

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİROİD UYARICI HORMON TAYİNİ İÇİN İMPEDANS SPEKTROSKOPİSİ
TEMELLİ BİR BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

UMUT DENİZ AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. HAKKI MEVLÜT ÖZCAN

EDİRNE-2019

UMUT DENİZ AYDIN'ın hazırladığı "TİROID UYARICI HORMON TAYINI İÇİN İMPEDANS SPEKTROSKOPİSİ TEMELLİ BİR BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

İmza

Prof.Dr. Ayşegül PEKSEL

Prof.Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR

Doç.Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN



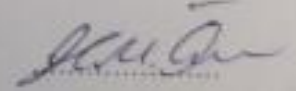
Tez Savunma Tarihi:
12/06/2019

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.


İmza

Doç.Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN

Tez Danışmanı



Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı




Prof.Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS/DOKTORA PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



12/06/2019

Umut Deniz AYDIN

Yüksek Lisans Tez

Tiroid Uyarıcı Hormon Tayini İçin İmpedans Spektroskopisi Temelli Bir Biyosensör
Geliştirilmesi

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Tiroid uyarıcı hormon (TSH) hipofiz ön lobundan salgılanan, glukoprotein yapılı bir hormondur. Tiroid bezini etkileyerek kana tiroid hormonlarının salınmasını uyarır. Kan konsantrasyonunun referans değerlerin üzerinde olması hipotiroidizm, referans değerlerin altında olması ise hipertroidizm olarak adlandırılır. Kan TSH konsantrasyonu pek çok hastalık ile ilişkilendirilir. Günümüzde TSH tayini için kullanılan yöntemler immünoassay temelli yöntemlerdir. Bunların çoğu zaman alıcı yöntemlerdir ve hepsi özel ekipman ve uzman personel gerektirir. TSH tayini için antikor-antijen ilişkisini temel alan biyosensörler, uygun maliyet, kısa ölçüm süresi ve yüksek hassasiyetleri gibi avantajları sayesinde alternatif ölçüm sistemleri olabilir.

Bu tez kapsamında kanda TSH tayini için elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) temelli bir immünosensör geliştirildi. Bu amaçla ilk önce altın çalışma elektrodu üzerine sisteamin ile kendiliğinden oluşan tek tabakalar oluşturuldu. İkinci aşamada poliamidoamin dendrimeri (PAMAM) ile elektrot yüzeyi modifiye edildi ve son aşamada anti-TSH antikorunu modifiye çalışma elektrodu yüzeyine immobilize edildi. Geliştirilen biyosensörün TSH tayin aralığı 0.1-0.6 mIU/L olarak belirlendi ve yapay serum örneklerinin analizinde başarıyla kullanıldı.

Yıl : 2019

Sayfa Sayısı : 66

Anahtar Kelimeler : Tiroid Uyarıcı Hormon, İmmünosensör, Biyosensör, Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi, Kendiliğinden Oluşan Tek Tabaka

Master Thesis

Development of an Impedance Spectroscopy Based Biosensor for the Determination of Thyroid Stimulating Hormone

Trakya University Institute of Natural Science

Department of Chemistry

ABSTRACT

Thyroid stimulating hormone (TSH) is a glycoprotein secreted from the anterior lobe of the pituitary. It stimulates the release of thyroid hormones into the blood by affecting the thyroid gland. The amount of TSH in the blood is greater than the reference value are called hypothyroidism, the amount of TSH in the blood is lower than the reference value are called hyperthyroidism. Blood TSH concentration is associated with many diseases. Today, the methods used for the determination of TSH are immunoassay based methods. Most of these are time consuming methods and all require special equipment and expert personnel. For the determination of TSH, biosensors based on the antibody-antigen relationship can have alternative measurement systems due to their advantages such as cost, short measurement time and high sensitivity.

In this thesis, an immunosensor based on electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was developed for the determination of TSH in the blood. For this purpose, in the first step self assembled monolayers were formed with cysteamine on the gold working electrode. In the second step, the electrode surface was modified with polyamidoamine dendrimer (PAMAM) and in the final step the anti-TSH antibody was immobilized to the modified working electrode surface. The TSH detection interval of the biosensor was determined as 0.1-0.6 mIU/L and this biosensor was used successfully in the analysis of artificial serum samples.

Year : 2019

Page Number : 66

Keywords : Thyroid Stimulating Hormone, Immunosensor, Biosensor, Electrochemical Impedance Spectroscopy, Self-Assembled Monolayer

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yardımcı olan, yönlendiren, yol gösteren, destek ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini aktarırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı tez danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, yardımlarını asla esirgemeyen canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Tarafında desteklenen 2017/109 nolu ve "Tiroid Uyarıcı Hormon Tayini İçin İmpedans Spektroskopisi Temelli Bir Biyosensör Geliştirilmesi" isimli proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Kimyasal Haberci; Hormon.....	3
2.1.1. Hormonların Sınıflandırılması.....	5
2.1.2. Hormonların Etki Mekanizmaları.....	6
2.1.3. Hormonların Kontrol Mekanizması.....	7
2.1.4. Tiroid Stimüle Edici Hormon (TSH).....	8
2.1.5. TSH Tayin Metodları.....	11
2.2. Biyolojik Belirteçler: Biyosensörler.....	17
2.2.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	20
2.2.2. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi.....	22
2.2.3. Dönüşümlü Voltametri	23
2.3. Hormon Temelli Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri.....	24
2.3.1. Tutuklama Metodu Esasına Dayanan İmmobilizasyon Yöntemi	25
2.3.2. Adsorbsiyon Metodu Esasına Dayanan İmmobilizasyon Yöntemi	25
2.3.3. Çapraz Bağlama Metodu Esasına Dayanan İmmobilizasyon Yöntemi	26
2.3.3.1. Glutaraldehit ile Çapraz Bağlama	27
2.3.4. Kovalent Bağlama Metodu Esasına Dayanan İmmobilizasyon Yöntemi.....	28
2.3.4.1. Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) yöntemi ile yapısında sülfür bulunduran organik yapının immobilizasyonu.....	28
2.3.4.1.1. Sisteamin	31
2.3.4.2. PAMAM (Poliamidoamin)	33
BÖLÜM 3	34
MATERYAL VE METOD	34
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Biyosensörün Geliştirilmesinde Kullanılan Materyaller	34

3.1.2. Biyosensörün Geliştirilmesinde Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanması	35
3.1.3. Biyosensörün Geliştirilmesinde Kullanılan Cihazlar	35
3.2. Metodlar	36
3.2.1. Çalışma Elektrodunun Temizlenmesi	36
3.2.2. Biyosensörün Hazırlanması	36
3.2.3. Biyosensörün Çalışma İlkesi	37
3.2.4. Biyosensörün İmmobilizasyon Adımlarının Optimizasyonu	40
3.2.4.1. Sisteamin Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	40
3.2.4.2. Sisteamin İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu.....	41
3.2.4.3 PAMAM Konsantrasyonunun Optimizasyonu	41
3.2.4.4. Anti-TSH Konsantrasyonunun Optimizasyonu	42
3.2.5. Biyosensörün Karakterizasyonu	42
3.2.5.1. Doğrusal Tayin Aralığının Belirlenmesi.....	42
3.2.5.2. Tekrar Üretilebilirlik.....	42
3.2.5.3 Yapay Serumda TSH Analizi.....	43
3.2.5.4. Biyosensörün Yüzey Alanının Hesaplanması.....	43
BÖLÜM 4	44
SONUÇLAR VE TARTIŞMA	44
4.1. Biyosensörün İmmobilizasyon Adımlarına İlişkin Veriler	44
4.2. Biyosensörün İmmobilizasyon Adımlarının Optimizasyonu	47
4.2.1. Sisteamin Konsantrasyonunun Optimizasyonu	47
4.2.2. Sisteamin İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu	48
4.2.3. PAMAM Konsantrasyonunun Optimizasyonu.....	50
4.2.4. Anti-TSH Konsantrasyonunun Optimizasyonu	52
4.3. Biyosensörün Karakterizasyonu	53
4.3.1. Doğrusal Tayin Aralığının Belirlenmesi.....	53
4.3.2. Tekrar Üretilebilirlik.....	56
4.3.3. Yapay Serumda Analiz	57
4.3.4. Biyosensörün Yüzey Alanının Hesaplanması	58
BÖLÜM 5	61
KAYNAKLAR	61

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

TSH	:Tiroid Uyarıcı Hormon
T3	:Triiyodotironin
T4	:Tiroksin
TRH	:Tirotropin Salıcı Hormon
PTH	:Paratiroid Hormon
RIA	:Radyoimmunoassay
IRMA	:İmmüno Radyometrik Assay
EIS	:Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
CV	:Dönüşümlü voltametri
R_{ct}	:Yük transfer direnci
Z_w	:Warburg impedansı
R_s	:Çözelti direnci
ELISA	:Enzim bağlı immünosorban yöntem
FSH	:Folikül uyarıcı hormon
ACTH :	Adrenokortikotropik Hormon
RNA	:Ribonükleikasit
CPE-alpha	:Sabit faz elemanı kapasitansı
FIA	:Floresans immünassay metodu
GA	:Glutaraldehit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sinirsel uyarı oluştuktan sonra endokrin sistemlerdeki mekanizma ve hedef dokular	4
Şekil 2.2. Kimyasal yapılarına göre hormonların sınıflandırılması.....	5
Şekil 2.3. Hücre yüzey reseptörü ve hücre içi reseptör etki mekanizması.....	7
Şekil 2.4. TSH molekülünün 3 boyutlu yapısı.....	8
Şekil 2.5. TSH etki ve salınım mekanizması.....	10
Şekil 2.6. İmmunoassay yöntemlerinin esası.....	12
Şekil 2.7. ELISA metodunun esası.....	13
Şekil 2.8. TSH molekülünün RIA metodu ile ölçülmesinin esası.....	14
Şekil 2.9. IRMA metodunun esasına ait görsel.....	16
Şekil 2.10. FIA Metoduna ait görsel.....	17
Şekil 2.11. Biyosensörlerin şematik olarak gösterimi.....	18
Şekil 2.12. Biyosensörler için farklı elektrokimyasal ölçüm metodları.....	21
Şekil 2.13. Potansiyel-Zaman ve Akım-Zaman büyüklerine bağımlı olan bir impedansın matematiksel olarak gösterim.....	22
Şekil 2.14. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında meydana gelen voltammogram....	24
Şekil 2.15. Tutuklama metodu ile immobilizasyon	25
Şekil 2.16. Adsorpsiyon metodu ile immobilizasyon.....	26

Şekil 2.17. Çarpraz bağlama metodu ile immobilizasyon.....	26
Şekil 2.18. Glutaraldehit molekül yapısı.....	27
Şekil 2.19. Glutaraldehit çarpraz bağlama reaksiyonu.....	27
Şekil 2.20. Kovalent bağlama metodu ile immobilizasyon.....	28
Şekil 2.21. SAM tabakasının şematik gösterimi.....	29
Şekil 2.22. A: Altın bir yüzeye fonksiyonel grubunda tiyol içeren bileşiklerin oluşturduğu SAM ve B: yüzeyi hidroksillenmiş silisyum dioksitin alkilsiloksan ile SAM yapısının şematik gösterimi.....	30
Şekil 2.23. Rosuhani ve arkadaşlarının tasarladığı sistemin bazı biyosensöre ait görsel.....	31
Şekil 2.24. Sisteamin molekülünün yapısı.....	32
Şekil 2.25. Sisteamin kullanılarak ALP'nin elektrot yüzeyine immobilizasyonu	32
Şekil 2.26. PAMAM Dendrimeri (Gen.2.0).....	33
Şekil 3.1. Biyosensörün tasarımı.....	37
Şekil 3.2. Eş-değer devre modeli.....	38
Şekil 3.3. Gambry Analyst® yazılımındaki hesaplama yapılabilen devre modelleri	39
Şekil 3.4. Yazılım Hesaplama Ekranı.....	40
Şekil 4.1. Biyosensörün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları.....	45
Şekil 4.2. Biyosensörün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltogramları.....	45
Şekil 4.3. Farklı sistemin miktarları kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri	47

Şekil 4.4. Farklı sistemin inkübasyon süreleri kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri.....	49
Şekil 4.5. Farklı pamam konsantrasyonları (w/v) kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri.....	51
Şekil 4.6. Farklı anti-tsh konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri.....	52
Şekil 4.7. Artan tsh konsantrasyonlarında eis spektrumları.....	55
Şekil 4.8. Artan tsh konsantrasyonlarında döngüsel voltogramlar.....	55
Şekil 4.9. Biyosensörün kalibrasyon grafiği.....	56
Şekil 4.10. Yalın elektrot ile 10 farklı potansiyelde elde edilen döngüsel voltogramlar.....	58
Şekil 4.11. Tasarlanan biyosensör ile 10 farklı potansiyelde elde edilen döngüsel voltogramlar.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kimyasal yapıları farklı olan hormonların sınıflandırılması.....	6
Çizelge 2.2. Biyosensörlerin bileşenleri	19
Çizelge 2.3. Biyosensörü oluşturan bileşenlerin içerikleri.....	20
Çizelge 4.1. İmmobilizasyon basamaklarının yük transfer direnci değerleri.....	46
Çizelge 4.2. Farklı sistemin konsantrasyonlarında elde edilen doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları.....	48
Çizelge 4.3. Farklı sistemin inkübasyon süreleri kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle elde edilen doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları.....	49
Çizelge 4.4. Farklı pamam konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle elde edilen doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları.....	51
Çizelge 4.5. Farklı anti-tsh konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle elde edilen doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları.....	53
Çizelge 4.6. Biyosensörün tekrar üretilebilirlik sonuçları.....	57
Çizelge 4.7. Yapay serum örneklerinde tsh analizi sonuçları.....	57

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Hormonlar, değişik iç salgı bezlerinde sentezlenen ve salgılanan, organların ve sistemlerin belirli görevlerini yerine getirmesinde ve kontrol mekanizmalarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan, metabolizmada hayati öneme sahip kimyasal habercilerdir (Nelson & Cox, 2013).

Tiroid uyarıcı hormon (TSH), hipofiz ön lobundan salınan, tiroid bezini uyarak birçok dokunun metabolizmasını düzenlemekle görevli olan tiroid hormonlarının kana salgılanmasını ve canlının büyümesinde ve gelişmesinde etkili olan hormondur (Rugge, Bougatsos & Chou, 2015).

TSH, metabolizmanın düzenlenmesinden sorumludur. Sinir sistemi, kas-iskelet sistemi ve üreme dokusunun işlevini düzenler. Ayrıca vücut ısısını, vücut ağırlığını ve kan kolesterol seviyesini düzenlemede kritik öneme sahiptir (Iwen, Schröder, & Brabant 2013). Düşük TSH düzeyleri, hipopitüitarizme, multinodüler guatr, Graves hastalığı ve kardiyovasküler hastalıklara yol açabilir (Green vd., 2014). Yüksek serum TSH düzeyleri konjenital hipotiroidi, Hashimoto tiroiditi ve hipofiz tümörlerine neden olabilir. Hipotiroidizmin lipid profili, kan şekeri düzeyi, yüksek tansiyon ve insülin direnci gibi önemli metabolik parametreleri olumsuz etkileyebileceği bildirilmiştir (Neto vd., 2014). Bu sebeple TSH'nin kan konsantrasyonunun tespiti çok önemlidir ve kandaki seviyelerinin takip edilmesi gereklidir.

Günümüzde biyoteknolojik gelişmeler sayesinde TSH'nin kandaki miktarının tayin edilmesi için çeşitli yöntemler tasarlanmıştır. TSH tayin yöntemleri içerisinde en

çok kullanılanı ELISA metodudur, ayrıca bu amaçla RIA, IRMA, FIA, CLIA, ECLIA metodları da kullanılmaktadır (Choi vd., 2017; Wilson vd., 1987). Fakat bu metodların pahalı ekipman gereksinimi, zaman alıcı olması ve uzman personel gerektirmesi gibi dezavantajları vardır. Bu nedenle bu metodların yerine daha pratik, ucuz ve zamandan kazanç sağlayan biyosensörlerin kullanımı ilgi uyandırmaktadır.

Bu tez çalışmasında TSH'ın kandaki seviyesini belirleyebilmek için elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) temelli bir immunosensör tasarlanmıştır.



BÖLÜM 2

KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kimyasal Haberci; Hormon

Hormonlar, farklı salgı bezlerinde üretilen ve salgılanan hedef dokularda etkili olan haberci moleküllerdir. Omurgalıların hedef dokularında metabolik ve fizyolojik olayların düzenlenmesinden sorumludurlar (Keha ve Küfrevioğlu, 2014). Hormonların salgılanması endokrin hücreler tarafından gerçekleştirilir, enerji metabolizmasını, üremeyi, gelişmeyi, büyüme ve farklılaşmayı düzenlerler.

Hormonlar ihtiyaç anında, özelleşmiş salgı bezlerinde belirli miktarlarda üretilir ve kana salınarak tüm vücuda yayılırlar (Nelson & Cox, 2013).

Hormonların sentezi ve salgılanması, hormon ve hedef hücre arasındaki etkileşimin sıralı basamakları yardımıyla kontrol edilir. Hipotalamustan kana küçük miktarlarda salgılatma faktörlerinin salınması, hipotalamusun özgül bir sinirsel haberciyle uyarılması sonucunda gerçekleşir; bu haberciler kapı toplar damarı sistemi üzerinden adenohipofize varırlar.

