



**YÜZEY ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN
SPEKTROSKOPİSİ (SERS) YAKLAŞIMI İLE
FARKLI HÜCRE TİPLERİNİN TANIMLANMASI**

Seda TARHAN

**Yüksek Lisans Tezi
Proses Ve Reaktör Tasarımı Ana Bilim Dalı
Doç. Dr. Mehmet YILMAZ
2021
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PROSES VE REAKTÖR TASARIMI ANA BİLİM DALI

**YÜZEY ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ (SERS) YAKLAŞIMI
İLE FARKLI HÜCRE TİPLERİNİN TANIMLANMASI**

(Detection of Different Cell Types through Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)
Approach)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seda TARHAN

Danışman: Doç. Dr. Mehmet YILMAZ

Erzurum
Temmuz, 2021

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Seda TARHAN tarafından hazırlanan “Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) Yaklaşımı ile Farklı Hücre Tiplerinin Tanımlanması” başlıklı çalışması .. / .. / 20.. tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Proses ve Reaktör Tasarımı Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Dr. Öğr. Üyesi Hatice BAYRAKÇEKEN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	
Danışman:	Doç. Dr. Mehmet YILMAZ <i>Atatürk Üniversitesi</i>	
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Adnan ALDEMİR <i>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi</i>	

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Unvan Ad SOYAD
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 119Z740

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek lisans Tezi olarak Doç.Dr. Mehmet YILMAZ danışmanlığında sunulan “Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi(SERS) Yaklaşımı ile Farklı Hücre Tiplerinin Tanımlanması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	Tezdeki benzerlik oranının yazınız	30
Kuramsal Temeller	Tezdeki benzerlik oranının yazınız	30
Materyal ve Yöntem	Tezdeki benzerlik oranının yazınız	35
Bulgular	Tezdeki benzerlik oranının yazınız	20
Tartışma	Tezdeki benzerlik oranının yazınız	20
Tezin Geneli	Tezdeki benzerlik oranının yazınız	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Seda TARHAN	Doç.Dr. Mehmet YILMAZ
Tarih girmek için burayı tıklayınız	Tarih girmek için burayı tıklayınız
İmza:	İmza:

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın planlanması ve uygulaması sırasında her zaman yanımda olan, bana yol gösteren bilgisini ve desteğini benden esirgemeyen Sayın danışman hocam Doç. Dr. Mehmet YILMAZ' a,

Deneysel çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Ferhunde AYSİN, Dr. Öğr. Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK ve Dr. Öğr. Üyesi Aslı YILMAZ 'a, teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca aldığım kararları ve seçtiğim yolu destekleyen başta kıymetli eşim Uğur TARHAN 'a ve sevgili aileme tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Seda TARHAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YÜZEY ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ (SERS) YAKLAŞIMI İLE HÜCRE TİPLERİNİN TANIMLANMASI

Seda TARHAN

Danışman: Doç. Dr. Mehmet YILMAZ

Amaç: Bu tez çalışmasında sağlıklı ve kanserli akciğer hücre modelleri (MRC5 ve A549), sağlıklı meme (MCF-10A), kanserli bağırsak (CACO2) ve kanserli meme (MCF7) hücreleri polidopamin (PDOP) aracılığı ile altın nanopartiküller (AuNPs) ile dekore edilmesi ve bu sistemin altın nanoçubuk dizinler (gold nanorod arrays, GNAs) ile bir araya getirilerek farklı hücre tiplerinin yüzey zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) ile tanımlanması amaçlanmıştır.

Yöntem: GNA yüzeyler eğik açı biriktirme (oblique angle deposition, OAD) ve AuNP ise sitrat indirgeme yöntemi ile üretilmiştir. Beş farklı hücre uygun besi ortamlarında üretilmiş ve hücre yüzeyleri dopaminin oksidatif polimerizasyonu yoluyla konformal olarak PDOP ile kaplanmış ve GNA yüzey üzerinden hücrelerden haritalama yaklaşımıyla SERS spektrumları alınmıştır. Karşılaştırma amacıyla benzer yaklaşım alüminyum folyo ve düz altın yüzeylere uygulanmıştır. Optimum koşullarda elde edilen sistemlerden alınan SERS spektrumları karşılaştırılmıştır.

Bulgular: OAD yaklaşımı ile GNA yüzeyler istenilen morfolojide üretilmiş ve PDOP kaplanan hücreler AuNP ile kolaylıkla dekore edilmiştir. AuNP ile dekore edilmiş hücrelerin GNA ile bir araya getirilmesi sonucu SERS sinyallerinde önemli iyileşmeler gözlenmiştir. Uygulanan farklı kemometrik analizler ile üretilen sistemler ile hücre tanısının SERS yaklaşımı ile yapılabileceği açık bir şekilde ortaya konmuştur.

Sonuç: AuNP ile dekore edilmiş hücrelerin GNA ile bir araya getirilmesi sonucu elde edilen SERS sinyalleri ile beş farklı hücre tipi için farklılaşma elde edilmiştir. Bu sistem ve SERS yaklaşımı ile alınan sinyaller ayrıntılı istatistiksel analizler yapılmıştır. Sonuç olarak hücre tanısının belirtilen yollarla gerçekleştirileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS), Hücre Tanısı, Altın Nanoçubuk Dizinleri, Altın Nanopartiküller, Polidopamin, Kemometrik Analizler

Temmuz 2021, 106 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

DETECTION OF DIFFERENT CELL TYPES THROUGH SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY (SERS) APPROACH

Seda TARHAN

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet YILMAZ

Objective: In this thesis study, healthy and cancerous lung cell models (MRC5 and A549), healthy breast (MCF-10A), cancerous intestine (CACO2) and cancerous breast (MCF7) cells were decorated with gold nanoparticles (AuNPs) through polydopamine (PDOP). It is aimed to identify different cell types by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) by combining this system with gold nanorod arrays (GNAs).

Method: GNA surfaces were produced by oblique angle deposition (OAD) and AuNP by citrate reduction method. Five different cells were grown in suitable nutrient media and their cell membrane were conformally coated with a PDOP layer via the oxidative polymerization of dopamine, and SERS spectra were obtained from the cells via the GNA surface mapping approach. For comparison, a similar approach has been applied to aluminum foil and flat gold surfaces. SERS spectra from systems obtained under optimum conditions compared.

Results: With the OAD approach, GNA surfaces were produced in the desired morphology and PDOP coated cells were easily decorated with AuNP. Significant improvements in SERS signals were observed as a result of combining AuNP-decorated cells with GNA. Different chemometric analyzes have been applied to the produced systems. It has been clearly demonstrated that cell diagnosis can be performed with the SERS approach.

Conclusion: With the SERS signals obtained by combining AuNP-decorated cells with GNA, differentiation was obtained for five different cell types. Detailed statistical analyzes of the signals received with this system and SERS approach were made. As a result, it has been observed that cell diagnosis will be performed in the specified ways.

Keywords: Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS), Cell Diagnosis, Gold Nanorod Arrays, Gold Nanoparticles, Polydopamine, Chemometric Analysis

June 2021, 106 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xiii
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	6
Nanoteknoloji.....	6
Nanoteknolojinin Amaçları.....	7
Nanoteknolojinin Avantajları.....	7
Nanoüretim Yöntemleri	7
Nanopartikül Üretim Yöntemleri	8
Altın Nanopartiküller	17
Hücre Kültürü.....	20
Hücre Kültürü Yöntemleri	22
Klasik Raman Spektroskopisi (RS).....	23
Tarihçesi.....	23
Raman Spektroskopisi Temel Teorisi	23
Raman Cihazının Yapısı	28
Işın Kaynakları	29
Raman Spektroskopisinin Avantajları	30
Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS)	31
SERS ve Biyolojik Uygulamaları	35
Kemometrik Yöntemler	40
Gözetimsiz Örüntü Tanımlama Yöntemi	41
Gözetimli Örüntü Tanımlama Yöntemi	43
MATERYAL VE METOD	45
Kullanılan Hücreler	45

Kullanılan Kimyasallar	45
Kullanılan Cihazlar	45
Altın Nanopartiküllerin Sentezi	48
Hücrelerin Çözülmesi ve Pasajlanması.....	48
Besiyerinin Hazırlanması	48
Hücrelerin Çözülmesi.....	48
Hücrelerin Pasajlanması.....	49
Altın Nanoçubuk Dizinlerin (Gold Nanorod Arrays, GNA) Yüzeyde Oluşturulması ve Karakterizasyonu.....	50
Hücrelerin PDOP ve AuNP ile Dekore Edilmesi.....	51
GNA Yüzeyler ile Biraraya Getirilen Cells@PDOP@AuNP Yapılarının Kemometrik Analizleri.....	52
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	53
Altın Nanopartikül (AuNP) Sentezi	53
GNA Platformlarının Üretimi	55
Hücrelerin Büyütülmesi ve Stoklanması.....	57
Hücrelerin PDOP ile Kaplanması (Cells@PDOP) ve Bu Yapının AuNP ile (Cells@PDOP@AuNP) Dekore Edilmesi	57
Cells@PDOP ve Cells@PDOP@AuNP Yapılarının GNA ile Biraraya Getirilerek SERS Haritalaması ile Analizi.....	60
Cells@PDOP@AuNP Hücrelerin SERS Çalışmalarına İlişkin Kemometrik Analiz Sonuçları	72
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ.....	90

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Sıçratma Kaynakları.	15
Tablo 2. Raman Spektroskopide Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Lazer Kaynakları	29
Tablo 3. Lazerlerin Dalga Boyuna Bağlı Olarak Uygulama Alanları	29



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nanoüretimde kullanılan yöntemler.....	8
Şekil 2. Kimyasal buhar birikimi (CVD) yönteminin şematik gösterimi	9
Şekil 3. Fiziksel buhar biriktirme teknikleri.....	10
Şekil 4. Buharlaştırma yönteminin gösterilişi	11
Şekil 5. Sıçratma işleminin gösterimi.	13
Şekil 6. OAD işlemi uygulanarak üretilen nano boyutlu yapılar a) Düz b) Eğik Kolon c-d-e) Farklı çaplarda sütunlar f) Dallanmış yapılar g-h) Başlıklonlar i) Sarmal yapı j) Dalgalı sütunlar k-l) Zigzag kolonlar.....	16
Şekil 7. Eğik açılı birikimi (OAD) işlemi.	17
Şekil 8. Bir elipsometrikden elde edilen altının karmaşık dielektrik fonksiyonu $\varepsilon = \varepsilon_1 + i\varepsilon_2$	19
Şekil 9. a) Konfluent olmamış uzun uzantılara sahip hücreler b) Konfluent olmaya başlayan oval şekil alan hücreler	22
Şekil 10. Elektromanyetik spektrumların dalga boyu skalaları.....	24
Şekil 11. Işın demetinin madde ile etkileşimi	24
Şekil 12. Rayleigh ve Raman saçılma süreçlerinin diyagramı	26
Şekil 13. Sikloheksan için Stokes ve anti-Stokes saçılması. Gücsüz görünen anti-Stokes spektrumu	26
Şekil 14. Stokes ve anti-Stokes türü Raman saçılması olaylarının molekül enerji diyagramı ile açıklanması.	28
Şekil 15. Zenginleştirilmiş Raman saçılımı	33
Şekil 16. Kimyasal SERS şiddetlendirmesinin gösterimi	33
Şekil 17. Metal nanoküredeki lokal plazmon rezonansının toplu salınımı.	33
Şekil 18. Farklı morfolojilere sahip nanoparçacıklar	35
Şekil 19. Temel bileşenin ilk ikisi koyu renkle çizili olan iki boyutlu sistemde verilerin bir dizi noktaları gösterilmiştir.....	42
Şekil 20. PCA: Varyansı maximuma çıkaran bileşen eksenleri ve LDA: Sınıf ayırımını maximuma çıkaran bileşen eksenlerini gösterir	44
Şekil 21. Raman Spektroskopisi (WITec alpha300 R)	47
Şekil 22. Yüzeylerin temizlenmesi için kullanılan plazma cihazı (a) ve PVD cihazı (b)	47
Şekil 23. OAD yaklaşımı ve PVD sistemi ile 10° biriktirme açısı koşulunda üretilen 50 nm kalınlığında üretilen GNA platformunun optik görüntüsü.	51

Şekil 24. Sitrat indirgeme yöntemi ile elde edilen AuNP için TEM görüntüsü (a) ve UV- vis absorpsiyon spektrumu (b). Sentezlenen AuNP dispersiyonu için optik görüntü TEM görüntüsü üzerinde verilmiştir	53
Şekil 25. AuNP sistemi için Zeta-potansiyel ölçümleri	54
Şekil 26. Üretilen AuNP için XRD desenlerini gösteren spektrumlar	54
Şekil 27. PVD tekniği ve OAD yaklaşımı ile üretilen GNA yapılar için farklı büyütmelede alınan SEM görüntüleri	55
Şekil 28. GNA yapılar için ince filmlerden alınan UV-vis absorpsiyon spektrumu.....	56
Şekil 29. GNA ince film için elipsometrik parametrelerin farklı ışık yön ve açılar için değişimi a) Ψ , b) Δ , c) gerçek (ϵ_r), ve d) sanal (ϵ_i) dielektrik sabitleri.....	56
Şekil 30. A. Hücrelerin (A549, CaCO-2, MCF 10A, MCF7 ve MRC5) 10X büyütmede alınmış mikroskop görüntüleri. B. Tripsin uygulaması sonucu yüzeylerden kalkmış olan hücrelerin (A549, CaCO-2, MCF 10A, MCF7 ve MRC5) 10X büyütmede alınmış mikroskop görüntüleri	57
Şekil 31. A. Cells@PDOP hücrelerin (A549, CaCO-2, MCF 10A, MCF7 ve MRC5) 40X büyütmede alınmış mikroskop görüntüleri. B. Cells@PDOP@AuNP hücrelerin (A549, CaCO-2, MCF 10A, MCF7 ve MRC5) 40X büyütmede alınmış mikroskop görüntüleri	58
Şekil 32. Cells@PDOP hücrelerin TEM görüntüleri ((a) A549 (b) CaCO-2 (c) MCF 10A (d) MCF7 (e) MRC5)	59
Şekil 33. Cells@PDOP@AuNP hücrelerin TEM görüntüleri ((a) A549 (b) CaCO-2 (c) MCF 10A (d) MCF7 (e) MRC5).....	60
Şekil 34. İşlem görmemiş hücreler için Al folyo üzerinden alınan örnek Raman sinyalleri ..	61
Şekil 35. Cells@PDOP hücreler için Al folyo üzerinden alınan örnek Raman sinyalleri	62
Şekil 36. Cells@PDOP@AuNP hücreler için Al folyo üzerinden alınan örnek Raman sinyalleri	62
Şekil 37. İşlem görmemiş hücreler için SGS üzerinden alınan örnek Raman sinyalleri.....	63
Şekil 38. Cells@PDOP hücreler için SGS üzerinden alınan örnek Raman sinyalleri	63
Şekil 39. Cells@PDOP@AuNP hücreler için SGS üzerinden alınan örnek Raman sinyalleri	63
Şekil 40. A549@PDOP@AuNP hücreler için GNA üzerinden alınan farklı Raman sinyalleri	64
Şekil 41. MRC-5@PDOP@AuNP hücreler için GNA üzerinden alınan farklı Raman sinyalleri	65

Şekil 42. MCF-7@PDOP@AuNP hücreler için GNA üzerinden alınan farklı Raman sinyalleri	65
Şekil 43. MCF-10A@PDOP@AuNP hücreler için GNA üzerinden alınan farklı Raman sinyalleri	65
Şekil 44. CaCO ₂ @PDOP@AuNP hücreler için GNA üzerinden alınan farklı Raman sinyalleri	66
Şekil 45. A549@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1230 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b' de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu	66
Şekil 46. MRC-5@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1230 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri. (a) hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b' de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu	67
Şekil 47. MCF-7@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1230 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b' de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu	67
Şekil 48. MCF-10A@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1230 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b' de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu	68
Şekil 49. CaCO ₂ @PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1230 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b' de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu	68
Şekil 50. A549@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1330 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri. (a) hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen	

bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu	69
Şekil 51. MRC-5@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1330 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu	69
Şekil 52. MCF-7@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1330 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu	70
Şekil 53. MCF-10A@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1330 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu	70
Şekil 54. CaCO ₂ @PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1330 cm ⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu	71
Şekil 55. GNA platformu için 2D hazırlanmış COMSOL modeli ve elektriksel alan dağılımı. Ölçek çubuğu 100 nm’dir	71
Şekil 56. Cells@PDOP@AuNP hücreleri için kemometrik analiz sonuçları: PCA skor çizimi.	73
Şekil 57. Cells@PDOP@AuNP hücreleri için kemometrik analiz sonuçları: PCA yükleme değerleri	74
Şekil 58. Cells@PDOP@AuNP hücreleri için kemometrik analiz sonuçları: HCA dendogramı	74

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

AuNP	: Küresel Altın Nanopartikül
AuNR	: Altın Nanoçubuk
PDOP	: Polidopamin
EF	: Zenginleştirme Faktörü (Enhancement Factor)
GNA	: Altın Nanoçubuk Yüzey (Gold Nanorod Array)
OAD	: Eğik Açılı Birikimi (Oblique Angle Deposition)
PVD	: Fiziksel Buhar Birikimi (Physical Vapor Deposition)
CVD	: Kimyasal Buhar Depozisyonu (Chemical Vapor Deposition)
RSD	: Görece Standart Sapma (Relative Standard Deviation)
RS	: Raman Spektroskopisi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskop (Scanning Electron Microscope)
SERS	: Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface-enhanced Raman Spectroscopy)
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskop (Transmission Electron Microscope)
UV	: Ultraviyole
XRD	: X-ışını Kırınım (X-ray Diffraction)
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonansı (Surface Plasmon Resonance)
FBS	: Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)
S/N	: Sinyal / Gürültü
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyon (American Type Culture Collection)
HOMO	: En Yüksek Dolu Molekül Orbitali (Highest Occupied Molecular Orbital)
LUMO	: En düşük Dolmamış Molekül Orbitali (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
MAMs	: Çok Değişkenli Analiz Yöntemleri (Multivariate Analysis Methods)

Simgeler

%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
cm²	: Santimetrekare

k/h	: Kütle/Hacim
L	: Litre
μL	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
mg	: Miligram
m	: Metre
M	: Molar
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
μ	: İndüklenmiş Dipol
E	: Elektromanyetik Alan
α	: Polarizibilete Tensörü ya da Buhar Fazı Birikim açısı
Q	: Titreşim Koordinatı
I	: Raman Sinyal Şiddeti
m	: Atom Kütlesi
k	: Kuvvet Katsayısı
$\epsilon_1(\omega)$	: Metalin Frekansa Bağlı Dielektrik fonksiyonu
ϵ_2	: Ortamın Göreceli Geçirgenliği
Kd	: Affinite Katsayısı
kDA	: KiloDalton
β	: Eğimli Nanoçubuk açısı
$I_{Yığın}$ ve I_{GNA}	: Sırasıyla Yığın MB ve GNA Nanoçubuk Kullanılarak Elde Edilen Raman Şiddetleri
$N_{Yığın}$ ve N_{GNA}	: Sırasıyla Yığın MB Referans Örnek ve GNA Üzerindeki MB Molekül Sayısı
Es	: Son Enerji
Ei	: İlk Enerji
λ	: Dalga boyu
ν	: Frekans
h	: Plank Sabiti
c	: Işık Hızı
$\bar{\nu}$	: Dalga Numarası
α	: Polarizarlık

GİRİŞ

Optik yöntemler invazif olmaması ve zararsız ışık-madde etkileşimi gibi özelliklerinden dolayı biyolojik sistemlerin analizinde yoğunlukla kullanılmaktadır(Rusciano vd., 2017). Floresans temelli teknikler ile biyolojik sistemlerin görüntülenmesinde yüksek hassaslıkta sonuçlar elde edilebilmektedir. Ancak, floresans yöntemler, floresans etiketlerin kolayca ağarması (photobleaching), floresans moleküllerin analit molekülü ile etkileşmesi ve zayıf kimyasal seçicilik gibi sorunları beraberinde getirmektedir. Son yıllarda Raman spektroskopisi, belirtilen sorunlara çözüm sunması ve uzaysal çözünürlüğü (spatial resolution) nanoölçeğe indirmesi gibi artı değerler kazandırmasıyla yaşam bilimlerinde artan bir ilgi uyandırmaktadır(Siebert & Hildebrandt, 2008; R. Smith vd., 2016). En basit haliyle Raman spektroskopisi, bir lazer kaynağı kullanılarak aktif hale getirilen hedef moleküllerden saçılan inelastik fotonların ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Raman spektroskopisi floresans ağarma problemi oluşturmaz, herhangi bir örnek hazırlama prosedürü gerektirmez (etiketleme yapılmadan kullanım) ve daha da önemlisi molekülün yapısına özel vibrasyonları belirleyebildiğinden kimyasal içeriğin parmak izi (chemical fingerprinting) hassasiyetinde tanısına olanak sağlar. Temel olarak Raman spektroskopisi infrared (IR) absorpsiyon spektroskopisine benzer bilgi sağlar. Fakat Raman spektroskopisinin IR tekniğine göre en bariz avantajı, su için IR absorpsiyon spektrumunda gözlenen dominant etkinin Raman spektrumunda görülmemesidir. Bu durumun önemi tüm biyolojik örneklerin az ya da çok suyla birlikte olduğu göz önüne bulundurulduğunda daha iyi anlaşılır. Bundan dolayı Raman spektroskopisi başta hücre (canlı ya da fikse) olmak üzere çok farklı biyolojik sistemin analizinde rahatlıkla kullanılmaktadır(Nottingham vd., 2002; Short vd., 2005). Ayrıca, Raman spektroskopisinin konfokal taramalı mikroskop ile biraraya getirilmesi, dokuların ya da tek bir hücrenin kimyasal görüntülenmesini (Raman görüntüleme) mümkün kılmaktadır. Aynı zamanda, karmaşık biyolojik sistemlerin moleküler kompozisyonunda oluşan değişimler çok değişkenli analiz yöntemleri (multivariate analysis methods, MAMs) yardımı ile belirlenerek hastalıkların tanısı yüksek bir hassasiyet ve spesifiklikte gerçekleştirilmektedir(Barman vd., 2012; Zoubir, 2012). Bunlara ek olarak Raman spektroskopisi ile hücre bileşenlerinin tanımlanması(Krafft vd., 2003), kanserli ve sağlıklı hücrelerin ayırt edilmesi(Bergholt vd., 2011), kanser hücrelerinde fenotip ayrımının sağlanması ve insan embriyonik kök hücreler ile farklılaşmış hücrelerin tanımlanması(Pascut vd., 2011) gibi farklı hücre uygulamalarında çalışmalar yapılmıştır.

Raman spektroskopisi biyolojik uygulamalarda sunduğu tüm bu avantajlarına rağmen, pratik uygulamalarda sorunlara yol açan birçok kısıtlamaya da sahiptir. Raman spektroskopisinin temel kısıtlaması inelastik ışık saçılmasının doğası gereği oldukça düşük mertebelerde gerçekleşmesidir (Rusciano vd., 2017). Saçılan fotonların çok önemli kısmı elastik özellikte iken (Rayleigh saçılması), yalnızca fotonların $1 / 10^7$ (on milyonda bir) kısmı Raman saçılması oluşturmaktadır. Bu da temelde Raman kesit bölgelerinin çok düşük değerlerde ($10^{-30} - 10^{-25} \text{ cm}^2 \text{ sr}^{-1}$) olmasından kaynaklanmaktadır. Bu değerler floresans ya da absorpsiyon kesit bölge değerlerinden 8-10 mertebe daha düşüktür. Bundan dolayı klasik Raman spektroskopisi ile elde edilebilecek tanı alt limitleri, düşük hassasiyet sorunundan dolayı yüksek olmaktadır ($\sim 0.1 \text{ mM}$). Son yıllarda bu sorunları aşmaya yönelik olarak Raman sinyal şiddetini arttırarak, hassasiyet konusunda çarpıcı ilerlemeler sağlanmıştır. Belirtilen bu yaklaşımlar yüzey zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) olarak adlandırılmış olup, ilerleyen bölümlerde SERS ve temel biyolojik uygulamaları konusunda genel değerlendirmeler yapılacaktır.

SERS, klasik Raman spektroskopisinin sunduğu yapısal spesifiklik ve deneysel esneklik gibi mevcut avantajlarına plazmonik nanoyapıların (altın, gümüş ya da bakır) eklenmesiyle sinyal şiddetinin arttırılması temeline dayanan bir tekniktir. Böylelikle, SERS, kimyasal ve biyolojik molekül ve yapıların eser miktarda ve parmak izi hassasiyetinde tanısını gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca gelişen nanoteknolojik yaklaşımlar ve nanomalzeme üretim yöntemleri Raman spektroskopisinin gelişimini önemli ölçüde arttırmıştır. SERS çalışmalarındaki bir diğer çarpıcı ilerleme de tek molekül tanısının parmak izi seçiciliğinde gerçekleştirilmesidir. Bu ilerlemeden sonra bu konudaki çalışmalarda adeta bir patlama yaşanmıştır. Günümüzde birçok farklı nanoteknolojik strateji kullanılarak SERS çalışmaları ile ağır metallerden proteinlere, bakterilerden toksinlere kadar çok farklı molekül ya da yapının tanısı gerçekleştirilebilmektedir.

SERS en basit tanımıyla molekül kaynaklı Raman sinyal şiddetinin arttırılması temeline dayanan bir tekniktir. Temel olarak SERS çalışmalarında iki farklı mekanizma ile Raman sinyal şiddeti arttırılabilmektedir: Kimyasal zenginleştirme ve Elektromanyetik zenginleştirme. Bunlardan kimyasal zenginleştirme çoğunlukla elektromanyetik zenginleştirme ile beraber aynı anda oluşmaktadır. Temel olarak kimyasal zenginleştirme, analit molekülün en yüksek dolu moleküler orbitali (highest occupied molecular orbital, HOMO) ve en düşük dolmamış moleküler orbitali (lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) ile metalin Fermi seviyesi arasında kullanılan lazerin enerjisine bağlı olarak olası yük transfer komplekslerinin ortaya çıkmasına bağlıdır. Bu uyarılma ya metalden moleküle ya da molekülden metale olabilir.

Kimyasal zenginleştirme ile 10^1 - 10^3 mertebelerinde Raman sinyal zenginleştirilmesi sağlanabilmektedir. Elektromanyetik zenginleştirme ise bir iletken içerisindeki elektron bulutunun kollektif olarak uyarılması sonucu oluşan yüzey plazmonlarının uyarılmasıyla nano-ölçekli metalik yüzeylerde lokalize elektrik alanının zenginleşmesine neden olmakta ve hem ışık uyarılmasını hem de saçılma radyasyonunun oluşmasını sağlamaktadır(Stiles vd., 2008). Yüzeydeki pürüzlülükler ve kavisler plazmonların ışıkla daha iyi uyarılmasını sağlar. Yüzeydeki ışığın elektromanyetik alanı yüzey plazmon uyarılma durumunda yüksek oranda artırılabilir. Bu durumda hem gelen lazerin alanı hem de lazerin yüzeydeki nanoyapılarla etkileşimi elektromanyetik SERS zenginleşmesini sağlamaktadır. Görünür bölge dalga boyları için gümüş, altın ve bakırın yüzey plazmon oluşturma yeteneğinde olduğu ve SERS'te elde edilen zenginleştirmenin büyük çoğunluğunun bundan kaynaklandığı saptanmıştır(Moskovits, 1978). Yıllar boyunca elektromanyetik mekanizmanın açıklanmasına katkı sağlayan çok sayıda elektromanyetik teori geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen deneysel ve teorik veriler elektromanyetik zenginleştirme ile 10^{11} - 10^{12} mertebesinde Raman sinyal zenginleştirmesinin sağlanabileceğini göstermiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalar lokal alan şiddetindeki artışın etkileşen komşu metalik nanoyapılar arasındaki uzaklığın birkaç nm seviyesinde olduğu durumlarda çok daha yüksek olduğunu göstermektedir(Hao & Schatz, 2004). Lokal elektromanyetik alanın bu şekilde çok daha şiddetli olan bölgelerine SERS sıcak noktaları (SERS hot-spots) denilmektedir. Bu bağlamda son zamanlarda kolloidal plazmonik nanopartiküller ve iki ya da üç boyutlu (2-D/3-D) plazmonik nanoyapılar kullanılarak çok yenilikçi yöntemler ortaya konulmuştur. SERS uygulamalarında kolloidal nanopartiküllerin kullanımı basit ve ucuz bir yol olmasına karşın, nanopartiküllerin kontrolsüz agregasyonu SERS sinyallerinde tutarsızlıklara neden olmaktadır. Diğer yandan SERS için üretilen 2-D/3-D nanoyapılar için genelde litografi gibi yöntemler kullanılmakta ve mevcut yöntemler doğaları gereği pahalı ve karmaşık cihazların kullanımını gerektirmektedir. Bu cihazların kullanımı için uzman kişilere ihtiyaç duyulmakta ve ayrıca üretilen sistemler çok küçük boyutlarda olduğu için pratik uygulamalarda kullanımı sınırlanmaktadır(K. Kneipp vd., 1997). Bundan dolayı mevcut SERS platformlarına alternatif olacak ucuz, hassas, güvenilir ve yüksek miktarda kolay üretilen sistemlere ihtiyaç duyulduğu tartışma götürmez bir gerçek olarak karşımıza çıkmaktadır.

Floresans sistemlere benzer şekilde SERS sistemleri on-/off-tipi yanıt verebilmektedir. Eğer elde edilen sinyal, ölçülen özellik ile kalibre ise kantitatif veri oluşturulabilir. Bu şekliyle analiz tipi tek değişkenli (univariate) olur. Fakat çoğunlukla biyolojik örneklerden alınan SERS spektraları çok değişkenlidir (multivariate). Bir başka deyişle binlerce karmaşık ve farklı vibrasyonel moddan alınan sinyallerin değerlendirilmesi son derece güçtür. SERS

çalışmalarında, SERS sisteminin çok yakınındaki moleküllere özgü biyokimyasal sinyaller direkt olarak ölçüldüğünden alınan spektra doğası gereği birçok farklı bileşen için veri içerecektir. Bundan dolayı SERS verilerinin analizinde çok daha sofistike kemometrik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durumda temel bileşen analizi (principal component analysis, PCA) temel bileşen oluşturarak verinin boyutunu düşürmek için kullanılır(Kotanen vd., 2016). PCA temel olarak çok değişkenli verileri kümelerle ayrıştırır. Daha sonra bu kümelemeler kullanılarak farklılıklar, benzerlikler ve verideki değişkenlikler analiz edilerek skor çizimleri elde edilir. Bir başka teknik olan kısmi en küçük kareler regresyon analizi ise denetlenmiş birçoklu değişken analiz yöntemidir. Burada spektral ölçümler deneysel değişimler olarak modellenir(Gracie vd., 2014). Bu yaklaşım ile SERS spektralarının daha iyi ayrıştırılması ve analizi mümkün olmaktadır(Faulds vd., 2008). Doğrudan klasik en küçük kareler analizi birçok-değişkenli analiz tekniği olup SERS verilerinin çoğullama tahlillerinde kullanılır(McAughtrie vd., 2013). SERS spektraları sahip oldukları keskin ve ayırt edici pikleri ile çok değişkenli veri sunarak çoğullama analizlerine imkân sağlamakta ve bu yönüyle tek değişkenli yapıdaki floresans analizinden farklılaşmaktadır.

Önceki kısımlarda belirtildiği üzere, etiketsiz SERS sistemlerinin biyolojik uygulamalarında karşılaşılan temel zorluk biyolojik sistemlerin karmaşık içerikleri gereği alınan sinyallerin ayrımının yapılamaması ve bunun sonucunda veri analizinde yaşanan zorluklardır. Yine bu kısımda verilen çalışmalar ışığında, PCA başta olmak üzere farklı istatistiksel yaklaşımların bu sorunu çözmeye konusunda oldukça etkin oldukları gösterilmiştir.

Bu kısımda verilen tüm çalışmalar ve değerlendirmeler gözönüne alındığında yenilikçi SERS yaklaşımlarının başta hücre olmak üzere tüm biyolojik sistemlere uygulamasının sunacağı katkılar açıkça görülmektedir. Bu bağlamda tez kapsamında etiketsiz SERS yaklaşımının hücre çalışmalarına uygulanması ve bu yolla hücre tanısına olanak sağlayacak bir sistemin üretilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda bu tarz uygulamalarda ilk kez kullanılmak üzere 3D ve anizotropik morfolojide altın nanoçubuk dizinler (gold nanorod array, GNA) bir SERS platformu olarak fiziksel buhar birikimi (physical vapor deposition PVD) tekniği ile üretilmiştir. Tez kapsamında iki farklı kategoride çalışma planlanmıştır.

İlk kısımda sağlıklı ve kanserli akciğer hücre modelleri (MRC5 ve A549), sağlıklı ve kanserli meme (MCF 10A ve MCF7), kanserli bağırsak (CACO2) hücre modelleri ince bir polidopamin (PDOP) kaplaması ile fonksiyonel hale getirilip (Cells@PDOP), yüzeyi AuNP (Cells@PDOP@AuNP) ile dekore edilmiştir. Daha sonra Cells@PDOP ve Cells@PDOP@AuNP, SERS platformu olan GNA yüzeyine aktarılıp, SERS haritalama tekniği ile sinyaller toplanmıştır. Elde edilen bu sinyaller sonrasında ayrıntılı istatistiksel analizler ile beş

farklı hücre tipi için farklılaşma elde edilip, hücre tanısının önerilen SERS haritalama tekniği gerçekleştirilmesi sağlanacaktır. Literatürde GNA yüzeyler ya da hücrelerin PDOP üzerinden plazmonik nanopartiküllerle dekore edilerek tanımlanmasına yönelik hiçbir çalışma bulunmamaktadır. GNA yüzeyler bir SERS platformu olarak hassaslık, verim, maliyet, kolay ve hızlı üretim ile pratik uygulamalara imkan tanınması gibi avantajlarıyla diğer SERS platformlarına üstünlükler göstermiştir(Yılmaz vd., 2014). Ayrıca hücrenin PDOP ile kaplanıp fonksiyonel hale getirilmesi başlı başına önemli bir gelişmedir ve önemli bir özgünlük arz etmektedir. Bundan dolayı bu kısımda yapılacak çalışmaların ilgili literatüre önemli katkılar sunacağı açıktır. Elde edilen sinyaller istatistiksel analizler ile değerlendirilerek önerilen sistem ile SERS yaklaşımı ile hücre tanısının yapılabileceği gösterilmiştir.



KURAMSAL TEMELLER

Nanoteknoloji

Fen bilimleri dalları, elektronik, endüstri, mekanik, inşaat vb birden çok mühendislik dallarını bir bütün haline getiren, moleküler düzeyde çalışmalara ve tasarlamaya ve bunları ürünlere dönüştürmeye yön veren bilim dalına nanoteknoloji denilmektedir(Hierold vd., 2007).

Nanoteknoloji sayesinde, atom ve moleküller kullanılarak, 1 ile 100 nm boyutta yapılar üretilmektedir. Bu teknoloji ile küçük boyuttaki üretilen malzemeler ile moleküler seviyede açığa çıkan farklı özellikleri kullanılmakta ve günlük hayatımızda yer bulmaktadır. Bir başka deyişle nanoteknoloji malzemelerin yığın ölçekteki özelliklerinden farklı olarak sıra dışı farklı ve özgün artı değerler sunmasına olanak tanımaktadır.

Nanoteknolojide ölçüm birimi olarak nanometre (nm) kullanılır. Metrenin milyarda biri olarak kabul edilen bu ölçüm birimi nanometre olarak tanımlanır ve $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ 'dir.

Ürünler atomlardan üretilirler ve bu elde edilen ürünlerin özelliklerini atomların dizilişlerinden alırlar. Atomların dizilişlerinin farklı olması, maddelerin de birbirinden farklı olmasını sağlamaktadır. Atomik diziliş benzetilerek doğadaki her şey kopyalanabilir. Bunlar atomları ve molekülleri birleştirerek ve atomları hareket ettirerek gerçekleştirmek mümkündür.

Nanometre ölçülerine inildiğinde malzemelerin özellikleri klasik etkiler yerine kuantum etkiler ile belirlenir. Bunun sonucunda kuantum etkilerle yığın malzemelere göre farklı ve ileri kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikler gösterirler. Birçok durumda nanometre boyutlarında üretilen malzemeler daha kuvvetli, mukavemetli olmasının yanında, kimyasal ve fiziksel özellikleri, atom yapıları, cinsleri olarak üstün davranışlar sunmaktadır. Ayrıca nanomalzemelerin esneklik, dayanım, hafiflik, farklı ısı ve elektrik iletme özellikleri ile optik ve magnetik özelliklerinde farklılaşmalar gözlenmektedir. Örneğin altının boyutu nanometer seviyesinde inildiğinde renginin mavi ya da kırmızı olabileceği gözlenmiştir. Mevcut bir malzemedeki nanoyapı farklı bir atomun birleşmesi ile o malzemenin elektronik özelliklerini büyük bir fark ile değiştirmektedir. Bu birleşen atom geçiş elementi olduğundan birleştiği nanoyapıya manyetik ve optik özelliklerde kazandırabilmektedir. Kısaca üretilen nanoteknolojik malzemelerin daha mukavemetli, daha düşük hatalı, daha hafif ve daha hassas özelliklerle üretilmesi günlük yaşantımızda nanoteknolojiye olan ilgiyi arttırmıştır(Dag vd., 2005).

Nanomalzemeler temel olarak yığın malzemeden temel malzemelere yukarıdan-aşağıya (top-down) ya da atom ya da moleküllerden aşağıdan-yukarıya (bottom-up) gibi iki temel yaklaşımla üretilmektedirler. Farklı şekil ve büyüklüklerde nanosistemlerin üretilmesi nanoteknolojinin temel çalışma alanlarından birisidir (Alexandridis, 2011).

Nanoteknolojinin Amaçları

Nanoteknoloji alanında yapılan çalışmalar sundukları sıra dışı avantajları ile dikkate değer fırsatlar sunmaktadır. Temel olarak nanoteknoloji alanında yapılan çalışmalar şu temel amaçlara yöneliktir;

- Nanometre boyutlu malzemelerin analizinin yapılması,
- Nanometre ölçeğinde üretilen yapıların fiziksel özelliklerinin araştırılması ve detaylandırılması,
- Nanometre boyutlu malzemelerin imalatı,
- Nano ölçekli malzemeler ve yapılar için daha hassas cihazların geliştirilmesi.

Nanoteknolojinin Avantajları

Nanoteknoloji, 1-100 nm boyutlarında ve yenilikçi fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip malzemeler üretilmesine olanak sağlamaktadır. Genellikle üretilen malzemeler ve cihazlar 100 nm'den daha büyük ölçeklerde yapılmış ve geleneksel yöntemler kullanılmıştır. Fakat 100 nm'den daha küçük ölçeklere inildiğinde bu kullanılan geleneksel yöntemler ortaya çıkan özellikleri açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu farklılığı açıklamak için nanoteknoloji kullanılmaktadır. Nanoteknolojide kullanılan parçaların üretilen malzemelerin daha az yer kaplamasından ziyade, daha az malzeme kullanımı, daha az enerji, maliyeti daha ucuz ve taşınması daha kolay olması, daha sağlam, daha uzun ömürlü olması en önemli avantajlar olarak karşımıza çıkmaktadır.

