



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



NÜKLEİK ASİT VE NANOMALZEME TABANLI ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE KANSER TANISINA YÖNELİK UYGULAMALARI

Yüksek Lisans Tezi

Mustafa KARATAŞ

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

İzmir

2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**NÜKLEİK ASİT VE NANOMALZEME TABANLI
ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE KANSER TANISINA
YÖNELİK UYGULAMALARI**

Mustafa KARATAŞ

Danışman : Prof. Dr. Dilşat ARIKSOYSAL

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyomedikal Teknolojiler Yüksek Lisans Programı

İzmir
2024

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Nükleik asit ve Nanomalzeme Tabanlı Elektrokimyasal Biyosensörlerin Geliştirilmesi ve Kansere Tanısına Yönelik Uygulamaları” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

14 / 05 / 2024

Mustafa Karataş

ÖZET**NÜKLEİK ASİT VE NANOMALZEME TABANLI
ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
KANSER TANISINA YÖNELİK UYGULAMALARI**

KARATAŞ, Mustafa

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilşat ARIKSOYSAL

Nisan 2024, 75 Sayfa

Bu tezde kanser tanısına yönelik elektrokimyasal nanobiyosensör (nanoaptasensör) temelli alternatif bir tanı yöntemi geliştirilmiştir. Elektrokimyasal biyosensörler hassas, hızlı, seçimli, küçültülebilir, taşınabilir, kolay kullanımı olan ve ekonomik cihazlar olduğundan günümüzde çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar.

Tez çalışması kapsamında, yerleşik bir kanser biyobelirteci olan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'nin meme kanseri hücre hattı MCF7 ve akciğer kanseri hücresi A549'daki varlığı geliştirilen biyosensör teknolojileriyle tayin edilmiştir. Meme kanseri dünyada kadınlarda çok sık görülen kanser türlerinden biridir. Bu ölümlerin %90'ından fazlası metastatik büyümeyle ilişkilidir. Bu nedenle kanserin erken evrede tespiti, hayatta kalma şansını arttırmak için çok önemlidir. HER2 aslında normal büyüme ve hücre farklılaşmasında rol oynamaktadır. Ancak malign yapılı bir büyüme, HER2'nin aşırı ekspresyonu ile ilişkilidir. Bu nedenle kanser gelişimini gösteren bu durumun erken tanısı, yani düşük HER2 seviyesinin etkin yöntemlerle tayin edilebilmesi tedaviye erken başlanabilmesi için önem taşımaktadır.

HER2'nin hızlı, ucuz, hassas ve seçimli tayini için kalem grafit elektrot (PGE) ve ayrıca üç boyutlu yazıcı aracılığıyla üretilen uygun tipte PLA katkı maddeli karbon siyahı (CB) ve karbon nanotüp (CNT) elektrotlar ayrı ayrı tasarlanıp üretilerek elektrokimyasal DNA biyosensörleri geliştirildi. Biyolojik algılama çalışmaları öncesinde ilk olarak 3D elektrotlar için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Daha sonra biyolojik algılayıcı elektrot yüzeylerine elektroaktif etiket içeren HER2 aptamerin immobilizasyonu sağlandı ve MCF-7 ve A549 kanser hücrelerindeki düşük HER2 seviyelerinin tespitine yönelik elektrokimyasal ölçümler diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği ile gerçekleştirildi. Geliştirilen PGE ve 3D elektrot tabanlı biyosensörlerden elde edilen sonuçlar birbirleriyle kıyaslandı. Çalışmada düşük seviyede HER2 analizinde sırasıyla PGE için 10^6 hücre/20 μ L ve 3D elektrotlar için 10^6 hücre/10 μ L derişimleri optimum koşul olarak tespit edildi. Tezde düşük HER2 seviyesindeki değışimleri bile gösterecek hassasiyete sahip, aptamer-hücre etkileşimi üzerinden tayin yapabilen üç farklı türde biyosensör geliştirilerek kanser tanısındaki uygulanabilirliği gösterilmiştir. Bu çalışma ile kısa sürede sonuç veren, pahalı kitlelere ve uzmanlığa ihtiyaç duyulmadan analiz yapılabilecek, sağlık alanı için alternatif bir tanı yöntemi geliştirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Elektrokimyasal Biyosensörler, Kanser, Aptamer, Aptasensör, 3D karbon elektrotlar, karbon nanotüp, kalem grafit elektrot(PGE), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), Meme kanseri hücre hattı (MCF-7), Akciğer kanseri hücresi (A549), biyomedikal uygulamalar.

ABSTRACT**DEVELOPMENT OF NUCLEIC ACID AND NANOMATERIAL
BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS AND THEIR
APPLICATIONS FOR CANCER DIAGNOSIS**

KARATAŞ, Mustafa

MSc in Biomedical Technologies.

Supervisor: Prof. Dr. Dilşat ARIKSOYSAL

April 2024, 75 pages

In this thesis, an alternative diagnostic method based on electrochemical nanobiosensor (nanoaptasensor) has been developed for cancer diagnosis. Electrochemical biosensors are used in a wide variety of fields today, as they are sensitive, fast, selective, miniaturized, portable, easy to use and economical devices.

Within the scope of the thesis study, the presence of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), an established cancer biomarker, in breast cancer cell line MCF7 and lung cancer cell A549 was determined with developed biosensor technologies. Breast cancer is one of the most common cancer types in women around the world. More than 90% of these deaths are associated with metastatic growth. Therefore, detecting cancer at an early stage is very important to increase the chances of survival. HER2 actually plays a role in normal growth and cell differentiation. However, a malignant growth is associated with overexpression of HER2. Therefore, early diagnosis of this expression indicating the development of cancer, that is, determination of low HER2 level with effective methods, is important in order to start treatment early.

For the fast, cheap, sensitive and selective determination of HER2, electrochemical DNA biosensors were designed separately by using a pencil graphite electrode (PGE) and then carbon black (CB) and carbon nanotube (CNT) electrodes with

appropriate types of PLA additives produced via a three-dimensional printer. Before biosensing studies, optimization studies were first carried out for 3D electrodes. Then, the HER2 aptamer containing the electroactive label was immobilized on the electrode surfaces, and electrochemical measurements for the detection of low HER2 levels in MCF-7 and A549 cancer cells were performed by using differential pulse voltammetry (DPV) technique. The results obtained from the developed PGE and 3D electrode-based biosensors were compared with each other. In the study, in low level HER2 analysis, concentrations of 10^6 cells/20 μ L for PGE and 10^6 cells/10 μ L for 3D electrodes were determined as the optimum conditions, respectively. In the thesis, three different types of biosensors that are sensitive to detect changes in even low HER2 levels and can be determined through aptamer-cell interaction have been developed and their applicability in cancer diagnosis has been demonstrated. With this study, an alternative diagnostic method for the healthcare field has been developed that provides results in a short time and can be analyzed without the need for expensive kits and expertise.

Keywords: Electrochemical Biosensors, cancer, Aptamer, Aptasensor, 3D carbon electrodes, carbon nanotube, pencil graphite electrode (PGE), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), Breast cancer cell line (MCF-7), Lung cancer cell (A549), biomedical applications.

ÖNSÖZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyomedikal mühendisliği mezuniyetimden sonra biyosensörlerle ilgili çalışma hayalimin olması ve bu alanda mühendislik disiplini ile birleştirmeyi hedefledim. Bu alandaki eksiklikleri karşılayabilecek yenilikçi yaklaşımlarla büyük emek verdiğimiz sevgili danışman hocam Prof. Dr. Dilşat ARIKSOYSAL hocamla yürüttüğümüz bu yüksek lisans tezimin bitirmenin gurunu yaşamaktayım. Tez sürecinde hem mühendislik anlamında hem de biyosensör geliştirilmesi sürecinde birçok sorunla karşılaştım. Bu süreçlerin başarılı bir şekilde yürüterek hem ülkemiz hemde dünya için yenilikçi çözümler üretebildik. 3D baskılı elektrot üretimiyle ilgili bölümler birçok defa kriz durumlarıyla karşılaştıktan sonra gerekli mühendislik çözümleri sayesinde üretimdeki problemlerin üstesinden geldik. Tez süresince sürecinde hem üretimle ilgili hem de laboratuvar deneyleri süresini etkili olarak yönettikten sonra tezi yazımını tamamlanmış bulunmaktayım.

Sonuç olarak yüksek lisans tezim gelecekteki diğer çalışmalar için öncü olabilecek şekilde hem ülkemize hem de dünyadaki akademik çalışmalara katkı sunarak yararlı olmasını diliyorum.

İZMİR

14/05/2024

Mustafa KARATAŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Elektrokimya.....	3
2.1.1. Voltametri	3
2.2. Biyosensör	11
2.2.1. Biyosensörlerin Kullanım Alanları.....	13
2.2.2. Nükleik Asitler.....	14
2.2.3. Aptamerler ve Kullanım Alanları	14
2.2.4. Karbon Nanomalzemeler ve Uygulama Alanları	15
2.3. 3D Yazıcılar ve Elektrot Üretim Teknikleri	17
2.3.1. 3D Yazıcı ile Üretim Teknikleri	17
2.3.2. 3D baskılı Elektrotların Biyomedikal Uygulamaları	19
2.4 Kanser ve Kanser Tanısı	21
2.5. Elektrokimyasal Biyosensörlerle Yapılan Kanser Araştırmaları.....	22
2.6. Meme kanseri HER 2 Tanısına Yönelik Geliştirilen Elektrokimyasal Biyosensörler.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Kullanılan Cihazlar	29

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
3.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı	29
3.3. Kullanılan Yöntem.....	31
3.3.1. Çalışmada Kullanılan Elektrotların Hazırlanışı	31
3.3.2. Elektrotlara uygulanan aktivasyon türleri	34
3.3.3. DNA İmmobilizasyonu	35
3.3.4. DNA Konsantrasyonu Çalışması	35
3.3.5. Aptamer Konsantrasyonu.....	36
3.3.6. Hücre Konsantrasyonu Çalışmaları	36
3.3.7. Hücre Algılama Çalışmaları.....	37
3.3.8 Elektrot yüzeylerinin Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu	38
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	39
4.1. CB ve CNT Elektrot Aktivasyonlarına İlişkin Bulgular	39
4.2. 3D Elektrotlara DNA İmmobilizasyonu ile İlgili Bulgular	42
4.4. Aptamer Konsantrasyon Çalışmasında Elde Edilen Bulgular	45
4.5. CB ve CNT Elektrot Yüzeylerine Aptamer İmmobilizasyonu ve Gürültü (Zemin/Girişim) Sinyalinin Önlenmesi Çalışmalarında Elde Edilen Bulgular	47
4.5.1 CB Elektrot ile kimyasal aktivasyon 1 sonrasında elde edilen bulgular	47
4.5.2 CNT Elektrot ile kimyasal aktivasyon 2 sonrasında elde edilen bulgular	49
4.6. Elektrot Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu(SEM) ile Karakterizasyonu	51
4.7. Hedef Hücrenin Algılanması ve En Uygun Hücre Derişiminin Bulunmasına ait Bulgular	54
4.8. Aptasensör Biyogılama ve Seçimlilik Çalışmalarına İlişkin Bulgular	56
4.8.1 PGE Elektrot ile Biyogılama ve Seçimlilik Tayinine ait Bulgular	56
4.8.2 CB Elektrot ile Biyogılama ve Seçimlilik Tayinine ait Bulgular	59
4.8.3 CNT elektrot ile Biyogılama ve Seçimlilik Tayinine ait Bulgular	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR DİZİNİ	66

TEŞEKKÜR	74
ÖZGEÇMİŞ.....	75



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Elektrokimyasal Biyosensör Düzenegi (Budak, 2020).....	4
2.2. Kalem grafit elektrodun şematik olarak yapısı (Wang et al., 2000).....	6
2.3. (a) Tek duvarlı bir karbon nanotüpün (SWCNT), (b) çift duvarlı bir karbon nanotüpün (DWCNT) ve (c) çok duvarlı bir karbon nanotüpün (MWCNT) yapısı (Rafique et al. 2016).	8
2.4. Dönüşümlü voltametrde uyarma sinyali ve elde edilen yanıt (Arıksoysal, 2006)	10
2.5. Diferansiyel puls voltametrisi için analog cihazlarda kullanılan uyarma sinyali (Arıksoysal, 2006).	11
2.6. Biyosensör yapısı ve işleyişi (Temiz ve ark., 2006).....	12
2.7. Fdm tekniği üretim akış şeması(Sukindar et. al., 2016)	18
3.1. Çalışmada uygulanan yöntemle ilişkin deneysel işlem basamakları	28
3.2. Elektrot Tasarımı	33
4.1. CB ve CNT elektrot için ABS tampon ile aktivasyondan sonra yaklaşık 1.0 V civarında elde edilen gürültü sinyallerine ilişkin voltamogram	39
4. 2 CB ve CNT elektrot için NaOH çözeltisi ile aktivasyondan sonra yaklaşık 1.0V civarında elde edilen gürültü sinyallerine ilişkin voltamogram	40
4. 3 Yalın(CB) (A) ve nanomalzeme modifiyeli elektrottan(CNT) (B) DNA immobilizasyonu öncesinde (A, a ve B, a) ve sonrasında (A, b ve B, b) elde edilen guanin sinyallerine ait pikleri gösteren voltamogram.	42
4. 4 CB elektrot yüzeyine DNA immobilizasyonu öncesinde(c) ve sonrasında (a,b) diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak elde edilen guanin sinyaline	

ait voltamogram. Deneysel kosullar: potansiyel tarama aralığı +0.60 V ile +1.40 V, tarama hızı 16 mV/s ve amplitüt 50 mV.	43
4. 5 CNT elektrot yüzeyine DNA immobilizasyonu öncesinde(c) ve sonrasında (a,b) diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak elde edilen guanin sinyaline ait voltamogram. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.	44
4. 6 PGE elektrot yüzeyine artan derişimde aptamer immobilizasyonu sonrasında DPV tekniği kullanılarak elde edilen MB yanıtlarına ilişkin kalibrasyon grafiği.	45
4. 7. PGE elektrot yüzeyine artan derişimde aptamer immobilizasyonu sonrasında DPV tekniği kullanılarak elde edilen guanin yanıtlarına ilişkin kalibrasyon grafikleri A) Tüm değerler, B) Eğrinin doğrusal kısmı.	46
4. 8 CB elektrot yüzeyine aptamer immobilizasyonu öncesinde(c) ve sonrasında(a,b) diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak elde edilen MB sinyaline ait voltamogram. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.	47
4. 9 CB elektrot yüzeyine aptamer DNA immobilizasyonu öncesinde(c) ve sonrasında(a,b) DPV tekniği kullanılarak elde edilen guanin sinyaline ait voltamogram. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.	48
4. 10 CNT elektrot yüzeyine aptamer DNA immobilizasyonu öncesinde(b) ve sonrasında(a) DPV tekniği kullanılarak elde edilen MB sinyaline ait voltamogram. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.	49
4. 11 CNT elektrot yüzeyine aptamer DNA immobilizasyonu öncesinde(b) ve sonrasında(a) DPV tekniği kullanılarak elde edilen G sinyaline ait voltamogram. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.	50
4. 12 Elektrot yüzeyleri aptamer immobilizasyonu öncesi ve sonrasına ait SEM görüntüleri; çözünürlük bilgileri: A1, B1, C1, D1, E1, F1 50 µm ve A2, B2, C2, D2, E2, F2 5 µm A) Yalın PGE, B) PGE/Aptamer, C) CB, D) CB/Aptamer, E) CNT, F) CNT/Aptamer.	53

4. 13 Yalın elektrot (PGE) içeren biyosensör yüzeyinde belirli derişimde aptamer ve artan derişimlerde MCF-7 hücresinin etkileşimine ait guanin sinyallerini gösteren (A) voltamogram a) aptamer (tek), b) aptamer- 10^6 hücre, c) aptamer- 10^5 hücre, d) aptamer- 10^3 hücre etkileşimleri, (B) kalibrasyon eğrisi..... 55
4. 14 Yalın PGE ile biyosensör yüzeyinden elde edilen MB sinyallerine ait voltamogram: a) Aptamer(tek) b) Aptamer- 10^6 MCF-7 hücre etkileşiminden sonra c) Aptamer- 10^6 A549 hücre etkileşiminden sonra. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir. 57
4. 15 Yalın PGE ile biyosensör yüzeyinden elde edilen guanin sinyallerine ait voltamogram: a) Aptamer(tek) b) Aptamer- 10^6 MCF-7 hücre etkileşiminden sonra c) Aptamer- 10^6 A549 hücre etkileşiminden sonra. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir. 58
4. 16 CB elektrot ile biyosensör yüzeyinden elde edilen MB sinyallerine ait voltamogram: a) Aptamer(tek) b) Aptamer - 10^6 MCF-7 hücre etkileşiminden sonra c) Aptamer - 10^6 A549 hücre etkileşiminden sonra. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir. 60
4. 17 CB elektrot ile biyosensör yüzeyinden elde edilen guanin sinyallerine ait voltamogram: a) Aptamer (tek) b) Aptamer- 10^6 MCF-7 hücre etkileşiminden sonra c) Aptamer- 10^6 A549 hücre etkileşiminden sonra. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir. 61
- 4.18. CNT elektrot ile biyosensör yüzeyinden elde edilen MB sinyallerine ait voltamogram: a) Aptamer(tek) b) Aptamer - 10^6 MCF-7 hücre etkileşiminden sonra c) Aptamer - 10^6 A549 hücre etkileşiminden sonra. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir. 63
- 4.19. CNT elektrot ile biyosensör yüzeyinden elde edilen guanin sinyallerine ait voltamogram: a) Aptamer (tek) b) Aptamer- 10^6 MCF-7 hücre etkileşiminden sonra c) Aptamer- 10^6 A549 hücre etkileşiminden sonra. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir. 64

TABLÖLAR DİZİNİÇizelgeSayfa

3.1. Çalışmada kullanılan tampon çözeltiler.	30
3.2. 3D yazıcıda üretim için test edilen parametreler.....	31
4.1. Farklı aktivasyon koşullarında guanine (G) ait pik bölgesinde elde edilen gürültü sinyalleri.....	41



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABS	Asetat Tampon Çözeltisi
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş Klorür
C	Sitozin
CV	Dönüşümlü Voltametri
DPV	Diferansiyel Puls Voltametri
DNA	Deoksiribonükleik asit
G	Guanin
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
CB	Karbon Siyahı
PGE	Kalem Grafit Elektrot
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
MB	Metilen Mavisi
FDM	Eriyik yığma modelleme
PLA	Polilaktik asit
PBST	Fosfat tamponu ile tween20 ile hazırlanan yıkama çözeltisi
MCF7	Meme kanseri hücre hattı
A549	Akciğer kanseri hücresi

1. GİRİŞ

Biyosensörler, biyokimyasal bir uyarıyı elektrik sinyaline dönüştüren cihazlardır. Biyosensörler tarım, gıda, eczacılık vb. birçok alanda modern teknolojinin gelişimiyle birlikte özellikle tıp alanında teşhisten tedaviye kadar çeşitli alanlarda mükemmel uygulamalara sahiptir. Hızlı analiz ile maliyet uygunluğu sayesinde yüksek talep görmektedir. Bu sensörlerin amacı hastalıkların ve tedavilerinin derinlemesine anlaşılmasına yardımcı olacak tanı amaçlı biyosensörlerin geliştirilmesidir (Fatima et al., 2022). Nanomalzemeler 1-100 nm ölçülerinde dış boyuta sahip malzemeler olarak tanımlanmaktadır. Bu nanomalzemeler doğal olarak meydana gelebilmekte, yanma reaksiyonu yan ürünü olarak veya özel bir işlevi yerine getirmek üzere mühendislik yoluyla da üretilmektedir (Twi, 2023). Nanomalzemelerin biyosensörlerde kullanılması, geniş doğrusal aralıklarla yüksek hassasiyet, seçicilik sağlanması açısından da yeni fırsatlar yaratmaktadır. Nanomalzemeler teknolojinin gelişmesiyle birlikte optik, elektrokimyasal ve mekanik özellikleri iyileştirmesine olanak tanımaktadır. Nanomalzemeler biyosensörlerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynadığından ve çeşitli uygulamalar için bağlama yeteneğine sahiptir (Fatima et al., 2022).

Bu çerçevede bu tezde kanserli hücre analizi için elektrokimyasal nanobiyosensör temelli bir tanı yöntemi geliştirilerek, bu yöntemle kanser hücrelerinde aşırı eksprese olan biyobelirteç insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) üzerinden kanser tayini yapılmıştır. HER2'nin hızlı, ucuz, hassas ve seçimli tayini için bu çalışmada etiketli aptamer ve ayrıca nanomalzeme içerecek şekilde ayrı ayrı geliştirilen elektrokimyasal DNA biyosensörleri hazırlanmıştır. Elektrokimyasal ölçümlerde kalem grafit elektrotlar sistemin optimizasyonu için tercih edilmiş, daha sonra üç boyutlu yazıcı aracılığıyla üretilen elektrotlar da kanser hücresi tayininde kullanılmıştır. Tezin hedeflerine uygun ve aynı zamanda da seçimli olarak HER2 üzerinden kanserli hücre tayini yapabilecek biyosensörler geliştirilmiştir. Literatürde üç boyutlu (3D) yazıcı ile özel tasarım 3D elektrot üretilerek meme kanseri biyobelirteci HER2 tayininin elektrokimyasal olarak yapıldığı bir aptasensör bulunmamaktadır. Ayrıca yine literatürde metilen mavisi etiketi kullanılarak ve nanomalzemeye dayalı hazırlanan biyosensör ile

HER2 üzerinden meme kanseri tespitine yönelik bir biyosensör tasarımı da bulunmamaktadır. Bu açılardan tez literatürdeki boşluğu doldururken ayrıca kısa sürede sonuç veren, pahalı kitlelere ve uzmanlığa ihtiyaç duyulmadan analiz yapılabilecek, sağlık alanı için alternatif yeni bir tanı yöntemi içermektedir. Ek olarak kanserin etken tanısı tedaviye yön verilmesinde önem taşıdığından, bu tez ile kanserle ilişkili sağlık sorunlarının erken evrede önüne geçilmesine katkı sağlanabilecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Elektrokimya

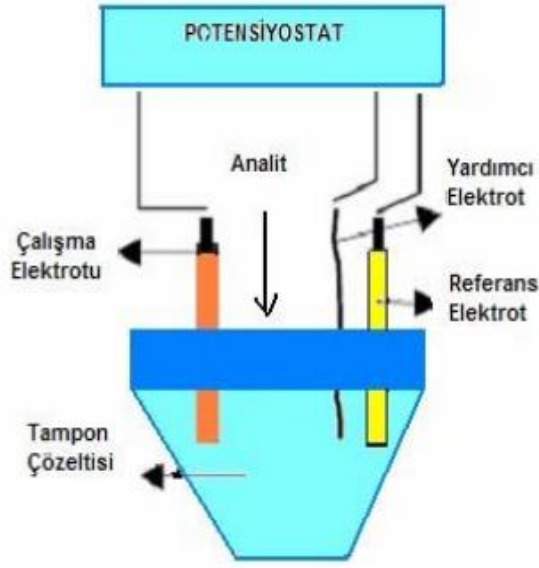
Elektrokimya, maddeyi elektrik enerjisiyle etkileyerek oluşan kimyasal dönüşümleri ve fiziksel değişimleri inceleyen bir bilim dalıdır. Aynı zamanda, bir maddeden diğerine elektron geçişini inceleyen ve elektronların bu hareketinin elektrik olarak tanımlanması, yükseltgenme-indirgenme (Redoks) reaksiyonuna dayanmaktadır (Libretexts Chemistry, 2023).

2.1.1. Voltametri

Voltametri, hem analitik kimya hem de çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılan bir elektroanalitik yöntemdir. Voltametrde, değişen potansiyel tarama aralığında ölçülen akım değeri üzerinden analite ilişkin bilgi edinilir. Bir voltametrik ölçüm sonucunda analite özgü veriler, analitten kaynaklanan akımın, çalışma elektroduna uygulanan potansiyel değerlerine karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen voltamogram ile belirtilmektedir. Ayrıca voltametri, indirgenme-yükseltgenme redoks tepkimesine bağlı olarak elektro aktif maddenin varlığını tespit etmek için kullanılmaktadır (Robson, 2023).

Voltametrik tekniklerde çeşitli potansiyellerde elektrokimyasal hücreye akım uygulanmaları bulunmaktadır. Bu teknikler; diferansiyel puls voltametri (DPV), dönüşümlü voltametri (CV), kare dalga voltametrisi (SWV) vb. şeklindedir (Gupta et al., 2011).

Voltametri yöntemlerinde ölçüm için üçlü elektrot sistemi kullanılmaktadır. Bu üçlü elektrot sistemi; çalışma elektrodu, referans elektrodu ve yardımcı (karşıt) elektrottan oluşmaktadır. Üçlü elektrot sistemi ve bir çözelti içeren hücre vasıtasıyla elektroanalitik ölçümler çalışma elektrodu ile çözelti arayüzünde meydana gelen değişimler-dönüşümler incelenebilmektedir (Wang, 2020). Bu elektrot sisteminin elektrokimyasal biyosensörlerde kullanımı oldukça yaygındır (Budak, 2020). Üçlü elektrot sistemi ve elektrokimyasal biyosensör düzeneği örneği Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



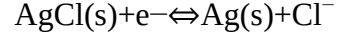
Şekil 2.1. Elektrokimyasal Biyosensör Düzenegi (Budak, 2020)

Çalışma elektrodu, analitin derişimine bağı olarak doğrusal olarak yanıt veren elektrottur. Bu sayede elektrot yüzeyindeki analitte indirgenme veya yükseltgenme meydana gelir. Üçlü elektrot sistemlerinde çalışma elektrodu genel olarak referans ve karşıt (yardımcı elektrot) ile birlikte kullanılmaktadır. Elektrottaki reaksiyonun indirgenme veya oksidasyon olmasına bağı olarak çalışma elektrodunda katodik veya anodik akım elde edilir. Yaygın çalışma elektrodları karbon pasta, karbon temelli grafit, altın veya platin, camı karbon vb. değışik iletken özellikli malzemelerden üretilerek kullanılabilmektedir. Bu çalışma elektrolarından özellikle karbon temelli olan türleri hem düşük maliyetli olması hem de geniş bir potansiyel aralığında çalışma olanağı sunması açısından tercih edilebilmektedir. Çalışma elektrodunun geniş bir algılama yüzey alanine sahip olması istenmektedir. Özellikle karbon ve metalik nanomalzemeler bu amaç için sıklıkla uygulamalarda kullanılabilmektedir.

