

T.C.
HASAN KALYONCU ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**GIDALARDAN BİYOSENSÖR TEKNOLOJİSİ İLE
FENİLALANİN ÖLÇÜMÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

Melike YILDIRIM

Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gaziantep

2022



LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS KABUL VE ONAY FORMU

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı **Beslenme ve Diyetetik** Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Melike YILDIRIM tarafından hazırlanan “Gıdalardan Biyosensör Teknolojisi ile Fenilalanin Ölçümünün Geliştirilmesi” başlıklı tez, **18/11/2020** tarihinde yapılan savunma sınavı sonucu **başarılı** bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Unvanı, Adı ve Soyadı	Kurumu/Üniversitesi	İmzası:
Tez Danışmanı	Prof.Dr. Mehmet Lütüfî YOLA	Beslenme ve Diyetetik Hasan Kalyoncu Üniversitesi	
Jüri Başkanı	Doç. Dr. Hacı Ahmet DEVECİ	Beslenme ve Diyetetik Gaziantep Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Dr. Öğretim Üyesi Mustafa Anıl ERBAĞCI	Beslenme ve Diyetetik Hasan Kalyoncu Üniversitesi	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. M.Serhat YENİCE
Enstitü Müdürü

T.C.

HASAN KALYONCU ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**GİDALARDAN BİYOSENSÖR TEKNOLOJİSİ İLE
FENİLALANIN ÖLÇÜMÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

MELİKE YILDIRIM

Hasan Kalyoncu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinin

Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı'nın

Yüksek Lisans Programı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet Lütfi YOLA

GAZİANTEP

2022

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans sürecimde, tez yazım aşamalarımnda desteğini esirgemeyen, bilgi, birikim ve deneyimlerini paylaşmaktan asla çekinmeyen, bilim dünyasına katkılarını hayranlıkla izlediğim ve araştırma ekibinde yer aldığım için gurur duyduğum değerli danışmanım Prof. Dr. Mehmet Lütfi YOLA' ya yoluma ışık tuttuğu için en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmamda desteğini ve deneyimlerini benden sakınmayan, fikir alışverişinde bulunduğum Sayın Doç. Dr. Ataman GÖNEL'e, her sorumu yanıtlayan, önerilerini eksik etmeyen Uzm. Kim. İlknur POLAT'a, değerli hocam aynı zamanda komite üyem Dr.Öğr. Üyesi Mustafa Anıl ERBAĞCI'ya ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmamda kullanılan kimyasalların temini konusundaki desteklerinden dolayı Hasan Kalyoncu Üniversitesi Yönetimi'ne teşekkür ederim.

Hep farklı bir çocuktum, büyüdüm farklı bir kadın oldum. Güçlü, kendinden emin, ayakları yere sapasağlam basan... Hayatta bana her zaman kendim olma fırsatı sunan, kararlarımın, hayallerimin en büyük destekçisi olan, beni hep bir gölge gibi kollayan, aramıza binlerce kilometre girse dahi daim yanı başımda hissettiren, kalkışmaya yeltendiğim tüm durumlarda bana inanan, her daim sığınabileceğim en nadide liman olan ailem sayesinde. Gördüğüm en özverili insan canım babam Halil YILDIRIM'a, tanıdığım en fedakar kadın canım annem Hatice YILDIRIM'a, bana yön gösteren yıldızım ablam Reyhan YILDIRIM'a ve abim Erhan YILDIRIM'a minnettarım.

Bir yandan akan zamanın, henüz 20'lerimin başında olmamın, profesyonel hayata atılmanın, bir yandan akademik hayatımı devam ettirmenin stresinde yer yer kaosunda bana hep konfor alanı sağlayan, "mola" verdiren, zihnimi hafifleten dostlarıma teşekkür ederim.

Tezimde en son yazmaya bıraktığım bu bölümü hüznle ama en çok da gururla kapatıyorum...

ÖZET

Melike YILDIRIM. Gıdalardan Biyosensör Teknolojisi ile Fenilalanin Ölçümünün Geliştirilmesi. Hasan Kalyoncu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep, 2022. Fenilketonüri (PKU), amino asit metabolizması bozukluğundan kaynaklı kritik bir hastalıktır ve çoğunlukla çocuklarda ortaya çıkar. Fenilketonüri tedavisinde kullanılan en yaygın yöntem, PKU'nun biyobelirteci olarak L-Fenilalaninin (PHEA) saptanmasıdır. Bu çalışmada, süt numunelerinde PHEA tahlili için N, B katkılı grafen temelli WS₂ nanoçiçeklere dayalı (WS₂ NFs/N,B-GR) yeni bir moleküler baskılı elektrokimyasal elektrot sunulmuştur. İlk olarak, N, B katkılı grafen temelli WS₂ nanoçiçekler, yüksek verimli hidrotermal sentez yoluyla sentezlendi. PHEA baskılı elektrokimyasal elektrotları oluşturmak için bir şablon molekül olarak PHEA ve bir monomer olarak pirol içeren elektrokimyasal hücreye döngüsel voltametri (CV) uygulandı. Daha sonra WS₂ nanoçiçekler ve WS₂ NFs/N,B-GR'nin yapısal ve morfolojik özellikleri çeşitli analitik yöntemlerle detaylı olarak araştırıldı. PHEA baskılı elektrokimyasal elektrot ile ölçüm limiti (LOQ) ve tespit limiti (LOD) değerleri sırasıyla 1.0×10^{-11} M ve 3.0×10^{-12} M olarak elde edildi. Son olarak, fenilketonürinin erken teşhisi için literatürde sunulan yüksek derecede seçicilik, stabilite ve yeniden kullanılabilirliğe sahip PHEA baskılı elektrokimyasal sensör elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Fenilketonüri; L-Fenilalanin; Elektrokimyasal baskı; WS₂ nanoçiçekler; nanokompozit

ABSTRACT

Melike YILDIRIM. Development of Phenylalanine Measurement from Foods with Biosensor Technology. Hasan Kalyoncu University Graduate Education Institute, Department of Nutrition and Dietetics, Master Thesis, Gaziantep, 2022.

Phenylketonuria (PKU) is a critical disease in the amino acid metabolism's disorder, which mostly emerges in children. The most common method used in phenylketonuria treatment is the detection of L-Phenylalanine (PHEA) as the biomarker of PKU. In present work, a new molecularly imprinted electrochemical electrode based on WS₂ nanoflowers on N, B doped graphene (WS₂ NFs/N,B-GR) was presented for PHEA assay in milk samples. First of all, WS₂ nanoflowers on N, B doped graphene was synthesized via high-efficiency hydrothermal synthesis. Cyclic voltammetry (CV) was applied to the electrochemical cell including PHEA as a template molecule and pyrrole as a monomer to form PHEA imprinted electrochemical electrodes. Then, the structural and morphological features of WS₂ nanoflowers and WS₂ NFs/N,B-GR were investigated in detail by various analytical methods. The limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) values were obtained as 1.0×10^{-11} M, and 3.0×10^{-12} M, respectively by PHEA imprinted electrochemical electrode. Finally, PHEA imprinted electrochemical sensor having a high degree of selectivity, stability and reusability presented in literature for early diagnosis of phenylketonuria is presented .

Keywords: Phenylketonuria; L-Phenylalanine; Electrochemical imprinting; WS₂ nanoflowers; Nanocomposite

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ SAVUNMA TUTANAĞI.....	
TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEZ ETİK VE BİLDİRİM SAYFASI.....	vi
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
TABLO DİZİNİ.....	ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Fenilalanin.....	3
2.1.1. Fenilalanin Metabolizması ve Metabolizma Bozuklukları.....	3
2.2.Fenilketonüri	4
2.2.1.PKU Epidemiyolojisi.....	6
2.2.2.PKU Mekanizmalar/Patofizyolojisi.....	7
2.2.3.PKU Genetik Etiyolojisi.....	7
2.2.4.PKU Tanısı.....	8
2.2.5.PKU Taraması.....	9
2.2.6.PKU Sınıflandırması.....	9
2.2.7.PKU Yönetimi.....	10
2.2.7.1.Diyet Yönetimi.....	10
2.2.7.2.Diyet Yönetiminin İlkeleri.....	11
2.2.7.3.Düşük fenilalanin diyetinde kaçınılan yiyecekler.....	12
2.2.7.4.Fenilalanin Toleransı.....	12
2.2.7.5.Diyette fenilalanin tahsisi.....	13
2.2.7.6.Düşük Proteinli Özel Gıdalar	14
2.3.Moleküler Baskılama Teknolojisi.....	16
2.4.Biyosensör Teknolojisi.....	17
2.4.1.Biyosensör Uygulamaları.....	18

2.5.Nanoteknoloji.....	19
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER.....	21
3.1. Kimyasallar ve Aparatlar.....	21
3.1.1. Cihazlar.....	21
3.2. WS ₂ nanoçiçekler ve WS ₂ NFs/N,B-GR Üretimi.....	21
3.3. WS ₂ NFs/N,B-GR modifiyeli GCE üretimi.....	22
3.3.1. GCE Temizleme prosedürü.....	22
3.4. PHEA baskılı sensörün üretimi ve PHEA'nın uzaklaştırılması.....	22
3.5. Örnek hazırlama.....	23
4.BULGULAR.....	25
4.1. WS ₂ NFs ve WS ₂ NFs/N,B-GR Karakterizasyonları.....	25
4.2. N,B-GR ve WS ₂ NFs/N,B-GR modifiye elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu.....	32
4.3. WS ₂ NFs/N,B-GR/GCE üzerinde PHEA baskılı polimer üretimi.....	33
4.4. Optimizasyon çalışmaları.....	35
4.4.1. Ph etkisi.....	35
4.4.2. Mol oranı PHEA'dan Py monomer etkisine.....	35
4.4.3. Elüsyon süresi etkisi.....	35
4.4.4. Tarama döngüsü efekti.....	36
5.TARTIŞMA.....	38
5.1. Ölçüm limiti (LOQ) ve Tespit limiti (LOD).....	38
5.2. Geri kazanım Çalışmaları.....	40
5.3. Seçicilik, kararlılık ve yeniden kullanılabilirlik çalışmaları.....	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
6.1. Sonuçlar.....	43
6.2. Öneriler.....	43
KAYNAKLAR.....	45
EKLER.....	56
Ek 1. Enstitü Yönetim Kurulu Kararı.....	56
Ek 2. İntihal Raporu.....	57
Ek 3. Kısa Özgeçmiş.....	58

TEZ ETİK VE BİLDİRİM SAYFASI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “Gıdalardan Biyosensör Teknolojisi ile Fenilalanin Ölçümünün Geliştirilmesi” başlıklı çalışmanın tarafımda, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bunlara atıf yapılarak yararlanmış olduğumu belirtir ve onurumla doğrularım.

Melike YILDIRIM

ŞEKİL DİZİNİ

Şekiller		Sayfa No
Şekil 2.1.1.	L-Phea'nin yapısı ve fizikokimyasal özellikler	3
Şekil 2.2.1.	Fenilalanin metabolizması ve PKU	5
Şekil 2.2.1.1.	Dünya çapında PAH eksikliği prevalansı ve farklı PAH eksikliği fenotipleri	7
Şekil 2.2.3.1.	PKU için Besin piramidi	15
Şekil 2.4.1.	Bir biyosensörün şematik gösterimi	18
Şekil 2.4.1.1.	Biyosensörlerin başlıca uygulama alanları	19
Şekil 3.4.1.	WS ₂ NFs/N,B-GR nanokompozit ve PHEA baskılı elektrokimyasal elektrotun hazırlık protokolü	23
Şekil 4.1.1.	(A) WS ₂ NFs, (B) N, B-GR ve (C) WS ₂ NFs/N,B-GR kompozitin XRD spektrumları	26
Şekil 4.1.2.	(A) WS ₂ NFs, (B) N, B-GR ve (C) WS ₂ NFs/N,B-GR kompozitin Raman spektrumları	28
Şekil 4.1.3.	(A) WS ₂ NFs ve (B) WS ₂ NFs/N,B-GR kompozitinin FESEM grafikleri	29
Şekil 4.1.4.	WS ₂ NFs/N,B-GR kompozitinin EDX eşleme (haritalama) görüntüsü	30
Şekil 4.1.5.	WS ₂ NFs/N,B-GR kompozitinin TEM ve HRTEM görüntüleri	31
Şekil 4.1.6.	(A) WS ₂ NFs/N,B-GR kompozitinin XPS araştırması ve (B) W4f, (C) S2p, (D) C1s, (E) N1s, (F) B1s'nin yüksek çözünürlüklü XPS spektrumları	32
Şekil 4.2.1.	(a) Modifiye edilmemiş GCE, (b) N,B-GR/GCE ve (c) WS ₂ NFs/N,B-GR/GCE'de (A) CV eğrileri ve (B) EIS yanıtları (Redox probu: 1.0 mM [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 0.1 M KCl içerir, potansiyel tarama hızı: 200 mV s ⁻¹)	33
Şekil 4.3.1.	(A) WS ₂ NFs/N,B-GR/GCE üzerinde 25.0 mM PHEA dahil 100.0 mM Py'nin polimerizasyonu (Tarama hızı: 200 mV s ⁻¹), (B) Bu çalışmada hazırlanan elektrotların Diferansiyel Puls Voltametrileri(DPV'ler): (a) Boş tampon çözeltisinde (pH 7.0) MIP/WS ₂ NFs/N,B-GR/GCE, (b) 0.5 nM PHEA'nın 0.1 M PBS (pH 7.0) içinde yeniden bağlanmasından sonra NIP/WS ₂ NFs/N,B-GR/GCE, (c) 0,5 nM PHEA'nın 0,1 M PBS (pH 7.0) içinde yeniden bağlanmasından sonra MIP/WS ₂ NFs/N,B-GR/GCE, (C) 0.1 M PBS içinde 0.5 nM PHEA'nın yeniden bağlanmasından sonra farklı moleküler baskı yapan elektrotların DPV'leri (a) MIP/	34

	modifiye edilmemiş GCE, (b) MIP/N,B-GR/GCE, (c) 35MIP/WS ₂ NFs/N,B-GR/GCE	
Şekil 4.3.2.	MIP/ WS ₂ NFs/N,B-GR/GCE temelli PHEA için elektro-oksidasyon mekanizması	35
Şekil 4.4.1.1.	(A) pH, (B) mol oranı, (C) elüsyon süresi, (D) tarama döngüsünün DPV'lerin sinyalleri üzerindeki etkisi (0,5 nM PHEA varlığında) (n = 6)	37
Şekil 5.1.1.	MIP/WS ₂ NFs/N,B-GR/GCE 'de farklı PHEA miktarlarına sahip DPV'ler (1.0×10^{-11} - 1.0×10^{-9} M konsantrasyon aralığında). Ek: PHEA'nın kalibrasyon eğrisi	39
Şekil 5.3.1.	0,5 nM PHEA, 100,0 nM DPHEA, 100,0 nM DTRY, 100,0 nM TYR ve 100,0 nM DOP'ta (A) MIP/ WS ₂ NF/N,B-GR/GCE ve (B) NIP/ WS ₂ NF/N,B-GR/GCE DPV'leri	41
Şekil 5.3.2.	MIP/ WS ₂ NF/N,B-GR/GCE'nin 25.0 °C'de 0.5 nM PHEA (n = 6) dahil stabilite testi	42

TABLO DİZİNİ

Tablolar		Sayfa No
Tablo 2.2.7.5.1.	Gıda etiketlerinden protein analizini yorumlarken dikkat edilmesi gerekenler	13
Tablo 2.2.7.6.1.	Uygun alkollü içecekler	15
Tablo 5.1.1.	PHEA baskılı sensörün performansının bildirilen çeşitli tekniklerle karşılaştırılması	40
Tablo 5.2.1.	PHEA'nın (n=6) geri kazanım sonuçları	40
Tablo 5.3.1.	PHEA baskılı elektrotların seçicilik katsayısı (k) ve bağlı seçicilik katsayısı (k') değerleri (MIP/WS ₂ NFs/N,B-GR/GCE and NIP/WS ₂ NFs/N,B-GR/GCE)	41



SEMBOLLER ve KISALTMALAR

PHEA	: Fenilalanin
PAH	: Fenilalanin Hidroksilaz
PKU	: Fenilketonüri
HPA	: Hiperfenilalaninemi
NBS	: Yenidoğan Taraması
TMS	: Tandem Kütle Spektrometrisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MIP	: Moleküler Baskılı Polimer
WS₂	: Tungsten Disülfür
DOP	: Dopamin
Py	: Pirol
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
FESEM	: Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu
XPS	: X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi
XRD	: X-Işını Kırınım Yöntemi
CV	: Döngüsel Voltametri
DPV	: Diferansiyel Puls Voltametrisi
HRTEM	: Yüksek Çözünürlüklü Transmisyon Elektron Mikroskobu
EIS	: Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
GCE	: Camsı Karbon Elektrot
LOQ	: Ölçüm Limiti
LOD	: Tespit Limiti
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
L	: Litre
mL	: Mililitre
g	: Gram
mg	: Miligram
M	: Molar
nM	: Nanomolar
mM	: Milimolar
µmol	: Mikromolar

eV : Elektronvolt
mg : Miligram
dk : Dakika



1.GİRİŞ

Fenilalanin esansiyel bir amino asittir ve vücutta fenilalanin hidroksilaz enzimi ile tirozine dönüştürülür(1). Birçok önemli proteinin sentezinde rol oynar ve nörotransmitter maddelerin (dopamin, epinefrin, norepinefrin) ve tiroid hormonlarının üretiminde kullanılır. Tirozin, fenilalanin ve farklı formları depresyonu tedavi etmek için kullanılır, çünkü tirozin ruh halini etkileyen norepinefrin sentezinde kullanılır. PHEA ayrıca iltihaplanma, kronik ağrı ve Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılır. PHEA eksikliği durumunda amino asitüri, iştahsızlık, yorgunluk, ödem, hafıza sorunları, uyuşukluk gibi bazı belirtiler ile karaciğer hasarı ve yavaş büyüme görülebilir(2). Yüksek kan PHEA konsantrasyonu, anksiyete ve çarpıntı gibi psiko-nörolojik semptomlara yol açar(3).

Kalıtsal bir metabolik hastalık olarak PKU'nun prevalansı dünya çapında değişmektedir. Türkiye(1) ve İrlanda'da daha yüksek prevalans ve Finlandiya'da çok daha düşük prevalans görülmektedir(4, 5). PKU'nun yeni doğan taramasından sonra, yüksek kan PHEA konsantrasyonu belirlenebilir ve bebekler düşük PHEA diyeti ile beslenir. Hastalar yaşam boyu düşük PHEA diyeti tüketmek zorundadır. Düşük bir PHEA diyetinin etkinliğini kandaki PHEA konsantrasyonunun ölçümü takip eder(6). Yaşa göre farklı kan PHEA ölçüm sıklıkları önerilmektedir. 0-1 yaş kan PHEA'si haftalık, 1-12 yaş arası iki haftada bir, 12 yaşa kadar ayda bir, gebelik öncesi haftada bir, gebelikte ise haftada iki kez takip edilmelidir. Tedavi değişikliklerine ve klinik gerekçelere bağlı olarak ölçümlerin sıklığı arttırılabilir(6).

PHEA konsantrasyonunun tespiti için florometrik enzim analizi, HPLC ve tandem kütle spektrometrisi kullanılır(7, 8). Bununla birlikte, bu teknikler zaman alıcıdır ve pahalı ekipmanlar gerektirir. Bu nedenle hassas, seçici, hızlı ve düşük maliyetli bir tekniğe sahip PHEA tespiti klinik takip için büyük önem taşımaktadır.

Bir yarı iletken olarak WS₂, elektron taşınmasını ve aktif bölgeleri azaltabilir. WS₂'nin grafen oksit/grafen bazlı nanomalzemelere dahil edilmesi, elektron transferi, elektrokimyasal iletkenlik ve agregasyonsuzluk kinetiğini iyileştirebilir(9, 10). Azot, bor, fosfor ve kükürt gibi bazı heteroatomların karbon bazlı malzemelere katılması, yarı iletken özelliklerini ve gelişmiş performansla neden olan aktif alanları belirleyebilir(11, 12). Nanomalzemeler üzerindeki azot, bor, fosfor ve kükürt atomlarının karbon atomlarına oranı, sentez ve üretim prosedürlerini etkilemektedir. Elektrik iletkenliği ve bağlanma eğilimi gibi bazı özellikleri nedeniyle, elektrokimyasal sensör uygulamalarında grafen/grafen oksit bazlı heteroatomlar sıklıkla kullanılmıştır(13, 14).

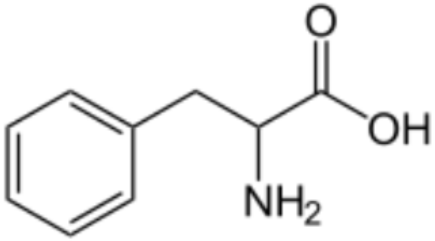
Mevcut çalışmada, PHEA tespiti için WS₂ NFs/N,B-GR nanokompozitine dayalı yeni bir moleküler baskılı elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Yüksek saflığa sahip çevre dostu WS₂ NFs/N,B-GR nanokompozit, hidrotermal sentez ile hazırlanmıştır. Daha sonra WS₂ NFs/N,B-GR modifiye elektrot yüzeyine yüksek seçici nano kavite sağlayan moleküler baskılama yöntemi uygulanmıştır. Moleküler baskılama tekniği, seçilen hedef molekülü (protein, iyon, pestisit gibi) şekil, boyut ve geometrik yapı bakımından tanıyan herhangi bir polimer matrisinde hafıza bölgelerinin oluşturulması olarak tanımlanır(15). Seçici tanıma bölgelerine sahip polimerler, moleküler baskılama yöntemi ile tespit edilmesi veya uzaklaştırılması gereken hedef molekül için hazırlanır(16). Moleküler baskılama yöntemi kullanılarak hazırlanan destek matrislerinin, hedef analit molekülünü yüksek seçicilikle belirlemesi önemlidir(17). Son olarak, hazırlanan elektrokimyasal PHEA sensörü, 3.0×10^{-12} M LOD ve çevresel uyumluluk ile yüksek seçicilik ve yüksek hassasiyet göstermiştir. Dolayısıyla bu çalışma özellikle fenilketonüri tanısı ve daha konforlu bir yaşam için literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Fenilalanin

Fenilalanin, yapısındaki fenil halkasından ötürü aromatik, besin yolu ile organizmaya alınan esansiyel bir amino asittir. Vücutta Fenilalanin hidroksilaz (PAH) enzimi tarafından karaciğerde metabolize edilir. Fenilalanin doğada, L-fenilalanin, D-fenilalanin ve bu iki çeşitin kombinasyonu D,L-fenilalanin olarak 3 farklı formda bulunur. L-Phea, proteinlerde bulunurken, D-Phea laboratuvar ortamında üretilir. PHEA'nin yapısal özellikleri Şekil 2.1.1.'de gösterilmiştir.

L-Fenilalanin aromatik ve hidrofobik bir amino asittir. Sinir hücreleri ve beyin arasında sinyalleri ileten nor-epinefrin ve dopamin üretmek için beyin tarafından bir öncü olarak kullanılır; bizi uyanık ve tetikte tutar, açlık ağrılarını azaltır, bir antidepresan olarak işlev görür ve hafızanın iyileştirilmesine yardımcı olur. Ayrıca L-Fenilalanin L-Tirozinin öncüsüdür(18).

Molekül Formülü: $C_9H_{11}NO_2$	
Molekül Ağırlığı: $165.19 \text{ g mol}^{-1}$	
pK_a : 1.83 (karboksil), 9.13 (amino)	
İzolektrik Nokta(pI): 5.48	
Sudaki Çözünürlüğü: (mg/mL)	
0°C 19.8	
25°C 29.6	
50°C 44.3	
75°C 66.2	
100°C 99.0	
Erime Noktası: 283°C	

Şekil 2.1.1. L-Phea'nin yapısı ve fizikokimyasal özellikleri(19).

