

**MONODİSPERS GÖZENEKLİ FORMDA METAL OKSİT MİKROKÜRELERİN
PEROKSİDAZ BENZERİ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ VE
BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİNDE KULLANIMI**

**INVESTIGATION OF PEROXIDASE-LIKE ACTIVITY OF MONODISPERSE-
POROUS METAL OXIDE MICROSPHERES AND THEIR USAGE IN THE
DEVELOPMENT OF BIOSENSORS**

Burcu GÖKÇAL

PROF. DR S. Ali TUNCEL

Tez Danışmanı

DR. ÖĞR. ÜYESİ F. Çiğdem KİP

Eş Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

Canım aileme...



ETİK

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

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

beyan ederim.

16 / 07 / 2020



ADI SOYADI

Burcu GÖKÇAL

YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

16 / 07 / 2020

 (İmza)

ÖĞRENCİNİN ADI-SOYADI

Burcu GÖKAL

ÖZET

MONODİSPERS GÖZENEKLİ FORMDA METAL OKSİT MİKROKÜRELERİN PEROKSİDAZ BENZERİ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ VE BİYSENSÖR GELİŞTİRİLMESİNDE KULLANIMI

Burcu GÖKÇAL

Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi F. Çiğdem KİP

Temmuz 2020, 60 sayfa

Çok basamaklı hidroliz-kondenzasyon yöntemi kullanılarak manyetik, monodispers ve gözenekli formda silika mikroküreler sentezlenmiştir. Mikrokürelerin yüzeyi SiO_2 ile kaplanmıştır ($\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$). Altın nanopartiküller (Au NP) Turkevich metodu ile sentezlenmiş ve $\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ mikroküreler üzerine immobilize edilmiştir. Ardından glukoz oksidaz (GOx), $\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ mikroküreler üzerine immobilize edilmiş Au NP'e bağlanmıştır. Brunauer-Emmett-Teller (BET) , Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), Geçirimli elektron mikroskobu (TEM), Titreşimli örnek manyetometrisi analizi (VSM), ve X-ray fotoelektron spektroskopisi (XPS) ve X-Işını Kırınım Analizi (XRD) analiz yöntemleri kullanılarak $\text{GOx}@Au@SiO_2@MagSiO_2$ mikrokürelerin özellikleri belirlenmiştir. $\text{GOx}@Au@SiO_2@MagSiO_2$ mikroküreler kullanılarak glikozun tek basamaklı tayininde oksidasyonla üretilen H_2O_2 , ilave edilen sentetik substrat 3,3',5,5'-

tetrametilbenzidin (TMB) ile GOx @Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin peroksidaz benzeri aktivitesi ile reaksiyona girmiştir. Mikrokürelerin peroksidaz benzeri aktivitesi farklı pH, substrat derişimlerinde incelenmiştir. GOX@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin glikoza karşı seçiciliği ve stabilitesi değerlendirilmiştir. Nanozim yapıları için Lineweaver-Burk ve Michaelis Menten (MM) Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek Km ve r_m değerleri hesaplanmıştır. GOX@Au@SiO₂@MagSiO₂ ve Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler için r_m değerleri sırasıyla 11.1 ve 47.84 µM/dakika olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen nanozim ile, ön işleme tabi tutulmadan, insan tam-kan örneğindeki glikoz derişiminin 2.8-38.9 mM aralığında doğrudan belirlenmesine sağlayan kalibrasyon türetilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glukoz oksidaz, hidrojen peroksit, altın nanopartikül, silika nanopartikül, manyetik nanopartikül

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PEROXIDASE-LIKE ACTIVITY OF MONODISPERSE-POROUS METAL OXIDE MICROSPHERES AND THEIR USAGE IN THE DEVELOPMENT OF BIOSENSORS

Burcu GÖKÇAL

Master of Science, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Co-Supervisor: Dr. Çiğdem KİP

Temmuz 2020, 60 sayfa

Magnetic-monodisperse and porous microspheres were synthesized using hydrolysis and condensation method. The surface of microspheres was again covered with SiO₂ structure. Gold nanoparticles (Au NP) were synthesized by Turkevich method and immobilized on SiO₂@MagSiO₂ microspheres. Glucose oxidase (GOx) was bound to Au NPs immobilized on SiO₂@MagSiO₂ microspheres. The physical and chemical properties of GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ microspheres were determined by Nitrogen adsorption-desorption method, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Scanning electron microscope (SEM), Transmission electron microscopy (TEM), Vibration sample magnetometry analysis (VSM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and X-Ray Diffraction Analysis (XRD) methods.

In one-pot determination of glucose using peroxidase-like activity of GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ microspheres, the hydrogen peroxide produced by oxidation induced by immobilized GOx was reacted with the synthetic substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). The peroxidase-like activity of GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ microspheres was investigated by changing the substrate concentration and pH. The selectivity against glucose and stability of GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ microspheres were also evaluated. The measurements were carried out using a UV-Vis spectrophotometer. K_m and r_m values were calculated by plotting Lineweaver-Burk and Michaelis Menten graphs with the developed nanozymes. The r_m values for GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ and Au@SiO₂@MagSiO₂ microspheres were calculated as 11.1 and 47.84 μM / min, respectively. The calibration curves with the developed nanozyme were obtained for direct determination of glucose concentration in human whole-blood without any pretreatment.

Keywords: Glucose oxidase, hydrogen peroxide, gold nanoparticles, silica nanoparticles, magnetic nanoparticles

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez sürecinde engin bilgi birikiminden faydalanma olanağı bulduğum için kendimi şanslı saydığım, bana yol gösteren ve hep destek olan, kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ali TUNCEL'e ,

Tez çalışmam boyunca gerek deneylerimde gerekse laboratuvar dışında desteğini hep hissettiğim, zor anlarımda hep yanımda olan, yoğun çalışma programına rağmen bilgi ve birikimiyle yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi F.Çiğdem KİP'e,

Laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Arş. Gör. Dr. K. Özlem HAMALOĞLU'na,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve tez boyunca her türlü desteği gördüğüm değerli arkadaşlarım Arş.Gör.Duygu YILDIRIM'a, Rukiye BABACAN TOSUN'a, Öğr. Gör. Mustafa Cihan DEMİR'e, Çağıl Zeynep SÜNGÜ AKDOĞAN'a, Hazal KAMAL'a, Senanur SEZGİN'e,

Her zaman yanımda olan arkadaşlarım Gamze ÇALIK'a, Gamze SEMİZ'e, Berkay KAPUCU'ya, Gizem Nur MUTİ'ye ve Deniz AŐKIN'a

Hayatım boyunca yanımda olup beni bugünlere getiren babam Mehmet GÖKÇAL'a, annem Meziyet GÖKÇAL'a, biricik kardeşim Gökтуğ GÖKÇAL'a , sesini hep kulağımda çınlatan minik kuş Ebabil'e

En içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enzimler ve Sınıflandırılması	3
2.2. Michaelis Menten Kinetiği	7
2.3. Nanozimler (Enzim-Mimetik)	9
2.4. Peroksidaz Benzeri Aktivite	10
2.5. Biyosensörler	12
2.6. Glikoz Tayini	13
2.6.1. Glukoz Oksidaz Yöntemi	15
2.6.2. Heksokinaz Yöntemi	16
2.6.3. Glikoz Dehidrojenaz Yöntemi (GDH)	17
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	18
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	18
3.2. Monodispers-Gözenekli Formda SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikrokürelerin Sentezi	19
3.3. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikrokürelerin Karakterizasyonu	23
3.3.1. Brunauer-Emmett-Teller (BET) ile Gözenek Boyutu ve Yüzey Alanı Ölçümü	23
3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	23

3.3.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM).....	23
3.3.4. Titreşimli Örnek Manyetometrisi Analizi	24
3.3.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi.....	24
3.3.6. X-Ray Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)	24
3.3.7. X-Işını Kırınım Analizi (XRD).....	24
3.4. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikrokürelerinin Peroksidaz-Mimetik Aktivitesi.....	24
3.5. Tek Basamaklı Tayin Protokolünde GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikroküreler Kullanılarak Tampon Ortamında Glikoz Tayini	25
3.6. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikrokürelerin Bağlı Peroksidaz Benzeri Aktivitesinin Serbest Peroksidaza Göre Belirlenmesi.....	25
3.7. Peroksidaz Benzeri Aktiviteye Sahip Serbest GOx ve Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikroküreleri İçeren İki Aşamalı Protokol Kullanılarak Glikoz Tayini.....	26
3.8. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikroküreler ile Kandaki Glikoz Seviyesinin Belirlenmesi.....	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	28
4.1. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikrokürelerin Sentez Protokolü Ve Etki Mekanizması	28
4.2. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikrokürelerinin Karakterizasyonu.....	30
4.2.1 Monodispers ve Gözenekli Formdaki GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikrokürelerinin Gözenek Boyutu ve Yüzey Alanı Analizleri	36
4.2.2. Titreşimli Örnek Manyetometri Ölçümü	37
4.2.3. X-Işını Kırınım Analizi.....	38

4.3. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikrokürelerinin Değişen pH Koşullarında Peroksidaz Benzeri Aktivitesi Ölçümleri.....	39
4.4. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikrokürelerinin Değişen Substrat Derişimi (TMB) İçin Peroksidaz Benzeri Aktivitesi Ölçümleri	40
4.5. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikroküreleri İle Glikoz Tayini.....	42
4.6. Seçicilik	46
4.7. Kararlılık	47
4.8. İnsan Kanındaki Glikoz Derişiminin GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ Mikroküreler İle Doğrudan Belirlenmesi.....	48
5. SONUÇLAR.....	53
6. KAYNAKLAR	54
EKLER.....	61
EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar.....	61
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	62
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Enzim substrat ilişkisi.....	6
Şekil 2.2. Bir enzimin, (a) katalizsiz olduğu ve (b) katalizli reaksiyon olduğu durumda reaksiyonu başlatmak için gereken aktivasyon enerjisini azaltmaya etkisi.....	6
Şekil 2.3. Nanozimlerin kullanım alanları.....	10
Şekil 2.4. OPD ve TMB'nin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.5. Farklı ELISA türleri.....	12
Şekil 2.6. Akıllı nanomalzemelerin peroksidaz benzeri aktiviteleri ve kolorimetrik glikoz biyosensörlerindeki ileri uygulamaları.....	14
Şekil 2.7. Glukoz oksidaz yöntemi.....	16
Şekil 2.8. Heksokinaz yöntemi.....	16
Şekil 2.9. Glikoz dehidrojenaz yöntemi.....	17
Şekil 4.1. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikroküreleri için sentez protokolünün şematik gösterimi	28
Şekil 4.2. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerin SEM fotoğrafları. Büyütme: (A) 2.000X, (B) 15.000X, (C) 30.000X, (D) 50.000X.....	31
Şekil 4.3. (A) Fe ₃ O ₄ NP'leri içeren MagSiO ₂ , (B) SiO ₂ @MagSiO ₂ , (C) APTES bağlı SiO ₂ @MagSiO ₂ , (D) ve (E) Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerin TEM görüntüleri.....	32
Şekil 4.4. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerinin (A) Yüzey XPS spektrumu (B) Si2p taraması, (C) O1s taraması, (D) C1s taraması, (E)Fe2p taraması, (F) N1s taraması ve (G) Au4f taraması.....	33
Şekil 4.5. (A) SiO ₂ @MagSiO ₂ , (B) APTES@SiO ₂ @MagSiO ₂ , (C) Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ ve (D) GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerinin FTIR spektrumları.....	34
Şekil 4.6. (A),(B) Çok basamaklı sol-gel kalıplama yöntemi ile polimetakrilat mikroküreleri kullanılmadan sentezlenen Fe ₃ O ₄ NP ve (C),(D)Turkevich yöntemi kullanılarak sentezlenen Au NP TEM fotoğrafları	35
Şekil 4.7. Azot adsorpsiyon-desorpsiyon yöntemi ile elde edilen	

GOx@Au@SiO ₂ @ MagSiO ₂ mikrokürelerinin gözenek boyutu dağılım eğrisi.....	36
Şekil 4.8. Titreşimli örnek manyetometrisi ile elde edilen GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerin manyetizasyon eğrisi.....	38
Şekil 4.9. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerinin X-ışını kırınım analizi	38
Şekil 4.10. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerin farklı pH koşullarında peroksidaz benzeri aktivitesi.....	39
Şekil 4.11. Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ ve GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerin Michaelis Menten grafikleri.....	40
Şekil 4.12. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerin Lineweaver Burk grafiği.....	41
Şekil 4.13. Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerin Lineweaver Burk grafiği.....	42
Şekil 4.14. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikroküreleri ile glikoz tayini mekanizmasının şematik gösterimi.....	43
Şekil 4.15. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerin peroksidaz benzeri aktivitesinin sulu tampon ortamındaki glikoz derişimi ile değişimi.....	44
Şekil 4.16. GOx @ Au @ MagSiO ₂ mikrokürelerin glikoza seçiciliği. Analit oksidasyonu için koşullar: Glikoz derişimi: 2 mg / mL, kontrol ajanlarının derişimi: 10 mg/mL. GOx@Au@MagSiO ₂ mikroküreler: 20 mg, pH 5.0'da 100 mM sitrat tamponu. Hacim: 1.25 mL, karanlık ortam 100 cpm, 37 ° C'de 1 saat. Nanozimin peroksidaz benzeri aktivitesi ile renk reaksiyonu koşulları: TMB: 200 µM, pH 5.0'da 100 mM sitrat tamponu, Son hacim: 2.5 mL, karanlık ortam 100 cpm, 37 ° C'de 20 dakika.....	47
Şekil 4.17. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerinin tek basamaklı kolorimetrik glikoz tayinindeki uzun süreli kararlılığı.....	48
Şekil 4.18. GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerin üç farklı kan hacmifraksiyonu ile elde edilen kalibrasyon eğrileri.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Enzimlerin sınıflandırılması.....	4
Çizelge 4.1.	Fe ₃ O ₄ NP içeren MagSiO ₂ , SiO ₂ @MagSiO ₂ , APTES@SiO ₂ @MagSiO ₂ , Au@APTES@SiO ₂ @MagSiO ₂ ve GOx@Au@APTES@SiO ₂ @MagSiO ₂ mikrokürelerinin XPS ile belirlenmiş yüzey atomik bileşimleri	35
Çizelge 4.2.	GOx@Au@MagSiO ₂ mikrokürelerinin yüzey ve gözenek özellikleri.....	37
Çizelge 4.3.	GOx@Au@SiO@MagSiO ₂ mikrokürelerin glikoz tayin özellikleri ve karşılaştırmalı formları.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
M	Molar
μM	Mikromolar
cpm	Dakikadaki çalkalama hızı (Circulation per munite)
rpm	Dakikadaki dönme hızı (Revolutions per minute)
D_n	Ortalama partikül boyutu (μm)
CV	Boy dağılım için değişim katsayısı
K_m	Michaelis Menten sabiti
r_0	Reaksiyon hızı
r_{max}	Maksimum reaksiyon hızı
k_1, k_2, k_{-1}	Reaksiyon hız sabitleri
V	Çözeltisi hacmi (mL)
[E]	Etkilenmemiş enzim derişimi
[E] _T	Toplam enzim derişimi
[S]	Substrat derişimi

Kısaltmalar

AIBN	2,2'-azobisisobütironitril
APTES	Aminopropiltrioksisilan
Au@SiO ₂	Yüzeyine altın immobilize edilmiş silika
Au@SiO ₂ @MagSiO ₂	Yüzeyi silika ile kaplanmış ve yüzeyine altın immobilize edilmiş manyetik silika
GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂	Yüzeyi silika ile kaplanmış, yüzeyine altın ve GOx immobilize edilmiş manyetik silika
AuNP	Altın nanopartikül
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BPO	Benzoil peroksit
DAB	Di-azo-aminobenzen
DDI	Distile-deiyonize
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDMA	Etilen dimetakrilat
EDX	Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (Energy dispersive X-ray spectroscopy)
ELISA	Enzim bağlı immüno sorbent tahlili (Enzyme-linked immuno sorbent assay)
FeCl ₂ .4H ₂ O	Demir (II) klorür tetrahidrat
FeCl ₃ .6H ₂ O	Demir (III) klorür heksahidrat
GMA	Glisidil metakrilat
GOx	Glukoz oksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HAuCl ₄ .4H ₂ O	Koroaurik asit-tetrahidrat
HCl	Hidroklorik asit
HRP	Yabancurpu peroksidaz enzimi (Horseradish peroxidase enzyme)
Iso-PrOH	İzopropil alkol
MAA	Metakrilik asit

MagSiO ₂	Manyetik silika
NaH ₄ OH	Amonyum hidroksit
NaOH	Sodyum hidroksit
OPD	O-fenilendiamin
PVA	Poli(vinil alkol)
PVP K-30	Poli(vinil pirolidon) K-30
RNA	Ribonükleik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SiO ₂ @MagSiO ₂	Yüzeysel silika ile kaplanmış manyetik silika
TBAI	Tetrabutil amonyum iyodat
TEA	Trietilamin
TEOS	Tetraetoksisilan
THF	Tetrahidrofuran
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
TSS	Trisodyum sitrat
XRD	X ışını kırınım yöntemi
VSM	Titreşimli örnek manyetometresi (Vibrating sample magnetometer)

1. GİRİŞ

Diyabet, insülin eksikliğinden dolayı vücudun kandaki glikoz seviyesini düzenleyemediği veya vücuttaki hücrelerin insüline uygun şekilde yanıt veremediği metabolik bir hastalıktır. Zamanla, kalbe, kan damarlarına, gözlere, böbreklere ve sinirlere ciddi zarar verebilir. Dünyada yaklaşık 422 milyon diyabet hastası vardır ve her yıl 1.6 milyon ölüm doğrudan diyabetle ilişkilidir [1]. Bu durum göz önüne alındığında, yeni glikoz ölçüm yöntemleri geliştirmek çok önemlidir.

Örnek ön işlem gerekliliği, kalibrasyon grafiğinin derişim aralığındaki sınırlı absorbands değişimi, kompleks örneklerde kullanılan kolorimetrik glikoz sensörlerinin ortak kısıtlamalarıdır. Çoğunlukla karmaşık örneklerdeki gerçek glikoz seviyesini bulmak için yüksek seyreltme faktörü kullanılmasını gerekmektedir.

Son yıllarda, altın nanopartiküllerin (AuNP), özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir olacak şekilde peroksidaz aktivitesine sahip oldukları gösterilmiştir [2-4]. AuNP'in biyolojik peroksidaz benzeri aktivitesi, eşsiz fizikokimyasal ve optoelektronik özelliklerinden dolayı önemlidir. Bununla birlikte, AuNP bazlı peroksidaz sistemi, Au-bazlı katalizörün inorganik yapısına bağlı olarak doğal biyolojik enzim ile karşılaştırıldığında daha düşük substrat afinitesine ve seçiciliğe sahiptir. Bu durum Au NPs bazlı peroksidaz nanozimlerin biyomedikal uygulanabilirliğini sınırlandırmaktadır. Bu olumsuzluğu gidermek için Au NP'in peroksidaz nanozim olarak katalitik etkinliğini arttırmak için günümüzde yoğun çalışmalar sürüdürülmektedir [2-4].

Enzim benzeri özelliklere sahip birçok nanomalzemeler (nanozimler) üzerine yapılan çalışmalar, nanomalzemelerin enzim taklitleri olarak kullanımı ile ilgili zorluklardan birinin seçicilik değerinin de özgülükleri olduğunu ortaya koymuştur [5-7]. Pek çok nanomalzemenin, içerdği reaktif gruplar nedeniyle, ortamda bulunan farklı bileşenlerin spesifik olmayan adsorpsiyonunu kolaylaştırabildiği gösterilmiştir. Bu durum ise katalitik aktivitenin azalması veya artmasıyla sonuçlanabilmektedir.

Tez kapsamında, monodispers gözenekli formda glikoz oksidaz bağlı ve Au Np içeren monodispers, manyetik silika (GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂) mikroküreler sentezlenmiştir. Glikoz, hidrojen peroksit (H₂O₂) üretmek için glukoz oksidaz enzimi tarafından oksitlenmiştir. H₂O₂, ortamdaki glikoz ile orantılı olarak üretilmiştir. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂) mikrokürelerin peroksidaz aktivitesi ile substrat olarak 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) kullanılarak insan tam kan örneğinde tek basamaklı glikoz tayini gerçekleştirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler ve Sınıflandırılması

Enzimler, canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir (biyokatalizör). Tatlandırıcı ajanların üretiminde, antibiyotiklerin modifikasyonunda, çeşitli temizlik ürünlerinde, klinik, adli ve çevresel uygulamalarda önemli rolleri olup sıkça kullanılmaktadır. Yunanca en (içeride) ve zume (Maya) kelimelerinin birleşiminden meydana gelen 'Enzim' ilk kez Alman fizyoloğu Wilhelm Kühne tarafından 1878'de mayanın şekerden alkol üretme kabiliyetini tarif etmesiyle kullanılmıştır. On dokuzuncu yüzyılın sonlarında, birçok enzimin ekstraksiyonu ve karakterizasyonunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. 1920'lere kadar enzimler kristalleştirilmiş ve katalitik aktivitenin protein molekülleri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. 1980'lerde bazı ribonükleik asit (RNA) moleküllerinin de katalitik etkiler gösterebildiği bulunmuştur. Ribozimler olarak adlandırılan bu RNA'lar, gen ekspresyonunda önemli bir rol oynamaktadırlar. Aynı yıllarda, biyokimyacılar katalitik özelliklere sahip antikorlar üretmiştir. Bu "abzimler", hem yeni endüstriyel katalizörler hem de tedavide kullanılan ajanlar olarak önemli bir potansiyele sahiptir [8].

Katalizörler olarak enzimler çok düşük derişimlerde gereklidir ve reaksiyon sırasında kendileri tüketilmeden reaksiyonları hızlandırır. Genellikle enzimler, substrat moleküllerinin ürün moleküllerine dönüşümünü katalizleyebilecek şekilde tanımlanmaktadır.

Son derece güçlü katalizörler olmasının yanı sıra enzimler, genellikle tek bir tip substratın ürüne dönüşümünü katalize ettikleri için dikkate değer özgüllüğe sahiptir. Bazı enzimler ise grup özgüllüğü gösterir. Örneğin, alkalik fosfataz, bir fosfat grubunu çeşitli substratlardan çıkarabilir. Diğer enzimler mutlak özgüllük olarak tanımlanan çok daha yüksek özgüllük gösterirler. Örneğin, glukoz oksidaz, substratı β -D-glikoz için mutlak özgüllük gösterir ve diğer monosakkaritlerle neredeyse hiç aktivite göstermez. Bu özgüllük, karmaşık bir karışımda belirli bir substratı ölçen birçok analitik analizde büyük önem taşımaktadır [9].

Reaksiyonlar ve onları katalizleyen enzimler sistematik isimlendirmeye göre 6 grupta toplanmıştır (Çizelge 2.1).

