



**10,12-PENTAKOSADİYNOİK ASİT
TABANLI BİYOTAYİN SİSTEMLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Derviş MALATYALI

Eskişehir 2019

**10,12-PENTAKOSADİYNOİK ASİT TABANLI BİYOTAYİN
SİSTEMLERİ**

Derviş MALATYALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

**Eskişehir
Eskişehir Teknik Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
TEMmuz 2019**

10,12-PENTACOSADIYNOIC ACID BASED BIOASSAY SYSTEMS

Derviş MALATYALI

MASTER'S DEGREE THESIS

Chemistry Department

Biochemistry

Advisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Eskişehir

Eskişehir Technical University

Postgraduate Education Institute

JULY 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Derviş Malatyalı'nın "10,12-Pentakosadiynoik Asit Tabanlı Biyotayin Sistemleri" başlıklı tezi 24/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Arzu Ersöz	
Üye	: Prof. Dr. Sinan Akgöl	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Özlem Ünlüer	

Prof. Dr. Murat Tanışlı
Enstitü Müdürü

ÖZET

10,12-PENTAKOSADİİNOİK ASİT TABANLI BİYOTAYİN SİSTEMLERİ

Derviş MALATYALI

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2019

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Doğada bulunan birçok biyolojik bileşik arasında, glukoz tartışmasız yaşam için en kritik olanlardan biridir. Bu çalışmada; polimerleştiği zaman eşsiz kromatik özellikler sergilemekte olan, konjuge polidiasetilen bir sistem oluşturan 10,12-Pentakosadiynoik asit (PCDA) tabanlı ve glukozun nitel analizini hedefleyen bir konjuge lipozomal yapı geliştirilmiştir. Uzun alifatik bir uca ve karbonil ile hidroksil gruplarına sahip PCDA'nın türevi olan PCDA-NHS; NHS/EDC yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. PCDA-NHS karakterizasyonu, FT-IR, ¹³C NMR, ¹H NMR analizleri ile yapılmıştır. PCDA-NHS lipozom, 2 metakriloiloksietil fosforilkolin (MPC), ve PCDA kullanılarak ince film hidrasyon ve sonikasyon yöntemi ile sentezlenmiş olup; karakterizasyonu için Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), boyut ve zeta potansiyeli analizleri yapılmıştır. Lipozom, yaklaşık olarak 212,8 nm boyutunda bulunmuştur. Moleküler ağırlığı 25,5 kDa ve boyutu yaklaşık olarak 462,6 nm olan karbonhidrat bağlayıcı protein Konkanavalin A, sentezlenmiş olan lipozoma inkübe edilerek konjuge edilmiştir. Konjugasyon sonrasında lipozom boyutları zetametre cihazı ile yaklaşık olarak 791,1 nm olarak ölçülmüş ve protein konjuge edilmiş bu lipozomlarla glukoz deteksiyonu yapılarak kolorimetrik cevap yüzdeliği hesaplanmış olup UV absorpsiyon çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak, elde edilen lipozomal yapının glukoz deteksiyonunda gelecek vadede bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Sensör, Biyosensör, Lipozom, PDA, PCDA, MPC, Glukoz, Konkanavalin A.

ABSTRACT

10,12-PENTACOSADIYNOIC ACID BASED BIOASSAY SYSTEM

Derviş MALATYALI

Department of Chemistry

Programme in Biochemistry

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Sciences, July 2019

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

With biological varieties found in nature, glucose has been found to be one of the most critical for unquestionable life. In this study; a conjugated liposomal structure targeting qualitative analysis of glucose has been developed based on 10,12-Pentacosadiynoic acid (PCDA) which forms a conjugated polydiacetylenic system exhibiting unique chromatic properties when polymerized. PCDA-NHS, a derivative of PCDA with a long aliphatic core and carbonyl and hydroxyl groups; was synthesized by NHS/EDC method. Characterization of PCDA-NHS was done by FT-IR, ^{13}C NMR and ^1H NMR analyzes. PCDA-NHS liposome was synthesized by thin-film hydration and sonication using PCDA-NHS, 2 methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), and PCDA; Scanning Electron Microscopy (SEM), size and zeta potential analyzes were performed for characterization. The liposome was approximately 212.8 nm in size. The carbohydrate binding protein Concanavalin, with a molecular weight of 25.5 kDa and a size of approximately 462.6 nm, was conjugated to the synthesized liposome by incubation technique. After conjugation, the liposome dimensions were measured to be approximately 791.1 nm and the percentage of colorimetric response was calculated by glucose detection with these protein-conjugated liposomes. Also, the UV absorption analysis was performed. As a result, this liposomal structure is thought to have an important role in glucose detection for the future.

Keywords: Sensor, Biosensor, Liposome, PDA, PCDA, MPC, Glucose, Concanavalin

A.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince sonsuz desteği ile yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Arzu Ersöz'e,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca sabırla ve anlayışla tüm araştırma ve deneysel süreçlerim boyunca bilgisi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan ve kritik süreçlerde bana cesaret verip desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen değerli hocam Prof. Dr. Rıdvan Say'a,

Deneysel çalışmalarım esnasında, hiçbir zaman yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Deniz Hür'e,

Çalışmalarım süresince yardıma ihtiyacım olduğunda hiçbir zaman geri çevirmeyen ve yanımda olan Doç. Dr. İlker Avan'a,

Bilgi, tecrübe ve önerileriyle, laboratuvar çalışmalarımındaki desteğiyle her zaman yanımda olan Umut Çelikoğlu'na ve Emine Çelikoğlu'na,

Birlikte çalışmanın keyif olduğu, çalışmalarım esnasında her türlü yardımı ve manevi desteği sağlayan Sercan Güzel'e ve Ayça Bakır'a,

Hayatım boyunca arkamda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen, bana karşı hep fedakâr ve özverili olan babam Ahmet Malatyalı, annem Semra Malatyalı ve ablam Zelen Malatyalı'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Derviş Malatyalı

Temmuz 2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmanın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Derviş MALATYALI

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GÖRSELLER DİZİNİ.....	xiii
FORMÜLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK BİLGİ	5
2.1. Sensörler; Temelleri ve Kategorizasyonu	5
2.2. Biyosensörler.....	6
2.2.1. Biyosensör bileşenleri.....	7
2.2.1.1 Analit.....	7
2.2.1.2 Biyoreseptör	7
2.2.1.3 Dönüştürücü	7
2.2.1.4 Elektronik Bölüm.....	7
2.2.1.5 Ekran.....	8
2.2.2. Bir biyosensörün karakteristikleri	8
2.2.2.1. Seçicilik	8
2.2.2.2. Tekrarlanabilirlik	9
2.2.2.3. Kararlılık	9
2.2.2.4. Duyarlılık.....	9
2.2.2.5. Doğrusallık	9
2.2.3. Biyosensör çeşitleri.....	10
2.2.3.1. Kalorimetrik biyosensörler	10

2.2.3.2. Piezo-elektrik biyosensörler.....	10
2.2.3.3. Amperometrik biyosensörler	11
2.2.3.4. Potansiyometrik biyosensörler	11
2.2.3.5 Optik biyosensörler.....	11
2.3. Lipozomlar	12
2.3.1. Lipozomlar ve sınıflandırılmaları.....	12
2.3.2. Lipozomların hazırlanışı.....	13
2.3.2.1. Hidrasyon için lipid hazırlanması	14
2.3.2.2. Lipid film/kek hidratlanması	15
2.3.2.3. Lipid süspansiyonunun boyutlandırılması	16
2.3.3. Lipozom oluşumunun enerjetikleri ve kinetikleri.....	17
2.3.4. Lipozomların yüzey modifikasyonu	18
2.4. Lipozomların Biyosensörlerde Kullanımı	19
2.5. Konjuge Polimerler	20
2.6. Polidiasetlenler (PDA).....	21
2.6.1. PDA'ların yapısal ve optik özellikleri.....	23
2.6.1.1. Kendiliğinden birleşen yapı	23
2.6.1.2 Topokimyasal polimerizasyon	24
2.6.1.3 Kendiliğinden sinyal oluşturma (Kolorimetrik ve florometrik geçiş)	24
2.6.2. Kolorimetrik cevap	25
2.7. Konkanavalin A	26
2.8. Amaç	27
3. MATERYAL	29
3.1. Kimyasallar	29
3.2. Çözeltiler ve Tamponlar	29
3.3. Cihazlar ve Laboratuvar Sarf Malzemeleri.....	30
4. YÖNTEM VE UYGULAMA	31
4.1. PCDA-NHS Sentezi	31
4.2. PCDA-NHS Lipozom Hazırlanışı	32
4.3. PCDA-NHS Lipozoma Konkanavalin A Konjugasyonu	32

4.4. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom İle Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu	32
4.5. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom İle Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu: Kolorimetrik Cevap	33
4.6. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom İle Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu: UV Spektroskopisi.....	33
4.7. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom İle Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu: Varyasyon Katsayısı, Deteksiyon Sınırı (LOD) ve Nicelik Sınırı (LOQ)	34
5. BULGULAR	35
5.1. PCDA-NHS	35
5.1.1. İTK analizi	35
5.1.2. FT-IR analizi.....	36
5.1.3. ¹³ C NMR ¹ H NMR analizleri.....	37
5.2. PCDA-NHS Lipozom	38
5.3. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom	42
5.4. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom ile Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu: Kolorimetrik Cevap.....	44
5.5. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom ile Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu: UV Absorpsiyon Spektroskopisi.....	45
5.6. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom ile Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu: Varyasyon Katsayısı, Deteksiyon Sınırı (LOD) ve Nicelik Sınırı Tayini (LOQ)	47
6. SONUÇ VE YORUM.....	48
KAYNAKÇA	52
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasallar	29
Tablo 3.2. Kullanılan çözeltiler ve tamponlar	29
Tablo 3.3. Kullanılan cihazlar ve laboratuvar sarf malzemeleri.....	30



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Biyosensörlerin başlıca uygulama alanları	2
Şekil 1.2. 1980-2011 yılları arasında” Web of Knowledge” kullanılarak "biyosensör" terimi hakkında yapılan araştırma grafiği	3
Şekil 1.3. Yıllar boyunca çeşitli temel ve ticari kaynaklardan hesaplanan ve gelecek için öngörülen biosensör pazarının değeri grafiği.	4
Şekil 2.1. Sensörlerde meydana gelen çeşitli işlemleri temsili gösterimi: 1) analit reseptör alanlarına çekiliyor 2) analit ile olan kimyasal etkileşim elektrik sinyali üretiyor 3) Transdüser, elektrik sinyalini işlemciye gönderir	6
Şekil 2.2. Biyosensörün şematik gösterimi	8
Şekil 2.3. Lipozom dizaynı	12
Şekil 2.4. Lipozomların sınıflandırılması.....	13
Şekil 2.5. Vezikül oluşum mekanizması.	14
Şekil 2.6. Hidrasyon kuvvetleri altında hidrodinamik kuvvetlere ve çift tabakaların ayrılmasına bağlı olarak çift tabakanın katlanma bağıl kinetiğinin, veziküllerin boyutuna ve katmanlılığına etkisi	18
Şekil 2.7. Lipozom içine kapsüllenmiş ve lipozom yüzeyine modifiye edilmiş materyalleri gösteren yapısal model	19
Şekil 2.8. Çeşitli konjuge polimerlerin kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2.9. Lineer diasetilen yapısı	21
Şekil 2.10. PDA oluşumu.....	22
Şekil 2.11. PDA'ların kendiliğinden birleşimi, polimerizasyonu ve uyarılma sonucu meydana gelen optik değişiklikleri	23

Şekil 2.12. Konjuge PDA omurgasında π -orbital örtüşmesinin şematik diyagramı. Uyarıcılar tarafından, düzlemsel örtüşme omurgadaki C-C bağlarından birinde rotasyon ile bükülür. Bunun sonucu olarak kırmızı faz, döndürülmüş alkil yan zincirleri olan düzlemsel olmayan bir omurgadan oluşur.....	25
Şekil 2.13. Glukoz bağlayıcı protein Konkanavalin A'nın kristal yapısı. Glukoz bağlama cebiyle birlikte hem glukoza bağlı hem de bağlanmamış durumları göstermektedir	26
Şekil 2.14. Mn^{2+} ve Ca^{2+} iyonları ile sakkarit moleküllerinin Konkanavalin A'ya bağlanması	27
Şekil 4.1. PCDA-NHS sentezi.....	31
Şekil 5.1. Sentezlenen PCDA-NHS ve PCDA'nın FT-IR spektrum karşılaştırması. ..	37
Şekil 5.4. PCDA-NHS lipozom SEM görüntüleri.....	40
Şekil 5.5. Modifiye edilmemiş PCDA-NHS lipozom için boyut analizi.	41
Şekil 5.6. Modifiye edilmemiş PCDA-NHS lipozom için zeta potansiyeli analizi.	42
Şekil 5.7. PCDA-NHS lipozoma Konkanavalin A konjugasyonu sonrası için zeta boyut analizi.....	43
Şekil 5.8. PCDA-NHS lipozom (259,5 nm), PCDA-NHS lipozomun Kon A konjugasyonu sonrası (791,1 nm) ve Kon A (462,6 nm) için zeta boyut analizi.	44
Şekil 5.9. %KC değerinin zamana karşı değişimi.	45
Şekil 5.10. Artan glukoz miktarı ile pH 8 HEPES tamponu içindeki PCDA NHS lipozom/Konkanavalin A konjugatının UV absorpsiyon değişim grafiği. ..	46

GÖRSELLER DİZİNİ

Görsel 4.1. Etil asetat ile kestrakte edilen PCDA/NHS/EDC karışımının su ile yıkanması	31
Görsel 4.2. Konkavalin A konjuge edilmiş PCDA-NHS lipozom çözeltisinin UV maruziyeti öncesindeki hali (A), UV maruziyeti sonrasındaki hal (B) ve yüzey modifikasyonu yapıp polimerleştirilen lipozom çözeltisine glukoz eklendikten sonraki hali (C).....	33
Görsel 5.1. PCDA-NHS ve PCDA'ya ait ince tabaka kromatografisi: $R_f(\text{PCDA})=50/60=0,83$ ve $R_f(\text{PCDA-NHS})=35/60=0,58$	36
Görsel 5.2. PCDA NHS Lipozom/Konkanavalin A konjugatına sırasıyla 6, 12, 18, 24 ve 30 ppm glukoz çözeltisi eklenip inkübe edildikten sonra renk tonu farklılıklarının gösterimi.	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
BSA	: Bovine Serum Albumin
CDCl₃	: Döörülenmiş kloroform
CO₂	: Karbondioksit
CV	: Coefficient of Variation (Varyasyon Katsayısı)
DA	: Dasetilen
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
H₂S	: Hidrojen Sülfür
HEPES	:4-(2-Hidroksietil)piperazine-1-etansülfonik asit, N-(2-Hidroksietil)piperazine-N'-(2-etanesülfonik asit)
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliğı
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KC	: Kolorimetrik Cevap
Kon A	: Konkanavalin A
KP	: Konjuge Polimer
LMV	: Büyük Çok Katmanlı Veziküller
LOD	: Limit of Detection (Deteksiyon Sınırı)
LOQ	: Limit of Quantification (Nicelik Sınırı)
LUV	: Büyük Tek Katmanlı veziküller

mg	: Milligram
mL	: Millilitre
MLV	: Çok Katmanlı Veziküller
MPC	: 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine
n	: Test Sayısı
NH	: Hidrojen monohidrit
NHS	: N-hydroxysuccinimide
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans spektroskopisi
O₂	: Oksijen
PCDA	: 10,12-Pentakosadiynoik Asit
PCDA-NHS	: 10,12-Pentakosadiynoik asit-N-hidroksisüksinimit
PDA	: Polidiasetilen
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SUV	: Küçük Tek Katmanlı Veziküller
T_c	: Faz Geçiş Sıcaklığı
UV	: Ultraviyole Işıklar
λ_{max}	: Maksimum Dalga Boyu
σ	: Standart Sapma

1. GİRİŞ

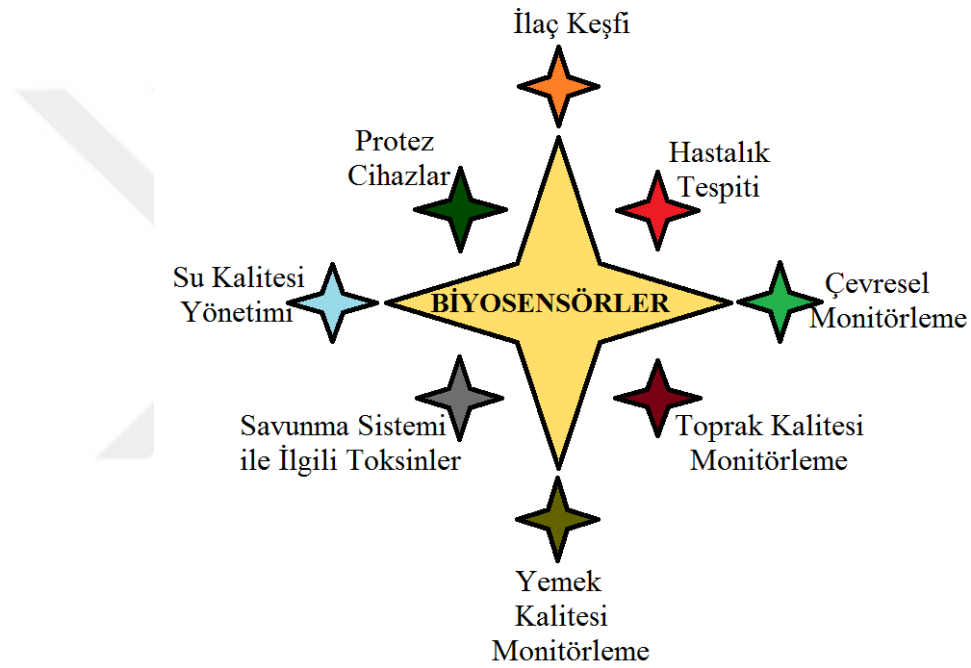
Sensör, fiziksel ortamdan gelen bazı türdeki girdileri algılayan ve yanıt veren bir aygıt olup spesifik girdi ise ışık, ısı, hareket, nem, basınç ya da çok sayıda çevresel fenomenden herhangi biri olabilmektedir. Çıktıysa genellikle, sensör konumunda insan tarafından okunabilir gösterime dönüştürülen veya daha ileri işlem için bir ağ üzerinden elektronik olarak iletilen bir sinyal olmaktadır (whatis). Fiziksel ve kimyasal algılama tekniğinin bir karışımı olan biyosensörler ise yakın zamanda tanımlanan algılayıcı sınıfından biri olup; ilke olarak biyosensörler, ortamın biyofiziksel veya biyokimyasal özelliklerini yorumlamak için kullanılabilen reseptör-transdüktör tabanlı bir alet olarak tanımlanmaktadır. Bu tip sensörleri diğerlerinden ayıran en ilginç karakteristik özellik, ortamdaki belirli biyolojik moleküllerin tespit edilmesini sağlayan biyolojik/organik tanıma unsurunun varlığı olarak görülmektedir (Ali vd., 2017).

Biyosensörler, üstün başarılarından dolayı farklı bilim dallarında yaygın şekilde kullanılmakta olup, yaşam kalitesini yükseltmeyi amaçlayan çok geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir ve bu aralık, çevresel denetleme, hastalık tespiti, gıda güvenliği, savunma, ilaç keşfi ve daha pek çok kullanımını kapsamaktadır (Şekil 1.1). Biyosensörlerin ana uygulamalarından biri, bir hastalığın göstergesi veya bir ilacın hedefleri olan biyomoleküllerin saptanmasıdır. Örneğin, elektrokimyasal biyosensifikasyon teknikleri, protein kanseri biyolojik belirteçlerini tespit etmek için klinik araçlar olarak kullanılabilmekte olup ayrıca biyosensörler, gıda izlenebilirliği, kalite, güvenlik ve besin değeri izleme platformları olarak da kullanılabilir (Karunakaran, Rajkumar, & Bhargava, 2015).

Tıbbi olarak biyosensörler, diyabetik hastalarda ve diğer toksinlerde tümörleri, patojenleri, kan glukoz seviyelerini doğru ve kesin olarak saptamak için kullanılabilir. Genlerin kodladığı floresans üreten biyosensörler, araştırmacılar için hücrelerde devam eden karmaşık kimyasal işlemleri incelemek ve analiz etmek için büyük önem taşımaktadır ve bu tür biyosensörler, hücredeki bazı spesifik lokasyonları hedeflemek için kullanılabilir. Herhangi bir spesifik maddenin konakçı hücrelere uzun süreli dahil edilmesi bu biyosensörler aracılığıyla da başarılabilmektedir.

Gıda endüstrisinde biyosensörler, bozulmuş gıdalardan salınan gazların tespiti, gıda kontaminasyonunun tespiti veya taze gıdalarda bakteri veya mantarların

büyümesini kontrol etmek ve en aza indirmekte kullanılmaktadır. Çevre açısından bakıldığında bu biyosensörler, havadaki kirliliği ve herhangi bir patojen, ağır metal vb varlığını tespit etmek için geliştirilmektedir. Askeri savunma sistemlerinde, saptanamadığı halde birçok insanın ölümüne neden olacak zararlı biyolojik materyallerin varlığını tespit etmek için kullanılabilir ve bu durumda çoğunlukla biyosensörler, *Bacillus Anthracis*, Ebola, Hepatit C virüsleri vb. gibi biyolojik varlıkların kasıtlı kullanımı gibi biyoterörist saldırıları tespit etmek için kullanılmaktadır (Ali vd., 2017).