2.1.1.1. Çalışmada Kullanılan Referans Elektrot

Referans elektrot elektrokimyasal hücrede iyonik çözeltilerde sabit bir potansiyel oluşturmak için kullanılan ve potansiyeli akım değışikliklerinden etkilenmeyen elektrottur. Referans elektrotları kalomel ve gümüş-gümüş klorür

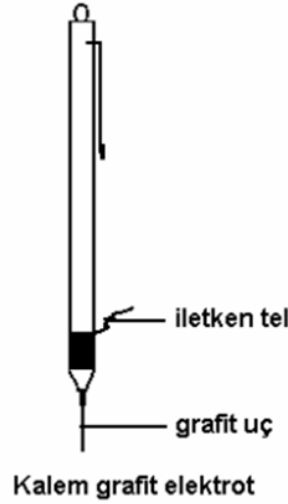
elektrodu (Ag/AgCl) vb. olmak üzere çeşitli tip referans elektrotlar bulunmaktadır. Bunlar arasında Ag/AgCl elektrotların en yaygın olarak kullanım alanları mevcuttur (Safari-Mohsenabad et al., 2010). Ag/AgCl elektodu doygun KCl çözeltisinde $E^0 = +0.22V$ 'luk yarı-hücre potansiyeline sahip ve Ag/AgCl referans elektrodun yarı tepkimesi şu şekildedir:



2.1.1.2. Çalışmada Kullanılan Çalışma Elektrotları

a) Tek kullanımlık Kalem Grafit Elektrot (PGE)

Çalışma elektrodu şeklinde kullanılan bu elektrot genel olarak kalem grafit elektrotları (PGE'ler) olarak bilinmektedir. Bu elektrotlar ucuz olmalarının yanı sıra, kullanımı kolay ve tek kullanım özelliğindedir. Ayrıca bu elektrotlar için zaman alıcı elektrot yüzey temizleme/parlatma adımı olmadığı için kullanımı rahattır. Geniş bir örnek yelpazesinden çeşitli analitleri ölçmek için farklı türde voltametrik teknikler uygulayan PGE'ler kullanılmaktadır. Bu elektrotlar iyi tanımlanmış voltametrik tepe noktaları veren tekrarlanabilir sinyal olarak görülmektedirler. Ek olarak bu elektrotların iyi bir hassasiyet ve tekrarlanabilirlik sağladığı, aynı zamanda kolay bir şekilde deneyde kullanım için uygulanabilir, yenilenebilir ve daha ekonomik olduğu literatürde çok fazla kullanıma rastlanmaktadır (David and Buleandra, 2017). Bu elektrotlar ucuz olmasından dolayı daha fazla analiz yapma fırsatı sunarlar. Ayrıca bu elektrotlar yüksek tepe noktası ve tekrarlanabilir sonuçlar vermesinden dolayı tercih edilmektedirler.



Şekil 2.2. Kalem grafit elektrodun şematik olarak yapısı (Wang et al., 2000)

b) 3D Baskılı Karbon Siyahı (CB) Elektrot

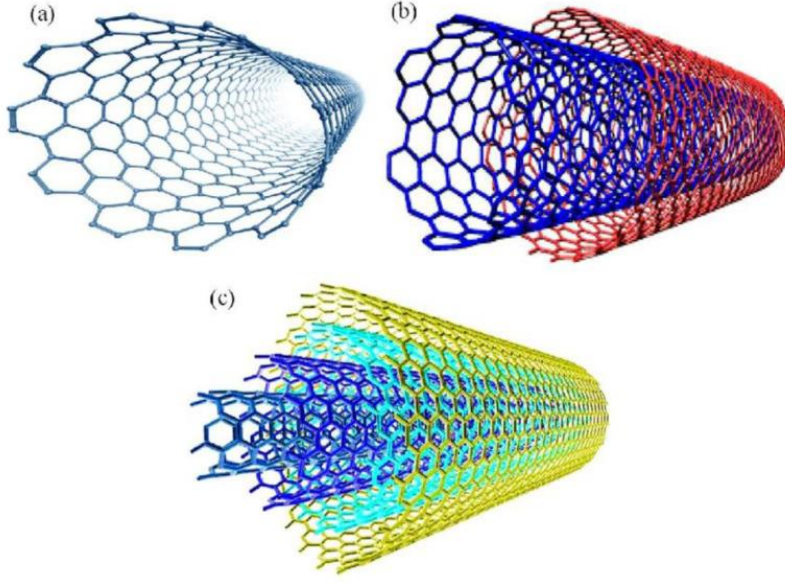
Karbon siyahı (CB), petrol ürünlerinin yakılmasıyla üretilen iletken ve düşük maliyetli bir nanomateriyaldir. Günümüzde CB'nin, çeşitli analitleri tespit etmek amacıyla elektrokimyasal cihazların, özellikle sensörlerin ve biyosensörlerin geliştirilmesinde kullanılan alternatif bir malzeme olarak kullanımı görülmektedir. Bu elektrotlar üç boyutlu yazıcılar aracılığıyla seri üretimi yapılarak kullanılabilir. Bu elektrotların üretimi ve modifikasyon kolaylığı ve diğer elektrotlara göre avantaj sağlamaktadır. Maliyet olarak da nispeten ucuz olduğu için tercih edilmektedirler.

Literatürde yapılan örnek bir araştırmada ince filmlere ve kompozitlere dayalı elektrotların üretiminde CB kullanılmaktadır. Silva ve arkadaşlarının çalışmasında, nanomateriyal elektro analiz için CB ile modifiye edilerek bir serigrafi baskılı elektrot oluşturulmuştur. Daha sonra bu elektrot metalik nanopartiküller ve polimerler gibi diğer materyallerle kolaylıkla modifiye edilebileceği belirtilmiştir (Silva et al., 2017). Morfolojik olarak CB nano ölçekli alanda geniş çap değişimine (3,0 – 100 nm) sahip küresel parçacıklar ile karakterize edilmektedir. Bu sayede CB'nin yaygın olarak karbon nanopartikülleri olarak da ifade edilebilmektedir (Ferreira et al., 2022). Günümüzde CB elektrotların kullanım alanları ve literatürde çalışmalar giderek artmaktadır.

PLA türevli CB elektrotlar elektrokimyasal uygulamada sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Örnek bir çalışmada amperometrik glikoz biyosensör, DPV tekniği ile kafein tayini amacıyla ve ayrıca anodik sıyırma voltametrisi (ASV) tekniği ile civa belirlenmesi gibi uygulamaları mevcuttur (Katseli et al., 2019).

c) 3D Baskılı Karbon Nanotüp (CNT) Elektrot

Karbon nanotüpler, tek veya birden fazla grafen tabakasının sarıldığı ve karbon atomlarının altıgen bir ağ oluşturduğu silindirlerdir. Bir CNT'deki her karbon atomu, CNT'lerin sensör sistemi tarafından bir yanıt olarak bir elektrik sinyalinden türetilen elektronları aktarmasına olanak tanıyan tek bir ortak elektron çiftine sahiptir. CNT'ler, tek duvarlı karbon nanotüpleri (SWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüpleri (MWCNT) olarak iki farklı grup içerir. SWCNT'ler, MWCNT'lere göre daha yüksek termal iletkenliğe, daha küçük çapa ve daha yüksek akım transfer kapasitesine sahiptir. Hem SWCNT'ler hem de MWCNT'ler benzer elektrokimyasal özellikleri nedeniyle çeşitli sensörlerde kullanılmaktadır. Metal bir SWCNT ile karşılaştırıldığında, yüksek hassasiyetli yarı iletken bir SWCNT'nin birçok elektrokimyasal avantajı vardır çünkü tüm karbon atomları yüzeyde bulunur ve yüksek hareketliliğe sahiptir. Bu yüzden sensör cihazları için SWCNT'ler uygundur (Lee et al., 2023). Bu sayede çalışma elektrodunun CNT ile modifiye edilmesiyle elektron transferi karbon nanotüp içermeyen nanomalzemelere kıyasla daha fazla olmaktadır. Çalışma elektrodunun CNT modifikasyonu sayesinde daha geniş bir elektrot yüzeyi elde edilmesi sağlanır. Aşağıda bir karbon nanotüpün yapısı Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.3. (a) Tek duvarlı bir karbon nanotüpün (SWCNT), (b) çift duvarlı bir karbon nanotüpün (DWCNT) ve (c) çok duvarlı bir karbon nanotüpün (MWCNT) yapısı (Rafique et al. 2016).

Literatürde yapılan araştırmalarda CNT elektrotlar ile bulanabilen bir çalışmada PLA katkılı karbon nanotüp (CNT) filamenti ile screen printed elektrot üretilerek LSV tekniği ile dopamin tespiti için kullanılmıştır. Bu elektrot için DMF kimyasal işlemi ile aktive edilerek yüzeydeki PLA uzaklaştırılmıştır. Bu sayede CNT ve CB açığa çıktığı görülmüştür. Daha sonra DMF/PBS işlemi ile karbon yüzeyi aktifleştirilmiştir. İlgili çalışmada ilk defa 3D yazıcı ile PLA katkılı karbon nanotüp(CNT) filamenti ile üretilen elektrot ile elektrokimyasal ölçüm yapıldığı bildirilmiştir (Contreras-Naranjo, 2021).

2.1.1.3. Çalışmada Kullanılan Yardımcı (Karşıt) Elektrot

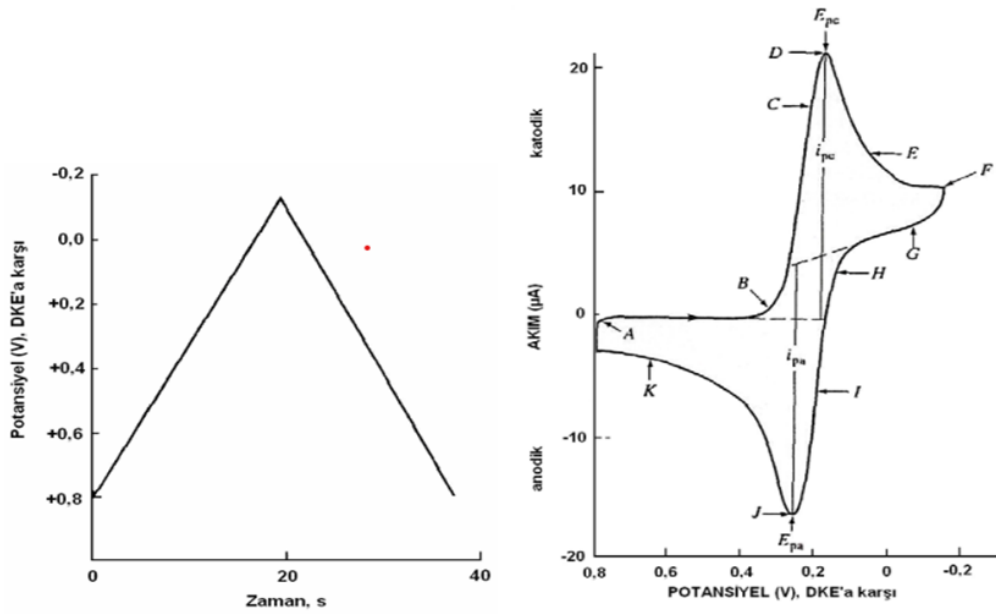
Bu elektrot iyi iletkenlik özelliği olması gerekmektedir. Bu elektrot, kısaca çalışma elektroduna giriş potansiyeli uygulanmasını sağlayarak devreyi tamamlamak ve yükün akmasını sağlamaktır. (Kissinger and Heineman, 2018). Karşıt elektrot olarak olarak deney düzeneğinde platin tel (Pt) kullanılmıştır.

2.1.1.4. Çalışmada Kullanılan Voltametri Yöntemleri

a) Dönüşümlü Voltametri (CV)

Dönüşümlü voltametri, analitte meydana gelen indirgenme ve yükseltgenmenin ölçülmesini sağlayan elektrokimyasal yöntemlerden biridir. Bir elektrodun yüzeyindeki elektrokimyasal tepkimelerin davranışını, yüzeyindeki difüzyon türlerini ve elektrodun materyal özelliklerini incelemek için kullanılabilir (Rusling et al., 1994). Dönüşümlü voltametri ile istenilen potansiyel aralığında, kaç defa tarama olacağını, tarama hızı ile ilgili parametreler seçilerek potansiyelin önce maksimum değere ulaşarak daha sonra doğrusal şekilde başlangıç değerine azalmasıyla bir voltamogram grafiği elde edilmektedir. Bu grafik sayesinde analite ait pik potansiyeli tepe noktası ve hangi aralıkta redoks tepkimesi verdiği görülmektedir. Bu voltamogram ile elektrokimyasal olarak redoks tepkimesi sonucunda ortaya çıkan ürünlerin yüzeyde tutunup tutunmadığı hakkında da bilgi edinebilmektedir.

Dönüşümlü voltametrizde uygulanan uyarma sinyali ile önce üçgen şeklinde dalga hareketi ile bir maksimuma kadar doğrusal olarak artar sonra aynı eğimle orijinal değerine doğrusal olarak azalır. Başlangıç taraması yönü pozitif veya negatif olabilir. Çevrim hızı, 1 ms- 100 s arasında veya daha uzun süren geniş bir aralıkta olabilir. Belli bir aralıktaki akımdaki değişim sürekli değişen potansiyel değerleriyle beraber grafikte dönüşümlü voltamogram elde edilir. Analitin indirgenme ve yükseltgenme grafiği aşağıdaki Şekil 4'te gösterilmektedir.

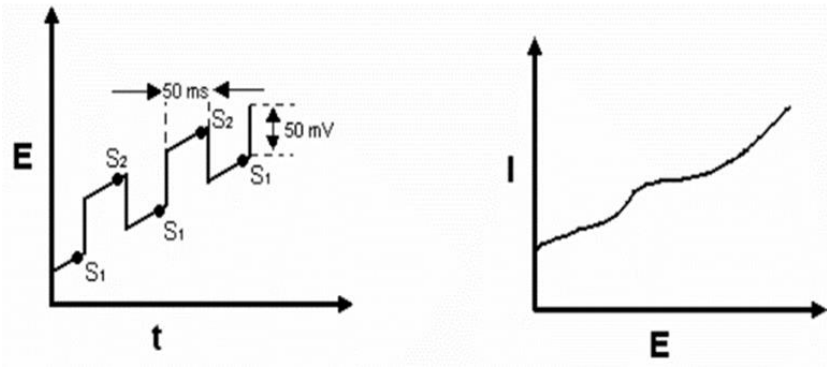


Şekil 2.4. Dönüşümlü voltametrde uyarma sinyali ve elde edilen yanıt (Arıksoysal, 2006)

Dönüşümlü voltametrde en küçük bölgedeki kapasitif akımı çalışmak için kullanılır. Bu voltametri yönteminde analiz edilecek maddenin hangi potansiyelde bir davranış sergilediği hakkında veri elde edilir. Buradaki voltamogramın duyarlılığı 10^{-5} M ile sınırlıdır.

b) Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)

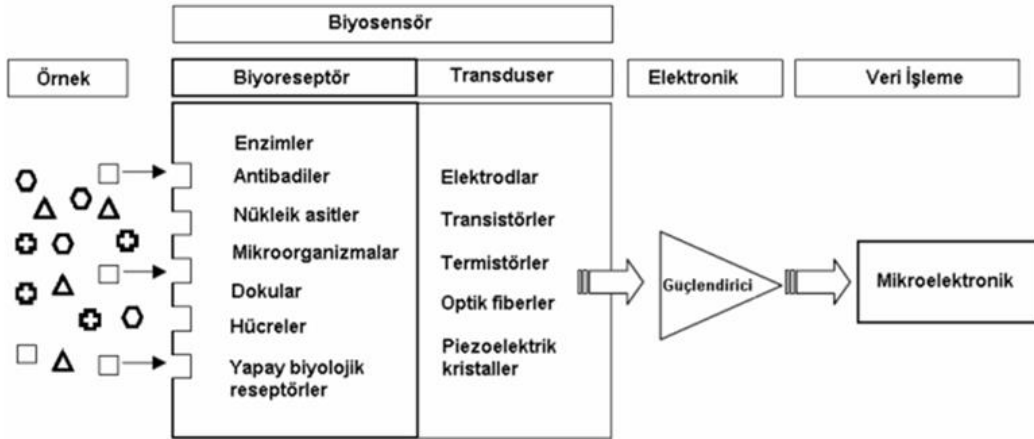
Diferansiyel puls voltametrisi (DPV), analitin varlığının hassas olarak algılanması, çeşitli kimyasalların indirgenme ve yükseltgenme özelliklerinin tayini için sık kullanılan elektrokimyasal tekniklerden biridir. DPV’de dikdörtgen bir darbe şeklinde uygulama yapılmakta ve akım her darbe periyodunda iki kez ölçülebilmektedir. Bu teknikte potansiyel dalga biçimi doğrusal olarak bir potansiyel tarama dalga biçimi üzerine bindirilen bir merdiven şeklinde bir darbeye benzetilebilir. Bu şekilde bir merdivende taban potansiyeli artmaktadır. Bu teknik ile pik maksimumlarını elde etmek için yarı-dalga potansiyelleri 0,04 - 0,05 V aralıklarında bir puls uygulanmaktadır. Aşağıdaki şekilde diferansiyel puls voltametri yöntemine ait bir voltamogram gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Diferansiyel puls voltametrisi için analog cihazlarda kullanılan uyarma sinyali (Arıksoysal, 2006).

2.2. Biyosensör

Algılayıcılar, belirli kimyasal bileşikler veya iyonlarla seçici ve geri dönüşlü bir şekilde etkileşerek onları tanıyan analitik cihazlardır (Cammann et al., 1991). Bu etkileşim sonucunda oluşan kimyasal değişimler, analitik cihazın fizikokimyasal çeviricisi tarafından analite bağlı olarak sinyallere dönüştürülür. Biyoalgılayıcılar veya biyosensörler olarak adlandırılan bu cihazlar, algılayıcı katmanlarına enzim, hücre, doku, antikor, nükleik asit gibi biyolojik maddelerin eklenmesiyle elde edilir (Turner et al., 1987). Bu biyolojik katmanlar ile dönüştürücü kısım bir araya getirilerek, hassas ve hedefe yönelik bir analitik cihaz oluşturur. Biyolojik kısım, hedef analit ile etkileşime girecek şekilde tasarlanırken, dönüştürücü kısım ise bu etkileşimleri ölçülebilir sayısal değerlere dönüştürür. Sonuç olarak, biyoalgılayıcılar hassas ve hızlı bir şekilde biyomoleküler etkileşimleri tespit etmek için kullanılır (Arıksoysal, Doğan Topal ve Topkaya, 2018). Şekil 2.6’da bir biyosensörün yapısı ve işleyişine yönelik aşamalar incelenebilmektedir.



Şekil 2.6. Biyosensör yapısı ve işleyişi (Temiz ve ark., 2006)

Elektrokimyasal bir biyosensörde elektrot bileşenlerinin yapısı için uygun malzemeler seçilmelidir. Bu seçimde biyosensör tasarımının gereksinimlerine ek olarak tespit yöntemi ve üretim süreci de dikkate alınmalıdır. Bu nedenle, bir elektrokimyasal biyosensörün bileşenleri için malzeme seçimi, biyosensörün geliştirilmesinden önce dikkate alınmasını gerektirir. Çalışma ve referans elektrodu için de malzeme seçimi önemlidir ve biyosensör yanıtını doğrudan etkileyecektir. Herhangi bir in-vivo uygulama için ise biyoyumluluk ek bir husustur. Biyosensörün performansını arttırmak için metalik bir katalizöre ihtiyacı varsa, metalik katalizörün boyutu ve bileşiminin yanı sıra üretim sürecine adaptasyonunun da değerlendirilmesi gerekecektir. Metalik katalizörün biyosensöre entegrasyonu üretim sürecinde önemlidir. Katalizörün biyosensör materyali ile uyumlu ve stabil bir şekilde entegrasyonu sayesinde daha sonra cihazın performansını etkileyebilir.

Biyosensörlerin seçiciliğini, tespit limitini ve ultra hassasiyetini arttırmak için çeşitli araçlar kullanılmıştır. Bu ilerleme, bu aletlerin klasik elektrokimyasal yöntemlerden diğerlerinin yanı sıra optik/görsel, cam, silika ve nano malzeme bazlı yaklaşımlara yükseltilmesiyle sonuçlanmıştır. Bu cihazların konfigürasyonu yoluyla sürekli izleme ve proses kontrolü optimize edilebilir. Bu, geleneksel ve zaman alıcı tanı laboratuvarı analizlerinden, temel parametreler için hasta başı izlemenin rahatlığına geçişi temsil eder ve daha verimli ve gerçek zamanlı bir yaklaşım sağlar (Tamayo et al., 2001; Du et al., 2007).

2.2.1. Biyosensörlerin Kullanım Alanları

Bugünün tıp alanında ürünleştirilmiş örnekleri bulunan biyosensörler(biyoalgılayıcılar), eczacılıkta ilaçlardaki kalite kontrol analizlerinde (mikroorganizma, virüs analizi vb.) etkili bir alternatif olarak kullanılabilir. Bu biyosensörler, biyolojik kaynaklı ilaçlardaki DNA safsızlıklarını analiz etmek, hücre ve gen terapisi biyolojik ürünleri için gerekli analitik testleri gerçekleştirmek gibi alanlarda güçlü bir potansiyele sahiptir. DNA biyoalgılayıcı tasarım teknolojileri, farmasötik ürünlerdeki toplam DNA ve nükleik asit safsızlıklarını (bir DNA örneğinde istenmeyen veya beklenmeyen diğer nükleik asitlerin, proteinlerin veya kimyasal bileşenlerin bulunma durumu) belirleme konusunda tercih edilen bir yöntem olabilmektedir (Arıksoysal, Doğan Topal ve Topkaya, 2018).

Biyosensörlerin tıp, eczacılık, gıda vb. birçok kullanım alanı mevcuttur. Bunlar özellikle teshiş, kalite kontrol gibi konularda olabilmektedir. Biyoteknoloji ve gıda alanında ise öncelikli glikoz olmak üzere organik bileşikler, alkol, amino asit ve monosakkaritler tayinlerinde enzim biyosensörleri analizlerde kullanılmaktadır (Kökbaş vd., 2013).

Tıbbi alanda biyosensörlerin öncüsü olarak glikoz biyosensörleri, diyabetin teşhisi amacıyla günümüzde halen kullanılmaktadır. Bu biyosensörler, insanların kanlarındaki şeker seviyelerini sık sık kontrol etmelerine ve hastalığa karşı önlem almaya olanak sağladıklarından son derece önemli ve hasta başı (hastaların kendisinin kullanabildiği) cihazlardır. Biyosensörler ayrıca hastaların durumun izlenmesini de (hasta takibi) kolaylaştırırlar (Haleem et al., 2021). Anti kanser ilaçların üretilmesinde, DNA hasarı çalışmalarında, ilaçlarda melezleşme temelli, mikroorganizma DNA tayinlerinde ve yine ilaçlarda melezleşme temelli viral DNA tayininde kullanılabilir (Arıksoysal, Doğan Topal ve Topkaya, 2018, s.73).

Biyosensörler gıda endüstrisinde önemli bir rol oynamakta olup, bozulmuş gıda gazlarının tespiti, kontamine gıdanın tanımlanması ve taze gıdalardaki bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların varlığının ve büyümesinin izlenmesi gibi çeşitli alanlarda farklı uygulamalar sunmaktadır. Günümüzün küresel dünyasında, ayrıca Bacillus anthracis (B. anthracis), hepatit C virüsü, Ebola, SARS (Şiddetli Akut Solunum Sendromu) virüsü vb. biyolojik ajanların kasıtlı kullanımını içeren

potansiyel biyoterörizm tehditleriyle mücadelede de biyosensörlerin, bu tür saldırıları geniş çapta zarar vermeden önce tespit etme ve önlemede oldukça etkili araçlar olduğu kanıtlanmıştır (Fatima et al., 2022).

2.2.2. Nükleik Asitler

Nükleik asitler, 5 karbonlu şeker (deoksiriboz veya riboz), bir fosfat grubu ve bir azotlu bazdan oluşan büyük biyomoleküllerdir. Bu bileşenler, nükleotit adı verilen yapı birimlerinin bir araya gelmesiyle nükleik asit moleküllerini oluşturur. 5 karbonlu şeker, nükleik asitin iskeletini oluşturan temel yapı taşlarından biridir. Fosfat grubu, şekerler arasında bağlantı kurarak nükleotidler arasındaki zinciri oluşturur. Azotlu bazlar (adenin, timin, guanin, sitozin veya urasil), nükleik asitlerin genetik bilgiyi kodladığı ve taşıdığı kısımları oluşturur (Saenger et al., 1984) .

Nükleik asitler deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır. DNA, hücrelerin protein yapmak için ihtiyaç duyduğu bilgiyi kodlar. RNA, genetik bilginin taşınması ve protein sentezinde rol oynayan moleküldür. RNA'nın çeşitli tipleri vardır, bunlar arasında mRNA (mesajcı RNA), tRNA (transfer RNA) ve rRNA (ribosomal RNA) bulunur. mRNA, genetik bilginin DNA'dan çevrildiği ve protein sentezi sürecinde kullanıldığı taşıyıcı bir moleküldür. tRNA, protein sentezinde amino asit taşıyan moleküllerdir. rRNA ise ribozomun yapısal ve katalitik bileşenlerinden biridir ve protein sentezinde yer alır. DNA'da ve RNA'da adenin, guanin ve sitozin bazları ortak olarak bulunmaktadır. Birbirinden farklı olarak DNA'da timin ve RNA'da ise urasil bazları bulunur.

Bu azotlu bazlar, birbirleriyle belirli bağlantılar oluşturarak DNA ve RNA moleküllerinin yapısını belirler ve genetik bilgiyi taşırlar. DNA molekülü, çift sarmallı bir yapıya sahiptir ve bu yapı iki uzun polinükleotid zinciri boyunca çift sarmallı bir merdiveni andırır. DNA, genetik bilginin depolanması, aktarılması ve çoğaltılması için temel bir rol oynar (Neidle et al., 2003).