Bir hastalığın tanısı ve tedavisi, hastalıkla ilgili patofizyolojiyi anlayabilme ve test edebilme (miktarlayabilme) yeteneğine bağlıdır. Endokrin sistem rahatsızlıkları genellikle bir nedenden dolayı hormonların normal miktarların dışında üretimi ile ortaya çıkar. Hormon dengesizliği sonucu organizma normal işleyişinin dışına çıkar. Bu durum çok farklı sendromlar oluşturur. Bu sendromlarını tanımak ve etkili tedaviyi uygulamanın ilk aşaması; Hormonların etkisini detaylı olarak bilmek ve spesifik bir

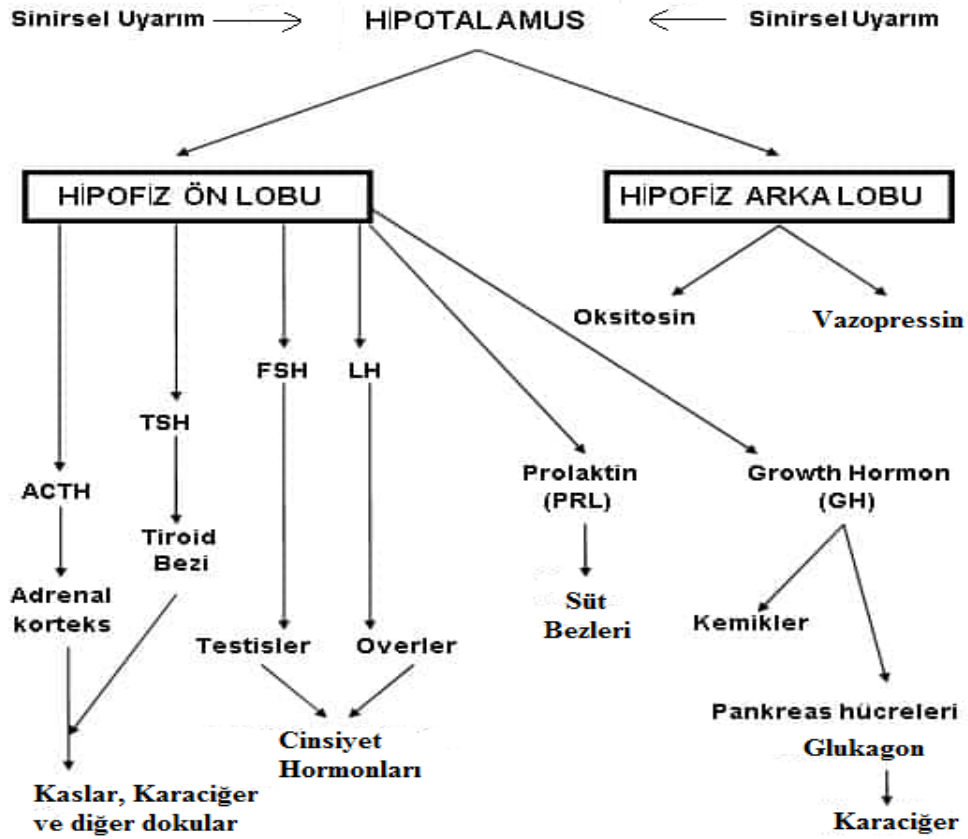
hormonun fizyolojik ve metabolik etkilerini anlamaktır (Murray, Mayes, Granner, Rodwell, 1993).

Hormonlar işlevlerine göre üç grupta incelenebilir;

- Büyüme ve farklılaşma
- Vücut dengesinin sağlanması
- Üreme

Büyüme ve farklılaşma işlevi üzerinde etkili olan hormonlar arasında en önemlileri büyüme hormonu ve tiroid hormonlarıdır. Vücut dengesinin sağlanmasında ise tiroid hormonları, paratiroid hormon (PTH), kortizol, aldosteron, insülin, vazopressin görev alır (Özata, 2019).

Temel iletişim kontrol sisteminde etkin olan nöronlar sinir sistemini oluştururlar. Nöronların oluşturduğu uyarılar hipotalamusu etkileyerek hormon salınımı düzenlenir. Hedef dokular Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

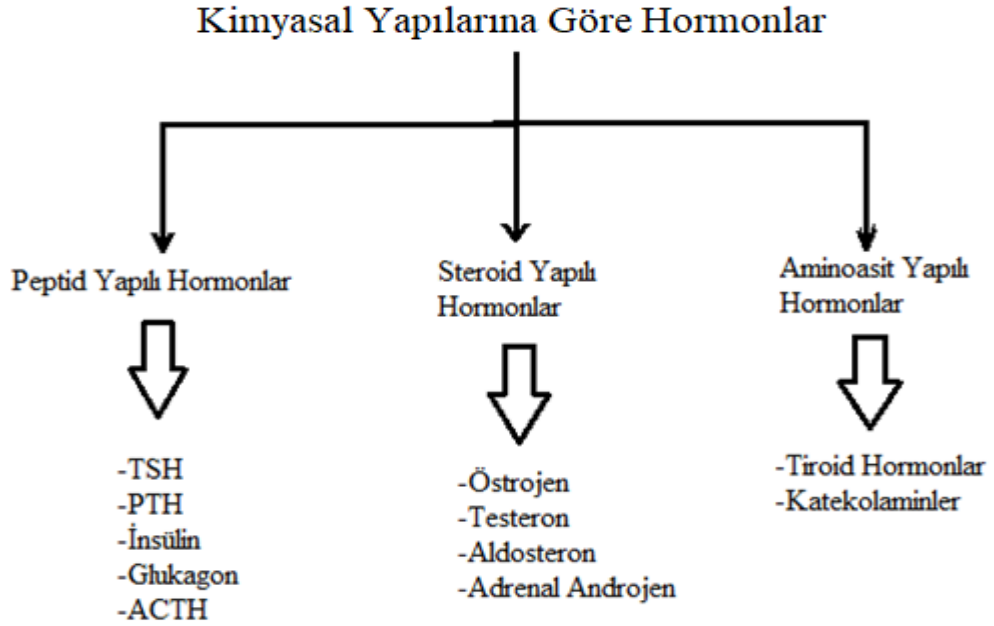


Şekil 2.1. Sinirsel uyarı oluştuktan sonra endokrin sistemlerdeki mekanizma ve hedef dokular (Nelson & Cox, 2013)

2.1.1. Hormonların Sınıflandırılması

Sentezleri belirli organlarla sınırlı olmadığı ve hormon kavramı yeterli nitelikte diğer endojen maddelerden ayrılmadığı için hormonların sınıflandırılması güçtür. Bu sebeple hormonlar en genel anlamda sınıflandırılmışlardır ve kimyasal yapılarına göre 3 ana başlıkta incelenir (Ası, 2009).

Şekil 2.2’de ki tabloda en genel anlamda hormon sınıflandırılması gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Kimyasal yapılarına göre hormonların sınıflandırılması (Ası, 2009)

Aminoasit yapısındaki hormonlar, en basit yapılı hormonlardır. Aminoasitlerden oluşurlar ve suda çözünebilirler. Endokrin bezlerde depolanırlar ve ihtiyaç halinde kana salınımları gerçekleşir. Dopamin ve epinefrin aminoasit yapısındaki hormonlara örnek olarak gösterilebilir.

Steroid yapıdaki hormonlar ise yağda çözünen ve vücut içerisinde kolesterolden sentezlenen hormonlardır. Hücre içerisinde depolanamadıkları için hızlıca kana salınırlar. Progesteron, aldosteron ve östrojen örnek olarak verilebilir.

Bir diğer hormon sınıfından olan peptid yapılı hormonlar ise karmaşık yapılardır ve büyük önem taşırlar. Yapısında uzun aminoasit zinciri içerirler ve suda çözünebilirler. Büyüme, hücrelerin çoğalması gibi metabolik olaylarda görevlidirler. Endokrin bezde depolanırlar ve endokrin bez sinirsel uyarım aldıktan sonra ihtiyaç duyulduğu anda salgılanırlar. TSH, insülin, PTH peptid yapılı hormonlara örnek olarak gösterilebilir (Akay, 2014)

Çizelge 2.1’de ise hormonların bir başka sınıflandırılması da gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Kimyasal yapıları farklı olan hormonların sınıflandırılması (Nelson & Cox, 2013)

Tip	Örnek	Orijin	Sentez Yolu	Etki Şekli
Peptit	Leu-Enkefalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Proenzimlerin Proteolitik İşlenmesi	Plazma Zarı Reseptörleri; ikinci mesajcı
Katekolamin	Epinefrin	Tirozin		
Eikozanoil	PGE ₁	20:4 Yağ Asidi		
Steroid	Testosteron	Kolesterol		
Retinoit	Retinoik asit	A vitamini		Nükleer reseptörler; Transkripsiyonel regülasyon
Tiroit	Triiyodotironin(T ₃)	Tiroglobülindeki tirozin		
D vitamini	1,25-dihidroksi-kolekalsiterol	Kolesterol		
Nitrik oksit	Nitrik oksit	NO ⁺	Arjinin+O ₂	Sitozolik reseptörler

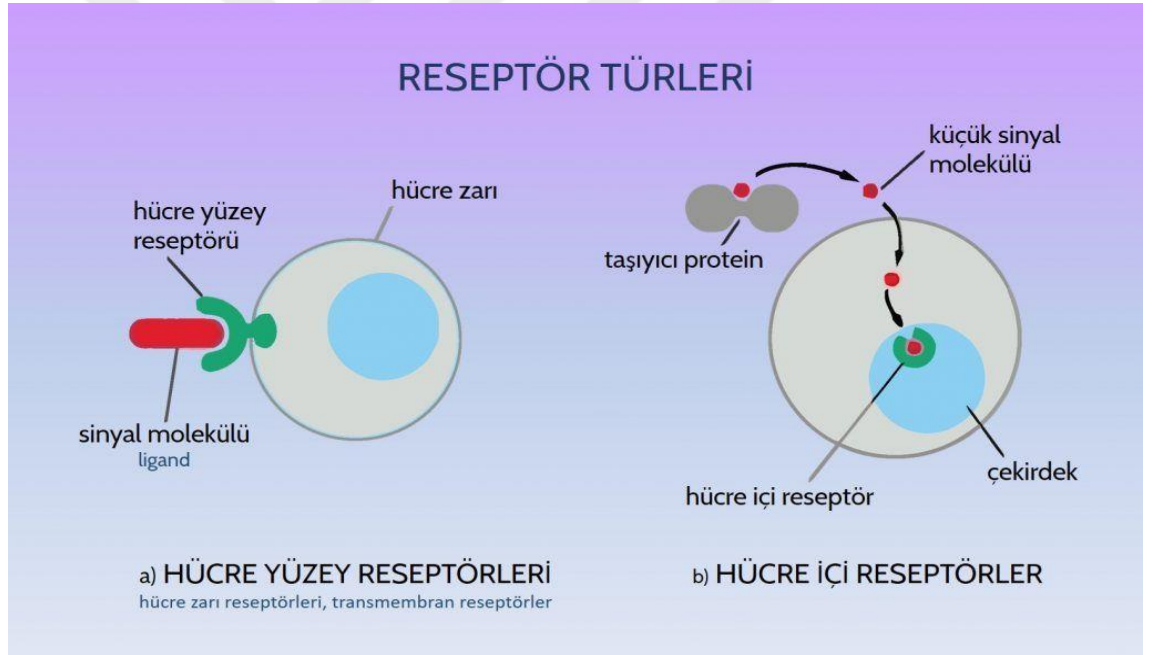
2.1.2. Hormonların Etki Mekanizmaları

Hipotalamus, sinirsel uyarım aldıktan sonra endokrin bezlerini uyarır ve hormonlar kana salınır. Bu etki mekanizması hormon-reseptör sistemi ve hormon içi protein sentez sistemi olmak üzere 2 şekilde gerçekleşir.

Hormon-Reseptör sistemlerinde, hücrelerin zarı üzerinde protein yapısında bir reseptör vardır ve hormon bu reseptörü tanır. Buna göre her hormon için spesifik bir reseptör bulunmaktadır.

Hipofiz ön lob hormonları olan TSH, ACTH, FSH ve hipofiz arka lob hormonları olan vazopressin, PTH, glukagon, epinefrin, hipotalamik bölgeden salınan faktörler bu tip reseptör sistemi yolu ile etki yapan hormonlardır.

Hücre içi protein sentez sistemlerinde ise hormonlar çekirdekte yer alan genlere etki ederek haberci-RNA sentezini uyarır ve sonuç olarak ribozomlarda belirli proteinlerin biyosentezini artırırlar. Steroid hormonlar bu etki ile çalışırlar (Ası, 2009). Şekil 2.3'te hormonların etki mekanizmaları şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. Hücre yüzey reseptörü ve hücre içi reseptör etki mekanizması (Özdoğan, 2019)

2.1.3. Hormonların Kontrol Mekanizması

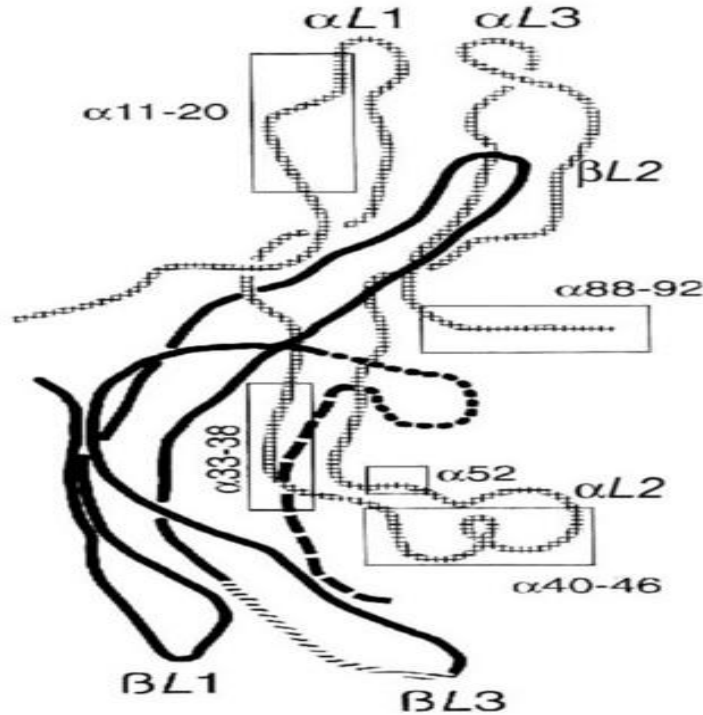
Hormonların sentezlenmesi ve hedef dokuya ulaşması için kana salınmaları, hiyerarşik bir kontrol mekanizmasının denetimi altında gerçekleşir. Genellikle hormonların büyük bir kısmının kana salınması birden fazla basamağın yer aldığı bir kontrol sistemi tarafından düzenlenir.

Hipotalamus bu kontrol sisteminin en üstünde yer alır. Hipotalamus'a ulaşan sinirsel bir uyarım bu bölgede salgılatıcı faktör mekanizmasını işletir ve çok küçük miktarlardaki özel hormonların salınımına yol açar (Ası, 2009).

Pankreas hormonları (insülin, glukagon), tiroid-paratiroid hormonları (PTH, Kalsitonin), böbrek üstü bezi hormonları (Adrenalin, Noradrenalin) hipotalamus tarafından kontrol edilemeyen hormonlardır (Nelson & Cox, 2013).

2.1.4. Tiroid Stimüle Edici Hormon (TSH)

TSH, hipofiz ön lobundan salgılanan moleküler ağırlığı insanda 30 kDa, sığırdada 10 kDa, koyunda 35 kDa civarında olan α - β dimer yapısına sahip glikoprotein yapısında bir hormondur. İnsanda α alt birim 92, β alt birim ise 118 amino asitten oluşur. Protein yapısı kükürtçe zengindir. Karbonhidrat kısmı molekül ağırlığının % 20 sini oluşturur ve fukoz, mannoz, galaktoz, glukozamin ve galaktozamin içermektedir. Şekil 2.4'te TSH hormonunun üç boyutlu yapısı görülmektedir (Szkudlinski, Fremont, Ronin ve Weintraub, 2002).



Şekil 2.4. TSH molekülünün 3 boyutlu yapısı (Szkudlinski vd., 2002)

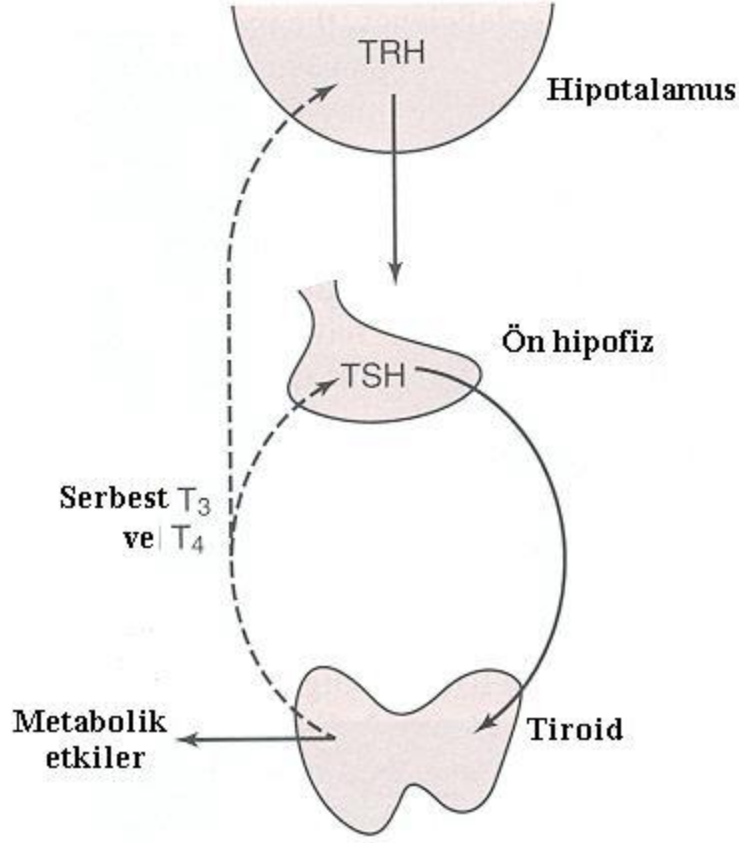
TSH, T3 ve T4 hormonlarının kana salınımı için tiroid bezini uyarır. TSH'ın tiroid bezi işlevi üzerinde akut etkileri vardır. Bu etkiler dakikalar içinde gerçekleşir ve iyodür konsantrasyonu, eşleşme, tiroglobulin hidrolizi, organifikasyon da dahil T3 (3,3',5-triiodotironin) ve T4 (tiroksin) biyosentezinin tüm fazları ile ilgili artışlarda etkilidir. Tiroid hormonları, gen ifadesi, doku farklılaşması ve genel gelişmeyi düzenler.

TSH Tiroid bezi üzerinde bazı kronik etkilere de sahiptir. Bunlar protein, fosfolipid, nükleik asit sentezlerindeki artışlar ve tiroid hücrelerinin sayısındaki ve ebatlarındaki artışlardır (Murray vd., 1993).