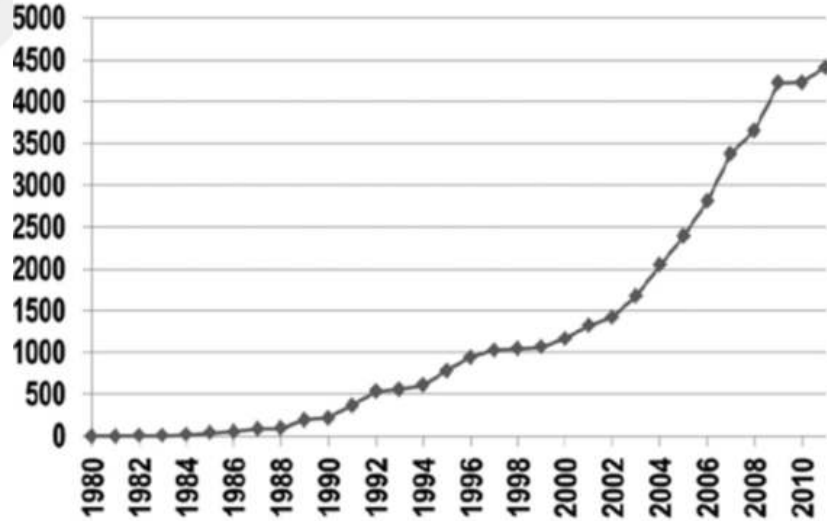


Şekil 1.1. *Biyosensörlerin başlıca uygulama alanları (Karunakaran vd., 2015).*

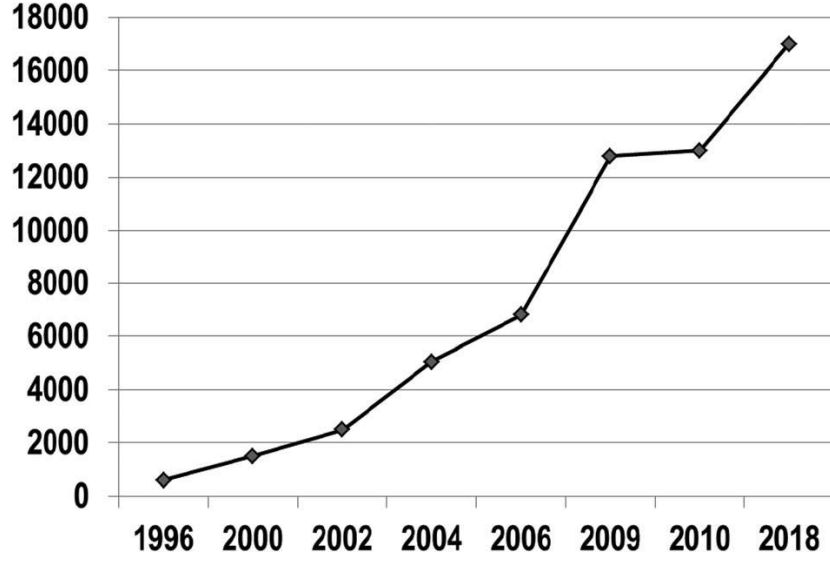
Lipozom yüzey yapısını geniş bir yelpazede analit çeşitleri ile tanıma fonksiyonlarını yerine getirmek için modifiye edebilme yeteneği sayesinde biyoanalizde kullanımda önemli bir yere gelmektedir. Lipozomlar, sinyali yükseltmek için bir araç olarak biyosensör alanında yıllar boyunca uygulama için büyük ilgi görmüştür ve lipozomlar, boyalar, enzimler, tuzlar, şelatlar, deoksiribonükleik asit (DNA), elektrokimyasal ve kemüloresans işaretleyiciler dahil olmak üzere çeşitli işaret işaretleyicilerini enkapsüle etmekle beraber büyük iç hacim, yüksek yüzey alanına sahip olmaları nedeniyle çeşitli biyolojik tanıma elemanlarıyla konjuge çift katmanlı lipozom oluşturma yeteneği nedeniyle biyosensör alanlarında kullanımda ilgi çekmektedir. Sonuç olarak lipozomlar, sinyalleri dönüştüren ve güçlendiren

biyosensörler için mükemmel bir aday bileşen olup çift katmanlı lipidlerin biyolojik tanıma unsurlarıyla birleşmesi olasılığı nedeniyle çok çeşitli analitler tespit edilebilmektedir (Liu & Boyd, 2013). Buna ek olarak, farklı sensör materyalleri ve hedef molekülleri bir araya getirerek, lipozom tabanlı sensörler, çok hedefli algılama için kolayca modifiye edilebilmektedir (Chen vd., 2015).

Biyosensörler alanında günümüze kadar olan gelişme ve yaygınlaşma olağanüstü olmuştur. Biyosensörler ve Biyoelektronikler, 1985 yılında Elsevier tarafından piyasaya sürüldüğünde, bu yıl dünyada yayınlanan yaklaşık yüz civarında biyosensörle ilgili makalenin otuzunu yayınladı. 2012 yılında ise, biyosensörler hakkında yaklaşık dört yüz elli bin makale yayınlandı ve bu konu şimdiye kadar yayınlanmış olan tüm makalelerin % 10'undan fazlasını temsil etmektedir (Şekil 1.2). Biyosensörler hakkında çeşitli ticari kaynaklardan yararlanılarak yapılan tahminlere göre biyosensörler, dünya pazarında milyonlarca dolarlık bir yere sahip olacaktır (Şekil 1.3) (Turner, 2013).



Şekil 1.2. 1980-2011 yılları arasında "Web of Knowledge" kullanılarak "biyosensör" terimi hakkında yapılan araştırma grafiği. (Turner, 2013)



Şekil 1.3. Yıllar boyunca çeşitli temel ve ticari kaynaklardan hesaplanan ve gelecek için öngörülen biosensör pazarının değeri grafiği.

2. TEORİK BİLGİ

2.1. Sensörler; Temelleri ve Kategorizasyonu

"Sensör" sözcüğünün kökeni temelde "herhangi bir şeyi tanımlamak" anlamına gelen Latince "sentire" kelimesinden gelmektedir. Sensör kelimesi duyulduğunda akla ilk gelen şey insan temel beş duyusu olan duyma, görme, koklama, tat alma ve dokunmadır. Bu duyuların çalışma mekanizması şöyle genelleştirilmektedir;

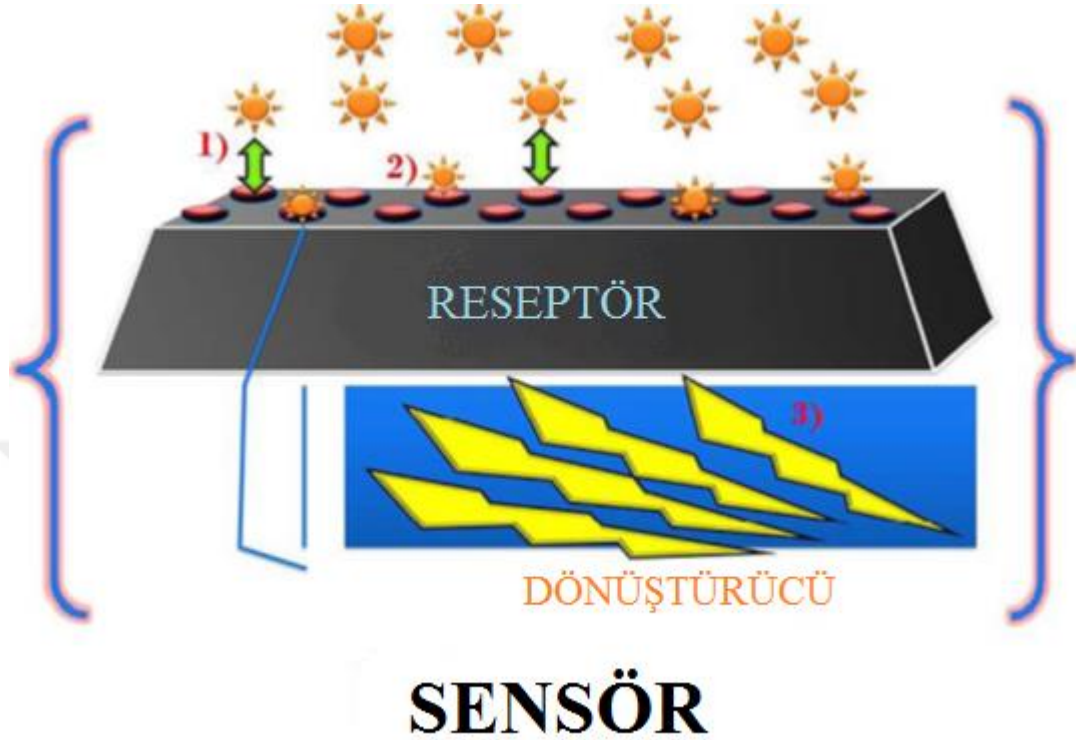
- a) harici uyarılar nedeniyle duyuşal hücreler tarafından girdi sinyalinin alınması,
- b) nörolojik dürtüler olarak yorumlanması için verilerin beyine iletimi,
- c) reseptörlerin, karşılıklı etkileşimde bulunduğu merkezin talimatına göre uyarana tepki vermesi.

Duyunun bu kısa açıklamasıyla, sensör için daha metodik ve teknik tanım olarak ortamdaki kaynaklanan uyarı ve sinyallere erişen ve yanıt veren bir cihaz olduğu söylenebilmektedir (Ali vd., 2017).

Sınıflandırma açısından fiziksel sensörler ve kimyasal sensörler en temel iki ve en çok tercih edilen sensör sınıfları olmaktadır. Bu ilk sınıflandırmanın arkasındaki asıl fikir insan duyusunu incelemekten de kaynaklanmaktadır. İşitme, dokunma ve görme duyusunun arkasındaki ortak çalışma mekanizması, harici fiziksel uyarılara (yani, akustik dalgalar, basınç ve elektromanyetik radyasyonlar) yanıt vermek olduğundan maddenin fiziksel özelliğine yanıt veren herhangi bir algılama cihazı fiziksel sensör olarak adlandırılmaktadır. Benzer şekilde tat ve koku duyuları, moleküllerin koku ve belirli damak tadının kimyasal uyarılarına tepki vermekte olup; sistemin kimyasal bilgilerini analitik olarak analiz edilebilir sinyallere dönüştürebilen herhangi bir algılama cihazı, kimyasal sensör olarak tanımlanmaktadır (Ali vd., 2017).

Sensör, ortamdaki belirli bir analit tipine tepki verebilen özel bir bölge içermektedir. Analit/uyaran, bilginin elektrik sinyaline çevrilmesini başlatan bir kimyasal etkileşimi tetiklemektedir. Elektrik sinyali daha sonra başka bir birime iletilmekte, işlem ünitesi de algılama tepkisini gerçekleştirmektedir. Teknik olarak sensör, reseptör ve dönüştürücü olmak üzere iki kısımdan oluşmakta olup (Şekil 2.1) reseptör, fiziksel/kimyasal uyarıyı alıp bu uyarıyı elektrik enerjisine çevirirken;

dönüştürücü de enerjiyi değerlendirerek enerjinin daha da analiz edilebilir elektronik forma dönüşmesini sağlamaktadır (Ali vd., 2017).



Şekil 2.1. Sensörlerde meydana gelen çeşitli işlemleri temsili gösterimi: 1) analit reseptör alanlarına çekiliyor 2) analit ile olan kimyasal etkileşim elektrik sinyali üretiyor 3) Transdüser, elektrik sinyalini işlemciye gönderir. (Ali vd., 2017)

2.2. Biyosensörler

Bir dönüştürücü elemana, doğrudan mekansal olarak temas eden bir biyolojik tanıma elemanı kullanarak belirli nicel veya yarı-kantitatif analitik bilgi sağlayabilen bağımsız ve entegre cihaza biyosensör denilmektedir (IUPAC). Biyosensör, biyolojik materyal örneklerinin biyolojik kompozisyonunu, yapısını, fonksiyonunu ve biyolojik yanıtı ölçülebilir tepkilere dönüştürerek anlaşılır kılmaya yarayan analitik araçtır (For, Positions, & Positions, 2014).

Biyosensörler, doğal konakçı-reseptör ("kilit-ve-anahtar") etkileşimlerini taklit etmek üzerine odaklanmaktadır. Kilit ve anahtar moleküler tanıma, enzim ve substrat, ligand ve reseptör, antikör ve antijen arasında veya tamamlayıcı diziler içeren iki nükleik asit dizisi arasında olabilmektedir (Y. Chen vd., 2011).

Bir biyosensör için ortak çalışma süreci, analitlerin biyolojik tanıma öğeleri tarafından tanınması ve tanıma olayının biyosensördeki transdüserler aracılığıyla bir sinyalin aktive edildiği bir yöntemi içermektedir (Liu & Boyd, 2013).

2.2.1. Biyosensör bileşenleri

Tipik bir biyosensör Şekil 2.2'de gösterilmekte ve aşağıdaki bileşenlerden oluşmaktadır.

2.2.1.1 Analit

İncelenen biyolojik bileşen veya analit. Örneğin E. Coli virüsü, bu virüsü analiz veya saptamak için tasarlanmış bir biyosensördeki analit olmaktadır (For vd., 2014).

2.2.1.2 Biyoreseptör

Analiti spesifik olarak tanıyan bir molekül, biyoreseptör olarak bilinmekte olup enzimler, hücreler, aptamerler, DNA ve antikorlar biyoreseptörlerin bazı örnekleri olmaktadır. Biyoreseptörün analit ile etkileşimi üzerine sinyal üretimi (ışık, ısı, pH, yük veya kütle değişikliği, vb.) süreci, biyolojik tanıma olarak adlandırılmaktadır (Karunakaran vd., 2015).

2.2.1.3 Dönüştürücü

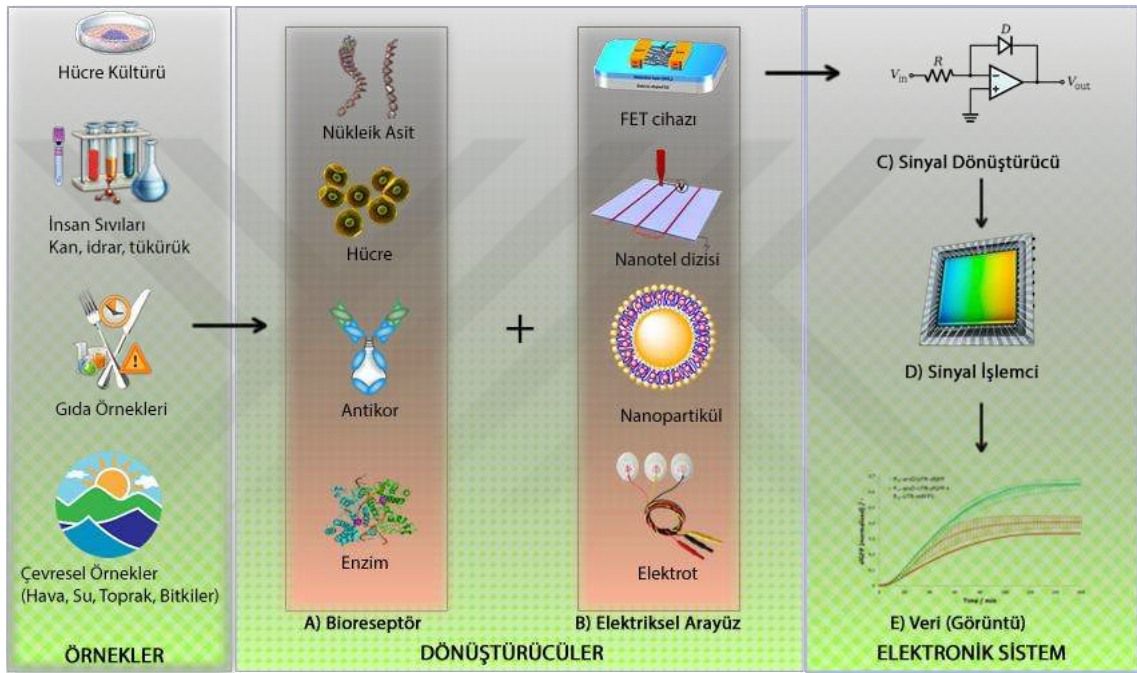
Dönüştürücü daha genel olarak, enerjiyi bir formdan diğerine dönüştüren bir cihaz olup; biyoreseptör ve elektriksel arayüzün birleşimi olarak tanımlanmaktadır. Elektriksel arayüzler, analitin biyolojik element ile etkileşiminden kaynaklanan sinyali elektrik sinyal formuna dönüştüren detektör elemanlarıdır (For et al., 2014) ve bu enerji dönüşüm süreci sinyalizasyon olarak bilinmektedir. Çoğu dönüştürücü, genellikle analit-biyoreseptör etkileşimlerinin miktarı ile orantılı olarak optik veya elektriksel sinyaller üretmektedir (Karunakaran vd., 2015).

2.2.1.4 Elektronik Bölüm

Dönüştürülen sinyali işleyen ve görüntüleme için hazırlayan elektronik bölüm ise sinyallerin analog formdan dijital forma yükseltilmesi ve dönüştürülmesi gibi sinyal koşullarını yerine getiren karmaşık elektronik devrelerden oluşmaktadır (Karunakaran vd., 2015).

2.2.1.5 Ekran

Ekran, bir bilgisayarın likit kristal ekranı veya kullanıcı tarafından anlaşılabilir sayılar veya eğriler üreten doğrudan bir yazıcı gibi bir kullanıcı yorumlama sisteminden oluşmaktadır. Bu bölüm genellikle biyosensörün sonuçlarını kullanıcı dostu bir şekilde üreten donanım ve yazılımdan oluşmakta ve ekrandaki çıkış sinyali de son kullanıcının gereksinimlerine bağlı olarak sayısal, grafik, tablo veya resim şeklinde olabilmektedir (Karunakaran vd., 2015).



Şekil 2.2. Biyosensörün şematik gösterimi
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Biosens%C3%B6r_bile%C5%9Fenleri.png).

2.2.2. Bir biyosensörün karakteristikleri

Bir biyosensörün karakteristiğini belirleyen özellikler içinde seçicilik, tekrarlanabilirlik, kararlılık, duyarlılık ve doğrusallık olup aşağıda kısaca açıklanmıştır.

2.2.2.1. Seçicilik

Seçicilik, bir biyoreseptörün diğer katkı ve kirleticileri içeren bir numunede belirli bir analiti algılama yeteneğidir ve seçiciliğin en iyi örneği, bir antijenin antikor ile etkileşimiyle gösterilmektedir. Klasik olarak, antikorlar biyoreseptörler olarak davranmakta ve transdüserin yüzeyinde immobilize olabilmektedirler. Antijeni içeren bir çözelti (genellikle tuzları içeren bir tampon), antikorların sadece antijenlerle etkileşime girdiği transdüser maruz bırakılmaktadır (Karunakaran vd., 2015).

2.2.2.2. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, biyosensörün çoğaltılmış bir deneysel kurulum için aynı tepkileri üretme kabiliyeti olup; bir biyosensördeki transdüserin ve elektronığın hassasiyeti ve doğruluğu ile karakterizedir. Hassasiyet, bir numunenin her ölçülmesinde sensörün aynı sonuçları sunma yeteneğini ve doğruluk da bir numunenin birden fazla ölçümüyle sensörün kapasitesinin gerçek değere yakın bir ortalama değer sağladığını göstermektedir (Karunakaran vd., 2015).

2.2.2.3. Kararlılık

Kararlılık, biyosensör sistemi içerisinde ve çevresinde gerçekleşen bozulmalara duyarlılık derecesini göstermekte olup bir biyosensörün uzun inkübasyon adımları veya sürekli izleme gerektiren uygulamalarda en önemli özelliğidir (Karunakaran vd., 2015).

2.2.2.4. Duyarlılık

Duyarlılık, analit derişimindeki birim değişim başına sensörün cevabı anlamına gelmektedir (Y. H. Lee & Mutharasan, 1995).

2.2.2.5. Doğrusallık

Doğrusallık, ölçülen tepkinin doğruluğunu (farklı derişimlerde analitlerin bulunduğu bir dizi ölçüm için) matematiksel olarak $y = mc$ olarak temsil edilen ve düz bir çizgide gösteren özelliğı olup burada c, analitin derişimi; y, çıkış sinyali ve m, biyosensörün duyarlılığı anlamında kullanılmaktadır. Biyosensörün doğrusallığı, biyosensörün çözünürlüğü ve test edilen analitin derişim aralığı ile ilişkilendirilmektedir. Biyosensörün çözünürlüğü, biyosensörün tepkisinde bir değişiklik meydana getirmek için analit derişiminde yapılması gereken en küçük değişiklik olarak tanımlanmaktadır. Doğrusallık ile ilişkili bir başka terim ise doğrusal aralıktır ve bu terim biyosensör tepkisinin derişim ile lineer olarak değiştığı analit derişim aralığı olarak tanımlanmaktadır (Karunakaran vd., 2015).

2.2.3. Biyosensör çeşitleri

Biyosensörler;

- Kalorimetrik biyosensörler
- Piezo-elektrik biyosensörler
- Amperometrik biyosensörler
- Potansiyometrik biyosensörler
- Optik biyosensörler

olmak üzere çeşitli gruplara ayrılmaktadır.