2.2.3. Aptamerler ve Kullanım Alanları

Aptamerler hedef moleküllere yüksek seçicilik ve afinite ile bağlanabilen DNA veya RNA gibi nükleik asit dizilerinden oluşan makromoleküllerdir. Bu

makromoleküller, çok küçük yapısal farklılıktan yararlanarak hedef molekülü diğer moleküllerden ayırmak için kullanılabilirler. Ayrıca bu makromoleküller oligonükleotid veya protein yapısında olabilirler (Ariksoysal,2006). Aptamerlerin çoğu, ligandların üstel zenginleştirme yoluyla sistematik evrimi adı (SELEX) verilen kombinatoriyal biyoloji tekniğiyle in vitro olarak taranır. Bu sayede nükleik asit kütüphanelerinden nükleik asitler seçilip üretilmektedirler. SELEX yönteminin üç ana basamağı vardır. Bu basamaklar kütüphane oluşturulması, istenen aptamerin seçilmesi ve aptamer-hedef kompleksinin yapısal analizi şeklinde sınıflandırılabilir. Aptamerler 1990'lı yıllarda keşfedildiğinden bu yana büyük ilgi görmüş ve benzersiz avantajları nedeniyle birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Ning et al., 2020). Daha detaylı açıklanacak olursa, üstel zenginleştirme (SELEX) yöntemiyle hazırlanan tek sarmallı nükleik asitler olan aptamerler (Darmostuk et al., 2015), hedefe spesifik algılama amacıyla tasarlanan ve benzersiz üç boyutlu (3D) biçimleri olan tanıyıcı elemanlardır. Antikorlara alternatif olarak geliştirilen (Radom et al., 2013) bu nükleik asit yapılarının hedeflerine güçlü afinite, özgüllük, düşük molekül ağırlığı, termostabilite, tekrar kullanılabilirlik, kolay üretim ve ekonomik biyoyüzey tasarımı gibi avantajları vardır (Hirano et al., 2020).

Aptamer tabanlı elektrokimyasal biyosensörler, hassas, hızlı ve düşük maliyetli analiz sağlarlar. Bu nedenle halen biyoalgılayıcı tasarımları için sıklıkla kullanılan biyomoleküller arasındadır. Elektrokimyasal çevirici sisteminin kullanıldığı aptasensörlerde genellikle aptamer immobilize edilmiş bir altın elektrot ve ferri/ferrosiyonür redoks çiftinin kullanıldığı görülmektedir (Ferapontova, 2018). Benzer tekniklerin kullanıldığı etiketsiz elektrokimyasal aptasensörler de bulunmaktadır (Channon et al., 2018; Li et al., 2019; Roushani et al., 2019). Bu alandaki aptamerler ile yapılan örnek review çalışmalarından ulaşılabilmektedir. (Kim et al., 2016; Dhiman et al., 2017).

2.2.4. Karbon Nanomalzemeler ve Uygulama Alanları

Nanomalzeme, boyutları genellikle 1 nanometreden (nm) 100 nanometreye kadar olan malzemelerdir. Nano boyutta olan bu malzemeler, özellikle dış, iç ve yüzey yapılarına odaklanarak tanımlanır. Nanomalzemelerin bu boyuttaki özellikleri, atom ve molekül seviyesindeki düzenlenme ve etkileşimlerine dayanır.

Bu özellikler, nanomalzemelerin çeşitli endüstriyel, bilimsel ve teknolojik uygulamalarda kullanılmasını sağlar. Nanometre ölçeğe sahip malzemeler benzersiz optik, elektronik, termo fiziksel veya mekanik özelliklere sahiptir (Dolez, 2015).

Karbon nanomalzeme bazlı en iyi bilinen kategorilerinden birini temsil eder. Bunlar arasında grafen, karbon nanotüpler, karbon nanofiberler, fullerener ve karbon siyahı bulunur. Grafen, bir atom kalınlığında karbon atomu tabakalarından yapılmıştır (Zhu et al., 2012). Bu nanomalzemenin endüstriyel üretim süreci hala geliştirme aşamasında olup çeşitli alanlarda uygulamaları bulunmaktadır. Örneğin güneş pilleri için elektrotlar ve organik LED'ler, polimer matrisli kompozitler için kullanımı, süperkapasitörler için enerji depolama, sensörler vb. olarak çeşitli kullanım alanları mevcuttur.

Karbon nanotüpler, bir silindire sarılan ve Van der Waals kuvveti altında kendiliğinden hizalanan grafen tabakalardır (Baughman et al., 2002). Mevcut uygulamalar arasında kompozitler için takviye, atomik kuvvet mikroskopları için uçlar ve kemik büyümesi için yapı iskeleleri yer almaktadır. Karbon nanolifler, grafen tabakalarından oluşur (De Jong et al., 2000). Alan elektron emisyon kaynaklarında, taramalı elektron mikroskobu uçları olarak ve kompozit takviye (bir matris malzemesi içine katılan ve mekanik özellikleri artırmak için kullanılan güçlendirici bir malzeme) olarak kullanılırlar. Fullerenerler ise grafen tabakalarının bir küre veya elipsoid şeklinde katlanmasıyla meydana gelir (Højgaard et al., 2012). Uygulama alanları arasında yaşlanma karşıtı kozmetikler (antioksidanlar, hyaluronik asit ve retinol vb. aktif bileşenler içeren serumlar), tıbbi görüntüleme için kontrast maddeler, su arıtma ve metan dönüşümü için katalizörler, elektronik ve fotovoltaik piller olarak birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Son olarak karbon siyahı, ağır petrol ürünlerinin eksik yanması sonucu oluşan amorf karbon parçacıklarından oluşur. Bu materyal aynı zamanda toz halinde kullanılabilir. Karbon siyahı esas olarak lastiklerdeki kauçuğu güçlendirmek için kullanılır, ancak aynı zamanda çeşitli kauçuk, plastik, mürekkep ve kaplama uygulamalarında pigment, UV dengeleyici ve iletken veya yalıtkan madde olarak da işlev görebilmektedir (Birla Carbon, 2023).

2.3. 3D Yazıcılar ve Elektrot Üretim Teknikleri

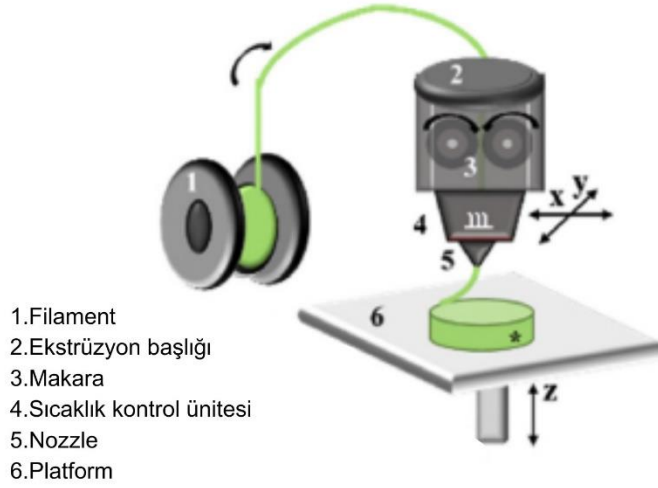
3D yazıcılar, dijital 3 boyutlu model verilerini kullanarak katmanlar halinde nesnelerin üretilmesini sağlayan teknolojik cihazlardır. Bu cihazlar, bilgisayar destekli tasarım (CAD) veya 3D modelleme yazılımları ile oluşturulan dijital tasarım dosyalarını alır ve bu tasarımları malzemeleri katman katman birleştirerek fiziksel olarak gerçek nesnelere dönüştürürler. İlk katmanlı üretimin 1980 sonuna doğru uygulanmasından bu yana katmanlı üretimde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Yaygın olarak üç boyutlu baskı(3D) veya hızlı prototipleme aracı olarak birçok farklı tanımlamalar da bulunmaktadır(Khoo et al., 2015). Son olarak, hızlı prototipleme yoluyla özelleştirilmiş ve kişisel olarak yapılan ürünlerde düzeltmeler yaparak üretimin daha verimli sonuçlar vermesine olanak tanır.

2.3.1. 3D Yazıcı ile Üretim Teknikleri

3D baskı teknolojileri, üretim tekniklerini katmanlı üretim sürecinde farklı yaklaşımlarla incelememize olanak sağlar. Bu teknolojiler, bir dijital modelin fiziksel bir nesneye dönüştürülmesinde kullanılır ve genellikle katman katman bir yapı oluşturmak için malzemelerin tabaka tabaka birleştirilmesine dayanır. Bu yazıcılarda yaygın olarak kullanılan üretim teknikleri: Eriyik yığma modelleme (FDM), stereolitografi (SLA), seçici lazer sinterleme (SLS), malzeme püskürtme, dijital ışık işleme (DLP) ve elektron ışınıyla eritme (EBM)'dir.

- Eriyik Yığma Modelleme (FDM): Termoplastik filamentler kullanan FDM yazıcılar, nesneler oluşturmak için malzemeyi katman katman çıkarır. Bir filament makara sayesinde ortalama belli bir erime sıcaklığında istenilen tasarımın üretilmesi için nozzle sıcak durumda ekstrüde(termoplastik bir malzemenin, genellikle bir makaradan beslenen ısıtılmış bir nozulden basınç altında itilerek belirli bir şekil ve boyutta çıkarılması işlemi) edilerek katman katman bir tabla üzerinde üretilmesi prensibi ile üretimi yapılmaktadır. Her bir katman öncesi termoplastik sıcaklığın altına soğuma şeklinde gerçekleşir. Baskı malzemesi olarak akrilonitril bütadien stiren (ABS), polilaktik asit (PLA), balmumu karışımı, naylon vb. kullanılır. Baskı malzemesi uygun şekilde ayarlanmazsa üretilen ürün şekil bütünlüğü yönünden eksik veya

filamentte bozulmalar görülmektedir (Han et al., 2019). Burada kullanılan yöntem maliyet olarak ucuz ve hızlı prototipleme olarak en ideal yöntem olduğu için kullanım alanı diğer üretim tekniklerine göre daha yaygındır. Bu üretim tekniğinde farklı filament türleri kullanılabilir. Piyasada genel olarak en sık rastlanan ABS ve PLA türleri rastlanmaktadır. Bunlardan ABS materyali içeren filamentler insan sağlığı açısından zararlı kimyasallar içerebilirler. PLA içeren filamentler ise biyobozunur bir malzeme olduğundan çevreye ve insan sağlığı açısından zararsızdır. Bu yüzden PLA materyali içeren filamentler daha sık tercih edilmektedirler.



Şekil 2.7. Fdm tekniği üretim akış şeması(Sukindar et. al., 2016)

- Stereolitografi (SLA): SLA, pürüzsüz yüzeyle nesneler oluşturmak için ultraviyole ışıkla kürlenene (bir malzemenin UV ışık altında sertleştirilmesi) sıvı bir reçine kullanılarak katman katman kullanılmaktadır. Bu üretim tekniği daha ayrıntılı olarak basım yapılabilen ve örneklerin dış modelleri vb. sektörlerinde üretimle ilgili kullanım alanı ön plandadır.
- Seçici Lazer Sinterleme (SLS): Toz halindeki malzemeleri seçilerek eritip katman katman birleştirme yöntemidir. Bunlar örneğin polimerler veya metalleri sinterlemek (katı bir haldeki malzemeyi yüksek sıcaklıkta

kısmen eriterek veya birleştirerek yoğun bir kütleye dönüştürme işlemi) için lazer kullanılmaktadır. Bu sayede işlev bakımından dayanıklı prototipler oluşturulabilmektedir. Bu yöntem karmaşık geometrili malzemeleri üretmek için ideal bir seçenek olarak kullanılmaktadır.

- **Bağlayıcı Püskürtme:** Bu teknik, sıvı bir bağlayıcı maddenin bir toz yatağına seçici olarak bırakılmasını, nihai nesneyi oluşturmak için katmanların katılaştırılmasını içerir. Bu yöntem ile büyük ölçekli modeller, kum kalıpları ve metal parçalar vb. basılabilir.
- **Malzeme Püskürtme:** Geleneksel mürekkep püskürtmeli baskıya benzer şekilde, malzeme püskürtme, sıvı fotopolimer damlacıklarının bir yapı platformuna püskürtülmesini ve bunların ultraviyole ışıkla sertleştirilmesini içerir. Bu, prototip oluşturmaya ve tasarım doğrulamaya uygun, yüksek çözünürlüklü ve çok malzemeli baskılarla sonuçlanır.
- **Dijital Işık İşleme (DLP):** DLP, sıvı reçineyi seçici olarak iyileştirmek ve nihai nesneyi oluşturmak için katmanlar dijital bir ışık kaynağı kullanır. Bu yöntem, hızı ve hassasiyetiyle ön planda olduğu için çeşitli uygulamalar için kullanımını tercih edilmektedir.
- **Elektron Işınıyla Eritme (EBM):** Metal tozunu seçici olarak eritmek için bir elektron ışınını kullanmaktadır. Bu yöntemin havacılık ve tıp endüstrilerinde yüksek mukavemetli, karmaşık metal parçalar üretmek için önemli kullanım alanları mevcuttur.

3D olarak CAD programında (Autocad, Solidworks vb.) ile tasarlanan modeller STL formatına dönüştürülerek kaydedilir. Bu format daha sonra istenilen dilimleme programı (cura vb.) sayesinde STL formatından G koduna (makine diline) dönüştürülerek SD kart veya USB ile cihaza yüklenerek tasarlanan model ile katman katman istenilen üretimler elde edilmektedir.

2.3.2. 3D baskılı Elektrotların Biyomedikal Uygulamaları

3D baskılı elektrotların biyomedikal alanda uygulamaları tedavi ve teşhis amaçları için giderek artan umut vaat eden teknolojik gelişmedir. Bu elektrotlar biyomedikal algılamalarda hassasiyeti ve özgüllüğü arttırmak için çeşitli

uygulamaları bulunmaktadır. Bunlar arasında biyopotansiyel algılama, biyolojik ve kimyasal algılama, ilaç dağıtım sistemleri, doku mühendisliği vb. çeşitli alanlarda kullanımları giderek artmaktadır.

Biyolojik moleküllerin tespiti için 3D elektrotlar özellikler artan yüzey alanı ve gelişmiş elektrokimyasal özellikler için biyosensör olarak duyarlılık ve seçiciliği arttırarak örneğin diyabet hastaları için glikoz izleme gibi çeşitli hastalar için biyobelirteç olarak kullanımı mevcuttur. 3D elektrotlar aynı zamanda kimyasal bileşiklerin tespiti için örneğin bir hastalığın erken tespiti için çevresel kirleticileri izleme vb. tespit etme yöntemlerinde kullanılmaktadır. 3D olarak üretilen elektrotlar örneğin grafen kullanılarak üretilmiş bir elektrot yüzeyine modifikasyon malzemesi olarak kullanımları mevcuttur (Yang et al., 2018).

Bakshi ve arkadaşları, homojen şekilde çok dallı altın nanoyapı içerikli immünosensör ile bir protein biyobelirteci olan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)'yi tayin etmişlerdir. Çalışmadaki analizde antikor-antijen etkileşimi esas alınmıştır. Elektrokimyasal ölçümlerde LSV tekniği, platin (Pt) (0,7 cm x 0,7 cm aktif alan) karşıtt(yardımcı) elektrot, Ag/AgCl elektrot referans elektrot ve altın tabaka kaplı cam yüzey çalışma elektrodundan oluşan üçlü elektrot sistemi hücresi kullanılmıştır. Amperometri tekniği de biriktirme işlemlerinde kullanılmıştır. H₂ kabarcıklarının altın elektrot yüzeyine yerleşmesini önlemek için elektrolite APTES (% 0.1 v / v ila % 0.3 v / v), etanol (% 0.2 v / v) ve Triton-X (% 0.01 v / v) gibi ilaveler yapılmıştır. 0.49 cm² aktif alana sahip altın kaplamalı cam slaytlara, daha sonra antikor immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hedef EGFR reseptör antijeni için gerçekleştirilen voltametrik ölçümlerde tayin sınırı 6.9 pg/ml olarak bulunmuş ve biyosensörün 10pg/ml ile 100ng/ml arasında doğrusal bir çalışma aralığında çalıştığı belirtilmiştir. Göğüs kanseri hücre dizileri kullanarak hedef dışındaki proteinlerin de bulunduğu bir örnekten hedef proteinlerin saptanmasında yüksek seçicilik elde edilmiştir. Geliştirilen sensörün stabilite ve yeniden kullanılabilirlik özellikleri de tespit edilmiştir (Bakshi et al., 2021).

Marzo ve arkadaşları, idrojen peroksit tespiti için doğrudan elektron transfer enzimi bazlı biyosensörler oluşturmak için eklemeli üretim teknolojisi ile yapılmış 3D baskılı bir grafen/polilaktik (PLA) elektrot kullanarak yaban turpu

peroksidazını(HRP) immobilize etmişlerdir. 3D baskılı grafen/PLA elektrotunun altın nanoparçacıklar (AuNP'ler) ile daha fazla modifikasyonu, HRP ve 3D baskılı grafen-PLA elektrotu arasındaki doğrudan elektron transferini doğrulayarak sonuçları değerlendirmişlerdir (Marzo et al., 2020).

Naranjo ve arkadaşları, dopamini tespit etmek için hibrit bir karbon-nanotüp/karbon siyahı/polilaktikasit (CNT/CB/PLA) filament malzemesinin bir elektrokimyasal algılama sisteminin imalatında ilk kez kullanmışlardır. Entegre 3D baskılı hibrit karbon elektrot iletken olmayan bir akrilonitril bütadien stiren(ABS) substrat ve iletken 3 boyutlu elektrot(CNT/CB/PLA) bölümlerinden oluşmuştur. Daha 1,45 μ M algılama sınırıyla dopamini tayin etmişlerdir (Naranjo et al., 2021).

2.4 Kanser ve Kanser Tanısı

Kanser hücrelerin bir organ veya dokuda düzensiz şekilde bölünüp çoğalmasıyla meydana gelir. Genel olarak bölünme ve çoğalma kontrolsüzdür ve vücudun çeşitli bölgelerinde meydana gelebilmektedir. Kansere neyin sebep olduğu hala tam olarak bilinmemektedir fakat bilinen bazı risk faktörleri mevcuttur. Bunlar; davranışsal risk faktörleri (sigara içmek, diyet, egzersiz vb.), biyolojik risk faktörleri (cinsiyet, yaş vb.), çevresel faktörler (hava kirliliği vb.) ve genetik faktörler olarak kategorilere ayrılmaktadır. Kanser türlerinden özellikle kadınlar için yüksek risk taşıyan ve çoğunlukla tehlikeli olan tür meme kanseridir ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) internet sitesinde yer alan verilere göre, 2020 yılı içerisinde dünyada meme kanseri teşhisi konulan 2.3 milyon kadın ve 685.000 ölüm vakası olduğu bildirilmektedir. 2020'den önceki 5 yıl içerisinde meme kanseri teşhisi konulan 7.8 milyon kadın ise yaşamaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, 2021). Fakat bu yüksek rakam aynı zamanda bu kanser türünün dünyanın en yaygın kanseri olduğu anlamına gelmektedir. Özellikle meme kanserinde erken teşhiste başarılı tedaviler uygulanabildiğinden hastalığın erken tespit edilmesi önem arz etmektedir.

Kanser; tanımlanmış 200'den fazla kanser türü ve her gün 1500'den fazla ölümle, tüm dünyada yaşamı tehdit eden önde gelen bir hastalıktır. Son dönemdeki hızlı teknolojik gelişmelere rağmen, kanser hastalarının sağ kalma oranı, geç evrede

teşhis ve kanserin kötü prognozu nedeniyle hala zayıftır. Ultrason, manyetik rezonans görüntüleme ve biyopsi gibi geleneksel yöntemler, kanserin erken evrede saptanmasında yetersizdir, çünkü bu yöntemler tümörün fenotipik özelliklerine bağlıdır (Altıntaş ve ark., 2011).

2.5. Elektrokimyasal Biyosensörlerle Yapılan Kanser Araştırmaları

Klinik kanser teşhisinin hedeflenen en üst noktası, hasta başı testleri sağlayan biyobelirteçlerin hassas ve eşzamanlı tespitini net olarak yapabilen analitik tekniklerin geliştirilmesidir. Son zamanlarda, üstün analitik performans ve gerçek zamanlı ölçüm gösterdikleri için kanser biyosensörlerinin geliştirilmesine artan bir ilgi vardır. Bu sistemler düşük tespit limitleri sayesinde, fizyolojik örneklerde kanserin erken teşhisine yardımcı olabilecek çok düşük biyobelirteç seviyelerini ölçebilmektedirler. Ayrıca bu biyosensörler, çoklu biyobelirteçlerin eşzamanlı tespiti için yüksek potansiyele sahiptirler. Bu konuda birçok derleme makaleye literatürden ulaşılabilmektedir (Jayanthi, 2017).

Kanser tedavisi için sürekli yeni ilaçların keşfi sürmesine rağmen, kanserde erken tanı alanında ilerlemeler nispeten yavaştır. Başlangıcında kanseri tespit etmek için hücresel değişikliklerin hızlı analizi için verimli biyosensörlere olan ihtiyaç halen devam etmektedir. Etkili tanı tekniklerinin üretilmesi prognozu ve tedavi stratejilerini ve ardından hastanın hayatta kalma oranını iyileştirebilecektir. Bu noktadan hareketle bu sorunun çözümüne katkıda bulunacak alternatif bir elektrokimyasal nanobiyosensör geliştirilmesi önem taşımaktadır. Bununla ilgili literatürde yapılan incelemelerde yapılan çalışmalar gün geçtikçe arttığı görülmektedir.

Yerleşik bir meme kanseri biyobelirteç olan HER2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) meme kanseri için de önemli bir prognostik bir biyobelirteçtir. HER2 biyobelirteç meme kanserlerinin %20-30'unda aşırı eksprese edilir ve meme kanserinde hem prognostik hem de prediktif biyobelirteç olarak sınıflandırılmıştır (Centane et al., 2021). HER2 pozitif meme kanseri hastalarının etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için HER2 aşırı ekspresyonunun tespiti hayati öneme sahiptir. Ekstra HER2 reseptörleri, meme hücrelerini kontrolsüz bir şekilde büyüme ve bölünme sürecine neden olarak HER2-pozitif meme kanseri olarak bilinen bir

duruma yol açar. Günümüzde HER2'nin belirlenmesi için kullanılan yöntemler genellikle tümör dokusunun biyopsi yoluyla alınması ve ardından immünohistokimya (IHC) veya floresan in situ hibridizasyon (FISH) gibi tekniklerle yapılan analizlere dayanır. Ancak bu yöntemler genellikle hücre düzeyinde çalıştığından, serumdaki serbest HER2 konsantrasyonunu ölçmek için uygun değildir. Bu tür tekniklerin dezavantajları arasında invaziv biyopsilerin gerekliliği, maliyeti ve karmaşık işaretlemelerle ilişkili zaman alıcı analizler bulunmaktadır. Bu zorlukların üstesinden gelmek için parçalanmış ve kan serumuna geçen serbest HER2 proteinlerinin konsantrasyonunu farklı bir yaklaşımla ölçmektir. Sağlıklı bireylerin kanındaki HER2 konsantrasyonu genellikle 2 ila 15 ng/mL arasında değişirken, HER2 pozitif meme kanseri olan hastalarda bu konsantrasyon 15 ng/mL'in üzerindedir. Dolayısıyla, kan serumundaki HER2 protein biyobelirteçlerinin incelenmesi, meme kanseri teşhisi ve tedavi sonrası hastalığın takibi için daha az invaziv bir yöntem sunmaktadır (Tabasi et al., 2017). Elektrokimyasal tabanlı sensörlere çeşitli kanser belirteçlerinin analizi için giderek artan bir ilgi vardır. Bunlar; basitlik, minyatürleştirme kolaylığı, yüksek hassasiyet, uygun maliyet ve hızlı tepki gibi avantajlarından kaynaklanmaktadır.

2.6. Meme kanseri HER 2 Tanısına Yönelik Geliştirilen Elektrokimyasal Biyosensörler

Adını Michigan Kanser Vakfı'ndan (MCF) alan ve dünyada en çok çalışılan insan meme kanseri hücre dizisi MCF7'dir (Lee et al., 2015). Örneğin göğüs adenokarsinomundan hasta olan 69 yaşındaki bir kadından alınan plevral efüzyondan MCF7 elde edilmiştir (Pathak, 2022). MCF-7 ile yapılan çalışmalarda biyobelirteç kullanarak elektrot yüzeyini uygun şekilde modifiye etmek ve çeşitli nanomateryaller ile etkileşimde bulunması istenilen analitten doğru sonuç ve düşük tayin sınırlarına ulaşmak için önem arz etmektedir (Zhou et al., 2019).

Meme kanseri dünya çapında kadınlarda en sık görülen kanserlerden biridir. Bu ölümlerin %90'ından fazlası metastatik büyümeyle ilişkilidir. Bu nedenle kanserin erken evrede tespiti, hayatta kalma şansını arttırmak için çok önemlidir.

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörleri (HER/erbB) normal büyüme ve hücre farklılaşmasında rol oynar. Ancak kötü huylu (malign) bir büyüme, büyümede eksprese edilen ve büyümede yer alan bir transmembran tirozin kinaz reseptörü olan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) aşırı ekspresyonu ile ilişkili olabilmektedir. Bununla beraber HER2 normalde meme kanseri MCF-7 hücrelerinde düşük seviyededir. (Suresh et al., 2020 ;Guan et al., 2014 ;Latrich et al., 2008). HER2'nin agresif meme kanserlerinin yaklaşık %20-30'unda aşırı eksprese edildiği ve kötü prognozla (malignite) ilişkili olduğu da tespit edilmiştir. Meme kanseri hastalarının kanlarında normal bireylere (4-14 ng/ml) kıyasla yüksek HER2 konsantrasyonları bulunur (14-75 ng/ml) ve risk altındaki veya tedavi gören hastaların tanı ve aktif gözetimi için kullanılabilir (Chun et al., 2013; Arya et al., 2018).