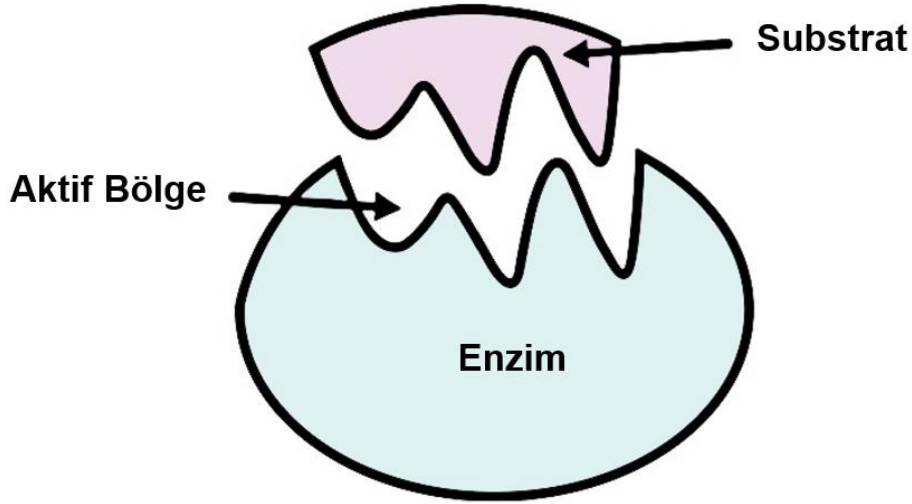
Çizelge 2.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzim sınıfı	Reaksiyon türü
Oksidoredüktazlar	Oksidasyon/redüksiyon
Transferazlar	Atom/grup transfer
Hidrolazlar	Hidroliz
Lizazlar	Çift bağ oluşumu
İzomerazlar	İzomerizasyon
Ligazlar	Pirofosfat bağlarının kopmasına bağlı biyomoleküllerin birleşmesi

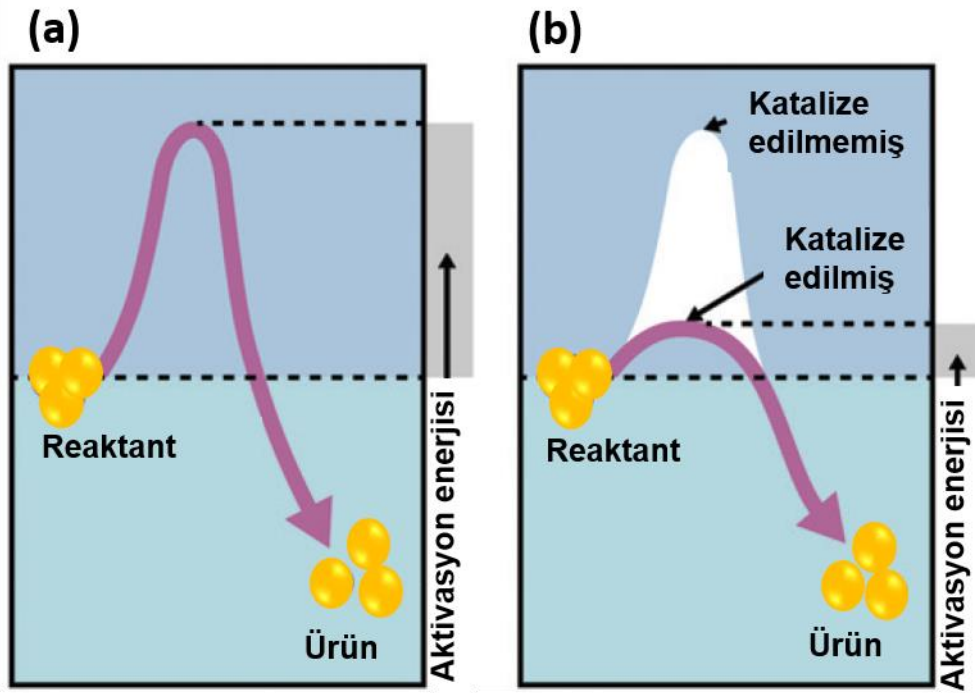
- 1- Oksidoredüktazlar:** Oksidoredüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen tüm enzimler bu enzim grubunda yer almaktadır. Oksitlenen substrat hidrojen donörü olarak kabul edilir.
- 2- Transferazlar:** Transferazlar, bir kimyasal grubu bir bileşikten (genellikle verici olarak kabul edilir) başka bir bileşiğe (genellikle alıcı olarak kabul edilir) aktaran enzimlerdir. İki substrat arasında H^+ dışındaki grupların transferini katalizler. Tüm biyolojik reaksiyonlar arasında, bu biyokataliz sınıfı en yaygın olanlardan biridir.
- 3- Hidrolazlar:** Glikozid, ester, eter, C-C, peptit, asit anhidrit, , C-halojenür veya P-N bağlarının, hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bu endüstriyel enzimlerin çoğu, deterjan formülasyonlarındaki ve gıda endüstrisindeki proteinleri, karbonhidratları ve lipidleri ayrıştırmak için reaksiyonlarda kullanılır.

- 4- **Lizazlar:** Bu enzimler C – C, C – O, C – N ve diğler bağları hidroliz veya oksidasyon dışındaki yollarla ayırır ve çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizlemektedir.
- 5- **İzomerazlar:** İzomerazlar az sayıda enzim grubunu temsil etmektedirler ancak günümüz endüstrisinde önemli bir rol oynamaktadır. Bir molekül içindeki geometrik veya yapısal değişiklikleri katalize etmektedir. Ksiloz izomeraz olarak bilinen bu enzim, yüksek fruktozlu mısır şurubunun üretiminde gerekli olan d-glikozun d-fruktoza dönüşümünü katalize eder. şurup, sükrözün yerine geçerek yiyecek ve içecek endüstrileri tarafından doğal bir tatlandırıcı olarak kullanılır.
- 6- **Ligazlar:** Ligazlar iki molekül arasında bir bağ oluşumunu katalize eden enzimlerdir. Genetik mühendisliğinde veya genetik teşhislerde önemli bir rol oynamaktadır. Bu gruptaki DNA ligazları olarak bilinen spesifik enzimler DNA sentezinde C – O bağlarının oluşumunu katalize etmektedir [10].

Amino asitler, substratın gerçekten bağlandığı aktif bölge olarak bilinen küçük bir alanı içeren belirli bir üç boyutlu yapı oluşturmak için katlanan ve bükülen bir veya daha fazla polipeptit zinciri oluşturabilen yapılardır. Bu yapı Şekil 2.1. de gösterilmiştir. Aktif bölge, az miktarda (10'dan az) bileşen amino asit içerebilir ve tek tip bir substrat molekülüne bağlanmayı sağlar. Böylece katalitik aktivitede önemli bir özgüllük gösterir. Substrata bağlanan sadece aktif bölge olduğu için, protein molekülünün geri kalanı, aktif bölgeyi stabilize etmekte ve bölgenin substrat molekülü ile etkileşimi için uygun bir ortam sağlamaktadır. Bu nedenle, aktif bölge katalitik aktivite kaybı olmadan proteinin geri kalanından ayrılamaz [11].



Şekil 2.1. Enzim substrat ilişkisi [8]



Şekil 2.2. Bir enzimin, (a) katalizsiz olduğu ve (b) katalizli reaksiyon olduğu durumda reaksiyonu başlatmak için gereken aktivasyon enerjisini azaltmaya etkisi [8]

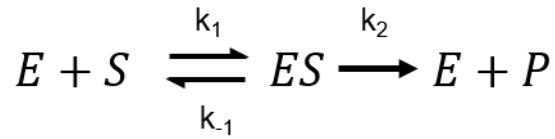
Şekil 2.2' de gösterildiği gibi, enzimlerin, geçiş durumunun oluşmasını enerjisel olarak kolaylaştırarak bir sistemin aktivasyon enerjisini azalttığı düşünülmektedir. Bir enzim katalizörünün varlığında, geçiş durumunun oluşumu enerjik olarak

daha elverişlidir, böylece reaksiyonun ilerleyeceği hızı hızlandırır, ancak reaktan veya ürünün enerji seviyelerini temelden değiştirmez [8].

2.2. Michaelis Menten Kinetiği

Enzim kinetiği, enzim katalizli reaksiyonların hızını belirleyen faktörlerin incelenmesidir. Enzimler hem metabolizmada hem de biyoteknolojide önemli rol oynamaktadırlar. Michaelis Menten kinetiği, enzim kinetiğinin en iyi bilinen modellerinden biridir. 1913 yılında, Leonor Michaelis ve Maud Menten ilk önce bu denklemi matematiksel olarak türetmiş, bir enzimin ürün oluşturmak için substratla reaksiyona girme şekli hakkında bazı basit varsayımlar olduğunu göstermiştir. Türetmelerinin merkezinde, reaksiyonun, bir kez oluşturulduğunda, ürünü serbest bırakmak için ayrışabilen veya başka herhangi bir ürün oluşumu olmaksızın ters yönde ayrılabilen bir ES kompleksinin oluşturulması yoluyla gerçekleştiği yer almaktadır. r_{max} , doymuş substrat derişiminde sistem tarafından elde edilen maksimum hızı temsil etmektedir. K_M , enzim için en iyi substratı belirlemede oldukça önemli bir kavramdır. Bu kinetik analiz modeline göre, K_M değeri, enzimin substrata afinitesi ile ters orantılıdır; küçük K_M değeri, yüksek bir afinite olduğunu ve enzimin doymuş hale gelmesi için az miktarda substrat gerektirdiğini göstermektedir. Bu nedenle, maksimum hıza düşük substrat derişimlerinde ulaşılmaktadır. Yüksek K_M değeri ise, maksimum reaksiyon hızına ulaşmak için yüksek substrat derişimlerine duyulan ihtiyacı göstermektedir [12].

Michaelis Menten denkleminin çıkarımı aşağıdaki basamakları içermektedir.



ES kompleksi, substratın (S) enzime (E) bağlandığı, reaksiyonun daha uygun hale getirileceği durumu temsil etmektedir. Reaksiyon meydana gelir gelmez ürün (P) enzimden ayrılmaktadır. Reaksiyon sırasında bir noktada substrat, bir ara forma ve daha sonra ürüne dönüştürülmektedir. Bu reaksiyonların dinamiklerine karşılık gelen diferansiyel denklem sistemi:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad (2.1)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (2.2)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (2.3)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (2.4)$$

Denklikleri çözümlenmek ve basit hale getirmek için bazı varsayımlar kullanılmıştır. Enzim-substrat kompleksi ($d[ES]/dt=0$) için E ve S'nin ES'ye oluşumunun, ES'nin E ve P'ye ayrışmasından çok daha hızlı olduğu varsayımı altında yarı-kararlı durum varsayımı:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (2.5)$$

Michaelis Menten sabiti,

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

ve toplam enzim derişimi ile beraber ($[E]_T = [E] + [ES]$),

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (2.7)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.8)$$

olarak Michaelis Menten denkleği son halini almaktadır [13]

Çoğu zaman, hız değerlerini, substrat derişimine karşı doğrudan bir hız grafiğinden tahmin etmek mümkün değildir. Çünkü maksimum hızı tahmin etmek

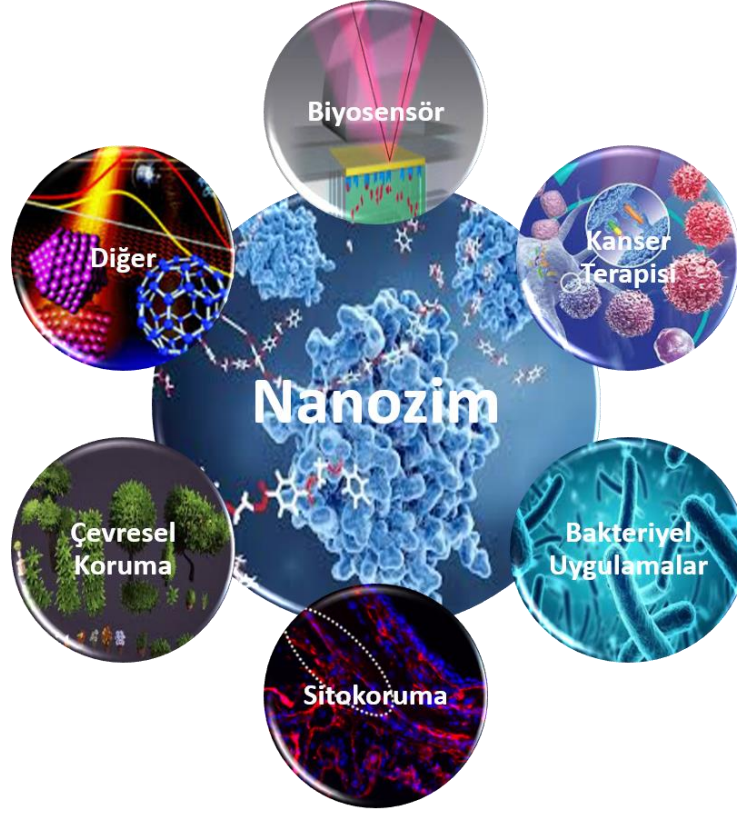
için çok yüksek miktarda substrat derişimi kullanmak gerekebilmektedir. Lineerleştirme için Eadie–Hofstee çizimi, Lineweaver–Burk grafiği ve Hanes–Woolf grafiği gibi alternatif grafikler kullanılmaktadır. En yaygın kullanılanı ise Lineweaver – Burk grafiğidir [13].

2.3. Nanozimler (Enzim-Mimetik)

Nanozim kavramı, enzim benzeri özelliklere sahip olan bir nano malzeme sınıfını ifade etmek için kullanılmaktadır. Doğal bir enzim ile aynı enzimatik kinetikleri ve katalitik mekanizmayı takip etmektedir. Katalitik aktivite, katalizör özünde enzim benzeri bir aktivitedir. Boyut, morfoloji ve yüzey gibi tipik nano ölçekli faktörler, aktivitesini ayarlamak için üstün bir strateji sağlayan nanozimlerin aktivitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Bir nanozim genellikle doğal enzimlere benzer aktif bölgelere ve elektron taşıma yapılarına sahiptir. Nanozimler, stabilite, düşük maliyet ve üretim kolaylığı gibi birçok açıdan insan sağlığı için enzim olarak kullanılmakta ve doğal enzimlerden daha iyi özellikler sunmaktadırlar [14].

İlk enzim 1900' lü yıllarda James B. Sumner tarafından keşfedilmiştir. Protein bazlı enzimler çok hassastır ve kolayca denatüre edilir, bu da sert koşullardaki ortamlarda daha hızlı inaktivasyona neden olur. Ayrıca, biyolojik olarak büyük ölçüde üretilmesi ve saflaştırılması için zor ve maliyetli bir şekilde sentezlenir. Bu sınırlamalar doğal enzimlerin pratik uygulamalarını büyük ölçüde etkilemektedir. Frances H. Arnold, yeni ve biyolojik olmayan ortamdaki zorlu koşullarla başa çıkmak ve enzimlerin uygunluğunu iyileştirmek için enzimlerin evrimini incelemiş bu sayede 2018'de Nobel Ödülü'nü kazanmıştır. Enzimdeki aktif alanın yapısından ilham alan bilim adamları, kimyasal organik moleküller kullanarak enzim kinetiğini tasarlamak ve hazırlamak için birçok strateji geliştirmişlerdir. İlk mimetikler 1960'larda siklodekstrin esas alınarak geliştirilmiştir. Enzim aktivitesi ile birlikte moleküler baskılı polimerler de bulunmuştur [15].

Nanozimlerin yüksek aktivitesi ve seçiciliği, ayarlanabilir aktivitesi, yüksek stabilitesi ve tekrar kullanılabilirliği de dahil olmak üzere üstün özellikleri nedeniyle, tıp, tarım, çevre, gıda ve eczacılık, kanser tedavisi gibi birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır [16]. Kullanıldığı alanlar Şekil 2.3'te verilmiştir.



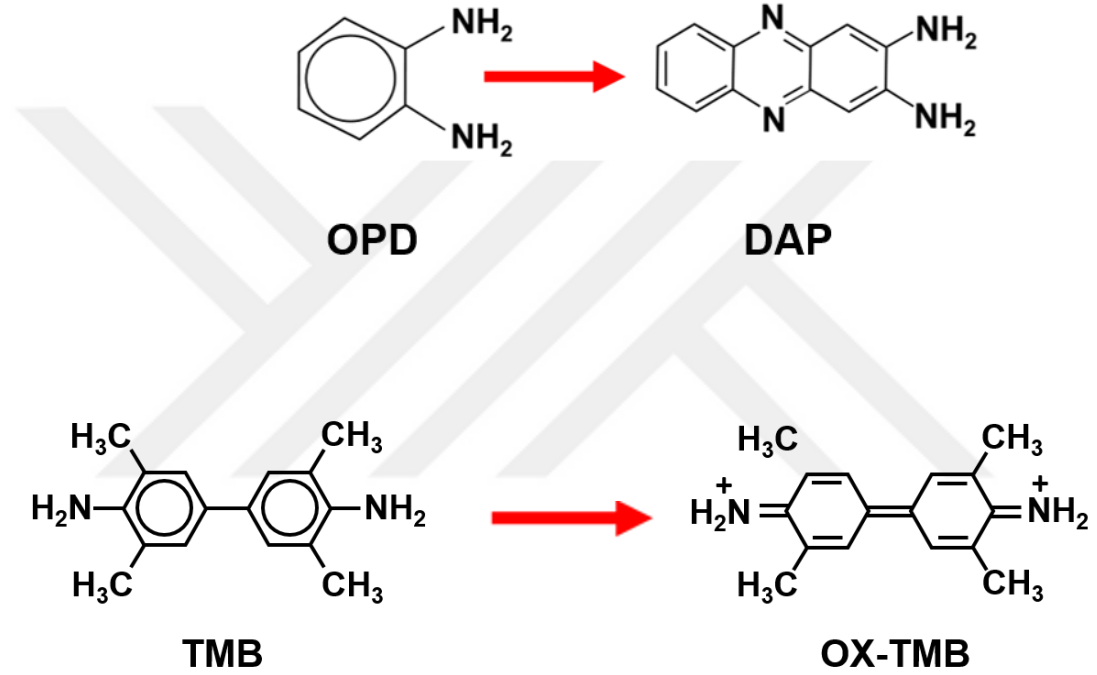
Şekil 2.3. Nanozimlerin kullanım alanları

Nanozimler, boyutu birkaç ila yüzlerce nanometre arasında değişen inorganik veya organik nanomalzemelerden yapılıdır. Kristal formu, kafes, düzlem, boşluk gibi birçok benzersiz nanoyapısal özelliklere sahiptirler. Bu özellikler, katalitik aktiviteyi etkilemek için birçok değişken sağlamaktadır. Nanozimler, bu zengin yapısal karakteristikleri nedeniyle enzime benzer çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Örneğin, demir oksit nanozimler asidik pH altında peroksidaz benzeri aktivite ve nötral pH altında katalaz benzeri aktivite gösterir. Çoklu aktiviteler, nanozimlerin farklı gereksinimler için kullanılmasına izin vermektedir [17].

2.4. Peroksidaz Benzeri Aktivite

Peroksidaz benzeri aktiviteye sahip nanozimler yaygın olarak üretilmektedir. Peroksidaz benzeri aktiviteye sahip nanozimler, substratla daha hızlı reaksiyona giren serbest radikaller gibi kısa ömürlü reaktif ara maddeler (radikaller) üretmek için peroksit üzerinde etkili olmaktadır. Peroksidaz benzeri nanozimin aktivitesi genellikle doğal peroksidazlar için kullanılan basit standart substratlar kullanılarak

test edilir. Örneğin, H_2O_2 ve 3,3,5,5-tetrametilbenzidin (TMB) sıklıkla enzim bağlı immün sorbent analizinde (ELISA) renk ölçümüne bağlı tayin için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu reaksiyonda H_2O_2 , serbest radikaller üretir ve TMB'yi okside ederek 652 nm'de karakteristik absorbanası olan mavi bir ürün oluşturur. OPD ise 2,3-diaminofenazin'e (DAP) dönüşürek turuncu ürün oluşturmaktadır. OPD ve TMB substratlarının kimyasal yapısı Şekil 2.4' te gösterilmektedir. Bu substratlar, hidrojen peroksit varlığında oksitlendiğinde ayırt edilebilir bir renk değişikliği sergiler [18].



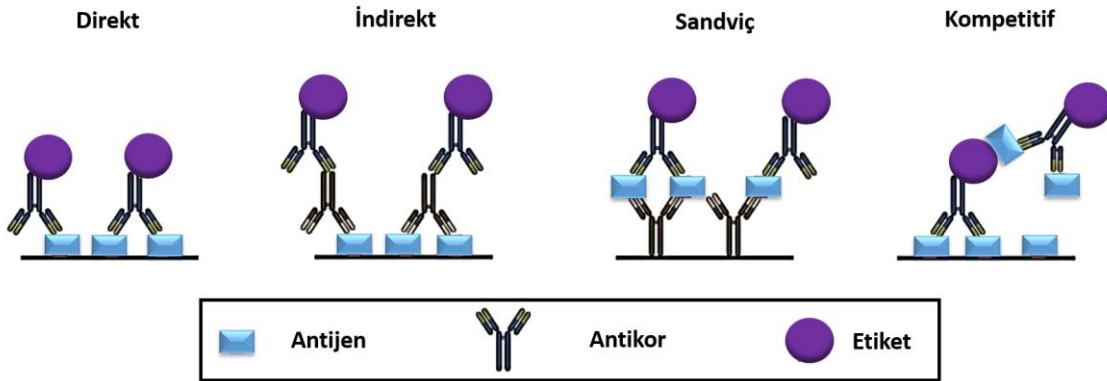
Şekil 2.4. OPD ve TMB'nin kimyasal yapısı

Peroksidaz benzeri aktivite ile katalizlenen reaksiyonda, peroksit ve hidrojen donörü olan iki substrat vardır. Bu nedenle, bunlardan biri için kinetik analizi genellikle diğ erinin derişimi sabitlenerek gerçekleştirilir. H_2O_2 -TMB reaksiyonunda, H_2O_2 için kinetik analiz doygunluk derişiminde TMB ile yapılır. Bu yolla reaksiyon, yaban turpu peroksidazı için gözleendiği şekilde tipik Michaelis-Menten Kinetiğini izler [18].

2.5. Biyosensörler

Maliyet uygunluğu ve sadeliği nedeniyle, biyosensörler biyomedikal teşhis, çevresel izleme, gıda kalitesi testi ve ilaç endüstrisinde oldukça kullanılmaktadır. Biyosensör alanının yarısından fazlasını oluşturan glikoz ölçümü yapan biyosensörler oluşturmaktadır. Sensörlerdeki biyomolekül bileşenleri esas olarak geri dönüşümsüz denatürasyona eğilimli proteinlerdir ve daha uzun bir raf ömrü için kararlılıklarını arttırmak ve daha sağlam sensörler sağlamak kritik önem taşımaktadır. Çoğu biyosensör sadece çevre veya fizyolojik koşullar altında çalışır, ancak aşırı pH, yüksek sıcaklık veya yüksek iyonik güç gibi zorlu koşullar altında hedefleri tespit etmek oldukça zordur. Çünkü fizyolojik olmayan koşullar proteinleri hızla denatüre edebilmektedir [19]. Nanozimler ise fizyolojik olmayan koşullarda kullanılma konusunda umut vaat etmektedir [20].

