

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**  
**2021-YL-031**

**GUT HASTALIĞININ TEDAVİSİ İÇİN YENİ BİR  
YAKLAŞIM: ÜRİKAZ BAĞLI NANOMAKİNELER**

**Ulviye KİLİMCİ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
FEF-19010 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2021**

## TEŞEKKÜR

“Gut Hastalığı İçin Yeni Bir Yaklaşım: Ürikaz Bağlı Nanomakineler” konulu tez çalışması Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi.

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmamın araştırılması, planlanması ve uygulanması sürecinde bilgi, deneyim, ilgi ve desteğini esirgemeyen, güler yüzü ve yüksek enerjisi ile akademik ve sosyal hayatta yoluma ışık tutan çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte fikirleri, bilgi ve tecrübeleriyle çalışmamın nihayete ermesinde katkısını esirgemeyen, içtenlikle yardım eden değerli hocam Prof. Dr. Murat UYGUN’a teşekkürlerimi sunarım. Kişiliği ve akademik hayatıyla her zaman örnek aldığım, bilgi birikimi ve tavsiyeleriyle yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Arife Alev KARAGÖZLER’e teşekkürlerimi sunarım. Bilgi birikimi ve deneyimiyle tüm çalışmalarım da sabırla ve büyük bir hoşgörüyle destek olan, mutlu olduğum anlarda olduğu gibi endişeli ve yorgun zamanlarımda da bana kucak açan başta değerli hocam Arş. Gör. Dr. Rukiye YAVAŞER olmak üzere, dosttan öte kardeşlerim olarak benimsediğim Buket İNCE, Hande ORHAN ve Melis BAYRAKTAROĞLU’na teşekkürlerimi sunarım.

Nanotellerin hazırlanmasındaki yardımlarından dolayı Alcalá Üniversitesi (Madrid-İspanya) Analitik Kimya Öğretim Üyesi Alberto Escarpa’ya ve Doktora Öğrencisi Víctor de la Asunción-Nadal’a; aynı laboratuvar da olmaktan keyif aldığım sevgili laboratuvar arkadaşlarım Öğr. Gör. Çağdaş SUNNA, Sinem EVLİ ve Baha ÖNDEŞ’e; bu çalışmayı FEF 19010 No’lu Bilimsel Araştırma Projesi olarak destekleyen Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’ne ve olanaklarından yararlandığım Kimya Bölümü’ne teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında maddi destek sağlayan TÜBİTAK’a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak sevgisini ve hoşgörüsünü cömertçe sunan, her koşulda yanımda olduklarını bildiğim çok kıymetli aileme tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Ulviye KİLİMCİ

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nanoteknoloji.....	1
1.2. Nanomateryaller.....	3
1.2.1. Nanopartiküller.....	6
1.2.2. Manyetik Nanopartiküller.....	10
1.2.3. Kuantum Dotlar.....	13
1.2.4. Dendrimerler.....	15
1.2.5. Karbon Nanotüpler.....	17
1.2.6. Grafen.....	18
1.2.7. Nanolifler.....	19
1.3. Nanomakineler.....	20
1.4. Nanoteller.....	21
1.4.1. Kalıp Yönelmeli Elektrobirikim.....	22
1.4.2. Kalıpsız Yaklaşım.....	23

1.4.3. Karbotermal İndirgeme .....	23
1.4.4. Metalik Nanoteller .....	25
1.4.4.1. Metalik Nanotellerin Sentezi .....	25
1.5. Ürikaz Enzimi.....	27
1.6. Enzim İmmobilizasyonu.....	32
1.6.1. Destek Materyali.....	33
1.6.2. İmmobilizasyon Yöntemi .....	33
1.6.2.1. Adsorpsiyon.....	34
1.6.2.2. Tutuklama.....	35
1.6.2.3. Kovalent Bağlama .....	36
1.6.2.4. Çapraz Bağlama.....	37
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	39
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	44
3.1. Kimyasallar ve Cihazlar .....	44
3.1.1. Kimyasallar.....	44
3.1.2. Cihazlar.....	44
3.2. Yöntem .....	44
3.2.1. Nanotellerin Hazırlanması.....	44
3.2.2. Nanotellerin Karakterizasyonu .....	46
3.2.3. Nanotellerin Modifikasyonu.....	47
3.2.4. Ürikaz İmmobilize Nanotellerin Poli(etilen glikol) (PEG) ile Kaplanması .....	48
3.2.5. Ürikaz Aktivitesinin ve Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi.....	49
3.2.6. Serbest ve İmmobilize Ürikaz Enziminin Termal, İşlemsel, Depo Kararlılıkları ve Proteaz Varlığındaki Aktivitesinin İncelenmesi .....	49
3.2.7. İmmobilize Ürikazın Yapay İnsan Serumunda Ürik Asit Oksidasyonu İçin Kullanılabilirliğinin Araştırılması.....	50

4. BULGULAR .....	51
4.1. Manyetik Nanotellerin Sentezi ve Karakterizasyonu .....	51
4.2. Ürikaz İmmobilizasyonu ve Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi .....	54
4.3. Serbest ve İmmobilize Ürikazın Termal, İşlemsel, Depo Kararlılıkları ve Proteaz Varlığındaki Aktivitesinin İncelenmesi .....	57
4.4. İmmobilize Ürikazın Yapay İnsan Serumunda Ürik Asit Oksidasyonu İçin Kullanılabilirliğinin İncelenmesi .....	59
5. TARTIŞMA.....	60
5.1. Manyetik Nanotellerin Sentezi ve Karakterizasyonu .....	60
5.2. Ürikaz İmmobilizasyonu ve Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi .....	61
5.3. Serbest ve İmmobilize Ürikazın Termal, İşlemsel ve Depo Kararlılıkları ve Proteaz Varlığındaki Aktivitesinin İncelenmesi .....	63
5.4. İmmobilize Ürikazın Yapay İnsan Serumunda Ürik Asit Oksidasyonu İçin Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	65
KAYNAKLAR.....	67
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	80
ÖZGEÇMİŞ.....	81

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AFM</b>	: Atomik Kuvvet Mikroskopyu
<b>CLE</b>	: Çapraz Bağlı Enzim
<b>CLEA</b>	: Çapraz Bağlı Enzim Agregatı
<b>CLEC</b>	: Çapraz Bağlı Enzim Kristali
<b>EDC</b>	: N-(3-dimetilaminopropil) 1-N'-Etilkarbodiimid Hidroklorür
<b>EDX</b>	: Enerji Dağılımlı X-Işın Analizi
<b>EGDMA</b>	: Etilen Glikol Dimetakrilat
<b>FTIR</b>	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
<b>GO</b>	: Grafen Oksit
<b>ITO</b>	: İndiyum Kalay Oksit
<b>İBTAM</b>	: İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi
<b>LOD</b>	: Tayin Sınırı
<b>MCH</b>	: 6-Merkapto-1-Hekzanol
<b>MOF</b>	: Metal Organik Çerçeve
<b>MUA</b>	: 11-Merkaptoundekanoik Asit
<b>NHS</b>	: N-Hidroksisüksinimid
<b>NP</b>	: Nanopartikül
<b>PAMAM</b>	: Poli(amidoamin)
<b>PANI</b>	: Polianilin Film
<b>PEG</b>	: Poli(etilen glikol)
<b>rGO</b>	: İndirgenmiş Grafen Oksit
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskopyu
<b>SPM</b>	: Taramalı Prob Mikroskopyu

**STM** : Taramalı Tünelleme Mikroskoku  
**TEM** : Geçirimli Elektron Mikroskoku  
**TGA** : Termogravimetrik Analiz  
**VIM** : N-Vinil İmidazol



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Ürik asidin ürikaz katalizi ile allantoin oksidasyonu .....	28
Şekil 3.1. Au/Ni/Au manyetik nanotellerin hazırlanması .....	46
Şekil 3.2. Au/Ni/Au manyetik nanotellerin şematik gösterimi .....	46
Şekil 3.3. Nanotellerin MUA ve MCH ile modifikasyonu.....	47
Şekil 3.4. Ürikaz enziminin EDC/NHS kimyası ile Au segmente bağlanması.....	48
Şekil 3.5. Ürikaz immobilize nanotellerin PEG'lenmesi .....	48
Şekil 4.1. Serbest ve immobilize ürikaz aktivitesi üzerine ortam pH'ının etkisi .....	55
Şekil 4.2. Serbest ve immobilize ürikaz aktivitesi üzerine ortam sıcaklığının etkisi.....	55
Şekil 4.3. Serbest ürikaz enzimine ait Lineweaver-Burk grafiği .....	56
Şekil 4.4. İmmobilize ürikaz enzimine ait Lineweaver-Burk grafiği.....	56
Şekil 4.5. Serbest ve immobilize ürikazın 45 °C'deki termal kararlılık profilleri .....	57
Şekil 4.6. İmmobilize ürikazın işlemsel kararlılık profili .....	58
Şekil 4.7. Serbest ve immobilize ürikazın depo kararlılık profilleri .....	58
Şekil 4.8. Serbest ve immobilize ürikazın proteaz varlığındaki aktivitesinin incelenmesi .....	59



## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.1.</b> Nanopartiküllerin ve biyomoleküllerin nanoölçekte entegrasyonu .....	4
<b>Resim 1.2.</b> Nanomalzemelerin sentezinde yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yaklaşımı.....	5
<b>Resim 1.3.</b> Nanomateryallerin farklı niteliklerine göre sınıflandırılması .....	6
<b>Resim 1.4.</b> Organik, hibrid ve inorganik nanopartiküller. ....	7
<b>Resim 1.5.</b> Nanopartikül ile hücre etkileşimi.....	9
<b>Resim 1.6.</b> Kanser tedavisinde ilaç dağıtımı için taşıyıcı nanopartiküllerin bir özeti.....	10
<b>Resim 1.7.</b> Manyetik nanopartiküllerin manyetik görüntüleme, dağıtım ve tedavi amaçlı kullanımı .....	12
<b>Resim 1.8.</b> Biyomedikal uygulamalardaki manyetik nanopartiküllerin yapı ve uygulamaları .....	13
<b>Resim 1.9.</b> Kuantum dotların medikal uygulama alanları.....	14
<b>Resim 1.10.</b> Dendrimerlerin biyolojik moleküller ile etkileşimi .....	16
<b>Resim 1.11.</b> Dendrimerlerin biyomedikal uygulamaları.....	16
<b>Resim 1.12.</b> Karbon nanotüplerin (a) yapıları ve (b) kullanım alanları .....	17
<b>Resim 1.13.</b> Grafen nanopartiküller ve uygulama alanları .....	18
<b>Resim 1.14.</b> Canlı hücrelerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin elektro-eğrilmiş nanoliflere dahil edilmesi ve uygulamaları.....	19
<b>Resim 1.15.</b> Farklı mekanizmalar ile hareket eden mikromotorlar.....	20
<b>Resim 1.16.</b> Farklı materyallerden sentezlenen nanotellerin TEM ve SEM görüntüleri ....	24
<b>Resim 1.17.</b> Farklı 1D nano şekil ve boyuta sahip nanomalzemeler: (A) nanorodlar; (B) nanoteller; (C) nanobeltler .....	25
<b>Resim 1.18.</b> Nanotellerin sentezinde uygulanan adımlar.....	26
<b>Resim 1.19.</b> <i>Candida albicans</i> ürikazın farklı açılardan üç boyutlu yapısının gösterimi ...	29
<b>Resim 1.20.</b> <i>Candida utilis</i> ürikazın yapısı .....	30

<b>Resim 1.21.</b> Ürat homeostazının yolları.....	31
<b>Resim 1.22.</b> Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	34
<b>Resim 1.23.</b> Altın nanopartiküllere enzimin elektrostatik adsorpsiyonu .....	35
<b>Resim 1.24.</b> Enzimlerin tutuklanması .....	36
<b>Resim 1.25.</b> Enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan dört farklı kovalent bağlama protokolünün gösterimi.....	37
<b>Resim 1.26.</b> Çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanması.....	38
<b>Resim 4.1.</b> (a) Boş ve (b) ürikaz bağlı manyetik nanotellerin SEM fotoğrafları .....	52
<b>Resim 4.2.</b> (a) Boş ve (b) ürikaz bağlı manyetik nanotellerin EDX spektrumu. ....	53
<b>Resim 4.3.</b> Manyetik nanotellerin mıknatıs ile ayrılması .....	54

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.</b> Metalik nanotellerin çeşitli sentez tekniklerinin özeti .....	27
<b>Çizelge 2.</b> Serbest ve immobilize ürikaza ait kinetik parametre verileri.....	57



## ÖZET

### GUT HASTALIĞININ TEDAVİSİ İÇİN YENİ BİR YAKLAŞIM: ÜRİKAZ BAĞLI NANOMAKİNELER

**Kilimci U. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2021.**

**Amaç:** Bu araştırma ürikaz enziminin manyetik nanotellere immobilizasyonunun etkinliğinin ve bu nanomakinelerin gut hastalığının tedavisinde kullanılabilirliğinin *in vitro* olarak araştırılmasını amaçlamıştır.

**Materyal ve Yöntem:** Au/Ni/Au nanoteller 60 µm kalınlıkta ve 200 nm-çaplı alümina membran içerisinde altın, nikel ve altının ardışık elektrobiriktirmesi ile hazırlanmıştır ve nanotellerin yüzey morfolojisi ve nanotel bileşenleri SEM ve EDX analizleri ile belirlenmiştir. Sentezlenen manyetik nanotellere ürikaz immobilizasyonu kovalent olarak gerçekleştirilmiş ve PEG ile kaplanmıştır. Serbest ve immobilize ürikaz enziminin aktivitesi incelenmiş, optimum koşulları, kinetik parametreleri, termal, depo ve işlemsel kararlılığı ile proteaz varlığındaki aktivitesi ve yapay insan serumundaki etkinliği belirlenmiştir.

**Bulgular:** Au/Ni/Au nanotellerin SEM görüntülerinden ürikaz bağlı nanotellerin PEG ile kaplamaya bağlı olarak çaplarının ortalama 226 nm'den 247 nm'ye arttığı görülmüştür. Serbest ve immobilize ürikazın  $K_m$  değerleri sırasıyla 0.297 ve 0.089 mM olarak hesaplanmış ve  $V_{max}$  değerinin immobilizasyon sonunda azaldığı belirlenmiştir. Serbest ve immobilize ürikaz enziminin optimum pH değerleri sırasıyla pH 8.5 ve pH 7.5 olarak bulunurken, optimum sıcaklığı immobilizasyon sonunda 35 °C'den 45 °C'ye artmıştır. Immobilize ürikazın incelenen tüm koşullarda serbest enzime göre daha yüksek kararlılık gösterdiği belirlenmiştir. Immobilize ürikazın yapay insan serumunda ürik asit oksidasyonundaki etkinliği incelendiğinde, serbest enzime göre yaklaşık 6 kat daha yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur.

**Sonuç:** Bu tezde sentezlenen ürikaz bağlı nanomakinelerin ürik asit oksidasyonunda etkili olduğu ve gut hastalığının tedavisine yönelik olarak umut verici potansiyeli olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Gut, Ürikaz, Nanomakine, Nanotel, Manyetik Nanoyapı

## ABSTRACT

### A NEW APPROACH FOR THE TREATMENT OF GUT DISEASE: URICASE-ATTACHED NANOMACHINES

**Kilimci U. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Chemistry Program, Master of Science Thesis, Aydın, 2021.**

**Objective:** This study aimed to evaluate *in vitro* effectiveness of the immobilization of uricase enzyme onto magnetic nanowires and the usability of these nanomachines for the treatment of gout.

**Material and Methods:** Au/Ni/Au nanowires were prepared by sequential electro-deposition of gold, nickel and gold in a 60  $\mu\text{m}$  thick and 200 nm-diameter alumina membrane, and the surface morphology and components of the nanowires were determined by SEM and EDX analysis. Uricase immobilization onto synthesized magnetic nanowires was performed covalently and they were coated with PEG. The activity of free and immobilized uricase enzyme was examined and optimum conditions, kinetic parameters, thermal, storage and operational stability, activity in presence of protease and its effectiveness in artificial human serum were determined.

**Results:** It was observed that the diameters of uricase-attached nanowires increased from 226 nm to 247 nm, after coating with PEG as seen from the SEM images of Au/Ni/Au nanowires.  $K_m$  values of free and immobilized uricases were calculated as 0.297 and 0.089 mM, respectively, and it was determined that  $V_{\text{max}}$  value decreased at the end of immobilization. While optimum pH values of free and immobilized uricase enzymes were found to be 8.5 and 7.5, respectively, optimum temperature increased from 35  $^{\circ}\text{C}$  to 45  $^{\circ}\text{C}$  at the end of immobilization. It was determined that immobilized uricase showed higher stability than that of free enzyme in all studied conditions. When the efficiency of immobilized uricase in the oxidation of uric acid in artificial human serum was examined, it was found that immobilized enzyme showed an activity approximately 6 times higher than the free enzyme.

**Conclusion:** In this thesis, it has been observed that synthesized uricase-attached nanomachines are effective in uric acid oxidation and have a promising potential for the treatment of gout for this purpose.

**Keywords:** Gout, Uricase, Nanomachine, Nanowire, Magnetic nanostructure

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Nanoteknoloji

Nanoteknolojinin temelleri ilk kez 1959 yılında fizik profesörü Richard Feynman tarafından atılmıştır. Feynman, Amerikan Fizik Derneği'nin California Teknoloji Enstitüsü'nde düzenlenen toplantısında, "Dipte çok miktarda boşluk var (There's plenty of room at the bottom.)" başlıklı konuşması ile dikkatleri nesnelerin atom düzeyinde manipülasyonuna çekmiştir (Toumey, 2009). Bu konuşmada, Feynman, Britannica Ansiklopedisi'nin 24 cildinin bir toplu iğne başına sığdırılabileceği hipotezini ortaya atmış ve daha küçük makinelerin moleküler düzeyde üretilebileceğini vurgulamıştır (Bayda vd., 2020). Konuşmasında nanoteknoloji terimini kullanmamış olsa da, Feynman'ın ortaya attığı vizyon, nanoteknolojinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir (Toumey, 2009; Pacheco-Torgal ve Jalali, 2011).

Nanoteknoloji terimi ise ilk kez 1974 yılında Norio Taniguchi tarafından tanımlanmış ve nanoteknolojinin maddenin tek bir atom veya tek bir molekül düzeyinde ayrılması, birleştirilmesi ve deforme edilmesi işlemlerinden oluştuğunu ifade etmiştir (Mulvaney, 2015).

Fizikçi Eric Drexler ise Feynman'ın görüşlerinden yola çıkarak 1980 yılında "Moleküler İmalata Yönelik Protein Tasarımı" ve 1981 yılında "Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology" başlıklı yayınları ile nanoteknolojiye nanoboyutlu moleküler makinelerin üretimi açısından farklı bir bakış açısı getirmiştir (Drexler, 1992; Benli, 2008; TÜSİAD, 2008).

Fizikçi bilim insanları Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer'in 1981 yılında Taramalı Tünelleme Mikroskopyu'nu (STM) icat etmeleri onlara 1986 yılında Nobel Ödülü kazandırmış ve bu icat nanoteknolojik araştırmalarda kullanılan Atomik Kuvvet Mikroskopyu (AFM) ve Taramalı Prob Mikroskopyu (SPM)'nin keşfine öncülük etmiştir. Ayrıca 1985'de Robert Curl, Harold Kroto ve Richard Smalley tarafından fullerenler ve karbon nanotüplerin keşfi, nanoteknoloji alanında bir dönüm noktası olmuştur (Bayda vd., 2020).

Nanoteknoloji, nanometre boyutundaki maddeleri kullanarak materyallerin, cihazların ve sistemlerin üretilmesi ve uygulanmasıdır ve 21. yüzyılın anahtar teknolojisi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yeni fonksiyonel nanoyapılı biyolojik materyaller üretmek üzere biyolojik moleküllerin, komplekslerin ve nanosistemlerin yapılarını, fonksiyonlarını ve işleyişlerini ortaya çıkarma kabiliyeti nanoteknoloji ve biyoteknolojinin araştırma alanlarının birleştiği nanobiyoteknoloji ve biyonanoteknoloji alanlarının çok hızlı büyümesini sağlamıştır. Bu iki kavram (nanobiyoteknoloji ve biyonanoteknoloji) sıkça birbirinin yerine kullanılmaktadır.

Nanobiyoteknoloji, biyolojik sistemleri araştırmak üzere materyaller, cihazlar ve sistemler oluşturmakla birlikte yeni biyolojik analizler, teşhis, tedavi, bilgi depolama ve hesaplama sistemleri geliştirmek için nanoteknolojinin kullanıldığı alanları içerir. Bu sistemler biyolojik alanların hedeflerini geliştirmede nanoteknolojiyi kullanır. Bazı nanoteknolojiler büyükten küçüğe yaklaşımını kullanırlar. Örneğin; mikroakışkanlardan nano akışkan biyoçiplere gibi. Bu da DNA ve protein gibi makromoleküllerin tayini ve ayrılmasında çip üstü laboratuvar uygulamaları; biyobelirteçlerin belirlenmesinde ve klinik teşhiste hasta başı biyosensörler ve DNA sekanslama katı faz nanopor sensörlerini kapsamaktadır. Diğer nanobiyoteknolojiler ise nanoboyuttaki hibrit materyallerin üretimi için küçükten büyüğe yaklaşımını kullanır. Örneğin bu yöntem sağlık uygulamalarında biyotanıma, biyogörüntüleme, teşhis ve tedavi uygulamaları için oldukça yararlı olan biyolojik moleküller ve nanopartikülleri (manyetik nanopartiküller, altın ve gümüş nanopartiküller, silika nanopartiküller, kuantum noktalar, polimerik miseller, lipozomlar, dendrimerler ve fullerenler) içeren komplekslerin üretiminde kullanılır.

Biyonanoteknoloji ise biyolojik sistemlerin nanoteknolojiye uygulanması ve biyolojik sistemlerin çalışma prensipleri taklit edilerek yeni nanoteknolojilerin üretilmesi ve var olanların geliştirilmesinde biyoteknolojinin kullanıldığı yaklaşımları içerir. DNA ve RNA nanoteknolojileri, ribozimler, ribozimler, DNA ve RNA aptamerleri, protein dizileri ve fotonikler ve elektronikler için DNA iskeletleri, DNA nanomakineleri, DNA origami gibi faydalı materyalleri üretmede nükleik asitlerin moleküler olarak kendiliğinden birleşmesi ve baz eşleşmesi özelliklerinin kullanımı nanobiyoteknolojinin önemli örnekleridir. Biyonanoteknoloji araştırmalarının diğer önemli alanları, iyi tanımlanmış üç boyutlu yapılar, fonksiyonel protein kompleksleri, nanofilmler ve programlanabilir nanomateryallerin geniş skalada üretimi için yeni yaklaşımlarda kullanılan lipozomlar, miseller ve ters miseller gibi diğer nanoyapıları oluşturmak üzere peptitler, proteinler ve lipidlerin kendiliğinden bir araya gelme özelliklerini dikkate alır. Doku mühendisliği ve tıpta, nanoteknoloji ile kombine edilen karbohidrat polimerlerin uygulamaları, biyotanıma, biyogörüntüleme, teşhis ve ilaç dağıtım sistemleri için yeni biyomateryallerin geliştirilmesinde önemli potansiyeller sunmaktadır.

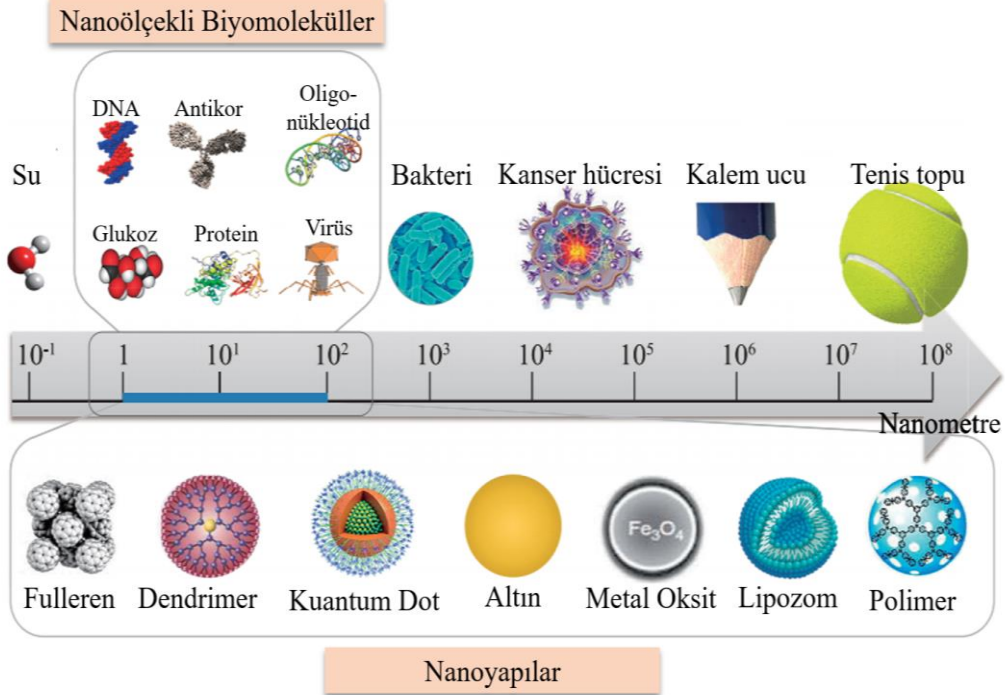
Nanobiyoteknoloji ve biyonanoteknolojide biyolojik moleküller, fonksiyonel nanomateryaller, nanocihazlar ve nanosistemlerin üretiminde zorunlu bileşenlerdir. Ayrıca biyolojik materyallerin nanoteknolojiye uygulamaları açısından bakıldığında doğadaki biyolojik materyaller, her zaman yeterli fonksiyon ve özelliğe sahiptir. Genetik mühendisliği, DNA ve RNA mühendisliği, protein mühendisliği, bölge spesifik kimyasal ve enzimatik konjugasyon teknolojileri, kendiliğinden birleşen teknolojiler gibi biyomoleküler mühendisliğindeki son gelişmeler biyolojik maddelerin fonksiyonlarının ve özelliklerinin gelişmesine, kararlı olmasına, bütünleştirilmesine ve değiştirilmesine olanak sağlamıştır. Böylece biyoelektronik, biyosensörler, biyokatalizörler, moleküler görüntüleme, biyolojik uyarıcılar, ilaç dağıtım sistemleri, doku mühendisliği için biyomateryaller ve yenileyici tıp alanlarında kullanılan fonksiyon ve özelliklere sahip mühendislik ürünü biyolojik materyallerin üretimi mümkün olmuştur (Nagamune, 2017).

## 1.2. Nanomateryaller

“Nano” terimi Yunanca’da “cüce” anlamına gelmektedir. Bir nanometre  $10^{-9}$  metreye yani metrenin milyarda birine eşittir. Doğadaki nanoboyutlu nesnelere örnek verilecek olursa, bir DNA molekülü 2.5 nm, bir protein yaklaşık 50 nm, bir saç teli ise 100000 nm çapındadır (Thakkar vd., 2010).

Nanomateryaller en az bir boyutu 1-100 nm arasında olan tanecik ya da malzemelerdir. Nanoteknoloji nanoboyutlu tanecikler ya da malzemeler ile ilgilenen araştırma alanıdır (Saleh, 2020). Nanomateryaller, yığın materyaller ile karşılaştırıldıklarında, farklı kimyasal, elektriksel, mekanik ve optik özelliklere sahiptirler. Bu farklılıklar onları ilgi çekici hale getirmektedir (Gleiter, 2000; Saleh, 2020). Nanopartiküllerin ve biyomoleküllerin nanoölçekte entegrasyonu Resim 1.1’de görülmektedir.



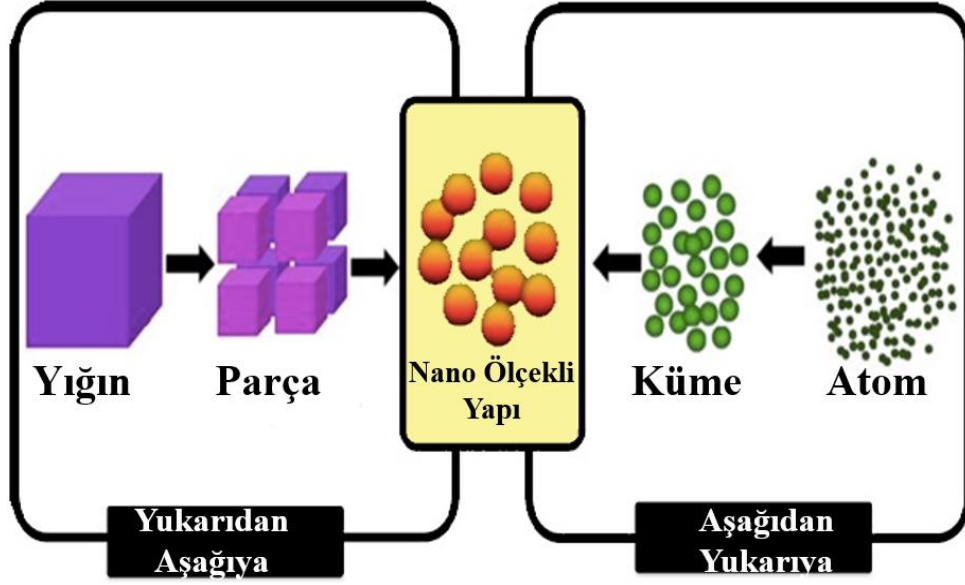


**Resim 1.1.** Nanopartiküllerin ve biyomoleküllerin nanoölçekte entegrasyonu (Saallah ve Lenggoro, 2017).

Nanomalzemelerin sentezinde temel olarak iki yaklaşım kullanılır:

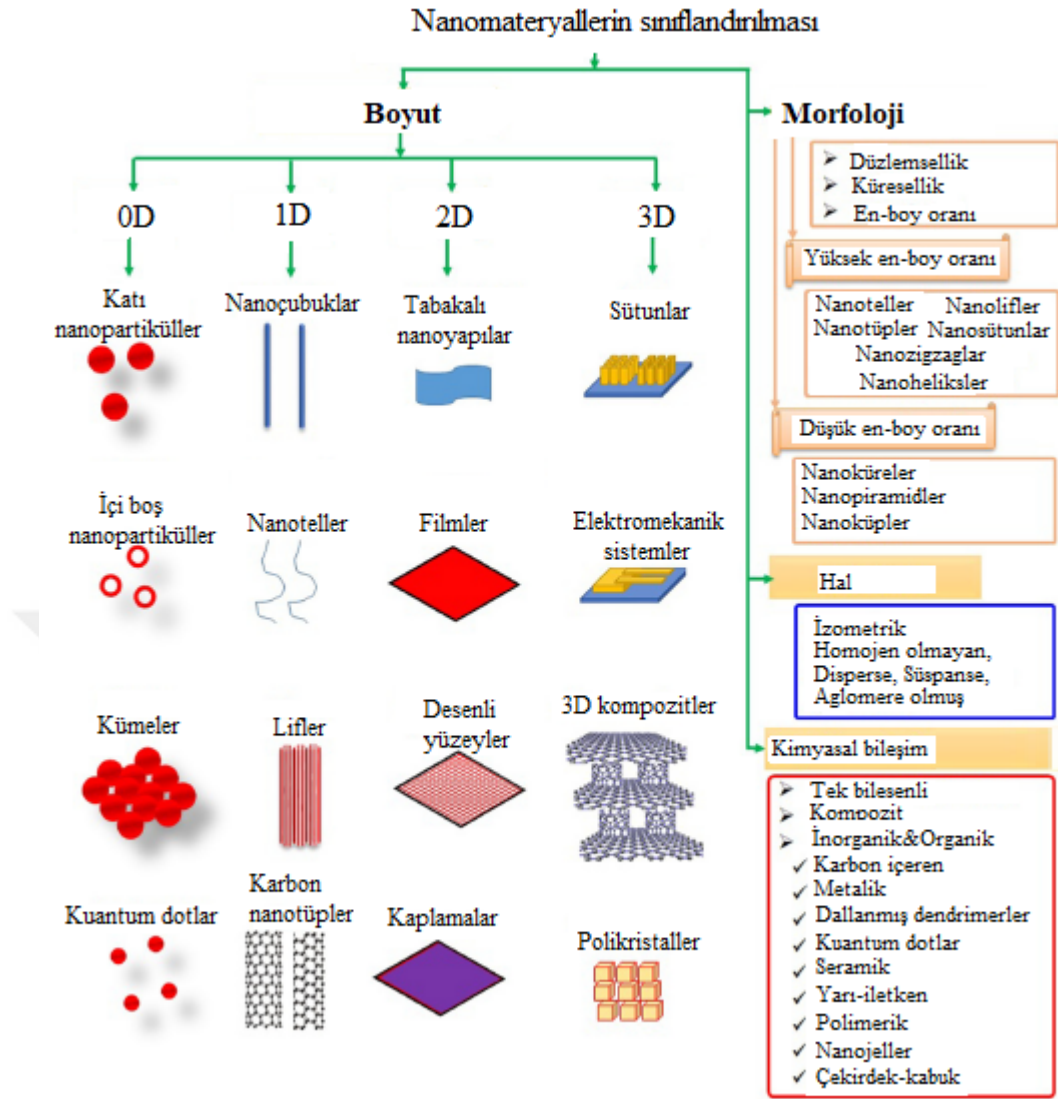
1. Yukarıdan aşağıya yaklaşımı (Top-down yaklaşımı): Büyük bir materyalin (bulk materyal) uygun tekniklerle (mekanik ve kimyasal işlemlerle enerji harcayarak, çözgünde ultrasonifikasyon ve mekanik aşındırma gibi) küçültülerek nano boyuta getirilmesi yaklaşımıdır (Resim 1.2).