2.2.3.1. Kalorimetrik biyosensörler

Enzim katalizli birçok reaksiyon ekzotermik olmakta ve kalorimetrik biyosensörler de enzim etkisini takiben analit içeren çözeltinin sıcaklık değişimini ölçerek, çözeltideki analit derişimi açısından yorumlamaktadırlar. Analit çözeltisi, immobilize enzimi içeren küçük bir paketlenmiş yatak kolonundan geçirilmekte ve çözelti sıcaklığı da solüsyonun kolona girmeden hemen önce ve kolondan ayrılır ayrılmaz termometreler kullanılarak belirlenmektedir. Bu tip sensörler, genel olarak uygulanabilir bir biyosensör türüdür ve bulanık ve kuvvetli renkli çözeltiler için kullanılabilirken, duyarlılık ve doğruluk aralığı ise birçok uygulama için oldukça düşük olmaktadır. Duyarlılık, ısı çıktısını arttırmak için ve çeşitli reaksiyonları bağlamak için biyolojik sensördeki yolakta iki veya daha fazla enzimin kullanılmasıyla arttırılabilmekte ve alternatif olarak çok fonksiyonlu enzimler kullanılabilir. Glukoz tayini için glukoz oksidazın kullanılması ise örnek olarak gösterilebilmektedir (<http://www.yourarticlelibrary.com/science/biosensors-types-and-general-features-of-biosensors/23331>).

2.2.3.2. Piezo-elektrik biyosensörler

Piezoelektrik etki, bir malzemenin mekanik olarak uyarıldığı zaman voltaj üretme yeteneğini ifade eden fiziksel bir olgudur. Piezoelektrik bir malzemenin yüzeyine uygulanan voltaj, mekanik uyarılmaya veya salınımına neden olur (Pohanka, 2018). Sensör seçimliliği kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Bir piezoelektrik sensörün üzerinde enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların

bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır (<http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/yapi.html>).

2.2.3.3. Amperometrik biyosensörler

Amperometrik biyosensörlerde kullanılan enzim elektrotlar, iki elektrot arasında potansiyel uygulandığında bir akım üreterek çalışmakta ve akım büyüklüğü, substrat derişimiyle orantılı olmaktadır. En basit amperometrik biyosensör, örnek (analit) çözeltisinde bulunan O₂ derişimindeki azalmayı belirleyen Clark oksijen elektrodudur. Bu ilk nesil biyosensör olarak tanınmaktadır (<http://www.yourarticlelibrary.com/science/biosensors-types-and-general-features-of-biosensors/23331>).

2.2.3.4. Potansiyometrik biyosensörler

Bu tip biyosensörler biyolojik reaksiyonu elektronik sinyale dönüştürmek için iyon seçici elektrotlar kullanmakta ve kullanılan elektrotlar çoğunlukla cam pH elektrotları (katyonlar için), gaz seçici zar (CO₂, NH veya H₂S için) veya katı hal elektrotları ile kaplanmış olmaktadır (<http://www.yourarticlelibrary.com/science/biosensors-types-and-general-features-of-biosensors/23331>).

2.2.3.5 Optik biyosensörler

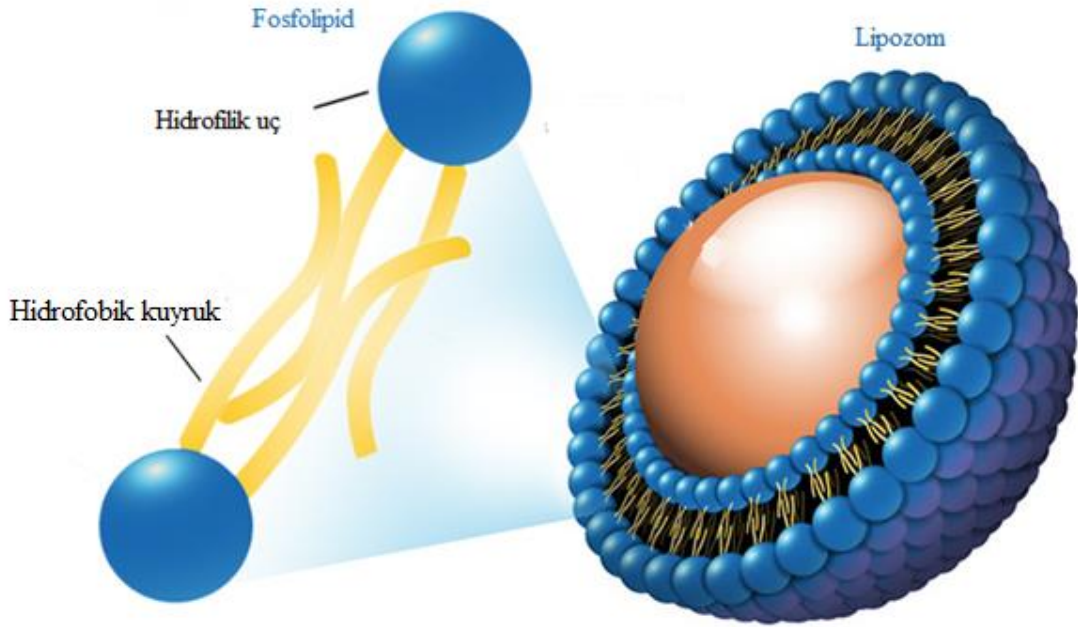
Bu tip biyosensörler hem katalitik hem afinite reaksiyonlarını ölçmektedir. Katalitik reaksiyonlarla üretilen ürünlerden kaynaklanan floresan veya absorbanstaki bir değişimi veya alternatif olarak, protein gibi dielektrik moleküllerin yüklenmesiyle (afinite reaksiyonları durumunda) biyosensör yüzeyin intrinsik optik özelliklerinde indüklenen değişiklikleri ölçmektedirler (<http://www.yourarticlelibrary.com/science/biosensors-types-and-general-features-of-biosensors/23331>). Optik biyosensörlerde iki temel gelişme alanı olup ve bunlar, tepkime maddeleri ve bir reaksiyonun ürünleri arasındaki ışık absorpsiyonundaki değişimleri belirlemek ya da ışığın çıktısını lüminesans süreçle ölçme esasına dayanmaktadır (<http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/optical.html>).

2.3. Lipozomlar

2.3.1. Lipozomlar ve sınıflandırılmaları

Lipozomlar, tipik olarak fosfolipidler ve sterollerden oluşan bir lipid çift katmanı ile çevrelenmiş bir iç sulu bölmeyi içeren kendiliğinden kurulmuş yapılar olarak bilinmektedir (C. Chen et al., 2015). Lipozomlar yapay mikroskobik veziküller olup, çift katmanı oluşturan lipidlerin hidrofobik zincirleri olan bir lipid çift tabakadan oluşmakta ve lipidlerin polar kutup grupları ekstrasvesiküler çözeltiye ve iç boşluğa doğru yönelmektedir (Liu & Boyd, 2013). İlk kez 1965'te Bangham tarafından keşfedilen lipozomlar, hücre zarları için model sistemler ve ilaç dağıtım sistemlerinde ilaç taşıyıcıları olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (C. Chen vd., 2015).

Lipozomlar Şekil 2.3'de belirtildiği gibi hem hidrofilik bir iç ve dış, hem de lipid membranı içinde hidrofobik bir bölgesi mevcut olan benzersiz bir yapı sergilemektedir. Böyle bir yapı, ya suda çözünür moleküllerin lipozomun hidrofilik iç kısmında kapsüllenmesini ya da lipid zar içindeki moleküllerin hareketsiz kalmasını mümkün kılmaktadır (C. Chen vd., 2015).



Şekil 2.3. Lipozom dizaynı (<http://www.integratedhealthblog.com/benefits-of-liposomal-nutrients-liposomes-2/>).

Lipozom boyutu çok küçük (0.025 μm) ile büyük (2.5 μm) vezikül arasında değişebilmekte ve ayrıca lipozomlar bir veya çift tabakalı zarlara sahip olabilmektedir.

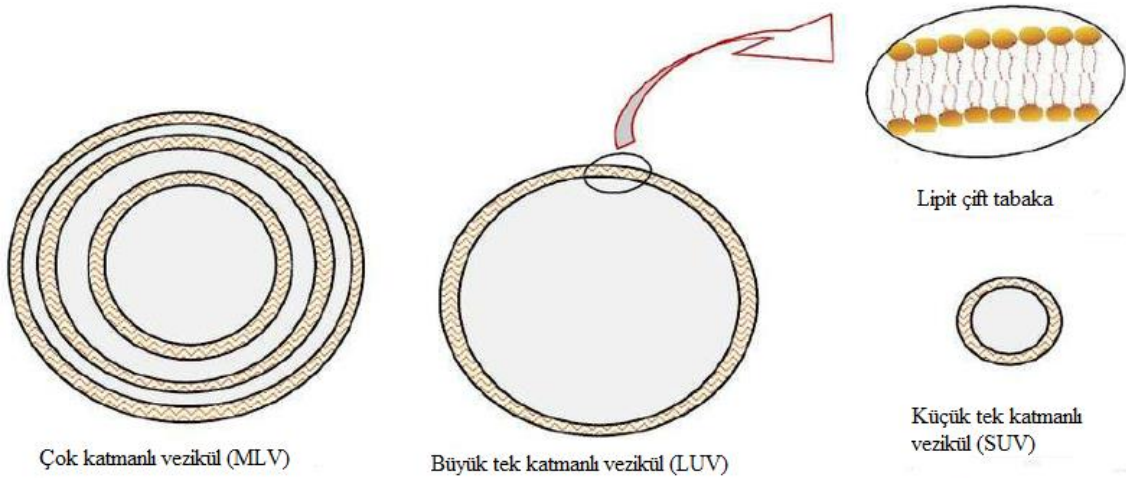
Lipozomlar, boyutları ve çift tabaka sayısı temelinde iki kategoride sınıflandırılmaktadır:

(1) Çok katmanlı veziküller (MLV)

(2) Tek katmanlı veziküller. Ayrıca, tek katmanlı veziküller iki kategoriye ayrılabilir;

- Büyük tek katmanlı veziküller (LUV),
- Küçük tek katmanlı veziküller (SUV) (Şekil 2.4).

Tek katmanlı lipozomlarda vezikül, sulu çözeltiyi çevreleyen tek bir fosfolipid çift tabakalı küreye sahipken; çok katlı lipozomlarda vezikül soğan yapısına sahip olmaktadır. Klasik olarak, birkaç tek katmanlı vezikül, diğer veziküllerin iç kısmında daha küçük boyutla oluşacak ve konsantre fosfolipid küreler suyun tabakaları ile ayrılmış çok tabakalı bir yapıya kavuşacaktır (Akbarzadeh vd., 2013).

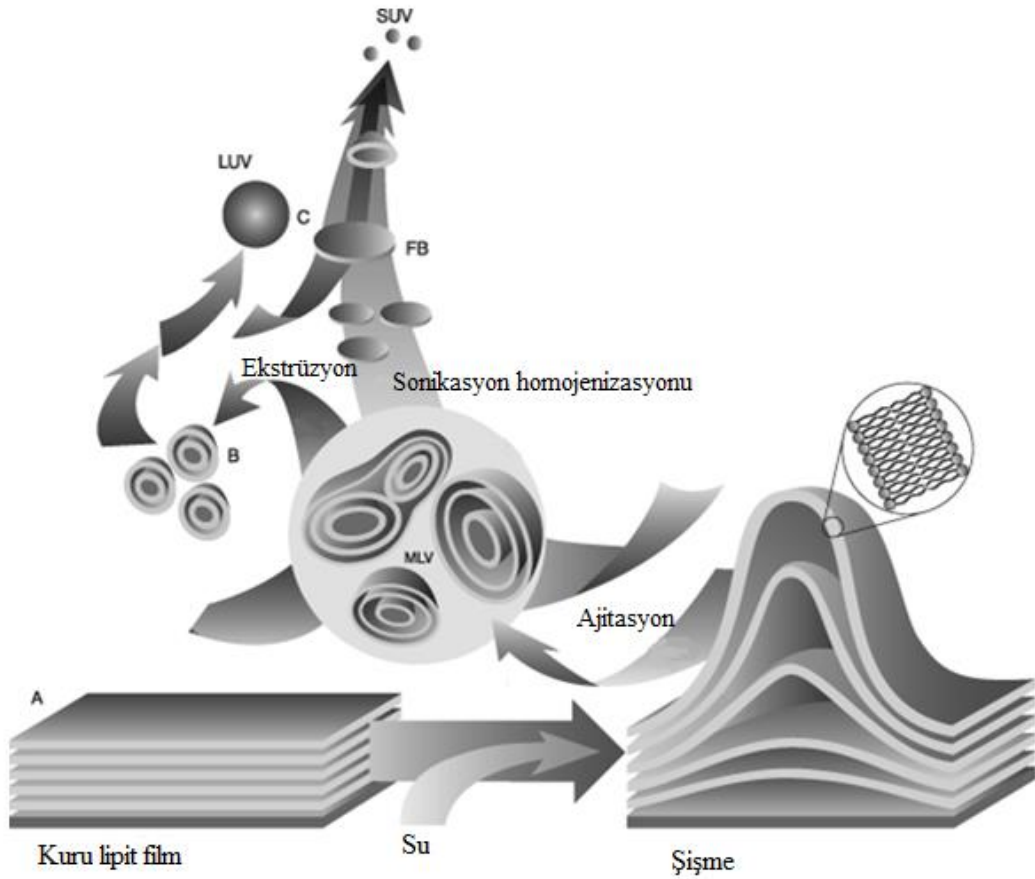


Şekil 2.4. Lipozomların sınıflandırılması (Akbarzadeh vd., 2013).

2.3.2. Lipozomların hazırlanışı

Lipozomlar (lipid vezikülleri), ince lipid filmleri veya lipid kekleri sulu hale getirildiğinde yani hidratlandığında oluşmakta ve sıvı kristal çift tabakalı yığınlar sıvılaşarak şişmektedirler. Hidratlanmış lipid tabakaları ajitasyon sırasında kendiliğinden kapanarak suyun, çift tabakanın uçlarındaki hidrokarbon çekirdeklerle

etkileşimini engelleyen büyük ve çok katmanlı vezikülleri (LMV) oluşturmaktadırlar. Bu parçacıklar oluştuğunda, parçacığın boyutunu küçültmek, sonik enerji (sonikasyon) veya mekanik enerji (ekstrüzyon) şeklinde enerji girişi gerektirmekte olup bu mekanizma Şekil 2.5’de gösterilmektedir (<https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>).



Şekil 2.5. Vezikül oluşum mekanizması.

Lipid formülasyonlarının özellikleri, bileşime (katyonik, anyonik, nötr lipid türleri) bağlı olarak değişiklik gösterebilmekte; ancak aynı hazırlama yöntemi, bileşime bakılmaksızın tüm lipid veziküller için kullanılabilir. Prosedürün genel unsurları, hidrasyon için lipid hazırlanmasını, hidrasyon ile ajitasyon ve veziküllerin homojen dağılımı için boyutlandırma işlemlerini içermektedir (<https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>).

2.3.2.1. Hidrasyon için lipid hazırlanması

Karışık lipid kompozisyonlu lipozomlar hazırlanırken, lipidlerin homojen karışımını sağlamak için önce organik bir çözücü içinde çözülmesi ve karıştırılması

gerekmekte ve genellikle bu işlem kloroform veya kloroform:metanol karışımları kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Amaç, lipidlerin tamamen karıştırılması için berrak bir lipid çözeltisi elde etmektir. Tipik olarak lipid çözeltileri, $10\text{-}20\text{ mgL}^{-1}$ olacak şekilde organik çözücü madde içinde hazırlanmakta, ancak lipid çözünürlüğü ve karıştırılması kabul edilebilirse daha yüksek derişimler kullanılabilir. Lipidler organik çözücü içerisinde iyice karıştırıldıktan sonra, bir lipid filmi elde etmek için çözücü uzaklaştırılmaktadır. Az miktarda organik çözücü ($<1\text{ mL}$) için, çözücü bir çeker ocak içinde kuru nitrojen veya argon akışı kullanılarak buharlaştırılmaktadır. Daha büyük hacimler için, organik çözücü döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmakta ve yuvarlak tabanlı cam balon şişenin kenarlarında ince bir lipid film elde edilmektedir. Lipid filmi, şişe veya cam balonda bir gece boyunca vakum altına yerleştirilerek artan organik çözücü uzaklaştırmak için iyice kurutulmaktadır. Lipid kekler için ise; lipid çözeltisi kaplara aktarılmakta ve kapların bir kuru buz bloğu üzerine yerleştirilerek veya kabın bir kuru buz-aseton veya alkol (etanol veya metanol) banyosu içerisinde dönmesi sağlanarak dondurulmaktadır. Dondurulduktan sonra, donmuş lipid kek bir vakum pompasına konmakta ve kuruyuncaya kadar liyofilize edilmektedir. Lipid kekin kalınlığı, liyofilizasyon için kullanılan kabın çapından daha fazla olmamalıdır. Kuru lipid filmleri veya kekleri vakum pompasından çıkartıldıktan sonra bulundukları kabın ağzı sıkıca kapatılmalı ve hidrasyona hazır oluncaya kadar dondurulmuş olarak saklanması gerekmektedir (Akbarzadeh vd., 2013).

2.3.2.2. Lipid film/kek hidratlanması

Kuru lipid filmin/kekin hidrasyonu, sadece kuru lipid kabına sulu bir ortam ilave edilerek ve ajitasyonla gerçekleştirilmektedir. Hidratlama ortamının sıcaklığı, kuru lipide ilave edilmeden önce en yüksek jel-sıvı kristal geçiş sıcaklığına (T_c veya T_m) sahip lipidin T_c 'si üzerinde olmalıdır. Hidratlama ortamına eklenmesinden sonra, lipid süspansiyonu, hidrasyon süresi boyunca T_c sıcaklığı üzerinde tutulmalıdır. Yüksek geçişli lipidler için, bu, lipid süspansiyonunun yuvarlak tabanlı bir şişeye aktarılması ve şişenin vakum olmadan rotasyonlu bir buharlaştırma sistemi üzerine yerleştirilmesiyle kolaylıkla başarılmaktadır. Yuvarlak tabanlı şişenin, ılık su banyosunda, lipid süspansiyonunun T_c 'si üstünde bir sıcaklıkta tutulması ve döndürülerek karıştırılması sıvının kendi akışkan fazında yeterli ajitasyon ile hidratlanmasını sağlar (<https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>). Hidrasyon ürünü, yapıda

bir soğana benzeyen büyük MLV olup, her lipid çift tabaka bir su katıyla ayrılmıştır. Kararlı, hidratlanmış bir MLV süspansiyonu üretildiğinde, parçacıklar sonikasyon veya ekstrüzyon gibi çeşitli tekniklerle küçültülebilir (Akbarzadeh vd., 2013).

2.3.2.3. Lipid süspansiyonunun boyutlandırılması

Sonikasyon

Sonik enerji kullanarak (sonikasyon) MLV süspansiyonlarının bozulması ile tipik olarak 15-50 nm aralığında çaplara sahip SUV oluşmaktadır. Prob uçlu sonikatörler lipid süspansiyonuna yüksek enerji girişi sağlamakta; ancak, lipid süspansiyonunun aşırı ısınmasına bağlı olarak parçalanmaya (degradasyon) neden olmaktadır. Ayrıca, sonikasyon uçları titanyum parçacıkları lipid süspansiyonu içine salma eğilimi göstermekte ve bu titanyum parçacıkların kullanımdan önce süspansiyondan santrifüjle uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu sebeplerden dolayı banyolu sonikatörler SUV hazırlanması için en yaygın kullanılan enstrümanlar olmaktadır. Bir MLV dağılımının sonikasyonu, süspansiyonu içeren bir test tüpünün bir banyo sonikatörüne yerleştirilmesi (veya sonikatörün ucunun test tüpüne yerleştirilmesi) ve lipidin T_c 'nin 5-10 dakika üstündeki sıcaklıkta sonike edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Ortalama boyut ve dağılım; kompozisyon ve derişim, sıcaklık, sonikasyon süresi ve gücü, hacim ve sonikatör ayarından etkilenmektedir (Akbarzadeh vd., 2013).