2.1.1. Fenilalanin Metabolizması ve Metabolizma Bozuklukları

Fenilalanin, vücutta fenilalanin hidroksilaz (PAH) varlığında tirozine dönüştürülür. Fenilalanin hidroksilaz enziminin koenzimi tetrahidrobiopterindir(BH4). Enzim, elektron ihtiyacını bu koenzim sayesinde karşılar.

Fenilalanin, tirozin yoluyla asetoasetik asit ve fumarik aside metabolize edilir. Bir tirozin metaboliti olan DOPA, nörotransmitterler epinefrin ve norepinefrine dönüştürülür. Bu nörotransmitterlerin eksikliği, Parkinson hastalığı ve şizofrenide nedensel bir faktördür. Fenilketonüri, tirozine dönüşümde rol oynayan fenilalanin hidroksilaz eksikliği veya işlev bozukluğundan kaynaklanan fenilalanin metabolizmasındaki bir hatadan kaynaklanır. Bu metabolizma sayesinde, kandaki fenilalanin konsantrasyonu yükselir. Fenilalaninemisi olan bir hasta (yüksek fenilalanin seviyelerinin göstergesi) daha yüksek konsantrasyonlarda fenil piruvik asit, fenilasetik asit ve fenilasetik asit üreterek fenilketonüri ve şizofreni ile sonuçlanır. Tirozinaz eksikliği, nörotransmitter dopamin eksikliği ile albinizme ve şizofreni semptomlarına neden olabilir.

2.2.Fenilketonüri

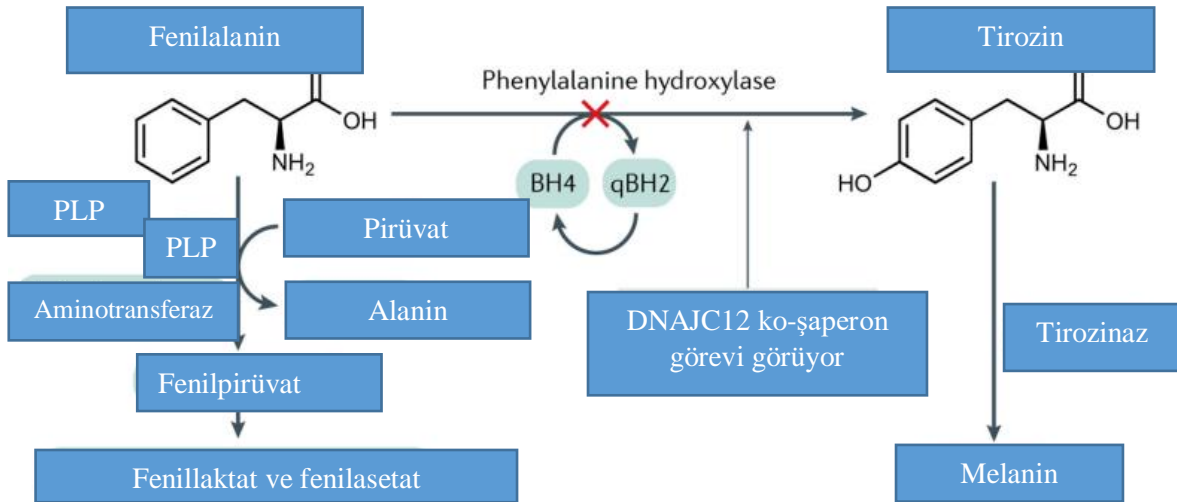
Fenilketonüri (PKU; fenilalanin hidroksilaz eksikliği ve Følling hastalığı olarak da bilinir), PAH genindeki patojenik varyantların neden olduğu fenilalanin (PHEA) metabolizmasının doğuştan gelen bir hatasıdır. PAH, ko-substrat tetrahidrobiyopterin (BH4) gerektiren bir reaksiyonda PHEA 'nin tirozine (Tyr) dönüştürülmesinden sorumludur. Not olarak, BH4, DNAJC12'nin yaptığı gibi, PAH monomerinin düzgün katlanmasını kolaylaştırmak için bir şaperon görevi de görebilir (20-23); sonuç olarak, az sayıda hiperfenilalaninemi (HPA) vakasında, HPA'ya BH4 metabolizmasındaki veya DNAJC12'deki patojenetik varyantlardaki kusurlar neden olur. HPA, normal kan PHEA konsantrasyonlarının (35–120µmol/l)) aşıldığı PKU'nun temel biyokimyasal anormalliğidir (Şekil 2.2.1.).

PKU'lu tedavi edilmeyen hastalarda, kan PHEA konsantrasyonları belirgin şekilde artar ve bu da idrarla atılan fenilketon cisimciklerinin oluşumuna neden olur; tersine, Tyr konsantrasyonları genellikle biraz düşüktür. Klinik olarak, tedavi edilmeyen hastalarda ciddi zihinsel yetersizlik, epilepsi ve davranışsal, psikiyatrik ve hareket sorunlarının yanı sıra ciltte, gözlerde ve saçta hafif pigmentasyon, egzama ve küf kokusu gelişir (24). PAH eksikliğinin daha az şiddetli formları çeşitli şekillerde orta PKU, hafif PKU, hafif HPA veya iyi huylu HPA olarak adlandırılırken, şiddetli formlar klasik PKU olarak adlandırılır. Tarihsel olarak, PAH eksikliğinin farklı şiddetleri, bu farklı PAH eksikliği şiddetlerinin küresel prevalansına ilişkin veriler sağlayan, tedavi edilmemiş PHEA konsantrasyonu ile farklılaştırılmıştır (Şekil 2). Bununla birlikte, hastalara biyolojik olarak en yüksek tedavi edilmemiş PHEA konsantrasyonuna ulaşılmadan önce teşhis konulduğundan, PAH

eksikliğinin ciddiyetini belirlemek zor olduğundan, bu prevalans verileri dikkatle yorumlanmalıdır. Bu nedenle, bu sınıflandırma artık geçerli değil (25).

PKU ilk olarak 1934'te Følling (26) tarafından iki Norveçli kardeşte tanımlandı, ilk olarak 1953'te Bickel ve ark. (27) tarafından tedavi edildi (diyet kontrolü ile) ve PHEA konsantrasyonunu değerlendirmek için kurutulmuş kan lekesi (DBS) testi kullanılarak popülasyon bazlı yenidoğan taraması 1963'te Guthrie ve Susi (28) tarafından tanıtıldı ve erken tanı ve tedavinin başlatılmasını sağladı.

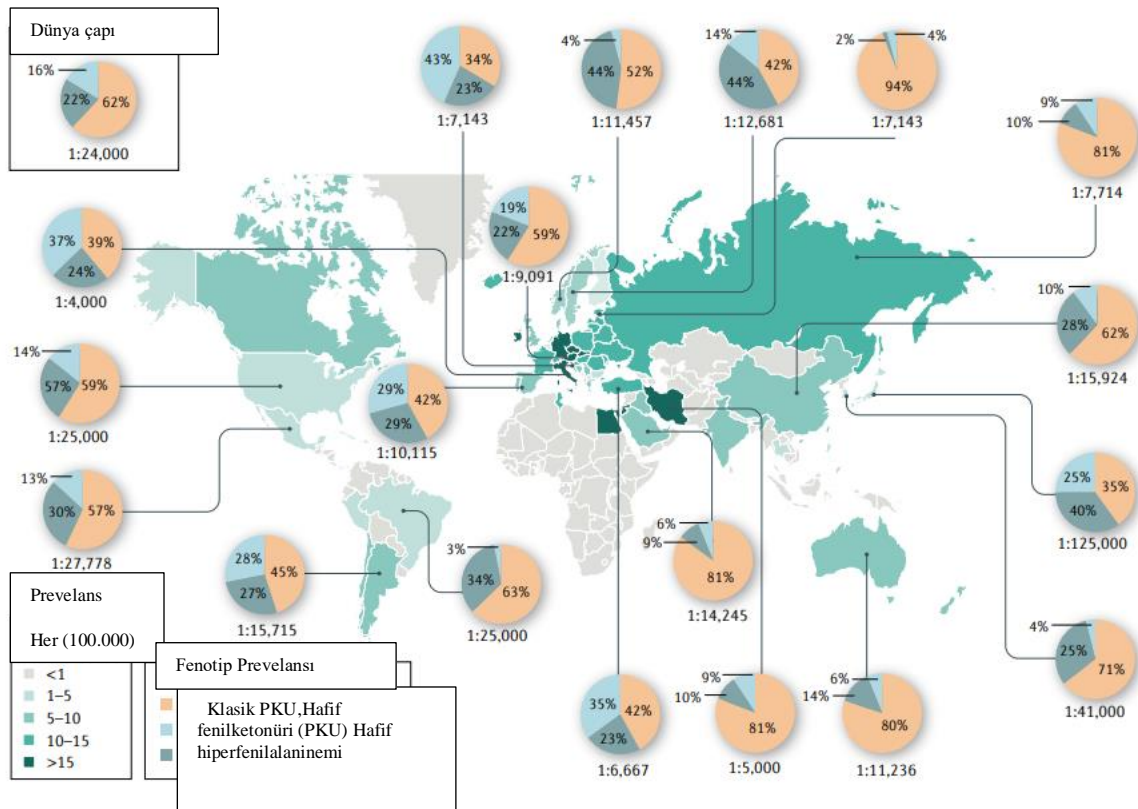
Diyet kontrolünün uygulanmasından sonraki ilk on yıllarda PKU yönetiminde belirgin bir iyileşme olmasına rağmen, bu teorik olarak basit tedavi PKU'nun tezahürlerini tamamen ortadan kaldırmamıştır ve kan PHEA konsantrasyonlarını hedef aralıkta tutmak, özellikle yaşamın ilk on yılından sonraki çocuklarda pratikte külfetlidir(29). 1960'larda Guthrie, büyük popülasyonlarda hiperfenilalaninemi (HPA) tespit etmek için basit bir test geliştirdi. Bu, PKU'nun yenidoğan taramasından yararlanan ilk bozukluk olmasına yol açtı; erken teşhis ve tedavisi zeka geriliğini önledi. Ancak, NBS ekranı HPA içindir ve bu, herhangi bir kan PHEA >120 µmol/L olarak tanımlanır. Bu nedenle, PHEA için her pozitif NBS'de, birincil fenilalanin hidroksilaz eksikliği, pterin kusurları, yüksek protein alımı, karaciğer hastalığı veya tedavi gerektirmeyen HPA dahil olmak üzere diğer HPA nedenlerinden ayırt edilmelidir(30).



Şekil 2.2.1. Fenilalanin metabolizması ve PKU(31).

2.2.1.PKU Epidemiyolojisi

PKU'nun prevalansı etnik kökenler arasında ve dünya çapında farklı coğrafi bölgeler arasında önemli ölçüde değişmektedir (Şekil 2.2.1.1.). PKU prevalansı genellikle beyaz veya Doğu Asya popülasyonlarında en yüksektir (~1:10.000–15.000 canlı doğum) (32). Avrupa'da, prevalansı İtalya'da 1: 2.700 canlı doğumdan ve İrlanda'da 1: 4.500 canlı doğumdan Finlandiya'da 1: 100.000 canlı doğuma kadar geniş bir yelpazede değişmektedir(33). İspanya, PAH'ın kısmi inaktivasyonundan kaynaklanan düşük tedavi edilmemiş PHEA konsantrasyonları (kan PHEA 360-600 µmol/l) ile yüksek hafif HPA ve PKU prevalansına sahip olması bakımından diğer Avrupa ülkelerinden/bölgelerinden farklıdır(34). Orta Doğu'daki bazı ülkelerde/bölgelerde PKU prevalansı, beyaz veya Doğu Asya popülasyonlarındakiyle karşılaştırılabilir veya hatta onlardan daha yüksektir. Örneğin, Türkiye'de(34, 35), İran'ın Fars eyaletinde(36) ve Rusya'nın Karaçay-Çerkes Cumhuriyeti'nde(37) prevalans sırasıyla 1:4,370, 1:4,698 ve 1:850 yenidoğandır. Bu son derece yüksek yaygınlık, akraba evliliklerinin daha sık ortaya çıkmasıyla açıklanabilir. Tayland (1:212,535)(38) ve Japonya (1:120,000)(39) gibi bazı Asya popülasyonlarında PKU prevalansı düşüktür. Güney Amerika'daki prevalansı ~ 1: 25.000-50.000 canlı doğum arasında değişmektedir(40).



Şekil 2.2.1.1. Dünya çapında PAH eksikliği prevalansı ve farklı PAH eksikliği fenotipleri(41).

2.2.2.PKU Mekanizmalar/Patofizyolojisi

PAH, Tyr oluşturmak üzere PHEA 'nin hidroksilasyonunu katalize eden tetramerik, demir içeren bir monooksijenaz enzimidir(42) (Şekil 2.2.1.). Bu reaksiyon, bir kofaktör olarak moleküler oksijeni ve bir ko-substrat olarak indirgenmiş pterin BH₄'ü gerektirir. PAH aracılı hidroksilasyon, L-Phea'nin ara metabolizmasında hız sınırlayıcı adımdır. Mevcut gelişmiş araştırma araçlarıyla bile, net protein metabolizması için kullanılan PHEA miktarı tam olarak bilinmemektedir. Sağlıklı çocuklarda ve yetişkinlerde PHEA gereksinimlerindeki farktan, PKU'lu çocuklarda ve yetişkinlerdekilere kıyasla, tipik diyet PHEA alımının ~% 10-20'sinin rutin protein döngüsü sırasında kullanıldığını tahmin ediyoruz; geri kalanı PAH'ın etkisiyle Tyr'a dönüştürülür. Tyr, nörotransmitterlerin dopamin, adrenalin ve norepinefrin üretimi, tiroid bezinde tiroksine ve melanositlerde melanine dönüşüm ve yakıt olarak kullanılmak üzere asetoasetat (bir keton) ve fumarat (bir Krebs döngüsü ara maddesi) için tam katabolizma dahil olmak üzere çeşitli metabolik kadere sahiptir. PAH aktivitesinin kalıtsal veya fonksiyonel eksikliği, HPA, hafif Tyr eksikliği ve şiddetli olduğunda, fenilpiruvatın (spontan PHEA deaminasyonunun ürünü) ve diğer fenil keton cisimlerinin idrarla atılımına yol açar(31).

2.2.3.PKU Genetik Etiyolojisi

HPA en sık olarak, kromozom 12 üzerinde bulunan PAH genindeki otozomal resesif bir şekilde kalıtsal olan patogenetik varyantlardan kaynaklanır ve bu da aktivitesi azalmış veya hiç aktivitesi olmayan PAH monomerlerinin üretimine veya PAH proteininin tamamen yokluğuna yol açar. Daha nadiren, fonksiyonel PAH eksikliği, biyopterin sentezindeki kalıtsal kusurlara (GTP siklohidrolaz 1 (GTPCH) veya 6-piruvoyltetrahydropterin sentaz (PTPS) eksiklikleri) veya BH₄ geri dönüşümüne (dihidropiridin redüktaz (DHPR) veya pterin-4a-karbinolamin dehidrataz (PCD) eksiklikleri) bağlı BH₄ eksikliğinden kaynaklanır. İlginç bir şekilde, GTPCH eksikliğinin otozomal dominant formu ve sepiapterin redüktaz (SR) eksikliği PAH aktivitesini azaltır, ancak HPA ile sonuçlanmak için yeterli değildir(43). Fonksiyonel PAH monomerlerinin katlanması ve montajı, yakın zamanda tarif edilen kalıtsal HPA'nın ek bir nedeni olan ve büyük klinik değişkenliğe sahip gerekli şaperon DNAJC12'nin yokluğunda bozulur(23, 44, 45).

PKU genetik olarak çok heterojendir ve dünyanın dört bir yanından PKU'lu bireylerde kataloglanan >1.000 PAH varyantı vardır(33, 46). Birçok hasta iki farklı PAH varyantı için bileşik heterozigottur ve bu da 2.600'den fazla bilinen PKU'ya neden olan genotipe yol açar.

PKU'lu bebekler doğumda fenotipik ve fonksiyonel olarak normaldir. Düşük doğum ağırlığı ve doğumda kısa vücut uzunluğu iki çalışmada(47, 48) bildirilmiştir, ancak birkaç çalışmanın meta-analizi normal doğum öncesi büyümeyi göstermiştir(49). PAH sadece karaciğer ve böbreklerde(50) eksprese edilmesine rağmen, hiçbir organ PAH eksikliğinin bir sonucu olarak belirgin anlamlı bir patolojiden muzdarip değildir. Tedavi edilmediği takdirde, PKU en derinden beyni etkiler (Şekil 2.2.3.1.). PKU'lu tedavi edilmemiş bireylerin birkaç post-mortem nöropatolojik değerlendirmesi, nöron sayıları genellikle normal olmasına rağmen, her durumda küçük beyin boyutu ve bozulmuş miyelinasyon belgelemiştir(51). PKU'daki beyin disfonksiyonunun kesin nedeni belirsizdir. Onlarca yıllık çalışmalardan sonra bile, PAH eksikliği ile ilişkili nöropatolojinin temelini oluşturan moleküler patofizyoloji tam olarak anlaşılammıştır(52).

2.2.4.PKU Tanısı

Yayınlanmış kanıtlar, PKU için evrensel NBS'nin kabul edilen tüm tarama kriterlerini karşıladığını ve yenidoğan kan lekelerinin toplanması ve test edilmesi için gerekli maliyet ve altyapıyı haklı çıkardığını doğrulamaktadır(53-55). NBS, popülasyonların PKU'ya sahip olmadığı bilinen ülkelerde bile ulusal bir yükümlülük olarak kabul edilir. Ülkelerdeki yüksek göç nedeniyle, PKU tanısı mümkün olmaya devam etmektedir. NBS, tedavinin zamanında başlamasını sağlamak için tüm yenidoğanlardan kan alınan sağlam bir altyapı (ideal olarak doğumdan 24 ila 72 saat sonra) ve kan lekelerini verimli bir şekilde işleyebilen iyi donanımlı bir laboratuvar gerektirir. Düşük gelirli ülkeler, diğer ülkelerin NBS laboratuvar imkanlarını kullanmayı düşünebilir(6).

Kan örnekleme zamanından itibaren NBS prosedürlerinin optimizasyonu, yüksek kan PHEA seviyelerini teşhis etmek için seçilen yöntem ve sevk prosedürü üzerinde çalışan çok sayıda komite ve çalışma grubu vardır. En azından kısmen, bu prosedürler ulusal sağlık kuruluşlarına bağlıdır. En önemli konu, pozitif NBS sonucu olan çocukların, PKU hastaları için en iyi sonucu sağlamak adına tanı prosedürleri ve erken tedavi stratejileri konusunda bilgi ve deneyime sahip uzmanlaşmış bir metabolik merkeze yönlendirilmesi gerektiğidir.

NBS geçirmemiş ve gelişimsel gecikme veya diğer PKU ile ilişkili semptomlarla başvuran bireyler, plazma amino asitlerini analiz ettirmelidir(6, 56).

Özet olarak; uygun maliyetli ve efektif olduğu kanıtlandığı için NBS ulusal bir yükümlülük olarak kabul edilmelidir.

2.2.5.PKU Taraması

Günümüzde, dünya çapında çoğu ülkede/bölgede PKU için yenidoğan taramasının uygulanması, tanının tipik olarak yenidoğan döneminde ortaya çıkmasıyla sonuçlanmıştır. Tarama, sağlıklı bir yenidoğandan topuktan iğne ile bir damla kan alınmasını içerir. Topuktan iğnenin kesin zamanlaması ülkeler/bölgeler arasında farklılık gösterse de, kan alımı için uygun zaman doğumdan sonraki 24 saat ile 72 saat arasındadır. Bebeğin topuğunun dış veya iç tarafı delinir ve bir filtre kağıdı kartına (Guthrie kartı) kan damlatılır, böylece karttaki işaretli daireler tamamen doymun hale gelir.

Kalibrasyon noktaları, hasta numunesindeki PHEA konsantrasyonunun kabaca tahmin edilmesini sağlar. Bu tahlil kolay uygulanabilir, düşük maliyetli ve çok sayıda bireysel numunenin taranması için uygundur; bununla birlikte, sınırlı duyarlılığa sahip yarı niceliksel bir yöntemdir (örneğin, antibiyotiklerin varlığı yanlış negatif sonuçlara neden olabilir). PHEA seviyelerini ölçmek için florimetrik mikroanaliz (FMA) kullanılarak artan doğruluk ve hassasiyet elde edilmiştir. Yöntem, kromatografi ayırmasını, ardından türevlendirmeyi ve florimetre saptamasını içerir. Hem BIA hem de FMA, PHEA gibi yalnızca tek bir amino asidi saptar, tandem kütle spektrometrisi (TMS) ise çoklu amino asitlerin ölçülmesine izin verir. Geçmişte yüksek protein alımı yanlış pozitif sonuçlara yol açabiliyordu, ancak artık TMS'de durum aynı şekilde değildir.

2.2.6.PKU Sınıflandırması

PKU'de fenotip sınıflandırması konusunda fikir birliği yoktur. Blaskovics, 5'i PAH eksikliği ile ilişkili olan 8 HPA hastalık tipi arasındaki yanıtlara dayalı olarak alt tipleri ayırt etmek için bir PHEA yükleme testi geliştirmiştir(57). Bununla birlikte, şu anda, bu PHEA seviyesini arttırdığı için etik olarak kabul edilmemektedir. 1980 yılında, tedavi edilmemiş PHEA seviyeleri, örneğin klinik tanıda ölçülenler, Güttler tarafından PKU fenotiplemesi için kullanılmıştır (58). Bu kriterler artık çok çeşitli kesme noktaları(59) ve daha da önemlisi yenidoğan tarama zamanı da dahil olmak üzere çeşitli nedenlerle hastaların teşhisine yardımcı olmamaktadır, çünkü hastalar genellikle maksimum PHEA konsantrasyonlarına

ulaşmadan önce tedaviye başlayacaktır(60). Ek olarak, PHEA toleransı 3 veya 4 fenotip arasında ayırım yapmak için kullanılır(58, 61).

Guttler ve Guldberg, PAH enzim eksikliği olan ve tedavi edilmesi gereken hiperfenilalaninemili (HFA) bireylerin tedavi öncesi kan PHEA düzeylerini ve beş yaşında iken tolere ettikleri günlük PHEA miktarlarını dikkate alarak PKU hastalığını sınıflamışlardır. Guldberg ve ark, bireylerin 5 yaşından önce PHEA toleransına göre PAH yetersizliğini dört sınıfta toplamışlardır(62):

- 1) Klasik PKU, tamamen veya tamamene yakın PAH enzim yetersizliğidir. Etkilenen bireyler, kan PHEA düzeylerini güvenli aralıklarda $<300 \mu\text{mol/L}$ tutmak için $<250\text{-}350 \text{ mg/gün}$ PHEA tolere edebilmektedirler. Klasik PKU'de tıbbi beslenme tedavisi olmaksızın, geri dönüşümsüz zihinsel gerilik bildirilmektedir.
- 2) Orta (moderate) PKU, bu gruptaki bireyler $350\text{-}400 \text{ mg/gün}$ PHEA tolere edebilmektedirler.
- 3) Hafif (mild) PKU, bu gruptaki bireyler $400\text{-}600 \text{ mg/gün}$ PHEA tolere edebilmektedirler.
- 4) Hafif (mild) HPA, normal beslenme ile yenidoğan döneminde bireylerin kan PHEA düzeyleri $< 600 \mu\text{mol/L}$ 'dir.