2. Aşağıdan yukarıya yaklaşımı (Bottom-up yaklaşımı): Atom ve/veya moleküllerin yan yana getirilerek istenilen boyut ve özelliklerde nanomalzemelerin hazırlanması yaklaşımıdır (Resim 1.2). Kimyasal buhar yoğunlaştırma, atom tabaka çökmesi gibi teknikleri içerir (Rawat, 2015).



**Resim 1.2.** Nanomalzemelerin sentezinde yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yaklaşımı (Rawat, 2015).

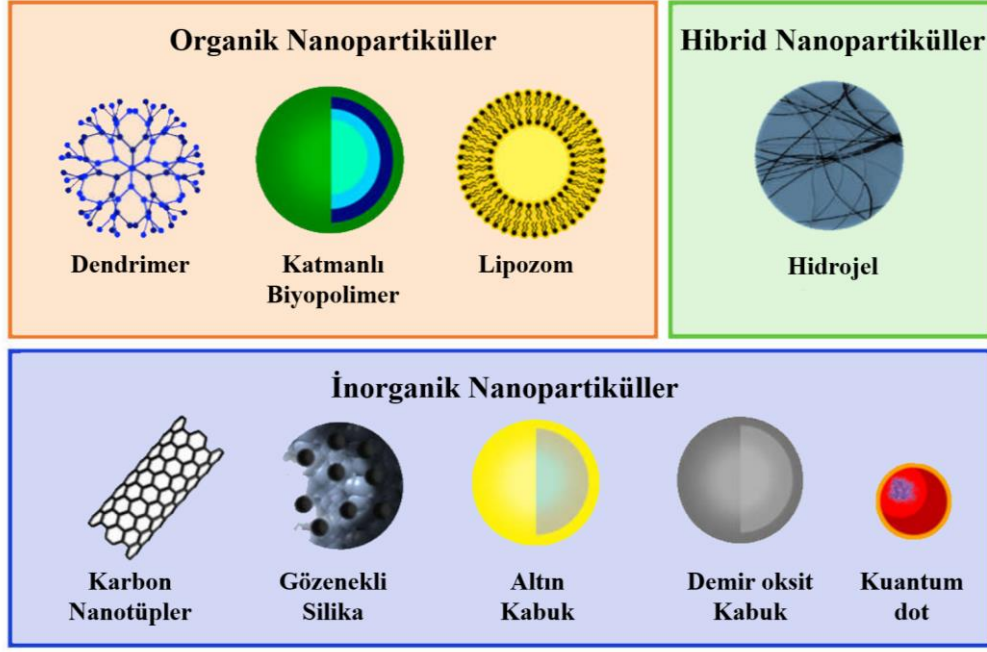
Nanomateriyaller boyutlarına, şekillerine, kimyasal bileşimlerine ve üniformalıklarına göre sınıflandırılabilirler. Boyutlarına göre 0D, 1D, 2D ve 3D olabilecekleri gibi, şekillerine göre düzlemsel ya da küresel, üniformalıklarına göre izometrik, heterojen, disperse ya da aglomere olarak bulunabilirler. Ayrıca bir veya daha fazla bileşenden meydana gelebilirler. Nanomateriyallerin farklı niteliklerine göre sınıflandırıldığı bir şema Resim 1.3.'de görülmektedir (Saleh, 2020).



**Resim 1.3.** Nanomateriyallerin farklı niteliklerine göre sınıflandırılması (Saleh, 2020).

### 1.2.1. Nanopartiküller

Nanopartiküller submikronik ( $<1 \mu\text{m}$ ) kolloidal sistemler olarak tanımlanabilir ancak polimerlerden yapılmış olmaları gerekmemektedir. Nanopartiküller organik (lipidler-proteinler veya polimerler), hibrid (nanoköpükler) ve inorganik (metal veya tuzları) nanopartiküller olmak üzere üç gruba ayrılabilirler (Resim 1.4).



**Resim 1.4.** Organik, hibrid ve inorganik nanopartiküller (Silva vd., 2019).

Ayrıca polimer nano yapılar, nanomembranlar, nanotüpler, nanolifler ve nanoboyutlu silikon damlalar gibi çeşitli yapısal şekillerde de bulunurlar. Nanopartiküller biyolojik işlemleri taklit edebilir veya değiştirebilir. Ayrıca kanser, kardiyovasküler hastalıklar, merkezi sinir sistemi hastalıkları, bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için potansiyel dağıtım vektörleri olarak geniş çapta çalışılmışlardır.

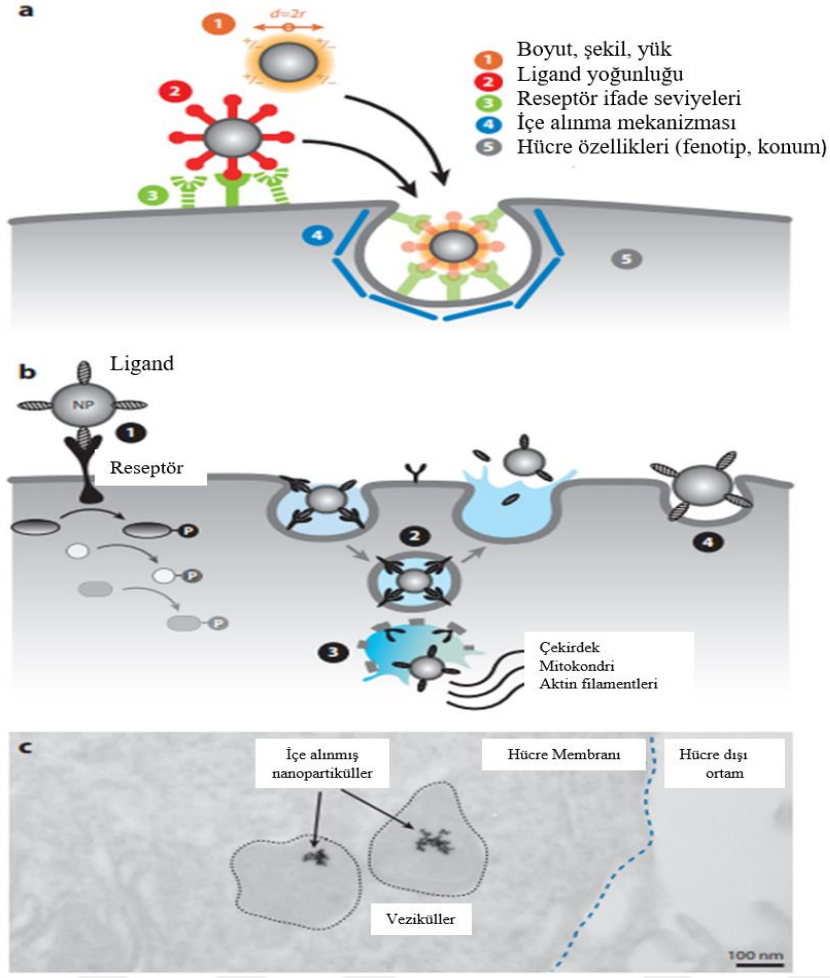
Nanoteknoloji temelli alternatifler, ilaçların mevcut sınırlamalarını gidermek için geliştirilmişlerdir. Nanopartikül-farmakokinetik alanı, etkili absorpsiyon ve doğru biyodağılım ile maksimum potansiyel elde etmek için temel alandır. Bu amaçla yüzey modifikasyonu ile nanopartikül optimizasyonu, etkili ve başarılı bir tedavi tasarlamak için gereklidir. Farklı olası modifikasyonlar pasif ve aktif ilaç hedefleme için araştırılmıştır. Ayrıca nanopartiküller hedef ligand ve nanopartikül (NP) konjugatları arasındaki spesifik etkileşimleri elde etmek için peptidler (CPP'ler, avidin-biyotin), antikolar, transferrinler ve sakkaritler (mannoz, hiyaluronik asit) ile fonksiyonelleştirilmiştir (Gaspar vd., 2017; Silva vd. 2019).

Birçok durumda nanopartiküller, reseptör hedefe bağlandıktan sonra hücreye giriş yaparlar. Bir kez bağlandığında nano-biyo ara yüzeyinde nanomateryallerin davranışını çeşitli faktörler etkiler (Resim 1.5). Örneğin nanopartikülün şekli hücre içerisine alınmayı doğrudan etkiler. Hücre içine en hızlı çubuk şeklinde olan nanopartiküller alınır ve bunları küreler, silindirler ve küpler takip eder (Albanese vd. 2012). Gratton vd. (2008), 100 nm'den büyük

boyutlarda sentezlenmiş olan nanopartikülleri kullanarak bu sınıflandırmayı yapmıştır. Yüz nm altındaki partiküllerle yapılan çalışmalarda küreler, çubuklara göre farkedilebilir bir avantaj göstermiştir. Gerçekte bu boyut aralığında nanoküreler boy/en oranını arttırmak için hücre içi alımı azaltmıştır. Günümüze kadar küresel olmayan nanopartiküller üzerine odaklanmış birkaç çalışma olmasına rağmen, araştırmacılar hücre ile etkileşimin çok daha kompleks olabileceğini belirtmişlerdir. Ligand kaplı çubuk şeklindeki nanopartiküller iki farklı yönelme ile hücre içine girebilirler. Eni ile karşılaştırıldığında, boy eksenini hücre yüzeyindeki daha fazla reseptör ile etkileşebilecektir. Altın nanokestane yapıları gibi uzun nanoyapılar için ligandın dikenler üzerinde veya arasında yer alıp almayacağı, hücre yüzey reseptörüne nasıl bağlanacağını etkiler.

Verilen geometrik şekiller içerisinde nanometeryallerin boyutu, hücre içine alımı kuvvetli bir şekilde etkiler. Küresel altın nanopartiküller, silika nanopartiküller, tek duvarlı karbon nanotüpler ve kuantum dotlar için 50 nm boyut, hücre içine alım oranını maksimumda tutmak için optimumdur. Boyut ve şekle ilaveten nanomateryalin içeriği de hücre içine alımı etkiler çünkü 50 nm çapındaki tek duvarlı karbon nanotüpler ve altın nanopartiküller sırasıyla  $10^{-3}$  dak<sup>-1</sup> ve  $10^{-6}$  dak<sup>-1</sup> endositoz hızına sahiptirler. Bu bin katlık fark karbonun altına karşı kendine has özelliklerinden kaynaklanabilir. Nanomateryalin hangi ligand kullanılarak kaplanacağı, biyolojik yanıtı da etkileyecektir. Örneğin nanopartikülün alımı ve sitotoksitesi nanopartiküller aynı reseptörü hedefleyen iki farklı protein ile kaplandığında önemli oranda değişecektir.

Nanopartiküllerin damar içi uygulamalarında çap, kan damarlarını çevreleyen interendothelial gözeneklerin değişken boyutlarından dolayı farmakokinetiğin ve biyodağılımın belirlenmesinde önemlidir. Altı nanometreden küçük çaplı nanopartiküller böbrek tarafından temizlenebildiğinden vücuttan hızlıca atılabilirler. Polimerler, lipidler veya hidrojel gibi bozunur materyalleri içeren bir nanomalzeme olmadıkça, 6 nm'den büyük çaplı partiküller böbrekler tarafından temizlenemez. İki yüz nm'den büyük çaplı nanopartiküller mononükleer fagosit sistem tarafından temizlenmek üzere dalak ve karaciğerde birikirler (Albanese vd., 2012).



**Resim 1.5.** Nanopartikül ile hücre etkileşimi (Albanese vd., 2012).

Nanopartikül ile hücre etkileşimine ilişkin verilen Resim 1.5'in açıklaması şu şekildedir.

a) Nano-biyo ara yüzeyinde nanopartikül-hücre etkileşimini etkileyen faktörlerin listesi

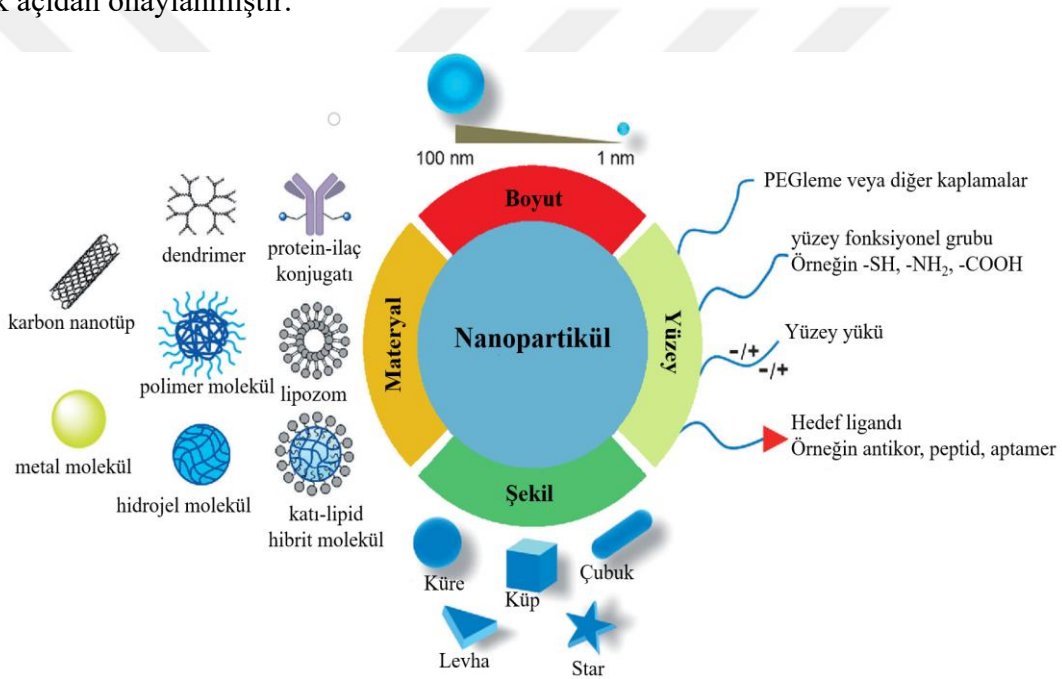
b) Hücre ile etkileşen ligand bağlı nanopartiküller. (1) Ligand kaplı nanopartiküller membran üzerindeki reseptörlere bağlanır ve hücreye girmeden kademeli bir sinyali tetikler. (2) Ligand kaplı nanopartiküller hücre içerisine girebilirler veya bir vezikül ile çevrelenmeden ekzositoz ile atılabilirler. (3) İçeri alınan nanopartiküller vezikülden çıkıp, çeşitli organeller ile etkileşime girebilirler. (4) Nanopartiküller hücre yüzey membranı ile spesifik olmayan etkileşimlere girebilirler ve hücre içine alınabilirler.

c) Çoklu transferrin kaplı 15 nm çapındaki altın nanopartiküller, HELA hücreleri içine vezikül yapıları yardımıyla alınmıştır.



## 1.2.2. Manyetik Nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller benzersiz optik, elektronik, manyetik ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Manyetik nanopartiküllerin boyutları, yüzeylerin nanomühendisliği ve fonksiyonel yapıların üretimi için onların ideal aday olmalarını sağlamıştır. Manyetik nanopartiküllerin modifikasyonu teşhis ve ilaç dağılımını içeren çok çeşitli farmasötik ve medikal uygulamalarda kullanım bulmalarına olanak sağlamıştır ve kanser tedavisinde özel bir potansiyele sahiptirler (Mahmoudi vd., 2011; Tietze vd., 2015; Xiong vd., 2018). Şu anda çeşitli nanopartiküller erken klinik deneylerinde kullanılmaktadır ve bazı formülasyonları medikal görüntüleme ve terapötik uygulamalarda klinik açıdan onaylanmıştır.



**Resim 1.6.** Kanser tedavisinde ilaç dağıtımını için taşıyıcı nanopartiküllerin bir özeti (Sun vd., 2014).

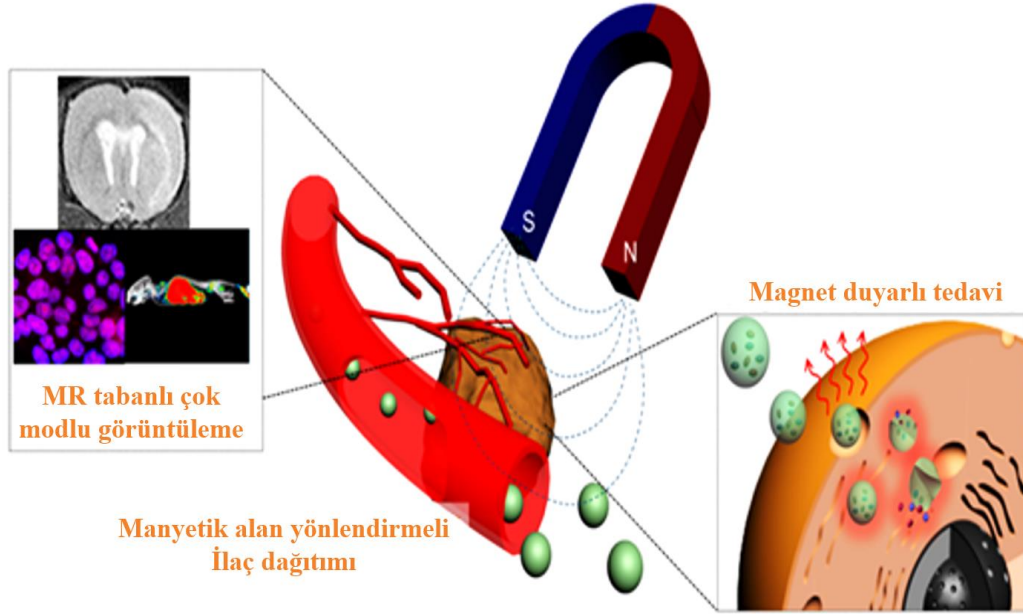
Klinik uygulamalarda kullanım bulabilecek sistemlerdeki en önemli ihtiyaç ilacın tekrarlanabilir ve istenen formülasyonda etkili bir şekilde yüklenebilmesidir. Yüksek ilaç yükleme kabiliyeti, manyetik rezonans görüntüleme özelliği ve iyi biyouyumluluk sunan ilaç iletim sistemlerinin geliştirilmesi çok önemli ve arzu edilebilir hale gelmiştir. Bu sistemlerde nanopartiküllerin davranışlarındaki anahtar parametreler ilaç yükleme metotları, yüzey kimyası, boyut (manyetik çekirdek, hidrodinamik hacim ve boyut dağılımı), şekil ve materyallerdir (Resim 1.6).

Genel olarak ilaç yükleme metotlarında kimyasal bağlanma ve fiziksel etkileşimler olmak üzere iki temel yaklaşım kullanılır. Kimyasal bağlanmalar manyetik nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan amino, karboksilik asit ve tiyol grupları gibi fonksiyonel gruplar ile konjuge ligandlar arasında spesifik olarak oluşan güçlü ve kararlı bağların oluşumuna dayanır. Fiziksel etkileşimler elektrostatik, hidrofilik/hidrofobik ve afinite etkileşimlerini içerir ve hızlı bağlanma, yüksek etkinlik ve ara modifikasyon adımlarına gereksinim duyulmaması gibi çeşitli eşsiz avantajlar sağlar.

Yüzey kimyası, ilaç yükleme kabiliyeti için anahtar bir rol oynar. Manyetik nanopartiküllerin biyobozunur bir polimer kabuk ile kaplanması veya polimer ile nanopartiküllerin matriksi içinde eşit olarak dağılması, etkili ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerdendir. Jelatin zincirindeki  $-NH_2$ ,  $-COOH$  gibi multifonksiyonel grupların varlığı, ilaç polimer konjugatı oluşturmak üzere ilaç ile bağlanma veya retikülo-endoteliyal sisteme takılmayan konjugat oluşturmak için poli(etilen glikol) ile kaplamada uygun bir aday olmasına olanak sağlamıştır (Xiong vd., 2018).

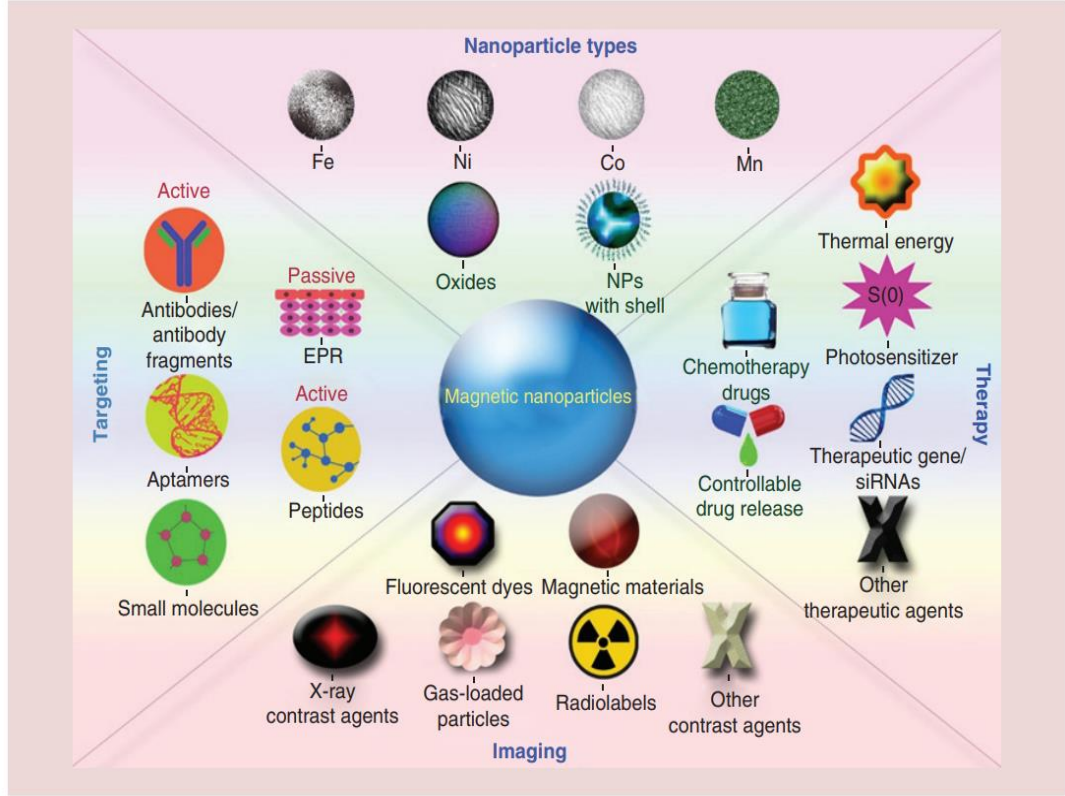
Manyetik nanopartiküller sahip oldukları süper özelliklerinin yanında geniş yüzey alanı ve yüksek kütle aktarımına sahip olmaları nedeniyle atık su arıtma, hastalık tedavisi, hastalık teşhisi (manyetik rezonans görüntüleme), hücre etiketleme ve görüntüleme, doku mühendisliği, sensörler, biyosensörler ve diğer tanıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Resim 1.7). Biyomedikal uygulamalardaki manyetik nanopartiküllerin yapıları ve uygulamaları Resim 1.8’de gösterilmiştir.





**Resim 1.7.** Manyetik nanopartiküllerin manyetik görüntüleme, dağıtım ve tedavi amaçlı kullanımı (Lee vd., 2015).

Demir oksitler ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ve  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ); mangan, kobalt, nikel ve magnezyum ferritleri; FePt, kobalt, demir, nikel, CoPt ve FeCo partikülleri ve nanopartiküllerin  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4Au$ ,  $\text{FePt}@Ag$ , CdS-FePt heterodimerleri gibi çok işlevli manyetik nanopartiküller geçtiğimiz birkaç yıl içerisinde sentezlenmiştir. Manyetik nanopartiküller fiziksel yöntemlerle (örneğin, gaz fazı biriktirme ve elektron ışın litografisi), kimyasal yöntemlerle (örneğin, birlikte çökeltme, yüksek sıcaklıkta termal ayrışma ve/veya indirgeme sol-jel sentezi, akış enjeksiyon sentezi, oksidasyon yöntemi, elektrokimyasal yöntem, aerosol/buhar fazı yöntemi, süperkritik akışkan yöntemi ve nanoreaktörler kullanılarak sentez) ve mikrobiyal yöntemlerle sentezlenebilir (Rocha-Santos, 2014).



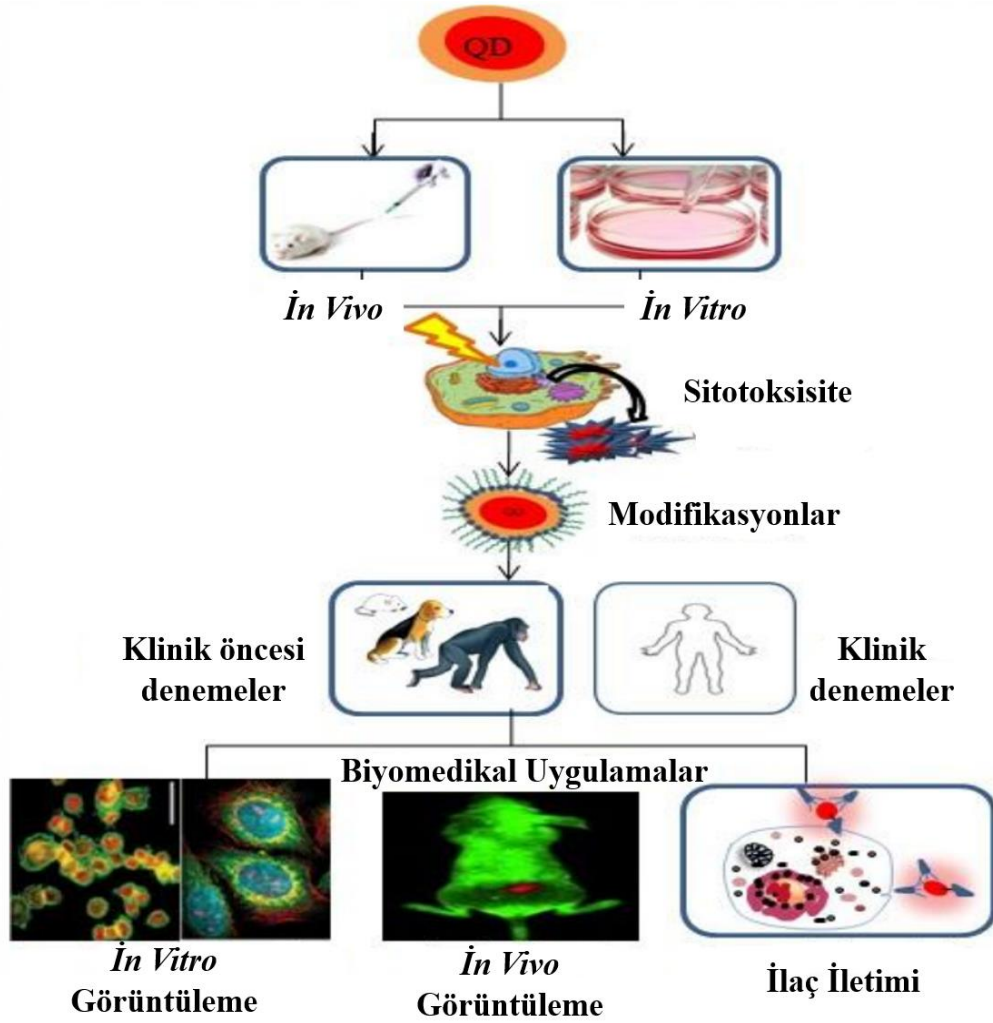
**Resim 1.8.** Biyomedikal uygulamalardaki manyetik nanopartiküllerin yapı ve uygulamaları (Zhu vd., 2017).

### 1.2.3. Kuantum Dotlar

Kuantum dotlar koloidal çözelti içinde Louis. E. Brus (1991) tarafından keşfedilmiş olmakla birlikte kuantum nokta terimi ilk kez fizik profesörü olan Mark Reed (1993) tarafından kullanılmıştır (Hou, 2019).

Kuantum dotlar nanometre boyutlarında yarı iletken malzemeden hazırlanan yapılar olup, büyüklükleri ve boyutlarıyla floresan yayma özellikleri değişen nanoparçacıklardır. Nano boyuttaki ışık emici moleküllerdir ve genellikle IIB ile VIA ve IIIA ile VA elementlerinin bileşimi ile oluşurlar. ZnS ve CdS den oluşan bir kabuk ile çevrilmiş CdSe, CdTe, PbS ve PbSe gibi yarı iletken maddelerden meydana gelmektedirler. Kuantum noktalar kabuk olmadan çekirdekten de üretilebilir. Fakat yalın haldeki nanokristal çekirdeğin oldukça reaktif ve toksik olması, ona fotokimyasal bozunmaya yatkın olan çok kararsız bir yapı kazandırmaktadır. Çekirdeğin ZnS gibi (yüksek bant genişliğine sahip) bir yarıiletken ile

kaplanması, onun kararlılığını ve kuantum verimi artırmakta ayrıca  $Cd^{2+}$  ve  $Te^{2-}$  iyonlarının perdelenmesini sağlayarak çekirdeğin toksisitesini azaltmaktadır. Kuantum dotların büyüklükleri ve yapılarını oluşturan yarı iletkenlerin kompozisyonu değiştirilerek farklı dalga boylarında yayılım yapmaları sağlanabilir. Kuantum noktaların büyüklüklerinin değiştirilmesi ile optik özelliklerinin değişmesi söz konusu olduğundan, kuantum noktalar görüntüleme sistemlerinde eşsiz malzemeler olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Kuantum dotların yüzeyi farklı biyolojik moleküller ile modifiye edilerek biyoteknolojide önemli uygulama alanları bulmuştur. Kuantum dotlar biyo-etiketleme, biyo-görüntüleme ve biyo-hedeflemede yaygın olarak kullanılırlar. Kuantum dotların biyomedikal uygulama alanları gösteren bir resim Resim 1.9'da gösterilmiştir (Reshma, ve Mohanan, 2019).