Tiroid hormonlarının kanda azalmasıyla hipotalamusa uyarı gider. Hipotalamus uyarıldıktan sonra tiroid salgılatıcı hormonun (TRH) salınımı gerçekleşir. TRH hipofiz bezi bazal zarındaki reseptörlerine bağlanır. Bu sayede ikincil haberci sistemi uyarılır. Çok fazla miktarda fosforilaz C üretilir. Fosforilaz C üretildikten sonra bir dizi tepkime kana TSH salınımını gerçekleştirir. Kana salınan TSH moleküllerinin tiroid hücre bazal zarındaki reseptörlerine bağlanmasıyla adenilatsiklaz etkinleşir ve cAMP sentezi uyarılır, cAMP miktarındaki artış protein kinazı aktifler, hücre içinde ilgili fosforilasyon basamakları başlar. Tüm bu olaylar sırasıyla gerçekleştikten sonra T3 ve T4 hormonları görevlerini yerine getirmek üzere kana salınırlar.

Kandaki TSH, T3 ve T4 seviyeleri birbirleriyle ilişkili haldedir. Kanda T3 ve T4 hormonlarının konsantrasyonu azaldığında hipofizden TSH salınımı gerçekleşerek kanda T3, T4 hormonlarının seviyelerini artırır. T3 ve T4 hormonlarının konsantrasyonları azaldığında kanda TSH konsantrasyonu artar, T3 ve T4 hormonlarının konsantrasyonu arttığında TSH konsantrasyonu azalır. (Nelson & Cox, 2013; Wartofsky & Dickey, 2005; Ruge vd., 2015).

Şekil 2.5'te yukarıda anlatılan kontrol mekanizması görülmektedir.



Şekil 2.5. TSH etki ve salınım mekanizması

TSH metabolizmanın düzenlenmesinden sorumludur. Sinir sistemi, kas-iskelet sistemi ve üreme dokusunun işlevini düzenler. Ayrıca vücut ısısını, vücut ağırlığını ve kan kolesterol seviyesini düzenlemede kritik öneme sahiptir (Moreno vd., 2008; Tarım 2011).

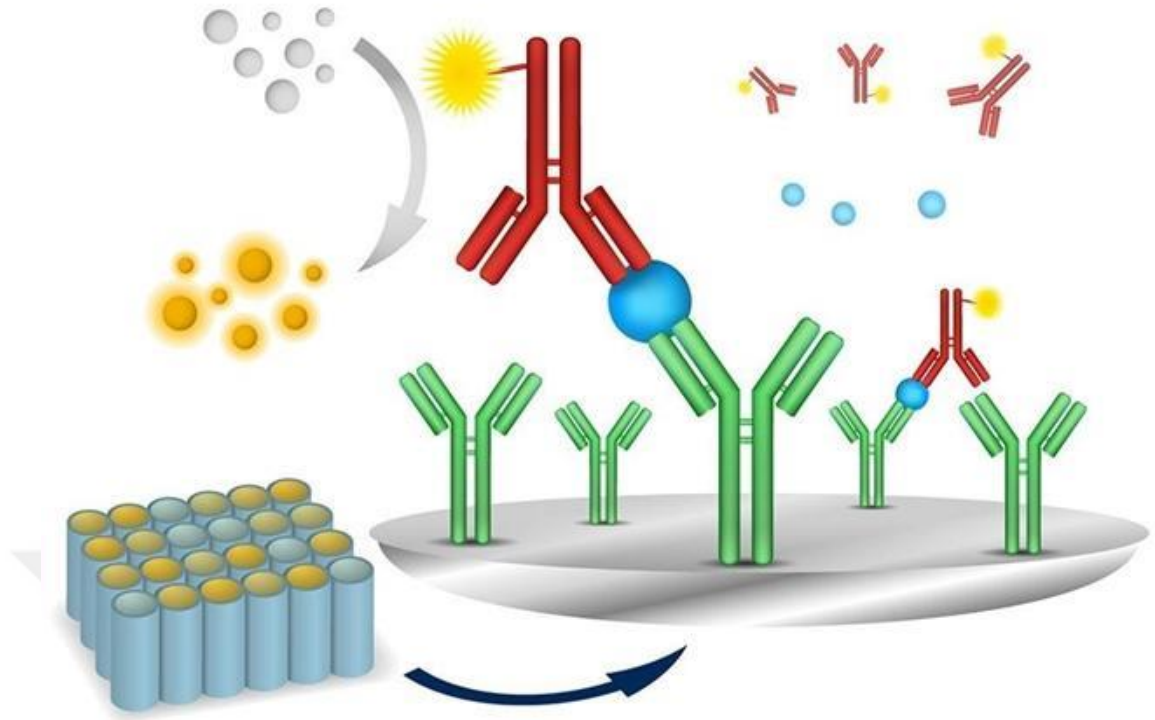
Kan serumunda TSH referans konsantrasyonu yaşa göre değişiklik göstermektedir ve referans değerler yetişkinler için 0.45- 4.12 mIU⁻¹ ve 70 yaşın üzerindeki yaşlılar için 0.4-5.9 mIU⁻¹'dir (Smaniotto, Mezalira, Zapp, Gallardo, Vieira, 2017; Wiersinga, 2003). TSH konsantrasyonunun referans değerlerden daha yüksek ve daha düşük olması, sırasıyla hipotiroidi ve hipertiroidi olarak tanımlanmaktadır (Moreno vd., 2008). Referans değerlerden farklı olan serum TSH düzeyi doğrudan birçok hastalıkla ilişkili olabilir.

Düşük TSH düzeyleri, hipopitüitarizme, multinodüler guatra, tiroid nodüllerinin yanı sıra, antikorların TSH'yi taklit ettiği otoonomik bir hastalık olan Graves hastalığına yol açabilir (Grenn vd., 2014; You, Park & Yoon 2013). Hipertiroidi, kemik mineral yoğunluğunda bir azalmaya neden olabilir. Ayrıca, kardiyovasküler sistemi etkileyebilir ve kalp hızını artırarak ve egzersiz kapasitesini azaltarak yaşam kalitesini bozabilir (Bernadette & David, 2008).

Yüksek serum TSH düzeyleri konjenital hipotiroidi, Hashimoto tiroiditi ve hipofiz tümörlerine neden olabilir. Hipotiroidizmin lipid profili, kan şekeri düzeyi, yüksek tansiyon ve insülin direnci gibi önemli metabolik parametreleri olumsuz etkileyebileceği bildirilmiştir (Wang 2013; Moura vd., 2014). Hipotiroidizm hamile kadınlarda fetusların nörolojik gelişimini olumsuz etkileyebilir (Haddow vd., 1999) ve çocuklarda ciddi fiziksel ve zihinsel gelişim sorunlarına yol açan endemik kretinizm ise neden olabilir (Kochupillai & Mehta 2008; You vd., 2013). Ayrıca, hipotiroidizmin sistolik hipertansiyon, atriyal fibrilasyon, bozulmuş lipid profili ve vasküler inflamasyona neden olarak kalp ve kardiyovasküler sistem hastalıklarına neden olduğu düşünülmektedir (Langén vd., 2018; Seo vd., 2018).

2.1.5. TSH Tayin Metodları

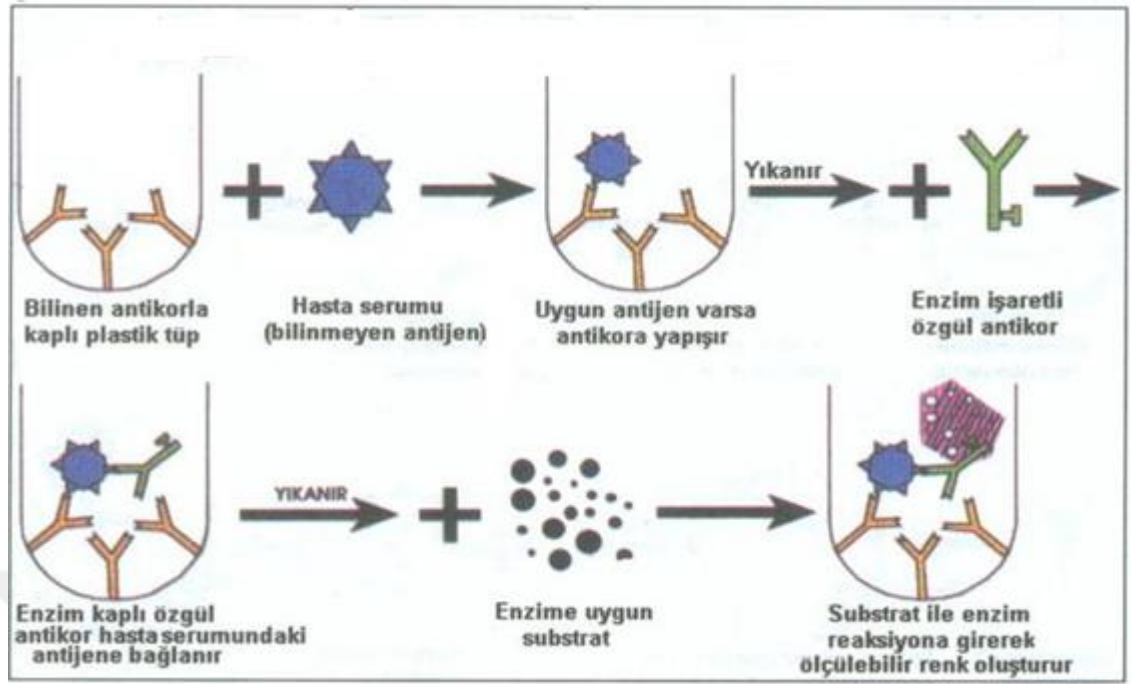
Hormonlar çok küçük miktarlarda etkili olabilen moleküllerdir ve serum konsantrasyonları da oldukça düşüktür. Bu nedenle hormonların serum konsantrasyonlarının belirlenmesi için kullanılan yöntemler çok hassas analiz metotlarını içermelidir. Hormon analizleri için günümüzde kullanılan metotların temelini immunoassay yöntemleri oluşturur. Bu yöntemlerin esasları analizlenecek maddeye karşı bir antikor içermesi ve bir işaretleyici ile kombine edilmesidir. İşlem sonunda spesifik işaretleyicinin konsantrasyonunun belirlenmesi analiz edilecek hormonun konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılır. (Adam, 2000). Şekil 2.6'da immunoassay yöntemlerinin esasları şematize edilmiştir.



Şekil 2.6. İmmunoassay yöntemlerinin esası

Enzim Linked Immuno Sorbent-Assay (ELISA)

ELISA metodu uzun bir deneysel prosedüre sahiptir ve hassasiyeti diğer immunoassay temelli metotlara göre azdır. Bu tekniğin prensibi antikorla antijen arasındaki reaksiyona dayanır. Sandviç metot olarak da bilinir. Bu teknikte konsantrasyonu belirlenmek istenen madde işaretsiz bir antijendir. Antikorum işaretlenmesi için enzim kullanılır; bu nedenle bu metoda enzim immunoassay adı verilmiştir. Alkalenfosfataz ve horseradishperoksidaz en çok kullanılan enzimlerdir. Ortama kullanılan enzimin substratını ekleyip enzim-substrat reaksiyonunda açığa çıkan rengin şiddeti ölçülerek antijenin miktarı tayin edilir. Renkli ürün oluşumu serumdaki antijen ile ters orantılıdır. Standart grafikten konsantrasyon belirlenir (Adam, 2000; Altınışik, 2004). Şekil 2.7’de ELISA yöntemi şematize edilmiştir.



Şekil 2.7. ELISA metodunun esası (Adam, 2000)

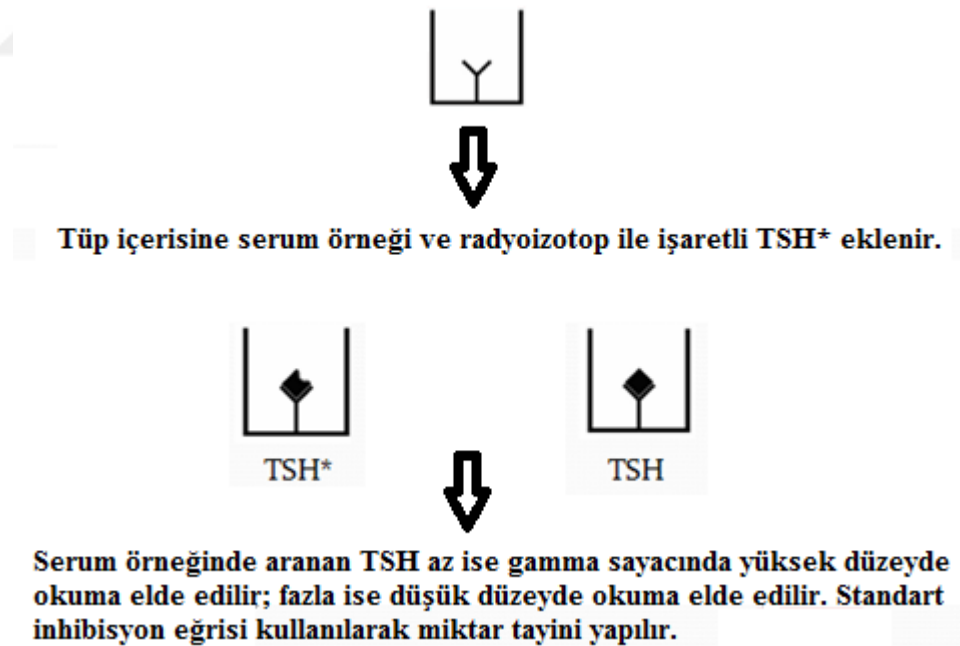
Literatürde ELISA metoduna dayalı TSH ölçümüyle ilgili çalışmalar yer almaktadır. Green vd. (2004), Graves rahatsızlığına dayalı göz kuruluğu yaşayan hastalarda 3. Nesil ELISA kiti kullanılarak TRAb-Hızlı ELISA kompleksine kan serumundaki TSH hormonlarının bağlanması ile TSH seviyeleri ölçerek klinik sonuçlar elde etmişlerdir. Wang vd. (2013) sandviç ELISA immünoassay yöntemini kullanarak TSH tayini için antikor seçimine olanak sağlayan yeni bir metot geliştirmişlerdir.

Radioimmunoassay (RIA)

Radyo immunoassay metodunun esası, işaretleyici bir radyoaktif element kullanarak işaretli hormonun miktarının tayin edilmesine dayanır. I^{125} radyoaktif element en sık kullanılan işaretçidir. Yarılanma ömrü 60 gün olup, düşük enerjili, yüksek aktiviteli olmasından, ucuz ve kullanım kolaylığından dolayı tercih edilir, fakat radyasyon riski bulunmaktadır. I^{125} gamma ışınları yayan bir elementtir. Yayıdığı gamma ışınları ile hormon miktarı tayin edilir.

Deney ortamında I^{125} ile işaretli TSH molekülleri ile işaretli TSH molekülleri bulunmaktadır. Fare ya da tavşan gibi kobay olarak kullanılan deney hayvanlarından hormonun antikorunu elde edilir. I^{125} ile işaretlenmiş hormonlar ise uygun laboratuvar şartlarında in vitro olarak hazırlanır. Radyoaktif işaretleyici element ile işaretlenmiş antijen kit ile antikor hazır olarak bulunmaktadır. Piyasada Count-A-Count kiti olarak ta bilinen bu kitlerde, antikor, plastik tüplere kitleriyle beraber daha evvel bağlanmış olarak bulunmaktadır. Hasta serumlarında ölçülmesi planlanan hormonlar, işaretlenmemiş antijenlerdir.

Metodun esası, işaretli ve işaretli olmayan antijenlerin antikorlara bağlanmak için yarışmalarına dayanır. Ortamda bulunan işaretli olmayan antijenlerin sayısının fazla olması antikora bağlanmanın oranını artırması anlamına gelmektedir. Deney bitiminde tüpteki sıvı alındıktan sonra tüp cidarında bağlı antikorlar ve antijenler kalır. Gamma sayıcı ile I^{125} 'in yaydığı gamma ışınları sayılır. Standart eğri grafiğinden hormon miktarı tayini yapılır (Adam, 2000). Şekil 2.8'de RIA metodu şematize edilmiştir.



Şekil 2.8. TSH molekülünün RIA metodu ile ölçülmesinin esası

Bu metodun dezavantajları; radyoaktif izleyici kullanıldığı için sağlık tehlikesi barındırması, raf ömrünün kısa olması, radyoaktif atık bertarafı gerektirmesi ve yüksek

maliyetli ekipmanlara ihtiyaç duymasidir. Bu sebeple yaygın olarak kullanılmamaktadır (Kalia vd., 2004).

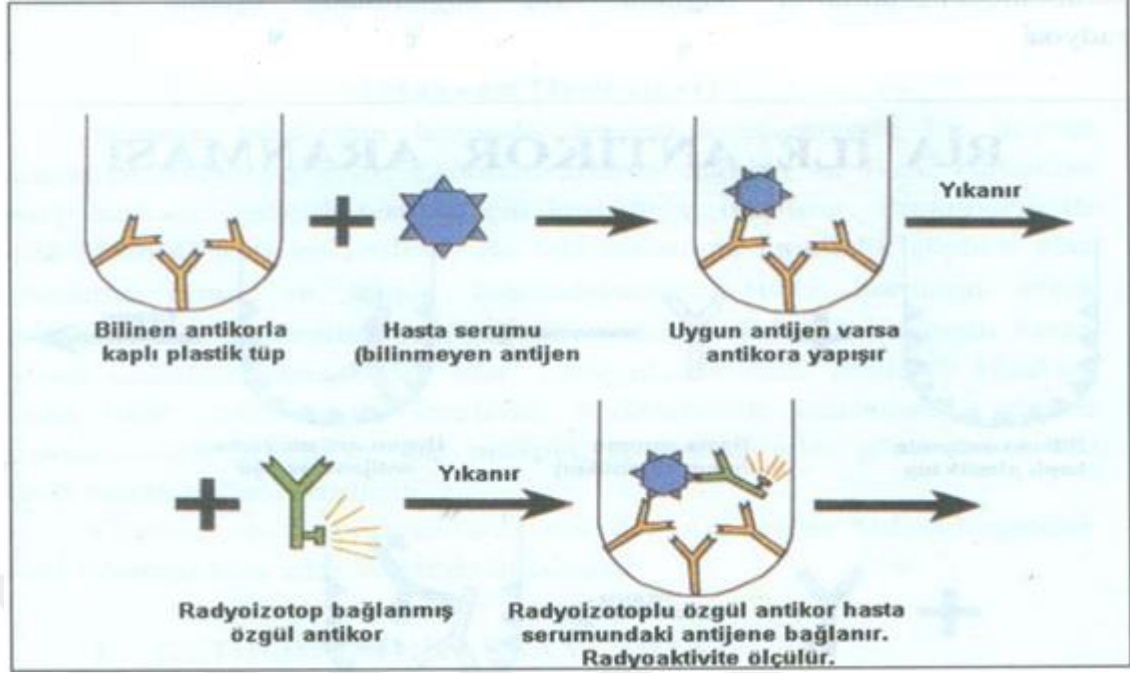
Günümüzde RIA metodunu temel alan hazır kitler TSH tayini için kullanılmaktadır. Literatürde de RIA metodunu baz alan çalışmalar yer almaktadır, bunlardan bir tanesinde Glinoe ve Spencer (2010) normal tiroid fonksiyonunun normal bir gebelik için en önemli parametrelerden biri olduğuna vurgu yaparak, hamile kadınlarda tiroid fonksiyon anormalliklerini belirlemek için, kan TSH konsantrasyonlarını RIA metoduyla ölçmüşlerdir.

