıbbi teşhis ve tedavi süreçlerinde de önemli bir yer tutar. Gıda güvenliği analizlerinde, çevresel kirleticilerin tespiti ve temizlenmesinde (Keçili, 2022), genetik araştırmalarda deoksi ribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve diğer nükleotid türevlerinin tanınması ve ayrıştırılmasında (Ge vd., 2009) kullanılarak, kimya, biyoloji, çevre ve tıp gibi farklı disiplinlerde kritik öneme sahiptir. MIP'lerin bu çeşitli kullanım alanları, onların çok yönlü ve etkili bir teknoloji olduğunu ortaya koymaktadır (Brüggemann vd., 2000).

1.3 Nanobiyosensörler

Sensör, bir örnek içerisinde bulunan analitin varlığını ve örnek içerisindeki miktarını belirlemek için kullanılan cihaz olarak tanımlanabilmektedir. Sensörler

sistemsel olarak reseptör, dönüştürücü ve okuma sisteminden oluşmaktadır. Biyosensörlerde (Şekil 1.3) bu sistemde biyolojik bir elementtir ve dönüştürücü üzerine farklı şekillerde sabitlenmektedir (Huang vd., 2021). Temel olarak biyokimyasal reaksiyonlarının tanımlaması için kullanılmaktadır (Kulkarni vd., 2022).



Şekil 1.3 Tipik biyosensörlerin çeşitli modülleri (Kulkarni vd.,2022).

Günümüzde nanoyapılar çeşitli amaçlar için biyosensörler ile birleştirilmiş ve bu alanda farklı ilerlemelere yol açmışlardır. Biyosensörlerin yapısına nanoyapılarının eklenmesinin asıl amacı, biyomalzemeleri stabilize etmek için gerekli olan seviyenin artışını sağlamak ve bunun sonucunda hassasiyeti, düşük potansiyellerde reaksiyona girme olasılığını artırmak ve elektronların aktif reaksiyon merkezinden elektrot yüzeyine (elektrokimyasal nano sensörlerde) hızlı transferine yardımcı olmaktır (Kulkarni vd., 2022).

1.3.1 Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, alıcısının biyolojik bir element olduğu grup elektrokimyasal sensördür (Kulkarni vd., 2022). Elektrokimyasal sensörler, biyosensör yüzeyinin iletkenliği, direnci veya kapasitansındaki biyolojik bağlanma olayına bağlı değişikliklerin ölçülmesine dayanmaktadır (Rahit ve Tarailo-Graovac, 2020). Günümüzde elektrokimyasal biyosensörler oldukça

yaygındır. Minimum fiyatları, esneklikleri, kompakt boyutları ve basit kullanılabilirlikleri nedeniyle oldukça tercih edilmektedir.

1.4 CRP Tayin Metotları

Klinik laboratuvarlarda türbidimetrik ve nefrometrik teknoloji (Roberts vd., 2000; Roberts vd., 2001) veya insan CRP enzim immünoassay (ELISA) kitleri kullanan çeşitli CRP testi yöntemleri mevcuttur. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) de CRP tayininde kullanılabilen bir diğer yöntemdir; bu teknik, CRP'nin bileşenlerini ayırarak ve analiz ederek tespit eder. Western blot yöntemi, proteinlerin elektroforezle ayrılması ve ardından antikorlar ile tespit edilmesi prensibine dayanarak CRP'nin spesifik tespiti ve doğrulaması için kullanılır (Kiefer vd., 2012). Mass spektrometri, CRP'nin peptid kütle profillerini analiz ederek yüksek hassasiyet ve doğrulukla tespit ve miktar belirleme imkanı sunar. Elektrokimyasal biyosensörler ise, CRP tespiti için elektroda bağlı biyolojik elemanlar (antikorlar, aptamerler) kullanarak elektriksel sinyal değişimlerini ölçer ve yüksek hassasiyet ve hızlı tespit imkânı sağlar (Kuhn vd., 2004). MIP bazlı sensörler, CRP'yi seçici olarak bağlamak için hazırlanmış polimer matrisler kullanır ve özgün bağlanma bölgeleri oluşturur.

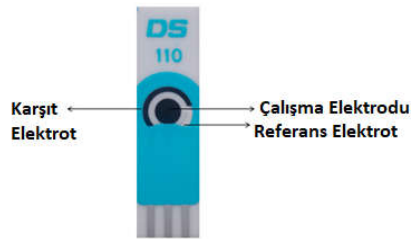
Bu yöntemler arasında seçim, tespit edilecek CRP konsantrasyonuna, gerekli hassasiyet seviyesine, numune türüne ve laboratuvarın teknik imkanlarına bağlı olarak değişir. Bununla birlikte, bu yöntemler yeterince duyarlı olmadıkları, zaman alıcı oldukları, yanlış negatif sonuçlara eğilimli oldukları veya uygun maliyetli olmadıkları için genellikle klinik uygulama için uygun değildir (Pearson vd., 2004). Aynı zamanda, CRP gibi proteinler, yüksek sıcaklıklar veya ultraviyole (UV) ışığına uzun süre maruz kalma gibi aşırı koşullar altında denatüre olabilir veya bozunabilir, bu nedenle deneysel ortamlarda bunların dikkatli ve uygun şekilde ele alınması önemlidir (Ruzza vd., 2021).

Sensör sistemleri, hızlı yanıt süresi ve düşük maliyet özellikleri nedeniyle son zamanlarda klinik tanı ve tanı prosedürlerinde en yaygın kullanılan ve popüler cihazlar haline gelmiştir. Bu enstrümanlar, küçük numune hacimlerini analiz edebilme, daha hızlı analiz süreleri, proses otomasyonuna uygunluk, artırılmış

güvenilirlik ve tekrarlanabilirlik gibi birçok avantaj sunar (Couto vd., 2016). Son araştırmalar, hücre dışı sıvıları ölçmek için minyatür elektrokimyasal sensörlerin ve klinik teşhis için mikron veya mikron altı boyutlu cihazların geliştirilmesine odaklanmıştır. Bunlar arasında elektrokimyasal deneyler, düşük maliyet, esneklik ve hassasiyet açısından en umut verici olanıdır (Bryan vd.,2013).

Günümüzde elektrotlar, mikro ve nanomalzemelerle modifiye edilerek veya modifiye edilmeden de kullanılabilen pirolitik grafen, camsı karbon ya da borlu elmas elektrotlardan üretilmektedir (Liu ve Lin, 2007). Bununla birlikte başka bir yaklaşım ise mikro veya nano-elektrotların elde edilmesi için boyutun küçültülmesi gibi makro elektrot bileşenlerinin geometrik şeklinin değişimini içerir. Fiziksel modifikasyonla kütle taşınım süreçleri, doğrusal/düzlemselden yakınsak/radyal difüzyona dönüşerek elektroanalitik sinyalde önemli gelişmelere neden olur (Sanghavi vd., 2015).

Yukarıda bahsedilen gelişmeler, çok çeşitli numune matrislerinde çeşitli bileşiklerin tayini için yüzey baskılı karbon elektrotlara (SPCE) dayalı yeni sensör tiplerini ortaya çıkarmıştır. SPCE'ler, son on yıldaki önemli gelişmelerden dolayı analitik kimya, ilaç kontrolü, klinik ve çevresel analiz dahil olmak üzere çok sayıda alanda bol miktarda kullanım alanı bulunan taşınabilir cihazlardır (Asuncion vd., 2010). Bir SPCE, çalışma elektrodunun (WE), referans elektrodun (RE) ve karşı elektrodun (CE) yüzey baskılama yöntemi ile basıldığı kimyasal olarak inert bir substrattan oluşur (Şekil 1.4).



Şekil 1. 4 SPCE Elektrot (Vasiliadou vd.,2016).

SPCE'lerin çalışma elektrodu yüzeyinde yapılabilen kapsamlı modifikasyon yelpazesi sayısız uygulama alanı açar (Chen ve Chatterjee, 2013). Özellikle, SPCE tabanlı sensörler, düşük tayin limiti, basit kullanım, düşük maliyet,

taşınabilirlik ve minyatürleştirme potansiyeli, farmasötiklerin çok çeşitli numunelerde analitik tespiti gibi önemli avantajlar sağlayan araçlar olarak düşünülebilir (Su ve Cheng, 2010).

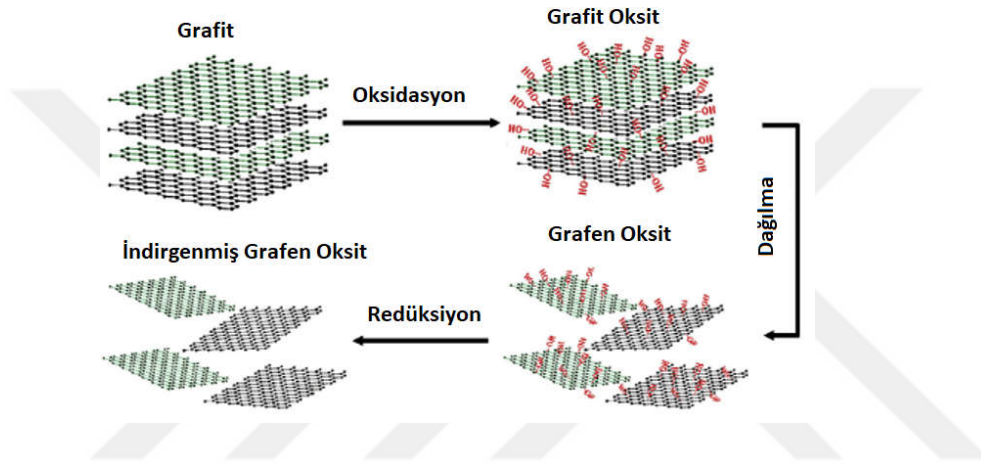
Nanoteknoloji ve malzeme bilimindeki hızlı gelişmeler sayesinde, biyolojik reseptörlerin sentetik analoglarla değiştirilmesine olan ilginin artması, alanın son zamanlardaki genişlemesine önemli katkı sağlamıştır (Chen, 2022). Moleküler baskılama, yüksek spesifik tanıma kabiliyetine sahip afinite malzemelerinin hazırlanmasında çekici bir yöntem haline gelmiştir. Enzim, antikor gibi biyolojik tanıma materyalleriyle karşılaştırıldığında, MIP'ler seçicilik, stabilite, tekrar kullanılabilirlik, düşük maliyet gibi birçok avantaj sağlar. Bununla birlikte, geleneksel teknikle hazırlanan MIP'ler, eksik kalıp uzaklaştırma, düşük bağlama kapasitesi, yüksek difüzyon bariyeri ve düşük alan erişilebilirliği gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Çünkü baskılanan alanların çoğu, MIP malzemesinin iç kısmında bulunur (Shahnazi vd., 2020). Bu problemleri çözmek için, son yıllarda nanomalzemelerin yüzeyinde MIP tabakasının oluşturulmasını içeren yüzey baskılama tekniği geliştirilmiştir. Bu yöntemle malzeme yüzeyinde daha yüksek bağlama kapasitesi ve daha hızlı bağlanma kinetiği avantajları sağlanmıştır (Luo vd., 2015). Şimdiye kadar demir (II,III) oksit (Fe_3O_4) nanopartikülleri (Jia vd., 2013), silika nanopartikülleri (Gao vd., 2007), polianilin nanofiber (Liang vd., 2011), polistiren çekirdek kolloidler (Ouyang vd., 2010), karbon nanotüp (Chen vd., 2012), kuantum noktalar (Zhao vd., 2011) için çok sayıda çalışma bildirilmiştir.

Elektrokimyasal çalışmalarla birleştirilen MIP'lerin, kullanım kolaylığı ve düşük maliyet gibi özelliklerinden dolayı sensör alanındaki uygulamaları artmıştır (Anirudhan vd., 2019). Bununla birlikte, MIP tabanlı sensörlerin, sensör pazarında yer almadan önce, hala bazı problemlerin üstesinden gelinmesi gerekir. Bu problemlerden en önemlisi, baskılanmış oyukların, sensör yüzeyine olan mesafesinin değişmesi ve buna bağlı olarak da düşük sinyal alınmasıdır (Uzun ve Turner, 2016). Araştırmacılar, bu sorunu önlemek ve elektrokimyasal sinyali iyileştirmek için grafen gibi olağanüstü elektriksel iletkenlik özelliği ve son derece geniş yüzey alanına sahip nano boyutlu destek materyali yüzeyinde ultra

ince ve homojen polimerik filmler geliştirmeye odaklanmışlardır. Bu sayede, ince MIP tabakaları için daha yüksek seçicilik sağlanmaktadır (Zhang vd., 2017).

Grafen (grafen/MIP kompozit) yüzeyinde bulunan MIP, daha hızlı bir adsorpsiyon ve desorpsiyon dinamiği sergilemekle kalmaz, aynı zamanda, yüksek bir bağlanma kapasitesi ve hedef moleküle karşı yüksek seçicilik gösterir (Zhao vd., 2018). Ayrıca, geniş π -elektron sistemine sahip olan grafen, ilaçlar, kirleticiler ve biyomoleküllerde bulunan karbon temelli halka yapılarına karşı güçlü bir afiniteye sahiptir (Liu vd., 2012). Bütün bunların yanı sıra grafen, yüksek elektron transfer hızı, yüksek ısı ve elektriksel iletkenliği, olağanüstü elastikiyet ve sertlik, yüksek termal stabilite gibi etkileyici özellikleri sayesinde yüksek hassasiyetli elektrokimyasal MIP sensörünün üretimi için oldukça elverişlidir (Lee vd., 2008). Grafen normalde iki oksidasyon derecesine sahiptir: grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (rGO). GO, düşük iletkenliğe sahip ve suda çözünürdür, rGO ise iyi iletkenliğe ve suda zayıf çözünürlüğe sahiptir. GO'nin sulu çözelti içindeki mükemmel çözünürlüğü temel olarak hidroksil, epoksit, karboksilik gruplar gibi oksijence zengin olan hidrofilik gruplardan kaynaklanmaktadır. Yüzeydeki bu fonksiyonel gruplar, yüzeye bağlanmak istenen molekülün fonksiyonel gruplarıyla etkileşime girerek çok sayıda reaksiyon bölgesi sağlayabilir (Zhang vd., 2017). Ayrıca, GO, geniş spesifik yüzey alanı ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) nedeniyle birim hacim başına düşen algılama alanı da artar ve bu da sensör cihazı için yüksek hassasiyet sağlar (Wang vd., 2009). Ancak yukarıda da bahsedildiği gibi GO'nun oksijence zengin fonksiyonel grupları üzerinde barındırması elektriksel iletkenliğin düşmesine sebep olur. Bu yüzden özellikle sensör uygulamalarında GO'nin indirgenmesi yoluna gidilir. İndirgemenin ardından GO içindeki oksijen içeren grupların çoğu, özellikle hidroksil, epoksit ve karboksil grupları tamamen uzaklaşır ve π -konjugasyonunca zengin grafen, yani indirgenmiş grafen okside dönüştürölür (Hou vd., 2010). Grafen tabakalarındaki π -konjugasyonu, grafenin iletkenliğini geri kazandırır. Ancak sudaki ve diğer birçok organik çözücüdeki çözünürlüğünü azaltır. Ek olarak, rGO, polimer matrisler gibi diğer bazı malzemelerle çok uyumlu değildir. Fonksiyonel moleküllerin grafen tabakalarına fiziksel olarak adsorbe edilmesi ve fonksiyonel grupların grafen yüzeyine kimyasal olarak bağlanması dahil olmak üzere bu problemi çözmek için çeşitli teknikler geliştirilmiştir (Stankovich vd., 2006).

Bugüne kadar, rGO'nun sulu çözücüler içindeki dağılımı, suda çözünen fonksiyonel gruplar içeren moleküller ve polimerleri rGO tabakalarına fiziksel olarak adsorbe edilerek başarılmıştır. Ancak bu tür stabilizatörlerin varlığı çoğu uygulama için arzu edilmez (Hou vd., 2010). GO kullanılarak elde edilen yüzey baskılanmış kompozitlerle ilgili birçok çalışma olmasına rağmen grafen tabakalarının çeşitli çözücüler içinde zayıf dağılması nedeniyle arzu edilen nitelikte üretilmek istenen özellikle rGO ile yüzey baskılanmış kompozitlerle ilgili yapılan çalışmalar çok azdır.



Şekil 1. 5 Grafen oksidasyon basamakları (Raji vd., 2019).

Grafen türevlerinin ve MIP'lerin başarılı kombinasyonu, MIP'lerin sensör sistemlerinde kullanılabilmesine olanak sağlar. Yüzey baskılanmış MIP kompozitlerinin hazırlanması için destek materyali ile MIP arasındaki bağlanmalar ve etkileşimler çok önemlidir. Grafen tabakalarının agrelatlaşma eğilimi yüksek olduğundan, moleküler baskılama işleminden önce geniş yüzey alanını korumak için grafenin yüzey modifikasyonu yapılmalıdır (Luo vd., 2015). Grafen oksidin, hem kovalent hem de kovalent olmayan bağlar yoluyla organik moleküller ile yüzey modifikasyonu, agregatlaşmayı önleyebilir ve stabil dispersiyonun oluşumunu kolaylaştırır (Cai ve Song, 2010). Ayrıca, bu modifikasyon, grafen katmanlarının polimer matris ile uyumluluğunu ve adhezyon/etkileşimini artırmak için özel olarak tasarlanır (Song vd., 2013). Genel olarak, grafenin yüzey modifikasyonu;

(1) Hidrojen bağı (H-bağ), π - π etkileşimi, π -kasyon etkileşimi, π -anyon etkileşimi, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals bağlaması gibi ikincil etkileşimler aracılığıyla kovalent olmayan adsorpsiyonla,

(2) organik moleküllerle ve grafen tabakalarının bazal düzlemler ve kenarlarında bulunan karboksil (-COOH), hidroksil (-OH) veya epoksi gibi belirli fonksiyonel gruplar arasında meydana gelen kovalent bağ (C-C) ile yapılabilir (Wang vd., 2016).

Yüzey baskılanmış MIP kompozitlerini hazırlamak için serbest radikal polimerizasyonu (FRP), tersinir katılma-bölünme zincir transfer (RAFT) (Lee ve Kim, 2009) polimerizasyonu, atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) (Xu vd., 2012) ve sol-jel metodu (Luo vd., 2014) dahil olmak üzere çeşitli yollar geliştirilmektedir. Bu yöntemler arasında, FRP, basit işlem ve hemen hemen tüm vinil monomerlerine uygulanabilirliği nedeniyle yüzey baskılanmış MIP kompozitlerinin hazırlanması için daha çok tercih edilmektedir (Gu vd., 2013). Vinil grupların destekleyici materyal yüzeyine eklenmesinin, destek materyalinin MIP filmi ile güçlü bir etkileşim yoluyla birleşmesini sağlamasının yanı sıra polimerleştirilebilir monomerler ile destek materyalin vinil gruplarının kopolimerizasyonu da moleküler baskılama polimerizasyonu gerçekleştirilebilir. MIP'ler, kullanımı uygun, ucuz ve oldukça kararlı polimerik malzemeleri kullanıma sunmak için geliştirilmiştir. Literatür verileri incelendiğinde CRP tayinine yönelik geliştirilen sensör sistemlerinin kullanım potansiyelleri araştırılmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir;

Bir çalışmada Kumar ve Prasad, CRP'nin ölçümü için, 'aşı' modifikasyonu ile uyumlu, tasarlanmış, kabartmalı, polimerle modifiye edilmiş serigrafi baskılı bir karbon elektrot kullanılmıştır. Kaplamaya çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT'ler) dahil edilmesi de elektrokimyasal algılamanın hassasiyetini artırmaya yardımcı olmuştur. 2-Akrilamidoetil dihidrojen fosfat (AEDP) ve N-(4-dimetilaminofenil)akrilamid (DMAA), her biri doğal bir CRP bağlayıcı olarak fosfatidilkolin'i (PC) taklit eder ve kendi kendine birleşmeyi zorlayabilen fonksiyonel monomerler olarak seçilmiştir. Sulu ortamda tespit limiti 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$

¹ (S/N = 3) olarak belirlenmiştir. Önerilen sensörün metodolojisini ve etkinliğini doğrulamak için insan serumunda CRP'nin saptanması da araştırılmıştır (Kumar ve Prasad, 2012).

Başka bir çalışmada, Liu ve arkadaşlarının 2020'de, CRP tespiti için polidopamin (PDA) bazlı moleküler baskılı C-Reaktif Protein (CMIP-PDA) ile dekore edilmiş mikrofiber interferometrik sensör geliştirilmiştir. Dopamin kendi kendine polimerizasyonu sırasında, 6-dihidroksiindol (DHI), şablona karşılık gelen farklı şekil ve boyutlarda baskı boşlukları ile trimer yeniden düzenlemeleri ve tamamlayıcı hidrofobik/hidrofilik yük dağılımları üretir. Şablon aracılı yeniden düzenleme ve fiber optik interferometrinin geliştirilmiş etkisinin kombinasyonu, algılama hassasiyetini artırır. Bu nedenle sensörün hassasiyeti 0,881 nm/(ng/mL)'ye ulaşır ve LoD $5,813 \times 10^{-10}$ ng/mL'dir (Liu vd.,2020).