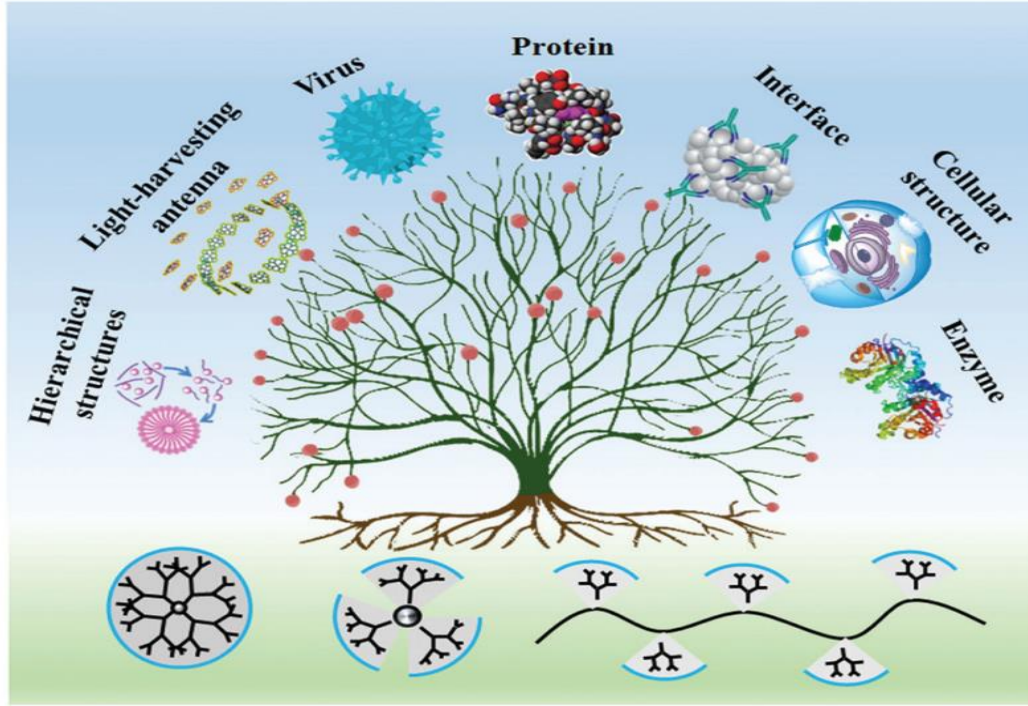


**Resim 1.9.** Kuantum dotların medikal uygulama alanları (Reshma ve Mohanan, 2019).

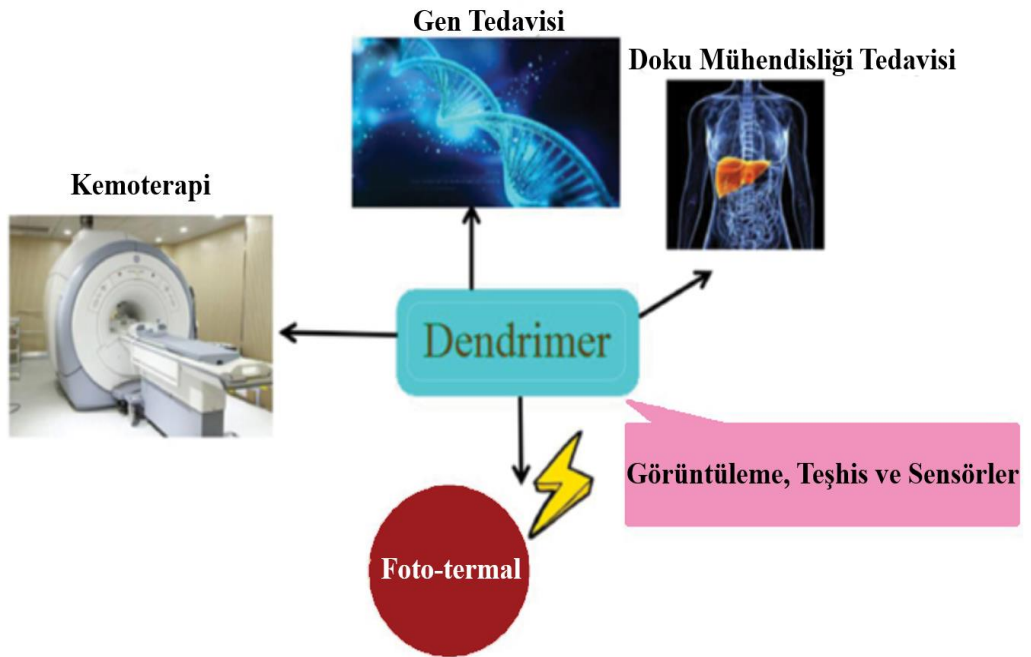
#### 1.2.4. Dendrimerler

Dendrimerler polimerlerin yeni bir sınıfı olup, kovalent bağı nanopartiküllerden oluşan genel olarak küresel ve orijinal tipli üç boyutlu yapılardır. Dendrimer Yunanca “dendron” (ağaç) ve “meros” (kısım) kelimelerinden türeyerek ağaç benzeri dallanmış yapıları ifade etmektedir. Dendritik (çok dallanmış) yapılar, doğada çok yaygın olarak bulunmaktadır ve ağaçların dalları ve kökleri, sinir hücreleri, hayvan ve bitkilerin damarlanma sistemleri canlı sistemlerde görülen, kar tanesi ise cansız sistemlerde görülen dendrik yapılara örnek verilebilir. Klasik polimerlere göre dendrimerlerin boyutu ve mol kütleleri sentez sırasında kontrol edilebilmektedir.

Dendrimerlerin işlevselliği çekirdek moleküllerine, kollar arasındaki boşluğa ve yüzey gruplarına bağlıdır ve çözeltileri, polimerlerin çözeltilerine göre daha düşük viskoziteye sahiptirler. Dendrimerlerde bulunan boşluklar non-kovalent etkileşimler ile de birtakım moleküllerin adsorplanmasına izin verir. Dendrimerler çok fonksiyonlu bir çekirdek, dallanma birimleri ve yüzey grupları olmak üzere üç kısımdan oluşur. Dendrimerlerin üçgen şeklinde büyüyen parçalarına “dendron” denir. Poli(amidoamin) (PAMAM) dendrimerleri ilk sentezlenen ve ticari olarak bulunan dendrimer tipidir. PAMAM dendrimerlerinin sentezi bir alkil diamin çekirdeği (örneğin etilendiamin) kullanılarak başlatılır. Çekirdeğe Michael ekleme yoluyla metil akrilat monomerleri eklenerek dallanmış bir ara ürüne ve ardından yüzeyinde -NH<sub>2</sub> bulunan en küçük jenerasyona sahip dendrimere dönüştürülür (Yang vd., 2014). Resim 1.10’da dendrimerlerin biyolojik moleküllerle etkileşimleri görülmektedir. Ayrıca dendrimerlerin biyomedikal uygulamaları Resim 1.11’de gösterilmiştir.



**Resim 1.10.** Dendrimerlerin biyolojik moleküller ile etkileşimi (Yang vd., 2014).

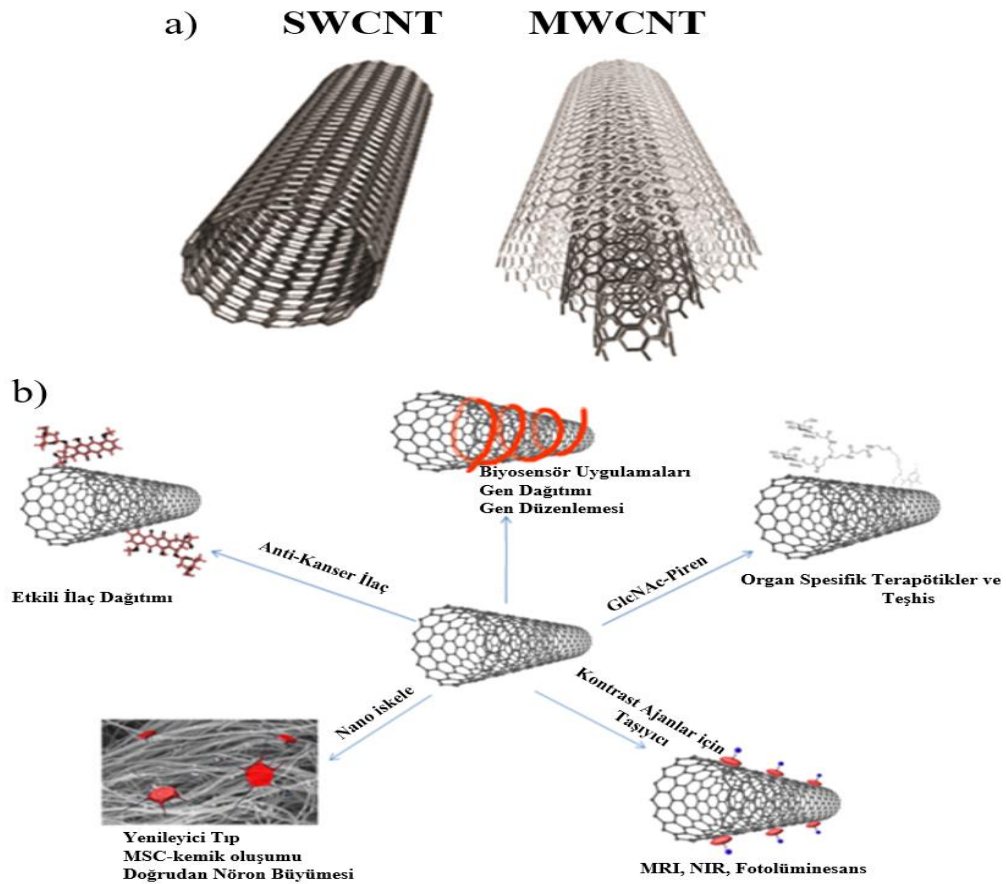


**Resim 1.11.** Dendrimerlerin biyomedikal uygulamaları (Zhou vd., 2018).



### 1.2.5. Karbon Nanotüpler

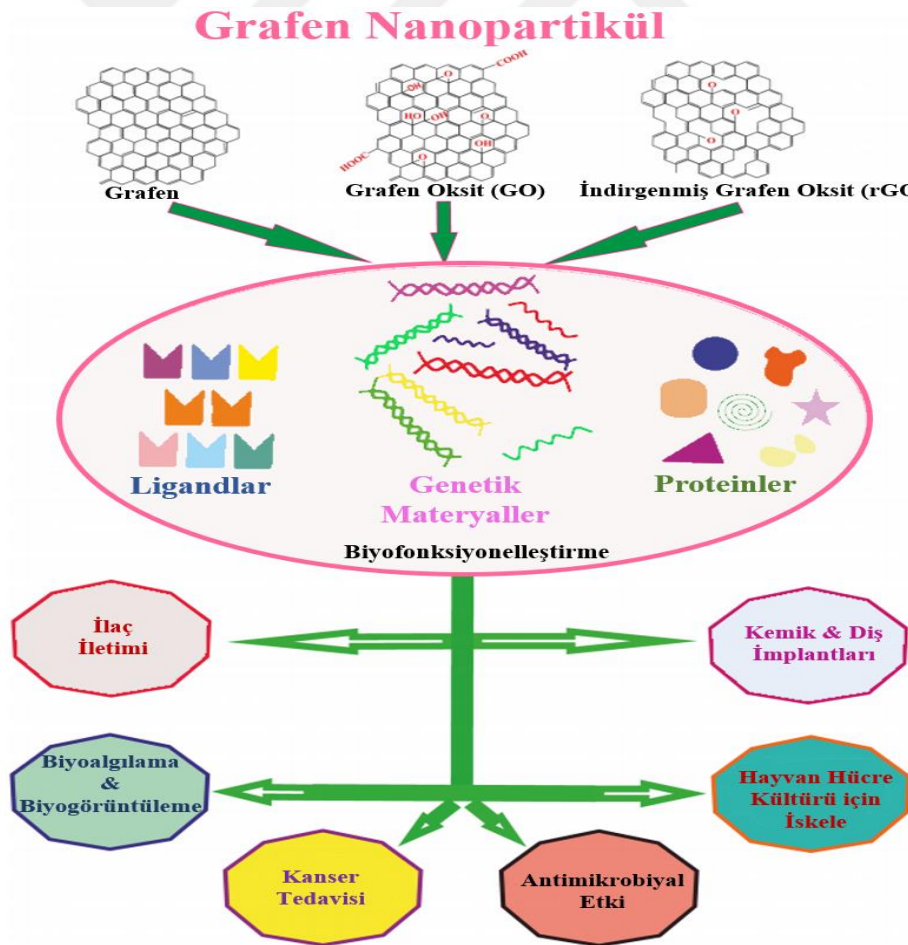
Karbon nanotüpler eşsiz özellikleri ve umut verici uygulamaları sebebiyle mühendislik, tıp, biyoloji ve kimya gibi birçok disiplinde yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Çapları yaklaşık 1 nm olup, boyları 1-100  $\mu\text{m}$  aralığında değişmektedir. Karbon nanotüplerdeki karbon atomları, grafenden bir silindir oluşturmak üzere düzenlenir. Temelde iki tip karbon nanotüp vardır. Tek bir grafen tabakasından meydana gelen tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT) ve çoklu grafen tabakalarından meydana gelen çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT). Karbon nanotüpler üç farklı teknik kullanılarak sentezlenirler: Karbon ark boşaltma tekniği, lazer-ablasyon tekniği ve kimyasal buhar birikimi. Karbon nanotüpler elektriksel, kimyasal, termal, mekanik ve yapısal gibi eşsiz özellikleri sayesinde biyomedikal uygulamalar için gelecek vaat eden malzemeler haline gelmişlerdir ve bu sebeple ilaç dağıtım sistemleri, gen terapisi, biyosensörler ve doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Resim 1.12) (Alshehri vd., 2016).



**Resim 1.12.** Karbon nanotüplerin (a) yapıları ve (b) kullanım alanları (Alshehri vd., 2016).

## 1.2.6. Grafen

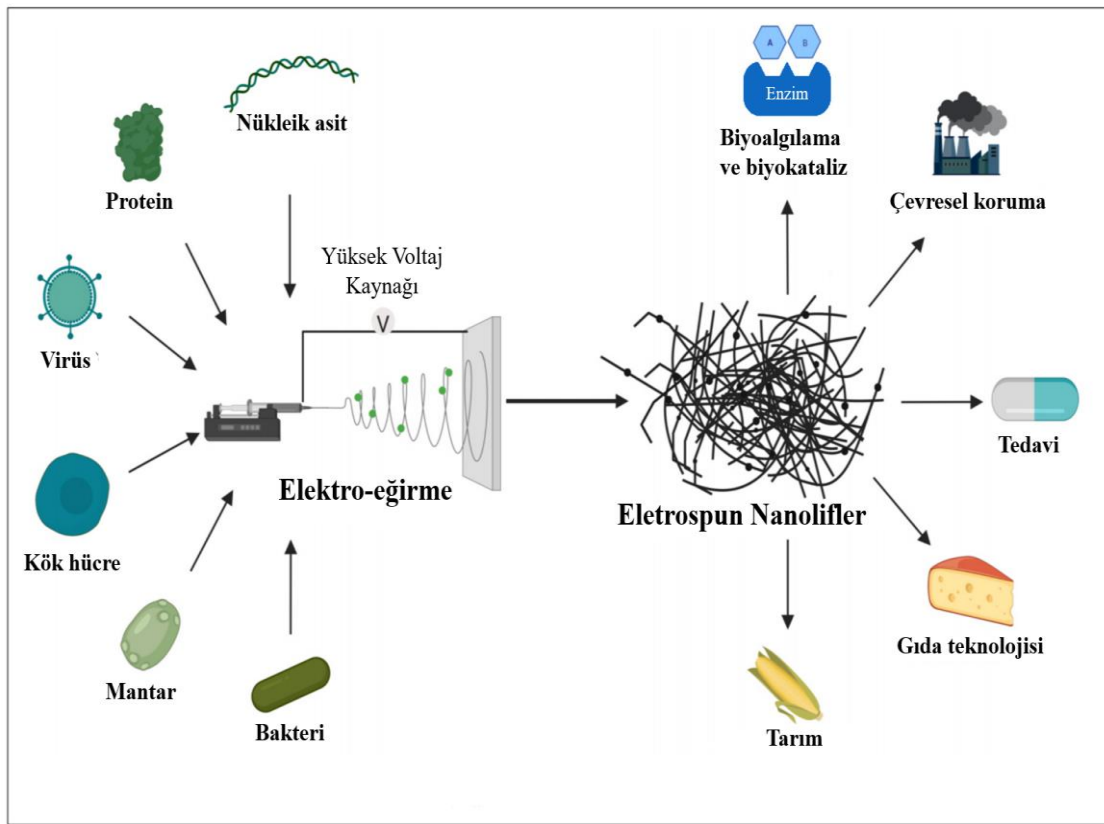
Grafen hekzagonal bir dizi halinde düzenlenmiş,  $sp^2$  hibritleşmesi ile bağlanmış C atomlarından oluşan ince bir tabakadır. Yüksek termal iletkenliği, yüksek akım yoğunluğu, kimyasal inertliği, optik geçirgenliği ve çok yüksek hidrofobisitesi gibi eşsiz elektrokimyasal özellikleri nedeniyle birçok alanda büyük ilgi görmüştür. Karbonun en basit formudur ve şimdiye kadar üretilen en ince malzemedir. Grafen, grafitin tabakaları olarak bulunmaktadır. X-ışını kırınımı tekniği, grafenin kristal yapısının bal peteği benzeri bir yapı sergilediğini göstermiştir. Grafen ailesi indirgenmiş grafen oksit (rGO), grafen oksit (GO), birkaç ve çok tabakalı grafen tabakalar gibi üyeleri içerir. Grafen yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yaklaşımları kullanılarak sentezlenebilir. Grafen ve grafen oksit biyoyoumluluğu ve hızlı fonksiyonelleştirilmesi sebebiyle doku mühendisliği, moleküler ilaç dağıtımı, kanser tedavisi, biyosensör ve biyogörüntüleme gibi alanlarda kullanım bulmuştur (Resim 1.13) (Priyadarsini vd., 2018).



**Resim 1.13.** Grafen nanopartiküller ve uygulama alanları (Priyadarsini vd., 2018).

### 1.2.7. Nanolifler

Nanolifler, nanometre çapındaki yüzey/hacim-kütle oranları yüksek olan lif yapısındaki nanomalzemelerdir. Nanolif sentezinde en çok kullanılan teknik elektro-eğirme tekniğidir. Bu teknik, çözelti içindeki polimerlerin bir şırıngadan geçerken güçlü bir elektrik alan uygulanarak nano boyutlu uzun lifler haline getirildiği bir yöntemdir (Resim 1.14). Nanolifler özellikle doğal, sentetik veya bunların birleşmesinden meydana gelen çeşitli polimerik malzemelerden üretilebilir. Nanolifler sağlık, enerji depolama ve çevresel kirlilik giderimi gibi birçok farklı alanda uygulama bulmuştur (Stojanov ve Berlec, 2020).



**Resim 1.14.** Canlı hücrelerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin elektro-eğrilmiş nanoliflere dahil edilmesi ve uygulamaları (Stojanov ve Berlec, 2020).



### 1.3. Nanomakineler

Kendiliğinden hareket eden nanomakineler, ilaç iletiminden elektronik görüntülemeye ve henüz hayal edilemeyen çok çeşitli alanlarda çok büyük umutlar vaat etmektedir. Özellikle insan yapımı mikro ve nano motorlara olan ilgi, santimetre boyutlu katalitik motorların keşfinin bir sonucu olarak oldukça artmıştır. Bu çığır açıcı keşiften beri, birçok strateji yukarıdan aşağıya veya aşağıdan yukarıya yaklaşımları kullanılarak yeni mikro ve nano makinelerin geliştirilmesi için kullanılmıştır. Nano çubuk/tel makineleri, boru şeklindeki makineler ve Janus motorlar, yüksek hız ve artan verim ile kalıplı veya kendiliğinden oluşan tekniklerle biriktirme yoluyla üretilmiştir (Abdelmohsen vd., 2014).

Manyetik alan, ultrasound, elektrik alan, ışık veya organizmalar gibi dış güç kaynakları ile kullanılan yakıtsız motorları (Resim 1.15) tasarlamaya yönelik ilgi yoğun olarak artmıştır.



**Resim 1.15.** Farklı mekanizmalar ile hareket eden mikromotorlar (Wang ve Gao, 2012).

Manyetik sürücülü motorların biyolojik sistemlerde zararlı yan ürün oluşturmaması, yakıt tüketmemesi, kolay manipüle edilmesi ve salım için hedeflenebilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Manyetik motorlar kullanılan manyetik alan tipine (homojen, heterojen, dönen veya salınan) veya motor içindeki manyetik materyalin tipine (ferromanyetik, paramanyetik veya diamanyetik) bağlı olarak etkili bir şekilde yönlendirilebilir. Motor tasarımı helikal yapıları, esnek veya rijit telleri veya mikroküreleri içerir.

## 1.4. Nanoteller

Nanoteller, nanoteknolojinin önemli bir bileşenidir ve bu tek boyutlu nanomateryallere olan ilgi farklı alanlardaki potansiyel uygulamaları nedeniyle oldukça artmıştır. Nanotellere olan bu yoğun ilgi temel olarak onların yüksek boy/en oranı ve farklı materyalleri içeren çoklu dış yüzeylere sahip olabilmeleri sonucu ortaya çıkan çok yönlülüğü nedeniyle. Farklı boyutlarda ve özelliklerde hazırlanabilmeleri onların eşsiz elektronik ve optik özellikler kazanmalarına sebep olur (Wang, 2009).

Çok-katmanlı ve kompozit nanotellerin mikroyapısı üzerindeki eşsiz kontrol, aynı zamanda farklı özellikler taşıyan nanotellerin hazırlanabilmesine olanak verir ve bu da sensörler, yakıt hücreleri, aktüatörler ve nanomotorlar gibi önemli nano-boyutlu aygıtların çeşitlenmesi için yeni ufuklar açar. Nanoteller ile biyomoleküllerin birleştirilmesi, nanotellerin eşsiz elektronik ve yapısal özellikleri ile biyomoleküllerin üstün tanıma ve katalitik aktivitelerinin birleşmesi ile yeni hibrid sistemlerin oluşturulmasını mümkün kılar. Nanoteller, kullanılacakları uygulamalara bağlı olarak enzimler, antikorlar veya nükleik asitler gibi biyomoleküller ile fonksiyonelleştirilebilirler. Böylece, nanotellere katalitik ve tanıma/bağlanma özellikleri eklenmiş olur (García vd., 2014).

Nanoteller, yığın materyalleri ile karşılaştırıldığında gelişmiş fonksiyonellikleri nedeniyle bilim dünyasında oldukça ilgi çekmiştir. Nanoteller, belli parametreleri kontrol edilerek istenilen özelliklerde hazırlanabilirler. Elektrokimyasal teknikler, yüzey bağımlı oldukları için bu yöntemler kullanılarak hazırlanan nanoteller daha geniş yüzey alanlarına sahip olurlar ve böylece daha gelişmiş analitik performans sergilerler. İlâveten, böylesi nanoteller diğer yığın materyallerinin ötesinde yeni özellikler kazanmış olur (Wang, 2009).

Nanoteller aşağıdan-yukarıya sentez yaklaşımı ile üretime en uygun malzemelerdir ve bu onların çeşitli nanoteknolojik uygulamalarda kullanılmak üzere dizayn edilmelerine ve kurgulanmalarına izin verir. Son yıllarda, metalik nanoteller kalıp yönelmeli elektrobiriktirme, kimyasal metotlar veya kimyasal buhar biriktirmesi gibi birçok teknik kullanılarak üretilmektedir. Günümüzde, nanotellerin kalıp yönelmeli elektrobirikimi sadece birikim parametrelerini değiştirerek nanotellerin boyut, çap ve yoğunluklarının kontrolüne izin vermesinden dolayı çok ilgi çekmektedir. Ayrıca bu yöntem kompleks enstrümanların kullanımını da elimine etmektedir. Aşağıdaki bölümde farklı yaklaşımlar kısaca açıklanmıştır (García vd., 2014).

### 1.4.1. Kalıp Yönelmeli Elektrobirikim

Kalıp yönelmeli sentez, nanotellerin sentezi için kolay ve sezgisel bir yoldur. Kalıp silindirik şekilde küçük gözeneklere sahiptir ve bu boşluklar daha sonra istenilen metal ile doldurularak gözenek şekline uygun olarak nanotellerin sentezine izin verir. Kalıbın mekanik ve kimyasal kararlılığı ile kalıp materyalinin gözenek boyutu ve şekli göz önünde bulundurulmalıdır. Nanotel sentezinde en yaygın kullanılan materyaller anodik alümina oksit ( $Al_2O_3$ ) ve iz-dağlamalı polikarbonattır. Kalıp yönelmeli bu elektrobirikim ile 10-300 nm çaplı ve 50-2000 nm uzunlukta teller hazırlanabilir. Elektro kaplanabilen metaller, polimerler veya metal oksitleri kullanılarak sentezlenen nanotellerin çeşitlendirilmesi sağlanabilir. Böylece, metalik, yarı iletken ve polimerik nanoteller farklı özelliklerde ve fonksiyonellikte hazırlanabilir.

#### *a. Elektrokimyasal Biriktirme*

Elektrokimyasal biriktirme ile nanotellerin sentezi metal tuzlarının indirgenmesine dayanır. İşlem için gerekli elektronlar bir güç kaynağından (potansiyostat) sağlanır. Direkt kalıp elektrobiriktirme yöntemi, membran gözeneklerinde metal indirgenmesi ile büyüyen nanotel temelli bir ıslak kimyasal sentezdir. Potansiyel uygulandığında, katyonlar kanal boyunca difüze edilir ve katotta biriktirilir ve kalıp içinde nanoteller büyümeye başlar.

Elektrokimyasal yaklaşım diğer metotlara nazaran bazı avantajlara sahiptir: nanoyapılar oluşturmak üzere metaller (Ni, Cu, Au, Zn ve Fe), iletken polimerler (polipirol, polianilin ve 3,4-etilendioksitiyofen) ve yarı iletkenler (CdSe ve ZnO) gibi çok çeşitli materyaller biriktirilebilir.

#### *b. Elektrotsuz Biriktirme*

Nanotellerin sentezi için bir başka yöntem de elektrotsuz biriktirmedir. Bu bir kimyasal biriktirme yöntemidir ve kalıp yüzeye materyalin kaplanması için bir kimyasal ajana gereksinim duyar. Bu metotta, yöntem elektroaktif bileşikler ile sınırlanmaz. Birikme gözenek duvarlarından başlar, böylelikle nanotüp oluşumuna neden olurlar.

#### *c. Kalıp Doldurma*

Bu teknik ile kalıp gözenekleri sıvı öncül veya koloidal süspansiyon ile doldurulur. Sonrasında ise katılma meydana gelir. Basit bir yöntem olmasının yanında, gözeneklerin sıvı ile tamamen dolu olması gerekmektedir.

### 1.4.2. Kalıpsız Yaklaşım

Kalıp kullanılmasından kaçınmak üzere, nanotellerin sentezini basitleştirmek amacıyla bazı kalıpsız metotlar geliştirilmiştir.

#### *a. Kimyasal Yaklaşım*

Kimyasal yaklaşımda, nanoteller metal tel üzerinde veya büyüme için destek görevi gören bir elektrodik yüzeyde büyürler. Kimyasal yaklaşım çok yönlü bir metottur. Sıcaklık, karışımın bileşimi ve karıştırma hızı süreci etkiler.

#### *b. Nanopartiküllerden Nanotel Sentezi*

Bu kalıpsız yaklaşım, nanopartiküllerin yapısal eleman olarak kullanıldığı ve bunların üzerinden nanotellerin büyütüldüğü bir metottur. Bu metodun en büyük avantajı, kalıbın uzaklaştırılması gibi zaman alıcı bir adımın olmamasıdır.

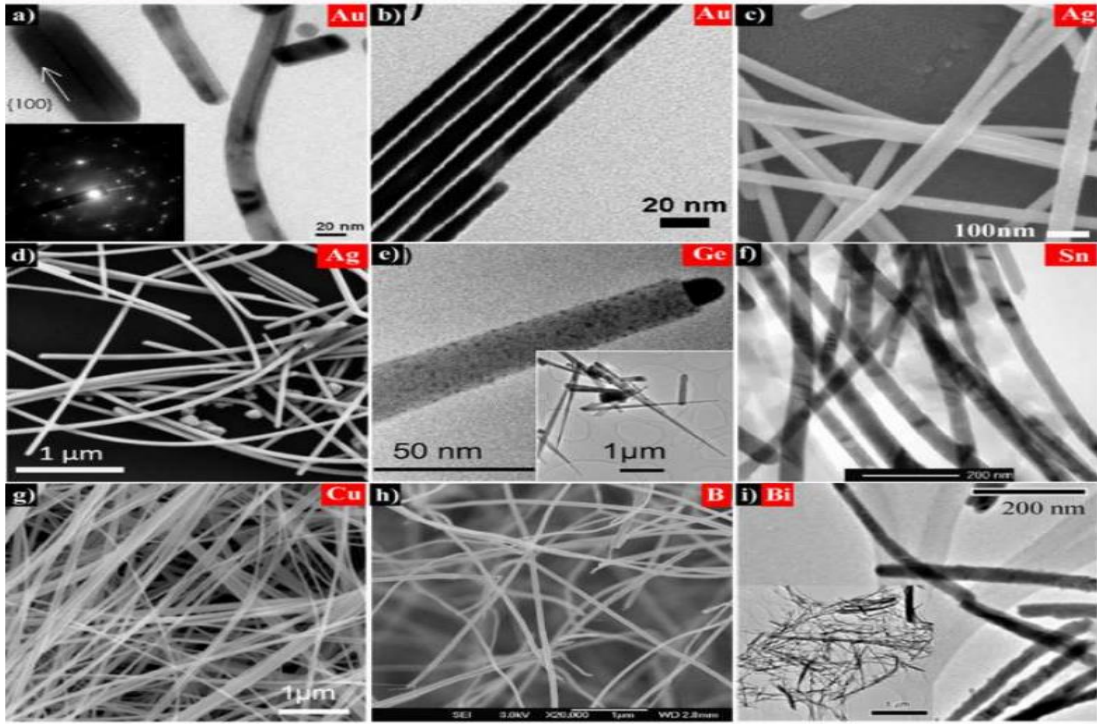
#### *c. Kimyasal Buhar Biriktirme*

Bu yöntem, karbon nanotüp üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır ve aynı zamanda nanoteller için de uygulanmaktadır. Kısaca, materyalin bir katı destek üzerine gaz fazdan katı faza birikmesi temeline dayanır. Bu teknik ile büyük miktarlarda nanomateryaller sentezlenebilir. Fakat yöntem kompleks cihazların kullanımını gerektirmektedir.

### 1.4.3. Karbotermal İndirgeme

Bu metodun temeli, nanotel oluşturabilecek element içeren çözelti karışımının karbon-indirgeyici ajan (örn. grafit tozu) ile sentezlenmesidir. Bu yöntemle birçok metalin elementel formu oluşturulabilir, fakat yöntem metal oksitlere karşı dayanıksızdır (García vd., 2014).

Resim 1.16’da farklı materyallerden sentezlenen nanotellerin TEM/SEM fotoğrafları görülmektedir.