İmmüno Radyometrik Assay (IRMA)

Kan serumunda konsantrasyonu araştırılan antijene özgül antikorlar polisitiren tüp ya da plastikten oluşan katı fazlara bağlanmış olarak bulunmaktadır. Katı fazlardan oluşan tüplerin içine kan serumu eklenir ve inkübasyona bırakılır. Bu süre boyunca kan serumunda uygun antijenler kendine özgül antikorlara bağlanır ve antikor-antijen kompleksleşmesi oluşur. İnkübasyon işleminden sonra yıkama işlemi yapılarak ortamdaki diğer maddeler uzaklaştırılır.

Yıkama işlemi bittikten sonra tüpe antijene özgül radyoaktif madde ile işaretli antikor (antikor*) ilave edilerek tekrar inkübasyona bırakılır. Bu süre boyunca radyoaktif madde ile işaretlenmiş antikor, antijene bağlanarak, antikor-antijen-antikor* kompleksini meydana getirir. Ortamda antikor-antijen-antikor* dışındaki maddeleri uzaklaştırmak için tekrardan yıkama işlemi gerçekleştirilir.

Gamma sayıcı ile oluşan bu kompleksin radyoaktivitesi ölçülerek standart grafikden antijen miktarı hesaplanır (Altınışık, 2004). Şekil 2.9'da IRMA metodu şematize edilmiştir.



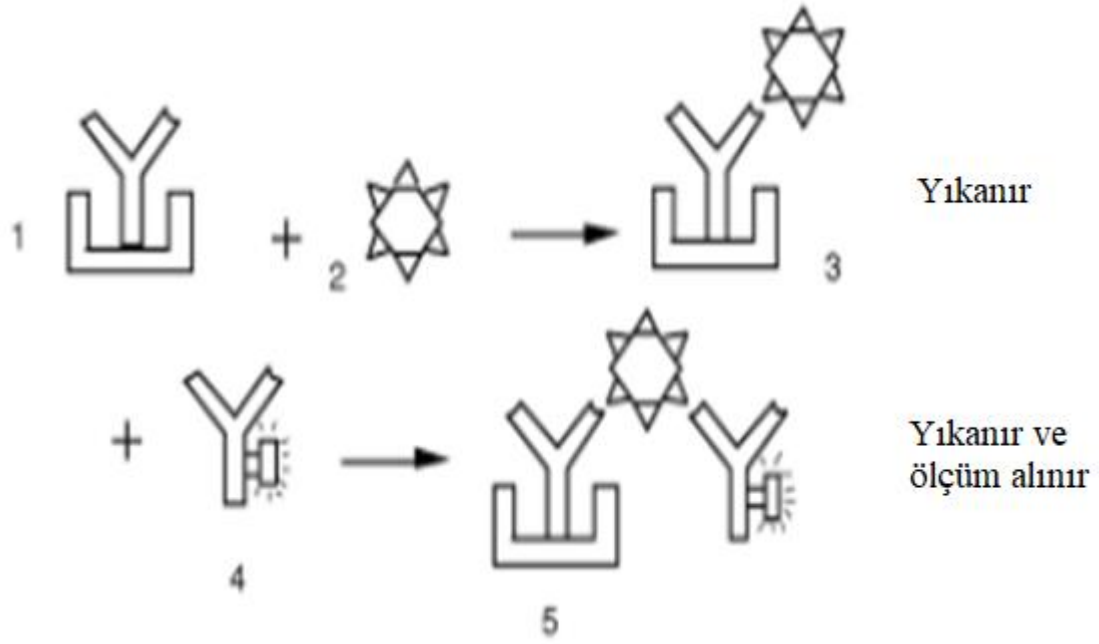
Şekil 2.9. IRMA metodunun esasına ait görsel (Ası, 2000)

IRMA metodu yaygın olarak kullanılmamaktadır. Literatürdeki TSH tayinine yönelik nadir çalışmalardan birinde Wilson vd. (1987), Graves hastalığına sahip hastalarda karbizamol ile tedavi sonrasında trioksikozun nüksetmesini öngörmenin mümkün olup olamayacağını belirlemek için kan TSH konsantrasyonlarını IRMA metodu ile belirlemişlerdir.

Floresans Immunoassay Metodu (FIA)

İşaretleyici olarak floresein gibi floresan özellik gösteren maddeler kullanılır. Floresan özellik gösteren bu maddeler önce enerjiyi absorbe ederler ve belli bir süre sonra tekrar salarlar. Bu şekilde oluşturdukları sinyal tespit edilerek ölçüm yapılır (Adam, 2000). Şekil 2.10'da FIA metodu şematize edilmiştir.

FIA metodu ile TSH tayini diğer metodlara nazaran daha az sayıda çalışılmıştır. Papendieck vd (1995) hipotiroidizm tanısı için yeni doğan bebeklerde ilk 48 saat içinde FIA metodu esasına dayanarak TSH seviyelerini belirlemişlerdir.



Şekil 2.10. FIA Metoduna ait görsel

TSH tayinine yönelik belirttiğimiz metodlar genel anlamda sıklıkla kullanılıp güvenilir yöntemler olmasına rağmen önemli dezavantajları bulunmaktadır. Belirtilen tüm yöntemlerin ekipmanlarının pahalı olması, ölçüm sürelerinin zaman alması, reaktiflerin raf ömürlerinin kısa olması, özel cihaz, ekipman ve kitlere ihtiyaç duyması, eğitilmiş uzman personele ihtiyaç duyulması ve yerinde rutin analizlere olanak vermemesi gibi dezavantajlara sahiptirler.

Tüm bunlar değerlendirildiğinde TSH analizleri için antikor-antijen ilişkisini temel alan yeni alternatif tayin metodlarının geliştirilmesinin gerekliliği açıktır.

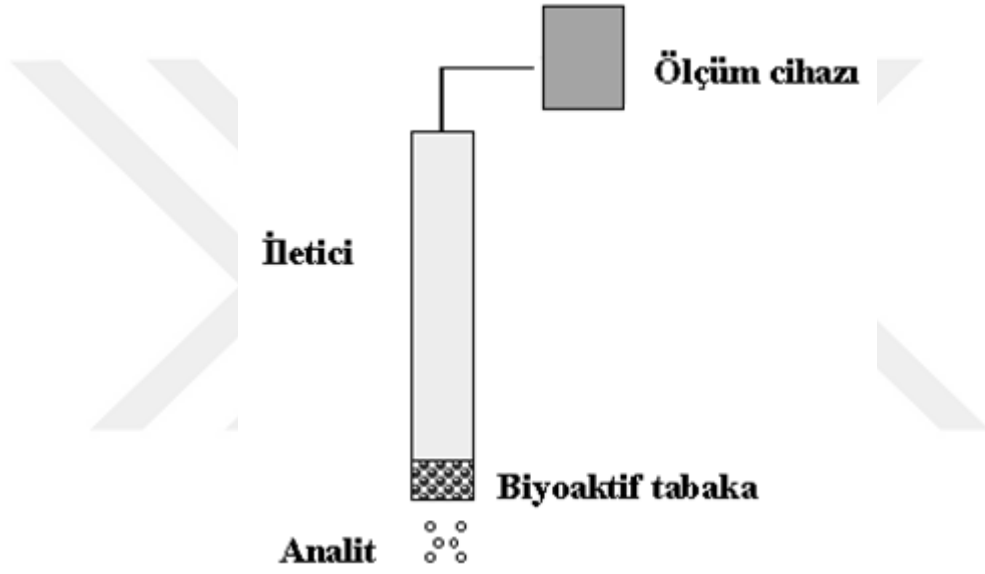
2.2. Biyolojik Belirteçler: Biyosensörler

Yaşayan tüm varlıklar yaşamlarını devam ettirebilmek için buldukları ortamdaki değişimleri algılayıp bu değişimlere uymaya çalışırlar. Biyosensörler bu algı mekanizmasıyla ortaya çıkmıştır (Telefoncu & Kılınç, 2012).

Bir biyosensör; biyoaktif veya biyoalgılama (biyokomponent, biyoreseptör, biyobileşen) kısımlarını içermelidir. Biyobileşen analiti tanımalıdır. Biyoalgılama

materyali fiziksel ölçüm bileşeni olan transdüser ile kombine edilmelidir. Tüm bunlar bir biyosensörün sahip olması gereken en önemli özellikleridir.

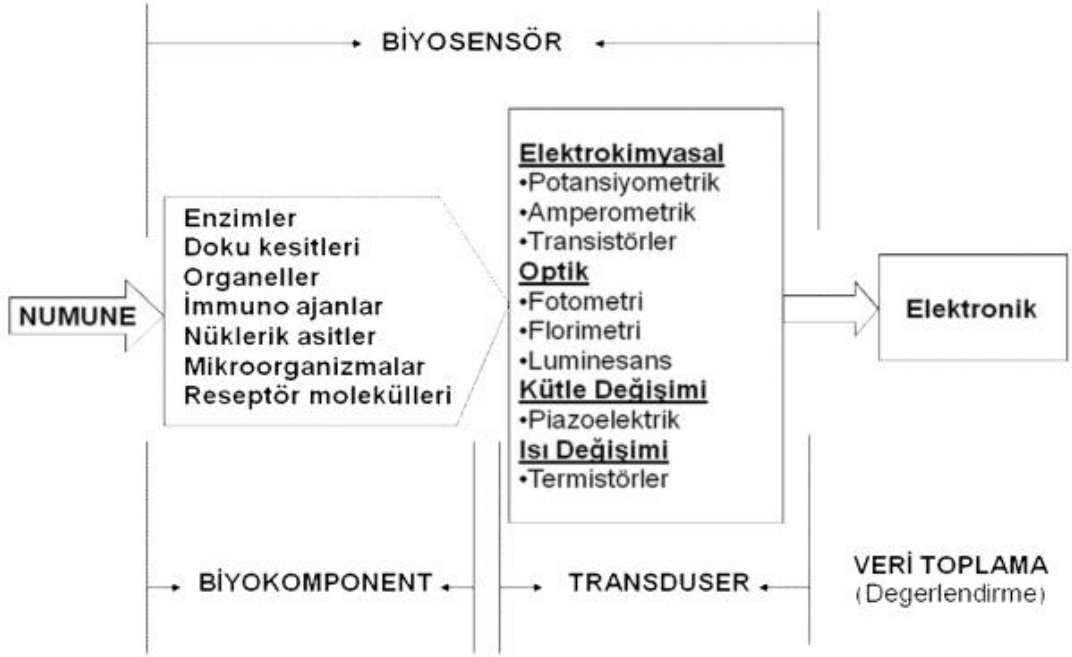
Genel olarak biyosensörler; kimyasal, biyolojik ya da biyokimyasal sinyali ölçülebilir ve işlenebilir elektriksel sinyale dönüştürebilen ve bir fiziksel bileşen ile birleştirilmiş biyolojik algılama materyali (biyokomponent) içeren bir cihazdır (Coulet, 1988; Datta, 1990; Turner, Karube, Wilson, 1987; Wangner & Guibalt, 1994). Şekil 2.11’de biyosensörler şematize edilmiştir.



Şekil 2.11. Biyosensörlerin şematik olarak gösterimi

Biyobileşenler ile fiziksel bileşenler birbirleriyle kimyasal reaksiyon ya da fiziksel bir yöntem ile birbirlerine bağlanabilmelidirler. En yaygın olarak kullanılan biyobileşenler antikorlar ile enzimlerdir (Telefoncu & Kılınç, 2012). Çizelge 2.2’de bir biyosensörleri oluşturan fiziksel bileşenler ve biyobileşenler şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Biyosensörlerin bileşenleri (Özcan, 2010)



Biyosensörler ile hormonlar, nükleik asitler, koenzimler ve inhibitörler gibi pekçok türde maddenin analiz edilmesi mümkündür. Çizelge 2.2’de belirtilen biyokomponent ve fiziksel bileşenler biyobileşenin analit ile ilişkisinin türüne göre genişletilebilir. Çizelge 2.3’te biyosensörü oluşturan biyokomponent ve fiziksel bileşenlerin daha geniş bir dağılımı yer almaktadır.

Çizelge 2.3. Biyosensörü oluşturan bileşenlerin içerikleri (Telefoncu, 2008)

<u>Analit olarak kullanılan maddeler</u>	<u>Biyoreseptör olabilecek moleküller</u>	<u>Sinyal iletici sistem olarak kullanılan transduserler</u>
Hormonlar	Reseptörler	<u>Elektrokimyasal Esaslı</u>
Antijen	Antikor	- Amperometri
Nükleik Asit	Aptamerler	- Potansiyometri
Koenzim	Enzim	- Yarı iletken esaslı
Mikroorganizmalar	Hücre Organelleri	<u>Optik Esaslı</u>
Allerjen	Lipid	- Fotometri esaslı
Metal	Mikroorganizma	- Fluorometri esaslı
Kanser Biyobelirteçleri	Antikor	- Biyoluminesans esaslı
Metabolitler	Hücre doku kesitleri	<u>Piazoelektrik</u>
İnhibitörler	Enzimler	- Mikrokantileverlar - Kuartz kristal mikrobalanse

2.2.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, biyokomponent türüne göre, analit madde ile biyoaktif bileşen ilişkisine göre ve ölçüm sisteminin türüne göre 3 farklı şekilde sınıflandırılabilirler (Bahadır ve Sezgintürk, 2015; Telefoncu & Kılınç, 2012).

- a) Analit madde ve biyoaktif bileşenlerine göre biyosensörler;
- Biyoaffinite esaslı biyosensörler
 - Biyokatalitik esaslı biyosensörler

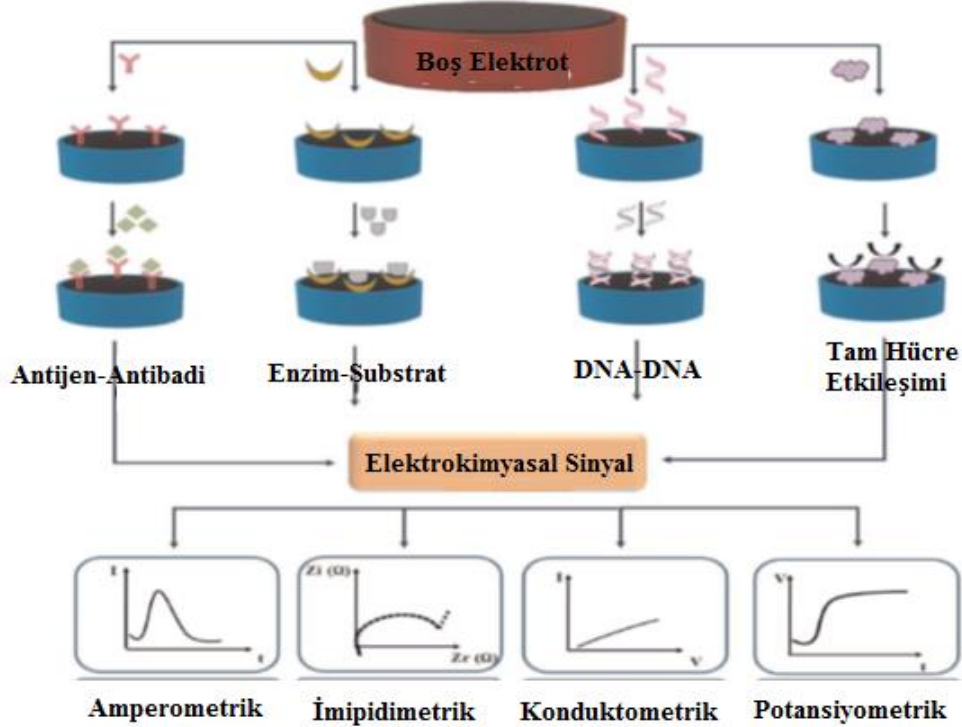
b) Biyolojik bileşenlerine göre biyosensörler;

- Enzim biyosensörleri
- DNA biyosensörleri
- İmmünoensörler
- Doku biyosensörleri
- Mikrobiyal Biyosensörler

c) Ölçüm sistemlerine göre biyosensörler;

- Elektrokimyasal esaslı biyosensörler
- Kalorimetri esaslı biyosensörler
- Piazoelektrik biyosensörleri
- Optik esaslı biyosensörler

Elektro kimyasal esaslı biyosensörler kendi içerisinde 4 ana sınıfa ayrılır. Şekil 2.12’de elektrokimyasal ölçüm sistemleri gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Biyosensörler için farklı elektrokimyasal ölçüm metodları (Bahadır ve Sezgintürk, 2015)

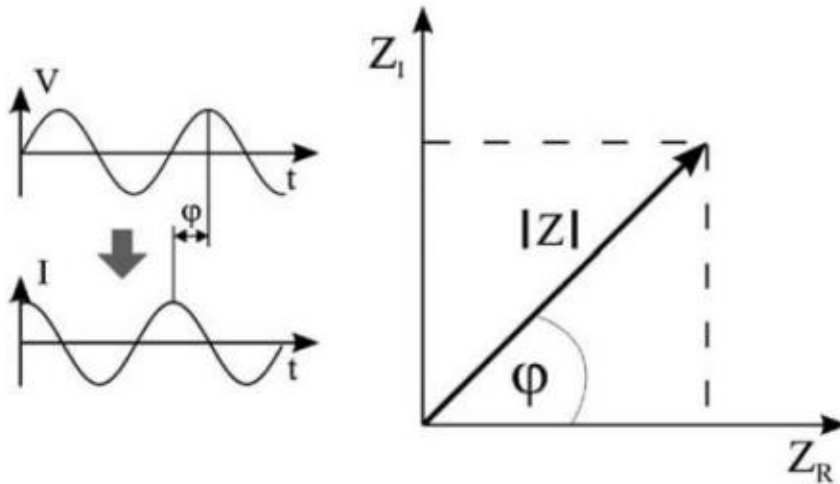
2.2.2. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS, elektrokimyasal dielektrik spektroskopisi) immobilizasyon işlemi uygulanmış olan sistemlerin, miktarlarındaki değişimleri, yüzeylerindeki hassasiyetleri, kompleks elektriksel dirençlerini analiz etmek için uygulanan hem kolay kullanışlı hem de oldukça etkili bir yöntemdir.