Balayan ve arkadaşlarının 2022'de yapmış olduğu çalışmada ise, elektrot yüzeylerinde üretilen moleküler baskılı polimerler kullanılarak yenidoğan sepsisi için bir biyobelirteç olan CRP'yi saptamak için bir elektrokimyasal biyosensörün geliştirilmeye çalışmışlardır. Bimetalik altın-platin nanomalzemeler, sensör yüzey alanını ve katalitik özellikleri iyileştirmek için yüzey baskılı karbon elektrotlarda biriktirdiler. Daha sonra elektrotun yüzeyinde CRP ile baskılanmış bir polimer biriktirilmiştir. Ayrıca, geliştirilen elektrodun tepkisini ölçmek için bir elektrokimyasal teknik uygulanmıştır. Tespit matrisinin CRP tespit ettiğini ve daha LoD değeri 0,1 nM performans gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Balayan vd., 2022).

Başka bir çalışmada Liu ve arkadaşlarının 2022 yılında, CRP'yi ölçmek için MIP tabanlı bir elektrokimyasal tespit sistemi geliştirilmiştir. Bu tür sistemler, çip üzerinde laboratuvar teknolojisi için mikroakışkanlar ve elektronik ile entegre edilebilir. MIP bileşimi, farklı konsantrasyonlarda baskı şablonu (CRP) kullanılarak optimize edilmiştir. o-(4-Nitrofenilfosforil)kolin (4NPPC), CRP'nin mikrotomas inhibisyonunda fonksiyonel bir monomer olarak kullanılmıştır. MIP'ye Tungsten Disülfür (WS₂) eklenmiştir. Geliştirilen sensör sisteminin çalışma aralığı 2.28 ± 0.12 µg/mL'dir. Genişletilmiş kapı alan etkili transistör platformunda WS₂ katkılı peptit baskılı polimer kaplı elektrotların standart bir

eğrisi elde edilmiştir ve gerçek insan serumundaki CRP konsantrasyonlarını ölçmek için kullanılmıştır (Liu vd., 2022).

Ne yazık ki, mevcut ticari immünoanalizlerde emek yoğunudur, büyük numune hacimleri gerektirir ve düşük stabilite ve yüksek üretim maliyetleri gibi pratik sınırlamalara sahiptir. Dolayısıyla, klinik bakış açısından CRP'nin hassas bir şekilde tayin edilmesi çok önemlidir.

Bu tez çalışmasında, klinikte kullanılan enzim immunoassay yöntemine alternatif olarak CRP tayinine yönelik moleküler baskılanmış modifiye bir modifiye-SPCE'nin geliştirilmesi hedeflenmiştir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Materyal

C-Reaktif Protein, 2-hidroksi etil metakrilat (HEMA), metil metakrilat (MMA), etilenglikoldimetakrilat (EGDMA), dimetil sülfoksit (DMSO), amonyum persülfat (APS), polivinilalkol (PVA), tetrametiletildiamin (TEMED), askorbik asit, hidrojen peroksit (H_2O_2), (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTS), grafit tozu, potasyum permanganat, sülfürik asit (H_2SO_4), fosforik asit (H_3PO_4), hidroklorik asit (HCl), nafyon 117, etanol, metanol, asetik asit, potasyum klorür (KCl), potasyum heksosiyanoferat (III) $K_3[Fe(CN)_6]$ ve potasyum heksosiyanoferat (II) trihidrat $K_3[Fe(CN)_6]$, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), HUMAN SERUM, ürik asit, bovin serum albümin (BSA) ve diğer kimyasallar Sigma-Aldrich firması tarafından analitik saflıkta olacak şekilde temin edilmiştir.

2.2 Cihazlar

Çizelge 2. 1 Çalışmada kullanılan cihaz ve sistemler.

Cihazlar	Marka ve Model
Manyetik karıştırıcı	IKA, RCT basic
Hassas terazi	Kern ABS 220-4 M
Ultrasonik ısıtmalı su cihazı	JeiTech UC-10
Soğutmalı santrifüj cihazı.	Centurion Scientific Benchtop Centrifuges, UK
Isıtmalı Su Cihazı	Wis, Bath
Ultra Santrifüj cihazı	Beckman Coulter Avanti JE
pH metre	pH/ISE Meter İstekNeoMet
Etüv	Memmert
UV-spektrofotometre cihazı	Evolution 60, Thermo Scientific
Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR)	Perkin Elmer Spectrum Two
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	Carl Zeiss 300VP Kaplama (QUORUM Q150 RES)
Zeta boyut ölçüm cihazı	Malvern Instruments Nanoseries Zeta Sizer

2.3 İyileştirilmiş Hummers metodu ile Grafen Oksitin Sentezlenmesi (GO)

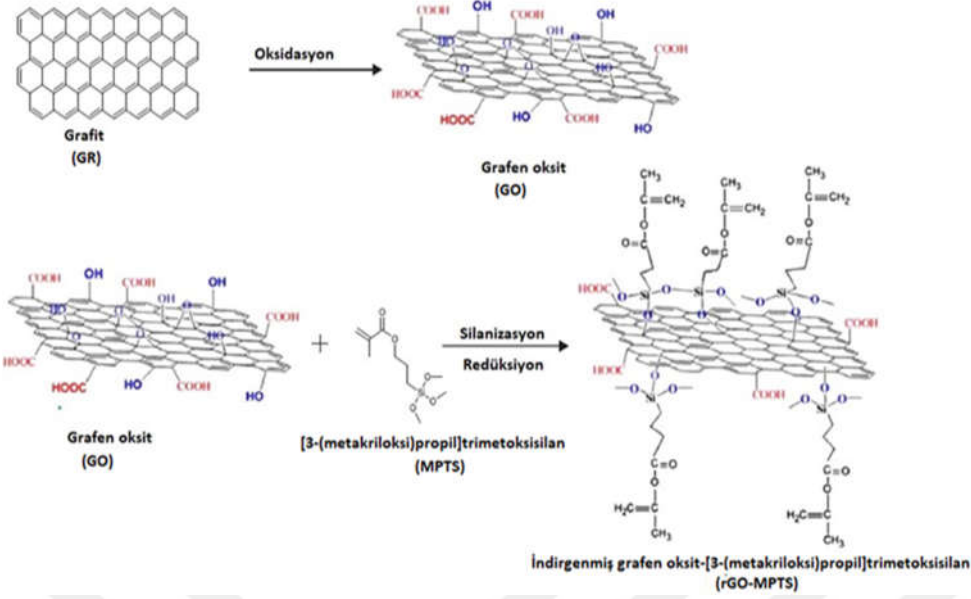
Grafen oksit, iyileştirilmiş Hummers metodu ile grafen tozundan hazırlanmıştır (Marcano vd., 2010). Kısaca, 2 g grafit tozu, 12 g potasyum permanganat ve 261 mL asit (235 mL H_2SO_4 + 26 mL H_3PO_4) bir balon reaktör içerisinde 12 saat boyunca $50^\circ C$ karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım donmuş halde olan 260 mL saf su ve 2 mL %30 H_2O_2 içeren karışımın üzerine dökülmüştür. Ardından elde edilen son çözelti 4000 rpm'de 4 saat santrifüj yapılmıştır. Çöken madde alınıp önce %10 HCl çözeltisiyle ardından etanolle yıkanarak $80^\circ C$ 'de bir gece kurutulmuştur.

2.4 Grafen Oksidin Silanizasyonu (S-GO)

GO'ı silanize etmek için, 200 mL etanol ve 100 mL su içeren üç boyunlu balona 0.35 g GO ilave edilmiştir ve 60 dakika boyunca ultrasonikasyon yoluyla dağıtılmıştır. 15 mL suya 1 mL MPTS ilave edilip tamamen hidrolize olması için asetik asit ile pH değerini 4-5 arasında tutulmuştur ve grafen oksit çözeltisine ilave edilip 2 saat $60-65^\circ C$ 'de silanizasyon işlemi için karıştırılmıştır. S-GO, filtre edilip art arda metanol ve suyla yıkanmıştır.

2.5 MPTS-GO'in İndirgenmesi (S-rGO)

İndirgenme işlemi askorbik asit ile gerçekleştirilmiştir ve indirgenmiş silanize grafen oksit elde edilmiştir (MPTS-rGO). Elde edilen S-GO'nun homojen dispersiyonuna (5.0 mL), 5.0 g askorbik asit eklenmiştir ve 30 dakika $60^\circ C$ 'de karıştırılmıştır. Ardından elde edilen son çözelti 4000 rpm'de 30 dakika çöktürülmüştür. Çöken maddenin üzerine %30'luk H_2O_2 eklenerek reaksiyona girmeyen askorbik asit uzaklaştırılmıştır. Elde edilen siyah ürün santrifüjlenerek etanol ve saf su ile üç kez yıkandıktan sonra $80^\circ C$ 'de bir gece kurutulmuştur. (Emiru ve Ayele, 2017).



Şekil 2. 1 GO'nin sentezlenmesi, silanizasyonu ve indirgenmesi.

2.6 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] Nanopolimer Sentezi

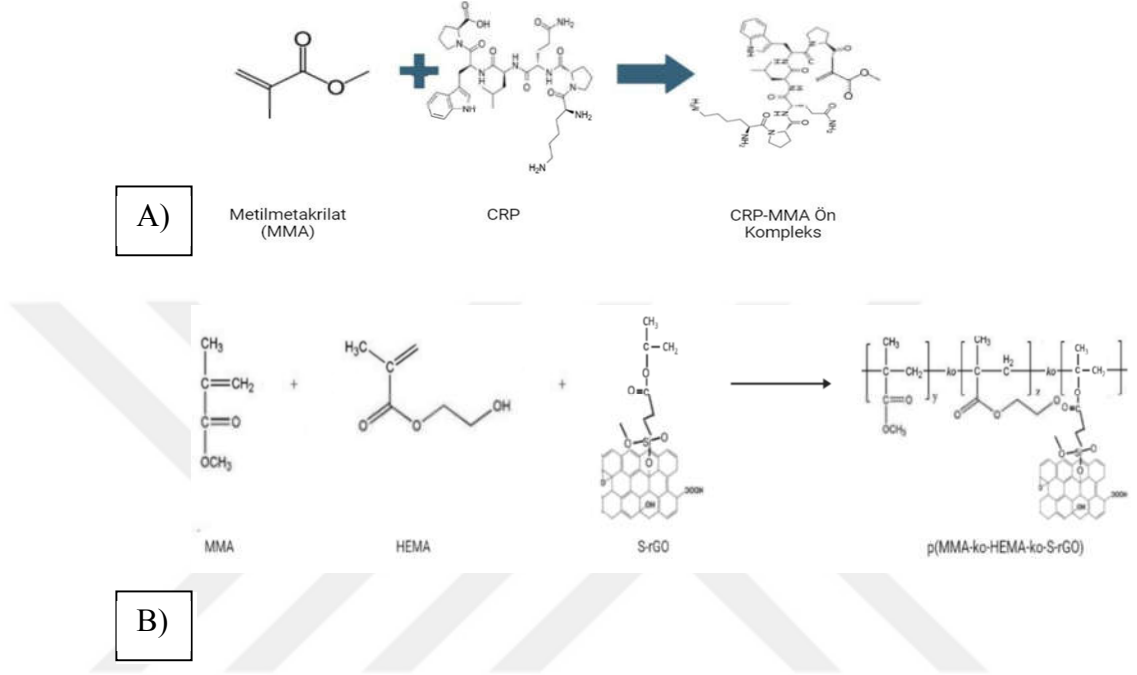
Yürütülen çalışmalarda, en uygun koşulları belirlemek amacıyla üç farklı ön-kompleks formüle edilmiştir. Bu amaçla, her biri 1 mg CRP ve farklı hacimlerde olmak üzere üç farklı kompleks oluşturulmuş ve test edilmiştir: 0,2 mL (MIP I), 0,4 mL (MIP II) ve 0,6 mL (MIP III) fonksiyonel monomer olarak MMA 1 mL DMSO içerisinde 2 saat muamele edilmiştir.

Ardından 0,5 g PVA 45 mL distile su içerisinde çözündükten sonra ön kompleks çözeltisi ile karıştırılmıştır. Ardından 0,6 mL HEMA ve 0,3 mL EGDMA karışım içerisinde dağıtıldıktan sonra 1 mg S-rGO eklenmiştir. Elde edilen karışım 15 dakika azot (N_2) gazından geçirilmiştir. Başlatıcı olarak da 0.04 g APS'yi 90 mL su varlığında çözdükten sonar karışıma eklenmiştir. Sonra 50 μ L TEMED konulmuştur ve ardından çalkalayıcı su banyosunda 100 rpm'de 37°C'de 24 saat boyunca serbest radikal polimerizasyonu yöntemiyle moleküler baskılama işlemi gerçekleştirilmiştir.

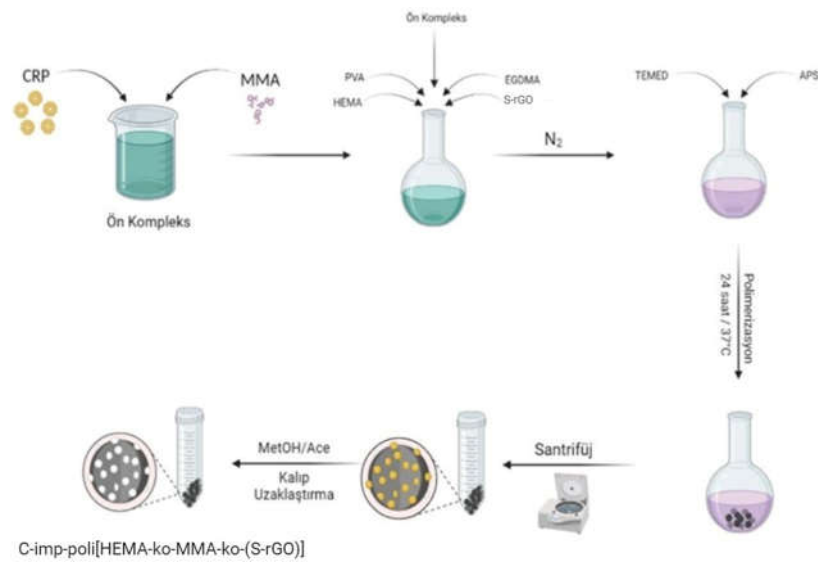
Elde edilen CRP baskılı nanopartiküller, reaktan monomerler ve başlatıcılar olabileceğinden dolayı ayrı ayrı su ve metanol ile birkaç kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra, metanol/asetik asit (4:1) mol oranı çözeltisi kullanılarak

polimerik yapıdan şablon molekül CRP çıkarıldı. Temizlenen nanopartiküller deiyonize su içinde redispers edildi ve +4°C'de saklandı.

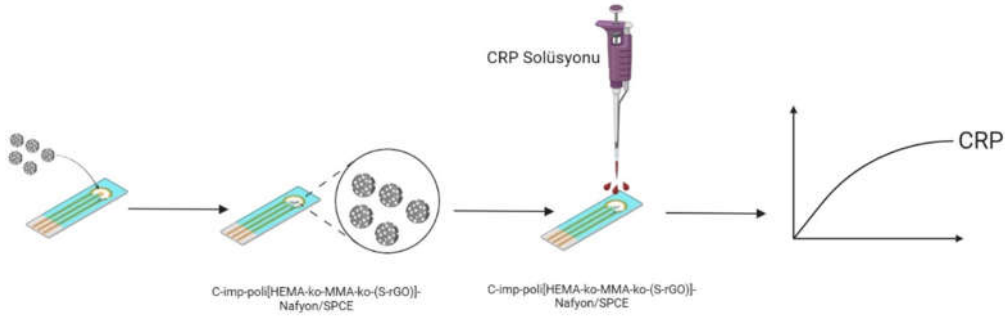
Şablonsuz poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopartiküllerin (NIP) şablon molekül (CRP) olmadan aynı reçete ile polimerizasyon ortamında hazırlandı.



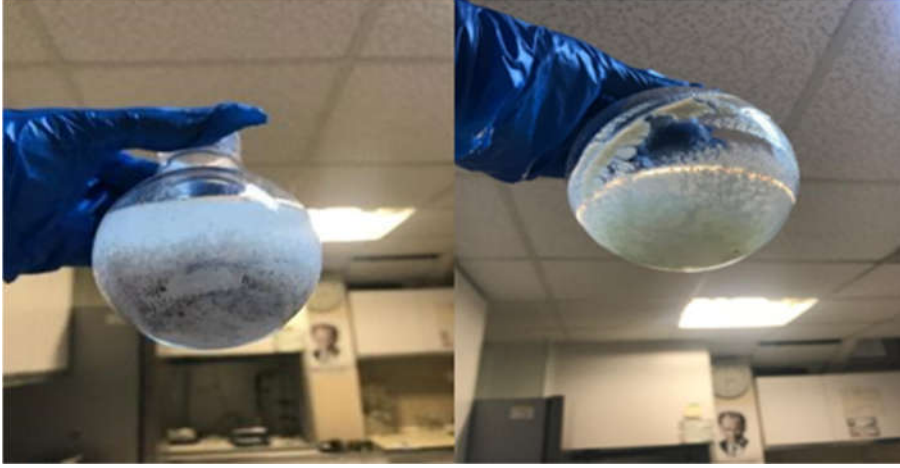
Şekil 2. 2 A) CRP ve MMA Ön Kompleks ve B) poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] terpolimerinin kopolimerizasyonun spesifik etkileşiminin şematik gösterimi



Şekil 2. 3 CRP-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimeri sentezi.



Şekil 2. 4 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE sensör sisteminin hazırlanmasının şematik gösterimi.



Şekil 2. 5 CRP-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimeri sentez sonrası fotoğrafları.

2.7 Sentezlenen Nanopolimerin Karakterizasyonunun Yapılması

Tez kapsamındaki çalışmalarda infeksiyonel hastalık biyobelirteci CRP tayini için sensör biyoaktif tabakası olarak kullanmak amacıyla sentezlenen nanoboyutlu polimerik malzeme olan C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, modifikasyonu ileri karakterizasyon teknikleri ile karakterize edilmiştir. Bu teknikler kapsamında, Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Zeta Boyut ve Potansiyel Analizi kullanılmıştır.

2.7.1 Baskılanmış ve baskılanmamış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] ve C-non-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) ölçümleri

Baskılanmış ve baskılanmamış p(HEMA-MMA) nanopolimerlerin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR) kullanılarak elde edildi. Kurutulmuş nanopolimerlerin (2 mg), 4000-650 cm^{-1} dalga sayısı aralığında FTIR spektrumu çekildi.

2.7.2 CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin ve NIP Nanopolimerlerinin SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüleri

CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin ve NIP nanopolimerlerinin SEM görüntüleri için İzmir Katip Çelebi Üniversitesi'nde Enstitüsünde bulunan SEM cihazı Carl Zeiss 300VP Kaplama (QUORUM Q150 RES) kullanıldı. Polimerik nano yapılar önce liyofilizasyonla kurutuldu, sonrasında polimerin iletkenliğini arttırmak amacıyla yüzeye altın kaplama yapılarak görüntü alındı. Partikülün morfolojik özellikleri ve boyutu incelendi.

2.7.3 CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin Zeta Boyut Analizi

Sentezlenen C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerin zeta boyut analizi, nanopolimerlerin seyreltik çözeltisi kullanılarak Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü) ile analiz edildi.

2.7.4 CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin Zeta Potansiyel Analizi

Sentezlenen C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerin zeta potansiyel analizi ile parçacıkların yüzey yükünü ve stabilitesini belirlemek için

nanopolimerlerin seyreltik çözeltisi (5x) kullanılarak Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü) ile analiz edildi.

2.7.5 CRP'nin Belirlenmesi için UV-Spektrofotometre Analizi

CRP'nin analizi kuvars küvet kullanılarak Ultraviyole spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific 60 Evolution) ile CRP tayini için öncelikle 200-800 nm aralığında spektrum taraması yapıldı. CRP kalibrasyon grafiği oluşturmak için CRP'nin en iyi hangi dalga boyunda absorbanans verdiği pik aralığı bulundu.

10 mg CRP, 1 mL DMSO ve 9 mL pH:7,0 fosfat tampon çözücü sistemi (Kumar ve Prasad, 2012) içerisinde çözünür. Çözelti konsantrasyonu 1mg/mL olacak şekilde oda sıcaklığında (25°C) ve aydınlık ortamda olacak şekilde hazırlanmıştır. Tüplerin total hacmi 1 mL olarak hesaplanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi 0.1,0.25,0.50,0.75,1 mg/mL derişimlerdeki CRP çözeltilerileri ile oluşturulmuştur. Saptanan CRP konsantrasyonları ile verilen Eşitlik 1 kullanılarak gram nanopolimer alanına tutunan CRP değerleri hesaplanmıştır.