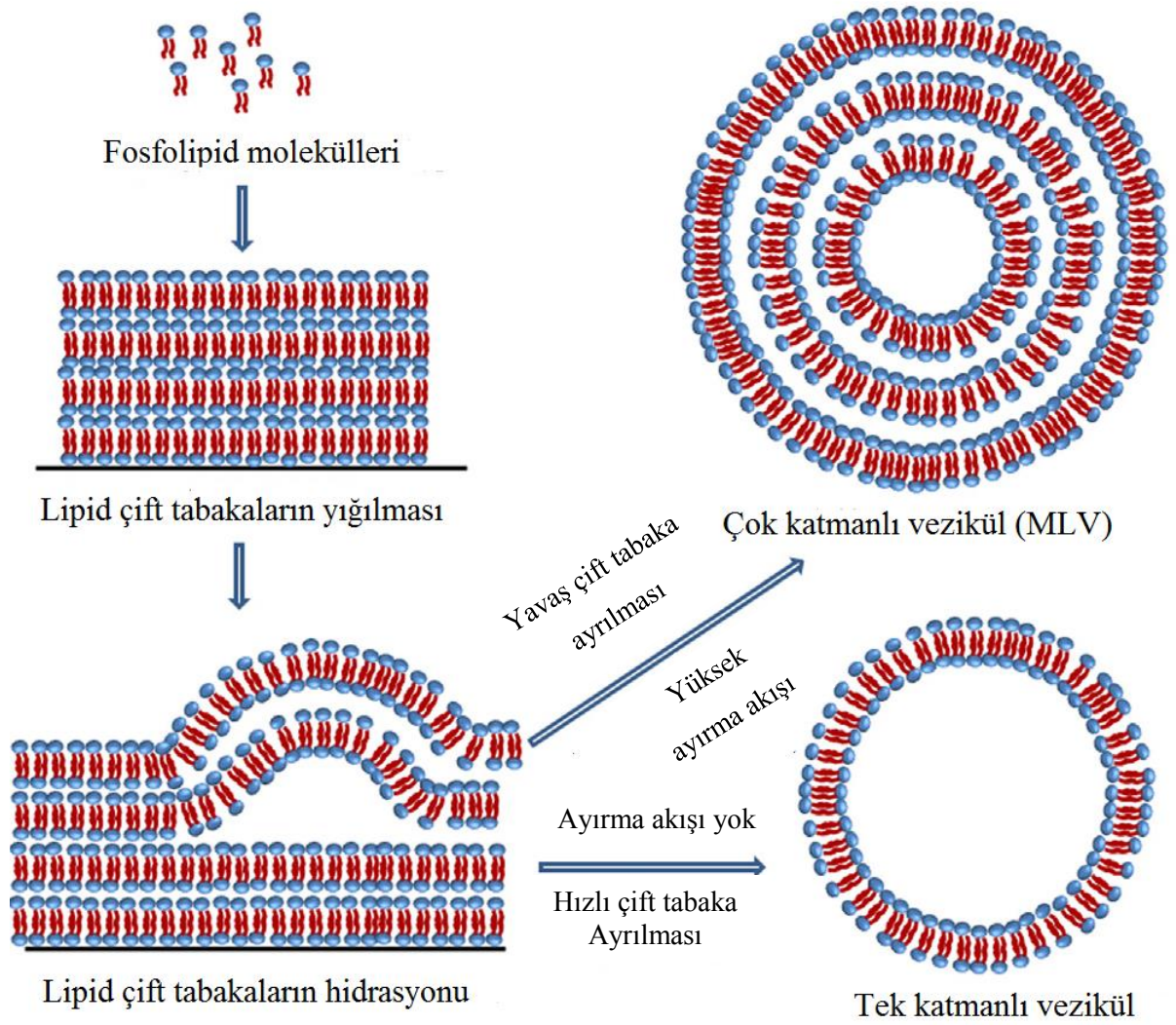
Ekstrüzyon (sıkıştırma) yöntemi

Lipid ekstrüzyonu, bir lipid süspansiyonunun gözenek boyutuna yakın bir çapa sahip parçacıklar üretmek için tanımlanmış gözenek boyutlu bir polikarbonat filtreden güçle geçirildiği bir tekniktir. Nihai gözenek boyutuna ulaşmak için ekstrüzyon işleminden önce, MLV süspansiyonları çeşitli donma-çözme döngüleri ile veya süspansiyonun daha büyük bir gözenek boyutlu filtreden geçirilmesi vasıtasıyla bozulmaktadır. Bu yöntem, son olarak elde edilecek olan süspansiyonun kirliliklerden korunmasını sağlamakta ve boyut dağılımının homojenitesini artırmaktadır. MLV dispersiyonlarını küçültmek için ekstrüzyonun, lipidin T_c sıcaklığı üzerindeki bir sıcaklıkta yapılması gerekmektedir. Aksi takdirde süspansiyonda katı parçacıklar olacak

ve gözenekleri tıkayarak başarısızlığa neden olacaktır (<https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>).

2.3.3. Lipozom oluşumunun enerjetikleri ve kinetikleri

Fosfolipidlerin hidrofilik bir uç grubu ve iki uzun hidrofobik kuyrukları vardır, bu durum da onları çift tabaka halinde kendi kendine bir araya getirmede suda çok zayıf çözünür hale getirmektedir. Fosfolipid çift tabakasının sonu olan bir yama, hidrofobik kuyrukların suya maruz kaldığı ve yamanın çevre ile orantılı olduğu kenarı ile ilişkili bir enerjiye sahip olmaktadır. Bu enerji, iki katmanlı yama, küresel bir kesecik oluşturmak için kapanırsa kenarı ortadan kaldırarak en aza indirilebilmektedir. İki tabakalı düz bir disk küre şeklinde yeniden düzenlendiğinde, sistemin toplam enerjisi, iki tabakanın bükme enerjisinden elde edilen katkılardan dolayı artmaktadır. Ardından, toplam enerji, kenarlar buluştuğunda ve kaybolduğunda azalmaktadır. Çift tabakanın küresel bir kesecik içine bükülmesi işlemi sırasında, yama, fosfolipid molekülleri ve diğer çift tabakalı fragmanların eklenmesi nedeniyle boyut olarak büyüyebilmektedir. Hidrodinamik ve diğer dengesizleştirici kuvvetlerin çift tabakanın parçalanmasına yol açması da mümkün olmaktadır, bu da daha küçük lipozomların oluşmasına neden olabilmektedir. Fosfolipid molekülleri, organik çözücü buharlaştırma yoluyla uzaklaştırıldığında, kendiliğinden substrat üzerine, çift tabaka yığını yerleşmektedir (Cottages, 1994). Şekil 2.6'da da görüldüğü gibi hidrasyon esnasında, çift tabakalı yığınlar çok yavaş ayrılır ve çift tabakalı kenarların daha hızlı bir şekilde birleşmesine izin verilirse, MLV'ler oluşur. Elektrik alan uygulanarak çift tabakayı ayırma oranının arttırılması veya hidrodinamik akışın baskılanarak çift tabakanın birleşme oranının düşürülmesi vasıtasıyla tek tabakalı kesecikler elde edilebilmektedir (Stein, Spindler, Bonakdar, Wang, & Sandoghdar, 2017).

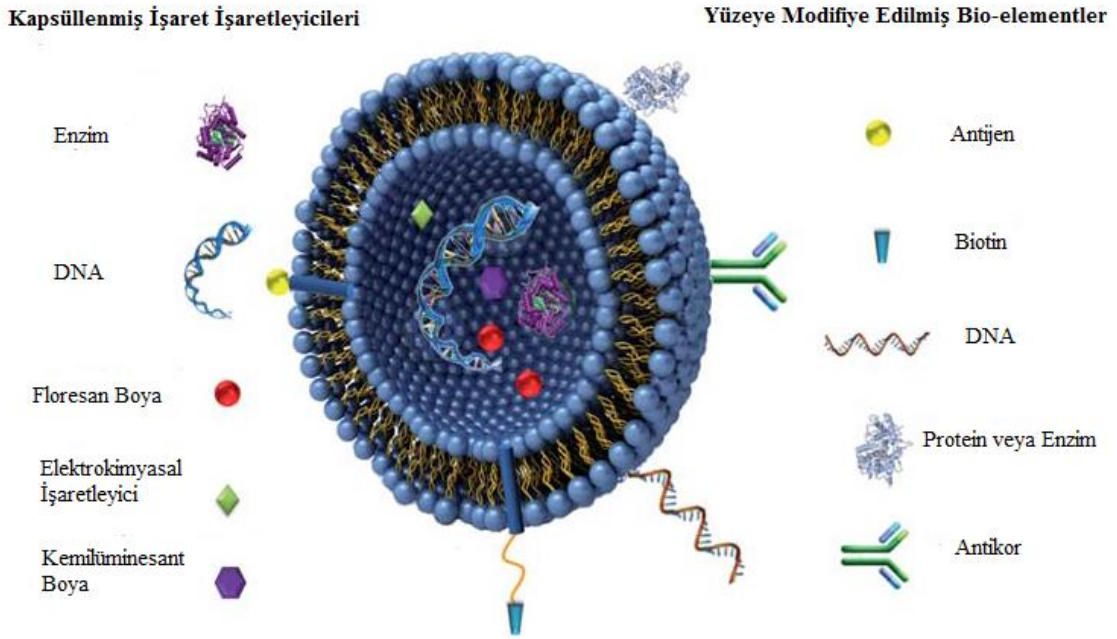


Şekil 2.6. Hidrasyon kuvvetleri altında hidrodinamik kuvvetlere ve çift tabakaların ayrılmasına bağlı olarak çift tabakanın katlanma bağıl kinetiğinin, veziküllerin boyutuna ve katmanlılığına etkisi (Patil & Jadhav, 2014).

2.3.4. Lipozomların yüzey modifikasyonu

Lipozom yüzey modifikasyonu, dokulara karşı spesifikliğı arttırmak veya kan akışında daha az tanınmak için geliştirilmiştir. Antikor etiketli immünilipozomlar ve koruyucu bir polimerle aşılınmış uzun süre kanda dolaşan lipozomlar, lipozomal ilaç ürünleri için ilgili sonuçları elde etmek amacıyla kullanılan iki önemli stratejidir. İmmünilipozomlar, arzu edilen doku ve organlarda lipozomal ilaçların birikimini artırabilirken, polietilenglikol kaplı uzun süreli dolaşımdaki lipozomlar, opsonize (opsonize, belli bir bakteriyi opsonin yardımıyla fagositoza duyarlı hâle getirme

anlamına gelmektedir.) eden proteinler ile lipozomlar arasındaki etkileşimi önleyebilir ve böylece kan dolaşım süresinin uzamasına neden olabilmektedir. Ayrıca, lipozom yüzey modifikasyonu teknolojisi, peptit, protein, enzim, antijen, biyotin, avidin ve DNA segmentleri dahil olmak üzere lipozomların yüzeyine konjuge edilebilen çeşitli biyotanıma unsurlarının (Şekil 2.7) kullanılmasını sağlar (Liu & Boyd, 2013).



Şekil 2.7. Lipozom içine kapsüllenmiş ve lipozom yüzeyine modifiye edilmiş materyalleri gösteren yapısal model (Liu & Boyd, 2013).

2.4. Lipozomların Biyosensörlerde Kullanımı

Lipozomlar, sinyali yükseltmek için bir araç olarak biyosensör alanında on yıllar boyunca uygulama için büyük ilgi görmüştür. Lipozomlar, boyalar, enzimler, tuzlar, şelatlar, DNA, elektrokimyasal ve kimyasal lüminesans gibi çeşitli işaretleyicileri enkapsüle edebilmektedir. Sonuç olarak lipozomlar, biyosensörlerin sinyalleri dönüştürmesi ve güçlendirmesi için mükemmel bir aday bileşen olmaktadır (Liu & Boyd, 2013).

Eşsiz yapıları sonucu lipozomlar kimyasal madde, biyomoleküller ve nanoparçacık taşıyıcıları olarak sıklıkla kullanılmakla beraber ilaç dağıtımında, kimyasal ve biyolojik sensörlerde uygulama alanı bulmaktadır. Ayrıca lipozom

yüzeyine, özel olarak bir reseptör bölgesine bağlanan uygun bir molekül ekleyerek belirli hücreleri hedeflemek de mümkün olmaktadır (C. Chen vd., 2015).

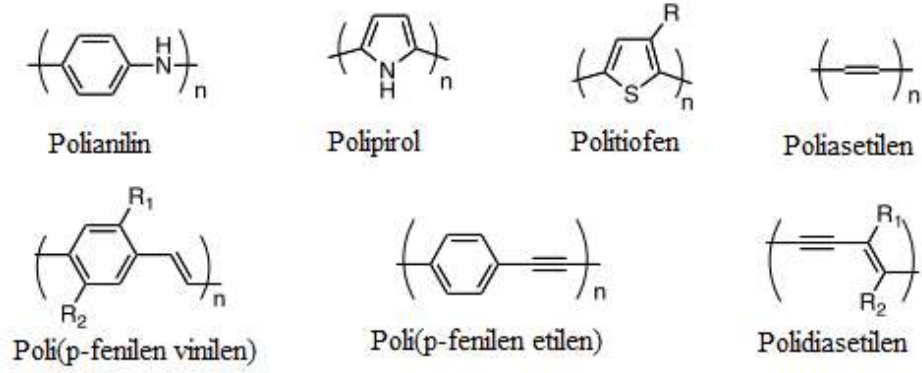
Eşsiz yapısal ilerlemeden dolayı lipozomlar, kimyasal ve biyolojik tespit için sensörlerde bir substrat olarak kullanımı büyük ilgi görmektedir. Floresans, kalorimetrik ve optik spektroskopi de dahil olmak üzere etkili iletme teknolojisi ile bir araya getirilen lipozomlar, mükemmel sinyal amplifikasyonunu gerçekleştirebilmekte ve ultra-duyarlı tayinler elde edilebilmektedir (C. Chen vd., 2015).

Sensörlerde kullanılan lipozomların başlıca işlevleri arasında şunlar bulunmaktadır;

- Birden çok sensör malzemesi taşıırken aktif sensör malzemeleri, sinyal yükseltme veya çoklu hedef tespitinde sensör güçlendirici elemanlar için taşıyıcı olarak çalışmak.
- Seçici algılama için enzimlerin veya proteinlerin aktivitesini dengelemek.
- Biyolojik ortamdaki sensörlerin biyoyumluluk ve erişilebilirliğini arttırmak (C. Chen vd., 2015).

2.5. Konjuge Polimerler

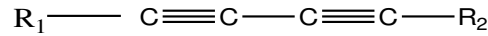
Değişken doymuş/doymamış bağlara sahip molekül zincirlerinde delokalize π elektronları içeren polimerler çoğunlukla konjuge polimerler (KP) veya iletken polimerler olarak adlandırılmaktadır. Uzatılmış π -bağları, sürekli şekilde delokalize olan elektronları içermekte ve böylece optik ve elektronik özellikler meydana gelmektedir. Sonuç olarak, bu elektro-aktif polimerler, alan etkili transistörler, polimer aktüatörler, ışık yayan malzemeler, sensörler ve güneş pilleri dahil olmak üzere çeşitli uygulamalarda kullanılabilir. Birkaç önemli KP örneği Şekil 2.8'de gösterilmektedir. KP sistemleri absorpsiyon ve emisyon özellikleri çevresel bozulmalara karşı çok hassas olduğundan sensör tasarımı için çok cazip bulunmaktadır (Ji-seok Lee, 2011).



Şekil 2.8. Çeşitli konjuge polimerlerin kimyasal yapısı (Ji-seok Lee, 2011).

2.6. Polidiasetilenler (PDA)

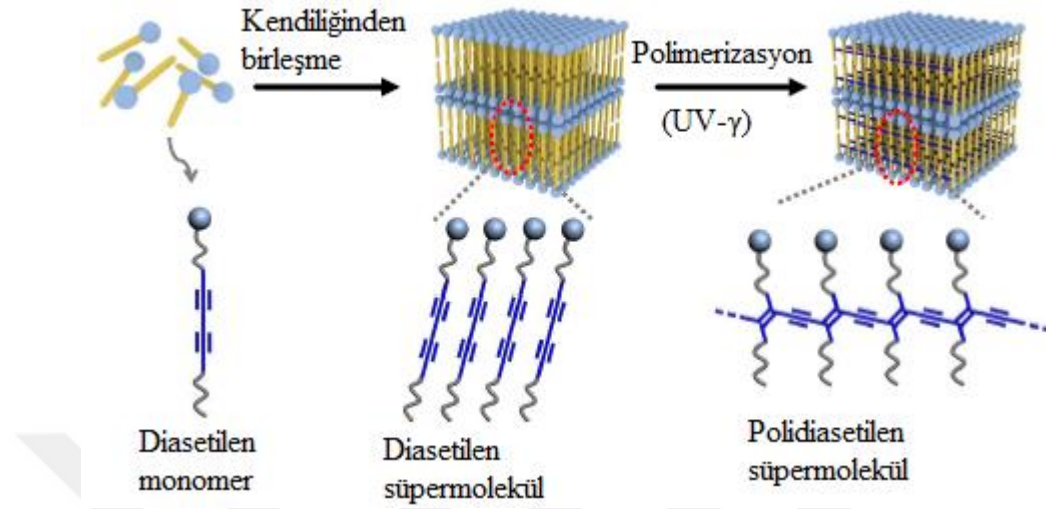
Lineer diasetilen (Şekil 2.9) ve türevleri katı haldeki reaktiviteleri, çıkıntılarının bulunmaması ve alkil zinciri boyunca moleküler paketlenmeye etki etmeden süstitüye olabılme özellikleri nedeniyle film oluşturan monomerlerde önemli bir role sahip olmaktadır (Pingsheng, Huilin, & Gang, 2003). Polidiasetilenler (PDA) gibi konjüge polimerler eşsiz elektriksel ve optik özelliklerinden ötürü "akıllı" materyaller olarak adlandırılmaktadır (Y. Chen vd., 2011).



Şekil 2.9. Lineer diasetilen yapısı

Diasetilen (DA) monomerlerin R grupları moleküle amfifilik karakteri verecek şekilde tasarlandığında reaktif monomerler, ince filmler veya veziküllere kendiliğinden monte edilerek kromik moleküler yapılar oluşturabilmektedir (Y. Chen vd., 2011). Amfifilik moleküller, kendi kendine oluşum koşullarına tabi tutulduklarında veziküller, tüpler, teller ve helezonlar gibi çeşitli nano / mikro şekillere dönüştürülmektedir. Bir amfifilik lipid molekülü polimerize olabilen bir birim içerdiğinde polimerizasyon, yükseltilmiş kararlılık ve kromojenik işlevler de dahil olmak üzere ekstra faydalı özellikler gösteren süper moleküllerin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Özellikle hidrofobik alkil zincirlerinde diasetilen parçalarını içeren lipid moleküllerinin kendi kendine oluşmasından kaynaklanan süper-molekül yapılar ilginç olmaktadır. Örneğin; 10,12-pentakosadiynoik asit (PCDA), UV maruziyeti ile polimerize edilebilen süper moleküllerin üretilmesi için sulu çözeltide spontan moleküler oluşuma girmektedir.

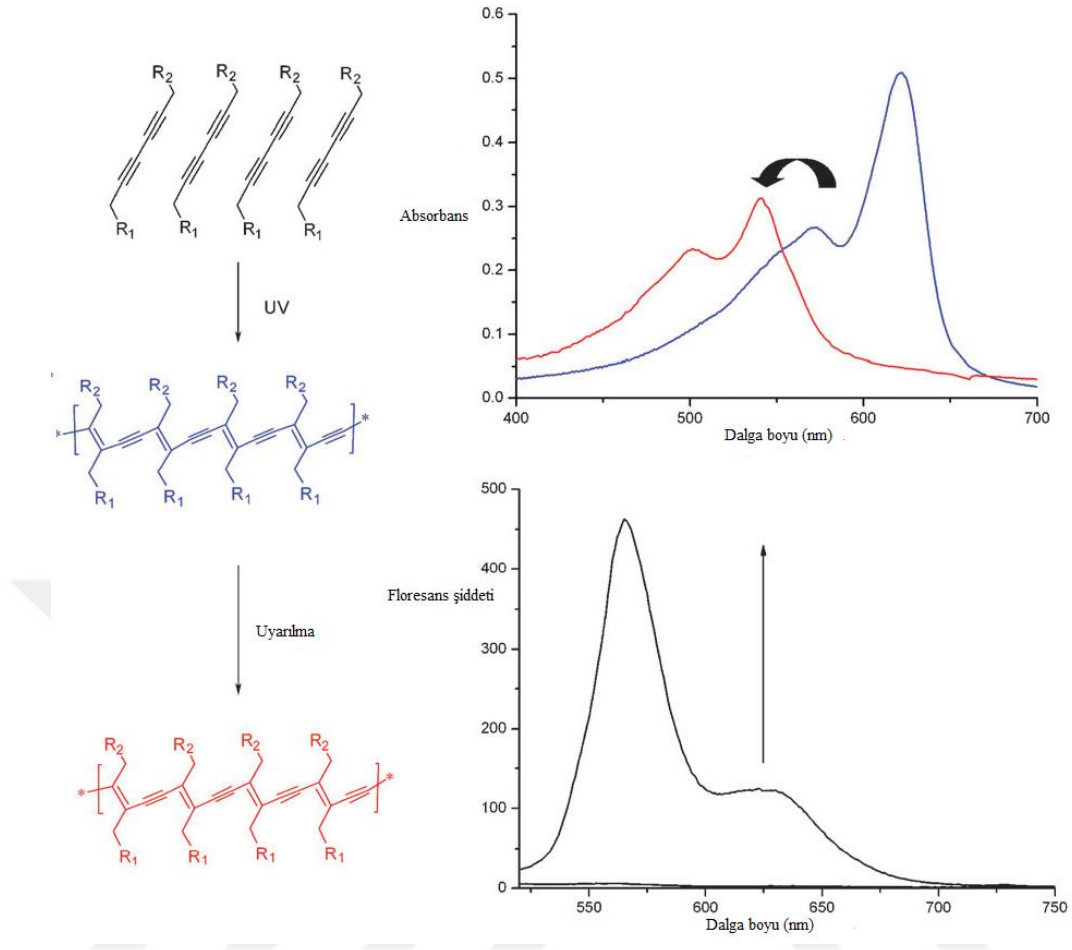
Bunun sonucu olarak, elde edilen konjuge ve “ene-yne” alternatif omurga yapısı gösteren polimerlere PDA yapı denilmektedir (Şekil 2.10) (Yoon, Lee, & Kim, 2009).



Şekil 2.10. PDA oluşumu (Joosub Lee vd., 2014).

Diğer KP'lere kıyasla, PDA'lar yapısal ve optik farklılıklar göstermektedirler. Bunlar;

- Öncelikle yukarıda belirtildiği gibi, bu polimerler moleküler olarak bir araya getirilmiş kristal ya da yarı kristal haldeki DA monomerlerinden hazırlanabilmektedir.
- PDA'lar, kimyasal başlatıcılar veya katalizörlere ihtiyaç duymadan kendiliğinden birleşen DA'lerin, UV veya γ -ışınlaması ile üretilmekte ve böylece oluşan polimerler, istenmeyen yan ürünlerle kontamine olmamaktadırlar.
- PDA'lar, biyolojik algılama için matris olarak kullanılmasını sağlayan nano yapıları lipozomlar, veziküller ve teller şeklinde sulu çözelti halinde kolayca hazırlanabilmektedirler.
- PDA'lar ısıya (termokromizm), organik çözücülere (solvato-kromizm), mekanik strese ve ligand-reseptör etkileşimlerine yanıt olarak maviden ($\lambda_{\max}$ 640 nm) kırmızıya ($\lambda_{\max}$ 550 nm) renk değişimine uğramaktadırlar. (Yoon vd., 2009), (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. PDA'ların kendiliğinden birleşimi, polimerizasyonu ve uyarılma sonucu meydana gelen optik değişiklikleri (X. Chen vd., 2012).