Meme dokusunda ekstra HER2 reseptörleri bulunduğunda (aşırı ekspresyon durumu), meme hücreleri çok hızlı çoğalabilir. Büyüme kontrolsüz hale gelebilir ve tümöre yol açabilir. HER2 pozitif olarak tanımlanan meme kanseri daha hızlı büyüme, yayılma (metastatik meme kanseri) ve geri gelme (tekrarlama) eğilimindedir. HER2 pozitif kanser agresif olabilse de HER2 proteinlerini hedef alan meme kanseri tedavisine de daha iyi yanıt vermektedir (Abramson Cancer Center, 2024).

Arya ve arkadaşları seyreltilmemiş serumda meme kanseri için bir biyobelirteç olan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) tespiti ve tahmini için basit ve güçlü bir kapasitif aptasensörün geliştirmişlerdir. Birbirine geçmiş altın mikro elektrot dizilerinin silikon/silikon oksit levhalar üzerine biriktirilmesi, standart litografi ve mikro imalat teknikleri kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Sensör, döngüsel voltametri, elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), atomik kuvvet mikroskobu ve temas açısı çalışmaları kullanılarak karakterize edilmiştir (Arya et al., 2018)

Harasheh ve arkadaşları altın (Au) nanopartiküller ile modifiye edilmiş perde baskılı karbon elektrot kullanılarak HER2 antijen tespiti için aptamer tabanlı biyosensör geliştirilmiştir. Aptasensör yanıtını incelenmesi DPV ve EIS teknikleri kullanılmıştır. Ayrıca, seçicilik çalışmasının sonuçları, geliştirilen Au nanoparçacık

modifiyeli aptasensör'ün, girişim yapan maddelere ihmal edilebilir çapraz HER2 seçici algılamasında oldukça etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Harahsheh et al., 2021).

Centane arkadaşları göğüs kanseri biyobelirteci olan HER2 elektrokimyasal tespiti için ile ilgili yaptıkları çalışmada camsı bir karbon elektrot kullanılarak biyosensörün operasyonel özellikleri üstündeki özellikleri araştırmak için sıralı adsorpsiyon ve elektropolimerizasyon olarak bilinen iki teknik ile birlikte modifiye edilerek elde edilen sonuçlar karşılaştırmışlardır. Amit bağlantısı yoluyla HER2'ye özgü HB5 aptamer için bir immobilizasyon platformu olarak farklı nanomalzemeler kullanmışlardır.

Ou ve arkadaşları, meme kanseri hücresi biyobelirteci HER2'yi saptamak için sandviç tipi bir elektrokimyasal aptasensör tasarlamışlardır. Burada sinyal nanoprobaları olarak çiçek tipi nanozimler Mn_3O_4 , $Pd@Pt$ ve HRP, H_2O_2 'nin hidrokinon (HQ) ile oksidasyonunu katalize ederek diferansiyel puls voltametri (DPV) sinyalini arttırmıştır. Biyosensör tasarımı sürecinde, TDN-aptamer 1, HER2 biyobelirteci yakalamak için altın elektrot (GE) yüzeyine immobilize edilmiştir. HER2'nin bağlanmasını takiben, GE yüzeyinde bir aptamer-protein-nanoparça sandviçi oluşturulmuştur (Ou et al., 2019).

Rauf ve ark., HER2 biyobelirteçinin tespiti için altın nanoyapılı modifiye edilmiş lazerle çizilmiş grafen (LSG) bazlı bir elektrokimyasal aptasensör kullandıklarını belirtmişlerdir. Gözenekli LSG elektrot yüzeyinde 3D altın nanoyapıları oluşturmak için basit bir elektrodpozisyon tekniği kullanarak bir altın yüzey kaplaması elde edilmiştir. Daha sonra aptamer dizisi yüzeye modifiye edilmiştir. LSG-AuNS elektrokimyasal aptasensörü ile HER2'yi saptanmasında, 0.008 ng/mL'lik bir saptama (LOD) sınırı ve 0.1-200 ng/mL'lik bir doğrusal aralık elde edilmiştir. Bu sonuçlar, daha iyi yüzey kaplaması, daha yüksek hassasiyet ve yüzey modifikasyonu kolaylığı ile LSG bazlı elektrokimyasal sistem üretmek için alternatif yöntem sağlamışlardır. $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ redoks probuyla yapılan EIS ve CV ölçümleriyle HER2 analizi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen aptasensörle, insan serumu numunelerinde HER2'nin hassas ve seçici olarak tayini de yapılmıştır. Çalışmada ayrıca çeşitli hastalık biyobelirteçlerini tespit etmek için uygulanabilen

bir POC cihazıyla entegre LSG-AuNS algılama sistemi de geliştirilmiştir(Rauf et al., 2021).

Sadeghi ve ark., Sıvı biyopside HER2-ECD oncomarker'ı tespit etmek için grafenle modifiye edilmiş rodyum nanoparçacıklarına dayalı yüksek performanslı bir elektrokimyasal aptasensör geliştirdiler. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2-ECD) oncomarker durumunun hücre dışı alanının değerlendirilmesi, erken evre meme kanserinin (BC) taranması, teşhisi ve izlenmesinde etkileyici bir faktördür. Bu çalışmada, farklı malzemelerle yapılan nanokompozit, grafit elektrot (GE) yüzeyinde indirgenmiş grafen oksit nano tabakaları (rGON'lar) ve rodyum nanoparçacıkları (Rh-NP'ler) içermektedir. GE tabanlı aptasensör, 10.0–500.0 ng/mL geniş Yazım alanları gerektiği kadar uzatılabilir dinamik aralığı, 0.667 ng/mL'lik düşük algılama limiti (LOD) ile HER2-ECD'ye karşı hassas sonuçlar elde edilmiştir (klinik eşik değerinden önemli ölçüde daha az) ve 2,01 ng/mL'lik bir kantifikasyon alt limiti (LOQ) değerlerine ulaşılmıştır. Geliştirilen aptasensörün geniş dinamik aralık, yüksek hassasiyet, seçicilik, stabilite, tekrarlanabilirlik ve düşük maliyet gibi faydaları bulunmakta ve klinik teşhisin HER2-ECD seviyelerinin invazif olmayan tespiti ve izlenmesi için güçlü bir potansiyel taşıdığını belirtmişlerdir (Sadeghi et al., 2022).

Vajhadin ve arkadaşları, yapılan çalışmada MXene'ler, önemli yüzey alanları ve benzersiz yüzey kimyası nedeniyle biyoalgılamada artan ilgi gören yeni bir iletken iki boyutlu malzeme sınıfıdır. Bu alandaki bir çalışma HER2 teşhisine yönelik olarak Vajhadin ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada altın elektrotlar, tümör hücrelerinin elektrokimyasal tespiti için yaklaşık 2 nm kalınlığında ve 1.5 um yanal boyutta MXene nanotabakalar ile modifiye edilmiştir. HER-2 pozitif hücreler için yüksek seçiciliğe sahip bir HB5 aptamer, elektrostatik etkileşimler yoluyla MXene katmanları üzerinde immobilize edilmiştir. HB5 ve HER-2 pozitif hücreler arasındaki güçlü bağlanma yoluyla HB5 ile birleştirilmiş manyetik nanohibritler $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{Ag}$ kullanılarak yüksek verimle manyetik hücre ayrımı yapılmıştır. Elektrokimyasal sito algılama, yakalanan hücreler ve işlevselleştirilmiş MXene nanosheets arasında sandviç benzeri yapıların oluşumu doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{Ag}$ nanohibritleri ve MXene nano tabakaları diğer farklı aptamerlerle işlevselleştirilmesiyle, bu

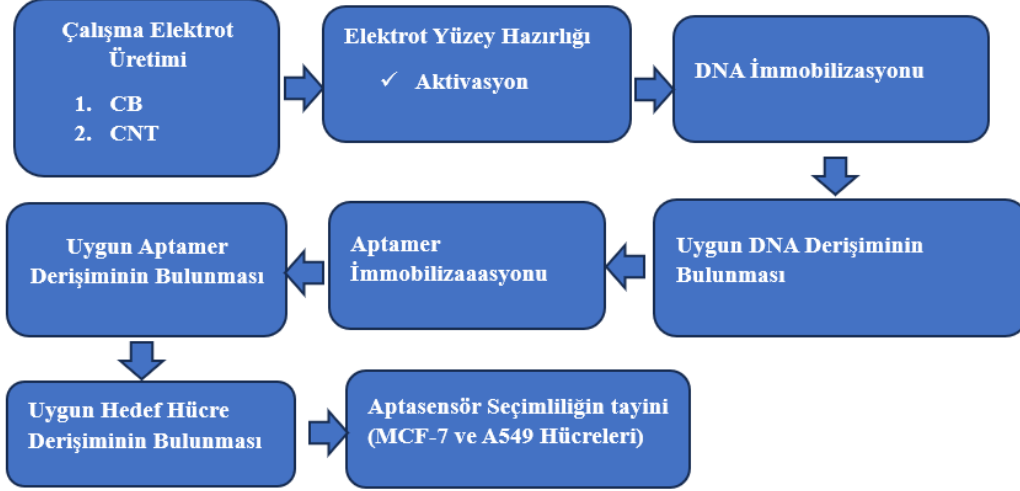
platformun farklı tümör hücrelerini tespit etmenin yanı sıra aynı zamanda hedeflenen bir ilacın dağıtımında da kullanılabileceği ifade edilmiştir(Vajhadin et al., 2022).

Zhou ve ark., kanser belirteci olan HER2'yi ve canlı MCF-7 hücrelerinin eser seviyelerinin belirlenmesi için aptamer bazlı bir analiz yöntemi üzerine çalışmışlardır. Bu yöntem, altın nanoparçacıklara (MnFePBA@AuNP) bağlı bir bimetalik MnFe Prusya mavisi analog (PBA) yapısının kullanımını içerir. MnFe PBA'nın nanoküplerden çeşitli elektrokimyasal aktivitelerle içi boş çekirdek-kabuk kürelerine dönüştürülmesi, AuNP'lerin kullanımı olarak ifade edilmiştir. MnFePBA ve MnFePBA@AuNP küreleri arasında, HER2 tayini için en yüksek immobilize edilmiş aptamer miktarı ve optimum elektrokimyasal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu, HER2'ye en iyi tayin verimini sağlamıştır (Zhou et al., 2019).

Bu çalışmada etiketli aptamer molekülü kullanılarak, kanserin HER2 üzerinden hızlı, ucuz, hassas ve seçimli tanısına yönelik nanomalzeme içerecek ve içermeyecek yapıda üç farklı türde elektrokimyasal DNA biyosensörleri geliştirilmiştir. Elektrokimyasal ölçümlerde kalem grafit elektrotlar sistemin optimizasyonu için tercih edilmiştir. Üç boyutlu yazıcı aracılığıyla üretilen PLA katkı maddeli CB ve CNT uygun tipte özgün elektrotlar da kanser tanısında kullanılmıştır. Geliştirilen sistemler düşük HER2 seviyesindeki değişimleri bile gösterecek hassasiyete sahiptir. Literatürde gerek üç boyutlu yazıcı ile özel tasarım 3D elektrot üretilerek HER2 tayininin elektrokimyasal olarak yapıldığı bir çalışma olmaması(nanomalzemeye dayalı olmadan), gerekse metilen mavisi (MB) etiketi kullanılarak ve CNT nanomalzemeye dayalı biyosensör ile HER2 tespitinin incelenmiş olmaması bu projenin özgün değeridir. Bu çalışma kapsamında HER2 analize yönelik olarak ilk defa özel tasarım 3D elektrotlar üretilmiş ve aptasensör tasarımında kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

HER2 üzerinden kanserli hücrenin analizi için geliştirilen elektrokimyasal nanobiyosensör temelli yöntemin detaylarına ilişkin şema Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada uygulanan yönteme ilişkin deneysel işlem basamakları

Bu çalışmada kalem grafit elektrotlar (PGE), 3D karbon siyahı (CB) ve karbon nanotüp (CNT) elektrotlar üretilerek kanserli hücre tanısı için kullanılmış ve eş zamanlı olarak birbirleriyle karşılaştırılarak tayin performansları değerlendirilmiştir. Yeni geliştirilen system için üretilen elektrotlardan elektrokimyasal olarak en iyi yanıtların alınmasını sağlamak amacıyla bir seri kimyasal/elektrokimyasal aktivasyon çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra algılayıcı birim yüzeyine DNA ve aptamer immobilizasyonu ve bu iki biyomolekül için uygun tayin koşullarının bulunması ve sonrasında da gerçek MCF-7 hücre örneklerinde HER2'nun tayini işlemleri gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen aptasensör sisteminin seçimli analiz yapabilme performansının araştırılmasında A549 hücresi kontrol hücresi olarak kullanılmıştır. A549, akciğer kanseri hücre hattı dizisidir. Hipotriploid alveolar bazal epitel hücrelerinden oluşmaktadır. Temel araştırma ve ilaç keşfi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hücre dizisi ilk olarak D. J. Giard ve arkadaşları tarafından 58 yaşındaki beyaz bir erkeğin eksplante edilen tümöründen akciğer karsinomu dokusunu çıkarıp kültürleyerek 1972'de

geliştirilmiştir (Synthego, 2023). A549 hücre hattı dizisinde HER2 seviyesi oldukça düşüktür (Suresh et al., 2020 ;Guan et al., 2014 ;Lattrich et al., 2008)

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Potansiyostat Cihazı: AUTOLAB (Metrohm)
- Kullanılan Cihaz Yazılımı GPES 4.9
- Otomatik Mikropipet (Eppendorf)
- pH metre (Inolab)
- Üçlü elektrot sistemi
- Kalem Grafit Elektrot (PGE): Rotring T 0.5 tombow HB model 0.5mm ucu ile çalışma elektrodu olarak kullanılır
- 3 boyutlu yazıcı (Crealty ender3)
- Karbon Siyahı (CB):3 boyutlu yazıcı ile üretilen çalışma elektrodu
- Karbon Nanotüp (CNT): 3 boyutlu yazıcı ile üretilen çalışma elektrodu
- Ag/AgCl (Referans elektrot)
- Yardımcı elektrot olarak kullanılan platin tel

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sodyum hidroksit (NaOH), glasiyel asetik asit (CH_3COOH) Merck (Darmstad, Almanya); N,N-Dimetilformamid (DMF) Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya), aseton Honeywell (Türkiye), karbon siyahı(CB) blackmagic firması protopasta filament ürünü (Amerika) ve karbon nanotüp (CNT) Filoalfa firması alfaohm isimli filament ürünü(İtalya) kullanıldı. Çalışmada kullanılan tampon çözeltiler hazırlandıktan sonra $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Tampon çözeltiler $18.2\text{ M}\Omega$ ultra saf su hazırlanmıştır. Deneyler oda sıcaklığında (23.0 ± 0.5) $^\circ\text{C}$ ' de gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

a) Tampon çözeltilerin hazırlanışı

Deneyde kullanılan tampon çözeltiler asetat tamponu (ABS), fosfat tamponu (PBS) ve Tween 20 eklenmiş fosfat tamponu (PBST) ile ilgili bilgiler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan tampon çözeltiler.

Tampon adı	İçeriği
Asetat tamponu (ABS)	20mM NaCl, 0,5M glasiyel asetik asit, pH 4,8
Fosfat tamponu (PBS)	20mM NaCl, 50mM fosfat (KH ₂ PO ₄ ve K ₂ HPO ₄), pH: 7,4
Fosfat tamponu + Tween 20 (PBST)	100mL PBS içinde 100µL Tween20, pH: 7,4

b) NaOH çözeltisi hazırlanışı

Elektrot aktivasyon işlemlerinde kullanılmak üzere 1M derişimde NaOH çözeltisi ultra saf su ile hazırlandı.

c) Aseton çözeltisinin hazırlanışı

Elektrot aktivasyon işlemlerinde kullanılmak üzere 4 mL saf asetona çözeltisi ve 1ml ultrapure su karıştırıldı.

d) Kullanılan DNA dizileri ve hazırlanışı

Bu çalışmada kullanılan çift iplikli yapıdaki liyofilize dsDNA balık sperm kaynaklı olup stok dsDNA çözeltisi 18.2MΩ iletkenlikteki ultra saf su ile oda sıcaklığında 1000 µg/mL derişiminde hazırlandıktan sonra -20°C’de muhafaza edildi. Deneyler sırasında 0.50M asetat tampon çözeltisi (ABS pH: 4.8) ile istenen derişimlere seyreltilerek kullanıldı.

Sentetik HER2-spesifik aptamer (Arya et al. 2018; Liu et al., 2012) liyofize toz halinde Heliks Biyoteknoloji (Türkiye) firmasından temin edildi. Metilen mavisi (MB) işaretli aptamere ilişkin baz dizilimi aşağıda verilmiştir.

HER2 Aptamer:

(5'-MB-(CH₂)₆-AAC CGC CCA AAT CCC TAA GAG TCT GCA CTT GTC
ATT TTG TAT ATG TAT TTG GTT TTT GGC TCT CAC AGA CAC
ACT ACA CAC GCA CA-3')

Sentetik aptamer dizisi 1000µg/mL derişimde olacak şekilde ultrasaf enjeksiyonluk su ile hazırlanmıştır. Deneyler sırasında uygun derişimde olacak şekilde seyreltilmiştir.

3.3. Kullanılan Yöntem

3.3.1. Çalışmada Kullanılan Elektrotların Hazırlanışı

Her bir CB ve CNT elektrot üretimi için Creality Ender 3 cihazı (Çin Halk Cumhuriyeti) kullanılmıştır. Cihazda kullanılan üretime ilişkin parametreler ortam koşullarına göre veya ürüne göre değişiklik göstermekle birlikte elektrot üretiminde stabil olarak test edilen aralıklar Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. 3D yazıcıda üretim için test edilen parametreler.

	3D Yazıcı için Dilimleme Programı Creality/cura Parametreleri
Katman yüksekliği	0.12-0.20 mm
Duvar kalınlığı	0.7 -1. 2 mm
Alt/üst kalınlık	0.70 -1.2mm
Üst katmanlar	7
Duvarlar arası boşluk	Her bölüm
Dolgu şekli	Kübik-ızgara-zigzag
Yazdırma sıcaklığı	195-210
Yapı levhası sıcaklığı	30-60
Akış	%80-100
Yazdırma hızı	45-50 mm/sn
Geri çekme mesafesi	0.8 mm/s

Geri çekme hızı	40 mm/s
Fan hızı	100%
Yüksekteki olağan fan hızı	0.36 mm
Oluşturma desteği	Yok
Yapı levhası türü	Etek

a) Kalem grafit elektrodun hazırlanışı

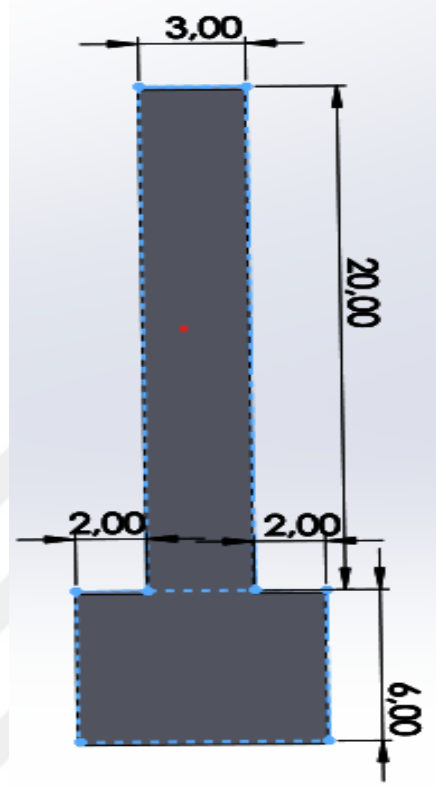
Elektrokimyasal üçlü elektrot deney düzeneğinde çalışma elektrodu(PGE) kullanılabilmesi 3cm ebatlarında kesilen Tombow marka 2B 0.5 mm kalem uçları (Japonya) hazırlandı. Daha sonra 1.4V 30sn potansiyel uygulanarak ABS tamponunda elektrokimyasal aktivasyon işlemi gerçekleştirildi.

b) Karbon siyahı (CB) elektrodun üretimi ve hazırlanışı

1.75 mm filament çapına sahip olan ürünün önceden Solidworks tasarım programında çizimi yapıldı ve daha sonra STL formatında kaydedildi. Daha sonra cura/creality programları ile STL formundaki tasarım uygun yazıcı parametrelerine göre düzenlenerek G koduna çevrildi. Son olarak bu bir USB ya da flash disk ile yazıcıya yüklenerek FDM tekniği ile katman katman ürünün üretimi tamamlandı. Bu elektrotta kullanılan filament katkı maddesi PLA ve karbon siyahı polimer yapıya sahiptir. Ürünün diğer PLA türevli katkı maddeli olanlardan farkı iletken özelliğe sahip olmasıdır. İlgili firmanın web sitesinde yer alan teknik özellikler kataloğundan alınan bilgilerine göre 3D baskılı parçaların katmanlara (z) karşı hacim direnci 115 ohm-cm özelliğine sahiptir. 10 cm uzunluğunda 1.75 mm filamentin direnci 2-3 kohm aralığına sahiptir (Protopasta, 2023).

Bu ürünün formu akışkanlığı yüksek olduğu için yazıcı nozzle sıcaklığı, tabla sıcaklığı, hızı vb. birçok parametre ürünün ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır.

Solidworks tasarımında ilk olarak yazıcı nozzle çapı 0.4 mm olduğu için buna uygun olabilecek en ince tasarım parametreleri dikkate alınmıştır. Yapılan tasarım şekil 3.2’de şekilde detaylı olarak gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Elektrot Tasarımı

Yukarıdaki tasarımda ölçüler mm cinsinden ifade edilmiştir. Buradaki ölçülere göre 1.2 mm’lik kalınlığın 3D yazıcıdan alınabilecek en stabil tasarım ölçüsü olduğu tespit edilmiştir. Daha düşük kalınlıktaki tasarımlarda üretilen ürünün deforme olduğu gözlenmiştir. Cihaz, her bir basımda 5’li olarak basım yapılabilmekte ve ortalama 15-20 dk aralığında bir üretim süresine sahiptir. Her bir elektrot 130 mg ağırlığına sahip olup maliyeti 1,05 TL olarak hesaplanmıştır.

c) Karbon nanotüp (CNT) elektrodun üretimi ve hazırlanışı

Karbon nanotüp elektrot ile ilgili tasarım da şekil 3.2’deki gibidir. Fakat bu malzemenin akışkanlığı daha az (viskozitesi yüksek) olduğu için 3D yazıcıdan cura/creality dilimleme programında ekstra parametre belirlenerek daha stabil üretimler yapıldı. Buradaki parametre ile stabil sonuçlar elde edildikten sonra

karbon siyahı elektrot ile ilgili de aynı parametreler uygulanarak sabit sonuçlar elde edildi.

Çalışmada kullanılan CNT elektrodun üretiminde kullanılan filament PLA türevli katkı maddesi içermektedir. İlgili firmanın web sitesindeki teknik özellikler katoloğundan alınan bilgilere göre içeriğindeki tabakalar boyunca yüzeyin elektriksel direnci 15 ohm-cm olarak belirtilmiştir. Katmanlara dik elektriksel direnci 20 ohm-cm sahiptir (Filoalfa, 2023). Her bir elektrot 130 mg ağırlığına sahip olup maliyeti elektrot başına 2,41 TL olarak hesaplanmıştır. Literatürde yapılan araştırmalara göre PLA katkılı CNT filamentin kesin bileşimi ve yapısı ticari sır olduğu için net olarak bilinmemekle birlikte SEM görüntülerinde incelenmesiyle CNT miktarı ~%2 olarak tahmin edilmektedir (Contreras-Naranjo, 2021).

3.3.2. Elektrotlara uygulanan aktivasyon türleri

a) ABS ile aktivasyon (elektrokimyasal aktivasyon)

3'lü elektrot sisteminde çalışma elektrodu olarak üretilen CB ve CNT elektrotlara ABS tamponu ile dolu olan elektrokimyasal hücrede sırasıyla 1.7V, 30sn ve 2.0V, 150 sn potansiyelleri DPV tekniği ile uygulanarak aktivasyonları gerçekleştirilmiştir. Farklı potansiyel ve süre uygulamalarıyla da elektrokimyasal aktivasyonlar gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.1). Daha sonra elektrot yüzeylerinden alınan ölçümlerde 0.6V-1.4V potansiyel aralığında tarama yapılarak +1.0V civarında herhangi bir gürültü veya kirlilik sinyali olup olmadığı izlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan biyomolekül DNA / aptamer olduğundan ve ölçümlerden biri guanin oksidasyon pikinin elde edildiği bölgede (+1.0V) yapılacağından zemin akım sinyali (background signal) her seferinde kontrol edilmiştir.

b) NaOH ile aktivasyon (kimyasal ve elektrokimyasal aktivasyon)

3'lü elektrot sistemi için çalışma elektrodu olarak üretilen CB ve CNT elektrotlara NaOH çözeltisi ile dolu olan hücrede 1.5V potansiyeli 120sn süreyle DPV tekniği ile uygulanarak aktivasyonları gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 0.6V-1.4V aralığında gerçekleştirilmiş ve guanin bazına ait oksidasyon pikinin elde edildiği bölgede zemin akım sinyali 3.3.2.a'da açıklandığı üzere her seferinde kontrol edilmiştir.

c) NaOH ile aktivasyon (Kimyasal aktivasyon 1)

CB elektrotlar 500µL hacimde NaOH çözeltisi içerisine daldırılarak 30dk bekletildi. Daha sonra her bir elektrot ultra saf su (UPW) ile yıkandı. İlgili zemin akım sinyali 3.3.2.a'da açıklandığı üzere kontrol edildi.

d) Aseton ile aktivasyon (Kimyasal aktivasyon 2)

CNT elektrotlarına aseton ile kimyasal aktivasyon işlemi için her bir CNT elektroda aseton içeren çözelti 10µL hacimde damlatma yoluyla uygulanarak kurutmaya bırakıldı. Kurutma işlemi bittikten sonra elektrotlar ultra saf su (UPW) ile yıkandı. Zemin akım sinyali 3.3.2.a'da açıklandığı üzere kontrol edildi.