Biyolojik materyallerin birbirleriyle spesifik etkileşimlerinin izlenmesinde ve kantitatif analizlerinde, biyosensörlerin hazırlanmasındaki kolaylıklardan dolayı tercih edilirler.

İmpedans yöntemleri ile biyoreseptör ve analiti arasındaki etkileşmesinin belirlenmesinin yanı sıra, immobilizasyon işleminin gerçekleşmesi ve yüzey modifikasyonunun karakterizasyonlarını da başarıyla gerçekleştirmek mümkündür. Bu özellikleri impedansa, görüntüleme tekniği kullanılarak yüzey morfolojisinin gözlenmesinde yardımcı olan önemli araçtır (Orazem & Tribollet, 2008; Sezgintürk ve Uygun, 2012).

Küçük genlikli bir potansiyel uygulayarak, akım cevabının belirlenmesi ile impedans tayini yapılır. Yani impedans, potansiyel-zaman fonksiyonunun, akım zaman fonksiyonuna bölümü ile hesaplanır. Şekil 2.13'te Potansiyel-Zaman ve Akım-Zaman büyüklerine bağımlı olan bir impedansın matematiksel olarak gösterimi yer almaktadır.



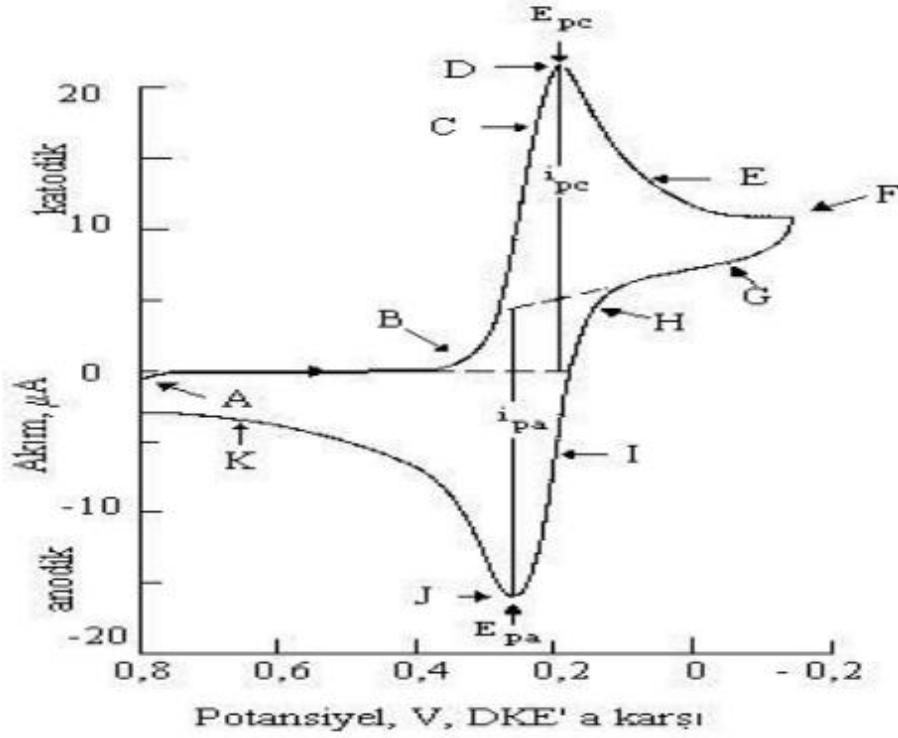
Şekil 2.13. Potansiyel-Zaman ve Akım-Zaman büyüklerine bağımlı olan bir impedansın matematiksel olarak gösterimi

İmpedansın birden fazla frekansı tayin etme özelliğinden dolayı difüzyon prosesleri, tabaka, membran veya yüzeylerin değişimleri hakkında bilgi edinilir. Bu bilgileri elde etmek için, impedans spektrumu eşdeğer bir devre kullanarak analiz işlemini gerçekleştirir. Bu devreler çoğunlukla direnç ve kapasitanstan oluşur. İncelenen sistemin farklı fizikokimyasal özellikleri de bu devre ile açıklığa kavuşur. Ayrıca bu sistem; partiyon, elektrokinetik, difüzyon gibi temel yasalardan türetilmiş olan transfer fonksiyonlarıyla da tanımlanır. Bu durumdan dolayı çözelti bileşiminin fonksiyonu, impedans bileşenlerinin (direnç veya kapasitans) değişimlerinden meydana gelmektedir. Konsantrasyondaki değişimle tüm impedans arasında ilişki kurulabilir fakat bu olay bazı durumlarda gerçekleşmektedir (Macdonald, 1987; Rubinstein, 1995; Barsoukov & Macdonald, 2005).

2.2.3. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri (Cyclic Voltammetry, CV), üçgen dalga şeklindeki bir potansiyelin, karıştırılmayan bir çözeltilde durgun elektrodun akım cevabı uyarılmasıyla meydana gelir (Skoog, Holler ve Nieman, 1997).

Dönüşümlü voltametricide doğrusal olacak şekilde belli bir potansiyel aralığında tarama işlemi gerçekleştirilir. Sonrasında potansiyeli asıl değerine getirebilmek için tarama yönü ters çevrilir. Tarama hızlarında değişiklik yoktur. Birkaç kez daha bu çevirim tekrarlanır. Ters yöndeki bu potansiyele döndürme potansiyelleri ismi verilmiştir. Bir ya da birden fazla analitin yükseltgenme ve ya indirgenmesinin difüzyon kontrollü olarak oluşturduğu potansiyel, döndürme potansiyel aralığını ortaya koyar. Başlangıç taramaları her iki yönlü (pozitif ya da negatif) olabilir. Bu yönler numune bileşimine göre değişiklik gösterir. İleri tarama, negatif potansiyeller yönündedir. Ters tarama da zıt yöndedir (Skoog vd., 1997). Şekil 2.14'te Döngüsel bir voltogram yer almaktadır.



Şekil 2.14. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında meydana gelen voltammogram (Skoog vd., 1997)

2.3. Hormon Temelli Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

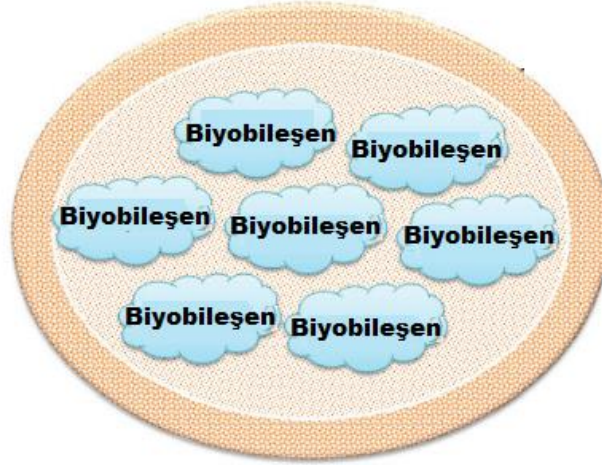
Hormon biyosensörleri, immünosensörler sınıfında yer alan, son yıllarda hormon konsantrasyon tayinleri için elektrokimyasal ölçüm metodu olarak popülerliği artan sistemlerdir. Boş elektroda miktarı belirlenecek hormonun antikoru immobilize edilerek Antikor-Hormon etkileşimi ile oluşan elektrokimyasal sinyalin impedimetrik, amperometrik, potansiyometrik ya da konduktometrik olarak ölçülmesine dayanan yöntemlerdir.

Analizlenecek hormona uygun biyoreseptör ve transduseri belirledikten sonra transduser ile biyoreseptör birbiri ile etkileşip bağlanmalıdır. Bu olaya kısaca biyoreseptörün yani biyokomponentin immobilize edilmesi denir (Telefoncu & Kılınc, 2012).

İmmobilizasyon işlemi, biyoreseptörü çözünmez bir hale getirerek fiziksel bileşene kuvvetlice bağlanmasını içerir ve bu immobilizasyon işlemi bir biyosensörü oluşturan en önemli aşamadır (Evtugyn, 2014).

2.3.1. Tutuklama Metodu Esasına Dayanan İmmobilizasyon Yöntemi

Yüksek sayıda molekül içeren biyomoleküller doğal ya da sentetik jel matrislerinde, yarı geçirgen membranlarda, misellerde ve mikro kapsüllerde tutuklanarak etkin bir şekilde fiziksel bileşene immobilize edilirler. Tutuklama işlemi yapan jel matrislerin en yaygınları silikon lastiği, akrilamit polimerleri, nişasta ve polivinilklorüdüdür (Joshi, 2006). Tutuklama metodu ile immobilizasyon Şekil 2.15'te şematize edilmiştir.



Şekil 2.15. Tutuklama metodu ile immobilizasyon

2.3.2. Adsorbsiyon Metodu Esasına Dayanan İmmobilizasyon Yöntemi

Kovalent olmayan etkileşimlerin (hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri ve Van der Waals kuvveti) etkin olduğu en basit immobilizasyon yöntemidir. Biyomoleküllerin sulu çözeltilerinin aktif taşıyıcı maddeleri ile etkileştirilerek adsorbe edilmesi esasına

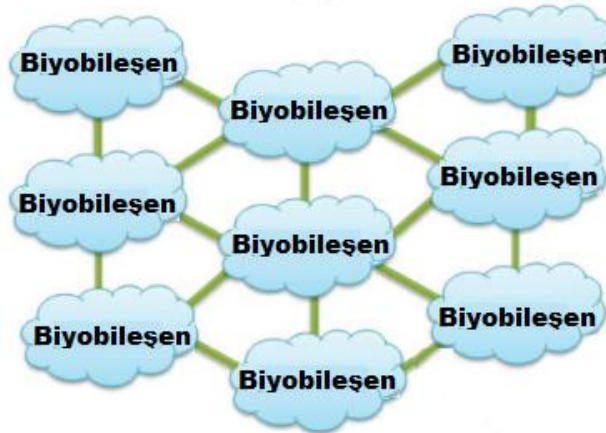
dayanır. Selüloz, silikajel, kollajen, kil, hidroksiapatit en yaygın kullanılan adsorban maddelerdir. (Joshi 2006; Schelfer & Schubert, 1992). Adsorbsiyon metodu ile immobilizasyon Şekil 2.16’da şematize edilmiştir.



Şekil 2.16. Adsorpsiyon metodu ile immobilizasyon

2.3.3. Çapraz Bağlama Metodu Esasına Dayanan İmmobilizasyon Yöntemi

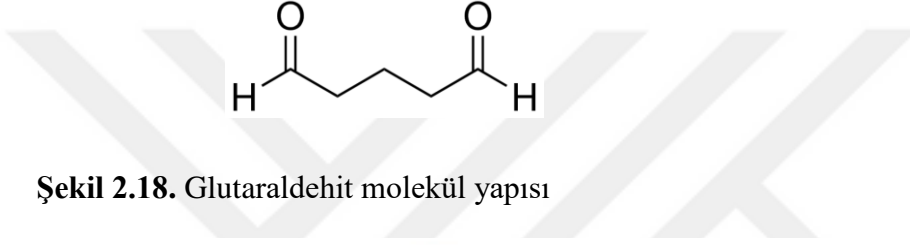
Çapraz bağlama ufak molekülü ya da yapısında çoklu fonksiyonel gruplar barındıran moleküllerin transdusere güçlü kovalent bağlarla bağlanıp çözünmeyen bir kompleks oluşturma işlemidir ve kolay pratik bir işleme sahiptir. Glutaraldehit en yaygın kullanılan çapraz bağlama ajanıdır (Joshi, 2006; Schelfer & Schubert, 1992). Çapraz bağlama metodu ile immobilizasyon Şekil 2.17’de şematize edilmiştir.



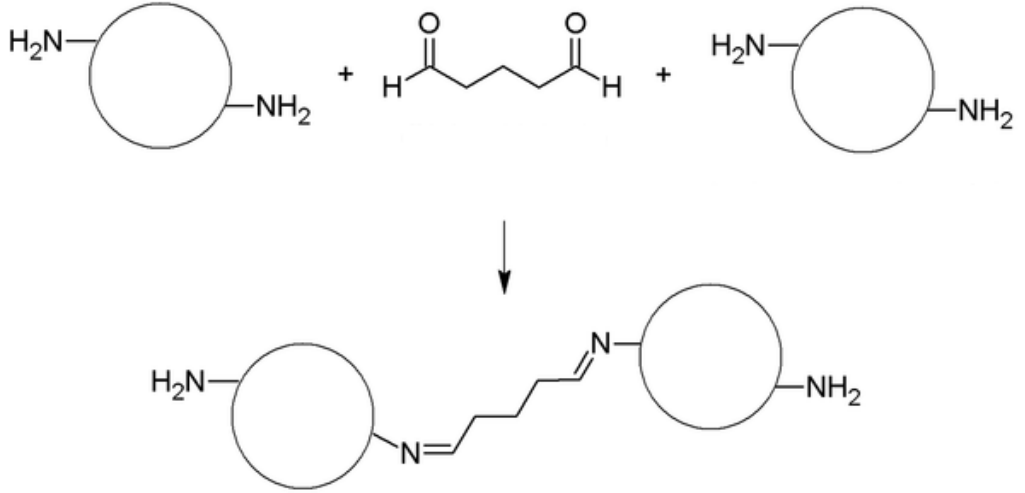
Şekil 2.17. Çapraz bağlama metodu ile immobilizasyon

2.3.3.1. Glutaraldehit ile apraz Bağlama

Glutaraldehit molekülünde her iki ucunda da aldehit (-CHO) grubu içeren 5 karbonlu bir bileşiktir. Yapısında bulundurduğu aldehit grupları aminlerle (-NH₂) kovalent olarak etkileşip Schiff bazını oluştururlar. Glutaraldehit bir ucu ile protein ile etkileşirken diğer ucu ile fiziksel bileşen yüzeydeki amin grubu ile bağlanarak çapraz bağlama yapar (Migneault, Dartiguenave, Bertrand ve Waldron, 2004). Şekil 2.18’de glutaraldehitin kimyasal yapısı, Şekil 2.19’da çapraz bağlama reaksiyonu gösterilmiştir.



Şekil 2.18. Glutaraldehit molekül yapısı



Şekil 2.19. Glutaraldehit çapraz bağlama reaksiyonu

2.3.4. Kovalent Bağlama Metodu Esasına Dayanan İmmobilizasyon Yöntemi

Kovalent bağlama oluşturmak için bağlanma yüzeyi ve etkileşecek moleküllerin reaktif kısımlarında tiyol (-SH), amin (-NH₂), Hidroksil (-OH), karboksil (-COOH), karbonil (-C=O) grupları bulunması gerekmektedir. Bu reaktif kısımlar olmadığında kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) yüzeyde reaktif gruplar oluşturur. (Joshi, 2006)

İmmobilizasyon yapılacak ortamın koşulları (ortam sıcaklığı, asitlik-bazlık) uygun olduğu takdirde bu kimyasal reaksiyona etki eder ve iyi bir bağlanma biyokomponenti daha dirençli bir hale getirir (Bain, Evall, Whitesides, 1989). Şekil 2.20'de kovalent bağlanma immobilizasyon yöntemi şematize edilmiştir.



Şekil 2.20. Kovalent bağlama metodu ile immobilizasyon

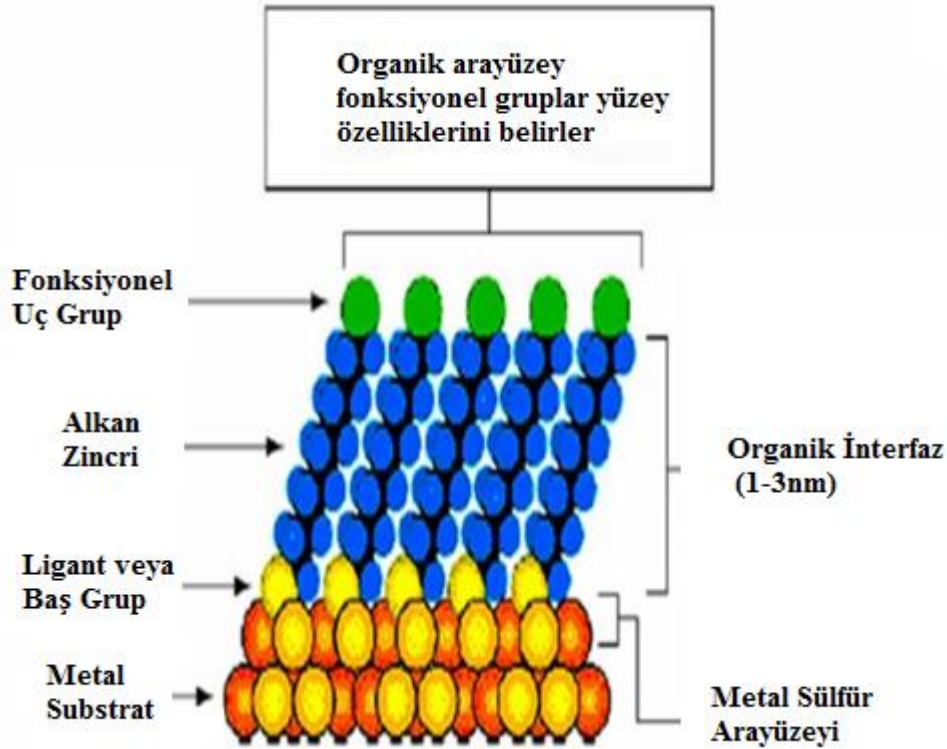
2.3.4.1. Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) yöntemi ile yapısında sülfür bulunduran organik yapının immobilizasyonu

Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM), metal yüzeyle (altın, bakır, nikel, platin.) fonksiyonel baş grup içeren organik bir molekülün reaktif kısmının etkileşmesiyle oluşan kovalent yapılardır. SAM oluşumu güçlü bir kemisorbsiyona dayanmaktadır. Organik alkil zincirleri arasındaki Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler sayesinde elektrot yüzeyinde çok düzenli ve iyi organize olmuş bir şekilde tek tabaka oluşumunu sağlar. Elektrot yüzeyinde oluşan SAM, elektron transferi için kinetik bir bariyerdir. SAM'in en büyük avantajı uygun moleküller

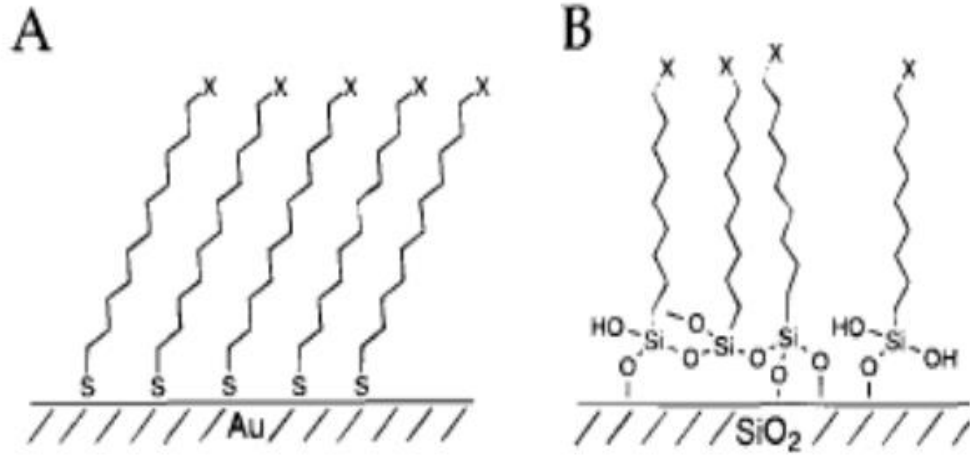
seçilerek SAM tabakasının kalınlığının kontrol edilebilmesidir (Ulman, 1991; Bain vd., 1989, Wink, van Zuilen, Bult ve van Bennekom, 1997).

