

**PEROKSİDAZ AKTİVİTESİNE SAHİP  
NANOPARTİKÜL/MİKROKÜRE KOMPOZİTLERİNİN  
SENTEZİ VE GLUTATYON TAYİNİNDE KULLANILMASI**

**SYNTHESIS OF NANOPARTICLE/ MICROSPHERE  
COMPOSITES WITH PEROXIDASE ACTIVITY AND  
THEIR USE IN THE DETERMINATION OF  
GLUTATHIONE**

**SELEN YAĞMUR GÜNGÖR**

**PROF. DR. S. ALİ TUNCEL**

**Tez Danışmanı**

**DR. ÇİĞDEM KİP**

**Eş Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

**SELEN YAĞMUR GÜNGÖR'** ün hazırladığı "Peroksidaz aktivitesine sahip nanopartikül/mikroküre kompozitlerinin sentezi ve glutatyon tayininde kullanılması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'**nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tülay DURUSOY

Başkan

Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Danışman

Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL

Üye

Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN

Üye

Doç. Dr. Hakan KAYI

Üye

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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Canım aileme ve sevgili eşime...*

## 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.

19 / 06 / 2019

SELEN YAĞMUR GÜNGÖR

## YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .... ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

...19 / 06 / 2019

SELEN YAĞMUR GÜNGÖR

## ÖZET

# PEROKSİDAZ AKTİVİTESİNE SAHİP NANOPARTİKÜL/MİKROKÜRE KOMPOZİTLERİNİN SENTEZİ VE GLUTATYON TAYİNİNDE KULLANILMASI

**Selen Yağmur GÜNGÖR**

**Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL**

**Eş Danışmanı: Dr. Çiğdem KİP**

**Haziran 2019, 73 sayfa**

Destek materyali olarak kullanılan monodispers gözenekli formda silika ve manyetik silika mikroküreler çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Manyetik mikrokürelerin yüzeyi tekrar silika kabuk yapısıyla kaplanmıştır. Silika ve yüzeyi silika kaplanmış manyetik silika mikrokürelere Türkevich metodu ile sentezlenen altın nanopartiküller immobilize edilmiştir. Mikrokürelerin yüzey morfolojileri ve boy dağılımı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Mikrokürelerin yüzeylerindeki atomik bileşim enerji saçılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ile ve kimyasal yapıları X ışını kırınım yöntemi (XRD) ile incelenmiştir. Mikrokürelerin yüzey alanları ve gözenek boyutu (BET/Brunauer-Emmett-Teller) azot adsorpsiyon ve desorpsiyon yöntemi kullanılarak, manyetik özelliğe sahip mikrokürelerin manyetizasyon özellikleri ise titreşimli örnek manyetometresi (VSM) kullanılarak belirlenmiştir. Sentezlenen mikrokürelerin peroksidaz benzeri aktivitesi değişen pH, substrat konsantrasyonu

ve nanozim miktarı için incelenmiştir. Peroksidaz aktivitesi ölçümlerinde substrat olarak o-fenilendiamin (OPD) kullanılmıştır. Ölçümler UV-görünür bölge spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. Nanozim yapıları için OPD tüketim hızı ve substrat derişimi kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş, enzimlerde enzim ve substrat arasındaki afiniteyi gösteren Michaelis Menten sabiti ( $K_m$ ) değeri hesaplanmıştır. Yüzeyine altın nanopartikül immobilize edilmiş ve silika ile kaplanmış manyetik silika mikroküreler için  $K_m$  değeri 522,47  $\mu\text{M}$ , yüzeyine altın nanopartikül immobilize edilmiş silika mikroküreler için 816,48  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır. Glutasyon tayini için geliştirilen sensörde, glutasyonun mikroküre yüzeyine bağlanmasıyla, mikrokürenin peroksidaz aktivitesinde glutasyon derişimine bağlı olarak ortaya çıkan değışim incelenmiştir. Glutasyonunun mikroküre yüzeyine adsorbsiyonu Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kullanılarak analiz edilmiştir. Sentezlenen nanozimler ile peroksidaz aktivitesi için uygun koşullar seçilerek çözelti ortamında ve insan serumunda glutasyon tayini yapılmıştır. Glutasyon derişimine karşılık gelen adsorbans değerlerinin lineer değışimi gösterilmiş, altın nanopartikül immobilize edilmiş silika ve silika ile kaplanmış manyetik silika mikroküreler ile çözelti ortamında 325 - 3253  $\mu\text{M}$  glutasyon tayini yapılmıştır. İnsan serumunda ise 2,5-50  $\mu\text{M}$  arasındaki derişim değerlerinde glutasyon tayininin yapılabildiği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nanozim, biyosensör, silika, manyetik silika, peroksidaz aktivitesi, peroksidaz benzeri aktivite, peroksidaz bazlı tayin, ELISA, glutasyon.

## **ABSTRACT**

# **SYNTHESIS OF NANOPARTICLE/MICROSPHERE COMPOSITES WITH PEROXIDASE ACTIVITY AND THEIR USE IN THE DETERMINATION OF GLUTATHIONE**

**Selen Yağmur GÜNGÖR**

**Master of Science, Department of Chemical Engineering**

**Supervisor: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL**

**Co- Supervisor: Dr. Çiğdem KİP**

**June 2019, 73 pages**

Silica and magnetic microspheres in the monodisperse porous form used as a supporting material are synthesized using the multi-step hydrolysis-condensation method. The surface of magnetic silica microspheres was coated with silica shell. The gold nanoparticles synthesized by the Turkevich method were immobilized onto the silica-coated magnetic silica and bare silica microspheres. Surface morphology and size distribution of the microspheres were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The surface atomic composition and the chemical structure were investigated by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and X-ray diffraction method (XRD), respectively. The surface area and the pore size distribution were determined by using the nitrogen adsorption and desorption method (BET / Brunauer-Emmett-Teller). The magnetization properties of magnetic microsphere were investigated using vibrating sample magnetometry (VSM). The peroxidase-like activity of the synthesized microspheres was investigated by varying pH, substrate concentration, and the nanozyme concentration. OPD was used as substrate in the peroxidase-like activity



measurements. Measurements were made with UV-visible spectrophotometry. Lineweaver-Burk graphs were plotted using OPD utilization rate and substrate concentration values and Michaelis Menten constant ( $K_m$ ) demonstrating the affinity between enzyme and substrate was calculated for nanozym structure.  $K_m$  values of gold nanoparticle immobilized silica coated magnetic silica microspheres and gold nanoparticle immobilized silica microsphere were calculated as 522,47  $\mu\text{M}$  and 816,48  $\mu\text{M}$ . A biosensor was developed for glutathione determination based on the variation of peroxidase-like activity of microsphere depends on glutathione concentration by adsorption glutathione to the surface of the microsphere. Adsorption of glutathione onto the microsphere surface was analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Glutathione in buffer solution and in human serum were determined using the synthesized nanozymes under appropriate conditions. The linear change of adsorbance values corresponding to glutathione concentration was shown, and the determination of glutathione between 325 - 3253  $\mu\text{M}$  concentration in buffer medium was performed with gold nanoparticle immobilized silica and silica coated magnetic silica microspheres. It has been shown that glutathione can be determined in human serum at concentrations between 2.5-50  $\mu\text{M}$ .

**Keywords:** Nanozyme, biosensor, silica, magnetic silica, peroxidase activity, peroxidase-like activity, peroxidase-based determination, ELISA, glutathione.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım esnasında bilgi birikimi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, tez çalışmalarım süresince bana laboratuvarında çalışma olanağı sağlayan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. S. Ali TUNCEL'e

Çalışmalarının yoğunluğuna rağmen benden desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, tez çalışmalarımın ilerlemesine büyük katkı sağlayan değerli hocam Dr. Çiğdem KİP'e,

Laboratuvar çalışmaları sırasında güler yüzünü ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Kadriye Özlem HAMALOĞLU,

Çalışırken yüksek lisans öğrenimimi tamamlamam için bana destek veren ve bir parçası olmaktan keyif aldığım GEN İlaç'a,

Tez çalışmalarım boyunca bana her konuda destek veren, her kafam karıştığında sorularımı bıkmadan cevaplayan, bu yoğun dönemde deneylerim sırasında bana yardımcı olan sevgili arkadaşım Burcu GÖKÇAL'a, aynı laboratuvarda çalışmaktan keyif aldığım arkadaşlarım; Duygu YILDIRIM, Mustafa Cihan DEMİR, Serap ULU ve Rukiye BABACAN TOSUN'a,

Lisans dönemimizden bu yana hiç ayrılmadığımız, her zaman yanımda olan canım arkadaşlarım Anıl TATLIDİLLİ, Aylin KANGALLI ve Sanem KILINÇ'a, lisede başlayan dostluğuyla hayatımdaki yeri büyük olan canım arkadaşım Dilek EFE KOÇOĞLU'na,

Hayatım boyunca yanımda olup, beni bugünlere getiren, bütün teşekkürleri hak eden annem Nihal BALER, babam Servet BALER'e ve bir tanecik kardeşim Suat BALER'e

Desteğini her an yanımda hissettiğim hayat arkadaşım İsmail GÜNGÖR'e

En içten teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Nanozimler .....	3
2.2. Manyetik Nanozimler.....	4
2.3. Peroksidaz Benzeri Aktivite.....	5
2.4. Peroksidaz Sensörleri .....	6
2.5. Glutasyon Tayini .....	7
2.6. Silika Mikroküreler .....	10
2.7. Manyetik Silika Mikroküreler .....	11
2.8. Altın Nanopartiküller.....	12
2.9 Michaelis-Menten Modeli .....	13
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	17
3.1. İmmobilize Formda AuNP İçeren ve Peroksidaz Aktivitesine Sahip Monodispers-Gözenekli Mikrokürelerin Sentezi .....	19
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	19
3.1.2. Monodispers Gözenek Yapılı SiO <sub>2</sub> ve SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Sentezi.....	19
3.1.2.1. GMA Polimerinin Sentezi .....	19
3.1.2.2. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyon Metodu ile Gözenekli Monodispers Partiküllerin Sentezi.....	20
3.1.2.3. SiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Sentezi .....	21
3.1.2.4. MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Sentezi.....	22

3.1.2.5. Manyetik Silika Mikrokürelerin Silika ile Kaplanması / SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Sentezi .....	23
3.1.2.6. SiO <sub>2</sub> ve SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin HCl ile Türevlendirilmesi.....	23
3.1.3. Monodispers ve Gözenek Yapılı SiO <sub>2</sub> ve SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin AuNP ile Modifiye Edilmesi.....	24
3.1.3.1. Aminopropiltrietoksisilan ile Monodispers-Gözenekli SiO <sub>2</sub> ve SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Türevlendirilmesi .....	24
3.1.3.2. AuNP Sentezi .....	25
3.1.3.3. Monodispers-Gözenekli SiO <sub>2</sub> ve SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Altın Nanopartiküller ile Dekorasyonu / Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Oluşturulması .....	25
3.2. Monodispers-Gözenekli SiO <sub>2</sub> ve SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin ve Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	26
3.2.1. Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçümü .....	26
3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) .....	26
3.2.3. Titreşimli Örnek Manyetometri Analizi.....	27
3.2.4. X Işını Kırınım Yöntemi .....	27
3.3. Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikroküreler ile Peroksidaz Aktivite Ölçümleri ve GSH Tayini.....	28
3.3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....	28
3.3.2. Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Değişen Ortam pH Değerleri için Peroksidaz Aktivitesi Ölçümleri .....	28
3.3.3. Değişen Substrat Derişimi için Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin Peroksidaz Aktivite Ölçümleri .....	29
3.3.4. Farklı Au@SiO <sub>2</sub> , Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Miktarları için Peroksidaz Aktivite Ölçümleri .....	30
3.3.5. Glutasyonun Au@SiO <sub>2</sub> , Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikroküre Yüzeylerine Adsorpsiyonunun Ölçülmesi .....	31
3.3.6. Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikrokürelerin GSH Tayininde Kullanılması .....	32
3.3.7. Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> Mikroküreler ile İnsan Serumunda GSH Tayini .....	33

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Monodispers-Gözenekli $\text{SiO}_2$ , $\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ , $\text{Au}@\text{SiO}_2$ ve $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ Mikrokürelerin Karakterizasyonu .....	34
4.1.1. Monodispers-Gözenekli Mikrokürelerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri .....	34
4.1.2. Monodispers-Gözenekli Mikrokürelerin Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçümleri.....	37
4.1.3. Titreşimli Örnek Manyetometri Analizi .....	39
4.1.4. X-Işını Kırınım Analizi .....	40
4.2. İmmobilize Formda AuNP İçeren ve Peroksidaz Aktivitesine Sahip Monodispers-Gözenekli Mikrokürelerin Peroksidaz Aktivitesi Ölçümleri .....	41
4.2.1. $\text{Au}@\text{SiO}_2$ ve $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ Mikrokürelerin Değişen Ortam pH Değerleri için Peroksidaz Aktivitesi Ölçüm Sonuçları .....	41
4.2.2. Değişen Substrat Derişimi (OPD derişimi) için $\text{Au}@\text{SiO}_2$ ve $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ Mikrokürelerin Peroksidaz Aktivitesi Ölçüm Sonuçları.....	45
4.2.3. Farklı $\text{Au}@\text{SiO}_2$ ve $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ Mikroküre Miktarları için Peroksidaz Aktivite Ölçümleri.....	56
4.3. $\text{Au}@\text{SiO}_2$ ve $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ Monodispers-Gözenekli Mikroküreler ile GSH Adsorpsiyon Ölçüm Sonuçları .....	59
4.4. $\text{Au}@\text{SiO}_2$ ve $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ Mikroküreler ile GSH Biyomolekülünün Kolorimetrik Tayini.....	60
4.4.1. $\text{Au}@\text{SiO}_2$ ve $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ Mikroküreler ile Çözelti Ortamında GSH Biyomolekülünün Kolorimetrik Tayini.....	60
4.4.2. $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ Mikroküreler ile İnsan Serumunda GSH Biyomolekülünün Kolorimetrik Tayini.....	63
5. YORUM .....	67
6. KAYNAKLAR .....	69
EKLER.....	74
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	74
ÖZGEÇMİŞ .....	75

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Peroksidaz reaksiyon mekanizması. ....	5
Şekil 2.2.	Glikozun kolorimetrik tespiti [45]. ....	7
Şekil 2.3.	GSH yapısı [49]. ....	8
Şekil 2.4.	Ag <sup>+</sup> - OPD GSH tayini [51]. ....	10
Şekil 2.5.	Stöber reaksiyon mekanizması [59]. ....	11
Şekil 2.6.	Michaelis-Menten kinetiği [73]. ....	14
Şekil 2.7.	Substratın enzim katalizörlüğünde ürüne dönüşmesi. ....	14
Şekil 2.8.	Lineweaver–Burk grafiği [74]. ....	16
Şekil 3.1.	Tez kapsamında yapılan çalışmaların genel akışı. ....	18
Şekil 3.2.	Monodispers gözenekli partiküllerin sentezi [75]. ....	20
Şekil 3.3.	Çıkış lateksinde monomer olarak kullanılan (A) GMA ve (B) MAA ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan (C) EDMA. ....	21
Şekil 3.4.	Amin bağlı SiO <sub>2</sub> ve SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> elde edilmesi [76]. ....	24
Şekil 3.5.	SiO <sub>2</sub> ve SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikrokürelerin AuNP'ler ile dekorasyonu [77]. ....	25
Şekil 4.1.	SiO <sub>2</sub> mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı (A) 5000X (B) 19300X. ....	34
Şekil 4.2.	Yüzeyine AuNP immobilize edilmiş Au@SiO <sub>2</sub> mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı (A) 5000X (B) 21000X (C) 100000X. ....	35
Şekil 4.3.	Au@SiO <sub>2</sub> ve SiO <sub>2</sub> mikroküreler için BET yüzey alanı analiz cihazı ile elde edilen gözenek boyutu dağılım eğrileri. ....	37
Şekil 4.4.	Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> ve SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için BET yüzey alanı analiz cihazı ile elde edilen gözenek boyutu dağılım eğrileri. ....	38
Şekil 4.5.	Manyetik özellik gösteren SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikrokürelerin VSM ile elde edilen manyetizasyon eğrileri. ....	39
Şekil 4.6.	Mikrokürelerin X-ışını kırınım spektrumu A) SiO <sub>2</sub> B) Au@SiO <sub>2</sub> . ....	40
Şekil 4.7.	Mikrokürelerin X-ışını kırınım spektrumu A) SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> B) Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> . ....	41
Şekil 4.8.	OPD yükseltgenme reaksiyonu [78]. ....	42
Şekil 4.9.	Farklı pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında Au@SiO <sub>2</sub> mikroküreler için zamanla alınan absorbans değerleri, OPD derişimi: 400 µM, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL. ....	43

Şekil 4.10. Farklı pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için zamanla alınan absorbans değerleri, OPD derişimi: 400 µM, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	43
Şekil 4.11. Farklı pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için hesaplanan OPD tüketim hızı, OPD derişimi: 400 µM, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	44
Şekil 4.12. Farklı OPD derişimine sahip reaksiyon ortamlarında Au@SiO <sub>2</sub> mikroküreler için zamanla alınan absorbans değerleri, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	45
Şekil 4.13. Farklı OPD derişimine sahip reaksiyon ortamlarında Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için zamanla alınan absorbans değerleri, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	46
Şekil 4.14. Farklı OPD derişimine sahip reaksiyon ortamlarına HCl çözeltisi ilavesi sonrası Au@SiO <sub>2</sub> mikroküreler için zamanla alınan absorbans değerleri, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	47
Şekil 4.15. Farklı OPD derişimine sahip reaksiyon ortamlarına HCl çözeltisi ilavesi sonrası Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için zamanla alınan absorbans değerleri, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	48
Şekil 4.16. Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için OPD tüketim hızının OPD derişimi ile değışimi, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamı pH değeri: 7, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	50
Şekil 4.17. Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için HCl çözeltisi ilavesi sonrası OPD tüketim hızının OPD derişimi ile değışimi, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	51
Şekil 4.18. Au@SiO <sub>2</sub> mikroküreler için Lineweaver-Burk grafiği, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	52
Şekil 4.19. HCl çözeltisi eklenmiş ortamda Au@SiO <sub>2</sub> mikroküreler için Lineweaver-Burk grafiği, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	53
Şekil 4.20. Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için Lineweaver-Burk grafiği, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	53

Şekil 4.21. HCl ilave edilmiş ortamda Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için Lineweaver-Burk grafiği, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL. ....	54
Şekil 4.22. Farklı Au@SiO <sub>2</sub> mikroküre miktarları için zamanla alınan absorbens değerleri, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL. ....	56
Şekil 4.23. Farklı Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküre miktarları için zamanla alınan absorbens değerleri, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	57
Şekil 4.24. Farklı Au@SiO <sub>2</sub> mikroküre miktarları için HCl çözeltisi ilave edilmiş ortamda zamanla alınan absorbens değerleri, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	57
Şekil 4.25. Farklı Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküre miktarları için HCl çözeltisi ilave edilmiş ortamda zamanla alınan absorbens değerleri, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	58
Şekil 4.26 Farklı GSH derişimlerine sahip ortamlarda, GSH biyomolekülünün Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküre yüzeyine adsorbsiyonu, mikroküre miktarı: 10 mg, adsorbsiyonun gerçekleştiği hacim: 3 mL, adsorbsiyon ortamının pH değeri: 7..	59
Şekil 4.27. Farklı GSH derişimlerinde, Au@SiO <sub>2</sub> mikroküreler için elde edilen absorbens değerleri, mikroküre miktarı:10 mg, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL. ....	61
Şekil 4.28. Farklı GSH derişimlerinde, Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için elde edilen absorbens değerleri, mikroküre miktarı: 10 mg, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL.....	62
Şekil 4.29. (A) 0 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM GSH içeren insan serumu, mikroküre ve OPD etkileşimi sonrası dispersiyondan ayrılan çözeltiler, Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküre miktarı: 2 mg, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7 (B) A çözeltilerine 3 M 100 µl HCl çözeltisi ilave edilip 10 dakika beklenecek elde edilen çözeltiler. ....	63
Şekil 4.30 İnsan serumunda farklı GSH konsantrasyonlarında, Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için dalga boyu ve absorbens değerleri, mikroküre miktarı: 2 mg, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7.....	64



Şekil 4.31. İnsan serumunda farklı GSH konsantrasyonlarında, HCl ilavesi sonrası Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için dalga boyu ve absorbans değerleri, mikroküre miktarı: 2 mg, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL.....	65
Şekil 4.32. İnsan serumunda farklı GSH konsantrasyonlarında, Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için alınan absorbans değerleri, mikroküre miktarı: 2 mg, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı: 2 µL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL.....	66

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Nanozim yapısı ile GSH'ın kolorimetrik tayini için yapılan çalışmalar .....	9
Çizelge 3.1. Kromotografik koşullar .....	31
Çizelge 4.1. SiO <sub>2</sub> , Au@SiO <sub>2</sub> mikrokürelerin boyut özellikleri .....	35
Çizelge 4.2. SiO <sub>2</sub> , Au@SiO <sub>2</sub> , SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> , Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikrokürelerin yüzeylerindeki atomların EDX yardımıyla bulunan bileşimleri.....	36
Çizelge 4.3. SiO <sub>2</sub> , Au@SiO <sub>2</sub> , SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> , Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikrokürelerin yüzeylerindeki atomların EDX yardımıyla bulunan atom içeriği değerleri .....	36
Çizelge 4.4. Monodispers-gözenekli mikrokürelerin gözeneklilik özellikleri.....	38
Çizelge 4.5. Değişen pH değerleri için peroksidaz aktivite ölçümlerinin yapıldığı dalga boyu değerleri.....	42
Çizelge 4.6. Ortama HCl çözeltisi ilavesi sonucunda Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için okunan absorbands değerleri .....	49
Çizelge 4.7. Çalışmada kullanılan mikroküreler için r <sub>max</sub> , Km ve r <sup>2</sup> değerleri.....	54
Çizelge 4.8. Au@SiO <sub>2</sub> ve Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküreler için farklı GSH derişimlerinde elde edilen absorbands değerleri.....	60

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\mu\text{m}$	Mikrometre
nm	Nanometre
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
M	Molar
$\mu\text{M}$	Mikromolar
nM	Nanomolar
pM	Pikomolar
cpm	Dakikadaki çalkalama hızı (Circulation per munite)
rpm	Dakikadaki dönme hızı (Revolutions per minute)
$D_n$	Sayıcı ortalama çap değeri ( $\mu\text{m}$ )
$D_i$	Partikülün çap değeri ( $\mu\text{m}$ )
$N_i$	$D_i$ çapına sahip partikül sayısı
CV	Boy dağılım için değişim katsayısı
$N_T$	Toplam partikül sayısı
$A_0$	Adsorbsiyon ortamından başlangıç alan değeri
$A_f$	Adsorbsiyon sonrası alan değeri
$K_m$	Michaelis Menten sabiti
$r_0$	Reaksiyon hızı
$r_{\text{max}}$	Maksimum reaksiyon hızı
$k_1, k_2, k_{-1}$	Reaksiyon hız sabiti

Q	Mikroküre yüzeyine adsorbe olan glutatyon miktarı (mg/g)
C	Glutatyon konsantrasyonu(mg/mL)
V	Adsorpsiyon çözeltisi hacmi (mL)
[E]	Etkilenmemiş enzim konsantrasyonu
[E] <sub>T</sub>	Toplam enzim konsantrasyonu
[S]	Substrat konsantrasyonu
m <sub>p</sub>	Partikül miktarı (g)
cc	Santimetre küp (cubic centimeter)

## Kısaltmalar

ACN	Asetonitril
AIBN	2,2'-azobisizobütironitril
AIDS	Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu (Acquired immune deficiency syndrome)
APTES	Aminopropiltrietoksisilan
Au@SiO <sub>2</sub>	Yüzeyine altın immobilize edilmiş silika
Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub>	Yüzeyi silika ile kaplanmış ve yüzeyine altın immobilize edilmiş manyetik silika
AuNP	Altın nanopartikül
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BPO	Benzoil peroksit
DAB	Di-azo-aminobenzen
DDI	Distile-deiyonize
DMF	N,N Dimetilformamid
EDMA	Etilen dimetakrilat
EDX	Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (Energy dispersive X-ray spectroscopy)
ELISA	Enzim bağlı immüno sorbent tahlili (Enzyme-linked immuno sorbent assay)
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	Demir (II) klorür tetrahidrat
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Demir (III) klorür heksahidrat
GMA	Glisidil metakrilat
GOx	Glikoz oksidaz
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSHt	Serbest glutatyon
GSSG	Oksitlenmiş glutatyon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HAuCl <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	Koroaurik asit-trihidrat
HCl	Hidroklorik asit
HEPES	4-(2-hidroksietil) piperazin-1-etansülfonik asit

HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü (Human immunodeficiency virus)
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi (High pressure liquid chromatography)
HRP	Yabanturpu peroksidaz enzimi (Horseradish peroxidase enzyme)
Iso-PrOH	İzopropil alkol
MAA	Metakrilik asit
MagSiO <sub>2</sub>	Manyetik silika
MoS <sub>2</sub>	Molibden disülfid
NaBH <sub>4</sub>	Sodyum borohidrit
NaH <sub>4</sub> OH	Amonyum hidroksit
NaOH	Sodyum hidroksit
OPD	O-fenilendiamin
PAD	Kağıt tabanlı analitik cihazlar (Paper based analytical devices)
PVA	Poli(vinil alkol)
PVP K-30	Poli(vinil piroolidon) K-30
SLS	Sodyum lauril sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope)
SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub>	Yüzeyi silika ile kaplanmış manyetik silika
TBAI	Tetrabutil amonyum iyodat
TEA	Trietilamin
TEOS	Tetraetoksisilan
THF	Tetrahidrofuran
TiO <sub>2</sub>	Titanyum dioksit
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
TSS	Trisodyum sitrat
XRD	X ışını kırınım yöntemi
UV	Mor ötesi (Ultra violet)

VSM

Titreşimli örnek manyetometresi (Vibrating sample magnetometer)

# 1. GİRİŞ

Glutasyon, vücut dokularına zarar veren reaktif oksijen moleküllerini ve serbest radikalleri yok ederek vücudun korunmasını sağlayan çok güçlü bir antioksidan biyomoleküldür. Kanserojen ve toksik maddelerin etkisiz hale getirilmesinde ve vücuttan atılmasında önemli rol oynar. DNA ve protein yapımında da doğrudan etkisi mevcuttur. Kanda glutasyon seviyelerinin dengesizliği, Alzheimer, Parkinson, HIV, AIDS, kanser, kalp krizi, diyabet gibi çok çeşitli hastalıklara ve yaşlanma sürecinin hızlanmasına yol açabilir. Ayrıca kanser biyobelirteci olarak da kritik bir öneme sahiptir [1]. Glutasyonun günümüzde tayini çeşitli enstürmental analiz yöntemleri ve enzim içeren ticari kitler ile yapılmaktadır [2]. “Enzim benzeri özelliklere sahip nanomalzemeler” olarak adlandırılan nanozimler, çeşitli biyolojik analiz ve hastalık teşhisinde önemli bir potansiyele sahip olan yapılardır. Nanozimlerin yüksek enzimatik aktivite göstermesi, enzim kinetiğinin incelenmesi için çalışmaların hızlanması ve çok çeşitli nanozim formlarının geliştirilmesine yol açmıştır [3]. Karbon malzemeleri; grafen oksit, karbon nanotüpleri, metal oksitleri;  $\text{Co}_3\text{O}_4$  ve  $\text{MnO}_2$  ve soy metal nanoparçacıklar içeren çeşitli nanomalzemelerin enzim benzeri aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu yapay nanoenzimler, başta kolay uygulanabilir kolorimetrik testlerde olmak üzere çok çeşitli uygulamalarda, doğal enzimlere kıyasla kararlı ve düşük maliyetli alternatifler olarak literatürdeki yerini almıştır [4].

$\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopartiküllerin peroksidaz benzeri aktivitesinin ilk kez 2007 yılında ortaya konmasından bu yana  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bazlı nanozimler, çok çeşitli biyomoleküllerin tespitinde kullanılmak üzere denenmiştir [4]. Zhang ve arkadaşları,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bazlı nanozimlerin kullanılarak antikor-antijen duyarlı bir kolorimetrik tanı sistemi kurmayı başarmışlardır [5]. Wang ve arkadaşları yine  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bazlı nanozim yardımıyla tetrasiklinlerin saptanması için kolorimetrik bir yöntem geliştirmişlerdir [6]. Glutasyonun tespiti için de peroksidaz benzeri aktiviteye sahip CuS-polidopamin-Au kompozit malzemesi ve azot-kükürt katkılı karbon kuantum nanomalzemeleri denenmiştir [2,7].

Peroksidaz bazlı biosensörlerin ve ELISA kitlerinin geliştirilmesi çalışmaları son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Farklı biyomoleküllerin tayinine yönelik olarak



yapılan bu çalışmalarda en önemli hedef, enzim yerine, bu enzimatik aktiviteyi taklit edebilen inorganik bazlı partiküller formların kullanılmasıdır.

