

**TELOMERAZ AKTİVİTESİ TAYİNİNE YÖNELİK
YÜKSEK ENERJİ DÖNÜŞÜMLÜ FLORESAN
PARTİKÜLLERİN BİYOSENSÖR OLARAK KULLANIMI**

**THE USE OF UP-CONVERSION FLUORESCENT
PARTICLES AS A BIOSENSOR FOR DETERMINATION
OF TELOMERASE**

MESUT KAPLAN

PROF. DR. LOKMAN UZUN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024

ÖZET

TELOMERAZ AKTİVİTESİ TAYİNİNE YÖNELİK YÜKSEK ENERJİ DÖNÜŞÜMLÜ FLORESAN PARTİKÜLLERİN BİYSENSÖR OLARAK KULLANIMI

Mesut KAPLAN

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Lokman UZUN

Temmuz 2024, 138 sayfa

Bu tez çalışması kapsamında, nadir toprak elementlerinin yüksek enerji dönüşümü (up-conversion) özelliğini ve antikor etkileşim süreçlerinin hassas seçim kabiliyetini kullanarak silika nanoyapıları ile vücut sıvısından telomeraz tespitini yapabilecek bir tanımlayıcı florofor probun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Telomeraz enzimi, sınırsız bölünme yeteneğine sahip hücrelerde (kanseri hücreleri) ekspresyonu oldukça yüksek olarak literatürde rapor edilmiş bir enzimdir. Buradan hareketle, telomeraz enziminin sekresyon miktarını saptayacak bir biyosensör, genel kanser taraması ve kanserin erken teşhisi için bir umut olabilir.

Günümüzde yaygın ve ölümcül bir hastalık olan kanserin erken dönemde teşhis edilmesi durumunda tedavisinin mümkün olduğu bir hastalıktır. Telomeraz miktarı ve aktivitesindeki anomaliler bu bağlamda bilim insanlarına ön bilgi vermektedir. Bu gerekçeyle, yeni nesil problemler ile vücut sıvısından telomeraz varlığını araştırabilecek bir florofor prob geliştirmek hedeflenmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, silika nanopartiküller taşıyıcı ana gövde olarak seçilmiştir. Literatürde Stöber yöntemi olarak bilinen yöntem ile sentezlenmiş ve bunlara yardımcı bağlayıcı gruplar (NH, OH vb.) ile modifiye edilmiştir. Modifiye edilen silika nanopartiküller ön deneme olarak,

organizmada fizyolojik ve biyolojik açıdan önemli bir yer teşkil eden demir ile alakalı olan “transferrin” antikoru ile yapılmıştır. Transferrin antikoru başarılı bir şekilde temel silika nanopartiküllere bağlanmış ve antijen yakalama ve tespit etme kabiliyeti ve kapasitesi analizler ile ölçülerek rapor edilmiştir. Kanserin erken teşhisi için, benzersiz emisyon özellikleri olan yüksek enerji dönüşümlü lantanit katkılı silika (silika@lantanit) problemlerin denemesinden önce yapılan bu ön deneylerde transferrin antijenin vücut sıvısındaki miktarını ölçmeye yarayan bir biyosensör olmuştur. Ön denemelerin başarılı bir şekilde sonuçlanmasından sonra, ölçülecek proteinden alınan sinyal farklarının daha yüksek ve daha keskin alınmasını sağlamak amacı ile sentezlenen silika nanopartiküllerin çekirdeğine evropiyum lantanit iyonu yerleştirilmiş ve alınan sinyalin daha yüksek ve kalıcı olması için de anten görevi görecek bir organik malzeme ile bu yapı desteklenerek bir florofor prob haline getirilmiştir. Daha sonra bu malzemeye, Si@Eu (Eu katkılı silika), “telomeraz” antikoru bağlanarak dekore edilmiş ve bir immüno prob halini almıştır. Hem florofor hem de immün etkileşimi olan bu nano sensör “immünoprob” olarak adlandırılmıştır. Telomeraz antijenini yakalamaya hazır hale getirilmiş olan bu problemler ile deneyler yapılmıştır. Ticari antijen ve gerçek kanser hücrelerinden ekstrakt edilmiş antijenler ile etkileşime sokularak ortam absorpsiyon sinyalleri değerlendirilmiştir. Bu analizlerde yüzey karakterizasyonu, modifikasyonun her aşamında yüzey potansiyeli ve elektron mikroskopu incelemeleri, FT-IR, elektroforez, UV spektrometri ve spektrofluorometri analizleri yapılmış ve sonuçlar, başarılı bir şekilde rapor edilmiştir. Bu çalışma neticesinde elde edilen net veriler şunlar olmuştur;

- 1) Silika nanoyapılar ön denemelerde bir prob haline getirilmiş ve toplam demir bağlama kapasitesi (TIBC) analizi yapabilecek medikal bir sensör geliştirilmiştir.
- 2) Silika nanoyapılar florofor problemlere dönüştürülerek, yüksek enerji dönüşümlü (YED) prob halini almış ve ticari antijen ile gerçek antijeni kayda değer oranlarda yakalamayı başarmıştır.
- 3) Elektroforez analizlerinde, yüksek enerji dönüşümlü (YED) nanoproblemlerin, ticari boya olan Cy2@Green ile yarışması sonucunda elde edilen bant görüntüleri, dissosiyasyon davranışları ve keskinliklerden de biyo-sensör olmasının yanısıra iyi bir belirteç olduğu da görülmüştür.

Özetle, silika nanoyapıların uygun ve işlenebilir yapıları sayesinde; lantanitlerin enerji dönüşümlerinin kararlılığı ve antikor-antijen etkileşimlerinin yüksek seçiciliği sayesinde

hem ticari kararlılığı yüksek bir biyo belirteç sentezlenmiş hem de tezin ana çalışması olan kanserin erken teşhisine olanak veren, telomeraz miktarının tayinini saptayacak bir biyosensör başarılı bir şekilde üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, Telomeraz Analizi, Yüksek Enerji Dönüşümlü Nanopartiküller, Silika Nanopartikül.



ABSTRACT

THE USE OF UP-CONVERSION FLUORESCENT PARTICLES AS A BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF TELOMERASE

MESUT KAPLAN

Doctor of Philosophy, Division of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Lokman UZUN

July 2024, 138 pages

Within the scope of this thesis study, it is aimed to develop a descriptive fluorophore-probe that can detect telomerase from body fluid with silica nanoparticles by using the high energy up-conversion feature of rare earth elements and the sensitive selection ability of antibody interaction processes. Telomerase is an enzyme that has been reported in the literature to be highly activated in cells with immortal ability (cancer cells). Based on this, a biosensor that will detect the secretion amount of telomerase may be a hope in treatment for general cancer screening and its early diagnosis.

Cancer, which is a very common and mortal disease today, is a disease that can be treated if diagnosed at an early stage. Anomalies in the amount and activity of telomerase provide preliminary information to scientists in this context. For this reason, it is aimed to develop a fluorophore probe that can detect the presence of telomerase in body fluid with new generation probes. In this study, silica nanoparticles were chosen as the main body. Silica nanoparticles were synthesized by the method known as the Stöber method in the literature, and auxiliary linking groups (NH, OH, etc.) were attached to them through modification treatments. As a preliminary test, the modified silica nanoparticles were made with the "transferrin" antibody, which is related to iron, which has a physiologically

and biologically important place in the organism. The transferrin antibody was successfully bound to basic silica nanoparticles, and its antigen capture and detection ability and capacity were measured and reported by assays. These preliminary experiments, conducted before the trial of high energy conversion ‘‘silica@lanthanide’’ UCNPs probes with unique emission properties for the early diagnosis of cancer, also became a biosensor to measure the amount of transferrin antigen in body fluid. After the successful completion of the preliminary tests, the europium lanthanide element was placed in the core of the synthesized silica particles in order to ensure higher and sharper signal differences received from the protein to be measured, and this structure was supported with an organic material that will serve as an antenna to make the signal received higher and more permanent. Then, Si@Eu (Eu doped silica NPs) particles were modified and decorated with "telomerase" antibody. Experiments were carried out with these fluorophore nanoprobe, which were prepared to capture telomerase antigen. Ambient absorption signals were evaluated by interacting with commercial antigen and antigens extracted from real cancer cells. In these analyses, surface characterization, surface potential and electron microscope examinations at every stage of modification, FT-IR, electrophoresis, UV spectrometry and spectrofluorometry analyzes were performed and the results were successfully reported. The logical data obtained as a result of this study were as follows;

- 1) Silica nanoparticles have been turned into a probe in preliminary trials and have shown promise as a medical sensor that will allow total iron binding capacity (TIBC) analysis.
- 2) Silica nanoparticles were converted into fluorophore probes and became up-conversion (UCNPs) probes, which managed to capture commercial antigen and real antigen at significant rates.
- 3) In electrophoresis analyses, it was seen that the band images, dissociation behaviors and sharpness obtained as a result of the competition of UCNPs nanoprobe with the commercial dye Cy2@Green were not only biosensors, but also a good marker.

In summary, a stable immunoprobe was developed thanks to the useful and processable structures of silica nanoparticles, the emission stability of lanthanides and the high selectivity of antibody-antigen interactions. . A sensor platform to be used in the early diagnosis of cancer, which is the main subject of the thesis, has been successfully produced.

Keywords: Biosensors, Telomerase Analysis, Upconversion Nanoparticles, Silica Nanoparticle.



TEŞEKKÜR

Sadece lisansüstü eğitimimde değil, lisans hayatımın nerdeyse tamamında bana hayatı ile örnek olan, hayata nasıl bakmam gerektiğini bana davranışları ile öğreten, sadece hoca olmanın ötesinde bana yol gösterici olan, manevi bağlar ile sıkıca bağlandığım ve bende sonsuz yeri olan, bugünlere gelebilmem için bana destek olan Sayın Hocam Prof. Dr. Lokman UZUN'a,

2012 yılının bir Haziran gününde Kimya bölümünün önündeki kaldırımda otururken beni görüp sorgulayan, yanına alıp araştırma laboratuvarına sokan, bana inanan ve umudunu benden asla kesmeyen, öğrendiğim her şeyde gerek akademide gerek sosyal hayatta katkısı olan canım abim ve hocam Dr. Mehmet Doğan AŞIK'a,

Kaderin yollarımızı birleştirdiği günden itibaren benden umudunu hiç kesmeyen ve bana her daim güvenen, destekleyen ve ortak hayallerimizi taçlandıran Sayın Hocam, rehberim ve iş ortağım Doç. Dr. Mehmet SORAR'a

Akademik birikimi ile her zaman yanımda olup beni doktora araştırmam boyunca motive eden, bana direnç sağlayan canım abim Doç. Dr. Erdoğan ÖZGÜR ve Prof. Dr. Mehmet Emin ÇORMAN ve canım ablam Dr. Canan ARMUTCU ÇORMAN'a

Akademik araştırma sürecimde beni yalnız bırakmayan dostum Dr. Rümeyza AKÇAPINAR'a, Tuca KARASU'ya ve Sena PİŞKİN'e

Doktora tezim için, beni "FDK-2020-18777" kodlu proje ile destekleyen Hacettepe Üniversitesi Rektörlüğü ve Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine,

Araştırma ve geliştirme süreçlerimin tamamında beni asiste eden ve toparlayan, geleceğin bilim insanları olan, hayatımda gördüğüm en çalışkan kadın iş arkadaşlarım, Aysu ÇOBAN ve Yasemin GÜVENİR'e,

Ve beni bu zamanlara getiren, zorluklara göğüs geren, bana direnç veren CANIM Annem Sultan KAPLAN ve Babam Ali KAPLAN'a, ailemin en değerli parçası ve bu aşamada hayata gözlerini yuman anılarımda yaşayacak **Kardeşim Belgin KAPLAN'a**

Beni hiç kimselerin bulamayacağı bir zamanın içinden çekip çıkartan, hayallerimin kahramanı, başarımın sırrı olan kadına, biricik eşim, sırdaşım ve yol arkadaşım Didem G. KAPLAN'a ve bu tezi vermeye çalıştığım zamanlarda hayatımıza yeni bir heyecan katarak ailemize katılan canım oğlum Atlas KAPLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Biyosensörler.....	3
2.1.1. Biyosensörlerin Tanımı ve Türleri.....	4
2.1.2. Biyoreseptörler ve Biy algılama Bileşenleri	5
2.1.2.1. Enzimler	5
2.1.2.2. Mikroplar.....	6
2.1.2.3. Organeller.....	6
2.1.2.4. Hücreler ve Dokular	6
2.1.2.5. Antikor Temelli Biyosensörler: İmmüno sensörler.....	7
2.1.2.6. Nükleik Asitler	7
2.1.3. Biyodönüştürücü Bileşenleri.....	8
2.1.3.1. Elektrokimyasal Biyosensörler	8
2.1.3.2. Optik Biyosensörler.....	8
2.1.3.3. Diğer Biyosensörler: Akustik, Termometrik, Manyetik ve Piezoelektrik Biyosensörler.....	8
2.1.4. Biyosensörlerin Doku Mühendisliğindeki Uygulamaları	9
2.1.4.1. Küçük Moleküllerin Tespiti	9
2.1.4.2. Fonksiyonel Protein Moleküllerinin Tayini	12

2.1.4.3. Diğer Analitlerin Tayini.....	13
2.1.5. Biyosensörlerde Güncel Modeller.....	14
2.1.5.1. Kuantum Nokta Tabanlı Optik Biyosensörler	14
2.1.5.2. Karbon Nanotüp Temelli Biyosensörler	15
2.1.5.3. MEMS/NEMS Temelli Biyosensörler.....	15
2.1.5.4. Grafen Tabanlı Biyosensörler.....	16
2.1.5.5. Mikroakışkanlar ve Biyosensörler	19
2.2. Lantanitler.....	20
2.2.1. Övropiyum (Eu) Elementi	21
2.2.2. Yüksek Enerji Dönüşümlü (YED) Özellikli Nanopartiküller	22
2.3. Silika Nanopartiküller.....	24
2.3.1. Biyomedikal Uygulamalarda Silika Temelli Nanopartiküller.....	25
2.3.2. Biyoanalitik Uygulamalarda Silika Temelli Nanopartiküller.....	26
2.3.3. Silika Temelli Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu	26
2.3.3.1. Konjuge Olmayan Bağlanma.....	26
2.3.3.2. Konjuge Bağlanma	27
2.4. Telomeraz	28
2.4.1. Telomeraz Tayininin Erken Kansere Teşhisindeki Rolü	29
2.4.2. Telomeraz Tayin Yöntemleri	30
2.4.2.1. Telomerik Tekrar Amplifikasyon Protokolü (TRAP)	30
2.4.2.2. Altın Nanopartiküllerle Telomeraz Tayini	31
2.4.2.3. Gümüş Nanopartiküllerle Telomeraz Tayini	32
2.4.2.4. Grafen Oksitler ile Telomeraz Tayini.....	32
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	33
3.1. İmmünoafinite Silika Nanopartiküllerle Transferrin Tayini.....	36
3.1.1. Silika Nanopartiküllerin Sentezi	36
3.1.2. Silika Nanopartiküllerin (SiNP) Amin Gruplarıyla Fonksiyonelleştirilmesi	36
3.1.3. Aminli [(SiNP)NH ₂] Silika Nanopartiküllerin Transferrin Antikoru ile Modifikasyonu	37
3.1.4. [(SiNP)NH ₂]+AntiTra Silika Nanopartiküllerle Transferrin Etkileşim Koşullarının Optimizasyonu	37

3.1.5. [(SiNP)NH ₂]+AntiTra Silika Nanopartiküllerle Yarışmalı Afinite Testleri	37
3.2. Yüksek Enerji Dönüşümlü Silika Nanopartiküller ile Telomeraz Tayini	38
3.2.1. N-Metakriloil-L-Aspartik Asit (MAAsp) Monomerinin Sentezi	38
3.2.2. Eu ³⁺ -MAAsp Floresans Kompleksinin Hazırlanması	38
3.2.3. SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp Nanopartiküllerin Sentezi	38
3.2.4. SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp Nanopartiküllerin Aminlenmesi.....	39
3.2.5. [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)NH ₂] Nanopartiküllerin Anti-Telomeraz ile Modifikasyonu.....	39
3.2.6. SDS-PAGE Çalışmaları.....	39
3.2.7. [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)NH ₂]+Anti-Telo Nanopartiküllerin Telomeraz Antijenleri ile Etkileşimi	41
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	42
4.1. İmmünoafinite Özellikli Silika Nanopartiküllerle Transferrin Tayini	42
4.1.1. Silika Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	42
4.1.1.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizleri	42
4.1.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri	43
4.1.1.3. Geçirilimli Elektron Mikroskopi (TEM) Analizleri.....	46
4.1.1.4. Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDX) Analizleri.....	47
4.1.1.5. Zeta Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	49
4.1.1.6. UV- Görünür Bölge Spektroskopisi Analizleri.....	51
4.1.2. Silika Nanopartiküllere (SiNP) Anti-Transferrin Antikorlarının Bağlanma Kapasitesi.....	52
4.1.3. [(SiNP)NH ₂]+AntiTra Silika Nanopartiküllerle Transferrin Etkileşim Koşullarının Optimizasyonu.....	53
4.1.4. [(SiNP)NH ₂]+AntiTra Silika Nanopartiküllerle Yarışmalı Afinite Testleri	59
4.2. Yüksek Enerji Dönüşümlü Silika Nanopartiküller ile Telomeraz Tayini	62
4.2.1. N-Metakriloil-L-Aspartik Asit Monomerinin Karakterizasyonu.....	62
4.2.2. [SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp] ve [SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp]NH ₂ Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	63
4.2.2.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizleri	63

4.2.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri.....	64
4.2.2.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizleri.....	68
4.2.2.4. Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDX) Analizleri	69
4.2.2.5. Zeta Boyut ve Potansiyel Ölçümleri.....	73
4.2.3. [SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp]NH ₂ Nanopartiküllerine Anti-Telomeraz	
Antikorlarının Bağlanma Kapasitesi	74
4.2.4. [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)NH ₂]+Anti-Telo Nanopartiküllerin Telomeraz	
Antijenleri ile Etkileşimi	75
4.2.4.1 SDS-PAGE Çalışmaları.....	75
4.2.4.2. UV-Görünür Bölge Spektroskopisi Analizleri	77
4.2.4.3. Spektrofluorometre Analizleri	78
5. YORUM.....	82
6. KAYNAKLAR	85
EKLER.....	113
EK 1 –Tez Çalışması Orjinallik Raporu	113
ÖZGEÇMİŞ	114

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Klasik bir biyosensörün en temel bileşenleri [10].	5
Şekil 2.2. NaYF ₄ 'ün farklı lantanitler ile katkılanması sonucu oluşan renk aralığı ve luminesans renk görünüşleri [154].	23
Şekil 2.3. Amino grup ile partikülün karboksil grup üzerinden bağlanması [179].	28
Şekil 4.1. Mavi renkli çizgiler (üstüste çakışık) [(SiNP)NH ₂] ve kırmızı çizgi ise sadece SiNP'yi temsil etmektedir.	43
Şekil 4.2. Boş silika nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri, 3,0 kV voltaj ve 50 kx yakınlaştırma.	44
Şekil 4.3. Aminli silika nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri, 5,0 kV voltaj ve 449 kx yakınlaştırma.	44
Şekil 4.4. Anti-transferrin ile modifiye edilmiş (SiNP@NH ₂) nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri, 7,0 kV voltaj ve 373 kx yakınlaştırma.	45
Şekil 4.5. Anti-transferrin ile modifiye edilmiş (SiNP@NH ₂) nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri, 2,5 kV voltaj ve 100 kx yakınlaştırma.	46
Şekil 4.6. Boş silika nanopartiküllerin modifikasyon öncesi geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri.	47
Şekil 4.7. Silika nanopartiküllerinin transferrin ile modifikasyonu sonrası geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri.	47
Şekil 4.8. Silika nanopartiküllerin EDAX spektrum analiz sonuçları a) boş, b) fonksiyonelleştirilmiş nanopartiküller.	48
Şekil 4.9. Modifiye edilmiş silika nanopartiküllerinin içerdiği elementleri gösterir yüzey haritalanması.	48
Şekil 4.10. Boş silika nanopartiküllerin zeta boyut ve potansiyel ölçümü.	50
Şekil 4.11. Modifikasyon aşamalarına göre silika nanopartiküllerin UV-Spektrometri analizleri.	51
Şekil 4.12. [(SiNP)NH ₂] partiküllere anti-transferrin antikorunun bağlanmasının kontrolü için oluşturulan standart grafik.	52
Şekil 4.13. [(SiNP)NH ₂] partiküllere anti-transferrin bağlanmasına ait verilerin bar grafiği.	53
Şekil 4.14. Transferrin standart çözeltilerinin spektrum taraması.	54

Şekil 4.15. Standart çözeltilerin 280 nm’de elde edilen kalibrasyon grafiği.	54
Şekil 4.16. Farklı derişimlerdeki antijenler ile etkileşime sokulan immünoprobların antijen bağlama kapasitesindeki değişimin incelenmesi.	55
Şekil 4.17. Sıcaklığın değişimiyle immünoprobların antijen bağlama kapasitesindeki değişiminin incelenmesi.	56
Şekil 4.18. Etkileşim süresinin değişimiyle immünoprobların antijen bağlama kapasitesindeki değişimin incelenmesi.	56
Şekil 4.19. pH değişimiyle immünoprobların antijen bağlama kapasitesindeki değişimin incelenmesi.	57
Şekil 4.20. [(SiNP)NH ₂]+AntiTra silika nanopartiküllerin yarışmacı ajanlar varlığında transferrin antijenlerini bağlama kapasitesi.	60
Şekil 4.21. [(SiNP)NH ₂]+AntiTra silika nanopartiküllerin yarışmacı ajanlar varlığında transferrin antijenlerini çöktürme yüzdeleri.	60
Şekil 4.22. MAAsp monomerinin sentez reaksiyon şeması.	62
Şekil 4.23. MAAsp monomerinin FT-IR Spektrumu.	63
Şekil 4.24. Boş silika (siyah), lantanit katkılı silika (kırmızı), aminli ve anten etkisi için MAAsp katkılı silika nanopartiküllerin FT-IR spektrumları.	64
Şekil 4.25. [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)NH ₂] YED nanopartiküllerin modifikasyon öncesi taramalı elektron mikroskopu görüntüleri 30 kV voltaj ve 5 kx yaklaştırma.	65
Şekil 4.26. [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)NH ₂] YED nanopartiküllerin modifikasyon öncesi taramalı elektron mikroskopu görüntüleri 30 kV voltaj ve 100000 kx yaklaştırma.	65
Şekil 4.27. [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)NH ₂] YED nanopartiküllerin modifikasyon öncesi taramalı elektron mikroskopu görüntüleri 30 kV voltaj ve 5 kx yaklaştırma.	66
Şekil 4.28. [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)NH ₂] YED nanopartiküllerin modifikasyon öncesi taramalı elektron mikroskopu görüntüleri 30 kV voltaj ve 5 kx yaklaştırma.	66
Şekil 4.29. [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)NH ₂]+AntTelo YED nanopartiküllerin modifikasyon sonrası taramalı elektron mikroskopu görüntüleri 30 kV voltaj ve 5 kx yaklaştırma.	67
Şekil 4.30. [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)NH ₂]+AntTelo YED nanopartiküllerin modifikasyon sonrası taramalı elektron mikroskopu görüntüleri 30 kV voltaj ve 5 kx yaklaştırma.	67

Şekil 4.31. Modifiye edilmemiş silika nanopartiküllerin geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri.	68
Şekil 4.32. YED özellikli nanopartiküllerin (içinde lantanit ihtiva eden) geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri.	69
Şekil 4.33. Yüksek enerji dönüşümlü silika nanoyapıların EDX analizi. (Kırmızı noktalar Eu elementini simgelemektedir.).....	70
Şekil 4.34. SiNP@Eu EDX Spektrumu	70
Şekil 4.35. [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)]NH ₂ EDX spektrumu.	71
Şekil 4.36. Antikor yüklü [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)]NH ₂ +AntTelo nanopartiküllerin yüzey haritalanması	72
Şekil 4.37. Antikor yüklü [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)]NH ₂ +AntTelo nanopartiküllerin yüzey haritalanması.	72
Şekil 4.38. Antikor yüklü [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)]NH ₂ +AntTelo nanopartiküllerinin EDX elementel analiz spektrumları.	73
Şekil 4.39. [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)]NH ₂ YED immünoprolarının antikor bağlama kapasitesi.	75
Şekil 4.40. YED immünoprolarının (kırmızı), ticari Cy@2 floresan boyasına (yeşil) karşılık denemesi ve ticari antijen ve gerçek hücre hatlarından elde edilmiş antijenlerin kıyası ve YED immünoprolarının bu antijenleri yakalama yeteneğinin jel elektroforez cihazı ile karşılaştırılması.	76
*Antb: Antikor, Antj: Antijen	76
Şekil 4.41. Telomeraz standart çözeltileriyle oluşturulan kalibrasyon eğrisi.	78
Şekil 4.42. YED immünoprolarının derişimi bilinen ticari antijen ve derişimi bilinmeyen gerçek hücre hattından ekstrakte edilen antijenler ile etkileşiminin nanodrop spektrometre cihazı ile incelenmesi.	78
Şekil 4.43. YED immünoprolarının ticari ve gerçek hücre antijenleri ile etkileşiminin spektrofiorometre ile incelenmesi.	80
Şekil 4.44. Standart telomeraz antijenlerinin spektrofiorometre ile oluşturulmuş kalibrasyon grafiği.....	80

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1 Tez çalışması aşamasında kullanılan cihazların listesi.....	35
Tablo 3.2 Elektroforez numunelerinin derişimleri	40
Tablo 4.1. [(SiNP)NH ₂]+AntiTra silika nanopartiküllerin antijen bağlama kapasiteleri	58
Tablo 4.2 Yarışmalı etkileşim sonrasında [(SiNP)NH ₂]+AntiTra silika nanopartiküllerin seçicilik ve dağılma katsayılarının değerlendirilmesi.....	62
Tablo 4.3 Boş silika, lantanit yüklü silika (SiNP@Eu), aminlenmiş lantanit yüklü silika (SiNP@Eu)NH ₂), antikor bağlanmış-YED nanoprob silika [(SiNP@Eu)NH ₂ +AntTelo) ve antijen ile etkileşime sokulmuş [(SiNP@Eu)NH ₂ +AntTelo+Telo) YED Nanoprobalarının adım adım yüzey potansiyeli.....	74
Tablo 4.4 [(SiNP@Eu ³⁺ -MAAsp)NH ₂] YED immünoprobalarının antikor bağlama kapasitesi.....	75
Tablo 4.5 Elektroforez yarışmalı grup incelemesi.....	77
Tablo 4.6. Ticari ve Derişimi Bilinmeyen Gerçek Kanser Hücrelerinden Elde Edilen Telomeraz Derişimleri	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2\text{O}$	Amonyum oksalat monohidrat
Eu	Övropiyum
Tb	Terbiyum
C_f	Bitiş konsantrasyonu
C_i	Başlangıç konsantrasyonu
$\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Övropiyum klorür hekzahidrat
HCl	Hidroklorik asit
k	Seçicilik katsayısı
k'	Bağıl seçicilik katsayısı
k_D	Dağılım katsayısı
m	Kütle
Q	Kapasite
T	Sıcaklık
t	Süre
$\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Terbiyum (III) nitrat pentahidrat
V	Hacim

Kısaltmalar

(SiNP)NH ₂	Aminlenmiş Silika Nanopartikül
AntiTrf	Antitransferrin Antikoru
AntTelo	Anti telomeraz ntikoru
APTES	3-Amino Propil Trietoksisilan
Cy2@Green	Siyanin Florofor Boya-Yeşil

FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi
HeLa	Ovaryum Kanseri Hücre Hattı
HSA	İnsan Serum Albümin
MAA _{sp}	Metakriloil- L-Aspartik Asit
MAB _t	Metakriloil benzotriazol
MCF-7	Meme Kanseri Hücre Hattı
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NH ₃	Amonyak
NH ₄ OH	Amonyum Hidroksit
NTE	Nadir Toprak Elementi
Ova	Ovalbümin
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SiN _p	Silika Nanopartikül
Telo	Telomeraz Antijen
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TEOS	Tetraetil Ortosilikat
Trf	Transferrin Antijen
YED	Yüksek Enerji Dönüşümlü Nanopartikül
γ -Glo	Gamma globülin

1. GİRİŞ

Günümüzde çok yaygın ve ölümcül bir hastalık olan kanser, erken dönemde teşhis edildiğinde tedavisi mümkün olan bir hastalıktır. Son on yıllarda kanser tanı ve tedavisi üzerine oldukça fazla eğilmiş olan biyoteknoloji bilimi bu alanda her geçen gün literatüre yeni çalışmalar kazandırmaktadır. Kanser tanı ve tedavisi ile ilgili literatürde sayısızca çalışma yapılmış ve erken teşhisin önemi bu çalışmalarda da vurgulanmıştır. Kanser teşhisi açısından yapılan çalışmalarda dikkat çeken bir durum ise telomeraz aktivitesinin metabolizmadaki rolü olmuştur. Telomeraz miktarı ve aktivitesindeki anomaliler bu bağlamda bilim insanlarına ön bilgi vermektedir. Bu gerekçe ile yeni nesil prob lar ile vücut sıvısından telomeraz aktivitesini araştırabilecek bir prob geliştirmek hedeflenmiştir.

Literatürde kanserin erken teşhis edilmesini amaçlayan ve bundan dolayı da onun varlığını telkin eden moleküllerin tespiti için birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmaları incelediğimizde, daha güvenilir, pratik, girişimsel olmayan ölçüm yöntemleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak, bu çalışmalarda kullanılan prob lar oldukça kararsız veya organizma açısından hasar verici veya kararsız ortamlar oluşturmaktadırlar. Bu sebeple, sayılan birtakım dezavantajları barındırmayan, vücut sıvısından telomeraz tayini yapabilecek prob ların sentezi ve geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, nadir toprak elementlerinin yüksek enerji dönüşümü (up-conversion) özelliğini ve antikör-antijen etkileşim proseslerinin hassas seçim kabiliyetini kullanarak silika nanoyapıları ile vücut sıvısından bazı proteinlerin tespitini yapabilecek bir tanımlayıcı prob un geliştirilmesi amaçlanmıştır. Sentezi planlanan bu prob ların üretim süreçleri optimize edildikten sonra, antibadi etkileşimleri ile süreç ilerlemiştir. Prob ların en belirgin özellikleri ise ‘‘ floro for özellikli olmalarıdır’’. Bu özelliklerini ise lantanitler sayesinde kazanmıştır.

Bu prob ların güncel floro for prob lardan üstünlüğünü ise iki ana başlık altında değerlendirebiliriz:

a) Yüksek enerji dönüşümü (up-conversion) özelliğine sahip olan nanoyapılar, güncel floro for lar ile kıyaslandığında, toksik değildir. Yanıp-sönme işlemi yapmazlar, ışıktan etkilenip aktivitelerini kaybetmezler, derişim ve cinsine göre spektrum aralıkları ayarlanabilen keskin renk aralıkları olan malzemelerdir [1].

b) Antikor-antijen etkileşimleri sayesinde, sadece ilgili moleküle afinitesi olan malzeme, tıpkı enzim-substrat ilişkisi gibi, çözelti içinde tanıma özelliğine sahip olacağından, ölçümdeki hata payı güncel ölçüm yöntemlerine oranla oldukça düşük olacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyosensörler

Biyosensörler 1962'de Lel ve Clark [2] tarafından ilk oksijen biyosensörünün geliştirilmesi ile tanımlandı. O zamandan bu zamana, tıp, biyoteknoloji, ve biyoterörizme karşı savunmada, ayrıca yiyecekler, içecekler ve çevresel-tarımsal uygulamalar gibi [3] çeşitli alanlarda araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmüştür. Hem doku mühendisliği hem de rejeneratif tıp ve biyomedikal mühendisliği hızla büyüyen alanlardır ve hastalıklı hasarlı doku ve organlar ya da hastaların kayıp fonksiyonlarını eski haline getirmek için tasarlanmış doku yapılarının geliştirilmesi için muazzam bir potansiyel sunmaktadırlar. Son zamanlarda, biyosensörler doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için muazzam bir potansiyel göstermiştir. [4, 5].

Biyosensörler, fiziksel ve kimyasal algılama tekniklerinin birleşimi ile ortaya çıkan, hedef biyolojik molekül veya bileşenler ile seçici bir şekilde etkileşime giren ve bu etkileşim sonunda ortaya çıkan sinyalleri vb. gibi değişkenliklerin bir algılayıcı sistem tarafından işlenip, sonucun matematiksel bir ifadeye çevrilmesini sağlayan yapılardır [6]. Ayrıca, "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tarafından, 20 yıldan daha fazla süre önce "hedef molekülde bulunan bir bileşiğe karşı verilen kimyasal ve biyolojik yanıtı, elektriksel sinyallere dönüştürerek anlamlı sonuçlar veren cihazlar" olarak tanımlanmıştır [7]. Biyosensörler, organizmada bulunan biyolojik reseptörler ile aynı prensiple çalışmaları için dizayn edilen ve birden fazla çeşidi bulunan teknolojik malzemelerdir. Biyoreseptörler, hedef molekülü biyokimyasal tanıma yeteneğine sahip, bu özelliği ile uyumlu merkezler içeren canlı ve biyolojik yapılardır. Biyosensör çalışmalarında, enzimler, antikorlar, aptamerler, moleküler baskılanmış yapılar, aminoasit ligandlar ve farklı nanoyapılar (kuantum noktalar, dendrimerler, lipozomlar vb.) kullanılan reseptörlere örnek verilebilir. Temelde bir takım modifikasyonlar ile biyo-aktifleştirilmiş bir dedektörü oluşturan bileşenler, gelen sinyali değerlendirmeye yönlendirecek bir sinyal alıcı, bu sinyali anlamlı matematiksel ifadelerle dönüştürebilecek bir sinyal işleyici ve matematiksel ifadeyi veri haline getirecek bir okuyucudur [8]. Dedektör veya sensör genel olarak analizi yapılacak analit ile seçici bir şekilde etkileşime girecek biyoaktif bir bölgeyi yapısında barındırır veya onunla donanımlaştırılmış bir alet gibidir. Elektronik diğer bileşenler ise, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan biyokimyasal süreçlerdeki değişimi, anlamlı sinyallere dönüştüren ve ileten yapılardır [9]. Elektronik

bölüm ise iletilen sinyali, çoğaltıcılar, sinyal işlemcisi, kayıt edici ve görüntüleme sistemlerinden geçirerek sonucun okunabilir bir şekilde girmesine öncülük ederler.

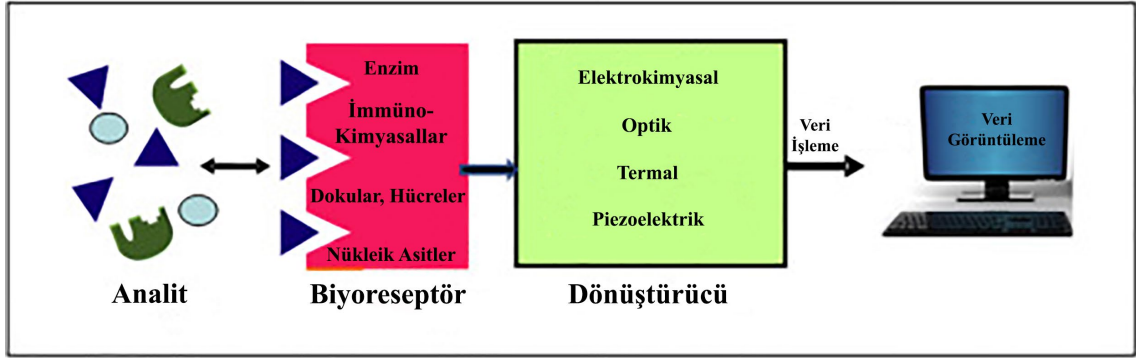
2.1.1. Biyosensörlerin Tanımı ve Türleri

Bir biyosensör, "analiz için öneme sahip bir molekülün, nicel veya nitel olarak belirlenmesini sağlayan, biyolojik bir malzemeyi fiziko-kimyasal bir materyalle birleştirerek anlamlı bir sonuç veren analitik cihaz" olarak tanımlanabilir. Tipik olarak üç temel bileşenden oluşur'' analit ile etkileşime girecek dedektör veya sensör, dönüştürücü ve okuyucudur. Biyosensörler, fizikokimyasal dönüştürücü moduna veya biyotanıma elemanının türüne göre sınıflandırılabilir [10].

Örneğin, elektrokimyasal ve amperometrik biyosensörler, analitin ortam koşullarındaki elektroaktifliğinden doğan veya reaktantların yükseltgenmesi veya indirgenmesi esnasında üretilen elektrik hareketinden oluşan akımı ölçer. Potansiyometrik biyosensörler ise referans bir elektrodun potansiyeline dayanarak, ortamdaki potansiyel değişim prensibine göre analiz yapan biyosensörlerdir. Kondüktometrik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyonlar nedeniyle ortamda meydana gelen elektriksel iletkenlikteki değişiklikleri ölçer. Elektrokimyasal biyosensörler, hassas tespit sınırları, yüksek özgül değer aralıkları, ergonomik ve basit yapıları sayesinde, üzerinde en çok çalışılan biyosensörlerdir. Çağımızda ciddi bir şekilde ilerleme kaydeden elektronik alanının son gelişmeleri sayesinde, laboratuvarlarda gerçek zamanlı *in vivo* izleme için çip üstü cihazlar veya yerinde izleme için el tipi cihazlar olarak tasarlanabilmektedirler. Optik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda emilen veya yayılan ışığın ölçümüne dayanmaktadır. Optik biyosensörler absorpsiyon, floresans, lüminesans ve yüzey plazmon rezonansı (SPR) gibi çeşitli optik tekniklere dayanmaktadır. [11]. Bunlar arasında kolorimetrik biyosensörler, tespit kolaylığı nedeniyle kapsamlı bir şekilde üzerinde çalışılan sensör tiplerindendir.

Termal biyosensörler, biyokimyasal reaksiyonlar esnasında açığa çıkan ısı ve sıcaklık verilerindeki dalgalanmalardan yararlanarak termal değişikliklerin ölçülmesini sağlarlar. Biyokimyasal reaksiyonların çoğu serbest Gibbs enerjisinin sebep olduğu entalpi değişikliklerini içerir ve ortam sıcaklığındaki değişiklikler hassas ısı almaçları kullanılarak ölçülebilir. Piezoelektrik biyosensörler ise biyomoleküler aktivitelerin sebep olduğu etkileşimler sonrasında kütledeki değişiklikleri ölçer. Bunun için titreşim

frekansları oldukça hassas olan piezoelektrik kristallerin frekans değişikliklerindeki farklar kullanılır. Bunların dışında biyo-tanırma biriminin türüne bağlı olarak, biyosensörler, nükleik asit bazlı, aptamer bazlı, antikor bazlı, hücre bazlı ve enzim bazlı biyosensörler olarak sınıflandırılabilir [7].



Şekil 2.1. Klasik bir biyosensörün en temel bileşenleri [10].

2.1.2. Biyoreseptörler ve Biyoalgılama Bileşenleri

Bir biyosensör bileşeni katalitik tip ve afinite tipi olarak sınıflandırılabilir. Katalitik tip sensörler, organelleri, hücreleri veya dokuları, mikroorganizmaları ve enzimleri içerirken, afinite tipi sensörler ise, enzimleri, protein uyumlarını, antikorları, reseptörleri ve nükleik asitleri içerir. Bu türlerin en önemlilerinden bir kaçtanesi aşağıda tartışılmıştır.

2.1.2.1. Enzimler

Biyosensörlerin, biyoreseptör bileşenleri olarak kullanılan enzimler genellikle spesifik moleküllerle seçici olarak reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonunda örneğin çözülmüş oksijeni tüketebilen ve kolayca tespit edilebilen proteinlerdir. Bunlardan en yaygın olan molekül ise peroksit bileşiğidir. Ortamda peroksidaz enzimi var ise peroksitli bileşiği parçalar ve açığa çıkan moleküllerin tespiti kalitatif ve kantitatif olarak bu enzim içerikli biyosensör sayesinde yapılmış olur. Enzim temelli biyodedeksiyonun diğer mekanizmaları ise enzimlerin ortam moleküllerinin aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonların hızlanması veya başlatılmasını veya inhibisyonunun saptanmasını ve enzim özelliklerinin analitlerle değiştirilmesini içerir. Enzim molekülleri, jellerde hapsedilerek, kovalent bağlanmayla, yüzeylere fiziksel adsorpsiyonla veya mevcut diğer tekniklerle dönüştürücü yüzeyleri üzerinde doğrudan hareketsiz hale getirilebilir [12, 13]. Enzim temelli dedeksiyonun avantajları arasında, yüksek saflıkta enzimlerin ticari olarak bulunabilirliklerinin kolay olması ve enzimlerin bağlanma kapasitelerinin yüksek

özgüllüğü, çeşitli analitik teknikler ile uyumlu olmaları ve çok çeşitli analitleri tespit etme yetenekleri yer alır. Enzimin etki mekanizması katalizör olup, reaksiyon tamamlandıktan sonra bile enzimin kendisi değişmez, dolayısıyla sürekli olarak kullanılabilir. Enzim bazlı sensörlerin dezavantajı, enzimin kararlılığının sınırlı olması ve enzim aktivitesinin pH, iyonik kuvvet, kimyasal inhibisyon ve sıcaklık gibi çeşitli faktörlere bağlı olmasıdır.