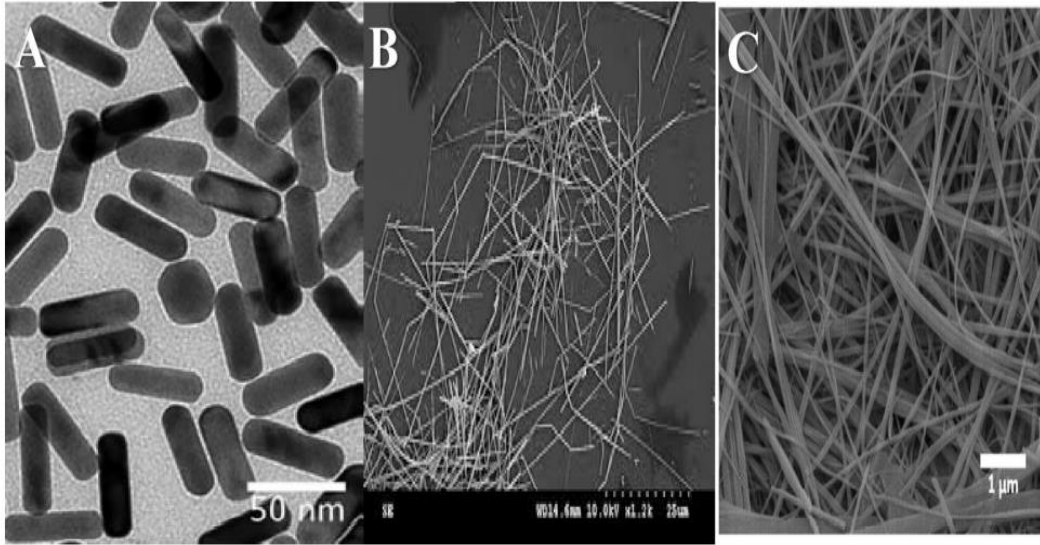
**Resim 1.16.** Farklı metaryallerden sentezlenen nanotellerin TEM ve SEM görüntüleri (Tian vd., 2005; Sutter ve Sutter, 2006; Lai vd., 2007; Wang vd., 2008; Cheng vd., 2010; Das vd., 2010; Xu vd., 2015; Kolesnik-Gray vd., 2015; Tian vd., 2015; Buzea ve Pacheco, 2018).

Nanotel yapıları, küresel eşleniklerine karşı avantajlara sahiptir. Örneğin nanoteller alternatif manyetik alana daha güçlü cevap verir ve aynı materyalden yapılmış nanopartiküllere göre yaklaşık %20 daha yüksek yüzey alanına sahiptir (Contreras, 2015).

Nanotellerin nanopartiküllere göre bir diğer avantajı canlı organizmalardaki biyodağılımlarıdır. Günümüzde kullanılan süperparamanyetik nanopartiküller karaciğer, dalak gibi organlarda ciddi derecede birikmektedir. Küçük boyutlarından dolayı nanopartiküller kan damarlarından sızıp dokulara ulaşabilir, pratikte bu sızma davranışı önemli bir dezavantajdır çünkü bir *in vivo* durumda toplam enjekte edilen nanopartiküllerin sadece %1-5 arası tümör gibi terapötik hedefe ulaşabilir. Buna karşılık nanotellerin boyutu, bu sızmayı önlemek için yeterli uzunluktadır ve nanopartiküllerin yaptığı sızmayı yukarıda değinilen organlarda oluşturmaz (Contreras, 2015).

#### 1.4.4. Metalik Nanoteller

Son on yılda, nanoboyutlu yapılar eşsiz mekanik, elektronik, optik ve manyetik özellikleri nedeniyle oldukça ilgi çekmektedir. Nanotellerin hacme karşı geniş yüzeyi temel olarak onlara geniş uygulama alanı sunmaktadır. En önemli tek boyutlu nano yapılar olarak nikel nanoteller, bakır nanoteller ve altın nanoteller gibi metalik nanotellerin gelecekte önemli bir rol oynayacağı beklenmektedir. Son yıllarda nanoteller ve diğer bir boyutlu nano yapılar (nanoçubuklar, nanokuşaklar, nanoşeritler, nanooluklar ve nanolifler- Resim 1.17) moleküler elektronik, teşhis biyosensörleri, yeni taramalı mikroskop problemleri, nanoelektro mekanik sistemlerdeki sensörler ve rezonatörler, gelişmiş nanokompozitlerde güçlendirici fazlar, biyomedikal bilim, enerji depolama, elektrokimya, optoelektronik aygıt ve yapıtaşları gibi çeşitli uygulamalardaki geniş potansiyelleri nedeniyle oldukça dikkat çekmektedir (Sofiah vd., 2018).



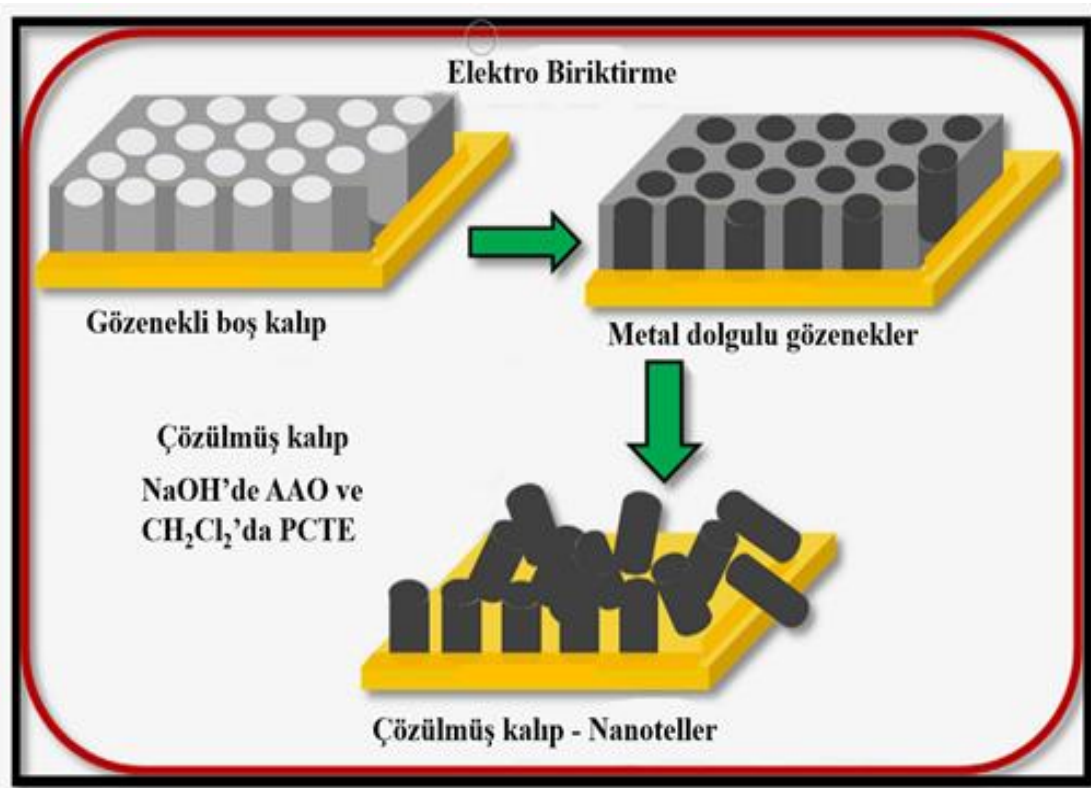
**Resim 1.17.** Farklı 1D nano şekil ve boyuta sahip nanomalzemeler: (A) nanorodlar; (B) nanoteller; (C) nanobeltler (Sofiah vd., 2018).

##### 1.4.4.1. Metalik Nanotellerin Sentezi

Çeşitli stratejiler ile nanotellerin sentezine ilişkin çok sayıda metot ve teknik rapor edilmiştir. Metalik nanotellerin sentezinde yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya metotları olarak iki kritik yaklaşım kullanılır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımı, araştırmacılara üretilen

nanoyapıların daha az defektli olması, daha homojen kimyasal bileşimde ve daha kısa sürede uzun vadeli üretimleri gibi olanaklar sunması nedeniyle yukarıdan aşağıya metodundan daha avantajlıdır.

Metalik nanotelleri sentezlemek için literatürde yer alan farklı metotlar arasında aşağıdan yukarıya yaklaşımı olarak kalıp destekli elektrobiriktirme en iyi bilinen metotlardandır ve elektrobiriktirme işlemi ile metal tuzlarının indirgenmesini içerir (Sofiah vd., 2018). Resim 1.18’de nanotellerden kalıp destekli elektrobiriktirmesine ilişkin adımlar görülmektedir. Ayrıca Çizelge 1’de metalik nanotellerin çeşitli sentez tekniklerinin özeti verilmiştir.



**PCTE:Polikarbonat**

**AAO: Anodik alüminyum oksit**

**Resim 1.18.** Nanotellerin sentezinde uygulanan adımlar (Sofiah vd., 2018).

**Çizelge 1.** Metalik nanotellerin çeşitli sentez tekniklerinin özeti (Sofiah vd., 2018).

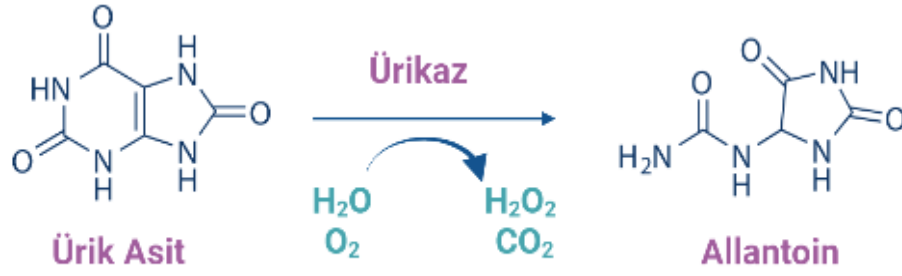
<b>Araştırmacılar</b>	<b>Yıl</b>	<b>Materyal</b>	<b>Sentez Yöntemi</b>
Jung vd.	2010	Tüm metaller	Blok kopolimer (BCP) nanolitografi
Tang vd.	2013	Gümüş	Kolay ve hızlı mikrodalga destekli poliol
Cai vd.	2015	Kalay	Fiziksel buhar taşıma (PVT) yöntemi
Duanmu ve Huang	2015	Tüm metaller	Seçici alan metal-organik kimyasal buhar biriktirme
Liu vd.	2014	Nikel ve paladyum	Nano baskı tekniği
Choi ve Park	2004	Bakır	Kimyasal buhar birikimi,
Decker vd.	2004	Nikel Silisit	Katalitik ayrışma
Yan vd.	2005	Platin	Nanoimprint litografi
Marzi vd.	2004	Platin	Odaklanmış iyon ışını
Shui ve Li	2009	Platin	Elektrospinning
Hanson vd.	2006	Gümüş	Fotokimyasal reaksiyon
Kang vd.	2015	Altın	Buhar taşıma yöntemi
Lin vd.	2015	Gümüş	Poliol yöntemi
Khan ve Kordesch	2006	Çinko	Termal buharlaşma
Suriani vd.	2015	Al-Cu alaşımı	Kimyasal buhar birikimi
Mao vd.	2015	Gümüş	Susuz yöntem
Haberkorn vd.	2014	Cu-Zn alaşımı	Elektrobiriktirme ve tavlamanın kombinasyonu

### 1.5. Ürikaz Enzimi

Schittenhelm (1905), Wiechowsky ve Wiener (1909), Batelli ve Stern (1909; 1912) ve diğer araştırmacıların çalışmalarından beri, farklı organizmaların hücrelerinin, ürik asidin allantoin oksidasyonunu katalize eden bir enzim içerdiği iyi bilinmektedir. Bu enzimi ürikaz adı ile tanımlayan Batelli ve Stern onun, temel özelliklerini ve katalizlediği reaksiyonun mekanizmasını belirleyen ilk araştırmacılarıdır (Holmberg, 1939).

Ürikaz (ürat oksidaz, EC 1.7.3.3) ürik asidin pürin halkasının oksidatif açılmasını katalizler ve reaksiyon sonucunda allantoin, karbon dioksit ve hidrojen peroksit oluşur. Enzimatik reaksiyonun denklemi Şekil 1.1'de görülmektedir.





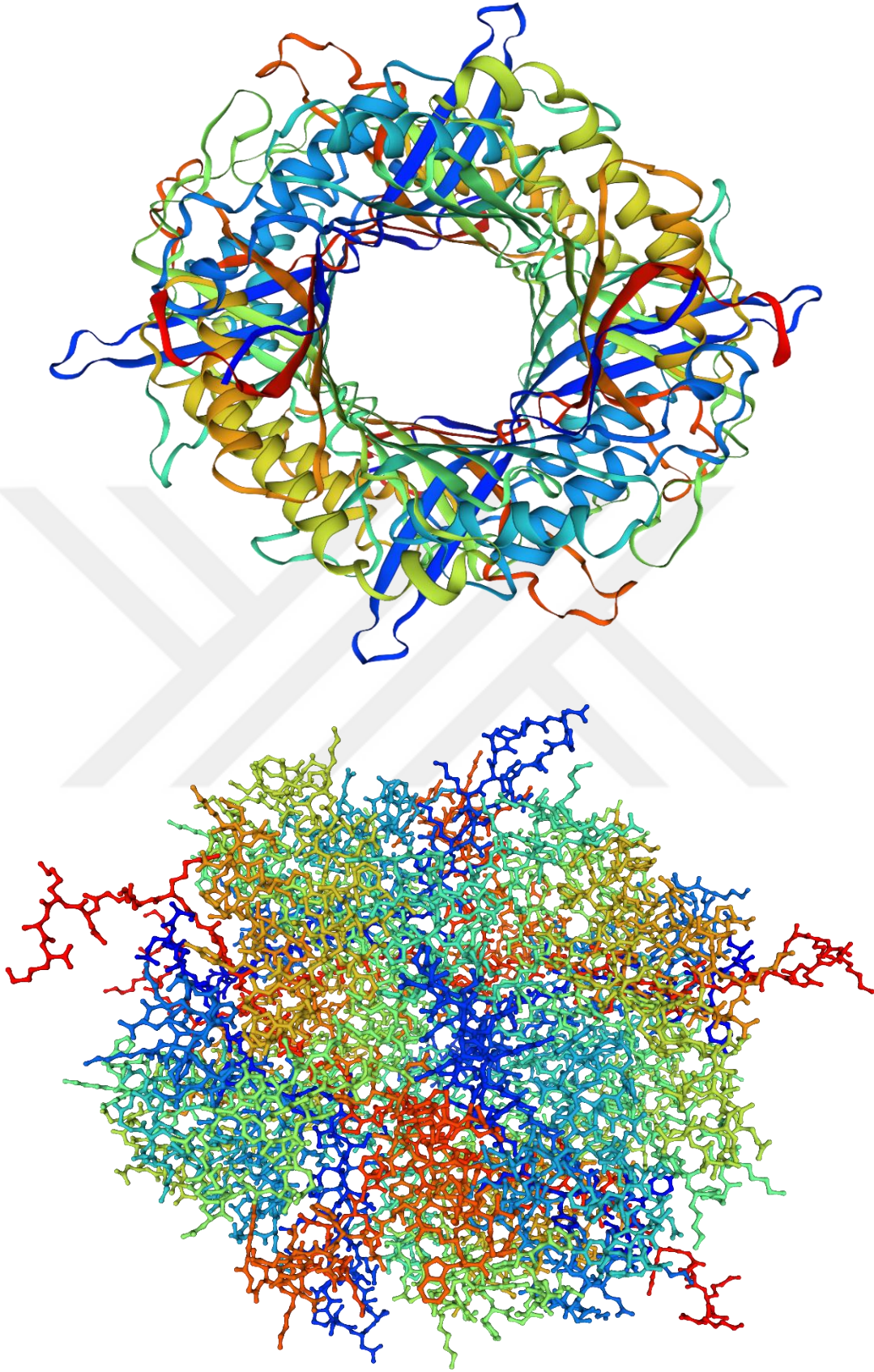
**Şekil 1.1.** Ürik asidin ürikaz katalizi ile allantoin oksidasyonu.

Ürikaz, serum ve idrarda ürat derişimini belirlemekte tanı amaçlı kullanılan bir enzimdir. Ürikaz enzimi bakteriler, funguslar, bitkiler ve hayvanlar gibi canlı organizmalarda bulunur (Schiavon vd., 2000) ancak insanlarda ve hayvanlarda inaktif bir protein fragmenti olarak sentezlenir.

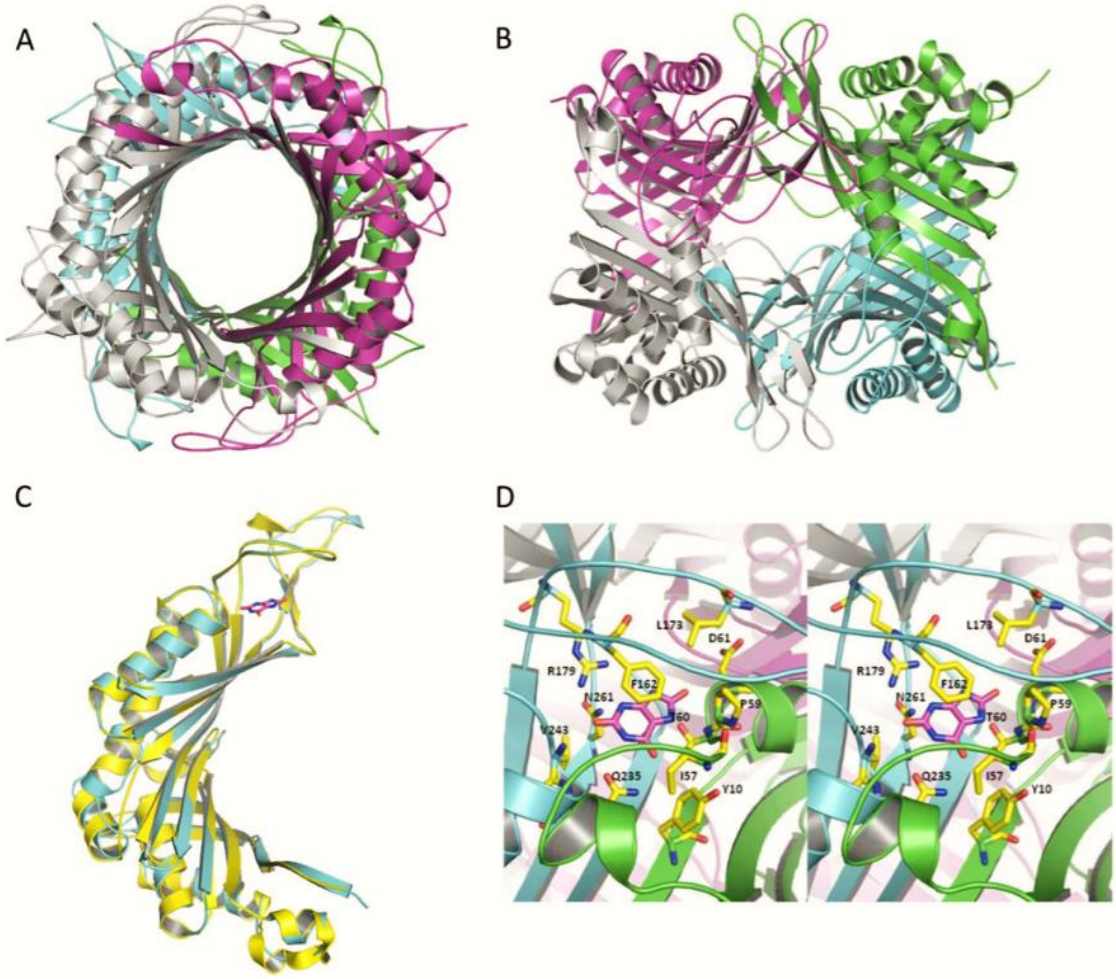
Ürik asidin sudaki çözünürlüğü 11 mg/dL iken allantoinin sudaki çözünürlüğü 147 mg/dL'dir. Bu sebeple allantoin idrar yoluyla kolayca atılır.

Ürikaz enzimi, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Streptomyces exfoliates*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Gliomastix gueg*, *Gliocladium viride*, *Candida utilis* ve *Aspergillus niger* mikroorganizmalarından elde edilebilir. Mikrobiyal kaynağa ek olarak börülce, soya fasulyesi, fasulye gibi farklı baklagiller ve nohut, bakla, buğday ve tütün gibi bitki yapraklarında bulunduğu rapor edilmektedir. Ayrıca ürikaz, keten bitkisinin (*Linum usitatissimum*) yapraklarında, saplarında, köklerinde ve tohumlarında bulunmaktadır (Khade ve Srivastava, 2015).

*Candida sp.* ürikazın önemli bir kaynağıdır ve Jianguo vd. (1994) ürikaz enzimini *Candida sp.*'den amonyum sülfat ile çöktürmüş, Sephadex G200 ve DEAE selüloz DE52 kolonları ile saflaştırmış ve enzimin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar bu enzimin spesifik aktivitesini 0.05-12 U/mg protein, optimum pH'sını 8.5, optimum sıcaklığını 30 °C, K<sub>m</sub> değerini 5.26×10<sup>-6</sup> mol/L, izoelektrik noktasını 5.6 ve molekül kütlelerini 70.000-76.000 olarak bulmuşlardır. Ayrıca araştırmacılar saflaştırılan ürikaz enzimini serumda ürik asit derişimini tayin etmek için kullanmışlardır. *Candida albicans* ve *Candida utilis* ürikaz enzimlerinin üç boyutlu yapıları Resim 1.19. ve 1.20'de görülmektedir.



**Resim 1.19.** *Candida albicans* ürikazın farklı açılardan üç boyutlu yapısının gösterimi (<https://swissmodel.expasy.org>).



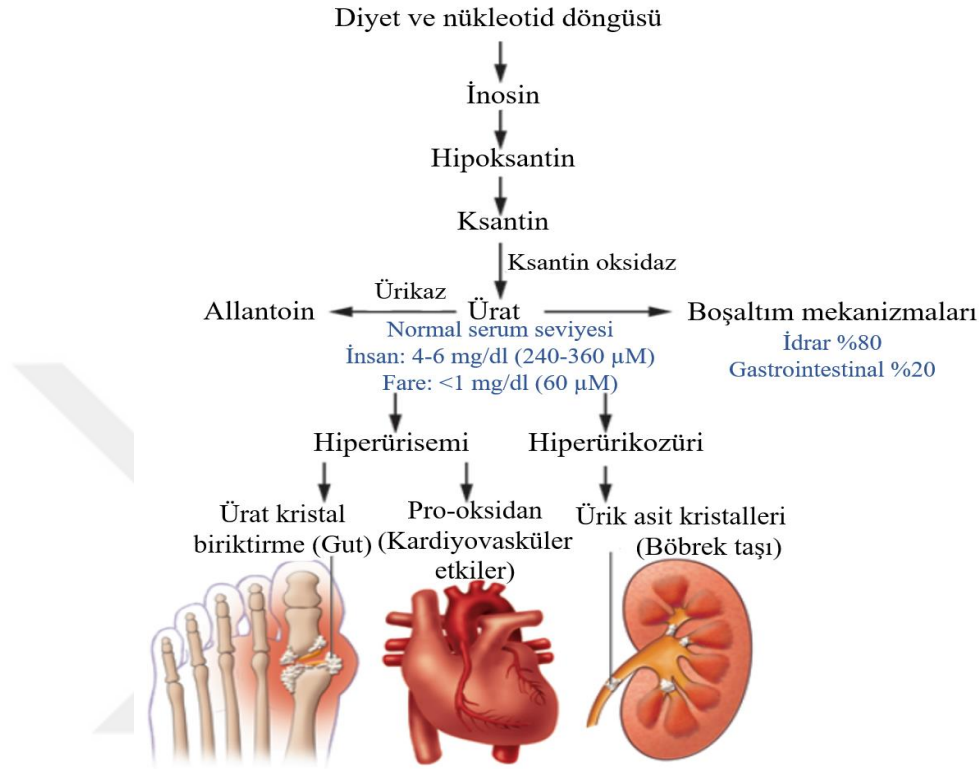
**Resim 1.20.** *Candida utilis* ürikazın yapısı (Liu vd., 2011).

A, B *Candida utilis* ürikaz homotetramerinin genel yapısını göstermektedir. Dört monomer sırasıyla camgöbeği, morumsu kırmızı, yeşil ve beyaz renklidir; A ve B, tetramerin iki ortogonal görünümüdür. C. *Candida utilis* ve *Aspergillus flavus* ürikaz yapılarının süperpozisyonu (PDB: 3BJP). *Candida utilis* ürikazın yapısı camgöbeği, diğeri sarı renklidir. D. Aktif bölgenin üç boyutlu yapısı. Azot ve oksijen atomları sırasıyla mavi ve kırmızı renklerde, ürik asit molekülü morumsu kırmızı ile belirtilmiştir (Liu vd., 2011).

İnsanlarda ürikazın bulunmaması nedeniyle, ürik asidin plazma derişimi daha yüksektir (yaklaşık 300  $\mu$ M) (Colloc'h vd., 2006) ve bu metabolitin anormal artışı böbrek yetmezliğine neden olabilir ve gut gibi bilinen bazı hastalıkların oluşmasına sebep olur (Resim 1.21). Hiperürisemi neoplastik hastalığı olan hastalarda çok yaygın olan ciddi bir komplikasyondur ve kemoterapi sırasında oluşabilir. Hiperüriseminin ciddiyeti böbrekler, beyin, derialtı dokular ve eklemlerdeki patolojik sonuçların geniş spektrumu nedeniyle. Dahası kanda ürik asidin ani artışı öldürücü olabilir (Cammalleri ve Malaguarnera, 2007).



Bu metabolik hastalıkların tedavisi ksantin oksidazı inhibe ederek ürik asit sentezini azaltmanın yanı sıra idrar atılımını teşvik eden ve idrarı alkalileştiren ilaçlarla gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, bu tedaviler bazen ciddi klinik komplikasyonlara yol açarak yetersiz olabilmektedir.



**Resim 1.21.** Ürat homeostazının yolları (So ve Thorens, 2010).

Gut ve üriseminin tedavisi için ilginç bir alternatif, ürikaz uygulamasıdır. Bu enzim ürik asidin plazma düzeylerini düşürdüğünden oldukça etkili olmaktadır. *Aspergillus flavus* dan izole edilmiş ürikazın, Fransa ve İtalya’da klinik kullanımı mevcuttur (Uricozyme®) ve onun rekombinant formu Rasburicase® tümoral lizis sendromunu önlemekte etkilidir. Bununla birlikte insanlarda ürikaz ekspresyonu olmadığından bu enzimin immün sistem tarafından yabancı bir protein olarak görüldüğü düşünülmektedir. Gerçekten de mikroorganizmalardan ve hayvanlardan izole edilen ürikaz hastalara uygulandığında oldukça antijeniktir ve bu enzim kronik tedavilerde uygulandığında alerjik reaksiyonlar ve anafilaktik şok oluşur (Bomalaski, 2002). Bu, terapötik bir ajan olarak ürikazın kullanımında ciddi sınırlayıcı bir faktör olmaktadır. Bu sebeple terapötik amaçlar için daha uygun olan biyolojik aktivitesi korunmuş ve immünojenitesi azaltılmış modifiye ürikaz metodolojilerini geliştirme çalışmaları yapılmaktadır (da Silva Freitas, 2010) ve ürikazın bir desteğe immobilizasyonu kullanılan metotlardan biridir.

## 1.6. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda bulunan, biyokimyasal ve kimyasal reaksiyonları katalizleyen proteinlerdir. Kataliz reaksiyonunu yüksek aktivite, seçicilik ve spesifiklik ile gerçekleştirmelerinin yanı sıra, ılımlı pH, sıcaklık ve basınç koşullarında aktivite gösterirler. Enzimler kimya, biyokimya, medikal, ilaç, gıda, tekstil, kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrileri, atık arıtımı gibi çeşitli alanlarda kullanılabilir. Business Communication şirketinin 2018 yılı araştırma raporuna göre 2017 yılında enzim küresel pazarının arzı olan enzimler, gıda ve içecek endüstrilerinde (%37), tekstil, kâğıt ve deri endüstrilerinde (%25), biyoyakıt üretiminde (%14), hayvan yeminde (%11) ve diğer uygulamalar (%13) dadır ve buradaki bütçe beş milyar dolar civarındadır (Mulinari vd., 2020). Ancak enzimler ilk kullanımlarından sonra geri kazanılamazlar ve tekrar kullanılamazlar. Ekonomik açıdan yüksek maliyet gerektiren bu problemin üstesinden gelebilmek için immobilizasyon yöntemleri gündeme gelmiştir (Liu vd., 2018).

Enzim immobilizasyonu, enzim moleküllerini belirli bir bölgede fiziksel olarak hapsedme ya da inert veya çözünür olmayan bir destek materyaline bağlama işlemidir. İlk kez 1916 yılında Nelson ve Griffin'in invertaz enzimini kömüre immobilize ettiği çalışma ile başlayan enzim immobilizasyonu araştırmaları; avantajları, dezavantajları, endüstriyel, tıbbi uygulamaları gibi özellikleri de ortaya konularak gün geçtikçe gelişen bir çalışma alanı haline gelmiştir (Nelson ve Griffin, 1916; Liu vd., 2018). Tosa vd. immobilize aminoasit enzimini, sentetik rasemik D-L amino asitlerin rezolüsyonu için kullandıkları çalışmaları ile immobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulamasını rapor etmişlerdir (Tosa vd., 1966; Mulinari vd., 2020). Enzim immobilizasyonunun hem laboratuvar ölçeğinde hem de endüstriyel alandaki etkinliği bu tür çalışmaların giderek artmasını sağlamıştır.

Enzim immobilizasyonunda üç temel faktör etkilidir:

1. Destek materyali (İnert matriks)
2. İmmobilizasyon yöntemi
3. İmmobilize edilecek enzim

### 1.6.1. Destek Materyali

Enzimleri immobilize etmek için evrensel ya da genel bir destek maddesi yoktur. Bu amaçla birçok organik ya da inorganik destek materyalinin üretilmesi için çalışmalar yapılmaktadır.

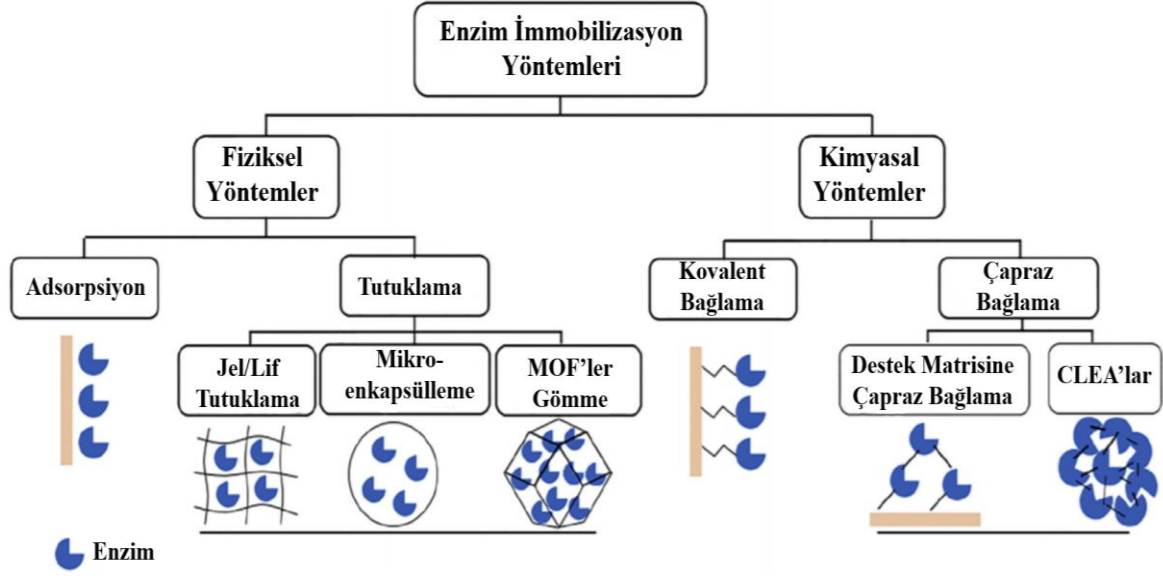
İdeal bir destek materyalinin özellikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Düşük maliyetli ve çevre dostu olmalı,
- İmmobilizasyondan sonra tamamen inert olmalı ve istenen reaksiyonu bloke etmemeli,
- Isıl ve mekanik dayanımı iyi olmalı, bu sayede immobilize enzimin çeşitli koşullarda aktivite gösterebilir olmasını sağlamalı,
- Rejenere edilerek tekrar kullanıma uygun hale getirebilmeli,
- Yüksek miktarda enzim tutuklayabilmeli, yüzey alanı geniş olmalı,
- İstenmeyen adsorpsiyon ya da denatürasyona neden olmamalı,
- İmmobilize enzimin kullanılacağı işleme uygun koşullarda kararlı olmalı,
- Antimikrobiyal olmalı,
- Yüzey yükü, partikül büyüklüğü, gözenekliliği gibi parametreleri yapılacak immobilizasyon işlemi için uygun olmalıdır.