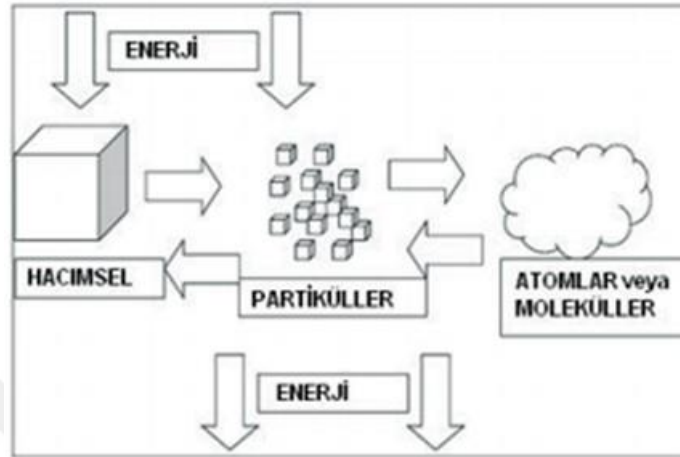
Günümüzde artık hemen her alanda nanoteknolojiden yararlanılmaktadır. Otomobil, elektronik, iletişim, ilaç, savunma sanayi gibi bir çok alanda yeni ürünler nanoteknoloji kapsamında araştırılıp geliştirilmektedir.

Nanoüretim Yöntemleri

Temel olarak iki yöntem ile nanoyapılar elde edilmektedir. Bunlar; aşağıdan yukarıya “bottom-up” ve yukarıdan aşağıya “top-down” olarak bilinen yöntemlerdir (Şekil 1).

Bottom-up: Aşağıdan-yukarıya yani küçükten büyüğe olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntem organik ve inorganik yapıların, atom atom veya molekül gibi temel yapı taşlarından oluşturulmasıdır.

Top-down: Yukarıdan aşağıya yani büyükten küçüğe olarak tanımlanır, fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak nanoyapıların imal edilmesi yöntemidir. Bu yöntemlerde yığın haldeki malzemeden boyut küçültme gibi yaklaşımlarla nanomalzeme elde edilir. Günümüzdeki teknolojinin değerlendirilmesinde genellikle yukarıdan aşağıya yöntemleriyle değerlendirilir.



Şekil 1. Nanoüretimde kullanılan yöntemler (Gürmen & Ebin, 2010).

Nanopartikül Üretim Yöntemleri

Nanopartikül üretim yöntemleri yukarıda açıklanan aşağıdan-yukarıya ve yukarıdan-aşağıya yöntemlerini temel almıştır. Yukarıdan-aşağıya yöntemiyle kullanılan teknikler, fiziksel ve kimyasal olarak ayrılır. Kimyasal yöntemlere örnek verecek olursak; kimyasal aşındırma (etching), fiziksel yöntemler ise; bilyeli öğütme, kuru aşındırma ve plastik deformasyon uygulama (litografi) en çok kullanılan yöntemleridir.

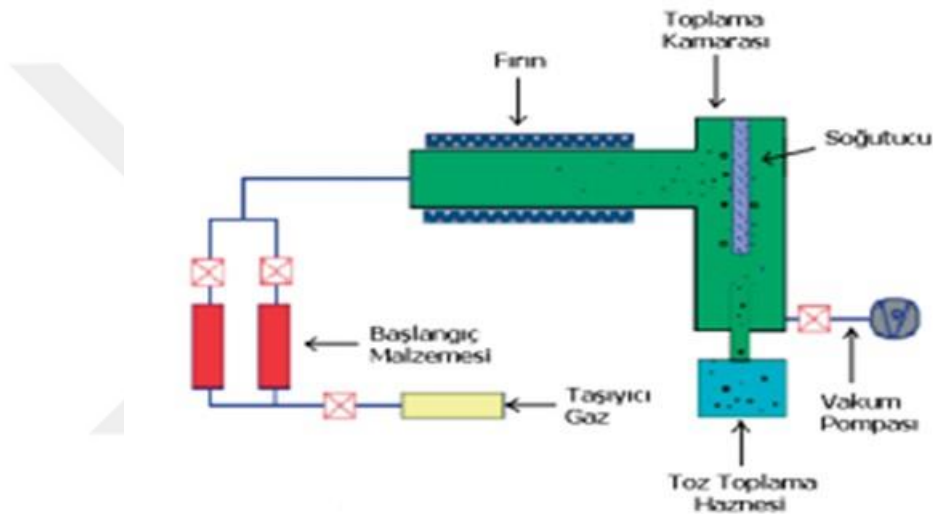
Aşağıdan-yukarıya üretim yöntemlerinde ise kimyasal olarak; sol – jel metodu ve ultrasonik sprej, kimyasal buhar birikimi (CVD) ve piroliz gibi yaklaşımlar kullanılır. Fiziksel yöntemler ise; fiziksel buhar birikimi (PVD), atomik katman birikimi (ALD), pulslu lazer birikimi (PLD), moleküler ışın epitaksi (MBE), metal organik buhar faz epitaksi (MOVPE) yöntemleri kullanılmaktadır.

Kimyasal Buhar Birikimi Yöntemi (CVD)

1994'te Almanya'da geliştirilmiştir ve fazla miktarda nanopartikül sentezi için kullanışlı bir yöntemdir. Bu yöntemde buhar fazına kolay bir şekilde geçişi sağlanan hidrür, klorür, karboniller ve metalorganikler gibi bileşikler uygundur. Kullanılan kimyasal malzemelerin kolaylıkla ulaşılabilmesi birçok malzemenin üretimini mümkün kılmaktadır. Bu da CVD yönteminin en büyük avantajlarından biridir (Wang vd., 2003).

Bu yöntemde gaz fazında bulunan yapılar ısıtılarak parçalanarak partikül boyutuna dönüşmektedir (Şekil 2). İlk olarak gaz fazına geçen malzemeye gaz akışı verilerek buharın reaktöre aktarılıp reaktör içerisinde ısıtılarak parçalanması sağlanır. He, Ar ya da N₂ gibi inert gazları taşıyıcı gaz olarak kullanılmakta ve bileşiğin oksitlenmesi için CO, H₂ ya da CH₄ gazları taşıyıcı gaza ek olarak ilave edilir. Reaktör içindeki ısıtılarak parçalanma sonucunda elde edilen nanopartiküller toz toplama yöntemleriyle elde edilirler. Bu toplama yöntemlerinden en çok kullanılan ortasından sıvı azot geçen bir çubuğun açık ortama kapalı bir bölme içerisinde partiküllerin birikmesi ve sonrasında toplanmasıdır.

Taşıyıcı gazın akış hızı, sıcaklığı, cinsi reaktör geometrisi CVD yöntemiyle sentezlenen partikülün boyutunu ve yapısını etkilemektedir (Grammatikopoulos vd., 2016).



Şekil 2. Kimyasal buhar birikimi (CVD) yönteminin şematik gösterimi (Gürmen & Ebin, 2010).

Fiziksel Buhar Birikimi Yöntemi (PVD)

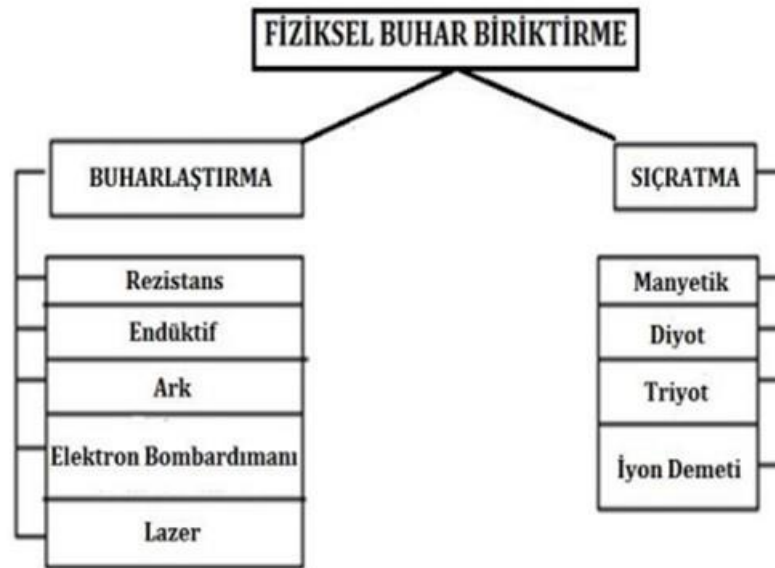
Fiziksel buhar birikimi yöntemi, katı veya sıvı fazdaki malzemelerin atomik veya moleküller olarak yüksek vakumlu bir ortamda veya düşük basınçlı gaz ortamında kaplanacak yüzeye birikmesine dayanan bir kaplama tekniğidir. 1-10 µm boyutlarında ince film kaplamalarında genellikle kullanılır. Bu kaplamaların birikmesi de atomik olarak gerçekleşmektedir. Fakat kalın film kaplamalarında ise bu atomik birikme daha büyük kütlelerin taşınımları ile olmaktadır (Bhushan, 2000). PVD yönteminde genel olarak 1-10 nm/s kaplama hızı uygulanmaktadır. PVD yöntemi uygulanarak elde edilen ince tabakalı film kaplamaları, aşınmalara karşı mukavemeti artırır ve doğru parametrelerin seçilmesiyle altta kullanılan malzemenin kullanım süresini iyileştirir. Sertlik, aşınma ve dayanıklılık avantajları açısından PVD yöntemi çok tercih edilmesinin yanı sıra, maliyeti, kaplama alanının az oluşu ve kaplama hızının düşük olması gibi dezavantajlar da sahiptir. Bu uygulamada kaplama

kalınlığı ve sıcaklık uygulanacak alanın seçiminde önemli parametrelerdir (Holmberg & Mathews, 1994).

PVD yönteminde moleküler boyutta kaplama yapılabilmesi için önemli 4 temel basamak vardır. Bunlar;

- Sıçratma veya buharlaşma yöntemi ile buhar eldesi,
- Kaplamada kullanılan atomların gaz fazına taşınımı,
- Kaplamadaki atomların kaplanacak malzeme üzerinde toplanması,
- Kaplamadaki atomların basamak basamak büyütülmesidir (Mattox, 1998).

PVD yöntemi buharlaştırma ve sıçratma olarak iki alt grupta incelenmektedir (Şekil 3). Buharlaştırma, kaplanacak malzemenin gaz fazına geçene kadarki ısıtım işlemi uygulanması yöntemidir. Sıçratma ise, kinetik enerjinin kaplanacak malzeme üzerine biriktirilmesiyle oluşan fiziksel çarpışma yöntemidir (Rockett, 2008).



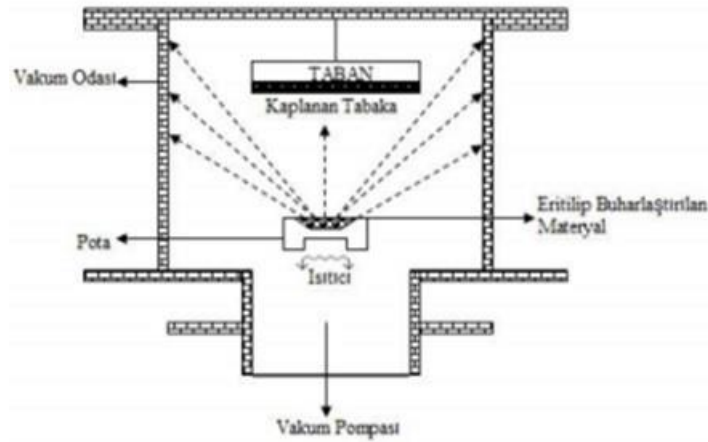
Şekil 3. Fiziksel buhar biriktirme teknikleri (Holmberg & Mathews, 1994).

Buharlaştırma (Evaporasyon)

Buharlaştırma, buharlaştırma reaktöründeki malzemenin kaynak ile kaplama yüzeyinde gaz fazındaki moleküllerin birbirleriyle hiçbir çarpışma yapmadan kaplanma yüzeyine biriktirilmesidir. Çoğunlukla buharlaştırma işleminde 10^{-3} - 10^{-7} Pa arasındaki gaz basıncında çalışılır. Eğer ki 1 Pa ve üzerindeki değerlerde sıcaklık arttırılırsa daha hızlı bir kaplama elde edilir.

Maddelerin herbirinin kendilerine özgü ayırt edici özellikleri bulunmaktadır. Bu yöntemde, kaplama yapılacak malzeme ilk önce buharlaşana kadar ısıtılmalıdır (Şekil 4). Isıtılan bu malzeme buharlaştırıldıktan sonra daha soğuk olan ortamda, kaplanacak olan

malzemenin üzerinde birikmektedir. Kaplanacak malzeme farklı şekillerde ısıtıldıktan son buhar fazına geçmektedir.



Şekil 4. Buharlaştırma yönteminin gösterilişi (R.E. Smallman, 2007).

Birçok organik malzemenin yanı sıra inorganik malzemeler de bu yöntemle kaplanabilmektedir. Bu yöntem yüksek sıcaklıktaki ultra iletken filmlerden farklı modellerdeki uygulamalara kadar çoğu alanda kullanılmaktadır. Kaplanan yüzeylerden alınan özellikler, malzemeye, yüzeyin kimyasına ve yapısına, yüzeyin hazırlanma işlemine, yöntemine, kaplamadaki kullanılan parametrelere bağlıdır (Mattox, 1998).

Buharlaştırma, basınçlı ortamda yapıldığında sıcaklık etkili şekilde azalmaktadır. Kaplanan yüzeyde safsızlıkların ve oksit oluşumunun yüzeydeki etkisinin azalması buharlaştırmının önemli bir avantajıdır. Genellikle 10^{-3} Pa basınçla çalışılır. Bu basınç şartları, kaplanacak film yüzeyi ile kaplama malzemesinin birbirlerine olan mesafedeki atomların, birbirine çarpmadan düz bir yolda lineer olarak devam etmesini sağlamaktadır. Yüzey ile malze arasındaki mesafe ise 10-50 cm arasında olmaktadır (George, 1992).

Buharlaşma, genellikle sıvı fazdaki malzemelerde gerçekleşmesine rağmen, bazen katı fazda da buharlaşabilmektedir. Bu katı malzemenin alanı A_e , süresi dt olan buharlaştırmada maksimum molekül sayısı dN_e aşağıdaki verilen formülle hesaplanır. Bunlar;

$$\frac{dN_e}{A_e \cdot dt} = (2\pi mKT)^{-1/2} P_e \quad (1.1)$$

(1.1) eşitliği ile hesaplanabilmektedir. Formülde ki P_e denge buhar basıncını, m ise molekül kütesini ifade etmektedir. Basınçlı ortamda buharlaşan malzemenin buharlaştırma hızı Langmuir denklemi ile hesaplanmaktadır;

$$m_e = 5.83 \times 10^{-2} P_e \left(\frac{M}{T}\right)^{1/2} \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad (1.2)$$

Bu formülde sıcaklık T ile buharlaşan malzemenin molekül ağırlığı M ile gösterilmiştir. P_e ise ≈ 1 Pa değerindedir. Moleküler buharlaştırma hızı ise;

$$N_e = 3.513 \times 10^{22} P_e \left(\frac{1}{MT}\right)^{1/2} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1} \quad (1.3)$$

olarak verilen formülle hesaplanabilmektedir (George, 1992).

Termal buharlaştırma yapılabilmesi için yüzeye ve buhar basıncına çıkacak kadar ısıtılan malzemeye ihtiyaç duyulmaktadır.

Buharlandırmada kullanılan kaynaklar, buharlaştırılırken kullanılan kaynağın ismine göre alırlar. Bunlar;

- Rezistanslı buharlaştırma,
- Elektron yansımali buharlaştırma,
- Radyo frekanslı buharlaştırma,
- Besleme kaynaklı buharlaştırma,
- Işın ve buhar tutucu kaynaklı buharlaştırma,
- Flash buharlaştırma,
- Süblimleşmeli buharlaştırma,
- Işın yayınımlı buharlandırmadır.

Elektronlu, rezistanslı, radyo frekanslı ve süblimleşmeli buharlandırmada kaplama malzemesinin miktarı belirlenerek kullanılmaktadır. Bu kaplama malzemesinin bir kısmının buharlaşmasıyla beraber kaplamada durmaktadır. Fakat diğer kaplama kaynaklarıyla daimi kaplama yapılabilir (Mattox, 1998).

Sıçratmalı (Sputter) Biriktirme

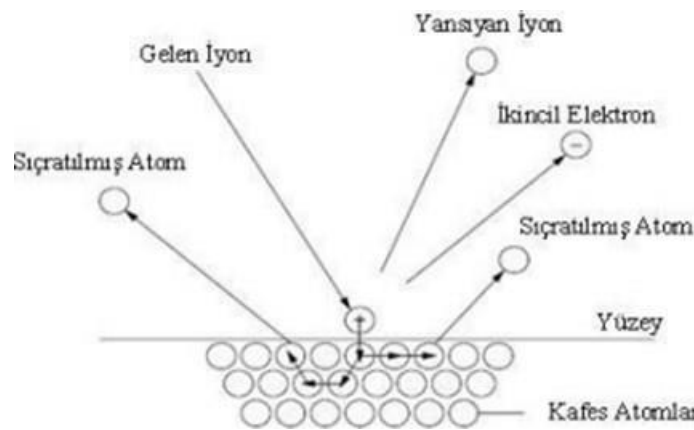
İlk olarak Grove tarafından 1852 yılında doğru akımlı gaz deşarj tüplerinde PVD yöntemlerinin uygulanması sırasında sıçratma işlemi gözlenmiştir. Bu tüplerde katot olan yüzeylerin iyonlar sayesinde sıçratıldığını bunun sonucunda da katot malzemenin tüpün iç çeperinde kaplandığı gözlemlenmiştir. Bu sıçratma işlemi aslında tüp içerisindeki katot yüzeylerinin bozulmasına sebep olduğu için bazen bu uygulama istenmeyen durum olmaktadır, fakat yüzey temizliğinde, ince film kaplamada, yüzey analizlerinde kullanılmak üzere günümüzde kullanılmaktadır (Wasa vd., 2004).

Genel olarak sıçratmalı biriktirme, kaplama malzemesinin yüzeyinden koparılan atomların, kaplanmak istenen yüzey üzerine biriktirilmesi işlemidir (Şekil 5). Bu işlem ısısız buharlaşma yöntemidir. Yüzey atomlarının, açığa çıkan iyon, elektron, atom gibi parçacıkları

kullanarak momentum transferi sayesinde kaplanacak yüzey üzerinde birikmesi ile kaplama yapılmaktadır. Bu enerjitik parçacıklar yüzeye çarptıkça, yüzeydeki atomların daha alt bölümlere geçmesine neden olmaktadır. Burada gerçekleşen çarpışma, başka bir atom ile enerjitik parçacığın çarpışmasına sebep olur. Bu çarpışmada kazanılan enerji ile yüzeydeki atom, yüzey enerji katmanını geçerek kopmaktadır. Böylece kaplama yüzeyinde koparılan bu atomlar, kaplanmak istenen yüzey üzerinde birikirler (Bunshah, 1994).

Sıçratma işleminde yüzeye çarpan parçacığın ortaya çıkardığı etki; parçacığın enerjisine, gelme açısına, parçacıkların kütlesine ve yüzeydeki atomların bağ enerjisine bağlıdır. Sıçratma yöntemi momentum transferi ile gerçekleştiğinden dolayı kimyasal oranda kayıp gerçekleşmemektedir. Buharlaştırma işleminde ise kaplanacak malzemenin buharlaştırılmasından dolayı kaplamanın kimyasal oranında azalma olmaktadır. Bu ikisi arasındaki kimyasal orandaki farktan dolayı sıçratma işlemi daha çok tercih sebebi olmaktadır. Sıçratma da genelde iyonlar hareket etmektedir ve bu iyonlar elektrik potansiyeliyle daha çok hız kazanmaktadır (Tracton, 2006). Sıçratma işlemi basınçlı veya alçak basınçlı ortamda 0.67 Pa ve daha az basınçta gerçekleşmektedir. Fakat bazı uygulamalarda 0.67- 2.0 Pa gibi daha yüksek basınçlarda sıçratma işlemi yapılabilmektedir (Bunshah, 1994).

Genellikle sıçratmalı biriktirme, ince film kaplamada, desenli cam kaplamasında, polimer kaplamasında, manyetik filmlerin depolama ortamı için yapılması, cam malzemelerin üzerine iletken film kaplanmasında, aşınmalara karşı mukavemetli kaplama yapılmasında, dekoratif desenli her türlü kaplamada uygulanan bir yöntemdir (Tablo 1) (Mattox, 1998).



Şekil 5. Sıçratma işleminin gösterimi (Tracton, 2006).

Kaplama kalınlığının tek bir tip olması, yüksek sıcaklıkta muvakaletin ve dayanımının yüksek olması, kaplama malzemesi olarak değişmeyen özelliklere sahip malzemelerin kullanılması, damla yapısının olmaması sıçratma işleminin avantajlarındandır. Farklı basınçlarda farklı hızlarda ilerleyen iyonların değişime uğramadan biriktirilmesi ise en önemli

avantajlarındandır. Sıçratma yönteminde ayrıca kaplanan filmin yapısına küçük boyutlu partiküller fazla girememektedir. Kaplama malzemeye iyi yapışmaktadır. Bu yöntemde sadece kaplanacak malzemenin kalınlığının sınırlı olması ve bundan dolayı maliyetinin artması dezavantajdır.

Sıçratma işlemi 4 farklı yöntemle uygulanmaktadır. Bunlar;

- Doğru akım diyot sıçratma,
- Radyo frekanslı sıçratma,
- Manyetik alanda sıçratma,
- Reaktif sıçratmadır (Ohring, 2013).

Sıçratma proseslerinde kullanılan bütün malzemeler ticari olarak kolay temin edilebilmektedir. Çoğunlukla alaşım ve metaller yüksek basınçta ya da atmosfer koşullarında eritilip, ısı kullanılan proseslerde üretilmektedir. Erimeyen metal veya alaşımlar ise yüksek sıcaklıkta pres yoluyla üretilmektedir. Ayrıca metal olmayan malzemeler de aynı yöntemle sıcak pres uygulanarak üretilmektedir. Elementler ve metaller yüksek saflıktadır fakat metal olmayan malzemelerin safsızlıkları % 99.99 dan daha azdır. Kaynaklar farklı ölçeklerde ve farklı şekillerde olabilir. Bu kaynaklar kullanıma geçmeden önce sıcaklıktan dolayı çatlama ve kırılma olmaması için soğutma bölmesine konulur. Bundan dolayı yüksek ısılı iletken olan metal dolgu malzemeli çimentolar kullanılmaktadır (Ohring, 2013).

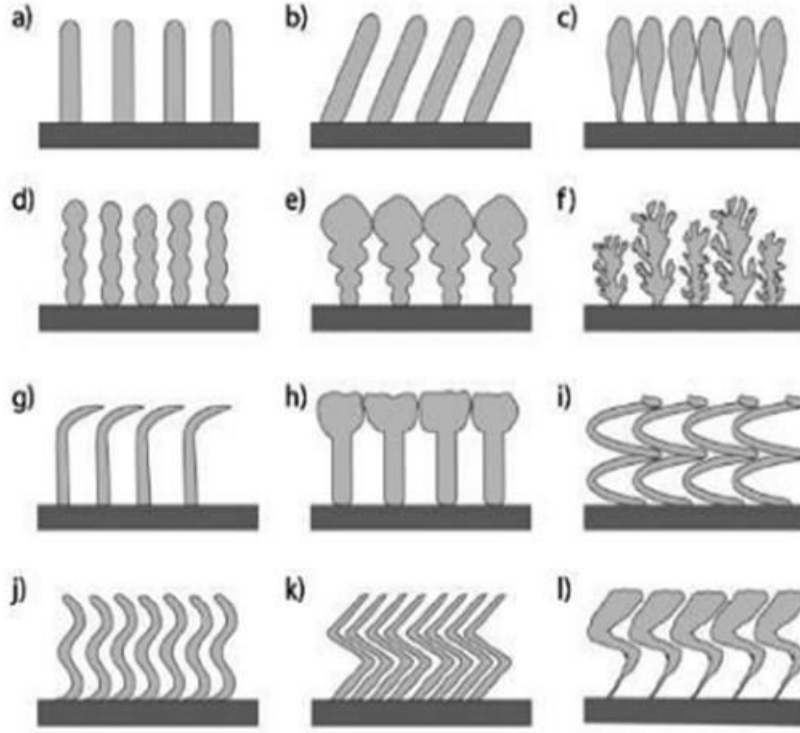
Tablo 1. Sıçratma Kaynakları (Ohring, 2013).

Malzeme	Uygulama
Metaller Alüminyum Krom Germanyum Altın Demir, nikel Paladyum, platin Gümüş Tantal Tungsten	Entegre devrelerin metalizasyonu, ön yüz aynalar Yapışma tabakaları, rezistör filmleri İnfrared filtreler Bağlantılar, yansıtıcı filmler Ferromanyetik filmler Bağlantılar Yansıtıcı filmler, bağlantılar İnce-film kapasitörler Bağlantılar
Alaşımlar Al-Cu, Al-Si, Al-Cu-Si Co-Fe, Co-Ni, Fe-Tb, Fe-Ni, Co-Ni-Cr Ni-Cr Ti-W Gd-Co	Entegre devrelerin metalizasyonu Ferromanyetik filmler Rezistörler Entegre devrelerde difüzyon bariyerleri Manyetik balon hafızalı cihazlar
Oksitler Al_2O_3 $BaTiO_3$, $PbTiO_3$ CeO_2 $In_2O_3 - SnO_2$ SiO_3 SiO Ta_2O_5 , TiO_2 , ZrO_2 , HfO_2 , MgO İttrium alüminyum oksit (YAG), Yttrium demir oksit (YIG), $Gd_3Ga_5O_{12}$ $YVO_3 - Eu_2O_3$ $Cu_3Ba_2YO_7$	İzolasyon, aynalar için koruyucu filmler İnce-film kapasitörler Yansıtıcı olmayan kaplamalar Şeffaf iletkenler İzolasyon Aynalar için koruyucu filmler, infrared filtreler Çok tabakalı optik kaplamalarda dielektrik filmler Manyetik balon hafızalı cihazlar Para kağıtlarına özel fosforlu kaplamalar Yüksek sıcaklık süperiletkenleri

Eğik Açılı Biriktirme Yöntemi (OAD)

Eğik açılı biriktirme işleminde, kaplama yapılmak istenen yüzeye gelen atom buharı kullanılmak istenen açıyla gelebilmekte ve kaplama işlemi sırasında hızı istenilen ivmede ayarlanabilmekte, hareket ettirilebilmesi kolayca sağlanabilmektedir. Bu yaklaşımın en önemli avantajı kaplama işlemi esnasında buharın gelme açısının değiştirilebilmesidir. Bu yöntemde genel olarak kontrol dışarıdan yapılmaktadır ve basınçlı ortama uygun olmaktadır. İnce film kaplama esnasında buhar hızı istenilen şekle göre hızlı veya daha yavaş olmaktadır. Ayrıca buharın gelme açısı da değiştirilebilir. Bu avantajlardan dolayı kaplama sırasında filmin şeklini ve yönünü değiştirebilir ve kontrol etmek daha kolaydır.

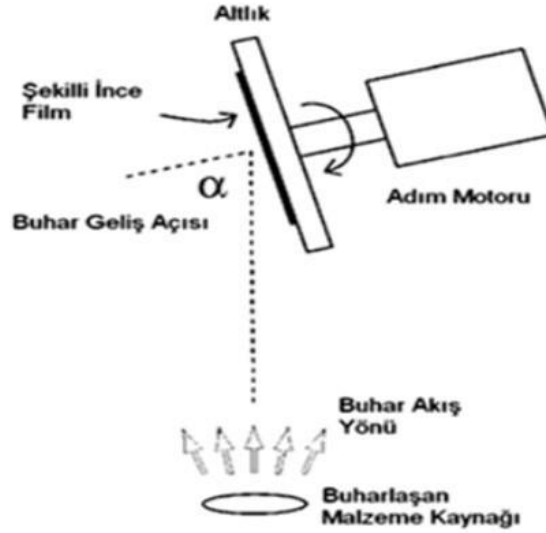
Buharlaştırma, sıçratma gibi ince film biriktirme yaklaşımlarında OAD yöntemi kullanılabilir ve istenilen şekiller elde edilir (Şekil 6) (Kevin Robbie vd., 2004).



Şekil 6. OAD işlemi uygulanarak üretilen nano boyutlu yapılar a) Düz b) Eğik Kolon c-d-e) Farklı çaplarda sütunlar f) Dallanmış yapılar g-h) Başlıklonlar i) Sarmal yapı j) Dalgalı sütunlar k-l) Zigzag kolonlar (Kevin Robbie vd., 2004).

Son dönemlerde buhar biriktirme işleminin değişik bir yöntemi olan OAD tekniğinde kullanılan altına gelen buhar eğik açıyla gelir. Kolay bir şekilde bu eğik açı yöntemi kullanılarak 3 boyutlu yapılar elde edilir. Kunt 1886 yıllarında eğik açı yöntemini PVD uygulayarak yapmış ve farklı açılarda eğik kolonlar üretmiştir. Bu yöntemde yüzeyin döndürülmesi ve buharın birikim açısı kolay bir şekilde ayarlanabildiği için farklı şekilde filmler elde edilmektedir (Şekil 7). Ayrıca dönme hızını değiştirerek farklı eğimlerde filmler oluşur ve bunların herbiri birbirinden farklı özellikte olmaktadır (Hawkeye & Brett, 2007).

OAD yöntemi elde edilen film tabakalar, sıvı kristallerin görüntülenmesi, manyetik ortamda analiz yapılabilmesi, üretilen inorganik ve organik sensörler, enerji depolayan teknolojiler gibi alanlarda uygulanmaktadır (K. Robbie & Brett, 1997).



Şekil 7. Eğik açılı birikimi (OAD) işlemi (K. Robbie & Brett, 1997).

Altın Nanopartiküller

Son yıllarda birçok nanopartikül sentez yöntemleri ve çok çeşitli şekillerde ve kullanılan malzemelerde nanopartikül sentezi yapımı mümkündür. Tez kapsamında altın nanopartikül ile ilgili çalışmamızı yürüttüğümüz için bu kısımda bu konu hakkında genel bilgi sunacağız.

Altının ilk çağlardan bu yana hemen hemen her alanda yer almakta ve binlerce yıla yayılan bir hikayesi vardır. Altın serveti ifade etmenin yanında yıllarca süren savaşların sebebi olmuştur. Genellikle dini bağımlılıklarda ve en samimi sevgiyi ifade etmede kullanılan bir metaryal olmuştur. Günümüzde hala bu anlamlar dahilinde ilgi çekmektedir. Bununla birlikte son yıllarda nanoteknoloji kapsamında yeni bir kullanım alanı bulmaktadır. Bilim adamları altını küçük taneciklere bölerek nanoparçacıklarına ayırmışlardır. Bu bilimsel gelişme bilim alanlarında çok kullanışlı hal almıştır. Önceden saf altının aktif olmadığı düşünülüyordu, ancak 1987 yılında boyutları daha küçük 5 nm altın nanoparçacıkların mükemmel bir katalizör olduğu, toksik olmadığı iyi bir optik özellikte olduğu gözlenmiştir. Yığın halde olan altın sarı renkte iken nanoboyutta altın ise kırmızı renktedir. Farklı boyut ve morfolojilerde ise farklı plazmon rezonans özelliği göstermekte mor, mavi, lacivert ve pembe gibi farklı renklerde olabilmektedir. Böylece 1990'dan bu yana tıpta birçok tedavilerde ve teşhis koymanın yanında kimyacıların, fizikçilerin ve biyologlarında ilgisi çekmektedir (Louis & Pluchery, 2012).

Altın Nanopartiküllerin İlk Kullanımları

Altın nanopartiküllerinin ilk kullanım alanı kırmızı renkli cam üretiminde olmuştur. 1300-1400 yıllarında Mısır ve Mezopotamya'da cam üretimi başlamıştır. Bu kırmızı cam rengini bakır ilavesiyle verilmiştir. Bazı bilim adamları bu kırmızı rengi bakır

nanoparçacıklardan kimileri ise oksitlendiğinden kaynaklandığını belirtiyor. Bu bakırdan kırmızı cam üretimi teknolojiye yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Fakat altın nanopartikülleri kullanarak kırmızı cam yapmanın başka bir yolu bulunmuştur. Camlara yakut kırmızısı rengini verebilmek için 1685 yılında Leyden Andreas Cassius eritilmiş cama altın eklemiştir (Louis & Pluchery, 2012, s. 1).

Altın Nanopartiküllerin Optik Özellikleri

Altın nanoparçacıkları ile araştırma yapan araştırmacılar plazmon rezonansının duyarlılığını arttırmak için spektroskopik teknikleri kullanarak nanoparçacıklarının şekli ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Rezonans, nanopartiküller absorpsiyon dalga boyu ile gelen ışığın dalga boyunun eşleştirilmesi ile oluşturulur (Louis & Pluchery, 2012). Bu etkileşimler ile yüzey plazmon rezonans (surface plasmon resonances, SPR) ve lokalize yüzey plazmon rezonans (localized SPR, LSPR) oluşur.

Altının Dielektrik Fonksiyonu

Metallerin dielektrik fonksiyonlarının tanımlanması için Drude modeli iyi bir yaklaşımdır. Aşağıda çok az değişim sabiti ile dielektrik sabiti formülü verilmiştir.

$$\epsilon_{\text{drude}} = \epsilon_{\infty} \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\Gamma\omega} \quad (1.4)$$

Altının plazma frekansı ve sönümlenme sabiti aşağıda verilmiştir.

$$\hbar\omega_p = 8.95 \text{ eV} \quad \text{i.e. } \omega_p = 1.36 \times 10^{16} \text{ rad.s}^{-1} \quad (1.5)$$

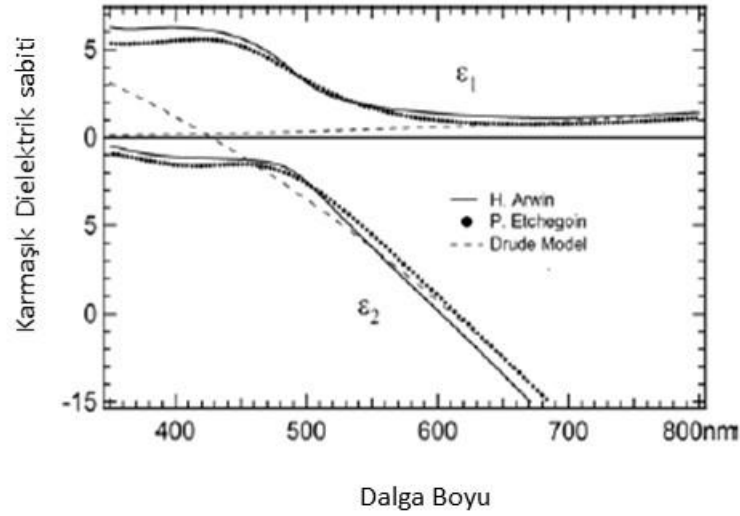
$$\hbar\Gamma = 65.8 \text{ meV} \quad \text{i.e. } \Gamma = 1.0 \times 10^{14} \text{ rad.s}^{-1}$$

$$\epsilon_{\infty} = 9.5$$

Bu değerler, deneysel değerler (1.4) ile birleştirilmesiyle elde edilir. Serbest elektronların katkıda bulunduğu bir enerji aralığında dielektrik fonksiyon değerleridir.

Ancak kesin bir modele ihtiyaç duyulduğunda, Drude modeli basitleştirilir yani serbest elektron (bant içi geçişler) ve bağlı elektronlardan (bantlararası geçişler) yararlanılmaz. Bu model altın için önemli bir rol oynar. Şekil 8’de karmaşık dielektrik fonksiyonu gösterilmektedir. Genel olarak bir malzemenin SPR özellik gösterebilmesi için dielektrik sabitlerinin belli aralıklarda olması istenir. Uygun SPR özelliği için görünür bölgede (380-800 nm) ϵ_1 değerinin pozitif ve sıfıra yakın ve ϵ_2 değerinin ise negatif ve mutlak değerinin büyük olması beklenir. Bu bağlamda Şekil 8’e göre altın ve gümüş bu konuda iyi adaylar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu modellerin doğru işlevi AuNP optik özelliği için önemlidir. Tercih

edilen ölçümlerden biri Johnson ve Cristy tarafından 1925'te gerçekleştirilmiştir ve yaklaşık bir analitik modeli Etchegoin tarafından yayınlanmıştır.



Şekil 8. Bir elipsometrikten elde edilen altının karmaşık dielektrik fonksiyonu $\epsilon = \epsilon_1 + i\epsilon_2$ (Louis & Pluchery, 2012, s. 48).

Altın Nanopartiküllerinin Uygulama Alanları

Altın nanopartiküllerin kullanımının geçmişi 16. yüzyıla kadar dayanmaktadır. İlk kullanımları cam ve gümüş renklendirmelerinde uygulanmıştır. Camlarda kullanılan farklı renkler, camın bileşimindeki nano ölçekli çinko, sülfat, krom, bakır, altın ve demir bulunan nanoparçacıklardan meydana gelmiştir. Bu camlardaki dalga boyunu ve rengini nanopartiküllerin boyutu ve morfolojisi belirlemiştir. Altın küresel şeklindeyken farklı boyutlarda farklı renkler elde edilmiştir. Bunlar; 25 nm boyutta kırmızı rengi verirken, 50 nm'de yeşil ve 100 nm'de kavuniçi renkleri oluşmuştur. Son dönemlerde bilim adamları nanopartikülleri daha çok alanda kullanmışlardır. Bunların başında kimya, elektronik, kataliz ve biyoteknoloji gibi alanlar gelmektedir. Bu dallarda nanopartiküller kullanılarak daha verimli ve dayanıklı teknolojiler elde edilmektedir. Nanoelektronik ve yarı iletkenlik özellikleri bakımından nanopartiküller artık sağlıkta da yararlanılmaya başlanmıştır. Bunların yanı sıra sulardaki ağır metal iyonlarının belirlenmesinde nanopartikül teknikleri kullanılmaktadır (Pyykkö, 2004).

Günümüzde tıp alanında nanopartikül uygulamalarında gelişim göstermektedir. Çalışmamızda olduğu gibi altın nanopartiküllerden kanserli hücre tanısında yararlanılmıştır ve bu altın nanopartiküller ile ilaç sektöründe de tümör hedefli araştırmalar yapılmaktadır.