3.3.3. DNA İmmobilizasyonu

CB ve CNT elektrotlara bölüm 3.3.2'de a maddesinde belirtilen aktivasyon yöntemi uygulandı. Daha sonra bu elektrot yüzeylerine 10ul hacimde ve 50 µg/ml konsantrasyonda ABS tampon(pH:4.77) içinde hazırlanan dsDNA yaklaşık 1 saat 30dk süreyle immobilize edilerek damlanın kuruması sağlandı. Daha sonra 2 kez ABS tamponu içerisine daldırma yapılarak yıkama yapıldı ve boş ABS tamponunda 0.6V-1.4V potansiyel aralığında DPV ile ölçümü alındı. Aynı DNA immobilizasyonu basamakları bölüm 3.3.2 b maddesinde belirtilen aktivasyonla aktive edilmiş elektrotlara da uygulandı.

3.3.4. DNA Konsantrasyonu Çalışması

CB ve CNT elektrotlara bölüm 3.3.2 a maddesinde belirtilen aktivasyon yöntemi uygulandı. Daha sonra bu elektrot yüzeylerine 10µl hacimde ve 20, 50 ve 100µg/mL konsantrasyonda ABS tampon (pH:4.8) içinde hazırlanan dsDNA yaklaşık 1saat 30dk süreyle immobilize edilerek damlanın kuruması sağlandı. Daha sonra 2 kez ABS tamponu içerisine daldırma yapılarak yıkama yapıldı ve boş ABS tamponunda 0.6V-1.4V potansiyel aralığında DPV ile ölçüm alındı.

PGE elektrot ile yapılan konsantrasyon çalışmalarında önce elektroda 1.4V potansiyel uygulanarak 30sn süreyle ABS tamponunda aktivasyon işlemi yapıldı. Daha sonra 20, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda DNA 1saat 30dk süreyle immobilize edildi. Daha sonra 2 kez ABS içine daldırılarak yıkandı. Sonrasında ise

boş ABS tamponuna daldırılarak 0.6V-1.4V potansiyel aralığında DPV ile ölçüm yapıldı.

3.3.5. Aptamer Konsantrasyonu

PGE elektrot ABS tamponu ile 1.4V 30sn potansiyel uygulanarak yüzeyi aktive edildi. Daha sonra ABS'de hazırlanan 2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 15µg/mL konsantrasyonlarda ve 20µL hacimde aptamer içeren viallerde 30dk süreyle bekletildi. Daha sonra 2 kez ABS içine daldırılarak yıkandı ve ardından DPV ile boş ABS'de ölçüm alındı. Ölçümlerde MB sinyali için (-0.10) ile (-0.75) V ve guanin sinyali için (+0.6) - (+1.4V) potansiyel aralıklarında tarama yapıldı. Bu testlerin devamında optimum konsantrasyon ve immobilizasyon süresi belirlendi. PGE ile bulunan sonuçlar referans alınarak CB ve CNT elektrotlara aptamer immobilizasyonunda aynı koşullar uygulandı.

3.3.6. Hücre Konsantrasyonu Çalışmaları

Çalışmamızda tayini yapılacak hücre olan MCF-7 (Meme kanseri hücresi) ve kontrol hücresi olan A549 (akciğer kanseri hücre hattı) Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda üretildi ve oradan temin edildi.

Tayin için en uygun hücre konsantrasyonunun bulunması için yapılan deneylerde ilk olarak PGE'ye 1.4V potansiyel 30 sn süreyle ABS tamponu ortamında uygulandı ve böylece aktivasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra her bir elektroda 10µg/mL konsantrasyonda aptamer 10-15 dk süreyle adsorbsiyon yoluyla immobilize edildi. Daha sonra PGE'ler yüzeyine immobilize olmamış fazla aptamerlerin uzaklaştırılması amacıyla 2 kez ABS içine daldırılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Diğer taraftan pellet halinde taze olarak hazırlanan MCF-7 hücresi mililitrede 6×10^6 sayıda olacak şekilde PBS tamponu ile hazırlandı (6×10^6 /mL derişimde) ve homojen olarak karıştırıldı (stok hücre çözeltisi). Deney sırasında istenen hücre miktarı 10^6 , 10^5 ve 10^3 olacak şekilde seyreltme yapılarak her bir vialde 20µL hacimde olacak şekilde dağıtıldı. Bu hücreler ve aptamer içeren PGE elektrotlar 1 saat boyunca 37 °C'de etkileştirildi. Daha sonra her bir elektrot PBST çözeltisi içeren her biri 20µL hacimde olan viallerde 5 dk boyunca bekletildi. Son

olarak her bir elektrot grubu taze PBS yıkama çözeltisi kullanılarak 10 kez daldırma yoluyla yıkandı. Elektrot yüzeyinde kuruma olmaması için ölçüme kadar her bir elektrot PBS çözeltisi içeren viallerde bekletildi. Sonra DPV ile hem guanin hem de metilen mavisi elektrokimyasal pik potansiyeli bölgelerinde elektrotlar ABS tamponuna daldırılarak ölçümler alındı (MB sinyali için (-0.10) ile (-0.75) V ve guanin sinyali için (+0.6) - (+1.4V) potansiyel aralıklarında).

3.3.7. Hücre Algılama Çalışmaları

Bu çalışmalarda kalem grafit elektroda 1.4V potansiyel uygulanarak 30 sn süreyle ABS tamponunda aktivasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra her bir PGE'ye 10µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde 10-15dk süreyle aptamer immobilize edildi. Her bir PGE elektrot 2 kez ABS içinde daldırılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra PBS içinde taze olarak hazırlanan 6×10^6 /mL'lik stok MCF-7 ve A549 (kontrol) hücrelerinin her biri 10^6 konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilerek viallere 20µL hacimde dağıtıldı. Aptamer-hücre etkileşimi 1 saat süreyle 37 °C'de gerçekleştirildi. Daha sonra her bir elektrot 20µL'şer hacimde PBST içeren viallerde 5 dk süreyle bekletildi. Son olarak da taze PBS ile 10 kez daldırma yapılarak yıkandı. Elektrotlar kuruma olmaması için boş PBS içeren viallere daldırılarak ölçüme kadar bekletildi. Elektrotlar daha sonra ABS tamponuna daldırılarak DPV ile hem guanin hem de metilen mavisi elektrokimyasal pik potansiyeli bölgelerinde sinyal ölçümleri yapıldı.

3D elektrotlardan CB elektrot 3.3.2 c ve CNT elektrot ise 3.3.2 d'de belirtildiği gibi aktive edildi. Daha sonra PGE elektrotta olduğu gibi 10µg/mL konsantrasyonda 10µL hacimde aptamer çözeltisi damlatılarak 20 dk boyunca immobilizasyon sağlandı. Daha sonra her bir elektrot 2 kez ABS tamponuna daldırılarak yıkandı. Hücre miktarı 10^6 olacak şekilde, bu deneylerde kullanılan MCF-7 ve A549 hücreleri seyreltilti. Daha sonra CB ve CNT elektrot yüzeylerine 10µL hacimde damlatılarak 25 dk süreyle aptamer-hücre etkileşimi sağlandı. Etkileşimden sonra elektrot yüzeyleri taze hazırlanmış PBS ile 2 kez daldırma yoluyla yıkandı. Elektrotlar daha sonra ABS tamponuna daldırılarak DPV ile hem guanin hem de metilen mavisi elektrokimyasal pik potansiyeli bölgelerinde sinyal

ölçümleri yapıldı. (MB sinyali için (-0.10) ile (-0.75) V ve guanin sinyali için (+0.6) - (+1.4V) potansiyel aralıklarında).

3.3.8 Elektrot yüzeylerinin Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu

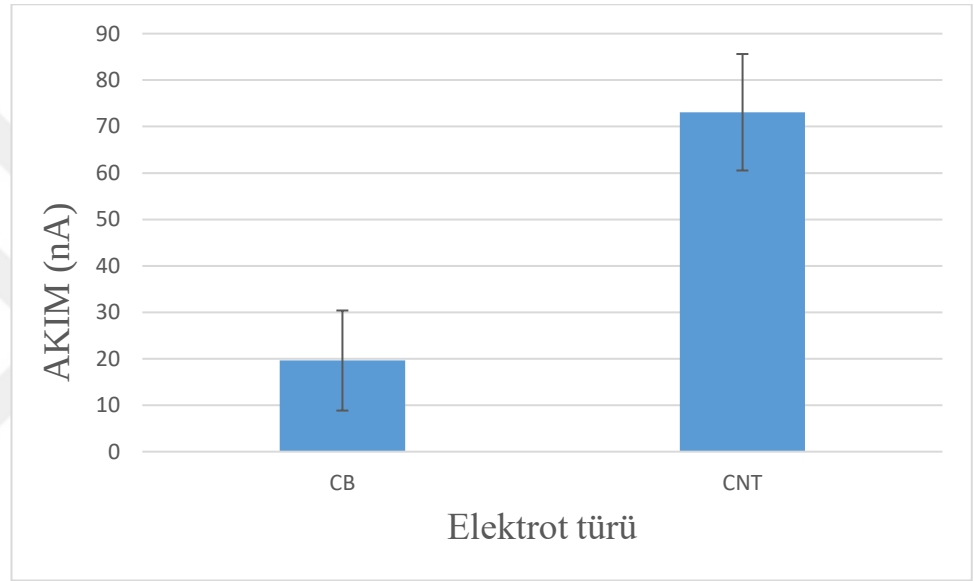
Bu işlemde Ege Üniversitesi MATAL laboratuvarında yer alan Thermo Scientific Apreo S model SEM cihazı kullanıldı. Yalın PGE, 3D CB ve 3D CNT elektrotlar ve aptamer modifiye edilen PGE, 3D CB ve 3D CNT elektrotları ile hızlandırma potansiyeli 5 kV ve çözünürlük 50 μm ve 5 μm olarak elde edilen SEM görüntüleri değerlendirildi ve elektrot yüzeyleri karakterize edildi.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

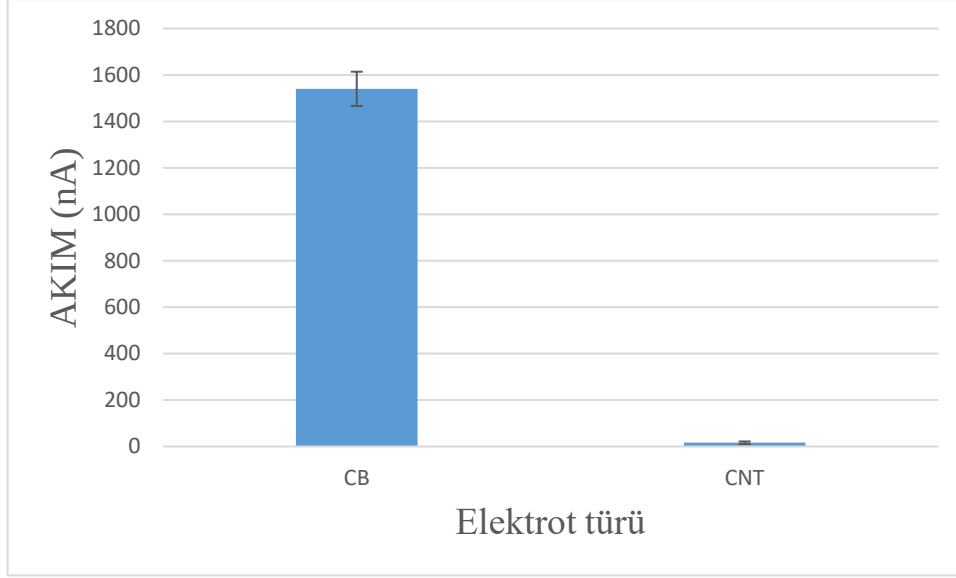
4.1. CB ve CNT Elektrot Aktivasyonlarına İlişkin Bulgular

CB ve CNT elektrotlarının yüzey aktivasyonu için bölüm 3.3.2. a ve b’de verildiği gibi ilk olarak ABS tamponu ve NaOH çözeltisi kullanıldı. ABS tamponu ve NaOH çözeltisiyle gerçekleştirilen aktivasyon işlemlerinden sonra yaklaşık +1.0V civarında elde edilen gürültü sinyallerine ilişkin histogramlar Şekil 4.1’de ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. CB ve CNT elektrot için ABS tampon ile aktivasyondan sonra yaklaşık 1.0 V civarında elde edilen gürültü sinyallerine ilişkin voltamogram

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi CB çalışma elektroduna ABS tamponunda aktivasyon yapıldıktan sonra ölçülen guanin pik bölgesinde elde edilen gürültü sinyali değerlerin ortalama değeri 20nA elde edilmiştir. CNT elektrodunki ise ortalama 72nA’dır.



Şekil 4. 2 CB ve CNT elektrot için NaOH çözeltisi ile aktivasyondan sonra yaklaşık 1.0V civarında elde edilen gürültü sinyallerine ilişkin voltamogram

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi elektrokimyasal hücrede NaOH çözeltisi içine daldırılan CB ve CNT elektroduna 1.5V 120sn potansiyeli uygulanıp aktive edildikten sonra guanin pik bölgesinde elde edilen gürültü sinyali değerlerinin ortalama değeri CB elektrot için 1520 nA olarak elde edilmiştir. CNT elektrot içinse ortalama değer 80 nA’dır.

Sonraki deneyler için Şekil 4.1. ve 4.2. de görülen aktivasyon koşullarının Şekil 4.2.’deki CB elektroda ait yüksek gürültü sinyali bulgusu haricinde uygun olduğu değerlendirilmiştir. Fakat ilerleyen deneylerde, hem ABS tamponu hem de NaOH çözeltisi ile yapılan aktivasyon sonrasında bu yüzeylere eğer DNA (veya aptamer) immobilize edilirse yüksek gürültü sinyali (zemin sinyali) meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle yeni aktivasyon koşullarının bulunmasına yönelik bölüm 4.5’te detayları verilen deneyler gerçekleştirilmiştir.

Farklı aktivasyon koşullarında guanine ait pik bölgesinde elde edilen gürültü sinyallerine ait veriler Tablo 4.1’de verilmiştir. Bu tablodaki verilere göre CB ve CNT elektrotlara uygulanan aktivasyon işlemleri sonrasında 200 nA ve altındaki gürültü sinyali büyüklükleri deneyler için kabul edilebilir olarak değerlendirilmiştir. Bulunan uygun koşullar daha sonra DNA immobilizasyonu sonrasında da gürültü sinyali açısından tekrar test edilmiştir. Ek olarak ABS

tamponu ve NaOH çözeltisi ile gerçekleştirilen aktivasyonlar sonrasında Metilen Mavisi(MB) pik bölgesinde de gürültü sinyali olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Tablo 4.1. Farklı aktivasyon koşullarında guanine (G) ait pik bölgesinde elde edilen gürültü sinyalleri.

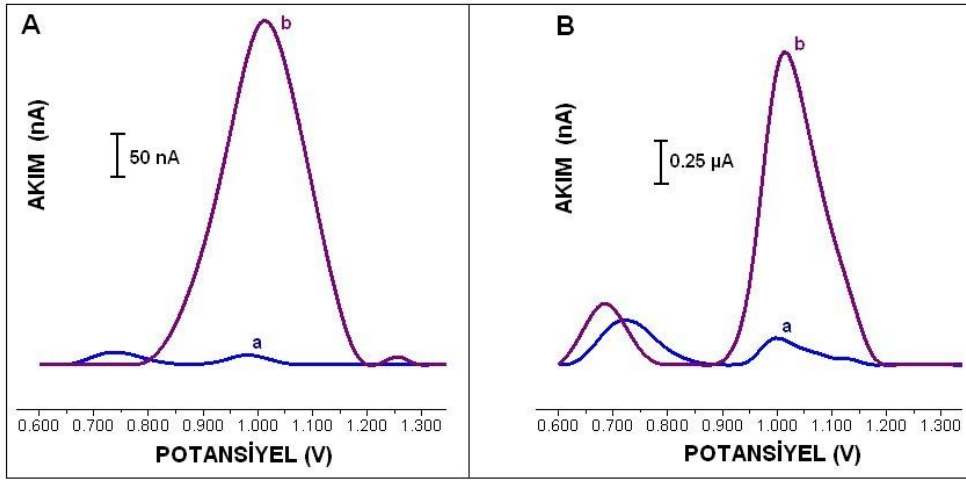
	Elektrokimyasal Aktivasyon (ABS)	
	Guanin Pik Bölgesi	
Koşul	CB	CNT
1.6V 60sn	-	0,906 nA
1.4V 120sn+1.6V 60sn	-	13,7 nA
2V 60sn	-	714 nA
1.4V 60sn +1.6V 60sn	13.3 nA	108 nA
1.8V 120sn	-	715 nA
1.6V 120sn + 1.8V 60sn	-	683 nA
2V 120sn	-	184 nA
1.8V 60sn + 2V 120sn	-	86 nA
2V 180sn	-	109 nA
1.7V 30sn + 2V 150sn	5.56 nA	166 nA
1.5V 180sn	-	220 nA
2V 120sn+1.8V 60sn	-	169 nA
2V 180sn	2.05 nA	67 nA
1.8v 60sn+ 2v 120sn	9.24 nA	70.3 nA
2v 120sn	10 nA	429 nA
	Kimyasal ve elektrokimyasal aktivasyon (NaOH)	
	CB	CNT
1.5V 120sn	1557 nA	12,70 nA
1.7V 30sn + 2V 150sn	1810 nA	58,9 nA

Tablo 4.1’de verilen aktivasyon koşullarından bazılarının gürültü sinyalinin az olması bakımından uygun olduğu değerlendirilse de deneyler tekrarlandığında hem CB hemde CNT elektrot için elektrokimyasal 1.7V 30sn + 2V 150 sn ABS koşulunun en uygun ve tekrarlanabilir olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber ilerleyen bölümlerde açıklanacağı üzere DNA immobilizasyonu sonrasında Şekil

4.4 ve Şekil 4.5'te gösterildiği gibi halen zeminden gelen gürültü sinyali engellenemediği için bölüm 4.5'te verilen gürültü sinyalinin engellenmesine yönelik yeni aktivasyon koşullarında deneyler gerçekleştirilmiştir.

4.2. 3D Elektrotlara DNA İmmobilizasyonu ile İlgili Bulgular

Elektroda dsDNA immobilizasyonu bölüm 3.3.3'teki gibi gerçekleştirildi. CB ve CNT elektrot yüzeyine 20, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ DNA immobilizasyonu ile en yüksek yanıt 50 $\mu\text{g/mL}$ de alınmıştır. 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dsDNA konsantrasyonda DNA immobilize edilen CB ve CNT elektrotlar Şekil 4.3'te kıyaslanmıştır.

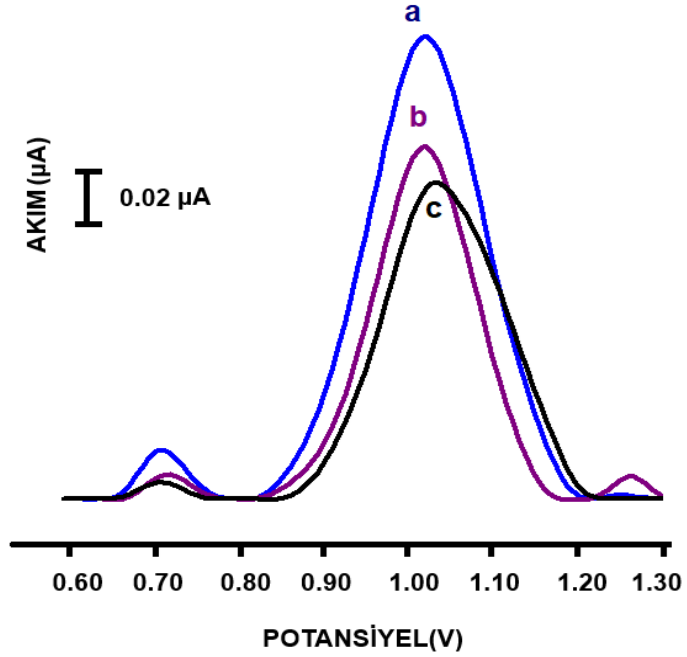


Şekil 4. 3 Yalın(CB) (A) ve nanomalzeme modifiyeli elektrottan(CNT) (B) DNA immobilizasyonu öncesinde (A, a ve B, a) ve sonrasında (A, b ve B, b) elde edilen guanin sinyallerine ait pikleri gösteren voltamogram.

Şekil 4.3'ten elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde yalın elektrotta DNA immobilizasyonu sonrasında 400nA'e varan bir sinyal elde edilmiştir. Benzer şekilde CNT modifiye elektrotla DNA immobilizasyonu sonrasında ise yaklaşık 2 μA düzeyinde yanıt elde edilmiştir. Bu bulgular her iki 3D elektroda da DNA immobilizasyonu gerçekleştirildiğini göstermektedir. Fakat nanomalzeme modifiye elektrotla yalın elektroda göre yaklaşık 5 kat daha fazla miktarda DNA immobilize edildiği tespit edilmiştir.

Şekil 4.4'te CB elektrot yüzeyine DNA immobilizasyonu öncesinde ve sonrasında diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak elde edilen guanin sinyallerine ilişkin voltamogram gösterilmiştir. Burada ABS ile 3.3.2

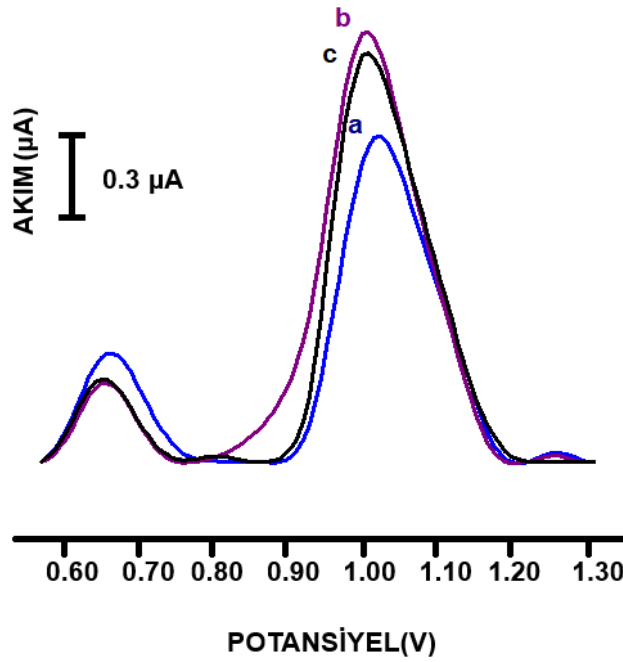
a’da verilen elektrokimyasal aktivasyon işlemi sonrasında önce kontrol amaçlı olarak DNA içermeyen ABS tamponu ile yüzey etkileştirilmiş (Şekil 4.4.c) ve tamponun elde edilen sinyal üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Daha sonra ABS’de hazırlanan DNA çözeltisi ile CB elektrot yüzeyi etkileştirildiğinde DNA’dan kaynaklı guanin piki elde edilmiştir (Şekil 4.4.a ve b). Elde edilen bulgulara göre, yüzeyine kontrol amaçlı olarak sadece ABS immobilizasyonu yapılan elektrottan elde edilen yanıt ve DNA immobilizasyonu sonrası elde edildiren yanıtların birbirine çok yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden bu koşullarda matriksin guanin sinyali üzerine olan yüksek girişim etkisinden dolayı (zemin sinyalinin büyüklüğü nedeniyle) DNA analizinin yapılması mümkün değildir. Yüksek miktarda arka plan/gürültü sinyali olarak adlandırılabilcek bir sinyal elde edildiği için gürültü sinyalini engellemek için bir seri çalışma gerçekleştirilerek bölüm 4.5’te sunulmuştur.



Şekil 4. 4 CB elektrot yüzeyine DNA immobilizasyonu öncesinde(c) ve sonrasında (a,b) diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak elde edilen guanin sinyaline ait voltamogram. Deneysel koşullar: potansiyel tarama aralığı +0.60 V ile +1.40 V, tarama hızı 16 mV/s ve amplitüt 50 mV.

Şekil 4.5’te CNT 3D elektrot yüzeyine DNA immobilizasyonu öncesinde ve sonrasında DPV tekniği kullanılarak elde edilen guanin sinyallerine ait voltamogram verilmiştir. Burada ABS ile 3.3.2 a’da verilen elektrokimyasal

aktivasyon işlemi sonrasında yine önce kontrol amaçlı olarak DNA içermeyen ABS tamponu ile yüzey etkileştirilmiş (Şekil 4.5.c) ve tamponun elde edilen sinyal üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Daha sonra ABS’de hazırlanan DNA çözeltisi ile CNT elektrot yüzeyi etkileştirildiğinde DNA’dan kaynaklı guanin piki elde edilmiştir (Şekil 4.5 a ve b). Elde edilen bulgulara göre, CNT elektrotta da yüzeyine kontrol amaçlı olarak sadece ABS immobilizasyonu yapılan elektrottan elde edilen yanıt ve DNA immobilizasyonu sonrası elde edilen yanıtların birbirine çok yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden bu koşullarda matriksin guanin sinyali üzerine olan yüksek girişim etkisinden dolayı DNA analizinin yapılması mümkün değildir. Yüksek miktarda zemin sinyali elde edildiği için gürültü sinyalinin yok edilmesi amacıyla CNT elektrotla bir seri çalışma gerçekleştirilerek bölüm 4.5’te sunulmuştur.

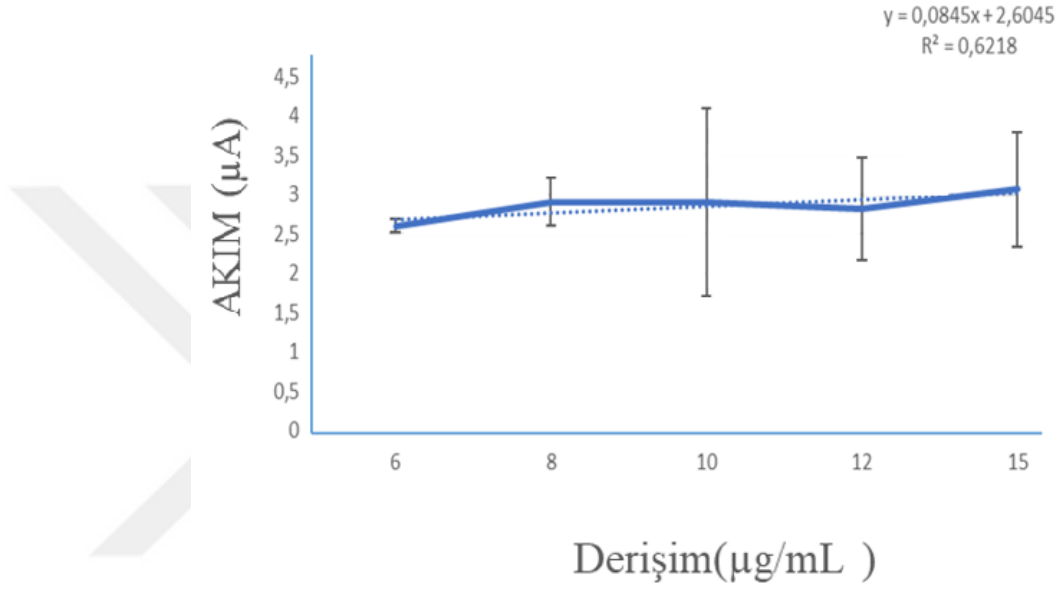


Şekil 4. 5 CNT elektrot yüzeyine DNA immobilizasyonu öncesinde(c) ve sonrasında (a,b) diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak elde edilen guanin sinyali ait voltamogram. DeneySEL ölçüm parametreleri Şekil 4. 4’teki gibidir.