Eşitlik 1

$$Q = \frac{C_{başlangıç} - C_{son}}{Kuru\ nanopolimer\ kütle} * V_{toplam}$$

Bu eşitlikte;

Q: mg nanopolimere adsorplanan CRP miktarı (mgmg⁻¹)

C_{başlangıç}: CRP'nin başlangıçtaki konsantrasyonu (mgmL⁻¹)

C_{son}: Süpernatantta kalan CRP konsantrasyonu (mgmL⁻¹)

V_{toplam}: nanopolimer ile CRP'nin çözelti toplam adsopsiyon hacmi (mL) 'dir.

2.7.6 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] Nanopolimerlerinin Adsorbsiyon Koşullarının Optimizasyonu

CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin CRP adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu denemelerinde zaman, pH, sıcaklık ve başlangıç CRP konsantrasyonu ve tuz derişiminin adsorpsiyon üzerine etkisi incelendi. Adsorpsiyon denemelerinde kullanılmak üzere 10 mg CRP 1 mL DMSO ve 9 mL pH:7,0 fosfat tampon çözücü sisteminde çözünerek 1 mg/mL konsantrasyonda CRP çözeltisi hazırlandı. pH denemeleri için her biri 50 mM olmak üzere, pH 5-6-7 için fosfat tamponu; pH 8-9 değerleri için sodyum borat tamponu hazırlandı. Denemelerin ardından yapılan analiz verileriyle adsorpsiyon kapasite değeri (Q); mg polimer başına adsorplanan mg CRP miktarı hesaplandı.

2.7.6.1 CRP Adsorbsiyonuna Zaman Etkisinin İncelenmesi

CRP adsorpsiyonu üzerine zamanın etkisini incelemek için 1,0 mg/mL konsantrasyonundaki CRP çözeltisi 2 mL eppendorf tüplere konuldu ve 10 mg polimer eklenip açılı karıştırıcıya bırakıldı. Denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Son hacmi 2 mL, başlangıç CRP konsantrasyonu 1,0 mg/mL olan adsorpsiyon ortamlarından 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 ve 120. dakikalarda örnekler alınarak 14500 g de 20 dakika santrifüjlendi ve üst fazlarında CRP tayini yapıldı. Böylece adsorpsiyonun zamana bağlı değişimi incelendi.

2.7.6.2 CRP Adsorbsiyonuna pH Etkisinin İncelenmesi

CRP adsorpsiyonu üzerine pH etkisini incelemek için farklı pH'larda hazırlanan 50 mM konsantrasyonda tamponlar kullanıldı. Denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Son hacim 2 mL, başlangıç CRP konsantrasyonu 1,0 mg/mL olacak şekilde farklı pH çözücü sistemlerinde CRP çözeltileri 2 mL'şer 2 mL'lik eppendorf tüplere konuldu ve içerilerine 10 mg C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerleri açılı karıştırıcıya bırakıldı. 2 saat adsorpsiyondan sonra örnekler 14500 g de 20 dakika santrifüj edilip üst fazlarında CRP analizi yapıldı.

2.7.6.3 CRP Adsorpsiyonuna Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi

CRP adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için 4°C-45°C aralığında çalışıldı. Denemeler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu çözücü sisteminde, başlangıç CRP konsantrasyonu 1,0 mg/mL olacak şekilde son hacim 2 mL hacimde gerçekleştirildi. CRP çözeltileri 2 mL'lik eppendorf tüplere konuldu ve içerilerine 10 mg C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerleri eklenip adsorpsiyon sıcaklığına ayarlanan su banyolarında 2 saat karıştırıldı. 2 saat adsorpsiyondan sonra örnekler 14500 g de 20 dakika santrifüj edilip üst fazlarında CRP analizi yapıldı.

2.7.6.4 CRP Adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi

CRP adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonunun etkisini incelemek için adsorpsiyon ortamındaki başlangıç CRP konsantrasyonu 0,2-0,5-0,75-1,0-1,5-2,0 mg/mL aralığında son hacim 2 mL'ye ayarlanarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu çözücü sisteminde 2,0 mg/mL'lik CRP stok çözeltisinden pipetlemeler yapıldı ve 10 mg MIP-I, MIP-II ve MIP-III nanopolimerleri eklenildi. Denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Adsorpsiyondan sonra örnekler 14500 g de 20 dakika santrifüj edilip üst fazlarında CRP analizi yapıldı. İçerisinde polimer bulunmayan kör deneme de her konsantrasyon değeri için başlangıç derişimi belirlemede kullanıldı.

2.7.6.5 CRP Adsorpsiyonu Tuz derişimi Etkisi

İyonik gücün CRP adsorpsiyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, pH'ı 7,0 ve konsantrasyonu 20 mM olan fosfat tamponları hazırlandı ve bu tamponlar, NaCl konsantrasyonları 0'dan 1.0 M'a kadar değışecek şekilde ayarlandı. Deney numuneleri 30 rpm hızla dönen açılı bir karıştırıcıda oda sıcaklığında 2 saat süreyle karıştırıldı. Bu sürenin sonunda, CRP miktarı UV-vis spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü. Bu yöntem, NaCl konsantrasyonlarıyla ayarlanan farklı iyonik güç koşullarının, CRP'nin moleküler baskılı nanopolimer üzerine adsorpsiyon verimliliğini nasıl etkilediğini araştırmak için kullanıldı.

2.8.Nanobiyosensör Yüzeyinin Hazırlanması ve karakterizasyonu

2.8.1 Nanobiyosensör Geliştirme Çalışmaları

Nanobiyosensör geliştirme kapsamında elektrokimyasal analizler için PalmSens potansiyostat (The Netherlands), SPCE kullanıldı. Elektrokimyasal nanobiyosensör geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda elektrokimyasal yöntem olarak diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve döngüsel voltametri (CV) yöntemleri kullanıldı. Uygulanan yöntemlerde elektrokimyasal tayin amacıyla çözelti içerisinde yer alan demirin indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonundan faydalanarak yüzeyin doluluğu hakkında bilgi edinmeyi sağlayan ferri-ferro çözeltisi hazırlandı ve kullanıldı. Yüzeye biyoaktif tabaka olarak nanopolimer bağlanma aşamalarıyla başlayarak bağlanan madde miktarı arttıkça çözelti içerisindeki demirin elektrotun iletken kısmına ulaşması zorlaşmaktadır. Bu prensip ışığında yüzeydeki bağlanma miktarları azalan iletkenliğe bağlı olarak azalan sinyal miktarından hesaplanabilmektedir.

2.8.1.1 Ferri-ferro çözeltisinin hazırlanması ve kullanımı

Ferri ferro çözeltisini hazırlarken kullanılan potasyum heksosiyanoferrat (III) $K_3[Fe(CN)_6]$ ve potasyum heksosiyanoferrat (II) trihidrat ışıktan etkilendiği için çözelti amberli şişeye aktarılan kadar karanlık ortamda gerçekleştirilmektedir. 745 mg KCl (0,1 M), 680.5 mg KH_2PO_4 tartıldıktan sonra 211.2 mg $K_4[Fe(CN)_6]$, 165 mg $K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) hassas terazi yardımıyla tartılarak 100 mL ultra saf su içerisinde çözüldü. Ardından amberli şişe içerisinde dış kısmı alüminyum folyo ile kaplanarak oda sıcaklığında saklandı. Ölçümler esnasında kullanılan hücrenin dış kısmı alüminyum folyo ile kaplanarak çözeltinin mümkün olduğu kadar ışıktan korunması sağlandı. Çözelti ölçümler sırasında ışıktan etkilendiği için sıklıkla yenilendi ve taze olan çözelti ile ölçümler gerçekleştirildi.

2.8.1.2 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE

Yüzeyinin Hazırlanması

Optimize edilmiş koşullara dayanarak, baskılanmış polimer ile modifiye edilmiş SPCE (C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE) hazırlandı. 0.5 % nafyon çözeltisi içerisinde 1,5 mg/mL total konsantrasyonda C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] polimeri süspansiyeye edilmiştir. Elde edilen nafyon polimer karışımından 15 µL elektrot yüzeyine damlatılarak oda sıcaklığında 2 saat boyunca karanlıkta bekletilerek filmin oluşturulması sağlanmıştır. Modifiye C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE sistemi daha sonraki analizlerde kullanılmak amacıyla +4 C° saklanmıştır.

2.8.2CRP Tayinine Yönelik Nanobiyosensör Optimizasyon Çalışmaları

2.8.2.1.Optimum Tarama Hızı

Elde edilen optimum değerlerdeki tarama hızı, nafyon konsantrasyonu, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] konsantrasyonu ve film kalınlığı sonucunda gerçekleştirilen her bir yüzey modifikasyonu CV ölçümleri ile gözlemlenmiştir.

2.8.2.2 Nafyon Konsantrasyonu Etkisi

C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon film çözeltisi, metanol içeren Nafyon 117 çözeltisi (%0.1 ila %1 (w/v)) ile hazırlandı. Daha sonra, bu metanol içeren çözeltilerden 15 µL her bir SPCE'nin yüzeyine uygulandı. Elektrot yüzeyindeki çözeltiyi kurutmak için elektrotlar oda sıcaklığında 2 saat boyunca bekletildi. SPCE'ler, analiz için gerektiğinde kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

2.8.2.3 Polimer Konsantrasyonu Etkisi

0 ile 2 mg/mL arasında değişen C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] polimer konsantrasyonları %0.5 nafyon polimeri içine eklenerek elektrot yüzeyine uygulanmıştır.

2.8.2.4 Polimer Film Hacmi Etkisi

C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE elektrodunun en iyi performans ile çalışabilmesi adına kullanılacak olan film kalınlığının optimizasyonu çalışılmıştır. % 0.5 nafyon ve 1.5 mg/mL C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] polimeri ihtiva eden 5, 10, 15 ve 20 µL solüsyonlar SPCE elektrot yüzeyine uygulanmıştır.

2.8.2.5 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon ile modifiye edilmiş SPCE'nin analitik performansı

Elde edilen en uygun koşullar altında, farklı CRP konsantrasyonları varlığında C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon ile modifiye edilmiş SPCE sisteminin analitik performansı incelenmiştir. Analitik analizler için CRP konsantrasyonları 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/mL olarak kullanılmıştır. Elde edilen DPV akım değerleri istatistiksel olarak hesaplanarak grafikler oluşturulmuştur. Bu çalışma kapsamında LoD (3.3 S/N) ve LoQ (10 S/N) değerleri istatistiksel olarak belirlenmiştir.

2.8.2.6 Yapay Kan Örneği Analizi

Tasarlanan C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon SPCE elektrot sisteminin kan örneklerindeki performansını değerlendirmek amacıyla literatüre uygun şekilde hazırlanmış yapay kan örnekleri kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda, 0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL ve 1.0 mg/mL CRP içeren yapay kan örnekleri hazırlanmış ve optimize edilmiş C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon SPCE elektrot sistemi ile % geri kazanım (recovery) oranları incelenmiştir. Böylece, tasarlanan modifiye elektrot sisteminin kan örneklerindeki performansı detaylı olarak değerlendirilmiştir.

2.8.2.7 Seçicilik Çalışması

C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon SPCE elektrot sisteminin seçiciliğinin belirlenmesi adına kan örneklerinde bulunan ve girişim

gösterme potansiyeli olan bovin serum albümin (BSA) ve ürik asit varlığında sistemin akım değerleri araştırılmıştır. Böylece tasarlanan elektrot sisteminin kan örneklerindeki çalışma performansı daha ayrıntılı olarak ortaya konacaktır.

2.8.2.8 Tekrarlanabilirlik Denemeleri

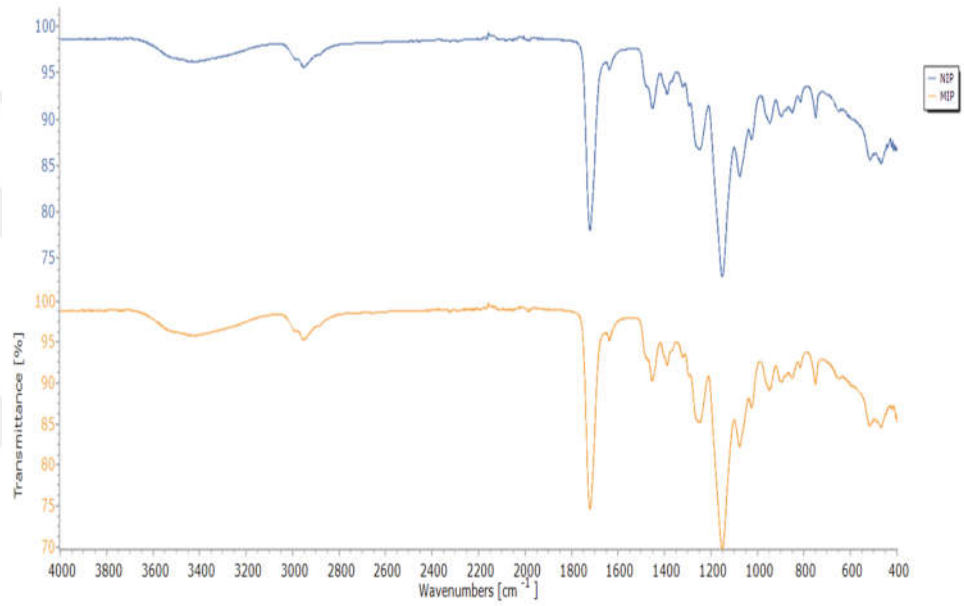
Tasarlanan SPCE elektrot sisteminin tekrar kullanılabilirliğinin anlaşılması adına belirlenen optimum şartlar altında sabit CRP konsantrasyonu içeren suni kan örneğinde tekrarlı DPV ölçümleri alınmıştır.



3. SONUÇ

3.1 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] Polimer Sentezi ve Karakterizasyonu

3.1.1 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] Polimer FTIR Analizi



Şekil 3. 1 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] ve C-non-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerlerinin FTIR spektrumları.

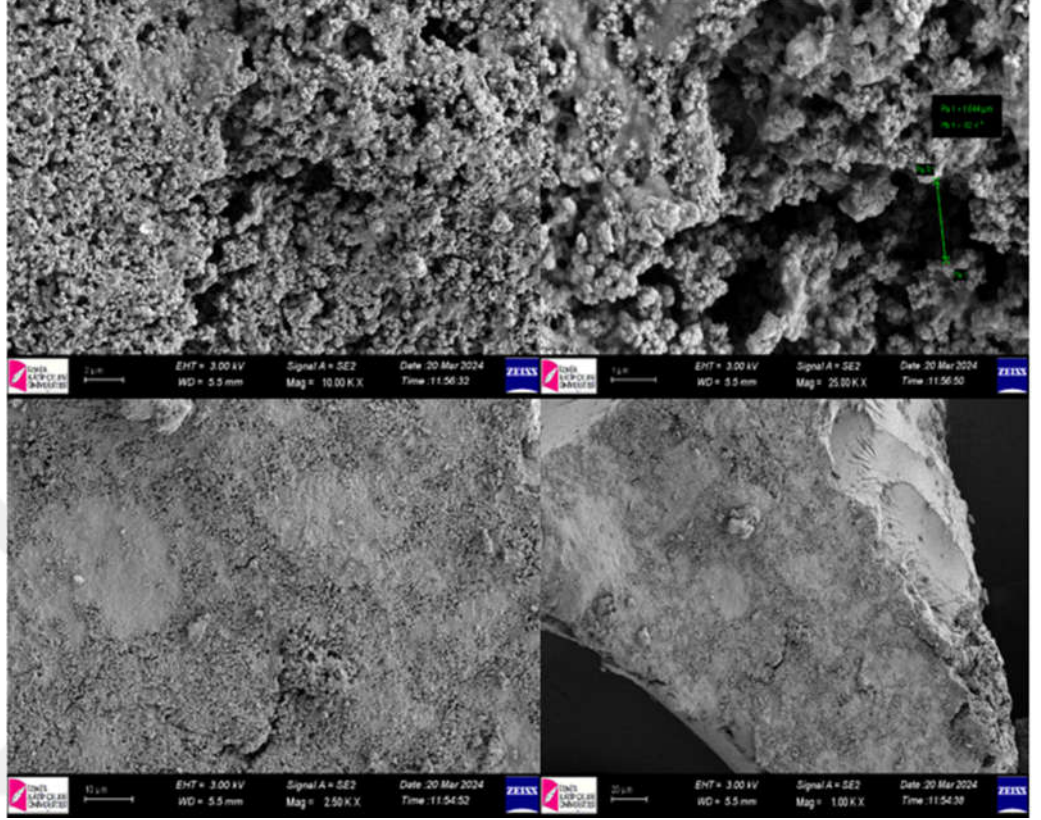
Şekil 3.1’de görüldüğü gibi FTIR spektrumunda görüldüğü üzere C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] ve C-non-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] yapıları 3440 cm^{-1} civarlarında karakteristik hidrojen bağlı alkol, -OH, gerilme vibrasyon bandına sahiptir. MMA komonomerinin polimer yapısına katılmasıyla hidrojen bağlı alkol, OH, gerilme vibrasyon bandının şiddeti NIP polimerine göre artmıştır. Bu durum, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] yapısındaki -NH gerilme titreşimlerinin de $3300\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ civarında titreşim göstermesinden kaynaklanmış olabilir. 2900 cm^{-1} civarında absorpsiyon bantları, kopolimerin ana zincirindeki -CH ve -CH₂’nin C-H gerilmesi olarak yorumlanmış, 1645 cm^{-1} ’deki absorpsiyon bandı ise HEMA zincirinin C=O

grubuna karşılık gelmektedir. 1449 ve 1500 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bantları, MMA zincirindeki C–C ve N–C bağlarının gerilme titreşimlerini göstermektedir.

1800-1700 cm^{-1} civarında görülen etkileşim karakteristik C=C, C=O ve C=N gerilme vibrasyon bandına sahiptir. 1200-1100 cm^{-1} civarında görülen etkileşim karakteristik C–C, C–O ve C–N gerilme vibrasyon bandına sahiptir.

Bu karakteristik HEMA ve MMA absorpsiyon bantları, poli(HEMA-MMA) nanopolimerinin başarıyla sentezlendiğini doğrulamaktadır. FTIR spektrumlarındaki bu karakteristik absorpsiyon bantlarının varlığı, poly(HEMA-MMA) nanopolimerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini teyit etmektedir. MIP nanopolimerleri için CRP'nin karakteristik zirveleri N–H gerilmesi (3300 cm^{-1}), N–H bükülmesi (3060 cm^{-1}), C=O gerilmesi ve C–N gerilmesi (1680 cm^{-1}) ve CO–O–C asimetrik gerilmesi (1165 cm^{-1}) olarak belirlenmiştir. Bu bantlar, kopolimerde bulunan belirli fonksiyonel gruplar ve kimyasal bağlar için parmak izi işlevi görmekte olup, yapının bileşimi ve yapısının kanıtını sunmaktadır.

3.1.2 MIP (C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]) ve NIP Nanopolimerlerinin SEM Görüntüleri

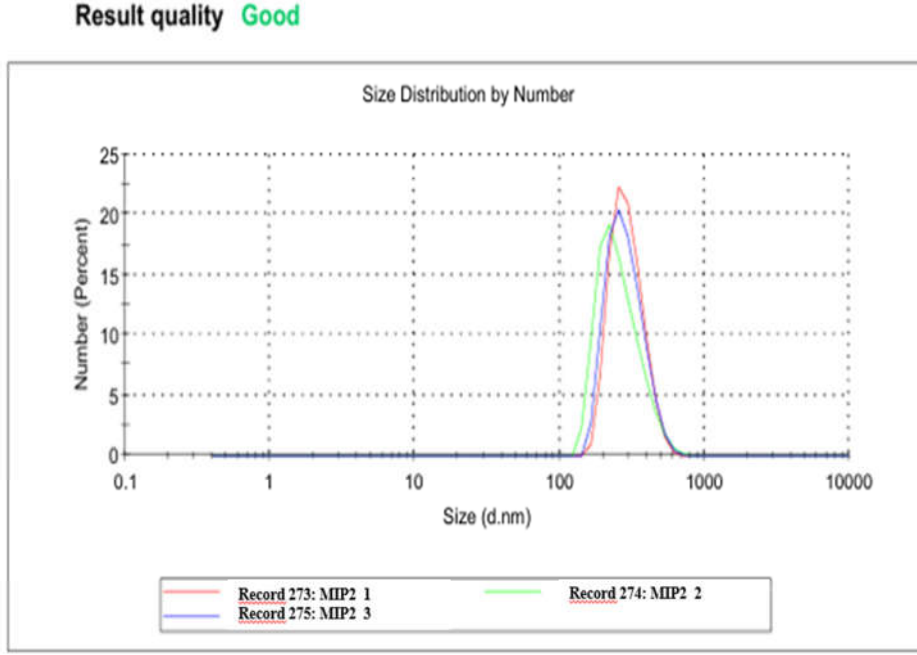


Şekil 3. 2 A) MIP nanopolimerlerinin SEM fotoğrafları **B)** NIP nanopolimerlerinin SEM fotoğrafları

Hem NIP hem de MIP nanopolimerlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri, belirgin bir morfolojik yapı ortaya koymaktadır (Şekil 3.2). Parçacıklar boyutları farklı büyütme ölçeklerinde tutarlı ve uyumlu görünmektedir. SEM görüntülerinde gözlemlenen boyutlardaki ve küresel yapıdaki tekdüzelik, sentezlenen nanopolimerlerin morfolojisi ve fiziksel özellikleri hakkında değerli bilgiler sunmaktadır. Bu bilgiler, hem NIP hem de MIP nanopolimerlerin yapısal özelliklerini ve ilaç taşıma veya biyosensör gibi çeşitli alanlardaki potansiyel uygulamalarını anlamak için önemlidir. Taramalı elektron mikroskobu görüntülerinde MIP ve NIP nanopolimerinin morfolojik yapısı gözlemlendi.

