

**METABOLİT TAYİNİNE YÖNELİK BİYOESİNLENMİŞ  
NANOMALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ VE  
UYGULAMALARI**

**DEVELOPMENT AND APPLICATIONS OF BIOINSPIRED  
NANOMATERIALS FOR METABOLITE DETECTION**

**ERDOĞAN ÖZGÜR**

**PROF. DR. ADİL DENİZLİ**

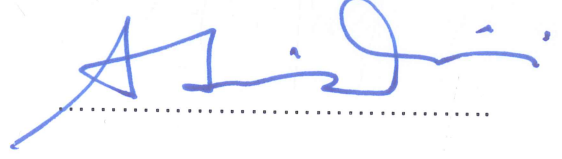
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2016

ERDOĞAN ÖZGÜR'ün hazırladığı “Metabolit Tayinine Yönelik Biyoesinlenmiş Nanomalzemelerin Geliştirilmesi Ve Uygulamaları” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

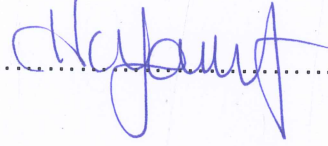
Prof. Dr. Adil DENİZLİ  
Başkan / Danışman



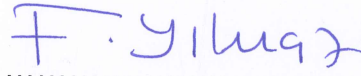
Prof. Dr. F. Sema BEKTAŞ  
Üye



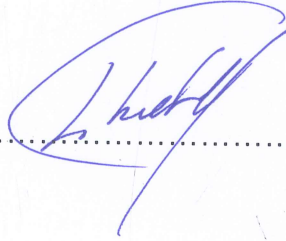
Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ  
Üye



Yrd. Doç. Dr. Fatma YILMAZ  
Üye



Yrd. Doç. Dr. Erkut YILMAZ  
Üye



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

Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN  
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 akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

16/12/2016



ERDOĞAN ÖZGÜR

## ÖZET

# METABOLİT TAYİNİNE YÖNELİK BİYOESİNLENMİŞ NANOMALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMALARI

**Erdoğan ÖZGÜR**

**Doktora, Kimya Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ**

**Tez Eş-Danışmanı: Doç. Dr. Lokman UZUN**

**Aralık 2016, 139 sayfa**

Tez çalışması üç temel kısımdan oluşmaktadır: **i)** melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin üretimi; **ii)** biyoesinlenilmiş sensör yüzeylerinin tasarımına yönelik polimerik filmlerin üretimi ve **iii)** DNA yapısından esinlenerek aç-kapa nükleotid temelli elektrotların üretimi.

Potansiyel metabolik biyobelirteçlerin kantitatif tayinine yönelik polimerleştirilebilen terbiyum(III) kompleksi temelli moleküler baskılanmış akıllı floresans nanopartiküller sentezlenmiştir. MIP nanopartikül sensörün etkinliğinin gösterimi için melatonin model metabolit olarak seçilmiştir. Bu biyoalgılama platformunda, daha derin penetrasyon kabiliyeti, ihmal edilebilir oto-floresans, floro ışıltama olmaması ve keskin absorpsiyon ve emisyon çizgileri, uzun ömür ve üstün foto kararlılığa sahip olması nedeniyle lantanit iyon kompleksinden yararlanılmıştır. Lantanit iyonlarının karboksilik asit gruplarına olan yüksek afinitesinden dolayı terbiyum(III) iyonlarının ve melatoninin koordinasyonu için sırasıyla amino asit temelli fonksiyonel monomerler olan N-metakriloil-L-aspartik asit (MA-Asp) ve N-metakriloil-L-triptofan (MATrp) kullanılmıştır. Floresans MIP nanopartiküller, terbiyum(III):MA-Asp ve melatonin:MATrp komplekslerin oluşturulmasının ardından miniemülsiyon

polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Floresans MIP nanopartiküller sulu çözeltiden melatonin tayini için kullanılmıştır.

Biyolojik moleküllerin ya da aktif bölgelerinin yapay polimerlerin omurgalarına entegrasyonu ile tipik biyomoleküllerin biyotanıma özelliklerini biyo-taklit etme işlemi gerçekleştirilebilir. Amino asitlerin kalıntı grupları, geniş bir yelpazedeki biyolojik yapının fonksiyonel özelliklerinin ve oldukça seçici substrat bağlama kabiliyetinin merkezinde yer almaktadır. Böylelikle bu çalışmanın ikinci kısmında, L-Histidin amino asitinin polimerleşebilen türevi olan N-metakriloil-L-histidin (MAH) sentezlenmiştir. Elde edilen işlevsel monomer (N-metakriloil-L-histidin) polivinil alkol varlığında ayarlanabilen gözenekli bir yapının eldesi için altın bir yüzey üzerinde polimerleştirilmiştir. Kontrol amaçlı olarak, gözenek yapısına sahip olmayan ve fonksiyonel olmayan polimerik yapılar (MAH ve PVA varlığında ve yokluğunda) sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerik filmlerinin yüzey morfolojisinin karakterizasyon için taramalı elektron (SEM) ve atomik kuvvet (AFM) mikroskopları kullanılmıştır. Polimerik filmin Cu(II) iyonlarına ait belirgin afinitesinin gösterimi için elektrokimyasal davranışı da diferansiyel puls voltametri (DPV) ile incelenmiştir. Ayrıca, önerilen stratejinin kuvars kristal mikroterazi (QCM) elektrot yüzeyinde gerçek zamanlı supramoleküler yapının kendiliğinden düzenlenmesinde uygulanabilirliği gösterilmiştir.

DNA genetik bilginin taşınmasındaki ve bu genetik bilginin protein sentezinde merkezi role sahip olmasının yanında ayrıca nükleotidler olarak adlandırılan tekrarlayan birimlerden oluşan doğal bir biyopolimerdir. Biyolojik işlevlerinin yanı sıra sahip olduğu fiziksel ve kimyasal özellikleri ile biyoanaliz, DNA bilgisayarı, DNA nanoteknoloji ve nanotıp gibi alanlarda kullanılmak üzere kovalent olmayan hidrojen bağları ile tamamlayıcı DNA sarmallarının kendi kendine eşleşmesi taklit edebilen farklı özellikte işlevsel malzemelerin geliştirilmesinde kullanılabilir. Bu bağlamda, tez çalışmasının bu kısmında, DNA'dan esinlenerek adenin, timin ve guanin gibi bazların (oluşturdukları hidrojen bağları DNA yapısını stabilize ederler) benzotriazolmetakrilat ile polimerleşebilen türevleri sentezlenmiştir. Böylelikle, metakriloilamidoadenin (MA-Ade), metakriloilamidoguanin (MA-Gua) ve metakriloilamidotimin (MA-Thy) monomerleri sentezlenmiş ve nükleotid işlevselliği taşıyan akrilamit temelli doğrusal polimerik omurgalar hazırlanmıştır. Sonrasında sentezlenen doğrusal polimerler (poli-Ade, poli-Gua, poli-Thy) camı karbon elektrot

üzerinde grafen (iletkenliğin artırılması amacıyla) ile etkileştirilip değişen sıcaklık ile ayarlanabilen/programlanabilir elektrotların geliştirilmesinde kullanılmıştır. Sıcaklığın ve tarama hızının etkisinin belirlenmesi amacıyla bazı spektroskopik ve impedimetrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Son olarak da interpolimerik sistemdeki sıcaklığa bağlı olarak değişen geçişi (aç-kapa arayüzeyler) spektrofotometrik ölçümler (sıcaklık kontrollü salınım çalışması için) gerçekleştirilmiştir. Kontrollü salınım çalışmalarında triptofan kullanılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoesinlenmiş nanomalzemeler, moleküler baskılama, QCM, DPV, aç-kapa elektrotlar.

## **ABSTRACT**

### **DEVELOPMENT AND APPLICATIONS OF BIOINSPIRED NANOMATERIALS FOR METABOLITE DETECTION**

**Erdoğan ÖZGÜR**

**Doctor of Philosophy, Department of Chemistry**

**Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ**

**Co-Supervisor: Doç. Dr. Lokman UZUN**

**December 2016, 139 pages**

The thesis consists of three main sections: i) synthesis of fluorescent molecular imprinted melatonin nanoparticles; ii) synthesis of functional nanofilms for designing bioinspired sensor surfaces; iii) DNA inspired gatekeeper for developing switchable electrodes.

Smart polymerisable terbium(III) complex-based fluorescent molecular imprinted nanoparticles were synthesized for the quantitative determination of potential metabolic biomarkers. Melatonin was chosen as a model metabolite to demonstrate the MIP nanoparticle sensor. We exploited lanthanide ion complexes in our biosensing platforms due to their deeper penetration ability, negligible auto-fluorescence, lack of photo bleaching and photo blinking, and their sharp absorption and emission lines, long lifetime and extreme photo stability. Given the high affinity of lanthanide ions towards carboxylic acid groups, we used two amino acid-based functional monomers, N-methacryloyl-L-aspartic acid (MA-Asp) and N-methacryloyl-L-tryptophan (MA-Trp), to coordinate terbium(III) ions and melatonin, respectively. The fluorescent MIP nanoparticles were synthesized using miniemulsion polymerization technique after forming complexes between

terbium(III):MA-Asp and melatonin:MATrp molecules. The fluorescent MIP nanoparticles have been used for melatonin adsorption from aqueous solutions.

The integration of biological molecules or their active sites into a synthetic polymeric backbone is one possible way to achieve biomimicking of the recognition features typical of biological molecules, such as amino acids, peptides and nucleic acids. Amino acid residues are the origin of the functional properties and highly selective substrate-binding ability of many extended biological structures. In the second part of this study, a polymerizable derivative of an amino acid (L-histidine) was synthesized N-methacryloyl-L-histidine (MAH). Then, MAH was polymerized in the presence of polyvinyl alcohol (PVA) as a sacrificial polymer, to create a macroporous functional polymer on a gold surface. For control purposes, non-porous and non-functional polymers (with and without MAH and PVA) were also synthesized. Scanning electron (SEM) and atomic force (AFM) microscopies were used to characterize the surface morphology of the polymeric films on the gold surface. We systematically investigated the electrochemical behaviour of the polymeric films using differential pulse voltammetry (DPV), to demonstrate the significant affinity of the polymeric film for Cu(II) ions. And, the applicability of proposed strategy to form Cu(II) ion-mediated supramolecular self-assembly on a quartz crystal microbalance (QCM) electrode surface in real time was showed.

While DNA has the central role as carrier of genetic information and translation of the genetic code into proteins, it is also an inherently biopolymeric material consists of repeating units called as nucleotides. Besides its biological functions, DNA can be used in the construction of various functional materials via mimicking self-assembling of complementary DNA strands through non-covalent hydrogen bonds for the fields such as bioanalysis, DNA computing, DNA nanotechnology and nanomedicine due to its physical and chemical properties. Herein, inspired from DNA to synthesize polymerizable derivative of some bases (adenine, thymine and guanine) through a set of reactions with benzotriazole methacrylate (MA-Bt). By this way, new monomers methacryloyladenine (MA-Ade), methacryloylthymine (MA-Thy) and methacryloylguanane (MA-Gua) were obtained. Then, these monomers were polymerized with acrylamide to produce linear polymeric backbone carrying nucleotide functionalities. After that, each linear polymers (poly-Ade, poly-Gua, and poly-Thy) were complexed on the glassy carbon electrodes in presence of graphene



which was included to enhance conductivity to develop switchable electrodes in respect to change in ambient temperature. The effects of temperature and scan rate were evaluated while some spectrometric and impedimetric measurements were conducted for characterization purpose. Finally, spectrophotometry (temperature-controlled release study by using tryptophan) was performed to show the switchability of the interpolymeric system in respect to temperature.

**Keywords:** Bioinspired nanomaterials, molecular imprinting, QCM, DPV, switchable electrodes.

## TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde bilgi ve tecrübesinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye yol göstericiliği ve değerli katkılarından dolayı, ayrıca bioreg araştırma grubuna dahil olmama imkan verdiği için teşekkürü bir borç bilirim.

Teorik bilgi birikiminden pratik uygulamalara dek bütün süreçlerde bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, bana büyük anlayış, sabırla yaklaşan, yardım elini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Lokman Uzun'a,

Bilimsel katkı ve desteği için Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e, Prof. Dr. F.Sema Bektaş'a, Yrd. Dr. Erkut Yılmaz'a, Yrd. Dr. Fatma Yılmaz'a ve Prof. Anthony P.F. Turner'a,

Çalışmalarım boyunca bana destek olan arkadaşlarım Ahmet H. Demirçelik, Ali Derazshamsir, Bahar Ergün, Canan Armutcu Çorman, Çiğdem Çiçek, Deniz Türkmen, Duygu Çimen, Emel Tamahkar, Engin Bayram, Fatma Kartal, Gizem Ertürk, Gözde Baydemir, Gülsu Şener, Ilgım Göktürk, Işık Perçin Demirçelik, İlker Koç, Kemal Çetin, Mehmet Emin Çorman, Müge Andaç, Nilay Bereli, Onur Parlak, Recep Üzek, Sevgi Aslıyüce, Veyis Karakoç, Yeşeren Saylan'a,

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili eşim Sinem'e ve aileme,

Teşekkürler...

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ .....	4
2.1. Biyomimik ve Biyoesinlenmiş Nanomalzemeler .....	4
2.1.1. Moleküler Baskılama Tekniği .....	6
2.1.1.1. Moleküler Baskılama Tekniğinin Uygulama Alanları .....	12
2.1.2. Membran Mimikleri ve Kendiliğinden Oluşmuş Tek Tabakalar (SAM) .	13
2.1.3. Peptitler, DNA ve Yapay Çevredeki Doğal Reseptörler .....	15
2.1.4. Nanopartiküller (NPs), Nanoyapılı Malzemeler, Kuantum Noktacıklar (QDs) ve Kompozit Yapılar .....	18
2.1.4.1. Kuantum Noktalar (QDs) .....	20
2.1.4.2. Metal Nanoparçacıklar .....	21
2.1.4.3. Silikon Nanomalzemeler .....	22
2.1.4.4. Yüksek Enerji Dönüştürücü (up-conversion) Nanomalzemeler.....	24
2.1.4.5. Çok Fonksiyonlu Nanoparçacıklar .....	24
2.2. Mevsimsel Duygusal Bozukluk.....	28
2.2.1 Melatonin .....	33
2.2.1.1. Melatonin Biyosentezi ve Reseptörleri.....	34
2.2.1.2. Melatoninin Biyolojik Sıvılardaki Tayini .....	37
2.2.2. Serotonin ve Triptofan'ın SAD ile Bağlantısı .....	38
2.3. Yaygın Analitik Tayin Yöntemleri.....	39
2.3.1. Optik Yöntemler .....	39
2.3.1.1. Görünür Bölge ve Mor Ötesi (UV-VIS) Spektroskopisi.....	39
2.3.1.2. Fotoluminesan Spektroskopisi.....	40
2.3.1.3. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR).....	41
2.3.2. Kütle Temelli Yöntemler .....	42

2.3.2.1. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM) .....	42
2.3.3 Elektrokimyasal Yöntemler .....	45
2.3.3.1. Dönüşümlü Voltametri (CV) .....	45
2.3.3.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV).....	47
2.3.3.3. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) .....	48
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	49
3.1. Melatonin Baskılanmış Floresans Nanopartiküllerin Tasarımı, Üretimi Ve Mevsimsel Duygusal Bozukluk Teşhisinde Kullanımının İncelenmesi .....	49
3.1.1. Kimyasal Malzemeler .....	49
3.1.2. Metakriloil amido-benzotriazol (MA-Bt) Sentezi .....	49
3.1.3. N-Metakriloil-L-Triptofan (MATrp) Monomerinin Sentezi.....	50
3.1.4. N-Metakriloil-L-Aspartik Asit (MAAsp) Monomerinin Sentezi .....	50
3.1.5. Tb(III)MAAsp <sub>3</sub> Floresans Kompleksin Hazırlanması .....	50
3.1.6. Moleküler Baskılanmış Floresans Nanopartiküllerin Üretilmesi .....	51
3.2. Biyoesinlenilmiş Sensör Yüzeylerinin Tasarımına Yönelik Polimerik Filmlerin Üretimi.....	53
3.2.1. Kimyasal Malzemeler .....	53
3.2.2. N-Metakriloil-L-Histidin (MAH) Monomerin Sentezi.....	53
3.2.3. N-Metakriloil-L-Sistein (MAC) Monomerin Sentezi.....	53
3.2.4. Biyoesinlenilmiş Gözenekli Polimerik Filmlerin Üretimi .....	54
3.2.4.1. Altın Kaplanmış Silika Plaka Yüzeylerinin Temizlenmesi.....	54
3.2.4.2. Aminoasit Temelli Gözenekli Polimerik Filmin Sentezi .....	54
3.2.4.3. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM) Elektrotların Hazırlanması .....	55
3.3. DNA Mimetik Sıcaklık Duyarlı Aç-Kapa Biyoarayüzeyler .....	57
3.3.1. Kimyasal Malzemeler .....	57
3.3.2. Nükleotid Temelli Monomerlerin Sentezi.....	57
3.3.3. DNA Mimetik Lineer Polimerlerin Sentezi .....	57
3.3.4. Sıcaklık Kontrollü (Aç-Kapa) Elektrotların Yüzeylerinin Hazırlanması..	58
3.3.4.1. Elektrotların Yüzeylerinin Temizlenmesi .....	58
3.3.4.2. Elektrotların Yüzeylerinin Nükleotid Temelli Polimer ile Kaplanması .....	58
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	60
4.1. Melatonin Baskılanmış Floresans Nanopartiküllerin Tasarımı, Üretimi Ve Mevsimsel Duygusal Bozukluk Teşhisinde Kullanımının İncelenmesi .....	60

4.1.1. N-Metakriloil-L-Triptofan (MATrp) Monomerin Karakterizasyonu .....	60
4.1.2. N-Metakriloil-L-Aspartik Asit (MAAsp) Monomerin Karakterizasyonu ..	61
4.1.3. Tb(III)(MAAsp) <sub>3</sub> Floresans Kompleksinin Karakterizasyonu.....	62
4.1.4. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi .....	63
4.1.5. Zeta Boyut Analizi .....	64
4.1.6. Floresans Nanopartiküllerle Melatonin Tayini .....	65
4.1.6.1. Melatonin Derişiminin Etkisi .....	66
4.1.6.2. pH Etkisi .....	67
4.1.6.3. İyonik Şiddetin Etkisi.....	68
4.1.6.4. Etkileşim Süresinin Etkisi.....	69
4.1.6.5. Sıcaklığın Etkisi .....	70
4.1.7. Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi .....	70
4.2. Biyoesinlenilmiş Sensör Yüzeylerinin Tasarımına Yönelik Polimerik Filmlerin Üretimi.....	74
4.2.1. N-Metakriloil-L-Histidin (MAH) Monomerin Karakterizasyonu .....	74
4.2.2. N-Metakriloil-L-Sistein (MAC) Monomerin Karakterizasyonu .....	75
4.2.3. Polimerik Filmlerin Karakterizasyonu .....	76
4.2.3.1. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Görüntüleri .....	76
4.2.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Görüntüleri.....	78
4.2.4. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) Ölçümleri.....	79
4.2.5. Seçicilik ve Tekrarlanabilirlik .....	84
4.2.6. QCM Sensörle Kinetik Analizler .....	86
4.3. DNA Mimetik Sıcaklık Duyarlı Aç-Kapa Biyoarayüzeyler .....	90
4.3.1. Nükleotid Temelli Polimer Monomerlerin FTIR- ATR Karakterizasyonu90	
4.3.2. Nükleotid Temelli GCE'ların Elektrokimyasal Karakterizasyonu .....	92
4.3.3. DNA Mimetik Biyoarayüzey'den L-Triptofan Salınımının İncelenmesi .	100
KAYNAKLAR.....	104
ÖZGEÇMİŞ .....	121

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. En yaygın kullanılan polimer sistemleri ve uygulama örnekleri [38]..	10
Çizelge 2.2. Doğal tanıma elemanlarının moleküler baskılanmış yapılar ile karşılaştırılması [61]. .....	12
Çizelge 2.3. SAD'ın klinik belirtilerinin ve semptomlarının görülme sıklığı [170]. ...	29
Çizelge 4.1. Seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları. ....	73
Çizelge 4.2. Şekil 4.25d'ye ait farklı sıcaklıktaki tarama hızı değerleri .....	96

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Moleküler baskılanmış polimerin sentezinin şematik gösterimi. a) fonksiyonel monomerlerin (yeşil) analit (kırmızı) çevresinde uygun yönleneşi, b) çapraz bağlayıcılar (gri) varlığında fonksiyonel monomer üzerinden polimerizasyon ve c) analitin uzaklaştırılmasıyla analit yapıya özgü kavitelere sahip moleküler baskılanmış polimer [38].....	7
Şekil 2.2. (a) Kovalent ve (b) non-kovalent yaklaşım [42].....	9
Şekil 2.3. (a) Geleneksel yığın baskılama, (b) yüzey baskılama, (c) epitop baskılama, (d) antikör maskeleye, (e) ara katman [38]. ....	11
Şekil 2.4. NP'lerin yüzey modifikasyonunda kullanılan yaklaşımlar [119].....	20
Şekil 2.5. a) Anten Etkisi, b) Eu ve Tb komplekslerinin lüminesan 4f-4f geçişleri.	27
Şekil 2.6. Işık üniteleri [170].....	31
Şekil 2.7. Melatonin biyosentezi. ....	35
Şekil 2.8. Melatonin salınımının fizyolojisi [207]. ....	36
Şekil 2.9. Jablonski diyagramı ve fotofiziksel süreçlerin zaman çizelgesi [111]....	40
Şekil 2.10. Piezoelektrik etkinin şematik gösterimi. ....	43
Şekil 2.11. AT kesim kuvars kristal düzlemi [236].....	44
Şekil 2.12. Dönüşümlü voltametik uyarma sinyali [241]. ....	46
Şekil 2.13. Tersinir redoks sürecine ait tipik dönüşümlü voltamogram [241]. ....	46
Şekil 2.14. Differansiyel puls polarografisi için uyarma sinyalleri [241].....	48
Şekil 3.1. Spesifik melatonin tayinine yönelik Tb(III) kompleksi içeren moleküler baskılanmış floresans nanopartiküllerin şematik gösterimi.....	52
Şekil 3.2. Gözenekli aminoasit işlevselliğine sahip polimerik filmin altın yüzeyde sentezinin şematik gösterimi. ....	55
Şekil 3.3. Kuvars kristal mikroterazi elektrot yüzeyinde aminoasit temelli gözenekli yapıya sahip polimerik filmin sentezi ve supramoleküler yapının kendiliğinden düzenlenmesinin şematik gösterimi.....	56
Şekil 4.1. MATrp'nin FTIR-ATR spektrumu. ....	61
Şekil 4.2. MAAsp'ın FTIR-ATR spektrumu. ....	62
Şekil 4.3. Tb(III)(MAAsp) <sub>3</sub> kompleksinin floresans spektrumu. ....	63
Şekil 4.4. Melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin AFM görüntüsü. ....	64

Şekil 4.5. Melatonin a) baskılanmış ve b) baskılanmamış nanopartiküllerin zeta boyut analizleri. ....	65
Şekil 4.6. a) Melatonin derişiminin etkisi ve b) derişim-sinyal doğrusallığı. ....	67
Şekil 4.7. pH etkisi (0.03 ng/mL melatonin derişimi, 748 nm'deki emisyon şiddeti). ....	68
Şekil 4.8. İyonik şiddetin etkisi (0.03 ng/mL melatonin derişimi, 748 nm'deki emisyon şiddeti). ....	69
Şekil 4.9. Etkileşim süresinin etkisi (0.03 ng/mL melatonin derişimi, 748 nm'deki emisyon şiddeti). ....	69
Şekil 4.10. Sıcaklığın Etkisi (0.03 ng/mL melatonin derişimi, 748 nm'deki emisyon şiddeti).....	70
Şekil 4.11. a) Melatonin baskılanmış, b) baskılanmamış floresans NPs seçiciliğinin belirlenmesi. ....	72
Şekil 4.12. MAH'a ait FTIR-ATR spektrumu. ....	75
Şekil 4.13. MAC'a ait FTIR-ATR spektrumu. ....	76
Şekil 4.14. Polimerik filmlerin SEM görüntüleri a) aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film, b) sadece aminoasit işlevselliğine sahip polimerik film, c) sadece gözenekli yapıya sahip polimerik film. ....	77
Şekil 4.15. AFM görüntüleri a) aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film ve b) sadece aminoasit işlevselliğine sahip polimerik film. ....	78
Şekil 4.15'in devamı. ....	79
Şekil 4.16. Farklı pH değerlerinde aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film ile gerçekleştirilen Cu(II) adsorpsiyonuna ait DPV voltamogramları (tarama hızı, 10 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı; Cu(II) derişimi 10 nM). ....	80
Şekil 4.17. İnkübasyon zamanının Cu(II) adsorpsiyonuna etkisine ait DPV voltamogramları (tarama hızı, 10 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı; 10 nM Cu(II) asetat tamponu içinde (pH: 5.0, 10 mM)). ....	81
Şekil 4.18. Aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film ile gerçekleştirilen Cu(II) adsorpsiyonu ait a) DPV voltamogramı (tarama hızı, 10 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı;120 saniye inkübasyon süresi; pH: 5.0 asetat tamponu (10mM)), b-c) derişim-sinyal doğrusallığı. ....	82
Şekil 4.19. DPV cevapları (tarama hızı, 10 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı; 120 saniye inkübasyon süresi; pH: 5.0 asetat tamponu (10 mM)). a)	



Aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film, b) sadece aminoasit işlevselliğine sahip polimerik film, c) sadece gözenekli yapıya sahip polimerik film, d) farklı özellikteki polimerik filmlerin DPV cevaplarının karşılaştırılması. ....	83
Şekil 4.19'un devamı. ....	84
Şekil 4.20. Supramoleküler yapının kendiliğinden oluşumuna ait seçiciliği ve tekrarlanabilirliği, a) Cu(II) iyonları koordinasyonunun dört farklı biyomolekülün düzenleme seçiciliği üzerine etkisi, b) Cu(II) iyonları koordinasyonunun supramoleküler yapının kendiliğinden oluşumuna etkisi, c) metal iyonlarının türünün ve derişiminin etkisi, d) Cu(II) iyonları/biyomoleküller ve Cu(II) iyonları/polimerik film arasındaki etkileşimlerin tekrarlanabilirliği. ....	86
Şekil 4.21. Cu(II) çözeltileri (pH: 5.0 asetat tamponu, 10 mM) ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı $\Delta F$ değerini gösteren sensorgramlar...	87
Şekil 4.22. a) Cu(II) adsorpsiyonu aracılığıyla gerçekleşen IgG adsorpsiyonu, b) Cu(II) adsorpsiyonu olmaksızın gerçekleşen IgG adsorpsiyonu, c) Cu(II) adsorpsiyonu varlığında/yokluğunda gerçekleştirilen IgG adsorpsiyonun karşılaştırılması. ....	88
Şekil 4.22'in devamı. ....	89
Şekil 4.23. i) N-Metakriloil-Adenin, ii) N-Metakriloil-Guanin, iii) N-Metakriloil-Timin monomerlerinin FTIR-ATR spektrumları.....	91
Şekil 4.23'nin devamı. ....	92
Şekil 4.24. a) 20° - 60°C sıcaklık aralığında 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ve 0.1 M $\text{KCl}_{(\text{aq})}$ çözeltisi içinde alınan grafen/ poli-Ade/ poli-Thy) ile modifiye edilmiş elektroda ait CV voltamogramları (Tarama hızı, 100 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı), b) elektroaktif yüzey alanın sıcaklığa bağlı değişimi (eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır), c) anodik pik akımının sıcaklığı bağlı değişimi (a grafiğindeki değerler esas alınarak), d) 30-40°C sıcaklık aralığında 2°C'lik tarama yapılarak hesaplanan pik akım yoğunluğu. ....	93
Şekil 4.25. Grafen/ poli-Ade)/ poli-Thy) ile modifiye edilmiş elektroda ait CV voltamogramları (10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ve 0.1 M $\text{KCl}_{(\text{aq})}$ çözeltisi içinde) a) 20°C, b) 30°C, c) 40°C d) farklı sıcaklıklardaki tarama hızının katodik ( $I_{pc}$ ) ve anodik ( $I_{pa}$ ) piklere etkisi. (Tarama hızı, 2-300 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı). ...	96
Şekil 4.26. CV voltamogramları (10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ve 0.1 M $\text{KCl}_{(\text{aq})}$ çözeltisi içinde) a) boş GCE, b) grafen ile modifiye edilmiş, c) grafen/ poli-Ade ile modifiye	

edilmiş GCE, d) grafen/poli-Ade/poli-Gua ile modifiye edilmiş GCE ve e) tüm elektrolardaki akım yoğunluğunun sıcaklığa bağlı değişimi (Tarama hızı, 100 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı). .....	97
Şekil 4.27. a) Boş GCE, grafen ile modifiye edilmiş, grafen/ poli-Ade ile modifiye edilmiş GCE, grafen/poli-Ade/poli-Gua ile modifiye edilmiş GCE ait empedans değerleri, b) grafen/poli-Ade/poli-Thy ile modifiye edilmiş GCE ait empedans değerleri, c) grafen/poli-Ade/poli-Thy ile modifiye edilmiş GCE ait yük transfer direnç değerleri (10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ve 0.1 M $\text{KCl}_{(\text{aq})}$ çözeltisi içinde).....	99
Şekil 4.28. Grafen/poli-Ade)/poli-Thy) ile modifiye edilmiş GCE ile L-triptofan salınımının incelenmesi a) derişimin etkisi, b) zamanın etkisi (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sulu L-triptofan çözeltisi), c) sıcaklığın etkisi (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sulu L-triptofan çözeltisi).....	101
Şekil 4.28'nin devamı. ....	102
Şekil 4.29. Geliştirilen DNA mimetik fermuar benzeri akıllı biyoarayüzeyden L-triptofan salınım mekanizması.....	103

# 1. GİRİŞ

Doğal süreç ve yapılar tarafından sağlanan işlevlerin anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalar giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Minyatürleştirme (nesnelerin temel işlevlerini küçük bir hacimde gerçekleştirebilmesi), komplementer olasılık ve işlevlerin optimizasyonuna yönelik organik-anorganik bileşenler arasındaki hibritleşme ve hiyerarşik yapılanmalarındaki gelişmişlik olağanüstü işlevlerinin başlıca kaynağıdır. Doğadaki nesne ve süreçler tarafından sağlanan işlevlerin altında yatan mekanizmanın anlaşılması farklı işleve sahip nanomalzemeleri, nanoaygıtları ve süreçleri geliştirilmesinde rehberlik edebilir. Doğadan esinlenerek türetme veya biyolojik olarak esinlenmiş tasarım (ya da adaptasyon) biyoesinlenme/biyomimetik olarak tanımlanmaktadır. Doğada bulunan çeşitli nesnelerin biyolojik fonksiyonlarının, yapılarının ve ilkelerinin anlaşılması ve sentetik malzemelere aktarılmasını içeren biyomimetik, kimya, fizik, biyoloji ve malzeme bilimi vs. gibi farklı alanları bünyesinde barındıran oldukça disiplinlerarası bir alandır. Ayrıca nanobilim ve nanoteknolojideki gelişmelerin getirdiği yenilikler ile biyolojik sistemleri taklit eden yeni nanomalzemelerin üretim ve tasarımı mümkün kılmaktadır.

Biyolojik sistemlerdeki oldukça yüksek tanıma mekanizması, yaşamı yöneten temel biyolojik işlevlerden birisidir. Spesifik tanıma mekanizmasının taklit edilebilmesi yeni biyoesinlenmiş yapay malzemelerin geliştirilmesinde kilit noktasıdır. Çünkü enzimin substratına, antikorun antijenine, bir hormonun kendine ait reseptöre ve bir virüsün konakçı hücreye bağlanması gibi tüm biyolojik süreçler spesifik moleküler tanıma mekanizması üzerinden gerçekleşmektedir.

Moleküler baskılama tekniği biyolojik süreçlerdeki spesifik tanıma mekanizmasını polimerik yapılara aktaran oldukça umut vaat eden yaklaşımdır. Hedef analiti yapısal ve boyutsal olarak tanıyabilen polimerik yapıların üretilmesine olanak sağlamaktadır. Bunun yanında nükleik asitler, amino asitler gibi biyolojik yapıların nanoyapılara entegre edilmesi, biyolojik membranlardaki tanıma mekanizmasının polimerik yapılara aktarılması biyoesinlenmiş malzemelerin geliştirilmesindeki diğer yaklaşımlardır.

Biyomoleküllerin floresans tanınması için çok fonksiyonlu nanopartiküllerin hazırlanması amacıyla moleküler baskılama, nanopartiküllerin (yüksek yüzey-hacim

oranı nedeniyle geliştirilmiş spesifik yüzey alanı) ve lantanit komplekslerinin (benzersiz floresans özellikleri) avantajlarının birleştirilmesiyle, melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin sentezi ve mevsimsel duygu bozukluklarının biyolojik belirteci olan melatonin hormonunun tayininde biyosensör ve/veya biyogörüntüleme amaçlı kullanımının incelenmesi, sunulan tezin ilk kısmını oluşturmaktadır. Mevsimsel duygusal bozukluk (seasonal affective disorder, SAD) her yılın aynı döneminde ortaya çıkan yinelenen depresyonlarla karakterize edilen bir sendrom olarak tanımlanmıştır. Genellikle kış depresyonu ile eşleştirilen mevsimsel duygusal bozukluk sonbahar-kış aylarında başlayan ve ilkbahar-yaz aylarında remisyon gösteren mevsimsel özellikli sendromdur. Bu kapsamda, lantanit iyonu içeren nanopartiküller moleküler baskılama tekniği kullanılarak sentezlenmiştir. Melatonin hormonu, moleküler baskılama tekniğinde kalıp molekül olarak kullanılmıştır. Böylelikle hem floresans hem de moleküler baskılamanın birleştirilmesiyle elde edilecek sinerjiyle melatonin hormonu belleklerine (kalıp molekül melatoninini hem kimyasal, hemde üç boyutlu yapısını tanıyan) sahip floresans nanopartiküller elde edilmiştir. Önerilen polimerizasyon stratejisinin, polimerlere floresans bileşenin katılımıyla ilgili kronik problemleri çözmede ve floresans nanopartiküllerin seçici ayırma ve floresans izleme amaçlı kullanımın potansiyeli belirlenmiştir.

Tez çalışmasının ikinci kısmında ise aminoasitlerin yapısı ve işlevlerinden esinlenilmiştir. Bu kapsamda kimyasal/biyokimyasal tanıma uygulamalarına yönelik yeni işlevsel malzemelerin geliştirilmesinin ve tasarlanmasının amino asit, peptit ya da nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerin tanıma mekanizmalarının biyotaklit edilmesi araştırılmıştır. Biyolojik moleküllerin ya da aktif bölgelerinin yapay polimerlerin omurgalarına entegrasyonu ile bu biyo-taklit işlemi gerçekleştirebilir. Bu amaçla sunulan tezin ikinci kısmında bir amino asitin (L-Histidin) polimerleşebilen türevi sentezlenmiştir. Elde edilen işlevsel monomer (N-metakriloil-L-histidin) 2-hidroksietilmetakrilat ile polivinil alkol varlığında (ayarlanabilen gözenekli bir yapının eldesi için) altın bir yüzey üzerinde polimerleştirilmiştir. Aminoasit temelli polimerleşebilen fonksiyonel monomerlerin sentezlenmesiyle protein, enzim vb. gibi pek çok biyomolekülün oldukça seçici bağlanma özelliği sentetik polimerlere [(poli(2-hidroksietilmetakrilat)] (pHEMA)) aktarılmıştır. Böylelikle biyomoleküllerdeki

tanıma mekanizması taklit edilmiş ve sentezlenen polimerler supramoleküler yapının kendiliğinden düzenlenmesi için kullanılmıştır.

Tez çalışmasının üçüncü kısmında ise deoksiribonükleik asit (DNA) yapısından faydalanılmıştır. DNA genetik bilginin taşınmasındaki ve bu genetik bilginin protein, RNA ve hücrenin diğer bileşenlerinin sentezinde merkezi role sahip olmasının yanında ayrıca nükleotidler olarak adlandırılan tekrarlayan birimlerden oluşan doğal bir biyopolimerdir. Biyolojik işlevlerinin yanı sıra sahip olduğu fiziksel ve kimyasal özellikleri ile biyoanaliz, DNA bilgisayarı, DNA nanoteknoloji ve nanotıp gibi alanlarda kullanılmak üzere kovalent olmayan hidrojen bağları ile tamamlayıcı DNA sarmallarının kendi kendine eşlemesi taklit edebilen farklı özellikte işlevsel malzemelerin geliştirilmesine artan bir ilgi söz konusudur. Bu bağlamda, tez çalışmasının bu kısmında, DNA'dan esinlenerek adenin, timin ve guanin gibi bazların (oluşturdukları hidrojen bağları DNA yapısını stabilize ederler) benzotriazolmetakrilat ile polimerleşebilen türevleri sentezlenmiştir. Böylelikle, metakriloilamidoadenin (MA-Ade), metakriloilamidoguanin (MA-Gua) ve metakriloilamidotimin (MA-Thy) monomerleri sentezlenmiş ve nükleotid işlevselliği taşıyan doğrusal polimerik omurgalar hazırlanmıştır. Sonrasında sentezlenen doğrusal polimerler (poliAde, poliGua, poliThy) camı karbon elektrot üzerinde grafen (iletkenliğin artırılması amacıyla) ile etkileştirilip değişen sıcaklık ile ayarlanabilen/programlanabilir elektrotların geliştirilmesinde kullanılmıştır. Sıcaklığın ve tarama hızının etkisinin belirlenmesi amacıyla bazı spektroskopik ve impedimetrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Son olarak da interpolimerik sistemdeki sıcaklığa bağlı olarak değişen geçişi (aç-kapa arayüzeyler) spektrofotometrik ölçümler (sıcaklık kontrollü salınım çalışması için) ve işlemsel hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Kontrollü salınım çalışmalarında mevsimsel duygu bozukluklarının biyolojik belirteci olan melatonin hormonunun öncü molekülü triptofan kullanılmıştır.

Sonuç olarak, tez kapsamında üç farklı biyoesinlenme (moleküler baskılama, DNA-benzeri yapılar, amino asit içeren malzemeler) geliştirilmiş ve floresans, elektrokimyasal ve kütle duyarlı sensörler gibi farklı tayin yöntemlerinde kullanımı araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Biyomimik ve Biyoesinlenmiş Nanomalzemeler

Yeryüzünde yaşamın başladığı andan itibaren, doğa mükemmel özelliklere sahip ve akıllı davranışlar sergileyen biyomalzemeler geliştirmektedir. Oluşan biyomalzemelerin sadece üstün performansları değil, aynı zamanda oluşum ve işlenme süreçlerinin oda sıcaklığında ve sulu ortamda canlı organizmalar için kullanılabilir kimyasal kaynakların çok kısıtlı tedarikiyle oluşumları malzeme bilimcileri hayran bırakmıştır. Oluşan bu biyomalzemelerin yapı taşları her zaman ileri düzeyde hiyerarşik bir düzen içinde organize olmuştur [1]. Doğanın geliştirdiği biyomalzemelerin makro boyuttan moleküler boyuta kadar olan bu hiyerarşik özelliklerinin anlaşılması arzu edilen özelliğe sahip pek çok nanomalzemenin, nanoaygıtın ve sürecin üretilmesine rehberlik etmiştir. Biyolojik esinlenme/uyum veya doğadan esinlenerek türetme biyomimetik ya da biyoesinleme olarak adlandırılmaktadır. Doğayı ya da biyolojiyi taklit etmek anlamına gelmektedir. “Biyomimetik” yunanca kökenli “bimimesis” kelimesinden türemiştir. Biyonik, biyomimik gibi diğer kelimelerde aynı anlamda kullanılmaktadır [2]. Bu bağlamda biyomimetik biyolojik süreçlerin, yapıların ve doğada bulunan çeşitli nesnelere ilkelerinin biyologlar, fizikçiler, kimyagerler ve malzeme bilimciler tarafından anlaşılmasını gerektiren oldukça yüksek disiplinlerarası bir alandır. Böylelikle çeşitli malzemelerin tasarımı, geliştirilmesi ve ticari açıdan önem taşıyan aygıtların üretimi bu şekilde doğadan biyoesinlenerek gerçekleştirilmiştir [2].

Biyolojik bileşenlerin moleküler seviyeden başlayarak nano-boyutta, mikroboyutta ve makroboyutta kendiliğinden düzenlenmesiyle oluşan biyolojik sistemin taklit edilmesi, biyoesinlenmiş malzemelerin olağanüstü fonksiyonlarının başlıca kaynağıdır. Ancak biyolojik sistemlerin hiyerarşik yapılarının gelişmişliği çoklu işlevsellik sunarken, biyoesinlenmiş malzemelerin geliştirilmesi esnasındaki yapay kontrol mekanizmaları henüz belirli özellikte malzemelerin tasarımına olanak sunmaktadır [3].

Doğal nesnelere çeşitli özelliklerinin sırrı nanoboyutta gizlenmektedir. 1990'ların başından günümüze nanobilim ve nanoteknolojideki yenilikler, çevre mühendisliğinden biyomedikal alana ve yüksek enerji depolamanın yanı sıra temel bilimlere kadar uygulama alanı edinmekle birlikte biyoesinlenmiş nanoüretim tekniklerinin geliştirilmesini de oldukça ivmelendirmiştir [1, 4]. Karbon nanotüpler

(CNTs), grafen, fulleren, polimerik nanopartiküller, metal-organik nanomalzemeler, kendiliğinden oluşmuş ya da supramoleküler nano yapılar ve bunların türevleri geliştirilen fonksiyonel nanomalzemelerin bazılarıdır. Katalitik aktivite, dielektrik, optik ve mekanik gibi kendine mahsus fizikokimyasal özellikleri sayesinde sensör, ilaç salımı, proteom analizi ve biyomoleküler elektronik gibi alanlarda uygulamaları hızla artmaktadır. Özellikle, biyolojik uygulamalarının veziküller, virüsler ve hücreler gibi biyomoleküler sistemlerin temelinde yatan işleyişi anlamada sağladığı faydalar ve biyolojik işlevi olan nanomalzemelerin tasarımını kolaylaştırmaktadır [4].

Biyolojik moleküllerin nanoboyutta kendiliğinden düzenlenmesiyle oluşan biyolojik sistemin taklit edilmesi biyoesinlenmiş nanomalzemelerin olağanüstü fonksiyonlarının başlıca kaynağıdır. Akıllı robotik cihazlar, çip üzeri organlar (organs-on-chips), canlı organizmaların homeostatik yeteneklerini taklit ederek kendiliğinden uyum ve düzen kurabilen yeni sınıf malzemeler ve organ mühendisliği ve ortopedik implantlara yönelik nanomalzemeler gibi biyomimik ve biyoesinlenmiş malzemelerin geliştirilmesinde geçtiğimiz on yılda muazzam ilerlemeler olmuştur [1, 5].

Substrat-reseptör bağlanması, substrat-enzim kenetlenmesi, çoklu protein kompleksleri, antikor-antijen immün cevabı, nörotransmitter sinyal iletimi, hücre tanınması ve genetik kodun okunması vs. gibi oldukça stereospesifik süreçler biyolojik sistemlerin temelini oluşturmaktadır. Tüm bu biyolojik süreçler, araştırmalara ilham kaynağı olmuş ve yeni buluşların önünü açmıştır. Gerçekten de yapay olarak üretilen bazı katalitik sistemler, hız ve seçicilik bakımından doğal sürece yakın cevaplar vermektedir. Siklodekstrinler, siklofanlar ve kaliksarenler kullanılarak etkin katalizörler geliştirilmiş ve moleküler tanıma duyarlı spesifik altbirimler olarak kullanılmıştır [6]. Redoks reaksiyonlarını düzenleyen ilkeler üzerindeki çalışmalar yeni yapay supramoleküler cihazlara ışık tutmuş ve daha etkin, seçici katalizörlerin geliştirilmesinin önünü açmıştır [7].

Biyolojik süreçlerdeki etkin tanıma süreci nanoboyutta stereospesifik tanımayı gerektirir (antikor, enzim, vb.). Kompleks yapıların inşası, topolojik çeşitlilik ve farklılık gösteren (nano/mikro/makro)moleküllerin üç boyutlu konformasyonuna bağlı olarak şekillenir. Mekanik, yoğunluk, geçirgenlik, renk ve hidrofobi gibi farklı özellikler arasında uzlaşımı sağlayabilen doğal yapılar (ya da biyoesinlenmiş yapılar) genellikle sensör platformlarından oluşan çok yönlü bir sistem ile kontrol

edilebilen oldukça yüksek entegre sistemlerdir. Pek çok biyosistemde böyle yüksek düzeydeki entegrasyon üç husus ile ilişiktir: *minyatürleştirme* (nesnelerin temel işlevlerini küçük bir hacimde gerçekleştirebilmesi), komplementer olasılık ve işlevlerin optimizasyonuna yönelik organik ve anorganik bileşenler arasındaki *hibritleşme* ve son olarak *hiyerarşi* [7]. Nano-, mikro- ve milimetre düzeyleri arasında değişen hiyerarşik yapılanma biyolojik yapıların fiziksel ve kimyasal olgulara karşı verdiği cevaplarda karakteristiktir [8].

Hiyerarşik düzene istinaden spesifik biyotanıma, geliştirilen biyoesinlenmiş yapıların hedef noktasıdır. Spesifik biyotanımanın (genel olarak biyoişlevsellik) altında yatan ilkelerin giderek anlaşılması kimya ve malzeme bilimlerinde oldukça dinamik bir alanın oluşmasına neden olup, doğadan esinlenerek oldukça duyarlı, spesifik ve dayanıklı tanıma elemanlarının geliştirilmesini mümkün kılmıştır. Bu tanıma elemanlarının geliştirilmesindeki yaklaşımları aşağıdaki şekilde sınıflandırmak mümkündür [9].

- (a) Moleküler baskılanma tekniği
- (b) Membran mimikleri ve kendiliğinden oluşmuş tek tabakalar (SAM)
- (c) Peptitler, DNAzimleri ve yapay çevredeki doğal reseptörler
- (d) Kompozit yapılar, nanopartiküller (NPs), nanoyapılı malzemeler ve kuantum noktacıklar (QDs)

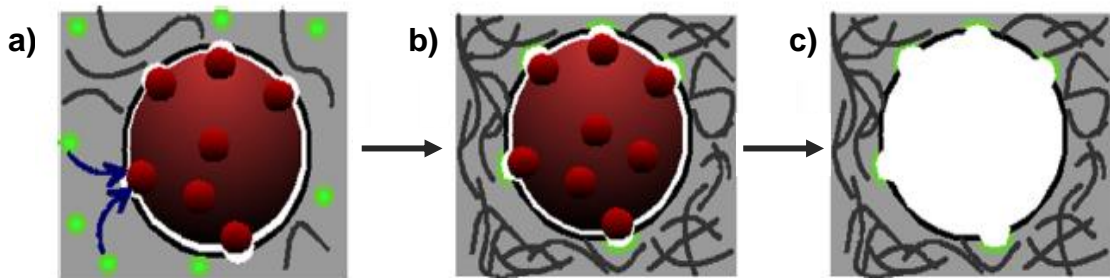
### **2.1.1. Moleküler Baskılama Tekniği**

Bir reseptör tarafından spesifik olarak tanınan moleküllerin tanı ve tayininde enzim ve antikolar analitik kimya ve biyokimyada yaygın olarak kullanılan biyomoleküllerdir. Ancak biyomoleküllerin kullanımı maliyetli olup uygulama alanları, doğal koşulların oluşturulması zorunluğu nedeniyle kısıtlı kalmaktadır. Geçtiğimiz birkaç on yılda, bilim insanları hedef analite spesifik bağlanan ve göreceli olarak yüksek afinitesi olan (doğal reseptörlere benzer), üretimi kolay ve daha düşük maliyetli yapay reseptörlerin geliştirilmesine yönelmişlerdir [10]. Bu bağlamda, "Moleküler Baskılama" bu tür yapay tanımayı mümkün kılan alternatif bir tekniktir. Wullf ve Sarhan 1972 yılında rasemik yapıları birbirinden ayırmak için enzim benzeri davranış sergileyen polimerik bir yöntem olarak tanımlamışlardır [11]. Moleküler baskılama yöntemi hedef analiti yapısal ve boyutsal olarak tanıyabilen bağlanma bölgelerine sahip yapay polimerik yapıların geliştirilmesini mümkün kılmaktadır. Bu bağlamda, hedef analitin polimerik yapı içinde baskılanmasıyla hedef analitin



spesifik tanınmasına yönelik tamamlayıcı fonksiyonlar polimerik yapay malzemeye aktarılmaktadır. Böylelikle elde edilen polimerik yapı moleküler tanımayla biyolojik seçiciliği taklit etmekte, ayrıca antikor ya da enzim gibi biyomoleküllere nazaran daha kararlı ve düşük maliyetli olmaktadır [12]. Biyomimetik yapıların hazırlanmasında umut verici bir yöntem olan moleküler baskılama tekniğiyle prensip olarak biyomakromoleküllerden iyonlara kadar uzanan yapılara özgü polimerler üretmek mümkündür [13-15]. Moleküler baskılama aminoasitler ve proteinler [16-18], nükleotit ve türevleri [19], kirleticiler [20, 21], hormonlar [22], ilaç ve gıda ürünleri [23, 24] gibi kimyasal ve biyolojik yapıların tayin ve teşhisinde çok yönlü ve gelecek vaat eden bir tekniktir [25]. Ayrıca, ayırma ve saflaştırma [20, 26-31], kimyasal/biyosensör [32], kataliz [33], ilaç salınımı [34] ve biyolojik antikorlar ve reseptör sistemleri [16, 35, 36] gibi alanlarda oldukça yaygın uygulamaları mevcuttur.

Moleküler baskılama tekniği, hedef analit ve fonksiyonel monomer (analite özgü fonksiyonel gruplara sahip) arasındaki moleküler tanıma temeline dayanmaktadır. Fonksiyonel monomerlerin analit çevresinde uygun yönelmesini takiben uygun özellikteki çapraz bağlayıcı varlığında gerçekleştirilen polimerizasyonla analite özgü spesifik tanıma bölgelerine (kavitelere) sahip çapraz bağlı moleküler baskılanmış polimerler (MIP) elde edilmektedir [37]. Polimerizasyon işleminden sonra, analitin polimerik yapıdan uzaklaştırılmasıyla oluşan kavite analite büyüklük, şekil ve fonksiyonel grupların yerleşimi açısından tamamlayıcıdır (Şekil 2.1).



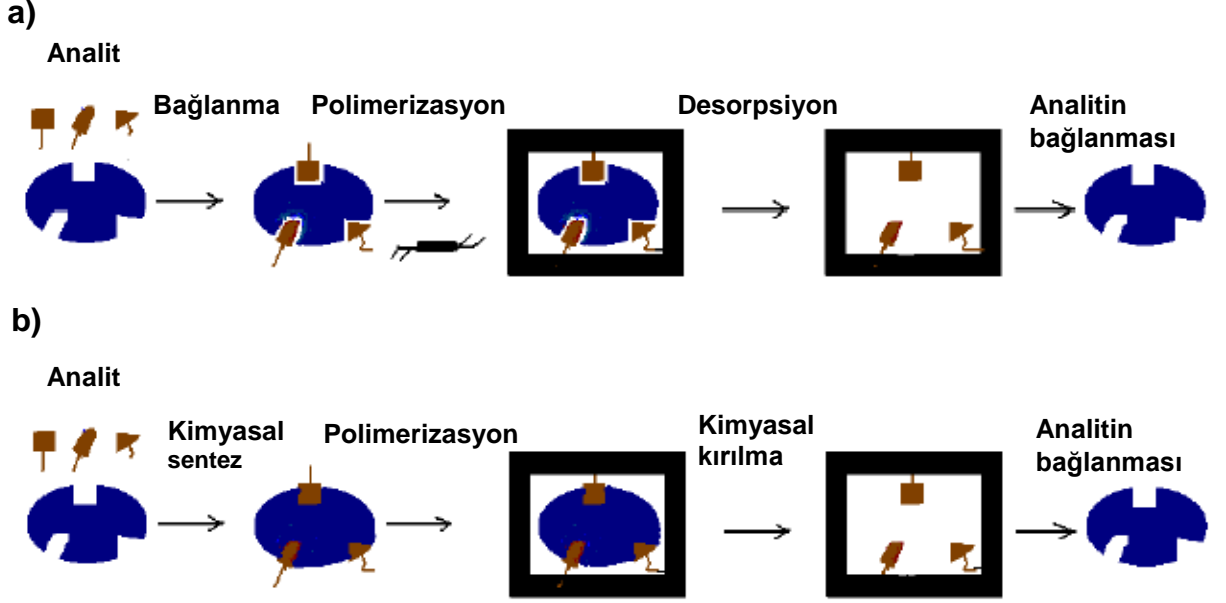
Şekil 2.1. Moleküler baskılanmış polimerin sentezinin şematik gösterimi. a) fonksiyonel monomerlerin (yeşil) analit (kırmızı) çevresinde uygun yönelmesi, b) çapraz bağlayıcılar (gri) varlığında fonksiyonel monomer üzerinden polimerizasyon ve c) analitin uzaklaştırılmasıyla analit yapıya özgü kavitelere sahip moleküler baskılanmış polimer [38].