2.1.2.2. Mikroplar

Biyosensör üretiminde mikroorganizmaların biyosensör bileşeni olarak kullanılması birçok avantaj sunmaktadır. Mikroplar, yapıları gereği her ortam koşulunda bulunabilirler, adaptasyon konusunda büyük bir yeteneğe sahiptirler ve zamanla yeni molekülleri metabolize etme yeteneğini geliştirerek bulundukları ekosisteme direnç kazanırlar. Mikrobiyal yapılar, antikorlardan, ve enzimlerden daha ucuzdur. Kararlılığı korurken birden fazla karmaşık reaksiyon gerçekleştirilebilir. Tüm hücreler canlı veya cansız formda kullanılabilir. Bu yapıların, organik bileşikleri anaerobik veya aerobik olarak metabolize etmeleri sonucunda ortamda, amonyak, karbondioksit ve karboksilik asitler gibi çeşitli son ürünler oluşur. Bunların çeşitli dönüştürücüler kullanılarak izlenebilmesi nedeniyle; bu yapılar, biyosensörlerin üretiminde önem kazanmaktadır. Mikrobiyal biyosensörler, toprak, hava, su ve dolayısıyla tarım ve gıdada biyolojik oksijen gereksinimine zarar veren bakteri ve pestisitlerin tespiti için çevresel alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [14-16].

2.1.2.3. Organeller

Hücre içindeki bölmelere organel denir. Her organelin (lizozomlar, kloroplastlar, mitokondri vb.) ayrı bir işlevi vardır. Mitokondri, hücre içindeki kalsiyumun metabolizması alanındaki fonksiyonlardan ve kalsiyuma bağlı işlevsel yolların düzenlenmesinden sorumludur. Yapılan çalışmalarda, yüksek konsantrasyonlarda kalsiyumun varlığının, mitokondriyi kalsiyum kanallarını açması için uyardığını göstermiştir. Biyolojik süreçlerden esinlenerek, ortamdaki kalsiyum konsantrasyonlarını ölçmek için bu yöntem kullanılabilir. Su kirliliğini tespit etmek için mitokondrinin kullanılması ise organellerin biyosensör alanlarındaki bir başka uygulamasıdır [17].

2.1.2.4. Hücreler ve Dokular

Hücreler sahip oldukları yüksek hassasiyetleri nedeni ile çevrelerine karşı oldukça duyarlıdır. Bu etkileşimleri sayesinde biyolojik reseptörler olarak kullanılır. Yüzeyle yapışma hücrelerin önemli bir özelliğidir ve hücrelerin kolayca hareketsiz hale

getirilmesini sağlar. Bunlar genellikle stres koşulları, toksisite, organik türevler gibi ortak parametreleri kaydetmek veya ilaçların terapötik etkilerini izlemek ve iyon dönüştürücü ve seçici reaksiyonların süreçlerinde de belirteç olarak kullanılır [18, 19]. Dokular büyük miktarda enzim içerdiğinden biyosensörlerde de kullanılırlar. Hareketsiz hale getirilmeleri daha kolaydır ve hücre ve organellere göre daha yüksek aktivite ve kararlılık sergilerler. Önemli avantajlar arasında düşük maliyet ve uygulama için gerekli kofaktörlerin varlığı yer alır [20].

Dezavantajları arasında, reaksiyonu karmaşık hale getirebilen, belirsiz ve daha az güvenilir verilere sebep olan istenmeyen enzimlerin varlığı yer almaktadır.

2.1.2.5. Antikor Temelli Biyosensörler: İmmünosensörler

Antikorlar, reseptör olarak uzun süredir biyosensörler dahil olmak üzere farklı analitik sistemlerin geliştirilmesinde ilgi uyandırmıştır. Antikorların hedef moleküllerine yüksek afiniteleri sayesinde, antikor ve antijen bağlanmalarının bağlanma sabitleri oldukça yüksektir. Bu sebeple antikor ve antijen etkileşimlerinin hassasiyeti, insan örneklerinde tespit amaçlı pratik yöntemler olarak kullanılır [21]. Antikorlar, glikoprotein yapıdadırlar ve üstün seçicilik özelliğine sahiptirler. Organizmada bulunan antijenik yapıların tanımlanması sürecinde, B lenfositler tarafından üretilirler. Y şeklindedirler ve iki adet tanımlama bölgeleri bulunur. Antikor temelli biyosensörler, immüno-biyosensörler olarak da isimlendirilirler. Antikorlar genellikle amin, karboksil, aldehit veya sülfü gruplarının koordinasyonu ile modifiye edilirler. İmmünosensörler, çevresel numunede patojenik olmayan mikroorganizmalarla çapraz reaksiyona girmeden çeşitli antijenleri belirlerler. Ayrıca, immünosensörler uygun bir antikoru geliştirilmesi ve daha sonra bir test formatı ile basitleştirilebilir [6, 22, 23].

2.1.2.6. Nükleik Asitler

Oligonükleotidler, sinyal dönüştürücüler kullanılarak nükleik asit biyosensörlerine dahil edilir. Oligonükleotid problemleri, DNA/RNA parçalarını tespit etmek için transdüser üzerinde fiksasyonu yapılır. Tespit süreci, DNA'nın tamamlayıcı nükleotid baz çifti koduna dayanmaktadır: adenin (A): timin (T) ve sitozin (C): guanin (G). Sensör içindeki hibridizasyon problemleri, hedef diziyle baz çiftleri oluşturur ve bir sinyali üretir [24].

2.1.3. Biyodönüştürücü Bileşenleri

2.1.3.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler esas olarak hibritleşmiş DNA'yı, glikoz konsantrasyonunu vb. tespit etmek için kullanılır. Elektrokimyasal biyosensörler elektriksel parametrelerin ölçümüne göre (i) kondüktimetrik, (ii) amperometrik ve (iii) potansiyometrik olarak sınıflandırılabilir. Elektrokimyasal biyosensörler genel olarak üç elektrot içerir: bir adet referans elektrotu, bir adet çalışma elektrotu ve bir adet de karşı elektrot. Hedef moleküller için reaksiyonlar, çalışma elektrot yüzeyinde meydana gelir. Bu reaksiyon, elektron transferine neden olur veya ortam potansiyeline katkıda bulunabilir. Bu tür biyosensörler iletken bir polimerle kaplanmış yalıtkan bir substrat üzerine bir elektrot modelinin serigrafi yöntemi ile baskılanması ve proteinler ile modifiye edilmesi sonunda oluşturulur. Biyosensör bileşenleri oldukça seçici olduğundan ve sinyal iletken polimer tabakasındaki elektrokimyasal ve fiziksel değişikliklerle üretildiğinden, tüm biyosensörler tipik olarak minimum numune hazırlama gerektirir.

2.1.3.2. Optik Biyosensörler

Optik biyosensörler prensipte ışığın kırınımının yarattığı değişikliklerin veya ışık yolundaki sapmaların ölçümüne dayanır. Bu sensörler, dönüştürücü yüzeylerde hareketsiz hale getirilmiş reseptörlerin aktivitelerinin sonucunda oluşan kimyasal bağlanma veya ayrışma vb. etkileşimlerin sonucu olarak ışığın davranışının değişimini analiz ederler. Işığın özelliklerindeki değişikliklere sebep olan parametreler ise, kütle, konsantrasyon ve molekül sayılarıdır. Bu sebeple, bu parametrelerdeki değişiklik ışığın özelliğini etkilediği anda aradaki fark anlamlı bir algoritma ile tayinine olanak sağlar. Aynı prensiple çalışan en yaygın yöntem yüzey plazmon rezonansı (SPR) ve elipsometridir. Araştırmacılar bakteriyel patojenleri optik olarak tespit etmek için bu yöntemleri sıklıkla kullanmaktadırlar [25, 26].

2.1.3.3. Diğer Biyosensörler: Akustik, Termometrik, Manyetik ve Piezoelektrik Biyosensörler.

Biyosensörlerde kullanılan akustik transdüserler, toplu veya yüzeyel akustik dalgalarına dayanmaktadır. Elektriksel iletkenlik, kütle yoğunluğu, elastikiyet, viskoelastisite ve elektriksel iletkenlik gibi fizikokimyasal özelliklerdeki değişikliklerin tespit edilmesiyle elde edilir [27]. Kalorimetrik dönüştürücüler ise biyokimyasal reaksiyonlar nedeniyle ölçüm bölgesindeki sıcaklık değişikliklerine dayanır [28]. Sıcaklık ölçümünün, manyetik

ve piezoelektrik dönüştürücülerin şimdiye kadar doku mühendisliği uygulamaları üzerinde pratik bir etkisi olmamıştır [29].

2.1.4. Biyosensörlerin Doku Mühendisliğindeki Uygulamaları

Biyosensörler, doku mühendisliği uygulamalarında, özellikle üç boyutlu hücre kültürlerinin sürdürülmesinde ve glikoz, adenosinler ve hidrojen peroksit seviyeleri gibi hücre ve dokuların kaderini belirleyen biyomolekül konsantrasyonlarının önemli roller oynadığı "organ-on-a-chip" modellerinin geliştirilmesinde çok büyük öneme sahip olabilir [30]. Canlı hücrelerin, oksijen tüketimindeki değişiklikler, ortamın pH dengesindeki dalgalanmalar, membran yüzey potansiyelleri, iyon değişim konsantrasyonları, ortama proteinlerin salımı ve birden fazla metabolik bileşiklerin oluşturduğu çeşitli fiziksel ve kimyasal sinyalleri ilettiği iyi bilinmektedir [31]. Bu analitlerin izlenmesi, hücresel aktiviteler hakkında gerçek zamanlı olarak fikir verebilir.

2.1.4.1. Küçük Moleküllerin Tespiti

Klinik uygulamalarda, kan şekeri konsantrasyonunun biyosensör tabanlı izlenmesi, yüksek seviyelerde glise edilmiş hemoglobin (HbA1c) içeren diyabetin doğru bir şekilde belirlenmesi için önemli bir teşhis yöntemi haline gelmiştir. Bunun yanında, doku mühendisliği uygulamalarında, kültür ortamındaki glikozun gerçek zamanlı izlenmesi ise, hücresel metabolik aktivitenin bir göstergesi olarak değerlendirilip araştırmalarda kullanılır [29, 32]. Kan şekeri seviyelerinin izlenmesine yönelik birçok farklı biyosensör yaklaşım vardır. Bu yöntem, kandan ve interstisyel sıvıdan glikoz oksidaz veya glikoz dehidrojenazı tespit etmek için sıklıkla kullanılan elektrokimyasal biyosensörleri kullanır [33]. Glikoz tespiti için, aktif olmayan apoenzimler, birtakım reseptörler ve bağlayıcı proteinler kullanılarak üretilen optik biyosensörler birçok çalışmada rapor edilmiştir. Bu, tersine çevrilebilir, implante edilebilir veya hat içi sensör sistemlerinin geliştirilmesine yönelik alternatif stratejileri ve yaklaşımları içerir [34]. Araştırmalar girişimsel olmayan bir şekilde, glikoz içeriğini ölçmek için bazı tekniklerin revizyonuna veya yeni teknikler keşfetmeye odaklanmıştır. Son yıllarda teknolojiye bazı ümit verici gelişmelere rağmen, halen klinik pratikte kullanımda olup da girişimsel olmayan araç yoktur [35]. Bunların aksine, dağınık yansıma spektroskopisi [36], termal emisyon spektroskopisi [37], polarimetri [38], absorpsiyon/geçirgenlik spektroskopisi [37], fotoakustik spektroskopi [39] ve yakın kızılötesi spektroskopi (NIRS) [40], kan şekeri düzeylerinin güvenilir değerlerle ölçülmesinde umut verici başarılar göstermiştir.

Hernekadar bu yöntemler başarılı olsa da, zayıf glikoz absorpsiyon bantları (kombinasyon bantları), yanıt verilebilirlikteki kısıtlamalar ve sistemin diğer bileşenlerinden gelen çeşitli istenmeyen bantların varlığı nedeniyle oldukça yavaştır. Öte yandan, orta kızılötesi (MIR) bölge, belirgin bir glikoz emilim bandı içermesine ve insan kanında izole bant vermesine rağmen, sudan kaynaklı absorpsiyon ve arka plan dalgalanmaları nedeniyle verim düşük olmaktadır [41]. Fotoakustik [39] ve termal radyasyon yöntemlerinde de [42] su varlığı girişimde bulunmaktadır ve sonuçları etkilemektedir. Son zamanlarda, MIR aralığında sürekli veya aralıklı glikoz izleme için girişimsel olmayan ve temassız bir teknik olan dalga boyu modülasyonlu diferansiyel lazer fototermal radyometri (WM-DPTR) geliştirilmiştir. Bu, *in vitro* olarak insan derisindeki serum glikoz seviyelerini ölçmek için uygulanabilir [43, 44]. Nanobiyosensör teknolojilerinin glikoz konsantrasyonlarının izlenmesindeki uygulamalar öncelikle, diyabetik hastalarda kan glikoz seviyesinin ölçülmesine yönelik dizayn edilmektedir [45]. Hücreler tarafından glikoz tüketimi hücresel metabolizmanın en iyi göstergesi olduğundan, bu teknikler benzer şekilde tasarlanmış doku yapılarının üretimi, çoğalması ve büyümesi sırasında hücresel metabolizmayı gerçek zamanlı olarak izlemek için kullanılabilir [46].

Hidrojen peroksit (H_2O_2) hücre ve doku kültürlerinde oksidatif stres veya hipoksik strese sebep olur. Yapısı gereği parçalandıkça oksijen ve hidrojen gazı açığa çıkartır. Bu sebeple doku mühendisliği ve klinik uygulamalarda peroksit tespiti büyük önem taşımaktadır. Peroksit ölçümü için, elektrokimya, fotometri ve titrasyon yöntemleri mevcut analitik yöntemler arasındadır [47]. Yüksek H_2O_2 seviyeleri (tipik olarak 50 M), çeşitli hayvan, bitki ve bakteri hücrelerinin yanı sıra insan için de sitotoksiktir. Anormal H_2O_2 seviyeleri biyolojik sistemlere son derece zararlıdır. H_2O_2 tespiti için floresans bazlı ve elektrokimyasal yöntemler doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bahsedilen tekniklerin, düşük hassasiyeti, düşük H_2O_2 özgüllüğü, biyolojik ortamlara uygulanma zorluğu gibi bazı dezavantajları vardır. Enzim bazlı amperometrik biyosensörler görece yüksek duyarlılıkları ve seçicilikleri sayesinde ilgi odağı olmuştur [48, 49]. Son derece hassas ve stabil olan sensörlerin geliştirilmesi, enzimlerin katı elektrot yüzeylerine etkili bir şekilde bağlanmasından kaynaklanır [49]. H_2O_2 tespiti için elektrot yüzeyindeki enzimleri verimli bir şekilde hareketsiz hale getirmek için çok sayıda strateji geliştirilmiştir. Bu stratejik çalışmalar, polimerleri [50], kuantum noktaları [51] ve çeşitli nanomalzemeleri [52, 53] içerir ki bunlar arasında nanomalzeme tabanlı

metotlar, bu amaçla en çok araştırılan yöntemler haline gelmiştir. Örneğin, gümüş (Ag) nanopartikül temelli elektrokimyasal biyosensörler, elektrot için önemli bir bileşen olarak kullanılmaktadır. Xu ve arkadaşları, camsı karbon (GC) elektrodu üzerinde hemoglobinin (Hb) doğrudan elektrokimyasına dayalı bir H₂O₂ biyosensörü geliştirmişlerdir. Hb, GC elektrotunda farklı bir redoks pik seviyesi göstermiş ve yüksek hassasiyetli, tekrarlanabilirliği olan ve stabil bir davranış sergilemiştir [54]. Nanobiyosensörlerin bir parçası olan nanoprobalar H₂O₂'yi, floresans, lokalize yüzey plazmon rezonansı, kemilüminesans, yakın kızılötesi absorpsiyonu ve elektrokimyasal yöntemler gibi yöntemleri kullanarak, nanopartiküllerden oluşan matris malzemeleri ve enzimlere bağlı olarak kullanarak saptayabilmektedirler [55-57]. H₂O₂ tespitinde sensörlerin kullanılmasının hem *ex-vivo* hem de *in-vivo* doku mühendisliğinde belirli avantajları vardır. Genel olarak nanoprobalar, biyolojik hücrelerin boyutundan çok daha küçük olan 10–500 nm boyut aralığındadır ve bu, ölçümler yapılırken hücrelere veya dokulara verilen fiziksel rahatsızlığı en aza indirir. Ayrıca, nanoprobalar çok işlevlilik sunar ve hedefe özgü ligand parçalarının nanopartikülle dekore edilmiş elektrot yüzeyine konjuge edilmesiyle doku veya hücreye özgü hale getirilebilirler.

Hücre dışı adenosin difosfat (ADP) ve adenosin trifosfat (ATP), kanda, kalpte ve karaciğerde bulunan çok işlevli hayati moleküllerdir. ATP, hücresel metabolizmadaki ana rolünün yanında önemli bir hücre dışı sinyal ajanı olarak kabul edilmektedir. Özellikle plazma zarı reseptörlerini aktive eder ve bir dizi fizyolojik yolun stimülasyonunu sağlar. Lüsiferaz enzimi temelli yöntemler, adenosinleri tespit etmek için uzun süredir kullanılmaktadır. Ancak, düşük hassasiyetleri ve çözünürlükleri sebebi ile *in vivo* uygulamaları sınırlıdır. Sonuç olarak, ATP ölçümü için alternatif ve daha uygun yöntemlere ihtiyaç vardır. Biyosensörler yerinde ve gerçek zamanlı, hücre dışı ATP ölçümü ve hassasiyet gerektiren *in vivo* uygulamalar için birer seçenek halini almışlardır [58, 59].

Hücre dışı ATP, ADP ve üridin trifosfatın (UTP) yaşamın düzenlenmesinde ciddi bir rolü vardır. Apoptoz ve nekroz, hücre çoğalması ve hücre göçü ve farklılaşması, sitokin sekresyonu gibi çeşitli biyolojik reaksiyonlarda rol oynamaktadır [60]. Nükleotidlerin sinyalleme, bağışıklık sisteminin olgunlaşması, nörodejeneratif bozukluklar, iltihaplanma-yanğı ve kanser gibi birçok önemli fizyolojik ve patolojik olayda rol oynar. *In vivo* olarak hipoksi, travma, iskemi, kanser ve inflamasyon gibi birçok hastalıkta hücre dışı ATP konsantrasyonları 100 µM'ye kadar çıkabilmektedir [61]. Tipik olarak hücre

süpernatantlarındaki hücre dışı ATP, standart bir biyoluminesans lusiferin/lusiferaz tayini kullanılarak ölçülür. Ancak bu yöntem, hücre dışı ATP konsantrasyonunun gerçek zamanlı ölçümüne izin vermez. Llaudet ve arkadaşları, ATP'nin *in vivo* ölçümleri için bir mikroelettrot kayıt sistemi geliştirerek ATP'nin ölçümünü engelleyecek girişimleri boşa çıkartmışlardır [58]. Başka bir grup ise, nöronal rejenerasyon için, granüler birincil hücre kültüründeki pürini ölçecek bir mikroelettrot biyosensörü geliştirmiştir [62]. Schneider ve arkadaşları, ATP salımının kaynağını belirlemek ve ATP konsantrasyonunu ölçmek için ATPaz içeren S1 miyozinin fragmanı ile modifiye edilmiş bir prob tasarlamışlardır [63]. Hayashi ve arkadaşları, ATP salınan hedef hücrelerin yakınına yerleştirilebilen bir biyosensör geliştirmişlerdir [64]. Bu teknikler hücre dışı ATP salımının ölçülmesinde doğru olsa da klinik uygulamalar için karmaşıktırlar. Son zamanlarda Xie ve arkadaşları, standart mikropilaka okuyucuları kullanarak basit, etiketsiz, yüksek verimli ATP tespiti için yeni bir dizi lokalize yüzey plazmonu (LSPR) çipi geliştirmişlerdir. Bu çalışmaya göre oldukça verimli sonuçlar kayıt edilmiş ve LSPR sensör çipinin, doku mühendisliği uygulamalarında biyolojik örneklerin eser analizlerde yüksek verimli tespiti için kullanılabileceğini öne sürülmüştür [65].

2.1.4.2. Fonksiyonel Protein Moleküllerinin Tayini

Teşhis ve tedavi için, farklı mikroçevre koşulları altında hücrelerden salınan biyolojik enzimler gibi fonksiyonel protein moleküllerinin aktivitesini ölçmek önemlidir. Bu durum için de doku mühendisliği uygulamalarına yönelik hücre biyolojisinin temellerini anlamak ve bunu işlevsel hale getirmek gerekmektedir. Bu sebeple de fonksiyonel proteinlerin tayinine yönelik araştırmalar oldukça önemlidir. Proteinaz ailesinin üyeleri olan matris metaloproteinazlar (MMP'ler), doğal doku rejenerasyon programında biyolojik bir yanıt olarak hücreler tarafından salınırlar [66]. MMP'ler, kanser dahil farklı patolojik durumlara yanıt olarak değişkenlik gösteren miktarlarda salınır. Bu nedenle MMP proteinleri, biyosensörler kullanılarak tespit edilebilen ve ölçülebilen çeşitli hastalık durumları için de biyobelirteç olarak görev yapabilen fonksiyonel proteinlerdir. Günümüzde kolorimetrik bir yöntemle proteinaz aktivitesini ölçmek için, ticari olarak temin edilebilen proteinaz tanı kitleri kullanılmaktadır [67]. Bu sistemlerde çok kullanılan enzime duyarlı polimerler, biyolojik cihazlarda algılama elemanları olarak da popülerdir [68]. Bu durumlarda, floresan molekülü, peptid dizisi yoluyla söndürücüye bağlanır ve peptid dizisinin proteinaz enzimi tarafından bölünmesi, hedef proteinin konsantrasyonunu ve aktivitesini izlemek için ölçülebilen bir floresan sinyali üretir [69].

Ancak bu etiketleme yöntemi, özellikle 3D *in vitro* doku kültürü koşullarında yetersiz miktardaki biyomoleküllerin tespiti için uygun olmayabilir.

Son zamanlarda oldukça hassas optik biyoalgılama yöntemlerine dayanan etiketsiz biyosensörler geliştirilmiştir [70]. Bu tür biyosensörler, *in vitro* hücre kültürü koşullarının ve otofaji ve proteostaz gibi hücre dışı proteinlerdeki anormalliklerin gerçek zamanlı izlenmesini sağlamaktadır [71]. Biyofotonik temelli biyosensörler, hücre dışı proteinlerin, enzimlerin, hormonların ve çözünür moleküllerin konsantrasyon seviyelerini gerçek zamanlı tespit etmek için de kullanılabilir.

Biyosensörler sayesinde girişimsel olmayan yöntemler ile kan örneklerinden kanserin erken teşhisi yapılmaktadır. Akciğer kanserinin erken tanısı için, serumdaki karsinoembriyonik antijen (CEA) yüzey plazmon rezonansı (SPR) sensörü sayesinde tespit edilmiştir [72-74]. Kanserinin erken teşhisi için epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) biyobelirteçlerinin saptanmasında çip üzerinde laboratuvar (lab-on-a-chip) ve optik biyosensörler kullanılmıştır [75]. Tasarlanmış tümör modellerinde, floresan bazlı biyosensörler, klinik teşhiste biyobelirteçlerin erken saptanması, hastalık ilerlemesinin ve tedavi/terapötiklere yanıtın izlenmesi için yararlı araçlar sunmaktadır [76]. Protein kinazlar, hücre sinyal yollarında ve hastalık ilerlemesinde ana proteinlerdir ve biyosensörler kullanılarak da saptanabilen farklı terapötiklere yanıt olarak gerçek zamanlı biyobelirteçler olarak hareket edebilirler [77]. Birçok biyobelirtecin normal aralıkları nanogram ve pikogram seviyelerindedir ve bu eser miktarlar yalnızca uygun yüzey kimyaları, nanomalzemelerin işlevselleştirilmesi ve sinyal amplifikasyonu metodoloji ile oldukça hassas bir biçimde tayin edilebilir. Öte yandan, algılayıcı molekül ile hedef arasındaki girişim, serum veya gerçek hasta numunelerinde spesifik olmayan bağlanma, hedefin küçük boyutu ve sensörlerin mikroakışkan sistemlerinin ölçüm sürecine etkisi gibi sorunlar, biyosensör sistemlerindeki en büyük zorluklardır ve üstesinden gelinmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

2.1.4.3. Diğer Analitlerin Tayini

Patojenik mikroorganizmaların tespit edilmesi için farklı tiplerde biyosensörler geliştirilmiştir. *Escherichia coli*'nin dolaylı tespiti için amperometrik biyosensörler ve *Salmonella enterica*'nın doğrudan tespiti için potansiyometrik biyosensörler geliştirilmiştir [78]. Enterobacteriaceae cinsi bakterilerin piezoelektrik immüno sensörler tarafından kolayca tespit edilebilirliği rapor edilmiştir [79]. *Neisseria meningitidis* ve

Brucella melitensis, ışık konsantrasyonu farkı ile bir potansiyometrik sensör tarafından tespit edilmiştir [80].

Endotoksinler, ateş, çoklu organ yetmezliği, septik şok, sepsis, meningokoksemi ve nörolojik sakatlık ve işitme kaybı gibi ciddi morbiditelere neden olan tüm gram negatif bakterilerin dış hücre duvarının karmaşık lipopolisakkaritleridir (LPS). Biyolojik ve medikal ürünlerde, rekombinant bazlı terapötik ürünlerde, tıbbi cihazlarda, serolojik ürünlerde, gıda ve su güvenliğinde kalite kontrolü için endotoksin analizi hayatidir [80]. *E. Coli* endotoksini, alt saptama sınırının 10 ng/mL olduğu ve saptama süresinin 30 saniye olduğu floresan tekniği kullanılarak saptanmıştır [81]. *Salmonella minnesota* kaynaklı endotoksin, bir amperometrik biyosensör kullanılarak 0,1 ng/mL seviyesinde [82] ve bir piezoelektrik biyosensör tarafından 0,1 pg/mL seviyesinde tanımlanmıştır [83]. Virüslerin tespiti ve karakterizasyonu ve de miktarının belirlenmesi, sanitasyon ve gıda üretiminden teşhis ve terapötiklere kadar çok çeşitli uygulamalar için gereklidir [84, 85]. Dang virüsü, optik biyosensör [86], insan bağışıklık eksikliği virüsü (HIV) SPR, EIS biyosensörü [87, 88] ve Hepatit C virüsünün neden olduğu karaciğer iltihabı optik ve kuvars kristal mikroterazi (QCM) biyosensörü kullanılarak etkili bir şekilde tespit edilmiştir [89, 90].

2.1.5. Biyosensörlerde Güncel Modeller

2.1.5.1. Kuantum Nokta Tabanlı Optik Biyosensörler

Yarı iletken kuantum noktaları (KNo), kaydadeğer kararlılıkları ve mükemmel kuantum sınırlama etkileri nedeniyle *in vitro* (biyosensörler ve kimyasal sensörler) ve *in vivo* (girişimsel olmayan derin doku görüntüleme) hastalık teşhisi için en umut verici optik görüntüleme ajanlarıdır [91]. KNo'lar geniş uyarılma dalga boylarına ve dar boyutlanabilme (5-10 nm çap), ayarlanabilir emisyon spektrumlarına ve dar emisyon bant genişliklerine sahiptirler. Bu benzersiz özellikler, KNo'ların biyoloji, biyosensörler, elektronik ve güneş pilleri gibi çeşitli alanlarda kullanımını kolaylaştırır [92-94]. KNo'ların, peptidler, nükleik asitler veya hedefleme ligandları ile yüzey modifikasyonu ve dekorasyonu, bağlantı yoluyla yeni multimodal prob tabanlı biyosensörlerin geliştirilmesine ilham vermiştir. KNo'ların floresan yoğunluğu oldukça kararlı ve hassas olduğundan, kimyasal veya fiziksel etkileşime dayalı floresans transdüksiyonu, yüzeyde doğrudan fotoluminesan ya da sönmelenme ile oluşur. KNo'lar serbest iyonları, pH değerlerini, organik bileşikler ve biyomolekülleri (nükleik asitler, protein ve enzimler)

ve diğerk biyolojik molekülleri algılama olasılıkları sebebiyle geniş uygulama alanları bulmuştur [95-98]. Bazı KNo'ların toksik etkileri endişe yaratmaya devam etse de, KNo'ların doku mühendisliğinde enzimleri ve biyomolekülleri tespit etmek için uygulanmasındaki son gelişmeler, biyoalgılama araştırmalarında önemli başarılarıdır [99].

2.1.5.2. Karbon Nanotüp Temelli Biyosensörler

Karbon nanotüpler, benzersiz kimyasal ve fiziksel özellikleri, yapıları gereği kendilerine has özellikleri olan ve neredeyse her alanda kullanılan malzemelerdir. Karbon nanotüp bazlı biyosensörlerin en yeni ve umut veren tarafı ise, in vitro sistemlerde kanserin erken tespitinde kullanılmasıdır [100]. Spesifik antikorlarla kaplanmış karbon nanotüp yüzeyleri, ilgilenilen proteinleri veya virüsleri tespit etmek için kullanılabilir. Karbon nanotüpleri, dehidrojenaz, peroksidaz, katalaz, DNA, glikoz ve enzim sensörleri gibi potansiyel uygulamalar için geniş çapta incelenmiştir [101]. Karbon nanotüp bazlı elektrokimyasal dönüştürücülerin, nükleik asit tespiti için amperometrik enzim elektrotlarının, immünosensörlerin ve biyosensörlerin aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir [102]. Karbon nanotüplerin geliştirilmiş performansı, esnekliği ve özellikleri, örneğin hücre çoğalmasını ve desenlenmesini geliştirerek doku mühendisliğinin sınırlamalarının üstesinden gelmek için önemli bir alternatifi temsil edebilir.

2.1.5.3. MEMS/NEMS Temelli Biyosensörler

Biyosensörlerin minyatürleştirilmesine yönelik artan ihtiyaç, mikroeletromekanik sistemlere (MEMS), nanoeletromekanik sistemlere (NEMS) ve mikroakışkan veya çip üzerinde laboratuvar sistemlerine dayalı biyosensörlere olan ilginin artmasına neden olmuştur [103-105]. Bu tür minyatürleştirilmiş sistemler hem ekonomik açıdan hem kullanıcı açısından daha uygun olmaktadır. Yüzeyel alan artmasından kaynaklı daha doğru, analite spesifik, daha hassas ve güçlü biyoalgılama cihazları sağlar [106]. MEMS tabanlı biyosensörlerde kullanılan farklı yöntemler arasında mekanik, optik, manyetik, biyokimyasal ve elektrokimyasal sensörler bulunur. Mekanik MEMS biyosensörleri, yüzey gerilimindeki değişiklikler ve kütledeki değişiklikler olmak üzere iki faktörden birine dayalı olarak tasarlanmıştır. Manyetik MEMS biyosensörlerinde manyetik, paramanyetik veya ferromanyetik nanopartiküllerin konjugasyonu kullanılmış ve optik algılama yöntemlerinde organik boyalar, yarı iletken kuantum noktaları ve diğerk floresan problemler kullanılmıştır. Analitlerin konsol üzerindeki biyokimyasal reaksiyonu ve

adsorpsiyonu, yüzey stresinde değişikliklere neden olur. Elektrokimyasal MEMS tabanlı biyosensörler, potansiyometrik, amperometrik veya kondüktometrik algılamada kullanılmaktadır [107, 108].

2.1.5.4. Grafen Tabanlı Biyosensörler

Grafen bazlı biyosensörler, gösterdikleri iyi biyouyumluluk davranışları geniş spesifik yüzey alanı, düşük üretim maliyeti, yüksek elektrik iletkenliği ve iyi bir elektrokimyasal kararlılık özellikleri göstermesi sayesinde bilimsel ve teknolojik açıdan ilgi odağı olmuştur [109, 110]. Grafenin iki boyutlu yapısı sayesinde elektronik konjugasyon moleküler düzlemde desteklenir ve yüzeyini diğer kimyasal türler için optimum hale getirir. Bu nedenle grafen, doku mühendisliğinde çeşitli biyosensör cihazlarının imalatında tercih edilen bir seçenek haline gelmiştir [111, 112].

Grafen türevleri, özellikle 0D grafen kuantum noktaları (Gdots), grafen veya karbon liflerinden türetilen fotolüminesan malzemelerdir [113]. Gdot'lar, kuantum sınırlandırma ve geometrik kombinasyonundan dolayı çok benzersiz optik özelliklere sahiptir. Çoklu uyarma/emisyon spektrumuna sahip ultra nano boyutlu Gdot'lar, çeşitli kimyasal ve biyolojik analizler için elektronik, fotolüminesans, elektrokimyasal ve elektrokemilüminesans sensörlerinin imalatındaki uygulamalar için umut verici olabilirler [114]. Gdot'lar, yanıp sönme, düşük toksisite, yüksek fotokararlılıkları nedeniyle organik boyalar ve kadmiyum bazlı Qdots gibi diğer iyi bilinen optik görüntüleme ajanlarından daha üstündür. Bu benzersiz özellikler Gdot'un elektronik, elektrokemilüminesan, elektrokimyasal ve fotolüminesan sensörlerde kullanılmasına olanak tanır [115]. Elektronik sensörlerde G noktaları esas olarak tek elektronlu transistörlere dayanan yük sensörleri için kullanılırken, grafen alan etkili transistörlerde yaygın olarak uygulanır [116].

Grafen veya karbon fiberlerden mavi, yeşil, sarı ve kırmızı G noktalarını sentezlemek için çeşitli yöntemler rapor edilmiştir [113, 117]. G noktalarının renkleri, S ve N'nin boyutu, şekli, uyarımı, pH'ı, bant aralığı, oksidasyon derecesi, yüzey işlevselleştirmesi ve katkısı gibi temel faktörlerle ilişkilidir. Gdotlar, yük-yük etkileşimleri yoluyla, Ag^{2+} ve Fe^{3+} gibi herhangi bir pozitif yükü tespit etmek için çok uygun oldukları gibi ayarlanabilir özellikleri sayesinde de, enzim immobilizasyonu, ssDNA tespiti ve virüs alt gruplarının tespitinde kullanılmaktadır [118]. Gdots'un yüzeyinin altın dekorasyonu (Au) ile fonksiyonelleştirilmesi sonucunda H_2O_2 tespiti için geniş bir aralık ve düşük tespit limiti

sunmaktadır. Gdotlar, Cd^{2+} , sistein ve ATP'yi saptamak için elektrokemilüminesans sensörü olarak da kullanılmıştır [106]. Düşük sitotoksisite, düşük maliyet, mükemmel çözünürlük ve etiketleme kolaylığı da yeni elektrokemilüminesans sensörlerin geliştirilmesi için caziptir.

Önceki bölümde bahsedildiği gibi glikoz biyosensörleri doku mühendisliğinde hücrelerin metabolik aktivitesini sürekli ölçmek için kullanılabilir. Grafenin öncüsü olan grafen oksit (GO), fosfat tamponlu salinde (PBS) glikozu tespit etmek için yeni bir yüksek verimli enzimatik elektrot olarak kullanıldı [119]. Glikoz oksidazın (GOX) amin işlevselliği, GO'nun karboksil grubu üzerinden kovalent olarak bağlıdır. Kimyasal olarak indüklenen grafen ile immobilize edilen GOX'un elektrokimyasal davranışı ayrıntılı olarak incelenmiştir [120]. Hareketsizleştirilmiş GOX elektrodu, sabit elektron transfer kinetiği sayesinde doğal yapısını ve katalitik-kinetik aktivitesini korumuştur. Bunun yanında kimyasal olarak indüklenen grafenin elektrokatalitik aktivitesi, PBS'deki glikozun tespiti için gelişmiş elektrokatalitik aktivite göstermiştir. Böylece geliştirilen elektrot, harika hassas seçicilik ve tekrarlanabilirlik sergileyerek düşük maliyetli glikoz ölçüm cihazlarının üretiminde kullanım potansiyelini ortaya koymuştur. Bu sebeple grafen bazlı nanokompozitler glikoz biyosensörlerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır [121-124]. Grafen/altın nanopartikül (AuNP)/Nafion nanokompozit biyosensörü, glikoza tipik katalitik oksidasyon tepkisi göstermiş ve tepki, glikoz eklendiğinde artış göstermiştir [122]. Grafen bazlı glikoz biyosensörlerinin algılama etkinliği ve tespit sınırının GOD'un elektrokimyasal reaksiyonunu katalize etmek için gümüş nanopartikül (AgNP)/AuNP hibriti kullanıldığında da artış gözlenmiştir [125]. Geliştirilen biyosensörün uzun vadeli kararlılıkları 30 gün boyunca incelenmiş ve elektrotun GOX immobilizasyonundan sonra bile stabil kaldığını ve biyosensörün geniş bir doğrusal aralıkta hızlı tepki ve yüksek hassasiyetle çalıştığı rapor edilmiştir [123]. Bununla birlikte, Kang ve arkadaşları tarafından grafen/kitosan nanokompozit biyosensörünün standart sapması ve tespit limitinin platin nanopartikül (PtNP) yokluğunda düştüğü rapor edilmiştir [126]. İyonik sıvı ile modifiye edilmiş grafen elektrotlar mükemmel yanıt süresi, <5 saniye ile iyi hassasiyet sergilemiştir [127]. İyonik bir sıvıyla işlevselleştirilen grafen bazlı bir glikoz sensörü, birkaç hafta boyunca soğuk PBS'ye daldırıldıktan sonra hassasiyetini ve seçiciliğini korudu. Liang ve arkadaşları elektrokimyasal olarak dizayn edilmiş karboksilgrafenin glikoz afinitesi verimliliğini araştırmışlardır [121]. Tasarlanan biyosensör, 0.02 mM'lik bir hassasiyet ile glikoza

doğrusal tepki göstermiştir. Bu nedenle, grafen bazlı glikoz sensörlerinin doğası gereği oldukça hassas, seçici ve tekrarlanabilir olduğu görülmüştür. [128]. Sülfonlanmış polieteter-eter-keton (SPEEK) ile değiştirilmiş grafen kullanan bir glikoz biyosensörü, ürik asit (UA), askorbik asit (AA) ve dopamin gibi yaygın olarak var olan girişimci türlerin varlığında glikozu başarıyla tespit etmiştir.

Kolesterol ve esterleri, tüm insan ve hayvan hücrelerinin hücre zarlarının temel bileşenleridir. İnsan serumundaki kolesterolün normal sınırı 1,0 ila 2,2 mM aralığındadır ve kanda aşırı kolesterol birikmesi ölümcül hastalıklara yol açabilir. Ghohivand ve Khodadadian, kolesterolün tespiti için grafen/iyonik sıvı ile modifiye edilmiş camsı bir karbon elektrot biyosensörü üretmişlerdir [129]. Kolesterol oksidaz (ChOx) ve katalaz (CAT) ile modifiye edilmiş olan bu sensör problemleri oldukça hassas amperometrik analiz yapılmasına olanak sağlamıştır [130]. Hassasiyet ve tespit limitinin çalışmalarının iyi olduğu belirlenmiştir. ChOx veya kolesterol esteraz yokluğunda tespit limiti 0.5 nM olarak rapor edilmiştir. Bu tür biyosensörler, fizyolojik solüsyonlarda kolesterolün saptanması için harika hassasiyet ve doğrusal tepki sergilemişlerdir. Serbest kolesterolün tespiti için bu tür bir biyosensörün kullanılması, *in vitro* ölçümlerde kullanım için oldukça uygun görülmektedir.

Enzim elektrotları mükemmel hassasiyete, seçiciliğe ve tespit limitlerine sahiptir. Bununla birlikte, bu elektrotlar sınırlı tekrarlanabilirlik, yüksek maliyet ve enzim immobilizasyon işleminin karmaşıklığı gibi sorunlarla karşı karşıyadır. Enzim elektrotları ayrıca çözelti pH'ındaki, sıcaklıktaki ve toksik kimyasallardaki değişikliklere karşı da çok hassastır. Bu tür sınırlamaların üstesinden gelmek için enzim temelli olmayan biyosensörlerin kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır.

Grafen temelli elektrotlar kullanılarak biyomoleküllerin enzimatik olmayan tespiti, düşük üretim maliyeti, yüksek hassasiyeti ve uzun vadeli kararlılığı sayesinde büyük ilgi görmüştür. Li ve arkadaşları GO/MnO₂ nanokompozitlerini kullanarak H₂O₂'nin enzimatik olmayan bir tayin yöntemini çalışmışlardır [131]. Biyosensör, 0,8 M'lik bir tayin limiti ile 5–600 M'lik bir lineer aralık göstermiştir. Biyosensör, ortam iyonlarından (SO₄²⁻, Cl⁻, NO₃⁻, CO₃²⁻) ve sitrik asit gibi sıklıkla karışılan girişimci türlerden etkilenmemiştir.

