



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM ve NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Nörotensin Peptidinin Geri Dönüşümlü Konjugasyonu
İçin Nanoparçacık İmmobilize Altın Yüzeylerin
Geliştirilmesi**

Doktora Tezi

Hidayet Gök

Ağustos 2025



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM ve NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Nörotensin Peptidinin Geri Dönüşümlü Konjugasyonu
İçin Nanoparçacık İmmobilize Altın Yüzeylerin
Geliştirilmesi**

Doktora Tezi

Hidayet Gök

Danışman

Prof. Dr. M. Nureddin Türkan

Eşdanışman

Dr. Öğr. Üyesi Ceyhun Ekrem Kırımlı

Ağustos 2025

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Hidayet Gök tarafından hazırlanan "Nörotensin Peptidinin Geri Dönüşümlü Konjugasyonu İçin Nanoparçacık İmmobilize Altın Yüzeylerin Geliştirilmesi" başlıklı bu Doktora Tezi, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. M. Nureddin Türkan

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Prof. Dr. Murat Kazancı

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Prof. Dr. Özge Can

Kurumu: Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi

Doç. Dr. Bahadır Keskin

Kurumu: Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Semran İpek

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 30/06/2025

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığımda yazılan bu tezin Vancouver yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. M. Nureddin Türkan

Etik İlkeler Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

İmza

Hidayet Gök

ÖZET

Nörotensin Peptidinin Geri Dönüşümlü Konjugasyonu İçin Nanoparçacık İmmobilize Altın Yüzeylerin Geliştirilmesi

Gök, Hidayet

Doktora Tezi, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Nureddin Türkan

Eş Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ceyhun Ekrem Kırımlı

Ağustos 2025

Polimer kaplamalar ince filmler olarak, algılama performansını iyileştirmek için biyosensör yüzeylerini değiştirmek için yaygın olarak kullanılan bir strateji olarak öne çıkmaktadır; ancak, spesifik olmayan biyomolekül etkileşimleri ve yüzeydeki sınırlı ligand konjugasyonu derecesi, yüzey modifikasyonu için yenilikçi yöntemlerin geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Bu amaçla, üç farklı molekül ağırlığında (2, 6 ve 10 kDa) metakrile edilmiş telekelik polietilen glikol (PEG- diMA) zincirleri sentezlenmiş ve fazla miktarda tetra-tiol çapraz bağlayıcı eklenerek tiyollenmiş nanopartiküller (NP'ler) elde etmek için kullanılmıştır. Boyutlarına, yüzey yüklerine, morfolojilerine ve tiyol miktarlarına göre karakterize edilen bu nanopartiküller, altın kaplı kütle sensörü platformlarını taklit eden altın yüzeylere immobilize edilmiştir. Özellikle PEG6K-diMA polimerleri ile hazırlanan PEG bazlı nanopartiküllerin, 80-120 nm kalınlığında bir monokatman ve pürüzsüz kaplamanın hazırlanmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir. Sisteinele modifiye edilmiş NTS(8-13) peptid (RRPYIL), geri dönüşümlü disülfür bağları ile tiyollenmiş NP'ye konjuge edildi ve dithiothreitol (DTT) gibi bir indirgeyici madde ile kesilmesinin NP ile immobilize edilmiş altın yüzeyini en az iki döngü boyunca geri kazandırdığı gösterildi. Peptit ile konjuge edilmiş NP ile modifiye edilmiş altın yüzeyin aynı veya farklı tipteki biyobelirteçlerin tespiti için yeniden kullanılabilir bir sensör yüzeyi modeli olarak kullanılabileceği ortaya çıktı.

Anahtar Kelimeler: reaktif nanopartiküller; poli(etilen glikol); yüzey modifikasyonu; kaplama; disülfür değişim reaksiyonu; nörotensin

ABSTRACT

Preparation of Nanoparticle Immobilized Gold Surfaces for the Reversible Conjugation of Neurotensin Peptide

Gök, Hidayet

Ph. D. Thesis in Department of Nanoscience and Nanoengineering

Supervisor: Prof. Dr. M. Nureddin Türkan

Second Supervisor: Asst. Prof. Dr Ceyhun Ekrem Kırımlı

August 2025

Polymer coatings, as thin films, stand out as a widely used strategy to modify biosensor surfaces to improve sensing performance; however, non-specific biomolecular interactions and the limited degree of ligand conjugation on the surface have made it necessary to develop innovative methods for surface modification. For this purpose, telechelic poly(ethylene glycol) (PEG-diMA) chains with three different molecular weights (2, 6, and 10 kDa) were synthesized, and by adding an excess amount of tetra-thiol crosslinker, thiolated nanoparticles (NPs) were obtained. These nanoparticles, characterized according to their sizes, surface charges, morphologies, and thiol amounts, were immobilized on gold surfaces mimicking gold-coated mass sensor platforms. In particular, it was shown that PEG-based nanoparticles prepared with PEG6K-diMA polymers resulted in the preparation of a monolayer and smooth coating with a thickness of 80–120 nm. The cysteine-modified NTS(8–13) peptide (RRPYIL) was conjugated to the thiolated NP through reversible disulfide bonds, and it was demonstrated that cleavage with a reducing agent such as dithiothreitol (DTT) restored the NP-immobilized gold surface for at least two cycles. Together with binding studies of NTSR2 antibodies, it was revealed that the gold surface modified with peptide-conjugated NP can be used as a reusable sensor surface model for the detection of the same or different types of biomarkers.

Keywords: Reactive nanoparticles, poly(ethylene glycol) (PEG), surface modification, coating, disulfide exchange reaction, and neurotensin

TEŞEKKÜR

Doktora dönemim boyunca, bu yolculuğumun her aşamasında bana verdiği rehberlik, destek, sabır, motivasyon ve cesaretlendirme için danışmanım Prof. Dr. Nureddin M. Türkan'a özel takdirimi ve teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Tez çalışmam boyunca bana labını açan ve her konuda destek olan Doç. Dr. Özgül Gök Özatay ile Prof. Dr. Özge Can hocalarıma sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca, ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ceyhun Ekrem Kırımlı'ya bu süreçte bana verdiği destek için ve tez jüri üyelerime değerli değerlendirmeleri için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam kapsamında çeşitli analizlerde bana destek olan Deniz Göl, Betül Zehra Temur, Hasan Barış Dara Bozalan, Berfin Tuğba Turak, Beyza Dönmüş, Gökhan Kafes, M. Furkan Turan ve İpek Duygu Türkdemir'e bu yolculuğun her aşamasında verdikleri destek için teşekkür ederim.

Hayatımın her anında bana destek olan annem Fizze Gök ve babam Aziz Gök'e paha biçilmez teşekkürlerimi sunmak isterim. Yardımları, ömür boyu destekleri, anlayışları, güvenleri, sabırları ve sevgileri ile beni her zaman ileriye taşıyorlar.

Son olarak, Medeniyet Üniversitesi Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı üyeleri sayın hocalarıma doktora sürecimdeki tüm destekleri için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
TABLO LİSTESİ.....	xvi
KISALTMA.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. BİYSENSÖRLER.....	1
1.1.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Çalışma Prensipleri.....	2
1.1.2. Biyolojik Tanıma Elemanları.....	2
1.1.3. Transdüser Teknolojileri.....	3
1.1.4. Biyosensörlerin Sınıflandırılması.....	3
1.2. ELEKTROKİMYASAL BİYSENSÖRLER.....	4
1.2.1. Elektrot Malzemeleri ve Yüzey Modifikasyonları.....	6
1.2.2. Elektrokimyasal Sensörlerin Uygulama Alanları.....	6
1.2.3. Elektrokimyasal Sensörlerin Tanımı ve Yapısal Bileşenleri.....	7
1.2.4. Transdüksiyon Mekanizmaları.....	8
1.2.5. Amperometrik Biyosensörler.....	8
1.2.6. Potansiyometrik Biyosensörler.....	9
1.2.7. Voltametrik Sensörler.....	9
1.2.8. İmpedimetrik (Elektroimpedans Spektroskopisi) Biyosensörler.....	10
1.2.9. İletkenlik Tabanlı Sensörler.....	10
1.2.10. Elektrot Malzemeleri ve Modifikasyon Teknikleri.....	10
1.3. PİEZOELEKTRİK BİYSENSÖRLER.....	11
1.3.1. Piezoelektrik Etki.....	13

1.3.2. Piezoelektrik Biyosensör Bileşenleri.....	14
1.3.3. Analitik Performans Özellikleri	17
1.3.4. Uygulama Alanları.....	17
1.3.5 Avantajlar ve Kısıtlamalar	18
1.3.6. Piezoelektrik Malzemeler	19
1.4. KÜTLE BAZLI BİYOSENSÖRLER	19
1.5. YÜZEY PLAZMON REZONANSI (SPR) BİYOSENSÖRLERİ.....	22
1.5.1. SPR'nin Fiziksel Temeli ve Prensipleri.....	23
1.5.2. SPR Tabanlı Sistemler ve Türetilmiş Teknolojiler	24
1.6. KUARS KRİSTAL MİKROBALANS (QCM) Sensörleri.....	25
1.6.1. Çalışma Prensipleri	25
1.6.2. Piezoelektrik Etki ve QCM Temeli	26
1.6.3. QCM Sisteminin Yapısal Bileşenleri	27
1.6.4. QCM Çalışma Modları	27
1.6.5. Avantajlar ve Sınırlamalar	29
1.7. NANOPARÇACIKLAR	30
1.7.1 . Nanoparçacıkların Yapısal ve Fiziksel Özellikleri	30
1.7.2. Nanoparçacık Sınıflandırması.....	31
1.7.3. Sentez Yöntemleri	33
1.7.4. Nanoparçacıkların Biyosensör Uygulamaları.....	34
1.7.5. Nanoparçacık Türleri ve Özellikleri.....	34
1.7.6. Yüzey Fonksiyonelleştirme Stratejileri.....	35
1.7.7. Mekanizmalar ve Sinyal Arttırımı	35
1.7.8. Nanoparçacıkların Uygulanması	36

1.8. POLİMERİK NANOPARÇACIKLAR	37
1.8.1 Yapısal Özellikler ve Avantajlar	38
1.8.2. Fonksiyonelleştirme ve Akıllı Sistemler.....	39
1.8.3. PEG-tabanlı Nanoparçacıklar	40
1.8.4. Sentez Yöntemleri ve Yapısal Özellikler	41
1.8.5. "Stealth" Özelliği ve Biyouyumluluk	41
1.8.6. PEGylation'ın sağladığı avantajlar	42
1.8.7. Serbest Radikal Polimerizasyonu ile Çapraz Bağlama.....	42
1.8.8. Serbest Radikal Polimerizasyonunun Temelleri	43
1.8.9. Çapraz Bağlama Mekanizması	43
1.8.10. Polimer Ağı Özellikleri ve Avantajları	44
1.8.11. Kontrollü Serbest Radikal Tekniklerle Çapraz Bağlama	44
1.8.12. Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu	45
1.8.13. Yüzey Modifikasyonunun Temel İlkeleri	45
1.8.14. Modifikasyon Yöntemleri	46
1.8.15. Polimer Kaplama Teknolojileri ve Uygulamaları.....	48
1.8.16. Polimer Kaplamaların Sınıflandırılması.....	49
1.8.17. Uygulama Alanları.....	50
1.9. BİYOMOLEKÜL KONJUGASYON	52
1.9.1. Biyomolekül Konjugasyonunun Temel İlkeleri	52
1.9.2. Konjugasyon Yöntemleri.....	53
1.9.3. EDC/NHS Kimyası (Amin-Karboksil Reaksiyonu).....	53
1.9.4. Maleimid-Tiol Konjugasyonu	53
1.9.5. Click Kimyası (Azid-Alkin Siklikleşme).....	53

1.9.6. Enzimatik Konjugasyon Yöntemleri	54
1.9.7. Katman Katman (Layer-by-Layer, LbL) Yöntemi.....	54
1.9.8. Disülfid Değişim Tepkimesi	54
1.9.9. Konjugasyon Platformları	55
1.10. POLİMER ENTEGRE SENSÖR YÜZEYLERİ	56
1.10.1. Polimerlerin Sensör Sistemlerine Entegrasyonu	56
1.10.2. Polimer Entegrasyonunun Sensör Performansına Etkisi	57
1.10.3. İNCE FİLM KAPLAMA.....	58
1.10.4. İnce Film Kaplama Teknikleri	58
1.10.5. Uygulama Alanları.....	60
2. Malzemeler ve Yöntemler.....	60
2.1. Malzemeler.....	61
2.2. Karakterizasyon Metodları	62
2.2.1. Boyut Ölçümü.....	62
2.2.2. Yüzey Yükü Ölçümü	62
2.2.3. FT-IR Spektroskopisi	62
2.2.4. NMR Spektroskopisi.....	62
2.2.5. LC-MS Analizi.....	63
2.2.6. Spin Kaplama	63
2.2.7. SEM Görüntülemesi	63
2.2.8. Temas açısı ölçümü	64
2.2.9. UV-Vis Spektroskopisi	63
2.2.10. Nanodrop	64
2.3. Metakrilatlanmış PEG'lerin Sentezi.....	65

2.4. Nanoparçacıkların Hazırlanması	65
2.5. Peptit Sentezi, NST(8-13)	66
2.6. Fonksiyonel Peptit Sentezi, PDS-NST(8-13).....	67
2.7. Peptit Konjuge Nanoparçacıkların (Pep-NP) Hazırlanması.....	68
2.8. Nanoparçacıklarla Yüzey Kaplama.....	68
2.9. Tersinir Peptit Bağlanması.....	70
2.10. Bağlanma Deneyleri: Afinite Çalışması.....	71
2.11. Bağlanma Deneyleri: Yüzey Bağlanma/Ayrılma Çalışması.....	71
3. SONUÇLAR.....	72
3.1. Fonksiyonel grup içeren PEG polimerlerinin sentezi, saflaştırılması ve karakterizasyonu.....	73
3.2. PEG bazlı nanoparçacıkların hazırlanması.....	76
3.3. PEG bazlı nanoparçacıkların karakterizasyonu.....	78
3.3.1. Elde edilen nanoparçacıkların saflaştırılması ve boyut ölçümleri.....	78
3.3.2. Elde edilen nanoparçacıkların yüzey yükü ölçümleri.....	87
3.3.3. Elde edilen nanoparçacıkların tiyol miktarı ölçümleri.....	89
3.3.4. Elde edilen nanoparçacıkların morfolojik analizleri.....	92
3.3.5. Elde edilen nanoparçacıkların kaplaması.....	95
3.3.6. Yüzeylerin temas açısı ölçümleri.....	97
3.4. Altın Yüzeylere Nanoparçacıkların Kaplanması.....	98
3.5. Peptid Konjüge Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	108
3.6. Peptit Konjüge Nanoparçacıkların Tersinir Özelliğinin İncelenmesi.....	111
3.7. Peptid Konjüge Nanoparçacıkların NTSR2 Antikoru Karşı Bağlanma Analizleri.....	112
4. TARTIŞMA.....	114

5. SONUÇLAR.....	127
6. KAYNAKLAR.....	129

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Temel bir biyosensör bileşenleri.....	2
Şekil 1.2. QCM sensör yapısı – kuartz kristali, altın elektrot, tanıma elemanı ve örnek akışı.....	15
Şekil 1.3. AT kesim kuars kristali.....	26
Şekil 1.4. İki veya daha fazla zıt yüklü polielektrolitin katman katman adsorpsiyonu için çekirdek skarifikasyon tekniği kavramı.....	48
Şekil 3.1. PEGdiMA polimerlerinin sentez çizimleri.....	72
Şekil 3.2. Sentezlenen PEG-diMA polimerlerinin PEG2K-diol ile karşılaştırılması.....	74
Şekil 3.3. Sentezlenen PEG-diMA polimerlerinin PEG6K-diol ile karşılaştırılması.....	74
Şekil 3.4. Sentezlenen PEG-diMA polimerlerinin PEG10K-diol ile karşılaştırılması.....	75
Şekil 3.5. Pentaeritritol tetrakis(3-merkaptopropionat) molekülünün kimyasal yapısı.....	76
Şekil 3.6. Filtre tipinin boyuta farkı.....	79
Şekil 3.7. Filtre sayısının boyuta etkisi.....	80
Şekil 3.8. Çözücünün boyuta etkisi.....	81
Şekil 3.9. Tetrakis-tiyol molekülünün çözücüsünün boyuta etkisi.....	82
Şekil 3.10. Hazırlanan tüm tiyolsüz ve tiyollü nanoparçacıkların şırınga filtrelemesi sonrası elde edilen son ve en düzgün DLS sonuçları.....	84
Şekil 3.11. Kullanılan Amicon tüplerinin bilgileri.....	85
Şekil 3.12. Hazırlanan tüm tiyolsüz (NP 1-3) ve tiyollü (NP4-6) nanoparçacıkların şırınga filtrelemesi sonrası elde edilen son ve en düzgün DLS sonuçları.....	86
Şekil 3.13. (A) tiyolsüz ve (B) tiyollü PEG-2K Np'lerin yüzey yükü sonuçları...	87

Şekil 3.14. (A) tiyolsüz ve (B) tiyollü PEG-6K Np'lerin yüzey yükü sonuçları...	88
Şekil 3.15. (A) tiyolsüz ve (B) tiyollü PEG-10K Np'lerin yüzey yükü sonuçları..	88
Şekil 3.16. Hazırlanan kalibrasyon eğrisi.....	91
Şekil 3.17. Ellman's assay için hazırlanan tiyolsüz (solda) ve tiyollü (sağda) nanoparçacık solüsyonları.....	91
Şekil 3.18. (A) tiyolsüz ve (B) tiyollü PEG-2K Np'lerin SEM görüntüleri.....	93
Şekil 3.19. (A) tiyolsüz ve (B) tiyollü PEG-6K Np'lerin SEM görüntüleri.....	93
Şekil 3.20. (A) tiyolsüz ve (B) tiyollü PEG-10K Np'lerin SEM görüntüleri.....	93
Şekil 3.21. SEM ölçüm cihazı karbon bantları (sol) ve numune altlıkları (sağ)....	96
Şekil 3.22. Altın kaplanmamış cam ve 100 nm kalınlığında altın kaplanmış cam.....	97
Şekil 3.23. Temas açısı ölçümü sırasında kullanılan su damlası görüntüsü.....	98
Şekil 3.24. Tiyolsüz ve tiyollü PEG-2K Np'lerin SEM görüntüleri ve kesit mesafesi.....	100
Şekil 3.25. Tiyolsüz ve tiyollü PEG-6K Np'lerin SEM görüntüleri ve kesit mesafesi.....	101
Şekil 3.26. Tiyolsüz ve tiyollü PEG-10K Np'lerin SEM görüntüleri ve kesit mesafesi.....	101
Şekil 3.27. Tiyolatlanmamış (NP1-3) ve tiyolatlanmış (NP4-6) nanopartikül kaplı altın yüzeylerin kesitlerinin karşılaştırmalı SEM görüntüleri.....	103
Şekil 3.28. CRRPYIL peptidinin yapısal özellikleri.....	104
Şekil 3.29. Saf peptidin FT-IR spektrumu.....	106
Şekil 3.30. Pep ve PDS-Pep'in HPLC kromatogramları.....	107
Şekil 3.31. (A) PDS-Pep'in ¹ HNMR spektrumu, (B) Pep'in ¹ HNMR spektrumu	107
Şekil 3.32. Pep-PEG2K NP için boyut ölçüm sonucu.....	108
Şekil 3.33. Pep-PEG6K NP için boyut ölçüm sonucu.....	109
Şekil 3.34. Pep-PEG2K NP (A) ve Pep-PEG6K NP (B) için yüzey yükü ölçüm	

sonuçları.....	109
Şekil 3.35. Pep-PEG2K NP için SEM görüntüsü (A) ve EDS elemental analiz sonucu (B).....	110
Şekil 3.36. Pep-PEG6K NP için SEM görüntüsü (A) ve EDS elemental analiz sonucu (B).....	110
Şekil 3.37. SEM-EDS ile haritalama analizine göre NP8 kaplı yüzey için atomik yüzdelер.....	111
Şekil 3.38. Mikroskobik termoforez yoluyla NTS(8-13) peptidinin NTSR2 antikoruna bağlanma afinitesi (n=3).....	112
Şekil 3.39. Peptit konjuge nanopartikül kaplı altın yüzey üzerinde inkübasyon sırasında antikor miktarında zamanla meydana gelen değişimler ve asidik ortamda salınması.....	113

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 . Kaplamalarda kullanılan bazı polimerlerin uygulama alanları.....	50
Tablo 1.2. Bazı biyomolekül konjugasyonunun uygulandığı alanlar.....	55
Tablo 1.3. Bazı polimerlerin özellikleri ve uygulama alanları.....	57
Tablo 3.1. PEGdiMA polimerlerinin sentez ayrıntıları.....	72
Tablo 3.2. Tiyollü ve Tiyolsüz nanoparçacıkların sentez ayrıntıları.....	77
Tablo 3.3. Nanoparçacıkların DLS ile alınan boyut (ÇAP) analizi sonuçları.....	87
Tablo 3.4. Nanoparçacıkların Zeta Potansiyeli ölçüm sonuçları.....	88
Tablo 3.5. Ellman's deneyi için standart olarak solüsyon hazırlamak için gerekli hesaplamalar.....	90
Tablo 3.6. Tiyollü ve tiyolsüz nanoparçacıklar için elde edilen Ellman's assay sonuçları.....	92
Tablo 3.7. Nanoparçacıkların karbon bandı üzerinde alınan boyut değerleri.....	94
Tablo 3.8. Nanoparçacıkların karbon bandı üzerinde alınan EDS sonuçları.....	94
Tablo 3.9. Hazırlanan nanoparçacıkların karakterizasyon detayları.....	94
Tablo 3.10. Hazırlanan ince film ve nanoparçacık kaplı yüzeyler için alınan temas açısı ölçüm sonuçları.....	98
Tablo 3.11. Altın kaplı yüzeylere kaplanan nanoparçacıkların SEM ile ölçülen kaplama kalınlıkları.....	102
Tablo 3.12. Peptid sentezinde kullanılan malzeme ve miktarları.....	105

KISALTMALAR

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ALD	Atomik Katman Biriktirme
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
CNT	Karbon Nanotüp
CQD	Koloidal Kuantum Noktalar
CVD	Kimyasal Buhar Biriktirme
DPV	Diferansiyel puls voltametri
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
EPD	Elektroforetik biriktirme
FBAR	Film Bulk Acoustic Resonator
FT-IR	Spektroskopisi
ISE	İyon Seçici Elektrot
LOD	Alt tespit limiti
LSPR	Lokalize Yüzey Plazmon Rezonansı
MNP	Manyetik Nanoparçacıklar
PANI	Polianilin
PCL	Polikaprolakton
PEG	Polyethylene Glikol
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinil Alkol
PVD	Fiziksel Buhar Biriktirme
PVDF	Poliviniliden florür
QCM	Kuars Kristal Mikrobals
SAM	Kendiliğinden Dizilen Tek Katmanlar
SAW	Yüzey Akustik Dalgası
SEM	Tarama Elektron Mikroskobu
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
SWV	Kare Dalga Voltametri
TGA	Termogravimetrik Analiz
DNA	Deoksiribonükleik Asit)
RNA	Ribonükleik Asi
PH	Hidrojen gücü / potansiyeli
COVID	Koronavirüs Hastalığı
GDO	Genetiği Değiştirilmiş Organizma
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi

DPV	Farklı Darbe Voltametrisi
AuNP	Altın Nanoparçacık
AqNP	Gümüş Nanoparçacık
NP	Nanoparçacık
ZnO	Çinko Oksit
Hz	Hertz
CCD	Yük Bağlantılı Aygıt
MOF	Metal-Organik İskelet Yapılar
PZT	Kurşun Zirkonat Titanyat
QD	Kuantum Noktası
CdSE	Kadmium Selenid
CdTe	Kadmiyum Tellürür
ZnS	Çinko Sülfür
PLA	Polilaktik Asit
SPION	Süperparamanyetik Demir Oksit Nanoparçacıkları
TiO ₂	Titanyum Dioksit
siRNA	Küçük Müdahaleci RNA
mRNA	Haberci RNA
MPI	Manyetik Parçacık Görüntüleme
PET	Polietilen Tereftalat
ATRP	Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu
RES	Retiküloendotelyal Sistem
Fe ₃ O ₄	Demir Oksit
CuO	Bakır Oksit
NH ₂	Amino grubu
COOH	Karboksil grubu
SH	Tiol grubu
RAFT	Geri Dönüşümlü Katılma-Parçalanma Zincir Transferi
PMMA	Polimetil metakrilat
PEDOT-PSS	Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate)
EVOH	Etilen Vinil Alkol Kopolimeri)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
NHS	N-Hydroxysuccinimide

1. GİRİŞ

1.1. BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, spesifik biyolojik tanıma elemanlarının analitik bir transdüser ile entegrasyonu sayesinde analitlerin nitel ve nicel olarak tayinine imkân tanıyan hibrit sistemlerdir. İlk biyosensörün 1962 yılında Leland C. Clark tarafından glukoz ölçümüne yönelik geliştirilmesinden itibaren, bu teknolojiler sağlık, çevre, gıda ve savunma gibi birçok sektörde kritik önem kazanmıştır [1].

Biyosensörler, özgül bir analiti tanımaya yönelik biyolojik bir tanıyıcı eleman (enzim, antikor, DNA, hücre, aptamer vb.) ile bu tanımayı elektriksel veya optik sinyallere çeviren bir transdüserin entegre olduğu sofistike analiz cihazlarıdır., temel yapıları; biyoreseptör, transdüser ve sinyal işleyici bileşenlerden oluşur.

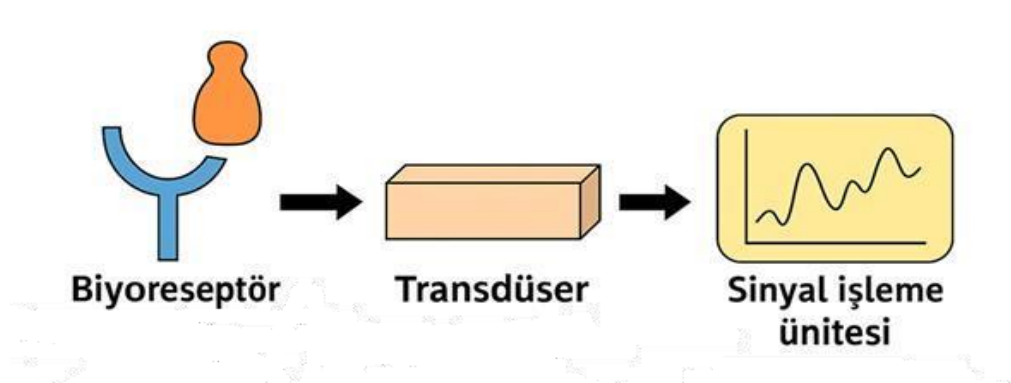
Biyosensörler; biyotanıyıcı elemanlara (enzimatik, immün, DNA vb.), transdüksiyon mekanizmalarına (elektrokimyasal, optik, akustik) ve uygulama alanlarına (tıbbi tanı, gıda güvenliği, çevresel izleme) göre sınıflandırılır. Son yıllarda nanoteknoloji ile karbon nanotüpler, grafen ve kuantum noktaları gibi nanomalzemelerin entegrasyonu, algılama hassasiyetini önemli ölçüde artırmıştır. Ayrıca, mikroakışkan sistemlerle geliştirilen lab-on-a-chip platformları, taşınabilir ve hızlı tanı imkânı sunarken, yapay zekâ destekli veri işleme algoritmaları da sensör çıktılarının sınıflandırılması ve analizinde yeni bir boyut kazandırmıştır. Günümüzde biyosensörlerin kullanımı; diyabet hastalarının glukoz takibi, kanser biyobelirteçlerinin saptanması, COVID-19 gibi enfeksiyonların teşhisi ve tarımsal alanda pestisit izlenmesi gibi çok çeşitli

alanlara yayılmıştır. Ancak hala karşılaşılan başlıca zorluklar arasında biyosensörlerin uzun dönemli stabilitesi, biyoseçiciliğin artırılması, çapraz tepkimelerin azaltılması ve regülasyon süreçlerinin standartlaştırılması yer almaktadır.

Gelecekte, giyilebilir sensör teknolojileri, IoT entegrasyonu ve sentetik biyoloji tabanlı biyorobotlar, biyosensör alanında devrimsel değişimlerin habercisi olacaktır.

1.1.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Çalışma Prensipleri

Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden (Şekil 1.1.) oluşur: (i) biyolojik tanıma elemanı (bioreseptör), (ii) transdüser (dönüştürücü) ve (iii) sinyal işleme birimi.



Şekil 1.1. Temel bir biyosensör bileşenleri

1.1.2. Biyolojik Tanıma Elemanları

Biyosensörlerde kullanılan bioreseptörler, hedef analite özgü yüksek afinite ve özgüllük gösteren biyomoleküllerdir. Bu tanıma elemanları aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

- Enzimler: En yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir. Yüksek katalitik verimlilikleri nedeniyle birçok biyokimyasal reaksiyonun izlenmesinde tercih edilir.
- Antikorlar: Antijen-antikor etkileşimleri sayesinde immünosensörlerin temelini oluşturur.
- Nükleik Asitler (DNA/RNA/Aptamer): Genetik ateryalin spesifik sekanslarına bağlanarak hibridizasyon temelli algılama sağlar.
- Mikroorganizmalar, hücreler veya doku parçaları: Özellikle M etabolik aktiviteyi izlemeye yönelik uygulamalarda kullanılır.

1.1.3. Transdüser Teknolojileri

Biyoreseptör ile hedef analit arasındaki biyokimyasal etkileşim, transdüser aracılığıyla ölçülebilir fiziksel sinyale dönüştürülür. Transdüser tipine göre biyosensörler aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

- Elektrokimyasal transdüserler (amperometrik, potansiyometrik, impedimetrik)
- Optik transdüserler (floresans, absorbands, kırılma indeksi)
- Piezoelektrik transdüserler (kütle değişimi algısı)
- Termal transdüserler (ısı değişimi ölçümü)

1.1.4. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler sınıflandırılırken genellikle transdüser tipi veya tanıyıcı unsur tipi esas alınır [2].

Elektrokimyasal Biyosensörler; Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik olayların sonucunda ortaya çıkan elektriksel sinyalleri (akım, potansiyel, iletkenlik) algılar. Bu sensörler düşük maliyetli, taşınabilir ve miniaturize edilebilir özellikleri sayesinde medikal tanı cihazlarında yaygın kullanılır.

Optik Biyosensörler; Optik biyosensörler, ışığın bir biyolojik etkileşim sonucu değişen özelliklerini (soğurma, kırılma, floresans) ölçerek analit tespiti yapar. Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR) ve interferometrik sistemler bu sınıfa girer.

Piezoelektrik Biyosensörler; Kütle değişimini mekanik rezonans üzerinden algılayan bu sensörler, yüzeye bağlanan biyomoleküllerin ağırlığına göre frekans değişimi üretir. Quartz Crystal Microbalance (QCM), bu tür sensörlerin tipik bir örneğidir.

Termal Biyosensörler; Bu sistemler, biyokimyasal reaksiyonlardan kaynaklanan ısı değişimlerini ölçer. Sinyal, termistör veya termočift aracılığıyla elektriksel formata dönüştürülür.

1.2. ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLER

Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik bir tanıyıcı eleman (enzim, antikor, DNA, aptamer vb.) ile bir elektrokimyasal transdüserin birleşmesiyle analitlerin tespitini mümkün kılan, hassas ve taşınabilir analiz cihazlarıdır. Bu sensörler, hedef molekül ile biyoreseptör arasındaki etkileşim sonucunda oluşan kimyasal sinyalleri elektriksel bir cevaba dönüştürerek kantitatif veri sağlar [3].

Genellikle üç ana türe ayrılırlar: amperometrik biyosensörler (akım ölçümü), potansiyometrik biyosensörler (gerilim ölçümü) ve impedimetrik biyosensörler (empedans değişimleri)[4]. Yüksek seçicilik ve düşük algılama sınırı gibi avantajları, onları başta tıbbi tanı, çevresel izleme, gıda güvenliği ve savunma sanayi olmak üzere birçok alanda vazgeçilmez kılmaktadır [5]. Sensör performansını artırmak amacıyla karbon nanotüpler, grafen ve altın nanoparçacıklar gibi nanomalzemeler elektrot yüzeylerinde kullanılmakta; bu da elektron transferini kolaylaştırarak analiz hassasiyetini artırmaktadır [6]. Mikroakışkan sistemler ile entegre edilen bu sensörler, “lab-on-a-chip” platformları aracılığıyla taşınabilir tanı kitleri haline getirilmiştir [7]. Bununla birlikte, makine öğrenmesi algoritmalarının bu alanda uygulanması, verilerin sınıflandırılması ve örüntü tanıma süreçlerinde doğruluğu açısından önemlidir [8]. Günümüzde glukoz düzeylerinin takibi, kanser biyobelirteçlerinin tespiti ve COVID-19 gibi enfeksiyonların hızlı tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır [9]. Ancak, uzun süreli stabilite, biyoseçicilik kaybı, sensör yüzeyinde biyofouling oluşumu gibi teknik sorunlar halen çözülmeyi beklemektedir [10]. Tüm bu gelişmelere rağmen, elektrokimyasal biyosensörlerin geleceği; yapay zekâ destekli teşhis sistemleri, IoT entegrasyonu ve sentetik biyoloji tabanlı biyoakıllı cihazların yaygınlaşmasıyla daha da genişlemeye adaydır.

Elektrokimyasal sensörler, kimyasal türlerin analitik olarak tespiti için elektrokimya ilkelerine dayanan cihazlardır. Bu sensörler, hedef analitin elektrot yüzeyinde gerçekleşen bir redoks reaksiyonu yoluyla elektriksel bir sinyale dönüştürülmesi esasına göre çalışır. Özellikle biyosensörlerde ve çevresel

analizlerde yaygın kullanımları, bu sensörleri günümüzde oldukça popüler kılmıştır. Elektrokimyasal sensörler; yüksek duyarlılık, seçicilik, hızlı yanıt süresi ve düşük maliyet gibi avantajları nedeniyle farmasötik, gıda güvenliği, çevresel izleme ve klinik tanı alanlarında önemli bir yer edinmiştir.

1.2.1. Elektrot Malzemeleri ve Yüzey Modifikasyonları

Elektrot yüzeyleri, sensör performansının en kritik bileşenidir. En yaygın kullanılan elektrot malzemeleri arasında altın, platin, karbon (camy karbon, grafit, karbon nanotüp, grafen) yer alır. Elektrot yüzeyleri, seçiciliği ve duyarlılığı artırmak amacıyla çeşitli nanomalzemeler (örneğin; AuNP, AgNP, ZnO, CNT) ile fonksiyonelleştirilmektedir [4].

- Nanoyapılı Elektrotlar: Yüksek yüzey alanı sağlar ve elektron transfer kinetiğini hızlandırır.
- Kimyasal Modifikasyon: Tiol, amino, karboksil gibi fonksiyonel gruplar ile yüzeyde biyomolekül sabitlemesi kolaylaşır.

1.2.2. Elektrokimyasal Sensörlerin Uygulama Alanları

Glukoz sensörleri, elektrokimyasal sensörlerin klinikteki en yaygın uygulamasıdır. Kan şekeri ölçümleri, amperometrik glukoz oksidaz sensörleri ile gerçekleştirilir [11].

Ağır metal iyonlarının (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}) su örneklerinde tespiti için voltametrik teknikler tercih edilmektedir. Sensörler, düşük tespit limitleriyle çevresel kontaminasyonun erken teşhisinde kullanılır. Nitrat, pestisit ve antibiyotik kalıntılarının tespiti için geliştirilen elektrokimyasal sensörler, hızlı ve yerinde analiz imkânı sunar. pH, iletkenlik ve çözünmüş oksijen gibi parametrelerin sürekli izlenmesi için elektrokimyasal sensörler kullanılmaktadır.

Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarının kimyasal etkileşimlerinin sonucu olarak meydana gelen elektriksel sinyalleri ölçen cihazlardır. Bu sensörler, yüksek duyarlılık, düşük maliyet, taşınabilirlik ve miniaturizasyon olanakları nedeniyle biyotıp, çevre izleme, gıda güvenliği ve biyoterörizme karşı erken uyarı sistemlerinde önemli uygulamalara sahiptir [12] [4]. Bu bölümde elektrokimyasal biyosensörlerin temel ilkeleri, transdüksiyon mekanizmaları, bileşenleri, sınıflandırmaları ve ileri düzey uygulama alanları ele alınmaktadır.

1.2.3. Elektrokimyasal Sensörlerin Tanımı ve Yapısal Bileşenleri

Elektrokimyasal biyosensörler, hedef analit ile biyoreseptör arasındaki özgül etkileşimin elektroaktif bir sinyale dönüştürülmesi esasına dayanır. Bu cihazlar genellikle üç temel bileşenden oluşur:

1. **Biyolojik Tanıma Elemanı (Bioreceptor):** Enzimler, antikorlar, aptamerler, DNA dizileri veya hücreler olabilir. Bu yapı, hedef molekül ile özgül bir bağlanma sağlar.

2. Transdüser (Dönüştürücü): Biyolojik etkileşimi elektriksel sinyale çevirir.
3. Sinyal İşleyici ve Okuyucu Sistem: Elektriksel sinyali ölçerek kullanıcıya ileten yazılım veya donanım bileşeni.

1.2.4. Transdüksiyon Mekanizmaları

Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik tanıma olayı sonucu ortaya çıkan elektroaktif değişiklikleri çeşitli transdüksiyon teknikleriyle ölçer. Bu teknikler aşağıdaki alt sınıflara ayrılmaktadır:

1.2.5. Amperometrik Biyosensörler

Bir elektrot yüzeyinde analitin oksidasyonu ya da indirgenmesi sırasında oluşan akım ölçülür. Bu sensörler glukoz, hidrojen peroksit ve laktoz gibi analitlerin tespiti için oldukça uygundur.

Biyosensörlerde sıkça kullanılır [12].

Amperometrik sensörler, sabit bir potansiyel altında elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks reaksiyonları sonucu oluşan akımı ölçer. Glukoz sensörleri bu kategoriye girer. Örneğin, glukoz oksidaz enzimi glukozu oksitleyerek hidrojen peroksit üretir; bu molekül elektroaktif olup akım üretir.

$$I = n \cdot F \cdot A \cdot k \cdot C \quad (1.1)$$

Bu denklemde:

- I : akım
- n : elektron sayısı
- F : Faraday sabiti
- A : elektrot yüzeyi
- k : hız sabiti
- C : analit konsantrasyonu

1.2.6. Potansiyometrik Biyosensörler

Bu sensörler, bir elektrot ile referans elektrot arasındaki potansiyel farkını ölçer. İyon-seçici elektrotlar (ISE) en yaygın türüdür. Özellikle pH, sodyum, potasyum ve amonyum gibi iyonların tespitinde kullanılır [4].

Potansiyometrik sensörler, biyokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan iyon değişimlerini ölçer.

Genellikle iyon-selektif elektrotlar kullanılır. En çok pH, Na^+ , K^+ tayininde kullanılır.

1.2.7. Voltametrik Sensörler

Uygulanan potansiyelin fonksiyonu olarak akımın ölçüldüğü sistemlerdir. Diferansiyel puls voltametri (DPV) ve kare dalga voltametrisi (SWV) gibi teknikler, düşük yoğunluklu analitlerin tespitinde yüksek hassasiyet sağlar [13].

