

**GAİTADA GİZLİ KAN TANISINDA KULLANILACAK
MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TABANLI HASTA
BAŞI TEST KİTİ İÇİN ALTIN NANOPARTİKÜL İŞARETLİ
SENTETİK HEMOGLOBİN MOLEKÜLÜNÜN
GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF GOLD
NANOPARTICLE LABELED SYNTHETIC HEMOGLOBIN
MOLECULE FOR DETECTION OF FECAL OCCULT BLOOD IN
MOLECULAR IMPRINTED POLYMER BASED POINT OF
CARE TEST KIT**

UĞUR AYDIN

YRD. DOÇ. DR. MEMED DUMAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji-Nanotıp Ana Bilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

UĞUR AYDIN'ın hazırladığı "**GAİTADA GİZLİ KAN TANISINDA KULLANILACAK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TABANLI HASTA BAŞI TEST KİTİ İÇİN ALTIN NANOPARTİKÜL İŞARETLİ SENTETİK HEMOGLOBİN MOLEKÜLÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ
Başkan

Yrd. Doç. Dr. Memed Duman
Üye (Danışman)

Prof. Dr. Handan YAVUZ
Üye

Doç. Dr. İsmail Cengiz KOÇUM
Üye

Doç. Dr. Halil Murat AYDIN
Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri tez yazım kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili esere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

26 / 01 / 2015

UĞUR AYDIN

ÖZET

GAİTADA GİZLİ KAN TANISINDA KULLANILACAK MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER TABANLI HASTA BAŞI TEST KİTİ İÇİN ALTIN NANOPARTİKÜL İŞARETLİ SENTETİK HEMOGLOBİN MOLEKÜLÜNÜN ELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Uğur AYDIN

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Memed DUMAN

Ocak 2015, 109 sayfa

İmmünokromatografik test sistemleri, örnek sıvısı içerisindeki istenen hedef analitin varlığını özel bir okuyucu cihaza gereksinim duymadan tespit edebilen sistemlerdir. Testin temelinde bir poröz kağıt ya da sinterlenmiş polimer gibi kapiler yatak serileri içerir. Bu sistem elemanları, sıvıyı kendiliğinden taşıma kapasitesine sahip olup ilk kısımdaki kapiler yatak örnek sıvısı ile etkileştirildiği zaman sıvıyı ikinci sistem elemanına taşır. Bu kısımda testin tanı elemanı olan antibadi (ligand), katı destek malzemesine immobilize haldedir. Biyolojik matriks sıvısında bulunan ve tayini istenen analit (antijen) bu kısımda bulununan ligand ile etkileşerek ligand-analit kompleksini oluşturur. Daha sonradan analite karşı afinite gösteren modifiye konjuge enzim bu komplekse bağlanır ve renk değiştirici substratın ortama verilmesi ile test tamamlanır. Geleneksel Gaitada Gizli Kan (GGK) test kitlerinde kullanılan antibadi ve enzim gibi biyolojik temelli moleküller

ortamın ısı ve nem gibi koşullarından etkilenmekte ve test kitlerinin raf ömürlerinde ciddi düşüslere sebep olmaktadır.

Tez kapsamında geliştirilmesi düşünölen test sistemi yarışmalı afinite kromotografisi yöntemine dayanmaktadır.

Yukarıda belirtilen test sisteminden farklı olarak testin ikinci elemanını oluşturan katı destek malzemesi GGK testlerinde tespiti yapılacak olan hemoglobin molekülüne spesifik MBP'lerden ve bu MBP'lerin üzerindeki kavitelere zayıf bağlarla tutturulmuş kolloidal altın nanopartikülleri ile etiketlenmiş sentetik hemoglobin moleküllerinden oluşacaktır. Örnek sıvısı ile bu kısma taşınan hemoglobin molekülleri daha yüksek afinite gösterdikleri ikinci kısımdaki kavitelere, işaretli sentetik hemoglobin moleküllerini uzaklaştırarak bağlanacaklardır. Yerlerinden sökülen sentetik hemoglobin molekülleri örnek sıvısı yardımıyla üçüncü kısma geçecek ve işaretlenmiş oldukları kolloidal altın nanopartiküllere spesifik hazırlanmış MBP'lerin ilgili kavitelere yerleşeceklerdir. Test sisteminin kantitatif tanı kısmı olan üçüncü kısımda ise kendilerine spesifik kavitelere yerleşen kolloidal altın nanopartikülleri test striptinde renk değişime sebep olacaktır. Renk değişimi gösteren bölgenin uzunluğu örnekteki hemoglobin miktarı ile orantılı olduğundan dolayı kantitatif analizi mümkün kılacaktır.

Bu sebeple tez kapsamında sentezlenecek olan sentetik hemoglobin molekülleri için öncelikle moleküler doking simölasyonu yapılarak altın nanopartiküllere immobilize edilecek moleküller belirlenmiştir. Doking simölasyonu sonucu elde edilen bilgiler doğrultusunda 11-MUA molekülü ve Etanolamin Hidroklorür modifiye Aldehit-PEG-Ester molekülleri yine tez kapsamında sentezlenen eş boyutlu ve homojen dağılımlı küresel altın nanopartiküllere immobilize edilmiştir.

Sentetik hemoglobin moleküllerinin tasarlanması için sentezlenen küresel altın nanopartiküllerin boyut ve şekil analizleri Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile modifiye edilen altın nanopartiküllerin karakterizasyonları ise UV Görünür Bölge Spektroskopisi, X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS), Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi (FT-IR) ve Zeta Potansiyel Ölçüm Cihazı (Zetasizer) ile yapılmıştır.

Tez kapsamında hazırlanan sentetik hemoglobin moleküllerinin, hemoglobine spesifik MBP yüzeyleri ile etkileşimleri Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) ile incelenmiş, denge ve kinetik analizleri yapılmıştır. Ayrıca sentetik hemoglobin moleküllerinin MBP yüzeyleri ile nasıl etkileştikleri yine SPR analizleri sonucu elde edilen sonuçlar doğrultusunda izoterm grafikleri çizilerek hesaplanmıştır.

Böylelikle geleneksel GGK test kitleri ile yarışabilecek, raf ömrü daha uzun ve kantitatif ölçüm imkanı sunacak test kitinin temelleri atılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gaitada Gizli Kan (GGK), Yarışmalı Afinite Kromatografisi, Sentetik Hemoglobin, Altın Nanopartikül, Moleküler Doking, 11-MUA, Etanolamin Hidroklorür, Aldehit-PEG-Ester

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF GOLD NANOPARTICLE LABELED SYNTHETIC HEMOGLOBIN MOLECULE FOR DETECTION OF FECAL OCCULT BLOOD IN MOLECULAR IMPRINTED POLYMER BASED POINT OF CARE TEST KIT

Uğur AYDIN

M.Sc., Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Memed DUMAN

January 2015, 109 pages

Immunochromatographic tests are the systems that enable to detect the existence of the target analyte in the liquid sample without needing a special device. This test is based on a porous paper or capillary beds in series as sintered polymers. The components of this system have the liquid bearing capacity instinctively. Once the capillary bed in the first part is interacted with the liquid sample, it transports the liquid to the second component of the system. In this part, the antibody (ligand), the diagnosis component of the test, is found as immobilized to the solid support material. The analyte (antigen) is found in biological matrix, where ligand-analyte complex occurs after their interaction. Next, the modified conjugate enzyme that has affinity to the analyte, attaches to this complex. Finally, the test finishes by the color changer substrate is given to the medium. The biological based molecules used in the conventional fecal occult blood (FOB) test kits, such

as antibody and enzyme, may be affected by the heat and humidity of the environment. This situation causes a significant reduction of the test kits shelf life.

In this thesis, the developed test system is based on a competitive affinity chromatography method. Apart from the test systems mentioned above, the second component of the test consists of the MIP (Molecular Imprinted Polymer), specific to hemoglobin molecule that is going to detect in FOB tests and the synthetic hemoglobin molecules labeled with colloidal gold nanoparticles which is attached to the cavities on these MIP by weak bonds. Due to the liquid sample and the transported hemoglobin molecules to this area have higher affinities, they are going to attach to the cavities in the second part by removing the labeled hemoglobin molecules. Removed synthetic hemoglobins are going to pass to the third part by means of the liquid sample and these molecules are going to settle in the relevant cavities of the MIP which are specific to the labeling materials, colloidal gold nanoparticles. In the third part of the test system (the diagnosis part), the colloidal gold nanoparticles, settled in the specific cavities, are going to lead a color change in the test strip. The length of the area that shows the color change correlates with the amount of hemoglobin in the sample and this enables the quantitative analysis.

For this purpose, the molecules that are going to immobilize to the gold nanoparticles were determined by docking simulation. According to the results obtained from docking simulation, 11-MUA and Ethanolamine hydrochloride modified Aldehyde-PEG-Ester were immobilized to the synthesized equidimensional, uniform and spheric gold nanoparticles.

For the size and shape analysis of the synthesized gold nanoparticles; Transmission electron microscopy (TEM) and for the characterization of the modified gold nanoparticles; UV Visible Spectroscopy, X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Dynamic Light Scattering (DLS-Zetasizer) were used. The interaction between the synthetic hemoglobin molecules prepared during the thesis and the surface of the hemoglobin specific MIP was investigated by Surface Plasmon Resonance (SPR). In addition, the balance and kinetic analysis were carried out. The isotherm graphs were design as a result of the SPR analysis and by this way the interaction of the molecules was calculated.

Thus, in this thesis, it was laid a foundation of a novel test kit, with the properties of competing with the conventional FOB test kits, having a longer shelf life and enabling the quantitative measurement.

Keywords: Fecal Occult Blood (FOB), Competitive Affinity Chromatography, Synthetic Hemoglobin, Gold Nanoparticle, Molecular Docking, 11-MUA, Ethanolamine hydrochloride, Aldehyde-PEG-Ester

TEŞEKKÜRLER

Bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, her zaman yakın ilgisini, alakasını hissettiğim ve 2 yıl boyunca uyum içinde beraber çalıştığımız değerli danışman hocam Yard. Doç. Dr. Memed DUMAN'a,

Tez çalışmaları laboratuvarlarının kapılarını her zaman sonuna kadar açan ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a

Tez ve tez harici çalışmalarına her zaman katkılarını koyan değerli hocalarım Yard. Doç. Dr. Müge ANDAÇ ve Doç. Dr. Ömür ÇELİKBIÇAK'a,

Tezin yazım düzeltmelerini büyük bir titizlikle gerçekleştiren sevgili çalışma arkadaşlarım Gülgün Aylaz ve Meltem Okan'a,

2 yıl boyunca beraber çalıştığım ve bana her konuda destek olan sevgili çalışma arkadaşım Soheil Malekghasemi'ye,

Arkadaşlıkları ve yardımları için Betül Bozdoğan Pala, Tamer Çırak, Tayfun Vural, Öznur Akbal, Ebru Erdal, Cem Bayram, Zeynep Karahaliloğlu, Göknur Kara, Ekin Çelik, Ali Örs, Ebru Kılıçay, Murat Demirbilek ve yazmayı unuttuğum tüm araştırma grubu arkadaşlarıma,

Her an yanımda ve kalbimde olan Güldeniz'e,

Doğduğum günden beri her konuda maddi manevi desteklerini veren, bana her zaman inanan değerli aileme,

Teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜRLER.....	x
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xxii
GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Biyosensörler	5
2.1.1. Nitelikli Bir Biyosensörün Özellikleri.....	6
2.1.2. Biyosensörlerin Kullanım Alanları	7
2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	7
2.2.1. Optik Biyosensörler.....	8
2.2.2. Piezoelektrik Biyosensörler.....	9
2.2.3. Elektrokimyasal Biyosensörler	9
2.2.4. Kalorimetrik Biyosensörler	10
2.2.5. Kolorimetrik Biyosensörler	10
2.2.6. Lateral Akış Test Kitleri.....	11
2.3. Gaitada Gizli Kan (GGK) Testi	13
2.4. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MBP)	14
2.5. Altın Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	17

2.5.1. Turkevich Yöntemi	17
2.5.2. Brust Yöntemi	18
2.5.3. Çekirdekten Büyütme Yöntemi	18
2.6. Altın Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu.....	19
2.7. Doking (Kenetlenme) Simülasyonları.....	19
2.7.1. Doking Programı (Autodock Vina)	20
2.8. Karakterizasyon Teknikleri	20
2.8.1. Moleküler Doking Simülasyonu	21
2.8.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	21
2.8.3. UV Görünür Bölge Spektroskopisi.....	21
2.8.4. X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi	22
2.8.5. Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi	22
2.8.6. Zeta Potansiyel Ölçümü	23
2.8.7. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR).....	23
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	24
3.1. Materyal ve Yöntemler	24
3.2. Moleküler Doking Simülasyonu	25
3.2.1. 11-MUA Moleküler Doking Simülasyonu	26
3.2.2. Aldehit-PEG-Ester Moleküler Doking Simülasyonu	27
3.3. Altın Nanopartikül Sentezi	28
3.3.1. Sitrat Kaplı 10 nm Altın Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	28
3.3.2. Sitrat Kaplı 25 nm Altın Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	29
3.4. Altın nanopartiküllerin Modifikasyonu	29

3.4.1. Sitrat Kaplı Altın Nanopartiküllerin 11-Mua (Merkapto Undekaonik Asit) İle Modifikasyonu	31
3.4.2. Sitrat Kaplı Altın Nanopartiküllerin Sistamin İle Modifikasyonu ...	31
3.4.3 Sistamin Modifiye Altın Nanopartiküllerin Aldehit Peg İle Modifikasyonu	32
3.4.4. Altın Nanopartiküllere İmmobilize Edilmiş Aldehit-PEG-Ester Molekülünün Etanolamin Hidroklorür İle Modifikasyonu	32
3.5. Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Farklı Derişimlerde, Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörü İle Kinetik Analizlerinin Yapılması....	33
3.5.1. Denge Analizi	36
3.5.2. Bağlanma Kinetik Analizi.....	36
3.5.3. Denge İzoterm Modelleri.....	37
3.6. Karakterizasyon Yöntemleri	38
3.6.1. TEM Analizleri.....	38
3.6.2. UV Görünür Bölge Spektroskopisi Analizleri	38
3.6.3. XPS Analizleri	39
3.6.4. FT-IR Analizleri.....	39
3.6.5. Zeta Potansiyel Analizleri	39
3.6.6. SPR Analizleri	39
4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRMELER	40
4.1. Moleküler Doking Simülasyonu	40
4.1.1. 11-MUA Doking Simülasyonu	41
4.1.2. Aldehit-PEG-Ester Doking Simülasyonu.....	44
4.2. Turkevich Yöntemi İle Sentezlenen Sitrat Kaplı Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	47

4.2.1. 10 nm Büyüklüğündeki Altın Nanopartiküllerin TEM Karakterizasyonu	47
4.2.2. 25 nm Büyüklüğündeki Altın Nanopartiküllerin TEM Karakterizasyonu	48
4.3. Modifiye Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	50
4.3.1. Altın Nano Partiküllerin 11-Merkapto Undekaonik Asit İle Modifiye Edilmesi.....	50
4.3.1.1. 11-Merkapto Undekaonik Asit İle Modifiye Edilen 10 nm Altın Nano Partiküllerin UV Görünür Bölge Spektroskopisi İle Karakterizasyonu	51
4.3.1.2. 11-Merkapto Undekaonik Asit İle Modifiye Edilen 10 nm Altın Nano Partiküllerin Xps (X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi) İle Karakterizasyonu	52
4.3.1.3. 11-Merkapto Undekaonik Asit İle Modifiye Edilen 10 nm Altın Nano Partiküllerin FT-IR (Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi) İle Karakterizasyonu	57
4.3.2. 10 nm Altın Nano Partiküllerin Sistamin İle Modifiye Edilmesi	59
4.3.2.1. Sistamin İle Modifiye Edilen Altın Nano Partiküllerin UV Görünür Bölge Spektroskopisi İle Karakterizasyonu	60
4.3.2.2. Sistamin İle Modifiye Edilen Altın Nano Partiküllerin XPS (X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi) İle Karakterizasyonu	61
4.3.3. Sistamin Modifiye Altın Nanopartiküllerin Aldehit-PEG-Ester ve Etanolamin Hidroklorür İle Modifikasyonu.....	64
4.3.3.1. Aldehit PEG-Ester ve Etanolamin Hidroklorür İle Modifiye Edilen Altın Nano Partiküllerin UV Görünür Bölge Spektroskopisi İle Karakterizasyonu	64

4.3.3.2. Aldehit PEG-EA İle Modifiye Edilen Altın Nano Partiküllerin XPS (X-İşını Fotoelektron Spektroskopisi) İle Karakterizasyonu.....	65
4.4. Boş Ve Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Zeta Potansiyeli Karakterizasyonu	68
4.5. Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Farklı Derişimlerde Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörü İle Kinetik Analizlerinin Yapılması....	68
4.5.1. 11-MUA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Farklı Derişimlerde Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörü İle Kinetik Analizlerinin Yapılması	69
4.5.1.1. 11-MUA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Denge Analizi	73
4.5.1.2. 11-MUA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Kinetik Analizi	74
4.5.1.3. 11-MUA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin İzoterm Analizi	76
4.5.2. Aldehit PEG-Ester ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Farklı Derişimlerde Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörü İle Kinetik Analizlerinin Yapılması	78
4.5.3. Aldehit PEG-EA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Farklı Derişimlerde Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörü İle Kinetik Analizlerinin Yapılması	81
4.5.3.1. Aldehit-PEG-EA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Denge Analizi	84
4.5.3.2. Aldehit-PEG-EA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Kinetik Analizi	85
4.5.3.3. Aldehit-PEG-EA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin İzoterm Analizi	87

4.6. Hemoglobine Spesifik Polimer Yüzeyine Tutunan Ve İşlem Sonrası Ayrılan Hemoglobin Ve Altın Nanopartikül Miktarlarının Hesaplanması ..	89
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ.....	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Tipik lateral akış test kiti	11
Şekil 2.2.	Altın nanopartikül tabanlı laterak akış test kitinin işleyiş mekanizması	12
Şekil 3.1.	N-metakriloil-L-histidin metil ester (a) 2D ve (b) 3D görünümleri	26
Şekil 3.2.	Avogadro ile çizilmiş ve pH:7.4 ortamda enerji minimizasyonu yapılmış altın nanopartikül modifiye 11-MUA molekülü	27
Şekil 3.3.	Avogadro ile çizilmiş ve pH:7.4 ortamda enerji minimizasyonu yapılmış altın nanopartikül modifiye 4-formyl-benzamido-dPEG [®] ₂₄ -TFP ester (PEG) molekülü	28
Şekil 3.4.	4-formyl-benzamido-dPEG [®] ₂₄ -TFP ester (Aldehit PEG) molekülünün yapısı	30
Şekil 3.5.	Sistamin molekülünün yapısı	30
Şekil 3.6.	4-formyl-benzamido-dPEG [®] ₂₄ -TFP ester (Aldehit PEG) molekülünün bağlanma mekanizması	30
Şekil 3.7.	Etanolamin hidroklorür (EA) molekülünün yapısı	33
Şekil 3.8.	Hemoglobine spesifik polimer yüzeyler üzerinde yarışmalı afinite kromatografisi	34
Şekil 3.9.	Modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi (Genel Grafik)	35
Şekil 4.1.	1-MUA doking konfigürasyon dosyası	41
Şekil 4.2.	11-MUA doking log dosyası	42
Şekil 4.3.	11-MUA ile N-metakriloil-L-histidin metil ester arasındaki 2 numaralı konformasyon	43

Şekil 4.4.	Aldehit-PEG-Ester doking konfigürasyon dosyası	44
Şekil 4.5.	Aldehit-PEG-Ester doking log dosyası	45
Şekil 4.6.	4-formyl-benzamido-dPEG [®] ₂₄ -TFP ester (PEG) ile N-metakriloil-L-histidin metil ester arasındaki 20 numaralı konformasyon ..	46
Şekil 4.7.	Eş boyutlu 10 nm altın anopartiküller	47
Şekil 4.8.	10 nm altın nanopartiküllerin, (a) 100 nm, (b) 50 nm, (c) 10 nm ölçeklerde TEM görüntüleri.	48
Şekil 4.9.	Eş boyutlu 25 nm altın nanopartiküller.	49
Şekil 4.10.	25 nm altın nanopartiküllerin, (a) 50 nm, (b) 20 nm, (c) 5nm ölçeklerde TEM görüntüleri.	49
Şekil 4.11.	11-MUA modifiye (a) 10 nm, (b) 25 nm altın nanopartiküller.	51
Şekil 4.12.	Boş altın nanopartiküllerin ve 11-MUA modifiye altın nanopartiküllerin absorbans grafiği	52
Şekil 4.13.	Boş altın nanopartiküllerin XPS grafiği	53
Şekil 4.14.	11-MUA modifiye altın nanopartiküllerin XPS grafiği.	55
Şekil 4.15.	0-4000 cm ⁻¹ dalga numarası aralığında a) 11-MUA, b) Altın nanopartikül, c) 11-MUA modifiye altın nanopartikül FT-IR grafiği. (Genel Grafik)	57
Şekil 4.16.	2500-4000 cm ⁻¹ dalga numarası aralığında a) 11-MUA, b) Altın nanopartikül, c) 11-MUA modifiye altın nanopartikül FT-IR grafiği	58
Şekil 4.17.	0-1800 cm ⁻¹ dalga numarası aralığında a) 11-MUA, b) Altın nanopartikül, c) 11-MUA modifiye altın nanopartikül FT-IR grafiği	59
Şekil 4.18.	Sistamin modifiye (a) 10 nm, (b) 25 nm altın nanopartiküller	60
Şekil 4.19.	Boş altın nanopartikül ve sistamin modifiye altın nanopartiküllerin absorbans grafiği.	61
Şekil 4.20.	Sistamin modifiye altın nanopartiküllerin XPS grafiği	62

Şekil 4.21.	Aldehit PEG-EA modifiye (a) 10 nm, (b) 25 nm altın nanopartikülleri	64
Şekil 4.22.	Boş altın nanopartikül ve Aldehit-PEG-Ester ve Aldehit-PEG-Etanolamin (EA) modifiye altın nanopartiküllerin absorbands grafiği	65
Şekil 4.23.	PEG modifiye altın nanopartiküllerin XPS grafiği.	66
Şekil 4.24.	2 nM 11-MUA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,1033$)...69	
Şekil 4.25.	5 nM 11-MUA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,1556$)...70	
Şekil 4.26.	10 nM 11-MUA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,1658$)... 70	
Şekil 4.27.	15 nM 11-MUA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,1472$)... 71	
Şekil 4.28.	20 nM 11-MUA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,3282$)... 71	
Şekil 4.29.	40 nM 11-MUA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,4422$) .. 72	
Şekil 4.30.	Hemoglobin baskılanmış nanokürelere bağlanan Altın-MUA derişimi ile SPR'de elde edilen ΔR arasındaki ilişki	73
Şekil 4.31.	Altın-MUA için Denge analiz yaklaşımı (Scatchard).	74
Şekil 4.32.	Altın-MUA için Bağlanma kinetik yaklaşımı	74
Şekil 4.33.	Altın-MUA için Langmuir Adsorpsiyon modeli	76
Şekil 4.34.	Altın-MUA için Freundlich Adsorpsiyon modeli	76
Şekil 4.35.	Altın-MUA için Langmuir-Freundlich Adsorpsiyon modeli	77
Şekil 4.36.	2 nM Aldehit PEG modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi	78
Şekil 4.37.	5 nM Aldehit PEG modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi	79

Şekil 4.38.	10 nM Aldehit PEG modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi	79
Şekil 4.39.	15 nM Aldehit PEG modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi	80
Şekil 4.40.	20 nM Aldehit PEG modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi	80
Şekil 4.41.	2 nM Aldehit PEG-EA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,0804$) ..	81
Şekil 4.42.	5 nM Aldehit PEG-EA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi	82
Şekil 4.43.	10 nM Aldehit PEG-EA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,4647$) ..	82
Şekil 4.44.	15 nM Aldehit PEG-EA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,5573$) ..	83
Şekil 4.45.	20 nM Aldehit PEG-EA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,7805$) ..	83
Şekil 4.46.	Hemoglobin baskılanmış nanokürelere bağlanan Altın-PEG-EA derişimi ile SPR'de elde edilen ΔR arasındaki ilişki	84
Şekil 4.47.	Altın-PEG-EA için Denge analiz yaklaşımı (Scatchard)	85
Şekil 4.48.	Altın-PEG-EA için Bağlanma kinetik yaklaşımı	86
Şekil 4.49.	Altın-PEG-EA için Langmuir Adsorpsiyon modeli	87
Şekil 4.50.	Altın-PEG-EA için Freundlich Adsorpsiyon modeli	87
Şekil 4.51.	Altın-PEG-EA için Langmuir-Freundlich Adsorpsiyon modeli ...	88
Şekil 4.52.	Hemoglobin çözeltisi içerisindeki modifiye altın nanopartiküllerin UV spektrometre ile tespit edilmesi	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Denge izoterm modelleri	37
Çizelge 4.1. Boş Altın nanopartiküllerin XPS dataları ve örnek içerisindeki molekül yüzdeleri	54
Çizelge 4.2. 11-MUA modifiye altın nanopartiküllerin XPS dataları ve örnek içerisindeki karbon (C) ve kükürt (S) yüzdesi	56
Çizelge 4.3. Sistamin modifiye altın nanopartiküllerin XPS dataları ve örnek içerisindeki Azot (N) yüzdesi	63
Çizelge 4.4. Aldehit PEG-EA modifiye altın nanopartiküllerin XPS dataları ve örnek içerisindeki oksijen (O) yüzdesi	67
Çizelge 4.5. Altın nanopartikülleri ve modifiye altın nanopartiküllerinin zeta potansiyelleri	68
Çizelge 4.6. Altın-MUA için Kinetik hız sabitleri	75
Çizelge 4.7. Altın-MUA için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri	77
Çizelge 4.8. Altın-Peg-EA için Kinetik hız sabitleri	86
Çizelge 4.9. Altın-MUA ve Altın-Peg-EA için eneysel olarak elde edilen (scatchard) K_A ve K_D sonuçlarının karşılaştırılması	89

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

K_A	Bağlanma sabiti
K_D	Ayrılma sabiti
k_A	Bağlanma hız sabiti
k_D	Ayrılma hız sabiti
ΔR	SPR sinyalinin değişim miktarı
C	Analit derişimi
S	Eğim

Kısaltmalar

SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
XPS	X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi
QCM	Kuvartz Kristal Mikrobalans
11-MUA	11 Mekapto undekaonik Asit
EA	Etanolamin Hidroklorür

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser türleri ülkemizde ve diğer gelişmiş ülkelerde en sık görülen kanser türlerinin başında gelmektedir. Kanserle Savaş Daire Başkanlığının 2004 yılı verilerine göre ülkemizde her yıl 5000 adet yeni kolorektal kanser vakası görülmekte ve bunların içinden yaklaşık 3200 tanesi ölümlle sonuçlanmaktadır. Yapılan bazı yeni çalışmalar, gastrointestinal sistemde gelişen farklı ülser lezyonlarının erken tanısının ve takibinin, kolorektal kanserlere bağlı mortalite oranını ciddi ölçüde düşürdüğü göstermiştir [1,2]. Bu sebeptedir ki, ülkemiz içinde önemli bir sağlık sorunu olarak görülen bu tür kanserlerin erken evrede yakalanması ve teşhis edilmesi çok önemlidir. Ülkemizdeki sağlık hizmetlerinin fiziksel yapısı ve sektörün ekonomik durumu göz önüne alındığında, Gaitada Gizli Kan (GGK) testi bu tür kanser türlerinin erken tanı ve teşhisinde kullanılacak en uygun yöntem olarak görülmektedir.

GGK testinde kullanılan yöntemlerin başında radyoaktif, fiziksel, immunokimyasal, ve kimyasal yöntemler gelmektedir. Belirtilen her yöntemin diğer yöntemlere göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Ülkemizde, GGK tanısında sık kullanılan ve en pratik yöntemlerin başında immünokimyasal ve kimyasal yöntemler gelmektedir. Gaitadaki 'heme' fraksiyonunun yalancı peroksidaz aktivitesine dayanan kimyasal yöntemlerden biri olan Guaiak yöntemi oldukça yaygın bir yöntem olmakla birlikte, hastanın tükettiği meyve ve sebzelerdeki peroksidaz enziminin bu yöntem ile interferans yaratması, testin yanlış sonuçlanma oranını oldukça yükseltmektedir. Test öncesi sıkı bir diyet kısıtlaması getirerek hastanın yaşam standartını düşürmektedir. Bu sebepten dolayı, immünokimyasal yöntemlere dayanan GGK testleri uygulanabilirliğinin kolay ve hassasiyetlerinin yüksek olmasından dolayı kullanımları giderek yaygınlaşmaktadır. Poliklonal veya monoklonal antibadileri kullanarak

hemoglobin varlığını gösterebilen bu testler, sadece insan hemoglobinine hassastırlar. Hayvan kaynaklı hemoglobinlerle reaksiyona girmediklerinden yalancı pozitif sonuçlara yol açmamaktadırlar. Fakat bu tür testlerde kullanılan poliklonal ve monoklonal antibadiler, biyolojik tabanlı moleküller oldukları için hem test kitinin üretim maliyetini yükseltmekte, hemde farklı ortam koşullarına adapte olamadıkları için yapılarında bozulmalar meydana gelmekte ve bu sebepten test kitinin raf ömrünü ciddi oranda azaltmaktadırlar.

MBP'ler, kolay hazırlanabilir, kararlı, ucuz ve özellikle moleküler tanıma yeteneğine sahiptirler. Ayrıca, MBP'in hedef molekülüne tanıma özelliği, kuvvetli asit, kuvvetli baz, organik çözücüler ve yüksek sıcaklıklar gibi zor koşullardan etkilenmez. Bu belirgin fiziksel ve kimyasal kararlılık antikolların immünolojik tanıma amaçlı kullanılmadığı durumlarda kullanılma kolaylığı sağlamaktadır. Moleküler baskılama, test kitlerinde veya başka uygulamalarda kullanılan biyolojik moleküllerin yukarıda belirtilen dezavantajlarını yok edebilmek amacıyla, yapay antibadi ve antijenleri verimli, hızlı ve ekonomik olarak oluşturmak için geliştirilmiştir bir yöntemdir. Moleküler baskılama, ilgilenilen analit için seçici tanıma bölgelerine sahip polimerlerin hazırlanmasında kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem ile hazırlanan taşıyıcılar hedef moleküle yüksek seçicilik gösterirler. Bu yöntem ilk defa 1972'de Günter Wulff ve ark. tarafından tanımlanmış ve polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar istenilen enzim tepkimelerinin substratlarını, ürünlerini veya geçiş analoglarını kalıp molekül olarak kullanarak bu yöntemle yapay enzim elde edilebileceğini de göstermiştir [3]. Aynı zamanda, antibadi/antijen ya da enzim/substrat gibi biyolojik sistemlerin tanıma mekanizmaları da polimerik yapılara moleküler baskılama tekniği ile aktarılmış ve farklı uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılmıştır [4].

Moleküler baskılanmış polimerler (MBP), moleküler tanıma oldukça elverişlidir, ucuz ve kolayca hazırlanabilir. Ayrıca MBP'ler yüksek mekanik özellikleri, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlıkları, asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücü ortamlarındaki yüksek kararlılıkları nedeni ile oldukça dayanıklıdır. Birkaç yıl boyunca performanslarında değişiklik olmadan saklanabilirler [5,6].

Sentetik polimerlerin moleküler baskılanması, işlevsel ve çapraz bağlama monomerleri arasında, bir hedef molekül varlığında kopolimerize olarak moleküler şablon oluşumunu gerçekleştiren bir süreçtir. İnorganik iyonların, ilaçların, proteinlerin, oligonukleotitlerin, bakterilerin ve mikrobiyal hücrelerin yüzlerce başarılı baskılanma çalışmaları vardır. Moleküler baskılanmış polimerlerin (MBP'ler) ucuz olmaları ve hedef molekül için yüksek afinite ve özgüllük göstermeleri, sensörlerde enzimlere, antibadilere ve doğal reseptörlere alternatif tanıma elemanı olarak kullanılması için büyüyen bir ilgi oluşturmuştur [7].

Günümüzde varolan çoğu biyosensör yaklaşımı içinde biyomoleküller genellikle bir flüoresan bir boya ile etiketlenir. Pek çok yöntemde kullanılan bu flüoresans boyaların belirlenmesi için özel mikroskoplar veya optik cihazlara gerek vardır. Ayrıca uygun olmayan saklama koşulları ve uyarılma emisyonu süresi flüoresans boyaların kimyasal kararlılıklarını kolaylıkla bozabilmekte, doğal aktivite kaybına sebep olmakta ve bu yüzden istenilen görüntülemeye izin vermemektedir. Son yıllarda altın nanopartiküller, kolay sentezlenebilir olmalarından, zor koşullarda bile kararlı yapılarını korumalarından ve uygun optik özelliklerinden dolayı biyosensör ve görüntülenme ile ilgili çalışmalarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [8,9]. Bunun yanı sıra, altın nanopartiküller kolaylıkla başka biyolojik moleküller ile kovalent yada kovalent olmayan etkileşimler ile modifiye edilebilir ve istenilen amaç doğrultusunda kullanılabilirler [10]. Araştırmalar peptid, protein ve nükleik asit gibi biyolojik moleküllere bağlanabilen ve optik,

elektronik ve manyetik özelliklere sahip süspansiyon içinde yer alan altın nanopartiküllerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Daha önceden de belirtildiği gibi altın nanopartiküller biyolojik ölçümlerde organik flüorofor veya radyoaktif işaretlemeyi elimine etmek için miktar tayini içinde kullanılabilir. Farklı büyüklükteki kolloidal altın nanopartikülleri hassas bir cihaza gerek kalmadan görünebilir dalga boylarında ışık saçılımı neden oldukları için, çıplak gözle farklı renklerde gözükümlerler. Bu olağanüstü optik özelliklerinden dolayı son yıllarda hastabaşı tanı kitlerinde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [11].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyosensörler

Biyosensörler; ölçülen maddenin konsantrasyonuna bağlı olarak, gerçekleşen biyolojik reaksiyonları bir transduser (dönüştürücü) yardımı ile ölçülebilen sinyallere çeviren analitik cihazlardır [12]. Bu sinyal; ölçülen ortamdaki proton değişiminden, spesifik gazların salımından, kütle değişiminden, ısı veya ışık yayınımından kaynaklanan bir sonuç olabilir.