4.4. Aptamer Konsantrasyon Çalışmasında Elde Edilen Bulgular

4.1.1 PGE

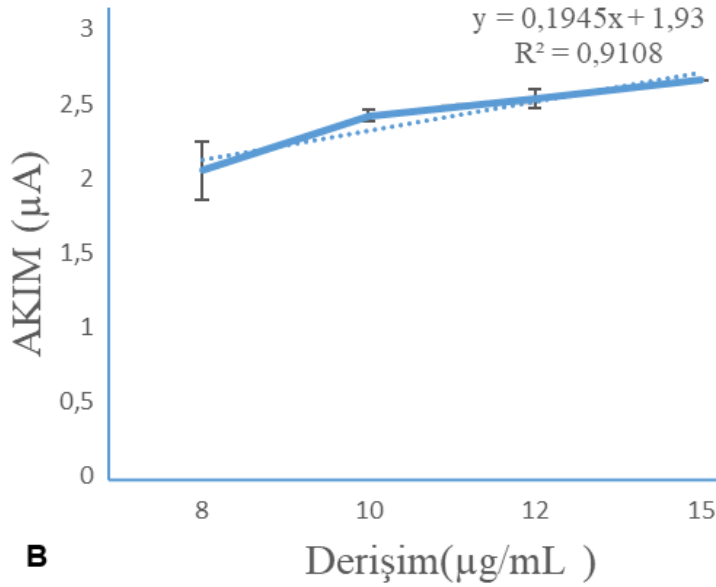
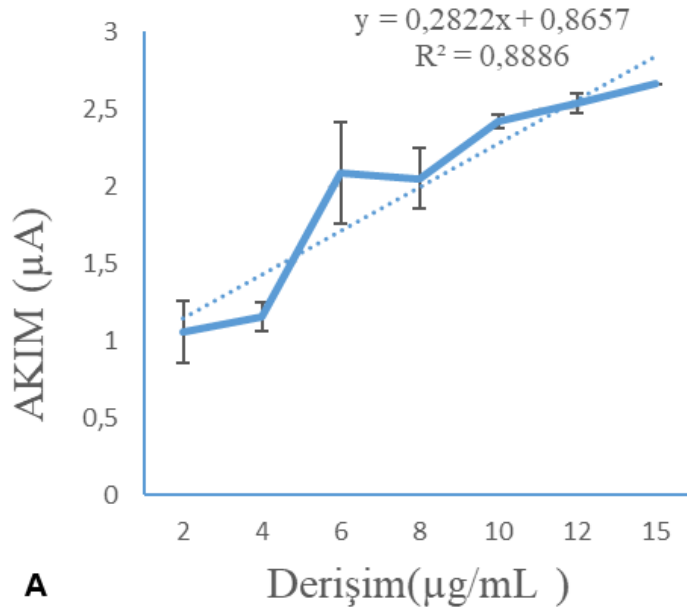
Deneyler bölüm 3.3.5'teki gibi uygulandı. PGE elektrot yüzeyine artan derişimlerde aptamer immobilizasyonu ile elde edilen metilen mavisi (MB) yanıtları Şekil 4.6'daki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4. 6 PGE elektrot yüzeyine artan derişimde aptamer immobilizasyonu sonrasında DPV tekniği kullanılarak elde edilen MB yanıtlarına ilişkin kalibrasyon grafiği.

Şekil 4.6'de aptamer konsantrasyonu arttıkça metilen mavisi (MB) sinyalinde meydana gelen sınırlı miktardaki artışlar görülmektedir. Grafikte 10µg/ml konsantrasyonundan sonra standart sapma değerlerinin de artış gösterdiği izlenmektedir. Bu yüzden metilen mavisi (MB) bölgesindeki verilerden en uygun aptamer konsantrasyonu belirlemek standart sapma değerleri yüksek olduğu için mümkün olmamıştır. Bu durum elektroaktif işaret molekülünün elektrot yüzeyinde hızlı doygunluğa ulaştığı şeklinde değerlendirilmiştir.

PGE elektrot yüzeyine artan derişimlerde aptamer immobilizasyonu ile elde edilen guanin yanıtları ise Şekil 4.7'deki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4. 7. PGE elektrot yüzeyine artan derişimde aptamer immobilizasyonu sonrasında DPV tekniğı kullanılarak elde edilen guanin yanıtlarına ilişkin kalibrasyon grafikleri A) Tüm değerler, B) Eğrinin doğrusal kısmı.

Şekil 4.7’de aptamer konsantrasyonu arttıkça guanin sinyalinde meydana gelen artış miktarları görülmektedir. Eğrinin doğrusal kısmı Şekil 4.7. B’de verilmiş olup 10 $\mu\text{g/mL}$ değerinden sonra belirgin bir sinyal artışı izlenmemiştir. Grafikte

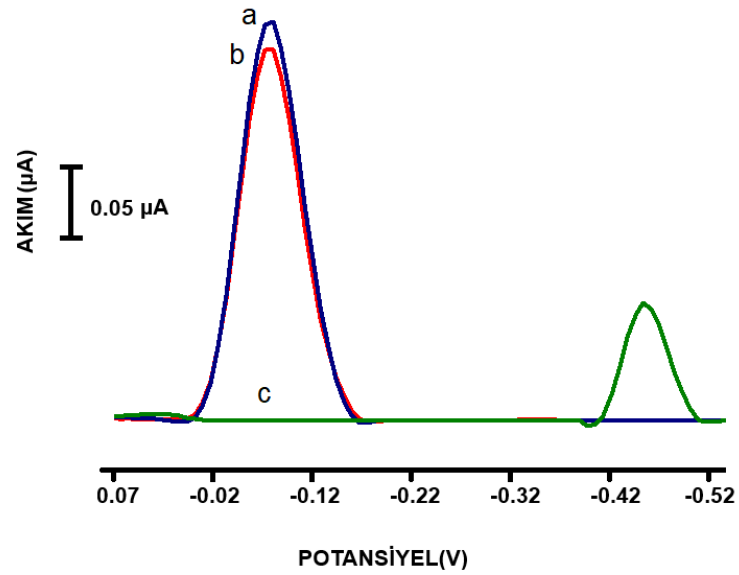
ayrıca bu derişimde standart sapma değerlerinin de düşük olduğu görülmektedir. Bu nedenle aptamer immobilizasyonu için en uygun konstanrasyonu 10 g/mL olarak belirlenmiş ve aptamer-hücre algılama çalışmalarında bu değer kullanılmıştır.

4.5. CB ve CNT Elektrot Yüzeylerine Aptamer İmmobilizasyonu ve Gürültü (Zemin/Girişim) Sinyalinin  nlenmesi çalışmalarında Elde Edilen Bulgular

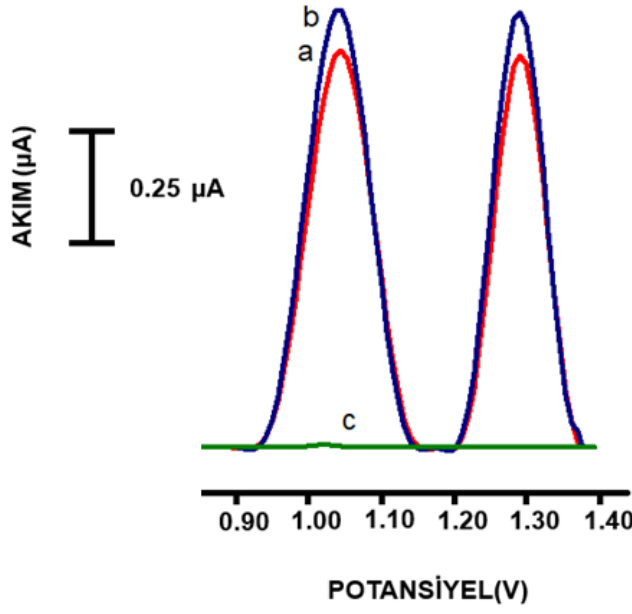
CB ve CNT elektrotlara uygulanan kimyasal aktivasyonlar ile gürültü sinyalinin  nlenmesine yönelik deneyler bölüm 4.5.1 ve 4.5.2’de detaylandırılmıştır.

4.5.1 CB Elektrot ile kimyasal aktivasyon 1 sonrasında elde edilen bulgular

şekil 4.8 ve şekil 4.9’da kimyasal aktivasyon 1 işlemi sonrasında elektrot yüzeyinden elde edilen sırasıyla MB ve guanin piklerine ait voltamogramlar verilmiştir.



şekil 4. 8 CB elektrot yüzeyine aptamer immobilizasyonu öncesinde(c) ve sonrasında(a,b) diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak elde edilen MB sinyaline ait voltamogram. Deneysel  l  m parametreleri şekil 4. 4’teki gibidir.



Şekil 4. 9 CB elektrot yüzeyine aptamer DNA immobilizasyonu öncesinde(c) ve sonrasında(a,b) DPV tekniği kullanılarak elde edilen guanin sinyaline ait voltamogram. DeneySEL ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.

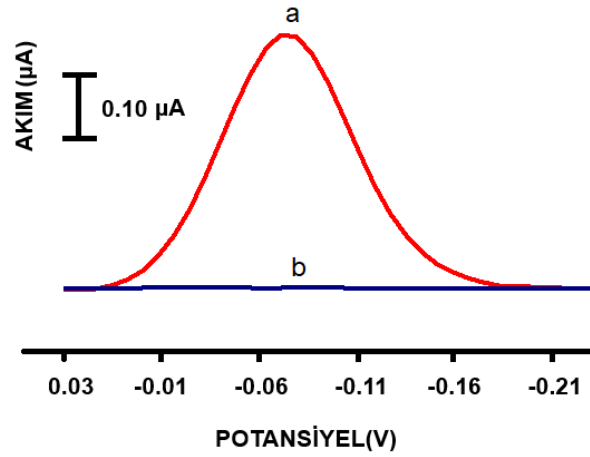
CB elektrotla gerçekleştirilen deneylerde, hem MB hem de guanine özgü voltametrik sinyal bölgesinde elektrot yüzeyinden elde edilen sinyalin aptamere ait olup olmadığının kontrolü amacıyla ölçülen boş ABS tamponundan belirgin bir sinyal elde edilmemiştir (Şekil 4.8. ve 4.9. c). Öte yandan ABS tamponunda belirli derişimde hazırlanan aptamer ile CB elektrot yüzeyi immobilize edildikten sonra alınan ölçümlerde her iki sinyal bölgesinde iyi tanımlı ve tekrarlanabilir pikler elde edilmiştir (Şekil 4.8. ve 4.9. a,b). Pik yüksekliği MB bölgesinde yaklaşık $0.15\mu\text{A}$ ve guanin bölgesinde yaklaşık $0.56\mu\text{A}$ olarak gözlenmiştir ($n=3$). Bu bulgular doğrultusunda aptamer immobilizasyonunun hem MB hem de guanin sinyali üzerinden tayin edildiği sonucuna ulaşılmıştır. Kimyasal aktivasyon 1 işlemi ile 3D CB elektrot kullanılarak analizlerin gürültü sinyalinin bozucu etkisi olmadan gerçekleştirilebileceği bulunmuştur.

Literatürde Stefano ve arkadaşlarının zımpara kağıdı ile PLA katkılı karbon siyahı yüzeyini cilalayarak 0.5M NaOH çözeltisi içerisinde 200 saniye boyunca $+1.4\text{ V}$ ve ardından 200 saniye boyunca -1.0 V potansiyel uygulanarak yaptıkları aktivasyon işlemi hakkında bir çalışmaya rastlanmıştır (Stefano et al., 2022). Bu tez

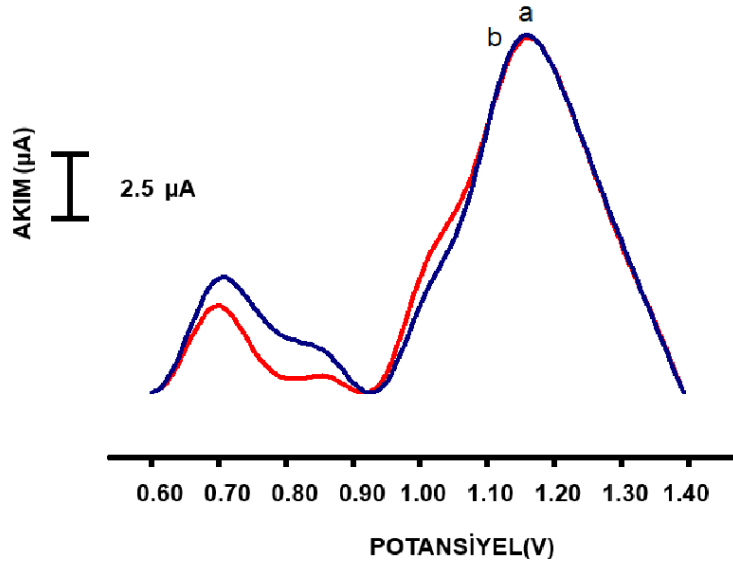
çalışmasında da benzer bir uygulama 1M NaOH çözeltisi ile kimyasal aktivasyon 1’de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. CB elektrot yüzeyinden yine PLA uzaklaştırılarak aktivasyon tamamlanmış ve daha sonra damlatma yöntemi (Arıksoysal,2019) ile elektrot yüzeyine aptamer immobilize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, CB elektrot içeren biyosensörlerle gerçekleştirilecek DNA analizleri için elektrokimyasal aktivasyon yerine kimyasal aktivasyon işleminin uygulanması gerektiğini göstermiştir.

4.5.2 CNT Elektrot ile kimyasal aktivasyon 2 sonrasında elde edilen bulgular

Şekil 4.10 ve 4.11’de kimyasal aktivasyon 2 sonrasında elektrot yüzeylerinden elde edilen sırasıyla metilen mavisi(MB) ve guanin(G) piklerine ait voltamogramlar verilmiştir.



Şekil 4. 10 CNT elektrot yüzeyine aptamer DNA immobilizasyonu öncesinde(b) ve sonrasında(a) DPV tekniği kullanılarak elde edilen MB sinyaline ait voltamogram. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4’teki gibidir.



Şekil 4. 11 CNT elektrot yüzeyine aptamer DNA immobilizasyonu öncesinde(b) ve sonrasında(a) DPV tekniği kullanılarak elde edilen G sinyaline ait voltamogram. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.

Şekil 4.10'da kimyasal aktivasyon 2 işlemi uygulanan CNT elektroda aptamer immobilizasyonu öncesinde yüzeyde sadece ABS tamponu varken (Şekil 4.10. b) ve aptamer immobilizasyonu sonrasında (Şekil 4.10. a) elde edilen MB yanıtları görülmektedir. Şekil 4.11'da ise aynı işlemlerden geçen diğer grup CNT elektrotlarla guanin pik potansiyel bölgesinde yapılan ölçümlerden elde edilen bulgular verilmiştir. Voltamogramda CNT elektroda aptamer immobilizasyonu öncesinde yüzeyde sadece ABS tamponu varken (Şekil 4.11. b) ve aptamer immobilizasyonu sonrasında (Şekil 4.11. a) elde edilen guanin oksidasyon sinyali yanıtları görülmektedir.

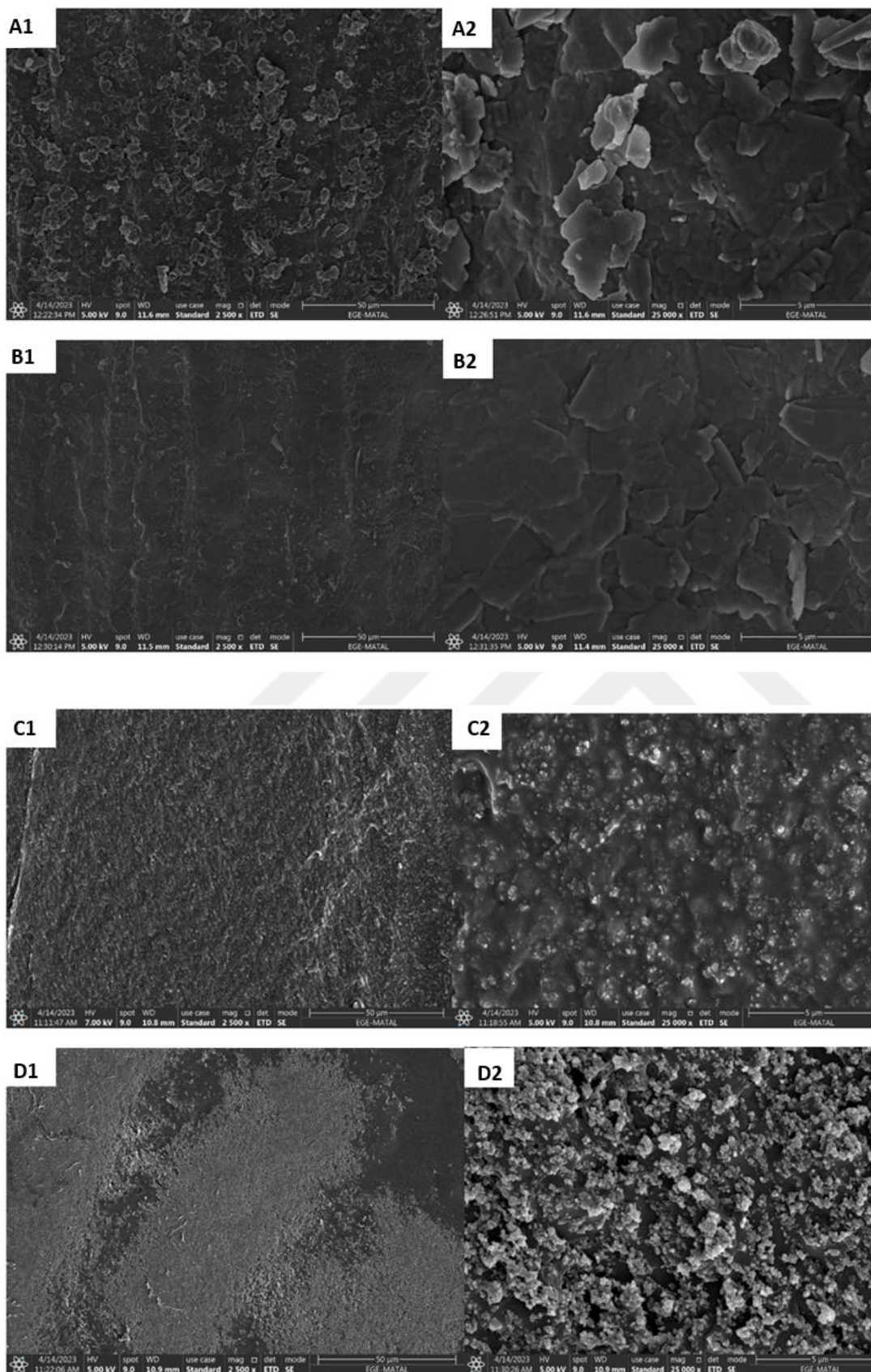
Elde edilen bulgulara göre Şekil 4.10'da aptamer immobilizasyonu sonrasında (Şekil 4.10. a) voltamogramda -0,10V civarında yaklaşık 0.43 μA 'lık bir MB sinyali elde edilmiştir. Aynı zamanda voltamogramda aptamer varlığı ve yokluğunda (Şekil 4.10. b) elde edilen sinyaller arasında belirgin bir farklanma olmuştur. Öte yandan, Şekil 4.11'de ise aynı işlemlerden geçen elektrotla alınan guanin oksidasyon sinyalleri aptamer varlığında (Şekil 4.11. a) ve yokluğunda (Şekil 4.11. b) durumları için kıyaslandığında iki yanıt arasında neredeyse fark olmadığı, hatta aptamer yokluğunda yüksek bir gürültü sinyalinin olduğu tespit

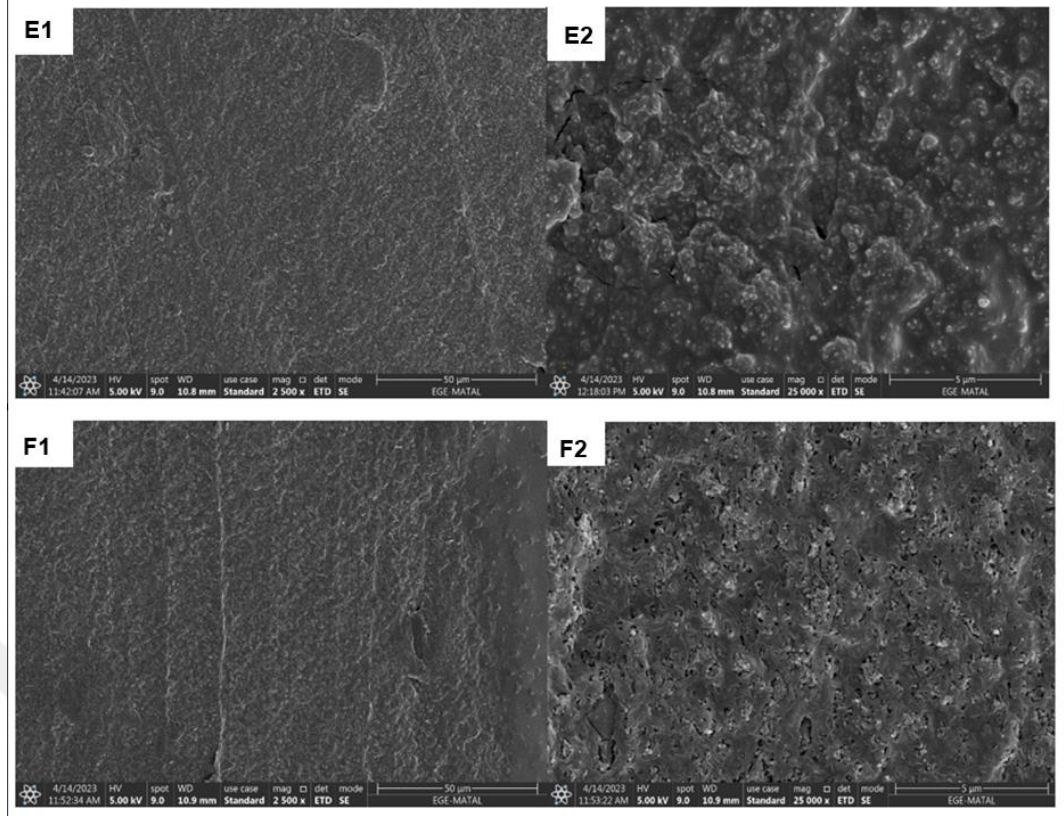
edilmiştir (Şekil 4.11. b). Bu bulgu doğrultusunda aptamer immobilizasyonunun guanin sinyali üzerinden tayin edilemediği sonucuna ulaşılmıştır. Bu aktivasyon işlemi ile 3D CNT elektrot kullanılarak sadece MB sinyal bölgesinde çalışılabileceği bulunmuştur.

Literatürde yapılan diğer bir çalışmada ise 3D CNT elektrot ile ilgili elektrot yüzey direncini azaltmak ve elektrot yüzeyinden PLA'yı uzaklaştırmak için dimetil formamid (DMF) kimyasal işlemi uygulanmıştır (Contreras-Naranjo, 2021). Tez çalışmasında ise CNT elektrot yüzeyinden PLA uzaklaştırmak için kimyasal aktivasyon 2 yöntemi ile MB sinyali bölgesinde DNA tayinin yapılabirliği gösterilmiştir. Shieh ve arkadaşları ise asitle işlenmiş CNT'lerin 0.2mg'ını, bir şişe içerisindeki 4ml asetona veya farklı pH'a sahip suya ilave ederek 5dk sonikasyon uygulanmışlardır. Bu işlemler, grafen duvarındaki çift bağların oksidasyonu yoluyla CNT'lerin yüzeyinde karboksilik asit grupları (-COOH) ve/veya hidroksil grupları (-OH) üretmekte olduğunu göstermişlerdir (Shieh ve ark., 2007). Bu tez çalışmasında asetonla gerçekleştirilen aktivasyon işlemi için damlatma yöntemi (Arıksoysal, 2019) uygulanmış ve analiz için uygun aktivasyon koşulu olduğuna karar verilmiştir. CNT yüzeyinde belirgin ve gürültüsüz bir MB sinyali elde edilmesi için karboksilik asit grupları oluşturma'nın etkisi Shieh ve arkadaşlarının çalışmasıyla desteklenebilir (Shieh ve ark., 2007).

4.6. Elektrot Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu(SEM) ile Karakterizasyonu

Görüntüleme için Yöntem 3.3.8'de anlatıldığı gibi işlemler yapıldı. Karakterizasyon deneylerinde yalın PGE, 3D CB ve 3D CNT elektrotlar ve aptamer modifiye edilen PGE, 3D CB ve 3D CNT elektrotlara ait Thermo Scientific Apreo S taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen bulgular 4.12'de verilmiştir.





Şekil 4. 12 Elektrot yüzeyleri aptamer immobilizasyonu öncesi ve sonrasına ait SEM görüntüleri; çözünürlük bilgileri: A1, B1, C1, D1, E1, F1 50 µm ve A2, B2, C2, D2, E2, F2 5 µm A) Yalın PGE, B) PGE/Aptamer, C) CB, D) CB/Aptamer, E) CNT, F) CNT/Aptamer.