2.1.5.5. Mikroakışkanlar ve Biyosensörler

Doku mühendisliği, yapay doku ortamını değerlendirmek için mikroakışkan sistemlerden oluşan yapıların geliştirilmesine ciddi oranda ihtiyaç duymuştur. Ortamın incelenmesi, gerçek zamanlı gözlem ve analizler doku mühendisliği açısından önemli hale gelmiştir. Güvenilir ve hassas mikro akışkan platformlar nanoteknolojik prosesler ile bu sebeple geliştirilmeye başlanmıştır. Bu tür platformların, tasarlanmış doku yapılarının işlevselliğini değerlendirmek için fizyolojik açıdan önemli olan bazı parametreleri düzenli bir şekilde izlemesi gerekmektedir. Mikroakışkan sistemler, mikro ölçekte kimyasal, fiziksel ve mekanik uyarıların hassas kontrolüyle spesifik organ yapıları oluşturmak için hücre oluşumunu yönlendiren çeşitli sinyalleri taklit edebilirler [132]. Ayrıca, mikroakışkan platformlar, küçük hacimli sıvıların (mikrolitreden nanolitreye kadar) yüksek verimli otomatik bir şekilde işlenmesine izin verir ve birkaç işlevi (örneğin, çoğullama yeteneği veya çok sayıda reaksiyonu gerçekleştirme olasılığı) tek bir taşınabilir cihazda birleştirirler [133]. Tüm bu faktörler, mikroakışkan özellikteki platformları doku mühendisliği açısından (özellikle organ-on-a chip olarak) *in vitro* doku modelleri için oldukça çekici hale getirmiştir. Bu bağlamda, son yıllarda yerinde uygulamalar (POC) için biyosensörlerin geliştirilmesi yönünde kaydedilen ilerleme, doku mühendisliği uygulamaları için de oldukça faydalı olabilecektir.

Son zamanlarda doku mühendisliği için biyosensör işlevselliğini mikroakışkan cihazlarla birleştiren birçok çalışma rapor edilmiştir. Weltin ve ark. Dinamik akış koşulları altında kültürlen T98G insan beyni tümör hücrelerinin metabolizmasını izlemek için çok parametrelili bir mikrofizyometri platformu sunmuştur [134]. Optik görüntülemeyi kolaylaştırmak için camdan bir mikroakışkan cihaz kullanılarak hücre odasına ve yukarı ve aşağı akış bölmelerine çok sayıda mikroüretim biyosensör entegre edilmiştir. pH değerleri, oksijen tüketimi ve hücresel metabolitlerin (laktat ve glikoz) üretimi harici cihazlar (örn. potansiyostat) kullanılarak izlenmiştir. Benzer şekilde Hu ve arkadaşları, insan meme kanseri hücrelerinin metabolizmasını gerçek zamanlı izleyebilmek için potansiyometrik bir sensörü (LAPS) mikroakışkan bir sisteme entegre etmişlerdir [135]. Sıcaklığı kontrol etmek ve çeşitli sıvıları işlemek için mikro ısıtıcılar ve mikropompalar da bu sistemlere entegre edilmiştir. Ek olarak empedans analizi sıklıkla doku mühendisliği yapılarında yapışık hücre davranışını incelemek için kullanılır. Sistem tarafından ölçülen elektriksel empedans, hücre sayısı, türü, durumu ve göçü gibi çeşitli hücresel parametrelerle ilişkilendirilir. Bu teknoloji hem laboratuarda üretilen

mikroakışkan sistemlerde hem de Applied BioPhysics Inc.'in ECIS Cultureware tek kullanımlık elektrot dizileri gibi ticari olarak temin edilebilen doku kültürü plakalarında başarıyla rapor edilmiştir [136-138].

Başarılı biyosensör teknolojilerinin doku mühendisliği platformlarına hızlı bir şekilde tanıtılması, araştırmacıların bunları mikroakışkan sistemlere düzgün bir şekilde entegre etmede çeşitli zorluklarla karşı karşıya kalması nedeniyle henüz başlangıç aşamasındadır [138]. Hücre kültürü ortamı, boyut ve konsantrasyon açısından büyük farklılıklar gösteren oldukça karmaşık molekül karışımları (küçük moleküller ve proteinler ve nükleik asitler gibi karmaşık moleküller) içerir. Bu nedenle biyosensörlerin büyük molekül popülasyonları arasındaki analitleri tespit edebilmesi için yüksek doğrulukta ve duyarlı olması gerekir. Bu sistemlerdeki hücre sayıları statik geleneksel standart kültürlerle karşılaştırıldığında genellikle çok düşük olduğundan, analitlerin üretim seviyeleri çok düşük olabilir. Yüzeyin biyolojik kirlenmesi ve hedef biyomoleküllerin biyosensör yüzeyinden farklı bölmelerde spesifik olmayan adsorpsiyonu, yanlış yanıt hatalarına ve duyarlılığın azalmasına neden olur. Mikroakışkan devrelerin yüzeyini pasifleştirmek için sıgır serum albümininden türetilen PEG'in kullanılması gibi stratejiler, sistem (doku mühendisliğiyle üretilmiş yapı) üzerinde öngörülemeyen etkilere sahip olabilir ve bundan kaçınılabilir. Bir yandan POC sistemleri genellikle tek bir cihazda aşağıdakiler de dahil olmak üzere çeşitli işlevler sunar: Örnekler: sıvı kullanımı, numune ön işleme (konsantrasyon, yıkama vb.), biyokimyasal analiz için çeşitli reaksiyonları gerçekleştirme yeteneği. Öte yandan, bu özelliklerin mikroakışkan hücre kültürü sistemlerine minyatürleştirilmesi ve entegre edilmesi, üretim ve operasyonel açıdan son derece zorlayıcı olabilir, ancak daha önce çeşitli girişimlerde bulunulmuştur [139]. Bu sistemlerin çoğu, numunenin testten sonra atıldığı uç nokta tespit cihazları olarak kullanılır. Bu nedenle, aynı (çok küçük) hacimdeki sıvı numuneler üzerinde birden fazla test gerçekleştirmek ve bunları hacmi boşa harcamadan gerçek zamanlı olarak kullanmak büyük bir zorluktur.

2.2. Lantanitler

Lantanitler veya nadir toprak elementleri (NTE), periyodik çizelgede geçiş metallerinin bir alt serisini oluşturan elementlerdir. Bu elementler periyodik çizelgede atom numarası 57 olan Lantanyum ile atom numarası 71 olan Lutetiyum arasında yer almaktadırlar [140]. 17.yüzyılda oksit bileşikleri şeklinde bulunduklarında gruplandırılmamış, oksitlerinin metale indirgenmesi çok zor olduğundan ve doğada benzeri olaya sık

rastlanmadığından bu elementler “nadir toprak elementleri (NTE)” olarak isimlendirilmiştir. NTE’ler özellikleri bakımından genel olarak birbirlerine yakın davranışlar gösterirler. Yoğunlukları 4,5 g/cm³’den 9.8 g/cm³’e kadar atom ağırlıkları ile orantılı olarak artar. Kristal yapıları hekzagonaldirler [Seryum(Ce), İterbiyum (Yb), Öropiyum (Eu) kübiktir]. NTE’lerin hepsinin üç değerli oksitleri mevcuttur. Genel olarak 1900-2400°C aralığında erirler [140, 141]. NTE’ler doğada saf metal olarak bulunmamaktadırlar ve prometyum dışındakiler de bileşik halindedir. NTE yatakları doğada birincil (volkanların etrafında ve granit kayalarda) ve ikincil (nehirler ve sahillerdeki plaserlerde) yataklarda bulunurlar [140-142].

Endüstride oldukça sık kullanımına rastladığımız NTE katkılı malzemeler, yaşamın neredeyse her anında kullanılmaktadırlar [143]. NTE’lerin kullanıldığı ürünler, yüksek sıcaklığa, aşınmaya ve korozyona karşı oldukça dayanıklı olup, hafif malzemelerdir [142, 144]. NTE’ler günümüzde, cep telefonu, diz üstü bilgisayar, modern tıp cihazları, optik lensler, fiber optik sinyal iletimi malzemesi, seramik sanayi, petrol rafineleri, televizyon üretimi gibi endüstriyel ve teknolojik ürünlerde kullanılmaktadırlar. Bunun yanında savunma sanayi sektöründe de ileri teknolojik ürün (gece görüş sistemleri, iletişim materyalleri, hassas güdümlü silahlar vb.) üretiminde kullanılmaları nedeniyle NTE’ler, yüzyılın stratejik ve vazgeçilmez elementleridir [143]. Bu sanayileşmiş ürünlerin veya endüstriyel malzemelerin çoğunda Eu nadir elementine de sıklıkla rastlanmaktadır. Eu, atom numarası 63 olan bir nadir toprak elementidir ve ergime sıcaklığı 822°C, kaynama noktası ise 1597°C olan süper iletken bir elementtir. Diğer lantanitlerde de olduğu gibi Eu doğada genellikle oksitlenmiş halde (+3), bazen de (+2) değerliğiyle bulunur ki bu özellik sadece Eu elementinde görülmektedir [145, 146].

2.2.1. Övropiyum (Eu) Elementi

Eu çok reaktif bir nadir toprak elementidir. Hızlı bir şekilde havadaki oksijenle tepkimeye girer. Su ile reaksiyonu ise $2Eu + 6H_2O \rightarrow 2Eu(OH)_3 + 3H_2$ şeklindedir [21].

Eu³⁺ hem üç değerli bir yapıya hem de (+2) değerli bir yapıya sahiptir. Bu iki değerli yapı diğer lantanitlerde çok sık görülmeyen bir durumdur [146]. Diğer lantanitler genel olarak (+3) yükseltgenme basamağında bileşikler oluşturur. (+2)’li durumda elektron diziliminin sonu 4f⁷ ile biter ve bu durum daha kararlı bir yapının oluşmasını sağlar. Eu (II) suda çözünmez [147] ve doğada serbest bir şekilde bulunmaz. Bazı mineraller Eu içerir ve bu mineralin en önemlileri de bastnazit (%0,12) ve monazit (%0,1)’dir. Eu, televizyon

(kırmızımsı-turuncu) ve enerji tasarruflu floresan ışıkları kullanılan fosforlarda, renkli televizyonlarda kırmızı renk oluşmasında, lazerlerde, avro ve diğer paraların sahtelerinden ayrılmasında ve nükleer reaktörlerde kontrol amacı için kullanılmaktadır [148].

L.S. Gomez-Villalba ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada Eu oksitlerini diğer nadir toprak elementlerine katkılanmışlar ve bu maddelerin ışık verici özelliklerinde ciddi oranda artış gözlemlemişlerdir. Eu oksitlerinin eklenmesiyle ışıldama verimi daha yüksek olmuş ve uzun süre kararlılık sağlanmıştır [149]. Eu ve benzeri elementlerin (Yb vb.), lüminesans özellikleri oldukça etkin ve güçlüdür. Kendi kendine yanıp sönme hareketi (blinking) yapmadıklarından bu durum onları, diğer lüminesantlara göre daha kullanışlı kılmaktadır.

Literatürde çoğunlukla Eu elementinin lüminesans özelliğinin oldukça fazla olması nedeniyle, biyomedikal ve analitik uygulamalarda görüntüleme ajanı olarak kullanıldığına rastlanmaktadır. Bu çalışmalar, Eu elementinin diğer nadir toprak elementlerine oranla toksitesinin oldukça az olduğunu göstermektedir [150, 151]. Eu nadir elementi tüm bu özelliklerinin dikkate aldığımızda, nadir toprak elementleri arasında en kullanışlı ve lüminesans özelliği ve de kolay işlenebilirliği bakımından deneysel çalışmalara oldukça uygun bir elementtir.

2.2.2. Yüksek Enerji Dönüşümlü (YED) Özellikli Nanopartiküller

Yüksek enerji dönüşümü yapan nanomalzemeler (YED) (Upconversion-UCNP), iki veya daha fazla foton tarafından uyarılıp düşük dalga boylarında emisyon yapan nanomalzemelere verilen isimdir. Bu malzemeler günümüzde oldukça popüler hale gelmekte ve yeni nesil floroforlar olarak adlandırılmaktadırlar [152]. Genellikle spektrumun kızılötesi bölgesinden absorbe olunup görünür ya da ultraviyole bölgeye yayılma olur. Bu duruma da yüksek atom dönüşümlü ışıldama veya upconversion lüminesans denir [152, 153].

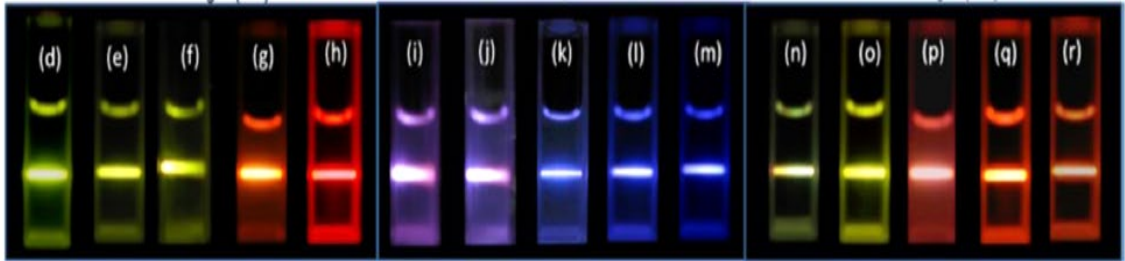
YED'lerin bazı kendilerine has özelliklerinden ve katkılандığı malzemeye kazandırdığı bir takım özelliklerden dolayı, ilerleyen zamanlarda biyomedikal görüntülemede ve teragnostik uygulamalarda oldukça popüler hale geleceği düşünülmektedir [154]. YED'ler, verimlilik olarak lineer olmayan çoklu foton absorplayıcılarından (kuantum noktacıklar veya organik boyalar vb.) farklı ve oldukça üstündür. Bu yapılar birden fazla foton absorplayıp eş zamanlı olarak daha uzun süre ve gürültüsüz bir şekilde lüminesans

yaparlar. Bu özellikleri de onları diyot lazerlerde kullanmaya elverişli kılar ki bu da maliyet olarak oldukça düşüktür ve bu durumda ultra kısa süreli foton uyarıcı pahalı lazerlere olan ihtiyacı ortadan kaldırır [155].

YED'ler benzersiz frekans çevirme özellikleri sayesinde, günümüzde kullanılan floroforlara üstün gelmektedirler [156].

Bu özelliklerini sıralayacak olursak;

- Biyogörüntüleme için, sinyal\gürültü oranı yok denecek kadar azdır.
- Yüksek anti-stokes kaymaları sayesinde foto lüminesansları, uyarılma dalga boylarından kolayca ayırmamızı sağlar.
- Dar emisyon bant genişlikleri sayesinde çoklu görüntüleme yapılabilir, bu da uzun vadeli görüntülemeler için olanak sağlar.
- Foto blokaja karşı yüksek direnç gösterirler.
- Renk ayarlanabilir konsantrasyonlara sahiptirler. Farklı renk skalası oluşturarak incelemeler yapılabilir.



Şekil 2.2. NaYF₄'ün farklı lantanitler ile katkılanması sonucu oluşan renk aralığı ve lüminesans renk görünüşleri [154].

Bunlara ek olarak, YED'ler yanıp sönme hareketi yapmazlar. Yakın kızılötesi ışığını absorpladıkları için derin doku nüfuzuna olanak sağlarlar ve derin dokunun görüntülenmesinde oldukça yararlı bir yöntem olarak karşımıza çıkarlar [156]. Tüm bu özellikleri YED'leri iyi birer biyogörüntüleme ajanı yapmaktadır. YED'ler Zhu ve arkadaşları tarafından MCF-7 tümör hücrelerinin *in vivo* görüntülenmesinde, Liu, Maji ve arkadaşları tarafından farelerde farklı organların görüntülenmesinde, Xing ve arkadaşları tarafından da anjiyografi ve aterosklerotik plak görüntüleme çalışmalarında kullanmış ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir [157].

Özetle YED'ler; renk kontrollerinin yapılabilirdiği, seçilmiş dalga boyunda spesifik çalışmalara olanak sağlayan, biyo-işaretleyici, biyosensör olarak kullanılabilinen, yüksek kontrastlarda görüntülemeye olanak sağlayan, sonuç tespitleri, ilaç salımı ve terapilerinde kullanılan yeni nesil nanoteknolojik teknikler ve kimyasal süreçlerin kullanımı sonucu sentezlenen ve gelecek vaat eden yapılardır.

2.3. Silika Nanopartiküller

Nanoteknolojinin biyomedikal alandaki önemli bir rolü, canlı sistemlerin inorganik ve organik malzemelerle etkileşimini nano ölçekte bu alanda irdeleyebilmektir. Silika nanopartiküller (SiNP'ler), bu bağlamda, kolay işlenebilirlikleri açısından ilgi çekici biyomalzemelerdir.

Silika nanopartiküller, nanopartikül türleri arasında, nano yapı oluşturma, ilaç yükleme ve optik görüntüleme ajanları olarak tercih edilmektedirler [158]. Silika temelli nanopartiküller, aşağıdaki nedenlerden dolayı üzerinde çok çalışılan malzemelerdendir.

- Silika düşük hücre sel biyotoksisiteye sahiptir,
- Enkapsülasyonu kolaydır,
- SiNP'ler oda sıcaklığında sentezlenmesi kolaydır,
- SiNP'lerin boyutu kolayca ayarlanabilir,
- Yüzeyi kolay modifiye edilebilir,
- Sentez parametrelerinin kolay ayarlanması, dar boyut dağılımına sahip olmasını sağlaması (monodisperse NP'ler),
- Silika NP'lerin biyolojik çözeltiler içinde kararlı olmaları,
- Çevre dostu malzemeler olmaları [158-161].

Kolloidal silika sentezlenmesindeki kolaylık, parçacıkların büyüklükleri ve dağılımları konusundaki keskinlik sebebiyle sıklıkla kullanılmaktadır [162]. Stöber ve arkadaşları, tek boyut dağılımına sahip (monodisperse) küresel silika partiküllerin basit bir sentezini rapor etmiştir [163]. Sentez alkol, su ve amonyak (katalizör) karışımı içinde tetraetil ortosilikatın (TEOS) hidroliz ve yoğunlaşmasıyla başlatılmıştır. Bu metot, silika alkoksitlerin, Si(OR)_4 (R, genel formülü $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ olan bir gruptur), hidrolizi reaksiyonu sonucunda siloksan (-Si-O-Si-) grupları oluşturup birbirine yakın çapta küresel, nano veya mikro boyutlarda silika yapıların sentezini oldukça basit bir şekilde sunmaktadır.

Reaksiyon bazik pH aralığında gerçekleşirken, elektrostatik itme kuvveti sayesinde, kondenzasyonu gerçekleştirmiş türlerin yanı sıra, ilgili türlerin monomerleri de oluşturmaktadır. Böylece topaklaşma engellenmekte ve çözünmeyen parçacıklar sol-jel içerisinde oluşmaktadır. Metot genel olarak, çözücü, silika-alkoksit ve katalizör içermektedir. Bunların yanı sıra boyut kontrolü için yüzey aktif malzemeler de kullanılabilir. Silika kaynağı olarak genellikle TEOS, çözücü olarak etil alkol ve katalizör olarak amonyak veya amonyum hidroksit literatürde sıkça kullanılmaktadır [164].

2.3.1. Biyomedikal Uygulamalarda Silika Temelli Nanopartiküller

SiNP'ler, üstün biyoyumlulukları ve kontrol edilebilir yapıları nedeniyle geçtiğimiz yıllarda biyomedikal uygulamalarda büyük ilgi görmüştür [165]. Bu nanopartiküllerin *in vitro* koşullarda kullanımı da belirtilen özelliklerinden dolayı bilim insanlarının tercih sebeplerindendir. Bu tür bir kullanım için partikül boyutu, morfoloji ve gözenek çapı, uygulama hedeflemesi için dikkate alınması gereken bazı önemli özelliklerdir. Yüzey topolojisi, asimetriklik, gözenek geometrisi, yapısal birleştirme ve kapsülleme bileşimi diğer bazı özel önemli özellikleridir [166]. Silika nanopartiküllerin kullanımında basit yüzey modifikasyonu, silika nanopartiküllerin tercih edilmesinin en önemli özelliklerinden biridir. Yüzey modifikasyonu ayrıca, geri dönüşü olmayan topaklaşmaya neden olan yüksek yoğunluklu yüzey silanol gruplarından dolayı, özellikle silis için zor olan, çeşitli ortamlarda yeniden dağılım ve koloidal kararlılığa izin verir [167]. Gözeneksiz silika NP'lerin boyutu ve şekli mükemmel bir şekilde kontrol edilebilir [168, 169]. Her silika nanopartikülün, optik özelliklerinden yararlanmak için farklı işlevler içeren benzersiz bir yapıya sahiptir. Bu avantajlar, silika nanopartiküllerinin, yalnızca görünür ışığı değil aynı zamanda yakın kızılötesi ışığı kullanarak *in vivo* olarak mikro ve nano seviyeye kadar güçlü ve gelişmiş optik görüntüleme elde edilmesine olanak tanır [170]. Silika malzemeler özellikle polimerlerin kompozitlerinin hazırlanmasında dolgu maddesi olarak kullanılır. Yüzey alanlarının yüksekliği ve kolay işlenebilir olmaları, iyileştirilmiş termal özellikleri, mekanik özgülük gibi fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip malzemelere olan ilginin artmasıyla büyük ilgi çekmiştir [171]. Silika nanopartiküller, daha fazla özellik elde etmek ve görüntüleme uygulamaları için terapötik yetenekler ve multimodalite elde etmek için diğer malzemelerle entegre edilebilir [172]. Yüksek biyoyumlulukları, hidrofilitiklikleri, yüksek taşıma kapasitesi ile yüzey

modifikasyonu için muazzam esneklikleri ve uzun kan dolaşımı süreleri ile öne çıkarlar [168].

2.3.2. Biyoanalitik Uygulamalarda Silika Temelli Nanopartiküller

Biyokonjuge silika nanopartiküller araştırılmış, doğrulanmış ve birçok biyokimyasal tahlil tekniğinde uygulanmıştır [173]. Silika ve boya katkılı silika bazlı nanopartiküller ile silika kaplı manyetik çekirdek kullanmak bunlardan bazılarıdır. Bu nanopartiküller kullanılarak DNA, bakteri ve çeşitli kimyasalların tespiti yapılabilir [174]. Bu nanopartiküllere uygulanabilen protein biyokonjugasyon kabiliyeti, biyoanaliz ve tahlil yaklaşımlarında büyük bir kolaylık ve gelişme sağlamıştır. Doğru şekilde kullanıldığında silika bazlı nanopartiküllerin çok yönlülüğü, bu yüksek oranda kullanılan potansiyelin ana nedenlerinden biridir. Polimerik nanopartiküller, hidrofobik olmaları ve biyouyumsuzlukları nedeniyle biyoanaliz için pek uygun olmamakla birlikte, diğer yandan silis, onu çok çekici bir alternatif substrat yapan çeşitli özelliklere sahiptir. Mikrobiyal saldırıya maruz kalmazlar ve ortamdaki hidronyum iyonlarından etkilenmezler (pH dalgalanmaları etkilemez) kimyasal değişikliklerle şişme veya gözenek yapılarında değişiklik olmaz. Bunların yanında silikalar, kimyasal olarak inert malzemelerdir ve optik olarak şeffaftırlar. Silika partiküllerinin kabuğu, dış ortamın partiküllerin çekirdeği üzerinde etkisini sınırlayarak bir izolatör görevi görebilir [175].

2.3.3. Silika Temelli Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu

Uygulama hedeflerine bağlı olarak bilim insanları yüzey aşılama için çeşitli işlev grupları kullanırlar. Avidin-biotin bağlantı köprüsü, disülfid bağlanması, siyanojen bromür, karbodiimid bazı örneklerdir. Bunlardan yüzeye amin gruplarının eklenmesi, özellikle herhangi bir biyomolekülün protein olarak yüzeye eklenmesi amaçlandığında, en yararlı olanlardan biridir. Silika bazlı nanopartiküllerin yüzeyine amino grupları eklemek için çeşitli tekniklerdir. Silika bazlı nanopartikülleri işlevselleştirmeyi konjuge ve konjuge olmayan aşılama olmak üzere iki ana teknik kategoriye ayırabiliriz.

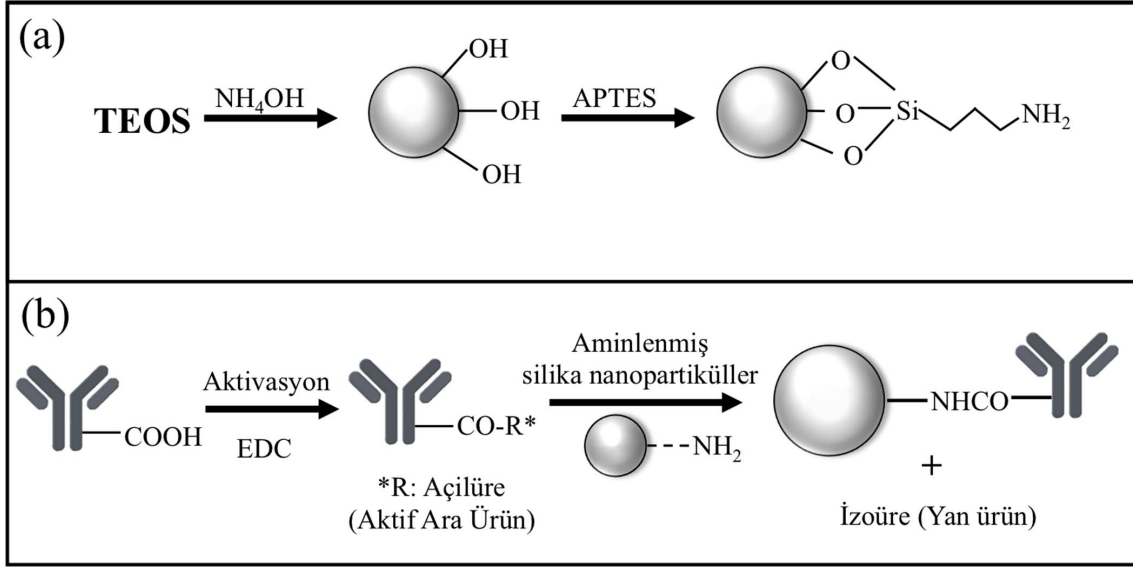
2.3.3.1. Konjuge Olmayan Bağlanma

Yüzeye amino gruplarının eklenmesi, çeşitli proteinlerin silika yüzeyine bağlanmasına yönelik işlevselleştirme için geniş yöntemlerden biridir. Amin grupları, reaksiyonlarda kendini katlamış, katalitik, ayırma ve biyolojik uygulamalardaki yüksek verimli ajanlar olmalarının yanı sıra daha karmaşık fonksiyonel grupların sentezine izin veren belirli

molekülleri, amin ile reaksiyona sokma kabiliyetleri nedeniyle seçilmiştir [176]. (3-aminopropil) dimetil etoksi silan (APDMES) veya 3-(aminopropil) trietoksisilan (APTES) kullanımı, amin grubunu silika nanopartiküllere aşlamak için yaygın olarak kullanılan iki malzemedir. Ancak, bu amaçla APTES veya APDMES kullanmanın çeşitli yöntemleri vardır [176-178].

2.3.3.2. Konjuge Bağlanma

Silika nanopartiküller üzerindeki proteinleri (enzimler veya antikorlar gibi) immobilize etmek için etkili bir biyokonjugasyon yaklaşımı, parçacık yüzeyini amin-reaktif gruplarla kimyasal olarak değiştirmektir. Yüzeydeki serbest amin grupları, nanopartiküllere kovalent olarak bağlanır ve kovalent olarak bağlanmış silika-nanopartikül komplekslerinin oluşmasına neden olabilir. Silika nanopartiküller başlangıçta trimetoksisilil-propildietilentriamin (DETA) ile silanize edildikten sonra süksinik anhidrit ile modifiye edilir. Karboksilatlanmış yapılar deiyonize su ile uzaklaştırılır. Nanopartikülleri daha da değiştirmek için Bangs Labs protokolünü temel alan iki farklı yaklaşım kullanılabilir. Bunlardan ilk proses nanoparçacıkların yüzeyinde aktif ara maddeler oluşturmak için bir aktivasyon tamponu içinde karbodiimid hidroklorürü kullanır. Biyomoleküller üzerinde mevcut olan amin grupları daha sonra nanopartiküllerin uygun bir konsantrasyonda bir biyomolekül çözeltisine daldırılmasıyla amin bağları yoluyla modifiye silika nanopartiküllerine bağlanır. İkinci bir yaklaşımda, karboksil ile modifiye edilmiş silika nanopartiküllerine karbodiimid hidroklorür ile birlikte suda çözünür N-Hidroksisüksinimit bileşikleri eklenebilir. N-Hidroksi bileşiği tarafından oluşturulan aktif ester ara maddesi, hidroliz için daha kararlı aktif ara maddenin yerini alır, böylece biyomoleküllerin nanopartiküllere konjugasyon verimliliğini artırır. Bu yöntemler, biyomoleküller ve silika nanopartikülleri arasında biyomoleküller inaktif hale gelene kadar devam edebilen kararlı bir bağlanma sağlar [179].



Şekil 2.3. Amino grup ile partikülün karboksil grup üzerinden bağlanması [179].

2.4. Telomeraz

Telomeraz, guaninden zengin tekrarlayan dizilerin eklenmesiyle telomer uzunluğunun korunmasından sorumlu enzimdir. Telomeraz enzimi, katalitik bir alt birim olan telomeraz ters transkriptaz (hTERT) molekülünü içerir [159]. Telomerazın katalitik protein bileşeni yalnızca spesifik germ hattı hücrelerinde, yenilenme dokularının proliferatif kök hücrelerinde ve kanser hücrelerinde eksprese edilir [161, 180]. Telomer uzunluğu ve yapısı, ters transkriptaz telomeraz ve telozom (shelterin) olarak adlandırılan bir multiprotein telomer kompleksi tarafından korunur [181]. Telomeraz aktivitesi, gametlerde, kök ve tümör hücrelerinde fazla miktarda bulunur [180]. Telomeraz aktivitesinin eksikliği, devam eden telomer kısalmasına neden olur ve deoksiribonükleik asidin (DNA) hasar sinyalleri yoluyla hücresel yaşlanmaya veya ölüme yol açar [50]. Ökaryotik kromozomların uç kısımlarına telomer adı verilir [182]. Telomerlerin hücresel kendini yenilemede çok önemli olduğunu bilerek, telomer bakımından sorumlu mekanizmalar kanser hastalıklarında çok önemli bir role sahiptir ve önemli onkolojik biyobelirteçler olabilir [183]. Karmaşık telomer/telomerazın benzersiz bir hedef olduğu ve kanser hücrelerinde oldukça spesifik olduğu konusunda pek çok çalışma yapılmıştır [184]. Telomer/telomeraz sistemi, hücrenin proliferatif aktivitesine müdahale etmek için iki olasılık sunar:

1. Telomeraz aktivitesini inhibe ederek telomer muhafazasının inhibisyonunu sağlar,
2. Rezidüel telomeraz enzimini aktive etmek veya telomeraz ekspresyonunu indüklemeye olanak sağlar [185].

Örneğin, Amelia E. Hochreiter ve meslektaşları, GRN163L tedavisinin, farklı genetik geçmişlere sahip farklı tümör alt tiplerini temsil eden bir dizi meme kanseri hücresi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu inceleme sonunda ‘*Telomeraz inhibisyonu gösteren meme kanseri hücreleri aynı zamanda koloni oluşumunda ve tümör oluşumunda da önemli bir azalma gösterdi*’ şeklinde bir rapor hazırlamışlardır [186].

Telomerazın fazla ekspresyonu, insan fibroblast dokuları ve normal epitelial hücrelerinde tümör oluşumunu tetikler. Telomerazın buradaki spesifik görevi hücrelere sınırsız çoğalma kapasitesi kazandırmasıdır. Çoklu onkogenlerin mutasyonlarının engellenmesi ve tümör oluşum mekanizmalarının baskılanmasında yaşlanmak önemli bir rol almaktadır [185, 186]. Son yıllarda yapılan çalışmaların verilerine göre, tümör ihtiva eden bölgelerin %85’inden fazlasında telomeraz aktivitesi tespit edilmiştir [187].

2.4.1. Telomeraz Tayininin Erken Kanser Teşhisindeki Rolü

Telomeraz iki molekülden oluşan bir ribo-nükleoprotein ters transkriptazdır. Vücut hücrelerinde aktivitesi bulunmayan ancak embriyonik ve erişkin kök hücrelerinde bulunan bir enzimdir. Son araştırmalar, telomeraz aktivasyonunun hücrelölümsüzlüğe ve kansere neden olabileceğini, telomeraz inaktivasyonunun ise hücrelölümsüzlüğü hızlandırabileceğini göstermektedir [188, 189]. Şimdiye kadar keşfedilen, insanlarda bulunan kötü huylu tümör hücrelerinde, kanser hücrelerinin %85-90’ı normal hücrelerdeki aktivitesi aşırı derecede bastırılırken, telomeraz ekspresyonunu yükseltmiştir. Bu da telomerazı hem kanser teşhisi ve prognoz değerlendirmesi açısından değerli bir biyobelirteç yapar hem de hücrelölümsüzlüğünün kontrolünde aktif bir rol oynadığının göstergesidir. Sınırsız bir şekilde büyüyen çok sayıda farklı kanser hücresi tipinde telomeraz aktivitesi tespit edilmiştir. Telomeraz aktivitesi çoğu somatik insan hücresinde bastırılırken, mide kanseri [190], kolorektal kanser [191], rahim ağzı kanseri [192], pankreas kanseri [193], meme kanseri [194], ürotelyal kanser [195, 196] ve yüksek riskli nöroblastom [197] dahil olmak üzere kanser hücrelerinin %85’inden fazlasında yüksek telomeraz seviyesi gözlenmektedir [198].

Tüm bu çalışmaların ışığında telomerazın doğru ve hassas bir şekilde tespit edilmesinin, terapötik açıdan oldukça önemli olduğu ve gelecek yıllarda kanser teşhis ve tedavilerinde insanlara oldukça fayda sağlayacağı görülmektedir.

2.4.2. Telomeraz Tayin Yöntemleri

Kanserli ve normal hücrelerdeki telomeraz aktivitesini, telomer uzunluğunu belirlemek, ölçmek için birçok metot bulunmaktadır. Bu algılama sistemlerinde ölçülen sinyaller, floresan [199, 200], kolorimetri [201], yüzey plazmon rezonansı (SPR) [202], elektrokimya [203], kemilüminesans [204, 205] ve benzerlerini içerir.

2.4.2.1. Telomerik Tekrar Amplifikasyon Protokolü (TRAP)

Telomeraz tayin yöntemlerinden en yaygın olan metot telomeraz ürünlerinin amplifiye edildiği ve PCR ile ölçüldüğü polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı telomerik tekrar amplifikasyon protokolleridir (TRAP'ler). Bu yöntem 1994'te Kim ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. TRAP, telomerazın ters transkriptaz aktivitesini tespit eden biyokimyasal bir tayin yöntemidir. Ancak bu yöntemin en büyük handikabı miktar saptamasının çok hassas olmamasıdır. TRAP'da karşılaşılan zorlukları aşabilmek ve uygulamayı kolaylaştırmak için TRAP-eze ve TRAP-eze-Elisa kitleri geliştirilmiştir [206].

Telomeraz aktivitesi, çoğu somatik hücrede tespit edilemeyecek kadar az olduğundan TRAP yöntemi hücre sayısı sınırlandığında oldukça hassas ölçümler yapabilmektedir. TRAP analizi üç basamaktan oluşur; uzatma, amplifikasyon ve telomeraz ürünlerinin tespitidir. Uzatma adımı esnasında telomeraz substratına (aslında telomerik olmayan bir oligonükleotid) telomeraz tarafından telomerazın tekrarları eklenir. Amplifikasyon aşamasında uzatma ürünü, spesifik primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilir ve tespit aşamasında telomerazın varlığı veya yokluğu elektroforez ile analiz edilmektedir. Ancak PCR ve jel elektroforez işlemleri zaman alıcıdır ve kontaminasyona açıktır ve bu gibi durumlar hatalı sonuçlara yol açabilmektedir. Daha iyi bir hassasiyet, güvenilir bir analiz aralığı ve tekrarlanabilirlik açısından bazı çalışmalar yapılmış ve analizlerde PCR içermeyen telomeraz tespit yöntemleri rapor edilmiştir. Alternatif olarak, son yıllarda biyoanalitik kimya ve malzeme bilimindeki ilerlemelerle birlikte birçok yeni telomeraz testi ortaya çıkmıştır. Hirose ve ark. TMA/HPA yöntemini önermişlerdir. Bu yöntemin uygulanması kolay ve hızlıdır. Ayrıca klinik örneklerden kaynaklanabilecek TRAP inhibitörlerinden de az miktarda

etkilenir. Bu yöntem, RNA'ya hibritlenen ve hibritleşmeyen problemlerin diferansiyel hidrolizine ve telomeraz tarafından uzatılan primere bir promotörün eklenmesine dayanmaktadır [207]. Yajima ve arkadaşları hTER'in ifade edilme düzeyini saptamak için RT-PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Bu sistemde spesifik PCR ürününün değerlendirilmesinde DNA polimerazın 5'→3' ekzonükleaz aktivitesinden yararlanılır [208]. Fletcher ve arkadaşları primerin parçalanmamış çekirdek içerisinde uzatılmasını sağlayan bir sistem geliştirmişlerdir. İnsan T-lösemik hücrelerinden izotonik olarak izole edilen çekirdeklerdeki telomeraz aktivitesi çok düşük bir düzeydedir. Ancak dört kadar TTAGGG telomerik tekrar dizisini ekleyebilir. Telomeraz aktivitesinin doğal ortamında araştırılması, enzimin işlevine yeni bir ışık tutabileceği gibi yeni telomeraz inhibitörlerinin değerlendirilmesi için de kullanışlı bir sistem olduğu düşünülmüştür [209].

2.4.2.2. Altın Nanopartiküllerle Telomeraz Tayini

Telomeraz tayini için kullanılan diğer yöntem de yüzey güçlendirilmiş Raman saçılmasıdır. Bu yöntemde, plazmonik duyarlılığa sahip sorgulama sinyali SERS kullanılarak, TEC-SERS (telomerik uzama kontrollü yüzey geliştirilmiş Raman saçılması) olarak adlandırılan diğer yöntemlere kıyasla PCR içermediği için kullanımı daha az handikaplı olan telomeraz tespit sistemi geliştirilmiştir.

Altın temelli nanoyapılar, kolay sentezlenmeleri, iletkenlik özellikleri ve ayarlanabilir boyutları gibi bir takım özellikleri sayesinde biyolojik analizlerde tercih edilmektedir [210]. Floresan deneyleri yoluyla telomeraz tespiti için kayda değer avantajları olan algılama yöntemlerinden biridir. Bu metotlara Yüzey Geliştirilmiş Raman Saçılma (SERS) yöntemi [211], lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) yöntemi ve gömülü mikro elektro mekanik sistemler (MEMS) örnek olarak verilebilir. Verici ve alıcı arasındaki mesafe belirli bir reaksiyondan sonra büyüdüğünde, FRET (Floresans Rezonans Enerji Transferi) kaybolur ve tespit için bir sinyal olarak floresan geri kazanımı ölçülebilir [212]. Bu nedenle, yerinde telomeraz tespiti için birçok AuNP tabanlı nanoproblar geliştirilmiştir [213].

Bunlardan başlıca olanı, Gao ve arkadaşlarının, telomeraz aktivitesini tespit etmek için SERS yöntemi ile yaptıkları bir çalışmadır. Bir nükleik asit işaretçisi (SNAB) kullanarak tümör hücrelerini saptayabilmişlerdir [214]. SERS yönteminde, tek molekül seviyesinde bile oldukça yüksek hassasiyetle, hedef analitin kayda değer oranda moleküler ve yapısal

bilgisine ulaşılır [215]. Bu yöntemde çok iyi sinyaller üretebilen altın veya gümüş nanopartiküller kullanılıyor. Bir çalışmada telomerazın varlığında Au etiketli NP'ler üzerinde immobilize edilen TS primerlerine telomerik tekrarlar eklenir. Kanseri hücresi ekstraktları zayıf bir sinyal üretirken normal hücreler bir SERS sinyali üretir [216]. Lei ve ark. boya etiketli hairpin DNA ipliklerini ve tek altın nanopartiküller üzerinde TP'ler içeren süper hairpin bileşenlerini hareketsiz hale getirerek telomeraz aktivitesini hassas bir şekilde tespit etmek için bir DNA yürüteç sentezlemişlerdir [217].

2.4.2.3. Gümüş Nanopartiküllerle Telomeraz Tayini

Gümüş nanomalzemeler, basit sentez, iyi fotokararlılık ve bariz parlaklık gibi özelliklere sahiptirler ve floresans ve SPR'nin gelişmiş etkilerinden dolayı sıklıkla algılamada kullanılırlar [218]. Zhu ve arkadaşları, AgNC'leri kullanarak telomeraz aktivitesini saptamak için bir çalışma dizayn etmişlerdir [219]. Bu çalışmada, DNA ile modifiye edilmiş AgNC'ler, telomerazın primerlerinin dizilerini ve primer uzantısının tamamlayıcı dizilerini içermektedir. Bu dizayn ise önceden tasarlanmış olan DNA dizilerinin varlığında AgNO₃'ün yapıda indirgenmesiyle elde edilmiştir.

2.4.2.4. Grafen Oksitler ile Telomeraz Tayini

Grafen Oksit, uzun vadeli nanometre floresan söndürme kabiliyetine sahip suda çözünür düzlemsel bir malzemedir ve DNA'yı enzimatik bölünmeden koruyabilir [220, 221]. Bunun yanında, grafen, kimyasal kararlılık sayesinde, elektron dağılım yapısı, büyük delokalize bağları sayesinde Raman geliştirilmiş kimyasal mekanizma (CM) için de kullanılmaktadır [222].