2.6.1. PDA'ların yapısal ve optik özellikleri

2.6.1.1. Kendiliğinden birleşen yapı

DA iki yarı kısımdan oluşan amfifilik bir monomerdur:

- polar bir uç grubu
- ve DA grubuna sahip hidrofobik kuyruk.

DA'nın amfifilik doğası sulu ortamda kendi kendine toplanarak bir araya gelen bir yapı meydana getirmektedir. DA amfifilinin her bir birimi, amfifilin kendiliğinden birleşen yapı oluşturup oluşturmayacağını ve hangi tür yapıların oluşacağını belirlemek için önemli bir parametredir. Örneğin, uç grubun kiralitesi koloidal yapıyı etkiler; akiral uç gruplu DA'lar genellikle küresel lipozomlar oluştururken, kiral DA'lar sıklıkla sarmallar ve tübüller gibi küresel olmayan yapılar oluşturmaktadırlar. Ayrıca, düşük

derişimlerde DA'lar sulu ortamda dağılmış haldedirler. Fakat, kritik derişimin üstünde, yüzey enerjilerini en aza indirmek için iki katmanlı lipozom yapıları oluşturmaya yönelmektedirler (Edwards, 2016).

2.6.1.2 Topokimyasal polimerizasyon

PDA, lipozom yapısı boyunca molekül içi DA paketlenmesi arasında 1,4-fotopolimerizasyonu ile oluşarak yan alkil zincirleri olan konjuge omurga oluşturmaktadır. Polimerizasyon ancak; DA'lar lipozom yapısı içinde bir kafeste düzenlendiği zaman gerçekleşmektedir (Şekil 2.10). DA monomerlerinin polimerizasyonu, lipozom yapısının fiziksel olarak stabilize edilmesine, termal kararlılığını ve mekanik mukavemetini arttırmaya yol açmaktadır (Edwards, 2016).

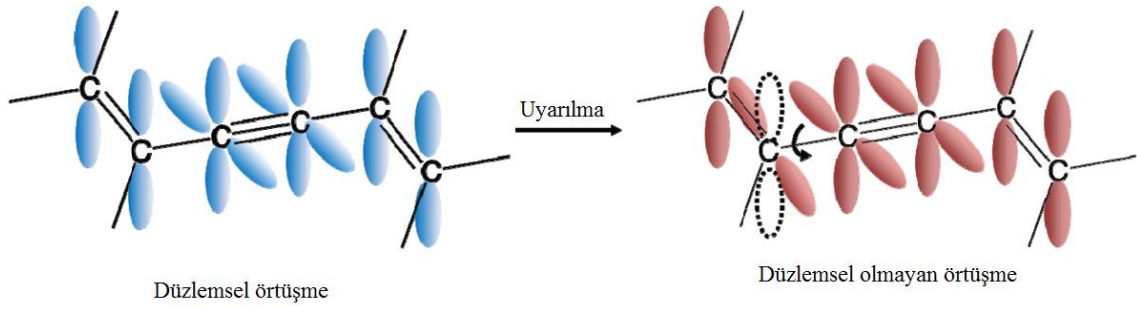
2.6.1.3 Kendiliğinden sinyal oluşturma (Kolorimetrik ve florometrik geçiş)

Konjuge PDA, eşsiz kromatik özellikler sergileyen önemli bir polimerik sistemdir. Elde edilen polimer, konjuge çerçevedeki (ene-yne) elektronik delokalizasyonundan dolayı göze yoğun şekilde mavi görünüp, elektromanyetik spektrumun görünür bölgesinde 650 nm civarında absorpsiyon göstermektedir. PDA, sıcaklık değişikliği, pH ve yüzey basıncı gibi çeşitli dış etkenlerdeki değişime bağlı olarak hızlı şekilde gerçekleşen maviden kırmızıya kolorimetrik geçişler sergilemektedir (Oommen vd., 2017). Dış uyarılar üzerine emilim λ_{max} 640nm'den (mavi faz) 540 nm'ye (kırmızı faz) kaymaktadır. İlginç şekilde, PDA'nın tetiklenmiş kırmızı fazı zayıf floresan özellik göstermektedir (Jiseok Lee, Jun, & Kim, 2009). Ek olarak; kırmızı PDA'lar düşük uyarılmış B_u düzeyinde oldukları için floresans özellik göstermekteyken, mavi PDA'ların A_g simetrisine sahip olduklarına inanılmakta ve singlet uyarılmış halinden emisyon sırasında dipol-yasak geçiş yüzünden floresan özellik göstermemektedir (X. Chen et al., 2012).

PDA süpermoleküllerinin kolorimetrik dönüşümleri geri döndürülemez; ancak, polimer uç gruplarının kimyasal modifikasyonu vasıtasıyla renk değişikliği tersinirliğinin getirilmesini açıklayan raporlar bulunmaktadır. Bu modifikasyonlar sonucunda polimer modülleri içindeki moleküler paketlenme ve topokimyasal dönüşümler değiştirilmektedir (Oommen vd., 2017). Kırmızı fazın oluşumu sıklıkla iddia edildiği gibi konjugasyon uzunluğunun kısalmasına neden olacak düzenin azalması ile ilgili değildir (Schott, 2006). Yan zincir molekül paketlenmesi, sıralama ve

yönlendirme gibi moleküler konformasyon değişikliklerin farklı omurga konformasyonlarına yol açan stresler verdiği, dolayısıyla elektronik durumlarını ve karşılık gelen optik absorpsiyonu değiştirdiğine inanılmaktadır. Özellikle, omurga düzlemselliğini değiştiren polimer omurgasının C-C bağındaki rotasyon önemli olmaktadır. Teorik ve deneysel kanıtlar C-C omurga bağında yaklaşık 5° lik bir rotasyonun, π -orbital çakışmasını dramatik bir şekilde değiştirebildiğini ve absorpsiyon spektrumunda belirgin bir maviye kaymaya neden olduğunu göstermektedir (Y. Chen vd., 2011).

Sonuç olarak; PDA renginin maviden kırmızıya geçişi, PDA molekül omurgasının düzlemsel yapıdan düzlemsel olmayan yapıya geçişiyle ilişkilidir ve yan zincir konformasyonu, “ene-yne” molekül omurgasının düzlemselden düzlemsel olmayan konformasyona geçişinde büyük rol oynamaktadır (Okada vd., 1998) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Konjuge PDA omurgasında π -orbital örtüşmesinin şematik diyagramı. Uyarıcılar tarafından, düzlemsel örtüşme omurgadaki C-C bağlarından birinde rotasyon ile bükülür. Bunun sonucu olarak kırmızı faz, döndürülmüş alkil yan zincirleri olan düzlemsel olmayan bir omurgadan oluşur (Edwards, 2016).

2.6.2. Kolorimetrik cevap

Kolorimetrik yanıt (KC), mavi formdaki göreceli değişiklikleri ve zaman içinde algılama materyali üzerindeki PDA'nın kırmızı şeklini bildirmektedir. Daha yüksek KC değerleri, mavi kontrol numunesine kıyasla daha kırmızımsı bir lipozom çözeltisi görünümünü gösterir. Çıplak gözle % 10 veya daha fazla KC değeri için renk değişimi açıkça görülmektedir (Y. Chen et al., 2011).

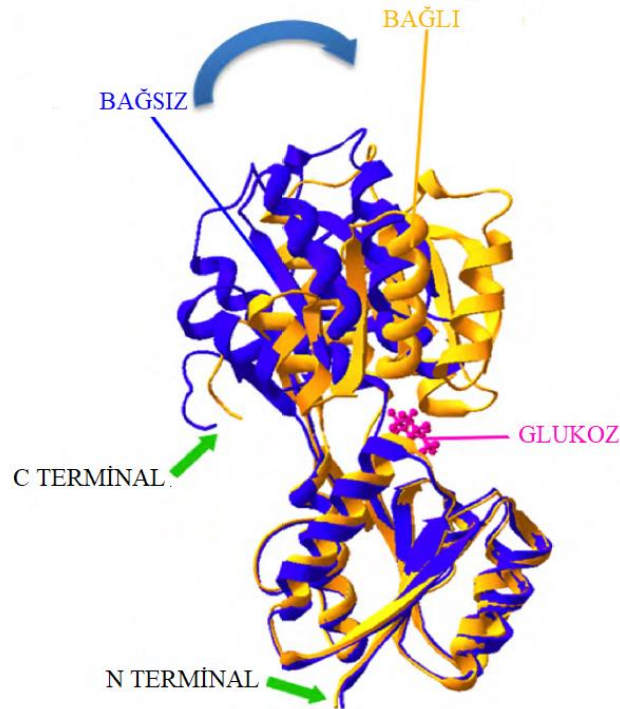
$$\%KC = \frac{PBo - PBt}{PBo} \times 100$$

$PB = \frac{Amavi}{Amavi + Akirmizi}$ A ise mavi renkteki çözeltinin (640 nm) ve kırmızı renkteki çözeltinin (550 nm) UV-Vis spektrumundaki absorbans değeridir (Oommen et al., 2017).

2.7. Konkanavalin A

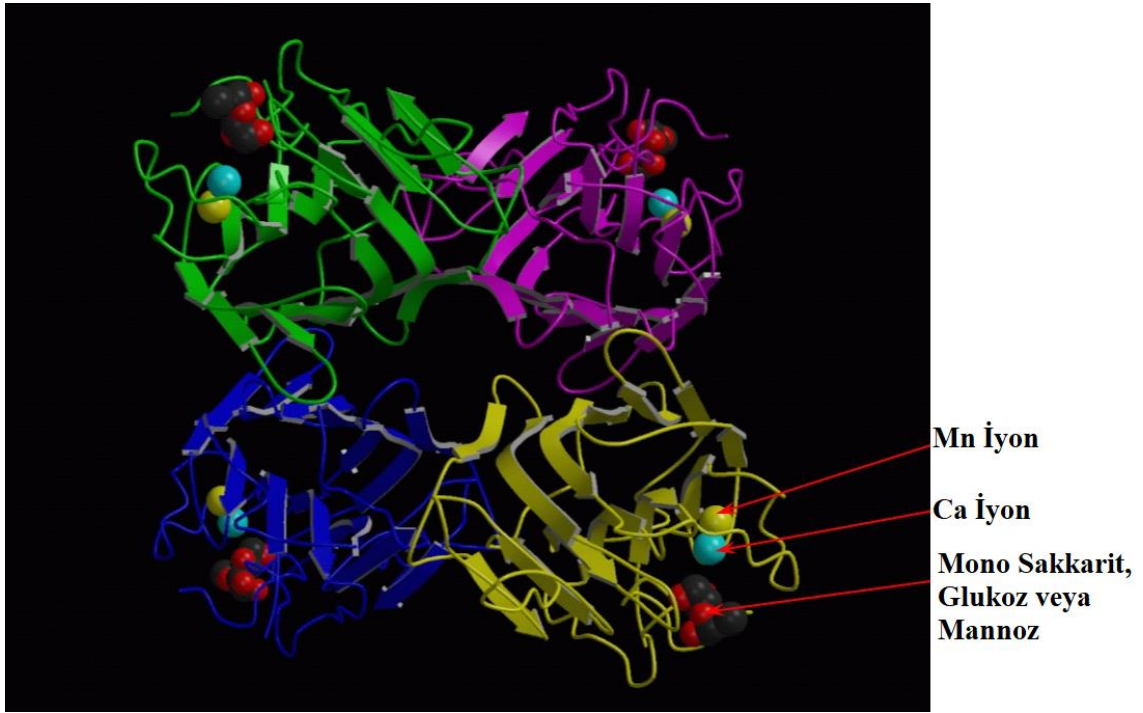
Konkanavalin A (Kon A), kabuklu fasulye “*Canavalia ensiformis*”ten ekstrakte edilmiş bir lektindir (karbonhidrat bağlayıcı protein). Baklagil, lektin ailesinin bir üyesidir. Bu küresel lektin çok sayıda ilginç özelliklere sahiptir. Örneğin Kon A, birçok polisakkarit ve glikoprotein ile çözünmeyen kompleksler oluşturur. Kon A'nın bu çöktürme reaksiyonu birçok dekstran, lipopolisakkarit ve diğer karbonhidrat içeren maddeleri tayin etmek için kullanılmaktadır (Nathan Back et al., 1974).

Özellikle çeşitli şekerler, glikoproteinler ve glikolipidlerde, temel olarak iç ve indirgeyici olmayan terminal α -D-mannosil ve α -D-glukosil gruplarında bulunan bazı yapılara bağlanmaktadır. Sakkarit bağlama bölgesinin geometrisi; sırasıyla manganese ve kalsiyum metal iyonları ile stabilize edilmiş prolin olmayan cis-peptit bağına dayanmaktadır. Örneğin; bu bağlanmalardan glukoz için olanı şekil 2.13’ de görülebilir.



Şekil 2.13. Glukoz bağlayıcı protein Konkanavalin A'nın kristal yapısı. Glukoz bağlama cebiyle birlikte hem glukozla bağlı hem de bağlanmamış durumları göstermektedir (Siegrist et al., 2010).

Çoğu lektin gibi, Kon A da bir homotetramer olup; her bir alt ünite (26.5 KDa, 235 amino asit, yoğun olarak glikatlı) genellikle Mn^{2+} ve Ca^{2+} gibi metal atomlarını bağlamaktadır. Alt birimler ağırlıklı olarak, pH 6'nın altında dimerler ve yaklaşık pH 7'de tetramerleri oluşturmak için birleşmektedir. Her monomer bir Mn^{2+} iyonu, bir Ca^{2+} iyonu ve bir sakkarit molekülü bağlamakta olup (Şekil 2.14), ayrıca bu metallere sakkarit bağlama aktivitesi için gerek duyulmaktadır (Sumner ve Howell, 1936b; Kalb ve Levitski, 1968).



Şekil 2.14. Mn^{2+} ve Ca^{2+} iyonları ile sakkarit moleküllerinin Konkanavalin A'ya bağlanması(<https://crystallography365.wordpress.com/2014/10/13/celebrating-laue-comprehensive-protein-structures/>).

Kon A kristallerinin yüksek derişimlerde inhibitör şekerlerle etkileşmesi, kristallerin dağılması veya kırınım paterninin kaybolması ile sonuçlanmaktadır. Bu etki sakkarit bağlanmasına bağlı konformasyonel bir değişiklik ile ilişkilendirilmektedir (Nathan Back et al., 1974) (Zhu, Tong, & Gao, 2011).

2.8. Amaç

Gıda ürünlerinde ve gıda ürünü öncülerinde glukozun belirlenebileceği sayısız analitik analiz vardır. 18. yüzyılın ortalarında, kandaki ve idrardaki indirgeyici şekerleri spesifik olarak tespit edemeyen ilkel kolorimetrik analizler tasarlanmıştır. Karbonhidrat

kimyasının teknolojisi ve bilgisi ilerledikçe, monosakkaritlerin ya da tek başına glukozun seçilmesi için spesifik olan yeni yöntemler oluşturulmuştur.

Günümüzde, çeşitli gıda matrislerinde glukozun saptanması ve ölçülmesi için çeşitli açık yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler iki ana kategoriye ayrılabilir: 1-) Enzimatik yaklaşımlar; hem spektrofotometrik analizleri hem de glukoz ölçümlerini kapsar; 2-) HPLC sistemleri ve bunlarla ilişkili detektörler gibi enzimatik olmayan enstrümantasyon (Galant, Kaufman, & Wilson, 2015). Bu çalışmada, enzimatik glukoz tespit sistemleri hakkında genel bir bakış sunmakta ve bunların göreceli olarak güçlü ve zayıf yönlerini tartışmaktayız.

Enzim, hem tıbbi hem de çevresel uygulamalarda hedef belirleme/izleme ihtiyacından dolayı sensör biyo-tanımlama elemanı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu aşamada; çalışmanın amacı; kolayca Kon A ile konjuge edilebilen PCDA türevi sentezleyip d-glukoz hedefli renk değiştiren lipozomal biyosensör oluşturmaktır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak, reaktif açılme ajanları ve antikörlerin amin gruplarıyla girdiği reaksiyon sonucu antikör-PDA konjugatı oluşturmak için Pentakosadiynoyik asit/N-Hidroksisüksinimid esteri sentezlenerek renk değiştiren PDA lipozomal sistem geliştirmek hedeflenmiştir.

Bunun için: lipozomal çift tabakayı oluşturmak amacıyla katyonik ve amfifilik bir fosfolipid olan 2-Metakriloiloksietil fosforilkolin (MPC) kullanılarak belli oranlarda PCDA-NHS/PCDA/MPC içeren lipozom sentezi yapılmış ve karbonhidrat bağlayıcı bir lektin olan Kon A lipozom yüzeyine konjuge edilmiştir.

Son olarak amacımız, mavi renkteki sensör çözeltisine d-glukoz eklendiği zaman, Kon A'nın büyük bir konformasyon değişikliğine uğraması ve bu konformasyonel değişimin algılayıcı olan kromatik polimer omurgasına bağlanarak maviden kırmızıya geri dönüşü olmayan renk değişimini gerçekleştirecek mekanik tahrik kuvvetini verimli şekilde sağlamasıdır.

3. MATERYAL

3.1. Kimyasallar

Deneysel süreçte kullanılan kimyasallar Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. *Kullanılan kimyasallar*

Kimyasalın Adı	Firma, Ülke
Diklorometan, CH ₂ Cl ₂	Sigma Aldrich, Amerika
Etil Asetat, CH ₃ COOCH ₂ CH ₃	Sigma Aldrich, Amerika
Etanol, C ₂ H ₆ O	Riedel-deHaen
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür, EDC	Fluka, İsviçre
Kloroform, CHCl ₃	Carlo Erba,
Hexane, C ₆ H ₁₄	Sigma Aldrich, Amerika
N-Hidroksisüksinimid	Acros Organics, Amerika
2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine	Sigma Aldrich, Amerika
Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich, Amerika
Concanavalin A	Sigma aldrich, Amerika
10,12-Pentacosadiynoic Acid, C ₂₅ H ₄₂ O ₂ , (PCDA)	Sigma Aldrich, Amerika
Mangan Klorür (MnCl ₂)	Sigma Aldrich, Amerika
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	Sigma Aldrich, Amerika

3.2. Çözeltiler ve Tamponlar

Deneysel süreçte kullanılan çözeltiler ve tamponlar Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. *Kullanılan çözeltiler ve tamponlar*

Çözelti ve Tamponlar	Hazırlanışı
PCDA-NHS Çözeltisi	0,47 mg PCDA-NHS, 10 mL Kloroform.
5mM HEPES Tamponu, pH 8	0,119 g HEPES, pH 8’e ayarlanır, H ₂ O (100 mL’ye tamamlanır).
0.15 M NaCl	109,5 mg NaCl, H ₂ O (12,5 mL’ye tamamlanır).
5M NaOH	2 g NaOH, H ₂ O (10 mL’ye tamamlanır).
%2 (w/v) NaOH	2 g NaOH, H ₂ O (100 mL’ye tamamlanır).
1 mM MnCl ₂	12,58 mg MnCl ₂ pH 8 HEPES tamponu(100 mL)
1 mM CaCl ₂	12,58 mg CaCl ₂ pH 8 HEPES tamponu(100 mL)

3.3. Cihazlar ve Laboratuvar Sarf Malzemeleri

Deneyisel süreçte kullanılan cihazlar ve laboratuvar sarf malzemeleri Tablo 3.3’de verilmiştir.

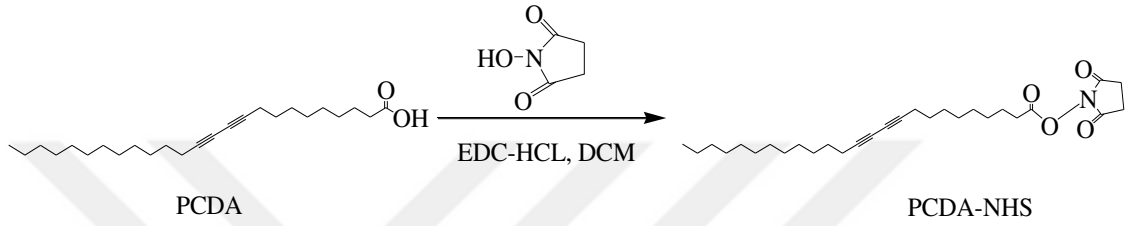
Tablo 3.3. *Kullanılan cihazlar ve laboratuvar sarf malzemeleri*

Cihazlar ve Sarf Malzemeleri	Firma, Ülke
+4 Buzdolabı	Liebherr, Medline, Almanya
-20 Buzdolabı	Liebherr, Medline, Almanya
Büyük Santrifüj	Sigma, Amerika
Çalkalayıcı	Thermo, Amerika
Döner Buharlaştırıcı (R-300)	Büchi Rotavapor, İsviçre
ELISA Okuyucu	BioTek Synergy H1, Amerika
Etüv	Innovens, Jouan, Amerika
FT-IR Spektrofotometri (Spectrum 100)	PerkinElmer
Hassas Terazı	Ohaus, Pioneer, Amerika
Küçük Santrifüj	Hettich, Almanya
Liyofilizatör	Labconco, Freezone, Amerika
Manyetik Karıştırıcı	Jeio Tech, Lab Companion, Amerika
Mikropipet Uçları	Isolab, Almanya
pH Metre (H1 2211 pH/ORP)	Hanna, Amerika
Pipetör	Brand, Transferpette, Almanya
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	Zeiss Ultra Plus, Almanya
Ultrasonik Prob Sonikatör	Bandelin Sonopuls HD 2070, Almanya
Ultrasonik Su Banyosu	Lab Companion, Amerika
Vorteks	Stuart, İngiltere
Nükleer Manyetik Rezonans spektroskopisi	Agilent-NMR-vnmrs-400F
Zetametre	Malvern, İngiltere
Silica Gel on TLC-Pet Foils	Fluka, İsviçre
Ultra Viyole Lamba	San Gabriel, Amerika

4. YÖNTEM VE UYGULAMA

4.1. PCDA-NHS Sentezi

1,72 mg NHS ve 2,65 μ L EDC, 3,745 mg PCDA içeren diklorometan çözeltisine oda sıcaklığında eklenmiştir (Şekil 4.1). Çözelti, oda sıcaklığında karıştırılmış ve çözücü vakum altında uzaklaştırılmıştır. Kalan tortu etil asetat ve su ile ekstrakte edilerek (Görsel 4.1) elde edilen beyaz PCDA-NHS, çözücüsü uçurulduktan sonra -20 °C’ de saklanmıştır (Jung, Kim, Park, & Soh, 2010) (Yun, Jeong, Cho, & Jung, 2015).