3.1.3 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] Polimer Zeta Boyut Analizi

C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin zeta boyut analizi Malvern Zeta-sizer cihazıyla yapıldı. Nanopolimerler oldukça seyreltik olacak şekilde hazırlanarak cihazın hücreğine verildi.



Şekil 3. 3 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerin ZETA boyut analizi.

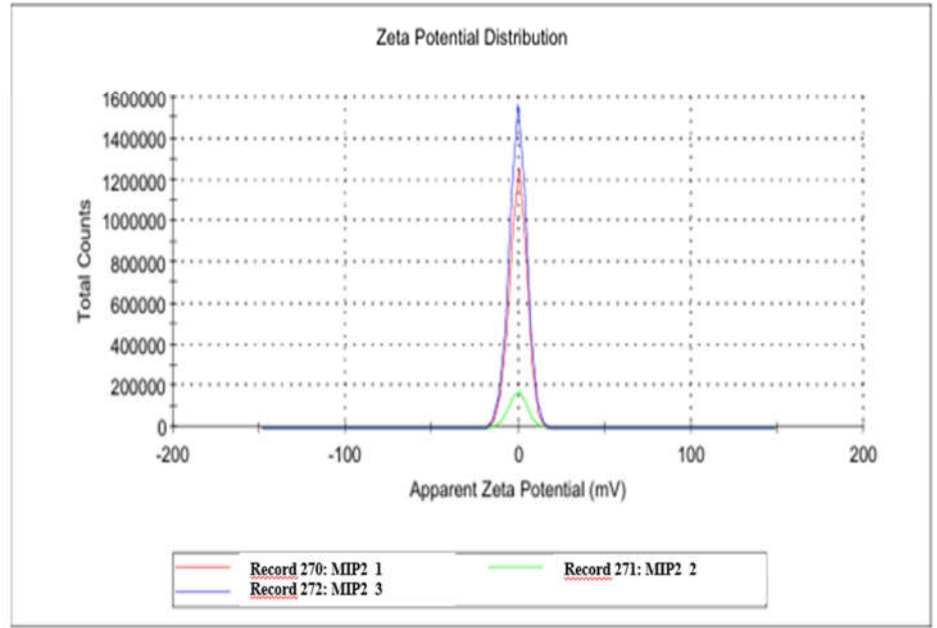
Nanopolimerlerin zeta boyut ölçümü sonucunda ortalama polimer boyutları C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] için 319,7 nm olarak belirlendi (Şekil 3.3).

Zeta Sizer cihazı partiküllerin sıvı içerisinde yaptığı brownian hareketine dayanan bir çalışma prensibine sahiptir. Partikül boyutunu belirleyebilmek için partiküllerin sıvıyı hareket ettirme özelliğinden faydalanılmaktadır. Küçük partiküller daha hızlı hareket ederken, büyük partiküller daha yavaş hareket etmektedir. Bu prensibe dayanarak örnek ortamına cihaz tarafından dinamik ışık gönderilerek partiküllerin yaptığı hareketin büyüklüğüne bakılması yoluyla boyutu hakkında bilgi elde edilmektedir. Buna bağlı olarak, zeta boyutun SEM görüntülerinden elde edilen boyutlara nazaran daha büyük olması partiküllerin sıvı

ortamdaki brownian hareketi ve sıvı ortamda bir miktar şişme davranışı göstermelerinden kaynaklandığı değerlendirildi.

3.1.4 CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin Zeta Potansiyel Analizi

Sentezlenen C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerin zeta potansiyel analizi, nanopolimerlerin seyreltik çözeltisi (5x) kullanılarak Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü) ile analiz edildi.



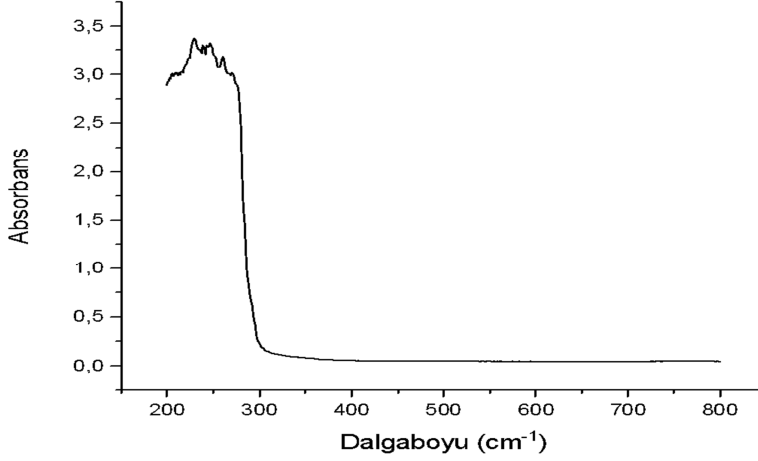
Şekil 3. 4 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerin ZETA potansiyel analizi.

Nanopolimerin zeta potansiyel ölçümü sonucunda C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] için -0,213 mV potansiyel verdiği görülmektedir (Şekil 3.4).

3.1.5 CRP'nin Belirlenmesi İçin UV-Spektrofotometre Analizi

CRP'nin analizi kuvars küvet kullanılarak Ultraviyole spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific 60 Evolution) ile CRP tayini için öncelikle 200-800 nm

aralığında spektrum taraması yapıldı. 220-260 nm aralığında maksimum absorbans elde edildi. Şekil 3.5'te de görüldüğü gib olası girişimi önlemek amacıyla 239 nm de ölçüm alındı (Antonio vd., 2020).

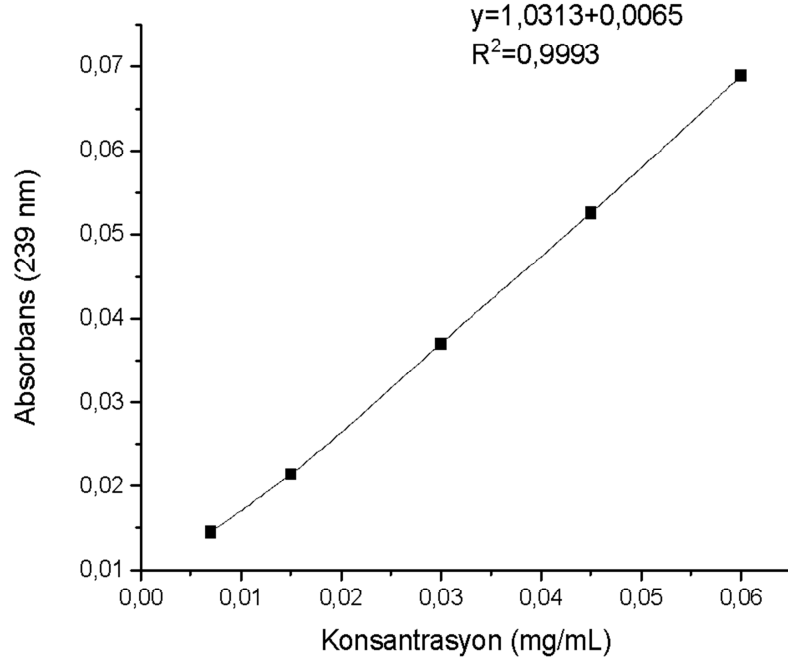


Şekil 3. 5 CRP'nin spektral tarama grafiği.

10 mg CRP, 1 mL DMSO ve 9 mL pH:7,0 Fosfat tampon çözücü sisteminde çözünerek 1 mg/ml konsantrasyonda CRP çözeltisi hazırlandı (Kumar ve Prasad, 2012).

Denemeler oda sıcaklığında (25°C) ve aydınlık ortamda olacak şekilde hazırlanmıştır. Tüplerin total hacmi 2 mL olarak hesaplanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi 3 tekrarlı olacak şekilde 0.1,0.25,0.50,0.75,1 mg/mL derişimlerdeki CRP çözeltiileri ile oluşturulmuştur. Saptanan CRP konsantrasyonları ile verilen Eşitlik 1 kullanılarak mg nanopolimer alanına tutunan CRP değerleri hesaplanmıştır.



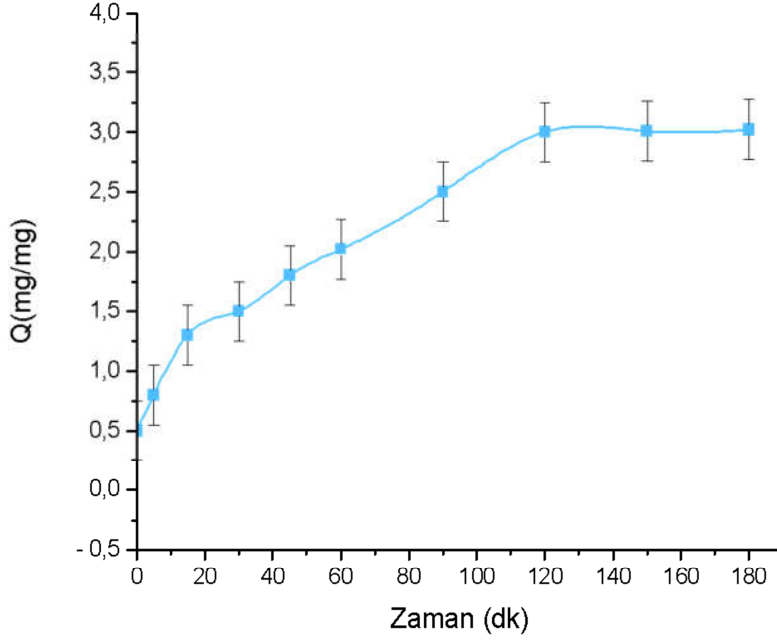
Şekil 3. 6 CRP'ye ait kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon grafiğine ait regresyon denklemi $y=1,0313x+0,0065$ ve R^2 değeri; 0,9993 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.6).

3.1.6 CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] polimerin Adsorbsiyon Koşullarının Optimizasyonu

3.1.6.1 CRP Adsorbsiyonunda Zaman Etkisinin İncelenmesi

CRP adsorpsiyonu üzerine zamanın etkisi 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 ve 120,150 ve 180. dakikalarda alınan örneklerle incelendi. CRP adsorpsiyonu üzerine zamanın etkisini incelemek için 1,0 mg/mL konsantrasyonundaki CRP çözeltisi 2 mL eppendorf tüplere konuldu ve 10 mg polimer eklenip açılı karıştırıcıya bırakıldı. Denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Başlangıç CRP konsantrasyonu 1,0 mg/mL olan adsorpsiyon ortamlarından 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90 ve 120,150 ve 180. dakikalarda örnekler alınarak 14500 g de 20 dakika santrifüjlendi ve üst fazlarında CRP tayini yapıldı. Böylece adsorpsiyonun zamana bağlı değişimi incelendi.

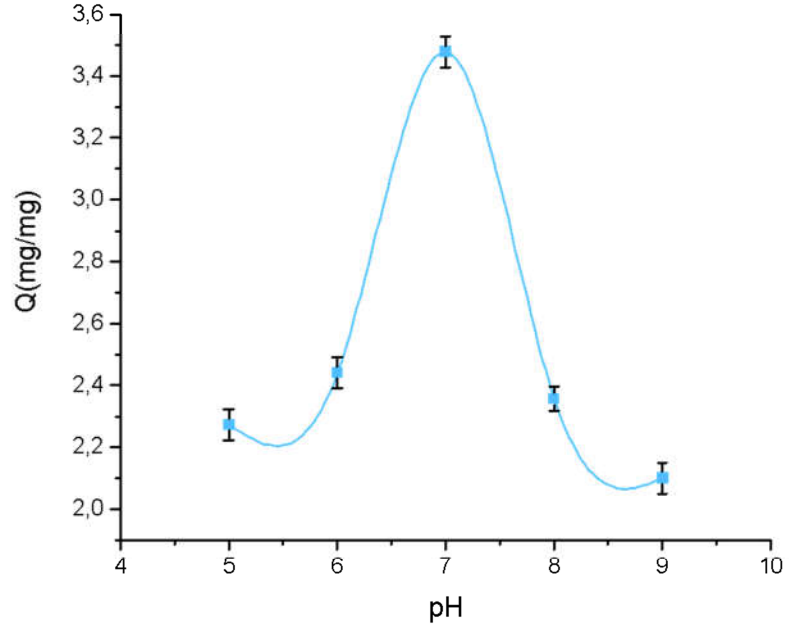


Şekil 3. 7 CRP adsorpsiyonu üzerine zamanın etkisi (CCRP:1,0 mg/mL, pH:7,0 (50 mM, fosfat tamponu) T:25 °C).

Elde edilen Q (adsorpsiyon kapasitesi) değerlerinin zamanla artıp belli bir değerden sonra da doygunluğa ulaştığı görüldü. Şekil 3.7’de görüldüğü gibi 120 dk sonra adsorpsiyon dengelendi ve maksimum adsorpsiyon değerine ulaşıldı.

3.1.6.2 CRP Adsorbsiyonuna pH Etkisinin İncelenmesi

CRP adsorpsiyonu üzerine pH etkisini incelemek için farklı pH’larda hazırlanan 50 mM konsantrasyonda tamponlar kullanıldı. Denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Son hacim 2 mL, başlangıç CRP konsantrasyonu 1,0 mg/mL olacak şekilde farklı pH çözücü sistemlerinde CRP çözeltileri 2 mL’şer 2 mL’lik eppendorf tüplere konuldu ve içerilerine 10 mg C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerleri açılı karıştırıcıya bırakıldı. 2 saat adsorpsiyondan sonra örnekler 14500 g de 20 dakika santrifüj edilip üst fazlarında CRP analizi yapıldı.



Şekil 3. 8 CRP adsorpsiyonu üzerine pH etkisi (CCRP:1,0 mg/mL, T:25 °C,tadsorpsiyon: 2 saat).

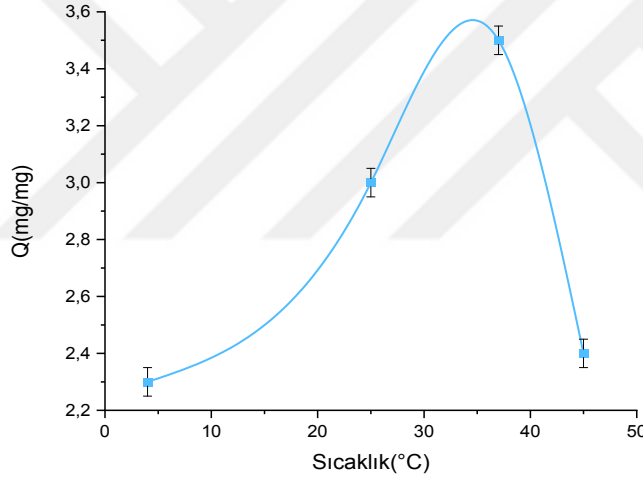
CRP adsorpsiyonuna pH'nin etkisini incelemek amacıyla, her biri 50 mM konsantrasyonunda farklı pH seviyelerinde tamponlar hazırlandı: pH 5.0 (asetat), pH 6.0-8.0 (fosfat) ve pH 9.0 (TRIS).

Şekil 3.8'de görüldüğü üzere C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin CRP adsorpsiyonu pH bağımlıdır. Asidik bölgeden nötral bölgeye gidildikçe moleküler baskılanmış nanopolimerin CRP adsorpsiyon kapasitesinde artış görülmektedir. Nötral bölgeden bazik bölgeye gidildikçe moleküler baskılanmış nanopolimerin CRP adsorpsiyon kapasitesinde düşme yaşanmaktadır. Bunun sebebi olarak MMA'nın $-NH_2$ grubu ile CRP'nin H-H grubu arasında hidrojen bağı oluşumu ile açıklanabilir. pH'nin daha da artmasıyla birlikte deprotonasyon meydana geldi; dolayısıyla, gruplar arasındaki hidrojen bağları zayıfladı ve Q değeri azaldı.

3.1.6.3 CRP Adsorbsiyonuna Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi

CRP adsorpsiyonu üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için sırasıyla 4°C - 25°C - 37°C ve 45°C değerlerinde çalışıldı. Denemeler 50 mM pH 7,0 fosfat

tamponu çözücü sisteminde, başlangıç CRP konsantrasyonu 1,0 mg/mL olacak şekilde son hacim 2 mL hacimde gerçekleştirildi. CRP çözeltileri 2 mL'lik eppendorf tüplere konuldu ve içerilerine 10 mg C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerleri eklenip adsorpsiyon sıcaklığına ayarlanan su banyolarında 2 saat karıştırıldı. 2 saat adsorpsiyondan sonra örnekler 14500 g de 20 dakika santrifüj edilip üst fazlarında CRP analizi yapıldı.



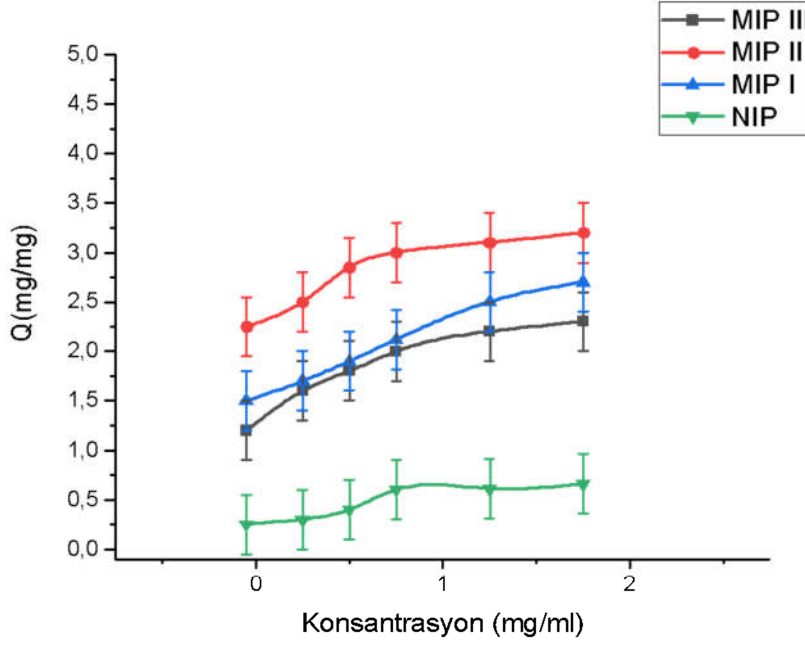
Şekil 3. 9 CRP adsorpsiyonu üzerine sıcaklık etkisi (CCRP:1,0 mg/mL, pH:7,0 (50 mM fosfat tamponu) tadsorpsiyon: 2 saat).

Şekil 3.9, CRP baskılı nanopolimerin adsorpsiyon kapasitesinin sıcaklık ile nasıl değiştiğini göstermektedir. Araştırma, 4-45 °C sıcaklık aralığını kapsamaktadır. Şekil 3.9'da MIP nanopolimerin CRP adsorpsiyon kapasitesinin artan sıcaklık değerleriyle birlikte artış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bağlanma kapasitesi, 37 °C'de zirveye ulaşarak, daha yüksek sıcaklıkların bağlanma etkinliğini artırdığını göstermektedir.

Adsorpsiyondaki zayıf ikincil etkileşimlerin baskınlığı, nanopolimer yüzeyindeki CRP'ye özgü boşluklarda bulunan MMA monomerine ve hedef molekül CRP'nin hidrofilik doğasına bağlanmıştır. Hem adsorbanın hem de hedef molekülün hidrofilik olduğu durumlarda, zayıf ikincil etkileşimler adsorpsiyon sürecinde baskın olma eğilimindedir. Suda hidrofilik maddelerin bağlanma süreci, $G = (H - T\Delta S)$ teoremine göre ilerler; burada G serbest enerji değişimini, H entalpi değişimini, T sıcaklığı ve ΔS entropiyi temsil eder. Bu durumda, hidrofilik adsorbanlar ile itici güç entropidir, bu da sıcaklık arttıkça etkileşimin artmasına neden olur. Entalpi H pozitif veya negatif olabilir, ancak pozitif entropi değişimi ΔS serbest enerji G üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir. Sonuç olarak, sıcaklık arttıkça entropi de artar. Ayrıca, HEMA yüzeyindeki hidroksil grupları ile zayıf etkileşimler, örneğin hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimleri de gözlemlenmiştir. Bu çok yönlü etkileşim profili, hidrofilik etkileşimleri ve diğer zayıf kuvvetleri içermekte olup, toplam bağlanma afinitesine katkıda bulunur ve adsorpsiyon sürecinin sıcaklığa bağımlılığını vurgular.