2.2.7.PKU Yönetimi

Tedavi edilmeyen PKU, yalnızca yenidoğan taramasının başlamasından önce veya her yenidoğan için yenidoğan taramasının henüz mevcut olmadığı bir ülkede doğmuş ve bu nedenle doğumdan itibaren tedavi edilmemiş bireylerde görülür. PKU, zihinsel engelliliği önlemek için bir tedavinin uygulandığı ilk hastalıktı. PKU tedavisinin hedefleri şunlardır: optimal nörobilişsel gelişim ve işlevsellik, normal büyüme, optimal beslenme durumu, yaşam kalitesi (QOL) ve psikososyal refah. HPA tanısı önemli olmakla birlikte, PKU'nun diyet tedavisi, büyük bilişsel ve nörolojik eksiklikleri önlemek için doğumdan sonraki ilk günlerde başlatılmalıdır(63).

2.2.7.1.Diyet Yönetimi

Bickel ve arkadaşları tarafından 1953'te tanıtıldığından beri fenilalanin'in diyet kısıtlaması PKU tedavisinin temel dayanağı olmaya devam etmektedir(64). PKU hastalarında aşırı kan ve dolayısıyla beyin PHEA 'sından kaynaklanan geri dönüşü olmayan

herhangi bir nörolojik hasarı önlemek için diyet tedavisi yenidoğan döneminde başlamalı ve ömür boyu devam ettirilmelidir.

Beslenme tedavisinin devamında da bazı sorunlar yaşanmaktadır örneğin; Çocuğun ebeveynleri diyeti kontrol ettiğinden, diyete bağlılık genellikle yenidoğan döneminde ve erken çocukluk döneminde kolaydır. Bununla birlikte, diyetin lezzetliliği nedeniyle çocuklar ergenliğe yaklaştıkça diyete uyum giderek zorlaşır. Bu, bu yaş grubundaki bireylerin bir kısmında kan fenilalanin konsantrasyonlarının zayıf kontrolü ile açıkça yansıtılmaktadır (29, 65, 66).

Şimdi çok mantıklı görünüyor, ancak belirli bir amino asidin alımını sınırlamak için diyet kontrolünün başlatılması, PKU'nun anlaşılmasında ve sadece PKU'lu hastalar için değil, aynı zamanda amino asitlerin, karbonhidratların veya yağ asitlerinin metabolizmasında diğer kusurları olanlar için de sonuçların iyileştirilmesinde ileriye doğru atılmış muazzam bir adım olmuştur. PKU'nun diyet tedavisi çok başarılı olmuştur, çünkü PHEA vücutta sentezlenemez ve bu nedenle PHEA sözde esansiyel bir amino asittir, yani kan PHEA konsantrasyonu diyet PHEA alımına büyük ölçüde bağımlıdır(31).

PHEA kısıtlı diyetin etkili olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, her tedavi hedefini en uygun şekilde yerine getirmeyebilir. Örneğin, muhtemelen yürütücü fonksiyonlardaki eksikliklerle ilişkili olan dikkat eksikliği-hiperaktivite bozukluğu ve spesifik öğrenme güçlüğü insidansı, PKU'lu iyi tedavi görmüş çocuklarda PKU'suz çocuklara göre daha yüksek kalabilir(67). Ergenlik ve yetişkinlik döneminde metabolik kontrol kaybı, dikkat, ruh hali, hafıza ve yürütücü işlev üzerinde önemli olumsuz etkilerin ortaya çıkması ile ilişkilidir(68, 69). Birkaç bireyde, alt ekstremitelerde spastisitesi ve nöbetleri, yetişkinlik döneminde tedaviye uzun süre uyulmamasından sonra gelişebilir(70). Ensefalopati, uzun süreli metabolik kontrol eksikliğinden sonra ve ilk prezentasyonda hastalarda tanımlanmıştır (71, 72) ve sıkı diyet tedavisine yanıt vermektedir. Görsel anormalliklerin, hastanın uyumsuz olduğu yetişkinlik döneminde ortaya çıktığı ve sıkı diyetin yeniden uygulanmasından sonra kaybolduğu bildirilmiştir(71). Bu veriler, metabolik kontrole uymayan çocuklarda tarif edilen daha ince görme eksiklikleri ve PKU'lu tedavi edilmemiş yetişkinlerde kortikal körlük ile tutarlı görünmektedir(73, 74).

2.2.7.2.Diyet Yönetiminin İlkeleri

PKU'de diyet yönetimi 3 temel ilkeye dayanır:

1. Doğal protein / fenilalanin alımının sıkı kontrolü ile kanda (ve dolayısıyla beyinde) aşırı fenilalanin birikmesini önlemek.
2. Diyetten çıkarılan doğal proteinin, sentetik protein, amino asit karışımı / takviyesi veya bir protein ikamesi olarak adlandırılan güvenli veya fenilalanin içermeyen protein ile değiştirilmesi. Çünkü tüm protein ikameleri fenilalanin içermez veya fenilalanin yönünden çok düşüktür.
3. Normal büyüme ve beslenme durumuna ulaşmak. Bu, diyetin tüm besin maddelerinin ve enerjinin dengeli bir şekilde alınmasını sağlayarak elde edilir. Vitamin ve mineral takviyeleri ya protein yerine eklenir ya da ayrı bir takviye olarak verilir(75).

2.2.7.3.Düşük fenilalanin diyetinde kaçınılan yiyecekler:

PKU'lu çoğu insanda, doğal protein veya diyet fenilalanin alımı, Avrupa PKU Yönergeleri hedef aralıklarında kan fenilalanin konsantrasyonlarını korumak için düzenli alımın %25'i veya daha azı ile sınırlıdır(6).

Bu genellikle aşağıdakiler gibi tüm yüksek proteinli gıdalardan kaçınılmasını / kısıtlanmasını gerektirir:

- ❖ Et, tavuk, balık, yumurta ve hayvan sütünden elde edilen peynir (inek, keçi, koyun).
- ❖ Fındık, tohum, kinoa, buğday, yulaf, çavdar, arpa.
- ❖ Quorn'dan™ yapılan yiyecekler (mantar kökenli proteinden yapılan bir et ikamesi).
- ❖ Soya, tempeh, bakliyat/mercimek.
- ❖ Jelatin ve spirulina gibi bitki algleri.
- ❖ Aspartam (tatlandırıcı).

2.2.7.4.Fenilalanin Toleransı

Fenilalanin toleransı, hedef tedavi aralığında kan fenilalanin konsantrasyonlarını korurken PKU'lu bir birey tarafından alınabilecek fenilalanin miktarıdır(75).

Hedef kan fenilalanin aralıkları şunlardır: 12 yaşına kadar olan çocuklar ve gebelik öncesi diyet veya gebelik alan kadınlar için 120 ila 360 $\mu\text{mol} / \text{L}$; ve ≥ 12 yaş arası hastalar için 120 ila 600 $\mu\text{mol} / \text{L}$.

Tolere edilen diyet fenilalanin miktarı, her bir kişinin PKU'sunun ciddiyetine (hafif veya orta derecede PKU'lu kişiler daha fazla proteine tolerans gösterecektir), protein ikamesinin dozajına, bağlılığına ve günlük dağılımına veya ilaç tedavisi, sapropterin veya

Pegvaliaz'ın (≥ 16 yaş arası hastalar) tedavi rejiminin bir parçası olup olmadığına bağlı olarak bireyler arasında değişecektir. Ayrıca hastalık sırasında büyüme, hamilelik ve katabolik durumdan da etkilenir. Diyet tedavisi gören hastaların çoğu 500 mg / gün'den az fenilalanin tolere eder(75).

2.2.7.5. Diyetle Fenilalanin Tahsisi

PKU'lu tüm bireylere, bireysel toleranslarına göre günlük bir fenilalanin ödeneği tahsis edilmelidir. Bu, bireylerin tutarlı bir fenilalanin / protein alımını sürdürmelerini sağlar. Fenilalanin / protein alımını hesaplamanın farklı yolları vardır ve herhangi bir yöntemin diğerinden daha iyi olduğunu gösteren çok az kanıt vardır. Fenilalanin / protein alımı, günlük protein gramları veya miligram fenilalanin ile hesaplanabilir. Avrupa genelinde, sağlık uzmanları her gün yenen fenilalanin miktarını hesaplamak için beş sistemden birini kullanabilir ve tüm sistemler kabul edilebilir kan fenilalanin kontrolünü sağlar (75).

Fenilalanin alımını hesaplamak için 5 sistem şunlardır:

- ❖ Fenilalanin değişim sistemi (örneğin 50, 25, 20 mg fenilalanin).
- ❖ 1 g protein değişimi.
- ❖ 1 g protein değişimi (ancak meyve ve sebzelerin fenilalanin analizlerini kullanarak ve 50 mg fenilalanin sağlayan ağırlığın hesaplanması).
- ❖ Gıdaların fenilalanin içeriğini listeleyen kağıt listeler / uygulamalar.
- ❖ Gıdaların protein içeriğini listeleyen kağıt listeler / uygulamalar.

Soslar ve kahvaltılık gevrekler gibi düzenli olarak üretilen gıdalar için, proteinli gıda etiketleri, düşük fenilalanin diyeti için uygun olup olmadıklarını belirlemek için kullanılır. Bazen protein etiketlemesi kafa karıştırıcı olduğu için bu zor olabilir. Protein etiketlemesi kullanılırken dikkat edilmesi gereken özel hususlar Tablo 2.2.7.5.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.2.7.5.1. Gıda etiketlerinden protein analizini yorumlarken dikkat edilmesi gerekenler

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Normal gıdaların gıda beslenme etiketlerinde belirtilen fenilalanin içeriğinden ziyade proteindir. |
| <ul style="list-style-type: none">• AB'de üretilen gıdalar için, protein içeriği $\leq 0,5$ g / 100 g ise, gıda ürünü 0 g protein içerdiğini belirtebilir. |

<ul style="list-style-type: none">• ABD, <1 g'lık bir protein içeriğinin önemsiz olduğunu düşünmektedir ve protein içeriği 1 g / porsiyon boyutunda <ise, porsiyon büyüklüğü başına spesifik protein miktarını belirtmeyecektir.
<ul style="list-style-type: none">• Bir gıda etiketindeki protein içeriği, pişmiş veya pişmemiş ağırlık arasında ayırım yapamaz.
<ul style="list-style-type: none">• Kuru gıdalarda, protein içeriği ancak bir gıda 'teorik olarak' yeniden oluşturulduktan sonra listelenebilir. Üreticiler, bazı gıda maddelerinin sütü ile yeniden oluşturulduğunu varsayabilir, örneğin tatlılar veya muhallebi ve bu, etikette belirtilebilecek protein değeridir. Bu, kuru gıdaların sütü yerine düşük proteinli sütle yeniden oluşturulması durumunda protein içeriğini abartacaktır.

2.2.7.6. Düşük Proteinli Özel Gıdalar:

Özel tıbbi amaçlar için hazırlanmış diyet gıdalarıdır ve EC (European Community) Yönetmeliklerinde “hastaların diyet yönetimi için özel olarak işlenmiş veya formüle edilmiş ve tıbbi gözetim altında kullanılması amaçlanan belirli beslenme amaçlı gıdalar kategorisi” olarak tanımlanmıştır. Düşük protein ve fenilalanin içeriğine sahip ve tedavi için üretilmiş un, ekme, makarna gibi ürünlerdir.

Çok düşük protein kaynaklarından yeterli enerji alımı sağlamak, enerji gereksinimlerini karşılamak ve zayıf kan fenilalanin kontrolüne yol açabilecek katabolizmayı en aza indirmek için gereklidir. Normal bir enerji alımının sürdürülmesi, protein bakımından çok düşük olan 'düzenli' gıdaların kullanımı ve ekme ve makarna gibi özel olarak üretilmiş düşük proteinli gıdaların tüketimi ile teşvik edilerek sağlanır.

Düşük proteinli/düşük PHEA 'li özel süt: Tüketilen hacimde 24 saatte > 25 mg toplam fenilalanin alımı sağlayan herhangi bir düşük proteinli özel süt ikameleri fenilalanin miktarı hesaplanmalı/ölçülmelidir. Düşük proteinli süt ikamelerinden alınan toplam fenilalanin alımı 24 saatte ≤25 mg fenilalanin sağlıyorsa, kısıtlama olmaksızın verilebilir(75).

Alkollü İçecekler: Nüfusun geri kalanı gibi, PKU'lu yetişkinlere de ölçülü miktarda alkol almaları tavsiye edilir.

Bununla birlikte, PKU'lu insanlar için birçok uygun alkollü içecek vardır (Tablo 2.2.7.6.1.). Bazı alkollü içecekler -bira gibi- protein içerir ve sadece günlük protein /

fenilalanin ödeneğinin bir parçası olarak alınmalıdır. Ne yazık ki, alkollü içecekler için beslenme bilgilerinin sağlanmasını zorunlu kılan hiçbir Avrupa gıda yasası yoktur. Bu, bir üretici bunu gönüllü olarak beyan etmeyi seçmediği sürece, alkolün gıda etiketlemesinde 100 ml başına protein içeriğini listeleyemeyeceği anlamına gelir.

Ayrıca, bazı içecekler aspartam içerir ve bu içecek gruplarından kaçınılmalıdır.

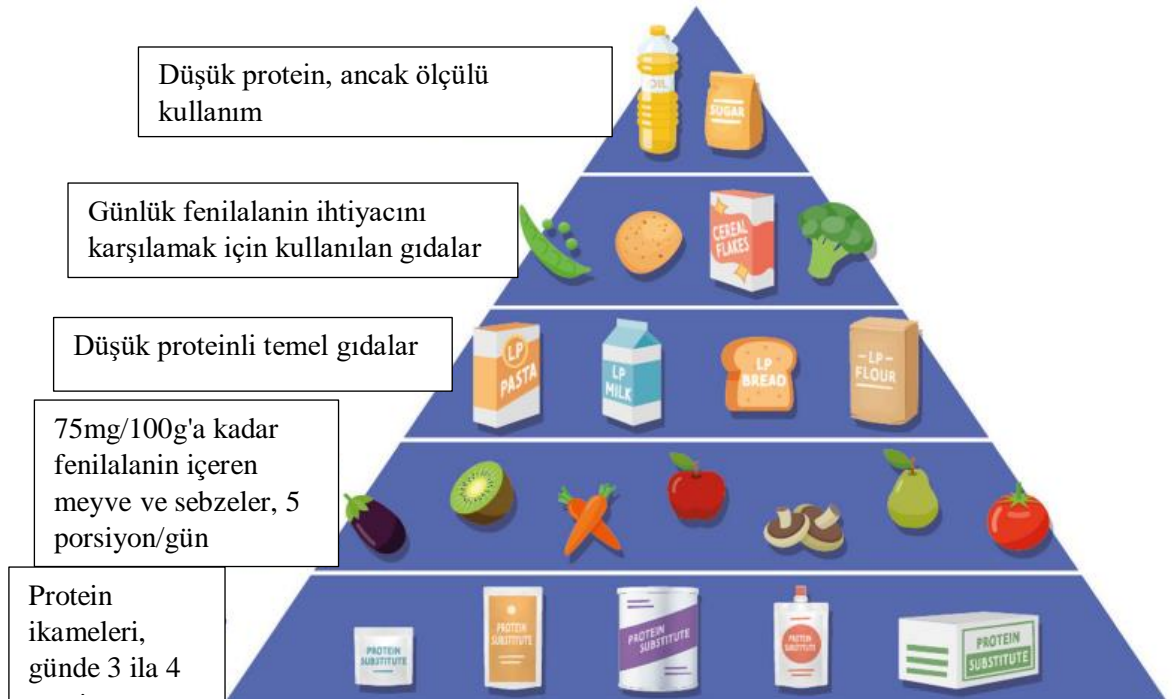
Tablo 2.2.7.6.1. Uygun alkollü içecekler

- Kuru, tatlı ve vintage cidar.
- Kırmızı, beyaz ve gül şarabı (750 ml yaklaşık 50 mg fenilalanin içerir). - Şampanya ve prosecco.
- Liman şarabı ve şeri.
- Kuru ve tatlı vermut.
- Alkollü içkiler: viski, cin, votka, rom, brendi, tekila ve martini.

Önceden karıştırılmış içeceklerin ve kokteyllerin (ör. alkol + limonata) aspartam içerebileceğini lütfen unutmayın.

Alkollü kremalar, Amaretto ve Advocaat (yumurta içerir) gibi bazı likörler protein içerecektir.

PKU'lu bir kişi için dengeli bir diyet aşağıdakilerden oluşmalıdır (Şekil 2.2.3.1.)



Şekil 2.2.3.1. PKU için Besin piramidi (75).

2.3.Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskı, bir şablon molekülün varlığında fonksiyonel monomerlerin polimerizasyonunu ifade eder. İdeal olarak, monomerler şablonun etrafında bir ön polimerizasyon kompleksi oluşturur, böylece şablonun şekli polimer matrisi içine basılır. Şablonun uzaklaştırılmasından sonra, ortaya çıkan boşluk seçici olarak yeniden bağlanabilir ve elde edilen malzemelere moleküler olarak damgalanmış polimerler (MIP'ler) denir(76). İşlevsel monomerlerin seçimi son derece önemlidir ve π - π istifleme, hidrojen bağlanması, elektrostatik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimler gibi çeşitli moleküller arası kuvvetlerin yer almasına izin veren şablonun özelliğine uymalıdır(77).

MIP kavramı ilk olarak 1930'larda önerilmiştir(78). O zamandan beri, birkaç açıdan önemli bir gelişme görmüştür. Örneğin, metal iyonlarından, küçük moleküllerden(79), peptitlerden ve proteinlerden(80), nükleik asitlerden(81) tüm hücrelere(82) kadar çeşitli şablonlar gösterilmiştir. MIP'nin başlıca uygulamaları arasında kromatografi, katı faz ekstraksiyonu(83), biyosensörler(84), terapötikler(85), organik sentezler ve kataliz bulunur. MIP'nin avantajları, antikolar gibi biyolojik olarak türetilmiş ligandlara kıyasla maliyet etkinliği, genellik ve daha yüksek stabilite gibi açıktır(86).

Bununla birlikte, MIP'lerin bir zorluğu, nispeten düşük bağlama performansları(87) veya düşük baskı faktörüdür; bu, baskılanmamış polimerler üzerine basılmış bağlanma afinite oranı olarak tanımlanır. Ek olarak, basit optik spektroskopi ile bağlanma reaksiyonunu tespit etmek zordur. Son olarak, fonksiyonel monomerlerin seçimi son derece önemlidir, ancak genellikle bir deneme yanılma sürecidir(88).

2.4.Biyosensör Teknolojisi

Biyosensörler, reaksiyondaki bir analitin konsantrasyonuyla orantılı sinyaller üreterek biyolojik veya kimyasal reaksiyonları ölçen bir cihazlardır. Biyosensörler, hastalık izleme, ilaç keşfi ve kirleticilerin, hastalığa neden olan mikroorganizmaların ve vücut sıvılarında (kan, idrar, tükürük, ter) hastalığın göstergeleri olan belirteçlerin tespiti gibi uygulamalarda kullanılır. Tipik bir biyosensör Şekil 2.4.1.'de gösterilmiştir ve aşağıdaki bileşenlerden oluşur;

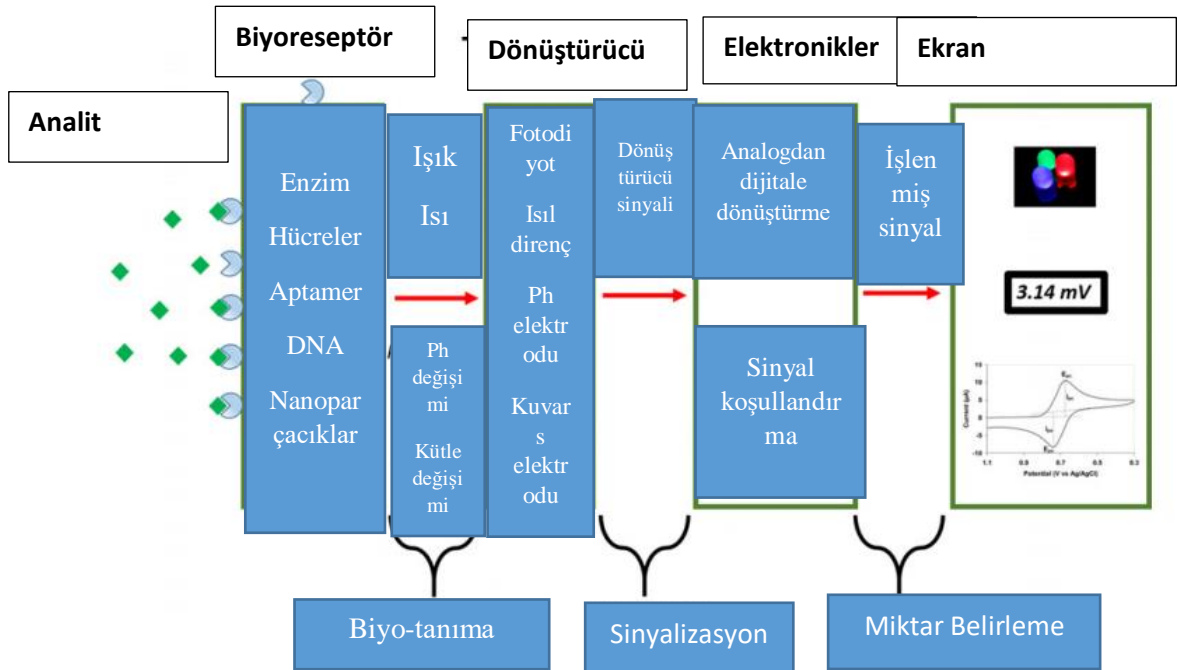
- Analit: Tespit edilmesi gereken ilgi çekici bir maddedir. Örneğin, glikoz, glikozu tespit etmek için tasarlanmış bir biyosensördeki bir “analit”tir.

•Biyoreseptör: Analiteyi spesifik olarak tanıyan bir molekül, biyoreseptör olarak bilinir. Enzimler, hücreler, aptamerler, deoksiribonükleik asit (DNA) ve antikorlar biyoreseptörlerin bazı örnekleridir. Biyoreseptörün analit ile etkileşimi üzerine sinyal üretme işlemine (ışık, ısı, pH, yük veya kütle değişimi vb. şeklinde) biyo-tanıma denir.

•Dönüştürücü: Dönüştürücü, bir enerji biçimini diğerine dönüştüren bir elemandır. Bir biyosensörde, dönüştürücünün rolü, biyo-tanıma olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştürmektir. Bu enerji dönüşüm süreci sinyalizasyon olarak bilinir. Çoğu dönüştürücü, genellikle analit-biyoreseptör etkileşimlerinin miktarıyla orantılı optik veya elektrik sinyalleri üretir.

•Elektronik: Bu, dönüştürülmüş sinyali işleyen ve görüntüleme için hazırlayan bir biyosensörün parçasıdır. Amplifikasyon ve sinyallerin analogdan dijital forma dönüştürülmesi gibi sinyal koşullandırmasını gerçekleştiren karmaşık elektronik devrelerden oluşur. İşlenen sinyaller daha sonra biyosensörün görüntüleme ünitesi tarafından ölçülür.

• Ekran: Ekran, bir bilgisayarın sıvı kristal ekranı veya kullanıcı tarafından anlaşılabilir sayılar veya eğriler üreten doğrudan bir yazıcı gibi bir kullanıcı yorumlama sisteminden oluşur. Bu bölüm genellikle biyosensörün sonuçlarını kullanıcı dostu bir şekilde üreten donanım ve yazılım kombinasyonundan oluşur. Ekrandaki çıkış sinyali, son kullanıcının gereksinimlerine bağlı olarak sayısal, grafik, tablo veya görüntü olabilir(89).