Şekil 4.1. PCDA-NHS sentezi (Guk, Hwang, Choi, & Kang, 2017).



Görsel 4.1. Etil asetat ile kestrakte edilen PCDA/NHS/EDC karışımının su ile yıkanması.

4.2. PCDA-NHS Lipozom Hazırlanışı

PCDA-NHS lipozom hazırlanması için öncelikle, sırasıyla 10/50/40 mol oranlarında PCDA-NHS, PCDA ve MPC kloroformda çözülmüş ve lipid film kaplanmıştır. Kaplanan ince film gece boyunca vakumda bekletilmiştir. Son molarite 1 mM olacak şekilde HEPES tamponu eklenerek çözelti 80 °C'ye ısıtılmış ve sıcak çözelti probe sonikatör ile sonike edilmiştir. Ardından, ılık çözelti 0,45 µm'lik selüloz asetat şırınga filtreden süzülerek gece boyunca +4 °C'de bekletilmiştir (Jeong et al., 2017) (Yun et al., 2015).

4.3. PCDA-NHS Lipozoma Konkanavalin A Konjugasyonu

Hazırlanmış olan 1 mM'lık lipozom çözeltisinden 1 mL alınmış ve bu çözeltiye 1 µgmL⁻¹ olacak şekilde Kon A eklenerek +4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında, bağlanmayan proteinleri uzaklaştırmak için santrifüj yapılmıştır. Reaksiyon ortamında bağlanmadan kalan serbest NHS'lerin bloke edilmesi amacıyla ortama BSA eklenerek 1 saat boyunca inkübasyona devam edilmiştir. Bağlanmayan BSA'lar da tekrardan santrifüjle ortamdan uzaklaştırılmıştır. Son olarak, çözelti 254 nm UV ışınlarıyla polimerleştirilerek mavi çözelti elde edilmiştir (Jeong et al., 2017).

4.4. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom İle Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu

Yüzey modifikasyonu yapılan mavi renkli lipozom çözeltisinden 1 mL alınarak, içerisine 1 mM Ca²⁺ ve Mn²⁺ iyonları eklenip çözelti ortamına 150 µgmL⁻¹ glukoz eklenmiştir. +4 °C'de 4 saatlik inkübasyon sürecinden sonra çözelti kırmızıya dönmüştür (Görsel 4.2) (Kang et al., 2012) (Yun et al., 2015).



(A)



(B)



(C)

Görsel 4.2. Konkavalin A konjuge edilmiş PCDA-NHS lipozom çözeltisinin UV maruziyeti öncesindeki hali (A), UV maruziyeti sonrasındaki hal (B) ve yüzey modifikasyonu yapıp polimerleştirilen lipozom çözeltisine glukoz eklendikten sonraki hali (C).

4.5. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom İle Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu: Kolorimetrik Cevap

Glukoz deteksiyonu sırasında KC değeri aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanarak zamana karşı kinetik çalışması yapılmıştır.

$$\%KC = \frac{PBo - PB_1}{PBo} \times 100 \quad (4.1)$$

4.6. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom İle Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu: UV Spektroskopisi

Hazırlanmış olan Kon A-PCDA-NHS lipozom konjugatından 1 mL alınarak; konjugattan 200'er µL ELISA ölçüm tabakası kuyucuklarına alınmıştır. Daha sonra son miktarı sırasıyla: 6, 12, 18, 24, 30 ppm olacak şekilde glukoz eklenmiştir. Belli miktarlarda glukoz eklendikten sonra; ölçüm tabakası 5 dakika boyunca dairesel olarak çalkalanıp inkübe edilmiş ve ELISA ölçer ile UV absorpsiyon ölçümleri alınmıştır.

4.7. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom İle Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu: Varyasyon Katsayısı, Deteksiyon Sınırı (LOD) ve Nicelik Sınırı (LOQ)

Kolorimetrik glukoz deteksiyonu sonrasında, elde edilmiş olan UV absorpsiyon değerleri kullanılarak hazırlanmış olan kalibrasyon grafiğinden yola çıkılarak ve aşağıdaki formüller kullanılarak glukoz varyasyon katsayısı (CV), deteksiyon sınırı (LOD), ve nicelik sınırı (LOQ) tespit edilmiştir (<https://www.inorganicventures.com/accuracy-precision-mean-and-standard-deviation>).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \mu)^2}{n-1}} \quad (4.2)$$

$$CV = \frac{\text{Standart sapma}}{\text{Ortalama}} \times 100 \quad (4.3)$$

$$LOD = 3.3 \times \text{Regresyon çizgisinin standart sapması} / \text{Eğim} \quad (4.4)$$

$$LOQ = 10 \times \text{Regresyon çizgisinin standart sapması} / \text{Eğim} \quad (4.5)$$

5. BULGULAR

5.1. PCDA-NHS

Sentezlenmiş olan PCDA-NHS için, ince tabaka kromatografisi (İTK) ^{13}C nükleer manyetik rezonans (NMR), ^1H nükleer manyetik rezonans (NMR) ve Fourier Transform infrared spektroskopisi (FT-IR) analizleri yapılarak sentezlenmiş olan malzemenin moleküler yapısı ile saflık oranı incelenerek sentez reaksiyonunun % verim değeri hesaplanmış ve % 71 olarak bulunmuştur (Formül 6).

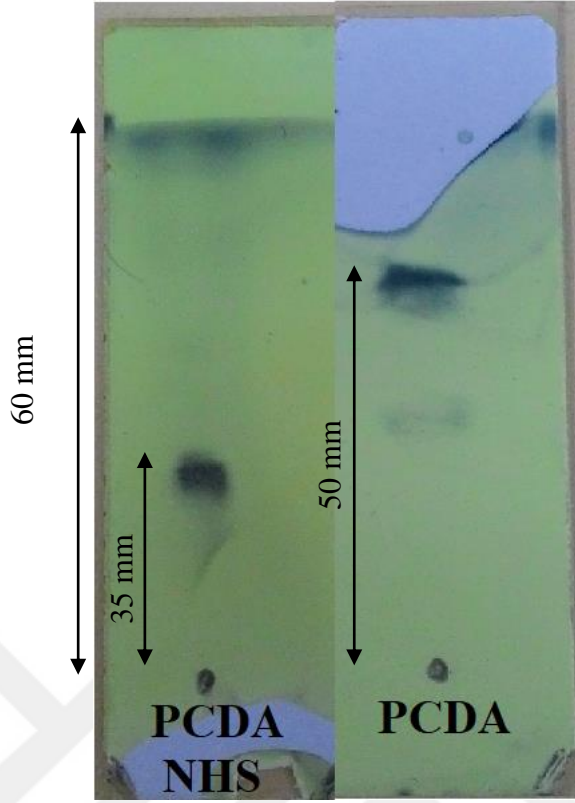
$$\%Verim = \frac{3,46 \text{ mg}}{4,88 \text{ mg}} \times 100 = 71\% \quad (5.1)$$

5.1.1. İTK analizi

PCDA-NHS molekülü sentezi sonunda reaksiyonun tamamlanıp tamamlanmadığını ve kirlilikler olup olmadığını tayin etmek adına sentezin ana maddesi olan PCDA ve sentezlenmiş olan PCDA-NHS; etil asetat/hekzan (1:2) çözücüsü kullanılarak İTK analizi yapılmıştır. PCDA-NHS ile PCDA'nın İTK'deki alıkonma faktör değerleri (R_f) aşağıdaki gibi hesaplanarak (Formül 7) yapılan karşılaştırmalar sonucunda sentezin başarılı olduğu tespit edilmiştir (Görsel 5.1).

$$R_f = \frac{\text{Analitin aldığı yol}}{\text{Çözücünün aldığı yol}} \quad (5.2)$$

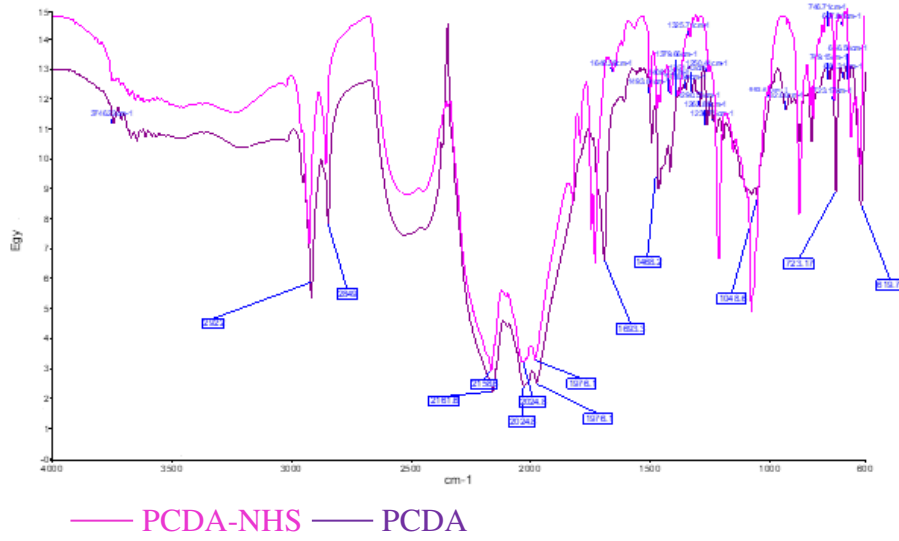
- $R_f(\text{PCDA}) = 50/60 = 0,83$
- $R_f(\text{PCDA-NHS}) = 35/60 = 0,58$



Görsel 5.1. PCDA-NHS ve PCDA'ya ait ince tabaka kromatografisi: $R_f(PCDA)=50/60=0,83$ ve $R_f(PCDA-NHS)=35/60=0,58$.

5.1.2. FT-IR analizi

Sentezlenen PCDA-NHS molekülünün fonksiyonel gruplarını inceleyip karakterize etmek ve ticari PCDA ile farklılıklarını karşılaştırmak amacıyla Fourier transform infrared spektroskopisi analizi incelenmiştir (Şekil 5.1). PCDA'ya ait $1693,3\text{ cm}^{-1}$ frekansında gözlemlenen karakteristik (-COOH) piki yerini (-COO-) pikine bırakmıştır. Ayrıca, Şekil 5.1'deki $1250-1020\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında gözlemlenmiş olan pikler (C-N) grubu gerilme titreşimlerine ait olmaktadır. Analiz sonuçları incelenip karşılaştırıldığında PCDA-NHS sentezinin başarıyla gerçekleştiği görülmüştür.



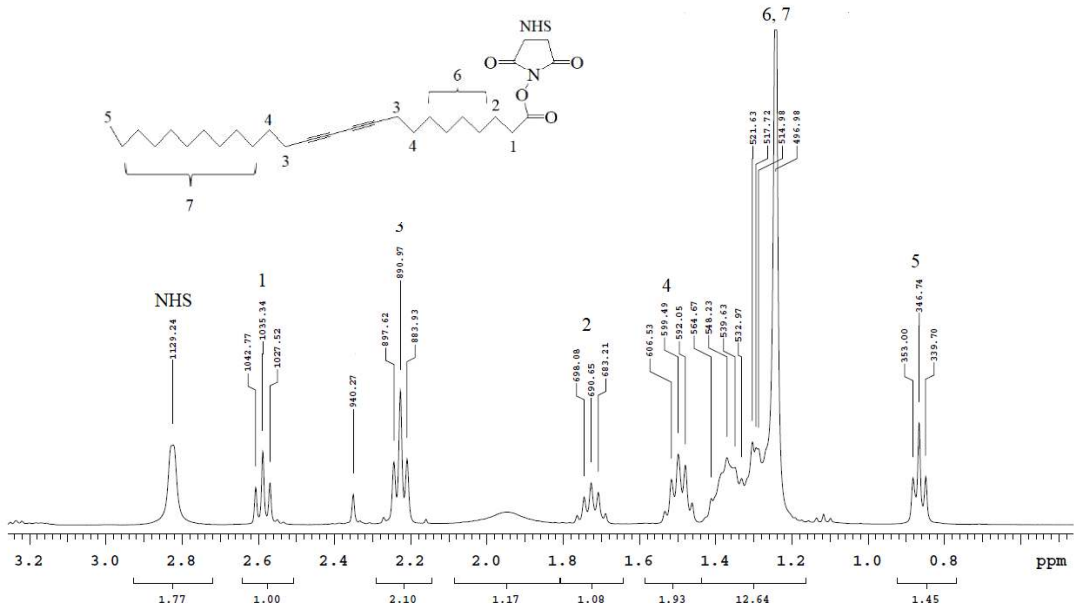
Şekil 5.1. Sentezlenen PCDA-NHS ve PCDA'nın FT-IR spektrum karşılaştırması.

5.1.3. ^{13}C NMR ^1H NMR analizleri

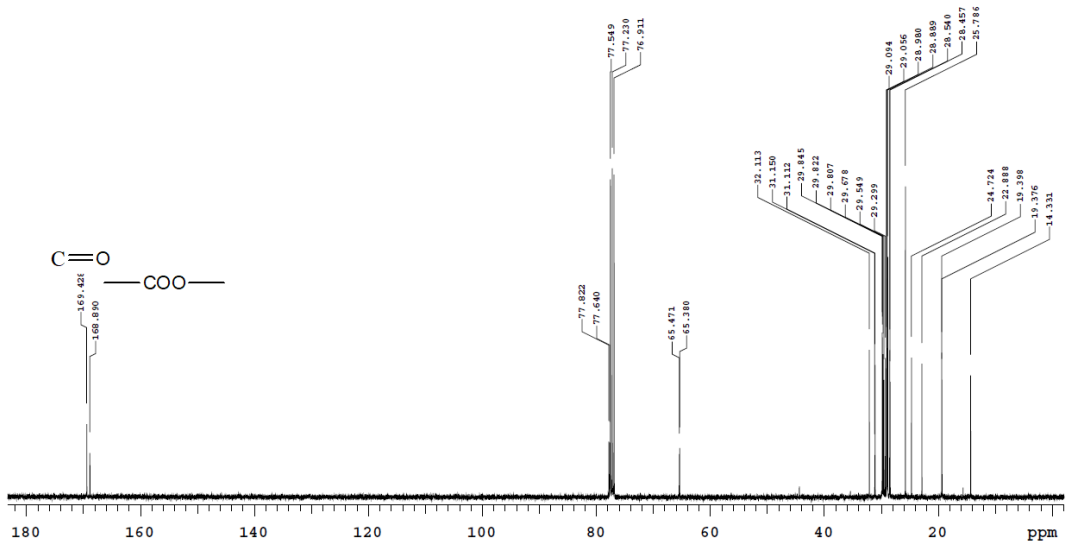
Sentezlenmiş olan PCDA-NHS için Şekil 5.2 ve 5.3'de de görüldüğü gibi ^{13}C ve ^1H NMR ölçümleri alınmıştır.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 2.8 (s, 4H, NHS), δ 2.6 (t, j = 7.43, 2H, 1), δ 2.2 (t, j = 7.05, 4H, 3), δ 1.65 (br, j = 7.43, 2H, 2), δ 1.45 (br, j = 7.05, 4H, 4), δ 1.40-1.22 (br, j = 11.74, 26 H, 6,7), δ 0.85 (t, j = 7.05, 3H, 5). Burada s; tekli, t; üçlü, br; geniş pik yarılmalarını temsil etmektedir. PCDA-NHS için, 2.8 ppm bölgesinde merkezlenmiş ve PCDA'da bulunmayan pik gözlemlenmektedir. Bu pik, PCDA'nın modifikasyonu sonucunda N-hidroksi süksinimit kısmının $>\text{CH}_2$ rezonansını temsil etmektedir (Şekil 5.2).

^{13}C NMR spektrumu incelendiği zaman, 180 ppm'deki karboksilik asit pikinin tamamen kaybolduğu ve bu pikin yerini PCDA-NHS'e ait 170 ppm civarındaki keto ve ester gruplarını temsil eden piklerin aldığı açıkça görülmektedir (Şekil 5.3).



Şekil 5.2. PCDA-NHS için ^1H NMR spektrumu.



Şekil 5.3. PCDA-NHS için ^{13}C NMR spektrumu.

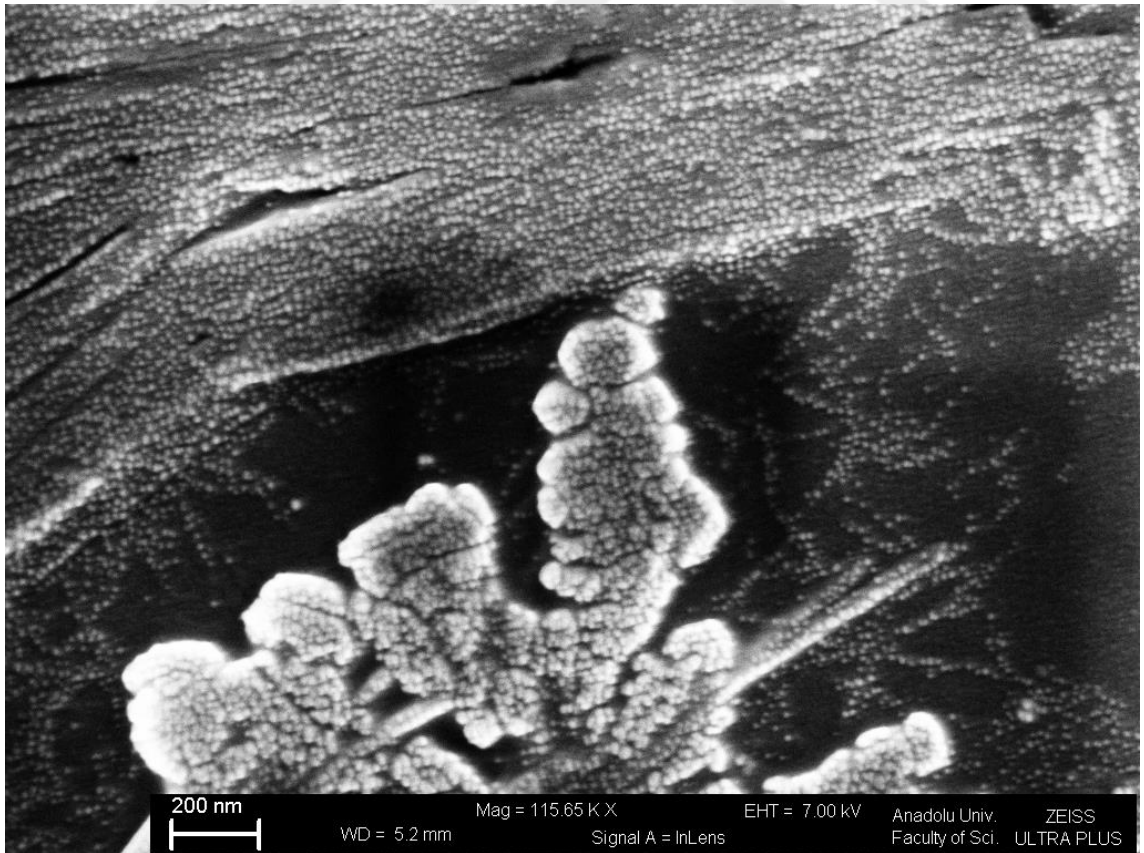
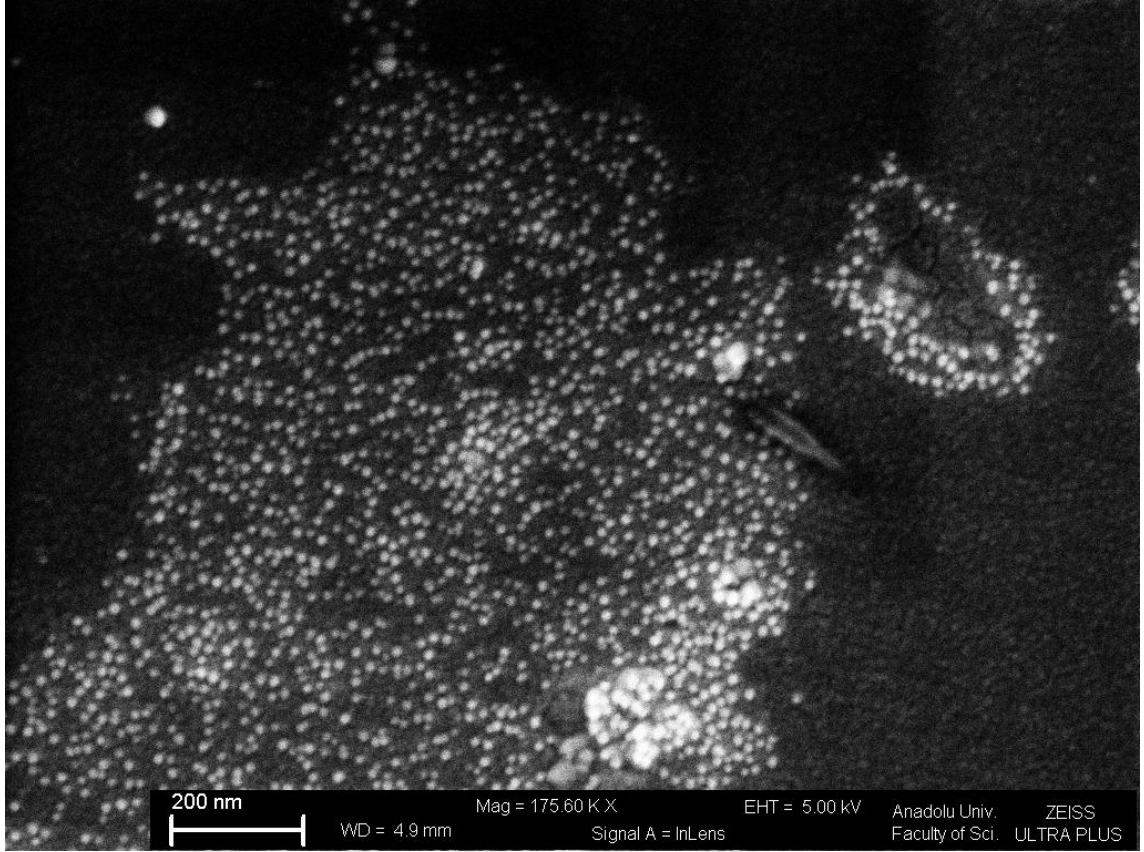
5.2. PCDA-NHS Lipozom

Sentezlenmiş olan PCDA-NHS lipozom için yüzey modifikasyonu öncesi zeta boyut ve zeta potansiyel analizleri yapıp, lipozomların yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) cihazı kullanılarak incelenmiştir (Şekil 5.4). Sentezlenen lipozomların ortalama boyutu 212,8 nm, polidispersiyon indeksi (PdI) değeri 0,178 (Şekil 5.5) ve zeta potansiyeli değeri -48 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 5.6). Polidispers

indeks değeri ne kadar artarsa çözeltinin homojenitesi o kadar azalmakta ve zeta potansiyel değeri sıfıra ne kadar yaklaşırsa lipozom çözeltisinin stabilitesi de doğru oranda azalarak agregasyon meydana gelmektedir. Sentezlenmiş olan Lipozom çözeltisinin, polidispers indeksinin düşük ve zeta potansiyelinin yüksek olması; kararlı ve homojen olduğunu göstermektedir.