Xia ve ark. telomeraz ve microRNA-21'i (miR-21) tespit etmek için grafen oksit (GO) bazlı bir floresan sensör (GOFA) tasarlamışlardır [223]. Sonuç olarak, farklı kanser tiplerinde yapılan çalışmalar, telomeraz aktivitesinin tanısal bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Telomeraz inhibisyonu ile özellikle kısa telomerli tümör hücrelerinde yaşam süresinin kısalması, ölümsüzleşmede ve kanser gelişiminde telomeraz reaktivasyonunun rol aldığını desteklemektedir [224]. Bu noktada telomeraz aktivitesinin tayini büyük bir önem teşkil etmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışması iki temel başlıkta özetlenmiştir, bu kapsamda i) anti-transferrin ile modifiye edilmiş silika nanopartiküllerin sentezi ve transferrin tayininde biyosensör amaçlı kullanımının incelenmesi, ii) anti-telomeraz ile modifiye edilmiş yüksek enerji dönüşümlü silika nanopartiküllerin sentezi ve telomeraz tayininde biyosensör ve/veya biyogörüntüleme amaçlı kullanımının incelenmesine ait sonuçlar incelenmiştir.

Günümüzde kullanılan ve yaygın olan problemleri, fiyat, performans, toksisite ve kullanım zorluğu bakımından göz önüne aldığımızda, bu yeni nesil lantanit temelli silika problemlerin sentez ve üretim aşamalarının iyileştirilmesi, uygun çözeltiden hedef molekülün tayinini yapabilecek bir biyosensör olarak kullanılması ve gerektiğinde herhangi bir malzemenin ölçümünü yapmaya olanak sağlayacak bir platform geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmanın ilk basamağında kullanılan hedef protein yapı, transferrin molekülüdür. Transferrin, organizmada ferrik demir (Fe^{3+}) formunun ana taşıyıcısıdır. Demir homeostazında organizmada oldukça önemli bir rolü vardır. Demir iyonu, vücutta birçok fizyolojik mekanizmaya katıldığı için hayati unsurlardan biri olarak kabul edilmektedir. Demir iyonu organizmada kritik rollere sahiptir. Bunlardan bir kaç, hayati olan oksijenin taşınması, deoksiribonükleik asitin (DNA) sentezi ve elektron hareketliliğini sağlamasıdır [225]. Bu nedenle de transferrin analizinin biyoanalitik yaklaşımlarda önemi her zaman vurgulanmıştır. Tüm bu önemli rollerden dolayı da, organizmada transferrin veya demir seviyesinin ölçülmesi birçok hastalığın yorumlanması açısından biyomedikal yaklaşımların ilgi odağı haline gelmiştir.

Araştırmanın ilk basamaklarında, transferrin antikorlarının silika nanopartikül yüzeyine bağlanması hedeflenmiştir. Transferrin antikor kaplı silika nanopartiküllerin biyomedikal ve biyoanalitik uygulamalarda yaygın olarak kullanılabileceği öngörülmüştür. Bu amaçla, fonksiyonel grup olarak amin grubunu nanopartikül yüzeyine eklemek için bir dizi kimyasal yöntemler kullanılmıştır.

Bu doğrultuda;

1. Silika nanopartiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve boyut optimizasyonu,

2. Anten etkisini arttırıcı ve yapının kararlılığını sağlayacak (ligand) organik malzemenin sentezi,
3. Lantanit -N-metakriloil-L-aspartik asit (MAAAsp) komplekslerinin hazırlanması,
4. [SiNP] ve [SiNP]NH₂ nanopartiküllerinin sentezi,
5. [SiNP]NH₂ nanopartiküllerine transferrin antikor immobilizasyonu
6. SiNP@Eu- MAAAsp nanopartiküllerinin sentezi,
7. SiNP@Eu- MAAAsp nanopartiküllerinin aminlenmesi,
8. Aminli-(SiNP@Eu)NH₂ silika nanopartiküllerine telomeraz antikorların immobilizasyonu
9. Nanoprobalar ile antijenlerin etkileşim koşullarının testleri
10. Hücre deneylerinin yapılması hedeflenmiştir.

Genel olarak geliştirilen problemlerin sentezinde, silika partiküllerin sentezi ve lantanitlerin bu partiküllere homojen dağıtılması, çekirdek-kabuk (core-shell) morfolojisinin sentezi ve bu yapı üzerine kimyasal etkileşimler ile antikor molekülünün bağlanması ve ortamda bulunan hedef molekülün belirlenmesi metodları yer almıştır.

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve makine-ölçüm cihazları;

Amonyak (NH₄OH) Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir. Sodyum hidroksit (NaOH), N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC), N-hidroksisüksinimid (NHS), tetraetilortosilikat (TEOS), amonyum okzalat monohidrat [(NH₄)₂C₂O₄.H₂O], evropium klorür heksahidrat (EuCl₃.6H₂O), terbiyum(III) nitrat pentahidrat [Tb(NO₃)₃.5H₂O], (3-aminopropil) trietoksisilan (APTES), sodyum bikarbonat (NaHCO₃), sodyum klorür (NaCl), agaroz, fosfat tamponu (pH 7.2), L-aspartik asit, metakriloil klorür, benzotriazol, 1,4-dioksan ve setildimetiletil amonyum bromür (CTAB) Sigma Aldrich firmasından (St. Louis, Missouri, ABD) temin edilmiştir. Antikor (Tavşan anti-Telomeraz monoklonal antikor), antijen (PrEST Antigen TERT) Merck Millipore (Burlington, ABD), karşılaştırma boyası Cy2@green

[(Keçi Anti-Tavşan IgG H&L (Cy2 ®)] ABCAM-UK, kimyasal parçalama tamponu ThermoFisher (Waltham ABD) firmasından temin edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında yapılan deneysel süreçlerin doğrulanmasında ve analizlerin yapılmasında kullanılan cihazlar ve kullanıma gerekçeleri ise aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3.1 Tez çalışması aşamasında kullanılan cihazların listesi

Cihazın Adı		Marka ve Modeli	Kullanım Amacı
Taramalı Elektron Mikroskobu		QUANTA 400F Field Emission	Sentezlenen malzemenin morfolojisinin anlaşılması ve morfoloji değişimlerinin incelenmesi
Yüksek Geçirimli Mikroskobu	Kontrastlı Elektron	TEM-CEI Tecnai G ² Spirit BioTwin	Sentezlenen malzemenin morfolojisinin anlaşılması ve morfoloji değişimlerinin incelenmesi ile birlikte yapıda bulunan kontrast farkından sistemin yorumlanması, core-shell yapının görülmesi
Zeta Boyut Ölçer		Malvern-NanoZs	Nanopartikül modifikasyonu sonrası hidrodinamik boyut dağılımına ve boyuta etkisinin araştırılması
Zeta Potansiyel Ölçer		Malvern-NanoZs	Nanopartiküllerin yüzey yükünün modifikasyon ile değişiminin incelenmesi
Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi		Hyperion 1000- IFS/66S	Nanopartiküllerin kimyasal yapısının belirlenmesi, modifikasyon sonrası değişimlerin anlaşılması
UV Spektrometre		Thermo-Scientific-1000	Nanopartiküllerin modifikasyonun absorbanla elde edilen algoritma üzerinden araştırılması
Floresans Spektrometre			Nanopartiküllerin yüksek enerji dönüşümünün uyarılması ve emisyon bantları üzerinden anlaşılması ve modifikasyon sonucu absorban ile

			değişimlerden malzeme hakkında nicel ve nitel yorum yapabilme
Elektroforez		ChemiDoc	Deney gruplarının protein düzeyinde incelenmesi ve tanımlanması
EDAX veya EDS Dedektörü	QUANTA 400F Field Emission- Tecnai BioTwin	TEM-FEI G ² Spirit	Nanopartiküllerin yüzeyinin taranması ile elementel düzeyde analiz edilmesi

3.1. İmmünoafinite Silika Nanopartiküllerle Transferrin Tayini

3.1.1. Silika Nanopartiküllerin Sentezi

Silika nanopartiküller (SiNP), literatürde bu sentez yönteminde en çok atıf almış olan çalışmaların sahibi Stöber'in yöntemine göre sentezlenmiştir [163]. Özetle, 50 mL etanol 50 mL ultra saf su, 250 mL boyunlu balonda homojen bir çözelti elde edilen kadar karıştırılmıştır. Ardından, 10 mL amonyum hidroksit (0.5 M) ve 5,0 ml tetraetil ortosilikat (TEOS) eklenerek 500 rpm karıştırma hızında 12 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 12 saatin sonunda oluşan çözelti santrifüj edilip etanol ile yıkanmış ve 50°C'de vakumlu etüvde kurumaya bırakılmıştır.

3.1.2. Silika Nanopartiküllerin (SiNP) Amin Gruplarıyla Fonksiyonelleştirilmesi

Önceden hazırlanmış olan silika nanoyapılar (bknz. 3.1.1), bu aşamada aminlenip, antikor ile modifiye edilmiştir. Belirli miktarda alınan silika nanoyapılar (4 mg), etanol:su (4:1) çözeltisinde disperse edilip homojenize edildikten sonra, uygun miktarlarda SiNP: APTES (10:1 v/v) damla damla karışıma eklenir ve 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılır. 1 saatin ardından, çözeltiye uygun miktarlarda (APTES:NaOH v/v) 5:1 amonyum hidroksit (0.5M) çözeltisi eklenir ve 12 saat çözeltinin olgunlaşması beklenir. Yüzeyi amin grupları ile modifiye edilmiş silika nanopartikül molekülleri vakumlu etüvde 50°C tamamen kurutulduktan sonra elde edilir.

3.1.3. Aminli [(SiNP)NH₂] Silika Nanopartiküllerin Transferrin Antikoru ile Modifikasyonu

Aminlenmiş silika nanoyapılar, de-iyonize su içinde disperse edilmiş ve EDC/NHS ile aktifleştirilmiş antikor (20:1 mol/mol) ile oda koşullarında 12 saat manyetik karıştırıcıda (500 rpm) karıştırılmıştır. 12 saatin ardından, silika nanoyapılar 9000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, elde edilen [(SiNP)NH₂]+AntiTra partiküller alınmıştır. Süpernatantlar antikor bağlanma kapasitesinin belirlenmesi amacıyla saklanmıştır. Alınan pelletler de-iyonize su içinde (10 mL) disperse edilmiş ve bir sonraki aşama için saklanmış ve kullanılmıştır.

3.1.4. [(SiNP)NH₂]+AntiTra Silika Nanopartiküllerle Transferrin Etkileşim Koşullarının Optimizasyonu

Bu aşamada 250 µg/mL derişimde modifiye edilmiş silika nanoprobolar, derişimi bilinen transferin standart çözeltileri (31,25-62,50-125,0-250,0 µg/mL) ile etkileşime sokulmuştur (25°C sıcaklık ve pH 7,2'de). 10 mL'lik falkon tüplerde, 1 mL silika nanopartikül çözeltisi ve 1 mL standart çözeltileri içeren analiz çözeltisi vorteks yardımı ile etkileşime sokulmuştur. 2 dakika süren bu işlem sonunda falkon tüpler santrifüj edilmiş, süpernatant kısmından 3 µL numune alınarak nanodrop UV-spektrometresinde ölçümler yapılarak, etkileşimden önceki absorbanslar arasında kayda değer değişikliklerin olup olmadığı incelenmiştir. Bu deneyin yanı sıra, transferin antijeni için nanopartiküllerin farklı ortam koşullarındaki etkileşim kabiliyetini sınamaya yönelik, pH, sıcaklık ve etkileşim süresinin prob-antijen etkileşimine etkisi incelenmiştir. Bu farklı koşullarda 250 µg/mL derişimindeki silika nanopartiküller ile yine aynı derişimde antijenler etkileşime sokulmuştur. Farklı pH, sıcaklık ve etkileşim süresi ortamlarında alınan sonuçlar incelenmiş ve rapor edilmiştir.

3.1.5. [(SiNP)NH₂]+AntiTra Silika Nanopartiküllerle Yarışmalı Afinite Testleri

Modifiye edilmiş silika nanoproboların sadece transferin ihtiva eden çözelti ortamında, antijene karşı ilgileri analiz edilmiştir. Bunların yanında, nanopartiküllerin kompleks sıvı karışımlarında ortamda bulunabilecek herhangi bir proteine karşı olan ilgileri ve transferine karşı olan ilgileri değerlendirilerek yarışmacı protein ortamında etkileşimler incelenmiştir. Bu analizler için, ovalbumin, γ-globulin ve albumin proteinleri kullanılmıştır. Belirli derişimlerde, spektrum taramaları yapılmış, absorbans değerleri kayıt edilmiştir. Daha sonra belirli miktarda silika nanoprobolar ile karışımı yapılmış

çözeltiler vorteks yardımı ile muamele edildikten sonra, santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımlarından alınan örneklerin yine aynı dalga boyunda absorbands değerlerine bakılmış ve azalan derişim miktarlarına paralel olarak absorbands değerleri yorumlanmıştır.

3.2. Yüksek Enerji Dönüşümlü Silika Nanopartiküller ile Telomeraz Tayini

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

Yüksek enerji dönüşümü özelliği olan lantanit katkılı silika nanoyapıların sinyal sürelerinin uzatılması için ortama anten görevi görecek bir molekül yerleştirilmesi gerekmektedir. Bu sebeple, uygun molekül olarak MAAsp molekülü seçilmiştir. 5,52 mmol, (0,73 g) L-aspartik asit, 1 M NaOH sulu çözeltisinde deney tüpü içinde çözülmüştür. MA-Bt (metakriloil benzotriazol) çözeltisi içeren 1,4-dioksan (25 mL) yavaşça aminoasit çözeltisi içine eklenmiştir. Karışım, reaksiyonun tamamlanması için oda sıcaklığında 20 dakika boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyon bittiğinde vakum altında 1,4-dioksan buharlaştırılarak final çözeltiden (karışımdan) uzaklaştırılmıştır. Çökelti su ile seyreltilmiş ve reaksiyon sonucu oluşan 1H-benzotriazol, etil asetat (3 x 50 ml) ile uzaklaştırılmıştır. Toplanan sulu monomer çözeltisi %10'luk HCl çözeltisi kullanılarak pH 6,0-7,0 olacak şekilde nötrleştirilmiştir. Döner buharlaştırıcı ile su yapıdan uzaklaştırılarak reaksiyon ürünü MAAsp monomeri (açık sarı renkli çökelek) elde edilmiştir.

3.2.2. Eu^{3+} -MAAsp Floresans Kompleksinin Hazırlanması

Eu lantanit tuz kompleksi, MAAsp fonksiyonel monomeri ile 1:3 (mol/mol) oranında karıştırılmasıyla oluşturulmuştur. Bu amaçla, MAAsp (3 mmol) ve kompleks oluşmasını kolaylaştıran ajan olarak amonyum oksalat monohidrat, (0.5 mmol, 71 mg), 20 mL deiyonize su içinde çözülmüştür. pH, NaOH'ın (1 M) damla damla eklenmesiyle kompleks oluşumu için en uygun pH olan pH 6,0-7,0 aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra, 5 mL deiyonize su içinde çözülen Eu^{3+} (1 mmol, 435 mg) iyonu önceki çözelti içerisine damla damla ilave edilmiştir. Karışım daha sonra 24 saat boyunca 150 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve oluşan beyaz çökelti (kompleks kristalleri) süzülerek çözeltiden toplanmıştır.

3.2.3. SiNP@ Eu^{3+} -MAAsp Nanopartiküllerin Sentezi

Önceden hazırlanmış olan, Eu^{3+} -MAAsp (1:3) kompleksi, 1:1 oranında, etanol:su (4:1) çözeltisinde homojenize edildikten sonra, uygun miktarlarda (10:1 v/v) damla damla

silika karışımına eklenmiş ve 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 1 saatin ardından, çözeltiye 1 mL amonyum hidroksit çözeltisi (5M) eklenmiş ve 12 saat çözeltinin olgunlaşması beklenmiştir. Karışımdan yüzey aktif malzemelerin ayrılması için 8:2 etanol/HCl (0,1 M) (v/v) ile muamele edilmiş ve vakumlu etüvde kurumaya bırakılmıştır.

3.2.4. SiNP@Eu³⁺-MAAsp Nanopartiküllerin Aminlenmesi

Sentezlenen SiNP@Eu³⁺-MAAsp nanopartiküllerinden 4 mg alınmış, 10 mL distile su içinde 30 dakika boyunca ultrasonikatör kullanılarak disperse edilmiş ve homojen bir çözelti hazırlanmıştır. Homojen çözelti oluştuğunda, bu çözelti içine, APTES oranı 10:1 (w/w) oranında olacak şekilde damla damla eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda 24 saat boyunca 500 rpm’de karıştırılmıştır. Daha sonra bu çözelti 3 defa distile su ile yıkanmış ve 10000 rpm dönme hızında santrifüjle çöktürülmüş ve oluşan pellet vakumlu etüvde 50°C’de 24 saat boyunca kurutulmuştur.

3.2.5. [(SiNP@Eu³⁺-MAAsp)NH₂] Nanopartiküllerin Anti-Telomeraz ile Modifikasyonu

Daha önce transferrin antikorunun bağlanma deneylerinde yapıldığı gibi modifiye edilmemiş silika nanoyapıların yüzeyleri aminlenerek [(SiNP@Eu³⁺-MAAsp)NH₂] yapıları elde edilmiştir. Bu yapıların yüzeylerine telomeraz antikoru yine bağlayıcı bir karbodiimid (EDC/NHS) yardımı ile bağlanmıştır. Bağlanma veriminin araştırılması ve optimum aralığın bulunması için ise antikor standartları oluşturulmuş ve bunlar ile 250,0 µg/mL derişimdeki [(SiNP@Eu³⁺-MAAsp)NH₂] yapıları etkileşime sokulmuştur. Deneysel prosedür ve kullanılan reaktiflerin derişimleri transferrin antikorlarını bağlamak için uygulanan prosedürün benzeri olmuştur.

3.2.6. SDS-PAGE Çalışmaları

Ticari olarak elde edilen, antikor (tavşan anti-telomeraz antikor), antijen (PrEST Antigen TERT) ve karşılaştırma boyası Cy2@green (Keçi Anti-Tavşan IgG H&L (Cy2 ®) preadsorbed) son derişimleri 125 ug/uL olacak şekilde, belirli oranlarda YED nano proplar ile (250 µl/ml) etkileştirilmesiyle ayarlanmıştır. Bu deney gruplarına ek olarak da gerçek kanser hücresi hatlarından (HeLa ve MCF-7) ekstrakte edilen ve derişimleri bilinmeyen solüsyonlar kullanılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 Elektroforez numunelerinin derişimleri

Numune Adı	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	Miktar (μL)
Boş Silika	250	25
Silika@YED	125	25
YED@Antikor	125	25
YED@Antikor+Antijen	125	25
Antikor+Antijen	125	25
Cybergreen@Antikor	125	25
Cybergreen@Antikor+Antijen	125	25
HeLa-T	---	25
YED@Antikor+HeLa-T	125	25
Ticari Antijen	125	25
MCF-7-T	---	25
YED@Antikor+MCF-7-T	125	25

Jel-elektroforez analizi için ilk adımda, 100 mL hacmindeki bir behere 25 mL soğutulmuş elektroforez tamponu (TBE) eklenmiş ve çözelti hızla karıştırılırken 1,125 g yüksek çözünürlüklü (HR) agaroz tozu yavaş yavaş eklenmiştir. Homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılmış ve beher plastik bir kapak ile kapatılarak havalandırma için küçük bir delik açılmıştır. Beher mikrodalgada 3 dakika "düşük" güçte ısıtılmış ve ardından "yüksek" güce geçilmiştir. Burada önemli olan nokta, çözeltinin dökülmesine neden olmayacak bir şekilde gerçekleştirilmiş olan kısa atımlarla ısıtma işlemidir. Isıtma ile oluşan köpük, büyük kabarcıklar haline geldiğinde bu köpükler birkaç saniye sonra kaybolmuştur. Bu durum, agarozun hazır olduğunu göstermektedir. Ardından, jel, jel aparatına (kasete) dökülmüş, oda sıcaklığında katılaştıktan sonra, kullanmadan önce $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika soğumaya bırakılmıştır. Her şeride 25 μL numune yüklenmiş ve 1 saat boyunca 200 V'ta çalıştırılmıştır. De-iyonize su ile hazırlanmış 0,1 M NaCl çözeltisi ile nazikçe çalkalayarak 20 dakika boyunca jel boyanmıştır. Bantları görüntülemek için, BIO RAD-CHEMIDOC cihazı 350-380 nm dalga boyu kullanılmıştır.

3.2.7. [(SiNP@Eu³⁺-MAA_{sp})NH₂]+Anti-Telo Nanopartiküllerin Telomeraz Antijenleri ile Etkileşimi

Antikor ile seçicilik özelliği kazandırılan [(SiNP@Eu³⁺-MAA_{sp})NH₂] partiküllerinin antijen yakalama kabiliyetlerinin sınanması için, derişimi bilinen ticari telomeraz antijenleri ve derişimleri bilinmeyen gerçek kanser hücre hatlarından (HeLa ve MCF-7) ekstrakte edilen telomerazlar kullanılmıştır. Bu aşamada, 250 µg/mL YED probolar ile derişimleri bilinen (12,50-25,50-100,0-200,0 ve 400,0 µg/mL) ve derişimleri bilinmeyen HeLa ve MCF-7 hücrelerinden ekstrakte edilen telomeraz antijenleri etkileşime sokulmuş ve 10 dakika rötarda bekletildikten sonra 1 dakika vorteks yardımı ile karıştırılarak belirlenen analizler yapılmıştır.

Bu deneyler için MCF-7 ve HeLa hücre hatları seçilmiştir. Hücrelerden, 2. pasajlarından ortalama 1x10⁶ olacak şekilde birer vial kullanılmıştır. Bu hücrelerden telomeraz ekstraksiyonu yapabilmek için literatüre uygun deneysel çalışmalar tertip edilmiştir [226]. Buna göre, RNase içermeyen 1,5 mL hacimli tüplere alınan hücreler soğuk PBS ile 2 defa 1800 rpm hızında 5 dakika yıkanmıştır. Süpernatant dikkatlice ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler, buzda bekleyen 200 µL kimyasal parçalama (liziz) tamponuna alınmış ve 30 dakika yatay çalkalayıcıda buz içinde bekletilmiştir. Daha sonra 12000 rp değerinde 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatlice alınmış ve -80°C’de saklanmıştır. Daha sonra bu numuneler YED probolar ile etkileşim için spektrometrik ve elektroforez analizleri için kullanılmıştır.

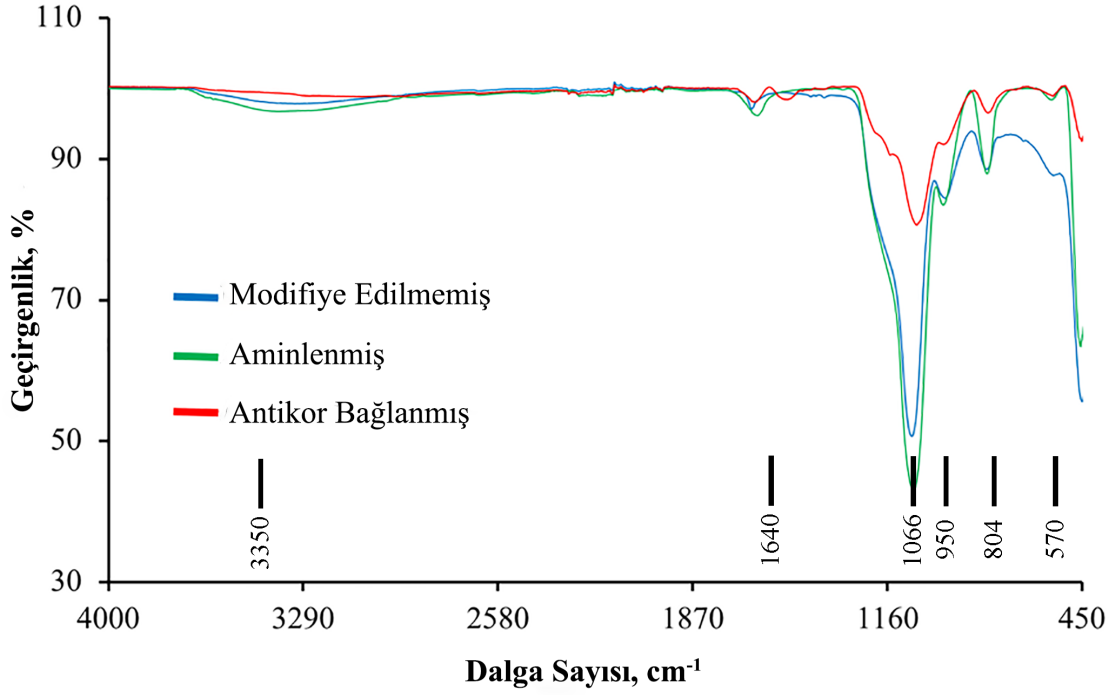
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. İmmünoafinite Özellikli Silika Nanopartiküllerle Transferrin Tayini

4.1.1. Silika Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizleri

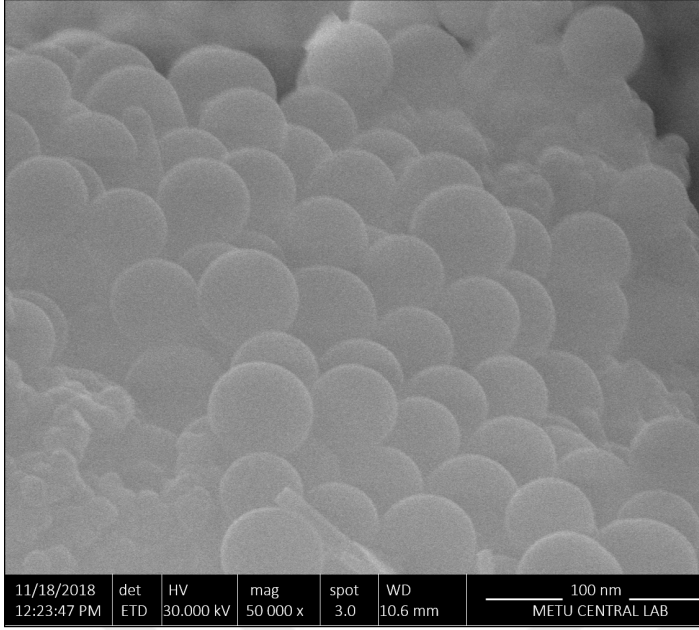
Çalışmanın bu bölümünde, boş silika nanopartiküllerinin, aminlenmiş silika nanoprtiküllerinin $[(\text{SiNP})\text{NH}_2]$ ve antikor bağlı final ürünlerinin FTIR-ATR spektrumları incelenmiştir. Bu sonuçlara göre, spektrumlarda kayda değer değişimler, beklenen yönde gözlemlenmiştir. Şekil 4.1. incelendiğinde, boş SiO_2 nanoprobaları, Si-OH'nin asimetrik eğilme ve gerilme titreşimine ait 950 cm^{-1} 'deki bandın yanı sıra, Si-O-Si asimetrik gerilmelerine karşılık gelen 1080 cm^{-1} 'de bir temel banda sahiptir. Öte yandan, amin ile işlevselleştirilmiş SiO_2 nanoprobaları (mavi çizgi), amin gruplarının [227] asimetrik titreşimine ait 1640 cm^{-1} civarında ekstra geniş bir banda sahiptir ve bandın genişliği, dahil edilen SiO_2 yapısında ayrışmamış su moleküllerine karşılık gelir [228]. Karşılaştırmalı sonuçlar, amino gruplarının SiO_2 parçacık yüzeyine başarılı bir şekilde dahil edildiğini göstermiştir. Ek olarak antikor moleküllerinin immobilizasyonuna göre yeni önemli bantların açıkça gözlemlendiği, amino işlevselleştirilmiş ve antikorla dekore edilmiş SiO_2 nanoprobaların spektrumlarının karşılaştırılmasında da görülmektedir. Bu bağlamda, boş, amino işlevselleştirilmiş ve antikorla dekore edilmiş SiO_2 nanoprobaları arasındaki açık farklar, spektrumlarda yeni bantların ortaya çıkışının yanı sıra mevcut bantlarda kaymalar/genişlemeler olarak ortaya çıkmıştır. 454 cm^{-1} , 570 cm^{-1} , 1066 cm^{-1} ve 804 cm^{-1} civarındaki SiO_2 (Si-O-Si veya Si-OH) gruplarına karşılık gelen bantların yoğunlukları, antikor dekorasyonundan sonra önemli ölçüde değişmiştir. Sonuçlar, ATR yaklaşımının analiz edilen yüzeydeki fonksiyonel grubu ve ayrıca yüzeyler boyunca antikor moleküllerinin homojen immobilizasyonunu/dekorasyonunu taradığı analiz yönteminin doğasına bağlıdır. Bant yoğunluklarındaki bu varyasyonlara ek olarak, protein spektrumlarında yaygın olarak amid I/II titreşimine karşılık gelen 1544 cm^{-1} civarında yeni bantlar görülmüştür [229]. Ayrıca, protein yapılarındaki amid bağları ile ilgili yapıya dahil olan yeni karbonil ($-\text{C}=\text{O}-$) grupları nedeniyle, bandın 1658 cm^{-1} civarındaki yoğunluğu önemli ölçüde artmıştır. Özetle, silika bazlı nanoprobalar başarılı bir şekilde sentezlenmiş ve karakterizasyon analizleri ışığında homojen bir şekilde modifiye edilmiştir.



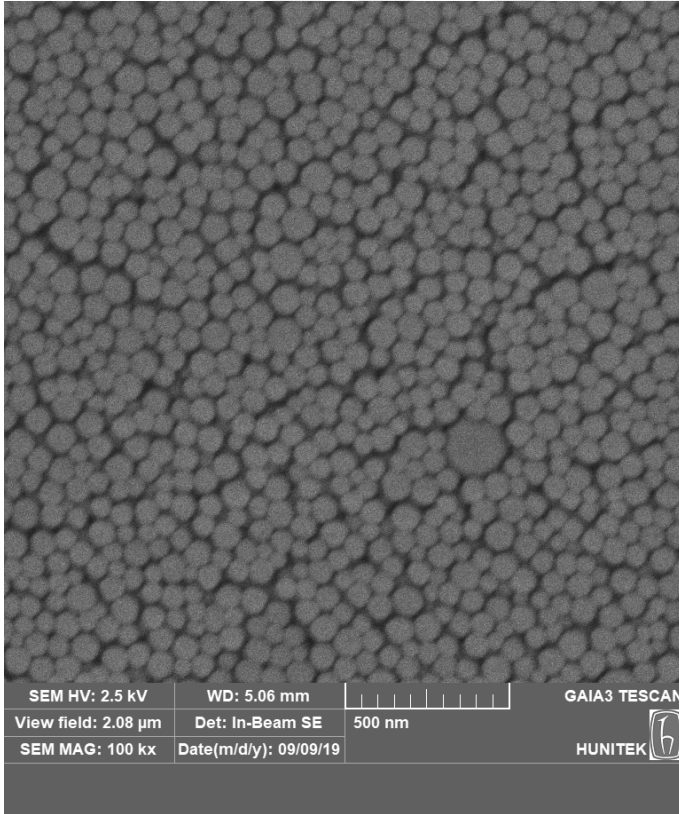
Şekil 4.1. Mavi renkli çizgiler (üstüste çakışık) $[(\text{SiNP})\text{NH}_2]$ ve kırmızı çizgi ise sadece SiNP'yi temsil etmektedir.

4.1.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri

Sentezlenen silika nanopartiküllerin boyutları ve morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. SEM analizine göre (Şekil 4.2), nanoprobaların boyut dağılımı Image J yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Boyutlar 91.6 ± 22.6 nm'lik dağılıma sahiptir. Boyut dağılımı yüksek monodispersitede olup, 70-120 nm aralığında rapor edilmiştir. Aminlenmiş silika nanopartiküller ise şekil 4.3'te incelenmiştir. Burada amin ile fonksiyonelleştirmenin morfolojide ciddi değişikliğe yol açtığı söylenemez. Partikül boyutları da boş silika nanoyapılarının boyutları ile neredeyse aynı çıkmıştır.

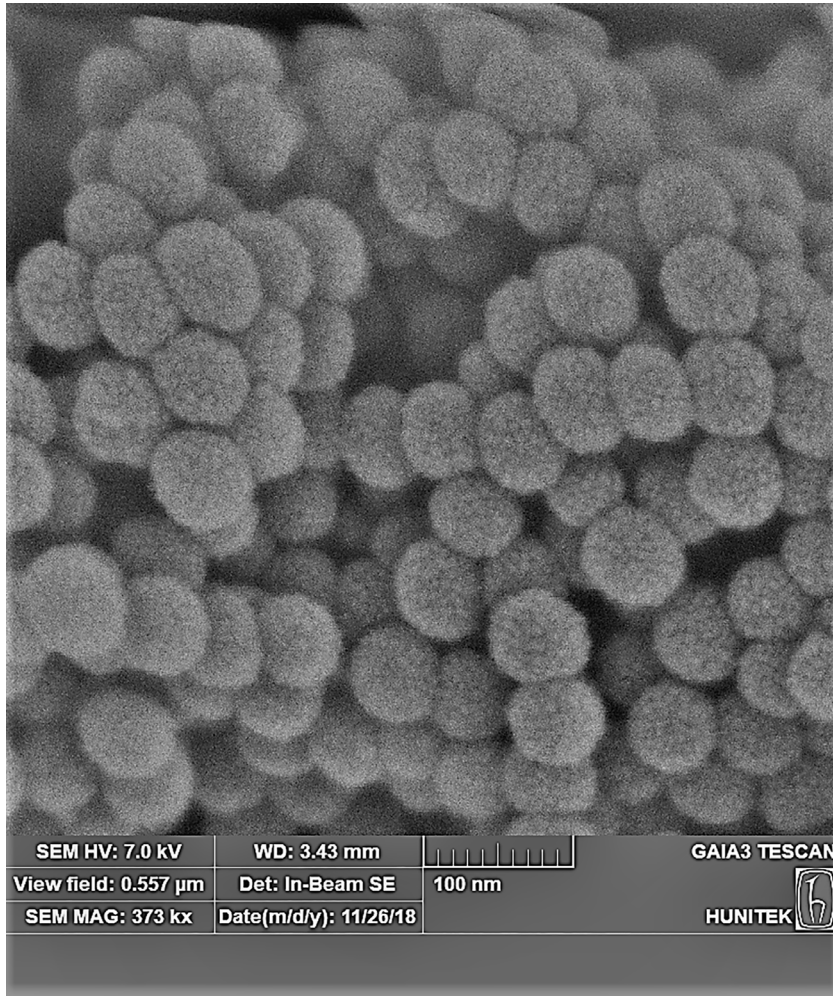


Şekil 4.2. Boş silika nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri, 3,0 kV voltaj ve 50 kx yakınlaştırma.

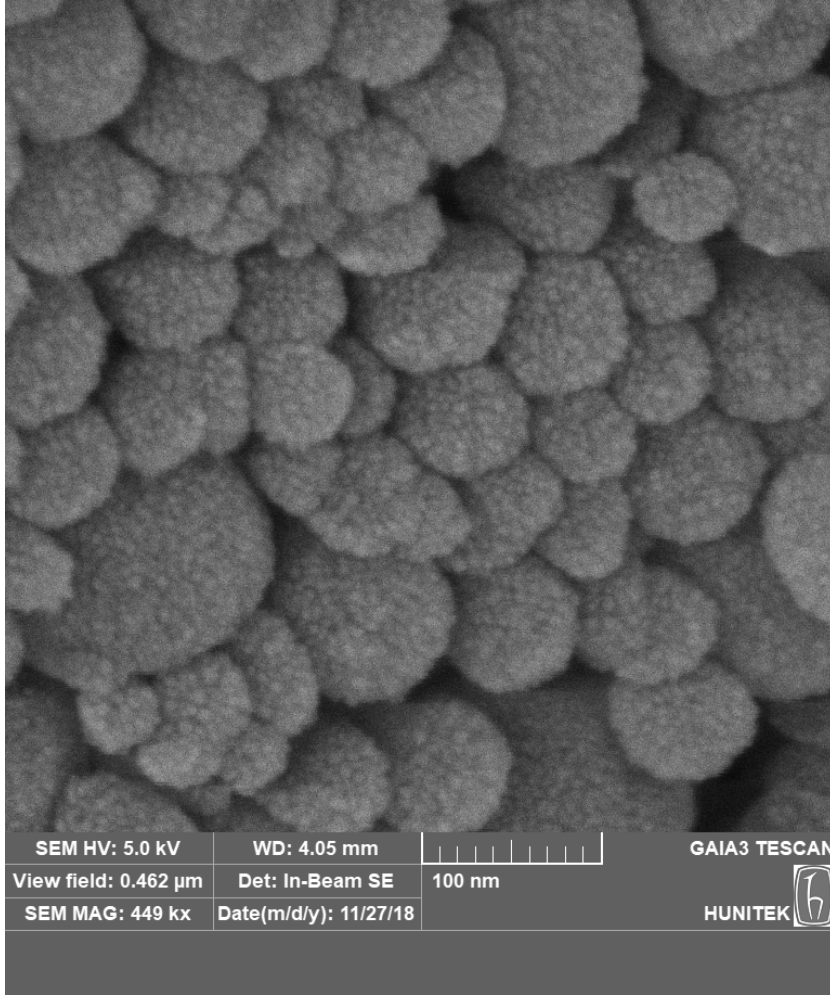


Şekil 4.3. Aminli silika nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri, 5,0 kV voltaj ve 449 kx yakınlaştırma.

Şekil 4.4 ve 4.5’de silika nanopartiküller modifikasyon sonrası taramalı elektron mikroskobu ile morfoloji incelemeleri yapılmıştır. Yüzey morfolojisinde kayda değer oranda değişimler elektron mikroskobu incelemelerinde tespit edilmiştir. Yüzeyleri pürüzsüz olan silika yapılar, modifikasyon sonrası yüzey pürüzsüzlüğünü yitirmişlerdir. Partikül boyutlarında ise ciddi değişimler olmamıştır. Modifikasyon sonrası ölçeklerine göre image-J programından partiküller incelenmiş ve modifikasyonun partikül boyutuna etkisi yaklaşık 22 nm civarında olmuştur.



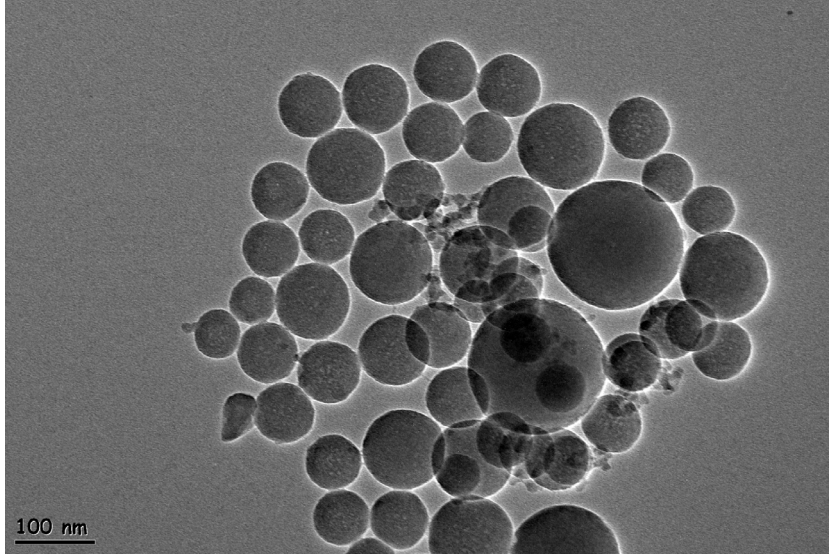
Şekil 4.4. Anti-transferrin ile modifiye edilmiş (SiNP@NH₂) nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri, 7,0 kV voltaj ve 373 kx yakınlaştıma.



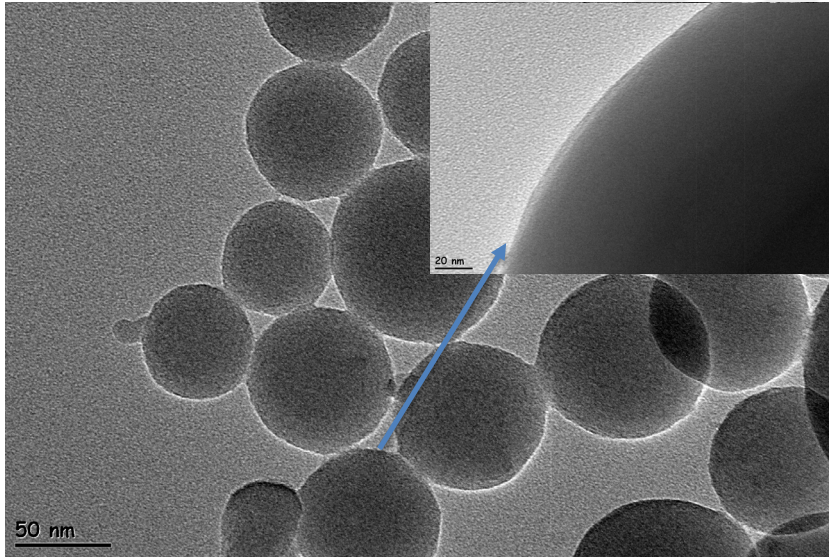
Şekil 4.5. Anti-transferrin ile modifiye edilmiş (SiNP@NH₂) nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri, 2,5 kV voltaj ve 100 kx yakınlaştıma.