Tabaka pürüzsüzlüğü, substratın yapısı, çözgen, adsorbanın yapısı, sıcaklık ve adsorban miktarı gibi bir çok etken SAM oluşumunu ve paketlenme yoğunluğunu etkiler (Chen & Jinghong, 2006).

Şekil 2.21’de SAM oluşumunun şematik gösterimi yer almaktadır. Şekil 2.22’de Sülfür ve tioyolat moleküllerinin pürüzsüz metal yüzeylerde oluşturduğu SAM gösterilmiştir (Chen & Jinghong, 2006).

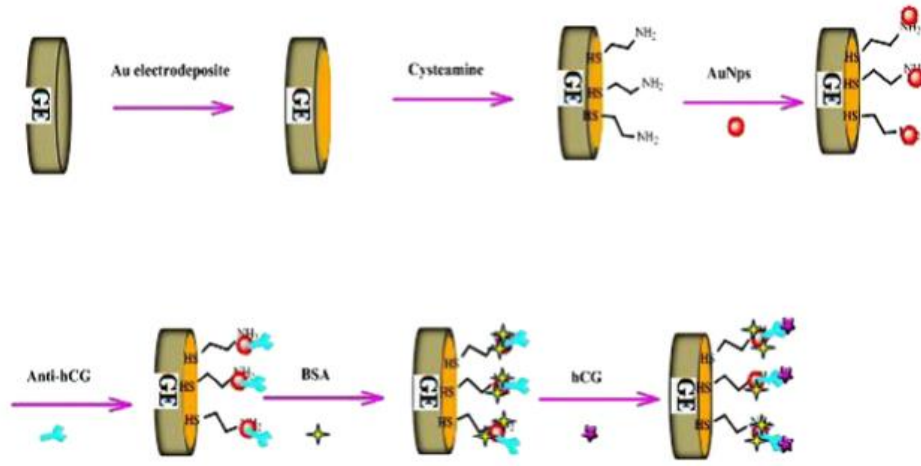


Şekil 2.21. SAM tabakasının şematik gösterimi (Chen ve Jinghong, 2006)



Şekil 2.22. A: Altın bir yüzeye fonksiyonel grubunda tiyol içeren bileşiklerin oluşturduğu SAM ve B: yüzeyi hidroksillenmiş silisyum dioksitin alkilsiloksan ile SAM yapısının şematik gösterimi (Mrksich & Whitesides, 1996)

Roushani vd. (2015), insanda karyonik gonadotropik hormonunun (hCG) ölçülmesine dayalı bir biyosensör tasarlamışlardır. Tasarladıkları biyosensörde altın elektrodun sisteamin molekülünü immobilize edip ile SAM tabakası oluşturmuşlardır. Sisteamin ile oluşturulan SAM tabakasının üzerine sisteamin moleküllerinin amin gruplarına altın nanopartiküllerini bağlamışlardır. Ölçümü yapmayı planladıkları hormonun antikorunu (Anti-hCG) altın nanopartiküllere immobilize ederek hCG hormonunun ölçülmesine dayalı bir impedimetrik biyosensör tasarlamışlardır. Tasarladıkları biyosensör Şekil 2.23'te şematize edilmiştir.



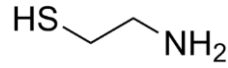
Şekil 2.23. Rosuhani ve arkadaşlarının tasarladığı sisteamin bazlı biyosensöre ait görsel (Roushani, Valipour ve Valipour, 2016)

SAM kullanımının birçok yönden avantajlıdır. Biyomoleküllerin kolayca immobilize olması için müsait bir yüzey sağlarlar. Düzenli bir yapı, ufak boşluklar ve stabil bir tek tabaka oluşması kolay gerçekleşir. Biyomolekül miktarı az olsa dahi SAM üzerine immobilizasyon sağlanır (Chaki & Vijayamohanan, 2002). Bu önemli avantajlar nedeniyle biyosensör tasarımlarında sıklıkla kullanılmıştır.

2.3.4.1.1. Sisteamin

Sisteamin, bir dizi endikasyona yönelik olan ve sistinozu tedavi etmek için FDA tarafından onaylanan bir ilaçtır. Stabil aminotiöl, yani hem bir amin hem de bir tiöl fonksiyonel grup içeren bir organik bileşiktir. Sisteamin beyaz, suda çözünür bir katıdır.

Yapısında bulundurduğu tiöl (-SH) ve amin (-NH₂) fonksiyonel gruplarından dolayı oldukça aktif bir moleküldür. Yapısındaki tiöl kısmı ile katı elektrot yüzey belli bir süre inkübe edildikten sonra SAM tabakası oluşmasını sağlar. Şekil 2.24'te sisteamin molekülü verilmiştir.

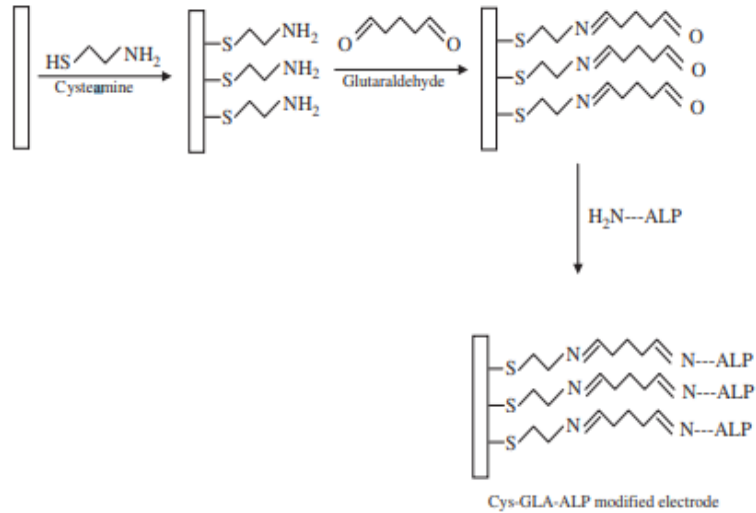


Şekil 2.24. Sisteamin molekülünün yapısı

Kullanım kolaylığı ve kararlı yapısı nedeniyle SAM oluşum reaksiyonları için oldukça uygun bir moleküldür. Bu nedenle biyosensör tasarımlarında sıklıkla kullanılmıştır.

Canbay ve Akyılmaz, dopamin ölçümünde kullanılmak üzere sisteaminin kullanıldığı bir biyosensör tasarlamışlardır. Tasarladıkları biyosensörde altın elektrot yüzeyine sisteamin ile SAM tabakası oluşturmuşlardır (Canbay & Akyılmaz, 2014).

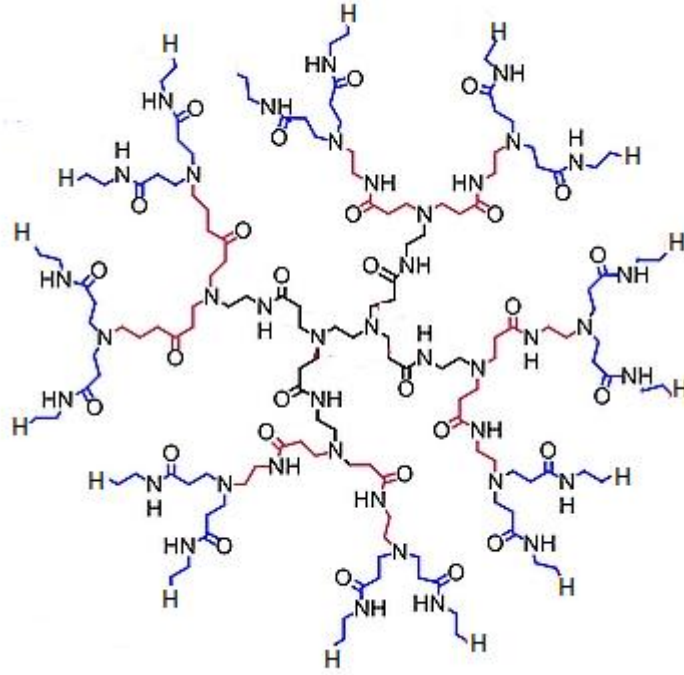
Sisteamin, bir çok biyosensör tasarımında SAM oluşturmak için kullanılmıştır. (Sezgintürk & Uygun, 2012; Yang vd., 2004; Yorgancı & Akyılmaz, 2011). Şekil 2.25 bu çalışmalardan birisine ait bir görsel içermektedir.



Şekil 2.25. Sisteamin kullanılarak ALP'nin elektrot yüzeyine immobilizasyonu (Yorgancı & Akyılmaz,2011)

2.3.4.2. PAMAM (Poliamidoamin)

Poli (amidoamin) veya PAMAM, çoklu dallanmış ve yapısında amin ve amidlerin bulunduğu bir dendrimerdir. Yapısında bulundurduğu çok sayıdaki fonksiyonel gruplardan dolayı biyosensörlerde sıkça kullanılan kovalent bağlanan ajandır. Şekil 2.26’da PAMAM dendrimeri gösterilmiştir.



Şekil 2.26. PAMAM Dendrimeri (Gen.2.0)

Şenel ve Çevik, pirol-PAMAM dendrimerli, hidrojenperoksidaz enzimini ölçmeye dayalı bir amperometrik biyosensör tasarlamışlardır (Şenel & Çevik, 2012).

Literatürde PAMAM dendrimeri kullanılarak bir çok biyosensör tasarlanmıştır (Hatamluyi & Es'haghi, 2019; Sezgintürk & Uygun, 2012; Uygun vd., 2018).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Biyosensörün Geliştirilmesinde Kullanılan Materyaller

Referans elektrot olarak kullanılan, 3 M potasyum klorür ile doyurulmuş Gümüş/Gümüş Klorür referans elektrot; IBAS, Warwickshire, UK'den satın alınmıştır.

Karşıt elektrod olarak kullanılan Platin tel karşı elektrot; IBAS, Warwickshire, UK'den satın alınmıştır.

Çalışma elektrodu olarak kullanılan 2.01 cm² yüzey alanına sahip Altın çalışma elektrodu; IBAS, Warwickshire, UK'den satın alınmıştır.

Kendiliğinden oluşan tek tabakaların hazırlanması için kullanılan Sisteamin; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA'den alınmıştır.

Antijen immobilizasyonunda kullanılan Poliamidoamin dendrimer (PAMAM Gen:1.5); Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA'den alınmıştır.

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan Glutaraldehit; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA'den alınmıştır.

Elektrokimyasal ölçümlerin gerçekleştirildiği, Potasyum klorür, Potasyum ferrisiyanat ve potasyum ferrosiyanür; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA'den, alınmıştır.

Yapay serum hazırlanması için kullanılan Serum Replacement Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA'den alınmıştır.

3.1.2. Biyosensörün Geliştirilmesinde Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanması

50 mM pH:7.0 Fosfat Tamponu: Önce 3.549 g Na_2HPO_4 500 mL saf suda çözülür, sonra 3.4015 g KH_2PO_4 tartılarak saf suda çözülür. Bu iki çözelti pH:7.0 olacak şekilde karıştırılarak tampon çözelti hazırlanır.

5.0 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: 0.8231 g potasyum ferrisiyanür tartılarak 500 mL pH:7.0 fosfat tamponunda çözülür.

5.0 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: 1.0560 g potasyum ferrosiyanür tartılarak 500 mL pH:7.0 fosfat tamponunda çözülür.

Redoks Prob çözeltisi: 0.1 M KCl, 5.0 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 5.0 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.1.3. Biyosensörün Geliştirilmesinde Kullanılan Cihazlar

Geliştirilen biyosensörün tüm optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında elektrokimyasal impedans ve döngüsel voltametri ölçümleri, Echem Analyst yazılımı içeren bir bilgisayara bağlı olan Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 1000 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan diğer cihazlar;

Sıcaklık ve zaman kontrollü ultrasonik banyo (Wise Clean DAIHAN, Kore)

Ultra saf su cihazı (ELGA PURELAB OPTION-Q)

Saf su cihazı (ELGA PURELAB OPTION-Q)

Hassas terazi (Precisa XB 220A, Precisa Gravimetrics AG/Switzerland)

Mikro Pipetler (10 μL , 200 μL , 1000 μL Eppendorff)

Manyetik karıştırıcı (Biosan MSH 300)

pH metre (6173 pH, made in China for USA)

3.2. Metodlar

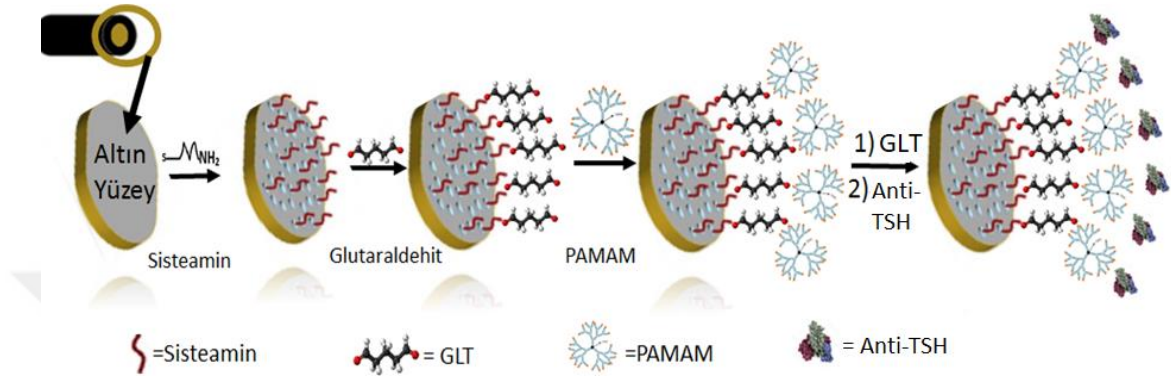
3.2.1. Çalışma Elektrodunun Temizlenmesi

Elektrod temizliği altın çalışma elektrodu yüzeyinde bir önceki denemelerden kaynaklı yada dış ortamdan gelen safsızlıkların ölçüm sonuçlarına etki etmemesi açısından oldukça önemlidir. Her çalışmadan önce altın çalışma elektrodunun temizliği için alüminyum oksit ($Al_2O_3 < 50$ nm partikül büyüklüğü) sentetik suni ipek (Buehler Microcloth PSA, Buehleri UK) üzerinde birkaç damla ultra saf su ile macun kıvamına getirilir. Her çalışmadan önce altın çalışma elektrodu bu yüzey üzerinde hafif hareketlerle gezdirilerek temizlenir. Elektrot yüzeyinde kalan alüminyum oksit partiküllerinin giderilmesi için elektrot önce saf su ile yıkanarak 5 dk saf su içerisinde ultrasonik su banyosunda inkübe edilir, daha sonra 5 dk etanol içerisinde yine ultrasonik su banyosunda inkübasyona bırakılır.

3.2.2. Biyosensörün Hazırlanması

Bu amaçla altın çalışma elektrodu Bölüm 3.2.1’de tarif edildiği şekilde temizlendi ve ultra saf argon gazı altında kurutuldu. Elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan tek tabaka oluşumu (SAM) için, temizlenmiş çalışma elektrodu % 99.9’luk etanolde (v/v) hazırlanan 0.1 M Sisteamin çözeltisi içerisinde 1 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda altın çalışma elektodu yüzeyi etanol ve ardından saf su ile yıkanarak yüzeyde bağlanmadan kalan sisteamin molekülleri uzaklaştırıldı. İkinci adımda çalışma elektrodu % 1 lik glutaraldehit (v/v) çözeltisi içerisinde 10 dk bekletildi. Daha sonra anti-TSH’ın immobilize edileceği amino gruplarının sayısını ve dolayısıyla immobilizasyonun başarısını arttırmak amacıyla çalışma elektrodu metanolde % 1.5’lik PAMAM (w/v) içerisinde bir saat bekletildi. Son olarak PAMAM bağlanmış çalışma

elektrodu % 1'lik Glutaraldehit (v/v) çözeltisi içerisinde 10 dk bekletilip 1 saat 2.5 ng/ μ L Anti TSH ile inkübe edildi. Herbir immobilizasyon adımından önce ve sonra CV ve EIS alındı. Şekil 3.1'de biyosensörün tasarımı gösterilmiştir.