Sentezlenmiş olan lipozomların konjugasyonu öncesi, yüzey morfolojisi incelenmiş olup (Şekil 5.4) 175.60 KX ve 115.65 KX büyütme uygulandığı zaman; tampon çözelti içerisinde homojen şekilde dağılmış yaklaşık 200 nm boyutundaki küresel lipozom gruplarının mevcut olduğu ve zeta boyut analiziyle örtüştüğü görülmüştür.





Şekil 5.4. PCDA-NHS lipozom SEM görüntüleri.

Sample Details

Sample Name: PCDA-NHS/PCDA/MPC LIPOZOM

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: derviss.dts	Dispersant Nam... Water
Record Number: 104	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,45	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbion: 0,001	Measurement Date and Time: 27 Mart 2018 Salı 18:08:...

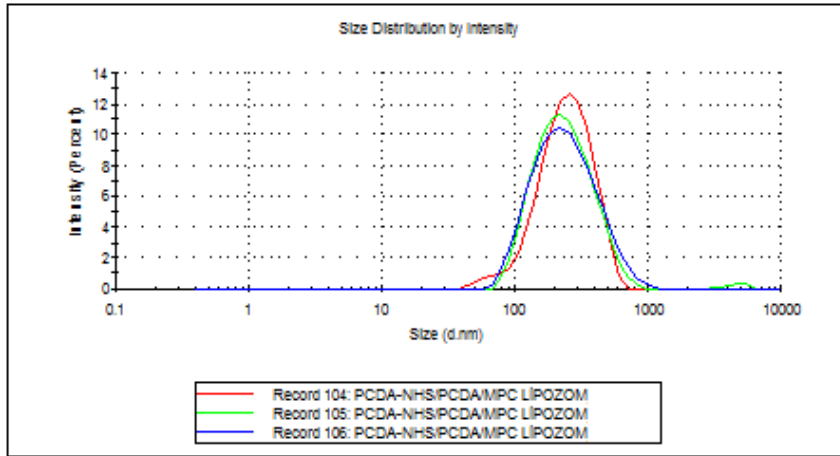
System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 40
Count Rate (kcps): 338,6	Measurement Position (mm): 5,50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 8

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 212,8	Peak 1: 259,5	100,0	112,6
Pdl: 0,178	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,931	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result Good



Şekil 5.5. Modifiye edilmemiş PCDA-NHS lipozom için boyut analizi.

Sample Details

Sample Name: PCDA-NHS/PCDA/MPC_LIPOZOM

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

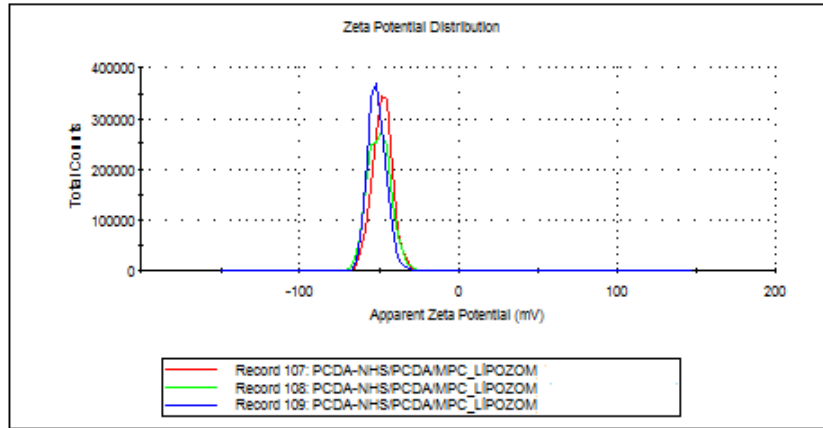
File Name: derviss.dts Dispersant Nam... Water
Record Number: 107 Dispersant RI: 1,330
Date and Time: 27 Mart 2018 Salı 18:14:38 Viscosity (cP): 0,8872
Dispersant Dielectric Const... 78,5

System

Temperature (°C): 25,0 Zeta Runs: 12
Count Rate (kcps): 245,3 Measurement Position (mm): 2,00
Cell Description: Clear disposable zeta ... Attenuator: 9

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -48,0	Peak 1: -48,0	100,0	6,08
Zeta Deviation (mV): 6,08	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,742	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result	Good		



Şekil 5.6. Modifiye edilmemiş PCDA-NHS lipozom için zeta potansiyeli analizi.

5.3. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom

Sentezlenen lipozomların yüzey modifikasyonu sonrasında ortalama boyutu 811,6 nm PdI değeri 0,415 olarak ölçülmüştür (Şekil 5.7). Sentezlenmiş olan PCDA-NHS lipozom için Kon A ile yüzey modifikasyonu sonrası zeta boyut analizleri yapılmıştır (Şekil 5.8). Ortalama boyutun lipozom ve Kon A boyutunun üzerine çıkmasıyla konjugasyon işleminin başarılı olduğu ve PdI değerinin artmasıyla da ortamda konjuge olmadan kalan lipozomlar ile Kon A'nın fazlası olduğu görülmüştür.

Sample Details

Sample Name: PCDA-NHS Lipozom_Concavalin A

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: derviss.dts	Dispersant Nam... Water
Record Number: 138	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,45	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbion: 0,001	Measurement Date and Time: 23 Mayıs 2018 Çarşamb...

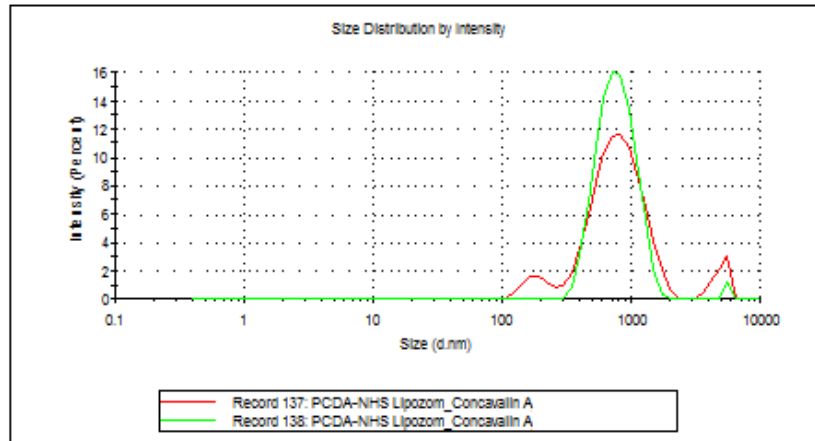
System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 437,0	Measurement Position (mm): 5,50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 10

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 811,6	Peak 1: 791,1	98,7	260,2
Pdl: 0,415	Peak 2: 5560	1,3	0,000
Intercept: 0,849	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result Good



Şekil 5.7. PCDA-NHS lipozoma Konkanavalin A konjugasyonu sonrası için zeta boyut analizi.

Sample Details

Sample Name: PCDA-NHS/PCDA/MPC LIPOZOM

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: derviss.dts	Dispersant Nam... Water
Record Number: 105	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,45	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbion: 0,001	Measurement Date and Time: 27 Mart 2018 Salı 18:10:...

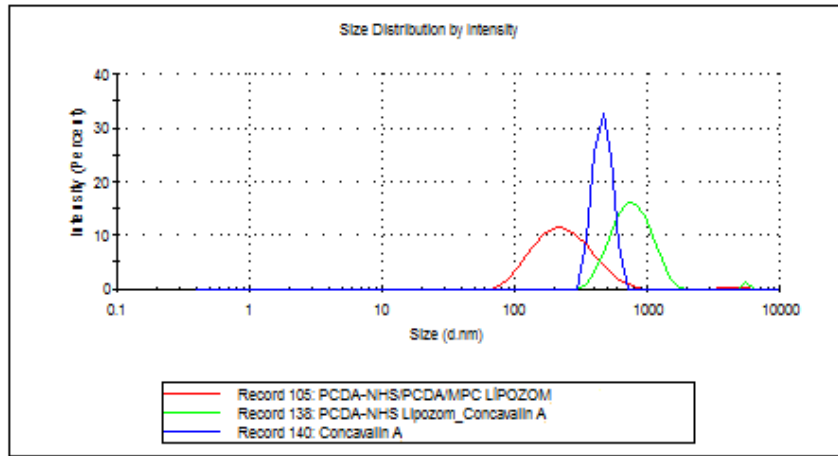
System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 40
Count Rate (kcps): 339,4	Measurement Position (mm): 5,50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 8

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 210,6	Peak 1: 255,8	98,9	127,8
Pdl: 0,195	Peak 2: 4648	1,1	806,7
Intercept: 0,899	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result **Good**

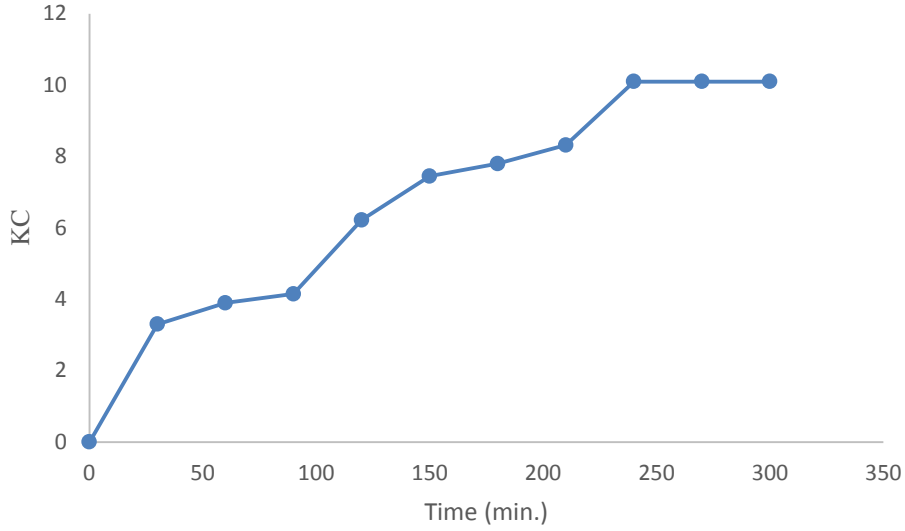


Şekil 5.8. PCDA-NHS lipozom (259,5 nm), PCDA-NHS lipozomun Kon A konjugasyonu sonrası (791,1 nm) ve Kon A (462,6 nm) için zeta boyut analizi.

5.4. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom ile Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu: Kolorimetrik Cevap

Glukoz deteksiyonu amacıyla sentezlenmiş olan Kon A konjuge edilmiş PCDA-NHS lipozom sisteminin, glukoz varlığında maviden kırmızıya kolorimetrik değişim derecesi (%KC); sisteme glukoz eklendikten sonra ELISA ölçer ile kinematik absorbans ölçümleri yapıp Formül 1 kullanılarak zamana karşı %KC değerleri saptanmış ve

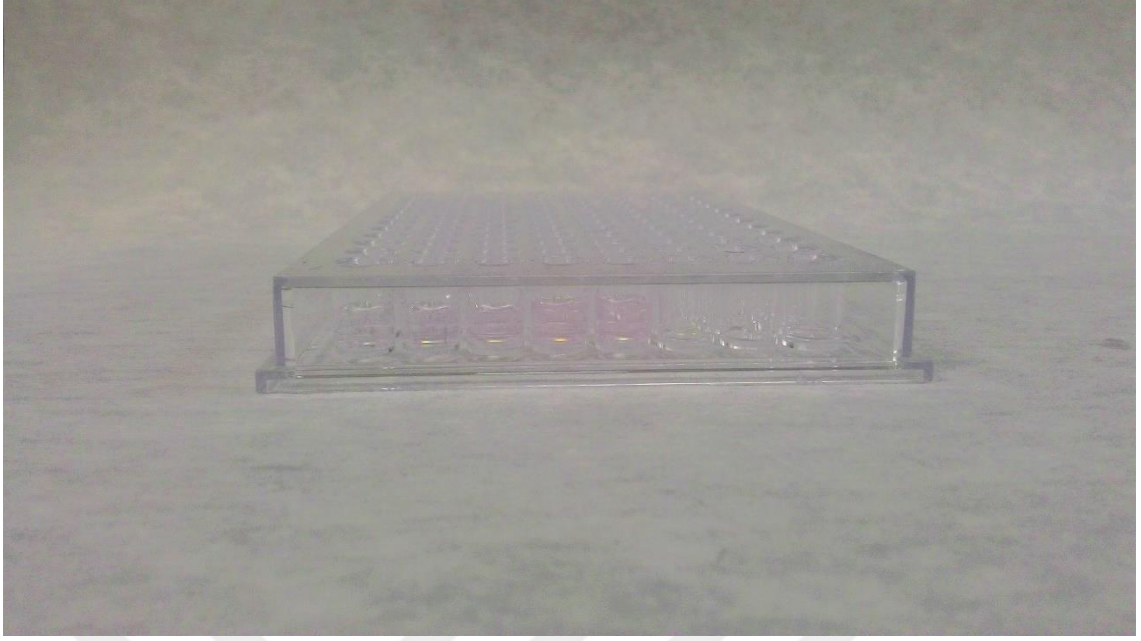
grafığe aktarılmıştır. %KC değerinin zamanla %10 değerine kadar gelmesi, glukoz deteksiyonunun başarılı olduğunu ve renk değişiminin çıplak gözle görülebilmesinin sebebini açıklamaktadır.



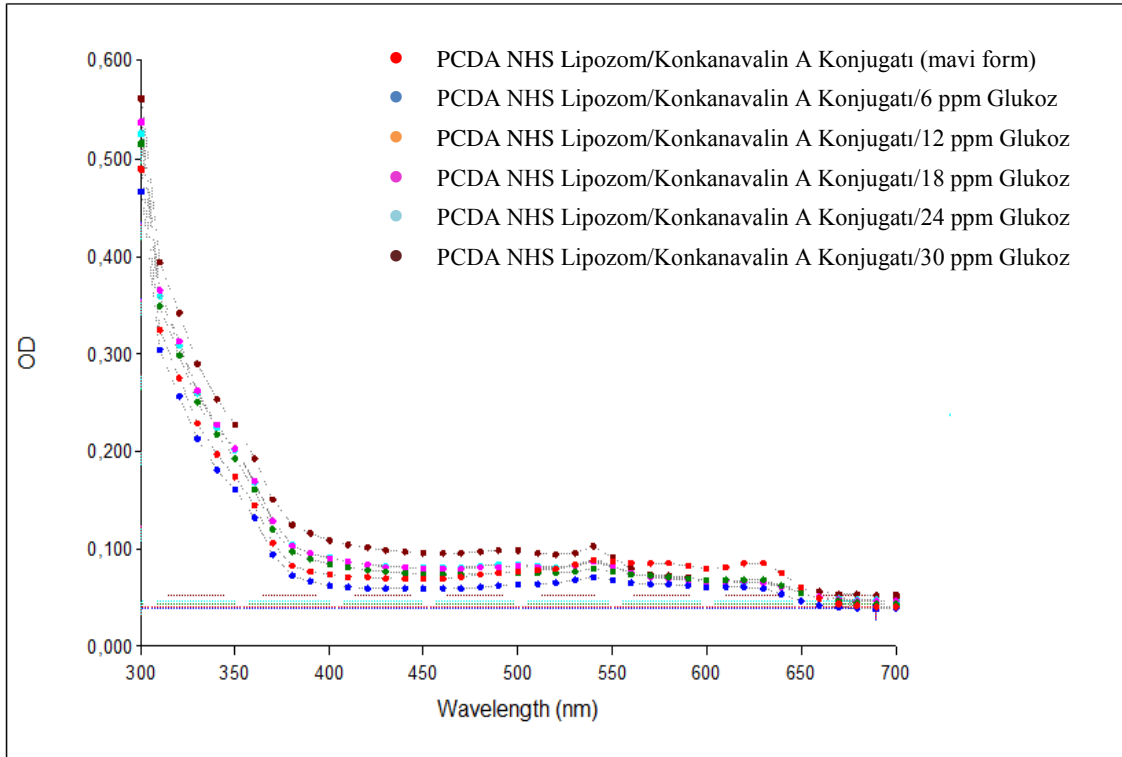
Şekil 5.9. %KC değerinin zamana karşı değişimi.

5.5. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom ile Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu: UV Absorpsiyon Spektroskopisi

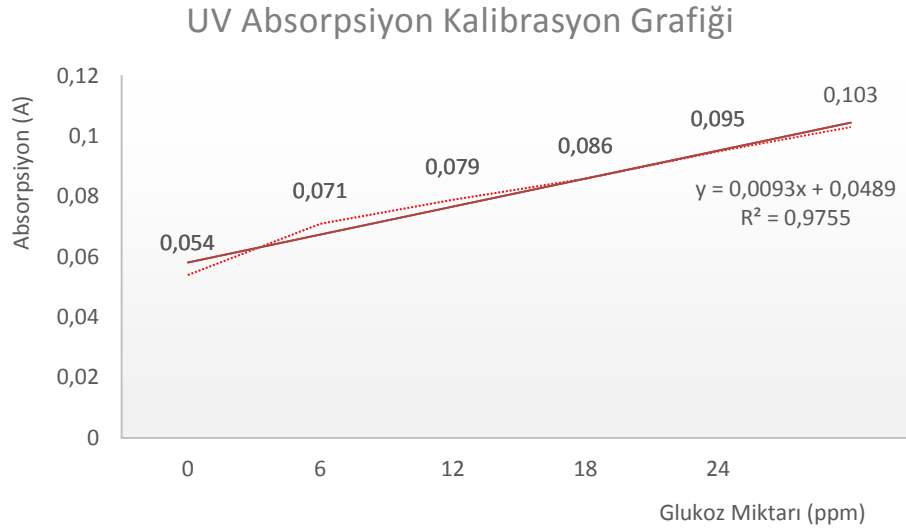
Konjugat ortamına son miktarı sırasıyla: 6, 12, 18, 24, 30 ppm olacak şekilde glukoz eklenerek ELISA ölçer ile alınan 550 nm dalga boyundaki UV-Vis absorpsiyon değerleri sırasıyla; 0,071, 0,079, 0,087, 0,095 ve 0,103 olarak bulunmuş (Şekil 5.10) ve kalibrasyon grafiğı (Şekil 5.11) oluşturulmuştur (Görsel 5.2). Absorbans değerleri ve kalibrasyon grafiğı incelendiğı zaman, glukoz miktarının artmasıyla beraber bağlanmanın da arttığı ve bunun sonucu olarak da Kon A konjuge edilmiş PCDA-NHS lipozomal sisteminin kırmızı forma geçişinin glukoz miktarıyla doğru orantılı olduğu saptanmıştır.



Görsel 5.2. PCDA NHS Lipozom/Konkanavalin A konjugatına sırasıyla 6, 12, 18, 24 ve 30 ppm glukoz çözeltisi eklenip inkübe edildikten sonra renk tonu farklılıklarının gösterimi.