Moleküler baskılama tekniği 3 basamakta gerçekleşir.

- I. *Ön kompleksleşme:*
- II. *Polimerizasyon*
- III. *Analitin uzaklaştırılması:*

Moleküler baskılanmış polimerin sentezinde analit ve fonksiyonel monomer arasında etkileşime göre kovalent, non-kovalent ve semi-kovalent olmak üzere üç yaklaşım kullanılmaktadır (şekil 2.2).

- *Ön-organizasyon* yaklaşımında, analit ve fonksiyonel monomer birbirine kovalent bağ ile bağlanmaktadır [39].
- *Kendiliğinden oluşum yaklaşımında*, analit ile fonksiyonel monomer arasında genellikle dipol-dipol etkileşimleri, hidrojen bağı, van der Waals etkileşimleri ve iyonik etkileşimler gibi non-kovalent ikincil etkileşimler hakimdir [40].
- *Semi-kovalent yaklaşımı da*, kovalent ve non-kovalent yaklallımların melezidir. Analit ve fonksiyonel monomer arasında polimerizasyon öncesinde kovalent bağlar kurulur ve polimerizasyon tamamlandıktan sonra analitin polimerik yapıdan uzaklaştırılmasından sonra analitin polimerik yapıya bağlanmasında kovalent ve non-kovalent etkileşimlerinden ikisi de görölür [41].



Şekil 2.2. (a) Kovalent ve (b) non-kovalent yaklaşım [42].

Önpolimerizasyon kompleksinin sentezine gerek olmaması, polimerizasyon sonrasında analitin polimerik matriksden genellikle daha kolay uzaklaştırılması, moleküler baskılanmış polimerde oluşturulan spesifik bağlanma bölgelerinde daha fazla işlevsellik eklenebilmesi non-kovalent yaklaşımı daha avantajlı hale getirmektedir [42]. Ayrıca, kovalent etkileşimlerin güçlü doğasından kaynaklanan termodinamik dengeye ulaşmaktaki zorluklar, yavaş bağlanma ve ayrılma gibi zorluklar non-kovalent yaklaşımı daha avantajlı hale getirmektedir [41].

Moleküler baskılama tekniğinde polimer seçimi de kritik etkenlerden biridir. Polimerlere olan gereksinim uygulamaya özgü olsa da, en yaygın kullanılan polimer sistemleri Çizelge 2.1’de özetlenmiştir. En önemli etken ise kullanılacak monomerin analit ile etkileşime girebilecek fonksiyonel gruplara sahip olmasıdır. Diğer bir etken de, analitin polimer ile etkin polimerizasyona katılmamasıdır. Bu açıdan bakıldığında biyomoleküllerin poliüretan yapısına baskılanmasında sorun teşkil etmektedir. Pek çok biyomolekülün yapısında var olan alkol ve amin gruplarının izotiyosiyonat monomerik birimleri ile tepkime vermesi bu tür istenmeyen duruma diğer bir örnektir [38]. Ayrıca, polimerik yapının yeterince çapraz bağlı olması gerekmektedir; çünkü, polimerik yapı içinde oluşan kaviteğin analit uzaklaştırıldıktan sonra kimyasal ve fiziksel yapısını koruması gerekmektedir. Kaviteğin aşırı esnek olması durumda analite benzer yapıların da bu bölgeye bağlanmasıyla seçicilik katsayısında önemli düşüş gözlemlenir. Küçük yapıların yüksek oranda çapraz bağlı polimerler ile iyi

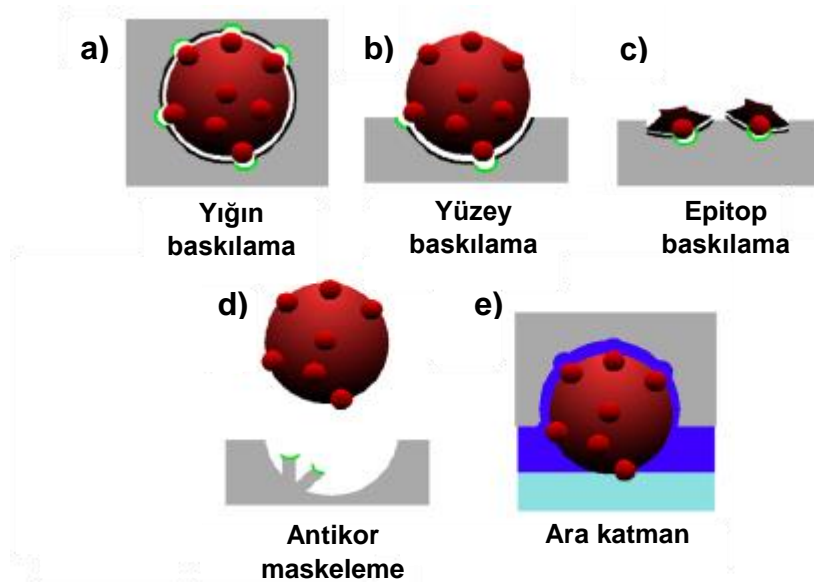
çalıştığı [43], buna karşılık büyük yapıların daha esnek polimerle iyi çalıştığı bilinmektedir [44, 45].

Çizelge 2.1. En yaygın kullanılan polimer sistemleri ve uygulama örnekleri [38].

Polimer	Uygulama	Yöntem	Kaynak
poliakrilat/	sensör,	yığın baskılama,	
polimetakrilat/	kromatografi,	yüzey baskılama,	[46-48]
polimetilmetakrilat	ilaç salımı	baskılanmış partiküller	
poliakrilamit	kromatografi, kristalizasyon	yığın baskılama	[49-51]
poliüretan	sensör	yüzey baskılama, ara katmanları	[52-55]
siloksan	kromatografi,	yüzey baskılama	[56]
sol-jel	kromatografi, sensör, kataliz	yığın baskılama	[57-60]

Moleküler baskılama tekniğinde analitin doğasına bağlı olarak farklı baskılama yaklaşımları geliştirilmiştir (Şekil 2.3). Polimerizasyon esnasında hedef analitin doğrudan monomer karışımına ilave edildiği yığın baskılama genellikle molekül ağırlığı birkaç atomik kütle birimi olan moleküller için kullanılmaktadır. Ancak, baskılanmış kavitelerin heterojen dağılımı, polimerik yapının içerisinde derin boşlukların oluşması, hedef analitin yapıdan tam olarak uzaklaştırılmaması, yavaş adsorpsiyon hızına ve kaviteler içerisinde olan difüzyonla sınırlanmış dinamiklere sebep olması bu yaklaşımın dezavantajlarıdır. Özellikle protein, virüs ya da mikroorganizma gibi biyotürlerin bir yüzeyde kendiliğinden düzenlenmesinin takiben monomer karışımını içeren diğer yüzeyin üzerine yerleştirilmesiyle yüzey baskılama yaklaşımı geliştirilmiştir. Böylelikle baskılama bölgeleri yüzeyde oluşturulmuş olup, yığın baskılamanın getirdiği kısıtlamalar bertaraf edilebilmektedir. Tüm yapı yerine sadece yapı için karakteristik olan bir bölgesinin baskılandığı yaklaşım da epitop baskılamadır. Bu yaklaşım hücre membran proteinleri gibi analit yüzeyindeki fonksiyonel grupların düzenlenmesinin değişken olduğu zaman oldukça avantajlıdır. Sadece analite karakteristik bölgenin baskılanmasıyla bağlanma afinitesini arttırmaktadır. Polimerik yapıya öncelikle analite özgü antikörlerin baskılanması ve

analitin başlangıç hedef olarak kullanılmadığı diğer bir yaklaşım antikor maskeleme yaklaşımıdır. Bu yaklaşım virüs ve hormon molekülleri gibi yapılar için oldukça seçici baskılanmış polimerlerin üretimini mümkün kılmaktadır. Diğer bir yaklaşımda kurban ara yaklaşımıdır. Bu yaklaşım ile hedef analit ile reaksiyona girebilecek polimerlerin kullanımını mümkün hale getirmektedir. Hedef analitin ile doğrudan baskılama işlemine katılmasından ziyade, analitin başka bir molekül ile oluşturduğu tek tabaka etkileşime tabi tutulur. Bu ara tabaka hem analit ile etkileşime girer ve bağlanma bölgelerini oluşturur diğer yandan da polimere kovalent olarak bağlanır. Böylelikle tanıma süreci daha iyi kontrol edilebilmektedir [38].



Şekil 2.3. (a) Geleneksel yığın baskılama, (b) yüzey baskılama, (c) epitop baskılama, (d) antikor maskeleme, (e) ara katman [38].

Baskılama sürecinde kullanılan analite özgü yüksek seçicilik ve afinite moleküler baskılanmış polimerlerin esas avantajlarıdır (Çizelge 2.2). Proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik sistemler ile karşılaştırıldığında baskılanmış polimerler daha yüksek fiziksel kararlılık, dayanıklılık; yüksek sıcaklık ve basınca karşı daha yüksek direnç ve asitlere, bazlara, metal iyonlarına ve organik çözücülere karşı daha yüksek kararlılık sergilemektedirler. Ayrıca, üretim maliyetleri daha düşük olup, raf ömürleri daha yüksektir ve spesifik tanıma kapasitelerine oda sıcaklığında birkaç yıl koruyabilirler [25].

Çizelge 2.2. Doğal tanıma elemanlarının moleküler baskılanmış yapılar ile karşılaştırılması [61].

	Doğal tanıma elemanları	Moleküler baskılanmış yapılar
Bağlanma afinitesi	Yüksek afinite/seçicilik	Doğal tanıma elemanları ile yarışan seçicilik ve afinite
Genelleme	Analit başına bir reseptör	Her tür analit için geliştirilebilir
Dayanıklılık	Kısıtlı kararlılık (her element kendine özgü işleme ait ekipmanı gerektirmekte)	Çeşitli değişken koşullarda kararlı (pH, sıcaklık, iyonik şiddet, çözücü)
Maliyet	Pahalı fakat etkin sentez	Ucuz
Raf ömrü	Oda sıcaklığında sınırlı süre	Performans kaybı olmadan uzun süreli depolama (birkaç aydan birkaç yıla uzanan)
Sentez/hazırlama süresi	Uzun	Kısa
Sensör integrasyonu	Dönüştürücü yüzeyi ile zayıf uyumluluk	Tam uyumlu
Altyapı gereksinimi	Pahalı analitik cihazlar ve nitelikli laboratuvar	Herhangi bir işaretleme olmaksızın tayin

#### 2.1.1.1. Moleküler Baskılama Tekniğinin Uygulama Alanları

Kromatografik uygulamalar için oldukça uygun olan ve seçiciliği önceden belirlenmiş destek malzemelerinin hazırlanmasına olanak sağlayan moleküler baskılanmış kromatografi, moleküler baskılama tekniğinin en yaygın araştırılan uygulama alanlarından biridir [62]. Optikçe aktif bileşiklerin özellikle rasemik ilaçların saf olarak elde edilmesine olan talebin artması, moleküler baskılanmış yapıların kiral ayırma amaçlı uygulamalarda önemli bir alternatif kılmıştır [63, 64]. Moleküler baskılanmış yapılar, katı faz ekstraksiyon uygulamalarında sadece ön deriştirmeye imkan vermeyen aynı zamanda hedef analitlerin çoklu karışımlardan seçici ayrılmasını mümkün kılan yeni sorbentler olarak değerlendirilmektedir [65].

Son zamanlarda yapılan çalışmalar moleküler baskılanmış yapıların doğal antikorları taklit ederek immünolojik analizlerde tanıma elemanı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu yapay tanıma elemanlarının sahip olduğu yüksek seçicilik ve hassaslık, kararlı yapılarını uzun süre korumaları ve kimyasal inertlik gibi özellikleri nedeniyle klinik teşhis analizlerinde, çevre ve gıda analizlerinde kullanımına yönelik çalışmalar giderek artmaktadır [66].

Sahip oldukları enzim benzeri aktiviteleriyle hedef analiti tanıma kabiliyeti, moleküler baskılanmış yapıların katalitik sistemlerde kullanılmasının önünü açmıştır [67, 68]. Moleküler baskılanmış yapıların biyolojik sistemlere entegrasyonu ya da biyolojik sistemler ile etkileşimi bilim dünyasının ilgisini oldukça çekmektedir, özellikle de ilaç salınımı [69] ve molekülerin baskılanmış yapılara biyolojik fonksiyon kazandırma çalışmaları hızla yaygınlaşmaktadır [15, 32].

### **2.1.2. Membran Mimikleri ve Kendiliğinden Oluşmuş Tek Tabakalar (SAM)**

Hücre ve çevresi arasındaki ara yüzey olan membranlar, yaşam için kilit rol oynamaktadır. Bundan dolayı, biyomimik sensör geliştirilme sürecinde başlangıç noktası olarak seçilmektedir. Yapay reseptörlerin tasarımı ve kan serumu gibi doğal ortamlardan non-spesifik protein adsorpsiyonunun etkin bir şekilde bertaraf etmek bu seçimin temelini oluşturmuştur. Zwitter iyonik poli(karboksibetain akrilamid) biyomimetik yapı, kan plazmasından proteinlerin hassas ve spesifik tayinini sağlayan, yüzeyinde protein agregasyonu oldukça yavaş olan bir biyotanıma temelli kaplama tabakası geliştirilmesi için kullanılmıştır [70]. Etkin bir antikor immobilizasyon süreci ve yapısında bol miktarda karboksil grubu ihtiva eden poli(karboksibetain akrilamid)'in kullanılmasıyla non-spesifik etkileşimleri minimize eden (mono)-fonksiyonel bir biyotanıma elemanı geliştirilmiştir [70].

Doğal yapılar ile kombine olmadan sadece saf polimer filmlerin kullanılmasında halinde ise amaç çoklu biyotabaka oluşumunu önlemek yerine oluşumunu kolaylaştırmaktır. Örneğin, polietilen ince polimerik film ile modifiye edilmiş QCM elektrodu kan proteinlerinin sensör yüzeyinde koagülasyonunu kolaylaştırmakta ve koagülasyon zamanlarını insan tüm kan örnekleri ile ilişkilendirmektedir [71]. Bu durumda polimer ekstrakorporeal bir yüzeyi taklit ederek kan pıhtılaşmasının başlangıç zamanının kesin tayinini mümkün kılmaktadır. Böylelikle, ameliyat esnasında uyutulmuş hastalara doğru dozda antikoagülan verildiğinin kontrolünü sağlayan bir izleme sistemi mümkün hale gelmektedir [71]. Aynı yaklaşımı

kullanarak, protein direnç ölçümlerinde fibrinojen adsorpsiyon ölçümü yönelik polietilen oksit / polipropilen oksit kopolimerlerinden oluşan ince film geliştirilmiştir [72]. Bu tür gerçek zamanlı çalışmalarda protein ve kan hücrelerinin non-spesifik adsorpsiyonu, geliştirilen kan sensörlerinin güvenilirliğini azaltmaktadır. Polimerik kaplama yaklaşımı kullanarak, non-spesifik adsorpsiyon %80'e varan bir yüzdeye kadar azaltılabilir.

Polimerik filmler aynı zamanda "afinite reseptörleri" olarak da işlev görebilmektedir. Poli(laktik-ko-glikolik asit)'dan oluşan biyobozunabilir tabaka, hasara uğrayan hücre kısımları tarafından salınan litik enzimler tarafından parçalanır. Böyle bir yaklaşım, gıda maddelerindeki mikrobiyal bozunmayı tespit etmek için kullanılabilir ve böylelikle mikrobiyal olarak kontamine olmuş örneklerdeki bozunma, geliştirilen polimerik tabakanın bir sensör yüzeyine immobilize edilmesiyle gerçek zamanlı olarak tespit edilebilmiştir [73]. Benzer bir yaklaşımla geliştirilen agaroz gömülü kromatik Langmuir-Schaefer fosfolipit / polidiasetilen film tabakası üzerinde bakteri üremesi olması durumunda rengini değiştirmekte ve bakteri tarafından salınan amfifilik bileşikler güçlü floresansa neden olmaktadır [74].

Modern nanoteknolojiden de faydalanarak böyle basit reseptör malzemeleriyle yeni biyo(mimik) sensörlerin geliştirmek mümkündür. Valinomisin içeren poli(vinil klorür) polimerik film tabakasıyla kaplanmış alan etkili transistör silikon nanoteller potasyum iyonlarının tayini için kullanılmıştır [75].

Hücre membranlarını oluşturan fosfolipit tabaka örneğinde olduğu gibi, kendiliğinden oluşum (düzenlenme) yaşamın temel itici güçlerinden birisidir. Biyomoleküllerin kararlı bir şekilde bulunabildiği lipit tabakasını bir yüzeye immobilize ederek biyomimik hücre membranı geliştirmek mümkündür [76].

Nanoteknolojideki gelişmelerin biyolojik yapıların moleküler düzeyde incelenmesinin önünü açmasıyla birlikte biyolojik yapılardan esinlenerek nanometre boyutta gözenek ve kanallara sahip malzemelerin üretimi mümkün hale gelmiştir. Üretilen bu malzemelerin çoğunda biyolojik yapılardaki spesifik biyokimyasal özellikleri taklit ederek moleküler boyutta tanıma hedeflenmiştir. Enantiyomerlerin spesifik ayırımına yönelik antikör takılmış silika nanogözenekli yapılar, enantioselektif tanımaya yönelik  $\beta$ -siklodekstrin modifiye edilmiş nanokanallar, protein, florofor ve diğer küçük moleküllerin spesifik ayırımına yönelik biyomimik gözenekli yapılar, çeşitli biyolojik



uygulamalara yönelik nanogözenekli yapıların DNA molekülünün farklı formları ile modifiye edilmesi, vs. yapılan çalışmalardan bazılarıdır [77].

Farklı bir yaklaşım ile üretilen gözenekli polimerik malzemelerin bazı ayırma filtreleri olarak kullanılabilirler. Pek çok polimer, boya, proteinin yük, büyüklük ve hidrofobitesine bakılarak spesifik ayrımı mümkündür. Ayrıca biyolojik yapılardan esinlenerek üretilen nanogözenekli yapıların algılama elemanları olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar giderek artmaktadır [77].

### **2.1.3. Peptitler, DNA ve Yapay Çevredeki Doğal Reseptörler**

Enzim, antikor, ilaç reseptörleri ve transmembran proteinleri gibi biyomoleküllerdeki moleküler tanıma mekanizmasını taklit edilmek istenmesi durumunda seçici peptitler hedeflenmektedir [78]. Bu makromoleküllerin sahip oldukları yüksek spesifiklik ve katalitik aktivite, bağlanma bölgelerinde analit ile yaptıkları çoklu etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Bu yapıları doğal ortamlarından saflaştırılması oldukça zor olup, yapay olarak sentezlenmesi günümüz şartlarında pek mümkün değildir. Bu nedenle, afinite saflaştırma sistemleri ve algılama sistemlerine yönelik yüksek spesifik tanıma özelliğine sahip daha kısa, peptid temelli yapay reseptörlerin tasarımı biyoteknolojinin getirdiği kazanımlardan biridir [79].

- 1) 21 farklı doğal aminoasitin farklı sırayla birbirine bağlanmasıyla farklı moleküller eldesi,
- 2) Peptid kütüphanelerinin taranmasında moleküler biyoloji ve kimyasal tekniklerin kullanılabilirliği,
- 3) Monoklonal antikor üretim tekniklerine kıyasla sentez kolaylığı ve maliyeti,
- 4) Etkin bağlanmayı (tanımayı) sağlamaya yönelik modifikasyonlarının kolay olması,
- 5) Nispeten kolay modellenmesi kısa peptitlerin yapay reseptörlerin tasarımında mükemmel fırsat sunmaktadır.

Peptit temelli biyomimik algılama sistemlerine yönelik çalışmaların sayısı (tüm hücreler, proteinler, ilaçlar, küçük organik moleküller, kirleticiler ve metal iyonlarına yönelik) literatürde hızla artmaktadır [78]. Örneğin, bakır, nikel, çinko, civa vs. gibi metallere yönelik geliştirilen iyon seçici elektrotların peptit tasarımları oldukça basit olmalarına rağmen yine de çok etkili olarak kullanılmaktadır [80, 81].

DNA ve doğal reseptörler temelli yapılar, biyomimik yaklaşımın diğer esin kaynaklarıdır. DNA, en ilginç biyopolimerlerden biridir. Genetik bilginin saklanması, protein ve RNA gibi bileşenlerin sentezlenmesi için gerekli bilgileri içermesinin yanında biyoanalizlerde, DNA bilgisayarlarında, DNA nanoteknolojisinde büyük umut vaat eden işlevsel bir yapıdır. İki pürin bazı (adenin (A) ve guanin (G)) ve iki pirimidin bazı (timin (T) ve sitozin (S)) dört harfli DNA alfabesini oluşturmaktadır. Standart Watson-Crick baz eşleşmesinde adenin, timin ile guanin de sitozin ile bir baz çifti oluşturur. Genetik bilginin dolayısıyla işlevsel bilgilerin biyopolimerlere kodlanması bu bazların DNA omurgası boyunca oluşturduğu diziyeye göre belirlenmektedir. Dizilim spesifik nükleotidler, düşük molekül ağırlıklı substratlara, biyopolimerlere ve hatta hücrelere (aptamerler gibi) özgü bağlanma bölgeleri sergilemektedir. Benzer şekilde, dizilim spesifik nükleik asitler (DNAzimler, ribozimler gibi), katalitik aktivite sergilemektedir. Ayrıca, dizilim spesifik DNA domainleri proteinlerin spesifik bağlanmasını belirlemektedir. Metal iyonları/ligandları, pH değeri, sıcaklık değeri, fotonik ve elektriksel uyarıcılar gibi dışarıdan uygulanan bir etkiyle DNA molekülleri yapısında konformasyonel bir değişiklik sonucunda anahtar (DNA switches) olarak işlev görmektedir. Tüm DNA yapılarının kararlılığı baz çifti sayısı, bazların çeşidi, iyonik şiddet ve moleküler yapıların interkalasyonu (pürin ve pirimidin bazların arasına girme) gibi farklı değişkenler ile kontrol edilmektedir [82].

DNAzimler, nükleik asit ayrılması, ligasyonu ve peptit bağı oluşumu gibi biyolojik ve kimyasal reaksiyonları katalizleyen DNA temelli enzimatik moleküllerdir. Doğal DNAzimlerin bulunmasına rağmen, aptamerler in-vitro ayırma yöntemleri (Çoklu Zenginleştirme ile Sistemik Ligand Geliştirilmesi, SELEX) ile elde edilirler. 1990'lardan günümüze metal iyonu bağımlı DNA/RNA yıkım DNAzimi [83], histidin bağımlı DNAzimi [84] ve DNA ligaz DNAzimi [85] gibi çok farklı DNAzim görüntülenmiştir. Ayrıca, analitik uygulamalar [86] için yaygın olarak araştırılan peroksidazı taklit eden DNAzim de rapor edilmiştir [87]. Nükleik asit, protein ve enzim aktivitesi tayinine yönelik doğru enzimatik dönüşümler sergileyen DNAzim temelli çok yönlü biyoalgılama platformları geliştirilmiştir [88, 89].

Doğal enzimlere nazaran yüksek kimyasal kararlılığı ve moleküler modifikasyonun kolay olmasıyla DNAzimler enzim ailesinin yeni üyeleri olmuştur [84, 85]. Çoğu DNAzim substratına karşı olan aktivitesini ve bağlanma afinitesini kaybetmeden

defalarca denatüre ve rejenere olabilmektedir. Tüm bu özellikler biyoalgılama ve nanoelektronik (örneğin akıllı kapı uygulamaları) gibi farklı alanlarda çok çeşitli uygulamalarda DNAzimleri çekici kılmaktadır [90].

Aptamerler, hedef moleküllerine spesifik olarak bağlanabilen oligonükleik asitlerdir. Laboratuvar ortamında “Çoklu Zenginleştirme ile Sistemik Ligand Geliştirilmesi” yöntemiyle in-vitro koşullarda oluşturulmalarından dolayı kimyasal antikolar olarak da adlandırılmaktadırlar. Bağışıklılık sisteminin tetiklenmesini gerektiren antikor üretim sürecinin aksine SELEX yöntemi immünolojik olmayan ve toksik olan hedeflere yönelik aptamer üretimini mümkün kılmaktadır [91, 92]. Metal iyonları ( $K^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  vs. gibi), küçük organik moleküller (amino asitler, ATP, antibiyotikler, vitaminler, kokain gibi), organik boyalar, peptitler, proteinler (trombin, büyüme faktörleri ve HIV bağlantılı peptitler gibi) ve hatta tüm hücreler ya da mikroorganizmalar (bakteri gibi) olmak üzere çok geniş bir hedef kitlesine uygulanması mümkündür [93-103]. Buna bağlı olarak da teşhis, anti-biyoterörizm, çevre ve gıda alanlarında yeni biyoassay araçlarını geliştirmek mümkün hale gelmektedir [92].

Aptamerler, hedef yapılara karşı oldukça yüksek seçicilik ve afinite sergilemektedirler. Aptamer ve hedef molekül arasındaki etkileşimler o kadar seçicidir ki, bazen hedef molekül yapısındaki ufak değişiklikler dahi aptamerin hedef moleküle bağlanmasını engelleyebilmektedir [104, 105]. Bu yüksek seçiciliğe ek olarak, aptamerler hedef moleküle karşı yüksek afinite ile bağlanmaktadır, özellikle de proteinler gibi makromoleküllerle [104].

Aptamerlerin üretim sürecinde herhangi bir immünolojik cevaba ihtiyaç olmaması antikor üretiminin aksine en büyük avantajlarından biridir. Metal iyonları gibi küçük hedeflere, zayıf immunojenitesi ya da yüksek toksisitesi olan moleküllere yönelik antikolar üretimi oldukça zordur. Ancak, bu tür hedeflere yönelik aptamer üretimi antikollara nazaran daha kolaydır [106].

Metal iyonları/ligandları, pH değeri, sıcaklık değeri, fotonik ve elektriksel uyarıcılar gibi tetikleyiciler varlığında DNA moleküllerinin farklı konformasyonlara geçişi ve farklı konformasyonlar arasında döngüsel ve ayarlanabilen geçişleri yapabilmesi DNA anahtarlarının temelini oluşturmaktadır. Bu supramoleküler nükleik asit yapılarının enzimatik DNAzimler gibi ayarlanabilen katalitik sistemler, enzim ya da

nanopartikül gibi nanomalzemeleri taşıyabilen mekanik yapı iskeleti ve kontrollü ilaç salımına yönelik ayarlanabilir DNA hidrojeller ya da mezo gözenekli yapılardaki kontrollü ilaç salımına yönelik kapılar gibi farklı uygulamaları bulunmaktadır. Sentetik baz birimlerinin (ligandosites) DNA dizisine dahil edilmesi ya da aptamer-substrat kompleks yapılarının tetikleyici olarak kullanımı bu moleküler cihazların uygulama alanını genişletecektir. Ayrıca bu sistemin geliştirilmesine yönelik çalışmalar ilerleyen süreçte “akıllı” nanotıp uygulamaları için yenilikçi fotonik nanomalzemelerin üretilmesini ve kontrollü kimyasal sentezi mümkün kılacağı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra ayarlanabilir DNA cihazları ile hücre içi nano çevrenin görüntülenmesi ve hücre içi değişikliklerin dinamiklerini araştırmak mümkündür [82].

#### **2.1.4. Nanopartiküller (NPs), Nanoyapılı Malzemeler, Kuantum Noktacıklar (QDs) ve Kompozit Yapılar**

Kendiliğinden moleküler düzenlenme uygun özelliklere sahip yeni işlevsel malzemelerin üretilmesi için çok önemlidir. Bu yaklaşım özünde 20 farklı aminoasitten binlerce nanoyapının üretilmesi örneğinde olduğu gibi doğanın sahip olduğu özelliklerden esinlenmeyi içermektedir [107]. Hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi için substrat yüzeylerinin kimyasal ya da topolojik desenlenmesi bu tür biyoesinlemiş malzemelerin geliştirilmesinde umut vaat etmektedir. Bu tür desenlemeler buldukları ölçeğe göre farklı hücre fonksiyonlarının düzenlenmesine izin vermektedir. Ayrıca, topografik desenleme sürecinde mikro- ve nanoboyuttaki hücre fonksiyonlarını yönlendirmektir. Nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar, nanoküreler, nanoşeritler, nanofiberler, nanopartiküller ve nanokompozit malzemeler gibi nanometre boyutta yapılar, biyomoleküllerin farklı basamaktaki tayinleri için kullanılmaktadır. Bu nanoyapılı malzemeler biyoyumlu, non-toksik, yüksek yüzey alanı, kimyasal ve ısıl dayanıklılık, elektrokatalitik aktivite, ve hızlı elektron aktarımı gibi özellikleri ile analitik cihazların daha hassas, seçici, doğrusal, hızlı ve tekrarlanabilir cevap vermesine öncülük etme potansiyeline sahiptir [108-110].

Nanomalzemeler, hızla gelişen nanoteknoloji alanının en ileri noktasında olmakla birlikte son yıllarda biyoanalitik işaretleme uygulamalarında oldukça ilgi görmektedir. Eşsiz boyut dağılımlı özellikleri sayesinde beşeri faaliyetlerin pek çok alanında üstün ve vazgeçilemezleri olmuştur. Bu arada yüksek seçiciliği, kolaylığı ve çeşitliliğinden

dolayı floresans temelli tayin, biyoalgılama yaklaşımlarının en yaygın kullanılan yöntemidir. Ayrıca mükemmel optik özelliklere sahip lüminesan nanopartiküllerdeki yeni gelişmeler hücrelerde, dokularda ve organizmalarda in-vitro ve in-vivo işaretlemeye olduğu gibi floresans temelli görüntüleme ve algılama için yeni yollar açmaktadır. Bu yaklaşım proteomik ve genomik çalışmaları, hastalık teşhisi, ilaç izleme süreci, ilaç salınımı, protein saflaştırma, biyolojik iyileştirme ajanları ve medikal işaretlemeyi (kanser araştırmalarında ve seçici tümör hedefleyiciler olarak) kapsayan biyoloji ve tıbbın pek çok alanında yaygın olarak kullanılmaktadır [111].

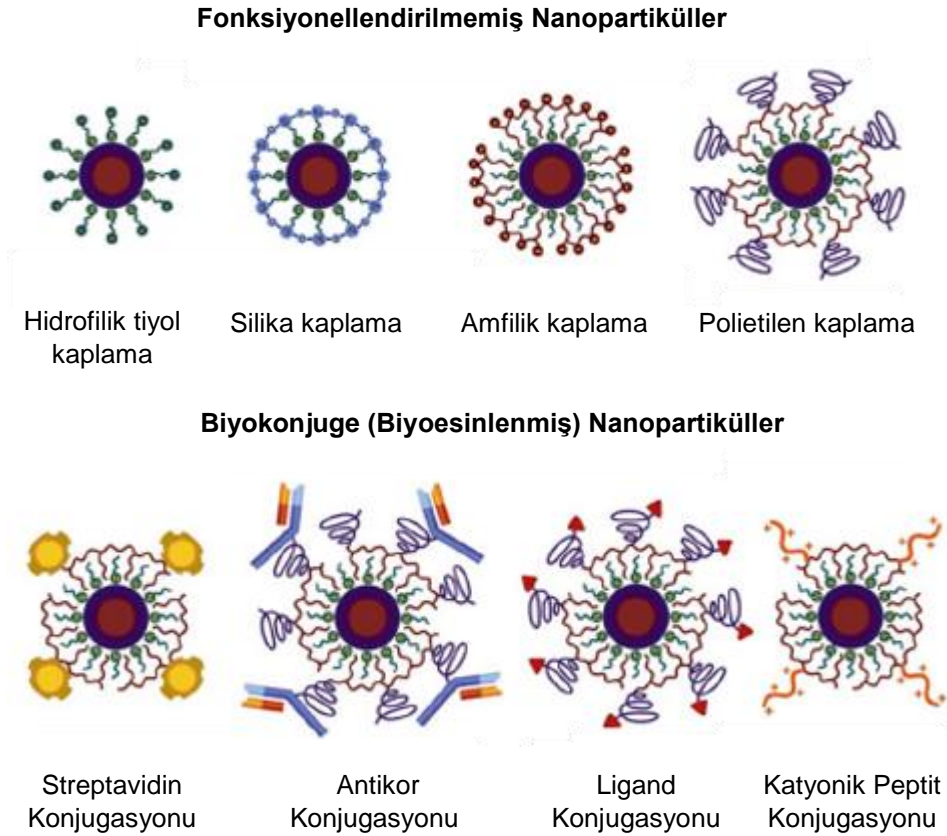
Floresans temelli tayin aşağıda belirtilen köklü avantajlarından dolayı algılama teknolojisi alanında en baskın yöntemlerden biridir.

- Hızlı sinyal alımı (her bir floresans işaretleyici tayin esnasında saniyede yaklaşık  $10^7$ - $10^8$  foton üretebilir).
- Çoklu floresans boyalar çoklu kitlerde kullanılabilir.
- Yüksek tayin hassasiyeti (tek bir molekül tayini gibi).
- Lüminesan sinyal lokalize edilmiştir (bazı enzim temelli sinyal artırım stratejilerinden farklı olarak).
- Hedef molekülün üzerinde sterik olarak ulaşılabilir fonksiyonel grupların olması durumunda işaretleme süreci oldukça kolaylaşmaktadır.

Geleneksel organik boyaların kısıtlı sönmeme katsayıları veya kuantum verimlerinden dolayı (ayrıca düşük boya-haberci molekül bağlanma oranından dolayı) floresans temelli tayinlerde düşük tayin limitlerine ulaşabilmek zor olabilmektedir. Uygun optik özellikleri sahip ve mikronaltı boyutlu malzemelerin gelişimine öncülük eden nanoteknolojideki yeni gelişmeler, floresans temelli tayine yönelik yeni ufuklar açmıştır. Nanomalzemeler, 100 nm altında en az bir boyut içeren organik veya anorganik malzemeler olarak değerlendirilmektedir [111].

Nanoparçacık teknolojisindeki en güncel konu, nanoparçacıkların (NP) manyetik hassasiyet ve floresans özelliği gibi bazı özelliklere sahip olmasını sağlayarak onlara çoklu işlevsellik kazandırmaktır [112]. Metal NP'ler (Au, Ag, Pt ve Pd gibi), yarı iletken nanokristaller (CdSe, CdS, ZnS, TiO<sub>2</sub>, PbS, InP ve Si gibi), manyetik bileşikler (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, FePt ve CoPt gibi), silika NP'ler, karbon NP'ler ve bunların türevleri (çekirdek-kabuk ve diğer kompozit nanoyapılar), NP'lerin geniş yelpazesindeki mevcut başarılı örneklerdir [111]. Dolayısıyla, bu hetero yapıları

nanoparçacıkların hazırlanması ilaç salınımı [113], biyogörüntüleme [114], manyetik rezonans görüntüleme [115], biyosensörler [116] ve biyo çoklu kitler [117] gibi bazı niteliklerin özgün bir kompozit nanoyapıda birleştirilme olasılığı sebebiyle son on yıl içinde çok dikkat çekmektedir [118].



Şekil 2.4. NP'lerin yüzey modifikasyonunda kullanılan yaklaşımlar [119].

#### 2.1.4.1. Kuantum Noktalar (QDs)

Yarıiletken nanomalzemeler son on yılda optik algılama alanındaki araştırma ve uygulamalarda oldukça dikkat çekmektedir. QDs, periyodik tablodaki II-IV (Cd, Zn, Se ve Te) veya III-V (In, P ve As) grup elementlerinin atomlarından oluşan CdSe, CdTe, HgTe, PbS, PbSe, PbTe, InAs, InP ve GaAs gibi yarıiletken nanokristal yapılardır [120]. QDs, biyomalzemeler arasında önemli bir sınıf haline gelmektedir, çünkü floresans proteinler ya da organik boyalar ile elde edilemeyen eşsiz optik özelliklere sahiptirler. QDs'ın özellikleri arasında yüksek fotokararlılık, yüksek kuantum verimi ve yüksek molar uyarma katsayısı (organik boyalara kıyasla yaklaşık 10-100 kat daha yüksek) yer almaktadır. Ayrıca belirli bir dalga boyunda (morötesi (UV) ve kızılötesi (IR) bölge arasında değişen) dar simetrik şiddetli

emisyonu sağıtırler. Çünkü farklı boyutlardaki QDs aynı dalga boyundaki ışık ile uyarıldığı zaman farklı dalga boyunda emisyon yapabilirler [121].

QD içindeki eksitonlar her üç uzaysal boyutta sınırlı olduğundan elektronları, küçük bir moleküldekine benzer şekilde belirli enerji paketlerinde kuantlaşır. Ayrıca daha fazla atomun birbirine bağlanmasıyla atomik orbitallerin farklı enerji düzeyleri yarıiletken malzemeler için bir enerji bandında birleşir. Bu nedenle yarıiletken malzemeler küçük ve yığın yapıların bir melezı olarak kabul edilebilir [122].

QDs'ın uyarılma ve emisyon pikleri NP çaplarının değıştirilmesiyle ya da QD'ın çekirdek-kabuk yapısındaki değışiklikler ile kolaylıkla ayarlanabilmektedir. Bu durum geniş bir görünür-UV bölge absorpsiyon spektrumu ve ayarlanabilir boyut bağımlı emisyon spektrumu (yakın-IR ve UV bölge arasında) alınmasına olanak sağlamaktadır [111].

QDs zaman bağımlı floresans ölçümler (floresans yaşam ömürleri 30-100 ns arasında) için uygundur ve geniş bir uyarılma spektrumu sergilemektedirler. Böylelikle farklı renklerdeki QDs tek bir dalga boyunda aynı anda uyarılabilmektedir [111]. Yakın IR bölgedeki emisyonlarıyla QDs'ın organik floroforlara kıyasla daha çok in-vivo görüntüleme uygulamaları bulunmaktadır. Bu özellikleriyle QDs, Co@CdSe çekirdek-kabuk nanokompozitler ve FePt-ZnS nanosüngerler gibi floresans ve manyetik özelliğı bir arada sergileyen melez (hibrit) nanoyapıların üretimine esin kaynağı olmuştur [123, 124].

#### **2.1.4.2. Metal Nanoparçacıklar**

Metal NP'ler (Ag, Au ve Pt) sahip oldukları optik özellikleriyle biyomedikal uygulamalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır [125]. Metal NP'ler, yığın metallerin spektrumlarında olmayan şiddetli bir görünür-UV bölge absorpsiyon bandına sahiptirler [126]. Bu absorpsiyon bandı görünür-UV bölge dalga boyuna sahip fotonun metal NP'leri uyarması sonucu, yüzey elektronlarının belli bir frekans değerinde rezonansa girmesiyle maksimum enerji absorplamasıyla oluşmaktadır ve bu durum lokalize yüzey plazmon rezonans (LYPR) olarak bilinmektedir [127]. LYPR, belirli şartlarda metal nanoparçacıklarda görülen elektromanyetik alan artışına dayanmaktadır. Yüzey plazmon rezonansı, dalga boyundan çok daha ufak, nanoboyutlardaki metal parçacıklar ile etkileşime giren elektromanyetik ışımının uyardığı yüzey iletim elektronlarının, birlikte salınımı anlamına gelmektedir. Bu

salınımın frekansı ve büyüklüğü, kullanılan metalin tipine, ortama, nanoparçacıkların boyutuna, boyut dağılımına ve şekillerine bağlıdır [128].

Altın nanoparçacıklar (AuNP'ler) küre, küp, çubuk, kafes ve tel formunda kolaylıkla büyük ölçekte sentezlenebilmektedir. Sentez aşamasında morfolojik özelliklerin kontrol edilebilmesi ürünün fiziksel özelliklerinin belirlenmesi açısından önemli bir avantajdır. AuNP'ler mükemmel floresans rezonans enerji transferi (FRET)-temelli sönümleyicilerdir, çünkü görünür bölgedeki yüzey plazmon rezonansları onları güçlü absorban ve saçıcılar haline getirmektedir. AuNP kontrol edilebilen boyutları dolayısıyla biyokit uygulamalarında oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, üzerinde tiyol grubu taşıyan biyomoleküller altın-sülfür etkileşimi üzerinden kolaylıkla altın yüzeylere immobilize edilebilmektedir [129].

Karbon elektrot yüzeyi altın nanopartikülleri ile modifiye edilmiş ve yapay bir biyomembran için substrat gibi davranan konjuge bir polimer ile elektrokimyasal kaplanmıştır. Spesifik biyoafinite özelliği de ubikinonun modifiye edilmiş elektrot yüzeyine immobilizasyonu ile sağlanmıştır [130].

Gümüş NP'ler de güçlü floresans ve şekil bağımlı ışık absorpsiyon spektrumu gibi mükemmel özelliklere sahiptir ve gümüş NP'lerin FRET kitlerde kullanımı tasarlanmaktadır [131]. Gümüş NP'ler FRET'de mükemmel elektron alıcısı olabilir ya da FRET temelli algılamada kit performansının yükseltilmesinde destek malzeme olarak etki gösterebilmektedir [132].

#### **2.1.4.3. Silikon Nanomalzemeler**

Optik biyoalgılama ve görüntüleme uygulamalarında kullanılan floresans silikon nanomalzemeler nanosistemlerin ilgi çekici bir sınıfıdır [133]. Optik saydamlık, düşük toksisite, kolay ve kararlı ürün sentezi ve aynı zamanda zengin yüzey kimyası gibi önde gelen özellikleriyle silika ve organik olarak modifiye edilmiş silika (ORMOSIL) bu sınıfın önde gelen malzemeleridir [134]. Silikon dolaylı band aralığına sahip bir yarıiletken, bu nedenle yığın hali zayıf bir ışık saçıcıdır. Ancak, güçlü kuantum hapsine sahip Si parçacıkları (1-5 nm) görünür bölgede boyut bağımlı fotoluminesans özellik göstermektedir. Silika NP'ler matriksi organik ya da metalorganik floresans boyalar, QDs ve metal NP'ler gibi ajanları spektral özelliklerini herhangi bir etkisi olmaksızın yapısında barındırabilmektedir [135, 136]. Floresans problemler için ideal matriks olan silika fotokimyasal olarak inert ve optik saydamlığa sahiptir, böylelikle ışığın emilimi ve saçılımına etkin şekilde izin



vermektedir. Ayrıca, silika yapısında barındırdığı boya moleküllerini dış etkenlerden (mekanik stres, şişme, gözeneklilik değişimi, agregasyon veya farklı çözücü koşullarında sızma gibi) koruyan kararlı kimyasal ve mekanik koruma sunmaktadır. Silika NP'ler floresans kuantum verimini ve foto kararlılığı artırmaktadır. Çünkü tek bir silika NP çok fazla miktarda boya molekülünü yapısında etkin şekilde barındırabilmektedir. Silika kabuk sadece oksijen penetrasyonunu önlemekle kalmaz aynı zamanda boya moleküllerini uzaysal olarak birbirinden ayırmaktadır, böylelikle parlama, bozunma ve boya arası sönümü indirgemektedir [137]. Boya yüklenmiş silika NP'ler tek bir boya molekülüne kıyasla oldukça etkin bir sinyal artışına olanak vermekte ve böylelikle sensör uygulamalarında düşük tayin limitlerine ulaşmayı mümkün kılmaktadır. Silika yapıların hidrofilitesi boya moleküllerinin sulu çözeltide parçacık yapısına gömülmesi esnasındaki problemleri ortadan kaldırmaktadır. Pek çok silika NP'ler iyi biyoyumluluk, su çözünürlülük ve evrensel biyokonjugasyon stratejileri sergilemektedir. Esnek silika kimyası ise yüzey modifikasyonu için pek çok olanak sunmaktadır. Biyomoleküllerin (antikor, protein, peptit, ve oligonükteotid gibi) silika yüzeye konjugasyonu oldukça basittir. Silika NP'lerin iç ve dış yüzeyleri seçici olarak kovalent ya da fiziksel tutunma yoluyla fonksiyonelleştirilebilmektedir. Ströber ve ters mikroemülsiyon yöntemi, silika NP'lerin ya da boya yüklenmiş silika NP'lerin sentezinde etkin olarak kullanılan ana yöntemdir [138, 139].

Lüminesan silika NP'ler, QDs ve metal NP'lere nazaran daha hidrofilik, biyoyumlu ve farklı koşullar altında daha karardır. Bu avantajlar silika NP'leri immunokit [140], ilaç salınımı [141], nükleik asit analizi [142], DNA hibridizasyon analizi [143], kanser hücresi tanıma [144] ve multikompleks biyoanalizler [145] gibi biyosensörler [146] ve çeşitli ara yüzey çalışmalarında etkin olarak kullanılan uygun floresans proplar yapmaktadır. Aynı zamanda boya yüklenmiş silika NP'ler konfokal floresans mikroskobu ve zaman çözünürlüklü fosfofloresans anizotropi gibi çalışmalarda kullanılabilir [147].

#### **2.1.4.4. Yüksek Enerji Dönüştürücü (up-conversion) Nanomalzemeler**

Limünesan yüksek enerji dönüştürücü (up-conversion) malzemeler, 50 yıldır bilinmektedir. Ancak son zamanlarda biyoteknoloji uygulamalarına yönelik limünesan yüksek enerji dönüşüm (up-conversion) nanoparçacıkların (UCNPs) hazırlanmasına yönelik ilgi artmıştır [148]. QDs ve organik floroforlara kıyasla UCNPs yüksek fotokimyasal kararlılık, keskin emisyon band genişliği, büyük anti-Stoke kayması, yüksek girişim derinliği ve düşük otofloresans sergilemektedir. Ancak, UCNPs'in kuantum verimi QDs kadar yüksek değildir [149]. Yakın zamanda, Boyer ve van Veggel kolloid heksagonal NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup> NP'lerin mutlak kuantum verimlerini hesaplanmıştır. Değerler parçacık boyutuna bağlı olarak %0.005-0.3 arasında değişmektedir [150]. Günümüzde pek çok çalışma UCNPs'in kuantum verimi artırmaya yönelmiştir, çünkü UCNPs'in emisyon dalga boyu piki boyut bağımlı değildir ve çok renkli emisyon kolaylıkla mevcut kristal ve nadir toprak elementinin çeşitlendirilmesiyle sağlanabilir. Bu yüzden, bu parçacıklar immunokit, gen analizi, lüminesan işaretleyici, kimyasal algılama ve hücre görüntüleme gibi biyoteknoloji analizlerinde gelecek vaat eden malzemelerdir [111].

#### **2.1.4.5. Çok Fonksiyonlu Nanoparçacıklar**

Nanoölçekli parçacıklar, antikolar, nükleik asitler, proteinler ve membran reseptörleri gibi biyomoleküller ile göreceli olarak aynı boyut aralığındadır. Bu biyonik özellikler, yüksek yüzey/hacim oranı ve kendi özelliklerinin modifiye edilebilmesiyle birleştiğinde nanoparçacıklar görüntüleme, teşhis ve tedavi uygulamalarında yararlı malzemeler haline gelmektedir [151, 152]. Biyonanoteknoloji, biyolojik süreç ve bunların uygulamalarından esinlenerek özellikle medikal biyoteknolojide kullanılacak yeni cihaz ve sistemlerin geliştirilmesini amaçlayan kimya, fizik ve mühendisliği bünyesine katarak yeni bir disiplinlerarası araştırma ve geliştirme alanı oluşturmaktadır. Tıp alanındaki sağladığı kolaylıklara rağmen, in-vivo eş zamanlı hücrel olguların görüntülenmesi, aktif bölgeye spesifik yönlendirme ya da hedef hücre içinde etkin ilaç salınımı gibi bazı uygulamalarda halen tartışılan unsurları vardır. Bu sebeple, çift fonksiyonlu ya da çok fonksiyonlu NP'lerin geliştirilmesi mevcut NP'lerdeki bu eksik kalan yönlerin geliştirilmesine yardımcı olabilecektir. Son yıllarda, çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere çok fonksiyonlu NP tasarımına yoğun ilgi vardır. Karmaşık biyolojik sistemlerde ilgilenilen hedef yapıların işaretlemesinde ve

tayininde önemli potansiyele sahip çok fonksiyonlu NP'ler geleneksel tek fonksiyonlu NP'lere göre daha üstündür. Çünkü tayin ya da görüntüleme esnasında floresans, X-ışını, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve ultrason gibi yöntemlerin aynı anda kullanımına izin vermektedir [153]. Bu nedenle, yüksek çözünürlüklü ve hedef spesifik çok fonksiyonlu NP'lerin geliştirilmesine yönelik büyük bir talep söz konusudur. Teşhis ve terapötiklerin entegrasyonu ile eş zamanlı teşhis ve tedavi (teranostik) amaçlı kullanılan ilaçların hedefine etkin bir şekilde ulaşım sağlanmadığı ve ilacın iyileşme sürecindeki etkinliğinin görüntülenmesine olanak sağlayacağı ön görülmektedir.

Teranostik amaçlı geliştirilen çok fonksiyonlu NP'ler metalik [154], seramik [155] ya da polimerik [156] gibi farklı kimyasal doğaya sahiptir. Bunların yüzeyleri polietilen (PEG) [156] veya poli(N-izopropilakrilamid) [157] gibi polimerle ya da antikör, peptid ve oligonükleotid gibi biyomoleküller [157, 158] ile fonksiyonelleştirilebilir. Çoğu durumda çok fonksiyonlu NP'ler dört ana bileşenden oluşmaktadır: (1) matriks, (2) MRG için manyetik duyarlı alt bileşen ( $Fe_3O_4$  gibi), (3) mikroskopik uygulamalar için optik bir prob (genellikle rodamin gibi bir floresans bileşen), (4) küçük moleküllerin (terapötik ajanlar, biyomoleküller gibi) entegrasyonuna izin veren gözenekler ya da fonksiyonellik. Çok fonksiyonlu NP'ler, esas olarak anorganik bileşenlerden ve/veya organik bileşenlerden ve/veya bu bileşenlerin melezlerinden oluşabilir. Melez anorganik NP'ler manyetik temelli hedeflemede, terapötiklerin salınımında, MRG, hücre görüntüleme ve biyoışaretleme uygulamalarında güçlü bir araç olarak ortaya çıkmaktadır. Yarıiletken QDs ve manyetik NP'lerden oluşan çok fonksiyonlu nanokompozitler manyetik kuantum noktalar (MQDs) olarak bilinmektedir. AuNP'lerin yarıiletken QDs ve manyetik NP'lerle oluşturabileceği melez nanokompozit yapıların ( $CdSe-Au$ ,  $Fe_3O_4-Au$  ve  $PbSe-Au-Fe_3O_4$  gibi) üretimi de bilgisayarlı tomografi görüntüleme (CT) ve fototermal tedavi uygulamalarında kullanılmak üzere yoğun bir şekilde araştırılmaktadır [159-161]. QDs ya da boya entegre edilmiş silika kaplı manyetik NP'lerin biyomedikal uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır [162].