Enzimler son derece yüksek katalitik aktiviteye sahiptir. Enzimler sinyal üretimi ve amplifikasyonu için oldukça hassas ve popülerdir. Enzim etiketlerini kullanmanın en popüler formatı enzime bağlı immünosorban testidir (ELISA). 4 farklı ELISA türü Şekil 2.5'te gösterilmektedir. Direkt tahlilde, enzim birincil antikora konjüge edilirken, dolaylı veya sandviç tahlilde, enzim ikincil bir antikora bağlanmaktadır [21]



Şekil 2.5. Farklı ELISA türleri [22]

2.6. Glikoz Tayini

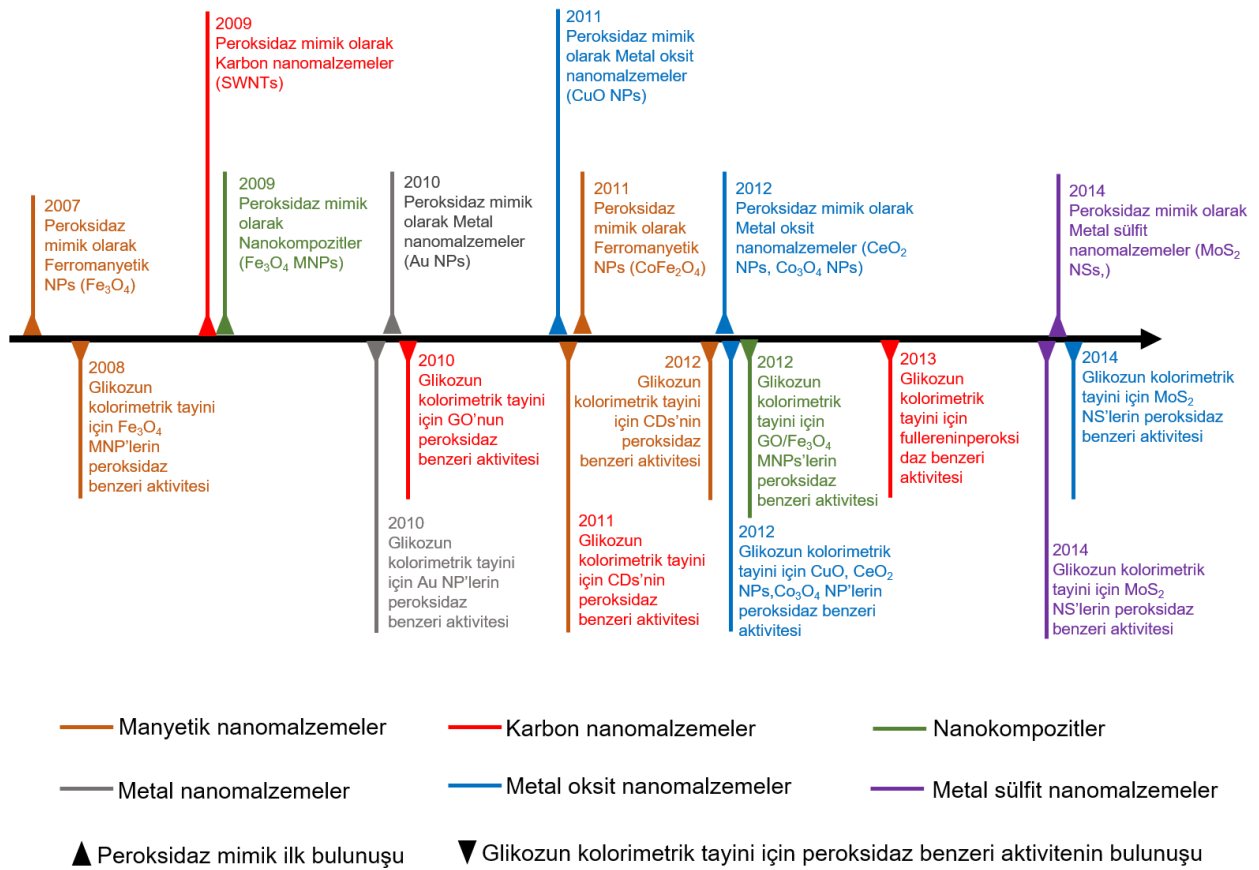
Glikoz, $C_6H_{12}O_6$ moleküler formülüne sahip basit şekerdir. Karbonhidrat kategorisinde yer alan monosakkarittir [23]. Esas olarak fotosentez sırasında bitkiler ve algler tarafından meydana gelmektedir [24]. Enerji metabolizmasında glikoz, tüm organizmalarda en önemli enerji kaynağıdır. Metabolizma için glikoz kısmen polimer olarak, bitkilerde nişasta ve amilopektin olarak ve hayvanlarda glikojen olarak depolanır.

Diyabet, vücudun insülin eksikliğinden ya da vücuttaki hücrelerin insüline düzgün yanıt verememesinden dolayı kandaki glikoz seviyelerinin düzenlenemediği metabolik bir hastalıktır. Zamanla kan damarlarında, böbreklerde, gözlerde, kalpte ve sinirlerde ciddi hasara yol açmaktadır. Diyabetli insanlar için, insülin de dahil olmak üzere tedaviye erişim, hayatta kalmak için kritik öneme sahiptir. Dünya çapında yaklaşık 422 milyon diyabet hastası vardır ve her yıl 1.6 milyon ölüm doğrudan diyabetle ilişkilendirilmektedir [1]. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda glikoz tayini için farklı ve yeni yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Kolorimetrik biyosensörler, düşük maliyeti, basitliği ve pratikliği nedeniyle dikkat çekmektedir. Son zamanlarda, peroksidaz benzeri aktiviteye sahip nanomalzemeler bulunmuştur ve bu nanomalzemeler kullanılarak glukoz oksidaz varlığında ölçüm yapan glikoz biyosensörlerinin elde edilmesinde ilerlemeler kaydedilmiştir. Doğal yaban turpu peroksidazı (HRP) ile karşılaştırıldığında, nanomalzemeler yapı tasarımı ve bileşiminde esneklik sergilemekle beraber, kolay ayırma, depolama, yüksek kararlılık, basit hazırlama ve ayarlanabilir katalitik aktiviteye sahiptir [25].

Soy metaller veya manyetik demir oksit nanoparçacıkları taşıyan hibrid nanozimler, renk veya floresan ölçümüne dayalı yöntemler ile karmaşık örneklerde glikoz tayini için yaygın olarak kullanılmaktadır [26-34]. Glikozun kolorimetrik tayini için geliştirilen nanozimlerin çoğu, glukoz oksidaz (GOx) kullanılarak glikozun hidrojen peroksit tarafından üretilen enzimatik oksidasyonunun saptanmasına dayanılarak tasarlanmıştır. Bu nedenle, H_2O_2 oluşumu sağlayan serbest GOx yoluyla glikozun enzimatik ayrışması ve oluşan H_2O_2 'nin nanozimin peroksidaz benzeri aktivitesi ile renk ölçümüne dayalı olarak belirlenmesini içeren iki aşamalı bir protokol birçok çalışmada izlenmiştir.

[26,30,32-34]. İlk olarak Wei ve arkadaşları tarafından 2008'de glikozun renk ölçümüne dayalı tespiti için peroksidaz olarak Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller kullanılmıştır [25].

Akıllı nanomalzemelerin peroksidaz benzeri aktivitesinin geliştirilmesi ve renk ölçümüne dayalı glikoz biyosensör oluşturulmasında kullanımı Şekil 2.6 'da verilmiştir [25].



Şekil 2.6. Akıllı nanomalzemelerin peroksidaz benzeri aktiviteleri ve kolorimetrik glikoz biyosensörlerindeki ileri uygulamaları

Diğer bir tayin yöntemi olan elektrokimyasal sensörler, enzimsiz glikoz tayin yöntemi olarak sıklıkla kullanılmaktadır [35-40]. Elektrokimyasal sensörler ile duyarlı glikoz tayini için selüloz filtre kağıdı üzerinde elektrokimyasal yolla biriktiren nikel/kobalt sülfür nanoparçacık bazlı yapılar, mezogözenekli silika nanoparçacıkları üzerine tutturulmuş Ni-Co alaşımlı nano yapılar ve Ni-Co/ Fe_3O_4 bazlı nanokompozit yapılar sentezlenmiştir [35-37]. Kimyasal olarak modifiye edilmiş gözenekli grafen bazlı elektrokimyasal biyosensörler, nikel hidroksit ile

dekore edilmiş üç boyutlu esnek poliüretan sünger ve glikoz elektrokoksidasyonuna yönelik Co^{+3} açısından zengin $\text{Cu}_2\text{O@ZIF-67}$ bazlı elektrokimyasal sensörler de glikoz tayini için önerilmiştir [38-40].

Son yıllarda, hem peroksidaz benzeri aktiviteye sahip nanozim, hem de nanozime bağlı glikoz oksidasyon yeteneğine sahip enzim (glukoz oksidaz, GOx) kullanılarak glikozun tek basamaklı tayini üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. GOx immobilize çok fonksiyonlu janus hematit-silika nanopartiküller, GOx entegre metal-organik yapılar, GOx bağlı grafen oksit/ MnO_2 nanozimler ve ZnFe_2O_4 -karbon nanotüp-GOx nanokompozitler, biyolojik ortamlarda glikozun tek basamakta tayinine izin veren yapılardır [31,41-44]. Diğer yandan, GOx bağlı yapay peroksidaz aktivitesine sahip hemin-peptid nanoçiçekler, yüksek duyarlılıkla 5–2000 μM derişim aralığında glikoz tayinine izin vermiştir. Böylece, geniş bir derişim aralığında glikozun tek basamakta saptanmasına izin veren renk ölçümüne dayalı biyosensör elde edilmiştir [45].

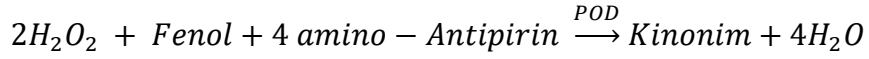
Mevcut nanozimlerin kalibrasyon grafiklerinde kullanılan glikoz derişim aralığının üst sınırı genellikle sağlıklı ve diyabetik bireylerden elde edilen tam kan aralığında bulunan glikoz seviyelerinden (3-40 mM) çok daha düşüktür. Bir başka deyimle, bu kalibrasyon grafiklerindeki üst sınır çoğunlukla 500 μM 'den daha azdır [41, 42, 43, 46-50]. Bu nedenle kandaki glikoz seviyesinin tayini için değeri 100-1000 aralığında değişen seyreltme faktörleri kullanılmaktadır [41,42,43, 46-50].

Enzimler günümüzde kandaki glikozu belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler yüksek özgülüğe sahip, hızlı ve etkili sonuçlar vermektedir. Kandaki glikozu ölçmek için yaygın olarak kullanılan üç ana enzim türü vardır: glukoz oksidaz, heksokinaz, ve glikoz dehidrojenaz [51].

2.6.1. Glukoz Oksidaz Yöntemi

Glukoz oksidaz içeren yöntem, oldukça yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem, enzim, glukoz oksidaz ve peroksidaz kullanımını birleştirmektedir. Yöntem Şekil 2.7' de verilmektedir [52].



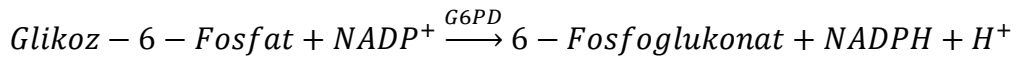
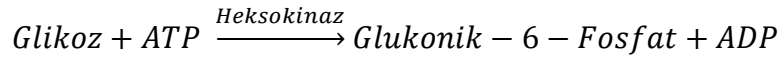


Şekil 2.7. Glukoz oksidaz yöntemi

Yöntem 2 basamaktan meydana gelmektedir. İlk basamakta , örnekteki glikoz, hidrojen peroksit (H₂O₂) üretmek için glukoz oksidaz enzimi tarafından oksitlenir. H₂O₂, ortamdaki glikoz derişimi ile orantılı olarak oluşturulur. Oluşturulan H₂O₂, kinonimin üretmek için fenol ve 4 amino-antipirin ile reaksiyona girmeye devam eder. Kinonimin lotus pembesi renge sahiptir ve renk yoğunluğu glikoz derişimi ile orantılıdır. Yöntemde 540 nm'de absorbans ölçülerek glikoz tayini yapılır [53]. Bu yöntemin avantajı hızlı sonuç vermesi ve düşük maliyetli olmasıdır.

2.6.2. Heksokinaz Yöntemi

Hexokinase yöntemi, günümüzde otomatik analizör sistemlerinde kullanılan en yaygın yöntem olarak bilinmektedir. Heksokinaz enziminin glikoza karşı yüksek seçiciliği vardır ve diğer karbonhidratlardan etkilenmemektedir [54]. Prosedür Şekil 2.8.'deki gibidir.



Şekil 2.8. Heksokinaz yöntemi

İlk aşamada, heksokinaz reaktifi ile glikoz fosforilasyonu yoluyla glikoz-6-fosfat, üretilir. İkinci aşamada G6PD, NADPH üretmek için glikoz-6-fosfat oksidasyonunu katalizler. Glikoz derişimi, NADPH'nin optik yoğunluğundaki artışla orantılıdır ve 340 nm'de ölçülür [54].

Bu yöntem yüksek özgülüğü nedeniyle günümüzde en yaygın yöntem olarak bilinmektedir ve sonuçlar diğer faktörlerden daha az etkilenmektedir. Bununla birlikte, bu yöntemin dezavantajı yüksek kimyasal maliyettir [54]

2.6.3. Glikoz Dehidrojenaz Yöntemi (GDH)

Şeker ölçüm cihazlarında glikoz dehidrojenaz yöntemi (GDH) kullanılmaktadır. Yöntem Şekil 2.9' da görüldüğü gibi tek basamakta çalışır.



Şekil 2.9. Glikoz dehidrojenaz yöntemi

Bu yöntemde doğruluğu arttırmak amacıyla α -glikoz'dan β -glikoza dönüşüm için mutarotaz eklenir. Ayrıca GDH, maltoz, galaktoz veya ksiloz gibi diğer şekerlerle de reaksiyona girer. Ortamda bu şekerler varken doğru sonuçlar alınamayabilir [55].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında monodispers gözenekli formda, Fe_3O_4 nanopartiküllerin immobilize edildiği SiO_2 mikroküreler sentezlenmiştir. Mikroküreler, hidroliz kondenzasyon protokolü uygulanarak SiO_2 ile kaplanmıştır. Au nanopartiküller (Au NP) manyetik ve gözenekli-monodispers formdaki $SiO_2@MagSiO_2$ mikrokürelere bağlanmıştır (Au@ $SiO_2@MagSiO_2$ mikroküreler). GOx, herhangi bir aktivasyon protokolü kullanılmadan manyetik mikroküreler üzerine Au NP üzerinden immobilize edilmiştir (GOx@Au@ $SiO_2@MagSiO_2$ mikroküreler). Tayinde peroksidaz substratı olarak TMB kullanılmıştır. Böylece peroksidaz aktivitesinde glikoz derişimine bağlı olarak oluşan değişim seçilen peroksidaz substratı olan TMB 'nin vermiş olduğu reaksiyon ile görünür bölgede spektrofotometrik olarak izlenmiştir. Tampon ortamı ve insan tam kanında glikoz tayini gerçekleştirilmiştir. GOx@Au@ $SiO_2@MagSiO_2$ mikrokürelerin özellikleri SEM,BET,VSM,XRD,XPS,TEM ve EDX kullanılarak incelenmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Kloroaurik asit tetrahidrat ($HAuCl_4.4H_2O$), trisodyum sitrat, glisidil metakrilat (GMA), etilen dimetakrilat (EDMA), metakrilik asit (MAA), tetraetoksisilan (TEOS) amonyak çözeltisi (a/a %25), izopropil alkol (İzo-PrOH), tetraetoksisilan (TEOS), 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) ve tetrabutylamonyum iyodür (TBA) Sigma-Aldrich Chem Co. ABD 'den temin edilmiştir. Glikoz, maltoz, laktoz, fruktoz, fenilalanin, askorbik asit ve glukoz oksidaz (GOx) (katalog No: G6125, Tip II,> 15.000 birim / g katı) elde edildi. 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin (TMB), hidrojen peroksit (a/a %50) ve insan kanı (BCR634), glukoz oksidaz (Aspergillus niger'den elde edilmiş) Sigma-Aldrich'ten tedarik edilmiştir. Peroksidaz benzeri aktivite ve glikoz tayin deneyleri, Direct-Q3, Millipore, ABD'den elde edilen 18 M Ω cm'lik bir dirençle damıtılmış deiyonize su (DDI) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Monodispers-Gözenekli Formda SiO₂@MagSiO₂ Mikrokürelerin Sentezi

3.2.1. GMA Polimerinin Sentezi

Monodispers gözenekli yapıda poli(glisidil metakrilat), poli(GMA) partiküller, glisidil metakrilat, GMA monomeri kullanılarak dispersiyon polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Cam reaktörde, 0.45 g polivinilpirolidon K-30 (PVP K-30), 30 mL saf etanol içerisinde sonikatör yardımıyla dağıtılmıştır. Daha sonra ortama başlatıcı olarak 0.24 g AIBN ve 3 mL GMA eklenerek ultrasonik su banyosu yardımıyla (Elma LC 30, Germany) çözünmesi sağlanmıştır. Reaktör, çalkalamalı su banyosuna (Memmert, Germany) sabitlenerek 70°C'de 24 saat boyunca, 120 cpm çalkalama hızında karıştırılmıştır. Reaksiyon sonrası, reaktör çalkalamalı su banyosundan alınarak oda sıcaklığında soğutulmuştur. Polimer sırasıyla 3 defa etanol ve 1 defa DDI su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi santrifüjleme-dekantasyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından, polimer 5 mL su içerisinde dağıtılmıştır. Dağıtılan polimer çözeltisi içerisinde 250 µL hacminde çözelti alınarak, 24 saat boyunca 70°C sıcaklıkta kurutulmuştur. Gravimetrik yöntem kullanılarak partikülün katı içeriği belirlenmiştir.

3.2.2. Monodispers Gözenekli Formda Poli(metakrilik asit-co-etilendimetakrilat) Mikrokürelerin Sentezi

Poli(metakrilik asit-co-etilen dimetakrilat), poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler poli(GMA) lateks mikrokürelerin çıkış materyali olarak kullanıldığı, çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlenmiştir.

Sentez için öncelikle 50 mL DDI su içerisine, 0,125 g sodium dodesil sulfat (SDS) eklenmiş, ultrasonik su banyosu yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. Ardından buz banyosu içerisindeki ortama 3,5 mL gözenek oluşturucu özelliğe sahip etil benzen (EB) eklenerek elde edilen çözelti 4 dakika boyunca sonikasyon (200 W) işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemin ardından ortama poli(GMA) mikroküreler (0.3 g) eklenmiş ve dağılımları için ortam tekrar 8 dakika boyunca sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen emülsiyon, gözenek yapıcı solventin çıkış lateksi tarafından tamamen absorpsiyonu için oda sıcaklığında, 24 saat boyunca

manyetik karıştırıcı (IKA RO 10, Almanya) kullanılarak karıştırılmıştır. Böylece polimer mikrokürelerin solvent ile şişmesi sağlanmıştır.

0,125 g SDS, 50 mL DDI su içerisinde ultrasonik su banyosu yardımıyla çözülmüş, çözelti içerisinde, ortama monomer olarak 2 mL MAA, çapraz bağlayıcı olarak 4 mL EDMA ve polimerizasyon başlatıcısı olarak 0.25 g BPO eklenip ortam, 6 dakika boyunca sonikasyona tabi tutulmuştur. Ortam ilk basamakta solvent ile şişme işlemine tabi tutulmuş poli(GMA) latex üzerine eklenerek, emülsiyon 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Elde edilen dispersiyon, sızdırmaz cam polimerizasyon reaktörüne aktarılmış ve sıcaklık kontrollü, çalkalamalı su banyosunda 120 cpm çalkalama hızında, 24 saat boyunca 80°C' da karıştırılmıştır. Reaktör su banyosundan alınıp oda sıcaklığında soğutulmaya bırakılmıştır. Dispersiyon, polimerleşmeyen monomerlerin ve kullanılan solventin ortamdaki uzaklaştırılması için santrifüjleme-dekantasyon yöntemi kullanılarak sırasıyla 2 kez teknik etanol, 2 kez THF, 2 kez teknik etanol ve 2 kez DDI su ile yıkanmıştır. Elde edilen poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler, 70 °C sıcaklıkta 24 saat etüvde bekletilerek kurutulmuştur.

3.2.3. Monodispers Gözenekli Formda Manyetik Poli(metakrilik asit-co-etilendimetakrilat) ve MagSiO₂ Mikrokürelerin Sentezi

Monodispers gözenekli formda manyetik SiO₂ (MagSiO₂) mikroküreler çok basamaklı hidroliz kondenzasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. MAA-co-EDMA polimeri sentez için başlangıç kalıp materyali olarak kullanılmıştır. İkili çöktürme işlemi uygulanarak MAA-co-EDMA polimerinin manyetizasyonu sağlanmıştır. Erlen içerisinde 100 mL distile su ve 0.7g poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler eklenmiş ve çözelti buz banyosu içerisinde 15 dakika boyunca azot altında karıştırılmıştır. Başka bir şişede 10 ml distile suya 0.54 g demir (II) klorür heksahidrat ve 0.8 g demir (II) klorür tetrahidrat eklenip elde edilen çözelti 15 dakika boyunca azotlanan çözelti içerisinde ilave edilmiştir. Buz banyosunda 15 dakika daha azotlanan çözelti buz banyosundan çıkarılmış ve oda sıcaklığına getirilip oksijenin ortamdaki uzaklaşması için vakumlanmıştır. Bu sayede Fe⁺² ve Fe⁺³ iyonlarının poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler üzerine daha iyi adsorplanması sağlanmıştır. Elde edilen çözelti yağ banyosuna alınarak sıcaklık

85°C 'ye yükseltilmiştir. Ortamın karışması için mekanik karıştırıcı kullanılmıştır. Poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler içerisine adsorpsiyonu sağlanan demir tuzlarının indirgenmesi için çözeltinin sıcaklığı 80°C'ye getirildikten sonra ortama 25 mL derişik amonyak eklenmiştir. Demir tuzları indirgenerek Fe₃O₄ nanopartiküllere dönüştürülmüş, karışımın renginin siyaha döndüğü gözlemlenmiştir. Amonyak ilavesinden sonra sıcaklığın tekrardan 80°C'ye gelmesi beklenmiş ve 1 saat boyunca karıştırılmış, ardından yağ banyosundan çıkarılıp oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Mikroküreler 3 kez DDI su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından elde edilen poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler su ortamında dağıtılıp 70 °C sıcaklıkta 24 saat etüvde bekletilerek kurutulmuştur. SiO₂ mikrokürelerin sentezinde kullanılan yöntem uygulanarak MagSiO₂ mikrokürelerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi sırasında santrifüj yerine mıknatıs kullanılmıştır.