Tez kapsamında monodispers-gözenekli formda silika ve manyetik silika mikroküreler çok basamaklı mikrosüspansiyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Mikroküreler, sentezlenen altın nanopartiküller ile dekore edilmiştir. Immobilize formada altın nanopartikül içeren monodispers-gözenekli mikrokürelerin peroksidaz aktiviteleri substrat olarak o-fenilendiamin (OPD) kullanımıyla belirlenmiştir. Çalışmada substrat derişimi, mikroküre miktarı ve ortam pH değeri değiştirilerek, bu değişimlerin peroksidaz benzeri aktiviteye etkisi incelenmiştir. Peroksidaz aktivitesi yönünden uygun koşullar belirlenerek, glutatyon derişim tayini için zgn kolorimetrik biyosensör sistemi geliştirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nanozimler

Enzimler, protein yapısında biyokatalizörlerdir. Tipik kimyasal katalizörler genellikle yüksek sıcaklık, yüksek basınç, aşırı pH değerleri ve organik çözücü içeren ortamlar gibi sert koşullarda kullanılırken; enzimler daha hafif koşullar altında, esas olarak biyomoleküllerin dönüşümünü katalizlemek için kullanılırlar. Doğal enzimler, yüksek katalitik aktiviteleri ve substrat özgüllüğü nedeniyle endüstriyel, tıbbi ve biyolojik alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Avantajlarına rağmen genellikle hazırlık ve saflaştırma için yüksek maliyet, düşük çalışma kararlılığı, katalitik aktivitenin çevresel koşullara duyarlılığı, geri dönüşüm ve yeniden kullanım zorlukları gibi dezavantajları bulunmaktadır. Doğal enzimlere bir alternatif olarak, onların katalitik özelliklerini taklit eden moleküllerin, komplekslerin ve nanoparçacıkların sentezini içeren stratejiler geliştirilmiştir [8].

Doğal enzimin yapısını ve fonksiyonunu taklit edebilecek yeni materyallerin geliştirilmesi biyolojik sistemi taklit eden kimyanın temel amaçlarından biri olarak kabul edilmiştir. Bu bağlamda, yapay enzimler ortaya çıkmış ve ilk olarak Ronald Breslow tarafından tanımlanmıştır [9].

Bir enzimin özelliklerini sergileyen nanopartiküller, “nanozimler” olarak adlandırılmıştır. Nanozimlerin basit sentez yöntemleri, düşük maliyetleri, yüksek katalitik performansları gibi doğal enzimlere göre çeşitli avantajları bulunmaktadır. Ayrıca yüksek kararlılığa ve yüzey modifikasyon olanağına sahip olmaları da doğal enzimlere göre avantajları arasında sayılabilir [8]. Nanozimlerle tıbbi, immünolojik testler, antibakteriyel uygulamalar ve kanser terapi uygulamaları gibi farklı alanlarda birçok çalışma yapılmıştır [10-17].

Oksidaz, peroksidaz, dehidrojenaz, katalaz, nükleaz ve proteaz gibi katalizledikleri reaksiyonlara göre farklı isimler alan enzimlere benzer özellikler gösteren yapay katalizörler sentezlenmiş ve çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır [18-21]. 2012 yılında,  $V_2O_5$  nanotellerinin peroksidaz benzeri aktivite gösterdiği ve bu özelliğin deniz içerisinde biyofilm oluşumunu engellemek için kullanılabileceği gösterilmiştir [22].

2014 yılında Tremel ve arkadaşları, molibden trioksit ( $\text{MoO}_3$ ) nanopartiküllerin sülfat oksidaz benzeri aktiviteye sahip olduğunu ve nanopartiküllerin sülfat oksidaz eksikliğinde kullanılabileceğini göstermiştir [23]. Sitrat ile zenginleştirilmiş altın nanopartiküllerin (AuNP) glikoz oksidaz (GOx) benzeri aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sisteinle modifiye edilmiş AuNP'ler peroksidaz benzeri, grafen-gümüş yapıları nanopartiküller ise oksidaz benzeri aktivite göstermiştir [20,24].

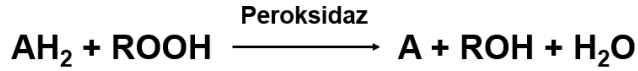
## 2.2. Manyetik Nanozimler

Genellikle kimyasal ve biyolojik olarak inert olan manyetik demir oksit nanomalzemeler biyosensör çalışmalarında, çok çeşitli moleküllerin yakalanması ve saflaştırılması işlemlerinde aktif olarak rol almaktadır [25]. Ayrıca küçük yapıları peptidlerle modifiye edilen manyetik nanomalzemelerin, manyetik rezonans görüntüleme spesifik tümör hedefleme özelliğine sahip olduğu ortaya konulmuştur [26].

Manyetik özelliğe sahip  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoyapılar ve soy metal bazlı nanokompozitler kullanılarak farklı biyomoleküllerin tanımlanması için literatürde çeşitli uygulamalar mevcuttur. Örneğin,  $\text{Au}@\text{Fe}_3\text{O}_4$  manyetik nanopartiküller,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$  manyetik nanopartiküller ve Fe-Pt-Au üçlü metalik nanopartiküller, okratoksin A, glikoz ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin saptanması için nanozim olarak kullanılmıştır [27-29]. Bunun yanı sıra, Pt nanopartiküller kullanılarak, peroksidaz benzeri aktivite gösteren manyetik nanozimler üretilmiş ve biyosensör olarak kullanılmıştır [30]. Bir başka çalışmada, altın ve manyetik nanopartiküller içeren agaroz jel matrisi kullanılarak glikozun kolorimetrik tespiti yapılmıştır [31]. Platin nanopartiküllerle zenginleştirilmiş manyetik karbon nanokürelerin peroksidaz benzeri aktivite gösterdiği kolorimetrik yöntem kullanılarak gösterilmiştir. Sentezlenen nanokürelerin farmasötik, çevre ve endüstriyel alanlarda kullanılma potansiyelinin olduğu raporlanmıştır [32].

### 2.3. Peroksidaz Benzeri Aktivite

Peroksidaz enzimi doğada, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunur. Çok çeşitli alt türlere sahip peroksidaz enzimi, peroksit ile oksidasyon reaksiyonunu katalize eder [33]. Şekil 2.1'de reaksiyon mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Peroksidaz reaksiyon mekanizması.

Bu özelliği sayesinde peroksidazlar, biyolojik sistemlerde canlı dokulara zarar verebilen reaktif oksijen türlerini zararsızlaştırma, ve patojenlere karşı savunma gibi bir çok kritik rol oynar. Ek olarak, peroksidaz özellikle HRP (Yaban turpu peroksidaz enzimi), görüntüleme sistemlerinde substratları katalize etmek için klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Peroksidaz yüksek katalitik verim, substrata özgülük ve hafif enzimatik koşullar gibi avantajlarının yanı sıra, yüksek maliyet, zahmetli reaksiyon koşulları ve kolay denatüre olma gibi uygulama sınırlayıcı dezavantajlara da sahiptir [33].

Yapay enzimler, substratlara özel afinite, elektron transferini kolaylaştırması vb. özellikleri ile doğal enzimleri birçok yönden taklit edecek şekilde tasarlanmıştır [34]. Bugüne kadar çok sayıda fonksiyonel karbon bazlı, metal oksit bazlı, metal bazlı nano-malzeme türü peroksidazı taklit etmek için araştırılmıştır. Bunlar arasında geçiş metallerinin oksit formunu içeren nanomalzemeler, mükemmel katalitik aktiviteleri, yüksek kararlılıkları, düşük maliyetleri ve sentez kolaylığı nedeniyle çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmıştır. Örneğin, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparçacıklar, Ebola ve tümör teşhisi için peroksidazı taklit edecek şekilde üretilmiştir [35].

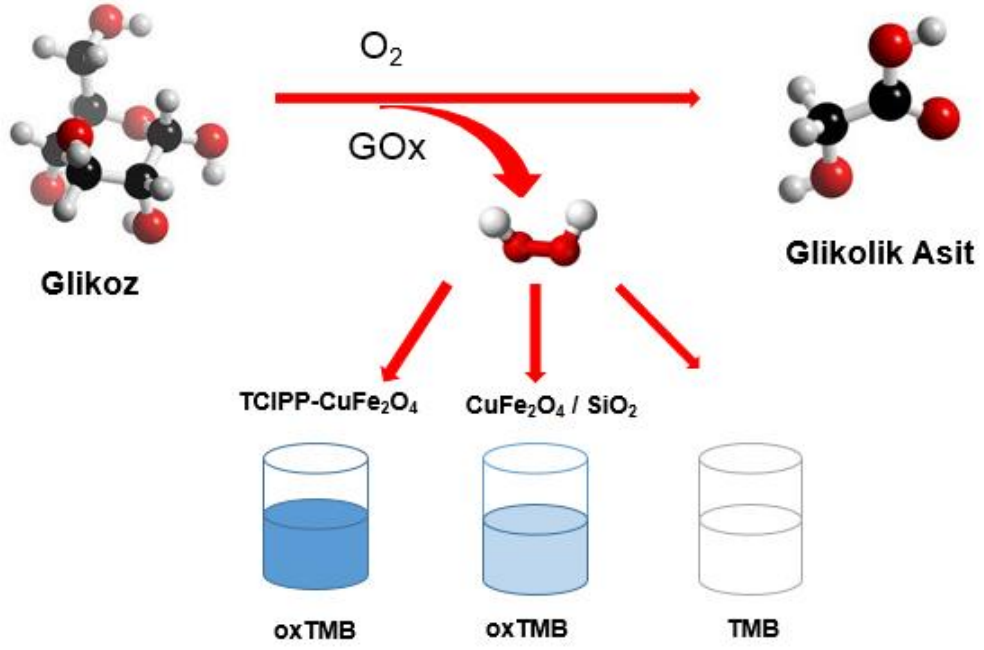
Geliştirilen peroksidaz taklitçileri arasında metal komplekslerine ait hemin, siklodekstrin, porfirin gibi yapılar bulunmaktadır. Son zamanlarda Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, CuO nanoparçacıklar ve V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nanoteller gibi bazı inorganik nanomalzemelerin peroksidaz benzeri aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir [5, 36-41].

Yan ve arkadaşları, çalışmalarında üç farklı boyutta  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartikül kullanmıştır.  $H_2O_2$  varlığında substrat olarak kullanılan TMB, DAB ve OPD okside olmuştur ve kolorimetrik ürünler oluşmuştur. Çalışmada nanozimin katalitik aktivitesinin partikül boyutuna bağlı olduğu, daha küçük boyutlu parçacıkların daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [5].

#### **2.4. Peroksidaz Sensörleri**

Peroksidaz benzeri aktivite gösteren kompozit nanomalzemeler ile ilgili çalışmalar biyosensör uygulamalarında yoğunlaşmıştır. Hallaj ve arkadaşları,  $Co_3O_4$  ve  $CeO_2$  nanokompozitlerinin peroksidaz benzeri özelliğe sahip olduğu göstermişler, glukozun hassas tayini için yeni bir kağıt tabanlı biyosensör geliştirmişlerdir. Platformun renk değişimi mobil kamera ile kayıt edilmiş ve akıllı telefon uygulaması ile analiz edilmiştir. Bu biyosensörün, insan serum numunelerinde 0,005 - 1,5 mM konsantrasyon aralığındaki glikozun hızlı ve hassas bir şekilde tayinini gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Geliştirilen sensör yüksek katalitik aktivite ve düşük maliyeti ile biyoteknoloji, çevre kimyası ve klinik tanılama alanlarında çok çeşitli potansiyel uygulamalara sahiptir [42]. Bir başka çalışmada altın nanoparçacık / L-sistein / ZnSeS yapısındaki nanozimin peroksidaz benzeri özelliği kullanılarak kokainin hızlı kolorimetrik tespiti yapılmıştır [43].

Peroksidaz benzeri aktivite gösteren bir başka nanozim çalışmasına, Au-Ni katkılı grafit karbon nitrür tabakaları ve  $CuFe_2O_4 / SiO_2$  nanokompozitler ile glikozun kolorimetrik tespiti yapılmıştır [44, 45]. Liu ve arkadaşlarının çalışmasında porfirin türevi (TCIPP) ile fonksiyonelleştirilmiş ve fonksiyonelleştirilmemiş  $CuFe_2O_4/SiO_2$  nanokompozitler, GOx, substrat olarak TMB kullanılarak 5-100  $\mu M$  aralığındaki glikozun kolorimetrik tayinini yapabilen sensör oluşturulmuştur. Nanokompozitlerin, glikozun oksidasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit ile TMB reaksiyonunu etkin bir şekilde katalizlediği, TMB'nin oksidasyonu ile renkli çözelti oluştuğu raporlanmıştır. Glikozun değişen konsantrasyonları için renk değişimi kullanılarak tespit gerçekleştirilmiştir. Glikozun kolorimetrik tayini Şekil 2.2'de gösterilmiştir [45].

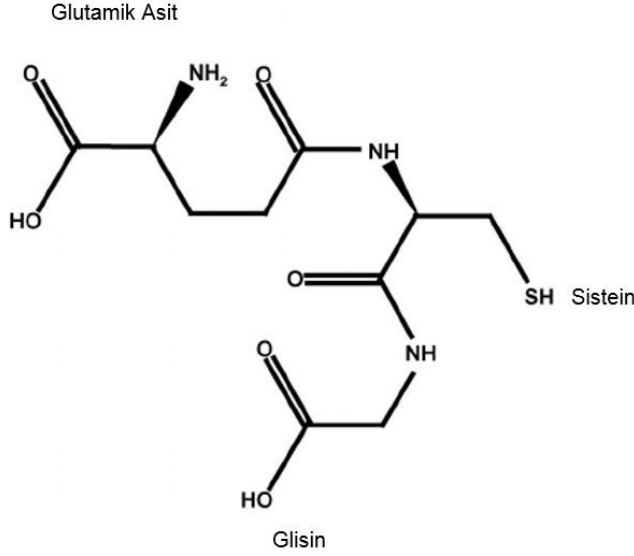


Şekil 2.2. Glikozun kolorimetrik tespiti [45].

Nanozimlerle ilgili titanyum bazlı çalışmalar da mevcuttur. Örnek olarak TiO<sub>2</sub> nanotüplerinin peroksidaz benzeri aktivite gösterdiği ve peroksidaz aktivitesinin çeşitli yöntemlerle oluşturulan titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>) / molibden disülfid (MoS<sub>2</sub>) katmanlı nano yapı ile yoğun şekilde artırıldığı raporlanmıştır. TiO<sub>2</sub> / MoS<sub>2</sub> nano yapının yüksek peroksidaz benzeri aktivitesine dayanarak, glutatyon tespiti için basit bir kolorimetrik yaklaşım geliştirilmiştir. Bu çalışma, kolorimetrik analiz ve tıbbi teşhis konularında ileriye yönelik uygulamalar için basit ve hassas bir algılama yöntemi olarak sunulmuştur [46, 47].

## 2.5. Glutatyon Tayini

Glutatyon, üç amino asitten (sistein, glutamik asit ve glisin) oluşan düşük molekül ağırlıklı bir tripeptittir. Glutatyon, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, DNA sentezi, protein sentezi, hücre dışı ve içi transportlar gibi hücre fonksiyonları dışında, antioksidan olarak hücre savunmasında önemli bir rol oynamaktadır. GSH yapısı Şekil 2.3 'te gösterilmiştir [48].



Şekil 2.3. GSH yapısı [49].

Glutasyon, serbest (GSht), indirgenmiş (GSH), oksitlenmiş (GSSG) veya proteinlere bağlanmış halde bulunabilir. Hücre içi ve kan glutasyon konsantrasyonları milimolar, plazma glutasyon konsantrasyonları ise mikromolar mertebesindedir. Yapılan çalışmalarda insanda GSH konsantrasyonu kanda 684 ile 2525  $\mu\text{mol/L}$  aralığında, plazmada ise 2,22 ile 11,36  $\mu\text{mol/L}$  aralığında değiştiği görülmüştür [50]. GSH, hücre savunmasında yer aldığı için damar sertliği, romatoid artrit, yetişkin solunum sıkıntısı sendromu gibi hastalıklarda glutasyon konsantrasyonu azalır [50].

Anemiden etkilenen hastalarda eritrosit içeriğindeki GSH seviyesinde bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Alkol kaynaklı ve alkol kaynaklı olmayan karaciğer hastalıklarında GSH konsantrasyonlarının azaldığı gözlenmiştir. HIV ile enfekte olmuş hastaların laboratuvar araştırmaları sonucunda, plazmalarındaki glutasyon seviyesinde azalma olduğu görülmüştür. Öte yandan, yüksek glutasyon konsantrasyonlarının bazı kemoterapilerde direnç yarattığı ve bu sebeple kanser tedavileri için bir dezavantaj oluşturabileceği raporlanmıştır [50].

Günümüzde glutasyon tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi, elektrokimyasal yöntemler ve spektrofotometri dahil olmak üzere çeşitli analitik yöntemler kullanılmaktadır. Belirtilen analizler için pahalı araçlara ihtiyaç duyulması, uzun laboratuvar işlemleri ve karmaşık prosedürler gibi belirli

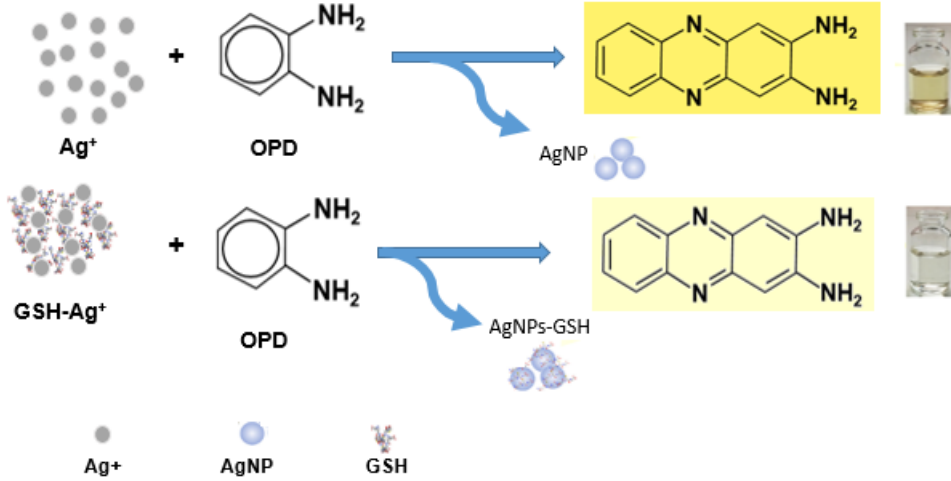
kısıtlamalar vardır. Enzimatik ardışık reaksiyonlara dayanan ticari GSH kitleri pratikte yaygın olarak uygulanan diğer bir tayin yöntemidir. Bu yöntemde ise enzim etkisizliği sıklıkla karşılaşılan kısıtlayıcı bir özelliktir. Hücresele GSH değerlendirmesini basit bir şekilde yapmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır [2]. Farklı yapıda nano malzemeler GSH biyomolekülünün kolorimetrik tayini için kullanılmıştır [2, 51-53]. Çizelge 2.1’de tayinde kullanılan nanozimler ve substratlar ile tayini yapılan GSH derişim aralığı belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Nanozim yapısı ile GSH’ın kolorimetrik tayini için yapılan çalışmalar

Nanozim Çeşidi	Substrat Çeşidi	GSH Tayin Aralığı
Ag <sup>+</sup>	OPD	2 nM - 1 µM
Porfirin-Co <sub>9</sub> S <sub>8</sub>	TMB	0,3 µM - 10 µM
CuS-Polidopamin-Au kompozit	TMB	0,5 µM - 100 µM
WS <sub>2</sub> Nano Tabaka	TMB	100 pM - 10 nM

He ve arkadaşları yaptığı çalışmada, AgNO<sub>3</sub> kullanılarak GSH’nun kolorimetrik tayinini gerçekleştirmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan ortamda OPD ve Ag<sup>+</sup> arasındaki redoks reaksiyonu sonucu OPD yükseltgenerek sarı renkli bir çözelti oluşturmuştur. Ortama GSH ilave edilmesinin ardından reaksiyon inhibe olmuştur ve renkte solma görülmüştür. Şekil 2.4. A’da GSH bulunmayan ve Şekil 2.4.B’de GSH bulunan Ag<sup>+</sup>-OPD tayin sistemi gösterilmiştir. GSH konsantrasyonu arttıkça çözelti renginde açılma görülmüştür. Bu özellikten yararlanılarak GSH tayini gerçekleştirilmiştir [51].





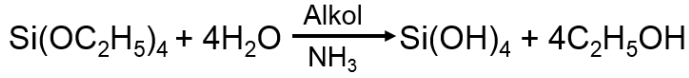
Şekil 2.4.  $Ag^+$  - OPD GSH tayini [51].

## 2.6. Silika Mikroküreler

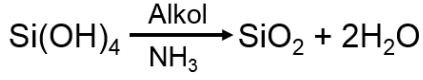
Silika bazlı nanopartiküller, stabiliteleri, yüksek hidrofilik yüzeyleri, biyouyumluluk özelliği ve yüzey işlevselliği nedeniyle çok çeşitli alanlarda kendine uygulama sahası bulmuştur [54]. Monodispers silika mikroküreler, kromatografik malzemelerin, kaplama malzemelerinin ve katalizörlerin üretiminde ve eczacılık gibi konularda kullanılmaktadır. Ayrıca silika mikroküreler bağlayıcı, stabilizör, kaplama ve sır malzemesi olarak kullanılmaktadır [55]. Silika mikroküreler sol-jel ve mikroemülsiyon yöntemi gibi yöntemler kullanılarak sentezlenebilmektedir [56]. Stöber ve arkadaşları tarafından 1968'de geliştirilen koloidal sol-jel yöntemi, monodispers silika sollarının hazırlanmasında en yaygın kullanılan yöntemdir [57].

Stöber çalışmasında 0,5 - 2  $\mu m$  aralığındaki monodispers silika küreleri, amonyak katalizli hidroliz ve silikon alkoksitlerin kondenzasyonu ile sentezlemiştir [58]. Stöber yöntemi, hidroliz ve kondenzasyon basamaklarından oluşmaktadır ve reaksiyon mekanizması Şekil 2.5.'te gösterilmiştir. Reaksiyon sonrası hidrojel formundaki partiküllerin yoğun küresel partikül haline dönüşmesi için kalsinasyon işlemi uygulanmaktadır. Oluşan silika kürelerinin yüzeyinde hidroksil grupları bulunmaktadır. Amonyak sadece katalizör görevi yapmayıp, aynı zamanda silika parçacıklara negatif, dengeleyici bir yüzey yükü sağlamaktadır [59].

## Hidroliz Reaksiyonu



## Kondenzasyon Reaksiyonu



Şekil 2.5. Stöber reaksiyon mekanizması [59].

Monodispers silika küre boyutu, su ve amonyak içeriğine, çözücü tipine ve sentez sıcaklığına bağlıdır [57]. Liu ve arkadaşları yaptığı çalışmalar sonucunda tetraetoksisilan (TEOS) ekleme yönteminin, TEOS ekleme hızının ve TEOS miktarının partikül büyüklüğüne etkisi olduğunu belirtmiştir [56]. TEOS, reaksiyonun başında kesikli bir şekilde eklendiğinde daha küçük partiküller elde edilirken, sürekli bir şekilde eklendiğinde daha büyük partiküller elde edildiği görülmüştür. Sürekli TEOS eklenen sistemde, TEOS ekleme hızı arttıkça partikül büyüklüğünün azaldığı ve eklenen TEOS konsantrasyonu arttıkça partikül büyüklüğünün arttığı raporlanmıştır [56].

## 2.7. Manyetik Silika Mikroküreler

Manyetik mikroküreler, harici bir manyetik kuvvet altında yönlenebilen mikro yapılardır [60]. Manyetik mikropartiküllerin, uygun maliyetleri ve kolay bir şekilde ortamdaki ayrılabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Bu avantajları nedeniyle manyetik mikroküreler biyomedikal alanda protein saflaştırma, ilaç hedefleme, hücre analizi, tıbbi tanı, immünolojik testler gibi uygulamalarda kullanılabilmektedir [61]. Kanseri tedavisinde ilacın etkin bir şekilde hedefe ulaştırılması ve böylece sağlıklı hücrelerde meydana gelebilecek zararın engellenmesi gibi nedenlerle manyetik hedefleme ve izlemesi olan ilaç dağıtım sistemleri yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Son zamanlarda, mezogözenek yapılı silika nanopartiküller en iyi potansiyel ilaç taşıyıcılardan biri olarak görülmektedir. Yao ve arkadaşları, grafen kaplı gözenekli silika malzemeler üzerinde çalışmış ve bu malzemelerin tedavi sırasında taşıyıcı olarak kullanılması üzerinde

durmuşlardır [62]. Mezogözenek yapısına sahip silika ile oluşturulan manyetik  $WS_2@Fe_3O_4$  nanokompozitin, ilaç salımı ve kanser tedavisi gibi alanlarda kullanımı için çalışmalar yapılmıştır [63].

Manyetik mikroküreler ayrıca Au, Pt veya Pd nano bileşenler gibi nispeten pahalı soy metal katalizörlerin manyetik olarak geri kazanımı için destek yapı olarak kullanılırlar. Soy metal katalizörlerin manyetik mikrokürelere bağlanması, bu malzemelerin tekrar kullanılabilirlik özelliğini arttırmaktadır. Reaksiyon sonrası katalizörün atıktan ayrıştırılması için ilave saflaştırma işlemlerine duyulan gereksinimi önler [60].

Manyetik silika nanomalzemelerin kullanılarak yapılan nanozim çalışmalarına örnek vermek gerekirse; Yang ve arkadaşları tarafından homojen bir morfolojiye sahip manyetik çekirdek-kabuk yapıda nanokompozit üretilmiştir. 15 nm'lik bir çapa sahip  $Fe_3O_4$  nanopartikül çekirdeği, ince bir 10 nm silika katmanı ile kaplanmış ve 2-3 nm çapındaki Pt nano tozlar  $Fe_3O_4@SiO_2$ -Pt nanokompozitlerini oluşturmak için yüzeyde düzgün bir şekilde tutturulmuştur. Bu nanokompozitlerin, çok iyi peroksit enzimi aktivitesi sergilediği ve patojenik bakterilerin tanımlanması için bir sinyal probu olarak davrandığı raporlanmıştır [64].

Sol-gel yöntemi, birlikte çöktürme yöntemi, mikroemülsiyon, hidrotermal reaksiyon, termal ayrışma dahil olmak üzere manyetik nanoparçacıkların sentezi için farklı yöntemler kullanılmıştır [65]. Tuncel ve arkadaşları monodispers-gözenekli  $SiO_2(MagSiO_2)$  mikrokürelere, manyetik formda monodispers-gözenekli (metakrilikasit-co-etilendimetakrilat) (poli (MAA-co-EDMA)) mikrokürelere şablon materyali olarak kullanarak elde etmiştir [66]. Bu amaçla, manyetik olmayan poli (MAA-co-EDMA), çok basamaklı mikro-süspansiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiş ve bir sonraki aşamada manyetik özellik kazandırılmıştır [66].

## 2.8. Altın Nanopartiküller

Metal nanopartiküllerin, kendilerine özgü yapıları nedeniyle yığın veya atomik halde farklı fiziksel ve kimyasal özellikler gösterdiği düşünülmektedir. AuNP, metal nanopartikül grubunun en çok ilgi gören üyelerindendir. AuNP'lerin biyosensör olarak

kullanıldığı çeşitli potansiyel uygulamalar bulunmaktadır [67]. Ayrıca kanser teşhisinde ve biyolojik görüntüleme de kullanılmıştır [68]. Yüksek yüzey/hacim oranlarından dolayı altın nanopartiküller üstün özelliklere sahiptir. AuNP'lerin yüksek yüzey enerjilerinin çeşitli reaksiyon sistemlerinde güçlü bir katalitik etki sağlaması nedeniyle, AuNP'ler katalizör olarak da ilgi çekmektedirler [69].