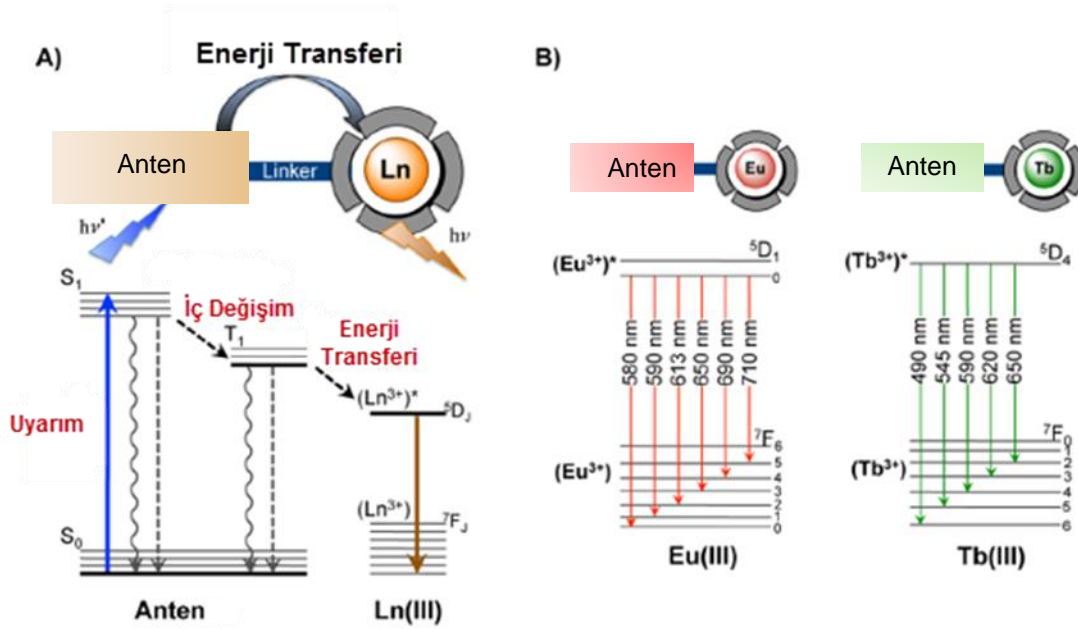
Polimerlerin mükemmel biyouyumlulukları ve yüzeylerinin fonksiyonelleştirilmesinin kolaylığı nedeniyle çok fonksiyonlu NP'lerin tasarımında, hazırlanmasında ve geliştirilmesinde vazgeçilmez role sahiptir. Floroforların fizikokimyasal özellikleri bir polimer ile kaplanmasıyla oldukça iyileştirilebilir. Floroforların dev polimerlerin içine

dahil edilmesiyle, normal haline nazaran yüksek floresans sinyal şiddeti, daha iyi biyokararlılık (oksijen ile temasın engellenmesiyle) elde edilebilir. Hazırlanan melez malzemeler yüzlerce hatta binlerce lüminesans molekül içerebilir ve de böylelikle önemli ölçüde sinyal artırımı sağlanmaktadır. Organik ve anorganik bileşenler çeşitli yöntemler kullanarak polimerik malzemelerin yapısına dahil edilebilir. Kapsülleme yöntemi polimerik çok fonksiyonlu nanomalzemelerin üretimi için oldukça verimli bir yöntemdir. Bu yöntem ile elde edilen melez nanokompozitler sadece kapsüle edilen yapının özelliğini değil aynı zamanda polimerik yapının da özelliklerini taşımaktadır. Nanoparçacıkların toksisiteleri (CdX (X: Te, Se ve S) nanoparçacıkların ağır metal toksisitesi gibi) nanoparçacık-polimer çekirdek-kabuk yapısı sayesinde etkin bir şekilde önlenir. Yani, medikal ve tıbbi uygulamalarda, hücre sınıflandırılması/ayırmasında, biyoışaretleme/görüntüleme ve kanser hedeflemesinde kullanılmak üzere kapsülleme yöntemi kullanarak geliştirilen çok fonksiyonlu nanoparçacıklar için polimerik yapı çok yönlü bir iskelet yapı sağlamıştır.

Organik floroforlar ve kuantum noktalar çoğunlukla floresans bileşenler olarak kullanılmasına rağmen, flor ışıldama geniş bozunma spektrumu ve organik florofor uyarılma ve emisyonu arasında çapraz sinyal ile sonuçlanan küçük Stokes kayması [163] ve daha az kimyasal kararlılık, potansiyel toksisite ve kuantum noktaların kısa-lüminesan ömrü [121] gibi bazı doğal sınırlamalara sahiptir. Bu bileşenler ile karşılaştırıldığında, lantanit iyonu (özellikle kompleksleri) temelli bileşenler, keskin adsorpsiyon ve emisyon çizgileri, uzun ömür, üstün foto kararlılık ve kısa ömürlü ışık saçılması ve arka plan gürültülerinin etkin eliminasyonu yanında penetrasyon derinliğini iyileştirme, oto-floresansda ciddi bir düşüş, floro ışıldama olmaması, foto göz kırpması olmaması ve daha düşük emisyon enerjisi sebebiyle foto hasarda azalma gibi önemli avantajlara sahiptir [164]. Ancak, polimerik ağ içine lantanit komplekslerinin dahil edilmesi, hala, organik floresans boyaların çeşidine göre zayıf floresans yoğunluğu gibi bazı sınırlamalara sahiptir. Bu durum, daha çok lantanit kompleksi dahil ederek giderilmesine rağmen, yüksek birleşme oranı nano yapıdan kompleks sızıntısı olmasına neden olur. Polimerik ağ içine komplekslerin doğrudan dahil edilmesi, sınırlamaları çözmede en güçlü alternatiftir. Komplekslerin polimerik omurgaya kovalent bağlanmasıyla sızıntının azalması ve dolayısıyla da daha yüksek kararlılık ve daha çok kompleks bağlanmasıyla da daha yüksek floresans yoğunluğuna sahip nano kompozitlerin elde edilmesi mümkün olmaktadır [164].

Lantanit iyonları, 4f orbitallerinin dolu  $5s^25p^6$  alt kabukları tarafından korunmasından kaynaklanan, spesifik floresans emisyon bantlarına sahiptir. 4f düzeyindeki bir elektronun uyarılmasıyla moleküldeki bağlanma şiddetinde önemli bir etkiye neden olmaksızın kolaylıkla bir üst enerji düzeyine geçebilir. Lantanit iyonlarının floresans emisyon etkinliği doğrudan, O-H, N-H ya da C-H osilatörleri gibi özellikle yüksek enerjili titreşimleri iç ve dış koordinasyon kürelerinde bulunabilen çevreye bağlıdır. Etkin floresans emisyonu elde etmek için iyonların koordinasyon küreleri, ışığı absorplayan kromofor gruplara sahip ve enerji transferi ile oluşan uyarılmış hali stabilize eden ligandlarla (anten olarak adlandırılır) uygun şekilde işgal edilmelidir (Şekil 2.5) [165, 166].

Europiyum(III) ve Terbiyum(III) lantanit iyon kompleksleri biyomoleküler sistemlerde lüminesan prop ve işaretleyici olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.



Şekil 2.5. a) Anten Etkisi, b) Eu ve Tb komplekslerinin lüminesan 4f-4f geçişleri.

Akıllı stratejileri ve özelliklerin tek fonksiyonlu nanomalzemelere uygulanmasıyla kazandıkları benzersiz optik, manyetik ve yapısal özellikleriyle çok hassas tayin, medikal görüntüleme, teşhis ve terapötiklerin hedeflenmesi gibi pek çok biyo-uygulamada gelecek vaat etmektedir. Dahası çok fonksiyonlu NP'ler ilaç seçimlerinin hassas şekilde yönlendirilmesi, tümör dokusuna intraoperatif cerrahi rezeksiyonu, aynı zamanda terapötik ajanların salınım etkinliğinin izlenmesine yönelik farklı görüntüleme taktikleri (floresans görüntüleme, MRG, X-ışını, tek foton

emisyon bilgisayarlı tomografisi, ultrason ve Raman görüntülemesi gibi) sunmaktadır [167].

## **2.2. Mevsimsel Duygusal Bozukluk**

Mevsimsel değişiklerin, insan ruh ve fiziksel aktivite düzeylerini etkilediği antik çağlardan beri bilinmektedir. Mevsimsel duygu durum bozukları üzerindeki araştırmalar da son 20 yıl içerisinde gelişmeye başlamıştır.

Mevsimsel duygusal bozukluk (seasonal affective disorder, SAD) her yılın aynı döneminde ortaya çıkan yinelenen depresyonlarla karakterize edilen bir sendrom olarak tanımlanmıştır. Genellikle kış depresyonu ile eşleştirilen SAD sonbahar-kış aylarında başlayan (gün ışığı eksikliğine bağlı olarak tetiklenen bir durum) ve ilkbahar-yaz aylarında remisyon gösteren mevsimsel özellikli sendromdur [168]. SAD, mevsimsel düzenle birlikte ortaya çıkan tekrarlayan baskın depresif atakları içeren duygu durum bozukluklarının klinik bir alt tipidir [169]. SAD'ın resmi teşhis kriteri 1993 yılında Dünya Sağlık Örgütü ve 1994 yılında Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından kabul edilmiştir [169].

Çoğu hasta hipersomi (aşırı uyuma), yorgunluk, enerji kaybı, iştah artışı ve kilo artışı gibi atipik ya da ters nörovejetatif belirtileri göstermektedir. Eğer daha fazla depresif belirteçler ortaya çıkarsa bipolar I ya da bipolar II (yaz aylarında hipermani ya da mani geçiş) teşhisi konulmaktadır. İlerleyen aşamalarda intihar vakalarına kadar ilerlediği de raporlanmıştır. Pek çok yetişkin sonbahar/ kış aylarında benzer fakat daha ılıman vejetatif semptomları göstermekte ve bu durum "alt sınıf SAD sendromu" olarak tanımlanmaktadır [168].

Kuzey Amerika'da yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, kış mevsimsel duygu durum bozukluğunun toplam nüfustaki oranının %0.4-2.7 arasında olduğu rapor edilmiştir. Kuzey Avrupa'daki nüfusun yaklaşık %2'sinin SAD'dan muzdarip olduğu ve %10'dan daha fazlasının da alt sınıf SAD sendromuna ait daha ılımlı semptomları gösterdiği tahmin edilmektedir. İngiltere'de yapılan çalışmalar, İngiltere'deki genel nüfusun %2-3'ü SAD'dan muzdarip olabileceğini ileri sürmektedir [171]. Adana, G.Antep, İzmir, Elazığ, Eşkişehir, Ankara, Trabzon ve Edirne'yi kapsayan çalışmada SAD'ın görülme sıklığı %4.86 (3498 kişi içeren bir çalışma) olarak saptanmıştır [172]. Konum ile SAD arasındaki ilişkinin kesinliği henüz kanıtlanamamış olmasına rağmen, ikamet edilen enlemin (ekvatorundan uzaklaştıkça) artmasıyla SAD'ın görülme sıklığının artığı rapor edilmektedir [171].

Çizelge 2.3. SAD'ın klinik belirtilerinin ve semptonlarının görülme sıklığı [170].

Hipersomi (aşırı uyuma)	68
Uykusuzluk	24
İştah	
- Artışı	55
- Azalması	27
Karbohidrat alma isteği	77
Kilo	
- Artışı	51
- Azalması	14
Endişelenme hali	84
İntihar düşüncesi	45

\*SAD'maruz 454 kişiden alınan veriler, Vancouver, British Columbia, Kanada

Çalışmaların çoğu SAD'ın neredeyse kadınlarda erkeklere göre iki kat daha yaygın olduğunu raporlamaktadır [173]. Yetişkinlere oranla çocuklarda çok daha az yaygındır, ancak ergenlikle birlikte SAD'ın yaygınlığı artmaktadır [174]. Üreme döneminin ortasında SAD'ın yaygınlık düzeyinin en yüksek olduğu ve sonra yaşlılıkta (biyolojik özelliklerin SAD etiolojisindeki genetik ve kalıtsal etkisi) birlikte keskin düşüşe uğradığı görülmektedir [175, 176]. Bununla birlikte genel nüfus içinde bile toplumdaki bireylerin ruh hali kış aylarında düşük bir noktaya ulaşma eğilimindedir. Kuzey enlemlerde depresif olmayan bireylerin neredeyse yarısı kış aylarında SAD belirtilerini bir dereceye kadar gösterdiği varsayılmaktadır. Ruh halini düşüren belirtilerden (genellikle depresyona sürükleyen) ayrı olarak, SAD'a maruz hastalarda çoğunlukla hiperfaji (aşırı yeme) ve hipersomi (aşırı uyuma) gibi atipik klinik belirtiler rapor edilmektedir [177].

SAD nedeni olarak en erken ve en makul hipotez, kış aylarında azalan gün ışığının depresif belirtileri tetiklemesidir [168]. Mevsimsel değişimlerin ötesinde, SAD'a maruz kalan bireylerin ruh halinin kışın kuzey ya da güneye seyahat etmeleri halinde bile etkilendiği rapor edilmiştir. Rosenthal ve çalışma arkadaşları, kendi hastalarının %83'nün (kuzey yarım kürede ikamet etmekte olan) ruh halinde güneye seyahatlerinden sonra (gün ışığının uzamasına bağlı olarak) belirgin bir iyileşmenin

gözledikleri rapor etmişlerdir. Ayrıca kuzeye seyahat etmelerinde aynı derecede ruh hallerindeki düşüşü gözlemlediklerini rapor etmişlerdir [168, 178].

Böylelikle, SAD'ın ışık periyodunun (aydınlık-karanlık döngüsü) mevsimsel değişimiyle tetiklendiği öne sürülmüştür. Bu yaklaşım, kış aylarında ışık periyodunun daha kısa olduğu daha kuzey enlemlerde SAD'ın görülme sıklığının arttığını da desteklemektedir. SAD hakkında daha fazla çalışmaların yayınlanmasıyla, sirkadiyen faz kayması, ışık periyodu ve melatonin, genetik olgular ve nörotransmitterlerin (özellikle de serotonin, norepinefrin ve dopamin gibi beyin nörotransmitterlerinin etkileri) olası rolüne ilişkin hipotezlerde rapor edilmiştir [179]. SAD'ın evrimsel, genetik ve fizyolojik nedenleri ve dinamikleri henüz tam doğrulanamamıştır. SAD'ın nedenlerinin ve tetikleyicilerinin tam bilinmemesiyle birlikte, duyu dalgalanmaların ve klinik belirtilerin ışık periyodundaki mevsimsel değişikliklerle ilişkilendirilmesi doğru gözükmemektedir. Bu belirgin ilişki nedeniyle, ışık tedavisi SAD hastaları için önerilmekte ve etkili bir tedavi olarak başarıyla uygulanmaktadır. Antidepresan ilaçlarla karşılaştırılabilen etkinliğe sahip parlak ışık 20 yıldır SAD hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır [171].

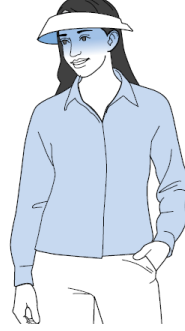
Tipik bir parlak ışık tedavisi 10000 lux değerindeki yapay ışık kaynağının yarım saatlik (tercihen sabah saatlerinde) uygulanmasından ibarettir. 10000 lux değerindeki ışık şiddeti evlerdeki normal aydınlatma şiddetinden 100 kat daha yoğundur [180]. Belirli bir dalga boyuna sahip ışığın tedavi sürecinde daha etkili olduğu dair bulgular rapor edilmiştir. Bu durumun belirli dalga boyundaki ışığın sirkadiyen ritmin kontrolünde daha etkili olmasından kaynakladığı ileri sürülmüştür. Bazı çalışmalar, mavi spektrumdaki ışığın (449-477 nm) melatoninin baskılanmasında, sirkadiyen faz kaymasında ve antidepresan etkisinde diğer dalga boylarından daha üstün olduğu göstermektedir [181-184].



**Çalışma alanı ışık ünitesi**



**Işık siperi**



**Aydınlık simülatörü**



Şekil 2.6. Işık üniteleri [170].

Işık terapisi, yorgunluk ve gün içindeki aşırı uykulu olma eğilimini azaltmaya yardımcı olur ve sağlıklı yaşama kalitesini artırmaktadır. SAD'a maruz bireyler, ışık kutuları kullanarak ışığın yoğunluğuna bağlı olarak günlük 30 dakika ile 2 saat arasında değişebilen sürelerle kendileri bu terapiyi evde uygulabilirler. Hasta bireyler ışık kutularından 1 ya da 3 ft uzaklıkta oturabilir ve ışık kutusuna baktıkları süre içinde de normal aktivitelerini sürdürebilirler [185]. Ayrıca terapinin sabah saatlerinde uygulanmasıyla (şafak ve 08:00 arası) daha etkili sonuçlar alındığı belirtilmektedir [186]. Klinik iyileşme terapinin başlamasından 1 ya da 2 hafta sonra gözlemlenebilir ve anlamlı klinik iyileşme ise 3. haftadan sonra gözlemlenmektedir. Ancak ışık terapisinin bırakılmasıyla semptomlar yavaş yavaş geri gelmeye başlamaktadır [187, 188].

Bazı ciddi vakalarda SAD hastalarına antidepresanlar reçete edilmektedir. Reçete edilen antidepresanın çeşidi genellikle seçici serotonin geri alım inhibitörü (SSRI) olduğu bilinmektedir. Bu ilaçlar serotonin düzeyini artıracak şekilde etki göstermektedirler. İlaveten son benzodiazepinler, melatonin üretimini bloke ediciler gibi değişik antidepresanların da etkileri incelenmeye başlanmıştır. Sertralin, sitalopram, essitalopram (serotonin geri alım inhibitörleri) SAD tedavisinde tolere edilebilir olumlu sonuçlar vermekte ve SAD'ın baharda kendiliğinden sönümlenmesine kadar semptomları kontrol altında tutmaktadır. Noradrenerjik ve seçici serotonerjik aktivitesiyle mirtazapin de etkin kullanılan antidepresandır. Bupropion, alprazolam kullanılan diğer antidepresanlardır. Ancak antidepresanlara verilen tepki süresi parlak ışık tedavisine kıyasla çok daha uzundur. Kullanımıyla birlikte getirdiği yan etkiler bazı sağlık problemleri oluşturmaktadır. Bununla birlikte ışık tedavisine cevap vermeyen hastalar ilaçlara yanıt vermektedir.

Işık, sirkadyen ritmin senkronizasyonun en etkin ritim vericisidir (Zeitgeber). Biyolojik saat olarak da adlandırılan sirkadyen ritim 24 saatlik zaman dilimindeki döngüyü ifade eder. Pineal bez'den melatonin salgılanması, vücut sıcaklığının ayarlanması vs. gibi değişimler 24 saatlik döngülerde tekrarlayan olaylardan bazılarıdır. Araştırmalar parlak ışığa maruz kalınmasıyla insan ve hayvanlarda sirkadyen ritimde faz kayması (sirkadyen ritmin bozulması) meydana gelebileceğini ayrıca, suprakiazmatik çekirdek (SCN) tarafından kontrol edilen moleküler salınım ve aydınlık-karanlık döngüsü arasındaki senkronizasyonun bozulabileceğini göstermektedir. Sirkadyen ritim ile ilişkili olarak ışığa maruz kalmanın zamanı ve şiddeti bu faz kaymasının yönünü ve şiddetini etkilemektedir [173, 186]. Bazı çalışmalar da, fiziksel egzersin ışığa karşı olan duyarlılığı artırabileceğini göstermekte ve böylelikle faz kaymasını hızlanabileceğini raporlamaktadır [189].

Aile ve ikiz kardeşleri ele alan çalışmalar ve moleküler genetik çalışmaları, bazı genlerin SAD'a maruz kalma eğilimini etkileyebileceğini ileri sürmektedir. Dolayısıyla birkaç kuşaktır yüksek kuzey enlemlerde ikamet eden etnik grupların kutup kışına adapte olması olağandır. Norveç, Finlandiya, Sibiryaya ve Alaska'da ikamet eden aborjinleri inceleyen pek çok çalışma rapor edilmiştir [190-193]. Aborjin ve diğer etnik grupları inceleyen çalışmalarda, kış depresyonunu yaşama eğiliminin etnik gruplar arasında farklılar gösterdiği rapor edilmiştir. Bir örnek olarak, bir ada olan İzlanda'daki nüfus yüksek kuzey enlemlerde geçmiş 1000 yıldır izole bir şekilde yaşamaktadır. Bir dizi çalışmada, SAD'ın buradaki görülme sıklığı düşük çıkmıştır [194]. 3-4 nesildir Kanada'da yaşayan İzlanda göçmenlerinde de aynı şekilde düşük çıkmıştır [195, 196]. Çoğu çalışma, iklime alışma problemlerinden kaynaklı olarak göçmenlerin yerli halka oranla daha yüksek oranda SAD'a maruz kaldığını göstermektedir.

SAD'ın melatonin hipotezi, ışık periyodunun sonbahar ve kışın karanlık aylarında kısılmasıyla melatonin salımının artmasına böylelikle negatif etkiyen ruh hali ve davranışının ortaya çıkmasına dayandırılmaktadır. Işık, melatonin salımını etkileyen (salımı bastırır ve uykuya geçişi sağlar) başlıca faktördür. Pek çok araştırmacı, sirkadyen hormon melatoninin SAD'ı oluşumuna neden olan en önemli anahtar faktör olduğunu ileri sürmektedir [186].

Çalışma saatlerinin uzaması, sosyal hayat ve doğru olmayan ve yoğun aydınlatma nedeniyle günümüz modern şehirlerinde yaşayan pek çok birey uzun süre ışığa

maruz kalmaktadır. Buna bağlı olarak büyük şehirlerde yaşayan bireylerde melatonin döngüsünde anormallikler görölmektedir. Çalışma saatlerinden dolayı sirkadiyen ritmin bozulması endüstrileşmiş ölkelerde vardiyalı çalışmanın getirdiği sorunlardan biridir. Doğal aydınlık-karanlık döngüsünün bozulmasıyla melatonin değerlerinde saptanan anormalliklerin kişilerde kalp damar hastalıklarının, sindirim sistemi hastalıklarının ve psikolojik sorunların yanı sıra, oksidatif stres, meme, prostat, bağırsak ve rahim kanseri riskini önemli derecede yükselttiği saptanmıştır. [197, 198].

### **2.2.1 Melatonin**

Kronobiyotik bir madde olan melatonin (5-metoksi-N-asetilmetoksitriptamin), vücut ritmini stabilize eden senkronizerdir. Melatonin salınımı öncelikle pineal bezler tarafından yapılmakla birlikte deri, retina, kemik iliği, gastrointestinal sistem ve lenfositler (ki buradan parakrin sinyal iletimi ile diğer fizyolojik aktivitere etkileyebilir) tarafından da yapılmaktadır. Melatonin pineal bir hormondur. Melatonin sentezi, salınımı ve 24 saatlik vücut saatindeki senkronizasyonun kontrolü, suprakiazmatik çekirdeğe bilgi aktaran aydınlık/karanlık döngüsünün egemenliği altındadır. Bu nedenle, melatonin 'karanlığın hormonu' olarak da bilinmektedir. Melatonin salınımı esas olarak geceleri gerçekleşmektedir ve uyku ile bağlantılı parametrelerden sorumlu olan suprakiazmatik çekirdeğin uyarılmasıyla pineal bezlerden salınımı başlar ve uykunun düzenlenmesinin yanında diğer döngüsel vücut aktivitelerinin senkronize eder [197, 199].

Melatonin sentezi artınca hormon pasif difüzyonla kan dolaşımına geçer [200, 201]. Serum melatonin derişimi yaşa bağlı olarak belirgin değişiklik göstermektedir. İnsan fetusu ve yenidoğan kendi melatoninini üretmezler. İntrauterin dönemde plasental kan yoluyla ve postnatal olarak da anne sütü yoluyla anneden aldığı melatonin hormonunu kullanır. Aydınlık-karanlık döngüsü ile senkronize edilen endojen serum melatonin derişimi sağlıklı genç erişkinlerde tipik olarak yaklaşık gündüz saatlerinde 10 pg/mL-20 pg/mL arasında iken gece 30-150 pg/mL seviyesinde seyreder [201].

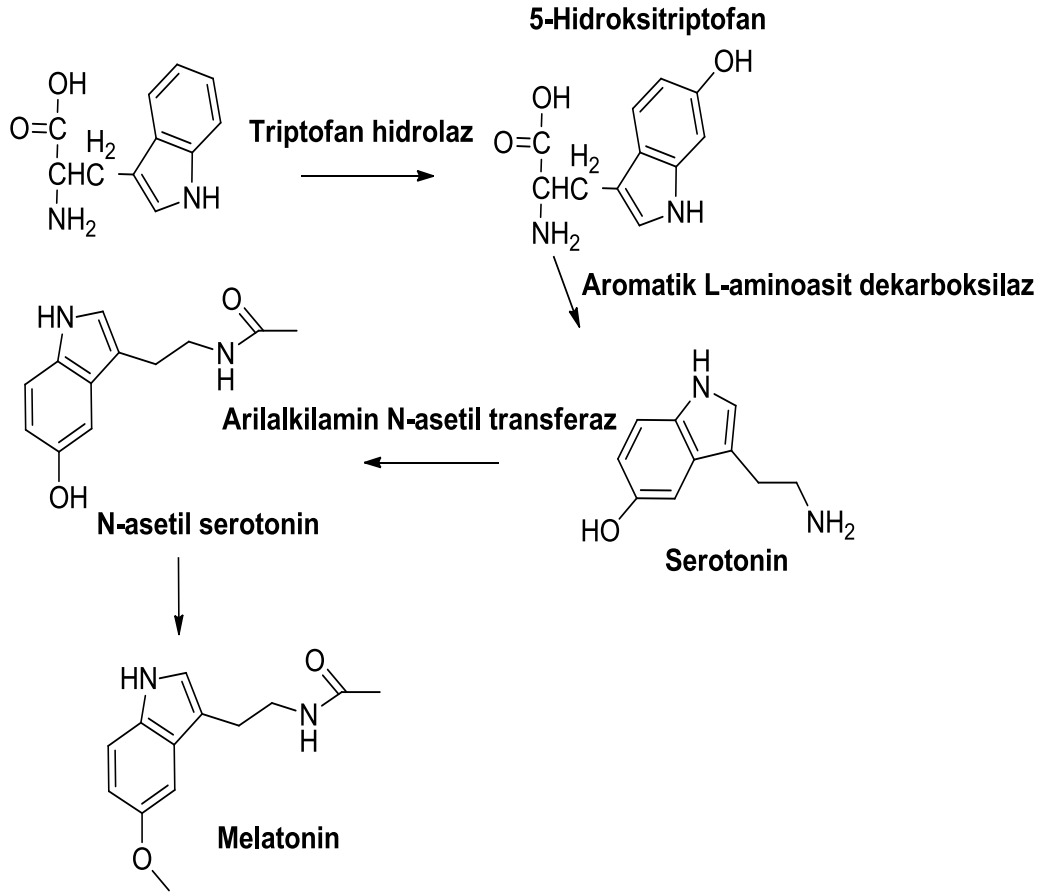
Melatoninin çoğu kanda albumine bağlı olarak taşınır. Albumine bağlı bulunması idrarla atılımını sınırlamasına rağmen, yarılanma ömrü 10-40 dakika gibi nisbeten kısa bir süredir. Karaciğerden ilk geçişte hormonun %90'ı kandan temizlenir. Hepatik hücreler tarafından alınan melatoninin yaklaşık %75'i 6-hidroksimelatonine

dönüştürülür. Bu bileşik de, sülfat [%70) ya da glukronik asitle (%6) konjuge olur. Tüm bu metabolitler idrarla atılır [202, 203].

Melatonin reseptörlerine bağlanan melatonin ve analoglarının depresyon, uykusuzluk, epilepsi, alzheimer hastalığı (AD), diyabet, obezite, alopesi, migren, kanser, immün sistem bozuklukları ve kardiyak bozukluklarının tedavisindeki rolleri nedeniyle önem taşımaktadır [197]. Ayrıca, melatonin serbest radikalleri (hidroksi radikalleri) inaktif hale getiren etkili bir antioksidandır [197, 204] ve bazı enzimlerin regülasyonunu sağlamaktadır [205].

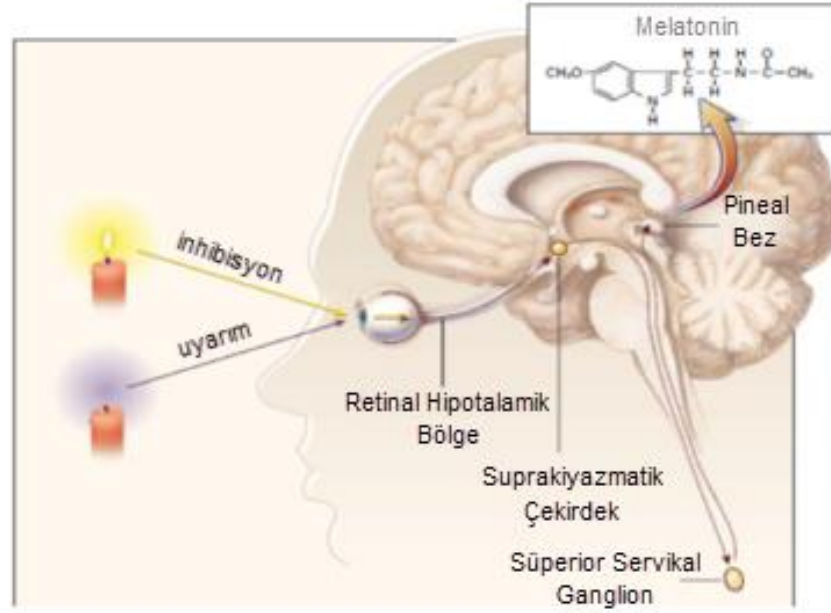
#### **2.2.1.1. Melatonin Biyosentezi ve Reseptörleri**

Melatonin biyosentezi besinlerle zorunlu olarak dışarıdan alınması gereken esansiyel bir amino asit olan triptofan üzerinden gerçekleşen bir indol bileşiğidir (Şekil 2.7). Kan dolaşımı ile pineal beze gelen triptofan, triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksillenerek 5-hidroksitriptofan'a (ara metabolit) ve L-aromatik asit dekarboksilaz enzimi etkisiyle karboksil grubunun yapıdan ayrılmasıyla serotonine (5-hidroksitriptamin) dönüşür. Bir sonraki aşamada serotonin, N-arilalkil asetil transferaz (AA-NAT) enzimi ile N-asetil serotonine ve hidroksi indol O-metil transferaz (HIOMT) enzimi etkisi ile melatonine dönüşür.



Şekil 2.7. Melatonin biyosentezi.

Pineal bezlerde melatonin sentezi fotoperiyodik etkileşim ile sinirsel, hormonal ve enzimatik sistemlerin kontrolü altında gerçekleşmektedir. Göze gelen ışık, retinadan hipotalamus çekirdeklerine (SCN ve PVN: Paraventriküler çekirdek) ve paraventriküler çekirdekten sinirler vasıtasıyla çıkan impulslar, median ön beyin demeti (MÖD) ve retikuler formasyon yolu ile medulla spinalize daha sonra da superior servikal gangliona (SCG) aktarılır ve en son olarak da pineal bezlere aktarılır [206]. Bu nöronal sistem karanlık ile aktive edilir ve ışık tarafından bastırılır. Pineal bezlerdeki  $\alpha_1$ - ve  $\beta_1$ -adrenerjik reseptörlerinin aktivasyonu siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve kalsiyum derişimleri yükselir ve N-arilalkil asetil transferaz enzimi melatonin üretimini ve salınımını başlatır [207].



Şekil 2.8. Melatonin salınımının fizyolojisi [207].

Melatoninin birçok önemli eylemi, G-proteine bağlı reseptörler ailesine ait  $MT_1$  ve  $MT_2$  membran reseptörleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu reseptörler SCN'deki kronobiyojik etkilerden ve sirkadyen ritimden sorumludur.  $MT_2$  faz kaymalarını uyarır ve  $MT_1$  sinirsel tetikleme aktivitesini baskılar.  $MT_1$  reseptörünün aktivasyonu, cAMP üretimini artıran adenilat siklaz enzimini inhibe eder ve ayrıca protein kinaz aktivitesi düşürür.  $MT_1$  reseptörü ayrıca hücre içindeki iyon akışını düzenleyen fosfolipaz enzimini aktive eder. Melatonin  $MT_2$  reseptörüne bağlanması adenilat siklaz inhibe etmesine ve cAMP azalmasına neden olur.

$MT_2$  reseptörü aracılığıyla ayrıca melatonin, guanilat siklazı inhibe eder ve cGMP oluşumunu azalmasına neden olur. Ek olarak PLC aracılığıyla, melatonin hücre içindeki iyon akışından sorumlu olan bir diğer enzim olan protein kinaza etki eder.  $MT_3$  reseptörlerinin hamsterların karaciğerinde ve böbreğinde ifade edilmesine karşın, insanlarda henüz tam olarak tanımlanamamıştır. Melatonin kalmodulin reseptörüne (kalsiyum metabolizmasında işlevi olan bir protein) bağlanmaktadır. Sitolitik kalmoduline bağlanarak adenilat siklaz ve fosfodiesteraz gibi hedef enzimler ve yapısal proteinler ile etkileşimi sayesinde doğrudan kalsiyum sinyaline etki etmektedir [197, 199]. Melatonin ayrıca retinoid orphan nükleer hormon reseptörlerinin (RZR/ROR) ligandıdır [208]. Bu nükleer reseptörler RZR / ROR orphan reseptör alt ailesine ait olup, üç tane alt tipi ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) ve bu alt tiplerin de dört

varyasyonunu içermektedir.  $ROR_{\alpha 1}$ ,  $ROR_{\alpha 2}$  immün modülasyondaki bazı kısımlarında görev almakta ve  $RZR_{\beta}$  merkezi sinir sisteminde ifade olmaktadır. Ayrıca  $ROR_{\alpha}$ , antioksidan enzimlerin yukarı düzenlenmesini sağladığı düşünülmektedir [197, 199].

### **2.2.1.2. Melatoninin Biyolojik Sıvılardaki Tayini**

Gündüz vaktindeki oldukça düşük melatonin derişimi (özellikle plazmadaki) araştırmacıları doğru ve güvenilir analitik yöntemleri geliştirmeye yöneltmiştir. Biyolojik sıvılardaki melatonin miktarının tayin edilmesinde immünolojik yöntemler kullanılan en yaygın yöntemdir. Bu yöntemeye dayalı çeşitli ticari kitler mevcuttur. Bu yöntemlerden bazıları son derece hassas (5 pg/mL gibi düşük tayin limitlerine ulaşabilen) ve kullanımı çok kolaydır; ancak melatonin özütlemesi yapılmamış ise yapısal olarak benzer bileşikler ile çapraz reaktivite göstermesi en büyük potansiyel riskidir [209, 210]. Melatonin tayini için ELISA testinin (1 fmol tayin limitine sahip) de kullanıldığı rapor edilmiştir [211]. Mevcut çalışmaların çoğunda pineal bez, retina, ve plazmadaki melatoninin miktarını radyoimmunoassay (RIA) ile belirlenmektedir. Çünkü yöntemin yüksek seçiciliği ile günlük melatonin salınımında değişikleri belirlemeye izin vermektedir. Mide-bağırsak yolu ele alındığında, memelilerdeki melatonin miktarı RIA ile belirlenmiş ve aynı zamanda balıklarda, amfibilerde ve sürüngenlerde yöntemin uygunluğu gösterilmiştir [212, 213]. RIA yöntemine alternatif olarak GC-LC/MS ve HPLC birçok biyolojik örnekteki melatonin miktarının belirlenmesinde başarıyla kullanılmıştır [214]. Hassasiyeti artırmak için HPLC'nin elektrokimyasal tayin (ED) ile birleştirmiştir. Ancak melatoninin yükseltgenmesi-indirgenmesi yüksek elektrik potansiyeli gerektiği için arka plandaki yükseltilmiş akımdan kaynaklanan girişimler oluşabilmektedir [215-217]. Floresans tayin içeren diğer bir kombinasyon, melatoninin herhangi bir türevlendirmeye ihtiyaç duyulmayan analizine olanak vermekte ve bir ön özütlemeye gerek duyan ve düşük melatonin miktarını içeren bu tür bir tayin yöntemi komplike örneklerdeki (plazma, merkezi ve periferik dokular) melatonin tayinini çok yönlü hale getirmektedir [218]. Bunların yanı sıra bazı laboratuvarlarda melatonin kan plazması ve pineal bezlerdeki tayini ve ayırımına yönelik kapiler elektroforez (CE) uygulamaları geliştirilmiştir [219]. Moleküler baskılanmış poli(etilen-ko-vinil alkol) ile kaplanmış çinko oksit nano borular da idrardaki melatonin miktarının saptanmasında kullanıldığıda da rapor edilmiştir [220].

### 2.2.2. Serotonin ve Triptofan'ın SAD ile Bağlantısı

SAD hakkında daha fazla çalışmaların yayınlanmasıyla, sirkadiyen faz kayması, ışık periyodu ve melatonin, genetik olgular ve nörotransmitterlerin (özellikle de serotonin, norepinefrin ve dopamin gibi beyin nörotransmitterlerinin etkileri) olası rolüne ilişkin hipotezlerde rapor edilmiştir [179]. Yapısal olarak tekli amin grubuna giren serotonin, norepinefrin ve dopamin gibi nörotransmitterin biyolojik ritim, ruh halinin düzenlenmesi, beslenme davranışları ve uyku üzerindeki etkisi göz önüne alındığında SAD araştırmalarının ilgi odağı bu sistem üzerine de yönelmiştir.

'Mutluluk hormonu' olarak da bilenen serotonin (5-hidroksitriptamin), biyokimyasal olarak triptofandan sentezlenen, esas olarak mide-bağırsak yolunda, trombositlerde ve merkezi sinir sisteminde bulunan bir tekli amin nörotransmitterdir [221]. %1'den daha az miktarı serbest formda kanda sirküle olurken geri kalan kısmı trombosit, perisinaptik sinirler ve enterokromafin hücrelerde depo edilmektedir. İnsan vücudundaki toplam serotonin miktarının yaklaşık %90'nı ince bağırsak hareketleri düzenlenmesinde kullanıldığı sindirim yolu içindeki enterokromafin hücrelerde (buradan da kan yoluyla vücut içindeki gerekli yerlere transfer edilir) yerleşmiştir. Geri kalan kısmı ruh halinin, iştahın ve uykunun düzenlenmesinde kullanıldığı merkezi sinir sistemindeki serotonerjik nöronlarda sentezlenir. Serotonin ayrıca hafıza ve öğrenme gibi bazı bilişsel işlevleri de bulunur [222, 223]. Kalp gelişimi [224], bağırsak hareketleri, vasküler ton ve trombosit agregasyonunun [222] düzenlenmesi gibi pek çok fizyolojik süreçte görev almaktadır. Serotonin reseptörleri (5-HTR) hücre membranlarında yerleşmiş ve merkezi sinir sisteminde, kalpte, mide bağırsak kanalında, kan damarlarında ve trombositlerde bulunmaktadır. Serotonin reseptörlerinin (5-HTR) 7 türü olmakla birlikte bunlardan da kendi alt sınıflarına (5-HTR1A, 5-HTR1B vb. gibi) ayrılmaktadır. 5-HTR1 ve 5-HTR5 aktivasyonu hücre içi cAMP birikimini inhibe ederken, 5-HTR4 ve 5-HTR7 aktivasyonu bu olayı stimüle etmektedir. 5-HTR2 aktivasyonu hücre içi  $Ca^{2+}$  salınımını azaltır ve 5-HTR2 aktivasyonu  $Na^+/K^+$  iyon kanallarının düzenlenmesi stimüle etmektedir. Serotonin taşıyıcılar plazma membranında yerleşmiştir ve aktif olarak doku boşluğu ve kandan hücrelere taşımaktadır [222]. Bu reseptörler beyin [225], kalp, mide-bağırsak kanalı, pineal bez, kan damarları [226] ve trombositlerde [225] ifade edilmektedir. Beyin, mide-bağırsak kanalı, karaciğer, akciğer ve trombosit hücrelerinde tekli amin



oksidaz (MAO) tarafından metabolize edilmektedir ve 5-hidroksiindolasetik asit (5-HIAA) olarak böbreklerden atılmaktadır.

Serotonin ve öncülü triptofanın derişimi mevsime göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca serotonin ve serotonin taşıma bölgelerinin derişimi dahi mevsim boyunca değişiklik göstermektedir. Serotoninin SAD üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar; reseptör çalışmaları, triptofan tükenmesi çalışmaları ve serotoninergik ajanlar ile tedavi çalışmaları olmak üzere 3 tiptedir. Melatoninin tersine, serotonin ışık ile salınımı aktifleşmektedir. Normal insan popülasyonlarında 24 saatlik serotonin serum derişiminin bir haftalık parlak ışık tedavisinden sonra beyindeki serotonin salınımı ve döngüsü güneş ışığıyla hızla artmaktadır. Bir çok çalışma beyin omuriliği sıvısı, postmortem beyin ve kandaki metabolizmasına ve serotonin miktarına ait belirgin mevsimsel değişiklikleri göstermektedir. Çoğu kış aylarında serotonin aktivitesinin düştüğünü göstermektedir. Serotonin taşıyıcılarının SAD'a etkisi üzerine yapılan çalışmalarda, serotonin taşıyıcıların da mevsimsel değişimler ile değişiklikliğe uğradığı belirtilmiştir [227].

## **2.3. Yaygın Analitik Tayin Yöntemleri**

### **2.3.1. Optik Yöntemler**

En yaygın olarak uygulanan optik yöntemler ışığın absorpsiyonuna ya da emisyonuna dayanmaktadır. Bununla birlikte, absorpsiyon temelli yöntemler ile karşılaştırıldığında lüminesan yöntemler (genellikle floresans ve fosforesan) sergilediği yüksek hassasiyet ve spesifite ile ön plana çıkmaktadır. Hedef yapılara yönelik gerçek zamanlı, in-situ ve dinamik bilgileri sağlayabilen floresans olgusu yaşam bilimlerinin en hızlı gelişen vazgeçilmez lüminesan yöntemidir [111]. Ayrıca, ışık ile bir metal yüzeyinin etkileşimine dayanan optik-elektriksel bir yöntem olan yüzey plazmon rezonans spektroskopisi afinite etkileşimlerini, kinetik hesaplamaları, sitokiyometri ve termodinamik hesaplamaları belirlemede yaygın şekilde kullanılmaktadır [228].

#### **2.3.1.1. Görünür Bölge ve Mor Ötesi (UV-VIS) Spektroskopisi**

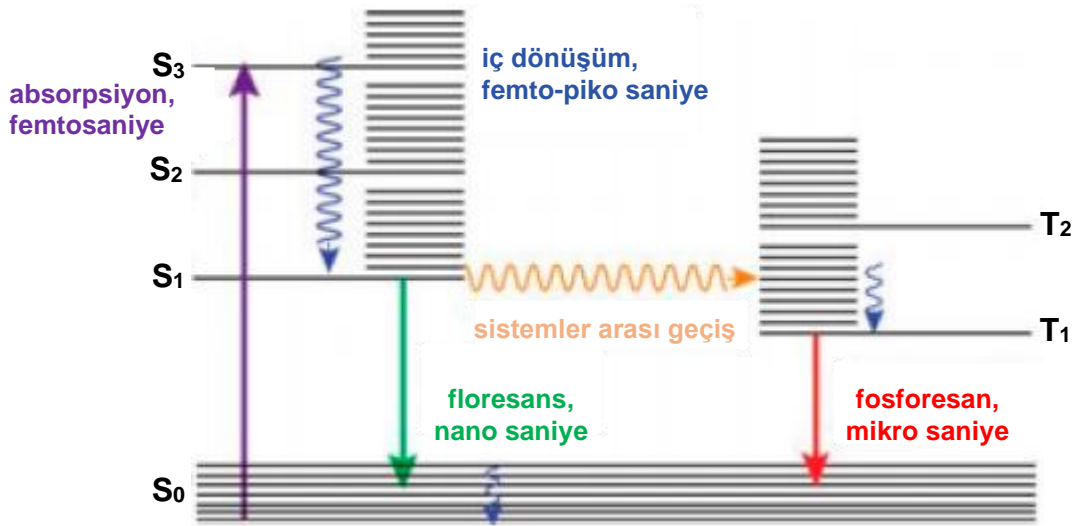
UV-VIS spektroskopisi elektromanyetik dalganın madde ile etkileşmesiyle (elektromanyetik dalganın absorpsiyonu) bağ elektronlarının uyarılması (bağ elektronlarının temel enerji seviyesinden ( $E_0$ ) bir üst enerji seviyesine ( $E_1$ ) geçmesi sonucunda gerçekleşen elektronik geçişleri konu almaktadır. UV-VIS spektroskopisi analitik kimyada geçiş metal iyonları, konjuge organik bileşikler, biyolojik

makromoleküller gibi farklı analitlerin kalitatif ve kantitatif tayininde rutin bir şekilde kullanılmaktadır.

### 2.3.1.2. Fotolüminesan Spektroskopisi

Maddeyi oluşturan atom veya moleküllerin uygun formdaki enerjiyi absorplamasıyla elektronik olarak uyarılmış enerji seviyesinden temel enerji seviyesine dönerken enerjisinin bir kısmını ışımaya şeklinde atması olayına genel olarak lüminesan (ışık saçılması) denir. Uyarılma olayı belirli dalga boyuna sahip fotonun madde tarafından absorplanmasına dayanıyorsa gözlenen lüminesan olayı fotolüminesan olarak tanımlanır. Fotolüminesan durulma sürecine göre (uyarılmış enerji seviyesinden temel enerji seviyesine geçiş süreci) floresans ve fosforesans olarak ikiye ayrılmaktadır.

Floresans ve fosforesans oluşum mekanizması Şekil 2,9'da açıklanmaktadır. Belirli bir dalga boyuna sahip fotonun madde ile etkileşimi sonucunda temel enerji düzeyindeki ( $S_0$ ) elektronların daha yüksek boş enerji seviyelerine ( $S_1$ ,  $S_2$  ve benzeri) geçişleri uyarılmaktadır. Uyarılmış tekil enerji seviyesindeki moleküller iç dönüşüm ya da titreşimsel durulma (ışık saçılımı olmaksızın), floresans, sistemler arası geçiş (tekil enerji seviyesinden üçlü enerji seviyesine geçiş) ve fosforesans gibi fizikokimyasal olay zinciri aracılığıyla temel enerji seviyelerine geri dönerler.



Şekil 2.9. Jablonski diyagramı ve fotofiziksel süreçlerin zaman çizelgesi [111].

Goppelsrodel tarafından 1867 yılında yapılan en eski floresans temelli analizin üzerinden yaklaşık 150 yıllık bir süre geçmiştir. Bir buçuk asırlık gelişim süreci

içerisinde, floresans temelli yöntemler moleküler biyoloji, hücre biyolojisi, genomiks, proteom analizi, medikal teşhis ve tedavi gibi alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmakta olup, ayrıca yaygın analitik yaşam bilimlerinde temel ve uygulamalı çalışmaları destekleyen yaygın analitik araçlar olarak yerini almıştır. Günümüzde floresans korelasyon spektroskopisi, floresans rezonans enerji transferi, floresans ömrü görüntüleme ve floresans in-situ melezleme gibi oldukça basit ve kullanışlı stratejilerle çevre, biyokimya ve biyotıp alanında farklı amaçlar için ustalıkla kullanılmaktadır. Floresans temelli kitler biyolojik makromoleküllerde tek molekül düzeyinde yapısal ve işlevsel bilgilerin eldesine yönelik mükemmel uzaysal ve zamansal (nanosaniyeler) çözünürlükte hassas ölçümlerin yapılmasını mümkün kılmaktadır [111].

### **2.3.1.3. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)**

Yüzey plazmon rezonans, farklı kırınım indisine sahip iki ortam arasındaki ince iletken filme uygun dalga boyunda ışık gönderilmesi sonucu, ışığın metal yüzeyle etkileşmesiyle oluşan optik-elektriksel bir olaydır. Işığın metal yüzeyine çarpması ile gelen ışığın bir kısmı yansırken bir kısmında metal atomları (metalin iletim bandı elektronları) ile etkileşerek homojen olmayan elektromanyetik dalga oluşturur. Kullanılan metalin ışık ile uygun dalga boyunda rezonansa girebilecek iletim bandı elektronlarına sahip olması gereklidir. Genelde en çok kullanılan metaller altın, gümüş, bakır, alüminyum ve sodyumdur. Oluşan homojen olmayan dalga prizma metal yüzeyine dikey olarak yayılır ve üssel olarak azalır. Eğer metal yeterince ince ise (görünür ve yakın kızılötesi dalga boyları için  $<100$  nm) dalga metal film boyunca ilerler ve metalin dış yüzeyinde yüzey plazmon ile çiftleşir. Oluşan yüzey plazmonları metal/dielektrik arayüzeyine paralel olarak yayılır [229, 230].

Plazmon metal ile dielektrik bölge sınırında olduğundan bu yüzeydeki değişikliklere karşı çok duyarlıdır. Plazmonun oluşturduğu alan etrafındaki kimyasal yapıda meydana gelecek herhangi bir değişiklik, rezonansa giren ışığın dalga boyunda da değişikliğe neden olur. Bu da SPR'yi analitik uygulamalarda kullanmamızı sağlar. Sensör yüzeyinin yakınındaki kırınım indeksi, yüzeye makromolekül bağlanmasıyla değişir. Sonuçta yansıyan ışığın açısı da, bağlanan makromolekülün miktarına göre değişir. Yansıyan ışığın açısı ile bağlanan maddenin miktarı arasında lineer bir ilişki vardır [229, 231].

SPR biyosensör teknolojisinden bu alanda sıkça yararlanılmaktadır ve bu konuda hedeflenen analitler; kanser işaretleyicileri, alerji ve kalp krizi belirtleçleri, antikolar, ilaçlar ve hormonlardır [232].

SPR, esas olarak 4 alanda uygulanmaktadır: Afinite etkileşimleri, kinetik hesaplamalar, sitokiyometri ve termodinamik hesaplamalar. Bunlar içinde en önemlisi, biyotanıma molekölü ile hedef analit arasındaki spesifik etkileşime dayanan afinite etkileşimleridir. Ayrıca SPR ile eş-zamanlı ölçüm yapılabildiği için kinetik eğrisinden kinetik hesaplamalar da yapılabilir. Aynı zamanda sitokiyometri ve termodinamikte de yine SPR uygulamalarından yararlanılmaktadır [229].

SPR ile incelenebilen affinite etkileşimleri çok çeşitlidir. Bunlara örnek olarak; peptid ya da protein ile protein arasındaki etkileşim, nükleik asitler ile proteinler arasındaki etkileşim, moleküler baskılama yöntemiyle oluşturulmuş yapay malzeme ile biyolojik madde arasındaki etkileşim ya da çeşitli ilaçlar ile protein ya da nükleik asitler arasındaki etkileşim verilebilir.

SPR biyosensör teknolojisinin, gıda analizleri konusundaki geçerliliği arttıkça bu alandaki hedef analit tespitine yönelik yapılan çalışmaların sayısı da artmaktadır. Bu alanda hedeflenen analitler arasında; patojenler, toksinler, çeşitli ilaçlar, vitaminler, hormonlar, tanısal antikolar, alerjenler, proteinler ve kimyasal atıklar sayılabilir. Diğer bir uygulama alanı, çevre analizleridir. SPR biyosensör teknolojisiyle hedeflenen ve çevresel öneme sahip analitler, pestisitler, aromatik hidrokarbonlar, ağır metaller, fenoller, bifeniller ve dioksinlerdir. Üçüncü uygulama alanı, SPR'nin tıbbi tanı amaçlı kullanımınıdır. Normal biyolojik süreçlerde, patolojik süreçlerde veya belirli bir tedaviye karşı yürütülen farmakolojik cevaplarda önem taşıyan çeşitli moleküler biyomarkırların hızlı, hassas ve spesifik tespiti, modern biyoanalitik uygulamalarda büyük önem taşımaktadır [229-233].

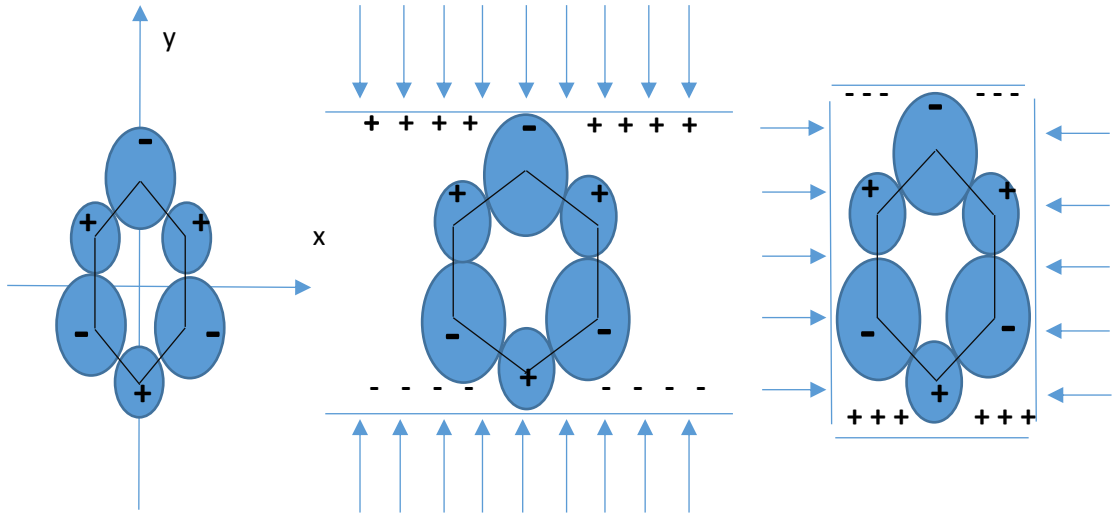
## **2.3.2. Kütle Temelli Yöntemler**

### **2.3.2.1. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM)**

Piezoelektrik kristale dayalı bir sensör veya çevirici kütle artışına karşı aşırı duyarlı olması nedeniyle genellikle kuvars kristal mikroterazi (QCM) olarak adlandırılır. Adına rağmen, bir mikroteraziden çok daha fazlasıdır. Kimyasal sensörlerin geliştirilmesinde kullanılan sentetik ve biyolojik polimerlerin dahil olduğu pek çok malzemenin viskozitesinin ve esnekliğinin incelenmesinde kullanılabilen bir yaklaşımdır. Bu yüzden, QCM kimyasal sensörlerde kullanılan ince tabakaların

fizikokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesinde benzersiz bir araçtır. QCM'in geniş potansiyelinin akılcı kullanımı algılama elemanın fizikokimyasal özellikleri hakkında bilgi hazinesi oluşturur. Aynı zamanda çeşitli tipte kimyasal sensörlerin tasarımını ve uygulanmasını mümkün kılar.