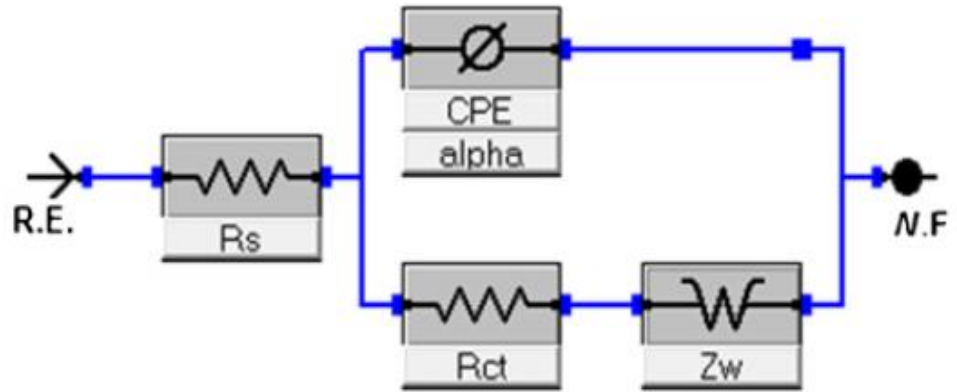
Şekil 3.1. Biyosensörün tasarımı

3.2.3. Biyosensörün Çalışma İlkesi

Tasarlanan biyosensörün hazırlanması için ilk önce Bölüm 3.2.1'de tarif edildiği gibi temizlenen çalışma elektrotlarına Bölüm 3.2.2'deki prosedür uygulandı. Her bir immobilizasyon adımından sonra döngüsel voltogramlar ve EIS spektrumları elde edildi. Anti-TSH immobilizasyonu sonrasında hazır hale getirilen biyosensör yüzeyine farklı konsantrasyonlarda TSH örnekleri uygulandı. Her uygulamadan sonra bağlanmadan kalan TSH molekülleri saf su ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Her bir TSH inkübasyonu sonrası EIS ölçümleri alınarak, yüzeydeki bağlanmaya bağlı olan yük transfer değişimleri kaydedildi. TSH konsantrasyonlarına karşı yük transfer direncindeki eğimden yararlanılarak kalibrasyon grafikleri hazırlandı. CV ve EIS ölçümleri Bölüm 3.1.2'de tarif edilen redoks prob çözeltisi içerisinde gerçekleştirildi. CV ölçümleri -0.5 - 1.0 V potansiyel aralığında 1 mV adım büyüklüğünde ve 50 mV/s tarama hızında yapıldı. EIS ölçümleri 5 mV alternatif akımda, impedans spektrumları 10000 – 0.05 Hz aralığındadır.

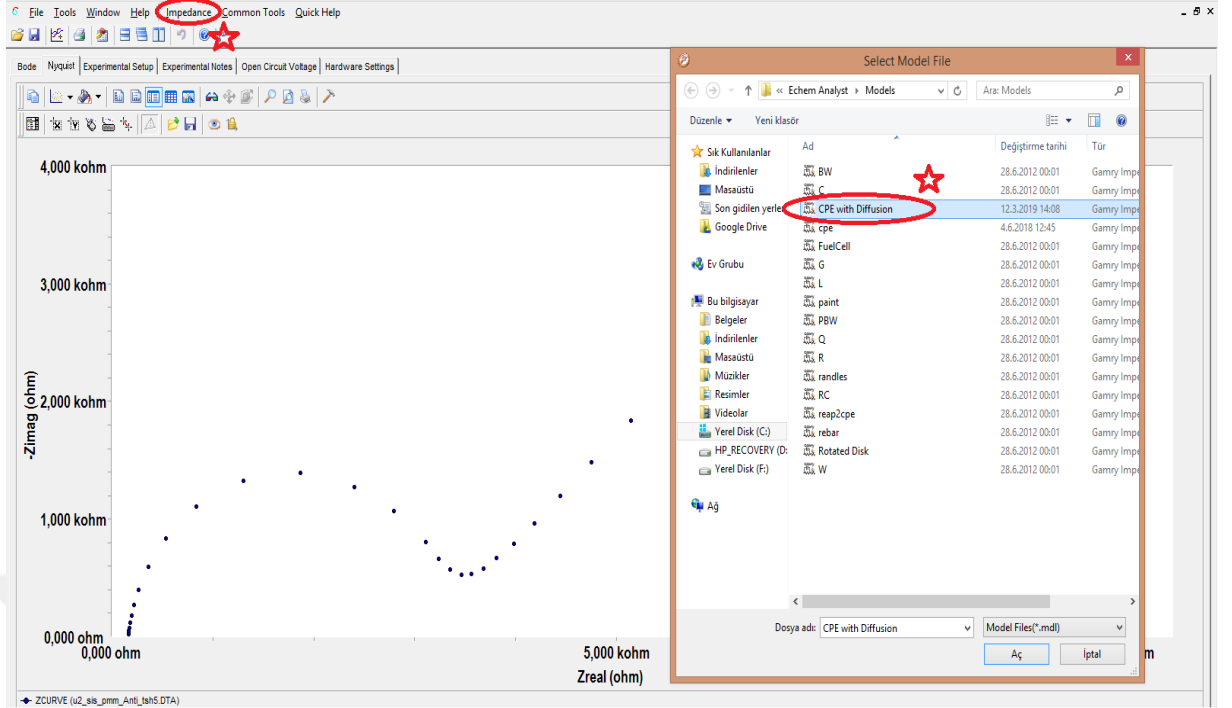
EIS yük transfer direncinin belirlenmesinde kullanılan etkili bir yöntemdir. Hedef analitin konsantrasyonu, analit çalışma elektrot yüzeyine bağlandığında oluşan

yük transfer direncindeki değişiklik ölçülerek EIS ile kolayca belirlenebilir. EIS spektrumlarından elde edilen Nyquist eğrileri tipik olarak doğrusal ve yarım daire biçimli iki bölümden oluşur ve elde edilen yarım daire çapı çalışma elektrotunun yüzeyindeki yük aktarma direncini hesaplamak için kullanılır. Yük transfer direncinin doğru hesaplanması için geliştirilen sistem bir eş-değer devre modeline göre modellenmelidir ve bu model kullanılarak yük transfer direnci hesaplanır. Bu çalışmada Gamry Analyst® yazılımı kullanılarak geliştirilen sistemin modellendiği eş değer devre Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Burada R_{ct} ; yük transfer direncini, Z_w ; Warburg İmpedansını, R_s ; çözelti direncini, CPE-alpha; sabit faz elemanı kapasitansını göstermektedir.



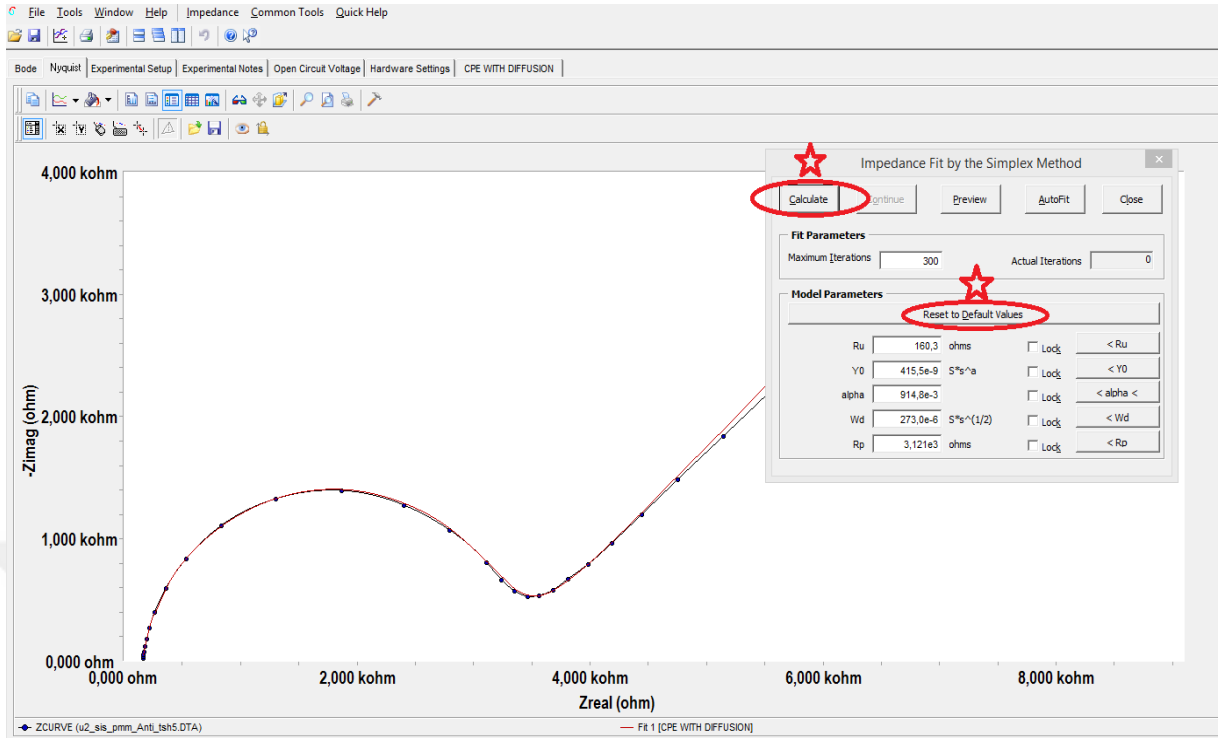
Şekil 3.2. Eş-değer devre modeli

Yük transfer direncinin hesaplanması için, Nyquist diyagramı Gamry Analyst® yazılımı kullanılarak açılır. Üst menüde yer alan sekmelerden “Impedance” sekmesi tıklanır ve açılan sekmeden “Fit A Model (Simplex Method)” seçilir. Daha sonra açılan pencereden görülen devre sistemlerinden bu çalışmaya uygun olan “CPE with Diffusion” devresi seçilir (Şekil 3.3.).



Şekil.3.3. Gambrly Analyst® yazılımındaki hesaplama yapılabilen devre modelleri

Devre modeli seçildikten sonra “reset to default values” sekmesi seçilerek hesaplama ekranındaki değerler sıfırlanır (Şekil 3.4). Hesaplama alanındaki değer sıfırlandıktan sonra “calculate” sekmesi birkaç kez tıklanarak hesaplama eğrisinin Nyquist eğrisi ile uyumlu hale gelmesi sağlanır. Yazılımın hesapladığı R_p değeri yük transfer direncine karşılık gelir ve kaydedilerek bir sonraki hesaplamaya geçilir.



Şekil 3.4. Yazılım Hesaplama Ekranı

3.2.4. Biyosensörün İmmobilizasyon Adımlarının Optimizasyonu

Biyosensör dizaynında kullanılması planlanan her bir kimyasalın optimize edilmesi, biyosensör cevaplarının her ölçümde tutarlı olması açısından büyük önem taşır. Bu amaçla immobilizasyon adımlarında kullanılan kimyasalların değişen konsantrasyonlarıyla hazırlanan biyosensörler ile 7 farklı TSH konsantrasyonunda EIS ve CV ölçümleri alındı.

3.2.4.1. Sisteamin Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Anti-TSH immobilizasyonun en başarılı olduğu SAM oluşumunda kullanılması gereken optimum sisteamin konsantrasyonunu belirlemek amacıyla dört farklı konsantrasyonda sisteamin çözeltileri hazırlandı. Altın elektrotlar 10 mM, 50 mM, 100 mM ve 150 mM'lık sisteamin çözeltileri içerisinde 1 saat süre ile inkübe edildi. Sisteamin konsantrasyonun biyosensör cevabına etkisinin kesin olarak belirlenmesi için

Anti-TSH immobilizasyonunda kullanılan diğer kimyasalların konsantrasyonları sabit tutuldu. Hazırlanan biyosensörler ile analitin farklı konsantrasyonlarında EIS ve CV ölçümleri yapılarak standart grafikler elde edildi

3.2.4.2. Sisteamin İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

İmmobilizasyonun ilk aşaması olan SAM oluşumunda en uygun sisteamin konsantrasyonu belirlendikten sonra, biyosensör cevabına sisteamin inkübasyon süresinin etkisinin belirlenmesi amacıyla, altın çalışma elektrotları aynı sisteamin konsantrasyonunda farklı zaman aralıklarında inkübe edildi. 30 dk, 60 dk ve 90 dk'lık inkübasyon periyotları ile hazırlanan biyosensörler ile farklı analit konsantrasyonlarında EIS ve CV ölçümleri alındı. Hazırlanan standart grafikler yardımıyla en iyi biyosensör cevabının elde edildiği sisteamin inkübasyon süresi tespit edildi. Biyosensör cevabına sisteamin inkübasyon süresinin net etkisinin belirlenmesi için diğer immobilizasyon koşulları herbir elektrot için sabit tutuldu.

3.2.4.3 PAMAM Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Elektrot yüzeyinde Anti-TSH moleküllerinin immobilize olduğu amino gruplarının sayısının arttırılması için kullanılan PAMAM dendrimerinin en uygun konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, diğer immobilizasyon koşulları sabit tutularak dört farklı konsantrasyondaki PAMAM çözeltileri ile biyosensörler hazırlandı. Bu amaçla % 0.5, % 1, % 1.5 ve % 2 lik (w/v) PAMAM çözeltileri kullanılarak hazırlanan dört farklı biyosensör ile farklı analit konsantrasyonlarında EIS ve CV ölçümleri gerçekleştirildi. Hazırlanan standart grafikler yardımıyla en uygun PAMAM konsantrasyonu belirlendi.

3.2.4.4. Anti-TSH Konsantrasyonunun Optimizasyonu

TSH analizi için biyoreseptör molekül olan Anti-TSH'ın optimum konsantrasyonunun belirlenmesi için dört farklı konsantrasyonda Anti-TSH çözeltileri hazırlandı. 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM ve 5 mM lık antikor çözeltileri ile hazırlanan dört farklı biyosensör ile farklı analit konsantrasyonlarında EIS ve CV ölçümleri yapıldı. Bu aşamada sadece Anti-TSH miktarının biyosensör cevabına etkisini belirlemek için diğer immobilizasyon kimyasallarının konsantrasyonu sabit tutuldu. Hazırlanan standart grafikler yardımıyla en iyi biyosensör cevabının elde edildiği antikor konsantrasyonu belirlendi.

3.2.5. Biyosensörün Karakterizasyonu

Bu kapsamda; doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, tayin sınırı, elektrod yüzey alanı ve yapay serumda analizler yapılarak tasarlanan biyosensörün değerlendirilmesi yapılmıştır.

3.2.5.1. Doğrusal Tayin Aralığının Belirlenmesi

Bölüm 3.2.4.'te tanımlanan optimum değerlerin kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörler ile altı farklı TSH konsantrasyonunda (0.1-0.6 mIU/L) EIS ölçümleri gerçekleştirildi ve elde edilen veriler kullanılarak kalibrasyon grafiği çizildi. Kalibrasyon grafiğinin hazırlanmasında $\Delta R_{ct} = R_{ct}(\text{antijen}) - R_{ct}(\text{antikor})$ denklemi kullanıldı.

3.2.5.2. Tekrar Üretilirlik

Bölüm 3.2.4.'te tanımlanan optimum değerlerin kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörler ile doğrusal tayin aralığında EIS ölçümleri yapıldı. Farklı günlerde hazırlanan biyosensörler ile elde edilen biyosensör cevapları karşılaştırılarak tasarlanan biyosensörün tekrar üretilebilirliği incelendi.

3.2.5.3 Yapay Serumda TSH Analizi

Bölüm 3.2.4.'te tanımlanan optimum değerlerin kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörler ile doğrusal tayin aralığında yapay serum örneklerinde EIS ölçümleri gerçekleştirildi. Yapay serum örnekleri hazırlamak için ilk önce serum replacement çözeltisi 1/50 oranında seyreltildi, daha sonra son konsantrasyonlar 4.5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 145 mM NaCl olacak şekilde tuz ilaveleri yapıldı, son olarak istenilen konsantrasyonda TSH örnekleri eklendi. Bu çalışma ile serum içerisinde bulunan protein ve tuzların biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi.

3.2.5.4. Biyosensörün Yüzey Alanının Hesaplanması

Biyosensörün oluşum aşamasında çalışma elektrodunun ne oranda antikor ile kaplandığını belirlemek amacıyla yalın elektrod ve antikor bağlı elektrodlar kullanılarak 10 farklı potansiyelde (10→100 mV) döngüsel voltogramlar alındı. Döngüsel voltogramlardan elde edilen verilerin Laviron eşitliğine uygulanmasıyla çalışma elektrodu yüzeyinin hangi oranda kaplandığı belirlendi. Laviron eşitliği;

$$Q = n \times F \times A \times \Gamma$$

Eşitlikte;

Q: Yük miktarı

A: Elektrot alanı (0.0201 cm²)

n: 10 farklı tarama hızında elde edilen döngüsel voltogramlar yardımıyla hazırlan katodik akım- potansiyel grafiklerinin eğimi.

F: Faraday sabiti (96485 C/mol)

Γ: Kaplanan yüzey alan (mol/cm²)

BÖLÜM 4

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Biyosensörün İmmobilizasyon Adımlarına İlişkin Veriler

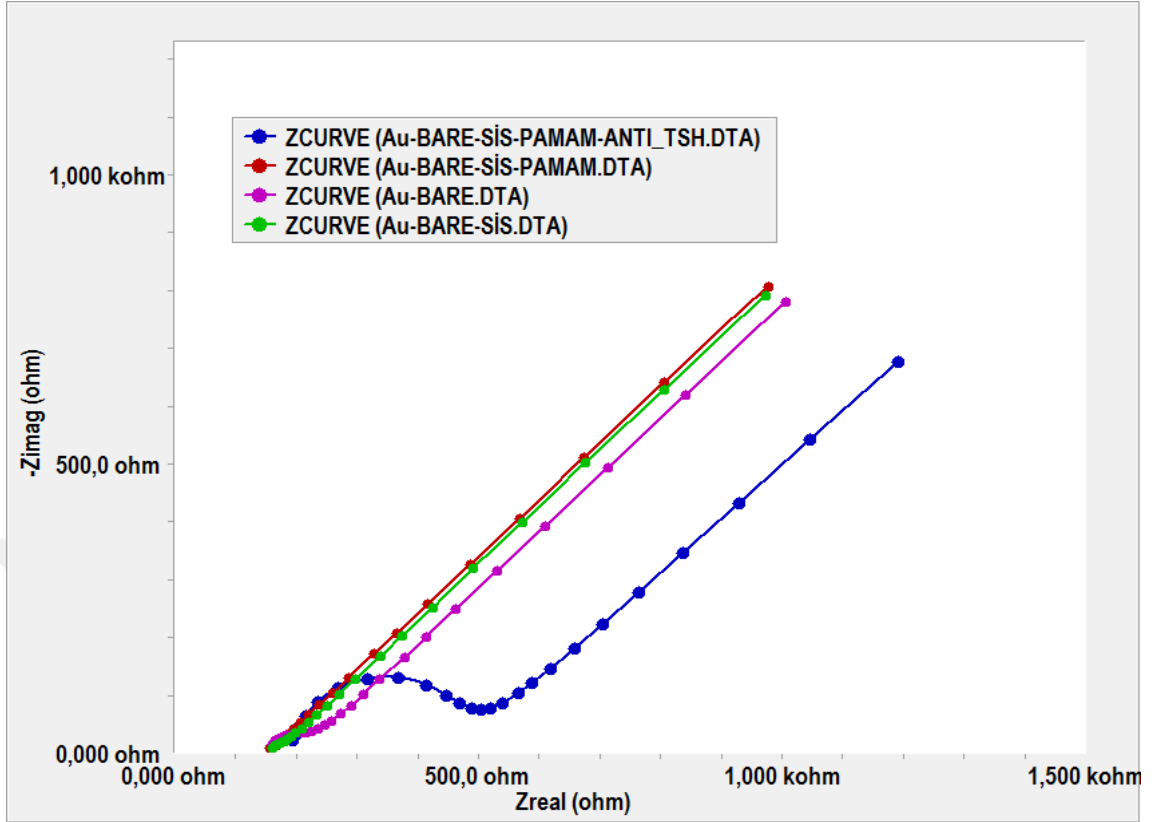
Biyosensörün hazırlanması aşamasında, herbir immobilizasyon adımından sonra EIS spektrumları ve döngüsel voltogramlar alınmıştır. Şekil 4.1’de EIS spektrumları Şekil 4.2’de döngüsel voltogramlar gösterilmiştir. Ayrıca immobilizasyon adımlarının yük transfer direnci değişimleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Burada her bir immobilizasyon adımını işaret eden bazı kısaltmalar kullanılmıştır;

BARE: Temizlenmiş yalın altın çalışma elektrodu.