Sinyaller dönüştürücü yardımı ile; akım, gerilim, kütle ve sıcaklık değişimi, optik , termal ve piezoelektrik anlamda kütle değişimi olarak ölçülebilir nicelikler haline getirilir. Elde edilen sinyallerin güçlendirilmesi ve daha sonra yapılacak analizler için depolanması da mümkündür [13]. Biyolojik algılayıcı moleküllerin seçiciliği, bir ön örnek hazırlığına ve yüksek hacimlerde örneğe gerek duymaksızın, kompleks karışımlar içinde bile yüksek hassasiyette gerçek zamanlı ölçümler yapılabilmesine olanak sağlar. Biyosensörler ayrıca kullanımı kolay, hızlı sonuç veren ve oldukça hassas cihazlardır [14]. Biyoreseptör molekülü, biyosensör içerisindeki biyolojik hassasiyete sahip olan kısım olup ölçülecek olan maddenin tanınmasından sorumludur. Üretilen bir biyosensör de seçicilik ve hassasiyet biyoreseptörler sayesinde kontrol edilir. Bu reseptörler sadece hedef molekülleri ile etkileşecek özellikte seçilmeli, diğer moleküller ile etkileşmemelidir [15].

Biyolojik bileşenlerin dönüştürücü yüzeyine bağlanması (immobilizasyon), biyosensör üretimindeki dikkat edilmesi gereken konuların başında gelmektedir. Genel olarak dönüştürücü ve biyobileşen birbirlerine adsorbsiyon, mikroenkapsülasyon, tutuklama, çapraz bağlama ve kovalent bağlama gibi 5 farklı fiziksel veya kimyasal yöntem ile bağlanabilir [16].

Bir biyosensörün ömrü, biyobileşen ile dönüştürücü arasındaki immobilizasyon işleminin kalitesi ile doğrudan orantılıdır. Bu nedenle immobilizasyon işlemleri hassasiyetle yapılarak biyobileşenlerin yüzeyden kolayca ayrılması engellenmelidir [17].

2.1.1. Nitelikli Bir Biyosensörün Özellikleri

Biyosensörler 8 ana başlık altında karakterize edilebilir. Bunlar;

1. Hassasiyet, ölçülen madde konsantrasyonunda meydana gelen birim başına değişimleri karşı sensörden alınan cevaptır.
2. Seçicilik, sensörün sadece ölçülecek olan hedef maddeyi tanınması diğer moleküllere karşı bir cevap vermemesidir.
3. Ölçüm aralığı, Cihazın ölçebildiği hedef madde miktarıdır. Analit konsantrasyonu iyi belirlenmiştir. Aksi halde konsantrasyon az veya çok ise sensör iyi bir duyarlılıkla çalışmayabilir.
4. Tutarlılık, sensörden alınan sonuçların birbiriyle olan tutarlılığını ifade eder.
5. Cevap süresi, ölçülecek madde konsantrasyonundaki değişime karşı cihazın vereceği nihayi yanıtın sadece %63'lük kısmını ölçmek için gösterdiği ölçüm süresidir.
6. Tayin limiti, sensör tarafından tesbit edilebilecek en düşük madde konsantrasyonudur.

7. Ömrü, sensörün performansında bir düşüş olmadan yararlanılabileceği süredir.
8. Kararlılık, Belirli bir süre içerisinde sensörün duyarlılığındaki değişimleri karakterize eden bir kalite ölçüm değeridir [18].

2.1.2. Biyosensörlerin Kullanım Alanları

- Tıbbi uygulamalarda; metabolitlerin ölçülmesi, insulin eksikliği belirtilerinin ölçülmesi vb. durumlarda,
- Endüstriyel uygulamalarda, Biyoreaktörlerin kontrolü, giren hammadde ve çıkan ürünlerin ölçülmesinde,
- Çevresel denetim alanında, hava ve suyun düzenli olarak izlenmesi, kirlilik, toksisite vb. durumların tespit edilmesinde,
- Askeri ve sivil savunma sanayi alanında hastalıkların vb. durumların kontrolünde, biyosensörler sıklıkla kullanılmaktadır [19].

Yüksek hassasiyete sahip, hızlı cevap veren ve maliyeti düşük minyatürize sensörlerin üretilmesi; fizik, kimya, biyoloji ve malzeme bilimleri gibi multidisipliner alanların birlikte çalışması ile mümkün olmaktadır [20-25].

2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, kullanılan biyolojik tanıma molekülleri ve bu moleküllerden ölçülebilir sinyaller üreten dönüştürücülerin çeşitlerine göre kategorize edilir. Biyobileşen olarak enzimler, mikroorganizmalar, antibadiler (immünosensörler) ve biyolojik dokular kullanılır. Altın nanopartiküller, biyoyumluulukları ve diğer biyomoleküllerle (ligand, aptamer, antibody ve

peptidler...) kolay etkileşimleri sebebiyle biyosensör uygulamalarında en çok kullanılan malzemeler olmuştur. Altın nanopartiküllerin bu özelliklerinden yararlanarak kolorimetrik sensörler [27-29] ve lateral akış test kitlerinde [30-33] sıkça tercih edilen ve başarılı sonuçlar alınan malzemelerdir.

Altın nanopartiküller ayrıca birçok elektrod malzemesi ve elektroaktif material arasında hızlı ve direkt elektron transferine imkan verirler. Ek olarak altın nanopartiküllerin ışığı saçma özellikleri ve yerel manyetik alanları oldukça yüksek miktarlarda kuvvetlendirmeleri sayesinde biyosensör uygulamalarında sinyal güçlendirici olarak kullanılmalarını da sağlamıştır. . Altın nanopartiküllerinde sıklıkla kullanıldığı biyosensör türleri; Optik biyosensörler, Elektrokimyasal biyosensörler, Piezoelektrik biyosensörler, Kalorimetrik biyosensörler, Kolorimetrik biyosensörler ve Lateral akış test kitleri [26].

2.2.1. Optik Biyosensörler

Fiberoptik probun ucuna yerleştirilen enzim veya boyalar (floresans) ile ışığın etkileşmesi sonucu ışık şiddetinde meydana gelen değişimlerin ölçülmesi ile analit miktarının belirlenmesi prensibine dayanarak çalışan sensörlerdir. Laktik asit sensörleri optik biyosensörlere örnek olarak gösterilebilir. Altın nanopartiküllerin optik biyosensörlerde birçok farklı kullanım alanı mevcuttur. Ancak bunlardan en önemlisi ve üzerinde en fazla durulan Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) dir. SPR, elektromanyetik dalga ile metal üzerindeki iletkenlik elektronlarının etkileşmesi sonucu oluşan sinyalleri tespit etme ve metal yüzeyindeki ince film tabakası üzerinde oluşan fizikokimyasal değişimleri karakterize etme ilkesine dayanır [34,35].

SPR sensörü üzerinde bulunan metal ince film tabakası yüzeyine spesifik moleküllerin bağlanması sonucu, dielektrik sabitinde meydana gelen

değişimler nedeniyle yüzeye etkiyen lazer sinyalinin yansımada değişimler meydana gelir [34,35].

Biyolojik moleküller altın nanopartiküller ile konjuge edilerek SPR sensörü üzerinde bulunan metal ince film yüzeyine tutturulduğunda, altın nanopartiküllerin optik sönüm (yoğunluk) spektrumlarının, ortamın değişen dielektrik sabitine karşı çok daha hassas olmalarından [36,37] dolayı ölçülen sinyallerde artmaya sebep olduğu ve SPR sinyalini yükselttiği gözlenmiştir. [38-48].

2.2.2. Piezoelektrik Biyosensörler

Piezoelektrik malzemeler kütle değişimlerine karşı yüksek hassasiyet göstermektedirler. Bu tip sensörler tanıma reaksiyonu sonucu biyoreseptörde oluşan kütle artışı sonucu oluşturulan sinyallerin ölçülmesi prensibine dayanır. QCM (kuartz kristal mikrobals) sensörleri bu tip biyosensörlere örnek olarak gösterilebilir. Altın nanopartiküller, sahip oldukları yüksek yoğunluk ve yüksek yüzey-hacim oranı sayesinde ölçüm sırasında yüzeyde meydana gelen kütle değişim sinyallerinde artış meydana getirirler [26].

2.2.3. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik bağlanma sonucu meydana gelen değişimleri yararlı elektrik sinyallerine çevirirler. Elektrokimyasal biyosensörler sağladıkları hızlı ölçüm alma, kolaylık, düşük maliyet ve tayin kapasiteleri sayesinde son yıllarda en çok üzerinde durulan sensör uygulamalarıdır. Daha da önemlisi altın nanopartiküllerin, elektrokimyasal sensörlerde kullanılması son dönemde en çok ilgilenilen kolların başında gelmektedir [49].

Mükemmel biyouyumlulukları, iletkenlikleri ve katalitik özellikleri sebebiyle altın nanopartiküller elektrod yüzeyinde sinyali arttırmakta, moleküller arası yükseltgenme-indirgenme merkezleri arası elektron transferini güçlendirmekte ve elektrokimyasal reaksiyonları arttırmaktadır [26].

2.2.4. Kalorimetrik Biyosensörler

Birçok enzim kataliz reaksiyon ekzotermiktir (dışarıya ısı veren). Bu özellik sonucu ölçülen maddenin reaksiyon hızı ve konsantrasyonu ısı direncin belirlenmesi ve ölçülebilen sinyallere dönüştürülmesi sonucu belirlenebilir. Kolesterol sensörleri (reaksiyon sonucu açığa çıkan ısı enerjisi (53 Kj/mol) bu tip biyosensörlere örnektir.

2.2.5. Kolorimetrik Biyosensörler

Biyolojik moleküller ile modifiye edilen metal nanopartiküllerin, çözelti içerisinde çeşitli hedef moleküllerle etkileştirilmesi ile agregasyona (üst üste yığılma) uğraması sonucu ölçülebilir renk değişimleri oluşması ilkesine dayanır [50]. Kolorimetrik sensörlerde altın nanopartiküller en yaygın kullanılan metal nanomalzemelerdir. Küresel altın nanopartiküller ortalama 520 nm dalgaboyunda yüzey plazmon rezonanslarına bağlı olarak, çözelti içerisinde kırmızı renkte görünürler. Altın nanopartiküller, agregelerde olduklarında çözeltinin rengini kırmızıdan, mavi veya mor'a dönüştürürler.

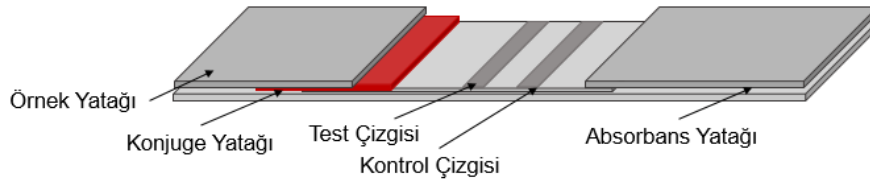
Boyutları 1-100 nm arasında olan altın nanopartiküller yüzey plazmon rezonanslarına bağlı olarak gösterdikleri kırmızı renk ve yüksek yüzey-hacim oranı sayesinde birçok farklı biyolojik molekülün aktivasyonlarını kaybetmeden stabil bir şekilde partikül yüzeyine bağlanmasına olanak sağlamalarından dolayı lateral akış test kitlerinde de oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

2.2.6. Lateral Akış Test Kitleri

Lateral akış test sistemleri (immünokromatografik test sistemleri), örnek sıvısı içerisindeki istenen hedef analitin varlığını veya yokluğunu özel bir okuyucu cihaza gereksinim duymadan tespit edebilen sistemlerdir [51].

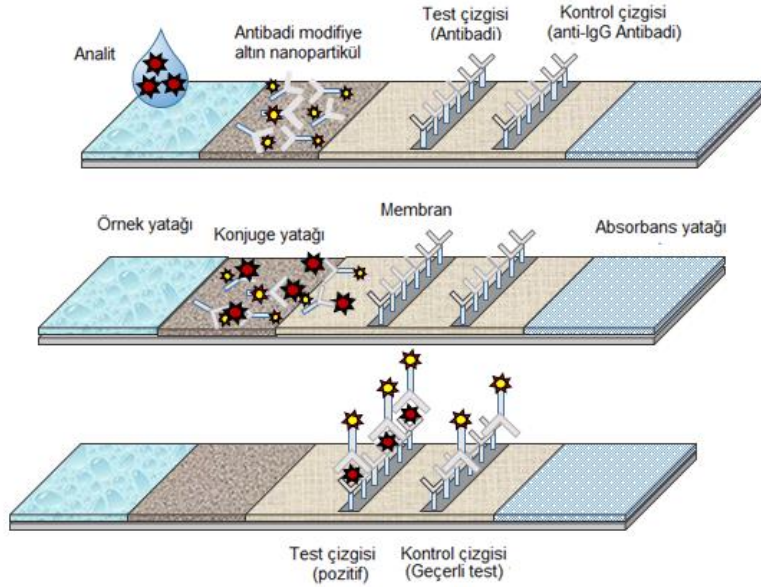
Test, içeriğinde poröz bir kağıt tabakası ya da ısıl işlem sonucu sertleştirilmiş polimer gibi kapiler yatak serileri içermektedir. Bu bileşenlerden her biri sıvıyı hızlı bir şekilde taşıma kapasitesine sahiptir.

Test kiti, içerisinde çeşitli gözenek büyüklüklerine sahip kağıt temelli yataklar (örnek yatağı, konjuge yatağı, nitroselüloz membran ve absorblama yatağı) bulunmaktadır. Bu malzemelerin kapiler akış zamanları, yüzey kaliteleri, incelikleri, gözenek büyüklükleri ile absorpsiyon-adsorpsiyon verimleri önemli parametrelerdir [52].



Şekil 2.1. Tipik lateral akış test kiti.

Test kiti içerisindeki tüm yataklar ve membranlar birbiri ile bağlantılı olup, örnek sıvısı ilk kısımdaki yatak (örnek yatağı) ile etkileştirildiğinde bir sünger gibi sıvıyı emer ve hemen altındaki konjuge yatağına taşır. Örnek sıvısı içerisindeki analiz edilecek molekül (antijen) burada bulunan tuz-şeker matriksi içerisinde immobilize edilmiş altın nanopartikül modifiyeli biyoaktif malzeme (antibadi) ile etkileşir. Nitroselüloz membrane yardımı ile sıvı kapiler akışla iletmeye devam ederken bu membran üzerindeki spesifik alanlara gömülmüş antibadiler (test kısmı) ve anti-antibadiler (kontrol kısmı) test sonuçlarını gözlemlenebilir hale getirir [53].



Şekil 2.2. Altın nanopartikül tabanlı laterak akış test kitinin işleyiş mekanizması.

Antibadi modifiye altın nanopartiküllere bağlanmış olan hedef molekül test kısmındaki yine kendisine spesifik antibadiler ile etkileştiğinde membrane üzerinde kırmızı renkli (Küresel altın nanopartiküller ortalama 520 nm dalgaboyunda yüzey plazmon rezonanslarına bağlı olarak, çözelti içerisinde kırmızı renkte görünürler.) bir çizgi belirir. Bu çizgi altın nanopartikül işaretli antibadilerin hedef molekül ile etkileştiğini gösterir. Bu çizginin hemen ilerisinde, üzerinde anti-antibodi bulunan bölgede de kırmızı bir çizgi olması beklenir (kontrol kısmı). Bu kısımda antibadi modifiye altın nanopartiküller, anti-antibadi ile etkileşirler. Bu çizgi kullanıcıya, modifiye altın nanopartiküllerin doğru ve verimli bir şekilde çalıştığını gösterir. Test sisteminin son kısmında bulunan absorblama yatağı ise sıvı örneğin fazlasını emer ve test işlevini yerine getirmiş olur.

2.3. Gaitada Gizli Kan (GGK) Testi

Kolorektal kanserler tüm kanserlerin yaklaşık %15'ni oluşturmakta, Avrupa ve Amerika'daki kanser ölümlerinin ikinci sırasında yer almaktadırlar. Ülkemizde çok sağlıklı kanser kayıtlarının olmamasına rağmen, Türkiye'de her yıl 30.000 kişinin kolorektal kansere yakalandığı tahmin edilmektedir. Sağlık Bakanlığı, Kansere Daire Başkanlığının yapmış olduğu çalışmalar doğrultusunda ülkemizde, bireylerin, bilinen tarama yöntemleri ile kanser taramalarının gerçekleştirilmesi, erken teşhis ve etkin tedavilerinin yapılması ile kanser vakalarına bağlı ölümlerde önemli bir oranda azalma sağlanması beklenmektedir. Gaitada Gizli Kan (GGK) testi erken dönemdeki kolorektal tümörlerinin belirlenmesi ve engellenmesinde sıklıkla kullanılan en belirgin testtir. Bu testin erken tanı olanağı sağlayarak kolorektal kanserlere bağlı ölüm oranını düşürdüğü çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir. Yapılan bazı yeni çalışmalar, gastrointestinal sistemde gelişen farklı ülser lezyonlarının erken tanısının ve takibinin, kolorektal kanserlere bağlı mortalite oranını ciddi ölçüde düşürdüğü göstermiştir [1,2]. Bu sebeptendir ki, ülkemiz içinde önemli bir sağlık sorunu olarak görülen bu tür kanserlerin erken evrede yakalanması ve teşhis edilmesi çok önemlidir. Ülkemizdeki sağlık hizmetlerinin fiziksel yapısı ve sektörün ekonomik durumu göz önüne alındığında, Gaitada Gizli Kan (GGK) testi bu tür kanser türlerinin erken tanı ve teşhisinde kullanılacak en uygun yöntem olarak görülmektedir.

GGK testinde kullanılan yöntemlerin başında radyoaktif, fiziksel, immunokimyasal, ve kimyasal yöntemler gelmektedir. Belirtilen her yöntemin diğer yöntemlere göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Ülkemizde, GGK tanısında sık kullanılan ve en pratik yöntemlerin başında immünokimyasal ve kimyasal yöntemler gelmektedir. Gaitadaki 'heme' fraksiyonunun yalancı peroksidaz aktivitesine dayanan kimyasal yöntemlerden biri olan Guaiak yöntemi oldukça yaygın bir yöntem

olmakla birlikte, hastanın tükettiği meyve ve sebzelerdeki peroksidaz enziminin bu yöntem ile interferans yaratması, testin yanlış sonuçlanma oranını oldukça yükseltmektedir. Test öncesi sıkı bir diyet kısıtlaması getirerek hastanın yaşam standartını düşürmektedir. Bu sebepten dolayı, immünokimyasal yöntemlere dayanan GGK testleri uygulanabilirliğinin kolay ve hassasiyetlerinin yüksek olmasından dolayı kullanımları giderek yaygınlaşmaktadır. Poliklonal veya monoklonal antibadileri kullanarak hemoglobin varlığını gösterebilen bu testler, sadece insan hemoglobinine hassastırlar. Hayvan kaynaklı hemoglobinlerle reaksiyona girmediklerinden yalancı pozitif sonuçlara yol açmamaktadırlar. Fakat bu tür testlerde kullanılan poliklonal ve monoklonal antibadiler, biyolojik tabanlı moleküller oldukları için hem test kitinin üretim maliyetini yükseltmekte, hemde farklı ortam koşullarına adapte olamadıkları için yapılarında bozulmalar meydana gelmekte ve bu sebepten test kitinin raf ömrünü ciddi oranda azaltmaktadırlar.

2.4. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MBP)

MBP'ler, kolay hazırlanabilir, kararlı, ucuz ve özellikle moleküler tanıma yeteneğine sahiptirler. Ayrıca, MBP'in hedef molekülünü tanıma özelliği, kuvvetli asit, kuvvetli baz, organik çözücüler ve yüksek sıcaklıklar gibi zor koşullardan etkilenmez. Bu belirgin fiziksel ve kimyasal kararlılık antikolların immünolojik tanıma amaçlı kullanılmadığı durumlarda kullanılma kolaylığı sağlamaktadır. Moleküler baskılama, test kitlerinde veya başka uygulamalarda kullanılan biyolojik moleküllerin yukarıda belirtilen dezavantajlarını yok edebilmek amacıyla, yapay antibadi ve antijenleri verimli, hızlı ve ekonomik olarak oluşturmak için geliştirilmiştir bir yöntemdir. Moleküler baskılama, ilgilenilen analit için seçici tanıma bölgelerine sahip polimerlerin hazırlanmasında kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem ile hazırlanan taşıyıcılar hedef moleküle yüksek seçicilik gösterirler.

Bu yöntem ilk defa 1972'de Günter Wulff ve ark. tarafından tanımlanmış ve polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla kullanılmıştır.

Daha sonra yapılan çalışmalar istenilen enzim tepkimelerinin substratlarını, ürünlerini veya geçiş analoglarını kalıp molekül olarak kullanarak bu yöntemle yapay enzim elde edilebileceğini de göstermiştir [3]. Aynı zamanda, antibadi/antijen ya da enzim/substrat gibi biyolojik sistemlerin tanıma mekanizmaları da polimerik yapılara moleküler baskılama tekniği ile aktarılmış ve farklı uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılmıştır [4].

Moleküler baskılanmış polimerler (MBP), moleküler tanımaya oldukça elverişlidir, ucuz ve kolayca hazırlanabilir. Ayrıca MBP'ler yüksek mekanik özellikleri, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlıkları, asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücü ortamlarındaki yüksek kararlılıkları nedeni ile oldukça dayanıklıdır. Birkaç yıl boyunca performanslarında değişiklik olmadan saklanabilirler [5,6].

Moleküler baskılama yöntemi temelde 3 basmaktan oluşur:

- 1) Ön kompleksleşme, uygun fonksiyonel gruba sahip ve polimerleşebilen monomer ilgili analitle (hedef molekül/kalıp) kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler ile kompleks oluşturur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemlidir.
- 2) Polimerizasyon, monomer-analit kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcı ve başlatıcı kullanılarak fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

- 3) Analit molekülünün uzaklaştırılması, uygun çözücü veya çözücü karışımları kullanılarak polimerik yapıdan analit molekülü uzaklaştırılır. Baskılanan molekülün polimerden uzaklaştırılması sonucunda polimerde baskılanan moleküle kimyasal ve topolojik olarak uygun seçici bellekler elde edilir ve bir karışımda baskılanan molekül polimere seçici olarak tekrar bağlanabilir.

Sentetik polimerlerin moleküler baskılanması, işlevsel ve çapraz bağlama monomerleri arasında, bir hedef molekül varlığında kopolimerize olarak moleküler şablon oluşumunu gerçekleştiren bir süreçtir. İnorganik iyonların, ilaçların, proteinlerin, oligonukleotitlerin, bakterilerin ve mikrobiyal hücrelerin yüzlerce başarılı baskılanma çalışmaları vardır.

Moleküler baskılanmış polimerlerin (MBP'ler) ucuz olmaları ve hedef molekül için yüksek afinite ve özgüllük göstermeleri, sensörlerde enzimlere, antibadilere ve doğal reseptörlere alternatif tanıma elemanı olarak kullanılması için büyüyen bir ilgi oluşturmuştur [7]. Günümüzde varolan çoğu biyosensör yaklaşımı içinde biyomoleküller genellikle bir floresan bir boya ile etiketlenir. Pek çok yöntemde kullanılan bu floresans boyaların belirlenmesi için özel mikroskoplar veya optik cihazlara gerek vardır. Ayrıca uygun olmayan saklama koşulları ve uyarılma emisyonu süresi floresans boyaların kimyasal kararlılıklarını kolaylıkla bozabilmekte, doğal aktivite kaybına sebep olmakta ve bu yüzden istenilen görüntülemeye izin vermemektedir. Son yıllarda altın nanopartiküller, kolay sentezlenebilir olmalarından, zor koşullarda bile kararlı yapılarını korumalarından ve uygun optik özelliklerinden dolayı biyosensör ve görüntülenme ile ilgili çalışmalarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [8,9]. Bunun yanı sıra, altın nanopartiküller kolaylıkla başka biyolojik moleküller ile kovalent yada kovalent olmayan etkileşimler ile modifiye edilebilir ve istenilen amaç doğrultusunda kullanılabilirler [10]. Araştırmalar peptid, protein ve nükleik

asit gibi biyolojik moleküllere bağlanabilen ve optik, elektronik ve manyetik özelliklere sahip süspansiyon içinde yer alan altın nanopartiküllerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Daha önceden de belirtildiği gibi altın nanopartiküller biyolojik ölçümlerde organik flüorofor veya radyoaktif işaretlemeyi elimine etmek için miktar tayini içinde kullanılabilir. Farklı büyüklükteki kolloidal altın nanopartikülleri hassas bir cihaza gerek kalmadan görünebilir dalga boylarında ışık saçılımına neden oldukları için, çıplak gözle farklı renklerde gözükabilirler. Bu olağanüstü optik özelliklerinden dolayı son yıllarda hastabaşı tanı kitlerinde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [11].

2.5. Altın Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Günümüzde altın nanopartiküllerin hazırlanması için sayısız sentez yöntemi kullanılabilir. Bunlar fiziksel sentez yöntemleri (yukarıdan-aşağıya) ve kimyasal sentez yöntemleri (aşağıdan-yukarıya) olarak 2 ana başlık altında incelenebilir [54]. Kimyasal sentez yöntemleri; nanoküre litografi, kimyasal, fotokimyasal, elektrokimyasal ve ısı indirgenme gibi teknikleri kapsar ve atomların bir araya getirilerek arzulanan nano yapıların elde edilmesini sağlar. Fiziksel sentez yöntemleri; fotolitografi ve elektron demeti litografi tekniklerini kapsar ve katı malzemeden parçacıkları sökerek istenilen yapının oluşturulmasını sağlar [55]. Aşağıda en çok kullanılan kimyasal yöntemlere kısaca değinilmiştir.

2.5.1. Turkevich Yöntemi

Turkevich yöntemi, ilk olarak 1951 yılında [56] tanımlanan ve günümüzde küresel altın nanopartikül yapımında kullanılan en yaygın yöntemdir. Bu yöntem altın iyonlarının sitrat, amino asitler, askorbik asit ve UV ışık altında indirgeyici/stabilize edici ajanlar ile indirgenmesi (Au^{3+} ten Au^0 'a) ilkesine dayanır [56-58]. Bu yöntem ile başlangıçta 10-20 nm arası boyutlarda

üretilebilen altın nanopartiküller, daha sonraları 1973 yılında Frens tarafından indirgeyici/stabilize edici ajanların miktarları değiştirilerek altın nanopartikül boyutlarının 16-147 nm aralığına çekilebileceğini gösterilmiştir [59-61].

2.5.2. Brust Yöntemi

Brust yöntemi ilk olarak 1994 yılında [62] tanımlanan ve tiyol altın oranını değiştirerek ve organik çözücüler kullanarak 1.5-5.2 nm aralığında altın nanopartiküllerin üretimine olanak sağlayan 2 fazlı bir süreçtir. Yöntem, altın tuzunun faz transfer ajanı (tetraoktilamonyum bromür (TOAB)) kullanılarak sulu çözeltiden organik çözücü (toluen) transfer edilmesi ileksine dayanır. Daha sonra altın bir alkanetiyol varlığında sodyum borohidrür kullanılarak indirgenir. Alkanetiyol altın nanopartiküllerini stabil hale getirerek [63] işelmin sonuçlanmasını sağlar.

2.5.3. Çekirdekten Büyütme Yöntemi

Turkevich ve Brust yöntemleri ile küresel altın nanopartiküller üretilebilirken, aslında çubuk [64-66], küp [67,68] ve tüp [69] gibi birçok farklı nano yapı şeklinde de üretilebilir. Altın tuzunun ilk önce sodyum borohidrür gibi güçlü bir indirgeme ajanı ile indirgenmesi sonucu oluşturulan çekirdek partiküller daha sonra içerisinde askorbik asit gibi zayıf bir indirgeme ajanı ve metal tuzları ve yapı yönlendirici ajan içeren bir çözeltiye eklenir. Çekirdek partikülleri, indirgeyici ajan ve yapı yönlendirici ajanların konsantrasyonları değiştirilerek altın nanopartiküller farklı şekillerde elde edilebilir.

2.6. Altın Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu

Altın nanopartikül yüzeylerinde, çeşitli organik moleküller yardımı ile biyosensör, biyoteknoloji, kimyasal sensör ve moleküler elektronik alanlarında kullanılmak üzere düzenli bir şekilde tek katmanlı tabakalar oluşturulması mümkündür [70-80]. Altın film tabakaları [70] ve altın nanopartikül yüzeylerinde [74,81-84], birçok farklı ligand ile (amin, karboksilat, polietilen glikol (PEG), tiyol vb.) tek katmanlı yapılar oluşturulabilir. Altın ve kükürt arasındaki güçlü etkileşimden dolayı tiyol/disülfid bileşikleri en çok kullanılan ligandlardır [70]. Sıvı fazdaki nanopartiküllerin stabilitesi oluşturulan bu tek katmanlı yapılar ile arttırılabilir ve biyoloji, kataliz ve nanoteknoloji alanlarında daha kullanışlı hale getirilebilir [74,81,85,86]. Altın nanopartiküllerin amin, karboksilat, polietilen glikol (PEG), tiyol vb. ligandlarla modifiye edilmesi partikülleri biyouyumlu hale getirebilme yetisinin yanında, partiküller üzerinde çeşitli kimyasal veya biyolojik moleküllere karşı spesifik tanıma ve bağlanma (kovalent/kovalent olmayan) bölgelerinin de oluşturulabilmesi son yıllarda üzerinde oldukça çalışılan konuların başında gelmektedir.

2.7. Doking (Kenetlenme) Simülasyonları

Doking protein ve ligand gibi iki molekül arasındaki "en uygun" bağlanmanın bulunmasıdır. Çalışılan iki molekül arasında etkileşim varsa bu moleküllerin kompleksinde; etkileşimlerinin maksimum, toplam enerjinin minimum olduğu yönelimi bulur.

Proteinin bağlanma bölgesine bir ligandın yerleştirilmesi ve skora fonksiyonları kullanarak bağlanma afinitesinin hesaplanmasını sağlar. Doking skora uygulamaları sayesinde, tek bir ligand için farklı yönelimler sıralanabilir ve bağlanma serbest enerjisi ,elektrostatik etkileşimler, Van der Waal's etkileşimleri, Hidrojen bağları ve etkileşim enerjisi (pKd) elde edilebilir. 2 çeşit doking uygulaması mevcuttur;

- Bölgesel doking, reseptör üzerindeki bağlanma bölgesi biliniyorsa ligandın bu bağlanma bölgesinde ki pozisyonu belirlenir.
- Geniş çaplı doking, reseptör üzerindeki bağlanma bölgesi bilinmiyorsa, öncelikle reseptörün bağlanma bölgesi ve ardından ligandın bu bağlanma bölgesinde ki pozisyonu belirlenir [87].

2.7.1. Doking Programı (Autodock Vina)

Autodock Vina, 2010 yılında geliştirilmiş bir doking programıdır [88]. Autodock Vina'nın algoritması birçok yerel ve global optimizasyon yaklaşımının bir kombinasyonudur. Programın grafiksel kullanıcı arayüzünün bulunmaması ve programın temel olarak Linux platformu için tasarlanmış olması doking prosedürünün parametrizasyonunu karmaşık hale getirebilmektedir.

Bunu yanı sıra, AD Vina ile doking hesaplaması için bir konfigürasyon dosyası hazırlanmalıdır. Bu konfigürasyon dosyası, ligand ve hedef molekül bilgileri ile birlikte, AutoDock hesaplaması için hazırlanan grid parametre dosyasından alınan ve doking yapılacak alanı merkezin kartezyen koordinatları ve doking bölgesinin genişliği şeklinde tanımlayan parametreler içerir.

2.8. Karakterizasyon Teknikleri

Çesitli malzemelerin fiziksel veya kimyasal özelliklerini, yapılarını ve çevreleri ile olan etkileşimlerini incelemek için karakterizasyon tekniklerinden yararlanılmaktadır. Yapılan tez kapsamında sentezlenen altın nanopartiküller Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) ile, modifiye edilen altın nanopartiküller Moleküler Doking Simülasyonu, UV Görünür Bölge Spektroskopisi, X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS), Fourier

Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi (FT-IR), Zeta Potansiyel Ölçümü ve Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) gibi çeşitli tekniklerle karakterize edilmiştir.