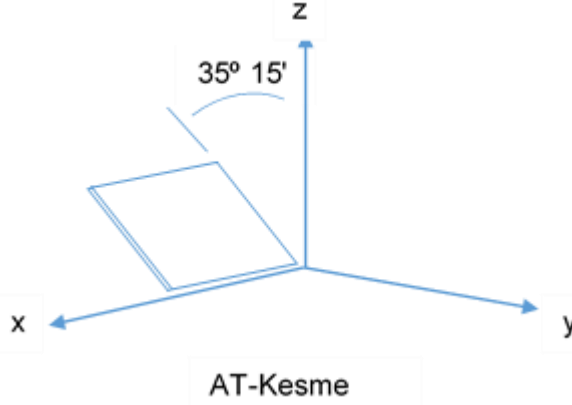
Bazı kristallerin yüzeylerine mekanik gerilim uygulandığında kristal yüzeyleri arasında, uygulanan bu gerilimin şiddeti ile doğru orantılı bir elektriksel potansiyel farkı oluşur. Bu etki "piezoelektrik etki" olarak tanımlanmıştır. Yunanca da "baskı" anlamına gelen "piezein" kelimesinden türetilmiş piezoelektrik etki 1880 yılında Curie kardeşler tarafından keşfedilmiştir [234]. Piezoelektrik kristalinin iki yüzeyi arasına uygulanan elektriksel gerilim farkının kristallerde boyut değiştirmeye ve gerilime yol açtığını, başka bir ifadeyle "ters piezoelektrik etki" olarak bilinen bu etkiyi kullanarak kristal yüzeyleri arasına uygulanan elektriksel gerilimin şiddetini değiştirerek piezoelektrik kristalin boyutlarını değiştirmenin mümkün olduğu saptanmıştır. [235].



Şekil 2.10. Piezoelektrik etkinin şematik gösterimi.

Kuvars kristal elektriksel, mekanik ve kimyasal özellikleriyle ticari olarak en yaygın kullanıma sahip piezoelektrik kristaldir. Piezoelektrik dedektör özelliğinin sağlanması için kuvars kristaller belli bir açıyla kesilir. Kalınlık kesme modu kütle değişimlerin en hassas algılandığı mod olması sebebiyle kuvars kristaller optik z-ekseninden  $35^{\circ}15'$  açıyla kesilir (AT-kesme). AT-kesme kuvars kristallerin  $\Delta f(\text{frekanstaki değişim})/f(\text{frekans}) \sim 10^{-8}$  gibi yüksek frekans kararlılığı ve  $0-50^{\circ}\text{C}$

aralığında sıfıra yakın sıcaklık katsayısına sahip olması nedeniyle piezoelektrik etkiyi temel alan uygulamalarda sıklıkla tercih edilir [235, 236].



Şekil 2.11. AT kesim kuvars kristal düzlemi [236].

AT-kesme kuvars kristale (rezonatör) alternatif bir elektrik alanın uygulanmasıyla yığın yapıdaki kristalin iki yüzeyi mekanik stresin etkisiyle birbirine paralel yönlerde hareket eder ve uygulanan elektrik alan boyunca ilerleyen bir akustik dalga oluşturur. Bu tip rezonatörler kalınlık kesme mod rezonatörleri olarak adlandırılmaktadır.

Gerilim kaynağı, frekans sayacı ve osilatör devresinden oluşan QCM sistemi piezoelektrik kuvars kristal rezonatör yüzeyindeki kütleli değişimlere rezonatörün titreşim frekansındaki değişimi ölçerek yanıt vermektedir.

Kuvars kristal rezonatörün frekansındaki değişimin ( $\Delta f$ ), kütle değişiminin ( $\Delta m$ ) doğrusal bir fonksiyonu olduğu Sauerbrey tarafından gösterilmiştir [237].

$$\Delta f_m = - (f_o^2 / F_q \rho_q) m_s = - (f_o^2 / F_q \rho_q) (\Delta m_s / A_{el}) \quad (2.1)$$

Eşitlik 2.1 sadece rezonatör üzerinde biriken ince katı tabakalar için geçerlidir. Başlangıçta, QCM ölçümleri katı faz ölçümler için kullanılmıştır. Fakat uygun salınım devrelerinin geliştirilmesiyle sıvı fazda da ölçüm yapmak mümkün hale gelmiştir [238]. Sıvının yoğunluğu ( $\rho_1$ ), viskozitesi ( $\eta_1$ ) ve kuvars kristal rezonatörün frekansı arasındaki ilişkiyi açıklayan eşitlik Kanazawa ve Gordon tarafından türetilmiştir [239].

$$\Delta f = - f_o^{3/2} (\rho_1 \eta_1 / \pi \rho_q \mu_q)^{1/2} \quad (2.2)$$

İki tabakalı bir sistemde frekans değişimi, tüm değişimlerin toplanması ile hesaplanır.

$$\Delta f = \Delta f_m + \Delta f_1 = - f_o^2 [(\Delta m_s / F_q \rho_q A_{el}) + (\rho_1 \eta_1 / f_o \pi \rho_q \mu_q)^{1/2}] \quad (2.3)$$

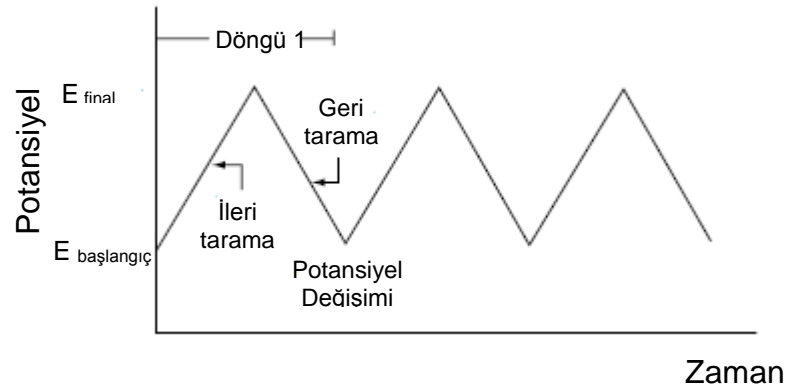
$f_o$  (Hz), rezonans frekansı;  $F_q$ , ( $F_q = \frac{1}{4} f_o \cdot d_q$ ) (Hz.cm<sup>2</sup>/ng), kristalin frekans sabiti;  $d_q$  (mm), kristalin kalınlığı;  $\rho_q$  (g/cm<sup>3</sup>), yoğunluğu;  $A_{el}$  (mm<sup>2</sup>), kristal rezonatörün elektrot boyutu;  $\rho_1$  (g/cm<sup>3</sup>), sıvının yoğunluğu;  $\eta_1$  (kg/m/s), sıvının viskozitesidir.

Kuvars kristal rezonatör sadece kütle değişimine hassas olmayıp ayrıca rezonatör yüzeyinde viskosite ve yoğunluk değişimlerine de hassasiyet gösterir (Eşitlik 2.2) [240]. Kütle hassasiyetine dayanan ölçüm yöntemiyle işaretleme basamağına gerek duyulmamaktadır. Piezoelektrik mekanizma üzerinden sinyal iletimi kompleks, optikçe opak karışımlarda iyi sonuç vermektedir. Ara yüzey malzemedeki viskozite ve yüzeydeki serbest enerji değişimlerinden dolayı bu teknik ile çözelti-yüzey ara yüzeyindeki algılanması zor olan değişiklikler tayin edebilir. Elektrokimyasal kuvars kristal mikroterazi türleri, araştırmacılara metal elektrodun üst kısmına potansiyel uygulanmasına izin verir. Böylelikle bir elektrokimyasal hücre oluşturulur. Elektrokimyasal tepkimelerin ve elektron aktarım süreçlerinin incelenmesi mümkün olur. Bu tekniğin kullanımının oldukça kolay olması ve temel cihazların pahalı olmaması diğer avantajlarıdır [234].

### 2.3.3 Elektrokimyasal Yöntemler

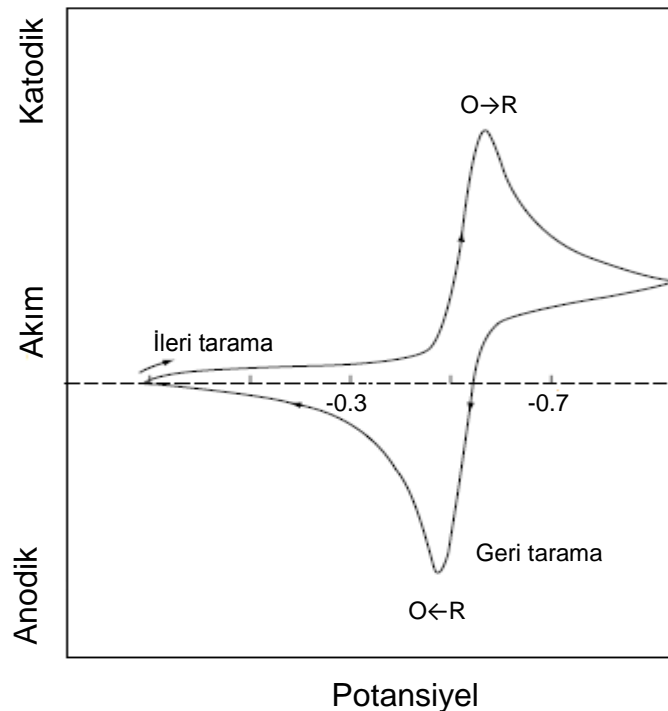
#### 2.3.3.1. Dönüşümlü Voltametri (CV)

Dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal reaksiyonlar hakkında nitel bilgi edinilmesinde en yaygın kullanılan tekniktir. Dönüşümlü voltametri sonuçlarının gücü redoks süreçlerine ait termodinamiklere, heterojen elektron-transfer reaksiyonlarının kinetiklerine ve adsorpsiyon süreçlerine ait verdiği güvenilir bilgilerin hızlı şekilde sunmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, elektroanalitik çalışmalarda genellikle ilk gerçekleştirilen deney basamağıdır. Dönüşümlü voltametri, üçgen dalga şekilli potansiyel ile uyarılan durgun çalışma elektrodun karıştırılmayan bir çözültideki akım cevabını içermektedir (Şekil 2.12). Potansiyel taraması esnasında, potansiyostat uygulanan potansiyele karşı oluşan akım değerlerini ölçer. Elde edilen akım-potansiyel eğrisi dönüşümlü voltamogram olarak tanımlanmaktadır. Dönüşümlü voltamogram çok sayıda fiziksel ve kimyasal parametrenin komplike, zamana bağlı fonksiyonudur [241].



Şekil 2.12. Dönüşümlü voltametrik uyarma sinyali [241].

Şekil 2.13, tersinir redoks çiftine ait tek bir potansiyel çevrimini temsil etmektedir. Bu şekilde, çözelti ortamında sadece yükseltgenmiş türün (Yük) bulunduğu varsayılmıştır. Yük + ne- → İnd (İndirgenmiş tür) reaksiyonu tersinir olduğu durumda dönüşümlü voltamogram Şekil 2.13'deki gibi ifade edilir. İleri yönlü taramada, Yük'ün İnd'e indirgenmesi ile katodik bir pik elde edilir. Geri yönlü taramada, ileri yönlü tarama süresince meydana gelen İnd'in Yük'e tekrar yükseltgenmesinden kaynaklanan, anodik bir pik gözlenir. Tersinir reaksiyonlar için, katodik ve anodik pik akımlarının büyüklükleri ( $|i_p^k| = |i_p^a|$ ) eşittir [241].



Şekil 2.13. Tersinir redoks sürecine ait tipik dönüşümlü voltamogram [241].



Tersinir elektrot reaksiyonlarında, pik akımlarının değeri (25°C'de) Randles–Sevcik eşitliği (Eşitlik 2.4) ile belirlenmektedir [241].

$$I_p = 2.69 \times 10^5 AD^{1/2} n^{3/2} \gamma^{1/2} C \quad (2.4)$$

$I_p$ , akım yoğunluğu (A/cm<sup>2</sup>)

$n$ , redoks sürecinde aktarılan elektron sayısı

$D$ , difüzyon katsayısı, (cm<sup>2</sup>/s)

$A$ , elektroaktif yüzey alanı (cm<sup>2</sup>)

$\gamma$ , tarama hızı (V/s)

$C$ , prob moleküllerinin ana çözeltideki derişimi (mol/cm<sup>3</sup>)

Ayrıca, formal redoks potansiyelini elde etmek için kullanılan yarı dalga potansiyeli Eşitlik 2.5 ile hesaplanmaktadır.

$$E_{r/2} = (E_p^k + E_p^a)/2 \quad (2.5)$$

Pik potansiyelleri arasındaki ayırım da Eşitlik 2.6 ile hesaplanmaktadır.

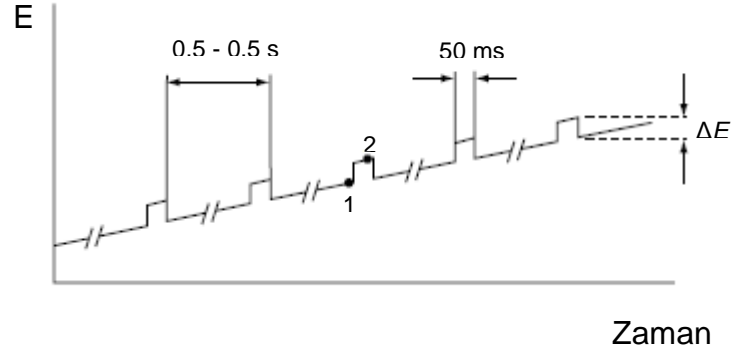
$$\Delta E = E_p^a - E_p^k = \frac{0,059}{n} \quad (2.6)$$

### 2.3.3.2. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)

Diferansiyel puls voltametri, organik ve inorganik türlerin eser miktarlarının belirlenmesinde oldukça kullanışlı bir tekniktir. Doğrusal bir potansiyel artışına göre ayarlanmış sabit büyüklükte pulslar (dE/dt), çalışma elektroduna belli bir süre uygulanır. Şekil 2.14'de görüldüğü gibi iki kez akım ölçümü yapılır. İlki, doğru akım pulsu uygulanmadan önce, diğeri ise pulsun bitmesine yakın bir zamanda yapılır. Puls basına akımdaki fark ( $\Delta i$ ) doğrusal şekilde artan potansiyelin fonksiyonu şeklinde ifade edilir. Uygulanan potansiyele karşı bu akım farklarının grafiğe geçirilmesiyle diferansiyel puls voltamogramı elde edilir. Elde edilen differansiyel eğri pik şeklinde yüksekliği derişim ile doğru orantılıdır (Eşitlik 2.7) [241].

$$i_p = \frac{(nFACD^{1/2})}{(\sqrt{\pi t})} \frac{(1-\sigma)}{(1+\sigma)} \quad (2.7)$$

$\sigma = \exp[(nF/RT)(\Delta E/2)]$  ve  $\Delta E$ , puls genişliğini ifade etmektedir [241].



Şekil 2.14. Differansiyel puls polarografisi için uyarma sinyalleri [241].

### 2.3.3.3. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)

Empedans spektroskopisi, elektrot ve elektrot ara yüzeylerinin elektriksel özelliklerinin belirlenmesinde güçlü bir tekniktir.  $U(t) = U_m \sin(\omega t)$ , alternatif potansiyelin bir elektroda uygulanmasıyla  $I(t) = I_m \sin(\omega t - \vartheta)$ , akımı oluşmaktadır. Burada;  $\vartheta$ , potansiyel ve akım arasındaki faz farkı,  $U_m$  ve  $I_m$  terimleri ise sırasıyla sinüsoidal potansiyel ve akım genliklerini ifade etmektedir. Bu koşullarda impedans Eşitlik 2.8 ile ifade edilmektedir [242].

$$Z = U(t) / I(t) = |Z| e^{j\vartheta} = Z' + jZ'' \quad (2.8)$$

$$j = (-1)^{1/2}$$

$Z'$  ve  $Z''$ , sırasıyla gerçek ve sanal direnci ifade etmektedir. İmpedans ölçümlerini gerçekleştirirken en genel yol frekans analizidir. Farklı frekanslardaki sinyallerin uygulanmasıyla, genlik ve faz değişimleri ya da gerçek ve sanal direnç değerleri ölçülür. İmpedans verileri,  $-Z''$  karşı  $Z'$  olacak şekilde Nyquist eğrisi olarak ifade edilmektedir [242].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışması üç temel başlıkta özetlemek mümkündür: **i)** melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin sentezi ve mevsimsel duygu bozukluklarının biyolojik belirteci olan melatonin hormonunun tayininde biyosensör ve/veya biyogörüntüleme amaçlı kullanımının incelenmesi; **ii)** biyoesinlenilmiş sensör yüzeylerinin tasarımına yönelik polimerik filmlerin üretimi ve **iii)** DNA yapısından esinlenerek sıcaklığa duyarlı aç-kapa nükleotid temelli polimerlerin üretimi. Bu kapsamda üç farklı biyoesinlenme yaklaşımı kullanılarak çeşitli metabolitlere karşı biyosensörler geliştirilmiştir.

#### 3.1. Melatonin Baskılanmış Floresans Nanopartiküllerin Tasarımı, Üretimi Ve Mevsimsel Duygusal Bozukluk Teşhisinde Kullanımının İncelenmesi

##### 3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Melatonin, serotonin hidroklorür, L-triptofan, L-aspartik asit, terbiyum (III) nitrat pentahidrat, polivinil alkol (PVA), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), dimetakrilat (EGDMA), azobisisobutironitril (AIBN), 1H-benzotriazol, trietilamin ve metakriloil klorür Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. HEMA ve EGDMA polimerizasyon inhibitörünü uzaklaştırmak için düşük basınçta (100 mmHg) damıtılmış ve kullanılabileceği kadar 4°C'da muhafaza edilmiştir. Deneylede kullanılacak cam malzemeler bir gece boyunca 4 M nitrik asitte bekletilmiştir. Deneylede kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değıştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir.

##### 3.1.2. Metakriloil amido-benzotriazol (MA-Bt) Sentezi

1H-Benzotriazol (0.01 mol, 1.19 g) ve trietilamin (0.011 mol, 1.11 g) toluen içinde çözülmüş ve çözelti 0-5°C'ye kadar soğutulmuştur. Metakriloil klorür (0.011 mol, 1.15 g) damla damla 150 rpm sabit karıştırma hızında benzotriazol ve trietilamin içeren toluen çözeltisine ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 15 saat içerisinde reaksiyonun tamamlanmasına izin verilmiştir. Reaksiyonun tamamlanmasıyla oluşan yağimsı çökelek toluen ile yıkanmıştır. Yağimsı yeşil renkli sıvı haldeki monomer (MA-Bt) reaksiyona katılmamış trietilamin, metakriloil klorür ve toluenin döner buharlaştırıcıyla uzaklaştırılmasıyla elde edilmiştir.

### 3.1.3. N-Metakriloil-L-Triptofan (MATrp) Monomerinin Sentezi

N-Metakriloil-L-triptofan (MATrp) monomerinin sentezi için uygulanan yöntem kısaca şöyledir: 5.52 mmol, (1.12 g) L-triptofan, 1 M NaOH sulu çözeltisinde deney tüpü içinde çözülmüştür. MA-Bt (5.52 mmol) çözeltisi içeren 1,4-dioksan (25mL) yavaşça aminoasit çözeltisi içine eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 10-20 dakika içerisinde reaksiyonun tamamlanmasına izin verilmiştir. Reaksiyon bittiğinde vakum altında 1,4-dioksan buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Çökelti su ile seyreltilmiş ve reaksiyon sonucu oluşan 1H-benzotriazol, etil asetat (3 x 50 mL) ile çekilmiştir. Toplanan sulu monomer çözeltisi % 10'luk HCl çözeltisi kullanılarak pH 6-7 (metakriloil grubunun asidik ortamda olası polimerleşmesini engellemek için pH 6-7 civarında tutulmalıdır) olacak şekilde nötrleştirilmiştir. Döner buharlaştırıcı ile su yapıdan uzaklaştırılarak reaksiyon ürünü MATrp monomeri (açık kahverengi renkli çökelek) elde edilmiştir.

### 3.1.4. N-Metakriloil-L-Aspartik Asit (MAAsp) Monomerinin Sentezi

N-Metakriloil-L-Aspartik Asit (MAAsp) monomerinin sentezi aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Uygulanan yöntem kısaca şöyledir: 5.52 mmol, (0.73 g) L-aspartik asit, 1 M NaOH sulu çözeltisinde deney tüpü içinde çözülmüştür. MA-Bt çözeltisi içeren 1,4-dioksan (25 mL) yavaşça aminoasit çözeltisi içine eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 10-20 dakika içerisinde reaksiyonun tamamlanmasına izin verilmiştir. Reaksiyon bittiğinde vakum altında 1,4-dioksan buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Çökelti su ile seyreltilmiş ve reaksiyon sonucu oluşan 1H-benzotriazol, etil asetat (3 x 50 mL) ile çekilmiştir. Toplanan sulu monomer çözeltisi % 10'luk HCl çözeltisi kullanılarak pH=6-7 olacak şekilde nötrleştirilmiştir. Döner buharlaştırıcı ile su yapıdan uzaklaştırılarak reaksiyon ürünü MAAsp monomeri (açık sarı renkli çökelek) elde edilmiştir. Elde edilen fonksiyonel monomerler, Fourier dönüşümlü infrared spektrometresi-azaltılmış toplam reflektans (FTIR-ATR) ile karakterize edilmiştir.

### 3.1.5. Tb(III)MAAsp<sub>3</sub> Floresans Kompleksin Hazırlanması

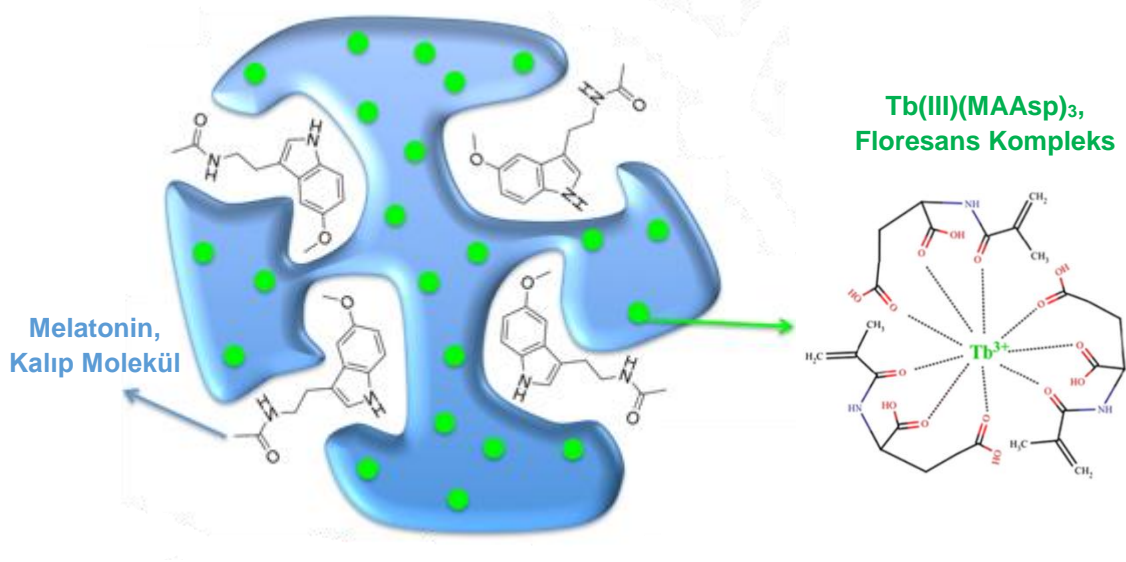
Floresans lantanit kompleks, MAAsp fonksiyonel monomeri ile Tb(III) iyonlarının 3:1 (molce) oranında karıştırılması ile oluşturulmuştur. Bu amaçla, MAAsp (3 mmol) ve kompleks oluşmasını kolaylaştıran ajan olarak amonyum oksalat monohidrat, (0.5 mmol, 71 mg), 20 mL deiyonize su içinde çözülmüştür. pH, NaOH'ın (1.0 M) damla damla eklenmesiyle kompleks oluşumu için en uygun pH olan pH = 6.0 -7.0

aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra, 5 mL deiyonize su içinde çözülen  $Tb(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$  (1 mmol, 435 mg) tuzu önceki çözelti içerisine damla damla ilave edilmiştir. Karışım daha sonra 24 saat boyunca 150 rpm'de manyetik olarak karıştırılmış ve oluşan beyaz çökelti (kompleks kristalleri) süzülerek çözeltilerden toplanmıştır. Floresans kompleksinin karakterizasyonu spektrofotometri (Shimadzu, RF 5301, Tokyo, Japonya) ile yapılmıştır. Bu amaçla MAAsp, Tb(III) ve floresans kompleksinin emisyon spektrumları 250-900 nm dalga boyu aralığında alınmıştır.

### **3.1.6. Moleküler Baskılanmış Floresans Nanopartiküllerin Üretilmesi**

Melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin hazırlanmasında aşağıdaki yöntem izlenmiştir. Polimerizasyon ikili sıvı faz karışımında gerçekleştirilecektir. Birinci sıvı faz, polivinil alkol (PVA, 93 mg), sodyum dodesil sülfat (SDS, 15 mg) ve sodyum bikarbonatın (12.5 mg) sulu çözeltisidir. İkinci sıvı faz, PVA (50 mg) ve SDS'nin (50 mg) sulu çözeltisidir. Monomer fazı ise; fonksiyonel monomer N-metakriloil-L-triptofan (MATrp) monomeri (0.125 mmol), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) (0.5 mmol), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) (15 mmol) kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan monomer fazı, birinci sıvı faza eklenmiştir. Karışım, miniemülsiyon elde etmek için 25.000 rpm'de homojenize (T10, Ika Labortechnik, Almanya) edilmiştir. Daha sonra, kalıp molekül (melatonin) miniemülsiyona eklenmiş ve etkin monomer-kalıp etkileşimini gerçekleştirmek için manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırılmıştır. Bu işlem sırasında ortama polimerleşebilir lantanit kompleksi (0.125 mmol) de ilave edilmiştir. Karıştırma işlemi devam ederken kalıp molekülü içeren miniemülsiyon yavaşça ikinci sıvı faza eklenmiştir. Daha sonra karışım cam polimerizasyon reaktörüne aktarılmıştır. Reaktör manyetik olarak karıştırılıp (400 rpm) ve 40°C'ta ısıtılmıştır. Son olarak, sodyum bisülfat ve amonyum persülfat polimerizasyon başlatıcısı olarak karışıma eklenmiştir. Polimerizasyon 40°C'ta 24 saat süreyle devam ettirilmiştir. Elde edilen melatonin baskılanmış floresans nanopartiküller (Şekil 3.1) 5 kez deiyonize su, 5 kez etil alkol ve tekrar deiyonize su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen monomer, yüzey aktif madde ve başlatıcı uzaklaştırılmıştır. Her bir yıkama basamağı için çözelti 60000 rpm'de 1 saat süreyle santrifüj edilmiş (Allegra-64R Beckman Coulter, ABD) ve nanopartiküller yıkama ortamından ayrılmıştır. Yıkama işleminden sonra kalıp molekül olan melatonin floresans nanopartikül yapısından uzaklaştırılabilmesi amacıyla 1 M NaCl

çözeltisi kullanılmıştır. Temizlenen nanopartiküller, deiyonize su içerisinde tekrar dağıtılmış ve 4°C’de saklanmıştır. Baskılanmamış floresans nanopartiküller polimerizasyon ortamında kalıp molekül (melatonin) ve fonksiyonel monomer (MATrp) olmaksızın aynı yöntem ile hazırlanmıştır.



Şekil 3.1. Spesifik melatonin tayinine yönelik Tb(III) kompleksi içeren moleküler baskılanmış floresans nanopartiküllerin şematik gösterimi.

## **3.2. Biyoesinlenilmiş Sensör Yüzeylerinin Tasarımına Yönelik Polimerik Filmlerin Üretimi**

### **3.2.1. Kimyasal Malzemeler**

L-histidin, L-sistein, polivinil alkol (PVA), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), azobisisobutironitril (AIBN), 1H-benzotriazol, trietilamin, dimetil sülfoksit (DMSO) ve metakriloil klorür Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. HEMA ve EGDMA polimerizasyon inhibitörünü uzaklaştırmak için düşük basınçta (100 mmHg) damıtılmış ve kullanılabildiği kadar 4°C'da muhafaza edilmiştir. Deneylerde kullanılan su, Millipore System (Billerica, MA, USA) firmasından temin edilen Milli-Q water sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir.

### **3.2.2. N-Metakriloil-L-Histidin (MAH) Monomerin Sentezi**

N-Metakriloil-L-histidin (MAH) monomerinin sentezi için uygulanan yöntem kısaca şöyledir: 5.52 mmol (1.12 g) L-histidin, 1 M NaOH sulu çözeltisinde deney tüpü içinde çözülmüştür. MA-Bt (5.52 mmol, 1.033 g) çözeltisi (Bölüm 3.1.2) içeren 25 mL 1,4-dioksan yavaşça aminoasit çözeltisi içine eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10-20 dakika içerisinde reaksiyonun tamamlanmasına izin verilmiştir. Reaksiyon bittiğinde vakum altında 1,4-dioksan buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Çökelti su ile seyreltilmiş ve reaksiyon sonucu oluşan 1H-benzotriazol, etil asetat (3 x 50 mL) ile çekilmiştir. Toplanan sulu monomer çözeltisi % 10'luk HCl çözeltisi kullanılarak pH6-7 olacak şekilde nötrleştirilmiştir. Döner buharlaştırıcı ile su yapıdan uzaklaştırılarak reaksiyon ürünü MAH monomeri elde edilmiştir.

### **3.2.3. N-Metakriloil-L-Sistein (MAC) Monomerin Sentezi**

N-Metakriloil-L-sistein (MAC) monomerinin sentezi için uygulanan yöntem kısaca şöyledir: 5.52 mmol, (0.67 g) L-sistein, 1 M NaOH sulu çözeltisinde deney tüpü içinde çözülmüştür. MA-Bt (5.52 mmol, 1.033 g) çözeltisi içeren 25 mL 1,4-dioksan yavaşça aminoasit çözeltisi içine eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 10-20 dakika içerisinde reaksiyonun tamamlanmasına izin verilmiştir. Reaksiyon bittiğinde vakum altında 1,4-dioksan buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Çökelti su ile seyreltilmiş ve reaksiyon sonucu oluşan 1H-benzotriazol, etil asetat (3 x 50 mL) ile çekilmiştir. Toplanmış sulu monomer çözeltisi % 10'luk HCl çözeltisi kullanılarak pH 6-7 olacak şekilde nötrleştirilmiştir. Döner buharlaştırıcı ile su yapıdan uzaklaştırılarak reaksiyon ürünü MAC monomeri (turuncu renkli çökelek) elde edilmiştir.

### **3.2.4. Biyoesinlenilmiş Gözenekli Polimerik Filmlerin Üretimi**

#### **3.2.4.1. Altın Kaplanmış Silika Plaka Yüzeylerinin Temizlenmesi**

Altın kaplanmış silikon plakaların ( $0.75 \text{ cm}^2$ ) yüzeyi  $\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}_2$  (5/1/1, v/v) bazik pirana çözeltisi içinde 5 dakika boyunca  $80^\circ\text{C}$  bekletilerek temizlenmiştir. Bu işlem 5 defa tekrarlanmıştır. Silika plakalar, deiyonize su ve saf etil alkol ile yıkanmış ve vakum etüvünde ( $200 \text{ mmHg}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ) 3 saat kurutulmuştur.

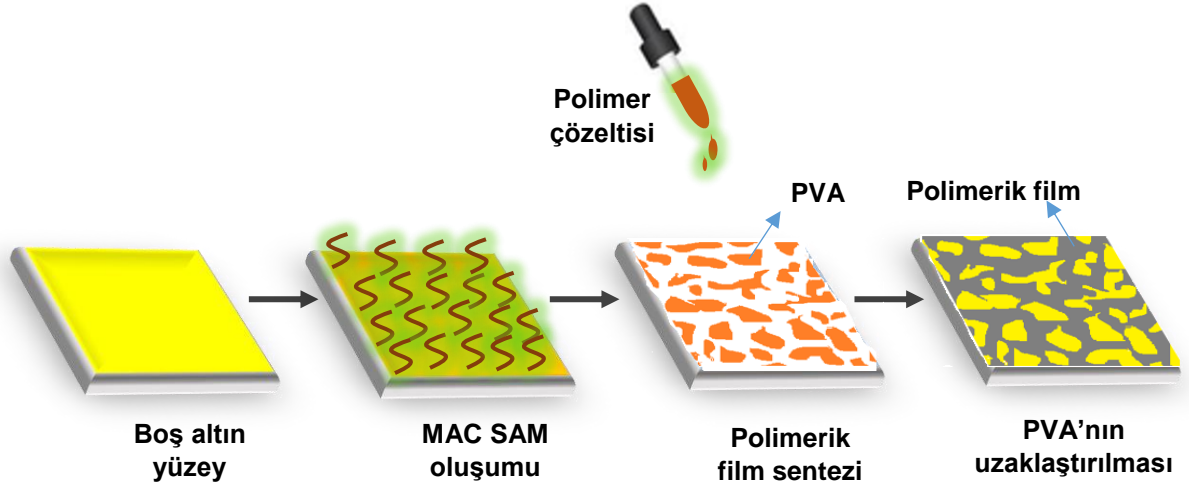
#### **3.2.4.2. Aminoasit Temelli Gözenekli Polimerik Filmin Sentezi**

Silika plakaların altın yüzeyleri, N-metakriloil-L-sistein (MAC) sulu çözeltisinden ( $5 \text{ mg/mL}$ )  $200 \mu\text{L}$  damlatılıp 12 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Yüzeğe bağlanmayan MAC silika plakaların suyla yıkanmasıyla uzaklaştırılmıştır. MAC ile modifiye edilmiş altın yüzeyde amino asit temelli polimerik filmin sentezlenmesi HEMA ( $1 \text{ mL}$ ), EGDMA ( $0.2 \text{ mL}$ ),  $\text{H}_2\text{O}$  ( $0.25 \text{ mL}$ ) ve MAH ( $5 \text{ mg}$ ) içeren stok çözelti hazırlanmıştır. Ayrıca gözenekli bir yapının elde edilmesi için PVA ( $25 \text{ mg/mL}$ ) sulu stok çözeltisi hazırlanmıştır. Başlatıcı olarak kullanılan AIBN ( $2 \text{ mg/mL}$ ) DMSO içinde çözülmüştür. Hazırlanan stok çözeltiden  $100 \mu\text{L}$ , PVA stok çözeltisinden  $20 \mu\text{L}$  ve AIBN çözeltisinden  $40 \mu\text{L}$  alınarak polimer çözeltisi hazırlanmıştır. Bu polimer çözeltisinden  $10 \mu\text{L}$  alınarak MAC ile modifiye edilmiş altın yüzeye damlatılmıştır.  $80^\circ\text{C}$ 'de yığın polimerizasyonu ile altın yüzeyde polimerik filmin sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Polimerizasyon süreci sonrasında polimerik film yapısından PVA uzaklaştırılması için silika plakalar çalkalamalı etüv içinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında yıkanmıştır. Ayrıca hazırlanmış gözenekli polimerik filmde amino asit ve gözenekli yapısının işlevselliğinin incelenmesi MAH monomerini içermeyen ama gözenekli yapıya sahip ve MAH monomerini yapısında bulunduran ancak gözenekli yapıya sahip olmayan polimerik filmler de hazırlanmıştır. Sonuç olarak 3 farklı yapıya sahip polimerik filmler hazırlanmıştır.

- Gözenekli aminoasit işlevselliğine sahip polimerik film
- Sadece aminoasit işlevselliğine sahip polimerik film (gözenekli yapıya sahip olmayan)
- Sadece gözenekli yapıya sahip polimerik film (aminoasit işlevselliğine sahip olmayan)

Sentezlenen polimerik filmlerin karakterizasyonu FTIR-ATR, SEM, AFM ve diferansiyel puls voltametri (DPV) ölçümleri ile yapılmıştır.





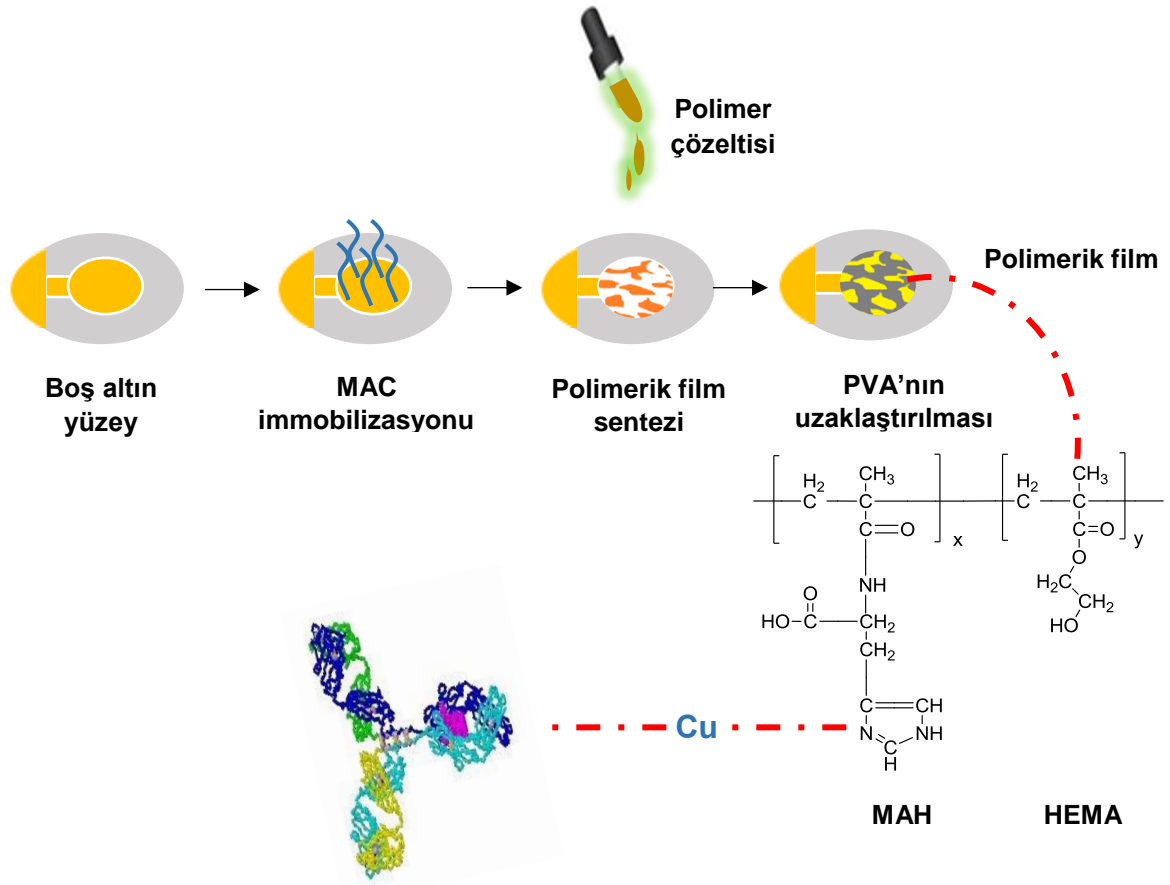
Şekil 3.2. Gözenekli aminoasit işlevselliğine sahip polimerik filmin altın yüzeyde sentezinin şematik gösterimi.

Supramoleküler yapının kendiliğinden düzenlenmesi için sentezlenen polimerik filmlerin seçiciliğinin ve tekrarlanabilirliğinin gösterilmesi için üç farklı deney seti ile empedans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. İlk sette, [Cu (II), Zn (II) ve Pb (II)] olmak üzere üç farklı iyon ile dört farklı konsantrasyonda metal iyonu koordinasyonu gerçekleştirilmiştir. İkinci sette, dört farklı biyomolekülün (albümin, immünoglobülin, transferrin ve anti-transferrin antikor) polimerik filmler üzerindeki oryantasyonu (Cu (II) iyonlarının koordinasyonu öncesi ve sonrası) değerlendirilmiştir. Ayrıca, immünoglobülin / transferrin ve anti-transferrin / transferrin çiftleri arasındaki supramoleküler yapıların oluşumu da değerlendirilmiştir. Üçüncü sette, supramoleküler oluşumların elüsyonu / yok edilmesi, sodyum klorür (NaCl) ve etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) kullanılarak incelenmiştir. NaCl, Cu (II) iyonları ile biyomoleküller arasındaki etkileşimi yok etmek için seçildi ve Na<sub>4</sub>EDTA Cu (II) iyonları ile polimerik filmler arasındaki etkileşimi doğrudan yok etmek için seçilmiştir.

### 3.2.4.3. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM) Elektrotların Hazırlanması

Silika plakaların karakterize edilmesinin ardından kuvars kristal mikroterazi elektrot yüzeyinde de aynı yöntem takip edilerek polimerik filmler sentezlenmiştir. Hazırlanan QCM elektrot ile aminoasit temelli gözenekli polimerik film yüzeyinde Cu(II) aracılığıyla gerçekleşen supramoleküler (IgG model yapı olarak seçilmiştir) yapının kendiliğinden düzenlenmesi incelenmiştir. Bakır iyonları polimerik yapıdaki aminoasitin L-histidin olması nedeniyle seçilmiştir. Çünkü histidinin imidazol halkası bakır iyonlarına yönelik yüksek afiniteye sahiptir. Daha önce belirtildiği gibi QCM

elektrotların hazırlanmasında silika plakalardaki süreç uygulanmıştır. Elektrot yüzeyleri pirana çözeltisiyle yıkanmış ve MAC immobilize edilmiştir. Sonrasında hazırlanan stok çözeltiden (silika plakalar için) 100 µL, PVA stok çözeltisinden 20 µL ve AIBN çözeltisinden 40 µL alınarak polimer çözeltisi hazırlanmıştır. Bu polimer çözeltisinden 3 µL alınarak MAC ile modifiye edilmiş altın yüzeye damlatılmıştır. 80°C'de yığın polimerizasyonu ile altın yüzeyde polimerik filmin sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Kuvars kristal mikroterazi elektrot yüzeyinde aminoasit temelli gözenekli yapıya sahip polimerik filmin sentezi ve supramoleküler yapının kendiliğinden düzenlenmesinin şematik gösterimi.

### **3.3. DNA Mimetik Sıcaklık Duyarlı Aç-Kapa Biyoarayüzeyler**

#### **3.3.1. Kimyasal Malzemeler**

Potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\geq\%99.0$ ), dipotasyum hidrojen fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\geq\%99.0$ ), potasyum klorür ( $\text{KCl}$ ,  $\geq\%99.0$ ), potasyum ferrosiyaniür ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,  $\geq\%98.5$ ), potasyum ferrisiyaniür ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,  $\geq\%99.0$ ), adenin, timin, guanin, N,N,N',N'-tetrametildiamin (TEMED), potasyum persülfat (KPS) ve akrilamit ( $\geq 99\%$ , HPLC) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edilmiştir. 0.1 M KCl içeren ferri/ferro çözeltileri tüm amperometrik ve impedimetrik ölçümlerde destek elektrolit olarak kullanılmıştır. İletken grafen dispersiyonu Graphene Supermarket (ABD) firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan su, Millipore Sistem (Billerica, MA, ABD) firmasından temin edilen Milli-Q water sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 M $\Omega$ /cm'dir.

#### **3.3.2. Nükleotid Temelli Monomerlerin Sentezi**

N-Metakriloil-Adenin (MA-Ade) monomerinin sentezi için uygulanan yöntem kısaca şöyledir: 7.40 mmol (1 g) adenin, 1 M NaOH sulu çözeltisinde deney tüpü içinde çözülmüştür. MA-Bt (7.40 mmol, 1.38 g) çözeltisi içeren 25 mL 1,4-dioksan yavaşça adenin içeren çözelti içine eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10-20 dakika içerisinde reaksiyonun tamamlanmasına izin verilmiştir. Reaksiyon bittiğinde vakum altında 1,4-dioksan buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Çökelti su ile seyreltilmiş ve reaksiyon sonucu oluşan 1H-benzotriazol, etil asetat (3 x 50 mL) ile çekilmiştir. Toplanan sulu monomer çözeltisi % 10'luk HCl çözeltisi kullanılarak pH 6-7 olacak şekilde nötrleştirilmiştir. Döner buharlaştırıcı ile su yapıdan uzaklaştırılarak reaksiyon ürünü MA-Ade fonksiyonel monomeri elde edilmiştir. MA-Thy ve MA-Gua fonksiyonel monomerleri de aynı şekilde sentezlenmiştir.

#### **3.3.3. DNA Mimetik Lineer Polimerlerin Sentezi**

Karşılaştırma amacıyla hem nükleotid temelli monomer içeren hem de sadece akrilamit monomeri kullanarak lineer poliakrilamit polimerleri ayrı ayrı sentezlenmiştir. Bu kapsamda, akrilamit (0.5 g) 1 mL deiyonize su içerisinde çözülmüştür. Akrilamit monomerinin polimerizasyonu oda sıcaklığında 20 mg KPS (başlatıcı) ve 25  $\mu\text{L}$  TEMED (katalizör) kullanılarak 15 dakika içinde tamamlanmıştır.

Nükleotid temelli poli(akrilamit) polimerlerin sentezi adenin, timin ve guanin bazlarının polimerleşebilen türevlerinin (MA-Ade, MA-Thy ve MA-Gua) kullanılmasıyla elde edilmiştir.

Akrilamit (0.5 g) ve MA-Ade (25 mg) 1 mL deiyonize su içerisinde çözülmüştür. Bu sulu çözeltiye 20 mg KPS ve 25 µL TEMED ilave edilmesiyle poli(akrilamit-ko-metakriloil-adenin) [poli-Ade] polimerizasyonu oda sıcaklığında 15 dakika içinde tamamlanmıştır. Poli(akrilamit-ko-metakriloil-timin) [poli-Thy] ve poli(akrilamit-ko-metakriloil-guanin) [poli-Gua] kopolimerleri de aynı şekilde sentezlenmiştir.

### **3.3.4. Sıcaklık Kontrollü (Aç-Kapa) Elektrotların Yüzeylerinin Hazırlanması**

#### **3.3.4.1. Elektrotların Yüzeylerinin Temizlenmesi**

Camsı karbon elektrotların (GCE) yüzeyleri modifiye edilmeden önce Buehler parlatma mikro petleri üzerine sırasıyla 1.0, 0.3, ve 0.05 µm alumina tozu (bulamacı) ilave edilerek parlatılmıştır. Parlatma işlemi sonrasında elektrot yüzeylerinde kalan alumina kalıntılarının uzaklaştırılması için sırasıyla saf su ve sonra da izopropil alkol/asetonitril 50:50 (v/v) karışımıyla sonikasyona tabi tutulmuştur.

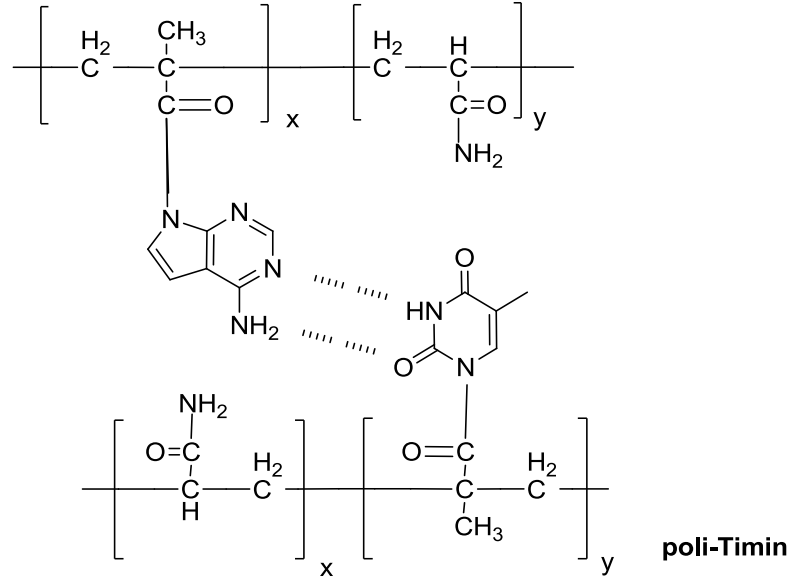
#### **3.3.4.2. Elektrotların Yüzeylerinin Nükleotid Temelli Polimer ile Kaplanması**

poli-Ade), poli-Thy), poli-Gua) kopolimerlerinin 10 mg/mL derişime sahip sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Elektrokimyasal ölçümler için 5 farklı elektrot hazırlanmıştır.

- E1, boş GCE
- E2, grafen dispersiyonu (40 µL)
- E3, grafen dispersiyonu (40 µL)+poli-Ade (20 µL)
- E4, grafen dispersiyonu (40 µL)+poli-Ade (20 µL +poli-Gua (20 µL)
- E5, grafen dispersiyonu (40 µL)+poli-Ade (20 µL)+poli-Thy (20 µL)

Elektrotlar iletken grafen dispersiyonu ve nükleotid temelli polimerlerin sulu çözeltilerinin elektrot yüzeylerine yukarıdaki oranlarda damlatılarak bir gece boyunca +4°C'de kurutulmasıyla hazırlanmıştır. DNA çift zincirini stabilize eden DNA yapısında bu dört bazarasında oluşan hidrojen bağlarıdır. Tez çalışması kapsamında bu baz yapıları polimer yapıya dahil edilerek (Şema 3.1) sıcaklık ile kontrol edilebilen elektrotlar elde edilmiştir.

**poli-Adenin**



Şema 3.1. poli-Adenin ve poli-Timin polimer zincirleri arasında kurulan seçici hidrojen bağları.

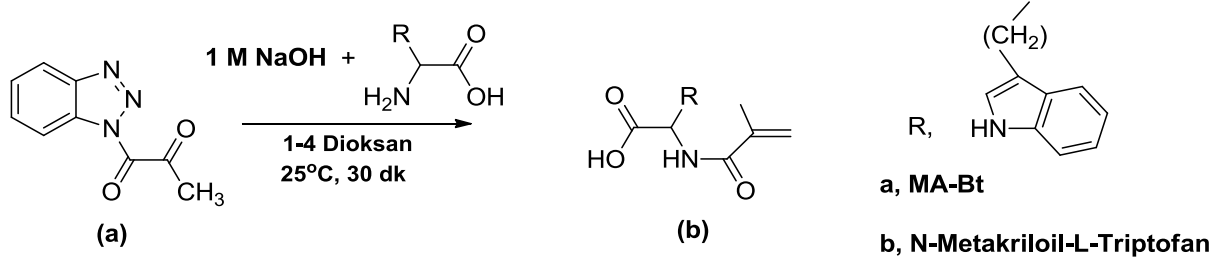
## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması üç temel başlıkta özetlemiştir, bu kapsamda i) melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin sentezi ve mevsimsel duygu bozukluklarının biyolojik belirteci olan melatonin hormonun tayininde biyosensör ve/veya biyogörüntüleme amaçlı kullanımının incelenmesi; ii) biyoesinlenilmiş sensör yüzeylerinin tasarımına yönelik polimerik filmlerin üretimi ve iii) DNA yapısından esinlenerek sıcaklığa duyarlı aç-kapa nükleotid temelli polimerlerin üretimine ait sonuçlar incelenmiştir.