Ne yazık ki, çoğu destek materyali yukarıda bahsedilen özelliklerden ancak birkaçına sahip olabilmektedir. Bu nedenle uygun destek materyalinin seçimi oldukça fazla niteliğin göz önünde bulundurulmasını gerektirir (Sirisha vd., 2016; Mulinari vd., 2020).

### 1.6.2. İmmobilizasyon Yöntemi

İmmobilizasyon yöntemleri enzim molekülü ile destek materyali arasındaki etkileşime göre fiziksel ve kimyasal yöntemler şeklinde sınıflandırılabilir. Fiziksel yöntemler adsorpsiyon ve tutuklama, kimyasal yöntemler ise kovalent bağlama ve çapraz bağlama işlemlerini içerir (Resim 1.22) (Liu vd., 2018).

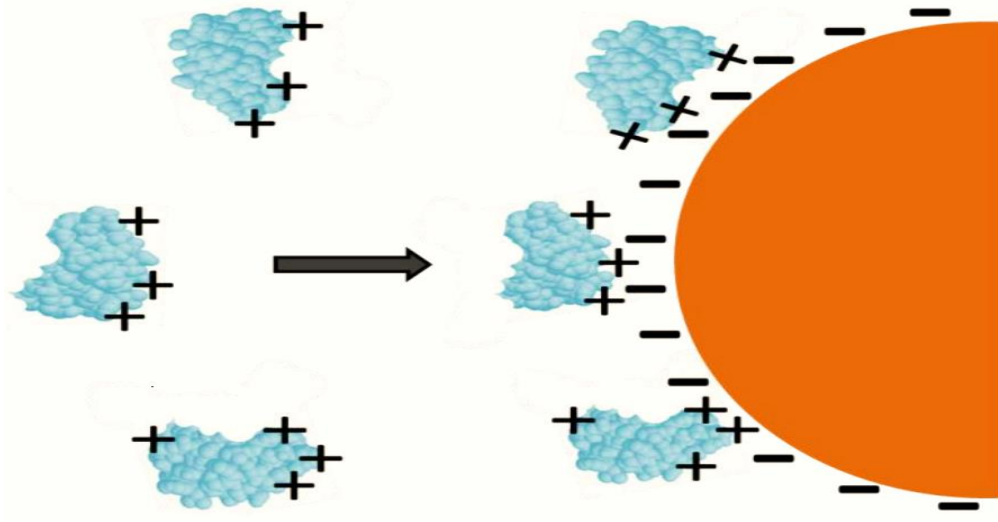


**Resim 1.22.** Enzim immobilizasyon yöntemleri (Liu vd., 2018).

### 1.6.2.1. Adsorpsiyon

Enzim ile destek materyali arasında dipol-dipol etkileşimleri, van der Waals etkileşimleri, hidrofobik ya da elektrostatik etkileşimler veya hidrojen bağları ile gerçekleşen basit, ucuz ve sık kullanılan bir immobilizasyon yöntemidir. Adsorpsiyon, uygun koşullarda enzimin destek materyali ile belirli süre boyunca etkileşime girmesi ile gerçekleşir. Bu sırada enzimin yapısını etkilemeyen, aktif merkezin korunduğu böylece katalitik aktivitenin kaybedilmediği zayıf bir etkileşim meydana gelir. Bununla birlikte, zayıf etkileşimler nedeniyle reaksiyon ortamının pH, sıcaklık, basınç, iyonik şiddet gibi koşulları değiştiğinde enzimin destek materyalinden ayrılması/sızması yani desorpsiyonu söz konusu olabilir.

Adsorpsiyon yönteminde enzimin immobilizasyonu için ilave bir bağlanma ajanına ya da modifikasyon aşamasına ihtiyaç duyulmamaktadır. Destek materyallerinin rejenere edilerek tekrar kullanılabilmesi adsorpsiyonun önemli avantajlarından biridir. Resim 1.23'de altın nanopartiküllere enzimin elektrostatik adsorpsiyonu gösterilmektedir (Putzbach ve Ronkainen, 2013).

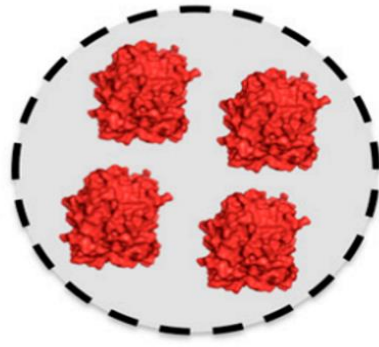


**Resim 1.23.** Altın nanopartiküllere enzimin elektrostatik adsorpsiyonu (Putzbach ve Ronkainen, 2013).

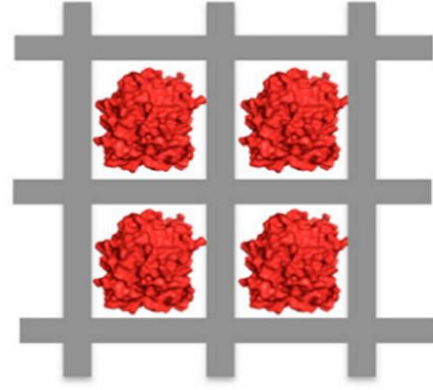
#### 1.6.2.2. Tutuklama

Enzimlerin destek materyali içerisine hapsedilmesi ile gerçekleştirilen immobilizasyon yöntemine tutuklama (Resim 1.24) adı verilir (Datta vd., 2013). Tutuklamada enzim genellikle jel ya da lif ağları içerisinde hapsedilir böylece enzimin agregasyonu, denatürasyonu ve aktivite kaybı önlenmiş olur. Ayrıca enzim bir ağ yapısı içerisinde tutuklandığından, substrat ve ürünlerin geçişleri kolaylıkla gerçekleşmekte ayrıca enzimin sızma ihtimali de oldukça düşük olmaktadır. Bu yöntemde destek materyalinin üretimi ve enzimin immobilizasyonu aynı anda gerçekleşmektedir. Dolayısıyla destek materyalinin üretim koşulları, enzimin denatürasyonuna neden olmayacak şekilde seçilmelidir. Tutuklamada en çok kullanılan doğal polimerlere aljinat, kitosan, kitin, karragenan, jelatin ve selüloz, sentetik polimerlere ise poliüretan ve poliakrilamid örnek olarak verilebilir (Mulinari vd., 2020).





**Enkapsülleme**



**Tutuklama**

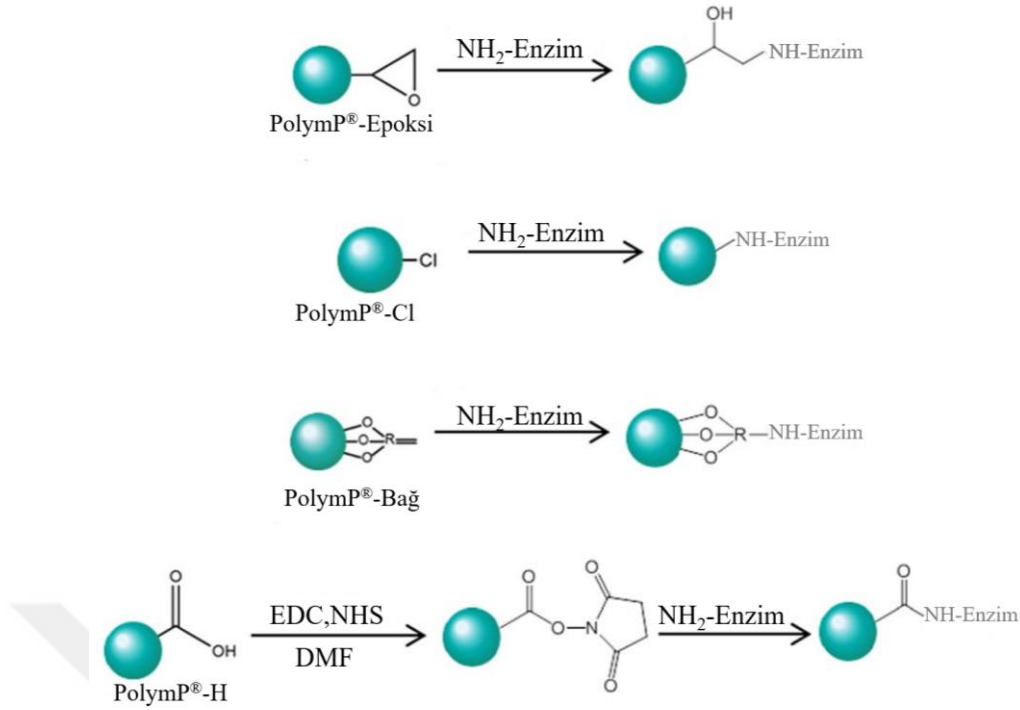
**Resim 1.24.** Enzimlerin tutuklanması (Graebin vd., 2016).

### 1.6.2.3. Kovalent Bağlama

Bu yöntemde destek materyali ile enzim arasında güçlü etkileşimler oluşur ve bu etkileşim kovalent bağlar ile sağlanır. Enzimlerin genellikle lizin, sistein, aspartik asit ve glutamik asit amino asitlerinin yan zincirleri kovalent bağlanma için uygundur. Ayrıca destek maddesinde bulunabilecek karboksil, amino, hidroksil, sülfidril, imidazol, epoksi, indol, tiyol grupları da kovalent bağlar oluşturur (Chakraborty vd., 2016; Liu vd., 2018; Facin vd., 2019).

Kovalent bağlama enzimin destek maddesinden sızmasını engeller böylece enzimin stabilitesini artırır (Liu vd., 2018). Ancak bağlanma aktif merkez ya da substrat bağlanma bölgelerinden gerçekleşirse, enzim aktivitesini kaybedebilir (Eldin vd., 2011). Bununla birlikte eğer uygun bir reaksiyon seçilmezse enzim denatüre olabilir, konformasyonel değişiklikler meydana gelebilir ve kütle transfer sınırlamaları nedeniyle aktivite düşebilir.

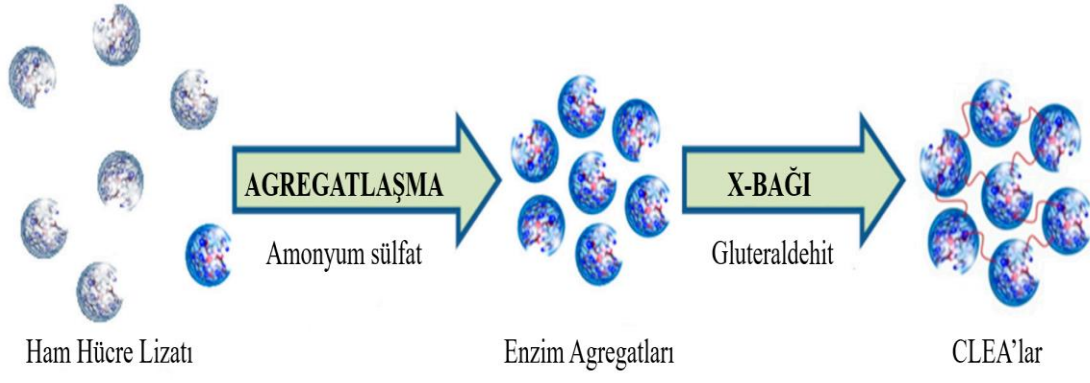
Kovalent bağlama destek materyalinin sentezinde kullanılan öncül moleküllerde bulunan gruplar üzerinden yapılabileceği gibi, desteğe glutaraldehit, epiklorhidrin, glioksal gibi kimyasallar ile muamele edilerek eklenen fonksiyonel gruplar ile de yapılabilir (Mulinari vd., 2020). Bu yöntem tersinir olmadığı için destek maddesi rejenere edilemez. Bu nedenle enzimin destek materyalinden sızmaması istendiğinde daha çok tercih edilir (Barbosa vd., 2013). Resim 1.25'de enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan dört farklı kovalent bağlama protokolü gösterilmektedir.



**Resim 1.25.** Enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan dört farklı kovalent bağlama protokolünün gösterimi (Ramon-Marquez vd., 2015).

#### 1.6.2.4. Çapraz Bağlama

1960'lı yılların başında, çözünmüş enzim moleküllerinin yüzeyindeki -NH<sub>2</sub> gruplarının bifonksiyonel bir ajan ile çapraz bağlanması sonucu çözünmeyen çapraz bağlı enzimlerin (CLEs) üretilbildiği ortaya çıkmıştır. Bu yöntem ile çapraz bağlı enzim kristalleri (CLECs) ve çapraz bağlı enzim agregatları (CLEAs) üretilmektedir. CLECs üretiminde enzim, tampon çözelti ortamından kristallendirilir ve çapraz bağlayıcı ile bu kristaller birbirine bağlanır. CLEAs üretiminde ise protein çözeltisine tuz, su ile karışabilen organik çözücüler ya da non-iyonik polimerlerin eklenmesi ile protein çöktürülür ve agregatlar oluşur. Bu agregatlar daha sonra çapraz bağlayıcı ile muamele edilerek çözünmeyen protein agregatları elde edilmiş olur (Sheldon ve van Pelt, 2013). Resim 1.26'da çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanması görülmektedir.



**Resim 1.26.** Çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanması (Sheldon, 2019).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ürikaz, ürik asidin daha kolay çözünür ürünlere oksidasyonunu katalizleyen bir enzimdir ve çoğu memelinin aksine insanda bulunmaz. Ürikaz enzimi vücuda serbest halde verildiğinde proteaz hidrolizine maruz kalması, immünolojik reaksiyonlara neden olması (Schiavon vd., 2000) ve istenilen bölgeye yönlendirilememesi gibi birtakım sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu sorunların giderimine yönelik *in vitro* temelli ürikaz immobilizasyonu çalışmaları yapılmıştır ancak bunlar literatürde sınırlı sayıda olup, genellikle manyetik olmayan desteklerin kullanıldığı ve immobilize enzimin serbest enzimle karşılaştırıldığı çalışmaları içermektedir. Bu çalışmalara örnekler şöyledir:

Cete vd. (2007), ürikaz enzimini polipirol film üzerine gluteraldehit/jelatin çapraz bağlama prosedürü ile immobilize etmişlerdir. Bu immobilizasyon işlemi ile immobilize enzimin  $K_m$  değerini (0.44 mM), serbest enziminkinden (0.35 mM) daha yüksek bulmuşlardır ve serbest ve immobilize enzimlerin sırasıyla  $V_{max}$  değerlerini  $8.4 \times 10^{-2}$  mM/dak ve  $7.1 \times 10^{-2}$  mM/dak olarak rapor etmişlerdir. Serbest ve immobilize ürikazın optimum pH değerleri sırasıyla 8.5 ve 8.0 olarak, optimum sıcaklık değerleri ise 35 °C ve 55 °C olarak bulunmuştur. İlâveten yedi hafta boyunca serbest ve immobilize enzimin depo kararlılığı incelenmiş ve serbest ve immobilize enzim sırasıyla başlangıç aktivitelerine göre %42 ve %49 oranlarında aktivite göstermiştir.

Akgöl vd. (2008), 150-200 µm boyutundaki poli(EGDMA-VIM) kürecikleri EGDMA ve VIM kopolimerizasyonu ile hazırlamışlar ve SEM, elementel analiz ve şişme çalışmaları ile karakterize etmişlerdir. Daha sonra hazırladıkları bu küreleri  $Cu^{+2}$  ile şelatlaştırmışlar ve ürikaz adsorpsiyonunda kullanmışlardır. Maksimum ürikaz adsorpsiyonu pH 6.0'da 118.3 mg/g olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar immobilize enzimin  $K_m$  değerini ( $91.95 \times 10^{-3}$  mM) serbest enzimin  $K_m$  değerinden ( $7.5 \times 10^{-3}$  mM) daha büyük bulmuşlardır. Ayrıca serbest enzimin  $V_{max}$  değerini 0.012 µmol/dak.mg protein ve immobilize enzimin  $V_{max}$  değerini 1.44 µmol/dak.mg protein olarak rapor etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin depo kararlılığı karşılaştırıldığında serbest enzimin 35 günde tüm aktivitesini yitirdiği ve immobilize enzimin aktivitesinin %80'ini koruduğu görülmüştür.

Tan vd. (2010), fizyolojik koşullarda düşük aktivite ve *in vitro/in vivo* koşullarda düşük stabiliteye sahip ürikaz enzimini lipid vezikülleri içine tutuklamışlardır ve ürikaz içeren

bu lipid veziküllerini hazırlarken tutuklama etkinliği, polidispersiyon, partikül boyutu ve zeta potansiyeli indekslerini de belirlemişlerdir. Araştırmacılar hazırlanan ürikaz içeren lipid veziküllerinin depo kararlılığının ve proteolitik parçalanmaya karşı stabilitesinin arttığını rapor etmişlerdir.

Phaugat vd. (2010), polietilen tereftalat membran üzerine ürikaz enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir ve enzimin başlangıç aktivitesinin %66.6'sına sahip olduğunu görmüşlerdir. İmmobilize enzimin pH'ı pH 7.0'dan pH 8.5'e kaymış,  $K_m$  değeri 0.075 mM'dan 0.13 mM'a artmıştır. Ayrıca optimum sıcaklığı 37 °C'den 35 °C'ye azalmıştır. İmmobilize ürikaz +4 °C'de 60 gün boyunca saklandığında aktivite kaybetmeksizin 100 kez kullanılmıştır. Araştırmacılar bu çalışmadaki desteğin biyoyumlu, antimikrobiyal, inert, darbeye dirençli, hafif kütlede ve iyi raf ömrüne sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

Bayramoğlu vd. (2011), poliakrilonitril film üzerine iletken anilin fırçaları aşılanmış ve bunların üzerine ürikaz enzimini geri dönüşümlü olarak immobilize etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzimin optimum pH'ı sırasıyla pH 7.0 ve pH 7.5 olarak,  $K_m$  değerleri ise sırasıyla 94  $\mu$ M ve 138  $\mu$ M olarak bulunmuştur. Ayrıca serbest enzimin 4 hafta içinde aktivitesini kaybetmesine karşılık immobilize enzimin iki ay sonra bile başlangıç aktivitesinin %68'ini koruduğunu rapor etmişlerdir.

Chauhan vd. (2014), ürikaz enzimini plastikleştirilmiş polivinil klorür şişenin iç kısımlarına gluteraldehit yardımıyla kovalent olarak immobilize etmişlerdir ve immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin %65.23'ünü koruduğunu görmüşlerdir. Enzim bağlı şişe 45 °C'de 5 dakika bekletildiğinde pH 7.2'de optimum aktiviteyi göstermiştir. İmmobilize enzimin ürik asit için  $K_m$  değeri 0.17 mM olarak bulunmuştur ve enzim bağlı şişe serum ve idrarda ürik asidin kolorimetrik olarak tayininde kullanılmıştır. Bu metodun minimum tayin sınırı 0.01 mM olarak rapor edilmiştir. Serumda 10 ve 20 mM ürik asit ilavesinde analitik geri kazanım oranları sırasıyla %98.0 ve %96.5 olarak bulunmuştur. Ayrıca ürikaz bağlı şişe +4 °C'de saklandığında 4 ay boyunca 200 kez kullanılmıştır.

Literatürde yalnızca ürikaz immobilizasyonunu içeren çalışmalar sınırlı sayıda yer alırken, ürik asit tayinine yönelik ürikaz temelli biyosensörlerin hazırlanmasını içeren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda elektrotlar üzerine ürikaz enziminin immobilizasyonuna ilişkin çeşitli stratejiler geliştirilmiştir ve ürikaz immobilizasyonu biyosensör çalışmalarında daha fazla kullanım olanağı bulmuştur. Örneğin:

Arora vd. (2007), elektrokimyasal olarak sentezlenmiş polianilin filmler (PANI) üzerine gluteraldehit çapraz bağlayıcısını kullanarak ürikaz enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Hazırladıkları PANI-ürikaz elektrotları spektroskopik, siklik voltametri ve impedans ölçümleri ile karakterize etmişlerdir. Elektrot aktivitesi üzerine pH, sıcaklık ve derişimin etkisini incelemişler ve enzim içeren elektrotların 4 °C’de saklandığında 17-18 haftadan sonra %95 oranında aktivitesini koruduğunu görmüşlerdir. Elektrotların cevap süresi 60 s bulunmuştur ve hazırlanan biyosensörler serumdaki ürik asit derişimini ölçmek için kullanılmıştır.

Bhambi vd. (2010), çok duvarlı karbon nanotüpler ve polianilin kompozitini içeren elektrotlar üzerine ürikaz enzimini kovalent olarak immobilize etmişler ve serumda ürik asit tayininde kullanılabilir bir biyosensör hazırlamışlardır. Taramalı elektron mikroskopisi ile elektropolimerize karbon nanotüp/polianilin kompoziti üzerine globüler enzimin immobilizasyonunu göstermişlerdir. Kompozit kullanımı 8 saniye gibi hızlı bir cevap zamanının alınmasına ve enzimin 180 günden daha fazla raf ömrüne sahip olmasına olanak sağlamıştır.

Ali vd. (2011), 80-150 nm çaplarında çinko oksit nanoteller sentezlemişler ve altın kaplı plastik elektrot üzerine nanotelleri kaplayarak yüzeylerine ürikaz enzimini elektrostatik olarak immobilize etmişlerdir. Daha sonra bu ürikaz içeren elektrotlar nafyon ile kaplanarak ürik asidin potansiyometrik olarak tayininde kullanılmış ve potansiyometrik cevap 1-1000 µM derişim aralığında incelenmiştir. Membranın sensör dayanıklılığını önemli ölçüde arttırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca sensörün cevabı askorbik asit, glukoz ve üre gibi yaygın girişim ajanlarından etkilenmemiştir.

Chu vd. (2012), ürikaz immobilizasyonuna dayanan bir elektrokemilüminesans biyosensörünü, işaretçi olarak luminol kullanarak ürik asit tayini için tasarlamıştır. Hazırlanan biyosensör  $7.5 \times 10^{-11} - 8.3 \times 10^{-6}$  M aralığında lineer olarak hızlı cevap sergilemiştir. Ayrıca hazırlanan biyosensör ürik asit tayini için yalın elektrottan 50 kat daha duyarlılıkta bir performans göstermiştir.

Liu vd. (2013), altın/amino asit nanokompozitlere ürikaz enzimini immobilize ederek basit bir amperometrik ürik asit sensörü hazırlamışlardır. Hazırlanan biyosensör ile  $108 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  duyarlılıkta 4 saniyeden daha az sürede ve 0.02-2.5 mM aralığında lineer olarak ölçüm yapılabilmektedir. Bu biyosensörün olağanüstü termal stabiliteye, iyi girişim karşıtı davranışa ve uzun süreli depo kararlılığına sahip olduğu rapor edilmiştir.

Piermarini vd. (2013), insan serumunda ürik asidin tayini için Prussian blue ile modifiye edilmiş perde baskılı elektrot temelli bir ürikaz içeren biyosensör hazırlamışlardır. Bu biyosensörün çalışma aralığı 0.03-0.3 mM ve tayin sınırı 0.01 mM olarak bulunmuştur ve 85 kez serum örneklerinde analiz için kullanılmıştır.

Devi ve Pundir (2014), platin elektrot üzerinde demir oksit nanopartikülleri/kitosan-g-polianilin kompozit film yapısı hazırlamışlar ve bu film yapısına ürikaz enzimini immobilize etmişlerdir. Bu enzim elektrodunu siklik voltametri, TEM, FTIR ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile karakterize etmişlerdir. Bu biyosensör ile 0.1-800 µM ürik asit derişimi aralığında lineer bir grafik elde etmişlerdir. Bu biyosensör 100 günün üzerinde 120 kez kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin sadece %10'unu kaybetmiştir. Bu çalışma ile hazırlanan biyosensörün gut hastalarında serum ürik asit derişiminin tayini için kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Kumar vd. (2014), poliakrilik asit-g-polipropilen fonksiyonel polimerini radyasyon aşılama tekniği ile hazırlamışlar ve ürikaz enziminin kovalent immobilizasyonu için kullanmışlardır. Hazırlanan polimerik desteği FTIR, TGA, SEM ve şişme analizleri ile karakterize etmişler ve immobilize ürikazın  $V_{max}$ ,  $K_m$ , depo, termal ve pH kararlılığını belirlemişlerdir. Daha sonra immobilize ürikaz sistemini, optik sensör sistemine konjuge ederek ürik asit tayininde kullanmışlardır.

Cheng ve Kao (2016), bakır tel üzerine altını elektrobiriktirme yöntemi ile kaplamışlar ve L-methionin ile fonksiyonelleştirdikten sonra bu yapıya ferrosen mediatörünü ve ürikaz enzimini kimyasal olarak bağlayarak ürik asit tayininde kullanmışlardır. Araştırmacılar bu şekilde düşük maliyetli, kolay hazırlanabilen, hızlı ve yüksek duyarlıkta sonuç verebilen, uzun süre kullanılabilen bir biyosensör hazırladıklarını rapor etmişlerdir.

Omar vd. (2016), grafen oksit üzerine ürikaz enzimini EDC/NHS kimyasını kullanarak immobilize etmişler ve serbest enzime kıyasla immobilize enzimin %88 oranında aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ürikaz bağlı grafen oksit yapısını, camsı karbon elektrot üzerine damlatarak ürik asidin siklik voltametri ile tayinini sağlayan bir biyosensör hazırlamışlardır. Bu biyosensör ile 0.02-0.49 mM aralığında ürik asit tayini yapılabilmiş ve biyosensör girişim ajanlarının varlığında başarılı bir şekilde kullanılabilmıştır.

Jain vd. (2019), bütülin ile kaplanmış kuarterner kalkopirit ( $Cu_2ZnSnS_4$ ) nanopartiküllerini hazırlayarak, ITO ile kaplanmış cam yüzeyin üzerine biriktirmişler ve

ürrikaz enzimini bu yüzeye immobilize etmişlerdir. Hazırlanan bu biyosensör ile 0-700  $\mu\text{M}$  aralığında ürik asit tayini yapılmış, biyosensörün LOD değeri 0.066  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Araştırmacılar hazırlanan biyosensörün klinik uygulamalarda da kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Jirakunakorn vd. (2020), perde baskılı elektrot yüzeyine elektrobiriktirilen Prussian blue tabakası üzerine, grafen katkılı kitosanı içeren gözenekli kriyojel yapısını yerleştirmiş ve ürikaz enzimini immobilize ederek ürik asidin amperometrik tayininde kullanmıştır. Bu biyosensörün lineer çalışma aralığı 0.0025-0.40  $\text{mmol.L}^{-1}$  ve tayin sınırı 2.5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Modifiye elektrot insan serum örneklerindeki yaygın girişim ajanlarından etkilenmemiş ve başarılı bir şekilde insan serum örneklerinde kullanılmıştır.

Shi vd. (2020), insan tükürüğünde ürik asit miktarının tayini için karbon nanotüpleri içeren bir biyosensör tasarlamışlardır. Bu biyosensör perde baskılama teknolojisi ile esnek polietilentereftalat elektrodunun üretilmesi ve karbon nanotüpler ve ürikaz ile modifikasyonu ile hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensör ürik aside karşı yüksek duyarlılıkta elektrokatalitik aktivite, düşük tayin sınırı ve geniş lineer aralık sergilemiştir. Araştırmacılar hazırlanan bu biyosensörün insan tükürüğünde doğrudan ürik asit tayininde kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Literatürde manyetik nanotellere ürikaz immobilizasyonuna ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sadece nanotelleri içeren birkaç tane ürikaz immobilizasyonu çalışması görülmüştür ve bu çalışmalarda ürikaz bağlı nanoteller, ürik asit tayinine yönelik bir biyosensör tasarımıda kullanılmıştır. Bu tezde ilk kez, gut tedavisinde kullanılma potansiyeli taşıyan bir sistem olarak manyetik nanotellere ürikaz immobilizasyonunun gerçekleştirilmesi söz konusudur ve bu özellik tezin özgünlüğünü ortaya koymaktadır.



## 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1. Kimyasallar ve Cihazlar

#### 3.1.1. Kimyasallar

Whatman siklopor polikarbonat membran (0.2  $\mu\text{m}$ , 25 mm), hidrojen tetrakloroaurat ( $\text{HAuCl}_4$ ), nikel (II) sülfat ( $\text{NiSO}_4$ ), nikel (II) klorür ( $\text{NiCl}_2$ ), borik asit ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), alümina, metilen klorür ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), izopropil alkol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ), etil alkol ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ), 11-merkaptoundekanoik asit (MUA), 6-merkapt-1-hekzanol (MCH), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC), N-hidroksisüksinimid (NHS), poli(etilen glikol), ürikaz enzimi, tripsin enzimi, yapay insan serumu Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya)'dan temin edilmiştir. Ürik asit Alfa Aesar (Kandel, Almanya)'dan temin edilmiştir.

#### 3.1.2. Cihazlar

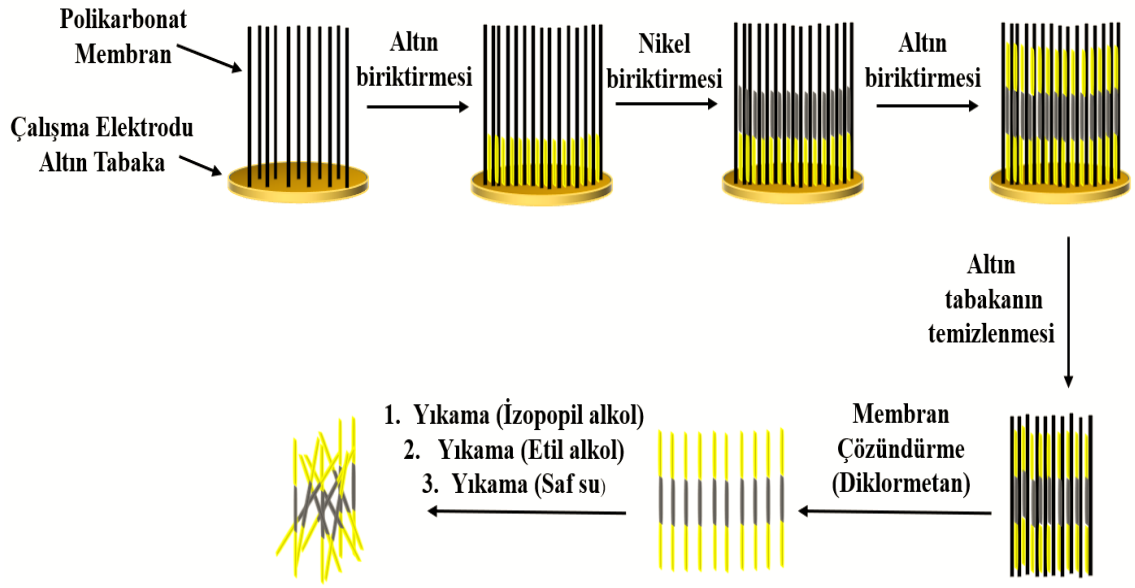
Deneyleerde Palm Sens4 potansiyostat, Vestel (White FR 540) buzdolabı, Radwag (AS220 C/2) analitik terazi, Memmert (Beschicung-Loading Model 100-800) etüv, Sigma (3-30 KS) santrifüj cihazı, Hanna (pH 211) pH metre, Shimadzu (UV-1601) UV-Vis spektrofotometre, Velp (multistirrer) 15 çoklu manyetik karıştırıcı, Ultrasonic (LC30) ultrasonik banyo, GFL (2001/4) saf su cihazı, Isolab (CAPP) otomatik pipetler, Millipore Simplicity UV ultra saf su cihazı ve Heidolph Reax top vorteks kullanıldı.