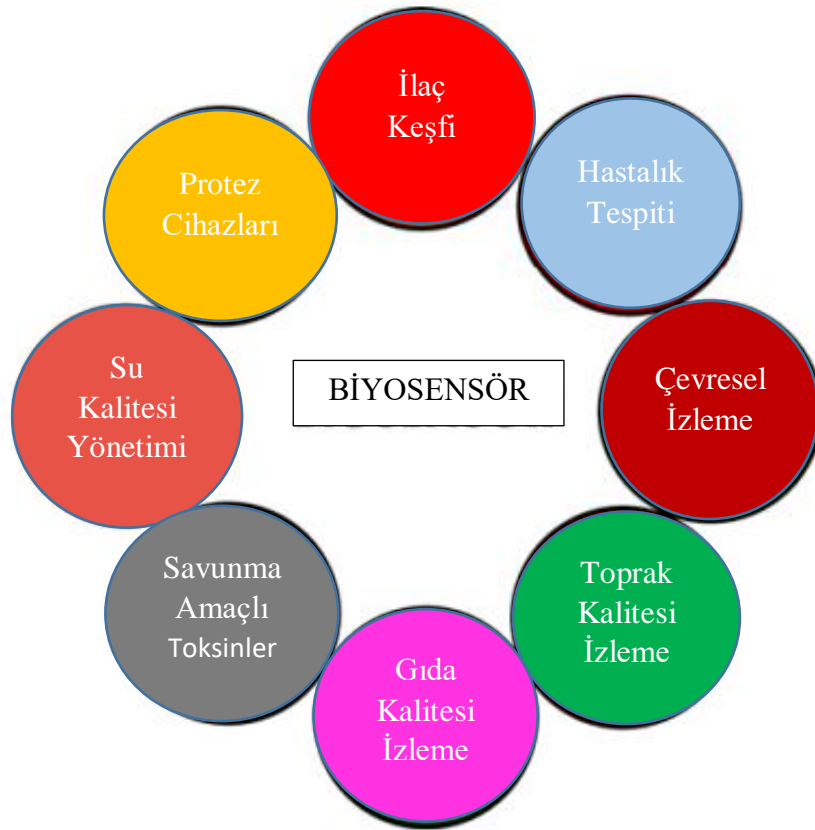


Şekil 2.4.1. Bir biyosensörün şematik gösterimi (90)

2.4.1. Biyosensör Uygulamaları

Biyosensörler, yaşam kalitesini iyileştirmeyi amaçlayan çok geniş bir uygulama alanına sahiptir. Bu seri; çevresel izleme, hastalık tespiti, gıda güvenliği, savunma, ilaç keşfi ve daha pek çok şey için kullanımlarını kapsar. Biyosensörlerin ana uygulamalarından biri, bir hastalığın göstergesi veya bir ilacın hedefi olan biyomoleküllerin tespitidir. Örneğin, elektrokimyasal biyosensing teknikleri, protein kanseri biyobelirteçlerini tespit etmek için klinik araçlar olarak kullanılabilir(89, 91, 92). Biyosensörler ayrıca gıda izlenebilirliğini, kalitesini, güvenliğini ve besin değerini izlemek için platformlar olarak da kullanılabilir(93, 94).

Şekil 2.4.1.1., biyosensörlerin kullanıldığı farklı araştırma alanlarını göstermektedir.



Şekil 2.4.1.1. Biyosensörlerin başlıca uygulama alanları (90)

2.5.Nanoteknoloji

Alandan bağımsız olarak, minyatürleştirilmenin her zaman çeşitli nedenlerle faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin, biyosensörün boyutunu mikro veya nano ölçeğe indirmek, daha iyi bir sinyal-gürültü oranının yanı sıra daha küçük numune hacimleri kullanma olasılığının yanı sıra daha düşük tahlil maliyetleri anlamına gelir. Ayrıca, nano ölçekli boyutlara doğru giderken, algılama aktif alanının yüzey-hacim oranı artar ve algılama elektrodunun boyutları ile hedef biyobelirtecin boyutları karşılaştırılabilir hale gelir. Bu, hem spesifik olmayan bağlanmanın azalmasına hem de hedef moleküle doğru bağlanma verimliliğinin artmasına neden olur. Sonuç olarak, biyoreseptör algılama sistemi için aktif bir dönüştürücü haline gelir ve tek moleküllü algılama gerçekleştirmek mümkün hale gelir(95).

Bir elektrokimyasal sistemdeki ilginç bir gerçek, nano ölçekli boyutlara doğru çift katmanlı kapasitansın elektrot alanına bağımlılığı nedeniyle önemli ölçüde azalmasıdır. Sonuç olarak, son derece düşük $R_s C_{dl}$ zaman sabiti (burada R_s , direncidir ve C_{dl} çift katmanlı kapasitansdır) ultra hızlı elektron transfer kinetiğine izin verir ve kısa ömürlü ara türler de araştırılabilir. Zaman sabiti azaldıkça, bir ölçümü gerçekleştirmek için gereken süre de nanosaniye alanına doğru azalır. Dahası, C_{dl} önemli ölçüde azaldığında, bir başka ilginç sonuç, normal mikroelektrotların kullanılmadığı yerlerde yüksek çözelti direncine sahip ortamlarda ölçüm yapma olasılığıdır. Aslında, $R_s C_{dl}$ faktörünü sabit tutarak, destekleyici bir elektrolit gerektirmeden bile ölçümler yapmak mümkündür(96).

Grafen, grafen oksit ve karbon nanotüplerin (tek veya çoklu tek atom kalınlığında karbon konsantrik tüpler) yanı sıra farklı malzemelerin nanopartikülleri ve nanotellerin entegrasyonu, elektrot üretimi için literatürde yaygın olarak bildirilmiştir. Bu şekilde imal edilen biyosensörler, günümüzde daha önce mümkün olandan daha düşük algılama sınırlarına izin vererek tek moleküllü algılamayı bile mümkün kılmaktadır(89).

PHEA konsantrasyonunun tespiti için florometrik enzim analizi, HPLC ve tandem kütle spektrometrisi kullanılır(7, 8). Bununla birlikte, bu teknikler zaman alıcıdır ve pahalı ekipmanlar gerektirir. Bu nedenle hassas, seçici, hızlı ve düşük maliyetli bir tekniğe sahip PHEA tespiti klinik takip için büyük önem taşımaktadır.

Bir yarı iletken olarak WS_2 , elektron taşınmasını ve aktif bölgeleri azaltabilir. WS_2 'nin grafen oksit/grafen bazlı nanomalzemelere dahil edilmesi, elektron transferi, elektrokimyasal iletkenlik ve agregasyonsuzluk kinetiğini iyileştirebilir(9, 10). Azot, bor,

fosfor ve kükürt gibi bazı heteroatomların karbon bazlı malzemelere katılması, yarı iletken özelliklerini ve gelişmiş performansa neden olan aktif alanları belirleyebilir(11, 12). Nanomalzemeler üzerindeki azot, bor, fosfor ve kükürt atomlarının karbon atomlarına oranı, sentez ve üretim prosedürlerini etkilemektedir. Elektrik iletkenliği ve bağlanma eğilimi gibi bazı özellikleri nedeniyle, elektrokimyasal sensör uygulamalarında grafen/grafen oksit bazlı heteroatomlar sıklıkla kullanılmıştır(13, 14).

Mevcut çalışmada, PHEA tespiti için WS₂ NFs/N,B-GR nanokompozitine dayalı yeni bir moleküler baskılı elektrokimyasal sensör geliştirilmiştir. Yüksek saflığa sahip çevre dostu WS₂ NFs/N,B-GR nanokompozit, hidrotermal sentez ile hazırlanmıştır. Daha sonra WS₂ NFs/N,B-GR modifiye elektrot yüzeyine yüksek seçici nano kavite sağlayan moleküler baskılama yöntemi uygulanmıştır. Moleküler baskılama tekniği, seçilen hedef molekülü (protein, iyon, pestisit gibi) şekil, boyut ve geometrik yapı bakımından tanıyan herhangi bir polimer matrisinde hafıza bölgelerinin oluşturulması olarak tanımlanır(15). Seçici tanıma bölgelerine sahip polimerler, moleküler baskılama yöntemi ile tespit edilmesi veya uzaklaştırılması gereken hedef molekül için hazırlanır(16). Moleküler baskılama yöntemi kullanılarak hazırlanan destek matrislerinin, hedef analit molekülünü yüksek seçicilikle belirlemesi önemlidir(17). Son olarak, hazırlanan elektrokimyasal PHEA sensörü, 3.0×10^{-12} M LOD ve çevresel uyumluluk ile yüksek seçicilik ve yüksek hassasiyet göstermiştir. Dolayısıyla bu çalışma özellikle fenilketonüri tanısı ve daha konforlu bir yaşam için literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Kimyasallar ve Aparatlar

PHEA, D-Fenilalanin (DPHEA), D-Triptofan (DTRY), tirozin (TYR), dopamin (DOP), pirrol (Py), azot kaynağı olarak üre ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), bor kaynağı olarak borik asit (H_3BO_3), sodyum metatungstat ($\text{Na}_6[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}]$), tiyoasetamid ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NS}$), trikloroasetik asit (TCA) ve oksalik asit ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) Sigma-Aldrich tarafından korunmuştur. Elektrolit ve seyreltme çözeltisini desteklemek için 0.1 M, pH 7.0 fosfat tamponlu salin (PBS) hazırlandı.

3.1.1. Cihazlar

Nanoyapıların fizikokimyasal özelliklerini incelemek için alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM), transmisyon elektron mikroskobu (TEM), x-ışını difraktometresi (XRD) ve x-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) analiz teknikleri uygulandı. Öte yandan, inşa edilen elektrotların elektrokimyasal davranışları hakkında daha fazla bilgi edinmek için döngüsel voltametri (CV), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) analizi Gamry Reference 600 potansiyostat-galvanostat tarafından uygulandı.

Nano yapıların yüzey morfolojilerini incelemek için ZEISS EVO 50 SEM (Carl-Zeiss-Stiftung, Almanya) ve JEOL 2100 HRTEM (JEOL Ltd., Tokyo, Japonya) kullanıldı. Nanomalzemelerin XRD spektrumları, 0.154 nm dalga boyunda Cu- $\text{K}\alpha$ radyasyonlu bir Rigaku X-ışını difraktometresi (MiniFlex, Japonya/ABD) kullanılarak toplandı ve XPS analizi, bir PHI 5000 Versa Probe tipi x-ışını fotoelektron spektrometresi (Φ ULVAC-PHI.Inc., Japonya/ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Gamry Reference 600 iş istasyonu (Gamry, ABD) ayrıca üretilen elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonları için CV, EIS ve DPV araştırmalarını yürütmekle görevlendirildi.

3.2. WS_2 nanoçiçekler ve WS_2 NFs/N,B-GR Üretimi

İlk olarak, önceki çalışmalarımıza göre grafen oksit hazırlandı (97, 98). Daha sonra N,B-GR'nin hazırlanması için iki aşamalı hidrotermal işlem uygulandı. Üre (10.0 mg) ve borik asit (10.0 mg), grafen oksit (30.0 mL, 2.0 mg mL⁻¹) süspansiyonu içinde seyreltildi ve karışım, 10 saat boyunca 200°C'de Teflon-otoklava taşındı. Üç yıkama işleminden sonra süspansiyon, 30°C'de 24 saat kurutuldu. Son olarak N,B katkılı grafen (**N,B-GR**) başarıyla hazırlandı.

WS₂ NFs hidrotermal işleme hazırlandı. Bu amaçla sodyum metatungstat (0.300 g) ve tiyoasetamid (0.500 g), ultra saf su (50.0 mL) içinde seyreltildi. Daha sonra karışım, 30°C'ye ve 2 saat süreyle karıştırma işlemine tabi tutuldu. Daha sonra yukarıdaki karışıma düzenli ve muntazam bir düzende (1.0 g) oksalik asit ilave edildi ve 1 saat karıştırıldı. Daha sonra, süspansiyon ısıtma işlemine tabi tutuldu (48 saat boyunca 250 ° C). 60 °C'de soğutma işleminden sonra, ürün etanol çözeltisi ile temizlendi.

N,B-GR süspansiyonunun (ultra saf suda 5.0 mg mL⁻¹) hazırlanmasından sonra, N,B-GR süspansiyonuna WS₂ NFs (10.0 mg) ilave edildi ve hidrotermal işlem 48 saat boyunca 250 °C'de başlatıldı. Bundan sonra, elde edilen ürün ultra saf su ile yıkandı ve 25 ° C'de kurutuldu. Son olarak, N,B katkılı grafen temelli WS₂ nanoçiçekleri hazırlandı (**WS₂ NFs/N,B-GR**).

3.3. WS₂ NFs/N,B-GR modifiyeli GCE üretimi

Camsı karbon elektrot (GCE), bildirilen prosedüre (99) göre parlatıldı. GCE temizlendikten sonra temiz GCE üzerine WS₂ NFs/N,B-GR dispersiyonu (30.0 µL, 0.3 mg mL⁻¹) damlatıldı. Çözücünün buharlaşmasını önlemek için IR lambasının 45 dakika boyunca maruz kalmasından sonra, WS₂ NFs/N,B-GR modifiye GCE (**WS₂ NFs/N,B-GR/GCE**) etiketlendi ve sonraki kullanım için saklandı. N,B-GR modifiye GCE (**N,B-GR/GCE**) aynı protokol ile hazırlandı.

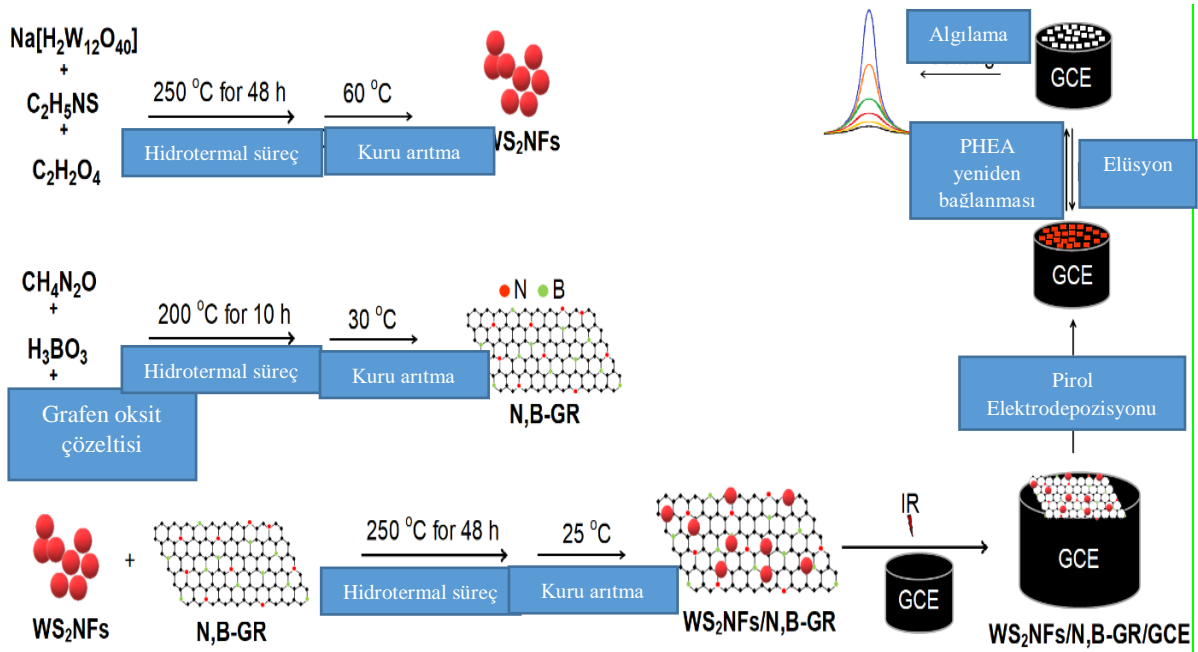
3.3.1. GCE Temizleme prosedürü

GCE elektrotları, ince ıslak zımpara kağıdı (tane boyutu 4000) ile ayna benzeri bir cilaya parlatılarak temizlendi ve hazırlandı. Mikro bez pedler (Buehler, Lake Bluff, IL, ABD) üzerinde 0.1 µm ve 0.05 µm alümina bulamaçlarında (Baikowski Int. Corp., ABD) art arda parlatıldılar. Elektrotlar önce iki kez ultra saf suda ve 50:50 (h/h) izopropil alkol ve aktif karbon üzerinde saflaştırılmış asetonitril (IPA+MeCN) çözeltisinde sonike edildi. İz alümina'nın su ile durulanarak yüzeyden uzaklaştırılmasından ve ultrasonik bir banyoda (Bandelin RK 100, Almanya) su ile kısa bir süre temizlenmesinden sonra IPA + MeCN karışımı saflaştırıldı, GCE, elektrot yüzeyinden fizisorbe edilmiş, reaksiyona girmemiş malzemeleri uzaklaştırmak için MeCN ile durulandı. Modifikasyon işleminden önce elektrotlar argon gazı akımı ile kurutuldu.

3.4. PHEA baskılı sensörün üretimi ve PHEA'nın uzaklaştırılması

PHEA baskılı elektrot (**MIP/WS₂ NFs/N,B-GR/GCE**), 25.0 mM PHEA içeren 0.1 M, pH 7.0 PBS çözeltisi içinde 100.0 mM Py varlığında yapılmıştır. Yukarıdaki analit ve

monomer çözeltisinin elektrokimyasal hücreye taşınmasından sonra, potansiyel tarama (0.0V / +1.5V) CV ile ardışık 20 döngü ile başlatıldı (Tarama hızı: 200 mV s⁻¹). Ardışık 20 döngüden sonra, MIP elektrotu ultra saf su ile yıkandı ve 25 °C'de kurutuldu. PHEA baskısız elektrot (*NIP/WS₂ NFs/N,B-GR/GCE*), aynı üretim yöntemiyle PHEA olmadan hazırlanmıştır. Şekil 3.4.1., WS₂ NFs/N,B-GR nanokompozit ve PHEA baskılı elektrokimyasal elektrotun hazırlama protokolünü göstermektedir. PHEA'nın elektrot yüzeyinden elüsyon çalışmaları için, tüm MIP elektrotları 20 dakika boyunca bir karıştırıcı ile 30.0 mL NaCl çözeltisi (2.0 M) içeren bir banyoya kondu. Daha sonra MIP elektrotları 25 °C'de kurutuldu.



Şekil 3.4.1. WS₂ NFs/N,B-GR nanokompozit ve PHEA baskılı elektrokimyasal elektrotun hazırlık protokolü

3.5. Örnek hazırlama

Elektrokimyasal MIP sensör uygulaması için süt numunelerinin hazırlanma prosedürü (100):

10.0 mL süt numunesi 2.0 mL TCA (10.0% m/v) ile 40 saniye vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı ve 5000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Süpernatant başka bir santrifüj tüpüne

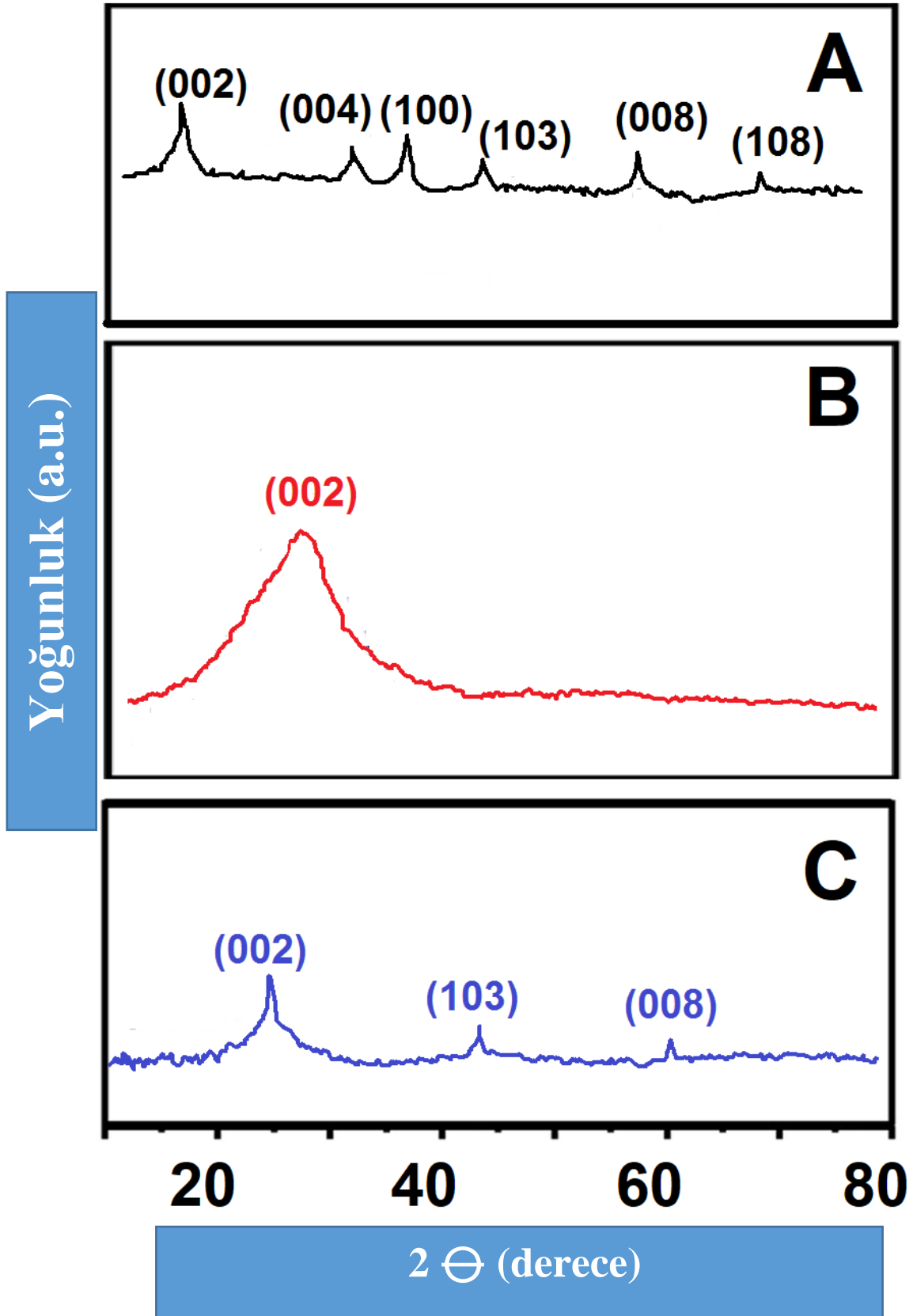
aktarıldı. Daha sonra, süpernatant L-Fenilalanin analizi için 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile seyreltildi.