2.8.1. Moleküler Doking Simülasyonu

Tez kapsamında yapılacak deneylerin belirlenmesi ve altın nanopartiküllere immobilize edilecek molekül gruplarının, hemoglobine spesifik moleküler baskılanmış polimer yüzeyleri ile olan ilişkisinin incelenmesi bakımından çeşitli moleküler simülasyon çalışmaları yapıldı. Modifiye altın nanopartiküllerin pH :7,4 ortamda MMFF94 kuvvet alanı altında, 9999 adımda ve Steepest Descent algoritması kullanılarak enerji minimizasyonları yapıldıktan sonra, hemoglobine spesifik kaviteelerde bulunan fonksiyonel grup N-metakriloil-L-histidin metil ester ile etkileşimleri incelendi.

2.8.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Elektron tabancasından elde edilen elektronlar 100-200kV değerinde hızlandırma voltajı ile numuneye yönlendirilirler. Elektronların yönlendirilmesi elektromanyetik lensler kullanılarak yapılır. Koyu tonlu bölgeler numuneden daha az sayıda elektronun geçtiği bölgelerdir. Bir bölgeden daha az sayıda elektronun geçmesi demek o bölgenin daha yoğun (büyük atom numarası) veya daha kalın olduğunu gösterir. Numuneden geçebilen elektronlar gözlem ekranının üzerine düşer ve görüntü elde edilir.

2.8.3. UV Görünür Bölge Spektroskopisi

Temel mantığı, hazırlanan çözeltilerden belirli spektrumlarda ışık geçirilmesi ve bu ışığın ne kadarının çözeltili tarafından absorblandığını bulunması esasına dayanır. Çözeltinin içerdiği madde miktarı ne kadar fazla ise daha fazla ışın, çözeltili tarafından soğurur. Spektrofotometre, çözeltinin içinden geçebilen -çözeltili tarafından absorblanmayan- ışığın yoğunluğu tespit ederek çözelti içeriğindeki aranan maddenin miktarı hakkında kantitatif bilgi

verir. Tez kapsamında hazırlanan modifiye altın nanopartiküller öncelikle UV görünür bölge spektroskopisi yardımı ile incelenmiştir.

2.8.4. X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi

X-ışını fotoelektron spektroskopisi katı materyallerin yüzeyleri hakkında kimyasal bilgi elde etmek için kullanılan gelişmiş bir yüzey analiz tekniğidir. Metod, katı örnekleri uyaran bir x-ışın demeti kullanarak fotoelektronların saçılmasını sağlar. Elde edilen spektrum elementin kimyasal çevresi ve yükseltgenme durumu hakkında bilgi verir. Farklı kimyasal çevrelerle ilişkili atomlar, kimyasal kayma olarak adlandırılan düşük farklılıkta bağlanma enerjisine sahip enerji pikleri üretirler. Enerjisi birbirine yakın olan ayrı kimyasal durumlar, her bir durumun içeriğini yüzde olarak veren pik saptama programları kullanılarak birbirinden ayrılır. Modifiye altın nanopartiküller yine bu yöntem ile karakterize edilmiştir.

2.8.5. Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi

Infrared (IR) spektroskopisi; moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçer ve moleküldeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi verir. IR spektrometresinde dalga sayısı ölçeği kullanılmaktadır. Dalga sayısı ($1/\lambda$), hem enerji hem de frekans ile doğru orantılıdır. Titreşim frekansı sayısal olarak ölçeklendirmeye uygun olmadığı için dalga sayısı kullanımı tercih edilir. Bu yöntem ile, moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak; katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik yada alifatik olup olmadığı belirlenebilir. Tez kapsamında sentelenen 11-MUA altın modifiye altın nanopartiküllerin karakterizasyonunda FT-IR Spektroskopisinde kullanılmıştır.

2.8.6. Zeta Potansiyel Ölçümü

Zeta potansiyel, partiküller arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür. Zeta potansiyel ölçümü dağılma mekanizmaları ile ilgili ayrıntılı bilgi verir ve elektrostatik dağılma kontrolünün anahtarıdır. Tez kapsamında sentezlenen, boş ve modifiye altın nanopartiküllerin yük dağılımları bu yöntemle incelenmiştir.

2.8.7. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)

Polarize ışık, yüzeyi altın kaplı bir prizmaya gönderildiğinde ışığın bir kısmı absorplanmakta, bir kısmı da yansımaktadır. Geliş açısı değiştirilip yansıyan ışığın şiddeti izlendiğinde yansıyan ışık şiddetinde azalma görülür. Yansıyan ışığın şiddetinde maksimum kaybın gerçekleştiği açığa rezonans açısı ya da SPR açısı adı verilir. Bu geliş açısında ışık, yüzey plazmonlarını (elektron paketçikleri) harekete geçirecek, yüzey plazmon rezonans olayı gerçekleşecektir. Yüzey plazmon rezonansı iki optik ortamın ara yüzeyine ince iletken bir film yerleştirildiğinde meydana gelir. Spesifik bir geliş açısında metal yüzeyindeki elektron frekanslarının eşleşmeleri nedeniyle gelen ışık ile rezonans durumuna gelecektir. Bu rezonans durumunda enerji absorblanacağı için yansıyan ışının yoğunluğunda bir azalma meydana gelmektedir. Tez kapsamında sentezlenen modifiye altın nanopartiküllerin, hemoglobine spesifik moleküler baskılanmış polimer yüzeyler ile olan etkileşimlerinde denge ve kinetik analizleri farklı derişimler altında SPR karakterizasyon tekniği kullanılarak yapılmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışmasının bu kısmında, öncelikle sentezlenecek modifiye altın nanopartiküllerin hemoglobin spesifik moleküler baskılanmış polimer yüzeyler ile etkileşimi moleküler docking simülasyonu ile incelenmiş ve hangi moleküllerin modifikasyon işleminde kullanılacağına karar verilmiştir. Daha sonra altın nanopartiküller sentezlenmiş ve modifikasyon işlemleri yapılmıştır. En son kısımda ise sentezlenen altın nanopartiküllerin hemoglobin spesifik hazırlanmış yüzeyler ile etkileşimi, denge ve kinetik analizleri çeşitli derişimlerde modifiye altın nanopartiküller kullanılarak Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) ile incelenmiştir.

3.1. Materyal ve Yöntemler

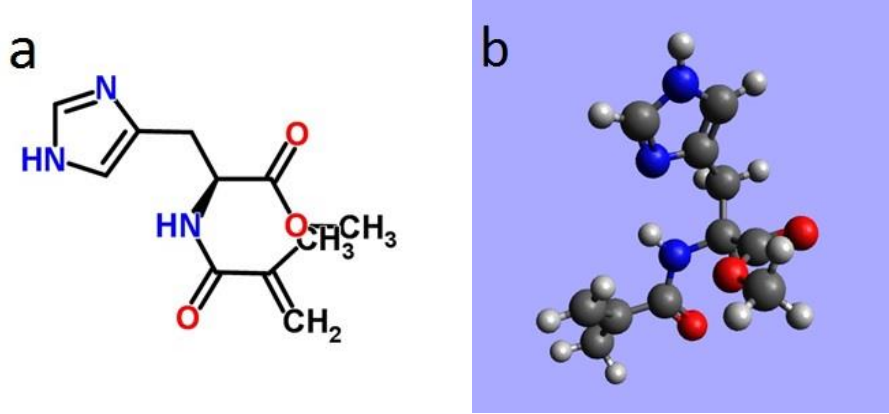
Tez çalışmasının bu aşamasında, modifiye altın nanopartiküllerin hemoglobin spesifik moleküler baskılanmış polimer yüzeyleri ile olan etkileşimi moleküler docking programı ile simüle edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 10 ve 25 nm altın nanopartiküller sentezlenerek, 11-Merkaptoundekaonik asit ve Aldehit-PEG-Ester molekülleri ile modifiye edildi ve karakterizasyon işlemleri yapıldı. Daha sonra Peg molekülünün yaklaşık 10 nm uzunluğundan faydalanarak ve Aldehit grubunun Etanolamin hidroklorür yardımı ile -OH modifikasyonuna açık olması sebebiyle, hem 11-MUA modifikasyonunun güvenilirliğinin tekrar kontrol edilmesi hem de PEG molekülünü spacer arm gibi kullanarak yüzey etkileşiminde herhangi bir değişikliğe sebep olup olmadığı incelendi. Son olarak sentezlenen modifiye altın nanopartiküllerin Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) yardım ile hemoglobine spesifik moleküler baskılanmış polimer yüzeyler ile etkileşimi incelenerek, denge ve kinetik analizleri yapıldı.

Sodyum sitrat tribazik dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), hidrokloroaurik asit ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$), sistamin ($HSCH_2CH_2NH_2 \cdot HCl$), 11-merkaptoundekaonik asit ($HS(CH_2)_{10}CO_2H$) Sigma-Aldrich (St Louis, MO), 4-formyl-benzamido-dPEG[®]₂₄-TFP ester (Aldehit-PEG-Ester) Quanta Biodesign Limited, Etanolamin hidroklorür ($H_2NCH_2CH_2OH \cdot HCl$) Alfa Aesar firmalarından temin edildi. Sitrat kaplı koloidal altın nanopartiküllere spesifik fonksiyonel yüzeylere sahip hemoglobin baskılanmış polimerler'ler (MBP), Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Öğretim Görevlisi Sayın Prof. Dr. Adil Denizli hocamız'ın laboratuvar grubundan temin edilmiştir.

Altın nanopartiküllerin şekil ve boyut analizi 200 kV TEM mikroskobu (FEI, Tecnai G2 F30), modifiye altın nanopartiküllerin karakterizasyonları; 14kV odak voltajı, 6mA demet akımı ve 400 µm nokta büyüklüğe sahip kaynak tabancası kullanılarak (AI K-Alpha) yüksek performanslı monokromatik XPS spektrometresi, UV görünür bölge spektroskopisi (Thermoscientific NanoDrop 1000), FT-IR spektroskopisi (Perkin Elmer SpectrumOne, Nicolet 520), Zetasizer (Malvern Nano-ZS) ve modifiye altın nanopartiküllerin hemoglobin spesifik moleküler baskılanmış polimer yüzeyler ile etkileşimi Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) (SPRILAB Made in France) tekniği ile yapılmıştır. Deneyler boyunca kullanılan su AquaMAX Ultra 370 Series saflaştırma cihazı kullanılarak saflaştırılmıştır.

3.2. Moleküler Doking Simülasyonu

Modifiye altın nanopartiküller Avogadro programı yardımıyla istenilen pH aralığına çekildi ve belirli bir kuvvet alanı altında enerji minimizasyonları yapıldıktan sonra, yine aynı pH aralığında aynı kuvvet alanı altında enerji minimizasyonu yapılan, hemoglobine spesifik kavitelerde bulunan fonksiyonel grup N-metakriloil-L-histidin metil ester ile etkileşimleri Autodock Vina programı yardımıyla incelendi.

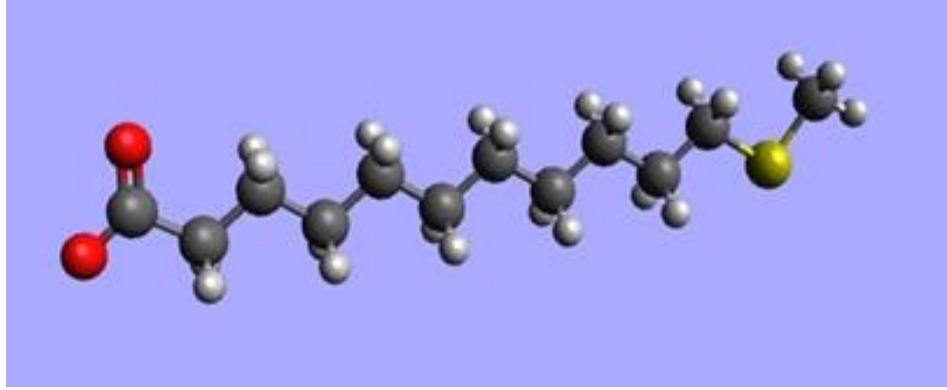


Şekil 3.1. N-metakriloil-L-histidin metil ester (a) 2D ve (b) 3D görünüşleri.

3.2.1. 11-MUA Moleküler Doking Simülasyonu

Doking işlemi uygulanacak N-metakriloil-L-histidin metil ester ve 11-MUA, Avogadro programı kullanılarak aslına uygun olarak çizildi. Deneysel şartlarda 11-MUA ucunda altın nanopartikül bulunmasından ve Autodock Vina programının altın nanopartikülü tanımamasından dolayı 11-MUA molekülünün -SH ucu reaktif olmayan CH₃ grubu ile kapatıldı (Şekil 3.2.). Avogadro programı ile hidrojen eklenerek ortam, pH : 7.4 çalışma aralığına çekildi.

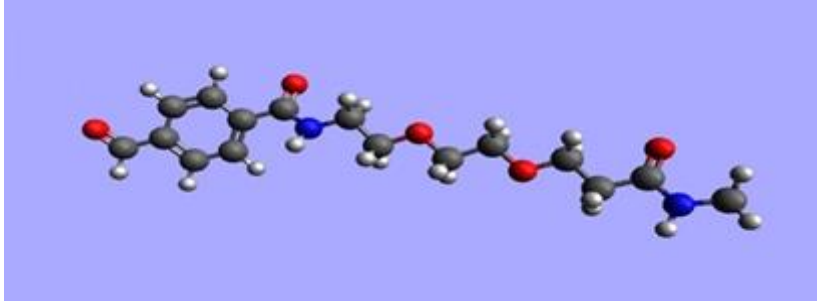
MMFF94 kuvvet alanı altında, 9999 adımda ve Steepest Descent algoritması kullanılarak enerji minimizasyonları yine Avogadro programı ile yapıldıktan sonra oluşturulan PDB dosyaları Doking işleminin uygulanacağı Autodock Vina programına aktarılarak çeşitli konformasyonlar içinden en uygun olanı seçildi.



Şekil 3.2. Avogadro ile çizilmiş ve pH:7.4 ortamda enerji minimizasyonu yapılmış altın nanopartikül modifiye 11-MUA molekülü.

3.2.2. Aldehit-PEG-Ester Moleküler Doking Simülasyonu

Bir diğer doking çalışması yapılacak olan 4-formyl-benzamido-dPEG[®]₂₄-TFP ester (PEG) molekülü de deneysel şartlarda amin (NH₂) grubu takılmış altın nanopartiküle bağlanacağından PEG molekülünün çift bağlı Oksijen (O) ucuna Amin grubu takıldı ve yine reaktif olmayan CH₃ grubu ile kapatıldı (Şekil 3.3.). Avogadro programı ile hidrojen eklenerek, ortam (pH : 7.4) çalışma aralığına çekildi. MMFF94 kuvvet alanı altında, 9999 adımda ve Steepest Descent algoritması kullanılarak enerji minimizasyonları yine Avogadro programı ile yapıldıktan sonra oluşturulan PDB dosyaları Doking işleminin uygulanacağı Autodock Vina programına aktarılarak çeşitli konformasyonlar içinden en uygun olanı seçildi.



Şekil 3.3. Avogadro ile çizilmiş ve pH:7.4 ortamda enerji minimizasyonu yapılmış altın nanopartikül modifiye 4-formyl-benzamido-dPEG[®]₂₄-TFP ester (PEG) molekülü

3.3. Altın Nanopartikül Sentezi

Eş boyutlu ve homojen dağılıma sahip altın nanopartiküller literatürde de bolca yer alan ve en stabil yöntemlerden biri olarak gösterilen, altın tuzunun sodyum sitrat ile indirgenmesi (Au^3 den Au^0 'a) işlemine dayanan Turkevich yöntemi ile sentezlenmiştir.

3.3.1. Sitrat Kaplı 10 nm Altın Nanopartiküllerin Hazırlanması

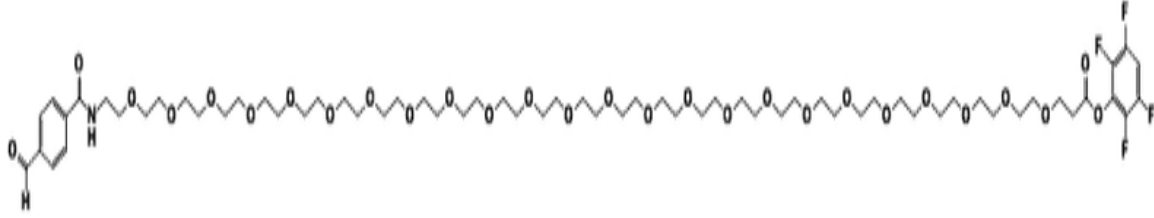
Çapları 10 nm olan altın nanopartiküller $HAuCl_4$ altın tuzunun, sodyum sitrat ile indirgenmesi ilkesine dayanan Turkevich yöntemi [56] ile sentezlendi. 20 mg hidrokloroaurik asit ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$), 50 mL DI (deiyonize) su içerisinde çözüldü. Isıtmalı manyetik karıştırıcıda 800 rpm'de karıştırılarak kaynama sıcaklığına gelinceye kadar ısıtıldı. 60 mg sodyum sitrat tribazik dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), 5 mL DI su içerisinde çözülerek kaynayan $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ çözeltisine eklendi. Çözelti koyu kırmızı renk aldıktan sonra ısıtma sistemi kapatıldı ve soğuyana kadar karıştırılmaya devam edildi. 7500 rpm de 20 dakika santrifüj edildi ve daha sonra kullanılmak üzere 4 °C' de saklandı. Sentezlenen altın nanopartiküllerin renkleri optik olarak yapılırken, şekil ve boyut karakterizasyonları ise TEM ile yapıldı.

3.3.2. Sitrata Kaplı 25 nm Altın Nanopartiküllerin Hazırlanması

Çapları 25 nm olan altın nanopartiküller HAuCl_4 altın tuzunun, sodyum sitrat ile indirgenmesi ilkesine dayanan Turkevich yöntemi [56] ile sentezlendi. 20 mg hidrokloroaurik asit ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 50 mL DI (deiyonize) su içerisinde çözüldü. Isıtmalı manyetik karıştırıcıda 800 rpm'de karıştırılarak kaynama sıcaklığına gelinceye kadar ısıtıldı. 45 mg sodyum sitrat tribazik dihidrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 5 mL DI su içerisinde çözülerek kaynayan $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisine eklendi. Çözelti koyu kırmızı renk aldıktan sonra ısıtma sistemi kapatıldı ve soğuyana kadar karıştırılmaya devam edildi. 7500 rpm de 20 dakika santrifüj edildi ve daha sonra kullanılmak üzere 4°C ' de saklandı. Sentezlenen altın nanopartiküllerin renkleri optik olarak yapılırken, şekil ve boyut karakterizasyonları ise TEM ile yapıldı.

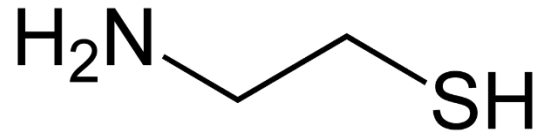
3.4. Altın nanopartiküllerin Modifikasyonu

Altın nanopartiküllerin modifikasyonu 11-MUA ve Aldehit-PEG-Ester molekülleri kullanılarak yapıldı. 11-MUA molekülü, altın nanopartiküllere bir ucunda bulunan tiyol grubu (-SH) yardımı ile kolayca immobilize edilirken, Aldehit-PEG-Ester molekülünün doğrudan altına immobilizasyonu mümkün değildir. PEG molekülü ester ucunda bulunan flor halkasının amin (- NH_2) gruplarını gördüğünde kopması ve boşalan uçta bulunan çift bağlı oksijen (O) molekülünün bu amin gruplarına bağlanması sonucu altın nanopartikül yüzeyine immobilize edilebilmektedir.



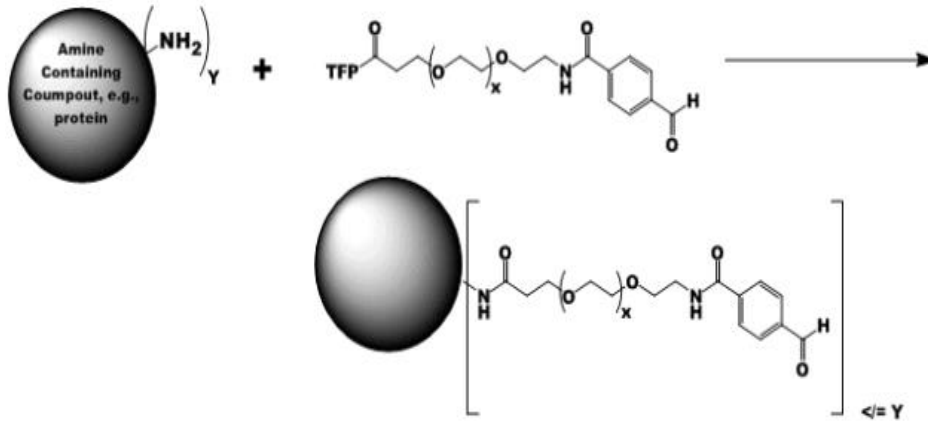
Şekil 3.4. 4-formyl-benzamido-dPEG[®]₂₄-TFP ester (Aldehit PEG) molekülünün yapısı.

Bu sebepten dolayı altın nanopartiküller önce, bir ucunda tiyol grubu (-SH) bulunduran sistamin molekülleri ile modifiye edilmiştir.



Şekil 3.5. Sistamin molekülünün yapısı.

Daha sonra Aldehit-PEG-Ester molekülleri sistamin molekülünün boşta kalan ucu olan amin gruplarına (NH₂) immobilize edilmiştir.



Şekil 3.6. 4-formyl-benzamido-dPEG[®]₂₄-TFP ester (Aldehit PEG) molekülünün bağlanma mekanizması.

3.4.1. Sitrat Kaplı Altın Nanopartiküllerin 11-Mua (Merkapto Undekaonik Asit) İle Modifikasyonu

22 mg 11-MUA ($\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$), 1 mL etanol içerisinde çözüldü. Hazırlanan 10 nm sitrat kaplı altın nanopartikül çözeltisi içerisinde (1:10) oranında eklenerek oda sıcaklığında en az 60 saat manyetik karıştırıcı ile 500 rpm'de karıştırıldı [89]. Karışım daha sonra 7500 rpm'de, 20 dakika santrifüj edildi ve daha sonra kullanılmak üzere 4°C ' de saklandı. Modifikasyon işlemi sonucunda 10 nm çapındaki nanopartiküllerin istenilen renk olan koyu kırmızı rengini koruduğu ancak 25 nm modifiye altın nanopartiküllerde şiddetli agregasyon olduğu optik olarak gözlemlendi. Bu sebeple ilerleyen aşamalara yalnızca 10 nm modifiye partiküller ile devam edildi. Daha sonra UV görünür bölge spektroskopisi, Zeta potansiyel ölçümü, FT-IR (Fourier transform infrared spektroskopisi) ve XPS (X-ışını fotoelektron spektroskopisi) ölçümleri ile modifikasyon işlemi karakterize edildi.

3.4.2. Sitrat Kaplı Altın Nanopartiküllerin Sistamin İle Modifikasyonu

40 mg sistamin ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$), 10 mL DI su içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözeltiden 10 μL alınarak, 1 mL DI su içerisinde eklendi ve karıştırıldı. Böylelikle 50 μM ' lık sistamin çözeltisi elde edildi. Hemen ardından 50 μM sistamin çözeltisi (1:100) oranında [90], altın nanopartikül çözeltisine eklendi ve 24 saat boyunca rotator ile yavaş bir şekilde karıştırıldı. 7500 rpm de santrifüj edildi ve daha sonra kullanılmak üzere 4°C da saklandı. 11-Mua modifikasyonu ile benzer olarak, sistamin ile modifiye edilmiş 10 nm modifiye nanopartiküllerin istenilen renk olan koyu kırmızı rengini koruduğu ancak 25 nm modifiye partiküller de ise agregasyon başlangıcı optik olarak gözlemlendi. Daha sonra UV görünür bölge spektroskopisi, Zeta potansiyel ölçümü ve XPS (X-ışını fotoelektron spektroskopisi) ölçümleri ile modifikasyon işleminin karakteriasyonu yapıldı.

3.4.3 Sistamin Modifiye Altın Nanopartiküllerin Aldehit Peg İle Modifikasyonu

4-formyl-benzamido-dPEG®₂₄-TFP ester (Aldehit PEG-ester) molekülü 1 mL DMSO içerisinde oda sıcaklığında çözüldü. Hazırlanan sistamin modifiye altın nanopartikül çözeltisi içerisinde, (1:1000) oranında Aldehit-PEG-Ester çözeltisi eklenerek 2 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile yavaş bir şekilde karıştırıldı. 7500 rpm de santrifüj edilerek daha sonra kullanılmak üzere 4°C da saklandı. Sistamin molekülünün -NH₂ ucuna takılan Aldehit-PEG-Ester molekülü sonrası, çözelti optik olarak analiz edildi ve 10 nm modifiye partiküllerin koyu kırmızı rengini koruduğu gözlenirken 25 nm modifiye partiküllerde agregasyonun devam ettiği görüldü. Bu sebeple ilerleyen aşamalara yalnızca 10 nm modifiye partiküller ile devam edildi. Daha sonra UV görünür bölge spektroskopisi, Zeta potansiyel ölçümü ve XPS (X-ışını fotoelektron spektroskopisi) ölçümleri ile modifikasyon işleminin karakteriasyonu yapıldı.

3.4.4. Altın Nanopartiküllere İmmobilize Edilmiş Aldehit-PEG-Ester Molekülünün Etanolamin Hidroklorür İle Modifikasyonu

11-MUA modifikasyonunun güvenilirliğinin tekrar kontrol edilmesi ve PEG molekülünün spacer arm özelliğinden yararlanmak amacı ile ayrı bir deney seti hazırlandı. Aldehit-PEG-Ester molekülünün ucunda bulunan çift bağlı oksijen (O) moleküllerinin, -OH grupları ile modifiye edilmesini sağlamak amacıyla, 4-formyl-benzamido-dPEG®₂₄-TFP ester (Aldehit PEG-ester) molekülü 1 mL DMSO içerisinde oda sıcaklığında çözüldü. Hazırlanan sistamin modifiye altın nanopartikül çözeltisi içerisinde, (1:1000) oranında Aldehit-PEG-Ester çözeltisi eklenerek karıştırıldı. Karıştırılmaya başladıktan 110 dakika sonra çözeltiye 1 M 5µL etanolamin hidroklorür (H₂NCH₂CH₂OH.HCl) eklenerek 10 dakika daha karıştırıldı. Böylelikle PEG molekülünün fonksiyonel ucu da 11-MUA molekülü ile benzer hale getirildi

[91]. Elde edilen karışım 7500 rpm de santrifüj edildi ve daha sonra kullanılmak üzere 4 °C'de saklandı. 10 nm çapındaki nanopartiküllerin istenilen renk olan koyu kırmızı rengini koruduğu ancak 25 nm modifiye altın nanopartiküllerde agregasyonun devam ettiği optik olarak gözlemlendi. Bu sebeple ilerleyen aşamalara yalnızca 10 nm modifiye partiküller ile devam edildi. Daha sonra UV görünür bölge spektroskopisi, Zeta potansiyel ölçümü ve XPS (X-ışını fotoelektron spektroskopisi) ölçümleri ile modifikasyon işleminin karakterizasyonu yapıldı.

HCl



Şekil 3.7. Etanolamin hidroklorür (EA) molekülünün yapısı.

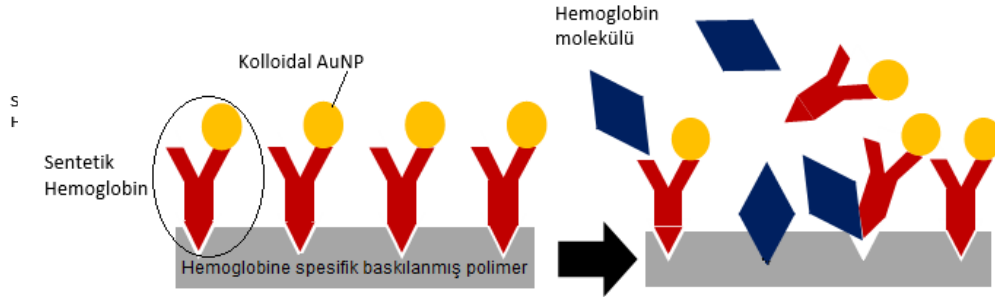
3.5. Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Farklı Derişimlerde, Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörü İle Kinetik Analizlerinin Yapılması

Biyomoleküllerin tayininde sıklıkla kullanılan enzim veya floresan işaretleme yöntemlerinden farklı olarak SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretlemeye gerek duyulmadan kullanılabilirler [92]. İşaretleme işleminin yapılmaması hem zaman kazandırmakta hem de maliyeti düşürmektedir.

İşaretleyici moleküllerin ortamda bulunan diğer moleküllerle etkileşiminden dolayı yanlış sonuçlar elde edilebilmektedir. SPR temelli biyosensörlerin kullanılmasıyla bu sorunlar giderilebilmektedir [93]. Ayrıca bu sensörlerde analit ve yüzey etkileşimi gerçek zamanda ve doğrudan ölçülebilmektedir.

Bu özellik nicel olarak kinetik, termodinamik ve derişim parametrelerinin belirlenmesini veya nitel olarak ligand ve analit arasındaki ilişkinin karakterize edilmesini sağlamaktadır [94].

Bu çalışma kapsamında hemoglobin baskılanmış SPR nanosensör ile çalışılmıştır. SPR çipi yüzeyine hemoglobine spesifik baskılanmış polimerler kaplanmış ve modifiye altın nanopartiküller (sentetik hemoglobin molekülü) ile gerçek hemoglobin molekülünün, baskılanmış polimer yüzeyindeki fonksiyonel gruplar ile yarışmalı afinite kromatografi ilkesine dayanarak etkileşimleri incelenmiştir. Yarışmalı afinite kromatografisi, 2 molekülün aynı fonksiyonel gruba farklı bağlanma isteği göstermesi ve bunun sonucunda yüksek afiniteye sahip olan molekülün düşük olanı ortamdaki uzaklaştırmasıdır.

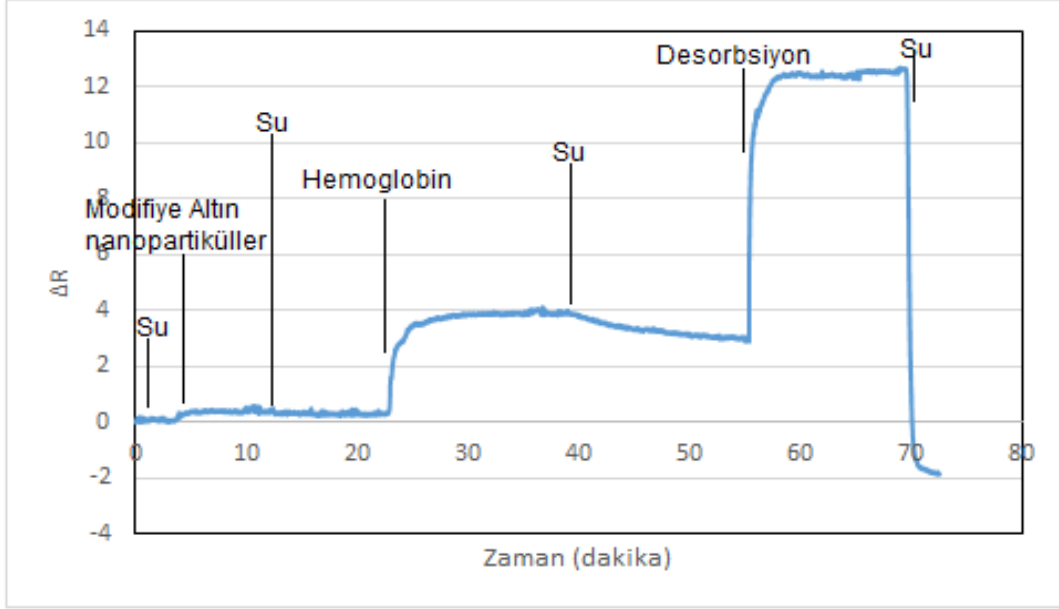


Şekil 3.8. Hemoglobine spesifik polimer yüzeyler üzerinde yarışmalı afinite kromatografisi

SPR sinyali ile, modifiye altın nanopartikül derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi ve tekrarlanabilirliğin görülebilmesi için farklı derişimlerde (2, 5, 10, 15, 20 nm) modifiye altın nanopartikül çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler peristaltik pompa aracılığıyla SPR nanosensörle etkileştirilmiş ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler alınmıştır.

(Şekil 3.9.)'de farklı derişimlerde modifiye altın nanopartikül çözeltilerinden elde edilen sinyaller için genel grafik verilmektedir. Diğer derişim grafikleri,

etkileşimlerin daha iyi görülebilmesi amacıyla sadece modifiye altın nanopartiküllerin bağlanma zamanlarını ve miktarlarını gösterecek şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 3.9. Modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi (Genel Grafik)

Her bir ölçümde; sistemden öncelikle sinyalin dengeye gelmesini beklemek amacıyla su, sonra modifiye altın nanopartiküller geçirilmiştir. Daha sonra dengeli bir şekilde yüzeye tutunamayan modifiye altın nanopartikülleri ortamdaki uzaklaştırmak için tekrar sistemden su geçirilmiştir. Son aşamada hemoglobin baskılanmış polimer yüzeyine tutunan modifiye altın nanopartikülleri ortamdaki uzaklaştırmak ve sistemi bir sonraki ölçüme hazırlamak amacıyla desorpsiyon çözeltisi (NaOH veya NaCl) kullanılmıştır. Ardından sistemden tekrar su geçirerek sistemin tekrar denge durumuna dönmesi sağlanmıştır. Bütün ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için 30 dakika beklendi. Desorpsiyon ve rejenerasyon işlemleri 10 dakika içinde gerçekleştirildi.