### 3.2. Yöntem

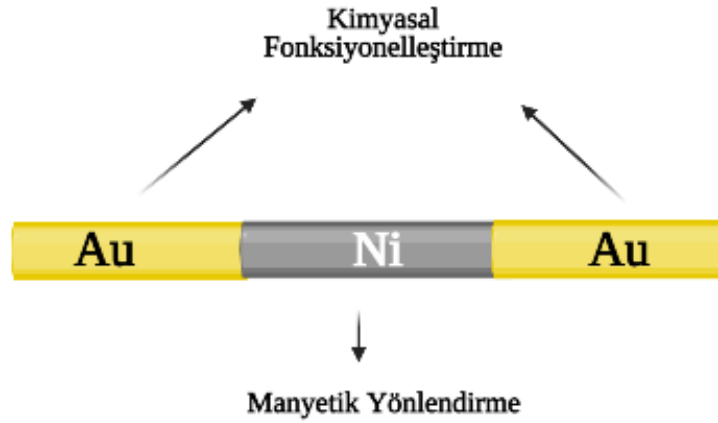
#### 3.2.1. Nanotellerin Hazırlanması

Au/Ni/Au nanoteller, 200 nm gözenek çapına sahip (25 mm çaplı) polikarbonat membran içerisinde sırasıyla altın, nikel ve altının ardışık elektrobiriktirmesi ile sentezlendi. Elektrobiriktirme işleminden önce, membranın bir yüzü çalışma elektrodu olarak kullanılmak üzere altın ile kaplandı. Membranın altın ile kaplanması, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde gerçekleştirildi. Daha sonra membran, bir teflon kaplama hücrelerine yerleştirildi

ve elektriksel iletkenliğin oluşması için alüminyum folyo ile ara bir katman eklendi. On mL altın çözeltisi (0.0127 M kloroaurik asit ve 0.162 M borik asit) teflon hücre içerisine eklendi ve böylece Au segmenti -0.95 V potansiyelde ve 2 C toplam yükte kronoamperometri tekniği ile biriktirildi. İşlem tamamlandıktan sonra teflon hücre saf su ile yıkandı. Nanotellerin manyetik kontrolü için nanotellerin yapısına nikel segmenti eklendi. Bu amaçla öncelikle 30 g nikel (II) sülfat, 1.06 g nikel (II) klorür ve 3 g borik asit 100 mL saf suda çözüldü ve bu çözeltinin pH'ı HCl (1:1) ile 4.0'e ayarlandı. Hazırlanan bu çözelti ile Au segmentinin üzerine Ni biriktirildi ve öncelikle çekirdeklenme (nükleasyon) noktaları oluşturmak için 0.1 saniye süreyle -20 mA'de 10 kez kronopotansiyometri işlemi uygulandı. Ardından, nikel segmentini büyütmek için kronopotansiyometri tekniği ile 360 saniye boyunca -6 mA sabit akım uygulandı. Daha sonra Au/Ni segmentinin üzeri yeniden aynı koşullarda Au ile biriktirildi. Elektrobiriktirme işlemlerinin sonrasında membran, teflon kaplama hücresinden alınarak saf su ile yıkandı. Daha sonra altın tabaka önce kalın çaplı alümina ile daha sonra ise ince çaplı alümina ile temizlenerek, altın tabaka uzaklaştırıldı. Polikarbonat membranın çözdürülmesi için membran, 1 mL'lik ependorf tüpüne alınarak üzerine 1.0 mL diklorometan eklendi ve 30 dakika çalkalandı. Ardından 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılarak çözgen atıldı. Bu aşamada ependorf tüpünde yaklaşık 200 µL süpernatant bırakıldı ve nanoteller süspansiyon edildi. Diklorometan ile yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı. Daha sonra 1.0 mL izopropil alkol ile yıkama yapıldı ve 9000 rpm'de 2 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Ardından, teller 1.0 mL etil alkol ile yıkandı ve 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Son olarak 1.0 mL su ile yıkanan nanoteller 12000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi. Su ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Saf su içinde süspansiyon haldeki nanoteller kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı (Uygun vd., 2017). Şekil 3.1'de Au/Ni/Au manyetik nanotellerin hazırlanması ve Şekil 3.2'de Au/Ni/Au manyetik nanotelin şematik gösterimi sunulmuştur.



Şekil 3.1. Au/Ni/Au manyetik nanotellerin hazırlanması.



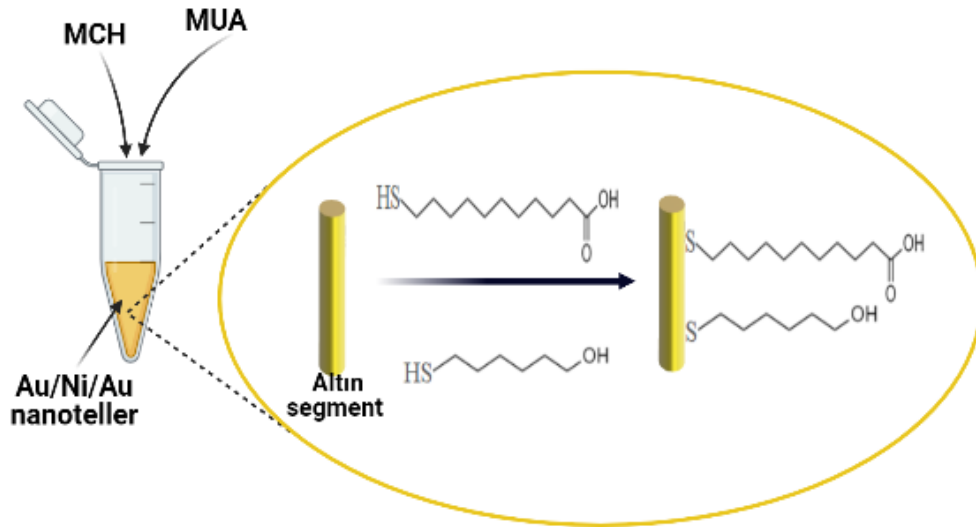
Şekil 3.2. Au/Ni/Au manyetik nanotelin şematik gösterimi.

### 3.2.2. Nanotellerin Karakterizasyonu

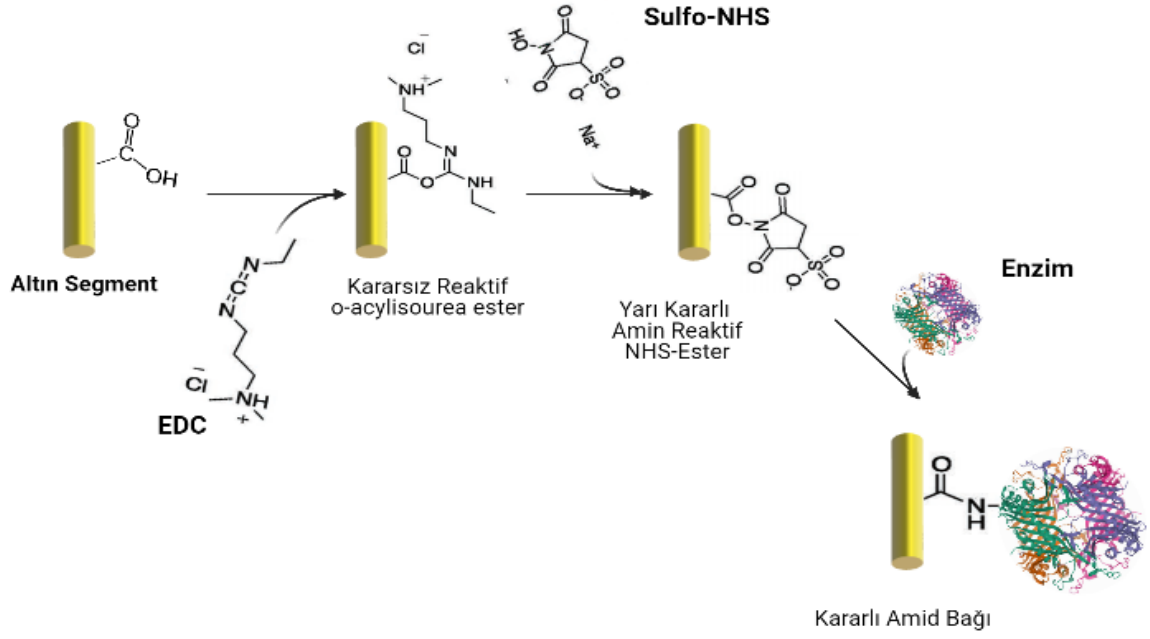
Hazırlanan nanotellerin yüzey morfolojisi, boyutu ve şekli hakkında bilgi edinmek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve içeriğinin belirlenmesi için enerji dağılımlı X-ışını analiz (EDX) tekniklerinden yararlanılmıştır. Bu amaçla sentezlenen ve kurutulan nanoteller İnönü Üniversitesi İBTAM'a gönderilerek hizmet alımı ile analizlenmiştir.

### 3.2.3. Nanotellerin Modifikasyonu

Ürikaz enziminin nanotellere immobilizasyonunda kükürt-altın etkileşiminden yararlanılmıştır. Bu amaçla, nanotellerin iç altın segmenti MUA/MCH alkantiol monotabakası ile kaplanmıştır. İki buçuk milimolar MUA (11-merkaptoundekanoik asit) ve 7.5 mM MCH (6-merkaptohexanol) karışımı etanolde (10 mL) hazırlanmış ve bu karışımın 1.0 mL'si 100 µL nanotel çözeltisi ile bir gece boyunca etkileştirilmiştir. Ardından nanoteller tampon çözelti ile yıkanmış ve 0.4 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC), 0.1 M N-hidroksilsülfosüksinimid (sülfo-NHS) ve 5.0 mg/mL derişiminde ürikaz enzimi içeren çözelti (200 µL fosfat tamponunda, pH 5.5) ile +4 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Nanotellerin yıkama işlemi pH 8.5 Na-Borat tamponunda ve 6000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek yapılmıştır. Hazırlanan ürikaz immobilize nanoteller +4 °C'de saklanmıştır. Şekil 3.3'de nanotellerin MUA ve MCH ile modifikasyonu, Şekil 3.4'de ise ürikaz enziminin EDC/NHS kimyası ile Au segmente bağlanması gösterilmektedir.



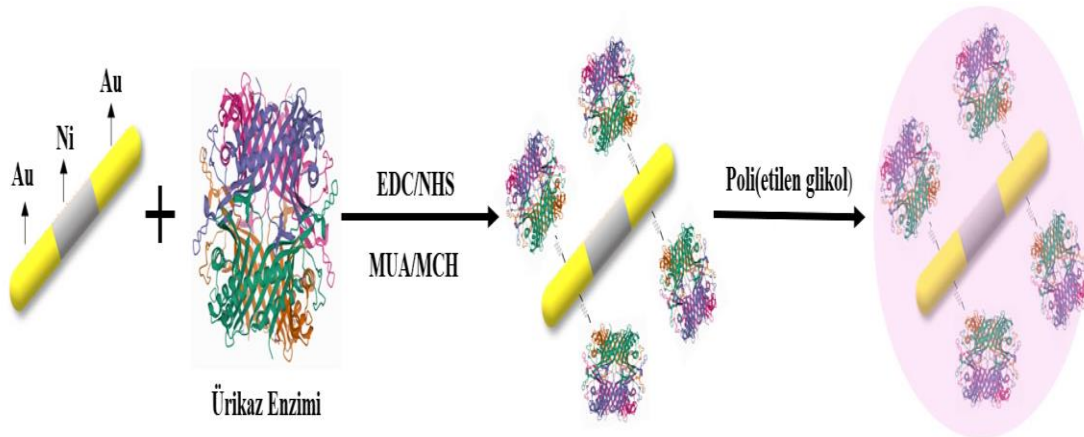
Şekil 3.3. Nanotellerin MUA ve MCH ile modifikasyonu.



Şekil 3.4. Ürikaz enziminin EDC/NHS kimyası ile Au segmente bağlanması.

### 3.2.4. Ürikaz İmmobilize Nanotellerin Poli(etilen glikol) (PEG) ile Kaplanması

Nanotellerin poli(etilen glikol) ile kaplanması için poli(etilen glikol) metil eter tiyol kullanılmıştır (Niidome vd., 2006). Bu amaçla 1 mL nanotel-enzim çözeltisi ile 200  $\mu$ L 5mM PEG çözeltisi +4 °C’de 24 saat inkübe edilmiş ve ardından tampon çözelti ile yıkanmıştır. PEG ile kaplanan ürikaz immobilize nanoteller kullanılmak üzere +4 °C’de depo edilmiştir. Şekil 3.5’de ürikaz immobilize nanotellerin PEG’lenmesi şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 3.5. Ürikaz immobilize nanotellerin PEG’lenmesi.

### 3.2.5. Ürikaz Aktivitesinin ve Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi

Ürikaz aktivitesi, ürik asidin allantoine oksidasyonuna bağlı olarak 290 nm'de absorpsiyon azalması takip edilerek spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Mahler, 1970).

Bu amaçla, 0.0595 mM 2 mL ürik asit (2.0 M Na-Borat pH 8.5 tamponunda) ile 0.1 M 0.9 mL Na-Borat tamponu karıştırılmış ve 0.1 mL ürikaz çözeltisinin (1 mg/mL, 0.1 M Na-Borat pH 8.5 tamponunda) eklenmesi ile enzimatik reaksiyon başlatılmıştır. Bir ünite ürikaz enzimi aktivitesi, 1 µmol ürik asidi allantoine dönüştüren protein miktarı olarak tanımlanmıştır. İmmobilize ürikaz ile aktivite tayinlerinde nanotellere bağlı ürikaz enzimi kullanılmıştır.

Serbest ve immobilize ürikazın optimum pH değerlerinin belirlenmesi için aktivite denemeleri 4.5-10.5 pH aralığında incelenmiştir. Bu amaçla aktivite ölçümleri yukarıda anlatılan şekilde yapılmış ve en yüksek aktivite değeri 100 kabul edilerek % aktivite değerleri hesaplanmıştır. pH değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirilmiş ve böylece serbest ve immobilize ürikazın optimum pH değeri saptanmıştır.

Serbest ve immobilize ürikazın optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi için aktivite ölçümleri 4-60 °C aralığında yapılmış ve sıcaklık değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirilerek serbest ve immobilize ürikazın optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir.

Serbest ve immobilize ürikazın kinetik sabitlerinden  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi için ürik asit derişimi 0.0133- 0.1 mM arasında değiştirilerek aktivite denemeleri yapılmıştır. Serbest ve immobilize ürikaz için başlangıç hız değerleri hesaplanmış ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Çizilen grafiklerden elde edilen verilerle  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplanmıştır.

### 3.2.6. Serbest ve İmmobilize Ürikaz Enziminin Termal, İşlemsel, Depo Kararlılıkları ve Proteaz Varlığındaki Aktivitesinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize ürikazın termal kararlılığı 45 °C'de incelenmiştir. Bu amaçla, serbest ve immobilize enzim çözeltileri 45 °C'de inkübe edilerek belirli zaman aralıklarında

aktivite ölçümleri yapılmıştır. Aktivite değerleri serbest ve immobilize ürikaz için belirtilen sıcaklıklarda zamana karşı yüzde olarak hesaplanmış ve grafiğe geçirilmiştir.

İmmobilize enzimin işlemsel kararlılığının belirlenebilmesi için aktivite ölçümleri aynı nanotel-enzim sistemi kullanılarak 5 kez tekrar edilmiştir. Aktivite ölçümleri döngü sayısına (kullanım sayısına) karşı % aktivite olarak grafiğe geçirilmiştir.

Serbest ve immobilize ürikazın depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla +4 °C'de 60 gün boyunca inkübe edilen serbest ve immobilize enzim çözeltilerinden belirli zaman aralıklarında alınarak aktivite değerleri değerlendirilmiştir. Zamana bağlı olarak aktivitedeki değişiklikler ölçülmüş ve aktivite değerleri yüzde olarak zamana karşı grafiğe geçirilmiştir.

Serbest ve immobilize ürikazın proteazlara karşı dayanıklılıklarının incelenmesi için tripsin varlığında aktivite ölçümleri yapılmıştır. Bu amaçla 0.1 M pH 8.5 tamponunda son derişimleri 0.15 mg/mL tripsin ve 0.1 mg/mL ürikaz enzimi olan karışım hazırlanmıştır. Bu enzim karışımından farklı zaman aralıklarında alınan örneklerin ürikaz aktivitesi ölçülmüştür.

### **3.2.7. İmmobilize Ürikazın Yapay İnsan Serumunda Ürik Asit Oksidasyonu İçin Kullanılabilirliğinin Araştırılması**

Ürikaz immobilize nanotellerin vücut sıvılarında kullanılabilirliğinin bir göstergesi olarak satın alınan yapay insan serum örneğine 0.5 mM ürik asit ve immobilize ürikaz ilave edilmiş ve ürik asit oksidasyonu incelenerek değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

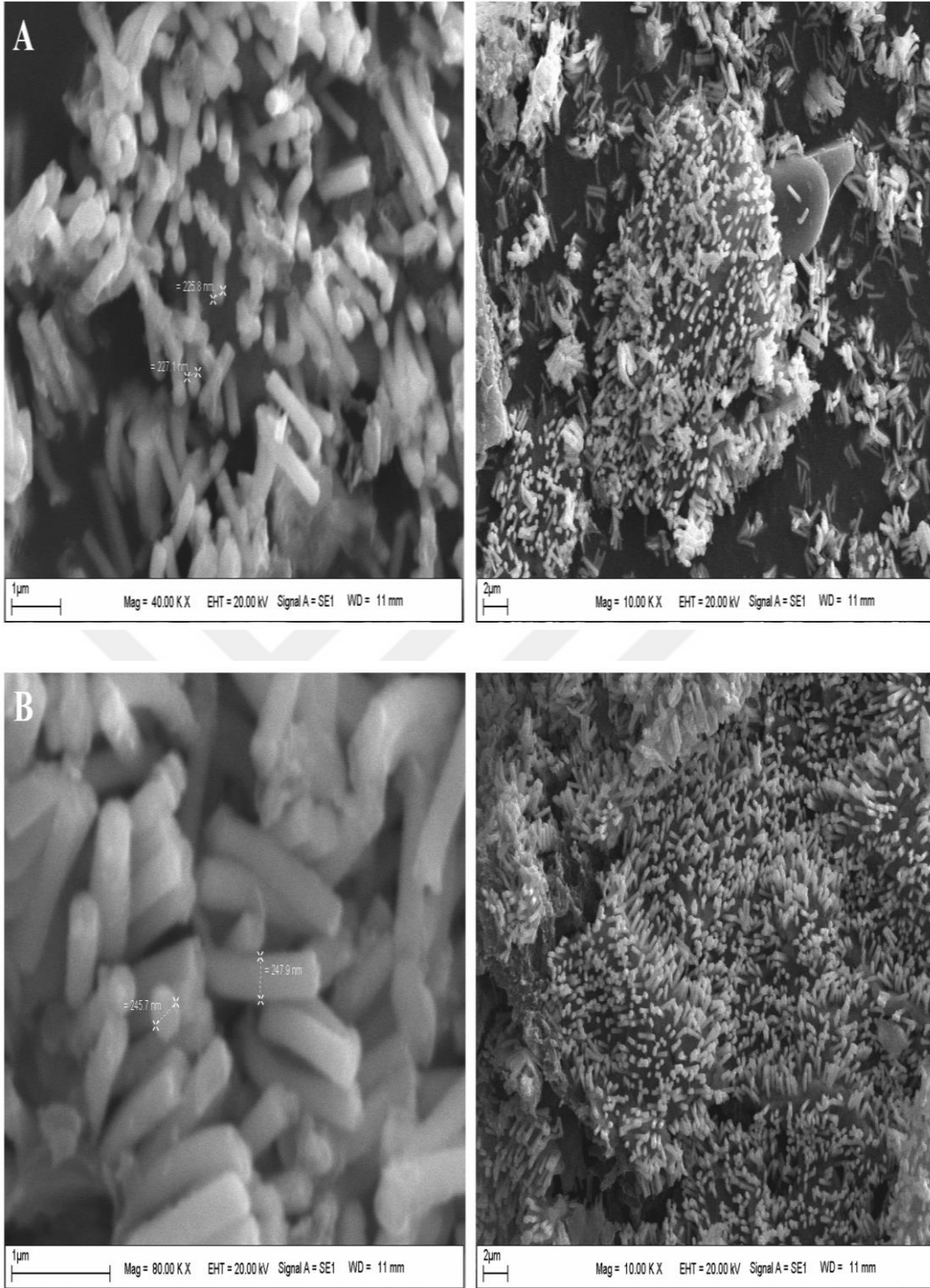
### 4.1. Manyetik Nanotellerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Bu tezde altın/nikel/altın nanoteller polikarbonat membran içerisinde altın, nikel ve altının ardışık elektrobiriktirmesi ile sentezlenmiştir. Sentezlenen manyetik nanotellere EDC/NHS kimyası kullanılarak ürikaz enzimi kovalent olarak bağlanmış ve PEG polimeri ile kaplanmıştır.

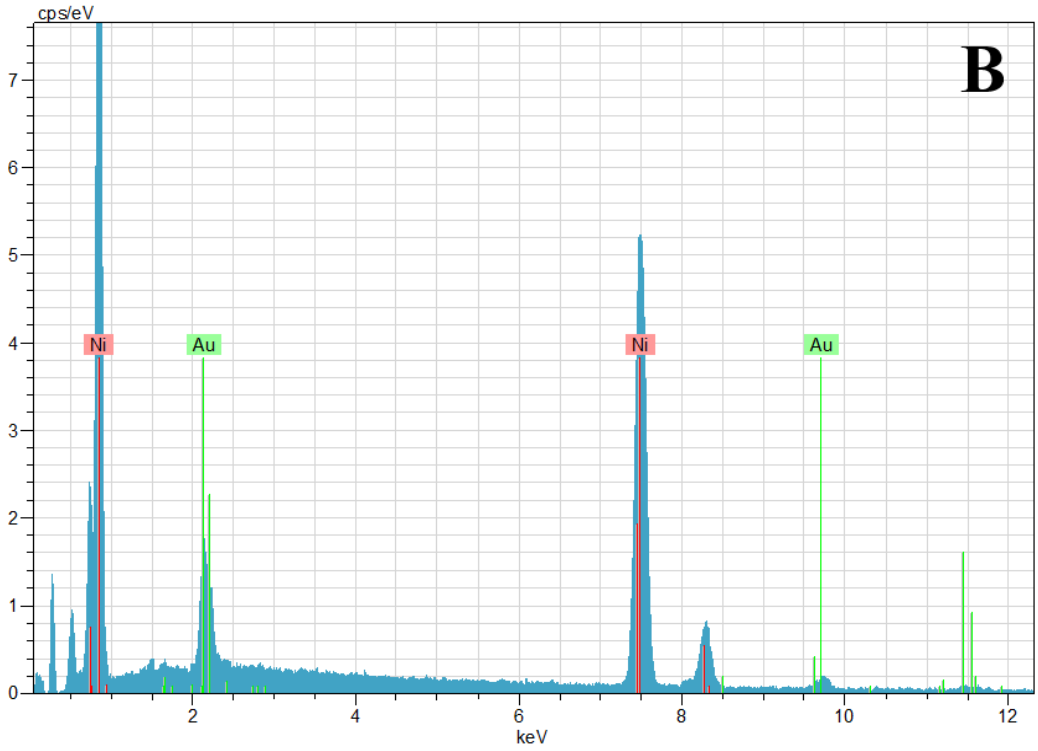
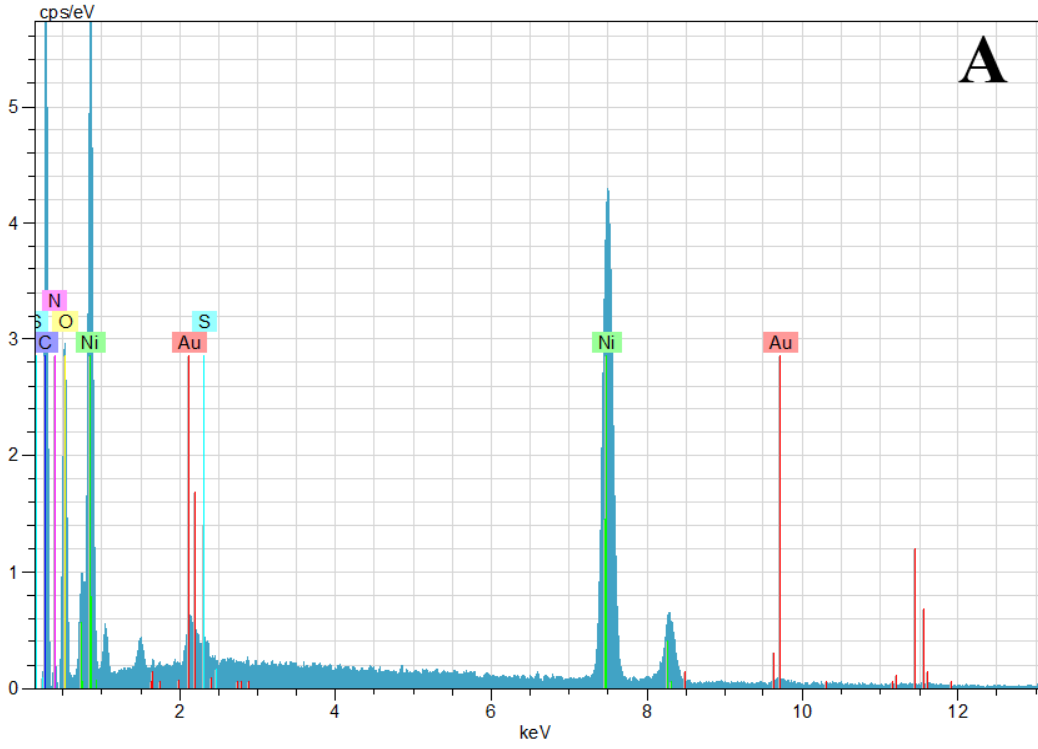
Sentezlenen manyetik nanotellerin SEM ve EDX analizleri İnönü Üniversitesi İBTAM'de bulunan SEM cihazı ile gerçekleştirilmiştir (SEM, LEO-EVO40, Cambridge İngiltere ve EDX ünitesi, Bruker-125 eV, Berlin Almanya).

Boş ve ürikaz bağlı manyetik nanotellerin SEM görüntüleri Resim 4.1'de ve boş ve ürikaz bağlı manyetik nanotellerin EDX analizi sonuçları Resim 4.2'de gösterilmiştir. Ayrıca sentezlenen nanotellerin manyetik özellik gösterdiğinin kanıtı olarak bir mıknatıs ile nanotellerin ayrılmasına ilişkin fotoğraf Resim 4.3'de gösterilmiştir.

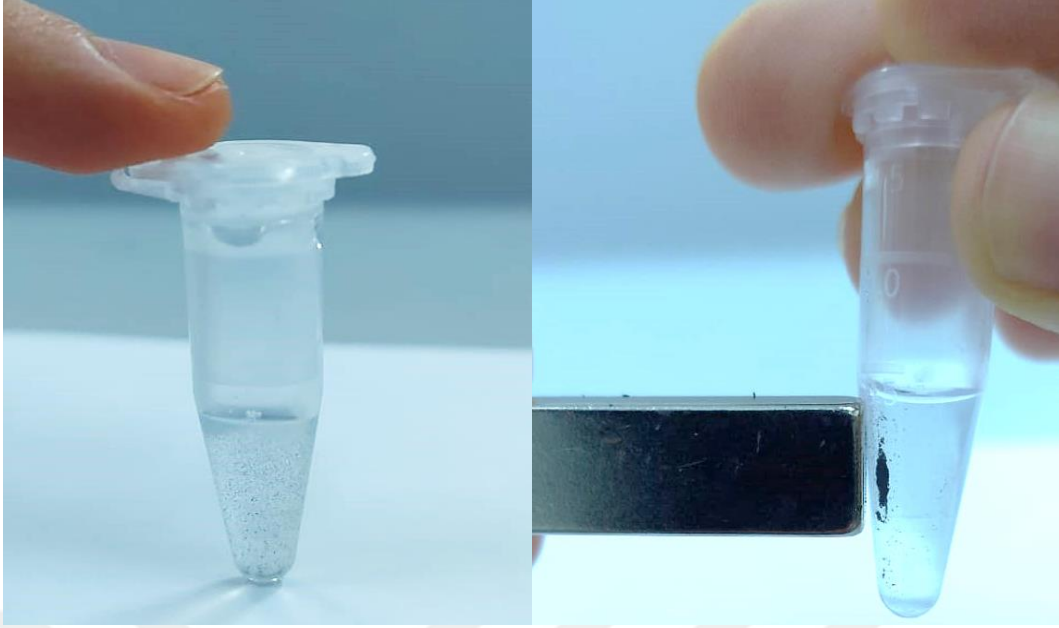




**Resim 4.1.** (a) Boş ve (b) ürikaz bağlı manyetik nanotellerin SEM fotoğrafları.



**Resim 4.2.** (a) Boş ve (b) ürikaz bağlı manyetik nanotellerin EDX spektrumu.

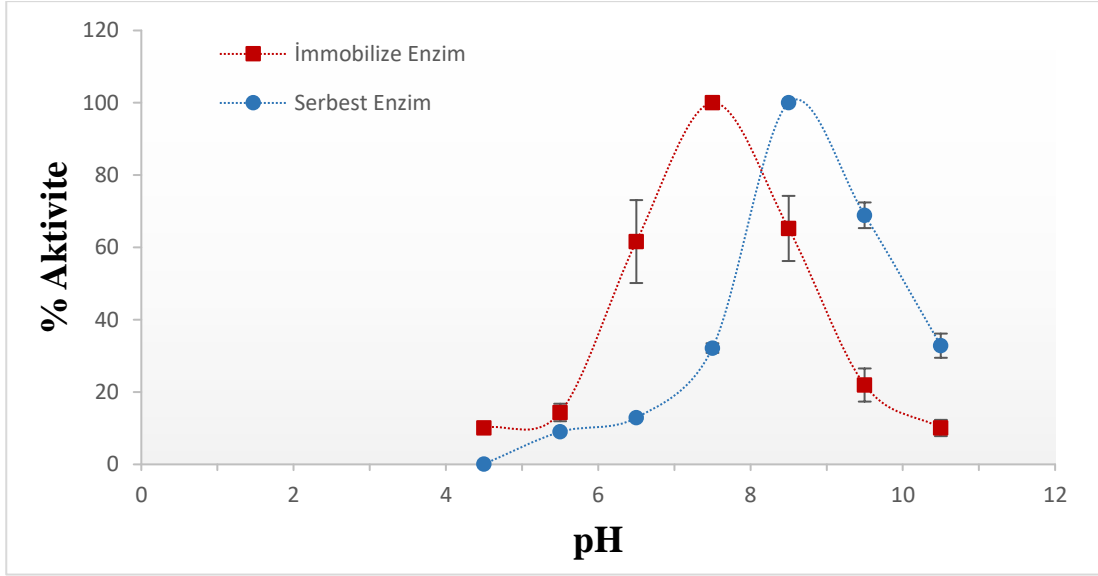


**Resim 4.3.** Manyetik nanotellerin mıknatıs ile ayrılması.

#### **4.2. Ürikaz İmmobilizasyonu ve Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi**

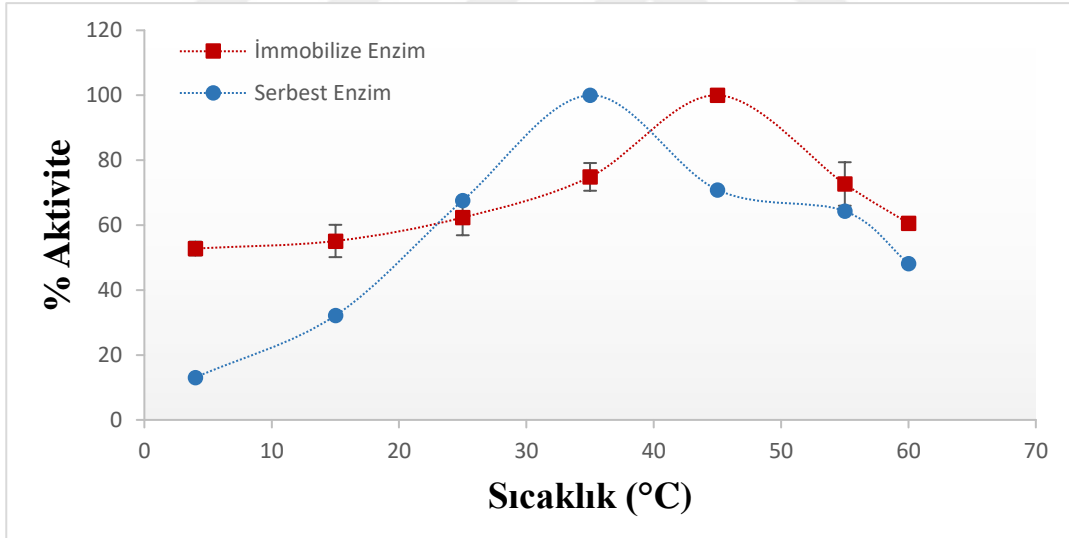
Nanotellere bağlanan ürikaz miktarını belirlemek için, başlangıç ve denge anındaki protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edilmiş ve bağlanan ürikaz miktarı 271.75 mg /gram nanotel olarak hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize ürikazın aktivitesi ürik asidin zamana bağlı olarak allantoine dönüşümü incelenerek ölçülmüştür.

Serbest ve immobilize ürikazın aktivitesinin pH'a bağlı olarak değişimi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Serbest ürikazın optimum pH'ı 8.5 ve immobilize ürikazın optimum pH'ı 7.5 olarak bulunmuştur.



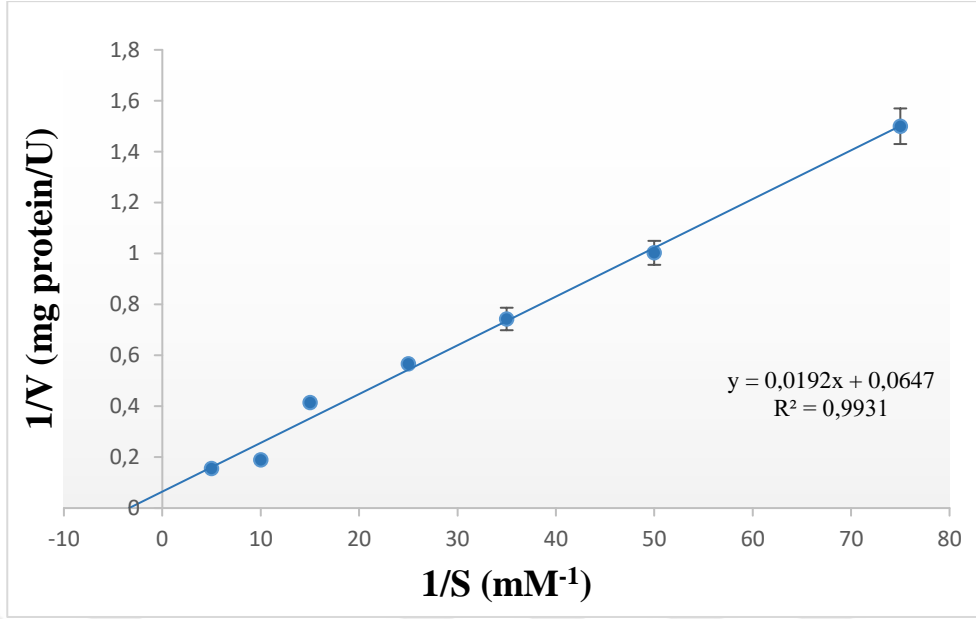
**Şekil 4.1.** Serbest ve immobilize ürikaz aktivitesi üzerine ortam pH'nın etkisi.

Serbest ve immobilize ürikazın aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Serbest ürikazın optimum sıcaklığı 35 °C ve immobilize ürikazın optimum sıcaklığı 45 °C olarak bulunmuştur.

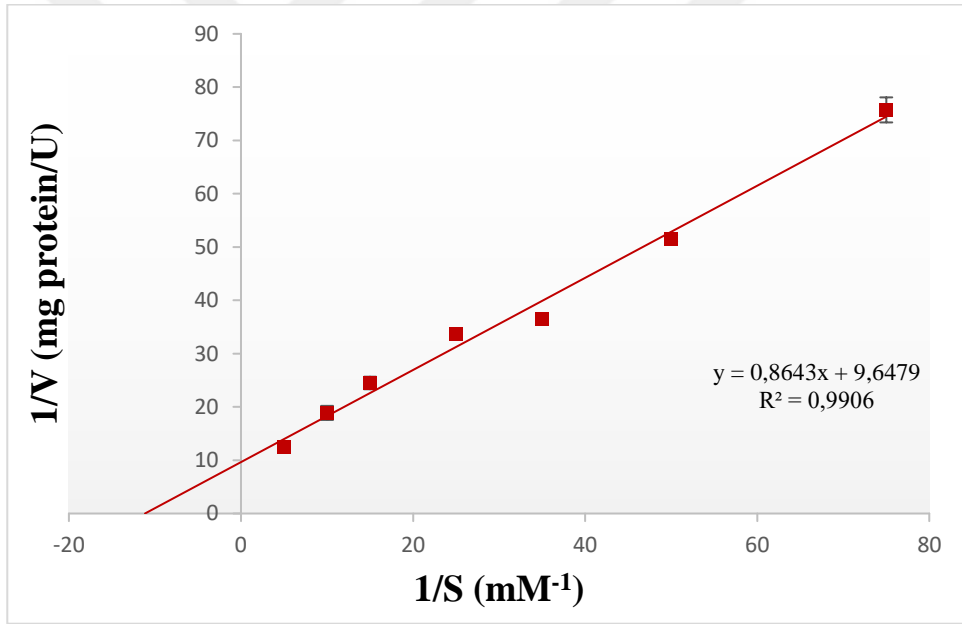


**Şekil 4.2.** Serbest ve immobilize ürikaz aktivitesi üzerine ortam sıcaklığının etkisi.

Serbest ve immobilize ürikazın aktivitesine substrat derişiminin etkisi sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri ise Çizelge 2'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Serbest ürikaz enzimine ait Lineweaver-Burk grafiği.



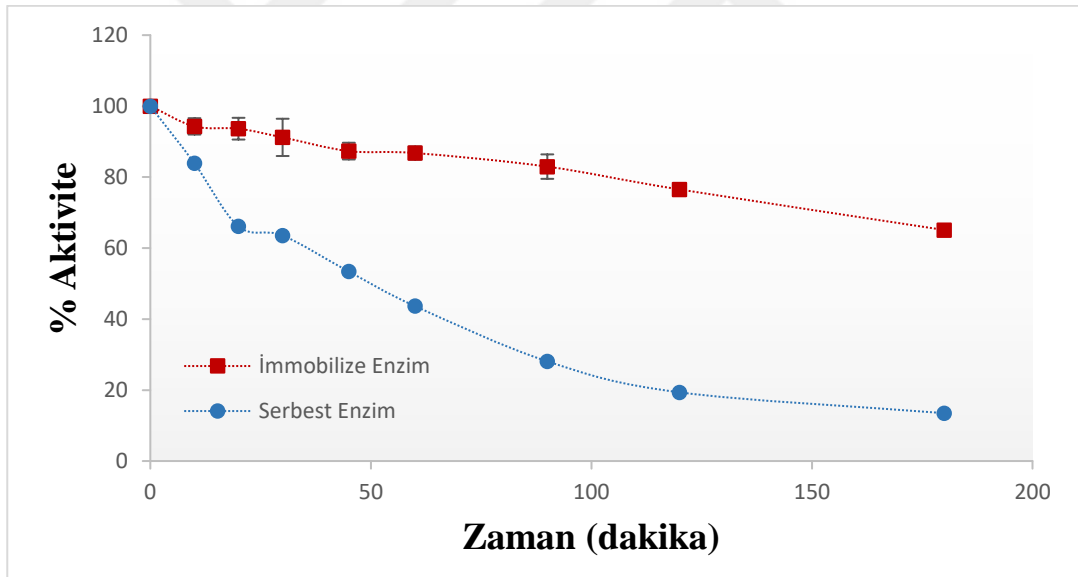
Şekil 4.4. İmmobilize ürikaz enzimine ait Lineweaver-Burk grafiği.

**Çizelge 2.** Serbest ve immobilize ürikaza ait kinetik parametre verileri.

	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/dak}$ )
Serbest Enzim	0.297	15.66
İmmobilize Enzim	0.089	9.6154

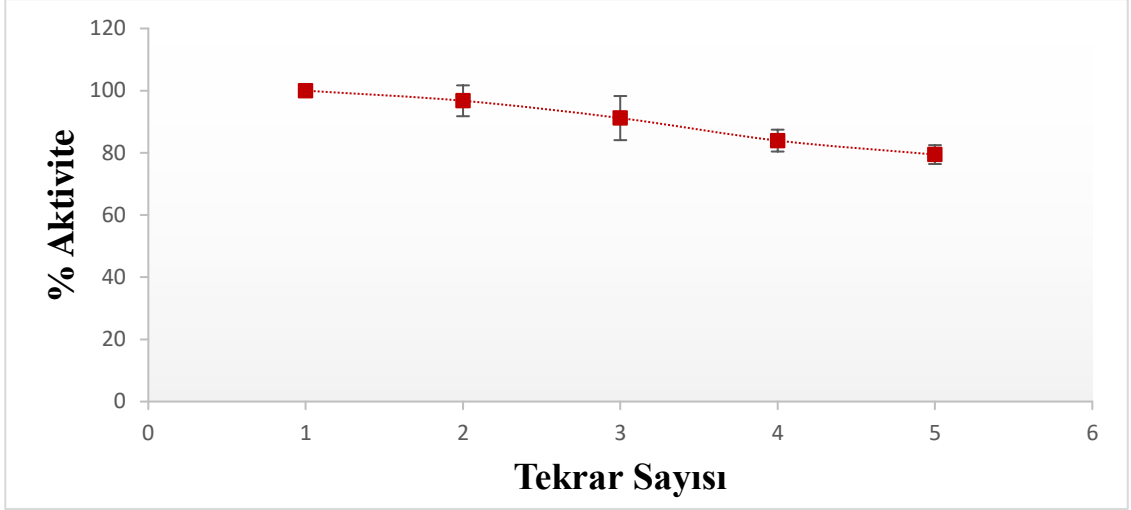
### 4.3. Serbest ve İmmobilize Ürikazın Termal, İşlemsel, Depo Kararlılıkları ve Proteaz Varlığındaki Aktivitesinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize ürikazın 45 °C'deki sıcaklığa karşı aktivitesi incelenmiş ve termal kararlılığa ilişkin profil Şekil 4.5'de verilmiştir. 180 dakikalık inkübasyon sonunda serbest enzim başlangıç aktivitesinin %13.49'unu korurken, immobilize enzim başlangıç aktivitesinin %65.09'unu korumuştur.



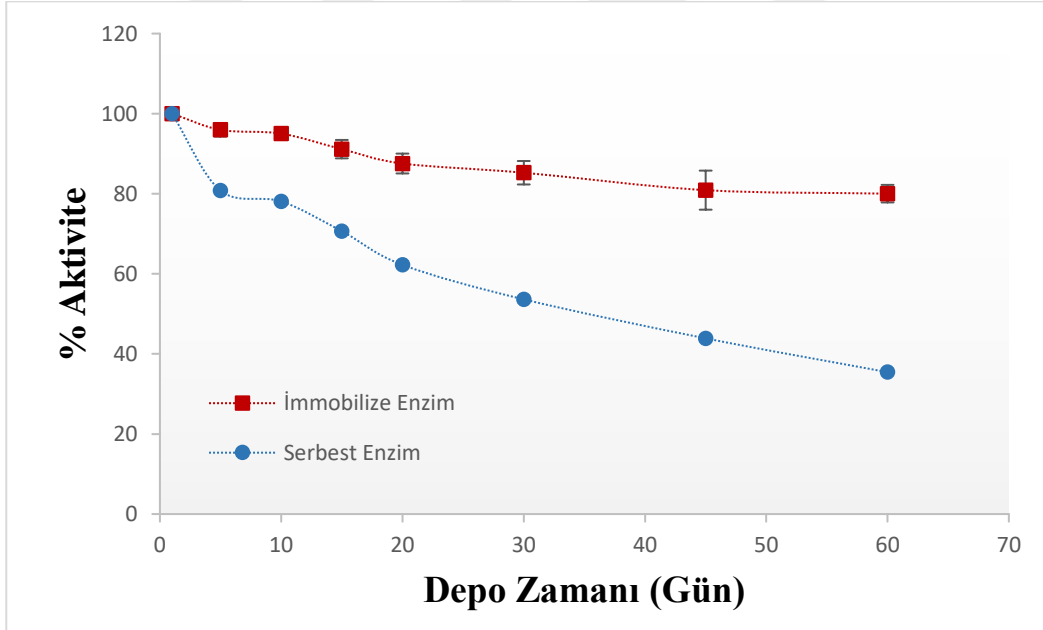
**Şekil 4.5.** Serbest ve immobilize ürikazın 45 °C'deki termal kararlılık profilleri.

İmmobilize enzimin işlemsel kararlılığına ilişkin elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Ürikaz bağlı nanoteller 5 döngü sonunda aktivitesinin %79.44'ünü korumuştur.



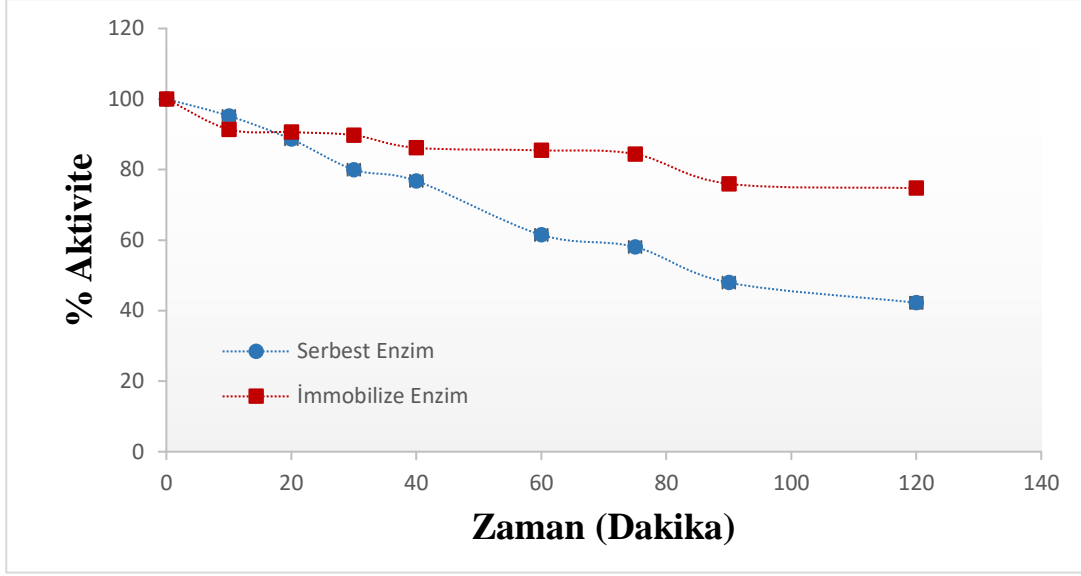
**Şekil 4.6.** İmmobilize ürikazın işlemsel kararlılık profili.

Depo kararlılığı için +4 °C’de 60 gün boyunca saklanan serbest ve immobilize enzimlerin aktivite ölçümleri yapılmış elde edilen sonuçlar Şekil 4.7’de verilmiştir. 60 günlük depo süresi sonunda serbest ürikaz başlangıç aktivitesinin %35.43’ünü korurken, immobilize ürikaz başlangıç aktivitesinin %80.01’ini korumuştur.



**Şekil 4.7.** Serbest ve immobilize ürikazın depo kararlılık profilleri.

Serbest ve immobilize ürikazın proteazlara karşı davranışına ilişkin sonuçlar ise Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Serbest ve immobilize enzim 120 dakika boyunca tripsin enzimiyle muamele edilmiş ve serbest enzim başlangıç aktivitesinin %42.23’ünü, immobilize enzim başlangıç aktivitesinin %74.72’sini korumuştur.



**Şekil 4.8.** Serbest ve immobilize ürikazın proteaz varlığındaki aktivitesinin incelenmesi.

#### 4.4. İmmobilize Ürikazın Yapay İnsan Serumunda Ürik Asit Oksidasyonu İçin Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Bu tezde manyetik nanotellere immobilize edilen ürikaz enziminin gut hastalığının tedavisinde kullanılma potansiyelini değerlendirmek için yapay serum örneğinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla yapay serum örneğine 0.5 mM derişiminde ürik asit ilave edilerek serbest ve immobilize ürikazın aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler, immobilize ürikazın serbest ürikaza göre yapay serum örneğinde yaklaşık 6 kat daha yüksek aktivite gösterdiği sonucunu vermiştir.



## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Manyetik Nanotellerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Manyetik nanomalzemeler, manyetik alan altında hareket eden sistemlerin hazırlanmasında spesifik yüzey kimyası, yüksek özgülük, geniş yüzey alanı ve manyetik özellikler sergileyen malzemelerdir. Bu malzemeler içerisinde metalik nanoteller farklı segmentleri içerme potansiyeli sunan ve kullanılacakları uygulamaya göre enzimler, antikolar veya nükleik asit gibi biyomoleküller ile fonksiyonelleştirilerek katalitik ve tanıma/bağlanma özellikleri sunan malzemeler olarak bilinmektedirler. Nanotellerin sentezinde kalıp yönelmeli (elektrokimyasal biriktirme, elektrotsuz biriktirme, kalıp doldurma) ve kalıpsız (kimyasal, nanopartiküllerden nanotel sentezi, kimyasal-buhar biriktirme, karbotermal indirgeme) olmak üzere özellikle iki temel yaklaşım kullanılmaktadır. Çalışmada kalıp yönelmeli elektrokimyasal biriktirme yöntemi seçilerek polikarbonat membran içerisinde altın, nikel ve altın metalleri içeren nanoteller sentezlenmiştir. Nanotellerin altın segmenti yüksek kimyasal ve termal kararlılığa ve biyoyumluluğa sahiptir ayrıca biyolojik moleküllerle fonksiyonelleştirmeye elverişlidir (García vd., 2014). Nanotellerin yapısına katılan Ni segmenti ise manyetik alan altında yönlenebilir ve manyetik sürücülü motorların hazırlanmasına olanak sağlamaktadır (Lin vd., 2004).

Sentezlenen Au/Ni/Au nanoteller, Au segmenti kullanılarak MUA/MCH ile fonksiyonelleştirilmiş ve EDC/NHS kimyası ile ürikaz enziminin kovalent olarak bağlanmasında kullanılmıştır. Ardından enzim bağlı nanotellerin yüzeyi PEG ile kaplanarak SEM fotoğrafları çekilmiş ve Resim 4.1 a ve b'de gösterilmiştir. Resim 4.1'de gösterilen SEM fotoğraflarından malzemelerin nanotel morfolojisinde olduğu uzunlukları 1-1.2 µm aralığında iken PEG ile kaplamaya bağlı olarak nanotellerin çaplarının ortalama 226 nm'den 247 nm'ye arttığı görülmüştür.

PEG'leme ile nanotellerin kalınlıklarının arttığı bakır nanotellerin PEG'lenmesine ilişkin Li vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada da rapor edilmiş ve TEM fotoğrafları ile gösterilmiştir. Literatürde tek başına ürikaz enziminin PEG'lenmesi ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (Schiavon vd., 2000 ve Sherman vd., 2008). Ürikaz tek başına kullanıldığında

immünojenite, düşük aktivite ve zayıf kararlılık sorunları ortaya çıkmakta iken, son yapılan birçok çalışma hedef molekül ile inert ve non-toksik bir polimer olan PEG'in bağlanmasının yani PEG'lemenin, proteinlerin terapötik ve biyoteknolojik kullanımlarını genişletmekte başarılı bir metodoloji olduğunu rapor etmiştir. Birçok araştırmacı PEG'lemenin proteinlerin fizikokimyasal özelliklerini önemli ölçüde değiştirdiğini ve çözünürlük ve termal stabiliteyi geliştirdiğini, immünojeniteyi azaltmanın yanı sıra plazmatik yarı ömrü arttırdığını ifade etmişlerdir (Colonna vd., 2008; Song vd., 2008; Veronese ve Mero, 2008; Zappe vd., 2008; Morille vd., 2009; Zhou vd., 2009). Adenozin deaminaz (Adagen®) ve asparaginaz (Oncaspar®) ın PEG'lenmiş formları ile  $\alpha$ -interferonun iki formu (Pegasys®, PEG-Intron®), insanlarda kullanım için FDA tarafından onaylanmıştır. PEG'lenmiş diğer proteinler hepatit C, akromegali, romatoid artrit ve kanser tedavisi için PEG'lenmiş ilaçlar olarak geliştirilmektedirler (da Silva Freitas vd., 2010). Bu tezde manyetik nanotellere immobilize edilen ürikazın PEG'lenmesi gerçekleştirilmiş ve manyetik yönlendirmenin de sağlandığı ürikaz taşıyan manyetik sürücülü bir nanomotor hazırlanmıştır. Literatürde ürikazın PEG'lendiği ve manyetik sürücülü bir motor olarak immobilize edildiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır ve bu çalışmanın orijinalliğini ortaya koymaktadır. Resim 4.2'deki EDX spektrumları incelendiğinde nanotellerin yapısına katılan Au ve Ni segmentleri görülmekle birlikte enzimin nanotellere immobilizasyonu S ve N elementlerinin varlığı ile ispatlanmıştır. İlave olarak sentezlenen nanotellerin manyetik özellik sergilediği Resim 4.3'de mıknatıs karşısında ayrılmaları ile gösterilmiştir. Bu tezde hazırlanan nanoteller Ni segmenti yardımıyla manyetik özellik kazanmış ve hazırlanan ürikaz desteğinin manyetik sürücülü nanomotor olarak davranmasına olanak sağlamıştır. Manyetik nanotellerin herhangi bir yakıt gereksinim duymaması ve kolayca yönlendirilmesi bu malzemelerin sağladığı en önemli avantajlardır. Ayrıca nanomotor tasarımında tel morfolojisinin küresel yapıdaki nanomotora göre manyetik olarak daha güçlü cevap verme ve daha yüksek yüzey alanı sunma potansiyeli mevcuttur.

## **5.2. Ürikaz İmmobilizasyonu ve Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi**

Literatürde ürikaz immobilizasyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır ve bunların önemli bir kısmı immobilize ürikaz yapılarının biyosensör kullanımına ilişkindir. Bu tezde yapılan işlemlerde manyetik nanotellere ürikaz immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve bunun

daha sonra canlı sistemlerde ürik asit uzaklaştırılmasında manyetik sürücülü bir nanomotor olarak kullanılmasının denenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada ürikaz immobilizasyonu altın segmentinin MUA/MCH ile fonksiyonelleştirilmesinin ardından EDC/NHS kimyası kullanılarak kovalent olarak gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon taşıyıcıya bağlama ve tutuklama şeklinde yapılabilir ve taşıyıcıya bağlama yöntemleri içerisinde kovalent bağlama, en sık kullanılan ve enzim sızmasının neredeyse olmadığı bir metottur. Bu tezde manyetik nanotellere ürikaz enzimi kovalent olarak bağlanmış ve bağlanan ürikaz miktarı 271.75 mg/gram nanotel olarak hesaplanmıştır.

Liu vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada metal-organik çerçevelere ürikaz enzimi immobilize edilmiş ve bağlanan ürikaz miktarı 225 mg/g destek olarak bulunmuştur. Bu tezde elde edilen bağlanma miktarı (271.75 mg/gram nanotel) literatürle yarışır durumdadır. İmmobilize ürikazın aktivitesine pH'ın etkisi 4.5-10.5 arasında incelenmiş ve *Candida sp.* kaynaklı serbest ürikazın optimum pH'ı 8.5 iken immobilize ürikazın pH'ı 7.5 olarak bulunmuştur. Jianguo vd. (1994) yılında *Candida sp.*'den ürikaz enzimini saflaştırmışlar ve enzimin optimum pH'sını 8.5 olarak rapor etmişlerdir. Ürikaz immobilizasyonu çalışmalarında optimum pH'ının asidik veya bazik bölgeye kayması yapılan birçok çalışmada görülmüştür. Örneğin Cete vd. (2007) gluteraldehit/jelatin çapraz bağlama işlemi ile ürikazı immobilize ettikleri bir çalışmada serbest ürikazın optimum pH'ını 8.5 bulurken, immobilize ürikazın optimum pH'ını 8.0 olarak rapor etmişlerdir. Phaugat vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ürikaz polietilen tereftalata immobilize edilmiş, serbest ürikazın optimum pH'ı 7.0 bulunurken immobilize ürikazın optimum pH'ı 8.5 olarak bulunmuştur. İmmobilizasyonun yanı sıra sadece PEG'leme işlemi ile serbest ürikazın optimum pH'ının asidik bölgeye kaydığı da Silva Freitas vd. (2010) tarafından gösterilmiştir. da Silva Freitas vd. (2010) tarafından yapılan bu çalışmada ürikaz enzimi (optimum pH'ı 9.0) p-nitrofenil karbonat taşıyan PEG ve 4,6-dikloro-s-triazin taşıyan PEG yapıları ile modifiye edildiğinde optimum pH'ları 8.0 olarak bulunmuştur. Bu tezde yapılan çalışmada hem immobilizasyon hem de PEG'leme işlemine bağlı olarak optimum pH'ının asidik bölgeye kayması literatür ile benzerlik göstermektedir.

Jianguo vd. (1994) *Candida sp.* ürikazının optimum sıcaklığını 30 °C olarak rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise serbest ve immobilize ürikazın optimum sıcaklıkları Şekil 4.2'de görüldüğü gibi sırasıyla 35 °C ve 45 °C olarak bulunmuştur. İmmobilizasyonla enzimin sıcaklığa karşı dayanıklılığının artışı genellikle beklenen bir durumdur. Kumar vd. (2014) ürikaz enzimini polipropilene aşılınmış poliakrilik asit desteğine immobilize

etmişlerdir ve serbest ve immobilize enzimin optimum sıcaklıklarını sırasıyla 50 ve 60 °C olarak rapor etmişlerdir. Cete vd. (2007) ise serbest ürikazın optimum sıcaklığını 35 °C ve immobilize ürikazın optimum sıcaklığını 55 °C olarak rapor etmişlerdir.

$K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri bir enzimin kinetik sabitleri olarak tanımlanır ve bu değerlerden  $K_m$  enzimin substratına olan ilgisinin bir ölçüsüdür. Bu tezde serbest ve immobilize ürikazın  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri ürik asit substratı kullanılarak 0.0133-0.1 mM derişim aralığında incelenmiştir. Serbest ürikaz için  $K_m$  değeri 0.297 bulunurken, immobilize ürikaz için  $K_m$  değeri 0.089 olarak bulunmuştur.  $K_m$  değerindeki bu azalma immobilize enzimin, serbest enzime göre substratına ilgisinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Benzer bir durum Chauhan vd. (2014) tarafından yapılan bir immobilizasyon çalışmasında bulunmuştur. Araştırmacılar serbest ürikazın  $K_m$  değerini 0.80 mM ve immobilize ürikazın  $K_m$  değerini 0.17 mM olarak rapor etmişlerdir.  $V_{max}$  enzimin doygun substrat konsantrasyonunda sergilediği maksimum hız olarak tanımlanır ve immobilizasyonla etkilendiği bilinmektedir. Bu tezde serbest ürikaz için 15.66  $\mu\text{mol/dak}$  olarak ve immobilize ürikaz için 9.62  $\mu\text{mol/dak}$  olarak bulunmuştur. Maksimum hızdaki azalma immobilizasyon işleminde genellikle görülen bir durumdur. Benzer bir sonuç Kumar vd. (2014) tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacılar serbest ürikazın maksimum hızının 145.6  $\mu\text{mol/dak}$  olarak bulurken immobilize ürikazın  $V_{max}$  değerini 116.5  $\mu\text{mol/dak}$  olarak bulmuşlardır.

### **5.3. Serbest ve İmmobilize Ürikazın Termal, İşlemsel ve Depo Kararlılıkları ve Proteaz Varlığındaki Aktivitesinin İncelenmesi**

Bir immobilize enzimin termal kararlılığı immobilizasyon etkinliği değerlendirmede araştırılan parametrelerden biridir. Bu tezde serbest ve immobilize ürikazın termal kararlılığı 45 °C'de 180 dakika boyunca aktivite ölçümü ile incelenmiş ve bu inkübasyon süresi sonunda serbest ürikaz başlağıç aktivitesinin %13.49'unu gösterirken, immobilize ürikaz %65.09'unu göstermiştir. İmmobilize ürikazın serbest ürikaza göre yüksek sıcaklıkta sergilediği daha yüksek kararlılık, immobilizasyon işleminin etkinliğini göstermektedir. Benzer bir sonuç Bayramoğlu vd. (2011) tarafından yapılan bir immobilizasyon çalışmasında gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada serbest ve immobilize ürikazın 55 ve 65 °C'de termal kararlılıkları araştırılmış ve her iki sıcaklıkta immobilize enzimin termal kararlılığının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

İmmobilize enzimlerin aktivitelerini koruyarak, birçok kez kullanımları, serbest enzimlere göre sağladıkları önemli avantajlardandır. Bu tezde immobilize ürikazın 5 kez art arda kullanıldığında aktivitesini %79.44 oranında koruduğu görülmüştür.

Serbest ve immobilize enzimlerin depo kararlılıklarının araştırılması immobilizasyonun etkinliğinin değerlendirilmesinde diğer önemli faktörlerden biridir. Bu tezde serbest ve immobilize ürikaz 4 °C'de 60 gün boyunca saklanmış ve belli aralıklarla aktiviteleri ölçülerek depo kararlılıkları belirlenmiştir. Serbest ürikaz 60 günün sonunda başlangıç aktivitesinin %35.43'ünü korurken, immobilize ürikaz %80.01'ini korumuştur. Cete vd. (2007), 7 hafta boyunca serbest ve immobilize ürikazın aktivitelerini izlemiş ve bu sürenin sonunda serbest ve immobilize enzim sırasıyla %42 ve %49 oranında aktivitesini koruduğunu belirtmiştir. Bayramoğlu vd. (2011), immobilize ürikazın 2 aylık süre sonunda başlangıç aktivitesinin %68'ini koruduğunu, serbest ürikazın ise 35 gün içerisinde başlangıç aktivitesinin tamamını kaybettiğini rapor etmişlerdir. Bu sayısal değerler, bu tezde bulunan sonuçların literatür ile yarışabilir düzeyde olduğunu göstermektedir.

Serbest ve immobilize ürikazın proteaz varlığındaki aktivitesi, tripsin varlığında incelenmiş ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Tripsin varlığında serbest ürikaz 120 dakika sonunda %42.23 aktivite gösterirken, immobilize ürikaz %74.72 oranında aktivite sergilemiştir. Tan vd. (2010) tarafından yapılan bir immobilizasyon çalışmasında serbest ürikazın proteaz varlığında 60. dakikada tüm aktivitesini yitirdiği, immobilize ürikazın aynı sürede %50'den daha fazla oranda aktivitesini koruduğu belirtilmiştir.

#### **5.4. İmmobilize Ürikazın Yapay İnsan Serumunda Ürik Asit Oksidasyonu İçin Kullanılabilirliğinin İncelenmesi**

Ürikaz bağlı manyetik nanoteller, 0.5 mM ürik asit içeren yapay serum örneğinde serbest enzime göre yaklaşık 6 kat daha yüksek aktivite göstermiştir. Ürikaz enziminin immobilizasyonu ile termal ve depo kararlılığının arttığı yapılan deneylerde görülmüştür. Ayrıca immobilize ürikazın proteaz varlığındaki aktivitesi de serbest enzime göre daha yüksek bulunmuştur. Yapay serum gibi karmaşık bir örnekte immobilize ürikazın sergilediği 6 katlık yüksek aktivite, immobilizasyonun ve PEG'lemenin ürikaz enziminin aktivitesinin korunmasında oldukça etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Au/Ni/Au nanoteller 60 µm kalınlıkta ve 200 nm-çaplı alümina membran içerisinde altın, nikel ve altının ardışık elektrobiriktirmesi ile hazırlanmış ve yüzey morfolojileri ve nanotel bileşenleri SEM ve EDX analizleri ile belirlenmiştir.