4.BULGULAR

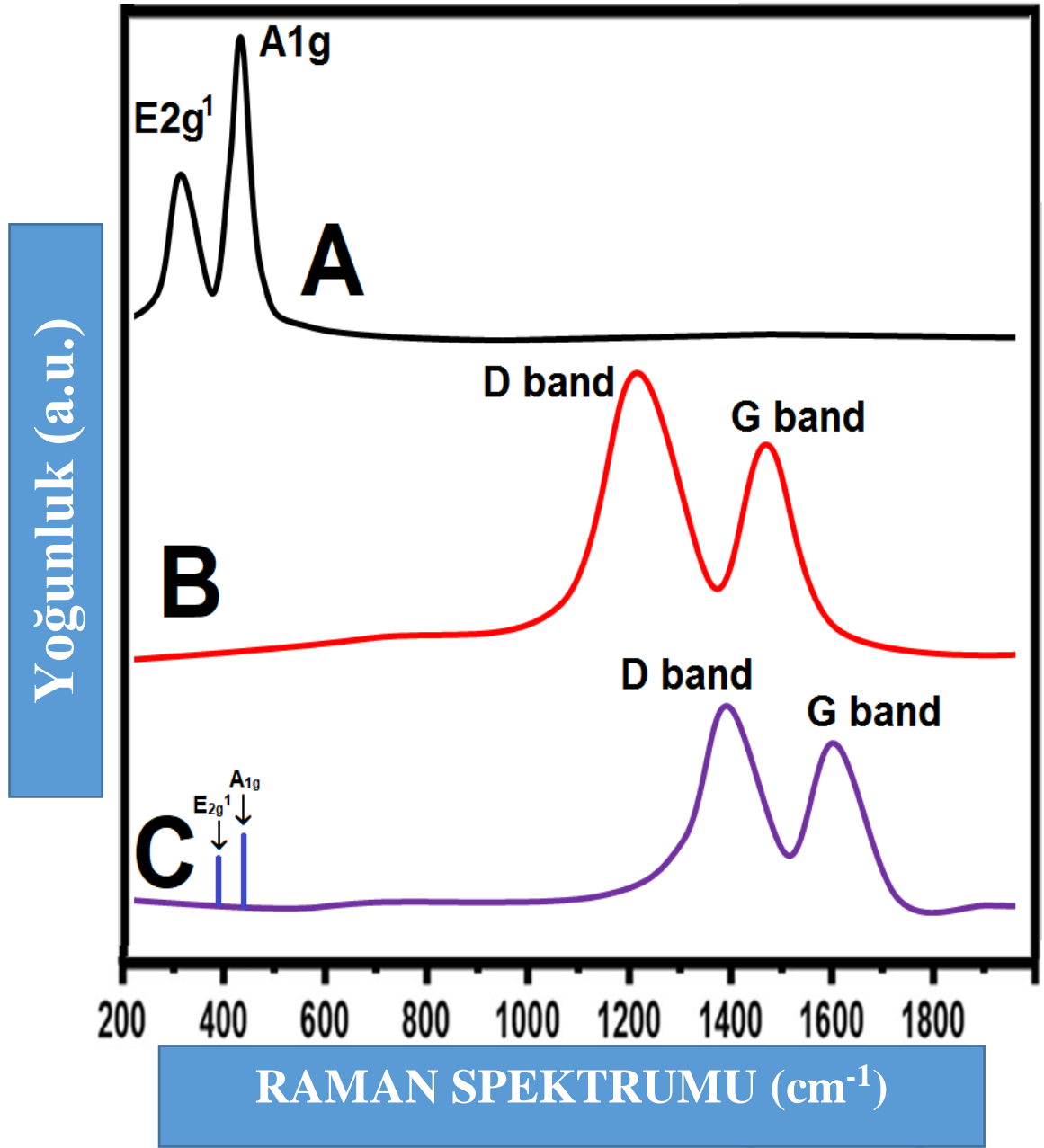
4.1. WS₂ NFs ve WS₂ NFs/N,B-GR Karakterizasyonları

XRD ölçümleri, kristalografik düzlemlerin belirlenmesi ve WS₂ NFs'e N,B-GR katılımının doğrulanması için gerçekleştirildi. Şekil 4.1.1.A'ya göre, altıgen faz ve safsızlık XRD tepe noktaları, WS₂ NFs'in kristal yapısını doğruladı ve 14.28°, 33.08°, 40.09°, 46.87°, 59.14° ve 60.17°deki XRD tepeleri, sırasıyla (002), (004), (100), (103), (008) ve (108) kafes düzlemlerine atfedildi. WS₂ NFs'in katmanlı istiflenmesi (002) düzlem varlığı ile doğrulandı (14). Şekil 4.1.1.B'ye göre, (002) düzlemine atfedilen 28.07°deki XRD tepe noktası, grafen oksidin hidrotermal sentez yoluyla N,B-GR'ye başarılı bir şekilde dönüşümünü doğruladı. WS₂ NFs'in XRD spektrumları üzerinde 14.28°deki belirgin XRD zirvesi, WS₂ NFs/N,B-GR kompozitinin XRD spektrumlarında kayboldu (Şekil 4.1.1.C). Tersine, grafit kristal düzlemlerine karşılık gelen 24.47°deki XRD tepe noktası, hidrotermal sentez sırasında grafen oksidin grafene indirgenliğini gösterdi(9, 101). Ek olarak, WS₂ NFs'in grafen levhalar üzerinde ex-situ oluşumu nedeniyle WS₂ NFs/N,B-GR kompozitinin XRD spektrumlarında (100) ve (108) düzlemlerinde bastırılmış XRD tepe noktaları vardır. N,B-GR ile karşılaştırıldığında WS₂ NFs'in atom yarıçapları nedeniyle (002) düzleminde belirgin bir kayma oldu ve bu bozulma elektrokatalitik aktiviteyi sağlayan kusurlara neden oldu(102, 103).



Şekil 4.1.1. (A) WS₂ NFs, (B) N, B-GR ve (C) WS₂ NFs/N,B-GR kompozitin XRD spektrumları

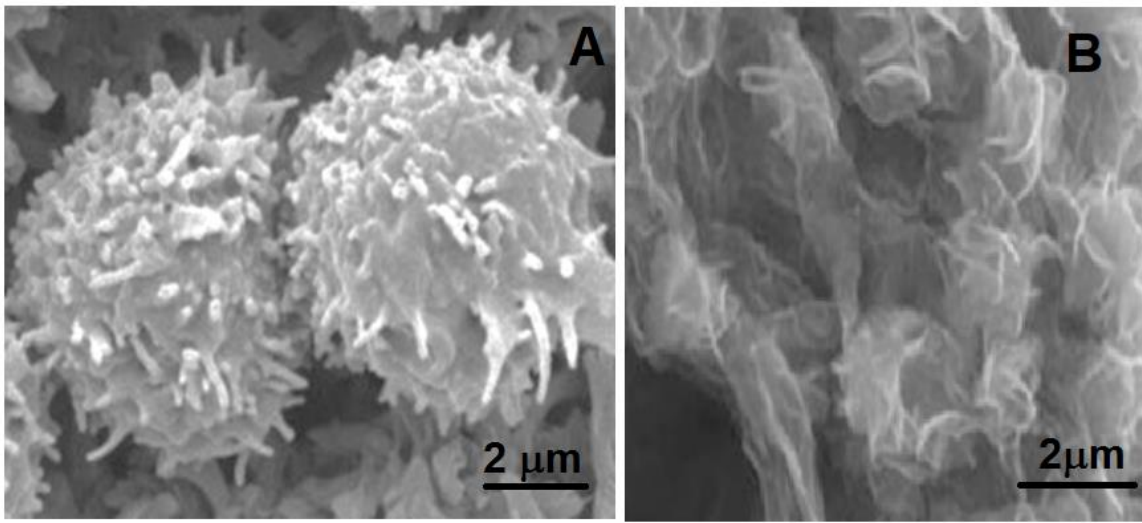
İkinci olarak, kusurlar ve gerinim etkileri gibi yapısal bilgilerin araştırılması için Raman spektroskopisi çalıştırıldı. WS₂ NFs'in Raman spektrumlarına göre (Şekil 4.1.2. A), 418 cm⁻¹'de A_{1g} ve 351 cm⁻¹'de E_{2g}¹ ile ilgili iki önemli bant WS₂ NFs'in varlığını göstermiştir. Tungsten atomunun yüksek kütlesi nedeniyle fononlar farklı frekanslara kaymış ve yeni raman bantları ortaya çıkmamıştır. Kafes gerilimi ve Van der-Waals kuvveti arasındaki uyumsuzluk nedeniyle, WS₂ NFs'in A_{1g} modunun frekans kaymaları meydana gelmiştir(14). E_{2g}¹ ve A_{1g} sırasıyla tungsten/kükürt atomlarının düzlem içi titreşimlerini ve kükürt atomunun(104) düzlem dışı titreşimlerini gösterdi. N,B-GR'nin Raman spektrumlarına göre (Şekil 4.1.2.B), D bandına (bozukluğa bağlı bant) ve G bandına (sp² karbon atomlarının düzlem içi titreşimi) atfedilen iki Raman absorpsiyon bandı, N,B-GR'nin başarılı bir şekilde hazırlandığını doğruladı. WS₂ NFs/N,B-GR kompozitinin hazırlanmasından sonra (Şekil 4.1.2.C), E_{2g}¹ ve A_{1g} bantları, WS₂ NFs'in yoğunluğunun azalması nedeniyle yüksek dalga sayısına küçük bir kayma gösterdi.



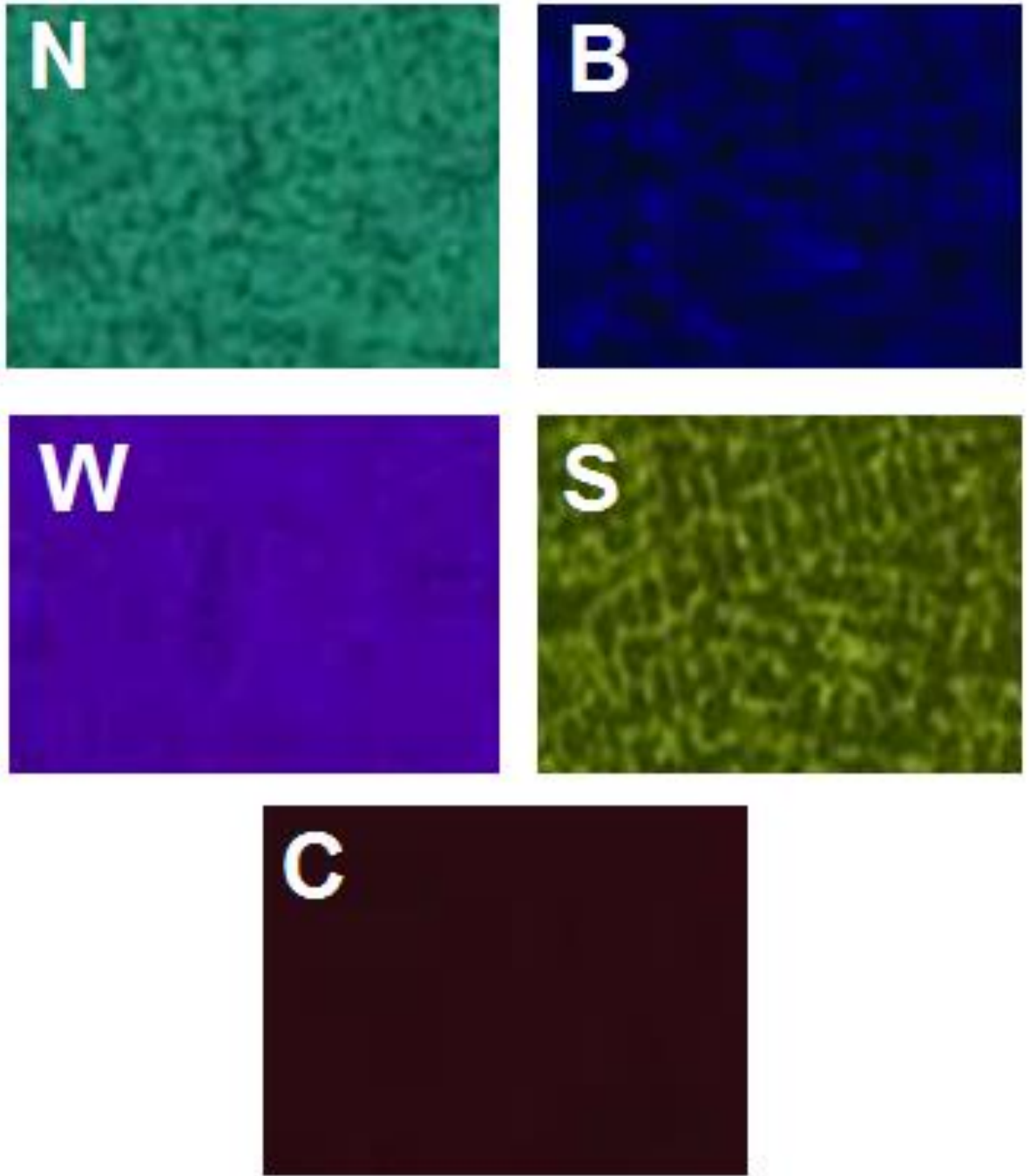
Şekil 4.1.2. (A) WS₂ NFs, (B) N, B-GR ve (C) WS₂ NFs/N,B-GR kompozitinin Raman spektrumları

WS₂ NFs ve WS₂ NFs/N,B-GR kompozitinin yüzey morfolojik analizi için FESEM ve TEM incelemeleri yapıldı. Şekil 4.1.3.A'ya göre hiyerarşik çiçek benzeri yapı gözlemlendi ve 4-8 nm çapında ince nano tabakalardan oluşuyordu. Kompleks oluşturucu bir kimyasal olarak oksalik asit içeren hidrotermal sentez işlemi nedeniyle, WS₂ NFs'in iyi organize edilmiş düzenlemesi meydana geldi. Oksalik asit, yüzey enerjisi düşüşü ve kafes enerjisi artışı yoluyla WS₂ NFs'in yarıçapını yeniden düzenledi ve arayüz enerjisini ve

oryantasyon davranışını etkileyen bir şablon sağladı. Şekil 4.1.3.B, N, B katkıli grafen üzerinde WS_2 NFs oluşumunu gösteren WS_2 NFs/N,B-GR kompozitinin FESEM görüntüsünü göstermektedir. Ara bağlantı yapısı, elektrokimyasal aktif yüzeyleri ve kolay elektron transferini sağlayan gözenek yapısını artırabilir. Azot ve bor atomlarının grafen levhalar üzerindeki katkılama (doping) işlemi, karbon atomları yerine azot ve bor atomlarının yer değiştirmesi nedeniyle levha benzeri morfolojiyi değiştiremez. WS_2 NFs/N,B-GR kompozitinin EDX görüntüsüne (Şekil 4.1.4.) göre, W, S, C, N ve B atomlarının varlığı ve düzenli dağılımlar, WS_2 NFs/N,B-GR kompozitinin başarılı üretimini doğruladı.



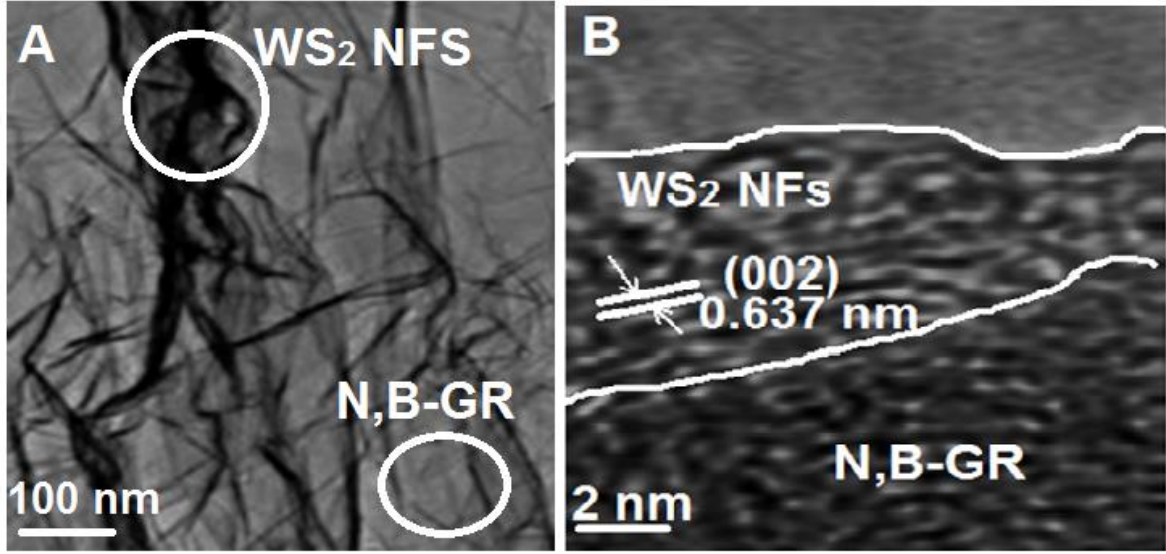
Şekil 4.1.3. (A) WS_2 NFs ve (B) WS_2 NFs/N,B-GR kompozitinin FESEM grafikleri



Şekil 4.1.4. WS₂NFs/N,B-GR kompozitinin EDX eşleme (haritalama) görüntüsü

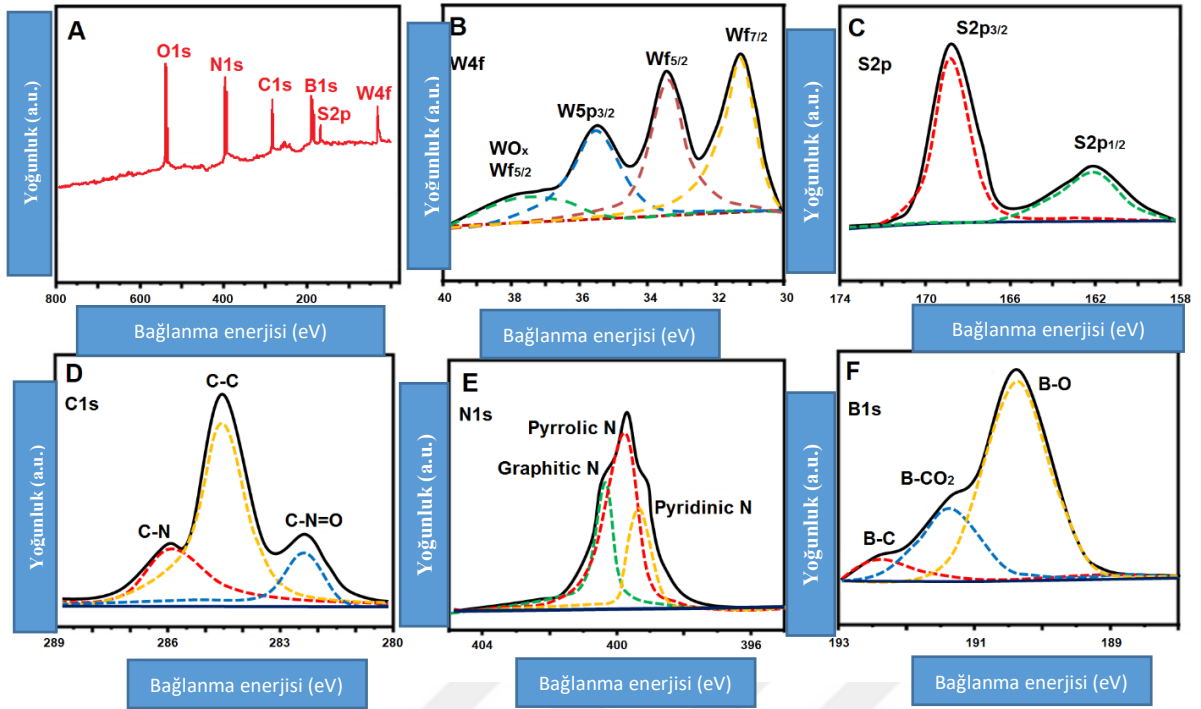
WS₂ NFs/N,B-GR kompozitinin TEM ve HRTEM görüntüleri (Şekil 4.1.5.) elde edildi. WS₂ NFs/N,B-GR kompoziti, (002) altıgen düzleme atfedilen 3-5 ince katmandan ve 0.637 nm ara katman mesafesinden oluşuyordu. WS₂ NFs'in N, B katkılı grafen ile ara bağlantısının nedeni, daha fazla elektrokimyasal aktif yüzey sağlayan grafen levhalar

üzerinde asılı bağlardan kaynaklanmaktadır. Ek olarak, WS₂ NFs/N,B-GR kompozitinin HRTEM görüntüsü, bölge eksenel oryantasyonu ile yüksek kristallik doğası göstermiştir.



Şekil 4.1.5. WS₂ NFs/N,B-GR kompozitinin TEM ve HRTEM görüntüleri

Daha sonra kompozit malzeme üzerindeki kimyasal etkileşimlerin ve bantların araştırılması için XPS ölçümleri yapılmıştır (Şekil 4.1.6.). Tarama spektrumu (Şekil 4.1.6.A), WS₂ NFs/N,B-GR kompozitinin varlığını doğrulayan W, S, N, B, C ve O'nun varlığını gösterdi. Şekil 4.1.6.B, W_{4f7/2} ve W_{4f5/2} ile ilgili olarak 31.78 ve 33.86 eV'de iki XPS zirvesini gösteren yüksek çözünürlüklü W_{4f} spektrumunu gösterdi. Bununla birlikte, 35.93 eV'deki XPS zirvesi, grafen tabakasındaki WO_x grubu nedeniyle W_{5p3/2} ile korelasyon gösterdi. Şekil 4.1.6.C'ye göre, 162.63 ve 169.18 eV'deki iki XPS tepe noktası, sırasıyla S_{2p3/2} ve S_{2p1/2} için W-S bağının S²⁻ iyonlarına karşılık geldi(14, 105, 106). Yüksek çözünürlüklü C_{1s} spektrumları (Şekil 4.1.6.D), sırasıyla -C-N, -C-C- ve -C-N=O (107)bağlarına atfedilen 286.12, 284.84 ve 283.64 eV'de üç fonksiyonel grup gösterdi. 284.84 eV'deki tepe noktası, sp² veya grafitik düzlemin restorasyonu ile ilgiliydi. Şekil 4.1.6.E, sırasıyla pirrolik (N-X), piridinik (N-P) ve kuaterner (N-O) nitrojene karşılık gelen 399.37, 400.08 ve 401.97 eV'de üç fonksiyonel grubu gösteren yüksek çözünürlüklü N_{1s} spektrumlarını gösterdi(108). Son olarak, yüksek çözünürlüklü B_{1s} spektrumları (Şekil 4.1.6.F), sırasıyla B-O, B-CO₂ ve B-C'ye atfedilen 190.45, 192.89 ve 192.76 eV'de üç fonksiyonel grup gösterdi.



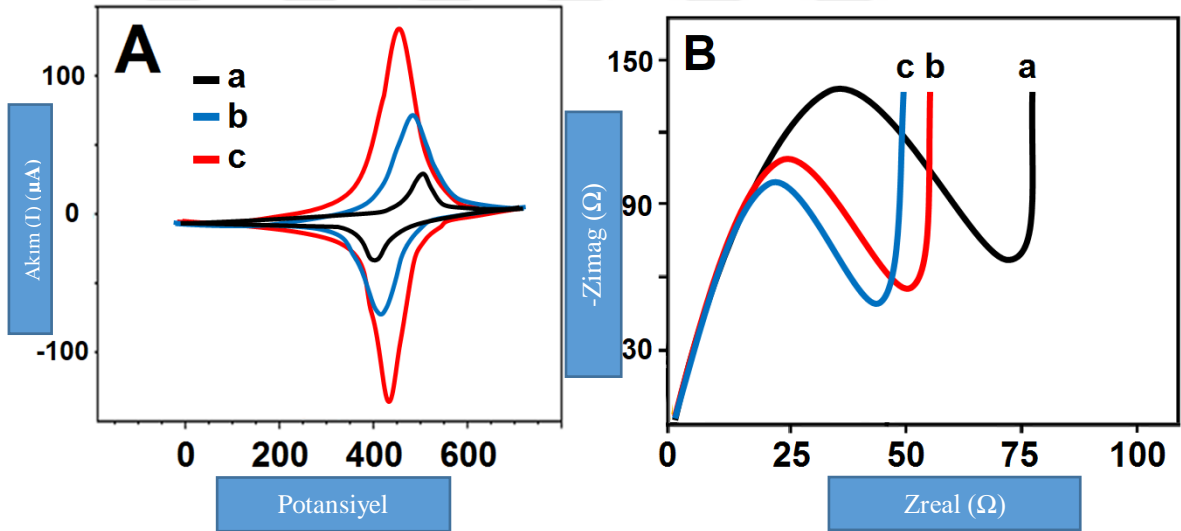
Şekil 4.1.6. (A) WS₂ NFs/N,B-GR kompozitinin XPS araştırması ve (B) W4f, (C) S2p, (D) C1s, (E) N1s, (F) B1s'nin yüksek çözünürlüklü XPS spektrumları

4.2. N,B-GR ve WS₂ NFs/N,B-GR modifiye elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu

N,B-GR ve WS₂ NFs/N,B-GR modifiye elektrotların (N,B-GR/GCE ve WS₂ NFs/N,B-GR/GCE) elektrokimyasal karakterizasyonları 0.1 M KCl içeren 1.0 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} içinde CV ve EIS ile araştırıldı. İlk olarak, anodik ve katodik zirveler sırasıyla modifiye edilmemiş GCE kullanılarak Epa=500 mV ve Epc=400 mV'de gözlenmiştir (Şekil 4.2.1A'nın a eğrisi). N,B-GR/GCE ile grafenin yüksek yüzey alanı ve elektriksel iletkenlik gibi fizikokimyasal özelliklerinin bir sonucu olarak daha anodik ve katodik tepe akımları elde edilmiştir (109, 110) (Şekil 4.2.1A'nın b eğrisi). Son olarak, en yüksek elektrokimyasal tepkiler, elektron transfer kabiliyetinin iyileştirilmesi ve elektrot yüzeylerinde daha fazla elektrokimyasal aktif alan sağlayan agregatif olmayan kompozitler nedeniyle WS₂ NFs'in N, B-GR / GCE'ye (Şekil 4.2.1A'nın c eğrisi) dahil edilmesinden sonra gözlenmiştir(9). Etkin elektrokimyasal aktif alan, daha kolay elektron transferi sağlar ve elektrot yüzeylerinin elektrokimyasal performansını etkiler. Böylece etkin elektrokimyasal aktif alanlar Randel'in Sevcik denklemi(111) ile elde edilmiş ve etkin elektrokimyasal aktif alanlar modifiye edilmemiş GCE, N,B-GR/GCE ve WS₂ NFs/N,B-GR/GCE için sırasıyla 0.072 cm², 0.193

cm² ve 0.287 cm² olarak hesaplanmıştır. Son olarak, modifiye elektrotlar arasında WS₂ NFs/N,B-GR/GCE, PHEA saptamasına yönelik üstün elektrokimyasal aktivite gösterdi.