3.5.1. Denge Analizi

Analit derişiminin akış hücrelerinde sabit kaldığı koşullar altında bağlanma şu şekilde ifade edilir;

$$d\Delta R / dt = k_a C (\Delta R_{maks} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad (4.1)$$

Burada; $d\Delta R/dt$, SPR sinyalinin değişim hızı; R ve R_{maks} , bağlanma ile ölçülen ve maksimum sinyali; C , analit derişimini (nM), k_a , bağlanma hız sabiti ($1/nM.s$) ve k_d , ayrılma hız sabiti ($1/s$)'dir. Bağlanma sabiti K_A ($1/nM$), k_a ve k_d sabitlerinin oranından hesaplanır ($K_A = k_a/k_d$). Denge durumunda, $d\Delta R/dt=0$ alınarak eşitlik basitleştirilir:

$$\Delta R_{denge} / C = K_A \Delta R_{maks} - K_A \Delta R_{denge} \quad (4.2)$$

Burada, bağlanma sabiti K_A , $\Delta R_{denge}/C$ 'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinden hesaplanır. Ayrılma sabiti K_D ise; $1/K_A$ eşitliği ile hesaplanabilir.

3.5.2. Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 4.1 tekrar düzenlendiğinde;

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (4.3)$$

eşitliği elde edilir. Burada, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiğinin eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bir doğru vermektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusal bir ilişki içerisindedir ve kantitatif olarak derişim belirlenmesinde kullanılır. Eğer R_{maks} değeri biliniyorsa, tek bir sensogram kullanılarak k_a ve k_d değerleri hesaplanabilir. Yüzeyi tamamen doygunluğa erdirmek için çok yüksek analit derişimlerine gerekli olduğundan R_{maks} 'ın deneysel olarak belirlenmesi zordur.

Tercih edilen yaklaşım, birçok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensogramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri (S) vermektedir:

$$S = k_a C + k_d \quad (4.4)$$

S'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası k_d değerini vermektedir. Fakat, $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda k_d hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (4.5)$$

Burada; ΔR_0 ve ΔR_t , ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir.

3.5.3. Denge İzoterm Modelleri

SPR çip üzerindeki hemoglobin baskılanmış nanokürelerin Altın-MUA ile etkileşim modelini belirlemek amacıyla dört farklı denge izoterm modeli uygulanmıştır: Scatchard, Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri.

Çizelge 3.1. Denge izoterm modelleri.

Scatchard	$\Delta R_{\text{denge}} / [C] = K_A (\Delta R_{\text{maks}} - \Delta R_{\text{denge}})$
Langmuir	$\Delta R = \{ \Delta R_{\text{maks}} [C] / K_D + [C] \}$
Freundlich	$\Delta R = \Delta R_{\text{maks}} [C]^{1/n}$
Langmuir-Freundlich	$\Delta R = \{ \Delta R_{\text{maks}} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n} \}$

Burada; ΔR_{maks} , maksimum SPR sinyal kaymasını; ΔR_{denge} , denge halindeki SPR sinyal kaymasını; $[C]$, analit derişimi (nM); K_A (1/nM), bağlanma denge sabitini; K_D (nM), ayrılma denge sabitini; $1/n$, Freundlich yüzey heterojenite indeksini ifade etmektedir.

Langmuir adsorpsiyon modeli homojen, Freundlich adsorpsiyon modeli ise heterojen bağlanma varsayımına dayanır. Freundlich adsorpsiyon modeli, özellikle düşük derişimlerde MIP sistemlerine uygunluk göstermektedir[95].

Fakat bu model, yüksek derişim değerlerinde bazı sapmalar göstermektedir. Bu sapmaları engellemek için Langmuir-Freundlich ikili modeli kullanılabilir. Bu model, heterojenite olduğu durumda çok düşük derişimlerden doygunluğa kadar MBP sistemleriyle uygunluk göstermektedir[96].

3.6. Karakterizasyon Yöntemleri

Sentezlenen altın nanopartiküllerin boyut ve şekil analizleri ve altın nanopartiküllere immobilize edilen moleküllerin bağlanma analizleri çeşitli karakterizasyon teknikleri kullanılarak incelenmiştir.

3.6.1. TEM Analizleri

Sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutları, şekil analizi, yönelimleri ve homojen dağılımı TEM ile karakterize edilmiştir.

3.6.2. UV Görünür Bölge Spektroskopisi Analizleri

11-MUA, Sistamin, Aldehit-PEG-Ester ve Aldehit-PEG-EA moleküllerinin altın nanopartikül yüzeylerine immobilizasyonu UV Görünür Bölge Spektroskopisi ile karakterize edilmiş ve maksimum absorban pikinin bulunduğu dalga boyundaki kaymalar incelenerek modifikasyon hakkında bilgi sahibi olunulmuştur.

3.6.3. XPS Analizleri

11-MUA, Sistamin ve Aldehit-PEG-Ester moleküllerinin altın nanopartikül yüzeylerine modifikasyonu, bu moleküllerin uçlarında bulunan fonksiyonel gruplarının XPS ile elemental analizi yapılarak incelenmiştir.

3.6.4. FT-IR Analizleri

11-MUA molekülünün altın nanopartikül yüzeyi ile etkileşimi ve modifikasyon işlemi FT-IR spektroskopisi ile incelenerek –SH gerilmesi ve Au-S piki analiz edilmiştir.

3.6.5. Zeta Potansiyel Analizleri

11-MUA, Sistamin, Aldehit, PEG-Ester ve Boş altın nanopartiküllerin zeta potansiyelleri incelenerek immobilizasyon işleminin sonuçları analiz edilmiştir.

3.6.6. SPR Analizleri

Modifiye altın nanopartiküllerin hemoglobine spesifik moleküler baskılanmış polimer yüzeylerinde yer alan fonksiyonel grup ile etkileşimleri denge ve kinetik analizleri yapılarak belirlenmeye çalışıldı. Ayrıca izoterm eğrileri çizilerek modifiye altın nanopartiküllerin yüzeye bağlanma şekilleri incelendi. SPR çip üzerindeki hemoglobin baskılanmış polimer yüzeylerin modifiye altın nanopartiküller ile etkileşim modelini belirlemek amacıyla dört farklı denge izoterm modeli uygulandı (Çizelge 3.1.).

4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRMELER

Bu tez çalışmasında, deneylere başlamadan önce Autodock Vina programı yardımı ile modifiye altın nanopartiküllerin hemoglobin spesifik moleküler baskılanmış polimer yüzeyleri ile ilişkisi incelenmiş, 11-MUA ve Aldehit-PEG-Ester molekülleri altın nanopartikül yüzeylerine immobilize edilmek için seçilmiştir. Bu kapsamda stabil, homejen dağılıma sahip ve tek boyutlu küresel altın nanopartiküllerin sentezlenmiş, daha sonra ise hemoglobin yüzeyine spesifik moleküler baskılanmış polimer yüzeyler üzerindeki fonksiyonel gruplar ile etkileşmesi için, sentezlenen altın nanopartiküllerin modifikasyonları yapılmıştır. Modifikasyonları yapılan altın nanopartiküller yarışmalı afinite kromatografisi tabanlı bir sistem hazırlanarak bağlanma kinetikleri (bağlanma/kopma hızı) ve yüzeylere bağlanma şekilleri karakterize edilmiştir.

4.1. Moleküler Doking Simülasyonu

pH : 7.4 ortamda MMFF94 kuvvet alanı altında, 9999 adımda ve Steepest Descent algoritması kullanılarak enerji minimizasyonları Avogadro programı ile yapıldıktan sonra oluşturulan PDB dosyaları Doking işleminin uygulanacağı Autodock Vina programına aktarılarak çeşitli konformasyonlar içinden en uygun olanı seçildi. Bu amaç doğrultusunda 11-MUA ve Aldehit-PEG-Ester molekülleri ligand, hemoglobine spesifik moleküler baskılanmış polimer yüzeylerinde bulunan N-metakriloil-L-histidin metil ester molekülü ise reseptör olarak adlandırıldı. Ligand molekülleri için, reseptör molekülü ile etkileşiminin olabileceği kısımlar belirlenerek ve kaç farklı konformasyona bakılacağı girilerek konfigürasyon dosyası hazırlandı. Simülasyon sonucunda Autodock Vina programı tarafından verilen ve bağlanma enerjileri değerlerini içeren log dosyası yardımı ile en anlamlı konformasyon belirlendi.

4.1.1. 11-MUA Doking Simülasyonu

Doking işlemi için 11-MUA ligandı ile N-metakriloil-L-histidin metil ester reseptörü arasında mümkün olan doking hesaplamaları yapıldı. Bu işlem için hazırlanan konfigürasyon dosyası (Şekil 4.3.)'de verilmiştir.

```
receptor = receptor.pdbqt  
ligand = ligand.pdbqt  
  
out = out.pdbqt  
  
center_x = 0.056  
center_y = 0.111  
center_z = 0.083  
  
size_x = 40  
size_y = 40  
size_z = 40  
  
exhaustiveness = 100
```

Şekil 4.1. 11-MUA doking konfigürasyon dosyası.

Hazırlanan konfigürasyon dosyası seçimiyle doking işlemi yapıldı ve mümkün olabilecek 9 konformasyon Autodock Vina programı tarafından belirlendi. Sonuç olarak bulunan log dosyası ise (Şekil 4.2.)'te gösterilmiştir.

```

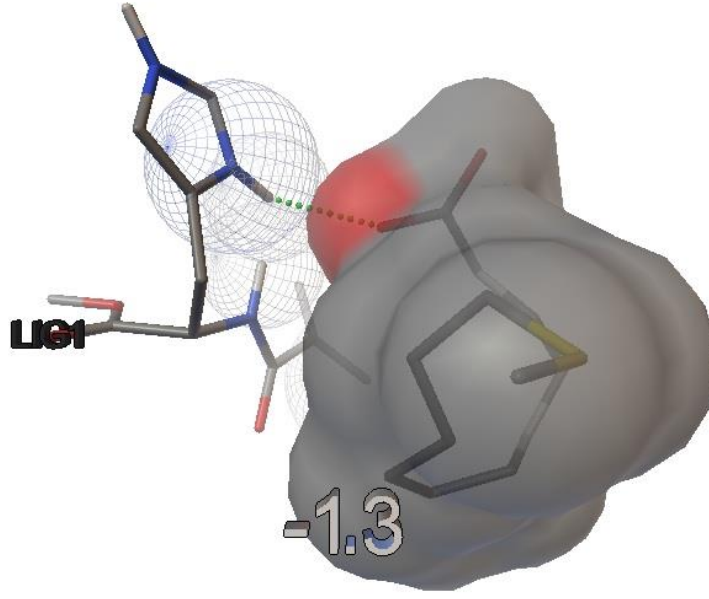
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 1575752168
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode |  affinity |  dist from best mode
      |  (kcal/mol) |  rmsd l.b. |  rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
  1   |    -1.4   |    0.000   |    0.000
  2   |    -1.3   |    1.944   |    4.373
  3   |    -1.3   |    5.268   |    7.747
  4   |    -1.3   |    2.501   |    4.170
  5   |    -1.3   |    4.092   |    6.514
  6   |    -1.3   |    4.023   |    6.197
  7   |    -1.3   |    2.481   |    4.444
  8   |    -1.3   |    2.803   |    4.393
  9   |    -1.3   |    2.624   |    4.261
Writing output ... done.

```

Şekil 4.2. 11-MUA doking log dosyası

Bulunan 9 konformasyon Autodock Tools kullanıcı ara yüzü kullanılarak görsel olarak incelendi. Bu program ile aktif bölgedeki 11-MUA ligandı ile N-metakriloil-L-histidin metil ester reseptörü arasında oluşabilecek tüm etkileşimler ve hidrojen bağları gözlemlendi. Log dosyası ve ADT kullanıcı ara yüzü kullanılarak yapılan incelemede 2 numaralı konformasyonun en anlamlı etkileşim olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.3. 11-MUA ile N-metakriloil-L-histidin metil ester arasındaki 2 numaralı konformasyon.

2 numaralı konformasyonda belirtilen etkileşimde, N-metakriloil-L-histidin metil ester molekülünün imidazol halkasındaki Azota (N) bağlı Hidrojenin (H), 11-MUA molekülünün ucundaki karboksil grubunun (COOH) Oksijeni (O) ile zayıf bir hidrojen bağı yaptığı görülmektedir ((Şekil 4.3.), kesikli yeşil çizgi).

Ayrıca anlamlı konformasyonlar, Ki (inhibisyon katsayısı) cinsinden de analiz edilmiştir. Autodock Vina programı log dosyasında bize ΔG bağlanma enerjilerini vermektedir. Bu enerjiden Ki değeri hesaplanabilir.

Hesaplama için dikkate alınacak formül;

$$\Delta G = - R.T.\ln K_i \quad (R= 1.986 \text{ cal/mol.K, } T= 298,15 \text{ K, } \Delta G = -1.3)$$

Buradan; Autodock Vina hesaplamalarına göre Ki değeri 0.8 olarak bulunmuştur. Bu sonuç bize zayıf bağlanmanın meydana geldiğini göstermektedir.

4.1.2. Aldehit-PEG-Ester Doking Simülasyonu

Doking işlemi için Aldehit-PEG-Ester ligandı ile N-metakriloil-L-histidin metil ester reseptörü arasında mümkün olan doking hesaplamaları yapıldı. Bu işlem için hazırlanan konfigürasyon dosyası (Şekil 4.1.)'de verilmiştir.

```
receptor = receptor.pdbqt
ligand = ligand.pdbqt

out = out.pdbqt

center_x = 6.157
center_y = -0.578
center_z = -0.774

size_x = 40
size_y = 40
size_z = 40

num_modes = 30

exhaustiveness = 100
```

Şekil 4.4. Aldehit-PEG-Ester doking konfigürasyon dosyası

Hazırlanan konfigürasyon dosyası seçimiyle docking işlemi yapıldı ve mümkün olabilecek 20 konformasyon Autodock Vina programı tarafından belirlenerek log dosyası oluşturulmuştur (Şekil 4.5.).

```

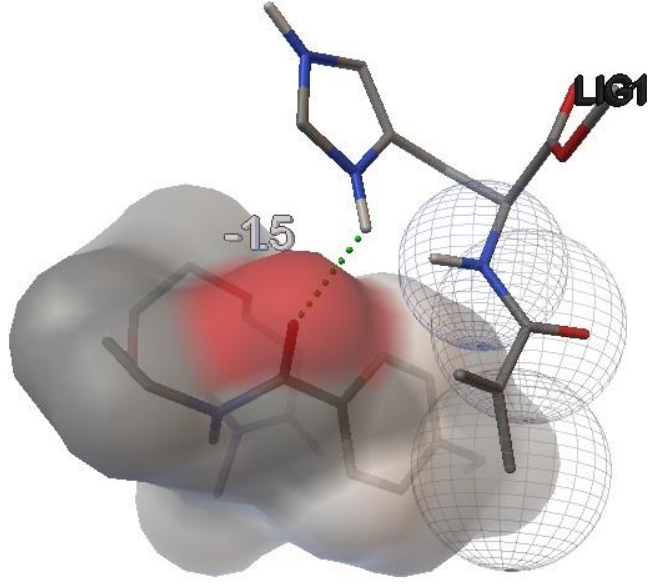
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -1322057316
Performing search ... done.
Refining results ... done.

mode |   affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
  1   |    -1.8   |    0.000   |    0.000
  2   |    -1.8   |    3.341   |    5.739
  3   |    -1.8   |    3.395   |    5.187
  4   |    -1.7   |    6.186   |    8.244
  5   |    -1.7   |    2.475   |    3.430
  6   |    -1.7   |    2.680   |    4.748
  7   |    -1.7   |    6.305   |    7.765
  8   |    -1.7   |    2.644   |    4.522
  9   |    -1.7   |    1.258   |    1.917
 10   |    -1.7   |    9.195   |   11.383
 11   |    -1.7   |    1.256   |    2.165
 12   |    -1.7   |    4.081   |    5.488
 13   |    -1.7   |    3.009   |    5.723
 14   |    -1.6   |    2.755   |    4.617
 15   |    -1.6   |    2.622   |    3.779
 16   |    -1.6   |    3.136   |    5.039
 17   |    -1.6   |    2.310   |    4.760
 18   |    -1.6   |    2.194   |    4.467
 19   |    -1.6   |    4.015   |    6.088
 20   |    -1.5   |    2.232   |    2.845
Writing output ... done.

```

Şekil 4.5. Aldehit-PEG-Ester doking log dosyası

Bulunan 20 konformasyon Autodock Tools kullanıcı ara yüzü kullanılarak görsel olarak incelendi. Bu program ile aktif bölgedeki Aldehit-PEG-Ester ligandı ile N-metakriloil-L-histidin metil ester reseptörü arasında oluşabilecek tüm etkileşimler ve hidrojen bağları gözlemlendi (Şekil 4.6., kesikli yeşil çizgi). Log dosyası ve ADT kullanıcı ara yüzü kullanılarak yapılan incelemede 20 numaralı konformasyonun anlamlı olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.6. 4-formyl-benzamido-dPEG[®]₂₄-TFP ester (PEG) ile N-metakriloil-L-histidin metil ester arasındaki 20 numaralı konformasyon

Yukarıdaki konformasyonda N-metakriloil-L-histidin metil ester molekülünün imidazol halkasındaki Azota (N) bağlı Hidrojen (H) ile 4-formyl-benzamido-dPEG[®]₂₄-TFP ester (PEG) molekülünün Aldehit ucundan hemen önce gelen Oksijen ile zayıf bir hidrojen bağı yaptığı görülmektedir.

Ayrıca anlamlı konformasyonlar, Ki (inhibisyon katsayısı) cinsinden de analiz edilmiştir. Autodock Vina programı log dosyasında bize ΔG bağlanma enerjilerini vermektedir. Bu enerjiden Ki değeri hesaplanabilir. Hesaplama için dikkate alınacak formül;

$$\Delta G = - R.T.\ln K_i \quad (R= 1.986 \text{ cal/mol.K, } T= 298,15 \text{ K, } \Delta G = -1.5)$$

Buradan; Autodock Vina hesaplamalarına göre Ki değeri 0.9 olarak bulunmuştur. Bu sonuç bize zayıf bağlanmanın meydana geldiğini göstermektedir.

Her iki molekül (11-MUA ve Aldehit-PEG-Ester) içinde bulunan Ki değerleri literatürde yer alan kuvvetli bağlanma Ki değerleri ile de (7.8-8) karşılaştırılmış ve bu iki molekülün aktif gruplarının N-metakriloil-L-histidin metil ester molekülünde bulunan imidazol halkasındaki uygun gruplar ile zayıf bağlanma gerçekleştiği onaylanmıştır

4.2. Turkevich Yöntemi İle Sentezlenen Sitrat Kaplı Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

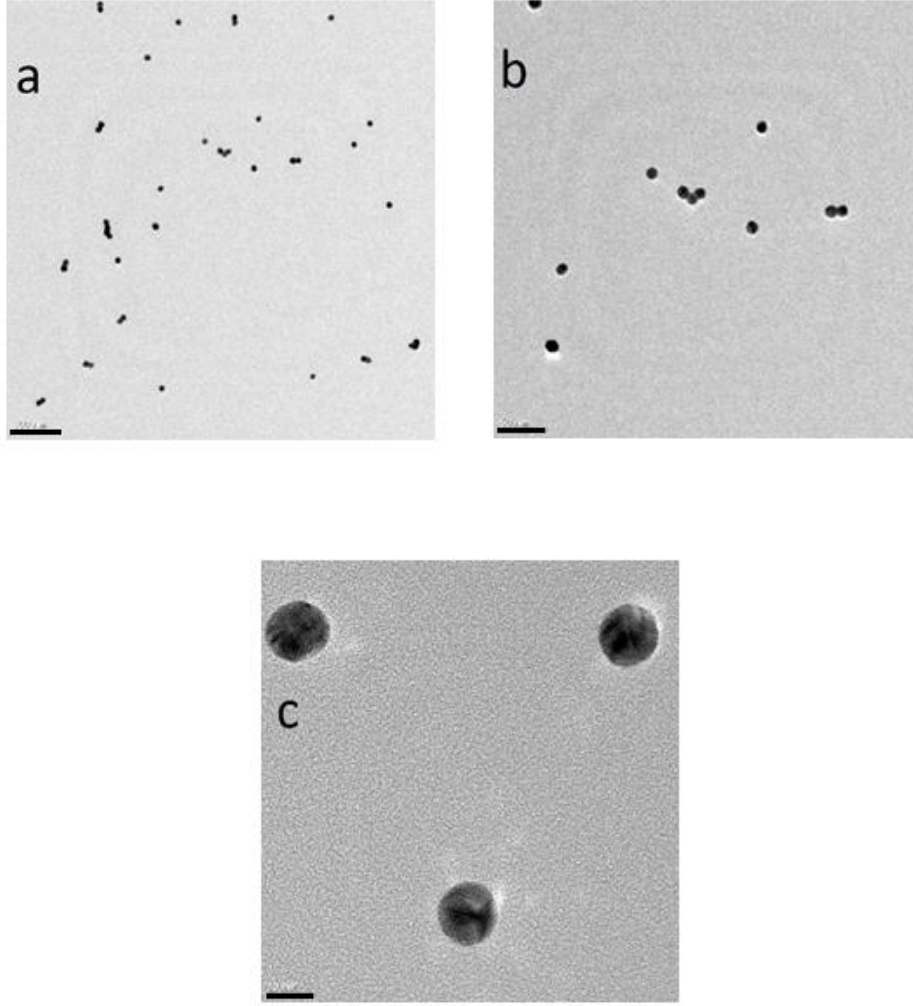
Bu tez çalışması kapsamında sentezlenen altın partiküllerin boyut ve şekil analizleri TEM (geçirimli elektron mikroskobu) ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar literatürde belirtilen sonuçlar ile tutarlılık göstermektedir.

4.2.1. 10 nm Büyüklüğündeki Altın Nanopartiküllerin TEM Karakterizasyonu

Elde edilen nanopartiküller optik olarak incelendiğinde renklerinin istenildiği gibi koyu kırmızı ve boyutlarının da 10 ± 1 nm olduğu belirlenmiştir. TEM görüntüleri nanopartikülleri eş boyutlu özellik gösterdiğini de desteklemektedir. Ayrıca partiküller arasında agregasyonun gözlemlenmemesi de sitrat kaplı altın nanopartiküllerin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.7. Eş boyutlu 10 nm altın nanopartiküller.



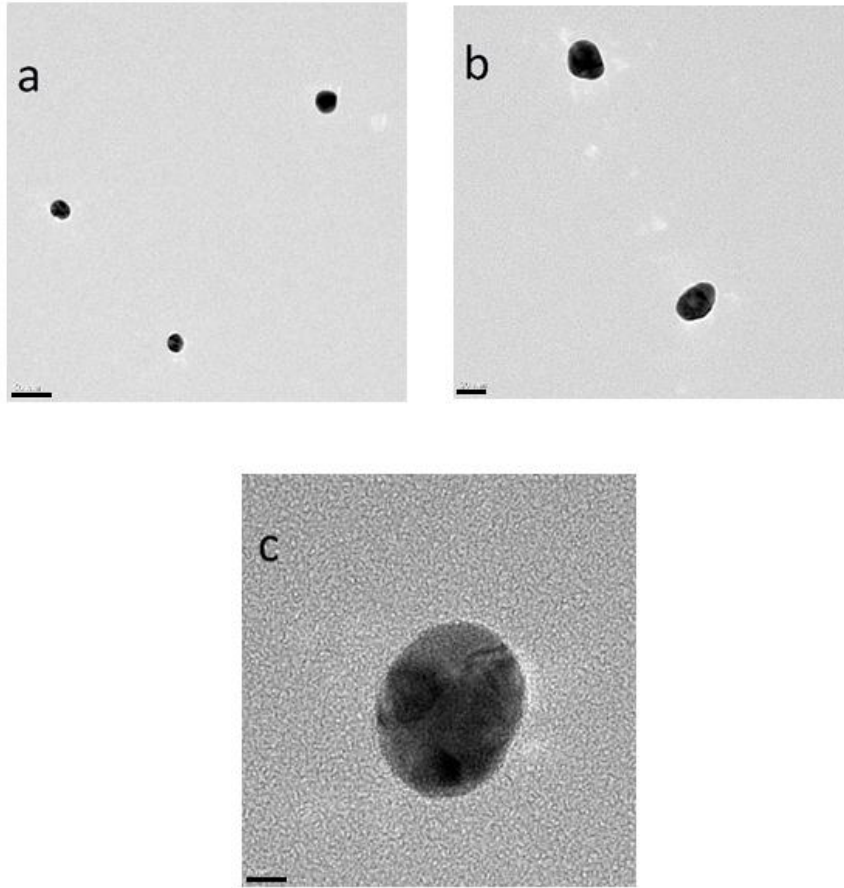
Şekil 4.8. 10 nm altın nanopartiküllerin, (a) 100 nm, (b) 50 nm, (c) 10 nm ölçeklerde TEM görüntüleri.

4.2.2. 25 nm Büyüklüğündeki Altın Nanopartiküllerin TEM Karakterizasyonu

Sentezlenen partiküllerin 10 nm'lik partiküllere oranla daha koyu bir renkte olduğu gözlemlenmiş (partikül boyutunun artması ışığın kırınımında farklılaşmalara sebep olmaktadır) [97] ve alınan TEM sonuçlarından, sentezlenen partiküllerin 25 nm boyutlarında, tek boyutlu olduğu ve çözelti içerisinde homojen dağılarak agregasyona sebep olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.9. Eş boyutlu 25 nm altın nanopartiküller.



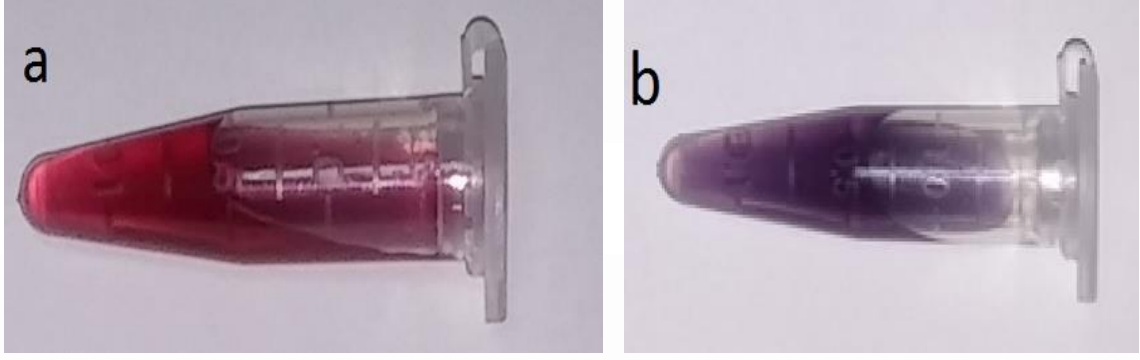
Şekil 4.10. 25 nm altın nanopartiküllerin, (a) 50 nm, (b) 20 nm, (c) 5nm ölçeklerde TEM görüntüleri.

4.3. Modifiye Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Moleküler doking simülasyonu hemoglobin spesifik moleküler baskılanmış pollimer yüzeyleri ile etkileşmesi için seçilen 11-MUA ve Aldehit-PEG-Ester molekülleri altın nanopartiküller üzerine immobilize edildi. 11-MUA molekülleri bir ucunda bulunan tiyol grubu (-SH) yardımı ile Aldehit-PEG-Ester molekülleri ise sistamin modifiye altın nanopartiküllerin boşta kalan amin grupları (NH₂) yardımı ile partiküller üzerine tutturuldu.

4.3.1. Altın Nano Partiküllerin 11-Merkapto Undekaonik Asit İle Modifiye Edilmesi

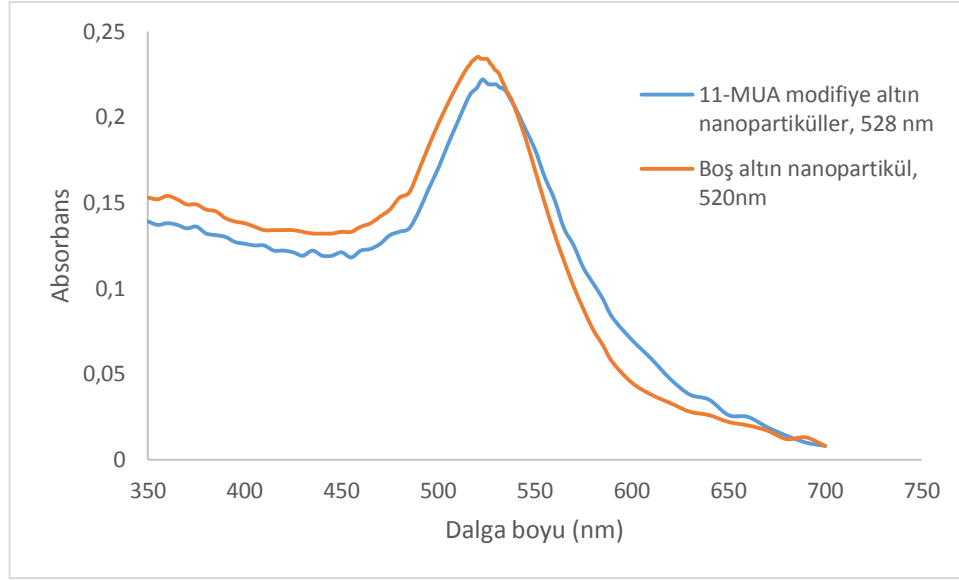
Modifiye edilen partiküllerin renkleri (Şekil 4.10.)'da görülmektedir. Modifikasyon işlemi sonucunda 10 nm'lik partiküllerin istenilen renk olan kırmızı rengini koruduğu, fakat 25 nm'lik partiküllerin mor renk aldığı (agregasyona uğradığı) belirlenmiştir. Tez aşamasının bu kısmında 25 nm'lik partiküllerin kullanılmasından vazgeçilmiştir.



Şekil 4.11. 11-MUA modifiye (a) 10 nm, (b) 25 nm altın nanopartiküller.

4.3.1.1. 11-Merkapto Undekaonik Asit İle Modifiye Edilen 10 nm Altın Nano Partiküllerin UV Görünür Bölge Spektroskopisi İle Karakterizasyonu

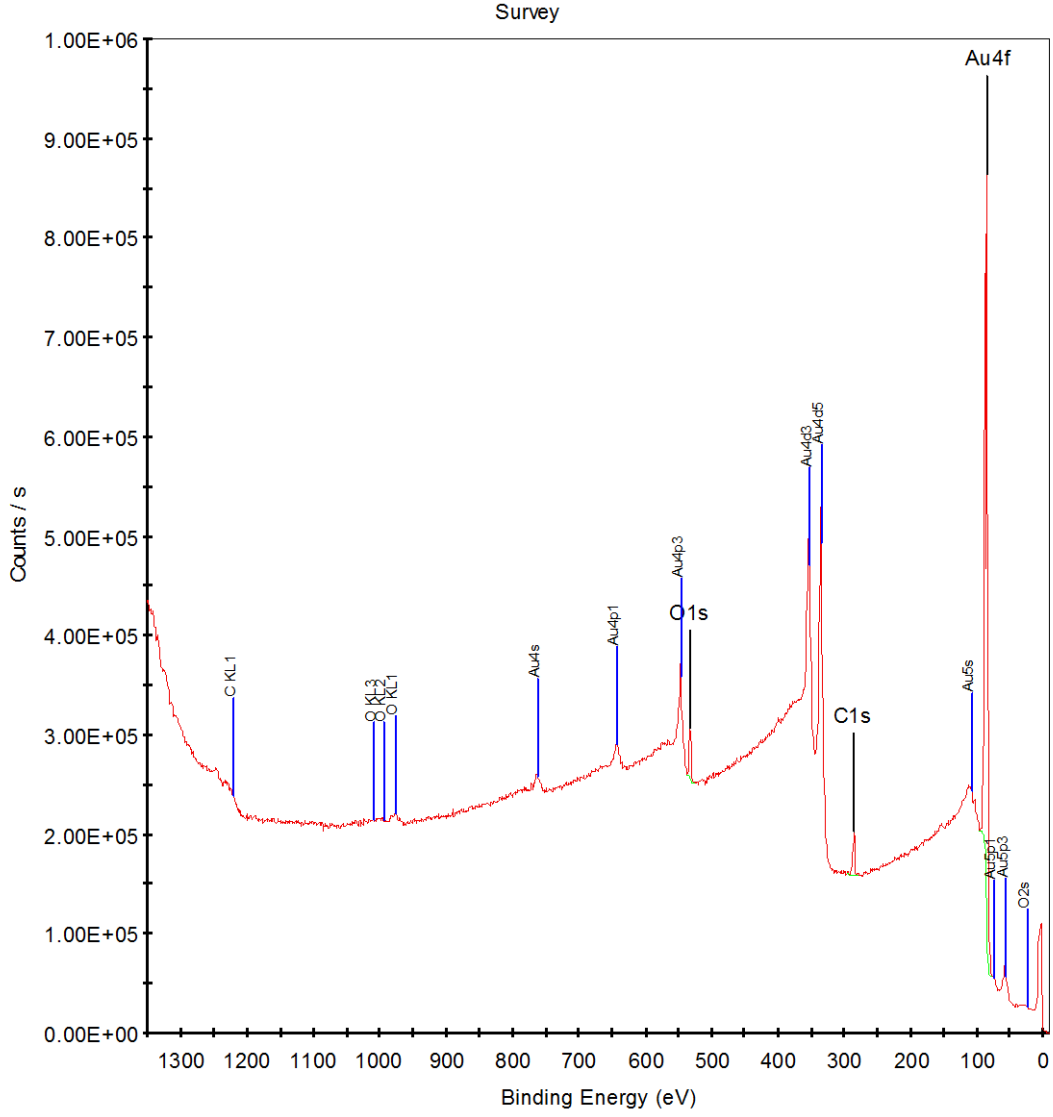
Boş altın nanopartiküllerin modifiye edildikten sonra, absorbands pikinin maksimum değerine denk gelen dalgaboyunda sağa doğru 8 nm kayma olduğu [98] UV Absorbans spektroskopisi yardımı ile gözlenmiştir. Bu kaymanın partiküller üzerine immobilize olan MUA moleküllerinden kaynaklandığı literatürdeki benzer çalışmalar ile de doğrulanmıştır.