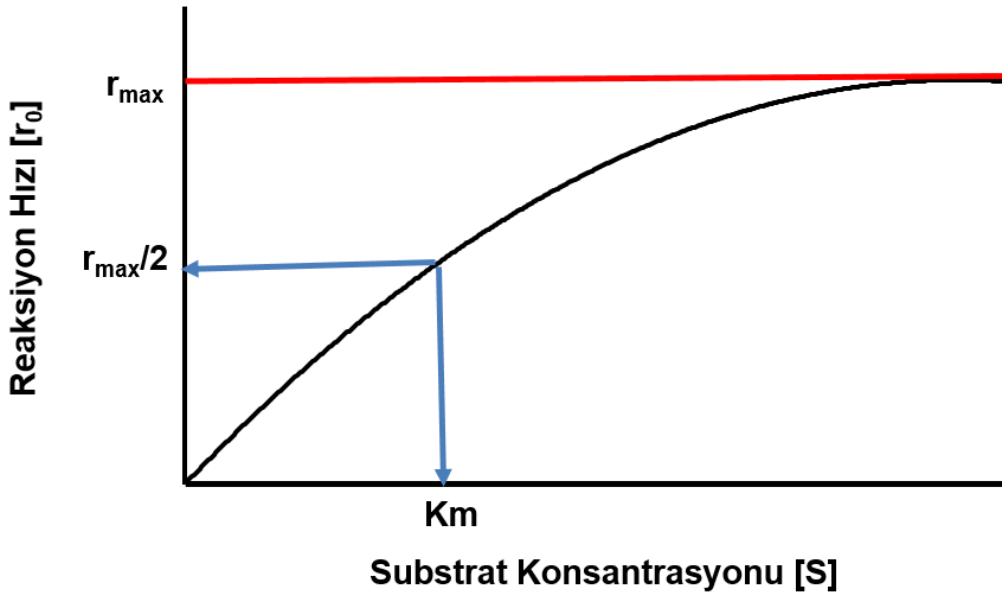
Nanopartiküller birçok faydalı özelliğe sahip olmalarına rağmen yüzey özelliklerinin değişmesine yol açan toplanma eğilimi gösterirler. AuNP'lerin katalitik performansı; büyüklükleri, şekilleri ve yüzey kimyası ile ilgili olduğu için yüzey özelliklerinde meydana gelen bu değişiklikler katalitik aktivitede bir azalmaya neden olur. AuNP'lerde katalitik performansı etkileyen yüzey/hacim oranını arttırmak için AuNP'ler karbon, silika, zeolit, metal oksit veya metal-organik yapılardan oluşan farklı türdeki katı malzeme yüzeylerine immobilize edilmiştir [69].

Genel olarak, AuNP'lerin hazırlanması kimyasal indirgenme ve stabilizasyon olmak üzere iki ana basamaktan oluşmaktadır. İndirgenme için borohidrit, aminoboran, formaldehit, alkol, sitrik asit, hidrojen peroksit, asetilen ve elektron bakımından zengin geçiş metal kompleksleri gibi ajanlar kullanılırken, stabilizasyon için trisodyum sitrat dihidrat, fosfor ligandları, azot bazlı ligandlar, oksijen bazlı ligandlar, kükürt ligandları gibi maddeler kullanılmıştır [67]. Geçmişte Türkevich ve arkadaşları, çekirdeklenme-büyüme mekanizması yoluyla AuNP sentezini açıklamıştır. Türkevich yönteminde sitrat iyonları hem  $Au^{+3}$ 'ün indirgenmesi hem de sonuçta ortaya çıkan AuNP'lerin stabilizasyonu için kullanılmıştır. Sonuçta, 20 nm civarında AuNP elde edilmiştir. [70] Daha sonra, Frens ve arkadaşları tarafından çalışma genişletilmiştir. Trisodyum sitratı, Au oranına göre kontrol ederek 15 ile 150 nm arasında geniş bir AuNP boyut aralığı elde edilmiştir. Fakat partikül büyüklüğü 20 nm'den büyük partiküllerin polidispers dağılım gösterdikleri görülmüştür [71]. Bunların yanında farklı bir çalışmada ise AuNP'leri stabilize etmek için alkiltiyollerin kullanılabilirliği gösterilmiştir. Türkevich metoduna göre daha küçük partiküller elde edilmiştir [72].

## **2.9 Michaelis-Menten Modeli**

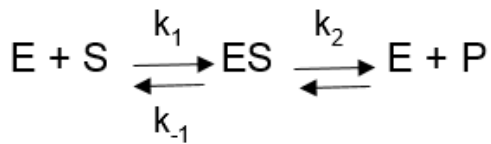
Enzimler, reaksiyonların uygun sıcaklık, pH ve hücre basıncı koşullarında hızlı ilerlemelerini sağlayan katalizörlerdir. Enzimlerin nasıl çalıştığını anlamak için, etkinliklerinin kinetik bir tanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Enzim için, birim

zamanda oluşturulan ürünün mol sayısı olarak tanımlanan katalizör hızı  $[r_0]$ , substrat konsantrasyonu  $[S]$  ile değişmektedir. Şekil 2.6'de görüldüğü gibi reaksiyon hızı, öncelikle substrat konsantrasyonu arttıkça doğrusal bir şekilde artar, belirli bir substrat konsantrasyonuna ulaşılması ile hız sabitlenmeye başlar. Enzim hala aktif olarak substratı ürüne dönüştürür, ancak reaksiyon dengesi sağlanmıştır. Reaksiyon hızı daha yüksek substrat konsantrasyonlarında maksimum değere yaklaşmaktadır.



Şekil 2.6. Michaelis-Menten kinetiği [73].

Şekil 2.7'de gösterilen reaksiyon ile ilerleyen bir sistem düşünüldüğünde, substratın (S) ürüne (P) dönüşümü enzim (E) katalizörlüğünde gerçekleşmiştir.



Şekil 2.7. Substratın enzim katalizörlüğünde ürüne dönüşmesi

Sabit bir enzim konsantrasyonunda,  $r_0$ ,  $[S]$  küçük olduğunda  $[S]$  ile orantılıdır, ancak  $[S]$  büyük olduğunda  $[S]$  'den bağımsızdır. 1913'te Leonor Michaelis ve Maud Menten bu kinetik özellikleri açıklamak için basit bir model önermiştir.

Model birçok enzimin kinetik özelliğini açıklayan, önerilen en basit model olarak kabul edilmiştir.

Bir enzim, substrat ile birleşerek bir  $k_1$  hız sabiti ile ES kompleksi oluşturmaktadır. ES kompleksi için iki durum bulunmaktadır. Hız sabiti  $k_{-1}$  ile E ve S'ye ayrışabilir veya hız sabiti  $k_2$  ile P oluşturmaya devam edebilir. Hiçbir ürünün, başlangıç substratına geri dönmediği varsayılmaktadır.

$$r_0 = k_2 [ES] \quad (2.1)$$

$$\text{ES oluşum hızı} \quad ES = k_1[E][S] \quad (2.2)$$

$$\text{ES parçalanma hızı} \quad ES = (k_{-1}+k_2)[ES] \quad (2.3)$$

Oluşum ve parçalanma hızları eşitlendiğinde;

$$k_1[E][S] = (k_{-1}+k_2)[ES] \quad (2.4)$$

$$[E][S]/[ES] = (k_{-1}+k_2)/k_1 \quad (2.5)$$

Michaelis sabiti adı verilen yeni bir  $K_m$  tanımlanarak sadeleştirilmiştir.

$$K_m = \frac{k_{-1}+k_2}{k_1} \quad (2.6)$$

$K_m$ , enzim-substrat etkileşimlerinin önemli bir özelliğidir ve enzim ve substrat konsantrasyonlarından bağımsızdır.  $K_m$ , enzim katalizli bir reaksiyonların önemli bir özelliğidir.

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (2.7)$$

Etkilenmemiş enzimin konsantrasyonu  $[E]$ , toplam enzim konsantrasyonu  $[E]_T$  ile ES kompleksi konsantrasyonu farklarına eşittir.

$$[E] = [E]_T - [ES] \quad (2.8)$$

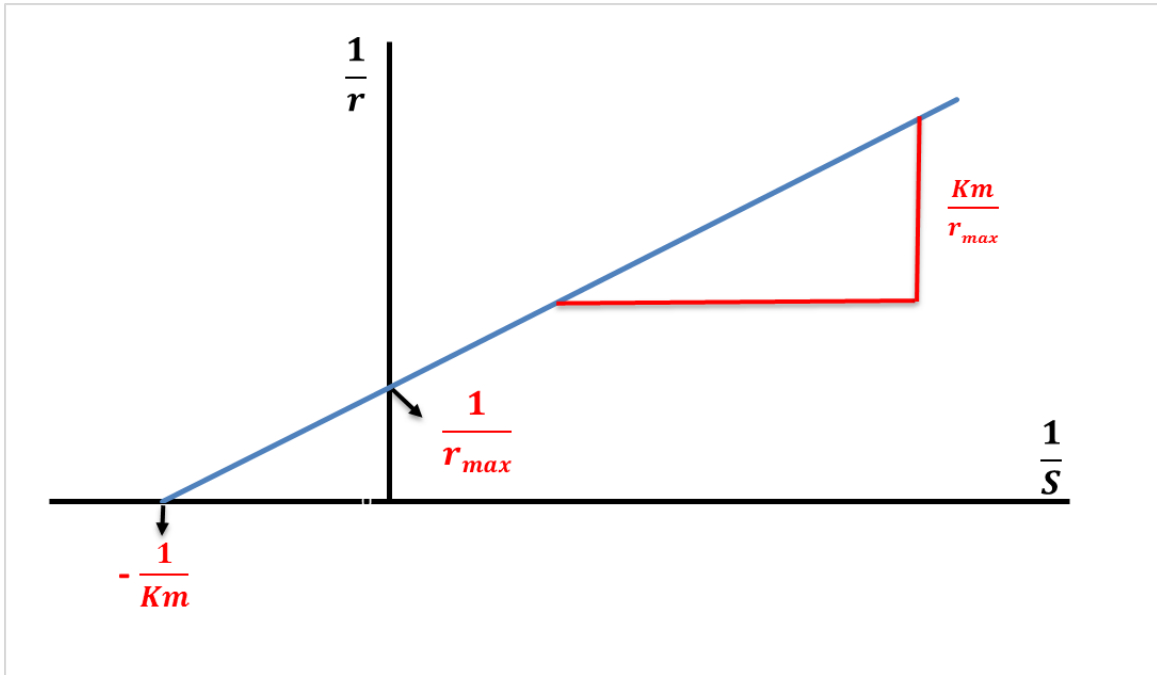
$$[ES] = [E]_T \frac{[S]}{[S]+K_m} \quad (2.9)$$

$$r_{\max} = k_2 [E]_T \quad (2.10)$$

$$r_0 = r_{\max} \frac{[S]}{[S]+K_m} \quad (2.11)$$

Bu denklem, Şekil 2.8'de verilen kinetik verileri açıklar. Çok düşük substrat konsantrasyonunda reaksiyon hızı, substrat konsantrasyonuyla doğrudan orantılıdır [73].

$K_m$  ve  $r_{max}$  hesaplamaları yapmak için Michaelis-Menten denklemini lineerleştiren Lineweaver–Burk grafiği, Eadie–Hofstee çizimi ve Hanes–Woolf grafiği gibi grafik yöntemleri kullanılmaktadır. Şekil 2.8 ve Eşitlik 2.12'de Lineweaver–Burk grafiği ve Michaelis-Menten denkleminin düzenlenmiş hali verilmiştir [73, 74].



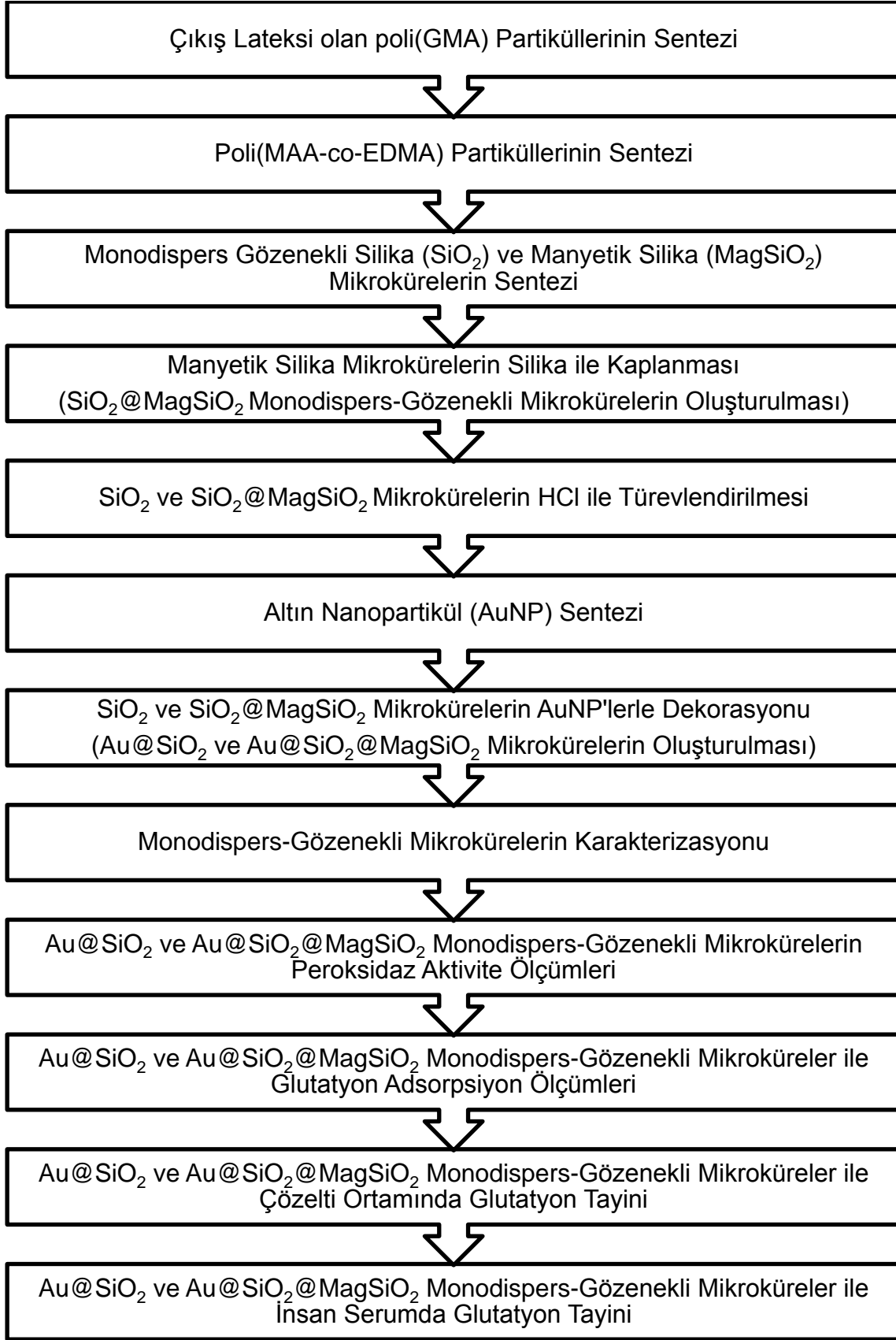
Şekil 2.8. Lineweaver–Burk grafiği [74].

$$\frac{1}{r} = \frac{K_m}{r_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{r_{max}} \quad (2.12)$$

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında immobilize formda AuNP içeren ve peroksidaz aktivitesine sahip monodispers-gözenekli formda manyetik  $\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$  ve manyetik olmayan  $\text{SiO}_2$  mikrokürelerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Yüzeğe immobilizasyonu yapılacak olan AuNP'lerin sentezi için Türkevich yöntemi kullanılmıştır. Yüzeyi AuNP ile modifiye edilen ve edilmeyen  $\text{SiO}_2$  mikrokürelerin yüzey özellikleri ve boy dağılımı SEM kullanılarak incelenmiştir. EDX kullanılarak mikrokürelerin yüzey bileşimleri ve XRD kullanılarak mikrokürelerin kimyasal yapısı incelenmiştir. Manyetik mikrokürelerin manyetizasyon davranışları ve doygunluk manyetizasyon değerleri VSM kullanılarak elde edilmiştir. Mikrokürelerin peroksidaz aktiviteleri substrat olarak o-fenilendiamin (OPD) kullanımıyla belirlenmiştir. Çalışmada substrat, mikroküre ve ortam pH değeri değiştirilerek bu değişimlerin peroksidaz aktivitesine etkisi incelenmiştir. Peroksidaz aktivite ölçümleri UV-görünür bölge spektrofotometresi ile yapılmıştır. GSH biyomolekülünün mikroküre yüzeyine adsorpsiyonu HPLC yardımıyla tespit edilmiştir. Peroksidaz aktivitesi yönünden en uygun koşullar kullanılarak, çözelti ortamında ve insan serumu içerisinde GSH tayini yapılmıştır. Tez kapsamında yapılan çalışmaların genel akışı Şekil 3.1'de verilmiştir.





Şekil 3.1. Tez kapsamında yapılan çalışmaların genel akışı.

### **3.1. İmmobilize Formda AuNP İçeren ve Peroksidaz Aktivitesine Sahip Monodispers-Gözenekli Mikrokürelerin Sentezi**

#### **3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

Monodispers gözenekli SiO<sub>2</sub> mikrokürelerin sentezi için monomer olarak glisidil metakrilat (GMA) ve metakrilik asit (MAA), çapraz bağlayıcı olarak etilen dimetakrilat (EDMA) kullanılmıştır. Sentezde kullanılan tetraetoksisilan (TEOS), izopropanol, poli(vinil pirolidon) (PVP K-30), tetrabutilamonyum iyodat (TBAI), poli(vinil alkol) (PVA) ve sodyum lauril sülfat (SLS) kimyasalları, yukarıda bahsedilen monomer ve başlatıcıların hepsi Sigma-Aldrich Co., ABD firmasından alınmıştır. Etanol, etil benzen ve tetrahidrofuran (THF) Riedel De Haen firmasından alınmıştır. Başlatıcı olarak kullanılan 2,2'- azobisisobütironitril (AIBN) ve benzoil peroksit (BPO) Across Organics'ten temin edilmiştir. Manyetik mikroküre oluşturmak için kullanılan demir (III) klorür heksahidrat (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, Fe<sup>+3</sup>) ve demir (II) klorür tetrahidrat (FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, Fe<sup>+2</sup>) tuzları Sigma-Aldrich Co., ABD'den alınmıştır.

Amin grupları içeren SiO<sub>2</sub> ve MagSiO<sub>2</sub> mikroküre elde etmek amacıyla kullanılan aminopropiltrietoksisilan (APTES) ve trietilamin (TEA) ve çözücü olarak kullanılan isopropanol (Is-PrOH, HPLC grade) Sigma Aldrich Co., ABD firmasından temin edilmiştir. Sentez için kullanılan kloroaurik asit-trihidrat (HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O), trisodyum sitrat (TSS) , sodyum borohidrid (NaBH<sub>4</sub>) kimyasalları ve çözelti hazırlamak için kullanılan sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl) Sigma Chemical Co., ABD firmasından temin edilmiştir. Bütün sentez aşamalarında Direct-Q®3 UV System, Millipore S.A.S, Molsheim, Fransa sisteminden elde edilen distile-deiyonize (DDI) su kullanılmıştır.

#### **3.1.2. Monodispers Gözenek Yapılı SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Sentezi**

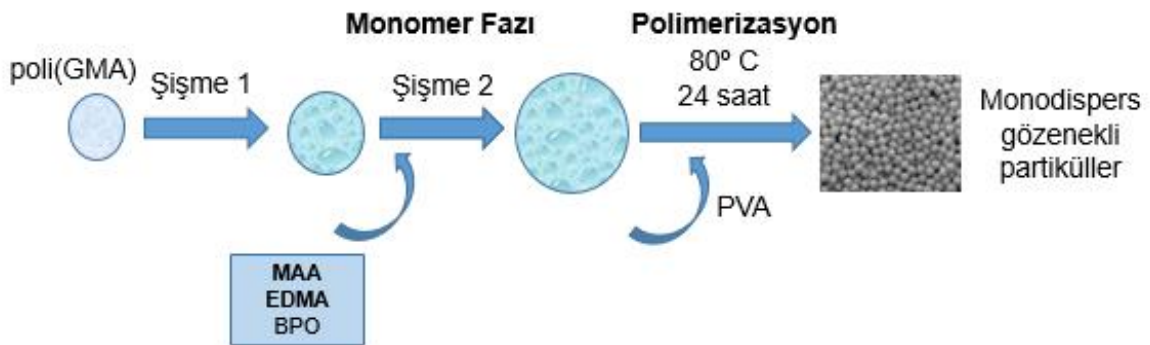
##### **3.1.2.1. GMA Polimerinin Sentezi**

GMA monomeri ile dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak monodispers yapıda poli(GMA) partikülleri sentezlenmiştir. Reaksiyon cam reaktör içerisinde gerçekleştirilmiştir. 30 mL etanolün içerisine 0,45 g

Polyvinylpyrrolidone K-30 (PVP K-30) eklenip çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra 3 mL GMA ve başlatıcı olarak 0,24 g AIBN eklenerek ultrasonik su banyosunda (Elma LC 30, Germany) tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Cam reaktör, çalkalamalı su banyosunda (Memmert, Germany) sabitlenerek 24 saat boyunca 70°C'de, 120 cpm çalkalama hızıyla karıştırılmıştır ve polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonrasında, reaktör oda sıcaklığında soğutulmuştur. Sentezlenen polimer 3 defa sırasıyla etanol ve DDI su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi yapılırken polimer karışımına su ya da etanol eklenerek karıştırılmış ve ardından santrifüj yardımıyla (Hettich Universal 320 R, Germany) çöktürülerek üstte kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi sonrasında, polimer 10 mL su içerisinde ultrasonikasyon ile dağıtılmıştır. Dağıtılan polimer çözeltisinden 1 mL hacimde çözelti alınarak, 70°C sıcaklıkta 24 saat vakum altında kurutulmuştur ve kurutulan partikülün katı içeriği gravimetrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir.

### 3.1.2.2. Çok Basamaklı Mikrosüspansiyon Polimerizasyon Metodu ile Gözenekli Monodispers Partiküllerin Sentezi

Çıkış lateksi olarak kullanılan GMA polimerinin sentezlenmesinden sonra gözenekli mikroküreler çok basamaklı mikrosüspansiyon metodu ile üretilmiştir. Metot, Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

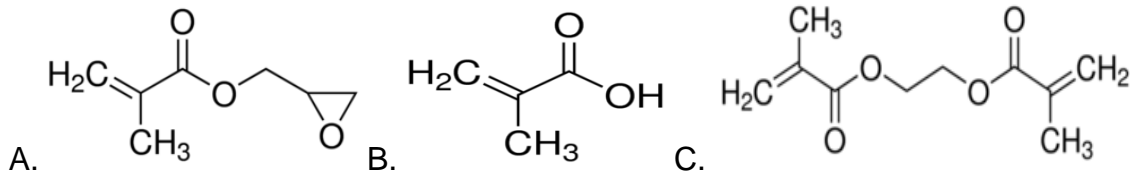


Şekil 3.2. Monodispers gözenekli partiküllerin sentezi [75].

Öncelikle %0,25 SLS içeren 50 mL sulu çözelti içerisine 3,5 mL etil benzen ilave edilmiştir. Etil benzen burada gözenek oluşturucu özelliğe sahiptir. İlave işleminin

ardından çözelti 5 dakika sonikasyona (200 W) tabi tutulmuştur. Sonikasyon ile gözenek oluşturucu etil benzenin dağılımı sağlandıktan sonra ortama 0,3 g poli(GMA) ilave edilip, sonike edilmiştir. Etil benzen içeren çözelti ve poli(GMA) 25 °C oda sıcaklığında 24 saat manyetik karıştırıcı(IKA RO 10, Almanya) ile karıştırılarak polimerin şişmesi sağlanmıştır.

%0,25 SLS içeren 50 mL sulu çözelti içerisinde 2 mL MAA monomeri, 4 mL çapraz bağlayıcı EDMA ve 0,25 g polimerizasyon başlatıcısı BPO ilave edilip 5 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur. Şişme işlemi tamamlanmış olan poli(GMA) üzerine dağılması sağlanmış emülsiyon eklenmiştir. 25°C oda sıcaklığında 24 saat manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır. Karıştırmadaki amaç emülsiyonun şişmiş olan çıkış lateksine difüzyonunu sağlamaktır. Karıştırma sonrası 0,8 g PVA içeren 10 mL sulu çözelti ilave edilmiştir. Dispersiyon, sızdırmaz cam reaktör içerisinde alınmıştır. Polimerizasyon işlemi 80°C'de 150 cpm hızında çalkalamalı su banyosunda 24 saatte gerçekleştirilmiştir. Reaktör oda sıcaklığında soğutulmuştur. Soğuma işleminin ardından polimerleşmeyen monomer ve kullanılan solventlerin giderilmesi için 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminde teknik etil alkol ve ayırma işleminde santrifüjleme-dekantasyon yöntemi kullanılmıştır. Yıkama sonrası partiküller 2 defa THF ile ekstrakte edilip aynı şekilde 3 defa etil alkol ile yıkanmıştır. Elde edilen poli(MAA-co-EDMA) etanol içerisinde dağıtılmıştır.



Şekil 3.3. Çıkış lateksinde monomer olarak kullanılan (A) GMA ve (B) MAA ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan (C) EDMA.

### 3.1.2.3. SiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Sentezi

Çok basamaklı hidroliz kondenzasyon metodu kullanılarak silika sentezlenmiştir. 50 mL Iso-PrOH ve 5 mL DDI su içeren ortama 0,25 g TBAI eklenmiştir ve çözünmesi sağlanmıştır. Sonrasında 0,25 mL amonyum hidroksit (NaH<sub>4</sub>OH) ilave

edilmiştir. Sentezlenen 0,4 g poli(MAA-co-EDMA), hazırlanan sıvı içerisinde ultrasonikasyon ile dağıtılmıştır. Dispersiyon oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 400 rpm hızda 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Karışmaya devam eden ortam içerisine % 25 TEOS içeren 5 mL TEOS-Iso-ProOH çözeltisi ilave edilmiştir. Isıtıcı sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmıştır. Çözelti sıcaklığı 30°C'ye ulaştıktan sonra ısıtıcı manyetik karıştırıcıda 400 rpm hız ile 24 saat karıştırma sağlanmıştır. 24 saat tamamlandıktan sonra oluşan silika-polimer kompozit mikropartiküller 2 kez Iso-ProOH ve 2 kez DDI su ile santrifüjleme-dekantasyon metodu kullanılarak yıkanmıştır. Silika kompozit mikroküreler santrifüjlenip, üstte kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Partiküller 70°C'de, 24 saat boyunca etüv içerisinde kurutulmuştur. Son olarak, polimerik yapının uzaklaştırılması ve monodispers-gözenekli yapıda silika mikrokürelerin eldesi için kalsinasyon gerçekleştirilmiştir. Kalsinasyon 450°C sıcaklıkta, hava ortamında 6 saat boyunca yapılmıştır. Böylece polimerik yapı yok olmuştur ve monodispers-gözenekli yapıda silika mikropartiküller elde edilmiştir.

#### **3.1.2.4. MagSiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Sentezi**

Manyetik monodispers ve gözenekli silika mikrokürelerin sentezlenmesinde çok basamaklı hidroliz kondenzasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu sentez işleminde başlangıç kalıp materyali olarak MAA-co-EDMA polimeri kullanılmıştır. Başlangıçta, poli(MAA-co-EDMA) partiküllerine ikili çöktürme işlemi ile manyetizasyon uygulanmıştır. İkili çöktürme sürecinde absorbe Fe<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+3</sup> iyonlarının mikroküreler içerisine bağlanmış Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllere dönüştürülmesi sağlanmıştır. Fe<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+3</sup> iyonları, mikrokürelerde bulunan karboksil grupları ile kompleks oluştururlar. 0,27 g demir (III) klorür heksahidrat ve 0,4 g demir (II) klorür tetrahidrat içeren 50 mL sulu çözelti ortamına 0,7 g poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler ilave edilmiştir ve azot altında oda sıcaklığında 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Ortam 10 dakika boyunca vakumlanarak ortamda bulunan oksijenin uzaklaşması ve Fe<sup>+2</sup> ve Fe<sup>+3</sup> iyonlarının mikroküreler içerisine adsorbsiyonu sağlanmıştır. Ortam sıcaklığı 85°C'ye yükseltilmiştir. Mikrokürelerin gözenekleri içerisinde yer alan demir tuzlarının indirgenmesi için ortama 50 mL derişik amonyak ilave edilmiştir. Demir tuzlarının indirgenmesi sağlanarak Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopatiküllere dönüştürülmüştür. 85°C'deki ortama amonyak

ilavesinin ardından, 1 saat boyunca karıştırılmıştır ve oda sıcaklığında soğuması sağlanmıştır. Manyetik mikroküreler 3 defa DDI su ile kullanılarak yıkanmıştır. Yıkama sırasında manyetik mikroküreler mıknatıs yardımı ile ortandan ayrılmıştır. Yıkama işleminin sonunda mikrokürelerin DDI su içerisinde dağılması sağlanmıştır. Elde edilen manyetik poli(MAA-co-EDMA) mikrokürelere, SiO<sub>2</sub> mikrokürelerin sentezi için kullanılan yöntemin aynısı uygulanarak MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler elde edilmiştir. Yıkama sırasında manyetik mikroküreler mıknatıs ile ortandan ayrılmıştır. Manyetik mikroküreler 70°C'de 24 saat boyunca etüvde kurutulmuştur. Kurutulan mikroküreler 450°C'de 6 saat kalsine edilmiştir. Kalsinasyon işlemi ile polimerik kısmın uzaklaşması sağlanmıştır ve partiküller tekrar DDI su içerisinde dağıtılmıştır.