4.1.1.3. Geçirilimli Elektron Mikroskopi (TEM) Analizleri

Geçirimli elektron mikroskobu görüntülerinden anlaşılabileceği üzere, silika nanoyapıların sentezi ve karakterizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de silika yapılarının boş olduğu ışık geçirgenliğinden anlaşılmaktadır. Bu yapılarda lantanit kullanıldığı zaman nasıl bir kontrast farkı oluştuğu ileri deneylerde lantanit ile modifiye edilen floresan özellik gösteren problemlerin TEM görüntülerinde değinilmiştir. Şekil 4.7 ‘deki görüntüde ise silika yapıların dış yüzeyinin modifiye edildiği gradient farkından dolayı belli olmaktadır. Yüzeyde çok ince bir tabaka hem yüzey yükünden kaynaklı hidrodinamik yarıçap etkisi hem de jelimsi saydam tabaka belli olmaktadır. Problemlerin boyutları, zeta-sizer ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleri ile de uyusmaktadır.



Şekil 4.6. Boş silika nanopartiküllerin modifikasyon öncesi geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri.

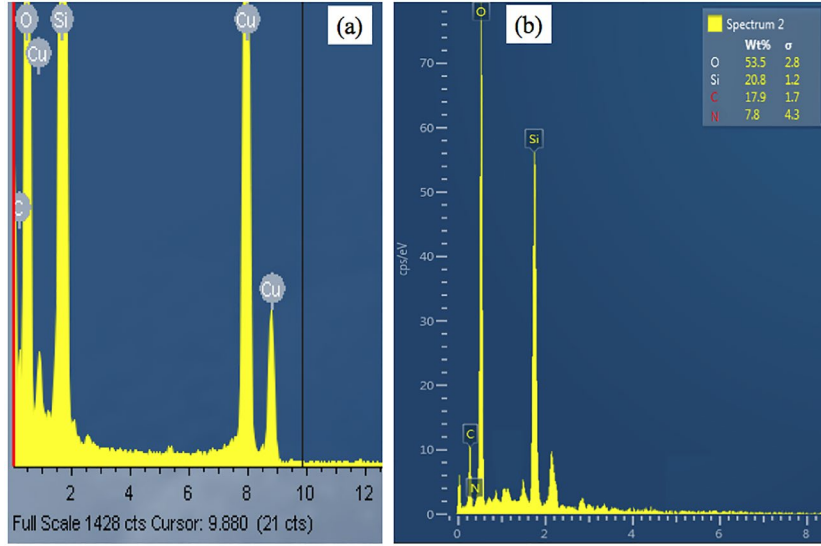


Şekil 4.7. Silika nanopartiküllerinin transferrin ile modifikasyonu sonrası geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri.

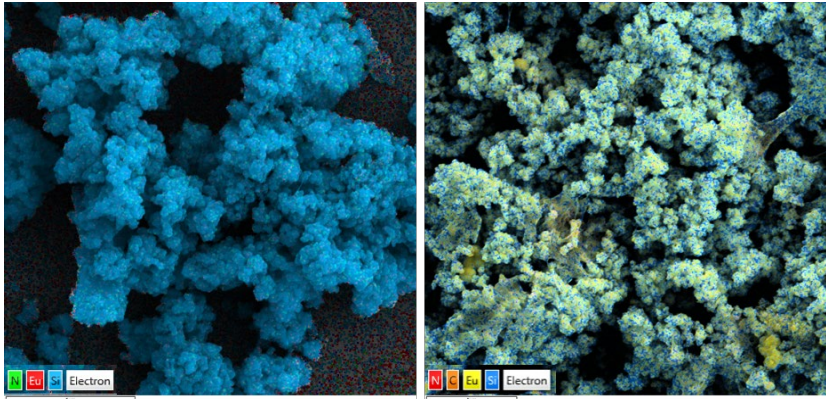
4.1.1.4. Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDX) Analizleri

SiNP yapıları öncelikle amin yapıları ile modifiye edilmiş ve sonrasında ise anti-transferin ile fonksiyonellenmiştir. Bu işlem basamaklarının doğruluğuna, TEM mikroskobu altında EDAX dedektörü ile elementel olarak hem spektrum hem yüzey haritalamasında bakılmıştır. Şekil 4.8 incelendiğinde, final yapıda, boş silikaya göre karbon ve azot elementleri tespit edilmiştir. Yapıda silisyum ve oksijenden başka tespit edilen ve oldukça fazla olan karbon elementi, protein yapıda olan transferrinden ve azot

elementi ise hem proteinden hem de amin gruplarından gelmiştir. Bu sonuç da hem anti-transferrinin hem de aminleme işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Bunun yanında, aynı partiküllerin elementel incelenmesi Şekil 4.9'da yüzey haritalanması şeklinde ifade edilmiştir. Burada elementlerin, kendilerini temsil eden renkler ile topoğrafik olarak dağılımları incelenmiştir.



Şekil 4.8. Silika nanopartiküllerin EDAX spektrum analiz sonuçları a) boş, b) fonksiyonelleştirilmiş nanopartiküller



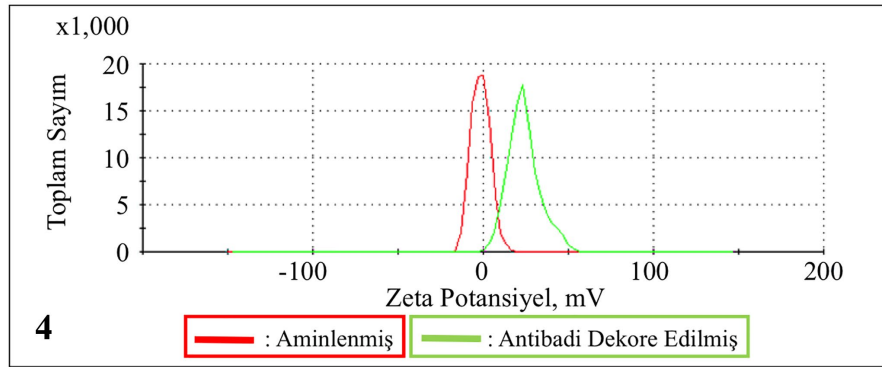
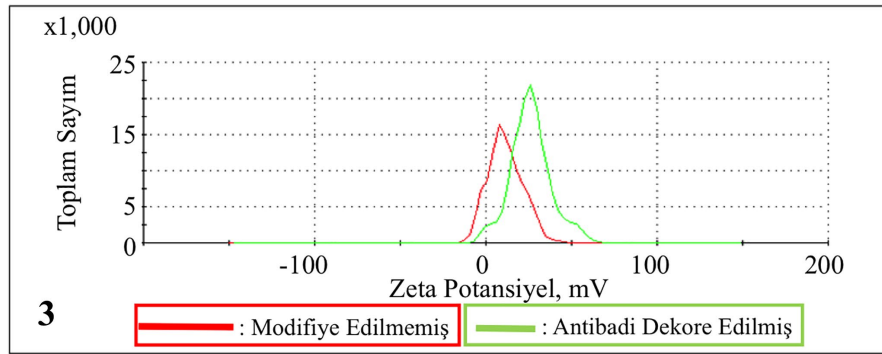
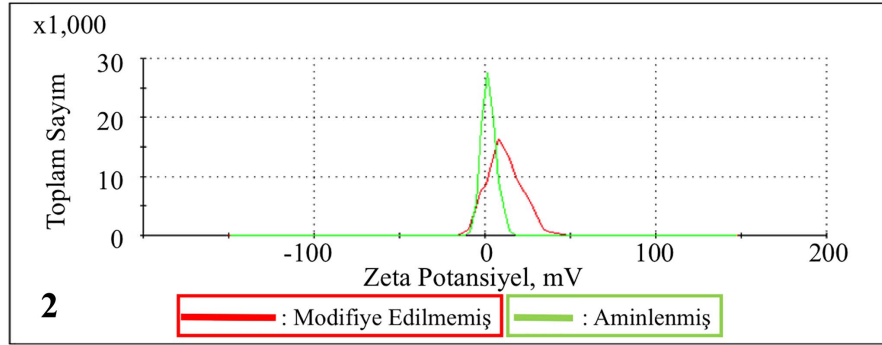
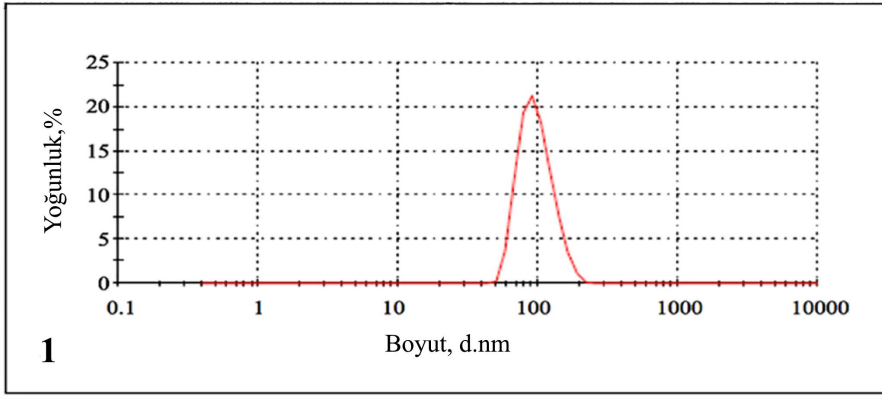
Şekil 4.9. Modifiye edilmiş silika nanopartiküllerinin içerdiği elementleri gösterir yüzey haritalanması.

4.1.1.5. Zeta Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Çalışmanın temel amacı, spesifik antikor ile donanımlaştırılmış dekore silika bazlı nanoprobolar tarafından, antijenin yakalanması ve ortamda bulunan antijenin kantitatif olarak belirlenmesidir.

Kayda değer miktarda ve optimum şekilde sentezlenen silika nanoyapıları ileri düzeyde “antikor-antijen” etkileşimlerine hazır hale getirilmek için biyolojik ajanlar ile modifiye edilmiştir. Çalışmanın asıl amacı silika nanopartiküllere antikorun kovalent bağlanması sonucu ortamda bulunan antijeni belirlemektir. Bu sebeple, silika nanoyapılara bağlanan antikorların karakterizasyonu yapılmış ve yüzey yüklerindeki değişim rapor edilmiştir (Şekil 4.10). 1 numaralı grafikte kullanılan silika yapıların boyutlarının hidrodinamik yarıçap ile ortalama 105 nm olduğu görülmektedir. Bu değerler taramalı elektron mikroskopunda ortalama 70-120 nm çıkan değer ile örtüşmektedir. 2 numaralı grafikte, boş silika nanomalzemenin yüzeyine amin grupları takıldıktan sonraki değişim görülmektedir. 3 numaralı grafikte modifiye edilmemiş silika yapılar ile bunlara antikor bağlandıktan sonraki değişim görülmektedir. 4 numaralı grafikte ise yüzeyi aminlenmiş silika yapılar ile final ürün olan silika nanoyapıların arasındaki değişim görülmektedir. Yüzey yükü analizlerinden de görüldüğü üzere, aşama aşama yüzeydeki modifikasyonun yüzey yükü üzerindeki etkisi sırasıyla değerlendirilmiş ve yüzeye antikorun bağlanması bu analizler ile de gösterilmiştir.

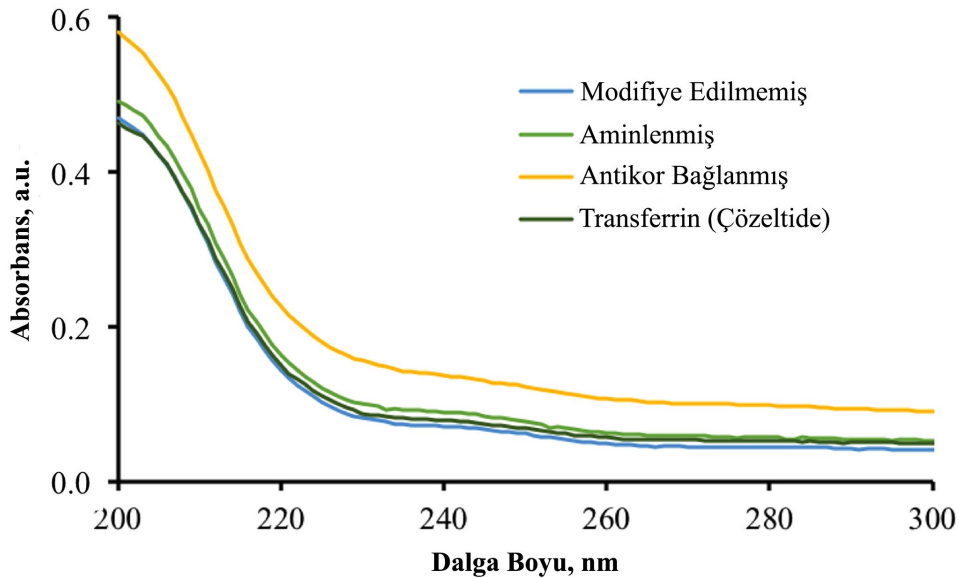
Burada farklı fonksiyonel grupların, özellikle amin gruplarının dahil edilmesi zeta potansiyel ölçümleri ile izlenmiştir. Şekil 4.11'de verildiği gibi, zeta-potansiyel (Z-P) değerleri, modifikasyon adımlarına göre önemli ölçüde değişmiştir. Boş silika nanopartiküller için Z-P değeri (+11 mV), yüzey aminlenmesi nedeniyle -19 mV'a düşmüştür. Z-P değerleri, antikor dekorasyon adımıyla -3.0 mV'lık daha pozitif bir bölgeye kaymıştır. Yüzey aminasyonu, daha pozitif yüzey yükleriyle sonuçlanmıştır. Bu nedenle, Z-P değeri önemli ölçüde azalmıştır. Ayrıca, ölçümlerin pH değerinin (7.0) antikor moleküllerinin izoelektronik noktasından yüksek olması nedeniyle antikor molekülleri negatif yüzey yüklerini arttırmıştır. Bu arada, daha büyük boyutlu antikor molekülleri, bazılarının konjuge olmanın yanı sıra, aminlenmiş grupları da maskeleymiştir. Parçacıkların yüzey yükleri zıt yüklü moleküller tarafından çevrelendiğinden, tüm potansiyel kaymalar yüzey modifikasyonu ile tutarlıdır. Sonuç olarak, Z-P ölçümleri, yüzey modifikasyonunun başarıyla gerçekleştirildiğini ve boyut ölçümünün mikroskopik gözlemleri doğruladığını ortaya koymuştur.



Şekil 4.10. Boş silika nanopartiküllerin zeta boyut ve potansiyel ölçümü.

4.1.1.6. UV- Görünür Bölge Spektroskopisi Analizleri

Fonksiyoneleştirilmiş silika nanopartiküllerinin adım adım spektrometri analizleri yapılmış ve her basamaktan sonra absorpsiyon miktarında artış görülmüştür. Şekil 4.11’de sırasıyla fonksiyonelleştirilmiş malzemelerin absorpsiyon değerlerini göstermektedir. Burada absorpsiyon miktarı olarak, büyükten küçüğe doğru “final ürün- aminlenmiş ürün- silika nanopartikül” olarak sıralanmıştır. UV-Vis spektrometri ölçümleri, 200-800 nm dalga boyu aralığında, boş silika, amin ile modifiye edilmiş silika ve antikora dekore edilmiş silika nanoproboların dağılımında gerçekleştirilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi boş silika nanoprobosu bu aralıkta soğurma bandına sahip değilken, aminasyon ‘n-pi/pi-pi’ geçişlerine sahip olabilecek nitrojen atomlarındaki yalnız çiftler nedeniyle 256 nm’de bir omuz oluşumuna neden olmuştur. Öte yandan, antikör immobilizasyonu, yüzeyde polipeptit yapısının birleşmesinden dolayı 260-560 nm arasında net bir absorpsiyon bandı ile sonuçlanmıştır. Burada absorpsiyon miktarı, antikora dekore edilmiş-> aminlenmiş-> boş (modifiye edilmemiş) SiNP’ler olarak sıralanabilir. Ek olarak, sonuçlar, silika bazlı nanoproboların başarılı bir şekilde değiştirildiğini ve bu arada zeta-potansiyel ölçümleriyle oldukça tutarlı olduklarını ortaya koymuştur.

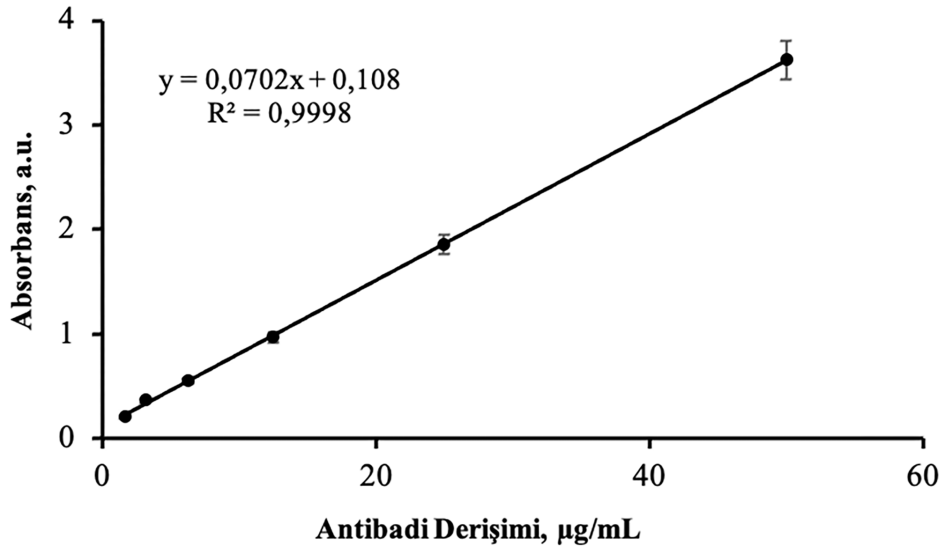


Şekil 4.11. Modifikasyon aşamalarına göre silika nanopartiküllerin UV-Spektrometri analizleri.

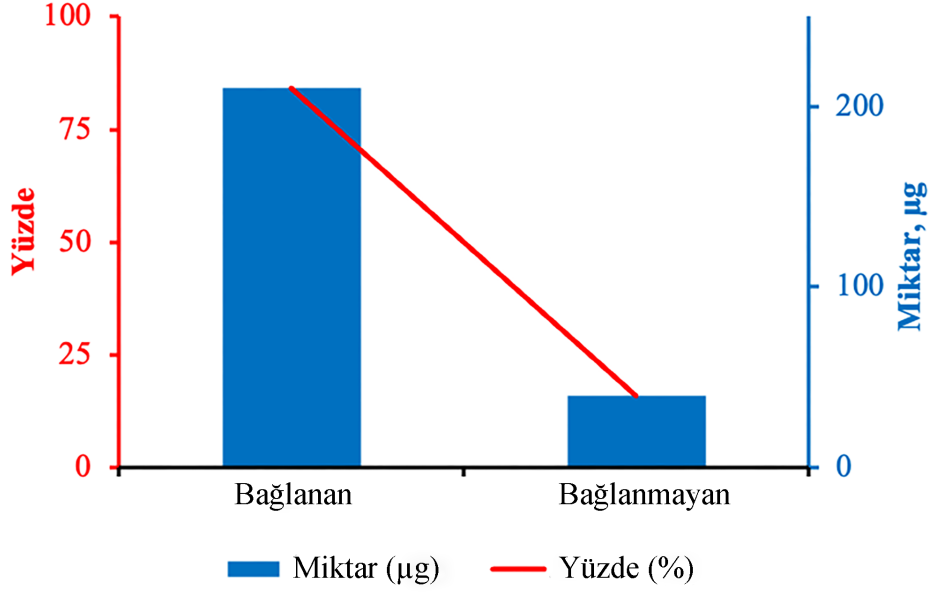
4.1.2. Silika Nanopartiküllere (SiNP) Anti-Transferrin Antikorlarının Bağlanma Kapasitesi

4,0 mg [(SiNP)NH₂] partiküllerine karşılık 250 µg antikor alınmıştır. Daha sonra homojen karışım santrifüj edilmiş ve süpernatant bağlanma kapasitesi ölçümü için kullanılmıştır. Dışarıda kalan antikor miktarı, standart çözeltilerden elde edilen kalibrasyon grafiğinde absorbansları üzerinden hesaplanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

İmmüno-çökeltme adımlarına başlamadan önce, spesifik antikor (anti-transferrin antikor) molekülleri, karbodiimid yolu ile immobilize edildi. Burada, 250 µg antikor molekülü, daha önce özetlendiği gibi 4 mg aktifleştirilmiş/aminlenmiş silika nanoprobaları ile etkileşime girmiştir. Homojen karışım belirli işlemlerden geçirildikten sonra santrifüjlendi ve süpernatant bağlama kapasitesi ölçümü için kullanıldı. Antikor miktarları (bağlı ve tutulan), standart çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisindeki absorbans üzerinde değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonunda antikorun kütleye %15,79'u çözelti fazında kalmış, kalan %84,21'lik kısım başarıyla yapıya bağlanmıştır. Sonuç olarak silika bazlı nanoprobaların antikor yükleme kapasitesi diğer bir deyişle ligand yoğunluğu 52,64 mg/g nanoprob olarak hesaplanmıştır.



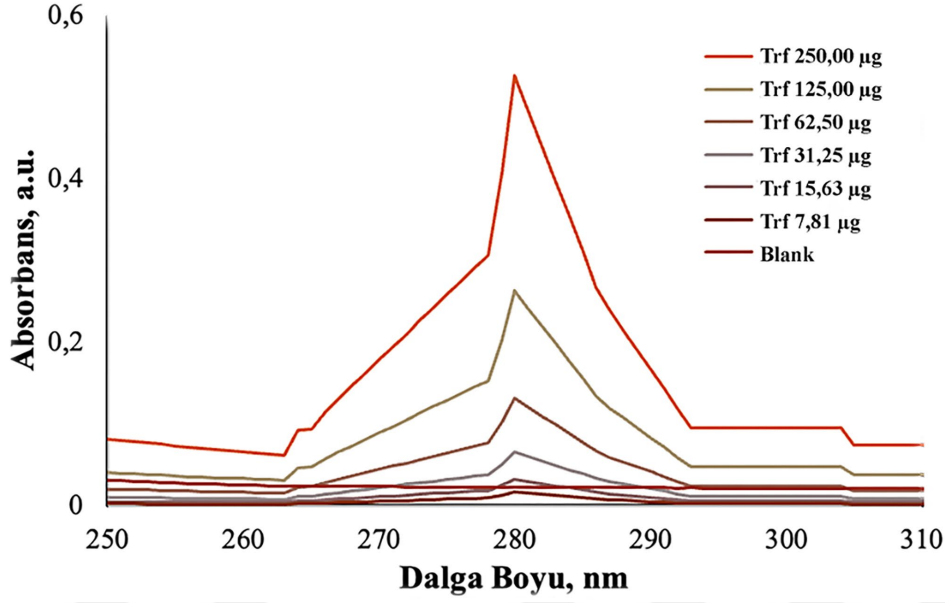
Şekil 4.12. [(SiNP)NH₂] partiküllere anti-transferrin antikorunun bağlanmasının kontrolü için oluşturulan standart grafik



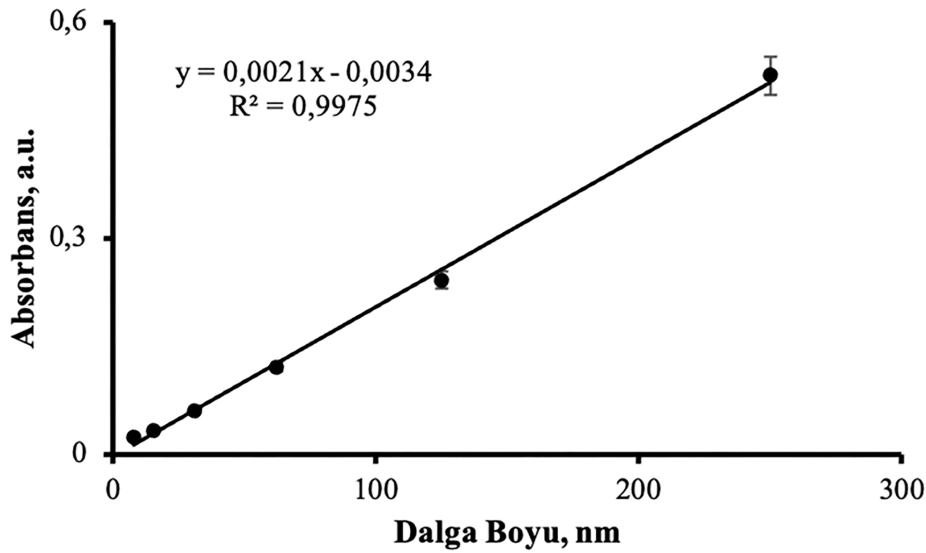
Şekil 4.13. [(SiNP)NH₂] partiküllere anti-transferrin bağlanmasına ait verilerin bar grafiği.

4.1.3. [(SiNP)NH₂]+AntiTra Silika Nanopartiküllerle Transferrin Etkileşim Koşullarının Optimizasyonu

Bu aşamada 250 µg/mL derişimde silika nanoprobolar, 7,81 µg/mL- 250,00 µg/mL derişim aralığındaki transferrin standart çözeltileri ile muamele edilmiştir (ortam koşulları 25°C sıcaklık, süre 10 dk. ve pH 7,2). Standart çözeltiler ile kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve spektrum taramasında en uygun dalga boyu 280 nm olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Etkileşimler bu dalga boyunda ve bu kalibrasyon grafiğine göre değerlendirilmiştir. Kalibrasyon grafiğinde R² değeri 1'e en yakın olan grafik seçilmiştir.



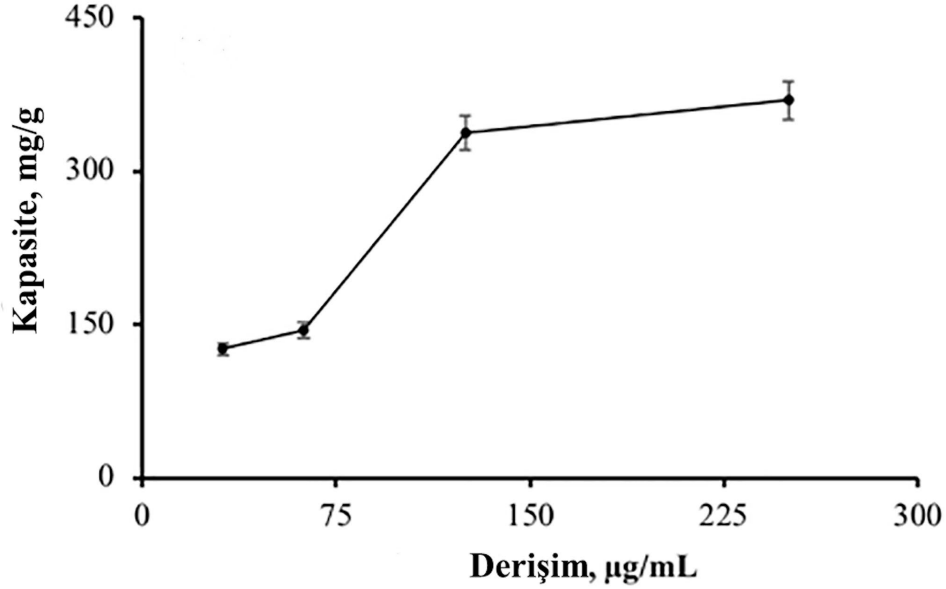
Şekil 4.14. Transferrin standart çözeltilerinin spektrum taraması.



Şekil 4.15. Standart çözeltilerin 280 nm’de elde edilen kalibrasyon grafiği.

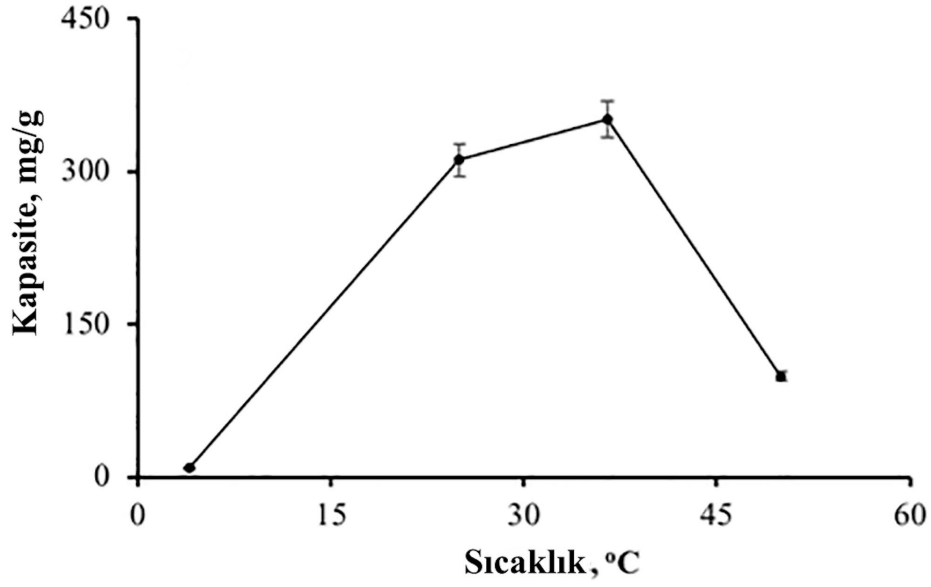
Şekil 4.16’da farklı antijen konsantrasyonları ile etkileşime sokulan silika nanoproboların antijen bağlama kapasiteleri grafiğe dökülmüş ve incelenmiştir. Bu grafik verilerine göre 1 mg antikör başına maksimum antijen yakalama kapasitesi 369,23 µg/mL derişimine sahip antijen grubunda olduğu görülmüştür. Antijen miktarı arttıkça bağlanma kapasitesinin artması olası bir durumdur. Ancak partikül başına bağlanma yüzdesini de bu durumda incelemek gerekmektedir. Bu bağlamda ise bağlanma kapasitesi yüzdesi antijen derişimi başına en yüksek 31,25 µg/mL derişime sahip antijen grubunda

görülmüştür. Kapasite 125,64 mg/g olarak da en yüksek olan bu grup çalışma grubu olarak belirlenmiştir.



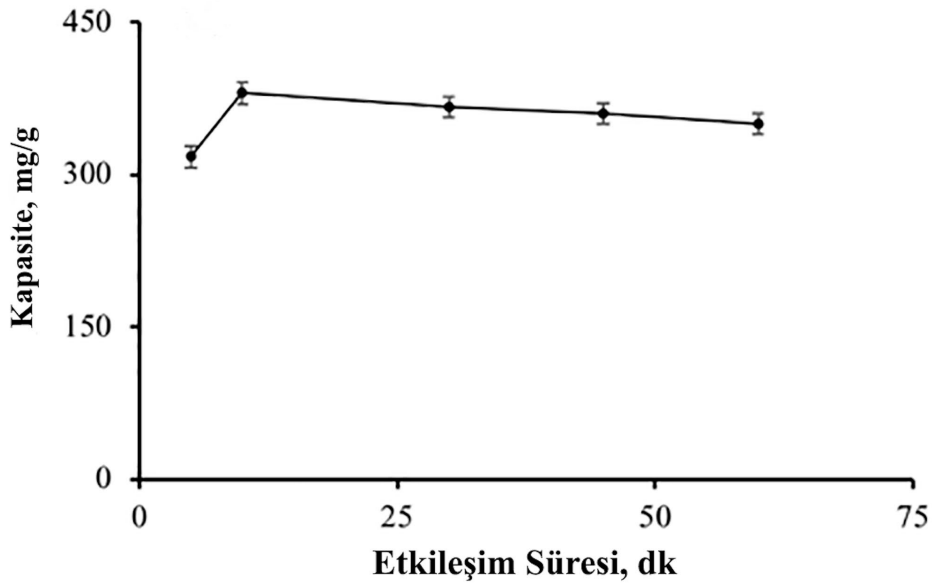
Şekil 4.16. Farklı derişimlerdeki antijenler ile etkileşime sokulan immünoprobların antijen bağlama kapasitesindeki değişimin incelenmesi.

Şekil 4.17’de, silika nanopartiküller ile farklı sıcaklıklarda belirlenmiş derişimde antijen ile etkileşime sokulup absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu değerlere göre optimum sıcaklık, maksimum absorbans değeri-maksimum kapasite değeri olan nokta olarak belirlenmiştir. Bu nokta yaklaşık 37°C olarak belirlenmiştir. +4°C den itibaren yaklaşık 37°C’ye kadar artış gösteren bağlanma afinite davranışı, protein yapıları bu sıcaklık aralığında kayda değer oranda etkilenmiş olabileceğinden 40°C’den sonra düşüşe geçmiş ve 50°C’de neredeyse hiç bağlanma göstermemiştir.



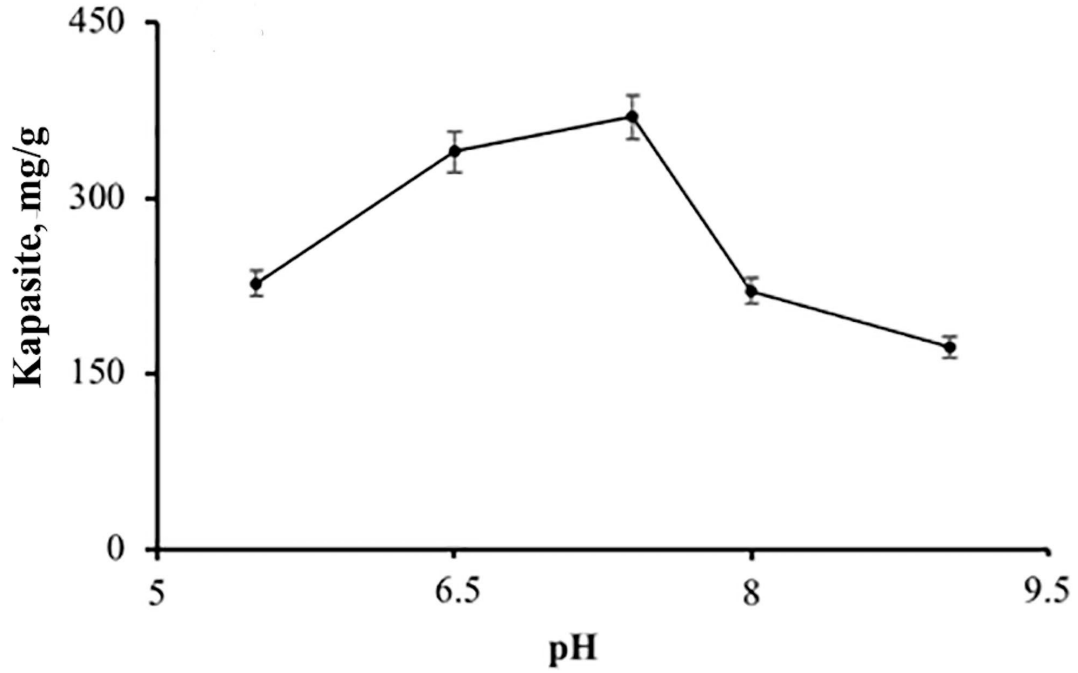
Şekil 4.17. Sıcaklığın değişimiyle immünoprobların antijen bağlama kapasitesindeki değişiminin incelenmesi.

Şekil 4.18’de silika nanoprobolar ile derişimi bilinen standart çözeltiler farklı süreler boyunca etkileşimde tutulmuştur. Bunun için 37°C ve pH 7,2 ortamı kullanılmıştır. 10. dakikadan sonra neredeyse kayda değer değişim görülmemiştir. Grafik incelendiğinde bu biyosensörün verimli çalışma süresi olarak 10 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.18. Etkileşim süresinin değişimiyle immünoprobların antijen bağlama kapasitesindeki değişimin incelenmesi.

Şekil 4.19’da silika nanoprobolar ile derişimi bilinen standart çözeltiler ile farklı pH ortamında, 37°C sıcaklık değeri ve 10 dakika boyunca etkileşimde tutulmuştur. Bu sonuçlara göre en optimum etkileşim pH 7,4 ortamında gerçekleşmiştir. pH 5 ile 7 arasında ve pH 8 ile 9 arasında değerler neredeyse sabit kalmıştır. Bu durumda, bu pH aralıklarında gerçekleşecek olan ölçümlerin gerçeği yansıtmayacağı düşünülmüştür. En uygun aralık vücut pH’ına yakın olan 7,4 olarak rapor edilmiştir.



Şekil 4.19. pH değeriyle immünoproboların antijen bağlama kapasitesindeki değeri incelenmesi.

Sonuç olarak, farklı ortam koşulları ve sürelerde gerçekleştirilen etkileşim deneyleri sonucunda en optimum koşullar bulunmuştur. Buna göre, pH 7,0-7,5 aralığında, 10 dakika etkileşim süresi ve 37°C sıcaklık aralığı olarak rapor edilmiştir.

Transferrin antikoru ile modifiye edilmiş silika nanoprobolar ile (pH 7,2 ortamında ve 25°C) etkileşim deneyleri yapılmıştır. Probolar, Tablo 4.1’de belirtilen transferin antijeni konsantrasyonları ile etkileşime sokulmuştur. Bu çözelti, 10.000 rpm ve 5 dakikada santrifüjlenmiş ve süpernatantları alınarak etkileşime girmeyen transferin miktarı ölçülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak, mikrogram nanoprob başına bağlanan antijen miktarı hesaplanmış ve grafiği oluşturulmuştur.

Bağlanma kapasiteleri,

$Q = [(C_i - C_f) \times V] / m$ formülüne göre hesaplanmıştır.

C_i ve C_f : antijenlerin başlangıç ve final konsantrasyonları,

V : protein çözeltisinin hacmi,

m : partikül kütlesi.