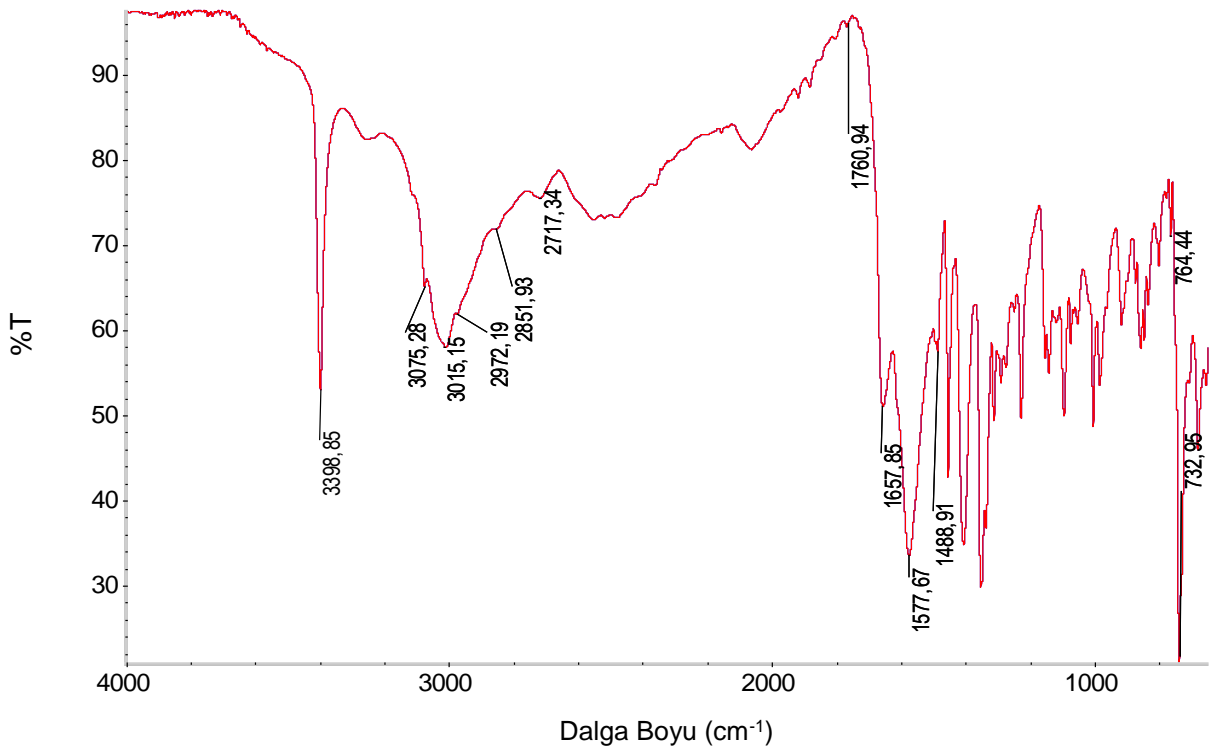
### 4.1. Melatonin Baskılanmış Floresans Nanopartiküllerin Tasarımı, Üretimi Ve Mevsimsel Duygusal Bozukluk Teşhisinde Kullanımının İncelenmesi

#### 4.1.1. N-Metakriloil-L-Triptofan (MATrp) Monomerin Karakterizasyonu

Fonksiyonel monomer MATrp, L-triptofan ve metakriloil grubu taşıyıcısı MA-Bt'nin tepkimesi ile sentezlenmiştir (Şema 4.1). Sentezlenen MATrp monomerine ait FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.1'de verilmiştir. FTIR-ATR spektrumunda MATrp monomerine ait  $3398\text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bandları N-H (ikincil amin grubu) gerilmelerine aittir.  $3075\text{-}3015\text{ cm}^{-1}$  absorpsiyon bandları, aromatik C-H gerilmelerinden kaynaklanmaktadır. C-H alifatik gerilmesine ait absorpsiyon bandı  $2972\text{ cm}^{-1}$  de görülmektedir. C=O gerilme bandı  $1657\text{ cm}^{-1}$  ve C=C gerilme bandı  $1577\text{ cm}^{-1}$  de görülmektedir. C-N gerilme aromatik bandı da  $1488\text{ cm}^{-1}$  de görülmektedir.  $732$  ve  $764\text{ cm}^{-1}$  aromatik C-H eğilmeleri görülmektedir.



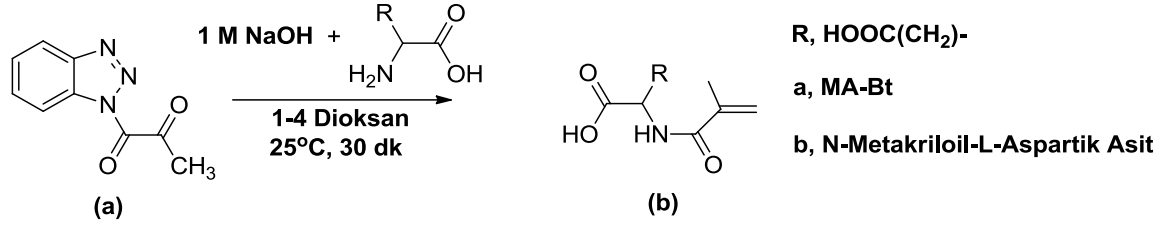
Şema 4.1. MATrp monomerinin sentez reaksiyonu.



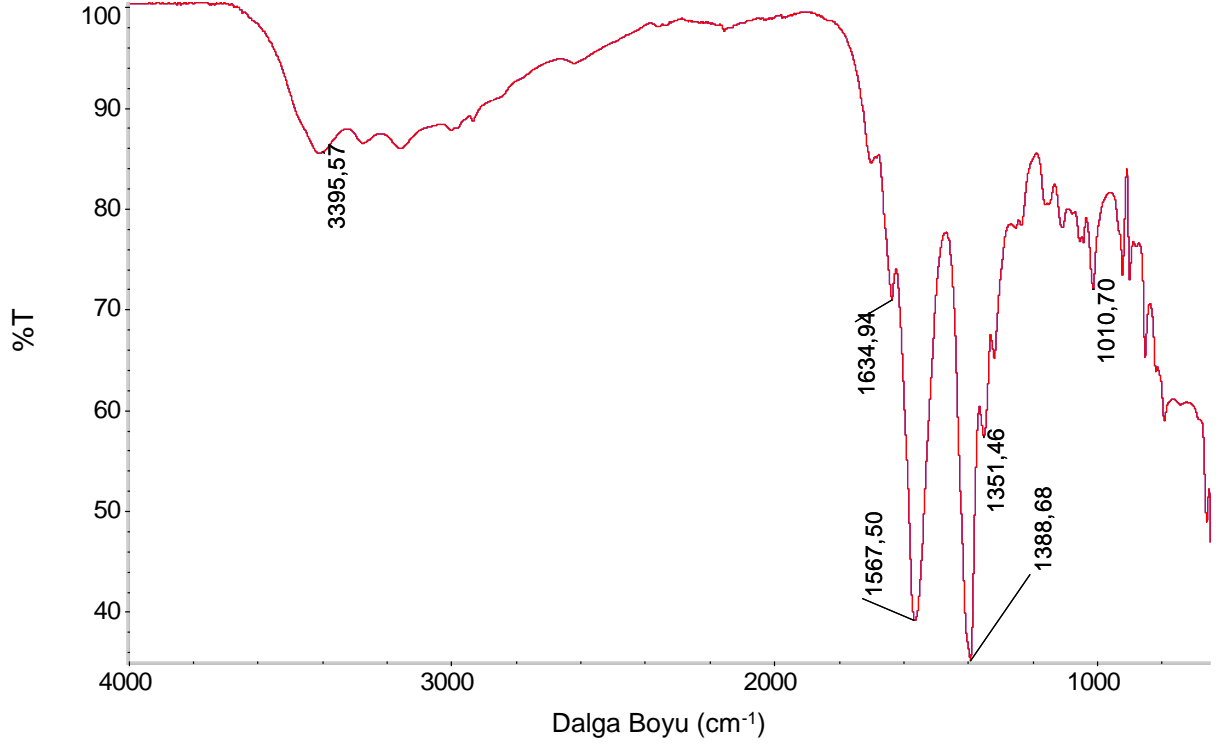
Şekil 4.1. MATrp'nin FTIR-ATR spektrumu.

#### 4.1.2. N-Metakriloil-L-Aspartik Asit (MAAsp) Monomerin Karakterizasyonu

Fonksiyonel monomer MAAsp, L-aspartik asit ve metakriloil grubu taşıyıcısı MA-Bt'nin tepkimesiyle sentezlenmiştir (Şema 4.2). Sentezlenen MAAsp monomerine ait FTIR spektrumu Şekil 4.2'de verilmiştir. FTIR spektrumunda MAAsp monomerine ait karakteristik pik 1567 cm<sup>-1</sup> de karbonil bandı; 3398 cm<sup>-1</sup>'deki absorpsiyon bandı N-H (ikincil amin grubu) ait gerilme bandı; 1010 cm<sup>-1</sup> ve 1388 cm<sup>-1</sup> C-N simetrik ve asimetric gerilme bandları görülmektedir. FTIR spektrumları hem MATrp hemde MAAsp monomerlerinin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.



Şema 4.2. N-Metakriloil-L-aspartik asit (MAAsp) monomerinin sentez reaksiyonu.

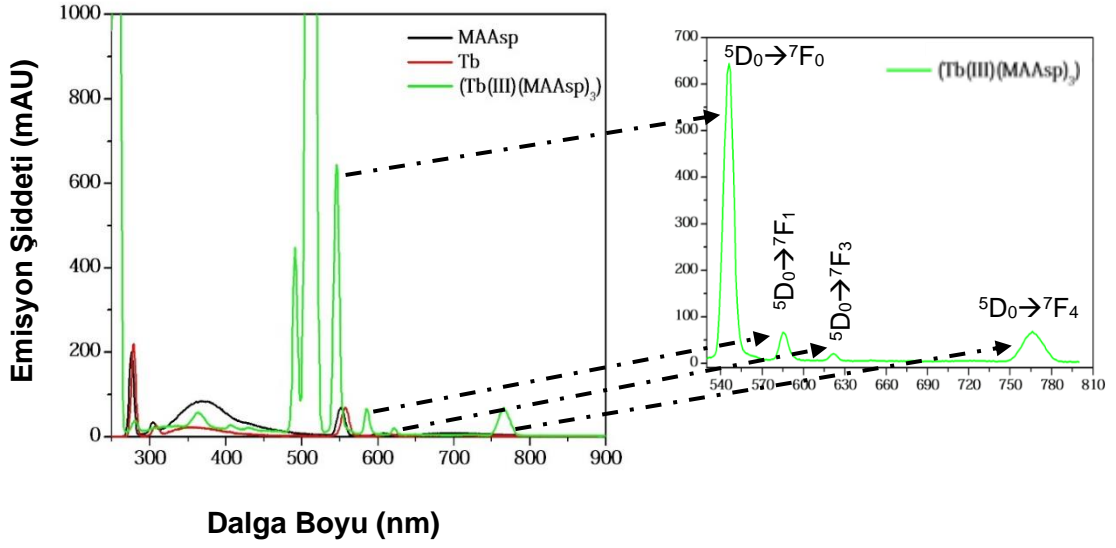


Şekil 4.2. MAAsp'ın FTIR-ATR spektrumu.

#### 4.1.3. Tb(III)(MAAsp)<sub>3</sub> Floresans Kompleksinin Karakterizasyonu

Kompleks sırasıyla 547 nm (<sup>5</sup>D<sub>0</sub>→<sup>7</sup>F<sub>0</sub> geçişi), 586 nm (<sup>5</sup>D<sub>0</sub>→<sup>7</sup>F<sub>1</sub> geçişi), 622 nm (<sup>5</sup>D<sub>0</sub>→<sup>7</sup>F<sub>3</sub> geçişi), ve 763 nm'de (<sup>5</sup>D<sub>0</sub>→<sup>7</sup>F<sub>4</sub> geçişi) dört tane terbiyum kompleksinin karakteristik emisyon bandlarına sahiptir (Şekil 4.3). Dört bandın da bir arada gözlenmesi, Tb(III) iyonlarının tam anlamıyla kompleksleştirildiğini ve ligand-iyon bağlarının kuvvetli bir şekilde oluştuğunu belirtmektedir.

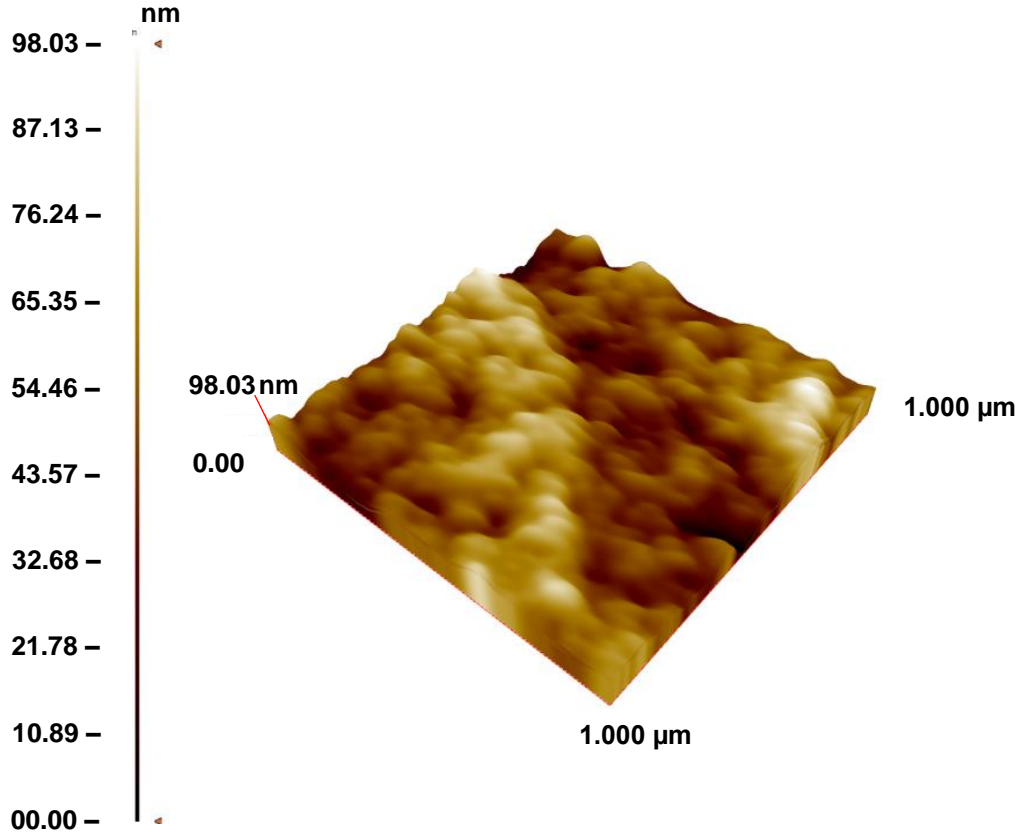




Şekil 4.3. Tb(III)(MAAsp)<sub>3</sub> kompleksinin floresans spektrumu.

#### 4.1.4. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi

Melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin yüzey morfolojisi yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) ile karakterize edilmiştir. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı değen modda gerçekleştirilmiştir. Salınım rezonans frekansı, 341.30 kHz olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği, 1 RMS ve boş titreşim genliği ise 2 RMS'dir. Örnekler 2 µm/s tarama hızında, 256 x 256 piksel çözünürlükte, 1 x 1 µm'lik bir alanın görüntüsü olarak alınmıştır. Melatonin baskılanmış nanopartikülle yüzey derinliği Şekil 4.4'de görüldüğü üzere yaklaşık olarak 70 nm civarındadır. Bu sonuçlar; başarılı bir şekilde küresel yapıda nanopartiküllerin sentezlendiğini göstermektedir. Melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin yarı değen modda 300kHz AFM tipleri ile Nanomagnetics Ins. Ambient AFM (İngiltere) cihazı kullanarak elde edilen AFM görüntüleri Şekil 4.4'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi floresans partiküller dar boyut dağılımına bağlı olarak pürüzlü bir yüzey oluşturmuşlardır. Ancak partiküllerin varlığı ve boyutları şekilden açıkça belirlenebilmektedir.



Şekil 4.4. Melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin AFM görüntüsü.

#### 4.1.5. Zeta Boyut Analizi

Sentezlenen moleküler baskılanmış floresans nanopartiküllerin boyut analizi, Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile belirlenmiştir. Zeta boyut analizi, ışık saçılması tekniği ile ölçüm yapan partiküllerin hidrodinamik boyutu (0.6 nm-6.0  $\mu$ m aralığında), zeta potansiyeli (maksimum iletkenlik 200 mS) ve molekül ağırlığının ( $1 \times 10^3$ - $2 \times 10^7$  aralığında) tayinine olanak sağlayan bir sistemdir. Zeta boyut analizi için izlenen deneysel yöntem şu şekildedir; partikül çözeltisi (3 mL) boyut analizörünün örnek yuvasına yerleştirilmiştir. Işık saçılması  $90^\circ$ 'lik geliş açısında  $25^\circ\text{C}$ 'de tayin edilmiştir. Veri analizi için, deiyonize suyun yoğunluğu (0.88 mPa.s) ve kırınma indeksi (1.33) kullanılmıştır. Işık saçılma sinyali partikül sayısı (partikül sayısı/s) olarak hesaplanmıştır.

Melatonin baskılanmış ve baskılanmamış partiküllerin zeta boyut analizi sonuçları Şekil 4.5'da görülmektedir. Melatonin baskılanmış nanopartiküllerin ortalama boyutu 63.3 nm ve polidispersitesi 0.093 olarak bulunmuştur. Melatonin baskılanmamış partiküller içinse bu değerler sırasıyla 71.80 nm ve 0.381 olarak bulunmuştur. Polimerizasyon işlemleri sonucunda boyutları birbirine yakın baskılanmış ve

baskılanmamış partiküller elde edilmiştir. Bu sonuç, uygulanan polimerizasyon yönteminin uygunluğunu, tekrar edilebildiğini ve kalıp molekülün varlığından etkilenmediğini göstermektedir.

a)

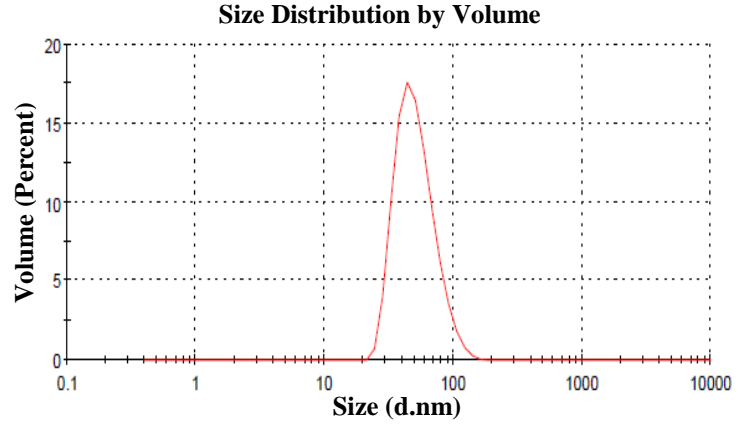
Results

Z-Average (d.nm): 63,27

Pdl: 0,093

Intercept: 0,954

Result quality Good



b)

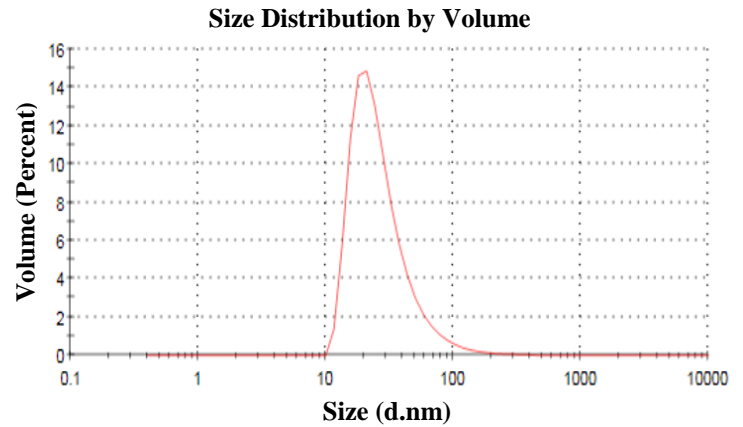
Results

Z-Average (d.nm): 71.80

Pdl: 0.381

Intercept: 0.929

Result quality : Good



Şekil 4.5. Melatonin a) baskılanmış ve b) baskılanmamış nanopartiküllerin zeta boyut analizleri.

#### 4.1.6. Floresans Nanopartiküllerle Melatonin Tayini

Baskılanmış floresans nanopartiküller, melatonin tayini parametrelerinin optimizasyonu için sulu çözeltilerden melatonin adsorpsiyonunda kullanılmıştır. Bu bağlamda melatonin derişimi, pH, iyonik şiddet [sodyum klörür (NaCl) derişimi], zaman ve sıcaklık gibi etkin parametreler sırasıyla 0.01-0.5 ng/mL, 4.0-8.0, 0.1 M-1.0 M, 15 dak-180 dak ve 4°C-40°C aralığında değiştirilmiştir. Çeşitli parametrelere göre hazırlanan çözeltiler, 50 rpm de rotatörde çalkalanarak baskılanmış floresans nanopartiküllerle etkileştirilmiştir.

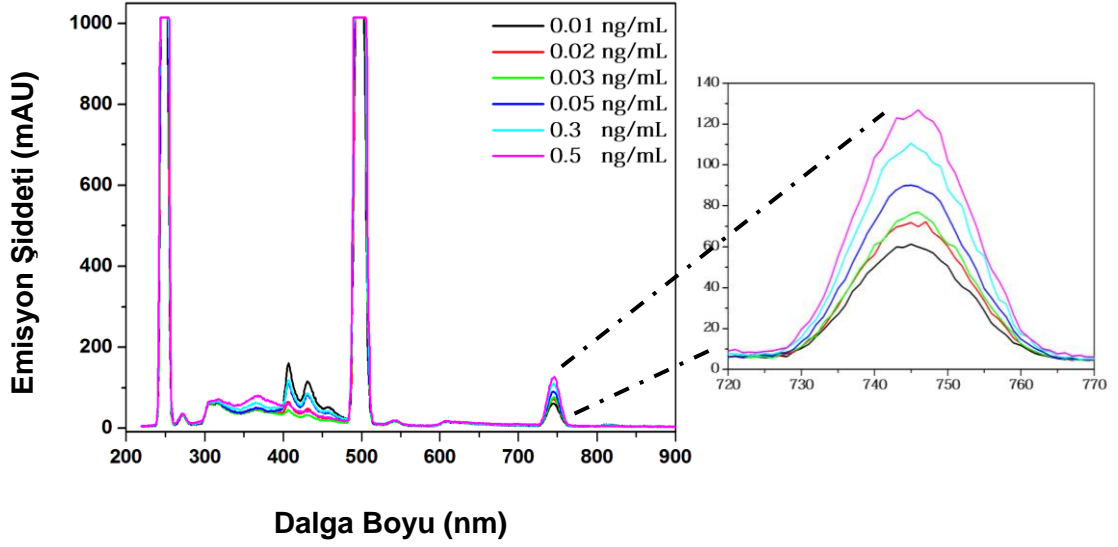
#### 4.1.6.1. Melatonin Derişiminin Etkisi

Melatonin baskılanmış floresans nanopartiküller Şekil 4.6'de görüldüğü gibi iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. 0.01-0.05 ng/mL ve 0.05-0.5 ng/mL aralığındaki alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğruların denklemi ( $y = 692.41x + 51.27$ ) ve ( $y = 78.548x + 80.393$ ) ve doğrusallıkları ( $R^2$ ) sırasıyla 0.9903 ve  $R^2 = 0.9793$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6b' de görüldüğü gibi). Elde edilen bu verilerle, sentezlenen melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin 0.01-0.05 ng/mL derişim aralığında % 99; 0.05-0.5 ng/mL derişim aralığında ise %97 doğrusallıkta ölçüm yapabileceği belirlenmiştir.

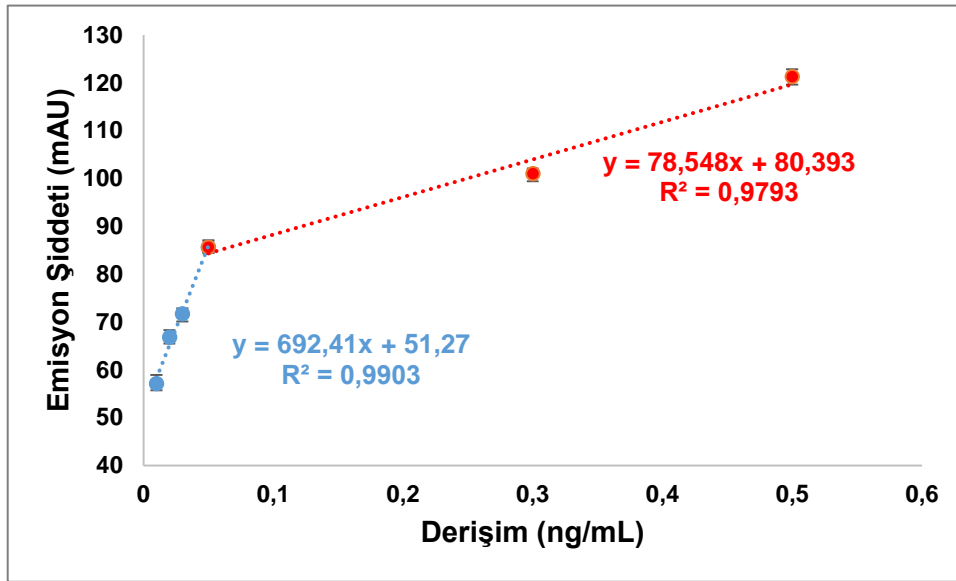
Aydınlık-karanlık döngüsü ile senkronize edilen endojen serum melatonin derişimi, sağlıklı genç erişkinlerde gündüz saatlerinde yaklaşık tipik olarak gündüz saatlerinde 10 pg/mL-20 pg/ml arasında iken gece 30-150 pg/mL seviyesinde seyrederek. Buna istinaden, geliştirilen floresans nanopartiküllerin yüksek melatonin seviyelerinin tayininde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Melatonin baskılanmış floresans nanopartiküller, 0.01 - 0.5 ng/mL derişim aralığında hazırlanan melatonin çözeltilerine (pH=7) ilave edilmiştir ve 100 dakikalık adsorpsiyonun sonunda 60000 rpm'de çöktürülerek melatonin çözeltilerinden ayrılmıştır. Bu floresans nanopartiküller su içinde dağıtılarak floresans ölçümleri alınmıştır (derişim taramasında 1-50 seyreltme oranı kullanılmış; sıcaklık, pH, iyonik şiddet ve zaman taraması ölçümlerinde ise 1-5 seyreltme oranı kullanılmıştır). Derişim taramasının sonuçları Şekil 4,6a'da görüldüğü gibi artan melatonin derişimi ile birlikte floresans şiddeti önemli düzeyde doğrusal olarak artmaktadır. Bu durum, melatonin moleküllerinin floresans emisyonuna katkı yaptığı ve elektron (foton) transferini arttırdığı anlamına gelmektedir. Melatonin molekülündeki, aromatik hidroksi-indol halkası ve amit bağları elektron transferine katkı yapan gruplardır.

a)



b)

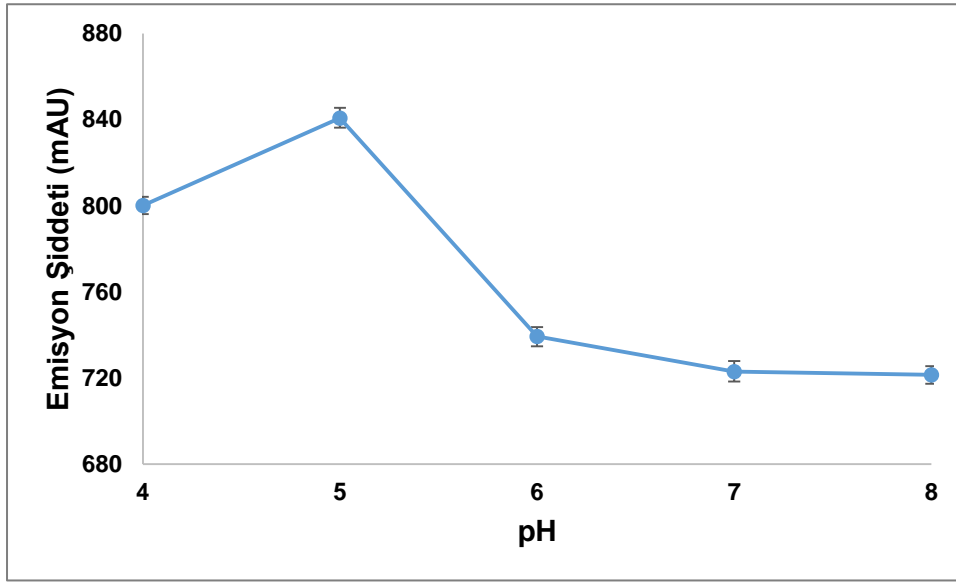


Şekil 4.6. a) Melatonin derişiminin etkisi ve b) derişim-sinyal doğrusallığı.

#### 4.1.6.2. pH Etkisi

PH etkisini saptamak için pH 4.0–8.0 aralığında çalışılmıştır (pH 4.0-5.0 için 100 mM  $\text{CH}_3\text{COONa} - \text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 6.0–8.0 için 100 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Optimum pH Şekil 4.7’de görüldüğü üzere 5 olarak saptanmıştır. Daha düşük ve yüksek pH’larda bağlanma verimi çok düşüktür. pH’ın etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan deneyler, oda sıcaklığında 0.03 ng/mL melatonin derişiminde gerçekleştirilmiştir. pH 5.0 değerinde ligand (triptofan temelli fonksiyonel monomer, MATrp) yüksüzdür, buna bağlı olarak hidrofobik etkileşimler bu pH değerinde daha

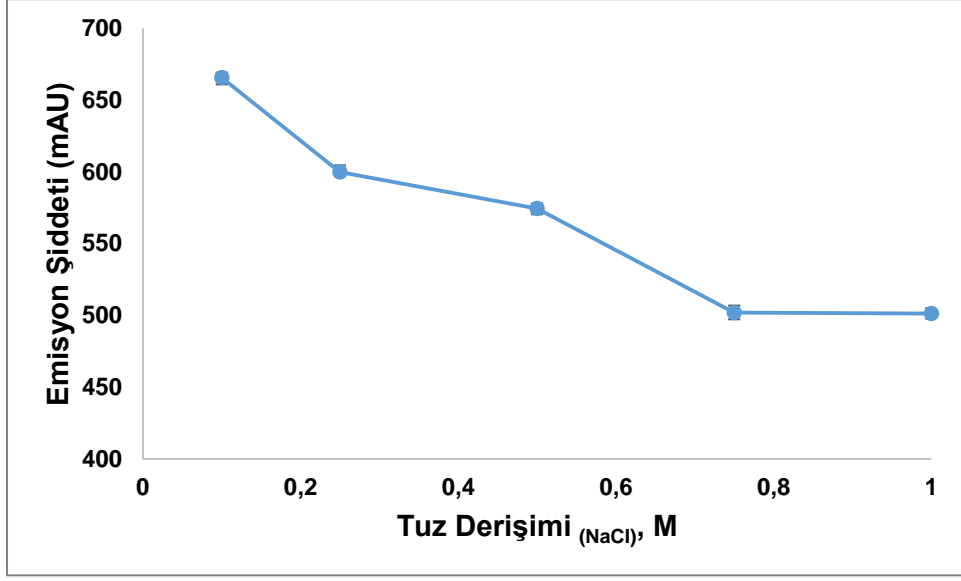
seçici olarak gerçekleşmekte ve maksimum hidrofobik etkileşimle yüksek adsorpsiyon kapasitesine ulaşılmaktadır. Bu durum, kullanılan fonksiyonel monomerin yapısal özellikleri ile ilişkilendirilebilir. Çünkü moleküler baskılama yöntemi olarak hidrofobik etkileşimler hedeflenmiştir. Bu doğrultuda hidrofobik aminoasitlerden biri olan triptofanın polimerleşebilen türevi sentezlenmiş ve melatonin koordinasyonu için kullanılmıştır. Bunun sonucu olarak baskın hidrofobik etkileşimler, melatonin tanınmasında ortaya çıkmaktadır. Maksimum bağlanmanın gözlemlendiği pH 5.0 değeri sunulan çalışmada en uygun değer olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.7. pH etkisi (0.03 ng/mL melatonin derişimi, 748 nm'deki emisyon şiddeti).

#### 4.1.6.3. İyonik Şiddetin Etkisi

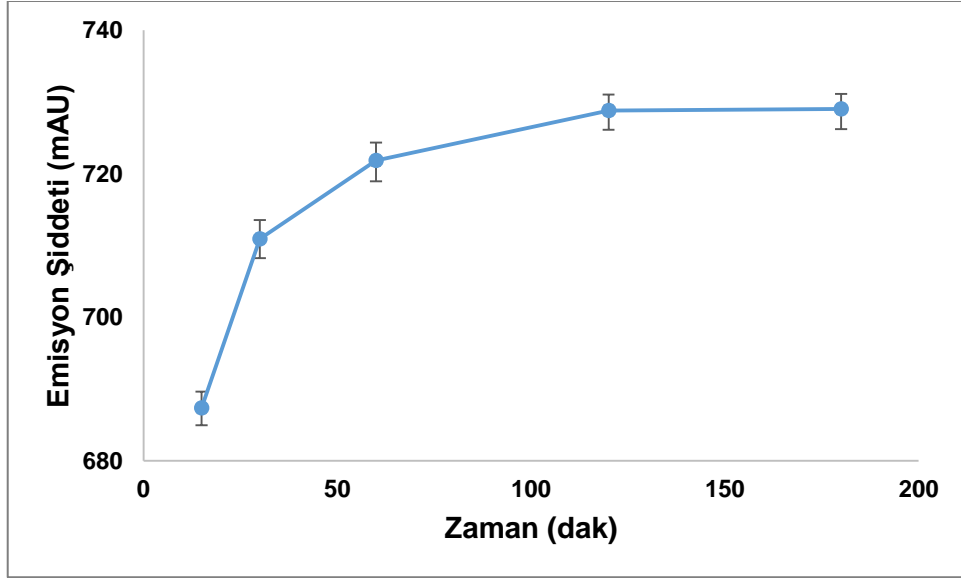
Melatonin baskılanmış floresans nanopartiküller ile melatonin adsorpsiyonuna iyonik şiddetin (tuz derişiminin) etkisi incelenmiştir. İyonik şiddet NaCl tuzu kullanılarak ayarlanmış ve bu tuzlar için 0.1-1.0 M derişim aralığı taranmıştır. Ortama eklenen nötral tuzun iyonik şiddeti, analit moleküllerin de çözünürlüğünü etkilemektedir. İyonik şiddet, tuzu oluşturan katyon ve anyonların yük sayısı ve derişimi tarafından belirlenir. Şekil 4.8'dan da görüldüğü gibi, tuz derişimi arttıkça melatonin adsorpsiyonu azalmıştır. Çünkü artan tuz derişimi melatonin çözünürlüğünü azalmasına neden olmuş, bu nedenle floresans nanopartiküller ile olan etkileşimi azalmıştır. Bu sonuç, her ne kadar klasik hidrofobik etkileşim kromatografisine ters görünse de analit molekülün küçük olması (protein değil) çözünürlük faktörünün etkin olmasına sebep olmaktadır.



Şekil 4.8. İyonik şiddetin etkisi (0.03 ng/mL melatonin derişimi, 748 nm'deki emisyon şiddeti).

#### 4.1.6.4. Etkileşim Süresinin Etkisi

Yapılan zaman taraması ölçümleri sonucunda adsorpsiyon işleminin ilk yarım saatte yarı değere ve 60. dakikada ise denge değerine geldiğini göstermektedir.

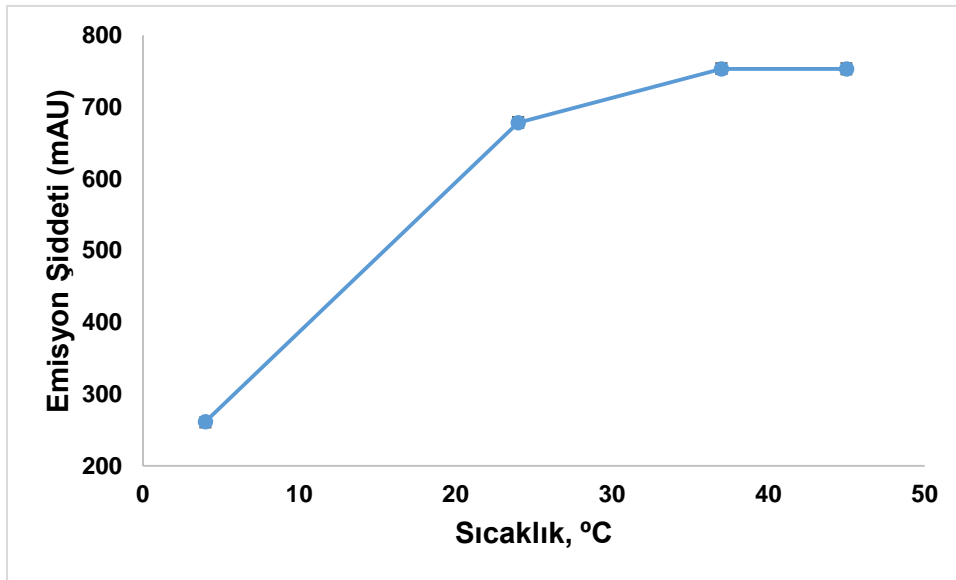


Şekil 4.9. Etkileşim süresinin etkisi (0.03 ng/mL melatonin derişimi, 748 nm'deki emisyon şiddeti).

Bu dakikadan sonra adsorpsiyon değerinde Şekil 4.9'da da görüldüğü gibi önemli bir değişim gerçekleşmemektedir. Bu sonuçlar, floresans nanopartiküllerin göreceli olarak hızlı bir adsorpsiyon kinetiğine sahip olduğunu belirtmektedir.

#### 4.1.6.5. Sıcaklığın Etkisi

Adsorpsiyona sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla ortam sıcaklığı 4°C-40°C aralığında değiştirilmiştir. Sıcaklığın artmasıyla Şekil 4.10'de görüldüğü gibi melatonin adsorpsiyonunda belirgin bir artış görülmektedir. Bu sonuçlar melatonin molekülü ile floresans melatonin baskılanmış floresans nanopartiküller arasında etkileşimin hidrofobik karaktere sahip olduğu varsayımını güçlendirmektedir (MATrp fonksiyonel monomerinin kullanılmasına bağlı olarak). Hidrofobik etkileşim olduğu için, entropi artışıyla yürüyen etkileşimdir, sıcaklık artışı bu etkileşimleri artırma yönünde etkilemekte ve sıcaklığın artması ile analit etkileşim kinetiği hızlanmaktadır.



Şekil 4.10. Sıcaklığın Etkisi (0.03 ng/mL melatonin derişimi, 748 nm'deki emisyon şiddeti).

#### 4.1.7. Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

Hazırlanan melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin seçiciliğinin belirlenmesi için serotonin ve triptofan molekülleri seçilmiştir. Bu tercihin sebebi melatonin biyosentezi besinlerle zorunlu olarak dışarıdan alınması gereken esansiyel bir amino asit olan triptofan üzerinden gerçekleşen bir indol bileşiğidir. Kan dolaşımı ile pineal beze gelen triptofan, triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksillenerek 5-hidroksitriptofan'a (ara metabolit) ve L-aromatik asit dekarboksilaz enzimi etkisiyle karboksil grubunun yapıdan ayrılmasıyla serotonine (5-hidroksitriptamin) dönüşür. Şekil 4.11a'de görüldüğü gibi melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin serotonin (0.03 ng/mL) ve triptofan (0.03 ng/mL) ile



etkileştirilmesinden sonra floresans intensitelerinde anlamlı bir değişme olmamıştır. Ayrıca baskılama seçiciliğini göstermek için melatonin baskılanmamış floresans nanopartiküller sentezlenmiştir ve bunlarla yapılan adsorpsiyon çalışmalarında melatonin baskılanmamış floresans nanopartiküllerin (NIP) floresans şiddetlerin de Şekil 4.11b'de görüldüğü gibi anlamlı bir değişim olmamıştır.

Melatonin baskılanmış floresans nanopartiküllerin seçiciliklerini göstermek için ara ve başlangıç metabolitleri olan triptofan ve serotoninine karşı sulu çözeltilerden adsorpsiyon çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda; aynı derişime sahip (0.03 ng/mL) metabolit çözeltileri, hem moleküler baskılanmış hem de baskılanmamış floresans nanopartiküllerle etkileştirilmiştir. Nanopartiküllerin floresans emisyon şiddetlerindeki değişim, adsorpsiyon öncesi ve sonrasında alınan ölçümlerle izlenmiştir. Daha sonra; emisyon sönümlene özelliklerini karşılaştırmak amacıyla bu değerler normalizasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen değerlerin oranları ile moleküler baskılanmış ve baskılanmamış floresans nanopartiküllerin dağılım ( $k_D$ ), seçicilik ( $k$ ) ve bağıl seçicilik katsayı ( $k'$ ) değerleri hesaplanmıştır. Bu değerlerin hesaplanmasında kullanılan eşitlikler şunlardır:

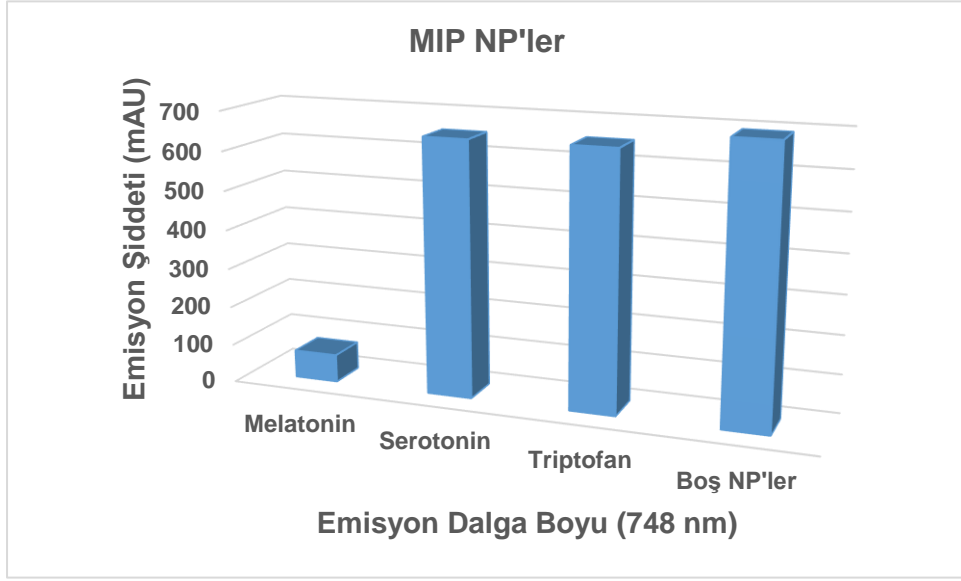
$$k_{D,analit} = \frac{\text{Şiddet}^*}{\text{Şiddet}^0}$$

$$k_{melatonin} = \frac{k_{D,melatonin}}{k_{D,yarışmacı}}$$

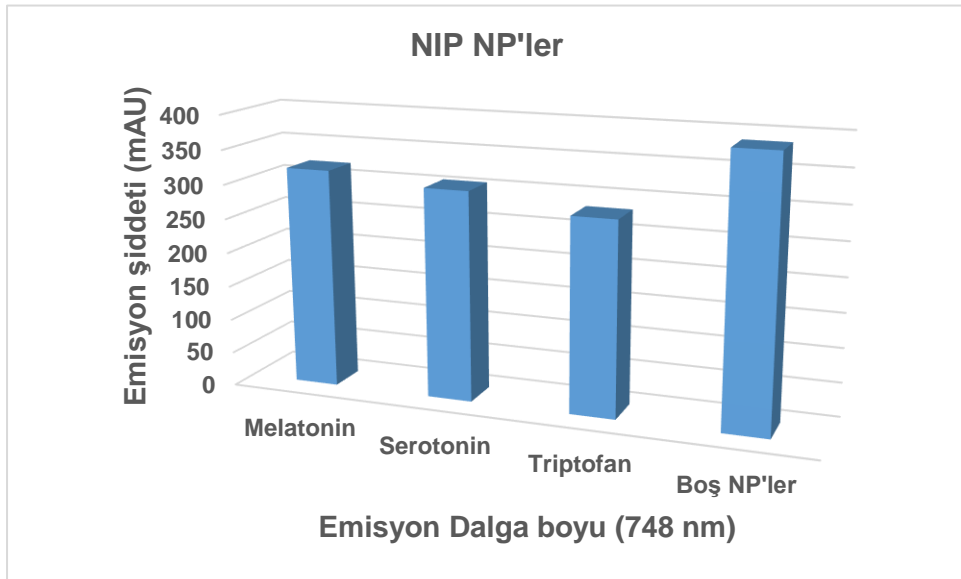
$$k' = \frac{k_{MIP}}{k_{NIP}}$$

Burada;  $k_{D,analit}$  hedef metabolitin dağılım katsayısı;  $\text{şiddet}^*$ , hedef metabolitin normalize şiddeti ( $\text{şiddet}^* = \text{şiddet}^0 - \text{şiddet}^{analit}$ );  $\text{şiddet}^0$ , boş floresans nanopartikülün floresans emisyon şiddeti;  $k_{melatonin}$ , floresans nanopartiküllerin yarışmacı metabolitlere karşı melatonin için seçicilik katsayısı ve  $k'$  ise moleküller baskılanmış floresans nanopartiküllerin baskılanmamış nanopartiküllere karşı bağıl seçicilik katsayısı değerini ifade etmektedir.

a)



b)



Şekil 4.11. a) Melatonin baskılanmış, b) baskılanmamış floresans NPs seçiciliğinin belirlenmesi.

Hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler, Çizelge 4.1'de özetlenmiştir. Çizelgeden de da görüldüğü gibi moleküler baskılanmış floresans nanopartiküllerin emisyon şiddetlerindeki sönümlenme etkisi daha açık bir şekilde görülmektedir. Moleküler baskılanmış floresans nanopartiküller için hesaplanan seçicilik katsayı değerleri, serotonin ve triptofana göre sırasıyla 14.97 ve 15.63 olarak bulunmuştur. Baskılanmamış nanopartikülerde ise bu değerler yine sırasıyla 0.8175 ve 0.6344

olarak hesaplanmıştır. Görüldüğü gibi moleküler baskılanmış floresans nanopartiküller seçici bir şekilde melatonin molekülleriyle etkileşime girmekte ve floresans emisyonlarında sönümlere uğramaktadır. Moleküler baskılama işleminin kazandırdığı seçicilik değerini ifade eden bağıl seçicilik katsayısı (k') değerleri dikkate alındığında, moleküler baskılama işlemi ile üretilen nanopartiküllerin melatonin/serotonin ve melatonin/triptofan eşleniklerinin bağıl seçicilik katsayı değerleri 18.31 ve 24.64 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, baskılama işlemi ile floresans nanopartiküllere melatoninine göre 18.31 kat ve benzer şekilde triptofana göre 24.64 kat daha seçici olarak tanıma yeteneği kazandırıldığını göstermektedir. Sonuç olarak elde edilen floresans nanopartiküller, hem analitik performansı hem de seçicilik parametreleri açısından mevsimsel duygusal bozukluk tanısında kullanım potansiyeli sahiptir.

Çizelge 4.1. Seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları.

	MIP			NIP			
	Şiddet*, mAU	k <sub>D</sub>	k	Şiddet*, mAU	k <sub>D</sub>	k	k'
Melatonin	621.3	0.8965		66.3	0.1714		
Serotonin	41.5	0.0599	14.97	81.2	0.2097	0.8175	18.31
Triptofan	39.8	0.0574	15.63	104.6	0.2702	0.6344	24.64

\*: Normalize edilmiş şiddet değeri. Normalizasyon işlemi boş floresans nanopartikülün emisyon şiddeti ile analit adsorpsiyonu sonrasındaki floresans şiddetlerinin farkıdır.

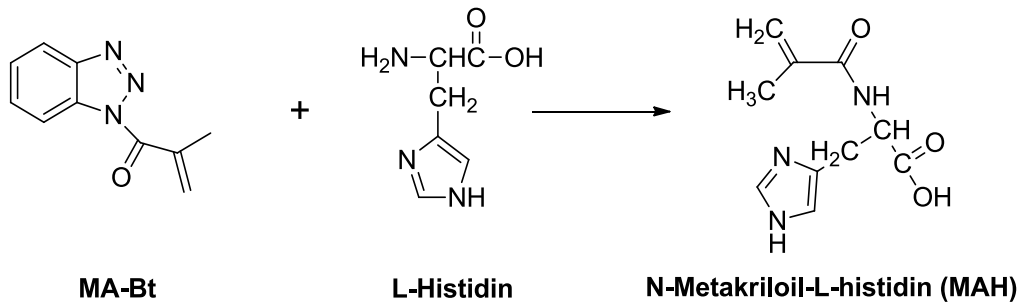
Boş MIP için floresans şiddeti: 693 mAU ve Boş NIP için floresans şiddeti: 387 mAU'dur.

## 4.2. Biyoesinlenilmiş Sensör Yüzeylerinin Tasarımına Yönelik Polimerik Filmlerin Üretimi

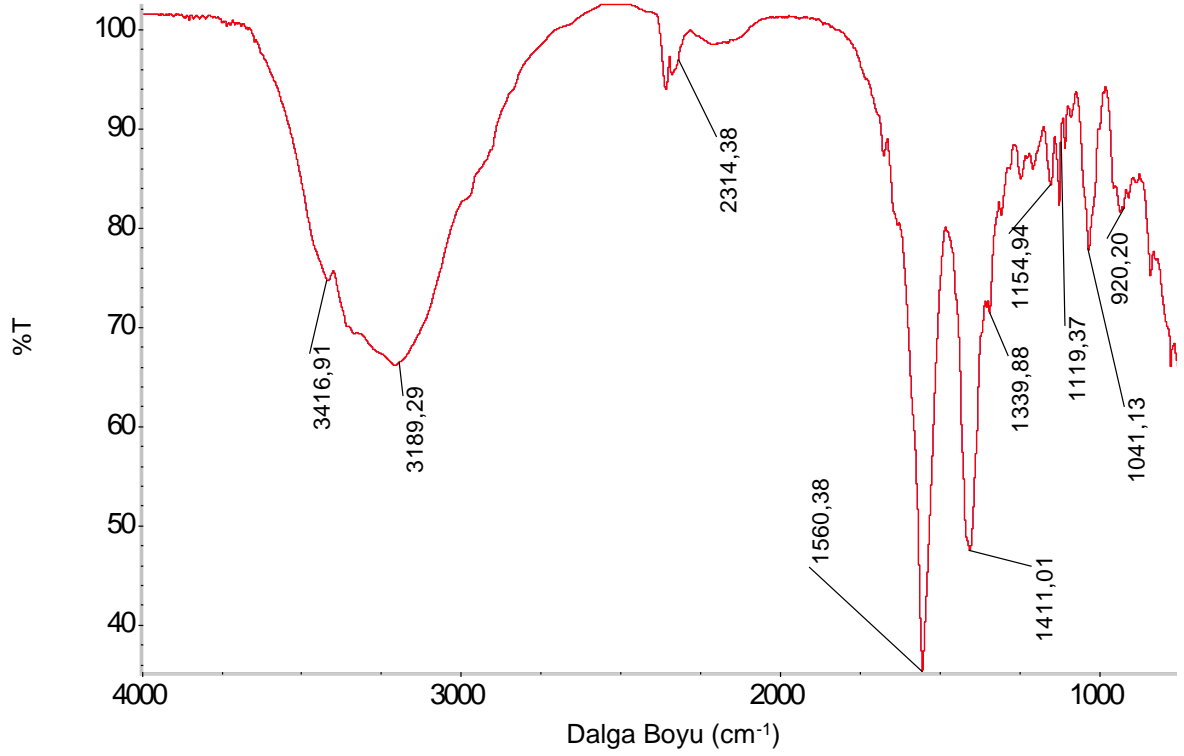
Aminoasit temelli polimerleşebilen fonksiyonel monomerlerin sentezlenmesiyle protein, enzim vb. gibi pek çok biyomolekülün oldukça seçici bağlanma özelliği sentetik polimerlere (PHEMA'ya) aktarılmıştır. Böylelikle biyomoleküllerdeki tanıma mekanizması taklit edilmiş ve sentezlenen polimerler supramoleküler yapının kendiliğinden düzenlenmesi için kullanılmıştır.