Altın Nanopartikül Üretim Yöntemleri

Islak ve kuru yöntemler ile farklı şekil ve boyutlarda altın nanopartiküller üretilmektedir. Farklı indirgeyici ajanlar kullanılarak altın tuzlarının indirgenmesi ıslak yöntemler kapsamında değerlendirilmektedir. Sodyum borhidrür, askorbik asit, trisodyum sitrat, hidroksilamin ve polivinilpirolidin en çok kullanılan indirgeyici ajanlardandır. Kuru yöntemler kapsamında ise ultraviyole ışınlar ve aerosol teknikler gibi yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bugüne kadar bu iki yöntem kullanılarak magnezyum, krom, demir, kobalt, nikel, çinko, bakır, boryum, sezyum ve silikon içeren nanopartiküller elde edilmiştir. Benzer yollarla saflık derecesi yüksek altın, gümüş, platin, rutenyum vb. nanopartiküller üretilmiştir. Bu nanopartiküller üretilirken partikül boyutlarını istenilen boyutta kontrol edebilmek için yoğun çalışmalar yapılmıştır. Altın nanopartiküllerin üretiminin daha düşük maliyette ve çevreye zarar vermeyen, güvenilir yöntemler bulunması için kayda değer çalışmalar yapılmaktadır (Armendariz vd., 2004).

Hücre Kültürü

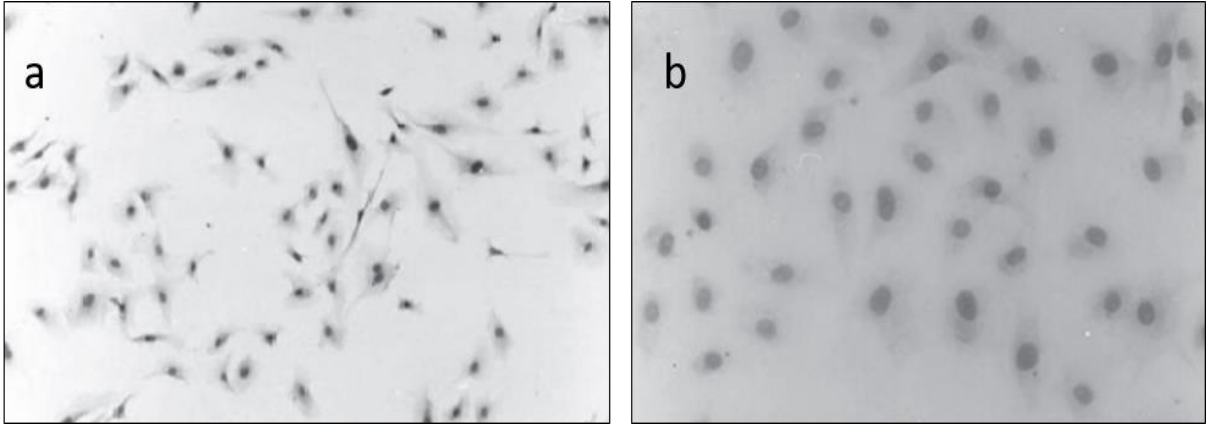
Laboratuvar koşullarında canlı dokulardan alınan parçaların yaşamını sürdürebilmesi ve çoğalmasının sağlanmasına hücre kültürü çalışmaları in vitro olarak adlandırılmaktadır. Bu çalışmalarda canlı yapıların yaşamlarını sürdürebilmesi ve çoğalması için gerekli besleyici maddeler dışarıdan verilerek yürütülmektedir. İnsan, maymun, fare gibi birçok farklı canlıdan alınan akciğer, mide, karaciğer, tümör farklı dokuları gibi küçük parçalar öncelikle hücrelere ayrılırlar. Ayrılan hücreler uygun tuzlar, tampon sıvılar, vitaminler, at ve dana serumu içeren besleyici sıvılar ile süspanse edilerek steril tüp ve şişelerin içine bırakılır. Bu besleyici sıvılar ile süspanse edilen hücreler, steril edilen etüvlerde 36 °C bekletilip hücreler bulundukları kapların çeperlerine yapışarak çoğalırlar. Bu çoğalan yapıya hücre kültürü denilmektedir (Freshney, 2005). Hücre kültürünün avantajı, araştırılacak hücre ve dokular bağımsız olarak etkilenmeden incelenmektedirler. Bu yöntemler ekonomiktir ve kolay uygulanabilirler. Hücre kültürü uygulama alanları aşı, antikor, hormon ve enzim üretimlerinde, DNA ve RNA çalışmalarında, kök hücre çalışmaları ve genetik tedavilerdir.

Ayrıştırılan hücrelerin kültür ortamında üreyebilmeleri, yaşayabilmeleri ve özelliklerini yitirmemeleri canlılıklarını devam ettirecekleri ortam şartlarına bağlıdır. İn vivo yani canlı yaşam koşullarıyla benzer şartlar olmalıdır. Böylece hücre kültüründeki hücreler in vivo ortamlarındaki gibi yaşamlarını devam ettirecek beslenmelerini sağlayacak, fetal sıgır serumu (FBS), büyüme faktörü, çoğalmaları için konulan kaplarda yüzeye yapışacakları jelatin, çoğaldıklarında pasajı sağlayacak tripsin ve EDTA, olası bir enfeksiyonu durduracak antibiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır (Yazır & Dalçık, 2012).

Çeşitli kaynaklardan alınan hücre kültürleri üç ayrı sınıfta incelenmektedir. Bunlar;

- Primer hücre kültürü: Tripsin yardımıyla dokulardan ayırarak alınan hücrelerin in vitro yani labaratuvar koşullarında üretilmeleriyle elde edilen hücrelere denir. Hücrelerin pasajları sınırlıdır ve in vitro şartlarında birkaç pasajdan sonra üreyebilme kabiliyetlerini kaybederler. Doku ve organlardan ayrıştırılarak alınan hücre kültürleri 24 saatten daha uzun tutulmasıyla elde edilir. Primer hücrelere örnek olarak insan embriyo böbreği (HEK), diş eti, insan amniyonu (HAM) verilebilir.
- Sekonder (diploid) hücre kültürü: Normal kromozom sayılı diploid yani iki kromozom takımı taşıyan hücrelerden elde edilir. Diğer bir tanımı ise primer hücrelerden üreyen hücreler başka kültürlerde çoğaltılabilir. Böyle elde edilenlere alt kültürler denir. Sekonder hücre kültüründe 50 kez pasajlama yapılabilir.
- Sürekli hücre kültürü: Pasaj sınırı yoktur ve sonsuz pasaj yapılabilir. Çoğunlukla kötü huylu tümörlerden elde edilirler. İn-vitro koşullarında farklılaşarak, kromozom sayılarında da değişim gösterirler. İnsan epitaryal hücreleri (Hela), insan larenks epidermoit karsinomu (Hep-2) buna örnek verilebilir (Çiçek & Bilgiç, 2006).

Alınan hücreler sağlıklı ise hücre kültürü de sağlıklıdır. Bu durum kültür ortamının steril olmasıyla ve kullanılan maddelerin hücrelerle uyumlu olmasına bağlıdır. Sağlıklı bir hücre bir hafta içerisinde ekildikleri kabın tüm yüzeyinde kaplanacak kadar hızlı çoğalır ve hücreler değişime uğramadan özellikleri aynı kalır. Üreme esnasında hücreler mikroskop ile incelendiğinde confluent (sıkışık) olmayan ve yalnızca yüzeyde kaplı duran hücrelerin görüntüsü ince ve uzun uzantılardır (Şekil 9). Konfluent durumdaki hücrelerin görüntüsü ise uzantıların azaldığı, birbirlerine bağlandıkları ve daha yuvarlak ya da oval bir şekilde görünmektedirler. Hücre çekirdeğinin çevresi ve sitoplazmada kofullar (vakuol) gözlemlenebilir. Fakat bu kofulların az sayıda olması hücrenin sağlıklı olduğunun göstergesidir (Jaffe vd., 1973).



Şekil 9. a) Konfluent olmamış uzun uzantılara sahip hücreler b) Konfluent olmaya başlayan oval şekil alan hücreler (Yazır, 2004).

Hücre Kültürü Yöntemleri

- Standart tüp kültürü: Birçok hücre üretiminde kullanılan genel bir yöntemdir. Steril şişe veya tüplerin içerisinde pasajlanan hücrelerin belirli aralıklarla döndürülmesi ve ısıtılarak şişe veya tüplerin yüzeyinde kaplanmasını sağlar. Şişe veya tüplere ekimi yapılan hücrelerin mikroskobik değişiklik (sitopatik) etkisi farklı olmakla beraber ekilen hücreler 14 gün boyunca inkübe edilirler.
- “Shell vial” hücre kültürü: Yaklaşık olarak 16-18 mm çapında tüplerin içerisine 13-15 mm’lik yuvarlak şeklindeki lameller düzgün şekilde yerleştirilir. Bu yuvarlak lamellerin üzerine hücreler pasajlanır. Hücreden tek tabaka oluştuktan sonra hızı ve süresi yapılan örneğe göre farklılık gösteren santrifüj işlemi yapılır. Bu santrifüjleme işleminin amacı olası etkenin hücrenin içerisine girmesini kolaylaştırmak ve hızlandırmaktır. Standart tüp yönteminde olan sitopatik etki bu yöntemde gerçekleşmez. İki gün sonunda ekim yapılan lameller kendine özgü monoklonal antikor ile boyanırlar.
- Ko-kültivasyon yöntemi: Tanımlamak amacı ile araştırılan dokunun, önceden çoğaltılan hücreler ile beraber hücre kültürünün yapılmasıdır. Daha önceden çoğaltılan hücre kültürü, tanı konulması için incelenen hücrelerin canlılığını ve devamlılığını sağlamaktadır. Örnek verecek olursak bu yöntem HIV tanısında kullanılmaktadır.

Hücredeki sitopatik etki, hücredeki etken ekimi yapılmadan önce görünümü sağlam ve düzenlidir. Ekimi yapılan etken hücrelerde öncelikle yuvarlaklaşma veya ovalleşmeye, hücrelerin birbirleriyle uzantılar oluşturmaya yani köprü kurmasına ve farklı dejenerasyon göstergeleri meydana gelmesine sebep olur. Hücre kültüründe görülen bu etki farklılık gösterebilmektedir. Hücre kültüründe meydana gelen bu değişiklikler ekimi yapılan örnekte bir

virüsün olduğunu gösterir. Gözlenen bu değişimlerde karakteristik özellikleri ve görünümü ile tanı konulmasına yardım eder (Çiçek & Bilgiç, 2006).

Klasik Raman Spektroskopisi (RS)

Tarihçesi

Işığın inelastik saçılmasını 1923 yılında ilk olarak Smekal tarafından bulunmuş ve ilk olarak 1928’de Raman ve Krishnan tarafından deneysel olarak gözlemlenmiştir. O zamandan bu yana ışığın inelastik saçılmasına Raman saçılması denilmektedir. 1930 yılında ise Prof. Raman, Raman saçılması konusunda yaptığı çalışmalardan dolayı Nobel Fizik Ödülünü almaya hak kazanmıştır. Uygulanan ilk deneyde safsızlaştırılmış bir sıvı veya tozsuz bir buharın üzerine güneş ışığı bir teleskopla odaklanmıştır. Saçılan radyasyonu toplamak için numuneye ikinci bir lens yerleştirilmiştir. Saçılan radyasyonun varlığını göstermek için optik filtre sistemi kullanılmıştır ve Raman saçılmasına bu saçılan radyasyonun enerjisindeki değişim olarak belirtilmiştir. Bu enerji farklılaşması Δcm^{-1} cinsinden gösterilmektedir ancak yapılan uygulamalar ve çalışmalarda cm^{-1} olarak gösterilmektedir. Moleküler yapının özelliklerinin belirlenmesi için farklı frekanslardaki saçılan fotonlar Raman spektrumunun yapısını oluşturması gerekmektedir (Braz vd., 2013). Raman spektroskopisi ile ilgili çalışmalar 1960’lı yıllara kadar sınırlı düzeyde kalmıştır. Bunun temel sebebi olarak hassas optik ve dedektör sistemlerinin olmayışı ve varolan sistemlerin ise çok yüksek maliyetlerde olması olarak gösterilebilir. Daha sonraki dönemlerde elektronik alanında yaşanan hızlı gelişmelere paralel olarak çok daha hassas ve uygun fiyatlı sistemler geliştirilmiş ve Raman spektroskopisi çok fazla araştırmacının ulaşabildiği bir teknik haline gelmiştir. Günümüzde başta tıp, biyoloji, fizik ve kimya gibi tüm bilimsel alanlarda Raman spektroskopisi yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Raman Spektroskopisi Temel Teorisi

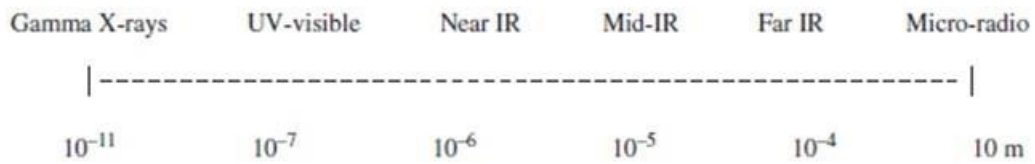
Işık, madde ile etkileşime girdiğinde ışığı oluşturan fotonlar absorbe edilir veya dağılır ya da malzeme ile etkileşime girmeden doğrudan geçebilir. Elde edilen bu ışımların ölçülmesi ve açıklanıp yorumlanması spektroskopi yöntemleri ile yapılabilmektedir. Maddelerin fiziksel ve kimyasal yapılarının belirlenmesi için Raman Spektroskopisi sıklıkla kullanılmaktadır. Numune içerisindeki maddelerin tanısının konulması, açıklanabilmesi ve kantitatif madde miktarının belirlenmesi için Raman spektroskopisi ile elde edilen spektrallerden yararlanılır (E. Smith & Dent, 2005).

Raman spektroskopisi inelastik saçılmaya bağlı titreşimsel değişimlerin ölçüldüğü bir yöntemdir. Raman spektroskopisinde yararlanılan dalga boyu ile araştırılmak istenen örnekten

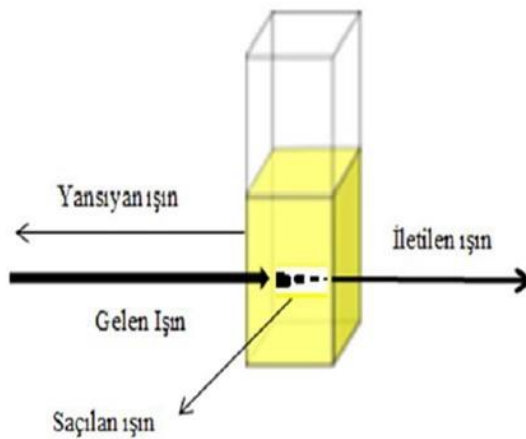
elde edilen absorpsiyon demetinin dalga boyu birbirlerine göre farklılık göstermektedirler (Sikirzhytski vd., 2011).

Raman spektroskopisi, biyoloji, eczacılık, malzeme bilimi, kimya gibi birçok alanda kullanılan çok yönlü ve kullanışlı bir tekniktir. En önemli kullanım amacı alınan mikroskobik örnekler üzerinde hızlı, garantili, duyarlı, tahribatsız analiz sağladığından dolayı son zamanlarda önemi ve kullanımı gittikçe artmaktadır. Raman spektroskopisinde su bazlı bileşikler zayıf saçıcı olduğu için su titreşimleri olmadan da Raman spektrumu elde edilir. Bu elde edilen spektrumlar sulu karışımlardaki bileşiklerin belirlenmesi açısından idealdir. Bir başka deyişle Raman spektroskopisi su içerisindeki örneklerin analiz edilmesine olanak sağlar. Bu sebepten dolayı Raman spektroskopisi infrared spektroskopisine kıyasla daha kullanışlı ve üstün bir yöntemdir (Ferraro vd., 2003).

Elektromanyetik radyasyonların atom veya moleküller ile temas etmesi ve etkileşim oluşturması spektroskopik tekniklerdir. Bu sebepten radyasyonlar belirli dalga boyu ya da frekans ile ayrımları yapılabilir (Şekil 10). λ dalga boyu olarak tanımlanan bir ışın demeti maddeye temas ettiğinde ışın demetinden çıkan fotonlar farklılık gösterebilirler. Bu farklılıklar fotonların soğuması, saçılması ya da direk temas etmeden geçişleri olabilir (Şekil 11).



Şekil 10. Elektromanyetik spektrumların dalga boyu skalaları



Şekil 11. Işın demetinin madde ile etkileşimi

Saçılan ışık demetlerinden ayrı olarak dalga boyları farklı ışınlar bulunmaktadır. Gelen fotonun enerjisi $h\nu_0$ olarak tanımlayıp, saçılan fotonun enerjisi ise $h\nu_s$ olarak ifade edersek, gelen ve saçılan foton arasındaki enerji farkı ΔE ' dir.

$$\Delta E = h\nu \quad (2.3.1)$$

$$\Delta E = h\nu_0 - h\nu_s \quad (2.3.2)$$

olur. Burada (2.3.2) denkleminde ΔE enerji farkı, ν frekans ve h plank sabitini ifade etmektedirler. Frekans ile dalga boyu arasındaki ilişkiye bakacak olursak;

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (2.3.3)$$

şeklinde gösterilir. Dalga boyu λ , ışık hızı c ışık hızı ile gösterilir. Frekans ifadesini veren (2.3.3) denklemini (2.3.2) denkleminde yerlerine koyarsak,

$$\Delta E = hc \left(\frac{1}{\lambda_o} - \frac{1}{\lambda_s} \right) \quad (2.3.4)$$

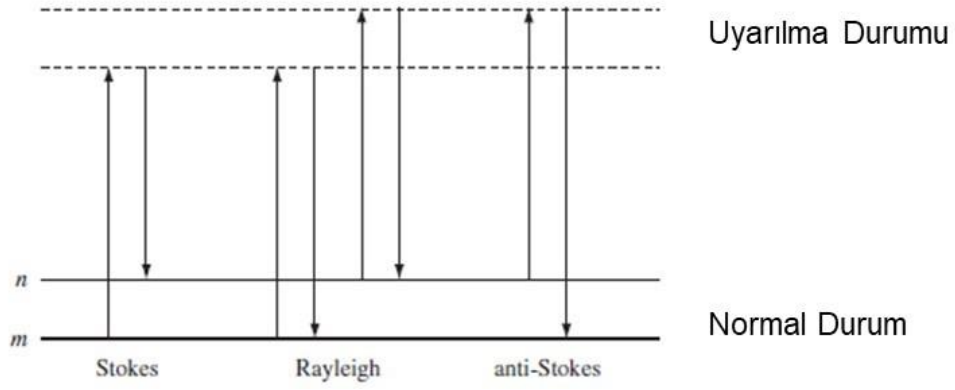
Denklemiyle Dalga boyuyla bağlantılı enerji değişimini vermektedir.

Dalga sayısı ise,

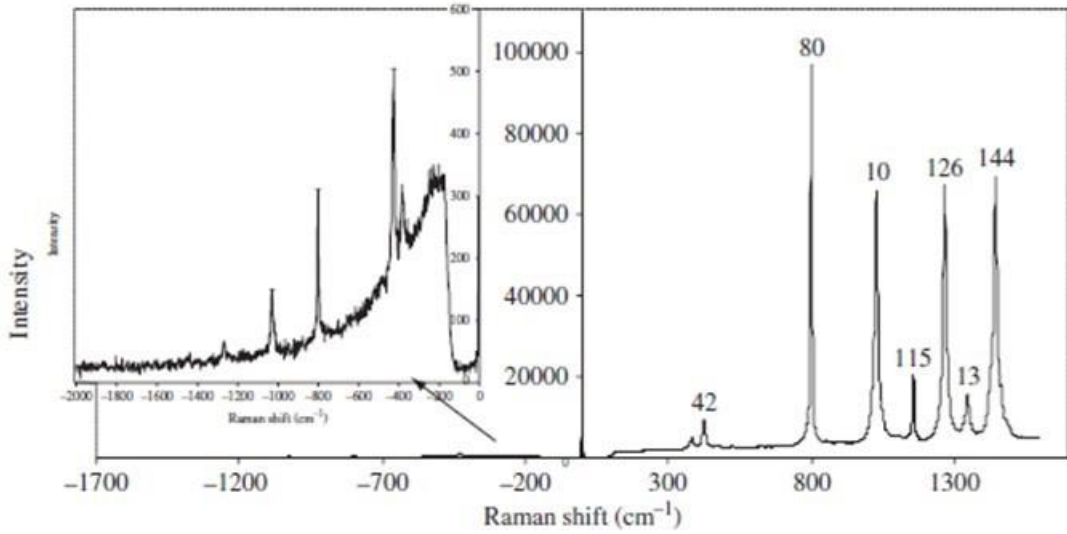
$$\bar{\omega} = 1/\lambda \quad (2.3.5)$$

ile gösterilmektedir.

Işığın, madde ile etkileşimi ile Raman etkisi belirlenebilmektedir. Raman etkisini tanımlayabilmek için en ideal yaklaşım kuantum mekaniği temelli yöntemlerdir. Kendisini uyarabilecek enerjiden daha fazla enerjiye sahip bir molekül, ışıkla etkileşim yaparsa bu molekül temel halden (ground state) aldığı enerji ile uyarılmış hale (virtual state) geçer (Şekil 12). Uyarılmış haldeki elektron çok kararsız olduğundan çok kısa zamanda tekrardan kararlı temel hale döner. İlk haline dönen elektronun, gelen ışığın ile saçılan ışığın enerjisi aynı oluyorsa böyle bir durum da elastik saçılma olarak kabul edilir ve buna Rayleigh saçılması denir. Fotonların az bir kısmı uyarılmadan bir önceki enerji seviyelerinden daha farklı bir seviyeye geçerler. Bu yüzden ilk hale göre inelastik saçılmanın sebep olduğu enerji farklılığı gözlenir. Bu enerji farklılığının yüksek bir enerji seviyesinde olmasında Stokes saçılması gözlenir. Anti-Stokes saçılması ise daha az bir seviyede olursa gözlenir (Yılmaz vd., 2014).



Şekil 12. Rayleigh ve Raman saçılma süreçlerinin diyagramı



Şekil 13. Sikloheksan için Stokes ve anti-Stokes saçılması. Güçsüz görünen anti-Stokes spektrumu (Ferraro vd., 2003)

Şekil 13'te sikloheksan molekülü için alınan Raman spektrumu verilmiştir. Moleküllerin çevresindeki elektronların polarizasyondaki değişimleri, Raman saçılmasındaki titreşimlere sebep olur. Büyük farklılıklar ve saçılım elde edilmesi için simetrik titreşimlere ihtiyaç duyulur. Fakat bu simetrik titreşimler kızılötesi spektrumuyla aynı değildir. Çünkü kızılötesi titreşimlerinde en büyük absorpsiyon asimetrik titreşimlerinde görülür. Raman spektroskopisinde bulunan elektromanyetik ortam birçok özelliği oluşturmaktadır. Elektromanyetik alandaki molekül etkileşir ise çekirdekler ve elektronlar birbirlerini farklı yönde itmeye uğraşır ve bu etkileşimdeki elektrik alan şiddetiyle orantılı bir şekilde moleküler polarizabilite indüklenir.

$$P = \alpha E \quad (2.3.6)$$

Verilen denklemde polarizasyon elde edilir. Burada α molekül polarizarlüğünü, E elektromanyetik dalgadaki elektrik alanı, P ifadesi ise molekül içerisindeki indüklenmiş elektrik dipolünü göstermektedir.

Klasik Raman teorisine göre, elektrik alanın zamana bağlı değişim denklemi,

$$E = E_0 \cos (2\pi\nu_0.t) \quad (2.3.7)$$

E_0 titreşim genliğini, ν_0 ise ışın frekansını vermektedir. (2.3.7) denklemini (2.3.6) denklemine yerine yazarsak aşağıdaki denklem elde edilir,

$$P = \alpha_0 E = \alpha E_0 \cos (2\pi\nu_0.t) \quad (2.3.8)$$

Gönderilen ışın molekülü ν_m frekansı ile titreşime girdiğinde nükleer yer değiştirme yani q ,

$$q = q_0 \cos (2\pi\nu_m .t) \quad (2.3.9)$$

denkleminde elde edilir. Bu denklemde q_0 titreşimsel genliği ifade eder. Edinilen titreşimin ufak bir genliği için, α polarizabilirliği q 'nın doğrusal bir fonksiyonu olduğundan,

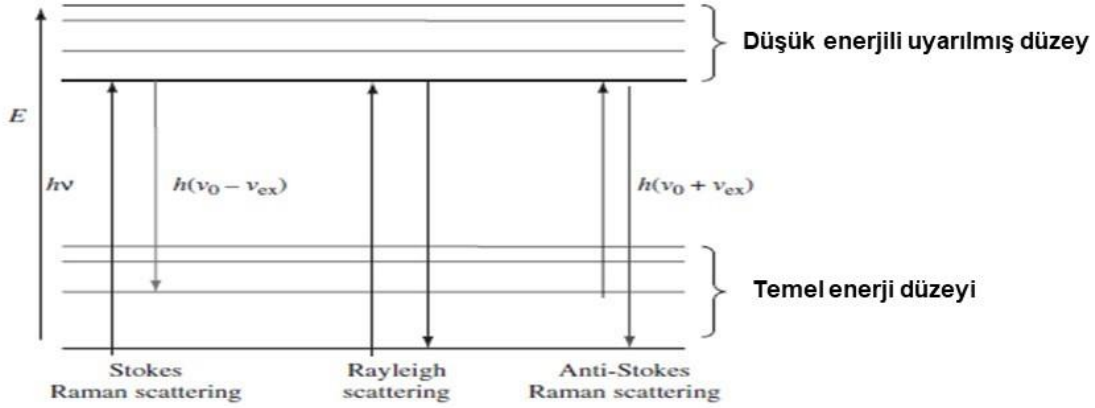
$$\alpha = \alpha_0 + \left[\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right] . q + \dots \quad (2.3.10)$$

denkleminde ifade edilir. $\partial \alpha / \partial q$ kesiri ise α 'nın q ile bağımlı olduğunu ve α değiştikçe q 'nunda orantılı şekilde değiştiğini göstermektedir.

$$\begin{aligned} P &= \alpha_0 E = \alpha_0 E_0 \cos (2\pi\nu_0 .t) + \left[\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right]_{q=0} . q_0 \cos (2\pi\nu_m .t) . E_0 \cos (2\pi\nu_0 .t) \\ &= \underbrace{\alpha_0 E_0 \cos (2\pi\nu_0 .t)}_{\text{Rayleigh saçılması}} + \frac{1}{2} \left[\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right]_{q=0} . q_0 E_0 \underbrace{[\cos (2\pi\{\nu_0 - \nu_m\} .t) + \cos (2\pi\{\nu_0 + \nu_m\} .t)]}_{\text{Anti-Stokes saçılması}} \\ &\quad \text{Stokes saçılması} \end{aligned} \quad (2.3.11)$$

(2.3.8) denklemine verilen E ve α_0 ifadelerini yerlerine yazdığımız zaman (2.3.11) denklemini elde ederiz. Raman spektrumunda birbirinden farklı üç bölge elde edilir ve bu denklem ifadesi çıkarılırken gözlenen piklerin denklemleri de elde edilir. Rayleigh saçılması frekansında artma veya azalma olmamaktadır, fakat Stokes saçılması frekansında ν_m kadar azalırken, Anti-Stokes saçılmasında ise frekans ν_m kadar artış gözlenmektedir. Bu üç bölge gözlenen saçılmalardaki frekans farklılıklarına bağlı enerji değişimleri diyagramı Şekil 14'te verilmiştir (Ferraro vd., 2003).

Raman saçılmasına uğrayan fotonlarda açığa çıkan dalga boylarındaki farklılık, titreşimli molekülün uyarılmasına ya da serbest bırakılmasına neden olur. Farklı moleküler grupların farklı özellikleri ve titreşim enerjileri vardır. Ayrıca her molekülün bir tek ve parmak-izi özelliğinde Raman spektrumu bulunmaktadır.



Şekil 14. Stokes ve anti-Stokes türü Raman saçılması olaylarının molekül enerji diyagramı ile açıklanması.

Raman Cihazının Yapısı

Genel Raman sistemleri dört temel bileşenden oluşur. Bunlar;

- Uyarılma veya ışın kaynağı olarak bilinen lazer,
- Numune aydınlatma ve ışık toplama optiği
- Dalga boyu ölçüm ve ayırt ediciler (spektrometre veya filtre)
- Dedektör

Hassas ve zayıf bir saçılma olan Raman saçılmasının, hassas bir dedektör ve yoğun şekilde uyarılma olmadan analiz edilmesi zordur. Lazerler Raman spektroskopisinde kullanılan ışın kaynaklarıdır. Işın kaynağı olarak lazerlerin kullanım sebebi yüksek enerjili olması ve odaklanmaya olanak sağlamasıdır. Raman sinyallerinin açığa çıkması için lazer kaynağının gücü yeterli olmalıdır. Numune için kullanılan lazer kaynaklarının gücü genellikle 1-1000 mW aralığında olmaktadır.

Aşağıda verilen özellikler Raman spektroskopisinde diyod lazerlerinin kullanım amacını belirtmektedir. Bunlar;

- Yüksek verimlilikleri ve soğutma durumlarını en aza indirmesi,
- Birkaç milimetre gibi çok ufak boyutlarda bulunabilmeleri,
- Diyod lazerlerin çok daha sınırlı bir aralıkları varken Raman için uygun olan diyod lazerleri yaklaşık olarak 670 nm ile 860 nm arasında dalga boyunda çalışabilirler.
- Fiyat bakımından uygun olmaları olarak gösterilebilir.

Işın Kaynakları

Modern Raman spektrometrede çoğunlukla lazer ışın kaynakları kullanılmaktadır. Güçlü bir Raman saçılması elde edebilmek için yeterli miktarda sinyal/gürültü (signal-to-noise, S/N) oranı elde edilmelidir. Bunun içinde yüksek şiddetli ışın kaynağı gerekmektedir. Raman spektroskopide en sık olarak kullanılan lazer kaynak tipleri ve dalga boyları Tablo 2’de verilmektedir.

Tablo 2. Raman Spektroskopide Yaygın Olarak Kullanılan Bazı Lazer Kaynakları

Kaynak Tipi	Dalga Boyu (nm)
Argon iyonu	488,0 veya 514,5
Kripton iyonu	530,9 veya 647,3
Helyum/Neon	632,8
Diyod lazeri	785 veya 830
Nd/YAG	1064

Raman saçılmasının toplanabilmesi için Raman spektroskopisi için kullanılan lazerlerin seçimi önemlidir. Tablo 3’de Dalga boyu verilen lazerlerin uygulama alanları gösterilmektedir.

Tablo 3. Lazerlerin Dalga Boyuna Bağlı Olarak Uygulama Alanları (Princeton Instruments, 2012)

Lazer Dalga Boyu	Uygulama Alanları
244 nm	Biyolojik uygulamalar ve katalizörler
325 nm	Bant aralığı geniş yarı iletkenler
488 ve 514 nm	Yarı iletkenler, katalizörler, biyolojik örnekler, polimerler, mineraller, karbon esaslı malzemeler ve genel amaçları
633 nm	Korozyon ve genel kullanım amaçları
785 nm	Polimerler,biyolojik uygulamalar, genel kullanımlar
830 nm	Biyolojik uygulamalar

Kullanışlı bir Raman spektrumları elde edilebilmesi için yapılması gerekenler aşağıda verilmiştir. Bunlar;

- Yeterli spektrum, çözünürlük ve kapsama alanı önemlidir.
- Numuneden alınan spektralleri büyükten küçüğe kadar hepsini önemseyerek yeteri kadar spektral pikleri ayırt edilir.
- Analiz yapılabilmesi için gerek duyulan tüm spektrum verilerin toplanması gerekir.
- Elde edilen verilerin optik üzerinde gerekli şekilde toplanmasıdır.
- Yeteri kadar S/ N sinyalleri gereklidir. Çünkü numunenin özellikleri değişmeden veya bozunmadan önceki fotonların yeteri kadar algılanıp toplanması için gereklidir.
- Tekrarlanabilirlik. Doğru ya da yanlış olan değerlerin tekrarlandığında aynı değerlerin elde edilmesidir.

Raman saçılması tüm moleküller için genelde etkilidir. Fakat bu durum floresans moleküller için geçerli değildir. Yüksek kalitede Raman spektrumunun elde edilebilmesi için saçılma ve floresans arasında ayırım yapılması gereklidir. Birçok biyolojik uygulamada floresans etki baskın gelebilir ve Raman saçılmasının ölçülmesini engelleyebilir. Bundan dolayı deneysel olarak Raman saçılımının elde edilebilmesi oldukça zordur. Fakat saçılma sistemlerinin birçoğu güçlüdür ve zorlu durumlarda dışardan müdahale edilebilme özelliği vardır. Moleküllerden elde edilen spektrumlar daha doğru tanı konulur ve daha hızlı sonuç alınması sağlanır. Raman saçıcı su zayıf olduğu için sulu çözeltilerin Raman spektrumu su titreşimleri olmaksızın da elde edilebilir. Bir başka deyişle sulu çözeltideki numunelerin araştırılması ve incelenmesinde Raman spektroskopisi kullanılabilir (Ferraro vd., 2003).

Raman Spektroskopisinin Avantajları

Genellikle film, jel, çözelti, buhar ve sıvılarda bu yöntem kullanılmaktadır. Numune hazırlama Raman spektroskopisinde uzun zaman ve emek isteyen bir süreç değildir. Numune hazırlanırken dikkat edilmesi gereken temel nokta safsızlıkların örnekten uzak tutulmasıdır. Katı numunelerin yüzeylerindeki toz ve kirlilikler giderilmelidir. Toz ve kirlilikler yüzeyden giderilmez ise elde edilmek istenen atom ya da moleküllerin bulunduğu spektrumlarda, fotonlar ve kirlili yüzeyler arasında etkileşiminden meydana gelen Tyndall saçılması olarak adlandırılan gürültüler görülmektedir (Willard vd., 1988). Eğer analizi yapılacak numunemiz sıvı veya çözelti ise yüzeydeki kirliliklerden meydana gelecek gürültüyü en aza indirmek için yüzey düzgün bir filtre işlemi yapılarak temizlenmelidir (Irish vd., 1963).

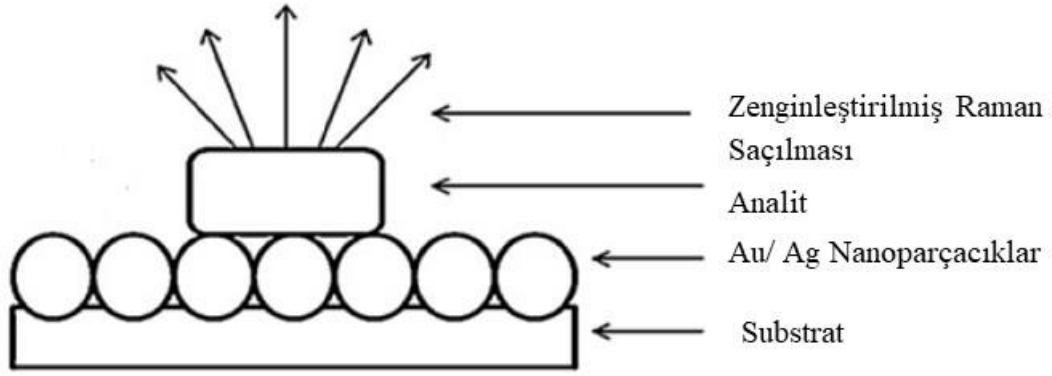
Yüzey Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS)

Raman spektroskopisi biyolojik uygulamalarda sunduğu tüm bu avantajlarına rağmen, pratik uygulamalarda sorunlara yol açan birçok kısıtlamaya da sahiptir. Raman spektroskopisinin temel kısıtlaması inelastik ışık saçılmasının doğası gereği oldukça düşük mertebelerde gerçekleşmesidir (Rusciano vd., 2017). Saçılan fotonların çok önemli kısmı elastik özellikte iken (Rayleigh saçılması), yalnızca fotonların $1 / 10^7$ (on milyonda bir) kısmı Raman saçılması oluşturmaktadır. Bu da temelde Raman kesit bölgelerinin çok düşük değerlerde ($10^{-30} - 10^{-25} \text{ cm}^2 \text{ sr}^{-1}$) olmasından kaynaklanmaktadır. Bu değerler floresans ya da absorpsiyon kesit bölge değerlerinden 8-10 mertebe daha düşüktür. Bundan dolayı klasik Raman spektroskopisi ile elde edilebilecek tanı alt limitleri, düşük hassasiyet sorunundan dolayı yüksek olmaktadır ($\sim 0.1 \text{ mM}$). Son yıllarda bu sorunları aşmaya yönelik olarak Raman sinyal şiddetini arttırarak, hassasiyet konusunda çarpıcı ilerlemeler sağlanmıştır. Belirtilen bu yaklaşımlar yüzey zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS) olarak adlandırılmış olup, ilerleyen bölümlerde SERS ve temel biyolojik uygulamaları konusunda genel değerlendirmeler yapılacaktır.

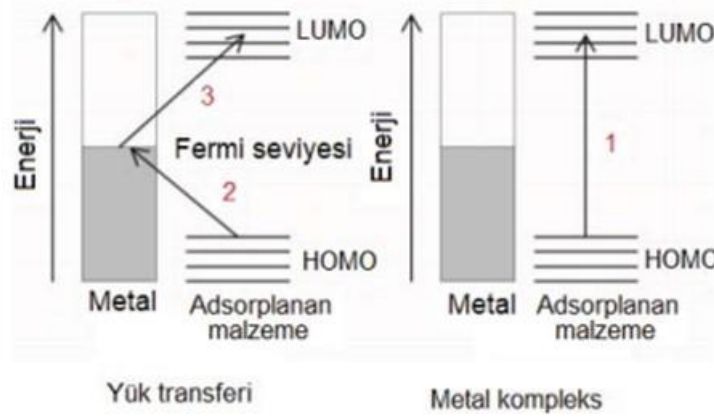
SERS, klasik Raman spektroskopisinin sunduğu yapısal spesifiklik ve deneysel esneklik gibi mevcut avantajlarına plazmonik nanoyapıların (altın, gümüş ya da bakır) eklenmesiyle sinyal şiddetinin arttırılması temeline dayanan bir tekniktir (Şekil 15). Böylelikle, SERS, kimyasal ve biyolojik molekül ve yapıların eser miktarda ve parmak izi hassasiyetinde tanısını gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca gelişen nanoteknolojik yaklaşımlar ve nanomalzeme üretim yöntemleri Raman spektroskopisinin gelişimini önemli ölçüde arttırmıştır. SERS çalışmalarındaki bir diğer çarpıcı ilerleme de tek molekül tanısının parmak izi seçiciliğinde gerçekleştirilmesidir. Bu ilerlemeden sonra bu konudaki çalışmalarda adeta bir patlama yaşanmıştır. Günümüzde birçok farklı nanoteknolojik strateji kullanılarak SERS çalışmaları ile ağır metallerden proteinlere, bakterilerden toksinlere kadar çok farklı molekül ya da yapının tanısı gerçekleştirilebilmektedir.