3.1.6.4 CRP adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonunun etkisinin İncelenmesi

CRP adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonunun etkisini incelemek için adsorpsiyon ortamındaki başlangıç CRP konsantrasyonu 0,2-0,5-0,75-1,0-1,5-2,0 mg/mL aralığında son hacim 2 mL'ye ayarlanarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu çözücü sisteminde 2,0 mg/mL'lik CRP stok çözeltisinden pipetlemeler yapıldı ve 10 mg MIP-I, MIP-II ve MIP-III nanopolimerleri eklenildi. Denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Adsorpsiyondan sonra örnekler 14500 g de 20 dakika santrifüj edilip üst fazlarında CRP analizi yapıldı. İçerisinde polimer bulunmayan kör deneme de her konsantrasyon değeri için başlangıç değişimi belirlemede kullanıldı.



Şekil 3. 10 CRP adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonunun etkisi (pH:7,0 (50 mM fosfat tamponu)T:37 °C, tadsorpsiyon: 2 saat).

Başlangıç CRP konsantrasyonunun CRP adsorpsiyonu üzerindeki etkisi Şekil 3.10'da açıklanmaktadır. Grafik, MIP II'nin diğer MIP'lere göre daha yüksek CRP bağlanma kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, daha fazla fonksiyonel monomerin kullanılmasına ve dolayısıyla daha fazla bağlanma noktası oluşturulmasına bağlanmaktadır. Ayrıca, çözeltideki CRP konsantrasyonu arttıkça, nanopolimerin birim kütle başına adsorbe ettiği CRP miktarının da arttığı ve sonuçta polimer miktarının yaklaşık dört katı bir seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir.

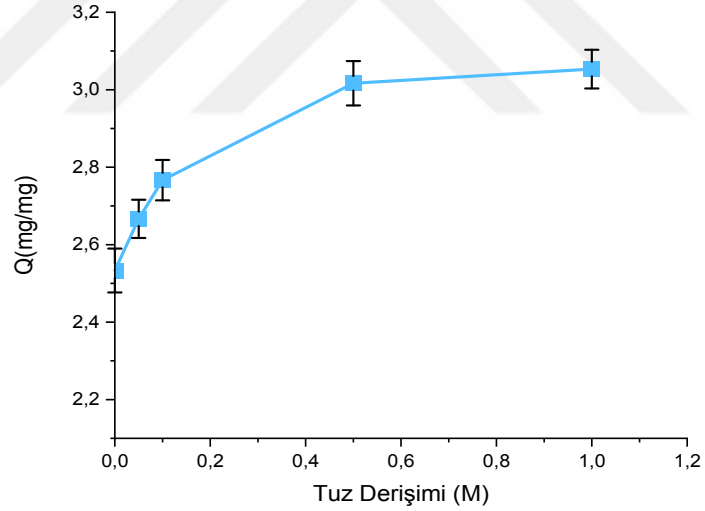
CRP konsantrasyonu ile adsorpsiyon miktarı arasındaki ilişki, adsorpsiyon için itici güç olan konsantrasyon farkının (C) artmasıyla açıklanabilir. İtici güç arttıkça, adsorpsiyon kapasitesi de artmakta ve bu beklenen bir sonuç olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle, CRP konsantrasyonu 1,0 mg/mL'ye ulaştığında, CRP için tasarlanmış moleküler baskılanmış nanopolimerin boşlukları doyuma ulaşmış ve maksimum adsorpsiyon kapasitesine erişmiştir.

CRP baskılanmış nanopolimerin C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] birim kütle başına büyük miktarda CRP adsorbe etme kabiliyeti, nanoyapının

geniş yüzey alanına bağlanmaktadır. Ek olarak, CRP'ye özgü moleküler boşluklarda yer alan MMA'nın hidrofobik doğası, CRP'ye olan afinitesini artırarak nanopolimerin etkileyici adsorpsiyon performansına katkı sağlamaktadır.

3.1.6.7 CRP adsorpsiyonu üzerine tuz derişiminin etkisinin incelenmesi

İyonik gücün CRP adsorpsiyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, pH'ı 7.0 ve konsantrasyonu 20 mM olan fosfat tamponları hazırlandı ve bu tamponlar, NaCl konsantrasyonları 0'dan 1.0 M'a kadar değişecek şekilde ayarlandı. Deney numuneleri 30 rpm hızla dönen açılı bir karıştırıcıda oda sıcaklığında 2 saat süreyle karıştırıldı. Bu sürenin sonunda, CRP miktarı UV-vis spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü. Bu yöntem, NaCl konsantrasyonlarıyla ayarlanan farklı iyonik güç koşullarının, CRP'nin moleküler baskılı nanopolimer üzerine adsorpsiyon verimliliğini nasıl etkilediğini araştırmak için kullanıldı.



Şekil 3. 11 CRP adsorpsiyonu üzerine başlangıç konsantrasyonunun etkisi (CCRP:1,0 mg/mL, pH:7,0 (50 mM fosfat tamponu)T:37 °C, tadsorpsiyon: 2 saat).

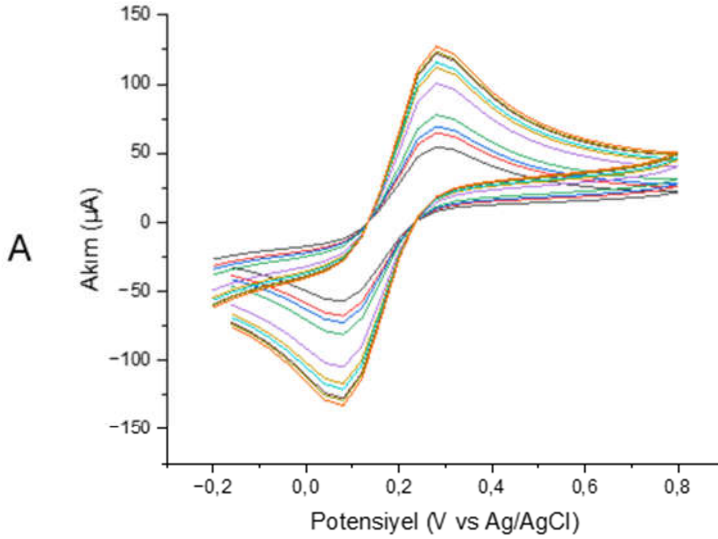
Şekil 3.11'de gözlemlenen eğilim, artan tuz konsantrasyonları ile birlikte iyonik gücün protein adsorpsiyonu üzerindeki etkisinin daha belirgin hale geldiğini göstermektedir. Yüksek tuz seviyelerinde, protein adsorpsiyonu, adsorbe edilmiş protein molekülleri arasındaki elektrostatik itmenin azalmasıyla artar. Bu azalan itme, yüzeyde daha fazla protein birikimine yol açar. Ayrıca, çözeltideki

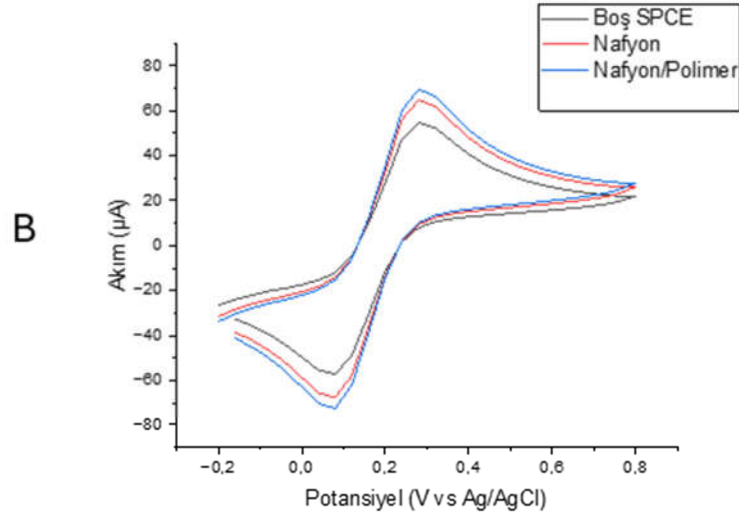
çok değerlikli iyonların etkisi özellikle dikkate değerdir. Bu iyonlar, proteinin yüklü bölgelerine bağlanarak yük yoğunluğunu nötralize eder ve proteinin hidrofobikliğini artırır, bu da yüzeye adsorpsiyonu teşvik eder. İyonik gücün etkisi, proteinin yükünün yüzey yüküyle uyumlu olup olmamasına bağlıdır. Bu etkileşimlerin düzenlenmesi, genel adsorpsiyon davranışını etkiler. Bu bulgular, değişen iyonik güç koşulları altında protein adsorpsiyonunda elektrostatik kuvvetler, yük nötralizasyonu ve hidrofobik etkileşimlerin karmaşık ilişkisini vurgulamaktadır.

3.2 Nanobiyosensör Optimizasyon Çalışmaları

3.2.1 Optimum Tarama Hızı

Elde edilen optimum değerlerdeki tarama hızı, nasyon konsantrasyonu, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] konsantrasyonu ve film kalınlığı sonucunda gerçekleştirilen her bir yüzey modifikasyonu CV ölçümleri ile gözlemlenmiştir.



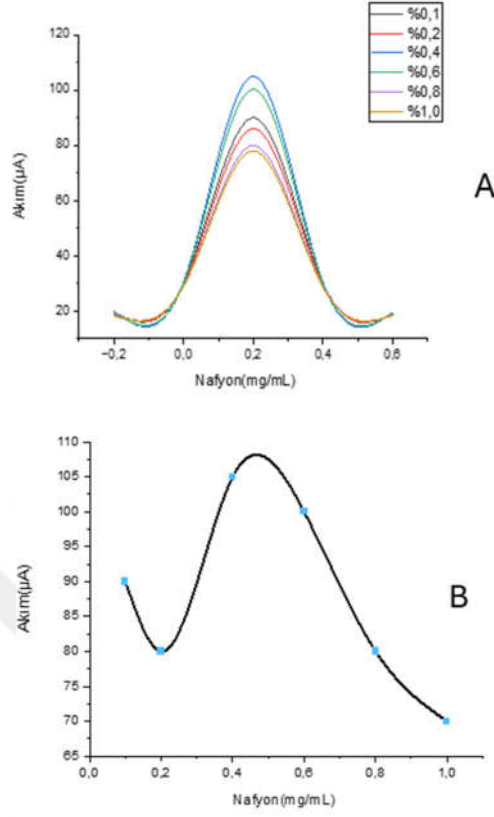


Şekil 3. 12 A) 10 ila 100 mV/s tarama hızlarında kaydedilen çevrimsel voltamogramlar, B) 5 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} çözeltisinde çıplak Serigrafi Baskılı Karbon Elektrot (SPCE), Nafyon/SPCE ve CRP-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] /Nafyon-SPCE'nin CV'leri.

Şekil 3.12'de görüldüğü üzere boş SPCE elektrodun akım değeri %0.5 nafyon ilavesi ile artmıştır. Nafyon polimerinin iletken yapısından kaynaklı olarak bu akım değerlerinin artışı beklenen bir değişimdir (Mauritz ve Moore, 2004). Elektrot yüzeyine 1.0 mg/mL C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] polimeri eklendiğinde ise akım değerlerinde artış gözlenmiştir ve bu artışın sebebi polimerin iletken doğası gereği beklenen bir durumdur. S-rGO yapısı gereği iletken bir maddedir (Manna ve Raj, 2017). CV sonuçları değerlendirildiğinde C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] elektrodunun modifikasyonun aydınlatılmış ve takip edilmiştir.

3.2.2 Nafyon Konsantrasyonu Etkisi

C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] /Nafyon film çözeltisi, metanol içeren Nafyon 117 çözeltisi (%0.1 ila %1 (w/v)) ile hazırlandı. Daha sonra, bu metanol içeren çözeltilerden 20 µL her bir SPCE'nin yüzeyine uygulandı. Elektrot yüzeyindeki çözeltiyi kurutmak için elektrotlar oda sıcaklığında 2 saat boyunca bekletildi. SPCE'ler, analiz için gerektiğinde kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.



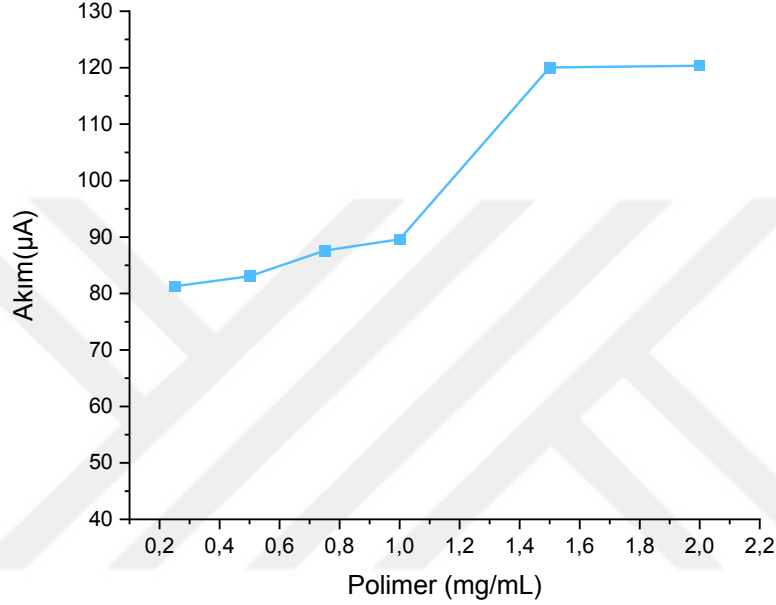
Şekil 3. 13 Farklı konsantrasyonlardaki Nafyon varlığında A) DPV ölçümleri, B) DPV akım pik değerlerinin kıyaslanması.

Şekil 3.13'te 60 mV/s tarama hızında -0.20 ila +0.60 V potansiyel aralığında yapılan DPV ölçümlerinde, en yüksek sinyalin %0.5 Nafyon konsantrasyonunda elde edildiği görülmüştür (Şekil 3.13). %0.5 Nafyon konsantrasyonundan sonra, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3- / 4-}$ iyonlarının difüzyon problemi yaşamasından dolayı akım sinyallerinde bir azalma olduğu düşünülmektedir. Gözlemlenen bu sonuçlar, literatürdeki verilerle uyum göstermektedir (Yang vd., 2017).

3.2.3 Polimer konsantrasyonu etkisi

Tasarlanan C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] polimerinin yüksek iletkenlik özelliği nedeniyle, elektrot yüzeyine yüklendiğinde sistemin genel iletkenliğinin artması beklenen bir durumdur. Bu sebeple, elektrot yüzeyine

yüklenecek polimer miktarı ile en iyi akım değerlerinin elde edildiği miktarların incelenmesi gereklidir. 0 ile 2 mg/mL arasında değişen C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] polimer konsantrasyonları %0.5 nafyon polimeri içine eklenerek elektrot yüzeyine uygulanmıştır.



Şekil 3. 14 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözeltisinde, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon ile modifiye edilmiş SPCE'nin DPV pik değerleri, CRP-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] konsantrasyonlarının 0 ile 2 mg/mL arasında değişen konsantrasyon sonuçları.

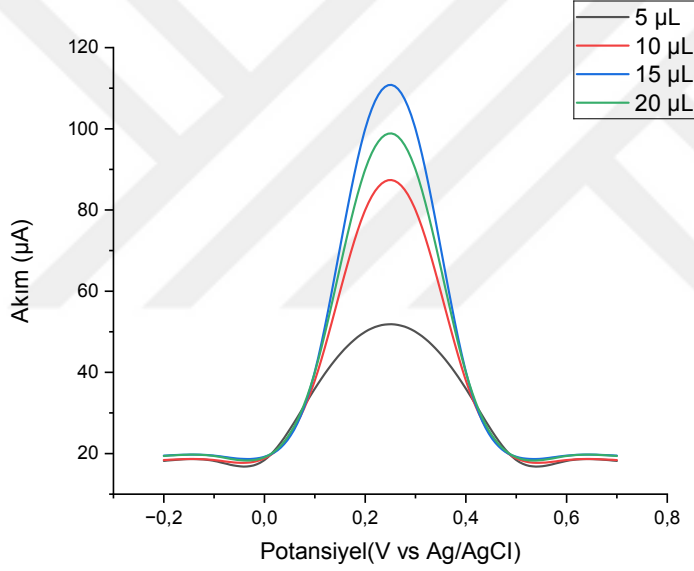
Şekil 3.14'de görüldüğü üzere, 1.5 mg/mL C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] polimer konsantrasyonu, hem kan seviyelerindeki CRP miktarının tespiti için yeterli aktif alan sağlanması, hem de elektrokimyasal sinyalin (akım değeri) en iyi gözlemlenebildiği optimal değer olarak belirlenmiştir.

3.2.4 Polimer Film Hacmi Etkisi

Nafyon iletken bir polimer olmasından dolayı yüksek miktarlarda kullanılması iletkenliği artırması beklenir. Ayrıca SPCE elektrot yüzeyine

kaplanacak film kalınlığı arttıkça elektrodun yüzey alanı artacak ve daha yüksek akım değerlerinin okunmasına imkân sağlayacaktır. Fakat, film kalınlığının artması ile iyonların ve moleküllerin film içerisine difüzyonu zorlaşacak ve sabit tarama hızında daha yavaş bir reaksiyon gözlemlenecektir. Bu olay akım değerlerinde düşüşe sebep olacaktır.

C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] /Nafyon-SPCE elektrodunun en iyi performans ile çalışabilmesi adına kullanılacak olan film kalınlığının optimizasyonu çalışılmıştır. % 0.5 nafyon ve 1.5 mg/mL C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] polimeri ihtiva eden 5, 10, 15 ve 20 μL solüsyonlar SPCE elektrot yüzeyine uygulanmıştır.

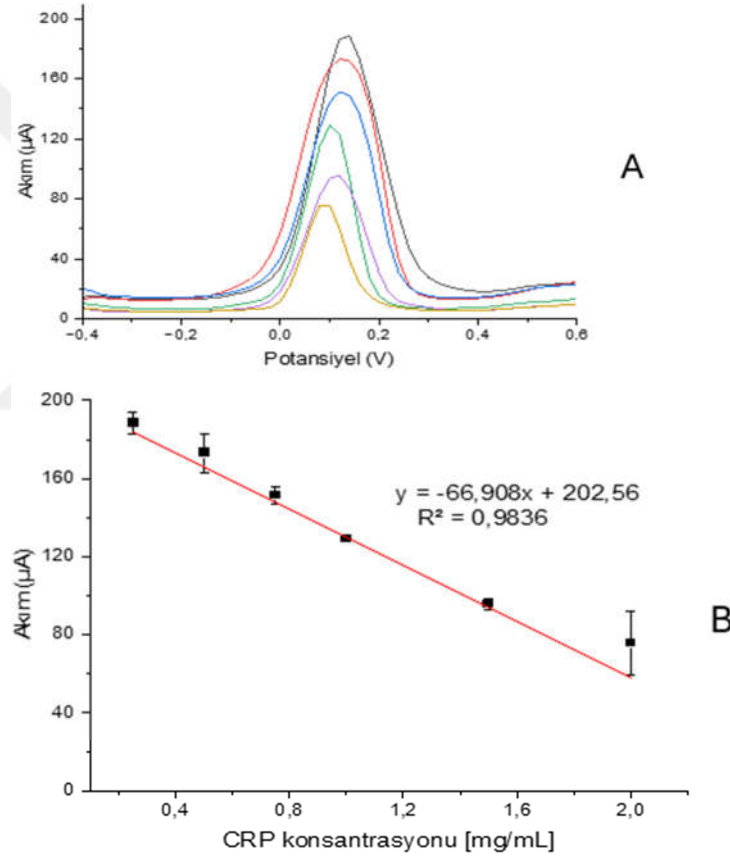


Şekil 3.15 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözeltisinde, kaydedilen DPV sonuçları üzerinde C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon'un 5 ile 20 μL arasında değişen hacimlerinin etkisi.

Şekil 3.15'te görüldüğü üzere 15 μL lik solüsyon uygulanmasında en iyi akım değeri gözlemlenmiştir. 20 μL değerinde akım değerlerinde düşme gözlemlenmiştir. Bu düşüş film kalınlığından dolayı $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3- / 4-}$ iyonlarının difüzyon problemi yaşadığının ve reaksiyonun yavaşladığını göstermektedir. Bu sebepten, tasarlanan C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE için optimum film kalınlığı için 15 μL olarak seçilmiştir.