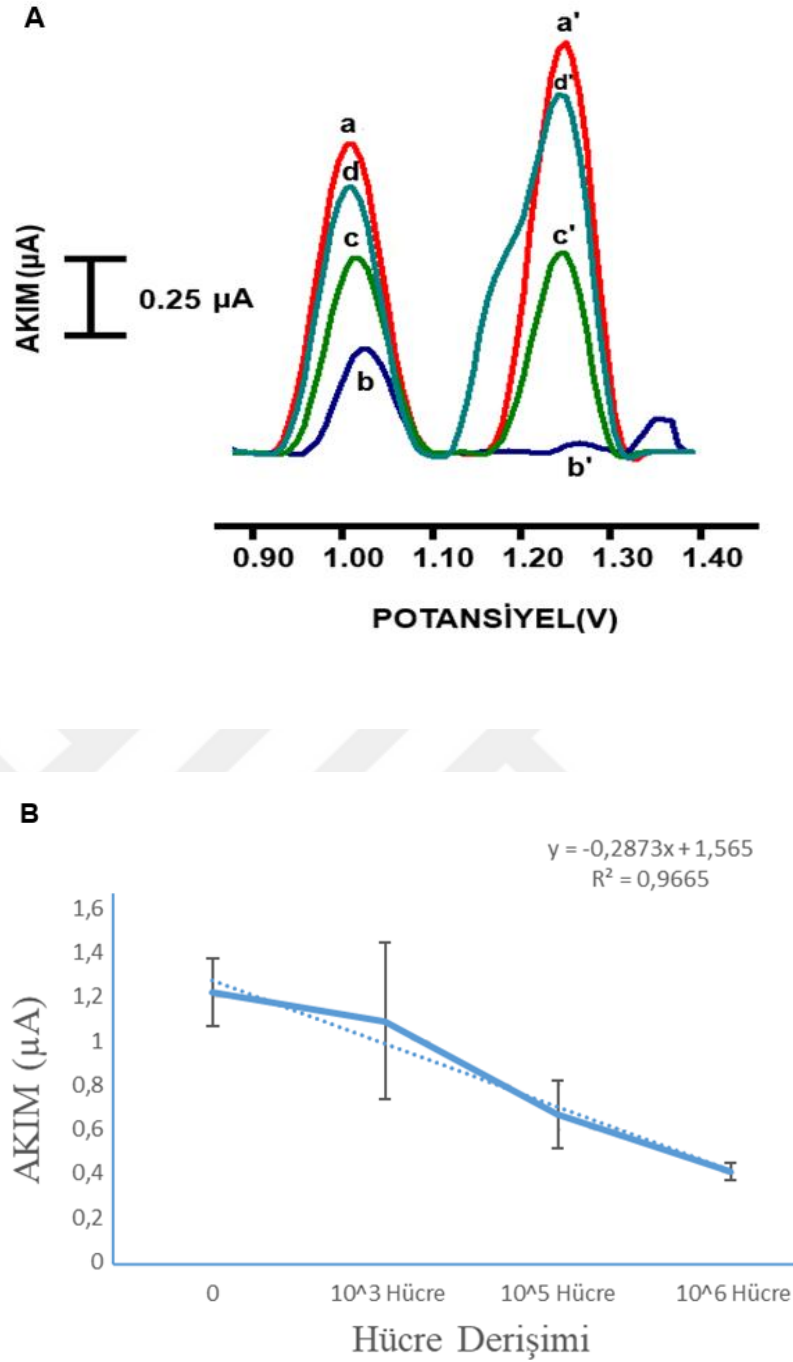
Hızlandırma potansiyeli 5 kV ve çözünürlük 50 µm ve 5 µm olarak elde edilen SEM görüntülerinde ilk olarak yalın PGE (A) yüzeyinin yalın 3D CB (C) ve yalın 3D CNT (E) yüzeyleri ile karşılaştırılması yapılmıştır. Buna göre PGE elektrot yüzeyinin tabakalı bir yapısı olduğu, CB elektrot yüzeyinin topografik olarak tepe ve çukurlar içerdiği, CNT elektrodun da tepe ve çukur bölgeler içeren daha geniş tabakalı görünümlü bir yüzeyi olduğu görülmektedir. Diğer bir ifadeyle CB elektrodun yüzeyinde daha küçük görünümlü tepe-çukur yapıları varken CNT elektrot yüzeyinde geniş yapılı tepe ve çukur yapılar izlenmektedir. Daha sonraki işlemlerde her 3 elektrot yüzeyi MB işaretli aptamer dizisi ile muamele edilmiş (modifikasyon) ve elde edilen bulgular Şekil 4.12. B, D ve F’de sunulmuştur. Modifikasyon ile PGE elektrot yüzeyindeki tabaka yapısının fazlaştığı ve tabakaların bir miktar genişlediği hatta yüzeyin pürüzsüzleştiği görülmektedir (Şekil 4.12. B). Bu durum yüzeye bağlanan bir yapının varlığına işaret etmektedir. 3D CB elektrotta aptamer varlığında gözle net görülen porlu-süngerimsi bir yapı

izlenmektedir (Şekil 4.12. D). Ayrıca yüzey alanı genişlemiş ve pütürlü bir görünümündedir. Aptamer immobilizasyonu öncesine göre görüntüde farklılık izlenmektedir. Aptamer immobilizasyonu sonrasında CNT elektrotta ise yeni oluşan ağımsı bir yapı görülmektedir (Şekil 4.12. F). Aptamer modifikasyonlarından sonra izlenen bu yapıların MB'ye ait olabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca uzun aptamer dizilerinin yüzeyi kaplamasıyla yüzeylerdeki tabakalanma yapısında değişimlere neden olabileceği de değerlendirilmiştir.

4.7. Hedef Hücrenin Algılanması ve En Uygun Hücre Derişiminin Bulunmasına ait Bulgular

Tez kapsamında hedef MCF-7 hücrelerinin algılanmasında “sinyal azalması” yaklaşımı (Ariksoysal et al., 2008; Luo et al., 2012) üzerinden analiz gerçekleştirilmiştir. Aptamer-hücre bağlanması sonrasında, pik yüksekliğinde bağlanma öncesine göre en az yaklaşık %40-45 oranında azalma elde edilmesi hedefe spesifik bir analiz gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Gerçek hücre numunelerinin tayin edilebildiği en düşük hücre derişiminin bulunması amacıyla, geliştirilen PGE temelli biyosensörle üç farklı hücre konsantrasyon değeri koşullarında aptamer-hücre etkileşimi öncesinde ve sonrasında ölçülen guanin oksidasyon sinyallerini gösteren DPV voltamogramı (A) ve ilgili kalibrasyon eğrisi (B) Şekil 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4. 13 Yalın elektrot (PGE) içeren biyosensör yüzeyinde belirli derişimde aptamer ve artan derişimlerde MCF-7 hücrelerinin etkileşimine ait guanin sinyallerini gösteren (A) voltamogram a) aptamer (tek), b) aptamer- 10^6 hücre, c) aptamer- 10^5 hücre, d) aptamer- 10^3 hücre etkileşimleri, (B) kalibrasyon eğrisi.

Şekil 4.13’de sunulan voltamogramda yalın PGE elektrotla elde edilen yüzeyde yalnız aptamer varken (a) ve artan derişimlerde hücre-aptamer etkileşimi sonrasında (b, c, d) elde edilen bulgular görülmektedir. Çalışmada artan hücre derişiminde elde edilen guanin sinyalinde kademeli bir azalma gözlenmiştir (Şekil

4.13 A ve B). 10^6 'lık derişimde hücre içeren örnekle beklenen en düşük yanıtlar elde edilmiştir. $10 \mu\text{g/mL}$ aptamer ve $10^6 \mu\text{g/mL}$ hedef hücre ile 1 saat aptamer-hücre etkileşimi sonucunda DPV tekniğı ile ölçülen ($n=3$) bağlanmaya ilişkin guanin oksidasyon sinyali, PGE yüzeyinden yaklaşık $0.40 \mu\text{A}$ olarak elde edildi. Şekil 4.13 A, a ve b'den elde edilen sinyaldeki azalma oranı ise %67.21 olarak bulunmuştur. Ayrıca Şekil 4.13 'de verilen kalibrasyon eğrisiyle R^2 değeri 0.9665 olarak elde edilmiştir.

PGE elektrot ile bulunan en uygun hücre konsantrasyon değeri referans alınarak diğer çalışmalarda ve ayrıca CB ve CNT elektrotlar için de kullanılmıştır.

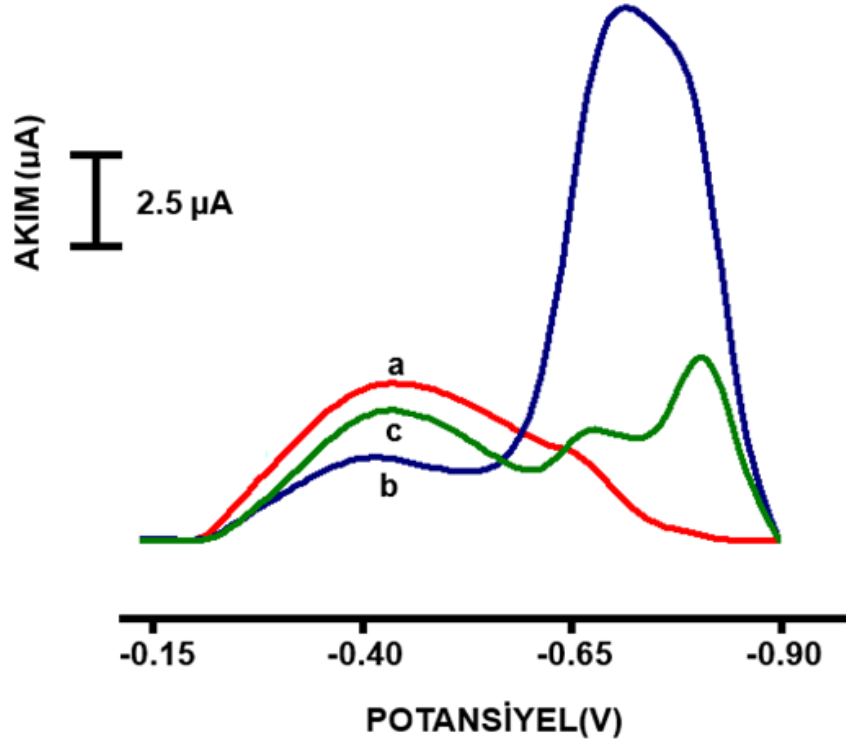
4.8. Aptasensör Biyoalgılama ve Seçimlilik Çalışmalarına İlişkin

Bulgular

Geliştirilen aptasensör sisteminin hedefine özgü analiz yapıp yapmadığının tayini amacıyla seçimlilik deneyleri gerçekleştirilerek bulgular Şekil 4.14- 4.19'de sunulmuştur. Çalışmada hem hedef MCF-7 hücresi, hem de aptamerle etkileşimini test etmek amacıyla çok düşük HER2 seviyesine sahip A549 kontrol hücresi geliştirilen sistemlerin hassasiyetini test etmek amacıyla kullanılmıştır.

4.8.1 PGE Elektrot ile Biyoalgılama ve Seçimlilik Tayinine ait Bulgular

Yalın PGE ile biyosensör yüzeyinde belirli derişimde aptamer immobilizasyonundan sonra daha yüksek seviyede HER2 içeren hedef MCF-7 ve çok düşük HER2 seviyesine sahip A549 kontrol hücreleriyle gerçekleştirilen etkileşimler sonucunda elde edilen MB sinyallerine ait voltamogram Şekil 4.14'te verilmiştir.

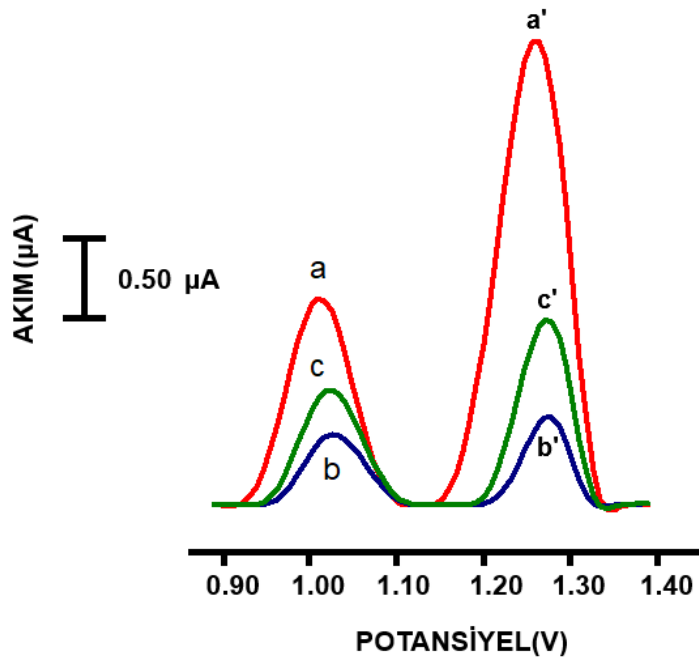


Şekil 4. 14 Yalın PGE ile biyosensör yüzeyinden elde edilen MB sinyallerine ait voltamogram: a) Aptamer(tek) b) Aptamer- 10^6 MCF-7 hücre etkileşiminden sonra c) Aptamer- 10^6 A549 hücre etkileşiminden sonra. DeneySEL ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.

Yalın PGE elektrotla elde edilen MB sinyallerine ait şekil 4.14'te görüldüğü gibi, elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a), aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b) ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c) MB sinyalinde meydana gelen değişiklikler izlenmektedir. Elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a), yaklaşık $4.96\mu\text{A}$ ($n=3$), aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b), yaklaşık $2.56\mu\text{A}$ ($n=3$) ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c), yaklaşık $4.40\mu\text{A}$ ($n=3$) sinyaller elde edilmiştir. Şekil 4.14 a ve c'den elde edilen sinyaldeki azalma oranı ise %48.38 olarak bulunmuştur. Hedef hücreyle etkileşim ve bağlanma sonucunda bağlanma öncesine göre (a) elde edilen MB sinyalinde belirgin bir azalma gözlenmiştir (b). Fakat çok düşük seviyede HER2 içeren A549 kontrol hücresi ile aptamer etkileşiminin az olması sonucunda, aptamer-hücre bağlanması yeterli oranda gerçekleşmediğinden dolayı etkileşim öncesinde(a) ve sonrasında (b) MB sinyalinde sadece bir miktar azalma olmuştur. Sinyaldeki

değişim oranı sadece %11.29 olmuştur. Sonuç olarak, geliştirilen aptasensörle gerçek hücre örneklerinden elde edilen MB pik görünümleri iyi tanımlı ve dar pikler olmamasına rağmen yine de MB sinyali üzerinden PGE ile analiz yapılabileceği tespit edilmiştir.

Yalın PGE ile biyosensör yüzeyinde belirli derişimde aptamer immobilizasyonundan sonra hedef ve kontrol hücreleriyle gerçekleştirilen etkileşimler sonucunda elde edilen guanin sinyallerini gösteren voltamogram şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4. 15 Yalın PGE ile biyosensör yüzeyinden elde edilen guanin sinyallerine ait voltamogram: a) Aptamer(tek) b) Aptamer- 10^6 MCF-7 hücre etkileşiminden sonra c) Aptamer- 10^6 A549 hücre etkileşiminden sonra. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.

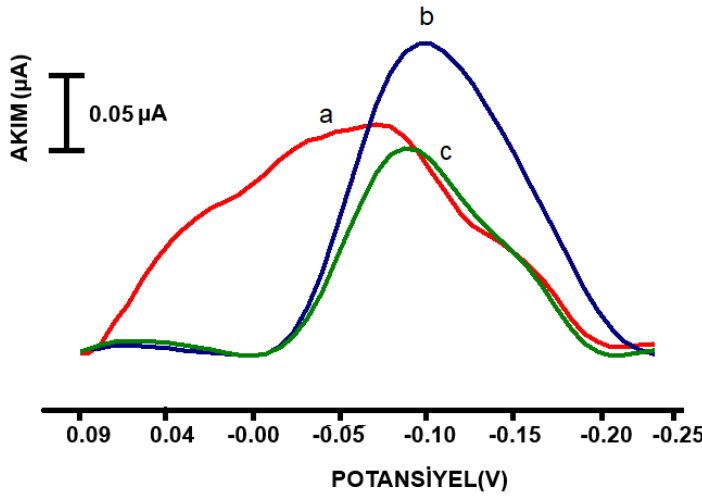
Yalın PGE elektrotla elde edilen yaklaşık +1.0V civarında elde edilen guanin sinyalleri şekil 4.15'te görülmektedir. Diferansiyel puls voltamogramında, elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a), aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b) ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c) guanin sinyalindeki değişiklikler izlenmektedir. Elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a), yaklaşık $1.38\mu A$ ($n=3$), aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b), yaklaşık $0.30\mu A$ ($n=3$), ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c), yaklaşık $0.73\mu A$ ($n=3$)

guanin sinyali elde edilmiştir. Şekil 4.15 a ve b sinyalleri değerlendirildiğinde, elde edilen azalma oranı %73,91 olarak bulunmuştur. Hedef hücreyle etkileşim ve bağlanma sonucunda (b) bağlanma öncesine göre (a) elde edilen guanin sinyalinde belirgin bir azalma gözlenmiştir (b). Çok düşük HER2 seviyesine sahip A549 kontrol hücresi ile aptamer etkileşimi sonucunda, beklendiği üzere bir miktar aptamer-hücre bağlanması gerçekleşmiştir. Bu etkileşim öncesinde(a) ve sonrasında (c) guanin sinyalindeki azalma oranı %47.10 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak geliştirilen PGE temelli aptasensörün gerçek hücre örneklerinde guanin sinyali üzerinden HER2 seviyesindeki değişiklikleri hassas şekilde algılayabildiği tespit edilmiştir.

Yalın PGE elektrotla elde edilen yaklaşık 1.20V civarında elde edilen adenin sinyalleri de Şekil 4.15'te görülmektedir. Diferansiyel puls voltamogramında, elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a'), aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b') ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c') adenin sinyalindeki değişiklikler izlenmektedir. Elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a'), yaklaşık 3.10 μ A (n=3), aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b'), yaklaşık 0.45 μ A (n=3), ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c'), yaklaşık 1.06 μ A (n=3) adenin sinyali elde edilmiştir. Şekil 4.15 a ve b sinyalleri değerlendirildiğinde, elde edilen azalma oranı %85.48 olarak bulunmuştur. Hedef hücreyle etkileşim ve bağlanma sonucunda (b') bağlanma öncesine göre (a') elde edilen adenin sinyalinde belirgin bir azalma gözlenmiştir (b'). Çok düşük seviyede HER2 seviyesine sahip A549 kontrol hücresi ile aptamer etkileşimi sonucunda, yine beklendiği gibi bir miktar aptamer-hücre bağlanması gerçekleşmiştir. Bu etkileşim öncesinde(a') ve sonrasında (c') adenin sinyalindeki azalma oranı %65.80 olarak hesaplanmıştır. Bu oran MCF7'deki azalmaya göre daha azdır. Geliştirilen aptasensörün gerçek hücre örneklerinde adenin sinyali üzerinden de düşük HER2 seviyelerindeki değişimleri tayin edebildiği sonucuna ulaşılmıştır.

4.8.2 CB Elektrot ile Biyogölgeleme ve Seçimlilik Tayinine ait Bulgular

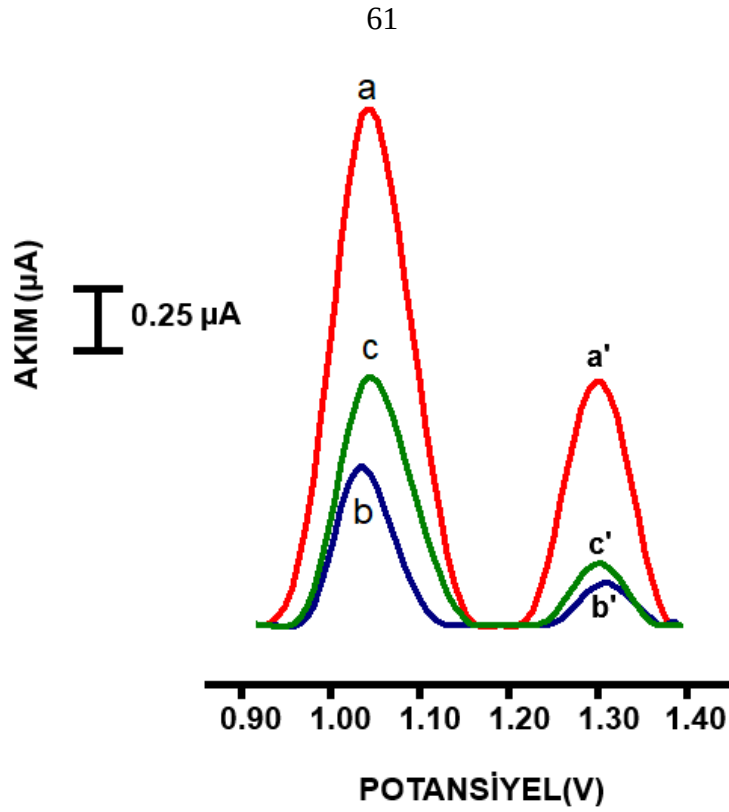
3D CB aptasensör yüzeyinde gerçekleştirilen biyogölgeleme ve seçimlilik çalışması Şekil 4.16'da sunulmuştur.



Şekil 4. 16 CB elektrot ile biyosensör yüzeyinden elde edilen MB sinyallerine ait voltamogram: a) Aptamer(tek) b) Aptamer - 10^6 MCF-7 hücre etkileşiminden sonra c) Aptamer - 10^6 A549 hücre etkileşiminden sonra. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.

CB elektrot yüzeyinde sadece aptamer varken (a), aptamer üzerine MCF-7 hücresi gönderildiğinde (b) ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c) elde edilen MB sinyalleri görülmektedir. Elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a), yaklaşık $0.23\mu\text{A}$ ($n=3$), aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b), yaklaşık $0.33\mu\text{A}$ ($n=3$) ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c), yaklaşık $0.17\mu\text{A}$ ($n=3$) sinyaller elde edilmiştir. Şekil 4.30 a ve b'den elde edilen veriler doğrultusunda b sinyalinde aptamer-hücre bağlanması sonucunda beklenen azalma gözlenmemiş, aksine a sinyaline göre yaklaşık %30 oranında artış olmuştur. Diğer yandan A549 kontrol hücresi ile aptamer etkileşimi sonucunda da etkileşim öncesinde (a) ve sonrasında (c) MB sinyalinde belirgin bir değişiklik olmamıştır. Bununla beraber, gerek pik görünümünün iyi tanımlı olmaması gerekse tekrarlanabilirliğin düşük olması nedeniyle 3D CB elektrot ile MB sinyali üzerinden hassas olarak kanser hücresi tayininin yapılamayacağı sonucuna ulaşılmıştır.

CB elektrot içeren biyosensör yüzeyinden aptamer-hücre etkileşimleri sonrasında elde edilen guanin sinyallerine ait voltamogram ise Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4. 17 CB elektrot ile biyosensör yüzeyinden elde edilen guanin sinyallerine ait voltamogram: a) Aptamer (tek) b) Aptamer- 10^6 MCF-7 hücre etkileşiminden sonra c) Aptamer- 10^6 A549 hücre etkileşiminden sonra. DeneySEL ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.

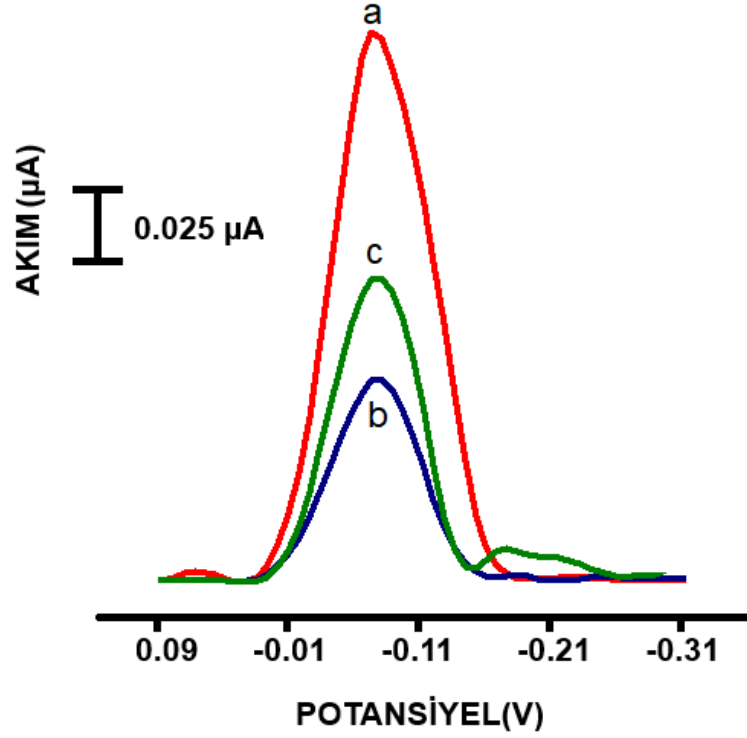
Diferansiyel puls tekniğiyle elde edilen guanin ve adenin sinyallerine ait bulgular Şekil 4.17'de görülmektedir. Elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a), yaklaşık $2.15 \mu\text{A}$ ($n=3$), aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b), yaklaşık $0.76 \mu\text{A}$ ($n=3$), ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c), yaklaşık $1.19 \mu\text{A}$ ($n=3$) guanin sinyali elde edilmiştir. Şekil 4.17 a ve b sinyalleri değerlendirildiğinde, elde edilen azalma oranı %64.65 olarak bulunmuştur. Hedef hücreyle etkileşim ve aptamer-hücre bağlanması sonucunda (b) bağlanma öncesine göre (a) elde edilen guanin sinyalinde belirgin bir azalma gözlenmiştir (b). Çok düşük HER2 seviyesine sahip A549 kontrol hücresi ile aptamer etkileşimi sonucunda da beklenen bir miktar aptamer-hücre bağlanması gerçekleşmiş ve sinyalde azalma görülmüştür. Bu etkileşim öncesinde (a) ve sonrasında (c) guanin sinyalindeki azalma oranı yaklaşık %40 civarlarındadır. Geliştirilen CB temelli aptasensörün gerçek hücre örneklerinde guanin sinyali üzerinden hassas olarak kanser hücresi analizi yapabildiği sonucuna ulaşılmıştır.