Sentezlenen Au/Ni/Au manyetik nanotellere ürikaz enzim EDC/NHS kimyası ile kovalent olarak bağlanmıştır.

Enzim bağlı nanotellerin yüzeyi PEG ile kaplanarak SEM fotoğrafları çekilmiş ve SEM fotoğraflarından malzemelerin nanotel morfolojisinde olduğu uzunlukları 1-1.2 µm aralığında iken PEG ile kaplamaya bağlı olarak nanotellerin çaplarının ortalama 226 nm'den 247 nm'ye arttığı görülmüştür.

Nanotellere bağlanan ürikaz miktarı başlangıç ve denge anındaki protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edilmiş ve 271.75 mg /gram nanotel olarak hesaplanmıştır.

Serbest ve immobilize ürikaz aktivitesine pH'ın etkisi pH 4.5 ve pH 10.5 arasında farklı tampon çözeltiler kullanılarak incelenmiş ve serbest enzimin optimum pH'ı pH 8.5; immobilize enzimin optimum pH'ı pH 7.5 olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize ürikazın aktivitesine sıcaklığın etkisi 4-60 °C arasındaki sıcaklıklarda incelenmiş ve serbest ürikazın optimum sıcaklığı 35 °C iken immobilize ürikazın 45 °C olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize ürikazın kinetik sabitleri incelenmiş ve  $K_m$  değerinin immobilizasyon işlemi sonunda azaldığı, yani enzimin substratına olan ilgisinin arttığı gözlenmiştir.

Enzimin  $V_{max}$  değerinin ise immobilizasyon işlemi sonunda azaldığı görülmüştür.

Serbest ve immobilize ürikazın aktivitesi 45 °C'de 180 dk boyunca incelenmiş ve serbest enzim başlangıç aktivitesinin %13.49'unu korurken immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin %65.09'unu koruduğu görülmüştür.

Serbest ve immobilize ürikazın depo kararlılığı 60 gün boyunca izlenmiş ve 60 günün sonunda serbest enzim başlangıç aktivitesinin %35.43'ünü korurken immobilize enzimin

başlangıç aktivitesinin %80.01'ini koruduğu bulunmuştur.

İmmobilize ürikaz beş kez art arda kullanılmış ve bu kullanımlar sonunda aktivitesinin %79.44'ünü koruduğu görülmüştür.

Serbest ve immobilize ürikazın proteazlara karşı davranışı 120 dakika boyunca izlenmiş ve serbest enzim başlangıç aktivitesinin %42.23'ünü korurken immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin %74.72'sini koruduğu bulunmuştur.

Serbest ve immobilize ürikazın serum ortamında kullanılabilirliğini göstermek için 0.5 mM ürik asit eklenmiş yapay insan serum örneğinde aktivite ölçülmüştür. Serbest ve immobilize ürikazın etkinlikleri kıyaslandığında immobilize ürikazın serbest ürikaza göre yaklaşık 6 kat daha fazla aktivite gösterdiği görülmüştür.

Bu tezde nanomakine olarak kullanılan manyetik nanotellere ürikaz enzimi bağlanmış ve çalışma koşulları ve aktivitesi değerlendirilmiştir. İmmobilize ürikazın serbest ürikaza göre aktivitesinin ve kararlılığının daha yüksek olduğu bulunmuş ve yapay serum örneğinde immobilize ürikazın aktivitesinin serbest enzimden 6 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar hazırlanan ürikaz bağlı nanomakinelerin gut hastalığının tedavisinde umut verici bir potansiyele sahip olduğunu göstermekle birlikte, bu nanomakinelerin *in vivo* fare deneylerinin yapılamamış olması ciddi bir eksiklik ve gelecekte yapılması planlanan çalışmalardandır. Ayrıca literatürde ürikaz immobilizasyonu çalışmalarının yoğun olarak biyosensör çalışmalarında kullanıldığı görülmektedir. Bu tezde hazırlanan ürikaz bağlı nanotellerin ürik asit tayinine yönelik bir biyosensörün tasarımında kullanımının araştırılması da gelecek çalışmalarda mutlaka yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Abdelmohsen, L. K., Peng, F., Tu, Y., Wilson, D. A. (2014). Micro-and nano-motors for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(17), 2395-2408. doi: 10.1039/c3tb21451f
- Akgöl, S., Öztürk, N., Karagözler, A. A., Uygun, D. A., Uygun, M., Denizli, A. (2008). A new metal-chelated beads for reversible use in uricase adsorption. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51(1-2), 36-41. doi:10.1016/j.molcatb.2007.10.005
- Albanese, A., Tang, P. S., Chan, W. C. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*, 14, 1-16. doi:10.1146/annurev-bioeng-071811-150124
- Ali, S. M. U., Alvi, N. H., Ibutoto, Z., Nur, O., Willander, M., Danielsson, B. (2011). Selective potentiometric determination of uric acid with uricase immobilized on ZnO nanowires. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 152(2), 241-247. doi:10.1016/j.snb.2010.12.015
- Alshehri, R., Ilyas, A. M., Hasan, A., Arnaout, A., Ahmed, F., Memic, A. (2016). Carbon nanotubes in biomedical applications: factors, mechanisms, and remedies of toxicity: miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(18), 8149-8167. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01770
- Arora, K., Sumana, G., Saxena, V., Gupta, R. K., Gupta, S. K., Yakhmi, J. V., ... Malhotra, B. D. (2007). Improved performance of polyaniline-uricase biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 594(1), 17-23. doi:10.1016/j.aca.2007.04.068
- Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Rodrigues, R. C., Fernandez-Lafuente, R. (2013). Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. *Biomacromolecules*, 14(8), 2433-2462. doi:10.1021/bm400762h
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., ve Rizzolio, F. (2020). The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112. doi:10.3390/molecules25010112



- Bayramoğlu, G., Altıntaş, B., Arıca, M. Y. (2011). Reversible immobilization of uricase on conductive polyaniline brushes grafted on polyacrylonitrile film. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(2), 127-134. doi:10.1007/s00449-010-0453-3
- Benli, B. (2008). Nanoteknoloji ve antik çağlara uzanan killi nanoyapılar. *Kil Bilimi ve Teknolojisi Dergisi (Kibited)*, 1(3), 143-162.
- Bhambi, M., Sumana, G., Malhotra, B. D., Pundir, C. S. (2010). An amperometric uric acid biosensor based on immobilization of uricase onto polyaniline-multiwalled carbon nanotube composite film. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 38(4), 178-185. doi:10.3109/10731191003716344
- Bomalaski, J. S., Holtsberg, F. W., Ensor, C. M., Clark, M. A. (2002). Uricase formulated with polyethylene glycol (uricase-PEG 20): biochemical rationale and preclinical studies. *The Journal of Rheumatology*, 29(9), 1942-1949.
- Buzea, C., ve Pacheco, I. (2018). Electrical Properties of Nanowires and Nanofibers. In: Barhoum A., Bechelany M., Makhoulouf A. (Eds.), *Handbook of Nanofibers* (pp. 1-62). Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-53655-2\_14
- Cai, H., Wang, W., Liu, P., Wang, G., Liu, A., He, Z., ... Xia, M. (2015). Enhanced synthesis of Sn nanowires with aid of Se atom via physical vapor transport. *Journal of Crystal Growth*, 420, 42-46. doi:10.1016/j.jcrysgro.2015.03.037
- Cammalleri, L., ve Malaguarnera, M. (2007). Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and in gout. *International Journal of Medical Sciences*, 4(2), 83. doi:10.7150/ijms.4.83
- Cete, S., Yaşar, A., Arslan, F. (2007). Immobilization of uricase upon polypyrrole-ferrocenium film. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 35(6), 607-620. doi:10.1080/10731190701378634
- Chakraborty, S., Rusli, H., Nath, A., Sikder, J., Bhattacharjee, C., Curcio, S., Drioli, E. (2016). Immobilized biocatalytic process development and potential application in membrane separation: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(1), 43-58. doi:10.3109/07388551.2014.923373
- Chauhan, N., ve Pundir, C. S. (2014). Covalent immobilization of uricase inside a plastic vial for uric acid determination in serum and urine. *Analytical Sciences*, 30(4), 501-506. doi:10.2116/analsci.30.501

- Cheng, B., Le, Y., Yu, J. (2010). Preparation and enhanced photocatalytic activity of Ag@TiO<sub>2</sub> core-shell nanocomposite nanowires. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), 971-977. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.01.013
- Cheng, C., ve Kao, C. Y. (2016). An electrochemical biosensor with uricase immobilized on functionalized gold coated copper wire electrode for urinary uric acid assay. *Electroanalysis*, 28(4), 695-703. doi:10.1002/elan.201500539
- Choi, H., ve Park, S. H. (2004). Seedless growth of free-standing copper nanowires by chemical vapor deposition. *Journal of the American Chemical Society*, 126(20), 6248-6249. doi:10.1021/ja049217+
- Chu, H., Wei, X., Wu, M., Yan, J., Tu, Y. (2012). An electrochemiluminescent biosensor based on polypyrrole immobilized uricase for ultrasensitive uric acid detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 163(1), 247-252. doi:10.1016/j.snb.2012.01.047
- Colloc'h, N., Girard, E., Dhaussy, A. C., Kahn, R., Ascione, I., Mezouar, M., Fourme, R. (2006). High pressure macromolecular crystallography: The 140-MPa crystal structure at 2.3 Å resolution of urate oxidase, a 135-kDa tetrameric assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1764(3), 391-397. doi:10.1016/j.bbapap.2006.01.006
- Colonna, C., Conti, B., Perugini, P., Pavanetto, F., Modena, T., Dorati, R., ... Genta, I. (2008). Site-directed PEGylation as successful approach to improve the enzyme replacement in the case of prolidase. *International journal of pharmaceutics*, 358(1-2), 230-237. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.03.012
- Contreras, M. F. (2015). *Magnetic nanowires as materials for cancer cell destruction*. Doktora tezi, King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, Kingdom of Saudia Arabia
- da Silva Freitas, D., Spencer, P. J., Vassão, R. C., Abrahão-Neto, J. (2010). Biochemical and biopharmaceutical properties of PEGylated uricase. *International Journal of Pharmaceutics*, 387(1-2), 215-222. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.11.034
- Das, S. K., Das, A. R., Guha, A. K. (2010). Microbial synthesis of multishaped gold nanostructures. *Small*, 6(9), 1012-1021. doi:10.1002/smll.200902011

- Datta, S., Christena, L. R., Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9. doi:10.1007/s13205-012-0071-7
- Decker, C. A., Solanki, R., Freeouf, J. L., Carruthers, J. R., Evans, D. R. (2004). Directed growth of nickel silicide nanowires. *Applied Physics Letters*, 84(8), 1389-1391. doi:10.1063/1.1650877
- Devi, R., ve Pundir, C. S. (2014). Construction and application of an amperometric uric acid biosensor based on covalent immobilization of uricase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline composite film electrodeposited on Pt electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 193, 608-615. doi:10.1016/j.snb.2013.12.010
- Drexler E., (1992). *Nanosystems-Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation* (Eds), J. Wiley ve Sons, Chichester, UK.
- Duanmu, Y., ve Huang, Q. (2015). Analysis and optimization of the edge effect for III–V nanowire synthesis via selective area metal-organic chemical vapor deposition. *IIE Transactions*, 47(12), 1424-1431. doi:10.1080/0740817X.2015.1033038
- Eldin, M. M., Seuror, E. I., Nasr, M. A., Tieama, H. A. (2011). Affinity covalent immobilization of glucoamylase onto  $\rho$ -benzoquinone-activated alginate beads: II. Enzyme immobilization and characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(1), 45-57. doi:10.1007/s12010-010-9113-y
- Facin, B. R., Melchioris, M. S., Valério, A., Oliveira, J. V., Oliveira, D. D. (2019). Driving immobilized lipases as biocatalysts: 10 years state of the art and future prospects. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(14), 5358-5378. doi:10.1021/acs.iecr.9b00448
- García, M., Batalla, P., Escarpa, A. (2014). Metallic and polymeric nanowires for electrochemical sensing and biosensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 57, 6-22. doi:10.1016/j.trac.2014.01.004
- Gaspar, D. P., Faria, V., Quintas, J. P., Almeida, A. J. (2017). Targeted delivery of lipid nanoparticles by means of surface chemical modification. *Current Organic Chemistry*, 21(23), 2360-2375. doi:10.2174/1385272820666161031161101
- Gleiter, H. (2000). Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. *Acta Materialia*, 48(1), 1-29. doi:10.1016/S1359-6454(99)00285-2

- Graebin, N. G., Schöffler, J. D. N., Andrades, D. D., Hertz, P. F., Ayub, M. A., Rodrigues, R. C. (2016). Immobilization of glycoside hydrolase families GH1, GH13, and GH70: state of the art and perspectives. *Molecules*, 21(8), 1074. doi:10.3390/molecules21081074
- Gratton, S. E., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., DeSimone, J. M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(33), 11613-11618. doi:10.1073/pnas.0801763105
- Haberkorn, N., Condo, A. M., Sirena, M., Soldera, F., Lovey, F. C. (2014). Single crystalline  $\beta$  phase Cu–Zn nanowires: Synthesis and martensitic transformation. *Materials Letters*, 124, 256-260. doi:10.1016/j.matlet.2014.03.101
- Hanson, J. N., Rodriguez, B. J., Nemanich, R. J., Gruverman, A. (2006). Fabrication of metallic nanowires on a ferroelectric template via photochemical reaction. *Nanotechnology*, 17(19), 4946. doi:10.1088/0957-4484/17/19/028
- Holmberg, C. G. (1939). Uricase purification and properties. *Biochemical Journal*, 33(12), 1901. doi:10.1042/bj0331901
- Hou, B. (2019). Colloidal Quantum Dots: The Artificial Building Blocks for New-Generation Photo-Electronics and Photochemistry. *Israel Journal of Chemistry* 59(8), 637-638 doi:10.1002/ijch.201900069
- Jain, S., Verma, S., Singh, S. P., Sharma, S. N. (2019). An electrochemical biosensor based on novel butylamine capped CZTS nanoparticles immobilized by uricase for uric acid detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 127, 135-141. doi:10.1016/j.bios.2018.12.008
- Jianguo, L., Gaoxiang, L., Hong, L., Xiukai, Z. (1994). Purification and properties of uricase from *Candida* sp. and its application in uric acid analysis in serum. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 47(1), 57-63.
- Jirakunakorn, R., Khumngern, S., Choosang, J., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., Numnuam, A. (2020). Uric acid enzyme biosensor based on a screen-printed electrode coated with Prussian blue and modified with chitosan-graphene composite cryogel. *Microchemical Journal*, 154, 104624. doi:10.1016/j.microc.2020.104624

- Jung, Y. S., Lee, J. H., Lee, J. Y., Ross, C. A. (2010). Fabrication of diverse metallic nanowire arrays based on block copolymer self-assembly. *Nano Letters*, 10(9), 3722-3726. doi:10.1021/nl1023518
- Kang, M., Lee, H., Kang, T., Kim, B. (2015). Synthesis, properties, and biological application of perfect crystal gold nanowires: a review. *Journal of Materials Science & Technology*, 31(6), 573-580. doi:10.1016/j.jmst.2015.01.007
- Khade, S., ve Srivastava, S. K. (2015). Uricase and its clinical applications. *International Journal of Biological and Medical Research*, 6(3), 5211-5215.
- Khan, A., ve Kordesch, M. E. (2006). Large-scale fabrication of metallic Zn nanowires by thermal evaporation. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 33(1), 88-91. doi:10.1016/j.physe.2005.11.009
- Kolešnik-Gray, M. M., Hansel, S., Boese, M., Krstić, V. (2015). Impact of surface and twin-boundary scattering on the electrical transport properties of Ag nanowires. *Solid State Communications*, 202, 48-51. doi:10.1016/j.ssc.2014.11.006
- Kumar, V., Misra, N., Paul, J., Dhanawade, B. R., Varshney, L. (2014). Uricase-immobilization on radiation grafted polymer support for detection of uric acid using Ag-nanoparticle based optical biosensor. *Polymer*, 55(11), 2652-2660. doi:10.1016/j.polymer.2014.04.012
- Lai, S. H., Liu, S. C., Lan, M. D. (2007). Fabrication of MgB<sub>2</sub> nanowire and its superconductivity. *Journal of Crystal Growth*, 304(2), 460-463. doi:10.1016/j.jcrysgro.2007.03.020
- Lee, N., Yoo, D., Ling, D., Cho, M. H., Hyeon, T., Cheon, J. (2015). Iron oxide based nanoparticles for multimodal imaging and magnetoresponsive therapy. *Chemical Reviews*, 115(19), 10637-10689. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00112
- Li, K. C., Chu, H. C., Lin, Y., Tuan, H. Y., Hu, Y. C. (2016). PEGylated copper nanowires as a novel photothermal therapy agent. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(19), 12082-12090. doi:10.1021/acsami.6b04579
- Lin, J. Y., Hsueh, Y. L., Huang, J. J., Wu, J. R. (2015). Effect of silver nitrate concentration of silver nanowires synthesized using a polyol method and their application as transparent conductive films. *Thin Solid Films*, 584, 243-247. doi:10.1016/j.tsf.2015.02.067

- Lin, S. W., Chang, S. C., Liu, R. S., Hu, S. F., Jan, N. T. (2004). Fabrication and magnetic properties of nickel nanowires. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 282, 28-31. doi:10.1016/j.jmmm.2004.05.023
- Liu, D. M., Chen, J., Shi, Y. P. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 332-342. doi:10.1016/j.trac.2018.03.011
- Liu, X., Wen, M., Li, J., Zhai, F., Ruan, J., Zhang, L., Li, S. (2011). High-yield expression, purification, characterization, and structure determination of tag-free *Candida utilis* uricase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(3), 529-537. doi:10.1007/s00253-011-3244-0
- Liu, X., Shao, Y., Li, J. F., Chen, N., Yao, K. F. (2014). Large-area and uniform amorphous metallic nanowire arrays prepared by die nanoimprinting. *Journal of Alloys and Compounds*, 605, 7-11. doi:10.1016/j.jallcom.2014.03.176
- Liu, X., Qi, W., Wang, Y., Su, R., He, Z. (2017). A facile strategy for enzyme immobilization with highly stable hierarchically porous metal–organic frameworks. *Nanoscale*, 9(44), 17561-17570. doi:10.1039/C7NR06019J
- Liu, Y., Yuan, M., Liu, L., Guo, R. (2013). A facile electrochemical uricase biosensor designed from gold/amino acid nanocomposites. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 176, 592-597. doi:10.1016/j.snb.2012.08.058
- Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., Sen, T. (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(1-2), 24-46. doi:10.1016/j.addr.2010.05.006
- Mahler, J. L. (1970). A new bacterial uricase for uric acid determination. *Analytical biochemistry*, 38(1), 65-84. doi:10.1016/0003-2697(70)90156-9
- Mao, Y., Wang, C., Yang, H. (2015). Rapid and uniform synthesis of silver nanowires via rice-shaped silver nucleant. *Materials Letters*, 142, 102-105. doi:10.1016/j.matlet.2014.11.101
- Marzi, G. D., Iacopino, D., Quinn, A. J., Redmond, G. (2004). Probing intrinsic transport properties of single metal nanowires: direct-write contact formation using a focused ion beam. *Journal of Applied Physics*, 96(6), 3458-3462. doi:10.1063/1.1779972

- Morille, M., Passirani, C., Letrou-Bonneval, E., Benoit, J. P., Pitard, B. (2009). Galactosylated DNA lipid nanocapsules for efficient hepatocyte targeting. *International journal of pharmaceutics*, 379(2), 293-300. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.05.065
- Mulinari, J., Oliveira, J. V., Hotza, D. (2020). Lipase immobilization on ceramic supports: An overview on techniques and materials. *Biotechnology Advances*, 107581. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107581
- Mulvaney, P. (2015). Nanoscience vs Nanotechnology-Defining the Field. *ACS Nano*, 9, (3), 2215–2217. doi:10.1021/acsnano.5b01418
- Nagamune, T. (2017). Biomolecular engineering for nanobio/bionanotechnology. *Nano Convergence*, 4(1), 1-56. doi:10.1186/s40580-017-0103-4
- Nelson, J. M., ve Griffin, E. G. (1916). Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society*, 38(5), 1109-1115.
- Omar, M. N., Salleh, A. B., Lim, H. N., Tajudin, A. A. (2016). Electrochemical detection of uric acid via uricase-immobilized graphene oxide. *Analytical biochemistry*, 509, 135-141. doi:10.1016/j.ab.2016.06.030
- Pacheco-Torgal, F., ve Jalali, S. (2011). Nanotechnology: advantages and drawbacks in the field of construction and building materials. *Construction and Building Materials*, 25(2), 582-590. doi:10.1016/j.conbuildmat.2010.07.009
- Phaugat, K., Bhambi, M., Pundir, C. S. (2010). Polyethylene terephthalate membrane as a support for covalent immobilization of uricase and its application in serum urate determination. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), 27-31. doi:10.1016/j.molcatb.2009.08.012
- Piermarini, S., Migliorelli, D., Volpe, G., Massoud, R., Pierantozzi, A., Cortese, C., ve Palleschi, G. (2013). Uricase biosensor based on a screen-printed electrode modified with Prussian blue for detection of uric acid in human blood serum. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 179, 170-174. doi:10.1016/j.snb.2012.10.090
- Priyadarsini, S., Mohanty, S., Mukherjee, S., Basu, S., Mishra, M. (2018). Graphene and graphene oxide as nanomaterials for medicine and biology application. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 8(2), 123-137. doi:10.1007/s40097-018-0265-6

- Putzbach, W., ve Ronkainen, N. J. (2013). Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: *A review. Sensors, 13*(4), 4811-4840. doi:10.3390/s130404811
- Ramon-Marquez, T., Medina-Castillo, A. L., Fernandez-Sanchez, J. F., Fernández-Gutiérrez, A. (2015). Evaluation of different functional groups for covalent immobilization of enzymes in the development of biosensors with oxygen optical transduction. *Analytical Methods, 7*(7), 2943-2949. doi:10.1039/c5ay00103j
- Rawat, R. S. (2015). Dense plasma focus-from alternative fusion source to versatile high energy density plasma source for plasma nanotechnology. *Journal of Physics: Conference Series 591*(1), 012021. doi:10.1088/1742-6596/591/1/012021
- Reshma, V. G., ve Mohanan, P. V. (2019). Quantum dots: Applications and safety consequences. *Journal of Luminescence, 205*, 287-298. doi:10.1016/j.jlumin.2018.09.015
- Rocha-Santos, T. A. (2014). Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 62*, 28-36. doi:10.1016/j.trac.2014.06.016
- Saallah, S., ve Lenggoro, I. W. (2017). Nanoparticles carrying biological molecules: Recent advances and applications. *KONA Powder and Particle Journal, 35*, 89-111. doi:10.14356/kona.2018015
- Saleh, T. A. (2020). Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation, 10*1067. doi:10.1016/j.eti.2020.101067
- Schiavon, O., Caliceti, P., Ferruti, P., Veronese, F. M. (2000). Therapeutic proteins: a comparison of chemical and biological properties of uricase conjugated to linear or branched poly (ethylene glycol) and poly (N-acryloylmorpholine). *Il Farmaco, 55*(4), 264-269. doi:10.1016/S0014-827X(00)00031-8
- Sheldon, R. A., ve van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews, 42*(15), 6223-6235. doi:10.1039/C3CS60075K
- Sheldon, R. A. (2019). CLEAs, combi-CLEAs and ‘smart’magnetic CLEAs: Biocatalysis in a bio-based economy. *Catalysts, 9*(3), 261. doi:10.3390/catal9030261
- Sherman, M. R., Saifer, M. G., Perez-Ruiz, F. (2008). PEG-uricase in the management of treatment-resistant gout and hyperuricemia. *Advanced drug delivery reviews, 60*(1), 59-68. doi:10.1016/j.addr.2007.06.011



- Shi, W., Li, J., Wu, J., Wei, Q., Chen, C., Bao, N., ... Gu, H. (2020). An electrochemical biosensor based on multi-wall carbon nanotube–modified screen-printed electrode immobilized by uricase for the detection of salivary uric acid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(26), 7275-7283. doi:10.1007/s00216-020-02860-w
- Shui, J., ve Li, J. C. (2009). Platinum nanowires produced by electrospinning. *Nano Letters*, 9(4), 1307-1314. doi:10.1021/nl802910h
- Silva, S., Almeida, A. J., Vale, N. (2019). Combination of cell-penetrating peptides with nanoparticles for therapeutic application: A review. *Biomolecules*, 9(1), 22. doi: 10.3390/biom9010022
- Sirisha, V. L., Jain, A., Jain, A. (2016). Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Advances in Food and Nutrition Research*, 79, 179-211. doi:10.1016/bs.afnr.2016.07.004
- So, A., ve Thorens, B. (2010). Uric acid transport and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(6), 1791-1799. doi:10.1172/JCI42344.
- Sofiah, A. G. N., Samykano, M., Kadirgama, K., Mohan, R. V., Lah, N. A. C. (2018). Metallic nanowires: mechanical properties–theory and experiment. *Applied Materials Today*, 11, 320-337. doi:10.1016/j.apmt.2018.03.004
- Song, S., Liu, D., Peng, J., Sun, Y., Li, Z., Gu, J. R., Xu, Y. (2008). Peptide ligand-mediated liposome distribution and targeting to EGFR expressing tumor in vivo. *International journal of pharmaceutics*, 363(1-2), 155-161. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.07.012
- Stojanov, S., ve Berlec, A. (2020). Electrospun Nanofibers as Carriers of Microorganisms, Stem Cells, Proteins, and Nucleic Acids in Therapeutic and Other Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 130. doi: 10.3389/fbioe.2020.00130
- Sun, T., Zhang, Y. S., Pang, B., Hyun, D. C., Yang, M., Xia, Y. (2014). Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(46), 12320-12364. doi:10.1002/anie.201403036
- Suriani, A. B., Alfarisa, S., Mohamed, A., Kamari, A., Hashim, N., Isa, I. M., ... Ahmad, M. K. (2015). Amorphous Al–Cu alloy nanowires decorated with carbon spheres synthesised from waste engine oil. *Journal of Alloys and Compounds*, 642, 111-116. doi:10.1016/j.jallcom.2015.04.035

- Sutter, E., ve Sutter, P. (2006). Au-Induced Encapsulation of Ge Nanowires in Protective C Shells. *Advanced Materials*, 18(19), 2583-2588. doi:10.1002/adma.200600624
- Swiss-ModelRepository.  
<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q5ACV3?csm=B1827C3CBF03E38B>. (E.T. 27 Nisan 2021).
- Tan, Q. Y., Wang, N., Yang, H., Chen, L., Xiong, H. R., Zhang, L. K., ... Zhang, J. Q. (2010). Preparation and characterization of lipid vesicles containing uricase. *Drug Delivery*, 17(1), 28-37. doi:10.3109/10717540903508953
- Tang, S., Vongehr, S., Wan, N., Meng, X. (2013). Rapid synthesis of pentagonal silver nanowires with diameter-dependent tensile yield strength. *Materials Chemistry and Physics*, 142(1), 17-26. doi:10.1016/j.matchemphys.2013.06.023
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 257-262. doi:10.1016/j.nano.2009.07.002
- Tian, M., Wang, J., Kurtz, J. S., Liu, Y., Chan, M. H. W., Mayer, T. S., Mallouk, T. E. (2005). Dissipation in quasi-one-dimensional superconducting single-crystal Sn nanowires. *Physical Review B*, 71(10), 104521. doi:10.1103/PhysRevB.71.104521
- Tian, M., Wang, J., Ning, W., Mallouk, T. E., Chan, M. H. (2015). Surface superconductivity in thin cylindrical Bi nanowire. *Nano Letters*, 15(3), 1487-1492. doi:10.1021/nl503398d
- Tietze, R., Zaloga, J., Unterweger, H., Lyer, S., Friedrich, R. P., Janko, C., ... Alexiou, C. (2015). Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468(3), 463-470. doi:10.1016/j.bbrc.2015.08.022
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., Chibata, I. (1966). Studies on continuous enzyme reactions. I. *Screening of Carriers for Preparation of Water-insoluble Aminoacylase*. *Enzymologia*, 31(4), 214-224. doi: 10.1271/bbb1961.33.1047
- Toumey, C. (2009). Plenty of room, plenty of history. *Nature Nanotechnology*, 4(12), 783-784. doi:10.1038/nnano.2009.357
- Türk Sanayicileri ve İş Adamları Derneği (2008). *Uluslararası rekabet stratejileri: nanoteknoloji ve Türkiye (Yayın No. TÜSİAD-T/2008-11/474)*. İstanbul.

- Uygun, M., Jurado-Sánchez, B., Uygun, D. A., Singh, V. V., Zhang, L., Wang, J. (2017). Ultrasound-propelled nanowire motors enhance asparaginase enzymatic activity against cancer cells. *Nanoscale*, 9(46), 18423-18429. doi:10.1039/c7nr07396h
- Veronese, F. M., ve Mero, A. (2008). The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs*, 22(5), 315-329. doi:10.2165/00063030-200822050-00004
- Wang, C., Hu, Y., Lieber, C. M., Sun, S. (2008). Ultrathin Au nanowires and their transport properties. *Journal of the American Chemical Society*, 130(28), 8902-8903. doi:10.1021/ja803408f
- Wang, J. (2009). Biomolecule-Functionalized Nanowires: From Nanosensors to Nanocarriers. *ChemPhysChem*, 10(11), 1748-1755. doi:10.1002/cphc.200900377
- Wang, J., ve Gao, W. (2012). Nano/microscale motors: biomedical opportunities and challenges. *ACS Nano*, 6(7), 5745-5751. doi:10.1021/nn3028997
- Xiong, F., Huang, S., Gu, N. (2018). Magnetic nanoparticles: recent developments in drug delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(5), 697-706. doi:10.1080/03639045.2017.1421961
- Xu, W. H., Wang, L., Guo, Z., Chen, X., Liu, J., Huang, X. J. (2015). Copper nanowires as nanoscale interconnects: their stability, electrical transport, and mechanical properties. *ACS Nano*, 9(1), 241-250. doi:10.1021/nn506583e
- Yan, X. M., Kwon, S., Contreras, A. M., Bokor, J., Somorjai, G. A. (2005). Fabrication of large number density platinum nanowire arrays by size reduction lithography and nanoimprint lithography. *Nano Letters*, 5(4), 745-748. doi:10.1021/nl050228q
- Yang, X., Shang, H., Ding, C., Li, J. (2014). Recent developments and applications of bioinspired dendritic polymers. *Polymer Chemistry*, 6(5), 668-680. doi:10.1039/c4py01537a
- Zappe, H., Snell, M. E., Bossard, M. J. (2008). PEGylation of cyanovirin-N, an entry inhibitor of HIV. *Advanced drug delivery reviews*, 60(1), 79-87. doi:10.1016/j.addr.2007.05.016
- Zhou, J., Cai, Z. H., Li, L., Kou, C., Gao, Y. F. (2009). Preparation and PEGylation of exendin-4 peptide secreted from yeast *Pichia pastoris*. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 72(2), 412-417. doi:10.1016/j.ejpb.2009.02.001

Zhou, L., Shan, Y., Hu, H., Yu, B., Cong, H. (2018). Synthesis and biomedical applications of dendrimers. *Current Organic Chemistry*, 22(6), 600-612. doi: 10.2174/1385272822666180129142809

Zhu, L., Zhou, Z., Mao, H., Yang, L. (2017). Magnetic nanoparticles for precision oncology: theranostic magnetic iron oxide nanoparticles for image-guided and targeted cancer therapy. *Nanomedicine*, 12(1), 73-87. doi:10.2217/nmm-2016-0316



**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİLİMSEL ETİK BEYANI**

“Gut Hastalığının Tedavisi İçin Yeni Bir Yaklaşım: Ürikaz Bağlı Nanomakineler” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Ulviye KİLİMCİ

... / ... / ...