Tablo 4.1. [(SiNP)NH₂]+AntiTra silika nanopartiküllerin antijen bağlama kapasiteleri

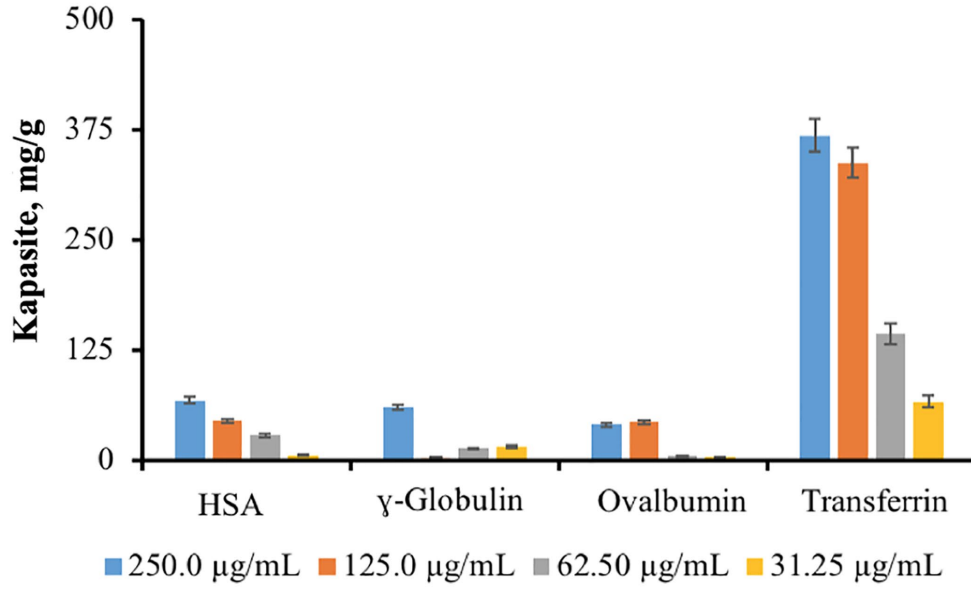
Başlangıç konsantrasyonu (µg/mL)	Q (Kapasite)
250,00	369,23
125,00	337,63
62,50	144,17
31,25	125,64

Şekil 4.16, silika bazlı immünoprobaların transferrin (hedef antijen) konsantrasyonu ile bağlanma kapasitesi arasındaki ilişkiyi gösterirken sıcaklık, etkileşim süresi ve pH gibi diğer faktörler sırasıyla ortam, 10 dakika ve 7,4 olarak sabit tutuldu. İlgili şekilde görüldüğü gibi, sıvı ve katı fazlar arasındaki konsantrasyon farkının analit moleküllerini yüzey üzerinde hareket etmeye/adsorbe etmeye zorlayan bir gradyan yaratması şeklindeki temel olguya bağlı olarak, ilk hedef konsantrasyonu doğrudan nanoprobaların immünoçöktürme kapasitesini kontrol eder. Bu nedenle, başlangıç konsantrasyonundaki artış, immüno çöktürme kapasitesinde de bir artışa neden olmuştur. Ayrıca sıcaklıktaki artış immüno çöktürme kapasitesini önce artırmış, ardından önemli bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.17). Sonuç, sıcaklık aralığının ilk bölümünde artan analit moleküllerinin hareketliliğine bağlıdır, oysa sıcaklıktaki daha fazla artış, transferrin ve antikor molekülleri arasındaki etkileşimleri engeller. Ek olarak, sonuçlar H-bağı, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin ortak etkilerinin olduğuna işaret etmiştir. İlk iki etkileşim artan sıcaklıkla azalırken, üçüncü etkileşim artan sıcaklıkla artar. Üçüncü bir etki faktörü olarak etkileşim süresi, analit çözeltisinden silika bazlı immünoprobaları ayırmadan önce 5 ila 60 dakika arasında değişmiştir (Şekil 4.18). Şekilde görüldüğü gibi, çözeltilerden hedef molekülleri yakalamak için on dakika yeterliyken, daha sonraki tedavi

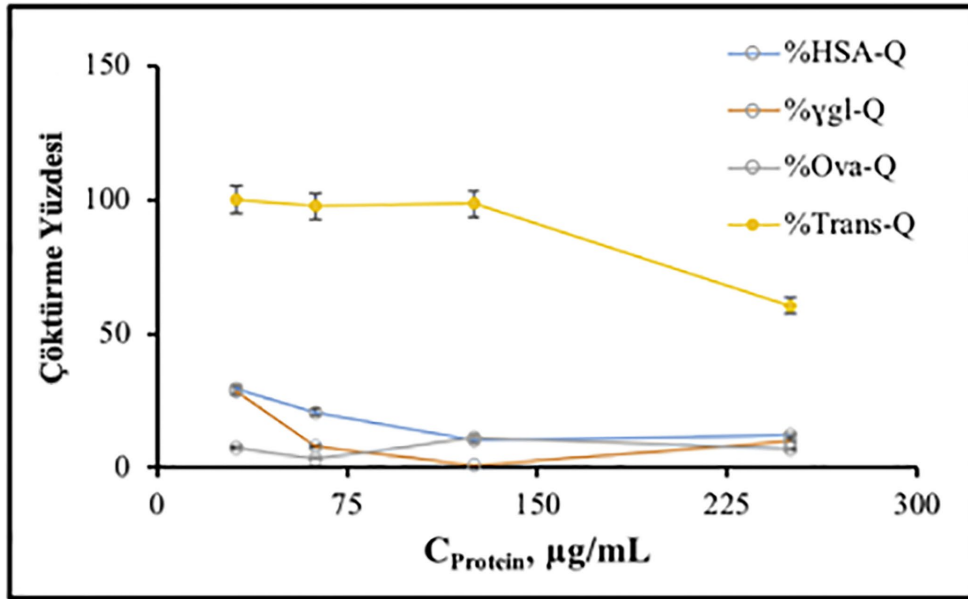
süresinden önemli bir etki gözlenmemiştir. Bu sonuç dört farklı nokta ile açıklanabilir: (i) spesifik antikor molekülleri, afinitelerini korumanın yanı sıra uygun bir oryantasyon içinde yüzeye immobilize edildi; (ii) antikor moleküllerine, uygun ligand dağılımını ve yoğunluğunu bulan hedef moleküllerle etkileşime girmek için serbestçe erişilebilir; (iii) yakalama işleminin hızlı bir kinetiği, immünoproboların boyutu ve biyouyumluluğu nedeniyle herhangi bir difüzyon sınırlaması göstermedi; ve (iv) oldukça küçük boyutlu (yaklaşık 105 nm) silika bazlı immünoprobolar, daha yüksek immünoçöktürme kapasitesi için daha yüksek aktif yüzey alanı sunar. Şekil 4.19, pH ve immünoçöktürme süreci arasındaki ilişkiyi gösterirken, en iyi yakalama kapasitesi pH 7,4'te gözlemlendi. Sonuç olarak, immünoçöktürme işlemi için optimum parametreler sırasıyla 125 µg /mL, 25 °C, 10 dk, 7,4 olarak belirlendi.

4.1.4. [(SiNP)NH₂]+AntiTra Silika Nanopartiküllerle Yarışmalı Afinite Testleri

Şekil 4.20 ve 4.21'de modifiye edilmiş silika nanoproboların sadece transferin içeren çözelti ortamında, antijene karşı ilgileri analiz edilmiştir. Bunların yanında, silika nanoproboların kompleks sıvı karışımlarında ortamda bulunabilecek herhangi bir proteine karşı olan ilgileri, transferine karşı değerlendirilmiştir. Bu analizler için, ovalbümin, γ-globulin ve serum albümin proteinleri kullanılmıştır. Belirli konsantrasyonlarda (31,25 µg/mL-250 µg/mL aralığında), spektrum taramaları yapılmış, absorbans değerleri kaydedilmiştir. Daha sonra belirli miktarda silika nanoprobolar ile etkileşime sokulup, çözeltiler vorteks yardımıyla etkileştirildikten sonra, santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımlarından alınan örneklerin yine aynı dalga boyunda absorbans değerlerine bakılmış ve azalan absorbans değerlerine bakılarak derişim miktarları hakkında yorum yapılmıştır. Grafiğe göre ortamda en çok bağlanan protein yine transferin proteini olmuştur. Yarışmacı proteinlerin varlığında silika nanoprobolar transferin antijenini yüksek seçicilikle tayin edebilmiştir.



Şekil 4.20. [(SiNP)NH₂]+AntiTra silika nanopartiküllerin yarışmacı ajanlar varlığında transferrin antijenlerini bağlama kapasitesi.



Şekil 4.21. [(SiNP)NH₂]+AntiTra silika nanopartiküllerin yarışmacı ajanlar varlığında transferrin antijenlerini çöktürme yüzdeleri.

Silika nanopartiküller, antikor ile modifiye edilip nihai olarak bu partiküllere antijen yakalama özelliği kazandırılmış ve bu sonuçları desteklemek için de *in vitro* koşullarda, içinde antijen ihtiva eden farklı derişimlerdeki çözeltiler ile nanopropolar etkileşime sokulmuştur. Antikor-antijen etkileşimlerinden sonra, ortamdaki antijen miktarlarında absorbans değerlerine paralel olarak azalmalar gözlemlenmiştir. Ortamda yalnızca transferrin ihtiva eden çözelti ile etkileşimi sonunda kayda değer bir sonuç elde edilmiştir.

Bunun güvenilirliğini sınamak ve ortamda bulunabilecek herhangi bir proteine de bağlanıp bağlanmayacağını ölçmek için, 3 farklı protein ile nanoproblar muamele edilmiş ve deneysel kısım tekrarlanmıştır. Burada, tüm proteinler için immüno çöktürme yüzdeleri de $(W_{\text{protein çöktürülmüş}}/W_{\text{protein başlangıç}}) \times 100\%$ olarak uygun kütle dengesi uygulanarak hesaplanmıştır. İmmüno-nanoprobların hedef protein ile seçici olarak etkileşime girdiğini ve 125 µg/mL başlangıç konsantrasyonuna kadar neredeyse %100 çökelme elde edildiğini daha açık bir şekilde gösterilmiştir. Öte yandan, yarışmacı proteinlerin oranı %10 dolaylarında belirlenmiş ve bu da transferrin moleküllerinin seçici immünoçöktürmesini doğrulamıştır. Ayrıca, sıvı ve katı fazlar arasındaki konsantrasyon gradienti nedeniyle beklendiği gibi daha düşük bir başlangıç konsantrasyonunda daha yüksek immünoçöktürme oranları elde edilmiştir. İmmünoçöktürme kapasiteleri literatüre göre nispeten yüksek olmasına rağmen, immünoprobların yüksek yüzey alanı/hacim oranı ile doğrudan ilişkili, başka bir deyişle nanoprobların daha yüksek aktif yüzey alanı, daha yüksek spesifik olmayan etkileşimlerle sonuçlanmıştır. Sonuç olarak, hedef proteinlerin seçici olarak tanındığını ve immünoproblar tarafından başarılı bir şekilde çöktürüldüğünü ortaya koyulmuştur. Bu denli yüksek afinitesi olan bu sistemin, ışık geçirgenliği yöntemini kullanarak, ortamda bulunan antijenin miktarının saptanabileceği ön görülmüştür. En belirgin değişim 280 nm dalga boyunda gözlenmiş, seçilen bazı dalga boylarında da analiz ortamı ve malzemelerin ışık geçirgenliği göz önüne alınarak amaca yönelik çalışmalar planlanabilir.

Tablo 4.2’de immünoprobların yarışmalı afinite testlerinden sonra alınan absorbans değerlerinden yola çıkılarak, dağılma sabiti ve seçicilik üzerine yapılan hesaplamalar verilmiştir. Bu sonuçlara göre, tabloda görüldüğü üzere, transferrin en yüksek seçiciliğe sahip olmuştur. Ve bunun yanında diğerlerine oranla dağılma katsayısı hayli yüksek çıkmıştır. Benzer proteinlere karşı girilen yarış transferrin ciddi oran farkı ile kazanmıştır. Silika nanoproblar transferrin antijenine karşı yüksek seçici davranmıştır.

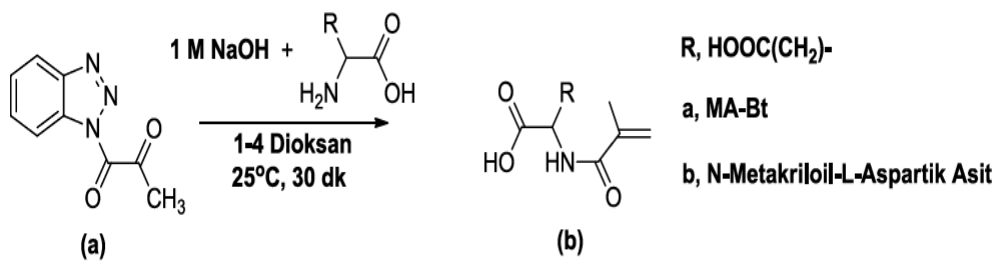
Tablo 4.2 Yarışmalı etkileşim sonrasında [(SiNP)NH₂]+AntiTra silika nanopartiküllerin seçicilik ve dağılıma katsayılarının değerlendirilmesi.

Hedef	Q	K _{d-α}	β
HSA	68,41	0,14	11,25
γ-Globulin	61,05	0,11	13,75
Ovalbumin	40,74	0,07	20,56
Transferrin	686,54	1,53	100

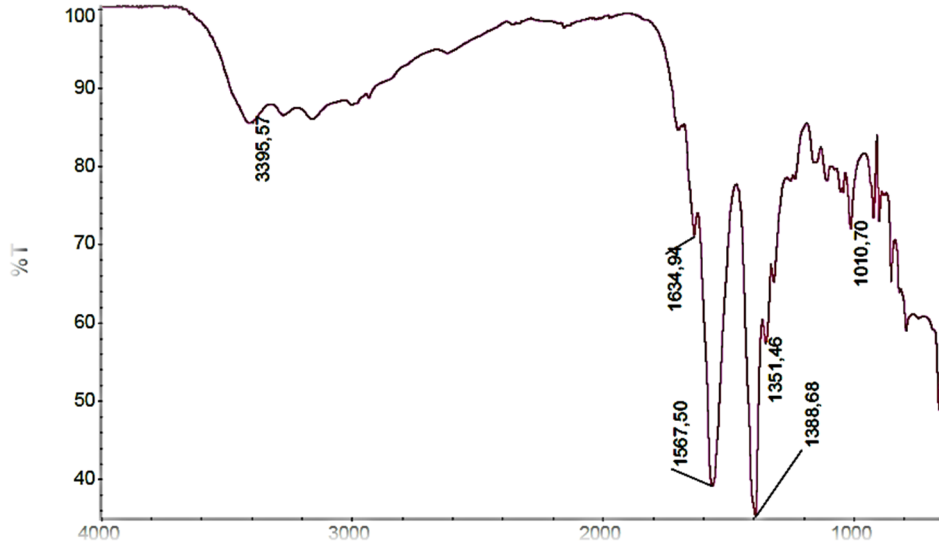
4.2. Yüksek Enerji Dönüşümlü Silika Nanoprobolar ile Telomeraz Tayini

4.2.1. N-Metakriloil-L-Aspartik Asit Monomerinin Karakterizasyonu

Fonksiyonel monomer, MAAsp, L-aspartik asit ve metakriloil grubu taşıyıcısı MABt'nin tepkimesiyle sentezlenmiştir (Şekil 4.22) Sentezlenen MAAsp monomerine ait FT-IR spektrumu Şekil 4.23'te verilmiştir. FT-IR spektrumunda MAAsp monomerine ait karakteristik pik 1567 cm⁻¹'deki karbonil bandı; 3398 cm⁻¹'deki absorpsiyon bandı -N-H (ikincil amin grubu) ait gerilme bandı; 1010 cm⁻¹ ve 1388 cm⁻¹'deki C-N simetrik ve asimetrik gerilme bantlarıdır. FT-IR analizi MAAsp monomerinin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.22. MAAsp monomerinin sentez reaksiyon şeması.

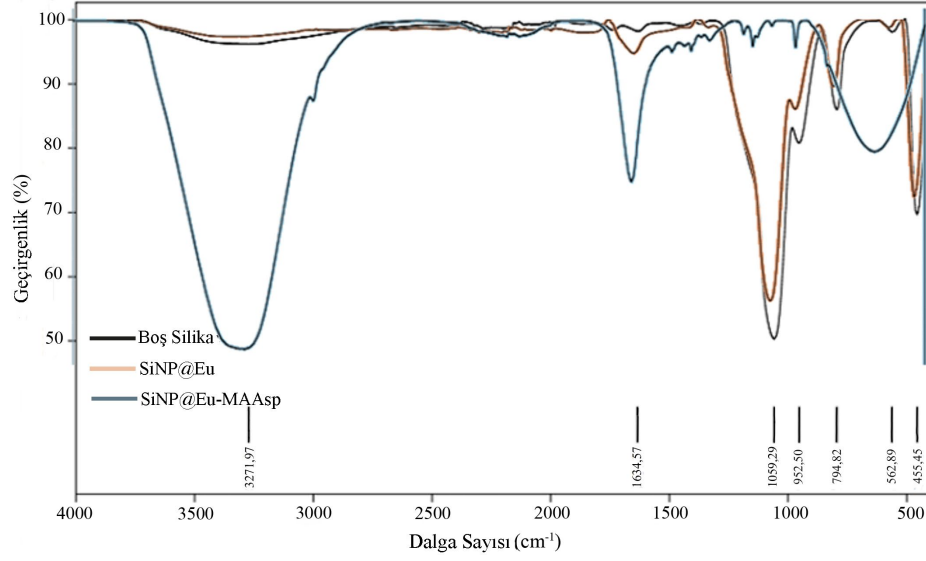


Şekil 4.23. MAAsp monomerinin FT-IR Spektrumu.

4.2.2. [SiNP@Eu³⁺-MAAsp] ve [SiNP@Eu³⁺-MAAsp]NH₂ Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.2.2.1. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizleri

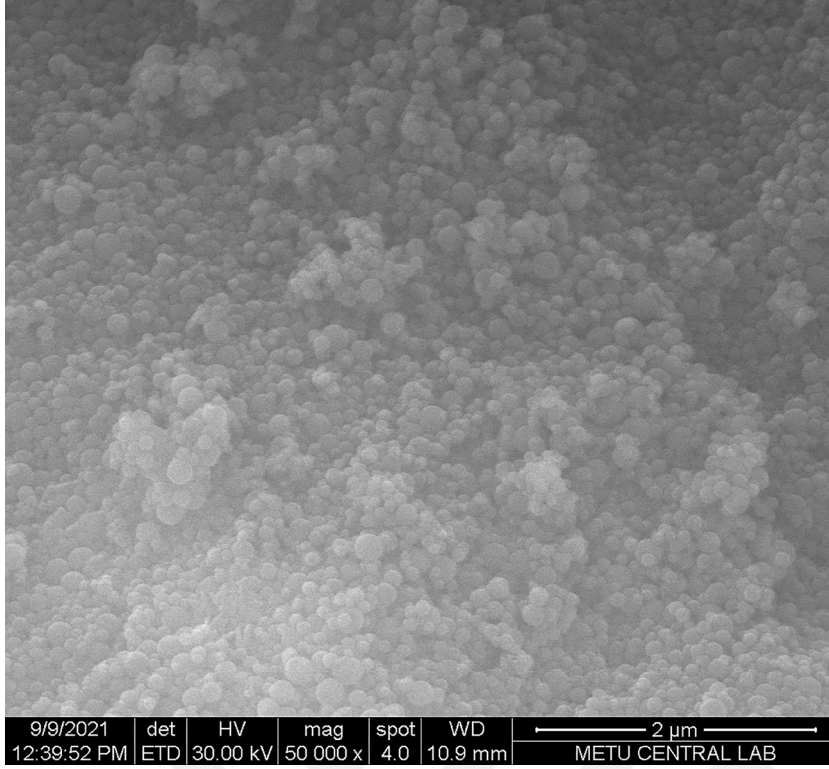
Silika nanopartiküllerin FT-IR spektrumu Şekil 4.24’de değerlendirilmiştir. Spektruma göre, 794, 1059, 1634, 3271 cm⁻¹’de silikatın tipik absorpsiyon bantları gözlenmiştir. 794 cm⁻¹’deki pik genellikle siloksan bağına karşılık gelir. 1059 cm⁻¹ ve 3271 cm⁻¹’deki pikler sırasıyla Si-O-Si eğilme ve silanol (Si-OH) simetrik gerilme titreşimlerinden ileri gelmektedir. Si-OH eğilme titreşimi, ayrıca 1634,57 cm⁻¹’de bir bant oluşturmaktadır. Silika nanopartiküller, 794 ve 1059 cm⁻¹’de Si-O bağ titreşimlerine sahiptir [230-233]. FT-IR spektrumunda 1060, 795 ve 455 cm⁻¹’deki karakteristik bantlar, sırasıyla Si-O bağlarının gerilmesine, bükülmesine ve düzlem dışı makaslama hareketine karşılık gelmektedir. 950 cm⁻¹’de Si-OH’nin asimetrik titreşimini ve 1634,57 cm⁻¹’de Si-OH’nin eğilme titreşimi gözlenmiştir [234]. 3500-3100 cm⁻¹ arasındaki bant, birincil aminlerin N-H gerilme titreşimlerine aittir. 3271 cm⁻¹’deki bant, N-H gerilme titreşimlerinin varlığını göstermektedir. 1638 cm⁻¹’deki pik, -C=O gerilmesine aittir. FT-IR analizinin sonucu silika nanopartiküllerin varlığını ortaya çıkarırken, modifikasyona ait moleküllerin de varlığını ortaya koymaktadır [233-235].



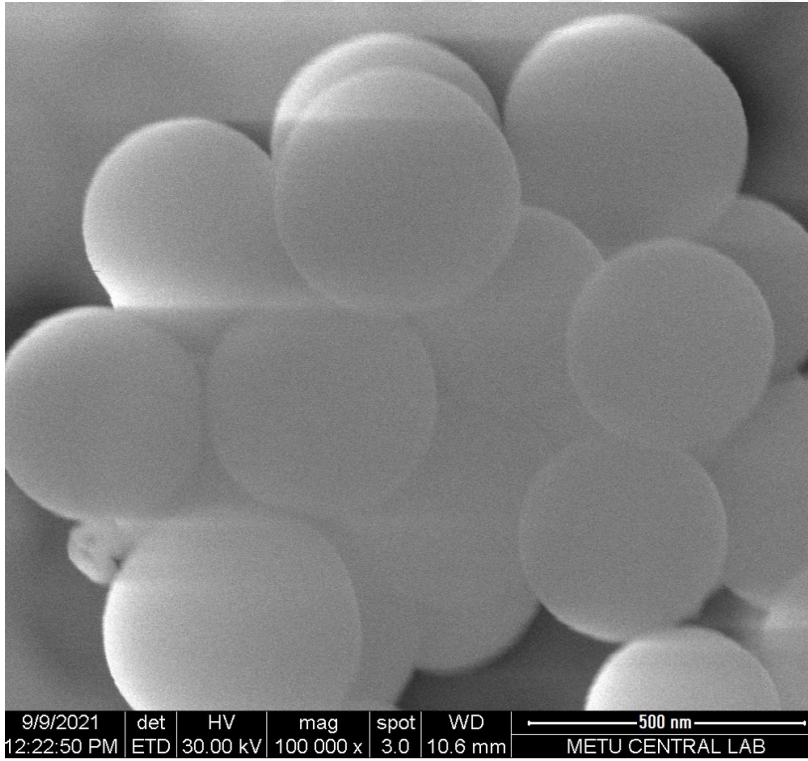
Şekil 4.24. Boş silika (siyah), lantanit katkılı silika (kırmızı), aminli ve anten etkisi için MAAsp katkılı silika nanopartiküllerin FT-IR spektrumları.

4.2.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri

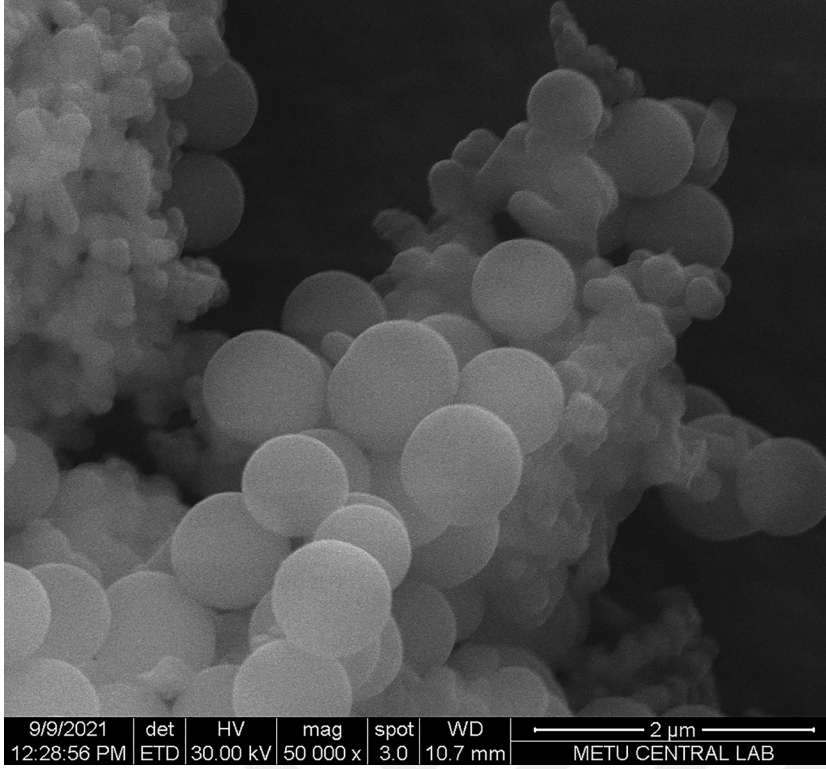
[(SiNP@Eu³⁺-MAAsp)NH₂] nanopartiküller (Şekil 4.25-4.28) taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiş ve daha önceki deney sonuçları ile benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. Bu analize göre partikül boyutları 80-120 nm arasında ve mono-dispersite oldukça yüksektir. Bu analiz sonuçları zeta boyut ölçümleri ile de uyumludur. Şekil 4.29 ve 4.30'da ise antikor ile modifiye edilmiş ve antijen ile etkileşime sokulan partiküllerin yüzey morfoloji değişimleri incelenmiştir. Partikül yüzeylerinde agregasyonlar ve tutulmalar gözlenmiştir. Etkileşim sonrası morfolojide ciddi değişimler gerçekleşmemiş olsa da yüzeyde oluşan tutulmalar (mikroskop ölçümlerinde net gözükmemektedir) zeta potansiyeli ve zeta boyut ölçerin kademeli ölçümleri (Tablo 4.3) ile uyumlu olmasından dolayı etkileşimin olduğunu kanıtlar nitelikte olmuştur.



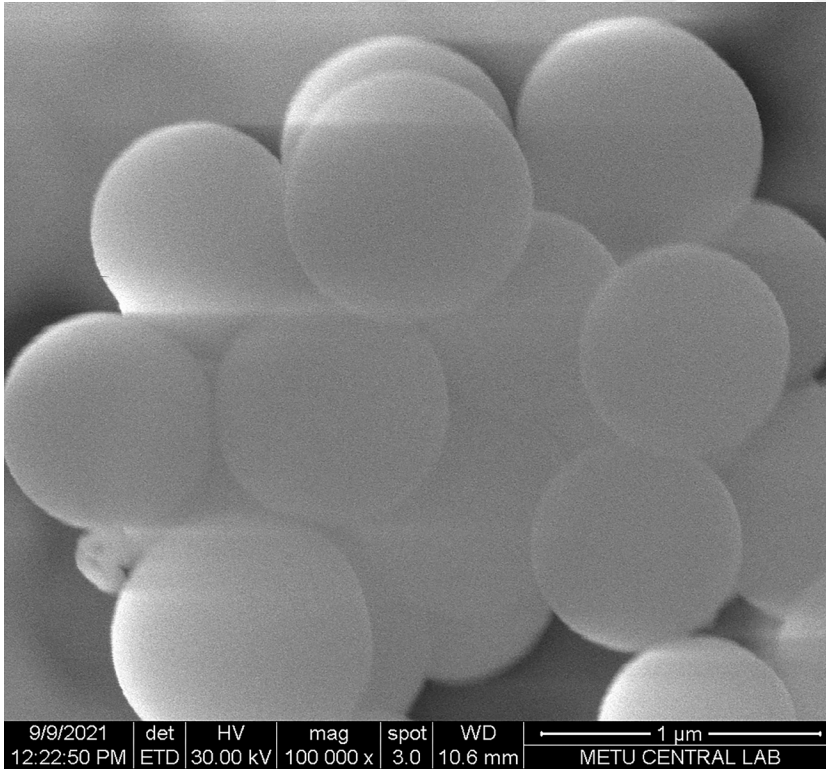
Şekil 4.25. $[(\text{SiNP}@ \text{Eu}^{3+}\text{-MAAsp})\text{NH}_2]$ YED nanopartiküllerin modifikasyon öncesi taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 30 kV voltaj ve 5 kx yaklaştırma.



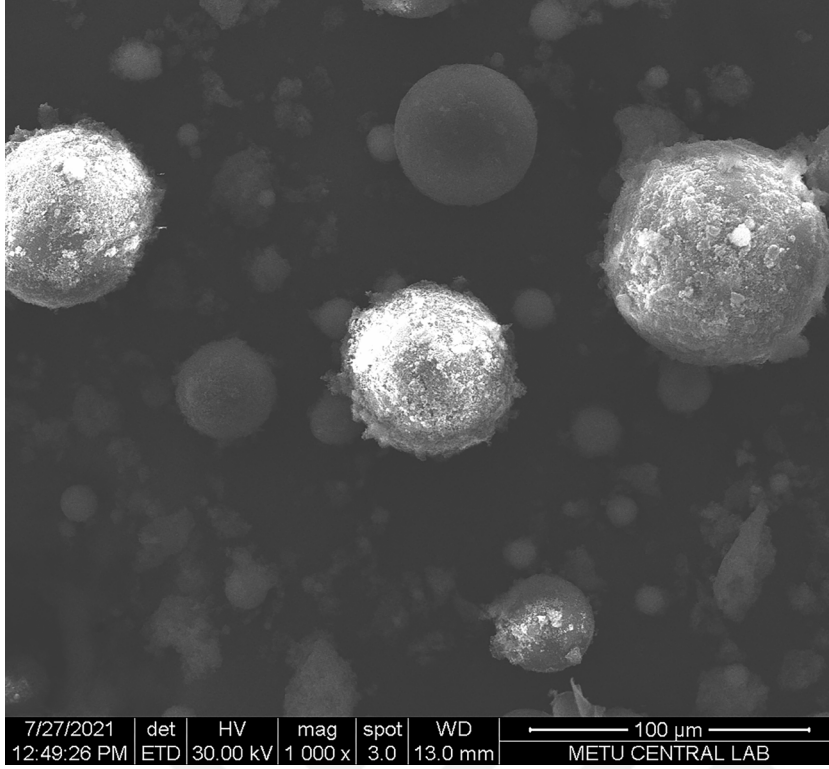
Şekil 4.26. $[(\text{SiNP}@ \text{Eu}^{3+}\text{-MAAsp})\text{NH}_2]$ YED nanopartiküllerin modifikasyon öncesi taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 30 kV voltaj ve 100000 kx yaklaştırma.



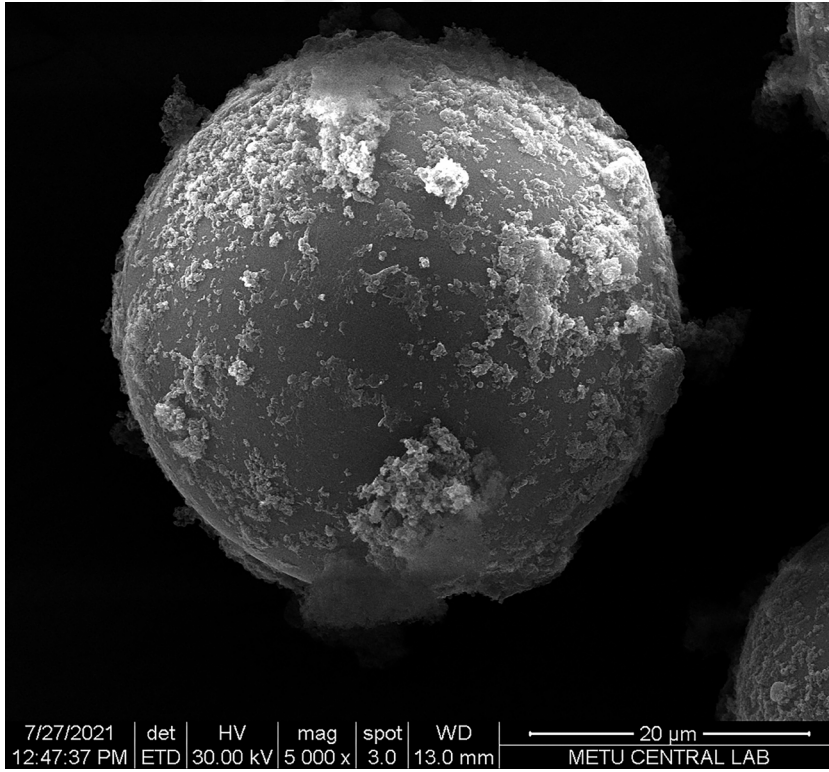
Şekil 4.27. $[(\text{SiNP}@\text{Eu}^{3+}\text{-MAAsp})\text{NH}_2]$ YED nanopartiküllerin modifikasyon öncesi taramalı elektron mikroskopu görüntüleri 30 kV voltaj ve 5 kx yaklaştırma.



Şekil 4.28. $[(\text{SiNP}@\text{Eu}^{3+}\text{-MAAsp})\text{NH}_2]$ YED nanopartiküllerin modifikasyon öncesi taramalı elektron mikroskopu görüntüleri 30 kV voltaj ve 5 kx yaklaştırma.



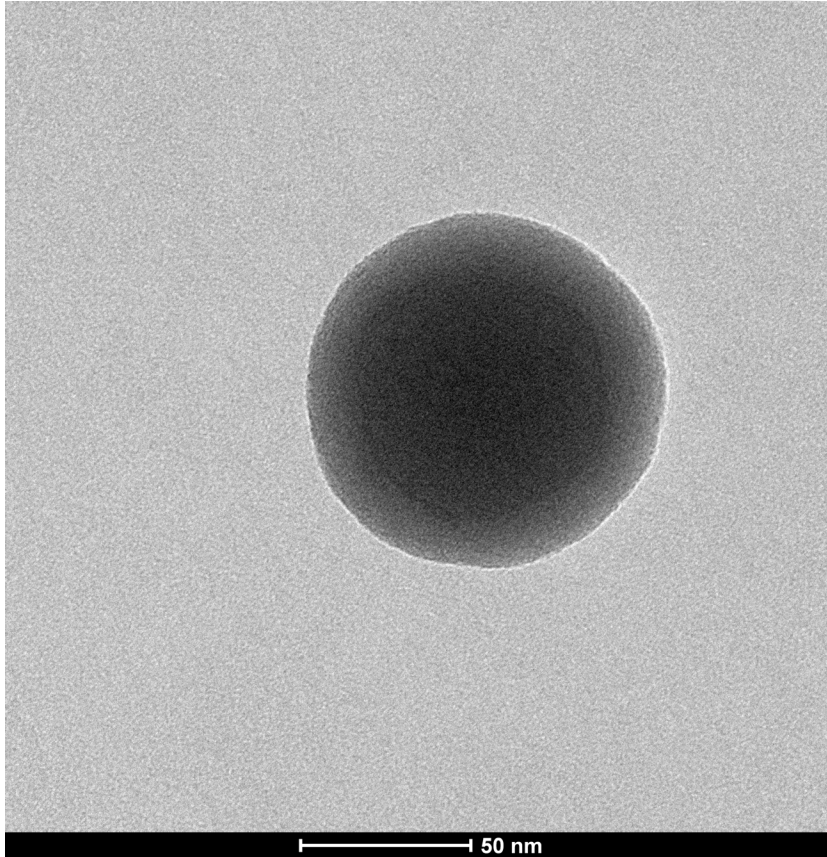
Şekil 4.29. $[(\text{SiNP}@ \text{Eu}^{3+}\text{-MAAAsp})\text{NH}_2] + \text{AntTelo}$ YED nanopartiküllerin modifikasyon sonrası taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 30 kV voltaj ve 5 kx yaklaştırma.



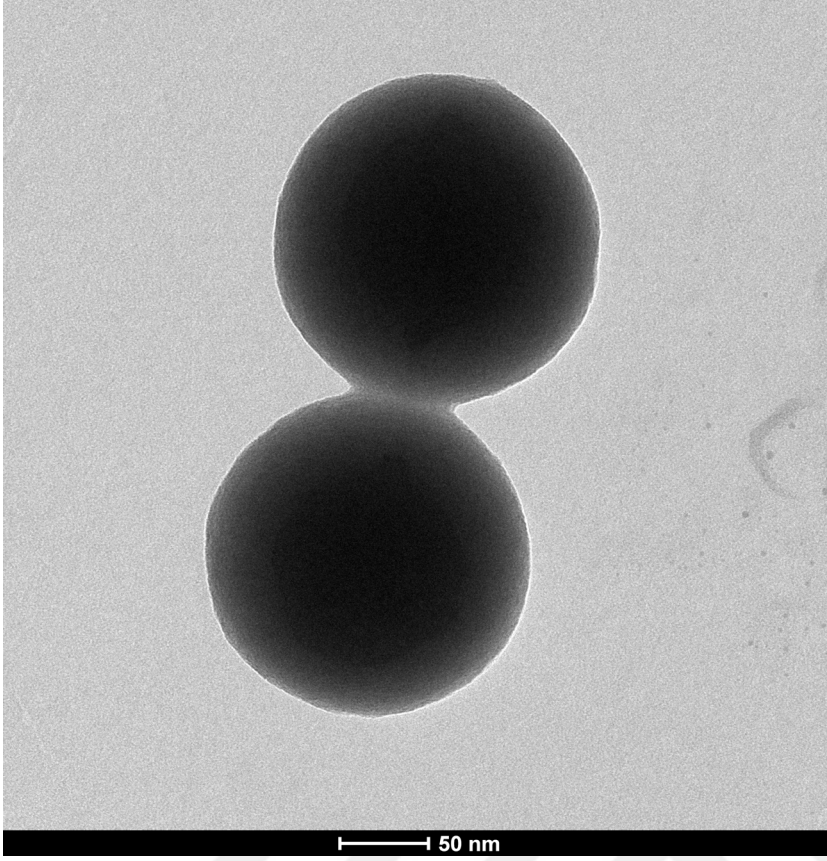
Şekil 4.30. $[(\text{SiNP}@ \text{Eu}^{3+}\text{-MAAAsp})\text{NH}_2] + \text{AntTelo}$ YED nanopartiküllerin modifikasyon sonrası taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 30 kV voltaj ve 5 kx yaklaştırma.

4.2.2.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizleri

$[(\text{SiNP}@ \text{Eu}^{3+}\text{-MAA}(\text{sp})\text{NH}_2)]$ nanopartiküller geçirimli elektron mikroskobu ile incelenmiş ve daha önceki deney sonuçları ile benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. Bu analizin amacı Eu iyonunun silika nanopartiküllerin içine başarılı bir şekilde katılıp katılmadığının araştırılmasıdır. Silika yapılar ışık geçirgenliği olan yapılardır. Bu sebeple, ışığı geçiren silika nanopartiküller Şekil 4.31’de verilmiştir. Herhangi bir kontrast fark bulunmamaktadır. Bunun yanında, içinde lantanit bulunduğu öngörülen numunelerin incelenmesinde ise Şekil 4.32 elde edilmiştir. Bu görüntüler incelediğinde, oluşan derişim farkı ve merkezden çevreye doğru oluşmuş olan gradient değişimi görülmektedir. Partiküllerin merkezinin daha koyu renkli görünmesinin temel nedeni, merkezde ışık geçirgenliğinin azalması, kenarlarda ise saydam ışığı geçiren bir morfolojinin oluşmasıdır. Bu sonuçlara göre çekirdek-kabuk formu başarılı bir şekilde oluşturulmuştur. Silika yapıların içine ışığın geçirilmesini engelleyen lantanit elementi eklenmiştir. Bu sonuçlar, EDX spektrumu, zeta potansiyeli yüzey yükü değişimi, FT-IR, SEM analizleri ve elektroforez sonuçları ile de uyusmaktadır.



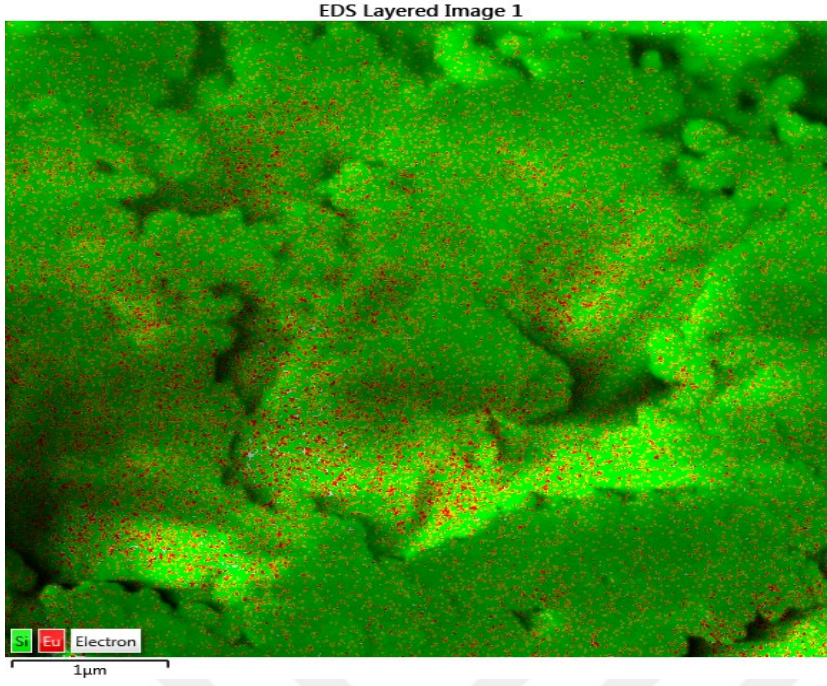
Şekil 4.31. Modifiye edilmemiş silika nanopartiküllerin geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri.



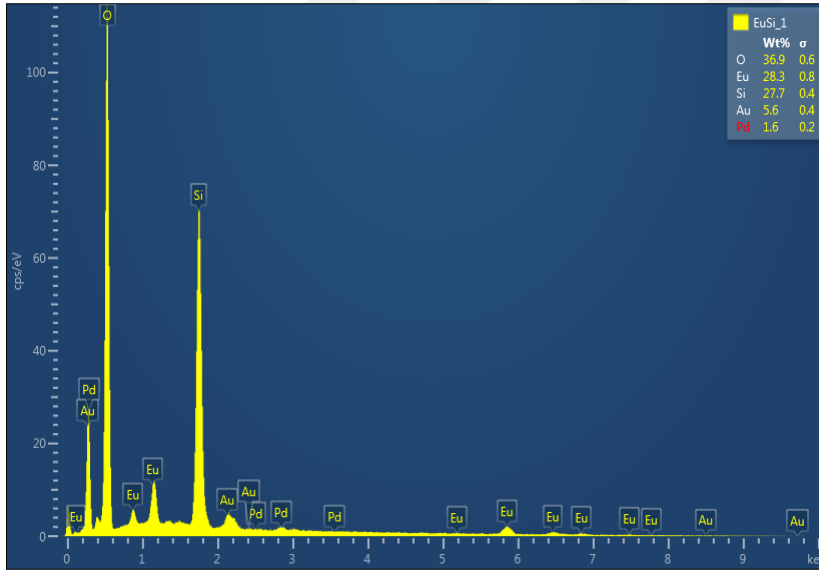
Şekil 4.32. YED özellikli nanopartiküllerin (içinde lantanit ihtiva eden) geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri.

4.2.2.4. Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDX) Analizleri

Silika nanoyapılara Eu iyonunun bağlandığı taramalı elektron mikroskobunun EDX dedektörü yardımı ile elementel analizi yapılarak yüzey haritalanması yapılmıştır. Bu analiz sonucunda silika yüzey yeşil renkli bölgeler ve kırmızı noktalar ise Eu elementini göstermektedir (Şekil 4.33). Şekil 4.34’de, Eu iyonu eklenen silika nanopartiküllerin EDS dedektörü ile elementel taraması yapılmış ve spektrum sonuçlarına bakılmıştır. Bu sonuca göre kayda değer oranda Eu elementinin silika yapılarda bulunan silisyum ve oksijen elementleri ile beraber ortamda olduğu tespit edilmiştir. Analizde çıkan diğer elementler (altın ve paladyum) ise malzemenin kaplanmasında kullanılan malzemeler olduğu için sonuçlara yansımışlardır.