SERS en basit tanımıyla molekül kaynaklı Raman sinyal şiddetinin arttırılması temeline dayanan bir tekniktir. Temel olarak SERS çalışmalarında iki farklı mekanizma ile Raman sinyal şiddeti arttırılabilmektedir: Kimyasal zenginleştirme ve Elektromanyetik zenginleştirme. Bunlardan kimyasal zenginleştirme çoğunlukla elektromanyetik zenginleştirme ile beraber aynı anda oluşmaktadır (Şekil 16). Temel olarak kimyasal zenginleştirme, analit molekülün en yüksek dolu moleküler orbitali (highest occupied molecular orbital, HOMO) ve en düşük dolmamış moleküler orbitali (lowest unoccupied molecular orbital, LUMO) ile metalin Fermi seviyesi arasında kullanılan lazerin enerjisine bağlı olarak olası yük transfer komplekslerinin

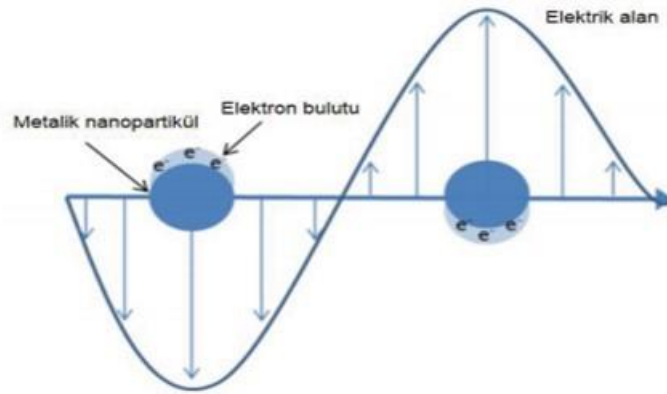
ortaya çıkmasına bağlıdır. Bu uyarılma ya metalden moleküle ya da molekülden metale olabilir. Kimyasal zenginleştirme ile 10^1 - 10^3 mertebelerinde Raman sinyal zenginleştirilmesi sağlanabilmektedir. Elektromanyetik zenginleştirme ise bir iletken içerisindeki elektron bulutunun kolektif olarak uyarılması sonucu oluşan yüzey plazmonlarının uyarılmasıyla nano-ölçekli metalik yüzeylerde lokalize elektrik alanının zenginleşmesine neden olmakta ve hem ışık uyarılmasını hem de saçılma radyasyonunun oluşmasını sağlamaktadır(Stiles vd., 2008). Yüzeydeki pürüzlülükler ve kavisler plazmonların ışıkla daha iyi uyarılmasını sağlar. Yüzeydeki ışığın elektromanyetik alanı yüzey plazmon uyarılma durumunda yüksek oranda artırılabilir (Şekil 17). Bu durumda hem gelen lazerin alanı hem de lazerin yüzeydeki nanoyapılarla etkileşimi elektromanyetik SERS zenginleşmesini sağlamaktadır. Görünür bölge dalga boyları için gümüş, altın ve bakırın yüzey plazmon oluşturma yeteneğinde olduğu ve SERS'te elde edilen zenginleştirmenin büyük çoğunluğunun bundan kaynaklandığı saptanmıştır(Moskovits, 1978). Yıllar boyunca elektromanyetik mekanizmanın açıklanmasına katkı sağlayan çok sayıda elektromanyetik teori geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen deneysel ve teorik veriler elektromanyetik zenginleştirme ile 10^{11} - 10^{12} mertebesinde Raman sinyal zenginleştirmesinin sağlanabileceğini göstermiştir(Camden vd., 2008). Ayrıca, yapılan çalışmalar lokal alan şiddetindeki artışın etkileşen komşu metalik nanoyapılar arasındaki uzaklığın birkaç nm seviyesinde olduğu durumlarda çok daha yüksek olduğunu göstermektedir(Hao & Schatz, 2004). Lokal elektromanyetik alanın bu şekilde çok daha şiddetli olan bölgelerine SERS sıcak noktaları (SERS hot-spots) denilmektedir. Bu bağlamda son zamanlarda kolloidal plazmonik nanopartiküller ve iki ya da üç boyutlu (2-D/3-D) plazmonik nanoyapılar kullanılarak çok yenilikçi yöntemler ortaya konulmuştur. SERS uygulamalarında kolloidal nanopartiküllerin kullanımı basit ve ucuz bir yol olmasına karşın, nanopartiküllerin kontrolsüz agregasyonu SERS sinyallerinde tutarsızlıklara neden olmaktadır. Diğer yandan SERS için üretilen 2-D/3-D nanoyapılar için genelde litografi gibi yöntemler kullanılmakta ve mevcut yöntemler doğaları gereği pahalı ve karmaşık cihazların kullanımını gerektirmektedir. Bu cihazların kullanımı için uzman kişilere ihtiyaç duyulmakta ve ayrıca üretilen sistemler çok küçük boyutlarda olduğu için pratik uygulamalarda kullanımı sınırlanmaktadır(K. Kneipp vd., 1997). Bundan dolayı mevcut SERS platformlarına alternatif olacak ucuz, hassas, güvenilir ve yüksek miktarda kolay üretilebilen sistemlere ihtiyaç duyulduğu tartışma götürmez bir gerçek olarak karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 15. Zenginleştirilmiş Raman saçılımı



Şekil 16. Kimyasal SERS şiddetlendirmesinin gösterimi (Özden Dinç, 2018)



Şekil 17. Metal nanoküredeki lokal plazmon rezonansının toplu salınımı(Özden Dinç, 2018).

Işığın dalga boyundan daha küçük çaplı metalik küre ile etkileştiğinde elektriksel alan yönüne bağlı olarak yüzeylerde bir elektron bulutu oluşur (Şekil 17). Bu durum yüzeyde SPR etkisinin oluşumuna neden olur ve elektriksel alanda bir zenginleştirme oluşturur. Böylelikle elektromanyetik zenginleştirme ile Raman sinyallerinde iyileştirmeler görülür. Küre

yüzeyindeki elektrik alanının uygulanan lazerle olan ilişkisi aşağıda verilen denkleme göre gerçekleşir.

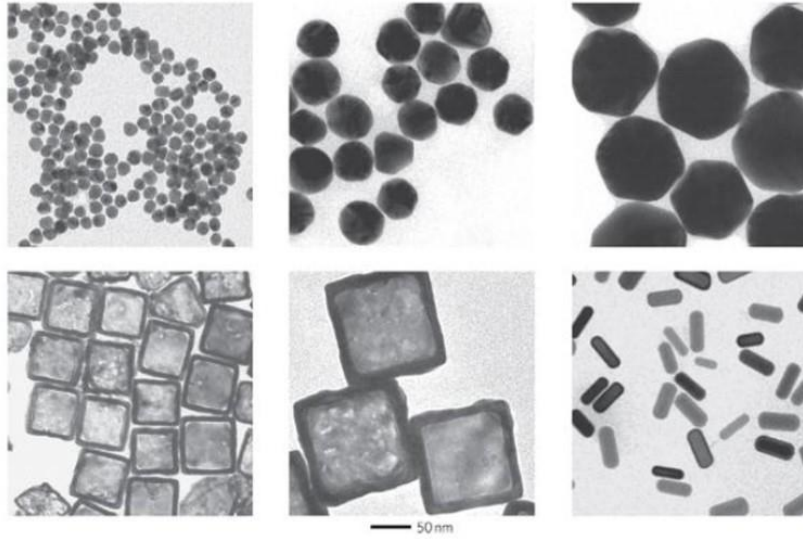
$$E_{\text{indüklenmiş}} = \{[\epsilon_1(\omega) - \epsilon_2]/[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_2]\} E_{\text{lazer}} \quad (2.3.12)$$

Denklemden verilen $\epsilon_1(\omega)$ ile gösterilen metalin frekansa bağlı dielektrik fonksiyonu, ϵ_2 ile gösterilen ise ortamın göreceli geçirgenliği olarak ifade edilmektedir. Bu ϵ_1 ve ϵ_2 arasındaki $\epsilon_1 = -2\epsilon_2$ şeklinde bir durum oluştuğunda rezonans hali olarak ortaya çıkar. Partikül yüzey üzerinde molekül bulunduğu zaman, yüzey plazmonlarının uyarılması sonucunda küre yüzeyindeki yerel elektrik alanda yüksek oranda artış meydana gelir. Bu durumda elektrik alanındaki partikülün şiddetlenmesiyle lokal yüzey plazmon rezonansını indükler ve Raman saçılmasında zenginleşme sağlar (Jin vd., 2001).

SERS yönteminde Raman sinyalinin zenginleştirilmesinde etkin olan yararlanılan parametreler aşağıda verilmiştir. Bunlar;

- Dalga boyu, polarizasyon ve lazer geliş açısı uyarılmada etkilidir.
- Saçılma konfigasyonu, polarize ya da polarize olmayan dedeksiyon ile dedeksiyon düzeneği için etkilidir.
- Genellikle altın ve gümüş gibi kullanılan malzeme türü, geometri, polarizasyon ve ışının kırılma indisi SERS yüzeyinin özellikleri bakımından önemlidir.
- Raman polarizabilite ya da Raman enine kesitleri numuneye has özellikler olarak etkindir.
- Adsorpsiyon verimliliği ve numunenin yüzey kaplanması, yüzeyden uzaklık, adsorpsiyon ile Raman polarizabilitesindeki farklılıklar numunenin adsorpsiyon özellikleri için önemlidir.

Yukarıda açıklandığı gibi SERS çalışmalarında birden çok değişken süreci etkileyen parameter olarak dikkat çekmektedir. Analiz edilecek numunenin yüksek sinyal şiddeti oluşturması hem örneğin hassas analizi ve hem de tanısı için oldukça önemlidir. Bu bağlamda SERS ile tanıda zenginleştirme oluşturacak SERS platformunun seçimi özenle yapılmalıdır (Yılmaz vd., 2014). SERS kapsamında kullanılabilecek nanoparçacıklar üretim prosedürlerine bağlı olarak çok farklı morfolojilerde olabilirler (Şekil 18). Nanoparçacıklar küresel, çubuk, kafes gibi şekillerde olabilirler ve morfoloji ve boyutlarındaki farklılıklarla çok farklı SPR özellik gösterirler (Kumar, 2012).



Şekil 18. Farklı morfolojilere sahip nanoparçacıklar(Cho vd., 2011)

SERS ve Biyolojik Uygulamaları

SERS bir optik nanosensör sistemi olarak günümüzde ortaya konmuş ve birçok farklı alanda kullanım alanı bulmuştur. SERS yaklaşımı kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda **etiketli** ve **etiketsiz** plazmonik nanoyapılar olmak üzere iki temel sistem önerilmiştir. Her iki yaklaşımda biyolojik yapıların ve süreçlerin analiz ve izlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Etiketli sistemlerde genel olarak kolloidal nanopartikülün yüzeyine aptamer, antibadi gibi tanıyıcı moleküller ve Raman rapörtör molekülü bağlanmaktadır. Böylelikle nanopartikül sistemi tanıyıcı molekül aracılığı ile spesifik analit molekülüne bağlanmakta ve sonrasında Raman rapörtöründen alınan SERS sinyali ile analiz gerçekleştirilmektedir. Alternatif olarak önerilen etiketsiz sistemlerde ise çıplak plazmonik nanoyapı hücre ya da doku ile etkileştirilmekte ve sonrasında alınan SERS sinyalleri ile analiz yapılmaktadır. Her iki yaklaşım ile kanserli ve sağlıklı hücrelerin tanısı, hücre canlılığı, endositoz ve hücre organelleri ile ilgili bilgi elde edilebilmektedir. İzleyen bölümlerde etiketli ve etiketsiz sistemler kullanılarak tasarlanmış SERS sistemleri ve uygulamaları hakkında genel değerlendirmeler yapılacaktır.

Etiketli SERS Sistemleri ve Biyolojik Uygulamaları

Son yıllarda farklı plazmonik nanoyapılar kullanılarak farklı biyolojik sistemler hakkında SERS yaklaşımı ile çok değerli bilgiler elde edilebilmektedir(Jamieson vd., 2017). Etiketli sistemler kullanılarak çoğunluğu *in vitro* olmak üzere *ex vivo* ve *in vivo* düzeyde farklı çalışmalar günümüzde yapılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda sıklıkla başta altın olmak üzere nanopartiküller farklı moleküllerle (aptamer, antibadi vb.) fonksiyonelize edilmekte ve spesifik bir hedef moleküle bağlanmaktadır. Örneğin antibadi ile fonksiyonel hale getirilmiş nanopartiküller spesifik bir antijenin tanısında kullanılabilmekte ve hücresel biyomoleküllerin

yüksek çözünürlükte görüntülenmesine olanak sağlamaktadır. Lee ve ark. gümüş ve altın nanopartikülleri kanserli hücrelerde yoğun olarak eksprese edilen bir biyoişaretleyiciye (fosfolipaz C γ 1) spesifik bir monoklonal antibadi ve Raman raportör molekül ile fonksiyonel hale getirmişlerdir(S. Lee vd., 2007). Belirtilen sistem ile *in vitro* hücre kültür çalışmalarında kanser teşhisinin gerçekleştirebileceğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada ise altın nanoçubuklar Raman boyası olarak merkaptopiridin ve ikincil antibadi (antirabbit immunoglobulin Gs (IgGs)) ile modifiye edilmişlerdir(Park vd., 2009). Bu sistem sonrasında SERS yaklaşımı ile MCF7 meme kanseri hücrelerinde insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) biyo işaretleyicisinin tanısında kullanılmıştır. 2014 yılında Lee ve ark. benzer bir yaklaşımı silika ile kaplanmış ve içi boş altın nanopartikül sistemine uygulamışlardır(S. Lee vd., 2014). Raman boyası ve üç farklı kanser biyoişaretleyicisine (epidermal büyüme faktörü, ErbB2 ve insulin büyüme faktörü) spesifik antibadi takılmış nanopartikül sistemi MDA-MB-468, KPL4 ve SK-BR-3 insan meme kanseri hatlarına uygulanmış ve meme kanseri fenotiplemesi amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmalar sadece *in vivo* koşullarda kanserin erken tanısını sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda kanserin ilerleme sürecinde gerçekleşen biyokimyasal prosesler hakkında bilgi edinmemizi de sağlar. Etiketli SERS sistemleri ile aynı zamanda farklı kanser biyoişaretleyicileri üzerinden aday ilaç moleküllerinin test edilmesi sağlanabilir. Son yıllarda spesifik bir molekülün tanısı yanında *in vitro* koşullarda benzer yaklaşımlarla enzim aktivitesi(Stevenson vd., 2013), hücre içi pH değişimleri(Bishnoi vd., 2006) ve redoks potansiyeli(Mallikarjun vd., 2012) gibi hücrenin fizyolojik özellikleri de ölçülebilmektedir. Bu kapsamda Bishnoi ve ark. hücre içi pH görüntülemesi için yüzeyi pH-duyarlı bir molekül olan p-merkaptobenzoik asit (pMBA) ile modifiye edilmiş altın nanokabuk sistemini önermişlerdir(Bishnoi vd., 2006). SERS spektrumunda pMBA molekülünün hücre içi farklı pH değerlerine karşılık protonlaşma aşamalarında oluşan değişimler SERS spektrumu ile izlenmiştir. Böylelikle hücrenin her bir bölgesi için pH farklılıkları görüntülenmiştir. Son yıllarda bu konuda benzer çalışmalar *in vitro* 3 boyutlu (3D) hücre kültür modellerine de uygulanmakla beraber bu konudaki çalışmalar hala sınırlı düzeydedir(Camus vd., 2016). 3D *in vitro* hücre kültür modelleri *in vivo* ve *ex vivo* ortamlarının gerektirdiği etik kaygıları hem ortadan kaldırmakta hem de *in vivo* koşullara yakın bilgilerin elde edilmesini sağlamaktadır. Yakın zamanda Lee ve ark. pH belirlenmesi ve ilaç salımını sağlayacak çok fonksiyonlu bir SERS sistemi tasarlamışlardır(K. Y. J. Lee vd., 2015). Bu sistem altın nanopartikül ve konjüge edilmiş doksorobisin ile polietilenglikolden (PEG) oluşmaktadır. Doksorobisin pH duyarlı hidrozon bağlayıcı ile modifiye edilmiş olup, yüzeyden ayrılarak tümör terapisinde kullanılmaktadır. Doksorobisin hem ilaç olarak çalışmakta hem de sahip olduğu karakteristik SERS spektrumu ile görüntülenmektedir. Çalışma sonucunda ilaç salımının asidik pH

değerlerinde gerçekleştiği saptanmıştır. Bu çalışma ile tümör hücrelerinde ilaç molekülünün SERS yaklaşımı ile tanımlanabileceği ve spesifik ilaç salımının görüntülenebileceği gösterilmiştir. 2013 yılında McAughtrie ve ark. üç farklı boya ile etiketlenmiş gümüş nanopartiküllerin hücre içi konumlarını 3D SERS tekniği ile belirlemişlerdir(McAughtrie vd., 2013). Çalışmada ayrıca bu yaklaşımla biyomoleküllerin çoklu ayırma (multiplexing) ile bu şekilde tanımlanabileceği saptanmıştır. Syme ve ark. soft litografi tekniği ile üretilen PDMS tabanlı 3-boyutlu sistemi hücre tuzağı olarak kullanılmış ve bu yapı mikroakışkan sistemine entegre edilmiştir(Syme vd., 2010). Daha sonra bu sistem farklı Raman aktif molekülleri takılı gümüş nanopartiküllerle etkileştirilmiştir. Pasif şekilde hücre içine transfekte olan nanopartiküller SERS sinyalleri ile haritalama yapılarak belirlenmiştir. Li ve ark. yıldız şeklindeki altın nanopartikülleri iki farklı reseptörü tanıyıcı peptit molekülleri ile konjüge etmişlerdir. Sonrasında bu nanopartikül sistemini MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri ile etkileştirerek Raman aktif moleküllerden SERS sinyalleri alınmıştır. Sonuçta farklı reseptör sistemleri için kanser hücrelerinden alınan sinyal farklılıklarından kanser hücrelerinin ayırt edilebileceği belirlenmiştir.

Son yıllarda *in vitro* çalışmaların yanı sıra *ex vivo* çalışmalarda da SERS yaklaşımı uygulanmaya başlanmıştır. Bu kapsamda glukoz gibi küçük moleküller(Shafer-Peltier vd., 2003), protein gibi büyük biyomoleküller(Rohr vd., 1989) ve DNA gibi hastalık işaretleyicileri kullanılarak biyoakışkan örneklerinde SERS ile çalışmalar yapılmıştır. Özellikle kan üzerinden elde edilen örneklerle yapılan etiketli SERS çalışmalarında çoğunlukla hedef molekül yerine Raman raportör molekülünden alınan sinyaller ölçülmektedir. 1984 yılında bu kapsamda yapılan ilk çalışmada benzoik asit gibi organik bileşiklerin kantitatif olarak tayini başarılmıştır(VoDinh vd., 1984). On yıl sonra ise yine aynı grup tarafından SERS temelli ilk DNA prop sistemi geliştirilmiştir(Vo-Dinh vd., 1994). Ayrıca yakın zamanda hastalık işaretleyicilerinin doku kesitlerinde etiketli SERS sistemleri ile tanısı gerçekleştirilmiştir.

Etiketli SERS sistemlerinin *in vivo* düzeyde uygulamalarında plazmonik nanoyapılar Raman raportörleri, agregasyonu önlemek ve biyouyumluluğu arttırmak amacıyla farklı ajanlarla (PEG, silika vb.) ve ayrıca hedeflemeli sistemler için biyotanıyıcı molekül ile fonksiyonelize edilirler. Hedeflenmemiş sistemlerde biyotanıyıcı molekül kullanılmaz. Bu konuda 2008 yılında yapılan ilk çalışmada Qian ve ark. altın nanopartikülleri Raman boyaları, PEG ve kanser hücreleri tarafından yoğun olarak eksprese edilen EGFR molekülünü tanıyıcı antibadi ile fonksiyonelize etmişlerdir(Qian vd., 2008). Hedeflenmiş ve hedeflenmemiş SERS sistemlerini sonrasında zenograft tümör fare modelinde farenin kuyruk kısmından enjekte ederek uygulamışlardır. Sonuçta hedeflenmiş sistemin hedeflenmemişe kıyasla tümörde daha

çok birikim oluşturduğu saptanmıştır. Yakın zamanda benzer stratejiler Au/Ag boşluk-kabuk ve nanoyıldız (Register vd., 2015) gibi farklı nanoyapı morfolojilerine de uygulanmıştır. Etiketli SERS sistemlerinin geliştirilmesinde yaşanan ilerlemeler sonucunda fare modellerinde hedeflenmiş çoklu tanı gerçekleştirilmiştir(Maiti vd., 2012). Bu alışmada EGFR için hedeflenmiş SERS sistemi seçici olarak tumörde birikirken, hedeflenmemiş olanların ise karaciğerde biriktiği belirlenmiştir. Benzer yaklaşımlarla Dinish ve ark. çoklu tanı sistemi olarak farklı biyoışaretleyicilerin kullanımını önermişlerdir(Dinish vd., 2014). Bunun için üç farklı kanser işaretleyicisi (EGFR, CD44 ve TGF-βII) için antibadi takılı SERS sistemleri üretilmiş ve model hayvanlarda tumor içerisine enjekte edilmiştir. Hedefli sistemlerde 48 saate kadar birikim ve tamamen uzaklaştırma 72 saatte olmaktadır. Hedeflenmemiş sistemlerde ise eliminasyon 6 saat içinde gerçekleşmekte ve 24 saatte tamamlanmaktadır. Son yıllarda *in vivo* alışmalarda esas hedeflerden bir tanesi SERS ile kombinlenmiş çoklu görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesidir. Bu şekilde herhangi bir yöntemin başarısız ya da zayıf kaldığı durumlar için alternatifler üretilebilmekte ya da daha çok veri elde edilebilmektedir. Bu kapsamda SERS sistemleri modifiye edilerek floresans(Iacono vd., 2014), fototermal, manyetik rezonans, Fourier-transform infrared, fotoakustik ve x-ışını ile görüntüleme artı özellikler kazandırılarak tanı gerçekleştirilmektedir.

Etiketli sistemler sundukları yüksek fotostabilite ve kantitatif tanıya olanak sağlaması gibi avantajlarına rağmen birçok sınırlamalar da barındırmaktadır(Jamieson vd., 2017). Bunlar arasında en önemlisi etiketli sistemlerde kullanılan kolloidal nanopartiküllerin farklı ortam koşullarında kolayca agrege olabilmesidir. Bu durum SERS sinyallerinde kararsızlıklara ve önemli ölçüde tekrarlanabilirlik sorunlarına neden olmaktadır. Ayrıca partiküllerin yüzeyinin Raman raportör boyları ve tanıyıcı moleküller ile fonksiyonalleştirmesi ek süreçler ve maliyetler gerektirmektedir. Bunun yanında bu süreçleri gerçekleştirecek insanların konu ile ilgili önemli tecrübeye sahip olması gerekmektedir. Bir başka önemli sınırlama ise fonksiyonalleştirmede kullanılan tanıyıcı molekül ve Raman raportör molekülünün yüzeyden aşınmasıdır. Moleküllerin yüzeyden aşınması Raman ölçümlerinde önemli değişimlere ve tutarsızlıklara neden olabilmektedir. Bundan dolayı belirtilen bu sınırlamaların aşılabilmesi amacıyla etiketsiz sistemler kullanılarak biyolojik sistemlerin SERS yaklaşımı ile analizleri gerçekleştirilmiştir. İzleyen bölümlerde bu konu ile değerlendirmeler yapılmıştır.

Etiketsiz SERS Sistemleri ve Biyolojik Uygulamaları

Etiketli sistemlerin yukarıda belirtilen sınırlamalarını ortadan kaldırmak amacıyla son yıllarda etiketsiz SERS sistemleri biyolojik sistemlerin analizinde kullanılmıştır. Bu yaklaşımda temel olarak herhangi bir tanıyıcı molekül ve Raman boyası ile fonksiyonel hale

getirilmemiş kolloidal nanopartikül ya da nanoyapılı yüzey biyolojik sistem ile etkileştirilmekte ve alınan SERS sinyalleri ile analiz gerçekleştirilmektedir. Böylelikle hücrenin kompozisyonu ve fiziksel özellikleri hakkında bilgi elde edilebilmektedir(Premasiri vd., 2005). Bu konuda yapılan ilk çalışmaların birinde Kneipp ve ark. etiketsiz altın nanopartikülleri kullanarak endositotik hücre içine girişi iki farklı hücre hattı (fare makrofaj hücreleri (J774) ve fare böbrek tubul hücreleri) için incelemişlerdir(J. Kneipp vd., 2006). Bunun sonucunda endositoz ile nanopartikülün hücre içine girişinde kullanılan hücre hattının önemli olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca apoptoz gibi farklı fizyolojik prosesler yine etiketsiz sistemler ile SERS yaklaşımıyla izlenmiştir(Zhou vd., 2016). Bunun için etiketsiz gümüş nanopartiküller doğrudan hücre membranı üzerinde biriktirilmiştir. İlaç uygulaması ile apoptoz başlatıldığında Raman sinyalindeki değişimler izlenerek süreç takip edilmiştir. Bu yaklaşım diğer fizyolojik süreçlere de uygulanabilmektedir. Örneğin benzer yaklaşımın yüksek kapasiteli ilaç tarama yöntemi olarak hücrelerin ilaçlara olan tepkisinin belirlenmesinde kullanıldığı gösterilmiştir(Jamieson & Byrne, 2017). Premasiri ve ark. yüzey de biriktirilmiş SiO₂ kaplı altın nanopartiküller kullanılarak farklı gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin SERS yaklaşımı ile ayırt edilebileceğini göstermişlerdir(Premasiri vd., 2005). Normal Raman ölçümlerinde yüksek floresans etkiden dolayı Raman sinyali alınamazken, SERS ile yüksek şiddette sinyaller elde etmişlerdir. Son yıllarda gerçekleştirilen ilginç bir çalışmada ise iğne şeklinde bir diatom üzerinde metal biriktirilmesi ile SERS platformu üretilmiş ve sonrasında kırmızı kan ve lösemi hücrelerinin araştırılmasında kullanılmıştır(Managò vd., 2018). Önerilen sistemde diatomun sahip olduğu yukarı doğru yönlenmiş 3D sivri nanoyapılar sayesinde belirtilen hücrelerin tanısı sağlanmış ve alınan SERS sinyallerinin ağırlıklı olarak hücre membranı kökenli olduğu saptanmıştır. Bir başka çalışmada ise hücrelerin apoptoz derecelerini belirlemek amacıyla SERS yaklaşımı kullanılmıştır(Zhou vd., 2016). Bunun için ilaç kullanılarak apoptoz sürecine sokulan hücre yüzeylerinde apoptoz göstergesi olan fosfatidilserin varlığında *in-situ* olarak gümüş iyonları hücre membranı yüzeyinde gümüş nanopartiküller şeklinde biriktirilmiştir. Böylelikle apoptoz sürecinde SERS sinyalinde elde edilen sinyaller ile bu süreç izlenmiştir. Böylelikle SERS ile apoptoz sürecinin eş-zamanlı olarak analizini mümkün kılan bir sistem oluşturulmuştur. Shao ve ark. ise 304 normal birey, 333 hepatopati hastası ve 99 yemek borusu kanserli hastadan alınan serum örneklerini SERS ile analiz etmişlerdir(Shao vd., 2018). Bunun için serum örnekleri kolloidal gümüş nanopartiküller ile karıştırılmış ve yüzeye damlatılıp kurutulduktan sonra Raman ölçümleri alınmıştır. Serum örneklerinden alınan normal Raman ölçümlerinde sinyal alınmazken, SERS ölçümlerinde önemli sinyal zenginleştirilmesi gözlenmiştir. Serum içeriğinin karmaşık bileşiminden kaynaklı sinyal benzerlik ve farklılıklarını belirlemek amacıyla çok-değişkenli analiz yöntemleri (multivariate analysis

methods, MAMs) kullanılmış olup, bu yolla farklı hastalıkların tanısının gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir. Veloso ve ark. ise fotodinamik terapi uygulanmış kanser hücreleri için kontrol, canlı ve ölü grupların analizini SERS yaklaşımı ile gerçekleştirmişlerdir (Veloso vd., 2017). SERS platformu olarak elektrobiriktirme yöntemiyle üretilen gümüş ince filmler kullanılmıştır. Bunun sonucunda MAM analizleri uygulanan SERS verileri sayesinde kontrol, canlı ve ölü hücreler için ayrıştırma yapılabildiği ve temel ölüm nedeni olarak nekroz saptanmıştır. Bir başka önemli çalışmada ise farklı zamanlarda toplanan hücre dışı ortam SERS tekniği ile analiz edilmiştir (Shalabaeva vd., 2017). Bunun için katı yüzeyde biriktirilen gümüş nanoyapılar üzerine hücre dışı ortam konularak SERS sinyalleri alınmıştır. Elde edilen sinyaller farklı istatistiksel yaklaşımlar kullanılarak analiz edilmiştir. Bunun sonucunda farklı zamanlarda alınan sinyallerin hücre fonksiyonları hakkında bilgi verici nitelikte olduğunu gösterilmiştir.

Etiketsiz SERS sistemlerinin temel darboğazı hücre gibi karmaşık biyolojik sistemlerin doğaları gereği çok kompleks yapıda olmaları ve bundan dolayı alınan SERS sinyallerinin değerlendirilmesinde yaşanan zorluklardır. Son yıllarda belirtilen zorlukları aşmak amacıyla kemometrik analizler ve SERS haritalama teknikleri önerilmiştir. Birçok farklı çalışmada bu önerilerin mevcut sorunları çözme konusunda başarılı oldukları belirlenmiştir. İzleyen kısımlarda bu kapsamda kullanılan kemometrik yöntemler ele alınacaktır.

Kemometrik Yöntemler

İstatistik ve matematiksel yöntemlerin yanı sıra 1970 yıllarında kimya uygulamalarında bilgisayar uygulamaları da kullanılmaya başlanmıştır. İsveçli Svante Wold ve Amerikalı Bruce R. Kowalski tarafından ilk kez kemometri yöntemleri konuşulmuş ve uluslararası kemometri derneği tarafından 1974 yılında kemometri ile ilgili ilk açıklama yapılmıştır (Dinç, 2007). Kemometri, veri hacmi açısından oldukça geniş olan enstrümental yöntemler ile kullanılan veri analiz yöntemi olarak açıklanabilmektedir. Tanı ve tespit araştırmaları için kullanılan araştırmalarda, verilerin boyutlarındaki azalma, numunelerin kalitatif olarak sınıflandırılması ya da bilinmeyen numunelerin kantitatif olarak tanı konulması kemometrik veri analiz yöntemlerinin kullanım amaçlarındandır (Moore vd., 2012). Son zamanlarda geliştirilen kemometrik yöntemler sayesinde, yapısında birden çok etken madde içeren örneklerin kantitatif analizi kimyasal ön işlem ve grafiksel işlem gerektirmeden doğru ve hızlı bir şekilde yapılabilmektedir. Bu nedenden dolayı kemometrik yöntemler diğer yöntemlere göre daha avantajlı olup kemometrik yöntemler daha geniş bir alanda yapılabilmektedir. Kemometrik yöntemlerde en önemli unsur hesaplama yapılabilmesine olanak sağlayan programlardır. Kemometrik hesaplamalar elle yapılamadığı için genellikle Excel, Matlab, Unscramber gibi programlar kullanılır.

Bilgisayar programlarının gelişmesi ile analizi yapılan numunelerin sayısındaki artışa karşın yüksek hassasiyete değerlendirmeler yapılabilmektedir. Bu verilerin çözülmesi ve değerlendirilmesi için istatistik yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Verilerin değerlendirilmesinin yanında, deney tasarımlarının yapılmasında da kemometrik yöntemler kullanılmaktadır.

Analitik kimya, biyoloji, adli tıp, gıda kimyası, arkeoloji ve başka birçok alanlarda kemometrik yöntemler uygulanmaktadır. Sinyal işleme ve çok değişkenli numunelerin analizlerinde fizikokimyacılar kemometrik yöntemleri kullanmaktadırlar. Organik ve farmasotik kimya, deneysel ve ilaç tasarımlarındaki araştırmalar ve çalışmalarında kemometrik yöntemler kullanılmaktadır (Ziegel vd., 1998).

Genellikle kullanılan bu kemometrik yöntemler iki ana gruba ayrılırlar. İzleyen kısımlarda bunlar hakkında temel bilgiler verilecektir.

Gözetimsiz Örüntü Tanımlama Yöntemi

Gözetimsiz örüntü tanımlama yönteminde, üzerinde çalışılan verilerle ilgili bilgilere ihtiyaç duyulmaz ve daha önceden hiç bilinmeyen ve bulunmayan sonuçların meydana gelmesine sebep olur. Bu yöntemlere örnek verecek olursak, temel bileşen analizi (PCA) ve hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) gözetimsiz örüntü tanımlama yöntemlerindendir.

Temel Bileşen Analizi (PCA)

Bir örnek sisteminde birden çok değişken verilerinin farklı gruplara ayrılarak kümelenmesi PCA metotudur. Bu yöntemde örnek sayısının n olduğu ve p sayıdaki değişkenin hesaplandığı A veri matrisinin ($A_{n \times p}$) temel bileşenlerine ayrışması denklem (2.4.1)'de verilmiştir.

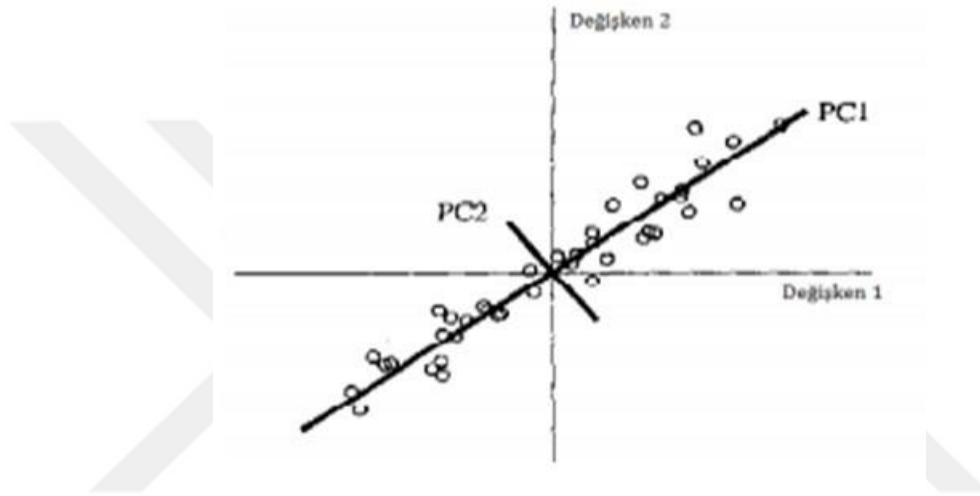
$$A = T \times B + E_A \quad (2.4.1)$$

Bu denklemde T $n \times q$ skor, B yükleme matrisi ve q sayısı A matrisinin PCA analizi için kullanılan en az temel bileşen sayısını göstermektedir. B matrisinin satır değerleri ile T matrisinin sütun değerleri A matrisinin temel bileşenini oluşturmaktadırlar.

Belirli bir A matrisini daha küçük iki matrikse çevirmesi PCA'nın çalışma prensibidir. Bu yöntem tek değerli ayrışma yapılarak ta uygulanır. Toplam varyansın çoğu bölümünü birinci (PC1) ve ikinci temel (PC2) bileşenler oluşturduğundan T matrisindeki iki sütunun birbirlerine karşı grafiği çizilip, örneklerin iki boyutlu düzlemde kümeleşmesi gerçekleşmektedir. Değişkenlerin dağılım yerlerine göre bir gruplandırma yapılmak istenirse, B matrisinin ilk iki satırıyla grafik çizilir (Diraman vd., 2009).

Örneklerin birbirleriyle olan ilişkilerini analiz etmek için matris dizilerinin birbirleriyle karşılaştırılmaları etkili bir yoldur. Yalnız bu değişkenlerin ölçüm sayısı 3'ten az olduğunda gerçekleşir. PCA analizi, varyasyon yüzdesini belirtmekle beraber, veri matrisinin matematiksel işlemini de sunar.

İki değişkenli örnek kullanıldığında temel bileşen analizi daha iyi bir şekilde anlaşılmaktadır. Değişkenlerin sayısını indirgmeden yalnızca bu iki değişkenle boşluk dizileri çizilebilmektedir. Örnek verilerin iki boyutlu dizi boşlukları Şekil 19'da verilmiştir. İki kolondan oluşan bu veri matrisi, iki ölçüm, 40 dizi olan örneği verir.



Şekil 19. Temel bileşenin ilk ikisi koyu renkle çizili olan iki boyutlu sistemde verilerin bir dizi noktaları gösterilmiştir(Toprak Çiçek, 2017).

Boşluk dizilerinde PCA örnekler arasındaki bağlantıyı açıklarken, matematiksel terimlerde PCA, boyutları hesaba katılarak iç noktaların uzaklığı açıklanmaktadır.

Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA)

Kümeler arasında birbirleriyle olan yakın ilişkileri belirlemek için kullanılan analizlere hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) denilmektedir. Kemometrik yöntemlerden biri olan HCA genellikle ayırt edici metotlar arasındadır. Farklı gruplardaki örneklerin arasındaki sınırlar bu metotla belirlenebilir. Numunelerden alınan spektrumlar HCA analizi yapılarak aralarındaki benzerlik ya da farklılıkları gözlemlenir ve bu numunelerin dağılımlarının gösterildiği kümeler istenilen amaç için yorumlanabilir (Murtagh & Legendre, 2014).

HCA değişken sayısının fazla olmasıyla PCA analizinden elde edilen temel bileşenlere uygulanabildiği gibi, direkt olarak orjinal değişkenlere de uygulanan bir yöntemdir. Kümeleme analizinde Öklit uzaklığı ve Mahalanobis gibi örnekler arasında uzaklık ölçütü birçok metod bulunmaktadır. Her bir yöntemin kendine özel farklılıkları vardır. Analizi yapılan veri

topluluğunun değişken sayısı toplam örnek sayısından az olması Mahalanobis metodunu kullanmak için gerekli bir özelliktir. Analizlenen veri seti ve bu verilerden toplanan bilgi türleri dikkate alınarak uzaklık ölçüt metodları seçimi yapılır. Uzaklık hesapları HCA analizinde uygulandıktan sonra kümeleme için algoritma seçimi yapılır. Ward kümeleme metodu en yaygın uygulanan metottur (Diraman vd., 2009).

Gözetimli Örüntü Tanımlama Yöntemi

Verilerin girdileri ve çıktılarını yani etiketleri arasında bağlantılı fonksiyonlar üreterek ilişkilendirilen yöntemlerdir. Gözetimli örüntü tanımlama yönteminde verilerin sınıflandırılması için ön bilgiye gerek duyulur. Bu bilgilere göre veriler gruplara ayrılır ve bu gruplarda kendi aralarında daha farklı sınıflandırma yapılır. Bu yöntemde örnek olarak doğrusal diskriminant analizi (LDA) verilebilir.