Şekil 4.12. Boş altın nanopartiküllerin ve 11-MUA modifiye altın nanopartiküllerin absorbans grafiği.

4.3.1.2. 11-Merkapto Undekaonik Asit İle Modifiye Edilen 10 nm Altın Nano Partiküllerin Xps (X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi) İle Karakterizasyonu

Boş altın (Şekil 4.13.) ve modifiyeli altın (Şekil 4.14.) nanopartiküller ikinci bir elemental analiz yöntemi olan XPS (X-ışını fotoelektron spektroskopisi) ile de karakterize edilmiştir.

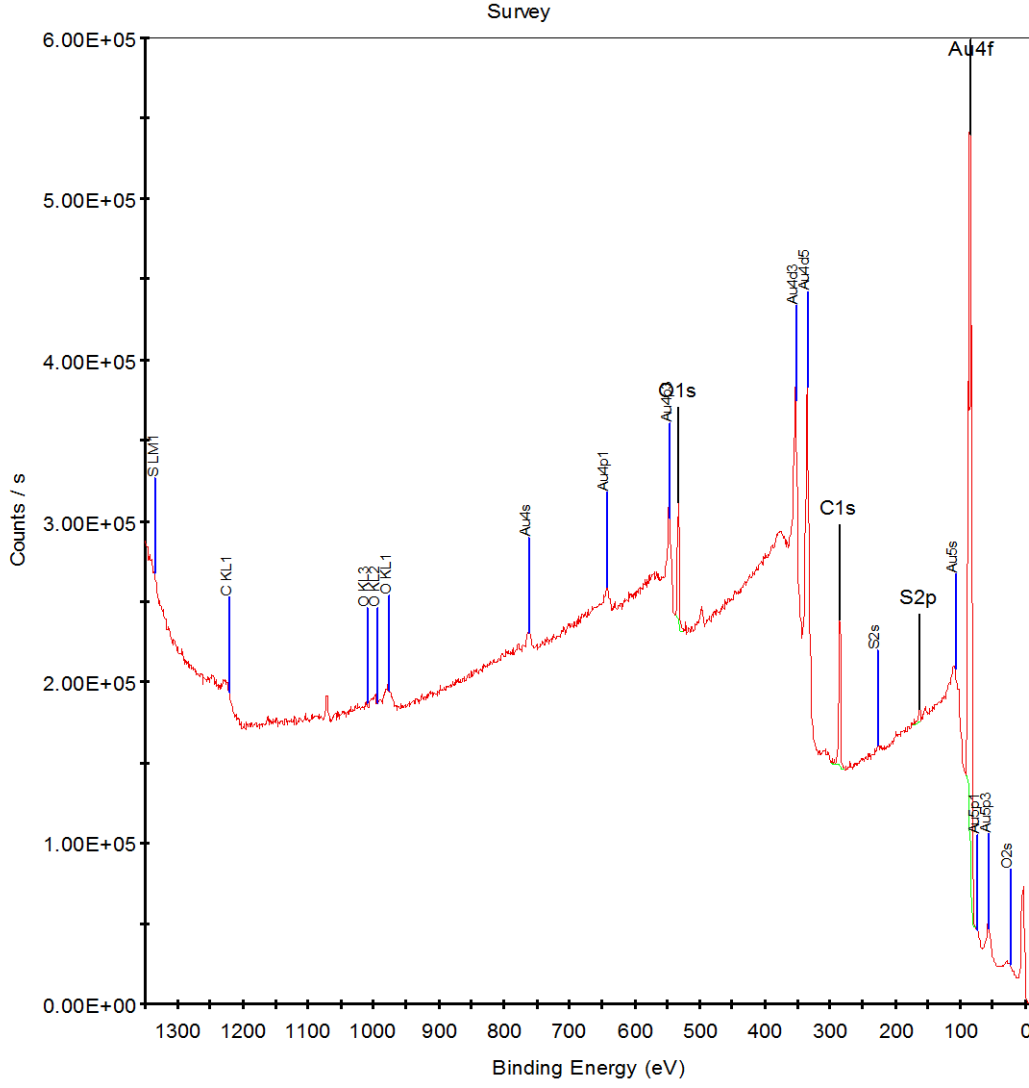


Şekil 4.13. Boş altın nanopartiküllerin XPS grafiği.

Çizelge 4.1. Boş Altın nanopartiküllerin XPS dataları ve örnek içerisindeki molekül yüzdeleri.

NAME	START BE	PEAK BE	END BE	HEIGHT CPS	FWHM eV	AREA(P) CPS.eV	AREA(N) TPP-2M	ATOMIC %
Au4f	96,08	84,31	77,08	709645,91	3,16	3955276,07	2373,8	39,56
O1s	537,08	532,27	524,08	48105,16	3,52	190470,67	1105,29	18,42
C1s	296,58	285,17	277,08	42983,34	3,28	179821,18	2522,13	42,03

XPS verileri incelendiğinde, boş altın partiküllerine (Çizelge 4.1.) göre, modifiye partiküllerdeki karbon (C) ve kükürt (S) miktarındaki artış (Çizelge 4.2.) bize yine 11-MUA moleküllerinin, altın nano partiküllere immobilize olduğu göstermektedir.

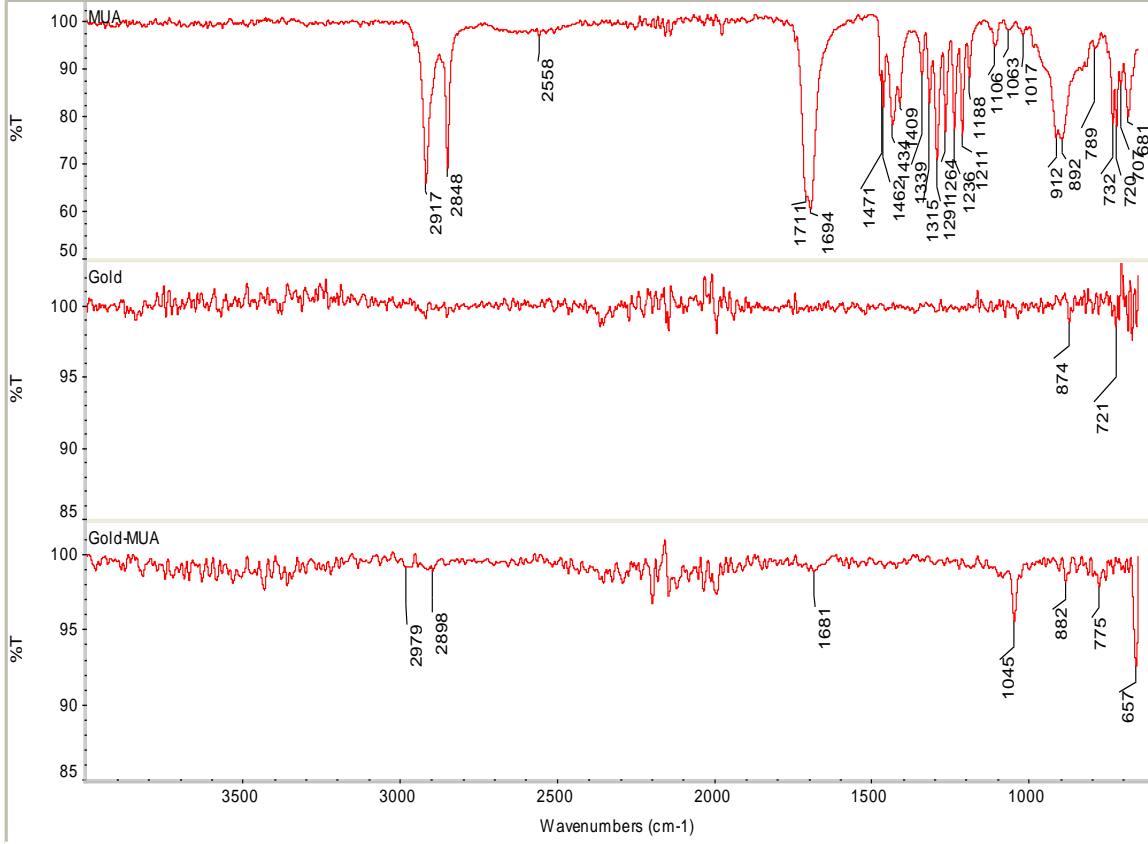


Şekil 4.14. 11-MUA modifiye altın nanopartiküllerin XPS grafiği.

Çizelge 4.2. 11-MUA modifiye altın nanopartiküllerin XPS dataları ve örnek içerisindeki karbon (C) ve kükürt (S) yüzdesi.

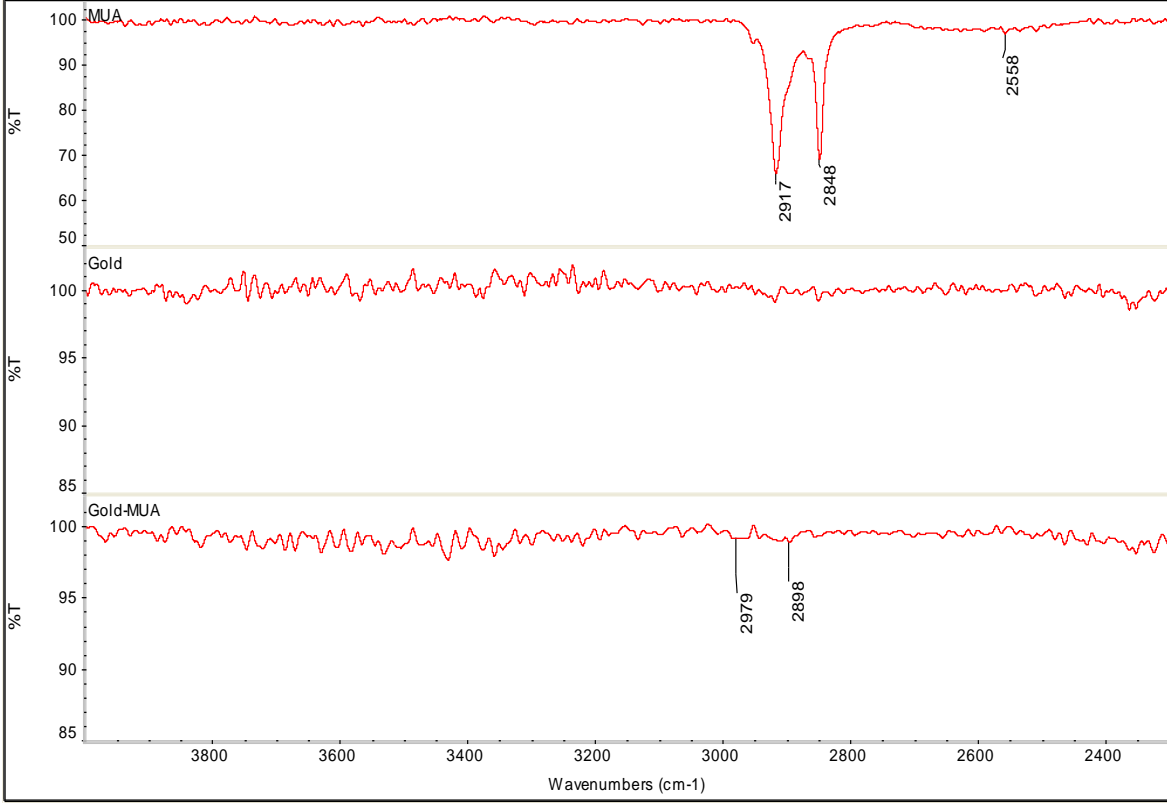
NAME	START BE	PEAK BE	END BE	HEIGHT CPS	FWHM eV	AREA(P) CPS.eV	AREA(N) TPP-2M	ATOMIC %
Au4f	92,58	84,07	77,08	460730,44	3,59	2656337,78	1594,02	20,19
C1s	297,58	284,96	277,08	84651,64	3,05	317944,9	4458,82	56,47
O1s	537,58	532,28	525,08	71296,23	3,28	268477,1	1557,96	19,73
S2p	173,08	162,49	160,08	8096,27	3,87	41283,95	285,59	3,62

4.3.1.3. 11-Merkapto Undekaonik Asit İle Modifiye Edilen 10 nm Altın Nano Partiküllerin FT-IR (Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi) İle Karakterizasyonu



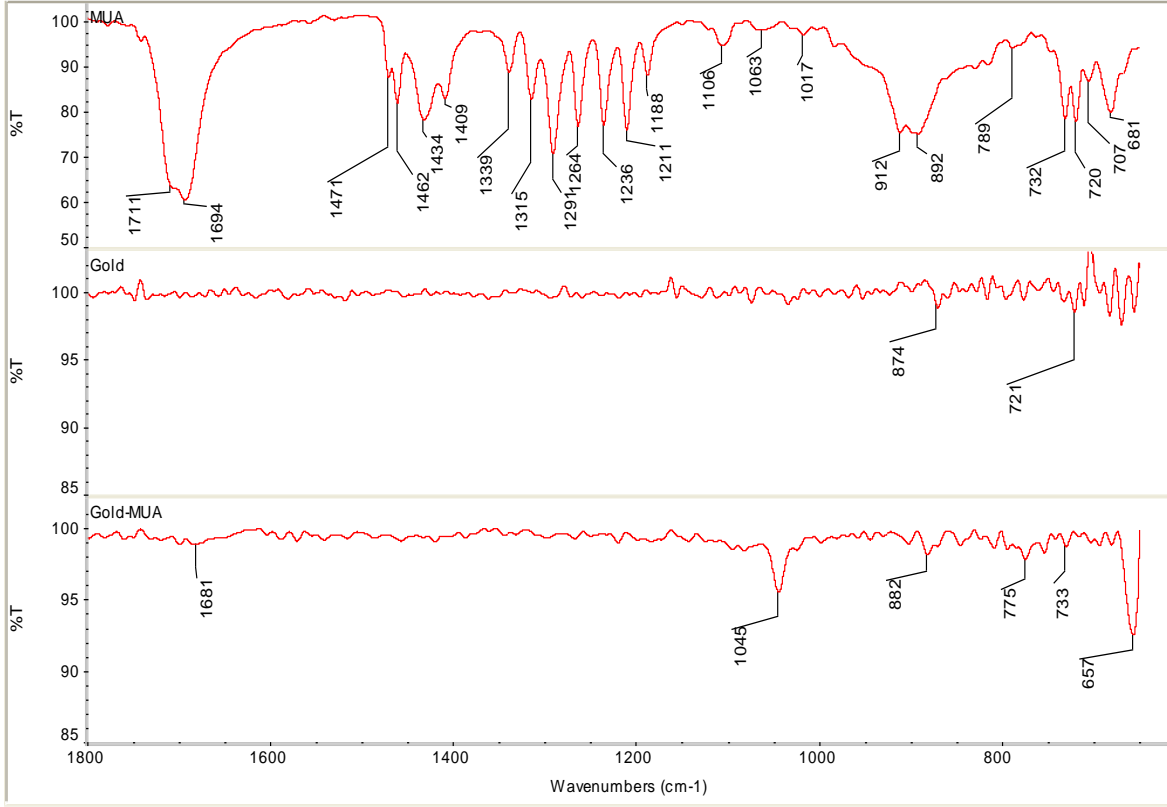
Şekil 4.15. 0-4000 cm⁻¹ dalga numarası aralığında a) 11-MUA, b) Altın nanopartikül, c) 11-MUA modifiye altın nanopartikül FT-IR grafiği. (Genel Grafik)

Yukarıdaki FT-IR grafiklerinde altın ve modifiye altın nanopartiküllerindeki piklerin şiddetleri, 11-MUA grafiğinde görülen piklerin şiddetlerinden daha azdır. Bu durum, modifikasyon işleminden kullanılan 11-MUA konsantrasyonunun çok az olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.16. 2500-4000 cm^{-1} dalga numarası aralığında a) 11-MUA, b) Altın nanopartikül, c) 11-MUA modifiye altın nanopartikül FT-IR grafiği.

Yukarıdaki FT-IR grafiğinde 11-MUA moleküllerinin ucunda bulunan $-\text{SH}$ gruplarına ait gerilmeler 2558 cm^{-1} de gözlenmektedir. Boş altın nanopartiküller ve 11-MUA altın nanopartiküllerde, bu dalga boylarında herhangi bir pik gözlenmemiştir. Modifikasyon işlemi sonucunda $-\text{SH}$ gruplarının altın yüzeyine immobilize olduğu ve gerilmelerinin ortadan kalktığı görülmüştür.



Şekil 4.17. 0-1800 cm^{-1} dalga numarası aralığında a) 11-MUA, b) Altın nanopartikül, c) 11-MUA modifiye altın nanopartikül FT-IR grafiği.

Yukarıdaki FT-IR grafiğinde ise 657 cm^{-1} dalga boyunda ortaya çıkan yeni pik, boş altın nanopartiküllerde ve 11-MUA moleküllerinde gözlemlenmiştir. Literatür bilgisine dayanarak [99] bu pikin Au-S (altın-kükürt) bağlanmasından ortaya çıkan yeni bir pik olduğu anlaşılmıştır.

4.3.2. 10 nm Altın Nano Partiküllerin Sistamin İle Modifiye Edilmesi

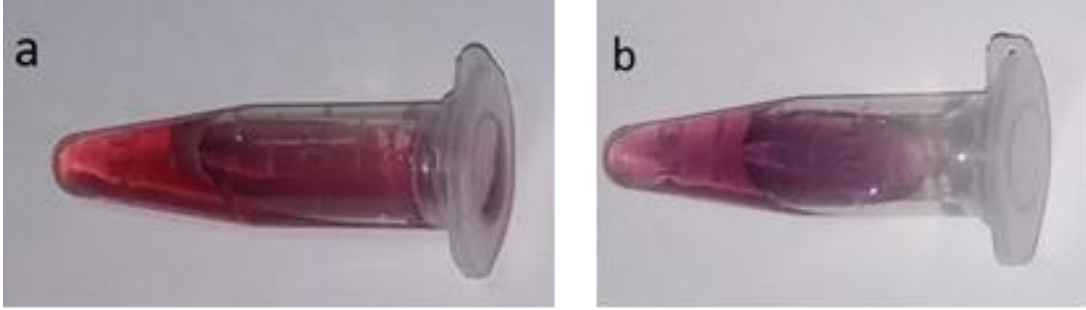
Altın nanopartikül işaretli sentetik hemoglobin moleküllerinin hazırlanması için izlenecek diğer bir modifikasyon yönteminde ise, bir ucu 4'lü flor halkası diğer ucu aldehit grubu içeren heterobifonksiyonel polietilenglikol Aldehit-PEG-Ester molekülü kullanılmıştır.

Aldehit-PEG-Ester molekülünün altın yüzeyine modifikasyonu, yüzeyin $-\text{NH}_2$ (amin) molekülü ile modifikasyonu sonrası mümkün olmaktadır. Ester ucu

çözelti içerisinde koparken çift bağlı oksijen (O) yüzeydeki $-NH_2$ (amin) grubuna bağlanmaktadır.

Bu sebepten, altın nanopartiküller öncelikle sistamin molekülü ile modifiye edilmişlerdir. Sistaminin molekülü, bir ucunda bulunan tiyol grubu ($-SH$) yardımı ile altın nanopartiküle bağlanmış ve boşta kalan amin grubuna da ($-NH_2$) Aldehit-PEG-Ester molekülü tutturulmuştur.

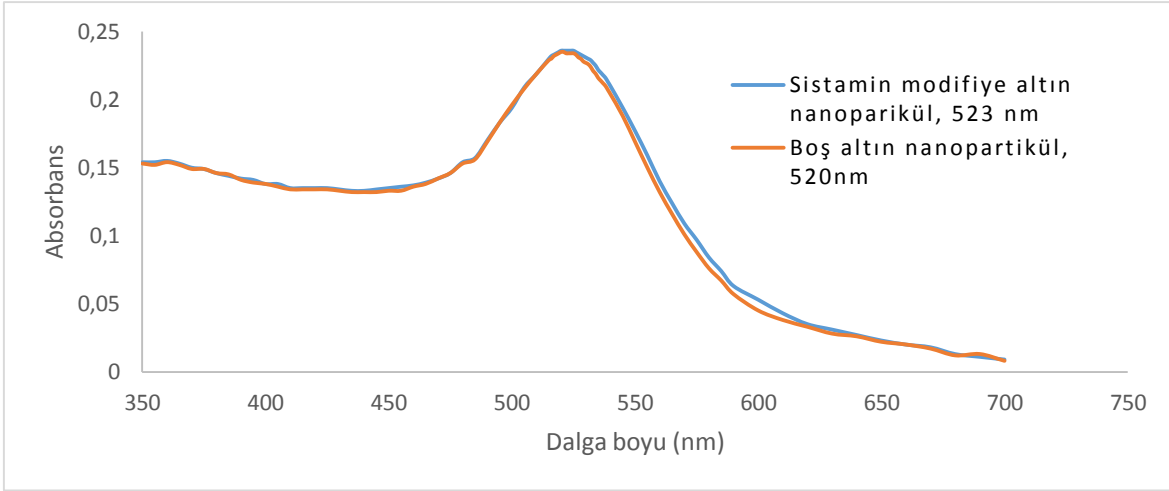
Sistamin modifiye nanopartiküllerin renkleri (Şekil 4.18.)’de görülmektedir. Modifikasyon işlemi sonucunda hem 10 nm’lik partiküllerin istenilen renk olan kırmızı renklerini koruduğu, 25 nm’lik partiküllerin ise biraz daha morumsu renk (agregasyona uğradığı) olduğu görülmektedir.



Şekil 4.18. Sistamin modifiye (a) 10 nm, (b) 25 nm altın nanopartiküller

4.3.2.1. Sistamin İle Modifiye Edilen Altın Nano Partiküllerin UV Görünür Bölge Spektroskopisi İle Karakterizasyonu

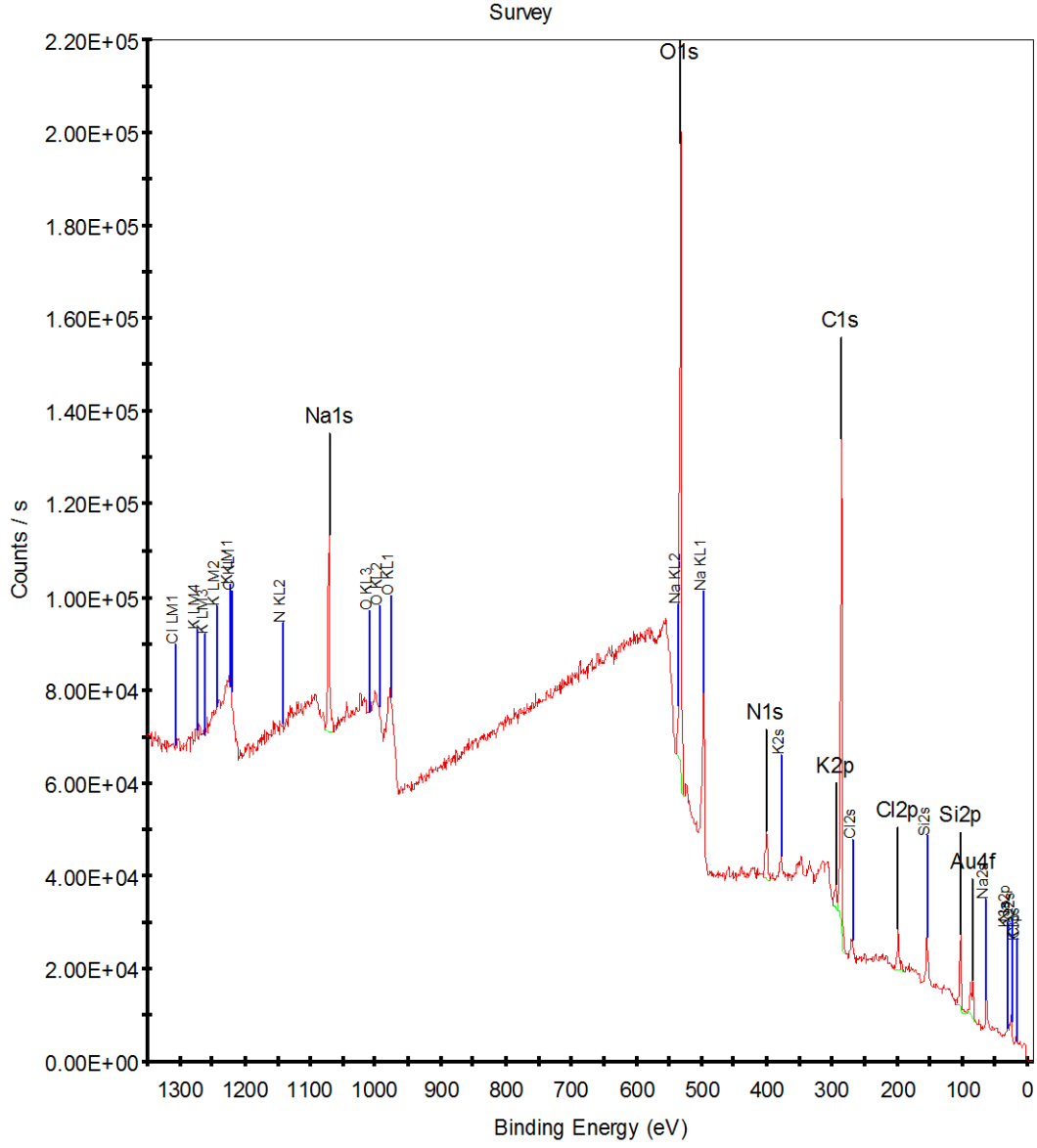
Altın nanopartiküllerin sistamin ile modifiye edildikten sonra, absorban pikinin maksimum değerine denk gelen dalgaboyunda sağa doğru 3 nm kayma olduğu UV Absorbans spektroskopisi yardımı ile gözlenmiş ve Mocanu ve ark.ları [100] tarafından yapılan deneysel çalışmalar ile uyumlu olduğu analşılarak bağlanmanın gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.19.).



Şekil 4.19. Boş altın nanopartikül ve sistamin modifiye altın nanopartiküllerin absorbans grafiği.

4.3.2.2. Sistamin İle Modifiye Edilen Altın Nano Partiküllerin XPS (X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi) İle Karakterizasyonu

Sistamin modifiye altın nanopartiküllerin analizleri aynı zamanda XPS ölçümleriyle yapılmış ve $-NH_2$ gruplarından gelen Azot (N) piki (Şekil 4.20.) ve örnek içersindeki bulunma yüzdesi çıkarılmıştır (Çizelge 4.3.)



Şekil 4.20. Sistamin modifiye altın nanopartiküllerin XPS grafiği.

Çizelge 4.3. Sistamin modifiye altın nanopartiküllerin XPS dataları ve örnek içerisindeki Azot (N) yüzdesi

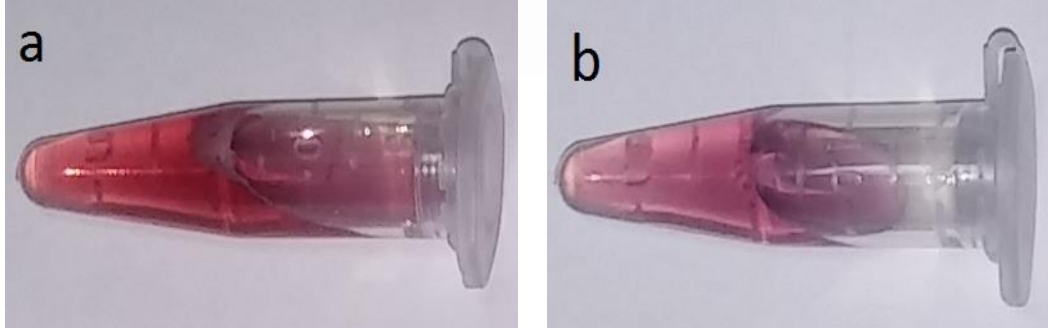
NAME	START BE	PEAK BE	END BE	HEIGHT CPS	FWHM eV	AREA(P) CPS.eV	AREA(N) TPP-2M	ATOMIC %
K2p	298,08	293,44	290,08	5591,78	2,75	22477,8	67,86	0,66
O1s	538,58	531,81	526,58	137274,2	3,37	522057,15	3028,36	29,24
C1s	298,08	285,1	277,08	98128,46	3,17	386039,68	5414,24	52,28
Na1s	1077,08	1071,14	1064,58	39205,98	3,18	143125,25	411,46	3,97
Si2p	110,08	102,38	93,58	15548,56	3,07	57902,81	808,75	7,81
N1s	405,08	399,92	394,08	10096,76	4,11	45581,2	411,91	3,98
Cl2p	203,58	198,24	188,08	8514,9	3,55	38601,27	187,15	1,81
Au4f	92	83,38	79,46	7855,46	2,86	44765,52	26,85	0,26

Yukarıdaki grafik ve verilerden de anlaşılacağı üzere, sentezlenen altın nanopartikül örnekler içerisinde Azot (N) molekülleri bulunmazken (Şekil 4.13. ve Çizelge 4.1.), sistamin modifiye örneklerde, sistamin molekülünün boşta kalan ucundan kaynaklanan Azot (N) molekülleri görülmektedir. Bu karakterizasyon yönteminde yine bize modifikasyon işleminin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Modifikasyon işleminin ikinci aşamasında ise, modifiye edilmiş altın nanopartiküllerin amin gruplarına aldehit-PEG-ester molekülünün ester ucundan bağlanması gerçekleştirilmiştir.

4.3.3. Sistamin Modifiye Altın Nanopartiküllerin Aldehit-PEG-Ester ve Etanolamin Hidroklorür İle Modifikasyonu

Sistamin modifiye altın nanopartiküllerin açıkta duran amin (-NH₂) uçlarına 4-formyl-benzamido-dPEG[®]₂₄-TFP ester (Aldehit-PEG-Ester) molekülü çift bağlı oksijen' den bağlanmaktadır (Şekil 3.6.).

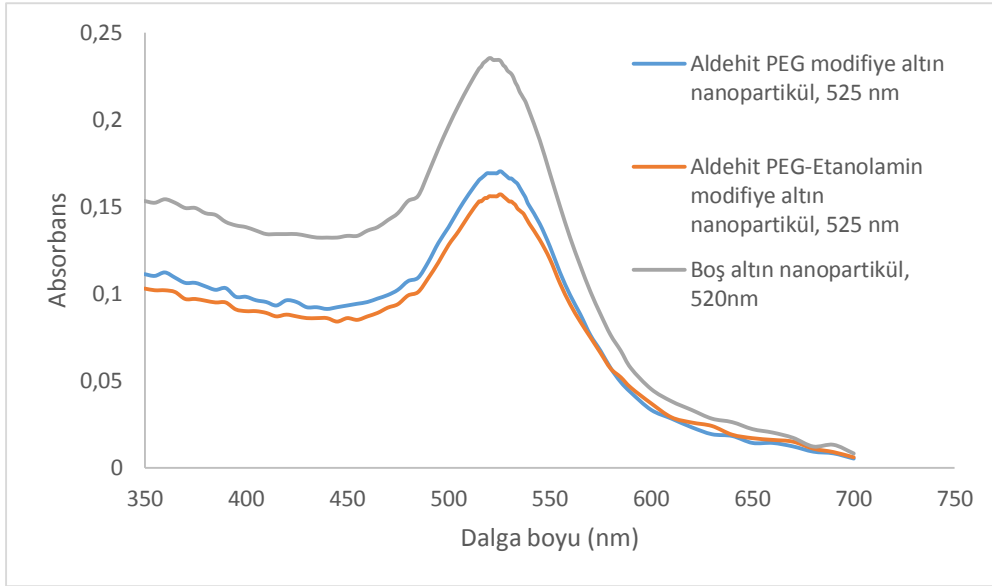
Aldehit-PEG-EA modifiye nanopartiküllerin renkleri (Şekil4.21.)'de görülmektedir. Modifikasyon işlemi sonucunda 10 nm'lik partiküllerin istenilen renk olan kırmızı rengini koruduğu, 25 nm'lik partiküllerin ise morumsu renk (agregasyona uğradığı) olduğu görülmektedir. Tezin bu aşamasından itibaren çalışmalara 10 nm'lik partiküller üzerinden devam edilmiştir.