1.2.8. İmpedimetrik (Elektroimpedans Spektroskopisi) Biyosensörler

Elektrot yüzeyinde bağlanan biyomoleküller elektriksel geçirgenliği değiştirir. Bu sensörler, elektrot-elektrolit arayüzeyindeki empedans değişimini ölçerek analit varlığını tespit eder. Etiket gerektirmemesi ve gerçek zamanlı analiz yapılabilmesi büyük avantajlardır.

$$Z=Z'+jZ'' \quad (1.2)$$

- $Z''>0$ Devre endüktif davranır
- $Z''<0$ Devre kapasitif davranır

Burada Z' rezistif, Z'' reaktif bileşeni ifade eder.

1.2.9. İletkenlik Tabanlı Sensörler

Çözelti içindeki iyonik değişimlere dayalı olarak çalışırlar. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), özellikle hücre davranışlarının izlenmesinde ve yüzey modifikasyonlarının karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır [14]. Bu sensörler ortamın elektriksel iletkenliğinde oluşan değişimleri doğrudan ölçer. Genellikle iyon üretimi veya tüketimiyle ilişkili reaksiyonlarda kullanılır.

1.2.10. Elektrot Malzemeleri ve Modifikasyon Teknikleri

Elektrotlar, elektrokimyasal sinyalin üretildiği yüzeylerdir. Yaygın olarak kullanılan elektrot materyalleri şunlardır:

- Altın (Au): Yüzey modifikasyonuna uygun, biyouyumlu.
- Karbon bazlı elektrotlar: Cam karbon, karbon nanotüp, grafen tabanlı elektrotlar ile yüzey alanı artırılır.
- Platin (Pt): Katalitik aktivitesi yüksektir ancak pahalıdır.

Yüzey Fonksiyonelleştirme Teknikleri:

- Self-assembled monolayers (SAM): Tiol grupları kullanılarak altın yüzeylere biyoreseptör bağlama.
- EDC/NHS kimyası: Karbodiimid aktivasyonu ile amin-karboksil grubu bağlaması.
- Elektropolimerizasyon: Elektrokimyasal olarak iletken polimerlerin yüzeyde sentezi (örn. polipirol, politiofen).

1.3. PİEZOELEKTRİK BİYOSENSÖRLER

Piezoelektrik biyosensörler, bir piezoelektrik kristalin mekanik deformasyonu sonucu ortaya çıkan elektriksel değişimlerin izlenmesine dayanan yüksek duyarlılığa sahip analitik cihazlardır. Bu sensörler, özellikle yüzey kütle değişikliklerini ölçmeye olanak sağlayan yapıları sayesinde, biyomoleküllerin bağlanma olaylarını doğrudan, etiketsiz ve gerçek zamanlı olarak saptayabilme yeteneğine sahiptir. Piezoelektrik biyosensör teknolojisi, medikal teşhis, çevresel izleme, ilaç geliştirme ve gıda güvenliği gibi alanlarda büyük potansiyel göstermektedir [15].

Piezoelektrik biyosensörler, piezoelektrik özellik gösteren kristallerin yüzeylerine yerleştirilen biyoreseptörler aracılığıyla kütle değişimlerini elektriksel sinyale dönüştüren sofistike tanı platformlarıdır. Bu sensörlerin temel çalışma prensibi, kristalin üzerine bağlanan hedef moleküllerin neden olduğu frekans değişiminin ölçülmesine dayanır [9]. Bu özellik özellikle Quartz Crystal Microbalance (QCM) ve Surface Acoustic Wave (SAW) tabanlı sistemlerde karşımıza çıkar. Piezoelektrik biyosensörlerde kullanılan başlıca malzemeler arasında ZnO, BaTiO₃, PZT (Pb[Zr_xTi_{1-x}]O₃) gibi seramikler ile PVDF (polyvinylidene fluoride) gibi polimerler yer alır. Bu malzemeler hem biyouyumluluk hem de yüksek piezoelektrik katsayısı sayesinde sağlık, çevre ve endüstri alanlarında yaygın kullanılmaktadır [16].

Bu biyosensörler, proteinler, nükleik asitler, virüsler ve hücreler gibi biyolojik hedefleri doğrudan, etiket gerektirmeksizin ve gerçek zamanlı olarak tespit edebilmektedir. COVID-19 gibi enfeksiyon hastalıklarının teşhisinde, yüksek hassasiyetli viral protein deteksiyonu gerçekleştirilmiştir [17]. Ayrıca toksinlerin, pestisitlerin, antibiyotik kalıntılarının ve ağır metallerin çevresel izlenmesinde de etkili oldukları gösterilmiştir [18]. Piezoelektrik biyosensörlerin avantajları; etiket gerektirmemeleri, düşük enerji tüketimi, minyatürleştirilebilirlik ve çoklu analit algılama potansiyelidir. Bununla birlikte, cihaz entegrasyonunda sinyal gürültüsü, nem hassasiyeti ve sınırlı yüzey fonksiyonelleştirme olanakları gibi teknik sınırlamalar mevcuttur [19].

Son yıllarda geliştirilen triboelektrik ve piezoelektrik nanogeneratörler, bu

sensörlerin kendi enerjisini üretmesini sağlayarak “self-powered” tanı cihazlarının önünü açmıştır [20] .

Bu gelişmeler, özellikle giyilebilir biyosensör sistemleri ve yapay zeka ile entegre sağlık izleme platformları gibi uygulamalarda öncüdür. Bu bağlamda, piezoelektrik sensörler hem biyolojik hem de mühendislik disiplinlerinde çok disiplinli bir yaklaşımı destekleyen kritik teknolojiler haline gelmiştir.

1.3.1. Piezoelektrik Etki

Piezoelektrik etki, belirli kristal yapılarına sahip malzemelerin mekanik stres altında elektriksel yük üretme yeteneğidir. Bu özellik tersine çevrilebilir olup, elektriksel uyarım altında mekanik deformasyon da yaratabilir. Piezoelektrik malzemelerin bu çift yönlü tepkisi, sensör teknolojisinde hem aktüatör hem de dedektör olarak kullanılmalarına imkân verir.

Piezoelektrik biyosensörlerde sıklıkla kullanılan prensip, kristalin doğal rezonans frekansındaki değişiklikleri ölçmektir. Bu frekans, sensör yüzeyine bağlanan biyomoleküller nedeniyle kütle artışı yaşandıkça düşer. Bu değişim, analit konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir.

$$\Delta f = - \frac{[A 2f_0^2 \Delta m]}{\sqrt{(\rho q \mu q)}} \quad (1.3)$$

Burada:

- Δf : Frekanstaki değişim

- f_0 : Kristalin rezonans frekansı
- Δm : Bağlanan kütle
- A : Elektrot yüzeyi
- ρ_q : Kristalin yoğunluğu
- μ_q : Elastik modül (saf kuartz için sabittir)

Bu denklem, Sauerbrey (1959) tarafından geliştirilmiştir ve sıklıkla Quartz Crystal Microbalance (QCM) sistemlerinde kullanılır [21].

1.3.2. Piezoelektrik Biyosensör Bileşenleri

1.3.2.1. Piezoelektrik Malzemeler

Biyosensörlerde en yaygın kullanılan piezoelektrik malzeme kuartz (SiO_2) kristalidir. Özellikle AT-cut kuartz kristalleri, sıcaklık değişimlerine karşı kararlı olmaları nedeniyle tercih edilir. Diğer potansiyel piezoelektrik materyaller şunlardır:

- Langasite ($\text{La}_3\text{Ga}_5\text{SiO}_{14}$)
- PZT (Lead zirconate titanate)
- ZnO ve AlN gibi piezoelektrik ince filmler [21]

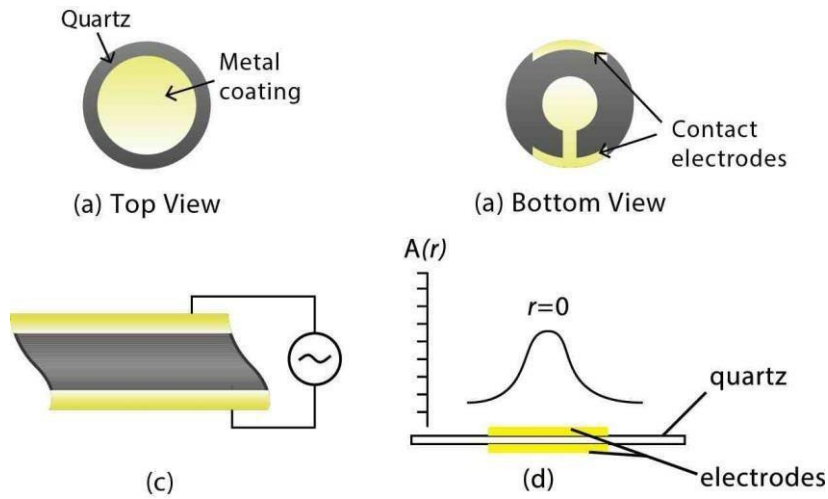
1.3.2.2. Elektrot Kaplama ve Fonksiyonelleştirme

Piezoelektrik kristalin yüzeyi genellikle altın elektrotlarla kaplanır. Bu yüzeyler, tanıma elemanlarının immobilizasyonu için fonksiyonelleştirilir. Kullanılan

yöntemler:

- SAM (Self-Assembled Monolayer) teknikleri
- EDC/NHS kimyası
- Avidin-biotin sistemleri
- Polimer tabakalar (örn. polianilin, polipirol)

Tanıma Elemanları; Piezoelektrik biyosensörlerde tanıma elemanı olarak enzimler, antikorlar, aptamerler, DNA probu veya hücre tabakaları kullanılabilir. Yüzeye immobilize edilen bu moleküller hedef analitle özgül etkileşime girer ve bu etkileşim, frekans değişimiyle tespit edilir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. QCM sensör yapısı-kuartz kristali, altın elektrot, tanıma elemanı ve örnek akışı.

Piezoelektrik Biyosensör Çalışma Modları; QCM sensörleri, piezoelektrik özellik gösteren kuartz kristallerin rezonans frekansındaki değişimi temel alır ve yüzeye bağlanan kütle değişimlerini yüksek hassasiyetle ölçebilen rezonans tabanlı

cihazlardır. Bu sistemlerde kuartz kristal, belirli bir rezonans frekansında titreştirilir, kristal yüzeyine bağlanan analitler, rezonans frekansında ölçülebilir bir azalmaya neden olur. Bu frekans değişimi, yüzeye bağlanan kütlenin bir fonksiyonu olarak tanımlanır ve bağlanan kütleyle doğrudan orantılıdır. QCM sistemleri, 10^{-9} gram düzeyinde kütle değişimlerini algılayabilecek duyarlılıktadır [22] [9]. QCM sistemleri, etiket gerektirmeyen ve gerçek zamanlı analiz imkânı sunmaları nedeniyle biyosensör teknolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [22].

Surface Acoustic Wave (SAW) Sensörler; Yüzey akustik dalga sensörleri, piezoelektrik yüzeyde yayılan akustik dalgaların hız ve genliğini izler. Yüzeydeki biyomoleküler bağlanmalar, bu dalgaları etkileyerek analitik bilgi sağlar [15].

SAW sensörler; yüzeyde yayılan akustik dalgaların hız ve genliğinde meydana gelen değişimleri ölçer. Bu değişiklikler bağlanan kütle, yüzey yükü veya viskozite gibi faktörlerden etkilenir. SAW sensörler genellikle yüksek frekansta (100 MHz – 1 GHz) çalışır ve QCM'ye kıyasla daha yüksek yüzey hassasiyeti sunabilir [21].

Film Bulk Acoustic Resonator (FBAR); bu sensörler çok daha yüksek frekanslarda çalışır (GHz seviyeleri). Ultrahassas kütle algılama sağlar ve özellikle mikroçip tabanlı sistemlerle entegre edilebilir [15].

Microcantilever (Mikro-kiriş) Sensörler; mikro-kiriş tabanlı sistemlerde, yüzeye bağlanan hedef moleküller kirişin kütle merkezini değiştirerek titreşim frekansında kayma oluşturur. Bu sensörler hem dinamik mod (rezonans frekansı

değişimi) hem de statik modda (eğilme) çalışabilir. Mikro-kirişler, MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems) teknolojileriyle uyumlu yapılar olduklarından mikroakışkan sistemlerle kolaylıkla entegre edilebilir [23].

1.3.3. Analitik Performans Özellikleri

Piezoelektrik sensörlerin başarımı şu parametrelerle değerlendirilir:

- Duyarlılık (Sensitivity)
- Seçicilik (Selectivity)
- Alt tespit limiti (LOD)
- Cevap süresi
- Rejenerasyon kapasitesi
- Termal stabilite

QCM sistemleri ile pM seviyesine kadar hassas ölçümler yapılabilmektedir. Bununla birlikte, ortamın viskozitesi ve sıcaklığı gibi faktörler, frekans değişimini etkileyebileceğinden, sistemlerin dikkatli kalibrasyonu şarttır.

1.3.4. Uygulama Alanları

Biyosensörler ve gelişmiş analitik sensör teknolojileri; tıp, çevre, gıda güvenliği ve ilaç geliştirme gibi çok çeşitli alanlarda geniş uygulama yelpazesine sahiptir. Özellikle HER2 ve CEA gibi kanser biyobelirteçlerinin hassas tespiti,

kişiselleştirilmiş tıbbın önünü açarken; HIV ve SARS-CoV-2 gibi virüslerin hızlı teşhisi, bulaşıcı hastalıklarla mücadelede önemli bir rol oynamaktadır. Protein-protein ve ligand-reseptör etkileşimlerinin analizi ile moleküler düzeyde biyolojik süreçlerin anlaşılması sağlanmakta, bu da ilaç keşfi ve protein denge kinetiklerinin değerlendirilmesine katkı sunmaktadır. Salmonella ve Listeria gibi gıda kaynaklı patojenlerin, ayrıca mikotoksinlerin ve antibiyotik kalıntılarının saptanması, gıda güvenliği için kritik öneme sahiptir. Tarım ürünlerinde sıkça karşılaşılan pestisit kalıntıları ile su kaynaklarında bulunan ağır metal iyonlarının tespiti, çevresel izleme çalışmalarının temelini oluştururken; su kalitesinin izlenmesi ise ekosistem sağlığı açısından vazgeçilmezdir. Tüm bu analizler, ilaç tarama (drug screening) platformlarıyla entegre çalışarak yeni terapötik ajanların keşfi ve güvenliğinin değerlendirilmesinde büyük kolaylık sağlamaktadır.

1.3.5 Avantajlar ve Kısıtlamalar

Quartz Crystal Microbalance (QCM) sensörlerinin kullanımı, sahip oldukları birçok avantaj sayesinde biyosensör teknolojilerinde yaygınlaşmıştır. Bu sensörler, etiket gerektirmeyen ölçüm yapabilmeleri sayesinde analiz sürecini basitleştirir ve doğal etkileşimleri bozmadan ölçüm olanağı sunar. Ayrıca, gerçek zamanlı analiz kapasitesi ile dinamik biyomoleküler etkileşimleri anlık olarak izleyebilirler. Yüksek duyarlılık düzeyi, özellikle düşük konsantrasyondaki hedef moleküllerin tespit edilmesini mümkün kılar. Kompakt ve miniaturize edilebilir yapıları ise taşınabilir cihazların geliştirilmesine olanak tanır. Ancak bu teknolojinin bazı kısıtlamaları da mevcuttur. Özellikle sıcaklık ve viskozite değişimlerine karşı

hassasiyet, ölçüm doğruluğunu olumsuz etkileyebilir. Ayrıca sensör yüzeyinin tekrar kullanılabilmesi için gereken rejenerasyon işlemleri zorlayıcı olabilir. Son olarak, karmaşık örnek matrislerinde istenmeyen parazit sinyallerin oluşması, ölçümlerin güvenilirliğini azaltabilir. Bu nedenle, QCM sistemlerinin uygulanabilirliğinde bu avantaj ve sınırlamaların dikkatle değerlendirilmesi gereklidir.

1.3.6. Piezoelektrik Malzemeler

Piezoelektrik sensörlerde kullanılan malzemeler genel olarak aşağıdaki gruplara ayrılır:

- Doğal Kristaller (örneğin kuartz); Kararlı ve sıcaklık bağımlılığı düşüktür.
- Seraimik Malzemeler (PZT, BaTiO₃); Yüksek piezoelektrik katsayıya sahiptir.
- Polimerik Malzemeler (PVDF); Esnek, hafif ve biyouyumlu.
- Kompozit Malzemeler; Mekanik dayanımı ve piezoelektrik yanıtı optimize eder [24].

1.4. KÜTLE BAZLI BİYOSENSÖRLER

Kütle bazlı biyosensörler, algılama olayını tanıyıcı yüzeye bağlanan hedef moleküllerin neden olduğu kütle değişimini ölçerek gerçekleştiren piezoelektrik temelli sensörlerdir. Bu sensörlerde ölçüm, rezonans frekansındaki değişimle yapılır; bağlanan her bir analit, rezonatörün kütlesini artırarak frekansı düşürür.

En yaygın kütle bazlı sensörler arasında Quartz Crystal Microbalance (QCM) ve Surface Acoustic Wave (SAW) tabanlı sensörler bulunmaktadır. QCM sensörleri, kuvars kristallerin piezoelektrik etkisinden faydalanarak, yüzeye bağlanan kütlenin neden olduğu frekans değişimini yüksek hassasiyetle ölçebilir [24]. SAW sensörleri ise yüzey boyunca yayılan akustik dalgaların bozunmasına dayanır ve hem katı hem sıvı ortamda yüksek çözünürlükte ölçüm yapabilir [25].

Bu sensörlerde kullanılan başlıca piezoelektrik malzemeler arasında α -kuvars, ZnO, LiNbO₃ ve BaTiO₃ yer alır. Yüzey modifikasyonu için altın elektrotlara bağlanan self-assembled monolayers (SAMs), proteinler ve DNA prob zincirleri kullanılmaktadır. Kütle bazlı sensörler etiket gerektirmeden çalışabilmeleri, gerçek zamanlı izleme imkânı sunmaları ve düşük algılama limitleri sayesinde özellikle biyolojik ajanlar (ör. Bacillus anthracis), viral proteinler, nükleik asitler, antikorlar ve patolojik hücreler gibi kompleks biyobelirteçlerin tanısında kullanılmaktadır [3,10,26].

Ancak bu teknolojilerin yaygınlaşmasının önünde bazı sınırlılıklar da vardır: özellikle sıvı ortamdaki viskoelastik etkiler frekans stabilitesini bozabilmekte, ayrıca yüksek hassasiyetli yüzey fonksiyonelleştirme ve sinyal/gürültü oranı sorunları devam etmektedir [24]. Buna karşın, son yıllarda geliştirilen nanoyapılı yüzey kaplamaları, çoklu analit tespiti, yapay zekâ ile entegre sistemler ve giyilebilir akustik sensör platformları, bu teknolojilerin hem tıbbi hem de çevresel tanılama alanında geniş çaplı entegrasyonuna olanak sağlamıştır [4,5]. Bu bağlamda kütle bazlı sensörler, sadece laboratuvar ortamında değil, gerçek

zamanlı klinik uygulamalarda da kullanılabilecek yeni nesil biyosensörlerin öncülerinden biri olarak değerlendirilmektedir.

Kütle bazlı sensörler, algıladıkları ortamdaki kütle değişimlerine karşı hassas frekans ya da genlik tepkileri veren sistemlerdir. Bu sensörler özellikle biyosensörler, çevresel izleme sistemleri ve nanoteknolojik uygulamalarda oldukça önemli hale gelmiştir. Temel çalışma prensipleri, kütlenin neden olduğu mekanik rezonans değişimlerine dayanmaktadır [21].

Kütle bazlı sensörlerin başarımı, kullanılan yüzey malzemesi ve fonksiyonelleştirme stratejilerine bağlıdır. Yaygın malzemeler [27] ;

- Kuartz (SiO_2): Yüksek kararlılık ve piezoelektrik özellik
- Altın: Biyoreseptör immobilizasyonu için ideal yüzey
- Polimer kaplamalar: Özelleştirilmiş bağlanma yüzeyleri sağlar
- Silisyum nitrat/kristalin Si: Mikro-kiriş sensörlerde yaygın

Fonksiyonelleştirme için kullanılan teknikler:

- SAM (Self-Assembled Monolayers)
- Karbodiimid (EDC/NHS) kimyası
- Biotin-avidin bağlanması
- Elektropolimerizasyon

1.5. YÜZEY PLAZMON REZONANSI (SPR) BİYOSENSÖRLERİ

Yüzey plazmon rezonansı (SPR) biyosensörleri; ışığın metal-dielektrik arayüzeyinde oluşturduğu plazmonik salınımları kullanarak, yüzeye bağlanan biyolojik moleküllerin neden olduğu kırılma indisi değişikliklerini ölçen, etiket gerektirmeyen ve gerçek zamanlı analiz yapılabilen optik sensörlerdir [28]. SPR etkisi genellikle altın veya gümüş gibi plazmonik metallerle kaplı bir cam prizma üzerine düşen polarize ışığın belirli bir açıdaki yansımasıyla oluşturulur. Bu açıdaki değişiklik, yüzeyde gerçekleşen moleküler bağlanma olaylarını çok yüksek hassasiyetle tespit etmeye olanak tanır [29]. Sensör yüzeyleri aptamerler, antikolar, DNA prob zincirleri veya sentetik tanıyıcılarla işlevselleştirilerek seçici tanıma sağlanır. Son yıllarda bu yüzeylere 2D nanomalzemeler (grafen oksit, MoS₂), metal-organik çerçeveler (MOF'ler) ve kuantum noktalarının entegre edilmesiyle algılama sınırları daha da düşürülmüş, aynı zamanda biyouyumluluk artırılmıştır [30,31,32].

SPR biyosensörleri, özellikle biyomolekül etkileşimlerinin kantitatif analizinde, bağlanma kinetiklerinin incelenmesinde ve ilaç etkileşim çalışmalarında altın standart yöntemlerden biri haline gelmiştir. Klinik tanıda (ör. kanser biyobelirteçleri, SARS-CoV-2 antijenleri), çevresel izlemelerde (ör. toksin, pestisit tespiti) ve gıda güvenliği analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [33]. Ayrıca, elektroSPR sistemleri ile elektrokimyasal ve optik verilerin eş zamanlı analizi sağlanarak biyosensör performansında önemli gelişmeler kaydedilmiştir [34]. Bununla birlikte, SPR sensörlerinin yüksek hassasiyetine rağmen sınırlı

taşınabilirlik, sıcaklık ve ortam değişimlerine duyarlılık gibi bazı teknik kısıtlamaları mevcuttur. Bu zorluklar, fiber optik tabanlı SPR sistemleri ve yapay zekâ entegreli sinyal işleme algoritmaları ile aşılmaya çalışılmaktadır [18] .

1.5.1. SPR'nin Fiziksel Temeli ve Prensipleri

SPR, yüzey plazmonlarının - metal yüzeydeki kolektif elektron salınımları - ışık ile etkileşimi sonucu oluşur. Genellikle altın veya gümüş gibi metalik bir film üzerine gelen polarize ışığın belirli bir açıyla yansımaları sırasında, belirli koşullar altında enerjisi yüzey plazmonlarına aktarılır. Bu enerji transferi, yansıyan ışıkta bir azalma (düşüş) yaratır ve bu minimum nokta rezonans açısı olarak adlandırılır.

Bu rezonans açısı, metal yüzeyle temas halinde olan ortamın kırılma indeksine son derece duyarlıdır. Dolayısıyla, bu yüzeyde gerçekleşen her türlü bağlanma, adsorpsiyon veya moleküler etkileşim rezonans açısında kayma yaratır. Bu olay, bir sensörgram olarak kaydedilir [35].

Bir SPR sisteminin temel bileşenleri aşağıdaki gibidir:

Işık Kaynağı ve Prizma; Genellikle tek dalga boylu, polarize bir ışık kaynağı (örn, He-Ne lazer) kullanılır. Işık, özel prizma (Kretschmann-Raether konfigürasyonu) aracılığıyla altın kaplı cam yüzeye iletilir. Bu geometri, plazmonların etkin şekilde uyarılmasını sağlar [36].

Altın Film (Sensör Çipi); Altın yüzey (genellikle 50 nm kalınlığında), tanıma elemanlarının

immobilizasyonuna uygun, biyoyumlu ve kararlı bir metal tabakadır.

Akış Hücresi; SPR sistemleri genellikle mikroakışkan kanallarla birlikte çalışır. Bu yapı sayesinde

sürekli örnek akışı sağlanır ve kinetik analiz mümkün olur.

Dedektör ve Veri Analizi Sistemi; Rezonans açısındaki kaymalar CCD veya fotodiyot dizileriyle ölçülür ve bilgisayar destekli yazılım sayesinde bağlanma kinetikleri analiz edilir [37].

1.5.2. SPR Tabanlı Sistemler ve Türetilmiş Teknolojiler

SPR Imaging (SPRi); Çok sayıda sensör yüzeyini aynı anda izlemeye olanak tanır. Mikroarray tabanlı ölçümler yapılarak çoklu analit taraması mümkün hale gelir.

Localized SPR (LSPR); Metal nanoparçacıkların yüzeyinde oluşan plazmon rezonansına dayanır. LSPR, nanosensörlerin geliştirilmesinde kullanılır ve daha kompakt, taşınabilir cihazlara zemin hazırlar.

Fiber Optik SPR Sistemleri; Işık taşıyıcı fiberlerin ucunda SPR oluşturularak, minyatür sistemlerde kullanılabilir hale gelir. Bu yöntem, özellikle giyilebilir sensör teknolojilerinde avantaj sağlar [38].

1.6. KUARS KRİSTAL MİKROBALANS (QCM) Sensörleri:

Quartz Crystal Microbalance (QCM), piezoelektrik özellik gösteren kuvars kristallerinin rezonans frekanslarındaki değişimi ölçerek kütle artışlarını dedekte

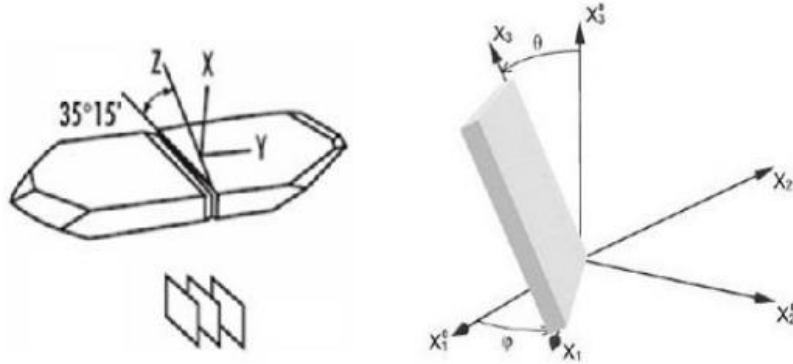
eden hassas bir sensör sistemidir. Bu teknoloji, ilk kez 1959'da Sauerbrey tarafından tanımlanan bir denklemle temellendirilmiş ve 1980'li yıllarda biyolojik uygulamalara entegre edilmiştir. QCM sensörleri, özellikle yüzey fonksiyonelleştirmesi yapılmış kristal yapılarına bağlanan analitlerin oluşturduğu kütle değişimini nanogram altı duyarlılıkla ölçme kapasitesine sahiptir [22] [39].

1.6.1. Çalışma Prensibi

Quartz Crystal Microbalance (QCM), piezoelektrik özellik gösteren kuvars kristallerini temel alan, yüksek hassasiyetli kütle değişim sensörleri arasında yer almaktadır. Özellikle yüzeye immobilize edilen biyomoleküllerin hedef analitlerle etkileşime girmesi sonucu oluşan kütle değişimlerini nanogram altı duyarlılıkla ölçebilmesi, QCM sistemlerini biyosensör tasarımında vazgeçilmez kılmaktadır [22]. Etiket gerektirmeyen, gerçek zamanlı analiz yapabilen yapısı sayesinde hem biyokimyasal süreçlerin izlenmesinde hem de moleküler etkileşimlerin kantitatif değerlendirilmesinde geniş uygulama potansiyeline sahiptir [39]. QCM transdüserleri; kanser biyobelirteçleri, protein-ligand etkileşimleri, antikor-antijen bağlanmaları, viral partikül tespiti, enzim kinetiği, ilaç tarama, pestisit analizi, nükleik asit hibridizasyonları gibi geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Özellikle etiketlenmemiş, hassas ve kinetik bilgi gerektiren çalışmalarda tercih edilir [8].

1.6.2. Piezoelektrik Etki ve QCM Temeli

QCM transdüserleri, en yaygın AT-cut kuvars kullanılır (Şekil 1.3). AT-cut, kuvars kristalinin kristal eksenlerine göre belirli bir açıda (yaklaşık 35.25°) kesilmesiyle elde edilen bir kesim türüdür. Bu kesim, kuvarsın piezoelektrik özelliklerini optimize eder ve özellikle yüksek frekans kararlılığı ile tanınır. AT-cut kuvars kristallerinin piezoelektrik etkisi sayesinde çalışır. Bu etki, kristalin üzerine uygulanan alternatif elektrik alanın, rezonans frekansında mekanik titreşimler oluşturmaya dayanır. Kuvars kristaline bağlanan herhangi bir kütle, bu rezonans frekansında kayma meydana getirir. Frekanstaki bu değişim, doğrudan bağlanan kütle miktarıyla ilişkilidir. Bu ilişki, Sauerbrey Denklemi ile açıklanır [22].



Şekil 1.3. AT kesim kuars kristali

Bu denklem, yalnızca rijit, ince ve homojen filmlerin bağlanması durumunda geçerlidir. Daha kompleks yapılar veya sıvı ortamlar viskoelastik etkiler için Voigt modeli veya Kanazawa- Gordon formülasyonu gibi genişletilmiş modeller kullanılmaktadır [23].

1.6.3. QCM Sisteminin Yapısal Bileşenleri

Kuvars Kristali; AT-cut kuvars kristalleri, yüksek frekans stabilitesi ve düşük sıcaklık etkilenimi nedeniyle tercih edilir. Tipik olarak 5–10 MHz frekans aralığında çalışırlar [40] .

Elektrotlar; Altın (Au) kaplamalı dairesel elektrotlar, hem elektrik alan uygulamak hem de biyomolekül immobilizasyonu için kullanılır. Elektrot yüzeyleri, self-assembled monolayers (SAMs), EDC/NHS aktivasyonu veya avidin-biotin sistemleri ile fonksiyonelleştirilir [39].

Sinyal İşleyici; Alternatif akım uygulayan jeneratör, frekans ölçer ve veri analiz birimi QCM sistemini tamamlar. Frekans kaymaları ve sönümlleme (dissipation) değerleri ölçülerek analiz gerçekleştirilir.

1.6.4. QCM Çalışma Modları

1.6.4.1. Kuru Ortamda Çalışma

Kuru ortamda bağlanan kütle, sadece frekans değişimine neden olur. Bu, klasik Sauerbrey denkleminin uygun bir durumdur [21].

$$f = \frac{2f^0 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}} \quad (1.4)$$

Burada:

- Δf : Frekanstaki değişim

- f_0 : Kristalin rezonans frekansı
- Δm : Bağlanan kütle
- A : Elektrot yüzeyi
- ρ_q : Kristalin yoğunluğu
- μ_q : Elastik modül (saf kuartz için sabittir)

1.6.4.2. Sıvı Ortamda Çalışma

Sıvı fazda çalışıldığında, kristalin yüzeyi ile sıvı arasındaki etkileşim viskoelastik enerji kayıplarına yol açar. Bu kayıplar frekans ile birlikte sönümleme (dissipation, D) parametresi ile de izlenir. Bu tür sistemler QCM-D (Dissipation Monitoring) olarak adlandırılır.

Kanazawa-Gordon denklemi, sıvı ortamın etkisini tanımlar:

$$\Delta f = -f_0^{(3/2)} \left(\frac{\eta_L \rho_L}{\pi \mu_q \rho_q} \right)^{(1/2)} \quad (1.5)$$

- Δf : Kristal rezonans frekansındaki değişim (Hz)
- f_0 : Kristalin temel rezonans frekansı (Hz)
- η_L : Sıvının dinamik viskozitesi ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$)
- ρ_L : Sıvının yoğunluğu (kg m^{-3})
- μ_q : Kuartzın kesme modülü (yaklaşık $2.947 \times 10^{10} \text{ N m}^{-2}$)
- ρ_q : Kuartzın yoğunluğu (yaklaşık 2650 kg m^{-3})

Burada η_L – sıvının viskozitesi ve ρ_L yoğunluğudur. Bu ifade, viskoelastik ortamda frekansın sadece kütle ile değil, aynı zamanda ortamın fiziksel özellikleriyle de etkilendiğini göstermektedir [23].

1.6.5. Avantajlar ve Sınırlamalar

Yüzey plazmon rezonansı (SPR) veya kuvars kristal mikroterazi (QCM) gibi etiket gerektirmeyen sensör teknolojilerinin önemli avantajları bulunmaktadır. Bu sistemler, gerçek zamanlı analiz imkânı sunmaları ve 10^{-9} gram düzeyindeki çok düşük kütle değişimlerine duyarlılık göstermeleri sayesinde biyomoleküler etkileşimlerin yüksek hassasiyetle izlenmesini mümkün kılar. Ayrıca hem sıvı hem de gaz ortamlarında çalışabilmeleri, bu sistemleri biyomedikal, çevresel ve endüstriyel uygulamalarda oldukça esnek hale getirir. Yüzeylerinin kimyasal olarak kolayca modifiye edilebilir olması [39] sensörlerin özgül hedeflere uyarlanmasını sağlar. Bununla birlikte, bazı sınırlamalar da söz konusudur. Özellikle sıvı ortamlarda viskozite ve yoğunluk gibi fiziksel parametrelerin ölçüm sonuçlarını etkileyebilmesi nedeniyle dikkatli kalibrasyon gerekmektedir. Ayrıca klasik QCM denklem modelleri yalnızca rijit bağlanmalar için geçerli olup, viskoelastik yapıların analizinde hata payı oluşturabilir. Rejenerasyon işlemlerinin zorlukları ve potansiyel parazit sinyallerin ölçüm doğruluğunu olumsuz etkilemesi gibi faktörler ise bu teknolojilerin dikkatle optimize edilmesini zorunlu kılar [23].

QCM sensörlerinde kullanılan kuvars kristali genellikle AT-cut olup, en uygun sıcaklık stabilitesine sahiptir. Elektrotlar çoğunlukla altın (Au) malzemeden yapılır ve yüzey fonksiyonelleştirmesi için tiol bazlı self-assembled monolayers

(SAMs), streptavidin-biotin sistemleri ve polimer kaplamalar uygulanır. Gelişmiş QCM platformları, sıvı ortamlarda çalışabilmesi için özel akış hücreleri ile donatılmıştır [8]. Ek olarak, QCM-D (Dissipation Monitoring) sistemleri, frekans değişimiyle birlikte enerji sönümlemesini de ölçerek viskoelastik özellikleri analiz edebilir [41].

1.7. NANOPARÇACIKLAR

Nanoparçacıklar (NP'ler), boyutları 1-100 nanometre arasında değişen, yüzey/hacim oranı yüksek ve kuantum sınırlamalara tabi malzemelerdir. Nano-boyutlara inildiğinde malzemelerin optik, elektriksel, manyetik ve kimyasal özellikleri makroskobik hallere kıyasla dramatik şekilde değişir. Bu özellikleri sayesinde nanoparçacıklar, biyosensörler, ilaç taşıyıcı sistemler, görüntüleme ajanları ve katalizörler gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. [38,42]

1.7.1 . Nanoparçacıkların Yapısal ve Fiziksel Özellikleri

Nanoparçacıkların işlevselliğini belirleyen başlıca parametreler şunlardır:

- Boyut ve şekil: Küresel, çubuk, yıldız, çiçek gibi morfolojiler.
- Kristal yapı: Yüzey atomları daha reaktif olduğundan kristal yüzey tipi önemlidir.
- Yüzey kimyası: Fonksiyonel gruplar, ligandlar, polimer kaplamalar.
- Yüzey yükü ve zeta potansiyeli: Kararlılık, çözelti davranışı ve

biyoyumluluk açısından önemlidir.

- Optik özellikler: Örneğin, altın NP'lerde plazmonik rezonans; kuantum noktalarında

Floresans [43].

1.7.2. Nanoparçacık Sınıflandırması

Metal Nanoparçacıklar; Metal nanoparçacıklar (MNPs), nanometre boyutunda olup yüksek yüzey/alan oranı, yüzey plazmon rezonansı (SPR), katalitik etkinlik ve elektriksel iletkenlik gibi benzersiz fiziksel-kimyasal özellikler sergileyen yapılar olarak tanımlanır. Altın (Au), gümüş (Ag), platin (Pt), paladyum (Pd), bakır (Cu) ve demir (Fe) gibi metallerden elde edilen nanoparçacıklar; biyomedikal görüntüleme, antimikrobiyal sistemler, kanser tedavisi, kimyasal sensörler ve kataliz gibi pek çok alanda kullanılmaktadır [42,44].

- Altın (AuNPs): SPR etkisiyle optik biyosensörlerde yaygın.
- Gümüş (AgNPs): Antibakteriyel özellikli, SERS tabanlı sensörlerde.
- Demir oksit (Fe_3O_4): Manyetik ayırma, hipertermi ve görüntüleme.

Yarı iletken Nanoparçacıklar; Kuantum noktaları (Quantum Dots, QD), 2-10 nm aralığında boyutlara sahip, üç boyutta kuantum sınırlaması gösteren yarı iletken kristallerdir. Bu parçacıklar, boyutlarına bağlı olarak değişen optik ve elektronik özellikleri sayesinde nanoteknolojinin önemli bileşenlerinden biri haline gelmiştir. Yüksek parlaklık, geniş emilim bandı, dar emisyon spektrumu, foto-kararlılık ve uzun floresans ömrü gibi üstünlükleri sayesinde kuantum noktaları biyomedikal görüntülemeden enerjiye kadar birçok alanda kullanılmaktadır [45,46]. CdSe,

CdTe, ZnS gibi bileşikler; yüksek kuantum verimi ve floresans yeteneği ile kullanılır.

Polimerik Nanoparçacıklar; Polimerik nanoparçacıklar, son yıllarda ilaç taşıma, gen tedavisi, biyolojik görüntüleme ve immünoterapi gibi birçok biyomedikal alanda ön plana çıkan çok yönlü araçlardır. Bu sistemler, ilaçların biyoyararlanımını artırabilen, hedefe yönlendirilebilen ve salım profilleri kontrol edilebilen platformlar sunar [47]. Polimerik yapının modifiye edilebilirliği sayesinde, bu nanoparçacıklar hem hidrofilik hem de hidrofobik ajanların taşınmasına olanak tanır.

- PLGA, PEG, chitosan gibi biyobozunur polimerlerden elde edilir. İlaç salımı ve hedeflenmiş taşıma sistemlerinde kullanılır.
- Nanoparçacıklar genellikle doğal (kitosan, jelatin, alginat) ya da sentetik (PLGA, PLA, PCL gibi) polimerlerden elde edilir. Doğal polimerler biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ve düşük toksisiteleri nedeniyle tercih edilirken, sentetik polimerler daha iyi yapısal kontrol sunar [48]. Ayrıca amfifilik blok kopolimerlerin kendiliğinden mikel oluşturma yeteneği, hidrofilik dış yüzey ve hidrofobik çekirdek yapısıyla taşıyıcı olarak avantaj sağlar [49].

Karbon Bazlı Nanoyapılar; Karbon temelli nanoyapılar, son yıllarda nanoteknoloji ve malzeme bilimi alanında çığır açan gelişmelere öncülük etmiştir. Atomik düzeyde kontrol edilebilen yapıları, yüksek yüzey alanları, elektriksel iletkenlikleri ve kimyasal kararlılıkları sayesinde biyomedikalden elektronik

uygulamalara kadar geniş bir kullanım spektrumu sunarlar [50] . Karbon nanotüpler (CNT), grafen, karbon kuantum noktaları (CQD) ve fullerenler gibi farklı türleri bulunan bu yapılar, fonksiyonel gruplarla modifiye edilerek spesifik uygulamalara adapte edilebilir.

1.7.3. Sentez Yöntemleri

Nanoparçacık sentezinde kullanılan başlıca iki yaklaşım olan Top-Down ve Bottom-Up yöntemler, partikül özellikleri üzerinde farklı derecelerde kontrol sunar. Top-Down yaklaşımlar; öğütme, litografi ve lazer ablasyon gibi fiziksel işlemlerle büyük yapıların küçültülmesi esasına dayanır. Ancak bu yöntemlerde boyut kontrolü sınırlı olup, yüzeyde defekt oluşumu sıklıkla karşılaşılan bir sorundur. Buna karşılık Bottom-Up yaklaşımlar, atom veya molekül düzeyinde yapı inşa edilmesine olanak tanır ve partikül boyutunun hassas kontrolü, yüzey modifikasyonu ve fonksiyonel grup eklenmesi açısından daha elverişlidir. Kimyasal indirgeme (örneğin HAuCl_4 ile altın nanoparçacık sentezi), sol-jel yöntemi, mikroemülsiyon, hidrotermal sentez ve çevre dostu yeşil sentez yaklaşımları bu sınıfa girer. Bu nedenle, fonksiyonelleştirilmiş ve uygulamaya özel nanoyapıların elde edilmesinde genellikle Bottom-Up yöntemler tercih edilmektedir [51].

1.7.4. Nanoparçacıkların Biyosensör Uygulamaları

Sinyal Artırıcı Olarak Kullanımı; AuNP'ler, elektroaktif yüzey alanını artırarak amperometrik ve impedimetrik sensörlerde sinyal-gürültü oranını iyileştirir. Kuantum noktaları, floresan sinyallerin kuvvetlendirilmesinde kullanılır [52].

Tanıma Elemanı Taşıyıcıları; Antikorlar, aptamerler veya DNA probu gibi biyotanıyıcılar NP yüzeyine bağlanarak hedefe özgül bağlanma sağlanır.

Manyetik Ayırma ve Konsantrasyon; Manyetik NP'ler (MNP), biyolojik örneklerden hedef analiti ön konsantre etmek ve saflaştırmak için kullanılır.

1.7.5. Nanoparçacık Türleri ve Özellikleri

- Altın Nanoparçacıklar (AuNPs): Yüksek biyoyumluluk, kolay fonksiyonelleştirme ve yüzey plazmon rezonansı (SPR) etkisi ile optik sensörlerde kullanılmaktadır.
- Manyetik Nanoparçacıklar (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$): Örnek ön işleme ve hedef analitin ayıklanmasında kullanılır; dış manyetik alanla kontrol edilebilir.
- Kuantum Noktaları (QDs): Floresan özellikleri sayesinde optik biyosensörlerde sinyal artırıcı olarak kullanılır.
- Karbon Nanotüpler (CNTs) ve Grafen: Elektrik iletkenliği yüksek olan bu yapılar, elektrokimyasal biyosensörlerin elektrot yüzeyini modifiye eder [53].
- Metal-Organik Çerçeveler (MOFs): Gözenekli yapıları sayesinde çoklu hedef analit tutma kapasitesine sahiptir [54].

1.7.6. Yüzey Fonksiyonelleştirme Stratejileri

Nanoparçacıkların biyosensör sistemlerine entegrasyonu için yüzey fonksiyonelleştirme zorunludur. Yaygın yöntemler arasında tiol-altın bağları, EDC/NHS aktivasyonu, streptavidin-biotin etkileşimleri ve silanizasyon yer alır. Bu stratejiler, antikorlar, aptamerler, DNA problemleri gibi biyotanıma elemanlarının nanoparçacık yüzeyine stabil ve yönlü bağlanmasını sağlar [55]. Ayrıca “self-assembly” tabanlı yaklaşımlar, çoklu fonksiyonlu NP yüzeyleri oluşturarak çoklu analit algılama imkânı sunar.

1.7.7. Mekanizmalar ve Sinyal Arttırımı

Nanoparçacıklar, biyosensör sistemlerine şu mekanizmalarla katkı sağlar:

- **Sinyal Yükseltme:** SPR, elektrokimyasal akım, floresans veya impedans sinyallerini artırarak daha düşük tespit limitleri sağlar.
- **Taşıyıcı Sistem:** Enzim, DNA veya antikorları taşımak için yüksek yüzey alanına sahiptir.
- **Hedef Toplama:** Manyetik nanoparçacıklar, hedef analiti zenginleştirip interferans azaltır.
- **Elektrot Modifikasyonu:** CNT ve grafen bazlı NP’ler, elektron transferini hızlandırarak elektrokimyasal duyarlılığı artırır [56].

1.7.8. Nanoparçacıkların Uygulanması

Nanoparçacıklar (NP'ler), sahip oldukları yüksek yüzey-hacim oranı, özelleştirilebilir kimyasal yüzeyler ve kuantum boyutu etkileri sayesinde biyomedikal, çevresel ve teknolojik birçok alanda devrim niteliğinde uygulamalara sahiptir. Biyomedikal alanda, özellikle hedefe yönelik ilaç taşıma sistemlerinde liposomal ve manyetik NP'ler (ör. Doxil) kontrollü salım ve biyoyararlanım artışı sağlarken, görüntüleme sistemlerinde kuantum noktaları ve SPION'lar yüksek çözünürlüklü tanıya olanak tanır. Aynı zamanda gümüş ve çinko oksit NP'ler, antibakteriyel ve antiviral etkileri nedeniyle yüzey kaplamalarında ve koruyucu ekipmanlarda geniş yer bulmuştur [54]. Çevresel uygulamalarda ise demir oksit, TiO_2 ve karbon bazlı nanoparçacıklar, su ve toprak ortamlarındaki toksik kirleticilerin giderimi için kullanılmakta, fotokatalitik ve manyetik özellikleri sayesinde sürdürülebilir arıtma sistemlerine entegre edilmektedir [55]. Enerji teknolojilerinde, Pt ve Au nanoparçacıkları yakıt hücrelerinde katalizör olarak görev yaparken, perovskit kuantum noktaları güneş pillerinde verimliliği artırmak amacıyla kullanılmaktadır [57]. Gıda ambalajı, akıllı tekstil, antimikrobiyal yüzeyler gibi endüstriyel alanlarda da aktif olan NP'ler, fonksiyonel kaplamalar sayesinde hem ürün raf ömrünü artırmakta hem de hijyenik güvenlik sağlamaktadır. Bununla birlikte, nanoparçacıkların toksikolojik profilleri, biyobirikim riskleri ve çevresel salınımları hâlen ciddi bilimsel ve etik tartışmalara neden olmaktadır. Bu nedenle, biyobozunur ve güvenli nanoparçacık sistemlerinin geliştirilmesi, gelecekteki uygulamalar açısından kritik öneme sahiptir [53,56].

1.8. POLİMERİK NANOPARÇACIKLAR

Polimerik nanoparçacıklar (PNP'ler), biyobozunur ve/veya biyouyumlu polimerlerden elde edilen, 10 ile 1000 nanometre çapındaki yapılar olup ilaç taşıma, gen aktarımı, tanı ve aşı geliştirme gibi çok çeşitli biyomedikal uygulamalarda yüksek düzeyde fonksiyonellik sunmaktadır. PLGA, PLA, PCL, kitozan ve alginat gibi doğal ve sentetik polimerler; PNP'lerin kontrollü ilaç salımı, hedefe yönlendirme, çözünürlük artırımı ve hücre içi taşınım gibi görevleri başarıyla gerçekleştirmesini sağlar [53]. Bu nanoparçacıklar, PEGilasyon gibi yüzey modifikasyonlarıyla dolaşım süresi artırılarak hedef dokuya spesifik yönlendirilebilirken; antikor, aptamer ve ligandlarla fonksiyonelleştirilerek hücrel seçicilikleri yükseltilmektedir [58]. Ayrıca, pH, sıcaklık ve redoks potansiyeli gibi çevresel uyarılara duyarlı akıllı sistemler olarak geliştirilen stimuli-responsive PNP'ler, hem tanı hem terapi uygulamalarında çığır açmaktadır [59].

Doksorubisin, siRNA, mRNA gibi terapötiklerin PNP'ler aracılığıyla tümör dokusuna selektif taşınımı, hem sistemik toksisiteyi azaltmakta hem de tedavi etkinliğini artırmaktadır [21]. Tanısal alanda ise PNP'ler, manyetik veya floresan ajanlarla yüklenerek MRI, PET ve optik görüntüleme platformlarında kontrast artırıcı rol oynamakta, theranostik yaklaşımlara olanak sağlamaktadır [55]. Bununla birlikte, toksikolojik değerlendirmeler, üretim ölçeklemesi ve regülasyon eksiklikleri gibi zorluklar, klinik geçişin önündeki başlıca sınırlamalardır [10]. Ancak biyonik kaplama teknolojileri, yapay zeka ile entegre tasarımlar ve organ-

on-chip sistemlerle birlikte geliştirilen yeni nesil PNP'ler, kişiselleştirilmiş tıp, hassas tedavi ve akıllı biyosensör sistemleri açısından umut verici bir gelecek vaat etmektedir [60].

1.8.1 Yapısal Özellikler ve Avantajlar

Polimerik nanoparçacıklar genel olarak iki temel formda sınıflandırılır:

Nanokapsüller; çekirdek-kabuk yapısında olan, iç kısmında hedef maddeyi kapsülleyen ve etrafı polimer kabukla çevrili sistemlerdir. Bu kapsül yapısı, taşıdıkları içeriği çevresel faktörlerden koruma ve kontrollü salım sağlama avantajı sunar. Nanokapsüller; genetik materyallerin korunması, çevresel sensörlerde seçici analiz yapısı oluşturulması, veya biyolojik ortamlarda protein ve peptitlerin taşınması gibi çok çeşitli alanlarda işlevsel olarak kullanılır. Nanokapsüller, iç kısmında iletken veya yarı iletken maddeleri (örn. karbon nanotüp, metal nanoparçacık) taşıyarak bu maddelerin hassas ve kontrollü şekilde belirli yüzeylere veya mikro/nano boyutlu devre alanlarına iletilmesini sağlar. Biyobozunur nanokapsüller, belirli süre çalışan ve ardından kendiliğinden yok olan elektronik sistemlerde kullanılır. Bu sistemler çevresel sensörlerde veya geçici medikal cihazlarda kritik öneme sahiptir. Nanokapsüller, ayrıca yüzeye yapıştıktan sonra içeriğini salarak yüzeyin iletkenliğini ya da hidrofobikliğini değiştirebilir. Bu özellik, akıllı yüzeyler, mikroakışkan çipler ve kendini onaran sistemlerde kullanılmaktadır.

Nanosferler/nanomatris yapılar; polimer matrisinin tamamına dağılmış aktif bileşen veya hedef molekül içeren, kompakt ve katı yapılardır. Yapılarında gözeneksizlik hakimdir ve içerik genellikle polimerin tümüne yayılmış biçimdedir. Nanosferler, iletken polimerlerle (örneğin polianilin, PEDOT:PSS) birlikte kullanılarak esnek elektronik devrelerde ve sensör tabanlarında iletkenliği artıran katkı maddesi olarak kullanılır. Polimerik nanosferler, düşük dielektrik sabiti ve yüksek ısıl stabiliteye sahip olmaları nedeniyle kapasitörlerde ve yalıtkan tabakalarda yer alır. Yüzeyleri kolayca fonksiyonelleştirilebildiği için, elektrot yüzeylerine biyomolekül immobilizasyonunda kullanılırlar. Bu da elektriksel sinyallerle biyolojik etkileşimlerin tespitine olanak tanır. Işık saçan polimerlerin (ör. PPV) içerisine dağıtılmış nanosferler, ışığın yönlendirilmesini ve yayılmasını kontrol ederek optoelektronik performansı artırır [61].

1.8.2. Fonksiyonelleştirme ve Akıllı Sistemler

Stimuli-duyarlı PNP'ler; pH, sıcaklık, manyetik alan veya ışık gibi dış uyaranlara tepki verecek şekilde tasarlanabilir. Bu sayede spesifik bölgelerde ilaç salımı tetiklenebilir [62].

Kabuk-çekirdek yapılar; hem koruyucu hem de taşıyıcı fonksiyonları aynı yapıda birleştirir [63].

1.8.3. PEG-tabanlı Nanoparçacıklar

Polietilen glikol (PEG) tabanlı nanoparçacıklar, biyouyumluluk, uzun dolaşım süresi ve immün kaçış (stealth) özellikleri sayesinde ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılan nanotaşıyıcılardır. PEG'in hidrofilik doğası, nanoparçacık yüzeyini plazma proteinlerinden koruyarak mononükleer fagositik sistemden kaçınmasını sağlar ve dolaşım süresini uzatır [64]. PEGleştirme (PEGylation), kemoterapötik ajanlar (ör. doxorubicin), proteinler ve genetik materyaller için hedefe yönlendirilmiş ve toksisitesi azaltılmış taşıma sistemleri geliştirilmesinde kritik rol oynar [65]. PEG-tabanlı lipit nanoparçacıklar, özellikle kan-beyin bariyerini aşabilme potansiyeliyle nörolojik tedavilerde öne çıkmaktadır [66]. Tanısal uygulamalarda PEG-kaplı manyetik nanoparçacıklar, MRI gibi görüntüleme sistemlerinde uzun süreli kontrast sağlayarak theranostik stratejilere katkı sunmaktadır [67]. Bununla birlikte, PEG'in immünojenitesi ve biyobirikim riski, özellikle tekrarlayan dozlamalarda anti-PEG antikorlarının oluşmasına neden olabilir [68]. Bu nedenle, güncel çalışmalar PEG alternatifi polimerlerin (örn. PMeOx, zwitteriyonik yapılar) geliştirilmesine ve çözünebilen PEG zincirlerinin kullanımına yönelmiştir [69]. Tüm bu özellikleriyle PEG-tabanlı nanoparçacıklar, farmasötik sistemlerde hem terapötik etkinliği artırmakta hem de toksisiteyi minimize ederek klinik başarıya katkı sağlamaktadır.

1.8.4. Sentez Yöntemleri ve Yapısal Özellikler

PEG tabanlı nanoparçacıklar genellikle magnetit (Fe_3O_4), altın, CuO , TiO_2 gibi çekirdek malzemelerin yüzeyine PEG zincirlerinin bağlanmasıyla elde edilir. Bu kaplama işlemi ko- çöktürme, elektro-kimyasal çöktürme, mikroemülsiyon veya ligand değişimi gibi yöntemlerle gerçekleştirilir. Örneğin, PEG ile kaplı Fe_3O_4 nanoparçacıklarının süperparamanyetik özellikleri ve kolloidal stabiliteleri, biyomedikal uygulamalarda kullanıma uygundur [70]. PEG'nin zincir uzunluğu ve yoğunluğu, nanoparçacığın biyoyararlanımı, dağılımı ve bağışıklık sistemiyle etkileşimini belirler [14].

1.8.5. "Stealth" Özelliği ve Biyouyumluluk

PEG'nin en dikkat çekici özelliği, nanoparçacıkların yüzeyine bağlandığında "stealth" (gizlilik) etkisi kazandırmasıdır. Bu sayede makrofajlar tarafından tanınıp yok edilmeleri önlenir, dolaşım süreleri uzar ve hedefe daha fazla nanoparçacık ulaşabilir [71]. PEG ayrıca nanoparçacıkların aglomerasyonunu azaltır ve fizyolojik koşullarda stabilite sağlar.

En sık kullanılan yöntem, nanoparçacık yüzeyine polietilen glikol (PEG) moleküllerinin bağlanmasıdır. PEG zincirleri, su molekülleri ile hidrojen bağı kurarak koruyucu bir hidratasyon katmanı oluşturur. Bu tabaka, opsoninlerin bağlanmasını engeller ve (RES) retiküloendotelyal sistem tarafından tanınma riskini azaltır [72].

1.8.6. PEGylation'ın sağladığı avantajlar

Biyosensör teknolojisinde yüzey modifikasyonu, özgüllük ve duyarlılık gibi performans kriterlerini doğrudan etkileyen önemli bir unsurdur. Bu bağlamda, polietilen glikol (PEG) zincirlerinin sensör yüzeylerine kovalent olarak bağlanması anlamına gelen PEGylation, biyosensör performansını artıran etkili bir strateji olarak öne çıkmaktadır. PEG, yüksek biyouyumluluğa sahip bir polimerdir ve bu özelliği sayesinde sensör yüzeylerinde protein, hücre ya da diğer biyomoleküllerle istenmeyen etkileşimleri büyük ölçüde engeller [73]. Aynı zamanda PEG zincirleri, yüzeyde non-spesifik adsorpsiyonu azaltarak, özellikle kompleks biyolojik sıvılarda (kan, serum vb.) ölçüm doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini artırır [74]. Ayrıca, PEGylation yüzeyin kimyasal stabilitesini artırmakta, bu sayede biyosensörlerin uzun süreli ve çoklu kullanıma uygun hale gelmesini sağlamaktadır. PEG zincirlerinin uçlarına fonksiyonel gruplar (örneğin $-NH_2$, $-COOH$, $-SH$) eklenerek, antikor, aptamer veya enzim gibi biyoreseptörlerin etkin biçimde immobilizasyonu sağlanabilir; bu durum, sensörün hedef analite karşı yüksek seçicilik kazanmasına olanak tanır [75]. PEG aynı zamanda su tutucu özelliğiyle biyomoleküllerin doğal konformasyonlarının korunmasına yardımcı olarak, sensör yüzeyinde biyolojik aktivitenin sürekliliğini destekler. Tüm bu özellikler, PEGylation'ı modern biyosensör dizaynında vazgeçilmez bir yüzey mühendisliği yaklaşımı haline getirmektedir.

1.8.7. Serbest Radikal Polimerizasyonu ile apraz Bağlama

Polimerik malzemelerin mekanik dayanımı, kimyasal stabilitesi ve termal özellikleri, zincirler arası kovalent bağların oluşturulmasıyla ciddi ölçüde geliştirilebilir. Bu bağlar, çapraz bağlama (crosslinking) adı verilen bir süreçle elde edilir. Çapraz bağ yapıları, polimer matrislerinde üç boyutlu bir ağ oluşturarak çözünürlüklerini azaltır ve termal bozulmaya karşı direnç sağlar [76]. Serbest radikal polimerizasyonu, hem polimerizasyonu başlatmak hem de çapraz bağlama yapmak için yaygın olarak kullanılan etkili bir yöntemdir.

1.8.8. Serbest Radikal Polimerizasyonunun Temelleri

Serbest radikal polimerizasyonu, üç ana adımda ilerleyen zincir büyüme polimerizasyon türüdür: başlatma (initiation), büyüme (propagation) ve sonlanma (termination) [77]. Başlaticılar (rneğin benzoil peroksit, AIBN), termal veya ışık enerjisi ile aktive edilerek reaktif radikaller oluşturur. Bu radikaller, çift bağ içeren monomerlerle reaksiyona girerek polimer zincirini başlatır ve zincir, monomer eklenmesiyle uzar.

1.8.9. Çapraz Bağlama Mekanizması

Çapraz bağlama, polimer zincirleri arasında kovalent bağlar oluşturarak üç boyutlu bir ağ yapısının meydana gelmesini sağlar. Serbest radikal polimerizasyonunda bu işlem genellikle iki veya daha fazla fonksiyonel gruba sahip monomerlerin (rneğin etilen glikol dimetakrilat, divinil benzen)

kullanılması ile gerçekleştirilir [78]. Reaksiyon sırasında oluşan aktif radikaller, çapraz bağlayıcı moleküllerin çift bağlarına saldırarak birden fazla zincir arasında bağ kurar. Bu sayede ağ yapısı oluşur ve materyal çözünmez hale gelir.

1.8.10. Polimer Ağı Özellikleri ve Avantajları

Serbest radikal çapraz bağlama ile oluşturulan polimer ağları, aşağıdaki özellikleriyle dikkat çeker:

- Artan termal stabilite; Çapraz bağlar, polimer zincirlerinin hareketini kısıtlayarak ısıya karşı dayanımı artırır.
- Daha yüksek mekanik dayanım; Ağ yapıları, özellikle elastomerik malzemelerde daha iyi geri dönüş davranışı sağlar.
- Çözünmezlik; Çapraz bağlar nedeniyle oluşan yapı, çözücülere karşı dirençlidir ve bu özellik jel bazlı sistemlerde özellikle önemlidir [79].
- Şekil hafızası ve uyarılabilirlik; Stimuli-yanıtlı sistemlerde çapraz bağ yoğunluğu, şişme ve duyarlılık kontrolü açısından kritik rol oynar.

1.8.11. Kontrollü Serbest Radikal Tekniklerle Çapraz Bağlama

Son yıllarda gelişen kontrollü radikal polimerizasyon teknikleri (örneğin ATRP- Atom Transfer Radical Polymerization, RAFT - Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer), çapraz bağlama işlemlerinde daha iyi mimari kontrol imkânı sunmuştur [78]. Bu yöntemlerle, çapraz bağ yoğunluğu daha

hassas bir şekilde ayarlanabilir ve malzemenin hedefe yönelik özellikleri optimize edilebilir.

1.8.12. Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu

Nanopartiküller (NP'ler), yüksek yüzey/hacim oranları, kuantum etkileri ve çok yönlü fonksiyonelleştirilebilirlikleri sayesinde biyomedikal uygulamalardan çevresel sensörlere kadar geniş bir alanda kullanılmaktadır. Ancak bu üstün özelliklerinin uygulamaya aktarılabilmesi, büyük ölçüde yüzey kimyalarının uygun şekilde düzenlenmesine bağlıdır. Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu, biyoyuymululuk, kolloidal stabilite, hedefleme yeteneği ve fonksiyonel grupların taşınabilirliği gibi kritik parametreleri optimize etmek için vazgeçilmez bir yaklaşımdır [80].

1.8.13. Yüzey Modifikasyonunun Temel İlkeleri

Nanoparçacık yüzey modifikasyonu, parçacıkların dış yüzeyine kovalent ya da fiziksel etkileşimlerle yeni kimyasal gruplar kazandırılması sürecidir. Bu modifikasyon; (i) fiziksel adsorpsiyon, (ii) ligand değişimi, (iii) silanizasyon, (iv) polimer kaplama, (v) biyomolekül konjugasyonu ve (vi) katman-katman (LbL) teknikleri gibi çeşitli stratejilerle sağlanabilir [64].

Amaç, nanoparçacığın hedeflenen uygulamaya göre; çözünürlük, dispersiyon kararlılığı, biyolojik tanınma ya da spesifik bağlanma gibi özelliklerini iyileştirmektir. Yüzey modifikasyonu, aynı zamanda toksisiteyi azaltma ve hücre

içi taşınım mekanizmalarını kontrol etme potansiyeli ile de önem arz eder [81].

1.8.14. Modifikasyon Yöntemleri

Fiziksel Adsorpsiyon; Bu yöntem, nanoparçacık yüzeyine elektrostatik ya da Van der Waals kuvvetleri aracılığıyla molekül tutunması esasına dayanır. Kolay uygulanabilir olması avantaj sağlarken, bağların zayıf olması nedeniyle uzun süreli stabilite sorunları ortaya çıkabilir.

Ligand Değişimi (Ligand Exchange); Metal nanoparçacıklarda sıklıkla kullanılan bu teknik, yüzeye bağlı zayıf ligandların daha güçlü fonksiyonel ligandlarla değiştirilmesini içerir. Örneğin, altın nanoparçacıkların sitrat kaplamalarının tiol grupları içeren ligandlarla değiştirilmesi yaygındır [82].

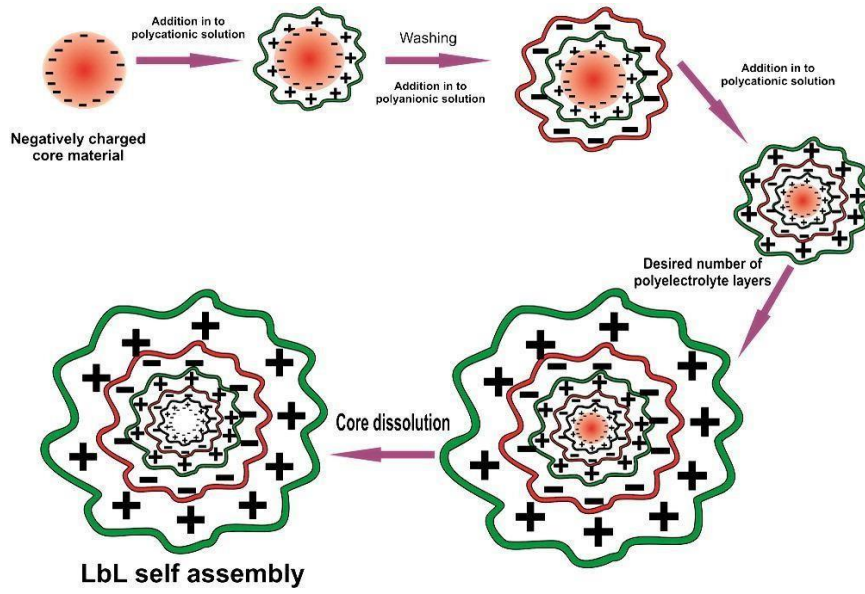
Silanizasyon; Silan grupları, özellikle silika ve metal oksit yüzeylerine kovalent bağlarla bağlanarak istenen fonksiyonel grupların taşınmasını sağlar. Amino, karboksil, epoksi ve PEG gruplarını taşıyan silanlar, biyouyumlu yüzeyler elde etmekte sıklıkla tercih edilir [71].

Polimer Kaplama; Polimer modifikasyonu, kolloidal stabiliteyi arttırmak için kritik rol oynar. Polietilen glikol (PEG) ile yapılan PEGilasyon işlemi, nanoparçacıkların opsonizasyondan kaçmasını sağlayarak dolaşım süresini uzatır [77]. Ayrıca kitozan, PVA ve PLGA gibi polimerlerle de biyobozunur yapıların elde edilmesi mümkündür [79].

Biyomolekül Konjugasyonu; Antikor, aptamer, enzim ya da DNA gibi biyolojik

tanıma elemanlarının yüzeye kovalent bağlarla tutturulması, hedefe yönelik tanı ve tedavi uygulamalarında kullanılır. Karbodiimid kimyası (EDC/NHS) veya maleimid-tiol reaksiyonları bu süreçlerde yaygındır [83].

Katman-Katman (LbL) Yöntemi; Yüzey fonksiyonelleştirme ve ince film kaplama teknolojileri arasında oldukça yaygın olarak kullanılan, kontrollü ve tekrarlanabilir bir teknik olup; genellikle zıt yüklü polielektrolitlerin art arda adsorpsiyonu esasına dayanır (Şekil 1.4). Bu yöntem sayesinde nanometre mertebesinde hassas kalınlık kontrolü sağlanabilirken, yüzeylere biyomolekül, nanoparçacık veya fonksiyonel polimer gibi çok çeşitli bileşenler entegre edilebilmektedir. LbL tekniği, düşük maliyetli donanım gereksinimi, ortam koşullarına duyarlılığın azlığı ve çok yönlü uyarlanabilirliği sayesinde biyosensörlerin yanı sıra ilaç taşıma sistemleri, doku mühendisliği iskeleleri ve antimikrobiyal kaplamalar gibi geniş bir uygulama yelpazesinde tercih edilmektedir. Ayrıca bu yöntemle hazırlanan çok katmanlı yapılar, biyomoleküllerin kontrollü salımı, enzim stabilizasyonu ve sinyal güçlendirme gibi gelişmiş fonksiyonlar sunarak ileri düzey biyomedikal uygulamalara katkı sağlamaktadır [13,84].



Şekil 1.4. İki veya daha fazla zıt yüklü polielektrolitin katman katman adsorpsiyonu için çekirdek skarifikasyon tekniği kavramı; Şekil, istenen sayıda zıt yüklü polielektrolit katmanıyla tekrar tekrar kaplanabilen ve son olarak uygun bir çözücünde çözülerek kendiliğinden birleşen içi boş polielektrolit nanokabuğu oluşturan negatif yüklü çekirdeği göstermektedir [41] .

1.8.15. Polimer Kaplama Teknolojileri ve Uygulamaları

Polimer kaplama teknolojisi, malzemelerin yüzey özelliklerini iyileştirmek, fonksiyonellik kazandırmak veya çevresel etkilere karşı korumak amacıyla polimer tabakalarının yüzeylere uygulanmasını içerir. Bu teknoloji, biyomedikal cihazlardan elektronik bileşenlere, tekstilden gıda ambalajlarına kadar çok geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Polimer kaplamalar; kimyasal direnç, biyoyoumluluk, hidrofobiklik/hidrofiliklik kontrolü, aşınma dayanımı ve optik özellikler gibi pek çok özelliğin tasarıma entegre edilmesine olanak sağlar [63].

1.8.16. Polimer Kaplamaların Sınıflandırılması

Polimer kaplamalar, uygulama yöntemine ve bağlanma türüne göre farklı kategorilere ayrılabilir:

Fiziksel Kaplamalar; polimerin yüzeye fiziksel kuvvetlerle (hidrofobik etkileşim, van der Waals, elektrostatik) bağlandığı sistemlerdir. Bu yöntem genellikle düşük yüzey enerjisi gerektiren geçici uygulamalarda tercih edilir.

Kimyasal Kaplamalar; Bu tür kaplamalar, polimerlerin yüzeye kovalent bağlarla sabitlendiği ve daha kalıcı bir modifikasyon sağladığı yöntemlerdir. Yüzeydeki fonksiyonel gruplar ($-OH$, $-COOH$, $-NH_2$) ile polimer zincirleri arasında reaktif kimya kullanılır [13].

İnce Film Kaplamalar (Thin Films); Spin coating, dip coating veya layer-by-layer (LbL) teknikleri kullanılarak birkaç nanometre kalınlığında homojen polimer tabakaları oluşturulabilir. Bu kaplamalar, özellikle biyosensörlerde yüzey hassasiyeti gerektiren sistemlerde tercih edilir [84].

Self-Assembled Monolayers (SAMs); Organik moleküllerin kendiliğinden düzenlenerek yüzey üzerine tek katmanlı olarak dizilmesiyle elde edilir. Polimerik SAM'ler, nano-mühendislik uygulamalarında yaygın kullanım alanına sahiptir.

Kaplama Teknikler olarak:

Spin Coating; Yüzeye damlatılan polimer çözeltisinin yüksek hızda döndürülmesi ile ince, düzgün bir film elde edilir. Mikroçip üretimi ve sensör teknolojilerinde yaygındır.

Dip Coating; Substratın polimer çözeltisine daldırılıp çekilmesiyle yüzey kaplama gerçekleştirilir. Basit, düşük maliyetli bir yöntemdir.

Elektropolimerizasyon; Elektriksel akım altında, monomerlerin substrat yüzeyinde polimerleşerek kaplama oluşturmastır. Özellikle iletken polimerler için uygundur [39].

Sprey Kaplama ve LbL; Polimer çözeltisinin spreyleneşmesi veya katman katman elektrostatik olarak biriktirilmesi ile kaplama yapılır. Nanoyapı kontrolü mümkündür.

1.8.17. Uygulama Alanları

Kaplamalarda kullanılan bazı polimerlerin uygulama alanları aşağıda Tablo 1.1’de verilmiştir.

Tablo 1.1 . Kaplamalarda kullanılan bazı polimerlerin uygulama alanları

Uygulama Alanı	Kullanılan Polimer Kaplama	Kullanılan Polimer Kaplama
Biyomedikal cihazlar	PEG, PCL, PLA	Biyouyumluluk, protein direnç
Sensör teknolojileri	PANI, PPy, Nafion	İletkenlik, seçicilik
Ambalaj endüstrisi	PVDC, EVOH	Gaz bariyeri
Optik-elektronik	PMMA, PEDOT:PSS	Şeffaflık, iletkenlik
Antifouling yüzeyler	PEG, Zwitterionic polimer	Biyo-kirlenmeyi önleme

Polimer kaplamalar; uygulandıkları yüzeyin kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirerek çeşitli fonksiyonel avantajlar sağlar. Bu kaplamalar, özellikle korozyon ve aşınma direnci açısından büyük fayda sunar; metal yüzeyleri oksidasyon ve aşındırıcı ortamlardan korur. Örneğin, karbon nanotüplerle güçlendirilmiş polimer nanokompozit kaplamalar, hem elektriksel iletkenlik hem de mekanik dayanım kazandırır. Ayrıca, polimer kaplamalar kimyasal direnç sağlayarak organik çözücüler, asitler ve bazlar gibi agresif maddelere karşı bariyer oluşturur. Bazı özel formülasyonlar sayesinde bu kaplamalar yüksek sıcaklıklara dayanabilen termal stabilite özelliği de kazanabilir. Medikal uygulamalarda kullanılan polimer kaplamalar, biyouyumluluk ve antibakteriyel özellikler kazandırılarak vücutla uyumlu hale getirilebilir. Son olarak, iletken polimer filmler, elektronik cihazlar ve güneş enerjisi uygulamaları gibi alanlarda elektriksel iletkenlik ve işlevsellik açısından önemli rol oynar.

Polimer kaplamaların performansını ve işlevselliğini değerlendirmek için çeşitli karakterizasyon teknikleri kullanılır. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), kaplamanın kimyasal yapısını ve içerdiği fonksiyonel grupları belirlemek için kullanılırken, Tarama Elektron Mikroskobu (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), yüzey morfolojisinin ve film kalınlığının detaylı analizi için tercih edilir. Termogravimetrik Analiz (TGA) yöntemiyle kaplamanın termal stabilitesi belirlenebilir. Ayrıca, elektrokimyasal testler, polimer kaplamaların korozyon direncini ve iletkenliğini ortaya koyarken; mekanik testler ise kaplamanın sertliği, yapışma dayanımı ve aşınma direnci gibi

fiziksel özelliklerini değerlendirir.

Bu tekniklerin bir arada kullanımı, kaplamaların kalite kontrolü ve uygulama alanlarına uygunluğunun sağlanmasında büyük önem taşır [60].

1.9. BİYOMOLEKÜL KONJUGASYON

Biyomolekül konjugasyonu, biyolojik moleküllerin (örneğin proteinler, antikorlar, DNA, enzimler) kimyasal olarak başka bir molekül veya yüzeye bağlanmasını sağlayan stratejik bir tekniktir. Bu işlem, moleküllerin taşıyıcı sistemlere entegre edilmesi, hedeflenmiş ilaç salımı, biyoanalitik sensörlerin geliştirilmesi ve tanı-tedavi uygulamaları için vazgeçilmezdir [85]. Fonksiyonel grupların seçici olarak birbirine bağlanması sayesinde, biyolojik aktivite korunarak yeni fonksiyonlar kazandırılabilir.

1.9.1. Biyomolekül Konjugasyonunun Temel İlkeleri

Konjugasyon, reaktif fonksiyonel gruplar (örneğin amin, karboksil, tiol, aldehit, azid) taşıyan moleküllerin bir araya getirilerek kovalent veya non-kovalent bağlarla birleştirilmesidir. Biyolojik moleküllerin konjugasyonu genellikle aşağıdaki avantajları sağlar:

- Spesifik hedefleme
- Yüksek stabilite ve çözünürlük
- Uzun dolaşım süresi
- Tanı ve tedavi ajanlarının aynı sistemde taşınması (teranostik)

Bu özellikler, özellikle nanobiyoteknoloji ve biyomedikal mühendislik alanlarında uygulama çeşitliliğini artırmaktadır.

1.9.2. Konjugasyon Yöntemleri

1.9.3. EDC/NHS Kimyası (Amin-Karboksil Reaksiyonu)

En yaygın kullanılan kovalent bağlama yöntemlerinden biridir. Karbodiimid bileşiği olan EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid), karboksil gruplarını aktive eder ve NHS (N- hidroksisüksinimid) yardımıyla kararlı bir ester ara ürünü oluşturur. Bu ürün, primer aminlerle reaksiyona girerek stabil amid bağları oluşturur [27].

1.9.4. Maleimid-Tiol Konjugasyonu

Maleimid grupları, serbest tiol (-SH) grupları ile yüksek özgüllükte ve fizyolojik koşullarda hızlı bir şekilde reaksiyona girerek tiyol-eter bağları oluşturur. Bu yöntem, özellikle antikor- fragment konjugatları ve altın nanoparçacık yüzey modifikasyonlarında yaygındır [86].

1.9.5. Click Kimyası (Azid-Alkin Siklikleşme)

Bioorthogonal ve yüksek verimli bir yöntemdir. Azid ile terminal alkin grupları, genellikle Cu(I) katalizli “Huisgen 1,3-dipolar sikloeklenme” reaksiyonu ile triazol halkası oluşturarak bağlanır. Sitotoksik olmayan, sulu ortamda çalışabilen yapısıyla hücre içi konjugasyon uygulamalarında ön plandadır [87].

1.9.6. Enzimatik Konjugasyon Yöntemleri

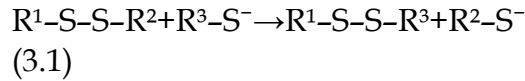
Enzim temelli konjugasyonlarda (örneğin transglutaminaz, sortase A), yüksek spesifiklikte ve kontrollü konjugasyon elde edilir. Bu yöntemler biyolojik aktivitenin korunması açısından avantaj sağlar [75].

1.9.7. Katman Katman (Layer-by-Layer, LbL) Yöntemi

Yüzeye alternatif olarak pozitif ve negatif yüklü biyomoleküllerin adsorpsiyonu ile çok katmanlı yapılar oluşturulabilir. Bu yöntem, özellikle kontrollü ilaç salımı sistemlerinde tercih edilir [39].

1.9.8. Disülfid Değişim Tepkimesi

Disülfid değişim tepkimesi, moleküller arasında yer alan -S-S- (disülfid) bağlarının, nükleofilik saldırı ile yeniden düzenlenmesi esasına dayanır. Bu tepkime sırasında, bir tiyolat iyonu ($R-S^-$) mevcut bir disülfid bağındaki kükürt atomuna saldırarak, yeni bir disülfid oluşturur ve eski bağın diğer parçası serbest bırakılır. Genel mekanizma şu şekildedir:



$R^1-S-S-R^2$: Disülfid bağ içeren molekül

R^3-S^- : Tiyolat iyonu (reaktif sülfür)

$R^1-S-S-R^3$: Yeni disülfid bileşiği (ürün)

R^2-S^- : Reaksiyon sonucu oluşan serbest tiyolat

Bu, bir nükleofilik sülfür (tiolat iyonu) ile bir disülfid bağının yer değiştirmesini içerir.

Disülfid değişim reaksiyonları genellikle su bazlı çözeltilerde, hafif bazik pH (yaklaşık 7.5 – 9) altında gerçekleşir. Bunun nedeni, tiyol gruplarının ($-SH$) bu pH aralığında daha aktif nükleofiller olan tiolat ($-S^-$) formuna dönüşmesidir [88].

1.9.9. Konjugasyon Platformları

Bazı Biyomolekül Konjugasyonunun Uygulandığı Alanlar Tablo 1.2’de verilmiştir. Buna göre, nanopartiküller (Altın, Silika, Polimerik); Fonksiyonel gruplar taşıyan yüzeylerine antikör, aptamer veya DNA bağlanarak hedefe yönelik sistemler geliştirilir.

Yüzeyler (Biyosensör elektrotları, çipler); Elektrot yüzeylerine kovalent olarak bağlanan biyomoleküller, analit seçiciliğini büyük ölçüde artırır. Polimer Matrisler/Hidrojeller; Biyomoleküller, kontrollü salım veya hücre sinyalleşmesi gibi amaçlarla çapraz bağ yapılabilir hidrojellere entegre edilir.

Tablo 1.2. Bazı Biyomolekül Konjugasyonunun Uygulandığı Alanlar

Uygulama Alanı	Konjugasyon Örneği	Yararları
Hedefe yönelik ilaç taşıma	Antikör-konjugat taşıyıcı sistemler	Tümör spesifik taşıma, sistemik toksisite azalması
Biyosensörler	DNA/aptamer konjugasyonlu elektrotlar	Yüksek seçicilik ve hassasiyet

Moleküler görüntüleme	Fluorofor-konjugat nanopartiküller	Hedef doku görüntüleme
Aşı geliştirme	Protein-antijen konjugatları	İmmün yanıtı artırma

1.10. POLİMER ENTEGRE SENSÖR YÜZEYLERİ

Sensör teknolojileri, kimyasal, biyolojik ve fiziksel parametrelerin hassas şekilde tespiti için hızla gelişmekte olup, yüzey mühendisliği bu sistemlerin performansını doğrudan belirleyen kritik bir unsurdur. Polimerlerin, sensör yüzeylerine entegre edilmesi, fonksiyonel gruplar kazandırarak seçicilik, biyouyumluluk, esneklik ve iletkenlik gibi özellikleri optimize eder. Bu bağlamda, polimer entegre sensör yüzeyleri, yeni nesil biyosensör, gaz sensörü, optik sensör ve piezoelektrik sistemlerin temel yapı taşını oluşturmaktadır [4].

1.10.1. Polimerlerin Sensör Sistemlerine Entegrasyonu

Polimerler, sensör platformlarına üç temel yöntemle entegre edilebilir:

Kaplama (coating); Sensör substratının yüzeyi, spin coating, dip coating veya inkjet printing gibi yöntemlerle polimerle kaplanır.

Doğrudan polimerizasyon; Elektropolimerizasyon veya yüzey başlatmalı polimerizasyon yöntemleriyle sensör yüzeyinde polimer sentezi gerçekleştirilir.

Kompozit yapı oluşturma; Polimerler, nanopartiküller, karbon nanotüpler veya grafen gibi iletken katkılarla birlikte entegre edilir.

Bu entegrasyonlar, hem fiziksel hem de kimyasal modifikasyonlara olanak tanıyarak sensörlerin duyarlılığını artırır.

Aşağıdaki tabloda (Tablo 1.3), Bazı polimerlerin özellikleri ve uygulama alanları verilmiştir.

Tablo 1.3. Bazı polimerlerin özellikleri ve uygulama alanları

Polimer	Özellikleri	Uygulama Alanı
Polipirol (PPy)	Elektriksel iletkenlik, biyouyumluluk	Elektro kimyasal sensörler
Polianilin (PANI)	pH duyarlılığı, iletkenlik	Gaz sensörleri, biyosensörler
Polietilen glikol (PEG)	Biyo-anti-fouling, hidrofilik yapı	Protein sensörleri, immün sensörler
Nafion	Proton iletkenliği seçici, geçirgenlik	İyon sensörleri
Polimetil metakrilat(PMMA)	Mekanik dayanıklılık, şeffaflık	Optik sensörler
Kitosan	Doğal, biyobozunur, amin fonksiyonel gruplar	Enzim sensörleri, DNA aptasensörler

1.10.2. Polimer Entegrasyonunun Sensör Performansına Etkisi

Polimerlerin sensör yüzeylerine entegrasyonu aşağıdaki açılardan önemli avantajlar sağlar:

Seçicilik ve biyouyumluluk; Biyomolekül bağlanması için uygun fonksiyonel gruplar sağlar.

Mikro/akıllı ortam stabilitesi; Şartlara duyarlı polimerler sayesinde sensörler çevresel değişkenlere adapte olabilir.

Yüzey alanı artışı; Poröz veya ağ yapılı polimerler, daha fazla bağlanma yeri sunar.

Sinyal amplifikasyonu; İletken polimerler ile sinyalin daha net ve güçlü biçimde iletilmesi sağlanır [21].

1.10.3. İNCE FİLM KAPLAMA

İnce film kaplama, malzeme yüzeylerine nanometre ile mikrometre aralığında kalınlığa sahip tabakaların kontrollü bir şekilde uygulanması sürecidir. Bu teknik, yüzey özelliklerini iyileştirmek, yeni fonksiyonlar kazandırmak ve malzemenin performansını artırmak amacıyla kullanılır. İnce film kaplamalar, elektronik, optik, biyomedikal ve enerji sektörleri başta olmak üzere birçok alanda kritik öneme sahiptir [39].

1.10.4. İnce Film Kaplama Teknikleri

Nanoteknoloji çağında, nanopartikül kaplama teknikleri; biyomedikal uygulamalardan elektronik cihazlara, enerji depolamadan yüzey modifikasyonlarına kadar birçok alanda stratejik önem taşımaktadır. Nanopartikül kaplama, yüzey özelliklerini geliştirmek, biyoyumluluğu artırmak, fonksiyonel grupların entegrasyonunu sağlamak ve kontrollü salım sistemleri oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır [4]. İnce film kaplama yöntemleri, genel olarak fiziksel ve kimyasal temelli teknikler olarak iki ana gruba

ayrılır: [39]

1.10.4.1. Fiziksel Yöntemler

Fiziksel Buhar Biriktirme (PVD); Bu yöntemde, katı haldeki kaplama malzemesi vakum ortamında buharlaştırılarak hedef yüzeye kondanse edilir. PVD, yüksek saflıkta ve homojen kaplamalar elde etmek için tercih edilir.

Sputter Biriktirme; İnert gaz plazması kullanılarak hedef malzeme atomlarının yüzeyden koparılması ve substrata yönlendirilmesi esasına dayanır. Bu teknik, özellikle iletken ve yarı iletken filmlerin kaplanması yaygındır.

Spin Kaplama; Sıvı haldeki kaplama malzemesi, dönen bir substrat üzerine damlatılır ve merkezkaç kuvvetiyle yüzeye yayılır. Bu yöntem, özellikle polimer bazlı kaplamalar için uygundur.

1.10.4.2. Kimyasal Yöntemler

Kimyasal Buhar Biriktirme (CVD); Gaz fazındaki öncül maddelerin kimyasal reaksiyonları sonucunda katı bir film oluşur. CVD, yüksek sıcaklık gerektirmesi nedeniyle termal olarak dayanıklı substratlar için uygundur.

Atomik Katman Biriktirme (ALD); Bu teknik, ardışık ve kendiliğinden sınırlanan yüzey reaksiyonları ile atomik düzeyde film büyümesi sağlar. ALD, yüksek uniformite ve kalınlık kontrolü sunar.

1.10.4.3. Kendiliğinden Organize Olan Monolayerler (SAMs)

Altın yüzeyler üzerine tiol fonksiyonel gruplu nanopartiküllerin bağlanmasıyla oluşturulan SAM yapıları, biyosensör teknolojisinde moleküler tanıma elemanlarının immobilizasyonunda kritik rol oynamaktadır [74]. Bu yöntem, kimyasal olarak kontrollü yüzey fonksiyonelleştirmesine olanak tanır.

1.10.5. Uygulama Alanları

Nanopartikül kaplamalar, biyosensör uygulamalarından antibakteriyel yüzey tasarımlarına ve ilaç taşıma sistemlerine kadar birçok biyomedikal alanda kritik avantajlar sunmaktadır. Biyosensörlerde, özellikle altın nanoparçacıklarla (AuNP) kaplı yüzeyler üzerine nörotensin peptidinin konjugasyonu gibi yaklaşımlar, yüksek yüzey alanı ve spesifik bağlanma sayesinde hedef analitlerin çok düşük konsantrasyonlarda bile tespit edilmesini mümkün kılmaktadır [4]. Antibakteriyel yüzeylerde ise gümüş nanoparçacıklarla yapılan kaplamalar, geniş spektrumlu antimikrobiyal etki göstererek implant malzemeleri ve yara iyileştirici ürünlerde yaygın kullanım alanı bulmaktadır [89]. Ayrıca, polimerik nanoparçacıklarla yapılan yüzey kaplamaları, ilaçların kontrollü salımı için etkili bir platform oluşturmakta; PLGA ve PEG türevli sistemler, biyolojik ortamlarda hem kararlılık hem de hedeflenebilirlik açısından üstün performans sergilemektedir [90].

2. Malzemeler ve Yöntemler

2.1. Malzemeler

Farklı uzunluklarda PEG polimerleri (MW 2, 6 ve 10 kDa), metakriloil klorür (MAC, %97, MW 104,53 g/mol), Pentaeritritol tetrakis(3-merkaptopropionat) (MW 488,66 g/mol, >%95), Aldritiol (MW 220,31 g/mol, %98), Irgacure 2959 (340,32 g/mol, %98), trietil amin (Et₃N, MW 101,19 g/mol, ≥%99,5), diklorometan (DCM, susuz, ≥%99,8) ve metanol (MeOH, mutlak, ≥%99,8) Sigma Aldrich, ABD'den satın alındı. Dithiothreitol (DTT, MW 154,25 g/mol, >%99) Biomatik'ten alındı. Amicon® Ultra-15 Santrifüj Filtre Ünitesi (Mwt kesme değeri: 100 kDa) Merck Millipore'dan alındı. N,N-Dimethylformamide (peptit sentezi için DMF, susuz, %99,8), Fmoc-Cys(Trt)-OH (sistein, MW 585,71 g/mol), Fmoc-Arg(Pbf)-OH (arginin, MW 648,77 g/mol), triisopropylsilane (TIS, MW 158,36 g/mol, %98) ve oxyma pure (MW 142,11 g/mol, ≥%99,0 (HPLC)) Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Fmoc-L-Pro-OH (prolin, MW 337,37 g/mol), Fmoc-L- Tyr(tBu)-OH (tirozin, MW 459,53 g/mol), Fmoc-L-Ile-OH (izolösin, MW 353,41 g/mol), Fmoc-L- Leu-OH (lösin, MW 353,41 g/mol) ve rink amid proTide (reçine, yükleme: 0,70 mmol/g) CEM Corporation'dan elde edildi. Piperidin (MW 85,15 g/mol, %99), N,N'-Diizopropilkarbodiimid (DIC, 126,2 g/mol, ≥%99,0), dietil eter (MW 74,12 g/mol, ≥%99,7) ve trifloroasetik asit (TFA, MW 114,02 g/mol) de Merck Millipore'dan satın alındı. NTSR2 Poliklonal Antikoru ThermoFisher Scientific'ten satın alındı (0,5 mg/mL, PA1-41575). Asetonitril (ACN, ≥%99,9) ISOLAB Chemicals'tan satın alındı. Şırınga filtreleri (0,22 ve 0,45 µm, polietersülfon (PES) ve poliviniliden diflorür (PVDF) membranlar) TPP'den kaynaklandı. Fosfat tamponlu tuzlu su

(PBS) tabletleri MP Biomedicals'dan temin edildi.

2.2. Karakterizasyon Metodları

2.2.1. Boyut Ölçümü

Nanoparçacık numuneleri için 10 ardışık ölçümle hidrodinamik hacimleri için Dinamik Işık Saçılımı (DLS, Wyatt Technologies DynaPro NanoStar) ile analiz edildi. Örnekler su ortamında süspanse edilerek hazırlandı. 80 µL hacimdeki DLS küvetleri kullanılarak yapılan ölçümlerde, nanoparçacıkların hem boyut hem de polidispersite değerleri elde edildi.

2.2.2. Yüzey Yükü Ölçümü

Nanoparçacıkların yüzey yükünü zeta potansiyel değeri (RT, n = 3) olarak ölçmek için Malvern Zetasizer Nano ZS kullanıldı. Uygun zeta potansiyel küveti (DTS1070) kullanılarak yapılan ölçümlerde, nanoparçacık solüsyonları hacimce 10 katı olacak şekilde 10 mM NaCl ile seyreltilti.

2.2.3. FT-IR Spektroskopisi

Polimerlerin FT-IR spektrumları kuru formda ATR FT-IR spektroskopisi (ThermoScientific NICOLET iS10) ile 500-3500 cm⁻¹ aralığında alındı.

2.2.4. NMR Spektroskopisi

Üretilen peptid sekansının ve PDS- modifiye halinin ¹H NMR spektroskopisi için Bruker 400 MHz kullanıldı. 5 mg civarı tartılan örnekler, DMSO-*d*₆'da çözüldü ve 256 tarama sayısında analizler gerçekleştirildi.

2.2.5. LC-MS Analizi

Peptitlerin ve antikor çözeltilerinin saflığı, LC-MS cihazı (Thermo-scientific, DioNex Ultimate3000) ile analiz edildi. Bu analizlerde sabit faz olarak C18 kolonu kullanıldı. Hareketli faz olarak 0,1 mL/dakika akış hızıyla %50 ACN ve %50 ddH₂O kullanıldı. HPLC viallerinde hazırlanan örnekler, 5 µL enjeksiyon hacmi verilerek analizler başlatıldı. Metod olarak ise, toplamda 10 dakikalık olacak şekilde, önce saf su ile başlanan ve 9. dakikaya kadar acetonitril yüzdesi arttırılarak %100'e çıkartıldı. Son bir dakikada ise saf zetonitril akıtılarak kolonun temizlenmesi sağlandı.

2.2.6. Spin Kaplama

Polimer ve nanoparçacık kaplı yüzeyleri hazırlamak için bir spin kaplayıcı cihazı (SCS, 6800 serisi) kullanıldı. Yüzey olarak kullanılan cam lameller üzerine konulan polimer ve nanoparçacık solüsyonları, vakum uygulanarak 1000 rpm hızda 30 saniye süreyle döndürülmüş ve bu şekilde kaplamalar elde edilmiştir.

2.2.7. SEM Görüntülemesi

Nanoparçacıkların morfolojik olarak değerlendirilmesi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM- Quanta650) ile yapılmıştır. Nanoparçacıklar direk karbon bandın üzerine konulup kurutularak hazırlanmıştır. Ayrıca nanoparçacık kaplı cam yüzeyler de SEM'de analiz edilmiştir. Hazırlanan örneklerin yüzeyi 50 nm altınla kaplandıktan sonra stub denilen parçanın üzerine konulmuş ve cihaza yerleştirilmiştir. Vakum altında ETD dedektörü kullanılarak 3,5 nokta boyutu ile 20

kV'da görüntülemeler yapılmıştır. Ayrıca, yüzeydeki atom çeşidi ve miktarlarının belirlenmesi için semi-kantitatif bir analiz yapabilen EDS dedektörü kullanılmıştır.

2.2.8. Temas açısı ölçümü

Temas açısı ölçümleri, İzopropil alkol, aseton ve distile su ile ultrasonik banyoda yaklaşık 20'şer dakika maruz bırakılarak temizlenen, 1 cm² boyutunda cam yüzey kullanılarak yapıldı. Ölçümler, 5 µL dH₂O'ya karşı Biolin Scientific Attension ThetaLite (tek otomatik dağıtımlı optik tensiyometre) kullanılarak tekrarlanarak yapıldı ve analiz edildi.

2.2.9. UV-Vis Spektroskopisi

UV-Vis spektroskopisi (Shimadzu, UV-260), hazırlanan nanoparçacıkların yapısındaki total serbest tiyol miktarının belirlenmesi için yapılan Ellman's standart prosedürü uygulanarak elde edilen örnekler için kullanıldı.

2.2.10. Nanodrop

Nanoparçacıklara konjüge edilen peptit miktarları nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Mikrohacim UV-Vis Spektrofotometresi) ile belirlendi. Hazırlanan her bir solüsyon en az 3 kez tekrarlanarak ölçüm alınıp ortalaması kullanılarak peptit miktarı hesaplandı.

2.3. Metakrilatlanmış PEG'lerin Sentezi

Her iki uçta da mevcut birincil hidroksil gruplarıyla üç farklı molekül ağırlığındaki

PEG polimeri (2, 6 ve 10 kDa) kullanıldı. İlk olarak, PEG polimerleri toluende çözüldü ve yaklaşık 50 °C'de döner buharlaştırıcıda iki kez azeotropik damıtmaya tabi tutuldu, ardından tüm nemi gidermek için bir gece boyunca vakum altında bir desikatörde inkübe edildi. Daha sonra, polimerler (1,0 eq) susuz CH₂Cl₂'de çözüldü ve MAC (2,2 eq) Et₃N (1,0 eq) ile elde edilen bazik bir ortamda reaksiyon ortamına eklendi. Reaksiyonlar bir gece boyunca devam etti ve fazla çözücü vakum altında bir döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırıldı ve polimerler soğuk dietil etere çöktürüldü ve saflaştırma için bir gece boyunca -20 °C'de tutuldu. Daha sonra, polimerler sinterlenmiş camdan (gözenek boyutu 4) filtrelendi ve bir desikatörde kurutuldu. Toplanan polimer ağırlıklarına göre, verimler PEG2K-diMA için %99,9, PEG6K-diMA için %95 ve PEG10K- diMA için %98,8 olarak hesaplandı. Metakrilik esterın eklenmesi ve PEG polimerleri için hidroksil gruplarının uzaklaştırılması FT-IR spektroskopisi ile doğrulandı.

2.4. Nanoparçacıkların Hazırlanması

PEG bazlı nanoparçacıklar (NP1-3), UV kürleme ile radikal bağımlı çapraz bağlama reaksiyonu ile hazırlandı. 27 mg metakrile edilmiş PEG (PEG-diMA) polimeri 8 mL dH₂O'da çözüldü. Daha sonra, bu karışıma fotobaşlatıcı olarak 10 µL Irgacure (%0,2 w/v) eklendi ve reaksiyon, kuvvetli karıştırma (1500 rpm'de) ile UV ışığı (365 nm) altında 20 dakika boyunca sürdürüldü. Elde edilen nanoparçacıklar 0,22 ve 0,45 µm PES filtrelerinden süzüldü ve hidrodinamik hacimleri DLS cihazları (Wyatt Technologies DynaPro NanoStar) ile analiz edildi. Ayrıca, nanoparçacıkların zeta potansiyel değerleri, 0,01 M NaCl çözeltisi ile

seyreltildikten sonra Malvern DLS cihazı ile ölçüldü. Nanoparçacıkların çevresine serbest tiyol grupları (-SH) kazandırmak için, çapraz bağlayıcı molekül, Pentaeritritol tetrakis (3-merkaptopropiyonat), reaksiyon ortamına eklenerek nanoparçacık oluşumu için Tiyol-en kimyasının kullanılması sağlandı. Çapraz bağlama işlemi sırasında, polimer ve fotobaşlatıcı ile birlikte, mutlak etanolde çözünen bu çapraz bağlayıcı molekül, çözeltiye aşırı miktarda (polimer yapısındaki metakrilat gruplarına 1,5 eşdeğer) eklendi, böylece nanoparçacık yapısında serbest -SH grupları elde edildi. Aşırı çapraz bağlayıcı, Amikon filtreleri (MWCO 100 kDa) kullanılarak ddH₂O'ya karşı iki kez santrifüjleme yöntemi ile ultrafiltrasyon yoluyla ortamdan uzaklaştırıldı. Elde edilen nanoparçacıkların (NP4-6) boyut ve zeta potansiyeli ölçümleriyle birlikte, serbest tiyol miktarları, üreticinin talimatlarına göre Ellman testi uygulanarak belirlendi.

2.5. Peptit Sentezi, NST(8-13)

Sistein modifiyeli peptit "CRRPYIL" (MW: 919,14 g/mol), daha önce bildirilen bir yöntem izlenerek, sentez ölçeği 0,1 mmol'e ayarlanarak ve C-terminusu bir amid ucuna modifiye edilerek The Liberty Blue™ (CEM) Otomatik Mikrodalga Peptit Sentezleyici kullanılarak sentezlendi. Kısaca, reçine (0,143 mg) tartıldı ve peptit sentezinden önce yaklaşık 30 dakika şişmeye bırakıldı. DIC ve oksima sırasıyla bir aktivatör ve aktivatör bazı olarak kullanılırken, piperidin korumayı kaldırmak için kullanıldı. Bu arada, gerekli miktarda amino asit, peptit sentezleyici tarafından belirlendiği gibi, uygun hacimdeki DMF'de çözüldü. Reaksiyon yaklaşık 1,5 saat sürdü ve ham peptit, TFA (4,75 mL), TIS (125 µL) ve ddH₂O (125 µL) içeren bir

ayırma kokteyli ile 38 °C'de 30 dakika boyunca Razor Peptid Ayırma Sistemi (CEM) kullanılarak reçineden ayrıldı. Ayrılan peptit daha sonra 15 mL soğuk dietil eterde çöktüldü ve 5 dakika boyunca 8000 rpm'de iki kez santrifüj edildi. Santrifüjlemenin ardından dietil eter çıkarıldı ve peptit bir desikatörde bir gece boyunca kurutuldu (Verim: %66,4, saflık %96,7). Elde edilen saf peptidin kimyasal yapısı daha sonra HPLC cihazı ve proton NMR (DMSO-d₆'da) ve FT-IR spektroskopileri kullanılarak karakterize edildi.

2.6. Fonksiyonel Peptit Sentezi, PDS-NST(8-13)

Peptit C-NST(8-13)'ün tiyol grubu, disülfid değişim reaksiyonu yoluyla tiyollenmiş nanoparçacıkların yüzeyine konjuge olması için piridil disülfür (PDS) kısmı tarafından aktive edildi. Peptit (50,0 mg, 0,055 mmol) 2 mL mutlak metanolde çözüldü ve bu çözeltiye aldrityol (17,9 mg, 0,081 mmol) eklendi. Bu karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta kuvvetlice karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, ham madde 100 mL soğuk dietil etere eklendi ve ürün -20 °C'de gece boyunca bekletilerek çöktürüldü. Saf PDS-Pep bileşiği (32,8 mg, MW 1028,3 g/mol) santrifüjleme ile bir falcon tüpünün dibinde toplandı ve desikatörde kurutuldu. (Verim: %59,1, saflık %80,8) Bileşiğin kimyasal yapısı FT-IR ve ¹HNMR spektroskopileri (DMSO-d₆ içinde) ve HPLC cihazı ile doğrulandı.

2.7. Peptit Konjuge Nanoparçacıkların (Pep-NP) Hazırlanması

Serbest tiyol gruplarının miktarlarına göre, PEG2K-diMA (NP4) ve PEG6K-diMA (NP5) ile hazırlanan nanoparçacıklar, disülfür değişim reaksiyonu yoluyla peptit

konjugasyonu için seçildi. Nanoparçacıklar üzerindeki tiyol miktarlarına dayanarak, nanoparçacık yüzeyine tam konjugasyonu göstermek için 1,5 eşdeğer fazlalıkta peptit molekülleri kullanıldı. PDS ile aktive edilen peptitler, yapısında 1,482 mM -SH bulunan NP4 için 2,3 mg (2,223 mM) ve yapısında 1,771 mM -SH bulunan NP5 için 2,7 mg (2,656 mM) olarak kullanıldı.

Kısaca, PDS-Pep molekülleri 1 mL MeOH içinde çözüldü ve çözüldükten sonra, nanoparçacık çözeltilerinden 1 mL damla damla eklendi. Elde edilen reaksiyon karışımları oda sıcaklığında ve karanlıkta 100 rpm'de bir gece karıştırıldı. Hazırlanan peptid-konjuge nanoparçacıklar, Amicon filtreleri (MWCO 100 kDa) kullanılarak ddH₂O'ya karşı 3000 rpm'de 5 dakika boyunca iki kez santrifüjleme yöntemi ile ultra filtrasyon kullanılarak fazla peptit moleküllerinden ve Pridin 2-tiyon gibi yan ürünlerden saflaştırıldı. Elde edilen nanoparçacıklar (sırasıyla NP7 ve NP8) nanodrop aracılığıyla boyutları, zeta potansiyelleri ve yapılarındaki peptit miktarı açısından analiz edildi.

2.8. Nanoparçacıklarla Yüzey Kaplama

Tiyol grupları içeren ve içermeyen hazırlanmış nanoparçacıklar, altın bazlı herhangi bir sensör yüzeyini simüle etmek için çıplak cam ve altın kaplı cam yüzeylere kaplandı. Nanoparçacık çözeltileri, iyi dağılmış parçacıklar elde etmek için oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bir orbital çalkalayıcıda karıştırıldı. Diğer tarafta, nanoparçacık yapmak için kullanılan 27 mg/mL konsantrasyonda doğrusal PEG polimerleri (2, 6 ve 10 kDa) hazırlandı. Daha sonra, cam lamelleri

500 rpm'de çalkalanarak 30 dakika boyunca bu çözeltilere daldırıldı. Daha sonra, bu yüzeyler bir spin kaplayıcı cihazına alındı ve yüzeyin tamamen kaplanması için 1 dakika boyunca ve 1000 rpm'de vakuma tabi tutuldu. Elde edilen yüzeyler, Biolin Scientific Attension ThetaLite cihazı ile suya karşı temas açısı ölçülerek ıslanabilirlikleri açısından analiz edildi. "Oturmuş damla" yöntemi, hazırlanan kaplanmış lamellerin üzerine "dispenser" adı verilen otomatik bir pipet veya manuel damlatma için Hamilton iğneleri ile 5 µL su damlatılarak çok kısa bir sürede düzinelerce görüntü almak için kullanıldı.

Ek olarak, cam lamel yüzeyleri Vakum püskürtmeli kaplayıcı (Leica EM ACE200) yardımıyla altınla kaplandı. Ultrasonik homojenizatörde aseton, etanol ve damıtılmış su içinde tutulan cam yüzeylerin kapsamlı temizliğinden sonra, bunlar sırasıyla azot gazı altında kurutuldu. Yaklaşık 100 nm altın, metal kaplama cihazı kullanılarak bu temizlenmiş camların yüzeyine kaplandı ve elde edilen altın kaplı yüzeyler inert koşullar altında saklandı. Nanoparacak çözeltileri, yukarıda belirtilen prosedürü izleyerek bu taze hazırlanmış altın kaplı yüzeylere kaplandı.

Nanoparacak ve lineer polimer kaplı cam ve altın yüzeylerin morfolojisi SEM mikroskobu ile değerlendirildi. Numuneler yüksek iletkenlik ve kimyasal kararlılık için 50 nm altınla kaplandı. S (kükürt) varlığı ve yarı kantitatif analizi, altın yüzeyinde nanoparacakların varlığını kanıtlayacak olan EDS dedektörü ile yapıldı. Cam üzerine yapılan kaplamaların kalınlığını ölçmek için yüzeyler bir cam kesici yardımıyla küçük kesitlere kesildi ve saplama üzerine dikey olarak

yerleştirildi. Kesilen kenar yaklaşık 50 nm kalınlığında altınla kaplandıktan sonra, dikey olarak yerleştirilen camların kesit kalınlığı eğik bir konumda mikroskop altında incelendi.

2.9. Tersinir Peptit Bağlanması

Altın kaplı cam yüzeyler önce tiyollenmiş nanoparçacıklarle modifiye edildi. Daha sonra, peptit NST'nin (8-13) geri dönüşümlü bağlanması, güçlü bir indirgeyici madde olan DTT aracılığıyla ardışık di-sülfür bağı oluşumu ve kopmasıyla araştırıldı.[64] Ayrı yüzeyler, Bölüm 2.6'da daha önce açıklanan kaplama prosedürünü izleyerek NP5 (PEG6K-diMA polimeri kullanılarak hazırlandı) ile kaplandı. PDS ile modifiye edilmiş peptit, 0,5 mg/mL'lik son konsantrasyona sahip olmak için %50 MeOH ve %50 ddH₂O'da (h/h) çözüldü. Nanoparçacık kaplı yüzeyler peptit çözeltisine daldırıldı ve oda sıcaklığında 200 rpm'de bir orbital çalkalayıcıda 3 saat inkübe edildi. Yüzeyler ddH₂O ile iki kez durulandıktan sonra, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 50 mM DTT çözeltisine tabi tutuldular. Arada su yıkamaları olan bu işlemler iki kez tekrarlandı ve her adımdan sonra bir yüzey ayrıldı ve haritalama (mapping) modunda bir EDS dedektörü ile SEM yoluyla daha ileri morfolojik analiz için hava ile kurutuldu.

2.10. Bağlanma Deneyleri: Afinite Çalışması

Bir RED-NHS 2. Nesil Protein Etiketleme Kiti ve Monolith NT.115 premium kılcal damarları NanoTemper Technologies'den (München, Almanya) elde edildi. NTSR2 antikörünün bağlanma afinitesi -NTS(8-13) peptit etkileşimi, Monolith

NT.115 Pico cihazı (NanoTemper Technologies, Münih, Almanya) ile mikro ölçekli termoforez (MST) yöntemi kullanılarak değerlendirildi. NTSR2 antikoru, Monolith Protein Etiketleme Kiti RED-NHS 2. Nesil kiti ile etiketlendi ve %0,005 Tween-20 içeren PBS'de hedef molekül olarak kullanıldı. Deneyler, Pico- RED %80 uyarma gücünde ve termoforezli orta MST gücünde Monolith NT.115 Premium Kapillerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Etiketli NTSR2 antikoru için 20 nM konsantrasyon ve NT (8-13) peptidi için 16 seri seyreltme kullanıldı. Hedef ve ligand molekülü karıştırıldıktan sonra 20 dakikalık karanlık inkübasyon gerçekleştirildi. Üçlü sonuçlar M.O. Affinity Analysis v.2.3 yazılımı kullanılarak analiz edildi.

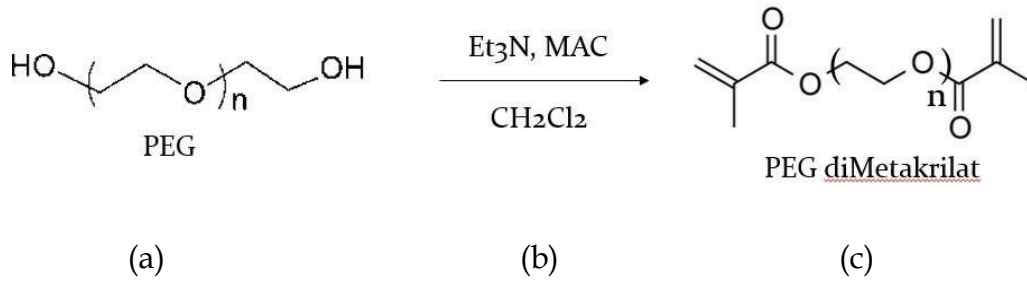
2.11. Bağlanma Deneyleri: Yüzey Bağlanma/Ayrılma Çalışması

Altın yüzeyler önce tiyollenmiş nanoparçacık NP6 ile kaplandı (Bölüm 2.6) ve ardından PDS- Peptid molekülleri ile konjuge edildi (Bölüm 2.7). Diğer taraftan, 110 µL çözelti içeren 55 µg antikorun 190 µL taze hazırlanmış ve filtrelenmiş 10 mM pH7.4 PBS tamponuyla seyreltilmesiyle NTSR2 antikor çözeltisi hazırlandı. Son konsantrasyonu 0.0034 nM olan elde edilen antikor çözeltisi önce %50ACN ve %50 ddH₂O karışımı içeren bir C18 kolonu üzerinde HPLC cihazı ile analiz edildi ve ardından hava ile kurutulmuş yüzeyin inkübasyonu için kullanıldı. Farklı zaman noktalarında, cihazın otomatik örnekleyicisi ile HPLC analizi için 5 µL'lik bir örnek çekildi. Bu şekilde, sürekli inkübasyon 8 saate kadar izlendi. Çıkarılan yüzey 2 saat boyunca pH3.0 asetik asit çözeltisine daldırıldı ve bu çözeltinin HPLC analizi, yüzeydeki bağlı antikorun ne kadarının ayrıldığını ortaya koydu.

3. SONUÇLAR

3.1. Fonksiyonel grup içeren PEG polimerlerinin sentezi, saflaştırılması ve karakterizasyonu

Nanoparçacıklar, doğrusal PEG zincirlerinin uçlarına eklenen metakrilat gruplarının kimyasal çapraz bağlanmasıyla elde edildi. Boyut ve yüzey yükü gibi optimum özelliklere sahip nanoparçacıkların hazırlanması için üç farklı molekül ağırlığındaki PEG polimeri (2, 6 ve 10 kDa) kullanıldı. Şekil 3.1. 'de PEG diMetakrilat sentezinin kimyasal yapıları verilmiştir.



Şekil 3.1. PEGdiMA polimerlerinin sentez çizimleri.

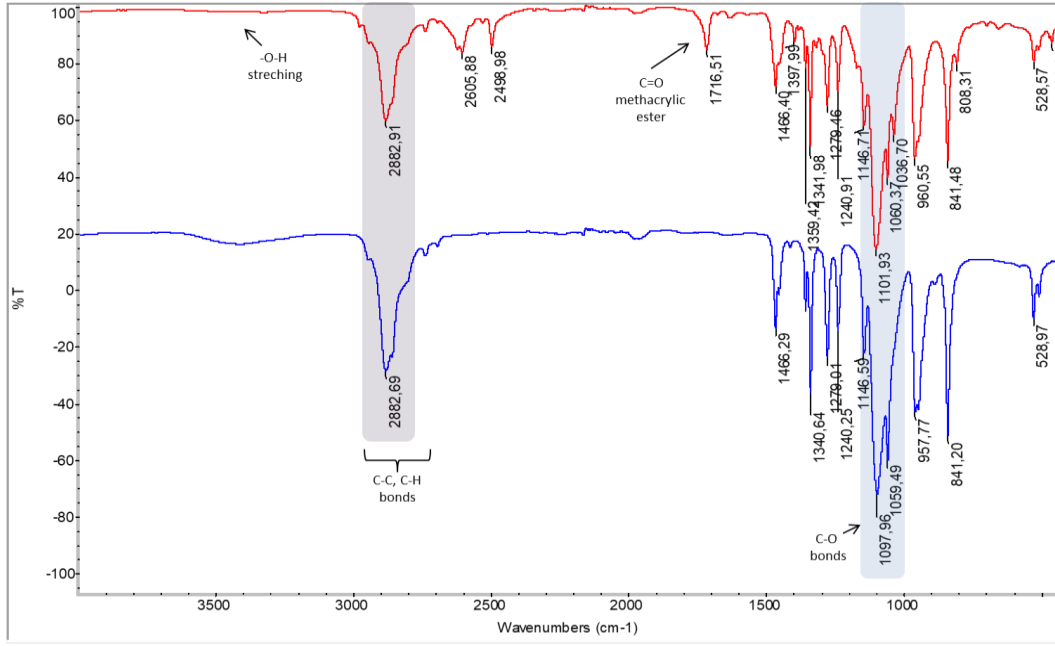
Burada Şekil 3.1(a) 'da verilen yapı ile Şekil 3.1(b) 'deki yapı reaksiyona sokularak Şekil 3.1(c) 'deki yapı elde edilmiştir.

Tablo 3.1. PEGdiMA polimerlerinin sentez ayrıntıları

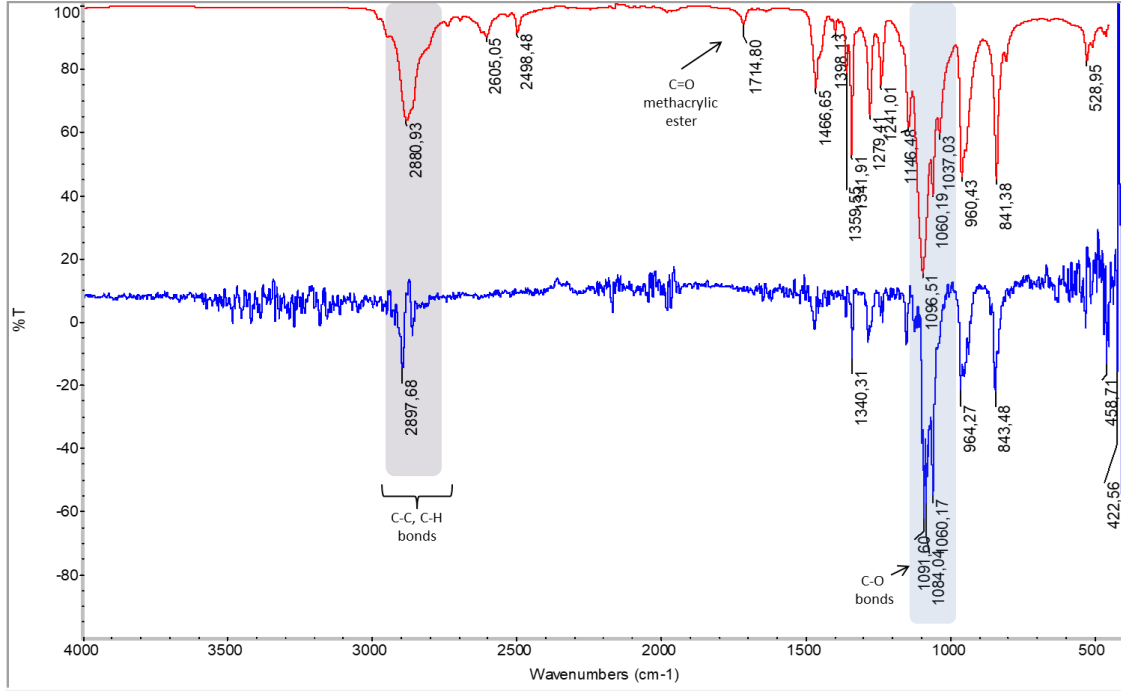
PEG = 10 K için (10.000 Dalton (Da))						
Kimyasallar	Eş değeri	Moleküler Ağırlık (g/mol)	n (mol)	m (mgr)	V (μL)	d (g/cm ³)
PEG 10K	1	10000	0.1	1000		
Et ₃ N	4	104.19	0.4	40.476	55.752	0.726
MAC	4	104.54	0.4	41.816	39.080	1.07
CH ₂ CL ₂ (Çözücü)					22000	
PEG = 6 K için (6000 Dalton (Da))						
PEG 6K	1	6000	0.167	1000		
Et ₃ N	4	104.19	0.67	67.8	93.39	0.726

MAC	4	104.54	0.67	70.05	65.46	1.07
CH ₂ CL ₂ (Çözücü)					24000	
PEG = 2 K için (2000 Dalton (Da))						
PEG 2K	4	2000	0.5	1000		
Et ₃ N	4	104.19	2	202.38	278.8	0.726
MAC	4	104.54	2	209.08	195.4	1.07
CH ₂ CL ₂ (Çözücü)					28000	

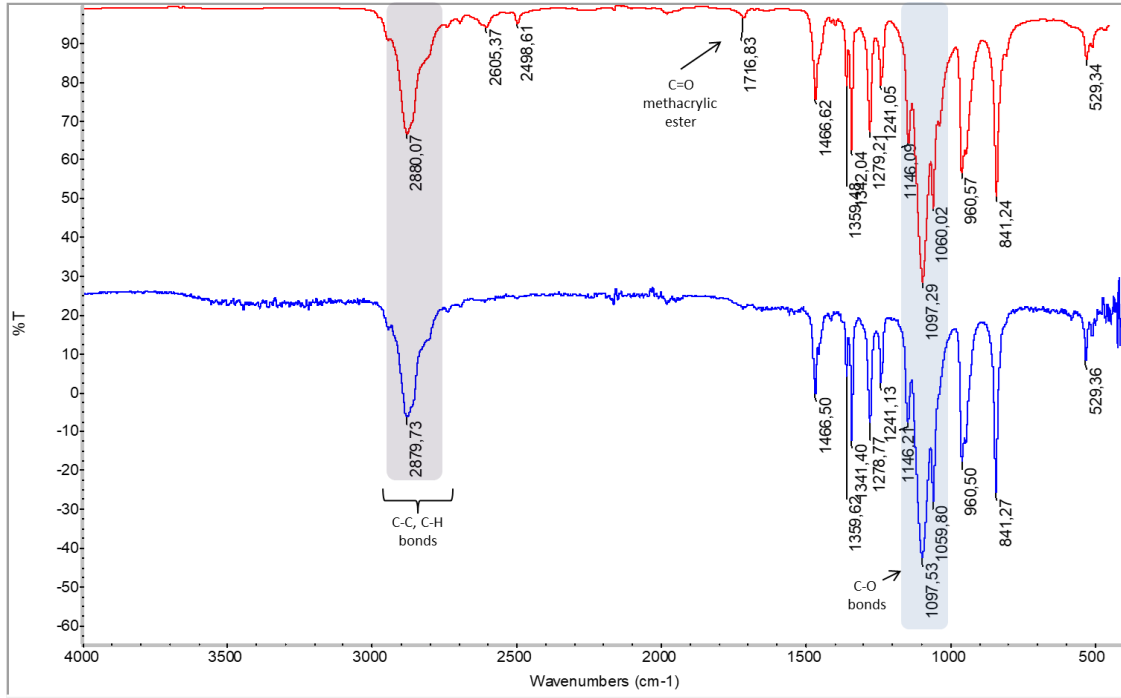
Birincil hidroksil gruplarının metakriloil klorür ile bazik ortamda reaksiyonu, FT-IR spektroskopisi ile izlenen polimer zincirlerinin her iki ucuna metakrilat gruplarının eklenmesini sağladı. Aşağıda verilen Şekil 3.2, Şekil 3.3. ve Şekil 3.4; farklı molekül ağırlıklarına (2K - 2000 Dalton (Da), 6K - 6000 Dalton (Da) ve 10K - 10.000 Dalton (Da)) sahip tüm sentezlenen polimerler için yaklaşık 1710 cm⁻¹'de metakrilat gruplarının yeni karbonil bağlarının (-C=O) görünümünü göstermektedir. Bu durum, diğer moleküler ağırlığa sahip PEG polimerleri için de görüldü. Bir örnek olarak doğrusal PEG2K polimeri ile karşılaştırıldığında, normalde ~3400 cm⁻¹'de geniş olarak görülen birincil hidroksil (-OH) gruplarının gerilme tepelerinin kaybolduğu kolayca fark edilebilir. PEG polimerlerinin tam işlevselleşmesinin bir işareti olarak, metakrilatlanmış polimerler nanoparçacıkların hazırlanmasında kullanıldı. Aşağıda sentezlenen bu PEG-diMA polimerlerinin FT-IR spektroskopisi analiz sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.2. Sentezlenen PEG-diMA polimerlerinin PEG2K-diol ile karşılaştırılması.



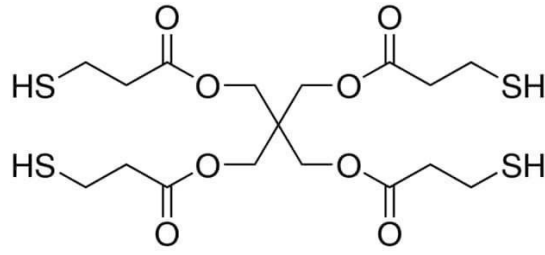
Şekil 3.3. Sentezlenen PEG-diMA polimerlerinin PEG6K-diol ile karşılaştırılması.



Şekil 3.4. Sentezlenen PEG-diMA polimerlerinin PEG10K-diol ile karşılaştırılması.

3.2. PEG bazlı nanoparçacıkların hazırlanması

Üç farklı molekül ağırlığında (2K, 6K ve 10K) hazırlanmış PEG-diMA polimerleri, bir fotobaşlatıcı olan Irgacure'un radikal üretimi üzerine UV ışığı altında çapraz bağlanarak PEG bazlı nanoparçacıklar (sırasıyla NP1, NP2 ve NP3) elde edildi. Serbest tiyol grupları, tiyol-en kimyası ile tetra-tiyol içeren bir molekül olan Pentaeritritol tetrakis (3-merkaptopropionat) aracılığıyla nanopartikül yapılarına sokuldu. Aşırı kullanıldığında, bu moleküller tiyollenmiş nanoparçacıklar (sırasıyla NP4, NP5 ve NP6) elde etmek için bir çapraz bağlayıcı görevi görür. Aşağıdaki şekilde (Şekil 3.5.), Pentaeritritol tetrakis (3-merkaptopropionat) molekülünün kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 3.5. Pentaeritritol tetrakis(3-merkaptopropionat) molekülünün kimyasal yapısı

İlk olarak immobilize olmayan parçacıklar için, sentezini yaptığımız PEG-diMA polimerlerinden 27 mg hassas terazide tartarak, 8 mL distile edilmiş su içerisinde çözdük. Daha sonra, bu karışımın içine 10 µL Irgacure denilen çarpraz bağlayıcı ekledik. Elde edilen bu karışım manyetik karıştırıcıda yaklaşık yarım saat karıştırdıktan sonra bu karışımı maksimum rpm'e alıp (1500 rpm) daha sonra kürlenmesi için UV lambasının altında 20 dk boyunca karıştırarak inkübe ettik. Sensörlerin altın elektrodlarına immobilize olmasını istediğimiz ve burada altın ile tiyol (-SH) bağı kurmasını istediğimiz nanoparçacıkların yapımı için ise 27 mg PEG-diMA ve 10 µL çarpraz bağlayıcı Irgacure karışımının içine ek olarak Pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionate) (tetrakis-tiyol olarak kısaltılan) ekledik. Bu küçük molekülün yapısında 4 adet serbest tiyol grubu vardır. Yine aynı şekilde her şeyi 8 mL distile edilmiş suda çözüp aynı şekilde maksimum rpm'de UV lambasının altında 20 dk döndürerek inkübe ettik. Burda -SH grubu elde etmek için eklemiş olduğumuz Pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionate) malzemesinin moleküler ağırlığına göre diğer malzemelerle karşılaştırmalı hesaplamaları Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Tiyollü ve Tiyolsüz nanoparçacıkların sentez ayrıntıları

Kimyasallar	Eş Değerlik	Moleküler Ağırlık (g/mol)	n (mmol)	Miktar (mg)	Hacim (μL)
PEGdiMA	1	2000	0.0135	27	
Irgacure	0.005	340.32	0.0001	0.02	
Distile su(dH ₂ O)					8000

Kimyasallar	Eş Değerlik	Moleküler Ağırlık (g/mol)	n (mmol)	Miktar (mg)	Hacim (μL)
PEGdiMA	1	6000	0.00450	27	
Irgacure	0.005	340.32	0.00001	0.1	
Distile su (dH ₂ O)					8000

Kimyasallar	Eş Değerlik	Moleküler Ağırlık (g/mol)	n (mmol)	Miktar (mg)	Hacim (μL)
PEGdiMA	1	10000	0.00270	27	
Irgacure	0.005	340.32	0.00001	0.01	
Distile su(dH ₂ O)					8000

Tetra-kiss-thiol Pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionate)
Sigma-Aldrich 38146-100 mL

Kimyasallar	Eş Değerlik	Moleküler Ağırlık (g/mol)	n (mmol)	Miktar (mg)	Yoğunluk (g/mL)	Hacim (μL)
PEGdiMA	1	2000	0.0135	27		
Irgacure	0.005	340.32	0.0001	0.0230		
Tetrakiss-thiol	0.60	488.66	0.0081	3.96	1.28	3.09
Distile su(dH ₂ O)						8000

Kimyasallar	Eş Değerlik	Moleküler Ağırlık (g/mol)	n (mmol)	Miktar (mg)	Yoğunluk (g/mL)	Hacim (μL)
PEGdiMA	1	6000	0.0045	27		
Irgacure	0.005	340.32	0.0001	0.0077		
Tetrakis-thiol	0.60	488.66	0.0081	1.32	1.28	1.03
Distile su(dH ₂ O)						8000

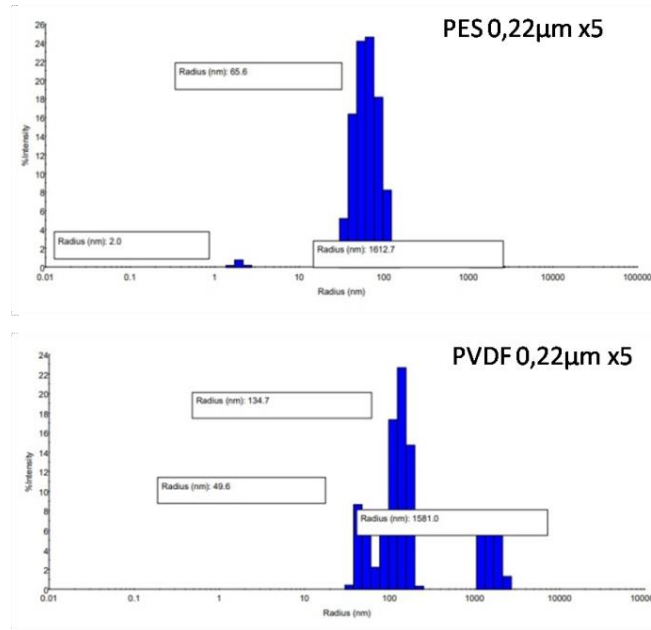
Kimyasallar	Eş Değerlik	Moleküler Ağırlık (g/mol)	n (mmol)	Miktar (mg)	Yoğunluk (g/mL)	Hacim (μL)
PEGdiMA	1	10000	0.0027	27		
Irgacure	0.005	340.32	0.0001	0.0046		
Tetrakis-thiol	0.60	488.66	0.0016	0.79	1.28	0.62
Distile su(dH ₂ O)						8000

3.3. PEG bazlı nanoparçacıkların karakterizasyonu

3.3.1. Elde edilen nanoparçacıkların saflaştırılması ve boyut ölçümleri

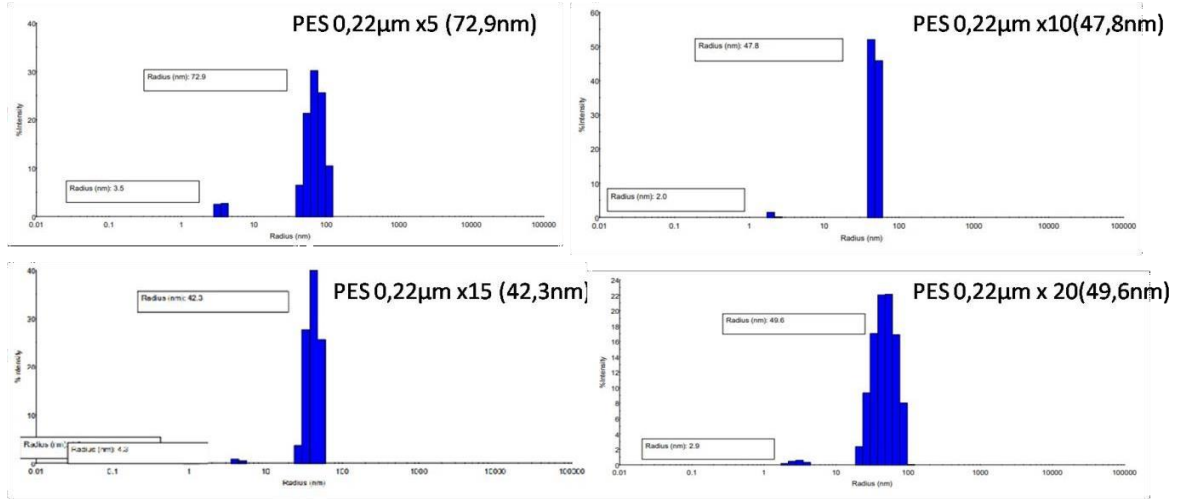
Elde ettiğimiz bu parçacıkların thiol grubu olanlarına ve olmayanlara aynı saflaştırma işlemleri uyguladık. Bu saflaştırma işlemlerinde ilk önce şırınga filtresiyle manüel (el ile) filtrasyon uygulayarak uzaklaştırmak istediğimiz büyük agregatlardan kurtulduk. Bunun için 2 çeşit şırınga filtresi kullandık: gözenek büyüklüğü 0,22 μm olan PES (Polyethersulfonate) ve 0,22 μm PVDF (Polyvinylidene Flouride) filtreleri. Filtrelerin ıslanması için hazırlanan malzemeleri geçirirmeden önce membranların ıslanmasını sağlamak için birkaç kez distile sudan geçirdik, daha sonra hazırladığımız parçacıkları şırınga yardımıyla

çeşitli sayıda membranlardan geçirerek parçacıkların optimizasyonun sağlamaya çalıştık. Bu filtreleme işlemini kontrollü bir şekilde yapmak için parçacık boyutu ölçen DLS (Dynamic Light Scattering) cihazını her aşamada kullandık. Parçacık boyutuna göre standardize edilmiş bir prosedür oluşturmaya çalıştık. Bu denediğimiz optimizasyonlar aşağıda ayrıntılarıyla belirtilmiştir. Kullanmış olduğumuz membran filtrelerin farkını anlamak için PES ve PVDF filtrelerinden, hazırlamış olduğumuz nanoparçacık solüsyonunu (PEG2K-diMA ile yapılan tiyolsüz) ikiye bölerek eşit sayıda geçirip DLS cihazında parçacık boyutuna baktık. PES 0,22 μm filtresinde daha az agregat kaldığı ve sağlıklı (tekrarlanabilir) ölçüm alındığı görüldü (Şekil 3.6).



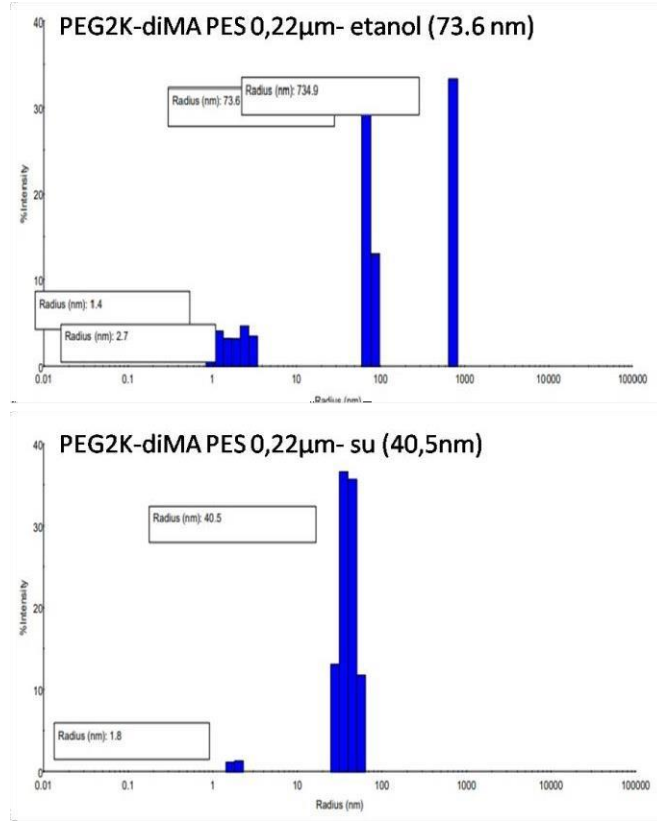
Şekil 3.6. Filtre tipinin boyuta farkı

Daha sonra PEG2K-diMA için hazırlanan malzemeler, 5-10-15-20 kez filtreleme yapılarak parçacık boyutu etkilerine (Şekil 3.7) bakıldı.



Şekil 3.7. Filtre sayısının boyuta etkisi

Sayılarla göre yaptığımız filtrasyonun 5 ile 10 arasında boyut farkının olduğunu fakat 10 ile 15 arasında farkın daha az olduğu ve 20'den sonra yaklaşık kaldığı sonucuna ulaştık ve filtrasyon sırasında malzeme kaybının olmaması açısından 10 kez filtrasyonun uygun olacağı sonucuna vardık. Daha sonra malzemeyi çözdüğümüz çözücünün etkisine bakmak için yine aynı polimeri (PEG2K-diMA) kullanarak tiyolsüz olacak şekilde nanoparçacık hazırladık. 2 ayrı deney düzeneği hazırlayarak birinde karışımı su içerisinde diğesinde ise ethanol içerisinde hazırladık ve PES filtrelerine karşı boyut ölçümlerini aldık. Şekil 3.8. 'de kullanılan çözücünün boyuta etkisinin DLS analizi ile sonuçları verilmiştir.

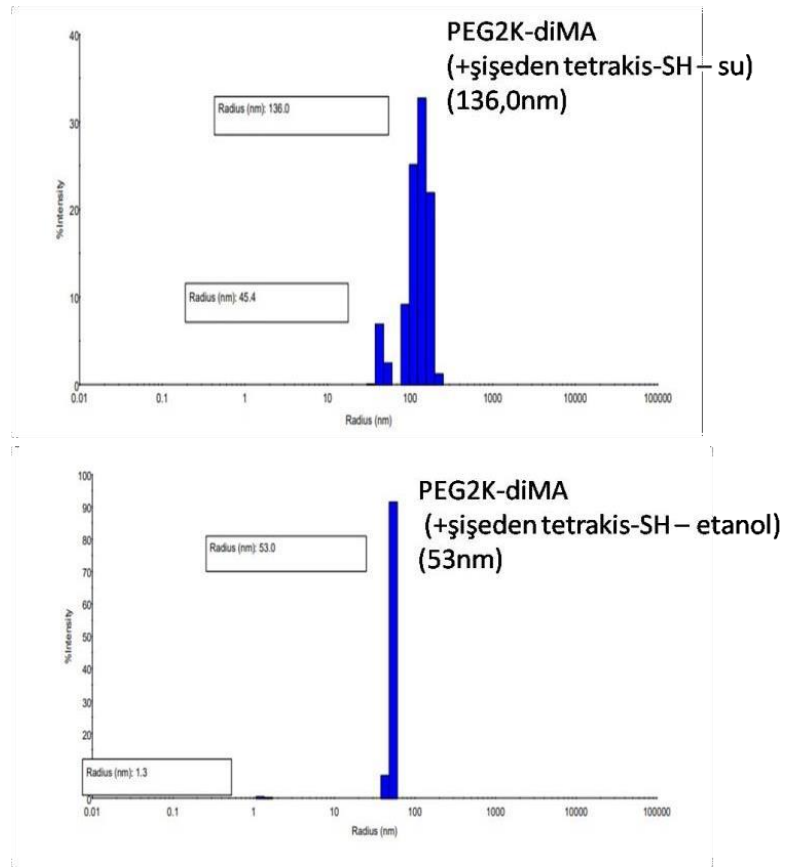


Şekil 3.8. Çözücünün boyuta etkisi

Yaptığımız ölçümlerde etanol çözücüsüyle yapılan nanoparçacık solüsyonunda oldukça fazla agregatların olduğu ve beklenen hızda filtrasyonun yapılamadığı görülmüştür. Bu durum, etanolün fitrenin membranına zarar verdiğini düşündürmüştür. Deiyonize su ile yapılan malzemenin daha rahat filtrelenebildiği, alınan DLS sonuçlarının ise daha stabil ve düzgün olduğu görülmüştür.

İmmobilizasyon için nanoparçacıkların yapısında olmasını istediğimiz tiyol (-SH) gruplarını oluşturmak için, nanoparçacık yapım aşamasında ortama Pentaerythritol tetrakis(3- mercaptoproppionate) ekledik. Bu malzeme ortama 2 farklı şekilde eklendi: hem direk şişeden istenilen miktarda çekip karışıma

ekleyerek deneme yapıldı hem de etanolde stok solüsyon hazırlayıp, istenilen miktarı (yaklaşık 20-50 µL) bu solüsyondan çekip karışıma ekleyerek nanoparçacık yapımı tekrarlandı. Daha sonra elde edilen karışımları sırasıyla 20 dakika olacak şekilde UV lambasının altında döndürerek inkübe ettik ve oluşan nanoparçacıkların boyuta olan etkisini DLS cihazında ölçümler yaparak inceledik ve sonuçlar Şekil 3.9.'da verilmiştir.



Şekil 3.9. Tetrakis-tiyol molekülünün çözücüsünün boyuta etkisi

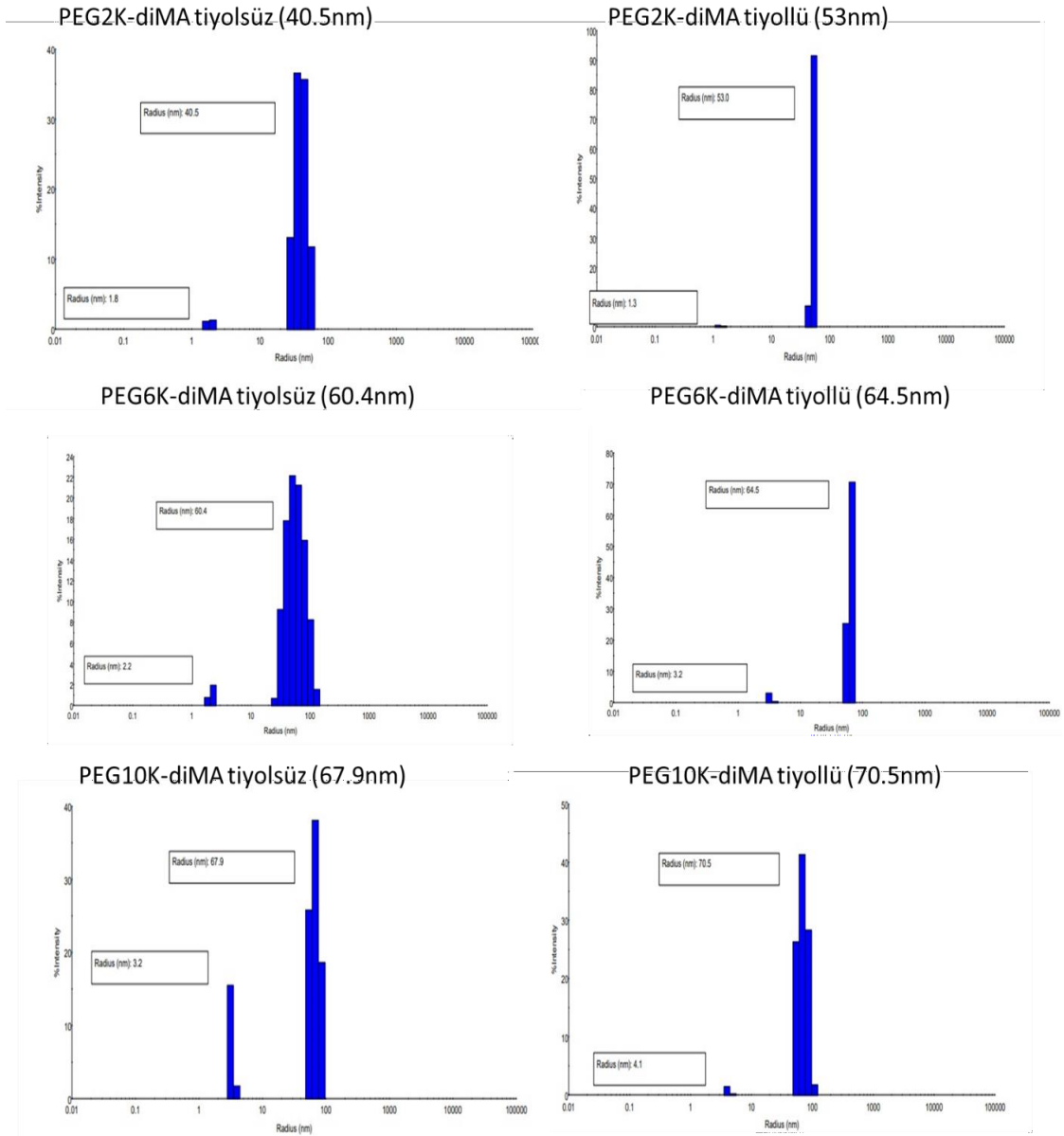
Boyut ölçümü sonuçlarına bakarak, thiol grubu oluşturmak için eklediğimiz tetrakis-tiyol malzemesinin çok yapışkan olması nedeniyle önce etanolde stok solüsyonunu hazırlayıp nanoparçacık karışımına eklemenin, daha düzgün

nanoparçacıkların oluşmasına olanak sağlayacağı sonucuna ulaştık. Nanoparçacık yapılırken, yapıda ekstra -SH olmasını istediğimizden, polimerdeki metakrilat grubu miktarına göre 1,5 kat fazla tetrakis-tiyol koymuştuk. PEG2K-diMA polimeri için, gerekli tetrakis-tiyol miktarı 103 µL, PEG6K-diMA polimeri için 6k için 34,3 µL ve PEG10K-diMA polimeri için için 20 µL şeklindedir. Thiol grubu olmayan (NP1-3) ve olan (NP4-6) nanoparçacıkların boyutları Şekil 6'da gösterilmiştir.

Nanoparçacık solüsyonlarının şırınga filtrelemesi sonrası büyük agregatlardan (çökeltilerden) uzaklaştırılmasından sonra ise, sensör yüzeyinde yer tutmaması amacıyla ortamdaki küçük parçacıklardan ve safsızlıklardan kurtulmak amacıyla santrifüj yardımlı ultra-filtrasyon tüplerini de kullandık. Bu tüplerin içerisinde farklı Mwt cut-off değerlerine sahip diyaliz membranları bulunmaktadır. Bu çalışmada Amicon (Mwt cut-off: 1000 kDa) tüpleri kullanılmıştır. Santrifüj yardımıyla tüpün üstüne konulan solüsyon, belli rpm değerlerinde ve farklı dakikalarda çevrilerek sıvının bir kısmının membranlardan geçip aşağı gelmesi sağlanır. Bu sırada, yukardaki solüsyonda bulunan ve moleküler ağırlığı 100kDa'dan küçük tüm safsızlıklar da solüsyonla birlikte aşağı iner. Böylece total nanoparçacık solüsyonundaki küçük moleküler ağırlıktaki tüm safsızlıklardan kurtulunmuş olunur.

Bu projede hazırlanan NP4-6 için, santrifüj sonrası membranın içinde, yani tüpün üst tarafında kalan saf nanoparçacık solüsyonunu alarak analizlere devam edildi.

Denenen farklı rpm ve zamandaki santrifüj işlemleri sonrası kalan nanoparçacık solüsyonundan yapılan DLS ölçümleri sonrası, bu santrifüj yardımcı ultra-filtrasyon işlemini oda sıcaklığında, 3 dakika boyunca ve 1700 rpm'de döndürerek yapmaya karar verildi.

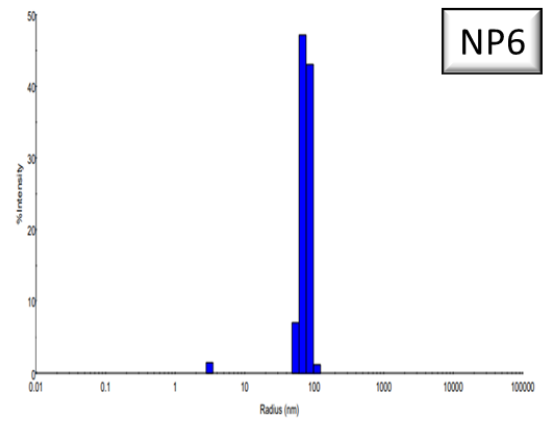
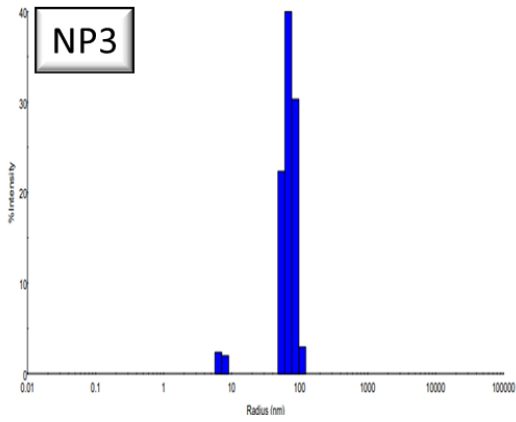
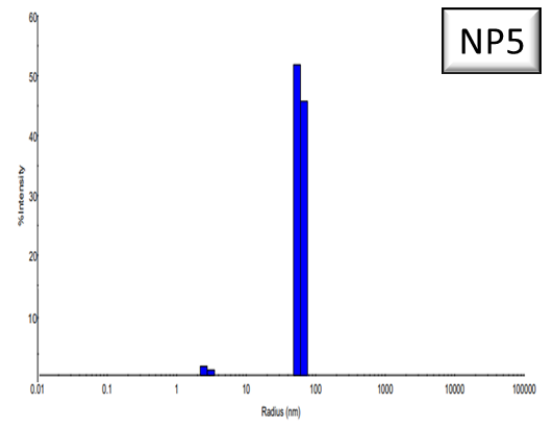
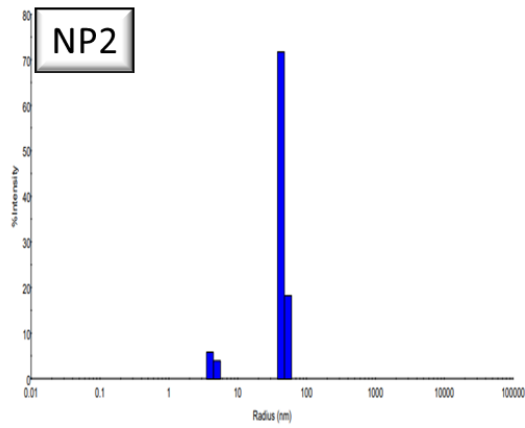
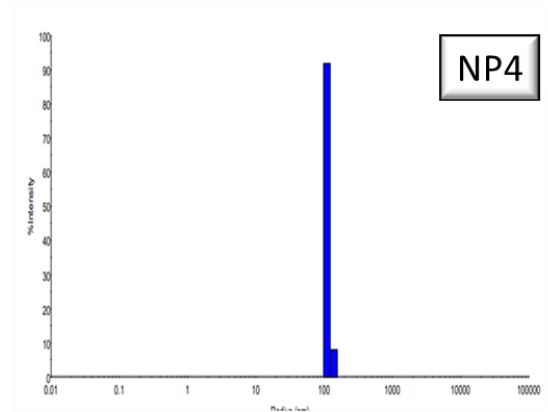
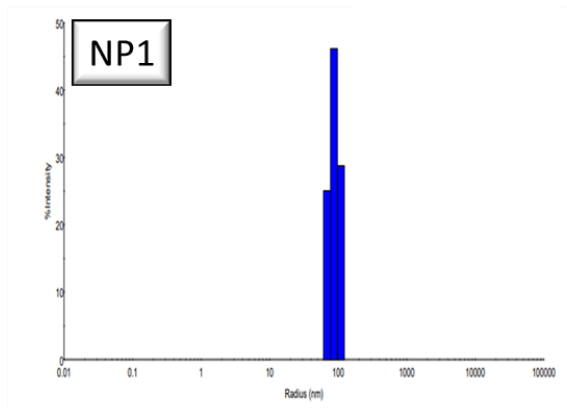


Şekil 3.10. Hazırlanan tüm tiyolsüz ve tiyollü nanoparçacıkların şırınga filtrasyonu sonrası elde edilen son ve en düzgün DLS sonuçları

A	B	Boyutlar	
		Uzunluk	12.1 cm
		Çap	2.97 cm
		Filtrasyon Alanı	7.6 cm ²
		Min. Final Konsantrasyon Hacmi	200 µL
		Hacim	15 mL

Şekil 3.11. Kullanılan Amicon tüplerinin bilgileri (A) Tüpün resmi, (B) Tüp boyutları

Ayrıca bu işlemi aynı nanoparçacık solüsyonu için, her ara adımda temiz çözücü ekleyerek 3 kez yaptığımızda daha saf bir nanoparçacık solüsyonu elde ettiğimizi gördük. Şekil 3.12’de, tepkime sonrası 10 kere 0.22 µm’lik şırınga filtrelerinden geçirilen, sonra da distile suya karşı 3 kere Amicon ultra-filtrasyon tüpleriyle santrifüj edilerek saflaştırılan tiyollü ve tiyolsüz nanoparçacıkların DLS boyut analiz sonuçları görülebilir (Tablo 3.3.).



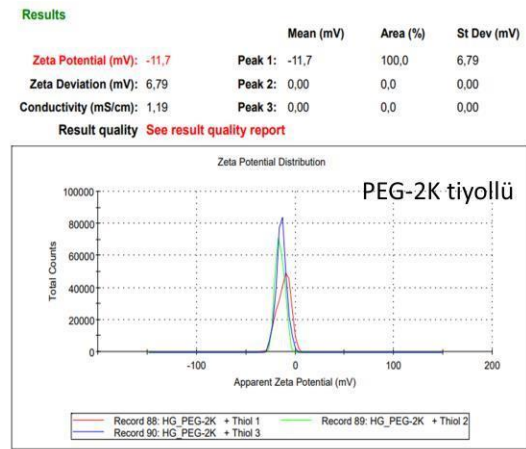
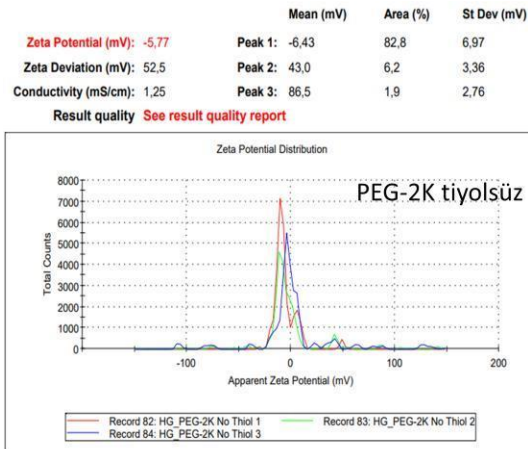
Şekil 3.12. Hazırlanan tüm tiyolsüz (NP 1-3) ve tiyollü (NP4-6) nanoparçacıkların sıringa filtrelemesi sonrası elde edilen son ve en düzgün DLS sonuçları

Tablo 3.3. Nanoparçacıkların DLS ile alınan boyut (ÇAP) analizi sonuçları

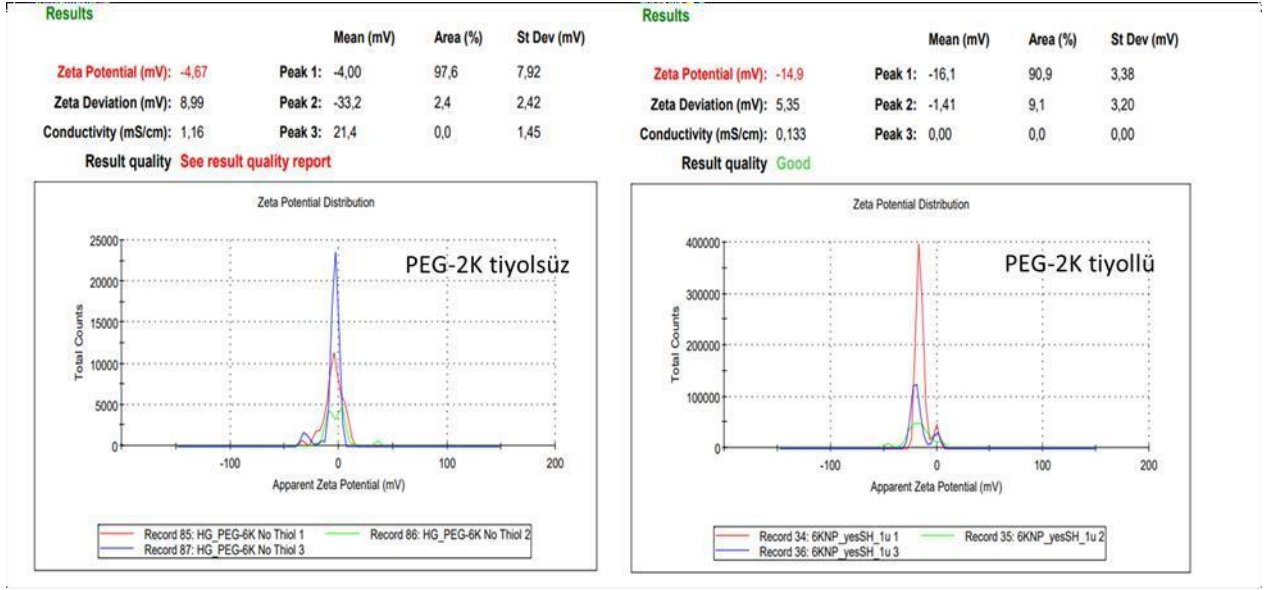
NP	NP1	NP4	NP2	NP5	NP3	NP6
boyut (nm)	177,5	224,5	89,6	121,3	144,1	151,6

3.3.2. Elde edilen nanoparçacıkların yüzey yükü ölçümleri

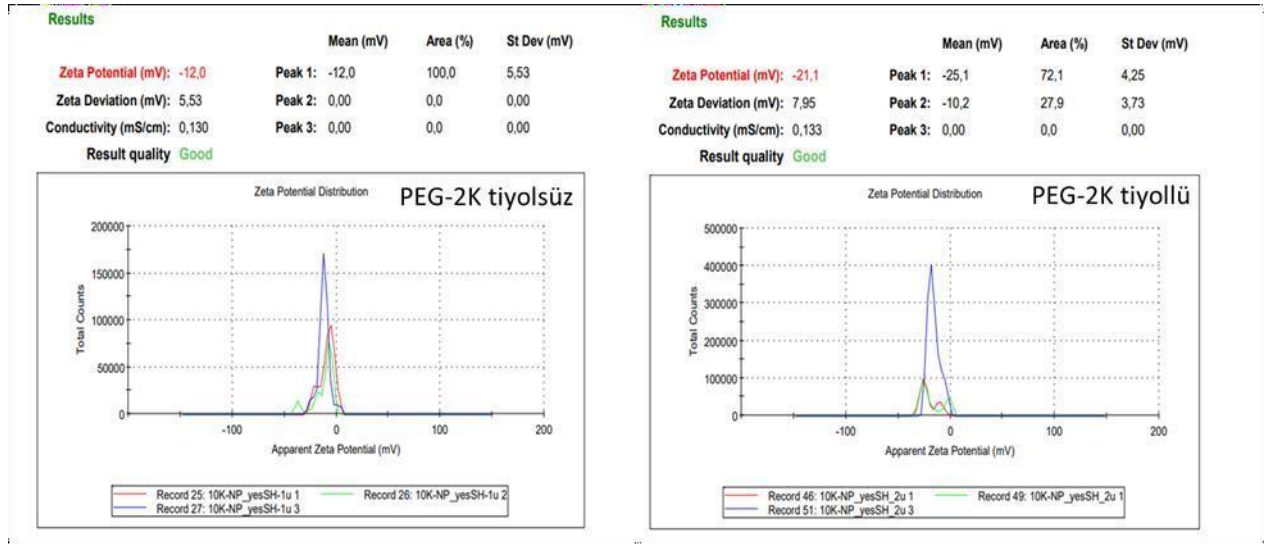
Hazırlanan PEG bazlı nanoparçacıkların hem tiyol grubu içermeyen hem de tetra-kis molekülü eklenerek serbest tiyol gruplarının eklendiği hallerinin 10 mM NaCl içerisinde hacimce %10 olacak şekilde seyreltilerek ve oda sıcaklığında alınmış zeta potansiyeli (yüzey yükü boyut) analizleri aşağıda verilmiştir (Tablo 3.4.).



Şekil 3.13. (A) tiyolsüz ve (B) tiyollü PEG-2K Np'lerin yüzey yükü sonuçları



Şekil 3.14. (A) tiyolsüz ve (B) tiyollü PEG-6K Np'lerin yüzey yükü sonuçları



Şekil 3.15. (A) tiyolsüz ve (B) tiyollü PEG-10K Np'lerin yüzey yükü sonuçları

Tablo 3.4. Nanoparçacıkların Zeta Potansiyeli ölçüm sonuçları

NP	NP1	NP4	NP2	NP5	NP3	NP6
Zeta Potansiyel (mV)	-5,77	-11,7	-4,67	-14,9	-12	-21,1

3.3.3. Elde edilen nanoparçacıkların tiyol miktarı ölçümleri

Tüm yapılan karakterizasyon adımları sonrası, sensör yüzey kaplamalarına geçmeden önce, özellikle sensör altın kaplaması ile yarı-kovalent bağ oluşturarak yüzeye immobilize olması beklenen tiyollü nanoparçacıklar için, yapılarında ne kadar tiyol olduğunu gösteren Ellman's reagent protokolü uygundu.

Ellman's reagent protokünün hazırlanması;

DTNB olarak da bilinen 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoik asidi), solüsyondaki serbest sülfhidril gruplarının miktarını belirlemek için suda çözünür çok yönlü bir bileşiktir. Bu bileşiğin bir çözeltisi, sülfhidrillerle reaksiyona girdiğinde ölçülebilir sarı renkli bir ürün üretir.

İlk etapta kullanılacak solüsyonları hazırlandı;

Reaksiyon Tamponu: 0,1 M sodyum fosfat ve pH 8,0, 1 mM EDTA içerir.

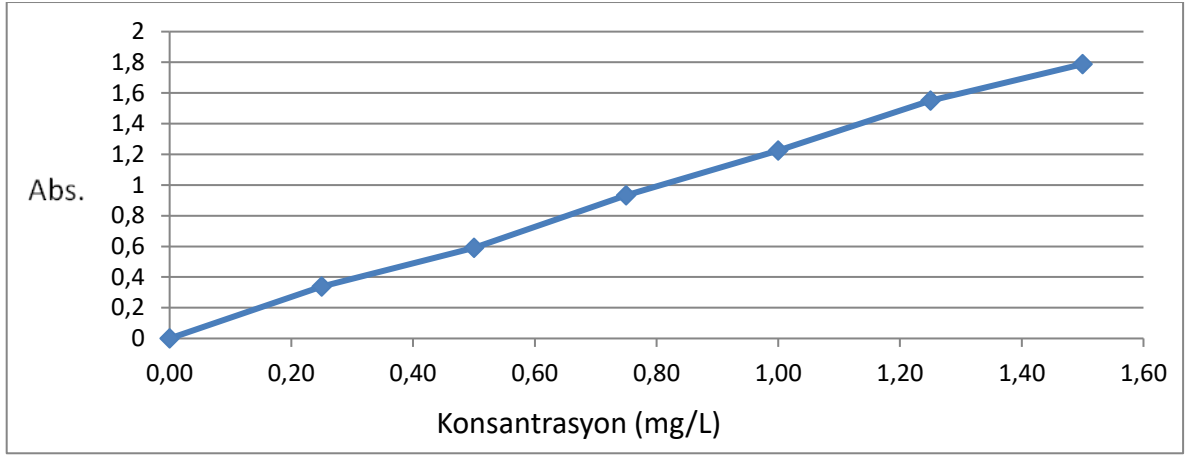
Ellman Reaktif Solüsyonu: 4 mg Ellman Reaktifi, 1 mL reaksiyon tamponunda çözülür.

Daha sonra, kimyasal yapısında 1 adet serbest tiyol (-SH) grubu bulundurduğundan emin olduğumuz ticari olarak satın alınmış saf "Sistein Hidroklorür Monohidrat" kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda Reaksiyon Tamponunda solüsyonunu hazırladık. Bu solüsyonlardan istenilen (Tablo 3.5) miktarda alıp seyrelterek, bu protokolde kullanılacak standart örneklerini hazırlamış oldu.

Tablo 3.5. Ellman's deneyi için standart olarak solüsyon hazırlamak için gerekli hesaplamalar

Standart	Reaksiyon tamponunun hacmi	Sistein miktarı (M.A.=175.6)	Son konsantrasyonu
A	100 mL	26.34 mg	1.5 mM
B	5 mL	Standart A'dan 25mL	1.25 mM
C	10 mL	Standart A'dan 20 mL	1.0 mM
D	15 mL	Standart A'dan 15 mL	0.75 mM
E	20 mL	Standart A'dan 10 mL	0.5 mM
F	25 mL	Standart A'dan 5 mL	0.25 mM
G	30 mL	0 mL	0.0 mM (boş)

Bu standart solüsyonlarından 250 µL alıp, üzerine 50 µL Ellman's reagent solüsyonundan ve Reaksiyon Tamponundan 2,5 mL ekledik ve karanlıkta 15 dakika boyunca inkübe ettik. Daha sonra bu solüsyonların, Ellman's reagent'in maksimum absorbans verdiği bilinen dalga boyunda (412 nm) UV-Vis Spektrofotometresini kullanarak analiz ettik. Konsantrasyonu bilinen bu örneklerin tek tek 412 nm'de absorbansı alındıktan sonra, cihazda kalibrasyon eğrisini çizdik. Burdaki amaç, içerdiği tiyol miktarı bilinmeyen bir örneğe de aynı hazırlık protokolüyle yaklaştığımızda, 412 nm'deki absorbansından, tiyol miktarını kantitatif olarak hesaplayabilmektir. Hazırlanan kalibrasyon eğrisi aşağıda verilmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Hazırlanan kalibrasyon eğrisi

Bu kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra, eldeki nanoparçacık solüsyonlarına aynı prosedür uygulanmıştır. Kısaca, bu nanoparçacık solüsyonlarının hepsi aynı hacme (5 mL) getirilmiş ve içlerinden 250 μ L alınıp, üzerine 50 μ L Ellman's reagent solüsyonundan ve Reaksiyon Tamponundan 2,5 mL eklenmiştir. Bu solüsyonlar karanlıkta 15 dakika boyunca inkübe edildi ve Şekil 3.17'de görüldüğü gibi, tiyollü nanoparçacık solüsyonu sarıya dönerken, tiyolsüz nanoparçacıkta renk değişimi olmamıştır. Bu durum, tiyollü nanoparçacıklar için ortamda tiyol gruplarının varlığını göstermektedir.



Şekil 3.17. Ellman's assay için hazırlanan tiyolsüz (solda) ve tiyollü (sağda)

nanoparçacık solüsyonları

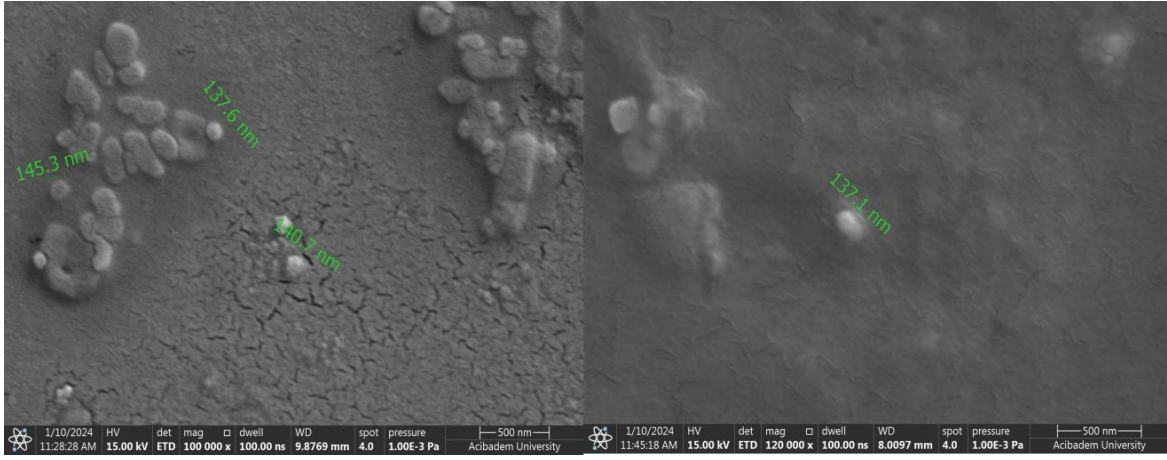
Tablo 3.6. 'da elde edilen tiyollu ve tiyolsuz nanoparçacıklarının Ellman's assay standartı ile tiyol miktarları verilmiştir.

Tablo 3.6. Tiyollü ve tiyolsüz nanoparçacıklar için elde edilen Ellman's assay sonuçları

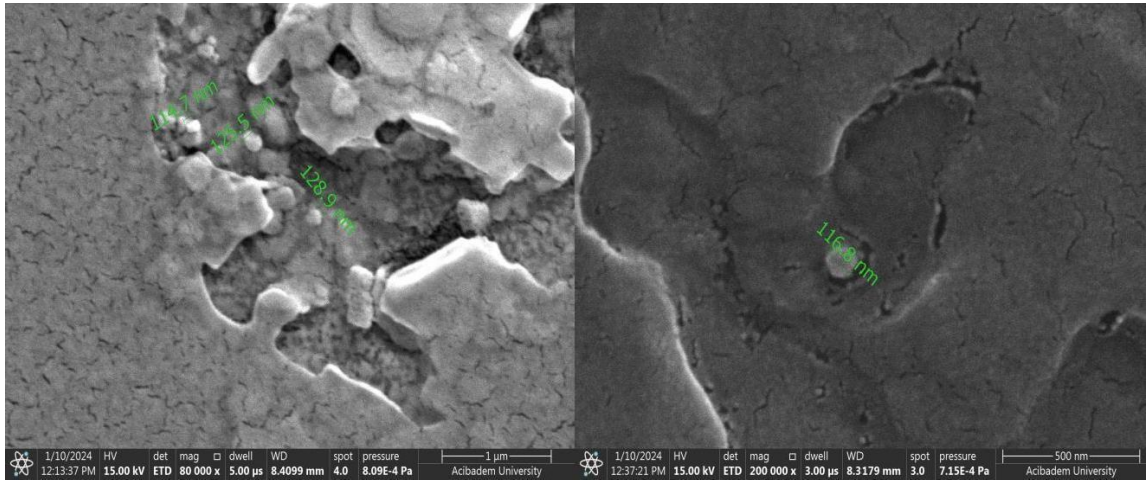
NP	NP1	NP4	NP2	NP5	NP3	NP6
Ölçüm sonuçları	0,19	1,54	0,191	1,806	0,201	0,635
Net tiyol miktarı (mM)	0	1,35	0	1,615	0	0,434

3.3.4. Elde edilen nanoparçacıkların morfolojik analizleri

Hazırlanan nanoparçacıkların morfolojik özellikleri, Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) kullanılarak yapıldı. Kurutulmuş örnekler kullanılarak yapılan SEM görüntülenmesi yüksek vakum altında gerçekleştirilmiştir. Nanoparçacık içeren su bazlı örnekler, karbont bantların üzerine konulmuş ve havaya açık olarak kurutulmuştur. Daha sonra örneklerin üzeri 50 nm kalınlığında olacak şekilde Vakum püskürtmeli kaplayıcı (Leica EM ACE200) cihazı kullanılarak altınla kaplandı. Stub üzerine yerleştirilen örnekler, yüksek vakum altında görüntülendi. (Şekil 3.18., Şekil 3.19. ve Şekil 3.20.) Örneklerin, boyut sonuçları Tablo 3.7. 'da verilmiştir.



Şekil 3.18. (A) tiyolsüz ve (B) tiyollü PEG-2K Np'lerin SEM görüntüleri



Şekil 3.19. (A) tiyolsüz ve (B) tiyollü PEG-6K Np'lerin SEM görüntüleri



Şekil 3.20. (A) tiyolsüz ve (B) tiyollü PEG-10K Np'lerin SEM görüntüleri

Tablo 3.7. Nanoparçacıkların karbon bandı üzerinde alınan boyut değerleri

NP	NP1	NP4	NP2	NP5	NP3	NP6
karbon bandı üzerinde boyut (nm)	137,6	137,1	114,7	116,8	101,8	122,2

EDS yarı kantitatif elemental analizi, örneklerin karbon bandı üzerinde damlatılarak yapılır. Hazırlanan nanoparçacıkların serbest tiyol gruplarının incelenmesi için de yine bu karbon bantları kullanılmıştır. Su içerisinde disperse olan nanoparçacıklardan mikropipet yardımıyla yüzeyi kaplayacak kadar alıp, ayrı ayrı olacak şekilde karbon bandı üzerine damlatılmıştır. Çeker ocak içerisinde açık havaya maruz kalarak kurutulan örnekler, daha sonra 50 nm altın ile kaplanarak SEM cihazının EDS dedektörü kullanılarak analizi edilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda nanoparçacıkların yapısındaki sülfür atomunun varlığı, her bir nanoparçacıkta benzer miktarda görülmüştür (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. Nanoparçacıkların karbon bandı üzerinde alınan EDS sonuçları

NP	NP1	NP4	NP2	NP5	NP3	NP6
sülfür (ağırlık %)	0	0,3	0	0,2	0	0,3

Tablo 3.9. Hazırlanan nanoparçacıkların karakterizasyon detayları.

NP	PEG'in MW (kDa) ^a	Thiol miktarı (mM) ^b	DLS Çap (nm) ^c	PDI (%)	Yoğunluk (%)	SEM Çap (nm) ^d	Yüzey Yükü (mV)
NP1	2	-	177.5	17.28	100	137.6	-5.77 ± 1.87
NP2	6	-	89.60	10.23	90.1	114.7	-4.67 ± 0.66
NP3	10	-	89.60	10.23	90.1	114.7	-4.67 ± 0.66

NP4	2	1.350	224.5	7.13	100.0	137.1	-11.7 ± 2.42
NP5	6	1.615	121.3	11.89	97.6	116.8	-14.9 ± 1.15
NP6	10	0.434	151.6	14.87	98.5	122.2	-21.1 ± 2.75

^aNanoparçacıkları yapmak için kullanılan PEG-diMA yapısındaki PEG polimerinin moleküler ağırlığı.

^bNanoparçacıklar için Thiol miktarları Ellman'ın testi ile ölçüldü.

^cBoyut ölçümleri dH₂O'da DLS cihazı ile yapıldı.

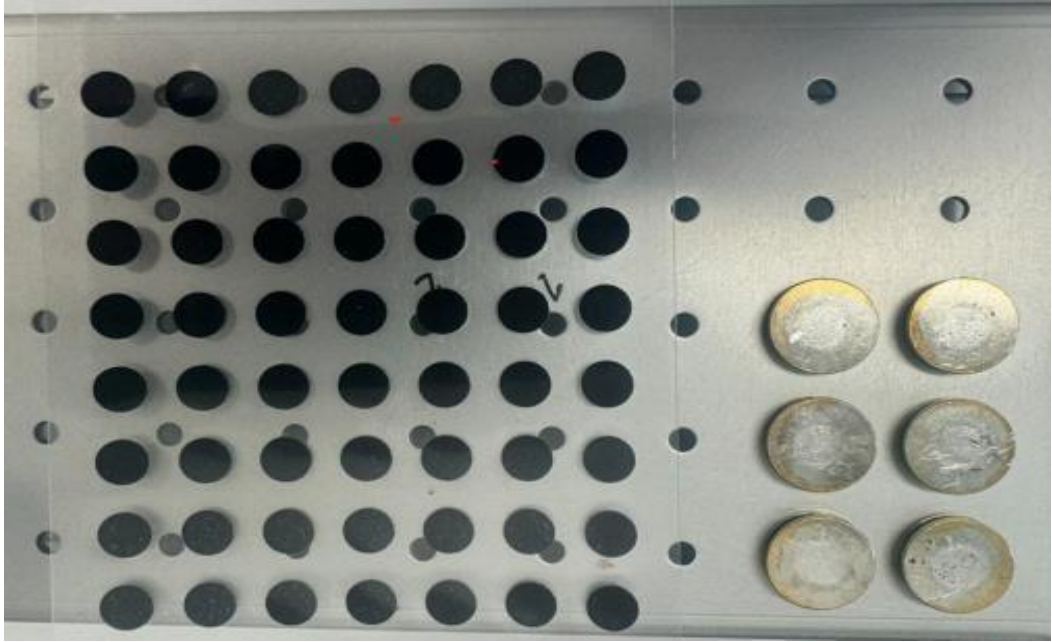
^dBoyut ölçümleri yüksek vakum altında SEM ile yapıldı.

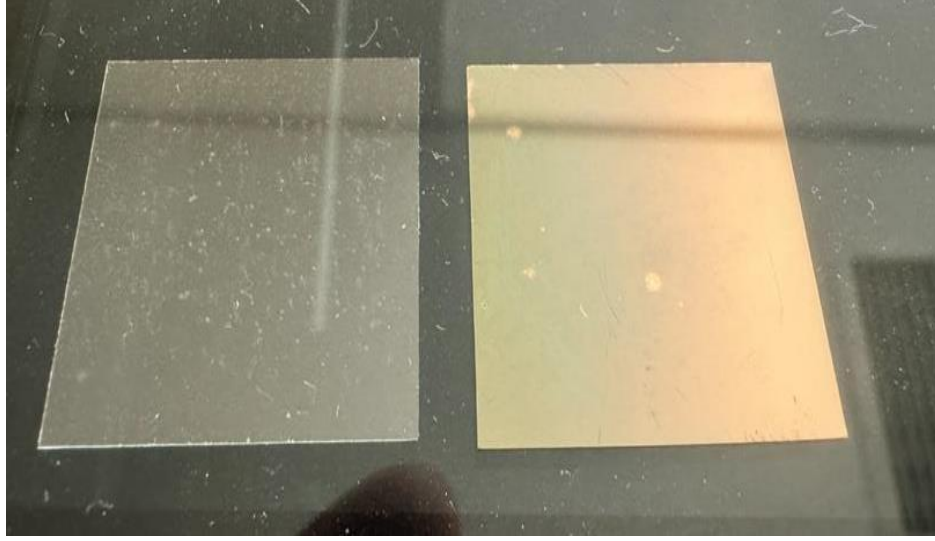
3.3.5. Elde edilen nanoparçacıkların kaplaması

Hazırlanmış olduğumuz ince film malzemelerini cam yüzeyine (lamel) spin kaplama cihazıyla kapladık. Bu cihaz, lameli vakum altında yüksek hızda döndürerek üzerine koyduğumuz solüsyonun eşit ve düzgün bir şekilde lamel yüzeyine kaplanmasını sağlar. Bu lineer polimerlerin, 50 mg/mL ve 100 mg/mL konsantrasyonlarında olacak şekilde deiyonize su içerisinde solüsyonlarını oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırarak hazırlandı. Maksimum 50 µL olacak şekilde lamelelerin üzerine konuldu ve bu “spin-coater” cihazı kullanılarak farklı metodlarda kaplamalar yapıldı. Uygulanan metodlarda, sabit rpm değerleri ile belli sürelerde kaplamalar denendi. Ayrıca farklı sürelerde (0,5, 1, 2, 4 dakika) ve farklı rpm değerleri (500, 1000, 2000 ve 3000) ile döndürme sağlayabilecek kademeli metodlar da oluşturuldu ve denendi. Hem hazırlanan linner polimer solüsyonları hem de saflaştırılan nanoparçacık solüsyonları için, kademeli olarak 1000 rpm’de 1 dakika boyunca yapılan kaplamanın, lamel yüzeyinde gözle de görülebilir bir polimer tabakası bırakabildiği görüldü.

Karşılaştırma olması adına, aynı solüsyonlar kullanılarak ayrı ve temizlenmiş lameller, bu solüsyonlarda tüm gece bekletildi ve “dip kaplama” denilen bu yöntemle elde edilen kaplı lamellerin yüzeyleri de temas açısı açısından analiz edildi.

Şekil 3.21. SEM ölçüm cihazı karbon bantları (sol) ve numune altlıkları (sağ)

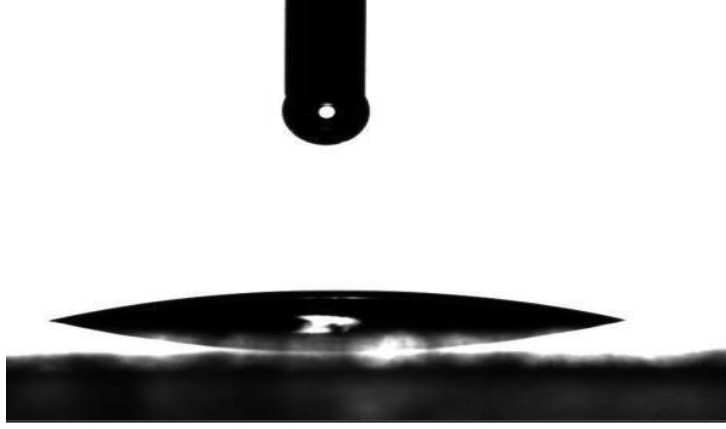




Şekil 3.22. Altın kaplanmamış cam ve 100 nm kalınlığında altın kaplanmış cam

3.3.6. Yüzeylerin temas açısı ölçümleri

Temas açısı ölçümü için, Biolin Scientific Attension ThetaLite cihazının “sessile drop” metodu kullanılmıştır. Distile suyu, hazırlanan kaplamalı lamellerin üzerine damlatarak fotoğraf çekimi yapan bu cihaz, çok kısa bir sürede çektiği onlarca resmi işleyerek, kaplamanın üzerindeki su damlasının yüzeye yaptığı açıyı hesaplar. Bu çalışmada, öncelikle “dispenser” denilen otomatik pipet ile yüzeye su damlatılmaya çalışıldı. Fakat bu pipet 5 μ L hacim altında su damlatamadığı için, cihazla uyumlu Hamilton iğneleri ile manuel damlatma yapıldı. Aşağıda, lineer polimerlerle hazırlanan solüsyonlarla yapılan döndürülerek kaplama (spin-coated) yüzeyler için elde edilen temas açısı ölçüm sonuçları görülebilir.



Şekil 3.23. Temas açısı ölçümü sırasında kullanılan su damlası görüntüsü

Tablo 3.10. Hazırlanan ince film ve nanoparçacık kaplı yüzeyler için alınan temas açısı ölçüm sonuçları

Malzeme	PEG 'in MA (kDa)	Su Temas Açısı (°)
Boş cam	-	24.07
NP1	2	9.75
NP2	6	20.35
NP3	10	12.42
NP4	2	26.28
NP5	6	18.67
NP6	10	12.64

3.4. Altın Yüzeylere Nanoparçacıkların Kaplanması

Hazırlanan nanoparçacıklar, QCM üzerindeki altın elektotlarına kaplanacaktır. Fakat QCM sensörleri pahalı olduğundan dolayı, cam üzerine altın kaplayarak QCM yüzeyi benzeri yüzeyler elde edilmiş ve öncelikle, nanoparçacıklar bu yüzeylere kaplanmıştır. Altın kaplı yüzeylerin hazırlanmasında ilk adım olarak cam yüzeyler temizlendi. Bunun için cam yüzeyler aseton, etanol ve distile su solüsyonları içinde 20 dk sürelerle ultrasonik homojinatörde bekletildi.

Temizlenen camlar azot gazı altında kurutuldu ve yine azot gazı ortamında muhafaza edildi. Daha sonra, bu temizlenen camlar üzerine metal kaplama cihazı kullanılarak yaklaşık 100 nm altın kaplandı ve elde edilen altın kaplı yüzeyler yine azot gazı altında muhafaza edildi.

Denenen Kaplama metodlarından bazıları şöyledir;

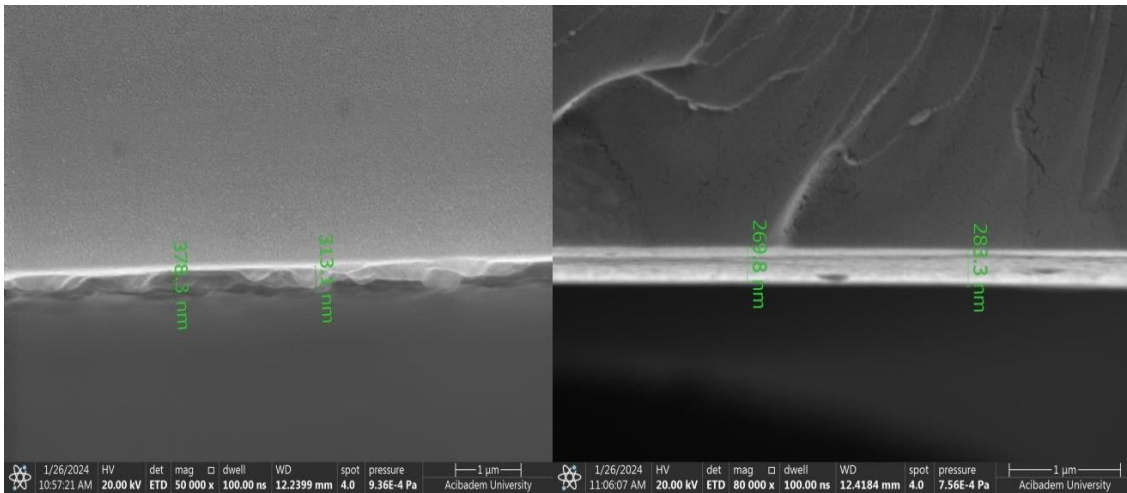
Daldırma Yöntemi (dip coating); Hazırlanan nanoparçacık (üç farklı moleküler ağırlıktaki PEG- diMA polimerleri ile (2K, 6K ve 10 kDa) solüsyonları bir beher içine yerleştirilerek altın kaplı cam yüzeyler eklendi ve çeker ocak altında 6 ve 12 saat beklenerek film oluşturulmaya çalışıldı. İnkübasyon süreleri sonrası, yüzeyler üzerinde oluşması beklenen nanoparçacık filmlerin gözle görülür bir şekilde düzgün olmadığı gözlemlendi.

Döndürerek Kaplama (spin coating); Hazırlanan nanoparçacık solüsyonları, temizlenen cam ve altın kaplı camların üzerine eklenerek 100, 500 ve 1000 rpm hızlarında karıştırıldı. Her bir solüsyon için 3 farklı karıştırma süresi (30 sn, 1 ve 2dk) uygulandı. Ardından solüsyonlardan çıkarılan bu yüzeyler, çeker ocakta kurutuldu ve yüzeylerde nanoparçacıkların düzgün bir film oluşturmadığı, düşük döndürme hızlarında yüzey üzerinde sıvı kaldığı ve kurutulunca adacıklı bir desen şeklinde filmlerin oluştuğu görülmüştür.

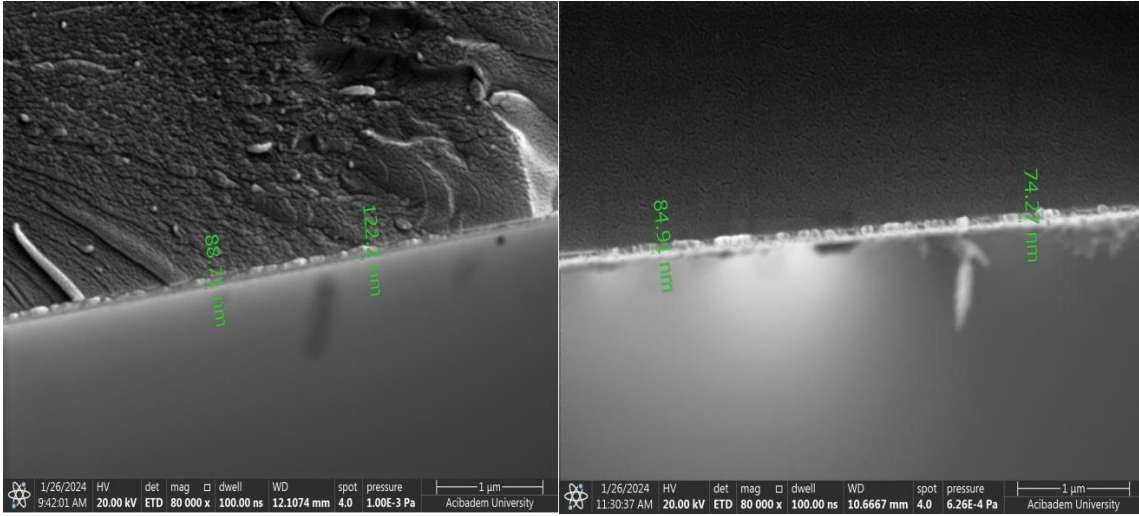
Püskürterek Kaplama; Bu yöntemde, mikropipetle hazırlanan düzenek denendi. Nanoparçacıkların distile suda süspansiyonuyla elde edilen solüsyonlar, öncelikli olarak denendi ve yüzeyler üzerinde düzgün film oluşturmadığı görüldü. Daha

sonra su içerisinde bulunan solüsyonlar -80 °C’de dondurulup liyofilizatörde kurutuldu ve nanoparçacıklar kuru olarak toz şeklinde bir ependorf tüpünün dibinde toplandı. Sonrasında bu toz nano parçacıklar, etanol içerisinde süspanse edildi ve DLS cihazında boyutlarına bakıldı. DLS cihazında nanoparçacıkların agregat oluşturduğu görüldü. Bu solüsyonlar, eş zamanlı olarak, hazırlanan püskürtme ile kaplama deney düzeneği denenerek film haline getirilmeye çalışıldı, fakat yine adacıklı yapı oluşturduğu görüldü.

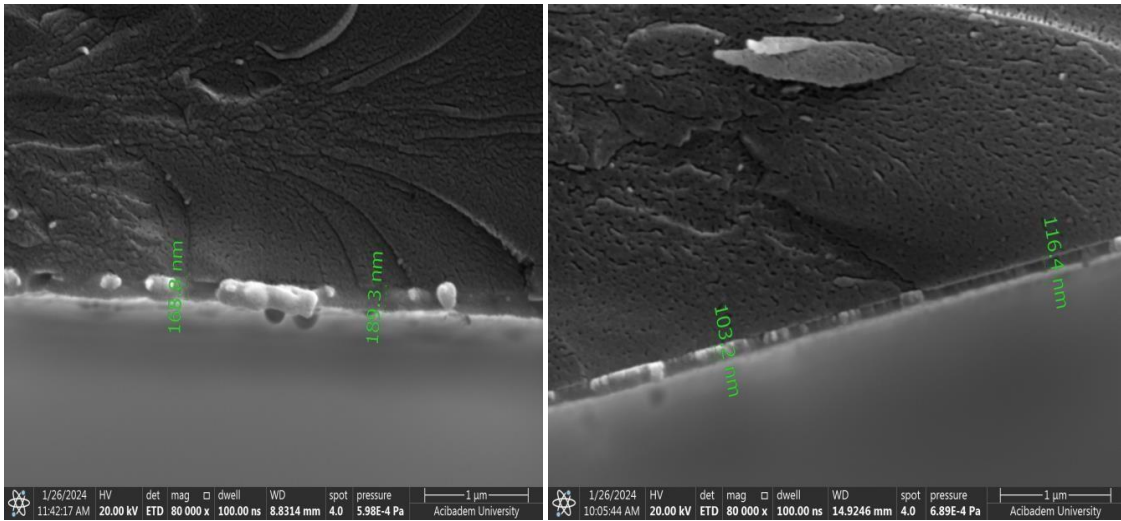
Orbital Karıştırıcı ve Döndürerek Kaplama; Bu yöntemde, nanoparçacık solüsyonları oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 30 saniye boyunca ve 500 rpm hızında karıştırıldı ve yüzeyler üzerinde yayılması sağlandı. Elde edilen camların kaplamasına, direk spin coater cihazında 1 dakika boyunca ve 1000 rpm hızında tekrardan solüsyon damlatılarak devam edildi ve elde edilen kaplamalar SEM cihazında görüntülenerek morfolojik analizleri yapıldı. Sonuçlar Şekil 3.24, Şekil 3.25 ve Şekil 3.26’da verilmiştir.



Şekil 3.24. Tiyolsüz ve tiyollü PEG-2K Np’lerin SEM görüntüleri ve kesit mesafesi



Şekil 3.25. Tiyolsüz ve tiyollü PEG-6K Np'lerin SEM görüntüleri ve kesit mesafesi



Şekil 3.26. Tiyolsüz ve tiyollü PEG-10K Np'lerin SEM görüntüleri ve kesit mesafesi

Altın ile kaplanan can yüzeylerin üzerine konulan ve kaplaması yapılan nanoparçacık solüsyonlarının yandan görüntülenmesi ile SEM resimleri alınmıştır. Cihazın kendi yazılımı kullanılarak yandan bakıldığındaki polimerik nanoparçacık kaplama kalınlığı ölçülmüştür. Buna göre, Tablo 3.11’de belirtilen değerlere bakıldığında, tiyol grubu olan naoparçacıklarla yapılan kaplamaların

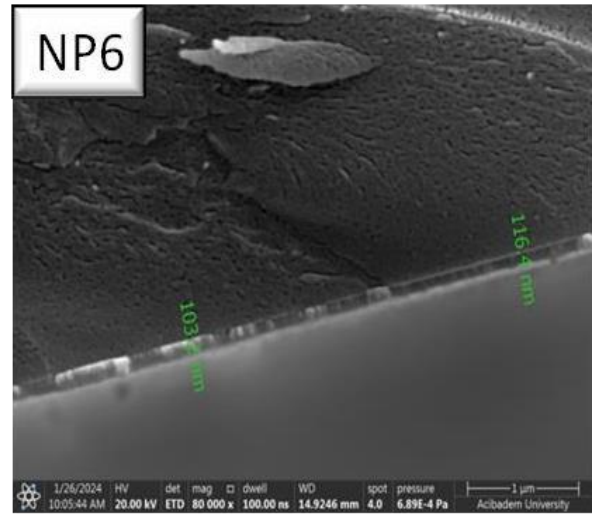
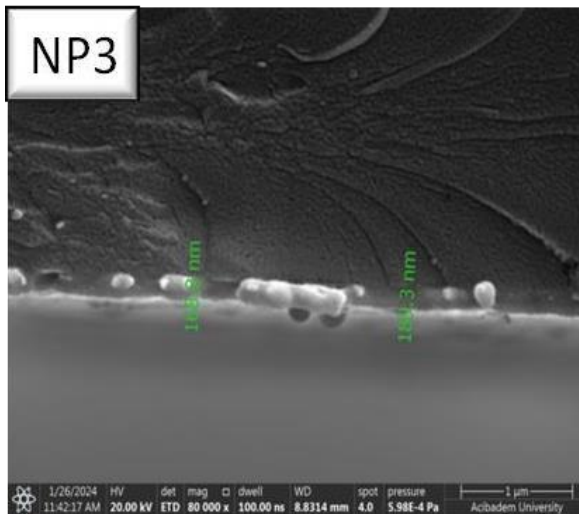
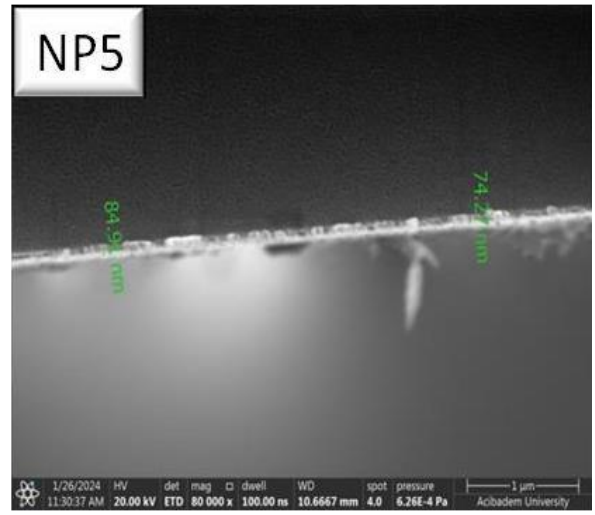
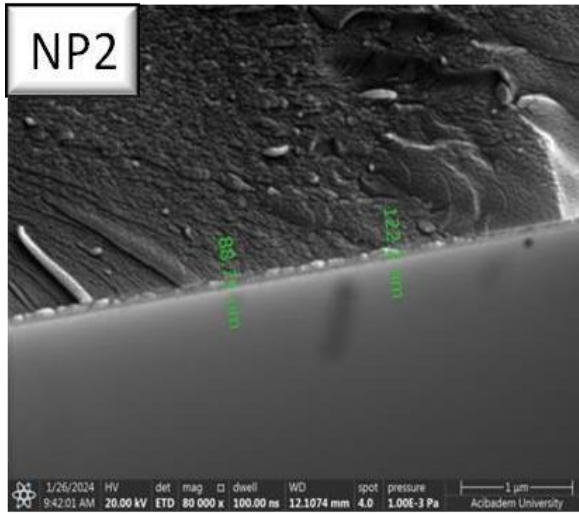
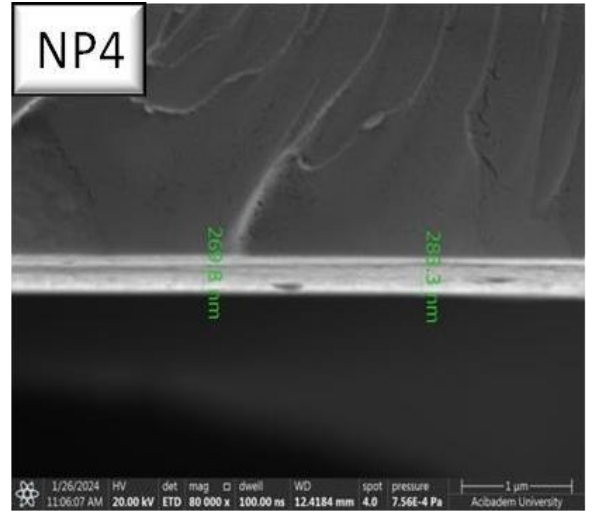
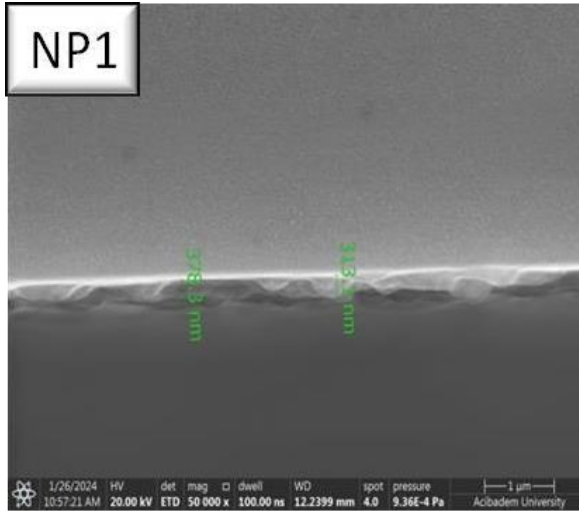
daha ince olduğu gör÷lmektedir. Bu durum, nanoparçacıkların tiyol grupları ile altın yüzeyine semi-kovalent bağ yaparak tutunduğunu işaret edebilir. Ayrıca, nanoparçacıkların serbest hallerinin DLS ile alındığı çap ölçümleri dikkate alındığında, özellikle 6K ve 10K boyutundaki polimerler ile yapılan nanoparçacıkların altın yüzey üzerinde monolayer oluşturdıkları söylenebilir. Bu nanoparçacıkların yüzey yüklerinin daha negatif olması, ikinci kat nano parçacık tabakasının yüzeye gelip yerleşmesine engel olmuş olabilir. Diğer yandan, 2K boyutundaki PEG-diMA ile yapılan nanoparçacıkların tabaka kalınlıklarına bakıldığında ise hem tiyollü hem tiyolsüz hallerinin multilayer oluşturduğu gör÷lmüştür.

Tablo 3.11. Altın kaplı yüzeylere kaplanan nanoparçacıkların SEM ile ölç÷len kaplama kalınlıkları

NP	PEG'in MA (kDa) ^a	Kalınlık (nm) ^b
Boş	-	-
NP1	2	378.3
NP2	6	122.1
NP3	10	189.3
NP4	2	283.3
NP5	6	84.9
NP6	10	116.4

^aAltın kaplı cam yüzeylerdeki nanopartikül katmanlarının kalınlığı SEM ile ölç÷ldü.

^bMaksimum değerler sunuldu.

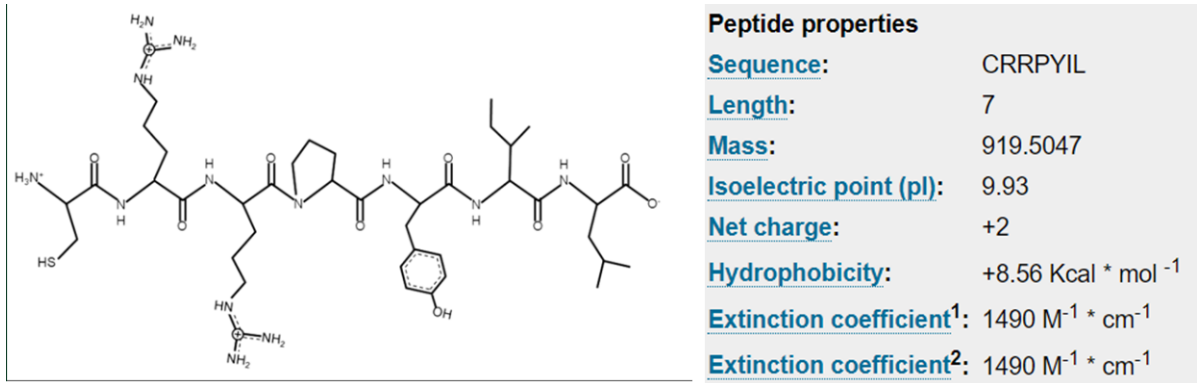


Şekil 3.27. Tiyolatlanmamış (NP1-3) ve tiyolatlanmış (NP4-6) nanopartikül kaplı altın yüzeylerin kesitlerinin karşılaştırmalı SEM görüntüleri.

3.5. Fonksiyonel Peptidin (PDS-NTS(8-13)) Sentezi ve Karakterizasyonu

Bir biyomolekölün nanoparçacıklarla kaplanmış altın yüzeylere konjugasyonu, NTS(8-13) peptidinin yüzeydeki tiyol gruplarına kimyasal bağlanmasıyla çalışılmıştır.

Pankreas kanser hücrelerinin membranında üretilen Nuerotensin II reseptörüne seçici ve yüksek afinite ile bağlanabilen Neurotensin peptidinin, bu bağlanmadan sorumlu 8-13 aminoasit dizi aralığı, küçük peptid dizisi olarak üretilmiştir. Peptid sekansı RRPYIL olan bu peptide, nanoparçacıkların yüzeyindeki serbest tiyol (-SH) grubuna bağlayabilmek için, bir ucuna Sistin amino aside (C) eklenmiştir. Şekil 3.28’de, sentezlenen peptidin kimyasal yapısı gösterilmiştir. (Şekil 3.28)



Şekil 3.28. CRRPYIL peptidinin yapısal özellikleri

NTS(8-13) peptidi, peptit sentez cihazı ile katı faz peptit sentez yöntemi ile N-terminalinde ek bir C (sistein) amino asidi ile sentezlendi. Amin reçinesi, peptit dizisinin büyümesi için kullanıldı ve ayrılmadan sonra peptit molekülleri soğuk

eterde çöktürülerek saflaştırıldı. Özetle, sentez ölçeği 0,1 mmol'e ayarlandı ve C terminali amid ucu olarak ayarlandı. 0,143 mg Rink Amid Protid reçinesi önceden tartılmış, peptid sentezinden önce neredeyse 30 dakika boyunca dimetilformamid (DMF) içerisinde şişmeye bırakılmıştır. Aktivatör olarak DIC kullanıldı ve 10,1 mL DMF içerisine 0,9 mL DIC eklenerek çözeltisi hazırlandı. Aktivatör bazı olarak oksima kullanıldı ve 6 mL DMF içerisinde çözüldü. Ayrıca korumanın kaldırılmasından sorumlu olan piperidin, 8 mL'si 32 mL DMF ile karıştırılarak hazırlandı. Her bir amino asit, DIC, oksima, reçine, piperidin ve DMF uygun şişelere yerleştirildikten sonra peptid sentezine başlandı. Reaksiyon devam etti ve bittikten sonra peptid, RazorPeptide Klevaj Sistemi (CEM) ile reçine kısmından ayrıldı. Bölünme kokteyli 4,75 mL trifloroasetik asit (TFA), 125 µL triizopropilsilan (TIS) ve 125 µL damıtılmış sudan oluşur. Bölünme 38 °C'de 30 dakika süreyle gerçekleştirildi. Bundan sonra, parçalanmış peptid soğuk dietil eter içerisinde çöktürüldü ve daha sonra iki kez 8000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüjden sonra dietil eter çıkarıldı ve peptid, gece boyunca vakum altında kurumaya bırakıldı.

Tablo 3.12. Peptid sentezinde kullanılan malzeme ve miktarları

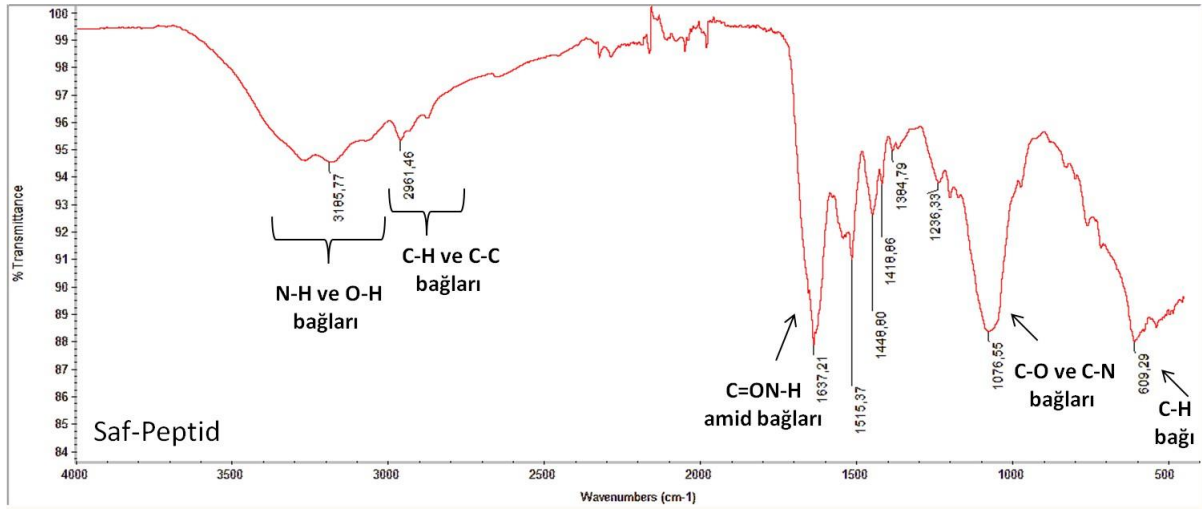
Malzemeler	Miktarlar
Arginine	1.56 g in 12 mL DMF
Cysteine	0.36 g in 3 mL DMF
Isoleucine	0.22 g in 3 mL DMF
Leucine	0.22 g in 3 mL DMF
Proline	0.21 g in 3 mL DMF

Tyrosine	0.28 g in 3 mL DMF
Resin mass required	0.143 g
Oxyma	0.853 g oxyma in 6 mL DMF
DIC	0.9 mL DIC in 10.1 mL DMF
Piperidine	8 mL piperidine in 32 mL DMF
Yıkama (DMF)	227 mL

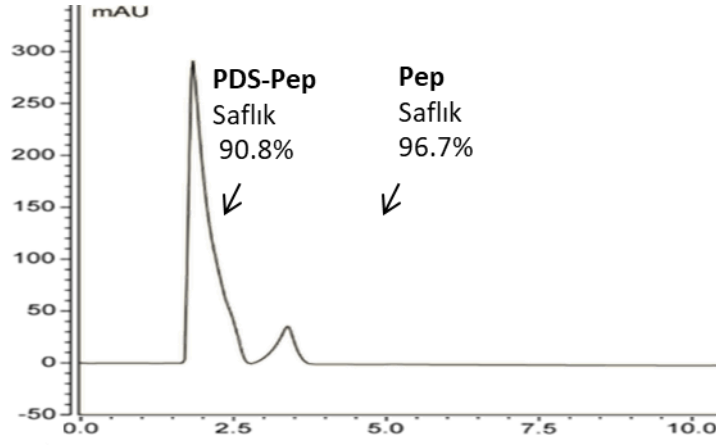
Peptid sentezinde saf elde edilen peptid miktarı: 94.6 mg

Kullanılan malzemelere göre maksimum elde edilebilecek peptid miktarı: 142.5 mg

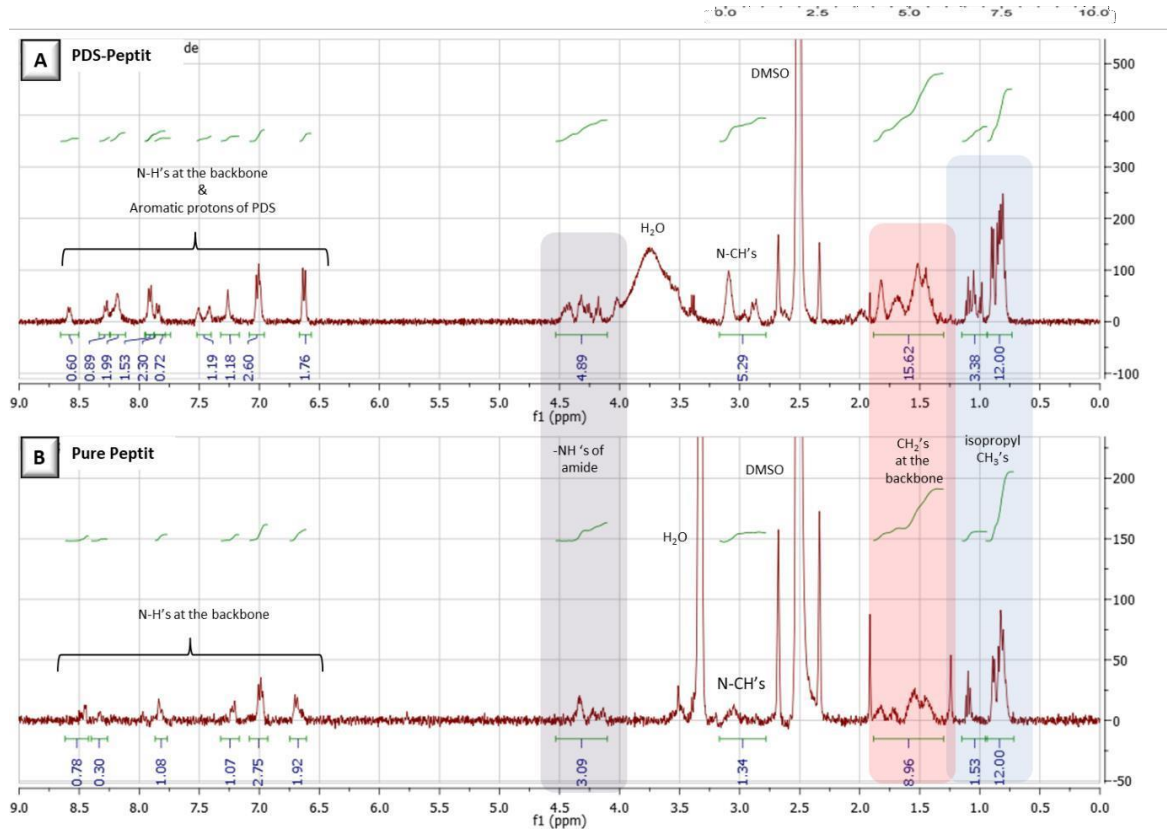
Verim = 66.4%



Şekil 3.29. Saf peptidin FT-IR spektrumu



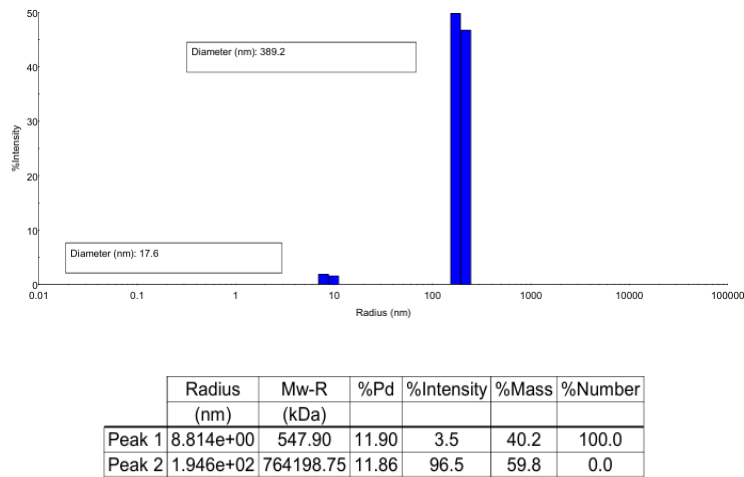
Şekil 3.30. Pep ve PDS-Pep'in HPLC kromatogramları



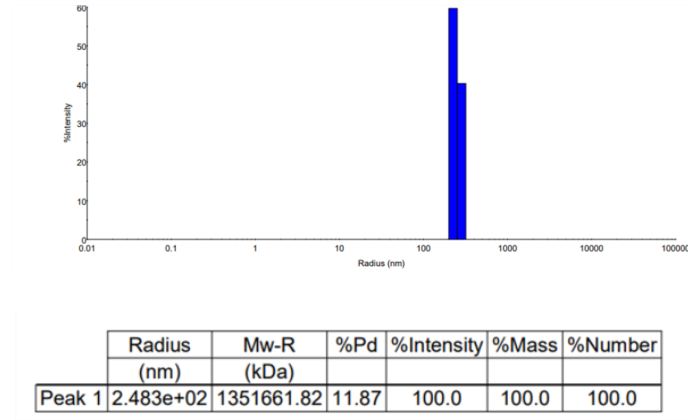
Şekil 3.31. (A) PDS-Pep'in ^1H NMR spektrumu, (B) Pep'in ^1H NMR spektrumu.

3.5. Peptit Konjüge Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

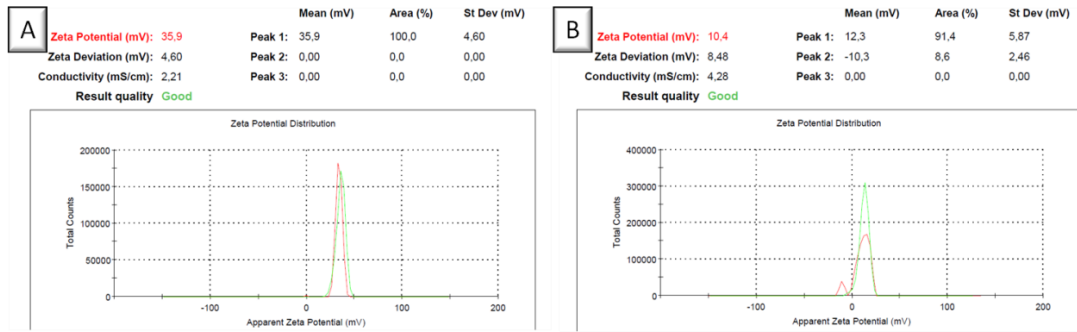
Modifiye peptidler 1 mL metanol içerisinde çözülmüş ve eşlendiği nanoparçacık solüsyonundan 1 mL alınarak, ayrı ayrı, üzerlerine eklenmiştir. Oda sıcaklığında ve alüminyum folyaya sarılı şekilde 100 rpm'de tüm gece karıştırılan bu tepkimeler sonrası, elde edilen solüsyonlar, Amicon filtreleri kullanılarak saflaştırılmıştır. MWCO değeri 1000kDa olan bu filtrelere, reaksiyon karışımları koyulmuş ve 2şer kere distile suya karşı 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjle döndürülerek yıkanmıştır. Bu aşamada, reaksiyon karışımlarının içerisindeki safsızlıklar ve tepkimeye girmemiş modifiye peptidlerin, membrane gözeneklerinden geçerek, santrifüj aracılığıyla aşağı geçmesi ve yukardaki kısımda da saf bir şekilde, peptid bağlı nanoparçacık solüsyonunun kalması beklenmektedir. En sonunda, filtrelerin üst tarafında kalan solüsyon alınarak içindeki NPlar karakterize edilmiştir. Peptid bağlı NPlerin boyut ve yüzey yükü analizleri, DLS cihazı kullanılarak yapıldı



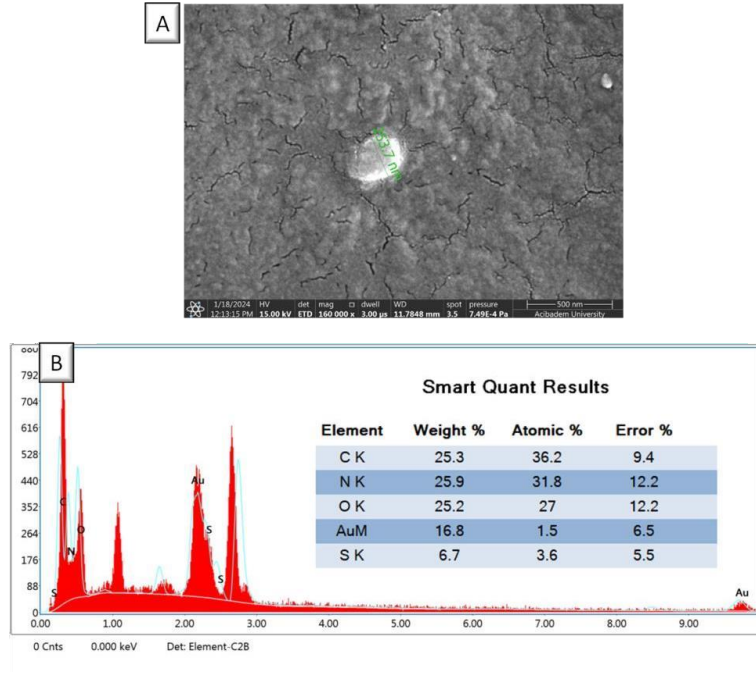
Şekil 3.32. Pep-PEG2K NP için boyut ölçüm sonucu



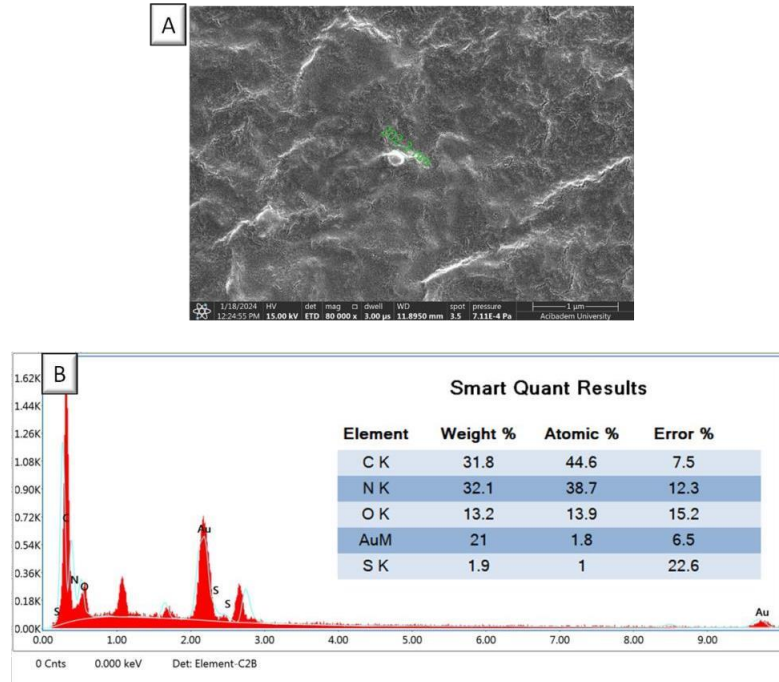
Şekil 3.33. Pep-PEG6K NP için boyut ölçüm sonucu



Şekil 3.34. Pep-PEG2K NP (A) ve Pep-PEG6K NP (B) için yüzey yükü ölçüm sonuçları



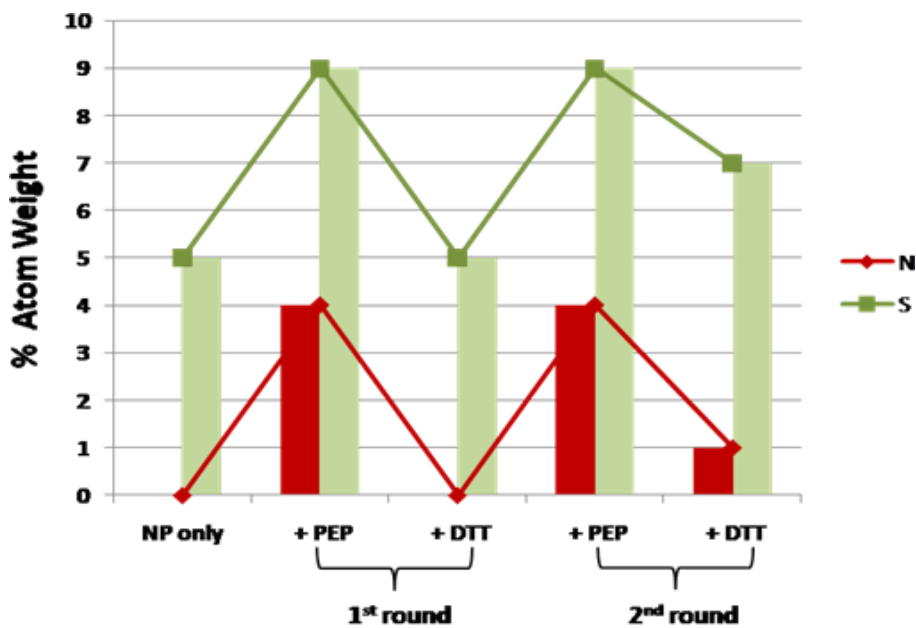
Şekil 3.35. Pep-PEG2K NP için SEM görüntüsü (A) ve EDS elemental analiz sonucu (B)



Şekil 3.36. Pep-PEG6K NP için SEM görüntüsü (A) ve EDS elemental analiz sonucu (B)

3.6. Peptit Konjüge Nanoparçacıkların Tersinir Özelliğinin İncelenmesi

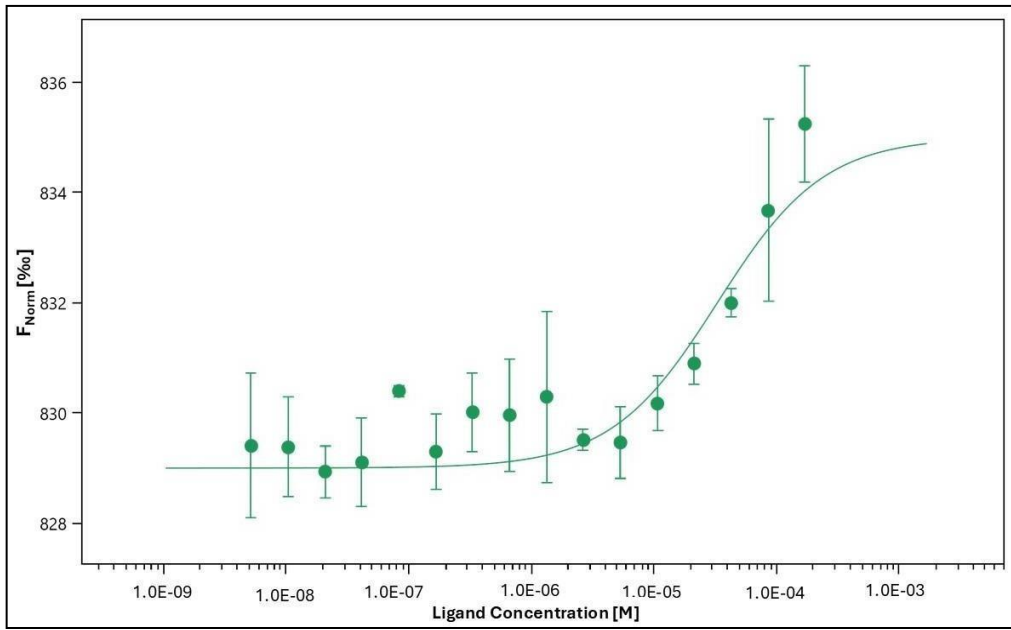
Nanoparçacıklarla kaplanmış ve yeniden kullanılabilir sensör yüzeyleri hazırlama amacıyla, disülfür bağları olan peptitlerin bağlanmasının ardından peptit bağlama ve ayırma adımlarıyla geri döndürülebilir olduğu gösterildi (Şekil 3.37). NP8 kaplı altın yüzey, ardışık iki peptit konjugasyon döngüsü ve indirgeyici bir madde olan DTT aracılığıyla bunun ardından gelen kopmasıyla modifiye edildi. SEM görüntüleme için EDS dedektörü kullanılarak haritalama analizi ile hem N hem de S'nin atomik yüzdelерinin peptit konjugasyonu üzerine yükseldiği ve yalnızca nanopartikül kaplı altın yüzey durumuna geri döndürüldüğü gösterildi. Bu davranış en az iki döngü boyunca tam olarak görülebildi, bu da peptidin tamamen çıkarılmasının, indirgeyici bir madde aracılığıyla aradaki disülfür bağının kesilmesiyle yönetilebileceğini ve nanopartikül kaplı altın yüzeyin aynı veya farklı tipteki peptit moleküllerinin başka bir bağlanması için tekrar kullanılabileceğini gösteriyor.



Şekil 3.37. SEM-EDS ile haritalama analizine göre NP8 kaplı yüzey için atomik yüzdelер.

3.7. Peptit Konjüge Nanoparçacıkların NTSR2 Antikoruna Karşı Bağlanma Analizleri

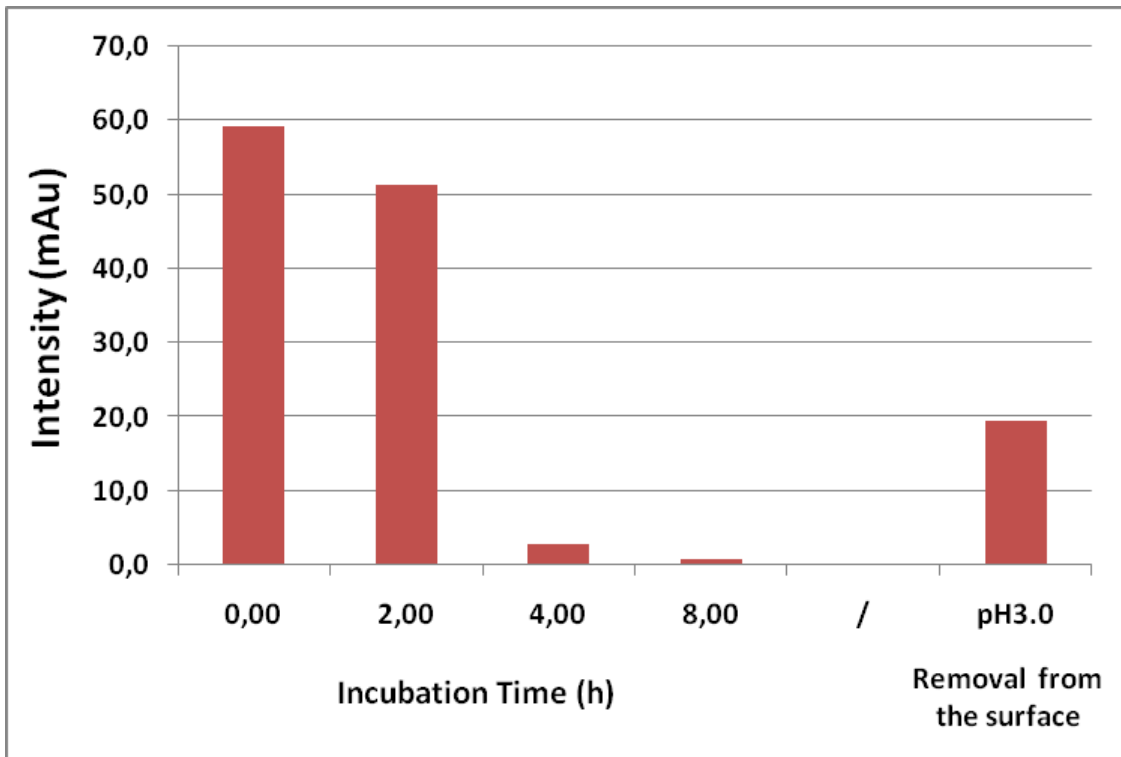
Nanoparçacıklar üzerindeki konjuge NTS(8-13) peptidinin biyoaktivitesi, hem çözeltide hem de yüzeyde bağlanma yeteneği açısından NTSR2 antikoruna karşı değerlendirildi. Birkaç seyreltmenin saf peptidi hazırlandı ve Monolith NT.115Pico cihazında RED-NHS etiketli antikora karşı analiz edildi.



Şekil 3.38. Mikroskopik termoforez yoluyla NTS(8-13) peptidinin NTSR2 antikoruna bağlanma afinitesi (n=3).

Bu peptid-antikor etkileşimin derecesi yalnızca tek tek peptit molekülleri için geçerli olsa da, yüzeydeki nanoparçacıklar tarafından sağlanan çok değerliliğin bu bağlanma eğilimini daha yüksek yoğunluğa getirmeye yardımcı olduğu gösterilmiştir. Tiyolatlanmış nanoparçacıklar (NP6) altın yüzeye kaplandıktan sonra, dış yüzeylerinde bozulmadan bırakılan tiyol grupları, peptit konjugeli nanopartikül kaplı altın yüzeyler elde etmek için PDS ile modifiye edilmiş

NTS(8-13) peptit moleküllerine konjuge edilmiştir. Bu yüzeyin 3,4 pM konsantrasyondaki NTSR2 antikör çözeltisinde inkübasyonu gerçekleştirilmiştir, bu sırada örnekler antikör çözeltisinden çekilmiş ve serbest antikör miktarı HPLC analizi ile takip edilmiştir (Şekil 3.39).



Şekil 3.39. Peptit konjuge nanopartikül kaplı altın yüzey üzerinde inkübasyon sırasında antikör miktarında zamanla meydana gelen değişimler ve asidik ortamda salınması.

4. TARTIŞMA

Yapılan bu tez çalışmasında, altın yüzey entegre edilmiş biyosensör yüzeylerinde kullanılmak üzere, fonksiyonel grubu olan PEG polimeri bazlı nanoparçacıklar üretilmiştir. Yapısına eklenen serbest tiyol grupları sayesinde, radikal çapraz bağlanmaya dayalı olarak sentezlenen polimerik nanoparçacıklar, altın ile kaplanmış cam yüzeylere tutturulmuş ve biyomolekül konjügasyonu için kullanılmıştır. Özellikle sensör çalışmalarında oldukça büyük problem olan ve teşhisi zorlaştıran spesifik olmayan biyomolekül etkileşimlerini azaltması adına, PEG polimeri kullanılarak nanoparçacıklar hazırlanmıştır. Daha sonra, yapısına eklenen tiyol gruplarına, pankreas kanser hücrelerinde yüksek miktarda üretilen reseptörlere bağlanabilen bir peptid dizisi olan nörotensin peptidi konjüge edilmiştir. Nanoparçacık yüzeylerine peptid moleküllerinin disülfid bağları, ortama eklenen bir indirgeyici ajan ile birlikte kırılabilir. Böylece, peptidi salarak altın yüzeyindeki nanoparçacıkların, bir sonraki ölçüm için geri kazandırılmasını sağlayabildiği gösterilmiştir.

Polimerik nanoparçacıklar, biyoyumlu ve sudaki çözünürlüğü oldukça iyi olan PEG polimeri kullanılarak hazırlanmıştır. Bu amaçla, her iki ucunda serbest hidroksik grubu olan 3 farklı moleküler ağırlıktaki PEG polimerlerinin her iki ucuna metakrilat reaktif grubu eklenmiştir. PEG polimerinden oluşan nanoparçacıkları hazırlamak için öncelikle, jelleşmeye katılabilecek fonksiyonel gruplara sahip PEG-DiMetakrilat polimerlerinin sentezlerini yaptım. Bu amaçla, farklı moleküler ağırlıklara sahip (2, 6 ve 10 kDa) ve her iki ucunda hidroksil grubu bulunan PEG polimerleri kullanıldı. Öncelikle 1'er gram tartılan PEG polimerleri

toluende çözölüp rotary evaporator cihazında yaklaşık 50 °C’de döndürölerek 2 kez kurutuldu ve 1 gece de desikatörde vakum altında bekletildi. Böylece PEG polimerleri nemden uzaklaştırıldı. Daha sonra polimerler, organik bir çözölücü olan diklorometan (CHCl₂) içerisinde çözölündü ve polimer zincirlerinin her iki ucundaki -OH gruplarının, bazik ortamda MAC (Methacryloyl Chloride) ile tepkimesi sonrası, her iki ucunda metakrilat grubu olan PEG polimerleri elde edildi.

Tepkimeler tüm gece devam ettirildikten sonra polimerlerin fazla diklorometanı yine vakum altında rotary evaporator kullanılarak uzaklaştırıldı ve soğuk dietileter içerisinde dmalatılarak polimerler çöktürölüdü. Buradaki amaç, hidrofilik olan polimerin, hidrofobik olan eterde çöktürölülerek safsızlıklarından uzaklaştırılmasını sağlamaktı. Bir gece boyunca -20 °C’de bekletilen bu karışım, ertesi gün filtrelenerek, çöken beyaz polimerler toplandı ve desikatörde de 1 gece kurutuldu. Elde edilen malzemenin verim hesabı yapıldığında başlangıçta 1 gr malzemeye göre hesaplanırsa reaksiyon sonucunda elde edilen malzeme miktarı PEG2K-diMA için 999 mgr (verim= %99,9), PEG6K-diMA için 951 mg (verim= %95) ve PEG10K-diMA için 988 mgr (verim= %98,8) olarak hesaplanmıştır.

Daha sonra, ışık bazlı radikal oluşumuna dayalı çapraz bağlanma tepkimesi sayesinde, uçlarında metakrilat grubu olan PEG polimeri çapraz bağlanmış ve nanoparçacıklar elde edilmiştir. Irgacure I2959 fotobaşlatıcının kullanıldığı bu tepkimede, ortama ekstradan eklenen ve yapısında 4 adet serbest tiyol grubu bulunduran (tetrakis-tiyol olarak kısalttığımız) çapraz bağlayıcı molekül kullanıldığında ise tiyol grubu içeren nanoparçacıklar elde edilmiştir. Agregalar,

nanopartikül çözeltilerinin 0,22 µm PES ve PVDF şırınga filtrelerinden süzülmesiyle uzaklaştırılırken, küçük molekül ağırlıklı safsızlıklar, 100 kDa kesme değerine sahip Amikon filtreleri kullanılarak santrifüjleme yöntemi ile ultra filtrasyon yoluyla ayrıldı.

Kullanılan filtre tipi değiştirilerek PES veya PVDF olacak şekilde çökeltilerin uzaklaştırılması denendi. Yapılan DLS ölçümlerine göre, PES filtresi kullanıldığında çökeltilerin yüksek oranda uzaklaştırılabildiği ve daha monodispers nanoparçacıkların elde edildiği görüldü. Daha sonra, filtrelerden geçirim sayısına göre DLS sonuçları analiz edildi. 20 kereye kadar PES filtresinden geçirilen bu nanoparçacıklar için, yapılan 10 filtrasyon sonrasında sonuçların anlamlı olarak değişmediği görüldü. Daha fazla filtrasyon yapıp da malzeme kaybını da engellemek adına 10 kez filtrasyonun yeterli olduğuna karar verildi. Nanoparçacıkların hazırlanmasında PEG-diMA polimerlerinin çözdürüldüğü çözücü çeşidinin nanoparçacık boyutuna etkisine de bakıldı. Etanol içerisinde çok farklı boyut dağılımları görüldüğünden, su ortamının ideal ortam olduğuna karar verildi. Ayrıca, tiyollü nanoparçacıkların üretilmesi için ortama eklenen tetrakis-tiol molekülünün direk olarak şişeden alınması ya da etanol içerisinde çözdürülerek tepkimeye eklenmesinin boyuta etkisi de değerlendirilen parametreler arasındadır. Elde edilen DLS sonuçlarına göre, etanol içerisinde çözdürülerek hazırlanan stok çözeltiden nanoparçacık yapım prosedürüne eklenen durumun, daha düzgün sonuçlar verdiği gözlemlendi.

Hazırlanan nanoparçacıkların çökeltilerinin şırınga filtrasyonu yöntemi ile uzaklaştırılması ve tepkimeye girmeyen küçük moleküler ağırlıktaki molekül ve

safsızlıkların da Amikon filtresi ile ultrafiltrasyon yöntemiyle uzaklaştırılması sonucu, PDI değeri düşük ve hedef boyut aralığında nanoparçacıklar elde edilebilmiştir. Nanoparçacıkların tiyol içeren halleri için, ölçülen çap değerleri, tiyolsüz olanlarınkine göre daha büyük çıkmıştır. Bunun sebebi, yüzeyde bulunan serbest tiyol (-SH) gruplarının etraftaki su molekülleri ile Hidrojen bağları oluşturarak hidrodinamik çaplarının artmış olmasıdır. 2K, 6K ve 10K büyüklüğündeki PEG-diMA zincirleri ile hazırlanan tüm nanoparçacık çeşitlerinde bu fark, tutarlı görülmüştür.

Elde ettiğimiz tiyol grubu olan ve olmayan nanoparçacıklarının yüzey yükünü Malvern marka DLS cihazının zeta potansiyeli özelliğini kullanarak ölçtük. Bunun için, saflaştırılan nanoparçacık solüsyonlarını hacimce 1:10 olacak şekilde 0,1 molar NaCl ile seyrelttik ve PEG polimerinin kırılma indeksini (refractive index) baz alarak yapılan metoda analiz ettik. Elde edilen yüzey yükü değerleri mV cinsinden olacak şekilde Tablo 3.4'te görülebilir. Genelde, PEG polimerinin yapısındaki oksijen atomları dolayısıyla negatif çıkan yüzey yükü değeri, nerdeyse tüm nanoparçacıklar için -10 mV'un altında olduğundan elde edilen nanoparçacıkların yüzey yükü açısından stabil olduğu söylenebilir.

Hazırlanan nano parçacıkların ölçülen zeta potansiyel değerlerine bakıldığında tiyol içeren fonksiyonel nano parçacıkların yüzey yüklerinin daha negatif mV değerinde olduğu görülebilir. Bunun sebebi, yüzeydeki tiyol gruplarından gelen elektronegatif sülfür atomları olabilir. Ayrıca serbest tiyol (-SH) grupları, etraf su molekülleri ile Hidrojen bağı yaparken bağlı oldukları hidrojen atomunu verdiklerinde -S- negatif kalırlar ve bu durum da elde edilen nano parçacıkların

daha negatif olması durumunu açıklayabilir. Ayrıca, nano parçacıkların yapımında kullanılan PEG-diMA polimerlerinin uzunlukları arttıkça, boyutlarının arttığını, DLS sonuçlarında görmüştük. Boyutu artan nano parçacıkların yüzey alanları da arttığından dolayı yüzeylerinde daha fazla O ve S atomları olacağından, yüzey yüklerinin daha negatif olması beklenmektedir.

Tetra-kis molekülü eklenerek hazırlanan PEG bazlı nanoparçacıkların içerdikleri serbest tiyol gruplarının varlığı ve miktar tayini, Ellman's testi ile yapılmıştır. Elde edilen nanoparçacık solüsyonları, kit prosedürüne uygun olarak aktif ajan (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoik asidi)) ile muamele edilmiş ve daha önceki tez döneminde hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak serbest tiyol miktar tayini yapılmıştır. Ölçümler, UV-Vis spektrofotometre cihazı kullanılarak 412 nm'de alınmıştır. Tiyolsüz nanoparçacıkların hepsinde ölçülen değerler benzer çıkmış olup, analiz baseline değeri (blank) olarak alınmıştır. Her bir tiyollü nanoparçacık için alınan sonuçtan, kendi tiyolsüz versiyonunun sonucu çıkarılmış ve net serbest tiyol miktarı mM biriminde hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre, özellikle 2K ve 6K boyutundaki PEG-diMA polimerleri ile yapılan tiyollü nanoparçacıkların yapısında yüksek miktarsa -SH grubunun var olduğu gösterilmiştir.

Elde edilen görüntülerde, hazırlanan nanoparçacıkların beklendiği şekilde yuvarlak olduğu ve agregat oluşturmadığı görülmektedir. Her bir nanoparçacık için, alınan DLS boyut sonucunun SEM görüntülemesindeki sonuçtan daha büyük olduğu görülmektedir (Şekil 3.18, 3.19, 3.20). Bu durum, SEM görüntülerinin, nanoparçacıkların kurutularak ve yüksek vakum altında alınmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü bu nanoparçacıklar PEG bazlı

nanojellerdir ve kuruyunca vakum altında büzüşebilir ve daha küçük boyutta gözlemlenebilirler.

Tablo 3.9’da, tüm nanoparçacıklar için karşılaştırmalı karakterizasyon ayrıntılarını sunmaktadır. Burada, PEG2K-diMA polimeri ile hazırlananlar, en küçük uzunluktaki polimer zincirlerinin her iki ucundaki metakrilat birimlerinin artan etkileşiminden kaynaklanmış olabilecek en yüksek boyutu vermiş gibi görünmektedir. Mikroskop altında görselleştirme için yüksek vakum koşulları nedeniyle, DLS ölçümüne kıyasla SEM görüntülemesinde boyutları daha küçük olarak ölçüldü. Ellman testi, daha fazla konjugasyon için mevcut olan yapılarındaki serbest tiyol miktarını ölçmek için NP4-6'ya uygulandı ve PEG6K-diMA polimeriyle elde edilen NP5'in en yüksek tiyol grubu miktarına sahip olduğu görüldü. Nanoparçacıkların yapısındaki S atomunun varlığı, SEM'e birleştirilmiş EDS dedektörü aracılığıyla gerçekleştirilen yarı-kantitatif element analizi ile de doğrulandı (Tablo 3.8). Tüm tiyollenmiş nanoparçacıkların, yüzeyde bulunan elektronegatif atomların varlığından kaynaklanabilecek olan tiyollenmemiş olanlara kıyasla daha fazla negatif yüzey yükünü koruduğu gözlemlendi. Ellman'ın NP4 ve NP5 için yaptığı analizde elde edilen tiyol miktarları ile ilişkili olmasına rağmen, PEG10K-diMA polimerinden (NP6) elde edilen nanopartikülün en büyük boyutunun en düşük yüzey yükünden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Hazırlanan nanoparçacıkların yüzey üzerine tutturulması için, altın kaplı cam yüzeyler kullanılmıştır. Bu adımda asıl amaç, sensör yüzeylerini modelleyerek, sensör dışı ortamda ve altın yüzey üzerinde rahatça çalışabilmek ve gerekli

optimizasyonları yapabilmektir. Nanoparçacıkları yaptıktan sonra hem bu tiyollü hem de tiyolsüz nanoparçacık solüsyonlarını kullanarak, hem de bu nanoparçacıkların hazırlandığı lineer PEG polimerleriyle cam yüzeyler üzerine kaplamalar yaptık. Lineer PEG polimeri kullanarak yaptığımız kaplamalara “ince film” diyebiliriz ve bu amaçla nanoparçacıkta kullanılan polimerlerle aynı moleküler ağırlığında polimer zincirleri (Mwt: 2, 6 ve 10 kDa) ile çalıştık. Altın kaplı cam yüzeyler, sensör yüzeyleri için bir model görevi görmesi amacıyla Vakum püskürtmeli kaplayıcı ile elde edildi ve hazırlanan nanoparçacıklarla yüzey modifikasyonları hem tiyollenmemiş hem de tiyollenmiş nanoparçacıklarla etkileşimlerini kavramak için incelendi. 100 nm kalınlığında altınla kaplanan bu yüzeyler, spin kaplayıcı cihazı aracılığıyla nanoparçacık çözeltileriyle kaplandı ve hava ile kurutulmuş yüzeyler ıslatılabilirlikleri ve yüzey morfolojileri açısından değerlendirildi. Tablo 3.11'de, altın kaplı cam yüzeyle karşılaştırıldığında, tüm PEG bazlı nanoparçacıkların doğrusal PEG polimerleri gibi çok hidrofilik yüzeyler sağladığı açıkça görülebilir.

SEM mikroskopik analizleri, örneklerin karbon bandı üzerinde damlatılarak yapılır. Hazırlanan nano parçacıkların şekillerinin incelenmesi için de yine bu karbon bantları kullanılmıştır. Su içerisinde disperse olan nanoparçacıklardan yüzeyi kaplayacak şekilde mikropipetle bir miktar alınarak, ayrı ayrı olacak şekilde karbon bandı üzerine damlatılmıştır. Çeker ocak içerisinde açık havaya maruz kalarak kurutulan örnekler, daha sonra 50 nm altın ile kaplanarak SEM cihazında analizi yapılmıştır. Yüksek vakum altında ve hem EDT hem de EDS dedektörleri kullanılarak morfolojik görüntülemeler yapılmıştır.

Kaplaması yapılan nanoparçacıkların yüzey görüntüleri SEM cihazından görüntü alınabilmesini sağlamak amacıyla öncelikle metal kaplama cihazında yaklaşık 50nm kalınlığında altınla kaplandı. Daha sonra, SEM cihazı altında yüzey görüntülenmesi yapıldı. Aynı cihazın fonksiyonu olan EDAX dedektörüyle, nanoparçacıkların altın yüzeyindeki varlığını kanıtlayacak S (sülfür) varlığına ve yarı-kantitatif miktarına bakıldı. Cam üzerine yapılan kaplamaların kalınlığını ölçmek için yüzeyler, cam kesici yardımıyla ufak bölümlere ayrıldı ve dik bir biçimde SEM altlıklarına yerleştirilerek metal kaplama cihazında görüntü vermesi için yine yaklaşık 50 nm kalınlığında altın ile kaplandı. Daha sonra dik olarak yerleştirilen camların mikroskopta kesit kalınlığına bakıldı.

Altın yüzeylere kaplanan nanoparçacıklar SEM ile görüntülendi ve küresel yapılar yüzeyin her tarafına dağılmış olarak gözlemlenebildi. Ayrıca, nanopartikül kaplı altın yüzeyler bir cımbız yardımıyla dikkatlice ikiye bölündü ve altın yüzeyindeki nanopartikül tabakasının kalınlığı, yüzeyler eğik bir açıdan görüntülenerek ölçüldü. Şekil 3.24, 3.25, 3.26, altın kaplı yüzeylerdeki nanopartikül tabakalarını ince filmler olarak göstermektedir ve burada PEG2K-diMA polimeri ile hazırlanan nanoparçacıklar (hem tiyollenmiş hem de tiyollenmemiş olanlar için) çok katmanlı nanopartikül birikimi ile daha kalın kaplamalar ile sonuçlanmıştır. Öte yandan, aynı kaplama prosedürü altında hazırlanan kaplama tabakalarının yan görünümülerinden tek katmanlı nanopartikül dağılımı gözlemlenebilir. DLS ile ölçülen en küçük hidrodinamik hacim değerlerine sahip olan PEG6K-diMA polimeri ile hazırlanan NP2 ve 5, altın yüzeyinde daha ince nanopartikül tek katmanları sağlamış gibi görünmektedir. Ancak, tiyollenmiş olan NP5'in daha

düzgün ve homojen bir kaplama verdiği gözlemlendi; bu, altın yüzey ile tiyol kısımları arasında yarı kovalent bağ oluşumundan kaynaklanıyor olabilir. Bu bağlanmayı doğrulamak için NP5, ddH₂O'da 3 saat boyunca hafifçe çalkalanarak inkübe edildi ve ardından EDS analizi yapıldı. SEM görüntülemesi, nanopartikül tabakasının hala altın yüzeyinde olduğunu ve element analizinin yüzeyde Kükürt atomu varlığını gösterdiğini ortaya koydu; bu da tiyollenmiş nanoparçacıkların altın kaplı yüzeyde hareketsizleştirildiğini kanıtlıyor.

NTS(8-13), kanser dokularında aşırı ifade edilen nörotensin reseptörlerine (NTSR) özgül ve yüksek afiniteye sahip nörotensin peptidlerinin bir parçası olarak öne çıkıyor. Literatürden, NTS(8-13) peptidinin pankreas kanseri hücre zarlarında bol miktarda bulunan NTSR2'ye özgül bir afiniteye sahip olduğu iyi bilinmektedir. Hazırlanan nanopartikül kaplı altın yüzeylerin sensör yüzey modelleri olarak uygulanması olarak, bu peptidin NTSR2 antikoruna bağlanması incelendi. Nanoparçacıklar üzerindeki kalan tiyol grupları, bu NTS(8-13) peptidinin disülfür bağları aracılığıyla konjugasyonu için değerlendirildi, bu sayede peptit ve hedefi gibi oluşan biyomoleküller kompleksi, DTT gibi bir indirgeyici maddenin yardımıyla sensör yüzeyinde temizlenecek ve nanopartikül-immobilize edilmiş altın yüzeyi başka bir kullanım için geri kazanılacaktır.

NTS(8-13) peptidi, peptit sentez cihazı ile katı faz peptit sentez yöntemi ile N-terminalinde ek bir C (sistein) amino asidi ile sentezlendi. Peptidin FT-IR spektrumu, 1637 cm⁻¹'de görülen amid karbonil tepe noktası ile birlikte N-H ve O-H gerilmesine ait yaklaşık 3200 cm⁻¹'deki karakteristik peptit tepe noktaları ile kimyasal yapısını doğruladı (Şekil 3.29). Elde edilen peptidin HPLC analizine göre

%96,7 saflıkta olduğu bulundu (Şekil 3.30). Daha sonra Sistein aminoasitinden gelen tiyol grubu, aldrityol molekülüyle reaksiyonu sağlanarak PDS (piridil disülfür) grubu ile korundu. %59,1 verim ve %80,6 saflıkta elde edilen bu peptidin PDS- korumalı tiyol grubundan nanoparçacıklara bağlanması sağlanmıştır. Peptide bağlı PDS grubunun varlığı ¹HNMR spektroskopisi ile 6,5 ve 8,5 ppm arasında yeni ortaya çıkan piklerle doğrulandı (Şekil 3.31). Ayrıca, peptit yapısıyla ilgili beklenen pikler hem saf peptid hem de PDS-modifiye peptid yapılarının NMR spektrumlarında, amid karbonil protonları için ~4,3 ppm'de ve izopropil -CH₃ protonları için ~0,8 ppm'de görülen piklerle gözlemlendi.

Hazırlanan nanoparçacıklardan serbest tiyol grubu yüksek olan PEG2K-diMA (1,482 mM -SH) ve PEG6K-diMA (1.771 mM -SH) iki nanoparçacık, peptid bağlama adımıda kullanılmıştır. Nnparçacıklar, içerdikleri tiyol grubunun molce 1,5 katı olacak şekilde Pep-PDS molekülleri ile tepkimeye sokulmuştur. PEG2K-diMA için 2,223 mM (2,3 mg) ve PEG6K-diMA için 2,656 mM (2,7 mg) Pep-PDS malzemesi kullanılmıştır. PEG tabanlı tiyollenmiş nanoparçacıkların çevresine peptit konjugasyonu, disülfür değişim reaksiyonu yoluyla gerçekleştirildi. Herhangi bir safsızlığı ve reaksiyona girmemiş molekülleri gidermek için nanopartikülün Amicon filtrelerinden saflaştırılmasından sonra, peptit bağlanması hem DLS hem de SEM ile ölçülen artan boyutla doğrulandı. Ayrıca, nanoparçacıkların yüzey yükü de pozitif değerlere döndü ve bu da peptit moleküllerinin başarılı bir şekilde bağlandığını gösteriyor. Peptit konsantrasyonları, saf peptit standartlarıyla elde edilen bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak nanodrop ile ölçüldü ve NP7 (Pep-PEG2K NP) için 105,3 µg/mL ve

NP8 (Pep-PEG6K NP) için 203,2 µg/mL ile sonuçlandı. Ellman testi, konjugasyon reaksiyonundan sonra serbest tiyol grubu kalmadığını doğrulamak için peptit bağlı nanoparçacıklara uygulandı. Daha yüksek peptit miktarı ile NP8, yüzey bağlama deneyleri için seçildi.

Tiyollü nanoparçacık olan NP8'in altın yüzeye kaplanmasının ardından, nanoparçacıkların üst taraflarında kalan tiyollere ise PDS-korumalı NTS(8-13) peptidinin konjugasyonu yapılmıştır. Böylece, nanoparçacık tutturulmuş yüzeylere biyomolekül bağlanması başarı ile gösterilmiştir. Daha sonra, bu peptid molekülleri, nanoparçacıklara bağlandıkları disülfid gruplarının indirgeyici bir ajanla (DTT) kırılması sonucu serbest kalmış ve yüzeyden uzaklaştırılmıştır. Bu disülfid bağının kırılabilir olduğu, ve yüzeyde geride bıraktığı nanoparçacık üzerindeki tiyol grupların peptid bağlamada tekrar kullanılabilir olduğunu göstermek için SEM-EDS analizi yapılmıştır. Şekil 3.37'de görülen atom ağırlık oranlarındaki değişime bakılırsa, yüzeydeki kükürt ve azot atomlarının varlığı, nanoparçacık ve peptid bağlama ve kopma durumlarına göre en az 2 tur geri kazandırılabilirdiği görülebilir. Bu durum, elde edilen nanoparçacık tutturulmuş altın yüzeylerin, peptid bağlamada tekrar kullanılabilir olduğuna işaret eder.

Öncelikle, NTS(8-13) peptid-NTSR2 antikor etkileşiminin bağlanma eğilimi, Monolith NT.115Pico cihazında RED-NHS etiketli antikora karşı analiz edildi. 16 kez seyreltilen peptid solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen bağlanma çalışması sonucu elde edilen eğri, FNorm[%]- Ligand Konsantrasyonu olarak molarite [M] olarak sunulmuştur. Bu etkileşimin deneysel ayrışma sabiti (K_d), $32,9 \pm 0,69$ nM olarak hesaplanmıştır; bu, peptid ile antikoru arasında belirli bir afinite düzeyi

olduğunu göstermektedir. Literatüre göre, bu NTS(8-13) peptidinin yüksek afiniteli reseptörü NTSR2'ye bağlanma afinitesi 5-7 nM'lik bir K_d değeri olarak bildirilmiştir ve bu, peptidin bu çalışmada bulunan ilgili antikora olan etkileşimine kıyasla çok daha güçlü bir etkileşime işaret etmektedir.

Altın yüzey üzerine tutturulan NP8 için, biyomolekül bağlanma deneyleri de yapılmıştır. Bu amaçla, nanoparçacıkların bazı tiyol grupları altın yüzeye tutturma için, daha önce anlatılan prosedür kullanılarak gerçekleştirilmiş ve üst tarafta kalan tiyol gruplarına da PDS-kortumal peptidin disülfid bağları ile konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yüzeye bağlanan peptidlerin, afinite çalışmaları için NTSR2 antikoruna üzerinden çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde kullanılan antikor miktarı, doygunluk koşulunu ortadan kaldırmak için bu peptide karşı K_d değerine kıyasla çok düşüktü, ancak sıvı kromatografisinde hala tespit edilebilirdi. İnkübasyon çözeltisinde ölçülen antikor yoğunluğunu temsil eder ve 4 saatlik inkübasyonun, altın yüzeyindeki nanoparçacıklara konjuge edilmiş peptitlere neredeyse %95,2 antikorun bağlanması için yeterli olduğu açıkça anlaşılmaktadır. Dahası, bağlı antikorun salınması sert asidik koşullar altında (pH3.0) gerçekleştirildi ve bu da yüzeydeki başlangıçta bağlı antikor miktarının %34,5'inin ayrılmasıyla sonuçlandı. HPLC kromatogramında ayrıca, daha polar olmayan bölgede ekstra bir tepe noktasının ortaya çıktığı gözlemlendi; bu, salınan antikorun bir kısmının deprotonasyonunu veya denatürasyonunu gösterebilir (Şekil 3.39). Elde edilen verilerle, peptit kaplı nanopartikül kaplı altın yüzeyin, belirli bir afinite ile hedef moleküllerin tespiti için tekrar kullanılabilir bir platform olarak kullanılma potansiyelinin yüksek olduğu sonucuna varılabilir.

5. SONUÇLAR

Burada, biyomolekül tespitini iyileştirmek için altın yüzeye bağlı kütle sensörlerine uygulanabilen nanopartikül immobilize yüzeyleri hazırlamak için yeni bir strateji tanıtılmıştır. Üç molekül ağırlığındaki (2, 6 ve 10 kDa) PEG bazlı polimerler, %95'e kadar yüksek verimlerle her iki uçtan metakrile edildi ve NP sentezlemek için kullanıldı. Bu NP'ler, tetra-tiol içeren bir çapraz bağlayıcının aşırı miktarları eklenerek serbest tiyol grupları ile dekore edildi. 100-200 nm'lik tiyollenmiş NP'ler negatif yüzey yüklerini korudu ve sulu bir ortamda kararlı hidrodinamik boyut sundu. Bu NP'ler, cam yüzeyler üzerine biriktirilen altın filmler üzerine kaplandı ve tiyollenmiş NP'ler, bu yüzeylere yarı kovalent S-Au bağları yoluyla immobilize edildi. NP kaplı altın yüzeylerin yan görünümü, nanopartikül kaplamalarının kalınlığının ~250 nm olduğunu ortaya koydu. Kalınlık belirgin şekilde azaldı ve altın yüzeyinde, özellikle PEG6K- diMA polimerlerinden sentezlenenler olmak üzere, 85 nm boyutunda bir NP monokatmanı oluştu. NP'ler üzerindeki tiyol grupları, pankreas kanseri hücrelerindeki reseptörlere yüksek afinitesi ile bilinen, %95 saflıkta elde edilen bir peptit dizisine (NTS(8-13)) bağlandı. Disülfür bağları aracılığıyla geri dönüşümlü konjugasyonu, biyomolekül bağlanmasından sonra salınımını kolaylaştırdı ve NP-immobilize edilmiş yüzeyin en az iki döngü boyunca sonraki kullanım için restore edildiği gösterildi. Bu peptidin reseptör antikoruna bağlanmasının 4 saat içinde %96,7'ye kadar ulaştığı araştırıldı. Bu bulgular, NP-immobilize edilmiş altın kaplamalı bir cam yüzeyin hazırlanması için geliştirilen protokolün, altın film içeren sensör yüzeylerine uygulanacak protokol olarak değerlendirilebileceğini

göstermektedir. Ligand moleküllerinin NP'ler üzerinde geri dönüşümlü konjugasyonu nedeniyle yeniden kullanılabilir bir yüzey sağlar; bu, altın yüzey tabanlı sensörler için çok amaçlı hastalık teşhisi için esnek, yenilenebilir biyosensör platformları oluşturmanın önünü açabilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] L. C. Clark and C. Lyons, "ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 1, pp. 29–45, 1962, doi: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
- [2] A. P. F. Turner, "Biosensors: Sense and sensibility," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 8, pp. 3184–3196, Mar. 2013, doi: 10.1039/c3cs35528d.
- [3] J. Appl Biomed, M. Pohanka, and P. Skládal, "Journal of APPLIED BIOMEDICINE Electrochemical biosensors-principles and applications."
- [4] D. Grieshaber, R. Mackenzie, J. Vörös, and E. Reimhult, "Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures," *Sensors*, vol. 8, pp. 1400–1458, 2008, [Online]. Available: www.mdpi.org/sensors.
- [5] A. Singh *et al.*, "Recent advances in electrochemical biosensors: Applications, challenges, and future scope," *Biosensors*, vol. 11, no. 9. MDPI, Sep. 01, 2021, doi: 10.3390/bios11090336.
- [6] F. F. Cheng, T. T. He, H. T. Miao, J. J. Shi, L. P. Jiang, and J. J. Zhu, "Electron transfer mediated electrochemical biosensor for microRNAs detection based on metal ion functionalized titanium phosphate nanospheres at attomole level," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 4, pp. 2979–2985, Feb. 2015, doi: 10.1021/am508690x.
- [7] V. Naresh and N. Lee, "A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors," *Sensors (Switzerland)*, vol. 21, no. 4. MDPI AG, pp. 1–35, Feb. 02, 2021, doi: 10.3390/s21041109.
- [8] F. Cui and H. S. Zhou, "Diagnostic methods and potential portable biosensors for coronavirus disease 2019," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 165, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.bios.2020.112349.
- [9] M. Pohanka, "Piezoelectric Chemosensors and Biosensors in Medical Diagnostics," *Biosensors*, vol. 15, no. 3. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Mar.

- 01, 2025, doi: 10.3390/bios15030197.
- [10] R. Mohapatra *et al.*, "Nanomaterials in Biomedical Applications: A Review," *J. Adv. Biol. Biotechnol.*, vol. 28, no. 3, pp. 996–1009, Apr. 2025, doi: 10.9734/jabb/2025/v28i32157.
 - [11] E. H. Yoo and S. Y. Lee, "Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice," *Sensors*, vol. 10, no. 5, pp. 4558–4576, May 2010, doi: 10.3390/s100504558.
 - [12] J. Wang, "Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics," in *Biosensors and Bioelectronics*, Apr. 2006, vol. 21, no. 10, pp. 1887–1892, doi: 10.1016/j.bios.2005.10.027.
 - [13] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, and D. R. Thévenot, "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification," 2001. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/bios.
 - [14] F. M. Chen, Y. M. Zhao, Y. Jin, and S. Shi, "Prospects for translational regenerative medicine," *Biotechnology Advances*, vol. 30, no. 3, pp. 658–672, May 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.11.005.
 - [15] H. Muramatsu, K. Kajiwara, E. Tamiya, and I. Karube, "Candida albicans MICROBES," 1986.
 - [16] M. T. Chorsi *et al.*, "Piezoelectric Biomaterials for Sensors and Actuators," *Advanced Materials*, vol. 31, no. 1, Wiley-VCH Verlag, Jan. 04, 2019, doi: 10.1002/adma.201802084.
 - [17] Y. Wang, Y. Shi, and F. Narita, "Design and finite element simulation of metal-core piezoelectric fiber/epoxy matrix composites for virus detection," *Sensors Actuators, A Phys.*, vol. 327, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.sna.2021.112742.
 - [18] M. Li, Y. Zeng, Z. Huang, L. Zhang, and Y. Liu, "Vertical Graphene-Based Printed Electrochemical Biosensor for Simultaneous Detection of Four Alzheimer's Disease Blood Biomarkers," *Biosensors*, vol. 13, no. 8, Aug. 2023, doi: 10.3390/bios13080758.

- [19] E. Delgado-Alvarado *et al.*, “Triboelectric and Piezoelectric Nanogenerators for Self-Powered Healthcare Monitoring Devices: Operating Principles, Challenges, and Perspectives,” *Nanomaterials*, vol. 12, no. 24. MDPI, Dec. 01, 2022, doi: 10.3390/nano12244403.
- [20] J. Xu, Y. Fang, and J. Chen, “Wearable biosensors for non-invasive sweat diagnostics,” *Biosensors*, vol. 11, no. 8. MDPI, Aug. 01, 2021, doi: 10.3390/bios11080245.
- [21] A. Janshoff, H. J. Galla, and C. Steinem, “Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors?,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 39, no. 22. pp. 4004–4032, Nov. 17, 2000, doi: 10.1002/1521-3773(20001117)39:22<4004::AID-ANIE4004>3.0.CO;2-2.
- [22] G. Sauerbrey, “Verwendung von Schwingquarzen zur W~igung diinner Schichten und zur Mikrow~igung*,” 1959.
- [23] M. V Voinova, M. Rodahl, M. Jonson, and B. Kasemo, “arXiv:cond-mat/9805266v1 [cond-mat Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach.”
- [24] X. Huang, Q. Chen, W. Pan, and Y. Yao, “Advances in the Mass Sensitivity Distribution of Quartz Crystal Microbalances: A Review,” *Sensors*, vol. 22, no. 14. MDPI, Jul. 01, 2022, doi: 10.3390/s22145112.
- [25] Y. Zeng, R. Yuan, H. Fu, Z. Xu, and S. Wei, “Foodborne pathogen detection using surface acoustic wave biosensors: a review,” *RSC Advances*, vol. 14, no. 50. Royal Society of Chemistry, pp. 37087–37103, Nov. 20, 2024, doi: 10.1039/d4ra06697a.
- [26] T. Azam, S. H. Bukhari, U. Liaqat, and W. Miran, “Emerging Methods in Biosensing of Immunoglobulin G – A Review,” *Sensors*, vol. 23, no. 2. MDPI, Jan. 01, 2023, doi: 10.3390/s23020676.
- [27] F. Ricci and G. Palleschi, “Sensor and biosensor preparation, optimisation and

- applications of Prussian Blue modified electrodes," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 3. pp. 389–407, Sep. 15, 2005, doi: 10.1016/j.bios.2004.12.001.
- [28] H. H. Nguyen, J. Park, S. Kang, and M. Kim, "Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications," *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 5. MDPI AG, pp. 10481–10510, May 05, 2015, doi: 10.3390/s150510481.
- [29] F. B. K. Eddin and Y. W. Fen, "The principle of nanomaterials based surface plasmon resonance biosensors and its potential for dopamine detection," *Molecules*, vol. 25, no. 12. MDPI AG, Jun. 01, 2020, doi: 10.3390/molecules25122769.
- [30] S. Singh *et al.*, "2D nanomaterial-based surface plasmon resonance sensors for biosensing applications," *Micromachines*, vol. 11, no. 8. MDPI AG, 2020, doi: 10.3390/mi11080779.
- [31] K. S. Phillips and Q. Cheng, "Recent advances in surface plasmon resonance based techniques for bioanalysis," in *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Mar. 2007, vol. 387, no. 5, pp. 1831–1840, doi: 10.1007/s00216-006-1052-7.
- [32] X. Wang, Z. Mei, Y. Wang, and L. Tang, "Gold nanorod biochip functionalization by antibody thiolation," *Talanta*, vol. 136, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2014.11.023.
- [33] S. Mariani and M. Minunni, "Surface plasmon resonance applications in clinical analysis," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 406, no. 9–10. Springer Verlag, pp. 2303–2323, Apr. 01, 2014, doi: 10.1007/s00216-014-7647-5.
- [34] M. A. Cooper, "Optical biosensors in drug discovery," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 1, no. 7. European Association for Cardio-Thoracic Surgery, pp. 515–528, 2002, doi: 10.1038/nrd838.
- [35] J. Homola, "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species," *Chemical Reviews*, vol. 108, no. 2. pp. 462–493, Feb. 2008, doi: 10.1021/cr068107d.

- [36] L. Molloy *et al.*, "Mental Health Nurses' Enforcement of Involuntary Care in Inpatient Settings: A Meta-Ethnography," *International Journal of Mental Health Nursing*, vol. 34, no. 3. John Wiley and Sons Inc, Jun. 01, 2025, doi: 10.1111/inm.70044.
- [37] M. Piliarik *et al.*, "Comparison of plasmon surface waves on shallow and deep metallic 1D and 2D gratings," Springer-Verlag, 2006. doi: 10.1364/OA_License_v1#VOR.
- [38] J. Lv *et al.*, "Recent advances of optical fiber biosensors based on surface plasmon resonance: sensing principles, structures, and prospects," *Sensors and Diagnostics*. Royal Society of Chemistry, Jun. 08, 2024, doi: 10.1039/d4sd00045e.
- [39] K. A. Marx, "Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution - Surface interface," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 5. pp. 1099–1120, Sep. 2003, doi: 10.1021/bm020116i.
- [40] K. Keiji Kanazawa and J. G. Gordon, "The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid," *Anal. Chim. Acta*, vol. 175, no. C, pp. 99–105, 1985, doi: 10.1016/S0003-2670(00)82721-X.
- [41] P. K. Deshmukh *et al.*, "Stimuli-sensitive layer-by-layer (LbL) self-assembly systems: Targeting and biosensory applications," *J. Control. Release*, vol. 166, no. 3, pp. 294–306, 2013, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.12.033.
- [42] M.-C. Daniel and D. Astruc, "Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology," 2004, doi: 10.1021/cr030698.
- [43] S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential - What they are and what they are not?," *Journal of Controlled Release*, vol. 235. Elsevier B.V., pp. 337–351, Aug. 10, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [44] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Noble metals on the

- nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine," *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 12, pp. 1578–1586, Dec. 2008, doi: 10.1021/ar7002804.
- [45] C. Sanchez, B. Julián, P. Belleville, and M. Popall, "Applications of hybrid organic-inorganic nanocomposites," *J. Mater. Chem.*, vol. 15, no. 35–36, pp. 3559–3592, Sep. 2005, doi: 10.1039/b509097k.
- [46] S. W. and A. P. A. Marcel Bruchez Jr., Mario Moronne, Peter Gin, "Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels Author (s): Marcel Bruchez Jr ., Mario Moronne , Peter Gin , Shimon Weiss and A . Paul Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stabl>," *Am. Assoc. Adv. Sci.*, vol. 281, no. 5385, pp. 2013–2016, 2017.
- [47] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, 2010, doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
- [48] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, and V. Préat, "PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 2, pp. 505–522, 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
- [49] S. Parveen, R. Misra, and S. K. Sahoo, "Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 8, no. 2, pp. 147–166, 2012, doi: 10.1016/j.nano.2011.05.016.
- [50] L. Zhang, J. Xia, Q. Zhao, L. Liu, and Z. Zhang, "Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs," *Small*, vol. 6, no. 4, pp. 537–544, 2010, doi: 10.1002/sml.200901680.
- [51] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, and J. Dobson, "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine," 2003. [Online]. Available:

<http://iopscience.iop.org/0022-3727/36/13/201>.

- [52] P. Ghosh, G. Han, M. De, C. K. Kim, and V. M. Rotello, "Gold nanoparticles in delivery applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, no. 11. pp. 1307–1315, Aug. 17, 2008, doi: 10.1016/j.addr.2008.03.016.
- [53] S. K. Tammina, A. M. Abdelmonem, and N. K. R. Bogireddy, "Editorial: Bioimaging applications in biosensors and biomolecular electronics," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 13. Frontiers Media SA, 2025, doi: 10.3389/fbioe.2025.1568124.
- [54] P. Khanal, R. Chikhale, and J. Machhi, "Editorial: Targeting neuroinflammation for novel therapeutics in neurodegenerative diseases," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 16. Frontiers Media SA, 2025, doi: 10.3389/fphar.2025.1602495.
- [55] W. Zhang and B. Law, "Editorial: Self-assembly of biomolecules as healthcare materials: drug delivery and beyond," *Frontiers in Chemistry*, vol. 12. Frontiers Media SA, 2024, doi: 10.3389/fchem.2024.1473033.
- [56] J. Wekalao, "High-Efficiency Broadband Solar Absorber Based on Graphene/YBCO/LaAlO₃/Ti for Enhanced Solar Thermal Performance Using Random Forest Regression," *Plasmonics*, 2025, doi: 10.1007/s11468-025-02862-3.
- [57] B. Mohan, S. Kumar, V. Kumar, T. Jiao, H. K. Sharma, and Q. Chen, "Electrochemiluminescence metal-organic frameworks biosensing materials for detecting cancer biomarkers," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 157. Elsevier B.V., Dec. 01, 2022, doi: 10.1016/j.trac.2022.116735.
- [58] G. Nunziata, M. Nava, E. Lacroce, F. Pizzetti, and F. Rossi, "Thermo-Responsive Polymer-Based Nanoparticles: From Chemical Design to Advanced Applications," *Macromolecular Rapid Communications*. John Wiley and Sons Inc, May 01, 2025, doi: 10.1002/marc.202401127.
- [59] S. Sharma, S. K. Shukla, K. K. Govender, and P. P. Govender, "Unveiling the

- multifunctionality of iron oxide nanoparticle: A synergistic experimental and computational investigation," *Chem. Phys. Impact*, vol. 10, p. 100845, Jun. 2025, doi: 10.1016/j.chphi.2025.100845.
- [60] B. Rezaei *et al.*, "Effect of Polymer and Cell Membrane Coatings on Theranostic Applications of Nanoparticles: A Review," *Advanced Healthcare Materials*. John Wiley and Sons Inc, Oct. 18, 2024, doi: 10.1002/adhm.202401213.
- [61] H. Bhardwaj, R. K. Sahu, and R. K. Jangde, "Development and Validation of Simultaneous Estimation of Ferulic Acid and Doxycycline Concentrations Based on Two Different UV Spectrophotometric Methods," *Lett. Appl. NanoBioScience*, vol. 14, no. 2, Jun. 2025, doi: 10.33263/LIANBS142.085.
- [62] E. Caló and V. V. Khutoryanskiy, "Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products," *European Polymer Journal*, vol. 65. Elsevier Ltd, pp. 252–267, 2015, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024.
- [63] M. Elsbahy and K. L. Wooley, "Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, pp. 2545–2561, Mar. 2012, doi: 10.1039/c2cs15327k.
- [64] O. K. Nag and V. Awasthi, "Surface engineering of liposomes for stealth behavior," *Pharmaceutics*, vol. 5, no. 4, pp. 542–569, Oct. 25, 2013, doi: 10.3390/pharmaceutics5040542.
- [65] A. A. Sebak, "Limitations of pegylated nanocarriers: Unfavourable physicochemical properties, biodistribution patterns and cellular and subcellular fates," *International Journal of Applied Pharmaceutics*, vol. 10, no. 5. Innovare Academics Sciences Pvt. Ltd, pp. 6–12, 2018, doi: 10.22159/ijap.2018v10i5.27568.
- [66] R. A. H. Ishak, N. M. Mostafa, and A. O. Kamel, "Stealth lipid polymer hybrid nanoparticles loaded with rutin for effective brain delivery – comparative study with the gold standard (Tween 80): Optimization, characterization and

- biodistribution," *Drug Deliv.*, vol. 24, no. 1, pp. 1874–1890, 2017, doi: 10.1080/10717544.2017.1410263.
- [67] K. Rahme and N. Dagher, "Chemistry routes for copolymer synthesis containing peg for targeting, imaging, and drug delivery purposes," *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 7. MDPI AG, Jul. 01, 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11070327.
- [68] T. T. H. Thi, E. H. Pilkington, D. H. Nguyen, J. S. Lee, K. D. Park, and N. P. Truong, "The importance of Poly(ethylene glycol) alternatives for overcoming PEG immunogenicity in drug delivery and bioconjugation," *Polymers*, vol. 12, no. 2. MDPI AG, Feb. 01, 2020, doi: 10.3390/polym12020298.
- [69] J. D. Friedl, V. Nele, G. De Rosa, and A. Bernkop-Schnürch, "Bioinert, Stealth or Interactive: How Surface Chemistry of Nanocarriers Determines Their Fate In Vivo," *Advanced Functional Materials*, vol. 31, no. 34. John Wiley and Sons Inc, Aug. 01, 2021, doi: 10.1002/adfm.202103347.
- [70] M. Anbarasu, M. Anandan, E. Chinnasamy, V. Gopinath, and K. Balamurugan, "Synthesis and characterization of polyethylene glycol (PEG) coated Fe₃O₄ nanoparticles by chemical co-precipitation method for biomedical applications," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 135, pp. 536–539, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.saa.2014.07.059.
- [71] A. S. Karakoti, S. Das, S. Thevuthasan, and S. Seal, "PEGylated inorganic nanoparticles," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 50, no. 9. pp. 1980–1994, Feb. 25, 2011, doi: 10.1002/anie.201002969.
- [72] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, and L. M. Ensign, "PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 99, pp. 28–51, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.09.012.
- [73] F. M. Veronese and G. Pasut, "m10. PEGylation, successful approach," *Drug Discov. Today*, vol. 10, no. 21, pp. 1451–1458, 2005.

- [74] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, and G. M. Whitesides, "Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology," *Chemical Reviews*, vol. 105, no. 4, pp. 1103–1169, Apr. 2005, doi: 10.1021/cr0300789.
- [75] L. S. Witus and M. B. Francis, "Using synthetically modified proteins to make new materials," *Acc. Chem. Res.*, vol. 44, no. 9, pp. 774–783, Sep. 2011, doi: 10.1021/ar2001292.
- [76] K. Triyana *et al.*, "Chitosan-based quartz crystal microbalance for alcohol sensing," *Electron.*, vol. 7, no. 9, Sep. 2018, doi: 10.3390/electronics7090181.
- [77] D. E. Owens and N. A. Peppas, "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 307, no. 1, pp. 93–102, Jan. 03, 2006, doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.
- [78] K. Matyjaszewski, "Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current status and future perspectives," *Macromolecules*, vol. 45, no. 10, pp. 4015–4039, May 2012, doi: 10.1021/ma3001719.
- [79] N. A. Peppas and E. W. Merrill, "Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 21, no. 7, pp. 1763–1770, 1977, doi: 10.1002/app.1977.070210704.
- [80] A. Verma and F. Stellacci, "Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions," *Small*, vol. 6, no. 1, pp. 12–21, Jan. 04, 2010, doi: 10.1002/sml.200901158.
- [81] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, and N. Li, "Toxic Potential of Materials at the Nanolevel." [Online]. Available: <http://science.sciencemag.org/>.
- [82] Y. Yang *et al.*, "Probing the interaction of nanoparticles with small molecules in real time: Via quartz crystal microbalance monitoring," *Nanoscale*, vol. 11, no. 23, pp. 11107–11113, 2019, doi: 10.1039/c9nr03162f.
- [83] R. L. Rich and D. G. Myszka, "Survey of the year 2004 commercial optical biosensor

- literature," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 18, no. 6. pp. 431–478, Nov. 2005, doi: 10.1002/jmr.753.
- [84] G. Decher, "Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites," *Science* (80-.), vol. 277, no. 5330, pp. 1232–1237, Aug. 1997, doi: 10.1126/science.277.5330.1232.
- [85] Z. Fu, Y.-C. Lu, and J. J. Lai, "Recent Advances in Biosensors for Nucleic Acid and Exosome Detection," *Chonnam Med. J.*, vol. 55, no. 2, p. 86, 2019, doi: 10.4068/cmj.2019.55.2.86.
- [86] E. Baslé, N. Joubert, and M. Pucheault, "Protein Chemical Modification on Endogenous Amino Acids," *Chemistry and Biology*, vol. 17, no. 3. pp. 213–227, Mar. 26, 2010, doi: 10.1016/j.chembiol.2010.02.008.
- [87] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 40, no. 11. pp. 2004–2021, Jun. 01, 2001, doi: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.
- [88] S. P. Black, J. K. M. Sanders, and A. R. Stefankiewicz, "Disulfide exchange: Exposing supramolecular reactivity through dynamic covalent chemistry," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 6, pp. 1861–1872, 2014, doi: 10.1039/c3cs60326a.
- [89] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials," *Biotechnology Advances*, vol. 27, no. 1. pp. 76–83, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.
- [90] H. K. Makadia and S. J. Siegel, "Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier," *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 3, pp. 1377–1397, Sep. 2011, doi: 10.3390/polym3031377.