WS₂ NFs/N,B-GR nanokompozit ve GCE arasındaki reaksiyon kinetiğinin araştırılması için 20 mV potansiyelde EIS ölçümleri (Şekil 4.2.1B) sağlandı. EIS spektrumları, yük-transfer direncinin (R_{ct}) belirlenmesi için Randles devresi ile Nyquist grafiklerine yerleştirildi. WS₂ NFs/N,B-GR nanokompozit ve GCE arasındaki elektron transferi, daha yüksek frekansta yarım daire oluşumu ile açıklanmıştır. R_{ct} değerleri, modifiye edilmemiş GCE (eğri a) için 95 ohm, N,B-GR/GCE (eğri b) için 65 ohm ve WS₂NFs/N,B-GR/GCE (eğri c) için 50 ohm olarak hesaplandı. Modifiye edilmemiş GCE, zayıf elektron transfer kinetiği sağlayan yüksek direnç ve düşük iletkenlik gösterdi. Ancak, WS₂ NFs/N,B-GR/GCE'nin en düşük direnci, PHEA tanımayaya yönelik yüksek iletkenlik ve verimli elektrokimyasal davranış gösterdi.



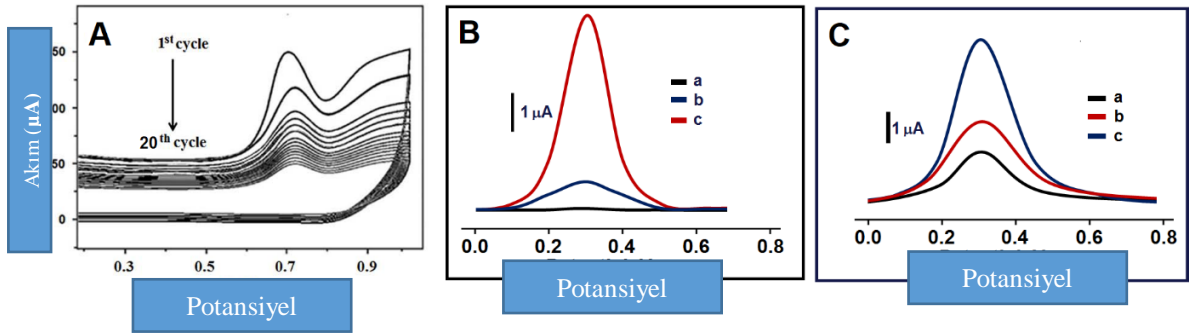
Şekil 4.2.1. (a) Modifiye edilmemiş GCE, (b) N,B-GR/GCE ve (c) WS₂ NFs/N,B-GR/GCE'de (A) CV eğrileri ve (B) EIS yanıtları (Redox probu: 1.0 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 0.1 M KCl içerir, potansiyel tarama hızı: 200 mV s⁻¹)

4.3. WS₂NFs/N,B-GR/GCE üzerinde PHEA baskılı polimer üretimi

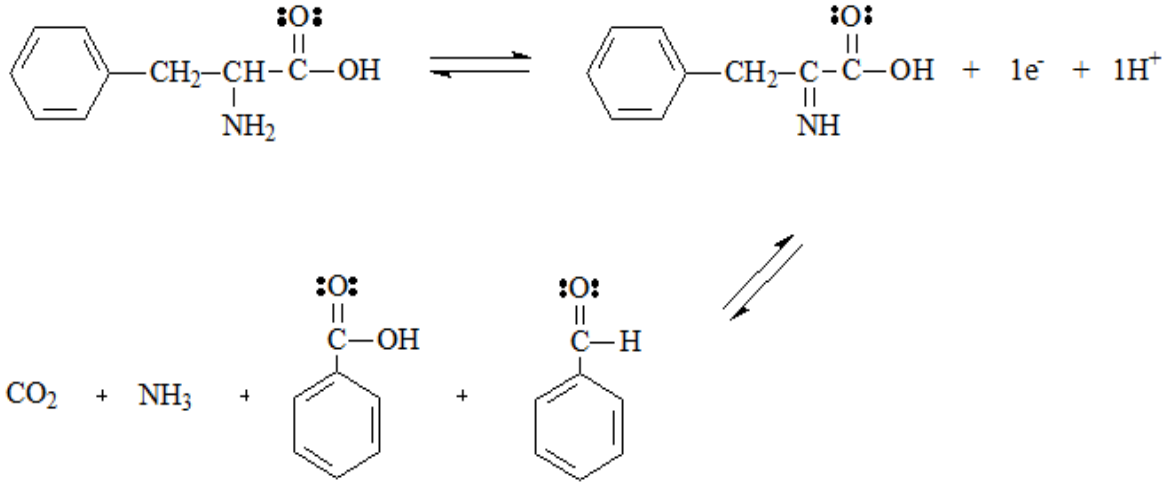
WS₂NFs/N,B-GR/GCE üzerinde 25.0 mM PHEA içeren 100.0 mM Py'nin polimerizasyonu Şekil 4.3.1.A'da gösterilmiştir. İlk taramada +0.8 V'ta belirgin polimerizasyon akım sinyalleri (µA) ortaya çıktı ancak bu akım sinyalleri ilk taramadan sonra yavaş yavaş kaybolmaya başladı ve 20. döngüde neredeyse kayboldu.

Baskı faktörünün etkisini görmek için, MIP ve NIP elektrotları üzerinde diferansiyel puls voltametrileri (DPV'ler) elde edildi (Şekil 4.3.1B). Beklendiği gibi, yalnızca boş çözeltide herhangi bir akım sinyali gözlemlenmedi (Şekil 4.3.1B'deki a eğrisi). Bununla birlikte, MIP/ WS₂ NFs/N,B-GR/GCE (Şekil 4.3.1.B'nin c eğrisi) üzerindeki tepe sinyalleri, 0,5 nM PHEA'nın varlığında NIP/ WS₂ NFs/N,B-GR/GCE'ninkinden (Şekil 4.3.1B'nin b eğrisi) baskı tekniğinin avantajını doğrulayacak şekilde daha yüksekti.

Son olarak, çeşitli PHEA baskılı elektrot (Şekil 4.3.1.C) hazırlandı ve 0.1 M PBS çözeltisi içinde 0.5 nM PHEA için kullanıldı. Şekil 4.2.1A ve Şekil 4.2.1B ile uyumlu olarak en yüksek akım sinyalleri MIP/ WS₂ NFs/N,B-GR/GCE üzerinde elde edilmiştir. Ek olarak, MIP/ WS₂ NFs/N,B-GR/GCE üzerinde PHEA için elektrooksidasyon mekanizmasını önerdik (Şekil 4.3.2.). İlk olarak, PHEA'nın oksidasyonu, bir elektron ve bir proton yoluyla bir ara madde olarak 2-imino-3-fenilpropanoik asit oluşturdu(112, 113).Sonuç olarak, NH₃ ve CO₂'nin ortadan kaldırılması, benzaldehit ve benzoik asit ürünleri sağladı.



Şekil 4.3.1. (A) WS₂ NFs/N,B-GR/GCE üzerinde 25.0 mM PHEA dahil 100.0 mM Py'nin polimerizasyonu (Tarama hızı: 200 mV s⁻¹), (B) Bu çalışmada hazırlanan elektrotların diferansiyel puls voltametrileri (DPV'ler): (a) Boş tampon çözeltisinde (pH 7.0) MIP/WS₂ NFs/N,B-GR/GCE, (b) 0.5 nM PHEA'nın 0.1 M PBS (pH 7.0) içinde yeniden bağlanmasından sonra NIP/WS₂ NFs/N,B-GR/GCE, (c) 0,5 nM PHEA'nın 0,1 M PBS (pH 7.0) içinde yeniden bağlanmasından sonra MIP/WS₂ NFs/N,B-GR/GCE, (C) 0.1 M PBS içinde 0.5 nM PHEA'nın yeniden bağlanmasından sonra farklı moleküler baskı yapan elektrotların DPV'leri (a) MIP/ modifiye edilmemiş GCE, (b) MIP/N,B-GR/GCE, (c) MIP/WS₂ NFs/N,B-GR/GCE



Şekil 4.3.2. MIP/ WS₂ NFs/N,B-GR/GCE temelli PHEA için elektro-oksidasyon mekanizması

4.4. Optimizasyon çalışmaları

Çözelti pH'nın, molar oranların, elüsyon süresinin ve tarama döngüsünün etkileri Şekil 4.4.1.1. 'de ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

4.4.1. Ph etkisi

İlk olarak, akım sinyalleri üzerindeki pH etkisi araştırılmıştır (Şek. 4.4.1.1A). En yüksek ve optimal pik akımları göz önünde bulundurduğumuzda, optimal pH olarak pH 7.0 seçilmiştir.

4.4.2. Mol oranı PHEA'dan Py monomer etkisine

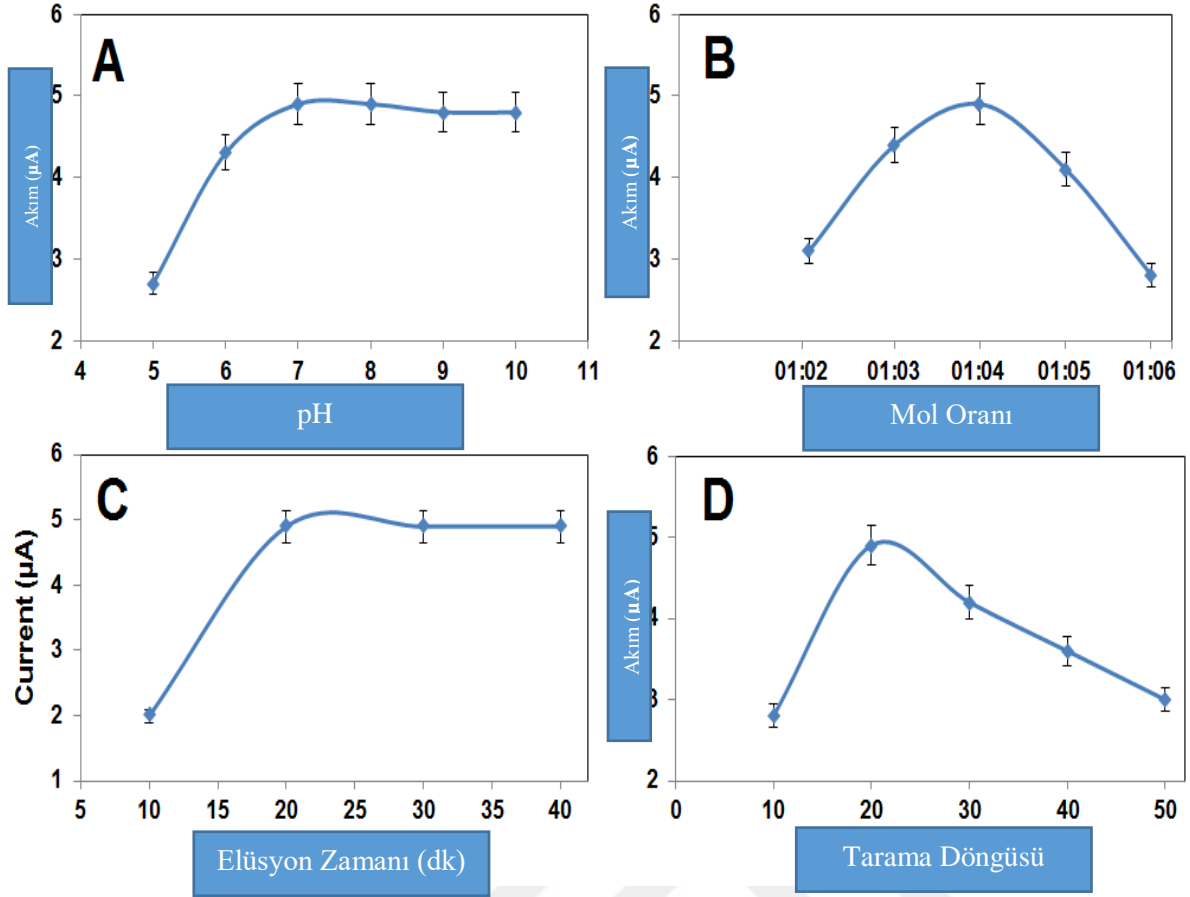
İkinci olarak, mol oranı etkisi (1:2) ila (1:6) aralığında değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.1.1B). Şekil 17B'ye göre, akım sinyalleri 100.0 mM Py'ye kadar artmıştır. Akım sinyallerindeki bu artışlar, PHEA molekülünün bağlanma yerlerinin artmasından kaynaklanmıştır. 100.0 mM Py'den sonra, daha kalın polimer tabakasının oluşumu, elektrot yüzeyinde spesifik olmayan etkileşimlerle sonuçlanmıştır. Bu nedenle, akım sinyallerinde bariz düşüşler meydana gelmiş ve bunun sonucu olarak, PHEA baskılama elektrokimyasal sensörünün geliştirilmesi için optimum mol oranı (1:4) olarak seçilmiştir.

4.4.3. Elüsyon süresi etkisi

Bu tür sensör tasarımları için, analit molekülünün elektrot yüzeyinden tamamen uzaklaştırılması kritik öneme sahiptir. Analit molekülü tamamen uzaklaştırılmadığında analit molekülünün desorpsiyon-yeniden bağlama kinetiği düşebilir ve bu durum sensör hassasiyetini etkileyebilir. Böylece, optimum desorpsiyon süresi elde etmek için 10, 20, 30 ve 40 dakika gibi çeşitli desorpsiyon süreleri denenmiştir. 20 dakika desorpsiyon süresine kadar akım sinyalleri artmış ve 20 dakika sonra elektrokimyasal sinyaller azalmış ya da sabit kalmıştır. Sonuç olarak, sonraki deneyler için 20 dakikalık optimal desorpsiyon süresi seçilmiştir (Şekil 4.4.1.1C).

4.4.4. Tarama döngüsü efekti

Diğer bir önemli parametre de sensör performansı üzerindeki tarama sayısıdır. Bu nedenle, 10, 20, 30, 40 ve 50 tarama döngülerine sahip birçok PHEA baskılı elektrokimyasal sensör hazırlanmıştır. Şekil 4.4.1.1D'ye göre, analit molekülüne özgü PHEA baskılı polimer oluşumu nedeniyle akım sinyalleri 20. tarama döngüsüne kadar artmıştır. Bununla birlikte, 20. tarama döngüsünden sonra WS₂ NFs/N,B-GR/GCE üzerinde daha kalın PHEA baskılı polimer oluşmuştur. Bu sebeple, mevcut sinyallerde belirgin düşüşler meydana gelmiştir. Son olarak, 20. tarama döngüsü optimum tarama döngüsü olarak seçilmiştir.



Şekil 4.4.1.1. (A) pH, (B) mol oranı, (C) elüsyon süresi, (D) tarama döngüsünün DPV'lerin sinyalleri üzerindeki etkisi (0,5 nM PHEA varlığında) (n = 6)

5.TARTIŞMA

Fenilketonüri tedavi edilmediği takdirde yüksek serum fenilalanin seviyeleri; geridönüşü olmayan nörobilişsel hasar, mikrosefali, büyüme geriliği, ekzematöz döküntü, psikiyatrik semptomlar ile sonuçlanmaktadır. Yüksek kan fenilalanin konsantrasyonları nörobilişsel sonuçla güçlü bir şekilde ilişkili olduğundan, bu metabolik hastalığın temel yönetim yolu esansiyel bir aminoasit olan fenilalaninin kandaki konsantrasyonlarını azaltmayı amaçlayan beslenme tedavisidir.

Yenidoğan döneminden itibaren başlanması gereken beslenme tedavisi kısıtlayıcı ve zorlayıcıdır. Bu sebeple tedaviye uyumda hastalarda özellikle ilerleyen yaşlarda sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu problemler çoğu zaman farkında olmadan alınan fenilalanin ile ilişkilidir. Fenilketonüri hastaları günlük hayatta aldıkları gıdaların içeriğinde ne kadar fenilalanin olduğunu tespit edemez. Buna bağlı olarak farkında olmadan tüketilen fenilalanin içeren gıdaların oluşturacağı intoksikasyon kısa, orta ve uzun vadede farklı klinik komplikasyonlara neden olabilir.

Fenilalanin konsantrasyonunun tespitini hızlı, hassas, seçici, ve düşük maliyetli bir şekilde sağlayacak bu biyosensör, fenilketonüri hasta grubunun yaşam konforunu artırarak olası komplikasyon riskini minimuma indirmek amacıyla tasarlanmış olup biyosensörün üretim tekniğinin; literatürdeki diğer teknikler ile karşılaştırılması, geri kazanım, seçicilik, kararlılık ve yeniden kullanılabilirlik çalışmaları aşağıdaki gibidir.

5.1. Ölçüm limiti (LOQ) ve Tespit limiti (LOD)

DPV tepe akımlarının artan PHEA konsantrasyonlarına karşı çizilmesiyle elde edilen $y (\mu A) = 9.7713x (C_{PHEA}, nM) - 0.0761$, ($R^2 = 0.9999$) kalibrasyon eğrisinde yüksek doğrusallık elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.5.1.). LOQ ve LOD değerleri sırasıyla 1.0×10^{-11} M ve 3.0×10^{-12} M olarak hesaplanmıştır. Tablo 4.5.1'de, bu çalışmada hazırlanan elektrokimyasal MIP sensörünün doğrusallık aralığı ve duyarlılık gibi bazı analitik özelliklerinin literatürde mevcut olan diğer tekniklerle karşılaştırılması hakkında bazı bilgiler sunulmuştur. Öncelikle PHEA tespiti için diğer tekniklere kıyasla daha hassas ve seçici bir elektrokimyasal sensör hazırlandığını söylemek mümkündür. Ayrıca bu çalışmada elektrokimyasal sensör hazırlanırken çevre dostu ve daha az maliyetli hidrotermal sentez tekniğinin kullanılması yeşil-kimya sentezi açısından büyük önem taşımaktadır. Son olarak,

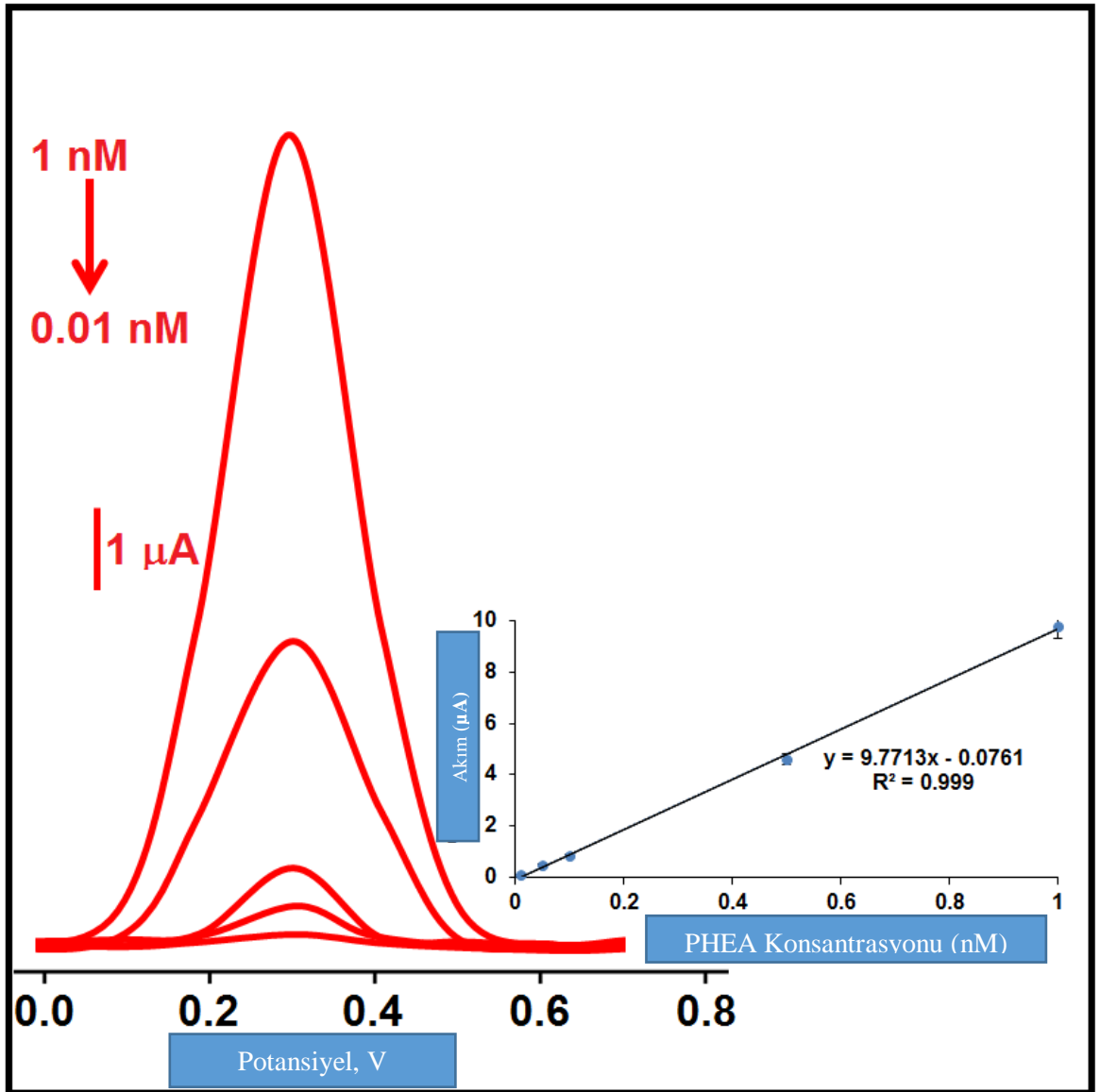
daha az kimyasal çözücü kullanılarak süt numunelerine bu elektrokimyasal sensör uygulamasının başarıyla tamamlanması, kar-maliyet açısından da önemlidir.