### **3.1.2.5. Manyetik Silika Mikrokürelerin Silika ile Kaplanması / SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Sentezi**

25 mL Iso-PrOH, 2,5 mL DDI su, 0,125 g TBAI, 0,125 mL NaH<sub>4</sub>OH, 0,2 g MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler sırasıyla otoklav şişesine eklenmiştir. Dispersiyon 25 °C oda sıcaklığında mekanik karıştırıcı ile 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Karışmaya devam eden ortam içerisine hacimce % 50 TEOS içeren 2 mL TEOS-Iso-ProOH çözeltisi damla damla ilave edilmiştir. 40°C'de 24 saat karıştırma işlemine devam edilmiştir. Karıştırma tamamlandıktan sonra oluşan silika-polimer kompozit mikropartiküller 2 kez Iso-PrOH ve 2 kez de DDI su ile santrifüjleme-dekantasyon metodu kullanılarak yıkanmıştır. Silika-polimer kompozit mikropartiküllerin bulunduğu dispersiyon santrifüjlenmiştir, üstte kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Mikroküreler tekrar DDI su içerisinde dağıtılmıştır.

### **3.1.2.6. SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin HCl ile Türevlendirilmesi**

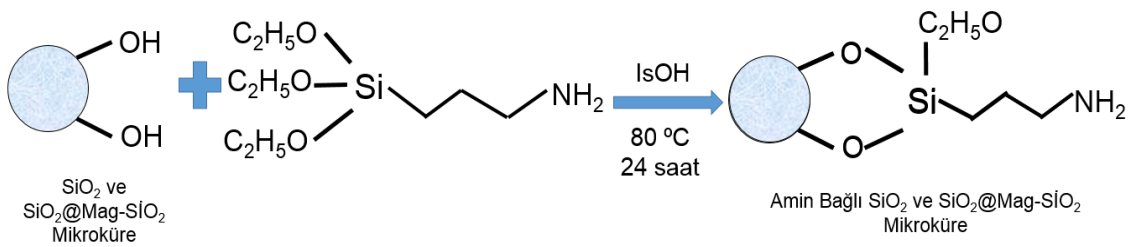
Öncelikle cam reaktöre 0,1 g SiO<sub>2</sub> ya da SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküre koyulmuştur. 3,38 mL HCl, 25 mL hacmine DDI su ile tamamlanmıştır. Oluşturulan HCl su çözeltisi cam reaktöre eklenmiştir. Cam reaktörün ağzı sıkıca kapatılarak, çalkalamalı su banyosunda (Memmert, Germany) sabitlenerek 80 °C'de 6 saat 120 cpm çalkalama hızıyla karıştırılmıştır. Sonrasında dispersiyon, 5000 rpm hızda 5 dakika santrifüjlenmiştir ve yüzeydeki sıvı alınmıştır. 3 kez de DDI su ile

santrifüjleme-dekantasyon metodu kullanılarak yıkanmıştır. Fonksiyonel hidroksil içeren silika mikroküreler 24 saat 60°C'de kurutulmuştur.

### 3.1.3. Monodispers ve Gözenek Yapılı SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin AuNP ile Modifiye Edilmesi

#### 3.1.3.1. Aminopropiltrietoksisilan ile Monodispers-Gözenekli SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Türevlendirilmesi

Monodispers-gözenekli SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelere amin bağlanması için APTES ile tepkime sağlanmıştır, reaksiyon mekanizması Şekil 3.4'de gösterilmiştir. Monodispers gözenekli SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler (0,4 g), APTES ile reaksiyona girmeden önce fiziksel olarak adsorbe edilmiş su buharını çıkarmak için 6 saat boyunca 250°C'de gazdan arındırılmıştır. Mikroküreler (0,4 g) içinde APTES (3 mL) ve TEA (0,3 mL) bulunan Iso-PrOH (20 mL) kapalı bir cam reaktöre eklenmiştir. Ardından, reaktör 24 saat 80 °C'de sıcaklık kontrollü bir çalkalamalı su banyosunda tutulmuştur. Daha sonra, amin bağlanmış SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreleri, fazla APTES'ten ayırmak için mikroküreler sırasıyla Iso-PrOH ve DDI su ile yıkanmıştır ve santrifüjleme işlemi (5000 rpm, 3 dakika boyunca) uygulanarak sıvıdan ayrılmıştır. Sonrasında mikroküreler su içerisinde dağıtılmıştır. Belirli bir hacimdeki amin bağlı SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin miktarları, gravimetrik analiz ile elde edilmiştir.



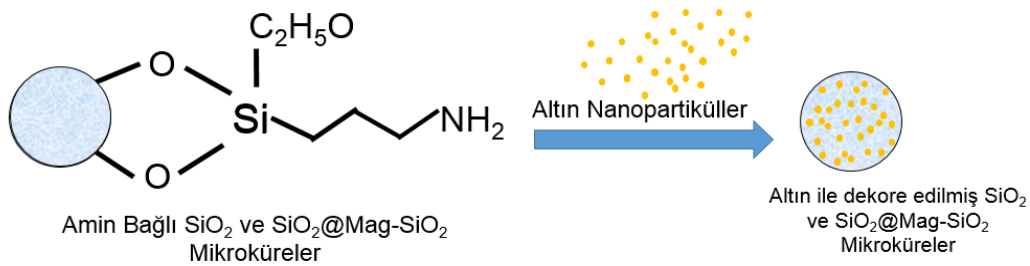
Şekil 3.4. Amin bağlı SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> elde edilmesi [76].

### 3.1.3.2. AuNP Sentezi

AuNP'ler, Türkevich metodu kullanılarak sentezlenmiştir. Sentez sırasında  $Au^{+3}$  AuNP'e indirgenmiştir. 24 mL  $1.0 \times 10^{-3}$  M Bir  $HAuCl_4$  çözeltisi kaynaya kadar ısıtıcıli manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra 2,0 mL TSS çözeltisi (% 1,75 (ağırlık/hacim)) eklenmiştir. Türkevich yönteminde sitrat iyonları hem  $Au^{+3}$ 'ün indirgenmesi hem de sonuçta ortaya çıkan AuNP'lerin su içinde stabilizasyonu için kullanılmıştır. TSS çözeltisi eklenmesinin sonrasında, çözelti rengi 5 dakika içinde koyu kırmızıya dönüşmüştür. Bu renk değişimi altın iyonlarının sitrat ile indirgenmesinin tamamlandığını gösterir. Kaynama 15 dakika daha sürdürülmüştür. Daha sonra, çözelti sonra oda sıcaklığına alınarak soğuyuncaya kadar 250 rpm'de manyetik olarak karıştırılmıştır.

### 3.1.3.3. Monodispers-Gözenekli $SiO_2$ ve $SiO_2@MagSiO_2$ Mikrokürelerin Altın Nanopartiküller ile Dekorasyonu / $Au@SiO_2$ ve $Au@SiO_2@MagSiO_2$ Mikrokürelerin Oluşturulması

AuNP'lerle monodispers gözenekli  $SiO_2$  ve  $SiO_2@MagSiO_2$  mikrokürelerin dekorasyonu için, amin grubu bağlı  $SiO_2$  ve  $SiO_2@MagSiO_2$  mikrokürelere elde edilen AuNP çözeltisi ilave edilmiştir ve 250 rpm'de oda sıcaklığında 6 saat karıştırılmıştır. Mikroküreler su içerisinde dağıtılmıştır. Belirli bir hacimdeki altın bağlı mikrokürelerin miktarı, gravimetrik analiz ile elde edilmiştir. Reaksiyonun görseli Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.5.  $SiO_2$  ve  $SiO_2@MagSiO_2$  mikrokürelerin AuNP'ler ile dekorasyonu [77].



## **3.2. Monodispers-Gözenekli SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin ve Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Karakterizasyonu**

### **3.2.1. Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçümü**

Sentezlenen SiO<sub>2</sub> mikrokürelerin ve yüzeyine AuNP immobilize edilmiş Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin özgül yüzey alanı ve gözenek boyutu dağılımı ölçümleri Quantochrome, Nova 2200e cihazında yapılmıştır. Ölçüm öncesi mikroküreler 80°C'de 24 saat süresince kurutulmuştur. Sonrasında yaklaşık 0,05 g mikroküre cihazın örnek portuna yerleştirilmiştir ve 6 saat boyunca 250 °C sıcaklık altında vakumlanarak nemin uzaklaşması sağlanmıştır. Özgül yüzey alanı ve gözenek boyutu dağılımı ölçümleri 77 K'de sıvı azot içerisinde yer alan örnek haznesinde yapılmıştır. Cihazın ölçümü azotun buhar basıncı ile mikrokürelerin azot adsorpsiyonunun miktarının ölçülmesi prensibine dayanır. BET cihazı ile mikrokürelerin spesifik yüzey alanları ile gözenek boyutu dağılım eğrileri elde edilmiştir .

### **3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)**

Sentezlenen SiO<sub>2</sub> mikrokürelerinin ve AuNP immobilize edilmiş SiO<sub>2</sub> mikrokürelerinin yüzey morfolojisi ve boyut dağılımı özellikleri SEM cihazı (FEI, Quanta 200 FEG, ABD) ile belirlenmiştir. Numune hazırlama aşamasında, belirli miktarda kurutulmuş mikroküre, birkaç dakika boyunca sonikasyonla ağırlıkça % 0,1 derişimde SLS sulu çözeltisinde dağıtılmıştır. Daha sonra dispersiyon karbon bant üzerine damlatılmıştır ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulmuş numuneler fiziksel buhar biriktirme yöntemi kullanılarak altınla kaplanmıştır. Numunelerin altın ile kaplanmasındaki amaç görüntü alınırken iletkenliğin sağlanmasıdır. Mikrokürelere 5000-100000X arasında büyütme yapılarak SEM cihazı ile fotoğraflanmıştır. Her bir numune için alınmış SEM görüntüsünde yaklaşık 50 - 100 adet mikroküre ölçülerek, ortalama çap D<sub>n</sub> (µm) bulunmuştur ve boy dağılımı için değişim katsayısı CV (%) değerleri Eşitlik 3.1 ve 3.2'de yer alan denklemler kullanılarak hesaplanmıştır. N<sub>i</sub>, D<sub>i</sub> çapına sahip mikroküre sayısını, N<sub>T</sub> toplam mikroküre sayısını ifade etmektedir. CV değeri mikrokürenin monodispers özelliği ile ilgili bilgi verir.

$$D_n = \sum N_i D_i / \sum N_i \quad (3.1)$$

$$CV = [(\sum N_i (D_i - D_n)^2 / [N_T - 1])^{1/2} / D_n] \times 100 \quad (3.2)$$

Ayrıca SiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin yüzeyinde yer alan atomların miktarlarını tespit etmek amacıyla enerji saçılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) kullanılmıştır.

### 3.2.3. Titreşimli Örnek Manyetometri Analizi

Manyetik mikrokürelerin manyetik özelliklerine VSM cihazı (Cryogenic Limited, PPM System, İngiltere) ile bakılmıştır. Analizde, mikrokürelerin manyetizasyon davranışı ve doygunluk magnetizasyon değerleri tayin edilmiştir. Ölçüm öncesi manyetik mikrokürelerin (SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub>) 24 saat 80°C'de etüvde kuruması sağlanmıştır. Ölçüm için numune cihazın örnek haznesine yerleştirilmiştir. Cihaz içerisindeki süper iletken mıknatıs yardımı ile oda sıcaklığında manyetizasyon eğrileri elde edilmiştir.

### 3.2.4. X Işını Kırınım Yöntemi

Mikrokürelerin kimyasal yapıları XRD (Rigaku, D/Max-2200, ABD) kullanılarak incelenmiştir. Ölçüm öncesi mikrokürelerin 24 saat 80 °C'de etüvde kuruması sağlanmıştır. Kurutulan numuneler cihazın örnek diski üzerine konulmuştur ve analiz gerçekleştirilmiştir. X-ışını kırınım yöntemi, her bir malzemenin kendine özgü atomik dizilimleri ile bağlantılı olarak, X-ışınlarını karakteristik şekilde kırması esasına dayanır. Bu nedenle her malzemenin kendine özgü kırınım deseni bulunmaktadır.

### **3.3. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikroküreler ile Peroksidaz Aktivite Ölçümleri ve GSH Tayini**

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

Peroksidaz aktivitelerinin ölçümünde substrat olarak kullanılan OPD(o-fenilendiamin), tampon çözelti hazırlamak için kullanılan HEPES (4-(2-Hidroksietil) piperazin-1-etansülfonik asit), hidrojen peroksit (% 50), hidroklorik asit (%37), insan serumu Sigma Aldrich Co., ABD firmasından temin edilmiştir. Tayini yapılan biyomolekül olan “L-glutatyon reduced” (GSH) Sigma Aldrich Co., ABD firmasından alınmıştır. Fosfat tamponu hazırlamak için kullanılan mono sodyum fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Riedel-de Haën, Almanya ve di-sodyum hidrojen fosfat dodekahidrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O) Merck, Almanya firmasından temin edilmiştir. Sitrat tamponu hazırlamak için kullanılan sitrik asit monohidrat (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O) ve Sodyum sitrat tribazik dihidrat (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O) Sigma Aldrich Co., ABD firmasından temin edilmiştir. Bütün aşamalarda kullanılan DDI su, Direct-Q®3 UV System, Millipore S.A.S, Molsheim, Fransa sisteminden elde edilmiştir.

#### **3.3.2. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Değişen Ortam pH Değerleri için Peroksidaz Aktivitesi Ölçümleri**

Sentezlenen mikroküreler ile yapılan peroksidaz aktivite ölçümleri farklı pH değerlerine sahip ortamlarda yapılarak, pH değişiminin peroksidaz aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. pH 4 ve pH 5 çözeltisi için 50 mM sitrat tamponu, pH 6 ve pH 7 çözeltisi 50 mM fosfat tamponu ve pH 8 ve pH 9 çözeltisi için 50 mM HEPES tamponu kullanılmıştır. Mikroküreler (10 mg) belirlenen pH değerlerindeki tamponlar ile 2 kere yıkanmıştır. Yıkama sırasında manyetik mikroküreler için mıknatıs ile ayırma yöntemi kullanılırken, manyetik olmayan mikroküreler santrifüj yardımıyla (5000 rpm, 5 dakika) çöktürülmüştür. Dispersiyondan ayrılan mikroküreler 4 mL belirlenen pH değerlerinde hazırlanmış 400 µM OPD çözeltisine ilave edilmiştir ve oluşan dispersiyona 2 µL hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50% a/a) eklenmiştir. Hidrojen peroksit ilavesi reaksiyon başlangıcı olarak kabul edilmiştir. OPD çözeltisini ışıktan koruma amaçlı olarak çözeltinin bulunduğu kapların dışları alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Dispersiyon belirlenen sürelerde (5 - 90 dakika aralığında) rotatorda (120 cpm)

karıştırılmıştır. Belirlenen süreler tamamlandıktan sonra sıvı mikroküreden ayrılmıştır ve sıvının UV-görünür bölge spektrofotometresi ile (UV-Vis, Shimadzu, UV-1601, Japonya) 300-600 nm dalga boyu aralığında absorbans taraması yapılmıştır. Ölçümler belirlenen farklı pH ortamları ve Au@SiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için tekrarlanmıştır. Elde edilen absorbans değerleri yardımıyla Eşitlik 3.3 - 3.8'te, OPD tüketim hızının hesaplanması için denklem türetilmiştir. Eşitlik 3.8 kullanılarak OPD tüketim hızı hesaplanmıştır. C<sub>0</sub>, t=0 anındaki OPD konsantrasyonunu, C ile ifade edilen t anındaki OPD konsantrasyonunu, -r OPD tüketim hızını, A absorbansı ve A<sub>f</sub> absorbansın platoya ulaştığı değeri göstermektedir.

$$C = C_0 \cdot x \quad (3.3)$$

$$\frac{dC}{dt} = C_0 \cdot \frac{dx}{dt} \quad (3.4)$$

$$x = \frac{A}{A_f} \quad (3.5)$$

$$-r = \frac{C_0}{A_f} \cdot \frac{dA}{dt} \quad (3.6)$$

$$\frac{dA}{dt} = \frac{A(t) - A(0)}{t} \quad (3.7)$$

$$-r = \frac{C_0}{A_f} \cdot \frac{A(t) - A(0)}{t} \quad (3.8)$$

### 3.3.3. Değişen Substrat Derişimi için Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Peroksidaz Aktivite Ölçümleri

Bu deneyler sırasında substrat olarak kullanılan OPD'nin konsantrasyonunun peroksidaz aktivitesine etkisi gözlemlenmiştir. Substrat derişiminin peroksidaz aktivitesine etkisini görmek amacıyla yapılan ölçümler pH 7 ortamında gerçekleştirilmiştir. Mikroküreler (10 mg) pH 7 fosfat tamponu ile 2 kere

yıkanmıştır. Yıkama sonrasında dispersiyondan ayrılan mikroküreler 4 mL, pH 7, 50 mM fosfat tamponu ile hazırlanmış 50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM, 400 µM, 500 µM OPD çözeltilerine ilave edilmiştir. Oluşan dispersiyona 2 µL hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50% a/a) eklenmiştir. Hidrojen peroksit ilavesi reaksiyon başlangıcı olarak kabul edilmiştir. OPD çözeltilerini ışıktan koruma amaçlı olarak çözeltilerin bulunduğu kapların dışları alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Dispersiyon belirlenen sürelerde (5 - 90 dakika aralığında) rotatorda (120 cpm) karıştırılmıştır. Belirlenen süreler tamamlandıktan sonra sıvı mikroküreden ayrılmıştır ve sıvının UV-görünür bölge spektrofotometresi ile 300-600 nm dalga boyu aralığında absorbans taraması yapılmıştır. Ölçümler Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için yapılmıştır. Daha sonra patikülden ayrılan yani ölçümleri yapılan 4 mL sıvı içerisine 3 M, 100 µL HCl çözeltisi ilave edilmiştir. Çözelti vortekslenmiştir ve 10 dakika beklenerek tekrar 300-600 nm dalga boyu aralığında absorbans taraması yapılmıştır. Elde edilen veriler ve Eşitlik 3.8 kullanılarak OPD tüketim hızı hesaplanmıştır. Veriler Lineweaver–Burk grafiği ile düzenlenmiştir, maksimum reaksiyon hızı ve reaksiyon için Michaelis-Menten sabiti hesaplanmıştır.

#### **3.3.4. Farklı Au@SiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Miktarları için Peroksidaz Aktivite Ölçümleri**

Mikroküre miktarının değişimi için aktivite ölçümleri pH 7 ortamında gerçekleştirilmiştir. Farklı miktarlardaki mikroküreler (1 mg, 2 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg) pH 7 fosfat tamponu ile 2 kere yıkanmıştır. Yıkama sonrasında dispersiyondan ayrılan mikroküreler 4 mL, pH 7, 50 mM fosfat tamponu ile hazırlanmış 400 µM OPD çözeltisine ilave edilmiştir ve oluşan dispersiyona 2 µL hidrojen peroksit(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50% a/a) eklenmiştir. Dispersiyon sonunda oluşan sorbent konsantrasyonu sırasıyla 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5 mg/ml'dir. Hidrojen peroksit ilavesi reaksiyon başlangıcı olarak kabul edilmiştir. OPD çözeltilerinin bulunduğu kapların dışları ışıktan koruma amaçlı olarak alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Dispersiyon belirlenen sürelerde (5 - 90 dakika aralığında) rotatorda (120 cpm) karıştırılmıştır. Belirlenen süreler tamamlandıktan sonra sıvı mikroküreden ayrılmıştır. Ayrılan sıvının UV-görünür bölge spektrofotometresi ile (UV-Vis, Shimadzu, UV-1601, Japonya) 300-600 nm

dalga boyu aralığında absorbans taraması yapılmıştır. Ölçümler Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için yapılmıştır. Daha sonra partikülden ayrılan yani ölçümleri yapılan 4 mL sıvı içerisine 3 M, 100 µL HCl (3 M, 100 µL) ilave edilmiştir. Çözelti vortekslenmiştir ve 10 dakika beklenerek tekrar 300-600 nm dalga boyu aralığında absorbans taraması yapılmıştır. Elde edilen veriler kullanılarak OPD tüketim hızı hesaplanmıştır.

### 3.3.5. Glutasyonun Au@SiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikroküre Yüzeylerine Adsorpsiyonunun Ölçülmesi

10 mg Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler 50 mM pH 7 fosfat tamponu ile 4 defa yıkanmıştır. 50 mM pH 7 fosfat tamponu ile 5 mL 0,25 - 6 mg/mL (813 µM – 19523 µM) arasında değişen konsantrasyonlarda GSH çözeltisi hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan GSH çözeltisinin 4 mL'si ile yıkanan mikroküreler 2 saat rotatorda karıştırılmıştır ve adsorpsiyon sağlanmıştır.

Karıştırmanın sonrasında, sıvı ve mikroküreler ayrılmıştır. Manyetik mikroküreler için mıknatıs ile ayırma yöntemi kullanılırken, manyetik olmayan mikroküreler santrifüj ile (5000 rpm, 5 dakika) çöktürülmüştür. Partikülden ayrılan sıvıların ve partikülle etkileşmeyen 1 mL ayrılmış olan GSH çözeltilerinin ölçümleri HPLC (Shimadzu, SPD-10 AV, UV, Japonya) ile yapılmıştır. Kromatografik koşullar Çizelge 3.1'de vermiştir.

Çizelge 3.1. Kromatografik koşullar

Koşullar	Özellikler
Kolon	Phenomenex, SphereClone 5u Silica, 250x4,60 mm, 5 µm
Mobil Faz	Asetonitril/Su (10/90, h/h)
Akış hızı	0,5 mL/dakika
Dalga Boyu	214 nm

Konsantrasyonları 0,25 - 6 mg/mL (813  $\mu$ M – 19523  $\mu$ M) aralığında değişen GSH çözeltilerinin HPLC kolonuna gönderilmesi ile elde edilen kromatogramların alan değerleri  $A_0$ , adsorbsiyon sonrası partikülden ayrılan sıvı kısımlar için HPLC'den elde edilen kromatogramların alan değerleri  $A_f$  olarak kayıt edilmiştir. Eşitlik 3.9 kullanılarak 1 g mikroküreye adsorblanan GSH miktarı,  $Q$  (mg/g) hesaplanmıştır.  $C$  (mg/mL) olarak tanımlanan GSH konsantrasyonu,  $V$  (mL) adsorpsiyonun gerçekleştiği çözeltilinin hacmi,  $m_p$  (g) olarak tanımlanan partikül miktarıdır. Ölçüm ve hesaplamalar  $Au@SiO_2$  ve  $Au@SiO_2@MagSiO_2$  mikroküreler için yapılmıştır.

$$Q = \frac{\left(\frac{A_0 - A_f}{A_0}\right) \times C \times V}{m_p} \quad (3.9)$$

### 3.3.6. $Au@SiO_2$ ve $Au@SiO_2@MagSiO_2$ Mikrokürelerin GSH Tayininde Kullanılması

$Au@SiO_2$  ve  $Au@SiO_2@MagSiO_2$  mikroküreler (10 mg), 50 mM pH 7 fosfat tamponu ile 3 kere yıkanmıştır. Yıkama sırasında manyetik mikroküreler için mıknatıs ile ayırma yöntemi kullanılırken, manyetik olmayan mikroküreler santrifüj yardımıyla (5000 rpm, 5 dakika) çöktürülmüştür. 0,1 - 5 mg/mL (325 - 16269  $\mu$ M) derişim aralığında 3 mL GSH çözeltisi 50 mM pH 7 fosfat tamponu ile hazırlanmıştır. GSH çözeltileri içerisine yıkanan mikroküreler ilave edilmiştir ve 2 saat rotatorda karıştırılarak GSH'ın mikrokürelere adsorpsiyonu sağlanmıştır. İki saatin sonunda çözeltiliye 1 mL 1600  $\mu$ M OPD çözeltisi ve 2  $\mu$ L  $H_2O_2$  ilave edilmiştir. Son dispersiyondaki OPD konsantrasyonu 400  $\mu$ M olarak elde edilmiştir. OPD çözeltisinin bulunduğu kapların dışları ışıktan koruma amaçlı olarak alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Hidrojen peroksit ilavesi reaksiyon başlangıcı olarak kabul edilmiştir ve reaksiyonun tamamlanması için dispersiyon 90 dakika rotatorda karıştırılmıştır. 90 dakikanın sonunda sıvı mikroküreden ayrılmıştır ve sıvının UV-görünür bölge spektrofotometre ile (UV-Vis, Shimadzu, UV-1601, Japonya) 300-600 nm dalga boyu aralığında absorbans taraması yapılmıştır.

### 3.3.7. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikroküreler ile İnsan Serumunda GSH Tayini

İnsan serumu 10000 rpm'de 10 dakika süre ile üç defa santrifüjlenmiştir. Üstte kalan sıvı, 50 mM pH 7 fosfat tamponu ile 1000 kat seyreltilmiştir. Seyreltilen insan serumu ile 2,5 µM - 50 µM derişim aralığında GSH çözeltisi hazırlanmıştır. 3 kere 50 mM pH 7 fosfat tamponu ile yıkanan 2 mg Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler hazırlanan GSH çözeltilerine ilave edilmiştir ve 2 saat rotatorda karıştırılarak GSH mikrokürelere adsorpsiyonu sağlanmıştır. 2 saatin sonunda çözeltiliye 1 mL 1600 µM OPD çözeltisi ve 2 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilmiştir. Son dispersiyondaki OPD konsantrasyonu 400 µM olarak elde edilmiştir. OPD çözeltisinin bulunduğu kapların dışları ışıktan koruma amaçlı olarak alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Hidrojen peroksit ilavesi reaksiyon başlangıcı olarak kabul edilmiştir ve reaksiyonun tamamlanması için dispersiyon 90 dakika boyunca rotatorda karıştırılmıştır. 90 dakikanın sonunda sıvı mikroküreden ayrılmıştır ve sıvının UV-görünür bölge spektrofotometresi ile (Thermo Scientific, Genesys, UV-Vis spektrofotometre, ABD) 300-600 nm dalga boyu aralığında absorbans taraması yapılmıştır.



## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

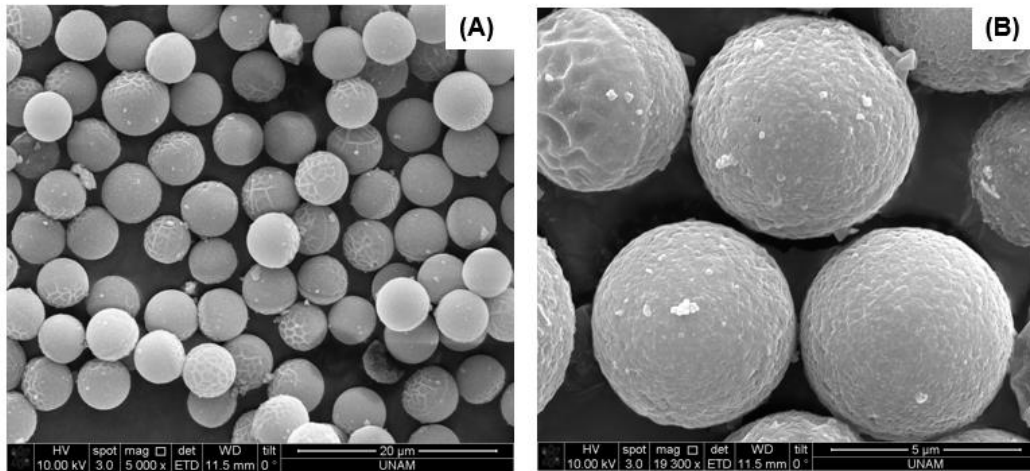
Tez kapsamında;  $Au@SiO_2$  ve  $Au@SiO_2@MagSiO_2$  mikrokürelerin karakterizasyon sonuçları, değişen reaksiyon koşulları altında peroksidaz aktivitesi ölçüm sonuçları,  $Au@SiO_2$  ve  $Au@SiO_2@MagSiO_2$  mikroküre yüzeyine GSH adsorbsiyonunun sonuçları ve GSH'nun kolorimetrik tayininde kullanılmasına ait sonuçlar elde edilmiştir.