3.2.4. SiO₂@MagSiO₂ Mikrokürelerinin Sentezi

50 mL saf isopropanol'e 5 mL DDI su eklenerek hazırlanan çözeltiliye 0.25 g TBAI eklenmiş çözünmesi için ultrasonikatörde 2 dakika boyunca tutulmuştur. Ardından ortama sırasıyla 0.25 mL amonyum hidroksit (NaH₄OH), 0.4 g poli(MAA-co-EDMA) eklenmiş, tekrar ultrasonikatör yardımıyla çözünme sağlanmıştır. Dispersiyon, 1 saat mekanik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır. Karışmakta olan ortama 2 mL TEOS, 2 mL saf Iso-PrOH içeren %50'lik TEOS çözeltisi damla damla eklenmiştir. Elde edilen çözelti ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 40°C'da 24 saat boyunca manyetik olarak karıştırılarak silika-polimer kompozit mikroküreler elde edilmiştir. Dispersiyon, mıknatıs kullanılarak üstteki sıvı atılacak şekilde sırasıyla 2 kez teknik Iso-PrOH, 2 kez DDI su ile yıkanmıştır. Daha sonra partiküller 70 °C sıcaklıkta 24 saat etüvde bekletilerek kurutulmuştur.

3.2.5. SiO₂@MagSiO₂ Mikrokürelerinin HCl ile Türevlendirilmesi

3,38 ml derişik HCl son hacim 25 mL olacak şekilde DDI ile seyreltilmiştir. Hazırlanan çözelti kapalı Pyrex® cam reaktörüne aktarılmıştır. Ultrasonikasyon işlemi uygulandıktan sonra ortama 0.1 g SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler eklenip ortam, yeniden ultrasonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Dispersiyon ağız kapatılarak, çalkalamalı su banyosuna (Memmert, Germany) sabitlenmiştir. 120

rpm çalkalama hızında 80°C'de 6 saat boyunca ortam karıştırılmıştır. Sonrasında dispersiyon DDI su ile 3 defa mıknatıs yardımıyla yüzeyde kalan sıvı atılarak yıkanmıştır. Hidroksil grubu içeren SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler 60° de 24 saat boyunca etüvde kurutulmuştur.

3.2.6. SiO₂@MagSiO₂ Mikrokürelerinin APTES (3-aminopropiltrioksilan) ile Türevlendirilmesi

Monodispers gözenekli formdaki SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere amin bağlanması amacıyla, kapalı Pyrex® cam reaktörü içerisine 0,3 mL trietilamin, 3 mL APTES ve 20 mL Iso-PrOH içeren çözelti eklenmiş ve ortam 5 dakika boyunca ultrasonikasyona maruz bırakılmıştır. 0.4 g SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler hazırlanan çözelti içerisinde ultrasonikatör yardımıyla dağıtılmıştır. Ağız sıkıca kapatılan cam reaktör çalkalamalı su banyosu içerisine sabitlenmiş ve 24 saat boyunca 80°C'de çalkalama işlemine tabi tutulmuştur. Mikroküreler 2 defa Iso-ProH ve 2 defa DDI su ile mıknatıs yardımıyla manyetik ayırma yöntemi kullanılarak yıkanmıştır. Mikroküreler su içerisinde dağıtılarak gravimetrik analize tabi tutulmuştur.

3.2.7. SiO₂@MagSiO₂ Mikroküreler Üzerine Au Nanopartikül (Au NP) Bağlanması

Au NP sentezi Turkevich yöntemine göre yapılmıştır [56]. HAuCl₄ çözeltisi (60 mg, 144 mL), 350 rpm'de manyetik karıştırma altında kaynayıncaya kadar yağ banyosu içerisinde ısıtılmıştır. Trisodyum sitrat çözeltisi (5 mL, a/a% 4.0) çözeltinin içine eklenmiş ve kaynama 15 dakika boyunca sürdürülmüştür. Trisodyum sitrat çözeltisinin eklenmesinden sonra çözeltinin renginin koyu kırmızıya dönüştüğü gözlemlenmiştir. Bu dönüşüm Au iyonlarının sitrat ile indirgendiğini göstermiştir. Dispersiyon 350 rpm'de karıştırılarak oda sıcaklığına soğutulmuştur. Au NP içeren dispersiyona oda sıcaklığında APTES bağlı SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler (0.3 g) eklenmiştir. Ortam, Au NP'in APTES bağlı SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere bağlanması için oda sıcaklığında 6 saat manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Au NP bağlı SiO₂@MagSiO₂ (Au@SiO₂@MagSiO₂) mikroküreler, mıknatıs yardımıyla manyetik ayırma yöntemi uygulanarak DDI 3 kere yıkanmıştır.

3.2.8. Au@SiO₂@MagSiO₂ Mikroküreler Üzerine GOx İmmobilizasyonu

Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler (150 mg) kapalı bir falkon tüpte GOx (20 mg / mL) içeren pH 7.0 (1.5 mL, 100 mM) fosfat tamponu içinde 1 dakika vorteksenerek dağıtılmıştır. Dispersiyon 100 rpm'de, oda sıcaklığında ve karanlıkta rotator yardımıyla 24 saat boyunca karıştırılmıştır. GOx bağlanmış Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler (GOx @Au@SiO₂@MagSiO₂) mıknatıs ile manyetik ayırım yapılarak üç kez DDI su ile yıkanmıştır.

3.3. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ Mikrokürelerin Karakterizasyonu

3.3.1. Brunauer-Emmett-Teller (BET) ile Gözenek Boyutu ve Yüzey Alanı Ölçümü

Azot adsorpsiyonu ile GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin yüzey alanını ve gözenek boyutunu hesaplamak için Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Quantochrome, Nova 2200e, ABD) cihazı kullanılmıştır. Bunun için 0.1 g GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler, 70°C'ye ayarlanmış etüvde kurutulmuştur. BET hücresine ilave edilen örnek, nemin 6 saat azotla çıkarıldığı bir vakum odasına yerleştirilmiştir. Vakumdan sonra ölçüm bölgesine yerleştirilen örnek azot adsorpsiyon-desorpsiyonu işlemine tabi tutulmuştur. Adsorplanmış ve desorplanmış azot hacmi sayesinde gözenek boyutu ve yüzey alanı elde edilmiştir.

3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin yüzey morfolojisi, ortalama boyut ve boyut dağılımının belirlenmesi için taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM, JEOL, JEM1200EX, Japonya) kullanılmıştır. Örnekler 1 gün boyunca 70°C'ye ayarlanmış etüvde kurumaya bırakılmıştır.

3.3.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Geçirimli Elektron Mikroskobu kullanılarak GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin yüzeyi incelenmiştir. Analiz Konya Selçuk Üniversite'sinde

(TEM, JEOL JEM-2100, U.S.A) gerçekleştirilmiştir. Görüntüde mikrokürelerin çakışmaması için örnek (1/1000) oranında seyreltilmiştir.

3.3.4. Titreşimli Örnek Manyetometrisi Analizi

Titreşimli örnek manyetometrisi ile $GOx@Au@SiO_2@MagSiO_2$ mikrokürelerin manyetizasyon davranışı incelenmiştir. Analiz Hacettepe Üniversitesi Fizik Mühendisliği Bölümü'nde (Cryogenic Limited, PPM System, İngiltere) gerçekleştirilmiştir.

3.3.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi kullanılarak $GOx@Au@SiO_2@MagSiO_2$ mikrokürelerin fonksiyonel grupları tayin edilmiştir. Mikroküreler 1 gün boyunca $70^{\circ}C$ 'ye ayarlanmış etüvde kurutulmuştur.

3.3.6. X-Ray Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

Mikrokürelerin yüzey atomik bileşenlerinin belirlenmesi için XPS (Thermo Scientific, K-Alpha, A.B.D.) kullanılmıştır. Bu yöntem, malzemenin yüzeyine X-ışınları gönderme ve elektronları kırmak için X-ışınlarının enerjisini kontrol etme ilkesine dayanmaktadır. Malzemenin yüzeyine gönderilen X-ışınları atomlar veya moleküller tarafından emildiğinde, elektronlar kopmaktadır. Kinetik enerjinin ölçümü, yüzey elemanları ve malzemenin içerikleri hakkında bilgi sağlamaktadır [57].

3.3.7. X-Işını Kırınım Analizi (XRD)

$GOx@Au@SiO_2@MagSiO_2$ mikrokürelerinin kimyasal yapılarını incelemek için XRD (Ultima IV X-ray diffractometer, Rigaku Ultima IV, Japan) kullanılmıştır. Mikroküreler 1 gün boyunca $70^{\circ}C$ 'ye ayarlanmış etüvde kurutulmuştur.

3.4. $GOx@Au@SiO_2@MagSiO_2$ Mikrokürelerinin Peroksidaz-Mimetik Aktivitesi

pH'in, mikrokürelerin peroksidaz aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmak için pH 3-7 aralığında deneyler yapılmıştır. pH 3,4,5 ve 6 için 100 mM sitrat tamponu kullanılırken pH 7 için 100 mM fosfat tamponu hazırlanmıştır. Mikroküreler, mıknatısla ayırma yöntemi kullanılarak belirlenen pH değerindeki tampon

çözeltisi ile yıkanmıştır. Mikroküreler (20 mg) belirli bir pH'da (pH 3-7) TMB çözeltisi (200 µM, 1.25 mL) içinde dağıtılmıştır. Dispersiyona H₂O₂ çözeltisi (a/a,% 50, 2 µL) ilave edilmiş ve reaksiyon, 20 dakika boyunca 37°C'de karanlıkta su banyosu içinde 100 cpm çalkalama hızında sürdürülmüştür. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler, mıknatıs kullanılarak manyetik ayırma yoluyla dispersiyondan toplanmıştır. Süpernatantın absorbansı 652 nm'de UV-Vis spektrofotometresinde (Thermo Scientific, ABD) ölçülmüştür.

Başlangıç TMB derişimi 25-250 µM arasında değiştirilerek Au@SiO₂@MagSiO₂ ve GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin peroksidaz aktivitesi üzerindeki etkisi pH 5.0'de (100 mM sitrat tamponu) araştırılmıştır. Başlangıç TMB tüketim hızı ($-r_{TMB}$, µM TMB / dak) hesaplanmıştır.

3.5. Tek Basamaklı Tayin Protokolünde GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ Mikroküreler Kullanılarak Tampon Ortamında Glikoz Tayini

GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler, pH:5.0 100 mM sitrat tamponuyla mıknatısla ayırma yöntemi kullanılarak üstteki sıvı atılacak şekilde 3 defa yıkanmıştır. Mikroküreler (20 mg), 0.08-6.4 mg / mL aralığında farklı derişimlerde glikoz içeren pH 5.0 sitrat tamponu (1.25 mL) içerisinde dağıtılmıştır. Cam şişeye aktarılan dispersiyon oksijen girişinin engellenmemesi için ağzı açık şekilde çalkalayıcı su banyosuna sabitlenerek sıcaklık 37°C'ye yükseltilmiştir. 1 saat boyunca karanlıkta karıştırılmıştır. 1 saat karışmanın ardından pH 5.0 sitrat tamponu içerisinde hazırlanan TMB çözeltisi (400 µM, 1.25 mL) ortama eklenmiştir. Son dispersiyondaki TMB derişimi 200 µM olarak elde edilmiştir. Kolorimetrik reaksiyon, karanlıkta 100 cpm çalkalama hızında 37 ° C'de 20 dakika sürdürülmüştür. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri, mıknatıs kullanılarak manyetik ayırma yoluyla dispersiyondan toplanmıştır. Süpernatantın absorbansı 652 nm'de UV-Vis spektrofotometresinde okunmuştur.

3.6. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ Mikrokürelerin Bağlı Peroksidaz Benzeri Aktivitesinin Serbest Peroksidaza Göre Belirlenmesi

GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin peroksidaz benzeri aktivitesini incelemek, peroksidaz-TMB reaksiyonu, GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler yerine serbest HRP kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla

GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler, mıknatısla manyetik ayırma yöntemi kullanılarak birkaç kere 100 mM pH 5.0 sitrat tamponu ile yıkanmıştır. Mikroküreler (20 mg), 0.4-6.4 mg / mL'lik aralığında farklı derişimlerde glikoz içeren 1.25 mL sitrat tamponu (pH 5.0,100 mM) içerisinde dağıtılmıştır. Dispersiyon, 37°C' de 1 saat boyunca çalkalamalı su banyosunda karanlık ortamda karıştırılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler, mıknatıs kullanılarak sulu ortamdaki ayrılmıştır. pH 5.0'de sitrat tamponu içerisinde hazırlanan TMB çözeltisi (400 µM, 1.25 mL) ve HRP çözeltisi (5 mg / mL) sulu çözeltiliye ilave edilmiştir. Kolorimetrik reaksiyon, karanlık ortamda 100 cpm'lik bir çalkalama hızı ile çalkalama banyosunda , 37 ° C'de 20 dakika boyunca sürdürülmüştür. Çözeltinin absorbanı, 440 nm'de UV-Vis spektrofotometresinde ölçülmüştür.

3.7. Peroksidaz Benzeri Aktiviteye Sahip Serbest GOx ve Au@SiO₂@MagSiO₂ Mikroküreleri İçeren İki Aşamalı Protokol Kullanılarak Glikoz Tayini

100 mM, pH 5 sitrat tamponu (1.25 mL) içerisinde hazırlanan glikoz çözeltisine, serbest GOx (20 mg Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri üzerine immobilize edilen miktara eşdeğer olan 0.48 mg) ilave edilmiştir. Çözelti, 37 ° C'de 1 saat boyunca,serbest glukoz oksidazın glikozun ile oksidasyonu sayesinde H₂O₂ üretmesi için karanlıkta çalkalamalı su banyosunda karıştırılmıştır. Tayin ortamına,1.25 mL, 100 mM pH 5.0 sitrat tamponu içerisinde hazırlanan TMB çözeltisi (400 µM) ve Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri (20 mg) eklenmiştir. Kolorimetrik reaksiyon, karanlıkta 100 cpm çalkalama hızında çalkalamalı su banyosu içerisinde ile 37 ° C'de 20 dakika sürdürülmüştür. Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri, mıknatıs kullanılarak manyetik ayırma yoluyla dispersiyondan ayrılmıştır. Elde edilen çözeltinin absorbanı 652 nm'de UV-Vis spektrofotometresinde ölçülmüştür.

3.8. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ Mikroküreler ile Kandaki Glikoz Seviyesinin Belirlenmesi

0.015-4.71 mg / mL arasında farklı derişimlerde glikoz içeren pH 5.0'da (40 µL) 100 mM sitrat tamponu ile hazırlanan glikoz stok çözeltilerine belirli bir hacimde kan (10 µL) ilave edilmiştir. Böylece, 50 µL hacminde, 10 µL tam kan ve 0.5-7.0

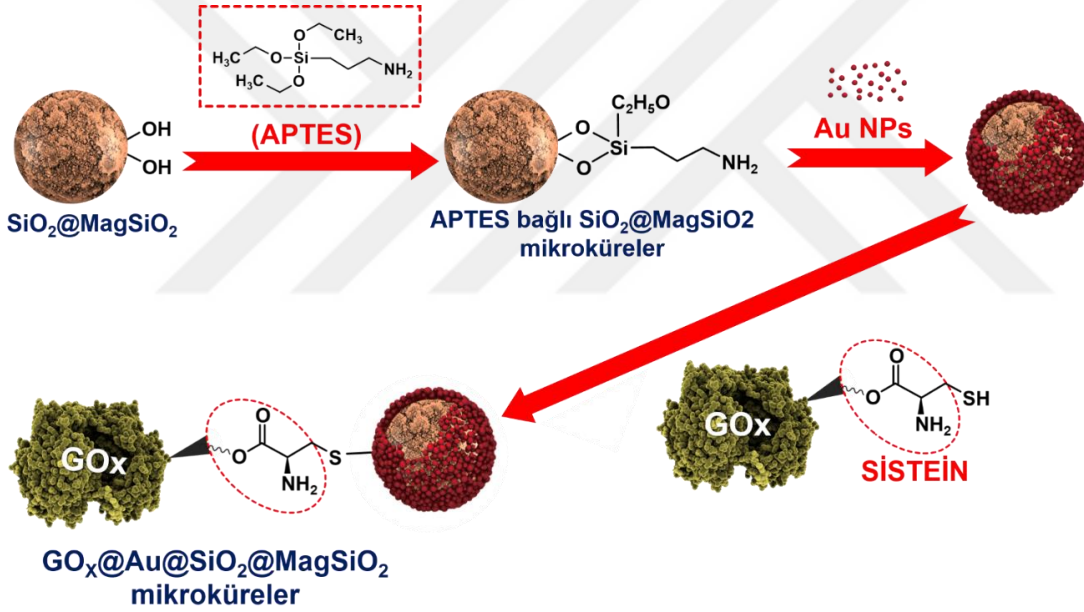
mg glikoz /mL kan derişim aralığında glikoz içeren ezelteleri, elde edilmiştir. Bu rnekler, kolorimetrik yanıtın glikoz derişimi (mg glikoz / mL kan) ile değişiminin verildiği bir kalibrasyon grafiğinin türetilmesi için kullanılmıştır. Ek olarak, kalibrasyon grafiklerinin türetilmesi, 20/30 ve 23/27 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ tam kan/sitrat tamponu hacim oranları ile hazırlanan örnek ezelteleri kullanılarak da yapılmıştır. Belirli bir kan hacmi fraksiyonu ile hazırlanan kan-sitrat tamponu karışımına, GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri (10 mg) içeren 200 μL , pH 5.0, 100 mM sitrat tamponu ilave edilmiştir. Dispersiyon, 37 ° C'de 30 dakika süreyle karanlıkta çalkalamalı su banyosu kullanılarak karıştırılmıştır. pH 5.0'da sitrat tamponu içerisinde hazırlanan TMB ezeltisi (400 μM , 250 μL) elde edilen dispersiyona ilave edilmiştir. Kolorimetrik reaksiyon, karanlıkta 100 cpm çalkalama hızında 37°C'de 20 dakika sürdürülmüştür. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri, mıknatis kullanılarak manyetik ayırma yoluyla dispersiyondan toplanmıştır. Süpernatant 0.45 μm Millex® PTFE şırınga filtresinden (Sigma-Aldrich) geçirildikten sonra absorbands 630 nm'de UV-Vis spektrofotometresinde okunmuştur.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında $GOx@Au@SiO_2@MagSiO_2$ mikrokürelerin sentez protokolü ve etki mekanizması, karakterizasyon sonuçları, farklı reaksiyon koşullarındaki peroksidaz benzeri aktivite ölçüm sonuçları, glikozun tampon ortamında ve insan kanında kolorimetrik tayininde kullanılmasına ait deney sonuçları incelenmiştir.

4.1. $GOx@Au@SiO_2@MagSiO_2$ Mikrokürelerin Sentez Protokolü Ve Etki Mekanizması

$GOx@Au@SiO_2@MagSiO_2$ mikroküreleri için kullanılan sentez protokolünün şematik gösterimi Şekil 4.1 'de verilmiştir.



Şekil 4.1. $GOx@Au@SiO_2@MagSiO_2$ mikroküreleri için sentez protokolünün şematik gösterimi [58]

İlk olarak, monodispers gözenekli formda, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin immobilize edildiği silika mikroküreler sentezlenmiştir [59]. Tez kapsamında, manyetik silika mikrokürelerin üzerine immobilize edilmiş altın nanopartiküllere (Au NP) bağlı peroksidaz benzeri aktivite amaçlanmıştır. Bu nedenle mikroküreler, hidroliz kondenzasyon protokolü uygulanarak SiO_2 ile kaplanmıştır [60]. Böylece, sulu ortamdaki sentetik substratın, SiO_2 mikrokürelerine immobilize edilmiş Fe_3O_4

NP'leri ile olası etkileşimi önlenmiştir. Silika kaplı manyetik silika mikroküreler $\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ olarak adlandırılmıştır. APTES, silanizasyon reaksiyonu yoluyla $\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ mikrokürelere kovalent olarak bağlanmıştır. Sitrat iyonlarıyla indirgenmiş olan Au NP'ler, amino ve sitrat grupları arasındaki etkileşim sayesinde $\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ mikrokürelere bağlanmıştır ($\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$). Son olarak, GOx enzimi $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ mikrokürelere bağlanmıştır.

Tez kapsamında, insan kanında tek basamaklı glikoz tayini gerçekleştirmek için çift enzimatik aktiviteye sahip manyetik nanozim sentezlenmiştir. $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ mikroküreler, silika ile kaplanmış manyetik silika mikroküreler üzerine immobilize edilen Au NP sayesinde peroksidaz benzeri aktiviteye sahip manyetik nanozim olarak işlev görmüştür. Sentezin ikinci aşamasında, GOx, $\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ mikrokürelere üzerine immobilize edilmiş Au NP'lere bağlanmıştır. Peroksidaz benzeri aktivite gösteren ve yüzeylerinde immobilize GOx taşıyan nanozimler kullanılarak benzer bir tek basamaklı glikoz belirleme protokolü geliştirilmiştir. [61, 62-65]. Bununla birlikte, benzer GOx entegre nanozimlerin sentezinde, GOx'un nanozime bağlanması için çoğunlukla karmaşık aktivasyon protokolleri izlenmiştir. Örneğin, GOx'un çok fonksiyonlu janus hematit silika nanopartiküllere kovalent bağlanması için silanizasyon ve glutaraldehit aktivasyonu uygulanmıştır. [63]. Suda çözünür karbodiimid aktivasyonu, GOx-entegre metal-organik hibritleri, GOx-konjuge grafen oksit / MnO_2 ve ZnFe_2O_4 -karbon nanotüp nanozimlerin sentezi için uygulanmış ve tek basamaklı glikoz tayini için önerilmiştir. [62, 64, 65].