Şekil 5.10. Artan glukoz miktarı ile pH 8 HEPES tamponu içindeki PCDA NHS lipozom/Konkanavalin A konjugatının UV absorpsiyon değişim grafiği.



Şekil 5.11. Artan miktarlarda glukoz eklenmesi ardından pH 8 HEPES tamponu içindeki PCDA NHS lipozom/Konkanavalin A konjugatına ait 550 nm dalga boyunda UV absorpsiyon değışimi kalibrasyon grafiği.

5.6. Konkanavalin A Konjuge Edilmiş PCDA-NHS Lipozom ile Kolorimetrik Glukoz Deteksiyonu: Varyasyon Katsayısı, Deteksiyon Sınırı (LOD) ve Nicelik Sınırı Tayini (LOQ)

Kolorimetrik glukoz deteksiyonu UV absorpsiyon spektroskopisi çalışmaları sonrasında yapılan hesaplamalar sonucunda; standart sapma değeri 0,005441, varyasyon katsayısı 6,69, glukoz deteksiyon sınırı değeri 1,930619 ppm ve nicelik sınırı 5,85 ppm olarak belirlenmiştir. Literatürde benzer bir çalışma olan XUE WangXin, ZHANG DeQing, ZHANG GuanXin ve ZHU DaoBen'in (Xue, Zhang, Zhang, & Zhu, 2011a) çalışmalarında, uzun alkil zincirli ve amino uç gruplu DA molekülünden amin terminalli PDA veziküler yapı oluşturulmuştur. Ortamdaki glukozun glukoz oksidaz enzimiyle glukonik asit oluşturması sonucu pH'ın değışmesiyle, veziküler sistemin pH'a karşı renk değıştirmesi ile glukoz deteksiyonu gerçekleştirilmiş olup, glukoz deteksiyon sınırı 0.08875 ppm olarak tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızdaki deteksiyon sınırı bu çalışmaya göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak; tez kapsamında geliştirilen sistem kolaylıkla modifiye edilebilir bir nano vezikül sistem içermekte olup bu yönüyle üstünlük taşımaktadır. Geliştirilen sistemimizde, lektin (Kon A) yerine enzim modifikasyonu yapıldığında hem deteksiyon sınırı düşürülebilir hem de spesiflik arttırılabilir. Bu da çalışmamızın değıştirilebilir ve geliştirilebilir olduğunu ve farklı biyosistemler geliştirmede önem arz ettiğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE YORUM

Günümüzde, metabolik süreçleri veya gıda sistemlerini tartışıyor olsak da, glukoz molekülü tüm bu süreçlerin temelini oluşturan ve anlaşılması önem kazanan bir konudur. Glukozun algılanması ve nicelendirilmesi, yüzyıllar boyunca incelenen ve diyabet araştırmaları adına pek çok önemli bulgunun ortaya çıkmasına sebep olmuş bir süreçtir. Diyabet, kan glukozunun non-invaziv/tahribatsız tespiti üzerinde durarak bu araştırma alanındaki çalışmaların sürdürülmesi gerekliliğinin tam bir kanıtı olmaktadır. Bu doğrultuda; yeni bir metodolojiyi test etmek, bilinen standart protokollere karşı sonuçları kontrol etmeyi gerektirmekte olup; bilim adamları, tartışılan mevcut enzimatik ve enzimatik olmayan metodolojileri kullanmayı ve geliştirmeyi amaçlamaktadırlar (Galant et al., 2015).

Bu çalışmada; kendinden birleştirilmiş konjuge polimerlerin (örn., PDA ve PDA bileşikleri) optik değişim mekanizmalarından faydalanılarak glukoz deteksiyonunu amaçlayan biyosensör tasarlanmıştır.

Hedef olarak, modifiye edilebilir ve non-toksik lipozomal bir nano yapı geliştirilmiştir. Bu doğrultuda çalışmanın ilk aşamasında, lipozomal nano yapının glukozu iyi tanıyan ligandlardan biri olan Kon A ile modifikasyonu için, PCDA yağ asidi, EDC varlığında NHS ile reaksiyona sokularak PCDA-NHS molekülü sentezlenmiştir. Sentez sonucu elde edilen PCDA-NHS molekülünün karakterizasyonu için İTK, NMR ve FT-IR spektrometreleri kullanılmıştır. Sentezlenen PCDA-NHS molekülünün sadece %29'luk gibi az bir kayıpla ve %71'lik bir verimle başarılı şekilde sentezlendiği görülmektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, sentezlenen PCDA-NHS, çift tabakalı lipozomal nanosistemini oluşturmak amacıyla PCDA ve MPC ile birlikte lipozom oluşturma sürecine tabii tutulmuştur. Spesifik hedefleme doğrultusunda kullanılacak olan lipozomal nano yapının sentezi gerçekleştirilmiş olup lipozom çift tabakasının boşluklarını doldurarak daha stabil bir yapı elde etmemizi sağlamak amacıyla PCDA yağ asidi ve çift tabaka oluşum verimini arttırmak amacıyla da fosfolipid olan MPC lipozom sentezinde yer almıştır. Sentez gerçekleştirilirken, lipit film hidratlama işlemi sırasında; su gibi sıcaklık azaldıkça ayrışması da azalan ve bu özelliğinden dolayı enzim yapısının korunarak düşük sıcaklıklarda işlev görmesi için daha etkili bir tamponlama

sağlaması amacıyla HEPES tamponu kullanılmıştır. Elde edilen PCDA-NHS lipozomun karakterizasyonunda boyut analizi ve zeta potansiyel ölçümü için zetametre ve oluşan lipozomların yüzey morfolojisini görüntülemek için SEM cihazı kullanılmıştır. Boyut analizleri sonucunda PCDA-NHS lipozom boyutu 259,5 nm olarak ölçülmüştür. Ölçümler sonucu elde edilen -48 mV değerindeki zeta potansiyeli lipozomların kararlı yani stabil bir yapıda olduklarını göstermektedir. Sentezden sonra her iki günde bir alınan ölçümlerde zeta potansiyeli değerleri -45, -39, -27, -24, -11 ve -7 olarak ölçülmüş ve ikinci hafta sonunda lipozom çözeltisinin fiziksel stabilitesini yitirerek çöktüğü gözlemlenmiştir. Yani, zeta potansiyeli değerlerinin sıfıra yaklaşması bu lipozomların raf ömrünün kısıtlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, sonikasyon süresinin uzamasıyla beraber nano yapı boyutunun küçüldüğü ancak aynı zamanda da nano yapının konformasyonel stabilizasyonun düştüğü zeta potansiyelindeki azalmayla gözlemlenmektedir. Bu nedenle, lipozomlar için her kullanım öncesinde zeta potansiyel ölçümü alınarak stabiliteleri ve bozulup bozulmadıkları kontrol edilmiştir.

Lipozomal yapı oluşturulduktan sonra glukoz bağlayıcı ajan olarak kullanılacak Kon A, inkübasyon yöntemiyle PCDA-NHS lipozomal nano yapının yüzeyine bağlanarak yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCDA-NHS lipozom-Kon A karakterizasyonu için zetametre boyut analizi yapılmış olup modifiye edilmiş lipozomların boyutu 791,1 nm olarak ölçülmüştür. Modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş lipozomlar arasındaki boyut farkı modifikasyonun başarılı olduğunu göstermektedir.

Çalışmanın son aşamasında; 254 nm'deki UV ışın ile polimerleştirilip mavi renk alan sensör çözeltisine glukoz eklenmesiyle mavi renkli çözeltinin geri dönüşü olmayacak şekilde kırmızıya döndüğü gözlemlenmiştir. Glukozun bağlanmasıyla, Kon A büyük bir konformasyon değişikliğine uğramış ve proteindeki bu büyük konformasyon değişiklikler sayesinde bağlı olduğu kromatik polimer omurgasının da konformasyonel değişimine sebep olmuştur. Kolorimetrik değişim, küçük bir molekülün enzim aktif alanına bağlanmasının neden olduğu enzim konformasyonel değişiklikleriyle uyarılmıştır (Cheng & Stevens, 1997). Glukozun, Kon A'ya bağlanmasından kaynaklanan konformasyonel değişimin, algılayıcının rengini değiştirmesine neden olan mekanik tahrik kuvvetini sağladığını göstermektedir. Dolayısıyla, değişikliğe uğramış ve 550 nm'de UV absorpsiyon veren kırmızı renkli

sensör çözeltisinde Kon A ve glukoz reaksiyonu sonucu zaman içinde oluşan kırmızı çökelmeler de Kon A ile glukoz arasındaki reaksiyonun başarılı olduğunu destekler niteliktedir. Ayrıca, Kon A bağlanması olmaksızın 10, 12-PCDA, MPC ve PCDA-NHS'ten yapılmış çift katmanlı lipozomal sensörler, glukozla maruz kalmanın ardından renk değişikliklerine maruz kalmamıştır. Daha sonra, glukozla maruz bırakılmamış mavi renkteki çözeltiye kıyasla her yarım saatte bir alınan absorbans değerleri kullanılarak kolorimetrik cevap kinetiği çalışılmış ve KC değerinin gözlenebilirlik sınırının çok az üstünde olduğu bulunmuştur. Bu da reaksiyona bağlı olarak renk değişikliğini göstermekte olup mavi renk azalarak kırmızı agregatlar gözlenmiştir. Son olarak, sentezlenmiş olan lipozomal sensör çözeltisine artan miktarlarda glukoz eklenmiş ve oluşan çökelmelerden dolayı her ölçüm öncesi orbital çalkalamadan faydalanılarak UV absorpsiyon ölçüm çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Mavi renkteki çözeltinin 650 nm'deki UV absorpsiyonunun kayb olduğu ve kırmızı formuna ait olan 550 nm dalga boyundaki UV absorpsiyonunun glukoz miktarıyla arttığı gözlemlenmiştir. Bu UV absorpsiyon spektroskopi çalışmasından yola çıkılarak elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak glukoz deteksiyon sınırı 1,930619 ppm (mgL^{-1}), nicelik sınırı 5,85 ppm (mgL^{-1}) ve varyasyon katsayısı 6,69 olarak belirlenmiştir.

Literatürde, glukoz deteksiyonu ile ilgili pek çok çalışma olup, bunlardan sunulan bu çalışma ile daha benzer olanı da Cheng, Q. ve Stevens R.C. nin çalışmasıdır. Çalışmalarında, PCDA-NHS sentezi gerçekleştirilerek mekanik stabilitenin yanısıra tekli tabakaların da sensör uygulamaları için renk yoğunluğu açısından uygunluğunu göstermiş olup, yüzey modifikasyonu işlemini glukozun aktif bölgesinden glukozla bağlanan hekzokinaz enzimini kullanarak gerçekleştirmişlerdir ve enzimin glukozu bağlaması sonucu renk dönüşümünü tetikleyecek olan konformasyonel değişim meydana gelmektedir (Cheng & Stevens, 1997). Başka bir çalışmada da; amin terminalli PDA olan PCDA-NHS'den yola çıkılarak amin terminalli veziküller sentezlenip bu veziküllerin pH'ya karşı renk değiştirme özelliğinden yararlanılmıştır. Ortamda, PCDA-NHS lipozom, glukoz ve glukoz oksidaz enzimi varken glukoz oksidazın glukozu glukonik aside yükseltgemesi sonucu ortamın pH'sı değişmekte ve çözeltinin rengi dönüşmektedir (Xue, Zhang, Zhang, & Zhu, 2011b). Mevcut bu çalışmalara ek olarak bizim çalışmamızda öncelikle çift katmanlı lipozom senteziyle beraber geliştirilecek çalışmalarda birden fazla malzemenin enkapsülasyonuna izin

vermesi ve MPC gibi bir fosfolipidin kullanılmasıyla biyoyumluluğun artırılması gibi avantajlara sahip olmasıyla gelecek çalışmalara zemin hazırlamaktadır.

Bu çalışmada sonuç olarak; glukoz deteksiyonu amacıyla 10,12-pentakosadiynoik asit ve N-hidroksi suksinimit-10, 12-pentakosadiynoik asitten polimerleştirilen yeni bir PDA biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Konjuge polimerlerin kolorimetrik olarak glukoz varlığında verdiği tepkiler yüksek başarı göstermiş olup tespit edilen deteksiyon sınırıyla da sentezlenen sensör çözeltisinin 1,930619 ppm (mgL^{-1}) gibi çok az glukoz miktarlarına bile hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir. Glukoz deteksiyonu için kullanılan geleneksel çoğu sisteme göre maliyet, hızlı ve doğru sonuç alma ile kolay kullanım açılarından üstünlük sağlayacak hücre membranını taklit edebilecek, biyoyumlu, toksik olmayan ve kolayca yüzey modifikasyonu yapılabilen lipozomal nano sistem başarıyla sentezlenmiştir. Bu çalışma, biyopolimerlere ve konjuge polimerlere dayalı kemosensing (kimyasal uyarının varlığına bir cevap oluşumu) materyallerinin geliştirilmesi için bir strateji sunmaktadır.

KAYNAKÇA

- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, **8(1)**, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Ortiz, B. (2013). Review Article LIPOSOME : METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. *Liposome Technology*, **6(II)**, **102**. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ali, J., Najeeb, J., Asim Ali, M., Farhan Aslam, M., & Raza, A. (2017). Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, **08(01)**, 1–9. <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000235>
- Chen, C., Wang, Q., & Chen, C. (2015). Liposome-based nanosensors for biological detection. *American Journal of Nano Research and Application*, **3(1–1)**, 13–17. <https://doi.org/10.11648/j.nano.s.2015030101.13>
- Chen, X., Zhou, G., & Yoon, J. (2012). *Biosensors and chemosensors based on the optical responses of polydiacetylenes*. <https://doi.org/10.1039/c2cs35055f>
- Chen, Y., Nie, X., Cui, X., Wu, W., Zhang, J., Wen, C., ... Lu, J. (2011). Direct colorimetric biosensors from polydiacetylenes. *Current Organic Chemistry*, **15(4)**, 518–533. <https://doi.org/10.2174/138527211794474438>
- Cheng, Q., & Stevens, R. C. (1997). Coupling of an induced fit enzyme to polydiacetylene thin films: Colorimetric detection of glucose. *Advanced Materials*, **9(6)**, 481–483. <https://doi.org/10.1002/adma.19970090605>
- Cottages, T. (1994). *Liposomes : From Physics to Applications by D . D . Lasic Biophysique Moleculaire : Structures en Mouvement by Michel Daune*. **67(September)**, 1358–1359.
- Edwards, K. A. (2016). *Liposomes in Analytical Methodologies*. <https://doi.org/10.4032/9789814669276>

- For, A., Positions, F., & Positions, O. A. (2014). *Pondicherry university*. 2–7.
- Galant, A. L., Kaufman, R. C., & Wilson, J. D. (2015). Glucose: Detection and analysis. *Food Chemistry*, 188, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.071>
- Guk, K., Hwang, S., Choi, J. M., & Kang, T. (2017). *Colorimetric detection of influenza A (H1N1) virus by a peptide- functionalized polydiacetylene (PEP-PDA) nanosensor*. 88, 2017.
- Jeong, J. pil, Cho, E., Yun, D., Kim, T., Lee, I. S., & Jung, S. (2017). Label-free colorimetric detection of influenza antigen based on an antibody-polydiacetylene conjugate and its coated polyvinylidene difluoride membrane. *Polymers*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/polym9040127>
- Joosub Lee¹, Minkyong Pyo¹, Sang-hwa Lee², Jaeyong Kim^{2, 3}, Moonsoo Ra⁴, Whoi-Yul Kim⁴, Bum Jun Park⁵, Chan Woo Lee³ & Jong-Man Kim^{1, 3}. (2014). Hydrochromic Conjugated Polymers for Human Sweat Pore Mapping Hydrochromic conjugated polymers for human sweat pore mapping. *Nature Communications*, 5(August 2015), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms4736>
- Jung, Y. K., Kim, T. W., Park, H. G., & Soh, H. T. (2010). Specific colorimetric detection of proteins using bidentate aptamer-conjugated polydiacetylene (PDA) liposomes. *Advanced Functional Materials*, 20(18), 3092–3097. <https://doi.org/10.1002/adfm.201001008>
- Kang, D. H., Jung, H. S., Lee, J., Seo, S., Kim, J., Kim, K., & Suh, K. Y. (2012). Design of polydiacetylene-phospholipid supramolecules for enhanced stability and sensitivity. *Langmuir*, 28(19), 7551–7556. <https://doi.org/10.1021/la300863d>
- Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K. (2015). Introduction to Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, (June), 1–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>
- Lee, Ji-seok. (2011). *Molecular design and self-assembly of polydiacetylene for biosensors and sensor arrays*. 1–174.
- Lee, Jiseok, Jun, H., & Kim, J. (2009). Polydiacetylene-liposome microarrays for selective and sensitive mercury(II) detection. *Advanced Materials*, 21(36), 3674–

3677. <https://doi.org/10.1002/adma.200900639>

Lee, Y. H., & Mutharasan, R. (1995). *Chapter 6*. 161–180.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-075067729-5/50046-X>

Liu, Q., & Boyd, B. J. (2013). Liposomes in biosensors. *The Analyst*, 138(2), 391–409.
<https://doi.org/10.1039/C2AN36140J>

Nathan Back, N. R. Di Luzio, Bernard Halpern, Ephraim Katchalski, David Kritchevsky, Abel Lajtha, R. P. (1974). Glasgow college. In *Provincial Medical and Surgical Journal* (Vol. 2).

Okada, S., Peng, S., Spevak, W., & Charych, D. (1998). Color and Chromism of Polydiacetylene Vesicles. *Accounts of Chemical Research*, 31(5), 229–239.
<https://doi.org/10.1021/ar970063v>

Oommen, E., Hummel, A., Allmannsberger, L., Cuthbertson, D., Carette, S., Pagnoux, C., ... Monach, P. A. (2017). Biomolecular sensing with colorimetric vesicles. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 35(1), 98–101.
<https://doi.org/10.1007/128>

Patil, Y. P., & Jadhav, S. (2014). Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, 8–18.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>

Pingsheng, H., Huilin, Z., & Gang, Z. (2003). Polymerization kinetics of 10,12-pentacosadiynoic acid monolayer and possible acceleration effect of visible light. *Polymer*, 44(11), 3235–3241. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(03\)00272-6](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(03)00272-6)

Pohanka, M. (2018). Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications. *Materials*, 11(3).
<https://doi.org/10.3390/ma11030448>

Schott, M. (2006). The colors of polydiacetylenes: A commentary. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(32), 15864–15868. <https://doi.org/10.1021/jp0638437>

Siegrist, J., Kazarian, T., Ensor, C., Joel, S., Madou, M., Wang, P., & Daunert, S. (2010). Continuous glucose sensor using novel genetically engineered binding

- polypeptides towards in vivo applications. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 149(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.06.031>
- Stein, H., Spindler, S., Bonakdar, N., Wang, C., & Sandoghdar, V. (2017). Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations. *Frontiers in Physiology*, 8(FEB), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00063>
- Turner, A. P. F. (2013). Biosensors - Sense and sensitivity. *Science*, 290(5495), 1315–1317. <https://doi.org/10.1126/science.290.5495.1315>
- Xue, W. X., Zhang, D. Q., Zhang, G. X., & Zhu, D. Ben. (2011a). Colorimetric detection of glucose and an assay for acetylcholinesterase with amine-terminated polydiacetylene vesicles. *Chinese Science Bulletin*, 56(18), 1877–1883. <https://doi.org/10.1007/s11434-011-4505-0>
- Xue, W. X., Zhang, D. Q., Zhang, G. X., & Zhu, D. Ben. (2011b). Colorimetric detection of glucose and an assay for acetylcholinesterase with amine-terminated polydiacetylene vesicles. *Chinese Science Bulletin*, 56(18), 1877–1883. <https://doi.org/10.1007/s11434-011-4505-0>
- Yoon, B., Lee, S., & Kim, J.-M. (2009). Recent conceptual and technological advances in polydiacetylene-based supramolecular chemosensors. *Chemical Society Reviews*, 38(7), 1958. <https://doi.org/10.1039/b819539k>
- Yun, D., Jeong, D., Cho, E., & Jung, S. (2015). Colorimetric detection of some highly hydrophobic flavonoids using polydiacetylene liposomes containing pentacosyl 10,12-diynoyl succinoglycan monomers. *PLoS ONE*, 10(11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143454>
- Zhu, Y., Tong, W., & Gao, C. (2011). Molecular-engineered polymeric microcapsules assembled from Concanavalin A and glycogen with specific responses to carbohydrates. *Soft Matter*, 7(12), 5805–5815. <https://doi.org/10.1039/c1sm05047h>
- <http://www.yourarticlelibrary.com/science/biosensors-types-and-general-features-of-biosensors/23331>
- <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/optical.html>

<http://www.integratedhealthblog.com/benefits-of-liposomal-nutrients-liposomes-2/>

<https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>

<https://crystallography365.wordpress.com/2014/10/13/celebrating-laue-comprehensive-protein-structures/>

<https://www.inorganicventures.com/accuracy-precision-mean-and-standard-deviation>



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Derviş Malatyalı

Yabancı Dil : İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı : Güzelyurt-Kuzey Kıbrıs/1993

E-Posta : d_malatyali@anadolu.edu.tr

dervismalatyali@gmail.com

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2019, Kluthe Duraner - kimyevi ürünler san. ve tic. a.ş./Laboratuvar sorumlusu ve ürün geliştirme elemanı
- 2019, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya, Kimya Anabilim Dalı
- 2017, Erasmus+ öğrenim, University of Palermo, Chemistry
- 2016, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya

Yayınları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri: