

**PROSTAT KANSERİ BİYOBELİRTEÇLERİNİN TAYİNİ İÇİN  
NANOPLAZMONİK PLATFORMLARIN HASSASİYETİNİN  
ARTTIRILMASI**

**ENHANCING THE SENSITIVITY OF NANOPLASMONIC  
PLATFORMS FOR DETECTING PROSTATE CANCER  
BIOMARKERS**

**SEMİH ÇALAMAK**

**Prof. Dr. KEZBAN ULUBAYRAM**

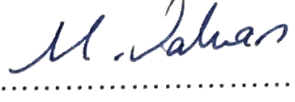
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

**SEMİH ÇALAMAK'** in hazırladığı “**Prostat Kanseri Biyobelirteçlerinin Tayini İçin Nanoplazmonik Platformların Hassasiyetinin Arttırılması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI'** nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

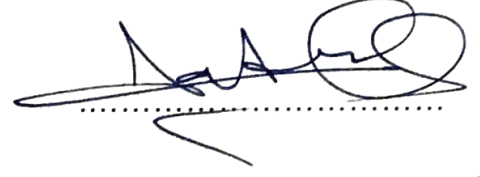
Prof. Dr. Mürvet VOLKAN  
Başkan



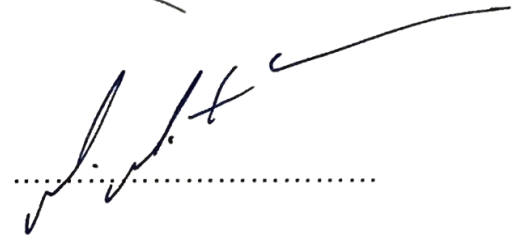
Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM  
Danışman



Prof. Dr. Şadan ÖZCAN  
Üye



Prof. Dr. Mehmet MUTLU  
Üye



Doç. Dr. Memed DUMAN  
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

- ☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ **Tezimin/Raporumun ...07/06/2021.. tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ **Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- ☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

07 / 06 / 2018



Semih ÇALAMAK

## ETİK

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

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

beyan ederim.

07.06.2018



SEMİH ÇALAMAK

## ÖZET

# PROSTAT KANSERİ BİYOBELİRTEÇLERİNİN TAYİNİ İÇİN NANOPLAZMONİK PLATFORMLARIN HASSASIYETİNİN ARTTIRILMASI

**Semih ÇALAMAK**

**Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kezban Ulubayram**

**Haziran 2018, Sayfa 148**

Vücut sıvılarından kanser biyobelirteçlerinin tayini erken teşhis açısından büyük önem taşımaktadır. Lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) bazlı sistemler hiçbir işaretleyici ajana gerek duymadan ultra-düşük (ag/mL) konsantrasyonlarda biyomoleküllerin tayininde kullanılan en güçlü optik biyosensör sistemleridir. Bu avantajlarına rağmen birçok biyomolekül için tespit limitleri istenilen seviyelerde değildir. Özellikle düşük moleküler ağırlığa sahip belirteçler tespit edilememektedir. Bu tez çalışmasının amacı nanoplazmonik platformların hassasiyetinin artırılması ve düşük molekül ağırlıklı belirteçlerin tayini için altın nanopartiküllerin dinamik koşullarda (mikroakışkan platformlarda) “*in-situ*” olarak büyütürek plazmonik eşleşmelerin artırılması ve böylece hassasiyeti artırılmış, kolay ve maliyetsiz nanoplazmonik platformlar geliştirmektir. Tezin ilk bölümünde altın nanopartiküllerin elektrik alan etkileşimlerinin teorik analizleri yapılarak daha hassas bir ölçüm için en uygun altın nanopartikül boyutu ve konfigürasyonu incelenmiştir. Bu amaçla farklı partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin (20, 50, 80 ve 100 nm) Mie teorisi yöntemi kullanılarak altın nanopartiküllerin yüzeylerinde meydana gelen elektrik alanlar incelenmiş ve en yüksek elektrik alan oluşturan nanopartikül boyutunun 50 nm olduğu bulunmuştur. Daha sonra 50 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartikülün ikili, üçlü ve dördü dizileri oluşturulmuş en yüksek elektrik alan arttırımının 40.85 V/m ile dördü nanopartikül dizisinde olduğu ve 11.10 artış

faktörüne (enhancement factor) sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde ise elde edilen teorik veriler ışığında farklı partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin polistiren (PS) yüzeylere polietilenimin (PEI) aracılığıyla immobilize edilerek yüzeylerin nanoplazmonik özellikleri incelenmiş ve nanoplazmonik yüzeylerin en keskin LSPR sinyalini  $548 \pm 1.5$  nm ile 1 mg/mL PEI ile immobilize edildiği yüzeylerin gösterdiği bulunmuştur. Tezin üçüncü bölümünde ise nanoplazmonik platformların hassasiyetinin artırılması için maliyetsiz yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde PS yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartiküller (50 nm) mikroakışkan platformlara entegre edilerek statik ve farklı akış rejimleri gösteren dinamik ortamlarda (laminar ve türbülans akış) “*in-situ*” olarak büyütülmüştür. Laminar ve türbülans akış rejiminin olduğu mikroakışkan çiplerde altın nanopartiküller artan LSPR sinyaliyle birlikte PS yüzeylerde daha homojen büyüdüğü ve tek sıra halinde diziler oluştuğu gözlenmiştir. “*In-situ*” partikül büyümelerinden sonra yüzeye başlangıçta 50 nm olarak immobilize edilen altın nanopartiküller statik ortam, laminar akış ve türbülans akış ortamlarında sırasıyla  $110 \pm 14$ ,  $123 \pm 12$  ve  $175 \pm 6$  ortalama partikül boyutuna ulaşmıştır. Ayrıca “*in-situ*” partikül büyütmelelerinden sonra türbülans “*in-situ*” nanoplazmonik yüzeylerin LSPR sinyallerindeki sönüm yoğunluklarında 3 kata kadar artışla beraber maksimum dalga boyunda anlamlı kaymalar (kırmızı) gözlemlenmiştir. Tezin son bölümünde ise farklı molekül ağırlığına sahip prostat kanser biyobelirteçleri (BSA (66 kDa), TGF- $\beta$ 1 (12.8 kDa) ve BMP-2 (13 kDa) standart, statik (*in-situ*) ve türbülans (*in-situ*) nanoplazmonik yüzeylerde analiz edilmiştir. Türbülans (*in-situ*) nanoplazmonik yüzeylerin yüksek (BSA) ve düşük molekül ağırlıklı (TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2) prostat kanseri biyobelirteçlerinin tayininde 1 pg/mL konsantrasyonundan itibaren standart olarak hazırlanan nanoplazmonik yüzeyler ve statik (*in-situ*) nanoplazmonik yüzeylere göre daha hassas olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, mikroçip içine entegre edilmiş nanoplazmonik platformun güvenilir, doğru, tekrarlanabilir ve uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nanoplazmonik, lokalize yüzey plazmon rezonansı, altın nanopartikül, prostat kanseri, mikroakışkan çip, mikroakışkan çiplerde *in-situ* büyüme

## **ABSTRACT**

### **ENHANCING THE SENSITIVITY OF NANOPLASMONIC PLATFORMS FOR DETECTING PROSTATE CANCER BIOMARKERS**

**Semih ÇALAMAK**

**Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and  
Nanomedicine**

**Supervisor: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM**

**JUNE 2018, 148 pages**

Early detection of cancer biomarkers in body fluids has significant importance for early diagnosis of cancer. LSPR technologies are the most powerful optical biosensors that can be used for label-free detection of biomolecules at ultra-low concentrations (ag/mL). Despite these advantages, the detection limits for many biomolecules are not at the desired levels. Especially biomarkers with low molecular weight can not be detected with LSPR sensors. The aim of the thesis is to develop the easy and cost-effective way to improve the sensitivity of nanoplasmonic platforms to detect low molecular weight biomarkers with enhanced plasmon coupling and *in-situ* gold nanoparticle growth method under static and dynamic conditions (in microfluidic platforms). In the first part of the thesis theoretical analysis of the electric field interactions of gold nanoparticles were investigated to determine the most suitable gold nanoparticle size and configurations for more precise measurement. The electric field enhancements on gold nanoparticles (20, 50, 80 and 100 nm) were investigated using Mie theory and the highest electric field enhancement was observed on the gold nanoparticle, which has the size of 50 nm. After that, double, triple and quadruple gold nanoparticle (50 nm) arrays were assembled and the highest electric field enhancement was calculated for quadruple nanoparticle array with 40.85 V/m electric field and 11.10 electric field enhancement factor. In the second part of the thesis, gold nanoparticles were functionalized on PS surface via polyethyleneimine (PEI). It was found that the nanoplasmonic

surfaces showed the sharpest LSPR signal on the PS surfaces modified with 1 mg/mL PEI at  $548 \pm 1.5$  nm maximum wavelength. In the third part of the thesis, a cost-effective new approach has been developed to increase the sensitivity of nanoplasmonic platforms. In this new approach, gold nanoparticles which were functionalized on PS surface were grown (*in-situ*) under static and dynamic (laminar and dynamic flow) using microfluidic platforms. In microfluidic chips with laminar and turbulence flow regimes, gold nanoparticles were grown more homogeneously and single row sequences on PS surface with increasing LSPR signal. Gold nanoparticles, which have 50 nm of particle size reached  $110 \pm 14$ ,  $123 \pm 12$  and  $175 \pm 6$  average particle size in static media, laminar flow, and turbulence flow media after *in-situ* particle growth, respectively. The maximum wavelengths of nanoplasmonic surfaces were shown red shifts from  $548 \pm 4$  nm to  $569 \pm 3$ ,  $570 \pm 2$  and  $577 \pm 4$  nm for static *in-situ*, laminar *in-situ* and turbulence *in-situ* nanoplasmonic surfaces, respectively. Furthermore, after *in-situ* particle growth, turbulence *in-situ* nanoplasmonic surfaces showed significant red shifts in maximum wavelength along with an increase in extinction intensity in the LSPR signals three times more compared to the standard nanoplasmonic surface. In the last part of the study, detection studies of prostate cancer biomarkers (BSA (66 kDa), TGF- $\beta$ 1 (12.8 kDa) and BMP-2 (13 kDa)) with various molecular weights were carried out on standard, static *in-situ* and turbulent *in-situ* nanoplasmonic surfaces. Turbulent *in-situ* nanoplasmonic surfaces were found more sensitive than standard nanoplasmonic surfaces and static *in-situ* nanoplasmonic surfaces from 1 pg/mL concentration of high (BSA) and low molecular weight (TGF- $\beta$ 1 and BMP-2) prostate cancer biomarkers. These results have shown that the nanoplasmonic platforms integrated into the microchips are reliable, accurate, reproducible and applicable.

**Keywords:** Nanoplasmonic, localized surface plasmon resonance, gold nanoparticle, prostate cancer, microfluidic chip, *in-situ* particle growth in microfluidic chips

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince önümde yeni ufuklar açan, araştırmalarımın her aşamasında bilgi ve önerilerini esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar sosyal ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeye katkıda bulunan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a,

Tez çalışmam boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocalarım Doç. Dr. Eda Ayşe AKSOY ve Doç. Dr. İpek EROĞLU'na,

Laboratuvar çalışmalarımda destekleri ve güler yüzlerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Betül Süyümbike YAĞCI ve Gülseher MANAP'a,

Laboratuvarda her zaman yüzümüzü gülümseten Özlem YURTALAN'a

Doktora sırası araştırmalar yapmak üzere bana yurt dışı desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na

Her anımda yanımda olan, en zor zamanları birlikte geçirdiğimiz, bana olan desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli eşim Elif SARIGÖL ÇALAMAK'a

Hayatımın her anında yanımda olan, gerek akademik, gerekse sosyal hayatta bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili ağabeyim Melih ÇALAMAK'a,

Varlıklarından ve sevgilerinden her zaman güç aldığım, ne olursa olsun her an yanımda olan, duyduğum minneti ifade edebilecek kelime bulamadığım Anne ve Babam'a,

Teşekkür ederim.



*Annem Selma, Babam Yaşar*  
&  
*Eşim Elife*

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

|                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET .....                                                                               | i   |
| ABSTRACT .....                                                                           | iii |
| TEŞEKKÜR .....                                                                           | v   |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....                                                                 | vii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                  | xi  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                    | xii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                                            | xxv |
| 1. GİRİŞ .....                                                                           | 1   |
| 1.1. LSPR Tabanlı Plazmonik Sensörler .....                                              | 2   |
| 1.1.1. Temel İlkeler .....                                                               | 2   |
| 1.1.2. Nanoparçacıkların Plazmonu ve LSPR Teorisi .....                                  | 4   |
| 1.1.3. LSPR Tabanlı Plazmonik Sensörlerin Uygulama Alanları .....                        | 7   |
| 1.1.4. LSPR tabanlı sensörlerin hassasiyetini artırmak için kullanılan yaklaşımlar ..... | 9   |
| 1.4.4.1. Enzimatik yüzey arttırımı .....                                                 | 9   |
| 1.4.4.2. Plazmonik nanopartikül eşleşmesine dayalı sinyal arttırılması .....             | 10  |
| 1.2. Altın Nanoparçacıkların Elektrik Alan Etkileşimlerinin Teorik Analizi .....         | 13  |
| 1.2.1. Teorik Modelleme .....                                                            | 15  |
| 1.2.1.1. Kısmi Statik Yaklaşım .....                                                     | 16  |
| 1.2.1.2. Mie Teorisi .....                                                               | 17  |
| 1.2.2. Plazmon Eşleşmesi ve Elektrik Alan Arttırımı .....                                | 19  |
| 1.3. Altın Nanoparçacıkların Sentezi ve Nanoplazmonik Özellikleri .....                  | 21  |

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.3.1. Altın Nanomalzemelerin Üretiminde Aşağıdan-Yukarı (Bottom-Up) ve Yukarıdan (Top- Down) Aşağı Üretim Teknikleri..... | 21 |
| 1.3.1.1. Altın nanopartiküllerin sentezinde çekirdek büyütme (Seed and Growth) yöntemi .....                               | 24 |
| 1.3.1.2. Altın nanopartikül sentezinde fotokimyasal yöntemler .....                                                        | 24 |
| 1.3.2. Altın Nanopartiküllerin İşlevselleştirilmiş Yüzeyle İmmobilizasyonunu .....                                         | 25 |
| 1.4. Mikroakışkan Sistemler ve Sensör Teknolojilerindeki Yeri .....                                                        | 26 |
| 1.4.1. Mikroakışkan sistemlerde akış rejimleri.....                                                                        | 27 |
| 1.4.2. Türbülans akış rejiminin partikül büyümesi üzerine etkisi.....                                                      | 29 |
| 1.5. Prostat Kanseri Biyobelirteçleri ve Teşhisindeki Zorluklar .....                                                      | 29 |
| 1.5.1. Prostat Kanseri Biyobelirteçleri .....                                                                              | 31 |
| 1.5.1.1. Sığır serum albümin (BSA).....                                                                                    | 31 |
| 1.5.1.2. Transform edici büyüme faktörü beta 1 (TGF- $\beta$ 1) .....                                                      | 31 |
| 1.5.1.3. Kemik morfojenetik proteini 2 (BMP-2) .....                                                                       | 32 |
| 1.5.2. Kanser Teşhisinde Mikroakışkan Çipler .....                                                                         | 33 |
| 2. MATERYAL VE METOD .....                                                                                                 | 35 |
| 2.1. Teorik Modelleme Basamakları.....                                                                                     | 35 |
| 2.1.2. Altın nanopartikül dizilerinin elektrik alan etkileşimlerinin teorik analizi .....                                  | 36 |
| 2.1.3. Mikroakışkan çiplerin modellenmesi ve akış rejimleri .....                                                          | 38 |
| 2.2. Altın Nanoyapıların Sentezi.....                                                                                      | 39 |
| 2.2.1. Farklı boyutlarda altın nanopartiküllerin sentezi .....                                                             | 39 |
| 2.2.2. Altın nanoçubukların sentezi .....                                                                                  | 41 |
| 2.2.3. Altın nanoyapıların karakterizasyonu .....                                                                          | 41 |
| 2.3. Nanoplazmonik Platformların Geliştirilmesi.....                                                                       | 42 |

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.1. Altın nanopartiküllerin polistiren yüzeylere direkt immobilizasyonu ile nanoplazmonik yüzeylerin hazırlanması ..... | 42 |
| 2.3.2. Nanoplazmonik yüzeylerin mikrokakışkan çiplere entegrasyonu ...                                                     | 43 |
| 2.3.2.1. Mikroakışkan çiplerin hazırlanması.....                                                                           | 43 |
| 2.3.2.2. Altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde kontrollü olarak büyütülmesi (In-Situ) .....                                | 46 |
| 2.3.3. Plazmonik Yüzeylerin Analizi .....                                                                                  | 48 |
| 2.4. Geliştirilen Nanoplazmonik Platformlarda Prostat Kanseri Biyobelirteçlerinin Tayini.....                              | 50 |
| 2.4.1. Prostat Kanseri Biyobelirteçlerinin Hazırlanması .....                                                              | 50 |
| 2.4.2. Prostat Kanseri Biyobelirteçlerinin Nanoplazmonik Platformlarla Etkileştirilmesi .....                              | 51 |
| 2.4.3. Nanoplazmonik Yüzeylerin Karakterizasyonu ve LSPR Sinyallerinin Ölçülmesi.....                                      | 51 |
| 2.4.3.1. UV-Vis görüntüleme .....                                                                                          | 51 |
| 2.4.3.2. Data Analizi .....                                                                                                | 53 |
| 2.5. İstatik Analizi .....                                                                                                 | 54 |
| 3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....                                                                                              | 55 |
| 3.1. Altın Nanopartikül Boyut ve Dizilimlerinin Elektrik Alan Etkileşimlerine Etkisi .....                                 | 55 |
| 3.2. Plazmonik Yüzeyler için Sentezlenen Altın Nanoyapıların Özellikleri ve Yüzey Plazmon Rezonansı Üzerine Etkileri ..... | 67 |
| 3.2.1. Altın nanopartiküller .....                                                                                         | 67 |
| 3.2.2. Altın Nanoçubuklar .....                                                                                            | 73 |
| 3.3. Geliştirilen Nanoplazmonik Platformların Değerlendirilmesi .....                                                      | 75 |
| 3.3.1. Altın nanopartiküllerin polistiren yüzeylere direkt immobilizasyonu ile hazırlanan plazmonik yüzeyler.....          | 75 |

|                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3.2. Altın nanopartiküllerin “ <i>in-situ</i> ” olarak PS yüzeylerde büyütülmesiyle geliştirilen nanoplazmonik yüzeyler ..... | 83  |
| 3.3.3. Mikroçip sistemlerde akış dinamiklerinin nanoplazmonik yüzeylere etkisi .....                                            | 91  |
| 3.3.4. Prostat kanseri biyobelirteçlerinin nanoplazmonik yüzeylerde tayini .....                                                | 99  |
| 3.3.4.1. Standart nanoplazmonik yüzeylerde prostat kanseri biyobelirteçlerinin tayini .....                                     | 100 |
| 3.3.4.2. Altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde in-situ olarak büyütüldüğü nanoplazmonik yüzeyler .....                          | 113 |
| 4. SONUÇ .....                                                                                                                  | 140 |
| KAYNAKLAR.....                                                                                                                  | 143 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                                  | 149 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tablo 2.1 Elektrik alan arttırmaları için analiz parametreleri.....                                                                       | 37  |
| Tablo 2.2 AuNP için deneysel koşullar ve tepkime konsantrasyonları.....                                                                   | 41  |
| Tablo 3.1 İkili altın nanopartikül sistemlerindeki partiküllerin maksimum elektrik alan arttırmaları ve elektrik alan artış faktörü. .... | 61  |
| Tablo 3.2 Sentezlenen altın nanopartiküllerin özellikleri.....                                                                            | 73  |
| Tablo 3.3 Nanoplazmonik yüzeylerin $R^2$ ve tekrarlanabilirlik değerleri. ....                                                            | 138 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1 Plazmon rezonansı oluşum mekanizmaları; A) Yüzey plazmon rezonansı: Bu sistemde yüzey tabakasının yakınında bulunan kırılma indisindeki değişiklikler bir sensör çipi ile tespit edilir. Plazmonik rezonans yansıyan ışıktaki, yüzeydeki maddenin kütlesine bağlı olan bir açıda keskin bir kayma olarak gözlemlenir. B) Lokalize yüzey plazmon rezonansı: Parçacık plazmonlarının metalik nanoparçacıkların polarizasyonu yoluyla uyarılması. Rezonans frekansında plazma, 90 ° faz farkıyla salınım yapmaktadır. ....                                                                                                                                                                                                                             | 5  |
| Şekil 1.2 LSPR sinyali ve $\lambda_{max}$ kayması .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 7  |
| Şekil 1.3. Elektromanyetik ışık spektrumu.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 14 |
| Şekil 1.4 Laminar ve türbülans akış dinamikleri.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 28 |
| Şekil 2.1 Altın nanopartiküller arasında oluşan elektrik alan dağılımı ve sıcak noktalar. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 36 |
| Şekil 2.2 Teorik analiz yaklaşımı. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 37 |
| Şekil 2.3 COMSOL Multiphysics 5.2a ara yüzü. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 38 |
| Şekil 2.4 Mikroakışkan kanalın ağ yapısının gösterimi. A) Laminer akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın mesh yapısı, B) Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın mesh yapısı. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 39 |
| Şekil 2.5 PS yüzeylerde nanoplazmonik platformların hazırlanması. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 43 |
| Şekil 2.6 Akis rejimlerinin PS yüzey üzerine immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin <i>in-situ</i> büyümesi üzerine etkisinin incelenmesi için tasarlanan mikroakışkan çip tasarımları. Tez kapsamında kullanılan çiplerin her bir katmanı mikro işleme teknolojilerinden olan lazer kesici kullanılarak oluşturulmuştur. A) Laminer akis rejimine sahip mikroakışkan çip tasarımı; en alt katman 0.8 mm PS yüzey mikroakışkan cipin kanalini oluşturan orta katman 1.5 mm kalınlığında PMMA yüzey ve giriş ve çıkış portlarının bulunduğu en üst katman ise 1.5 mm kalınlığında PMMA yüzeylerden kesilerek oluşturulmuştur. Bütün katmanlar 80 µm DSA kullanılarak birleştirilmiştir. B) Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan çip tasarımı; en alt |    |

katman 0.8 mm PS yüzey, mikroakışkan cipin kanalini oluşturan orta katman 1.5 mm kalınlığında PMMA yüzey ve giriş ve çıkış portlarının bulunduğu en üst katman ise 1.5 mm kalınlığında PMMA yüzeylerden kesilerek oluşturulmuştur. Bütün katmanlar 80 µm DSA kullanılarak birleştirilmiştir..... 45

Şekil 2.7 PS yüzey üzerine immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin büyüme çözeltisi kullanılarak PS yüzeyinde *in-situ* olarak büyütülmesi. A) Yüzeyi temizlenmiş PS yüzey, B) PS yüzeye PEI yüzey modifikasyonu (Bölüm 2.3.1' de optimize edilen konsantrasyonda (1 mg/mL)) PEI, PS yüzeylerle etkileştirilerek 24 saat inkube edilmiştir. C) PEI ile işlevselleştirilmiş yüzeylere 50 nm partikül biyutuna sahip altın nanopartiküllerin immobilizasyonu. D) Nanoplazmonik yüzeylerin eldesi (Standart nanoplazmonik yüzeyler). E) Nanoplazmonik platformlarda LSPR sinyalinin hassasiyetini arttırmak için yüzeye immobilize olmuş altın nanopartiküllerin yüzeyine *in-situ* büyüme çözeltilerinin (0.1-2 mM konsantrasyon aralığında) eklenmesi. F) PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütülmüş ve LSPR sinyali arttırılmış nanoplazmonik platformların eldesi. .... 47

Şekil 2.8 Farklı akış rejimlerine sahip mikroakışkan çipler kullanarak nanoplazmonik yüzeylerde *in-situ* partikül büyümesinin incelenmesi için kullanılan sistemin görüntüsü. A) Ayarlanabilir şırınga pompası, mikroakışkan çip ve bağlantı tüplerinden oluşan düzeneğin görüntüsü. B) Laminer ve türbülans akış rejimlerine ait mikroakışkan çiplere büyüme çözeltisinin iki ayrı giriş portundan verilmesi. C) Laminer mikroakışkan kanalın görüntüsü. D) Giriş (iki ayrı kanaldan büyüme çözeltisinin akışı) ve çıkış portlarına silikon tüplerin epoksi yapıştırıcı kullanarak bağlanması ve mikroakışkan çip düzeneğinin görüntüsü. .... 48

Şekil 2.9 Altın nanopartiküllerin haritalama (Nanoparticle Mapping) yöntemi ve partikül sayılarının hesaplanması A) Altın nanopartiküllerin PS yüzeydeki partikül sayılarının ve yoğunluğunun hesaplanması için Image J yazılımındaki işlem basamakları B) Üst üste çakışan ve birbirleriyle bitişik olan nanopartiküllerin birbirlerinden ayrılarak analize dahil edilmesi. .... 49

Şekil 2.10 Tez çalışmasında kullanılan iki farklı UV-Vis spektroskopisi A) Miko plaka okuyucu tipindeki UV-Vis spektroskopisi, B), C) Mikroakışkan çiplerin ölçümlerinin alındığı UV-Vis spektroskopisi. B) UV-Vis spektroskopisine mikroakışkan çiplerin

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| yerleştirilmesi (10 mm x 40 mm), C) UV-Vis spektroskopisi cihazından mikroakışkan çipi ölçümü alınması. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 52 |
| Şekil 2.11 UV-Vis spektroskopisinde mikroakışkan çiplerinin ölçümlerinin alındığı noktalar. A) Laminer akış rejimine sahip mikroakışkan çip. B)Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan çip. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 53 |
| Şekil 3.1 Model katmanları .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 56 |
| Şekil 3.2 a) Değişken çapları 20 nm, 50 nm, 80 nm ve 100 nm olan dört altın nanopartikül için elektrik alan (electric field) dağılımının karşılaştırılması. Alan dağılımları, dalga boyu 550 nm olan elektromanyetik dalgasına göre aydınlatmaya karşılık gelir. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 57 |
| Şekil 3.3 LSPR sensör yüzeylerinde oluşan ve COMSOL yazılımı kullanılarak analizleri yapılan farklı altın konfigürasyonlarının şematik gösterimi verilmiştir. Altın nanopartiküller arasında oluşacak sıcak noktalar ve elektrik alan genişlemeleri kırmızı ok ile gösterilmiştir. A) Altın nanopartiküllerin yx düzlemindeki konfigürasyonları, B) Altın nanopartiküllerin yz düzlemindeki konfigürasyonları. .                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 59 |
| Şekil 3.4 LSPR sensör yüzeylerindeki farklı altın nanopartiküllerin COMSOL konfigürasyonları. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 60 |
| Şekil 3.5 Çapı 50 nm olan iki altın nanopartikül arasında oluşan elektrik alan dağılımları; TEM görüntüsü skala bar: 20 nm. Alan dağılımları, Dalga boyu 550 nm olan elektromanyetik dalgasına göre aydınlatmaya karşılık gelir ve gelen ışık 45°'dir. A) Nanopartiküller arası mesafe 10 nm, 5 nm, 2 nm, 1 nm, 0 nm, B) Nanopartiküller arası mesafeye göre meydana gelen maksimum elektrik alan, C) İki altın nanopartikül sisteminde mesafeleri değişen elektrik alanının geliştirme faktörü; $E_0$ , iki altın nanopartikülün birbirinden sonsuz uzak olduğu (bir altın nanopartikül ile modellendiğinde) maksimum elektrik alanıdır. $E_{max}$ ise nanopartiküller arasında ölçülen maksimum elektrik alanıdır. .... | 62 |
| Şekil 3.6 Çapı 50 nm olan iki altın nanopartikül arasında oluşan elektrik alan dağılımlarının farklı dalga boylarına göre diyagramı ( $d=5$ nm). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 64 |
| Şekil 3.7 Çapı 50 nm olan altın nanopartiküllerin farklı konfigürasyonlarda dizilimi ve elektrik alan dağılımları; TEM görüntüsü skala bar: 25 nm. Alan dağılımları, Dalga boyu 580 nm olan elektromanyetik dalgasına göre aydınlatmaya karşılık gelir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Kırmızı oklar nanopartiküllerin temas noktalarını ve nanopartiküller arasında oluşan sıcak noktaları göstermektedir.....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 65 |
| Şekil 3.8 Çapı 50 nm olan altın nanopartiküllerin aralarında üçgen oluşturmaları ve farklı dalga boylarına göre elektrik alan dağılımları ( $d=0$ ).....                                                                                                                                                                                                                                                              | 66 |
| Şekil 3.9 Turkevich metodu ile sentezlenen 20 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin yoğunluğa karşı boyut grafiği ve TEM görüntüsü. Skala bar 50 nm. ....                                                                                                                                                                                                                                                | 68 |
| Şekil 3.10 Turkevich metodu ile sentezlenen 100 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin yoğunluğa karşı boyut grafiği ve TEM görüntüsü. Skala bar 50 nm. ....                                                                                                                                                                                                                                              | 69 |
| Şekil 3.11 Çekirdek büyütme metodu ile sentezlenen 50 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin yoğunluğa karşı boyut grafiği ve TEM görüntüsü. Skala bar 50 nm. ....                                                                                                                                                                                                                                        | 70 |
| Şekil 3.12 Çekirdek büyütme metodu ile sentezlenen 80 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin yoğunluğa karşı boyut grafiği ve TEM görüntüsü. Skala bar 50 nm. ....                                                                                                                                                                                                                                        | 70 |
| Şekil 3.13 Farklı partikül boyutuna sahip altın nanopartikül çözeltilerinin karakteristik renkleri. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 71 |
| Şekil 3.14 Farklı boyutlarda (20, 50, 80 ve 100 nm) sentezlenen altın nanopartiküllerin; A) Sönüm (extinction) spektrumları, B) Nanopartiküllerde maksimum plazmon rezonansının nanoparçacık çapı (D) ile maksimum absorpsiyonun değişimi. ....                                                                                                                                                                       | 72 |
| Şekil 3.15 Altın nanoçubukların TEM görüntüleri ve sönüm yoğunlukları .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 74 |
| Şekil 3.16 Altın nanoçubukların yüzey plazmon rezonansı ve suda karşılık gelen elektronik soğurma spektrumu. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 74 |
| Şekil 3.17 PS yüzeylere farklı konsantrasyonlarda PEI immobilizasyonu sonucu meydana gelen spektral tepe kaymaları; A) PS yüzeylerde PEI aracılığıyla altın nanopartiküllerin tutunması, B) Farklı PEI konsantrasyonlarında LSPR spektralları, C) Farklı PEI konsantrasyon aralığındaki tepe noktaları ( $n = 6$ ). PEI konsantrasyonu ve dalga boyu kayması arasında dogrusal olmayan korelasyon gözlemlenmiştir. D) |    |

Farklı PEI konsantrasyonlarındaki sönüm yoğunlukları. Dalga boyu ölçümleri için tüm veriler, dalga boyu ölçümleri ortalaması  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak sunulmuştur..... 77

Şekil 3.18 Farklı altın nanopartikül konsantrasyonlarının (0.05, 0.1 ve 0.2 mmol/L) LSPR spektrallerindeki değişimi. A) LSPR spektralleri. B) sönüm yoğunlukları, C) LSPR spektrallerindeki maksimum dalga boyları. .... 78

Şekil 3.19 Farklı PEI konsantrasyonlarının (0.05-8 mg/mL) altın nanopartiküllerin PS yüzeyler üzerinde dağılımlarının farklı magnifikasyonlarda (5000X, 10000X, 20000X ve 50000X) SEM görüntüsü. A) 0.05, B) 0.5, C) 1, D) 2, E) 4 ve F) 8 mg/mL. Skala bar 2 $\mu$ m. .... 80

Şekil 3.20. Farklı PEI konsantrasyonlarının (0.05-8 mg/mL) altın nanopartiküllerin PS yüzeyler üzerinde dağılımlarının SEM görüntüsü; A) 0.05, B) 0.5, C) 1, D) 2, E) 4 ve F) 8 mg/mL. Skala bar 1 $\mu$ m. .... 81

Şekil 3.21 Farklı PEI konsantrasyonlarında (0.05-8 mg/mL) PS yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin SEM görüntüleri ve Image J analizleri A) Farklı PEI konsantrasyonlarında (0.05-8 mg/mL) PS yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin SEM görüntüleri ve eşik değeri alınmış SEM görüntüleri B) Üst üste çakışan ve birbirleriyle bitişik olan nanopartiküllerin birbirlerinden ayrılarak analize dahil edilmesi (Watershed). C) Farklı PEI konsantrasyonlarında (0.05-8 mg/mL) PS yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartikül sayıları. .... 82

Şekil 3.22 PS yüzeylerin altın nanopartiküllerle yüzey modifikasyonu ve değişen PEI konsantrasyonlarına karşılık gelen floresans spektrumları..... 83

Şekil 3.23 PS yüzeye immobilize olmuş altın nanopartiküllerin yüzeylerine H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 'ün indirgenmesi ve partikül yüzeyinde kontrollü büyümesi. .... 85

Şekil 3.24 Artan hidrokinon konsantrasyonuyla birlikte 96 kuyucuklu petri kaplarındaki gözle görülebilir renk değişimi. .... 86

Şekil 3.25 Bölüm 3.3.2'de optimize edilen 1 mg/mL konsantrasyonunda PEI kullanılarak altın nanopartiküllerin (50 nm) PS yüzeylere yüksek oranda immobilizasyonunun gerçekleştirilmesinden sonra bu partiküllerin PS yüzeyde (*in-situ*) kontrollü olarak büyümesini incelemek için optimum hidrokinon (zayıf indirgen)

konsantrasyonunun belirlenmesi. Kontrol grubu 1mg/mL PEI varlığında PS yüzeye immobilize edilen altın nanopartiküllerin oluşturduğu nanoplazmonik yüzeyler seçilmiştir (Standart nanoplazmonik yüzey). Deneyler boyunca ortama eklenen H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> konsantrasyonu (1mM) sabit tutulmuştur. A) 0.1-2 mM hidrokinon ve 1mM H<sub>Au</sub>Cl<sub>4</sub> varlığında statik koşullarda (96 kuyucuklu petri) altın nanopartiküllerin *in-situ* olarak büyümeleri sonucu oluşan LSPR spektrası ve LSPR spektrasının enine kesiti. B) Farklı hidrokinon konsantrasyonları için elde edilen LSPR spektralarının maksimum dalga boyları ( $\lambda_{max}$ ). C) Farklı hidrokinon konsantrasyonları için elde edilen LSPR spektralarının maksimum sönüm yoğunlukları. D) Farklı hidrokinon konsantrasyonlarının nanoplazmonik yüzeylerde meydana getirdikleri *in-situ* büyümenin 96 kuyucuklu petri kaplarında makroskopik olarak gözlenmesi. .... 87

Şekil 3.26 Değişen hidrokinon konsantrasyonlarında (0.1-2 mM) PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntüleri (Mag: 50 000X) (Altındaki SEM görüntülerinde Skala Bar: 200 nm Mag: 80 000X) A) Standart nanoplazmonik yüzey, B) 0.1 mM, C) 0.3 mM, D) 0.5 mM, E) 0.7 mM, F) 1mM, G) 1.5 mM ve H) 2mM. .... 89

Şekil 3.27 Değişen hidrokinon konsantrasyonlarında (0.1-2 mM) PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntüleri (Skala Bar: 100 nm Mag:100 000 X). A) 0.1 mM, B) 0.3 mM, C) 0.5 mM, D) 0.7 mM, E) 1mM, F) 1.5 mM ve G) 2mM..... 90

Şekil 3.28 PS yüzeylere immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin *in-situ* büyümesini etkileyen akış dinamikleri ve akış hızı profilleri (Computational fluid dynamics (CFD) Analizi). A) Laminer akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın akış hızı profili (kırmızı oklar akış yönünü ve hareketini göstermektedir). B) Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın akış hızı profili (beyaz oklar akış yönünü ve hareketini göstermektedir). .... 92

Şekil 3.29 Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın ayrıntılı görüntüsü. A) Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın akış hızı profillerinin 3D gösterimi. B) Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın giriş portundan yarısına kadar olan kesiti (beyaz oklar akış yönünü ve hareketini göstermektedir). C) Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın ortasından çıkış portuna kadar olan kesiti (beyaz oklar akış yönünü ve hareketini göstermektedir). .... 92

Şekil 3.30 Nanoplazmonik yüzeyler oluşturmak için PS yüzeylere immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin farklı büyüme koşullarında (statik, laminar akış ve türbülans akış) *in-situ* olarak büyütülmesi ve nanoplazmonik yüzeylerin SEM görüntüleri (Mag: 50 000 X) Altındaki SEM görüntülerinde Mag: 100 000X, Skala Bar: 200 nm) A) Bölüm 3.3.1’de optimize edilen 1 mg/mL konsantrasyonunda PEI kullanılarak altın nanopartiküllerin (50 nm) PS yüzeylere yüksek oranda immobilizasyonunun gerçekleştirilmesi ve yüzeye immobilize edilen altın nanopartiküllerin SEM görüntüsü. B) Büyüme çözeltisiyle (1.5 mM hidrokinon ve 1 mM H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub>) birlikte yüzeye immobilize edilen altın nanopartiküllerin statik koşullarda (96 kuyucuklu petri) büyütülmesi C) Daha önceden yüzeye immobilize edilen altın nanopartiküllerin laminar akış rejimine sahip mikroçip içerisinde büyütülmesi ve PS yüzeydeki altın nanopartiküllerin SEM görüntüsü. C) Daha önceden yüzeye immobilize edilen altın nanopartiküllerin türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde büyütülmesi ve PS yüzeydeki altın nanopartiküllerin SEM görüntüsü. .... 94

Şekil 3.31 Nanoplazmonik yüzeyler oluşturmak için PS yüzeylere immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin farklı büyüme koşullarında (statik, laminar akış ve türbülans akış) *in-situ* olarak büyütülmesi ve nanoplazmonik yüzeylerin SEM görüntüleri kullanılarak Image J yazılımı kullanılarak partikül sayısı ve ortalama partikül büyüklüğünün belirlenmesi. A) 50 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin PS yüzeydeki SEM görüntüsü. B) Statik koşullarda *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntüsü. C) Laminar akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntüsü. D) Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntüsü. E) 50 nm partikül boyutuna sahip altın naopartiküllerin SEM görüntülerinin Image J yazılımıyla eşik değerlerinin (thershold) alınması. F) Statik koşullarda *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntülerinin Image J yazılımıyla eşik değerlerinin alınması. G) Laminar akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntülerinin Image J yazılımıyla eşik değerlerinin alınması. H) Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntülerinin Image J yazılımıyla eşik değerlerinin alınması. .... 96

Şekil 3.32. Statik ve dinamik (laminar ve türbülans akış) koşullarda *in-situ* olarak altın nanopartiküllerin büyütmesinden sonra PS yüzeylerdeki altın nanopartikül

sayısı ve ortalama altın nanopartikül boyutları, A) Image J yazılımı kullanılarak farklı ortam koşullarında (statik ve dinamik) PS yüzeylerde kontrollü olarak büyütülen altın nanopartikül sayıları (SEM görüntüsü n=3). B) Farklı *in-situ* büyüme koşullarında ortalama altın nanopartikül boyutunun değişimi. Nanopartiküllerin ortalama boyutu Image J yazılımı kullanılarak en az 100 partikülün (n=100) ölçümü alınarak gerçekleştirilmiştir. .... 97

Şekil 3.33 Statik ve dinamik (laminar ve türbülans akış) koşullarda *in-situ* olarak altın nanopartiküllerin büyütmesinden sonra ölçülen LSPR sinyalleri. A) Altın nanopartiküllerin *in-situ* olarak büyümeleri sonucu oluşan LSPR spektrası ve LSPR spektrasının enine kesiti. B) Altın nanopartiküllerin *in-situ* olarak büyümeleri sonucu LSPR spektralarının maksimum dalga boyları ( $\lambda_{max}$ ). C) Altın nanopartiküllerin *in-situ* olarak büyümeleri sonucu oluşan LSPR spektralarının maksimum sönüm yoğunlukları. .... 98

Şekil 3.34 Nanoplazmonik platformların geliştirilmesi için izlenen yüzey modifikasyonlarının şematik olarak gösterilmi. .... 99

Şekil 3.35 Standart nanoplazmonik yüzeylerin prostat kanseri biyobelirteçlerine karşı seçici hale getirilmesi için Bölüm 2.3.1' de bahsedilen yüzey modifikasyonu basamaklarının sırasıyla uygulanmasından sonra LSPR sinyallerinde meydana gelen değişimler, A) PS yüzeye altın nanopartikül immobilizasyonu, MUA ve EDC/NHS modifikasyonlarından sonra ölçülen LSPR spektraları ve LSPR spektralarının enine kesiti. B) Nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra ölçülen LSPR spektralarının maksimum dalga boyları ( $\lambda_{max}$ ). C) Nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra ölçülen LSPR spektralarının maksimum sönüm yoğunlukları. .... 101

Şekil 3.36 BSA ile etkileştirilen standart nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au). .... 102

Şekil 3.37 Standart nanoplazmonik yüzeylerin PBS içinde hazırlanmış 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BSA ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektraları ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir). .... 103

Şekil 3.38 Standart nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış BSA tespiti için alınan ölçümler. A) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği. ... 105

Şekil 3.39 TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirilen standart nanoplazmonik yüzeylerin A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au). ..... 106

Şekil 3.40 Standart nanoplazmonik yüzeylerin PBS içerisinde hazırlanmış 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir)..... 107

Şekil 3.41 Standart nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış TGF- $\beta$ 1 tespiti için alınan ölçümler. A) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği. .... 109

Şekil 3.42 BMP-2 ile etkileştirilen standart nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au). ..... 110

Şekil 3.43 Standart nanoplazmonik yüzeylerin PBS içerisinde hazırlanmış 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BMP-2 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir)..... 111

Şekil 3.44 Standart nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış BMP-2 tespiti için alınan ölçümler. A) BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği. 112

Şekil 3.45 Statik koşullarda (96 kuyucuklu petri) *in-situ* olarak altın nanopartiküllerin büyütülmesinden sonra LSPR sinyali arttırılmış yüzeylere Bölüm 2.3.1' de bahsedilen yüzey modifikasyonu basamaklarının sırasıyla uygulanmasından sonra LSPR sinyallerinde meydana gelen değişimler. A) Statik koşullarda altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütüldüğü nanoplazmonik yüzeylere sırasıyla MUA ve EDC/NHS modifikasyonları uygulandıktan sonra ölçülen LSPR spektraları ve LSPR spektralarının enine kesiti. B) Statik koşullarda *in-situ* altın nanopartikül büyümesi sonucu oluşturulmuş nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra LSPR spektralarındaki maksimum dalga boyları ( $\lambda_{max}$ ). C) Statik koşullarda *in-situ* altın nanopartikül büyümesi sonucu oluşturulmuş nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra LSPR spektralarındaki maksimum sönüm yoğunlukları.

..... 114

Şekil 3.46 BSA ile etkileştirilen statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au). ..... 115

Şekil 3.47 Statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BSA ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektraları ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir). ..... 116

Şekil 3.48 Statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış BSA tespiti için alınan ölçümler. A) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği. ... 117

Şekil 3.49 TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirilen statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au). ..... 118

Şekil 3.50 Statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektraları ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir). ..... 119

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 3.51 Statik <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış TGF- $\beta$ 1 tespiti için alınan ölçümler. A) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 120 |
| Şekil 3.52 BMP-2 ile etkileştirilne statik <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 121 |
| Şekil 3.53 Statik <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BMP-2 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektraları ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 122 |
| Şekil 3.54 Statik <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış BMP-2 tespiti için alınan ölçümler. A) BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği..                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 123 |
| Şekil 3.55 Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde <i>in-situ</i> olarak altın nanopartiküllerin büyütülmesinden sonra LSPR sinyali arttırılmış yüzeylerde LSPR sinyallerinde meydana gelen değişimler. A) Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde <i>in-situ</i> olarak büyütüldüğü nanoplazmonik yüzeylere sırasıyla MUA ve EDC/NHS modifikasyonları uygulandıktan sonra ölçülen LSPR spektraları ve LSPR spektralarının enine kesiti. B) Statik koşullarda <i>in-situ</i> büyüme sonucu LSPR sinyal hassasiyeti arttırılmış nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra ölçülen LSPR spektralarının maksimum dalga boyları ( $\lambda_{max}$ ). C) Statik koşullarda <i>in-situ</i> büyüme sonucu LSPR sinyal hassasiyeti arttırılmış nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra ölçülen LSPR spektralarının maksimum sönüm yoğunlukları. B) Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde <i>in-situ</i> olarak büyütüldüğü nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra LSPR |     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| spektralarındaki maksimum dalga boyları ( $\lambda_{max}$ ). C) Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde <i>in-situ</i> olarak büyütüldüğü nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra LSPR spektralarındaki maksimum sönüm yoğunlukları. ....                                                                                                                                     | 125 |
| Şekil 3.56 BSA ile etkileştirilen türbülans <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 126 |
| Şekil 3.57 Türbülans <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BSA ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektraları ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir). ....                                                                                           | 127 |
| Şekil 3.58 Türbülans <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış BSA tespiti için alınan ölçümler. A) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği. ...                                              | 128 |
| Şekil 3.59 TGF- $\beta$ 1 için türbülans <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 129 |
| Şekil 3.60 Türbülans <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektraları ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir). ....                                                                                | 130 |
| Şekil 3.61 Türbülans <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış TGF- $\beta$ 1 tespiti için alınan ölçümler. A) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği. .... | 131 |
| Şekil 3.62 BMP-2 için türbülans <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 132 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 3.63 Türlölans <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeylein 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BMP-2 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralei ve maksimum dalęa boyunda meydana gelen kayma değışimleii ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir). .....                                                                                          | 133 |
| Şekil 3.64 Türlölans <i>in-situ</i> nanoplazmonik yüzeyleide PBS içeriisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış TGF- $\beta$ 1 tespiti için alınan ölçümler. A) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalęaboyu değışimi. B) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalęaboyu değışimi ve kalibrasyon eğrii C) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği. .... | 134 |
| Şekil 3.65 Nanoplazmonik yüzeyleilerin farklı BSA konsantrasyonlarındaki performanslarının karşılaştıırılması. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 136 |
| Şekil 3.66 Nanoplazmonik yüzeyleilerin farklı TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonlarındaki performanslarının karşılaştıırılması. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 136 |
| Şekil 3.67 Nanoplazmonik yüzeyleilerin farklı BMP-2 konsantrasyonlarındaki performanslarının karşılaştıırılması. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 137 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|       |                                                        |
|-------|--------------------------------------------------------|
| AuNP  | Altın nanopartikül                                     |
| BCML  | Blok Kopolimer Litografisi                             |
| BSA   | Sığır Serum Albümin                                    |
| BMP-2 | Kemik Morfogenetik Proteini-2                          |
| CAD   | Bilgisayar Destekli Tasarım                            |
| CFD   | Computational Fluid Dynamics                           |
| CTAB  | Hexadesiltrimetiammonyumbromit                         |
| DDA   | Ayrık Dipole Yaklaşım                                  |
| DNA   | Deoksiribonükleik asit                                 |
| DSA   | Çift taraflı yapışkan bant                             |
| EBL   | Elektron Demeti Litografisi                            |
| EDC   | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit hidrokorit |
| EM    | Elektromanyetik                                        |
| FEM   | Sonlu Elemanlar Metodu                                 |
| FISH  | Floresans <i>In-situ</i> Hibritleşmesi                 |
| HCl   | Hidroklorik asit                                       |
| LC-MS | Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi               |
| LOD   | Tespit Limiti                                          |
| LSP   | Lokalize yüzey plazmonu                                |
| LSPR  | Lokalize Yüzey Plazmon Rezonansı                       |
| MAD   | Maske Aracılı Birikim                                  |
| MUA   | merkaptoundekanoik asit                                |
| NSL   | Nanoküre Litografisi                                   |
| NHS   | N-Hidroksisüksinimit                                   |
| PC    | Polikarbonat                                           |
| PCR   | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                            |
| PDMS  | Polimetilsiloksan                                      |
| PEI   | Polietilen imin                                        |
| PMMA  | Polimetil metakrilat                                   |
| PML   | Mükemmel Katmanlı Tabakalar                            |
| PRM   | Parmakla Rektal Muayene                                |
| PS    | Polistiren                                             |

|                |                                           |
|----------------|-------------------------------------------|
| PSA            | Prostat Spesifik Antijen                  |
| PSP            | Yayılan yüzey plazmonu                    |
| PVP            | Polivinil prolidon                        |
| RI             | Refraktif indeks                          |
| SEM            | Taramalı Elektron Mikroskobu              |
| SP             | Yüzey plazmonları                         |
| TEM            | Geçirmeli Elektron Mikroskobu             |
| TGF- $\beta$ 1 | Transforme Edici Büyüme Faktörü $\beta$ 1 |
| TRUS           | Transrektal Ultrasonografi                |
| UV             | Ultraviyole ışık                          |
| $\mu$ m        | Mikrometre                                |



## 1. GİRİŞ

Biyosensörler, biyokimyasal araştırmalar, hastalıkların tanısı, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi, gıda teknolojisi, yasadışı uyuşturucuların tespiti gibi uygulamalar için önemli ve güçlü araçlardır. Geleneksel biyosensörler büyük numune hacmi, geniş zaman, laboratuvar ortamı ve ekipmanları gerektirir. Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişmelerle birlikte, sensör uygulamalarında yüksek hassasiyet, hızlı tepki, küçük numune hacmi, sağlamlık, minyatürleştirme ve düşük maliyet gibi konular önem kazanmış ve çalışmalar bu özelliklere yönelik yeni sensör tasarımları üzerine yoğunlaşmıştır.

Çeşitli biyosensör teknolojileri arasında optik biyosensörler biyolojik ve kimyasal analitlerin algılanmasında en eski ve yaygın olarak kullanılan teknikler arasındadır. Optik biyosensörlerin bir alt kolu olan yüzey plazmon rezonansı temelli (SPR) ve lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) sensörler, yüksek duyarlılık, işaretleyiciye ihtiyaç duymadan algılama, hızlı tepki ve gerçek zamanlı görüntüleme gibi cazip özelliklerinden dolayı oldukça ilgi çekmektedir.

LSPR çok yönlü ve hassas bir teknik olmasına rağmen pratikte kullanımını sınırlayan bazı zorluklarla karşı karşıyadır. LSPR bazlı biyosensör ölçümleri nanoparçacık yüzeyindeki kırılma indeksindeki değişiklikleri tespit ettiğinden yüzeyi kaplamak için büyük sayılar gerektiren küçük moleküllerin saptanması büyük bir problemdir. Düşük konsantrasyondaki analitlerin (proteinler patolojik belirteçler, toksinler vb.) hızlı ve doğru tespiti, tıbbi teşhis, çevresel izleme veya gıda endüstrisinde kalite kontrolü gibi birçok alan için büyük önem taşımaktadır. Bu konular arasında kanser biyobelirteçlerinin vücut sıvılarından erken teşhisi LSPR tabanlı sistemlerle çalışılan önemli bir konudur. LSPR tabanlı sensörlerin en büyük dezavantajı kanserin erken evrelerinde aktive olan düşük molekül ağırlığa sahip biyobelirteçlerin LSPR sensör yüzeyinde tespit edilebilir değişiklikler meydana getirmemesidir ve bu tip biyobelirteçlerin teşhisinde yetersiz kalmasıdır [1].

Bu tez çalışmasının amacı, altın nanopartiküller kullanarak hassasiyeti arttırılmış kolay ve maliyetsiz nanoplazmonik platformlar geliştirmek ve bu platformların farklı molekül ağırlığına sahip prostat kanseri biyobelirteçleri üzerinde tespit limitlerinin arttırılmasıdır. Bu amaçla, altın nanopartiküllerin optik özelliklerini ve nanopartikül plazmonik eşleşmelerini ayarlamak için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde

yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartikül dizilerinin partikül boyutunu ve partiküller arası mesafelerini ayarlamak için altın nanopartiküller PS yüzeylerde “*in-situ*” olarak büyütülmüştür. Bu yöntemde, yüzeye immobilize edilerek sabitlenmiş altın nanopartiküllerin yüzeyine iyonik bir metal kompleksi olan  $\text{AuCl}_4^-$ ’ün indirgenmesi için  $\text{HAuCl}_4$  çözeltisi ve indirgeyici madde olarak da hidrokinon kullanılmıştır. Tez kapsamında altın nanopartiküllerin yüzeyde (*in-situ*) büyütülmesi için 96 kuyucuklu polistiren petri (statik) ve mikroakışkan çip (dinamik) olmak üzere iki farklı formatta nanoplazmonik yüzeyler hazırlanmıştır. Altın nanopartiküllerin yüzeyde kontrollü büyümesini araştırmak için farklı akış rejimlerine (laminar ve türbülans) sahip mikroakışkan çipler geliştirilerek akış rejimlerinin partikül büyümesine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla; nanoplazmonik sistem polistiren yüzeylerde oluşturulduktan sonra buna paralel olarak aynı sistem, mikroakışkan PMMA (polimetilmetakrilat) kanallara sahip polistiren yüzeylerde oluşturularak iki sistemdeki partikül büyümesi ve plazmonik artışlar değerlendirilmiştir. Daha sonra BSA (66 kDa), TGF- $\beta$ 1 (12.8 kDa) ve BMP-2 (13 kDa) olmak üzere farklı molekül ağırlıklarına sahip prostat kanseri biyobelirteçlerinin standart, statik *in-situ* ve türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde tespit çalışmaları yürütülmüştür.

## 1.1. LSPR Tabanlı Plazmonik Sensörler

### 1.1.1. Temel İlkeler

Plazmonik metalik veya nanometalik arayüzlerindeki iletim elektronlarının elektromanyetik ışımayla etkileşimi inceler. Metallerdeki serbest elektronlar ışığın elektriksel bileşeni tarafından uyarılarak toplu halde salınım girerler. Bu plazma salınımları plazmon olarak tanımlanır. Yüzey plazmon polaritonlarının ilk belgelenmiş gözlemi, 1902 yılına dayanmaktadır; Wood çok renkli ışıklı bir metalik kırınım ızgarasını aydınlatıldığında dağınık ışığın yelpazesinde dar karanlık bantlar fark etmiş ve bunları anormallikler olarak tanımlamıştır [2]. Wood'un ölçümlerinden kısa süre sonra Lord Rayleigh fenomenin fiziksel bir yorumunu önermiş ancak yine de Fano'nun bu anomalileri, kırınım ızgarasında elektromanyetik yüzey dalgalarının uyarılmasıyla ilişkilendirmesi birkaç yıl almıştır [3]. Daha sonra 1957'de Ritchie, ince filmlerdeki elektron enerji kaybı bağlamında yüzey plazmonları kavramını önermiş ve deneysel doğrulama iki yıl sonra Powell ve

Swan tarafından yapılmıştır [4]. 1958'de, bir substrat üzerinde metal filmler ile yapılan deneyler optik uyarımın Kretschmann ve Raether'in yanı sıra, Otto tarafından neredeyse aynı anda yayınlanmıştır [5]. Bu çalışmalarda yüzey plazmonlarının uyarılması için uygun bir yöntem geliştirilmiştir. (Şekil 1.1 A). Konvansiyonel SPR sensörleri normalde Kretschmann konfigürasyonu temeline dayanılarak üretilir; buradaki altın ve gümüş gibi çok ince bir tabaka (~ 50 nm), cam prizmanın altına kaplanmıştır. Bununla birlikte, prizma temelli SPR sensörlerinin, SPR sensörlerinin imalatının pahalı araçlar içerimesi ve deney yürütebilmek için bir laboratuvar ortamına ihtiyaç duyulması bu sistemin dezavantajları olarak sıralanabilir.

LSPR teknolojisinde gelen ışık metalik nanoparçacıklarla etkileşime girdiğinde, ışığın elektrik alanı, metalik nanopartiküllerdeki iletken elektronlarının bir rezonant frekansla toplu olarak salınımına neden olur. Diğer bir tanım olarak, LSPR metalik nanoyapının boyutundan daha büyük bir dalga boyunda giren ışığın nanoyapıların yüzeyinde bulunan elektronların uyarılmasıyla meydana getirdikleri ortak salınımdır.

LSPR'nin özellikleri, nanoparçacıkların büyüklüğü, şekli ve kompozisyonu ile nanopartikülleri çevreleyen yerel dielektrik çevreye bağlıdır. Bu nedenle, bu anahtar parametrelerin varyasyonları ile özellikleri belirlenebilir veya kontrol edilebilmektedir. SPR bazlı sensörlere benzer şekilde, LSPR bazlı sensörler, dielektrik malzeme üzerine kaplanan nanopartiküllerin yüzeyi yakınındaki yerel kırılma indisi (RI) değişimine de oldukça duyarlıdır. SPR sensörleri ile karşılaştırıldığında, SPR sensörleri kütle kırılma indisindeki değişikliğe karşı çok daha yüksek hassasiyete sahip olmasına rağmen, LSPR sensörlerinin, örneğin moleküler adsorpsiyonun neden olduğu refraktif indekste kısa aralıklı bir değişimi ölçtüğünden çok daha hassas sistemler olarak tanımlanmıştır. LSPR bazlı sensörlerinin üretimi çoğunlukla metal nanoparçacıkları ve yüzeye işlenmiş metal nanodesenleri içerir. Ayrıca, nanoparçacıkların boyutu ve şekli, LSPR özelliklerini güçlü bir şekilde etkilediğinden küre, çubuk, küp ve piramit gibi çeşitli geometrilere sahip altın nanopartiküllerin LSPR sensörleri, karşılık gelen absorpsiyon spektrumlarında ve hassasiyetlerinde önemli farklılıklar gösterir. LSPR temelli sistemler, ultra düşük konsantrasyonlarda az sayıdaki molekülün tespiti için kullanılabilen en güçlü optik biyosensörlerden biridir. Son yıllarda LSPR sinyali ve bunları etkileyen faktörler arasındaki ilişki göz önüne alınarak, nanoyapılarla

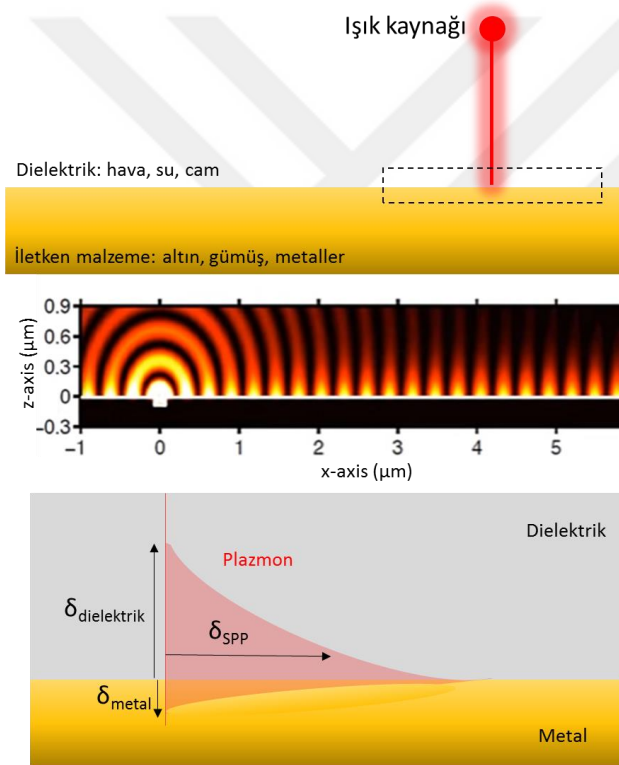
desteklenmiş platformlara dayalı yüksek hassasiyetli kimyasal ve biyolojik sensörlerin geliştirilmesine büyük ilgi duyulmuştur [6, 7]. Yüzey plazmon rezonansı temelli biyosensörler herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan (label free) biyomoleküllerin etkileşimlerini ölçebilmektedirler. Bu özellikleri sayesinde, moleküler seviyede etkileşimlerin tayin edilmesi ve incelenmesi son dönemde ilgi artmıştır. Bu sistemler sahip oldukları yüksek seçicilik ve hızlı cevap süresinden dolayı, protein-protein, antikor antijen, reseptör-ligand etkileşimlerinden düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tanımlanmasına kadar değişen çok çeşitli biyomoleküler mekanizmaların anlaşılmasında kullanılmaktadırlar. Yüzey plazmon rezonansı temelli sistemlerde genellikle yüzeylere desenlenmiş metalik nanoyapılar kullanılır. Altın kimyasal modifikasyona olanak vermesi ve zamanla okside olmaması bakımından yüzey plazmon rezonansı çalışmalarında en çok tercih edilen metaldir [8]. Yüzey plazmon rezonansı (SPR), metal-dielektrik arayüzünde oluşan plazma için genel bir terimdir. Lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) spesifik bir SPR türüdür. Bu yöntemde nanoboyutlu metalik parçacıklar kullanılır ve elektromanyetik alan nanopartikül-dielektrik arayüzün etrafındaki nano ölçekli bir bölgede kalır.

#### **1.1.2. Nanoparçacıkların Plazmonu ve LSPR Teorisi**

Elektromanyetik spektrumun görünür bölgesini de kapsayan geniş bir kısmında metallerin yansıtıcılığı yüksektir. Altın ve gümüş gibi metaller mor ötesi bölgede güçlü absorpsiyon gösterirler. Genel olarak, plazmonların elektron yoğunluğu salınımlarının ve uyarıcı elektromanyetik alanların etkileşiminden kaynaklandığını bilinmektedir. Yüzey plazmonları (SP) metal ve dielektrik arasındaki sınırlarda serbest elektronların tutarlı salınımlarıdır ve bunlar çoğunlukla iki sınıfa ayrılır: yayılan yüzey plazmonları (PSP) (Şekil 1.1 A) ve lokalize yüzey plazmonları (LSP) (Şekil 1.1 B). PSP'ler genellikle metalik film yüzeylerinde uyarım oluştururken LSP'ler metalik nanopartiküller yüzeyinde uyarılabilir ve yakın alan bölgede (near-field region) kuvvetli elektromanyetik alanlar oluştururlar. Bir elektromanyetik dalga metalik bir nanoparçacık üzerine çarparsa, (nanoparçacık boyutu ışığın dalga boyundan çok daha küçük olduğu kabul edilir) elektron gazı kutuplanmış olur (yüzeyde polarizasyon yükleri) ve ortaya çıkan geri yükleme kuvveti yine plazmonik bir salınım oluşturur (Şekil 1.1 B). Nanoparçacıktaki iletim elektronlarının elektromagnetik uyarım sonucu yaptıkları salınımın ilerleyerek değil lokalize şekilde gerçekleşir. Böylece metalik parçacık osilatör gibi davranır ve karşılık gelen

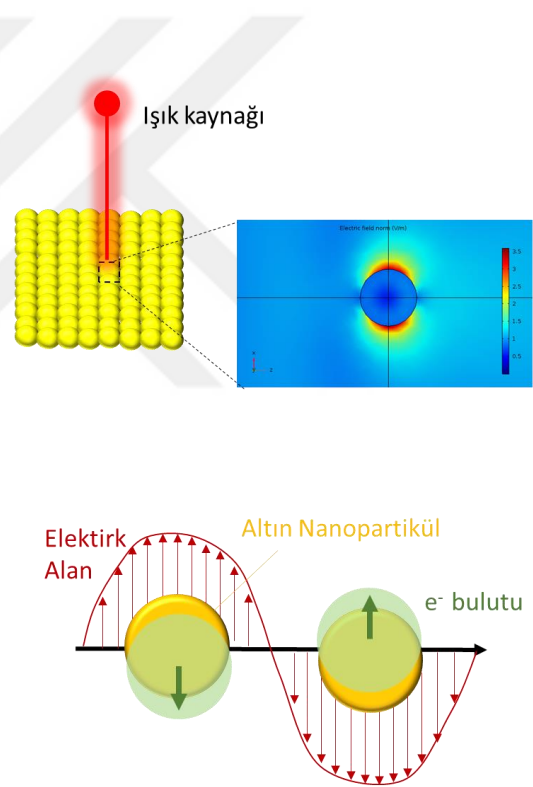
rezonans davranışı optik özellikleri belirler. Bu sistemden yola çıkarak metalik nanoparçacıkların boyutunu veya şeklini değiştirerek yüzey plazmon rezonansı ayarlanabilmektedir. Plazmonik rezonans sadece bir nano yapının şekline ve boyutuna duyarlı değildir, ayrıca parçacığı çevreleyen dielektrik ortam da önemli bir rol oynamaktadır. Dielektrik çevresindeki en ufak bir değişiklik bile rezonans enerjisinde saptanabilir bir kaymaya yol açar. Algılama ve biyosensör uygulamaları için uygun olmasının sebebi budur. LSPR’da plazmon rezonansının lokalize olması nedeniyle metalik nanopartiküllerin çevresindeki yerel elektromanyetik alan dramatik bir şekilde artar [9].

#### A Yüzey Plazmon Rezonansı



$\lambda$ : Işık dalga boyu ( $\sim 500$  nm)  
 $\delta_{\text{metal}}$ :  $\sim 5$  nm  
 $\delta_{\text{dielektrik}}$ :  $\sim 250$ - $1000$  nm  
 $\delta_{\text{SPP}}$ :  $2$ - $20 \mu\text{m}$   $500$  nm uyarımında,  $1$  mm  $1550$  nm uyarımında

#### B Lokalize Yüzey Plazmon Rezonansı



Şekil 1.1 Plazmon rezonansı oluşum mekanizmaları; A) Yüzey plazmon rezonansı: Bu sistemde yüzey tabakasının yakınında bulunan kırılma indisindeki değişiklikler bir sensör çipi ile tespit edilir. Plazmonik rezonans yansıyan ışıkta, yüzeydeki maddenin kütlesine bağlı olan bir açıda keskin bir kayma olarak gözlemlenir. B) Lokalize yüzey plazmon rezonansı: Parçacık plazmonlarının metalik nanoparçacıkların polarizasyonu yoluyla uyarılması. Rezonans frekansında plazma,  $90^\circ$  faz farkıyla salınım yapmaktadır.

Metalik nanoparçacıklar, yığın metalde gözlemlenenlerden önemli ölçüde farklı optik özelliklere sahiptir. Gelen ışık metalik nanoparçacıklarla etkileşime girdiğinde ışığın elektromanyetik alanı ışık frekansı ile rezonansa giren metalik nanopartiküllerin yüzey iletken elektronlarının ortak bir tutarlı salınımını indükler. Metallerin elektromanyetik alanlarla etkileşimi Maxwell denklemleri ile açıklanır. Birkaç nanometre boyutundaki metalik nano yapıların davranışları bile iletim elektron yoğunluğunun yüksek olduğu durumlarda kuantum mekaniğine ihtiyaç duyulmadan Maxwell denklemleri ile ifade edilebilirler. Küresel metalik nanopartiküllerin LSPR'da neden olduğu ışık emilimini tanımlamak için Maxwell denklemlerine Mie çözümü uygulanır.

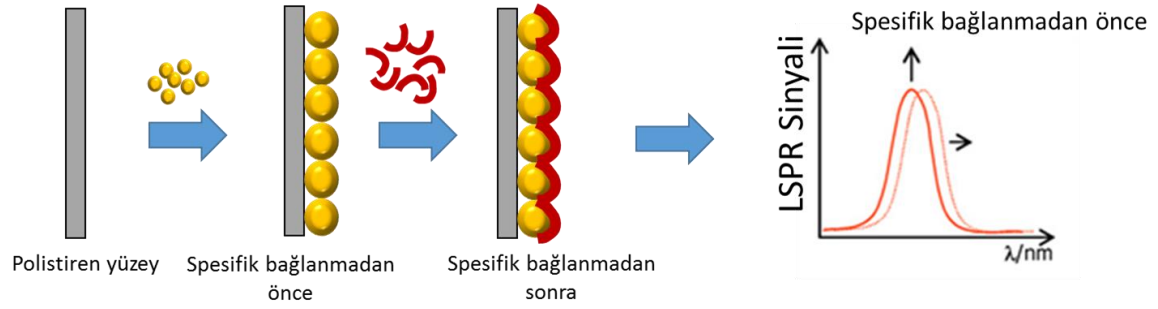
Mie teorisine göre, ışının  $\lambda$  ( $R / \lambda < 0.1$ ) dalga boyundan çok daha küçük olan ve yarıçapı  $R$  olan iyi ayrılmış küresel nanoparçacıklar için, sönüm kesiti  $C_{ext}$ , olarak ifade edilebilir.

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 R^3 \epsilon_m^{3/2} N}{\lambda \ln(10)} \frac{\epsilon_i}{(\epsilon_r + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon_i^2} \quad (1.1)$$

Burada,  $\epsilon_m$  partikülü çevreleyen ortamın dielektrik sabitidir,  $\epsilon_r$  ve  $\epsilon_i$  sırasıyla partikülün dielektrik fonksiyonunun gerçekte ve sanal kısmıdır ve  $N$  elektron yoğunluğudur. Altın ve gümüş küresel nanoparçacıklar için, plazmon absorpsiyon bantları görünür bölgede bulunur ve bu malzemeleri birçok uygulamada kullanmak üzere uygun hale getirir. Buna ek olarak, LSPR dalga boyu, kırılma indisi değişimine duyarlıdır. Böylece, nanoparçacıkları çevreleyen lokal ortamdaki değişiklikler LSPR dalga boyunda bir kayma ile sonuçlanır. Refraktif indeks değişimine yanıt olarak LSPR dalga kayması  $\Delta\lambda$  aşağıdaki ilişki ile tanımlanmaktadır.

$$\Delta\lambda = m\Delta n \left[ 1 - \exp\left(\frac{-2d}{l_d}\right) \right] \quad (1.2)$$

LSPR uygulamalarında optik ölçüm oldukça basit bir düzenlenim ile geçirgenlik ya da yansıma spektroskopisi şeklinde ölçülür. LSPR yüzeyinde biyolojik ya da kimyasal algılama için moleküler adsorpsiyona bağlı olarak yerel dielektrikteki değişim, LSPR daki bir kayma ile ölçülür (Şekil 1.2). Bu nedenle aynı miktarda analitten  $\lambda_{max}$  kaymasını arttırmak için yeni yöntemler incelenmektedir.



Şekil 1.2 LSPR sinyali ve  $\lambda_{\max}$  kayması

LSPR  $\lambda_{\max}$  kaymaları, başta nanopartikül duyarlılığına ve bağlı moleküllerin molekül ağırlığına bağlıdır. Nanopartikül duyarlılığı, partikülün metal kaynağına, boyutuna ve çevresinin kırılma indisine bağlıdır. Verilere doğrusal bir uyum sağlanacak olursa nanopartikül kompozisyonu, boyutu ve morfolojisine özgü nanopartikül duyarlılık faktörü  $m$  ortaya çıkar ve  $\lambda_{\max}$  arasında eşitlikte verilen ilişki vardır.

$$\Delta\lambda_{\max} = m\Delta n \quad (1.3)$$

Genel olarak, daha yüksek en-boy oranına (aspect ratio) sahip nanoparçacıklar, yerel dielektrik ortamına daha duyarlıdır. Bu shift aynı zamanda adsorbant molekülü kütlesi ile de orantılıdır. Bu nedenle, molekül ağırlığı büyük bir proteinin küçük bir molekülden çok daha büyük bir LSPR  $\lambda_{\max}$  kayması üretmesi beklenir [10]. Günümüzde plazmonik sensörler, ultra düşük konsantrasyonlarda az sayıda molekül tespiti için kullanılabilen en güçlü optik biyosensörlerden biridir. Ancak, düşük molekül ağırlıklı (<1000 Da) seyreltilmiş analitlerin tespiti halen mevcut plazmonik biyosensörler için oldukça zordur [7].

### 1.1.3. LSPR Tabanlı Plazmonik Sensörlerin Uygulama Alanları

Yüzey plazmonlarının uyarımına dayanan sistemler kimyasal ve biyolojik sensörlerin geliştirilmesinde büyük rol oynamıştır. Yüzey plazmonlarının uyarımı çevresel dielektrik özelliklerin değişimine duyarlıdır. Biyolojik ve kimyasal algılamada kullanılan mekanizma da bu özelliklerin değişimine dayanmaktadır [11]. Yüzey plazmon tabanlı sensörler hava, su, toprak gibi çevre kirliliklerinin belirlenmesinde, yemek ve kozmetik ürünlerin kalite kontrolünde ve genellikle de medikal alanında kullanılmaktadır. LSPR bazlı sensörlerin medikal alanda

uygulamalarının başında enzim, antijen ve antikor gibi küçük biyoreseptörlerin farklı ortamlardan tayini ve saptanması gelmektedir [12-14].

LSPR bazlı biyosensörünün tasarımındaki ilk adım metalik nanoyapı-biyomolekül konjugatlarının oluşturulmasıdır. Bu tip sensörlerde nanoyapılar çeşitli litografik yöntemlerle metal yüzeylere işlenebildiği gibi direkt olarak metalik nanopartiküllerin farklı yüzeylere modifikasyonu ile elde edilebilmektedir. Bilindiği üzere altın ve gümüş gibi metalik nanopartiküllerin benzersiz fotonik, elektronik ve katalitik özellikleri vardır ve bu özellikler küçük moleküllerin algılanmasında büyük rol oynamaktadır. Nanoyapı-biyomolekül konjugatları oluşturulurken yüzeylere immobilize edilen altın nanopartiküller proteinler veya DNA gibi biyomoleküller ile işlevselleştirilerek, algılama, görüntüleme ve tanı gibi farklı biyomedikal uygulamalarda kullanılabilmektedir. Üzerinde tanıyıcı moleküllere karşı modifikasyon yapılmış ve belli malzemelere karşı seçici hale getirilmiş bir yüzeye hedef malzemenin (protein, antikor, vb) bağlanması ortamın dielektrik sabitini değiştireceğinden hedef malzemenin varlığı rezonans dalgaboyundaki sapma ile tespit edilebilecektir.

Metalik nanoyapı-biyomolekül konjugatları oluşturulurken biyomoleküller metalik yüzeylere elektrostatik adsorpsiyon, kemisorpsiyon ve kovalent bağlanma gibi etkileşimlerle yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmektedir. Bu yüzey etkileşimleri arasında en umut vaat edici olan ise kovalent bağlanmadır. Kovalent bağlanma yüzeyde geri dönüşümsüz ve kararlı bir bağlanma gerçekleştirirken bir molekül bir fonksiyonel grubuyla yüzeye bağlanma sağlarken diğer bir fonksiyonel grubuyla hedef moleküle bağlanmak için kullanılır. Farklı yapıdaki analitleri (antijen, peptit, enzim vb.) algılamak üzere çeşitli formatlarda LSPR yüzeyleri geliştirilmiştir. LSPR temelli nanoplazmonik yüzeylerin hassasitetlerinin artırılması ve daha düşük molekül ağırlığına ve daha düşük konsantrasyonlarda analitlerin algılanabilmesi için çalışmalar devam etmektedir. LSPR tabanlı sensörler sayesinde gerçek zamanlı tayin çalışmaları moleküllerin işaretlemesine ihtiyaç duyulmadan yapılabilmektedir. Bu yöntemde patojen, toksik madde, ilaç ve hastalık biyobelirteci gibi çok sayıda molekülün tayin çalışmaları yürütülmektedir.

#### **1.1.4. LSPR tabanlı sensörlerin hassasiyetini artırmak için kullanılan yaklaşımlar**

LSPR bazlı sensörlerin tespit limitinin arttırılması bu alanın araştırma konularından birisidir ve asıl hedef duyarlılığı arttırmak ve rezonans konumunu belirlenmesindeki problemleri ortadan kaldırmaktır. Metal nanopartiküllerin duyarlılığı rezonans dalga boyuna oldukça bağlıdır. Bir yüzey üzerine sabitlenmiş metal nanopartiküller için duyarlılık rezonans modu ve substrat arasındaki mekansal çakışmadan (spatial overlap) önemli ölçüde etkilenmiştir. Ölçüm belirsizliği ölçüm sistemi tarafından spektrumun sinyal-gürültü (S/N) oranı ve spektral hat genişliği (linewidth) ile belirlenir. Altın nanoyapıların çeşitli yüzeylere immobilize edilerek elde edildiği LSPR bazlı sistemlerin çok sayıda avantajı bulunmasına rağmen yüzeye immobilize edilen altın nanopartikül dizilerinin dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajların başında da teshiş limiti gelmektedir. Altın nanopartiküller yüzeye immobilize edilerek oluşturulan plazmonik yüzeyler kullanarak büyük biyolojik moleküllerin tayin edilmesi oldukça kolay olsa da, daha küçük moleküllerin tayini oldukça problemli olmaktadır. LSPR bazlı platformların tespit limitini arttırmak için çok sayıda yaklaşım mevcuttur. Özellikle küçük moleküllerin tespit limitini arttırmak için nanopartiküllerin boyut ve şeklinin ayarlanması gibi farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlardan bazıları altın nanopartikülün boyutunun ve şeklinin ayarlanmasıyla plazmonik hassasiyetin arttırılması ve tespit limitlerinde iyileşmenin sağlanmasına dayanırken diğer bir yaklaşım da yüzeye bağlanan analitin sinyalini arttırmaktır. Bu stratejiler genellikle az miktarlarda biyomolekülü yüzeye bağlarken büyük ölçülebilir değişikliklerin elde edilmesini sağlamaktadır. Bu yaklaşımlara aşağıda yer verilmiştir.

##### **1.4.4.1. Enzimatik yüzey arttırımı**

Bu stratejilerden biri biyolojik bağlamayı arttırmak için plazmonik yapının yüzeyindeki moleküllerin çökmesini indüklemek için enzimleri kullanmaktır. Birçok biyosensör uygulaması için kimyasal reaksiyonlar genellikle enzimler kullanılarak gerçekleştirilir. Shin ve ark. PSA antikoru ile fonksiyonel hale getirilmiş nanodisk diziler üzerine enzimatik çökelmeyi uyarmak için bir strateji geliştirmişlerdir. Bu yaklaşımda PSA analitiyle reaksiyona girecek alkalın fosfataz yüzeylere ikinci bir antikorla bağlanmıştır. Alkalın fosfataz çok düşük miktardaki PSA analiti ile reaksiyona girerek altın nanodiskler üzerinde 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat p-

toluidin/nitro mavi tetrazolyumun çökmesini katalize ederek daha büyük bir LSPR kayması sağlamaktadır. Bu yöntemle birlikte PSA'nın femtomolar hassasiyetle algılamasını sağlamıştır [15]. LSPR sinyal arttırımı için çökme reaksiyonlarının kullanılması için bir başka yöntem de horseradish peroksidaz enziminin kullanılmasıdır. Lee ve ark. LSPR sinyalini yükseltmek için 4-kloro-1-naftolün altın nano adaların yüzeyine çökmesini katalize etmek için sistemlerine horseradish peroksidaz eklemiştir. IFN- $\alpha$ -antijeni, immobilize reseptörüne bağlandığı için ikinci bir biyotinlenmiş antikör ile horseradish peroksidaz enzimi yüzeye bağlanmış ve enzimin IFN- $\alpha$ -antijeni ile reaksiyona girmesi ile oluşan 4-kloro-1-naftolün yüzeye yüksek oranda çöktürülerek bağlanması sağlanarak yüksek bir LSPR sinyali elde edilmiştir. Plazmonik yüzeylerde 0.54 nM konsantrasyonuna kadar IFN- $\alpha$  antijeninin tayini yapılabilmektedir [16].

Başka bir enzimatik sinyal artış stratejisi de enzimlerin yüzeye bağlanmasıyla plazmonik substratla doğrudan reaksiyona girebilen ve kimyasal yan ürünler üreten enzimlerin kullanılmasıdır. Bu tepkimeler genellikle nanoparçacıkların şekli ve büyüklüğünde büyük değişiklikler meydana getirerek LSPR frekansında artmış kaymalar oluşturmaktadır. Saa ve ark. glikozun saptanması için horseradish peroksidaz ve glukoz oksidaz enzimlerinin karışımı kullanmışlardır. Bu amaçla altın nanoçubuklar yüzeyine enzim kombinasyonu bağlanmıştır. Sensor ortamına glikoz eklendiğinde ortamdaki hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşmasını tetiklemiş ve ortamda oluşan hidrojen peroksit daha sonra altın nanoçubukların oksidasyonunu ve aşınmasını sağlamıştır. Glikoz konsantrasyonuna bağlı olan altın nanoçubuklar yüzeyinde meydana gelen aşınma LSPR spektrumunda büyük mavi kaymalar yaratarak ve serum ortamında çalışan kolorimetrik glikoz tespit cihazı geliştirilmesine olanak sağlamıştır [17].

#### **1.4.4.2. Plazmonik nanopartikül eşleşmesine dayalı sinyal arttırılması**

Tezin ilk kısmında (Bölüm 1.1.2) anlatıldığı üzere plazmonik nanopartiküller birbirine yaklaştıklarında LSPR frekanslarında şiddetli kaymalara neden olabilen plazmonik eşleşmeler oluşabilir. Bunun için özellikle koloidal sistemlerde nanopartiküllerin agregasyonunu sağlayarak LSPR sinyal arttırılabilmektedir.

Bazı çalışmalar, nano çubukların çözelti içerisinde agregasyonunu arttırarak yüksek seçiciliğe sahip glutatyon ve sisteini tayini gerçekleştirebilen sistemler geliştirmiştir.

Amino asitlerin zitteriyonik özellikleri ve altın yüzeyi için tiyol parçasının afinitesi ortama aminoasitler eklendiğinde altın nanorodların sıralı nanoçubuk dizileri oluşturmalarını sağlamış ve plazmonik eşleşme artırılarak yüksek LSPR sinyaliyle aminoasitlerin tayin çalışmaları yürütülmüştür [18]. Benzer şekilde Kotov ve ark. karaciğer yetmezliği ve karaciğer kanserine neden olabilen çevresel toksin mikrokistin LR'nin 5 pg/mL'lik yüksek hassasiyet limitiyle saptanması için altın nanoçubukların plazmonik eşleşmelerinden faydalanmışlardır [19]. Jana ve ark. yaptıkları çalışmada altın nanopartiküllerin yüzeylerini polivinilpirolidon (PVP) ile kapladıklarında altın nanopartikül yüzeyinde kırılma indisi değişiklikleri meydana geldiğini ve bu değişikliklerin LSPR sinyalini büyük ölçüde arttırdığını göstermiştir [20]. Daha sonra Jana ve ark. PVP ile kaplı altın nanoyıldızları prostat spesifik antijeni (PSA) antikoru ile fonksiyonel hale getirerek ultra hassas PSA test sensörü geliştirmiştir.

Plazmonik eşleşmeyi uyarmanın ve arttırmanın diğer bir yolu da altın nanopartikülleri daha yakın hale getirmek için nanopartiküllerin bir yüzeye immobilizasyonudur. Plazmonik sensörler için hassasiyet göstergeleri duyarlılık, doğruluk, tekrarlanabilirlik ve tespit limitidir (LOD). Duyarlılık, sensör çıkışındaki değişimin (Dalga boyu, genlik veya insidans açısı) ölçekteki değişime oranıdır (örneğin, yoğunluk, kalınlık, analit konsantrasyonu). Doğruluk, sensör okuma değerinin, ölçülenin gerçek değerine karşılık gelme derecesini tanımlar. Tekrarlanabilirlik, sensörün aynı tepkiyi her seferinde tekrar üretme kabiliyetini ifade eder. Son olarak, tespit limiti sensörün algılayabildiği en düşük analit konsantrasyonuna karşılık gelir. Sensör performanslarını bir konfigürasyondan diğerine karşılaştırırken, sadece hassasiyetleri (yani dalga boyu kaymaları) ile birlikte tespit limitlerinin de karşılaştırılması gerekir [21]. Altın nanopartiküllerin plazmonik özelliklerinin kontrol edilmesi plazmonik uygulamalar için oldukça önemlidir. Literatürde altın nanoyapıların plazmonik özelliklerini ayarlamak için boyut şekil ve geometri kontrollü sentezleri çalışılmaya devam etmektedir. Altın nanoyapıların plazmonik özelliklerinin kontrol edilmesi için kullanılan diğer bir yöntem ise yakın aralıklı nanopartiküller arasındaki plazmonik eşleşmelerin arttırılmasıdır. Plazmonik eşleşmelerin arttırımı LSPR spektrasında büyük değişikliklere yol açar.

Fonksiyonel nanoparçacıkların üretim teknolojilerinde temel zorluklardan biri, nanoparçacıkların önceden tanımlanmış alanlara basit, hızlı ve düşük maliyetli yöntemlerle istenilen geometride üretilmesidir. Nano ölçekli desenlendirme sağlamak amacıyla sofistike ekipman ve kimyasallarla çeşitli 'yukarıdan aşağı (top down)' ve 'aşağıdan yukarı (bottom-up)' teknikler kullanılmıştır. Literatürde desenlenmiş metalik yüzeyler oluşturmak için, fotolitografi, soft litografi, mikro temas litografi, elektron demeti litografisi, dip-pen litografi, taramalı uç litografi, iyon demeti litografisi ve lazer litografi gibi yöntemler kullanılmaktadır.

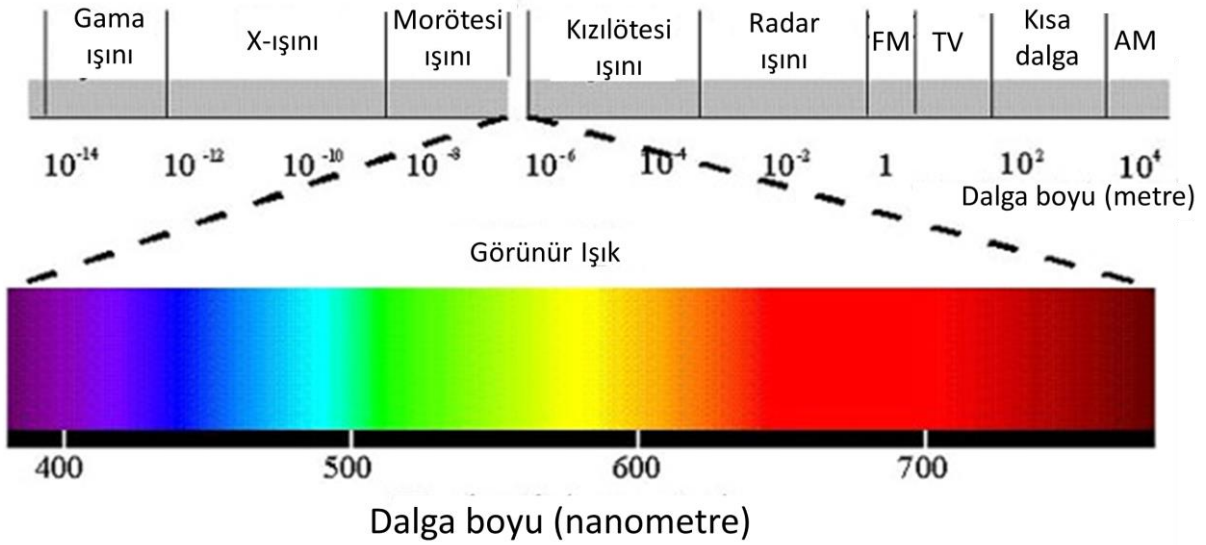
Bu yöntemlerin, nanoteknoloji üzerindeki potansiyelleri büyük olmasına rağmen, genel olarak tüm yaklaşımlar çok sayıda dezavantaja sahiptir. Fotolitografi, elektron ve iyon demeti litografisi ve taramalı uç litografi teknikleri, yüksek çözünürlüklü desenlendirme elde edebilmesine rağmen, nispeten uzun işlem süreleri, aşındırma ve geri dönüşüm sırasında malzemelerin kaybı, imalat maliyeti, sofistike ekipman ve bakım ve temiz oda gereksinimi bu teknikleri nispeten pahalı hale getirmiştir. Buna ek olarak, kararlı desenli yüzeyler geliştirmek veya yüzeyde aşındırmak için ışınlama ve tehlikeli kimyasalların kullanılması nanoparçacıkların veya organik işlevleri olan biyomoleküllerin desenlendirilmesinde kullanımlarını sınırlar.

Son yıllarda bu yöntemlere alternatif olarak yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartiküller üzerine çalışmalar devam etmektedir. Kullanılan yöntemlerin büyük bir çoğunluğu silanla işlevselleştirilmiş cam yüzeyler üzerin altın nanopartiküllerin immobilizasyonuna dayanmaktadır [22]. Ayrıca bazı yaklaşımlar poliektrolit polimerler vasıtasıyla altın nanopartiküllerin yüzeylere (polistiren, asetat, polikarbonat vb.) kontrollü ve kararlı immobilizasyonunun yapılabileceğini kanıtlamıştır [23]. Bu yöntemlerde altın nanopartikül aralığı ve yoğunluğu, polimer bileşimi ve moleküler ağırlıkları ile kontrol edilebilmektedir [24]. Yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin plazmonik performansı nanopartiküllerin kompozisyonu, boyutları ve şekli, nanopartikülü çevreleyen ortam ve bunların agregasyon durumu gibi çeşitli faktörlerden büyük ölçüde etkilenebilir. Yüzeylerde agregasyona uğramış altın nanopartiküller sıcak nokta (hot spot) oluşumu yoluyla elektrik alan arttırımını iyileştirmek ve sensör hassasiyetini arttırmak için kullanılan bir yöntemdir fakat agregasyon işlemi genellikle kontrolsüzdür ve tekrarlanabilirliği mümkün değildir. Diğer taraftan bu agregasyonu engellemek için ve kolloidal stabilitenin arttırılması için altın nanopartiküller silika oksit veya polimer kaplamalar

(enkapsülasyon) yapıldıktan sonra yüzeye immobilize edilmiştir. Ancak bu enkapsülasyon işlemi partiküller arasında oluşan sıcak noktaları da azaltmaktadır [25, 26]. Bu nedenle yüzeyde optimize edilmiş morfolojiye sahip nanopartikül dizilerinin geliştirilmesi ve altın nanopartiküllerin kontrollü olarak büyütülmesine oldukça ihtiyaç vardır. Yüzey hareketsiz kılınmış metal nanopartiküllerin büyümesi literatürde post metalizasyon işlemi olarak da adlandırılır. Metalik nano yapılar yüzeylere kaplandıktan sonra yüzeylerde çekirdeklemeyi (seeding) ve metalizasyon sağlamak için genellikle püskürtme, vakum buharlaştırma, kimyasal /fiziksel buhar çöktürme ve elektrokimyasal depozisyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu tarz yaklaşımlar gelişmiş bir laboratuvar, vakum kurulumu desenlendirme için toksik kimyasalların kullanımı ve metal israfı gibi dezavantajlara sahiptir.

## **1.2. Altın Nanoparçacıkların Elektrik Alan Etkileşimlerinin Teorik Analizi**

Parlak rengiyle uzun zamandır kullanılan kolloida altın olağanüstü spektral özelliklere sahip büyüleyici bir malzeme olarak bilinir. Günümüzde ise bu parlaklığın, altın nanopartiküllerinin yüzey plazmon rezonansı kaynaklı olduğu bilinmektedir. Altın nanopartiküller düşük frekanslardan spektrumun görünür bölgesine kadar yüksek yansıtıcılığa sahiptirler ve elektromanyetik dalgaların içlerinden geçmelerine izin vermezler. Morötesi frekanslarda ise metaller dielektrik özellik kazanırlar ve elektronik bant yapısına göre elektromanyetik dalgaların geçmesine izin verirler. Altın, gümüş gibi soy metallerde elektronik bantlar arasındaki geçişler UV rejiminde yüksek absorpsiyon sağlar (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Elektromanyetik ışık spektrumu.

Küresel şekildeki altın nanopartiküllerin kavisli yüzeyi elektronlar üzerinde etkili bir geri yükleme kuvveti oluşturarak rezonansın artmasına sebep olur. Bu fenomen yakın alan bölgesinde güçlü elektriksel alan arttırımına yol açar. Nanoparçacıklar birbirine yakın olduğunda parçacıklar arasında birbirine bağlanarak ek alan arttırımı sağlanabilir. Altın nanopartiküllerin optik özelliklerini anlamak plazmonik cihazların geliştirilmesinde oldukça önemlidir. Plazmonik nanoparçacıkların yüksek elektromanyetik emilimi, moleküllerin optik olarak serbest bırakılması için ve fototerapi tedavisi için kullanılmaktadır.

Plazmonik sensörlerin neredeyse tamamı sadece altın veya gümüşten yapılmış olmakla birlikte, diğer metal ve/veya metal oksit nanokompozitlerin (çinko oksitin aliminyum ve bakır) LSPR algılama uygulamaları da araştırılmıştır [27-30]. Ancak, asal olmayan metaller, sulu ortamlarda korozyona ve havadaki oksidasyona duyarlıdır ve her ikisi de refraktif indeks hassasiyetini önemli ölçüde azaltmaktadır. Benzer şekilde, gümüşün üstün hassasiyetine rağmen, yüksek reaktivitesi, kompleks biyolojik numunelerde molekülleri algılamak için gümüşün tercih edilmemesine sebep olur. LSPR sensörlerinin etkili algılama bölgesi oldukça lokalizedir, çünkü lokalize plazmon rezonansı nanoparçacık yüzeylerinin uzaklıklarıyla katlanarak azalır. Dolayısıyla, LSPR'nin spektral yanıtı sadece metalik nanopartikülleri çevreleyen nano ölçekli çevredeki bölgelere duyarlıdır. Bu yüksek

oranda lokalize edilmiş algılama hacmi, nanoparçacık yüzeyine yakın olan biyomoleküler bağlanma olayları tarafından indüklenen lokal refraktif indeks değişikliklerinin gerçek zamanlı izlenmesi için çok uygundur [1]. Altın plazmonik nanoparçacıklar harici optik alanlara maruz bırakıldıklarında, plazmonik eşleşme gösterirler ve izole nanoparçacıklardan önemli ölçüde daha büyük elektrik alanına neden olurlar. Literatürde, iki plazmonik nanopartikül birbirine çok yakın olduğunda (partikül aralığı nanoparçacık kısa ekseninin 2,5 katından daha küçükse), bireysel nanoparçacıkların yüzey plazmonundan türetilen elektromanyetik alanlar komşu bölgelerin dipolar etkileşiminden etkilenebilir. Bu yakın alan-eşleşmesinin neden olduğu  $\lambda_{\max}$  kayması, parçacıklar arası mesafeye oldukça bağımlıdır [1]. Yakın bir şekilde yerleştirilmiş altın nanopartiküller, komşu nanopartiküller arasındaki birleşime bağlı yüksek lokalize elektromanyetik alanları gösterir. Sentez yöntemlerinin geliştirilmesiyle nanopartiküllerin boyut ve geometrileri kontrol edilebilir ve böylece nanopartiküllerin optik özelliklerini foto-voltaik, fotonik, opto-elektronik veya algılama alanlarında uygulama olanağı sağlanabilir [31].

Plazmonik nanoparçacıkların spektral duyarlılığı büyüklüklerine ve geometrik parametrelerine doğrudan bağlıdır. İlk geliştirilen plazmonik nanosensörler çoğunlukla küresel veya yarı küresel nanopartiküllerden oluşmaktadır. Son zamanlarda teorik simülasyonlar ve deneysel veriler, anizotropik nanoyapıların küresel nanoparçacıklardan daha yüksek kırılma indisi hassasiyeti sergilediğini ortaya koymuştur [32]. Altın nanoçubuklar nispeten olgunlaşmış sentez yaklaşımları ve diğer küresel olmayan nanopartiküller ile karşılaştırıldığında yüksek verim nedeniyle altın nanopartiküllere en popüler alternatif haline gelmiştir. Buna ek olarak, altın nanoçubukların kırılma indisi hassasiyeti en-boy oranı (aspect ratio) ile doğrusal orantılıdır ve ayarlanabilir.

### **1.2.1. Teorik Modelleme**

Modelleme bir nesnenin fiziksel veya matematiksel olarak aynı özelliklere sahip bir benzerini oluşturmaktır. Simülasyon (benzetim) ise bilgisayar kullanılarak gerçek nesnenin davranışlarını anlama işidir. Bilgisayar kullanılarak yapılan modelleme ve simülasyon sanal bir deney ortamı oluşturup ürünün somut örneklerini üretmeden istenilen tüm şartlar için deney yapılabilmesini sağlar. Bu çalışmada farklı konfigürasyonlarda altın nanopartiküllerin ikili, üçlü ve dörtlü dizileri oluşturularak elektrik alan arttırmaları ve elektrik alan artış faktörü incelenmiş ve elektrik alan

artışlarının LSPR sinyallerine etkisi tartışılmıştır. Literatürde metalik nanoyapıların elektrik alan etkileşimlerinin incelenmesi için farklı yaklaşımlar vardır. Bu yaklaşımlar; kısmi statik yaklaşım (Quasi Static Approximation), Mie teorisi, ayırık dipole yaklaşımı (Discrete Dipole Approximation (DDA)) ve sonlu elemanlar metodu (Finite Element Method (FEM))'dir

#### 1.2.1.1. Kısmi Statik Yaklaşım

LSPR kavramının genellikle tek bir spesifik dalga boyunda veya plazmon rezonans frekansında olduğu anlaşılmaktadır. Bu, söz konusu parçacığın gelen ışığının dalga boyundan çok daha küçük olduğunu varsayan yarı statik yaklaşımdan kaynaklanır. Bu varsayım, Maxwell'in zaman harmonik denklemleri ile birlikte, küçük bir kürenin kutuplanabilirliği ifadesidir. Kısmi statik yaklaşım, küçük parçacık varsayımına dayandığı için artan parçacık boyutunun etkisi hakkında az bilgi sağlar.

Elektrostatik yaklaşım, metalik bir nanopartikülün absorbe edebileceği veya saçabileceği ışık miktarının tanımını verir. Bununla birlikte, bu teori çok küçük ve çok büyük nanoparçacıklar için uygun değildir. Elektronların metal nanoparçacıklardaki ortak salınımı, polarize edilebilirlik ( $\alpha$ ) ile hesaplanır.

$$\alpha(\lambda) = \frac{1}{L} \epsilon_0 V \frac{\epsilon(\lambda) - \epsilon_m}{\epsilon(\lambda) + \kappa \epsilon_m} \quad (1.4)$$

burada,  $V$  parçacık hacmi,  $\epsilon_m$  çevreleyen ortamın dielektrik sabitidir,  $L$ , polarize edilebilirliğin yüzey geometrisine bağımlılığını içeren şekil faktörüdür ( $L = 1/3$ ) ve  $\epsilon$  metal nanopartikülünün dielektrik fonksiyonudur.

Metalin dielektrik fonksiyonu ( $\epsilon$ ), frekansa bağlıdır ve aşağıdaki gibi gerçekte ve hayali kısımlara sahiptir:

$$\epsilon(\lambda) = \epsilon_1(\omega) + \epsilon_2(\omega) \quad (1.5)$$

Elektronik kutuplaşmadan kaynaklanan uyarılmış dipol momenti ( $p$ )

$$p = \epsilon_m \alpha E_0 \quad (1.6)$$

Küresel bir parçacık içindeki dipol tarafından üretilen elektrik alanı ( $E_i$ ) denklemlerle açıklanmaktadır:

$$E_i = E_0 \frac{3\varepsilon_m}{\varepsilon(\lambda) + 2\varepsilon_m} \quad (1.7)$$

Rezonans, payda terimler minimuma indiğinde kutuplanabilirlik ve dipol elektrik alanı için oluşur, yani:

$$[\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_m]^2 + [\varepsilon_2(\omega)]^2 = \text{minimal} \quad (1.8)$$

$\varepsilon_1(\omega) = -2\varepsilon_m$  ve  $\varepsilon_2(\omega) \ll 1$  olduğunda tam yerine getirilir.

Metal dielektrik fonksiyonunun gerçek kısmı ( $\varepsilon_1$ ) plazmon rezonansının frekans konumunu yönetirken, hayali kısım ( $\varepsilon_2$ ) rezonansın genişliğini ve yüksekliğini belirler.

#### 1.2.1.2. Mie Teorisi

Bir metal nanopartikülün harici bir elektromanyetik alana tepkisini hesaplamak için Maxwell denklemlerini çözmek gerekir. Teori, nanoparçacıkların gelen ışığın dalga boyundan çok daha küçük olan Rayleigh saçılma teorisinin aksine, tüm nanoparçacık boyutları ve optik dalga boyları için geçerlidir. Aslında, Rayleigh saçılımı Mie teorisinin birinci derece yaklaşımıdır. Maxwell denklemleri çözümünde Mie, düzlem dalga ile yüksüz homojen parçacıklar arasındaki etkileşimi tanımlamaktadır. Bu, parçacık içindeki ve çevresindeki elektromanyetik alanların hassas hesaplanmasına olanak tanır. Küresel simetrik geometri, elektrik alanların çok kutuplu bir genişlemesini önerir. Ortaya çıkan yüzey harmonikleri parçacıkların, sönmüleme saçılma ve absorpsiyon kesitlerinin hesaplanmasını sağlar:

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi}{|k^2|} \sum_{L=1}^{\infty} (2L + 1) \cdot \text{Re}[a_L + b_L] \quad (1.9)$$

$$\sigma_{scat} = \frac{2\pi}{|k^2|} \sum_{L=1}^{\infty} (2L + 1) \cdot [|a_L|^2 + |b_L|^2]$$

$$\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{scat}$$

Burada,  $a_L$  ve  $b_L$ , çok kutuplu genişlemeden gelen Mie katsayılarıdır,  $L$ , çok kutuplu sırada (dipol modu için  $L = 1$ ) ve  $k$ , olaydaki elektromanyetik dalganın dalga

vektörüdür. Nanopartiküller, ışığın dalga boyundan çok daha küçük olduğu için, formül şu şekilde basitleştirilebilir:

$$\sigma_{ext} = 9 \frac{\omega}{c} \varepsilon_m^{3/2} V \frac{\varepsilon_2(\omega)}{[\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_m]^2 + [\varepsilon_2(\omega)]^2} \quad (1.10)$$

Saçılma ve absorpsiyon kesitleri (cross-section) belirlendiğinde, sönüm (extinction) hesaplanabilir. Metalik bir partikül üzerine gönderilen ışık dedektör tarafından tespit edilen ışığın enerjisi, gelen dalganın çıktı enerjisinden daha az olacak şekilde tespit edilir. Arada meydana gelen enerji kaybı "sönüm" olarak tanımlanır. Gelen ışığın yola girdiği ve partikülün bulunduğu ortamın emici olmadığı varsayıldığı durumda algılanan dalga ile partiküleden çıktıktan sonra tespit edilen dalga arasındaki fark, parçacıklar tarafından absorpsiyon ve saçılma ile hesaplanır. Sönüm boyutu, partikülün şekli, yönelimi, çevreleyen ortamı, parçacık sayısını ve olay huzmesinin polarizasyon durumu ve frekansına bağlı olarak değişmektedir. Yok olma emilim ve saçılma toplamıdır  $C_{ext}=C_{abs}+C_{sca}$ , yani Maier plazmoniklerinden aşağıdaki formülü kullanarak açıkça tarif edilebilir:

$$Cx = 9 \frac{\omega}{c} \varepsilon_m^{3/2} V \frac{\varepsilon_2}{[\varepsilon_1 + 2\varepsilon_m] + \varepsilon^2} \quad (1.11)$$

Bu eşitlikte V, kürenin hacmi, dielektrik fonksiyonu ise  $\epsilon=\epsilon_1+\epsilon_2$  olarak verilir  $\epsilon_1$  ve  $\epsilon_2$ , nanopartikül ve çevresindeki ortamın dielektrik işlevini sırasıyla göstermektedir. Bu noktada sunulan formüller küresel parçacıkları ele alır, ancak küresel olmayan parçacıklar modifikasyonla da modellenenebilir. Mie teorisi, yuvarlak nanopartiküllerin absorpsiyonunu, saçılmasını ve nihayetinde sönümünü hesaplamamızı sağlar ve nihai olarak, polarize edilebilirlik nedeniyle rezonant alanın iyileştirilmesini sağlar. Bu koşullar yerine getirildiğinde, partikül bir dipol gibi davranır; gelen elektromanyetik alanı emici olarak sağlar ve absorbe eder.

COMSOL Multiphysics kullanım kolaylığı, düşük hata yüzdesi, tüm fiziksel modüllerin (ısı transferi, akışkanlar mekaniği, yapı mekaniği vs.) aynı programda olması gibi özelliklerinden dolayı yaygın şekilde kullanılmaktadır. COMSOL Multiphysics programı, nümerik çözüm olarak sonlu elemanlar metodunu kullanmaktadır. Sonlu elemanlar metodu mühendislik ile ilgili karmaşık problemlerin

çözülebilmesine imkân sağlayan nümerik bir metottur. Kainattaki tüm nesneler bulundukları düzlemde sonsuz sayıda nokta içerirler. Sonlu elemanlar metodu ise adından da anlaşılacağı gibi nesneleri sonlu sayıda noktaya (eleman) ayırarak çözüme gitmeye çalışır [33].

Bulk malzemelerle karşılaştırıldığında, nanopartiküller yüzey birimi başına çok daha yüksek bir elektron konsantrasyonuna sahiptir. Bu nedenle, metal nanopartiküllerin çekici özellikleri yüzey plazmonları adı verilen yüzey elektromanyetik modları yoluyla elektromanyetik alana bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Ortalama boyutu 100 nm'den daha büyük partiküller için, Ayırık Dipole Yaklaşımı (Discrete Dipole Approximation (DDA)) ve Sonlu Elemanlar Metodu (Finite Element Method (FEM)) gibi sayısal teknikler kullanılır. DDA yönteminde, objeler çift-dipol olarak, yani parçacıkların ve birbirleriyle etkileşim halinde olan sonuçtaki elektrik alanlarını muamele ederek ışık saçılması ve absorpsiyon hesaplamasında kullanılan bir yöntemdir. Diğer bir deyişle bir bölge, kutuplaşabilir noktalar dizisine bölünür ve her biri gelen elektrik alanına bağlı olarak bir dipol moment kazanır. Bu elektrik alanlar dipollere çok benzer şekilde etkileşirler. Bu yöntem, rasgele şekil ve boyuttaki bir parçacığın, saçılma ve absorpsiyon özelliklerini hesaplamak ve simüle etmek için kullanılabilir. FEM, diferansiyel denklemler için sınır değer problemlerine yaklaşık çözümler bulma tekniğidir. Bu yöntem esas olarak geniş bir alanı alır ve onu sonlu boyuttaki çok sayıda daha küçük elemana böler. Bu alanlar daha sonra orijinal sorunun bir element denklemleri kullanılarak yaklaşık olarak hesaplanır. Daha sonra her bir unsurun nihai sonucu, soruna bir bütün olarak bir çözüm sağlamak için yeniden birleştirilir.

### **1. 2.2. Plazmon Eşleşmesi ve Elektrik Alan Arttırımı**

Plazmon rezonans sinyallerindeki artışı ilk kez 1974'de Fleischmann tarafından keşfedilmiştir. Fleischmann, elektromanyetik olarak pürüzlendirilmiş gümüş elektrot yüzeyinde piridin moleküllerinin Raman spektrumunu üzerinde araştırma yaparak yüksek oranda bir sinyal arttırımı gözlemlemiştir [34]. Daha sonra Jeanmarie ve Albercht birbirinden bağımsız olarak yaptıkları çalışmalarda Raman sinyallerini önemli ölçüde artırmanın sadece elektrokimyasal pürüzlendirme yöntemiyle oluşturulan yüzey alanı artışı ya da moleküllerin konsantrasyonunun artışıyla anlaşılamayacağını rapor etmişlerdir [35, 36]. Jeanmaire ve Van Duyne metalik nanoyapıların oluşturduğu hot-spot (sıcak nokta) olarak adlandırılan plazmon

rezonansı yüzünden Raman sinyallerinde artış olduğunu öne sürmüşlerdir ve buna elektromanyetik kuvvetlendirme adı verilmektedir [37]. Tekli nanopartiküllerin aksine nanopartikül dizileri arasındaki elektromanyetik etkileşimler, Coulomb etkileşimlerine bağlı olarak plazmon rezonans pozisyonunun ek bir spektral kaymasına neden olur. Bu plazmonik bağlanma olarak bilinir ve yeni hibridize plazmon modları ile sonuçlanır. Bu etkileşim ya yüzey yüklerinin polarizasyonuna bağlı olarak bir “bağlama” plazmon modu (daha düşük enerji) ya da bir “anti-bağlanma” plazmon modu (daha yüksek enerji) oluşturabilir [38]. Plazmonik eşleşme modunun spektral pozisyonu, parçacıklar arası mesafe büyük ölçüde bağlıdır ve partiküller arasındaki mesafe azaldığında önemli ölçüde kırmızı-kaymalar gösterir. Plazmonik eşleşme, plazmon rezonans frekansını ayarlamak için kullanılan diğer bir yoldur. Yakın aralıklı metal nanoyapılar arasındaki plazmonik eşleşme, genellikle “sıcak noktalar (hot spots)” olarak adlandırılır ve parçacıklar arasındaki boşlukta büyük yakın alan geliştirmesi sağlar. İndüklenen yerel elektrik alanı, çevre elektrik alanına kıyasla 100 kat ile arttırılabilir. Nanopartiküllerin bir araya getirilmesi, bireysel nanopartiküllerin plazmonları arasında eşleşmeye ile sonuçlanır. Nanopartikül seviyesinde, iki veya daha fazla parçacık plazması arasındaki eşleşme, orijinal nanopartikülünün spektrumlarında belirgin bir kırmızı kaymaya yol açar. Böylece bir analitin algılama sınırını nanomolardan pikomodar ve hatta femtomolar seviyelerine düşürmek mümkün olmuştur.

Altın nanopartiküllerin elektromanyetik modellenmesi son yıllarda ilgilenilen önemli konulardan birisidir. Altın nanopartiküllerin elektromanyetik modellenmesinde birçok farklı metod mevcut olsa da tezin bu bölümünde farklı partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin tekli, ikili, üçlü ve dördü dizilerinin farklı konfigürasyonlarda dizilimleriyle oluşturdukları plazmonik eşleşme sonucu elektrik alan ve sıcak noktalar tespit edilerek elektrik alan arttırmaları (electric field enhancement) incelenmiştir. Bu hesaplamalar için Mie teorisi kullanılmıştır.

### **1.3. Altın Nanoparçacıkların Sentezi ve Nanoplazmonik Özellikleri**

Her ne kadar 19. yüzyılın ortalarına kadar metalik nanopartiküller uzun yıllardır kullanılmış olsalar da metalik nanopartikülleri inceleyen ve optik özelliklerini ilk olarak ortaya koyan kişi Michael Faraday olmuştur. Daha sonra Richard Zsigmondy Henry Siedentopf ile birlikte koloidal nanopartiküller ile çalışmaya devam ederek tekli altın nanopartiküllerin gözlemlenebildiği ve nano boyutlarının doğrulanabileceği görüntüleme sistemleri geliştirilmiştir. Faraday ve Zsigmondy'nin öncü çalışmalarından sonra, koloidal kimya ve nanomalzemelerin üretimi önemli ölçüde ilerlemiş ve son yıllarda altın nano yapıların sentezi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir [39].

Nanofabrikasyon tekniklerindeki gelişmeler, altın mikro/nano yapıların boyut, şekil ve mesafeleri üzerinde büyük bir kontrol ile nanopartiküllerin üretimini nanodesenlenmelerini mümkün kılmıştır. Yüzey kimyası uygulamalarında artan bilgi birikimi ile altın nano yapıların üretimi ve işlevselleştirilmesi birleştiğinde bu yapılar çok çeşitli uygulamalar için çok yönlü ve fonksiyonel yapı taşları haline gelmiştir. Altın nano yapıları yüzeylere mikro/nanodesenlemesine yönelik çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmesinin yanı sıra özellikle yüksek verimli ve büyük ölçekli üretim teknikleri kullanılarak çeşitli yüzeylerde altın mikro/nano yapıların üretilmesine yönelik iyileştirmelere büyük ölçüde ihtiyaç duyulmaktadır. Yüksek homojeniteye sahip nanopartiküller sentezlenebilir ve yüzeylere birbirlerine yakın olabilecek şekilde işlevselleştirilebilirse LSPR sinyalinin artmasıyla birlikte plazmonik cihazların hassasiyet limitleri ve ölçüm performansı önemli ölçüde arttırılabilecektir. Ayrıca, altın nanopartiküllerin yapısal modifikasyonlarının refraktif indeks duyarlılıklarını etkileyeceğinden nanopartiküllerin yüksek morfolojik stabiliteye sahip olması ve işlevsellendirilmeden önce kararlılığını bozmadan kalması önemlidir. Ticari olarak uygulanabilir ve yüksek hassasiyetli nanoplazmonik algılama platformları geliştirmek için altın nanomalzemelerin sentezinde ve üretilmesinde daha fazla gelişmeye ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **1.3.1. Altın Nanomalzemelerin Üretiminde Aşağıdan-Yukarı (Bottom-Up) ve Yukarıdan (Top- Down) Aşağı Üretim Teknikleri**

Altın nanomalzemeler aşağıdan-yukarı ve yukarıdan-aşağı olmak üzere iki farklı üretim yaklaşımıyla üretilebilmektedir [40]. Yukarıdan aşağı üretim teknikleri,

desenli nanoyapıların üretilmesi için farklı litografik yöntemler kullanırken, aşağıdan yukarıya yöntemler, atomlar, moleküller ve diğer bileşenlerin farklı yüzeyler veya çözelti üzerinde nanoyapılara bağlanmasına dayanmaktadır. Altın nanoyapıların yüzeylere desenlenmesi için elektron demeti litografisi (EBL) [41, 42], nanoküre litografisi (NSL) [43], maske aracılı biriktirme yöntemleri (MAD) [44] ve sentez yoluyla elde edilmiş altın nanoyapıların yüzeylere immobilizasyonu gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Elektron demeti litografisi gibi yukarıdan aşağıya litografi yöntemleri metal nanoyapıların boyutu, şekli ve aralığı üzerinde büyük bir kontrol ile plazmonik malzemeler üretebilmektedir [45]. Bu yöntem optik özelliklerin ayarlanabildiği ve çeşitli plazmonik uygulamaların sistematik olarak incelenmesini mümkün kılan, yüksek oranda tekrarlanabilir plazmonik yüzeylerin üretilmesini mümkün kılar [46, 47]. Ancak bu litografik yöntemin en büyük dezavantajı çok maliyetli oluşudur. Elektron demeti litografisine alternatif olarak Van Duyne ve ark. daha büyük nanodesenlenmiş alanların üretilmesini sağlayan ucuz bir nano fabrikasyon yöntemi olan nanoküre (nanosphere) litografi yöntemini (NSL) geliştirmiştir [48]. NSL yöntemi mikro boyutta silika veya polistiren partikülleri farklı yüzeyler üzerinde immobilize (hareketsizleştirip) edip bu partikülleri maske olarak kullanarak partiküller arasında kalan boşluklara altın birikimi esasına dayanır. Daha sonra yüzeylerden mikropartiküller uzaklaştırılır ve partiküller arasında altın nanodesenler elde edilir. NSL yöntemi elektron demeti litografisine  $>1 \text{ cm}^2$ 'den büyük altın nanodesenlenmiş yüzeyleri çok daha ucuza üretebilmektedir [49]. Ancak, bu teknik kullanılarak üretilen altın nanodesenlenmiş yüzeyler üzerinde maske olarak kullanılan taneciklerin geometrisi nedeniyle belirgin sınırlamalar mevcuttur.

Yukarıdan aşağı litografik tekniklerle karşılaştırıldığında, aşağıdan yukarı üretim teknikleri genellikle istenilen nanomalzemelerin üretiminde daha hızlı ve ucuz bir yaklaşım sunar. Aşağıdan yukarı üretim yöntemleri nanomalzeme üretiminde büyük bir esneklik sağlar ve farklı geometrilere sahip çok çeşitli yapılar bu yöntemle oluşturulabilir. Doğal malzemelerin ve nanoyapıların yapısal ve birleşimsel karmaşıklığına bakıldığında, kendiliğinden oluşma gücü çok belirgin hale gelir. Nanomalzemelerin oluşum mekanizmaları genellikle kendiliğinden oluşma (self-assembly) eğilimindedir. Bu nedenle, fonksiyonel nanomalzemeler üretmek için üretimde yer alan kuvvetler ve fiziksel sınır koşullarını kontrol etmek güçtür. Altın

nanopartikül sentez yöntemleri bu sınıfa aittir ve altın nanopartiküller genellikle kolloid kimyasına dayalı sentez yöntemleriyle üretilirler. Modern kolloid kimyası yöntemleri dar boyut dağılımında altın nanopartiküller üretebilmektedir. Bu partiküller iyi tanımlanmış ve kontrol edilebilir iç yapı, şekil, kimyasal bileşim ve yüzey modifikasyonu ile sentezlenmektedir. Kolloid kimyasıyla sentezlenen altın nanoparçacıkların optik özellikleri özel kullanımlarına göre uyarlamaya da olanak sağlar. Kolloid kimyası yöntemlerinin nanopartiküllerin optik özelliklerini ve şekillerini ayarlamak için en uygun yol olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir [8, 50, 51].

Altın nanopartiküllerin LSPR bazlı sensörlerde kullanımı diğer geleneksel biyosensör yöntemlerine göre büyük avantajlara sahip olduğundan son yıllarda giderek artmaktadır. Altın nanopartiküllerin bu kadar popüler olmasının diğer bir sebebi de üretiminin ucuz ve kolay olmasıdır. Altın nanopartiküllerin küçük yapısı birbirinden farklı özelliklere sahip plazmonik yüzeyler oluşturmaya olanak sağlamakla birlikte plazmonik yüzeylerin mikroakışkan çiplere entegrasyonuna da kolaylaştırmaktadır. Ayrıca altın nanopartiküllerin biyolojik bağlanma konusundaki kayda değer hassasiyeti düşük tespit limitlerinin gerekli olduğu zorlu durumlarda bile yüksek hassasiyetli ölçümlere olanak sağlamaktadır [52, 53].

Altın nanopartiküllerin sentezlenmesi için ortak olan strateji nanopartiküllerin agregasyonunu engelleyebilecek moleküllerin (indirgeyici ajanlar) varlığında altın tuzunu ( $\text{HAuCl}_4$ ) çözmek ve indirgemektir. İndirgeme ajanının altın tuzuna olan oranı nanopartiküllerin büyüme kinetiğini etkileyerek sonuç partikülün büyüklüğünü etkiler. Çoğunlukla indirgeme ajanının nanopartikülleri stabilize etme rolü de vardır. Altın nanopartikül sentezine en iyi örnek altın klorit tuzunun ( $\text{HAuCl}_4$ ) sodyum sitrat ile indirgendiği Turkevich ve ark. 1951 yılında geliştirdikleri sentez yöntemidir [54]. Bu yöntemde, sitrat, partiküllerin büyüklüğünün kontrol edilebildiği bir indirgeyici madde ve elektrostatik stabilizatör olarak hareket eder. Reaksiyon kinetiği ve oksidasyon potansiyeli sıcaklığa bağlı olduğundan, reaksiyon sıcaklığı da altın nanopartiküllerin oluşumu için oldukça önemlidir. Sitrat anyonlarının fazlalığı, partiküllerin etrafında agregasyonu engelleyen ve parçacıklara net bir negatif yüzey yükü veren kompleks bir çok katmanlı oluşturur [55]. Negatif yüklü sitrat kapaklama altın nanopartikülleri ortam pH'sındaki değişimlere, iyonik mukavemete ve proteinler veya diğer biyomoleküller ile yüzey modifikasyonu için uygun hale getirir [56].

#### **1.3.1.1. Altın nanopartiküllerin sentezinde çekirdek büyütme (Seed and Growth) yöntemi**

Altın nanopartiküllerin boyut kontrollü sentez mekanizması genel olarak iki aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalardan ilki altın çekirdeğin oluşması, ikincisi ise bu altın çekirdeğin kontrollü olarak büyütülmesidir. Altın nanopartikül sentez reaksiyonuna Bölüm 3.2.1. de bahsedildiği üzere sadece altın tuzu ve indirgeyici madde eklenirse oluşan altın çekirdekleri düşük yüzey enerjisine sahip olduklarından küresel nanopartiküller oluşacaktır [57]. Anizotropik altın nanoyapıların üretilmesi için çekirdek büyüme reaksiyonunun belirli bir yönde büyümeyi destekleyen spesifik ajanlarla yönlendirilmesi gerekmektedir. Altın nanopartiküllerin boyut ve şekil kontrollü sentezi için kullanılan en popüler yöntem çekirdek büyütme tekniğidir. Bu yöntemde ilk olarak birincil altın çekirdekleri oluşturulur daha sonra daha düşük indirgeyici ajan (askorbik asit vb) kullanılarak altın büyümesi teşvik edilir ve altın nanopartiküller kontrollü olarak büyütülür. Parçacıkların boyutu ve şekli reaksiyonda kullanılan indirgeme ajanlarının tipi ve konsantrasyonunun yanı sıra sıcaklık ve karıştırma hızı gibi reaksiyon koşulları değiştirilerek kontrol edilir [58].

#### **1.3.1.2. Altın nanopartikül sentezinde fotokimyasal yöntemler**

Altın ve gümüş gibi metalik nanopartiküller herhangi bir indirgeyici ajana veya yüzey aktif maddeye ihtiyaç duymadan sadece ışıkla uyarılarak sentezlenebilir burada altın klorür tuzu ( $\text{HAuCl}_4$ ) ya da gümüş nitrat tuzu ( $\text{AgNO}_3$ ) 254 nm UV ışığı ile indirgenerek altın ya da gümüş nanopartiküller üretilmektedir. Bu yöntemde UV ışığı  $\text{Au}^{3+}$ 'ü  $\text{Au}^0$  'a ya da  $\text{Ag}^{1+}$  'i  $\text{Ag}^0$  dönüştürmek için indirgeme ajanı olarak kullanılmıştır. Bu yöntemden faydalanarak Çalamak ve ark ipek fibroin nanofiberler yüzeyinde gümüş nanopartiküllerin oluşumunu UV ışığı altında tetikleyerek antibakteriyel özellikte biyouyumlu yara örtü malzemeleri geliştirmiştir [59, 60]. Cao ve ark. yaptıkları çalışmada altın tuzu, yüzey aktif madde (CTAB) ve gümüş nitrat içeren büyütme çözeltisini 254 nm UV ışığa bırakarak altın nanoçubuk sentezlemeyi hedeflemişlerdir. Altın çözeltisi çeşitli sürelerde UV ışığına maruz bırakılarak ilk saatlerde altın nanoçubuklarının oluşumu gözlenmiştir. 24 saatten fazla UV ışığına maruz kalan örneklerde nanoçubukların yapısının bozularak nanopartiküler forma dönüştüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca, 300 nm UV ışığı ile optik yoğunluk artırılarak altın nanoçubukların boyutunu uzatmanın mümkün olduğu tespit edilmiştir [61].

### 1.3.2. Altın Nanopartiküllerin İşlevselleştirilmiş Yüzelere İmmobilizasyonunu

Altın nanopartiküllerin (AuNPs) eşsiz optik özellikleri lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) uygulamalarında hassas platformların gelişimi bu partikülleri çok çekici hale getirmektedir. LSPR bazlı platformların ana çalışma prensibi metal yüzeyinin dielektrik sabitindeki adsorbant kaynaklı değişikliklere olan yüksek duyarlılığına dayanmaktadır [62]. Altın nanopartiküllerin çeşitli katı yüzeylere immobilizasyonu nanoplazmonik yüzeylerin geliştirilmesinde büyük rol oynamıştır. Bu cihazların optik özellikleri yalnızca altın nanopartiküllerin boyutuna ve şekline değil aynı zamanda yüzeylerde mekansal düzenlemelerine ve substrat yüzeyi ile etkileşimlerine de bağlıdır. Mükemmel boyut dağılımıyla birlikte altın nanopartiküllerin yüzeye homojen ve birbirlerine yakın bir biçimde immobilize edilmeleri oldukça önemlidir. Metalik yüzeylerde altın nanodesenlerin monodispers olarak desenlenmesi pik kaymasının tespitini kolaylaştıran daha keskin bir sönüm spektrumuna sahiptir.

LSPR bazlı sistemlerin performansını etkileyen diğer bir etmen de altın nanopartiküllerin yakın çevresinde elektromanyetik (EM) alan oluşturmalarıdır. Nanopartiküller arası oluşan bu elektrik alanlar partikülün boyutuna, şekline, yönüne ve kümelenmesine büyük ölçüde bağlıdır. Altın nanopartiküllerin katı yüzeylere immobilizasyonu için kullanılan yüzeyler genellikle silikon, cam, polistiren, asetat ve polikarbon gibi yüzeylerdir [63, 64]. Genellikle bu yüzeyler üzerine altın nanopartiküllerinin sabitlenmesi nanopartiküller ile elektrostatik veya kimyasal etkileşim içinde olan katı yüzey üzerine işlevsellendirilmiş moleküller kullanılarak gerçekleştirilir. Altın nanopartiküller katı yüzey üzerine işlevselleştirilen  $-CN$ ,  $-NH_2$  ve  $-SH$  gibi fonksiyonel gruplara altın nanopartiküllerin kovalent olarak bağlanmasıyla hazırlanabilmektedir. Bu yüzeyler kararlı olmakla birlikte nanopartiküllere yüzey modifikasyonu sırasında partiküllerin yüzeye bağlı kalmasını sağlayacak kadar güçlü olmalıdır.

Altın nanopartiküllerin rezonans dalga boyunu ve bu dalga boyundaki kayma miktarını, partikül boyutu, partikül şekli, partikül-partikül etkileşimi, partiküller arası mesafe ve partikülün dielektrik çevresi gibi faktörler etkiler. Altın nanopartikül periyodik dizilerin kullanılmasının avantajı, metal nanopartiküllerin sönüm tepe çizgilerinin genişletilmeden çok yüksek yoğunlukta yakın bir şekilde paketlenabilmeleridir. Bu sönüm ya da saçılma sinyalinin kuvvetini arttırabilir ve

böylece sensörün sinyal gürültü (S/N) oranını arttırabilir. Bunlara ek olarak periyodik dizi sensör performansını optimize etmek için çok uygun olan geniş bir dalga boyu aralığında rezonans ayarlayabilir. İyi ayrılmış LSPR spektrum aralıklarına sahip farklı periyodik diziler farklı dalga boylarında çoklu moleküllerin tespit edilmesine yardımcı olur [65]. Spesifik uygulama için optimum plazmon özelliklerini kontrol etmek için nanopartiküllerin çeşitli bileşimlerinin, şekillerinin ve boyutlarının sentezine yönelik önemli çabalar gösterilmiştir. Altın nanopartiküllerin sıralı dizileri, plazmon özelliklerinin hassas kontrolü için oldukça önemlidir, çünkü altın yüzey elektronlarının rezonans salınımına yönelik boyut sınırının ötesine yığılma eğilimindedir. Nanopartiküllerin zincir benzeri diziler şeklinde yüzeylere tutunmaları, polimerik elektrolitler üzerinde nanopartiküllerin birleştirilmesiyle veya nanopartiküller arasındaki dipol etkileşimi ile oluşturulabilir. Polikasyonik polimerler üzerinde dizilmiş altın nanopartiküllerin plazmon rezonansı genellikle partiküller arası mesafeleri ve dizilen partiküllerin yoğunluğu ayarlayarak kontrol edilmiştir.

#### **1.4. Mikroakışkan Sistemler ve Sensör Teknolojilerindeki Yeri**

Mikro ölçekli akışkan sistemlerin kompaktlığı ve yüksek yüzey hacim oranları, bu sistemleri, ısı transferi arttırma, kimyasal reaktör, havacılık teknolojisi uygulaması, ilaç etkileşimi ve DNA dizilimi gibi biyomedikal uygulamalar için geleneksel akış sistemlerine göre cazip alternatifler haline getirmiştir. Deneysel ve teorik çalışmalar, mikroakışkan kanallarda özellikle de duvar sürtünmesi açısından sıvı akışının makrokanal akış davranışından farklı olduğunu göstermiştir [66].

Mikroakışkan teknolojileri ile birleştirilen kompakt biyosensörler, biyolojik örnekleri makro ölçekte işleyen ve tespit eden mevcut yaklaşımlarla karşılaştırıldığında, kimyasal ve biyolojik belirteçleri algılamak için daha hızlı ve daha ucuz yaklaşımlar sağlayabilmektedir. Mikroakışkan platformlar yüksek yüzey/hacim oranı ve kütle taşınımını ile kısa tahlil süresi ve artan algılama hassasiyeti sağlarlar [67]. Biyomedikal araştırmalar ve klinik uygulamalar için mikroakışkan çiplerin kullanımı oldukça avantajlıdır. İlk olarak, bu kanallardaki akışkanların hacmi çok küçük olduğundan genellikle pahalı olan reaktif ve analit miktarı oldukça az ve optimum seviyede tutulur. Ayrıca mikroakışkan çiplerin üretim teknikleri nispeten ucuzdur ve seri üretime çok uygundur. Son zamanlarda, konvansiyonel SPR biyosensör sistemi ve mikroakışkanlarla entegrasyonu çokça araştırılmasının yanı sıra [68, 69] LSPR

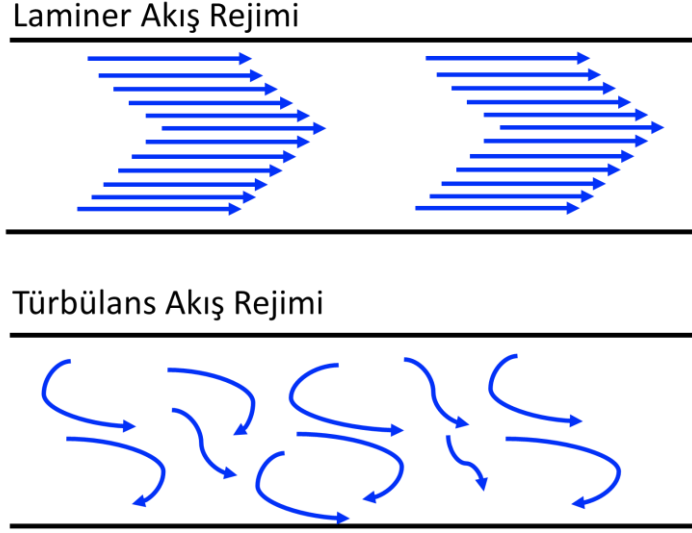
bazlı biyosensörlerin mikroakışkan teknolojisi ile entegrasyonu hakkında araştırma sayısı oldukça azdır. Mikroakışkan sistemlerde genellikle polimetilsiloksan (PDMS), polimetilmetakrilat (PMMA) ve polikarbonat (PC) gibi fotolitografi, kalıplama ve mikro işleme (lazer veya mikrodeme) gibi yöntemlerle işlenebilecek malzemeler kullanılır.

#### **1.4.1. Mikroakışkan sistemlerde akış rejimleri**

Mikrokanallar içerisindeki hidrodinamik akış mikroakışkan sistemlerin karakterini belirlemektedir. Mikroakışkan kanallardaki akışın şeklini ve akış içindeki moleküllerin nasıl davrandığını karakterize eden belirteç Reynold sayıdır. Bazı akışlar oldukça çalkantılıyken bazıları düzgün ve düzenlidir. Düzgün akım çizgileriyle belirtilen çok düzenli akış hareketine laminar akış denir. Laminar akış, sıvının hareket ettiği yöne paralel olan farklı akış hatlarına sahip olan bir akış türüdür. Türbülanslı akış farklı akış çizgileri olmadan düzensizce akan bir akışkan olarak tanımlanır. Bir mikroakışkan kanal içerisindeki sıvı akışı laminar veya türbülanslı akış olabilir. Laminar akıştan türbülanslı akışa geçiş kanalın geometrisine, yüzey pürüzlülüğüne, akış hızına, yüzey sıcaklığına ve akışkan türüne bağlıdır (Şekil 4.1).

$$Re = \frac{\rho V L}{\mu} \quad (1.12)$$

Burada  $\rho$  akışkanın yoğunluğu,  $V$  ortalama hız,  $L$  akışkanın içinde aktığı nesnenin ölçütü  $\mu$  ise kinematik viskozitedir. 2000'den düşük Reynolds sayılarında sıvı laminar bir özellik gösterirken 2000'den yüksek sayılarda sıvı türbülans akış gösterir [70].



Şekil 1.4 Laminer ve türbülans akış dinamikleri.

Mikroakışkan çipler moleküler difüzyon katsayıları, akış viskozitesi, kimyasal bağlanma katsayıları ve enzim reaksiyon kinetikleri dahil olmak üzere çeşitli ölçümler elde etmek için kullanılabilmesinin yanı sıra mikroakışkan çiplerin diğer uygulama alanları kılcal elektroforez, immünolojik testler, akış sitometrisi, PCR amplifikasyonu, DNA analizi, hücre manipülasyonu, hücre ayırma, hücre ve kimyasal gradyan oluşumu yoluyla proteinlerin ayrıştırılması olarak sıralanabilir. Bu uygulamaların çoğu klinik uygulamalar için oldukça faydalıdır.

Taşıyabilir uygulamalarda kullanmak üzere geliştirilen mikroakışkan kanallı çiplerin ana hedeflerden birisi yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip olmaktır. Mikrokanallardan sıvı harekete geçirmenin iki yaygın yöntemi vardır. Bunlardan ilki ve en çok tercih edileni basınçlı akışta sıvının şırınga pompaları gibi pozitif yer değiştirme pompaları vasıtasıyla sağlanması. Basınçla çalışan laminar akış için akışkanlar mekaniğinin temel yasalarından biri olan ve kaymayan sınır koşulu adı verilen duvarlardaki akışkan hızının sıfır olması gerektiğini belirtir. Bu kanal içerisinde parabolik bir hız profili oluşturur. Mikroakışkan kanallarda sıvı akışını sağlayan diğer bir yöntemde elektroosmatik akıştır. Elektroosmotik akışta iyonların bir çözücü içerisinde kanal içerisindeki potansiyel ile iyon hareketinin sağlandığı oldukça dar kanallar içerisine difuze olması reaksiyon ortamında itici güç olmaktadır [71].

#### **1.4.2. Türbülans akış rejiminin partikül büyümesi üzerine etkisi**

Konveksiyon etkileri, arayüz mikroyapılarının model oluşumunun kontrol edilmesinde temel öneme sahiptir. Çok sayıda deneysel ve simülasyon çalışması, arayüzlü mikroyapılarda çözünmüş konveksiyon harici zorlamaların etkisini göstermiştir. Türbülans akış yüzey parçacık arasındaki etkileşimde önemli rol oynar. Konvansiyonel statik sistemlere göre türbülans akışa sahip mikrokanallar, moleküler desenlerin ve katmanlı yapıların üretilmesinde avantajlıdır. Ayrıca, bazı araştırmacılar, mikrokanalların geometrilerini ve akış sürelerini değiştirerek türbülans akışlı mikrokanallar geliştirmişlerdir. Türbülans akışa sahip mikrokanallar hızlı ısı ve kütle transferi sağlamakla birlikte mikroakışkan kanal ortamının daha rahat yönetimini sağlar. Bu sistemlerde akışı gerçekleştirilen türlerin dağılımı ve yüzeyle etkileşimleri akış hızı, hız ve kayma (shear) profilleri ile belirlenir. Türbülans akışlı sistemler, akış hızı kontrolü (stokiyometrik oran), reaktif transport kontrolü (hassas zaman aralıkları ve istenen konum) ve akış yolu kontrolü (mikroakışkan kanal geometrisi) gibi nano sentezde kritik aşamalarının ayarlanmasında büyük bir potansiyele sahiptir [72, 73].

#### **1.5. Prostat Kanseri Biyobelirteçleri ve Teşhisindeki Zorluklar**

Prostat kanseri, mesanenin altında rektumun önünde yerleşmiş olan prostat bezinde gelişen bir kanser türüdür. Prostat kanseri Avrupa'da tahmini 382.000 Amerika' da ise 239.000 vaka insidansı ile batı toplumlarındaki erkeklerde en sık rastlanan kanser türüdür [1]. Genellikle prostat kanseri ileriki yaşlarda görülen ve prostatın dış kısmında başlayan kötü huylu bir tümördür. Çoğu erkekte prostat kanserinin gelişmesi çok yavaştır. Bu yüzden hastalığı olan birçok erkek bunun farkında olmamaktadır. Prostat kanseri tanısında; parmakla rektal muayene (PRM), serum prostat spesifik antijen (PSA) düzeyi ölçümü ve transrektal ultrasonografi (TRUS) yöntemleri kullanılmaktadır [2]. Bu yöntemler arasında; klinikte en sık kullanılanı serumdan, prostat spesifik antijen (PSA) seviyesinin ölçümüne dayanmaktadır. Prostatik duktal epitel hücreleri, spermin dışarı atılmasını kolaylaştıran PSA (Prostat Spesifik Antijen) denilen bir protein salgırlar. PSA, kimotripsin gibi serin proteaz aktivitesindedir. Malign özellikte olan hücrelerde sentezlendiği gibi normal yapıları hücrelerde de oluşturulmaktadır. Sağlıklı bir bireyde kandaki PSA seviyesi 4 ng dan daha düşük seviyededir. Hasta bireylerde ise bu seviye 4-10 ng/ml olarak ölçülür ve PSA seviyesine göre "Gleason Skoru"

hesaplanır. Gleason Skoru 2' den 10' a kadar değişen bir derecelendirme sisteminden oluşmaktadır. "2" kanserin en az saldırgan formunu (prostat beziyle sınırlı), "10" ise en saldırgan formunu (bezin dışına yayılma riski en yüksek) temsil eder. PSA seviyesi kanser dışındaki durumlarda da (prostat iltihabı ve benign prostat hiperplazisi) plazma seviyesinde artış gösterdiğinden prostat kanserinin teşhisinde %100 sonuç veren bir yöntem değildir. Prostat kanserinde kesin teşhis lezyonların *in vivo* görüntülenmesi ve alınan cerrahi örneklerde adenokarsinomun görülmesiyle konulmaktadır [3, 4].

Prostat kanseri erken teşhis edildiğinde iyileşme şansı oldukça yüksek bir hastalıktır. Henüz prostat bezi dışına yayılmamış kanserlerde yüzde yüze yakın oranda iyileşme sağlanabilmektedir. Bu nedenle 45 yaşını açan erkeklerin yılda en az bir kere prostat taramasından geçmesi önerilmektedir. Prostat kanseri mekanizmasında moleküler biyolojik çeşitlilik diğer kanser türleri arasında hastalığı özel bir yere koymaktadır. Aynı eşitlilik kanserin teşhisi ve moleküler temeli aydınlatılmaya çalışılırken birçok tezinin gelişmesine neden olmuştur. Son yıllarda yapılan proteomik ve metabolomik çalışmalar serumdan ve idrardan prostat biyobelirteçlerinin tayinine yöneliktir [5]. PSA düzeyinin prostat kanserin tanısındaki düşük seçiciliği nedeniyle önümüzdeki yıllarda idrarda belirteç arama süreci devam edecektir [6]. Özellikle bu alanda meydana gelecek gelişmelerin prostat kanserinin erken teşhisinde hastalara umut ışığı olacağı düşünülmektedir. Prostat bezinin bulunduğu yer itibariyle idrar kanalına doğrudan bağlı olması prostat bezinde hücresel ve moleküler boyutta meydana gelebilecek her bir değişikliği idrar yoluyla takip etmemize olanak sağlamaktadır. Non-invaziv olan idrar bazlı testler prostat kanseri için prognostik bilgilerin düzenli olarak toplanabileceği testlerdir.

Prostat kanser biyobelirteçlerinin vücutta herhangi bir tümör bulunmadığı durumlarda kan ve idrar gibi vücut sıvılarında eser seviyede bulunduğu belirtilmiştir. Prostat bezinde tümör oluşumuyla birlikte kan ve idrardaki kanser biyobelirteçlerinin miktarına belirli bir oranda artış olmaktadır. Ancak proteomik ve metabolomik çalışmalarda kelfedilen yeni nesil kanser biyobelirteçlerinin vücut sıvılarındaki miktarları tespit limitlerinin (LOD) ok altında olduğundan yeni keşfedilen kanser biyobelirteçlerinin hassasiyeti diğer sensörlere göre daha yüksek olan optik bazlı plazmonik sensörlerde teşhis edilmesine acil ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde plazmonik sensörler, ultra düşük konsantrasyonlarda az ayda molekül tespiti için

kullanılabilen en güçlü optik biyosensörlerden biri olmasına karşın düşük molekül ağırlıklı (<1000 Da) seyreltilmiş analitlerin tespiti halen mevcut plazmonik biyosensörler için mümkün olmamıştır[7].

Bilindiği üzere klinikte en çok kullanılan prostat kanseri belirteci PSA'dır. Prostat kanserinin teşhisinin aynı sıra PSA değeri aynı zamanda geçerli lokal tedavinin etkinliğini araştırmak için kullanılmaktadır. Bu nedenle daha hızlı, güvenilir ve kullanımı kolay test kitlerinin geliştirilmesi için PSA'nın idrardan veya serumdan tespitine yönelik çeşitli sensör sistemleri geliştirilmiştir. PSA'nın molekül ağırlığı 60-66 kDa arasında değişiklik göstermektedir. PSA büyük molekül ağırlığına sahip olduğundan özellikle nanoplazmonik sensörlerin yüzeyinde düşük konsantrasyonlarda bile ölçülebilir değişikliklere sebep olur. Khan ve ark. altın elektrot ve grafen nanoplateletler kullanarak geliştirdikleri sensörde bir sensörde tükürük içerisinde 40 fg/mL ( $R^2 = 0.963$ ) PSA tayin limitine ulaşarak oldukça hassas bir sensör geliştirmişlerdir [74]. PSA'nın dışında BSA, TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 prostat kanseri oluşumunda ve metastazında oldukça etkili biyobelirteçlerdir.

### **1.5.1. Prostat Kanseri Biyobelirteçleri**

#### **1.5.1.1. Sığır serum albümin (BSA)**

Albümin insan serumunda bulunan başlıca proteinlerden biridir ve karaciğer tarafından sentezlenir. Bir hastanın kanındaki albümin seviyeleri enfeksiyon, kalp yetmezliği, travma, karaciğer yetmezliği ve böbrek yetmezliği gibi durumlardan etkilenebilir. Tüm bu rahatsızlıkların yanı sıra kanserin de önemli bir prognostik faktörüdür [75]. Sejima ve ark. düşük düzeydeki serum albümin düzeylerinin lenf nodu metastazlarını tahmin edebildiğini ve en sonunda radikal prostatektomi hastalarında prostat kanserinin tekrarlaması ile korele olduğunu bildirmişlerdir [76]. BSA birçok sensör uygulamasında bloklayıcı ajan gibi amaçlar için kullanılmasının yanı sıra sığır serum albumini hem prostat kanseri biyobelirteci hem de nanoplazmonik platformların hassasiyetlerinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

#### **1.5.1.2. Transforme edici büyüme faktörü beta 1 (TGF- $\beta$ 1)**

Transforme edici büyüme faktörü beta 1 (TGF- $\beta$ 1) hücrel farklılaşma, immün cevap, anjiyogenez ve proliferasyon gibi çok çeşitli moleküler süreçlerde rol oynayan bir büyüme faktörüdür. Yapılan çalışmalar, kanser gelişiminde TGF- $\beta$ 1'in rol oynadığını göstermektedir. TGF- $\beta$ 1 derişimindeki artışın, tümör evresi, lenf

nodülüne metastaz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [77]. G1 fazında hücre döngüsünü bloke etme kapasitesi nedeniyle TGF  $\beta$ 1 erken tümör gelişimi sırasında majör tümör baskılayıcı olarak kabul edilir. Blanchère ve ark. insan prostat fibroblastlarının normal insan prostatından elde edilen ölümsüzleştirilmiş PNT2 epitelyal hücrelerin büyümesi üzerinde inhibitör etki gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Bu inhibitör etki fibroblastlar tarafından salgılanabilen yayılabilir TGF- $\beta$ 1 faktörün kontrolü altında meydana gelmiştir [78, 79]. TGF-  $\beta$ 1 ayrıca hücre döngüsünü düzenleyen EGF, aFGF, bFGF, PDGF ve TGF $\alpha$  gibi birçok büyüme faktörüyle de iletişim halindedir. TGF- $\beta$ 1'in plazma derişimini ölçmek için yapılan ELISA çalışmaları ile prostat kanserli hastalarda TGF- $\beta$ 1 derişiminin arttığı [80] ve bu artışın, seminal vezikül invazyonu, metastaz ve biyokimyasal nüks etme ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir [81]. Bu yüzden, TGF- $\beta$ 1 prostat kanseri için iyi bir erken teşhis biyobelirtecidir. Literatürde plazmonik olarak TGF- $\beta$ 1 tespitine yönelik çalışmaya rastlanmamışsa da hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere ELISA bazlı ticari kitler mevcuttur. Bu kitlerin tespit limit aralığı 32 pg/mL-2000 pg/mL aralığında değişmektedir. Tez kapsamında *in-situ* partikül büyütme yöntemiyle hassasiyeti arttırılmış nanoplazmonik platformlar yüzeyinde TGF- $\beta$ 1'in tespitine yönelik çalışmalar yapılacaktır.

#### **1.5.1.3. Kemik morfojenetik proteini 2 (BMP-2)**

Kemik morfojenetik proteini 2 (BMP-2) TGF- $\beta$  süper ailesinin bir alt üyesi olup kemik dokusunun mediatörü olarak bilinir. BMP-2 prostat kanser hücrelerinin osteoblastik aktivitesinde aktif rol almaktadır [82, 83]. Buna karşılık BMP-2 kanser hücrelerinin migrasyonunu, invazyonunu ve proliferasyonunu uyararak osteolitik prostat kanseri metastazlarını etkilemektedir. BMP-2 prostat kanser hücrelerinin salgıladığı urokinaz tipi plazminojen aktivatörü, osteoblast mitogenezi doğrudan veya TGF- $\beta$ 1 yi aktive ederek uyarmaktadır [84, 85]. Görüldüğü üzere BMP-2 iyi bir prostat kanseri biyobelirtecidir. Literatürde plazmonik olarak BMP-2 tespitine yönelik çalışma bulunmamaktadır. Ancak hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere ELISA bazlı ticari kitler mevcuttur. Bu kitlerin tespit limit aralığı 45 pg/mL-3000 pg/mL aralığında değişmektedir. Tez kapsamında *in-situ* partikül büyütme yöntemiyle hassasiyeti arttırılmış nanoplazmonik platformlar yüzeyinde BMP-2'nin tespitine yönelik çalışmalar yapılacaktır.

### 1.5.2. Kanser Teşhisinde Mikroakışkan Çipler

Kanser tanısında tümörleşme başlamadan önce, güvenilir teşhis sonuçları için çok sayıda kanser biyobelirtecinin eş zamanlı taramasını yapabilecek panellerin hazırlanması gerekmektedir. Günümüzde protein bazlı kanser biyobelirteçlerinin teşhisi ELISA (enzim bağlı immunosorbent analizi), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Flüoresan *In-situ* Hibritleşmesi (FISH) ve sıvı kromatografisi-kütle spektrofotometresi (LC-MS) gibi yöntemler kullanılarak yapılmaktadır [86, 87]. Klinikte kullanılan kanser diagnostikleri çok basamaklı bir süreç olup ve antikor antijen bağlanma afinitesine göre çalışan sistemlerdir. Antikor bazlı sistemler yüksek örnek hacmi, pahalı bağlanma ajanları, uzun inkübasyon süresi gibi acil müdahale gerektiren durumlarda yetersiz kalmaktadırlar. Ayrıca bu sistemlerde kullanılan antikorların bağlanma afiniteleri üretimden üretime değişmektedir bu da kullanılan biyosensörlerin klinik uygulamalar için güven sınırını zorlamaktadır. Vücut sıvılarından, yüksek seçicilikte ve hızlı bir şekilde kanser biyobelirteçlerinin taranması kanserin erken teşhisi ve metastazının engellenmesi için büyük önem taşımaktadır. Klinikte kullanılan son dönem test sistemleri hasta başı test sistemleri (Point of Care) olarak tasarlanmaktadır. Hasta başı test sistemleri, acil servis gibi kritik bakım gerektiren alanlarda hızlı ve güvenilir test sonuçları sağlayarak, tanı ve tedavi takibinde hasta ve klinisyene büyük yararlar sağlayan sistemlerdir. Bu sistemler özel laboratuvar ortamına ihtiyaç duyulmaksızın her ortamda çalışabilen ve mikrolitre mertebelerinde örnek hacimleriyle az numune kullanarak hızlı sonuç veren sistemlerdir. Bu sistemler genellikle hamilelik testi gibi tek kullanımlık olarak tasarlanırlar. Hasta başı test sistemleri genellikle mikroakışkan bazlı ve yüzey plazmon rezonansı temeline dayanan sistemlerdir [88].

Mikroakışkan sistemler analitik sistemlerin minyatürize edilmesi ile örnek miktarlarının azalmasına ve yüksek oranda analizin gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır. Bunlara ilaveten mikroakışkan sistemler taşınabilir bir panel üzerinde çok sayıda örneğin paralel analizine olanak sağlayan sistemlerdir. Mikroakışkan bazlı sistemlerin özellikle hasta başı teşhisler (Point of Care) için önemi büyüktür. Son yıllarda geliştirilen mikroakışkan kanallara sahip HIV tarama sistemleri 1µL örnek hacmiyle 20 dakika içinde tarama yapabilme yeteneğine sahiptirler [87, 89, 90]. Augustsson ve arkadaşlarının geliştirdikleri mikroakışkan temelli tanı kiti kan örneğinden hiçbir işaretleyici ajan kullanmadan prostat kanser

hücrelerini ayırt edebilme özelliğine sahiptir. Geliştirilen sistem prostat kanseri hücrelerinin boyut farkından faydalanarak mikroakışkan kanallar vasıtasıyla filtrasyonuna dayanmaktadır [91]. Ayrıca literatürde mikroakışkan temelli sistemlerle noninvaziv olarak prostat kanseri biyobelirteçlerinin miRNA ile tayinini gerçekleştirebilecek çalışmalar da mevcuttur [92].



## 2. MATERYAL VE METOD

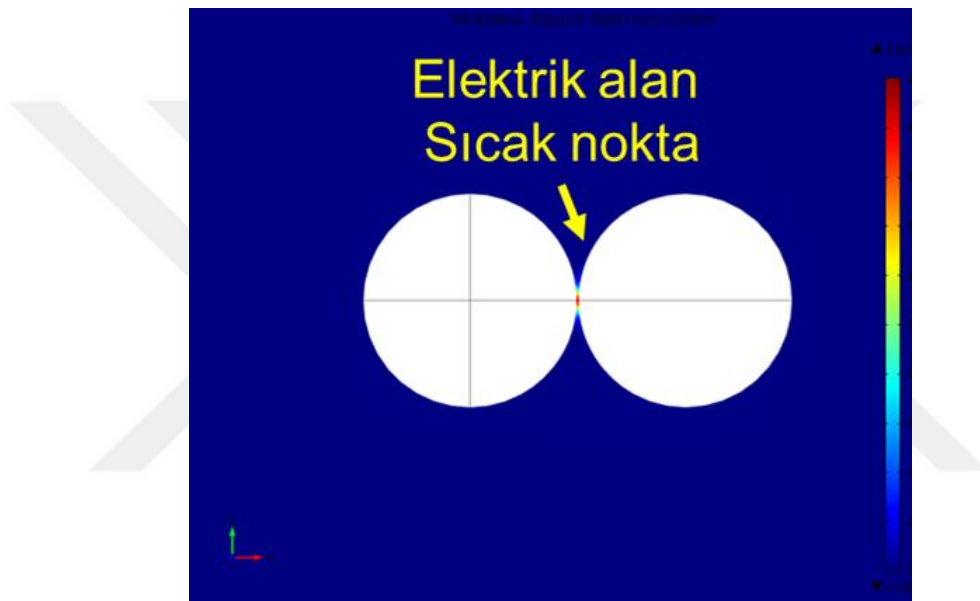
### 2.1. Teorik Modelleme Basamakları

Teorik analizler problemin belirlenmesi, ilgili geometrenin oluşturulması, fiziksel ve matematiksel hesaplamalar ve dataların değerlendirilmesi gibi pek çok adımdan oluşmaktadır. Problem belirlendikten sonra fiziksel ve matematiksel hesaplamalarda kullanılacak denklemlerin boyutunun ve zamana bağlı olup olmadığı gibi parametrelerin belirlenmesi gerekir.

İlk olarak hesaplamalarda kullanılacak denklemlerde nelerin ihmal edilip nelerin ihmal edilmeyeceğinin belirlenmesi için problemin zamana bağlı (time dependent) yoksa zamandan bağımsız mı çözüleceğine karar verilir. Daha sonra problemin fiziksel ya da kimyasal özellikleri belirlenir. Örneğin problem içinde akışkan hareketi varsa akışın laminar mı türbülanslı mı olduğu yani Reynold sayısı; kaç fazlı akışkan olduğu belirlenir. Problem ve problemin yapısı tam olarak belirlendikten sonra çalışılacak geometrinin belirlenmesi işlemine geçilir. Geometrinin belirlenmesi bilgisayar destekli (Computer Aided Design-CAD) farklı yazılımlar kullanılarak belirlenebildiği gibi yazılımın içerisinde de istenilen geometriler oluşturulabilmektedir. Programa girilen geometrinin de tam olarak belirlendikten sonra malzemeye ait tüm özellikler (viskozite, yoğunluk, iletkenlik vs.) sisteme girilir. Bu özellikler kullanıcı tarafından girilebildiği gibi yazılımın veri tabanından da elde edilebilmektedir. Tüm verilere girildikten sonra çözüm için en önemli aşamalardan biri olan mesh (ağ) yapısı girişi yapılır analizde kullanılacak geometrik şekle kendi şekline uygun ağ yapısı oluşturulmalı, uygun eleman sayısına bölünmelidir. Eleman sayısı arttıkça bilgisayarın problem çözme süresi de artacaktır. Tez kapsamında ilk olarak farklı boyutlara sahip altın nanopartiküllerin elektrik alan etkileşimlerinin ve arttırımlarının teorik analizleri yapılmıştır. Daha sonra yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin yüzeyde *in-situ* büyümelerine akış rejimlerinin etkisinin incelenmesi için tasarımı tamamlanan mikroakışkan çiplerin kanal geometrilerinin akış ve hız profillerinin teorik analizleri COMSOL Multiphysics yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

### 2.1.2. Altın nanopartikül dizilerinin elektrik alan etkileşimlerinin teorik analizi

Bu tez çalışmasının ilk bölümünde birbirinden farklı partikül boyutuna sahip (20, 50, 80 ve 100 nm) altın nanopartiküllerin elektrik alan arttırmaları ve plazmonik eşleşmeleri teorik olarak incelenmiştir. Bu amaçla, COMSOL Multiphysics'in RF modülünü kullanarak, farklı boyutlardaki altın nanopartiküller üzerindeki elektrik alan etkileşimleri ve parçacıklar arası mesafeye etkileri araştırılmıştır. Yakın mesafedeki altın nanopartikül çiftleri üzerindeki yüzey plazmonları eşleşebilir ve boşluklarında algılama ve hassasiyeti artırıcı güçlü elektrik alan ve sıcak noktalar (hot points) oluşturabilirler (Şekil 2.1).



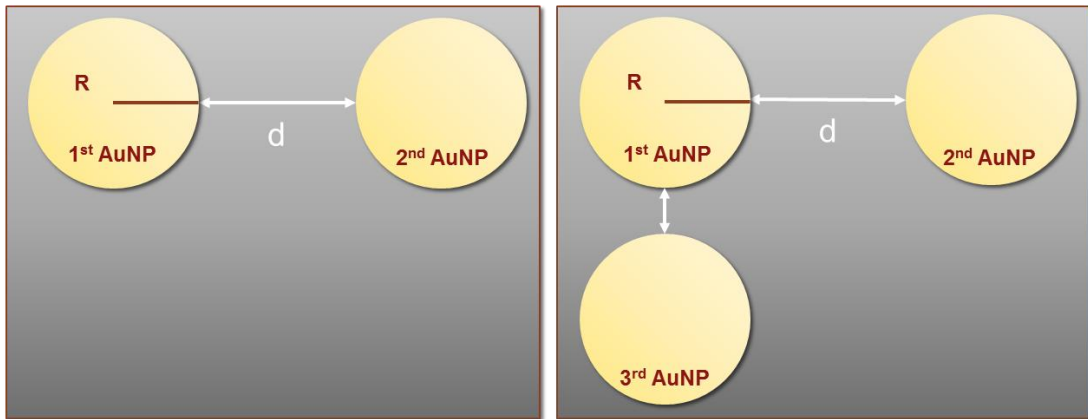
Şekil 2.1 Altın nanopartiküller arasında oluşan elektrik alan dağılımı ve sıcak noktalar.

RF modülü plazmonik nanoyapıların ve sınır koşullarının tanımlanması için kullanılmıştır. Substrat üzerindeki nanoparçacıkların varlığına bağlı olarak elektrik alanını çözmek için dağınık radyasyonu her yönden absorbe edecek mükemmel uyumlu katmanlar (PML) kullanılmıştır. PML açık sınırlardaki problemleri simüle etmek, sayısal yöntemlerde hesaplama bölgelerini kesmek ve dalga denklemleri için yapay emici bir katman olarak kullanılmaktadır. Altının kırılma indeksi, Johnson ve Christy'nin [93] deney verilerinin interpolasyon değerlerine dayanılarak tanımlanmış ve alan modülü 1 V/m olarak ayarlanmıştır. Analiz parametreleri Tablo 2.1'de detaylı olarak verilmiştir.

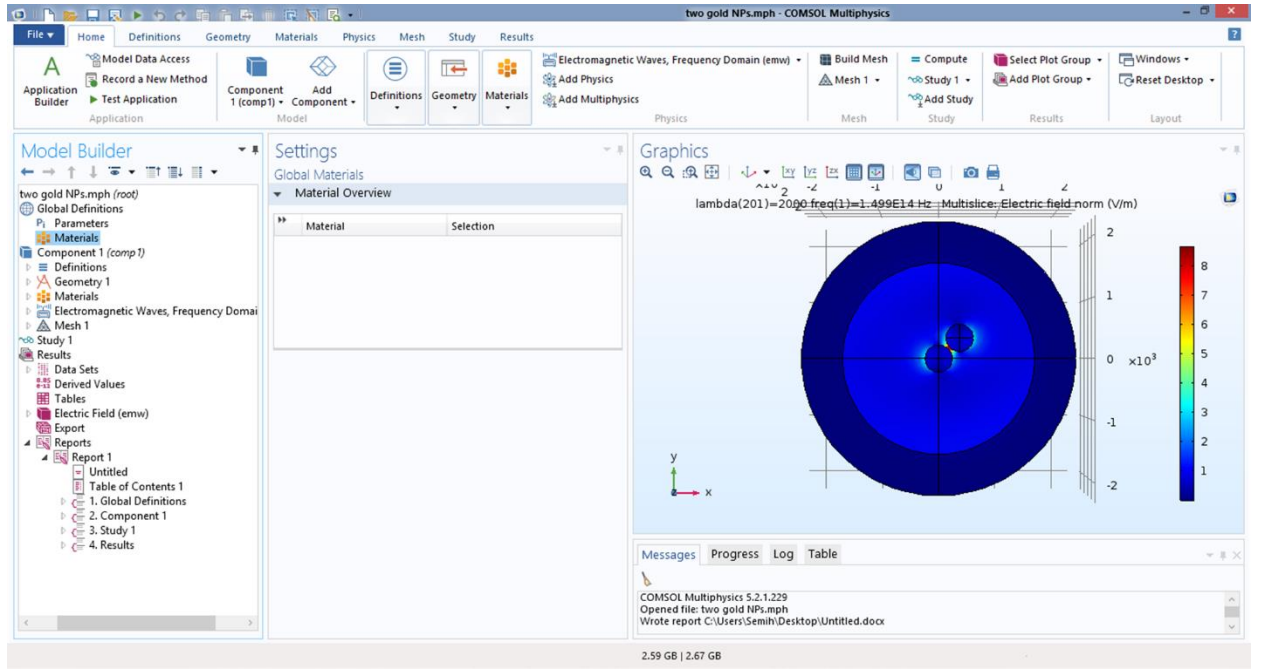
Tablo 2.1 Elektrik alan arttırmaları için analiz parametreleri

| İsim        | İfade                                      | Değer                      | Tanım                   |
|-------------|--------------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| E0          | 1[V/m]                                     | 1 V/m                      | Electromagnetic Field   |
| Radius (nm) | 50                                         | 50                         | Radius of the sphere    |
| r_pml       | 10*radius                                  | 500                        | Radius of the PML       |
| t_pml       | 3*radius                                   | 150                        | Thickness of the PML    |
| lambda      | 1000                                       | 1000                       | Initial Wavelength      |
| lambda_min  | 350                                        | 350                        | Initial Wavelength      |
| lambda_max  | 800                                        | 800                        | Final Wavelength        |
| lambda_step | 5                                          | 5                          | Wavelength Step         |
| sigma_geom  | $\pi \cdot (\text{radius}[\text{nm}])^2$   | 1.6619E-13 m <sup>2</sup>  | Geometric Cross Section |
| S_in        | $E_0^2 / (2 \cdot Z_0 \cdot \text{const})$ | 0.0013272 W/m <sup>2</sup> | Scalling Factor         |

Farklı boyutlara sahip altın nanopartiküllerin (20,50,80 ve 100 nm) elektrik alanları ve spektrumları tarandıktan sonra partiküller arasındaki mesafeler değiştirilerek ve birden fazla partikülün birbirleriyle etkileşimler incelenmiştir (Şekil 2.2). Altın nanopartiküller arası elektrik alan arttırmalarının incelendiği COMSOL yazılımının ara yüzü Şekil 2.3’de verilmiştir. Elektrik alan arttırmaları tekli, ikili, üçlü ve dördü altın nanopartikül dizileri için maksimum elektrik alan ( $E_{\text{max}}$ ) ve elektrik alan artış faktörü değerleri hesaplanarak incelenmiştir ( $E_{\text{max}}/E_0$ ).



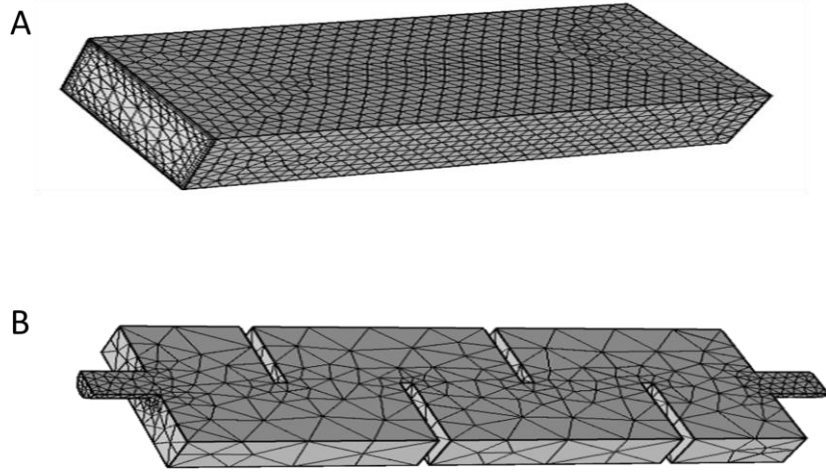
Şekil 2.2 Teorik analiz yaklaşımı.



Şekil 2.3 COMSOL Multiphysics 5.2a ara yüzü.

### 2.1.3. Mikroakışkan çiplerin modellenmesi ve akış rejimleri

Mikroakışkan çiplerin akış rejimlerinin teorik analizi için Computational Fluid Dynamic (CFD) analizi yapılmıştır. Bunun için COMSOL yazılımında 3 boyutlu model kısmından Fluid flow sekmesi seçilerek single phase flow kısmından CFD analizi yürütülmüştür. Bunun için ilk olarak mikroakışkan çiplerin geometrisi oluşturulmuş ve mikroakışkan kanallardaki akış rejimi ve hız profili belirlenmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Mikroakışkan kanalın ağ yapısının gösterimi. A) Laminer akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın mesh yapısı, B) Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın mesh yapısı.

## 2.2. Altın Nanoyapıların Sentezi

Sentez için kullanılan tetrakloroaurik asit ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), trisodyum sitrat dehidrat ve hidrokinon analitik dereceli olup Sigma Aldrich'den satın alınmıştır. Tüm reaksiyonlar ve hazırlama prosedürleri için kullanılan su milli-Q kalitesindedir ( $R > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ). Bu sentez işlemlerinde kullanılan tüm cam eşyalar önce  $\text{HCl}:\text{HNO}_3$  3:1 karışımında temizlendikten sonra, miliQ saflıkta suyla havayla kurutulmuştur.

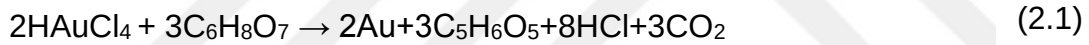
### 2.2.1. Farklı boyutlarda altın nanopartiküllerin sentezi

Altın nanopartiküllerin sentezi için kolloid kimyasına dayalı yöntemler kullanılarak basit ve hızlı bir şekilde sentezler gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde, farklı boyutlarda (20 nm, 50 nm, 80 nm ve 100 nm) yüksek kaliteli altın nanopartikülleri üretmek için iki farklı yöntem izlenmiştir.

**Turkevich metodu:** Tez çalışmasında altın nanopartikül elde etmek için izlenen yöntem, tetra kloroaurik asidin ( $\text{HAuCl}_4$ ) sodyum sitratla indirgenme metodudur (Turkevich Metodu) [94, 95]. Bu yöntemde indirgen maddenin etkisiyle  $\text{Au}^{+3}$  iyonları nötr altın atomları haline getirilmiştir. Sitrat iyonları taneciklerin stabilizasyonunu sağlayarak birbirlerine yapışmasını engellediği için sodyum sitrat miktarının değiştirilmesiyle nanopartikül boyutu değişmektedir. İstenilen boyutlarda nanopartikül eldesi için farklı koşullar altında üretimin optimizasyonu üzerine

çalışılmıştır. Bu amaçla ilk olarak 50 mM HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O çözeltisi hazırlanmış daha sonraki deneylerde stok çözelti olarak kullanılmak üzere amberli şişede +4°C' de saklanmıştır.

20 ve 100 nm boyutlarında altın nanopartiküller sentezlemek için stok çözeltisine deiyonuzu su eklenerek 1 mM HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O 20 mL altın çözeltisi hazırlanmış ve 500 rpm karıştırma hızında ısıtılmaya bırakılmıştır. Daha sonra bu çözelti kontrollü olarak ısıtılarak 100°C'ye getirilmiş ve karıştırma hızı 1000 rpm'e yükseltilmiştir. Çözelti kaynadığı anda deiyonuze su içerisinde hazırlanmış %1 (w/v) sodyum sitrat çözeltisinden 0.5 mL ve 1.5 mL eklenmiştir. Bu aşamada altın çözeltisinin 100°C'ye ulaşması ve sodyum sitrat çözeltisinin bu sıcaklıkta eklenmesi oldukça önemlidir. Sodyum sitrat daha düşük sıcaklıklarda eklendiği takdirde indirgenme tam olarak gerçekleşmemekte ve kararlılığı hızla bozulan nanopartiküller oluşmaktadır. Sodyum sitratın eklenmesinin ardından renk değişimi gözlenmiş ve yaklaşık 10 dakikalık sürenin sonunda reaksiyon sonlandırılarak altın nanopartiküller (AuNPs) elde edilmiştir. 500 rpm karıştırma hızında soğumaya bırakılmıştır. Altın nanopartiküllerin oluşma reaksiyonu aşağıda belirtilmiştir.



**Çekirdek büyüme metodu:** 50 ve 80 nm boyutlarında nanopartiküller elde etmek için çekirdek ve büyüme çözeltileri hazırlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak çekirdek partikül çözeltisi yukarıda belirtilen sitrat indirgeme metodu ile hazırlanmıştır. 20 mL, 1mM HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O çözeltisi öncelikle 500 rpm karıştırma hızında kaynama sıcaklığına kadar ısıtılmış ve 100°C'ye ulaştığında karıştırma hızı 1000 rpm'e yükseltilerek içerisine 0.5 mL sodyum sitrat çözeltisi eklenmiş ve karışım renk kırmızı renge dönmesi beklenerek 10 dakika kaynama sıcaklığında tutulmuştur. Daha sonra çekirdek altın nanopartikül çözeltisi karışımı ısıtıcıdan alınarak oda sıcaklığına 500 rpm karıştırma hızında soğumaya bırakılmıştır. Çözelti oda sıcaklığına geldikten sonra aynı karıştırma hızında 10 mM hidrokinon çözeltisi büyüme çözeltisi olarak farklı miktarlarda karışıma eklenmiştir. Bu amaçla, 50 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküller için 20 mL hazırlanan çekridek çözeltisine 10 mM hidrokinon çözeltisinden 3 mL eklenmiş, 80 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküller için 20 mL hazırlanan çekridek çözeltisine ise 10 mM hidrokinon çözeltisinden 5 mL eklenmiştir. Daha sonra çözeltiler 10 dk daha 500

rpm de oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra stabilitelerini daha uzun süre korumak adına +4°C' de saklanmıştır. Reaksiyon koşulları ve reaktif miktarları Tablo 2.2' de verilmiştir.

Tablo 2.2 AuNP için deneysel koşullar ve tepkime konsantrasyonları

| <b>Nanopartikül</b> | <b>HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O</b> | <b>Trisodyum</b>       | <b>Hidrokinon</b> | <b>Sıcaklık</b> |
|---------------------|------------------------------------------|------------------------|-------------------|-----------------|
| <b>Boyutu</b>       | <b>mL/mM</b>                             | <b>sitrat mL/(w/v)</b> | <b>mL/mM</b>      | <b>(°C)</b>     |
| 20 nm               | 20 mL, 1 mM                              | 0.5 mL ,1%(w/v)        | -                 | 100             |
| 50 nm               | 20 mL, 1 mM                              | 1.5 mL ,1%(w/v)        | -                 | 100             |
| 80 nm               | 20 mL, 1 mM                              | 0.5 mL ,1%(w/v)        | 10mM, 3mL         | 25              |
| 100 nm              | 20 mL, 1 mM                              | 0.5 mL ,1%(w/v)        | 10mM, 5mL         | 25              |

### 2.2.2. Altın nanoçubukların sentezi

Altın nanoçubukların sentezi için çekirdekleşme ve büyüme olmak üzere iki farklı çözelti hazırlanmıştır. Çekirdekleşme çözeltisi için 5 mL 0.20 M hexadesiltrimetiammonyumbromit (CTAB) çözeltisi, 5mL 0.00050 M HAuCl<sub>4</sub> ile karıştırıldıktan sonra bu çözeltiye buz banyosunda 0.60 mL 0.010 M NaBH<sub>4</sub> eklenir ve kahverengi-sarı renginde bir çözelti elde edilir. Bu çözelti hızlı bir şekilde 2 dakika boyunca karıştırılır ve ileriki deneyler için oda sıcaklığında saklanır.

Büyüme çözeltisi için 5 mL 0.20 M CTAB, oda sıcaklığında farklı oranlarda (0.20, 0.40, 0.60 mL) 0.0040 M AgNO<sub>3</sub> çözeltisine eklenir. Daha sonra bu çözeltiye 5mL 0.0010 M HAuCl<sub>4</sub> eklenir ve yavaş bir karıştırmada 70µL 0.078 M askorbik asit eklenir. Askorbik asit eklendikten sonra çözeltinin rengi koyu sarıdan renksiz hale dönüşür. Son olarak büyüme çözeltisine 27-30 °C sıcaklık aralığında 12 µL çekirdekleşme çözeltisinden eklenir ve 20 dakika boyunca karıştırmaya bırakılır ve altın nanoçubuklar çözelti içerisinde elde edilir.

### 2.2.3. Altın nanoyapıların karakterizasyonu

Tez kapsamında sentezlenen altın nanopartiküllerin hidrodinamik partikül boyutu ve zeta potansiyeli, Zeta Sizer (Malvern) kullanılarak ölçülmüştür. Bu ölçümler, zeta elektrotları bulunan tek kullanımlık küvetlerin 1 mL örnek hacmiyle doldurulmasıyla gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 25°C'de ölçüm koşulları ve numune sıcaklığı optimize

edilerek gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümler  $n=3$  çalışılmış ve sonuçlar Zeta sizer yazılımı ile analiz edilerek sunulmuştur.

Altın nanopartiküllerin kuru partikül boyutları ve altın nanoçubukların en-boy oranları Geçirmeli Eleltron Mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Bu amaçla altın nanopartikül ve nanoçubuk kolloid çözeltilerinden 5  $\mu$ L bakır gridler üzerine damlatılarak örnekler kurumaya bırakılmış ve nanopartikül morfolojileri incelenmiştir.

### **2.3. Nanoplazmonik Platformların Geliştirilmesi**

Bu tez çalışmasında iki farklı nanoplazmonik platform geliştirilmiştir. Bu amaçla önce 96 kuyucuklu polistiren (PS) yüzeylerde nanoplazmonik platformlar hazırlanmış daha sonra mikrokakışkan çiplerin içerisine entegre edilmiş nanoplazmonik platformlar geliştirilmiştir.

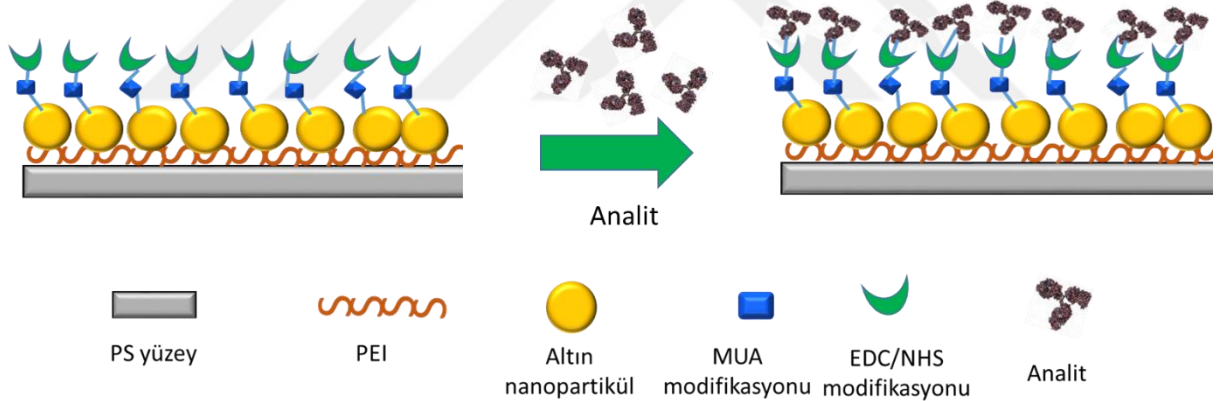
#### **2.3.1. Altın nanopartiküllerin polistiren yüzeylere direkt immobilizasyonu ile nanoplazmonik yüzeylerin hazırlanması**

Bu amaçla 96 kuyucuklu polistiren yüzeyleri önce mutlak etanol ve miliQ su ile yıkanmış, daha sonra azot gazı altında kurutulmuştur. Temizleme aşamalarını takiben, polistiren yüzeyi, amin ile sonlandırılmış gruplar oluşturmak üzere polikasyonik PEI ile modifiye edilmiştir. Bu amaçla, 0.05-8 mg/mL konsantrasyon aralığında 100  $\mu$ L PEI her bir kuyucuğa konularak 24 saat 4°C'de inkübe edilmiştir. PEI modifikasyonundan sonra, 50  $\mu$ L altın nanopartikül çözeltisi her bir kuyucuğa eklenmiş ve nanoparçacıkların polistiren destek malzemesine bağlanması için 24 saat boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa 100  $\mu$ L PBS eklenerek spektral ölçümler alınmıştır. Buna göre en yüksek LSPR sinyali veren örnekler üzerinde çalışmaya devam edilmiştir. Çalışmalar, 1 mg/mL derişim aralığında 100  $\mu$ L PEI 24 saat 4°C'de inkübe edilmiştir. PEI modifikasyonundan sonra, Bölüm 2.2.1'de sentezi gerçekleştirilen altın nanopartikül çözeltisinden 50  $\mu$ L her bir kuyucuğa eklenmiş ve nanopartiküllerin PS destek malzemesine bağlanması için 24 saat boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir.

Altın nanopartiküller yüzeye immobilize edildikten sonra elde edilen nanoplazmonik yüzeylerin biyosensör uygulamalarında kullanılabilmesi için önemli bir adım ise altın nanopartiküllerin üzerinde seçici moleküllerin işlevsellendirilmesidir. Bunun için de biyolojik olarak seçici moleküllerin yüzey modifikasyonu için karbodiimid yüzey kimyası kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak yüksek karboksilik asit içeren

merkaptoundekanoik asit (MUA) ile modifiye edilmiştir. Bunun için 1 mM MUA çözeltisi etanol içerisinde hazırlanır ve her bir kuyucuğa 100 µL konularak yüzeyler gece boyunca etkileşime bırakılır.

MUA ile yüksek oranda karboksillenen yüzeylere kanser biyobelirteçlerinin bağlanmasını incelemek için nanoplazmonik yüzeyler karbodiimid kimyasıyla (EDC/NHS) ile işlevselendirilmiştir. Bu amaçla 50 mM 20 mL EDC ve 50 mM 20 mL NHS çözeltileri PBS içerisinde hazırlanır. Yüzeye tam olarak bağlanmanın sağlanması için ortamın asidik olması gereklidir yapılan çalışmalar EDC ve NHS 'in aktivitelerinin en iyi asidik ortamlarda gösterdiğini belirtmektedir. Bu reaktiflerin en aktif olduğu pH ise 6'dır (Thermo Scientific Instructions). Bu nedenle çözeltiler hazırlanırken ortamın pH'sı 6 seviyelerine çekilir ve reaksiyon ortamı asidikleştirilir. Daha sonra yüzeyler EDC ve NHS çözeltileri (1:1) oranlarında karıştırılarak 96 kuyucuklu (statik) yüzeylere 100 µL ve mikrokakışkan çiplere (dinamik) 185 µL uygulanarak plazmonik yüzeyler gece boyunca +4°C' de yüzey modifikasyonuna bırakılır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 PS yüzeylerde nanoplazmonik platformların hazırlanması.

## 2.3.2. Nanoplazmonik yüzeylerin mikrokakışkan çiplere entegrasyonu

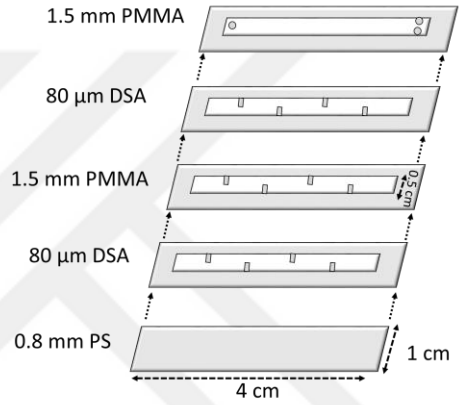
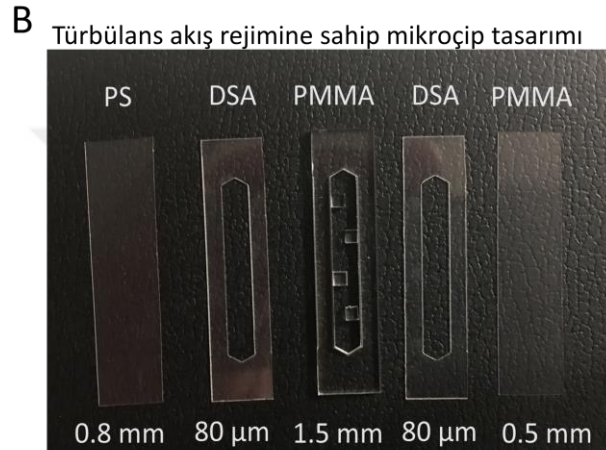
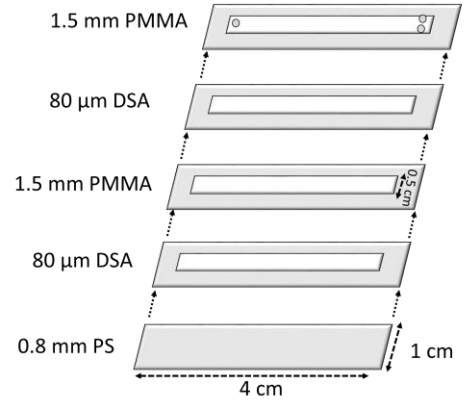
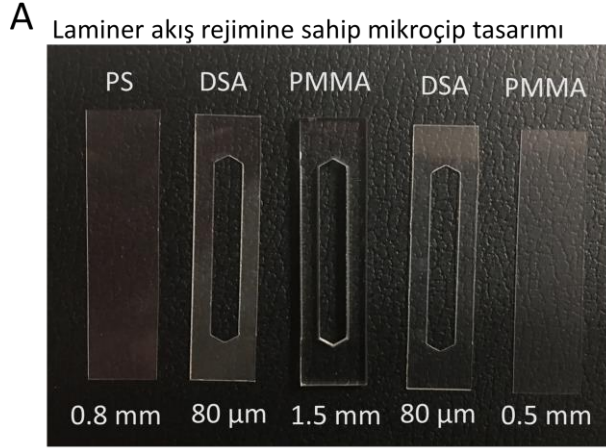
### 2.3.2.1. Mikrokakışkan çiplerin hazırlanması

Geliştirilen tanı kitlerinin taşınabilirliği hastabaşı teknolojilerin uygulanması açısından oldukça önemlidir. Büyüme çözeltisinin (hidrokinon ve H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> çözeltileri) maksimum yüzey alanıyla etkileştirilmesi için mikro kanallara sahip çipler oluşturulmuştur. PMMA yüzeylerine farklı geometrilerde mikrokakışkan kanalların üretimi için bilgisayar destekli tasarım (CAD) yazılımları yardımıyla üretilmek istenen

mikrokanal geometrileri belirlenir ve desen işleyicisi bu dizaynı elektronik sinyallere çevirerek lazer demetini uygun şekilde pozisyonlandırır. Bu çalışma kapsamında mikroçip tasarımları Corell Draw series programında çizilerek CO<sub>2</sub>'le çalışan lazer kesiciye (VersaLaser, Austria) aktarılmıştır. Mikrokanallar, PMMA yüzeylerde lazer teknolojisiyle açılarak akış dinamikleri numerik (Computational Fluid Dynamic Analysis) ve deneysel olarak optimize edilmiştir.

İlk mikroçip prototipleri için nanoplazmonik yüzey için 40 mm x 10 mm boyutlarında polistiren tabaka ve orta tabaka için (kanal yüksekliği) 1.5 mm kalınlığa ve 30 mm x 5 mm boyutlarına sahip PMMA tabakaları kullanılarak kesilmiştir. Bütün tabakalar şekilde belirtildiği sırayla (soldan sağa) 80 µm kalınlığında iki tarafı yapışkan bantlarla (DSA) kullanılarak birleştirilmiştir. Çipler oluşturulduktan sonra nanoplazmonik yüzeyler çipler üzerinde oluşturulmuştur (Şekil 2.6).

Çipler oluşturulduktan sonra nanoplazmonik yüzeyler çiplerin içerisinde oluşturulmuştur. Bu amaçla yukarıda daha önceden bahsedilen nanoplazmonik yüzey kimyası basamakları uygulanmıştır. Kısaca; polistiren yüzeylerin PEI ile kaplandıktan sonra, altın nanopartiküller (50 nm) yüzeye immobilize edilmiştir (Bölüm 2.3.1). Daha sonra eşlenme ajanı MUA ile yüksek oranda karboksillenen yüzeylere kanser biyobelirteçlerinin bağlanmasını incelemek için nanoplazmonik yüzeyler karbodiimid kimyasıyla (EDC/NHS) ile yüzeyler işlevsellendirilmiştir. Bu amaçla 50 mM 20 mL EDC ve 50 mM 20 mL NHS çözeltileri PBS içerisinde hazırlanmıştır. Yüzeye tam olarak bağlanmanın sağlanması için ortamın asidik olması gereklidir yapılan çalışmalar EDC ve NHS 'in aktivitelerinin en iyi asidik ortamlarda gösterdiğini belirtmektedir. Bu reaktiflerin en aktif olduğu pH ise 6' dır (Thermo Scientific Instructions). Bu nedenle çözeltiler hazırlanırken ortamın pH'sı 6 seviyelerine çekilir ortamın asidikleştirilir daha sonra yüzeyler EDC ve NHS çözeltileri (1:1) oranlarında karıştırılarak 96 kuyucuklu (statik) yüzeylere 100 µL ve mikroakışkan çiplere (dinamik) 185 µL uygulanarak plazmonik yüzeyler gece boyunca +4 °C' de yüzey modifikasyonuna bırakılmıştır. Nanoplazmonik yüzeyler prostat kanseri biyobelirteçleri ile etkileştirmek için +4°C'de saklanmıştır.



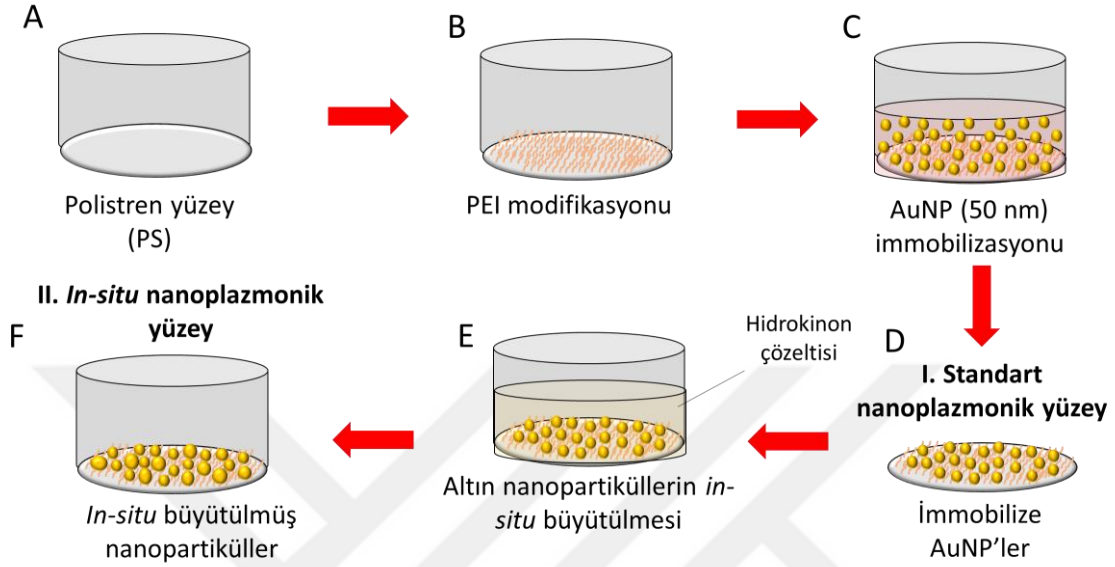
Şekil 2.6 Akış rejimlerinin PS yüzey üzerine immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin *in-situ* büyümesi üzerine etkisinin incelenmesi için tasarlanan mikroakışkan çip tasarımları. Tez kapsamında kullanılan çiplerin her bir katmanı mikro işleme teknolojilerinden olan lazer kesici kullanılarak oluşturulmuştur. A) Laminer akış rejimine sahip mikroakışkan çip tasarımı; en alt katman 0.8 mm PS yüzey mikroakışkan çipin kanalini oluşturan orta katman 1.5 mm kalınlığında PMMA yüzey ve giriş ve çıkış portlarının bulunduğu en üst katman ise 1.5 mm kalınlığında PMMA yüzeylerden kesilerek oluşturulmuştur. Bütün katmanlar 80 µm DSA kullanılarak birleştirilmiştir. B) Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan çip tasarımı; en alt katman 0.8 mm PS yüzey, mikroakışkan çipin kanalini oluşturan orta katman 1.5 mm kalınlığında PMMA yüzey ve giriş ve çıkış portlarının bulunduğu en üst katman ise 1.5 mm kalınlığında PMMA yüzeylerden kesilerek oluşturulmuştur. Bütün katmanlar 80 µm DSA kullanılarak birleştirilmiştir.

### **2.3.2.2. Altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde kontrollü olarak büyütülmesi (*In-Situ*)**

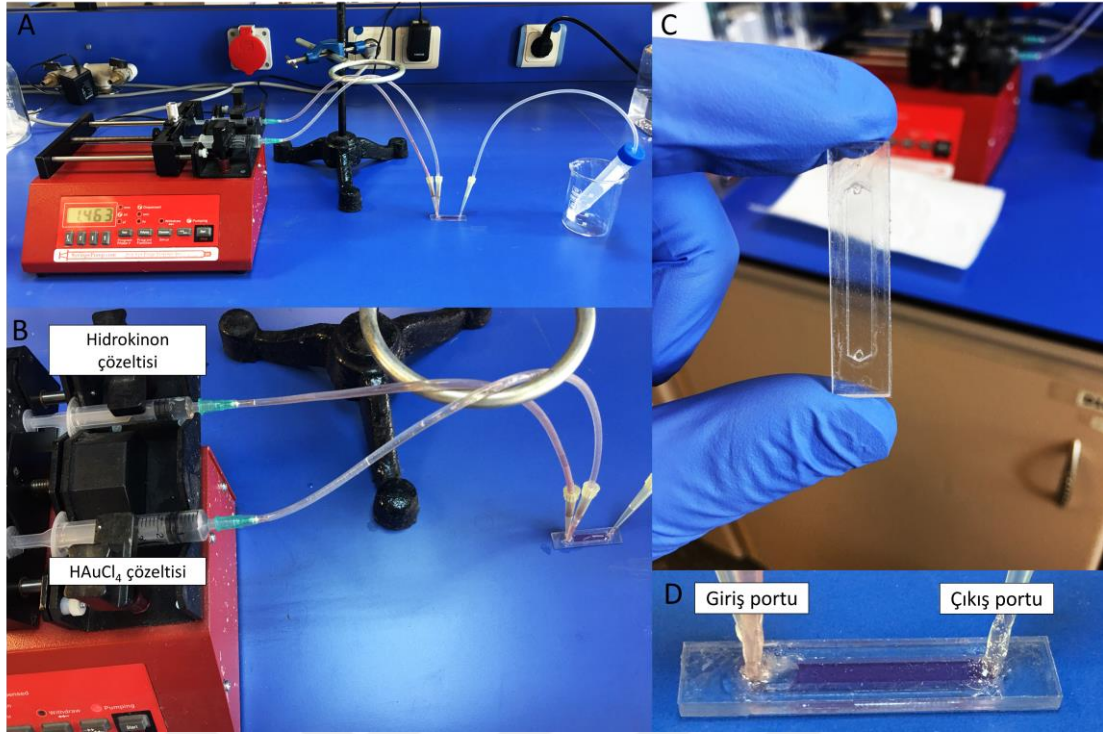
PS yüzeylere immobilize edilen 50 nm partikül boyutuna sahip nanopartiküllerden oluşan nanoplazmonik yüzeylere 1mM HAuCl<sub>4</sub> varlığında zayıf bir indirgen ajan olan hidrokinondan 0.1-2 mM konsantrasyon aralığında eklenerek altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde 2 saat boyunca *in-situ* olarak büyütülmesi incelenmiştir (Şekil 2.7) Tez kapsamında altın nanopartiküllerin *in-situ* olarak büyütülmesi statik ve dinamik (mikroakışkan platformlar) koşullarda incelenmiş nanoplazmonik platformların LSPR sinyallerinde meydana gelen değişimler ölçülmüştür.

**Altın nanopartiküllerin PS yüzeyde statik olarak büyütülmesi:** PS yüzeylere immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin (50 nm) oluşturduğu nanoplazmonik yüzeylerde statik ortamda *in-situ* partikül büyümesinin incelenmesi için altın nanopartiküller Bölüm 2.3.1’de anlatıldığı üzere 96 kuyucuklu petri yüzelerine immobilize edilmiştir. Daha sonra her bir petri içerisine 100 µL 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.1, 1.5 ve 2 mM hidrokinon çözeltileri 100 µL 1mM HAuCl<sub>4</sub> çözeltileri eş zamanlı olarak eklenerek 2 saat boyunca *in-situ* partikül büyümesi incelenmiştir. Daha sonra bu yüzeylerde partikül morfoloji ve büyüme analizleri yapılmıştır.

**Altın nanopartiküllerin PS yüzeyde dinamik koşullarda büyütülmesi:** PS yüzeylere immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin oluşturduğu nanoplazmonik yüzeylerde dinamik reaksiyon koşullarının *in-situ* partikül büyümesine etkisi incelemek için tasarımı Bölüm 2.3.2.1’de anlatılan ve farklı akış rejimlerine (laminer ve türbülans) sahip olan mikroakışkan kanallara sahip çipler kullanılmıştır. Bu amaçla daha önceden PS yüzeylere altın nanopartiküller immobilize edilerek oluşturulan (Bölüm 2.3.1) mikroakışkan çiplere *in-situ* partikül büyümesi incelenmesi için büyüme çözeltisi akışı sağlanmıştır. Mikroakışkan çiplere büyüme çözeltisi (hidrokinon ve HAuCl<sub>4</sub>) iki ayrı kanaldan verilerek partikül büyümesinin sadece nanoplazmonik yüzeylerde olması sağlanmıştır. Mikroakışkan çiplerin birinci giriş portundan 1.5 mM hidrokinon çözeltisi ikinci giriş portundan ise 1mM HAuCl<sub>4</sub> çözeltisi 10 µL/min akış hızında mikroakışkan çiplere 2 saat boyunca aktarılmıştır (Şekil 2.8).



Şekil 2.7 PS yüzey üzerine immobilize edilmiş altın nanopartiköllerin büyüme çözeltisi kullanılarak PS yüzeyinde *in-situ* olarak büyütölməsi. A) Yüzeyi temizlenmiş PS yüzey, B) PS yüzeye PEI yüzey modifikasyonu (Bölüm 2.3.1' de optimize edilen konsantrasyonda (1 mg/mL)) PEI, PS yüzeylerle etkileştirilerek 24 saat inkube edilmiştir). C) PEI ile işlevselleştirilmiş yüzeylere 50 nm partiköl biyutuna sahip altın nanopartiköllerin immobilizasyonu. D) Nanoplazmonik yüzeylerin eldesi (Standart nanoplazmonik yüzeyler). E) Nanoplazmonik platformlarda LSPR sinyalinin hassasiyetini arttırmak için yüzeye immobilize olmuş altın nanopartiköllerin yüzeyine *in-situ* büyüme çözeltilerinin (0.1-2 mM konsantrasyon aralığında) eklenmesi. F) PS yüzeylerde *in-situ* olarak buyutulmuş ve LSPR sinyali arttırılmış nanoplazmonik platformların eldesi.

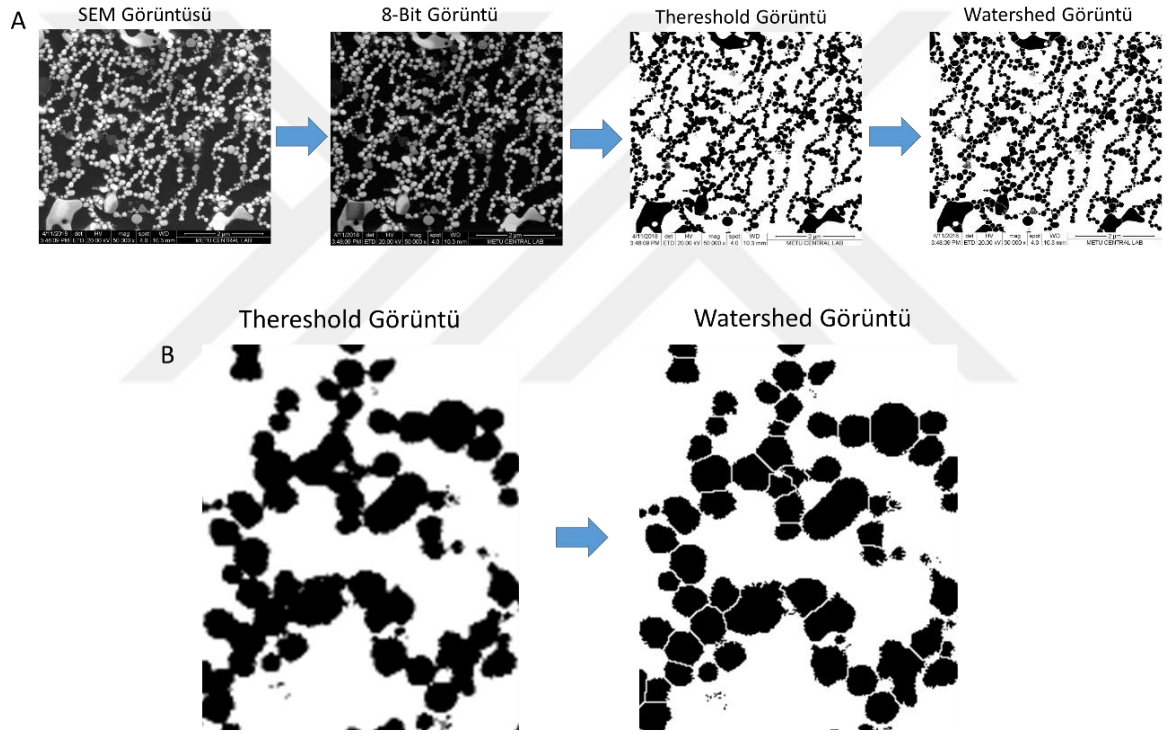


Şekil 2.8 Farklı akış rejimlerine sahip mikroakışkan çipler kullanarak nanoplazmonik yüzeylerde *in-situ* partikül büyümesinin incelenmesi için kullanılan sistemin görüntüsü. A) Ayarlanabilir şırınga pompası, mikroakışkan çip ve bağlantı tüplerinden oluşan düzeneğin görüntüsü. B) Laminer ve türbülans akış rejimlerine ait mikroakışkan çiplere büyüme çözeltisinin iki ayrı giriş portundan verilmesi. C) Laminer mikroakışkan kanalın görüntüsü. D) Giriş (iki ayrı kanaldan büyüme çözeltisinin akışı) ve çıkış portlarına silikon tüplerin epoksi yapıştırıcı kullanarak bağlanması ve mikroakışkan çip düzeneğinin görüntüsü.

### 2.3.3. Plazmonik Yüzeylerin Analizi

Plazmonik yüzeylerde altın nanopartiküllerin immobilizasyon sonrası morfolojileri haritalama yöntemi ile incelenerek, yüzey yoğunlukları hesaplanmıştır. Bu amaçla nanopartiküllerin SEM görüntülerinin Image J yazılımı kullanılmıştır (Şekil 2.9). Image J parçacık şekli, morfolojisi ve sayı analizi yapabilen çok yararlı ve açık kaynaklı bir yazılımdır. Bu yazılım büyük ve heterojen bir parçacık havuzundan parçacıkların sayısını ve boyutunu tespit etmek için kullanılır. Tez çalışmasında altın nanopartiküllerin yüzeydeki sayısını tespit etmek için öncelikle SEM fotoğraflarının görüntü kontrastı 8-bit formatına ayarlanmıştır (Image/ Adjust/ Brightness/ Contrast command 8-bit). Bu adım görüntü kontrastını arttırmaya yardımcı olur. Daha sonra threshold komutu görüntüyü ilgi alanlarına ve arka plana bölmek için kullanılmıştır. Analiz sırasında, düzensiz şekillere sahip nanopartiküller, boyut ve dairesellik

işlevleri ile hariç analizin dışında tutulabilir veya görüntüde partiküller üst üste gelebilmektedir. Analiz boyunca seçilen görüntüdeki tüm nanopartikülleri analize dahil etmek için Watershed segmentasyon fonksiyonunu kullanılmıştır (Process/ Binary/ Watershed). Bu komut üst üste gelmiş partiküllerin sınırlarını belirleyerek partikülleri birbirinden ayırt edilmesini sağlayarak çakışan partiküllerin analize dahil edilmesini sağlar. Son adım olarak Analyze kısmından Analyze Particles komutuyla analize ait nanopartikül sayısı elde edilir (Analyze/ Analyze Particles) [96]. Yüzeye immobilize edilen altın nanopartikül sayıları için en az 3 SEM görüntüsünün analizi yapılmış ve ortalama değer hesaplanmıştır.



Şekil 2.9 Altın nanopartiküllerin haritalama (Nanoparticle Mapping) yöntemi ve partikül sayılarının hesaplanması A) Altın nanopartiküllerin PS yüzeydeki partikül sayılarının ve yoğunluğunun hesaplanması için Image J yazılımındaki işlem basamakları B) Üst üste çakışan ve birbirleriyle bitişik olan nanopartiküllerin birbirlerinden ayrılarak analize dahil edilmesi.

## **2.4. Geliştirilen Nanoplazmonik Platformlarda Prostat Kanseri Biyobelirteçlerinin Tayini**

Prostat kanseri biyobelirteçlerinin tayin çalışmaları hem 96 kuyucuklu plazmonik platformlarda hem de mikroçip formatında *in-situ* altın nanopartikül büyütmeye işleminden sonra hazırlanan nanoplazmonik platformlarda yürütülmüştür. Nanoplazmonik platformların hassasiyetlerinin ve performanslarının ölçülmesi için üç farklı kanser biyobelirteci seçilmiştir. Bunlar; sığır serum albumin (BSA), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) ve transforming growth factor beta-1 (TGF- $\beta$ 1) dir. Literatürde de belirtildiği üzere LSPR bazlı plazmonik platformlar düşük molekül ağırlığına sahip biyobelirteçlerin tayininde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle seçilen prostat kanseri biyobelirteçlerinden bir tanesi (BSA: 66 kDa) proteinler için ortalama molekül ağırlığına sahip iki tanesi (TGF $\beta$ 1 ve BMP-2 sırasıyla 12.8 kDa ve 13 kDa) ise düşük molekül ağırlığına sahip kanser biyobelirteçleridir.

### **2.4.1. Prostat Kanseri Biyobelirteçlerinin Hazırlanması**

Serum albüminin (BSA) vücudumuzda çok sayıda görevi bulunmasının yanı sıra prostat kanseri vakalarında da prognostik biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Tez kapsamında kullanılan BSA (Sigma Aldrich, Katalog no: A2153) 66 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve proteinlerin molekül ağırlığı sınıflandırmasında orta molekül ağırlıklı olarak nitelendirilir. Tez kapsamında geliştirilen nanoplazmonik platformların hassasiyet ve performanslarının değerlendirilmesi için BSA tayin çalışmaları yürütülmüştür. Bunun için BSA'nın PBS (pH:6) içerisinde 1  $\mu$ g/mL konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlanmış ve yine PBS (pH: 6) kullanılarak seyreltilere 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL çözeltiler hazırlanmıştır. Çözeltiler sensör yüzeylerine etkileştirilene kadar +4° C 'de saklanmıştır. 1  $\mu$ g/mL alikotlar daha sonra -20° C'de muhafaza edilmiştir.

Prostat kanseri biyobelirteçlerinden biri de transforming growth factor beta-1 (TGF- $\beta$ 1)'dir. Tez kapsamında kullanılan TGF- $\beta$ 1 Standard (R&D Systems, Katalog no: 340715) 12.8 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve proteinlerin molekül ağırlığı sınıflandırmasında düşük molekül ağırlıklı olarak nitelendirilir. Tez kapsamında geliştirilen nanoplazmonik platformların hassasiyet ve performanslarının değerlendirilmesi için TGF- $\beta$ 1 tayin çalışmaları yürütülmüştür. Bunun için TGF- $\beta$ 1 'nin PBS (pH: 6) içerisinde 1  $\mu$ g/mL konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlanmış ve

yine PBS (pH: 6) kullanılarak seyreltilere 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL çözeltiler hazırlanmıştır. Çözeltiler sensör yüzeyleriye etkileştirilene kadar +4° C 'de saklanmıştır. 1µg/mL alikotlar daha sonra -20° C'de muhafaza edilmiştir.

Tez kapsamında kullanılan diğer bir prostat kanseri biyobelirteçi TGF-β ailesine ait olan BMP-2'dir. BMP-2 (R&D Systems, Katalog no: P131986) 13 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve proteinlerin molekül ağırlığı sınıflandırmasında düşük molekül ağırlıklı olarak nitelendirilir. Tez kapsamında geliştirilen nanoplazmonik platformların hassasiyet ve performanslarının değerlendirilmesi için BMP-2 tayin çalışmaları yürütülmüştür. Bunun için BMP-2'nin PBS (pH: 6) içerisinde 1µg/mL konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlanmış ve yine PBS (pH: 6) kullanılarak seyreltilere 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL çözeltiler hazırlanmıştır. Çözeltiler sensör yüzeyleriye etkileştirilene kadar +4° C 'de saklanmıştır. 1µg/mL alikotlar daha sonra -20° C'de muhafaza edilmiştir.

#### **2.4.2. Prostat Kanseri Biyobelirteçlerinin Nanoplazmonik Platformlarla Etkileştirilmesi**

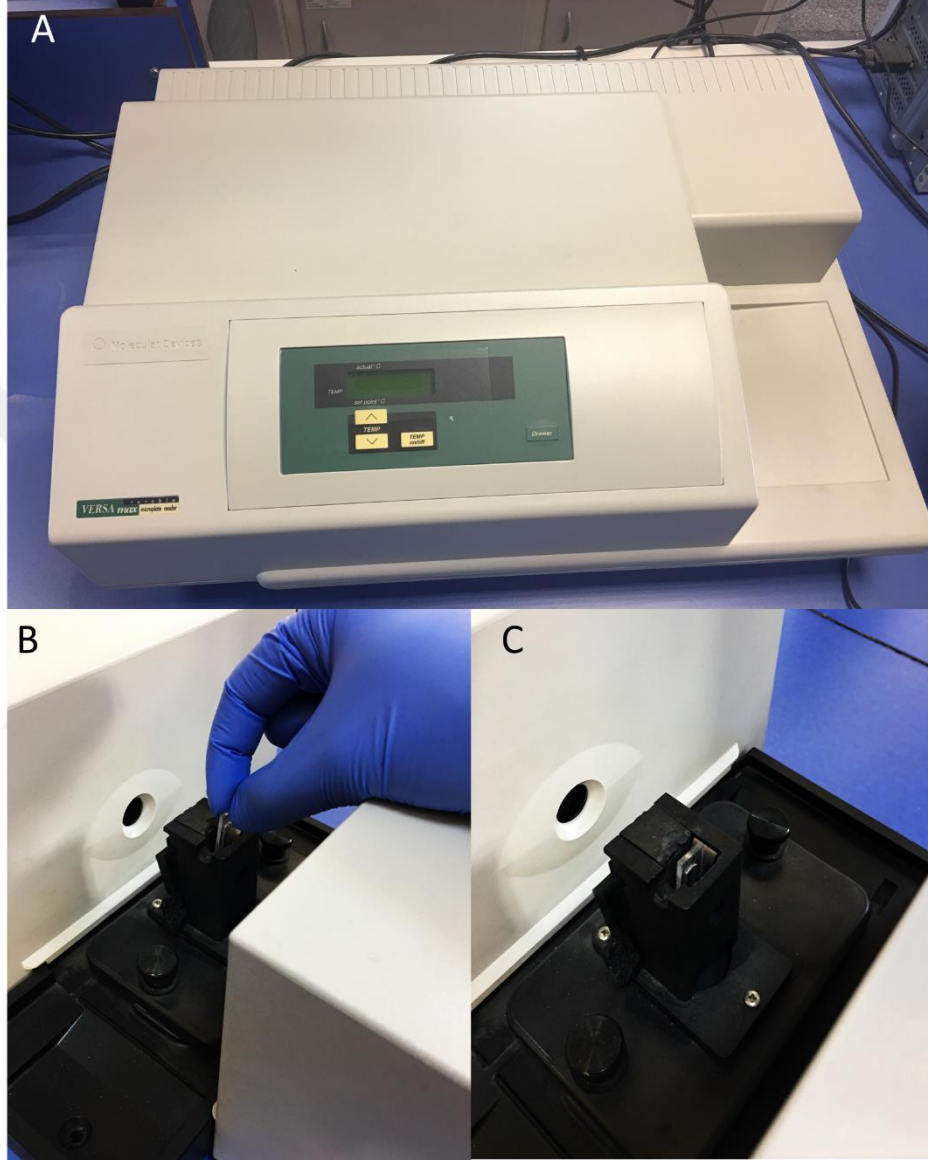
Nanoplazmonik yüzeylerin hassasiyet ve tespit limitlerinin belirlenmesi için standart nanoplazmonik yüzeyler ve *in-situ* partikül büyütme ile elde edilmiş statik ve dinamik nanoplazmonik yüzeylerin LSPR sinyalleri incelenmiştir. Bu amaçla; BSA, TGF-β1 and BMP-2 prostat kanseri biyobelirteçleri için 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltiler nanoplazmonik yüzeylerde 3 saat boyunca +4°C'te etkileştirilmiştir. Daha sonra örnekler 3 kez PBS (pH: 7.2) ile yıkanarak spektral ölçümler alınmıştır.

#### **2.4.3. Nanoplazmonik Yüzeylerin Karakterizasyonu ve LSPR Sinyallerinin Ölçülmesi**

##### **2.4.3.1. UV-Vis görüntüleme**

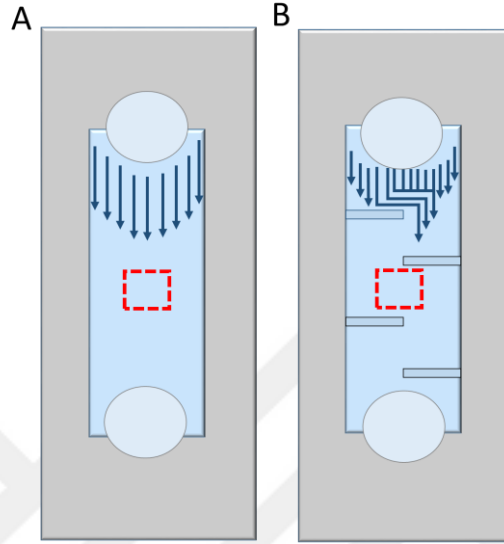
LSPR uygulamalarında yüzeye bağlanan analitin algılanması için genellikle UV (morötesi) spektroskopisi yöntemi kullanılır. Sönüm spektrumu (extinction spectrum), absorpsiyon ve saçılım sinyallerinin toplamıyla elde edilir. Analitin algılama işlemi ise ortamdaki dielektrik özelliğin değişimi sonucunda rezonans noktalarının ( $\lambda_{max}$ ) kayması belirlenerek gerçekleştirilir [97]. Bu tez çalışmada iki farklı UV-Vis spektroskopisi sistemi kullanılmıştır. Bunlardan ilki 96 kuyucuklu petri içerisindeki ölçümlerin yapıldığı UV-Vis mikro plaka okuyucu (microplate reader)

(Molecular Devices). İkincisi ise mikroakışkan çiplerin ölçümlerinin alındığı UV-Vis spektroskopisidir (Agilent). Tez çalışmasında sentezlenmiş altın nanoparçacıkların lokalize yüzey plazmon rezonansı yaklaşık 350-800 nm aralığında karakteristik absorpsiyon tepe noktaları UV Vis spektrofotometresi incelenmiştir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Tez çalışmasında kullanılan iki farklı UV-Vis spektroskopisi A) Miko plaka okuyucu tipindeki UV-Vis spektroskopisi, B), C) Mikroakışkan çiplerin ölçümlerinin alındığı UV-Vis spektroskopisi. B) UV-Vis spektroskopisine mikroakışkan çiplerin yerleştirilmesi (10 mm x 40 mm), C) UV-Vis spektroskopisi cihazından mikroakışkan çipi ölçümü alınması.

UV-Vis spektroskopisinde mikroakışkan çiplerinin ölçümlerinin alındığı noktalar Şekil 2.11’da belirtilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi ölçümler mikroakışkan çiplerin tam ortasından alınmıştır.



Şekil 2.11 UV-Vis spektroskopisinde mikroakışkan çiplerinin ölçümlerinin alındığı noktalar. A) Laminer akış rejimine sahip mikroakışkan çip. B)Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan çip.

#### 2.4.3.2. Data Analizi

Bütün datalar MATLAB ve SpectraGryph yazılımı kullanılarak analiz edilmektedir bu yazılımlar bütün dataları üst üste çakıştırmakta ve dalga boyu kaymalarının kesin doğrulukta belirlenmesi için kullanılmaktadır. Nanoplazmonik yüzeylerin performansı test edilirken yüzey modifikasyonu veya örnek uygulamasından önce ve sonra yapılan spektral ölçümlerin önce ve sonraki değerlendirmelerinde elde edilen eğrinin ve eğriye ait tepe noktasının yerdeğiştirmesi incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Grafiklerde verilen ortalama dalga boylarıdır ve standart sapma değeri ortalama değerlerin standart hatası olarak verilmiştir.

Nanoplazmonik ölçümlerin tekrarlanabilirliği aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$\text{Tekrarlanabilirlik} = \frac{\text{Ortalama Dalga Boyu Kayması}}{\text{Ortalama Dalga Boyu Kayması} + \text{Standart Sapma}} \quad (2.2)$$

Literatürde, tekrarlanabilirlik aynı şartlarda yürütülen deneydeki ölçüm sonuçları arasındaki yakınlık olarak tanımlanmaktadır [98]. Burada, tekrarlanabilirlik parametresi, yüzey modifikasyonları için dalga boyu kayması ölçümlerinde yüzde varyasyon olarak tanımlanmaktadır.

## **2.5.İstatik Analizi**

Nanoplazmonik yüzeylere her bir modifikasyonu değerlendirmek için deneysel sonuçlar parametrik olmayan Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi kullanarak analiz edilmiştir. İstatiksel anlamlılık eşik değeri 0.05 seçilmiştir ( $p < 0.05$ ).

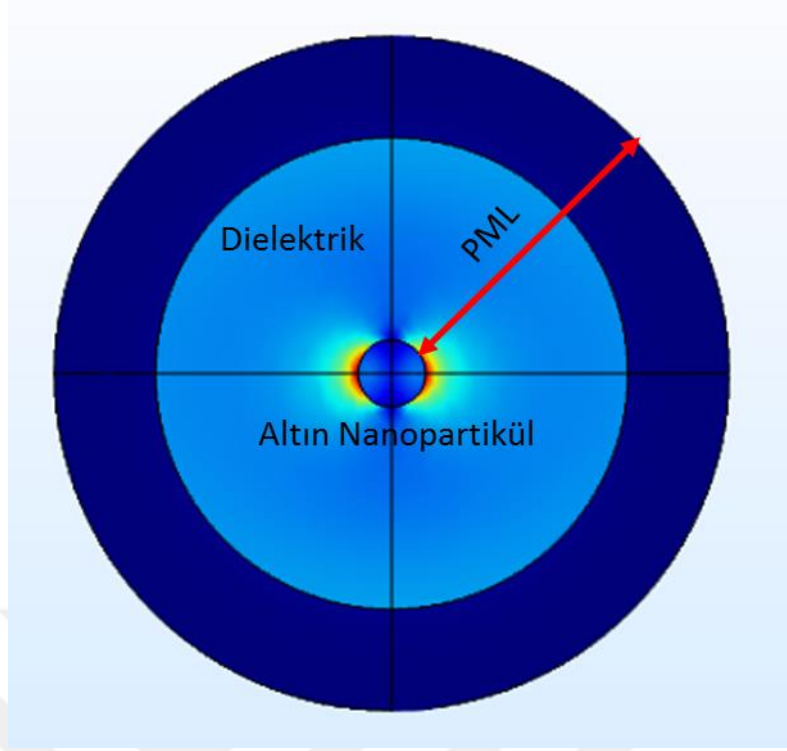


### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. Altın Nanopartikül Boyut ve Dizilimlerinin Elektrik Alan Etkileşimlerine Etkisi

Nanoparçacıkların boyutları, şekli ve konfigürasyonları plazmonik uygulamalar için önemli parametrelerdir. Bu nedenle, tez kapsamında 20, 50, 80 ve 100 nm partikül boyutlarına sahip altın nanopartiküllerin dizilerinin elektrik alan etkileşimleri Mie teorisi ile incelenmiştir.

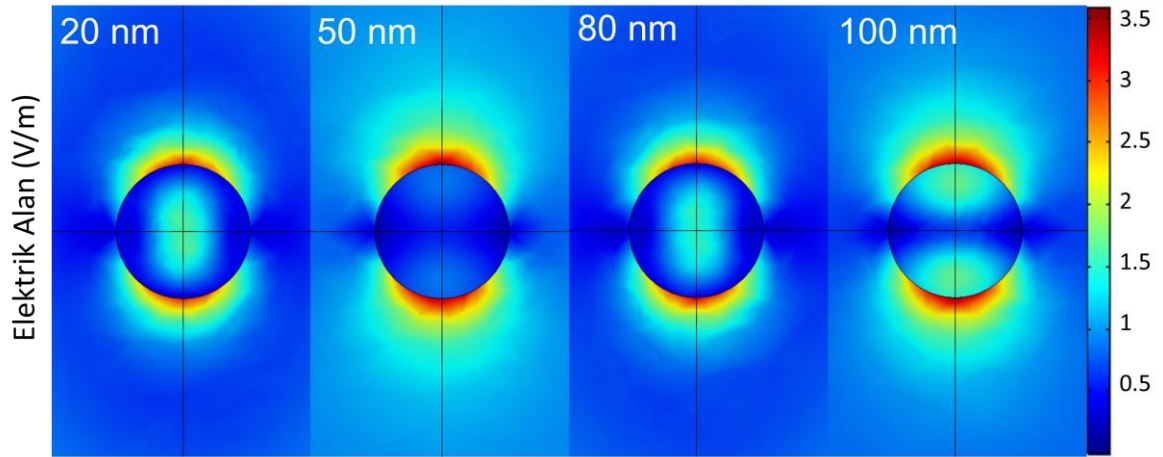
Mie teorisi, küresel altın ve gümüş nanopartiküllerin optik özelliklerini tanımlayan bir modeldir. Bu teoriyle birlikte kırmızı kayma, dipol rezonans genişlemesi ve elektrik alan genişlemeleri gibi partiküllere ait birçok optik özellik incelenebilmektedir. Bu teori Maxwell denklemleri ile homojen bir küreyle bir elektromanyetik düzlem dalgasının dağılmasını tanımlamaktadır. Bu yaklaşımın avantajı metalik nanopartiküller (MNP) için dielektrik fonksiyonunun fenomenolojik bir varsayımı ve genellikle deneysel veriler de dahil olmak üzere modellenmesidir. MNP geometrisindeki Maxwell denklemi COMSOL sayısal sisteminde uygulandığı gibi hem uzay hem de zaman alanlarında diferansiyel denklemlerin sonlu elemanlar çözüm yöntemi olarak kullanılır. Tezin bu bölümünde Maxwell denklemlerini çözmek için FEM uygulayan COMSOL Multiphysics 5.2a yazılım paketinin RF modülü ile metalik nanopartiküllere plazmon uyarımlarının sayısal çalışması uygulanmıştır. Bu modül metalik, dielektrik, manyetik veya parçacık şekli, malzemesi ve boyutu üzerinde herhangi bir kısıtlama olmaksızın elektromanyetik dalgaların yayılımını çözmemizi sağlar. COMSOL hesaplamasının avantajı şekil ve malzeme kurulumuna karşı esnekliğidir. Model üç alandan oluşmaktadır bunlar; merkeze oturtulmuş  $r$  yarıçaplı metalik nanopartikül, parçacığı çevreleyen dielektrik ortam ve dış çevredeki sınırlardan geri yansımaları soğuran mükemmel uyumlu katmanlardır (PML) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Model katmanları

Altın nanopartikül z yönünde polarize edilmiş ve x eksenine boyunca ilerleyen düzlemsel elektromanyetik dalga ile aydınlatılmıştır. Partikülü çevreleyen ortam için PML'nin kalınlığı, gelen ışığın dalga boyuna uygun olarak seçilmiştir.

COMSOL simülasyonu ile analizi yapılan yüzey plazmon rezonansı, nano parçacık boyutundan kuvvetle etkilenir. Şekil 3.2'de, 20, 50, 80 ve 100 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin optik özellikleri karşılaştırılmıştır. Tüm partiküller PBS içerisinde ve 350-800 nm dalga boylu düzlemsel elektromanyetik dalgasıyla aydınlatılmışlardır. Altın nanopartiküllerin çaplarının sistemin optik cevabı üzerindeki etkisi elektrik alan dağılımlarıyla gösterilmiştir. Çeşitli boyutlardaki altın nanopartiküllerin koloidal çözeltileri için teorik elektrik alan hesaplamaları sonuçların karşılaştırılması Şekil 3.2'de sunulmuştur. Buna göre 20, 50, 80 ve 100 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküller için elektrik alanlar 2.62, 3.56, 2.73 ve 3.28 V/m olarak hesaplanmıştır. 50 nm boyuta sahip altın nanopartiküller uyarıldıklarında çevrelerinde en yüksek elektrik alanı oluşturduğu belirlenmiştir. Bu nedenle tezin bundan sonraki aşamalarında 50 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküller kullanılmıştır.



Şekil 3.2 a) Değişken çapları 20 nm, 50 nm, 80 nm ve 100 nm olan dört altın nanopartikül için elektrik alan (electric field) dağılımının karşılaştırılması. Alan dağılımları, dalga boyu 550 nm olan elektromanyetik dalgasına göre aydınlatmaya karşılık gelir.

Metal yüzeyindeki serbest iletken değerlik elektronları, atom çekirdeğinin pozitif yükünün depolandığı merkezin etkisine bağlı olarak salınırlar. Bu salınım, metal yüzeyinde karakteristik frekansı olan bir elektron yoğunluğu dalgalarına (yüzey plazmon) neden olur. Elektronlar ve çekirdekler arasındaki kuvvetin temeli coulomb kuvvetleridir. Dolaylı olarak elektronların ayrılma mesafesi orantılıdır ve bu çekim kuvvetleri ile doğru orantılıdır. Metaldeki yüklerin (elektronlar ve çekirdekler) ayrılma mesafesi aşağıdaki verilmektedir.

$$S = \sqrt[3]{N} \quad (3.1)$$

N, partikül yük yoğunluğu S, ise elektronlar ve çekirdek yükü arası mesafedir.

Elektronların pozitif yüklü çekirdeklerin çevresinde salınması klasik harmonik osilatör gibi ele alınabilir. Nano ölçekli düzlemsel metaller ve nanopartiküller için gelen ışık fotonlarının frekansı, metalin elektron yoğunluğu dalgalarının doğal karakteristik frekansı ile eşleşirse gelen fotonların enerjisi absorplanır ve yüzey plazmon rezonansı gerçekleşir. Maksimum absorpsiyonun dalga boyu, nanoparçacıkların türüne, şekline, boyutuna ve bulunduğu ortama bağlıdır. Metal nanopartiküllerin de lokalize yüzey plazmon rezonansına neden olan bu maksimum absorpsiyon elektromanyetik spektrumun ultraviyole bölgesinde düşer. Özellikle

altın ve gümüş nanopartiküllerde, rezonans, bantlar arası geçişler nedeniyle görünür bölgede (UV-Vis) yer alır. Örnek tarafından absorbe edilen ışık miktarını ölçmek için, A olarak tanımlanan emilim absorbansı kullanılır ve aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır.

$$A_{\lambda} = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right) \quad (3.2)$$

Burada  $I_0$  ve  $I$ , çalışılacak örneği geçirmeden önce ve sonra, belli dalga boyundaki ( $\lambda$ ) ışığın yoğunluğunu belirtir. Absorpsiyon, iki yoğunluğun bir fraksiyonu olduğundan hiçbir birimi yoktur, ancak absorpsiyon birimi olarak (a.u) olarak kullanılır.

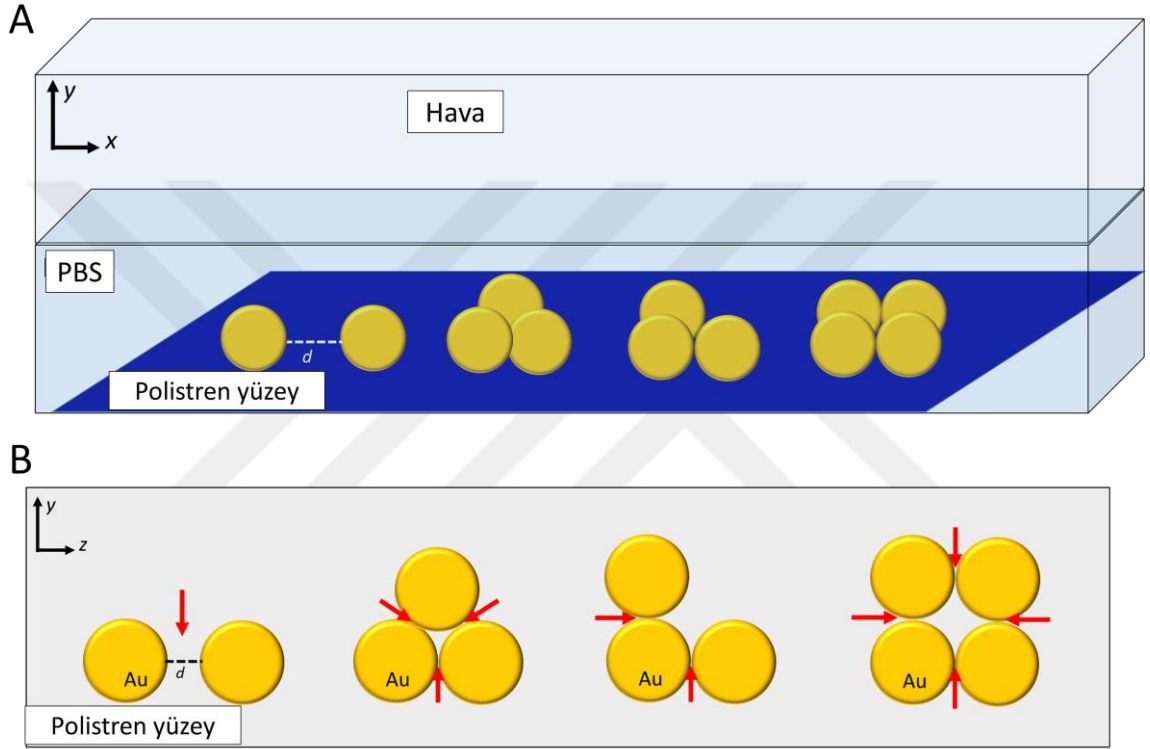
Numerik analizler, sentez ve üretim öncesinde bir sistemin özelliklerini en iyi şekilde anlamamızı sağlarken, aynı zamanda bir plazmonik sistemdeki rezonansların karşılaşılabileceği herhangi bir kırmızı veya mavi kaymayı öngörmemize yardımcı olur. Bir plazmonik sistemdeki kırmızı kayma, gelen ışık dalgasının bir parçacıkla (elektron hareketleri) ve partikülün çevresindeki ortamla etkileşimiyle değişir.

Mie teorisi bir parçacığın rezonans pikinin (küresel bir parçacık için) parçacığın kavisli yüzeyinden kaynaklı elektronlara etkili bir geri yükleme kuvveti uygulayacağından rezonansın ortaya çıkmasına bağlı olarak yakın-alan bölgesinde hem parçacık içinde hem de dışında güçlendirilecek elektrik alan bölgelerin oluşacağını göstermektedir.

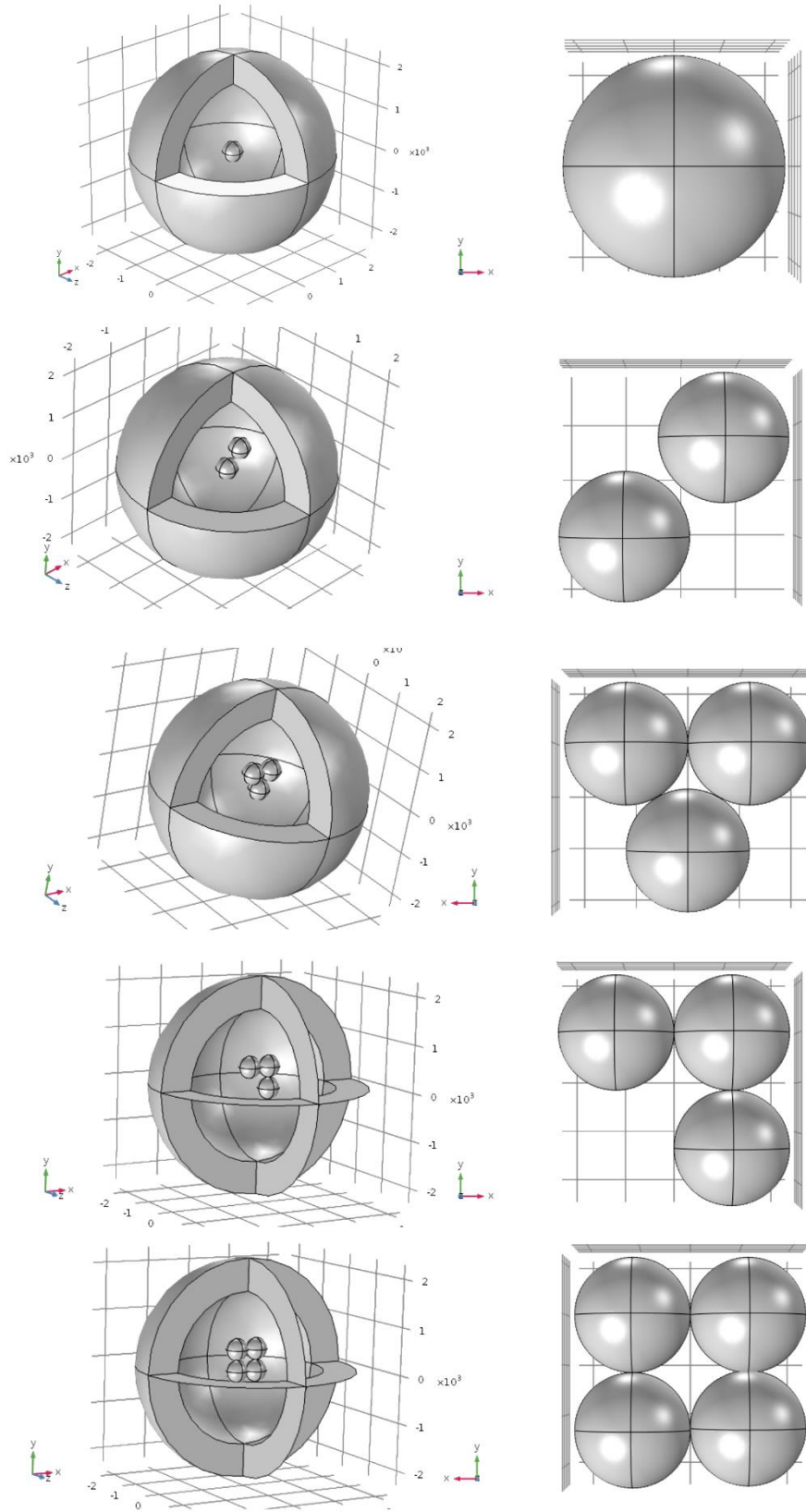
Partikül boyutu ile rezonans tepe noktaları  $\lambda_{max}$  arasında doğrudan bir ilişki olduğu için, bir parçacığın boyutunun bilinmesi, plazmonik cihazlar tasarlanırken oldukça önemlidir. Parçacık boyutunu ve partikül yerleşimini kontrol ederek belirli bir dalga boyunda çalışacak şekilde ayarlanmış nanoplazmonik cihazlar üretmek mümkündür. Parçacık boyutunu ve yerleşimi ayarlanarak, optik veya tıbbi uygulamalarda kullanılabilecek olan bir sistemi daha verimli çalışabilir hale getirmek en fazla istenilen şeydir.

Altın nanopartiküller birbirlerine yaklaştırıldıklarında her bir nanopartiküldeki birbiri ile eşleşir bu plazmon birleşmesi, izole edilmiş partiküllerden daha güçlü plazmon rezonansının oluşmasına sebep olur. Bu çalışmada altın nanopartiküllerin dimer, trimer ve kuadrumer'lerin farklı konfigürasyonlarda dizilimlerinin nanopartiküller

arasında oluşacak olan elektrik alan üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil 3.3). Uygun uyarım koşulları ve nanopartiküller arasındaki boşlukta sıcak nokta, yani yoğun elektromanyetik alan bölgesi oluşur. Bu çalışmada farklı partikül boyutuna sahip altın nanopartikül dizilerinde farklı partiküller arası mesafede plazmonik eşleşmeleri incelenmiştir. Yakın bir şekilde dizilmiş nanopartiküller komşu nanopartiküller arasındaki birleşime bağlı yüksek lokalize elektromanyetik alanları göstermektedir. Altın nanopartiküllerin COMSOL yazılımında dizimleri Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.3 LSPR sensör yüzeylerinde oluşan ve COMSOL yazılımı kullanılarak analizleri yapılan farklı altın konfigürasyonlarının şematik gösterimi verilmiştir. Altın nanopartiküller arasında oluşacak sıcak noktalar ve elektrik alan genişlemeleri kırmızı ok ile gösterilmiştir. A) Altın nanopartiküllerin yx düzlemindeki konfigürasyonları, B) Altın nanopartiküllerin yz düzlemindeki konfigürasyonları.



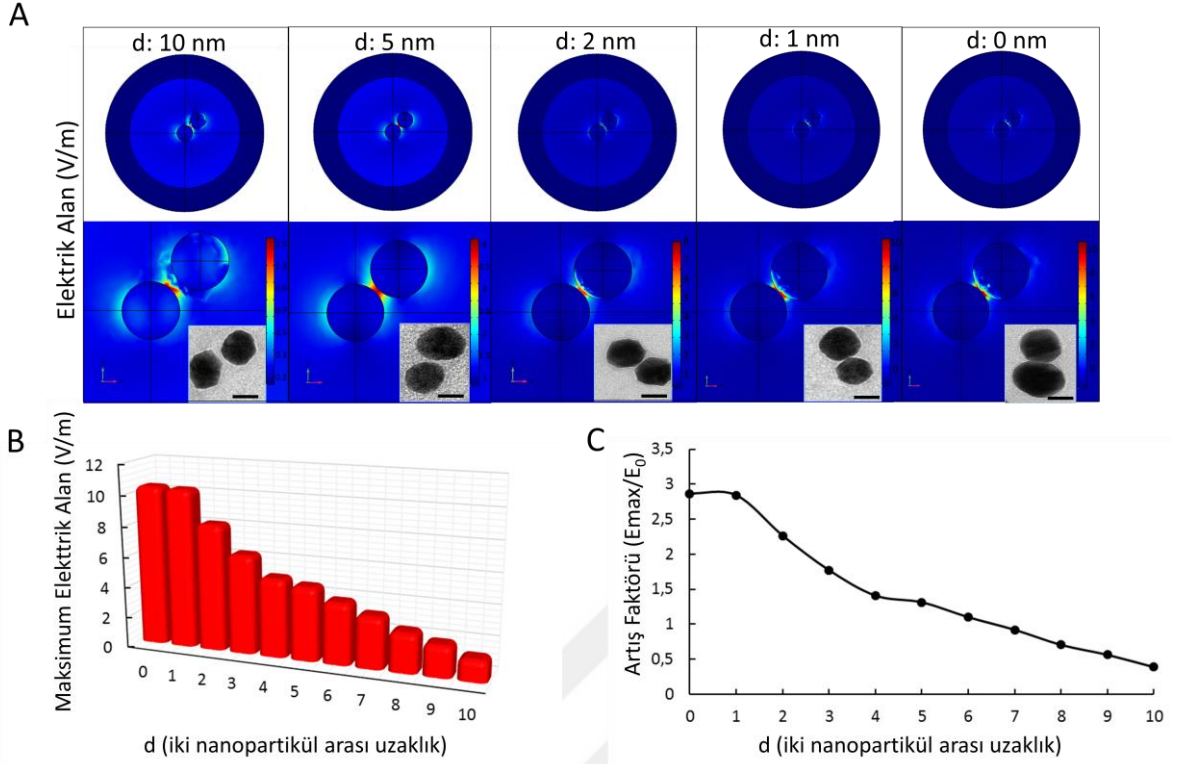
Şekil 3.4 LSPR sensör yüzeylerindeki farklı altın nanopartiküllerin COMSOL konfigürasyonları.

Nanopartiküller arasındaki bu etkileşimler iyi aydınlatıldığında nanoplazmonik yüzeylerde, birkaç  $\text{mm}^2$ 'lik alanlardaki dizilerde elektrik alan arttırımı sağlanarak ve plazmonik yüzeylerin daha düşük molekül ağırlığındaki biyomoleküllerin tespit etmesine olanak sağlayacaktır. Yapılan teorik analizler sonucu ikili altın nanopartikül sisteminde aralarındaki mesafe 0, 1, 2, 5 ve 10 nm olan partiküllerin elektrik alan arttırmaları ve elektrik alan artış faktörü Şekil 3.5'te verilmiştir. Ayrıca partiküller arası maksimum elektrik alan (V/m) ve artış faktörü değerleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 İkili altın nanopartikül sistemlerindeki partiküllerin maksimum elektrik alan arttırmaları ve elektrik alan artış faktörü.

| İki Nanopartikül Arası<br>Mesafe (nm) | Maksimum Elektrik<br>Alan (V/m) | Artış<br>Faktörü |
|---------------------------------------|---------------------------------|------------------|
| 1                                     | 10.343                          | 2.838            |
| 2                                     | 8.254                           | 2.262            |
| 3                                     | 6.456                           | 1.769            |
| 4                                     | 5.135                           | 1.407            |
| 5                                     | 4.785                           | 1.311            |
| 6                                     | 4.012                           | 1.099            |
| 7                                     | 3.355                           | 0.919            |
| 8                                     | 2.571                           | 0.704            |
| 9                                     | 2.052                           | 0.562            |
| 10                                    | 1.413                           | 0.387            |

Rezonans dalga boyundaki çeşitli interpartiküler mesafe (d) için altın nanopartikül dimerleri etrafındaki maksimum elektrik alan yoğunluğu dağılım profilleri Şekil 3.5 A ve B'de gösterilmektedir. Partikül büyüklüğüne partikül aralığının oranına bağlı olarak, kuvvetli yakın-alan etkileşimi parçacıklar arası aralıktaki yerel elektrik alanını arttırmaktadır. Ayrıca nanopartiküller arası mesafeye göre elektrik alan artış faktörü Şekil 3.5 C'de verilmiştir.

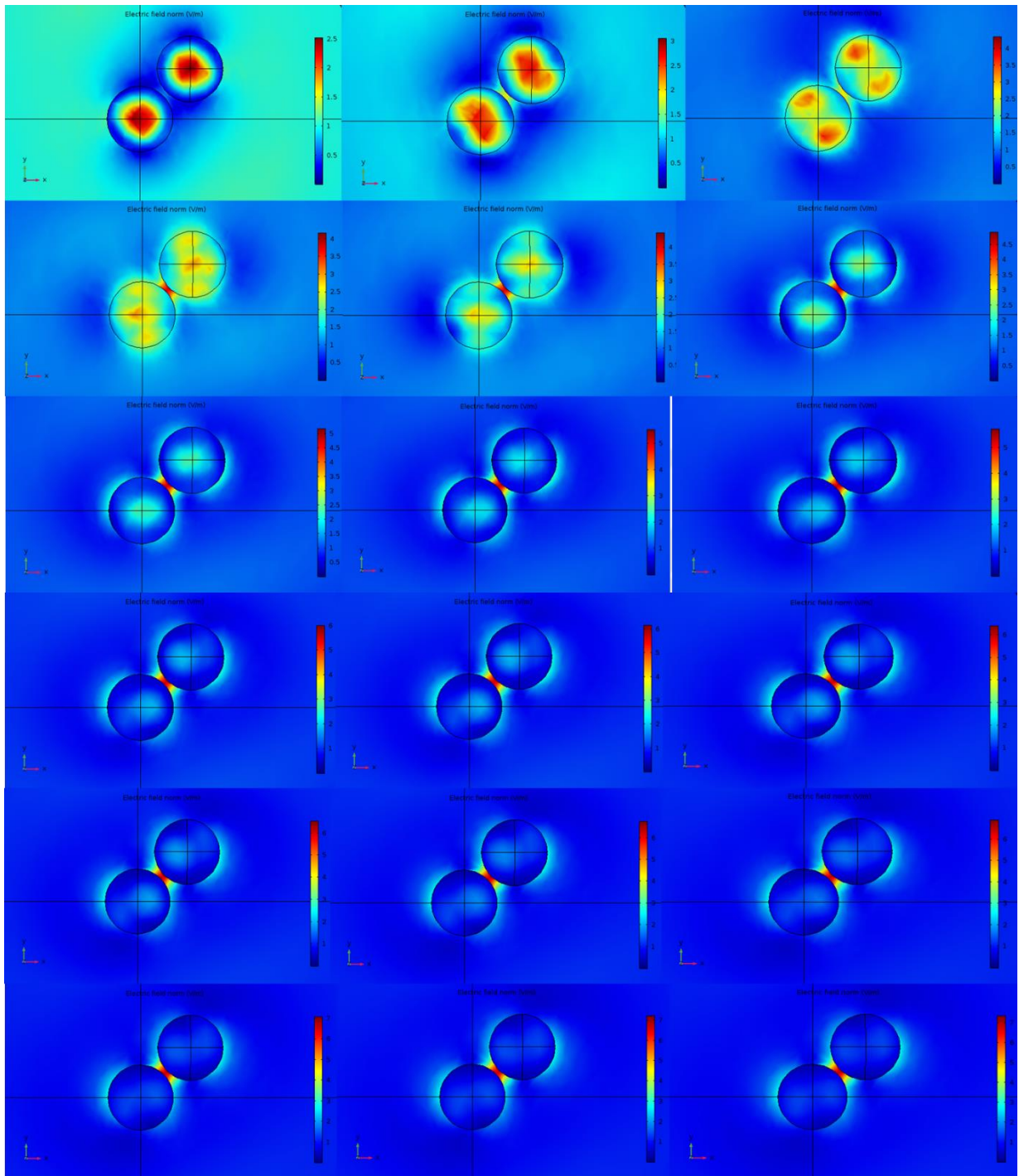


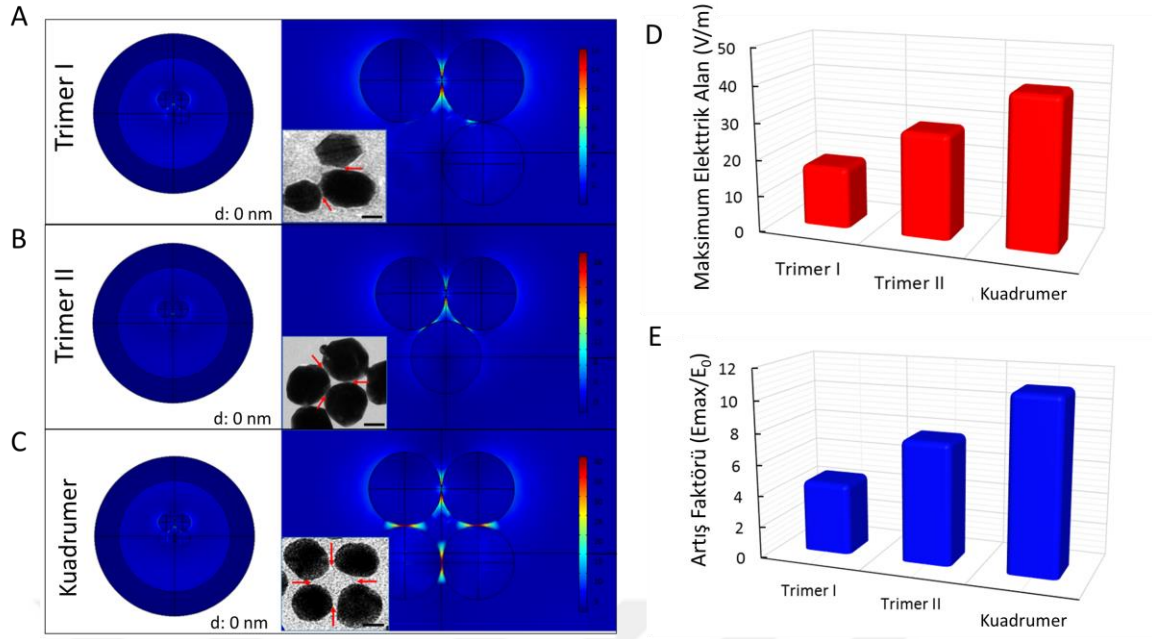
Şekil 3.5 Çapı 50 nm olan iki altın nanopartikül arasında oluşan elektrik alan dağılımları; TEM görüntüsü skala bar: 20 nm. Alan dağılımları, Dalga boyu 550 nm olan elektromanyetik dalgasına göre aydınlatmaya karşılık gelir ve gelen ışık 45°'dir. A) Nanopartiküller arası mesafe 10 nm, 5 nm, 2 nm, 1 nm, 0 nm, B) Nanopartiküller arası mesafeye göre meydana gelen maksimum elektrik alan, C) İki altın nanopartikül sisteminde mesafeleri değişen elektrik alanının geliştirme faktörü;  $E_0$ , iki altın nanopartikülün birbirinden sonsuz uzak olduğu (bir altın nanopartikül ile modellendiğinde) maksimum elektrik alanıdır.  $E_{max}$  ise nanopartiküller arasında ölçülen maksimum elektrik alandır.

Mie teorisinde büyüyen nano-küre yarıçaplı metalik nanopartiküllerde deneysel olarak gözlemlenen plazmon rezonansının kırmızı-kaymasının boyut bağımlılığındaki çapraz-bağlamayı açıklamak için genellikle iki rejim dikkate alınır. Bunlar; içsel boyut etkisi ( $R < 20$  nm) ve dışsal boyut etkisidir ( $R > 20$  nm). İçsel boyut plazmon rezonans dalga boyundan çok daha küçük olan nano-küre yarıçapı için geçerli olan Mie yanıtının dipol yaklaştırılmasına atıfta bulunmaktadır. İçsel boyut etkisi gibi nispeten küçük parçacıklar için, model dielektrik fonksiyon elektron saçılımı içerir), bu da bir kırmızı Dipol Mie rezonansı verir. Daha büyük nanopartikülleri için Mie teorisinde elektromanyetik yanıtında çok kutuplu karıştırmanın ve çift kutuplu tepki bileşeni kutbu için doğrusal olmayan düzeltmelere dahil edilmesine karar verir [31]. İki plazmonik nanopartikülün birbirine çok yakın

olduğunda bireysel nanopartiküllerin yüzey plazmonundan türetilen elektromanyetik alanlar, komşu parçacıkların dipolar etkileşiminden etkilenebilir ve hem plazmon rezonansın artması hem de saçılım spektrumlarında önemli değişiklikler meydana gelebilir (Şekil 3.5). Bu yakın alan-etkileşmesinin neden olduğu pik kayması nanopartiküller arası mesafeye oldukça bağımlıdır. Nanopartiküller arasındaki boşluk daha küçük olduğunda, daha büyük bir birleştirme elde edilecektir. Şekil 3.6 'da farklı dalga boylarında iki partikül arasındaki elektrik alan artırımlarının oluşumu verilmiştir.

Altın nanopartikül sayısı ve oluşturdıkları geometriler değiştikçe meydana gelen elektrik alan dağılımları ve sıcak nokta bölgeleri değişmektedir. Küresel yapıların yanı sıra anizotropik yapıların elektrik alanları oldukça arttırdığı bilinmektedir [32]. Bu nedenle altın nanopartikül dizilerinin aralarında oluşturdıkları farklı geometrileri incelemek için küresel nanopartiküllerin aralarında oluşturdıkları konfigürasyonların elektrik alan dağılımları incelenmiştir (Şekil 3.7). Bu amaçla üçlü nanopartikül dizilerinin konfigürasyonları trimer I (L şekli) ve trimer II (üçgen şekli) olarak incelenmiş dörtlü nanopartikül dizisi de kuadrumer olarak isimlendirilerek incelenmiştir. Buna göre trimer I, trimer II ve kuadrumer nanopartikül dizilerinin elektrik alanları 16.87, 28.64 ve 40.85 V/m olarak ve artış faktörleri ise sırasıyla 4.5, 7.7 ve 11.1 olarak hesaplanmıştır. Teorik hesaplamalar altın nanopartikül dizilerinin birbirlerine çok yaklaştıklarında veya temas ettiklerinde en yüksek plazmonik eşleşmeyle birlikte elektrik artırımına sahip olduklarını göstermiştir. Ayrıca partikül konfigürasyonlarının da elektrik alan artırımlarını doğrudan etkilediği gösterilmiştir.

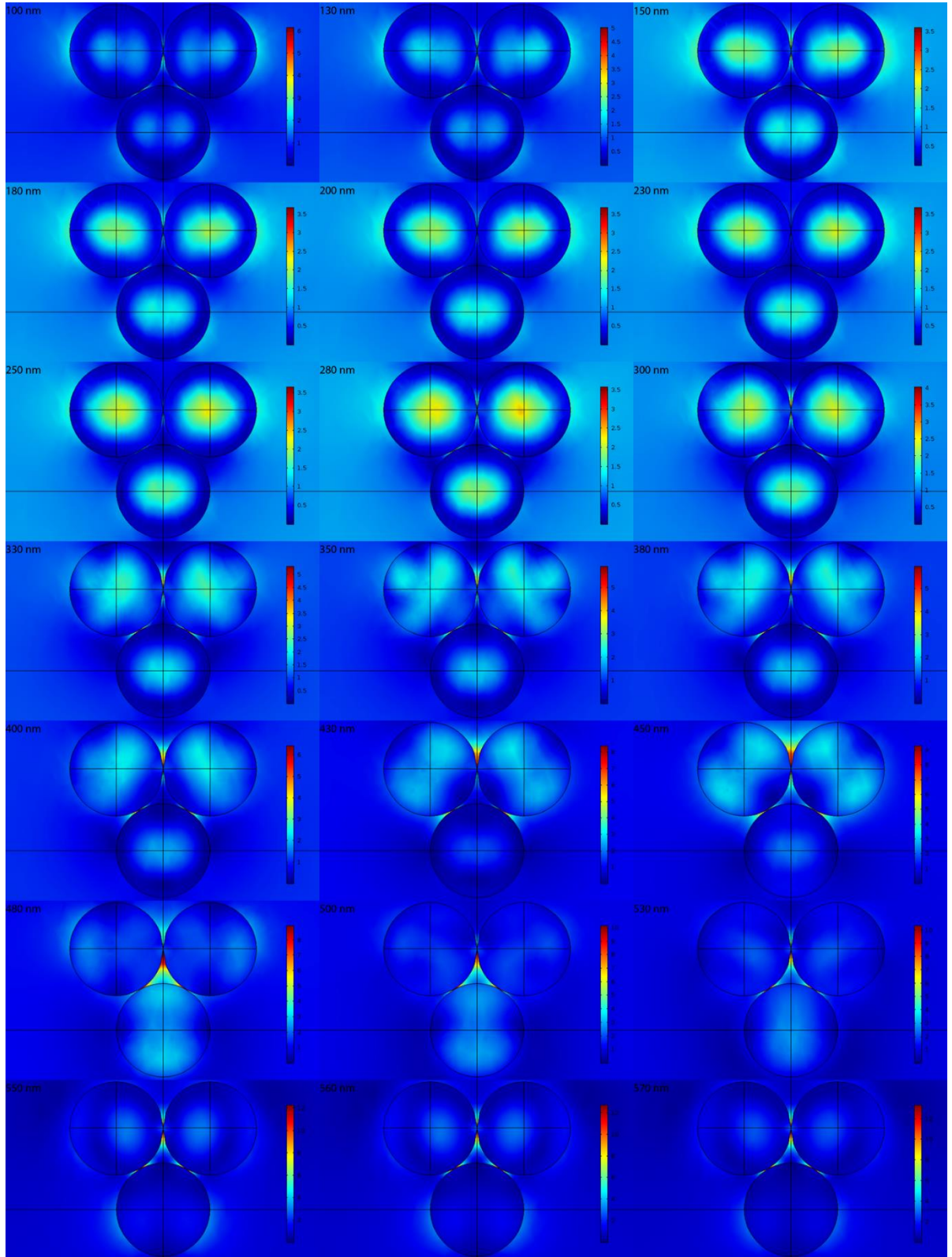




Şekil 3.7 Çapı 50 nm olan altın nanopartiküllerin farklı konfigürasyonlarda dizilimi ve elektrik alan dağılımları; TEM görüntüsü skala bar: 25 nm. Alan dağılımları, Dalga boyu 580 nm olan elektromanyetik dalgasına göre aydınlatmaya karşılık gelir. Kırmızı oklar nanopartiküllerin temas noktalarını ve nanopartiküller arasında oluşan sıcak noktaları göstermektedir.

Şekil 3.8 'de farklı dalga boylarında trimer II altın nanopartikülleri arasındaki elektrik alan arttırmalarının oluşumu verilmiştir. Şimdiye kadar yapılan teorik analiz sonuçları bize nanopartikül sayısı ve partiküller arası mesafe arttıkça elektrik alanda ve sıcak noktaların oluşumunda 11 kat artış olduğunu göstermiştir. Altın nanopartiküller arası elektrik alanlarla birlikte sıcak noktaların artışının LSPR spektrumunda maksimum dalga boyunda kırmızı kaymaya neden olduğu gibi sönüm yoğunluğunda önemli bir artışa sebep olduğu gösterilmiştir [99-101].

Sonuç olarak bu analizler neticesinde altın nanopartiküllerin yüzeyde tek sıra halinde ve sık dizilimleri plazmonik eşleşmeyi artırarak nanopartiküllerin etrafında oluşan elektrik alanların anlamlı bir şekilde artmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle plazmonik yüzeyler oluşturulurken altın nanopartiküllerin boyutları kadar dizimlerinde dikkate alınmalıdır.



Şekil 3.8 Çapı 50 nm olan altın nanopartiküllerin aralarında üçgen oluşturmaları ve farklı dalga boylarına göre elektrik alan dağılımları ( $d=0$ ).

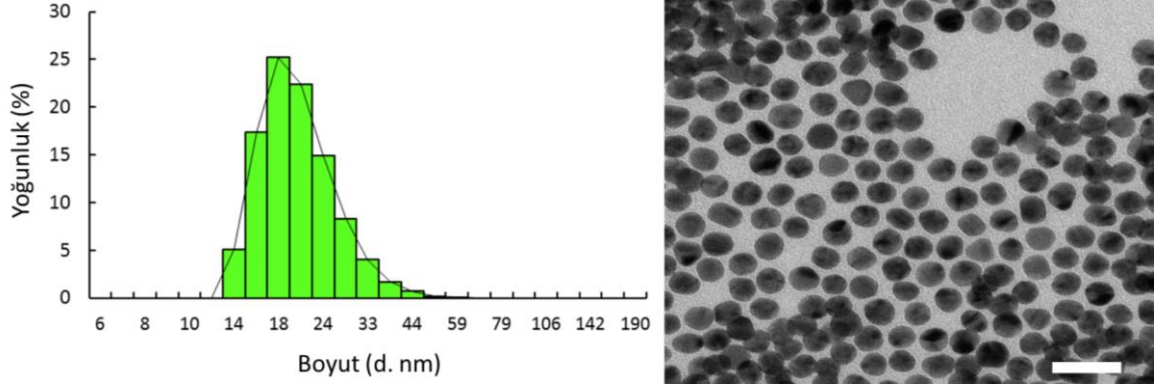
### **3.2. Plazmonik Yüzeyler için Sentezlenen Altın Nanoyapıların Özellikleri ve Yüzey Plazmon Rezonansı Üzerine Etkileri**

Bu bölümde farklı boyutlara ve en-boy oranlarına sahip küresel ve çubuk şeklinde altın nanopartiküller sentezlenerek karakterize edilmiş ve nanoplazmonik özellikleri tartışılmıştır. Altın nanopartiküllerin karakterizasyonu için TEM görüntüleri alınmış, UV-Vis absorpsiyon spektrumları incelenmiş ve Zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Aynı zamanda Bölüm 3.1’de bahsedilen teorik sonuçlarla deneysel sonuçların karşılaştırmalı analizleri yapılmıştır.

#### **3.2.1. Altın nanopartiküller**

Tez çalışmasında altın nanopartikül sentezi sitrat indirgeme (Turkevich) ve çekirdek partikül büyütme yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu iki yöntemde de indirgeme ajanı olarak sodyum trisitat kullanılmıştır. Kaynayan (100°C)  $\text{HAuCl}_4$  çözeltisine sitrat solüsyonu eklendiğinde ani bir renk değişikliği gözlenmiş, sitrat ilave edildikten sonra, sarı renkte olan altın çözeltisi, renksiz bir çözeltiye dönüşmüştür. Bu renk değişimi altın iyonlarının nötr Au atomlarına indirgenmiş olduğunu göstermektedir. Daha sonra renksiz çözeltinin önce maviye sonra 5 dakika içinde kırmızı yakut rengini alması ile kararlı altın nanopartiküllerinin oluşmuştur. Turkevich metodunda altın nanopartiküllerin renk değişimi 10 dk ve daha az zaman alırken oda sıcaklığında gerçekleşen çekirdek büyütme yönteminde renk değişimi nispeten daha uzun sürmüştür. Sentezlenen altın nanopartiküllerin boyut, şekil, yüzey plazmon rezonansı, monodispersite ve yüzey yükü gibi parametrelerle karakterize edilmiştir.

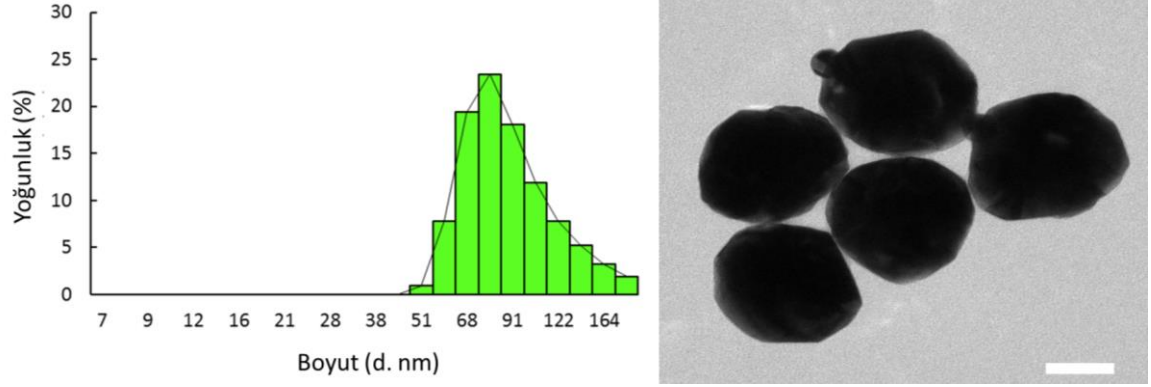
Turkevich metodu kullanılarak 20 mL 1mM  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ve 0.5 mL %1 (w/v) sodyum sitratın reaksiyonuyla elde edilen altın nanopartiküllerin Zetasizer cihazı ile yapılan analizleri sonucu polidispersite indeks (PDI) değeri 0.21, zeta potansiyeli değeri -30.23 mV ve Z-average değeri  $20.39 \pm 1.2$  nm olarak bulunmuştur. Şekil 3.9’ da bu koşullarda üretilen altın nanopartiküllerin yoğunluğa karşı boyut dağılımı verilmiştir.



Şekil 3.9 Turkevich metodu ile sentezlenen 20 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin yoğunluğa karşı boyut grafiği ve TEM görüntüsü. Skala bar 50 nm.

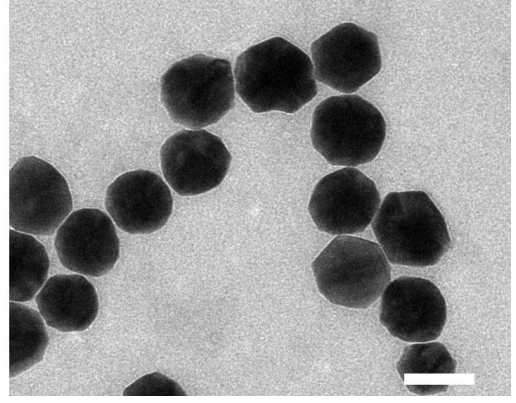
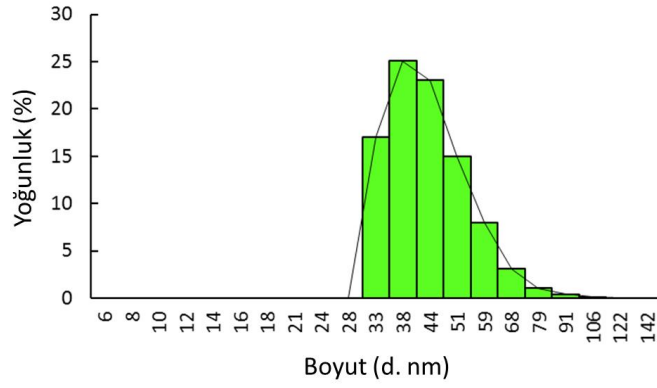
Turkevich metodunda aynı koşullarda, sitrat miktarının 0.5 mL'den 1.5 mL'ye artırılmasıyla altın nanopartiküllerin PDI değeri 0.05, zeta potansiyeli değeri -16.60 mV ve Z-average değeri  $106.17 \pm 1.6$  nm olarak bulunmuştur. İndirgenme reaksiyonunda başlangıçta reaksiyona giren altın tuzunun derişiminin önemli olduğu kadar indirgenme ajanı olarak kullanılan sodyum sitrat derişimi de oldukça önemlidir. Sodyum sitrat suda hidroliz olduktan sonra sitrik asite dönüşmekte ve ortamda üretilen sitrat iyonları, tetrakloroaurik asitin  $\text{AuCl}_4^-$  iyonlarına indirgemektedir. Sodyum sitrat konsantrasyonu arttıkça, indirgenme reaksiyonundaki stabilite bozulmuş ve daha büyük boyutlarda altın nanopartiküllerin oluşumu gözlenmiştir [102]. İndirgenme reaksiyonunda diğer bir önemli faktör de karıştırma hızıdır. Literatür çalışmaları karıştırma hızının yavaş olduğu durumlarda ortamda gerekli derişimlerde sodyum sitrat olmasına karşın eşit ısı dağılımının tam olarak sağlanamamış olmasından dolayı indirgenme reaksiyonun gerçekleşmediğini bildirmektedir.

Altın nanopartiküllerin partikül boyut dağılımları nanoplazmonik yüzeyler için oldukça önemli olan homojeniteyi göstermesi açısından oldukça önemlidir. Üretilen altın nanopartiküllerin dar bir boyut dağılımlarına sahip olduğu görülmektedir (Şekil 3.10).

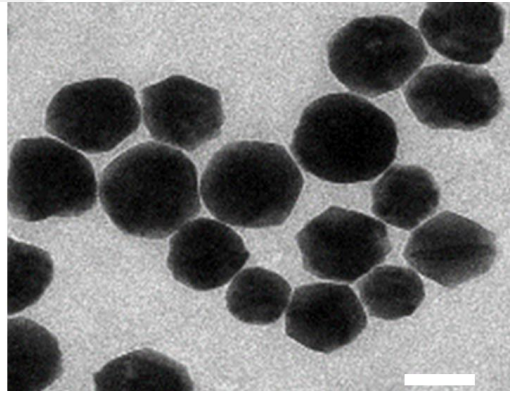
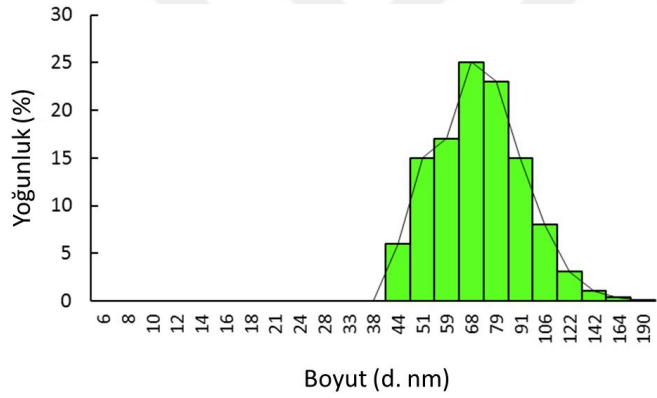


Şekil 3.10 Turkevich metodu ile sentezlenen 100 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin yoğunluğa karşı boyut grafiği ve TEM görüntüsü. Skala bar 50 nm.

Çekirdek büyütme metodunda ise hidrokinon kontrollü kullanımı ile 50 nm ve 80 nm nanopartikül boyutlarına sahip altın nanopartiküller elde edilmiştir. Hidrokinon zayıf bir indirgeme ajanı olup ( $E^\circ = -0.699$ ), genellikle gümüşü seçici olarak indirgemek için kullanılır. Bu çalışmada 20 mL 1mM  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ve 0.5 mL %1 (w/v) sodyum sitratın reaksiyonuyla elde edilen altın nanopartikül çözeltisi oda sıcaklığına kadar soğutulurak çekirdek çözeltisi (20 nm) elde edilmiştir. Daha sonra içerisine 10mM, 3mL hidrokinon konularak reaksiyona bırakıldığında (PDI) değeri 0.08, zeta potansiyeli değeri -32.83 mV ve  $50.62 \pm 1.4$  nm hidrodinamik partikül boyutuna sahip nanopartiküller elde edilmiştir (Şekil 3.11). TEM analizi sonucu yapılan ölçümlerde ise  $48 \pm 9$  nm kuru partikül boyutuna sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı çekirdek altın çözeltisine 10 mM, 5mL hidrokinon eklendiğinde ise analiz sonuçları PDI değeri 0.07, zeta potansiyeli değeri -21.26 mV ve  $80.62 \pm 1.1$  nm hidrodinamik partikül boyutuna sahip nanopartiküller elde edilmiştir (Şekil 3.11). TEM analizi sonucu yapılan ölçümlerle bu partiküllerin ve  $77 \pm 14$  nm kuru partikül boyutuna sahip olduğu belirlenmiştir. Altın nanopartiküllerin kuru partikül ortalama çapları TEM görüntüleri kullanılarak Image J yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.12).

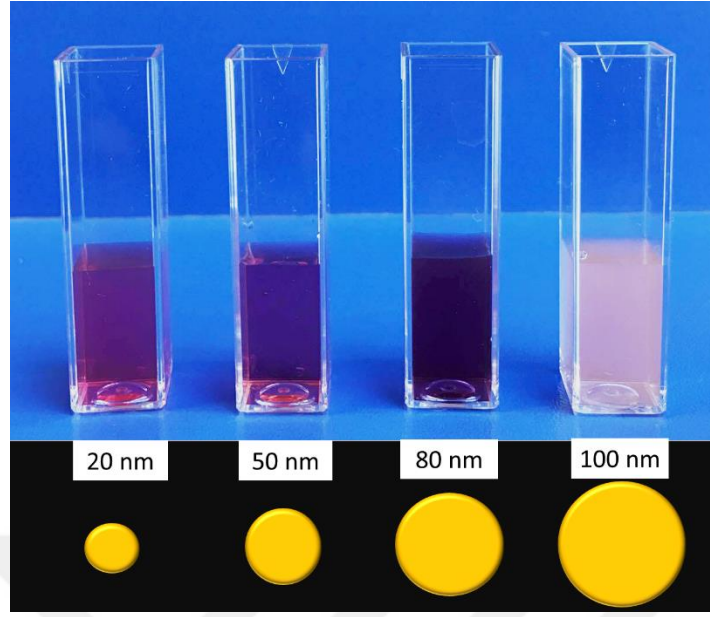


Şekil 3.11 Çekirdek büyütme metodu ile sentezlenen 50 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin yoğunluğa karşı boyut grafiği ve TEM görüntüsü. Skala bar 50 nm.



Şekil 3.12 Çekirdek büyütme metodu ile sentezlenen 80 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin yoğunluğa karşı boyut grafiği ve TEM görüntüsü. Skala bar 50 nm.

Şekil 3.13’de görülen renk değişimi altın nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonansı nedeniyle oluşur. Sentezlenmiş nanopartiküller, daha küçük partiküller için kırmızıdan daha büyük parçacıklar için mora kadar değişen renkleri göstermiştir. Altın nanopartiküllerin farklı renklere sahip olmalarının nedeni daha küçük parçacıkların (<30 nm) beyaz ışık spektrumunun mavi bölümünü absorblaması ve bunların kırmızı renklerinden sorumlu olan kırmızı kısmı yansıttıkları gerçeğiyle açıklanır [103]. Öte yandan büyük parçacıkların boyutu nedeniyle, spektrumun kırmızı kısmında daha büyük dalga boyunu absorblarken, mor/mavi rengin neden olduğunu açıklayan mavi kesiti yansıtmaktadır.



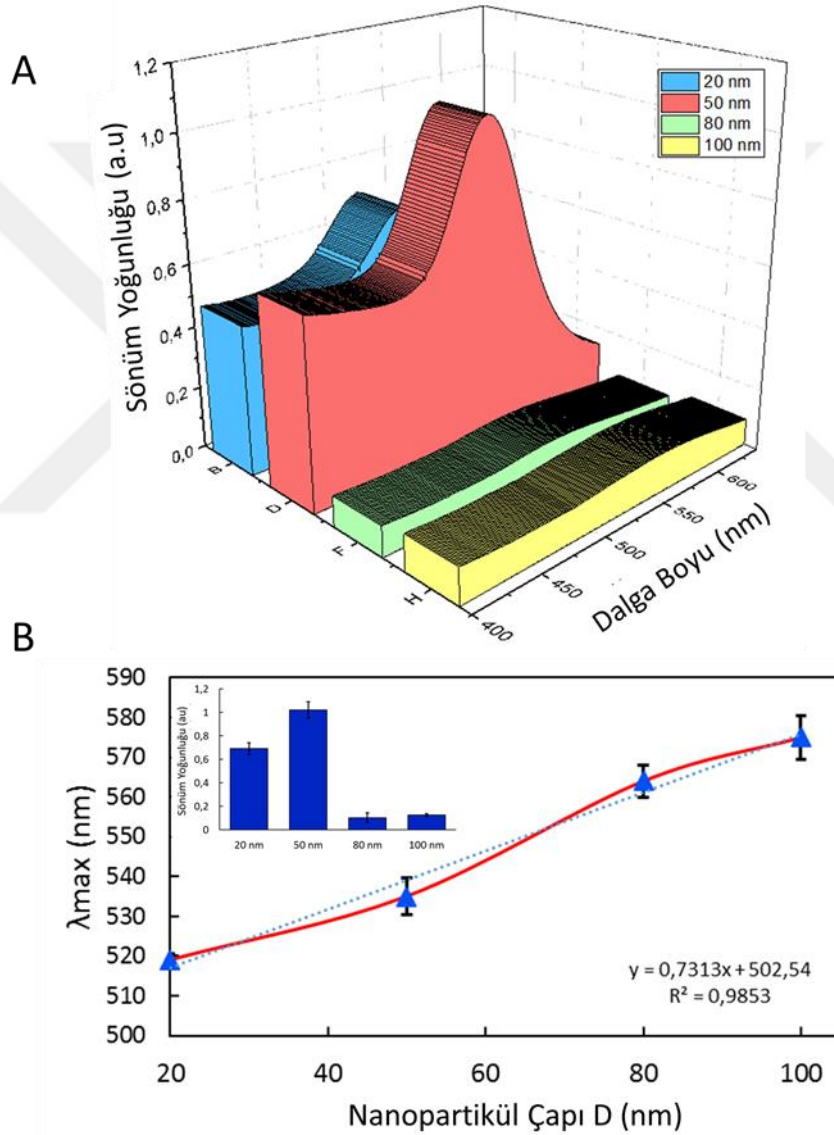
Şekil 3.13 Farklı partikül boyutuna sahip altın nanopartikül çözeltilerinin karakteristik renkleri.

Farklı boyutlarda üretilen altın nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonansı UV-Vis spektrofotometresi ile incelenmiştir (Şekil 3.14 A). Yüzey plazmon rezonansı görünür ışık da dahil olmak üzere elektromanyetik dalganın titreşen manyetik/elektrik alanları ile metalik nanopartiküllerin delokalize yüzey elektronları arasındaki etkileşimi göstermektedir. UV-Vis spektrofotometresi ile ölçülen maksimum absorbansın konumu, partikül şekli, dielektrik sabiti, partikülü çevreleyen matriks ortamı ve nanopartikülün boyutunu içeren bir dizi faktöre bağlıdır. Deneysel sonuçlar, partikül boyutu ve maksimum dalga boyu arasında regresyon sabitiyle yüksek bir pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir ( $R^2=0.98$ ) (Şekil 3.14 B). Daha büyük partikül boyutuna sahip parçacıkların, görünür ışık tayfının kırmızı bölümüne doğru nispeten daha yüksek bir dalga boyunda maksimum emilimine sahip oldukları açıkça görülmektedir. Tablo 3.2'de görüldüğü gibi altın nanopartikül boyutu 20 nm'den 100 nm'e arttığında maksimum dalga boyu 519 nm'den 575 nm'ye kırmızı bir kayma göstermiştir. (Şekil 3.14). Tez kapsamında sentezlenen her bir altın nanopartikül çözeltisi için altın nanopartiküllerin varlığı nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonans davranışlarını gösteren UV-Vis emilim ölçümüyle doğrulanmıştır. Sentezlenen altın nanopartiküllerin konsantrasyonları Beer's

Lambert kanununa göre hesaplanmıştır. Nanopartikül konsantrasyonları Tablo 3.2’de verilmiştir.

$$A = \epsilon I c \quad (3.3)$$

A; belirli bir dalga boyundaki çözeltinin absorpsiyonu,  $\epsilon$ ; molar absorptivite,  $I$ ; çözelti hücresinin uzunluğu ve  $c$ ; çözeltinin konsantrasyonu (mol/dm<sup>3</sup>).



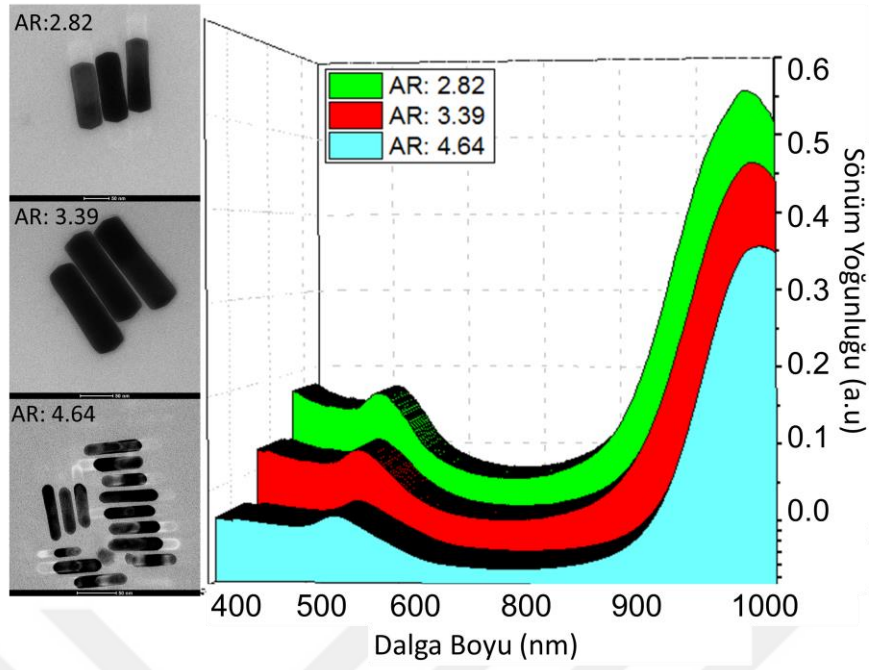
Şekil 3.14 Farklı boyutlarda (20, 50, 80 ve 100 nm) sentezlenen altın nanopartiküllerin; A) Sönüm (extinction) spektrumları, B) Nanopartiküllerde maksimum plazmon rezonansının nanoparçacık çapı (D) ile maksimum absorpsiyonun değişimi.

Tablo 3.2 Sentezlenen altın nanopartiküllerin özellikleri.

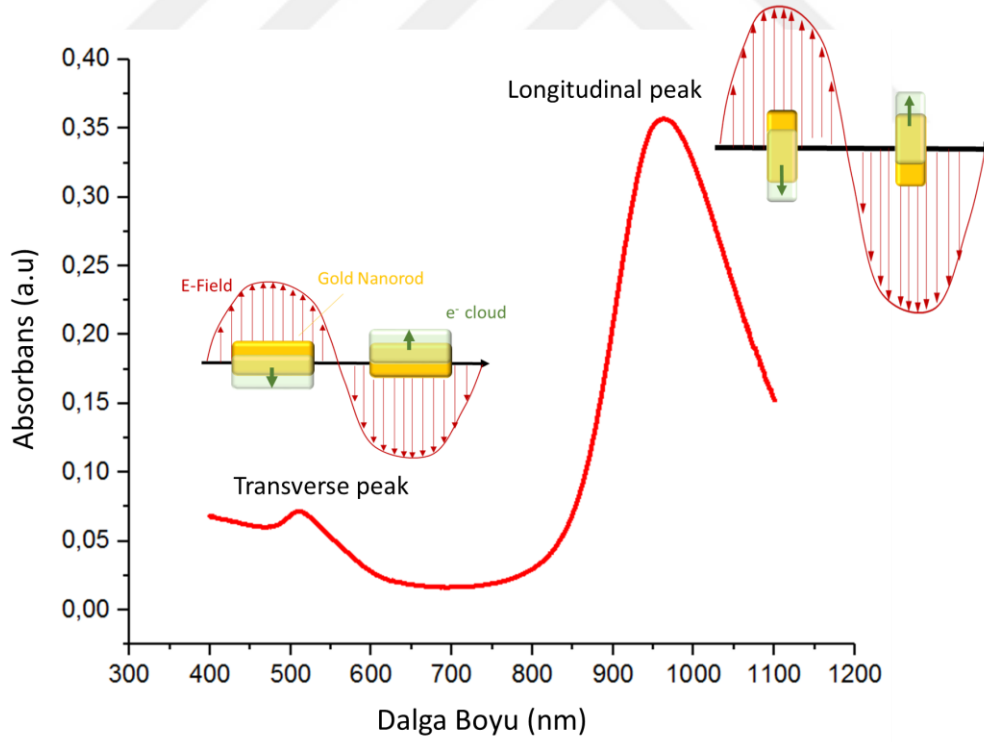
| Metod               | İndirgeme<br>ajanı              | Altın NP<br>boyutu<br>(nm) | PDI  | $\lambda$ max<br>(nm) | Zeta<br>potansiyeli<br>(mV) | Verim<br>(mmolAu/L) |
|---------------------|---------------------------------|----------------------------|------|-----------------------|-----------------------------|---------------------|
| Turkevich           | Sodyum<br>sitrat                | 20.39±1.2                  | 0.21 | 519                   | -30.23                      | 0.03                |
| Çekirdek<br>büyütme | Sodyum<br>sitrat/<br>hidrokinon | 50.62±1.4                  | 0.08 | 535                   | -32.83                      | 0.05                |
| Çekirdek<br>büyütme | Sodyum<br>sitrat/<br>hidrokinon | 80.62±1.1                  | 0.07 | 564                   | -21.26                      | 0.005               |
| Turkevich           | Sodyum<br>sitrat                | 106.17±1.6                 | 0.05 | 575                   | -16.60                      | 0.006               |

### 3.2.2. Altın Nanoçubuklar

Tez kapsamında üç farklı en-boy oranına sahip altın nanoçubuklar sentezlenmiş olup TEM görüntüleri ve UV-Vis ölçümleri Şekil 3.15’de verilmiştir. TEM görüntüsü üzerinden yapılan ölçümlerde altın nanoçubukların 2.82, 3.39 ve 4.64 olmak üzere üç farklı en-boy (aspect ratio) oranına sahip olduğu gösterilmiştir. Bilindiği üzere altın nanoçubuklar, nanopartiküllere kıyasla optik özellikleri bakımından daha yüksek frekansa ve seçiciliğe sahiptir. Altın nanopartiküllerin plazmon rezonansı küresel simetriden dolayı simetriktir ve tek bir rezonans piki gösterirlerken altın nanoçubuklar geometrileri (uzunluk-genişlik) nedeniyle, iki rezonans piki gösterirler. Bunlardan biri elektronların uzunlamasına salınımına diğeri ise iletken elektronların yatay salınımına karşılık gelir (Şekil 3.16). Altın nanoçubuklarda rezonans frekansı, altın nanoçubukların en-boy oranına ve dielektrik çevreye (yani kırılma indisi) bağlıdır. Dielektrik ortamdaki duyarlılık, çubukların yüzeyinden artan mesafe ile katlanarak azalır. Sonuç olarak, "algılama hacmi" olarak adlandırılan, kırılma indisindeki değişiklikler izlenebilen altın nanorodların çevresinde sınırlı bir hacimde mevcuttur. Altın nanoçubuklarda, uzunlamasına plazmon bandı, kırılma indeksindeki değişikliklere daha duyarlıdır.



Şekil 3.15 Altın nanoçubukların TEM görüntüleri ve sönüm yoğunlukları



Şekil 3.16 Altın nanoçubukların yüzey plazmon rezonansı ve suda karşılık gelen elektronik soğurma spektrumu.

Altın nanoçubukların plazmon bandının en-boy oranına göre ayarlanabilen eşsiz şekli ve optik özellikleri nedeniyle altın nanoçubuklar, LSPR sensör alanında potansiyel göstermiş ve oldukça ilgi çekmiştir. Bazı çalışmalar altın nanoçubuk bazlı LSPR sensörünün, benzer yapıları sahip klasik olarak kullanılan küresel altın nanopartiküllere oranla daha yüksek bir hassasiyete sahip olduğu bildirilmiştir [104]. LSPR sensörlerinin üretiminde kullanılan altın nanoçubuklar, normal olarak, setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) yüzey aktif madde varlığında çekirdek aracılı (seed mediating) bir kimyasal yöntemle sentezlenir. Altın nanoçubukların yüzeyinde dengeleyici bir tabaka olarak çalışan CTAB molekülleri yoğun bir katman oluşturur. Altın nanoçubukların yatay plazmon bandı partikülün boyutuna ve çevreleyen refraktif indeks değişimine karşı fazla duyarlı değildir; oysa boyuna plazmon bandı, en-boy oranının artmasıyla kırmızıya kaymış ve kırılma indisi değişimine karşı çok daha duyarlı bulunmuştur. İki nanoçubuk bir araya getirildiğinde, biri tarafından üretilen yakın alan diğerini etkilemektedir. Nanoçubuk çifti arasındaki bu yakın alan etkileşimi ise tüm sistemin rezonans frekansını değiştirecektir [105].

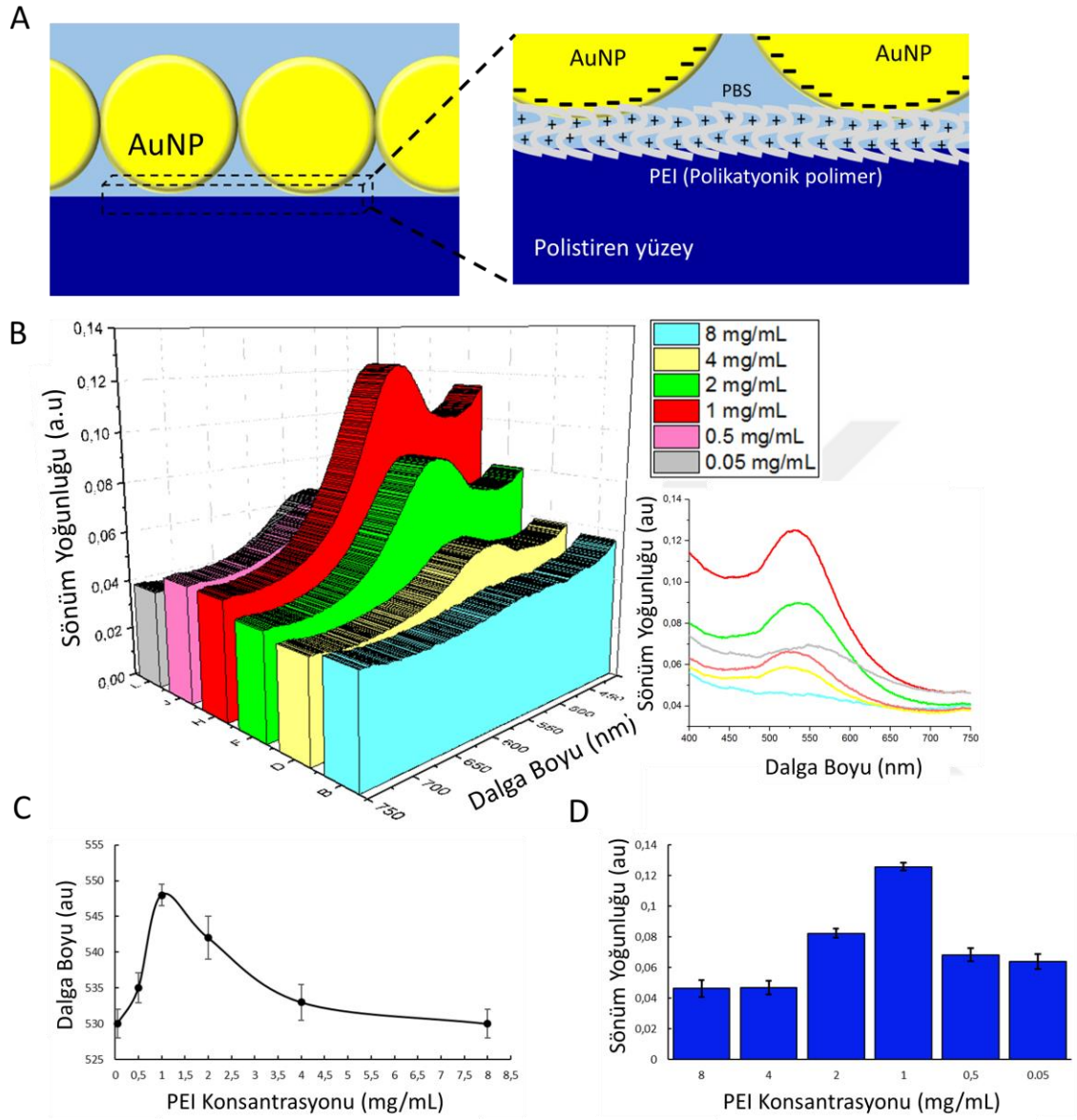
Deneyisel sonuçlar altın nanoçubukların LSPR spektralarının yüksek sönüm yoğunluğuna sahip olduğunu göstermesinin yanı sıra altın nanoçubukların sahip oldukları uzunluk ve genişlik rezonans piklerinde meydana gelen spektral kaymalar özellikle prostat kanseri biyobelirteç tayininde karışıklık yaratacağı için tezin bundan sonraki kısımlarında ve tayin çalışmalarında 50 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin kullanılması planlanmıştır.

### **3.3. Geliştirilen Nanoplazmonik Platformların Değerlendirilmesi**

#### **3.3.1. Altın nanopartiküllerin polistiren yüzeylere direkt immobilizasyonu ile hazırlanan plazmonik yüzeyler**

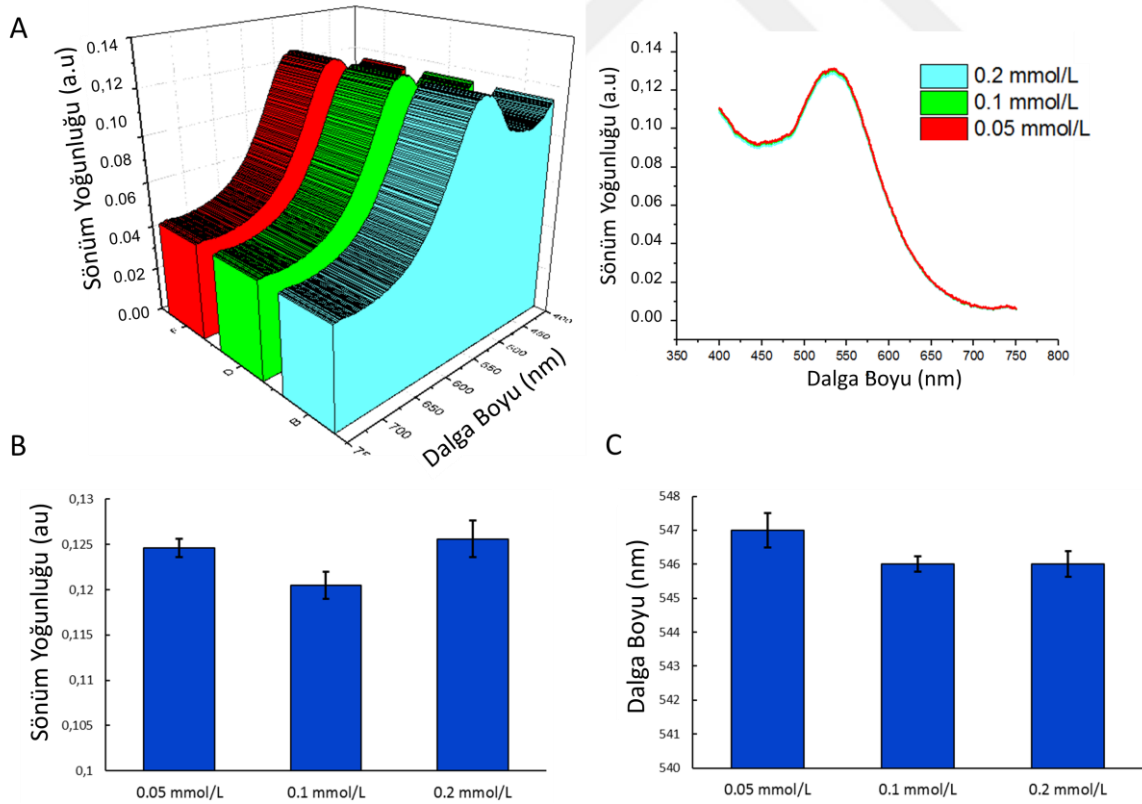
Bölüm 3.1’de tartışılan altın nanopartiküllerin teorik analiz sonuçları 50 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin daha yüksek oranda elektrik alan oluşturduklarını göstermiştir (Şekil 3.2). Ayrıca yapılan deneyisel sonuçlar en yüksek sönüm yoğunluğuna (a.u) 50 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 3.14). Bu nedenle PS yüzeylerde LSPR platformların oluşturulması için 50 nm ortalama partikül boyutuna sahip altın nanopartiküller kullanılmıştır. Son yıllarda ucuz ve maliyetsiz nanoplazmonik

platformlar üretmek için yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartiküller üzerine çalışmalar devam etmektedir. Kullanılan yöntemlerin büyük bir çoğunluğu  $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-CN$  gruplarının yüzeye işlevsellendirilmesiyle yüzeyler üzerine altın nanopartiküllerin immobilizasyonuna dayanmaktadır [63]. Bu yöntemlerde altın nanopartiküllerin yüzeye immobilizasyon yoğunluğu altın nanopartikülleri yüzeye immobilize edecek molekülün molekül ağırlığı ve konsantrasyonuyla bağlıdır. Bu çalışmada nanoplazmonik platformların üretimi için PS yüzeyler üzerinde pozitif (+) yüke sahip  $-NH_2$  grupları oluşturmak için polikasyonik bir polimer olan PEI kullanılmıştır. Bu amaçla, 96 kuyucuklu PS yüzeylerde altın nanoparçacık bağlanmasını incelemek için 0.05-8 mg/mL aralığında değişen farklı PEI konsantrasyonları PS yüzeylerle etkileştirilmiştir. LSPR sinyalindeki ölçüm alanı farklı konsantrasyonlarda PEI çözeltisi ile modifiye edilmiş ve polikasyonik yüzeyler üzerine 0.05 mmol/L konsantrasyonunda altın nanopartikül çözeltisi immobilize edilerek optimum LSPR sinyali için PEI konsantrasyonu seçilmiştir (Şekil 3.17 A). Şekil 3.17 B’de görüldüğü gibi her bir PEI konsantrasyonu için LSPR sinyalleri ölçülmüş ve 0.05, 0.5 ve 1 mg/mL PEI konsantrasyonlarında PS yüzeye bağlanan altın nanopartiküller sırasıyla  $530 \pm 2.0$ ,  $535 \pm 2.1$  ve  $548 \pm 1.5$  nm’de maksimum dalga boyu göstermişlerdir (Şekil 3.17 C). Dalga boyundaki bu artış yüzeye immobilize olan altın nanopartikül miktarındaki artışı göstermektedir. Ayrıca artan dalga boylarıyla LSPR spektralarının sönüm yoğunlukları da sırasıyla 0.064, 0.068 ve 0.120 (a.u)’ e ulaşmıştır (Şekil 3.17 D). Diğer ölçümlerde, 2, 4 ve 8 mg/mL olmak üzere giderek artan PEI konsantrasyonlarında maksimum dalga boyu sırasıyla  $542 \pm 3.0$ ,  $533 \pm 2.5$  ve  $530 \pm 2.0$  nm’de spektrumun soluna doğru (mavi kayma) kayarak artan PEI konsantrasyonlarında yüzeye immobilize olan altın nanopartiküllerin sayısı ve yoğunluğunda azalışa sebep olduğu görülmektedir (Şekil 3.17 C). Ayrıca azalan maksimum dalga boylarıyla birlikte LSPR spektralarının sönüm yoğunlukları sırasıyla 0.08, 0.04 ve 0.05 a.u’ya ulaşmıştır (Şekil 3.17 D). Sensör deneylerinde yüzey kimyasında olası değişimleri azalttığı için ve altın nanopartikül immobilizasyonunu en üst düzeye çıkarmak için en yüksek sönüm yoğunluğuna sahip olan 1 mg/mL PEI konsantrasyonu çalışmalar için optimum değer olarak seçilmiştir (Şekil 3.17B). Ayrıca dalga boyu ve yoğunluk ölçümlerinde meydana gelecek varyasyonları en aza indirmek için yüzeyler her bir modifikasyondan sonra PBS (pH: 7.2) ile 3 kez yıkanmıştır.



Şekil 3.17 PS yüzeylere farklı konsantrasyonlarda PEI immobilizasyonu sonucu meydana gelen spektral tepe kaymaları; A) PS yüzeylerde PEI aracılığıyla altın nanopartiküllerin tutunması, B) Farklı PEI konsantrasyonlarında LSPR spektralleri, C) Farklı PEI konsantrasyon aralığındaki tepe noktaları ( $n = 6$ ). PEI konsantrasyonu ve dalga boyu kayması arasında doğrusal olmayan korelasyon gözlemlenmiştir. D) Farklı PEI konsantrasyonlarındaki sönüm yoğunlukları. Dalga boyu ölçümleri için tüm veriler, dalga boyu ölçümleri ortalaması  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak sunulmuştur.

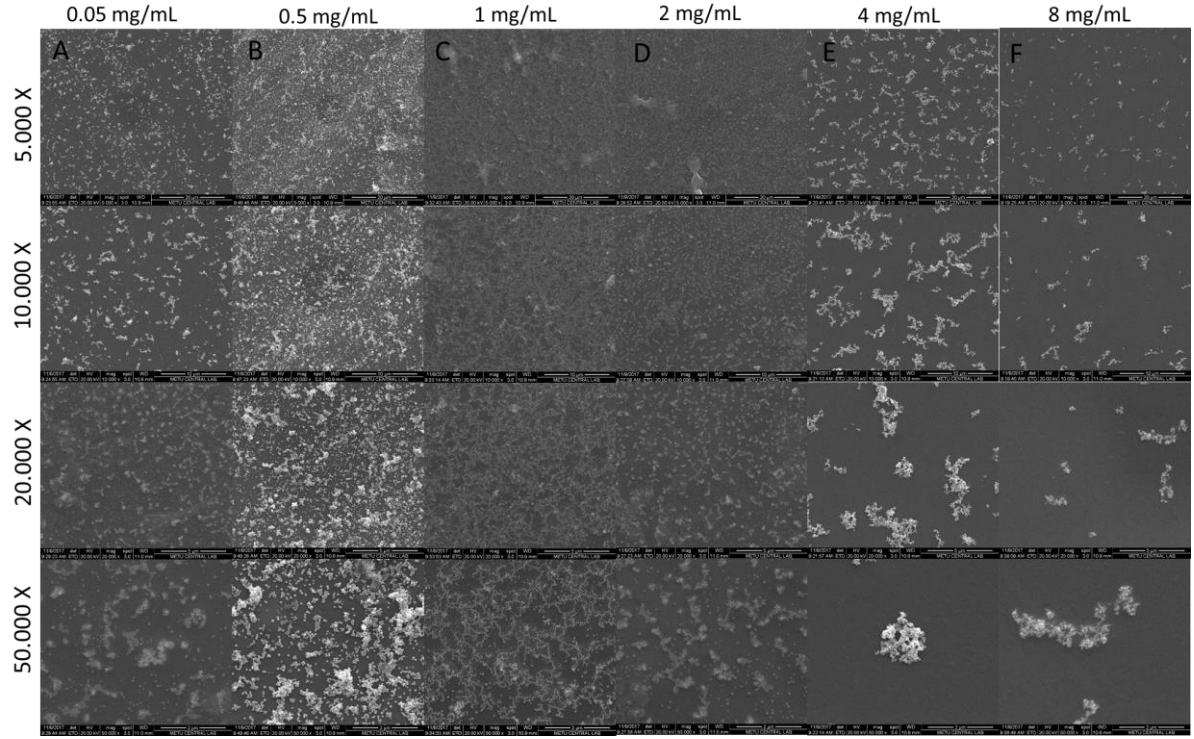
Altın nanopartiküllerin PS yüzeylere immobilizasyonu için optimum PEI konsantrasyonu belirlendikten sonra PEI ile fonksiyonellendirilmiş polikationik yüzeylerin tamamının altın nanopartiküllerle kaplandığını test etmek için altın nanopartiküllerin konsantrasyonları sırasıyla 0.1 mmol/L ve 0.2 mmol/L artırılarak yüzeyler altın nanopartiküllerle etkileşime bırakılarak LSPR spektralleri ölçülmüştür (Şekil 3.18). Yapılan ölçümlerde maksimum dalga boyu 0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L ve 0.2 mmol/L konsantrasyonları için  $547 \pm 0.5$ ,  $546 \pm 0.2$  ve  $546 \pm 0.3$  nm ölçülmüştür. Bu sonuçlar yüzeye kaplanan altın nanopartikül miktarında istatistiki olarak anlamlı bir artışın olmadığını göstermiştir ( $n=6$   $p<0.05$ ). Bu nedenle tezin bundaki sonraki kısımlarında nanopartiküler agregasyonu minimuma indirmek hem de nanopartikül çözeltilerinin stabilitesini bozmamak için nanoplazmonik yüzeyler için 0.05 mmol/L konsantrasyonunda altın nanopartiküller kullanılmıştır. Nanoplazmonik yüzeyler hakkında daha detaylı bilgi sahibi olmak için yüzey analizleri yapılmıştır.



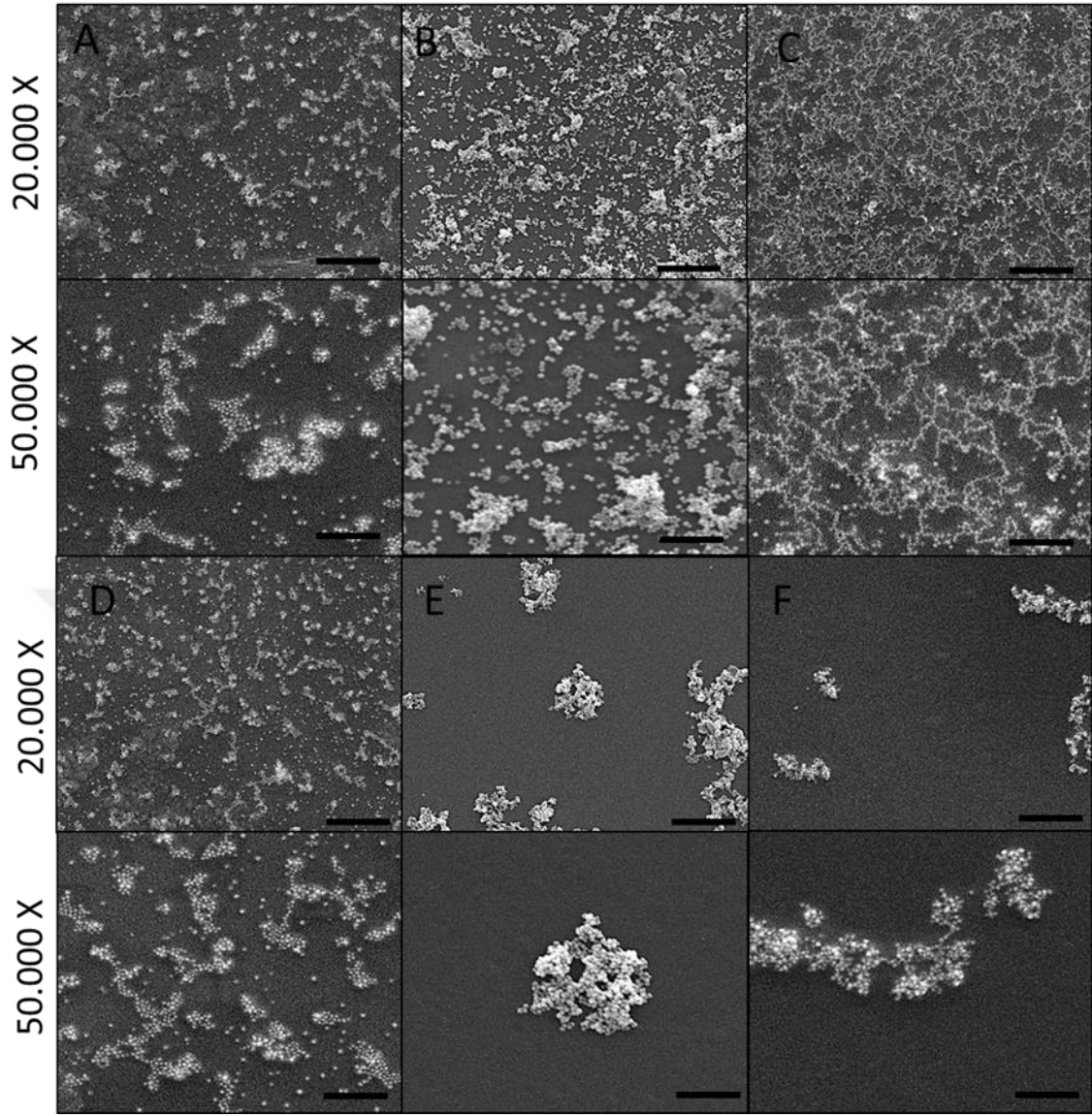
Şekil 3.18 Farklı altın nanopartikül konsantrasyonlarının (0.05, 0.1 ve 0.2 mmol/L) LSPR spektrallerindeki değişimi. A) LSPR spektralleri. B) sönüm yoğunlukları, C) LSPR spektrallerindeki maksimum dalga boyları.

Altın nanopartiküllerden oluşan nanoplazmonik yüzeyler, nanoküre litografisi (NSL), blok kopolimer nanolitografi (BCML) veya polimer kaplı nanoparçacıklar gibi kendinden oluşan yöntemler kullanılarak oluşturulur. Ancak bu gibi yöntemlerde oluşturulan nanoplazmonik yüzeyler partiküller arası mesafelerine bağlı olarak plazmonik eşleşme gösterememiştir [106, 107]. Özetle şimdiye kadar plazmonların güçlü bir şekilde etkileşime girdiği sıralı nanoparçacık dizileri için yeterli parçacık mesafelerine sahip altın nanoyapılar litografik yöntemlerle üretilmemiştir. Ayrıca litografik yöntemlerin sofistike laboratuvar ekipmanları gerektirmesi ve maliyetli nanoplazmonik sistemlerin geliştirilmesinde yeni yöntemlerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu çalışmada nanoplazmonik yüzeyler destek malzemesi olan PS yüzeye polikasyonik bir polimer olan PEI kullanılarak immobilize edilmiştir.

Farklı PEI konsantrasyonlarında (0.05-8 mg/mL) altın nanopartiküllerin PS yüzeyler üzerinde dağılımları SEM kullanılarak incelenmiştir (Şekil 3.19 ve Şekil 3.20). Elde edilen sonuçlar yüksek PEI konsantrasyonlarında (2, 4 ve 8 mg/mL) altın nanopartiküllerin PS yüzeylere immobilizasyonun çok düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca düşük PEI konsantrasyonlarında (0.05 ve 0.5 mg/mL) altın nanopartiküllerin PS yüzeylere immobilizasyonunun düşük olduğu gözlemlenmiştir. Altın nanopartiküllerin PS yüzeylere en iyi immobilize olduğu konsantrasyon 1 mg/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca 1 mg/mL PEI konsantrasyonu dışındaki konsantrasyonlarda altın nanopartiküllerin yüzeylere agregatlar şeklinde immobilize olduğu ve yüzey stabilitelerini kaybettikleri görülmüştür. Bunun en büyük sebeplerinden birisi de yüksek PEI konsantrasyonlarında (2, 4 ve 8 mg/mL) yüzeye bağlanan PEI zincirlerinin altın nanopartiküller için sterik engel oluşturmalarıdır. Bu nedenle yüksek PEI konsantrasyonlarında altın nanopartiküller büyük PEI zincirleri arasında büyük agregantlar şeklinde yüzeylere immobilize olmuşlardır. Bu da yüzeye tutunan altın nanopartikül sayısında düşüşe ve bununla birlikte düşük yoğunluğa sahip LSPR spektralarına sebep olmuştur (Şekil 3.17 turkuaz, yeşil ve sarı spektralar). 1 mg/mL'dan daha düşük PEI konsantrasyonlarında da yüzeye tutunan altın nanopartiküller genellikle tek sıra halinde yüzeye tutunmuş ancak PS yüzeye bağlanan PEI zincirlerinin sayısı yeteri kadar altın nanopartikülü tutamarak LSPR sinyallerinin yoğunluğunda düşüşe sebep olmuştur.

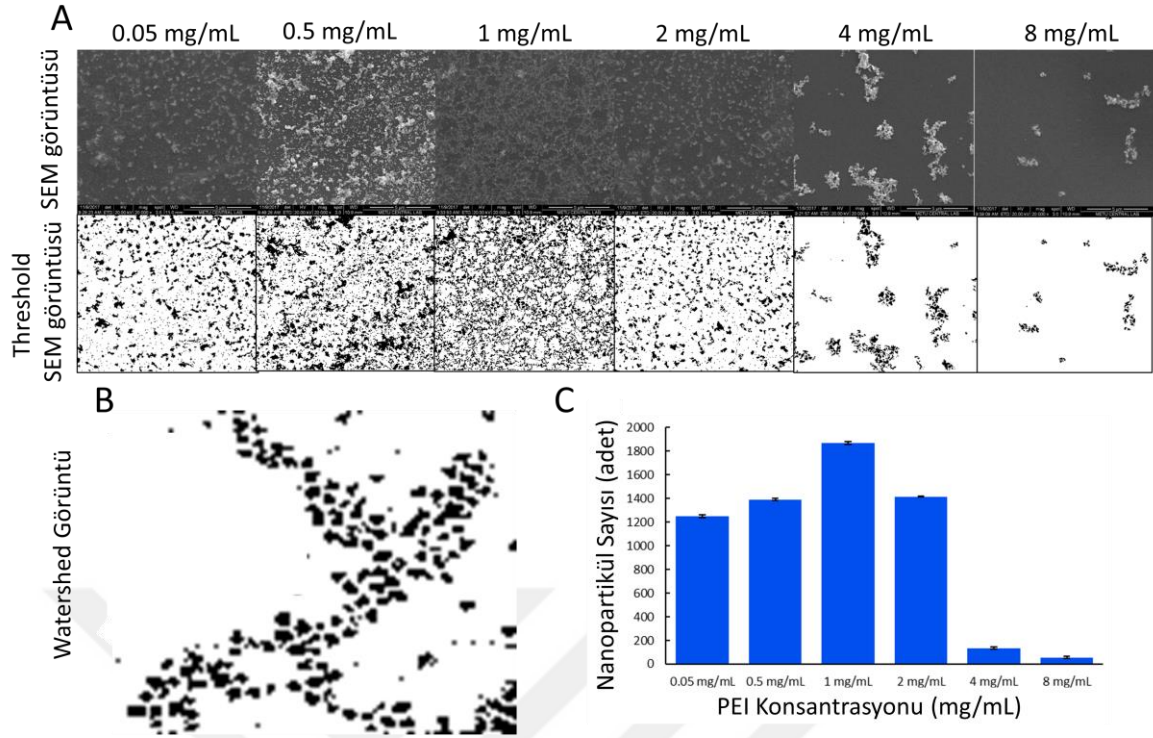


Şekil 3.19 Farklı PEI konsantrasyonlarının (0.05-8 mg/mL) altın nanopartiküllerin PS yüzeyler üzerinde dağılımlarının farklı magnifikasyonlarda (5000X, 10000X, 20000X ve 50000X) SEM görüntüsü. A) 0.05, B) 0.5, C) 1, D) 2, E) 4 ve F) 8 mg/mL. Skala bar 2µm.



Şekil 3.20. Farklı PEI konsantrasyonlarının (0.05-8 mg/mL) altın nanopartiküllerin PS yüzeyler üzerinde dağılımlarının SEM görüntüsü; A) 0.05, B) 0.5, C) 1, D) 2, E) 4 ve F) 8 mg/mL. Skala bar 1 $\mu$ m.

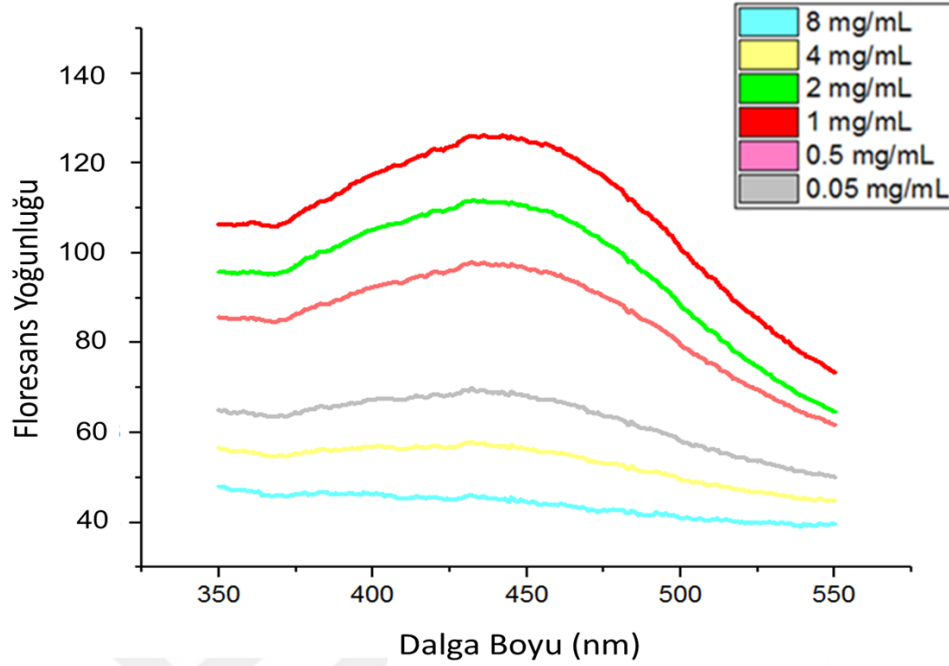
Altın nanopartiküllerin haritalama yöntemi ve yüzey yoğunluklarının hesaplanması nanopartiküllerin SEM görüntülerinin Image J yazılımı kullanılarak analiz edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.21). Buna göre 0.05, 0.5, 1, 2, 4 ve 8 mg/mL PEI konsantrasyonlarında yüzeye immobilize edilen altın nanopartikül sayıları 25  $\mu\text{m}^2$ 'de sırasıyla  $1249 \pm 10.5$ ,  $1391 \pm 10.4$ ,  $1867 \pm 13.0$ ,  $1416 \pm 5.2$ ,  $134 \pm 9.6$  ve  $56 \pm 10.2$  olarak hesaplanmıştır. Buna göre PS yüzeylerdeki en büyük partikül yoğunluğu 1mg/mL PEI konsantrasyonunun kullanıldığı yüzeylerde görülmüştür. Bu sonuçlar LSPR sinyal ölçümleriyle de örtüşmektedir.



Şekil 3.21 Farklı PEI konsantrasyonlarında (0.05-8 mg/mL) PS yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin SEM görüntüleri ve Image J analizleri A) Farklı PEI konsantrasyonlarında (0.05-8 mg/mL) PS yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin SEM görüntüleri ve eşik değeri alınmış SEM görüntüleri B) Üst üste çakışan ve birbirleriyle bitişik olan nanopartiküllerin birbirlerinden ayrılarak analize dahil edilmesi (Watershed). C) Farklı PEI konsantrasyonlarında (0.05-8 mg/mL) PS yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartikül sayıları.

Yüzeye kaplanan altın nanopartiküller hakkında bilgi sahibi olabilmemizin diğer bir yolu da Floresans spektroskopisi yöntemidir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda PEI kaplı yüzeyler 0.05 mmol/L konsantrasyonunda altın nanopartikülle kaplandıktan sonra 308 nm uyarılma dalga boyunda floresan yoğunluk ve sönüm spektrumları çekilmiş ve Şekil 3.22’de gösterilmiştir. 50 nm partikül boyutuna sahip nanopartiküller için Fotoluminesans (PL) bandının merkezi 444 nm’de gözlenmiştir. Yüzeye kaplanan nanopartikül yoğunluğu ile birlikte floresan yoğunluğunda da bir artış gözlenmiştir. 308 nm’de gönderilen gelen ışık, yüzey plazmon tutarlı elektron hareketin yanı sıra d elektronlarının uyarımına yol açmıştır. PS yüzeye yerleştirilmiş nanopartiküllerin emisyon bandının yoğunluğu, yüzeye kaplanan partikül miktarı arttıkça artmış ve bu eğilim altın nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonansı bandına karşılık gelen değişiklikleriyle de uyumludur (Şekil 3.17). Bu sonuçlar floresans

emisyon band yoğunluğunun ve altın nanopartiküllerin absorpsiyon bandının yüzüye kaplanan altın nanopartikül miktarına bağlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.22 PS yüzeylerin altın nanopartiküllerle yüzey modifikasyonu ve değişen PEI konsantrasyonlarına karşılık gelen floresans spektrumları.

LSPR spektralarının ölçümü, SEM yüzey analizleri ve floresan spektroskopisi ölçümleri 1 mg/mL PEI konsantrasyonda altın nanopartikül immobilizasyonunu en üst düzeyde olduğu ve en yüksek sönüm yoğunluğuna sahip LSPR spektrumunu verdiği için bundan sonraki çalışmalar için referans yüzey olarak seçilmiş ve standart nanoplazmonik yüzey olarak isimlendirilmiştir.

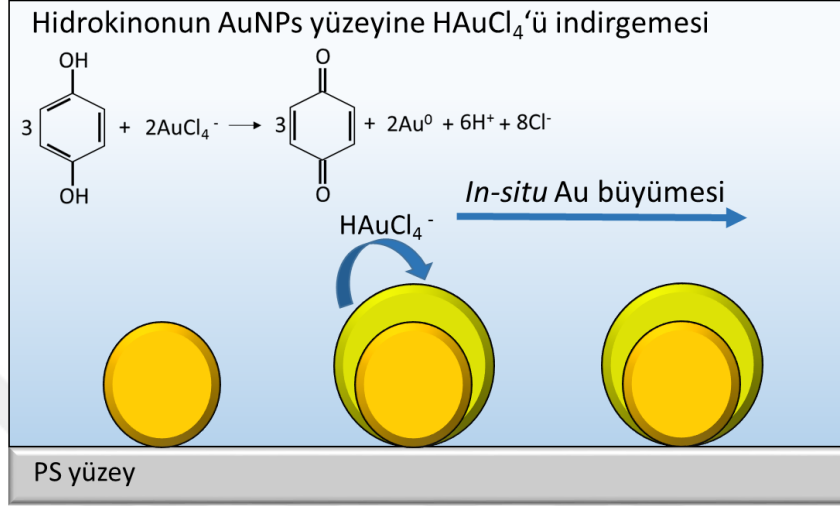
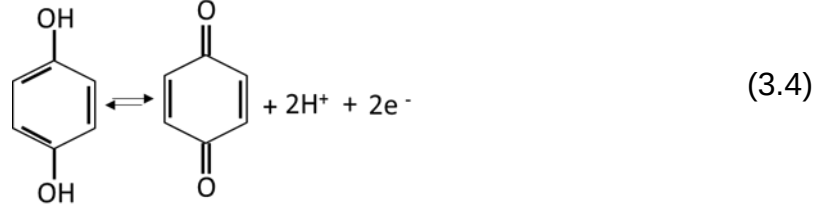
### 3.3.2. Altın nanopartiküllerin “*in-situ*” olarak PS yüzeylerde büyütülmesiyle geliştirilen nanoplazmonik yüzeyler

Bölüm 1.1’de detaylı bir şekilde anlatıldığı üzere LSPR ölçümü sensör yüzeyinde kırılma indisindeki meydana gelen değişikliklerle ifade edilmektedir. Bu pratikte metalik sensör yüzeyinde biriken analit miktarına çevrilir. Analit miktarının tayini için analitin doğrudan sensör yüzeyindeki ligandlar tarafından bağlanması ve yüzeyde kırılma indisinde ölçülebilir bir fark yaratması beklenir. Bu durum sensör yüzeyine bağlanan analitin molekül ağırlığına doğrudan bağlıdır ve yüzeyde kırılma indisinde

ölçülebilir bir değişikliğe sebep olması için analitin molekül ağırlığının 1000 Da dan büyük olması istenilir ve 500 Da'dan daha küçük molekül ağırlığına sahip analitlerin tespiti mümkün olmamaktadır [7]. Genellikle düşük molekül ağırlığına sahip analitlerin sensör yüzeyinde ölçülebilir bir kırılma indisi farkı yaratabilmesi için yüksek konsantrasyonlarda olmaları gerekmektedir. Literatürde düşük molekül ağırlığına sahip analitlerin tespiti için iki farklı strateji izlenmektedir. Bunlardan ilki sandiviç ve enzimatik yöntemlerdir. Bu yöntemlerde düşük konsantrasyonlardaki analitler ikinci bir konjuge antijen vasıtasıyla yüzelere tutunma yoğunluğu artırılır. Enzimatik yöntemlerde ise analiti katalizleyen enzim analitle birleşerek sensör yüzeyinde bir çökelme meydana getirir bu da düşük konsantrasyondaki düşük molekül ağırlığına sahip analitlerin yüzeye daha fazla oranda tutunarak yüzeyde ölçülebilir bir kırılma indisi farklı oluşturur. İkinci yaklaşım ise litografik ya da metal kaplama yöntemleri (altın kaplama ve post metallizasyon) kullanarak plazmonik yüzeylerde sinyal yoğunluğu ve hassasiyetini arttırmaktır.

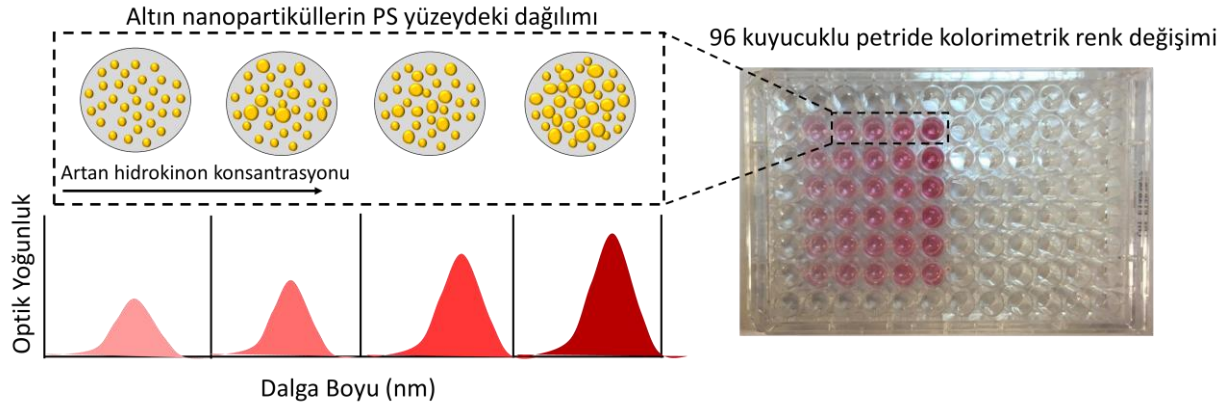
Tezin bu bölümünde ise nanoplazmonik platformların hassasiyetinin artırılması için maliyetsiz yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yaklaşımda amaç yüzeye immobilize olmuş ve çevresinde yüksek elektrik alan oluşturma kapasitesine sahip nanoplazmonik yüzeylerde altın nanopartikülleri *in-situ* olarak büyütürken partiküllerin plazmonik eşleşmesiyle birlikte partiküller arası elektrik alan etkileşimlerini arttırmaktır. Bu yeni yöntemde LSPR sinyallerinde daha yüksek yoğunluklarda dalga boyu kaymaları elde edilerek düşük molekül ağırlığına sahip biyobelirteçlerin tayininde etkili olacağı düşünülmüştür.

Bu yöntemde, yüzeye immobilize edilerek sabitlenmiş altın nanopartiküllerin yüzeyine iyonik bir metal kompleksi olan  $AuCl_4$ 'ün indirgenmesi için  $HAuCl_4$  çözeltisi ve indirgeyici madde olarak da hidrokinon kullanılmıştır (Şekil 3.23). Hidrokinon, metal nanopartikül sentezi için zayıf bir indirgen olarak kullanılır, ancak genellikle tohum (seed) parçacıklarının yüzeyinde metal tuzlarının kolayca indirgenmesi için çözeltide altın tohum parçacıklarının olması gereklidir. Hidrokinon ilk aşamada iki elektron yükseltgeyerek benzokinona dönüşür ve benzokinon altın tuzunu indirgeyerek yüzeyde seçilimli bir büyüme gerçekleştirir [108].



Şekil 3.23 PS yüzeye immobilize olmuş altın nanopartiküllerin yüzeylerine HAuCl<sub>4</sub>'ün indirgenmesi ve partikül yüzeyinde kontrollü büyümesi.

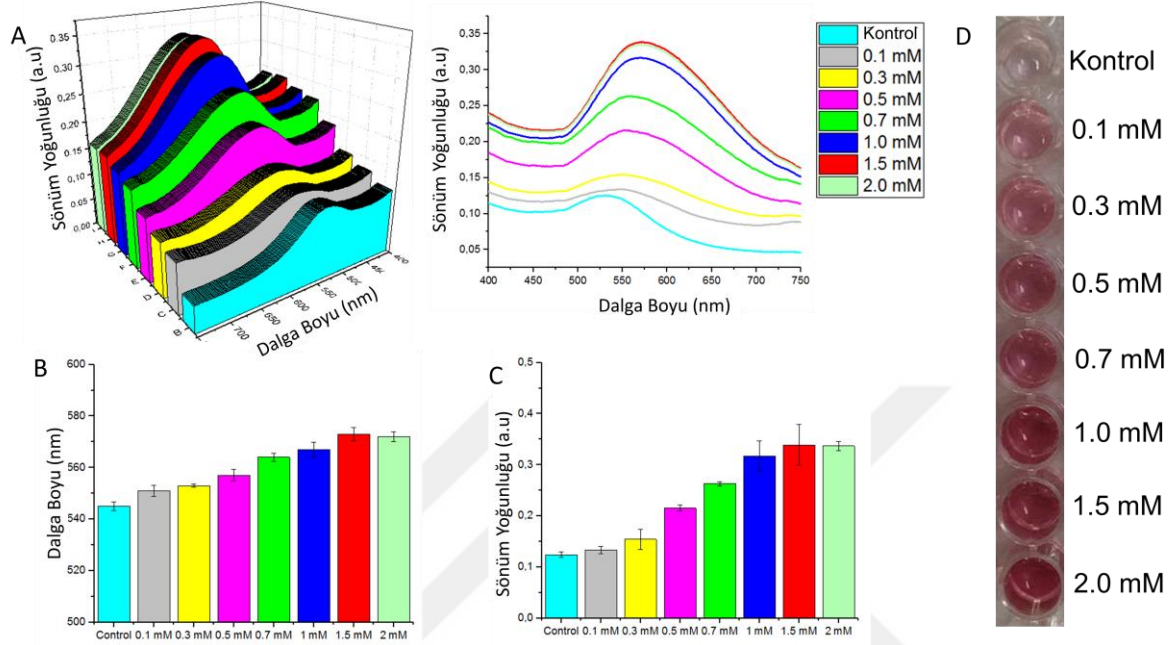
PS yüzeylerde hidrokinon konsantrasyonunun altın büyümesine etkisini incelemek için daha önceden PEI modifikasyonu yapılmış ve altın nanopartiküllerin kaplandığı (Standart nanoplazmonik yüzey) yüzeylere 100µL farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.1, 1.5 ve 2 mM) hidrokinon ve 100µL HAuCl<sub>4</sub> çözeltisi eklenerek partikül büyümesi ve yüzey morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir. Ayrıca her bir yüzeyden spektral ölçümler alınarak LSPR spektralarındaki sönüm yoğunlukları ve maksimum dalga boyu kaymaları incelenmiştir. Artan hidrokinon konsantrasyonlarında 96 kuyucuklu petri yüzeylerinde gözle görülebilir kolorimetrik bir kırmızılaşmayla birlikte LSPR spektralarında *in-situ* altın büyümesiyle birlikte spektrumun sağına doğru kırmızı bir kayma gözlenmiştir (Şekil 3.24).



Şekil 3.24 Artan hidrokinon konsantrasyonu ile birlikte 96 kuyucuklu petri kaplarındaki gözle görülebilir renk değişimi.

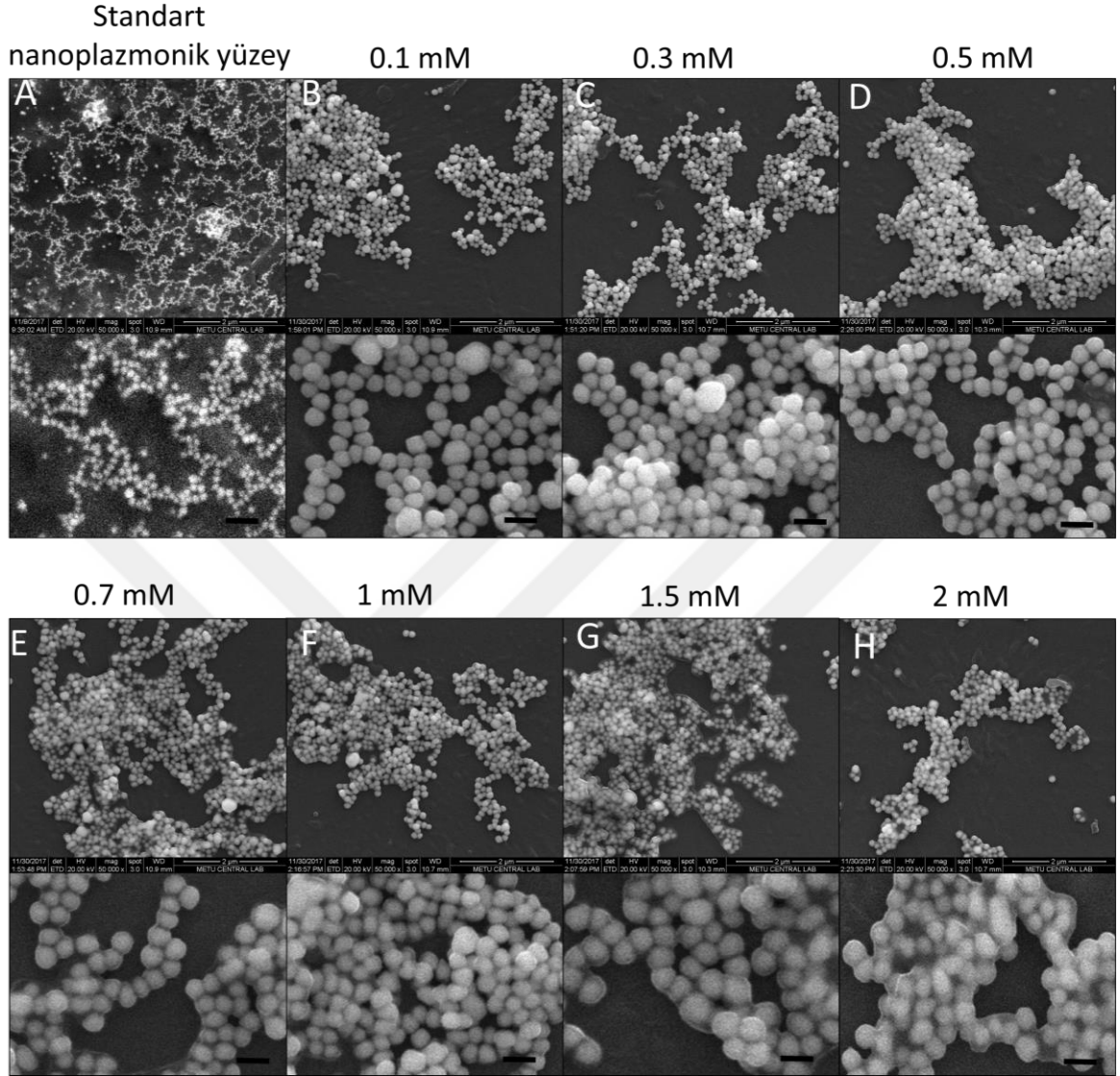
LSPR spektra ölçümleri, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 1.5 ve 2 mM hidrokinon konsantrasyonları için sırasıyla  $551 \pm 2.1$ ,  $553 \pm 0.7$ ,  $557 \pm 2.3$ ,  $564 \pm 1.6$ ,  $567 \pm 2.8$ ,  $573 \pm 2.6$  ve  $572 \pm 1.9$  nm'de maksimum dalga boyu göstermiştir. 1, 1.5 ve 2 mM hidrokinon konsantrasyonlarında ölçülen maksimum dalga boyları kontrol grubuna göre (standart nanoplazmonik yüzey  $548 \pm 1.5$  nm) anlamlı olarak kayma göstermiştir ( $n=6$   $p<0.05$ ). Ayrıca sönüm yoğunlukları 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 1.5 ve 2 mM hidrokinon konsantrasyonları için sırasıyla 0.12, 0.13, 0.15, 0.21, 0.26, 0.31, 0.33 ve 0.33 (a.u) olarak ölçülmüştür (Şekil 3.25 A, B ve C). 0.7, 1, 1.5 ve 2 mM hidrokinon konsantrasyonlarında ölçülen sönüm yoğunlukları kontrol grubuna göre (standart nanoplazmonik yüzey 0.12) anlamlı olarak değişmiştir ( $n=6$   $p<0.05$ ). Sonuç olarak artan hidrokinon konsantrasyonu ile birlikte altın nanopartiküllerin yüzeyinde  $\text{HAuCl}_4$  tuzlarının indirgenmesinde bir artış olduğu görülmüş, bu artış LSPR spektralarına kırmızı kayma olarak yansımıştır. Ayrıca  $\text{HAuCl}_4$  tuzlarının altın nanopartiküllerin yüzeyinde *in-situ* birikimi arttıkça sönüm yoğunluklarında da 3 kat kadar artış gözlenmiştir. Bu durum nanoplazmonik platformun hassasiyetini artırarak LSPR sinyalinin daha ölçülebilir seviyelere ulaştığını göstermektedir. Ayrıca, artan hidrokinon konsantrasyonu ile birlikte altın nanopartiküllerin PS yüzeyinde büyütüldükleri kolorimetrik olarak da gözlemlenmiştir (Şekil 3.25 D).  $\text{HAuCl}_4$  tuzlarının indirgenmesindeki artış 1.5 mM hidrokinon konsantrasyonuna kadar devam etmiş 2 mM hidrokinon konsantrasyonunda ise durmuştur bu da ortama konulan  $\text{HAuCl}_4$  tuzlarının tamamının indirgendiğini ve altın nanopartiküllerin yüzeyinde *in-situ* olarak toplandığını göstermektedir. Bu nedenle altın

nanopartiküllerin *in-situ* olarak statik ve dinamik ortamlarda büyütülmesi için 1.5 mM hidrokinon konsantrasyonu seçilmiştir.

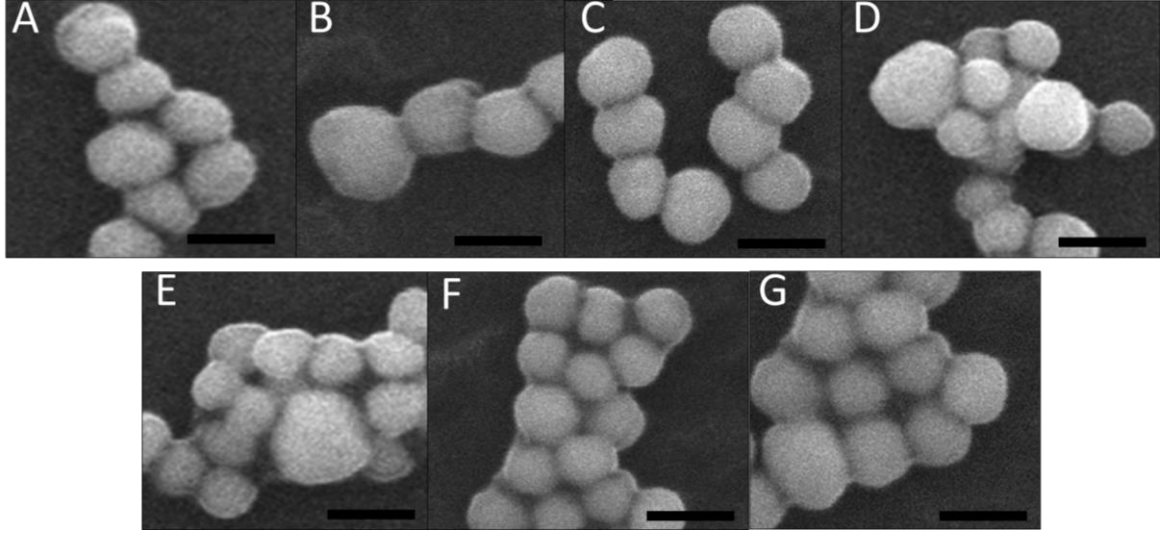


Şekil 3.25 Bölüm 3.3.2’de optimize edilen 1 mg/mL konsantrasyonunda PEI kullanılarak altın nanopartiküllerin (50 nm) PS yüzeylere yüksek oranda immobilizasyonunun gerçekleştirilmesinden sonra bu partiküllerin PS yüzeyde (*in-situ*) kontrollü olarak büyümesini incelemek için optimum hidrokinon (zayıf indirgen) konsantrasyonunun belirlenmesi. Kontrol grubu 1mg/mL PEI varlığında PS yüzeye immobilize edilen altın nanopartiküllerin oluşturduğu nanoplazmonik yüzeyler seçilmiştir (Standart nanoplazmonik yüzey). Deneyler boyunca ortama eklenen  $\text{HAuCl}_4$  konsantrasyonu (1mM) sabit tutulmuştur. A) 0.1-2 mM hidrokinon ve 1mM  $\text{HAuCl}_4$  varlığında statik koşullarda (96 kuyucuklu petri) altın nanopartiküllerin *in-situ* olarak büyümeleri sonucu oluşan LSPR spektrası ve LSPR spektrasının enine kesiti. B) Farklı hidrokinon konsantrasyonları için elde edilen LSPR spektralarının maksimum dalga boyları ( $\lambda_{max}$ ). C) Farklı hidrokinon konsantrasyonları için elde edilen LSPR spektralarının maksimum sönüm yoğunlukları. D) Farklı hidrokinon konsantrasyonlarının nanoplazmonik yüzeylerde meydana getirdikleri *in-situ* büyümenin 96 kuyucuklu petri kaplarında makroskopik olarak gözlenmesi.

PS yüzeylere immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin farklı hidrokinon konsantrasyonlarında *in-situ* büyütülmesini morfolojik olarak incelemek için SEM yüzey analizleri yapılmıştır. Yapılan yüzey ölçüm analizleri sonucu 50 nm ortalama partikül büyüklüğüne sahip altın nanopartiküllerin hidrokinon konsantrasyonu 1.5 mM 'a ulaştığında  $110 \pm 14$  nm'ye kadar büyüdüğünü göstermektedir ( $n=100$   $p<0.05$ ). Altın nanopartiküllerin yüzey morfolojisi incelendiğinde standart nanoplazmonik yüzeylerde 50 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde tek sıra halinde ve birbirleriyle bağlantılı zincirler oluşturacak şekilde dizildiğini gösterirken (Şekil 3.26 A), artan hidrokinon konsantrasyonu ile birlikte altın nanopartiküllerin büyümeleriyle birlikte agregatlar oluşturduğu ve PS yüzeylerde ikinci ve üçüncü katmanları oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.26 B, C, D, E, F, G ve H). Bunun en büyük nedeni hidrokinonun  $\text{HAuCl}_4$  tuzlarını altın nanopartikül yüzeylerine indirgedikten sonra yüzeyde partikül büyümesiyle birlikte metalizasyona devam ederek yüzeyde yeni altın nanopartiküllerinin katmanlar halinde oluşturmaya devam etmesidir. Altın nanopartiküllerin daha yakın görüntüleri Şekil 3.27'de verilmiştir.



Şekil 3.26 Değişen hidrokinon konsantrasyonlarında (0.1-2 mM) PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntüleri (Mag: 50 000X) (Altta SEM görüntülerinde Skala Bar: 200 nm Mag: 80 000X) A) Standart nanoplazmonik yüzey, B) 0.1 mM, C) 0.3 mM, D) 0.5 mM, E) 0.7 mM, F) 1mM, G) 1.5 mM ve H) 2mM.



Şekil 3.27 Değişen hidrokinon konsantrasyonlarında (0.1-2 mM) PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntüleri (Skala Bar: 100 nm Mag:100 000 X). A) 0.1 mM, B) 0.3 mM, C) 0.5 mM, D) 0.7 mM, E) 1mM, F) 1.5 mM ve G) 2mM.

Spektral ölçümlerde artan hidrokinon konsantrasyonuyla meydana gelen kırmızı kayma ve sönüm yoğunluğu artışı yüzeyde biriken altın nanopartiküllerin miktarının ve etkileşiminin (elektrik alan arttırımı) arttığını göstermektedir. Literatür çalışmaları altın nanopartiküllerin kolloid çözeltileri halindeyken veya yüzeylerde agregatlar oluşturduklarında altın nanopartiküller arasında plazmonik eşleşmenin arttığı ve bunun da partiküller arası elektrik alanların arttığını rapor ederek bu plazmonik eşleşmenin LSPR sinyalinde artışa sebep olduğunu belirtmişlerdir [1, 109]. Statik koşullarda altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde agregatlar oluşturarak büyümesi LSPR sinyalinde anlamlı bir artış sağlasa da bundan sonraki yüzey modifikasyonu ve biyobelitelerin tayin çalışmalarında varyasyonlara sebep olacağı bilinmektedir. Ayrıca statik reaksiyon ortamları özellikle yüzey ve substrat arasında verimli etkileşimi ve kütle transferini tam olarak sağlayamamaktadır [110].

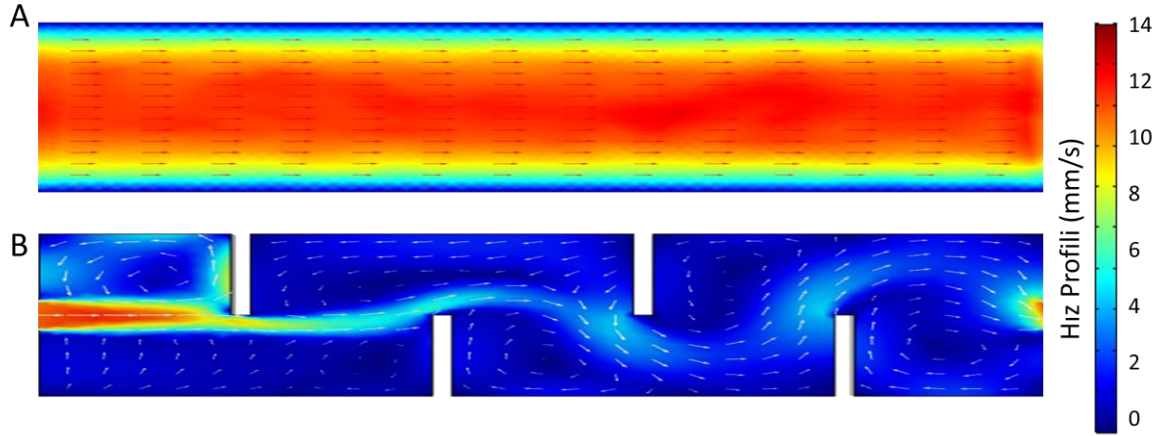
Mikroakışkan sistemler reaksiyon koşullarını mikro boyutlarda hassas bir şekilde manipüle edebilen bir teknolojidir. Son yıllarda mikroakışkan akış sistemleri nanoyapıların boyut dağılımı ve morfolojisi üzerinde kontrolün sağlanmasında en uygun yol olarak görülmektedir [72, 73]. Mikroakışkan akış sistemleri, akış hızı kontrolü (stokiyometrik oran), reaktif transport kontrolü (hassas zaman aralıkları ve istenen konum) ve akış yolu kontrolü (mikroakışkan kanal geometrisi) gibi nano

sentezde kritik aşamalarının ayarlanmasında büyük bir potansiyele sahiptir. Bu kontrol mekanizması yüksek yüzey alanı/hacim oranlarına bağlı olarak mikroakışkan kanallar içinde gelişmiş kütle taşınmasıyla mümkün hale getirilmiştir [111].

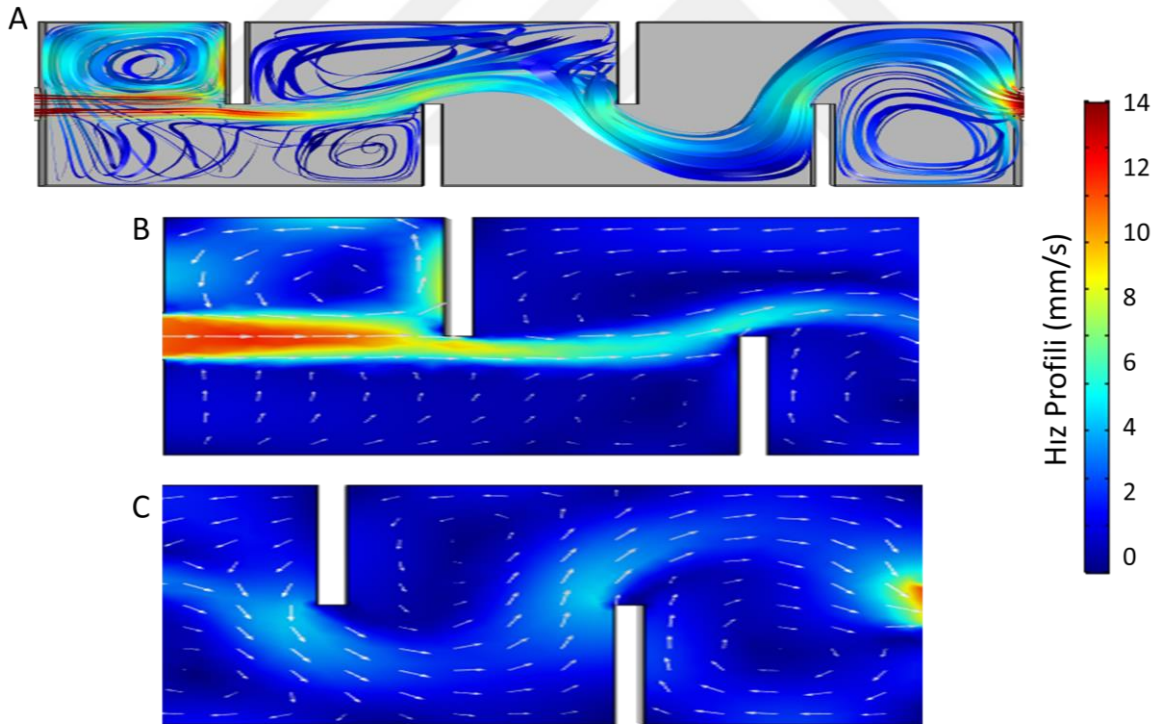
Tez çalışmasında altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde daha kontrollü bir şekilde büyütme amacıyla mikroakışkan çipler geliştirilmiştir. Mikroakışkan çiplerde oluşturulan dimanik reaksiyon ortamları yüzey ve reaktifler arasındaki difüzyon ve kütle transferini arttırdığı gibi mikroakışkan kanallarda manipule edilen akış rejimi de bu parametreleri büyük ölçüde etkilemektedir [111]. Bu nedenle yüzeyde *in-situ* partikül büyümesine farklı akış rejimlerinin etkilerinin incelenmesi için laminar ve türbülans akış rejimlerine sahip mikroçipler üretilmiştir (Şekil 2.6).

### **3.3.3. Mikroçip sistemlerde akış dinamiklerinin nanoplazmonik yüzeylere etkisi**

Mikroakışkan çiplerin tasarımı için mikro işleme teknolojilerinden biri olan lazer kesici kullanılmıştır. Son zamanlarda mikroakışkan çiplerin üretiminde düşük maliyetli olması ve toksik çözeltiler kullanılmadan hazırlanması nedeniyle lazer kesici yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır [112]. Bu çalışmada 40x10 mm boyutlarında kesilmiş PS yüzeylere 1.5 mm yüksekliğe ve 30 mm x 5 mm boyutlarına sahip PMMA tabakalar kullanılarak laminar ve türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanallar oluşturulmuştur. Mikrokanallar içerisindeki akış rejimini karakterize etmek için Computational Fluid Dynamics (CFD) analizi kullanılmıştır (Şekil 3.28 ve 3.29). CFD sonuçları laminar akışın olduğu mikroakışkan kanalda maksimum akış hızının 10.2 mm/s'ye ulaştığı belirlenmiştir. Laminar akışlı kanalda hız profilinin homojen dağıldığı gözlenirken mikroakışkan kanalın ortasından kenarlara doğru akış hızında yavaşlama görülmüş ve akışın 2.7 mm/s'ye kadar düştüğü hesaplanmıştır. Türbülans akış rejimine sahip mikroçipte ise akışkan hızı kanalın giriş portunda 10.5 mm/s ile maksimum akış hızına ulaşılırken kanalın diğer kısımlarında 2.2-10.5 mm/s arasında değişkenlik göstermektedir. CFD analizinde kırmızı ve beyaz oklar mikroakışkan kanal içerisindeki sıvı hareketinin yönünü göstermektedir. Şekil 3.29 A türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanal içerisinde akan sıvının 3 boyutlu görüntüsünü göstermektedir. Şekil 3.29 B ve C ise türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanaldaki sıvı hareketlerini daha detaylı bir şekilde göstermektedir.



Şekil 3.28 PS yüzeylere immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin *in-situ* büyümesini etkileyen akış dinamikleri ve akış hızı profilleri (Computational fluid dynamics (CFD) Analizi). A) Laminer akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın akış hızı profili (kırmızı oklar akış yönünü ve hareketini göstermektedir). B) Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın akış hızı profili (beyaz oklar akış yönünü ve hareketini göstermektedir).



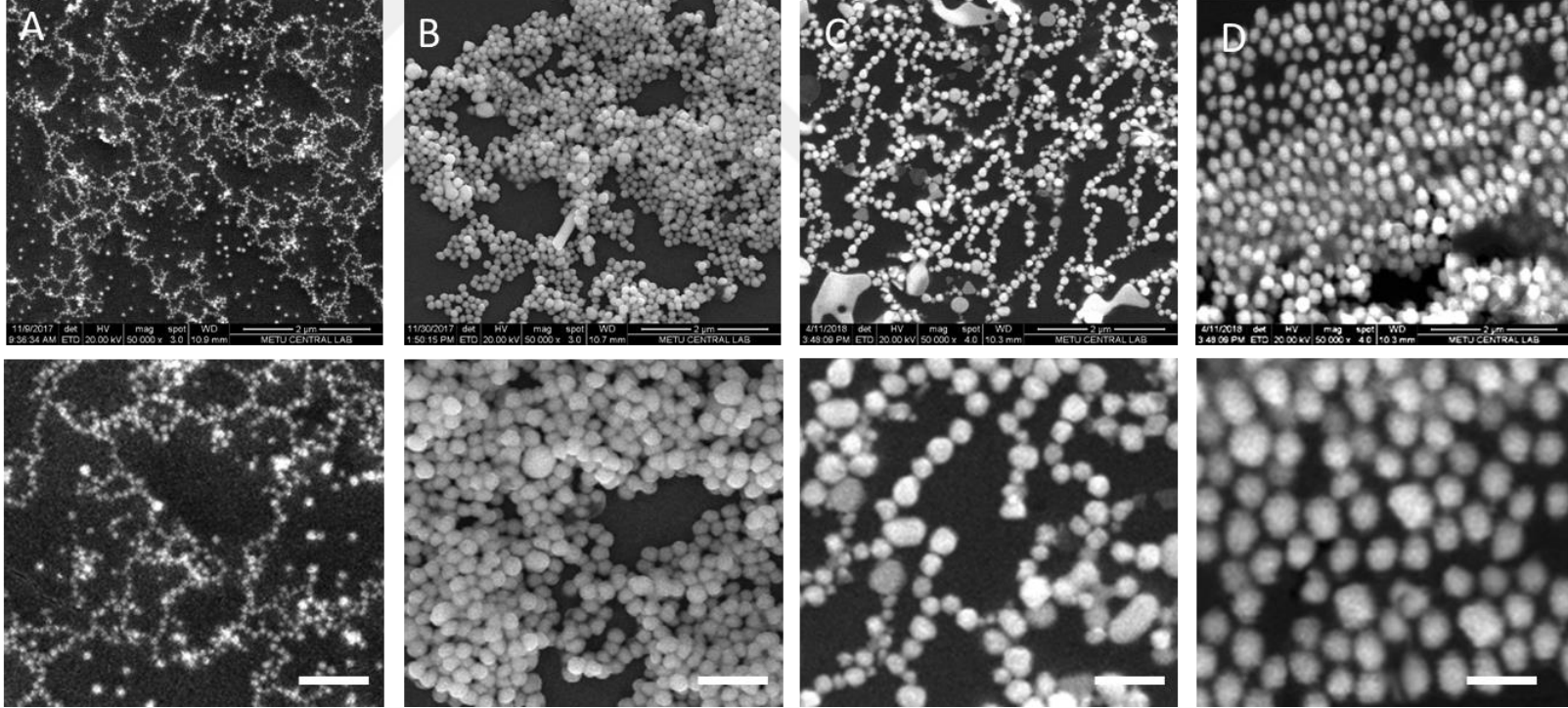
Şekil 3.29 Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın ayrıntılı görüntüsü. A) Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın akış hızı profillerinin 3D gösterimi. B) Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın giriş portundan yarısına kadar olan kesiti (beyaz oklar akış yönünü ve hareketini göstermektedir). C) Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın ortasından çıkış portuna kadar olan kesiti (beyaz oklar akış yönünü ve hareketini göstermektedir).

Mikroakışkan çiplerde akış dinamikleri optimize edildikten sonra PS yüzeylerde Bölüm 2.3.1’de bahsedilen altın nanopartikül yüzey modifikasyonu uygulanmıştır. Nanoplazmonik yüzeyler mikroakışkan çiplere entegre edildikten sonra altın nanopartiküllerin *in-situ* büyümelerini başlatmak için mikroakışkan çiplere büyüme çözeltisi bir kanaldan 1.5 mM hidrokinon çözeltisi ve diğer bir kanaldan 1mM H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub> çözeltisi olacak şekilde giriş portundaki iki ayrı kanaldan bağlanarak PS yüzeylerde *in-situ* altın nanopartikül büyümesini başlatılmıştır.

Laminer ve türbülans akış rejiminin olduğu mikroakışkan çiplerde altın nanopartiküller artan LSPR sinyaliyle birlikte PS yüzeylerde statik büyütülen yüzeylere göre daha homojen büyüdüğü ve tek sıra halinde diziler olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.30 A, C ve D). Altın nanopartiküllerin laminar ve türbülans akışın olduğu ortamlarda tek sıra halinde altın nanopartikül büyümesi göstermesinin sebebi akış ve metalik nanopartikül arasında oluşan kayma kuvvetleridir (shear stress) [113, 114]. Bu kayma kuvvetleri *in-situ* metalizasyonu sadece altın nanopartiküllerin yüzeyinde olmasını sağlarken ikinci ve üçüncü katman partikül metalizasyonu engellemiştir. Bu da yüzeyde altın nanopartiküllerin daha homojen olarak büyümesini sağlamıştır. Ayrıca altın nanopartikül dizilerinin aralarında oluşan nanopartiküller de akış hızı ve kayma kuvvetleri sayesinde PS yüzeylerde altın tohumları oluşturarak meydana gelmiştir.

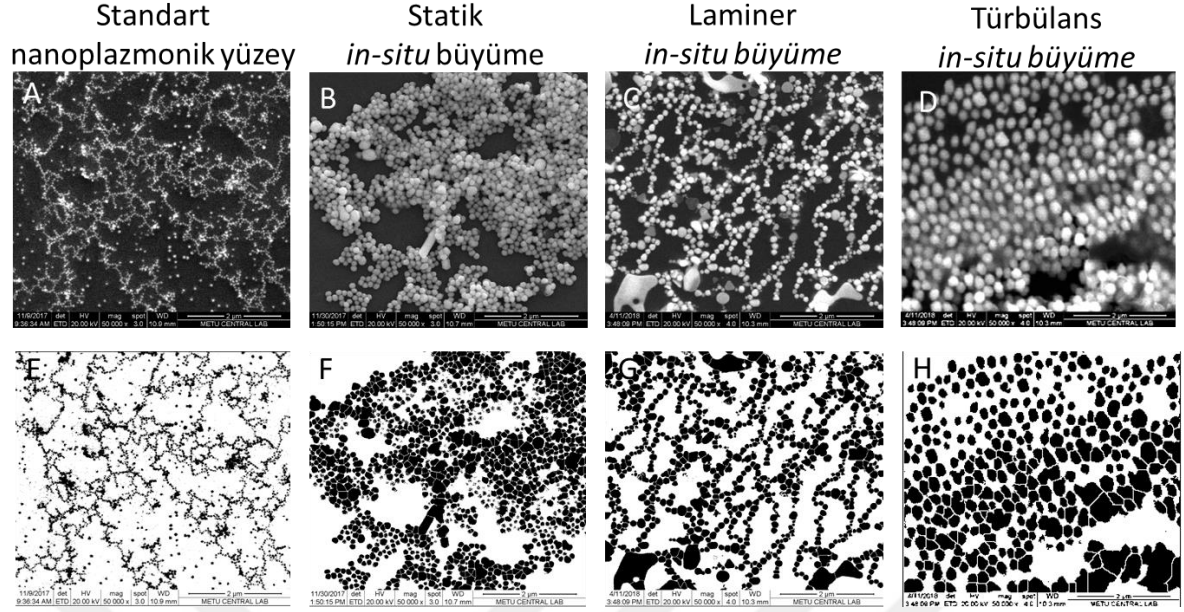
Laminer akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın içerisinde *in-situ* büyütülen altın nanopartiküller tek sıra zincirler halinde büyüyerek PS yüzeyleri kaplamışlardır (Şekil 3.30 C). Laminer akışta nanopartiküllerin yüzeyde zincirler şeklinde uzamasının en büyük nedenlerinden birisi akışın tek yönlü ve laminar olmasıdır. Bu nedenle nanopartiküller yüzeyde zincirler halinde genelde akış hızı yönünde *in-situ* büyüme göstermişlerdir. Türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanalın içerisinde ise altın nanopartiküllerin tek sıra halinde yan yana ve sıkı diziler oluşturduğu görülmüştür. (Şekil 3.30 D). Bu sıkı dizilerin oluşmasının en büyük sebeplerinden birisi türbülans akışın sebep olduğu büyüme çözeltisinin (hidrokinon ve H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub>) hız profilinin azalması ve büyüme çözeltisinin altın nanopartiküllerin yüzeyleriyle etkileşimini daha da arttırarak verimli bir *in-situ* büyüme sağlamasıdır. Ayrıca çok yönlü türbülans akış büyüme çözeltisinin altın nanopartiküllerin yüzeyleriyle daha fazla etkileşerek altın nanopartiküllerin aralarını da dolduracak şekilde büyümenin gerçekleşmesidir.

Standart nanoplazmonik yüzey

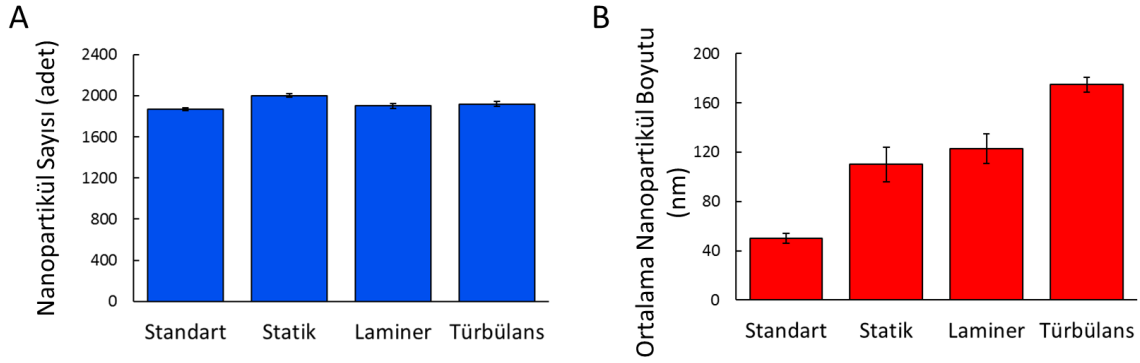
Statik *in-situ* büyümeLaminer *in-situ* büyümeTürbülans *in-situ* büyüme

Şekil 3.30 Nanoplazmonik yüzeyler oluşturmak için PS yüzeylere immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin farklı büyüme koşullarında (statik, laminar akış ve türbülans akış) *in-situ* olarak büyütülmesi ve nanoplazmonik yüzeylerin SEM görüntüleri (Mag: 50 000 X) Alttaki SEM görüntülerinde Mag: 100 000X, Skala Bar: 200 nm) A) Bölüm 3.3.1'dee optimize edilen 1 mg/mL konsantrasyonunda PEI kullanılarak altın nanopartiküllerin (50 nm) PS yüzeylere yüksek oranda immobilizasyonunun gerçekleştirilmesi ve yüzeye immobilize edilen altın nanopartiküllerin SEM görüntüsü. B) Büyüme çözeltisiyle (1.5 mM hidrokinon ve 1 mM HAuCl<sub>4</sub>) birlikte yüzeye immobilize edilen altın nanopartiküllerin statik koşullarda (96 kuyucuklu petri) büyütülmesi C) Daha önceden yüzeye immobilize edilen altın nanopartiküllerin laminar akış rejimine sahip mikroçip içerisinde büyütülmesi ve PS yüzeydeki altın nanopartiküllerin SEM görüntüsü. D) Daha önceden yüzeye immobilize edilen altın nanopartiküllerin türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde büyütülmesi ve PS yüzeydeki altın nanopartiküllerin SEM görüntüsü.

Altın nanopartiküllerin haritalama yöntemi ve yüzey yoğunluklarının hesaplanması nanopartiküllerin SEM görüntülerinin Image J yazılımı kullanılarak analiz edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.31 A, B, C ve D) PS yüzeydeki altın nanopartiküller *in-situ* büyüme ortamına göre (statik ve dinamik) yüzeylerde farklı dağılımlar göstermesinin yanı sıra yüzeyde oluşan nanopartikül sayısında anlamlı bir değişim görülmemiştir. Standart nanoplazmonik yüzey, statik ortam, laminar akış ve türbülans akış  $25 \mu\text{m}^2$ 'lik PS yüzeylerindeki altın partikül sayıları sırasıyla  $1867 \pm 13$ ,  $2002 \pm 17$ ,  $1900 \pm 25$  ve  $1920 \pm 22$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.32 A). *In-situ* partikül büyümelerinden sonra yüzeye başlangıçta 50 nm olarak immobilize edilen altın nanopartiküller statik ortam, laminar akış ve türbülans akış ortamlarında sırasıyla  $110 \pm 14$ ,  $123 \pm 12$  ve  $175 \pm 6$  ortalama partikül boyutuna ulaşmıştır (Şekil 3.32 B). Altın nanopartiküllerin ortalama boyutları statik ortam, laminar akış ve türbülans akış ortamlarında istatistiki olarak anlamlı büyümüştür ( $n=100$   $p<0.05$ ).

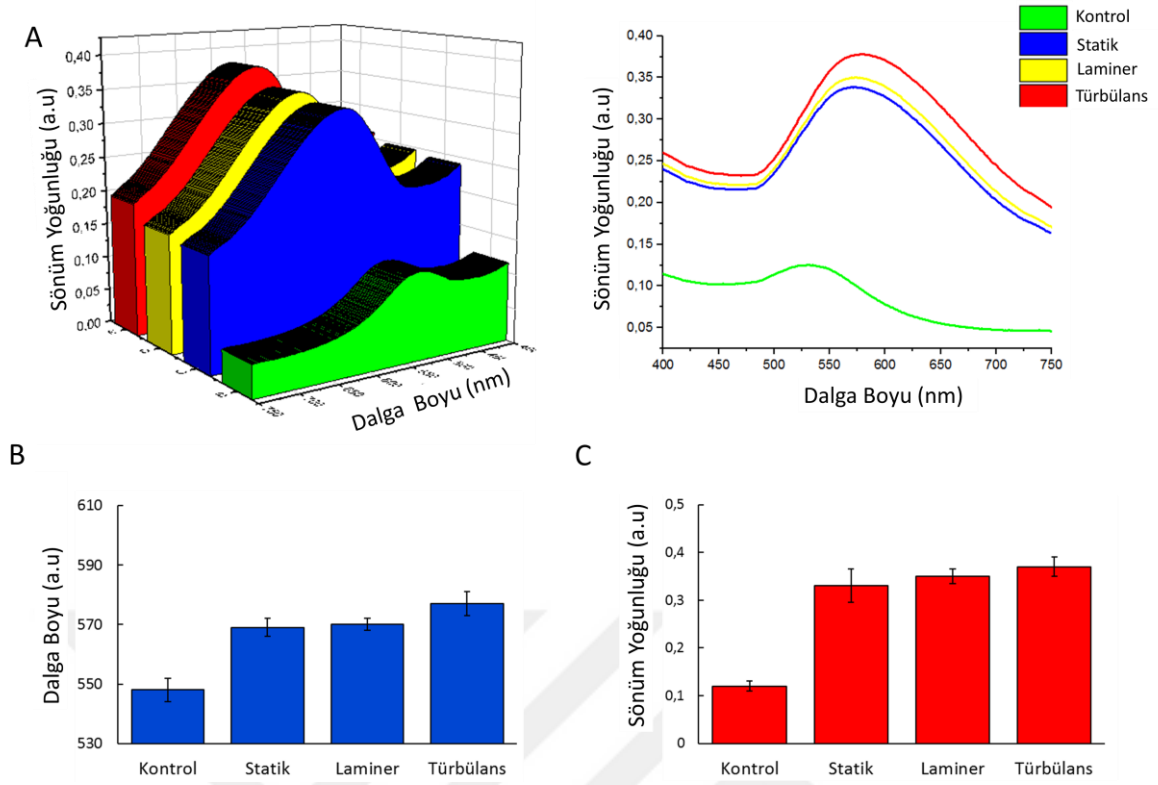


Şekil 3.31 Nanoplazmonik yüzeyler oluşturmak için PS yüzeylere immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin farklı büyüme koşullarında (statik, laminar akış ve türbülans akış) *in-situ* olarak büyütülmesi ve nanoplazmonik yüzeylerin SEM görüntüleri kullanılarak Image J yazılımı kullanılarak partikül sayısı ve ortalama partikül büyüklüğünün belirlenmesi. A) 50 nm partikül boyutuna sahip altın nanopartiküllerin PS yüzeydeki SEM görüntüsü. B) Statik koşullarda *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntüsü. C) Laminar akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntüsü. D) Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntüsü. E) 50 nm partikül boyutuna sahip altın naopartiküllerin SEM görüntülerinin Image J yazılımıyla eşik değerlerinin (thershold) alınması. F) Statik koşullarda *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntülerinin Image J yazılımıyla eşik değerlerinin alınması. G) Laminar akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntülerinin Image J yazılımıyla eşik değerlerinin alınması. H) Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak büyütülen altın nanopartiküllerin SEM görüntülerinin Image J yazılımıyla eşik değerlerinin alınması.



Şekil 3.32. Statik ve dinamik (laminer ve türbülans akış) koşullarda *in-situ* olarak altın nanopartikülerin büyütmesinden sonra PS yüzeylerdeki altın nanopartikül sayısı ve ortalama altın nanopartikül boyutları, A) Image J yazılımı kullanılarak farklı ortam koşullarında (statik ve dinamik) PS yüzeylerde kontrollü olarak büyütülen altın nanopartikül sayıları (SEM görüntüsü  $n=3$ ). B) Farklı *in-situ* büyüme koşullarında ortalama altın nanopartikül boyutunun değişimi. Nanopartiküllerin ortalama boyutu Image J yazılımı kullanılarak en az 100 partikülün ( $n=100$ ) ölçümü alınarak gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca *in-situ* partikül büyümelerinden LSPR sinyallerindeki sönüm yoğunlukları 0.12 (a.u)'dan statik ortam, laminer akış ve türbülans akış ortamlarında sırasıyla 0.33, 0.35 ve 0.37 (a.u) ya ulaşarak LSPR sinyalinde 3 kata kadar artış gözlemlenmiştir. Hassasiyeti artırılmış nanoplazmonik platformların maksimum dalga boyları da  $548 \pm 4$  nm 'den LSPR spektrumunda bir kırmızı kayma göstererek statik ortam, laminer akış ve türbülans akış ortamlarında sırasıyla  $569 \pm 3$ ,  $570 \pm 2$  ve  $577 \pm 4$  nm'ye ulaşmıştır (Şekil 3.33 A, B, C). Nanoplazmonik yüzeylerin sönüm yoğunlukları ve maksimum dalgaboyları statik ortam, laminer akış ve türbülans akış ortamlarında standart nanoplazmonik yüzeye göre anlamlı olarak değişmiştir ( $n=6$   $p<0.05$ ).

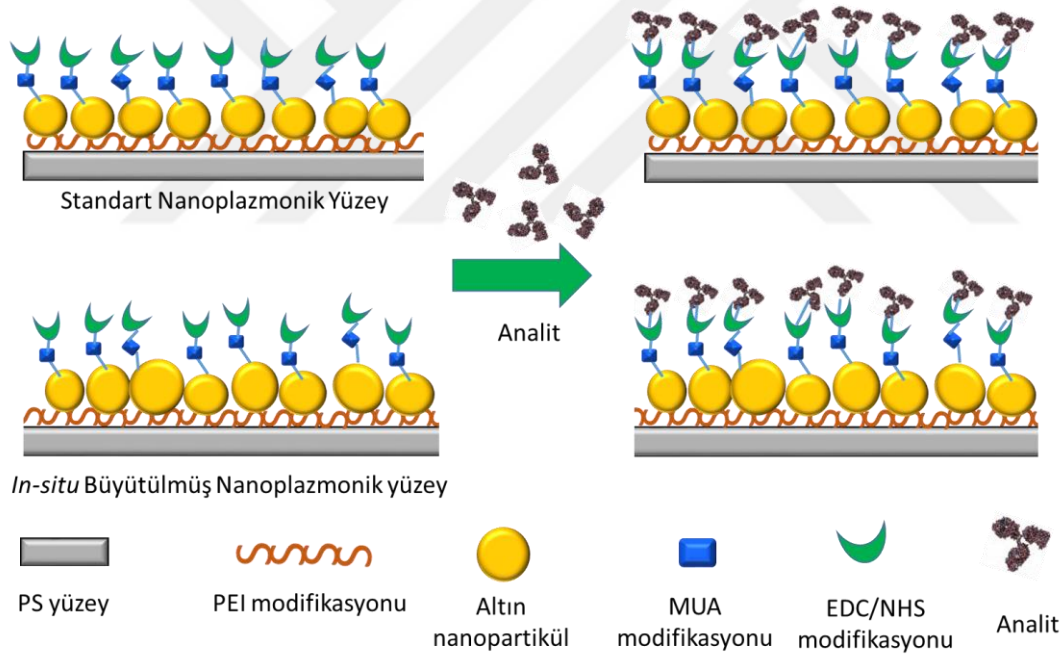


Şekil 3.33 Statik ve dinamik (laminar ve türbülans akış) koşullarda *in-situ* olarak altın nanopartiküllerin büyütmesinden sonra ölçülen LSPR sinyalleri. A) Altın nanopartiküllerin *in-situ* olarak büyümeleri sonucu oluşan LSPR spektrası ve LSPR spektrasının enine kesiti. B) Altın nanopartiküllerin *in-situ* olarak büyümeleri sonucu LSPR spektralarının maksimum dalga boyları ( $\lambda_{max}$ ). C) Altın nanopartiküllerin *in-situ* olarak büyümeleri sonucu oluşan LSPR spektralarının maksimum sönüm yoğunlukları.

Yapılan LSPR spektra ölçümleri ve yüzey analizleri PS yüzeylerde homojen büyümeyi ve en yüksek maksimum dalga boyu kaymasıyla (kırmızı kayma) birlikte sönüm yoğunluğunu, türbülans akış rejimine sahip mikroçiplerde elde edilen nanoplazmonik yüzeylerde olduğunu göstermiştir. Bu nedenle prostat kanseri biyobelirteçlerinin tayini için türbülans akış rejimine sahip mikroçipler (türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeyler) seçilmiştir. Ayrıca standart nanoplazmonik yüzeyler ve nanopartiküllerin statik olarak *in-situ* büyütüldüğü yüzeylerde (statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeyler) prostat kanseri biyobelirteçleri tayin çalışmaları yürütülerek hassasiyeti arttırılmış türbülans akış rejimine sahip mikroçiplerin performansları değerlendirilmiş ve sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

### 3.3.4. Prostat kanseri biyobelirteçlerinin nanoplazmonik yüzeylerde tayini

Prostat kanseri biyobelirteçlerinin (BSA, TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2) tayin çalışmaları için Bölüm 3.3.1’de geliştirilen standart nanoplazmonik yüzeyler ve Bölüm 3.3.2’de geliştirilen statik ve dinamik (türbülans akış rejimine sahip mikroçip) *in-situ* partikül büyütme yöntemleriyle elde edilmiş nanoplazmonik yüzeyler kullanılmıştır. Nanoplazmonik platformların yüzeyleri çeşitli ligandlarla yüzey modifikasyonu yapılarak belirli konsantrasyon aralığında prostat kanseri biyobelirteçleri ile etkileştirilmiş yüzey karakterizasyon ve LSPR sinyallerinin ölçüm çalışmalarına geçilmiştir. Prostat kanseri biyobelirteçleri ölçüm çalışmalarına geçilmeden önce her bir yüzey modifikasyonu için LSPR spektraları ölçülmüş ve her bir spektrumun maksimum dalga boyları ve sönüm yoğunlukları incelenmiştir. Yüzey modifikasyonu basamakları Şekil 3.34’te gösterilmiştir.



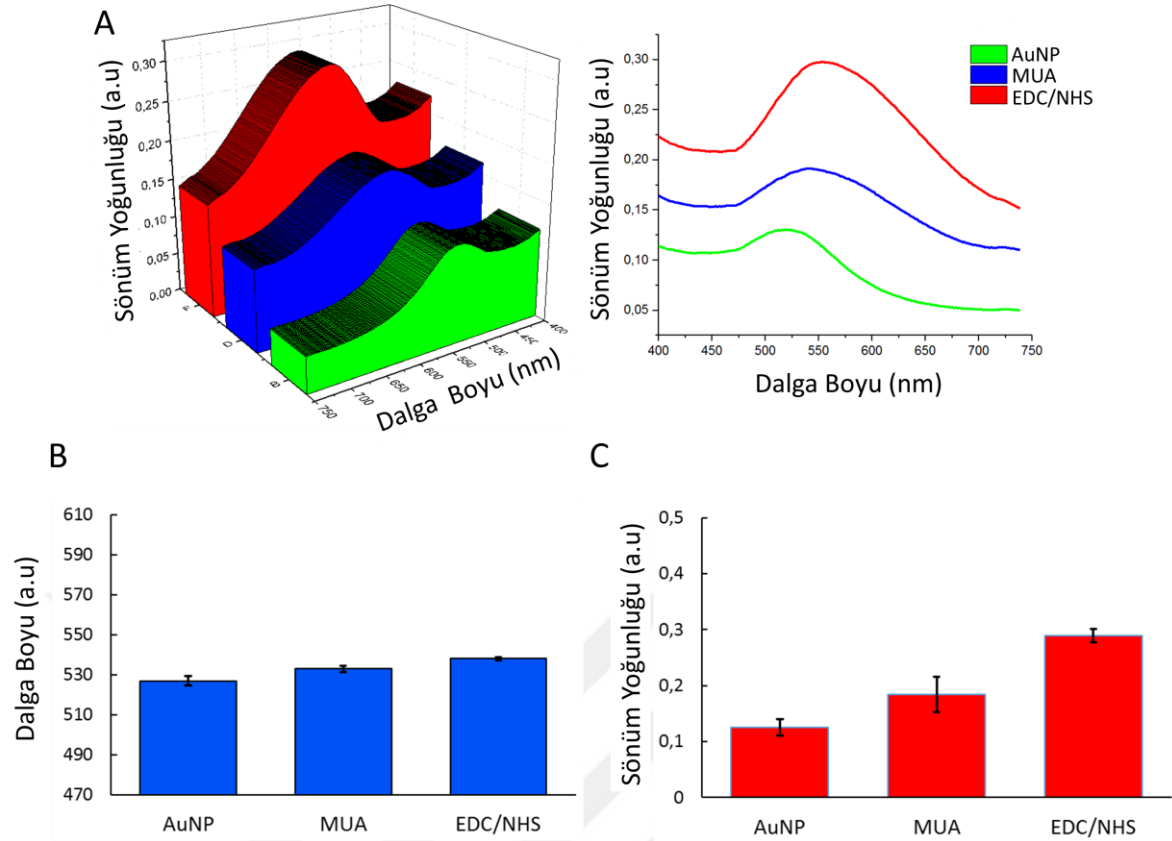
Şekil 3.34 Nanoplazmonik platformların geliştirilmesi için izlenen yüzey modifikasyonlarının şematik olarak gösterilmi.

Her bir prostat kanseri biyobelirteçi için PBS (pH: 7.4) içerisinde 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmış ve örnekler nanoplazmonik yüzeylerle +4°C'de 3 saat boyunca etkileşim bırakılmıştır. Daha sonra spektrofotometrede 350-800 nm aralığında 1 nm spektral aralıklarla absorbans taraması yapılmıştır. Kaydedilen LSPR spektraları noktasal verilerde bir eğriye dönüştürülerek bu eğrinin tepe noktası ve bu noktaya karşılık gelen dalgaboyu kaydedilmiştir. Elde edilen tepe noktası dalga boyu değişim değeri ( $\Delta\lambda$ ) önceki basamakta alınan tepe noktası dalga boyu verisinden çıkarılarak sonuçlar elde edilmiştir. Dalga boyu kayma verilerinin değerlendirmek için eğri uydurma yöntemi (curve-fitting) kullanılmıştır.

#### **3.3.4.1. Standart nanoplazmonik yüzeylerde prostat kanseri biyobelirteçlerinin tayini**

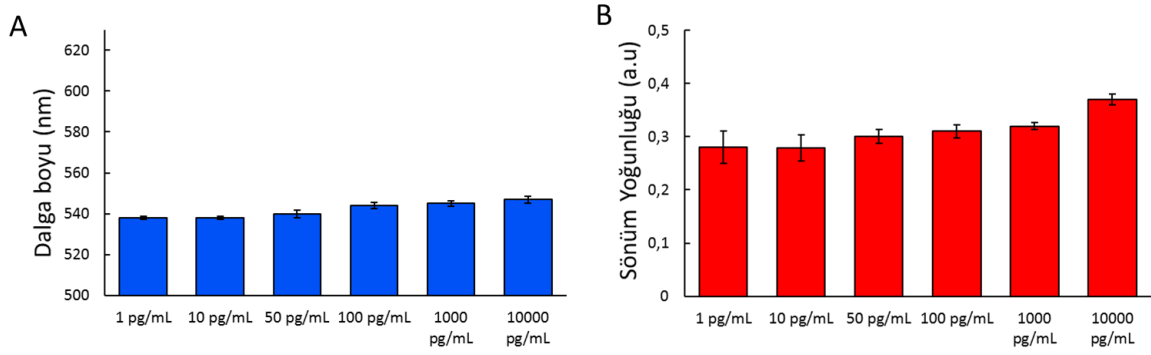
Standart nanoplazmonik yüzey için altın nanopartiküller yüzeye immobilize edildikten sonra sırasıyla MUA ve EDC/NHS ile modifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Yüzey modifikasyonuna başlamadan önce standart nanoplazmonik yüzeyler için maksimum dalga boyu  $527 \pm 2.2$  nm ve sönüm yoğunluğu 0.12 au olarak ölçülmüştür. MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra maksimum dalga boyları kırmızı kayma göstererek sırasıyla  $533 \pm 1.6$  ve  $538 \pm 0.7$  nm ölçülmüştür. Sönüm yoğunlukları ise MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra artış göstererek 0.18 ve 0.28 au olarak ölçülmüştür. Dalga boyunda meydana gelen kırmızı kayma ve sönüm yoğunluklarındaki artış yüzey modifikasyonlarının başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir ( $n=6$   $p<0.05$ ) (Şekil 3.35).

Nanoplazmonik yüzeylerde prostat kanseri biyobelirteçlerine karşı tutunmayı sağlayıcı ligandlar bağlandıktan sonra 96 kuyucuklu petri kapları içerisinde oluşturulan nanoplazmonik yüzeyler üzerine BSA, TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 biyobelirteçlerinin 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri PBS içerisinde hazırlanarak nanoplazmonik yüzeylerle etkileştirilmiştir.



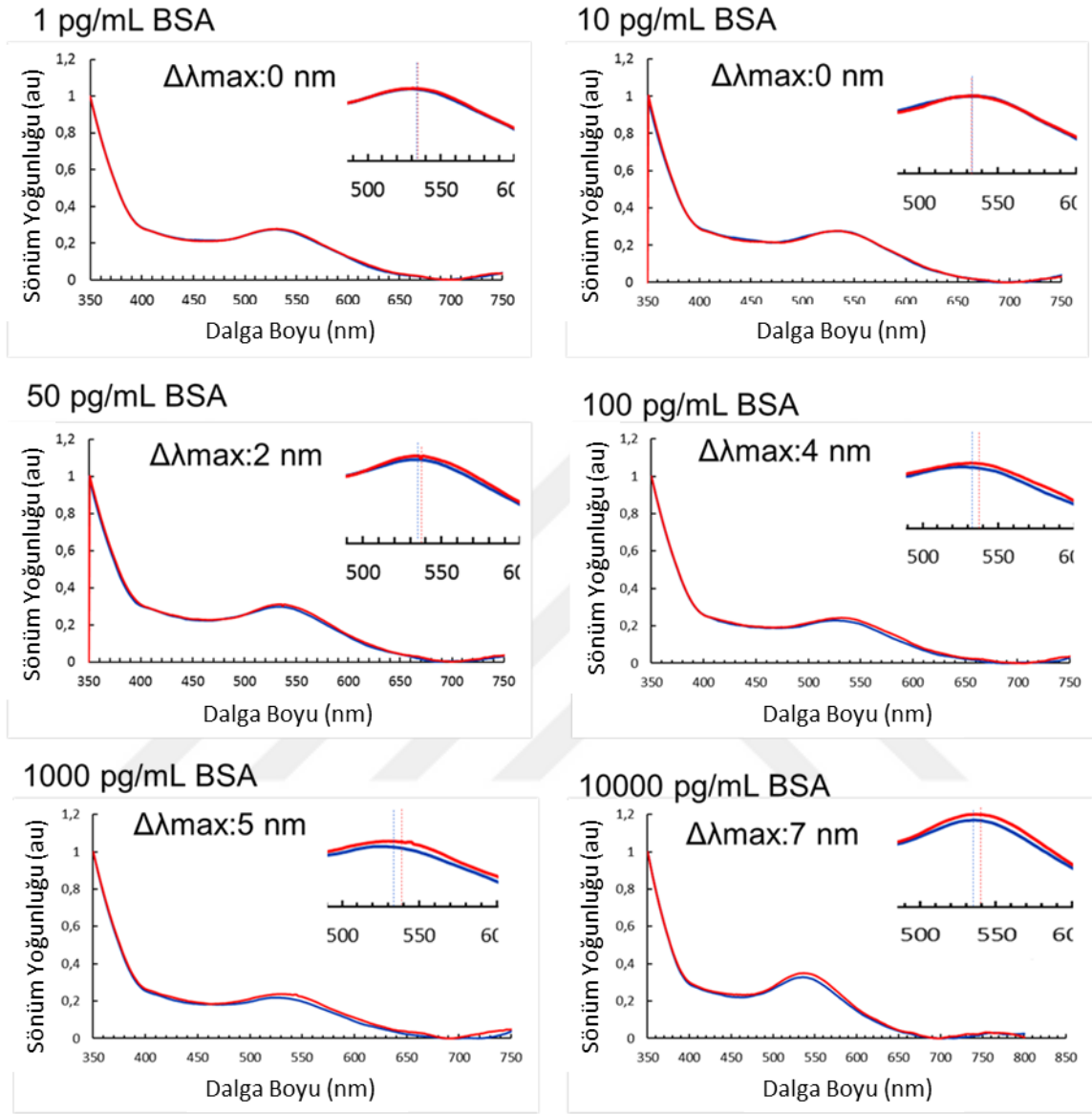
Şekil 3.35 Standart nanoplazmonik yüzeylerin prostat kanseri biyobelirteçlerine karşı seçici hale getirilmesi için Bölüm 2.3.1’ de bahsedilen yüzey modifikasyonu basamaklarının sırasıyla uygulanmasından sonra LSPR sinyallerinde meydana gelen değişimler, A) PS yüzeye altın nanopartikül immobilizasyonu, MUA ve EDC/NHS modifikasyonlarından sonra ölçülen LSPR spektraları ve LSPR spektralarının enine kesiti. B) Nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra ölçülen LSPR spektralarının maksimum dalga boyları ( $\lambda_{max}$ ). C) Nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra ölçülen LSPR spektralarının maksimum sönüm yoğunlukları.

BSA etkileştirilmeden önce nanoplazmonik yüzeyin maksimum dalga boyu ve sönüm yoğunluğu  $538 \pm 0.7$  nm ve 0.28 au olarak ölçülmüştür. 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL BSA konsantrasyonları için maksimum dalga boyu değerleri  $538 \pm 0.6$ ,  $538 \pm 0.9$ ,  $540 \pm 1.8$ ,  $544 \pm 1.6$ ,  $545 \pm 1.2$  ve  $547 \pm 1.7$  nm (Şekil 3.36 A) olarak ölçülürken, sönüm yoğunlukları sırasıyla 0.28, 0.27, 0.30, 0.31, 0.32 ve 0.37 au olarak ölçülmüştür (Şekil 3.36 B).



Şekil 3.36 BSA ile etkileştirilen standart nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (a.u).

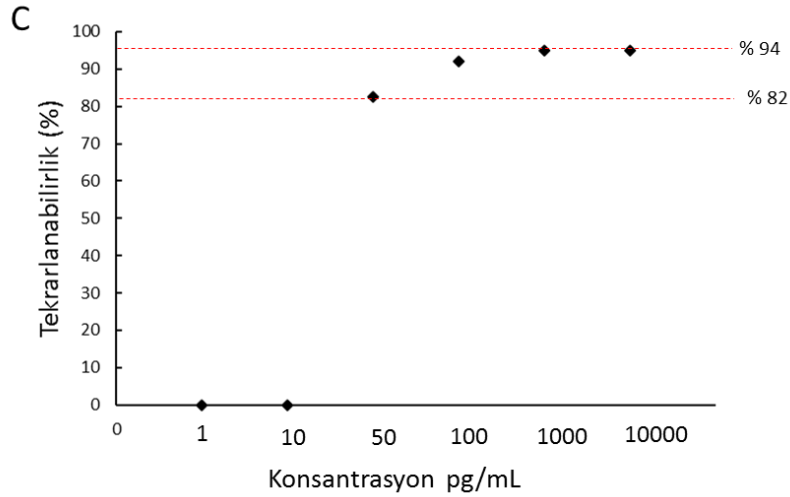
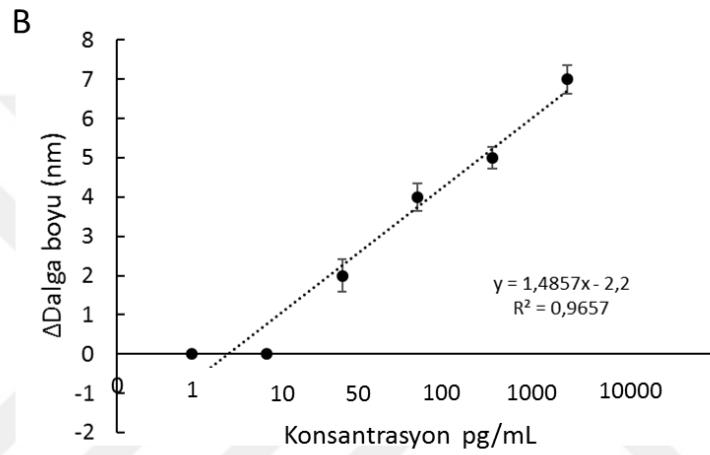
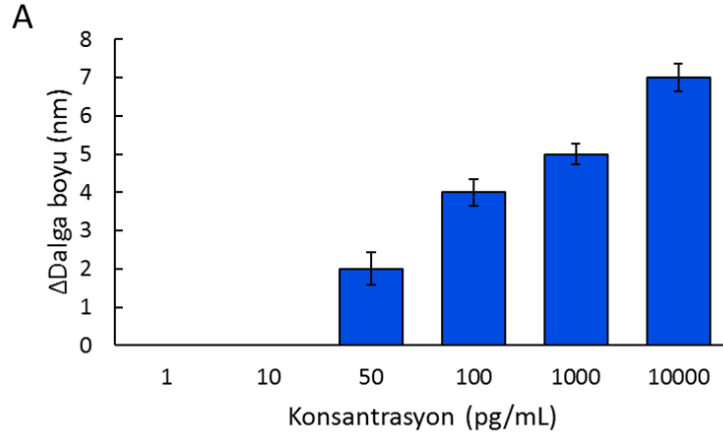
1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL BSA konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu kaymaları sırasıyla 0, 0,  $2 \pm 0.42$ ,  $4 \pm 0.35$ ,  $5 \pm 0.27$  ve  $7 \pm 0.37$  nm olarak ölçülmüştür. Ölçülen değerler 50 pg/mL'den itibaren BSA etkileştirilmemiş yüzeye göre anlamlı olarak artmıştır ( $n=6$   $p<0.05$ ). Standart nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BSA ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri Şekil 3.37'de verilmiştir.



Şekil 3.37 Standart nanoplazmonik yüzeylerin PBS içinde hazırlanmış 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BSA ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{\text{max}}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir).

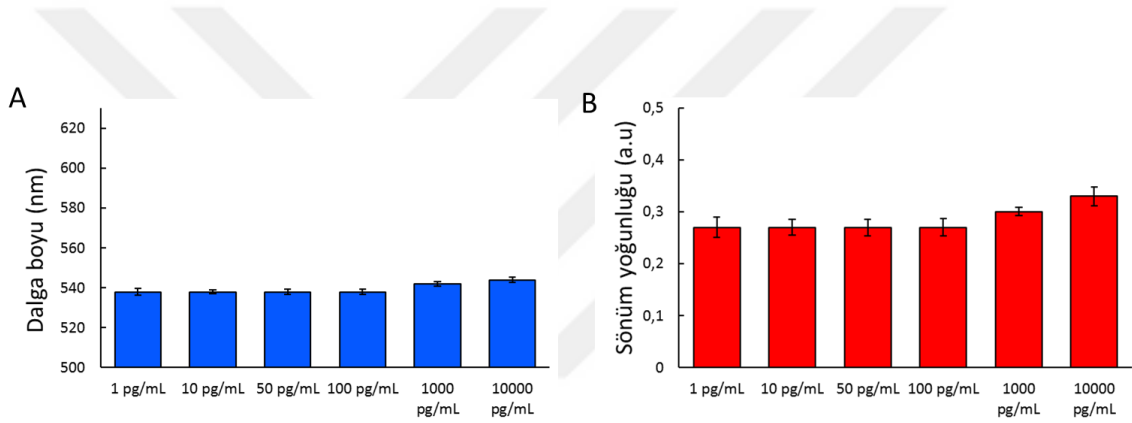
Şekil 3.38 A BSA konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerini ( $\Delta\lambda_{\text{max}}$ ) göstermektedir. Şekil 3.38 B ise BSA konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerinin eğri uydurma yöntemine göre değerlendirilmesini göstermektedir. Buna göre grafiğin  $R^2$  değeri 0.96 olarak hesaplanmıştır.

Düşük BSA konsantrasyonlarında (1 ve 10 pg/mL) maksimum dalga boyunda herhangi bir kayma tespit edilememiş olup 50 pg/mL'den itibaren artan konsantrasyona bağlı olarak LSPR spektralarında düzenli bir kırmızı kayma tespit edilmiştir. Düşük BSA konsantrasyonlarında LSPR spektralarında ölçülebilir bir değişikliğin tespit edilememesinin en büyük nedeni ortama eklenen BSA miktarının nanoplazmonik yüzeylerde (altın nanopartiküllerin çevresinde) herhangi bir kırılma indisi değişimine sebep olmamasıdır. Ölçümlerin tekrarlanabilirliği Şekil 3.38 C'de verilmiştir. Ölçülebilen BSA konsantrasyonları (50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL) için tekrarlanabilirlik %82-94 arasında bulunmuştur.



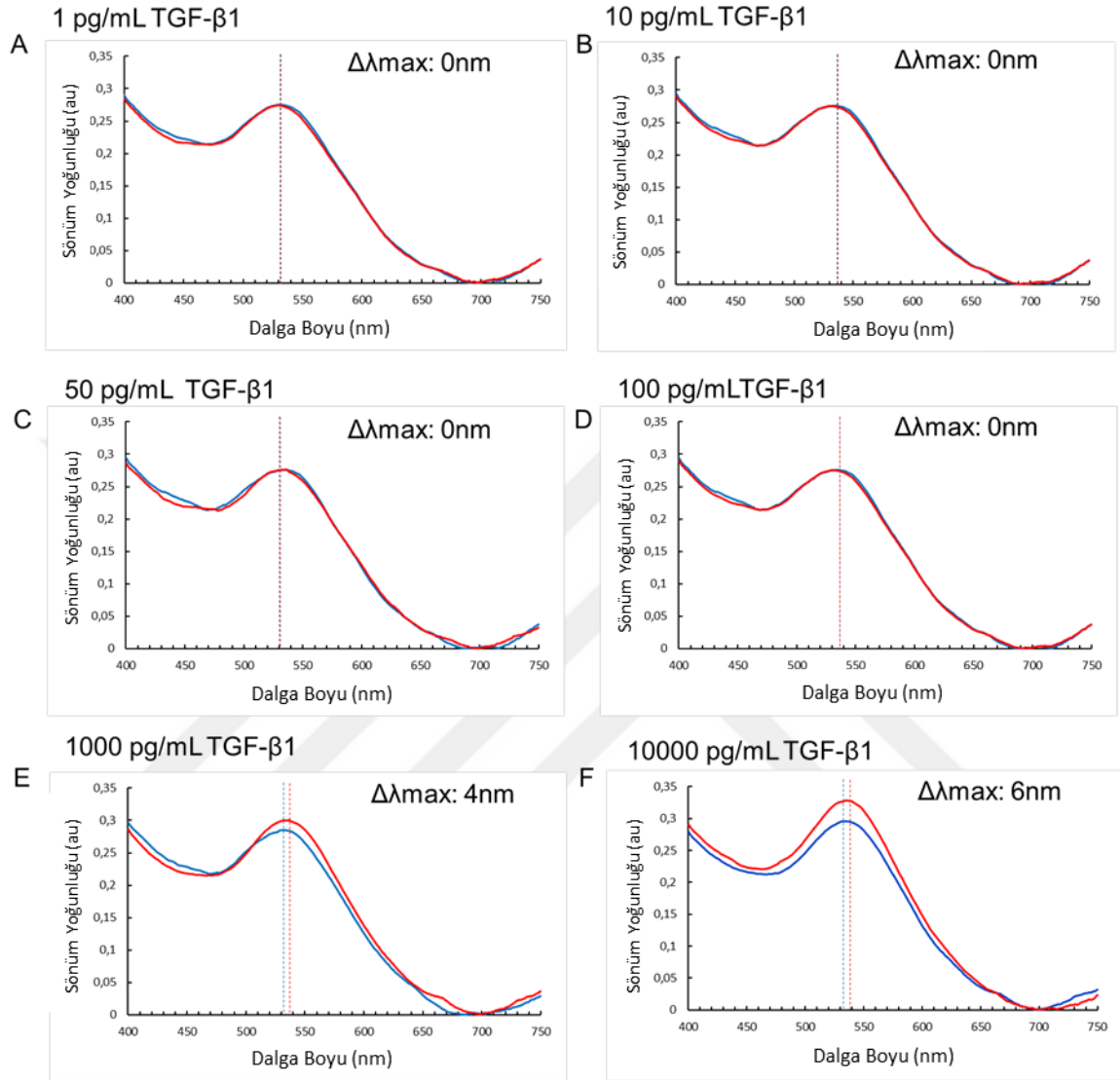
Şekil 3.38 Standart nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış BSA tespiti için alınan ölçümler. A) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.

Standart nanoplazmonik yüzeylerde molekül ağırlığı BSA'ya göre çok daha düşük olan ve prostat kanseri oluşumunda ve metastazında oldukça önemli olan TGF- $\beta$ 1 (12.8 kDa) biyobelirteçinin tayin çalışmaları yapılmıştır. TGF- $\beta$ 1 etkileştirilmeden önce nanoplazmonik yüzeyden ölçülen maksimum dalga boyu ve sönüm yoğunluğu  $538 \pm 0.7$  nm ve 0.27 au olarak ölçülmüştür. 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL BSA konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu değerleri  $538 \pm 1.6$ ,  $538 \pm 1.1$ ,  $538 \pm 1.4$ ,  $538 \pm 1.2$ ,  $542 \pm 1.2$  ve  $544 \pm 1.2$  nm (Şekil 3.39 A) olarak ölçülürken sönüm yoğunlukları sırasıyla 0.27, 0.27, 0.27, 0.27, 0.30 ve 0.33 au olarak ölçülmüştür (Şekil 3.39 B).



Şekil 3.39 TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirilen standart nanoplazmonik yüzeylerin A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au).

Düşük TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonlarında (1-100 pg/mL) dalga boylarında herhangi bir kayma gözlenmezken, 1000 ve 10000 pg/mL TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonlarında sırasıyla  $4 \pm 1.14$  ve  $6 \pm 1.07$  nm maksimum dalga boyu kaymaları ölçülmüştür. Ölçülen değerler 1000 pg/mL'den itibaren TGF- $\beta$ 1 etkileştirilmemiş yüzeye göre anlamlı olarak artmıştır ( $n=6$   $p<0.05$ ). Standart nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri Şekil 3.40'de verilmiştir.

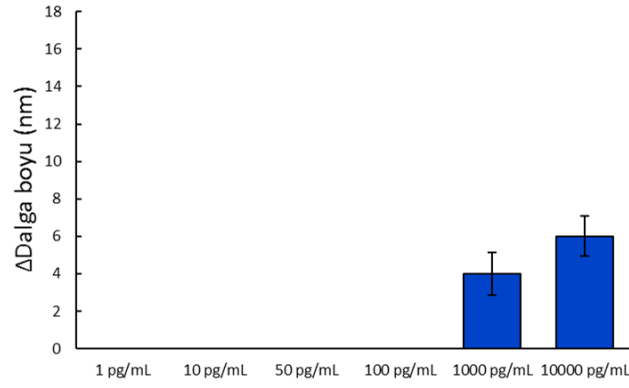


Şekil 3.40 Standart nanoplazmonik yüzeylerin PBS içinde hazırlanmış 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{\text{max}}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir).

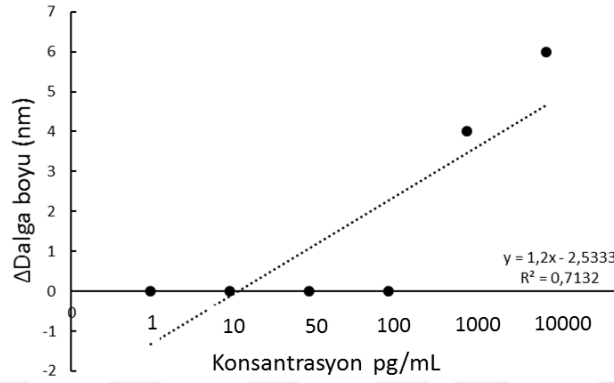
Şekil 3.41 A TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağılı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerini ( $\Delta\lambda_{max}$ ) göstermektedir. Şekil 3.41 B ise TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağılı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerinin eğri uydurma yöntemine göre değerlendirilmesini göstermektedir. Buna göre grafiğin  $R^2$  değeri 0.71 olarak hesaplanmıştır.

Düşük TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonlarında (1-100 pg/mL) LSPR spektralarında ölçülebilir bir değişikliğin tespit edilememesinin en büyük nedeni TGF- $\beta$ 1'in çok düşük moleköl ağırlığına sahip olmasının yanı sıra bu konsantrasyonlar arasında ortama eklenen TGF- $\beta$ 1 protein miktarı nanoplazmonik yüzeylerde (altın nanopartiküllerin çevresinde) herhangi bir kırılma indisi değişimine sebep olmamasıdır. Ölçümlerin tekrarlanabilirliği 1000 ve 10000 pg/mL TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonları için %81-84 arasında bulunmuştur (Şekil 3.41 C).

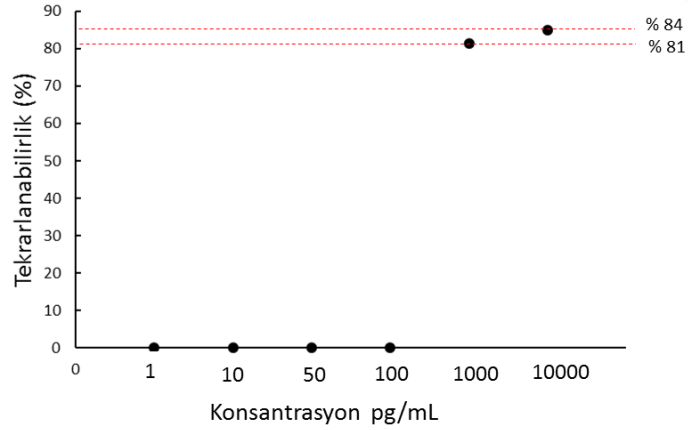
A



B

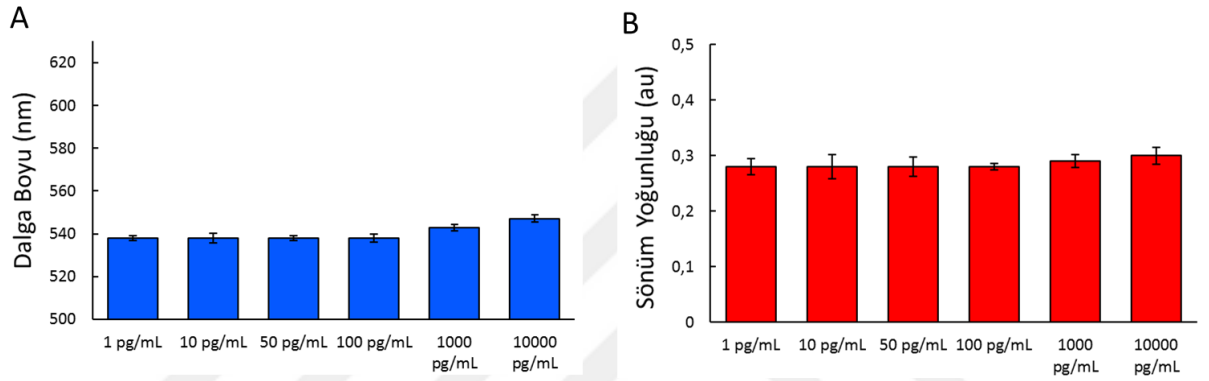


C



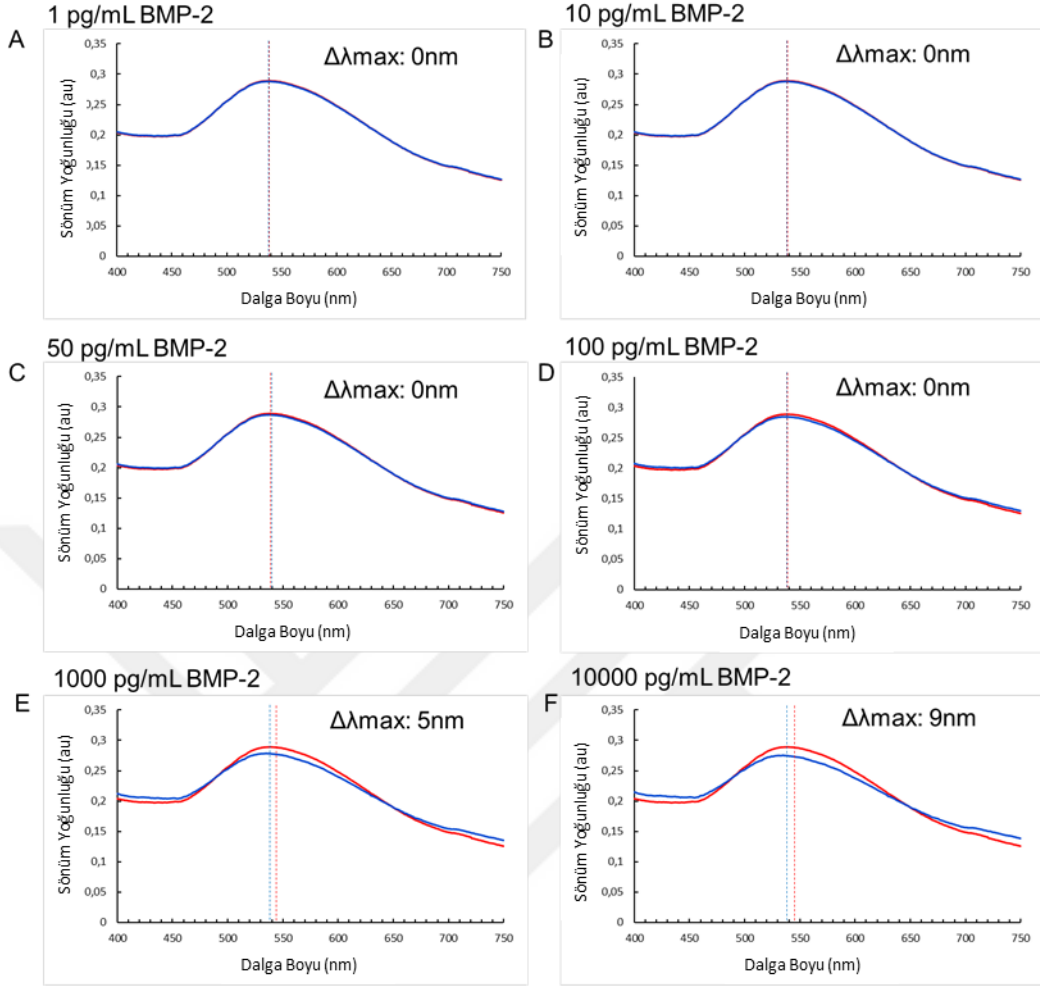
Şekil 3.41 Standart nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış TGF- $\beta$ 1 tespiti için alınan ölçümler. A) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.

Plazmonik yüzeylerde diğer bir düşük molekül ağırlıklı biyobelirteç olan BMP-2 (13 kDa) için tayin çalışmaları gerçekleştirilmiştir. BMP-2 etkileştirilmeden önce nanoplazmonik yüzeylerde maksimum dalga boyu ve sönüm yoğunluğu  $538 \pm 0.7$  nm ve 0.28 au olarak ölçülmüştür. 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL BSA konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu değerleri  $538 \pm 1.2$ ,  $538 \pm 1.1$ ,  $538 \pm 2.3$ ,  $538 \pm 1.1$ ,  $543 \pm 1.5$  ve  $537 \pm 1.7$  nm (Şekil 3.42 A) olarak ölçülürken sönüm yoğunlukları sırasıyla 0.28, 0.28, 0.28, 0.28, 0.29 ve 0.30 au olarak bulunmuştur (Şekil 3.42 B).



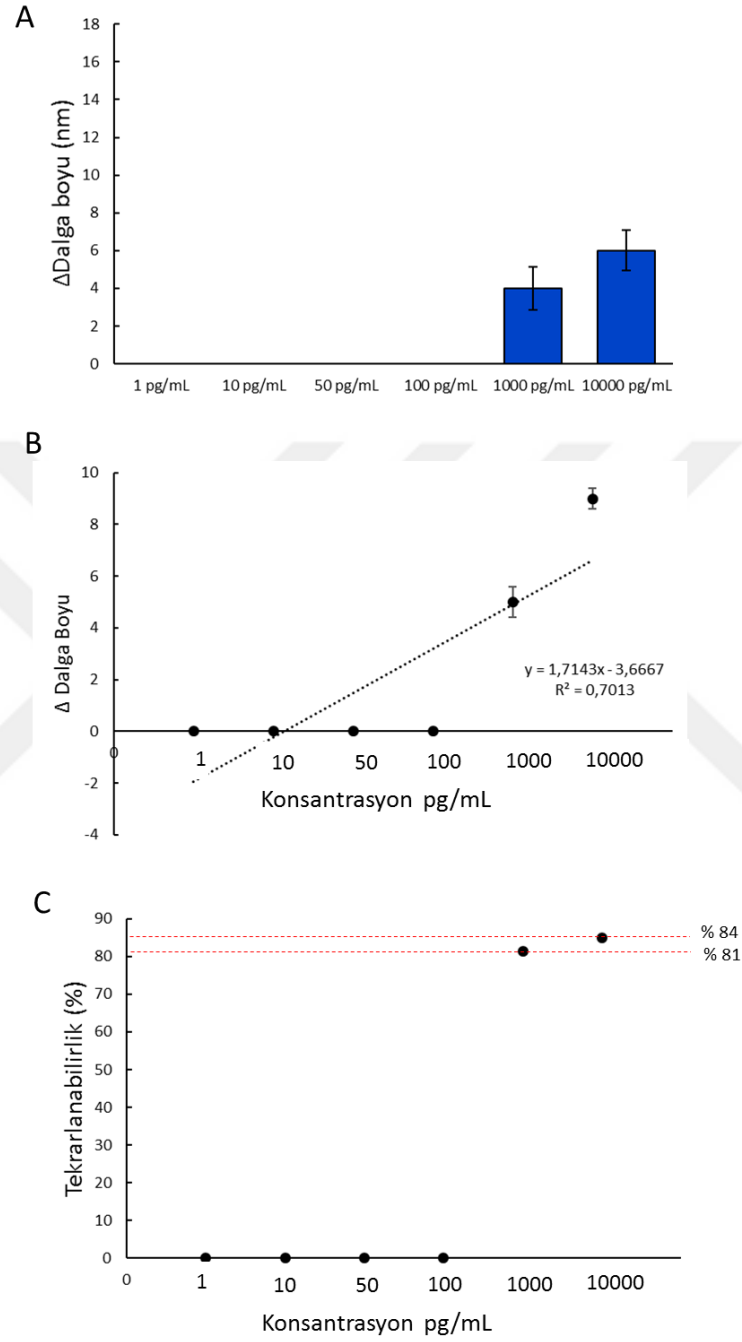
Şekil 3.42 BMP-2 ile etkileştirilen standart nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au).

Benzer şekilde 1-100 pg/mL BMP-2 konsantrasyonlarında hiçbir dalga boyu kayması gözlenmez iken 1000 ve 10000 pg/mL BMP-2 konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu kaymaları sırasıyla  $5 \pm 0.27$  ve  $9 \pm 0.48$  nm olarak bulunmuş ve bu değerler etkileştirilmemiş yüzeylere göre anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir ( $n=6$   $p<0.05$ ). Standart nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BMP-2 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektraları Şekil 3.43'te verilmiştir.



Şekil 3.43 Standart nanoplazmonik yüzeylerin PBS içinde hazırlanmış 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BMP-2 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{\text{max}}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir).

TGF- $\beta$ 1'in düşük konsantrasyonlarında da izlendiği gibi 1-100 pg/mL BMP-2 konsantrasyonlarında LSPR spektrallerinde ölçülebilir bir değişikliğin tespit edilememesinin nedeni BMP-2'nin düşük molekül ağırlığı ve BMP-2 protein miktarının nanoplazmonik yüzeylerde (altın nanopartiküllerin çevresinde) herhangi bir kırılma indisi değişimine sebep olmaması olarak düşünülmüş ve literatürde de benzer sonuçlara yer verilmiştir [115, 116]. Bu ölçümlerin tekrarlanabilirliği %81-84 arasında bulunmuştur (Şekil 3.44C).

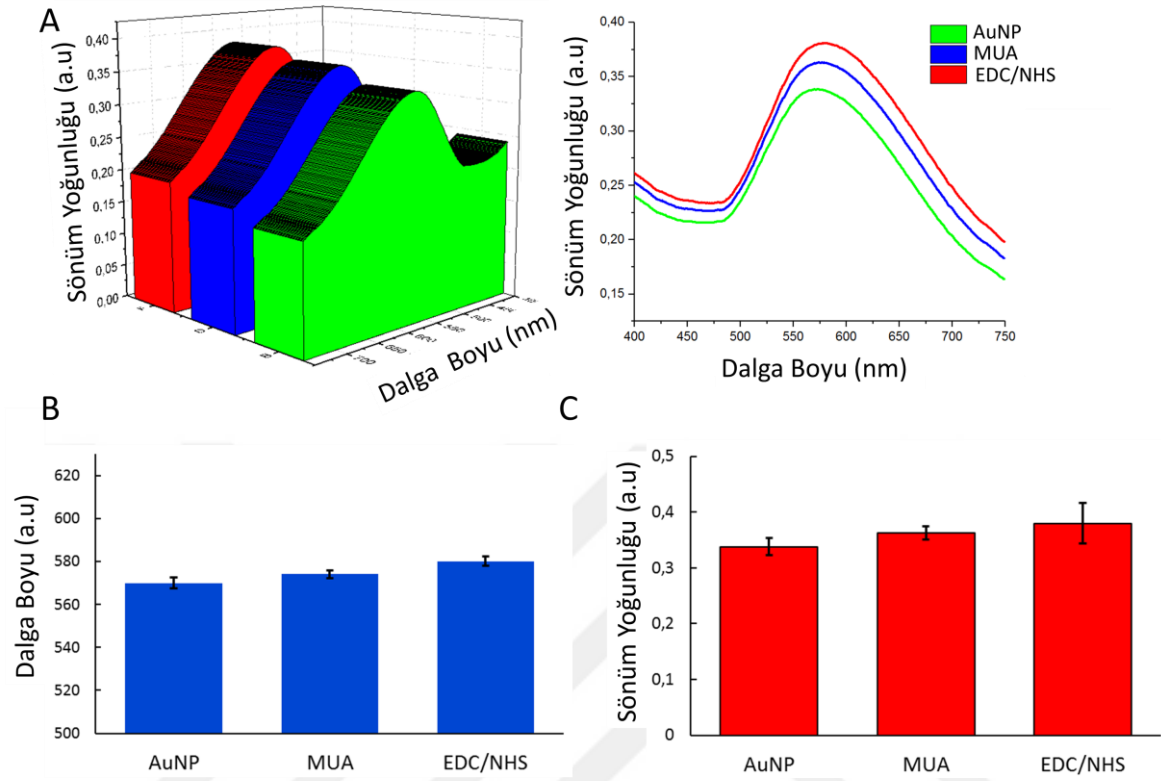


Şekil 3.44 Standart nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış BMP-2 tespiti için alınan ölçümler. A) BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.

#### 3.3.4.2. Altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütüldüğü nanoplazmonik yüzeyler

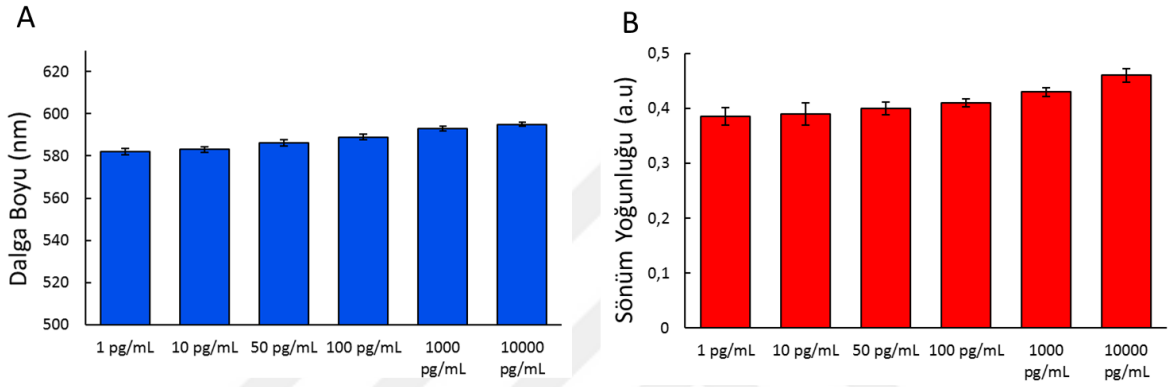
Standart nanoplazmonik yüzeylerde farklı molekül ağırlığına sahip prostat kanseri biyobelirteçlerinde tayin çalışmaları yapıldıktan sonra altın nanopartiküllerin *in-situ* olarak büyütüldüğü statik ve dinamik (türbülans akış rejimi) yüzeylerde prostat kanseri biyobelirteçleri tayin çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmada altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütüldüğü laminar ve türbülans akış rejimlerine sahip mikroçip platformları kullanılmıştır. Prostat kanseri biyobelirteçleri tayini için en çok maksimum dalga boyu kaymasının olduğu ve en yüksek sönüm yoğunluğunun gözlemlendiği türbülans akış rejimine sahip nanoplazmonik mikroçipler kullanılmıştır.

Standart nanoplazmonik yüzeyler Bölüm 3.3.2'de optimize edilen altın nanopartiküllerin en çok büyüme gösterdiği 100µL 1.5 mM hidrokinon ve 100µL 1mM H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub> varlığında statik koşullarda *in-situ* olarak büyütülmüştür. Daha sonra elde edilen yüzeylerde sırasıyla MUA modifikasyonu ve EDC/NHS modifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Yüzey modifikasyonuna başlamadan önce altın nanopartiküllerin statik *in-situ* olarak büyütüldüğü yüzeyler için maksimum dalga boyu 570±2.4 nm ve sönüm yoğunluğu 0.33 au olarak ölçülmüştür. MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra maksimum dalga boyları kırmızı kayma göstererek sırasıyla 574±1.9 ve 580±2.1 nm ölçülmüştür. Sönüm yoğunlukları ise MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra artış göstererek 0.36 ve 0.38 au olarak ölçülmüştür. Dalga boyunda meydana gelen kırmızı kayma ve sönüm yoğunluklarındaki artış yüzey modifikasyonlarının başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir (n=6 p<0.05) (Şekil 3.45).



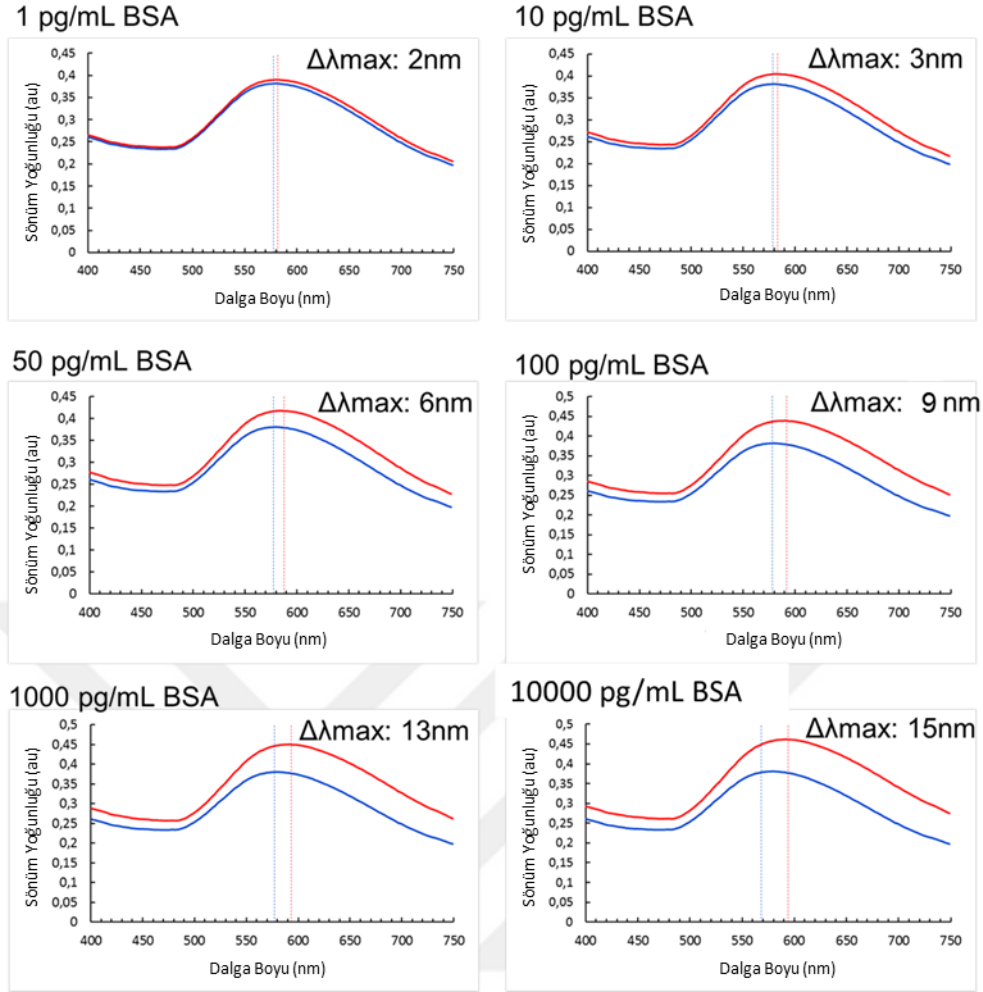
Şekil 3.45 Statik koşullarda (96 kuyucuklu petri) *in-situ* olarak altın nanopartiküllerin büyütülmesinden sonra LSPR sinyali artırılmış yüzeylere Bölüm 2.3.1' de bahsedilen yüzey modifikasyonu basamaklarının sırasıyla uygulanmasından sonra LSPR sinyallerinde meydana gelen değişimler. A) Statik koşullarda altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütüldüğü nanoplazmonik yüzeylere sırasıyla MUA ve EDC/NHS modifikasyonları uygulandıktan sonra ölçülen LSPR spektraları ve LSPR spektralarının enine kesiti. B) Statik koşullarda *in-situ* altın nanopartikül büyümesi sonucu oluşturulmuş nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra LSPR spektralarındaki maksimum dalga boyları ( $\lambda_{max}$ ). C) Statik koşullarda *in-situ* altın nanopartikül büyümesi sonucu oluşturulmuş nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra LSPR spektralarındaki maksimum sönüm yoğunlukları.

Altın nanopartiküllerin statik olarak *in-situ* büyütüldüğü nanoplazmonik yüzeylerin performanslarını değerlendirmek için ilk olarak BSA prostat kanseri biyobelirteci tayin çalışmaları yürütülmüştür. BSA etkileştirilmeden önce nanoplazmonik yüzeyden ölçülen maksimum dalga boyu ve sönüm yoğunluğu  $580 \pm 2.1$  nm ve 0.38 au olarak ölçülmüştür. 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL BSA konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu değerleri  $582 \pm 1.6$ ,  $583 \pm 1.4$ ,  $586 \pm 1.5$ ,  $589 \pm 1.3$ ,  $593 \pm 1.1$  ve  $595 \pm 1.1$  nm (Şekil 3.46 A) olarak ölçülürken sönüm yoğunlukları sırasıyla 0.38, 0.39, 0.40, 0.41, 0.43 ve 0.46 au olarak ölçülmüştür (Şekil 3.46 B).



Şekil 3.46 BSA ile etkileştirilen statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au).

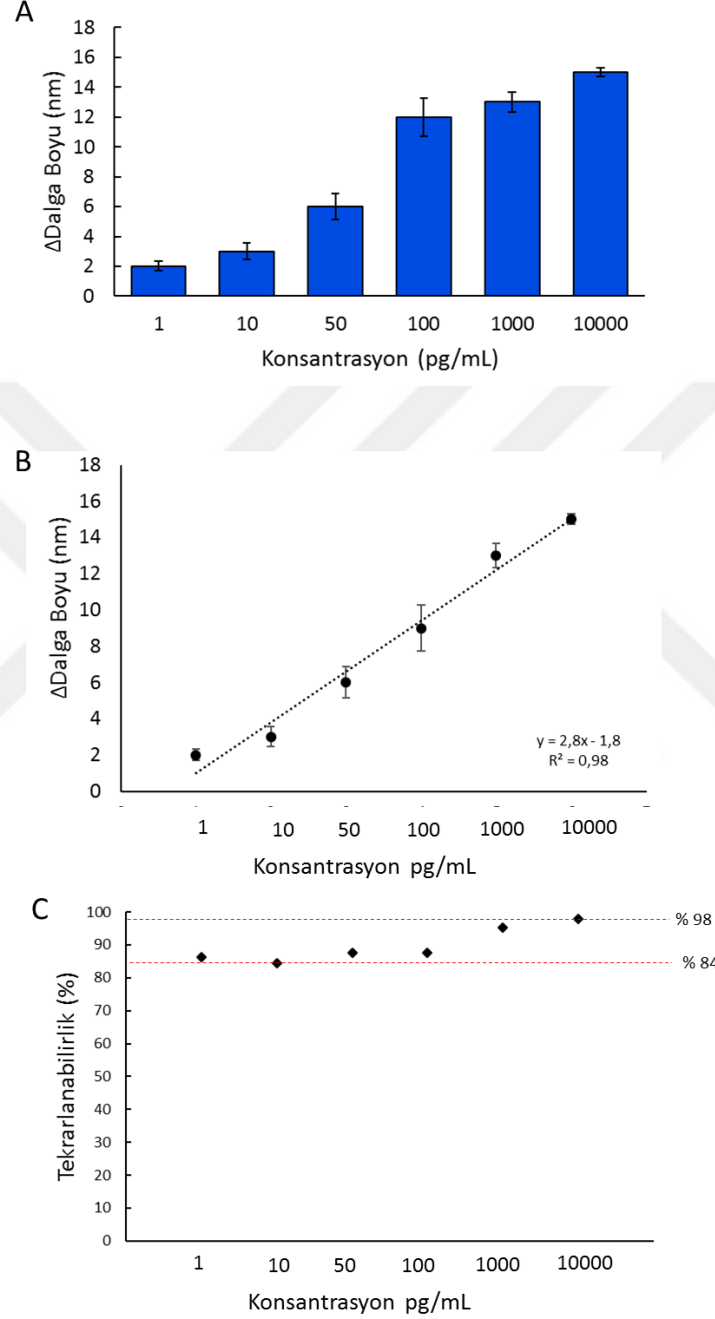
1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL BSA konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu kaymaları sırasıyla  $2 \pm 0.32$ ,  $3 \pm 0.55$ ,  $6 \pm 0.85$ ,  $9 \pm 1.28$ ,  $13 \pm 0.65$  ve  $15 \pm 0.30$  nm olarak ölçülmüştür. Ölçülen değerler 1 pg/mL'den itibaren BSA etkileştirilmemiş yüzeye göre anlamlı olarak artmıştır ( $n=6$   $p<0.05$ ). Statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BSA ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri Şekil 3.47'de verilmiştir.



Şekil 3.47 Statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BSA ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir).

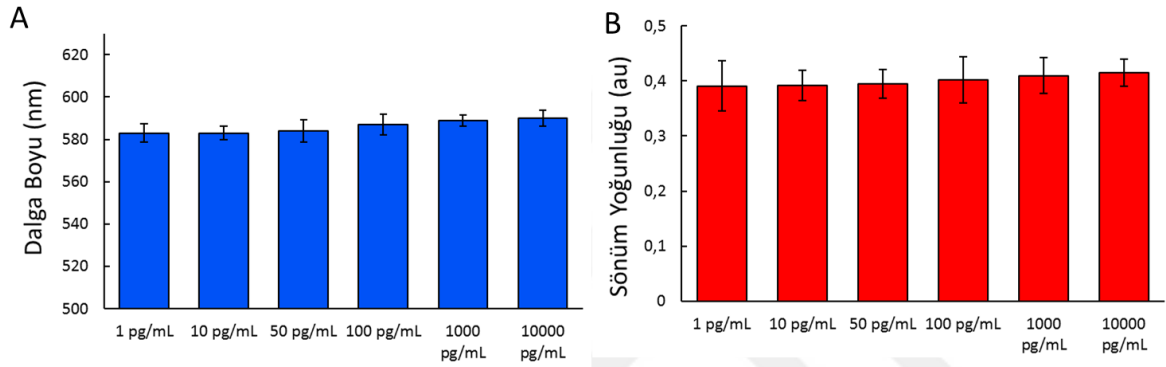
Şekil 3.48 A BSA konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerini ( $\Delta\lambda_{max}$ ) göstermektedir. Şekil 3.48 B ise BSA konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerinin eğri uydurma yöntemine göre değerlendirilmesini göstermektedir. Buna göre grafiğin  $R^2$  değeri 0.98 olarak hesaplanmıştır. 1 pg/mL'den itibaren konsantrasyona bağlı olarak LSPR spektrallerinde düzenli bir kırmızı kayma tespit edilmiştir. Standart nanoplazmonik yüzeylerde düşük konsantrasyonlarda (1 ve 10 pg/mL) maksimum dalga boylarında kayma tespit edilememişken altın nanopartiküllerin statik olarak *in-situ* büyütülmesiyle hassasiyeti artırılmış nanoplazmonik yüzeylerde 1 pg/mL BSA konsantrasyonunda itibaren anlamlı dalga

boyu kaymaları tespit edilmiştir (n=6 p<0.05). BSA için ölçümlerin tekrarlanabilirliği %84-98 arasında bulunmuştur (Şekil 3.48 C).



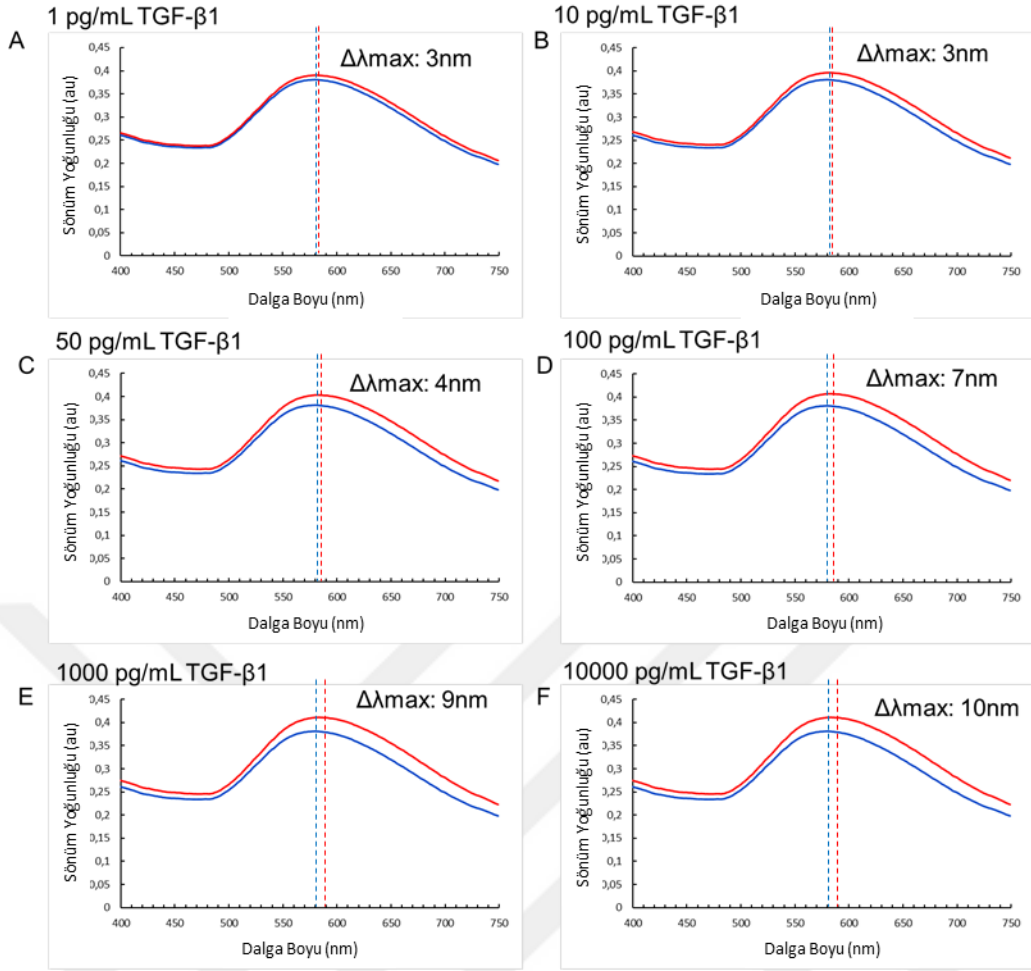
Şekil 3.48 Statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış BSA tespiti için alınan ölçümler. A) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.

Statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde BSA tayin çalışmaları yapıldıktan sonra TGF- $\beta$ 1 biyobelirteçinin tayin çalışmalarına geçilmiştir. TGF- $\beta$ 1 etkileştirilmeden önce nanoplazmonik yüzeyden ölçülen maksimum dalga boyu ve sönüm yoğunluğu  $580 \pm 2.1$  nm ve 0.38 au olarak ölçülmüştür. 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu değerleri  $583 \pm 4.4$ ,  $583 \pm 3.1$ ,  $584 \pm 5.2$ ,  $587 \pm 4.8$ ,  $599 \pm 2.7$  ve  $590 \pm 3.6$  nm (Şekil 3.49 A) olarak ölçülürken sönüm yoğunlukları sırasıyla 0.39, 0.39, 0.39, 0.40, 0.41 ve 0.41 au olarak ölçülmüştür (Şekil 3.49 B).



Şekil 3.49 TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirilen statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au).

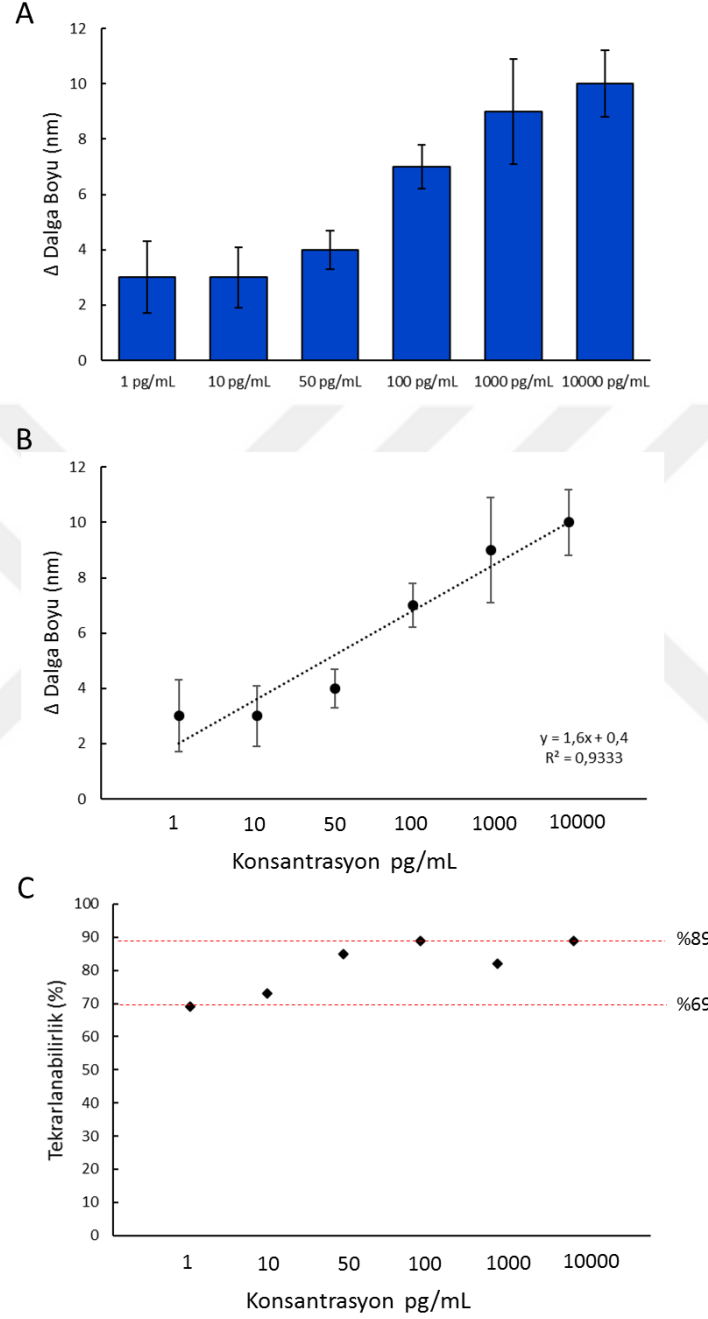
1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu kaymaları sırasıyla  $3 \pm 1.30$ ,  $3 \pm 1.10$ ,  $4 \pm 0.73$ ,  $7 \pm 0.82$ ,  $9 \pm 1.90$  ve  $10 \pm 1.22$  nm olarak ölçülmüştür. Ölçülen değerler 1 pg/mL'den itibaren TGF- $\beta$ 1 etkileştirilmemiş yüzeye göre anlamlı olarak artmıştır ( $n=6$   $p<0.05$ ). Standart nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri Şekil 3.50'de verilmiştir.



Şekil 3.50 Statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir).

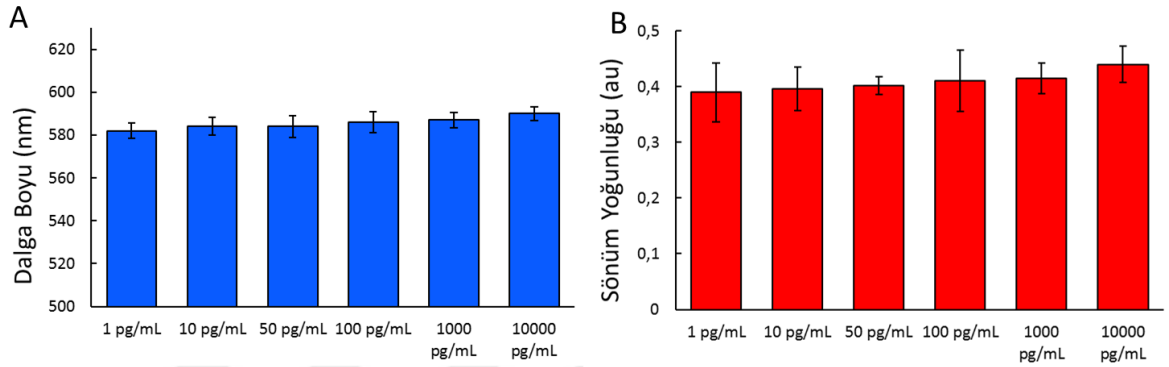
Şekil 3.51 A TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerini ( $\Delta\lambda_{max}$ ) göstermektedir. Şekil 3.52 B ise TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerinin eğri uydurma yöntemine göre değerlendirilmesini göstermektedir. Buna göre grafiğin  $R^2$  değeri 0.93 olarak hesaplanmıştır. 1 pg/mL'den itibaren konsantrasyona bağlı olarak LSPR spektrallerinde düzenli bir kırmızı kayma tespit edilmiştir. TGF- $\beta$ 1 biyobelirteçi için standart nanoplazmonik yüzeylerde düşük konsantrasyonlarda (1-100 pg/mL) maksimum dalga boylarında kayma tespit edilememişken altın nanopartiküllerin statik olarak *in-situ* büyütülmesiyle hassasiyeti artırılmış nanoplazmonik yüzeylerde 1 pg/mL TGF- $\beta$ 1

konsantrasyonunda itibaren anlamlı dalga boyu kaymaları tespit edilmiştir (n=6 p<0.05). TGF-β1 için ölçümlerin tekrarlanabilirliği %69-89 arasında bulunmuştur. (Şekil 3.51 C)



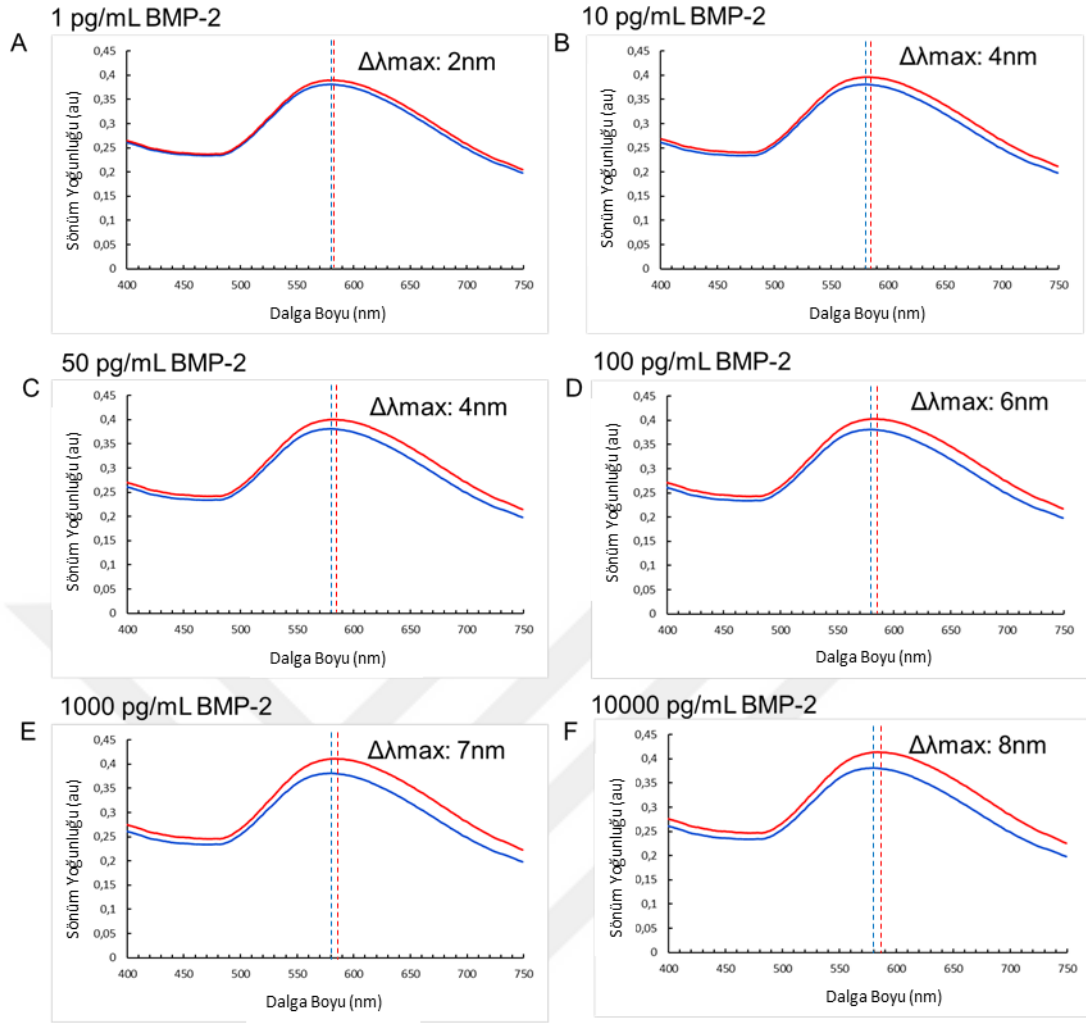
Şekil 3.51 Statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış TGF-β1 tespiti için alınan ölçümler. A) TGF-β1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) TGF-β1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) TGF-β1 konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.

Çalışmada kullanılan diğer düşük molekül ağırlıklı biyobelirteç olan BMP-2'nin (13 kDa) statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeyler için tayin çalışmalarında BMP-2 etkileştirilmeden önce nanoplazmonik yüzeyden ölçülen maksimum dalga boyu ve sönüm yoğunluğu  $580 \pm 2.1$  nm ve 0.38 au olarak ölçülmüştür. 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL BMP-2 konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu değerleri  $582 \pm 3.6$ ,  $584 \pm 4.1$ ,  $584 \pm 5.1$ ,  $586 \pm 4.8$ ,  $587 \pm 3.7$  ve  $590 \pm 3.1$  nm (Şekil 3.52 A) olarak ölçülürken sönüm yoğunlukları sırasıyla 0.39, 0.39, 0.40, 0.41, 0.41 ve 0.44 au olarak ölçülmüştür (Şekil 3.52 B).



Şekil 3.52 BMP-2 ile etkileştirilne statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au).

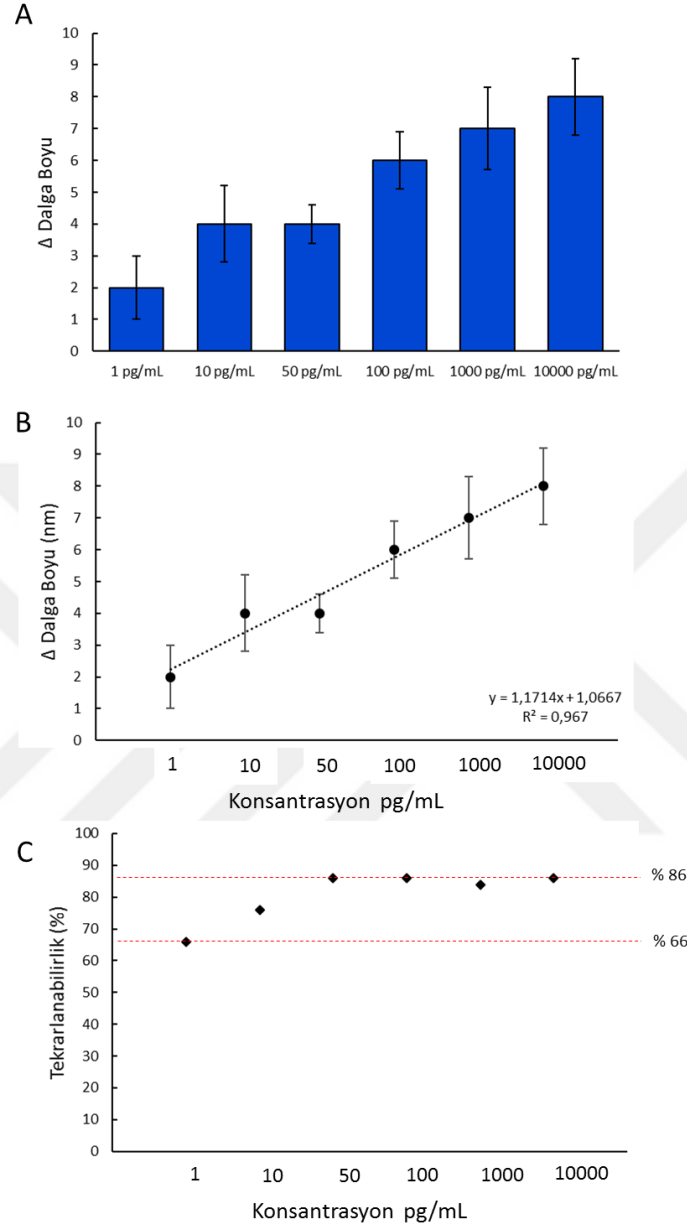
1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL BMP-2 konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu kaymaları sırasıyla  $2 \pm 1.10$ ,  $4 \pm 1.21$ ,  $4 \pm 0.62$ ,  $6 \pm 0.92$ ,  $7 \pm 1.34$  ve  $8 \pm 1.22$  nm olarak ölçülmüştür. Ölçülen değerler 1 pg/mL'den itibaren BMP-2 etkileştirilmemiş yüzeye göre anlamlı olarak artmıştır ( $n=6$   $p<0.05$ ). Standart nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BMP-2 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri Şekil 3.53' te verilmiştir.



Şekil 3.53 Statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BMP-2 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir).

Şekil 3.54 A BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerini ( $\Delta\lambda_{max}$ ) göstermektedir. Şekil 3.54 B ise BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerinin eğri uydurma yöntemine göre değerlendirilmesini göstermektedir. Buna göre grafiğin  $R^2$  değeri 0.96 olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde TGF- $\beta$ 1 olduğu gibi standart nanoplazmonik yüzeylerde düşük konsantrasyonlarda (1-100 pg/mL) maksimum dalga boylarında kayma tespit edilememişken altın nanopartiküllerin statik olarak *in-situ* büyütülmesiyle hassasiyeti artırılmış nanoplazmonik yüzeylerde 1 pg/mL BMP-2 konsantrasyonunda itibaren anlamlı

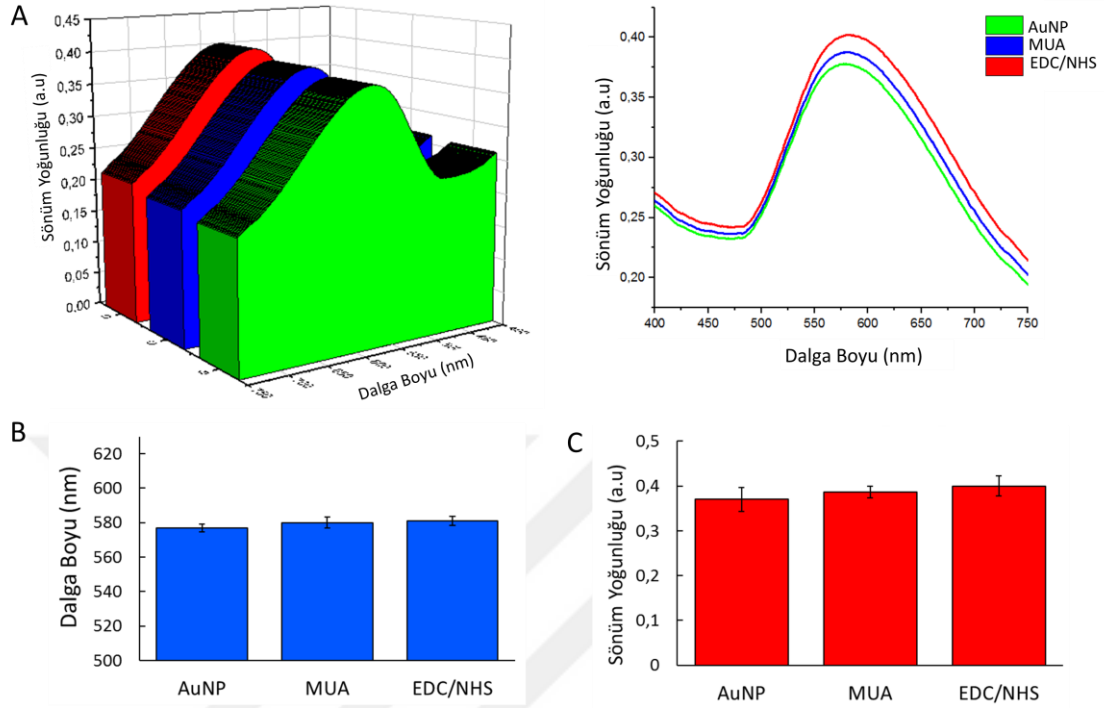
dalga boyu kaymaları tespit edilmiştir (n=6 p<0.05). BMP-2 için ölçümlerin tekrarlanabilirliği %66-86 arasında bulunmuştur (Şekil 3.54 C).



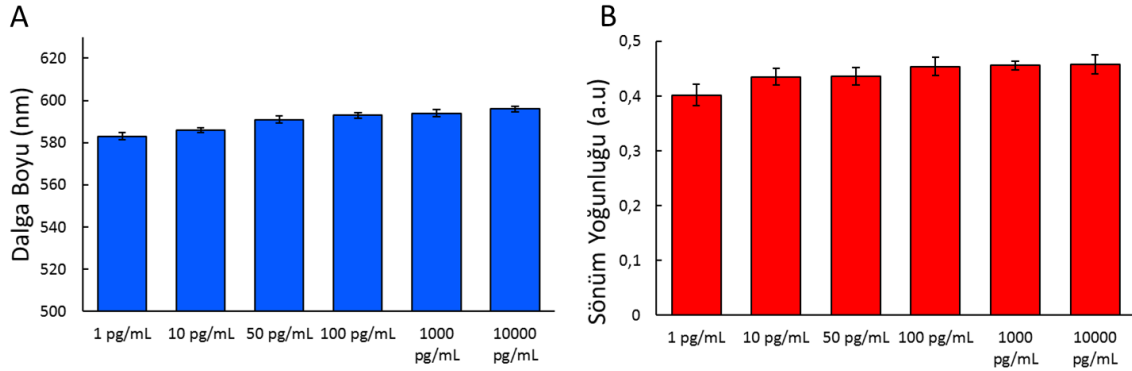
Şekil 3.54 Statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış BMP-2 tespiti için alınan ölçümler. A) BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.

Altın nanopartiküllerin statik koşullardaki çalışmalarından sonra türbülans akış rejimine sahip mikroçipler içerisinde büyütüldüğü nanoplazmonik yüzeylerde prostat kanseri biyobelirteçleri tayin çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Mikroçipler içerisinde üretilen nanoplazmonik yüzeylere yine mikroakışkan çipler içerisinde sırasıyla MUA modifikasyonu ve EDC/NHS modifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Yüzey modifikasyonuna başlamadan önce altın nanopartiküllerin türbülans akış altında *in-situ* olarak büyütüldüğü yüzeyler için maksimum dalga boyu  $577\pm 2.3$  nm ve sönüm yoğunluğu 0.37 au olarak ölçülmüştür. MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra maksimum dalga boyları kırmızı kayma göstererek sırasıyla  $580\pm 3.1$  ve  $581\pm 2.7$  nm ölçülmüştür. Sönüm yoğunlukları ise MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra artış göstererek 0.38 ve 0.40 au olarak ölçülmüştür. Dalga boyunda meydana gelen kırmızı kayma ve sönüm yoğunluklarındaki artış yüzey modifikasyonlarının başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir ( $n=6$   $p<0.05$ ) (Şekil 3.55).

Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak altın nanopartiküllerin büyütülmesiyle elde edilen nanoplazmonik yüzeylerin performanslarını değerlendirmek için ilk olarak BSA prostat kanseri biyobelirteçi tayin çalışmaları yürütülmüştür. BSA etkileştirilmeden önce nanoplazmonik yüzeyden ölçülen maksimum dalga boyu ve sönüm yoğunluğu  $581\pm 1.2$  nm ve 0.40 au olarak ölçülmüştür. 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL BSA konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu değerleri  $582\pm 1.6$ ,  $583\pm 1.7$ ,  $586\pm 1.2$ ,  $591\pm 1.6$ ,  $593\pm 1.4$  ve  $596\pm 1.3$  nm (Şekil 3.56 B) olarak ölçülürken sönüm yoğunlukları sırasıyla 0.40, 0.43, 0.43, 0.45, 0.45 ve 0.45 au olarak ölçülmüştür (Şekil 3.56 C).



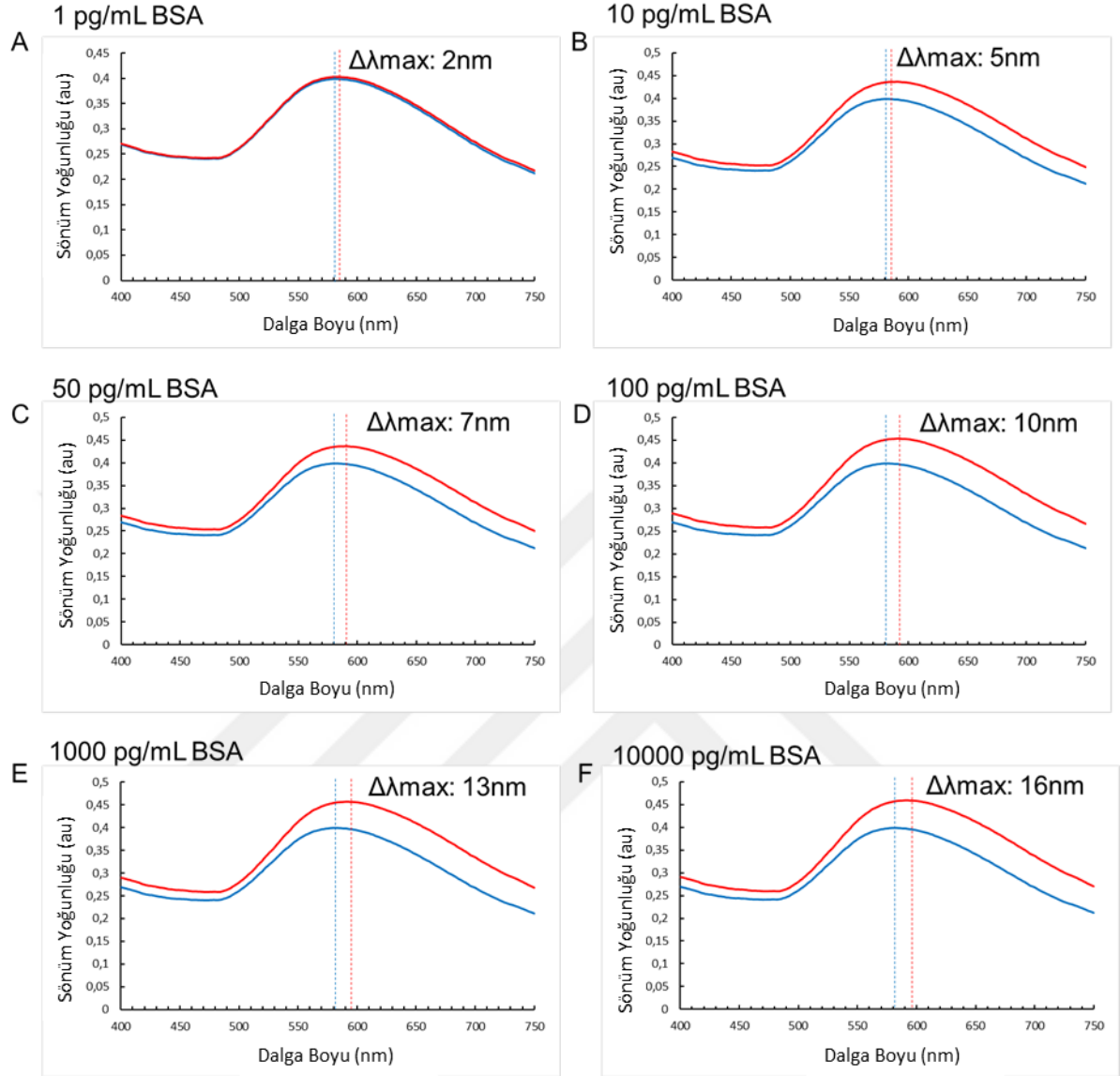
Şekil 3.55 Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak altın nanopartiküllerin büyütülmesinden sonra LSPR sinyali artırılmış yüzeylerde LSPR sinyallerinde meydana gelen değişimler. A) Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütüldüğü nanoplazmonik yüzeylere sırasıyla MUA ve EDC/NHS modifikasyonları uygulandıktan sonra ölçülen LSPR spektraları ve LSPR spektralarının enine kesiti. B) Statik koşullarda *in-situ* büyüme sonucu LSPR sinyal hassasiyeti artırılmış nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra ölçülen LSPR spektralarının maksimum dalga boyları ( $\lambda_{max}$ ). C) Statik koşullarda *in-situ* büyüme sonucu LSPR sinyal hassasiyeti artırılmış nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra ölçülen LSPR spektralarının maksimum sönüm yoğunlukları. B) Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütüldüğü nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra LSPR spektralarındaki maksimum dalga boyları ( $\lambda_{max}$ ). C) Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde altın nanopartiküllerin PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütüldüğü nanoplazmonik yüzeylere MUA ve EDC/NHS yüzey modifikasyonlarından sonra LSPR spektralarındaki maksimum sönüm yoğunlukları.



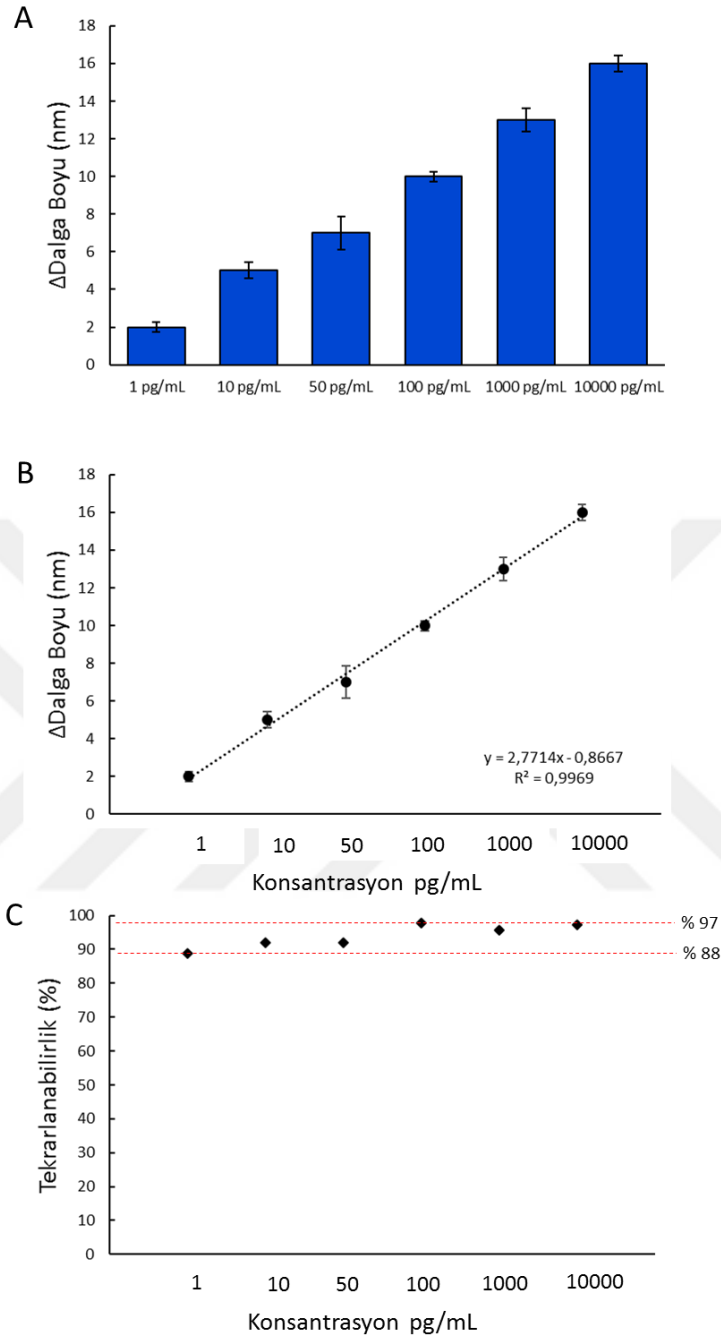
Şekil 3.56 BSA ile etkileştirilen türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au).

1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL BSA konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu kaymaları sırasıyla  $2 \pm 0.25$ ,  $5 \pm 0.43$ ,  $7 \pm 0.87$ ,  $10 \pm 0.26$ ,  $13 \pm 0.61$  ve  $16 \pm 0.44$  nm olarak ölçülmüştür. Ölçülen değerler 1 pg/mL'den itibaren BSA etkileştirilmemiş yüzeye göre anlamlı olarak artmıştır ( $n=3$   $p<0.05$ ). Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak altın nanopartikülerin büyütülmesiyle elde edilen nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BSA ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri Şekil 3.57'de verilmiştir.

Şekil 3.58 A BSA konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerini ( $\Delta\lambda_{max}$ ) göstermektedir. Şekil 3.58 B ise BSA konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerinin eğri uydurma yöntemine göre değerlendirilmesini göstermektedir. Buna göre grafiğin  $R^2$  değeri 0.99 olarak hesaplanmıştır. Standart nanoplazmonik yüzeylerde BSA'nın düşük konsantrasyonlarda (1 ve 10 pg/mL) maksimum dalga boylarında kayma tespit edilememişken Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak altın nanopartikülerin büyütülmesiyle elde edilen nanoplazmonik yüzeylerde 1 pg/mL BSA konsantrasyonunda itibaren anlamlı dalga boyu kaymaları tespit edilmiştir ( $n=3$   $p<0.05$ ). BSA için ölçümlerin tekrarlanabilirliği %88-97 arasında bulunmuştur (Şekil 3.58 C).

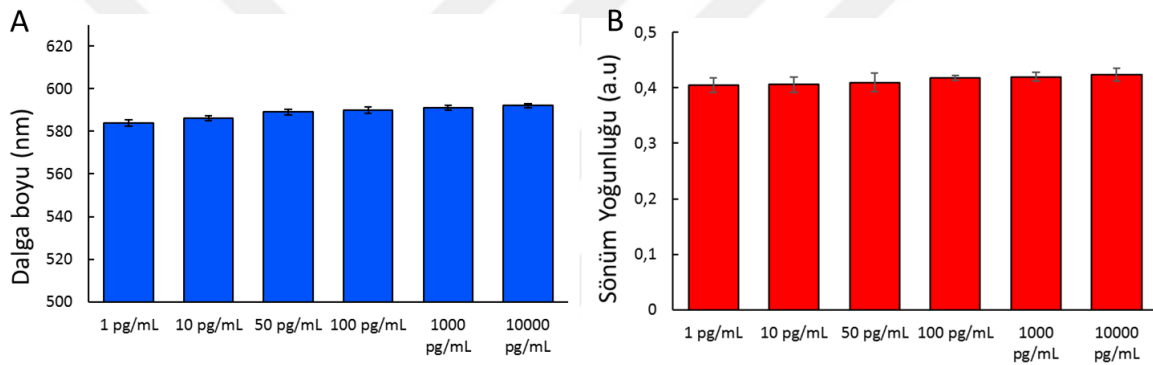


Şekil 3.57 Türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BSA ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{\text{max}}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir).



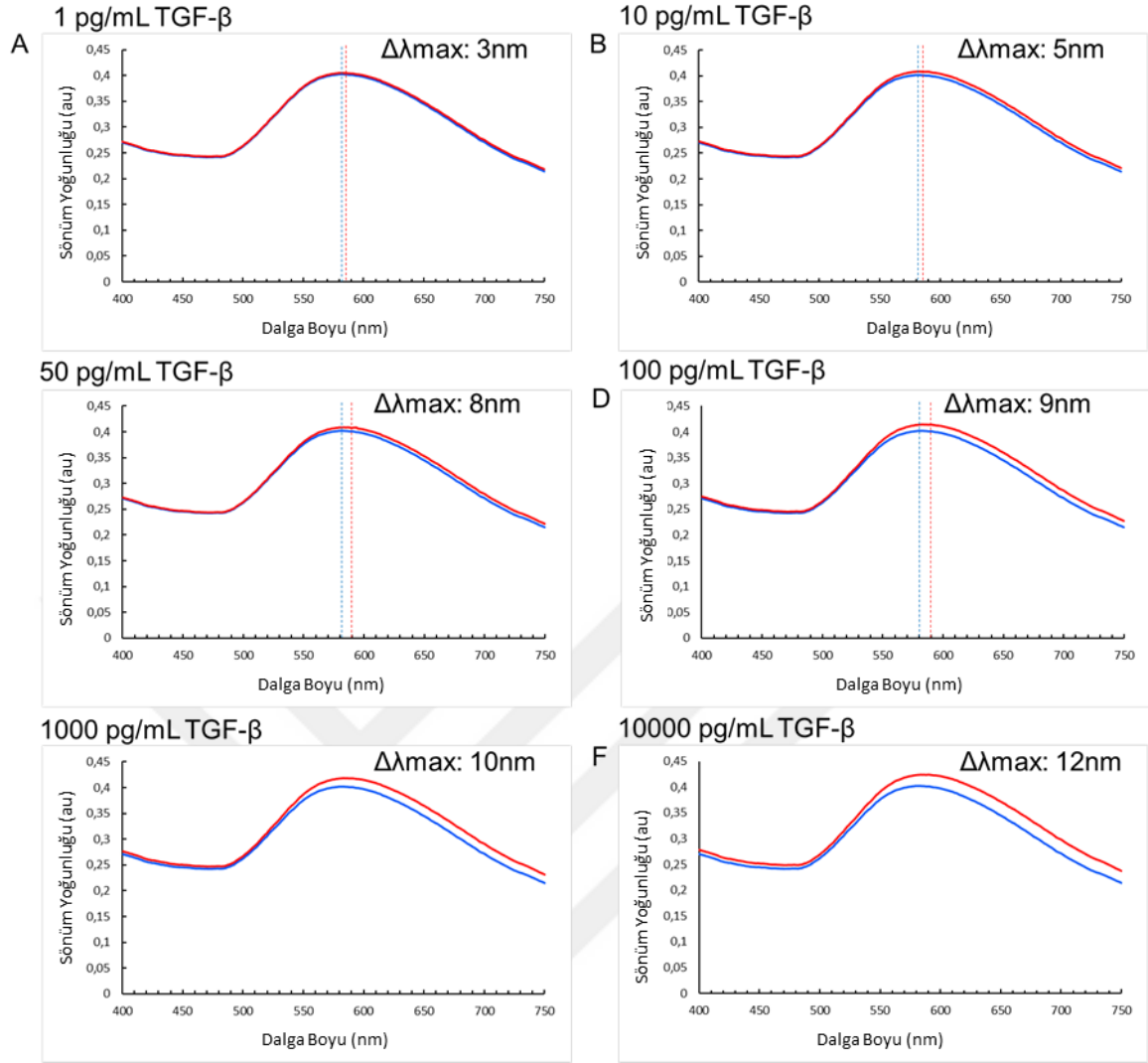
Şekil 3.58 Türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış BSA tespiti için alınan ölçümler. A) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) BSA konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.

Türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin performanslarını değerlendirmek için ilk olarak BSA tayin çalışmaları yürütüldükten sonra molekül ağırlığı BSA'ya göre çok daha düşük olan ve prostat kanseri oluşumunda ve metastazında oldukça önemli olan TGF- $\beta$ 1 biyobelirteçinin tayin çalışmalarına geçilmiştir. TGF- $\beta$ 1 etkileştirilmeden önce nanoplazmonik yüzeyden ölçülen maksimum dalga boyu ve sönüm yoğunluğu  $581 \pm 1.2$  nm ve 0.40 au olarak ölçülmüştür. 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu değerleri  $584 \pm 1.4$ ,  $586 \pm 1.1$ ,  $589 \pm 1.3$ ,  $590 \pm 1.4$ ,  $591 \pm 1.1$  ve  $592 \pm 1.0$  nm (Şekil 3.59 A) olarak ölçülürken sönüm yoğunlukları sırasıyla 0.40, 0.40, 0.41, 0.41, 0.42 ve 0.42 au olarak ölçülmüştür (Şekil 3.59 B).



Şekil 3.59 TGF- $\beta$ 1 için türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au).

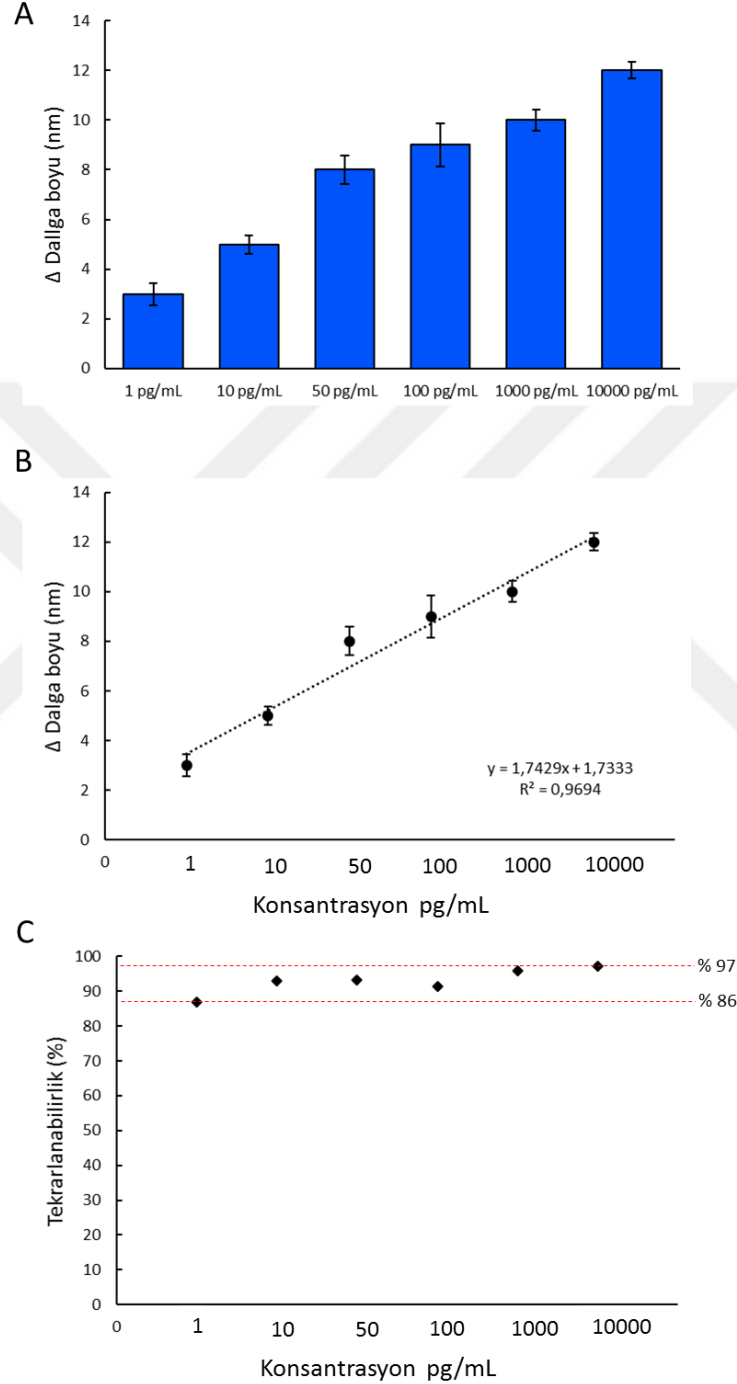
1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu kaymaları sırasıyla  $3 \pm 0.45$ ,  $5 \pm 0.37$ ,  $8 \pm 0.57$ ,  $9 \pm 0.86$ ,  $10 \pm 0.43$  ve  $12 \pm 0.34$  nm olarak ölçülmüştür. Ölçülen değerler 1 pg/mL'den itibaren TGF- $\beta$ 1 etkileştirilmemiş yüzeye göre anlamlı olarak artmıştır ( $n=3$   $p<0.05$ ). Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak altın nanopartikülerin büyütülmesiyle elde edilen nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri Şekil 3.60'ta verilmiştir.



Şekil 3.60 Türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında TGF- $\beta$ 1 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir).

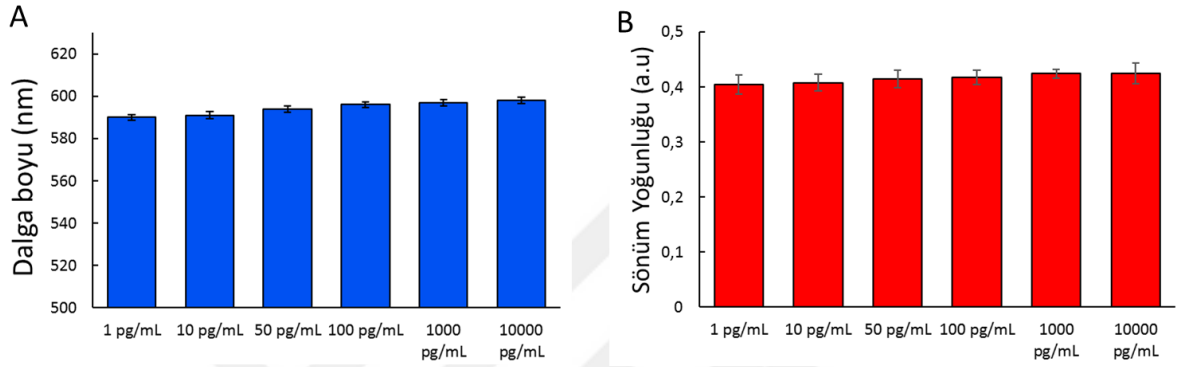
Şekil 3.61 A TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerini ( $\Delta\lambda_{max}$ ) göstermektedir. Şekil 3.61 B ise TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerinin eğri uydurma yöntemine göre değerlendirilmesini göstermektedir. Buna göre grafiğin  $R^2$  değeri 0.96 olarak hesaplanmıştır. TGF- $\beta$ 1 biyobelirteçi için standart nanoplazmonik yüzeylerde düşük konsantrasyonlarda (1 ve 100 pg/mL) maksimum dalga boylarında kayma tespit edilememişken türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak altın nanopartiküllerin büyütülmesiyle elde edilen nanoplazmonik yüzeylerde 1 pg/mL TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonunda itibaren anlamlı dalga boyu kaymaları tespit edilmiştir (n=3

p<0.05). TGF- $\beta$ 1 için ölçümlerin tekrarlanabilirliği %86-97 arasında bulunmuştur (Şekil 3.61 C).



Şekil 3.61 Türlüans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış TGF- $\beta$ 1 tespiti için alınan ölçümler. A) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.

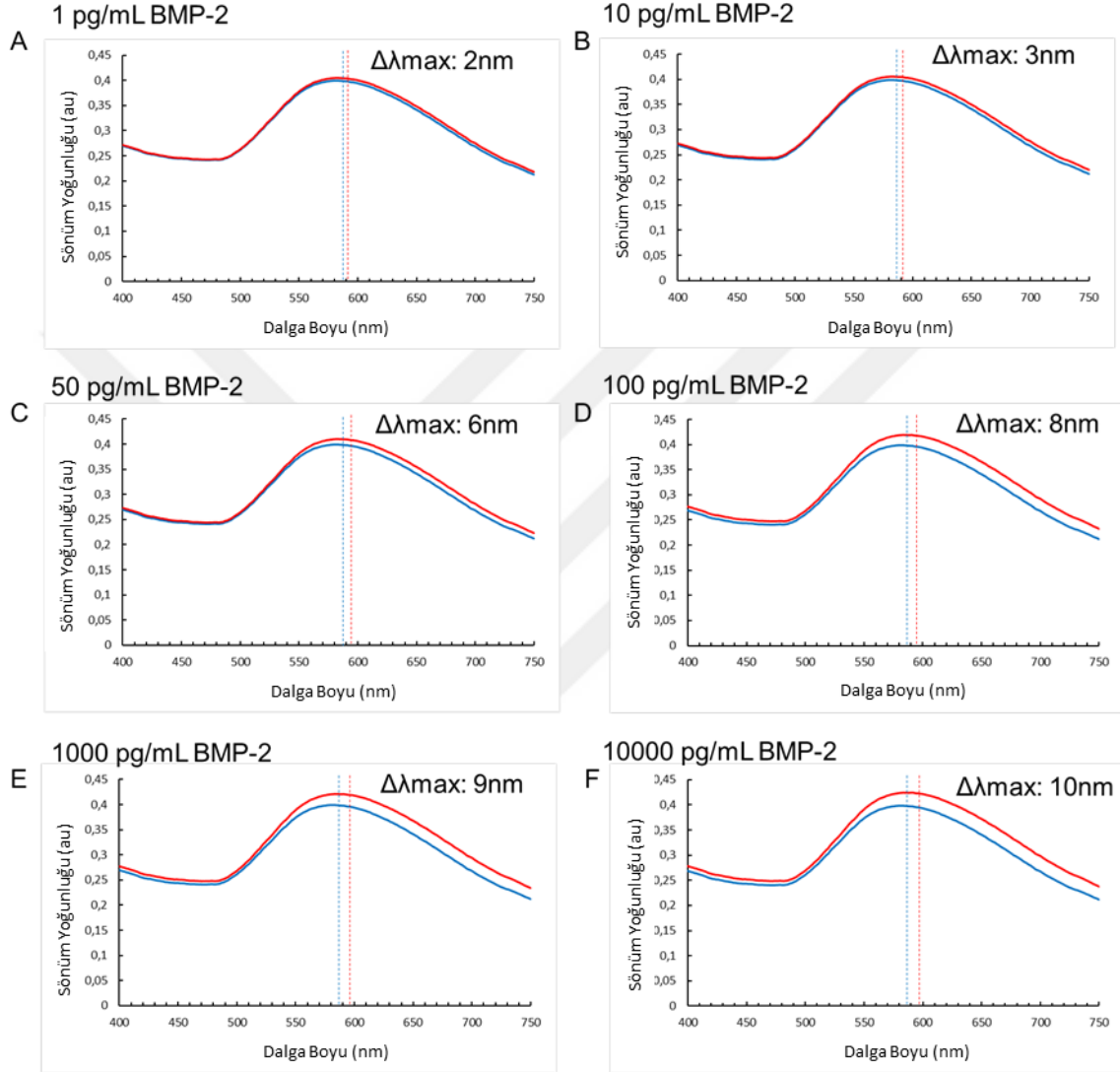
Benzer şekilde BMP-2 biyobelirteçinin türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin tayin çalışmalarında BMP-2 etkileştirilmeden önce nanoplazmonik yüzeyden ölçülen maksimum dalga boyu ve sönüm yoğunluğu  $581 \pm 1.2$  nm ve 0.40 au olarak ölçülmüştür. 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL BMP-2 konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu değerleri  $590 \pm 1.2$ ,  $591 \pm 1.7$ ,  $594 \pm 1.5$ ,  $596 \pm 1.3$ ,  $597 \pm 1.4$  ve  $598 \pm 1.3$  nm (Şekil 3.62 A) olarak ölçülürken sönüm yoğunlukları sırasıyla 0.40, 0.40, 0.40, 0.41, 0.42 ve 0.42 au olarak ölçülmüştür (Şekil 3.62 B).



Şekil 3.62 BMP-2 için türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin, A) Maksimum dalga boyları (nm) ve B) Sönüm yoğunlukları (au).

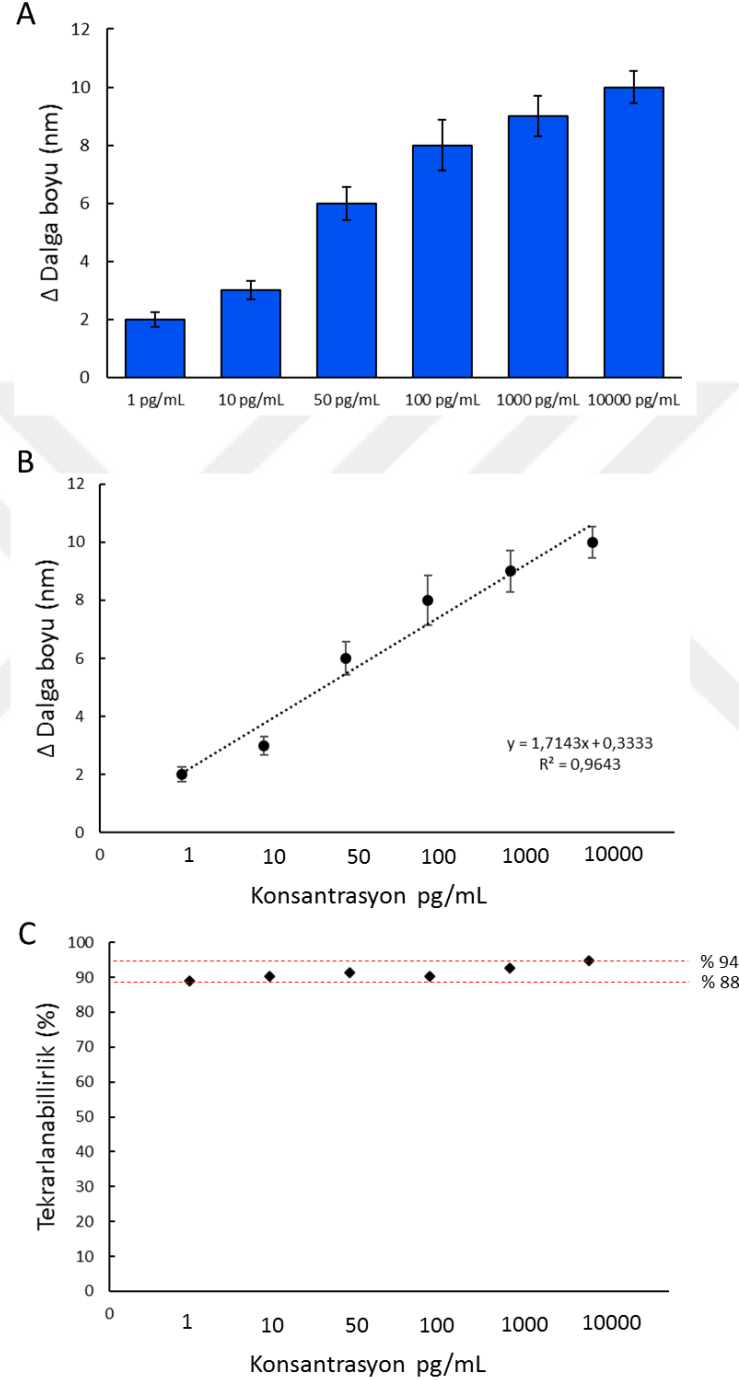
1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL BMP-2 konsantrasyonları için ölçülen maksimum dalga boyu kaymaları sırasıyla  $2 \pm 0.25$ ,  $3 \pm 0.32$ ,  $6 \pm 0.56$ ,  $8 \pm 0.79$ ,  $9 \pm 0.71$  ve  $10 \pm 0.54$  nm olarak ölçülmüştür. Ölçülen değerler 1 pg/mL'den itibaren BMP-2 etkileştirilmemiş yüzeye göre anlamlı olarak artmıştır ( $n=3$   $p<0.05$ ). Türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak altın nanopartikülerin büyütülmesiyle elde edilen nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BMP-2 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri Şekil 3.63' te verilmiştir. Şekil 3.64 A BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerini ( $\Delta\lambda_{max}$ ) göstermektedir. Şekil 3.64 B ise BMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimlerinin eğri uydurma yöntemine göre değerlendirilmesini göstermektedir. Buna göre grafiğin  $R^2$  değeri 0.96 olarak hesaplanmıştır. BMP-2 biyobelirteçi için standart nanoplazmonik yüzeylerde düşük konsantrasyonlarda (1 ve 100 pg/mL) maksimum dalga boylarında kayma tespit edilememişken türbülans akış rejimine sahip mikroçip içerisinde *in-situ* olarak altın nanopartikülerin

büyütülmesiyle elde edilen nanoplazmonik yüzeylerde 1 pg/mL TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonunda itibaren anlamlı dalga boyu kaymaları tespit edilmiştir (n=3 p<0.05).



Şekil 3.63 Türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında BMP-2 ile etkileştirildiklerinden önce ve sonraki LSPR spektralleri ve maksimum dalga boyunda meydana gelen kayma değişimleri ( $\Delta\lambda_{max}$ ) (Mavi spektrum etkileşimden önce kırmızı spektrum ise etkileşimden sonraki ölçümleri göstermektedir).

BMP-2 için ölçümlerin tekrarlanabilirliği %88-94 arasında bulunmuştur (Şekil 3.64 C).

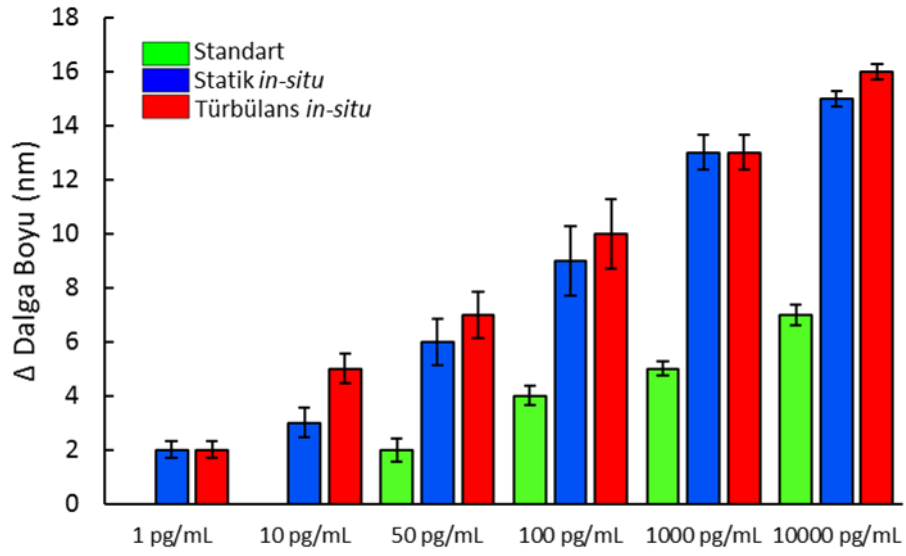


Şekil 3.64 Türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde PBS içerisinde 1-10000 pg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmış TGF-β1 tespiti için alınan ölçümler. A) TGF-β1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi. B) TGF-β1 konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen dalgaboyu değişimi ve kalibrasyon eğrisi C) TGF-β1 konsantrasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmanın tekrarlanabilirliği.

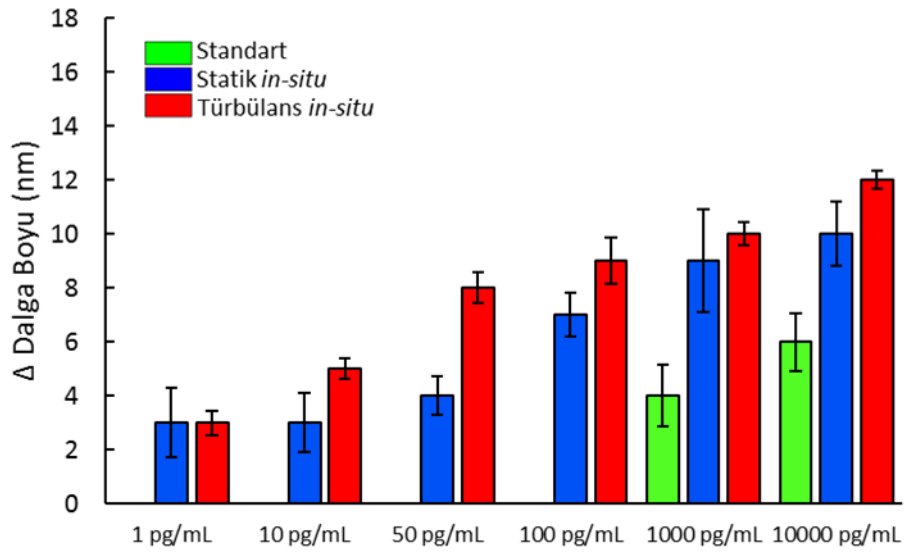
Nanoplazmonik yüzeylerin performanslarını değerlendirmek için öncelikle büyük molekül ağırlığına sahip BSA'nın tayin çalışmaları yürütülmüştür. Buna göre standart nanoplazmonik yüzeylerde BSA'nın düşük konsantrasyonlarda (1 ve 10 pg/mL) maksimum dalga boylarında kayma tespit edilememişken altın nanopartiküllerin statik *in-situ* ve türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde 1 pg/mL BSA konsantrasyonunda itibaren anlamlı dalga boyu kaymaları tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). Bunun en büyük nedeni PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütülen nanopartiküllerin birbirlerine daha da yaklaşarak plazmonik eşleşmelerini ve elektrik alanlarını arttırmakla birlikte partiküller arasındaki sıcak noktaları da arttırmasıdır (Bölüm 3.1). Plazmonik eşleşme ve sıcak noktaların artması LSPR sinyallerinin maksimum dalga boylarında yüksek oranda kırmızı kaymalara sebep olarak sönüm yoğunluklarını anlamlı bir şekilde arttırmaktadır [115, 116]. Böylece yüzeyde analit konsantrasyonu çok düşükken bile partiküller arası artmış sıcak noktalarla birlikte kırılma indislerindeki çok küçük değişimler ölçülebilir hale gelmektedir. Ayrıca bu durum yüksek BSA konsantrasyonlarında (50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL) standart nanoplazmonik yüzeylere göre daha fazla maksimum dalga boyu kaymasına sebep olmuştur.

Standart nanoplazmonik yüzeylerde düşük molekül ağırlığına sahip TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 tayin çalışmalarında 1-100 pg/mL konsantrasyonlarında LSPR spektralarında ölçülebilir bir değişikliğin tespit edilememiştir. Bunun en büyük nedeni biyobelirteçlerin çok düşük molekül ağırlığına sahip olmasının yanı sıra 1-100 pg/mL konsantrasyonları arasında ortama eklenen protein miktarının nanoplazmonik yüzeylerde (altın nanopartiküllerin çevresinde) herhangi bir kırılma indisi değişimine sebep olmamasıdır. Standart nanoplazmonik yüzeylerdeki altın nanopartiküllerin etrafında meydana gelen plazmon rezonansı partiküller arası mesafenin yetersiz olması ve nanopartiküllerin yüzeyde yüksek plazmon eşleşmesi gösteremediğinden düşük molekül ağırlıklı ve düşük konsantrasyonlu analit miktarı için ölçülebilir sonuçlar vermemiştir.

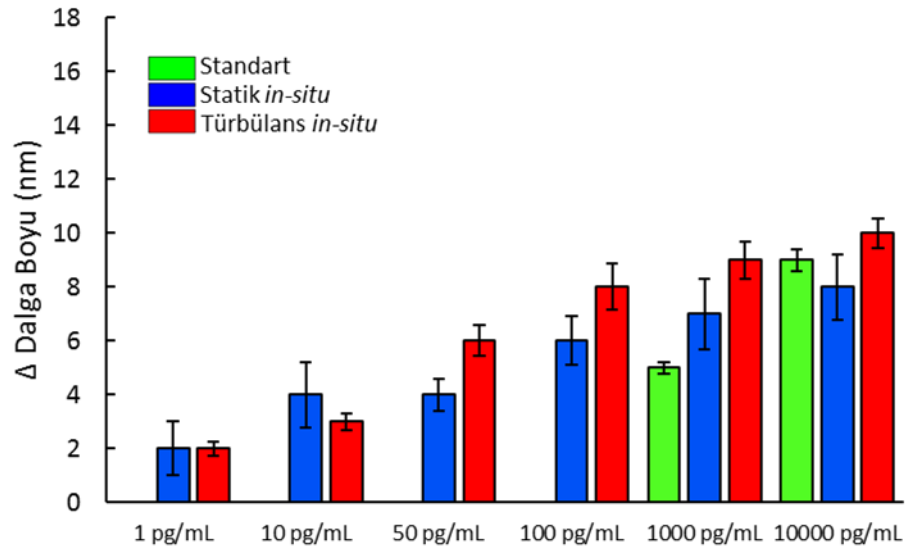
Statik *in-situ* ve türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerinde BSA, TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 tespiti 1 pg/mL konsantrasyonundan itibaren anlamlı maksimum dalga boyu değişimleri tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). Ayrıca bu biyobelirteçlerin standart, statik *in-situ* ve türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeyleri için maksimum dalga boyu kaymaları sırasıyla Şekil 3.65, Şekil 3.66 ve Şekil 3.67'de verilmiştir.



Şekil 3.65 Nanoplazmonik yüzeylerin farklı BSA konsantrasyonlarındaki performanslarının karşılaştırılması.



Şekil 3.66 Nanoplazmonik yüzeylerin farklı TGF-β1 konsantrasyonlarındaki performanslarının karşılaştırılması.



Şekil 3.67 Nanoplazmonik yüzeylerin farklı BMP-2 konsantrasyonlarındaki performanslarının karşılaştırılması.

Nanoplazmonik yüzeylerin  $R^2$  ve tekrarlanabilirlik değerleri Tablo 3.3'te verilmiştir. Statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde yapılan tayin çalışmalarında alınan ölçümlerin standart sapmaları standart nanoplazmonik yüzey ve türbülans akışla *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin ölçümlerinden daha yüksek çıkmıştır. Bu da statik *in-situ* nanoplazmonik yüzeyler için ölçümlerin tekrarlanabilirliğini düşürmüştür. Bunun en büyük sebebinin PS yüzeylerde statik *in-situ* büyüme sırasında çok tabakalı altın nanopartikül agregatlarının oluşması ve bu agregatların LSPR sinyalinde anlamlı bir artış sağlasa da farklı konsantrasyonlarda biyobelirteçlerle etkileştirildiklerinde LSPR spektralarında varyasyonlara sebep olduğu düşünülmektedir. En yüksek tekrarlanabilirlik değerleri türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeyler için hesaplanmıştır. Bu da türbülans akışın etkisiyle yüzeyde homojen bir şekilde büyütülen altın nanopartiküllerin aynı biyobelirteç konsantrasyonlarında daha standardize ölçümler alınmasını sağlamıştır.

Ölçümler arasında eğri uydurma yöntemine göre en düşük  $R^2$  değerleri standart nanoplazmonik yüzeylerde düşük molekül ağırlığına sahip biyobelirteçlerin (TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 ) tayininde sırasıyla 0.71 ve 0.70 olarak hesaplanmıştır. Bunun nedeni nanoplazmonik yüzeylerde 1000 pg/mL konsantrasyonuna kadar herhangi bir dalga boyu kayması tespit edilememesidir. En yüksek  $R^2$  değerleri türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeyin BSA tayininde bulunmuştur (0.99). Aynı nanoplazmonik

yüzeyin TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 tayininde ise  $R^2$  değeri 0.96 olarak hesaplanmıştır. Bu da biyobelirteç konsantrasyonu arttıkça ölçümler arasında yüksek bir korelasyon olduğunu göstermektedir [87, 117].

Tablo 3.3 Nanoplazmonik yüzeylerin  $R^2$  ve tekrarlanabilirlik değerleri.

| Biyobelirteç   | Nanoplazmonik Yüzey      | $R^2$ Değeri | Tekrarlanabilirlik (%) | Ölçülen Konsantrasyon Aralığı (pg/mL) |
|----------------|--------------------------|--------------|------------------------|---------------------------------------|
| BSA            | Standart                 | 0.96         | 82-94                  | 50,100,1000, 10000                    |
| TGF- $\beta$ 1 | Standart                 | 0.71         | 81-84                  | 1000,10000                            |
| BMP-2          | Standart                 | 0.70         | 81-84                  | 1000, 10000                           |
| BSA            | Statik <i>In-situ</i>    | 0.98         | 84-98                  | 1,10, 50, 100, 1000,10000             |
| TGF- $\beta$ 1 | Statik <i>In-situ</i>    | 0.93         | 69-89                  | 1,10, 50, 100, 1000,10000             |
| BMP-2          | Statik <i>In-situ</i>    | 0.96         | 66-86                  | 1,10, 50, 100, 1000,10000             |
| BSA            | Türbülans <i>In-situ</i> | 0.99         | 88-97                  | 1,10, 50, 100, 1000,10000             |
| TGF- $\beta$ 1 | Türbülans <i>In-situ</i> | 0.96         | 86-97                  | 1,10, 50, 100, 1000,10000             |
| BMP-2          | Türbülans <i>In-situ</i> | 0.96         | 88-94                  | 1,10, 50, 100, 1000,10000             |

Tez kapsamında performansları değerlendirilen nanoplazmonik yüzeyler arasında en yüksek hassasiyete sahip olan türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeyler olduğu tespit edilmiştir. Bunun sebebi ise mikroçip içerisindeki türbülans akış ile altın nanopartiküllerin tek sıra halinde yan yana ve sıkı diziler oluşturmasıdır. Bu sıkı altın dizileri türbülans akışla beraber büyüme çözeltisinin (hidrokinon ve H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>) altın nanopartiküllerin yüzeyleriyle etkileşimini daha da artırarak verimli bir *in-situ* büyüme sağlamıştır. PS yüzeylerde oluşturulan sıkı altın dizileri partiküller arası plazmonik eşleşmeleri ve elektrik alan arttırmaları sağlayarak partiküller arası sıcak noktaların oluşumunu arttırmıştır. Partiküller arası artan sıcak noktalar nanoplazmonik yüzeylerin hassasiyetini artırarak düşük molekül ağırlığına sahip biyobelirteçlerin düşük konsantrasyonlarında bile nanoplazmonik yüzeylerde ölçülebilir kaymaların tespitini sağlamıştır. Ayrıca türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeyler standart nanoplazmonik yüzeylerde ölçülebilen biyobelirteçlerin tayininde

de daha fazla maksimum dalga boyu kayması göstererek ölçümün güvenilirliğini arttırmıştır. Literatürde nanoplazmonik tabanlı BSA tayinine yönelik sınırlı sayıda araştırma mevcutken TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 tayinine yönelik çalışma bulunmaktadır. Szunerits ve ark. yaptıkları çalışmada mekanik, kimyasal ve optik olarak kararlı olan indiyum tin oksit (ITO) substratları üzerinde, ince altın filmlerin (2–6 nm), son kaplamaya gerek kalmaksızın doğrudan termal buharlaştırma yoluyla kaplayarak nanoplazmonik yüzeyler oluşturmuş ve geliştirdikleri sensörün hassasiyetin BSA kullanarak test etmişlerdir. Nanoplazmonik sensör üzerine 1 mg/mL BSA eklediklerinde sensörün LSPR spektrasında anlamlı kaymalar tespit etmiştir [118]. Başka bir çalışmada Kim ve ark. BSA'yı 79 nM konsantrasyona kadar tayin edebildiklerini rapor etmiştir [119]. Daha düşük molekül ağırlığına sahip biyobelirteçlerin tayini için sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Örneğin, kanserli hücrelerden endojen olarak salınan interlökin-2 (IL-2) (17.6 kDa) gibi sitokinlerin nanoplazmonik sensörlerde tayin çalışmaları gerçekleştirilmiş ve 1 ng/mL tespit limitine kadar interlökinin tayini yapılabilmektedir [120]. Bunun yanı sıra özellikle düşük molekül ağırlığına sahip kanser biyobelirteçlerinin tayini çok yeni bir konu olduğundan literatürde TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 tespitine yönelik nanoplazmonik tabanlı tayin çalışması bulunmamaktadır. Bu iki biyobelirteçin tayini için ELISA tabanlı tayin sistemleri kullanılmakla birlikte TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 için tespit limitleri sırasıyla 32 pg/mL-2000 pg/mL ve 45 pg/mL-3000 pg/mL aralıklarında değişmektedir (ELISA Kit Katalog). Bu nedenle çalışmada BSA, TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 biyobelirteçleri için tespit edilen tayin limitleri literatür için yeni olup tez kapsamında geliştirilen mikroçip içerisinde *in-situ* partikül büyütme yönteminin düşük molekül ağırlığına sahip kanser biyobelirteçlerinin araştırılmasında oldukça büyük öneme sahip olacağı düşünülmektedir.

#### 4. SONUÇ

Kanser biyobelirteçlerinin tayini son yıllarda kanser tanısı ve izlenmesinde önemli konular arasındadır. Yapılan çalışmalar kanserin erken teşhisine yönelik biyobelirteçlerin tayininde kullanılan LSPR bazlı sensörlerin herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan (label free) kanser biyobelirteçlerini hassas şekilde tayin edebildiğini göstermektedir [121-123]. Ancak LSPR çok yönlü ve hassas bir teknik olmasına rağmen pratikte kullanımı sınırlıdır. Daha önce bahsedildiği gibi kanserin erken evrelerinde aktive olan düşük molekül ağırlığa sahip biyobelirteçlerin LSPR sensör yüzeyinde tespit edilebilir değişiklikler meydana getirmemesi nedeniyle bu tip biyobelirteçlerin teşhisi mümkün olmamaktadır [1]. Son yıllarda düşük molekül ağırlığına sahip biyobelirteçlerin tespit limitini arttırmak için nanopartiküllerin boyut ve şeklinin ayarlanması gibi farklı stratejiler geliştirilmiştir [8]. Bu amaçla, çeşitli yüzey işleme teknolojileri ile yüzeylere (cam, polistiren, polikarbon vb) farklı altın nanopartikül immobilizasyonu yapılmıştır [63, 64]. Literatürde altın nanoyapıların yüzeylere istenilen şekil ve geometride desenlenmesi için elektron demeti litografisi (EBL) nanoküre litografisi (NSL) ve maske aracılı biriktirme yöntemleri (MAD) gibi çeşitli litografik teknikler yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra bu teknikler maliyet ve sofistike elemanlar gerektirmektedir [41-44]. Ayrıca bu yöntemlerle büyük ölçekli ve hızlı plazmonik platformların geliştirilmesi oldukça zordur. Son yıllarda bu yöntemlere alternatif olarak ucuz ve maliyetsiz nanoplazmonik platformlar üretmek için çalışmalar devam etmektedir [63, 124, 125].

Bu tez çalışmasında altın nanopartiküllerin optik özelliklerini ve nanopartiküller arası plazmonik eşleşmeyi arttırarak, LSPR teknolojilerinin ölçüm hassasiyetlerini geliştirmek için literatürdeki yöntemlere alternatif yeni bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yaklaşımda yüzeye immobilize edilmiş altın nanopartikül dizilerinin parçacık boyutunu ve partiküller arası mesafesini ayarlamak için altın nanopartiküller PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütülmüştür. Tez kapsamında altın nanopartiküllerin yüzeyde (*in-situ*) büyütülmesi, statik ve mikroakışkan çiplerde (laminar ve türbülans akış rejimine) incelenmiştir ve türbülans akış rejimine sahip mikroakışkan kanallarda altın nanopartiküllerin tek sıra halinde, yan yana ve sıkı diziler oluşturduğu görülmüştür. Bu sıkı dizilerin oluşmasının en büyük sebeplerinden birisi türbülans akışın sebep olduğu büyüme çözeltisinin (hidrokinon ve  $\text{HAuCl}_4$ ) hız profiline

azalması (2.2-10.5 mm/s) ve büyüme çözeltisinin altın nanopartiküllerin yüzeyleriyle etkileşimini daha da arttırarak verimli bir *in-situ* büyüme sağlamasıdır. Türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerin LSPR sinyallerindeki sönüm yoğunluklarında 3 kata kadar artışla beraber maksimum dalga boyu  $548 \pm 4$  nm'den  $577 \pm 4$  nm'ye anlamlı kaymalar (kırmızı) göstermiştir. LSPR spektralarındaki bu anlamlı değişimlerin nedeni PS yüzeylerde *in-situ* olarak büyütülen nanopartiküllerin birbirlerine daha da yaklaşarak plazmonik eşleşmelerini ve elektrik alanlarını arttırmakla birlikte partiküller arasındaki sıcak noktaları da arttırmasıdır (Bölüm 3.1). Bu artışlarla birlikte yüzeyde analit konsantrasyonu çok düşükken bile partiküller arası artmış sıcak noktalar kırılma indislerindeki çok küçük değişimleri ölçülebilir hale gelmektedir. Bu nedenle prostat kanseri biyobelirteçlerinin (BSA, TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2) tayini için türbülans akış rejimine sahip mikroçipler (türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeyler) seçilmiştir. Nanoplazmonik yüzeylerin performanslarının değerlendirilmesi için standart, statik *in-situ* ve türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerle prostat kanseri biyobelirteçleri etkileştirilmiştir.

Türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde 1 pg/mL BSA konsantrasyonunda itibaren anlamlı dalga boyu kaymaları tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). BSA biyobelirteci için 10, 50, 100 ve 10000 pg/mL konsantrasyonları için en yüksek maksimum dalga boyu kaymaları türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde ölçülmüştür. Ayrıca türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 tespiti 1 pg/mL konsantrasyonundan itibaren nanoplazmonik yüzeylerde anlamlı maksimum dalga boyu değişimlerine sebep olmaktadır ( $p < 0.05$ ). TGF- $\beta$ 1 ve BMP-2 biyobelirteçleri için 1, 10, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL konsantrasyonları için en yüksek maksimum dalga boyu kaymaları türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde ölçülmüştür. Aynı şekilde BMP-2 biyobelirteci için de 1, 50, 100, 1000 ve 10000 pg/mL konsantrasyonları için en yüksek maksimum dalga boyu kaymaları türbülans *in-situ* nanoplazmonik yüzeylerde ölçülmüştür. Bu sonuçlar, mikroçip içersine entegre edilmiş nanoplazmonik platformunun güvenilir, doğru, tekrarlanabilir ve uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Tez kapsamında geliştirilen mikroçip içerisinde *in-situ* partikül büyütme yöntemi, literatürde nanoplazmonik platformların geliştirilmesinde kullanılan pahalı laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç duymadan ucuz ve kolay bir şekilde tespit hassasiyeti yüksek nanoplazmonik platformların geliştirilmesini sağlamıştır. LSPR

bazlı sensörlerin mikroakışkan kanallara entegrasyonu hala büyük bir araştırma konusudur. Literatürde yaygın olarak kullanılan litografik teknikler altın nanoyapıların farklı geometrilere mikroakışkan kanallara desenlenmesine izin vermemektedir. Bu çalışmada mikroakışkan platformların içerisine entegre edilerek geliştirilen nanoplazmonik yüzeylerin literatürdeki bu boşluğu kapatarak mikroelektronik, yarı-iletken ve biyosensör endüstrileri için başta düşük molekül ağırlığına sahip kanser biyobelirteçlerinin tayininde oldukça ilgi çekici bir yöntem olacağı düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Guo, L., et al., *Strategies for enhancing the sensitivity of plasmonic nanosensors*. Nano Today, 2015. **10**(2): p. 213-239.
2. Homola, J., S.S. Yee, and G. Gauglitz, *Surface plasmon resonance sensors*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1999. **54**(1-2): p. 3-15.
3. Kravets, V., F. Schedin, and A. Grigorenko, *Extremely narrow plasmon resonances based on diffraction coupling of localized plasmons in arrays of metallic nanoparticles*. Physical review letters, 2008. **101**(8): p. 087403.
4. Ritchie, R., *Plasma losses by fast electrons in thin films*. Physical Review, 1957. **106**(5): p. 874.
5. Kretschmann, E. and H. Raether, *Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light*. Zeitschrift für Naturforschung A, 1968. **23**(12): p. 2135-2136.
6. Ahmed, S.M., et al., *Whey protein concentrate doped electrospun poly (epsilon-caprolactone) fibers for antibiotic release improvement*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016. **143**: p. 371-381.
7. Sreekanth, K.V., et al., *Hyperbolic metamaterials-based plasmonic biosensor for fluid biopsy with single molecule sensitivity*. EPJ Applied Metamaterials, 2017. **4**: p. 1.
8. Mondes, V., et al., *Plasmonic electric near-field enhancement in self-organized gold nanoparticles in macroscopic arrays*. Applied Physics B, 2016. **122**(6): p. 1-9.
9. Chen, Y. and H. Ming, *Review of surface plasmon resonance and localized surface plasmon resonance sensor*. Photonic Sensors, 2012. **2**(1): p. 37-49.
10. Bingham, J.M., W.P. Hall, and R.P. Van Duyne, *Exploring the unique characteristics of LSPR biosensing*, in *Nanoplasmonic Sensors*. 2012, Springer. p. 29-58.
11. Mock, J.J., D.R. Smith, and S. Schultz, *Local refractive index dependence of plasmon resonance spectra from individual nanoparticles*. Nano letters, 2003. **3**(4): p. 485-491.
12. Sepúlveda, B., et al., *LSPR-based nanobiosensors*. nano today, 2009. **4**(3): p. 244-251.
13. Zhao, J., et al., *Localized surface plasmon resonance biosensors*. 2006.
14. Englebienne, P., A.V. Hoonacker, and M. Verhas, *Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences*. Journal of Spectroscopy, 2003. **17**(2-3): p. 255-273.
15. Lee, S.-W., et al., *Highly sensitive biosensing using arrays of plasmonic Au nanodisks realized by nanoimprint lithography*. ACS nano, 2011. **5**(2): p. 897-904.
16. Lee, T.-H., et al., *Signal amplification by enzymatic reaction in an immunosensor based on localized surface plasmon resonance (LSPR)*. Sensors, 2010. **10**(3): p. 2045-2053.
17. Saa, L., et al., *Enzymatic etching of gold nanorods by horseradish peroxidase and application to blood glucose detection*. Nanoscale, 2014. **6**(13): p. 7405-7409.
18. Sudeep, P., S.S. Joseph, and K.G. Thomas, *Selective detection of cysteine and glutathione using gold nanorods*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(18): p. 6516-6517.
19. Wang, L., et al., *Side-by-Side and End-to-End Gold Nanorod Assemblies for Environmental Toxin Sensing*. Angewandte Chemie International Edition, 2010. **49**(32): p. 5472-5475.
20. Jana, D., et al., *Capping agent-free gold nanostars show greatly increased versatility and sensitivity for biosensing*. Analytical chemistry, 2015. **87**(7): p. 3964-3972.
21. Caucheteur, C., T. Guo, and J. Albert, *Review of plasmonic fiber optic biochemical sensors: improving the limit of detection*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2015. **407**(14): p. 3883-3897.

22. Lin, H.-Y., C.-T. Chen, and Y.-C. Chen, *Detection of phosphopeptides by localized surface plasma resonance of titania-coated gold nanoparticles immobilized on glass substrates*. Analytical chemistry, 2006. **78**(19): p. 6873-6878.
23. Tan, Y., et al., *Gold-nanoparticle-infiltrated polystyrene inverse opals: a three-dimensional platform for generating combined optical properties*. Chemistry of materials, 2006. **18**(15): p. 3385-3389.
24. Yockell-Lelièvre, H., F. Lussier, and J.-F. Masson, *Influence of the particle shape and density of self-assembled gold nanoparticle sensors on LSPR and SERS*. The Journal of Physical Chemistry C, 2015. **119**(51): p. 28577-28585.
25. Li, W., et al., *Dimers of silver nanospheres: facile synthesis and their use as hot spots for surface-enhanced Raman scattering*. Nano letters, 2008. **9**(1): p. 485-490.
26. Wustholz, K.L., et al., *Structure–activity relationships in gold nanoparticle dimers and trimers for surface-enhanced Raman spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(31): p. 10903-10910.
27. Ghosh, S.K., et al., *Solvent and ligand effects on the localized surface plasmon resonance (LSPR) of gold colloids*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(37): p. 13963-13971.
28. Villesen, T.F., et al., *Aluminum nanoparticles for plasmon-improved coupling of light into silicon*. Nanotechnology, 2012. **23**(8): p. 085202.
29. Matsumoto, R., S. Yamada, and H. Yonemura, *Effects of Gold Nanoparticles on Photocurrents of Zinc-Porphyrin-Viologen Linked Compound–Gold Nanoparticle Composite Films*. Molecular Crystals and Liquid Crystals, 2014. **598**(1): p. 86-91.
30. Zhang, Z., et al., *Highly sensitive visual detection of copper ions based on the shape-dependent LSPR spectroscopy of gold nanorods*. Langmuir, 2014. **30**(12): p. 3625-3630.
31. Kluczyk, K. and W. Jacak, *Damping-induced size effect in surface plasmon resonance in metallic nano-particles: Comparison of RPA microscopic model with numerical finite element simulation (COMSOL) and Mie approach*. Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, 2016. **168**: p. 78-88.
32. Wu, B., et al., *Anisotropic growth of TiO<sub>2</sub> onto gold nanorods for plasmon-enhanced hydrogen production from water reduction*. Journal of the American Chemical Society, 2016. **138**(4): p. 1114-1117.
33. Zimmerman, W.B., *Multiphysics modeling with finite element methods*. Vol. 18. 2006: World Scientific Publishing Co Inc.
34. Fleischmann, M., P.J. Hendra, and A.J. McQuillan, *Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode*. Chemical Physics Letters, 1974. **26**(2): p. 163-166.
35. Jeanmaire, D.L. and R.P. Van Duyne, *Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode*. Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry, 1977. **84**(1): p. 1-20.
36. Albrecht, M.G. and J.A. Creighton, *Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode*. Journal of the American chemical society, 1977. **99**(15): p. 5215-5217.
37. Moskovits, M., *Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective*. Journal of Raman Spectroscopy, 2005. **36**(6-7): p. 485-496.
38. Prodan, E., et al., *A hybridization model for the plasmon response of complex nanostructures*. science, 2003. **302**(5644): p. 419-422.
39. Edwards, P.P. and J.M. Thomas, *Gold in a Metallic Divided State—From Faraday to Present-Day Nanoscience*. Angewandte Chemie International Edition, 2007. **46**(29): p. 5480-5486.
40. Stewart, M., et al., *Unconventional methods for forming nanopatterns*. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part N: Journal of Nanoengineering and Nanosystems, 2006. **220**(3): p. 81-138.
41. Gopinath, A., et al., *Plasmonic nanogalaxies: multiscale aperiodic arrays for surface-enhanced Raman sensing*. Nano letters, 2009. **9**(11): p. 3922-3929.

42. Chu, Y., M.G. Banaee, and K.B. Crozier, *Double-resonance plasmon substrates for surface-enhanced Raman scattering with enhancement at excitation and stokes frequencies*. ACS nano, 2010. **4**(5): p. 2804-2810.
43. Tan, B., et al., *Fabrication of size-tunable gold nanoparticles array with nanosphere lithography, reactive ion etching, and thermal annealing*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(22): p. 11100-11109.
44. Nakayama, K., K. Tanabe, and H.A. Atwater, *Plasmonic nanoparticle enhanced light absorption in GaAs solar cells*. Applied Physics Letters, 2008. **93**(12): p. 121904.
45. Barbillon, G., et al., *Electron beam lithography designed chemical nanosensors based on localized surface plasmon resonance*. Surface Science, 2007. **601**(21): p. 5057-5061.
46. Gunnarsson, L., et al., *Interparticle coupling effects in nanofabricated substrates for surface-enhanced Raman scattering*. Applied Physics Letters, 2001. **78**(6): p. 802-804.
47. Féridj, N., et al., *Controlling the optical response of regular arrays of gold particles for surface-enhanced Raman scattering*. Physical Review B, 2002. **65**(7): p. 075419.
48. Hulteen, J.C. and R.P. Van Duyne, *Nanosphere lithography: A materials general fabrication process for periodic particle array surfaces*. Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films, 1995. **13**(3): p. 1553-1558.
49. Ormonde, A.D., et al., *Nanosphere Lithography: Fabrication of Large-Area Ag Nanoparticle Arrays by Convective Self-Assembly and Their Characterization by Scanning UV- Visible Extinction Spectroscopy*. Langmuir, 2004. **20**(16): p. 6927-6931.
50. Wang, J.-H., et al., *Bimodal optical diagnostics of oral cancer based on Rose Bengal conjugated gold nanorod platform*. Biomaterials, 2013. **34**(17): p. 4274-4283.
51. Li, Y., H.J. Lee, and R.M. Corn, *Detection of protein biomarkers using RNA aptamer microarrays and enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging*. Analytical chemistry, 2007. **79**(3): p. 1082-1088.
52. Ameen, A., et al., *Ultra-sensitive colorimetric plasmonic sensing and microfluidics for biofluid diagnostics using nanohole array*. Journal of Nanomaterials, 2015. **16**(1): p. 35.
53. Hammond, J.L., et al., *Localized surface plasmon resonance as a biosensing platform for developing countries*. Biosensors, 2014. **4**(2): p. 172-188.
54. Turkevich, J., P.C. Stevenson, and J. Hillier, *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*. Discussions of the Faraday Society, 1951. **11**: p. 55-75.
55. Zhao, P., N. Li, and D. Astruc, *State of the art in gold nanoparticle synthesis*. Coordination Chemistry Reviews, 2013. **257**(3): p. 638-665.
56. Ji, X., et al., *Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(45): p. 13939-13948.
57. Hu, M., et al., *Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications*. Chemical Society Reviews, 2006. **35**(11): p. 1084-1094.
58. Perrault, S.D. and W.C. Chan, *Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50– 200 nm*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(47): p. 17042-17043.
59. Calamak, S., et al., *Silver nanoparticle containing silk fibroin bionanotextiles*. Journal of Nanoparticle Research, 2015. **17**(2): p. 87.
60. Calamak, S., et al., *Ag/silk fibroin nanofibers: Effect of fibroin morphology on Ag<sup>+</sup> release and antibacterial activity*. European Polymer Journal, 2015. **67**: p. 99-112.
61. Cao, J., T. Sun, and K.T. Grattan, *Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014. **195**: p. 332-351.
62. Jensen, T.R., et al., *Nanosphere lithography: tunable localized surface plasmon resonance spectra of silver nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(45): p. 10549-10556.
63. Chen, H., et al., *Stabilization of gold nanoparticles on glass surface with polydopamine thin film for reliable LSPR sensing*. Journal of colloid and interface science, 2015. **460**: p. 258-263.

64. Kandeepan, S., et al., *OMCVD Gold Nanoparticles Covalently Attached to Polystyrene for Biosensing Applications*. Chemical Vapor Deposition, 2015. **21**(10-11-12): p. 275-280.
65. Jiang, H. and J. Sabarinathan, *Effects of coherent interactions on the sensing characteristics of near-infrared gold nanorings*. The Journal of Physical Chemistry C, 2010. **114**(36): p. 15243-15250.
66. Koo, J. and C. Kleinstreuer, *Liquid flow in microchannels: experimental observations and computational analyses of microfluidics effects*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2003. **13**(5): p. 568.
67. Erickson, D., et al., *Nanobiosensors: optofluidic, electrical and mechanical approaches to biomolecular detection at the nanoscale*. Microfluidics and nanofluidics, 2008. **4**(1-2): p. 33-52.
68. De Leebeeck, A., et al., *On-chip surface-based detection with nanohole arrays*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(11): p. 4094-4100.
69. Luo, Y., F. Yu, and R.N. Zare, *Microfluidic device for immunoassays based on surface plasmon resonance imaging*. Lab on a Chip, 2008. **8**(5): p. 694-700.
70. Tabeling, P., *Introduction to microfluidics*. 2005: Oxford University Press on Demand.
71. Jähnisch, K., et al., *Chemistry in microstructured reactors*. Angewandte Chemie International Edition, 2004. **43**(4): p. 406-446.
72. Puigmartí-Luis, J., *Microfluidic platforms: a mainstream technology for the preparation of crystals*. Chemical Society Reviews, 2014. **43**(7): p. 2253-2271.
73. Wang, J., et al., *Continuous fabrication of microcapsules with controllable metal covered nanoparticle arrays using droplet microfluidics for localized surface plasmon resonance*. Lab on a Chip, 2017.
74. Khan, M., et al., *Detection of prostate specific antigen (PSA) in human saliva using an ultra-sensitive nanocomposite of graphene nanoplatelets with diblock-co-polymers and Au electrodes*. Analyst, 2018. **143**(5): p. 1094-1103.
75. Fiala, O., et al., *Serum albumin is a strong predictor of survival in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer treated with erlotinib*. Neoplasma, 2016. **63**(3): p. 471-476.
76. Sejima, T., et al., *Low pre-operative levels of serum albumin predict lymph node metastases and ultimately correlate with a biochemical recurrence of prostate cancer in radical prostatectomy patients*. Central European journal of urology, 2013. **66**(2): p. 126.
77. Shariat, S.F., et al., *Tissue expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 and its receptors: correlation with pathologic features and biochemical progression in patients undergoing radical prostatectomy*. Urology, 2004. **63**(6): p. 1191-1197.
78. Blanchère, M., et al., *Alterations of expression and regulation of transforming growth factor  $\beta$  in human cancer prostate cell lines*. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2002. **82**(4-5): p. 297-304.
79. Blanchère, M., et al., *Transforming growth factor  $\beta$  in the human prostate: Its role in stromal-epithelial interactions in non-cancerous cell culture*. The Prostate, 2001. **46**(4): p. 311-318.
80. Ivanovic, V., et al., *Elevated plasma levels of TGF- $\beta$ 1 in patients with invasive prostate cancer*. Nature medicine, 1995. **1**(4): p. 282-284.
81. Shariat, S.F., et al., *Early post-operative plasma transforming growth factor-B1 is a powerful predictor of biochemical progression after radical prostatectomy*. The Journal of Urology, 2008. **179**(4): p. 719.
82. Dai, J., et al., *Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism*. Cancer research, 2005. **65**(18): p. 8274-8285.
83. Brubaker, K., et al., *Bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cell lines*. Journal of cellular biochemistry, 2004. **91**(1): p. 151-160.
84. Feeley, B.T., et al., *Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions*. Bone, 2006. **38**(2): p. 154-166.

85. Lai, T.H., et al., *Osteoblasts-derived BMP-2 enhances the motility of prostate cancer cells via activation of integrins*. The Prostate, 2008. **68**(12): p. 1341-1353.
86. Downes, M.R., et al., *Urinary markers for prostate cancer*. BJU international, 2007. **99**(2): p. 263-268.
87. Inci, F., et al., *Nanoplasmonic quantitative detection of intact viruses from unprocessed whole blood*. ACS nano, 2013. **7**(6): p. 4733-4745.
88. Tüdös, A.J., G.A. Besselink, and R.B. Schasfoort, *Trends in miniaturized total analysis systems for point-of-care testing in clinical chemistry*. Lab on a Chip, 2001. **1**(2): p. 83-95.
89. Zitka, O., et al., *Microfluidic chip coupled with modified paramagnetic particles for sarcosine isolation in urine*. Electrophoresis, 2013. **34**(18): p. 2639-2647.
90. Kim, Y.-G., et al., *Quantum dot-based HIV capture and imaging in a microfluidic channel*. Biosensors and Bioelectronics, 2009. **25**(1): p. 253-258.
91. Augustsson, P., et al., *Microfluidic, label-free enrichment of prostate cancer cells in blood based on acoustophoresis*. Analytical chemistry, 2012. **84**(18): p. 7954-7962.
92. Moltzahn, F., et al., *Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients*. Cancer research, 2011. **71**(2): p. 550-560.
93. Johnson, P.B. and R.-W. Christy, *Optical constants of the noble metals*. Physical review B, 1972. **6**(12): p. 4370.
94. Sonavane, G., K. Tomoda, and K. Makino, *Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008. **66**(2): p. 274-280.
95. Link, S., Z.L. Wang, and M. El-Sayed, *Alloy formation of gold–silver nanoparticles and the dependence of the plasmon absorption on their composition*. The Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(18): p. 3529-3533.
96. Papadopoulos, F., et al., *Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ*. Ultrastructural pathology, 2007. **31**(6): p. 401-407.
97. Willets, K.A. and R.P. Van Duyne, *Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing*. Annu. Rev. Phys. Chem., 2007. **58**: p. 267-297.
98. Taylor, B.N. and C.E. Kuyatt, *Guidelines for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurement results*. 1994: Citeseer.
99. Cunningham, A., et al., *Coupling of plasmon resonances in tunable layered arrays of gold nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry C, 2011. **115**(18): p. 8955-8960.
100. Malassis, L., et al., *Bottom-up fabrication and optical characterization of dense films of meta-atoms made of core–shell plasmonic nanoparticles*. Langmuir, 2013. **29**(5): p. 1551-1561.
101. Jiang, C., S. Markutsya, and V.V. Tsukruk, *Collective and individual plasmon resonances in nanoparticle films obtained by spin-assisted layer-by-layer assembly*. Langmuir, 2004. **20**(3): p. 882-890.
102. Shi, L., et al., *How does the size of gold nanoparticles depend on citrate to gold ratio in Turkevich synthesis? Final answer to a debated question*. Journal of colloid and interface science, 2017. **492**: p. 191-198.
103. Sun, Y. and Y. Xia, *Gold and silver nanoparticles: a class of chromophores with colors tunable in the range from 400 to 750 nm*. Analyst, 2003. **128**(6): p. 686-691.
104. Ye, X., et al., *Improved size-tunable synthesis of monodisperse gold nanorods through the use of aromatic additives*. ACS nano, 2012. **6**(3): p. 2804-2817.
105. Aizpurua, J., et al., *Optical properties of coupled metallic nanorods for field-enhanced spectroscopy*. Physical Review B, 2005. **71**(23): p. 235420.
106. Glass, R., M. Möller, and J.P. Spatz, *Block copolymer micelle nanolithography*. Nanotechnology, 2003. **14**(10): p. 1153.

107. Sivaraman, S.K. and V. Santhanam, *Realization of thermally durable close-packed 2D gold nanoparticle arrays using self-assembly and plasma etching*. Nanotechnology, 2012. **23**(25): p. 255603.
108. Mechler, A., et al., *The formation of gold nanoparticles using hydroquinone as a reducing agent through a localized pH change upon addition of NaOH to a solution of HAuCl<sub>4</sub>*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2010. **370**(1-3): p. 35-41.
109. Chegel, V., et al., *Gold nanoparticles aggregation: drastic effect of cooperative functionalities in a single molecular conjugate*. The Journal of Physical Chemistry C, 2012. **116**(4): p. 2683-2690.
110. Zhao, C.-X., et al., *Nanoparticle synthesis in microreactors*. Chemical Engineering Science, 2011. **66**(7): p. 1463-1479.
111. Lazarus, L.L., et al., *Flow-focused synthesis of monodisperse gold nanoparticles using ionic liquids on a microfluidic platform*. Lab on a Chip, 2010. **10**(24): p. 3377-3379.
112. Klank, H., J.P. Kutter, and O. Geschke, *CO<sub>2</sub>-laser micromachining and back-end processing for rapid production of PMMA-based microfluidic systems*. Lab on a Chip, 2002. **2**(4): p. 242-246.
113. Tan, Y.-C., V. Cristini, and A.P. Lee, *Monodispersed microfluidic droplet generation by shear focusing microfluidic device*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006. **114**(1): p. 350-356.
114. Nie, Z., et al., *Polymer particles with various shapes and morphologies produced in continuous microfluidic reactors*. Journal of the American chemical society, 2005. **127**(22): p. 8058-8063.
115. Seo, S., A. Ameen, and G.L. Liu, *Colorimetric Effect of Gold Nanocup Arrays on Fluorescence Amplification*. The Journal of Physical Chemistry C, 2015. **119**(32): p. 18518-18526.
116. Gartia, M.R., et al., *Colorimetric plasmon resonance imaging using nano lycurgus cup arrays*. Advanced Optical Materials, 2013. **1**(1): p. 68-76.
117. Kim, N.-H., W.K. Jung, and K.M. Byun, *Correlation analysis between plasmon field distribution and sensitivity enhancement in reflection-and transmission-type localized surface plasmon resonance biosensors*. Applied Optics, 2011. **50**(25): p. 4982-4988.
118. Szunerits, S., et al., *Gold island films on indium tin oxide for localized surface plasmon sensing*. Nanotechnology, 2008. **19**(19): p. 195712.
119. Kim, H.M., et al., *Detection of biomolecular binding through enhancement of localized surface plasmon resonance (LSPR) by gold nanoparticles*. Sensors, 2009. **9**(4): p. 2334-2344.
120. Wang, S., et al., *Subcellular resolution mapping of endogenous cytokine secretion by nanoplasmonic-resonator sensor array*. Nano letters, 2011. **11**(8): p. 3431-3434.
121. Hwang, W.S. and S.J. Sim, *A strategy for the ultrasensitive detection of cancer biomarkers based on the LSPR response of a single AuNP*. Journal of nanoscience and nanotechnology, 2011. **11**(7): p. 5651-5656.
122. Acimovic, S.S., et al., *LSPR chip for parallel, rapid, and sensitive detection of cancer markers in serum*. Nano letters, 2014. **14**(5): p. 2636-2641.
123. Devi, R.V., M. Doble, and R.S. Verma, *Nanomaterials for early detection of cancer biomarker with special emphasis on gold nanoparticles in immunoassays/sensors*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **68**: p. 688-698.
124. Baquedano, E., et al., *Low-cost and large-size nanoplasmonic sensor based on Fano resonances with fast response and high sensitivity*. Optics Express, 2017. **25**(14): p. 15967-15976.
125. Polavarapu, L. and L.M. Liz-Marzán, *Towards low-cost flexible substrates for nanoplasmonic sensing*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**(15): p. 5288-5300.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı Semih ÇALAMAK  
Doğum Yeri Ankara  
Medeni Hali Evli  
E-posta semihcalamak@hacettepe.edu.tr  
Adresi Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel  
Bilimleri  
Anabilim Dalı, Sıhhiye/Ankara

### Eğitim

Lise Mimarşinan Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı) (2002-2006)  
Lisans Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü  
(2006-2010)  
Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya  
Bölümü (2007-2010) (Çift-Anadal)  
Yüksek Lisans Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji  
ve Nanotıp Anabilim Dalı

### Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- İleri düzeyde (YÖKDİL: 92.5, 2018)

### İş Deneyimi

2012- Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık  
Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı

### Deneyim Alanları

Nanoteknoloji, Biyomalzemeler, Nanoplazmonik Yüzeyler, Doku Mühendisliği,  
Nanofiberler, Elektroegirme

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

### Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

### Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/ veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



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

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA**

Tarih:07/06/2018

Tez Başlığı / Konusu: Prostat Kanseri Biyobelirteçlerinin Tayini İçin Nanoplazmonik Platformların Hassasiyetinin Arttırılması

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 170 sayfalık kısmına ilişkin, 06/06/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

07/06/2018

**Adı Soyadı:** Semih ÇALAMAK

**Öğrenci No:** N12148912

**Anabilim Dalı:** Nanoteknoloji ve Nanotıp

**Programı:**

**Statüsü:** ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

(Unvan, Ad Soyad, İmza)