Doğrusal Diskriminant Analizi (LDA)

Verileri sınıflara ayıran istatistiksel metot olan doğrusal diskriminant analizi (LDA) gözetimli örüntü tanımlama yöntemidir. Fisher tarafından sınıf ayırımı yaklaşımı keşfedilmiştir. Bu yöntemde sınıfları doğrusal olarak ayırırken, aynı sınıftaki verilerin arasındaki mesafeyi de en aza indirmeyi amaçlamıştır (Kemp, 2003).

$$y = Ax \quad (2.4.2)$$

Bu denklemde A optimal yansıtma matrisi, x girdi değerini belirtmektedir. A matrisi aşağıda verilen denklem ile hesaplanır.

$$S_B W = \lambda S_W W \quad (2.4.3)$$

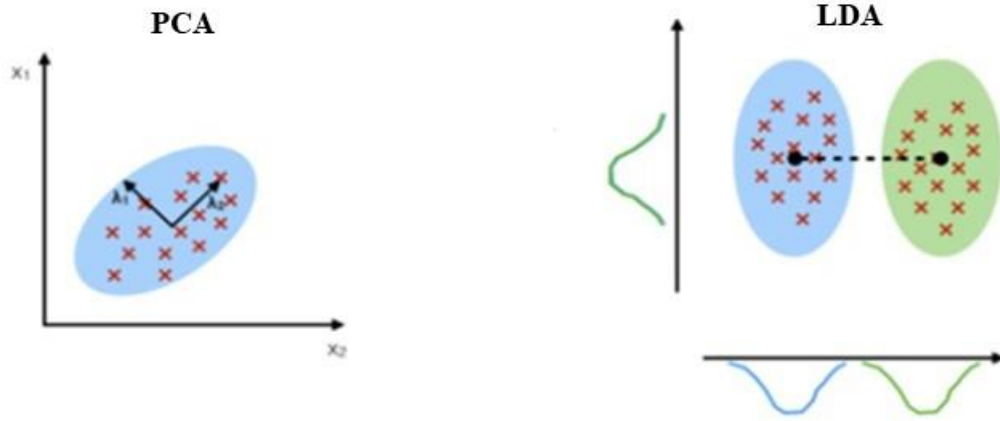
Denklemde verilen S_W 'nin tersi alınabilir ve denklemin her iki tarafıda tersi ile çarpılarak aşağıdaki denklem elde edilir.

$$S_W^{-1} S_B W = \lambda W \quad (2.4.4)$$

Sınıf sayısı S_B değerinin aldığı maximum değeridir. Her bir farklı kümelenmenin ortalaması hesaplanarak iki sınıf için kovaryans matrisi veriler alınmaktadır. Daha sonra bu kümelerin ortalamaları hesaplanıp kümedeki noktalar bu hesaplanan ortalamadan çıkartılır ve bu çıkartıldıktan sonraki sonuçlarında ortalaması alınarak sınıf içi kovaryans matrisi elde edilir (Abbasoğlu, 2019).

PCA ile LDA birbirlerine genel olarak benzese de LDA'nın prensibinde sınıflar arasındaki uzaklığı en yüksek mesafede tutmak vardır (Şekil 20). PCA'da ise sınıf kavramı

değil kümeleme kavramı vardır. PCA, LDA'dan farklı olarak yalnızca very noktalarının arasındaki mesafeyi en yükseğe çıkarmaya çalışır.



Şekil 20. PCA: Varyansı maximuma çıkaran bileşen eksenleri ve LDA: Sınıf ayrımını maximuma çıkaran bileşen eksenlerini gösterir

MATERYAL VE METOD

Kullanılan Hücreler

	<u>ATCC® NO</u>
• A549 = Akciğer Kanseri	CCL-185™
• MRC-5 = Akciğer Sağlıklı Fibroblast	CCL-171™
• MCF 10A = Sağlıklı Meme	CRL-10317
• Caco2 = Bağırsak (Kolon) Kanseri	HTB-37™
• MCF7 = Meme Kanseri	HTB-22™

Kullanılan Kimyasallar

- Etanol %96 (C₂H₅OH) (Sigma-Aldrich)
- Tri-Sodyum Sitrat dihidrat (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O) (Merck)
- Aurik Asit (HAuCl₄) (Sigma-Aldrich)
- FBS (Fetal Sığır Serum) (Sigma-Aldrich)
- PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi) (Sigma-Aldrich)
- Tripsin (Sigma-Aldrich)
- Tris aminometan (H₂ NC(CH₂ OH)₃) (Merck)
- NaOH (Merck)
- Dopamin-HCl (Merck)
- DMSO (dimetilsülfoksit) (Sigma D 2650 ve D 4540)
- Hidrojen Peroksit (H₂O₂) (Merck)
- Sülfürik Asit (H₂SO₄) (Merck)
- N₂ gazı

Kullanılan Cihazlar

- UV Kabini
- pH Metre
- Santrifüj Cihazı
- Manyetik Karıştırıcı
- Karıştırıcı
- Hassas Terazî
- Etüv Fırını

- Raman Spektroskopisi (WITec alpha300 R)
- TEM (Geçirimli elektron mikroskobu)
- SEM (Taramalı elektron mikroskobu)
- CO₂ inkübatörü
- Su banyosu
- UV-Vis Cihazı
- PVD Kaplama Cihazı

Tüm tez çalışmaları boyunca yıkama işlemleri ve çözelti hazırlamada saflaştırılmış deiyonize su kullanılmıştır. Altın nanopartikül yapımı için HAuCl₄, saf su, tri-Sodyum sitrat dihidrat kimyasalları kullanılmıştır. Daha sonra alüminyum yüzey, düz altın yüzey (smooth Au), Eğik Açılı Birikimli altın yüzey (OAD)’lerin temizleme işleminde yıkanması için %96 Etanol, kurutulması için UV kabini (ESCO) kullanıldı.

Büyütülen hücrelerin kaldırma işlemi için Tripsin, FBS, PBS solüsyonları ve etüv fırını kullanıldı. Hücreleri kaplamak için dopamin HCl ve Tris tampon çözeltisi hazırlamak içinde Tris aminometan ($H_2NC(CH_2OH)_3$) (Merck) kimyasalları kullanılmıştır.

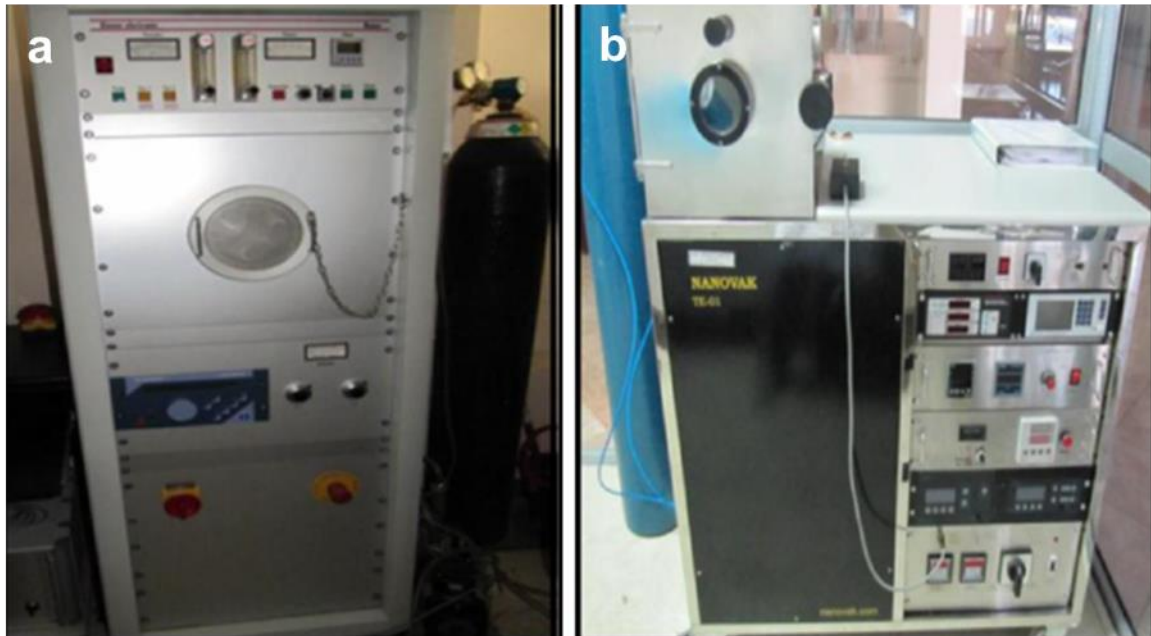
Bu aşamada santrifüj (Universal 320 R) cihazı ve karıştırıcı (IKA KS 3000 i) kullanılmıştır. Hücrelere PDOP kaplaması ve AuNP dekorasyonun belirlenmesi amacıyla kamera entegreli ters ışık mikroskobundan (Zeiss Primovert, Inverted microscope) kullanılmıştır. Kuruması için UV kabini içinde bırakılan altın yüzeyler daha sonra Raman Spektroskopisi (WITec alpha300 R, Şekil 20) cihazında okutulup spektrumlar elde edilmiştir.

Raman okumalarında 785 nm lazer kaynağı seçilmiştir. Cihaz CCD dedektör ve kontrol edilebilir güç kontrolörüne sahiptir. Raman spektrumlarını alırken ayarladığımız parametreler objektif yakınlaştırılması 50X, uygulama zamanı 10 s, spot boyutu 1.7 μm , spektral merkezi 1200 cm^{-1} ve lazer gücü 10 mW olarak ayarlanmıştır.



Şekil 21. Raman Spektroskopisi (WITec alpha300 R)

Nanoyüzeylerin oluşturulması için Yüksek Vakumlu Fiziksel Buharlaştırma Birikimi (Physical Vapor Deposition, PVD) cihazı (Nanovak HV, Şekil 21) kullanılmıştır. Bu cihazla istenilen kalınlıkta nanoyüzey üretilmektedir. Eğik açı birikimi (Oblique Angle Deposition, OAD) için de aynı cihaz kullanılmıştır.



Şekil 22. Yüzeylerin temizlenmesi için kullanılan plazma cihazı (a) ve PVD cihazı (b)

Birikim işlemi için % 99,9 saflıktaki altın kullanılmıştır. 10^{-6} Torr basınçla ve $0,1 \text{ Å/sn}$ hızında kaplama yapılmıştır. Eğik açı vakum biriktirme (OAD) tekniği ile elde edilen

nanoyüzeylerin karakterizasyonu JEOL JSM-6060 ve QUANTA 400F Field Emisyon taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır.

Image-J yazılımı ile altın nanoyapıların eğim açıları ve çapları kontrol edilmiştir. COMSOL yazılımı ile 10° anizotropik altın yüzey elektrik alan modellemesi elde edilmiştir. Bu modellemedeki temel özellikler ilgili literatürden temin edilmiştir (Johnson & Christy, 1972).

Altın Nanopartiküllerin Sentezi

Tez çalışmasında kolloidal altın nanopartiküller, anizotropik altın yüzeylerle bir araya getirilerek hücre tanısındaki verimleri SERS yaklaşımı ile test edilmiştir. AuNP sentezi için Turkevitch(Turkevich vd., 1951) tarafından belirlenen standart sitrat indirgeme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde bir behere 5 ml 1 mM HAuCl₄ çözeltisi eklenmiştir. Üzerine 45 ml deiyonize suda eklenip 1400 rpm’de manyetik karıştırıcıda karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Au⁺³ iyonlarının indirgenmesi için manyetik karıştırıcı eşliğinde üzerine 16.5 ml 0.1 M tri-sodyum sitrat çözeltisi eklenmiştir. Sonrasında 5 dakika daha kaynatılıp altın iyonları indirgenmiş ve ısıtıcı kapatılarak tepkime tamamlanmıştır. Nanopartiküllerin oluşum süreçleri UV-vis absorpsiyon spektroskopisi ile izlenmiştir. Tepkime sonunda oda sıcaklığına soğutulan AuNP örnekleri santrifüj yapılarak (12000 rpm, 20 dak.) saflaştırılmıştır. Tepkimeden elde ettiğimiz koyu kırmızı renkli AuNP çözeltisi ağzı kapatılıp oda koşullarında başka bir işlem yapmadan daha sonra kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

Hücrelerin Çözülmesi ve Pasajlanması

Besiyerinin Hazırlanması

- % 10 FBS (Fetal Sığır Serum) (10 ml)
- % 1 Pen-STREP (100 U penicillin/0.1 mg/mL streptomycin) (1 ml)
- % 89 Basal besiyeri (DMEM, MEM, EMEM, DMEM F12...) (89 ml)

Birbirleriyle karıştırılarak 100 ml’lik besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri 37 °C ‘de 10 dakika boyunca su banyosunda tutulup ısıtıldıktan sonra kullanılmaktadır. Ama fazla bekletilmesi de uygun değildir. Çünkü besiyerinin içerisindeki bileşenlerin bazıları sıcakta fazla bekletilmeye dayanıklı değildir. Fetal sığır serumu pahalı olduğundan genellikle dondurularak saklanmaktadır. Fakat besiyeri için eklendikten sonra erimiş parçalar bir süre daha buzdolabında dondurulmadan saklanabilmektedir.

Hücrelerin Çözülmesi

- Sıvı azot (-196 °C) içerisinde alınan ve içerisinde örnek hücrelerin bulunduğu cryo tüpleri 37 °C ile ısıtılmış su banyosunda hızlı bir şekilde eritilir.

- 4 ml besiyeri bulunan falkon tüplerine cryo tüpünün içindeki hücre süspansiyonu dikkatlice ve yavaşça dökülür. Hücreler, hücrelerin içinde saklandığı antifriz olan DMSO (dimetilsülfoksit)'nin içinde bulundukları için hareket ettirilirken çok hassas olunmalıdır.
- Falkon tüpleri 1500 rpm' de 5 dk boyunca santrifüj yapılır. Daha sonra üst sıvısı atılır ve 2 ml besiyeri pellete eklenir.
- Besiyeri eklendikten sonra hücreler tamamen çözüldükten sonra 3 ml daha üzerlerine besiyeri eklenir ve hacmi 5 ml olan hücre süspansiyonu 1500 rpm de 5 dk santrifüjlenir. Süpernatant yani DMSO 'nun ortamdan uzaklaştırılması için bu santrirüj işlemi yapılmaktadır.
- Besiyeri içerisinde hücreler çözündürülür ve uygun olan hücre büyütme kaplarına (flask) ekimleri yapılır. Ekimleri yapılan hücre flaskları ortamı 37 °C, %90 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilir.
- 2. gün flask kaplarına yapışmayan hücrelerin uzaklaştırılması için yeniden besiyerleri değiştirilir. Eğer hücre çoğalması tamamlanmazsa ve hücre kültürü devam ederse 2-3 gün sonra besiyerinin yenilenmesi gerekir. Flask içerisindeki besiyeri 1X dPBS' yi pipet ucuyla uzaklaştırılarak 25 cm²'lik flask içerisine 2 ml, 75 cm²'lik flask içerisine 4 ml besiyeri ilave edilir. Böylece hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlanır ve PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 25 cm²'lik flask içerisine 5ml, 75 cm²'lik flask içerisine 10 ml taze besiyeri eklenir.
- Kültür kapları (flask) invert mikroskop ile her gün bakılıp hücrelerin konfluent (sıkışma) oldukları zaman tripsin ile pasajlanma yapılabilir.

Hücrelerin Pasajlanması

Ekilen hücreler hücre kültürü ortamında kabın zeminini kaplayıp çoğalırlar. Bu durumda hücreler için besleyici sıvılar yetersiz gelmektedir. Ayrıca kültür kabında daha fazla yer bulamadıkları için çoğalmaları sonlanır ve hücreler ölmeye başlarlar. Böyle durum olduğunda pasajlanma işlemine başlanılmalıdır.

Hücrelerin çoğalmaları durup ölümleri başladığında, kültür kaplarının zeminindeki tabaka halinde olan hücre dizilerini sıcaklık ve tripsin kullanarak zarar vermeden hasas bir şekilde yüzeyden alınıp sıvı içinde farklı bir ortama transfer edilme işlemine pasajlama denir.

- Konfluent kültür kaplarının üzerindeki besiyeri uzaklaştırılır.
- Hücreler PBS ile yıkanarak serumdan arındırılır.

- Daha sonra PBS de uzaklaştırılır. Tripsinle hücreler inkübatörde 5 dk süre ile kontrol edilerek inkübe edilir. Bu süre bazı hücrelerde daha az olabilir. Çünkü her hücrenin tripsine tepkisi farklıdır. Bu yüzden arada mikroskopta bakılarak hücrelerin kültür kaplarının yüzeylerinden ayrıldıkları (hücre kaldırma işlemi) kontrol edilir. 25 cm²'lik flask için 0,5 ml, 75 cm²'lik flask için ise 1 ml tripsin eklenir.
- Üzerine tripsin miktarının 3 katı kadar besiyeri eklenip tek hücre süspansiyonu haline getirilerek 15 ml'lik tüplere aktarılır.
- Tüplerdeki hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 15 dk santrifüjlenir ve üst faz atılır.
- 1 ml besiyerinde hücreler sulandırılır ve sayılırlar.
- İstenilen uygun hücre kültürü büyütme kaplarına ekim yapılır. Ekimleri yapılan hücre kapları ortamı 37 °C, % 90 nem ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilir. Böylece istenilen miktarda çoğalmaları sağlanır.

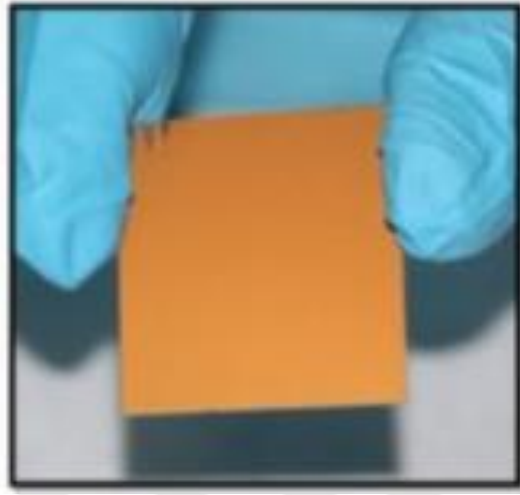
Altın Nanoçubuk Dizinlerin (Gold Nanorod Arrays, GNA) Yüzeyde Oluşturulması ve Karakterizasyonu

Öncelikle BK7 cam yüzeylerini istediğimiz şekilde kaplayabilmek için 2.5 cm x 2.5 cm boyutlarında kesilmiştir. Kesme işleminden sonra yüzeyde ki tozları ve kirleri arındırabilmek için sabunlu suda sonike edilerek yüzeyler temizlenmiştir. Yüzeylerin üst kabası temizlendikten sonra daha özenli temizlenmesi için öncelikle deiyonize su, aseton ve etanol ile 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur. %30 v/v (30 ml) hidrojen peroksit (H₂O₂) ve %70 v/v (70 ml) Sülfürik asit (H₂SO₄) karıştırılarak hazırlanan piranha çözeltisine yüzeylerin organik kirliliklerinden ve pürüzlülüklerinden arındırmak için 15 dakika boyunca bekletilir. Çözeltiden çıkartılıp deiyonize su ve etanol ile yıkayıp kaplama işlemine başlayana kadar yüksek saflıktaki etanol içerisinde bekletilmiştir. Yüzeyler etanolden çıkartılıp kaplama yapmadan önce N₂ gazı geçirilerek yüzeyin kurutulması sağlanır. Organik kirliliklerden arındırmak için BK7 cam yüzey 30 dakika boyunca 100 W oksijen plazması vakum ortamında temizlenmiştir. Süre sonunda plazma sisteminden alınan cam yüzeylerin üzerlerinin tekrar kirlenmemesi için hızlı bir şekilde kaplama aparatına takılıp kaplama cihazına yerleştirilmiştir.

Çalışmamızda altın yüzey oluşturulması için cam yüzey üzerine PVD tekniği uygulanmıştır. PVD cihazı sayesinde yüzeylerin buharlaşan altın atomları ile arasındaki açısı kontrol edilebilmektedir. Cam yüzeyler ile buhar halindeki altın atomları arasındaki açının istediğimiz eğim açısı olarak elde edebilmesi yüzey difüzyonu ve kendini gölgeleme işlemlerinin temeline dayandırılır. PVD cihazı içerisinde bulunan tungsten potaya yüksek saflıktaki altın (% 99,99) konulmuştur. Kaplanması istenilen BK7 cam yüzeyler ile buharlaşma kaynağının arasındaki uzaklığı 2 cm olarak ayarlanmıştır. 10⁻⁶ Torr buharlaşma basıncı ve 0.1

Å/sn biriktirme hızı olarak depozisyon sisteminin çalışma koşulları ayarlanmıştır. Cihazdan farklı açılarda ve 50 nm kalınlıkta altın biriktirilmiştir. Tez çalışmamızda 10° ile biriktirilmiş altın yüzey kullanılmıştır (Şekil 22).

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile yüzeylerin üzerlerinde oluşan nanoyapılar karakterize edilmiştir. SERS analizinde eğimli ve düz (izotropik) altın yüzeyleri karşılaştırmak için 3 nm Cr ve 32 nm kalınlığında düz altın yüzey aynı koşullarda ve yöntemde üretilmiştir. Altının yüzeye daha iyi bağlanabilmesi için Cr ile kaplanılmıştır.



Şekil 23. OAD yaklaşımı ve PVD sistemi ile 10° biriktirme açısı koşulunda üretilen 50 nm kalınlığında üretilen GNA platformunun optik görüntüsü.

Hücrelerin PDOP ve AuNP ile Dekore Edilmesi

Önceden ekimi yapılan ve büyütülen hücreler etüvden alınıp, mikroskoptan canlı hücre görüntüleri alındı ve yukarıda anlatılan yöntemle hücre kaldırma işlemi yapılmıştır. Kalkan hücreler mikroskopta yuvarlak şekilde görüntülenmektedir. Kalkan hücrelerin üzerine tripsin miktarının 3 katı kadar besiyeri eklenip 15 ml' lik tüplere aktarıldı. Tüpler 1000 rpm 'de 15 dk santrifüjlendi. Santrifüjlediğimiz hücrelerin üst fazı atılıp Alüminyum, Düz (Smooth) ve OAD' li yüzeylere 10 µl kadar damlatıldı. 3 saat kuruması için UV laminar kabin içerisinde bekletildi. Böylelikle ilk bare (boş) hücre ekimi yapılmıştır ve lam üzerine damlatılıp mikroskoptan görüntüsü alınmıştır.

Kaldırılan hücrelerin 1000 µl (1 ml) kadar PBS eklendi üzerine ise 40 mg dopamin-HCl ve 20 ml Tris buffer solüsyonu karışımdan 4 ml eklenip hacim 5 ml'ye tamamlandı. Dopamin-HCl eklenen hücre tüpleri 35 °C'de 150 rpm'de 2 saat karıştırıcıda bekletildi. Süre sonunda hücrelerin rengi koyulaşmıştır. Buradan dopaminin oksidatif polimerizasyon sonucu PDOP oluşumunun olduğu anlaşılmaktadır. Karıştırıcıdan alınan tüpler 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üst faz atılıp kaplamanın durması için 100 µl su eklendi. Elde edilen PDOP kaplı hücrelerden 10 µl alınarak alüminyum folyo, düz (Smooth) altın ve GNA yüzeylere damlatıldı

ve UV laminar kabin içerisinde 3 saat kurumaya bırakılıp kuruma sonunda mikroskopla görüntüsü alındı.

Kaplama sonrası PDOP kaplı hücrelerin üzerine 1000 µl AuNP süspansiyonu eklendi ve deiyonize su ile 5 ml hacime tamamlandı. 35 °C’de 150 rpm’de 2 saat karıştırıcıda bekletildi. Yukarıdaki gibi karıştırıcıdan alınan tüpler 1000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Üst faz atılıp kaplamanın durması için 100 µl su eklendi. Elde edilen Cells@PDOP@AuNP hücrelerden 10 µl alınarak alüminyum folyo, düz (Smooth) altın ve GNA yüzeylere damlatıldı ve UV laminar kabin içerisinde 3 saat kurumaya bırakılıp kuruma sonunda mikroskopla görüntüsü alındı.

Elde edilen bu sistemlerin SERS sinyalleri ve TEM görüntüleri alınarak kemometrik yöntemler ile dekore edilmiş hücrelerin yorumlamaları yapıldı.

GNA Yüzeyler ile Biraraya Getirilen Cells@PDOP@AuNP Yapılarının Kemometrik Analizleri

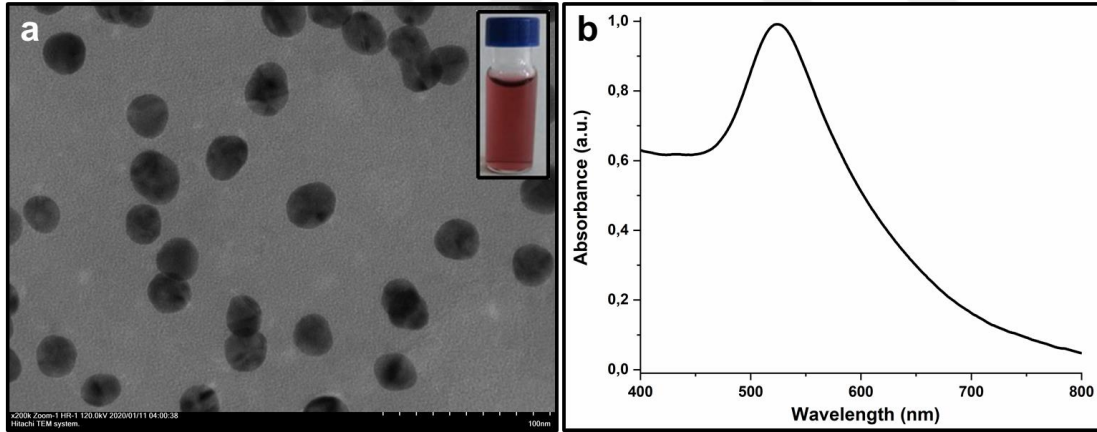
Tez çalışmamızda veriler elde edildikten sonra gruplama yapılabilmesi ve sonra yorumlanabilmesi için kemometrik analiz yöntemlerinden gözetimsiz örüntü tanımlama metodlarından olan hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) ve temel bileşen analizi (PCA) kullanılmıştır. HCA ve PCA yapılırken elde edilen 100 haritalama spektrumunda şiddeti yüksek 20 SERS spektrumu ilk olarak OPUS 5.5 (OPUS, Bruker Optics, Ettlingen, Germany) yazılımı kullanılarak ön işlemlerden geçirilmişlerdir. Bu kapsamda 20 spektrum öncelikle baseline (taban çizgisi) daha sonrasında smooth (düzleştirme) ön işlemlerden geçirilmiştir. Kemometrik analizlerde ise 200 - 2000 cm⁻¹ spektral bölge taratılmıştır. Hiyerarşik kümeleme analizli yapılırken de Ward’ın Öklit mesafesi algoritması uygulanmıştır. Daha rahat ve güvenilir şekilde gruplanabilmesi ve yorumlanabilmesi için ön işlemlerden geçen spektrumlar, HCA ve PCA uygulanabilmesi için Unscrambler X 10.3 (Camo Software, Inc.) programı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlardan HCA dendrogram grafiği şeklinde gösterilmişken, PCA sonuçları ise sınıflandırılmış şekilde ve yanında skor ve yükleme (loadings) grafiği de verilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Altın Nanopartikül (AuNP) Sentezi

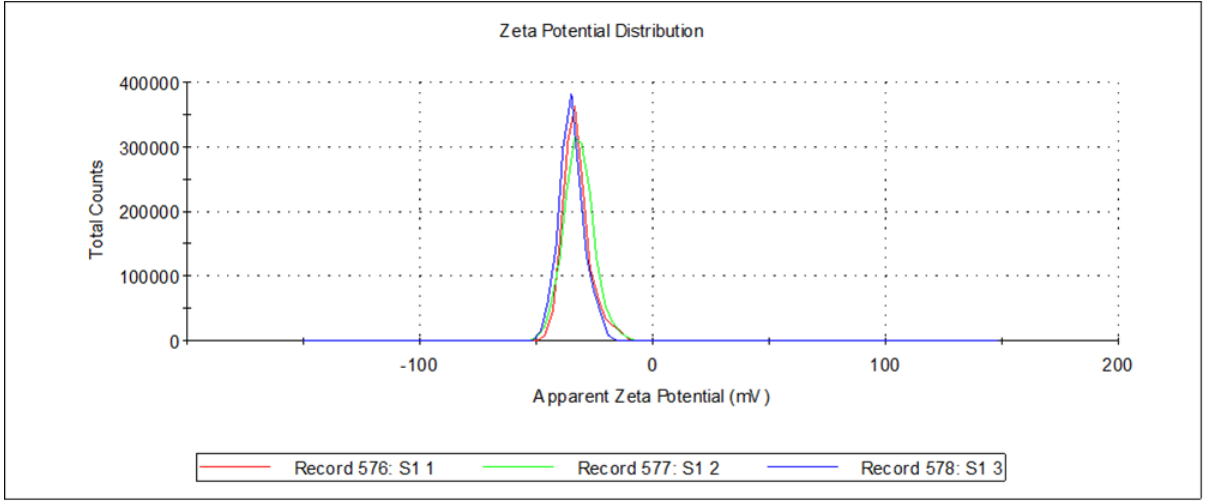
Elde edilen nanopartiküllerin morfolojileri, boyutları, kristal yapıları ile yüzey yükleri TEM, XRD ve Zeta-Sizer/Potential analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

Şekil 24’de sitrat indirgeme yöntemi ile elde edilmiş olan AuNP için TEM görüntüsü ve UV-vis absorpsiyon spektrumu verilmiştir. TEM görüntüsünden üretilen AuNP’lerin küresel şekilde olduğu ve partikül boyut dağılımlarının 15 ile 40 nm arasında ve ortalama partikül boyutunun 26 nm olduğu belirlenmiştir (Şekil 24a). Ayrıca iç görüntü olarak verildiği gibi elde edilen AuNP, önceki çalışmalarımıza benzer şekilde yakut kırmızısı (ruby-red) rengindedir. UV- vis absorpsiyon spektrumunda ise bu nanoparçacıklar için 520 nm’de bir absorpsiyon uyarılma maksimum noktası gözlenmiştir (Şekil 24b). Burada spektrumun görece dar bir pik yayılması gösterdiği ve bu gözlem sentezlenen nanopartiküllerin dar bir aralıkta olduğunu göstermektedir. Bu durum alınan TEM görüntülerini önemli ölçüde desteklemektedir.

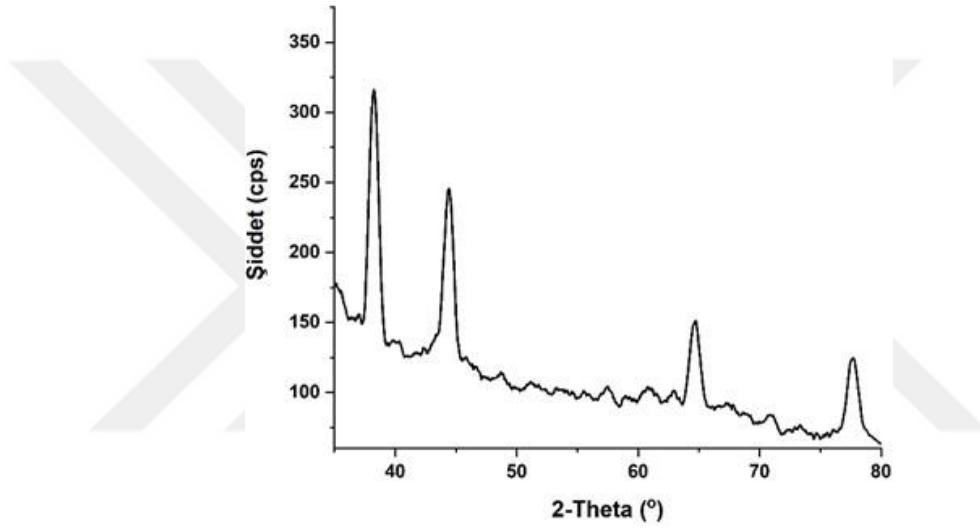


Şekil 24. Sitrat indirgeme yöntemi ile elde edilen AuNP için TEM görüntüsü (a) ve UV- vis absorpsiyon spektrumu (b). Sentezlenen AuNP dispersiyonu için optik görüntü TEM görüntüsü üzerinde verilmiştir

Üretilen AuNP için Zeta-potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Bu örnek için ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve elde edilen Zeta-potansiyel dağılımı Şekil 25’te verilmiştir. Bu spektrumdan AuNP için ortalama Zeta-potansiyel değeri -33 mV olarak belirlenmiştir. Bu sonuç ışığında indirgemedede kullanılan sitrat iyonları AuNP üzerinde birikmiş ve yüksek oranda potansiyel oluşturmuştur. Böylelikle NP sistemini kararlı tutabilecek bir potansiyel elde edilmiştir.



Şekil 25. AuNP sistemi için Zeta-potansiyel ölçümleri



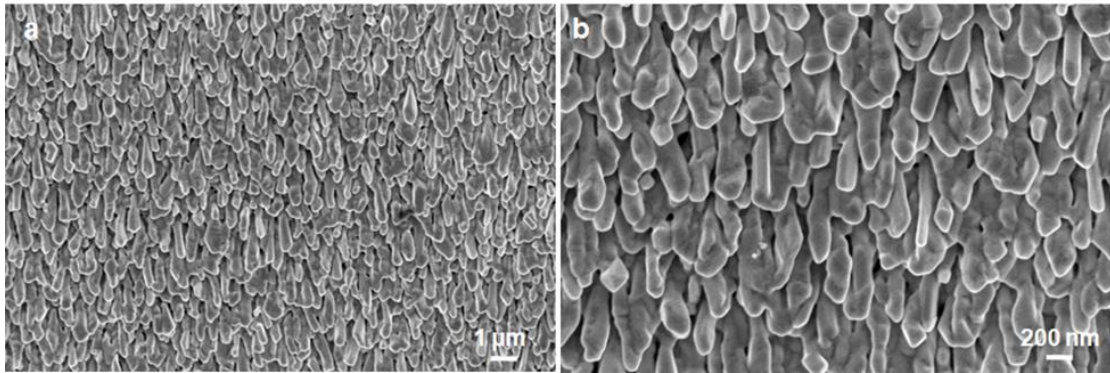
Şekil 26. Üretilen AuNP için XRD desenlerini gösteren spektrumlar

Üretilen AuNP sistemlerinin kristal yapılarının belirlenmesi amacıyla XRD spektrumları alınmış ve örnek bir spektrum Şekil 26’te verilmiştir. Bu spektrumda pik analizi yapıldığında 38.2° , 44.4° , 64.7° ve 77.7° için sırasıyla (111), (200), (220) ve (311) düzlemlerinde kristal yapıların oluşumu belirlenmiştir. Belirtilen bu düzlemler yüz-merkezli kübik (face-centred cubic, FCC) sistemlerin varlığını göstermektedir.

Yukarıda verilen veriler ışığında AuNP sentezinin başarılı bir şekilde istenilen morfoloji (küresel), boyut (25 nm) ve plazmonik özellikte yapıldığı görülmektedir. Bu kısımda üretilen nanoparçacıklar ileriki deneysel kısımlar kapsamında kullanılacaktır.

GNA Platformlarının Üretimi

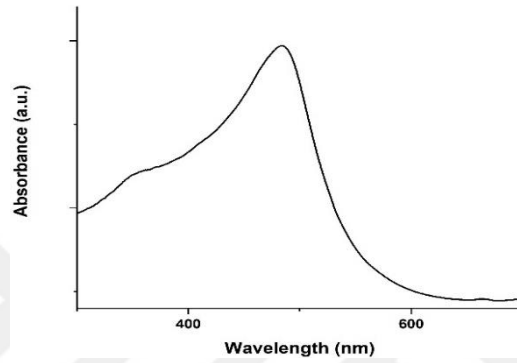
PVD tekniği ve OAD yaklaşımı ile anizotropik GNA yapılar cam yüzeyler üzerinde üretilmiş ve ince filmler için elde edilen SEM görüntüleri Şekil 27’te verilmiştir. Daha önceki çalışmalarımıza benzer şekilde biriktirme açısı değiştirilerek farklı morfolojilerde altın nanoyapıların yüzeylerde oluşturulabileceği gösterilmiştir(Yılmaz vd., 2015). 10° biriktirme açısı ile üretilen filmlerde yoğun bir şekilde paketlenmiş, belli bir yöne yönelmiş anizotropik yapıda altın nanoçubuk dizinleri elde edilmiştir. Nanoçubukların sayı yoğunluğu ImageJ yazılımı kullanılarak hesaplanmış ve $3,9 \times 10^8$ nanoçubuk / cm^2 olarak belirlenmiştir. Ayrıca nanoçubukların çaplarının 100–200 nm aralığında ve ortalama değer olarak 140 nm olduğu görülmüştür. Bu platform 1D ve 2D yapılara göre SERS aktivitesinde benzersiz avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlar 3D yapı ile yüksek yüzey alanı ile analit arasında etkileşimin artırılması, nano-anten etkileri (nano-antenna effect), uç-fokuslanma (tip-focusing) gibi etkenlerle elektriksel alanın artırılması şeklinde özetlenebilir(Yılmaz vd., 2014, 2015).



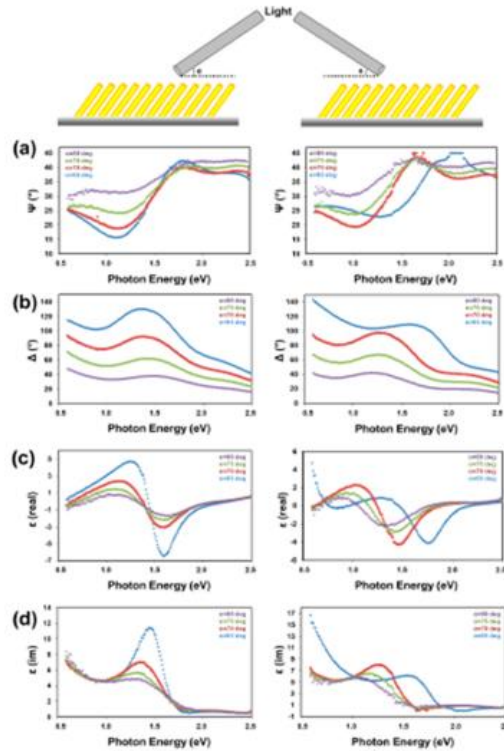
Şekil 27. PVD tekniği ve OAD yaklaşımı ile üretilen GNA yapılar için farklı büyütmelerde alınan SEM görüntüleri

SEM görüntülerine ek olarak üretilen GNA ince filmlerinin plazmonik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ilk aşamada UV-vis absorpsiyon spektroskopisi kullanılmıştır. Elde edilen spektrumda (Şekil 28) GNA sistemlerinin 400-600 nm arasında geniş bir absorpsiyon pikine sahip olduğu görülmektedir. Bu ölçümde ışığın yüzeye dik olarak geldiği ve bundan dolayı nanoçubukların 0D nanoküre gibi davranış gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu konuda daha ayrıntılı bilgi edinmek amacıyla GNA ince filmler için elipsometrik ölçümler alınmıştır. GNA ince film için farklı ışık yön ve açılarda gerçek (ϵ_r), ve sanal (ϵ_i) dielektrik sabitleri gibi elipsometrik parametrelerin değişimi Şekil 29’da verilmiştir. Özetle GNA filmleri, gelen ışığın yönüne bağlı olarak net optik anizotropi özelliği göstermiştir(Yılmaz vd., 2015, 2017). Gelen ışık GNA ince filminin anizotropik yönünde olduğunda yüksek oranda yüzey plazmon rezonans (surface plasmon resonance, SPR) oluşturduğu gözlenmiştir. Yüksek polariton oluşumunu gösteren güçlü plazmon rezonansı saptanmıştır. Genlik (Ψ) spektrumu sırasıyla 1.1 eV (1127

nm) ve 2.1 eV'de (590 nm) keskin ve zayıf bir dip bölge oluşturmuş olup, bunlar boyuna ve enine SPR varlığını göstermektedir. Aynı dalga boyları için faz (Δ) spektrumunda ise maksimum noktaları ortaya çıkmıştır. Özetle, GNA ince filmler sıra dışı 3D yapıları ile SPR uyarılmasında bir artışa neden olmuştur. Ayrıca gelen ışık izotropik eksen ile hizalandığında SPR bantlarında daha yüksek enerjiye geçiş ve genişleme gözlenmiştir. Bu durum elektromanyetik zenginleştirme ve buna bağlı olarak yüksek SERS aktivitesi eldesinin önünü açmaktadır. Bundan dolayı projenin ilerleyen bölümlerinde altın biriktirme açısı 10° sabit değerinde tutulmuş ve bu koşullarda üretilen sistemler SERS platformu olarak kullanılmıştır.