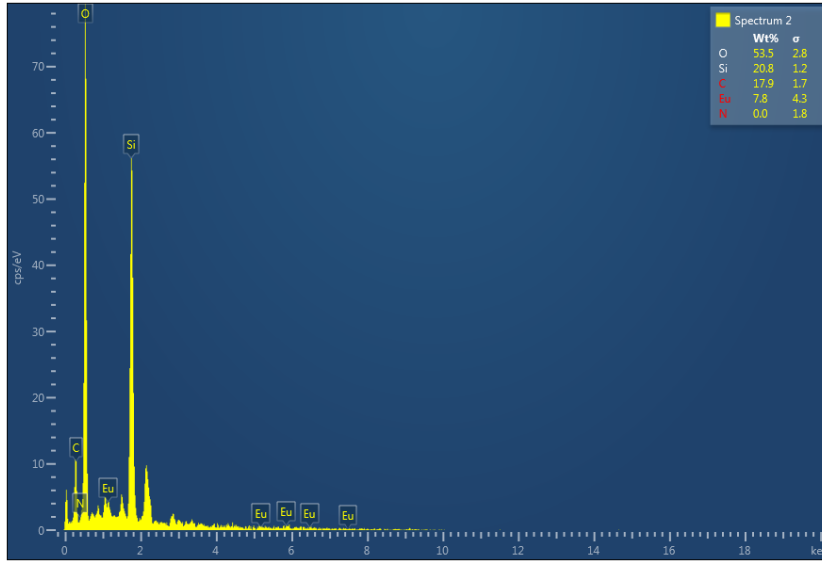


Şekil 4.33. Yüksek enerji dönüşümlü silika nanoyapıların EDX analizi. (Kırmızı noktalar Eu elementini simgelemektedir.)



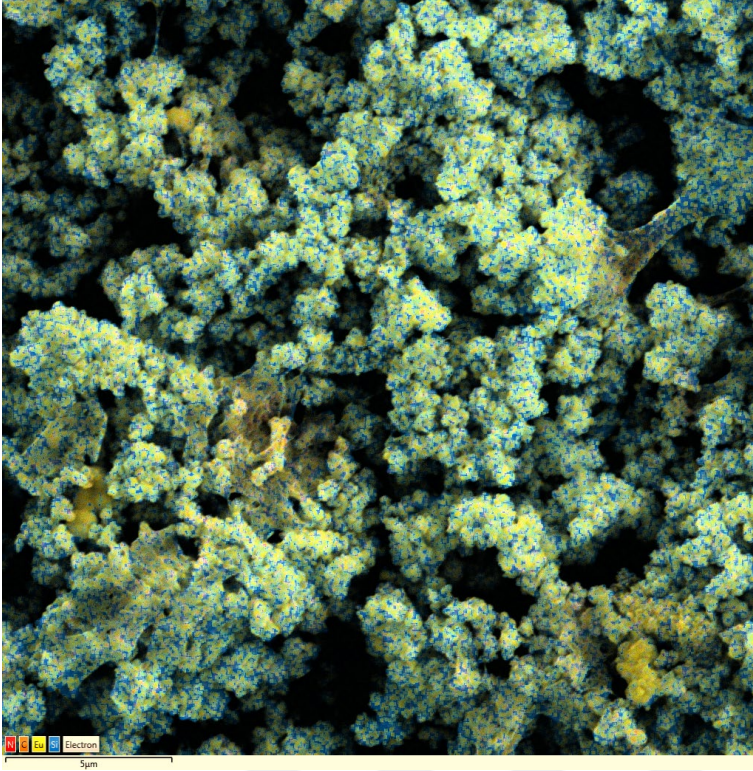
Şekil 4.34. SiNP@Eu EDX Spektrumu

Şekil 4.35’de Eu lantanit iyonu ile beraber yapıya kararlılık getirmesi ve anten etkisi yaratması amacı ile MAAsp ligandı da eklenmiştir. Eklenen malzemelerin içerdiği elementler EDS dedektörü ile elementel tarama sonrasında tespit edilmiştir. Bu analize göre MAAsp ligandının eklenmesi ile yapıda karbon ve oksijen elementi ve APTES eklenmesi ile de azot elementinin yer aldığı görülmüştür.

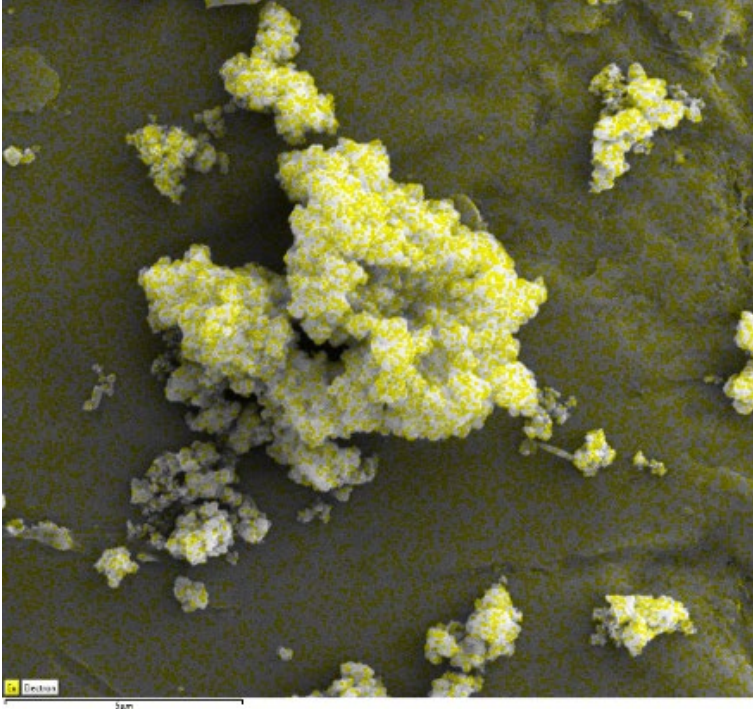


Şekil 4.35. [(SiNP@Eu³⁺-MAAsp)]NH₂ EDX spektrumu.

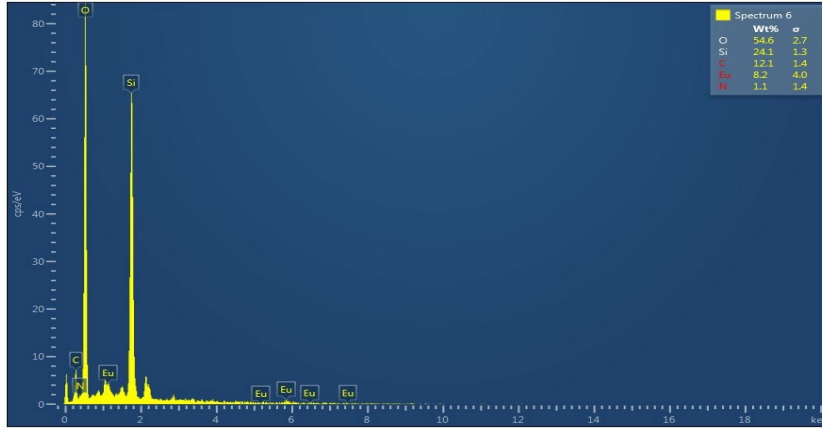
Telomeraz antikoru yüklü [(SiNP@Eu³⁺-MAAsp)]NH₂ nanopartiküllerinin SEM analizinde EDX dedektörü ile elementel incelemeleri yapılmıştır. Bunun sonucunda yüzey haritalanması yapılmış ve modifikasyon sonrasında ortamda olması gereken başlıca elementler araştırılmıştır (Şekil 4.36 ve 4.37). Partiküllerde kayda değer oranlarda karbon, amin ve lantanit elementi saptanmıştır. Yüzey haritalanmasında sarı renkler lantaniti, turuncu renkler karbon elementini, mavi renkler silisyum ve kırmızı renkler azot elementini göstermektedir. Bunun yanında EDS dedektörü ile elementel spektrum taraması yapılmış ve spektrumda karbon, azot ve lantanit spektrumu gözlenmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.36. Antikoru yüklü [(SiNP@Eu³⁺-MAAsp)NH₂]+AntTelo nanopartiküllerinin yüzey haritalanması



Şekil 4.37. Antikoru yüklü [(SiNP@Eu³⁺-MAAsp)NH₂]+AntTelo nanopartiküllerinin yüzey haritalanması.



Şekil 4.38. Antikor yüklü [(SiNP@Eu³⁺-MAA_{sp})NH₂]+AntTelo nanopartiküllerinin EDX elementel analiz spektrumları.

4.2.2.5. Zeta Boyut ve Potansiyel Ölçümleri

Modifikasyon sonrası YED nanopartiküller elektron mikroskopunda incelenmiş ve yüzeylerindeki değişimleri gözlemlemek amacı ile 3 boyutlu çekim yapılmıştır. SDS ortamında dağıtılan partiküllerin hareketli çekimlerinden alınan veriler incelenmiş ve yüzey modifikasyonu sonrası partiküllerin kayda değer morfolojik değişimleri gözlemlenmiştir. Yüzey modifikasyonunun partikül boyutuna etkisi maksimum 10-20 nm arasında olduğu ZETA ile incelenmiş ancak elektron mikroskopunda kayda değer değişiklikler gözlemlenmemiştir. Bunun sebebi olarak da hidrodinamik yarıçapın gerçek çaptan her zaman büyük olduğu olarak düşünülmüştür. Partikül boyutları 100-120 nm civarında sabit kararlılıktadır (Tablo 4.3). Partiküllerin analizlerinin desteklenmesi ve yüzey değişimlerinin sebebi olan moleküllerin etkilerini elektriksel iletkenlik olarak irdelemek amacı ile nanopartiküllerin modifikasyonun her aşamasında ve etkileşimin her aşamasında değişikliklerin anlaşılabilmesi için zeta potansiyel analizi ile incelenmiştir. Silika boş yapıdan, partiküllerin son halinin antijen ile etkileştiği formuna kadar yüzey potansiyellerindeki değişim kayda değer olarak görülmüştür. Tablo 4'te silika yapının boş hal yüzey potansiyeli -9 mV iken, ona pozitif yüklü bir malzemenin eklenmesi ile yüzey potansiyeli ciddi oranda yükselmiş ve -15 mV a kadar düşmüştür. Bunun sebebi pozitif yük merkezinin negatif yükleri çekmesidir. Ortam amino silika ile modifiye edildikten sonra merkez başına düşen pozitif yük arttığı için yüzey yükü negatife kayış meyillinde olmuş ve -22 mV'a düşmüştür. Daha sonra bu malzemeye antikor yüklemesi yapılmış ve yüzey yükü -10,7 mV'a doğru gerilemiş ve yüzeyde biriken negatif yük azalmıştır. Aynı durum antijen etkileşiminde de devam ederek kayda değer oranda yüzey

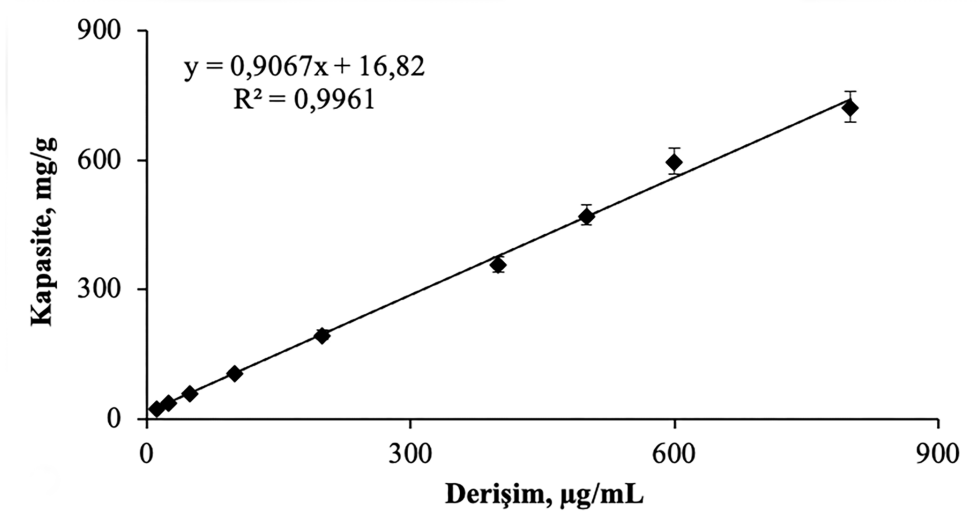
yükü pozitif kayış göstermiştir. Bu durumun sebebi antikor ve antijen proteinlerinin negatif grupları fazlası ile içermesinden kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı da partikülün hidrodinamik yarıçap ara-yüzeyinde oluşan yüzey yükü pozitif kaymıştır. Bu durum elektroforez analizinde de görülmektedir.

Tablo 4.3 Boş silika, lantanit yüklü silika (SiNP@Eu), aminlenmiş lantanit yüklü silika (SiNP@Eu]NH₂), antikor bağlanmış-YED nanoprob silika ([SiNP@Eu]NH₂+AntTelo) ve antijen ile etkileşime sokulmuş ([SiNP@Eu]NH₂+AntTelo+Telo) YED Nanoprobalarının adım adım yüzey potansiyeli.

Nanopartikül	Zeta Potansiyel (mV)	Z-Ortalama Boyut (d.nm)
SiNP	-9	70
SiNP@Eu	-15,3	80
SiNP@Eu]NH ₂	-22,78	100
[SiNP@Eu]NH ₂ +AntTelo	-10,7	115
[SiNP@Eu]NH ₂ +AntTelo+Telo	-4,8	120

4.2.3. [SiNP@Eu³⁺-MAAsp]NH₂ Nanopartiküllerine Anti-Telomeraz Antikorlarının Bağlanma Kapasitesi

YED nanopartiküllerinin belirli konsantrasyonlarda antikor standart çözeltileri ile etkileşimi sonucu nanopartiküllere antikorlar kovalent bağlanmıştır. Bu deney sonucunda ise mg nanopartikül başına kaç µg antikor bağlandığı tablo ve grafiğe dökülerek analiz edilmiştir (Tablo 4.4 ve Şekil 4.39). Kapasite hesaplamalarının sonucuna göre her derişim değerinin sonucu kayda değer çıkmıştır. Bu sebeple medyan değer olan ve hazırlaması kolay olan en optimum derişimdeki çözelti 200 ng/µL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.39. [(SiNP@Eu³⁺-MAAAsp)NH₂] YED immünoptroblarının antikor bağlama kapasitesi.

Tablo 4.4 [(SiNP@Eu³⁺-MAAAsp)NH₂] YED immünoptroblarının antikor bağlama kapasitesi.

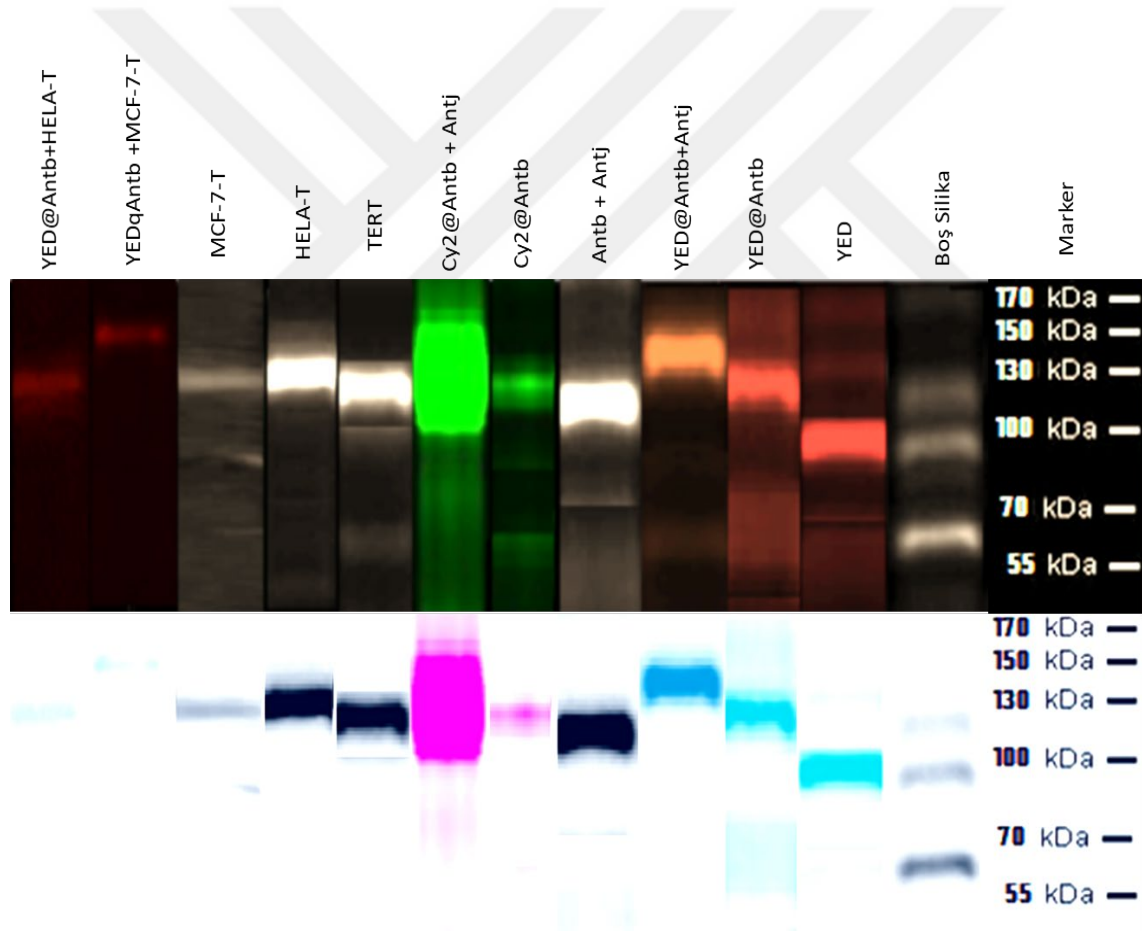
Derişim (µg/mL)	12,5	25	50	100	200	400	500	600	800
Kapasite (Q) (µg/mg)	27,22	40,56	63,06	108,16	196,1	359,3	472,32	597,89	723,46

4.2.4. [(SiNP@Eu³⁺-MAAAsp)NH₂]+Anti-Telo Nanopartiküllerin Telomeraz Antijenleri ile Etkileşimi

4.2.4.1 SDS-PAGE Çalışmaları

Şekil 4.40’da görüldüğü üzere, pozitif ve negatif görüntüleri alınan jel görüntülemenin sonrasında kayda değer sonuçlar elde edilmiştir. Silika, YED özellikli immünoptroblar, ticari boya, ticari antijen ve hücreden elde edilen antijenlerin çapraz kontrolleri yapılmıştır. Bu sonuca göre, UV bölgede yapılan görüntüleme işlemi neticesinde, immünoptrobların antijenleri yakaladığı, kayda değer oranda dissosiye olmadığı görülmüştür. Eu elementinden kaynaklanan kırmızı renk, ticari boya olan Cy2-green ile neredeyse benzer noktalarda ışıma vermiş ve ticari boyanın aksine, optimize etmiş

olduğumuz Eu katkılı nanoprobolar (YED immüno-probolar) daha keskin ve dağılımı daha az dispersiyonu daha az bantlar vermiştir. YED@Antikor ile Cy2@Antikor kıyaslandığı zaman, bantlar aynı noktada belirmiştir. Bunun yanında her iki malzeme de antijen ile etkileşime sokulup kontrol edilmiş ve yine benzer bölgede bantlar oluşmuştur. Ticari antijen, HeLa-T ve MCF-7-T kıyaslanmış ve MCF-7-T diğerlerine oranla biraz daha aşağı bölgede bant vermişken neredeyse her 3 malzeme de aynı bölgede bant vermiştir. Antijenlerin (Telo), antikor (AntTel) yüklü formlar ile etkileşimleri de yine benzer bölgelerde bantlar vermiştir. Bunun yanında tüm analizler kendi rakipleri içinde doğrusal ilerlemiştir. Grupları kendi içlerinde kıyasladığımız zaman bant oluşum aralıkları birbirleri ile benzer olarak rapor edilmiştir (Tablo 4.5)



Şekil 4.40. YED immüno-probolarının (kırmızı), ticari Cy@2 floresan boyasına (yeşil) karşılık denemesi ve ticari antijen ve gerçek hücre hatlarından elde edilmiş antijenlerin kıyası ve YED immüno-probolarının bu antijenleri yakalama yeteneğinin jel elektroforez cihazı ile karşılaştırılması. *Antb: Antikor, Antj: Antijen

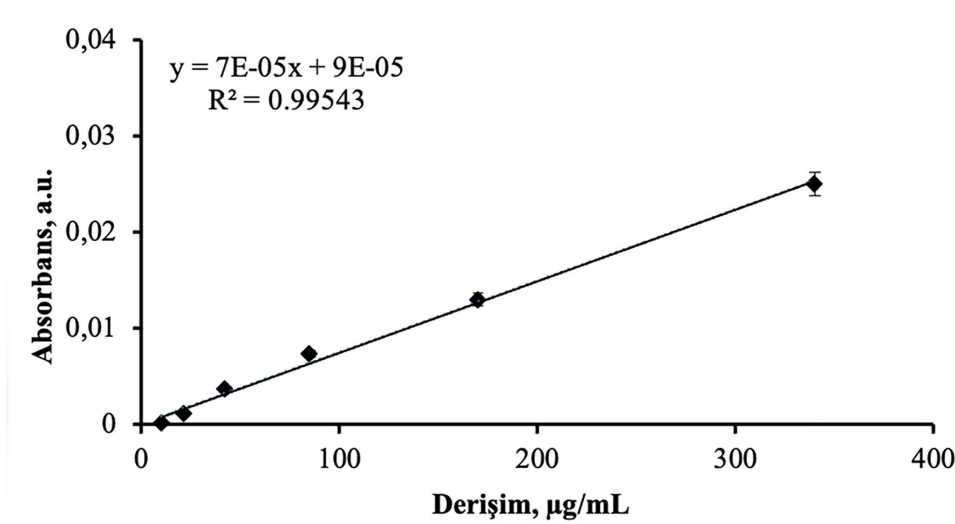
Tablo 4.5 Elektroforez yarışmalı grup incelemesi.

Deney Grubu	Bant (kDa)	Bant (kDa)	Deney Grubu
YED@Antikor	120 dolayları	120 dolayları	Cy2@Antikor
YED@Antikor+Antijen	130- üstü dolayları	130- üstü dolayları	Cy2@Antikor+Antijen
HeLa-T	100 dolayları	100 dolayları	TERT
MCF-7-T	100 Dolayları	100 Dolayları	TERT
YED@Antikor+HeLa-T	130- üstü dolayları	130- üstü dolayları	YED@Antikor+Antijen
YED@Antikor+MCF-7-T	130 dolayları	130 dolayları	YED@Antikor+Antijen

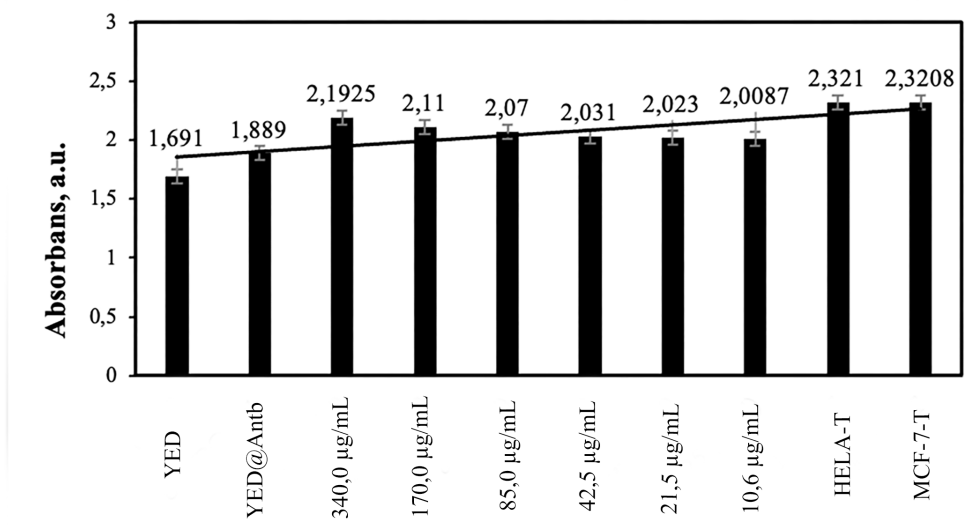
4.2.4.2. UV-Görünür Bölge Spektroskopisi Analizleri

Derişimi bilinen ticari telomeraz ile standart çözeltiler hazırlanmış ve en uygun dalga boyunda (280 nm) kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. R^2 değeri oldukça iyi çıkan bu grafik bundan sonraki hesaplamalarda kullanılmıştır (Şekil 4.41).

250 $\mu\text{g/mL}$ derişimindeki YED immünoprolar, derişimi bilinen ticari antijenler ve derişimi bilinmeyen iki farklı ölümsüz hücre hattından ekstrakte edilmiş telomeraz antijeni ile etkileşime sokulmuştur. Her numune 5'er dakika vorteks edildikten sonra nanodrop yardımı ile absorbanları ölçülmüştür. Ölçüm 280 nm dalga boyunda yapılmıştır. HeLa ve MCF-7 antijenlerinin absorbanı, değeri bilinen maksimum antijenin absorbanından daha yüksek çıkmıştır. Bu analiz sonuçlarına göre oluşturulan grafikte bu değerler yerine konularak gerçek derişimler saptanmıştır. Bu grafiğe göre de HeLa ve MCF-7 hücrelerinden ekstrakte edilen telomeraz miktarları, 719 ve 618,6 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.42).



Şekil 4.41. Telomerez standart çözeltileriyle oluşturulan kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.42. YED immüno problemlerinin derişimi bilinen ticari antijen ve derişimi bilinmeyen gerçek hücre hattından ekstrakte edilen antijenler ile etkileşiminin nanodrop spektrometre cihazı ile incelenmesi.

4.2.4.3. Spektroflorometre Analizleri

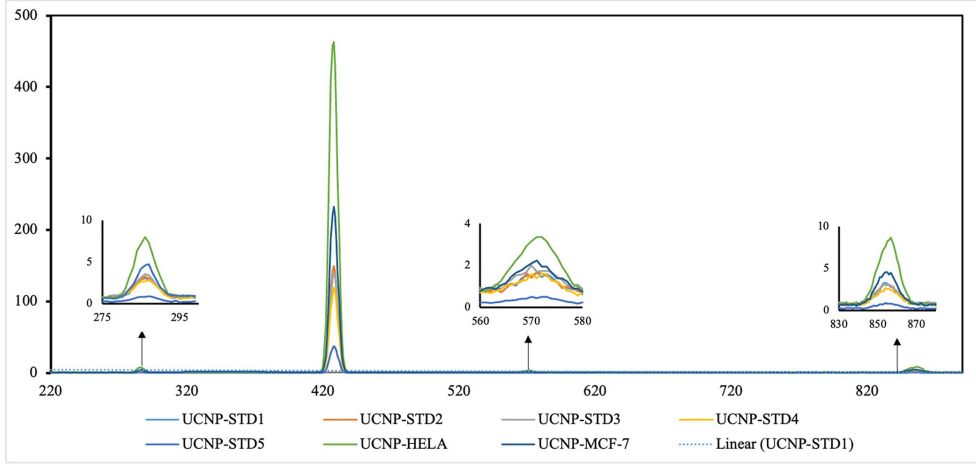
Spektrometrik analizler ve elektroforez analizlerinin dışında, bunlara ek olarak yüksek enerji dönüşümlerini de kanıtlamak ve analizleri kıyaslamak amacı ile final ürünler spektroflore metre analizine tabi tutulmuştur.

Kompleks sırasıyla 280 nm, 425 nm, 570 nm dalga boylarında emisyon yapmıştır. D0→7F0 ve 5D0→7F1 geçişi, 300-600 nm arasındaki yayılma tepe noktalarının Eu³⁺'nin f-f geçişlerine atfedildiği ve 425 nm'deki en güçlü yoğunluğun 7F0→5L6 geçişinden geldiği bilinmektedir. Bu durum, kompleksleşmenin başarıyla gerçekleştirildiğini ve

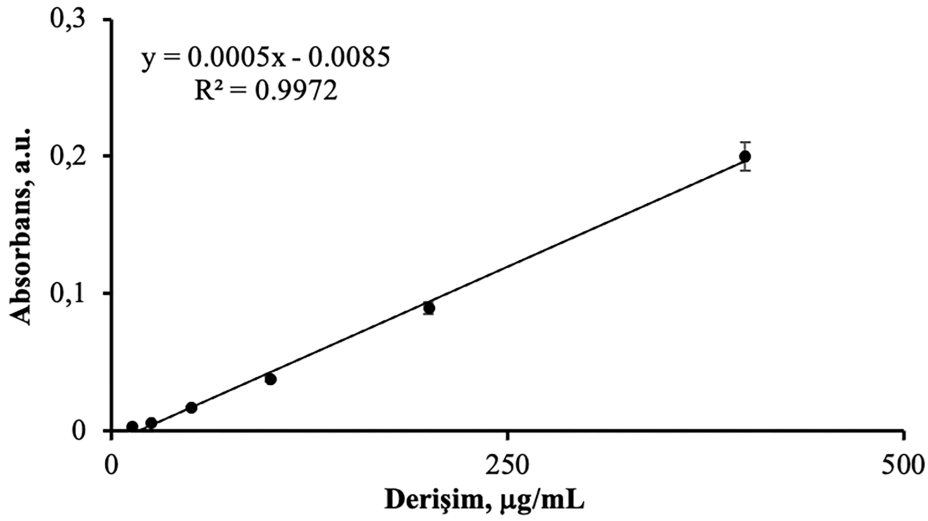
ligand-iyon bağlarının kuvvetli bir şekilde oluştuğunu belirtmektedir. Eu^{3+} 'nın bir bölgede 5 D₀→7 F₁ geçişinin en fazla üç tepeye ve 5D₀→7 F₂ geçişi için beş tepeye bölünebileceği genellikle bilinmektedir [104]. Böylelikle, Eu^{3+} iyonlarının çapraz enerji gevşemesini önleyen MAASp molekülleri tarafından izole edildiğine atfedilebilir (Şekil 4.43).

Önceden hazırlanan antikör ile modifiye edilen YED (UCNP) probolar, önceden hazırlanan derişimleri belli olan ticari antijenler ve derişimleri bilinmeyen gerçek hücrelerden ekstrakte edilen telomeraz antijenleri ile etkileşime sokulmuştur. Sonrasında spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Veriler oldukça umut vadeci olmuştur. Hem YED partiküllere has olan enerji dönüşümü gözlemlenmiş hem de derişim ile bu sonuçlar paralel oranda kayda değer bir şekilde değişim göstermişlerdir. Ayrıca bu analizden elde edilen sonuçlar nanodrop sonuçları ile paralel oranda doğruluk göstermiştir. Standart antijenlerinden alınan derişim sonuçlarına göre oluşturulan kalibrasyon eğrisinden alınan denkleme göre absorbans değerleri bilinen HeLa ve MCF-7 antijenlerinin derişim değerleri hesaplanmıştır. Tablo 4.5’de belirtildiği gibi HeLa ve MCF-7 antijen miktarları ciddi oranda yüksek çıkmıştır. HeLa-T derişimi, elektroforez ve UV-spektrometrede olduğu gibi floresans spektrometre analizinde de MCF-7-T’den daha agresif çıkmıştır. Bu deney sonucu da Chen ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları ‘‘tümör spesifik biyoluminesant’’ çalışmalarını (HeLa telomeraz aktivite davranışı, MCF-7 telomeraz aktivite davranışına göre daha agresiftir) destekler niteliktedir. Bu durumda, aynı konularda çalışan bilim insanlarının bir gün mutlaka birbirlerinin savlarına yorum yapabilme kabiliyetlerini deneysel doğrulardan aldığını bir kez daha göstermiştir [236].

Tablo 4.5’te maksimum emisyon piki temel alınarak bilinmeyen numunelerin ve bilinen numunelerin absorbans ve derişim değerleri özetlenmiştir. Derişimi bilinmeyen numuneler Şekil 4.44’de verilen grafikten türeyen formüle göre hesaplanmıştır.



Şekil 4.43. YED immünoptrolarının ticari ve gerçek hücre antijenleri ile etkileşiminin spektroflore metre ile incelenmesi.



Şekil 4.44. Standart telomerez antijenlerinin spektroflore metre ile oluşturulmuş kalibrasyon grafiğı.

Tablo 4.6. Ticari ve Derişimi Bilinmeyen Gerçek Kanser Hücrelerinden Elde Edilen Telomeraz Derişimleri

	Telomeraz Derişim (µg/mL)	Absorbans
Std1	400	0,2
Std2	200	0,0897
Std3	100	0,0378
Std4	50	0,017
Std5	25	0,006
Std6	12,5	0,00276
HeLa	740	0,4582
MCF-7	329	0,2322

5. YORUM

Silika bazlı immünoproblar önce amin grupları ile aktive edilmiş ve daha sonra antikorlar, EDC-NHS yolu ile yüzeylerine kovalent olarak bağlanmıştır. Her adımda, modifikasyon adımlarını tam olarak karakterize etmek için FT-IR ölçümleri, boyut ve yüzey potansiyel analizleri, elektron/transmisyon mikroskobu gözlemleri ve elemental (EDAX) ve UV spektrometre analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm bu analizler, immünoprobların başarılı sentezi, modifikasyonu ve seçici etkileşim kabiliyetini doğrulamıştır. Hedef ve yarışmacı protein çözeltileri ile etkileşimlerden elde edilen sonuçlar ışığında, her konsantrasyonda önemli etkileşimler gerçekleşmiş, ancak en etkili etkileşim transferrin antijeni temelinde, 250 µg/mL (kapasite 686,5 mg/g) transferrin konsantrasyonuna karşı iken, en yüksek immünoçöktürme yüzdesi daha düşük konsantrasyonda elde edilmiştir. Ek olarak, seçicilik çalışmalarına göre nanoproboların diğer yarışmacı proteinlere karşı önemli bir afinitesi gözlenmemiştir.[237]

Bu çalışmada, uygulaması kolay, kullanıcı dostu ve seçici bir immünoproblar geliştirmek için iyi bilinen geleneksel sentez yönteminin kullanımı gösterilmiştir. Silika bazlı nanopartiküller, biyomedikal uygulamaların yanı sıra birçok yeni teknolojik uygulamada da kullanılmıştır. Bu nedenle, silan kimyasını nispeten kolay uygulanabilirliği ile birleştirerek, yüzey modifikasyonuna izin vererek ve nanopartiküllerin yüksek aktif yüzey alanı/hacim oranlarıyla birleştirerek dikkatimizi yeni bir nanoprob sistemi geliştirmeye odaklanılmıştır. Ek olarak, nanoproboları seçicilik kazandırmak için bir tanıma elemanı olarak spesifik antikorların bağlanması gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sistemin performans analizinde kullanılacak olan hedef molekül olan transferrin antijeni, anemili hastalarda ayırıcı tanıda toplam demir bağlama kapasitesinin (TIBC) biyomedikal analizinde önemli olduğundan seçilmiştir. Toplam demir bağlama kapasitesi (TIBC), plazma veya serum transferrinini doyumak için gereken maksimum demir miktarını göstermektedir. TIBC, serum transferrin konsantrasyonu, serum demir konsantrasyonu veya doymamış demir bağlama kapasitesinden hesaplanabilir. Burada en hassas ölçüm transferrin miktarı ile gerçekleştirilen ölçüm olmaktadır. Çünkü organizmada demir iyonlarının net karşılığı onun antagonisti olacak olan TIBC sekretasyonu ile elde edilebilir. Ancak transferrinin doğrudan ölçümü pahalı ve karmaşık bir yöntem olduğundan, TIBC seviyeleri dolaylı yöntemlerden hesaplanmaktadır [237, 238].

Pilot çalışmada başarılı sonuçların alınmasının ardından, tez çalışmasının asıl hipotezi “son on yıllarda üzerinde oldukça durulan, kanserin erken dönem teşhisi için bir marker haline gelmiş telomeraz enzimi’nin belirlenmesi” üzerine çalışılmıştır. Bu çalışmada, önceki çalışmalarda optimize edilmiş sistemler üzerinden gidilerek, tayin limitini, kararlılığını ve nitel gözlenebilirliğini artırma amaçlı florofor özellik katılmıştır. Bu sistem yüksek enerji dönüşümü özelliği olan nadir toprak elementlerini, sinyal arttırıcı ve ligand görevi de gören Aspartik asitin modifiye polimerik yapısı ile silika yapıya bağlanması ile tertip edilmiştir. Bu malzeme her aşamada modifikasyonların başarılı olduğunu göstermek için elektron mikroskobu, FT-IR, yüzey potansiyeli, spektrometre ve jel-elektroforez yöntemi ile analiz edilmiştir. Telomeraz tespiti için son olarak ise florofor özelliği kazanmış silika YED (UCNP) partikülleri antijeni tanıyacak olan antikorlar ile modifiye edilmiş ve sensör haline dönüştürülmüştür. Yukarıda anlatıldığı gibi antikorun silika yapılara bağlanması oldukça verimli olmuştur. Bu nanoprobalar (UCNP) daha sonra, in vitro ortamda derişimi bilinen ticari ve derişimi bilinmeyen gerçek kanser hücrelerinden izole edilmiş antijenler ile etkileşime sokulmuştur. Etkileşim öncesi ve sonrası spektroflorete ile analizleri yapılmıştır. Malzemenin başlangıçta beklenildiği gibi yüksek enerji dönüşümü özelliği en az 5 farklı noktada yaptığı ışımlar ile saptanmış ve övropiyuma ait olan D ve F geçişleri de gözlenmiştir. Keskin spektrum piklerinin alındığı analizlerde en yüksek şiddete sahip olan spektrum seçilmiş ve bu noktada oluşturulan kalibrasyon grafiğine göre derişimi bilinmeyen MCF-7 ve HeLa kanser hücrelerinden izole edilen gerçek antijenlerin miktar tespiti yapılmıştır. Bu sonuçlara göre HeLa hücresi literatürden de hareketle MCF-7 hücresinden daha yüksek absorbands değerine sahip olmuştur. Literatüre göre de aynı miktarda bulunan hücrelerden elde edilen antijen miktarına göre HeLa hücresininki her zaman daha agresif çıkmıştır. Spektrometrik analizlerin, protein düzeyinde bir etkileşiminin olup olmadığını sağlamak amacı ile ticari ve gerçek antijene afinitesi olan bir florofor ticari boya alınmıştır (Cy@2-green). Bu boya ile karşılaştırmalı jel elektroforez çalışması yapılmıştır. Bu jel elektroforez sonuçları da Spektrometrik analizleri destekler nitelikte çıkmıştır. Bunların yanında, belki de ileri çalışmalarda bir projeye ilham verecek başka bir fikir daha açığa çıkmıştır. YED immünoprobalarının da bu analiz sayesinde adeta bir elektroforez boyası olarak kullanılacağı görülmüştür.

Sonuç olarak, seçici immünoçöktürme performansı sadece sentez, modifikasyon ve uygulama aşamaları dikkate alınarak değil, aynı zamanda kullanıcı dostu, zaman ve

maliyet açısından verimli, geleneksel sistemlere entegre edilmesi kolay, hızlı ve güvenli analiz ve seçici immünoçöktürme performansı sağlar. Geliştirilen immünoprobun hem sentez/modifikasyon yöntemi hem de seçici çöktürme performansı, biyomedikal analiz için umut verici alternatif araçlar olarak sınıflandırılmaları gerektiğini göstermiştir.

Tüm bu çalışmanın sonunda, cut-off değerlerinin net ve hassas olarak belirlenmesi için insan çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Bu tez çalışmasının devam çalışması olarak ileri düzey bir proje ile gerçek hastalar üzerinde sistematik bir kurgu ile çalışarak hassasiyeti oldukça yüksek bir immünoçöktürme temelli bir biyosensör geliştirilip, kanserin erken teşhisi için kliniğe ciddi destek verece ticari bir ürün çıkabilir.



6. KAYNAKLAR

1. Drake TJ, Zhao XJ, Tan W. Bioconjugated silica nanoparticles for bioanalytical applications. *Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives*. 2004:444-57.
2. Nurunnabi M, Cho KJ, Choi JS, Huh KM, Lee Y-k. Targeted near-IR QDs-loaded micelles for cancer therapy and imaging. *Biomaterials*. 2010;31(20):5436-44.
3. Malhotra BD, Singhal R, Chaubey A, Sharma SK, Kumar A. Recent trends in biosensors. *Current Applied Physics*. 2005;5(2):92-7.
4. Hasan A, Memić A, Annabi N, Hossain M, Paul A, Dokmeci MR, et al. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta biomaterialia*. 2014;10(1):11-25.
5. Hasan A, Ragaert K, Swieszkowski W, Selimović Š, Paul A, Camci-Unal G, et al. Biomechanical properties of native and tissue engineered heart valve constructs. *Journal of biomechanics*. 2014;47(9):1949-63.
6. Jain R, Miri S, Pachapur VL, Brar SK. Advances in antibody-based biosensors in environmental monitoring. *Tools, Techniques and Protocols for Monitoring Environmental Contaminants*: Elsevier; 2019. p. 285-305.
7. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Analytical Letters*. 2001;34(5):635-59.
8. Karunakaran C, Rajkumar R, Bhargava K. Introduction to biosensors. *Biosensors and bioelectronics*: Elsevier; 2015. p. 1-68.
9. Jayanthi VSA, Das AB, Saxena U. Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;91:15-23.