Şekil 4.21. Aldehit PEG-EA modifiye (a) 10 nm, (b) 25 nm altın nanopartikülleri

4.3.3.1. Aldehit PEG-Ester ve Etanolamin Hidroklorür İle Modifiye Edilen Altın Nano Partiküllerin UV Görünür Bölge Spektroskopisi İle Karakterizasyonu

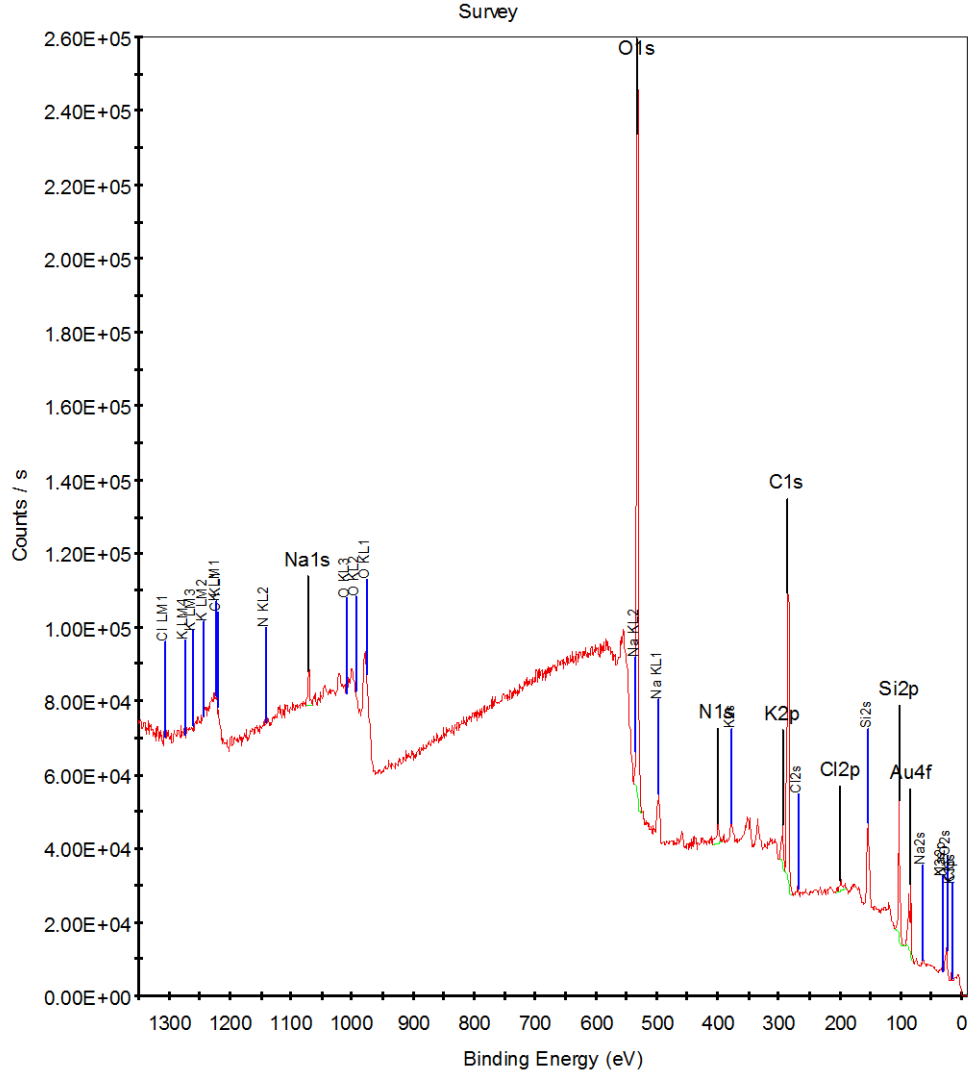
Altın nanopartiküllerin modifiye edildikten sonra, absorbans pikinin maksimum değerine denk gelen dalgaboyunda sağa doğru 5 nm kayma olduğu UV Absorbans spektroskopisi yardımı ile gözlenmiş ve yine literatürde de yer alan bu bilgi doğrultusunda bağlanmanın gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. Boş altın nanopartikül ve Aldehit-PEG-Ester ve Aldehit-PEG-Etanolamin (EA) modifiye altın nanopartiküllerin absorbands grafiği.

4.3.3.2. Aldehit PEG-EA İle Modifiye Edilen Altın Nano Partiküllerin XPS (X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi) İle Karakterizasyonu

PEG modifiyeli altın nanopartiküllerin XPS ölçümleri yapılmış, genel elemental analiz grafiği (Şekil 4.23.) ve elementlerin örnek içersindeki bulunma yüzdeleri (Çizelge 4.4.)’de gösterilmiştir.



Şekil 4.23. PEG modifiye altın nanopartiküllerin XPS grafiği.

Çizelge 4.4. Aldehit PEG-EA modifiye altın nanopartiküllerin XPS dataları ve örnek içerisindeki oksijen (O) yüzdesi.

NAME	START BE	PEAK BE	END BE	HEIGHT CPS	FWHM eV	AREA(P) CPS.eV	AREA(N) TPP-2M	ATOMIC %
O1s	538,08	531,81	525,08	194064,15	3,27	710950,16	4124,08	37,06
C1s	298,08	284,86	278,08	76048,42	3,33	331237,76	4644,92	41,74
Si2p	109,08	102,19	93,08	34742,82	3,06	122260,8	1707,49	15,34
K2p	298,58	293,3	290,08	10839,03	3,74	41931,8	126,58	1,14
Na1s	1075,58	1071,28	1066,08	7949,31	2,6	28533,34	82,05	0,74
N1s	408,58	399,35	392,58	4781,09	4,36	30433,94	274,92	2,47
Cl2p	206,58	198,21	188,08	3239,08	3,75	22503,24	109,1	0,98
Au4f	93,08	83,32	78,95	18336,99	2,93	99110,97	59,45	0,53

Grafiklerden ve bulunma yüzdelerinden de görüldüğü gibi aldehit-peg-ester modifiye altın nanopartikül örneğinde oksijen (O) molekülü yüzdesi boş altın (Çizelge 4.1.) ve sistamin modifiye altın nanopartikül (Çizelge 4.3.) örneklerine göre daha fazladır. Sistamin modifiye altın nanopartikül örneğinde, oksijen (O) miktarındaki artış sonucu yapısında bolca oksijen bulunan (Şekil 4.18.) aldehit-peg-ester molekülünün partikül yüzeylerine başarıyla immobilizasyonu sonucu örnek içerisindeki oksijen molekülü miktarının arttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, boş altın nanopartikülleri ile aldehit-peg-ester molekülü arasındaki bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir.

4.4. Boş Ve Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Zeta Potansiyeli Karakterizasyonu

Son olarak altın nanopartiküllerin her bir modifikasyon işlemi sonrakindaki yükleri zeta potansiyel analizi ile hesaplanmış (Çizelge 4.5.)'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Altın nanopartikülleri ve modifiye altın nanopartiküllerinin zeta potansiyelleri.

Nanopartikül Türü	Zeta potansiyeli
Boş altın nanopartikül	-28,4 (\pm 0,02)
Sistamin modifiye altın nanopartikül	-22,1 (\pm 0,09)
Aldehit-PEG-EA modifiye altın nanopartikül	-25,4 (\pm 0,09)

Yukarıdaki verilerden de anlaşıldığı üzere sitrat kaplı (- yüklü) altın nanopartiküllerin modifikasyonu sonucu, eksi yüklü sitrat moleküllerini yerlerinden söken; sistamin, aldehit-PEG-ester ve 11-MUA molekülleri, altın nanopartiküllerinin yüzey yükünde düşüslere sebep olmaktadır. Bu veriler doğrultusunda da modifikasyon işlemlerinin başarıyla gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

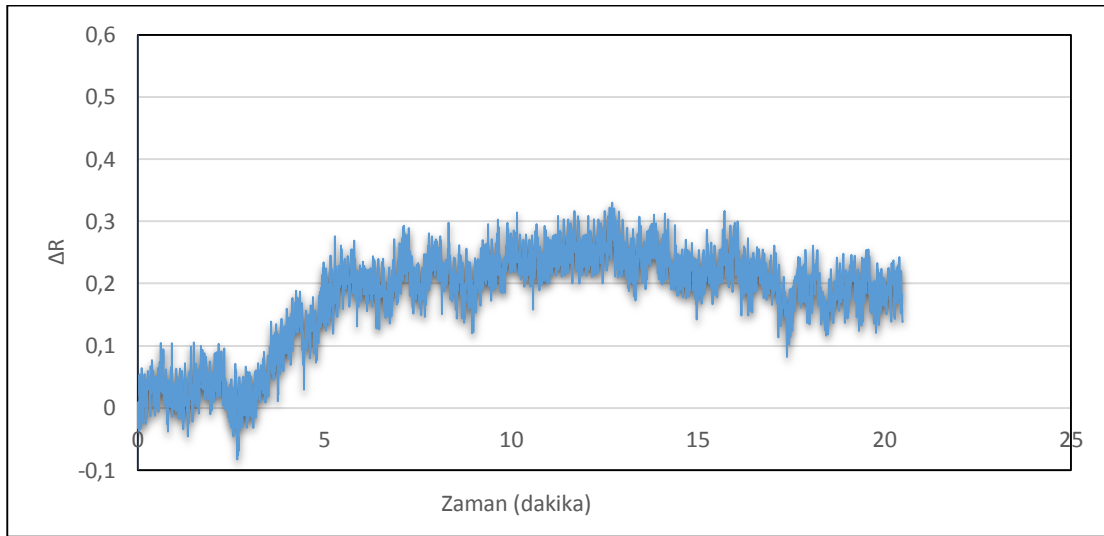
4.5. Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Farklı Derişimlerde Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörü İle Kinetik Analizlerinin Yapılması

Farklı derişimlerde modifiye altın nanopartiküller SPR çipi üzerinde hemoglobine spesifik moleküler baskılanmış polimer yüzeyleri ile etkileştirilerek kavitelere bulunan fonksiyonel gruplara bağlanma denge ve

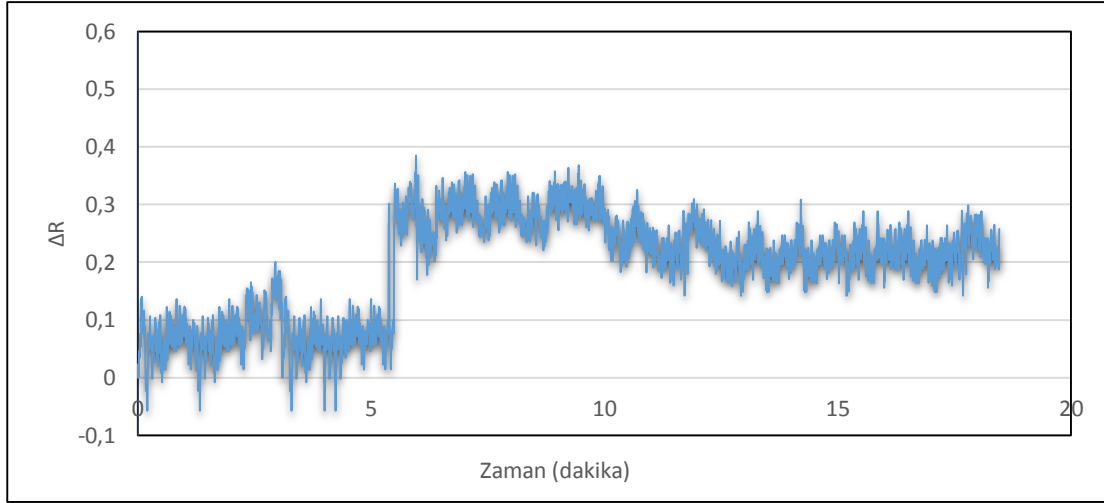
kinetik analizleri incelenmiştir. Ayrıca izoterm grafikleri çizilerek modifiye altın nanopartiküllerin yüzeye tutunma şekilleri analiz edilmiştir.

4.5.1. 11-MUA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Farklı Derişimlerde Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörü İle Kinetik Analizlerinin Yapılması

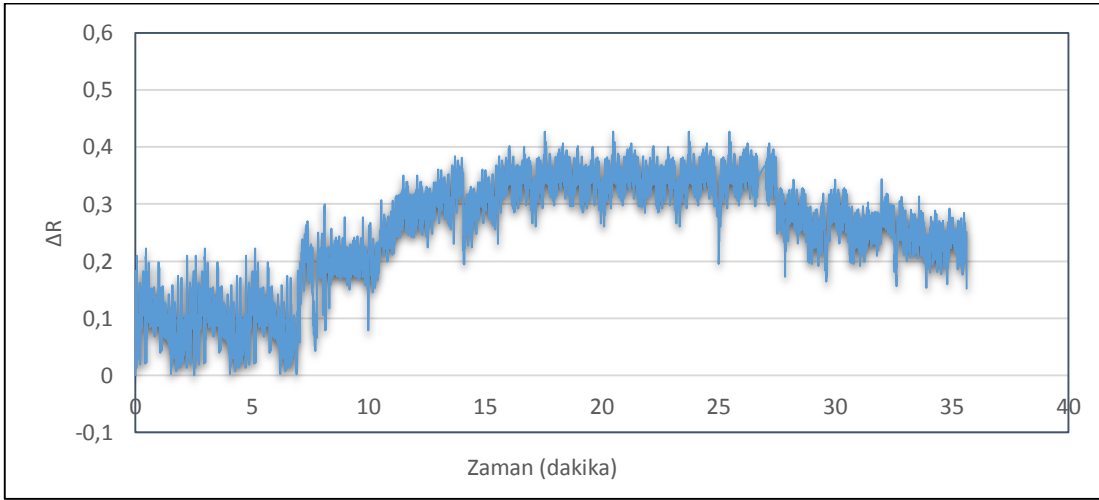
SPR sinyalinin Altın-MUA derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde (2-40 nM) Altın-MUA çözeltileri hazırlanmıştır. Verilerin daha duyarlı değerlendirilebilmesi için yaygın olarak anlık % kırılma değeri ile başlangıç % kırılma değeri arasındaki farkı gösteren ΔR değerleri kullanılmıştır



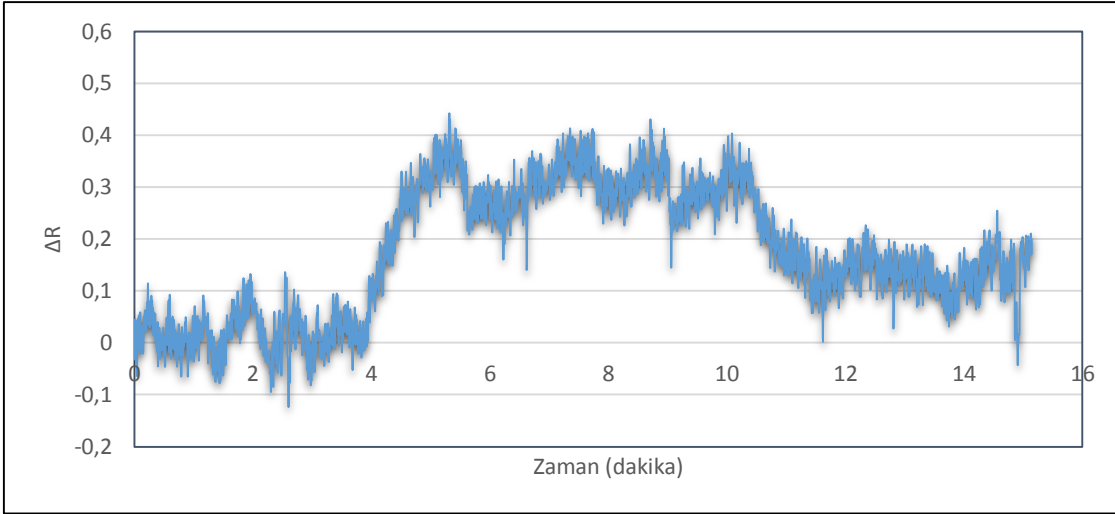
Şekil 4.24. 2 nM 11-MUA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,1033$)



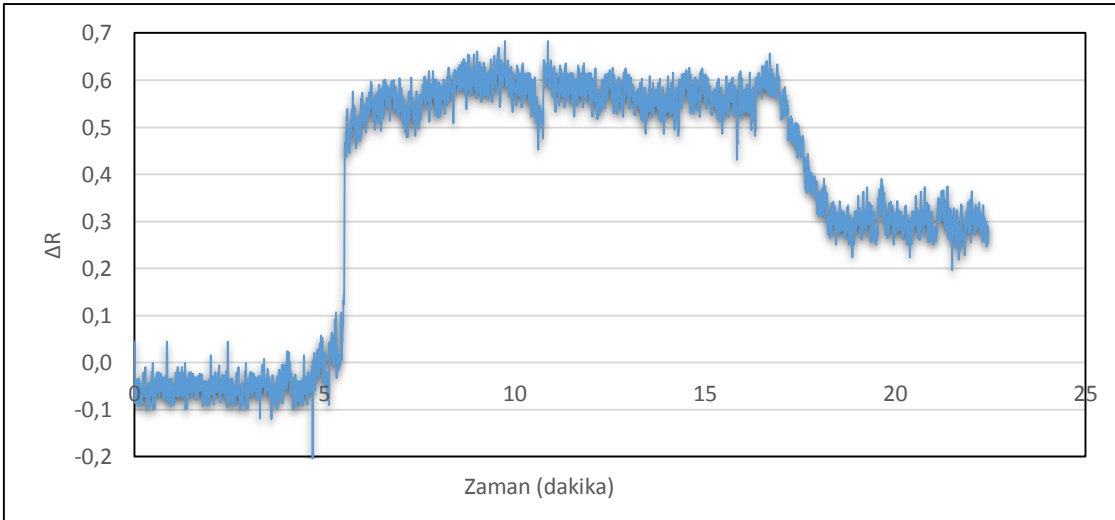
Şekil 4.25. 5 nM 11-MUA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,1556$)



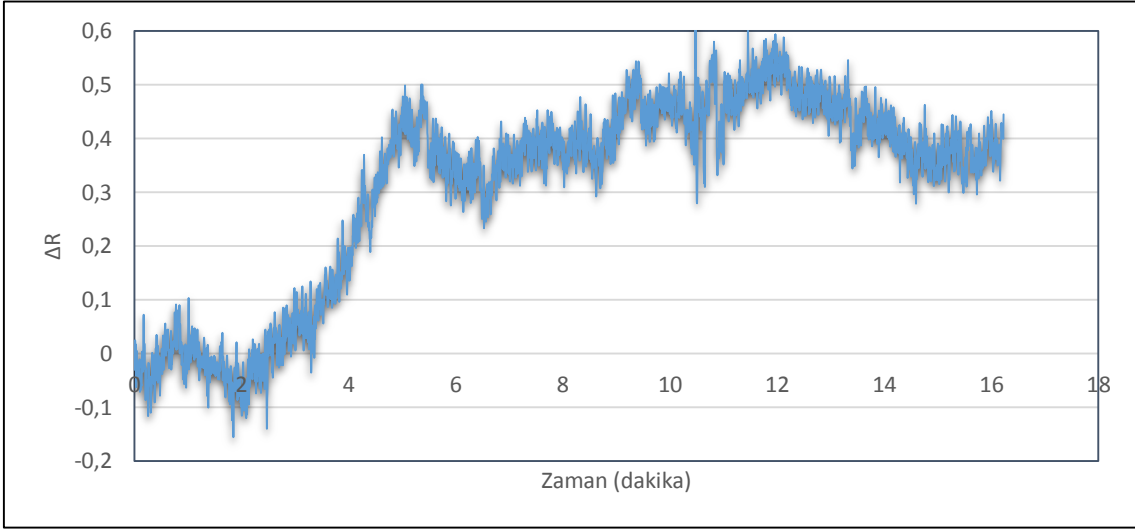
Şekil 4.26. 10 nM 11-MUA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,1658$)



Şekil 4.27. 15 nM 11-MUA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,1472$)



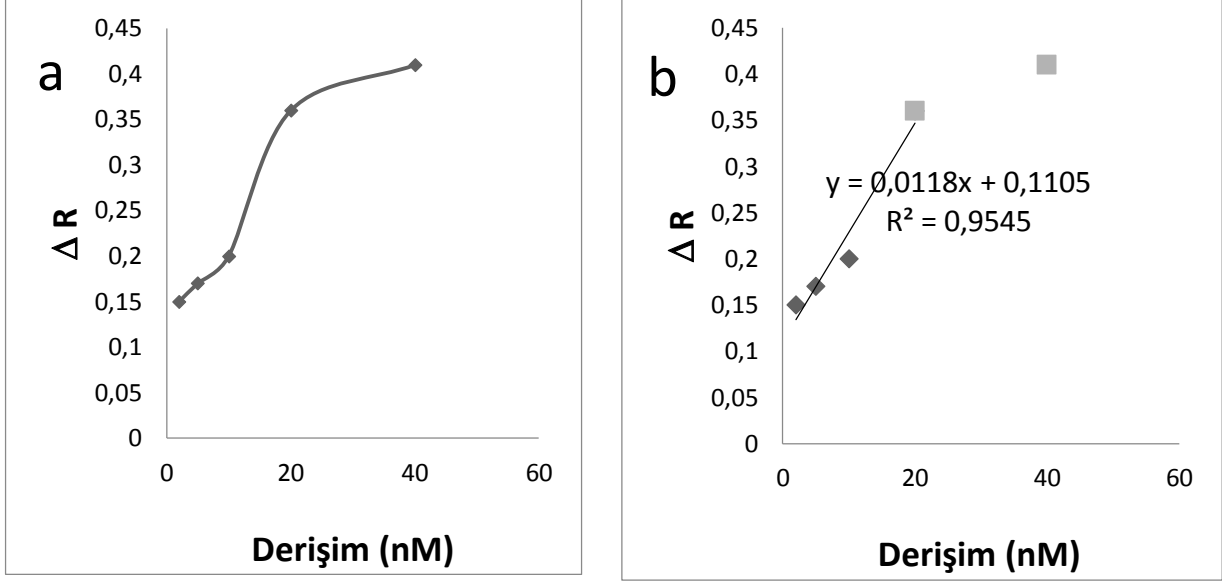
Şekil 4.28. 20 nM 11-MUA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,3282$)



Şekil 4.29. 40 nM 11-MUA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,4422$)

Şekil (4.24.-4.29.) değişik derişimlerde Altın-MUA çözeltilerinin SPR sensörü üzerindeki hemoglobine spesifik nanokürelere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi yüzeye Altın-MUA bağlanmasıyla birlikte % kırılma değeri artmaktadır. Standart bir ölçümde; sistemden öncelikle su, daha sonra sistem yeniden dengeye ulaşana kadar Altın-MUA çözeltisi geçirilmiş, non-spesifik olarak bağlanan Altın-MUA'nın uzaklaştırılması için tekrar su ve son aşamada desorpsiyon çözeltisi kullanılmıştır. Derişimdeki artışla birlikte %kırılma değerindeki artışın daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun sebebi, çözelti ile yüzey arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artmasıdır.

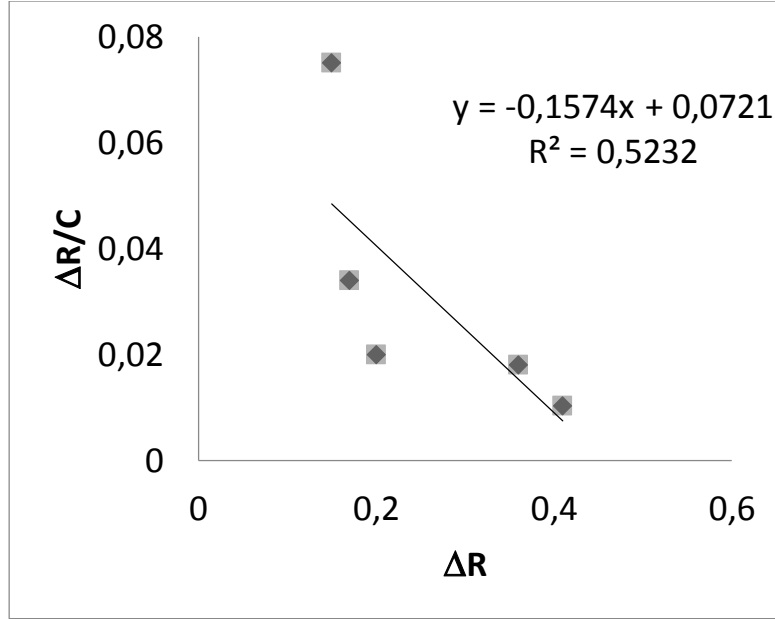
4.5.1.1. 11-MUA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Denge Analizi



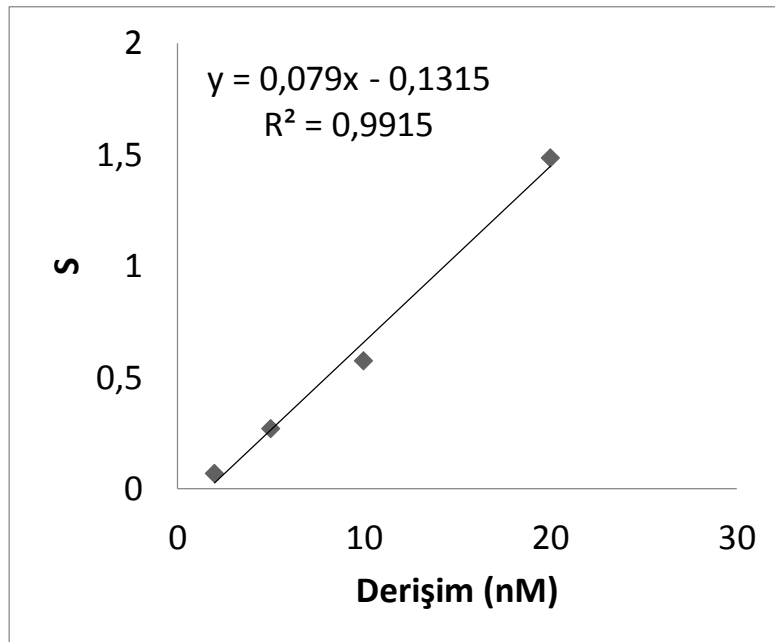
Şekil 4.30. Hemoglobin baskılanmış nanokürelere bağlanan Altın-MUA derişimi ile SPR'de elde edilen ΔR arasındaki ilişki.

Şekil 4.30. (a)'da görüldüğü gibi ΔR değeri derişim arttıkça artmaktadır. ΔR değeri yaklaşık 20 nM civarında dengeye ulaşmıştır. Şekil 4.30. (b)'de ise 2-20 nM aralığındaki verilerin doğrusallığı (R^2 değeri) 0.9545 olarak hesaplanmıştır ve elde edilen doğrunun denklemi ($y=0.0118x + 0.1105$)'dir. Bu sonuçlara göre; Altın-MUA hemoglobin baskılanmış bölgeye 2-20 nM derişim aralığında yüksek afinite ile bağlanmaktadır ve % 95.45 doğrulukla ölçüm yapabilmektedir.

4.5.1.2. 11-MUA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Kinetik Analizi



Şekil 4.31. Altın-MUA için Denge analiz yaklaşımı (Scatchard).



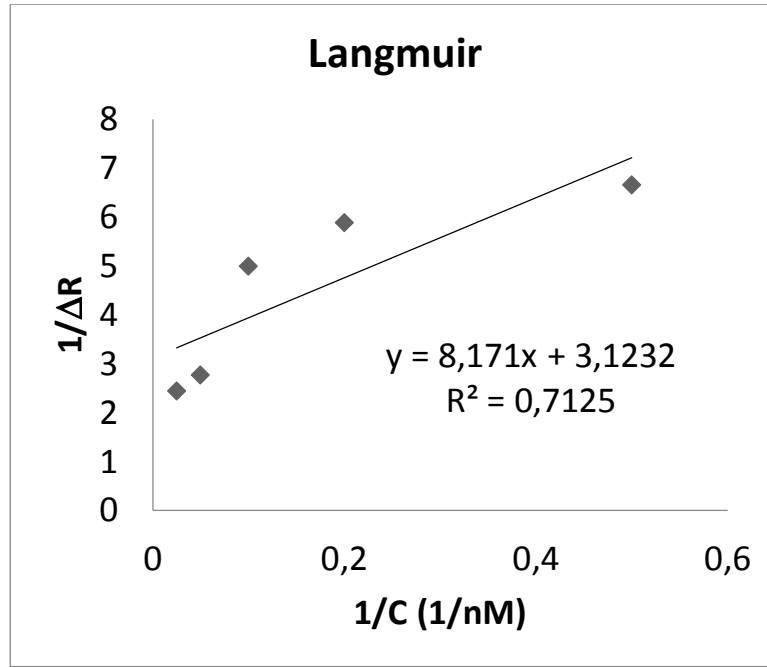
Şekil 4.32. Altın-MUA için Bağlanma kinetik yaklaşımı.

Şekil 4.31. ve 4.32.'de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.6'da özetlenmiştir.

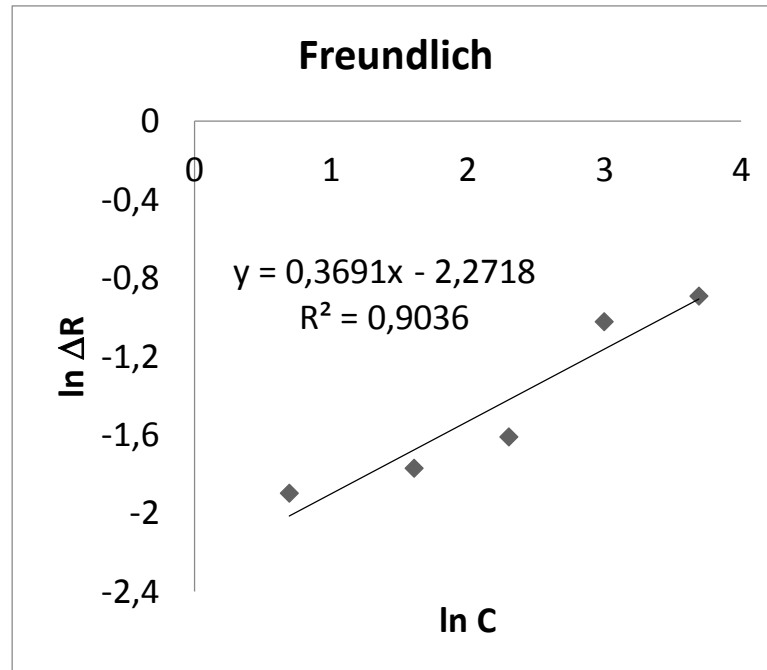
Çizelge 4.6. Altın-MUA için Kinetik hız sabitleri.

Denge Analiz (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
ΔR_{maks}	0.458	k_a 1/nM.s	0.079
K_A , 1/nM	0.157	k_d 1/s	0.132
K_D , nM	6.353	K_A 1/nM	0.600
R^2	0.523	K_D (nM)	1.664
		R^2	0.992

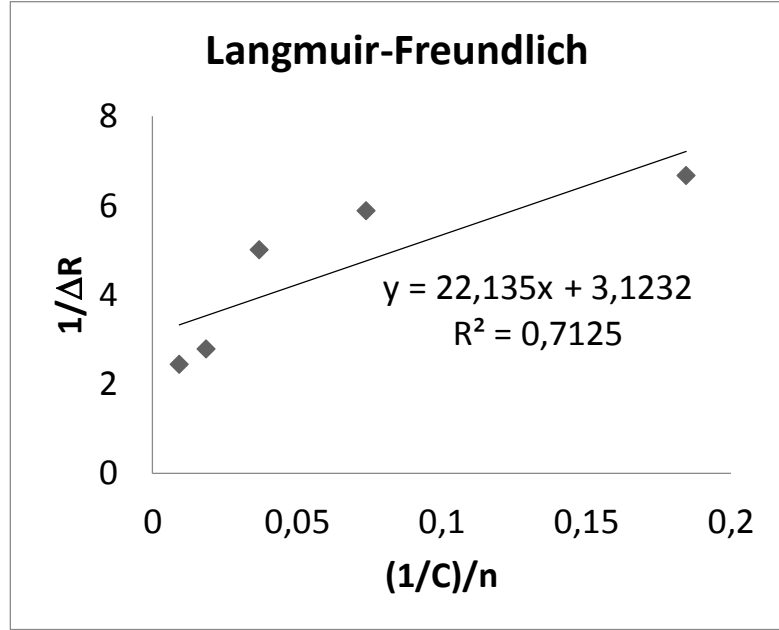
4.5.1.3. 11-MUA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin İzoterm Analizi



Şekil 4.33. Altın-MUA için Langmuir Adsorpsiyon modeli.



Şekil 4.34. Altın-MUA için Freundlich Adsorpsiyon modeli.