Şekil 28. GNA yapılar için ince filmlerden alınan UV-vis absorpsiyon spektrumu

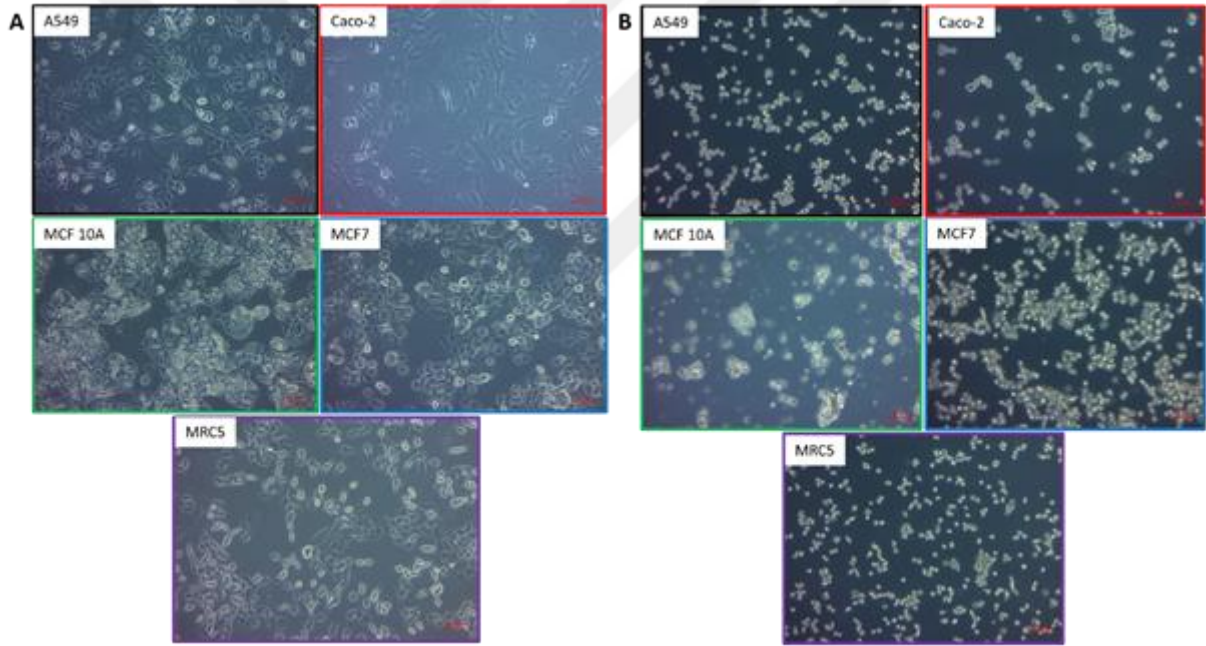


Şekil 29. GNA ince film için elipsometrik parametrelerin farklı ışık yön ve açılar için değişimi a) Ψ , b) Δ , c) gerçek (ϵ_r), ve d) sanal (ϵ_i) dielektrik sabitleri (Yılmaz vd., 2015, 2017)

Hücrelerin Büyütülmesi ve Stoklanması

Çalışmada kullanılan hücre hatları Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) alınmıştır ve her hücre hattı düzgün bir biçimde büyütülmüştür. Tez çalışmasında sağlıklı ve kanserli akciğer hücre modelleri (MRC5 ve A549), sağlıklı meme (MCF 10A), kanserli bağırsak (CACO2) ve kanserli meme (MCF7) hücre modellerinin ekimi yapıp büyütüldükten daha sonra tripsinle muamele edilerek yüzeylerden kaldırıldı. Tüm hücreler hem büyüme ortamlarında morfoloji kazandıktan, hem de tripsinle muamele edildikten sonra kamera entegreli ters ışık mikroskobu (Zeiss Primovert, Inverted microscope) ile gözlemlendi ve fotoğraflanarak (Şekil 30 A, B) doğru bir biçimde büyüdükleri gösterildi.

Uygun büyütme kaplarında çoğaltılan tüm hücrelerin normal morfolojilerini kazandıkları, etraflarındaki diğer hücrelerle bağlantılar kurarak, kabın yüzeyine yayılarak sayıca artış gösterdikleri ve gerekli hücre yoğunluğuna ulaştıkları gözlemlendi.

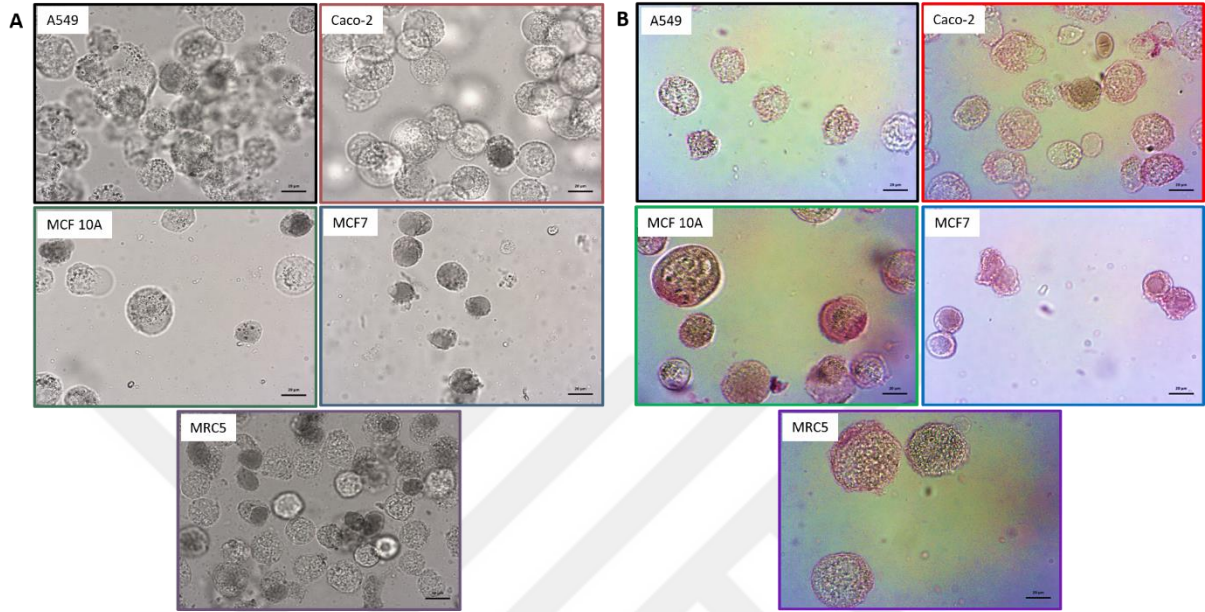


Şekil 30. A. Hücrelerin (A549, CaCO-2, MCF 10A, MCF7 ve MRC5) 10X büyütmede alınmış mikroskop görüntüleri. B. Tripsin uygulaması sonucu yüzeylerden kalkmış olan hücrelerin (A549, CaCO-2, MCF 10A, MCF7 ve MRC5) 10X büyütmede alınmış mikroskop görüntüleri

Hücrelerin PDOP ile Kaplanması (Cells@PDOP) ve Bu Yapının AuNP ile (Cells@PDOP@AuNP) Dekore Edilmesi

Hücreler, PDOP kaplaması için tripsinle muamele edilerek büyütüldükleri yüzeylerden kaldırıldı. Elde edilen PDOP kaplı hücrelerden 10 μ l alınarak alüminyum folyo, düz altın yüzeylere (smooth gold surface (SGS), 32 nm Au) ve altın nanoçubuk dizin (gold nanorod array (GNA), 10⁰) yüzeylere damlatıldı. Yüzeylerdeki örnekler laminar kabin içerisinde 3 saat kurumaya bırakıldı. Bu hücre örneklerinin her birinden 10 μ l lam üzerine damlatılarak, ışık mikroskop görüntüleri alındı (Şekil 31 A).

Sentezlenen AuNP'lerin hücre yüzeylerine daha iyi dekore edilebilmesi amacıyla hücreler öncelikle PDOP ile kaplanmıştır. Dopamin polimerizasyonu sonucu çözelti açık gri renge dönüşmüş ve bu renk değişimine bağlı olarak dopaminin hücreyi kapladığı mikroskop görüntülerinde net bir biçimde gösterilmiştir. Her bir hücrenin PDOP ile kaplanması sonuçlarımızın doğruluğunun ve tekrarlanabilirliğinin de bir göstergesidir.

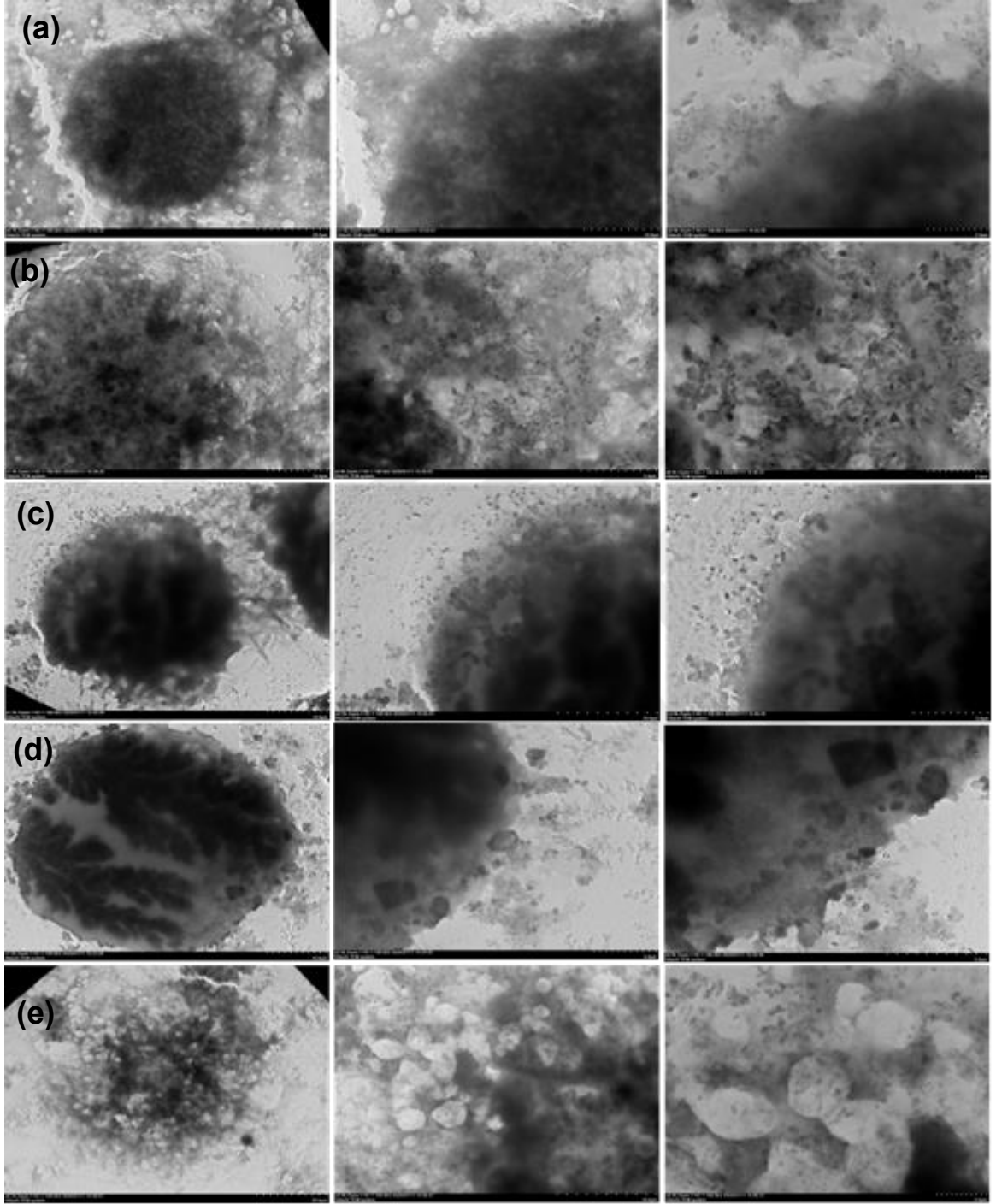


Şekil 31. A. Cells@PDOP hücrelerin (A549, CaCO-2, MCF 10A, MCF7 ve MRC5) 40X büyütmede alınmış mikroskop görüntüleri. B. Cells@PDOP@AuNP hücrelerin (A549, CaCO-2, MCF 10A, MCF7 ve MRC5) 40X büyütmede alınmış mikroskop görüntüleri

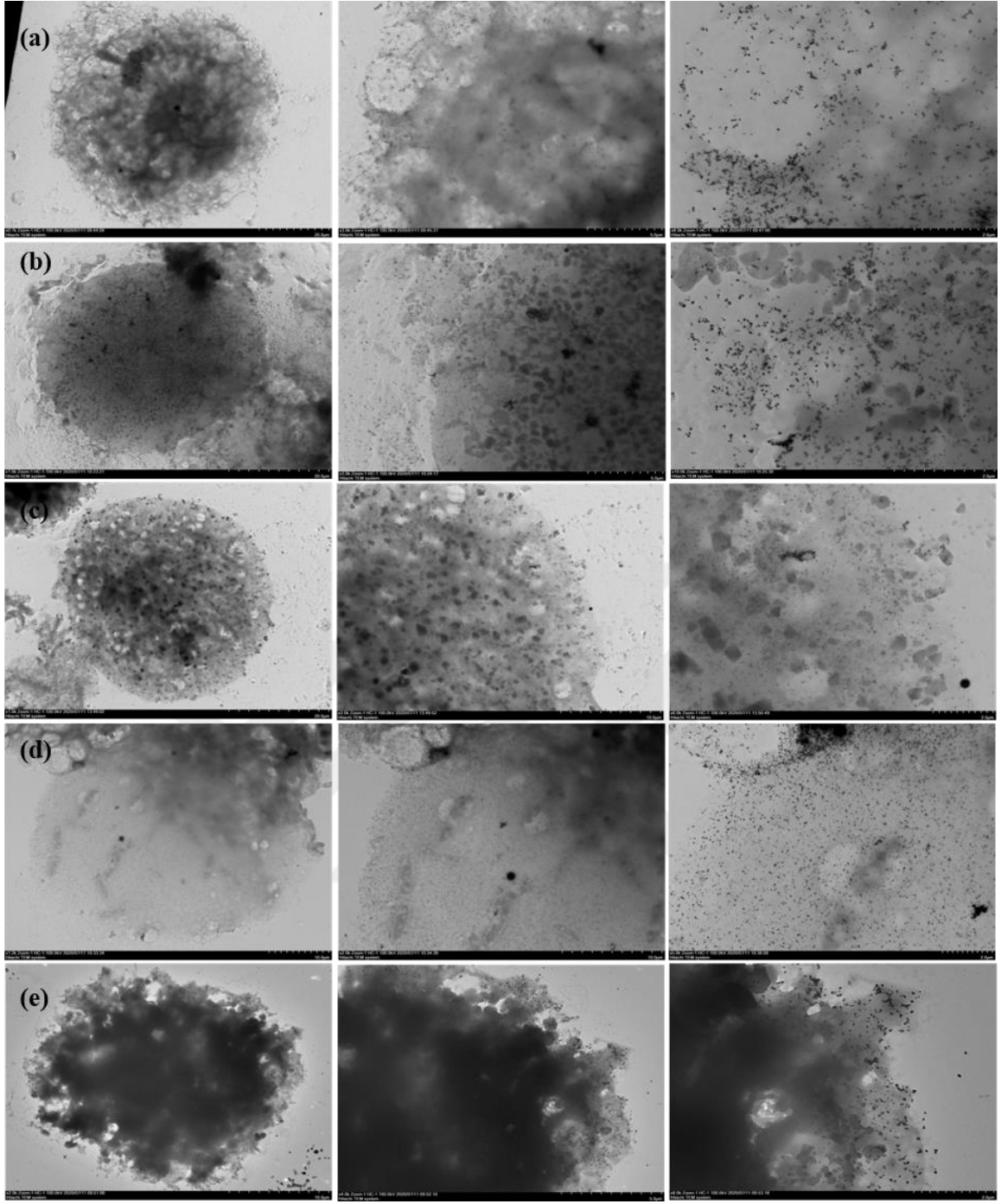
PDOP ile kaplaması tamamlanmış hücrelerin bulundukları tüplerin üzerine 1 ml AuNP çözeltisi (60 ppm) eklendi ve hücre süspansiyonu steril saf su kullanılarak 5 ml hacme tamamlandı. Bir önceki basamakta olduğu gibi 35 °C'de 150 rpm'de 2 saat karıştırıcıda bekletildi. Karıştırıcıdan alınan tüpler 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üst faz atılıp kaplamanın durması için 100 µl steril saf su eklendi. Elde edilen AuNP ile dekore edilmiş hücrelerden 10 µl alınarak yukarıda da belirtilen (alüminyum folyo, SGS ve GNA) yüzeylere damlatıldı ve laminar kabin içerisinde 3 saat kurumaya bırakıldı. Altınla dekore edilmiş hücre örneklerinin her birinden de 10 µl lam üzerine damlatılarak, ışık mikroskop görüntüleri alındı (Şekil 31 B). AuNP ile dekore edildikten sonra hücrelerde oluşan pembe renk, hücrelerin AuNP ile kaplandığının bir göstergesidir.

Bu kısımda hücrelerin PDOP ile kaplanması ve AuNP ile dekore edilmesini daha ayrıntılı belirlemek amacıyla hücrelerin TEM görüntüleri (Şekil 32 ve 4.10) alınmıştır. Cells@PDOP hücreleri için konformal PDOP ince film birikimi ve PDOP NP varlığı açıkça gözlenmiştir (Şekil 32). Cells@PDOP@AuNP hücrelerinde ise AuNP'lerin tüm hücre üzerinde homojen bir şekilde biriktiği saptanmıştır (Şekil 33). Bu kısımda elde edilen işlem görmemiş,

Cells@PDOP, Cells@PDOP@AuNP hücreler için sonraki İP' lerde SERS sinyalleri toplandı ve kemometrik yöntemler kullanılarak hücre sinyallerindeki farklılıklar yorumlandı.



Şekil 32. Cells@PDOP hücrelerin TEM görüntüleri ((a) A549 (b) CaCO-2 (c) MCF 10A (d) MCF7 (e) MRC5)



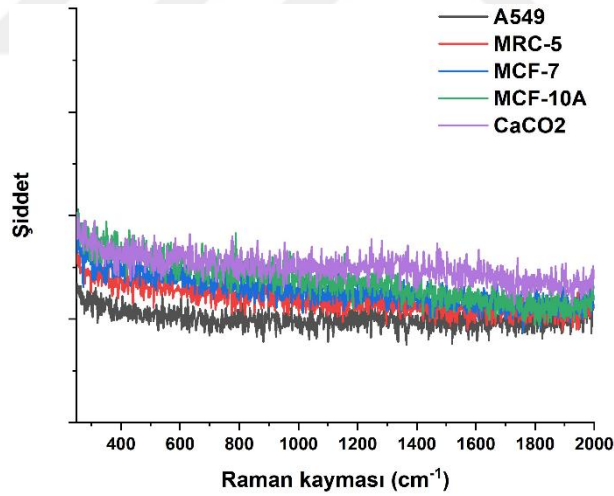
Şekil 33. Cells@PDOP@AuNP hücrelerin TEM görüntüleri ((a) A549 (b) CaCO-2 (c) MCF 10A (d) MCF7 (e) MRC5)

Cells@PDOP ve Cells@PDOP@AuNP Yapılarının GNA ile Biraraya Getirilerek SERS Haritalaması ile Analizi

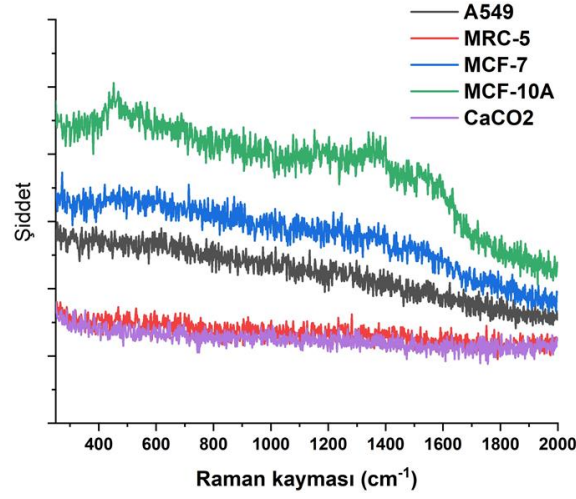
Bu kısımda daha önceki kısımlarda üretilen işlem gömmüş hücre, Cells@PDOP ve Cells@PDOP@AuNP yapılarının SERS analizleri haritalama tekniği ile belirlenmiştir. Bu bağlamda ilk olarak bu yapılar karşılaştırma amacıyla alüminyum (Al) folyo ve 32 nm kalınlığında düz altın yüzey (smooth gold surface) üzerine damlatılmış ve farklı bölgelerden Raman sinyalleri alınmıştır. Daha sonra aynı sistemler önceki kısımlarda üretilen GNA yüzeylere damlatılmış ve bu yapıdan farklı bölgelerden SERS sinyalleri alınmıştır. Optimize

edilmiş Raman ölçüm koşullarında (lazer dalga boyu ve gücü, uygulama süresi vs.) elde edilen sistemler için SERS analizleri yapılmıştır. Yapılan çalışmalar ile Raman sinyal zenginleşmesinin kaynağı belirlenmiştir. Ayrıca, SERS sisteminin daha derinlikli olarak incelenebilmesi için COMSOL programı kullanılarak sistem 2D olarak simüle edilmiş ve simülasyon sonucu oluşan elektrik alan dağılımı analiz edilmiştir. Bu veriler sonucunda muhtemel Raman sinyal şiddetindeki zenginleştirmenin kaynağı saptanabilmiştir. Bu kısımda maksimum oranda Raman sinyal zenginleşmesini sağlayan sistemler her bir hücre tipi için belirlenmiştir. Bu veriler ilerleyen bölümlerde uygun kemometrik yöntemlerle analiz edilmiş ve farklı hücre tiplerinin SERS ile tanısına olanak sağlayacak bir sistem geliştirilmiştir. Bu kısımdayapılan çalışmalar ve elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

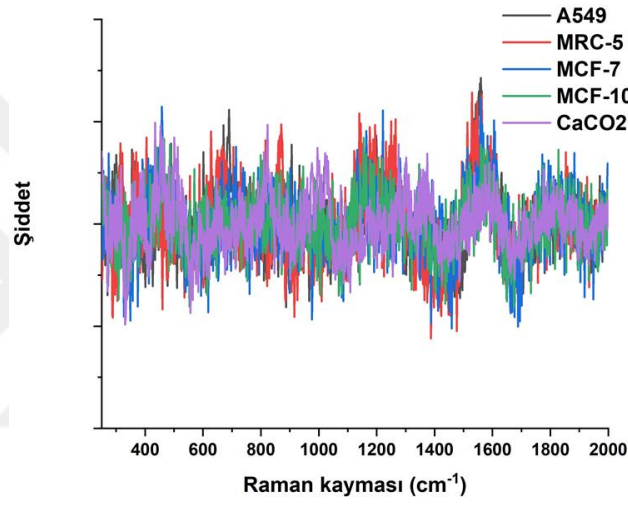
İlk aşamada farklı tipte işlem görmemiş, Cells@PDOP ve Cells@PDOP@AuNP hücreler Al folyo üzerine damlatılmış, kurutulmuş ve bu yapılardan Raman sinyalleri alınmıştır. Her bir hücre tipi ve şekli için örnek bir Raman sinyali Şekil 34, 4.12 ve 4.13'te verilmiştir. Buradan tüm hücre tipleri ve şekli için herhangi bir Raman sinyali gözlenmemiştir. Bu durum hücre yapısını oluşturan bileşenlerin zayıf Raman aktivitesinde olması ve önerilen platformların çok düşük ya da hiçbir zenginleştirme oluşturmayacak nitelikte olmasına bağlanabilir.



Şekil 34. İşlem görmemiş hücreler için Al folyo üzerinden alınan örnek Raman sinyalleri

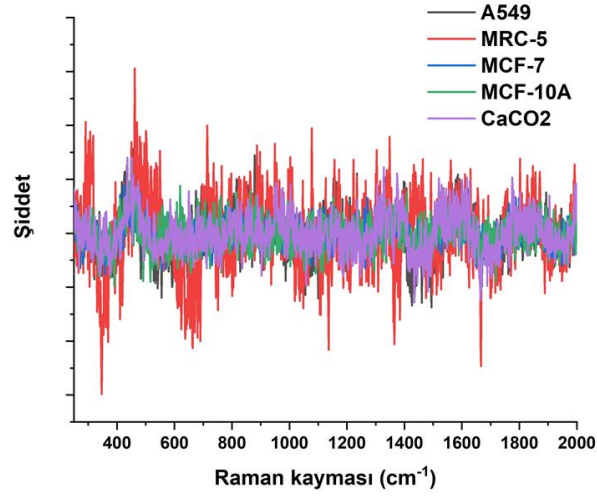


Şekil 35. Cells@PDOP hücreler için Al folyo üzerinden alınan örnek Raman sinyalleri

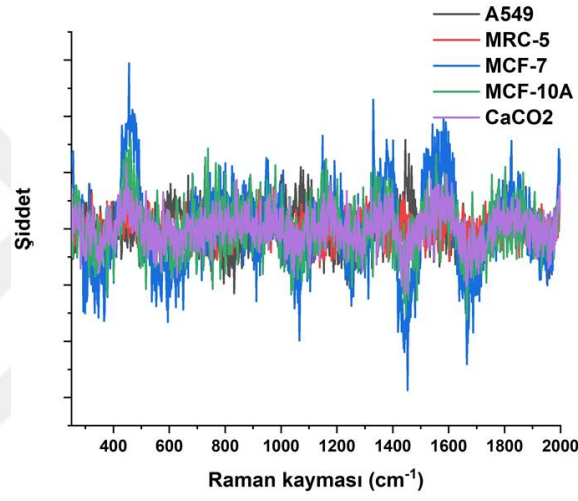


Şekil 36. Cells@PDOP@AuNP hücreler için Al folyo üzerinden alınan örnek Raman sinyalleri

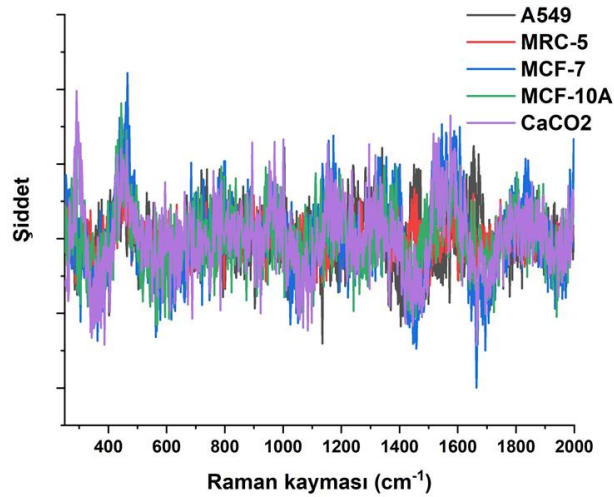
Yine karşılaştırma amacıyla farklı tipte işlem görmemiş, Cells@PDOP ve Cells@PDOP@AuNP hücreler SGS yüzey üzerine damlatılmış, kurutulmuş ve bu yapılardan Raman sinyalleri alınmıştır. Herbir hücre tipi ve şekli için örnek bir Raman sinyali Şekil 37, 4.15 ve 4.16’da verilmiştir. Buradan tüm hücre tipleri ve şekli için çok sınırlı şiddette Raman sinyali gözlenmiştir. Bu seviyede alınan sinyaller SERS ile hücre tanısına olanak sağlayacak düzeyde değildir. Bu durum hücre yapısını oluşturan bileşenlerin zayıf Raman aktivitesinde olması ve önerilen platformların çok düşük zenginleştirme oluşturacak nitelikte olmasına bağlanabilir. Bundan dolayı çalışmanın diğer kısımlarında yüksek Raman zenginleştirme oluşturabilecek 3D GNA platformlarının kullanımına ağırlık verilmiştir.



Şekil 37. İşlem görmemiş hücreler için SGS üzerinden alınan örnek Raman sinyalleri



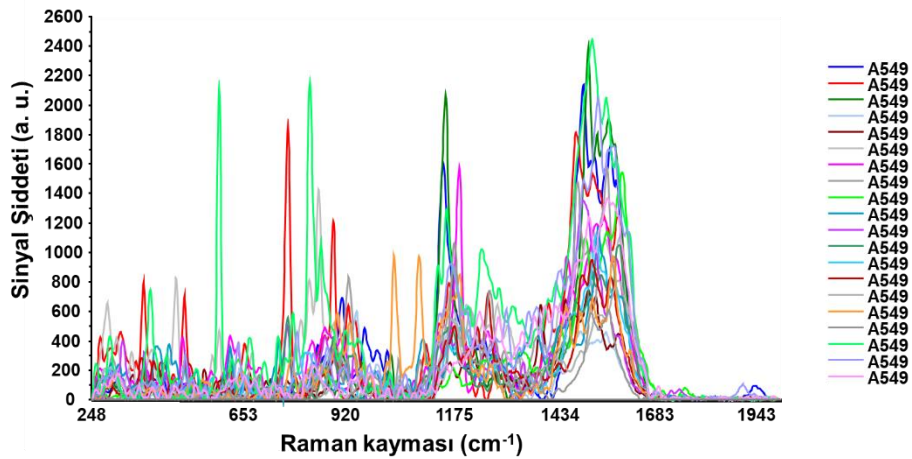
Şekil 38. Cells@PDOP hücreler için SGS üzerinden alınan örnek Raman sinyalleri



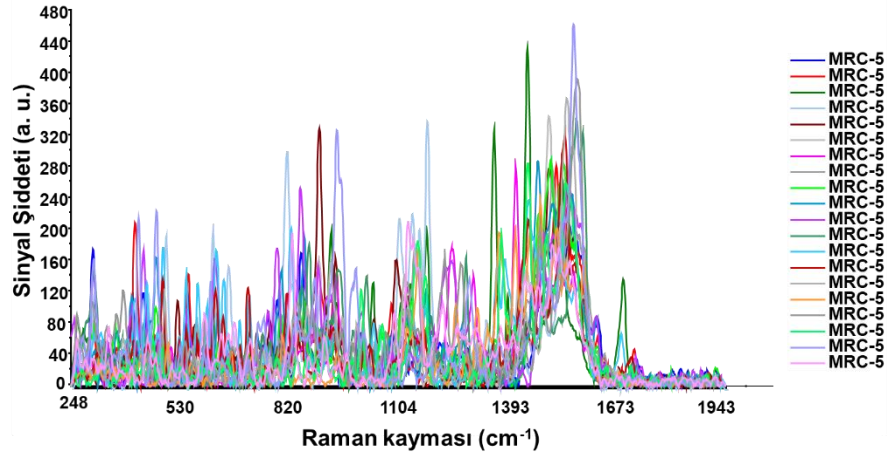
Şekil 39. Cells@PDOP@AuNP hücreler için SGS üzerinden alınan örnek Raman sinyalleri

Bu kısımda yüksek Raman zenginleştirilmesi oluşturabilmek için Cells@PDOP@AuNP hücreler 3D GNA platformları ile bir araya getirilmiş ve her bir hücre tipi için SERS sinyalleri alınmıştır. Benzer yaklaşım işlem görmemiş hücreler ve Cells@PDOP hücrelerine de

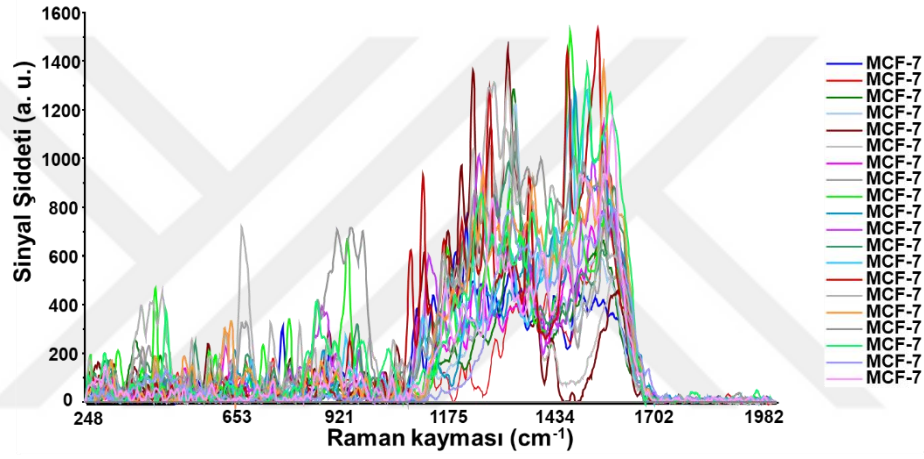
uygulanmıştır. Yapılan ölçüm ve analizler sonucu SERS zenginleşmesinin yüksek oranda GNA platformlarından kaynaklandığı belirlenmiştir. Bundan dolayı çalışmanın geri kalan süreçlerinde Cells@PDOP@AuNP hücreler GNA platformlarıyla bir araya getirilerek çalışmalara devam edilmiştir. İlk aşamada her bir hücre türü için farklı spotlardan Raman sinyalleri alınmıştır. Raman sinyal ölçümleri şu koşullarda yapılmıştır: WITech alpha 300R Micro Raman Mikroskopi sistem, 785 nm lazer, $\times 50$ objektif, 10 s uygulama süresi, 1.7 μm spot büyüklüğü ve 10 mW lazer gücü. Tüm Raman ölçümlerinde OriginPro 2019 yazılımı kullanılarak taban düzeltilmesi yapılmıştır. Her bir hücre tipi için 20 farklı spottan alınan Raman sinyalleri Şekil 40-21’de verilmiştir. Buradan SGS ile kıyaslandığında, GNA platformunun tüm Cells@PDOP@AuNP hücrelerinde dikkat çekici Raman zenginleşirmesi sağladığı açıkça görülmektedir. Bu durum GNA sistemlerinin 3D yapıları ile yüksek yüzey alanı ile analit arasında etkileşimin artırılması, nano-anten etkileri (nano-antenna effect), uç-fokuslanma (tip-focusing) gibi etkenlerle elektriksel alanın artırılması şeklinde özetlenebilir(Yılmaz vd., 2014, 2015). Dikkat edilirse her bir hücre tipi için birbirlerinden farklı SERS sinyallerinin alındığı görülmektedir. Bu durum sinyallerin alındığı spotlardaki molekül içeriklerinin farklı olmasına bağlanmaktadır. Burada temel olarak önemli olan nokta, kullanılan GNA sistemler ile alınan sinyal şiddet ve hassasiyetinin artırılması ve buna bağlı olarak hücre tanısına olanak sağlayacak verilerin elde edilmesidir. Buradan alınan temel band karşılıkları şöyledir: 1650 cm^{-1} amit I (protein), 1555 cm^{-1} amit II (protein), 1330 cm^{-1} CH₃-CH₂ (nükleik asit), 1230 cm^{-1} amit III (protein), 1035 cm^{-1} C-O, C-C (protein), 777 cm^{-1} halka gerilmesi (nükleik asit) ve 572 cm^{-1} C-C (karbohidrat)(Rusciano vd., 2017; Short vd., 2005).