### 4.2.1. N-Metakriloil-L-Histidin (MAH) Monomerin Karakterizasyonu

Fonksiyonel monomer MAH, L-histidin ve metakriloil grubu taşıyıcısı MA-Bt'nin tepkimesi ile sentezlenmiştir (Şema 4.3) ve sentezlenen MAH monomerine ait FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.12'de verilmiştir. FTIR-ATR spektrumunda MAH monomerine ait  $1560\text{ cm}^{-1}$ ,  $1128\text{ cm}^{-1}$ 'deki titreşimler sırasıyla amid ve imidazol gruplarına aittir.  $3421\text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bandı N-H (ikincil amin grubuna) ait gerilme bandına aittir.



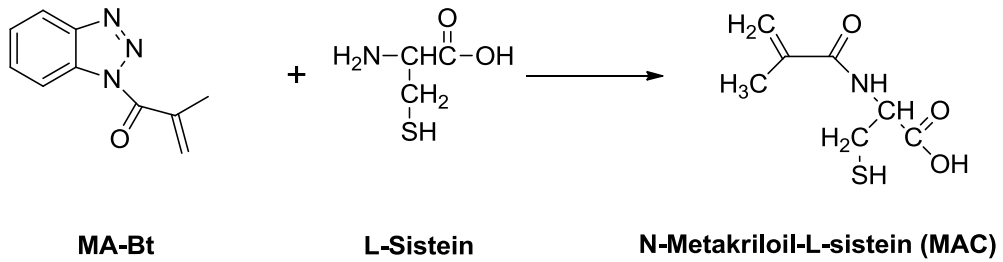
Şema 4.3. N-Metakriloil-L-histidin (MAH) monomerinin sentez reaksiyonu.



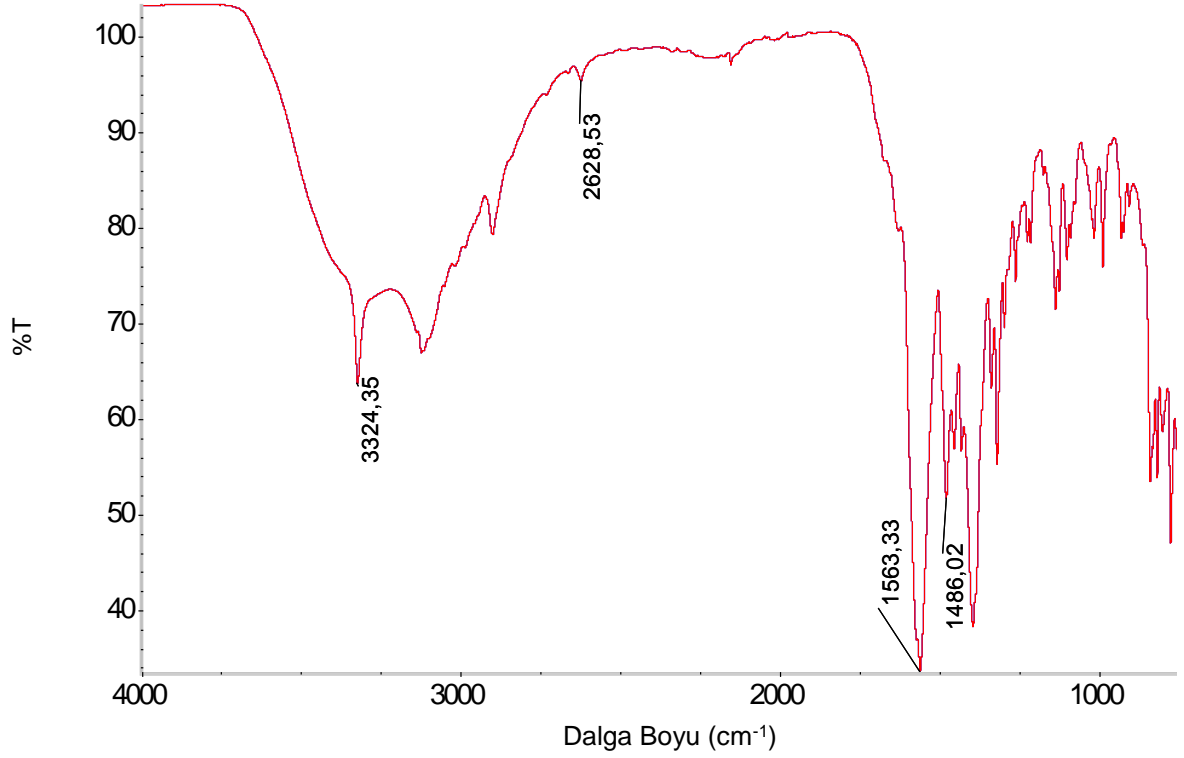
Şekil 4.12. MAH'a ait FTIR-ATR spektrumu.

#### 4.2.2. N-Metakriloil-L-Sistein (MAC) Monomerin Karakterizasyonu

Fonksiyonel monomer MAC, L-sistein ve metakriloil grubu taşıyıcısı MA-Bt'nin tepkimesi sentezlenmiştir (Şema 4.4). Sentezlenen MAC monomerine ait FTIR spektrumu Şekil 4.13'da verilmiştir.  $1563\text{ cm}^{-1}$  ve  $1486\text{ cm}^{-1}$  amid I ve amid II bandları,  $3324\text{ cm}^{-1}$ 'te ise N-H (ikincil amin grubu) ait gerilme bandı,  $2682\text{ cm}^{-1}$  ve absorpsiyon bandı S-H gerilme bandı görülmektedir.



Şema 4.4. N-Metakriloil-L-sistein (MAC) monomerinin sentez reaksiyonu.

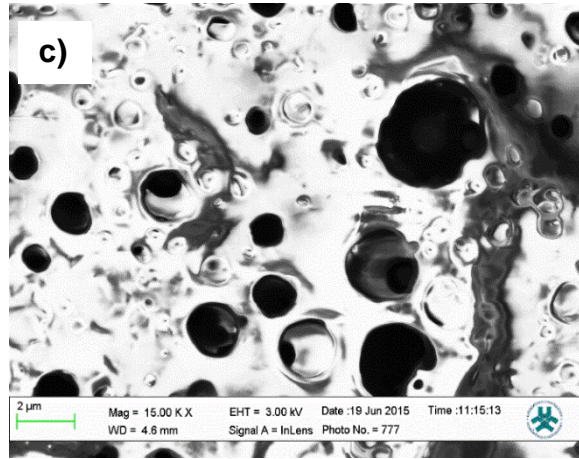
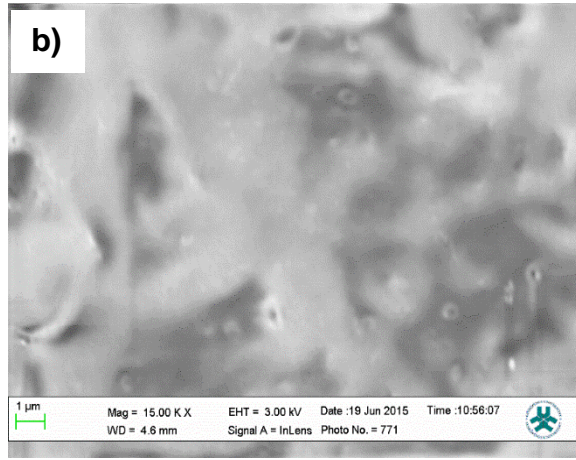
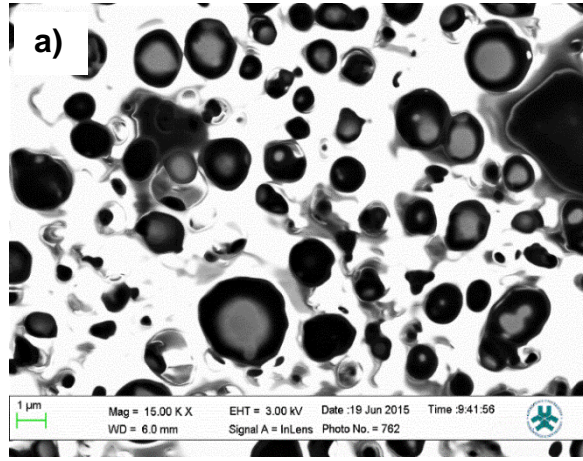


Şekil 4.13. MAC'a ait FTIR-ATR spektrumu.

### 4.2.3. Polimerik Filmlerin Karakterizasyonu

#### 4.2.3.1. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Görüntüleri

Sentezlenen polimerik filmlerin (aminoasit işlevselliğine/gözenekli yapıya sahip polimerik film, sadece aminoasit işlevselliğine sahip polimerik film ve sadece gözenekli yapıya sahip polimerik film) yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskop (SEM) ile incelenmiştir. Polimerizasyonun PVA varlığında gerçekleştirilmesi Şekil 4.14a,c görüldüğü polimerik filme gözenekli bir yapı kazandırmıştır. Gözenek boyutları 0,2-20 µm aralığında değişmektedir. PVA olmaksızın sentezlenen polimerik film gözeneksiz yapıya sahip olduğu Şekil 4.17b'de görülmektedir.

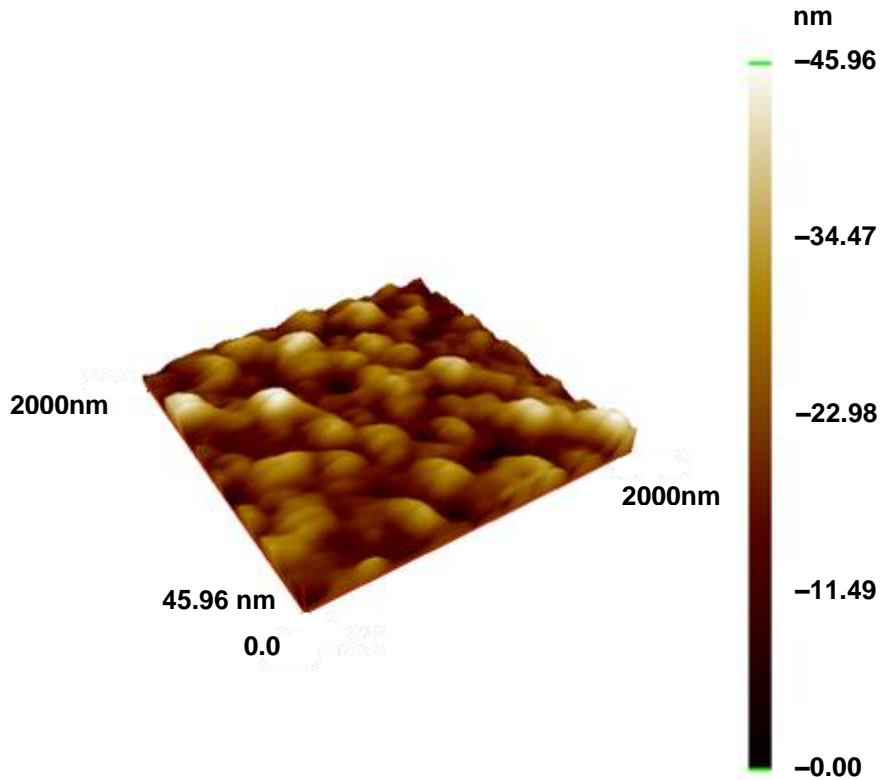


Şekil 4.14. Polimerik filmlerin SEM görüntüleri a) aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film, b) sadece aminoasit işlevselliğine sahip polimerik film, c) sadece gözenekli yapıya sahip polimerik film.

#### 4.2.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Görüntüleri

Sentezlenen polimerik filmlerin karakterizasyonu için yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanılmıştır. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Görüntüleme alışmaları hava ortamında, yarı değen modda gerçekleştirilmiştir. Salınım rezonans frekansı, 341.30 kHz olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği, 1 RMS ve boş titreşim genliği ise 2 RMS olarak uygulanmıştır. Örnekler 2 m/s tarama hızında, 256 x 256 piksel çözünürlükte, sırasıyla 2 x 2 m'lik ve 1 x 1 m'lik bir alanın görüntüsü olarak alınmıştır. AFM görüntüleri incelendiği zaman PVA varlığında sentezlenen polimerik filmin gözenekli ve daha amorf bir topografiye sahip olduğu görülmektedir (şekil 4.15a). Fakat PVA olmasızın sentezlenen polimerik filmin gözeneksiz ve düzgün bir topografiye sahip olduğu görülmektedir (şekil 4.18b).

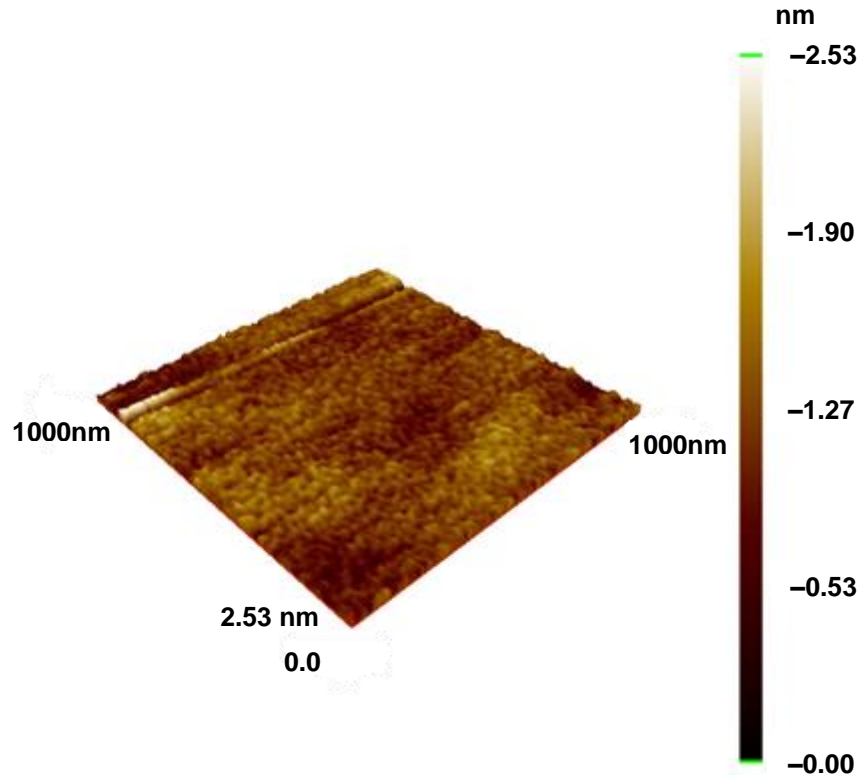
SEM ve AFM görüntülerinden anlaşıldığı gibi polimerizasyonun PVA varlığında gerçekleştirilmesiyle sentezlenen polimerik filmlerde nano boyuttan mikro boyuta değişen gözenekler oluşmuştur.



şekil 4.15. AFM görüntüleri a) aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film ve b) sadece aminoasit işlevselliğine sahip polimerik film.



b)



Şekil 4.15'in devamı.

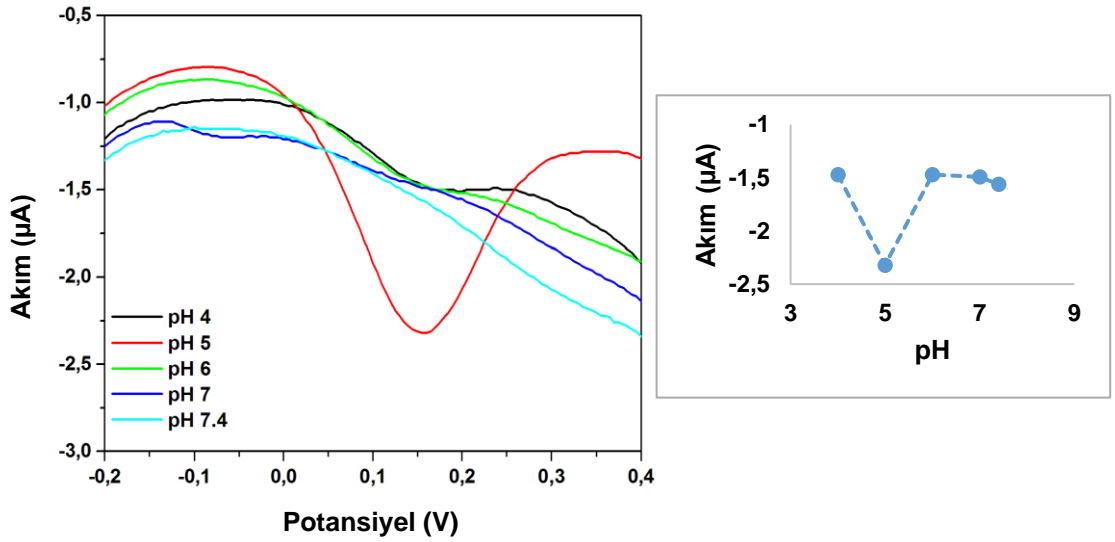
#### 4.2.4. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) Ölçümleri

Sentezlenen tüm polimerik filmlerin (aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film, sadece aminoasit işlevselliğine sahip polimerik film ve sadece gözenekli yapıya sahip polimerik film) elektrokimyasal özellikleri diferansiyel puls voltametri (DPV) ölçümleri ile karakterize edilmiştir. Voltametrik ölçümler Ivium Stat.XR elektrokimyasal analizör (Ivium Tech., Eindhoven, Hollanda) ile gerçekleştirilmiştir. İmpedans ölçümleri de Autolab potentiostat-galvanostat (Metrohm Autolab B. V., Utrecht, Netherlands) gerçekleştirilmiştir. Altın kaplı silica plaka (0,75 cm<sup>2</sup>, yüzey alanı), yardımcı elektrot platin tel ve Ag/AgCl (3 M KCl) referans elektrodundan oluşan üç elektrotlu hücre sistemi kullanılmıştır.

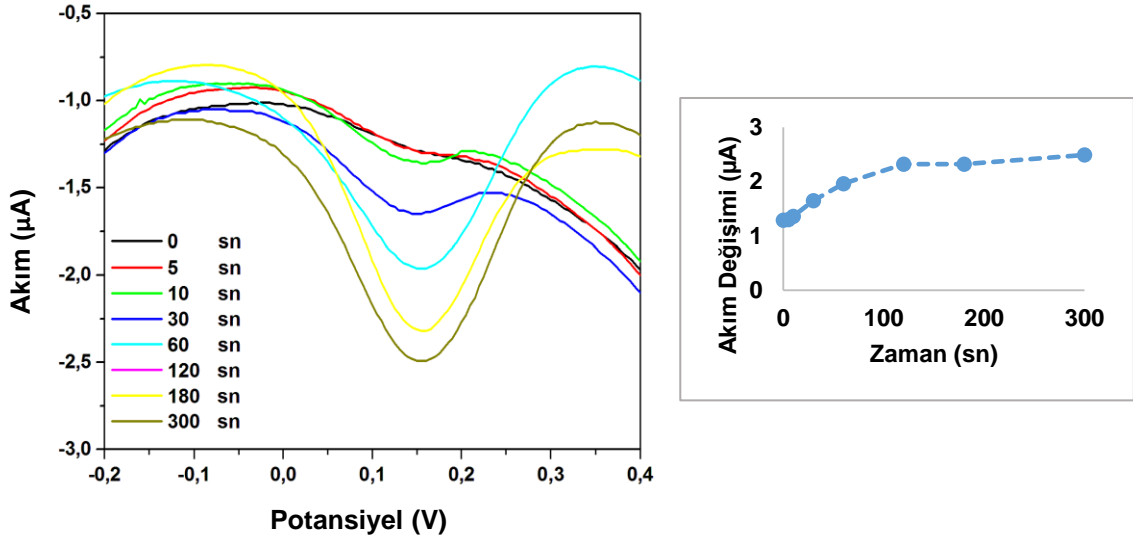
Sentezlenen aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik filmin Cu(II) iyonlarına olan ilgisinin belirlenmesi için öncelikle pH değerinin ve inkübasyon zamanının etkisi belirlenmiştir. Adsorpsiyon ve iyon tutunma davranışına pH etkisini göstermek için farklı tampon sistemleri kullanılmış ve pH 4.0–7.4 aralığında çalışılmıştır (pH 4.0-5.0 için 10 mM CH<sub>3</sub>COONa – CH<sub>3</sub>COOH, pH 6.0–7.4 için 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Optimum pH Şekil 4.16'da görüldüğü üzere pH 5.0 olarak saptanmıştır. Bakır iyonları imidazol halkasındaki çiftleşmemiş

elektronlara sahip azot atomları ile etkileşmektedir. Daha düşük ve yüksek pH'larda bağlanma verimi çok düşüktür. Yüksek pH değerlerinde çözünebilen bakır oksit bileşikleri oluşması Cu(II) iyonlarına ait akım pikinde azalmaya neden olmaktadır. Maksimum bağlanmanın gözlemlendiği pH 5.0 değeri sunulan çalışmada en uygun değer olarak kabul edilmiş ve ilerleyen çalışmalarda sabit tutulmuştur.

Yapılan zaman taraması ölçümleri sonucunda adsorpsiyon işleminin iki dakika içinde denge değerine geldiğini göstermektedir. Bu dakikadan sonra adsorpsiyon özelliklerinde Şekil 4.17'de de görüldüğü gibi önemli bir değişim gerçekleşmemektedir. Bu sonuçlar, aminoasit temelli gözenekli yapıya sahip polimerik filmin hızlı bir adsorpsiyon kinetiğine sahip olduğunu belirtmektedir.



Şekil 4.16. Farklı pH değerlerinde aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film ile gerçekleştirilen Cu(II) adsorpsiyonuna ait DPV voltamogramları (tarama hızı, 10 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı; Cu(II) derişimi 10 nM).



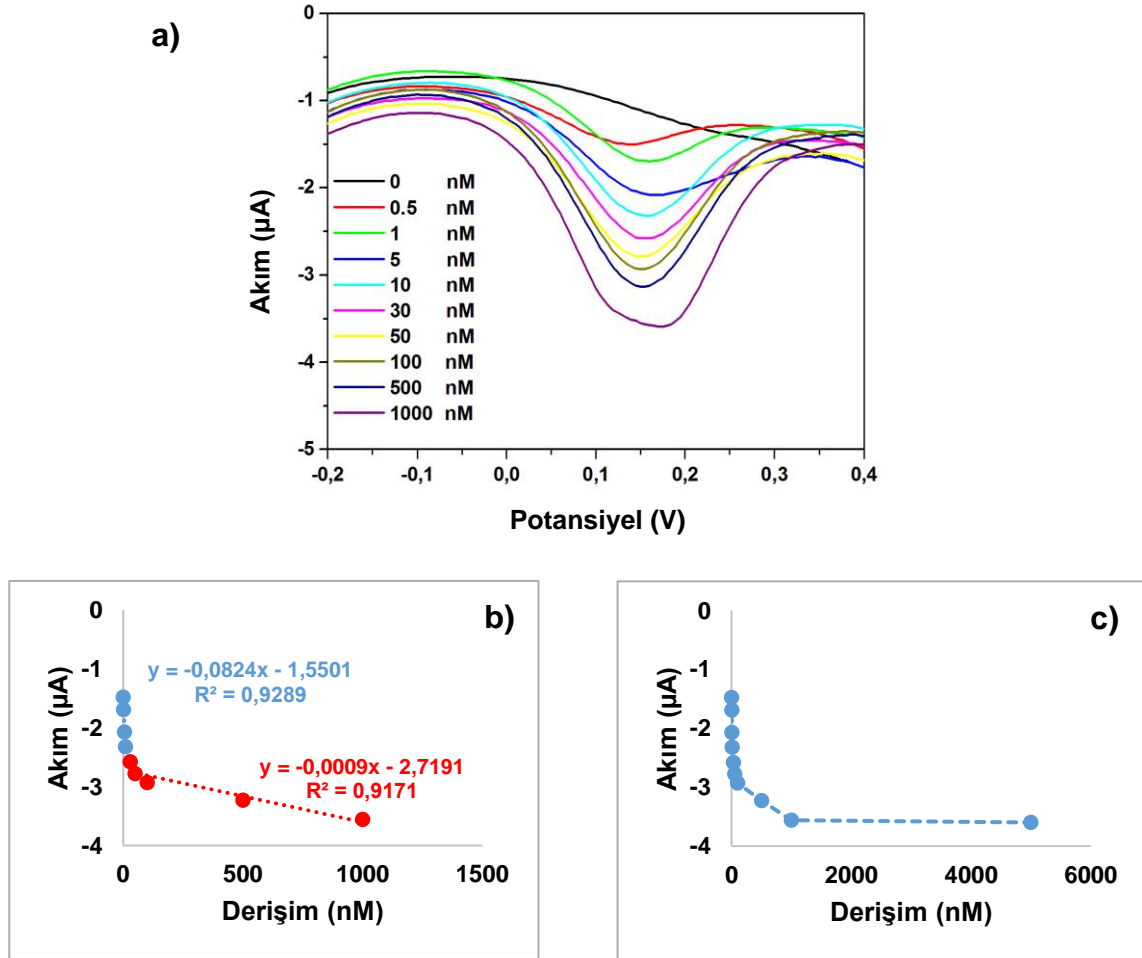
Şekil 4.17. İnkübasyon zamanının Cu(II) adsorpsiyonuna etkisine ait DPV voltamogramları (tarama hızı, 10 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı; 10 nM Cu(II) asetat tamponu içinde (pH: 5.0, 10 mM)).

Sentezlenen polimerik filmlerde aminoasit işlevselliğinin ve gözenekli yapının etkisinin belirlenmesi için daha önce belirtildiği gibi üç farklı özelliğe sahip polimerik film (aminoasit işlevselliğine/gözenekli yapıya sahip polimerik film, sadece aminoasit işlevselliğine sahip polimerik film ve sadece gözenekli yapıya sahip polimerik film) ile 0-5000 nM derişim aralığındaki Cu(II)çözeltileri (asetat tamponu içinde (pH:5.0, 10 mM)) ile DPV ölçümleri alınmıştır.

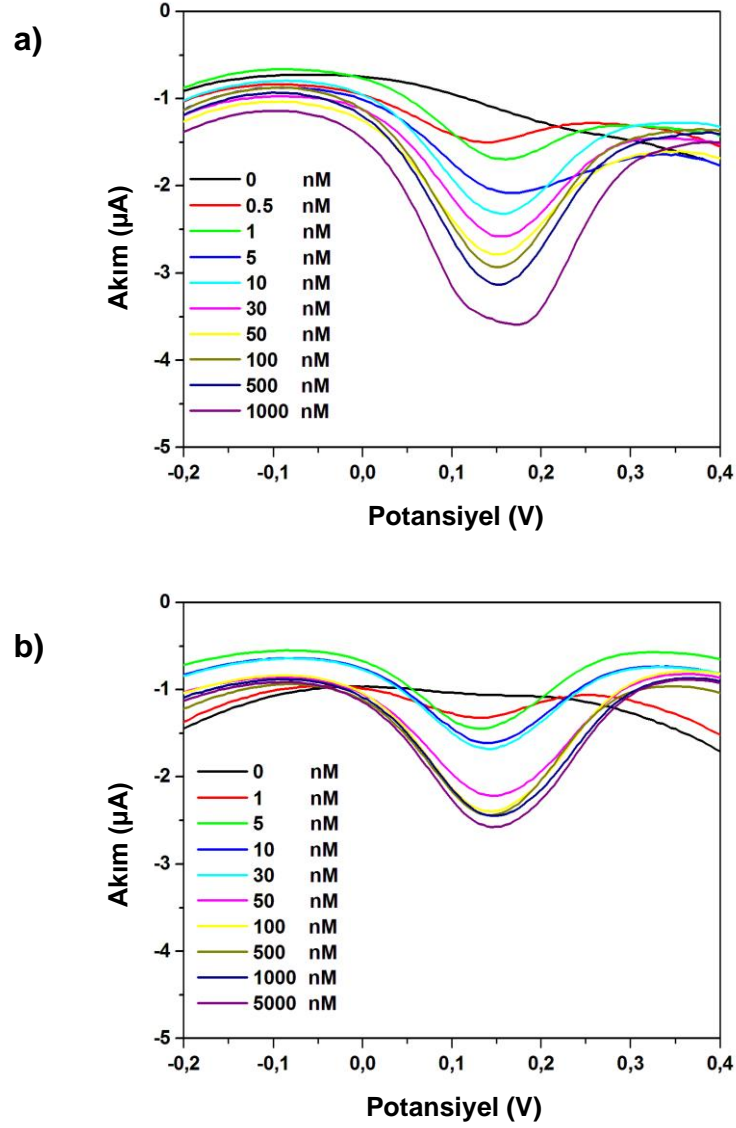
Aminoasit işlevselliğine/gözenekli yapıya sahip polimerik film ile alınan ölçümlerde Şekil 4.18a'da görüldüğü gibi DPV değeri artan Cu(II)derişimiyle artmaktadır. Şekil 4.18b'de görüldüğü gibi iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı gözlenmektedir. Şekil 4.18b'de görüldüğü gibi 0-1000 nM aralığındaki alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğruların denklemi ( $y = -0,0824x - 1,5501$ ), ( $y = -0,0009x - 2,7191$ ) ve doğrusallıkları ( $R^2$ ) sırasıyla 0.9289 ve 0.9171 olarak hesaplanmıştır. Bu elde edilen verilerle, sentezlenen polimerik filmin 0-10 nM derişim aralığında % 92; 30-1000 nM derişim aralığında %91 doğrusallıkta ölçüm yapmaktadır.

Polimerik film yapısındaki aminoasit temelli monomerin ve gözenek yapısının etkisini belirlemek için sadece aminoasit temelli monomeri yapısında içeren polimerik filmin Cu(II) ait DPV cevabı aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik filme kıyasla daha düşüktür. Polimerik filme aminoasit işlevselliğinin

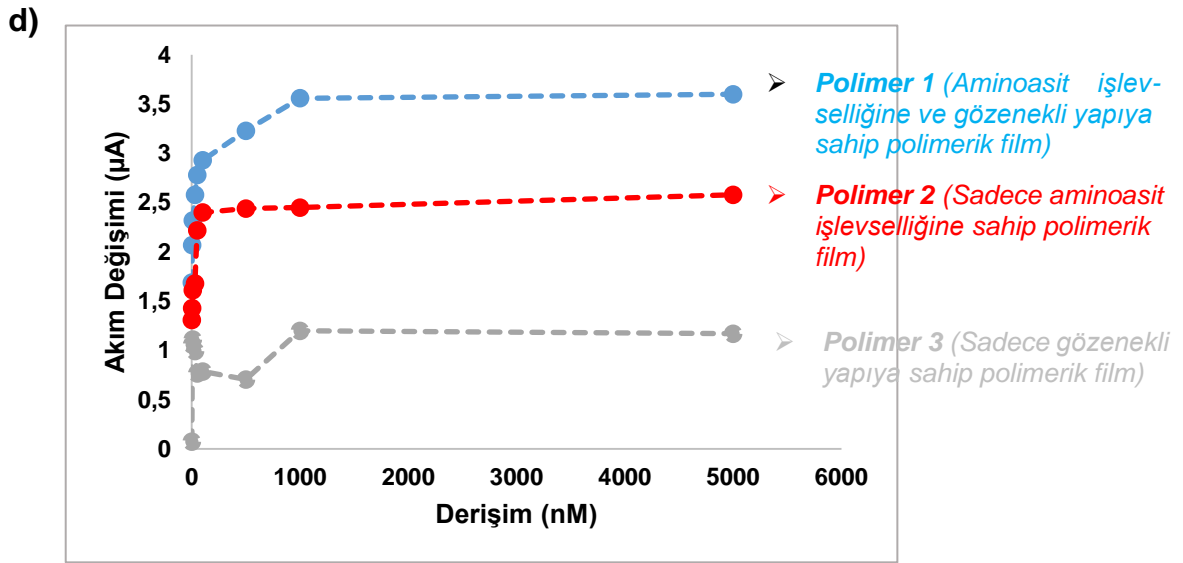
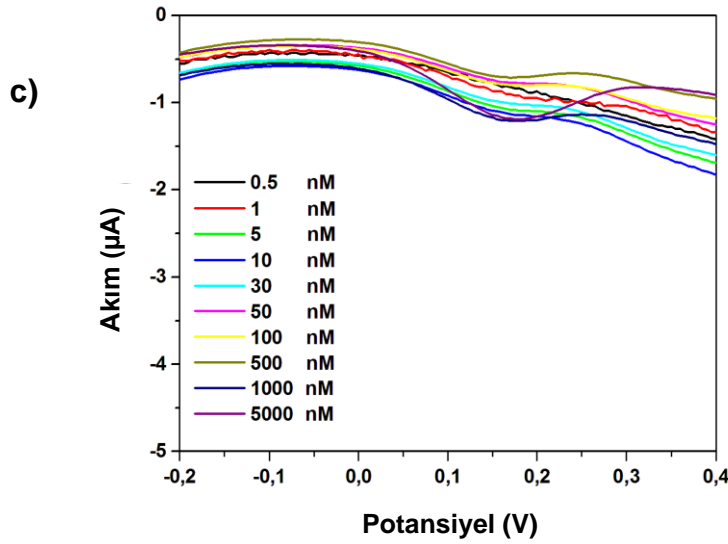
yanında gözenekli bir yapı kazandırmak adsorpsiyon kapasitesi arttırmıştır. Bunun yanında sadece gözenekli yapıya sahip olan polimerik film ile alınan ölçümler yorumlandığı zaman akım pikinde görülen değişimin yüzeye fiziksel adsorpsiyondan kaynaklandığı ve artan Cu(II) derişimine bağlı anlamlı sonuçlar olmadığı açıkça görülmektedir Şekil (4.19a-d). Alınan tüm ölçümler ile polimerik yapıdaki aminoasit monomerin etkin bir işlev yaptığı; aynı zaman gözenek yapısında adsorpsiyon kapasitesi üzerinde olumlu etkisi belirlenmiştir. Tüm bu aşamalardan sonra asıl amaç olan aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film yüzeyinde supramoleküler (IgG model yapı olarak seçilmiştir) yapının kendiliğinden düzenlenmesi QCM ölçümleri ile incelenmiştir.



Şekil 4.18. Aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film ile gerçekleştirilen Cu(II) adsorpsiyonu ait a) DPV voltamogramı (tarama hızı, 10 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı;120 saniye inkübasyon süresi; pH: 5.0 asetat tamponu (10mM)), b-c) derişim-sinyal doğrusallığı.



Şekil 4.19. DPV cevapları (tarama hızı, 10 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı; 120 saniye inkübasyon süresi; pH: 5.0 asetat tamponu (10 mM)). a) Aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film, b) sadece aminoasit işlevselliğine sahip polimerik film, c) sadece gözenekli yapıya sahip polimerik film, d) farklı özellikteki polimerik filmlerin DPV cevaplarının karşılaştırılması.



Şekil 4.19'un devamı.

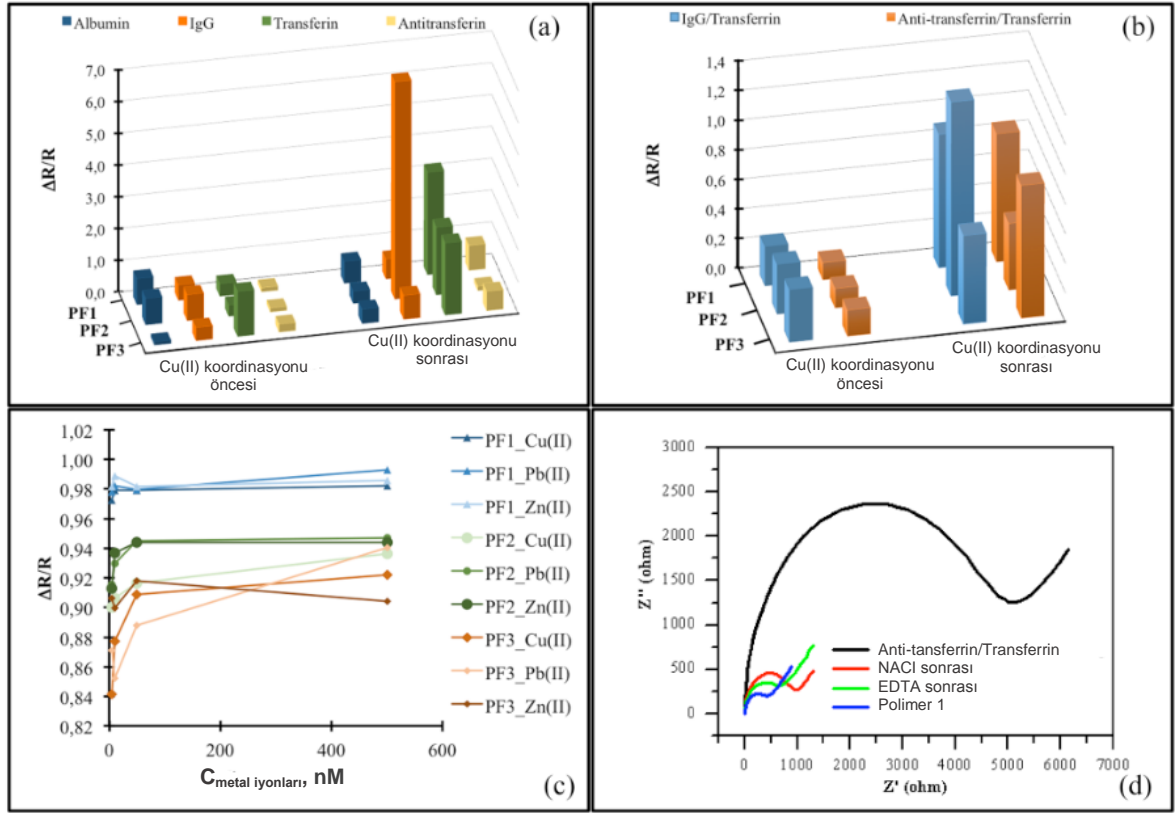
#### 4.2.5. Seçicilik ve Tekrarlanabilirlik

Supramoleküler yapının kendiliğinden düzenlenmesi için sentezlenen polimerik filmlerin metal iyonlarına ve biyomoleküllere karşı verdiği empedans yanıtlarının değerlendirilmesi için elde edilen veriler aşağıdaki şekilde normalize edilmiştir.

$$\Delta R/R_0 = (R_f - R_0)/R_0 \quad (4.1)$$

Şekil 4.20a'de görüldüğü gibi, Cu(II) iyonlarının polimerik filme adsorpsiyonunun polimerik film yüzeyinde biyomolekül düzenlenmesini arttırmıştır, özellikle de IgG ve transferin düzenlenmelerini. İncelenen elektrotlar arasında yüzeyi polimer 2 kaplanmış elektrot gözeneksiz bir yapıya sahip olmasından (daha yüksek öz direnç dolayısıyla) dolayı Cu(II) iyonlarının polimerik filme adsorpsiyonu öncesi ve sonrası olmak üzere incelenen tüm biyomolekül düzenlenmelerine en yüksek yanıtı vermiştir. Cu(II) iyonlarının polimerik filme adsorpsiyonu sonrasında transferrin

düzenlenmesi sahip olduğu metal bağlanma bölgesinden dolayı en yüksek yanıtı vermiştir. Cu(II) iyonlarının polimerik filme adsorpsiyonu öncesi ve sonrası biyomolekül düzenlenmesine ek olarak ayrıca IgG ve anti-transferrin antikoru kullanarak supramoleküler yapının kendiliğinden düzenlenmesi de incelenmiştir (Şekil 4.20b). Bu bağlamda, Cu(II) iyonlarının supramoleküler yapının kendiliğinden oluşumuna olan etkisi de incelenmiştir. Cu(II) iyonlarının yokluğunda ikinci biyomolekülün (transferrin) ilave edilmesiyle yanıt inhibe edilmiştir, çünkü transferrinin diğer biyomoleküllerle rekabeti diğerlerinin yerine geçmesine neden olmuştur. Cu(II) iyonlarının varlığında ise ilgilenilen biyomolekül ve Cu(II) iyonlarıyla etkileşimi supramoleküler yapının kendiliğinden oluşumunu mümkün kılmıştır. Aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film en yüksek yanıtı vermiştir. Şekil 4.20c'de farklı metal iyonların farklı derişimlerinin farklı özelliklere sahip polimerik filmler ile alınan empedans ölçümlerini özetlemektedir. Aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik filmin metal iyonlarının türünden en çok etkilenen ancak farklı derişim değerlerinden en az etkilendiği görülmektedir. Bu sonuçlar, a) metal iyonlarının histidin tarafından koordine edildiğini, b) metal iyon koordinasyonunun polimerik yapıdaki gözenekleri kapamasıyla prob çiftinin geçirgenliğini düşürdüğü göstermektedir. Gözeneksiz yapıya sahip olan polimerik film ise sistemin hassaslığı düşürmektedir, ancak artan metal iyonu derişimine sadece aminoasit işlevselliğine sahip olmasında dolayı ayırt edici yanıtlar verdiği görülmüştür. Son olarak ise, biyomolekülerin NaCl kullanarak seçici elüsyonu (Cu(II) iyonlarının koordinasyonu korunarak) ve Cu(II) iyonlarının EDTA ile polimerik yapıdan uzaklaştırılmasıyla sistemin tekrarlanabilirliği incelenmiştir. Yapılan empedans ölçümleri sonucunda sistemin tekrarlanabilir olduğu Şekil 4.20d'de gösterilmiştir.



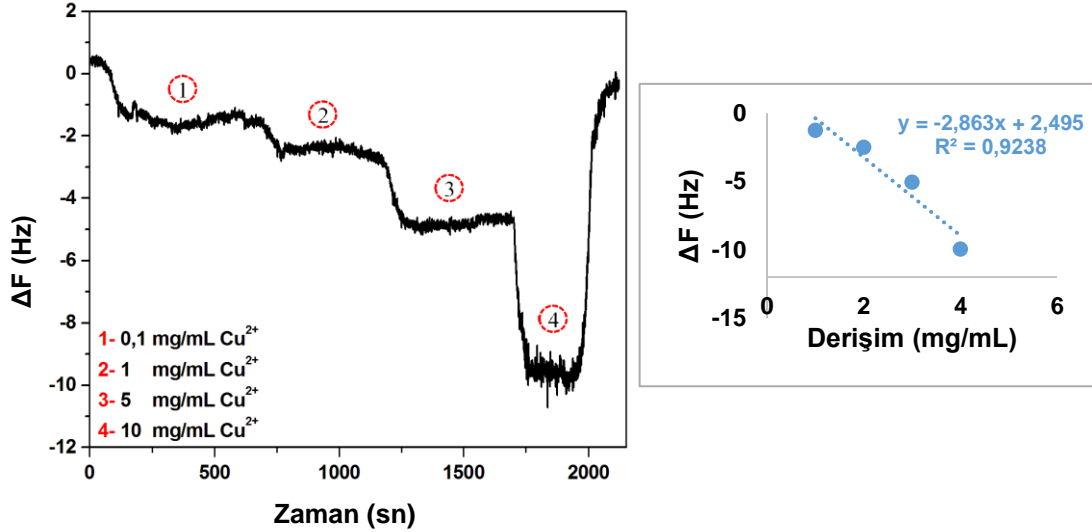
Şekil 4.20. Supramoleküler yapının kendiliğinden oluşumuna ait seçiciliği ve tekrarlanabilirliği, a) Cu(II) iyonları koordinasyonunun dört farklı biyomolekülün düzenleme seçiciliği üzerine etkisi, b) Cu(II) iyonları koordinasyonunun supramoleküler yapının kendiliğinden oluşumuna etkisi, c) metal iyonlarının türünün ve derişiminin etkisi, d) Cu(II) iyonları/biyomoleküller ve Cu(II) iyonları/polimerik film arasındaki etkileşimlerin tekrarlanabilirliği.

#### 4.2.6. QCM Sensörle Kinetik Analizler

Altın kaplı silika plakalar ile yapılan karakterizasyon ölçümlerinin ardından aminoasit işlevselliğine ve gözenekli yapıya sahip polimerik film ile kaplanmış QCM elektrot ile Cu(II) adsorpsiyonu gerçek zamanlı ölçümü alınmıştır. Silika plakalar ile alınan ölçümlerde en uygun pH değerinin 5.0 olduğu belirlenmiş ve QCM ölçümleri de bu pH değerinde gerçekleştirilmiştir. QCM sinyalinin Cu(II) derişimi arasındaki ilişkinin belirlenmesi için 0.1-10 mg/mL derişim aralığında Cu(II) çözeltileri peristaltik pompa yardımıyla 5  $\mu\text{L}/\text{dak}$  akış hızıyla QCM sistemine verilmiştir. Qtools veri analiz yazılımı ile elde edilen veriler eş zamanlı olarak izlenmiş ve kinetik veriler alınmıştır. Şekil 4.20'de farklı derişimlerde Cu(II) çözeltilerinden elde edilen sensorgramlar görülmektedir.



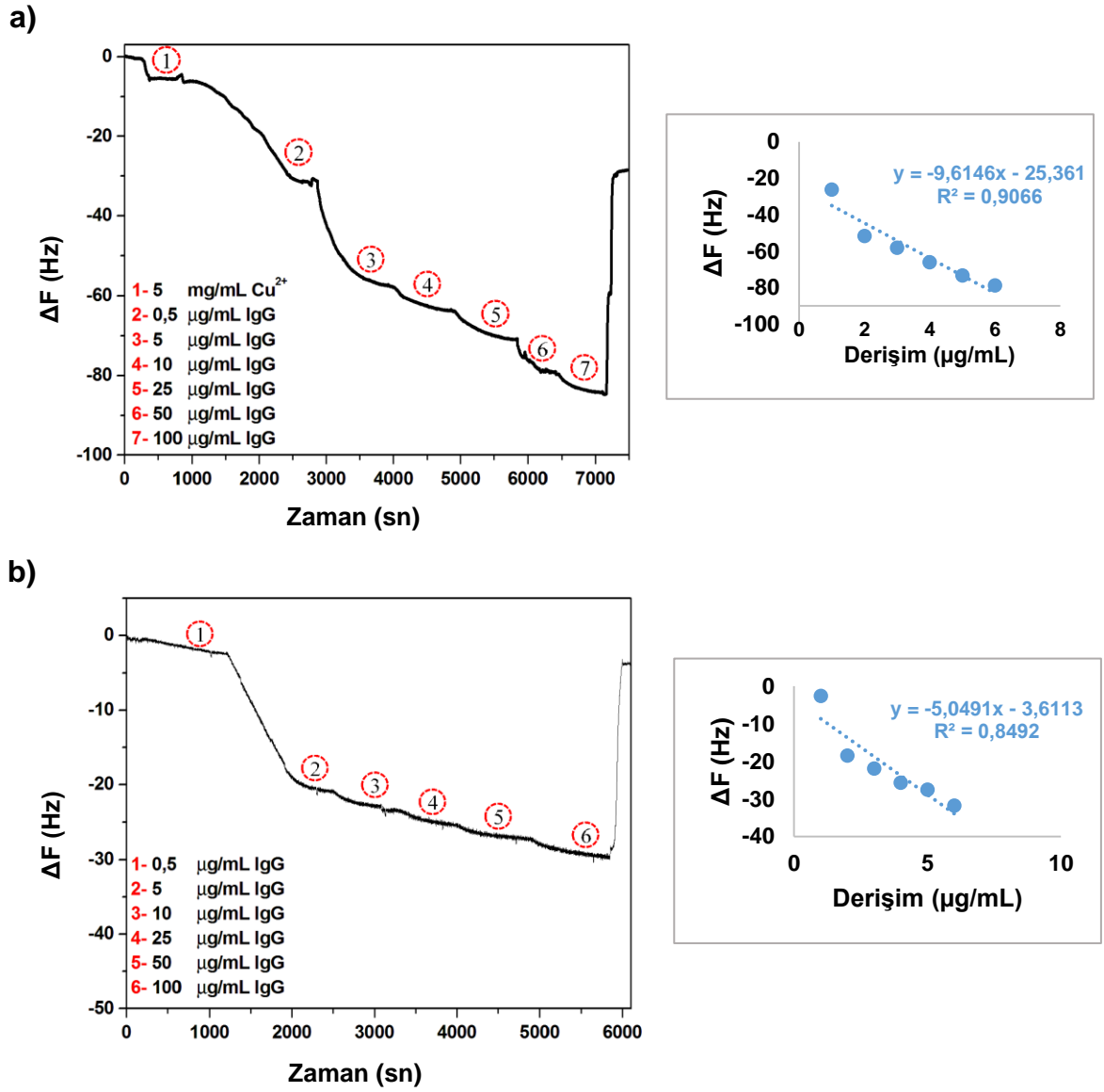
Tüm ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için yaklaşık 10 dakika beklenmiştir. Şekil 4.21'den de görüldüğü gibi artan derişimle birlikte sensorgramdaki  $\Delta F$  değışimleri doğru orantılıdır. QCM sensörün gerçek zamanlı, Cu(II) çözeltisinin 0.1-10 mg/mL derişim aralığında % 92 doğrusallıkta ölçüm yaptığı belirlenmiştir.



Şekil 4.21. Cu(II) çözeltileri (pH: 5.0 asetat tamponu, 10 mM) ile QCM sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı  $\Delta F$  değerini gösteren sensorgramlar.

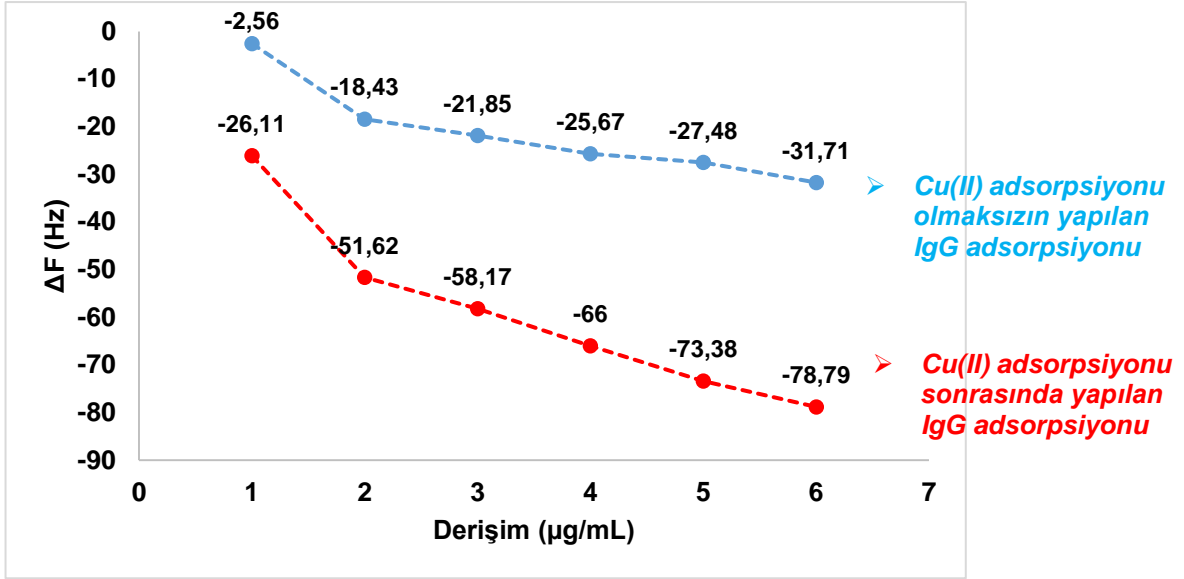
Nihayi hedef ise polimerik film ile modifiye edilmiş QCM sensör yüzeyindeki supramoleküler (IgG model yapı olarak seçilmiştir) yapının kendiliğinden düzenlenmesinin gerçek zamanlı izlenmesidir. Supramoleküler yapının kendiliğinden düzenlenmesi Cu(II) iyonlarının varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. Cu(II) iyonlarının polimerik filme adsorpsiyonunun ardından sisteme farklı derişim aralığındaki (0.5-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) IgG çözeltisinin (pH: 7.4 fosfat tampon, 10 mM) verilmiştir. Şekil 4.22'den de görüldüğü gibi artan derişimle birlikte sensorgramdaki  $\Delta F$  değışimleri doğru orantılıdır. MAH monomeri ile bakır iyonu arasında ikincil kuvvetlerden kaynaklanan koordine kovalent etkileşimi kırmak için 25 mM EDTA çözeltisi desorpsiyon ajanı olarak kullanılmıştır. QCM sensörün gerçek zamanlı, IgG çözeltisinin 0.5-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  derişim aralığında % 90 doğrusallıkta ölçüm yaptığı belirlenmiştir. Metal şelat etkışimlerinin olumlu etkisi IgG adsorpsiyonun Cu(II) olmaksızın gerçekleştirilmesiyle incelenmiştir (Şekil 4.22b-c). IgG adsorpsiyonun Cu(II) adsorpsiyonunun ardından gerçekleştirilmesiyle QCM

elektrodun frekans değerinde değerinde de daha fazla olduğu Şekil 4.22c'de açıkça görülmektedir.