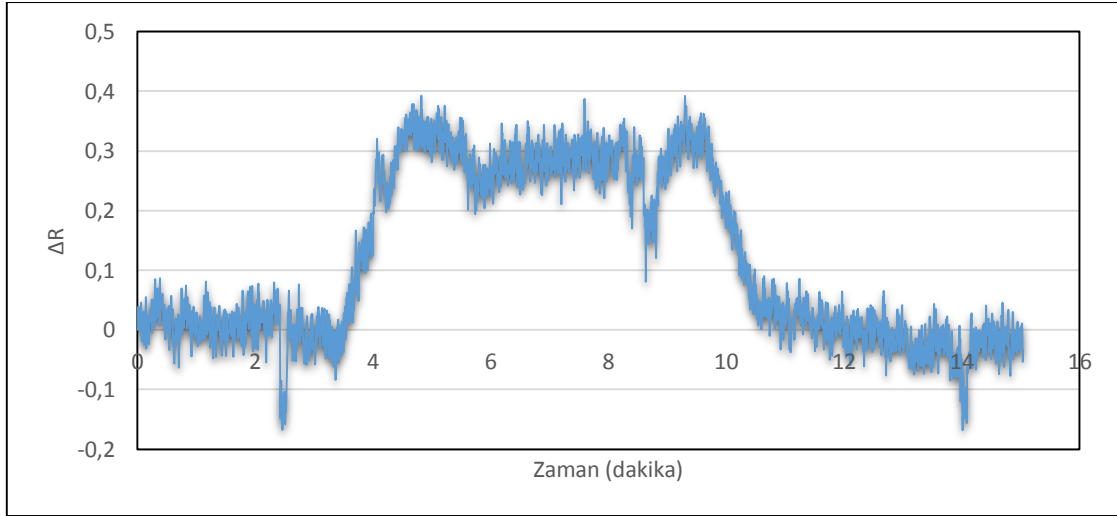
Şekil 4.35. Altın-MUA için Langmuir-Freundlich Adsorpsiyon modeli.

Çizelge 4.7. Altın-MUA için Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.

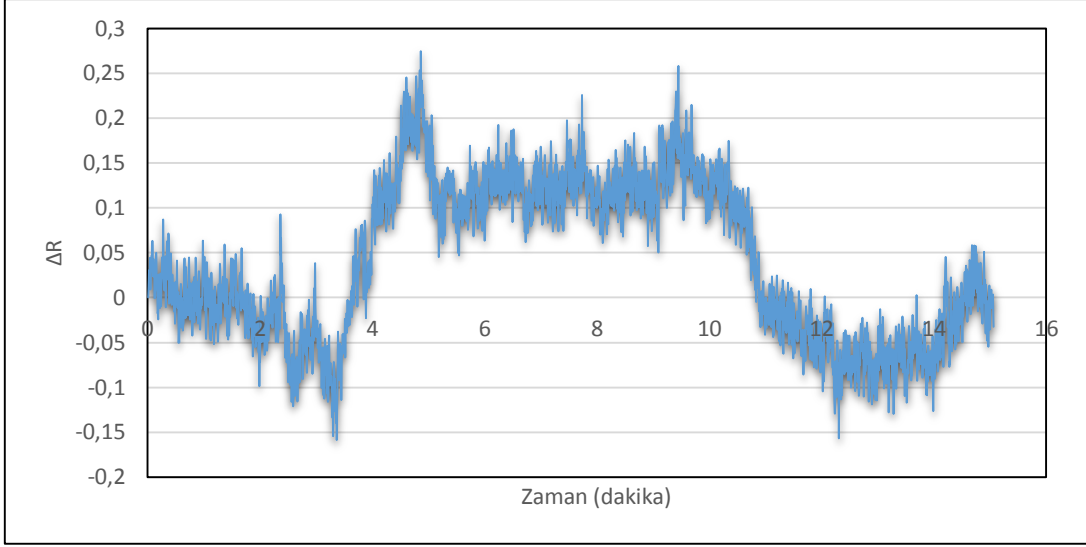
Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
ΔR_{maks}	0.320	ΔR_{maks}	0.103	ΔR_{maks}	0.045
K_D (nM)	2.616	$1/n$	0.369	K_D (nM)	0.141
K_A (1/nM)	0.382	R^2	0.9547	K_A (1/nM)	7.087
R^2	0.712			R^2	0.712

(Şekil 4.24-4.29.)'e göre deneysel olarak elde edilen verilerden hesaplanan adsorpsiyon modellerinin doğrusallığı incelendiğinde Freundlich modeli ($R^2 = 0.95$) Langmuir modeline ($R^2 = 0.71$) göre daha uyumlu olduğu görülmektedir. Bununla beraber, denge analiz (scatchard) grafiğinden elde edilen ve Çizelge 4.6. da hesaplanan deneysel $\Delta R_{maks.}$ değeri (0.458), Langmuir adsorpsiyon modelinde hesaplanan teorik $\Delta R_{maks.}$ değerine (0.320) en yakın sonuçtur. Bu sonuç; hazırlanan hemoglobin baskılanmış SPR çip yüzeyindeki nanokürelerin Altın-MUA (sentetik hemoglobin) bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7.'de verilmiştir. Langmuir denkleminde hesaplanan K_A ve K_D değerleri sırasıyla 0.382 nM^{-1} ve 2.616 nM olarak hesaplanmıştır.

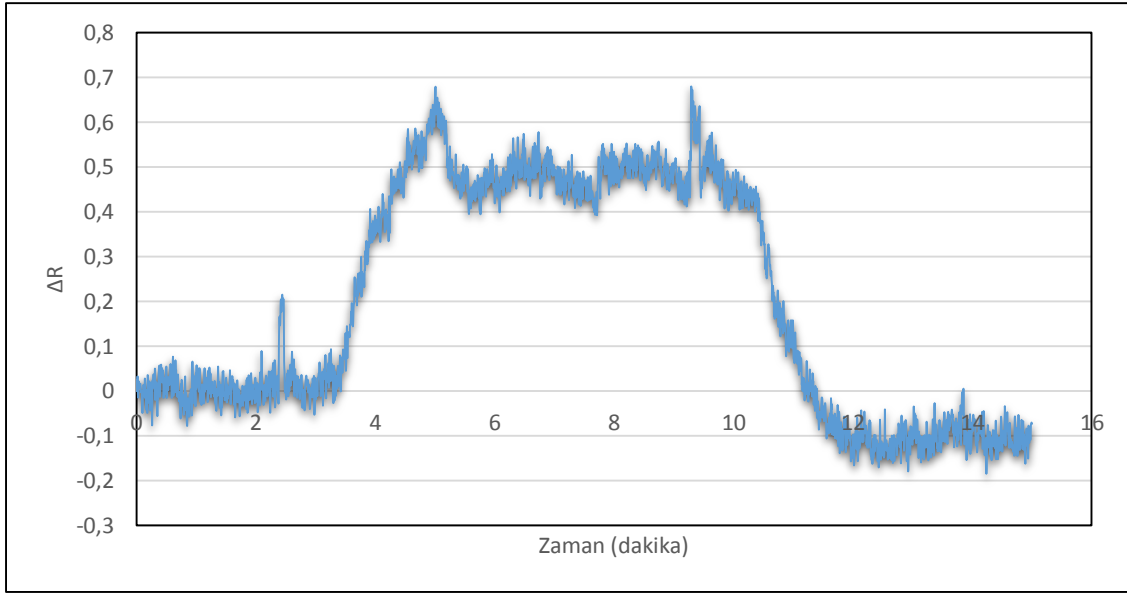
4.5.2. Aldehit PEG-Ester ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Farklı Derişimlerde Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörü İle Kinetik Analizlerinin Yapılması



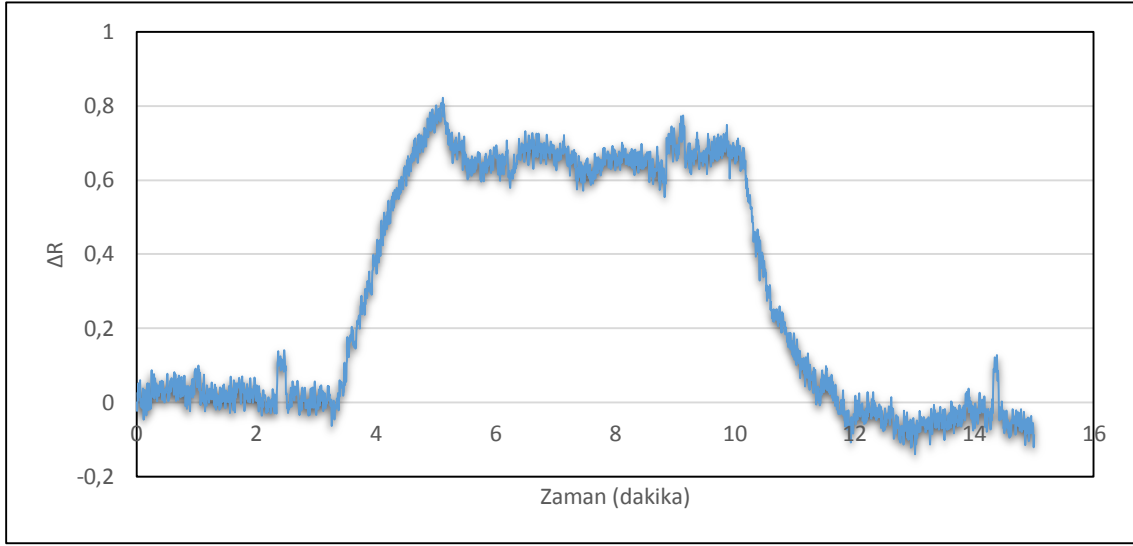
Şekil 4.36. 2 nM Aldehit PEG modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi.



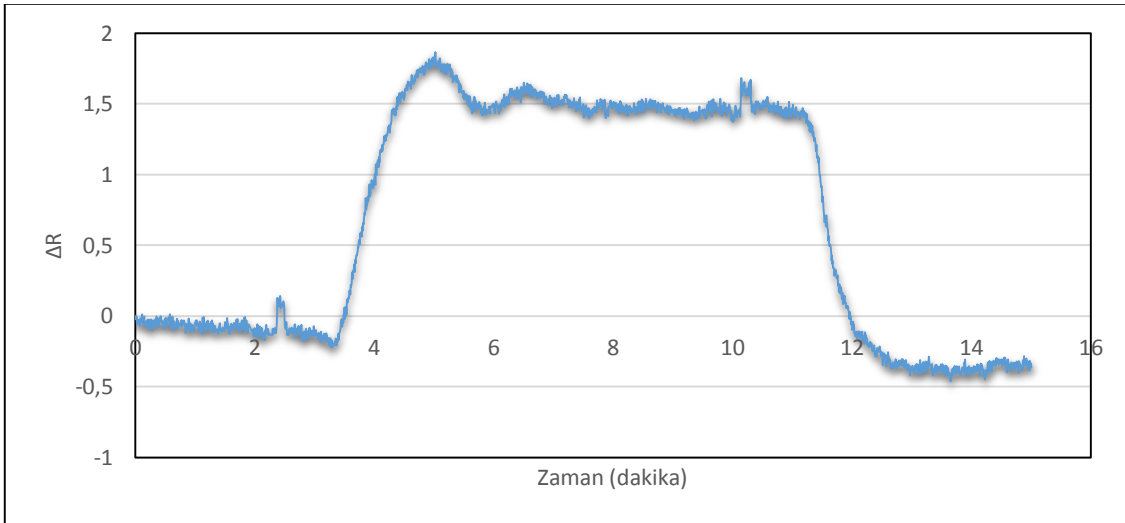
Şekil 4.37. 5 nM Aldehit PEG modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi.



Şekil 4.38. 10 nM Aldehit PEG modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi.



Şekil 4.39. 15 nM Aldehit PEG modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi.



Şekil 4.40. 20 nM Aldehit PEG modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi.

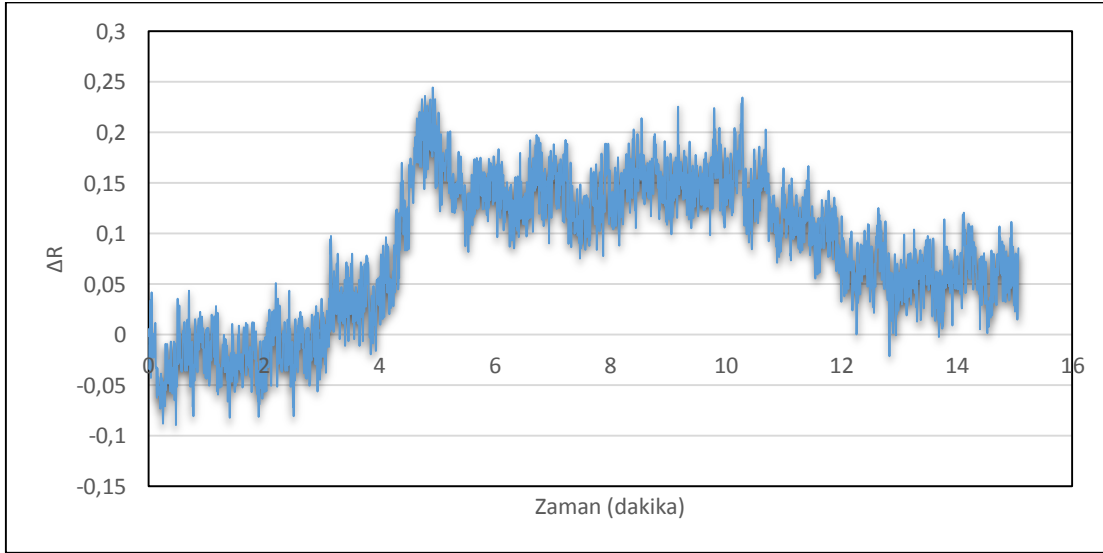
Aldehit PEG modifiye altın nanopartikül derişimindeki artışlar ile birlikte ΔR değerlerindeki artışlarının daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak SPR nanosensör yüzeyinden su geçirildiğinde Aldehit-PEG-ester molekülünün

hemoglobine spesifik polimer yüzeylerde non-spesifik etkileşimler gösterdiği SPR sinyalinin başlangıçtaki denge durumuna dönmesi sonucunda gözlemlenmiştir.

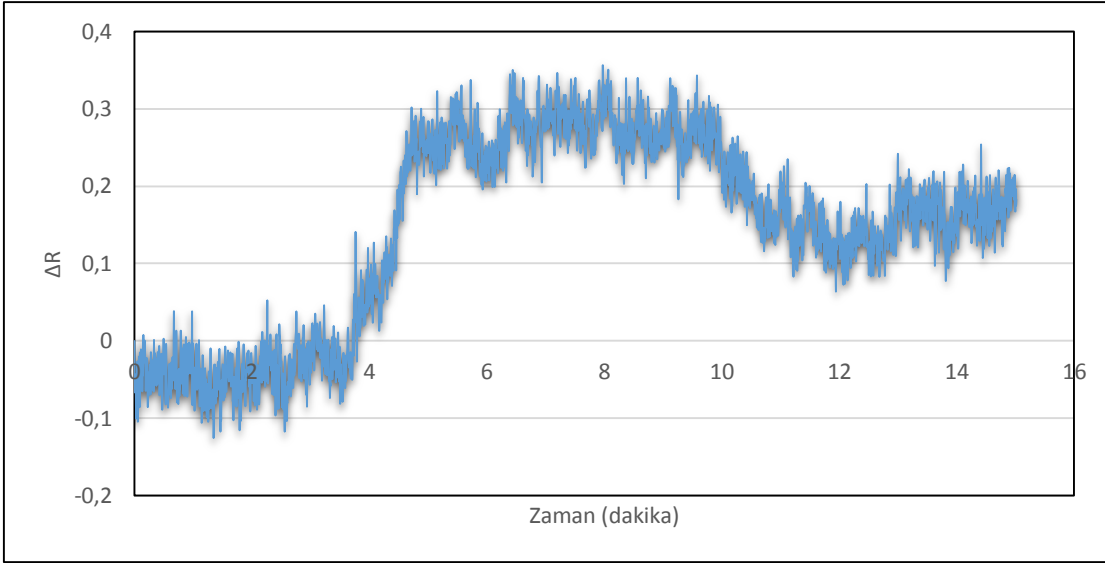
Bu nedenle herhangi bir kinetic analizi yapılmamıştır. Bu sonuçlar altında Aldehit-PEG-Ester molekülünün tasarlanan sistem için kullanışlı olmadığı anlaşılmıştır.

4.5.3. Aldehit PEG-EA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Farklı Derişimlerde Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörü İle Kinetik Analizlerinin Yapılması

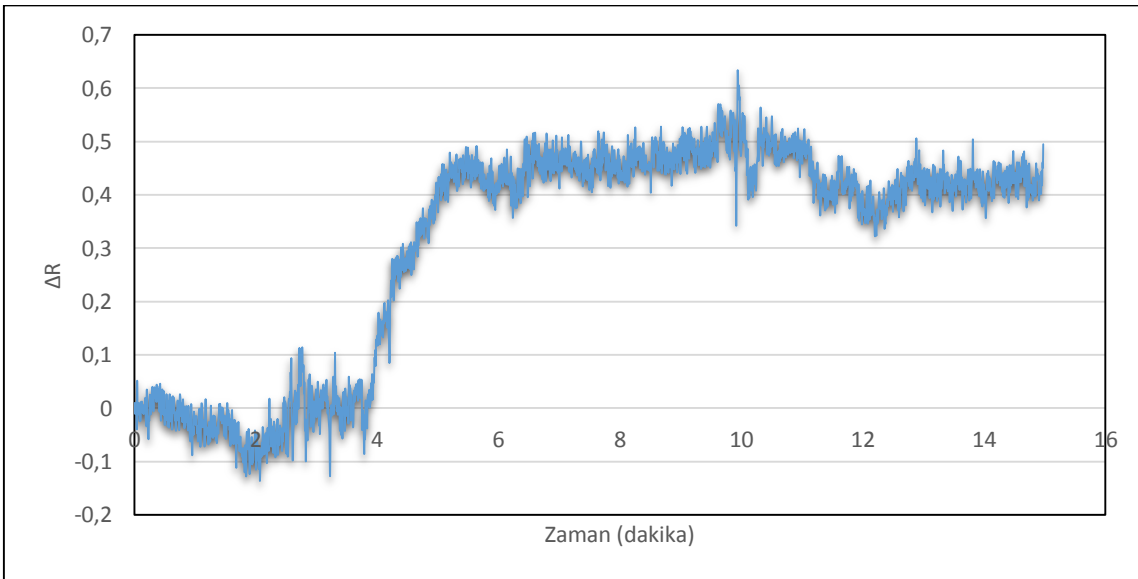
Verilerin daha duyarlı değerlendirilebilmesi için yaygın olarak anlık % kırılma değeri ile başlangıç % kırılma değeri arasındaki farkı gösteren ΔR değerleri kullanılmıştır



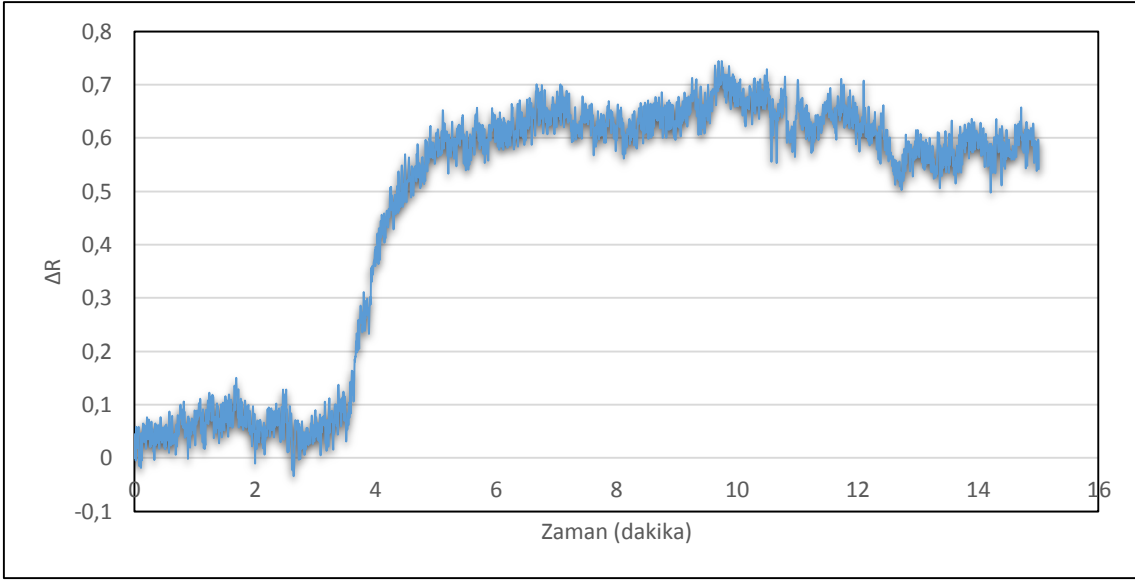
Şekil 4.41. 2 nM Aldehit PEG-EA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,0804$).



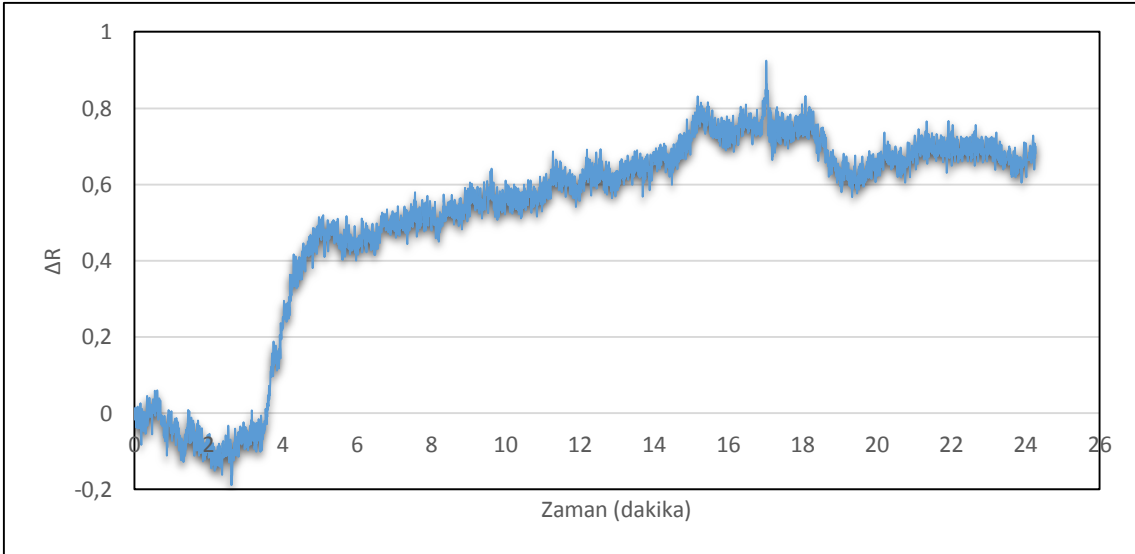
Şekil 4.42. 5 nM Aldehit PEG-EA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,2160$).



Şekil 4.43. 10 nM Aldehit PEG-EA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,4647$)



Şekil 4.44. 15 nM Aldehit PEG-EA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,5573$)



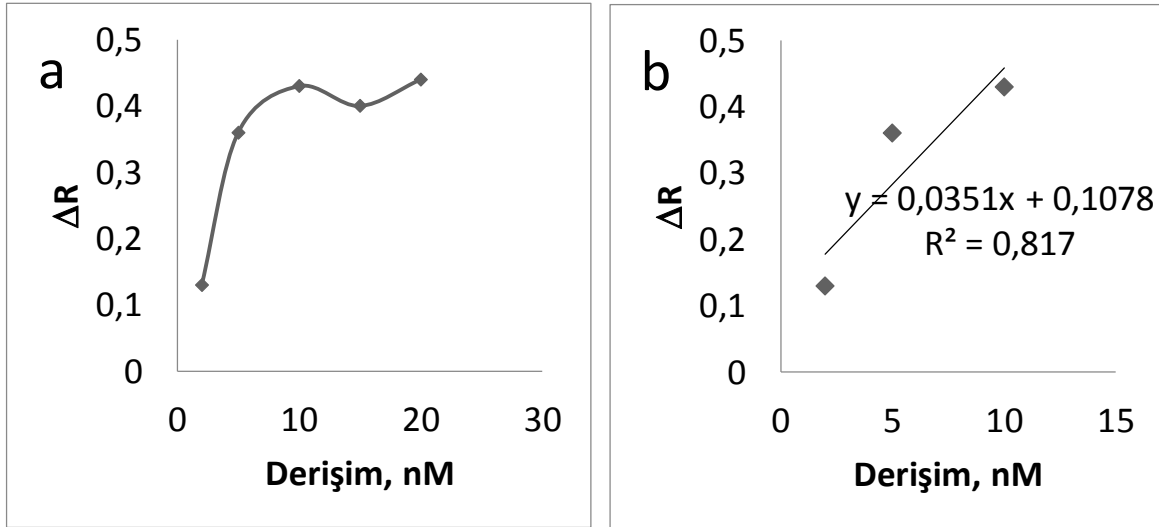
Şekil 4.45. 20 nM Aldehit PEG-EA modifiye altın nanopartikül çözeltisinin hemoglobin baskılanmış polimer ile etkileşimi ($\Delta R=0,7805$)

Şekil (4.41.-4.45.) değişik derişimlerde Altın-PEG-EA çözeltilerinin SPR sensörü üzerindeki hemoglobine spesifik nanokürelere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri verilmiştir. Şekilde de görüldüğü

gibi yüzeye Altın-PEG-EA bağlanmasıyla birlikte % kırılma değeri artmaktadır. Standart bir ölçümde; sistemden öncelikle su, daha sonra sistem yeniden dengeye ulaşana kadar Altın-PEG-EA çözeltisi geçirilmiş, non-spesifik olarak bağlanan Altın-PEG-EA'nın uzaklaştırılması için tekrar su ve son aşamada desorpsiyon çözeltisi kullanılmıştır. Derişimdeki artışla birlikte % kırılma değerindeki artışın daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun sebebi, çözelti ile yüzey arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artmasıdır.

4.5.3.1. Aldehit-PEG-EA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Denge Analizi

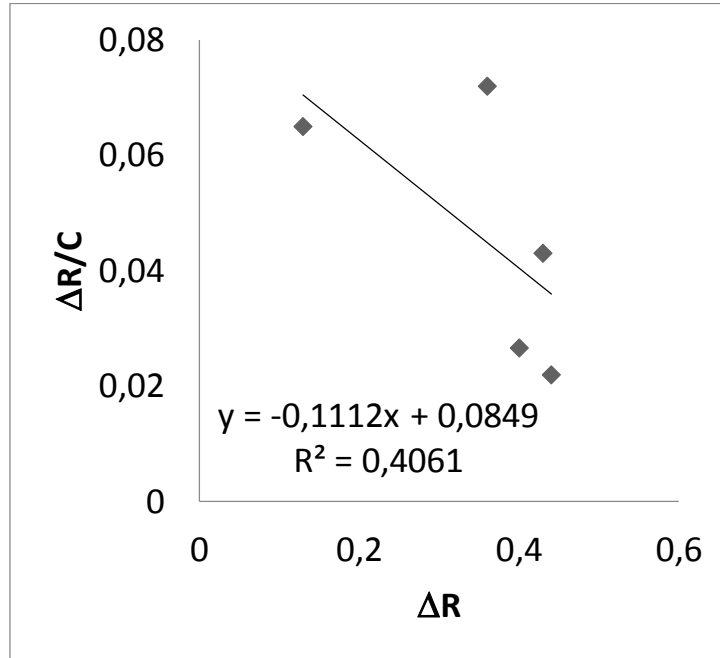
Şekil 4.31. ve 4.32.'de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.6.'da özetlenmiştir.



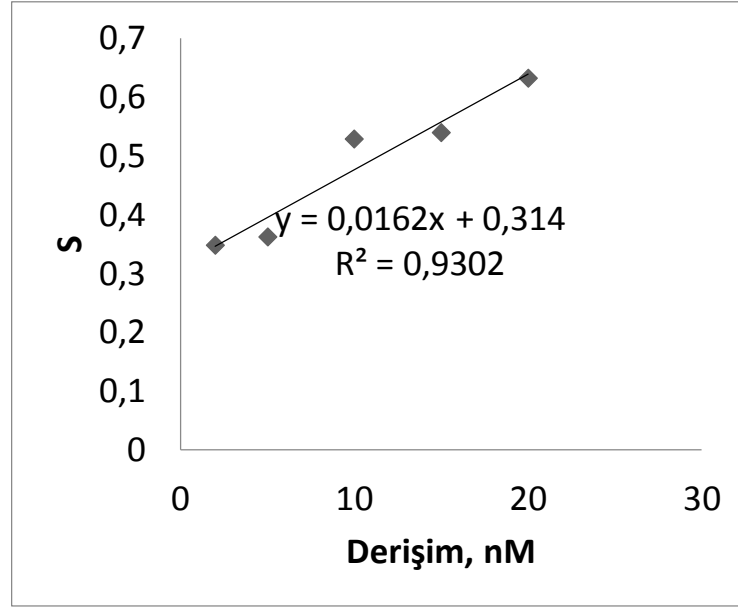
Şekil 4.46. Hemoglobin baskılanmış nanokürelere bağlanan Altın-PEG-EA derişimi ile SPR'de elde edilen ΔR arasındaki ilişki.

Şekil 4.46. (a)'da görüldüğü gibi ΔR değeri derişim arttıkça artmaktadır. ΔR değeri yaklaşık 10 nM civarında dengeye ulaşmıştır. Şekil 4.46. (b)'de ise 2-10 nM aralığındaki verilerin doğrusallığı (R^2 değeri) 0.817 olarak hesaplanmıştır ve elde edilen doğrunun denklemi ($y = 0.0351x + 0.1078$)'dir. Bu sonuçlara göre; Altın-PEG-EA, hemoglobin baskılanmış bölgeye 2-10 nM derişim aralığında yüksek afinite ile bağlanmaktadır ve % 81,70 doğrulukla ölçüm yapabilmektedir.

4.5.3.2. Aldehit-PEG-EA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin Kinetik Analizi



Şekil 4.47. Altın-PEG-EA için Denge analiz yaklaşımı (Scatchard).



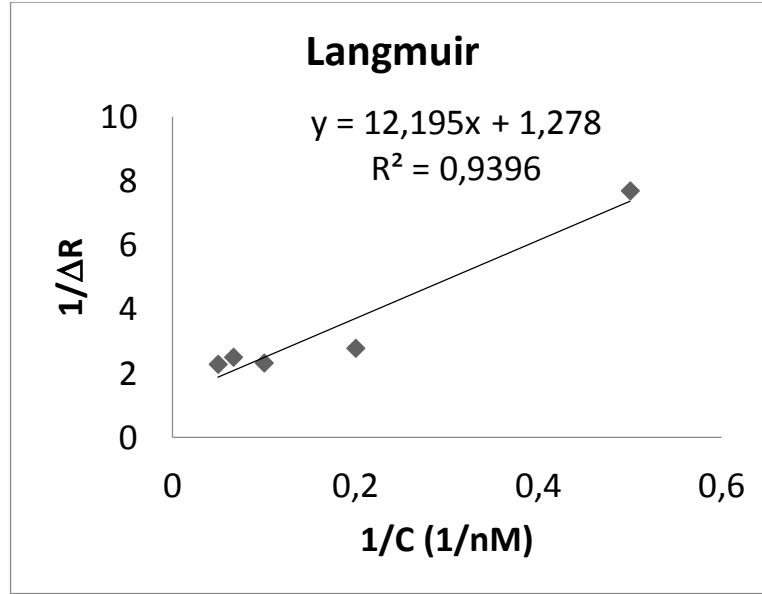
Şekil 4.48. Altın-PEG-EA için Bağlanma kinetik yaklaşımı.

Şekil 4.31. ve 4.32.'de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

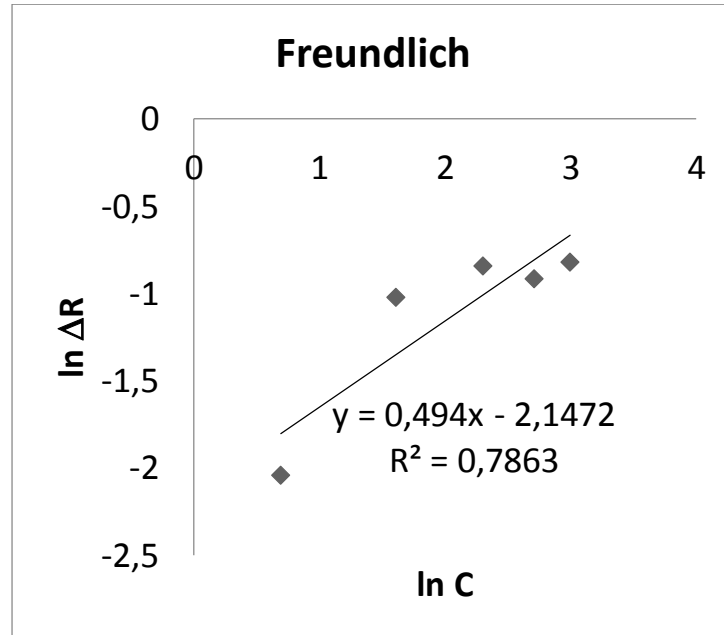
Çizelge 4.8. Altın-Peg-EA için Kinetik hız sabitleri.