10. Sawant S. Development of biosensors from biopolymer composites. Biopolymer composites in electronics: Elsevier; 2017. p. 353-83.
11. Long F, Zhu A, Shi H. Recent advances in optical biosensors for environmental monitoring and early warning. *Sensors*. 2013;13(10):13928-48.
12. Cosnier S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosensors and Bioelectronics*. 1999;14(5):443-56.
13. Tien HT, Wurster SH, Ottova AL. Electrochemistry of supported bilayer lipid membranes: background and techniques for biosensor development. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1997;42(1):77-94.
14. D'souza S. Immobilization and stabilization of biomaterials for biosensor applications. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2001;96:225-38.
15. Riedel K. Microbial biosensors based on oxygen electrodes. *Enzyme and microbial biosensors: techniques and protocols*. 1998:199-223.
16. Marty J, Olive D, Asano Y. Measurement of BOD: correlation between 5-day BOD and commercial BOD biosensor values. *Environmental technology*. 1997;18(3):333-7.
17. Rizzuto R, Pinton P, Brini M, Chiesa A, Filippin L, Pozzan T. Mitochondria as biosensors of calcium microdomains. *Cell calcium*. 1999;26(5):193-200.
18. Kress-Rogers E, Brimelow CJ. Instrumentation and sensors for the food industry: Woodhead Publishing; 2001.
19. Turner A, Karube I, Wilson GS. Biosensors: fundamentals and applications: Oxford university press; 1987.

20. Campàs M, Carpentier R, Rouillon R. Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. *Biotechnology Advances*. 2008;26(4):370-8.
21. Abdolrahim M, Rabiee M, Alhosseini SN, Tahriri M, Yazdanpanah S, Tayebi L. Development of optical biosensor technologies for cardiac troponin recognition. *Analytical biochemistry*. 2015;485:1-10.
22. Hermanson GT. *Bioconjugate techniques*: Academic press; 2013.
23. Sharma S, Byrne H, O'Kennedy RJ. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays in biochemistry*. 2016;60(1):9-18.
24. Benito-Pena E, Valdés MG, Glahn-Martinez B, Moreno-Bondi MC. Fluorescence based fiber optic and planar waveguide biosensors. A review. *Analytica chimica acta*. 2016;943:17-40.
25. Lazcka O, Del Campo FJ, Munoz FX. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and bioelectronics*. 2007;22(7):1205-17.
26. Watts HJ, Lowe CR, Pollard-Knight DV. Optical biosensor for monitoring microbial cells. *Analytical chemistry*. 1994;66(15):2465-70.
27. Heldman DR, Moraru CI. *Encyclopedia of agricultural, food, and biological engineering*: CRC press; 2010.
28. Kress-Rogers E. *Handbook of biosensors and electronic noses: medicine, food, and the environment*: CRC Press; 1996.
29. Turner AP. Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(8):3184-96.

30. Wheeldon I, Farhadi A, Bick AG, Jabbari E, Khademhosseini A. Nanoscale tissue engineering: spatial control over cell-materials interactions. *Nanotechnology*. 2011;22(21):212001.
31. Wang Y, Chen Q, Zeng X. Potentiometric biosensor for studying hydroquinone cytotoxicity in vitro. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010;25(6):1356-62.
32. Yoo E-H, Lee S-Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors*. 2010;10(5):4558-76.
33. Borgmann S, Schulte A, Neugebauer S, Schuhmann W. Advances in electrochemical science and engineering. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim. 2011:32885-7.
34. Scognamiglio V, Scire A, Aurilia V, Staiano M, Crescenzo R, Palmucci C, et al. A strategic fluorescence labeling of D-galactose/D-glucose-binding protein from *Escherichia coli* helps to shed light on the protein structural stability and dynamics. *Journal of Proteome Research*. 2007;6(11):4119-26.
35. Sacks DB, Brun DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clinical chemistry*. 2002;48(3):436-72.
36. Maruo K, Tsurugi M, Tamura M, Ozaki Y. In vivo noninvasive measurement of blood glucose by near-infrared diffuse-reflectance spectroscopy. *Applied spectroscopy*. 2003;57(10):1236-44.
37. Vrančić C, Fomichova A, Gretz N, Herrmann C, Neudecker S, Pucci A, et al. Continuous glucose monitoring by means of mid-infrared transmission laser spectroscopy in vitro. *Analyst*. 2011;136(6):1192-8.

38. Malik BH, Coté GL. Real-time, closed-loop dual-wavelength optical polarimetry for glucose monitoring. *Journal of biomedical optics*. 2010;15(1):017002--6.
39. Kottmann J, Rey JM, Luginbühl J, Reichmann E, Sigrist MW. Glucose sensing in human epidermis using mid-infrared photoacoustic detection. *Biomedical optics express*. 2012;3(4):667-80.
40. Tuchin VV. Handbook of optical sensing of glucose in biological fluids and tissues: CRC press; 2008.
41. Martin WB, Mirov S, Venugopalan R. Middle infrared, quantum cascade laser optoelectronic absorption system for monitoring glucose in serum. *Applied Spectroscopy*. 2005;59(7):881-4.
42. Zheng P, Kramer CE, Barnes CW, Braig JR, Sterling BB. Noninvasive glucose determination by oscillating thermal gradient spectrometry. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2000;2(1):17-26.
43. Guo X, Mandelis A, Zinman B. Noninvasive glucose detection in human skin using wavelength modulated differential laser photothermal radiometry. *Biomedical optics express*. 2012;3(11):3012-21.
44. Mandelis A, Guo X. Wavelength-modulated differential photothermal radiometry: theory and experimental applications to glucose detection in water. *Physical Review E*. 2011;84(4):041917.
45. Jain KK. Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics. *Clinical chemistry*. 2007;53(11):2002-9.
46. Scognamiglio V. Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013;47:12-25.

47. Rad AS, Mirabi A, Binaian E, Tayebi H. A review on glucose and hydrogen peroxide biosensor based on modified electrode included silver nanoparticles. *Int J Electrochem Sci*. 2011;6(8):3671-83.
48. Gu T, Hasebe Y. DNA–Cu (II) poly (amine) complex membrane as novel catalytic layer for highly sensitive amperometric determination of hydrogen peroxide. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006;21(11):2121-8.
49. Chen S, Yuan R, Chai Y, Zhang L, Wang N, Li X. Amperometric third-generation hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of hemoglobin on multiwall carbon nanotubes and gold colloidal nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;22(7):1268-74.
50. Li J, Lin X. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in poly (o-aminophenol) film on polypyrrole-Pt nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;22(12):2898-905.
51. Liu Q, Lu X, Li J, Yao X, Li J. Direct electrochemistry of glucose oxidase and electrochemical biosensing of glucose on quantum dots/carbon nanotubes electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;22(12):3203-9.
52. Qu F, Yang M, Jiang J, Shen G, Yu R. Amperometric biosensor for choline based on layer-by-layer assembled functionalized carbon nanotube and polyaniline multilayer film. *Analytical biochemistry*. 2005;344(1):108-14.
53. Zhang J, Feng M, Tachikawa H. Layer-by-layer fabrication and direct electrochemistry of glucose oxidase on single wall carbon nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;22(12):3036-41.
54. Xu Y, Hu C, Hu S. A hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of hemoglobin in Hb–Ag sol films. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2008;130(2):816-22.

55. Chang Q, Zhu L, Jiang G, Tang H. Sensitive fluorescent probes for determination of hydrogen peroxide and glucose based on enzyme-immobilized magnetite/silica nanoparticles. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2009;395:2377-85.
56. Kim G, Lee Y-EK, Xu H, Philbert MA, Kopelman R. Nanoencapsulation method for high selectivity sensing of hydrogen peroxide inside live cells. *Analytical chemistry*. 2010;82(6):2165-9.
57. Shiang Y-C, Huang C-C, Chang H-T. Gold nanodot-based luminescent sensor for the detection of hydrogen peroxide and glucose. *Chemical Communications*. 2009(23):3437-9.
58. Llaudet E, Hatz S, Droniou M, Dale N. Microelectrode biosensor for real-time measurement of ATP in biological tissue. *Analytical chemistry*. 2005;77(10):3267-73.
59. Wang C, Huang C-Y, Lin W. Optical ATP biosensor for extracellular ATP measurement. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013;43:355-61.
60. Bours MJL, Dagnelie PC, Giuliani AL, Wesselius A, Di Virgilio F. P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. *Frontiers in Bioscience-Scholar*. 2011;3(4):1443-56.
61. Corriden R, Insel PA. Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Science signaling*. 2010;3(104):re1-re.
62. Wall M, Eason R, Dale N. Biosensor measurement of purine release from cerebellar cultures and slices. *Purinergic Signalling*. 2010;6:339-48.
63. Schneider SW, Egan ME, Jena BP, Guggino WB, Oberleithner H, Geibel JP. Continuous detection of extracellular ATP on living cells by using atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(21):12180-5.

64. Hayashi S, Hazama A, Dutta AK, Sabirov RZ, Okada Y. Detecting ATP release by a biosensor method. *Science's STKE*. 2004;2004(258):p114-pl.
65. Xie L, Yan X, Du Y. An aptamer based wall-less LSPR array chip for label-free and high throughput detection of biomolecules. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014;53:58-64.
66. Stamenkovic I, editor *Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis*. *Seminars in cancer biology*; 2000: Elsevier.
67. Cupp-Enyard C. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay-Casein as a Substrate. *JoVE*. 19. Citeseer; 2008.
68. Hu J, Zhang G, Liu S. Enzyme-responsive polymeric assemblies, nanoparticles and hydrogels. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(18):5933-49.
69. Lowe SB, Dick JA, Cohen BE, Stevens MM. Multiplex sensing of protease and kinase enzyme activity via orthogonal coupling of quantum dot-peptide conjugates. *ACS nano*. 2012;6(1):851-7.
70. Orosco MM, Pacholski C, Sailor MJ. Real-time monitoring of enzyme activity in a mesoporous silicon double layer. *Nature Nanotechnology*. 2009;4(4):255-8.
71. Morimoto RI. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes & development*. 2008;22(11):1427-38.
72. Shevchenko Y, Camci-Unal G, Cuttica DF, Dokmeci MR, Albert J, Khademhosseini A. Surface plasmon resonance fiber sensor for real-time and label-free monitoring of cellular behavior. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014;56:359-67.

73. Altintas Z, Kallempudi SS, Sezerman U, Gurbuz Y. A novel magnetic particle-modified electrochemical sensor for immunosensor applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012;174:187-94.
74. Ladd J, Lu H, Taylor AD, Goodell V, Disis ML, Jiang S. Direct detection of carcinoembryonic antigen autoantibodies in clinical human serum samples using a surface plasmon resonance sensor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;70(1):1-6.
75. Kallempudi SS, Altintas Z, Niazi JH, Gurbuz Y. A new microfluidics system with a hand-operated, on-chip actuator for immunosensor applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012;163(1):194-201.
76. Morris MC. Fluorescent biosensors—probing protein kinase function in cancer and drug discovery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2013;1834(7):1387-95.
77. Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(7):547-66.
78. Nakamura N, Shigematsu A, Matsunaga T. Electrochemical detection of viable bacteria in urine and antibiotic selection. *Biosensors and Bioelectronics*. 1991;6(7):575-80.
79. Plomer M, Guilbault GG, Hock B. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of enterobacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. 1992;14(3):230-5.
80. Lee WE, Thompson HG, Hall JG, Fulton RE, Wong JP. Rapid immunofiltration assay of Newcastle disease virus using a silicon sensor. *Journal of immunological methods*. 1993;166(1):123-31.

81. Leung A, Shankar PM, Mutharasan R. A review of fiber-optic biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2007;125(2):688-703.
82. Priano G, Pallarola D, Battaglini F. Endotoxin detection in a competitive electrochemical assay: synthesis of a suitable endotoxin conjugate. *Analytical biochemistry*. 2007;362(1):108-16.
83. Xiong XL, Wang SM, Zhang Y, Chen LC, editors. Detection of endotoxin concentration using piezoelectric based biosensor system. *Applied Mechanics and Materials*; 2012: Trans Tech Publ.
84. Yang L, Bashir R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology advances*. 2008;26(2):135-50.
85. Ricci F, Volpe G, Micheli L, Palleschi G. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica chimica acta*. 2007;605(2):111-29.
86. Atias D, Liebes Y, Chalifa-Caspi V, Bremand L, Lobel L, Marks RS, et al. Chemiluminescent optical fiber immunosensor for the detection of IgM antibody to dengue virus in humans. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2009;140(1):206-15.
87. Rich RL, Myszka DG. Spying on HIV with SPR. *Trends in microbiology*. 2003;11(3):124-33.
88. Katz E, Willner I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*. 2003;15(11):913-47.

89. Griffin J, Singh AK, Senapati D, Lee E, Gaylor K, Jones-Boone J, et al. Sequence-Specific HCV RNA Quantification Using the Size-Dependent Nonlinear Optical Properties of Gold Nanoparticles. *small*. 2009;5(7):839-45.
90. Skládal P, dos Santos Riccardi C, Yamanaka H, da Costa PI. Piezoelectric biosensors for real-time monitoring of hybridization and detection of hepatitis C virus. *Journal of Virological Methods*. 2004;117(2):145-51.
91. Frasco MF, Chaniotakis N. Semiconductor quantum dots in chemical sensors and biosensors. *Sensors*. 2009;9(9):7266-86.
92. Khatun Z, Nurunnabi M, Cho KJ, Lee Y-k. Oral delivery of near-infrared quantum dot loaded micelles for noninvasive biomedical imaging. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2012;4(8):3880-7.
93. Khatun Z, Nurunnabi M, Cho KJ, Lee Y-k. Imaging of the GI tract by QDs loaded heparin–deoxycholic acid (DOCA) nanoparticles. *Carbohydrate polymers*. 2012;90(4):1461-8.
94. Kim JS, Cho KJ, Tran TH, Nurunnabi M, Moon TH, Hong SM, et al. In vivo NIR imaging with CdTe/CdSe quantum dots entrapped in PLGA nanospheres. *Journal of colloid and interface science*. 2011;353(2):363-71.
95. Tomasulo M, Yildiz I, Kaanumalle SL, Raymo FM. pH-sensitive ligand for luminescent quantum dots. *Langmuir*. 2006;22(24):10284-90.
96. Xie H-Y, Liang J-G, Zhang Z-L, Liu Y, He Z-K, Pang D-W. Luminescent CdSe-ZnS quantum dots as selective Cu²⁺ probe. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2004;60(11):2527-30.
97. Mattoussi H, Mauro JM, Goldman ER, Anderson GP, Sundar VC, Mikulec FV, et al. Self-assembly of CdSe– ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered

- recombinant protein. *Journal of the American Chemical Society*. 2000;122(49):12142-50.
98. Yeh H-C, Ho Y-P, Wang T-H. Quantum dot-mediated biosensing assays for specific nucleic acid detection. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2005;1(2):115-21.
99. Kauffer F-A, Merlin C, Balan L, Schneider R. Incidence of the core composition on the stability, the ROS production and the toxicity of CdSe quantum dots. *Journal of hazardous materials*. 2014;268:246-55.
100. Tucker A. Jack Andraka, the teen prodigy of pancreatic cancer. *Smithsonian Magazine*. 2012;1.
101. Hasan A, Nurunnabi M, Morshed M, Paul A, Polini A, Kuila T, et al. Recent advances in application of biosensors in tissue engineering. *BioMed research international*. 2014;2014.
102. Wang J, Dai J, Yarlagadda T. Carbon nanotube- conducting-polymer composite nanowires. *Langmuir*. 2005;21(1):9-12.
103. Kim K, Cheng J, Liu Q, Wu XY, Sun Y. Investigation of mechanical properties of soft hydrogel microcapsules in relation to protein delivery using a MEMS force sensor. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2010;92(1):103-13.
104. Kim K, Cheng J, Liu Q, Wu X, Sun Y, editors. MEMS capacitive force sensors for micro-scale compression testing of biomaterials. 2008 IEEE 21st International Conference on Micro Electro Mechanical Systems; 2008: IEEE.

105. Mao S, Yu K, Chang J, Steeber DA, Ocola LE, Chen J. Direct growth of vertically-oriented graphene for field-effect transistor biosensor. *Scientific reports*. 2013;3(1):1-6.
106. Timurdogan E, Alaca BE, Kavakli IH, Urey H. MEMS biosensor for detection of Hepatitis A and C viruses in serum. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011;28(1):189-94.
107. Bruchez Jr M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *science*. 1998;281(5385):2013-6.
108. Koydemir HC, K ulah H,  zgen C, Alp A, Ha celik G. MEMS biosensors for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011;29(1):1-12.
109. Ruan C, Shi W, Jiang H, Sun Y, Liu X, Zhang X, et al. One-pot preparation of glucose biosensor based on polydopamine–graphene composite film modified enzyme electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2013;177:826-32.
110. Xi F, Liu L, Wu Q, Lin X. One-step construction of biosensor based on chitosan–ionic liquid–horseradish peroxidase biocomposite formed by electrodeposition. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008;24(1):29-34.
111. Kuila T, Bose S, Khanra P, Mishra AK, Kim NH, Lee JH. Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosensors and bioelectronics*. 2011;26(12):4637-48.
112. Shao Y, Wang J, Wu H, Liu J, Aksay IA, Lin Y. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*. 2010;22(10):1027-36.

113. Yan X, Cui X, Li B, Li L-s. Large, solution-processable graphene quantum dots as light absorbers for photovoltaics. *Nano letters*. 2010;10(5):1869-73.
114. Gao L, Zhang H, Cui H. A general strategy to prepare homogeneous and reagentless GO/luciferin&enzyme biosensors for detection of small biomolecules. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014;57:65-70.
115. Nurunnabi M, Khatun Z, Nafiujjaman M, Lee D-g, Lee Y-k. Surface coating of graphene quantum dots using mussel-inspired polydopamine for biomedical optical imaging. *ACS applied materials & interfaces*. 2013;5(16):8246-53.
116. Sun H, Wu L, Wei W, Qu X. Recent advances in graphene quantum dots for sensing. *Materials today*. 2013;16(11):433-42.
117. Nurunnabi M, Khatun Z, Reeck GR, Lee DY, Lee Y-k. Near infra-red photoluminescent graphene nanoparticles greatly expand their use in noninvasive biomedical imaging. *Chemical Communications*. 2013;49(44):5079-81.
118. Wang D, Wang L, Dong X, Shi Z, Jin J. Chemically tailoring graphene oxides into fluorescent nanosheets for Fe³⁺ ion detection. *Carbon*. 2012;50(6):2147-54.
119. Liu Y, Yu D, Zeng C, Miao Z, Dai L. Biocompatible graphene oxide-based glucose biosensors. *Langmuir*. 2010;26(9):6158-60.
120. Wu P, Shao Q, Hu Y, Jin J, Yin Y, Zhang H, et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase assembled on graphene and application to glucose detection. *Electrochimica Acta*. 2010;55(28):8606-14.
121. Liang B, Fang L, Yang G, Hu Y, Guo X, Ye X. Direct electron transfer glucose biosensor based on glucose oxidase self-assembled on electrochemically reduced carboxyl graphene. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013;43:131-6.

122. Yin H, Zhou Y, Ma Q, Ai S, Chen Q, Zhu L. Electrocatalytic oxidation behavior of guanosine at graphene, chitosan and Fe₃O₄ nanoparticles modified glassy carbon electrode and its determination. *Talanta*. 2010;82(4):1193-9.
123. Wu H, Wang J, Kang X, Wang C, Wang D, Liu J, et al. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in platinum nanoparticles/graphene/chitosan nanocomposite film. *Talanta*. 2009;80(1):403-6.
124. Osikoya AO, Parlak O, Murugan NA, Dikio ED, Moloto H, Uzun L, et al. Acetylene-sourced CVD-synthesised catalytically active graphene for electrochemical biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;89:496-504.
125. Gupta VK, Atar N, Yola ML, Eryilmaz M, Torul H, Tamer U, et al. A novel glucose biosensor platform based on Ag@ AuNPs modified graphene oxide nanocomposite and SERS application. *Journal of colloid and interface science*. 2013;406:231-7.
126. Kang X, Wang J, Wu H, Aksay IA, Liu J, Lin Y. Glucose oxidase–graphene–chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009;25(4):901-5.
127. Yang MH, Choi BG, Park H, Hong WH, Lee SY, Park TJ. Development of a glucose biosensor using advanced electrode modified by nanohybrid composing chemically modified graphene and ionic liquid. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*. 2010;22(11):1223-8.
128. Singh J, Khanra P, Kuila T, Srivastava M, Das AK, Kim NH, et al. Preparation of sulfonated poly (ether–ether–ketone) functionalized ternary graphene/AuNPs/chitosan nanocomposite for efficient glucose biosensor. *Process Biochemistry*. 2013;48(11):1724-35.

129. Gholivand MB, Khodadadian M. Amperometric cholesterol biosensor based on the direct electrochemistry of cholesterol oxidase and catalase on a graphene/ionic liquid-modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014;53:472-8.
130. Dey RS, Raj CR. Development of an amperometric cholesterol biosensor based on graphene– Pt nanoparticle hybrid material. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2010;114(49):21427-33.
131. Li L, Du Z, Liu S, Hao Q, Wang Y, Li Q, et al. A novel nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on MnO₂/graphene oxide nanocomposite. *Talanta*. 2010;82(5):1637-41.
132. Chen H, Nordon RE. Application of microfluidics to study stem cell dynamics. *Emerging Trends in Cell and Gene Therapy*. 2013:435-70.
133. Kumar S, Kumar S, Ali MA, Anand P, Agrawal VV, John R, et al. Microfluidic-integrated biosensors: Prospects for point-of-care diagnostics. *Biotechnology journal*. 2013;8(11):1267-79.
134. Weltin A, Slotwinski K, Kieninger J, Moser I, Jobst G, Wego M, et al. Cell culture monitoring for drug screening and cancer research: a transparent, microfluidic, multi-sensor microsystem. *Lab on a Chip*. 2014;14(1):138-46.
135. Hu N, Wu C, Ha D, Wang T, Liu Q, Wang P. A novel microphysiometer based on high sensitivity LAPS and microfluidic system for cellular metabolism study and rapid drug screening. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013;40(1):167-73.
136. Shih SC, Barbulovic-Nad I, Yang X, Fobel R, Wheeler AR. Digital microfluidics with impedance sensing for integrated cell culture and analysis. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013;42:314-20.

137. Lei KF, Wu M-H, Hsu C-W, Chen Y-D. Real-time and non-invasive impedimetric monitoring of cell proliferation and chemosensitivity in a perfusion 3D cell culture microfluidic chip. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014;51:16-21.
138. Nguyen TA, Yin T-I, Reyes D, Urban GA. Microfluidic chip with integrated electrical cell-impedance sensing for monitoring single cancer cell migration in three-dimensional matrixes. *Analytical chemistry*. 2013;85(22):11068-76.
139. Melin J, Quake SR. Microfluidic large-scale integration: the evolution of design rules for biological automation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2007;36:213-31.
140. Teşkilatı DP. Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Endüstriyel Hammaddeleri ve Yapı Malzemeleri. Devlet Planlama Teşkilatı Yayınevi, Ankara. 1996.
141. Gültekin AH. Nadir metal yatakları jeolojisi. *Jeoloji Mühendisliği Dergisi*. 1998;21(1):27-41.
142. Suslick KS. Encyclopedia of physical science and technology. Sonoluminescence and sonochemistry, 3rd edn Elsevier Science Ltd, Massachusetts. 2001:1-20.
143. Zepf V, Zepf V. Rare Earth Elements: What and where they are: Springer; 2013.
144. García MVR, Krzemień A, del Campo MÁM, Álvarez MM, Gent MR. Rare earth elements mining investment: It is not all about China. *Resources Policy*. 2017;53:66-76.
145. Greenwood NN, Earnshaw A. Chemistry of the Elements: Elsevier; 2012.
146. Rard JA. Chemistry and thermodynamics of europium and some of its simpler inorganic compounds and aqueous species. *Chemical Reviews*. 1985;85(6):555-82.

147. SUSlick KS. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. J Wiley & Sons: New York. 1998;26:517-41.
148. Johansson B, Rosengren A. Generalized phase diagram for the rare-earth elements: Calculations and correlations of bulk properties. *Physical Review B*. 1975;11(8):2836.
149. Gomez-Villalba LS, Sourty E, Freitag B, Milosevic O, Rabanal ME. TEM–STEM study of europium doped gadolinium oxide nanoparticles synthesized by spray pyrolysis. *Advanced Powder Technology*. 2013;24(5):864-70.
150. Utochnikova V, Koshelev D, Medvedko A, Kalyakina A, Bushmarinov I, Grishko AY, et al. Europium 2-benzofuranoate: Synthesis and use for bioimaging. *Optical Materials*. 2017;74:191-6.
151. Santos S, Rodrigues Jr O, Campos L. Bio-prototyping of europium-yttria based rods for radiation dosimetry. *Materials Chemistry and Physics*. 2017;199:557-66.
152. Zhou B, Shi B, Jin D, Liu X. Controlling upconversion nanocrystals for emerging applications. *Nature nanotechnology*. 2015;10(11):924-36.
153. Haase M, Schäfer H. Upconverting nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011;50(26):5808-29.
154. Chen G, Qiu H, Prasad PN, Chen X. Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics. *Chemical reviews*. 2014;114(10):5161-214.
155. He GS, Markowicz PP, Lin T-C, Prasad PN. Observation of stimulated emission by direct three-photon excitation. *Nature*. 2002;415(6873):767-70.

156. Kumar R, Nyk M, Ohulchanskyy TY, Flask CA, Prasad PN. Combined optical and MR bioimaging using rare earth ion doped NaYF₄ nanocrystals. *Advanced Functional Materials*. 2009;19(6):853-9.
157. González-Béjar M, Francés-Soriano L, Pérez-Prieto J. Upconversion nanoparticles for bioimaging and regenerative medicine. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2016;4:47.
158. Yang J, Sandoval S, Alfaro JG, Aschemeyer S, Liberman A, Martin DT, et al. Red-luminescent europium (III) doped silica nanoshells: synthesis, characterization, and their interaction with HeLa cells. *Journal of Biomedical Optics*. 2011;16(6):066012--8.
159. Babizhayev MA, Yegorov YE. Tissue formation and tissue engineering through host cell recruitment or a potential injectable cell-based biocomposite with replicative potential: Molecular mechanisms controlling cellular senescence and the involvement of controlled transient telomerase activation therapies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015;103(12):3993-4023.
160. Banerjee S, Das J, Santra S. Native silica nanoparticle catalyzed anti-Markovnikov addition of thiols to inactivated alkenes and alkynes: a new route to linear and vinyl thioethers. *Tetrahedron Letters*. 2009;50(1):124-7.
161. Shay JW, Wright WE. Use of telomerase to create bioengineered tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1057(1):479-91.
162. Takeoka Y, Watanabe M. Template Synthesis and Optical Properties of Chameleonic Poly (N-isopropylacrylamide) Gels Using Closest-Packed Self-Assembled Colloidal Silica Crystals. *Advanced Materials*. 2003;15(3):199-201.
163. Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of colloid and interface science*. 1968;26(1):62-9.

164. Rahman IA, Padavettan V. Synthesis of silica nanoparticles by sol-gel: size-dependent properties, surface modification, and applications in silica-polymer nanocomposites—a review. *Journal of nanomaterials*. 2012;2012:8-.
165. Bitar A, Ahmad NM, Fessi H, Elaissari A. Silica-based nanoparticles for biomedical applications. *Drug discovery today*. 2012;17(19-20):1147-54.
166. Yang S, Li Y. Fluorescent hybrid silica nanoparticles and their biomedical applications. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2020;12(3):e1603.
167. Miller PJ, Shantz DF. Covalently functionalized uniform amino-silica nanoparticles. Synthesis and validation of amine group accessibility and stability. *Nanoscale Advances*. 2020;2(2):860-8.
168. Gonçalves M. Sol-gel silica nanoparticles in medicine: A natural choice. Design, synthesis and products. *Molecules*. 2018;23(8):2021.
169. Nordström E, Södergård B, Kukkonen L. Thin sol-gel-derived silica-coatings on cp-titania and bioactivity thereupon. *Bio-medical materials and engineering*. 1994;4(3):187-92.
170. Mochizuki C, Nakamura J, Nakamura M. Development of Non-Porous Silica Nanoparticles towards Cancer Photo-Theranostics. *Biomedicines*. 2021;9(1):73.
171. Rahman IA, Padavettan V. Synthesis of silica nanoparticles by sol-gel: size-dependent properties, surface modification, and applications in silica-polymer nanocomposites—a review. *Journal of Nanomaterials*. 2012;2012.
172. Chen F, Hableel G, Zhao ER, Jokerst JV. Multifunctional nanomedicine with silica: Role of silica in nanoparticles for theranostic, imaging, and drug monitoring. *Journal of colloid and interface science*. 2018;521:261-79.

173. Parra M, Gil S, Gaviña P, Costero AM. Mesoporous Silica Nanoparticles in Chemical Detection: From Small Species to Large Bio-Molecules. *Sensors*. 2022;22(1):261.
174. Korzeniowska B, Nooney R, Wencel D, McDonagh C. Silica nanoparticles for cell imaging and intracellular sensing. *Nanotechnology*. 2013;24(44):442002.
175. Festag G, Schüler T, Steinbrück A, Csáki A, Möller R, Fritzsche W. Chip-based molecular diagnostics using metal nanoparticles. *Expert opinion on medical diagnostics*. 2008;2(7):813-28.
176. Miller P, Shantz D. Covalently functionalized uniform amino-silica nanoparticles. Synthesis and validation of amine group accessibility and stability. Journal Name: *Nanoscale Advances*; Journal Volume: 2; Journal Issue: 2; Conference: null; Patent File Date: null; Patent Priority Date: null; Other Information: null; Related Information: null. 2020:Medium: X; Size: 860 to 8; Quantity: null; OS: null; Compatibility: null; Other: null.
177. Kuwahara Y, Ando T, Kango H, Yamashita H. Palladium Nanoparticles Encapsulated in Hollow Titanosilicate Spheres as an Ideal Nanoreactor for One-pot Oxidation. *Chemistry – A European Journal*. 2017;23(2):380-9.
178. Bagwe RP, Hilliard LR, Tan W. Surface Modification of Silica Nanoparticles to Reduce Aggregation and Nonspecific Binding. *Langmuir*. 2006;22(9):4357-62.
179. Drake T, Zhao X, Tan W. Bioconjugated Silica Nanoparticles for Bioanalytical Applications. 2005. p. 444-57.
180. Zvereva M, Shcherbakova D, Dontsova O. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Moscow)*. 2010;75:1563-83.

181. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(8):573-84.
182. Mergny J-L, Riou J-F, Mailliet P, Teulade-Fichou M-P, Gilson E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Research*. 2002;30(4):839-65.
183. Leão R, Apolónio JD, Lee D, Figueiredo A, Tabori U, Castelo-Branco P. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *Journal of biomedical science*. 2018;25(1):1-12.
184. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease. *International journal of oncology*. 2012;41(5):1561-9.
185. Tarkanyi I, Aradi J. Pharmacological intervention strategies for affecting telomerase activity: Future prospects to treat cancer and degenerative disease. *Biochimie*. 2008;90(1):156-72.
186. Hochreiter AE, Xiao H, Goldblatt EM, Gryaznov SM, Miller KD, Badve S, et al. Telomerase template antagonist GRN163L disrupts telomere maintenance, tumor growth, and metastasis of breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(10):3184-92.
187. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266(5193):2011-5.
188. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):9-18.

189. Xie Z, Jay KA, Smith DL, Zhang Y, Liu Z, Zheng J, et al. Early telomerase inactivation accelerates aging independently of telomere length. *Cell*. 2015;160(5):928-39.
190. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, et al. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer research*. 1995;55(15):3258-62.
191. Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti S. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer research*. 1995;55(12):2533-6.
192. Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Tanaka M, Inoue M. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer research*. 1998;58(7):1558-61.
193. Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, et al. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer research*. 1997;57(2):326-31.
194. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, et al. Telomerase activity in human breast tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(2):116-22.
195. Borah S, Xi L, Zaug AJ, Powell NM, Dancik GM, Cohen SB, et al. TERT promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. *Science*. 2015;347(6225):1006-10.
196. Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Inoue M, Namiki M. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1998;4(7):1603-8.

197. Peifer M, Hertwig F, Roels F, Dreidax D, Gartlgruber M, Menon R, et al. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature*. 2015;526(7575):700-4.
198. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *European journal of cancer*. 1997;33(5):787-91.
199. Gabourdes M, Bourguine V, Mathis G, Bazin H, Alpha-Bazin B. A homogeneous time-resolved fluorescence detection of telomerase activity. *Analytical biochemistry*. 2004;333(1):105-13.
200. Sharon E, Freeman R, Riskin M, Gil N, Tzfati Y, Willner I. Optical, electrical and surface plasmon resonance methods for detecting telomerase activity. *Analytical chemistry*. 2010;82(20):8390-7.
201. Wang J, Wu L, Ren J, Qu X. Visualizing human telomerase activity with primer-modified Au nanoparticles. *Small*. 2012;8(2):259-64.
202. Maesawa C, Inaba T, Sato H, Iijima S, Ishida K, Terashima M, et al. A rapid biosensor chip assay for measuring of telomerase activity using surface plasmon resonance. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(2):e4-e.
203. Sato S, Takenaka S. PCR-free telomerase assay using chronocoulometry coupled with hexaammineruthenium (III) chloride. *Analytical chemistry*. 2012;84(3):1772-5.
204. Wu L, Wang J, Feng L, Ren J, Wei W, Qu X. Label-free ultrasensitive detection of human telomerase activity using porphyrin-functionalized graphene and electrochemiluminescence technique. *Advanced Materials*. 2012;24(18):2447-52.

205. Zhou X, Xing D, Zhu D, Jia L. Magnetic bead and nanoparticle based electrochemiluminescence amplification assay for direct and sensitive measuring of telomerase activity. *Analytical chemistry*. 2009;81(1):255-61.
206. Kullanılan DMTAD. Yöntemler ve Dayandıkları Esaslar. *Türk Biyokimya Dergisi* [Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem]. 2003;28(1):25-9.
207. Hirose M, Abe-Hashimoto J, Tahara H, Ide T, Yoshimura T. New method to measure telomerase activity by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay. *Clinical chemistry*. 1998;44(12):2446-52.
208. Yajima T, Yagihashi A, Kameshima H, Kobayashi D, Furuya D, Hirata K, et al. Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the TaqMan fluorogenic detection system. *Clinical chemistry*. 1998;44(12):2441-5.
209. Fletcher TM, Trevino A, Woynarowski JM. Enzymatic activity of endogenous telomerase associated with intact nuclei from human leukemia CEM cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;265(1):51-6.
210. Sun W, Luo L, Feng Y, Cai Y, Zhuang Y, Xie RJ, et al. Aggregation-induced emission gold clustoluminogens for enhanced low-dose X-ray-induced photodynamic therapy. *Angewandte Chemie*. 2020;132(25):10000-7.
211. Zong S, Wang Z, Chen H, Hu G, Liu M, Chen P, et al. Colorimetry and SERS dual-mode detection of telomerase activity: combining rapid screening with high sensitivity. *Nanoscale*. 2014;6(3):1808-16.
212. Wang K, Shangguan L, Liu Y, Jiang L, Zhang F, Wei Y, et al. In situ detection and imaging of telomerase activity in cancer cell lines via disassembly of plasmonic core-satellites nanostructured probe. *Analytical chemistry*. 2017;89(13):7262-8.

213. Wu Q, Liu Z, Su L, Han G, Liu R, Zhao J, et al. Sticky-flares for in situ monitoring of human telomerase RNA in living cells. *Nanoscale*. 2018;10(19):9386-92.
214. Liu Z, Zhao J, Zhang R, Han G, Zhang C, Liu B, et al. Cross-platform cancer cell identification using telomerase-specific spherical nucleic acids. *ACS nano*. 2018;12(4):3629-37.
215. Nie S, Emory SR. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *science*. 1997;275(5303):1102-6.
216. Zong S, Wang Z, Chen H, Cui Y. Ultrasensitive telomerase activity detection by telomeric elongation controlled surface enhanced Raman scattering. *Small*. 2013;9(24):4215-20.
217. Huang J, Zhu L, Ju H, Lei J. Telomerase triggered DNA walker with a superhairpin structure for human telomerase activity sensing. *Analytical chemistry*. 2019;91(11):6981-5.
218. Yu Z, Jiang F, Hu C, Tang B. Functionalized nanoprobe for in situ detection of telomerase. *Chemical Communications*. 2021.
219. Huang S, Yao H, Wang W, Zhang J-R, Zhu J-J. Highly sensitive fluorescence quantification of intracellular telomerase activity by repeat G-rich DNA enhanced silver nanoclusters. *Journal of Materials Chemistry B*. 2018;6(28):4583-91.
220. Hong M, Xu L, Xue Q, Li L, Tang B. Fluorescence imaging of intracellular telomerase activity using enzyme-free signal amplification. *Analytical chemistry*. 2016;88(24):12177-82.
221. Wang Y, Li Z, Hu D, Lin C-T, Li J, Lin Y. Aptamer/graphene oxide nanocomplex for in situ molecular probing in living cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2010;132(27):9274-6.

222. Zheng T, Feng E, Wang Z, Gong X, Tian Y. Mechanism of surface-enhanced Raman scattering based on 3D graphene–TiO₂ nanocomposites and application to real-time monitoring of telomerase activity in differentiation of stem cells. *ACS applied materials & interfaces*. 2017;9(42):36596-605.
223. Ou X, Zhan S, Sun C, Cheng Y, Wang X, Liu B, et al. Simultaneous detection of telomerase and miRNA with graphene oxide-based fluorescent aptasensor in living cells and tissue samples. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019;124:199-204.
224. Güneri M, Aras S, Cansaran Duman D. The Role of Telomeres in Aging and Cancer Relationships. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*. 66(4):187-95.
225. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*. 2014;19(2):164-74.
226. Li Y, Wen Y, Wang L, Liang W, Xu L, Ren S, et al. Analysis of telomerase activity based on a spired DNA tetrahedron TS primer. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015;67:364-9.
227. Wrześniewska-Tosik K, Ryszkowska J, Mik T, Wesołowska E, Kowalewski T, Pałczyńska M, et al. Viscoelastic Polyurethane Foam with Keratin and Flame-Retardant Additives. *Polymers*. 2021;13(9):1380.
228. Soliveri G, Pifferi V, Annunziata R, Rimoldi L, Aina V, Cerrato G, et al. Alkylsilane–SiO₂ hybrids. A concerted picture of temperature effects in vapor phase functionalization. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2015;119(27):15390-400.
229. Gallagher W. FTIR analysis of protein structure. *Course manual Chem*. 2009;455.

230. Duan G, Zhang C, Li A, Yang X, Lu L, Wang X. Preparation and characterization of mesoporous zirconia made by using a poly (methyl methacrylate) template. *Nanoscale research letters*. 2008;3(3):118-22.
231. Dwivedi C, Pandey H, C Pandey A, W Ramteke P. Fabrication and assessment of gentamicin loaded electrospun nanofibrous scaffolds as a quick wound healing dressing material. *Current Nanoscience*. 2015;11(2):222-8.
232. Lin Z. Analysis and Identification of Infrared Spectrum of the Polymer. Sichuan University Press, Chengdu; 1989.
233. Mehmood Y, Khan IU, Shahzad Y, Khalid SH, Asghar S, Irfan M, et al. Facile synthesis of mesoporous silica nanoparticles using modified solgel method: Optimization and In Vitro cytotoxicity studies. *Pak J Pharm Sci*. 2019;32(4):1805-12.
234. Beganskienė A, Sirutkaitis V, Kurtinaitienė M, Juškėnas R, Kareiva A. FTIR, TEM and NMR investigations of Stöber silica nanoparticles. *Mater Sci (Medžiagotyra)*. 2004;10:287-90.
235. Metin CO, Lake LW, Miranda CR, Nguyen QP. Stability of aqueous silica nanoparticle dispersions. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011;13(2):839-50.
236. Chen Q, Li F, Zhou F, Wang W, Xu Y, Sun W, et al. Construction of a tumor-specific bioluminescent eukaryotic expression vector and analysis of its expression in vitro and in vivo. *Oncology letters*. 2013;6(1):207-11.
237. Yamanishi H, Iyama S, Yamaguchi Y, Kanakura Y, Iwatani Y. Total iron-binding capacity calculated from serum transferrin concentration or serum iron concentration and unsaturated iron-binding capacity. *Clinical chemistry*. 2003;49(1):175-8.

238. Gambino R, Desvarieux E, Orth M, Matan H, Ackattupathil T, Lijoi E, et al. The relation between chemically measured total iron-binding capacity concentrations and immunologically measured transferrin concentrations in human serum. Clinical chemistry. 1997;43(12):2408-12.

EKLER

EK 1 –Tez Çalışması Orjinallik Raporu

EK 2- Özgeçmiş