3.2.5 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon ile modifiye edilmiş SPCE'nin analitik performansı

Elde edilen en uygun koşullar altında, farklı CRP konsantrasyonları varlığında C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon ile modifiye edilmiş SPCE sisteminin analitik performansı incelenmiştir. Analitik analizler için CRP konsantrasyonları 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/mL olarak kullanılmıştır. Elde edilen DPV akım değerleri istatistiksel olarak hesaplanarak Grafik 12'deki grafikler oluşturulmuştur. Bu çalışma kapsamında LoD (3.3 S/N) ve LoQ (10 S/N) değerleri istatistiksel olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. 16 A) pH 7.0 olan 50 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ çözeltisinde CRP miktarının artışına bağlı olarak kaydedilen DPV tepkisi, B) Ag/AgCl'e karşı $-0.2 \leq E \leq 0.6$ V potansiyel aralığında ve 60 mV/s tarama hızında taranmış ve doğrusal çalışma aralığı.

Şekil 3.16'da anlaşıldığı üzere belirlenen en uygun koşullar altında, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon ile modifiye edilmiş SPCE sisteminin

LoD değeri 0.080 μM ve LoQ değeri 0.243 μM olarak tespit edilmiştir. Lineer çalışma aralığı 0.24 ila 15.44 μM arasında (R^2 : 0,9836) gözlemlenmiştir.

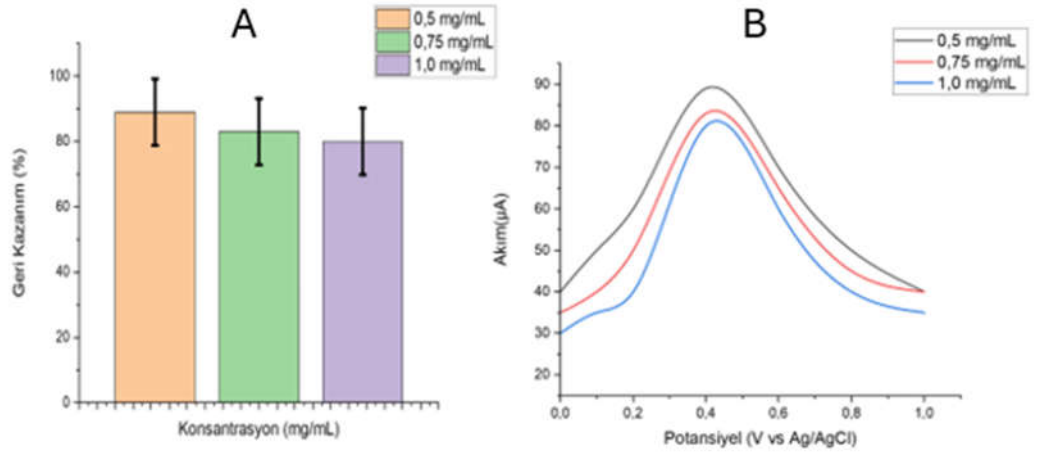
Çizelge 3. 1 Bu çalışmanın daha önce bildirilen voltametrik CRP sensörleri ile karşılaştırması.

Elektrot	Metot	LoD	Linear aralık	Ref.
C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE	DPV	0.080 μM	0.24 μM ila 15.44 μM	Bu Çalışma
MIP/Agaroz-SPCE	DPV-CV	0,04 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ila 8,51 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Kumar ve Prasad, 2012
MIP/Au-Pt NMs/SPCE	CV	0.1 nM	0.1 nM ila 500 nM	Balayan vd., 2022
WS ₂ /pKIPs-coated sensors	DPV	-	2.28 $\pm$ 0.12 $\mu\text{g/mL}$	Liu vd., 2022
CMIP-PDA mikrofiber sensör	DPV	5,813 $\times 10^{-10}$ ng/mL	10 ⁻¹⁰ ng/mL ila 10 ⁻¹ ng/mL	Liu vd., 2020
C-MIP/GCE Sensör	DPV	0,41 $\times 10^{-8}$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	10 ⁻⁸ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ila 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Cui vd., 2022
pRIPs/Ti ₂ C Sensör	CV	2 $\times 10^{-13}$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	10 ⁻¹⁰ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ila 10 ⁻⁵ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Lee vd., 2022

C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon SPCE'nin analitik sonuçları, literatürde yayınlanmış benzer çalışmalarla Çizelge 2'de karşılaştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, çalışmanın LoD değeri 0,080 μM olarak hesaplanmış ve bu değer, literatürdeki diğer sonuçlardan daha iyidir. Ayrıca, gözlemlenen 0.24 μM ila 20,4 μM arasındaki doğrusal çalışma aralığı, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-modifiye SPCE'nin insan kan örneklerinde kullanım potansiyelini ortaya koymaktadır.

3.2.6 Yapay Kan örneği Analizi

Tasarlanan C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon SPCE elektrot sisteminin kan örneklerindeki performansını değerlendirmek amacıyla literatüre uygun şekilde hazırlanmış yapay kan örnekleri kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda, 0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL ve 1.0 mg/mL CRP içeren yapay kan örnekleri hazırlanmış ve optimize edilmiş C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon SPCE elektrot sistemi ile % geri kazanım (recovery) oranları incelenmiştir (Şekil 3.17). 1.0 mg/mL CRP konsantrasyonunda hazırlanan yapay kan örneği, referans olarak en yüksek konsantrasyon seviyesini temsil ederken, 0.75 mg/mL ve 0.5 mg/mL konsantrasyonlarındaki örnekler sırasıyla 1.0 mg/mL'lik referans çözeltinin 3/4'ü ve yarısı olacak şekilde seyreltilmiştir. Bu seyrelme oranları, farklı CRP konsantrasyonlarının karşılaştırmalı analizlerini yapmak amacıyla kullanılmıştır. Hazırlanan bu yapay kan örnekleri, CRP tayininde kullanılan çeşitli yöntemlerin performansını ve hassasiyetini değerlendirmek için kullanılacaktır. Böylece, tasarlanan modifiye elektrot sisteminin kan örneklerindeki performansı detaylı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3. 17 A) Yapay kan örneklerinde farklı CRP konsantrasyonlarının % geri kazanımı B) Yapay kan örneklerinde farklı CRP konsantrasyonlarının DPV'leri.

Şekil 3.17'de gösterildiği gibi, DPV ölçümlerine dayanarak, CRP tayini için modifiye edilmiş sensör sisteminin geri kazanım oranları belirlenmiştir. Yapılan analizlerde, 0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL ve 1.0 mg/mL CRP konsantrasyonları için elde edilen geri kazanım oranları sırasıyla %89,4, %83 ve %80 olarak

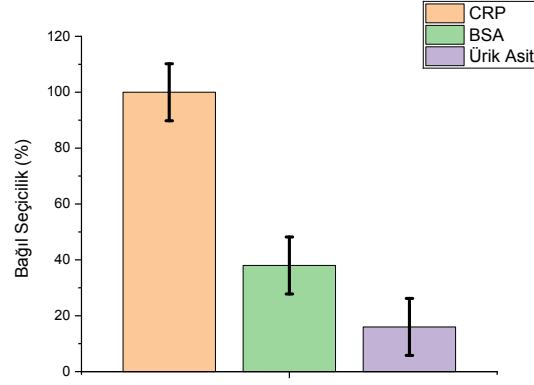
bulunmuştur. Bu bulgular, modifiye sensör sisteminin yüksek hassasiyet ve doğrulukla çalıştığını göstermektedir. Özellikle 0.5 mg/mL CRP konsantrasyonunda %89,4 gibi yüksek bir geri kazanım oranı elde edilmesi, sistemin düşük konsantrasyonlarda bile etkin bir şekilde çalışabildiğini ortaya koymaktadır.

Modifiye sensör sistemi, CRP'nin lineer çalışma aralığındaki konsantrasyonları için %80'nin üzerinde geri kazanım oranları göstermiştir. Bu yüksek geri kazanım oranları, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon SPCE (serigrafi baskılı karbon elektrot) elektrot sisteminin, gerçek kan örneklerinde de güvenilir ve doğru sonuçlar verebileceğinin güçlü bir göstergesidir. Ayrıca, bu elektrot sistemi, CRP'nin hassas ve doğru bir şekilde tayin edilmesi için tasarlanmış olup, gerçek kan örneklerinde uygulanabilirliğini doğrulayan sonuçlar elde edilmiştir.

Gerçek kan örneklerinde yapılan ölçümler, modifiye sensör sisteminin klinik uygulamalarda kullanılabilirliğini desteklemektedir. Özellikle, lineer çalışma aralığında yüksek geri kazanım oranları sunarak, sistemin çeşitli CRP konsantrasyonlarında tutarlı ve güvenilir sonuçlar verebileceğini kanıtlamıştır. Bu durum, sensör sisteminin, CRP tayininde klinik diagnostik uygulamalarda etkili bir araç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Yüksek doğruluk ve güvenilirlik, modifiye sensör sisteminin pratikte uygulanabilirliğini ve potansiyelini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon SPCE elektrot sistemi, CRP tayininde önemli bir yenilik olarak değerlendirilebilir ve gelecekteki çalışmalar için sağlam bir temel oluşturabilir.

3.2.7 Seçicilik Çalışması

C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon SPCE elektrot sisteminin seçiciliğinin belirlenmesi adına kan örneklerinde bulunan ve girişim gösterme potansiyeli olan bovin serum albümin (BSA) ve ürik asit varlığında sistemin akım değerleri araştırılmıştır. Böylece tasarlanan elektrot sisteminin kan örneklerindeki çalışma performansı daha ayrıntılı olarak ortaya konacaktır.

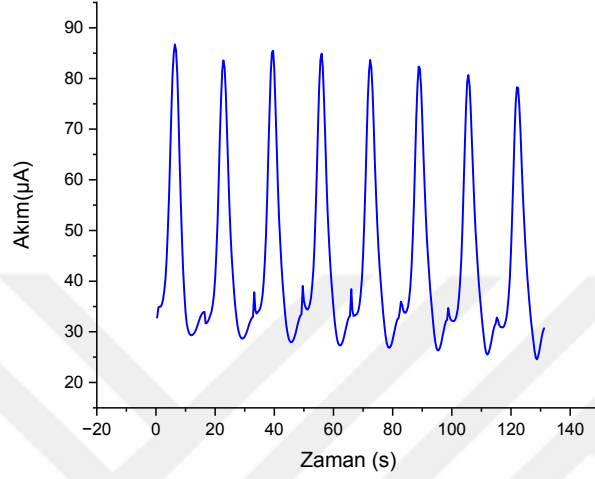


Şekil 3. 18 14.50 mM fosfat tamponu (pH: 7,0) 1 mg/mL CRP, ürik asit ve BSA'nın % göreceli yanıtı, $-0.2 \leq E \leq 0.6$ V potansiyel aralığında ve 60 mVs⁻¹ tarama hızında taranmış sonuçları.

Şekil 3.18'de belirtildiği üzere seçicilik çalışmasına baktığımızda en çok girişim yapan molekülün BSA olduğunu görülmektedir. Dolayısıyla, bu tezde kullanılan afinite ligand metilmetakrilat, albümin grubu içeren proteinler ile bağlanma gerçekleştirmesi olası bir durumdur. Benzer bir durum farklı çalışmada da gözlemlenmiştir (Kumar ve Prasad, 2012). Aynı zamanda CRP ve BSA içerisinde fonksiyonel grup olarak karboksilik asit (-COOH) bulunmaktadır. MIP çalışmasında bu gruba özel kaviteler oluştuğu için bu gruplar üzerinden bağ oluşumu olasılığı yüksektir. Buna karşılık, moleküler baskılama yönteminin etkinliği burada devreye girmekte ve CRP-baskılı polimerin en yüksek seçiciliği, CRP'ye gösterildiği bu tezde rapor edilmektedir.

3.2.8 Tekrarlanabilirlik

Tasarlanan SPCE elektrot sisteminin tekrar kullanılabilirliğinin anlaşılması adına belirlenen optimum şartlar altında sabit CRP konsantrasyonu içeren suni kan örneğinde tekrarlı DPV ölçümleri alınmıştır.



Şekil 3. 19 C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE modifiye elektrodun, 1 mg/mL CRP içeren yapay kan örneğinde (pH 7.0) tekrarlanabilirliği, 60 mVs– tarama hızında -0.2 ila 0.6 V potansiyel aralığında gerçekleştirilen DPV sonuçları.

Şekil 3.19’da görüldüğü gibi 8 tekrarlı DPV ölçümü sonunda sensör sistemi akım değerinin %80,5 sini koruduğu görülmüştür. Literatür ile kıyaslandığında tasarlanan sensör sisteminin oldukça iyi bir tekrar kullanım sayısına sahip olduğu anlaşılmaktadır.

4.DEĞERLENDİRME

Küresel CRP testi pazarı, 2021'de 2,76 milyar dolar olarak kaydedilmiş ve 2030'a kadar yıllık %2,4 büyüme oranıyla 3,42 milyar dolara ulaşması öngörülmektedir (Saxena ve Sharma, 2016). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, CRP iltihap veya enfeksiyonu erken tespit edebilen bir proteindir (Plebani, 2023). American Heart Association'ın 2022 verilerine göre, ABD'de kardiyovasküler hastalıklar yılda 874.613 ölüme sebep olmaktadır (Tsao vd., 2023). Bu bulgular, CRP testlerinin klinik uygulamalarda önemli bir yer tutmasını ve pazarın büyümesini sağlamaktadır.

Kan gibi karmaşık matrislerden CRP tayini için birçok etkili yöntem geliştirilmektedir. Analiz için klinik laboratuvarlarda türbidimetrik ve nefrometrik teknoloji (Roberts ve diğerleri, 2000, Roberts ve diğerleri, 2001) veya insan CRP ELISA kitleri kullanan çeşitli CRP testi yöntemleri mevcuttur. Ne yazık ki, mevcut ticari immünoanalizlerde emek yoğunudur, büyük numune hacimleri gerektirir ve düşük stabilite ve yüksek üretim maliyetleri gibi pratik sınırlamalara sahiptir. Bu nedenle, çalışmanın amacı doğrultusunda, geleneksel CRP tayin yöntemlerine kıyasla daha yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlayan, basit, güvenilir ve biyosensör uygulamalarına uygun C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE bir sensör sistemi geliştirilmiştir. Bu sensör sistemi, CRP'nin karmaşık matrislerden etkin bir şekilde tayin edilmesini sağlayarak, bu tez çalışması ile biyomedikal uygulamalarda önemli bir alternatif sunmaktadır.

Bu tezde ilk olarak Grafen Oksitin Sentezlenmesi (GO) ve S-GO'nun Silanizasyonu (S-GO) gibi işlemler de detaylı bir şekilde gerçekleştirildi. GO'nun indirgenmesi (S-rGO) adımıyla elde edilen materyal kullanılarak C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerleri sentezlendi. Hedef molekülün adsorpsiyon koşullarının optimizasyonu, sistem parametrelerinin (pH, sıcaklık, başlangıç CRP derişimi, zaman) değiştirilmesi ile gerçekleştirildi. Bu sentezlenen nanopolimerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri çeşitli karakterizasyon teknikleriyle incelendi, bunlar arasında FTIR, SEM, Zeta boyut analizi, ve Zeta potansiyel analizi yer aldı.

Ardından, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanoyapılarının adsorbsiyon koşullarının optimizasyonu ve CRP tayinine yönelik C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE nanobiyosensör optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu çalışmaların sonuçları, infeksiyonel hastalık biyobelirteci CRP tayini için sensör biyoaktif tabakası olarak kullanılmak üzere sentezlenen nanoboyutlu polimerik malzemenin etkinliğini ve uygunluğunu değerlendirdi. Sentezi gerçekleştirilen nano yapıli polimerin biyosensör tabanında tekrar kullanılabilirliğı hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar yapay kan örneklerinde denendi ve benzer yapıda bulunan ürik asit ve BSA molekülleriyle seçicilikleri belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimeri için CRP adsorpsiyonunun 2 saat gibi bir sürede maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaştığı ve optimum adsorpsiyon pH değerinin sodyum fosfat tamponu pH 7,0 olarak belirlendiğı gözlemlendi. Moleküler baskılanmış nanopolimerin CRP adsorpsiyonunun sıcaklıkla bağımlı olduğı görüldü ve hidrofobik etkileşimlerin sıcaklıkla artışına paralel olarak adsorpsiyon için optimum sıcaklık değerinin 37°C olduğı belirlendi. Ayrıca, 1,0 mg/mL CRP konsantrasyonunda nanopolimerin adsorpsiyon kapasitesinin nanopolimer başına 3,5 mg CRP gibi oldukça yüksek değerlere ulaştığı ve bu muazzam adsorpsiyon kapasitesinin sentezlenen CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin 319,7 nm boyutlarında küresel yapıda olması sonucu nanopolimer üzerinde CRP'ye özğı bağlanma bölgelerinin homojen dağılımına bağılı olduğı yorumlandı.

CRP baskılanmış nanopolimerin CRP'ye olan ilgisinin, yapısal olarak CRP molekülüne oldukça benzeyen ürik asit ve BSA molekülüne göre yaklaşık 2,6 kat fazla olduğı görüldü. Böylece polimer üzerinde CRP'ye spesifik oluşturulan oyukların CRP seçiciliğı gösterildi. Dolayısıyla sentezlenen moleküler baskılanmış nanopolimerik sistemle, karışık bir ortamdan CRP'nin seçici olarak uzaklaştırılabileceğı sonucuna varıldı. Buna ek olarak, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE sisteminin 8 tekrarlı DPV ölçümü sonunda sensör sistemi akım değerinin %80 sini koruduğı görülmüştür. Literatür ile kıyaslandığında tasarlanan sensör sisteminin oldukça iyi bir tekrar kullanım

sayısına sahip olduğu anlaşılmaktadır. Sensör sisteminin sahip olduğu bu rejenerasyon yeteneği, ürünün tekrar tekrar kullanılabilmesi ve ayırma işlemlerinde maliyeti düşürmesi açısından sistemin yaygın kullanımını oldukça elverişli hale getirmektedir.

FTIR spektrumunda, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] ve CRP-non-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] yapılarının yaklaşık 3440 cm^{-1} civarında karakteristik hidrojen bağlı alkol, $-\text{OH}$, gerilme vibrasyon bandına sahip olduğu tespit edildi. MMA komonomerinin polimer yapısına katılmasıyla hidrojen bağlı alkol, OH , gerilme vibrasyon bandının şiddeti NIP polimerine göre arttı. Ayrıca, bu yapıdaki $-\text{NH}$ gerilme titreşimlerinin de $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ civarında titreşim göstermesi, MMA'nın katılmasıyla ilişkilendirilmiş olabilir. FTIR spektrumlarındaki etkileşim karakteristik absorpsiyon bantlarının varlığı, poly(HEMA-MMA) nanopolimerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini doğrulamaktadır.

Taramalı elektron mikroskobu görüntülerinde, CRP baskılanmış C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerinin morfolojik yapısı incelendi. Bu görüntülerde, partiküllerin küresel yapıda olduğu ve $1,64\text{ }\mu\text{m}$ boyutunda olduğu gözlemlendi.

Nanopolimerlerin zeta boyut ölçümü sonucunda, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] için ortalama polimer boyutunun $319,7\text{ nm}$ olduğu belirlendi. Ayrıca, nanopolimerin zeta potansiyel ölçümü sonucunda C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] için $-0,213\text{ mV}$ potansiyel verdiği görülmektedir.

Elde edilen sonuçlar, adsorpsiyon kapasitesinin zamanla arttığını ve belirli bir noktada doygunluğa ulaştığını göstermektedir. Adsorpsiyon süreci, 120 dakika sonra dengelendi ve maksimum adsorpsiyon değeri elde edildi.

CRP adsorpsiyonu üzerinde pH'nin etkisini değerlendirmek için farklı pH seviyelerinde tamponlar kullanıldı. pH seviyelerinin değişimi, moleküler baskılanmış nanopolimerin CRP adsorpsiyon kapasitesinde belirgin bir etkiye neden oldu. Asidik koşullardan nötral koşullara geçişte adsorpsiyon kapasitesinde

artış gözlemlendi, ancak nötral bölgeden bazik bölgeye geçildiğinde adsorpsiyon kapasitesinde azalma yaşandı. Bu durum, MMA'nın $-NH_2$ grubu ile CRP'nin H-H grubu arasında hidrojen bağı oluşumunu açıklar. pH'nin artmasıyla birlikte deprotonasyon meydana geldi ve bu da hidrojen bağlarının zayıflamasına ve adsorpsiyon kapasitesinin azalmasına neden oldu.

Sıcaklık artışının, MIP nanopolimerinin CRP adsorpsiyon kapasitesini artırdığı ve bağlanma kapasitesinin $37^\circ C$ 'de zirveye ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu durum, sıcaklığın adsorpsiyon etkinliğini artırdığını vurgularken, adsorpsiyondaki zayıf ikincil etkileşimlerin, hidrofilik doğaya sahip olan MIP yüzeyindeki boşluklardaki MMA monomerine ve CRP'nin hidrofilik doğasına bağlanmasından kaynaklandığını açıklar.