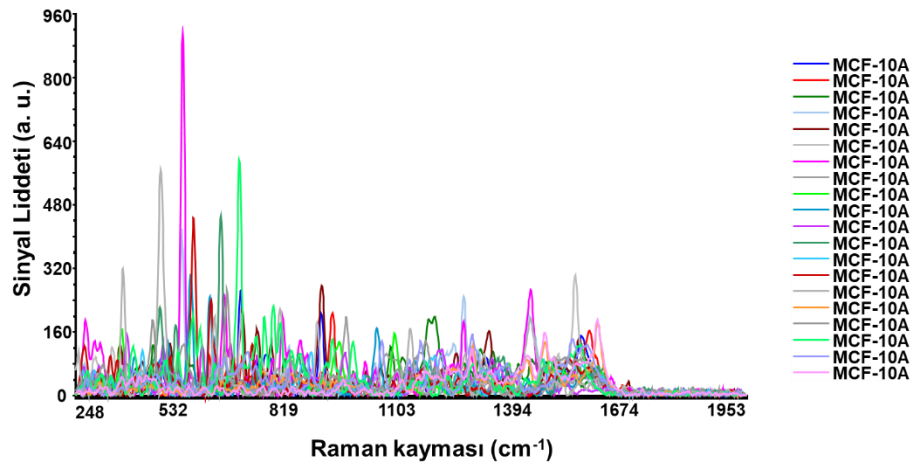
Şekil 40. A549@PDOP@AuNP hücreler için GNA üzerinden alınan farklı Raman sinyalleri



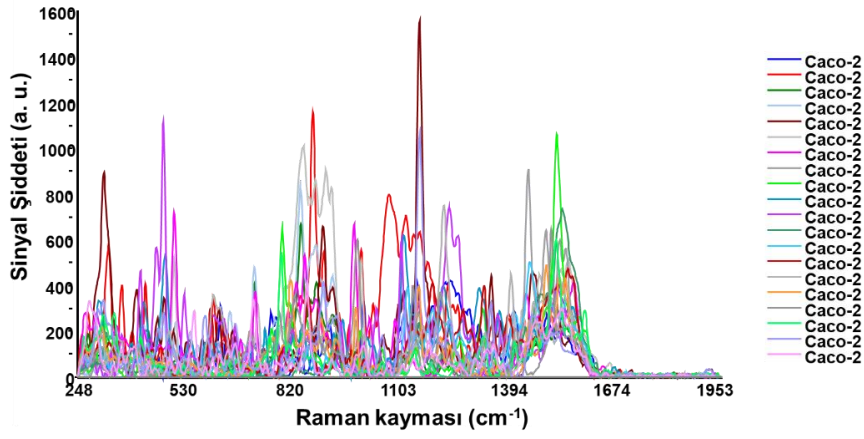
Şekil 41. MRC-5@PDOP@AuNP hücreler için GNA üzerinden alınan farklı Raman sinyalleri



Şekil 42. MCF-7@PDOP@AuNP hücreler için GNA üzerinden alınan farklı Raman sinyalleri

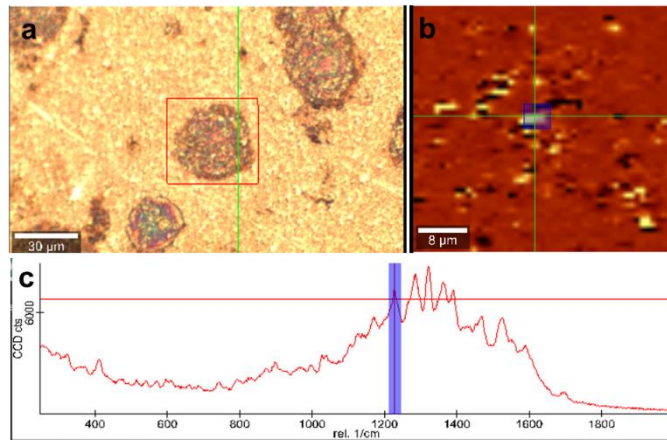


Şekil 43. MCF-10A@PDOP@AuNP hücreler için GNA üzerinden alınan farklı Raman sinyalleri

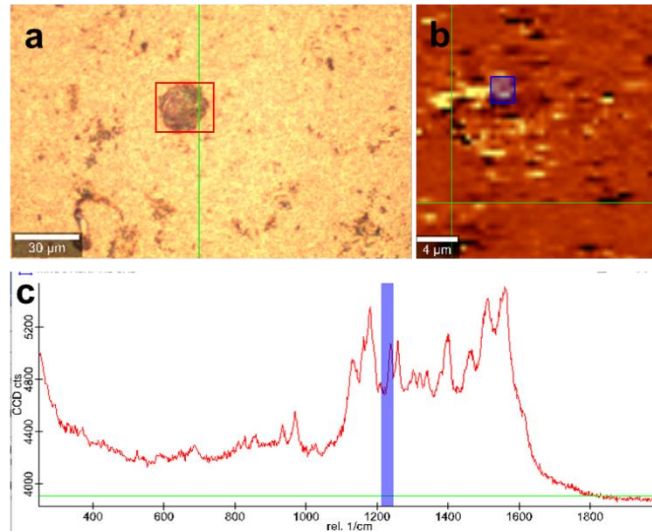


Şekil 44. CaCO₂@PDOP@AuNP hücreler için GNA üzerinden alınan farklı Raman sinyalleri

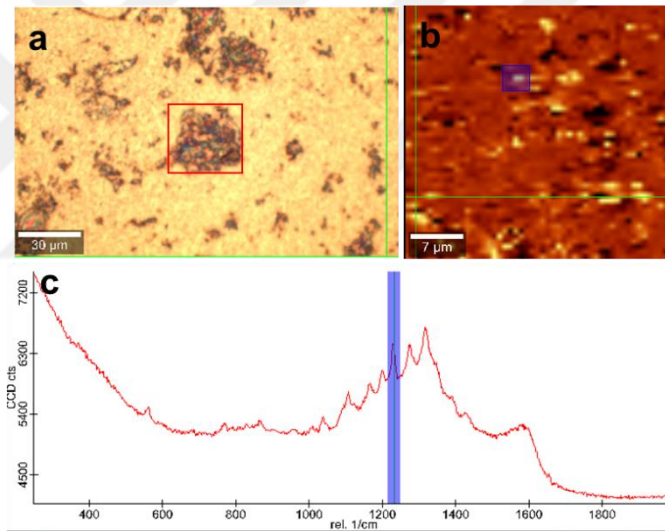
Daha önceden belirtildiği üzere Cells@PDOP@AuNP hücreler GNA yüzeylere aktararak yüksek şiddette SERS sinyalleri alınmıştır. Bu kısımda Raman ölçüm parametreleri (dalga boyu, lazer güç vs.) optimize edildikten sonra haritalama çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda her bir hücre için haritalama yapılmış ve elde edilen verilerin bir kısmı Şekil 45-31'de özetlenmiştir. Bunun için hücrelerin bulunduğu bir bölge (Şekil 22a-31a, kırmızı kare bölge) seçilmiş ve x ve y yönünde 30 bölgeye ayrılmıştır. Böylelikle her bir bölge için 900 spektrum (30 x 30) elde edilmiştir. Örnek olarak 1230 cm⁻¹ (amit III) (Şekil 22b-26b) ve 1330 cm⁻¹ (CH₃-CH₂ nükleik asit) (Şekil 50b-31b) bandına karşılık gelen harita desenleri verilmiştir. Haritada sarı bölgeler bu band için şiddetin yüksek, koyu yerler ise şiddetin düşük olduğu yerleri ifade etmektedir. Ayrıca bu haritalama üzerinde (Şekil 45b-31b) gösterilen noktaya karşılık gelen SERS sinyali de (Şekil 45c-31c) gösterilmiştir. Burada verilen yaklaşım diğer band karşılıklarına da uygulanabilmektedir. Yapılan bu analizler ile Cells@PDOP@AuNP hücreleri GNA GNA platformu ile kombinlendiğinde yüksek SERS aktivitesi ile beraber haritalamaya da olanak sağladığı görülmektedir.



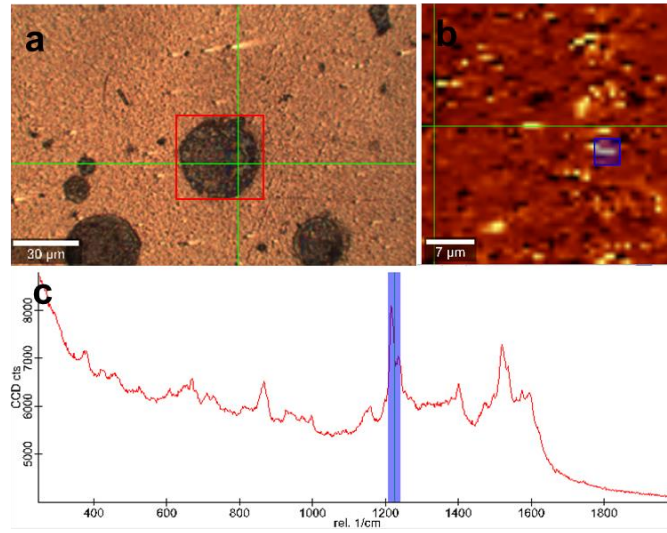
Şekil 45. A549@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1230 cm⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b' de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu



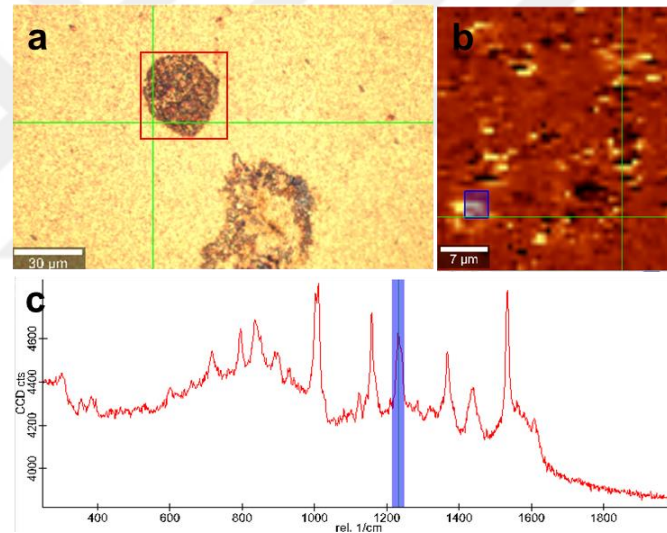
Şekil 46. MRC-5@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1230 cm^{-1} piki için elde edilen haritalama verileri. (a) hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’ de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu



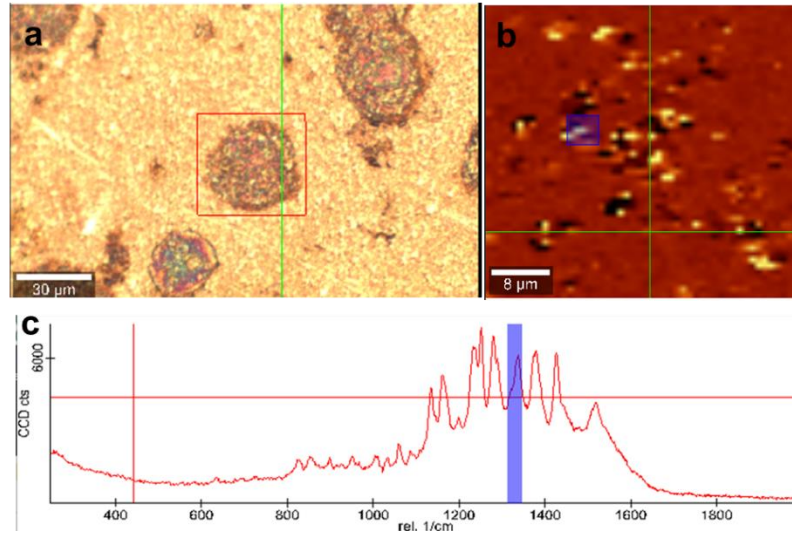
Şekil 47. MCF-7@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1230 cm^{-1} piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’ de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu



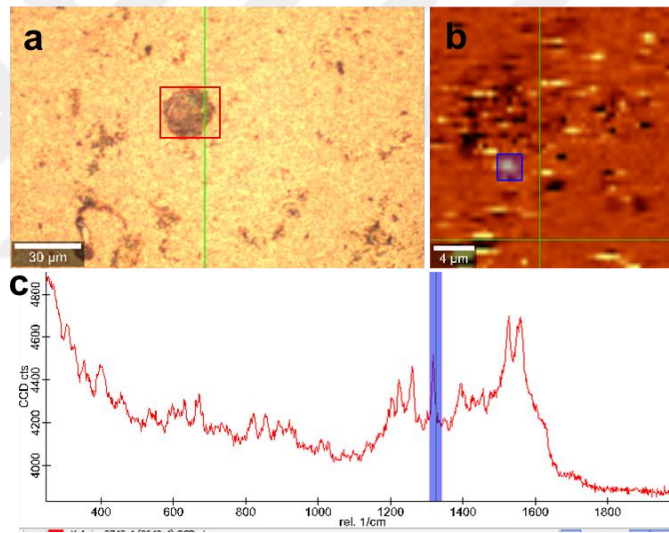
Şekil 48. MCF-10A@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1230 cm^{-1} piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu



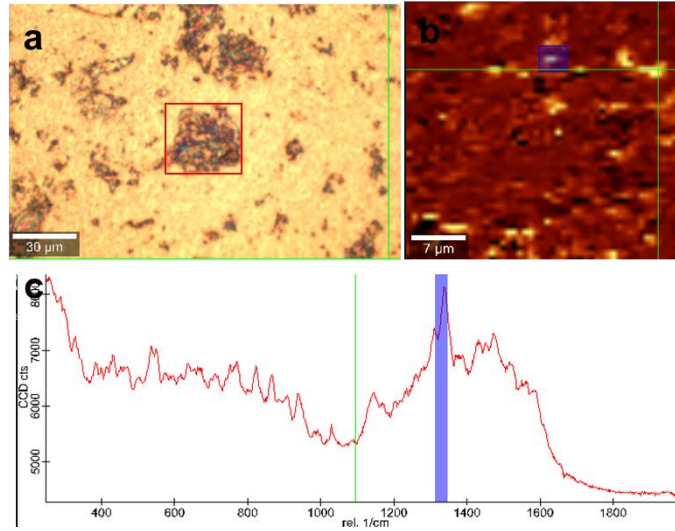
Şekil 49. CaCO₂@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1230 cm^{-1} piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu



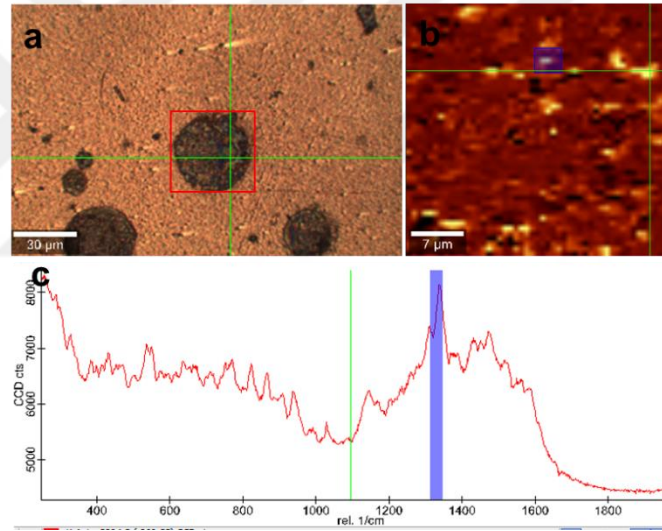
Şekil 50. A549@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1330 cm^{-1} piki için elde edilen haritalama verileri. (a) hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu



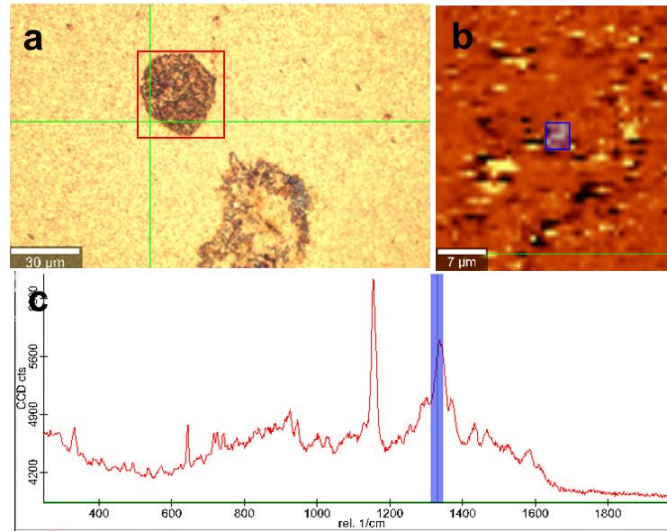
Şekil 51. MRC-5@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1330 cm^{-1} piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu



Şekil 52. MCF-7@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1330 cm^{-1} piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu

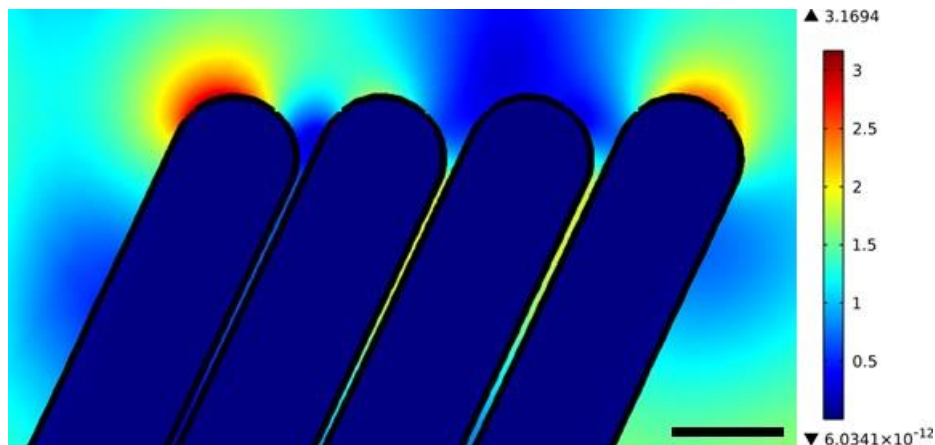


Şekil 53. MCF-10A@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1330 cm^{-1} piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu



Şekil 54. CaCO₂@PDOP@AuNP hücrelerinin GNA yüzeyler üzerinde SERS haritalaması ve 1330 cm⁻¹ piki için elde edilen haritalama verileri. (a) Hücrelerin GNA üzerinde optik mikroskop görüntüleri, (b) seçilen alanda (kırmızı dikdörtgen bölge) belirtilen pik dağılım haritası ve (c) b’de seçilen bölgede alınan SERS spektrumu

Yukarıda verilen bilgiler ve alınan SERS sinyalleri ışığında farklı şekil ve türlerde hazırlanan örneklerden kullanılan SERS platformunun sonucu önemli oranda etkilediği görülmüştür. Al folyo ve SGS kullanımında hiç ya da son derece düşük Raman sinyalleri alınmıştır. Fakat, GNA SERS platformu olarak kullanıldığında tüm hücre tiplerinde yüksek şiddette Raman sinyalleri alınmıştır. GNA için yüksek SERS sinyal şiddetinin kaynağının belirlenmesi amacıyla 2D sistemlerde COMSOL elektriksel alan dağılımı modelleri yapılmıştır. Önerilen modelde frekans olarak Raman ölçümlerinde 785 nm’lik dalgaboyuna karşılık gelen değerler kullanılmıştır. Burada elektriksel alan şiddet ve dağılımının doğrudan SERS zenginleşmesi ile bağlantılı olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Üretilen bir modelde alınan elektriksel alan dağılımı Şekil 55’de verilmiştir. Buradan nano-anten etkileri (nano-antenna effect) ve uç-fokuslanma (tip-focusing) gibi etkenlerle elektriksel alanın arttırıldığı ve bunun SERS etkisini oluşturduğu görülmektedir(Yılmaz vd., 2014, 2015).



Şekil 55. GNA platformu için 2D hazırlanmış COMSOL modeli ve elektriksel alan dağılımı. Ölçek çubuğu 100 nm’dir

Cells@PDOP@AuNP Hücrelerin SERS Çalışmalarına İlişkin Kemometrik Analiz Sonuçları

Tez çalışmamızda Cells@PDOP@AuNP hücrelerinin eğik açı birikim (OAD) yöntemiyle üretilen GNA yüzeylere (10°, 50 nm Au) damlatılması sonucunda elde edilen ve en verimli sinyallerin alındığı SERS spektrumları ile kemometrik çalışmalarımız gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin her yerinden alınan sinyallerin yüksek verimlilikte ve tekrarlanabilirliğini kanıtlamak için mapping yöntemi uygulanmış ve 900 spektrum elde edilmiştir. Kemometrik analizlerimizde de bu elde edilen 900 mapping verisinden şiddeti yüksek olan 20 veri seçilmiş ve analizi yapılmıştır.

Kemometrik analizlerin uygulanmasındaki temel amaç sağlıklı ve kanserli hücrelerin SERS çalışmalarında tespit edilen sinyalleri kemometri yöntemler ile spektral bilgi yardımı ile hücrelerin tanımlanmasıdır. Analiz için spektral bölge olarak 2000 – 200 cm⁻¹ aralığındaki bölgeler kullanılmıştır. 785 nm lazer kullanılarak mikroskop kısmında ise önce 10X objektifinde görülüp daha sonra 50X objektifi ile tarama yapılmıştır. Böylelikle daha fazla spektral ayrıntılı SERS spektrumları elde edilmiştir. Çalışılan bu parametrelerde her ne kadar ayrıntılı, ayık ve belirgin şekilde pikler görülsede ve 50X objektifi kullanılarak daha detaylı spektraller elde edilse de tanımlama yapılamamaktadır. Çalışmalarımız kalitatif analiz sonuçları olduğu için hücrelerin kökenine göre ayırt edilebilmesi için elde edilen veriler kemometrik yöntemler ile sonuçlandırılmalıdır.

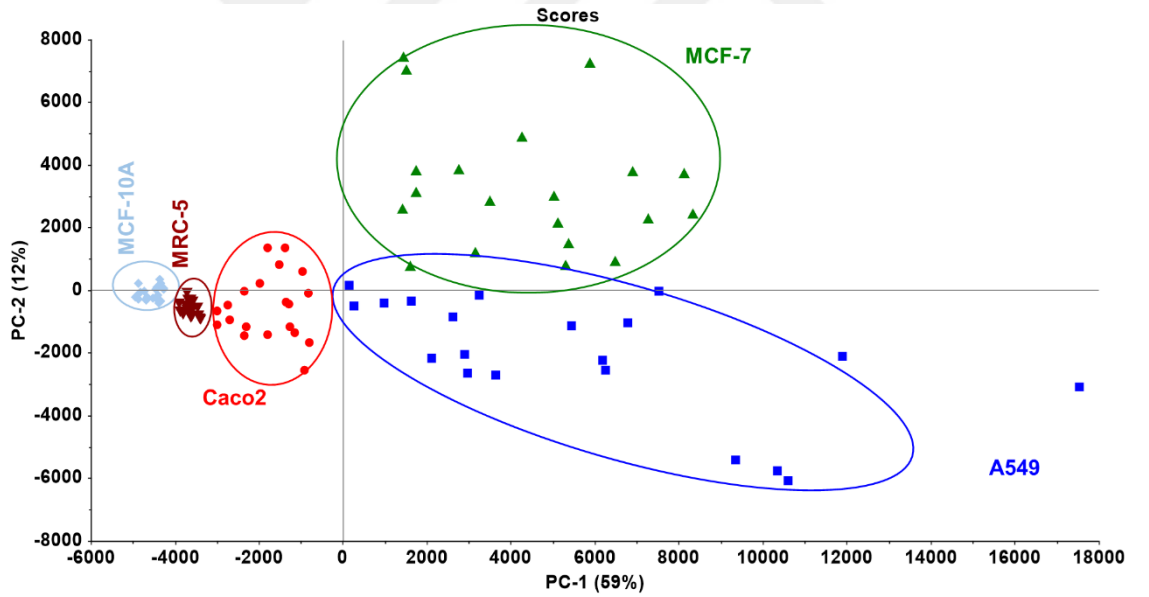
Çalışmamızda kemometrik yöntemler olarak gözetimsiz örüntü tanımlama metotlarından olan temel bileşen analizi (PCA) ve hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) analizi uygulanmıştır. Uygulanan bu analizler ile zenginleştirilmiş yüzeylerden alınan SERS spektral değişimleri çalışılan hücrelerin sınıflandırılmasını ve böylece tanı konulmasını sağlamaktadırlar.

Hücrelerin tanımlanması için elde edilen spektrumlar ön işlemlerden geçirilmiştir. Öncelikle spektrumlara baseline (taban çizgisi) uygulanılmıştır ve daha sonra ise smooth (düzleştirme) işlemi uygulanmıştır.

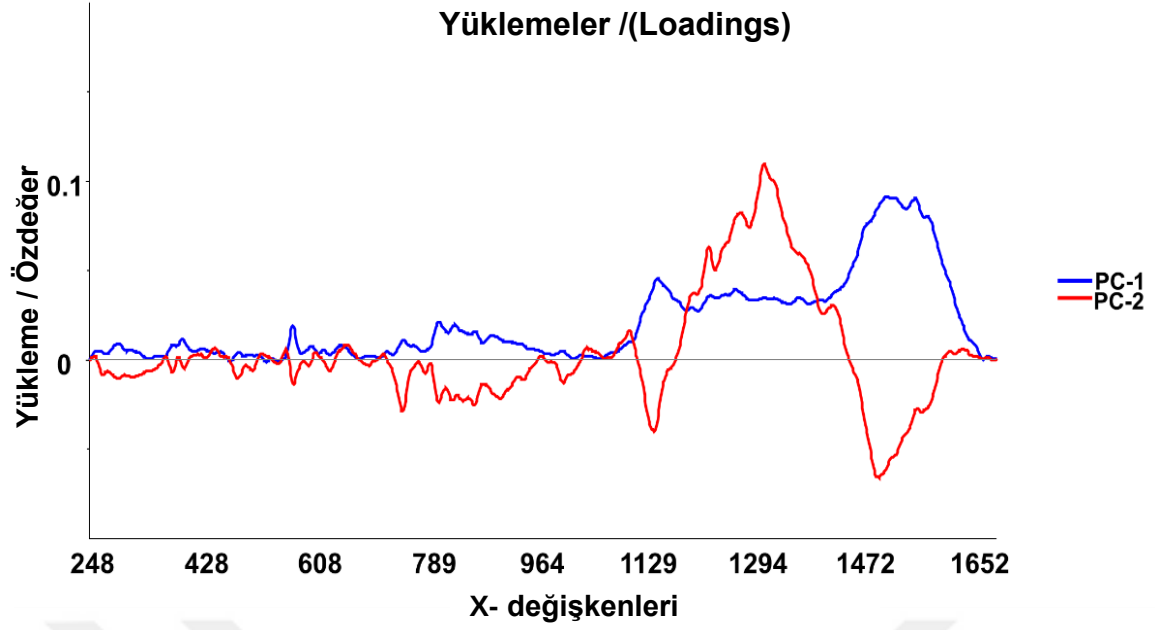
Cells@PDOP@AuNP hücrelerinden GNA platformu kullanılarak toplanılan SERS spektrumları çok karmaşık ve çok büyük bir spektral veri seti olmuştur. Bu verilerden karakteristik bilgileri çıkarmak ve analiz etmek için, PCA ve HCA dahil olmak üzere denetimsiz (unsupervised) bir kemometrik yaklaşım kullandık. Denetimsiz kemometrik yaklaşım, veriler ve değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için yaygın olarak kullanılır. Şekil 56’te tüm Cells@PDOP@AuNP hücrelerinden rastgele seçilen 20 farklı spektrum

analizlendiğinde PC1 ve PC2 skor değerleri toplamının %71 olduğu görülmektedir. Bu değer hücreler arasında farklılaşmanın yüksek oranda olduğunu ve eldeki veriler ile hücre tanısını yapılabileceğini göstermektedir. Gösterilen bu loading grafiğinde PC1 ve PC2 olarak gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir. Burada PC1 en değişken grubu temsil ederken, PC2 ise ikinci en değişken grubu göstermektedir. Bu skor ve yükleme vektörleri her değişken ve her temel bileşenlerin aralarındaki korelasyonuna göre yorum yapılabilmektedir. Pozitif korelasyon benzerlik olarak birbirlerine daha yakın olan değişkenler arasında vardır diyebiliriz. Negatif korelasyonu ise 180° ve birbirlerinden ayırık olan değişkenler arasında bulunmaktadır. PCA yükleme değerleri (Şekil 57) ise hangi Raman kaymalarında ayrımın daha belirgin olduğunu göstermektedir. PCA sınıflandırmasını doğrulamak için ayrıca HCA da gerçekleştirildi ve numuneler arasındaki farklılaşma bir dendrogram olarak gösterildi (Şekil 58). Buradan Cells@PDOP@AuNP hücrelerinin ayırık bir şekilde kümelendiği görülmektedir.

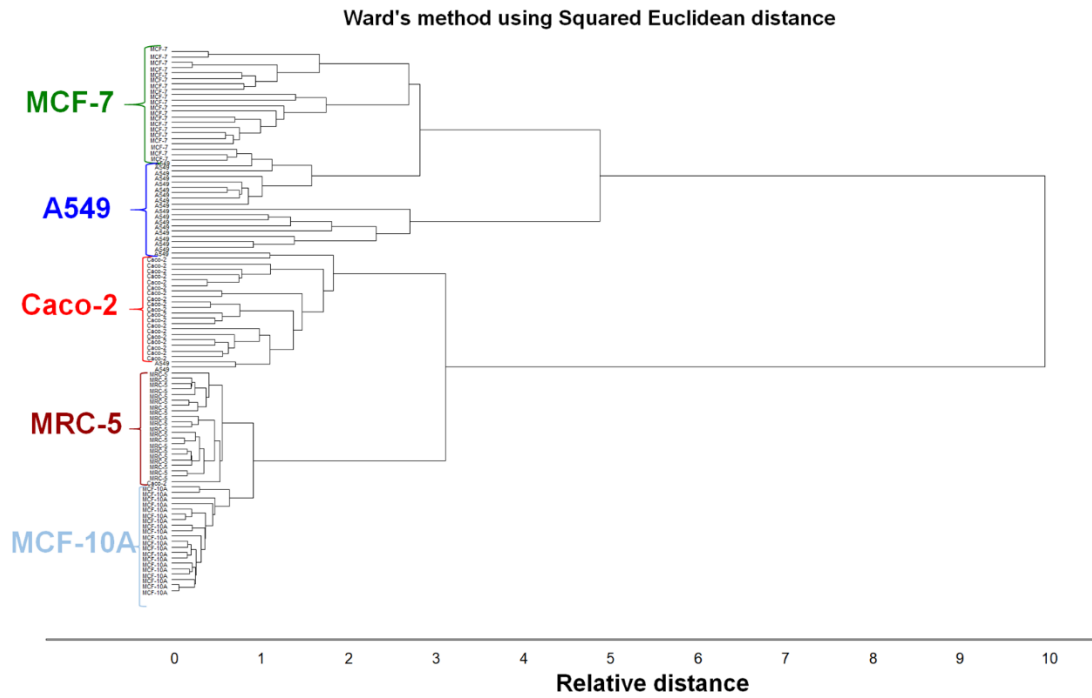
Elde edilen bu veriler ışığında Cells@PDOP@AuNP hücreleri için alınan SERS spektrumları kemometrik verilerle işlendiğinde önerilen sistem ile hücre tanısının yapılabileceği açıkça görülmektedir.



Şekil 56. Cells@PDOP@AuNP hücreleri için kemometrik analiz sonuçları: PCA skor çizimi.



Şekil 57. Cells@PDOP@AuNP hücreleri için kemometrik analiz sonuçları: PCA yükleme değerleri



Şekil 58. Cells@PDOP@AuNP hücreleri için kemometrik analiz sonuçları: HCA dendrogramı

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Cam yüzey üzerinde PVD tekniği ve OAD yaklaşımıyla 3-boyutlu ve anizotropik GNA ince filmleri başarılı bir şekilde üretilmiştir. GNA platformlar önceki çalışmalarımızda belirlendiği üzere SERS platformu olarak hassasiyet, kolay ve yüksek ölçekte üretilme ve kolaylıkla modifiye edilebilme gibi artı değerlerinden önemli fırsatlar sunmaktadır.

AuNP sistemleri istenilen morfoloji ve boyutta sitrat-indirgeme yoluyla sentezlenmiştir.

Farklı türde sağlıklı ve kanser hücre hatları başarılı bir şekilde üretilmiş ve bu hücrelerin yüzeyi konformal ve ince bir PDOP filmi ile kaplanmıştır. Cells@PDOP hücreleri, AuNP ile bir araya getirildiğinde hücrelerin çevresi homojen bir şekilde AuNP ile dekore edilmiştir. Bu kısımda PDOP sahip olduğu sayısız katekol, amin gibi fonksiyonel grupları sayesinde AuNP'lerin yüzeye adsorplanmasını sağlamıştır.

Cells@PDOP@AuNP sistemi karşılaştırma amaçlı olarak alüminyum folyo ve düz altın film üzerinde kurutulmuş ve Raman spektrumları alınmıştır. Bu durumlarda çok düşük Raman sinyalleri alınmıştır.

Cells@PDOP@AuNP sistemi GNA ile kombinlendiğinde çok yüksek şiddette SERS sinyalleri alınmıştır. Buradan Raman sinyal şiddetindeki artışın GNA kaynaklı olduğu görülmüştür. Bu durum COMSOL modeli ile teorik olarak da gösterilmiştir. Optimize koşullarda elde edilen yüksek şiddetteki SERS sinyalleri kemometrik analiz ile değerlendirilmiştir.

Kemometrik analizler sonucunda elde edilen veriler ışığında Cells@PDOP@AuNP hücreleri için alınan SERS spektrumları incelendiğinde önerilen sistem ile hücre tanısının yapılabileceği açıkça görülmüştür.

Önerilen sistem basitlik, kolay uygulanabilme ve ucuz olması gibi avantajlarından dolayı önemli fırsatlar sunmaktadır. Önerilen sistem ileriki dönemlerde hücre yaşlanması ve hücre içi metabolik değişikliklerin izlenmesi gibi farklı araştırma konularına uygulanacaktır.

KAYNAKLAR

- Abbasoğlu, F. (2019). *Öznitelik Çıkarım ve Evrimsel Öznitelik Seçim Metotlarının EEG Sinyallerinin Sınıflandırma Başarısına Etkileri*.
- Alexandridis, P. (2011). Gold Nanoparticle Synthesis, Morphology Control, and Stabilization Facilitated by Functional Polymers. İçinde *Chemical Engineering and Technology*. <https://doi.org/10.1002/ceat.201000335>
- Armendariz, V., Herrera, I., Peralta-Videa, J. R., Jose-Yacaman, M., Troiani, H., Santiago, P., & Gardea-Torresdey, J. L. (2004). Size controlled gold nanoparticle formation by Avena sativa biomass: Use of plants in nanobiotechnology. *Journal of Nanoparticle Research*. <https://doi.org/10.1007/s11051-004-0741-4>
- Barman, I., Dingari, N. C., Singh, G. P., Kumar, R., Lang, S., & Nabi, G. (2012). Selective sampling using confocal Raman spectroscopy provides enhanced specificity for urinary bladder cancer diagnosis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(10), 3091–3099. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6424-6>
- Bergholt, M. S., Zheng, W., Lin, K., Ho, K. Y., Teh, M., Yeoh, K. G., Yan So, J. B., & Huang, Z. (2011). In vivo diagnosis of gastric cancer using Raman endoscopy and ant colony optimization techniques. *International Journal of Cancer*, 128(11), 2673–2680. <https://doi.org/10.1002/ijc.25618>
- Bhushan, B. (2000). Modern Tribology Handbook, Two Volume Set. İçinde *Modern Tribology Handbook, Two Volume Set*. <https://doi.org/10.1201/9780849377877>
- Bishnoi, S. W., Rozell, C. J., Levin, C. S., Gheith, M. K., Johnson, B. R., Johnson, D. H., & Halas, N. J. (2006). All-optical nanoscale pH meter. *Nano Letters*, 6(8), 1687–1692. <https://doi.org/10.1021/nl060865w>
- Braz, A., López-López, M., & García-Ruiz, C. (2013). Raman spectroscopy for forensic analysis of inks in questioned documents. İçinde *Forensic Science International*. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.07.017>
- Bunshah, R. F. (1994). Handbook of deposition technologies for films and coatings science, technology, and applications. İçinde *Materials science and process technology series Electronic materials and process technology*.
- Camden, J. P., Dieringer, J. A., Wang, Y., Masiello, D. J., Marks, L. D., Schatz, G. C., & Van Duyne, R. P. (2008). Probing the structure of single-molecule surface-enhanced Raman scattering hot spots. *Journal of the American Chemical Society*, 130(38), 12616–12617. <https://doi.org/10.1021/ja8051427>
- Camus, V. L., Stewart, G., Nailon, W. H., McLaren, D. B., & Campbell, C. J. (2016). Measuring the effects of fractionated radiation therapy in a 3D prostate cancer model system using SERS nanosensors. *Analyst*, 141(17), 5056–5061. <https://doi.org/10.1039/c6an01032f>
- Cho, E. C., Zhang, Q., & Xia, Y. (2011). The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.58>
- Çiçek, C., & Bilgiç, A. (2006). *Kİİ Nİ K Vİ Rolojİ Laboratuvarında Uzmanlık Ö Ğ Rencİ Sİ Ne Verİ Len Hücre Kültürü EĞİ Tİ M Programı : Bİ R Model Cell Culture Training Programme for Specialist Residents in Virology Laboratory : a Model*. 20(3), 231–241.