### 4.1. Monodispers-Gözenekli $SiO_2$ , $SiO_2@MagSiO_2$ , $Au@SiO_2$ ve $Au@SiO_2@MagSiO_2$ Mikrokürelerin Karakterizasyonu

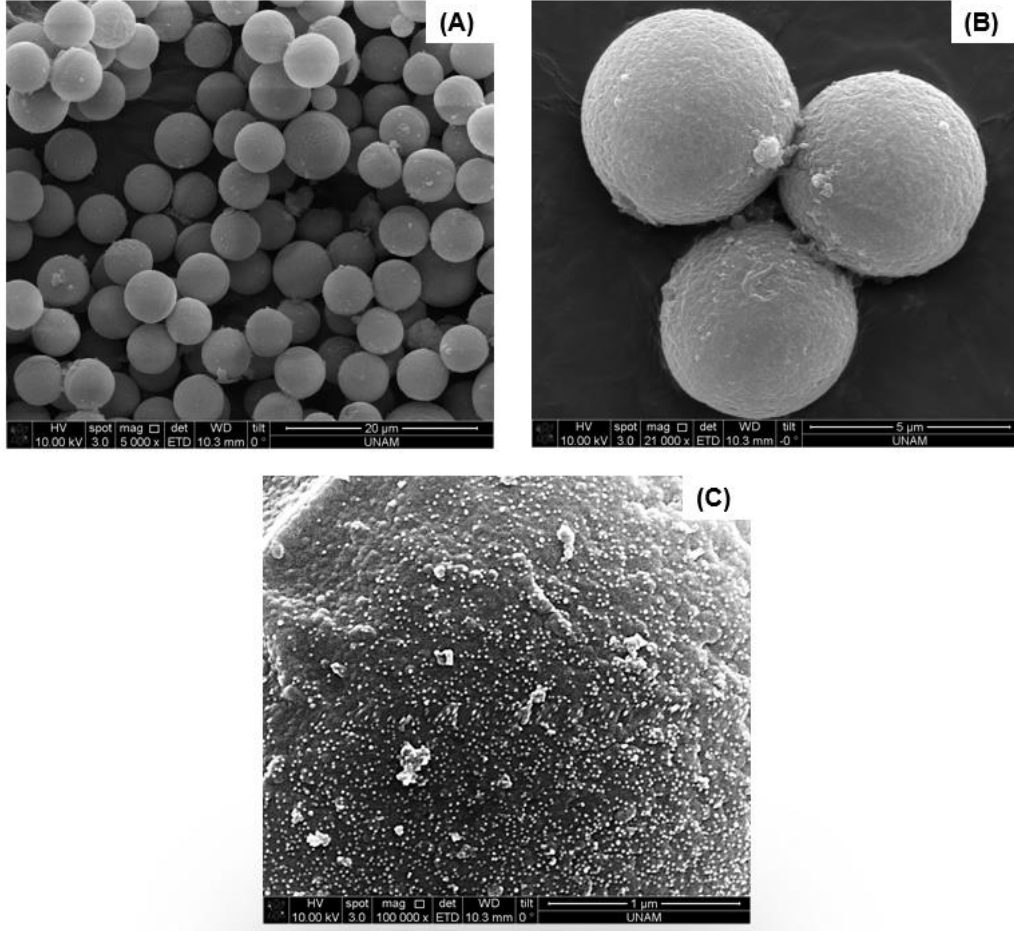
İlk kısımda yüzeyine altın immobilize edilmek üzere sentezlenen  $SiO_2$ ,  $SiO_2@MagSiO_2$  mikrokürelerin ve yüzeyine altın immobilize edilmiş  $Au@SiO_2$ ,  $Au@SiO_2@MagSiO_2$  mikrokürelerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Mikrokürelerin yüzey özellikleri, boyut dağılımı, parçacık büyüklüğü, yüzey alanı ve manyetik özellikleri incelenmiştir.

#### 4.1.1. Monodispers-Gözenekli Mikrokürelerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri

$SiO_2$  ve  $Au@SiO_2$  mikrokürelerin yüzey morfolojisi, ortalama boy ve boy dağılımını gösteren SEM fotoğrafları Şekil 4.1 ve 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1.  $SiO_2$  mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı (A) 5000X (B) 19300X.



Şekil 4.2. Yüzeyine AuNP immobilize edilmiş Au@SiO<sub>2</sub> mikrokürelerin SEM görüntüleri. Büyütme oranı (A) 5000X (B) 21000X (C) 100000X.

Çizelge 4.1’de SEM ölçümleri ile elde edilen SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub> mikrokürelere ait sayıca ortalama çap değerleri ve boy dağılımı için değişim katsayıları gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. SiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub> mikrokürelerin boyut özellikleri

Mikroküre	Dn (µm)	Cv (%)
SiO <sub>2</sub>	5,38	4,22
Au@SiO <sub>2</sub>	5,23	4,28

Dn: Sayıca ortalama çap değeri; Cv: Boy dağılımı için değişim katsayısı

SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin yüzeylerindeki atomların % ağırlık ve % atomik değerleri sırasıyla Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te verilmiştir. Mikroküre yüzeylerinde karbon (C) , azot (N), oksijen (O), silisyum (Si), demir (Fe) ve altın (Au) atomlarının varlığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. SiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin yüzeylerindeki atomların EDX yardımıyla bulunan bileşimleri

Mikroküre Çeşidi	% Ağırlık					
	C	N	O	Si	Fe	Au
SiO <sub>2</sub>	23,30	-	49,43	27,27	-	-
Au@SiO <sub>2</sub>	9,74	2,22	52,82	30,70	-	4,53
SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub>	6,23	-	48,77	31,19	13,81	-
Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub>	3,18	0,72	40,43	14,41	40,31	0,95

Çizelge 4.3. SiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin yüzeylerindeki atomların EDX yardımıyla bulunan atom içeriği değerleri

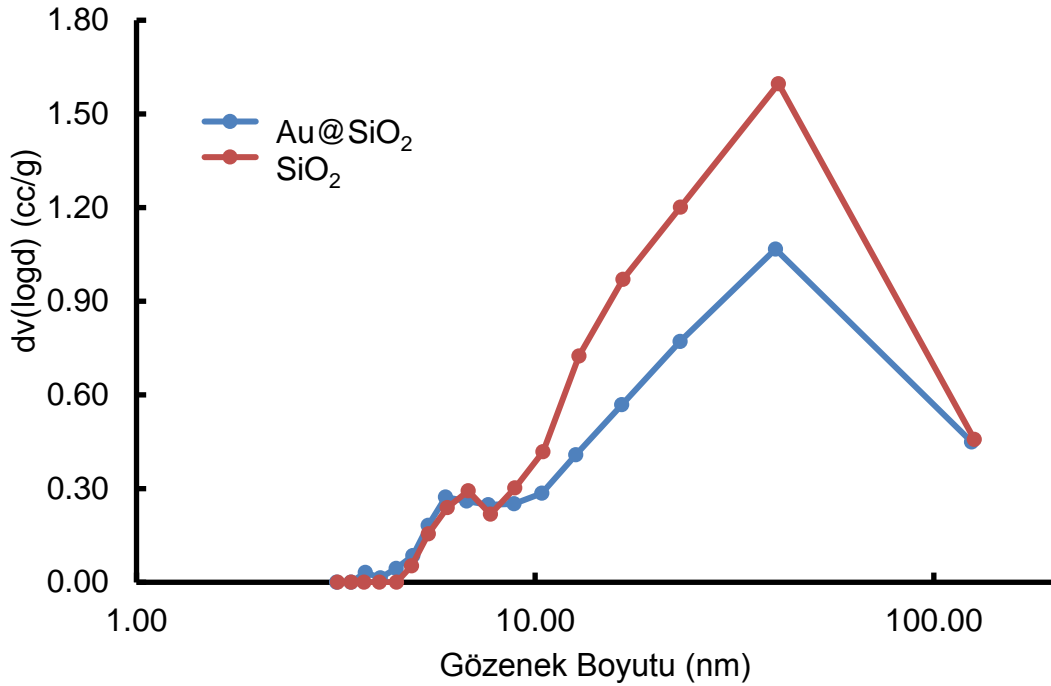
Mikroküre Çeşidi	% Atomik					
	C	N	O	Si	Fe	Au
SiO <sub>2</sub>	32,33	-	51,49	16,18	-	-
Au@SiO <sub>2</sub>	15,05	2,94	61,29	20,29	-	0,43
SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub>	10,53	-	61,89	22,55	5,02	-
Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub>	5,84	1,13	55,64	5,68	31,60	0,11

Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin yüzeylerinde gözlemlenen Fe atomu (sırasıyla % 31,60 ve % 5,02), mikrokürelerin manyetik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca yüzeyine AuNP immobilize edilmiş Au@SiO<sub>2</sub> ve

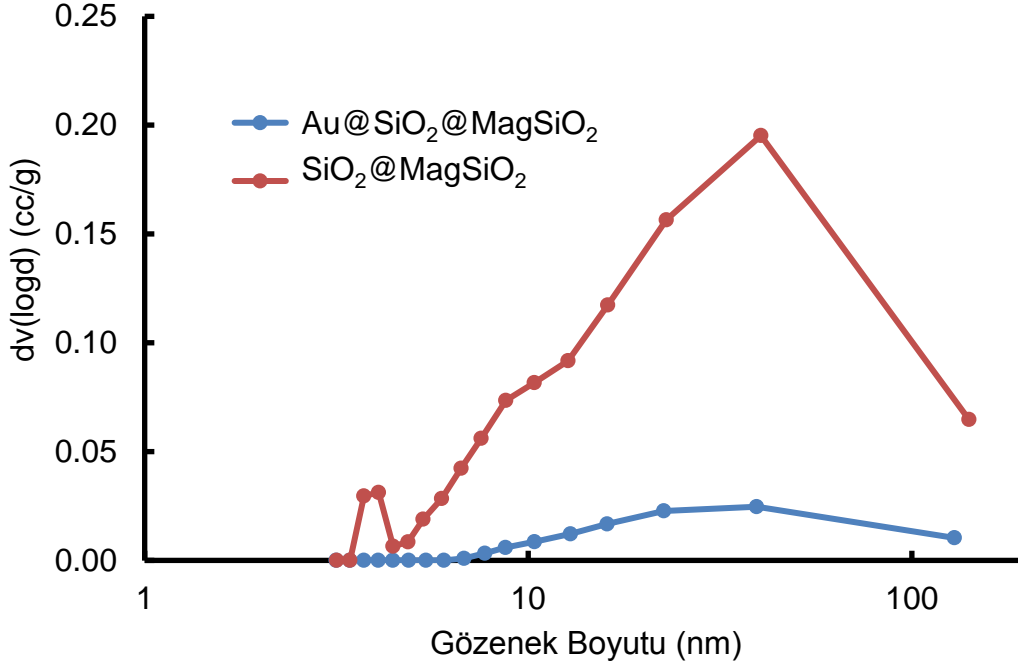
Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin yüzeylerinde gözlemlenen Au atomu da (sırasıyla % 0,43 ve % 0,11) SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler üzerine AuNP'nin başarıyla immobilize edildiğini göstermiştir. Bununla birlikte SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin APTES ile reaksiyonu sonucu yüzeyde N atomunun varlığı da görülmektedir.

#### 4.1.2. Monodispers-Gözenekli Mikrokürelerin Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Ölçümleri

SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin özgül yüzey alanları ve azotun adsorpsiyon-desorpsiyon izotermi BET yüzey alanı analiz cihazı kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen gözenek boyutu dağılım eğrileri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir. BET ölçümleri sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.4'de sunulmuştur.



Şekil 4.3. Au@SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub> mikroküreleri için BET yüzey alanı analiz cihazı ile elde edilen gözenek boyutu dağılım eğrileri.



Şekil 4.4.  $\text{Au}@SiO_2@MagSiO_2$  ve  $\text{SiO}_2@MagSiO_2$  mikroküreler için BET yüzey alanı analiz cihazı ile elde edilen gözenek boyutu dağılım eğrileri.

Çizelge 4.4. Monodispers-gözenekli mikrokürelerin gözeneklilik özellikleri

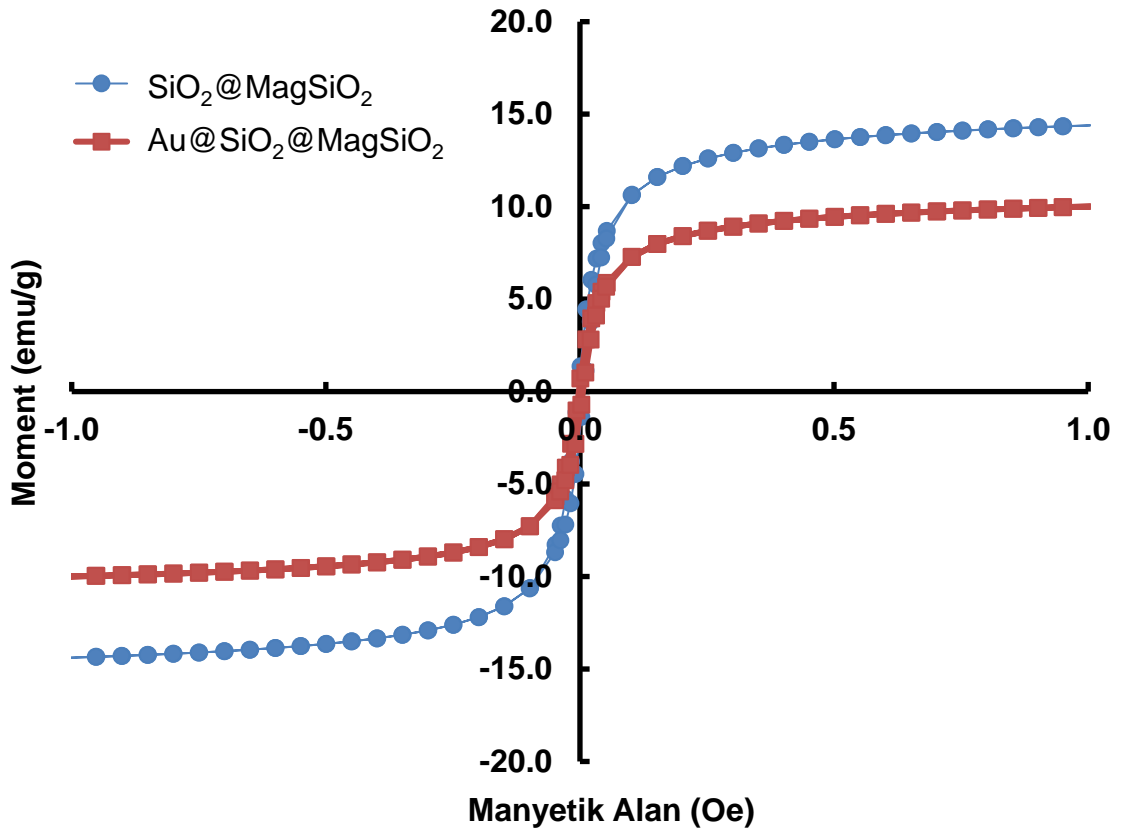
Mikroküre	Ortalama Gözenek Boyutu (nm)	Gözenek Hacmi (cc/g)	Özgül Yüzey Alanı (m <sup>2</sup> /g)
$\text{SiO}_2$	27,51	1,19	173
$\text{Au}@SiO_2$	24,38	0,88	144
$\text{SiO}_2@MagSiO_2$	26,05	0,0193	2,96
$\text{Au}@SiO_2@MagSiO_2$	23,41	0,163	27,97

Çizelge 4.4'e bakıldığında CV değerlerinin düşük olması (<5%), mikrokürelerin eşboyutlu sentezlendiğinin bir göstergesidir. Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'e bakıldığında,  $\text{SiO}_2$  mikrokürelerin mezogözenek yapısından kaynaklı yüksek özgül yüzey alanı (173 m<sup>2</sup>/g) sayesinde,  $\text{SiO}_2@MagSiO_2$  mikrokürelere kıyasla,  $\text{SiO}_2$  mikrokürelerin yüzeyine daha yüksek miktarda AuNP immobilize edilmiştir (Çizelge 4.2 ve 4.3) .  $\text{SiO}_2@MagSiO_2$  mikrokürelerin özgül yüzey alanının  $\text{SiO}_2$  mikrokürelerin özgül

yüzey alanından düşük olması, SiO<sub>2</sub> mikrokürelerin yüzeyine Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikül immobilizasyonu ve SiO<sub>2</sub> katmanı varlığı sonucu gözenek hacmindeki düşme ile açıklanabilir.

#### 4.1.3. Titreşimli Örnek Manyetometri Analizi

SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin manyetizasyon davranışları ve manyetizasyon doygunluk eğrileri, titreşimli örnek manyetometrisi ile incelenmiştir (Şekil 4.5).

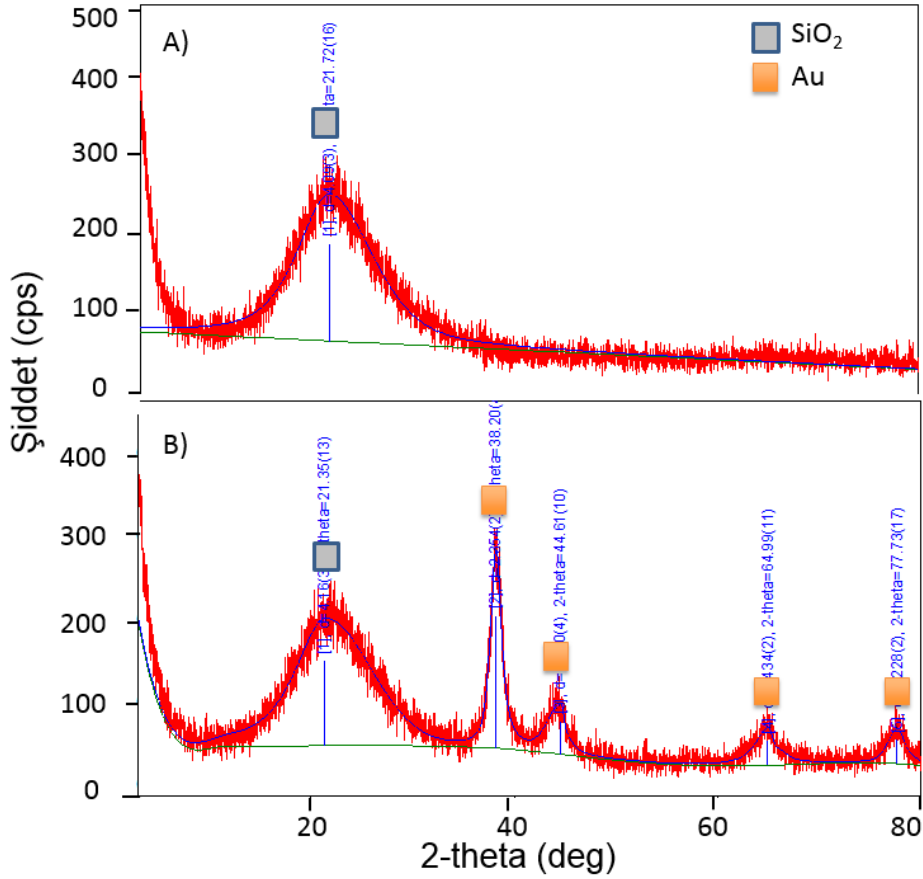


Şekil 4.5. Manyetik özellik gösteren SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin VSM ile elde edilen manyetizasyon eğrileri.

SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için doygunluk manyetizasyon değeri 14,3 emu/g, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için doygunluk manyetizasyon değeri 9,93 emu/g olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin yüksek doygunluk manyetizasyon değerleri ile superparamanyetik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir.

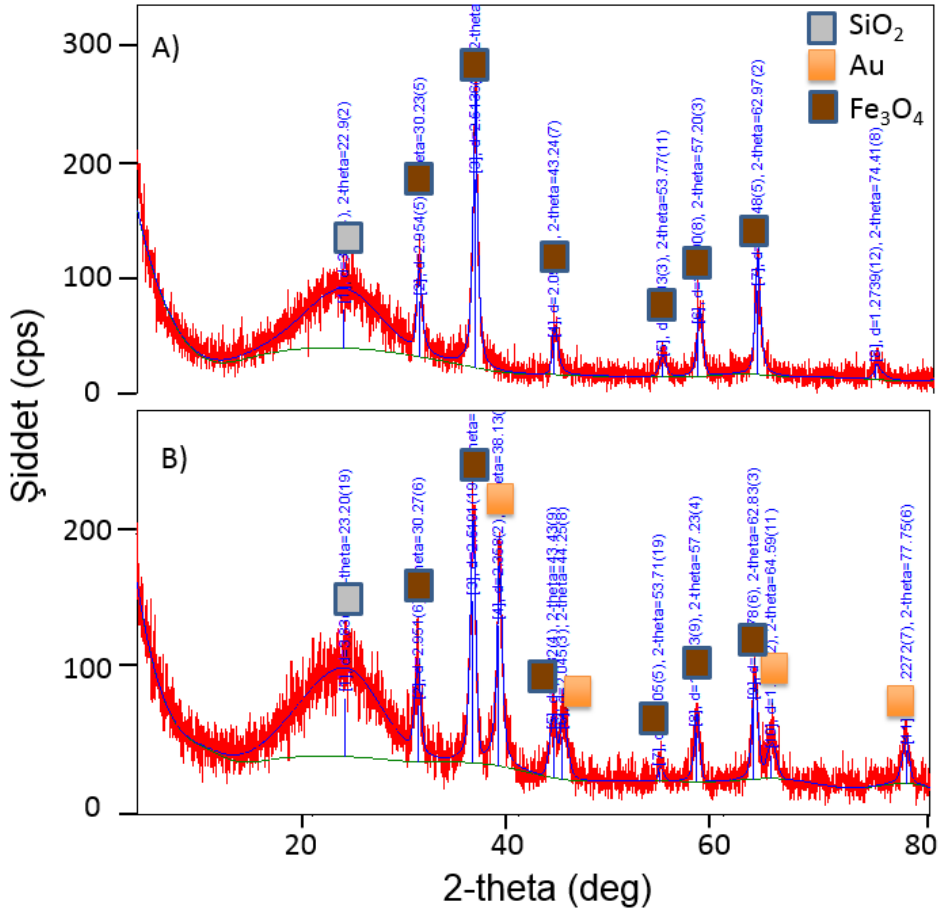
#### 4.1.4. X-ışını Kırınım Analizi

$\text{SiO}_2$ ,  $\text{Au@SiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ ,  $\text{Au@SiO}_2@\text{MagSiO}_2$  mikrokürelerin kimyasal yapıları X-ışını kırınım analizi yapılarak incelenmiştir.  $\text{SiO}_2$  ve  $\text{Au@SiO}_2$  mikroküreler için elde edilen  $\text{SiO}_2$  ve Au pikleri Şekil 4.6'da verilen X-ışını kırınım spektrumunda açıkça görülmektedir.



Şekil 4.6. Mikrokürelerin X-ışını kırınım spektrumu A)  $\text{SiO}_2$  B)  $\text{Au@SiO}_2$ .

$\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$  ve  $\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$  mikrokürelerin yüzeyine AuNP immobilize edilmesi sonucu elde edilen  $\text{Au@SiO}_2@\text{MagSiO}_2$  mikroküreler için elde edilen X-ışını kırınım spektrumu Şekil 4.7'de gösterilmektedir. Beklendiği gibi  $\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$  mikrokürelerin yüzeyinde  $\text{SiO}_2$  ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  pikleri,  $\text{Au@SiO}_2@\text{MagSiO}_2$  mikrokürelerin yüzeyinde ise  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ve Au pikleri açıkça görülmektedir.



Şekil 4.7. Mikrokürelerin X-ışını kırınım spektrumu A) SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> B) Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub>.

## 4.2. İmmobilize Formda AuNP İçeren ve Peroksidaz Aktivitesine Sahip Monodispers-Gözenekli Mikrokürelerin Peroksidaz Aktivitesi Ölçümleri

İkinci kısımda, değişen ortam pH değerinin, substrat olarak kullanılan OPD derişiminin ve sorbent olarak kullanılan Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin miktarının peroksidaz aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

### 4.2.1. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Değişen Ortam pH Değerleri için Peroksidaz Aktivitesi Ölçüm Sonuçları

Ortam pH değerinin Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin peroksidaz aktivitesine olan etkisi, pH 4-9 aralığında ölçülmüştür. Peroksidaz aktivitesi ölçümlerinde substrat olan OPD, ortama hidrojen peroksit ilavesi sonrası yükseltgenerek sarı renkli bir çözelti oluşturmuştur. Renk değişimi, mikrokürelerin



peroksidaz aktivitesi gösterdiğinin bir kanıtıdır. Gerçekleşen reaksiyon Şekil 4.8'de verilmiştir.



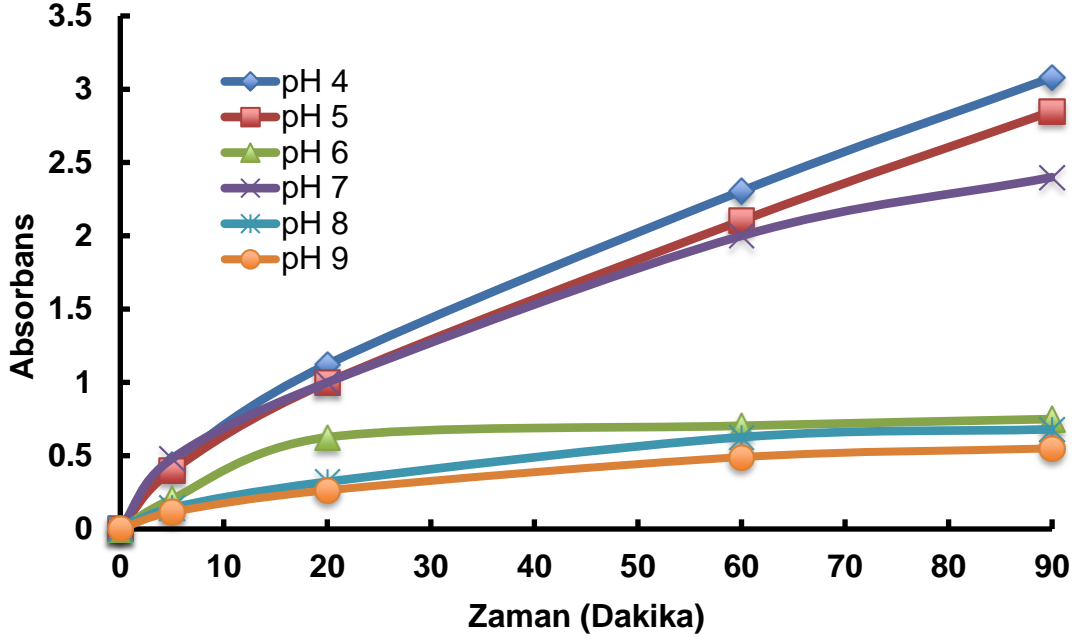
Şekil 4.8. OPD yükseltgenme reaksiyonu [78].

Peroksidaz aktivite ölçümleri, farklı pH değerlerine sahip ortamlarda Au@SiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler ve substrat olarak OPD kullanılarak yapılmıştır. En yüksek değer gözlemlendiği dalga boylarında absorbans değerleri okunmuştur. Çizelge 4.5'te değişen pH değerleri için peroksidaz aktivite ölçümlerinin yapıldığı dalga boyu değerleri verilmiştir. pH değeri düştükçe dalga boyunda artış gözlemlenmiştir.

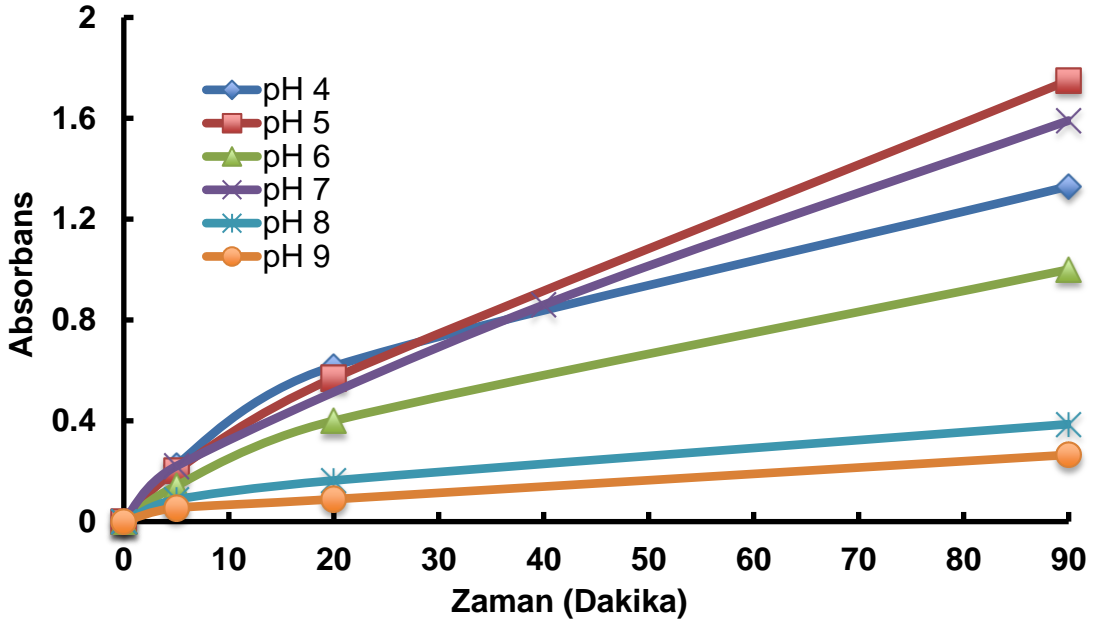
Çizelge 4.5. Değişen pH değerleri için peroksidaz aktivite ölçümlerinin yapıldığı dalga boyu değerleri

pH	Dalga Boyu (nm)
4	448-450
5	442-445
6	423-425
7	416-419
8	417-419
9	417-421

Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub> mikroküreler için farklı pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında elde edilen ve peroksidaz benzeri aktiviteyi gösteren absorbans-zaman grafikleri Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.