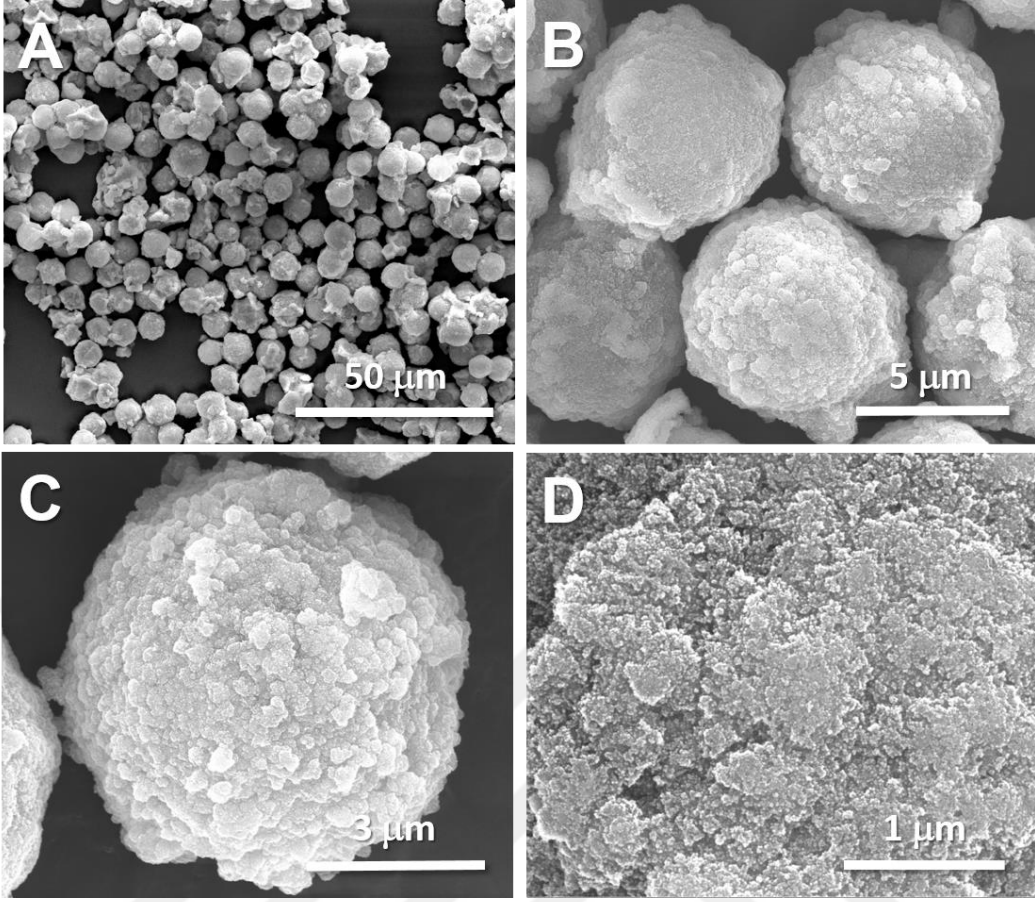
Diğer yöntemlerden farklı olarak tez kapsamında, $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ mikrokürelere GOx bağlanması için kolay ve basit bir protokol izlenmiştir. Bu amaçla, benzersiz yapısal özelliği olan GOx'un moleküler yapısında bulunan sistein kalıntılarının tiyol grubu ilk kez değerlendirilmiştir [66]. *Aspergillus niger*'den elde edilen GOx, 3 sistein kalıntısı ve N'ye bağlı glikosilasyon için 8 potansiyel bölge içermektedir. [66]. GOx'un Au NP'lere bağlanması için herhangi bir aktivasyon protokolü kullanılmamış, doğrudan GOx'un yapısındaki tiyol grubunun, Au NP ile etkileşimi kullanılmıştır. Bağlanma işlemi pH 7.0'da fosfat tamponu içinde GOx ve $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ mikrokürelere karıştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. $\text{Au}@\text{SiO}_2@\text{MagSiO}_2$ mikrokürelere bağlanan GOx miktarı, nanozimin manyetik olarak ayrılmasından sonra süpernatantın ilk ve son

absorbansı UV-Vis spektrofotometresinde 278 nm'de ölçülerek 24 mg GOx / g mikroküre olarak belirlenmiştir. Öte yandan aynı koşullar altında, SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere adsorplanan GOx miktarı ise 7.8 mg GOx / g MagSiO₂ olarak belirlenmiştir. Bu durum, GOx'un nanozim üzerine bağlandığını, yani sistein kalıntılarının SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri üzerindeki Au NP'lerle etkileşiminin baskın olduğu göstermiştir.

GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri kullanılarak glikozun tek basamaklı tayininde, glikoz, önce Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere üzerine immobilize edilmiş GOx tarafından oksitlenmiştir. Oksidasyonla üretilen H₂O₂, ilave edilen sentetik substrat (TMB) ile GOx @ Au @ SiO₂@ MagSiO₂ mikrokürelere peroksidaz benzeri aktivitesi ile reaksiyona girmiştir. Glikoz oksidasyonu ile üretilen H₂O₂ miktarı ile orantılı olan oksitlenmiş TMB oluşumundan kaynaklanan renk oluşumu, nanozimin manyetik olarak ayrılmasından sonra 652 nm'de absorbans alınarak ölçülmüştür.

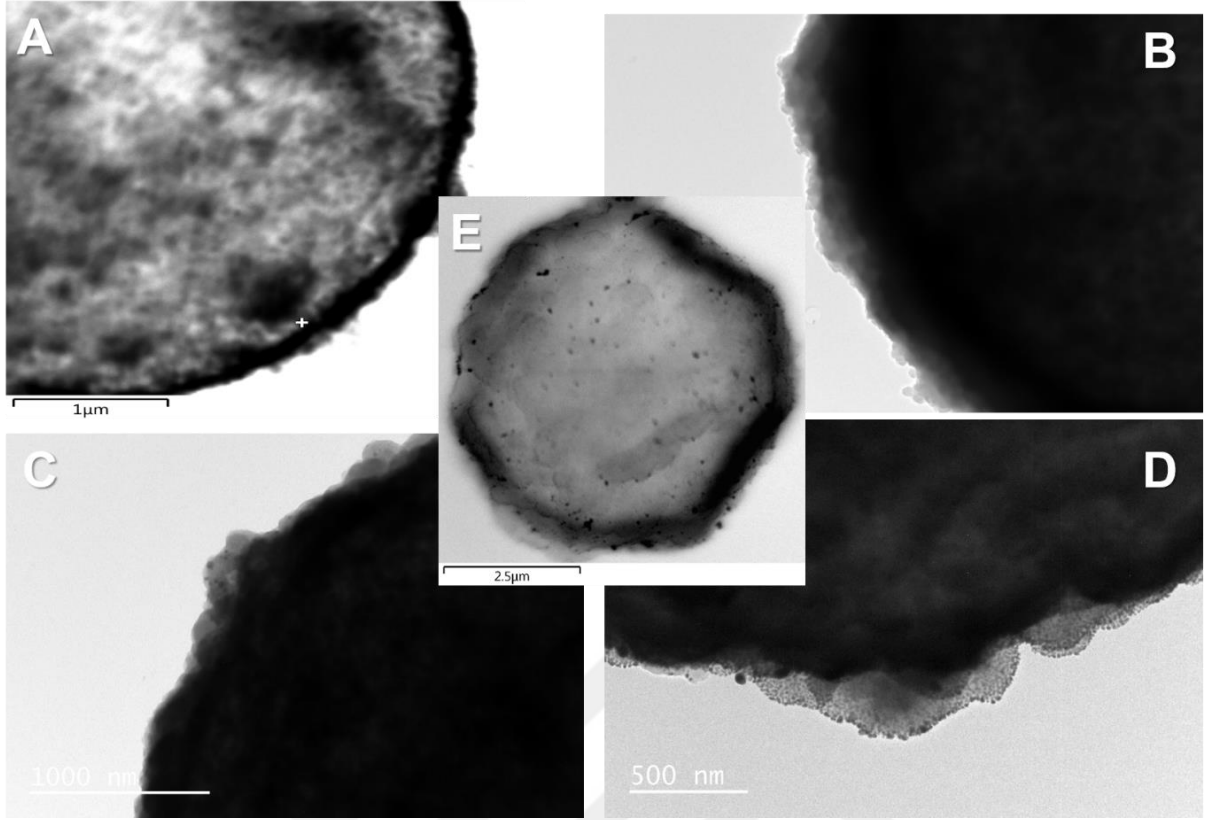
4.2. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ Mikrokülerinin Karakterizasyonu

GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokülerinin SEM görüntüleri Şekil 4.2 'de verilmiştir.



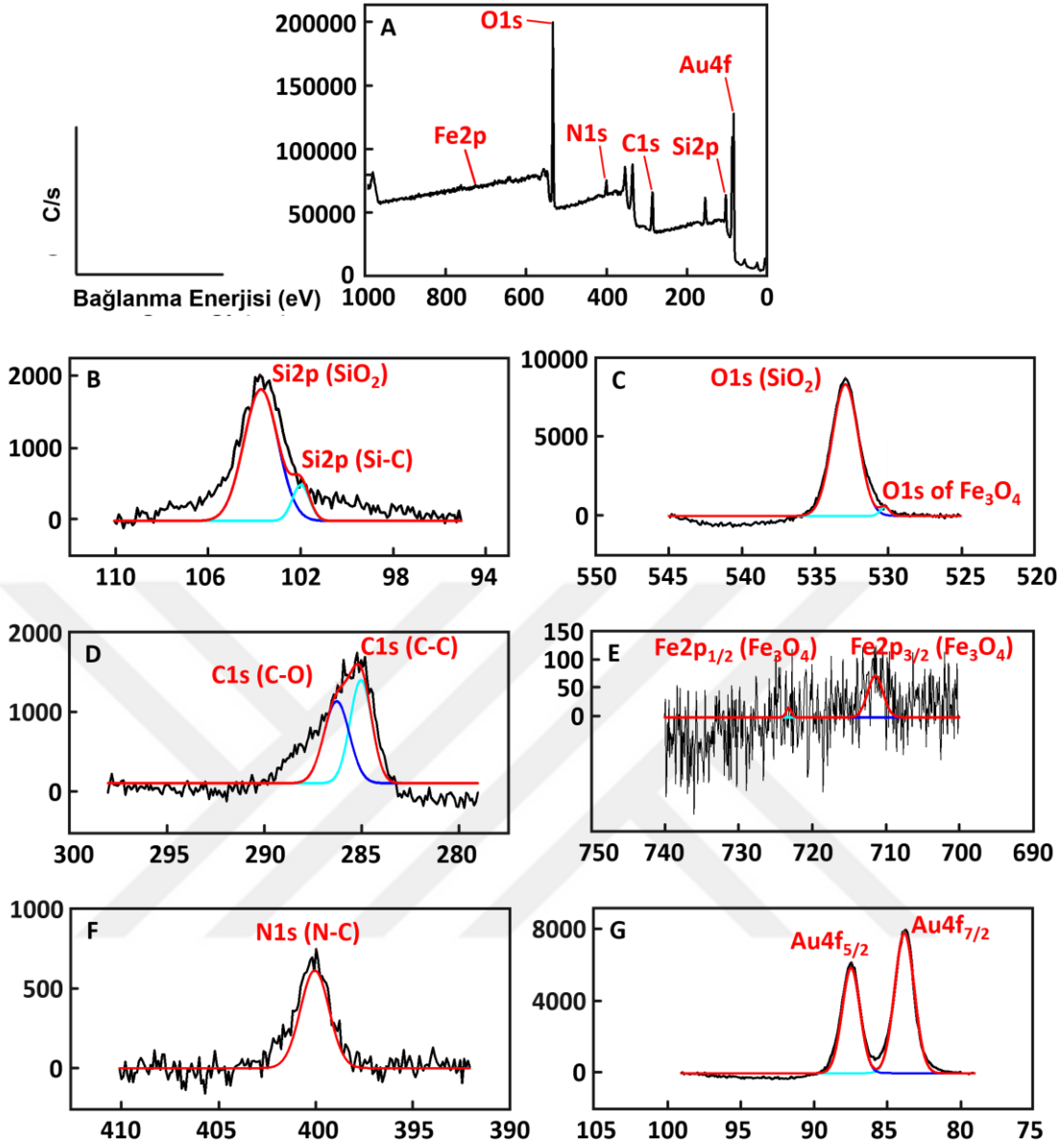
Şekil 4.2. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin SEM fotoğrafları. Büyütme: (A) 2.000X, (B) 15.000X, (C) 30.000X, (D) 50.000X [58].

Mikroküreler dar bir boyut dağılımında sentezlenmiş, ancak mükemmel küresel formda olmadıkları gözlemlenmiştir. Demir tuzlarının ikili çöktürmesi uygulanmaksızın aynı protokol ile elde edilen monodispers gözenekli SiO₂ mikroküreler mükemmel küresel formda ve sünger benzeri gözenekliliğe sahip oldukça pürüzsüz bir yüzeye sahiptir [67]. Bu nedenle, GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin pürüzlü yüzeyi, SiO₂ tabakası ile kaplanmış Fe₃O₄ NP'in/agregatlarının ve mikrokürelere bağlı Au NP'in /agregatlarının varlığına atfedilmiştir. (Şekil 4.2B-4.2D).



Şekil 4.3. (A) Fe₃O₄ NP'leri içeren MagSiO₂, (B) SiO₂@MagSiO₂, (C) APTES bağlı SiO₂@MagSiO₂, (D) ve (E) Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin TEM görüntüleri [58]

Manyetik nanozim sentezinde kullanılan kompozit mikrokürelerin morfolojisini incelemek için MagSiO₂, SiO₂@MagSiO₂, APTES@SiO₂@MagSiO₂, Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin, TEM fotoğrafları Şekil 4.3 'te verilmiştir. MagSiO₂ mikrokürelerin yüzeyinde ağırlıklı olarak Fe₃O₄ NP içeren yaklaşık 150 nm kalınlığında koyu renkli bir katman gözlenmiştir (Şekil 4.3A). Açık gri bir katman şeklinde gözlenen SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin üzerindeki SiO₂ kaplamanın kalınlığının yaklaşık 300 nm olduğu görülmüştür (Şekil 4.3B). Aynı bölge APTES@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin yüzeyinde de görüntülenmiştir (Şekil 4.3C). APTES@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere bağlanan Au NP, Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin yüzeyinde koyu gri noktalar şeklinde görüntülenmiştir. Au@MagSiO₂ mikrokürelerinin tüm parçacık yapısını gösteren TEM fotoğrafı da Şekil 4.3E'de verilmiştir.



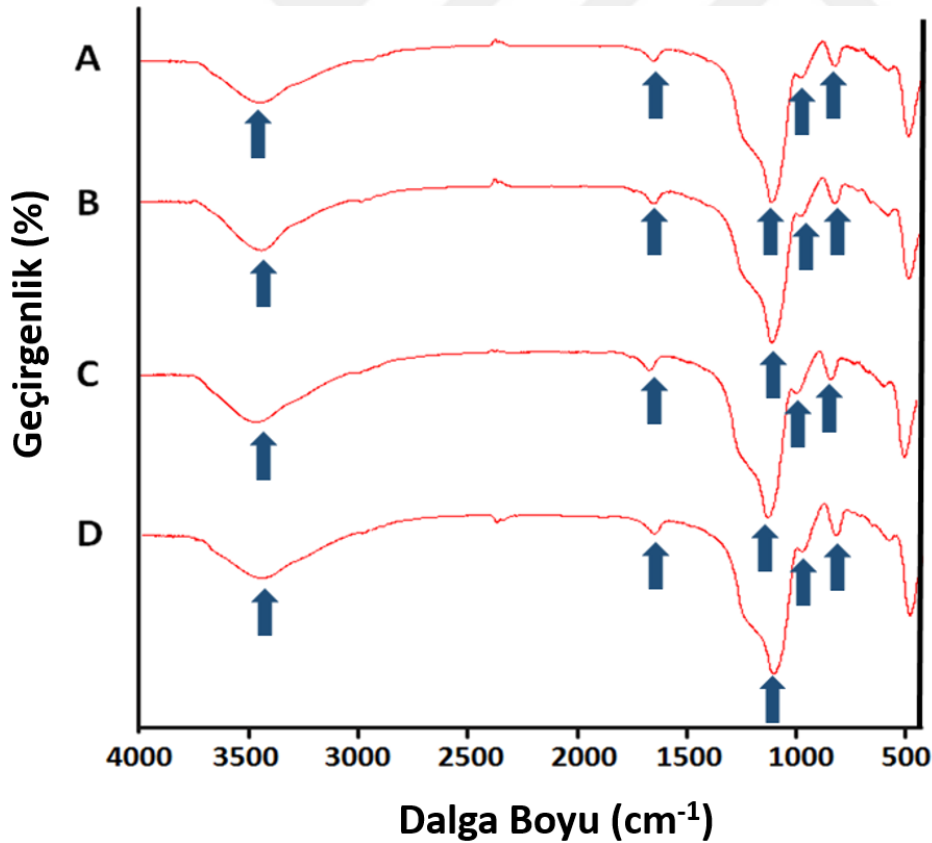
Şekil 4.4. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin (A) Yüzey XPS spektrumu (B) Si2p taraması, (C) O1s taraması, (D) C1s taraması, (E) Fe2p taraması, (F) N1s taraması ve (G) Au4f taraması [58]

GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin yüzey özelliklerinin belirlenebilmesi için X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) analizi yapılmıştır. Elde edilen dekonvolüsyon (ters evrişim) çekirdek seviyesi spektrumları ve yüzey spektrumu ve Şekil 4.4 'de verilmektedir. Sentezlenmiş nanozim ve tüm ara ürünler için, XPS ile belirlenen yüzey atomik bileşimleri de Çizelge 4.1 'de verilmiştir. Dekonvolüsyonda 103.7 eV'de keskin pike ek olarak GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂

mikroküreleri ile Si2p taraması için çekirdek düzeyinde spektrum, bağlı APTES nedeniyle Si-C'ye ait küçük bir pik 102 eV' de elde edilmiştir.

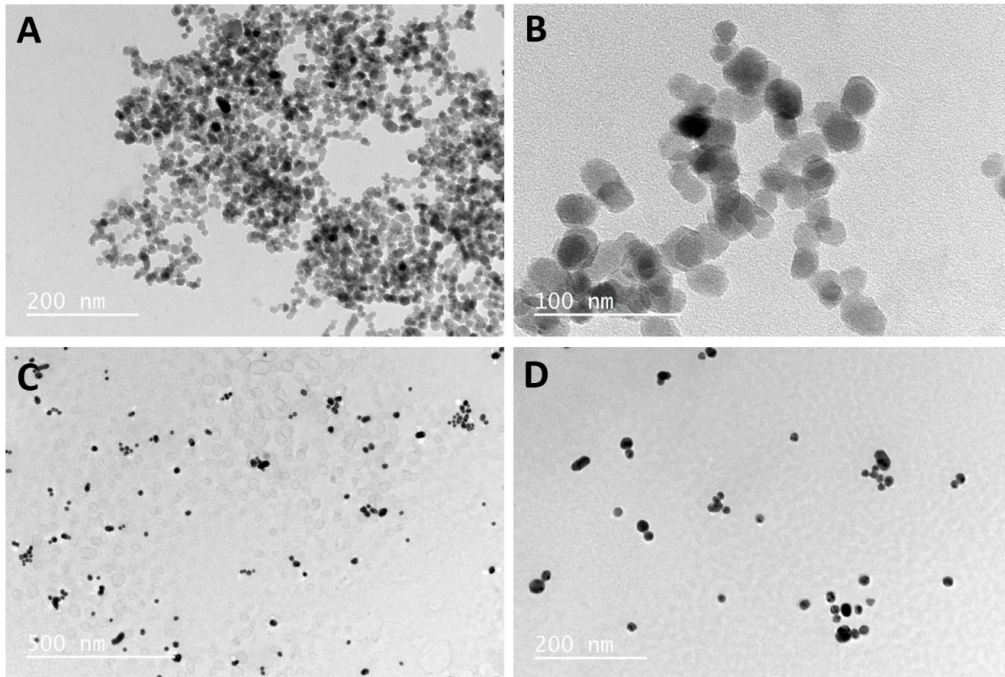
Çizelge 4.1. Fe₃O₄NP içeren MagSiO₂, SiO₂@MagSiO₂, APTES@SiO₂@MagSiO₂, Au@SiO₂@MagSiO₂ ve GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere ait XPS ile belirlenmiş yüzey atomik bileşimleri [58]

Mikroküre	C1s	O1s	Si2p	Fe2p	N1s	Au4f
MagSiO ₂	10.10	58.93	29.04	1.93	-	-
SiO ₂ @MagSiO ₂	17.25	55.34	27.41	-	-	-
APTES@SiO ₂ @MagSiO ₂	14.36	56.11	27.98	-	1.55	-
Au@SiO ₂ @MagSiO ₂	39.30	36.42	17.03	-	2.00	5.24
GOx@Au@SiO ₂ @MagSiO ₂	29.26	39.66	19.82	-	6.40	4.86



Şekil 4.5. (A) SiO₂@MagSiO₂, (B) APTES@SiO₂@MagSiO₂, (C) Au@SiO₂@MagSiO₂ ve (D) GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere ait FTIR spektrumları [58]

SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin FTIR spektrumunda, 950 cm⁻¹'deki pik, Si-OH'nin asimetrik titreşimine, 795 ve 1050 cm⁻¹'deki pikler, Si-O'nun simetrik ve asimetrik titreşimlerine aittir (Şekil 4.5A). Aynı spektrumda -OH gerilmesinden dolayı 3441 cm⁻¹'de geniş bir pik ve silanol gruplarının -OH bükülmesinden dolayı 1632 cm⁻¹'de küçük bir pik gözlenmiştir (Şekil 4.5A) [68]. Tüm bu bantlar APTES@SiO₂@MagSiO₂, Au@MagSiO₂ ve GOx@Au@MagSiO₂ mikrokürelerinin FTIR spektrumlarında bant şiddetlerinde oluşan ufak değişiklikler ile elde edilmiştir (Şekil 4.5B, 4.5C ve 4.5D). Bu durumun temel nedeni, -3440 cm⁻¹'de -OH, -NH ve 1630 cm⁻¹'de -OH ve -NH'a ait bantların üst üste gelmesidir. [68-69].



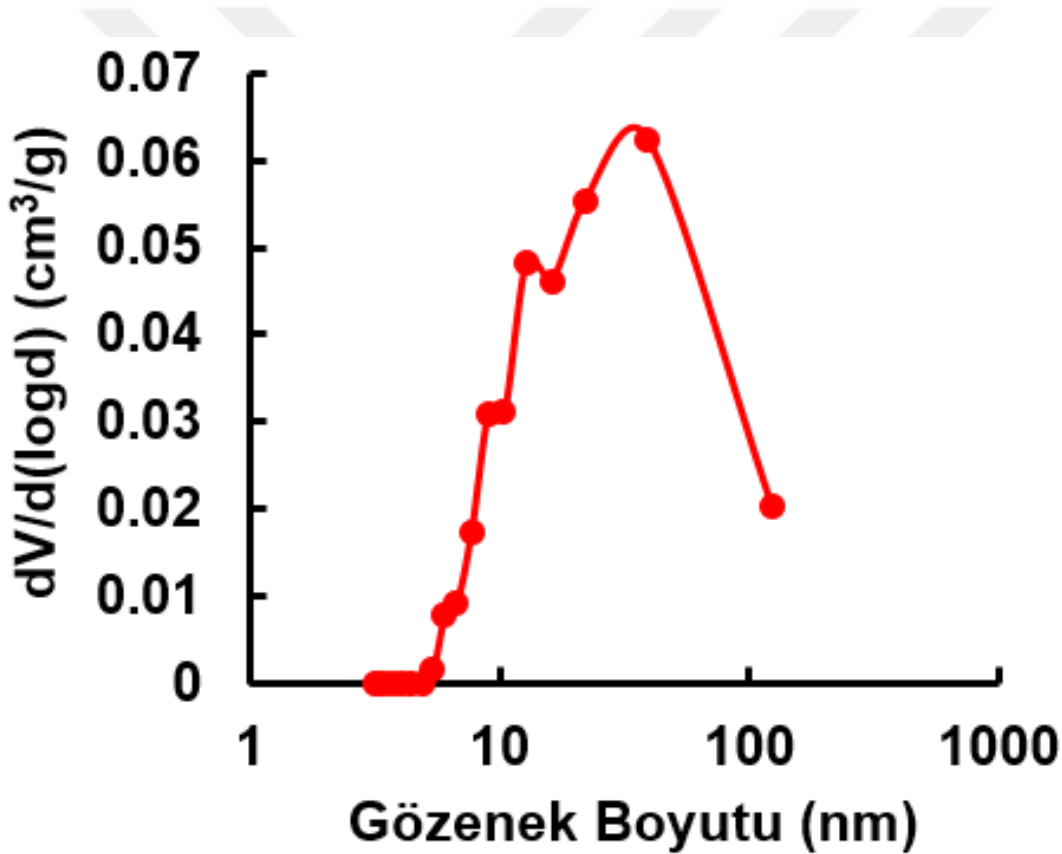
Şekil 4.6. (A),(B) Çok basamaklı sol-gel kalıplama yöntemi ile polimetakrilat mikroküreleri kullanılmadan sentezlenen Fe₃O₄ NP ve (C),(D)Turkevich yöntemi kullanılarak sentezlenen Au NP TEM fotoğrafları [58]

Fe₃O₄ NP, " çok basamaklı sol-gel kalıplama yöntemi" nde kullanılan koşullar ile, polimetakrilat mikrokürelerinin yokluğunda sentezlenmiştir [59]. Fe₃O₄ NP'in ve

Turkevich metoduna göre sentezlenen Au NP'in TEM fotoğrafları Şekil 4.6 'da verilmektedir. Ortalama boyutu 24 nm olan Fe₃O₄ NP dar bir boyut dağılımı ile elde edilmiştir (Şekil 4.6A ve 4.6B). Ortalama boyutu 16 nm olan Au NP'in boyut dağılımı biraz daha geniştir (Şekil 4.6C ve 4.6D).