Diferansiyel puls tekniğiyle alınan voltamogramda ayrıca yaklaşık +1.20V civarında izlenen adenin sinyalleri de Şekil 4.17’de görülmektedir. Elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a’), yaklaşık 1.06 μA (n=3) ve, aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b’), yaklaşık 0.13 μA (n=3) ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c’), yaklaşık 0.19 μA (n=3) ve adenin sinyali elde edilmiştir. Şekil 4.17 a’ ve b’ sinyalleri değerlendirildiğinde, elde edilen azalma oranı %87.73 olarak bulunmuştur. Hedef hücreyle etkileşim ve bağlanma sonucunda (b') bağlanma öncesine göre (a') elde edilen adenin sinyalinde belirgin bir azalma gözlenmiştir (b'). Çok düşük HER2 seviyesine sahip A549 kontrol hücresi ile aptamer etkileşimi sonucunda, beklenen aptamer-hücre bağlanması gerçekleşmiş ve sinyalde azalma görülmüştür. Bu etkileşim öncesinde (a') ve sonrasında (c') adenin sinyalindeki azalma oranı %82.07 olarak hesaplanmıştır. Hem MCF7 hem de A549 ile benzer oranda azalma elde edilmesi geliştirilen CB bazlı aptasensörün gerçek hücre örneklerinde adenin sinyali üzerinden hassas tayinde kullanılmasının uygun olmadığı sonucuna ulaşıldı.

PGE ve CB elektrotla biyoalgılama çalışmalarında elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde hem CB hem de PGE elektrotla MB sinyali üzerinden kanserli hücre tayini yapılamadığı tespit edilmiştir. Fakat PGE’den alınan MB sinyalleri kısmen CB elektrotla elde edilenlere göre daha iyi görünümündedir. PGE ile MCF-7 ve A549 hücre ayrımı MB sinyali üzerinden içerdikleri HER2 seviyelerine göre kısmen gerçekleşmiştir. Öte yandan her iki elektrotla guanin bölgesinde çalışıldığında içerdikleri HER2 seviyelerine göre MCF-7 ve A549 hücre farkı oldukça net bir şekilde izlenmiştir. Geliştirilen sistemlerin düşük HER2 seviyelerini bile hassas olarak tayin edebildiği bulunmuştur. Ayrıca her iki elektrot için adenin sinyali üzerinden biyoalgılama deneyleri bulgularında ise bu konuda PGE elektrotla CB’den çok daha iyi sonuç alındığı tespit edilmiştir.

4.8.3 CNT elektrot ile Biyoalgılama ve Seçimlilik Tayinine ait Bulgular

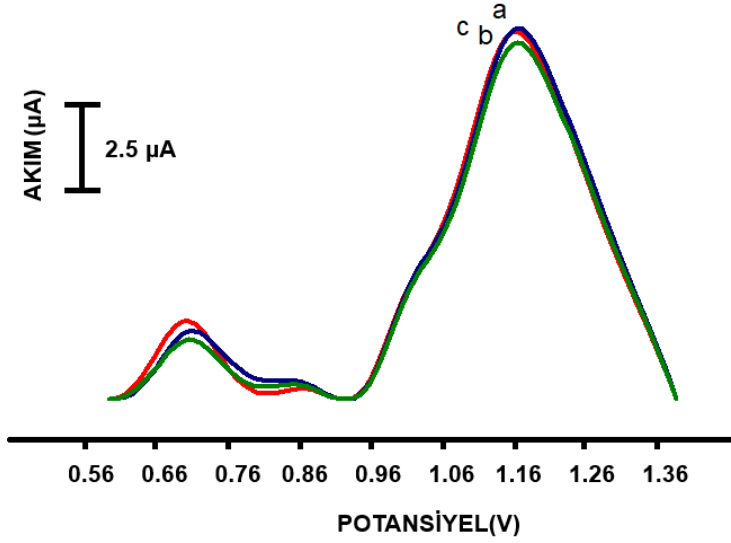
Şekil 4.18’deki voltamogramda 3D CNT elektrot ile MCF-7 hedef hücre ve A549 (kontrol) hücresi ile gerçekleştirilen deneylere ait MB sinyalleri gösterilmiştir.



Şekil 4.18. CNT elektrot ile biyosensör yüzeyinden elde edilen MB sinyallerine ait voltamogram: a) Aptamer(tek) b) Aptamer - 10^6 MCF-7 hücre etkileşiminden sonra c) Aptamer - 10^6 A549 hücre etkileşiminden sonra. Deneyisel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.

Şekil 4.18'de 3D CNT elektrotla elde edilen MB sinyallerine ait bulgular görülmektedir. DPV' de, elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a), aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b) ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c) MB sinyalinde meydana gelen değişiklikler izlenmektedir. Elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a), yaklaşık $0.20\mu\text{A}$ ($n=3$), aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b), yaklaşık $0.074\mu\text{A}$ ($n=3$), ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c), yaklaşık $0,12\mu\text{A}$ ($n=3$) sinyaller elde edilmiştir. Şekil 4.18 a ve b'den elde edilen sinyaller arası fark yani aptamer-hücre bağlanmasından sonraki azalma oranı % 63 olarak bulunmuştur. Aptamere spesifik hedef hücreyle etkileşim ve bağlanma sonucunda, bağlanma öncesine göre (a) elde edilen MB sinyalinde belirgin bir azalma olmuştur (b). Fakat A549 kontrol hücresi ile aptamerin etkileşimi sonucunda, beklenen bir miktar aptamer-hücre bağlanması gerçekleşmiş ve sinyalde azalma görülmüştür. Bu etkileşim öncesinde (a) ve sonrasında (c) MB sinyalindeki azalma oranı yaklaşık %40 olarak hesaplanmıştır.

Geliştirilen CNT temelli aptasensörün gerçek hücre örneklerinde MB sinyali üzerinden hassas analiz yapabildiği sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.19. CNT elektrot ile biyosensör yüzeyinden elde edilen guanin sinyallerine ait voltamogram: a) Aptamer (tek) b) Aptamer- 10^6 MCF-7 hücre etkileşiminden sonra c) Aptamer- 10^6 A549 hücre etkileşiminden sonra. Deneysel ölçüm parametreleri Şekil 4. 4'teki gibidir.

Şekil 4.19'da 3D CNT elektrotla elde edilen guanin sinyallerine ait sonuçlar görülmektedir. DPV' de, elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a), aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b) ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c) elde edilen guanin yanıtları gösterilmiştir. Elektrot yüzeyinde yalnız aptamer varken (a), yaklaşık $11,46\mu\text{A}$ ($n=3$), aptamer-MCF-7 hücre etkileşiminden sonra (b), yaklaşık $11,26\mu\text{A}$ ($n=3$), ve aptamer-A549 hücre etkileşiminden sonra (c), yaklaşık $11,31\mu\text{A}$ ($n=3$) sinyaller elde edilmiştir. Elde edilen bütün piklerin yükseklikleri yaklaşık olarak eşittir. Sinyalde herhangi bir farklanma olmamıştır.

Elde edilen bu bulgular doğrultusunda 3D CNT elektrotla guanin sinyal bölgesinde (+1.0V) analiz yapılamayacağı sonucuna ulaşılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında tasarımı yapılan PGE ve 3D elektrotlar içeren biyosensörler (aptasensörler) ile tez kapsamında yer alan hedeflere uygun olarak gerçek hücre numunelerinde kanser tanısına yönelik biyoalgılama yapılmıştır. Tayinde hem guanin bazının hem de MB molekülünün elektroaktivitesinin değerlendirildiği, sinyal azalmasına dayalı yaklaşım kullanılmıştır. Bu çalışmada geliştirilen PGE aptasensör sistemiyle dogrusal aralık 10^3 - 10^6 olarak belirlenmiş olup düşük seviyede HER2 analizinde sırasıyla PGE için 10^6 hücre/20 μ L ve 3D elektrotlar için 10^6 hücre/10 μ L derişimleri optimum koşul olarak tespit edilmiştir. Hem geliştirilen PGE biyosensörün hem de 3D elektrotlu sistemlerin daha da geliştirilerek ve yüzey stabilizasyonunu arttırılması ve tanı kitine dönüştürülmesi mümkündür. Bu durum gerçekleştirilirse yerinde analiz (Örn: hasta başı) gerçekleştirilme durumu da mevcut olabilecektir. Fakat bu durum ayrıca bir de fabrikasyon durumunu yani sanayi-üniversite işbirliğini gerektirmektedir.

Geliştirilen aptasensör sistemleri hastanelerdeki tanı kitleri içeren analiz metodlarıyla kıyaslandığında onlara göre ucuz ve hızlı bir alternatiftir. Diğer önemli özellikleri PGE ve 3D elektrotların yüzeylerinin kolaylıkla yenilenebilmesi, kullan-at tipinde analiz sağlaması, tayin sürelerinin kısalığı, kullanımlarının kolay olması, ekonomik olmaları, seçimli analiz sağlamalarıdır.

Bu tezde çok düşük HER2 seviyesindeki değışimleri bile gösterecek hassasiyete sahip, aptamer-hücre etkileşimi üzerinden tayin yapabilen üç farklı türde biyosensör geliştirilerek kanser tanısındaki uygulanabilirliği gösterilmiştir. Bu çalışma ile kısa sürede sonuç veren, pahalı kitlelere ve uzmanlığa ihtiyaç duyulmadan analiz yapılabilecek, sağlık alanı için alternatif bir tanı yöntemi geliştirilmiştir.

Sonuç olarak, erken kanser tanısı tedavi süreci açısından önem taşıdığından, bu tez kapsamında geliştirilen sistemlerle kanserle ilişkili sağlık sorunlarına “alternatif tanı” açısından katkı sunulmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Altintas, Z., Uludag, Y., Gurbuz, Y., Tothill, I.E.,** 2011, Surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of the cancer biomarker carcinoeMBryonic antigen. *Talanta* 86, 377–383pp.
- Ariksoysal, D.,** 2006, DNA“ da meydana gelen bazı mutasyonların ve hibridizasyonun tayinine yönelik elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımı, *Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 193843)*.
- ARIKSOYSAL, D.,** 2019, Electrochemical Investigation of Carbon Nanotube Modified Surfaces Based on Ferricyanide and Guanine Signals for DNA Biosensor Applications. *Cumhuriyet Science Journal*, 40(1), 11-23pp.
- Ariksoysal, D., Topal, B. D. ve Topkaya, S. N,** 2018, “Derleme Makalesi”, *Türk Farmakope Dergisi*, 3, 63s.
- ARIKSOYSAL, D., TOPAL, B. D., & TOPKAYA, S. N.,** 2018, Nükleik asit temelli alternatif analiz yöntemleri “biyoalgılayıcılar” (biyosensörler), *Türk Farmakope Dergisi*, 63-84ss .
- Arya, S. K., Zhurauski, P., Jolly, P., Batistuti, M. R., Mulato, M., & Estrela, P.,** 2018, Capacitive aptasensor based on interdigitated electrode for breast cancer detection in undiluted human serum, *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 106-112pp.
- Baughman, R. H., Zakhidov, A. A., & De Heer, W. A.,** 2002, Carbon nanotubes- the route toward applications, *science*, 297(5582), 787-792pp.
- Budak, F.,** 2020, *Eritromisinin elektrokimyasal davranışlarının DNA biyosensörleri ile incelenmesi* (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Centane, S., & Nyokong, T.,** 2021, Impedimetric aptasensor for HER2 biomarker using graphene quantum dots, polypyrrole and cobalt phthalocyanine modified electrodes. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 34, 1-10pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Channon, R. B., Yang, Y., Feibelman, K. M., Geiss, B. J., Dandy, D. S., & Henry, C. S.,** 2018, Development of an electrochemical paper-based analytical device for trace detection of virus particles, *Analytical chemistry*, 90(12), 7777-7783pp.
- Chun, L., Kim, S. E., Cho, M., Choe, W. S., Nam, J., Lee, D. W., & Lee, Y.,** 2013, Electrochemical detection of HER2 using single stranded DNA aptamer modified gold nanoparticles electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 186, 446-450pp.
- Contreras-Naranjo, J. E., Perez-Gonzalez, V. H., Mata-Gómez, M. A., & Aguilar, O.,** 2021, 3D-printed hybrid-carbon-based electrodes for electroanalytical sensing applications. *Electrochemistry Communications*, 130, 1-6pp.
- Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H., & Ruml, T.,** 2015, Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology, *Biotechnology Advances*, 33(6), 1141-1161pp.
- David, I. G., Popa, D. E., & Buleandra, M. ,** 2017, Pencil graphite electrodes: a versatile tool in electroanalysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017, 1-22pp.
- De Jong, K. P., & Geus, J. W.,** 2000, Carbon nanofibers: catalytic synthesis and applications. *Catalysis Reviews*, 42(4), 481-510pp.
- Du, Z., Li, H., & Gu, T.,** 2007, A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy, *Biotechnology advances*, 25(5), 464-482pp.
- ee, A.V., S. Oesterreich, and N.E. Davidson,** 2015, MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years, *J Natl Cancer Inst*, 107(7), 1-4pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fatima, A., Younas, I., & Ali, M. W.,** 2022, An overview on recent advances in biosensor technology and its future application. *Archives of Pharmacy Practice*, 13(1-2022), 5-10pp.
- Fatima, T., Bansal, S., Husain, S., & Khanuja, M.,** 2022,. Biosensors, In *Electrochemical Sensors* (pp. 1-30), Woodhead Publishing.
- Ferapontova, E. E.,** 2018, DNA electrochemistry and electrochemical sensors for nucleic acids, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 11, 197-218pp.
- Ferreira, L. M., Silva, P. S., Augusto, K. K., Gomes-Júnior, P. C., Farra, S. O., Silva, T. A., Fatibello-Filho, O., & Vicentini, F. C.,** 2022, Using nanostructured carbon black-based electrochemical (bio) sensors for pharmaceutical and biomedical analyses: A comprehensive review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1-16pp.
- Guan, S. S., Chang, J., Cheng, C. C., Luo, T. Y., Ho, A. S., Wang, C. C., ... & Liu, S. H.,** 2014, Afatinib and its encapsulated polymeric micelles inhibits HER2-overexpressed colorectal tumor cell growth in vitro and in vivo, *Oncotarget*, 5(13), 4868, 1-13pp.
- Haleem, A., Javaid, M., Singh, R. P., Suman, R., & Rab, S.,** 2021, Biosensors applications in medical field: A brief review, *Sensors International*, 2, 1-10pp.
- Hirano, S., Saito, J., Yukawa, T., Sano, D., Okamoto, A., Okabe, S., & Kitajima, M. ,** 2020, Improvement of electrochemical conditions for detecting redox reaction of K₃ [Fe (CN) ₆] toward the application in norovirus aptasensor. *Electrochemistry*, 88(3), 205-209pp.
- Hougaard, K. S., & Campagnolo, L.,** 2012, Reproductive toxicity. *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials: Exposure, Toxicology, and Impact on Human Health*, 225-242pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Katseli, V., Economou, A., & Kokkinos, C.,** 2019, Single-step fabrication of an integrated 3D-printed device for electrochemical sensing applications, *Electrochemistry Communications*, 103, 100-103pp.
- Kaur, H., Bhosale, A., & Shrivastav, S.,** 2018, Biosensors: classification, fundamental characterization and new trends: a review, *Int J Health Sci Res*, 8(6), 315-333pp.
- Kissinger, P., & Heineman, W. R. (Eds.),** 2018, *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, revised and expanded*, CRC press.
- Kökbaş, U., KAYRIN, L., & Abdullah, T.,** 2013, Biyosensörler ve tıpta kullanım alanları, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22(4), 499-513s.
- Latrich, C., Juhasz-Boess, I., Ortmann, O., & Treeck, O.,** 2008, Detection of an elevated HER2 expression in MCF-7 breast cancer cells overexpressing estrogen receptor β 1, *Oncology reports*, 19(3), 811-817pp.
- Lee, J. ,** 2023, Carbon Nanotube-Based Biosensors Using Fusion Technologies with Biologicals & Chemicals for Food Assessment, *Biosensors*, 13(2), 183p.
- Li, F., Yu, Z., Han, X., & Lai, R. Y.,** 2019, Electrochemical aptamer-based sensors for food and water analysis: A review, *Analytica Chimica Acta*, 1051, 1-23pp.
- Liu, Z., Duan, J. H., Song, Y. M., Ma, J., Wang, F. D., Lu, X., & Yang, X. D.,** 2012, Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells in vitro, *Journal of translational medicine*, 10, 1-10pp.
- Luo, C., Lei, Y., Yan, L., Yu, T., Li, Q., Zhang, D., ... & Ju, H.,** 2012, A rapid and sensitive aptamer-based electrochemical biosensor for direct detection of *Escherichia coli* O111, *Electroanalysis*, 24(5), 1186-1191pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ning, Y., Hu, J., & Lu, F.,** 2020, Aptamers used for biosensors and targeted therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 132, 1-21pp.
- Ozkan-Ariksoysal, D., Tezcanli, B., Kosova, B., & Ozsoz, M.,** 2008, Design of electrochemical biosensor systems for the detection of specific DNA sequences in PCR-amplified nucleic acids related to the catechol-O-methyltransferase Val108/158Met polymorphism based on intrinsic guanine signal, *Analytical chemistry*, 80(3), 588-596pp.
- Pathak, S.,** 2022, Cancer Cell Lines: Its Implication for Therapeutic Use, In *Cancer Diagnostics and Therapeutics: Current Trends, Challenges, and Future Perspectives*, 407-427pp.
- Radom, F., Jurek, P. M., Mazurek, M. P., Otlewski, J., & Jeleń, F.,** 2013, Aptamers: molecules of great potential, *Biotechnology Advances*, 31(8), 1260-1274pp.
- Rafique, I., Kausar, A., Anwar, Z., & Muhammad, B.,** 2016, Exploration of epoxy resins, hardening systems, and epoxy/carbon nanotube composite designed for high performance materials: A review, *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 55(3), 312-333pp.
- Roushani, M., Sarabaegi, M., & Pourahmad, F.,** 2019, Impedimetric aptasensor for *Pseudomonas aeruginosa* by using a glassy carbon electrode modified with silver nanoparticles, *Microchimica Acta*, 186(11), 1-7pp.
- Rusling, J. F., & Suib, S. L.,** 1994, Characterizing materials with cyclic voltammetry, *Advanced Materials*, 6(12), 922-930pp.
- Safari-Mohsenabad, S., Selvaganapathy, P. R., & Deen, M. J.,** 2010, microfluidic reference electrodes for applications in biosensing, 596-598pp.
- Shieh, Y. T., Liu, G. L., Wu, H. H., & Lee, C. C.,** 2007, Effects of polarity and pH on the solubility of acid-treated carbon nanotubes in different media, *Carbon*, 45(9), 1880-1890pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Silva, T. A., Moraes, F. C., Janegitz, B. C., & Fatibello-Filho, O.,** 2017, Electrochemical biosensors based on nanostructured carbon black: A review. *Journal of Nanomaterials*, 2017, 1-14pp.
- Stefano, J. S., Silva, L. R. G. E., & Janegitz, B. C.,** 2022, New carbon black-based conductive filaments for the additive manufacture of improved electrochemical sensors by fused deposition modeling, *Microchimica Acta*, 189(11), 1-16pp.
- Sukindar, N. A., Ariffin, M. K. A., Baharudin, B. H. T., Jaafar, C. N. A., & Ismail, M. I. S.,** 2016, Analyzing the effect of nozzle diameter in fused deposition modeling for extruding polylactic acid using open source 3D printing, *Jurnal Teknologi*, 78(10), 1-9pp.
- Suresh, D., Ghoshdastidar, S., Gangula, A., Mukherjee, S., Upendran, A., & Kannan, R.,** 2020, Magnetic iron nanocubes effectively capture epithelial and mesenchymal cancer cells, *ACS omega*, 5(37), 23724-23735pp .
- Tabasi, A., Noorbakhsh, A., & Sharifi, E.,** 2017, Reduced graphene oxide-chitosan-aptamer interface as new platform for ultrasensitive detection of human epidermal growth factor receptor 2, *Biosensors and Bioelectronics*, 95, 117-123pp.
- Tamayo, J., Humphris, A. D. L., Malloy, A. M., & Miles, M. J.,** 2001, Chemical sensors and biosensors in liquid environment based on microcantilevers with amplified quality factor, *Ultramicroscopy*, 86(1-2), 167-173pp.
- V.S.P.K. Sankara Aditya Jayanthi, Asim Bikas Das, Urmila Saxena,** 2017, Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers, *Biosens. Bielectron*, 19, 15-23pp.
- Wang, J., Kawde, A. N., & Sahlin, E.,** 2000, Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA, *Analyst*, 125(1), 5-7pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, J., Wang, D., & Hui, N.,** 2020, A low fouling electrochemical biosensor based on the zwitterionic polypeptide doped conducting polymer PEDOT for breast cancer marker BRCA1 detection, *Bioelectrochemistry*, 136, 1-8pp.
- Yang, Y., Fu, Y., Su, H., Mao, L., & Chen, M.,** 2018, Sensitive detection of MCF-7 human breast cancer cells by using a novel DNA-labeled sandwich electrochemical biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 122, 175-182pp.
- Zhou, N., Su, F., Li, Z., Yan, X., Zhang, C., Hu, B., ... & Zhang, Z.,** 2019, Gold nanoparticles conjugated to bimetallic manganese (II) and iron (II) Prussian Blue analogues for aptamer-based impedimetric determination of the human epidermal growth factor receptor-2 and living MCF-7 cells, *Microchimica Acta*, 186(2), 1-10pp.
- Zhu, Y., James, D. K., & Tour, J. M.,** 2012, New routes to graphene, graphene oxide and their related applications, *Advanced materials*, 24(36), 4924-4955pp.

İnternet kaynakları

- **Birla Carbon**, “Carbon black101”, <https://www.birlacarbon.com/whats-trending/carbonblack/#:~:text=Carbon%20black%20is%20mainly%20used,plastic%2C%20ink%20and%20coating%20applications>, (Erişim Tarihi: 12.10.2023)
- **Dünya Sağlık Örgütü**, “Breast Cancer”, [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer#:~:text=Introduction,potential%20for%20spread%20\(metastasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer#:~:text=Introduction,potential%20for%20spread%20(metastasis)) (Erişim Tarihi: 13.10.2023)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **Libretexts Chemistry**, “Elektrochemistry”, [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Electrochemistry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Electrochemistry) (Erişim Tarihi: 29.08.2023)
- **Robson, H.** “*What is Voltammetry? Types and Applications*”, <https://www.ossila.com/pages/voltammetry> (Erişim Tarihi: 04 Mayıs 2023)
- **Twinkl**, “What is a nanomaterial? Definition, examples, and uses” <https://www.twinkl-global.com/technical-knowledge/faqs/what-is-a-nanomaterial> (Erişim Tarihi: 15.11.2023)
- **Protopasta**, “Electrically Conductive Composite PLA” <https://protopasta.com/collections/all/products/conductive-pla> (Erişim Tarihi: 18.11.2023)
- **Filoalfa**, “Alfaohm”, <https://www.filoalfa3d.com/gb/content/20-alfaohm> (Erişim Tarihi: 18.11.2023)
- **Abramson Cancer Center**, “HER2 -Positive Breast Cancer”, <https://www.pennmedicine.org/cancer/types-of-cancer/breast-cancer/types-of-breast-cancer/her2-positive-breast-cancer#:~:text=All%20breast%20cells%20have%20and,cells%20can%20multiply%20too%20quickly>, (Erişim Tarihi: 19.04.2024)
- **SYNTHEGO**, “Everything You Need To Know About A549 Cells”, <https://www.synthego.com/a549-cells>, (Erişim Tarihi: 05.12.2023)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez boyunca hem katkıları hemde bilimsel çalışma anlamında bana desteklerinden ve yanı zamanda hem çalışma hayatı hemde akademik anlamda benim çalışmalarımı kordine edemilmemizde emeklerinden ötürü sevgili danışman hocam Prof.Dr Dilşat ARIKSOYSAL'A teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez süresince maddi ve manevi olarak yanımda olup bana desteklerinden ötürü ablam Meltem KARATAŞ'a ve bu hayatta her sürecimde beni anlayışla destekleyen annem,babam ve abime teşekkür ederim.

Tez boyunca laboratuvarında keyifle çalıştığımız ve desteklerini hissettiğim çalışma arkadaşlarım Elif Can Emiroğlu ve Hande İzem Özok'a teşekkür ederim. Aynı zamanda bu süreçte desteklerini yanımda hissettiğim değerli katkılarından dolayı yüksek lisans sürecinde tecrübeleriyle bilgilendirip destekleyen motive eden arkadaşım İsmail KAYADİBİ'ye teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tez projesi Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir(proje no:24070). Maddi katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmamda bulundukları değerli katkılarından dolayı Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Arş. Gör. Recep İLHAN ve Prof. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK' a teşekkürlerimi borç bilirim. Ek olarak çalışmamın başlangıç aşamasında desteklerinden ötürü Selen GÜNDEN ve Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFCILAR'a teşekkür ederim.

15 / 05/ 2024

İmzası

Mustafa KARATAŞ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

MUSTAFA KARATAŞ

Eğitim Bilgileri:

Yüksek Lisans:

Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ,Biyomedikal Teknolojiler A.B.D(2024)

Lisans:

Afyon Kocatepe Üniversite Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal
Mühendisliği(2020)

Duisburg Essen Üniversitesi (Erasmus Öğrenim 2018)

Usegood Medikal(Erasmus Stajı 2019)

Ön Lisans:

Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Meslek Yüksekokulu , Biyomedikal Cihaz
Teknolojisi(2014)

İş Deneyimi

Ekol Tıbbi Ürünler,Servis Mühendisi(2023, -)

Matek Medikal-Sesa Elektronik, Biyomedikal Mühendisi(2020, 2022)

Etkin Tıbbi Cihazlar (2014-2015)

Projeler

- Nükleik Asit ve Nanomalzeme Tabanlı Elektrokimyasal Biyosensörlerin Geliştirilmesi ve Kanser Tanısına Yönelik Uygulamaları(Bap Ege Projesi,24070,2022- 2024)
- Kemoterapi ilaç hazırlama Robotu ve İlaç Hazırlama Prototipi(Lisans Projesi,2020)