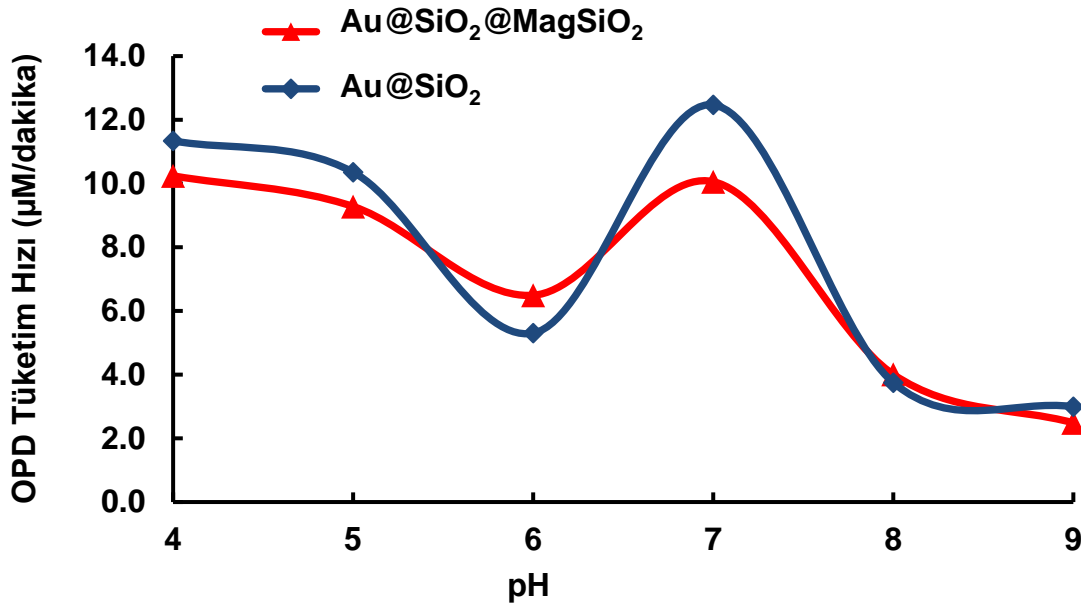
Şekil 4.9. Farklı pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında Au@SiO<sub>2</sub> mikroküreler için zamanla alınan absorbans değerleri, OPD derişimi: 400 µM, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.



Şekil 4.10. Farklı pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için zamanla alınan absorbans değerleri, OPD derişimi: 400 µM, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.

Absorbans değerleri, 90. dakikanın sonunda sabitlendiği için reaksiyon suresi 90 dakika belirlenmiş ve ölçümler 90. dakikaya kadar yapılmıştır. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokureler için pH 4, pH 5 ve pH 7 ortamlarında ozelti renklerinin daha koyu olduğu gözlemlenmiş ve yüksek absorbans değerleri elde edilmiştir. şekil 4.9 ve şekil 4.10'a bakıldığında Au@SiO<sub>2</sub> mikrokureler için daha yüksek absorbans değerlerine ulaşıldığı görülmektedir. Au@SiO<sub>2</sub> mikrokurelerin yüksek peroksidaz aktivite göstermesi, sahip oldukları yüksek özgül yüzey alanları ve yüzeyindeki yüksek AuNP miktarı ile açıklanabilmektedir.

Zamana bağlı olarak alınan absorbans değerlerinden yararlanılarak farklı pH değerlerinde OPD tkretim hızı hesaplanmıştır. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokureler için ortam pH değerinin OPD tkretim hızına etkisi şekil 4.11'de verilmiştir.

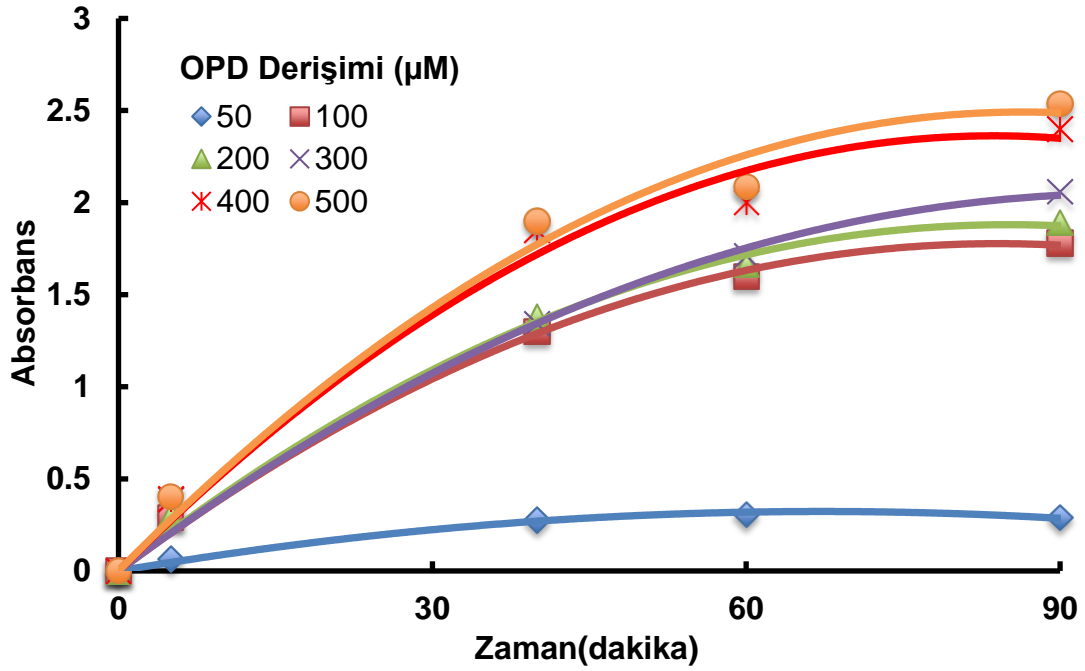


şekil 4.11. Farklı pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokureler için hesaplanan OPD tkretim hızı, OPD derişimi: 400 µM, mikrokure miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.

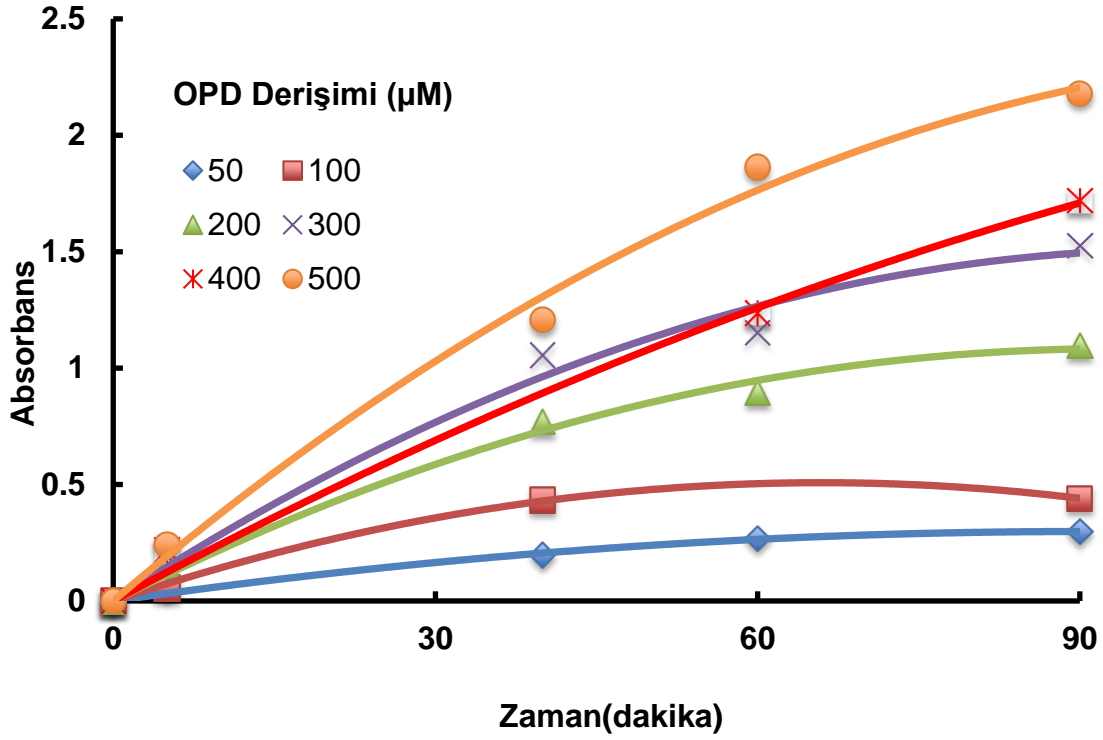
Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub> mikroküreler için en yüksek OPD tüketim hızı pH 7’de elde edilirken, pH 8 ve pH 9 ortamlarında daha düşük OPD tüketim hızı elde edilmiştir. pH 7 ortamında en yüksek OPD tüketim hızı elde edildiği için deneylere pH 7 ortamı kullanılarak devam edilmiştir.

#### 4.2.2. Değişen Substrat Derişimi (OPD derişimi) için Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikrokürelerin Peroksidaz Aktivitesi Ölçüm Sonuçları

Sabit pH ortamında (pH 7), farklı OPD derişimlerinin kullanıldığı peroksidaz aktivitesi ölçümleri sonucunda elde edilen Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için zamanla değişen absorbands değerleri sırasıyla Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’te verilmektedir.



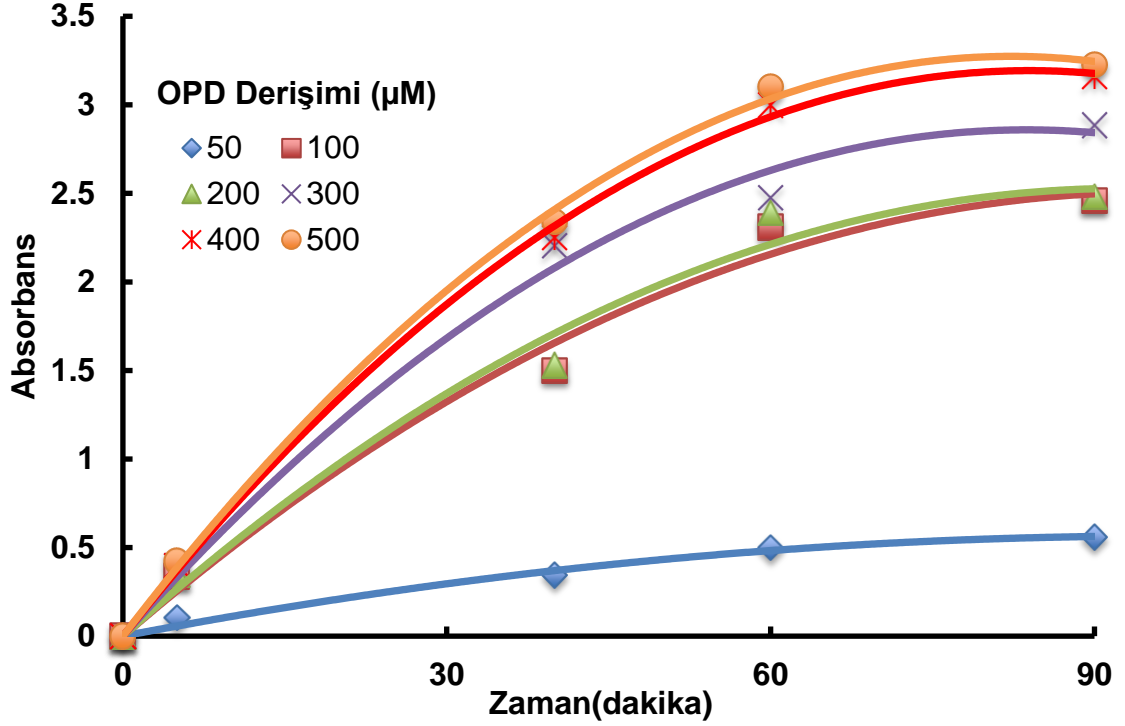
Şekil 4.12. Farklı OPD derişimine sahip reaksiyon ortamlarında Au@SiO<sub>2</sub> mikroküreler için zamanla alınan absorbands değerleri, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.



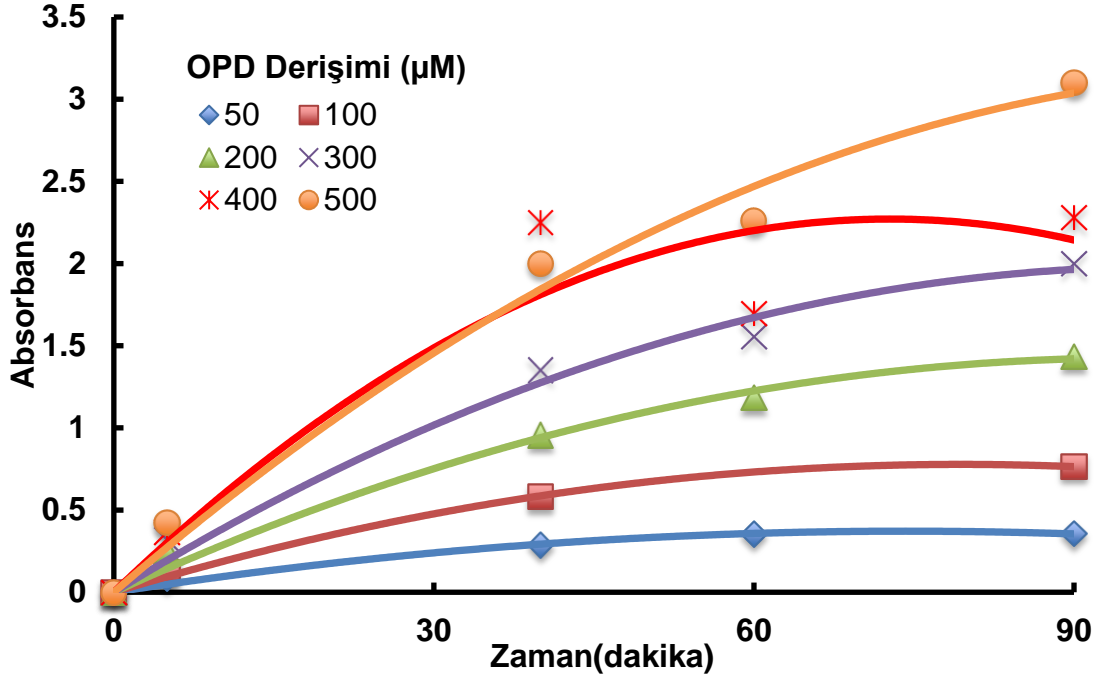
Şekil 4.13. Farklı OPD derişimine sahip reaksiyon ortamlarında Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için zamanla alınan absorbans değerleri, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.

Yapılan ölçümler sırasında yaklaşık olarak 417 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Çalışmada, OPD derişimi arttıkça çözelti renginde koyulaşma ve buna bağlı olarak absorbans değerinde artış görülmektedir. Reaksiyon süresi 90. dakikaya ulaştığında absorbans değeri sabitlenmeye başlamıştır. Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub> mikroküreler için 500 µM OPD derişiminde en yüksek absorbans değerine ulaşılmıştır. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler karşılaştırıldığında Au@SiO<sub>2</sub> mikroküreler için daha yüksek absorbans değerlerine ulaşılmıştır. Absorbans değerinin düşük olması, peroksidaz aktivitesinin azlığını göstermektedir. Bu sonuç, 50 ve 100 µM OPD derişimlerinde, GSH tayini için dar derişim aralığında peroksidaz aktivitesi deneylerinin yapılabileceğini göstermektedir.

Sabit pH ortamında (pH 7) farklı OPD derişimlerinin kullanıldığı peroksidaz aktivitesi ölçümleri ile elde edilen, ortama HCl çözeltisinin ilavesi sonrasında Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için zamanla değişen absorbands değerlerini gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verilmektedir.



Şekil 4.14. Farklı OPD derişimine sahip reaksiyon ortamlarına HCl çözeltisi ilavesi sonrası Au@SiO<sub>2</sub> mikroküreler için zamanla alınan absorbands değerleri, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.



Şekil 4.15. Farklı OPD derişimine sahip reaksiyon ortamlarına HCl çözeltilisi ilavesi sonrası Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için zamanla alınan absorbans değerleri, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.

Reaksiyon tamamlandıktan sonra (90 dk sonra) ortama 100 µL HCl çözeltilisi (3M) ilave edilmiştir ve 10 dakika beklenmiştir. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için yapılan ölçüm sonuçlarında ortama HCl çözeltilisi ilavesinin absorbans değerlerini arttırdığı görülmüştür.

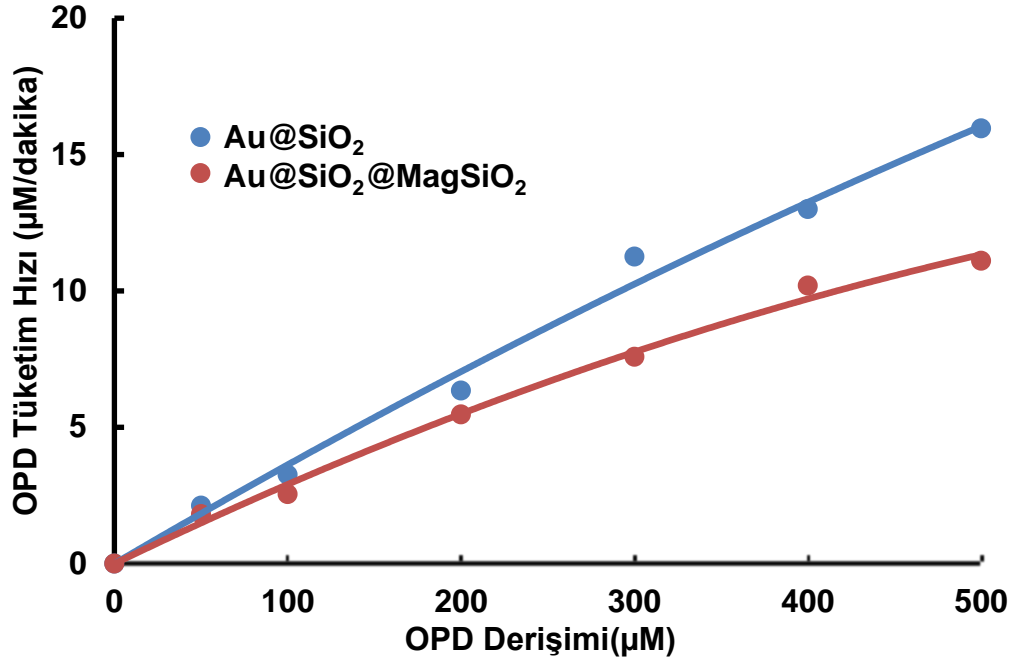
Ortama HCl çözeltilisi ilavesi öncesi ve sonrasında alınan absorbans değerlerinin değişimi Çizelge 4.6'te gösterilmiştir. HCl çözeltilisi ilavesi sonrası çözeltilerin renginde koyulaşma ve absorbans değerlerinde artış net bir şekilde görülmektedir. Ortama HCl çözeltilisi ilavesi ile ortamın protonlanmasının sonucu olarak en yüksek absorbansın gözlemlendiği dalga boyunun yaklaşık olarak 460 nm değerine kaydığı görülmektedir.

Çizelge 4.6. Ortama HCl çözeltisi ilavesi sonucunda Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için okunan absorbands değerleri

	OPD Derişimi ( $\mu\text{M}$ )	Absorbans (90.dakika)	Absorbans (90.dakika+HCl)
<b>Au@SiO<sub>2</sub></b>	50	0,29	0,56
	100	1,78	2,45
	200	1,89	2,48
	300	2,06	2,89
	400	2,40	3,16
	500	2,54	3,23
<b>Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub></b>	50	0,30	0,36
	100	0,44	0,77
	200	1,10	1,44
	300	1,53	2,00
	400	1,72	2,28
	500	2,18	3,10



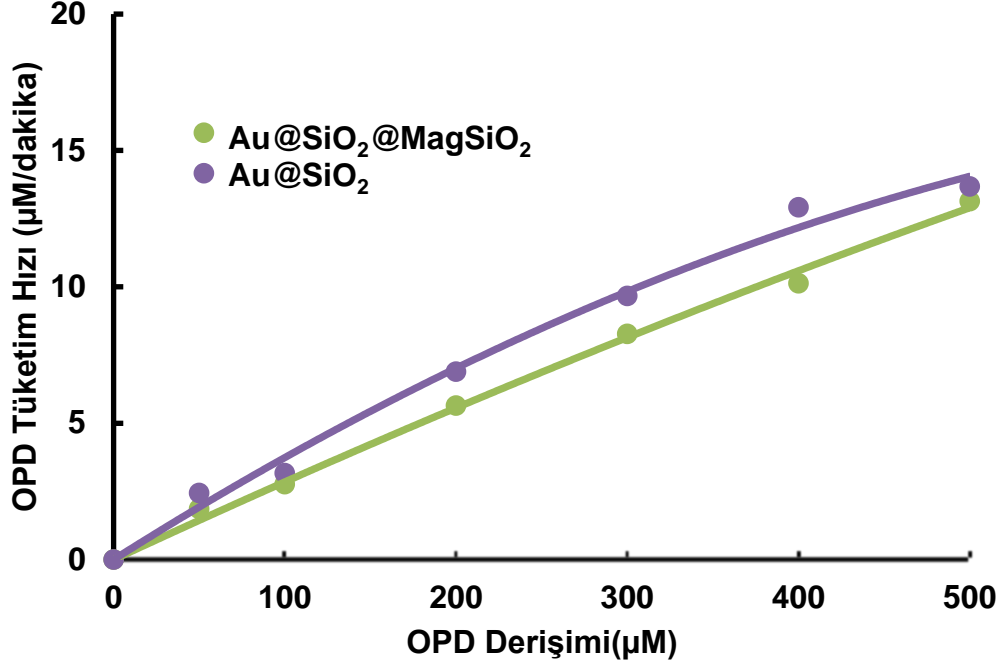
Farklı OPD derişimleri için zamana bağlı değişen absorbans değerlerinden yararlanılarak Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelere için OPD tüketim hızı hesaplanmıştır. OPD derişiminin, OPD tüketim hızına etkisini gösteren grafik Şekil 4.16'da gösterilmektedir.



Şekil 4.16. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelere için OPD tüketim hızının OPD derişimi ile değişimi, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamı pH değeri: 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.

Au@SiO<sub>2</sub> mikrokürelere için OPD tüketim hızı, sabit OPD derişimlerinde Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelere kıyasla daha yüksek değerlere ulaşmaktadır. OPD tüketim hızı OPD derişimi arttıkça artmaktadır. Şekil 4.16.'da görüldüğü gibi OPD tüketim hızının, düşük OPD derişimlerinde lineer olarak arttığı, yüksek OPD derişimlerinde ise artışın giderek azaldığı görülmektedir. Nanozim olarak sentezlenen Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelere, substrat miktarı arttıkça aktif olarak substratı ürüne dönüştürür, ancak reaksiyon hızı belirli bir substrat konsantrasyonunun üzerinde dengeye ulaşmaktadır. Farklı OPD derişimleri için yapılan ölçümler sonucunda 400 µM OPD derişimi en uygun değer olarak belirlenmiş ve sonrasında yapılacak ölçümler için 400 µM OPD derişimi kullanılmıştır.

Farklı OPD derişimleri için, ortama HCl çözeltisi ilavesi sonrası zamana bağılı değişen absorbans değerlerinden yararlanılarak Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelere için OPD tüketim hızı hesaplanmıştır. HCl çözeltisi ilavesi sonrası, OPD derişiminin OPD tüketim hızına etkisini gösteren grafik Şekil 4.17’de gösterilmektedir.

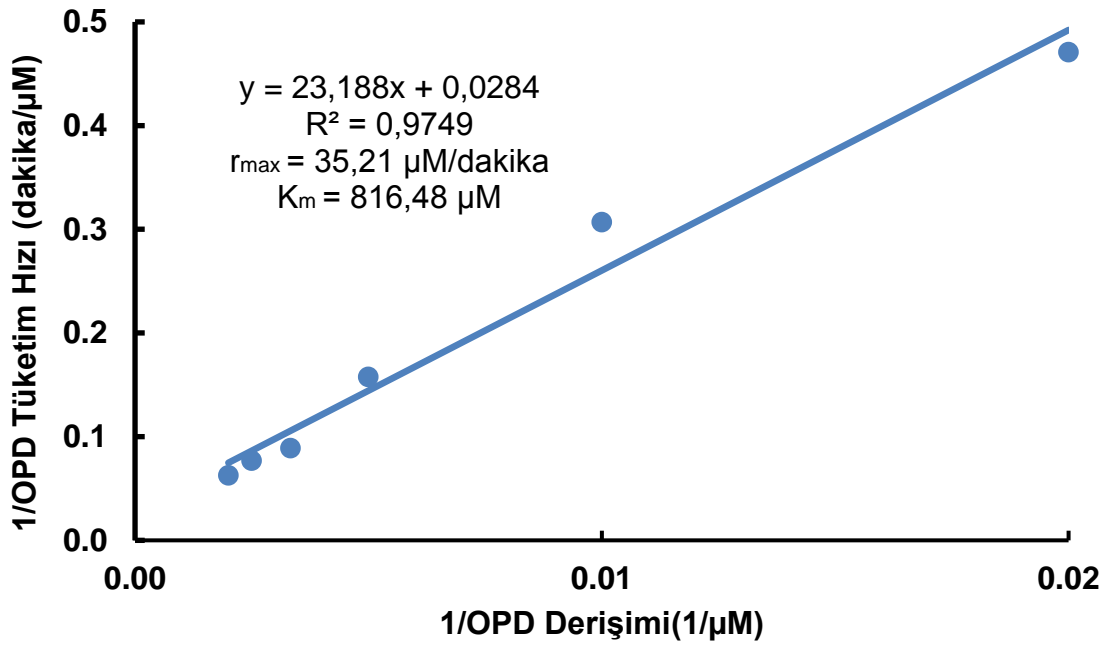


Şekil 4.17. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelere için HCl çözeltisi ilavesi sonrası OPD tüketim hızının OPD derişimi ile değişimi, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.

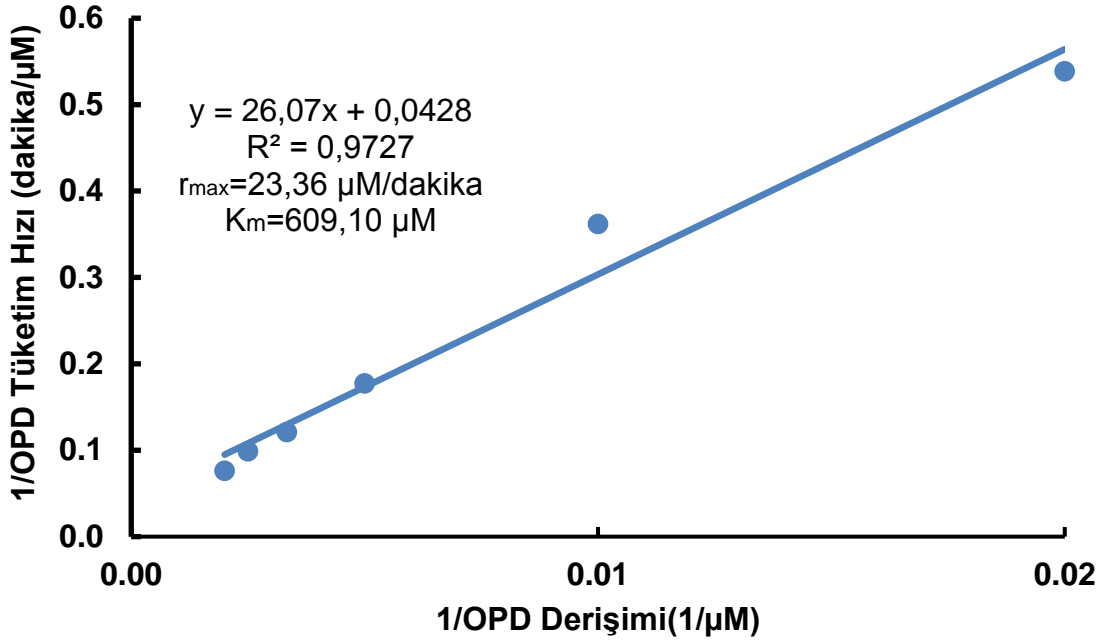
Ortama HCl çözeltisi ilavesi sonrası benzer şekilde, Au@SiO<sub>2</sub> mikrokürelere için OPD tüketim hızı, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelere göre daha yüksek değerlere ulaşmıştır. Düşük OPD derişiminde OPD tüketim hızı oldukça düşüktür. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelere ile yapılan ölçümlerde HCl çözeltisi ilavesi sonrası OPD tüketim hızının bariz bir şekilde değişmediği görülmektedir.

Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelere için enzim davranışını ve enzim kinetiğini açıklayabilmek için Michaelis-Menten kinetik modeli kullanılmıştır.