Şekil 4.22. a) Cu(II) adsorpsiyonu aracılığıyla gerçekleşen IgG adsorpsiyonu, b) Cu(II) adsorpsiyonu olmaksızın gerçekleşen IgG adsorpsiyonu, c) Cu(II) adsorpsiyonu varlığında/yokluğunda gerçekleştirilen IgG adsorpsiyonun karşılaştırılması.

c)



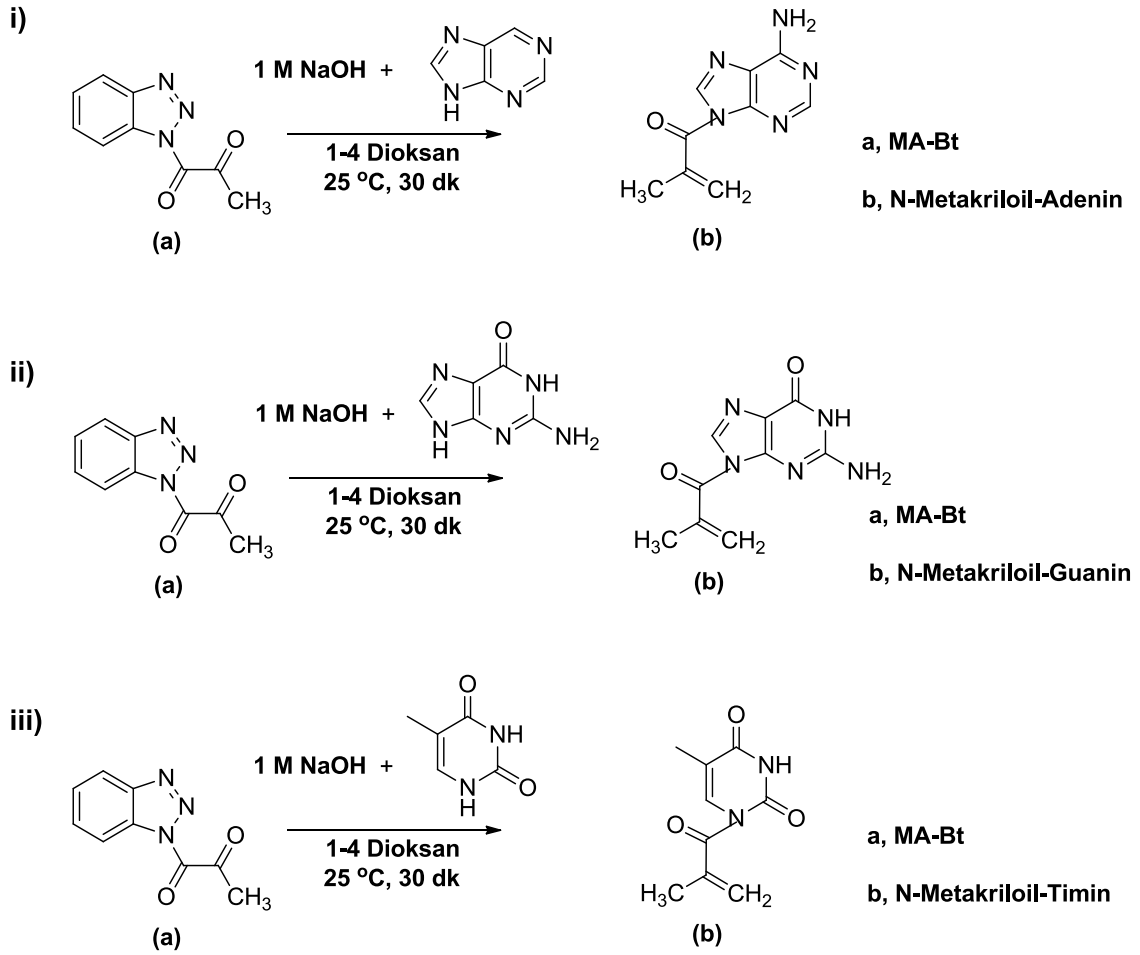
Şekil 4.22'in devamı.

Tüm bu sonuçlar biyomimetik yaklaşımıyla hazırlanan polimerik filmin supramoleküler yapının kendiliğinden düzenlenmesinde etkin bir şekilde kullanılabileceği ve supramoleküler yapının hedef analite göre belirlenerek yüzeye adsorbe edilmesiyle farklı tayin işlemlerinde kullanılabileceği belirlenmiştir.

### 4.3. DNA Mimetik Sıcaklık Duyarlı Aç-Kapa Biyoarayüzeyler

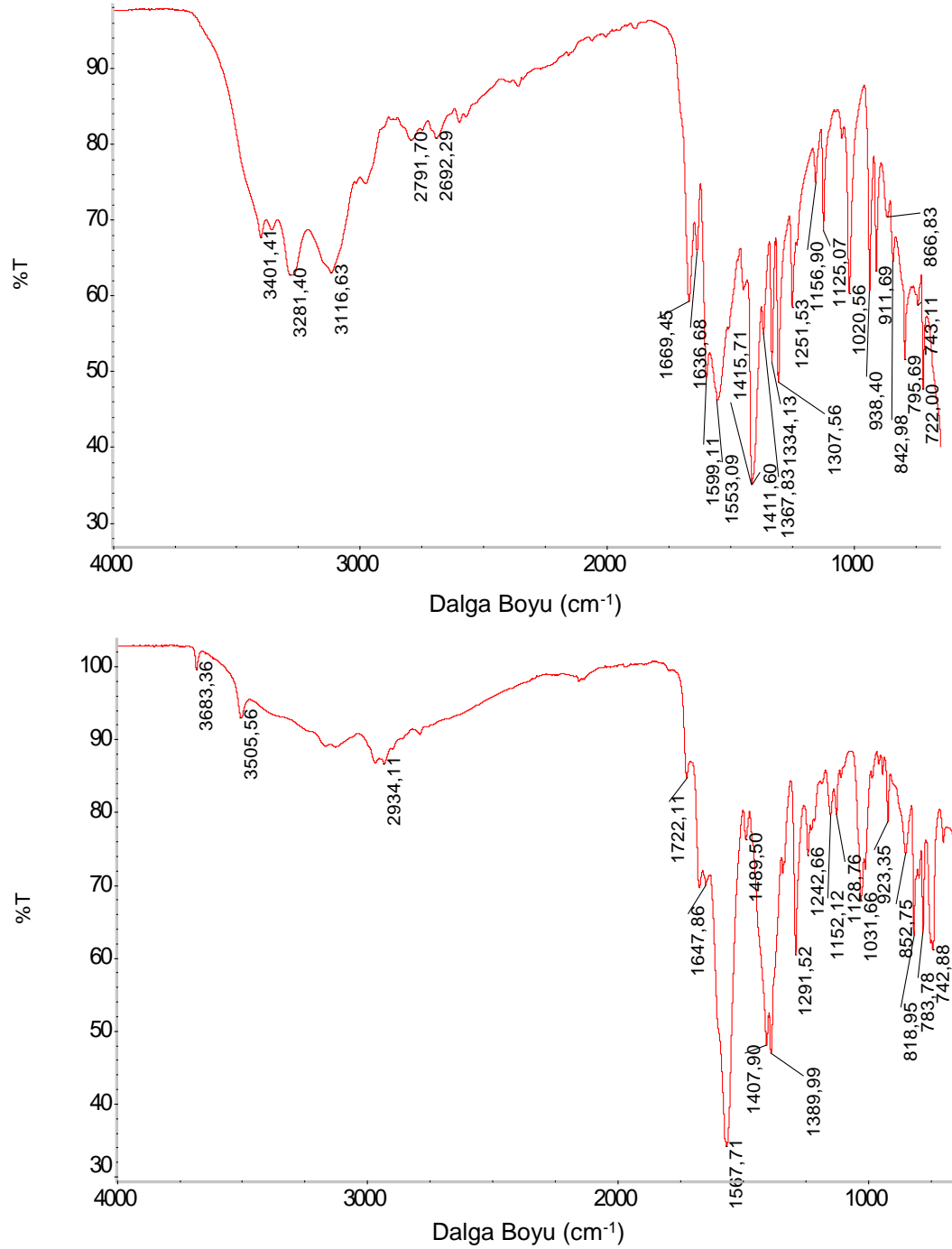
Adenin, timin, guanin bazlarının polimerleşebilen türevleri N-metakriloil-adenin (MA-Ade), N-metakriloil-timin (MA-Thy), N-metakriloil-guanin (MA-Gua) sentezlenmesinin ardından, DNA yapısından esinlenerek nükleotid temelli poli(akrilamit) polimerleri sentezlenmiştir. Sentezlenen nükleotid temelli lineer polimerler grafen ile etkileştirilerek camı karbon elektrot yüzeyinde sıcaklık ile kontrol edilebilen sıcaklık artışı ile fermuara benzer şekilde davranış sergileyen akıllı biyoarayüzey tabakası oluşturulmasında kullanılmıştır. Geliştirilen polimerlerin sıcaklığa bağlı davranışı elektrokimyasal yöntemler ile belirlenmiştir.

#### 4.3.1. Nükleotid Temelli Polimer Monomerlerin FTIR- ATR Karakterizasyonu

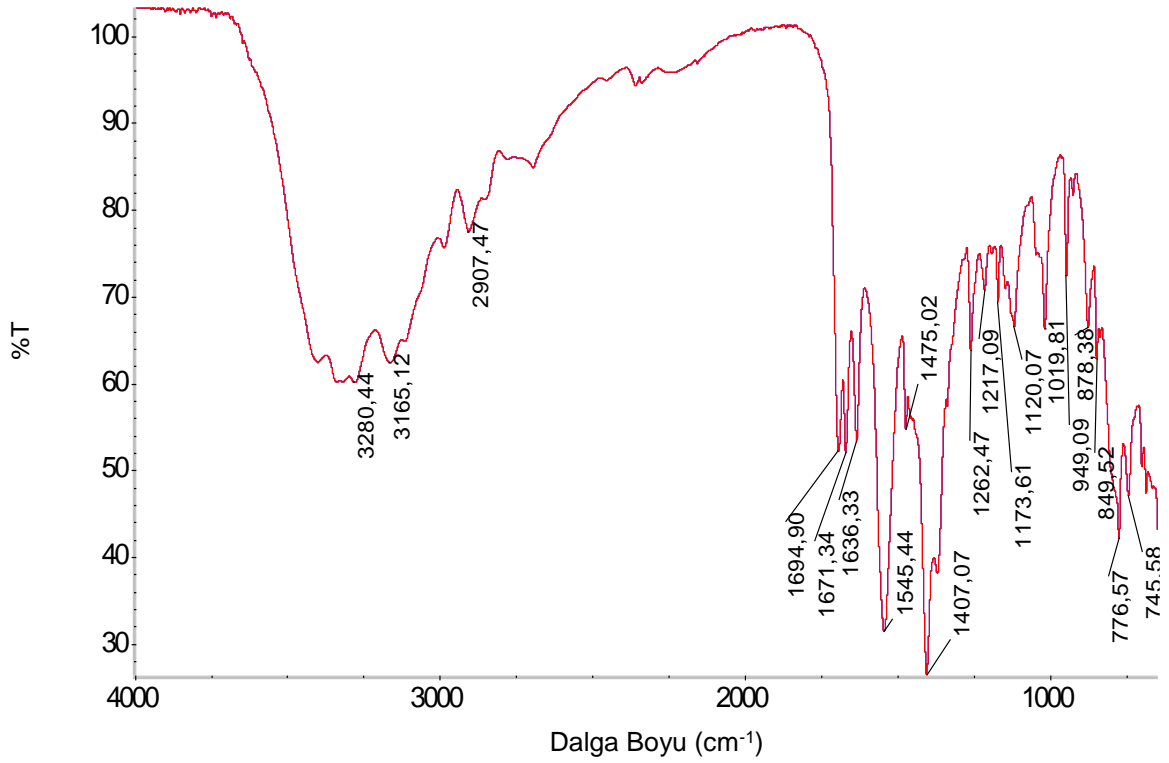


Şema 4.5. i) N-Metakriloil-Adenin, ii) N-Metakriloil-Guanin, iii) N-Metakriloil-Timin monomerlerinin sentez reaksiyonu.

Fonksiyonel monomer MA-Ade, adenin ve metakriloil grubu taşıyıcısı MA-Bt'nin tepkimesiyle sentezlenmiştir. Diğer fonksiyonel monomerler MA-Thy ve Ma-Gua aynı şekilde, timin ve guanin yapılarının MA-Bt ile tepkimesiyle sentezlenmiştir (Şema 4.5). Sentezlenen MA-Ade, MA-Thy ve MA-Gua monomerlerine ait FTIR-ATR spektrumları Şekil 4.23'de verilmiştir.



Şekil 4.23. i) N-Metakriloil-Adenin, ii) N-Metakriloil-Guanin, iii) N-Metakriloil-Timin monomerlerinin FTIR-ATR spektrumları.

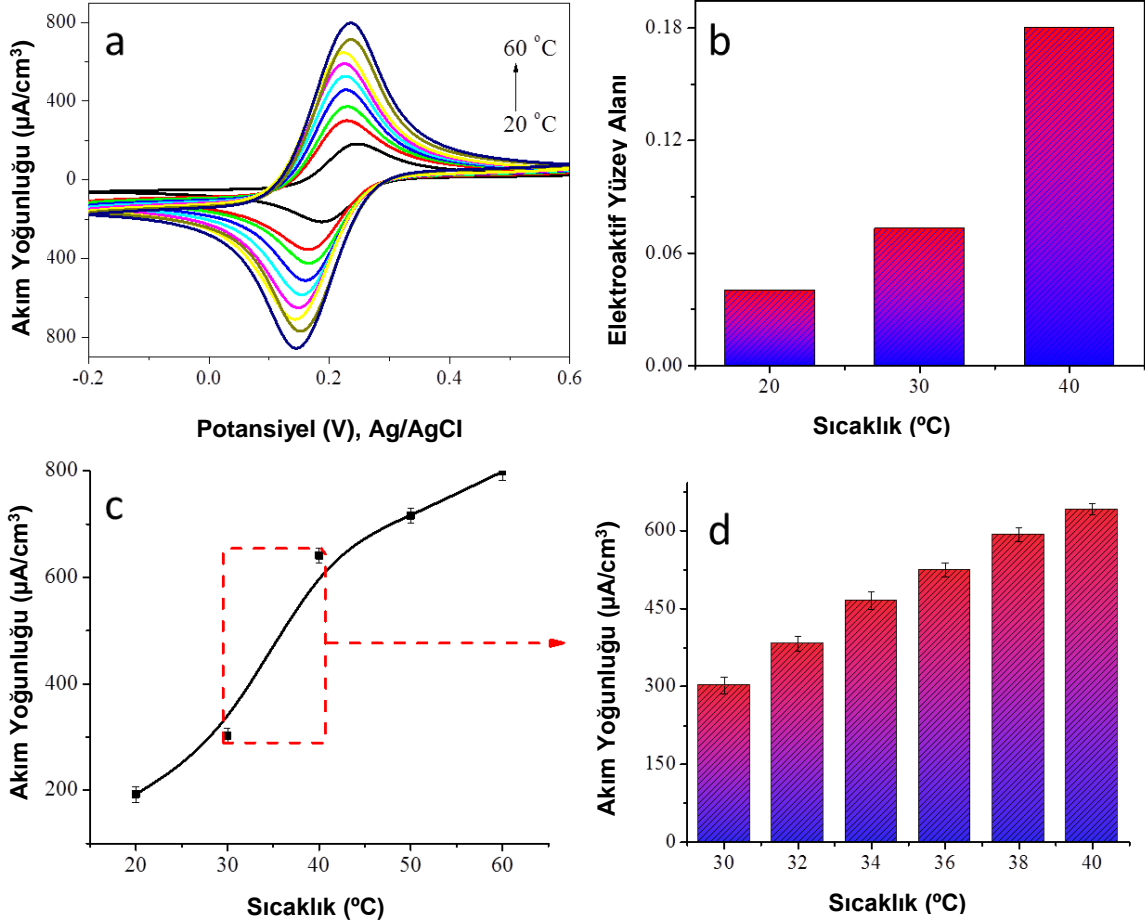


Şekil 4.23'nin devamı.

#### 4.3.2. Nükleotid Temelli GCE'lerin Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Tüm amperometrik ve voltametrik ölçümler Ivium Stat.XR elektrokimyasal analizör (Ivium Tech., Eindhoven, Hollanda) ile gerçekleştirilmiştir. İmpedans ölçümleri de Autolab potentiostat-galvanostat (Metrohm Autolab B. V., Utrecht, Hollanda) gerçekleştirilmiştir. Camısı karbon çalışma elektrodu (0.07 cm<sup>2</sup>, yüzey alanı), yardımcı elektrot platin tel ve Ag/AgCl (3 M KCl) referans elektrodundan oluşan üç elektrotlu hücre sistemi kullanılmıştır.

Hazırlanan tüm elektrotların elektrokimyasal özellikleri dönüşümlü voltametri (CV), elektrokimyasal empedans (EIS) spektroskopisi ile karakterize edilmiştir (10 mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> ve 0.1 M KCl çözeltisi içinde). Grafen ve grafen/polimer ile modifiye edilmiş tüm elektrotların [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> redoks probu kullanılarak alınan CV voltamogramlarında tersinir ve belirgin klasik sigmoidal şekle sahip pikler görülmüştür.



Şekil 4.24. a) 20° - 60°C sıcaklık aralığında 10 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ve 0.1 M  $\text{KCl}_{(\text{aq})}$  çözeltisi içinde alınan grafen/ poli-Ade/ poli-Thy) ile modifiye edilmiş elektroda ait CV voltamogramları (Tarama hızı, 100 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı), b) elektroaktif yüzey alanın sıcaklığa bağlı değişimi (eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır), c) anodik pik akımının sıcaklığı bağlı değişimi (a grafiğindeki değerler esas alınarak), d) 30-40°C sıcaklık aralığında 2°C'lik tarama yapılarak hesaplanan pik akım yoğunluğu.

Grafen/ poli-Ade/ poli-Thy ile modifiye edilmiş elektrot (E5) ile dönüşümlü voltametri ölçümleri 20°C ve 60°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir. Artan sıcaklık değeri ile birlikte  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  redoks probuna ait pik akımının artması poli-Ade ve poli-Thy arasında kurulan hidrojen bağlarının zayıfladığını, böylelikle daha yüksek elektroaktif yüzey alanının olduğu ve elektron transferi için iletken bir ara yüzeyin elde edildiğini göstermektedir (Şekil 4.24a). Üç farklı sıcaklık değerindeki (20, 30 ve 40°C) elektroaktif yüzey alanı (A) kütle transferinin sadece difüzyon ile gerçekleştiğini kabul eden Randles–Sevcik eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır. 2-300 mV/s tarama hızı aralığı ve 20-40°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilen CV

ölçümlerinden elde edilen veriler kullanılarak sonuçlar hesaplanmıştır (Şekil 4.25a-c).

$$I_p = 2.69 \times 10^5 AD^{1/2} n^{3/2} \gamma^{1/2} C \quad (4.2)$$

$I_p$ , akım yoğunluğu (A/cm<sup>2</sup>)

$n$ , redoks sürecinde aktarılan elektron sayısı

$D$ , difüzyon katsayısı, (cm<sup>2</sup>/s)

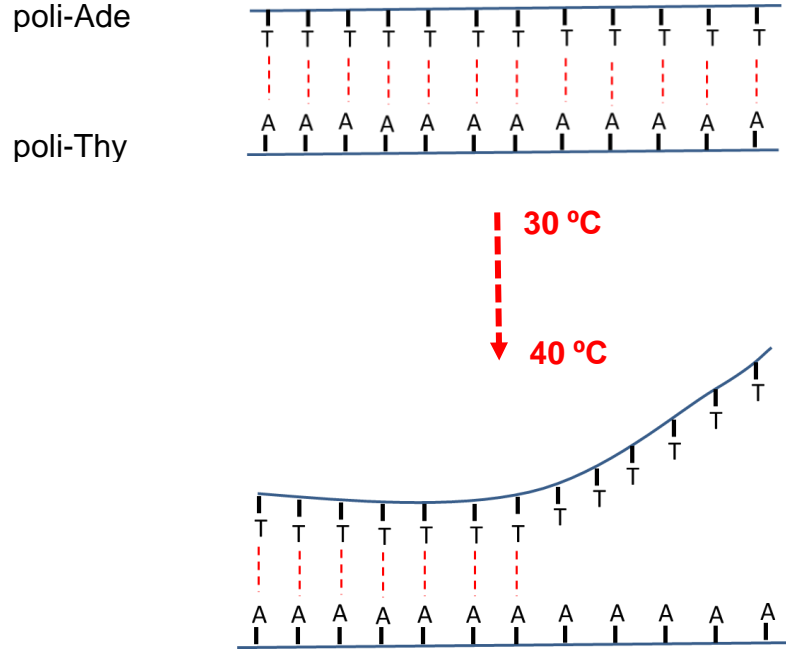
$A$ , elektroaktif yüzey alanı (cm<sup>2</sup>)

$\gamma$ , tarama hızı (V/s)

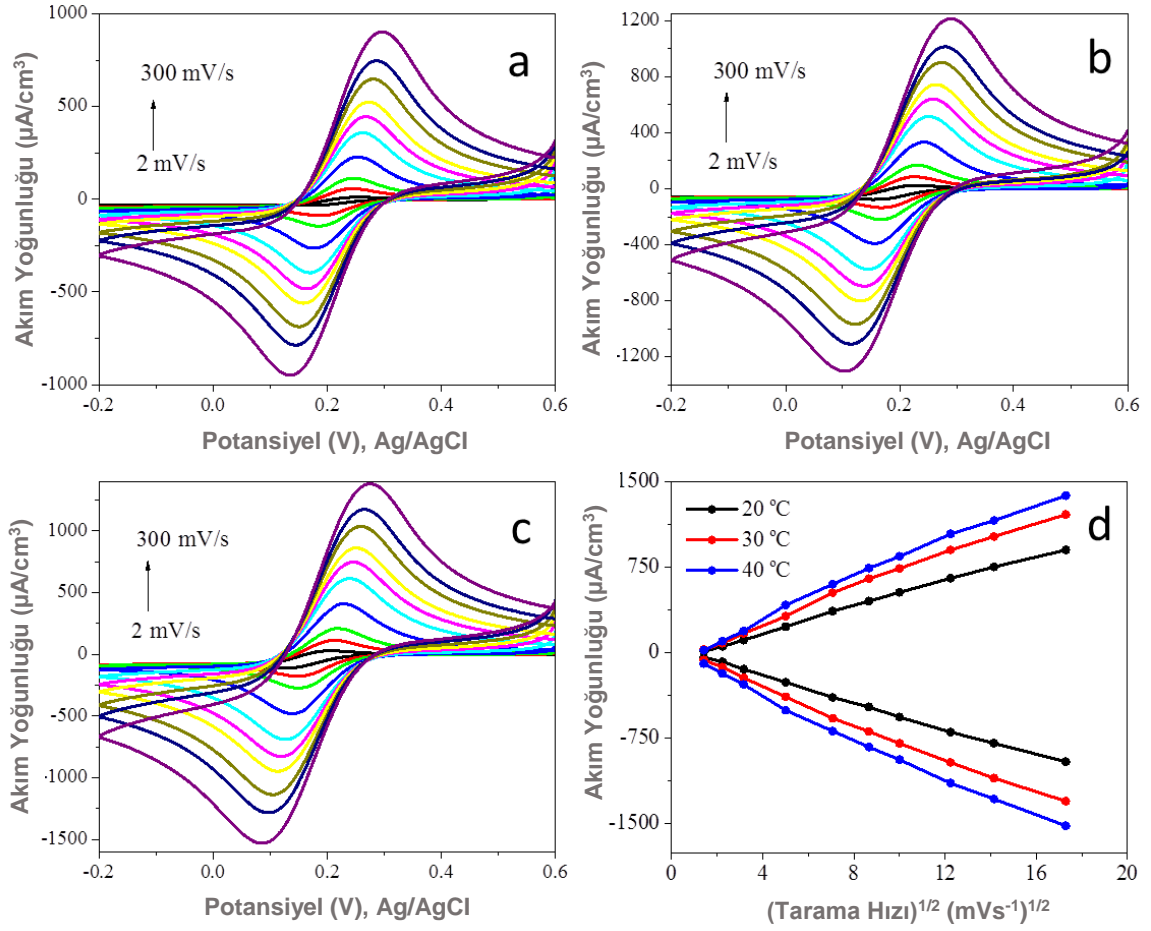
$C$ , prob moleküllerinin ana çözeltideki derişimi (mol/cm<sup>3</sup>)

Grafen/ poli-Ade/ poli-Thy ile modifiye edilmiş elektrodun (E5) yüzey alanı 20, 30 ve 40°C'deki değerleri sırasıyla 0.04, 0.073 and 0.18 cm<sup>2</sup> olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.24b). Böylelikle, 20-30°C sıcaklık değerleri arasında elektroaktif yüzey %82 oranında artarken, 30-40°C arasında bu oran %146'ya ulaşmıştır. Akım yoğunluğundaki bu yüksek kayma tasarlanan polimerik ara yüzeydeki hidrojen bağlarının artan sıcaklık ile zayıfladığını göstermektedir. Ara yüzeydeki elektrokimyasal özellikler ayrıca 2°C'lik aralıklar ile artan sıcaklık değerlerinde de incelenmiştir. Alınan sonuçlar göre akım yoğunluğu artan sıcaklık ile birlikte kademeli olarak artmaktadır (Şekil 4.24c-d). Artan akım yoğunluğunun sebep olan sürecin daha iyi anlaşılması için ayrıca farklı şekilde hazırlanan elektrotlar (E1, E2, E3, E4 numaralı elektrotlar) ile de ölçümler alınmıştır (Şekil 4.26). Tüm elektrotlar için artan sıcaklık ile birlikte artan akım yoğunluğu gözlenmesine rağmen, E5 elektrodu ile yapılan ölçümlerde sıcaklığın daha etkin bir şekilde akım yoğunluğunu arttırdığı gözlenmektedir. 30-40°C arasında akım yoğunluğunda keskin değişim beklenildiği sadece E5 elektrodunda gözlenmektedir. Çünkü adenin ve timin bazları arasındaki kurulan spesifik hidrojen bağları zayıflamakta (Şema 4.6), böylelikle poli-Ade/ poli-Thy polimer tabakaları fermuara benzer bir davranış sergilemektedir (Şekil 4.26e).





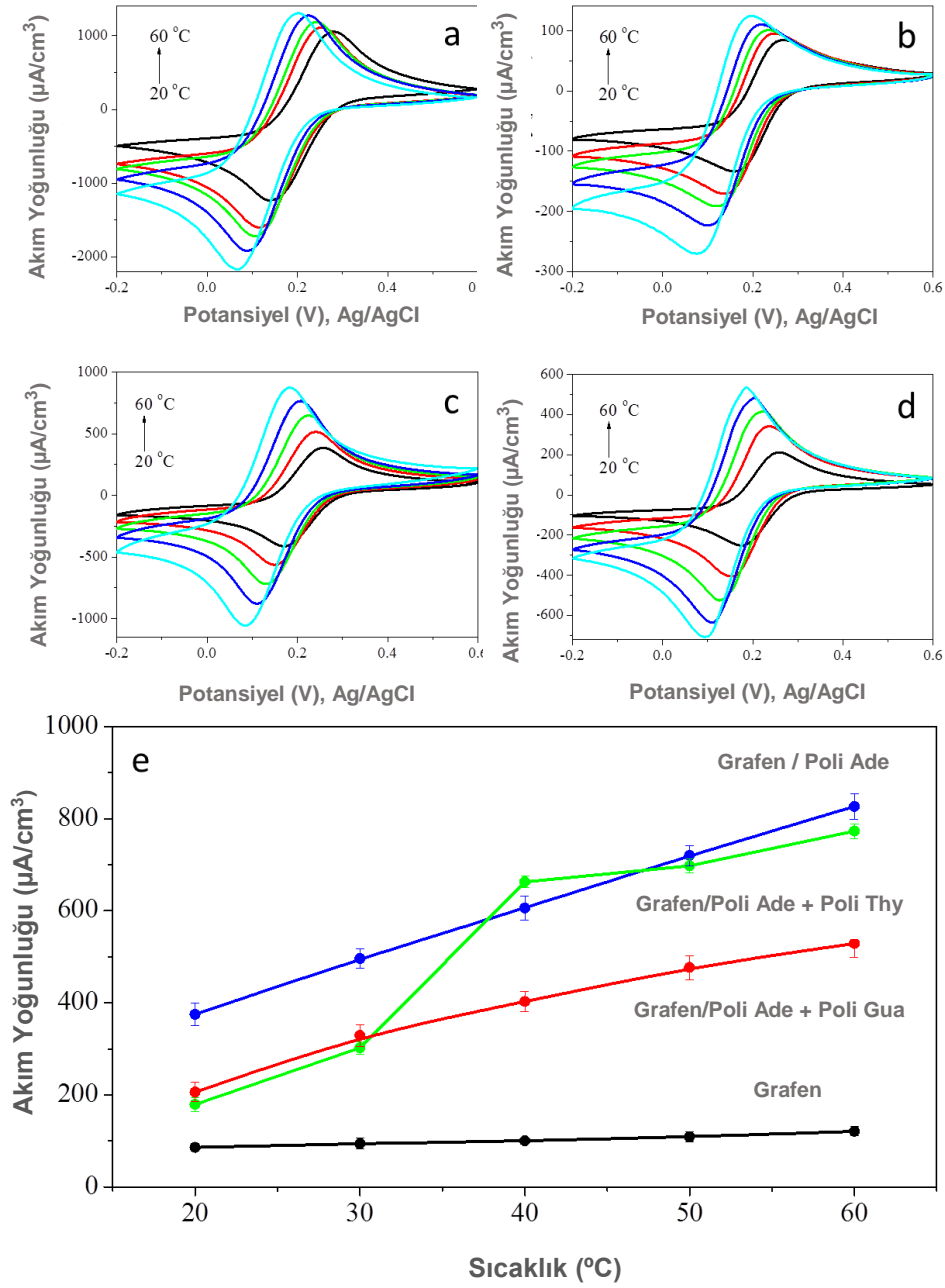
Şema 4.6. poli-Ade/ poli-Thy polimer tabakaları arasındaki hidrojen bağlarının sıcaklık ile zayıflamasının şematik gösterimi.



Şekil 4.25. Grafen/ poli-Ade)/ poli-Thy) ile modifiye edilmiş elektroda ait CV voltamogramları (10 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ve 0.1 M  $\text{KCl}_{(\text{aq})}$  çözeltisi içinde) a) 20°C, b) 30°C, c) 40°C d) farklı sıcaklıklardaki tarama hızının katodik ( $I_{pc}$ ) ve anodik ( $I_{pa}$ ) piklere etkisi. (Tarama hızı, 2-300 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı).

Çizelge 4.2. Şekil 4.25d'ye ait farklı sıcaklıktaki tarama hızı değerleri

Sıcaklık	20°C	30°C	40°C
$R^2$ (yük.)	0.996	0.992	0.991
Kesim noktası (yük.)	-57.97	-57.208	-54.37
Eğim (yük.)	57.19	76.55	86.76
$R^2$ (in.)	0.998	0.995	0.994
Kesim noktası (in.)	37.72	21.71	-10.811
Eğim (in.)	-58.68	-79.19	-90.34



Şekil 4.26. CV voltamogramları (10 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ve 0.1 M  $\text{KCl}_{(\text{aq})}$  çözeltisi içinde) a) boş GCE, b) grafen ile modifiye edilmiş, c) grafen/ poli-Ade ile modifiye edilmiş GCE, d) grafen/poli-Ade/poli-Gua ile modifiye edilmiş GCE ve e) tüm elektrolardaki akım yoğunluğunun sıcaklığa bağlı değişimi (Tarama hızı, 100 mV/s; Ag/AgCl referans elektroduna karşı).

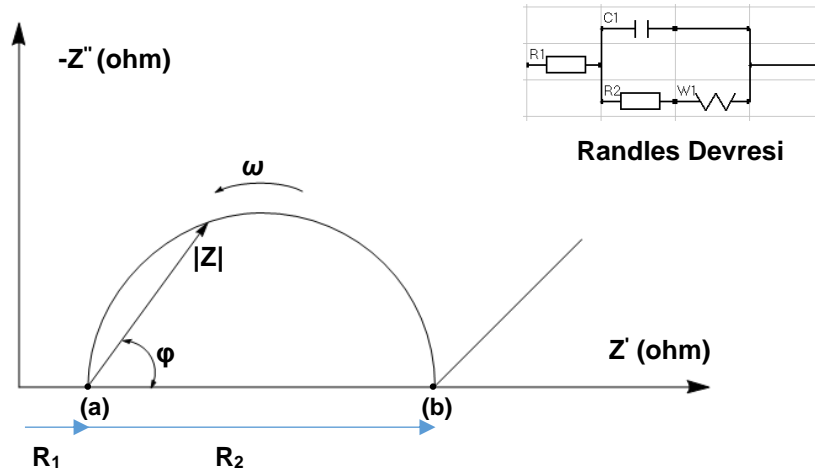
Tüm modifiye edilmiş GCE yük transfer özellikleri elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.27a-c). Elektrot-çözelti arayüzeyinde meydana gelen elektrokimyasal dönüşümler deneysel empedans spektrumuna karşılık gelen Randles devresiyle modellenmiştir. Bu modelde arayüzeyin empedansı, Ohm yasasının uygulamasından türetilir ve sistemin direnci ile ilgili bir gerçek ( $Z'$ ) ve daha çok yalıtkan tabakaların oluşumu ile ilgili bir sanal ( $Z''$ ) olmak üzere iki bileşenden oluşur.

Nyquist grafiği ve Randles devresi Şema 4.7'de gösterilmektedir.  $R_1$  değeri çözelti direncini gösterirken  $R_2$  direnci yük transfer direnci ( $R_{ct}$ )'ni ifade etmektedir. Spektrumun doğrusal olan son kısmı ise düşük frekansta taranan ve elektrot yüzeyi-çözelti arasında kütle aktarımıyla (difüzyon) oluşan Warburg empedansını ( $W$ ) ifade etmektedir.

$$Z_W = \sigma(\omega) - 1 / 2(1 - j) \quad j = \sqrt{-1} \quad (4.3)$$

( $\omega$ , açısal frekans ve  $\sigma$ , ise Warburg katsayısı)

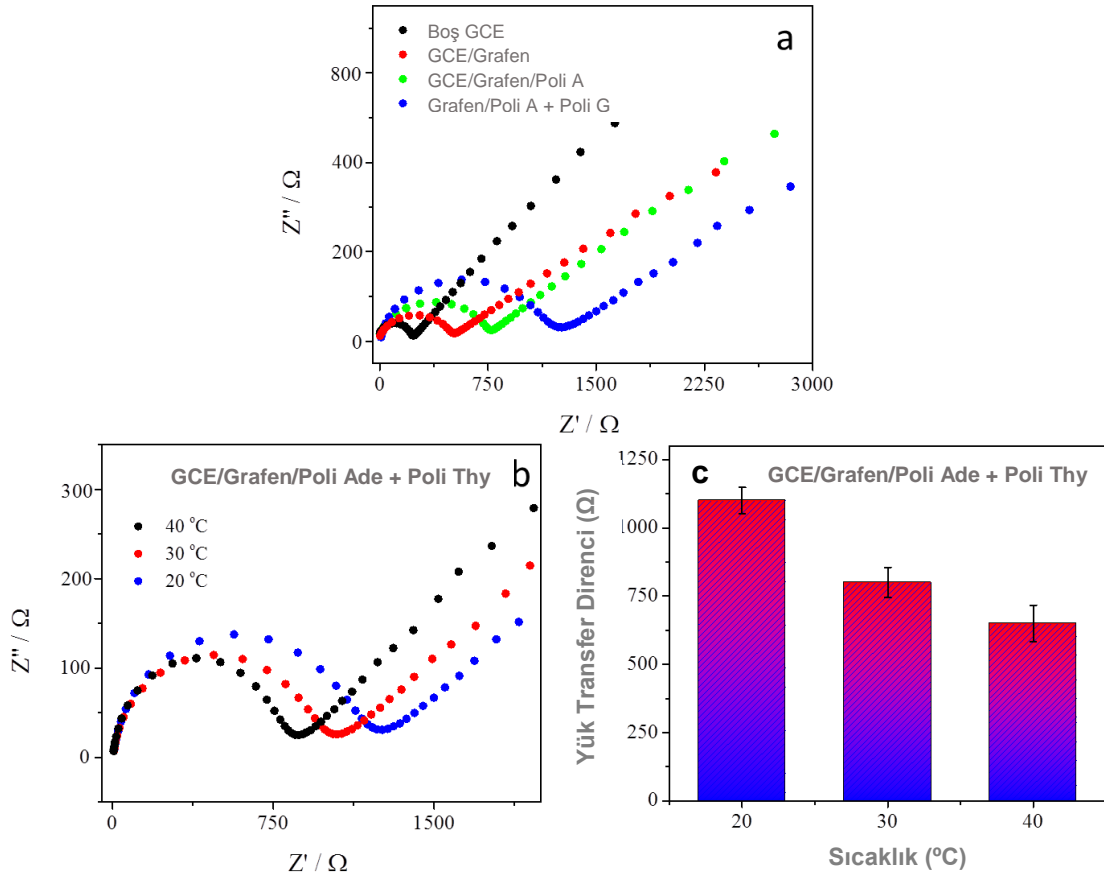
Randles devresi elektrot yüzeyindeki çift tabakanın direnme ( $R_2$ ) paralel bağlanmış kapasitörden ( $C$ ) ve onlara seri olarak bağlanmış çözelti direncinden meydana gelir. Warburg empedansı ( $W$ ) ise elektroda frekans bağımlı kütle aktarımını ifade etmektedir (241).



Şema 4.7. Nyquist formunda gösterilen Faradaik empedans spektrum grafiği.

Elektrot yüzeyindeki yük transfer direnci yarım daire şeklindeki Nyquist eğrilerinin çapı baz alınarak hesaplanabilir. Buna göre, boş GCE, grafen ile modifiye edilmiş, grafen/ poli-Ade) ile modifiye edilmiş GCE, grafen/poli-Ade)/poli-Gua) ile modifiye

edilmiş GCE ve grafen/poli-Ade)/poli-Thy) ile modifiye edilmiş GCE ait  $R_{ct}$  değerleri sırasıyla 59  $\Omega$ , 156  $\Omega$ , 260  $\Omega$ , 1205  $\Omega$  ve 1103  $\Omega$  olarak hesaplanmıştır. grafen/poli-Ade)/poli-Thy) ile modifiye edilmiş GCE'un sıcaklık ile olan değişiminin belirlenmesi için 20-40°C sıcaklık değerleri arasında empedans ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar artan sıcaklık değeri ile elektrot yüzeyindeki direncin azaldığını ve yük transfer direncinin azaldığını göstermektedir. Grafen/poli-Ade)/poli-Thy) ile modifiye edilmiş GCE'un 20°C, 30°C, 40°C'deki  $R_{ct}$  sırasıyla 1103  $\Omega$ , 799  $\Omega$ , and 650  $\Omega$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.27). Bu sonuçlar, adenin ve timin bazları arasındaki kurulan spesifik hidrojen bağları zayıflamakta, böylelikle poli-Ade)/poli-Thy) polimer tabakaları fermuara benzer bir davranış sergileyerek birbirinden ayrıldığını göstermektedir.



Şekil 4.27. a) Boş GCE, grafen ile modifiye edilmiş, grafen/ poli-Ade ile modifiye edilmiş GCE, grafen/poli-Ade/poli-Gua ile modifiye edilmiş GCE ait empedans değerleri, b) grafen/poli-Ade/poli-Thy ile modifiye edilmiş GCE ait empedans değerleri, c) grafen/poli-Ade/poli-Thy ile modifiye edilmiş GCE ait yük transfer direnç değerleri (10 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ve 0.1 M  $\text{KCl}_{(\text{aq})}$  çözeltisi içinde).

### 4.3.3. DNA Mimetik Biyoarayüzey'den L-Triptofan Salınımının İncelenmesi

Farklı amaçlar için geliştirilen fermuar benzeri biyoesinlenmiş yapıların potansiyel uygulanabilirliği göstermek için, tez kapsamında L-triptofanın kontrollü salınımına yönelik değişen sıcaklık ile ayarlanabilen ince bir film sistemi tasarlanmıştır. Bunun için, Bölüm 3.3.2.3.2'de ifade edilen GCE elektrotların hazırlanmasına ek olarak grafen/poli-Ade)/poli-Thy) ile modifiye edilmiş GCE'lerin poli-Ade)/poli-Thy) polimer tabakaları arasına 1 µg/mL ile 100 µg/mL derişim aralığında değişen L-triptofan çözeltileri yüklenmiş ve 20°C ve 40°C olmak üzere çalışma aralığındaki farklı iki sıcaklık değerinde 0.25 ile 120 dakikalık zaman aralığında L-triptofan salınımı izlenmiştir (Şekil 4.28a-c).

Salınım verilerinin analizine Ritger-Peppas ampirik denklemi uygulanmıştır (243).

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (0.5 < n < 1) \quad (4.4)$$

$M_t$  ve  $M_\infty$ , t anında ve  $\infty$  anında salınan analit miktarını

$M_t/M_\infty$ , t anında salınan analit fraksiyonu

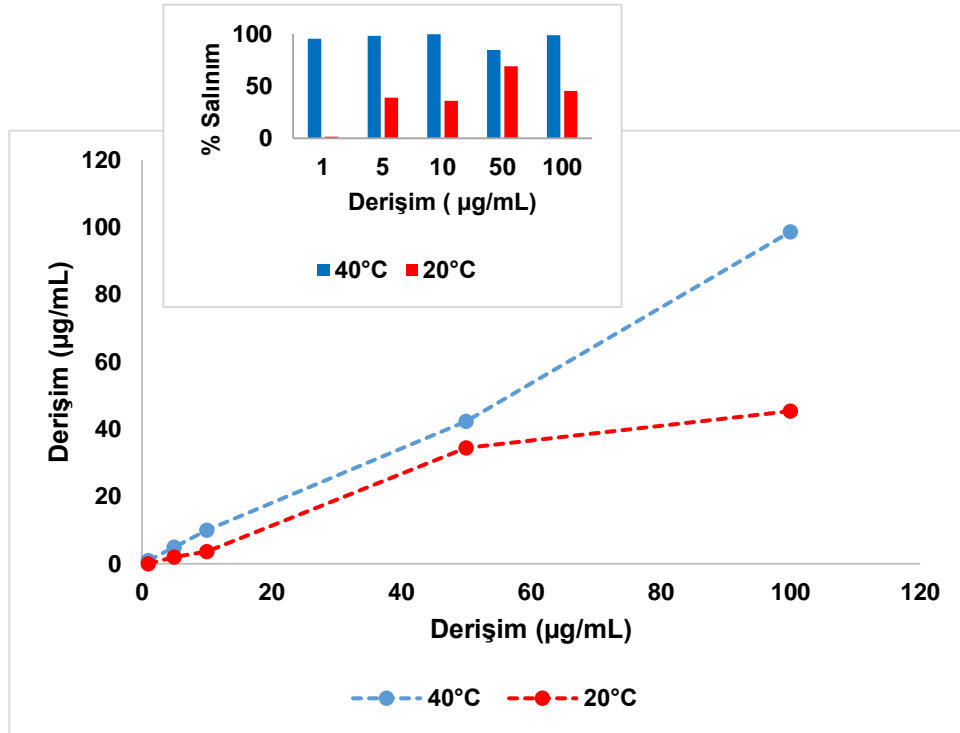
k, salınım sistemin kinetik özelliklerini belirten sabit

n, salınım mekanizmasını ifade eden difüzyon sabiti

n değerinin sayısal değeri 0.5 olması analit salınımının Fickian'a uyan difüzyon; eğer  $0.45 < n < 0.89$  sayısal değerleri arasında ise analit salınımının non-Fickian'a uyan difüzyon; eğer 0.89 sayısal değerine eşit ise analit salınımı Case II (sıfırıncı derece) difüzyon; eğer  $n > 0.89$  ise analit salınımının Supercase II difüzyon kontrollü olduğunu ifade etmektedir. Fickian mekanizmasında, difüzyon oranı polimer relaksasyonundan (gevşeme) daha düşüktür. Bu durumda salınım esas olarak analit difüzyonu ve çözünürlüğü ile tanımlanır. Diğer yandan polimer relaksasyonu ve ara yüzey hareketleri, Case II ve Supercase II mekanizmalarında salınım profilini tanımlayan baskın etkenlerdir (243). Ancak, bu model polimerik sistemden etkin madde salınımının %60'lık kısmı için geçerlidir (243). Yüklenen L-triptofan miktarının %32.9 salınmasına istinaden 20°C'deki L-triptofan salınımı bu model ile ifade edilebilmektedir. 20°C'deki L-triptofan salınımı için hesaplanan regresyon ( $R^2$ ), salınım sabiti (k) ve salınım mekanizmasını ifade eden difüzyon sabiti (n) değerleri sırasıyla, 0.9334, 1.484 ve 0.919 olarak belirlenmiştir. 40 °C'deki L-triptofan salınımı için sadece ilk 5 dakikadaki salınımı bu model ile ifade edilebilmektedir. Çünkü

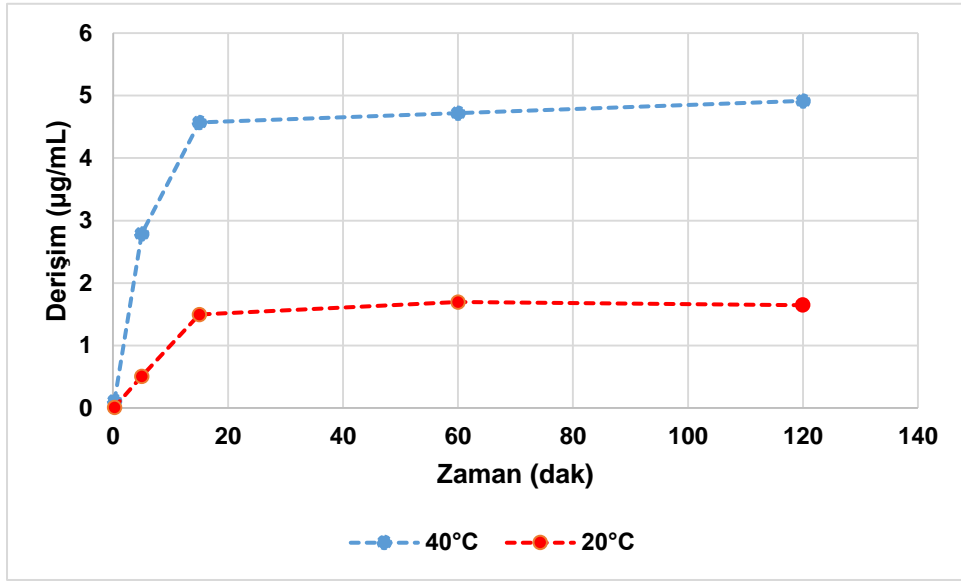
yüklenen L-triptofan miktarının %55.7'si ilk beş dakika içinde salınmıştır. Bu bölge için hesaplanan regresyon ( $R^2$ ), salınım sabiti (k) ve salınım mekanizmasını ifade eden difüzyon sabiti (n) değerleri sırasıyla, 0.9809, 9.065 ve 0.9367 belirlenmiştir. Bu eğrinin ikinci kısımda, difüzyon sabitinin (n) sıfıra yaklaşması (0.0334) L-triptofan salınımının dengeye ulaştığını ve/veya sıfırıncı dereceden salınım profili ile devam ettiğini göstermektedir. Bu durumda analit salınımı polimer relaksasyonu ve ara yüzey düzenlenmeleri yerine analitin çözünme ve difüzyon oranları ile kontrol edilmektedir. poli-Ade ve poli-Thy polimer katmanları arasında kurulan hidrojen bağlarının artan sıcaklık ile zayıflaması ve dolayısıyla ara yüzey polimer kompleksinin açılmasıyla L-triptofan salınımı önemli ölçüde hızlanmıştır. Bu sonuç hedef doğrultusunda DNA mimetik aç-kapa biyoarayüzeylerin başarılı bir şekilde çalıştığını ve de sıcaklıkla kontrol edilebildiğini göstermektedir (Şekil 4.29).

a)

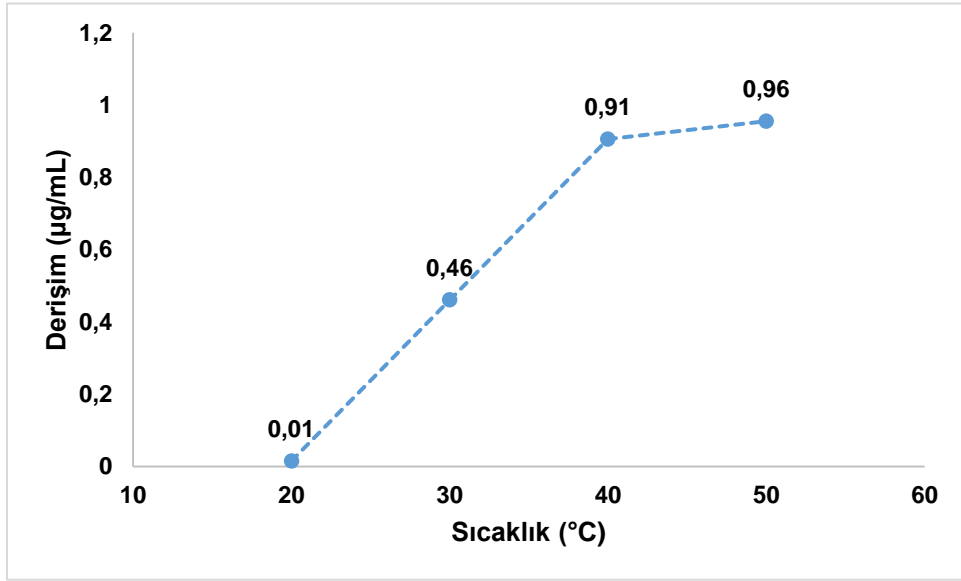


Şekil 4.28. Grafen/poli-Ade)/poli-Thy) ile modifiye edilmiş GCE ile L-triptofan salınımının incelenmesi a) derişimin etkisi, b) zamanın etkisi (5 µg/mL sulu L-triptofan çözeltisi), c) sıcaklığın etkisi (5 µg/mL sulu L-triptofan çözeltisi).

b)

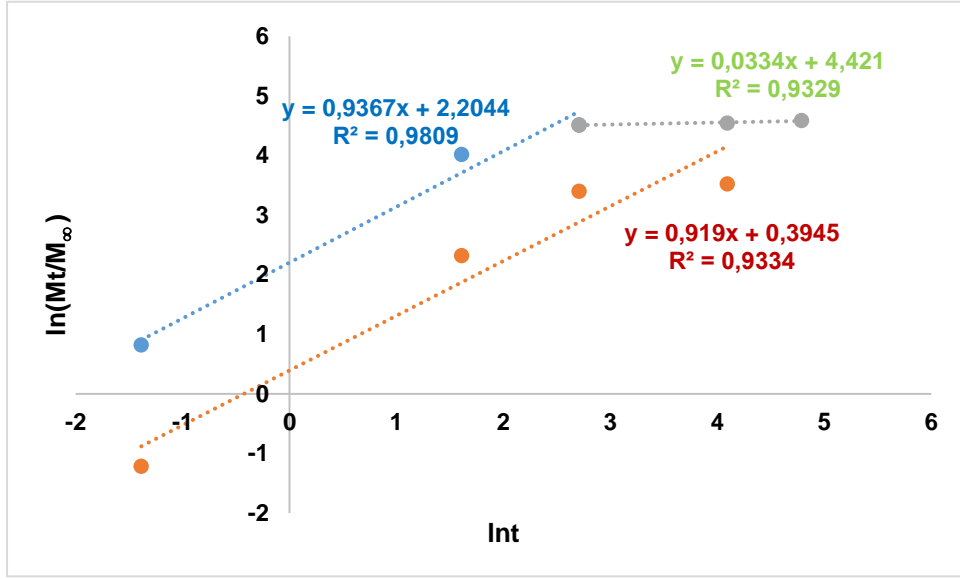


c)



Şekil 4.28'nin devamı.





Şekil 4.29. Geliştirilen DNA mimetik fermuar benzeri akıllı biyoarayüzeyden L-triptofan salınım mekanizması.