4.2.1 Monodispers ve Gözenekli Formdaki GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ Mikrokürelerinin Gözenek Boyutu ve Yüzey Alanı Analizleri

GOx@Au@SiO₂@ MagSiO₂ mikrokürelerinin gözenek boyutu dağılım eğrisi ve gözeneklilik özellikleri sırasıyla Şekil 4.7 ve Çizelge 4.2. verilmiştir.



Şekil 4.7. Azot adsorpsiyon-desorpsiyon yöntemi ile elde edilen GOx@Au@SiO₂@ MagSiO₂ mikrokürelerinin gözenek boyutu dağılım eğrisi [58]

Çizelge 4.2. GOx@Au@MagSiO₂ mikrokürelerinin yüzey ve gözenek özellikleri [58]

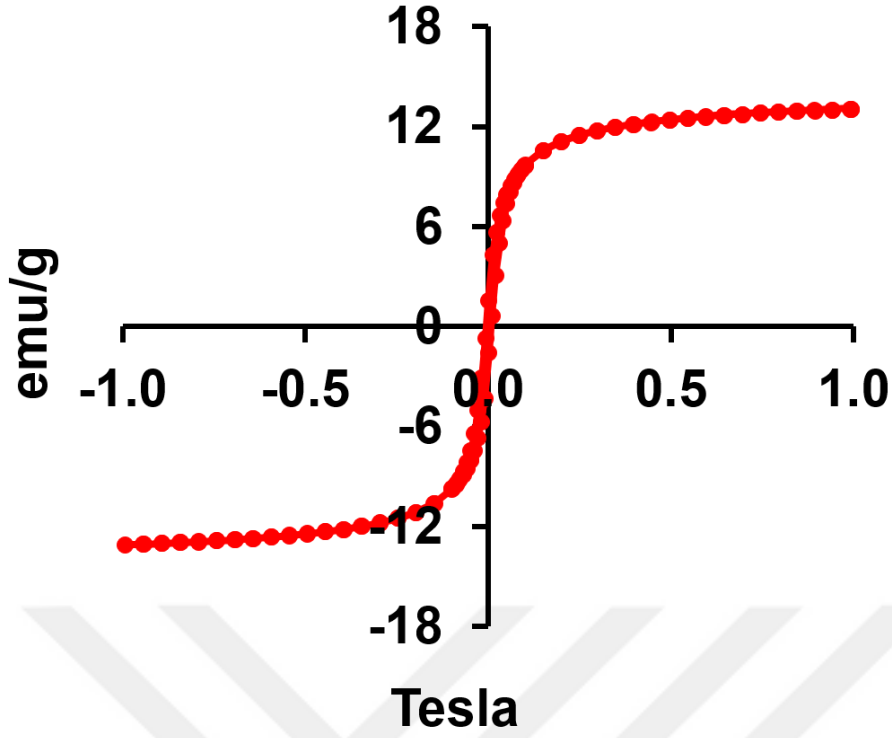
Dn (µm)	CV (%)	Ortalama Gözenek Boyutu (nm)	Gözenek Hacmi (cm ³ /g)	Özgül Yüzey Alanı (m ² /g)
6.5	4.1	38.56	0.05	12.3

Dn: Ortalama partikül boyutu, CV: boyut dağılımı için değişim katsayısı

Ortalama partikül boyutu ve boyut dağılımı için değişim katsayısı sırasıyla 6.5 µm ve % 4.1 olarak hesaplanmıştır. Mikrokürelerin gözenek hacmi ve özgül yüzey alanı, çok basamaklı hidroliz kondenzasyon yöntemiyle elde edilen gözenekli SiO₂ mikrokürelere göre oldukça düşüktür. Bunun muhtemel nedeni silika mikrokürelerin gözeneklerinin, Fe₃O₄ NP ve SiO₂ tabakası tarafından doldurulmasıdır.

4.2.2. Titreşimli Örnek Manyetometri Ölçümü

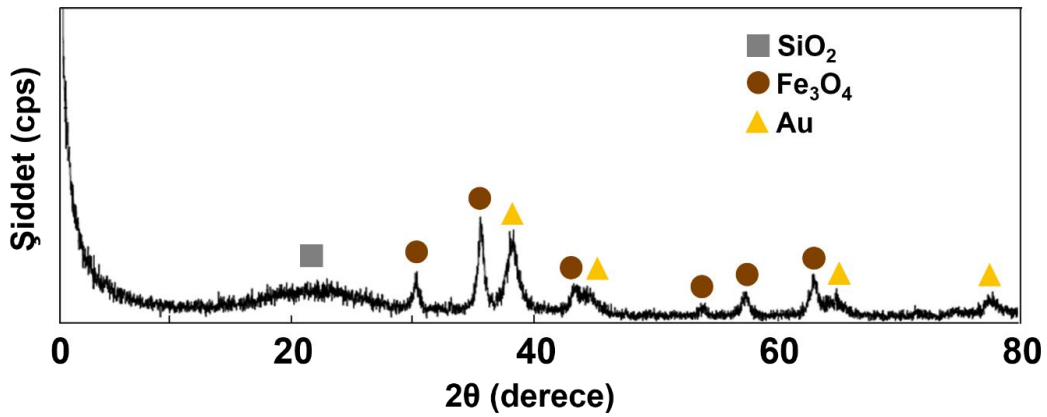
Titreşimli örnek manyetometrisi ile elde edilen GOx@Au@MagSiO₂ mikrokürelerin manyetizasyon davranışı ve manyetizasyon doygunluk eğrisi Şekil 4.8 'de verilmiştir. GOx@Au@MagSiO₂ mikrokürelerinin doygunluk manyetizasyon değeri 13.1 emu/g olarak bulunmuş, süpermanyetik özelliğe sahip oldukları gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Titreşimli örnek manyetometrisi ile elde edilen GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin manyetizasyon eğrisi [58]

4.2.3. X-ışını Kırınım Analizi

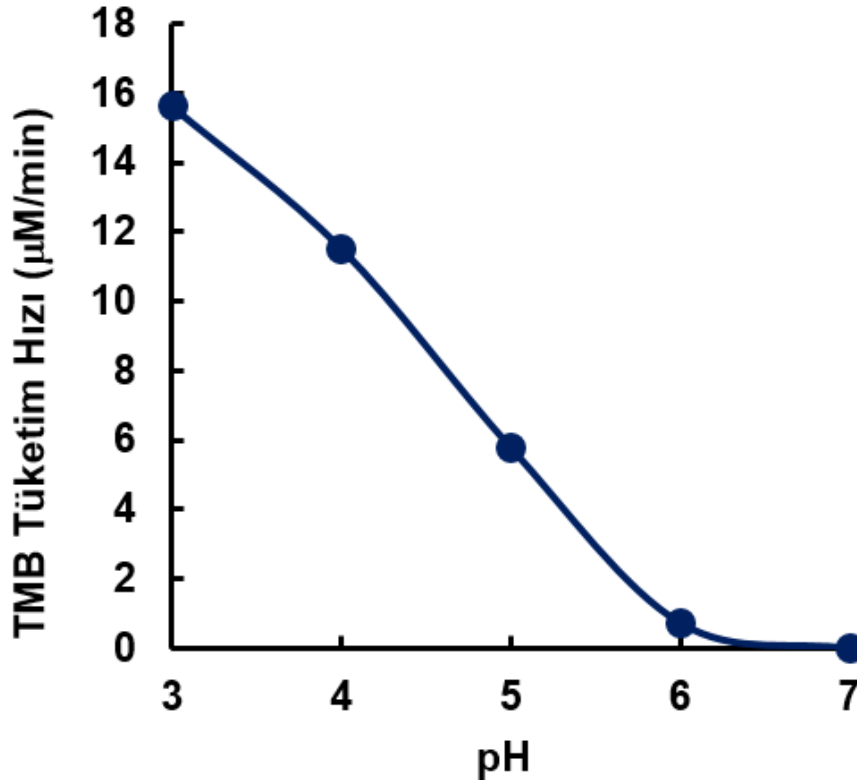
X-ışını kırınımı analizi ile GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin kimyasal yapıları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9 'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin X-ışını kırınım analizi [58]

SiO₂@MagSiO₂ üzerine Au NP immobilize edilmesi sonucunda elde edilen mikrokürelerde beklenildiği üzere SiO₂, Fe₃O₄ ve Au pikleri gözlemlenmiştir. SiO₂'ye ait pik 22° de görülürken Fe₃O₄ ve Au fazlarına ait pikler ise, 30-80° aralığında açıkça görülmüştür.

4.3. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ Mikrokürelerinin Değişen pH Koşullarında Peroksidaz Benzeri Aktivitesi Ölçümleri



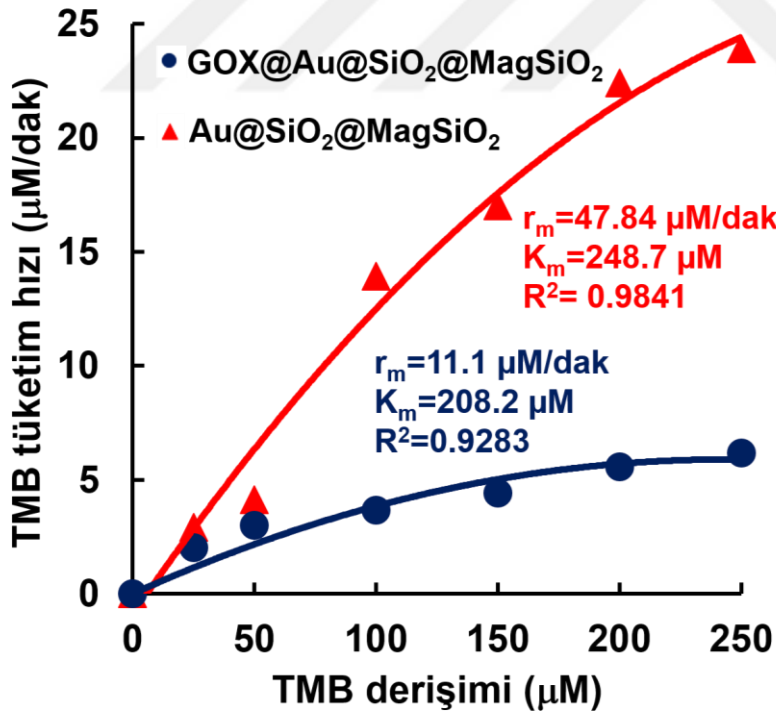
Şekil 4.10. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin farklı pH koşullarında peroksidaz benzeri aktivitesi [58]

GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin peroksidaz benzeri aktivitesinin pH ile değişimi Şekil 4.10 'da verilmektedir. Burada peroksidaz benzeri aktivite, sadece SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri üzerine immobilize edilmiş Au NP'den kaynaklanmaktadır. Aynı çalışmalar SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler ile de gerçekleştirilmiş ve incelenen pH aralığında aktivite gözlenmemiştir. Beklendiği gibi, peroksidaz benzeri aktivite, Au NP ve TMB içeren enzim-benzeri reaksiyon sistemlerinde de gözlemlendiği gibi artan pH ile azalmıştır [45-48]. Şekil 4.10'da

gözlemlenen davranış ve serbest GOx için tedarikçi tarafından önerilen pH değeri dikkate alındığında, GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin peroksidaz benzeri aktivitesinin incelenip Michaelis-Menten grafiği elde edilmesi için en uygun değer olarak pH 5.0 seçilmiştir [69].

4.4. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ Mikrokürelerinin Değişen Substrat Derişimi (TMB) İçin Peroksidaz Benzeri Aktivitesi Ölçümleri

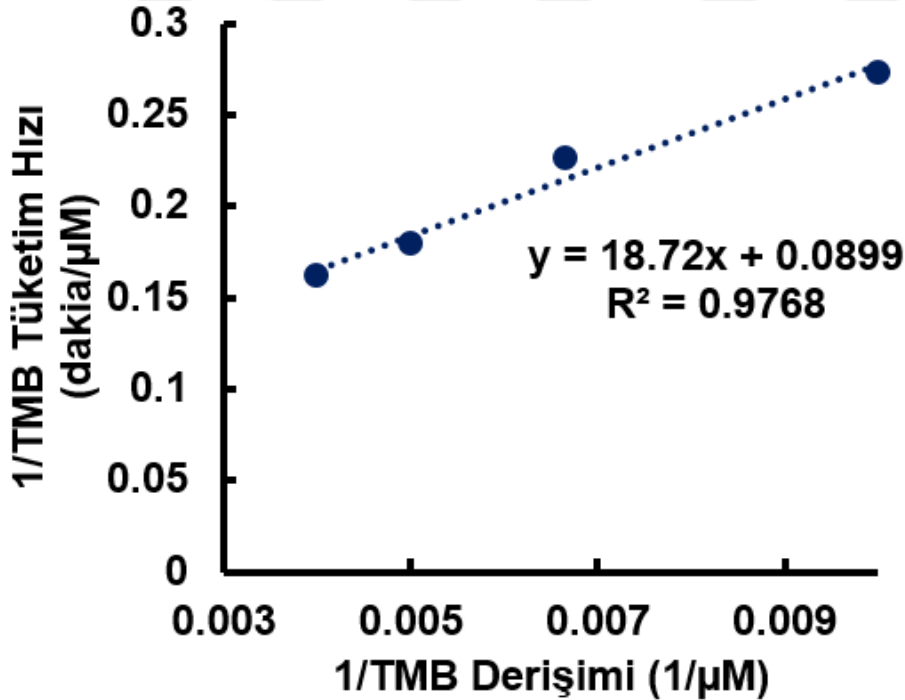
GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ ve Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin aktivite davranışını anlamak için sabit pH değerinde (pH:5.0) farklı TMB derişimleri kullanılarak yapılan peroksidaz benzeri aktivite çalışmalarından elde edilen Michaelis Menten grafikleri Şekil 4.11 'da verilmiştir. Sonuçlar 652 nm de UV-Vis spektrofotometresinde absorbans ölçümü ile elde edilmiştir. Artan TMB derişimiyle çözeltilerdeki mavi renk koyulaşmış ve daha yüksek absorbans değerleri ölçülmüştür.



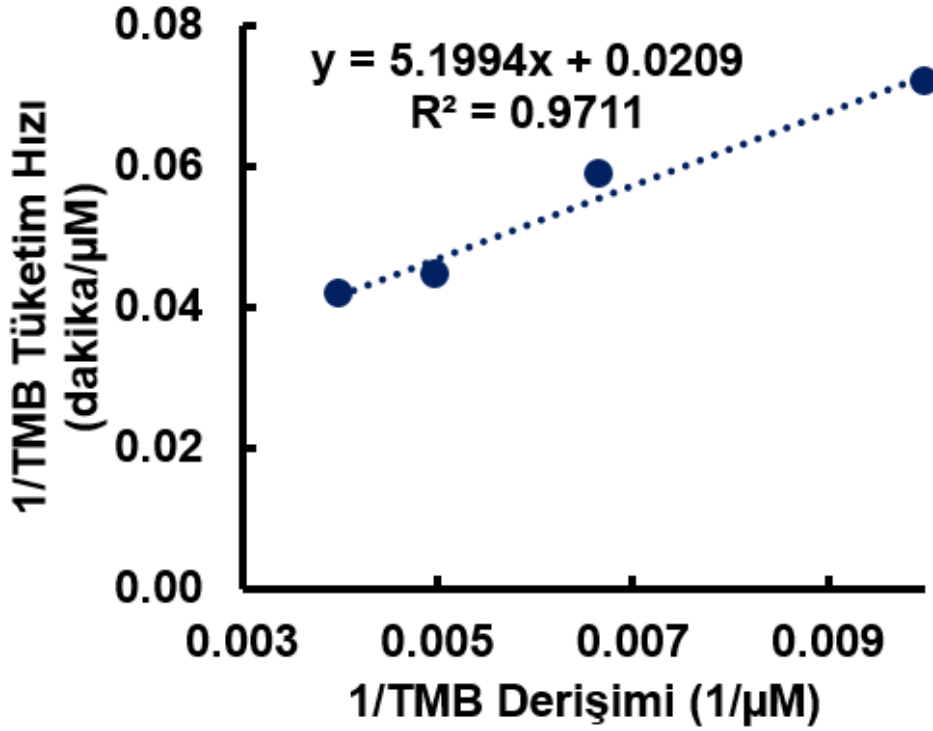
Şekil 4.11. Au@SiO₂@MagSiO₂ ve GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin Michaelis Menten grafikleri [58]

Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere için r_m değeri 47.84 $\mu\text{M}/\text{dakika}$ iken GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere için 11.1 $\mu\text{M}/\text{dakika}$ 'dır. Yani GOx'un Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere bağlanması, maksimum TMB tüketim hızında 4.3 kat azalmaya sonuçlanmıştır. pH 5.0' de katyonik olarak yüklenmiş enzim-mimetik bölgelerin (SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere immobilize edilmiş Au NP) TMB molekülleri ile etkileşiminin daha yüksek olduğu ve Au NP'in yüzeyi üzerine immobilize edilmiş GOx tarafından oluşturulan fiziksel bariyer nedeniyle GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ partiküllerin TMB molekülleri ile daha düşük etkileşim gösterdiği gözlemlenmiştir. Düşük K_m değerleri ise yüksek afinitenin göstergesidir.

Şekil 4.12 ve 4.13'de GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ ve Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere ait Lineweaver Burk grafikleri sırasıyla verilmiştir. Grafikler "1/TMB derişimi" ve "1/TMB Tüketim Hızı" arasında doğrusal ilişki olduğunu göstermektedir. Korelasyon katsayısı (R^2) değerlerinin yüksek olması da bunun kanıtıdır.



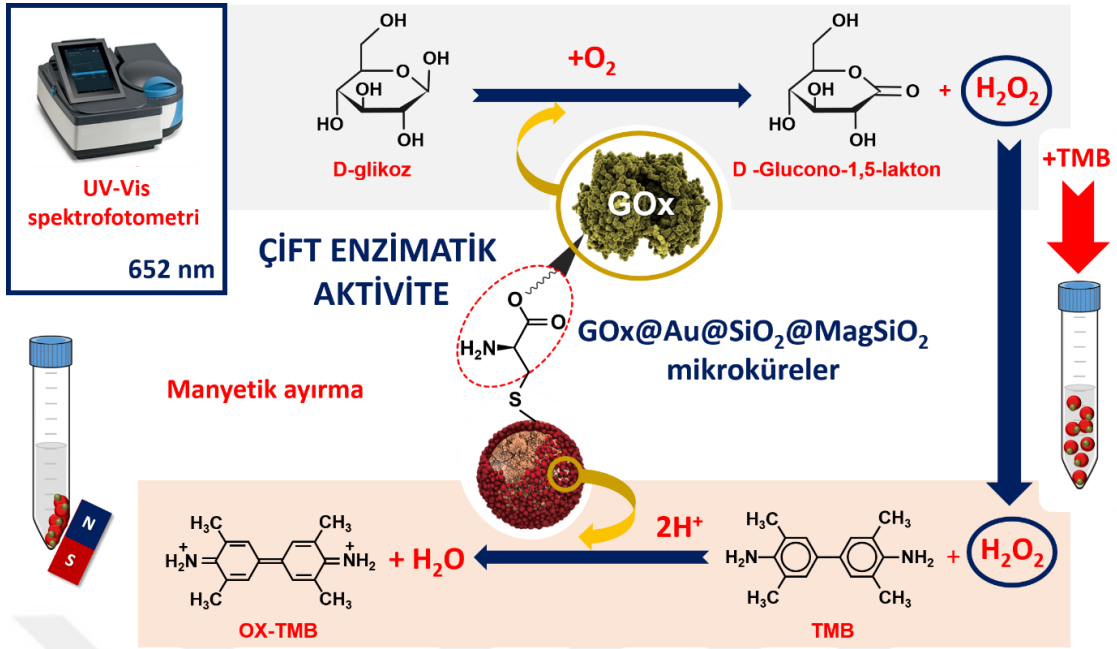
Şekil 4.12. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelere ait Lineweaver Burk grafiği



Şekil 4.13. Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin Lineweaver Burk grafiği

4.5. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ Mikroküreleri İle Glikoz Tayini

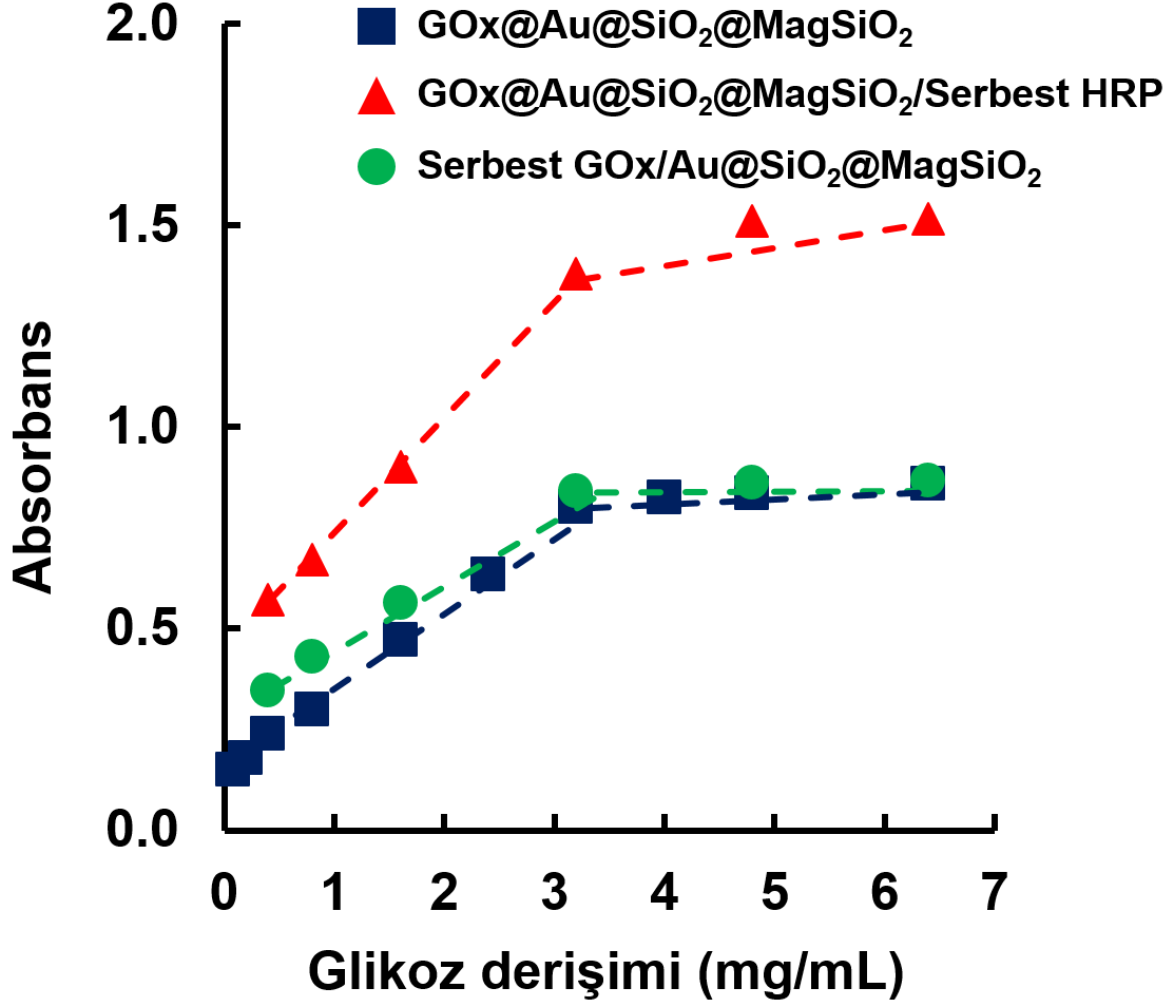
GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri ile glikoz tayini mekanizmasının şematik gösterimi Şekil 4.14 'de verilmiştir. D-glukoz, Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler üzerine immobilize edilmiş GOx tarafından D-glukono-1,5-lakton ve H₂O₂'ye dönüştürülmüştür. Renk tayini için GOx kullanımı, çeşitli biyomoleküller içeren tam kan gibi karmaşık bir örnekteki glikoza doğru seçicilik sağlamaktadır. H₂O₂, GOx'un glikoza özgülüğü nedeniyle karmaşık numunede bulunan glikoz miktarıyla orantılı bir miktarda üretilmiştir. Renk dönüşümü sağlayan substrat, 3,3',5,5' tetrametilbenzidin (TMB) daha sonra glikozun oksidasyonu ile H₂O₂ içeren ortama ilave edilmiştir. Mavi renkli ürün olan oksitlenmiş TMB (oks-TMB), TMB ile H₂O₂ arasındaki reaksiyon yoluyla GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin peroksidaz benzeri aktivitesi ile elde edilmiştir. Böylece, glikoz derişimi ile orantılı olan H₂O₂ derişimine bağlı olarak bir renk yanıtı elde edilmiştir. Bu yanıt, nanozimin manyetik olarak ayrılmasından sonra bir UV-Vis spektrofotometresinde 652 nm'de absorbans alınarak sayısal değere dönüştürülmüştür.