- Dag, S., Ozturk, Y., Ciraci, S., & Yildirim, T. (2005). Adsorption and dissociation of hydrogen molecules on bare and functionalized carbon nanotubes. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.72.155404>
- Dinç, E. (2007). Kemometri Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27(1), 61–92. http://www.eczfakder.hacettepe.edu.tr/Arsiv/EskiDergiler/01_2007/ecz-06.pdf
- Dinish, U. S., Balasundaram, G., Chang, Y. T., & Olivo, M. (2014). Actively targeted in vivo multiplex detection of intrinsic cancer biomarkers using biocompatible SERS nanotags. *Scientific Reports*, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep04075>
- Diraman, H., Ara, Z., Enstit, T., Fak, F., Ege, K., Bile, T., Pca, A., & Hca, A. (2009). Ayvalık Zeytin Çeşidinden Üretilen Erken Hasat Natürel Zeytinyağlarının Yağ Asitleri Bileşenlerine Göre Kemometrik Karakterizasyonu Characterization of Early Harvest Virgin Olive Oils Produced From Ayvalık Cultivar Based On Their Fatty acid Profiles By Ch. *Electronic Journal of Food Technologies*, 4(3), 1–11.
- Faulds, K., Jarvis, R., Smith, W. E., Graham, D., & Goodacre, R. (2008). Multiplexed detection of six labelled oligonucleotides using surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS). *Analyst*, 133(11), 1505–1512. <https://doi.org/10.1039/b800506k>
- Ferraro, J. R., Nakamoto, K., & Brown, C. W. (2003). Introductory Raman Spectroscopy: Second Edition. İçinde *Introductory Raman Spectroscopy: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-254105-6.X5000-8>
- Freshney, R. I. (2005). Culture of Animal Cells. İçinde *Culture of Animal Cells*. <https://doi.org/10.1002/9780471747598>
- George, J. (1992). Preparation of Thin Films. İçinde *CRC Press*.
- Gracie, K., Correa, E., Mabbott, S., Dougan, J. A., Graham, D., Goodacre, R., & Faulds, K. (2014). Simultaneous detection and quantification of three bacterial meningitis pathogens by SERS. *Chemical Science*, 5(3), 1030–1040. <https://doi.org/10.1039/c3sc52875h>
- Grammatikopoulos, P., Steinhauer, S., Vernieres, J., Singh, V., & Sowwan, M. (2016). Nanoparticle design by gas-phase synthesis. İçinde *Advances in Physics: X*. <https://doi.org/10.1080/23746149.2016.1142829>
- Gürmen, S., & Ebin, B. (2010). Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri. *TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası*.
- Hao, E., & Schatz, G. C. (2004). Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. *Journal of Chemical Physics*, 120(1), 357–366. <https://doi.org/10.1063/1.1629280>
- Hawkeye, M. M., & Brett, M. J. (2007). Glancing angle deposition: Fabrication, properties, and applications of micro- and nanostructured thin films. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*. <https://doi.org/10.1116/1.2764082>
- Hierold, C., Jungen, A., Stampfer, C., & Helbling, T. (2007). Nano electromechanical sensors based on carbon nanotubes. İçinde *Sensors and Actuators, A: Physical*. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2007.02.007>
- Holmberg, K., & Mathews, A. (1994). Coatings tribology: a concept, critical aspects and future directions. *Thin Solid Films*. [https://doi.org/10.1016/0040-6090\(94\)90315-8](https://doi.org/10.1016/0040-6090(94)90315-8)
- Iacono, P., Karabeber, H., & Kircher, M. F. (2014). A “Schizophotonic” All-In-One Nanoparticle Coating for Multiplexed SE(R)RS Biomedical Imaging. *Angewandte Chemie*, 126(44), 11950–11955. <https://doi.org/10.1002/ange.201403835>

- Irish, D. E., Mccarroll, B., & Young, T. F. (1963). Raman study of zinc chloride solutions. *The Journal of Chemical Physics*. <https://doi.org/10.1063/1.1734212>
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., & Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI107470>
- Jamieson, L. E., Asiala, S. M., Gracie, K., Faulds, K., & Graham, D. (2017). Bioanalytical measurements enabled by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) probes. İçinde *Annual Review of Analytical Chemistry* (C. 10, ss. 415–437). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041557>
- Jamieson, L. E., & Byrne, H. J. (2017). Vibrational spectroscopy as a tool for studying drug-cell interaction: Could high throughput vibrational spectroscopic screening improve drug development? *Vibrational Spectroscopy*, 91, 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.09.003>
- Jin, R., Cao, Y., Mirkin, C. A., Kelly, K. L., Schatz, G. C., & Zheng, J. G. (2001). Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1066541>
- Johnson, P. B., & Christy, R. W. (1972). Optical constants of the noble metals. *Physical Review B*. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.6.4370>
- Kemp, F. (2003). Applied Multiple Regression/Correlation Analysis for the Behavioral Sciences. *Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician)*. https://doi.org/10.1046/j.1467-9884.2003.t01-2-00383_4.x
- Kneipp, J., Kneipp, H., McLaughlin, M., Brown, D., & Kneipp, K. (2006). In vivo molecular probing of cellular compartments with gold nanoparticles and nanoaggregates. *Nano Letters*, 6(10), 2225–2231. <https://doi.org/10.1021/nl061517x>
- Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., Perelman, L. T., Itzkan, I., Dasari, R. R., & Feld, M. S. (1997). Single molecule detection using surface-enhanced raman scattering (SERS). *Physical Review Letters*, 78(9), 1667–1670. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.1667>
- Kotanan, C. N., Martinez, L., Alvarez, R., & Simecek, J. W. (2016). Surface enhanced Raman scattering spectroscopy for detection and identification of microbial pathogens isolated from human serum. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 8, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.03.002>
- Krafft, C., Knetschke, T., Siegner, A., Funk, R. H. W., & Salzer, R. (2003). Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 32(1 SPEC.), 75–83. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(03\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(03)00049-3)
- Kumar, C. S. S. R. (2012). Raman spectroscopy for nanomaterials characterization. İçinde *Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20620-7>
- Lee, K. Y. J., Wang, Y., & Nie, S. (2015). In vitro study of a pH-sensitive multifunctional doxorubicin-gold nanoparticle system: therapeutic effect and surface enhanced Raman scattering. *RSC Advances*, 5(81), 65651–65659. <https://doi.org/10.1039/c5ra09872f>
- Lee, S., Chon, H., Lee, J., Ko, J., Chung, B. H., Lim, D. W., & Choo, J. (2014). Rapid and sensitive phenotypic marker detection on breast cancer cells using surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging. *Biosensors and Bioelectronics*, 51, 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.07.063>

- Lee, S., Kim, S., Choo, J., Soon, Y. S., Lee, Y. H., Ha, Y. C., Ha, S., Kang, K., & Chil, H. O. (2007). Biological imaging of HEK293 cells expressing PLC γ 1 using surface-enhanced raman microscopy. *Analytical Chemistry*, 79(3), 916–922. <https://doi.org/10.1021/ac061246a>
- Louis, C., & Pluchery, O. (2012). *GOLD NANOPARTICLES FOR PHYSICS, CHEMISTRY AND BIOLOGY*.
- Maiti, K. K., Dinish, U. S., Samanta, A., Vendrell, M., Soh, K. S., Park, S. J., Olivo, M., & Chang, Y. T. (2012). Multiplex targeted in vivo cancer detection using sensitive near-infrared SERS nanotags. *Nano Today*, 7(2), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2012.02.008>
- Mallikarjun, V., Clarke, D. J., & Campbell, C. J. (2012). Cellular redox potential and the biomolecular electrochemical series: A systems hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(2), 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.034>
- Managò, S., Zito, G., Rogato, A., Casalino, M., Esposito, E., De Luca, A. C., & De Tommasi, E. (2018). Bioderived Three-Dimensional Hierarchical Nanostructures as Efficient Surface-Enhanced Raman Scattering Substrates for Cell Membrane Probing. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(15), 12406–12416. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b19285>
- Mattox, D. M. M. (1998). *HANDBOOK OF PHYSICAL VAPOR DEPOSITION (PVD) PROCESSING* Film Formation , Adhesion , Surface Preparation and Contamination Control. İçinde *Measurement*.
- McAughtrie, S., Lau, K., Faulds, K., & Graham, D. (2013). 3D optical imaging of multiple SERS nanotags in cells. *Chemical Science*, 4(9), 3566–3572. <https://doi.org/10.1039/c3sc51437d>
- Moore, J. C., Spink, J., & Lipp, M. (2012). Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. İçinde *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02657.x>
- Moskovits, M. (1978). Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals. *The Journal of Chemical Physics*, 69(9), 4159–4161. <https://doi.org/10.1063/1.437095>
- Murtagh, F., & Legendre, P. (2014). Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification*. <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>
- Nottingham, I., Verrier, S., Romanska, H., Bishop, A. E., Polak, J. M., & Hench, L. L. (2002). In situ characterisation of living cells by Raman spectroscopy. *Spectroscopy*, 16(2), 43–51.
- Ohring, M. (2013). The Materials Science of Thin Films. İçinde *The Materials Science of Thin Films*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-22199-4>
- Özden Dinç, D. Ş. (2018). *Yüzeylerin Titanyum Nanoçubuklar ve Onların Altın/Gümüş ile Modifiye Formları ile Nanodesenlenmeleri ve Farklı Alanlarda Kullanılabilirliklerinin İncelenmesi*.
- Park, H., Lee, S., Chen, L., Lee, E. K., Shin, S. Y., Lee, Y. H., Son, S. W., Oh, C. H., Song, J. M., Kang, S. H., & Choo, J. (2009). SERS imaging of HER2-overexpressed MCF7 cells using antibody-conjugated gold nanorods. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(34), 7444–7449. <https://doi.org/10.1039/b904592a>

- Pascut, F. C., Goh, H. T., Welch, N., Buttery, L. D., Denning, C., & Notingher, I. (2011). Noninvasive detection and imaging of molecular markers in live cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Biophysical Journal*, 100(1), 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.11.043>
- Premasiri, W. R., Moir, D. T., Klempner, M. S., Krieger, N., Jones, G., & Ziegler, L. D. (2005). Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of bacteria. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(1), 312–320. <https://doi.org/10.1021/jp040442n>
- Princeton Instruments. (2012). Raman Spectroscopy Basics - Application Note. *Internet*: <http://content.piacton.com/Uploads/Princeton/>.
- Pyykkö, P. (2004). Theoretical chemistry of gold. İçinde *Angewandte Chemie - International Edition*. <https://doi.org/10.1002/anie.200300624>
- Qian, X., Peng, X. H., Ansari, D. O., Yin-Goen, Q., Chen, G. Z., Shin, D. M., Yang, L., Young, A. N., Wang, M. D., & Nie, S. (2008). In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nature Biotechnology*, 26(1), 83–90. <https://doi.org/10.1038/nbt1377>
- R.E. Smallman, A. H. W. N. (2007). Physical Metallurgy and Advanced Materials Engineering. İçinde *Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki*.
- Register, J. K., Fales, A. M., Wang, H. N., Norton, S. J., Cho, E. H., Boico, A., Pradhan, S., Kim, J., Schroeder, T., Wisniewski, N. A., Klitzman, B., & Vo-Dinh, T. (2015). In vivo detection of SERS-encoded plasmonic nanostars in human skin grafts and live animal models. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(27), 8215–8224. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8939-0>
- Robbie, K., & Brett, M. J. (1997). Sculptured thin films and glancing angle deposition: Growth mechanics and applications. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*. <https://doi.org/10.1116/1.580562>
- Robbie, Kevin, Beydaghyan, G., Brown, T., Dean, C., Adams, J., & Buzea, C. (2004). Ultrahigh vacuum glancing angle deposition system for thin films with controlled three-dimensional nanoscale structure. *Review of Scientific Instruments*. <https://doi.org/10.1063/1.1667254>
- Rockett, A. (2008). The materials science of semiconductors. İçinde *The Materials Science of Semiconductors*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68650-9>
- Rohr, T. E., Cotton, T., Fan, N., & Tarcha, P. J. (1989). Immunoassay employing surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 182(2), 388–398. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90613-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90613-1)
- Rusciano, G., Zito, G., Pesce, G., & Sasso, A. (2017). Cell Imaging by Spontaneous and Amplified Raman Spectroscopies. *Journal of Spectroscopy*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2193656>
- Shafer-Peltier, K. E., Haynes, C. L., Glucksberg, M. R., & Van Duyne, R. P. (2003). Toward a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering. *Journal of the American Chemical Society*, 125(2), 588–593. <https://doi.org/10.1021/ja028255v>
- Shalabaeva, V., Lovato, L., La Rocca, R., Messina, G. C., Dipalo, M., Miele, E., Perrone, M., Gentile, F., & De Angelis, F. (2017). Time resolved and label free monitoring of extracellular metabolites by surface enhanced Raman spectroscopy. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175581>
- Shao, L., Zhang, A., Rong, Z., Wang, C., Jia, X., Zhang, K., Xiao, R., & Wang, S. (2018). Fast and non-invasive serum detection technology based on surface-enhanced Raman

- spectroscopy and multivariate statistical analysis for liver disease. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14(2), 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.11.022>
- Short, K. W., Carpenter, S., Freyer, J. P., & Mourant, J. R. (2005). Raman spectroscopy detects biochemical changes due to proliferation in mammalian cell cultures. *Biophysical Journal*, 88(6), 4274–4288. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.038604>
- Siebert, F., & Hildebrandt, P. (2008). *Vibrational Spectroscopy in Life Science*. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=LIY4Qs9sZAKC&oi=fnd&pg=PR5&dq=F.+Siebert+and+P.+Hildebrandt,+Vibrational+spectroscopy+in+life+science.+John+Wiley+%26+Sons,+2008.&ots=b0sYijO7m9&sig=qvL_iQ1_YAK0RvAjoEJu8wUUhYw&redir_esc=y#v=onepage&q=F. Sieb
- Sikirzhyski, V., Sikirzhyskaya, A., & Lednev, I. K. (2011). Multidimensional Raman spectroscopic signatures as a tool for forensic identification of body fluid traces: A review. İçinde *Applied Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1366/11-06455>
- Smith, E., & Dent, G. (2005). Introduction, Basic Theory and Principles. İçinde *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. <https://doi.org/10.1002/0470011831.ch1>
- Smith, R., Wright, K. L., & Ashton, L. (2016). Raman spectroscopy: An evolving technique for live cell studies. İçinde *Analyst* (C. 141, Sayı 12, ss. 3590–3600). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c6an00152a>
- Stevenson, R., McAughtrie, S., Senior, L., Stokes, R. J., McGachy, H., Tetley, L., Nativo, P., Brewer, J. M., Alexander, J., Faulds, K., & Graham, D. (2013). Analysis of intracellular enzyme activity by surface enhanced Raman scattering. *Analyst*, 138(21), 6331–6336. <https://doi.org/10.1039/c3an00729d>
- Stiles, P. L., Dieringer, J. A., Shah, N. C., & Van Duyne, R. P. (2008). Surface-enhanced Raman spectroscopy. İçinde *Annual Review of Analytical Chemistry* (C. 1, Sayı 1, ss. 601–626). Annual Reviews . <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112814>
- Syme, C. D., Sirimuthu, N. M. S., Faley, S. L., & Cooper, J. M. (2010). SERS mapping of nanoparticle labels in single cells using a microfluidic chip. *Chemical Communications*, 46(42), 7921–7923. <https://doi.org/10.1039/c0cc02209h>
- Toprak Çiçek, H. H. (2017). *Reflü Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaç Etken Maddelerin Kemometrik Yöntemlerle Tayini*.
- Tracton, A. A. (2006). Coatings technology: Fundamentals, testing, and processing techniques. İçinde *Coatings Technology: Fundamentals, Testing, and Processing Techniques*.
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. İçinde *Discussions of the Faraday Society*. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>
- Veloso, A. B., Longo, J. P. F., Muehlmann, L. A., Tollstadius, B. F., Souza, P. E. N., Azevedo, R. B., Moraes, P. C., & Da Silva, S. W. (2017). SERS Investigation of Cancer Cells Treated with PDT: Quantification of Cell Survival and Follow-up. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07469-1>
- Vo-Dinh, T., Houck, K., & Stokes, D. L. (1994). Surface-Enhanced Raman Gene Probes. *Analytical Chemistry*, 66(20), 3379–3383. <https://doi.org/10.1021/ac00092a014>
- VoDinh, T., Hiromoto, M. Y. K., Begun, G. M., & Moody, R. L. (1984). Surface-Enhanced Raman Spectrometry for Trace Organic Analysis. *Analytical Chemistry*, 56(9), 1667–1670. <https://doi.org/10.1021/ac00273a029>

- Wang, Z. H., Choi, C. J., Kim, B. K., Kim, J. C., & Zhang, Z. D. (2003). Microstructure and magnetic property of Fe-Co nanoparticles prepared by chemical vapor condensation process. *Journal of Alloys and Compounds*. [https://doi.org/10.1016/S0925-8388\(02\)01072-1](https://doi.org/10.1016/S0925-8388(02)01072-1)
- Wasa, K., Kitabatake, M., & Adachi, H. (2004). Thin Film Materials Technology: Sputtering of Compound Materials. İçinde *Thin Film Materials Technology: Sputtering of Compound Materials*.
- Willard, H. H., Merritt, L. L. J., Dean, J. A., & Settle, F. A. J. (1988). Instrumental methods of analysis, 7th edition. İçinde *Wadsworth Publishing Company*.
- Yazır, Y. (2004). İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücre (HUVEC) kültüründe, vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve intersellular adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi.
- Yazır, Y., & Dalçık, H. (2012). Vasküler Patolojilerin Araştırılmasında Önemli Bir Araç: Endotel Hücre Kültürü Yazışma Adresi/ Correspondence DERLEME • REVIEW. *Kosuyolu Kalp Derg.* <https://doi.org/10.5578/kkd.3563>
- Yilmaz, M., Erkartal, M., Ozdemir, M., Sen, U., Usta, H., & Demirel, G. (2017). Three-Dimensional Au-Coated Electrospayed Nanostructured BODIPY Films on Aluminum Foil as Surface-Enhanced Raman Scattering Platforms and Their Catalytic Applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(21), 18199–18206. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b03042>
- Yilmaz, M., Ozdemir, M., Erdogan, H., Tamer, U., Sen, U., Facchetti, A., Usta, H., & Demirel, G. (2015). Micro-/Nanostructured Highly Crystalline Organic Semiconductor Films for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Applications. *Advanced Functional Materials*, 25(35), 5669–5676. <https://doi.org/10.1002/adfm.201502151>
- Yilmaz, M., Senlik, E., Biskin, E., Yavuz, M. S., Tamer, U., & Demirel, G. (2014). Combining 3-D plasmonic gold nanorod arrays with colloidal nanoparticles as a versatile concept for reliable, sensitive, and selective molecular detection by SERS, *Physical Chemistry Chemical Physics*.
- Zhou, H., Wang, Q., Yuan, D., Wang, J., Huang, Y., Wu, H., Jian, J., Yang, D., Huang, N., Haisch, C., Jiang, Z., & Chen, S. (2016). Early apoptosis real-time detection by label-free SERS based on externalized phosphatidylserine. *Analyst*, 141(14), 4293–4298. <https://doi.org/10.1039/c6an00606j>
- Ziegel, E. R., Massart, D., Vandeginote, B., Buydens, L., DeJong, S., Lewi, P., & Smeyers-Verbeke, J. (1998). Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. *Technometrics*. <https://doi.org/10.2307/1271196>
- Zoubir, A. (2012). *Raman Imaging: Techniques and Applications*.
- Abbasoğlu, F. (2019). Öz nitelik Çıkarım ve Evrimsel Öz nitelik Seçim Metotlarının EEG Sinyallerinin Sınıflandırma Başarısına Etkileri.
- Alexandridis, P. (2011). Gold Nanoparticle Synthesis, Morphology Control, and Stabilization Facilitated by Functional Polymers. İçinde *Chemical Engineering and Technology*. <https://doi.org/10.1002/ceat.201000335>
- Armendariz, V., Herrera, I., Peralta-Videa, J. R., Jose-Yacaman, M., Troiani, H., Santiago, P., & Gardea-Torresdey, J. L. (2004). Size controlled gold nanoparticle formation by Avena sativa biomass: Use of plants in nanobiotechnology. *Journal of Nanoparticle Research*. <https://doi.org/10.1007/s11051-004-0741-4>

- Barman, I., Dingari, N. C., Singh, G. P., Kumar, R., Lang, S., & Nabi, G. (2012). Selective sampling using confocal Raman spectroscopy provides enhanced specificity for urinary bladder cancer diagnosis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(10), 3091–3099. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6424-6>
- Bergholt, M. S., Zheng, W., Lin, K., Ho, K. Y., Teh, M., Yeoh, K. G., Yan So, J. B., & Huang, Z. (2011). In vivo diagnosis of gastric cancer using Raman endoscopy and ant colony optimization techniques. *International Journal of Cancer*, 128(11), 2673–2680. <https://doi.org/10.1002/ijc.25618>
- Bhushan, B. (2000). Modern Tribology Handbook, Two Volume Set. İçinde *Modern Tribology Handbook, Two Volume Set*. <https://doi.org/10.1201/9780849377877>
- Bishnoi, S. W., Rozell, C. J., Levin, C. S., Gheith, M. K., Johnson, B. R., Johnson, D. H., & Halas, N. J. (2006). All-optical nanoscale pH meter. *Nano Letters*, 6(8), 1687–1692. <https://doi.org/10.1021/nl060865w>
- Braz, A., López-López, M., & García-Ruiz, C. (2013). Raman spectroscopy for forensic analysis of inks in questioned documents. İçinde *Forensic Science International*. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.07.017>
- Bunshah, R. F. (1994). Handbook of deposition technologies for films and coatings science, technology, and applications. İçinde *Materials science and process technology series Electronic materials and process technology*.
- Camden, J. P., Dieringer, J. A., Wang, Y., Masiello, D. J., Marks, L. D., Schatz, G. C., & Van Duyne, R. P. (2008). Probing the structure of single-molecule surface-enhanced Raman scattering hot spots. *Journal of the American Chemical Society*, 130(38), 12616–12617. <https://doi.org/10.1021/ja8051427>
- Camus, V. L., Stewart, G., Nailon, W. H., McLaren, D. B., & Campbell, C. J. (2016). Measuring the effects of fractionated radiation therapy in a 3D prostate cancer model system using SERS nanosensors. *Analyst*, 141(17), 5056–5061. <https://doi.org/10.1039/c6an01032f>
- Cho, E. C., Zhang, Q., & Xia, Y. (2011). The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.58>
- Çiçek, C., & Bilgiç, A. (2006). *Kİİ Nİ K Vİ Roloj Laboratuvarında Uzmanlık Ö Ğ Rencİ Sİ Ne Verİ Len Hücre Kültürü EĞİ Tİ M Programı : Bİ R Model Cell Culture Training Programme for Specialist Residents in Virology Laboratory : a Model*. 20(3), 231–241.
- Dag, S., Ozturk, Y., Ciraci, S., & Yildirim, T. (2005). Adsorption and dissociation of hydrogen molecules on bare and functionalized carbon nanotubes. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.72.155404>
- Dinç, E. (2007). Kemometri Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27(1), 61–92. http://www.eczfakder.hacettepe.edu.tr/Arsiv/EskiDergiler/01_2007/ecz-06.pdf
- Dinish, U. S., Balasundaram, G., Chang, Y. T., & Olivo, M. (2014). Actively targeted in vivo multiplex detection of intrinsic cancer biomarkers using biocompatible SERS nanotags. *Scientific Reports*, 4(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep04075>
- Diraman, H., Ara, Z., Enstit, T., Fak, F., Ege, K., Bile, T., Pca, A., & Hca, A. (2009). Ayvalık Zeytin Çeşidinden Üretilen Erken Hasat Natürel Zeytinyağlarının Yağ Asitleri Bileşenlerine Göre Kemometrik Karakterizasyonu Characterization of Early Harvest Virgin Olive Oils Produced From Ayvalık Cultivar Based On Their Fatty acid Profiles By Ch. *Electronic Journal of Food Technologies*, 4(3), 1–11.

- Faulds, K., Jarvis, R., Smith, W. E., Graham, D., & Goodacre, R. (2008). Multiplexed detection of six labelled oligonucleotides using surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS). *Analyst*, 133(11), 1505–1512. <https://doi.org/10.1039/b800506k>
- Ferraro, J. R., Nakamoto, K., & Brown, C. W. (2003). Introductory Raman Spectroscopy: Second Edition. İçinde *Introductory Raman Spectroscopy: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-254105-6.X5000-8>
- Freshney, R. I. (2005). Culture of Animal Cells. İçinde *Culture of Animal Cells*. <https://doi.org/10.1002/9780471747598>
- George, J. (1992). Preparation of Thin Films. İçinde *CRC Press*.
- Gracie, K., Correa, E., Mabbott, S., Dougan, J. A., Graham, D., Goodacre, R., & Faulds, K. (2014). Simultaneous detection and quantification of three bacterial meningitis pathogens by SERS. *Chemical Science*, 5(3), 1030–1040. <https://doi.org/10.1039/c3sc52875h>
- Grammatikopoulos, P., Steinhauer, S., Vernieres, J., Singh, V., & Sowwan, M. (2016). Nanoparticle design by gas-phase synthesis. İçinde *Advances in Physics: X*. <https://doi.org/10.1080/23746149.2016.1142829>
- Gürmen, S., & Ebin, B. (2010). Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri. *TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası*.
- Hao, E., & Schatz, G. C. (2004). Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. *Journal of Chemical Physics*, 120(1), 357–366. <https://doi.org/10.1063/1.1629280>
- Hawkeye, M. M., & Brett, M. J. (2007). Glancing angle deposition: Fabrication, properties, and applications of micro- and nanostructured thin films. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*. <https://doi.org/10.1116/1.2764082>
- Hierold, C., Jungen, A., Stampfer, C., & Helbling, T. (2007). Nano electromechanical sensors based on carbon nanotubes. İçinde *Sensors and Actuators, A: Physical*. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2007.02.007>
- Holmberg, K., & Mathews, A. (1994). Coatings tribology: a concept, critical aspects and future directions. *Thin Solid Films*. [https://doi.org/10.1016/0040-6090\(94\)90315-8](https://doi.org/10.1016/0040-6090(94)90315-8)
- Iacono, P., Karabeber, H., & Kircher, M. F. (2014). A “Schizophonic” All-In-One Nanoparticle Coating for Multiplexed SE(R)RS Biomedical Imaging. *Angewandte Chemie*, 126(44), 11950–11955. <https://doi.org/10.1002/ange.201403835>
- Irish, D. E., Mccarroll, B., & Young, T. F. (1963). Raman study of zinc chloride solutions. *The Journal of Chemical Physics*. <https://doi.org/10.1063/1.1734212>
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., & Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI107470>
- Jamieson, L. E., Asiala, S. M., Gracie, K., Faulds, K., & Graham, D. (2017). Bioanalytical measurements enabled by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) probes. İçinde *Annual Review of Analytical Chemistry* (C. 10, ss. 415–437). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041557>
- Jamieson, L. E., & Byrne, H. J. (2017). Vibrational spectroscopy as a tool for studying drug-cell interaction: Could high throughput vibrational spectroscopic screening improve drug development? *Vibrational Spectroscopy*, 91, 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2016.09.003>

- Jin, R., Cao, Y., Mirkin, C. A., Kelly, K. L., Schatz, G. C., & Zheng, J. G. (2001). Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1066541>
- Johnson, P. B., & Christy, R. W. (1972). Optical constants of the noble metals. *Physical Review B*. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.6.4370>
- Kemp, F. (2003). Applied Multiple Regression/Correlation Analysis for the Behavioral Sciences. *Journal of the Royal Statistical Society: Series D (The Statistician)*. https://doi.org/10.1046/j.1467-9884.2003.t01-2-00383_4.x
- Kneipp, J., Kneipp, H., McLaughlin, M., Brown, D., & Kneipp, K. (2006). In vivo molecular probing of cellular compartments with gold nanoparticles and nanoaggregates. *Nano Letters*, 6(10), 2225–2231. <https://doi.org/10.1021/nl061517x>
- Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., Perelman, L. T., Itzkan, I., Dasari, R. R., & Feld, M. S. (1997). Single molecule detection using surface-enhanced raman scattering (SERS). *Physical Review Letters*, 78(9), 1667–1670. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.78.1667>
- Kotanen, C. N., Martinez, L., Alvarez, R., & Simecek, J. W. (2016). Surface enhanced Raman scattering spectroscopy for detection and identification of microbial pathogens isolated from human serum. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 8, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.03.002>
- Krafft, C., Knetschke, T., Siegner, A., Funk, R. H. W., & Salzer, R. (2003). Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 32(1 SPEC.), 75–83. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(03\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(03)00049-3)
- Kumar, C. S. S. R. (2012). Raman spectroscopy for nanomaterials characterization. İçinde *Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20620-7>
- Lee, K. Y. J., Wang, Y., & Nie, S. (2015). In vitro study of a pH-sensitive multifunctional doxorubicin-gold nanoparticle system: therapeutic effect and surface enhanced Raman scattering. *RSC Advances*, 5(81), 65651–65659. <https://doi.org/10.1039/c5ra09872f>
- Lee, S., Chon, H., Lee, J., Ko, J., Chung, B. H., Lim, D. W., & Choo, J. (2014). Rapid and sensitive phenotypic marker detection on breast cancer cells using surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging. *Biosensors and Bioelectronics*, 51, 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.07.063>
- Lee, S., Kim, S., Choo, J., Soon, Y. S., Lee, Y. H., Ha, Y. C., Ha, S., Kang, K., & Chil, H. O. (2007). Biological imaging of HEK293 cells expressing PLC γ 1 using surface-enhanced raman microscopy. *Analytical Chemistry*, 79(3), 916–922. <https://doi.org/10.1021/ac061246a>
- Louis, C., & Pluchery, O. (2012). *Gold Nanoparticles For Physics, Chemistry And Biology*.
- Maiti, K. K., Dinish, U. S., Samanta, A., Vendrell, M., Soh, K. S., Park, S. J., Olivo, M., & Chang, Y. T. (2012). Multiplex targeted in vivo cancer detection using sensitive near-infrared SERS nanotags. *Nano Today*, 7(2), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2012.02.008>
- Mallikarjun, V., Clarke, D. J., & Campbell, C. J. (2012). Cellular redox potential and the biomolecular electrochemical series: A systems hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(2), 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.034>
- Managò, S., Zito, G., Rogato, A., Casalino, M., Esposito, E., De Luca, A. C., & De Tommasi, E. (2018). Bioderived Three-Dimensional Hierarchical Nanostructures as Efficient

- Surface-Enhanced Raman Scattering Substrates for Cell Membrane Probing. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(15), 12406–12416. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b19285>
- Mattox, D. M. M. (1998). Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing Film Formation , Adhesion , Surface Preparation and Contamination Control. İçinde *Measurement*.
- McAughtrie, S., Lau, K., Faulds, K., & Graham, D. (2013). 3D optical imaging of multiple SERS nanotags in cells. *Chemical Science*, 4(9), 3566–3572. <https://doi.org/10.1039/c3sc51437d>
- Moore, J. C., Spink, J., & Lipp, M. (2012). Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. İçinde *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02657.x>
- Moskovits, M. (1978). Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals. *The Journal of Chemical Physics*, 69(9), 4159–4161. <https://doi.org/10.1063/1.437095>
- Murtagh, F., & Legendre, P. (2014). Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification*. <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>
- Notingher, I., Verrier, S., Romanska, H., Bishop, A. E., Polak, J. M., & Hench, L. L. (2002). In situ characterisation of living cells by Raman spectroscopy. *Spectroscopy*, 16(2), 43–51.
- Ohring, M. (2013). The Materials Science of Thin Films. İçinde *The Materials Science of Thin Films*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-22199-4>
- Özden Dinç, D. Ş. (2018). *Yüzeylerin Titanyum Nanoçubuklar ve Onların Altın/Gümüş ile Modifiye Formları ile Nanodesenlenmeleri ve Farklı Alanlarda Kullanılabilirliklerinin İncelenmesi*.
- Park, H., Lee, S., Chen, L., Lee, E. K., Shin, S. Y., Lee, Y. H., Son, S. W., Oh, C. H., Song, J. M., Kang, S. H., & Choo, J. (2009). SERS imaging of HER2-overexpressed MCF7 cells using antibody-conjugated gold nanorods. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(34), 7444–7449. <https://doi.org/10.1039/b904592a>
- Pascut, F. C., Goh, H. T., Welch, N., Buttery, L. D., Denning, C., & Notingher, I. (2011). Noninvasive detection and imaging of molecular markers in live cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Biophysical Journal*, 100(1), 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.11.043>
- Premasiri, W. R., Moir, D. T., Klempner, M. S., Krieger, N., Jones, G., & Ziegler, L. D. (2005). Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of bacteria. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(1), 312–320. <https://doi.org/10.1021/jp040442n>
- Princeton Instruments. (2012). Raman Spectroscopy Basics - Application Note. Internet: <http://content.piacton.com/Uploads/Princeton/>.
- Pyykkö, P. (2004). Theoretical chemistry of gold. İçinde *Angewandte Chemie - International Edition*. <https://doi.org/10.1002/anie.200300624>
- Qian, X., Peng, X. H., Ansari, D. O., Yin-Goen, Q., Chen, G. Z., Shin, D. M., Yang, L., Young, A. N., Wang, M. D., & Nie, S. (2008). In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nature Biotechnology*, 26(1), 83–90. <https://doi.org/10.1038/nbt1377>

- R.E. Smallman, A. H. W. N. (2007). Physical Metallurgy and Advanced Materials Engineering. İçinde *Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki*.
- Register, J. K., Fales, A. M., Wang, H. N., Norton, S. J., Cho, E. H., Boico, A., Pradhan, S., Kim, J., Schroeder, T., Wisniewski, N. A., Klitzman, B., & Vo-Dinh, T. (2015). In vivo detection of SERS-encoded plasmonic nanostars in human skin grafts and live animal models. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(27), 8215–8224. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8939-0>
- Robbie, K., & Brett, M. J. (1997). Sculptured thin films and glancing angle deposition: Growth mechanics and applications. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*. <https://doi.org/10.1116/1.580562>
- Robbie, Kevin, Beydaghyan, G., Brown, T., Dean, C., Adams, J., & Buzea, C. (2004). Ultrahigh vacuum glancing angle deposition system for thin films with controlled three-dimensional nanoscale structure. *Review of Scientific Instruments*. <https://doi.org/10.1063/1.1667254>
- Rockett, A. (2008). The materials science of semiconductors. İçinde *The Materials Science of Semiconductors*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68650-9>
- Rohr, T. E., Cotton, T., Fan, N., & Tarcha, P. J. (1989). Immunoassay employing surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 182(2), 388–398. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90613-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90613-1)
- Rusciano, G., Zito, G., Pesce, G., & Sasso, A. (2017). Cell Imaging by Spontaneous and Amplified Raman Spectroscopies. *Journal of Spectroscopy*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2193656>
- Shafer-Peltier, K. E., Haynes, C. L., Glucksberg, M. R., & Van Duyne, R. P. (2003). Toward a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering. *Journal of the American Chemical Society*, 125(2), 588–593. <https://doi.org/10.1021/ja028255v>
- Shalabaeva, V., Lovato, L., La Rocca, R., Messina, G. C., Dipalo, M., Miele, E., Perrone, M., Gentile, F., & De Angelis, F. (2017). Time resolved and label free monitoring of extracellular metabolites by surface enhanced Raman spectroscopy. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175581>
- Shao, L., Zhang, A., Rong, Z., Wang, C., Jia, X., Zhang, K., Xiao, R., & Wang, S. (2018). Fast and non-invasive serum detection technology based on surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate statistical analysis for liver disease. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14(2), 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.11.022>
- Short, K. W., Carpenter, S., Freyer, J. P., & Mourant, J. R. (2005). Raman spectroscopy detects biochemical changes due to proliferation in mammalian cell cultures. *Biophysical Journal*, 88(6), 4274–4288. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.038604>
- Siebert, F., & Hildebrandt, P. (2008). *Vibrational Spectroscopy in Life Science*. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=LIY4Qs9sZAKC&oi=fnd&pg=PR5&dq=F.+Siebert+and+P.+Hildebrandt,+Vibrational+spectroscopy+in+life+science.+John+Wiley+%26+Sons,+2008.&ots=b0sYijO7m9&sig=qvL_iQ1_YAK0RvAjoEJu8wUUhYw&redir_esc=y#v=onepage&q=F. Sieb
- Sikirzhytski, V., Sikirzhytskaya, A., & Lednev, I. K. (2011). Multidimensional Raman spectroscopic signatures as a tool for forensic identification of body fluid traces: A review. İçinde *Applied Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1366/11-06455>
- Smith, E., & Dent, G. (2005). Introduction, Basic Theory and Principles. İçinde *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*. <https://doi.org/10.1002/0470011831.ch1>

- Smith, R., Wright, K. L., & Ashton, L. (2016). Raman spectroscopy: An evolving technique for live cell studies. İçinde *Analyst* (C. 141, Sayı 12, ss. 3590–3600). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c6an00152a>
- Stevenson, R., McLaughtrie, S., Senior, L., Stokes, R. J., McGachy, H., Tetley, L., Nativo, P., Brewer, J. M., Alexander, J., Faulds, K., & Graham, D. (2013). Analysis of intracellular enzyme activity by surface enhanced Raman scattering. *Analyst*, 138(21), 6331–6336. <https://doi.org/10.1039/c3an00729d>
- Stiles, P. L., Dieringer, J. A., Shah, N. C., & Van Duyne, R. P. (2008). Surface-enhanced Raman spectroscopy. İçinde *Annual Review of Analytical Chemistry* (C. 1, Sayı 1, ss. 601–626). Annual Reviews . <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112814>
- Syme, C. D., Sirimuthu, N. M. S., Faley, S. L., & Cooper, J. M. (2010). SERS mapping of nanoparticle labels in single cells using a microfluidic chip. *Chemical Communications*, 46(42), 7921–7923. <https://doi.org/10.1039/c0cc02209h>
- Toprak Çiçek, H. H. (2017). *Reflü Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaç Etken Maddelerin Kemometrik Yöntemlerle Tayini*.
- Tracton, A. A. (2006). Coatings technology: Fundamentals, testing, and processing techniques. İçinde *Coatings Technology: Fundamentals, Testing, and Processing Techniques*.
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. İçinde *Discussions of the Faraday Society*. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>
- Veloso, A. B., Longo, J. P. F., Muehlmann, L. A., Tollstadius, B. F., Souza, P. E. N., Azevedo, R. B., Moraes, P. C., & Da Silva, S. W. (2017). SERS Investigation of Cancer Cells Treated with PDT: Quantification of Cell Survival and Follow-up. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07469-1>
- Vo-Dinh, T., Houck, K., & Stokes, D. L. (1994). Surface-Enhanced Raman Gene Probes. *Analytical Chemistry*, 66(20), 3379–3383. <https://doi.org/10.1021/ac00092a014>
- VoDinh, T., Hiromoto, M. Y. K., Begun, G. M., & Moody, R. L. (1984). Surface-Enhanced Raman Spectrometry for Trace Organic Analysis. *Analytical Chemistry*, 56(9), 1667–1670. <https://doi.org/10.1021/ac00273a029>
- Wang, Z. H., Choi, C. J., Kim, B. K., Kim, J. C., & Zhang, Z. D. (2003). Microstructure and magnetic property of Fe-Co nanoparticles prepared by chemical vapor condensation process. *Journal of Alloys and Compounds*. [https://doi.org/10.1016/S0925-8388\(02\)01072-1](https://doi.org/10.1016/S0925-8388(02)01072-1)
- Wasa, K., Kitabatake, M., & Adachi, H. (2004). Thin Film Materials Technology: Sputtering of Compound Materials. İçinde *Thin Film Materials Technology: Sputtering of Compound Materials*.
- Willard, H. H., Merritt, L. L. J., Dean, J. A., & Settle, F. A. J. (1988). Instrumental methods of analysis, 7th edition. İçinde *Wadsworth Publishing Company*.
- Yazır, Y. (2004). *İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücre (HUVEC) kültüründe, vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve intersellular adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi*.
- Yazır, Y., & Dalçık, H. (2012). Vasküler Patolojilerin Araştırılmasında Önemli Bir Araç: Endotel Hücre Kültürü Yazışma Adresi/ Correspondence DERLEME • REVIEW. *Kosuyolu Kalp Derg.* <https://doi.org/10.5578/kkd.3563>

- Yilmaz, M., Erkartal, M., Ozdemir, M., Sen, U., Usta, H., & Demirel, G. (2017). Three-Dimensional Au-Coated Electrosprayed Nanostructured BODIPY Films on Aluminum Foil as Surface-Enhanced Raman Scattering Platforms and Their Catalytic Applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(21), 18199–18206. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b03042>
- Yilmaz, M., Ozdemir, M., Erdogan, H., Tamer, U., Sen, U., Facchetti, A., Usta, H., & Demirel, G. (2015). Micro-/Nanostructured Highly Crystalline Organic Semiconductor Films for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Applications. *Advanced Functional Materials*, 25(35), 5669–5676. <https://doi.org/10.1002/adfm.201502151>
- Yilmaz, M., Senlik, E., Biskin, E., Yavuz, M. S., Tamer, U., & Demirel, G. (2014). *Combining 3-D plasmonic gold nanorod arrays with colloidal nanoparticles as a versatile concept for reliable, sensitive, and selective molecular detection by SERS*, *Physical Chemistry Chemical Physics*.
- Zhou, H., Wang, Q., Yuan, D., Wang, J., Huang, Y., Wu, H., Jian, J., Yang, D., Huang, N., Haisch, C., Jiang, Z., & Chen, S. (2016). Early apoptosis real-time detection by label-free SERS based on externalized phosphatidylserine. *Analyst*, 141(14), 4293–4298. <https://doi.org/10.1039/c6an00606j>
- Ziegel, E. R., Massart, D., Vandeginote, B., Buydens, L., DeJong, S., Lewi, P., & Smeyers-Verbeke, J. (1998). Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. *Technometrics*. <https://doi.org/10.2307/1271196>
- Zoubir, A. (2012). *Raman Imaging: Techniques and Applications*.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler		
Adı Soyadı	:	
Doğum tarihi	:	
Doğum Yeri	:	
Uyruğu	:	
Adres	:	
Tel	:	
E-mail	:	
Eğitim		
Lise	:	Gazi Osman Paşa Anadolu Lisesi
Lisans	:	Kimya Mühendisliği
Yüksek lisans	:	Proses ve Reaktör Tasarımı
Doktora	:	-
Yabancı Dil Bilgisi		
İngilizce	:	İyi
Almanca	:	-
Rusça	:	-
Diğer		
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar		
Kimya Mühendisleri Odası		
Tezden Üretilmiş Yayınlar		