Başlangıç CRP konsantrasyonunun CRP adsorpsiyonu üzerindeki etkisi incelendiğinde, MIP II'nin diğer MIP'lere göre daha yüksek CRP bağlanma kapasitesine sahip olduğu gözlemlendi. Bu durum, daha fazla fonksiyonel monomerin kullanılmasına ve dolayısıyla daha fazla bağlanma noktası oluşturulmasına bağlanmaktadır. Ayrıca, çözeltideki CRP konsantrasyonunun artmasıyla birlikte, nanopolimerin birim kütle başına adsorbe ettiği CRP miktarının da arttığı ve sonuç olarak polimer miktarının yaklaşık dört katına ulaştığı gözlemlenmiştir.

C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimerine CRP adsorpsiyonu üzerine tuz derişiminin etkisi incelendiğinde, yüksek tuz seviyelerinin, iyonik gücün artmasıyla birlikte, protein adsorpsiyonunu artırdığı gözlemlenmiştir. Bu durum, elektrostatik itmenin azalmasıyla birlikte yüzeyde daha fazla protein birikimine yol açar. Özellikle, çözeltideki çok değerlikli iyonlar proteinin yük yoğunluğunu nötralize ederek ve hidrofobik etkileşimleri artırarak yüzeye adsorpsiyonu teşvik eder.

Literatürdeki verilerle kıyaslama yapıldığında, Balayan ve arkadaşlarının 2022'de yaptığı çalışmada Neonatal Sepsisin tespitinde kullanılan biyobelirteç olarak kullanılan CRP'yi tespit etmek amacıyla elektrot yüzeyine moleküler baskılanmış polimerin uygulanmasını tanımlar. Bunu bimetalik nanokompozit kullanarak sentezledikleri CRP baskılanmış polimerleri SPCE sensör yüzeyine

immobilize ederek gerçekleştirdiler. Yapay kan örneklerinden yaptıkları çalışmadaki LoD değerleri 0,1 nm değerindedir. Bu tezde C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE sensör sisteminde yapay kan örneklerindeki gerçekleştirilen çalışmadaki LoD değeri 0.080 μM 'dir.

Kumar ve arkadaşlarının 2012'de yaptığı çalışmada CRP'yi tayin etmek için moleküler baskılama teknolojisini kullandılar. MWCNT kullanarak sentezledikleri nanopolimeri SPCE elektrot yüzeyine uyguladılar. Ticari kan serumunda uyguladıkları örneklerden çıkan sonuca göre LoD değeri 0,04 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 'dir. C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE sensör sisteminde çalışmalarda modifiye edilmiş sensör sistemi, CRP konsantrasyonları için lineer çalışma aralığında % 80'in üzerinde geri kazanım oranları göstererek C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon SPCE elektrot sisteminin gerçek kan örneklerinde de yüksek doğrulukla sonuçlar verebileceğini göstermektedir.

LoQ değeri 0.243 μM olarak belirlenmiştir ve lineer çalışma aralığı 0.24 ila 15.44 μM arasında (R^2 : 0,9836) gözlemlenmiştir. En iyi akım değeri 15 μL solüsyon uygulanmasında elde edilirken, 20 μL değerinde akım değerlerinde bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu düşüş, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3- / 4-}$ iyonlarının difüzyon problemi yaşadığını ve reaksiyonun yavaşladığını göstermektedir. Bu nedenle, C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)]/Nafyon-SPCE için optimal film kalınlığının 15 μL olarak seçildiği belirlenmiştir.

1.5 mg/mL C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] polimer konsantrasyonu, hem kan seviyelerindeki CRP miktarının tespiti için yeterli aktif alan sağlamak hem de en iyi elektrokimyasal sinyalin (akım değeri) gözlemlenebildiği optimal değer olarak belirlenmiştir. 60 mV/s tarama hızında -0.20 ila +0.60 V potansiyel aralığında yapılan DPV ölçümlerinde, en yüksek sinyalin %0.5 Nafyon konsantrasyonunda elde edildiği görülmüştür. %0.5 Nafyon konsantrasyonundan sonra, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3- / 4-}$ iyonlarının difüzyon problemi yaşamasından dolayı akım sinyallerinde bir azalma olduğu düşünülmektedir. Bu gözlemlenen sonuçlar, literatürdeki verilerle uyumlu olup (Yang vd., 2017), boş

SPCE elektrodun akım değerinin %0.5 nasyon ilavesi ile arttığını göstermektedir. Nasyon polimerinin iletken yapısından kaynaklanan bu artış beklenen bir sonuçtur (Mauritz ve Moore, 2004). Elektrot yüzeyine 1.0 mg/mL C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] polimeri eklendiğinde ise akım değerlerinde bir artış gözlenmiştir ve bu artış, polimerin iletken doğası gereği beklenen bir sonuçtur (Manna ve Raj, 2017).

Bu tez kapsamında iltihap belirteci olan CRP'nin tayinine yönelik moleküler baskılanmış polimerler sentezlenerek biyoaktif yüzey tabaka haline getirilerek SPCE yüzeyine immobilize edilmiştir. Yapay kan örneklerinde analizler yapılarak yüksek seçicilikte moleküler baskılanmış, nano-boyutta, seçici ve göreceli olarak düşük maliyetli polimerik bir sistem geliştirildi.