Şekil 4.14. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri ile glikoz tayini mekanizmasının şematik gösterimi [58]

Au NP sentezlenen nanozimde ikili işleve sahiptir. İlk olarak, manyetik nanozimin peroksidaz benzeri aktivitesi, SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler üzerine immobilize edilen Au NP ile elde edilmiştir. İkinci olarak Au NP, GOx'un sistein kısmındaki tiyol gruplarının Au atomları ile doğrudan etkileşimi yoluyla GOx'un SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler üzerine immobilizasyonu için bir arayüz olarak kullanılmıştır.

GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin peroksidaz benzeri aktivitesinin tampon ortamındaki glikoz derişimi ile değişimi Şekil 4.15 'te verilmiştir.



Şekil 4.15. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin peroksidaz benzeri aktivitesinin sulu tampon ortamındaki glikoz derişimi ile değişimi [58]

GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin peroksidaz benzeri aktivitesi, 0.3-3.2 mg / mL aralığında artan glikoz derişimi ile doğrusal olarak artmıştır. Tampon ortamında tek basamaklı glikoz tayini için uygun tayin limiti (limit of detection, LOD) ve korelasyon katsayısı değerleri elde edilmiştir (Çizelge 4.3.). GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin peroksidaz benzeri aktivitesini aynı koşullar altında serbest peroksidaz ile karşılaştırmak için, glikoz oksidasyon aşamasının tamamlanmasından sonra GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri

manyetik olarak uzaklaştırılmış ve glikoz tayin ortamına serbest peroksidaz ilave edilmiştir. Glikozun $\text{GOx@Au@SiO}_2\text{@MagSiO}_2$ mikroküreler tarafından başlangıç glikoz derişimi ile oksidasyonu nedeniyle oluşan H_2O_2 miktarına göre elde edilen serbest peroksidaz aktivitesinin değişimi, Şekil 4.15 'te " $\text{GOx@Au@SiO}_2\text{@MagSiO}_2$ / Serbest HRP". göstergesi ile verilmiştir. Aynı koşullar altında serbest peroksidaz ile elde edilen aktivite, $\text{GOx@Au@SiO}_2\text{@MagSiO}_2$ mikrokürelerin glikoz tayini için kullanılan koşullarda yeterli peroksidaz benzeri aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.3. $\text{GOx@Au@SiO@MagSiO}_2$ mikrokürelerin glikoz tayin özellikleri ve karşılaştırmalı formları.

	Tayin aralığı mg/mL (mM)	LOD mg/mL (mM)	a	b	R ²
GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂	0.08-3.20 (0.44-17.78)	0.12 (0.66)	0.205	0.144	0.998
GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂/ Serbest HRP	0.40-3.20 (2.22-17.78)	0.11 (0.61)	0.291	0.443	0.999
Serbest GOx/Au@ SiO₂@MagSiO₂	0.40-3.20 (2.22-17.78)	0.13 (0.72)	0.174	0.283	0.997

Kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklemle tanımlanmıştır:

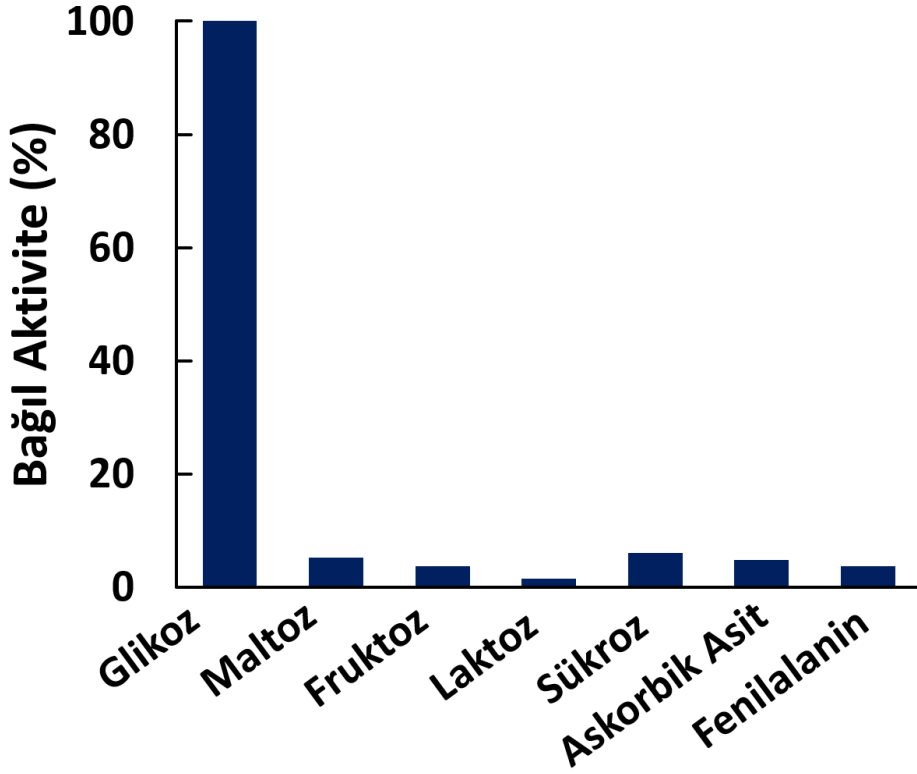
$A = aC_G + b$, A: 652 nm'deki absorbans, C_G (mg/mL): Tampon ortamındaki glikoz derişimi, LOD: Algılama limiti

$\text{Au@SiO}_2\text{@MagSiO}_2$ mikroküreler ayrıca Au@SiO@MagSiO_2 mikroküreler üzerine immobilize edilmiş eşit miktarda serbest GOx kullanılarak peroksidaz-benzeri aktiviteye sahip ajan olarak test edilmiştir. Bu amaçla, 0.4-6.4 mg / mL derişim aralığında glikoz içeren tampon çözeltilere 0.48 mg serbest GOx ilave edilmiştir. Serbest GOx miktarı, tayin ortamında bulunan Au@SiO@MagSiO_2 mikroküreler (20 mg) üzerine immobilize edilmiş miktara eşdeğer miktar olarak seçilmiştir. Aynı koşullar altında serbest GOx ile glikoz oksidasyonunun tamamlanmasından sonra, ortama Au@SiO@MagSiO_2 mikroküreler ilave edilmiş ve elde edilen peroksidaz benzeri aktivite, ortamdaki TMB ile belirlenmiştir. Bu nedenle, glikoz tayini için, serbest GOx ve peroksidaz-benzeri aktiviteye sahip

ajan olarak Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin eklenmesini içeren iki aşamalı protokol denenmiştir. Serbest GOx kullanılarak yapılan deneyde Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin peroksidaz benzeri aktivitesinin glikoz derişimi ile değişimi, Şekil 4.15 'te "Serbest GOx / Au@SiO₂@MagSiO₂ " göstergesi ile verilmiştir. İki aşamalı protokol ile de uygun LOD ve saptama aralığı değerleri elde edilmiştir (Çizelge 4.3). İki aşamalı protokol için çizilen absorbands-glikoz derişim grafiği ile tek aşamalı tayinde GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler ile elde edilen grafiğin hemen hemen aynı olduğu görülmüştür. Aynı miktarda serbest ve immobilize edilmiş GOx kullanılarak elde edilen benzer absorbands-glikoz derişim eğrileri, immobilize edilmiş GOx aktivitesinin serbest enzimle neredeyse aynı olduğunu göstermiştir. Bu sonuç GOx için seçilen immobilizasyon protokolünün (GOx'un sistein kısmının tiyol grupları yoluyla immobilize Au NP'e bağlanması) immobilizasyon sırasında serbest enzimin aktivitesinin korunmasına izin veren etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir. Bu özelliğin ayrıca, GOx' un asil metal bazlı desteklere immobilizasyonu için de kullanılabilecek faydalı bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

4.6. Seçicilik

GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin glikoza karşı seçiciliği, aynı koşullar altında kontrol olarak farklı şekerler, fenilalanin ve askorbik asit kullanılarak araştırılmış elde edilen grafik Şekil 4.16' de gösterilmiştir. Sonuçlar, denenmiş analitler arasında sadece glikoz ile kayda değer bir renk yanıtının elde edildiğini göstermiştir. Böylece, GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler glikoza karşı iyi bir seçicilik sergilemiştir.

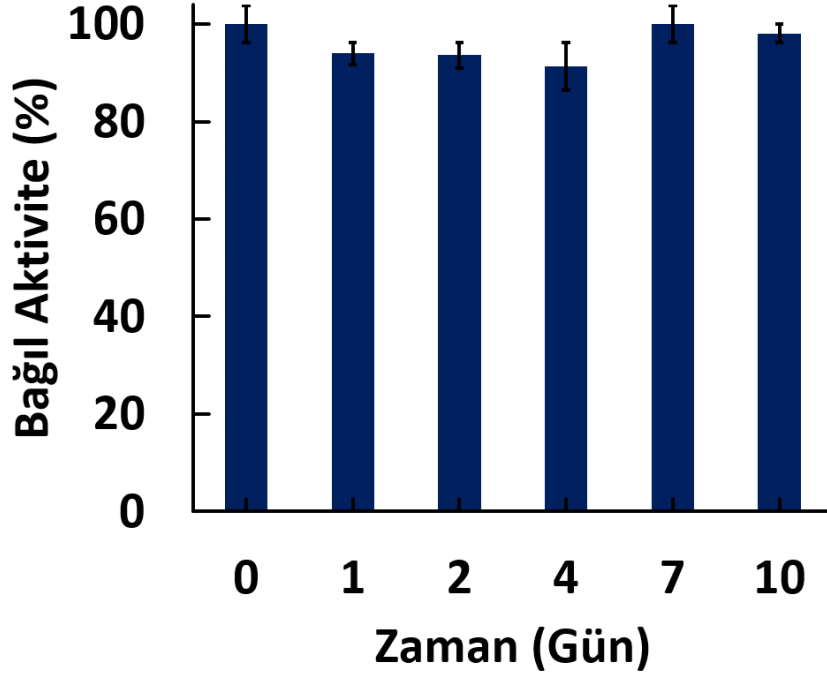


Şekil 4.16. GOx @ Au @ MagSiO₂ mikrokürelerin glikoza seçiciliği. Analit oksidasyonu için koşullar: Glikoz derişimi: 2 mg / mL, kontrol ajanlarının derişimi: 10 mg/mL. GOx@Au@MagSiO₂ mikroküreler: 20 mg, pH 5.0'da 100 mM sitrat tamponu. Hacim: 1.25 mL, karanlık ortam 100 cpm, 37 ° C'de 1 saat. Nanozimin peroksidaz benzeri aktivitesi ile renk reaksiyonu koşulları: TMB: 200 µM, pH 5.0'da 100 mM sitrat tamponu, Son hacim: 2.5 mL, karanlık ortam 100 cpm, 37 ° C'de 20 dakika [58]

4.7. Kararlılık

GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin tek basamaklı glikoz tayinindeki uzun süreli kararlılığı, 10 gün boyunca glikoz tayin çalışmaları yapılarak araştırılmıştır. Elde edilen grafik Şekil 4.17 'de gösterilmiştir. 10 gün boyunca GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler, buzdolabında + 4 ° C'de pH 5.0, 100 mM sitrat tamponu içerisinde saklanmıştır. Şekil 4.17 'da görüldüğü gibi, GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin renk yanıtı 10 gün boyunca

neredeysi bozulmadan kalmıştır. Böylece, ift enzimatik aktiviteye GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin kolorimetrik tepkisi, buzdolabında uzun süre bekletilmesine rağmen değişmemiş ve katalitik aktivitelesi, incelenen süre boyunca korunmuştur. Uzun süreli stabilite çalışması ayrıca nanozimin depolanması sırasında manyetik mikrokrelerden hem Au NP'ler hem de GOx için önemli bir bozulma gözlenmediğini göstermiştir.

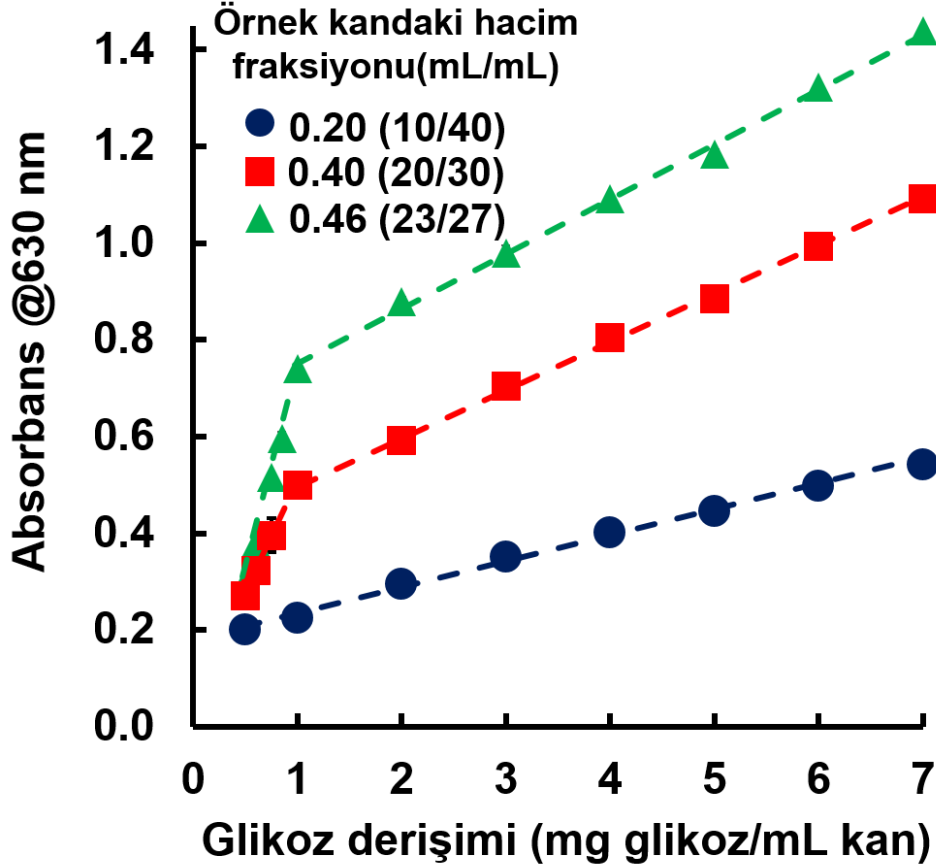


şekil 4.17. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin tek basamaklı kolorimetrik glikoz tayinindeki uzun süreli kararlılığı [58]

4.8. İnsan Kanındaki Glikoz Derişiminin GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ Mikroküreler İle Doğrudan Belirlenmesi

Önerilen nanozimin peroksidaz benzeri aktivite davranışı, insan kanının en geniş glikoz derişim aralığında (0.5-7.0 mg / mL veya 2.8-38.9 mM) kayda değer bir absorbands değişimi ile bir kalibrasyon grafiği oluşturmaya izin vermiştir. Glikoz analizleri için Sigma-Aldrich'ten (BCR 634) alınan insan tam kan rneği kullanılmıştır [70]. Orijinal kan örneğindeki glikoz derişimi, ticari bir kan şekeri ölçüm cihazı kullanılarak 0.44 mg/mL (2.4 mM) olarak ölçülmüştür. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler için kalibrasyon grafiğinin türetilmesinde, 0.44 mg/mL glikoz derişimine sahip orijinal kan, farklı derişimlerde

glukoz içeren pH 5.0 sitrat tamponu ile karıştırılmıştır. Bu aşamada, orijinal tam kan, glukoz içeren sitrat tamponu ile 5 kat seyreltilmiştir. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri kullanılarak üç farklı kan hacmi fraksiyonu ile elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.17 'de verilmiştir.



Şekil 4.18. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin üç farklı kan hacmi fraksiyonu ile elde edilen kalibrasyon eğrileri [58]

Şekil 4.18 'de görüldüğü gibi, 0.20 mL/mL'lik örnek çözeltisinde kan hacmi fraksiyonu kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiğı neredeyse doğrusaldır ve 0.5-7.0 mg / mL kan aralığında glukoz derişiminin belirlenmesi için uygundur. Bununla birlikte, 0.40 ve 0.46 mL /mL'lik kan hacmi fraksiyonuyla gerçekleştirilen deneyler için, grafikte farklı eğimli iki lineer bölge elde edilmiştir. Her iki eğride, 1 mg/mL (5.6 mM) glukoz derişiminde, farklı eğimli düz çizgilerin kesişme noktası olduğu gözlenmiştir. Kan hacmi fraksiyonu 0.46 mL/mL ile elde edilen eğri 0.40 mL/mL kan hacmi fraksiyonu olan eğriye göre 0.5-1.0 ve 1.0-7.0 mg/mL

aralığında daha yüksek eğime sahiptir. 0.20 ve 0.46 mL / mL kan hacmi fraksiyonları ile elde edilen kalibrasyon grafikleri, kan glikoz derişiminin 0.5-7.0 mg / mL kan (2.8-38.9 mM) aralığında doğrudan belirlenmesi için kullanılabilir.

Şekil 4.18 'deki tüm kalibrasyon grafikleri, “orijinal kan hacmine göre tanımlanan glikoz derişimi” kullanılarak çizilmiştir. Başka bir deyişle, Şekil 4.18 'deki kalibrasyon grafiklerinde veri noktaları olarak kullanılan tüm glikoz derişimleri, seyreltme tamponu hacimleri hariç tutularak kullanılan, orijinal kan hacmine göre hesaplanan glikoz derişimleridir. Orijinal insan tam kanı, glikozun GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri ile oksidasyonundan önce 25 kat seyreltilmiştir. Doğrudan kalibrasyon grafiğinde kullanılmaya uygun olan 0.2 ile 1.4 arasında değişen absorbans değerleri, 25 kat seyreltilmiş tam kan kullanılarak 0.5-7.0 mg/mL aralığında kandaki glikoz seviyesinden elde edilmiştir. Bir kan örneğinin bilinmeyen glikoz seviyesi, herhangi bir seyreltme faktörü kullanılmadan, sadece GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri kullanılarak uygulanan kolorimetrik protokol ile 630 nm'de absorbans alınarak, Şekil 4.18 'deki herhangi bir kalibrasyon grafiğinden doğrudan okunabilir.

Son zamanlarda sentezlenen bazı nanozimlerin glikoz tayin özellikleri aşağıda özetlenmiştir. Bu nanozimler tam kan veya serum gibi kompleks biyolojik örneklerde glikoz saptamak için kullanıldığında çeşitli sınırlamalar ortaya çıkabilmektedir. Bunlardan bazıları aşağıda listelenmiştir:

- 1) Tam kanın glikoz tayini için karmaşık bir örnek olarak doğrudan kullanılması, görünür bölgede gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümlerde problem yaşanmasına neden olabilir. Bu nedenle, biyolojik örnek olarak yüksek oranda seyreltilmiş insan serumu veya buzağı serumu formları, genellikle glikozun kolorimetrik tespiti için sentezlenen nanozimler ile kullanılmaktadır [41-43,46-54]. Bununla birlikte, numune ön işleme, önerilen sensörün pratik kullanımda uygulanmasını zorlaştıran bir faktördür. İnsan tam kanı, GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin varlığında glikozun kolorimetrik tespiti için doğrudan kullanılmıştır.

- 2) Ortak biyolojik numunelere göre düşük üst saptama sınırlarına sahip olan nanozimlerle de çok düşük LOD değerleri elde edilmektedir. [41-46,61] Bununla birlikte, karmaşık bir örnekteki gerçek glikoz derişiminin hesaplanması, düşük bir üst saptama sınırına sahip olan kalibrasyon grafiğine göre belirlenen glikoz derişiminin yüksek bir seyreltme faktörü ile çarpılmasını içerir. [41,46-50]. Bu durum, gerçek glikoz seviyesinde önemli bir belirsizliğe neden olabilir. Nanozim kullanılarak belirlenen glikoz derişimi ile diğer yöntemlerle (glukometre veya diğer klinik yöntemler) belirlenen derişim arasında kayda değer sapmalar görülebilir. [41-46,50]. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri ile gerçekleştirilen kolorimetrik protokolda, tam bir kan örneğinin glikoz seviyesi herhangi bir seyreltme faktörü kullanılmadan doğrudan kalibrasyon eğrisinden tayin edilmektedir.
- 3) Bazı nanozimlerle, kalibrasyon grafiğinde kullanılan absorbans değişimi nispeten daha dardır. [41,46-48,50] Böyle dar varyasyonlarda, çok düşük LOD bulunmasına rağmen, farklı biyolojik örneklerde yapılan ölçümlerin tutarlılığını (tekrarlanabilirlik) korumak nispeten zor olabilir. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri ile gerçekleştirilen deneylerde ise 0,5-0,7 mg / mL glikoz derişimi aralığındaki en dar ve en geniş absorbans aralıkları, 0.20 ve 0.46 mL/mL kan hacmi fraksiyonlarında sırasıyla 0.20-0.44 ve 0.27-1.44 mg/mL olarak elde edilmiştir.