## KAYNAKLAR

- [1] Zhao, N., Wang, Z., Cai, C., Shen, H., Liang, F., Wang, D., Wang, C., Zhu, T., Guo, J., Wang, Y., Liu, X., Duan, C., Wang, H., Mao, Y., Jia, X., Dong, H., Zhang, X., Xu, J., Bioinspired Materials: from Low to High Dimensional Structure, *Advanced Materials*, 26, 6994–7017, **2014**.
- [2] Bhushan, B., Bioinspired Structured Surfaces, *Langmuir*, 28, 1698-1714, **2012**.
- [3] Bhattacharya, P., Du, D., Lin, Y., Bioinspired Nanoscale Materials for Biomedical and Energy Applications, *Journal of The Royal Society Interface*, 11, 1-14, **2014**.
- [4] Andre, R., Tahir, M.N., Natalio, F., Tremel, W., Bioinspired synthesis of multifunctional inorganic and bio-organic hybrid materials. *Federation Of European Biochemical Societies Journal*, 279, 1737–1749, **2012**.
- [5] President and Fellows of Harvard College, <http://wyss.harvard.edu/> , (2015)
- [6] Breslow, R., Dong, S.D., Biomimetic reactions catalyzed by cyclodextrins and their derivatives, *Chemical Reviews*, 98, 1997–2011, **1998**.
- [7] Sanchez, C., Arribart, H., Giraud-Guille, M.M., Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems, *Nature Materials*, 4, 277-288, **2005**.
- [8] *Hierarchical Structures in Biology as a Guide for New Materials Technology* (eds. Tirrell, D. A.), National Material Advisory Board, The National Academic press, Washington DC, 1–130, **1994**.
- [9] Hussain, M., Wackerlig, J., Lieberzeit, P.A., Biomimetic Strategies for Sensing Biological Species, *Biosensors*, 3, 89-107, **2013**.
- [10] Ding, X., Heiden, P.A., Recent developments in molecularly imprinted nanoparticles by surface imprinting techniques, *Macromolecular Materials and Engineering*, 299, 268-282, **2014**.
- [11] Wackerlig, J., Lieberzeit P.A., Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing-Synthesis, characterisation and application, *Sensors and Actuators B*, 207, 144–157, **2015**.
- [12] Haupt, K., Mosbach, K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical Reviews*, 100, 2495–2504, **2000**.
- [13] Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L.I., Ansell, R.J., Kirsch, N., Nicholls, I.A., O'Mahony, J., Whitcombe, M.J., Molecular Imprinting Science and Technology: A Survey of the Literature for the Years Up to and Including 2003. *Journal of Molecular Recognition*, 19, 106–180, **2006**.
- [14] Wulff, G., Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers, *Chemical Reviews*, 102, 1–27, **2002**.
- [15] Whitcombe, M.J., Kirsch, N., Nicholls, I.A., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years 2004–2011, *Journal of Molecular Recognition*, 27, 297-401, **2014**.

- [16] Bossi, A., Bonini, F., Turner, A.P.F., Piletsky, S.A., Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1131-1137, **2007**.
- [17] Morelli, I., Chiono, V., Vozzi, G., Ciardelli, G., Silvestri, D., Giusti, P., Molecularly imprinted submicronspheres for applications in a novel model biosensor-film. *Sensors and Actuators B*, 150, 394-401, **2010**.
- [18] Scorrano, S., Mergola, L., Del Sole, R., Vasapollo, G., Synthesis of molecularly imprinted polymers for amino acid derivatives by using different functional monomers, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 1735-1743, **2011**.
- [19] Longo, L., Vasapollo, G., Molecularly imprinted polymers as nucleotide receptors, *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 5, 163-170, **2008**.
- [20] Pichon, V., Chapuis-Hugon, F., Role of Molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants - A Review, *Analytica Chimica Acta*, 622, 48-61, **2008**.
- [21] Tamayo, F.G., Casillas, J.L., Martín-Esteban, A., Clean up of phenylurea herbicides in plant sample extracts using molecular imprinted polymer, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 1234-1240, **2005**.
- [22] Özgür, E., Yılmaz, E., Sener, G., Uzun, L., Say R., Denizli, A., A new molecular imprinting-based mass-sensitive sensor for real-time detection of 17 $\beta$ -estradiol from aqueous solution, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 32, 1164-1169, **2013**.
- [23] Puoci, F., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., Spizzirri, U.G., Picci, N., Molecularly imprinted solid phase extraction for the selective HPLC determination of  $\alpha$ -tocopherol in bay leaves, *Analytica Chimica Acta*, 593, 164-170, **2007**.
- [84] Baggiani, C., Anfossi, L., Giovannoli, C., Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta*, 591, 29-39, **2007**.
- [25] Vasapollo, G., Del Sole, R., Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scorrano, A., Mele, M., Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5908-5945, **2011**.
- [26] Andersson, L.I., Molecular imprinting: Developments and applications in the analytical chemistry field, *Journal of Chromatography B*, 745, 3-13, **2000**.
- [27] Sellergren, B., Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 906, 227-252, **2001**.
- [28] Wei, S., Mizaikoff, B., Recent advances on noncovalent molecular imprints for affinity separations, *Journal of Separation Science*, 30, 1794-1805, **2007**.
- [29] Tamayo, F.G., Turiel, E., Martín-Esteban, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent Developments and future trends, *Journal of Chromatography A*, 1152, 32-40, **2007**.

- [30] Haginaka, J., Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media, *Journal of Chromatography B*, 866, 3-13, **2008**.
- [31] Lasáková, M., Jandera, P. Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction, *Journal of Separation Science*, 32, 788-812, **2009**.
- [32] Piletsky, S.A., Turner, N.W., Laitenberger, P. Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics-future potential and existing problems, *Medical Engineering and Physics-Journal*, 28, 971–977, **2006**.
- [33] Li, W., Li, S. Molecular imprinting: A versatile tool for separation, Sensors and Catalysis. *Advances in Polymer Science*, 206, 191–210, **2007**.
- [34] Puoci, F., Lemma, F., Picci, N., Stimuli-responsive molecularly imprinted polymers for drug delivery: A Review, *Current Drug Delivery*, 5, 85–96, **2008**.
- [35] Longo, L., Vasapollo, G., Phthalocyanine-based molecularly imprinted polymers as nucleoside receptors, *Metal-Based Drugs Journal*, 2008, 1–5, **2008**.
- [36] Ge, Y., Turner, E.P.F., Molecularly imprinted sorbent assays: Recent developments and applications, *Chemistry-A European Journal*, 15, 8100–8107, **2009**.
- [37] Ramstrom, O., Mosbach, K., Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials, *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 759-764, **1999**.
- [38] Schirhagl, R., Bioapplications for molecularly imprinted polymers, *Analytical Chemistry*, 86, 250–261, **2014**.
- [39] Wulff, G., Vesper, W., Grobeeinsler, R., Sarhan, A., Enzymeanalogue built polymers, 4. synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for resolution of racemates, *Die Makromolekulare Chemie*, 178, 2799-2816, **1977**.
- [40] Mosbach, K., Arshady, R., Synthesis of substrate-selective polymers by host–guest polymerization, *Die Makromolekulare Chemie*, 182, 687-692, **1981**.
- [41] Whitcombe, M.J., Rodriguez, M.E., Villar, P., Vulfso E., A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: Synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol, *Journal of the American Chemical Society*, 117, 7105–7111, **1995**.
- [42] Yan, H., Row, K.H., Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer, *International Journal of Molecular Sciences*, 7, 155-178, **2006**.
- [43] Nicolescu, T.V., Sarbu, A., Ghiurea, M., Donescu, D., Influence of crosslinker/progen ratio upon imprinted polymer parameters, *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 73, 163–172, **2011**.
- [44] Lee, S.H., Hoshino, Y., Randall, A., Zeng, Z., Baldi, P., Doong, R., Shea, K.J., Engineered synthetic polymer nanoparticles as IgG affinity ligands *Journal of the American Chemical Society*, 134, 15765–15772, **2012**.

- [45] Lei, W., Meng, Z., Zhang, W., Zhang, L., Xue, M., Wang, W., "Induced fit" recognition of proteins by surface imprinted silica with "soft" recognition sites, *Talanta*, 99, 966–971, **2012**.
- [46] Li, X. X., Bai, L. H., Wang, H., Wang, J., Huang, Y. P., Liu, Z. S., Preparation and characterization of enrofloxacin-imprinted monolith prepared with crowding agents, *Journal of Chromatography A*, 1251, 141–147, **2012**.
- [47] Puoci, F., Iemma, F., Muzzalupo, R., Spizzirri, U.G., Trombino, S., Cassano, R., Picci, N., Spherical molecularly imprinted polymers (SMPS) via a novel precipitation polymerization in the controlled delivery of sulfasalazine, *Macromolecular Bioscience*, 4, 22-26, **2004**.
- [48] Puoci, F., Iemma, F., Cirillo, G., Picci, N., Matricardi, P., Alhaique, F., Molecularly Imprinted Polymers for 5-Fluorouracil Release in Biological Fluids, *Molecules*, 12, 805–814, **2007**.
- [49] DePorter, S.M., Lui, I., McNaughton, B.R., Programmed cell adhesion and growth on cell-imprinted polyacrylamide hydrogels, *Soft Matter*, 8, 10403-10408, **2012**.
- [50] Saifuddin, N., Nur, Y.A.A., Abdullah, S.F., Microwave enhanced synthesis of chitosan-graft-polyacrylamide molecular imprinting polymer for selective removal of 17 $\beta$ -estradiol at trace concentration, *Asian Journal of Biochemistry*, 6, 38–54, **2011**.
- [51] Nematollahzadeh, A., Sun, W., Aureliano, C. S. A., Lutkemeyer, D., Stute, J., Abdekhodaie, M.J., Shojaei, A., Sellergren, B., High-capacity hierarchically imprinted polymer beads for protein recognition and capture, *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 495-498, **2011**.
- [52] Sreenivasan, K.J., Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polyurethane–poly(HEMA) semi-interpenetrating polymer networks as membrane, *Journal of Applied Polymer Science*, 70, 19–22, **1998**.
- [53] Dickert, F.L., Thierer, S., Molecularly imprinted polymers for optochemical sensors, *Advanced Materials*, 8, 987-989, **1996**.
- [54] Dickert, F.L., Tortschanoff, M., Bulst, W. E., Fischerauer, G., Molecularly imprinted sensor layers for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, *Analytical Chemistry*, 71, 4559-4563, **1999**.
- [55] Dickert, F.L., Aigner, S., Jungbauer, C., Blood typing with synthetic receptors - Development of a flow system for continuous measurement, *Tm-Technisches Messen*, 79, 509-515, **2012**.
- [56] Glad, M., Norrflow, O., Sellergren, B., Siegbahn, N., Mosbach, K.J., Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica, *Journal of Chromatography A*, 347, 11–23, **1985**.
- [57] Zang, D., Ge, L., Zhao, P., Yu, J., Huang, J., A high throughput and high selective chemiluminescence method for quantification of bifenthrin based on molecularly imprinted film, *Advanced Materials Research*, 306, 663-666, **2011**.

- [58] Graham, A.L., Carlson, C.A., Edmiston, P.L., Development and characterization of molecularly imprinted sol-gel materials for the selective detection of DDT, *Analytical Chemistry*, 74, 458–467, **2002**.
- [59] Yu, J., Zhang, C., Dai, P., Ge, S., Highly selective molecular recognition and high throughput detection of melamine based on molecularly imprinted sol-gel film, *Analytica Chimica Acta*, 651, 209–214, **2009**.
- [60] Katz, A., Davis, M.E., Molecular imprinting of bulk, microporous silica, *Nature*, 403, 286–289, **2000**.
- [61] Kryscio, D.R., Peppas, N.A., Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, *Acta Biomaterialia*, 8, 461–473, **2012**.
- [62] Lee, W.C., Cheng, C.H., Pan, H.H., Chung, T.H., Hwang, C.C. Chromatographic characterization of molecularly imprinted polymers. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 390, 1101–1109.
- [63] Haginaka, J., Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media, *Journal of Chromatography B*, 866, 3–13, **2008**.
- [64] Haginaka, J., Sanbe, H., Takehira, H., Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (s)-ibuprofen retention properties in aqueous mobile phase, *Journal of Chromatography A*, 857, 117–125, **1999**.
- [65] Tamayo, F.G., Turiel, E., Martín-Esteban, A., Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends, *Journal of Chromatography A*, 1152, 32–40, **2007**.
- [66] Vasapollo, G., Sole, R.D., Mergola, L., Lazzoi, M.R., Scardino, A., Scorrano, S., Mele, G., Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective, *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5908–5945, **2011**.
- [67] Wulff, G., Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers, *Chemical Review*, 102, 1–27, **2002**.
- [68] Li, W., Li, S., Molecular imprinting: A versatile tool for separation, sensors and catalysis, *Advances in Polymer Science*, 206, 191–210, **2007**.
- [69] Puoci, F., Iemma, F., Picci, N., Stimuli-responsive molecularly imprinted polymers for drug delivery: A review, *Current Drug Delivery*, 5, 85–96, **2008**.
- [70] Vaisocherova, H., Yang, W., Zhang, Z., Cao, Z., Cheng, G., Pilarik, M., Homola, J., Jiang, S., Ultralow fouling and functionalizable surface chemistry based on a zwitterionic polymer enabling sensitive and specific protein detection in undiluted blood plasma, *Analytical Chemistry*, 80, 7894–7901, **2008**.
- [71] Mueller, L., Sinn, S., Drechsel, H., Ziegler, C., Wendel, H., Northoff, H., Gehring, F.K., Investigation of prothrombin time in human whole-blood samples with a quartz crystal biosensor. *Analytical Chemistry*, 82, 658–663, **2010**.
- [72] Sinn, S., Eichler, M., Muller, L., Bunger, D., Groll, J., Ziegler, G., Rupp F., Northoff, H., Geis-Gerstorfer, J., Gehring, F.K., Wendel, H.P., NCO-sP(EO-

- stat-PO) coatings on gold sensors-A QCM study of hemocompatibility, *Sensors*, 11, 5253–5269, **2011**.
- [73] Ibršimović, N., Ibršimović, M., Barth, M., Bohrn, U., Biomimetic PLGA sensor: Proof of principle and application, *Monatshefte für Chemie*, 141, 125-130, **2010**.
- [74] Meir, D., Silbert, L., Volinsky, R., Kolusheva, S., Weiser, I., Jelinek, R., Colorimetric/fluorescent bacterial sensing by agarose-embedded lipid/polydiacetylene films, *Journal of Applied Microbiology*, 104, 787–795, **2008**.
- [75] Chang, K.S., Sun, C.J., Chiang, P.L., Chou, A.C., Lind, M.C., Liang, C., Hung, H.; Yeh, Y.H.; Chen, C.D.; Pan, C.Y.; Chen, Y.T., Monitoring extracellular K<sup>+</sup> flux with a valinomycin-coated silicon nano wire field-effect transistor. *Biosensors and Bioelectronics*, 31, 137–143, **2012**.
- [76] Hussain, M., Wackerlig, J., Lieberzeit, P.A., Biomimetic strategies for sensing biological species, *Biosensors*, 3, 89-107, **2013**.
- [77] Kowalczyk, S.W., Blosser, T.R., Dekker, C., Biomimetic nanopores: learning from and about nature, *Trends in Biotechnology*, 29, 607–614, **2011**.
- [78] Pavan, S., Berti, F., Short peptides as biosensor transducers, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, 3055-3070, **2012**.
- [79] Zarzo, M., The sense of smell: molecular basis of odorant recognition, *Biological Reviews*, 82, 455–479, **2007**.
- [80] Skerra, A., Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition, *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 295-304, **2007**.
- [81] Chow, E., Gooding, J.J., Peptide Modified Electrodes as Electrochemical Metal Ion Sensors, *Electroanalysis* 18,1437–1448, **2006**.
- [82] Wang, F., Liu, X., Willner, I., DNA Switches: From Principles to Applications, *Angewandte Chemie International Edition*, 54, 1098-1129, 2015.
- [83] Lan, T., Metal Ion-dependent DNazymes and their applications as biosensors, *Metal Ions in Life Sciences*,10, 217–248, **2012**.
- [84] Roth, A., Breaker, R.R., An amino acid as a cofactor for a catalytic polynucleotide, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 6027–6031, **1998**.
- [85] Liu, J., Lu, Y., A DNzyme catalytic beacon sensor for paramagnetic Cu(II) ions in aqueous solution with high sensitivity and selectivity, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 9838–9839, **2007**.
- [86] Travascio, P., Li, Y., Sen, D., DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA-aptamer-hemin complex, *Chemistry and Biology*, 5, 505–517, **1998**.
- [87] Sen, D., Poon, L. RNA and DNA complexes with hemin [Fe(III) heme] are efficient peroxidases and peroxygenases: how do they do it and what does it mean? *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46, 478-492, **2011**.
- [88] Zhao, X.H., Gong, I., Zhang, X.B., Yang, B., Fu, T., Hu, R., Tan, W., Yu, R., Versatile DNzyme-Based Amplified Biosensing Platforms for Nucleic Acid,

- Protein, and Enzyme Activity Detection, *Analytical Chemistry*, 85, 3614-3620, **2013**.
- [89] Wang, H.Q., Liu, W.Y., Wu, Z., Tang, L.J., Xu, X.M., Yu, R.Q., Jiang, J.H., Homogeneous label-free genotyping of single nucleotide polymorphism using ligation-mediated strand displacement amplification with dzyme-based chemiluminescence detection, *Analytical Chemistry*, 83, 1883–1889, **2011**.
- [90] Tang, Y., Ge, B., Sen, D., Yu, H., Functional DNA switches: rational design and electrochemical signaling, *Chemical Society Reviews*, 43, 518-529, **2014**.
- [91] Jayasena, S.D., Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics, *Clinical Chemistry*, 45, 1628-50, **1999**.
- [92] Song, S., Wang, L., Li, J., Zhao, J., Fan, C., Aptamer-based biosensors, *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 108-117, **2008**.
- [93] Ramos, E., Pineiro, D., Soto, M., Abanades, D.R., Martin, M.E., Salinas, M., Gonzalez, V.M., A DNA aptamer population specifically detects *Leishmania infantum* H2A antigen, *Laboratory Investigation*, 87, 409-416, **2007**.
- [94] Niu, W., Jiang, N., Hu, Y., Detection of proteins based on amino acid sequences by multiple aptamers against tripeptides, *Analytical Biochemistry*, 362, 126-135, **2007**.
- [95] Lee, S., Kim, Y.S., Jo, M., Jin, M., Lee, D.K., Kim, S., Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 358, 47-52, **2007**.
- [96] Ikanovic, M., Rudzinski, W.E., Bruno, J.G., Allman, A., Carrillo, M.P., Dwarakanath, S., Bhaadigadi, S., Rao, P., Kiel, J.L., Andrews, C.J., Fluorescence assay based on aptamer-quantum dot binding to *Bacillus thuringiensis* spores, *Journal of Fluorescence*, 17, 193-199, **2007**.
- [97] Santos-Alvarez, N., Lobo-Castanon, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tunon-Blanco, P., Modified-RNA aptamer-based sensor for competitive impedimetric assay of Neomycin B, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 3808-3809, **2007**.
- [98] Senior, K., Aptamers as potential probes for cancer, *Lancet Oncology*, 7, 712-716, 2006.
- [99] Rupcich, N., Nutiu, R., Li, Y., Brennan, J.D., Solid-phase enzyme activity assay utilizing an entrapped fluorescence-signaling DNA aptamer, *Angewandte Chemie International Edition*, 45, 3295-3299, **2006**.
- [100] Rankin, C.J., Fuller, E.N., Hamor, K.H., Gabarra, S.A., Shields, T.P., A simple fluorescent biosensor for theophylline based on its RNA aptamer, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 25, 1407–1424, **2006**.
- [101] Guthrie, J.W., Hamula, C.L., Zhang, H., Le, X.C., Assays for cytokines using aptamers, *Methods*, 38, 324-330, **2006**.
- [102] Minunni, M., Tombelli, S., Gullotto, A., Luzi, E., Mascini, M., Development of biosensors with aptamers as bio-recognition element: the case of HIV-1 Tat protein, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 1149-1156, **2004**.



- [103] Stojanovic, M.N., Landry, D.W., Aptamer-Based Colorimetric Probe for Cocaine, *Journal of the American Chemical Society*, 124, 9678-9679, **2002**.
- [104] Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A., Polisky, B., High-resolution molecular discrimination by RNA, *Science*, 263, 1425-1429, **1994**.
- [105] Geiger, A., Burgstaller, P., Eltz, H., Roeder, A., Famulok, M., RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity, *Nucleic Acids Research*, 24, 1029-1036, **1996**.
- [106] Tang, Y., Ge, B., Sen, D., Yu, H.Z., Functional DNA switches: rational design and electrochemical signaling, *Chemical Society Reviews*, 43, 518-529, **2014**.
- [107] Toksöz, S., Guler, M.O., Self-assembled peptidic nanostructures, *Nano Today*, 4, 458-469, **2009**.
- [108] Ansari, A.A., Alhoshan, M., Alsalhi, M.S., Aldwayyan, A.S., Prospects of nanotechnology in clinical immunodiagnosics, *Sensors*, 10, 6535-6581, **2010**.
- [109] Delehantya, J.B., Susumub, K., Manthea, R.L., Algara, W.R., Medintz, I.L., Active cellular sensing with quantum dots: Transitioning from research tool to reality, *Analytica Chimica Acta*, 750, 63-81, **2012**.
- [110] Sun, H., Choy, T.S., Zhu, D.R., Yam, W.C., Fung, Y.S., Nano-silver-modified PQC/DNA biosensor for detecting E. coli in environmental water. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 1405-1410, **2009**.
- [111] Yao, J., Yang, M., Duan, Y., Chemistry, Biology, and Medicine of Fluorescent Nanomaterials and Related Systems: New Insights into Biosensing, Bioimaging, Genomics, Diagnostics, and Therapy, *Chemical Review ACS*, 114, 6130-6178, **2014**.
- [112] Di, W., Ren, X., Zhao, H., Shirahata, N., Sakka, Y., Qin, W., Single-phased luminescent mesoporous nanoparticles for simultaneous cell imaging and anticancer drug delivery, *Biomaterials*, 32, 7226-723, **2011**.
- [113] Cho, H.S., Dong, Z., Pauletti, G.M., Zhang, J., Xu, H., Gu, L. Wang, H., Ewing, R.C., Huth, C., Wang, F., Shi, D., Fluorescent, superparamagnetic nanospheres for drug storage, targeting, and imaging: a multifunctional nanocarrier system for cancer diagnosis and treatment, *ACS Nano*, 4, 5398-5404, **2010**.
- [114] Lin, M., Zhao, Y., Wang, S.Q., Liu, M., Duan, Z.F., Chen, Y.M., Li, F., Xu, F., Lu, T.J., Recent advances in synthesis and surface modification of lanthanide-doped upconversion nanoparticles for biomedical applications, *Biotechnology Advances*, 30, 1551-1561, **2012**.
- [115] Foy, S.P., Manthe, R.L., Foy, S.T., Dimitrijevic, S., Krishnamurthy, N., Labhasetwar, V., Optical imaging and magnetic field targeting of magnetic nanoparticles in tumors, *ACS Nano*, 4, 5217-5224, **2010**.
- [116] Oh, W.K., Jeong, Y.S., Song, J., Jang, J., Fluorescent europium-modified polymer nanoparticles for rapid and sensitive anthrax sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 29, 172-177, **2011**.

- [117] Yuan, J., Wang, G., Lanthanide-based luminescence probes and time-resolved luminescence bioassays, *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 490-500, **2006**.
- [118] Ma, Z., Dosev, D., Nichkova, M., Dumas, R.K., Gee, S.J., Hammock, B.D., Liu, K., Kennedy, I.M., Synthesis and characterization of multifunctional silica core-shell nanocomposites with magnetic and fluorescent functionalities, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 1368-1371, **2009**.
- [119] Smith, A.M., Duan, H., Mohs, A.M., Nie, S., Bioconjugated Quantum Dots for In Vivo Molecular and Cellular Imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1226-1240, **2008**.
- [120] Smith, A.M., Nie, S.M., Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots", *Analyst*, 129, 672-677, **2004**.
- [121] Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R., Mattoussi, H., Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing, *Nature Materials*, 4, 435-446, **2005**.
- [122] Schodek, D.L., Ferreira, P., Ashby, M.F., Nanomaterials, nanotechnologies and design: an introduction for engineers and architects, Butterworth-Heinemann, Amsterdam, **2009**.
- [123] Pichon, A., Lazuen-Garay, A., James, S.L., Solvent-free synthesis of a microporous metal-organic framework, *CrystEngComm*, 8, 211-214, **2006**.
- [124] Rood, J.A., Noll, B.C., Henderson, K.W., Synthesis and characterization of a porous magnetic diamond framework, *Inorganic Chemistry*, 45, 5521-5528, **2006**.
- [125] Skrabalak, S.E., Chen, J., Sun, Y., Lu, X., Au, L., Cobley, C.M., Xia, Y., Gold Nanocages: Synthesis, Properties, and Applications, *Accounts of Chemical Research*, 41, 1587-1595, **2008**.
- [126] Haynes, C.L., Van Duyne, R.P.J., Nanosphere lithography: A versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics, *Journal of Physical Chemistry B*, 105, 5599-5611, **2001**.
- [127] Willets, K.A., Van Duyne, R.P., Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing, *Annual Review of Physical Chemistry*, 58, 267-297, **2007**.
- [128] Haes, A.J., Zou, S.L., Schatz, G.C., Van Duyne, R.P.J., The short range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of silver and gold nanoparticles, *Journal of Physical Chemistry B*, 108, 6961-6968, **2004**.
- [129] Reynolds, A.J., Haines, A.H., Russell, D. A. Gold glyconanoparticles for mimics and measurement of metal ion-mediated carbohydrate-carbohydrate interactions, *Langmuir*, 22, 1156-63, **2006**.
- [130] Lee, K.S.; Noh, H.B.; Won, M.S.; Shim, Y.B. Fabrication of a biomimetic membrane with biomaterials-attached conducting polymer: Application to a NADH sensor. In Proceedings of IEEE Sensor Conference, Busan, Korea, 25-28 October 2009.

- [131] Gao, J., Fu, J., Lin, C., Lin, J., Han, Y., Yu, X., Pan, C., Formation and photoluminescence of silver nanoparticles stabilized by a two-armed polymer with a crown ether core, *Langmuir*, 20, 9775-9779, **2004**.
- [132] Zhang, J., Fu, Y., Lakowicz, J.R.J., Emission behavior of fluorescently labeled silver nanoshell: enhanced self-quenching by metal nanostructure, *Journal of Physical Chemistry C*, 111, 1955-1961, **2007**.
- [134] Buck, S.M., Xu, H., Brasuel, M., Philbert, M.A., Kopelman, R., Nanoscale probes encapsulated by biologically localized embedding (PEBBLEs) for ion sensing and imaging in live cells, *Talanta*, 63, 41-59, **2004**.
- [192] Das, S., Jain, T.K., Maitra, A.J., Inorganic–Organic Hybrid Nanoparticles from n-Octyl Triethoxy Silane, *Journal of Colloid and Interface Science*, 252, 82-88, **2002**.
- [135] Santra, S., Bagwe, R.P., Dutta, D., Stanley, J.T., Walter, G.A., Tan, W., Moudgil, B.M., Mericle, R.A., Synthesis and Characterization of Fluorescent, Radio-Opaque, and Paramagnetic Silica Nanoparticles for Multimodal Bioimaging Applications, *Advanced Materials*, 17, 2165-2169, **2005**.
- [136] Qhobosheane, M., Santra, S., Zhang, P., Tan, W., Biochemically functionalized silica nanoparticles, *Analyst*, 126, 1274-78, **2001**.
- [137] Zhou, X., Zhou, J., Improving the signal sensitivity and photostability of DNA hybridizations on microarrays by using dye-doped core-shell silica nanoparticles, *Analytical Chemistry*, 76, 5302-12, **2004**.
- [138] Yan, J., Estevez, M.C., Smith, J.E., Wang, K., He, X., Wang, L., Tan, W., Dye-doped nanoparticles for bioanalysis, *Nano Today*, 2, 44-50, **2007**.
- [139] Bagwe, R.P., Yang, C.Y., Hilliard, L.R., Tan, W.H., Optimization of dye-doped silica nanoparticles prepared using a reverse microemulsion method, *Langmuir*, 20, 8336-8342, **2004**.
- [140] Lian, W., Litherland, S.A., Badrane, H., Tan, W.H., Wu, D.H., Baker, H.V., Gulig, P.A., Lim, D.V., Jin, S.G., Ultrasensitive detection of biomolecules with fluorescent dye-doped nanoparticles, *Analytical Biochemistry*, 334, 135-144, **2004**.
- [141] Barbé, C., Bartlett, J., Kong, L., Finnie, K., Lin, H.Q., Larkin, M., Calleja, S., Bush, A., Calleja, G., Silica Particles: A Novel Drug-Delivery System, *Advanced Materials*, 16, 1959-1966, **2004**.
- [142] Grifantini, R., Bartolini, E., Muzzi, A., Draghi, M., Frigimelica, E., Berger, J., Ratti, G., Petracca, R., Galli, G., Agnusdei, M., Giuliani, M.M., Santini, L., Brunelli, B., Tettelin, H., Rappuoli, R., Randazzo, F., Grandi, G., Previously unrecognized vaccine candidates against group B meningococcus identified by DNA microarrays, *Nature Biotechnology*, 20, 914-921, **2002**.
- [143] Gao, F., Cui, P., Chen, X., Ye, Q., Li, M., Wang, L., A DNA hybridization detection based on fluorescence resonance energy transfer between dye-doped core-shell silica nanoparticles and gold nanoparticles, *Analyst*, 136, 3973-80, **2011**.
- [144] He, X.X., Duan, J.H., Wang, K.M., Tan, W.H., Lin, X., He, C.M.J., A novel fluorescent label based on organic dye-doped silica nanoparticles for HepG

- liver cancer cell recognition, *Nanoscience and Nanotechnology*, 4, 585-589, **2004**.
- [145] Wang, L., Tan, W.H. Multicolor FRET silica nanoparticles by single wavelength excitation, *Nano Letters*, 6, 84-88, **2006**.
- [146] Burns, A., Sengupta, P., Zedayko, T., Baird, B., Wiesner, U., Core/Shell Fluorescent Silica Nanoparticles for Chemical Sensing: Towards Single-Particle Laboratories, *Small*, 2, 723-726, **2006**.
- [147] Lettinga, M.P., Van Zandvoort, M., Van Kats, C.M., Philipse, A.P., Rotational diffusion of tracer spheres in packings and dispersions of colloidal spheres studied with time-resolved phosphorescence anisotropy, *Langmuir*, 16, 6166-6172, **2000**.
- [148] Rantanen, T., Jaervenpaeae, M.L., Vuojola, J., Kuningas, K., Soukka, T., Fluorescence-Quenching-Based Enzyme-Activity Assay by Using Photon Upconversion, *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 3811-13, **2008**.
- [149] Wang, X., Qu, L., Zhang, J., Peng, X., Xiao, M., Surface-Related Emission in Highly Luminescent CdSe Quantum Dots, *Nano Letters*, 3, 1103-1106, **2003**.
- [150] Boyer, J.C., Van Veggel, F.C.J.M., Absolute quantum yield measurements of colloidal NaYF<sub>4</sub>: Er<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> upconverting nanoparticles, *Nanoscale*, 2, 1417-1419, **2010**.
- [151] Yezhelyev, M. V., Gao, X., Xing, Y., Al-Hajj, A., Nie, S., O'Regan, R.M., Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer, *Lancet Oncology*, 7, 657-667, **2006**.
- [152] Pison, U., Welte, T., Giersig, M., Groneberg, D.A., Nanomedicine for respiratory diseases, *European Journal of Pharmacology*, 533, 341-50, **2006**.
- [153] Masotti, A., Multifunctional nanoparticles: preparation and applications in biomedicine and in non-invasive bioimaging", *Recent Patents on Nanotechnology*, 4, 53-62, **2010**.
- [154] Thanh, N.T., Green, L.A., Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications, *Nano Today*, 5, 213-30, **2010**.
- [155] Zhang, H., Chen, B., Jiang, H., Wang, C., Wang, H., Wang, X., A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment, *Biomaterials*, 32, 1906-1914, **2011**.
- [156] Maltzahn, G., Park, J.H., Agrawal, A., Bandaru, N.K., Das, S.K., Sailor, M.J., Bhatia, S.N., Computationally Guided Photothermal Tumor Therapy Using Long-Circulating Gold Nanorod Antennas, *Cancer Research*, 69, 3892-3900, **2009**.
- [157] Jewell, C.M., Jung, J.M., Atukorale, P.U., Carney, R.P., Stellacci, F., Irvine, D.J., Oligonucleotide delivery by cell-penetrating "striped" nanoparticles, *Angewandte Chemie International Edition*, 123, 12520-12523, **2011**.
- [158] Qian, X., Peng, X.H., Ansari, D.O., Yin-Goen, Q., Chen, G.Z., Shin, D.M., Yang, L., Young, A.N., Wang, M.D., Nie, S., In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags, *Nature Biotechnology*, 26, 83-90, **2008**.

- [159] Mokari, T., Rothenberg, E., Popov, I., Costi, R., Banin, U., Selective Growth of Metal Tips onto Semiconductor Quantum Rods and Tetrapods, *Science*, 304, 1787-90, **2004**.
- [160] Yu, H., Chen, M., Rice, P.M., Wang, S.X., White, R., Sun, S., Dumbbell-like bifunctional Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles, *Nano Letters*, 5, 379-382, **2005**.
- [161] Shi, W., Sahoo, Y., Zeng, H., Ding, Y., Swihart, M.T., Prasad, P.N., Anisotropic Growth of PbSe Nanocrystals on Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Hybrid Nanoparticles, *Advanced Materials*, 18, 1889-94, **2006**.
- [162] Lu, J., Liong, M., Zink, J.I., Tamanoi, F., Mesoporous Silica Nanoparticles as a Delivery System for Hydrophobic Anticancer Drugs, *Small*, 3, 1341-1346, **2007**.
- [163] Ye, Z., Tan, M., Wang, G., Yuan, J., Novel fluorescent europium chelate-doped silica nanoparticles: preparation, characterization and time-resolved fluorometric application, *Journal of Materials Chemistry*, 14, 851-856, **2004**.
- [164] Ma, Z., Dosev, D., Nichkova, M., Dumas, R.K., Gee, S.J., Hammock, B.D., Liu, K., Kennedy, I.M., Synthesis and characterization of multifunctional silica core-shell nanocomposites with magnetic and fluorescent functionalities, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 1368-1371, **2009**.
- [165] Bunzli, J.C.G., Chauvin, A.S., Kim, H.K., Deiters, E., Eliseeva, S.V., Lanthanide luminescence efficiency in eight- and nine-coordinated complexes: role of the radiative lifetime, *Coordination Chemistry Reviews*, 254, 2623-2633, **2010**.
- [166] Heffern, M.C., Matosziuk, L.M., Meade, T.J., Lanthanide Probes for Bioresponsive Imaging, *ACS Publications Chemical Reviews*, 114, 4496-4539, **2010**.
- [167] Olson, E. S., Jiang, T., Aguilera, T.A., Nguyen, Q.T., Ellies, L.G., Scadeng, M., Tsien, R.Y., Activatable cell penetrating peptides linked to nanoparticles as dual probes for in vivo fluorescence and MR imaging of proteases, *PNAS*, 107, 4311-4316, **2010**.
- [168] Rosenthal, N.E., Sack, D.A., Gillin, J.C., Lewy, A.J., Goodwin, R.K., Davenport, Y., Mueller, P.S., Newsome, D.A., Wehr, T.A., Seasonal affective disorder: a description of the syndrome and preliminary findings with light therapy, *Archives of General Psychiatry*, 41, 72-80, **1984**.
- [169] Magnusson, A., Boivin, D., Seasonal affective disorder: an overview, *Chronobiology International*, 20, 189-207, **2003**.
- [170] Byrne, B., Brainard, G., Seasonal Affective Disorder. *Therapy in Sleep Medicine*, (eds. Barkoukis, T.J., Matheson, J.K., Ferber, R., Doghramji, K.), Elsevier, Philadelphia, 695-704, **2012**.
- [171] Peiser, B., Seasonal affective disorder and exercise treatment: a review, *Biological Rhythm Research*, 40, 85-97, **2009**.
- [172] Elbi, H., Noyan, A., Korukoğlu, S., Ünal, S., Bekaroğlu, M., Oğuzhanoğlu, N., Türköz, N., Abay, E., Kumbasar, H., Yurdakul, S., Seasonal affective disorder in eight groups in Turkey: a cross-national perspective, *Journal of affective Disorders*, 70, 77-84, **2002**.

- [173] Lam, R.W., Levitan, R.D., Pathophysiology of seasonal affective disorder: a review, *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 25, 469–480, **2000**.
- [174] Swedo, J.D., Pleeter, D.M., Richter, C.L., Hoffman, A.J., Allen, S.D., Hamburger, E.H., Turner, E.M., Rosenthal, N.E., Rates of seasonal affective disorder in children and adolescents, *The American Journal of Psychology*, 152, 1016–1019, **1995**.
- [175] Eagles, J.M., Seasonal affective disorder: a vestigial evolutionary advantage?, *Medical Hypotheses*, 63, 767–772, **2004**.
- [176] Davis, C, Levitan R.D., Seasonality and seasonal affective disorder (SAD): an evolutionary viewpoint tied to energy conservation and reproductive cycles, *Journal of Affective Disorders*, 87, 3–10, **2005**.
- [177] Keller, M.C., Fredrickson, B.L., Tbarra, O., Cote, S., Johnson, K., Mikels, J., Conway, A., Wager, T., A warm heart and a clear head. The contingent effects of weather on mood and cognition, *Psychological Science*, 16, 724–731, **2005**.
- [178] Kronfeld-Schor, N., Einat, H., Circadian rhythms and depression: Human psychopathology and animal models, *Neuropharmacology*, 62, 101-114, **2012**.
- [179] Levitan, R.D., The chronobiology and neurobiology of winter seasonal affective disorder, *Dialogues Clinical Neuroscience*, 9, 315-324, **2007**.
- [180] Gagne´a, A.M., Gagne´a, P., He´bert, M., Impact of light therapy on rod and cone functions in healthy subjects, *Psychiatry Research*, 151, 259–263, **2007**.
- [181] Brainard, G.C., Hanifin, J.P., Greeson, J.M., Byrne, B., Glickman, G., Gerner, E., Rollag, M.D., Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor, *The Journal of Neuroscience*, 21, 6405–6412, **2001**.
- [182] Thapan, K., Arendt, J., Skene, D.J., An action spectrum for melatonin suppression: evidence for a novel nonrod, non-cone photoreceptor system in humans, *The Journal of Physiology*, 535, 261-267, **2001**.
- [183] Lockley, S.W., Brainard, G.C., Czeisler, C.A., High sensitivity of the human circadian melatonin rhythm to resetting by short wavelength light, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88, 4502–4505, **2003**.
- [184] Glickman, G., Byrne, B., Pineda, C., Hauck, W.W., Brainard, G.C., Light therapy for seasonal affective disorder with blue narrow-band light-emitting diodes (LEDs), *Biological Psychiatry*, 59, 502–507, **2006**.
- [185] Golden, R.N., Gaynes, B.N., Ekstrom, D., The efficacy of light therapy in the treatment of mood disorders: a review and meta-analysis of the evidence, *American Journal of Psychiatry*, 162, 656-662, **2005**.
- [186] McClung, C.A., Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders, *Pharmacology and Therapeutics*, 114, 222–232, **2007**.
- [187] Lam, R.W., Levitt, A.J., Levitan, R.D., The Can-SAD study: a randomized controlled trial of the effectiveness of light therapy and fluoxetine in patients

- with winter seasonal affective disorder, *American Journal of Psychiatry*, 163, 805-812, **2006**.
- [188] Bauer, M.S., Kurtz, J.W., Rubin, L.B., Marcus, J.G., Mood and behavioral effects of four-week light treatment in winter depressives and controls, *Journal of Psychiatric Research*, 28, 135-145, **1994**.
- [189] Edwards, B.J., Reilly, T., Waterhouse, J., Zeitgeber-effects of exercise on human circadian rhythms: what are alternative approaches to investigating the existence of a phase-response curve to exercise?, *Biological Rhythm Research*, 40, 53-69, **2009**.
- [190] Booker, J.M., Hellekson, C.J., Prevalence of seasonal affective disorder in Alaska, *American Journal of Psychiatry*, 149, 1176–1182, **1992**.
- [191] Hansen, V., Jacobsen, B.K., Husby, R., Mental distress during winter. An epidemiologic study of 7759 adults north of Arctic Circle, *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 84, 137–141, **1991**.
- [192] Nayha, S., Vaisanen, E., Hassi, J., Season and mental illness in an Arctic area of northern Finland, *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 377, 46–49, **1994**.
- [193] Saanjarvi, S., Lauerma, H., Helenius, S., Saanlehto, S., Seasonal affective disorder is common in Finland, *Biological Psychiatry*, 42, 255-264, **1997**.
- [194] Magnusson, A., An overview of epidemiological studies on seasonal affective disorder, *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 101, 176–184, **2000**.
- [195] Axelsson, J., Stefansson, J.G., Magnusson, A., Sigvaldason, H., Karlsson, M. M., Seasonal affective disorders: relevance of Icelandic and Icelandic-Canadian evidence to etiologic hypotheses, *Canadian Journal of Psychiatry*, 47, 153–158, **2002**.
- [196] Magnusson, A., Axelsson, J., The prevalence of seasonal affective disorder is low among descendants of Icelandic emigrants in Canada, *Archives of General Psychiatry*, 50, 947–951, **1993**.
- [197] Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R., Melatonin: Nature's most versatile biological signal?, *FEBS Journal*, 273, 2813-2838, **2006**.
- [198] Stevens, R.G., Blask, D.E., Brainard, G.C., Hansen, J., Lockley, S.W., Provencio, I., Rea, M.S., and Reinlib, L., Meeting Report: The Role of Environmental Lighting and Circadian Disruption in Cancer and Other Disease, *Environmental Health Perspectives*, 115,1357-1362, **2007**.
- [199] Singh, M., Jadhav, H.R., Melatonin: functions and ligands, *Drug Discovery Today*, 19, 1410–1418, **2014**.
- [200] Reiter, R.J., Pineal Melatonin: Cell biology of its synthesis and its physiological interaction”, *Endocrine Reviews*, 12, 151-180, **1991**.
- [201] Zhdanova, IV., The role of melatonin in sleep and sleep disorders. *Sleep Disorders and Neurological Disease*, (ed. Culebras, A. ) Marcel Dekker Inc., New York, 120-140, **2000**.
- [202] Pardridge, W.M., Mietus, L.J., Transport of albumin-bound melatonin through the blood- brain barrier, *Journal of Neurochemistry*, 34, 1761-1766, **1980**.

- [203] Kveder, S., McIsaac, W.M. The metabolism of melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) and 5-Methoxytryptamine, *Journal of Biological Chemistry*, 236, 3214-3220, **1961**.
- [204] Poeggeler, B., Thuermann, S., Dose, A., Schoenke, M., Burkhardt, S., Hardeland, R., Melatonin's unique radical scavenging properties—roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs, *Journal of Pineal Research*, 33, 20–30, **2002**.
- [205] Storr, M., Koppitz, P., Sibae, A., Saur, D., Kurjak, M., Franck, H., Schusdziarra, V., Allescher, H.D., Melatonin reduces non-adrenergic, non-cholinergic relaxant neurotransmission by inhibition of nitric oxide synthase activity in the gastrointestinal tract of rodents in vitro, *Journal of Pineal Research*, 33, 101-108, **2002**.
- [206] Hadley M.E., Levine J.E., *Endocrinology*, 6<sup>TH</sup> Edition, (ed. Upper Saddle River), Pearson Prentice Hall, New Jersey, **2007**.
- [207] Brzezinski, A., Melatonin in humans, *New England Journal of Medicine*, 336, 186-195, **1997**.
- [208] Becker-Andre, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., Andre, E., Missbach, M., Saurat, J.H., Carlberg, C., Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily, *Journal of Biological Chemistry*, 269, 28531–28534, **1994**.
- [209] Lemaitre, B.J., Hartmann, L., Preparation of anti-melatonin antibodies and antigenic properties of the molecule, *Journal of Immunological Methods*, 32, 339–347, **1980**.
- [210] Di, W.L., Kadva, A., Djahanbakhch, O., Silman. R., Radioimmunoassay of bound and free melatonin in plasma, *Clinical Chemistry*, 44, 304–310, **1998**.
- [211] Yie, S.M., Johansson, E., Brown, G.M., Competitive solid-phase enzyme immunoassay for melatonin in human and rat serum and rat pineal gland, *Clinical Chemistry*, 39, 2322–2325, **1993**.
- [212] Bubenik, G.A., Pang, S.F., Cockshut, J.R., Smith, P.S., Grovum, L.W., Friendship, R.M., Hacker, R.R., Circadian variation of portal, arterial and venous blood levels of melatonin in pigs and its relationship to food intake and sleep, *Journal of Pineal Research*, 28, 9-15, **2000**.
- [213] Bubenik, G.A., Pang, S.F., Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians and a reptile, *General and Comparative Endocrinology*, 106, 415-419, **1997**.
- [214] Harumi, T., Matsushima, S., Separation and assay methods for melatonin and its precursors. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 747, 95-110, **2000**.
- [215] Vieira, R., Míguez, J.M., Lema, M., Aldegunde, M., Pineal and plasma melatonin as determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Analytical Biochemistry*, 205, 300-305, **1992**.
- [216] Harumi, T., Akutsu, H.G., Matsushima, S., Simultaneous determination of serotonin, N-acetylserotonin and melatonin in the pineal gland of the juvenile golden hamster by high-performance liquid chromatography with



- electrochemical detection, *Journal of Chromatography B*, 675, 152-156, **1996**.
- [217] Chanut, E., Nguyen-Legros, J., Versaux-Botteri, C., Trouvin, J.H., Launay, J.M., Determination of melatonin in rat pineal, plasma and retina by high-performance liquid-chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography B*, 709, 11-18, **1998**.
- [218] Hamase, L., Hirano, J., Kosai, Y., Tomita, T., Zaito, K., A sensitive internal standard method for the determination of melatonin in mammals using precolumn oxidation reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 811, 237-241, **2004**.
- [219] Musijowski, J., Pobozy, E., Trojanowicz, M., On-line preconcentration techniques in determination of melatonin and its precursors/metabolites using micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1104, 337-345, **2006**.
- [220] Lee, M.L., Thomas, J.L., Chen, Y.L., Lin, C.F., Tsai, H.H., Juang, Y.Z., Liu, B.D., Lin, H.Y., Optical sensing of urinary melatonin with molecularly imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol) coated zinc oxide nanorod arrays, *Biosensors and Bioelectronics*, 47, 56-61, **2013**.
- [221] Young, S.N., How to increase serotonin in the human brain without drugs, *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 32, 394-399, **2007**.
- [222] Mohammad-Zadeh, L.F., Moses, L., Gwaltney-Brant, S.M., Serotonin: a review, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31, 187-199, **2008**.
- [223] Ruddell, R.G., Mann, D.A., Ramm, G.A., The function of serotonin within the liver, *Journal of Hepatology*, 48, 666-675, **2008**.
- [224] Nebigil, C.G., Choi, D.S., Dierich, A., Serotonin 2B receptor is required for heart development, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 9508-9513, **2000**.
- [225] Torres, G.E., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function, *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 13-25, **2003**.
- [226] Ni, W., Watts, S.W., 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT), *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33, 575-583, **2006**.
- [227] Danilenko, K.V., Levitan, R.D., Seasonal affective disorder, *Handbook of Clinical Neurology*, 106, 279-289, **2012**.
- [228] Mujahid, A., Dickert F.L., Imprinted sensors: Overview and applications. *Molecularly imprinted polymers for sensors: Comparison of optical and mass-sensitive detection*, (eds. Li, S., Ge, Y., Sergey, A.P., Lunec, J.), 125-159, **2012**.
- [229] Piliarik, M., Homola, J., Surface plasmon resonance (SPR) sensors: Approaching their limits?, *Optics Express*, 17, 16505-16517, **2009**.
- [230] Sípová, H., Homola, J., Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: A review, *Analytica Chimica Acta*, 773, 9-23, **2013**.

- [231] Yilmaz, E., Daryoush, M., Ozgur, E., Denizli, A., Whole cell imprinting based Escherichia coli sensors: A study for SPR and QCM, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209, 714–721, **2015**.
- [232] Vaisocherová-Lísalová, H., Víšová, I., Ermini, M.L., Špringer, T., Song X.C., Mrázek, J., Lamačová, J., Scott Lynn, N., Šedivák, P., Homola, J., Low-fouling surface plasmon resonance biosensor for multi-step detection of foodborne bacterial pathogens in complex food samples, *Biosensors and Bioelectronics*, 80, 84-90, **2016**.
- [233] Nguyen, H.H., Park, J., Kang, S., Kim, M., Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications, *Sensors*, 15, 10481-10510, **2015**.
- [234] Marx, K.A., Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface, *Biomacromolecules*, 4, 1099–1120, **2003**.
- [235] Cheng, C.I., Chang, Y.P., Chu, Y.H., Biomolecular interactions and tools for their recognition: focus on the quartz crystal microbalance and its diverse surface chemistries and applications, *Chemical Society Reviews*, 41, 1947-1971, **2012**.
- [236] O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G., Commercial quartz crystal microbalances-Theory and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 663–670, **1999**.
- [237] Sauerbrey, G., Verwendung von schwingquarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung, *Zeitschrift für Physik*, 155, 206–222, **1959**.
- [238] Nomura, T., Okuhara, M., Frequency-shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids, *Analytica Chimica Acta*, 142, 281–284, **1982**.
- [239] Kanazawa, K.K., Mechanical behaviour of films on the quartz microbalance, *Faraday Discussions*, 107, 77–90, **1997**.
- [240] Uludağ, Y., Piletsky, S.A., Turner, A.P.F., Cooper, M.A., Piezoelectric sensors based on molecular imprinted polymers for detection of low molecular mass analytes. *FEBS Journal*, 274, 5471–5480, **2007**.
- [241] Wang, J., *Analytical Electrochemistry, Third Edition*, John Wiley & Sons, Inc.Hoboken, New Jersey, **2006**.
- [242] Scholz, F., *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, **2010**.
- [243] Peppas, N.A., Sahlin, J.J., A simple equation for the discription of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation, *International Journal of Pharmaceutics*, 57, 169-172, **1989**.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Ad Soyadı : Erdoğan Özgür  
Doğum Yeri : Kırcaali  
Medeni Hali : Evli  
E-posta : erdoganozgur@hacettepe.edu.tr  
Adresi : İlkyerleşim mah. 1938 sok. Güzel Sıla 2 Sitesi Batıkent/Ankara

### Eğitim

Lise : Avusturya Lisesi  
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Eğitimi Bölümü, Ankara  
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi. Kimya Bölümü. Biyokimya Anabilim Dalı  
Doktora : Hacettepe Üniversitesi. Kimya Bölümü. Biyokimya Anabilim Dalı

### Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, Almanca (İyi düzeyde)

### İş Deneyimi

2009- ----- : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü

### Deneyim Alanları

Polimer, kriyojeller, moleküler baskılama, afinite kromatografisi, sensörler

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Melatonin baskılanmış floresan nanopartiküllerin tasarımı, üretimi ve mevsimsel duygusal bozukluk teşhisinde kullanımının incelenmesi, **113M919**, TÜBİTAK, Yürütücü, 29500 TL.

### Tezden Üretilmiş Yayınlar

--

### Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. Porous functional nanofilms for designing bioinspired sensor surface. (Sözlü Sunum), Proceeding Advanced Materials World Congress, 23-26 Ağustos 2015, Stockholm, İsveç.
2. Smart polymerisable terbium(III) complex-based fluorescent MIP nanoparticles, Biosensors 2016: 26th Anniversary World Congress On Biosensors, Mayıs 25-27, 2016, Göteborg, İsveç.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 19/12/2016

Tez Başlığı / Konusu: Metabolit Tayinine Yönelik Biyoesinlenmiş Nanomalzemelerin Geliştirilmesi Ve Uygulamaları  
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç ve e) Kaynakça kısımlarından oluşan toplam 139 sayfalık kısmına ilişkin, 19/12/2016 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

19/12/2016 Edgür

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Erdoğan Özgür

Öğrenci No: N10248539

Anabilim Dalı: Kimya

Programı: Doktora

Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Adil Denizli

(Unvan, Ad Soyad, İmza)