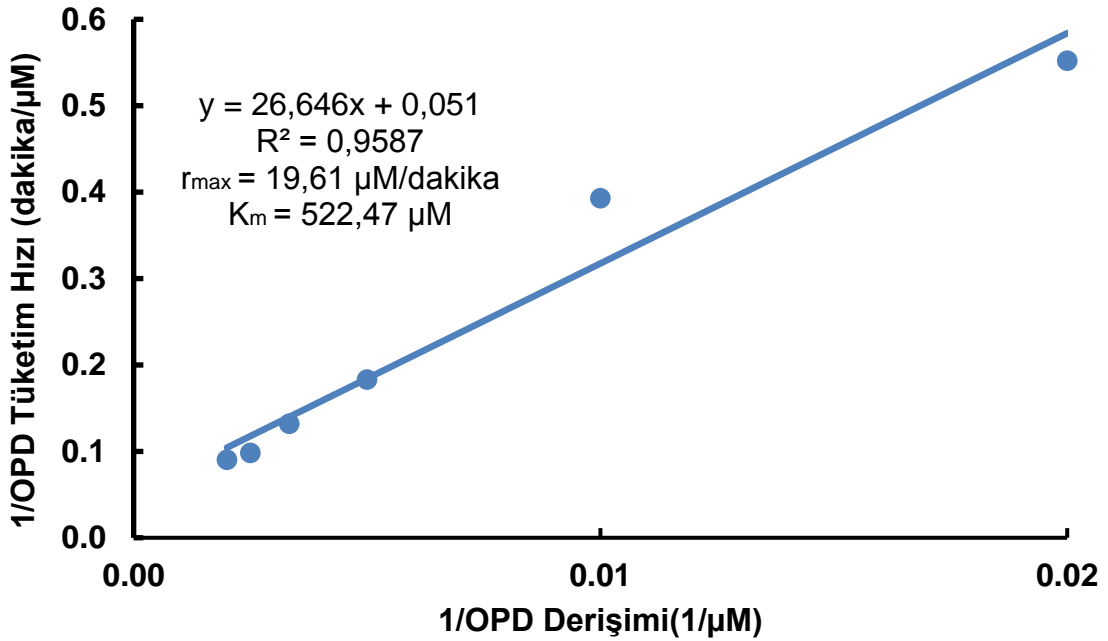
Deney koşulları sabit tutularak (pH 7, 400  $\mu\text{M}$  OPD derişimi),  $\text{H}_2\text{O}_2$  varlığında substratın konsantrasyonu değiştirilerek  $\text{Au@SiO}_2$  ve  $\text{Au@SiO}_2@\text{MagSiO}_2$  mikroküreler için OPD tüketim hızları hesaplanmıştır. Michaelis Menten ve Lineweaver Burk grafikleri yardımıyla Michaelis sabiti  $K_m$  ve maksimum reaksiyon hızı  $r_{\text{max}}$  elde edilmiştir.  $\text{Au@SiO}_2$  ve  $\text{Au@SiO}_2@\text{MagSiO}_2$  mikroküreler için ortama HCl çözeltisi eklenmiş/eklenmemiş deney koşullarında elde edilen grafikler Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



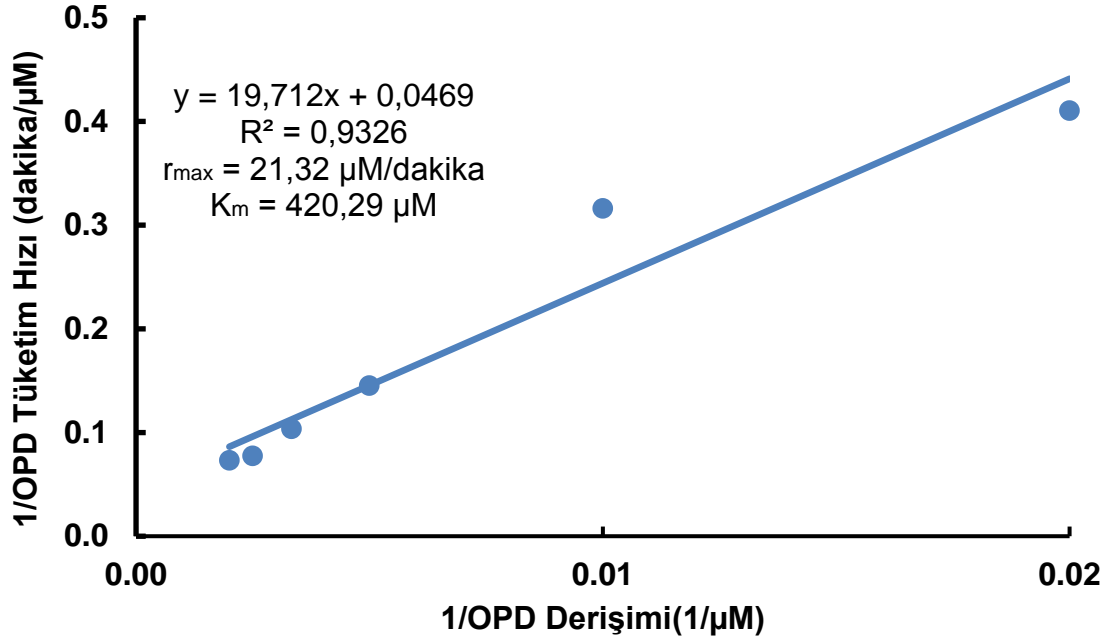
Şekil 4.18.  $\text{Au@SiO}_2$  mikroküreler için Lineweaver-Burk grafiği, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7,  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarı: 2  $\mu\text{L}$ .



Şekil 4.19. HCl çözeltisi eklenmiş ortamda Au@SiO<sub>2</sub> mikroküreler için Lineweaver-Burk grafiği, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100  $\mu\text{L}$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2  $\mu\text{L}$ .



Şekil 4.20. Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için Lineweaver-Burk grafiği, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2  $\mu\text{L}$ .



Şekil 4.21. HCl ilave edilmiş ortamda Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için Lineweaver-Burk grafiği, mikroküre miktarı: 10 mg, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2  $\mu$ L.

Çizelge 4.7'da farklı Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için hesaplanan K<sub>m</sub> ve r<sub>m</sub> değerleri verilmektedir.

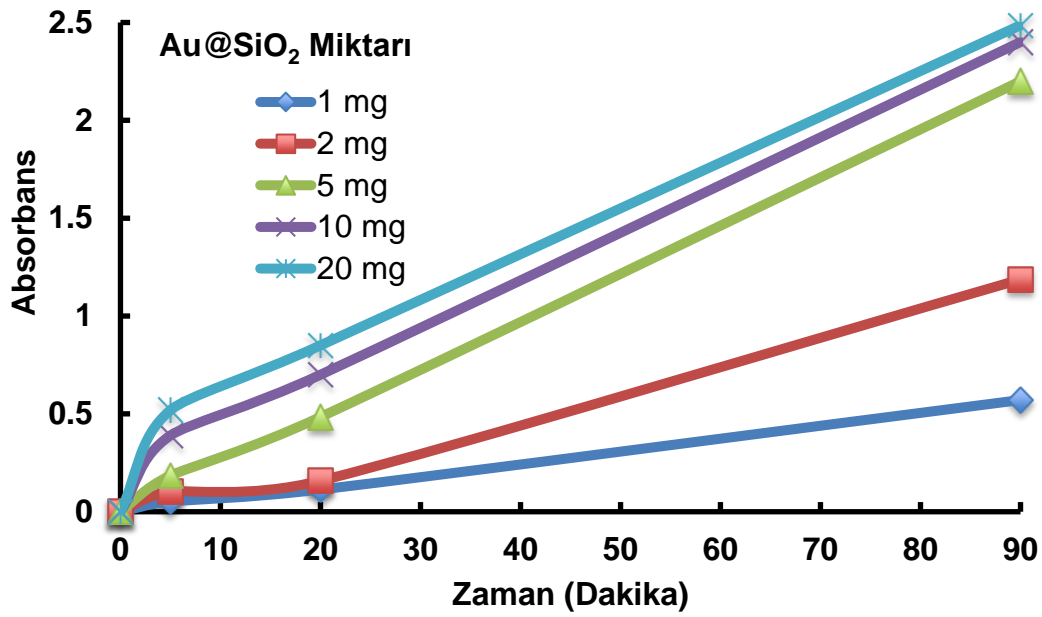
Çizelge 4.7. Çalışmada kullanılan mikroküreler için r<sub>max</sub>, K<sub>m</sub> ve r<sup>2</sup> değerleri

Mikroküre	R <sup>2</sup>	r <sub>max</sub> ( $\mu$ M/dakika)	K <sub>m</sub> ( $\mu$ M)
Au@SiO <sub>2</sub>	0,9749	35,21	816,48
Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub>	0,9587	19,61	522,47
Au@SiO <sub>2</sub> + HCl	0,9727	23,36	609,10
Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> + HCl	0,9326	21,32	420,29

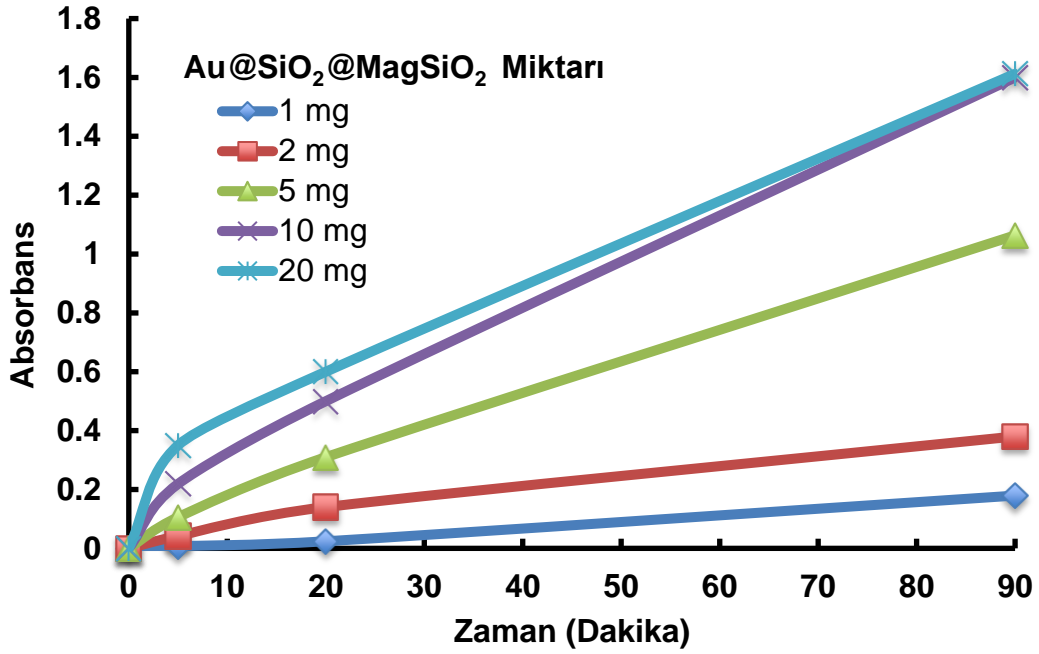
Yüksek  $R^2$  (Determinasyon katsayısı) değerleri, “ $1/(\text{substrat derişimi})$ ” ile “ $1/\text{substrat tüketim hızı}$ ” arasında doğrusal bir ilişkinin var olduğunu göstermektedir. Doğal enzimlerde  $K_m$  değeri, enzim ve substrat arasında bir afinite göstergesidir. Daha düşük bir  $K_m$  değerinin daha yüksek bir afinite ve katalitik aktivite göstergesi olduğu bilinmektedir [79]. Nano yapıllı enzim taklitçileri için  $K_m$  değeri, nanoparçacıkların enzim benzeri performansını karşılaştırmak için sıklıkla kullanılır [75].  $\text{Au@SiO}_2$  mikroküreler en yüksek  $K_m$  değerine (816,48  $\mu\text{M}$ ) sahipken,  $\text{Au@SiO}_2@\text{MagSiO}_2$  mikroküreler için HCl çözeltisi eklenmiş ortamda en düşük  $K_m$  değeri (420,29  $\mu\text{M}$ ) elde edilmiştir.  $\text{Au@SiO}_2@\text{MagSiO}_2$  mikroküreler,  $\text{Au@SiO}_2$  mikrokürelere göre daha yüksek afinite sergilemektedir.

#### 4.2.3. Farklı Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikroküre Miktarları için Peroksidaz Aktivite Ölçümleri

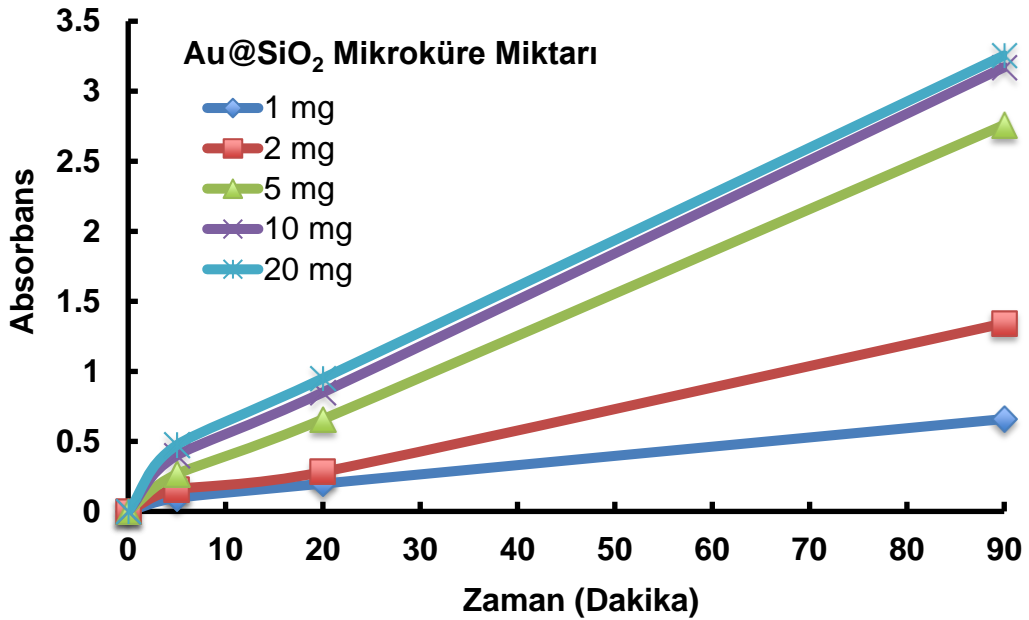
Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub> mikroküre miktarlarının peroksidaz benzeri aktiviteye etkisi, ortama HCl çözeltisi eklenmiş ve eklenmemiş reaksiyon koşulları için incelenmiştir. HCl çözeltisi eklenmiş ve eklenmemiş reaksiyon ortamında Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküre miktarlarının değişimi ile elde edilen absorbans değerleri Şekil 4.22, 4.23, 4.24 ve 4.25'te gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Farklı Au@SiO<sub>2</sub> mikroküre miktarları için zamanla alınan absorbans değerleri, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.

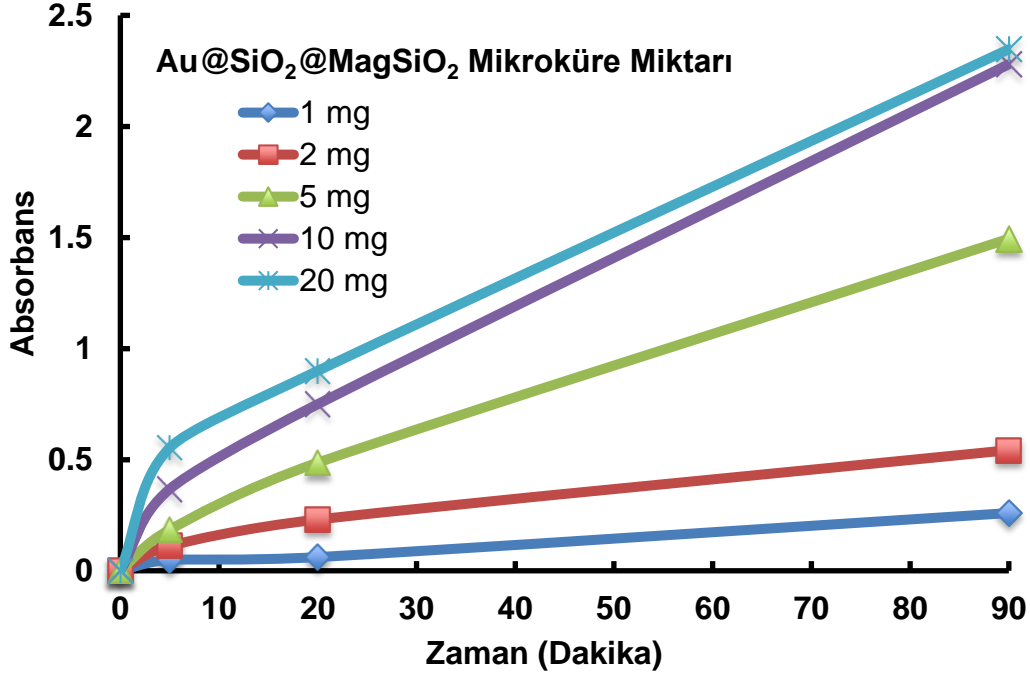


Şekil 4.23. Farklı Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküre miktarları için zamanla alınan absorbans değerleri, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.



Şekil 4.24. Farklı Au@SiO<sub>2</sub> mikroküre miktarları için HCl çözeltisi ilave edilmiş ortamda zamanla alınan absorbans değerleri, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.





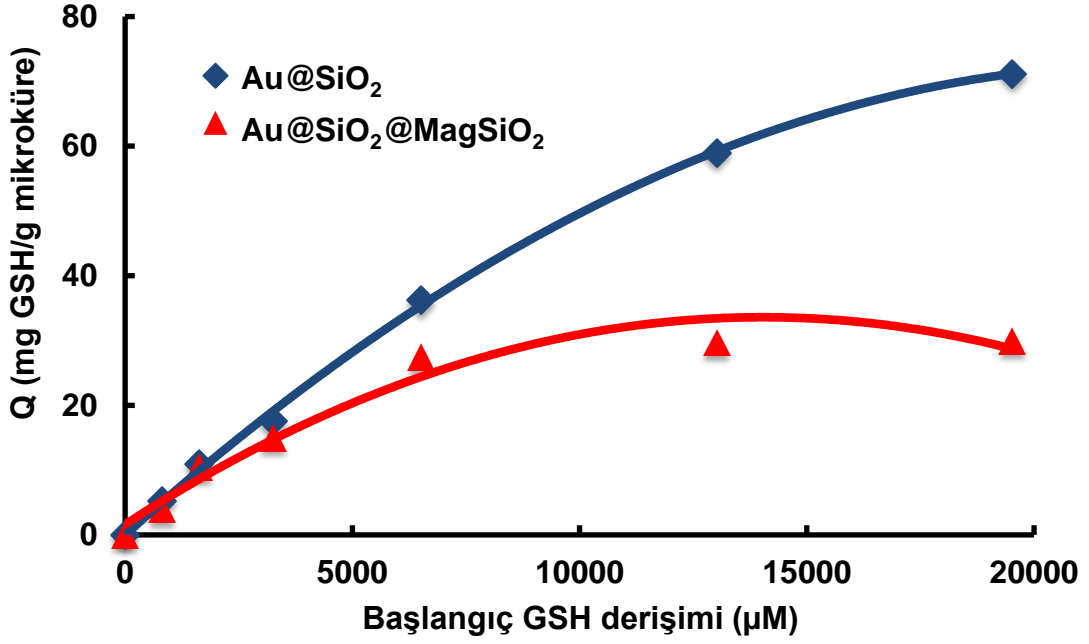
Şekil 4.25. Farklı Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküre miktarları için HCl çözeltisi ilave edilmiş ortamda zamanla alınan absorban değerleri, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.

Beklendiği gibi, Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için peroksidaz benzeri aktivite artan mikroküre miktarı (1-20 mg) ile artmaktadır. Absorbans değerleri 10 mg ve 20 mg mikroküre miktarları için oldukça yakın elde edilmiştir. Bu nedenle en uygun mikroküre miktarı olarak 10 mg seçilmiştir ve çalışmalara 10 mg partikül miktarı ile devam edilmiştir.

Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub> mikroküre miktarlarının peroksidaz benzeri aktiviteye etkisi ortama HCl çözeltisi eklenerek incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda, Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için ortama HCl çözeltisi eklenmemiş reaksiyon koşullarına kıyasla ortama HCl çözeltisi eklenmiş reaksiyon koşullarında daha yüksek absorban değerlerine ulaşıldığı görülmektedir. Ayrıca, peroksidaz benzeri aktivite ölçümlerinde Au@SiO<sub>2</sub> mikrokürelerin kullanımı ile, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin kullanımından daha yüksek absorban değerleri elde edilmiştir.

#### 4.3. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Monodispers-Gözenekli Mikroküreler ile GSH Adsorpsiyon Ölçüm Sonuçları

Farklı GSH derişimlerine sahip ortamlarda, GSH biyomolekülünün Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküre yüzeyine adsorpsiyonunu gösteren grafik Şekil 4.26'da verilmektedir.



Şekil 4.26 Farklı GSH derişimlerine sahip ortamlarda, GSH biyomolekülünün Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküre yüzeyine adsorpsiyonu, mikroküre miktarı: 10 mg, adsorpsiyonun gerçekleştiği hacim: 3 mL, adsorpsiyon ortamının pH değeri: 7.

Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürenin (1 g) yüzeyine adsorbe olan GSH miktarı, GSH derişimleri 0-1 mg/ml (0 µM - 3253 µM) arasında lineer olarak değişmektedir. Au@SiO<sub>2</sub> mikrokürenin (1 g) yüzeyine adsorbe olan GSH miktarı ise, GSH derişimleri 0-2 mg/ml (0 µM - 6507 µM) arasında lineer olarak değişmektedir. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler karşılaştırıldığında, Au@SiO<sub>2</sub> mikrokürelerin yüzeyine daha fazla GSH biyomolekülü adsorbe olduğu görülmüştür. Au@SiO<sub>2</sub> mikrokürelerin yüzeyine GSH adsorpsiyonunun yüksek olması, mikrokürelerin sahip oldukları yüksek özgül yüzey alanı ile açıklanabilmektedir.

#### 4.4. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikroküreler ile GSH Biyomolekülünün Kolorimetrik Tayini

Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreleri kullanılarak GSH biyomolekülünün çözelti ortamında kolorimetrik tayini için çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreleri kullanılarak GSH biyomolekülünün insan serumunda kolorimetrik tayini yapılmıştır.

##### 4.4.1. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikroküreler ile Çözelti Ortamında GSH Biyomolekülünün Kolorimetrik Tayini

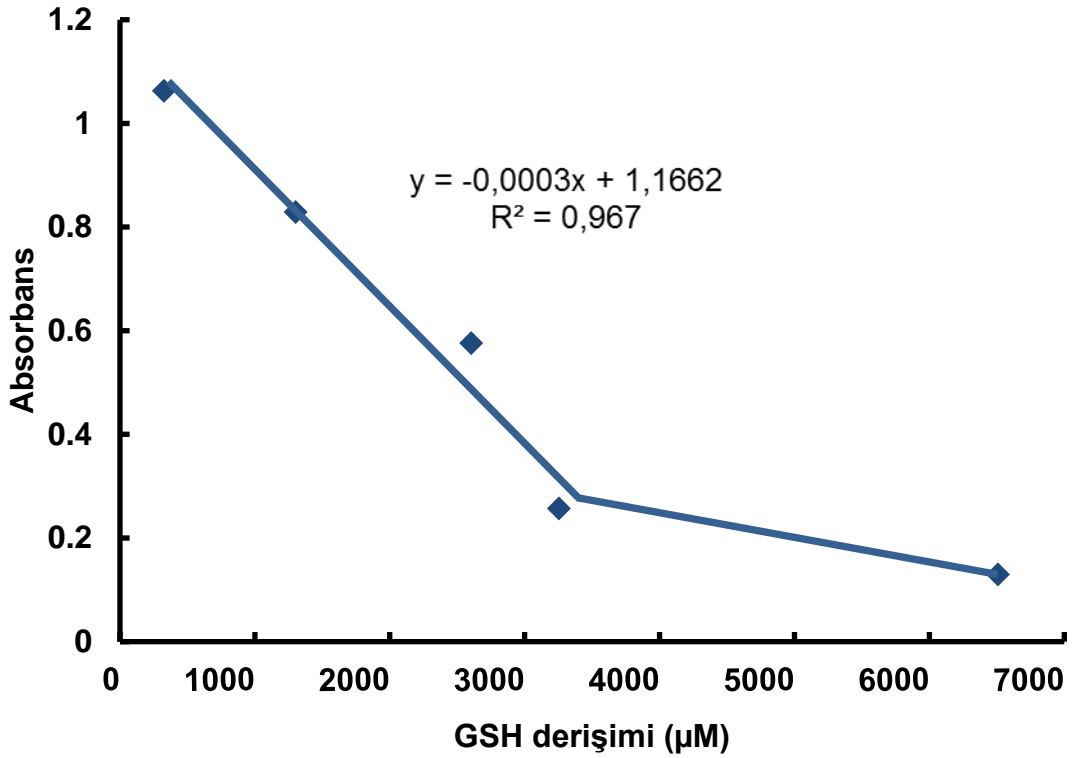
Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerinin, GSH biyomolekülünün kolorimetrik tayininde kullanılabilirliğini göstermek için fosfat tampon çözeltisi (pH 7, 50 mM) içinde hazırlanmış 0,1 - 5 mg/mL derişim aralığında GSH çözeltileri kullanılmıştır. UV-görünür bölge spektrofotometre ile yaklaşık 417 nm dalga boyunda absorbans değeri okunmuştur. Çizelge 4.8'de farklı GSH derişimleri için okunan absorbans değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 4.8. Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için farklı GSH derişimlerinde elde edilen absorbans değerleri

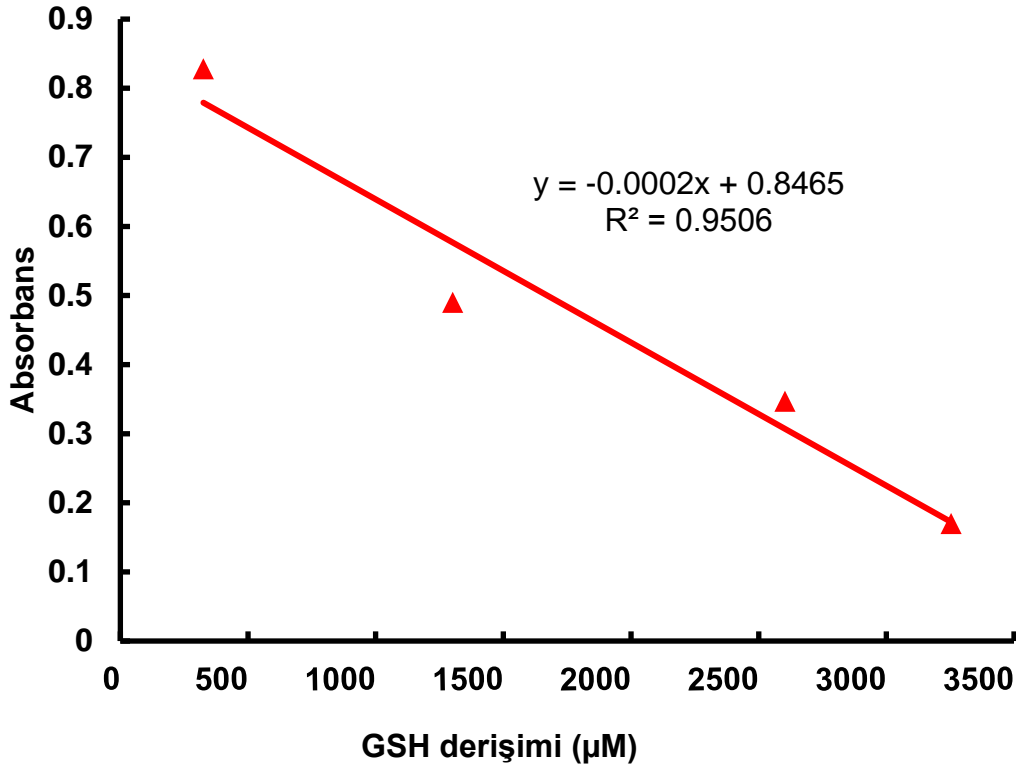
		Absorbans Değerleri	
GSH Derişimi (mg/mL)	GSH Derişimi (µM)	Au@SiO <sub>2</sub> mikroküre	Au@SiO <sub>2</sub> @MagSiO <sub>2</sub> mikroküre
0	0	2,4	1,599
0,1	325	1,063	0,828
0,4	1302	0,829	0,49
0,8	2603	0,576	0,347
1	3253	0,257	0,17
2	6507	0,13	0,092
3	9761	0,058	0,062
4	13015	-	-
5	16269	-	-

Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler kullanılarak yapılan GSH biyomolekülünün kolorimetrik tayininde GSH konsantrasyonu arttıkça reaksiyon sonrası elde edilen çözelti rengi açılırken, absorbans değerleri de buna bağlı olarak azalmaktadır (Çizelge 4.8). 4 mg/mL ve 5 mg/mL GSH derişimleri için çözültide renk değişimi ve UV spektrumunda pik görülmemiştir. GSH derişiminin artması ile peroksidaz aktivitesindeki azalma, mikroküre yüzeyine adsorbe olan GSH'nun, mikrokürenin aktif yüzeyini kapatarak OPD'nin yükseltgenme tepkimesini inhibe etmesiyle açıklanabilir.

Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için GSH derişimi ve absorbans değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de gösterilmektedir.



Şekil 4.27. Farklı GSH derişimlerinde, Au@SiO<sub>2</sub> mikroküreler için elde edilen absorbans değerleri, mikroküre miktarı:10 mg, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.



Şekil 4.28. Farklı GSH derişimlerinde, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için elde edilen absorbans değerleri, mikroküre miktarı: 10 mg, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL.

Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için 325 - 3253 µM GSH derişim aralıklarında lineer bir absorbans düşüşü görülmektedir. Bu lineer ilişkiyen yararlanarak Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin kullanılmasıyla, belirtilen derişim aralıklarındaki GSH biyomolekülünün tayininin yapılabileceği gösterilmiştir.

Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin manyetik özellikleri ile reaksiyon ortamından kolay bir şekilde ayrılabilme avantajları göz önünde bulundurularak bir sonraki aşamada yapılacak olan insan serumunda GSH tayini için bu mikroküre tipi seçilmiştir.

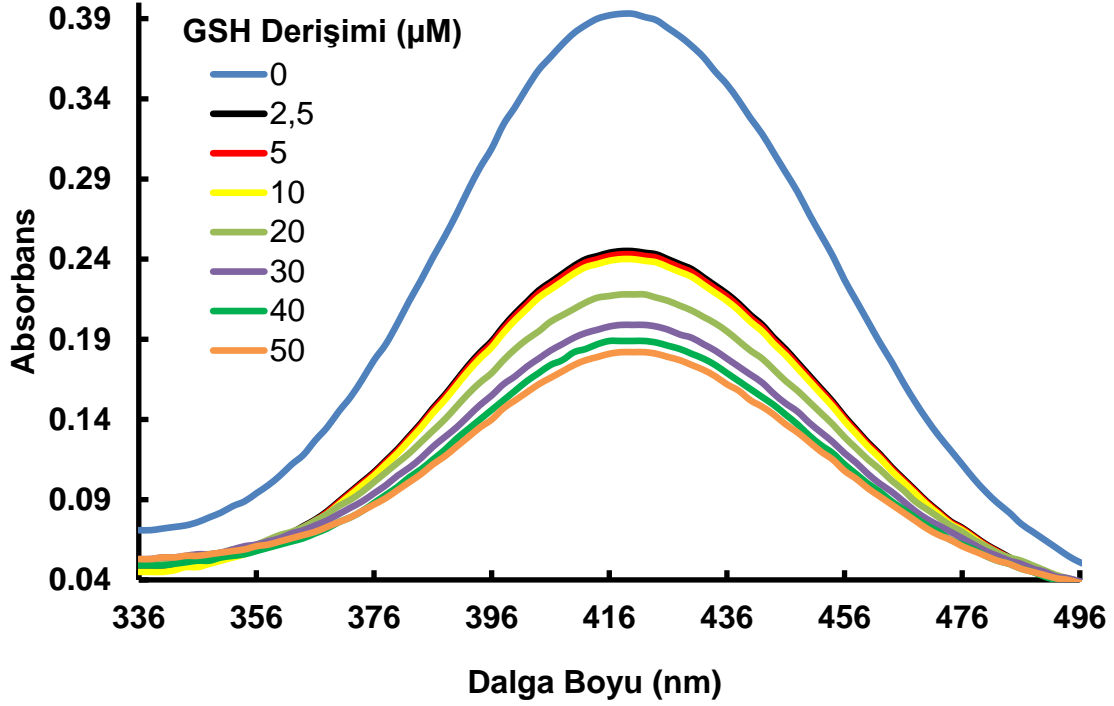
#### 4.4.2. Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> Mikroküreler ile İnsan Serumunda GSH Biyomolekülünün Kolorimetrik Tayini

Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerinin insan serumu içerisindeki GSH'nun kolorimetrik tayininde kullanılabilirliğini göstermek için insan serumu ile hazırlanmış 0 - 50  $\mu$ M derişim aralığındaki GSH çözeltileri kullanılmıştır. UV-görünür bölge spektrofotometre ile yaklaşık 417 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Farklı GSH derişimlerinde, HCl çözeltisi eklenmiş ve eklenmemiş reaksiyon ortamları için mikrokürelerden ayrılan sıvıların fotoğrafları Şekil 4.29'da gösterilmektedir. GSH derişimi arttıkça, dispersiyondan ayrılan sıvıların renkleri açılmıştır. HCl çözeltisi eklenmesi ile çözeltilerin renkleri koyulaşmıştır.

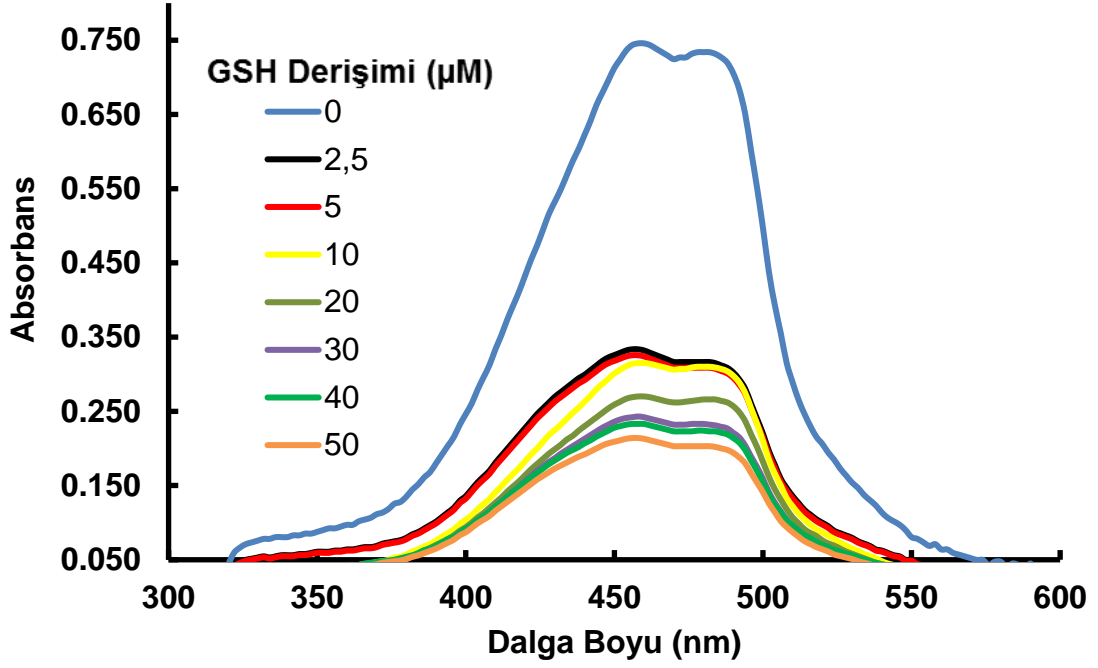


Şekil 4.29. (A) 0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 50  $\mu$ M GSH içeren insan serumu, mikroküre ve OPD etkileşimi sonrası dispersiyondan ayrılan çözeltiler, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküre miktarı: 2 mg, OPD derişimi: 400  $\mu$ M, reaksiyon hacmi: 4 mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2  $\mu$ L, reaksiyon ortamının pH değeri: 7 (B) A çözeltilerine 3 M 100  $\mu$ l HCl çözeltisi ilave edilip 10 dakika beklenerek elde edilen çözeltiler.

İnsan serumunda, farklı GSH konsantrasyonlarında, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreleri için HCl çözeltisi eklenmiş ve eklenmemiş reaksiyon ortamlarında dalga boyu ve absorbands grafikleri Şekil 4.30 ve Şekil 4.31’de gösterilmiştir.



Şekil 4.30 İnsan serumunda farklı GSH konsantrasyonlarında, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreleri için dalga boyu ve absorbands değerleri, mikroküre miktarı: 2 mg, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7.

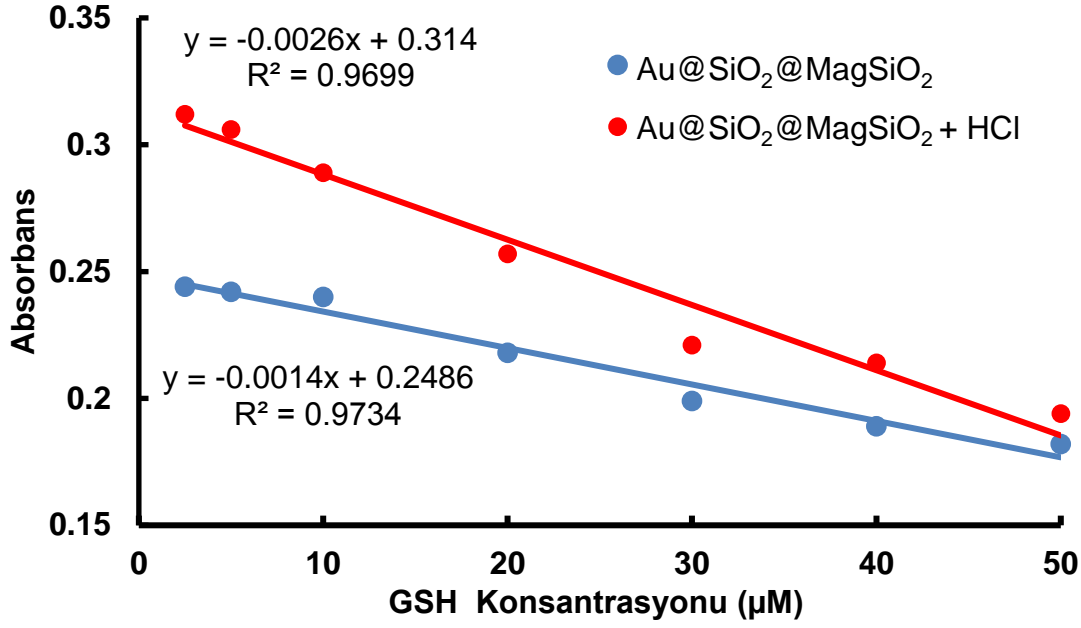


Şekil 4.31. İnsan serumunda farklı GSH konsantrasyonlarında, HCl ilavesi sonrası Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için dalga boyu ve absorbans değerleri, mikroküre miktarı: 2 mg, OPD derişimi: 400 μM, reaksiyon hacmi: 4 mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 μL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 μL.

HCl çözeltisi ilave edilmemiş reaksiyon ortamı için, Şekil 4.30'da görüldüğü gibi UV-görünür bölge spektrofotometresi ile yaklaşık olarak 417 nm dalga boyunda en yüksek absorbans değeri elde edilmiştir. Reaksiyon ortamına HCl çözeltisi eklenmesinin ardından Şekil 4.31'de görüldüğü gibi 460-490 nm dalga boyu arasında en yüksek absorbans değerleri elde edilmiştir. Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de görüldüğü gibi GSH derişimi arttıkça absorbans değeri düşmektedir. En yüksek absorbans GSH içermeyen reaksiyon ortamı için okunmuştur. GSH derişimi arttıkça mikroküre yüzeyine adsorbe olan GSH miktarı artarken, bunun sonucunda, GSH mikrokürenin yüzeyini kapatarak reaksiyonu engellemekte ve absorbans değeri düşmektedir.

Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküre için GSH derişimi ve absorbans değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafik Şekil 4.32'de gösterilmektedir.





Şekil 4.32. İnsan serumunda farklı GSH konsantrasyonlarında, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için alınan absorbans değerleri, mikroküre miktarı: 2 mg, OPD derişimi: 400 µM, reaksiyon hacmi: 4 mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı: 2 µL, reaksiyon ortamının pH değeri: 7, HCl derişimi/miktarı: 3M/100 µL.

Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için 2,5 µM ve 50 µM GSH derişim aralığında lineer bir absorbans düşüşü görülmektedir. Bu lineer ilişkidenden yararlanarak Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler ile belirtilen derişim aralığında GSH tayininin yapılabileceği gösterilmiştir.

## 5. YORUM

- GMA(Glisid Metakrilat) monomeri ile dispersiyon polimerizasyon yöntemi kullanılarak monodispers yapıda poli(GMA) partikülleri sentezlenmiştir. Sentezlenen poli(GMA), metakrilik(MAA) asit monomeri ve dimetakrilat (EDMA) kullanılarak poli(MAA-co-EDMA) elde edilmiştir.
- Poli(MAA-co-EDMA) kullanılarak çok basamaklı hidroliz kondenzasyon metodu ile SiO<sub>2</sub> ve Mag@SiO<sub>2</sub> mikroküreler sentezlenmiştir. Sentezlenen Mag@SiO<sub>2</sub> mikroküreler SiO<sub>2</sub> ile kaplanmıştır. Türkevich metodu kullanılarak sentezlenen AuNP'lerin SiO<sub>2</sub> ve SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküre yüzeylerine immobilizasyonu sağlanmıştır. EDX ve XRD sonuçları ile AuNP immobilizasyonunun başarıyla gerçekleştirildiği görülmüştür.
- SiO<sub>2</sub> mikroküre yüzeyine mezogözenek ve mikrogözenek yapısından kaynaklı yüksek özgül yüzey alanı sayesinde, SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelere kıyasla, daha yüksek miktarda AuNP immobilize edilmiştir.
- SiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerin yüzey alanları azot adsorbsiyon-desorbsiyon metodu kullanılarak sırasıyla 173 m<sup>2</sup>/g, 144 m<sup>2</sup>/g, 2,96 m<sup>2</sup>/g ve 27,97 m<sup>2</sup>/g olarak elde edilmiştir.
- SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub>, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> manyetizasyon davranışları ve doyumluk manyetizasyon değerleri VSM kullanılarak elde edilmiştir. SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için doyumluk manyetizasyon değeri 14,3 emu/g, Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için doyumluk manyetizasyon değeri 9,93 emu/g olarak bulunmuştur.
- Sentezlenen Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub> mikrokürelerin peroksidaz benzeri aktivitesi substrat olarak OPD kullanılarak incelenmiştir. Substrat miktarının, sorbent miktarının, ortam pH değerinin peroksidaz aktivitesine etkisi incelenmiştir.
- Sentezlenen Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub> mikroküreler için reaksiyon hızı-substrat derişim değerleri ile Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir ve enzimlerde enzim ve substrat arasındaki katalitik aktiviteyi gösteren Michaelis Menten sabiti (Km) hesaplanmıştır.

Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için Km değeri 522,47 µM ve Au@SiO<sub>2</sub> mikroküreler için 816,48 µM olarak hesaplanmıştır.

- GSH biyomolekülünün sentezlenen Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub> mikroküre yüzeyine adsorbsiyonu HPLC kullanılarak incelenmiştir.
- Peroksidaz aktivitesi yönünden en uygun koşullar belirlenerek, GSH biyomolekülüne duyarlılığın ölçülmesi için biyomolekül derişimine karşı spektrofotometrik cevap şeklinde kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub> mikrokürelerinin GSH tayini amacıyla biyosensör geliştirilmesinde kullanılabilirliği gösterilmiştir. Çözelti ortamında Au@SiO<sub>2</sub> ve Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikrokürelerde 325 - 3253 µM arasındaki GSH derişimi için lineer absorbands değerleri elde edilmiştir. Au@SiO<sub>2</sub>@MagSiO<sub>2</sub> mikroküreler için insan serumunda ise 2,5 µM ve 50 µM arasındaki GSH derişimi için lineer absorbands değerleri elde edilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] R. Wu, H. Ge, C. Liu, S. Zhang, L. Hao, Q. Zhang, J. Song, G. Tian, J. Lv, *Talanta*, 196 **(2019)** 191.
- [2] Y. Wang, Y. Liu, F. Ding, X. Zhu, L. Yang, P. Zou, H. Rao, Q. Zhao, X. Wang, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410 **(2018)** 4805.
- [3] B. Jiang, D. Duan, L. Gao, M. Zhou, K. Fan, Y. Tang, J. Xi, Y. Bi, Z. Tong, G. F. Gao, N. Xie, A. Tang, G. Nie, M. Liang, X. Yan, *Nature Protocols*, 13 **(2018)** 1506.
- [4] Z. Zhang, J. Xie, J. Yu, Z. Lu, Y. Liu, *Journal of Materials Chemistry B*, 5 **(2017)** 1454.
- [5] L. Gao, J. Zhuang, L. Nie, J. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, T. Wang, J. Feng, D. Yang, S. Perrett, X. Yan, *Nature Nanotechnology*, 2 **(2007)** 577.
- [6] Y. Wang, Y. Sun, H. Dai, P. Ni, S. Jiang, W. Lu, Z. Li, Z. Li, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 236 **(2016)** 621.
- [7] V. K. Singh, P. K. Yadav, S. Chandra, D. Bano, M. Talat, S. H. Hasan, *Journal of Materials Chemistry B*, 6 **(2018)** 5256.
- [8] Y. Huang, J. Ren, X. Qu, *Chemical reviews*, 119 **(2019)** 4357.
- [9] R. Breslow, L. E. Overman, *Journal of the American Chemical Society*, 92 **(1970)** 1075.
- [10] F. Pagliari, C. Mandoli, G. Forte, E. Magnani, S. Pagliari, G. Nardone, S. Licoccia, M. Minieri, P. D. Nardo, E. Traversa, *ACS Nano*, 6 **(2012)** 3767.
- [11] L. Hu, Y. Yuan, L. Zhang, J. Zhao, S. Majeed, G. Xu, *Analytica Chimica Acta*, 762 **(2013)** 83.
- [12] P. Biparva, S. M. Abedirad, S. Y. Kazemi, *Talanta*, 130 **(2014)** 116.
- [13] Q. Wang, L. Zhang, C. Shang, Z. Zhang, S. Dong, *Chemical Communications*, 52 **(2016)** 5410.
- [14] X. Xia, J. Zhang, N. Lu, M. J. Kim, K. Ghale, Y. Xu, E. McKenzie, J. Liu, H. Ye, *ACS Nano*, 9 **(2015)** 9994.
- [15] H. Liu, C. Gu, W. Xiong, M. Zhang, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209 **(2015)** 670.
- [16] W. Yin, J. Yu, F. Lv, L. Yan, L. R. Zheng, Z. Gu, Y. Zhao, *ACS Nano*, 10 **(2016)** 11000.
- [17] Z. Wang, Y. Zhang, E. Ju, Z. Liu, F. Cao, Z. Chen, J. Ren, X. Qu, *Nature Communications*, 9 **(2018)** 3334.
- [18] N. Salarizadeh, M. Sadri, R. H. Sajedi, *Applied Organometallic Chemistry*, 32 **(2018)** 4018.

- [19] G. L. Wang, L. Y. Jin, Y. M. Dong, X. M. Wu, Z. J. Li, *Biosensors and Bioelectronics*, 64 (2015) 523.
- [20] Y. Lin, Z. Li, Z. Chen, J. Ren, X. Qu, *Biomaterials*, 34 (2013) 2600.
- [21] V. Köhler, N. J. Turner, *Chemical Communications*, 51 (2015) 450.
- [22] F. Natalio, R. André, A. F. Hartog, B. Stoll, K. P. Jochum, R. Wever, W. Tremel, *Nature Nanotechnology*, 7 (2012) 530.
- [23] R. Ragg, F. Natalio, M. N. Tahir, H. Janssen, A. Kashyap, D. Strand, S. Strand, W. Tremel, *ACS Nano*, 8 (2014) 5182.
- [24] S. Chen, Y. Quan, Y. L. Yu, J. H. Wang, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3 (2017) 313.
- [25] H. Wei, E. Wang, *Chemical Society Reviews*, 42 (2013) 6060.
- [26] J. Xie, K. Chen, J. Huang, S. Lee, J. Wang, J. Gao, X. Li, X. Chen, *Biomaterials*, 31 (2010) 3016.
- [27] C. Wang, J. Qian, K. Wang, X. Yang, Q. Liu, N. Hao, C. Wang, X. Dong, X. Huang, *Biosensors and Bioelectronics*, 77 (2016) 1183.
- [28] S. Luo, Y. Liu, H. Rao, Y. Wang, X. Wang, *Analytical Biochemistry*, 538 (2017) 26.
- [29] Y. Ding, B. Yang, H. Liu, Z. Liu, X. Zhang, X. Zheng, Q. Liu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 259 (2018) 775.
- [30] M. S. Kim, S. H. Kweon, S. Cho, S. S. A. An, M. I. Kim, J. Doh, J. Lee, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9 (2017) 35133.
- [31] H. Y. Shin, S. Cho, M. I. Kim, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17 (2017) 7971.
- [32] C. Su, L. Bai, H. Zhang, K. Chang, G. Li, S. Li, *Chemical Research in Chinese Universities*, 35 (2019) 163.
- [33] J. Mu, Y. He, Y. Wang, *Talanta*, 148 (2016) 22.
- [34] R. Breslow, L. E. Overman, *Journal of the American Chemical Society*, 92 (1970) 1075.
- [35] X. Wang, W. Cao, L. Qin, T. Lin, W. Chen, S. Lin, J. Yao, X. Zhao, M. Zhou, C. Hang, H. Wei, *Theranostics*, 7 (2017) 2277.
- [36] Q. Wang, Z. Yang, X. Zhang, X. Xiao, C. K. Chang, B. Xu, *Angewandte Chemie International Edition*, 46 (2007) 4285.
- [37] Z. Y. Dong, X. Huang, S. Z. Mao, K. Liang, J. Q. Liu, G. M. Luo, J. C. Shen, *Chemistry—A European Journal*, 12 (2006) 3575.
- [38] Q. Wang, J. Lei, S. Deng, L. Zhang, H. Ju, *Chemical Communications*, 49 (2013) 916.

- [39] J. Mu, Y. Wang, M. Zhao, L. Zhang, *Chemical Communications*, 48 **(2012)** 2540.
- [40] L. Zhang, X. Hai, C. Xia, X. W. Chen, J. H. Wang, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 248 **(2017)** 374.
- [41] R. André, F. Natálio, M. Humanes, J. Leppin, K. Heinze, R. Wever, H. C. Schröder, W. E. G. Müller, W. Tremel, *Advanced Functional Materials*, 21 **(2011)** 501.
- [42] N. Alizadeh, A. Salimi, R. Hallaj, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 288 **(2019)** 44.
- [43] O. Adegoke, C. McKenzie, N. N. Daeid, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 287 **(2019)** 416.
- [44] G. Darabdhara, J. Bordoloi, P. Manna, M. R. Das, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 285 **(2019)** 277.
- [45] Z. Xu, X. Lyu, B. Yang, W. Cao, R. Li, X. Zhang, X. Zhang, G. Fan, X. Kong, Q. Liu, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 569 **(2019)** 28.
- [46] L. Zhang, L. Han, P. Hu, L. Wang, S. Dong, *Chemical Communications*, 49 **(2013)** 10480.
- [47] W. Zhu, M. Chi, M. Gao, C. Wang, X. Lu, *Journal of Colloid and Interface Science*, 528 **(2018)** 410.
- [48] E. Z. Ulakoğlu, M. K. Gümüştaş, A. Belce, T. Altuğ, E. Kökoğlu, *Cerrahpaşa J Med*, 3 **(1998)** 127.
- [49] R. Franco, O. J. Schoneveld, A. Pappa, M. I. Panayiotidis, *Archives of Physiology and Biochemistry*, 113 **(2007)** 234.
- [50] F. Michelet, R. Gueguen, P. Leroy, M. Wellman, A. Nicolas, G. Siest, *Clinical Chemistry*, 41 **(1995)** 1509.
- [51] F. Li, J. Liu, Y. Hu, N. Deng, J. He, *Talanta*, 186 **(2018)** 330.
- [52] Y. Gao, C. Jin, X. Li, K. Wu, L. Gao, X. Lyu, X. Zhang, X. Zhang, X. Luo, Q. Liu, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 568 **(2019)** 248.
- [53] L. Li, Q. Wang, Z. Chen, *Microchimica Acta*, 186 **(2019)** 257.
- [54] R. R. Castillo, M. Vallet-Regí, *International Journal of Molecular Sciences*, 20 **(2019)** 929.
- [55] K. Nozawa, H. Gailhanou, L. Raison, P. Panizza, H. Ushiki, E. Sellier, J. P. Delville, M. H. Delville, *Langmuir*, 21 **(2005)** 1516.
- [56] X. Lei, B. Yu, H. L. Cong, C. Tian, Y. Z. Wang, Q. B. Wang, C. K. Liu, *Integrated Ferroelectrics*, 154 **(2014)** 142.

- [57] B. Topuz, D. Şimşek, M. Çiftçioğlu, *Ceramics International*, 41 **(2015)** 43.
- [58] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *Journal of Colloid and Interface Science*, 26 **(1968)** 62.
- [59] A. Van Blaaderen, J. Van Geest, A. Vrij, *Journal of Colloid and Interface Science*, 154 **(1992)** 481.
- [60] J. Ma, Y. Wu, Y. Zeng, Y. Li, D. Wu, *Journal of Materials Chemistry A*, 3 **(2015)** 16762.
- [61] X. H. Pham, S. Kyeong, J. Jang, H. M. Kim, J. Kim, S. Jung, Y. S. Lee, B. H. Jun, W. J. Chung, *Journal of Nanomaterials*, 2016 **(2016)** 1.
- [62] Y. Bu, B. Cui, W. Zhao, Z. Yang, *RSC Advances*, 7 **(2017)** 55489.
- [63] G. Yang, H. Gong, T. Liu, X. Sun, L. Cheng, Z. Liu, *Biomaterials*, 60 **(2015)** 62.
- [64] Q. Han, X. Wang, X. Liu, W. Xiao, S. Cai, C. Wang, R. Yang, *Journal of Materials Chemistry B*, 7 **(2019)** 1124.
- [65] Z. Chen, C. Wu, Z. Zhang, W. Wu, X. Wang, Z. Yu, *Chinese Chemical Letters*, 29 **(2018)** 1601.
- [66] K. Salimi, D. D. Usta, Ö. Çelikbıçak, A. Pinar, B. Salih, A. Tuncel, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 153 **(2017)** 280.
- [67] P. Zhao, N. Li, D. Astruc, *Coordination Chemistry Reviews*, 257 **(2013)** 638.
- [68] E. Agunloye, L. Panariello, A. Gavriilidis, L. Mazzei, *Chemical Engineering Science*, 191 **(2018)** 318.
- [69] G. Kibar, A. Tuncel, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 28 **(2018)** 2249.
- [70] J. Türkeviç, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discussions of the Faraday Society*, 11 **(1951)** 55.
- [71] G. Frens, *Nature Physical Science*, 241 **(1973)** 20.
- [72] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 7 **(1994)** 801.
- [73] JM Berg, JL Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, Section 8.4, 5th Edition, W. H. Freeman and Company, New York, **2002**.
- [74] Chemistry LibreTexts, 10.2:The Equations of Enzyme Kinetics, [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Map%3A\\_Physical\\_Chemistry\\_for\\_the\\_Biosciences\\_\(Chang\)/10%3A\\_Enzyme\\_Kinetics/10.2%3A\\_The\\_Equations\\_of\\_Enzyme\\_Kinetics](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Physical_Chemistry_for_the_Biosciences_(Chang)/10%3A_Enzyme_Kinetics/10.2%3A_The_Equations_of_Enzyme_Kinetics) (Erişim tarihi: 28 Nisan 2019).
- [75] M. T. Gökmen, F. E. Du Prez, *Progress in Polymer Science*, 37 **(2012)** 365.
- [76] S. C. Feitfel, F. Lisdat, *Journal of Nanobiotechnology*, 9 **(2011)** 59.

- [77] P. Dobrowolska, A. Krajewska, M. Gajda-Rączka, B. Bartosewicz, P. Nyga, B. Jankiewicz, *Materials*, 8 **(2015)** 2849.
- [78] W. Ye, X. Guo, F. Xie, R. Zhu, Q. Zhao, J. Yang, *Nanoscale*, 6 **(2014)** 4258
- [79] G. J. Cao, X. Jiang, H. Zhang, T. R. Croley, J. J. Yin, *RSC Advances*, 7 **(2017)** 52210.





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

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 12/07/2019

Tez Başlığı / Konusu: PEROKSİDAZ AKTİVİTESİNE SAHİP NANOPARTİKÜL/MİKROKÜRE KOMPOZİTLERİNİN SENTEZİ VE GLUTATYON TAYİNİNDE KULLANILMASI

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 69 sayfalık kısmına ilişkin, 12/07/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5'tir.

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 Orjinallik 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.

12/07/2019

Adı Soyadı: Selen Yağmur GÜNGÖR  
Öğrenci No: N14326404  
Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği  
Programı: Kimya Mühendisliği – Yüksek Lisans  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Selen Yağmur GÜNGÖR  
Doğum yeri : Ankara  
Doğum tarihi : 10.06.1991  
Medeni hali : Evli  
Elektronik posta adresi : yagmurseleennn@gmail.com  
Yabancı dili : İngilizce

### EĞİTİM DURUMU

Lisans (2014) : Hacettepe Üniversitesi / Kimya Mühendisliği  
Yüksek Lisans (2019) : Hacettepe Üniversitesi / Kimya Mühendisliği ABD

### İş Tecrübesi

08.02.2016 – Devam ediyor. Gen İlaç ve Sağlık Ürünleri A.Ş. / Kalite Güvence Personeli