LOQ ve LOD değerleri (S1) ve (S2) aracılığıyla hesaplandı:

$$LOQ = 10.0 S/m \quad (S1)$$

$$LOD = 3.3 S/m \quad (S2)$$

burada S, kesmenin standart sapmasını temsil ederken, m, regresyon çizgisinin eğimini temsil eder.



Şekil 5.1.1. MIP/WS₂ NFs/N,B-GR/GCE 'de farklı PHEA miktarlarına sahip DPV'ler (1.0×10^{-11} - 1.0×10^{-9} M konsantrasyon aralığında). Ek: PHEA'nın kalibrasyon eğrisi

Tablo 5.1.1. PHEA baskılı sensörün performansının bildirilen çeşitli tekniklerle karşılaştırılması

Materyal	Doğrusal Aralık (M)	LOD (M)	Ref.
Nafyon/NQS	$3.0 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^{-4}$	3.0×10^{-6}	(114)
Fiberglas Kağıt	$5.0 \times 10^{-6} - 2.0 \times 10^{-4}$	2.0×10^{-6}	(115)
Fe ₃ O ₄ -grafen oksit	$1.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-6}$	1.5×10^{-8}	(116)
β-siklodekstrin/MWNT'ler	$5.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-4}$	1.0×10^{-9}	(117)
MIP	$2.0 \times 10^{-9} - 2.0 \times 10^{-9}$	5.9×10^{-7}	(118)
Karbon nanosfer	$1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-4}$	5.4×10^{-7}	(119)
MIP/CdS/CdSe/Zn	$5.0 \times 10^{-9} - 2.5 \times 10^{-6}$	9.0×10^{-10}	(120)
<i>MIP/WS₂NFs/N,B-GR/GCE</i>	<i>$1.0 \times 10^{-11} - 1.0 \times 10^{-9}$</i>	<i>3.0×10^{-12}</i>	<i>Bu çalışma</i>

5.2. Geri kazanım Çalışmaları

Geri kazanım deneylerinin gerçek numunelere (süt) uygulanması, hazırlanan sensörün işlevselliğinin önemli bir kanıtı olarak görülmektedir. Özellikle, yaklaşık %100'lük geri kazanım, elektrokimyasal MIP sensörünün doğruluğunun bir başka kanıtıdır (Tablo 5.2.1.). PHEA'nın geri kazanım değerleri Denklem 1 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Geri Kazanım} = \text{Bulunan PHEA, nM} / \text{Gerçek PHEA, nM} \quad (1)$$

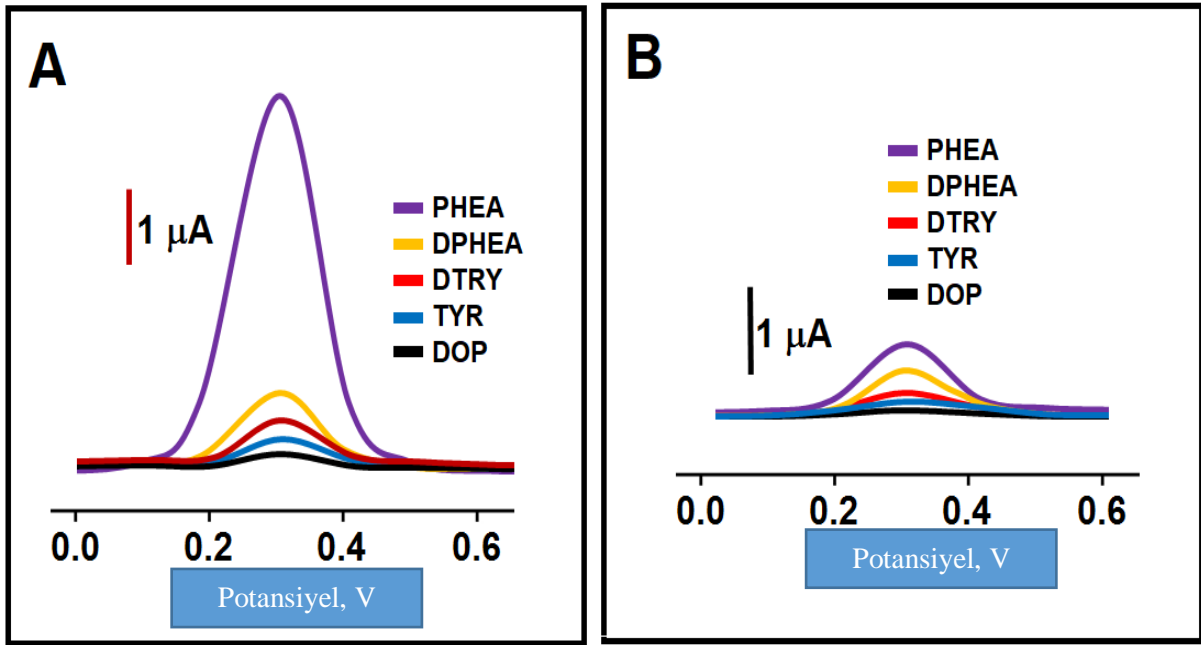
Tablo 4'e göre, hazırlanan elektrokimyasal MIP sensörü, süt numunelerinde girişim etkisi olmadan PHEA'nın verimli bir şekilde belirlenmesini sağlamıştır.

Tablo 5.2.1. PHEA'nın (n=6) geri kazanım sonuçları

Örnek	Eklenen PHEA (nM)	Bulunan PHEA (nM)	Geri Kazanım (%)
Süt	-	0.207 ± 0.004	-
	0.100	0.308 ± 0.002	100.33 ± 0.02
	0.300	0.506 ± 0.001	99.80 ± 0.01
	0.500	0.705 ± 0.003	99.72 ± 0.04

5.3. Seçicilik, kararlılık ve yeniden kullanılabilirlik çalışmaları

Elektrokimyasal MIP sensörünün seçicilik özelliğinin gösterilmesi için potansiyel enterferans olarak DPHEA, DTRY, TYR ve DOP gibi farklı çözeltiler hazırlanmıştır. MIP/ WS₂ NFs/N,B-GR/GCE'ye karşılık gelen Şek. 5.3.1 'a ve NIP/ WS₂ NFs/N,B-GR/GCE'ye atfedilen Şekil 5.3.1'a göre, kullanılan moleküler baskı yöntemi, potansiyel girişim ajanlarının varlığında PHEA tanıma için yüksek seçicilik kazanmıştır. Ayrıca Tablo 5.3.1'de seçicilik katsayısı (k) ve bağıl seçicilik katsayısı (k') değerleri gösterilmiştir. Dolayısıyla, MIP/ WS₂ NFs/N,B-GR/GCE, PHEA'ya özgü seçici nanokavitelerin bir sonucu olarak DPHEA, DTRY, TYR ve DOP'a karşı PHEA için sırasıyla 5.00, 6.67, 10.00 ve 20.00 kat daha seçicilik göstermiştir. NIP/ WS₂ NFs/N,B-GR/GCE ile elde edilen sonuçlar değerlendirilebildiğinde, moleküler baskılama yöntemi kompleks süt numunelerinde yüksek seçicilik avantajı sunabilir (Tablo 5.3.1).



Şekil 5.3.1. 0,5 nM PHEA, 100,0 nM DPHEA, 100,0 nM DTRY, 100,0 nM TYR ve 100,0 nM DOP'ta (A) MIP/ WS₂ NF/N,B-GR/GCE ve (B) NIP/ WS₂ NF/N,B-GR/GCE DPV'leri

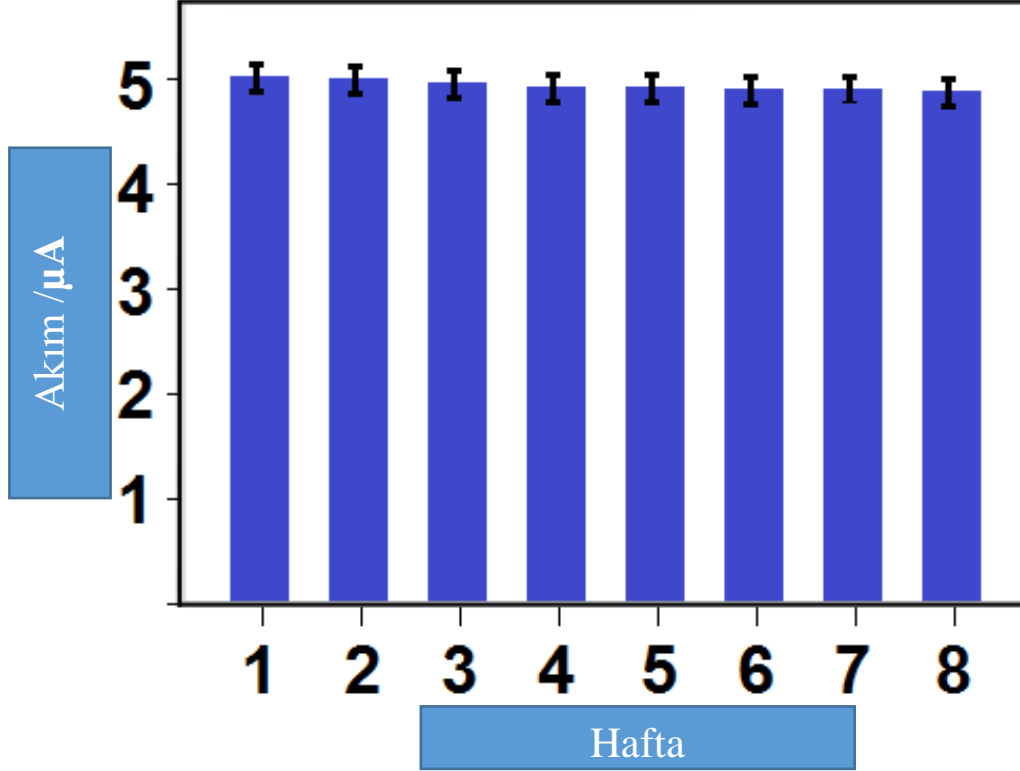
Tablo 5.3.1. PHEA baskılı elektrotların seçicilik katsayısı (k) ve bağıl seçicilik katsayısı (k') değerleri (MIP/WS₂ NFs/N,B-GR/GCE and NIP/WS₂ NFs/N,B-GR/GCE)

	MIP		NIP		k'
	ΔI (μA)	k	ΔI (μA)	k	
PHEA	5.00	-	0.75	-	-
DPHEA	1.00	5.00	0.50	1.50	3.33

DTRY	0.75	6.67	0.25	3.00	2.22
TYR	0.50	10.00	0.20	3.75	2.67
DOP	0.25	20.00	0.10	7.50	2.67

Analit konsantrasyonları: 0.5 nM PHEA, 100.0 nM DPHEA, 100.0 nM DTRY, 100.0 nM TYR and 100.0 nM DOP

Ardından stabilite testi yapıldı ve sonuçlar 8 haftalık bir süre boyunca değerlendirildi (Şekil 5.3.2). 8 haftanın sonundaki tepe sinyali, elektrokimyasal MIP sensörünün mükemmel kararlılığını doğrularak, 1 haftanın sonundaki tepe sinyalinin ~% 99.06'sı olarak değerlendirildi. Son olarak, bir MIP/WS₂ NFs/N,B-GR/GCE'nin yeniden kullanılabilirlik testi yapıldı ve elde edilen %0.39 görel standart sapma değerine sahip tepe sinyalleri, 60 kez kullanım sırasında yüksek derecede yeniden kullanılabilirliği doğruladı.



Şekil 5.3.2. MIP/ WS₂ NF/N,B-GR/GCE'nin 25.0 °C'de 0.5 nM PHEA (n = 6) dahil stabilite testi

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, fenilketonüri hastalarının yaşam konforunu yükseltmek adına fenilalanin tespiti için N,B katkılı grafen üzerinde WS₂ nanoçiçeklere dayalı yeni bir moleküler baskılı elektrokimyasal elektrot geliştirilmiştir. Çalışmanın sonuçları ve önerilere bu bölümde yer verilmiştir.

6.1. Sonuçlar

1. WS₂ NFs'in N,B katkılı grafen levhaya katılımı, WS₂ NFs'in elektrokimyasal iletkenliği, fiziksel özellikleri ve elektron transferinin iyileştirilmesi nedeniyle PHEA tespiti için elektrokimyasal aktiviteyi arttırmaktadır.
2. 3.0×10^{-12} M LOD değeri, hazırlanan elektrokimyasal elektrotun fenilketonüri erken teşhisi açısından yüksek yeteneğe sahip olduğunu göstermiştir.
3. Ayrıca elektrokimyasal sensörün çevre dostu bir yaklaşımla üretilmesi yeşil sentez açısından farklı bir bakış açısı sunmaktadır.
4. Son olarak, süt gibi gerçek numunelerde PHEA tespiti için seçici, doğru ve hassas elektrokimyasal sensör sunulmuştur.
5. Bu sensör, fenilketonüri hastalarının kan fenilalanin seviyelerini güvenli aralıkta tutmak için yaşamları boyunca sürdürmeleri gereken fenilalanin kısıtlı diyeti uygulamalarında büyük fayda sağlayacak ve hayat konforlarını önemli ölçüde iyileştirecektir.

6.2. Öneriler

1. Bu teknoloji giyilebilir olarak uyarlanırsa fenilketonüri hastalarının uymakla zorunlu oldukları eliminasyon diyeti açısından yaşam konforunu artırabilir.
2. Çalışmanın kapsamı, toplumda sık tüketilen hazır gıdaların ölçümlerinde de kullanılarak genişletilebilir.
3. Üretilen biyosensör, piyasada satılan fenilalaninden yoksun olduğu iddia edilen gıdaların kullanım güvenliğinin taranması açısından da fayda sağlayabilir.
4. Bu teknoloji fenilalaninden yoksun gıda üreten firmaların kullanımına sunulabilir ve böylece gıda güvenliğinin artırılması sağlanabilir.
5. Geri kazanımın %100 olması dolayısıyla sensör hassasiyetinin literatürdeki diğer tekniklere göre daha fazla olması gıdalardaki sıfır fenilalanin içeriğinin yakalanmasında fayda sağlayabilir.

6. Ayrıca bu çalışma, özellikle fenilketonüri tanısı ve daha konforlu bir yaşam için literatüre önemli katkılar sağlamanın yanısıra diğer metabolik hastalıklar üzerine geliştirilebilecek biyosensörler açısından geleceğe ışık tutabilir ve uyarlanabilir.



KAYNAKLAR

1. Jurecki E., Cederbaum S., Kopesky J., Perry K., Rohr F., Sanchez-Valle A., Viau K., Sheinin M., Cohen-Pfeffer J. J. M. G., *Metabolism*. (2017). Adherence to clinic recommendations among patients with phenylketonuria in the united states. *120*(3), 190-197.
2. Sarkissian C. N., Gámez A. J. M. G., *Metabolism*. (2005). Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? , *86*, 22-26.
3. González M. J., Gutiérrez A. P., Gassió R., Fusté M. E., Vilaseca M. A., Campistol J. J. M. G., *Metabolism*. (2011). Neurological complications and behavioral problems in patients with phenylketonuria in a follow-up unit. *104*, S73-S79.
4. Blau N., Bélanger-Quintana A., Demirkol M., Feillet F., Giovannini M., Macdonald A., Trefz F. K., Van Spronsen F. J. M. G., *Metabolism*. (2010). Management of phenylketonuria in europe: Survey results from 19 countries. *99*(2), 109-115.
5. Loeber J. G. J. J. O. I. M. D. O. J. O. T. S. F. T. S. O. I. E. O. M. (2007). Neonatal screening in europe; the situation in 2004. *30*(4), 430-438.
6. Van Wegberg A., Macdonald A., Ahring K., Bélanger-Quintana A., Blau N., Bosch A., Burlina A., Campistol J., Feillet F., Gizewska M. J. O. J. O. R. D. (2017). The complete european guidelines on phenylketonuria: Diagnosis and treatment. *12*(1), 1-56.
7. De Silva V., Oldham C. D., May S. W. J. C. C., *Medicine L*. (2010). L-phenylalanine concentration in blood of phenylketonuria patients: A modified enzyme colorimetric assay compared with amino acid analysis, tandem mass spectrometry, and hplc methods. *48*(9), 1271-1279.
8. Gregory C. O., Yu C., Singh R. H. J. G. I. M. (2007). Blood phenylalanine monitoring for dietary compliance among patients with phenylketonuria: Comparison of methods. *9*(11), 761-765.
9. Tao Y., Wang B., Qiao H., Huang Z., Qi X. J. J. O. M. S. M. I. E. (2019). Enhanced photoresponse of tungsten disulfide-reduced graphene oxide hybrid for photoelectrochemical photodetectors. *30*(12), 11499-11507.
10. Li Q., Xia Y., Wan X., Yang S., Cai Z., Ye Y., Li G. J. M. S., C E. (2020). Morphology-dependent mno₂/nitrogen-doped graphene nanocomposites for simultaneous detection of trace dopamine and uric acid. *109*, 110615.
11. Rajapriya A., Keerthana S., Rebekah A., Viswanathan C., Ponpandian N. J. I. J. O. H. E. (2021). Enriched oxygen vacancy promoted heteroatoms (b, p, n, and s) doped ceo₂:

Challenging electrocatalysts for oxygen evolution reaction (oer) in alkaline medium. *46*(75), 37281-37293.

12. Li G., Xia Y., Tian Y., Wu Y., Liu J., He Q., Chen D. J. J. O. T. E. S. (2019). Recent developments on graphene-based electrochemical sensors toward nitrite. *166*(12), B881.
13. Chen T.-W., Rajaji U., Chen S.-M., Chinnapaiyan S., Ramalingam R. J. J. U. S. (2019). Facile synthesis of mesoporous ws₂ nanorods decorated n-doped rgo network modified electrode as portable electrochemical sensing platform for sensitive detection of toxic antibiotic in biological and pharmaceutical samples. *56*, 430-436.
14. Keerthana S., Rajapriya A., Viswanathan C., Ponpandian N. J. M. T. C. (2022). Hybrid nanostructures of ws₂ nanoflowers on n, b co-doped rgo for sensitive amperometric detection of nilutamide. *26*, 101052.
15. Chen L., Wang X., Lu W., Wu X., Li J. J. C. S. R. (2016). Molecular imprinting: Perspectives and applications. *45*(8), 2137-2211.
16. Yola M. L. J. C. (2022). Carbendazim imprinted electrochemical sensor based on cdmoo₄/g-c₃n₄ nanocomposite: Application to fruit juice samples. *301*, 134766.
17. Bölükbaşı Ö. S., Yola B. B., Boyacıoğlu H., Yola M. L. J. F., Toxicology C. (2022). A novel paraoxon imprinted electrochemical sensor based on mos₂nps@ mwcnts and its application to tap water samples. *163*, 112994.
18. Mahalakshmi R., Jesuraja S., Das S. J. J. C. R., Experimental T. J. O., Crystallography I. (2006). Growth and characterization of l-phenylalanine. *41*(8), 780-783.
19. Ermiş N. (2013). L-fenilalanin tayini için moleküler baskılanmış biyosensör hazırlanması.
20. Anikster Y., Haack T. B., Vilboux T., Pode-Shakked B., Thöny B., Shen N., Guarani V., Meissner T., Mayatepek E., Trefz F. K., Marek-Yagel D., Martinez A., Huttlin E. L., Paulo J. A., Berutti R., Benoist J. F., Imbard A., Dorboz I., Heimer G., Landau Y., Ziv-Strasser L., Malicdan M. C. V., Gemperle-Britschgi C., Cremer K., Engels H., Meili D., Keller I., Bruggmann R., Strom T. M., Meitinger T., Mullikin J. C., Schwartz G., Ben-Zeev B., Gahl W. A., Harper J. W., Blau N., Hoffmann G. F., Prokisch H., Opladen T., Schiff M. (2017). Biallelic mutations in dnajc12 cause hyperphenylalaninemia, dystonia, and intellectual disability. *Am J Hum Genet*, *100*(2), 257-266.
21. Blau N. J. E. O. O. D. M., Toxicology. (2013). Sapropterin dihydrochloride for the treatment of hyperphenylalaninemas. *9*(9), 1207-1218.

22. Dhondt J. L. J. J. O. I. M. D. O. J. O. T. S. F. T. S. O. I. E. O. M. (2010). Lessons from 30 years of selective screening for tetrahydrobiopterin deficiency. *33*, 219-223.
23. Straniero L., Guella I., Cilia R., Parkkinen L., Rimoldi V., Young A., Asselta R., Soldà G., Sossi V., Stoessl A. J. J. a. O. N. (2017). Dnajc12 and dopa-responsive nonprogressive parkinsonism. *82*(4), 640-646.
24. Blau N., Van Spronsen F. J., Levy H. L. J. T. L. (2010). Phenylketonuria. *376*(9750), 1417-1427.
25. Van Spronsen F. J., Van Wegberg A. M., Ahring K., Bélanger-Quintana A., Blau N., Bosch A. M., Burlina A., Campistol J., Feillet F., Gizewska M., Huijbregts S. C., Kearney S., Leuzzi V., Maillot F., Muntau A. C., Trefz F. K., Van Rijn M., Walter J. H., Macdonald A. (2017). Key european guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. *Lancet Diabetes Endocrinol*, *5*(9), 743-756.
26. Fölling A. (1934). Über ausscheidung von phenylbrenztraubensäure in den harn als stoffwechselanomalie in verbindung mit imbezillität.
27. Bickel H., Gerrard J., Hickmans E. M. (1953). Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet*, *265*(6790), 812-813.
28. Guthrie R., Susi A. (1963). A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, *32*, 338-343.
29. Walter J., White F., Hall S., Macdonald A., Rylance G., Boneh A., Francis D., Shortland G., Schmidt M., Vail A. J. T. L. (2002). How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? , *360*(9326), 55-57.
30. Blau N., Hennermann J. B., Langenbeck U., Lichter-Konecki U. J. M. G., Metabolism. (2011). Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (bh4) deficiencies. *104*, S2-S9.
31. Van Spronsen F. J., Blau N., Harding C., Burlina A., Longo N., Bosch A. M. J. N. R. D. P. (2021). Phenylketonuria. *7*(1), 1-19.
32. Scriver C. R. J. H. M. (2007). The pah gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *28*(9), 831-845.
33. Hillert A., Anikster Y., Belanger-Quintana A., Burlina A., Burton B. K., Carducci C., Chiesa A. E., Christodoulou J., Đorđević M., Desviat L. R. J. T. a. J. O. H. G. (2020). The genetic landscape and epidemiology of phenylketonuria. *107*(2), 234-250.
34. Desviat L., Perez B., Gamez A., Sanchez A., Garcia M., Martinez-Pardo M., Marchante C., Boveda D., Baldellou A., Arena J. J. E. J. O. H. G. (1999). Genetic and

phenotypic aspects of phenylalanine hydroxylase deficiency in spain: Molecular survey by regions. *7*(3), 386-392.