Örnek karışımında üç farklı kan hacmi fraksiyonu kullanılarak GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri ile elde edilen LOD değerleri, doğrusal kalibrasyon grafiklerinin denklem katsayıları ve korelasyon katsayıları Çizelge 4.4'te verilmiştir. 0.5-7.0 mg / mL glikoz derişim aralığında 0.20 mL/mL kan hacmi fraksiyonu ile elde edilen kalibrasyon grafiğinin eğimi, bu aralıkta doğru bir tayin gerçekleştirmek için yeterince yüksektir. 0.40 ve 0.46 mL / mL kan hacmi fraksiyonları ile elde edilen birinci ve ikinci doğrusal bölgelerinde daha yüksek eğimler elde edilmiştir. Bu nedenle, daha yüksek kan hacmi fraksiyonları için 0.20 mL / mL kan hacmi fraksiyonu ile elde edilene göre daha düşük LOD değerleri bulunmuştur. GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreleri ile elde edilen kalibrasyon çizimlerinin eğimleri, düz veya hibrit nano yapılar şeklinde sentezlenen nanozimlerle elde edilenlere göre çok daha düşüktür.

Çizelge 4.4. Üç farklı kan hacmi fraksiyonu ile hazırlanan insan tam kan örneklerinde GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin glikoz tayin özellikleri.

Kan hacmi fraksiyonu mL/mL	Tayin aralığı mg/mL (mM)	LOD mg/mL (mM)	a	b	R²
0.20	0.5-7.0 (2.8-38.9)	0.32 (1.78)	0.049	0.2023	0.997
0.40	1.0-7.0 (5.6-38.9)	0.20 (1.11)	0.0985	0.4021	0.997
0.46	0.5-1.0 (2.8-5.6)	0.02 (0.11)	0.8785	-0.1437	0.999
0.46	1.0-7.0 (5.6-38.9)	0.30 (1.67)	0.1139	0.6357	0.997

Kalibrasyon grafiği aşağıdaki denklemlerle tanımlanmıştır:

$A = aC_G + b$, A: 652 nm'deki absorban, C_G (mg/mL): Tampon ortamındaki glikoz derişimi, LOD: Algılama limiti

5. SONUÇLAR

- Dispersiyon polimerizasyon yöntemi ile monodispers ve gözenekli formda poli(GMA) mikroküreleri sentezlenmiştir. Sentezlenen poli(GMA) mikroküreleri ile Poli(MAA-co-EDMA) elde edilmiştir.
- Poli(MAA-co-EDMA) manyetizasyonu ile manyetik Poli(MAA-co-EDMA) mikroküreler elde edilmiştir. MagSiO₂ mikroküreleri sentezlenerek SiO₂ ile kaplanmıştır.
- Monodispers ve gözenekli formdaki SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin yüzeyine Turkevich yöntemiyle AuNP immobilize edilmiştir.
- GOx'un Au NP'lere bağlanması için herhangi bir aktivasyon protokolü kullanılmamış, doğrudan GOx'un yapısındaki tiollerin, Au NP'ler ile etkileşimi yoluyla gerçekleştirilmiştir.
- GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin yüzey alanı azot adsorbsiyon desorbsiyon metodu ile 12 m²/g olarak elde edilmiştir.
- GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerinin doygunluk manyetizasyon değeri 13,1 emu/g olarak bulunmuştur.
- GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ mikrokürelerin peroksidaz benzeri aktivitesi TMB kullanılarak incelenmiştir.
- GOx@Au@SiO₂@MagSiO₂ ve Au@SiO₂@MagSiO₂ mikroküreler için r_m değerleri sırasıyla 11.1 ve 47.84 µM/dakika olarak hesaplanmıştır.
- Ön işleme tabi tutulmadan, TMB kullanarak insan kanındaki glikoz derişiminin (2.8-38.9 mM) doğrudan belirlenmesini sağlayan nanozim sayesinde üç farklı kan hacmi fraksiyonunda kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Anonim, https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1 (Erişim Tarihi: **12 Haziran 2020**)
- [2] M. C. Daniel, D. Astruc, Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum size related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chemical reviews*, 104(1), **(2004)**, 293-346.
- [3] M. Haruta, Size and support dependency in the catalysis of gold, *Catalysis Today*, 36,**(1997)**,153–166.
- [4] H. Cui, Z. F. Zhang, M. J. Shi, Y. Xu, Y. L. Wu, Light emission of gold nanoparticles induced by the reaction of bis (2, 4, 6-trichlorophenyl) oxalate and hydrogen peroxide, *Analytical chemistry*, 77(19), **(2005)**, 6402-6406.
- [5] H. Wei, E. Wang, Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes, *Chemical Society Reviews*, 42(14), **(2013)**, 060–6093.
- [6] Y. Lin, J. Ren, X. Qu, Catalytically active nanomaterials: a promising candidate for artificial enzymes, *Accounts of chemical research* 47(4), **(2014)**, 1097–1105.
- [7] M. Nasir, M. H. Nawaz, U. Latif, M. Yaqub, A. Hayat, A. Rahim, An overview on enzyme-mimicking nanomaterials for use in electrochemical and optical assays, *Microchimica Acta*, 184(2), **(2017)**, 323-342.
- [8] P. K. Robinson, Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays in biochemistry*, 59, **(2015)**, 1-41.
- [9] Y. Lin, J. Ren, X. Qu, Catalytically active nanomaterials: a promising candidate for artificial enzymes. *Accounts of chemical research*, 47(4), **(2014)**, 1097-1105.
- [10] E.C. Webb, International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Nomenclature Committee, *Enzyme Nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union Of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*, **(1992)**.
- [11] M. Raynal, P. Ballester, A. Vidal-Ferran, P. W. Van Leeuwen, Supramolecular catalysis. Part 2: artificial enzyme mimics, *Chemical Society Reviews*, 43(5), **(2014)**, 1734-1787.
- [12] J. M. G. Rodriguez, N. P. Hux, S. J. Philips, M. H. Towns, Michaelis–Menten graphs, Lineweaver–Burk plots, and reaction schemes: investigating introductory biochemistry students’ conceptions of representations in enzyme kinetics, *Journal of Chemical Education*, 96(9), **(2019)**, 1833-1845.

- [13] Y. Lin, J. Ren, X. Qu, Catalytically active nanomaterials: a promising candidate for artificial enzymes, *Accounts of chemical research*, 47(4), **(2014)**, 1097-1105.
- [14] H. Y. Shin, T. J. Park, M. I. Kim, Recent research trends and future prospects in nanozymes, *Journal of Nanomaterials*, **(2015)**.
- [15] X. Yan, *Nanozymology: Connecting Biology and Nanotechnology*, Springer Nature, Chapter 1, **(2020)**.
- [16] G. Li-Zeng, Y. Xi-Yun, Discovery and current application of nanozyme, *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 40(10), **(2013)**, 892-902.
- [17] B. Jiang, D. Duan, L. Gao, M. Zhou, K. Fan, Y. Tang, N. Xie, Standardized assays for determining the catalytic activity and kinetics of peroxidase-like nanozymes, *Nature protocols*, 13(7), **(2018)**, 1506-1520.
- [18] C. A. THOMSON, P. SPORNS, Variation in Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Components to Lower Sulfathiazole Detection Limits, *Journal of food science*, 60(4), **(1995)**, 872-879.
- [19] Y. Huang, J. Ren, X. Qu, Nanozymes: classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications, *Chemical reviews*, 119(6), **(2019)**, 4357-4412.
- [20] L. Gao, X. Yan, Nanozymes: an emerging field bridging nanotechnology and biology, *Science China Life Sciences*, 59(4), **(2016)**, 400-402.
- [21] E. M. Schwarz, CORR Insights®: Does the Alpha Defensin ELISA Test Perform Better Than the Alpha Defensin Lateral Flow Test for PJI Diagnosis? A Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Studies. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 478(6), **(2020)**, 1345-1347.
- [22] Anonim, <https://www.bosterbio.com/newsletter-archive/20170728-which-elisa> (Erişim Tarihi: **14 Temmuz 2020**)
- [23] A. J. Domb, J. Kost, D. Wiseman, *Handbook of biodegradable polymers* (Vol. 7). CRC press, Chapter 2, **1998**.
- [24] K. Kamide, *Cellulose and cellulose derivatives*, Elsevier, **(2005)**.
- [25] F. Arduini, A. Amine, Biosensors based on enzyme inhibition, In *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes* (pp. 299-326), **2013**, Springer, Berlin, Heidelberg
- [26] X.Z. Zhang, Y. Zhou, W. Zhang, Y. Zhang, N. Gu, Polystyrene@Au@prussian blue nanocomposites with enzyme-like activity

and their application in glucose detection, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 490, **(2016)**, 291–299.

- [27] X. Peng, G. Wan, L. Wu, M. Zeng, S. Lin, G. Wang, Peroxidase-like activity of Au@TiO₂ yolk-shell nanostructure and its application for colorimetric detection of H₂O₂ and glucose, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 257, **(2018)**, 166–177.
- [28] S. Ma, J. Wang, G. Yang, J. Yang, D. Ding, M. Zhang, Copper(II) ions enhance the peroxidase-like activity and stability of keratin-capped gold nanoclusters for the colorimetric detection of glucose, *Microchimica Acta*, 186, **(2019)**, 271.
- [29] Y. Wu, Y. Gao, J. Du, Bifunctional gold nanoclusters enable ratiometric fluorescence nanosensing of hydrogen peroxide and glucose, *Talanta* 197, **(2019)**, 599–604.
- [30] H. Liu, Y. Hua, Y. Cai, L. Feng, S. Li, H. Wang, Mineralizing gold-silver bimetallics into hemin-melamine matrix: A nanocomposite nanozyme for visual colorimetric analysis of H₂O₂ and glucose, *Analytica Chimica Acta*, 1092, **(2019)**, 57–65.
- [31] C. Lu, X. Liu, Y. Li, F. Yu, L. Tang, Y. Hu, Y. Ying, Multifunctional Janus Hematite-Silica Nanoparticles: Mimicking Peroxidase-Like Activity and Sensitive Colorimetric Detection of Glucose, *ACS applied materials & interfaces*, 7, **(2015)**, 15395–15402.
- [32] N.V.S. Vallabani, A.S. Karakoti, S. Singh, ATP-mediated intrinsic peroxidase-like activity of Fe₃O₄-based nanozyme: One step detection of blood glucose at physiological pH, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 153, **(2017)**, 52–60.
- [33] S. Song, Y. Liu, A. Song, Z. Zhao, H. Lu, J. Hao, Peroxidase mimetic activity of Fe₃O₄ nanoparticle prepared based on magnetic hydrogels for hydrogen peroxide and glucose detection, *Journal of colloid and interface science*, 506, **(2017)**, 46–57.
- [34] M. Aghayan, A. Mahmoudi, M.R. Sazegar, N. Ghavidel Hajiagha, K. Nazari, Enzymatic activity of Fe-grafted mesoporous silica nanoparticles: an insight into H₂O₂ and glucose detection, *New Journal of Chemistry*, 42, **(2018)**, 16060–16068.
- [35] K. J. Babu, T. R. Kumar, D. J. Yoo, S. M. Phang, G. G. Kumar, GG, Electrodeposited Nickel Cobalt Sulfide Flowerlike Architectures on Disposable Cellulose Filter Paper for Enzyme-Free Glucose Sensor Applications, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(12), **(2018)**, 16982-16989.
- [36] M. Ranjani, Y. Sathishkumar, Y. S. Lee, D. J. Yoo, A. R. Kim, G. G. Kumar, Ni-Co alloy nanostructures anchored on mesoporous silica nanoparticles for

- nonenzymatic glucose sensor applications, RSC Advances, 5, **(2015)**, 57804-57814.
- [37] P. Vennila, D. J. Yoo, A. R. Kim, G. G. Kumar, Ni-Co/Fe₃O₄ flower like nanocomposite for the highly sensitive and selective enzyme free glucose sensor applications, Journal of Alloys and Compounds, 703, **(2017)**, 633-642.
- [38] H. Yoon, J. Nah, H. Kim, S. Ko, M. Sharifuzzaman, S. C. Barman, J. Y. Park, A chemically modified laser-induced porous graphene based flexible and ultrasensitive electrochemical biosensor for sweat glucose detection, Sensors and Actuators B: Chemical, 311, **(2020)**, 127866.
- [39] S. X. Guo, C.H. Zhang, M. Yang, Y. L. Zhou, C. L. Bi, Q. T. Lv, N. Ma, A facile and sensitive electrochemical sensor for non-enzymatic glucose detection based on three-dimensional flexible polyurethane sponge decorated with nickel hydroxide, Analytica Chimica Acta, 1109, **(2020)**, 130-139.
- [40] N. Yang, K.L. Guo, Y. W. Zhang, C. L. Xu, Engineering the valence state of ZIF-67 by Cu₂O for efficient nonenzymatic glucose detection, Journal of Materials Chemistry B, 8(14), **(2020)**, 2856-2861.
- [41] W. Xu, L. Jiao, H. Yan, Y. Wu, L. Chen, W. Gu, D. Du, Y. Lin, C. Zhu, Glucose Oxidase-Integrated Metal-Organic Framework Hybrids as Biomimetic Cascade Nanozymes for Ultrasensitive Glucose Biosensing, ACS applied materials & interfaces, 11(25), **(2019)**, 22096-22101.
- [42] J. Liu, X. Shen, D. Baimanov, L. Wang, Y. Xiao, H. Liu, Y. Li, X. Gao, Y. Zhao, C. Chen, Immobilized Ferrous Ion and Glucose Oxidase on Graphdiyne and Its Application on One-Step Glucose Detection, ACS applied materials & interfaces, 11(3), **(2019)**, 2647-2654.
- [43] C. Wang, J. Li, R. Tan, Q. Wang, Z. Zhang, Colorimetric method for glucose detection with enhanced signal intensity using ZnFe₂O₄ -carbon nanotube-glucose oxidase composite material, Analyst, 144(5), **(2019)**, 1831-1839
- [44] P.C. Lee, N.S. Li, Y.P. Hsu, C. Peng, H.W. Yang, Direct glucose detection in whole blood by colorimetric assay based on glucose oxidase-conjugated graphene oxide/MnO₂ nanozymes, Analyst 144(9), **(2019)**, 3038-3044.
- [45] Y. Yuan, Z. D. Fu, K. Wang, Z. Y. Zhao, H. Li, Z. Wang, L. P. Wang, The design and characterization of a hypersensitive glucose sensor: two enzymes co-fixed on a copper phosphate skeleton, Journal of Materials Chemistry B, 8(2), **(2020)**, 244-250.
- [46] O. Adeniyi, S. Sicwetsha, P. Mashazi, Nanomagnet-Silica Nanoparticles Decorated with Au@Pd for Enhanced Peroxidase-Like Activity and Colorimetric Glucose Sensing, ACS Applied Materials & Interfaces, 12(2), **(2020)**, 1973-1987.

- [47] N. Wu, Y.T. Wang, X.Y. Wang, F.N. Guo, H. Wen, T. Yang, J.H. Wang, Enhanced peroxidase-like activity of AuNPs loaded graphitic carbon nitride nanosheets for colorimetric biosensing, *Analytica chimica acta*, 1091, **(2019)**, 69–75.
- [48] Y. Wang, Z. Gao, B. Liu, X. Xia, Peroxidase-AgAu hybrid nanocages as signal transducers for sensitive plasmonic colorimetric sensing, *Journal of Materials Chemistry C*, 7(48), **(2019)**, 15179–15187.
- [49] H. Ren, L. Yan, M. Liu, Y. Wang, X. Liu, C. Liu, K. Liu, L. Zeng, A. Liu, Green tide biomass templated synthesis of molybdenum oxide nanorods supported on carbon as efficient nanozyme for sensitive glucose colorimetric assay, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 296, **(2019)**, 126517.
- [50] G. Darabdhara, B. Sharma, M.R. Das, R. Boukherroub, S. Szunerits, Cu-Ag bimetallic nanoparticles on reduced graphene oxide nanosheets as peroxidase mimic for glucose and ascorbic acid detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 238, **(2017)**, 842–851.
- [51] E. H. Yoo, S. Y. Lee, Glucose Biosensors: An overview of use in clinical practice, *Sensors*, 10(5), **(2010)**, 4558-4576.
- [52] M.S. Blumenreich, Clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations, *The white blood cell and differential count*, 3(153), **(1990)**, 724-727.
- [53] D. T. Bostick, D. M. Hercules, Quantitative determination of blood glucose using enzyme induced chemiluminescence of luminol, *Analytical chemistry*, 47(3), **(1975)**, 447-452.
- [54] L. Dohnal, M. Kalousova, T. Zima, Comparison of three methods for determination of glucose, *Prague Med Rep*, 111(1), (2010), 42-54.
- [55] B. H. Ginsberg, Factors affecting blood glucose monitoring: sources of errors in measurement, *Journal of diabetes science and technology*, 3(4), **(2009)**, 903-913
- [56] K.O. Hamaloglu, E. Sag, A. Tuncel, Bare, gold and silver nanoparticle decorated, monodisperse-porous titania microbeads for photocatalytic dye degradation in a newly constructed microfluidic, photocatalytic packed-bed reactor, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 332, **(2017)**, 60–65.
- [57] Anonim,
[https://www.lanl.gov/orgs/nmt/nmtdo/AQarchive/04summer/XPS.html#:~:text=Photoemission%20principle%3A%20When%20an%20x,%2D9%20millibar%20\(mbar\)](https://www.lanl.gov/orgs/nmt/nmtdo/AQarchive/04summer/XPS.html#:~:text=Photoemission%20principle%3A%20When%20an%20x,%2D9%20millibar%20(mbar)) (Erişim Tarihi: **14 Temmuz 2020**)

- [58] B. Gökçal, Ç. Kip, A. Tuncel, One-pot, direct glucose detection in human whole blood without using a dilution factor by a magnetic nanozyme with dual enzymatic activity, *Journal of Alloys and Compounds*, 156012, **(2020)**.
- [59] E. Ogut, C. Kip, B. Gokcal, A. Tuncel, Aggregation-resistant nanozyme containing accessible magnetite nanoparticles immobilized in monodisperseporous silica microspheres for colorimetric assay of human genomic DNA, *Journal of colloid and interface science*, 550 **(2019)**, 90-98.
- [60] K. Salimi, D.D. Usta, O. Celikbicak, A. Pinar, B. Salih, A. Tuncel, Ti(IV) carrying polydopamine-coated, monodisperse-porous SiO₂ microspheres with stable magnetic properties for highly selective enrichment of phosphopeptides, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 153, **(2017)**, 280-290.
- [61] C. Lu, X. Liu, Y. Li, F. Yu, L. Tang, Y. Hu, Y. Ying, Multifunctional janus hematitesilica nanoparticles: mimicking peroxidase-like activity and sensitive colorimetric detection of glucose, *ACS Applied Materials & Interfaces* 7(28), **(2015)**, 15395-15402.
- [62] K.J. Babu, T.R. Kumar, D.J. Yoo, S.M. Phang, G.G. Kumar, Electrodeposited nickel cobalt sulfide flowerlike architectures on disposable cellulose filter paper for enzyme-free glucose sensor applications, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(12), **(2018)**, 16982-16989.
- [63] M. Ranjani, Y. Sathishkumar, Y.S. Lee, D.J. Yoo, A.R. Kim, G.G. Kumar, Ni-Co alloy nanostructures anchored on mesoporous silica nanoparticles for nonenzymatic glucose sensor applications, *RSC advances* 5(71), **(2015)**, 57804-57814.
- [64] P. Vennila, D.J. Yoo, A.R. Kim, G.G. Kumar, Ni-Co/Fe₃O₄ flower-like nanocomposite for the highly sensitive and selective enzyme free glucose sensor applications, *Journal of Alloys and Compounds*, 703, **(2017)**, 633-642.
- [65] H. Yoon, J. Nah, H. Kim, S. Ko, M. Sharifuzzaman, S.C. Barman, X. Xuan, J. Kim, J.Y. Park, A chemically modified laser-induced porous graphene based flexible and ultrasensitive electrochemical biosensor for sweat glucose detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 311, **(2020)**, 127866.
- [66] K.R. Frederick, J. Tung, R.S. Emerick, F.R. Masiarz, S.H. Chamberlain, A. Vasavada, S. Rosenberg, Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 265(7), **(1990)**, 3793-3802.
- [67] B. Gokcal, C. Kip, D. Sahinbas, E. Celik, A. Tuncel, Silica microspheres functionalized with the iminodiacetic acid/copper(II) complex as a peroxidase mimic for use in metal affinity chromatography-based

colorimetric determination of histidine-tagged proteins, *Microchimica Acta*, 187(2), **(2020)**, 1-9.

- [68] Ir Spectrum Table & Chart. <https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/biology/ir-spectrum-table.html> (Erişim Tarihi: **14 Mayıs, 2020**).
- [69] Glucose oxidase from *Aspergillus niger*, sigma-aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g6125?lang¼en®ion¼TR> (Erişim Tarihi: **14 Mayıs, 2020**).
- [70] Human blood (Pb and Cd) BCR® certified reference material, sigma-aldrich (n.d.), <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/bcr634?lang¼en®ion¼TR> (Erişim Tarihi: **14 Mayıs, 2020**).



EKLER

EK 1 - Tezden Türetilmiş Yayınlar

B. Gökçal, Ç. Kip, A. Tuncel, One-pot, direct glucose detection in human whole blood without using a dilution factor by a magnetic nanozyme with dual enzymatic activity, Journal of Alloys and Compounds, 156012, (2020).





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

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

Tarih: 16/07/2020

Tez Başlığı: Monodispers Gözenekli Formda Metal Oksit Mikrokürelerin Peroksidaz Benzeri Aktivitelerinin İncelenmesi Ve Biyosensör Geliştirilmesinde Kullanımı

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 60 sayfalık kısmına ilişkin, 14/07/2020 tarihinde ~~çalışmam~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7' dir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Burcu GÖKÇAL
Öğrenci No: N17127004
Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Programı: Yüksek Lisans (Tezli)
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

16.07.2020

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burcu GÖKÇAL
Doğum yeri : Y.Girne/ K.K.T.C
Doğum tarihi : 07.01.1993
Medeni hali : Bekar
Yazışma adresi : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü
06800 Beytepe - Ankara / TÜRKİYE
Telefon : 05376079206
Elektronik posta adresi : burcugokcal@hacettepe.edu.tr
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Hacettepe Kimya Mühendisliği
Yüksek Lisans : Hacettepe Kimya Mühendisliği
Doktora :

İş Tecrübesi

2020 Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Araştırma Görevliliği