Sentezlenen C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimeri, hazırlanması kolay, kararlı ve ucuz bir üründür. Baskılama işleminin sonucu olarak moleküler bir hafızaya sahip olan C-imp-poli[HEMA-ko-MMA-ko-(S-rGO)] nanopolimeri, hedef molekül CRP için tayin amacı ile biyosensörlerle kullanılabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmad, A., Imran, M., & Ahsan, H. (2023).** Biomarkers as biomedical bioindicators: approaches and techniques for the detection, analysis, and validation of novel Biomarkers of diseases. *Pharmaceutics*, 15(6), 1630.
- Akgönüllü, S., Kılıç, S., Esen, C., & Denizli, A. (2023).** Molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection. *Polymers*, 15(3), 629.
- Albrecht, C., Kaeppel, N., & Gauglitz, G. (2008).** Two immunoassay formats for fully automated CRP detection in human serum. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391, 1845-1852.
- Anirudhan, T. S., Deepa, J. R., Stanly, N. 2019.** “Fabrication of a molecularly imprinted silylated graphene oxide polymer for sensing and quantification of creatinine in blood and urine samples”, *Applied Surface Science*,
- Antonio, M., Ferreira, R., Vitorino, R., & Daniel-da-Silva, A. L. (2020).** A simple aptamer-based colorimetric assay for rapid detection of C-reactive protein using gold nanoparticles. *Talanta*, 214, 120868.
- Arroyo-Espliguero, R., Viana-Llamas, M. C., Silva-Obregón, A., & Avanzas, P. (2021).** The role of C-reactive protein in patient risk stratification and treatment. *European Cardiology Review*, 16.
- Arshady, R., & Mosbach, K. (1981).** Synthesis of substrate□selective polymers by host□guest polymerization. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 182(2), 687-692.
- Asuncion Alonso-Lomillo, M., Dominguez-Renedo, O., & Julia Arcos-Martinez, M. 2010.** “Electrochemical sensors in the development of selective methods for antiepileptic drugs determination”, *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 13(7), 650-657.
- Avery, C., Patterson, J., Grear, T., Frater, T., & Jacobs, D. J. (2022).** Protein function analysis through machine learning. *Biomolecules*, 12(9), 1246.
- Balayan, S., Chauhan, N., Chandra, R., & Jain, U. (2022).** Electrochemical based C-reactive protein (CRP) sensing through molecularly imprinted polymer (MIP) pore structure coupled with bi-metallic tuned screen-printed electrode. *Biointerface Res. Appl. Chem*, 6, 38.
- BelBruno, J. J. (2018).** Molecularly imprinted polymers. *Chemical reviews*, 119(1), 94-119.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bitas, D., & Samanidou, V. (2018).** Molecularly imprinted polymers as extracting media for the chromatographic determination of antibiotics in milk. *Molecules*, 23(2), 316.
- Brüggemann, O., Haupt, K., Ye, L., Yilmaz, E., & Mosbach, K. (2000).** New configurations and applications of molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 889(1-2), 15-24.
- Bryan, T., Luo, X., Bueno, P. R., & Davis, J. J. (2013).** An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood. *Biosensors and Bioelectronics*, 39(1), 94-98.
- Cai D, Song M. 2010.** “Recent advance in functionalized graphene/polymer nanocomposites”, *J Mater Chem* 2010;20:7906.
- Caro, E., Masqué, N., Marcé, R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G. and Sherrington, D.C., 2002,** Non-covalent and Semi-covalent Molecularly Imprinted Polymers For Selective On- Line Solid-Phase Extraction Of 4-Nitrophenol From Water Samples, *Journal of Chromatography A.*, 963(1-2): 169-178pp.
- Chapuis, F., Pichon, V., Hennion, M.C. 2004.** Molecularly Imprinted polymers: Developments and applications of New selective Solid-Phase Extraction Materials. *LC-GC Europe*, 17 (7), 408-417
- Chen, A., Chatterjee, S. 2013.** “Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications”, *Chemical Society Reviews*, 42(12), 5425-5438.
- Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., & Li, J. (2016).** Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chemical society reviews*, 45(8), 2137-2211.
- Chen, M. Q. (2022).** Recent advances and perspective of nanotechnology-based implants for orthopedic applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 878257.
- Chen, X., Zhang, Z., Yang, X., Li, J., Liu, Y., Chen, H., Yao, S. 2012.** “Molecularly imprinted polymers based on multi-walled carbon nanotubes for selective solid-phase extraction of oleanolic acid from the roots of kiwi fruit samples”, *Talanta*, 99, 959-965.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chou, P. C., Rick, J., & Chou, T. C. (2005).** C-reactive protein thin-film molecularly imprinted polymers formed using a micro-contact approach. *Analytica chimica acta*, 542(1), 20-25.
- Couto, R. A. S., Lima, J. L. F. C., Quinaz, M. B. 2016.** “Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis”, *Talanta*, 146, 801-814.
- Cui, M., Che, Z., Gong, Y., Li, T., Hu, W., & Wang, S. (2022).** A graphdiyne-based protein molecularly imprinted biosensor for highly sensitive human C-reactive protein detection in human serum. *Chemical Engineering Journal*, 431, 133455.
- Dar, K. K., Shao, S., Tan, T., & Lv, Y. (2020).** Molecularly imprinted polymers for the selective recognition of microorganisms. *Biotechnology Advances*, 45, 107640.
- De Servi, S., Mariani, M., Mariani, G., & Mazzone, A. (2005).** C-reactive protein increase in unstable coronary disease: cause or effect?. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(8), 1496-1502.
- Denegri, A., & Boriani, G. (2021).** High sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and its implications in cardiovascular outcomes. *Current Pharmaceutical Design*, 27(2), 263-275.
- Dong, Q., Yang, M., Wang, Y., Guan, Y., Zhang, W., & Zhang, Y. (2023).** Peptide-crosslinked molecularly imprinted polymers for efficient separation of immunoglobulin G from human serum. *Biomaterials Science*, 11(4), 1398-1407.
- Elugoke, S. E., Adekunle, A. S., Fayemi, O. E., Akpan, E. D., Mamba, B. B., Sherif, E. S. M., & Ebenso, E. E. (2021).** Molecularly imprinted polymers (MIPs) based electrochemical sensors for the determination of catecholamine neurotransmitters–Review. *Electrochemical Science Advances*, 1(2), e2000026.
- Emiru, T. F., Ayele, D. W. 2017.** “Controlled synthesis, characterization and reduction of graphene oxide: a convenient method for large scale production”, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(1), 74-79.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fu, X., Yang, Q., Zhou, Q., Lin, Q., & Wang, C. (2015).** Template-monomer interaction in molecular imprinting: is the strongest the best?. *Open Journal of Organic Polymer Materials*, 5(02), 58.
- Gao, D., Zhang, Z., Wu, M., Xie, C., Guan, G., Wang, D. 2007.** “A surface functional monomer-directing strategy for highly dense imprinting of TNT at surface of silica nanoparticles”, *Journal of the American Chemical Society*, 129(25), 7859-7866.
- Ge, Y; Turner, EPF (2009).** Molecularly imprinted sorbent assays: Recent developments and applications. *Chem Eur J*, 15, 8100–8107.
- Gu, L., Jiang, X., Liang, Y., Zhou, T., Shi, G. 2013.** “Double recognition of dopamine based on a boronic acid functionalized poly (aniline-co-anthranilic acid)–molecularly imprinted polymer composite”, *Analyst*, 138(18), 5461-5469.
- Hasanah, A. N., Safitri, N., Zulfa, A., Neli, N., & Rahayu, D. (2021).** Factors affecting preparation of molecularly imprinted polymer and methods on finding template-monomer interaction as the key of selective properties of the materials. *Molecules*, 26(18), 5612.
- Hashim, S. N., Boysen, R. I., Schwarz, L. J., Danylec, B., & Hearn, M. T. (2014).** A comparison of covalent and non-covalent imprinting strategies for the synthesis of stigmasterol imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1359, 35-43.
- Haupt, K., Mosbach, K., 2000.** Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors. *Chemical Reviews*, 100,2495-2504.
- Hou, S., Su, S., Kasner, M. L., Shah, P., Patel, K., Madarang, C. J. 2010.** “Formation of highly stable dispersions of silane-functionalized reduced graphene oxide”, *Chemical Physics Letters*, 501(1-3), 68-74.
- Huang, X., Zhu, Y., & Kianfar, E. (2021).** Nano biosensors: properties, applications and electrochemical techniques. *Journal of Materials Research and Technology*, 12, 1649-1672.
- IUPAC. (2008).** *Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature: IUPAC Recommendations, 2008*. Cambridge: RSC Publishing.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jia, X., Xu, M., Wang, Y., Ran, D., Yang, S., Zhang, M. 2013.** “Polydopamine-based molecular imprinting on silica-modified magnetic nanoparticles for recognition and separation of bovine hemoglobin”, *Analyst*, 138(2), 651-658.
- Joseph, T. M., Kar Mahapatra, D., Esmaeili, A., Piszczyk, Ł., Hasanin, M. S., Kattali, M., ... & Thomas, S. (2023).** Nanoparticles: Taking a unique position in medicine. *Nanomaterials*, 13(3), 574.
- Kang, M. S., Cho, E., Choi, H. E., Amri, C., Lee, J. H., & Kim, K. S. (2023).** Molecularly imprinted polymers (MIPs): emerging biomaterials for cancer theragnostic applications. *Biomaterials Research*, 27(1), 45.
- Kang, R., & Tang, D. (2017).** Nuclear DAMPs in Hepatic Injury and Inflammation. *Molecules, Systems and Signaling in Liver Injury*, 133-158.
- Karim, K., Breton, O.F., Rouillon, R., Piletska, E.V., Guerreiro, A., Chianella, I. and Piletsky, S.A., 2005,** How to Find Effective Functional Monomers For Effective Molecularly Gmprinted Polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 1795-1808.
- Keçili, R. (2022).** Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Yeşil Yönleri ve Çevresel Uygulamaları. *Artıbilim: Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 5(1), 60-73.
- Kiefer, C. R., Stock, R. E., Flanagan, S. S., Darling, C. E., Smith, C. S., & Snyder, L. M. (2012).** Early verification of myocardial ischemia with a novel biomarker of acute tissue damage: C-reactive protein fractional forms. *Clinica chimica acta*, 413(19-20), 1536-1541.
- Kim, H., & Spivak, D. A. (2003).** New insight into modeling non-covalently imprinted polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 125(37), 11269-11275.
- Klejn, D., Luliński, P., & Maciejewska, D. (2015).** Desorption of 3, 3'-diindolylmethane from imprinted particles: An impact of cross-linker structure on binding capacity and selectivity. *Materials Science and Engineering: C*, 56, 233-240.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma H. 2003.** Molecular Imprinting, from Fundamentals to Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBN: 3-527-30569-6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- KÖSE, S. İ., & MADEN, M. (2013).** Biyomarkerlar ve Klinik Kullanımları. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2), 30-37.
- Kriz, D., Ramstrom, O. and Mosbach, K., 1997,** Molecular Imprinting: New Possibilities For Sensor Technology, *Analytical Chemistry*, 69:345–349.
- Kubo, T., Arimura, S., Tominaga, Y., Naito, T., Hosoya, K., & Otsuka, K. (2015).** Molecularly imprinted polymers for selective adsorption of lysozyme and cytochrome c using a PEG-based hydrogel: selective recognition for different conformations due to pH conditions. *Macromolecules*, 48(12), 4081-4087.
- Kuhn, E., Wu, J., Karl, J., Liao, H., Zolg, W., & Guild, B. (2004).** Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ¹³C-labeled peptide standards. *Proteomics*, 4(4), 1175-1186.
- Kulkarni, M. B., Ayachit, N. H., & Aminabhavi, T. M. (2022).** Recent advancements in nanobiosensors: current trends, challenges, applications, and future scope. *Biosensors*, 12(10), 892.
- Kumar, D., & Prasad, B. B. (2012).** Multiwalled carbon nanotubes embedded molecularly imprinted polymer-modified screen printed carbon electrode for the quantitative analysis of C-reactive protein. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171, 1141-1150.
- Lee C, Wei X, Kysar JW, Hone J. 2008.** “Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene”, *Science*, 321(5887):385–8.
- Lee, H. Y., Kim, B. S. 2009.** “Grafting of molecularly imprinted polymers on iniferter-modified carbon nanotube”, *Biosensors and Bioelectronics*, 25(3), 587-591.
- Lee, M. H., Liu, K. H., Thomas, J. L., Chen, C. Y., Chen, C. Y., Yang, C. H., & Lin, H. Y. (2022).** Doping of MXenes enhances the electrochemical response of peptide-imprinted conductive polymers for the recognition of C-Reactive protein. *Biosensors and Bioelectronics*, 200, 113930.
- Liang, Y., Gu, L., Liu, X., Yang, Q., Kajiura, H., Li, Y., Shi, G. 2011.** “Composites of polyaniline nanofibers and molecularly imprinted polymers for recognition of nitroaromatic compounds”, *Chemistry–A European Journal*, 17(21), 5989-5997.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu Q, Shi J, Jiang G. 2012.** “Application of graphene in analytical sample preparation”, *Trac-Trend Anal Chem*, 37: 1-11.
- Liu, G., Lin, Y. 2007.** “Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays”, *Talanta*, 74(3), 308-317.
- Liu, K. H., Lin, H. Y., Thomas, J. L., Chen, C. Y., Chen, Y. T., Chen, C. Y., ... & Lee, M. H. (2022).** Sensing of C-reactive protein using an extended-gate field-effect transistor with a tungsten disulfide-doped peptide-imprinted conductive polymer coating. *Biosensors*, 12(1), 31.
- Liu, X., Lin, W., Xiao, P., Yang, M., Sun, L. P., Zhang, Y., ... & Guan, B. O. (2020).** Polydopamine-based molecular imprinted optic microfiber sensor enhanced by template-mediated molecular rearrangement for ultra-sensitive C-reactive protein detection. *Chemical Engineering Journal*, 387, 124074.
- Luo, J., Cong, J., Fang, R., Fei, X., Liu, X. 2014.** “One-pot synthesis of a graphene oxide coated with an imprinted sol–gel for use in electrochemical sensing of paracetamol”, *Microchimica Acta*, 181(11-12), 1257-1266.
- Luo, J., Cong, J., Liu, J., Gao, Y., Liu, X. 2015.** “A facile approach for synthesizing molecularly imprinted graphene for ultrasensitive and selective electrochemical detecting 4-nitrophenol”, *Analytica chimica acta*, 864, 74-84.
- Lusina, A., & Ceglowski, M. (2022).** Molecularly imprinted polymers as state-of-the-art drug carriers in hydrogel transdermal drug delivery applications. *Polymers*, 14(3), 640.
- Malik, S., Muhammad, K., & Waheed, Y. (2023).** Nanotechnology: A revolution in modern industry. *Molecules*, 28(2), 661.
- Manna, B., & Raj, C. R. (2017).** Inorganic–Organic Hybrid 3D Redox Nanoarchitecture for the Electrocatalytic Sensing of Thiols. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(10), 9412-9422.
- Maranata, G. J., Surya, N. O., & Hasanah, A. N. (2021).** Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique. *Heliyon*, 7(1).
- MARANGOZ, Ö., & YAVUZ, O. (2020).** Nano-ilaç taşıma sistemleri ve toksikolojik değerlendirmeleri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 77(4), 509-526.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Marcano, D. C., Kosynkin, D. V., Berlin, J. M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., Tour, J. M. 2010.** “Improved synthesis of graphene oxide”, *ACS nano*, 4(8), 4806-4814.
- Martin-Esteban, A. (2004).** Molecular imprinting technology: a simple way of synthesizing biomimetic polymeric receptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1875-1875.
- Matsumoto, H., Sunayama, H., Kitayama, Y., Takano, E., & Takeuchi, T. (2019).** Site-specific post-imprinting modification of molecularly imprinted polymer nanocavities with a modifiable functional monomer for prostate cancer biomarker recognition. *Science and Technology of Advanced Materials*, 20(1), 305-312.
- Mauritz, K. A., & Moore, R. B. (2004).** State of understanding of Nafion. *Chemical reviews*, 104(10), 4535-4586.
- Mayers, A. G. and Whitcombe, M. J., 2005,** Synthetic Strategies for The Generation of Molecular Imprinted Organic Polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:1742-1778.
- Mijangos, I., Navarro-Villoslada, F., Guerreiro, A., Piletska, E., Chianella, I., Karim, K., ... & Piletsky, S. (2006).** Influence of initiator and different polymerisation conditions on performance of molecularly imprinted polymers. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(3), 381-387.
- Molins, B., Pena, E., Vilahur, G., Mendieta, C., Slevin, M., & Badimon, L. (2008).** C-reactive protein isoforms differ in their effects on thrombus growth. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(12), 2239-2246.
- Mosbach, K. and Ramström, O., 1996,** The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology, *Nature Biotechnology*, 14:163-170pp.
- Murdaya, N., Triadenda, A. L., Rahayu, D., & Hasanah, A. N. (2022).** A review: using multiple templates for molecular imprinted polymer: is it good?. *Polymers*, 14(20), 4441.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nasraoui, C., Jaoued-Grayaa, N., Vanoye, L., Chevalier, Y., & Hbaieb, S. (2022).** Development of molecularly imprinted polymer for the selective recognition of the weakly interacting fenamiphos molecule. *European Polymer Journal*, 177, 111441.
- Ouyang, R., Lei, J., Ju, H. 2010.** “Artificial receptor-functionalized nanoshell: facile preparation, fast separation and specific protein recognition”, *Nanotechnology*, 21(18), 185502.
- Oyar, P. (2014).** DİŞ HEKİMLİĞİNDE KULLANILAN NANOPARTİKÜLLER, KULLANIM ALANLARI VE BİYOUYUMLULUK. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 24(1), 125-133.
- Panagiotopoulou, M., Beyazit, S., Nestora, S., Haupt, K., & Bui, B. T. S. (2015).** Initiator-free synthesis of molecularly imprinted polymers by polymerization of self-initiated monomers. *Polymer*, 66, 43-51.
- Pandya, D. B., Bhetariya, B., & Koitiya, N. (2024).** High-sensitivity C-reactive protein as a biomarker of cardiovascular events. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 14(2), 210-210.
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., ... & Shin, H. S. (2018).** Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1), 1-33.
- Pearson, T. A., Mensah, G. A., Hong, Y., & Smith Jr, S. C. (2004).** CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: overview. *Circulation*, 110(25), e543-e544.
- Pfützner, A., & Forst, T. (2006).** High-sensitivity C-reactive protein as cardiovascular risk marker in patients with diabetes mellitus. *Diabetes technology & therapeutics*, 8(1), 28-36.
- Pirzada, M., & Altintas, Z. (2021).** Template Removal in Molecular Imprinting: Principles, Strategies, and Challenges. In *Molecular Imprinting for Nanosensors and Other Sensing Applications* (pp. 367-406). Elsevier.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Plebani, M. (2023).** Why C-reactive protein is one of the most requested tests in clinical laboratories?. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine CCLM*, 61(9), 1540-1545.
- Poste, G. (2011).** Bring on the biomarkers. *Nature*, 469(7329), 156-157.
- Rahit, K. T. H., & Tarailo-Graovac, M. (2020).** Genetic modifiers and rare mendelian disease. *Genes*, 11(3), 239.
- Ridker, P. M. (2003).** High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular risk: rationale for screening and primary prevention. *The American journal of cardiology*, 92(4), 17-22.
- Ridker, P. M. (2004).** High-sensitivity C-reactive protein, inflammation, and cardiovascular risk: from concept to clinical practice to clinical benefit. *American heart journal*, 148(1), S19-S26.
- Ridker, P. M., Cushman, M., Stampfer, M. J., Tracy, R. P., & Hennekens, C. H. (1997).** Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *New England journal of medicine*, 336(14), 973-979.
- Roberts, W. L., Moulton, L., Law, T. C., Farrow, G., Cooper-Anderson, M., Savory, J., & Rifai, N. (2001).** Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Part 2. *Clinical chemistry*, 47(3), 418-425.
- Roberts, W. L., Sedrick, R., Moulton, L., Spencer, A., & Rifai, N. (2000).** Evaluation of four automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. *Clinical Chemistry*, 46(4), 461-468.
- Ross, Y., & Ballou, S. (2023).** Reliability of C-reactive protein as an inflammatory marker in patients with immune-mediated inflammatory diseases and liver dysfunction. *Rheumatology Advances in Practice*, 7(2), rkad045.
- Ruiz-Fernández, C., Eldjoudi, D. A., González-Rodríguez, M., Barreal, A. C., Farrag, Y., García-Caballero, L., ... & Gualillo, O. (2023).** Monomeric CRP regulates inflammatory responses in human intervertebral disc cells. *Bone & Joint Research*, 12(3), 189-198.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ruzza, P., Honisch, C., Hussain, R., & Siligardi, G. (2021).** Free radicals and ros induce protein denaturation by uv photostability assay. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6512.
- Sahu, M. K., Yadav, R., & Tiwari, S. P. (2023).** Recent advances in nanotechnology. *International Journal of Nanomaterials, Nanotechnology and Nanomedicine*, 9(1), 015-023.
- Sajini, T., & Mathew, B. (2021).** A brief overview of molecularly imprinted polymers: Highlighting computational design, nano and photo-responsive imprinting. *Talanta Open*, 4, 100072.
- Sanghavi, B. J., Varhue, W., Rohani, A., Liao, K. T., Bazydlo, L. A., Chou, C. F., & Swami, N. S. (2015).** Ultrafast immunoassays by coupling dielectrophoretic biomarker enrichment in nanoslit channel with electrochemical detection on graphene. *Lab on a Chip*, 15(24), 4563-4570.
- Saxena, K., & Sharma, R. (2016).** Efficient heart disease prediction system. *Procedia Computer Science*, 85, 962-969.
- Saylan, Y., Akgönüllü, S., Yavuz, H., Ünal, S., & Denizli, A. (2019).** Molecularly imprinted polymer based sensors for medical applications. *Sensors*, 19(6), 1279.
- Schmidt, R. H., Belmont, A. S., & Haupt, K. (2005).** Porogen formulations for obtaining molecularly imprinted polymers with optimized binding properties. *Analytica chimica acta*, 542(1), 118-124.
- Sellergren, B., Lepistö, M. and Mosbach, K., 1988,** Highly Enantioselective And Substrate-Selective Polymers Obtained By Molecular Imprinting Utilizing Noncovalent Interactions - NMR And Chromatographic Studies On The Nature Of Recognition, *Journal of The American Chemical Society*, 110:5853–5860.
- Shah, N., Ul-Islam, M., Haneef, M., & Park, J. K. (2012).** A brief overview of molecularly imprinted polymers: From basics to applications. *J. Pharm. Res*, 5(3309), e3317.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shahnazi, A., Nabid, M. R., & Sedghi, R. (2020).** Synthesis of surface molecularly imprinted poly-o-phenylenediamine/TiO₂/carbon nanodots with a highly enhanced selective photocatalytic degradation of pendimethalin herbicide under visible light. *Reactive and Functional Polymers*, 151, 104580.
- Shen, F., & Ren, X. (2014).** Covalent molecular imprinting made easy: a case study of mannose imprinted polymer. *RSC Advances*, 4(25), 13123-13125.
- Song M, Zeng L, Yuan S, Yin J, Wang H, Jiang G. 2013.** “Study of cytotoxic effects of single-walled carbon nanotubes functionalized with different chemical groups on human MCF7 cells”, *Chemosphere*, 92(5):576-82.
- Sproston, N. R., & Ashworth, J. J. (2018).** Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Frontiers in immunology*, 9, 342848.
- Stankovich, S., Dikin, D. A., Dommett, G. H., Kohlhaas, K. M., Zimney, E. J., Stach, E. A., Ruoff, R. S. 2006.** “Graphene-based composite materials”, *Nature*, 442(7100), 282-6.
- Steinke, J., Sherrington, D. and Dunkin, I., 1995,** Imprinting of Synthetic Polymers Using Molecular Templates, *Advanced Polymer Science*, 123:81-125pp.
- Su, W. Y., Cheng, S. H. 2010.** “Electrochemical Oxidation and Sensitive Determination of Acetaminophen in Pharmaceuticals at Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)-Modified Screen-Printed Electrodes”, *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 22(6), 707-714.
- Sun, Y., Luo, Y., Sun, L., Wang, X. R., Chen, L. W., Zhang, N., ... & Wang, X. H. (2023).** Improving performance of cell imprinted PDMS by integrating boronate affinity and local post-imprinting modification for selective capture of circulating tumor cells from cancer patients. *Biosensors and Bioelectronics*, 223, 115023.
- Sung, J. W., Lee, S. H., Byrne, C. D., Chung, P. W., Won, Y. S., & Sung, K. C. (2014).** High-sensitivity C-reactive protein is associated with the presence of coronary artery calcium in subjects with normal blood pressure but not in subjects with hypertension. *Archives of Medical Research*, 45(2), 170-176.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Takeuchi, T., & Haginaka, J. (1999).** Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 728(1), 1-20.
- Tanaka, A., Shimada, K., Sano, T., Namba, M., Sakamoto, T., Nishida, Y., ... & Yoshikawa, J. (2005).** Multiple plaque rupture and C-reactive protein in acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 45(10), 1594-1599.
- Thiele, J. R., Zeller, J., Bannasch, H., Stark, G. B., Peter, K., & Eisenhardt, S. U. (2015).** Targeting C-reactive protein in inflammatory disease by preventing conformational changes. *Mediators of inflammation*, 2015.
- Tillett, W. S., & Francis, T. (1930)** J. Exp. Med. 52, 561. Vetter, M. L., Gewurz, H., Hansen, B., James, K., & Baum, L. L. (1983) J. Immunol. 130, 2121.
- Tripathi, A., & Bankaitis, V. A. (2017).** Molecular docking: from lock and key to combination lock. *Journal of molecular medicine and clinical applications*, 2(1).
- Tsao, C. W., Aday, A. W., Almarzooq, Z. I., Anderson, C. A., Arora, P., Avery, C. L., ... & American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. (2023).** Heart disease and stroke statistics—2023 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 147(8), e93-e621.
- TÜRKOĞLU, İ., & ALAKUŞ, T. B. (2022).** İnsana ait protein fonksiyonlarının protein haritalama teknikleri ve derin öğrenme modeli ile tahmin edilmesi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 28(2), 255-265
- Uzun, L., Turner, A. P. 2016.** “Molecularly-imprinted polymer sensors: Realising their potential”, Biosensors and Bioelectronics, 76, 131-144.
- Valavanidis, A., & Vlachogianni, T. (2016).** Engineered nanomaterials for pharmaceutical and biomedical products new trends, benefits and opportunities. *Pharm Bioprocess*, 4(1), 13-24.
- Vasapollo, G., Sole, R. D., Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., & Mele, G. (2011).** Molecularly imprinted polymers: present and future prospective. *International journal of molecular sciences*, 12(9), 5908–5945.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vashist, S. K., Venkatesh, A. G., Schneider, E. M., Beaudoin, C., Lupp, P. B., & Luong, J. H. (2016).** Bioanalytical advances in assays for C-reactive protein. *Biotechnology advances*, 34(3), 272-290.
- Verheyen, E., Schillemans, J. P., Van Wijk, M., Demeniex, M. A., Hennink, W. E., & Van Nostrum, C. F. (2011).** Challenges for the effective molecular imprinting of proteins. *Biomaterials*, 32(11), 3008-3020.
- Vlakh, E. G., Korzhikov, V. A., Hubina, A. V., & Tennikova, T. Y. B. (2015).** Molecular imprinting: A tool of modern chemistry for the preparation of highly selective monolithic sorbents. *Russian Chemical Reviews*, 84(9), 952.
- Vlatakis, G., Andersson, L.I., Müller, R. and Mosbach, K., 1993,** Drug Assay Using Antibody Mimics Made By Molecular Imprinting, *Nature*, 361:645-647.
- Wang, A., Yu, W., Huang, Z., Zhou, F., Song, J., Song, Y., Shao, J. 2016.** “Covalent functionalization of reduced graphene oxide with porphyrin by means of diazonium chemistry for nonlinear optical performance”, *Scientific reports*, 6, 23325.
- Wang, J., Yang, S., Guo, D., Yu, P., Li, D., Ye, J., & Mao, L. (2009).** Comparative studies on electrochemical activity of graphene nanosheets and carbon nanotubes. *Electrochemistry Communications*, 11(10), 1892-1895.
- Wang, P., Liu, J., Ma, Y., Tian, X., Li, Y., Niu, X., ... & Pan, J. (2022).** Sequential assembly enabled surface precise imprinting on Janus nanosheets for highly specific separation of adenosine 5'-monophosphate. *Chemical Engineering Journal*, 432, 134349.
- Wulff, G. (1995).** Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates—a way towards artificial antibodies. *Angewandte chemie international edition in English*, 34(17), 1812-1832.
- Wulff, G., Best, W., & Akelah, A. (1984).** Enzyme-analogue built polymers, 17 Investigations on the racemic resolution of amino acids. *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents*, 2(3), 167-174.
- Wulff, G., Poll, H.G., 1987.** Enzyme-analog built polymers .23. Influence of the structure of the binding-sites on the selectivity for racemic-resolution. *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry And Physics*, 188 (4): 741-748.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wulff, G., Vesper, W., Grobe-Einsler, R., & Sarhan, A. (1977).** Enzyme-analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 178(10), 2799-2816.
- Xu, L., Huang, Y. A., Zhu, Q. J., & Ye, C. (2015).** Chitosan in molecularly-imprinted polymers: Current and future prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18328-18347.
- Xu, L., Pan, J., Dai, J., Cao, Z., Hang, H., Li, X., Yan, Y. 2012.** “Magnetic ZnO surface-imprinted polymers prepared by ARGET ATRP and the application for antibiotics selective recognition”, *RSC Advances*, 2(13), 5571-5579.
- Yang, H., Li, X., Batchelor-McAuley, C., Sokolov, S. V., Kätelhön, E., & Compton, R. G. (2017).** Immobilised Electrocatalysts: Nafion Particles Doped with Ruthenium (II) Tris (2, 2'-bipyridyl). *Chemistry—A European Journal*, 23(69), 17605-17611. <https://doi.org/10.1002/chem.201704418>
- Yang, Y., He, X., Xu, S., Wang, D., Liu, Z., & Xu, Z. (2023).** Post-imprinting modification of molecularly imprinted polymer for proteins detection: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127104.
- Yilmaz, E., Haupt, K., & Mosbach, K. (2000).** The use of immobilized templates—A new approach in molecular imprinting. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(12), 2115-2118
- Yoshimatsu, K., Yamazaki, T., Chronakis, I. S., & Ye, L. (2012).** Influence of template/functional monomer/cross-linking monomer ratio on particle size and binding properties of molecularly imprinted nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 124(2), 1249-1255.
- Zakaria, N. D., Yusof, N. A., Haron, J., & Abdullah, A. H. (2009).** Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for 2, 4-dinitrophenol. *International journal of molecular sciences*, 10(1), 354-365.
- Zeller, J., Cheung Tung Shing, K. S., Nero, T. L., McFadyen, J. D., Krippner, G., Bogner, B., ... & Eisenhardt, S. U. (2023).** A novel phosphocholine-mimetic inhibits a pro-inflammatory conformational change in C-reactive protein. *EMBO Molecular Medicine*, 15(1), e16236.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhang, H., Ye, L., & Mosbach, K. (2006).** Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 19(4), 248-259.
- Zhang, M., Zhao, H. T., Xie, T. J., Yang, X., Dong, A. J., Zhang, H., Wang, Z. Y. 2017.** “Molecularly imprinted polymer on graphene surface for selective and sensitive electrochemical sensing imidacloprid”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 252, 991-1002.
- Zhao, X. F., Duan, F. F., Cui, P. P., Yang, Y. Z., Liu, X. G., Hou, X. L. 2018.** “A molecularly-imprinted polymer decorated on graphene oxide for the selective recognition of quercetin”, *New Carbon Materials*, 33(6), 529-543.
- Zhao, Y., Ma, Y., Li, H., & Wang, L. 2011.** “Composite QDs@ MIP nanospheres for specific recognition and direct fluorescent quantification of pesticides in aqueous media”, *Analytical chemistry*, 84(1), 386-395.
- Zhong, N., Byun, H.S. and Bittman, R., 2001,** Hydrophilic Cholesterol-Binding Molecular Imprinted Polymers, *Tetrahedron Letters*, 42:1839-1841.
- Zuo, J., Ma, P., Li, Z., Zhang, Y., Xiao, D., Wu, H., & Dong, A. (2023).** Application of molecularly imprinted polymers in plant natural products: Current progress and future perspectives. *Macromolecular Materials and Engineering*, 308(3), 2200499.

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca, deneyimleri ve bilgisiyle ile yoluma ışık tutan, sevgisini paylaşan, hayata pozitif bakmayı öğreten, bilimsel bakış açısını öğreten, bilim insanlığının getirdiği vizyonu her zaman biz öğrencileri ile paylaşan, sevgili danışman hocam Prof. Dr. Sinan AKGÖL'e,

Akademik hayatım süresince engin bilgilerinden yararlandığım, çalışmalarımda bana destek olan çok sevgili hocam Dr.Öğretim Görevlisi Emre DOKUZPARMAK'a

Yüksek Lisans dönemim sürecinde BİOREGE ailesinden sevgileri ve destekleri ile her zaman yanımda olduklarını hissettiğim, laboratuvarımızı güzelleştiren, şenlendiren çalışma arkadaşlarım çok sevgili yüksek lisans öğrencisi Esra YAŞAR ve doktorant Timuçin GÜNER'e

Ve tüm üniversite hayatım boyunca beni bir an olsun yalnız bırakmayan, hep destekçim olan, motivasyonumu yükseltmemi sağlayan ve her koşulda beni cesaretlendiren çok sevgili yol arkadaşım Kader KELLE'ye

BİOREGE ailesinden sevgili dostlarım Kaan TIKTAŞ, Yağmur Dindoruk, Şevval Koç ve Damla EKER'e

Çok teşekkür ediyorum.

Son olarak, aileme en derin minnettarlığımı ifade etmek istiyorum. Onların bana olan sonsuz inançları, bu süreç boyunca benim gücüm ve motivasyonum oldu. Onların sevgi ve desteği, benim itici gücüm oldu ve hayatımda varlıkları için sonsuz minnettarım.

ÖZGEÇMİŞ

Ad:Hilal

Soyad:ÖZÇELİK

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lise:İzmir Buca Anadolu Lisesi

Lisans:Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü (2018-2022)

Anadolu Üniversitesi-Açık Öğretim Fakültesi Sağlık Yönetimi Bölümü
(2018-2023)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya
Anabilim Dalı (2022-2024)

Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Şarkaya, K., **Özçelik, H.**, Yaşar, E., Güner, T., Dokuzparmak, E., Hooshmand, S., & Akgöl, S. (2024). Selective Extraction and Quantification of Hemoglobin Based on a Novel Molecularly Imprinted Nanopolymeric Structure of Poly (acrylamide-vinyl imidazole). *ACS omega*, 9(16), 18458-18468.
2. **Özçelik, H.**, Subaşı, Y., Kibaroglu, M., Yaşar, E., Güner, T., Tiktaş, K., & Akgöl, S. (2024). Synthesis of Membrane Structures Containing Nanocomposites for Immunoglobulin G (IgG) Adsorption. *Anatolian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 178-190.

Ulusal Bilimsel Kongrelerde Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Posterler

1. L-Askorbik Asit Tayini İçin Nanopolimer İçeren Sensörük Çalışmaların Geliştirilmesi, **Hilal ÖZÇELİK**, Sinan AKGÖL, KROMATOĞRAFİ XXI, 14-16 Haziran 2023/Didim

Uluslararası Bilimsel Kongrelerde Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Posterler

1. **Hilal ÖZÇELİK**, Sinan AKGÖL, Removal Of Chromium From Wastewater Using Anyonic Nanopolymer, 5th Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (EBAT), 2-5 November 2023/Antalya
2. **Hilal ÖZÇELİK**, Aleyna İTMEÇ, Kader KELLE, Sinan AKGÖL, Burcu OKUTUCU, Removal Of Chromium From Wastewater Using Chromium Molecular Imprinted Polymer, 5th Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (EBAT), 2-5 November 2023/Antalya
3. Yasemin YAHŞİ, **Hilal ÖZÇELİK**, Sabriye YUŞAN, Sinan AKGÖL, Rasim İPEK, Investigation Of The Mechanical Properties And Corrosion Behavior Of Mg Produced By Electric Field Assisted Sintering Method, 5th International Mediterranean Scientific Research and Innovation Congress, 20-21 April 2024
4. **Hilal ÖZÇELİK**, Sinan AKGÖL, Esra YAŞAR, Timuçin GÜNER, Emre DOKUZPARMAK, Synthesis of Molecularly Imprinted Nanopolymers for C-Reactive Protein Detection, ICONIL 2024 SPRING, 8-9 June 2024/İstanbul