35. Özer E. A., İbanoğlu Ş., İbanoğlu E. J. T. (2008). Fenilketonüri hastalığı ve fenilalanin kısıtlı diyet. *10*, 21-23.
36. Senemar S., Ganjekarimi A., Tarami B., Bazrgar M. J. I. J. O. P. H. (2011). The prevalence and clinical study of galactosemia disease in a pilot screening program of neonates, southern iran. *40*(4), 99.
37. Gundorova P., Zinchenko R. A., Kuznetsova I. A., Bliznetz E. A., Stepanova A. A., Polyakov A. V. J. P. O. (2018). Molecular-genetic causes for the high frequency of phenylketonuria in the population from the north caucasus. *13*(8), e0201489.
38. Sutivijit Y., Banpavichit A., Wiwanitkit V. J. I. J. O. E., *Metabolism*. (2011). Prevalence of neonatal hypothyroidism and phenylketonuria in southern thailand: A 10-year report. *15*(2), 115.
39. Okano Y., Kudo S., Nishi Y., Sakaguchi T., Aso K. J. J. O. H. G. (2011). Molecular characterization of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency in japan. *56*(4), 306-312.
40. Borrajo G. J. C. J. J. O. I. M. D. O. J. O. T. S. F. T. S. O. I. E. O. M. (2007). Newborn screening in latin america at the beginning of the 21st century. *30*(4), 466-481.
41. Hillert A., Anikster Y., Belanger-Quintana A., Burlina A., Burton B. K., Carducci C., Chiesa A. E., Christodoulou J., Đorđević M., Desviat L. R., Eliyahu A., Evers R. a. F., Fajkusova L., Feillet F., Bonfim-Freitas P. E., Gizewska M., Gundorova P., Karall D., Kneller K., Kutsev S. I., Leuzzi V., Levy H. L., Lichter-Konecki U., Muntau A. C., Namour F., Oltarzewski M., Paras A., Perez B., Polak E., Polyakov A. V., Porta F., Rohrbach M., Scholl-Bürgi S., Spécola N., Stojiljković M., Shen N., Santana-Da Silva L. C., Skouma A., Van Spronsen F., Stoppioni V., Thöny B., Trefz F. K., Vockley J., Yu Y., Zschocke J., Hoffmann G. F., Garbade S. F., Blau N. (2020). The genetic landscape and epidemiology of phenylketonuria. *Am J Hum Genet*, *107*(2), 234-250.
42. Kaufman S. J. a. I. E., *Biology R. a. O. M.* (1971). The phenylalanine hydroxylating system from mammalian liver. *35*, 245-319.
43. Opladen T., Hoffmann G. F., Kühn A. A., Blau N. J. M. G., *Metabolism*. (2013). Pitfalls in phenylalanine loading test in the diagnosis of dopa-responsive dystonia. *108*(3), 195-197.

44. Anikster Y., Haack T. B., Vilboux T., Pode-Shakked B., Thöny B., Shen N., Guarani V., Meissner T., Mayatepek E., Trefz F. K. J. T. a. J. O. H. G. (2017). Biallelic mutations in *dnajc12* cause hyperphenylalaninemia, dystonia, and intellectual disability. *100*(2), 257-266.
45. Van Spronsen F. J., Himmelreich N., Rüfenacht V., Shen N., Van Vliet D., Al-Owain M., Ramzan K., Alkhalifi S. M., Luning R. J., Heiner-Fokkema R. M. J. J. O. M. G. (2018). Heterogeneous clinical spectrum of *dnajc12*-deficient hyperphenylalaninemia: From attention deficit to severe dystonia and intellectual disability. *55*(4), 249-253.
46. Garbade S. F., Shen N., Himmelreich N., Haas D., Trefz F. K., Hoffmann G. F., Burgard P., Blau N. J. G. I. M. (2019). Allelic phenotype values: A model for genotype-based phenotype prediction in phenylketonuria. *21*(3), 580-590.
47. Saugstad L. J. T. L. (1972). Birthweights in children with phenylketonuria and in their siblings. *299*(7755), 809-813.
48. Verkerk P., Van Spronsen F., Smit G., Sengers R. J. a. O. D. I. C. (1994). Impaired prenatal and postnatal growth in dutch patients with phenylketonuria. The national pku steering committee. *71*(2), 114-118.
49. Ilgaz F., Pinto A., Gökmen-Özel H., Rocha J. C., Van Dam E., Ahring K., Bélanger-Quintana A., Dokoupil K., Karabulut E., Macdonald A. J. N. (2019). Long-term growth in phenylketonuria: A systematic review and meta-analysis. *11*(9), 2070.
50. Ayling J., Helfand G., Pirson W. J. E. (1975). Phenylalanine hydroxylase from human kidney. *20*, 6-19.
51. Huttenlocher P. R. J. E. J. O. P. (2000). The neuropathology of phenylketonuria: Human and animal studies. *159*(2), S102-S106.
52. Surtees R., Blau N. J. E. J. O. P. (2000). The neurochemistry of phenylketonuria. *159*(2), S109-S113.
53. Geelhoed E., Lewis B., Hounsome D., O'leary P. J. J. O. P., Health C. (2005). Economic evaluation of neonatal screening for phenylketonuria and congenital hypothyroidism. *41*(11), 575-579.
54. Lord J., Thomason M. J., Littlejohns P., Chalmers R. A., Bain M. D., Addison G. M., Wilcox A. H., Seymour C. a. J. J. O. E., Health C. (1999). Secondary analysis of economic data: A review of cost-benefit studies of neonatal screening for phenylketonuria. *53*(3), 179-186.
55. Thomason M. J., Lord J., Bain M. D., Chalmers R. A., Littlejohns P., Addison G. M., Wilcox A. H., Seymour C. a. J. J. O. P. H. (1998). A systematic review of evidence for the

appropriateness of neonatal screening programmes for inborn errors of metabolism. *20*(3), 331-343.

56. Burgard P., Ullrich K., Ballhausen D., Hennermann J. B., Hollak C. E., Langeveld M., Karall D., Konstantopoulou V., Maier E. M., Lang F. J. T. L. D., *Endocrinology*. (2017). Issues with european guidelines for phenylketonuria. *5*(9), 681-683.
57. Blaskovics M., Schaeffler G. E., Hack S. J. a. O. D. I. C. (1974). Phenylalaninaemia: Differential diagnosis. *49*(11), 835-843.
58. Guttler F. J. a. P. S. (1980). Hyperphenylalaninemia: Diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. 1-80.
59. Campistol J., Gassio R., Artuch R., Vilaseca M. A., *Medicine P. F. U. U. J. D., Neurology C.* (2011). Neurocognitive function in mild hyperphenylalaninemia. *53*(5), 405-408.
60. Van Spronsen F. J., Van Rijn M., Dorgelo B., Hoeksma M., Bosch A., Mulder M., De Klerk J., De Koning T., Rubio-Gozalbo M. E., De Vries M. J. J. O. I. M. D. (2009). Phenylalanine tolerance can already reliably be assessed at the age of 2 years in patients with pku. *32*(1), 27-31.
61. Güttler F., Guldberg P. J. E. J. O. P. (1996). The influence of mutations on enzyme activity and phenylalanine tolerance in phenylalanine hydroxylase deficiency. *155*(1), S6-S10.
62. Güttler F., Guldberg P. J. E. J. O. P. (2000). Mutation analysis anticipates dietary requirements in phenylketonuria. *159*(2), S150-S153.
63. Azen C. G., Koch R., Friedman E. G., Berlow S., Coldwell J., Krause W., Matalon R., McCabe E., O'flynn M., Peterson R. J. a. J. O. D. O. C. (1991). Intellectual development in 12-year-old children treated for phenylketonuria. *145*(1), 35-39.
64. Bickel H., Gerrard J., Hickmans E. M. J. a. P. (1954). The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenylketonuria child. *43*(1), 64-77.
65. Crone M., Van Spronsen F., Oudshoorn K., Bekhof J., Van Rijn G., Verkerk P. J. J. O. I. M. D. (2005). Behavioural factors related to metabolic control in patients with phenylketonuria. *28*(5), 627-637.
66. Walter J. H., White F. J. J. I. J. O. a. M., *Health*. (2004). Blood phenylalanine control in adolescents with phenylketonuria. *16*(1), 41-46.
67. Van Spronsen Francjan J., Nenad B., Harding C., Alberto B., Longo N., Bosch A. M. J. N. R. D. P. (2021). Phenylketonuria (primer). *7*(1).

68. Bilder D. A., Noel J. K., Baker E. R., Irish W., Chen Y., Merilainen M. J., Prasad S., Winslow B. J. J. D. N. (2016). Systematic review and meta-analysis of neuropsychiatric symptoms and executive functioning in adults with phenylketonuria. *41*(4), 245-260.
69. Jahja R., Van Spronsen F. J., De Sonnevile L. M., Van Der Meere J. J., Bosch A. M., Hollak C. E., Rubio-Gozalbo M. E., Brouwers M. C., Hofstede F. C., De Vries M. C. J. B. G. (2017). Long-term follow-up of cognition and mental health in adult phenylketonuria: A pku-cobeso study. *47*(5), 486-497.
70. Thompson A. J., Youl B., Kendall B., Lees A., Smith I., Brenton D., Rylance G., Davidson D. J. T. L. (1990). Neurological deterioration in young adults with phenylketonuria. *336*(8715), 602-605.
71. Rubin S., Le Piffer A., Rougier M., Delyfer M., Korobelnik J., Redonnet-Vernhet I., Marchal C., Goizet C., Mesli S., Gonzalez C. (2012). Sight-threatening phenylketonuric encephalopathy in a young adult, reversed by diet. In *Jimd reports-volume 10* (pp. 83-85): Springer.
72. Jaulent P., Charriere S., Feillet F., Douillard C., Fouilhoux A., Thobois S. J. J. O. N. (2020). Neurological manifestations in adults with phenylketonuria: New cases and review of the literature. *267*(2), 531-542.
73. Kornguth S., Gilbert-Barness E., Langer E., Hegstrand L. J. a. J. O. M. G. (1992). Golgi-kopsch silver study of the brain of a patient with untreated phenylketonuria, seizures, and cortical blindness. *44*(4), 443-448.
74. Leuzzi V., Rinalduzzi S., Chiarotti F., Garzia P., Trasimeni G., Accornero N. J. J. O. I. M. D. (1998). Subclinical visual impairment in phenylketonuria. A neurophysiological study (vep-p) with clinical, biochemical, and neuroradiological (mri) correlations. *21*(4), 351-364.
75. Macdonald A., Van Wegberg A., Ahring K., Beblo S., Bélanger-Quintana A., Burlina A., Campistol J., Coşkun T., Feillet F., Giżewska M. J. O. J. O. R. D. (2020). Pku dietary handbook to accompany pku guidelines. *15*(1), 1-21.
76. Alexander C., Andersson H. S., Andersson L. I., Ansell R. J., Kirsch N., Nicholls I. A., O'mahony J., Whitcombe M. J. J. J. O. M. R. a. I. J. (2006). Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003. *19*(2), 106-180.
77. Ye L., Mosbach K. J. C. O. M. (2008). Molecular imprinting: Synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors. *20*(3), 859-868.

78. Polyakov M., Khim Z. J. Z. F. K. (1931). Adsorption properties of silica gel and its structure. *2*, 799-805.
79. Yuan Y., Yang Y., Ma X., Meng Q., Wang L., Zhao S., Zhu G. (2018). Molecularly imprinted porous aromatic frameworks and their composite components for selective extraction of uranium ions. *Adv Mater*, *30*(12), e1706507.
80. Hoshino Y., Koide H., Urakami T., Kanazawa H., Kodama T., Oku N., Shea K. J. (2010). Recognition, neutralization, and clearance of target peptides in the bloodstream of living mice by molecularly imprinted polymer nanoparticles: A plastic antibody. *J Am Chem Soc*, *132*(19), 6644-6645.
81. Ogiso M., Minoura N., Shinbo T., Shimizu T. J. B. (2006). Detection of a specific DNA sequence by electrophoresis through a molecularly imprinted polymer. *27*(22), 4177-4182.
82. Ren K., Zare R. N. (2012). Chemical recognition in cell-imprinted polymers. *ACS Nano*, *6*(5), 4314-4318.
83. Poma A., Guerreiro A., Whitcombe M. J., Piletska E. V., Turner A. P., Piletsky S. a. J. a. F. M. (2013). Solid-phase synthesis of molecularly imprinted polymer nanoparticles with a reusable template—"plastic antibodies". *23*(22), 2821-2827.
84. Cai D., Ren L., Zhao H., Xu C., Zhang L., Yu Y., Wang H., Lan Y., Roberts M. F., Chuang J. H., Naughton M. J., Ren Z., Chiles T. C. (2010). A molecular-imprint nanosensor for ultrasensitive detection of proteins. *Nat Nanotechnol*, *5*(8), 597-601.
85. Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A. J. J. O. C. B. (2004). Molecularly imprinted polymers for drug delivery. *804*(1), 231-245.
86. Zhang Z., Zhang X., Liu B., Liu J. J. J. O. T. a. C. S. (2017). Molecular imprinting on inorganic nanozymes for hundred-fold enzyme specificity. *139*(15), 5412-5419.
87. Chen L., Xu S., Li J. J. C. S. R. (2011). Recent advances in molecular imprinting technology: Current status, challenges and highlighted applications. *40*(5), 2922-2942.
88. Zhang Z., Liu J. J. S. (2019). Molecular imprinting with functional DNA. *15*(26), 1805246.
89. Nikhil B., Pawan J., Nello F., Pedro E. J. E. B. (2016). Introduction to biosensors. *60*(1), 1-8.
90. Bhalla N., Jolly P., Formisano N., Estrela P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays Biochem*, *60*(1), 1-8.

91. Jolly P., Formisano N., Tkáč J., Kasák P., Frost C. G., Estrela P. J. S., Chemical A. B. (2015). Label-free impedimetric aptasensor with antifouling surface chemistry: A prostate specific antigen case study. *209*, 306-312.
92. Formisano N., Jolly P., Bhalla N., Cromhout M., Flanagan S. P., Fogel R., Limson J. L., Estrela P. J. S., Chemical A. B. (2015). Optimisation of an electrochemical impedance spectroscopy aptasensor by exploiting quartz crystal microbalance with dissipation signals. *220*, 369-375.
93. Sharma T. K., Ramanathan R., Rakwal R., Agrawal G. K., Bansal V. (2015). Moving forward in plant food safety and security through nanobiosensors: Adopt or adapt biomedical technologies? *Proteomics*, *15*(10), 1680-1692.
94. Van Dorst B., Mehta J., Bekaert K., Rouah-Martin E., De Coen W., Dubruel P., Blust R., Robbens J. (2010). Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review. *Biosens Bioelectron*, *26*(4), 1178-1194.
95. Adams K. L., Puchades M., Ewing A. G. (2008). In vitro electrochemistry of biological systems. *1*(1), 329-355.
96. Zhang Y., Zhang B., White H. S. (2006). Electrochemistry of nanopore electrodes in low ionic strength solutions. *J Phys Chem B*, *110*(4), 1768-1774.
97. Gupta V. K., Yola M. L., Qureshi M. S., Solak A. O., Atar N., Üstündağ Z. J. S., Chemical A. B. (2013). A novel impedimetric biosensor based on graphene oxide/gold nanoplatfrom for detection of DNA arrays. *188*, 1201-1211.
98. Yola M. L., Atar N., Üstündağ Z., Solak A. O. J. J. O. E. C. (2013). A novel voltammetric sensor based on p-aminothiophenol functionalized graphene oxide/gold nanoparticles for determining quercetin in the presence of ascorbic acid. *698*, 9-16.
99. Yola M. L., Atar N., Qureshi M. S., Üstündağ Z., Solak A. O. J. S., Chemical A. B. (2012). Electrochemically grafted etodolac film on glassy carbon for pb (ii) determination. *171*, 1207-1215.
100. Yola M. L., Atar N., Erdem A. J. S., Chemical A. B. (2015). Oxytocin imprinted polymer based surface plasmon resonance sensor and its application to milk sample. *221*, 842-848.
101. Ma F., Hu Z., Jiao L., Wang X., He Y., Yang Y., Li Z. J. a. a. E. M. (2021). Organic molecule-functionalized reduced graphene oxide for all-carbon asymmetric supercapacitor applications. *4*(6), 5493-5503.

102. Zhang M., Hu G., Hu G., Howe R., Chen L., Zheng Z., Hasan T. J. S. R. (2015). Yb- and er-doped fiber laser q-switched with an optically uniform, broadband ws₂ saturable absorber. *5*(1), 1-10.
103. Sharma T. S. K., Hwa K.-Y. J. J. O. H. M. (2021). Rational design and preparation of copper vanadate anchored on sulfur doped reduced graphene oxide nanocomposite for electrochemical sensing of antiandrogen drug nilutamide using flexible electrodes. *410*, 124659.
104. Keerthana S., Rajapriya A., Viswanathan C., Ponpandian N. J. J. O. A., Compounds. (2021). Enzyme like-colorimetric sensing of h₂o₂ based on intrinsic peroxidase mimic activity of ws₂ nanosheets anchored reduced graphene oxide. *889*, 161669.
105. Huang Y., Chen X., Ge S., Zhang Q., Zhang X., Li W., Cui Y. J. C. S., Technology. (2020). Hierarchical feco₂s₄@cofe layered double hydroxide on ni foam as a bifunctional electrocatalyst for overall water splitting. *10*(5), 1292-1298.
106. Fuzhi L., Zhen C., Dan Z., Aokui S., Pu S., Jing L., Quanguo H. J. E. A. (2021). Neoteric hollow tubular mns/co₃s₄ hybrids as high-performance electrode materials for supercapacitors. *390*, 138893.
107. Rébé C., Demontoux L., Pilot T., Ghiringhelli F. (2019). Platinum derivatives effects on anticancer immune response. *Biomolecules*, *10*(1).
108. Deng P., Nie X., Wu Y., Tian Y., Li J., He Q. J. M. J. (2021). A cost-saving preparation of nickel nanoparticles/nitrogen-carbon nanohybrid as effective advanced electrode materials for highly sensitive tryptophan sensor. *160*, 105744.
109. Geim A. K., Novoselov K. S. (2007). The rise of graphene. *Nature Materials*, *6*(3), 183-191.
110. Service R. F. (2009). Carbon sheets an atom thick give rise to graphene dreams. In: American Association for the Advancement of Science.
111. Yola M. L., Atar N. J. B., Bioelectronics. (2019). Development of cardiac troponin-i biosensor based on boron nitride quantum dots including molecularly imprinted polymer. *126*, 418-424.
112. Omidinia E., Shadjou N., Hasanzadeh M. J. M. S., C E. (2013). (fe₃o₄)-graphene oxide as a novel magnetic nanomaterial for non-enzymatic determination of phenylalanine. *33*(8), 4624-4632.
113. Saghatforoush L., Hasanzadeh M., Shadjou N., Khalilzadeh B. J. E. A. (2011). Deposition of new thia-containing schiff-base iron (iii) complexes onto carbon nanotube-

modified glassy carbon electrodes as a biosensor for electrooxidation and determination of amino acids. *56*(3), 1051-1061.

114. Parrilla M., Vanhooydonck A., Watts R., De Wael K. (2022). Wearable wristband-based electrochemical sensor for the detection of phenylalanine in biofluids. *Biosensors & Bioelectronics*, *197*, 113764.

115. Melman Y., Katz E., Smutok O. (2022). Phenylalanine biosensor based on a nanostructured fiberglass paper support and fluorescent output signal readable with a smartphone. *Microchemical Journal*, *179*, 107497.

116. Omidinia E., Shadjou N., Hasanzadeh M. (2013). (Fe₃O₄)-graphene oxide as a novel magnetic nanomaterial for non-enzymatic determination of phenylalanine. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, *33*(8), 4624-4632.

117. Hu Y. F., Zhang Z. H., Zhang H. B., Luo L. J., Yao S. Z. (2011). Electrochemical determination of l-phenylalanine at polyaniline modified carbon electrode based on beta-cyclodextrin incorporated carbon nanotube composite material and imprinted sol-gel film. *Talanta*, *84*(2), 305-313.

118. Alisik F., Burc M., Koytepe S., Duran S. T. (2020). Preparation of molecularly imprinted electrochemical l-phenylalanine sensor with p-toluene sulfonic acid modified Pt electrode. *Journal of the Electrochemical Society*, *167*(16), 167508.

119. Saha M., Das S. (2014). Electrochemical detection of l-serine and l-phenylalanine at bamboo charcoal-carbon nanosphere electrode. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, *4*(2), 102

120. Dashtian K., Hajati S., Ghaedi M. (2020). L-phenylalanine-imprinted polydopamine-coated CDs/CDSE n-n type II heterojunction as an ultrasensitive photoelectrochemical biosensor for the PKU monitoring. *Biosensors & Bioelectronics*, *165*, 112346.

EKLER

Ek 1. Enstitü Yönetim Kurulu Kararı

Evrak Tarih ve Sayı: 19.12.2022-27941



T.C.
HASAN KALYONCU ÜNİVERSİTESİ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : E-97105791-302.14.01-27941
Konu : Tez konu başlığı hk.(Melike YILDIRIM)

19.12.2022

Sayın Melike YILDIRIM

Enstitü Yönetim Kurulunun 31.12.2021 tarih ve 2021-30 nolu kararına göre; tez konu başlığınız Tablo'da belirtilen şekilde uygun bulunmuş olup; Gereğini bilgilerinize rica ederim.

ÖĞRENCİNİN NUMARASI ADI-SOYADI	TEZ KONU BAŞLIĞI
216104560 Melike YILDIRIM	Gıdalardan Biyosensör Teknolojisi ile Fenilalanin Tespiti

Prof.Dr. Mahmut Serhat YENİCE
Müdür

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSRRYMF0T

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/hasan-kalyoncu-universitesi-ebys>

Adres:Hasan Kalyoncu Üniversitesi Havaalanı Yolu Üzeri 8. Km. Şahinbey / Gaziantep
Telefon:0 (342) 211 8080 / 1400/1402 Faks:0 (342) 211 80 81
e-Posta:info@hku.edu.tr Web:0 (342) 211 80 81
Kep Adresi:hasankalyoncu.unv@hs01.kep.tr

Bilgi için: Seda SÖNMEZ
Unvanı: Memur
Tel No: 0(342) 211 8080



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Ek 2. İntihal Raporu

HKU_LEE Form No: 006



LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ TEZ / DÖNEM PROJESİ BENZERLİK (İNTİHAL) RAPORU

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

TEZ BAŞLIĞI : Gıdalardan Biyosensör Teknolojisi ile Fenilalanin Ölçümünün Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın giriş, ana bölümler ve sonuç kısımlarından oluşan toplam 66 sayfalık kısmına ilişkin, 4 /11 /2022 tarihinde enstitü sekreterliği ve/veya tez danışmanı tarafından intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporu ekte (Orijinal TURNİTİN raporu eklenecektir*) olup, projenin benzerlik oranı alıntılar dahil % 19 'dur.

Not: Benzerlik oranı; alıntılar dâhil **en çok %20** olarak kabul edilmektedir. Bu değeri geçen durumlarda öğrenci ve/veya danışman tarafından açıklama-gerekçeli ek rapor sunulması gerekmektedir.

Uygulanan filtrelemeler:

- Kaynakça hariç
 Alıntılar dâhil

Açıklama / Taahhüt

Hasan Kalyoncu Üniversitesi TURNİTİN adlı intihal tespit programı sonucunda; azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim (4 /11 / 2022)

Öğrenci İmza

Adı Soyadı: : Melike YILDIRIM
Öğrenci No: :
Anabilim Dalı: : Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı
Programı: : Beslenme ve Diyetetik
Statüsü: : Dönem Projesi Yüksek Lisans Doktora

*TURNİTİN Programı Orijinal Raporu ektedir.

DANIŞMAN ONAYI

Danışmanlığında bulunan ve kimlik bilgileri yukarıda belirtilen öğrenciye ait lisansüstü tez/dönem çalışması intihal programında taranmış ve benzerlik raporu kontrol edilmiştir. Bu yönüyle çalışma,

UYGUNDUR.

Ek 3. Kısa Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER

1. Adı Soyadı : Melike YILDIRIM
2. Doğum Tarihi :
3. Mail Adresi :
4. Unvanı :
5. Öğrenim Durumu :

EĞİTİM

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Hasan Kalyoncu Üniversitesi	2016-2020
Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Nicolaus Copernicus University	2017-2018
Y. Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Hasan Kalyoncu Üniversitesi	2021-2022

YABANCI DİLLER

Yabancı Diller	Seviye
Türkçe	Anadil
İngilizce	C1 (Advanced)

AKADEMİK ÇALIŞMALAR

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

Yıldırım M., Bölükbaşı Ö. S., Parlak Özer Z., Polat İ., Atar N., Yola M. L. (2022). L-phenylalanine-imprinted electrochemical sensor based on ws2 nanoflowers on n,b-doped graphene and its application to milk samples. *Industrial & Engineering Chemistry Research*.