Denge Analiz (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
ΔR_{maks}	0.539	k_a 1/nM.s	0.0162
K_A , 1/nM	0.1112	k_d 1/s	0.314
K_D , nM	8.99	K_A 1/nM	0.0515
R^2	0.4060	K_D (nM)	19.38
		R^2	0.93

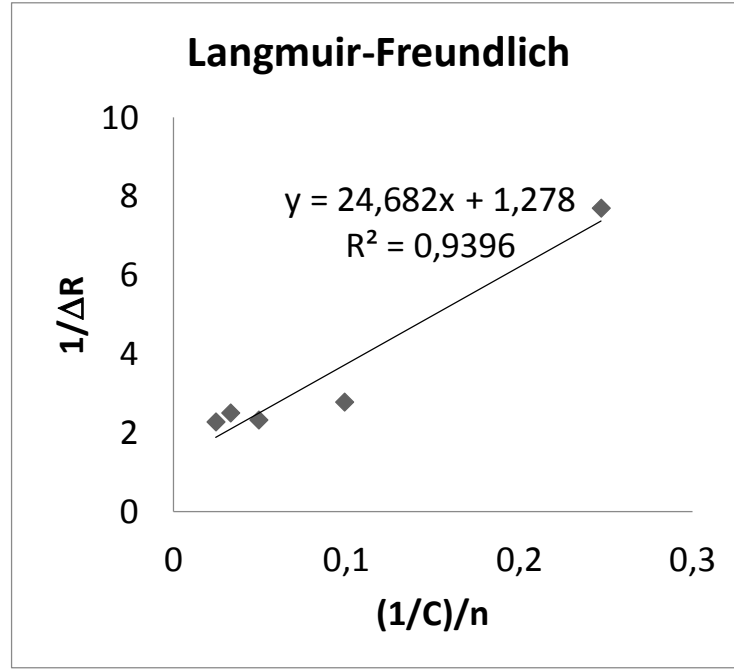
4.5.3.3. Aldehit-PEG-EA ile Modifiye Edilen Altın Nanopartiküllerin İzoterm Analizi



Şekil 4.49. Altın-PEG-EA için Langmuir Adsorpsiyon modeli.



Şekil 4.50. Altın-PEG-EA için Freundlich Adsorpsiyon modeli.



Şekil 4.51. Altın-PEG-EA için Langmuir-Freundlich Adsorpsiyon modeli.

Şekil (4.41.-4.45.)'ye göre deneysel olarak elde edilen verilerden hesaplanan adsorpsiyon modellerinin doğrusallığı incelendiğinde Langmuir adsorpsiyon modelinin ($R^2 = 0.94$) daha uyumlu olduğu görülmektedir. Buna ek olarak, denge analiz (scatchard) grafiğinden elde edilen ve Çizelge 4.8.' de hesaplanan deneysel $\Delta R_{maks.}$ değeri (0.539), Langmuir adsorpsiyon modelinde hesaplanan teorik $\Delta R_{maks.}$ değerine (0.782) en yakın sonuçtur. Bu sonuç; hazırlanan hemoglobin baskılanmış SPR çip yüzeyindeki nanokürelerin Altın-PEG (yarışmacı sentetik hemoglobin) bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiştir. Ayrıca, Langmuir denkleminde teorik olarak hesaplanan K_A ve K_D değerleri sırasıyla 0.104 nM^{-1} ve 9.54 nM olarak hesaplanmıştır.

Altın-MUA ve Altın-PEG moleküllerinin deneysel olarak elde edilen (scatchard) K_A ve K_D sonuçları Çizelge 4.9.' da karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.9. Altın-MUA ve Altın-Peg-EA için deneysel olarak elde edilen (scatchard) K_A ve K_D sonuçlarının karşılaştırılması.

Denge Analizi (SCATCHARD)	Altın-MUA	Altın-PEG
DR_{maks}	0.458	0.539
K_A	0.157	0.111
K_D	6.353	8.992

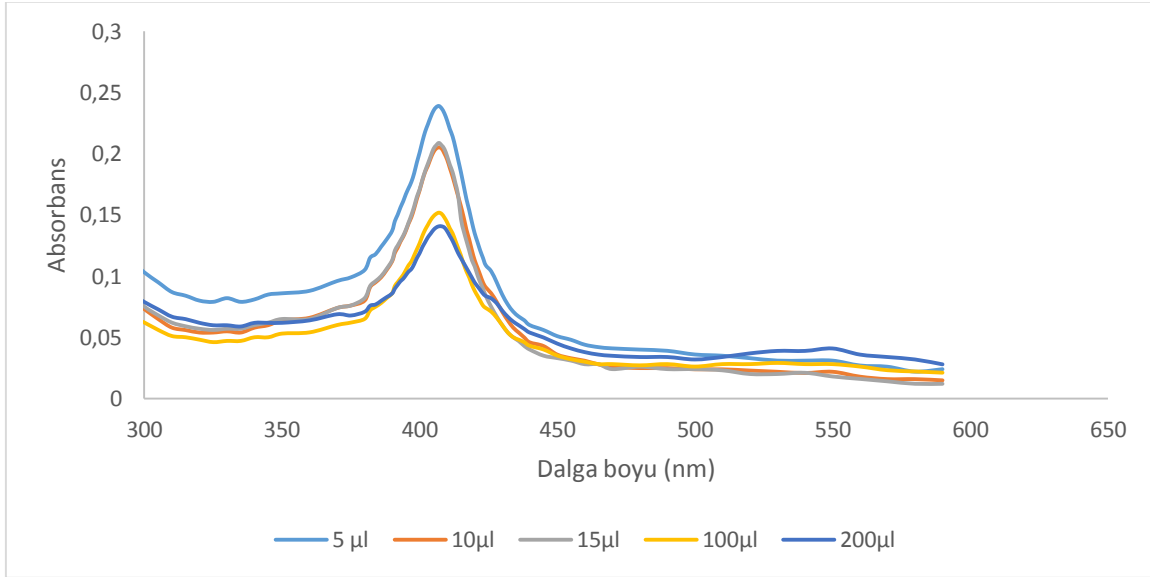
Anlık % kırılma değeri ile başlangıç % kırılma değeri arasındaki farkı gösteren ΔR değerlerinin Altın-MUA' ya oranla daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun sebebi, PEG moleküllerinin (9-10 nm) 11-MUA molekülüne (3-4 nm) göre daha büyük olması ve SPR yüzeyinde gerçekleşen etkileşimler sonucu çip yüzeyinde 11-MUA modifiye altın nanopartiküllere göre yüzeyin ortalama kalınlığını daha fazla arttırmasıdır [101].

4.6. Hemoglobine Spesifik Polimer Yüzeyine Tutunan Ve İşlem Sonrası Ayrılan Hemoglobin Ve Altın Nanopartikül Miktarlarının Hesaplanması

Yapılan SPR çalışmaları sonucunda, sentezlenen sentetik hemoglobin moleküllerinin tam anlamıyla gerçek hemoglobin moleküllerinin yerini tuttuğunu anlamak için hemoglobine spesifik polimer yüzeylerine tutunan partikül sayıları da hesaplanmak istenmiştir. Bu amaçla, SPR çipinin yüzeyine gönderilen hemoglobin sayısı bilindiğinde yüzeye tutunan

hemoglobin moleküllere ortama geldiğinde, çip yüzeyinden sökülen modifiye altın partiküllerin (sentetik hemoglobin) sayısı, toplanan örneğin UV cihazında ölçülmesi sonucu öğrenilecekti.

Ancak yüzeye etki eden modifiye altın nanopartikül solüsyonu yüzeyde çok küçük bir alan ile etkileşmektedir. İşlem sonucu SPR sensöründen desorbsiyon ile toplanan sıvılar UV görünür bölge spektroskopisi ile incelendiğinde, sensör yüzeyinde etkileşime giren modifiye altın nanopartiküllerin UV cihazının tespit sınırının altında kaldığı anlaşılmıştır.



Şekil 4.52. Hemoglobin çözeltisi içerisindeki modifiye altın nanopartiküllerin UV spektrometre ile tespit edilmesi

Yukarıdaki grafikte de görüldüğü üzere hemoglobin ve modifiye altın nanopartiküllerin aynı çözelti içerisinde incelenebilmesi ancak 200 µl modifiye altın nanopartikülün ortamda bulunmasını gerektirmektedir. (Şekil 4.52.)'de 200 µl modifiye altın nanopartikül içeren çözeltinin (koyu mavi renkli grafik) pik vermeye başladığı rahatlıkla görülebilmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kolorektal kanserler tüm kanserlerin yaklaşık %15'ini oluşturmakta, Avrupa ve Amerika'daki kanser ölümlerinde ise ikinci sırada yer almaktadırlar. Ülkemizde çok sağlıklı kanser kayıtlarının olmamasına rağmen, Türkiye'de her yıl 30.000 kişinin kolorektal kansere yakalandığı tahmin edilmektedir. Sağlık Bakanlığı, Kansere Daire Başkanlığının yapmış olduğu çalışmalar doğrultusunda ülkemizde, bireylerin, bilinen tarama yöntemleri ile kanser taramalarının gerçekleştirilmesi, erken teşhis ve etkin tedavilerinin yapılması ile kanser vakalarına bağlı ölümlerde önemli bir oranda azalma sağlanması beklenmektedir. Gaitada Gizli Kan (GGK) testi erken dönemdeki kolorektal tümörlerinin belirlenmesi ve engellenmesinde sıklıkla kullanılan en belirgin testtir. Bu testin erken tanı olanağı sağlayarak kolorektal kanserlere bağlı ölüm oranını düşürdüğü çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir. Hazırlanan tezin amacı, kolorektal kanser ve diğer gastroinsetinal bozuklukların erken tanısına imkan veren kantitatif ölçüm yapabilen immünokromotografik tabanlı hasta başı bir diagnostik test kiti için fonksiyonelleştirilmiş kolloidal altın nanopartiküllerin sentezlenmesi ve karakterize edilmesidir.

Geleneksel GGK test kitlerinde kullanılan poliklonal ve monoklonal antiserumlar, biyolojik tabanlı moleküller oldukları için hem test kitinin üretim maliyetini yükseltmekte, hemde farklı ortam koşullarına adapte olamadıkları için yapılarında bozulmalar meydana gelmekte ve bu sebepten test kitinin raf ömrünü ciddi oranda azaltmaktadırlar.

MBP'ler, kolay hazırlanabilir, kararlı, ucuz ve özellikle moleküler tanıma yeteneğine sahiptirler. Ayrıca, MBP'in hedef molekülünü tanıma özelliği, kuvvetli asit, kuvvetli baz, organik çözücüler ve yüksek sıcaklıklar gibi zor koşullardan etkilenmez. Bu belirgin fiziksel ve kimyasal kararlılık antikolların immünolojik tanıma amaçlı kullanılmadığı durumlarda kullanılma kolaylığı sağlamaktadır. Moleküler baskılama, test kitlerinde veya başka uygulamalarda kullanılan biyolojik moleküllerin yukarıda belirtilen dezavantajlarını yok edebilmek amacıyla, yapay antibodi ve antijenleri verimli, hızlı ve ekonomik olarak oluşturmak için geliştirilmiştir bir yöntemdir. Moleküler baskılama, ilgilenilen analit için seçici tanıma bölgelerine sahip polimerlerin hazırlanmasında kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem ile hazırlanan taşıyıcılar hedef moleküle yüksek seçicilik gösterirler.

Bu tez çalışması kapsamında, tasarlanacak test sistemi için eş boyutlu ve homojen dağılımlı altın nanopartiküller üretilmiş ve karakterizasyon işlemleri sonucunda (TEM,UV spektrometre) boyut ve şekil dağılımının istenilen düzeyde olduğu görülmüştür. Karakterizasyon işlemleri tamamlanan altın nanopartiküller tasarlanacak test sisteminin, biyolojik tanıma bölgesini oluşturmak amacıyla sentezlenmiş hemoglobine spesifik polimer yüzeylerindeki fonksiyonel grupları tanıyacak ve tutunacak şekilde modifiye edilmiştir. Modifikasyon işlemleri sonucunda hazırlanan farklı altın nanopartiküller için tekrar karakterizasyon çalışmaları (UV spektrometre, XPS, FT-IR ve Zeta potansiyel ölçümü) yapılmış ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda modifikasyon işlemlerinin başarılı olduğu görülmüştür. Hazırlanan sentetik hemoglobin molekülleri (modifiye altın nanopartiküller) yarışmalı afinite kromatografisi yöntemi tabanlı bir çalışma ile test edilmiştir.

Hemoglobine spesifik polimer yüzeyleri ile hazırlanan modifiye altın nanopartiküllerin etkileşimlerin ilk önce Moleküler Doking yöntemiyle ön çalışmaları yapılmıştır. 11-MUA molekülü bir ucunda bulunan tiyol grubu (-

SH) yardımı ile altın yüzeyine güçlü bir bağlanma gösterirken diğer ucunda bulunan karboksil (-COOH) grupları ile polimer yüzeyindeki kaviteelerde bulunan N-metakriloil-L-histidin metil ester molekülünün imidazol halkasındaki hidrojen (H) ile zayıf etkileşim göstermiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, polimer yüzeyindeki fonksiyonel grup olan N-metakriloil-L-histidin metil ester molekülü ile etkileşmesi açısından 11-Merkapto Undekaonik Asit altın nanopartikül yüzeylerini modifiye etmek için kullanılmıştır.

Tez kapsamında ayrıca, hemoglobine spesifik polimer yüzeyler ile zayıf etkileşmesi bakımından bir diğer molekül 4-formyl-benzamido-dPEG[®]₂₄-TFP ester ticari molekülü, altın nanopartiküllerin yüzeyine sistamin yardımı ile amin grupları takıldıktan sonra sonra (-NH₂) TFP ester ucundan bu gruplar ile etkileştirilmiştir. PEG molekülünün boşta kalan Aldehit ucunun hemoglobine spesifik yüzeylerde bulunan fonksiyonel gruplar ile etkileşimi incelenmiştir. Aldehit gruplarının olumsuz sonuç vermesinin ardından, bu gruplar bir ucunda -OH diğer ucunda -NH₂ (amin) grupları bulunan Etanolamin hidroklorür ile modifiye edilmiştir. -NH₂ grupları, altın nanopartiküle tutturulmuş PEG molekülünün serbest Aldehit ucunda bulunan çift bağlı oksijen molekülüne (O) tutturulmuş ve PEG molekülünün serbest ucunun tıpkı 11-MUA molekülünde olduğu gibi -OH gruplarına dönüştürülmesi başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Modifiye edilen altın moleküllerinin, hazırlanan SPR nanosensör üzerine immobilize edilmiş hemoglobine spesifik polimer yüzeyler ile farklı derişimlerde etkileşimleri incelenmiş ve kinetik çalışmaları yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 11-MUA modifiye altın nanopartiküllerin, Aldehit-PEG-EA modifiye altın nanopartiküllere göre hemoglobine spesifik moleküler baskılanmış polimer yüzeylere daha yüksek bir afinite ile

bağlandığı (K_A , 0,157) ve hemoglobin yüzeye geldiğinde daha hızlı ayrıldığı (K_D , 6,353) gözlemlenmiştir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar 11-MUA ile modifiye edilen altın nanopartiküllerin, tasarlanacak olan MBP tabanlı Gaitada Gizli Kan test kiti için hazırlanan hemoglobin molekülü baskılanmış polimer yüzeyler ile istenilen etkileşimleri gerçekleştirdiğini göstermiştir. Böylelikle, yukarıda bahsedilen dezavantajların ortadan kaldırılmasının ve ülke ekonomisine katkıda bulunulmasının önü açılmış, bunun yanı sıra literatüre yeni bilgiler kazandırılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Young GP, St John DJ, Winawer SJ, Rozen P. Choice of fecal occult blood tests for colorectal cancer screening: recommendations based on performance characteristics in population studies: WHO (World Health Organization) and OMED (World Organization for Digestive Endoscopy) report. *Am J Gastroenterol*; 97 (10): 2499-2507, **2002**.
- [2] Nakama H, Yamatoto M, Kamijo N, Li T, Wei N, Fattah AS, Zhang B. Colonoscopic evaluation of immunochemical fecal occult blood test for detection of colorectal neoplasia. *Hepatogastroenterology*; 46(25): 228-31, **1999**.
- [3] Wulff G, Poll HG, Influence of the Nature of the Crosslinking Agent on the Performance of Imprinted Polymers in Racemic Resolution., *Makromol, Chem.* 188, 741, **1987**.
- [4] Mosbach K, Ramström O, The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, *Biotechnology*, 14 163, **1996**.
- [5] Rao TP, Daniel S, Gladis JM, *Trends Analytic Chemistry*, 23,28, **2004**.
- [6] (Cormack PAG, Elorza AZ, Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation, *Journal of Chromatography B.*, 804,173, **2004**.

- [7] Alexander C, Andersson HS, Andersson LI, Ansell RJ, Kirsch N, Nicholls IA, O'Mahony J, Whitcombe MJ, Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, *J. Mol. Recognit.*, 19 106-180, **2006**.
- [8] De M, Ghosh PS, Rotello MV, Applications of Nanoparticles in Biology, *Adv. Mater.*, 20, 4225-4241, **2008**.
- [9] You CC, Miranda OR, Gider B, Ghosh PS, Kim IB, Erdogan B, Krovi SA, Bunz UHF, Rotello VM: Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer 'chemical nose' sensors. *Nat Nanotech*, 2:318-323, **2007**.
- [10] Niemeyer, CM, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 4128, **2001**.
- [11] Taton TA, Lu G, Mirkin CA, Two color labeling of oligonucleotides arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *J Am Chem Soc.* 123: 5164-5165, **2001**.
- [12] Recent Advances in Biosensors Technology: A Review, Neha Arora, *Octa. J. Biosci.* Vol. 1(2): 147-150, **2013**.
- [13] Junhui, Z., Hong, C. ve Ruifu, Y. DNA based biosensors. *Biotechnology Advances* Vol 15 (1):43-58, **1997**.
- [14] Velasco-Garcia, M. N. ve Mottram, T. Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering* Vol 84 (1):1-12, **2003**.

- [15] Mehrvar, M., Bis, C., Scharer, J. M., Moo-Young, M. ve Luong, J. H. Fiber-optic biosensors Trends and advances. Analytical Science Vol 16 July: 677-692, **2000**.
- [16] B. R. Eggins, Biosensors: an Introduction. Jon Wiley and Sons Inc, New York, 1 – 117, **1996**.
- [17] Cooper JC, Hall EA. The nature of biosensor technology. J Biomed Eng. 10:210-9, **1988**.
- [18] Drugs of Abuse, Chapter 6, Biosensors Young H. Lee and Raj Mutharasan, Department of Chemical Engineering, Drexel University, **1987**.
- [19] Gooding JJ, Analytica Chimica Acta, 559; Page:137, **2006**.
- [20] Miranda, O. R.; Creran, B.; Rotello, V. M. Curr. Opin. Chem. Biol. 14, 728, **2010**.
- [21] De, M.; Ghosh, P. S.; Rotello, V. M. Adv. Mater. 20, 4225, **2008**.
- [22] Anslyn, E. V.; Rotello, V. M. Curr. Opin. Chem. Biol. 14, 683, **2010**.
- [23] Cote, G. L.; Lec, R. M.; Pishko, M. V. IEEE Sens. J. 3, 251, **2003**.
- [24] Sanchez, C.; Julian, B.; Belleville, P.; Popall, M. J. Mater. Chem. 15, 3559, **2005**.
- [25] Thomas, S. W.; Joly, G. D.; Swager, T. M. Chem. Rev. 107, 1339, **2007**.

- [26] Gold nanoparticle-based biosensors, Yuanyuang Lia, Hermann J. Schluesenerb, Shunqing Xua, *Gold Bulletin* Volume 43 No 1, **2010.**
- [27] Ding N, Zhao H, Peng W, He Y, Zhou Y, Yuan L and Zhang Y *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 395 16, **2012.**
- [28] Lee H, Joo S, Lee S, Lee C, Yoon K and Lee K *Biosens. Bioelectron.* 26 730, **2010.**
- [29] Liu M, Yuan M, Lou X, Mao H, Zheng D, Zou R, Zou N, Tang X and Zhao J *Biosens. Bioelectron.* 26 4294, **2011.**
- [30] Rastogi S K, Gibson C M, Branen J R, Eric Aston D, Larry Branen A and Hrdlicka P J *Chem. Commun.* 48 7714, **2012.**
- [31] Yang F, Duan J, Li M, Wang Z and Guo Z *Anal. Sci.* 28 333, **2012.**
- [32] Moon J, Kim G and Lee S 2012 *Materials* 5 634 (Wang Y, Fill C and Nugen S R *Biosensors* 2 32, **2012.**
- [33] Wang Y, Fill C and Nugen S R *Biosensors* 2 32, **2012.**
- [34] M.C. Daniel and D. Astruc, *Chem Rev*, 104, 293, **2004.**
- [35] M. Hu, J. Chen, Z.Y. Li, L. Au, G.V. Hartland, X. Li, M. Marquez and Y. Xia, *Chem Soc Rev*, 35, 1084, **2006.**

- [36] S. Link and M.A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B*, 103,8410, **1996**.
- [37] P. Mulvaney, *Langmuir*, 12, 788, **1996**.
- [38] H.Y. Lin, C.T. Chen and Y.C. Chen, *Anal Chem*, 78,6873, **2006**.
- [39] S. Takae, Y. Akiyama, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki and K. Kataoka, *Bioconjug Chem*, 18, 1241, **2007**.
- [40] L.A. Lyon, M.D. Musick and M.J. Natan, *Anal Chem*,70, 5177, **1998**.
- [41] L. He, M.D. Musick, S.R. Nicewarner, F.G. Salinas, S.J. Benkovic, M.J. Natan and C.D. Keating, *Journal of the American Chemical Society*, 122, 9071, **2000**.
- [42] E. Hutter, S. Cha, J.F. Liu, J. Park, J. Yi, J.H. Fendler and D. Roy, *The Journal of Physical Chemistry B*, 105, 8, **2001**.
- [43] X. Yang, Q. Wang, K. Wang, W. Tan and H. Li, *Biosens Bioelectron*, 22, 1106, **2007**.
- [44] L.A. Lyon, M.D Musick, P.C. Smith, B.D. Reiss, D.J. Pena and M.J. Natan, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 54,118, **1999**.
- [45] E. Fu, S.A. Ramsey and P. Yager, *Analytica Chimica Acta*, 599, 118, **2007**.
- [46] C. Cao and S.J. Sim, *Biosens Bioelectron*, 22, 1874, **2007**.

- [47] L.A. Lyon, M.D. Musick, P.C. Smith, B.D. Reiss, D.J. Pena and M.J. Natan, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 54, 118, **1999**.
- [48] G. Xu, H. Li, X. Ma, X. Jia, J. Dong and W. Qian, *Biosens Bioelectron*, 25, 362, **2009**.
- [49] E. Katz, I. Willner and J. Wang, *Electroanalysis*, 16, 19, **2004**.
- [50] Oriented Gold Nanoparticle Aggregation for Colorimetric Sensors with Surprisingly High Analytical Figures of Merit Longhua Guo, Yang Xu, Abdul Rahim Ferhan, Guonan Chen and Dong-Hwan Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 12338–12345, **2013**.
- [51] Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic Devices, Ali Kemal Yetisen, Muhammad Safwan Akram and Christopher R. Lowe, *Lab Chip*, 13, 2210–2251, **2013**.
- [52] Drugs Of Abuse: Body Fluid Testing, Edited by Raphael C. Wong and Harley Y. Tse, *The Use of Nitrocellulose Membranes in Lateral-Flow Assays*, Michael A. Mansfield, **2005**.
- [53] <http://www.cytodiagnosics.com/store/pc/Lateral-Flow-Immunoassays-d6.htm>, **2015**
- [54] J. Turkevich, P.C. Stevenson and J. Hillier: A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.*, 11, 55-75, **1951**.
- [55] B.V. Enustun and J. Turkevich: Coagulation of colloidal gold. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 3317- 3328 (1963) S.K. Sivaraman, S.

- Kumar and V. Santhanam: Monodisperse sub-10 nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in turkevich method- The role of chloroauric acid. *J. Colloid Interface Sci.*, 361(2), 543-547, **2011**.
- [56] S.K. Sivaraman, S. Kumar and V. Santhanam: Monodisperse sub-10 nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in turkevich method- The role of chloroauric acid. *J. Colloid Interface Sci.*, 361(2), 543-547, **2011**.
- [57] G. Frens: Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature: Phys. Sci.*, 241, 20-22, **1973**.
- [58] T. Yonezawa and T. Kunitake: Practical preparation of anionic mercapto ligand stabilized gold nanoparticles and their immobilization. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 149, 193-199, **1999**.
- [59] K.J. Watson, J. Zhu, S.B.T. Nguyen and C.A. Mirkin: Hybrid nanoparticles with block copolymer shell structures. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 462-463, **1999**.
- [60] M. Brust, M. Walker, W. Bethell, D.J. Schriffrin, R. Whyman: Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two phase liquid system. *J. Chem. Soc.*, 801-802, **1994**.
- [61] M. Giersig and P. Mulvaney: Preparation of ordered monolayers by electrophoretic deposition. *Langmuir*, 9, 3408-3413, **1993**.

- [62] A. Gole and C.J. Murphy: Seed mediated synthesis of gold nanorods: Role of the size and nature of seed. *Chem, Mater.*, 16(19), 3633-3640, **2004**.
- [63] T.K. Sau and C.J. Murphy: Room temperature, High yield synthesis of multiple shapes of gold nanoparticles in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 8648-8649, **2004**.
- [64] N.R. Jana, L. Gearheart and C.J. Murph: Seed mediated growth approach for shape controlled synthesis of spheroidal and rod like gold nanoparticles using a surfactant template. *Chem. Mater.*, 12, 1389-1392, **2001**.
- [65] Y. Chen, X. GU, C.G. Nie, Z.Y. Jiang, Z.X. Xie and Z.J. Lin: Shape controlled growth of gold nanoparticles by a solution synthesis. *Chem. Commun.*, 4181-4183, **2005**.
- [66] S.E. Skrabalak, J. Chen, Y. Sun, X. Lu, L. Au, C.M. Cobley, Y. Xia: Gold nanocages: synthesis properties and applications. *Acc. Chem. Res.*, 41(12), 1587-1595, **2008**.
- [67] C.R. Bridges, P.M. Dicarmine, A. Fokina, D. Huesmann and D.S. Seferos: Synthesis of gold nanotubes with variable wall thickness. *J. Mater. Chem. A*, 1, 1127-1133, **2013**.
- [68] Ulman, A. *Chemical Reviews*, 96(4), 1533-1554, **1996**.
- [69] Hickman, J. J.; Ofer, D.; Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.; Wrighton, M. S. *Science*, 252(5006), 688-691, **1991**.

- [70] Mirkin, C. A.; Ratner, M. A. *Annual Review of Physical Chemistry*, 43(1), 719-754, **1992**.
- [71] Wollman, E. W.; Kang, D.; Frisbie, C. D.; Lorkovic, I. M.; Wrighton, M. S. *Journal of the American Chemical Society*, 116(10), 4395-4404, **1994**.
- [72] Bonnemann, H.; Richards, R. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 10(2455-2480), **2001**.
- [73] Noh, J.; Kato, H. S.; Kawai, M.; Hara, M. *Journal of physical Chemistry B*, 110(6), 2793-2797, **2006**.
- [74] Dameron, A. A.; Charles, L. F.; Weiss, P. S. *Journal of the American Chemical Society*, 127(24), 8697-8704, **2005**.
- [75] Crooks, R. M.; Ricco, A. J. *Accounts of Chemical Research*, 31(5), 219-227, **1998**.
- [76] Badia, A.; Lennox, R. B.; Reven, L. *Accounts of Chemical Research*, 33(7), 475-481, **2000**.
- [77] Adams, D. M.; Brus, L. E.; Chidsey, C. E. D.; Creager, S. E.; Creuts, C.; Kagan, C. R.; Kamat, P. V.; Lieberman, M.; Lindsay, S.; Marcus, R. A.; Metzger, R. M.; Michel-Beyerle, M. E.; Miller, J. R.; Newton, M. D.; Rolison, D. R.; Sankey, O.; Schanze, K. S.; Yardley, J.; Zhu, X. Y. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(6668-6697), **2003**.

- [78] Fendler, J. H. *Chemistry of Materials*, 13(10), 3196-3210, **2001**.
- [79] Daniel, M. C.; Astruc, D. *Chemical Reviews*, 104(293-346), **2004**.
- [80] Haes, A. J.; Hall, W. P.; Chang, L.; Klein, W. L.; Van Duyne, R. P. *Nano Letters*, 4(6), 1029-1034, **2004**.
- [81] Templeton, A. C.; Wuelfing, W. P.; Murray, R. W. *Accounts of Chemical Research*, 33(1), 27-36, **1999**.
- [82] Haes, A. J.; Zhao, J.; Zou, S.; Own, C. S.; Marks, L. D.; Schatz, G. C.; Van Duyne, R. P. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(22), 11158-11162, **2005**.
- [83] DeVries, G. A.; Talley, F. R.; Carney, R. P.; Stellacci, F. *Advanced Materials*, 20(22), 4243-4247, **2008**.
- [84] Sardar, R.; Heap, T. B.; Shumaker-Parry, J. S. *Journal of the American Chemical Society*, 129(17), 5356-5357, **2007**.
- [85] Shipway, A. N.; Katz, E.; Willner, I. *Chemical and Physical Chemistry*, 1(18-52), **2000**.
- [86] Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in Bionanotechnology, Yi-Cheun Yeh, Brian Creran and Vincent M. Rotello, *Nanoscale*, 4, 1871–1880 | 1873, **2012**.

- [87] PROTEİN-LİGAND ETKİLEŞİMLERİ, Prof. Dr. Vildan ADAR, Bilgisayar-destekli İlaç Tasarım Laboratuvarı, www.cadd.hacettepe.edu.tr, Kimya Bölümü, Hacettepe Üniversitesi, **2013**.
- [88] AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, Oleg Trott and Arthur J. Olson, J Comput Chem. 31(2): 455–461. Jan 30, 2010.
- [89] Covalently functionalized gold nanoparticles: synthesis, characterization, and integration into capillary electrophoresis, Michael Robert Ivanov, Ph.D. thesis, University of Iowa, **2011**.
- [90] Colorimetric detection of melamine in complex matrices based on cysteamine-modified gold nanoparticles, (Xiaosheng Liang, Hongping Wei, Zongqiang Cui, Jiaoyu Deng, Zhiping Zhang, Xiangyu You and Xian-En Zhang, Analyst, 136, 179–183 | 179, **2011**.
- [91] Binding Strength and Dynamics of Invariant Natural Killer Cell T Cell Receptor/CD1d-Glycosphingolipid Interaction on Living Cells by Single Molecule Force Spectroscopy, JBC Papers in Press, Bianca L. Bozna, Paolo Polzella, Christian Rankl, Rong Zhu, Mariolina Salio, Dawn Shepherd, Memed Duman, Vincenzo Cerundolo and Peter Hinterdorfer. March 15, **2011**.
- [92] Present and future of surface plasmon resonance biosensors, Anal Bioanal Chem 377 : 528–539, Jiří Homola. **2003**.

- [93] Cooper MA. Label-free screening of bio-molecular interactions. *Anal Bioanal Chem*, 377:834–42. **2003**.
- [94] Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species, Jiří Homola, *Chem. Rev.*, 108, 462–493. **2008**.
- [95] Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir–Freundlich Isotherm, Robert J. Upleby, II, Sarah C. Baxter, Yizhao Chen, Ripal N. Shah, and Ken D. Shimizu, *Anal. Chem.* 73, 4584-4591. **2001**.
- [96] Wei, X., Samadi, A., Husson, S.M. *Sep. Sci. Technol.* 40, 109–129, **2005**.
- [97] Effect of the Solution Refractive Index on the Color of Gold Colloids, Sylvia Underwood and Paul Mulvaney, *Langmuir*, 10, 3427-3430, **1994**.
- [98] Measurement of antibody binding to protein immobilized on gold nanoparticles by localized surface plasmon spectroscopy, Kazuhiko Fujiwara, Hitoshi Watarai, Hideaki Itoh, Erika Nakahama, Nobuaki Ogawa, *Anal Bioanal Chem* 386: 639–644, **2006**.
- [99] Soft and rigid" dithiols and Au nanoparticles grafting on plasma-treated polyethyleneterephthalate, Václav Švorčík, Zdeňka Kolská, Ondřej Kvítek, Jakub Siegel, Alena Řezníčková, Pavel Řezanka and Kamil Záruba, *Nanoscale Research Letters* , 6:607, **2011**.
- [100] Self-assembly characteristics of gold nanoparticles in the presence of cysteine, Aurora Mocanu, Ileana Cernica, Gheorghe Tomoaia, Liviu-Dorel Bobos, Ossi Horovitz, Maria Tomoaia-

Cotisel, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 338. 93–101, **2009**.

- [101] Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA Hybridization Adsorption and Streptavidin/DNA Multilayer Formation at Chemically Modified Gold Surfaces, Claire E. Jordan, Anthony G. Frutos, Andrew J. Thiel, and Robert M. Corn, *Analytical Chemistry*, Vol. 69, No. 24, December 15, **1997**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Uğur AYDIN

Doğum Yeri : İstanbul

Medeni Hali : Bekar

E-posta : uguraydin13@gmail.com

Adresi : Akıllı ve Basit Sensörler Araştırma Grubu, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Beytepe Kampüsü, 06800, Ankara, Türkiye

Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fizik Mühendisliği, Ankara

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve NanoTıp A. D., Ankara

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : Çok iyi

İş Deneyimi

2013 – 2014 : TÜBİTAK 1003 Ar-Ge Projesi (Araştırmacı)

Deneyim Alanları

Altın Nanopartiküller Tabanlı Biyosensörler, Eş boyutlu ve küresel altın nanopartiküllerin çeşitli sensör türlerinde kullanılması.

Atomik Kuvvet Mikroskoku : Sıvı ve katı örneklerin yüzey topografi görüntülerinin AFM ile belirlenmesi.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

"Gaitada Gizli Kan Tanısı İçin Hasta Başı (Point of care) Test Kiti Geliştirilmesi ve Üretilmesi " 113S076 Nolu 1003 TÜBİTAK Projesi. Proje bütçesi 292.155 TL `dir.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-