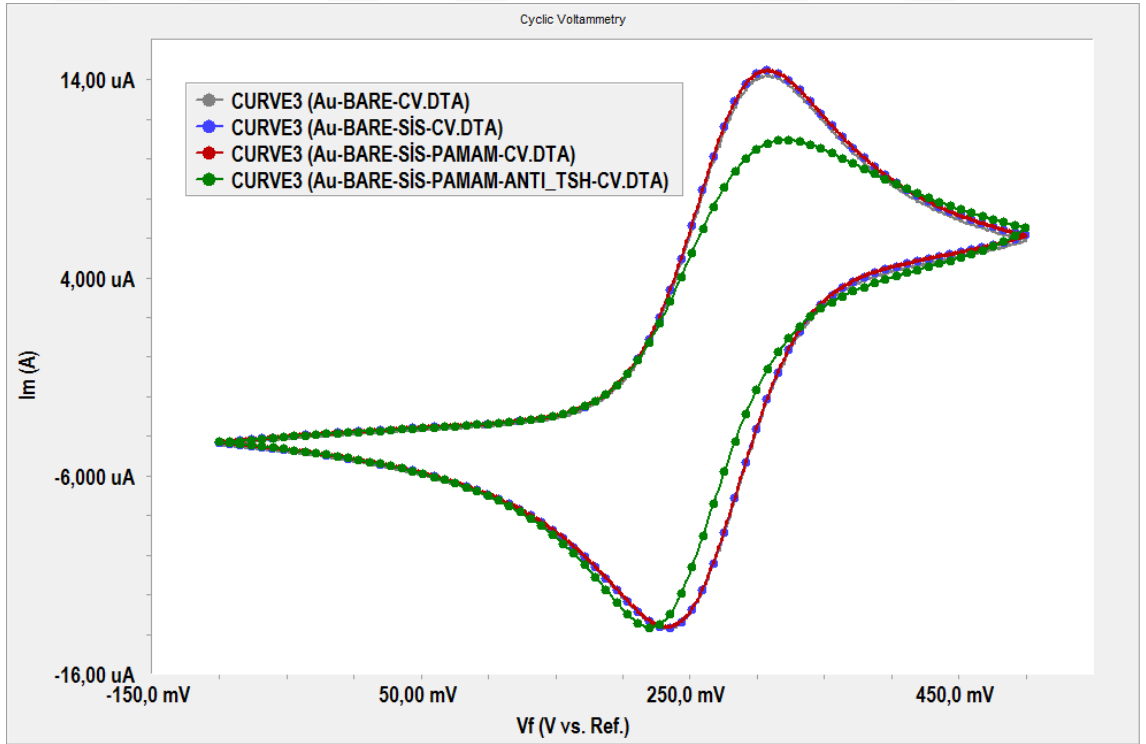
BARE-SİS: Sisteamin ile modifiye edilmiş altın çalışma elektrodu.

BARE-SİS-PAMAM: SAM oluşumu sonrası PAMAM ile modifiye edilmiş altın çalışma elektrodu.

BARE-SİS-PAMAM-ANTİ_TSH: Antikor immobilize edilmiş altın çalışma elektrodu.



Şekil 4.1. Biyosensörün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları



Şekil 4.2. Biyosensörün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltogramları

Çizelge 4.1. İmmobilizasyon basamaklarının yük transfer direnci değerleri

Elektrod Yüzeyi	Rct(kohm)
BARE	67,67
BARE-SİS	20,05
BARE-SİS-PAMAM	10,98
BARE-SİS-PAMAM-ANTİ_TSH	295

Şekil 4.1'deki Nyquist eğrileri ve Çizelge 4.1'deki yük transfer dirençleri değerlendirildiğinde; yalın elektroda göre SAM oluşumundan sonra yük transfer değerinde azalma görülmektedir. Bu azalmanın nedeni SAM oluşumunu gerçekleştiren sistemin moleküllerinin amino gruplarından dolayı yüzeye elektron transferini kolaylaştırması olabilir. Bunun sonucu olarak yük transfer direncinde azalma gözlenmiştir.

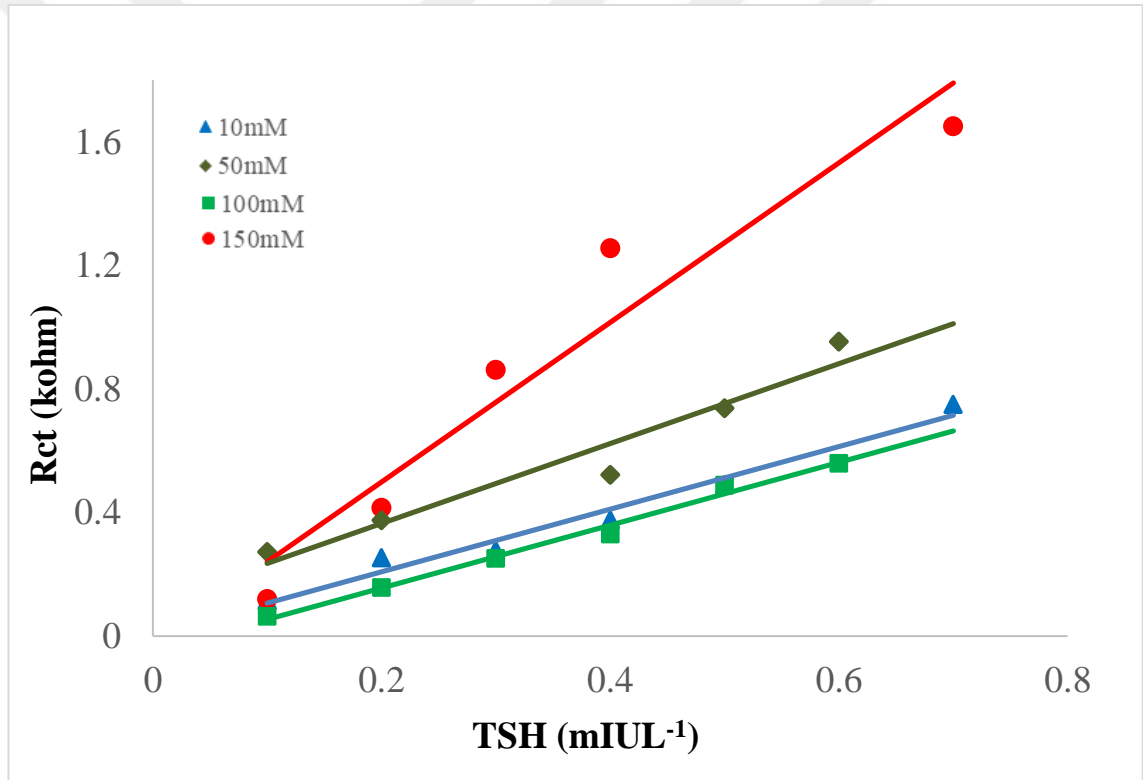
PAMAM modifikasyonu sonrasında ölçülen yük transfer direnci sistemin modifikasyonu sonrası ölçülen yük transfer direnci ile kıyaslandığında bu değere oldukça yakın olmakla birlikte daha düşük bulundu. Bunun sebebi PAMAM dendrimerinin uç grupları olan amino gruplarının elektron transferini kolaylaştırmasının etkisinin yüzeye bağlanan PAMAM moleküllerinin redoks probunun yüzeye difüzyonuna bir engel teşkil etmesinin etkisini dengelemiş olabileceğidir.

Yüzeye antikor immobilizasyonu sonrası yük transfer direncinde belirgin bir artış tespit edilmiştir. Bu beklenen bir sonuçtur. Yüzeye bağlanan hacimli bir antikorun, çoğu proteinin iletkenliğinin düşük olması da göz önünde bulundurulduğunda, iletkenliğe bir engel oluşturabileceği sonucuna ulaşılabilir. Şekil 4.2'deki döngüsel voltogram, EIS spektrumlarından yorumlanan sonuçları desteklemektedir.

4.2. Biyosensörün İmmobilizasyon Adımlarının Optimizasyonu

4.2.1. Sisteamin Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Optimum sisteamin konsantrasyonunun belirlenmesi çalışmasında 10 mM, 50 mM, 100 mM ve 150 mM sisteamin çözeltileri ile hazırlanan biyosensörler ile yedi farklı TSH konsantrasyonunda impedans ölçümleri yapıldı ve her bir biyosensör için ayrı ayrı yük transfer dirençleri hesaplanarak kalibrasyon grafikleri hazırlandı. Kalibrasyon grafikleri Şekil 4.3'te, sisteaminin farklı konsantrasyonları için elde edilen doğrusallık katsayıları (R^2) ve doğru denklemleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı sisteamin miktarları kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4.2. Farklı sisteamin konsantrasyonlarında elde edilen doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

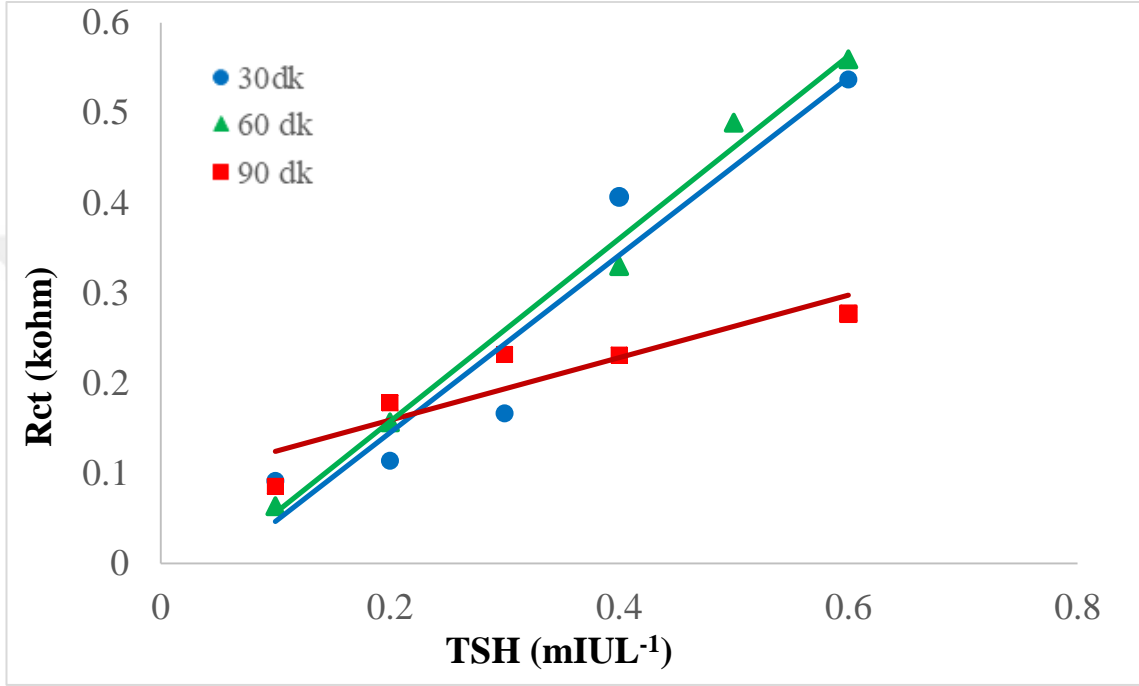
Sisteamin Kons. (mM)	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
10	0,9751	$y = 1,0133x + 0,0052$
50	0,9443	$y = 1,2928x + 0,1061$
100	0,9903	$y = 1,0159x - 0,0474$
150	0,9281	$y = 2,585x - 0,0185$

Şekil 4.3 ve Çizelge 4.2'den de görüldüğü gibi en iyi doğrusallık katsayısı 100 mM konsantrasyonda sisteamin çözeltisi kullanılarak hazırlanan biyosensör ile elde edilmiştir. Altın elektrot yüzeyinde SAM tabakasının düzenli oluşumu bir sonraki immobilizasyon basamaklarının başarısını etkiler. Bu bağlamda SAM oluşumu için kullanılan sisteamin konsantrasyonu oldukça önemlidir ve optimize edilmesi gerekir. Düşük konsantrasyonda sisteamin kullanımı yeterli düzeyde SAM oluşumunu sağlayamadığı için doğrusallık katsayısının ve biyosensör cevabının düşük çıkması beklenen sonuçtur. 10 mM sisteamin kullanılarak hazırlanan biyosensörde göreceli olarak iyi bir doğrusallık katsayısı elde edilmesine rağmen düşük biyosensör cevabı elde edilmiştir. 50 mM sisteamin kullanılarak hazırlanan biyosensörde doğrusallıktan sapma yüksek bulunmuştur. 150 mM sisteamin kullanılarak hazırlanan biyosensör en yüksek cevaba sahip olmasına rağmen doğrusallık katsayısı açısından en düşük değere sahiptir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda; 100 mM sisteamin kullanılarak hazırlanan biyosensör 0,9903 gibi oldukça iyi bir doğrusallık göstermiştir, göreceli olarak düşük biyosensör cevabına sahip olmasına rağmen doğruluğa en yakın ölçüm sonucunu vermesinden dolayı optimum sisteamin konsantrasyonu 100 mM olarak belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra hazırlanan tüm biyosensörlerde 100 mM'lık sisteamin çözeltisi kullanılmıştır.

4.2.2. Sisteamin İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

Altın çalışma elektrodu yüzeyinde, en düzenli SAM oluşumu için gerekli olan sisteamin konsantrasyonu belirlendikten sonra sisteamin inkübasyon süresi optimize edildi. Üç farklı çalışma elektrodu ile Bölüm 4.2.1'de elde edilen optimum sisteamin

konsantrasyonu kullanılarak 30 dk, 60 dk ve 90 dk'lık inkübasyon süreleri kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile elde edilen yük transfer dirençleri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafikleri Şekil 4.4'te, bu grafiklerden elde edilen doğrusallık katsayıları (R^2) ve doğru denklemleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı sistemin inkübasyon süreleri kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4.3. Farklı sistemin inkübasyon süreleri kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle elde edilen doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

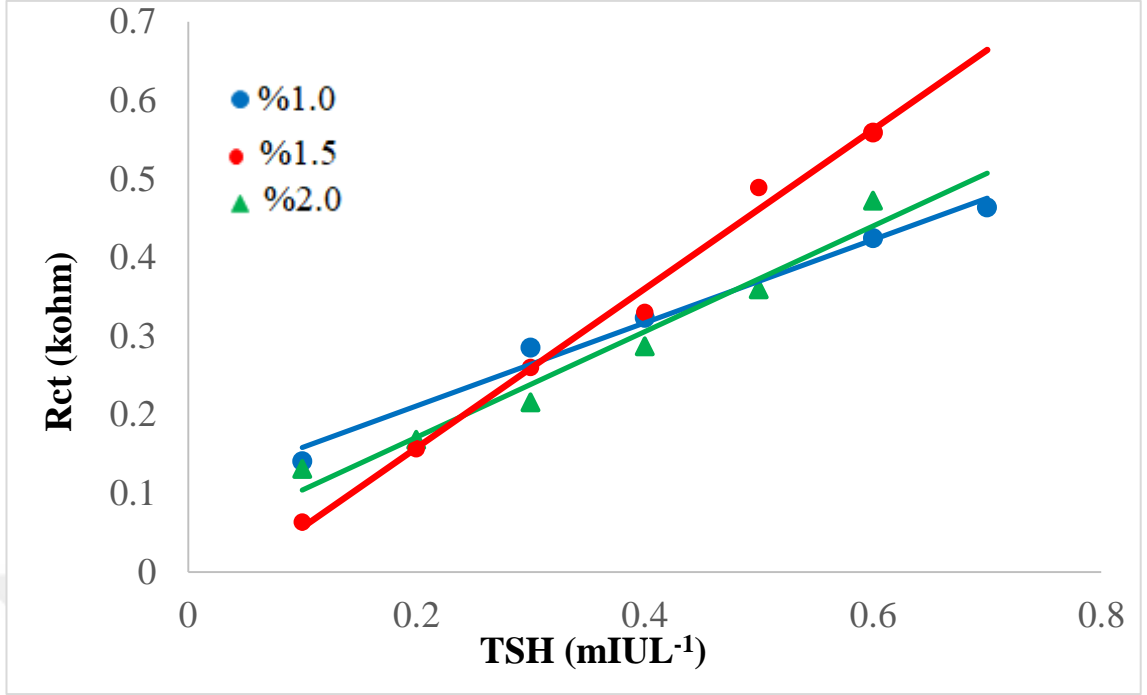
Sistemin İnkübasyon Süresi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi
30 dk	0,9162	$y = 0,9845x - 0,052$
60 dk	0,9903	$y = 1,0138x - 0,0454$
90 dk	0,8253	$y = 0,3467x + 0,0897$

Şekil 4.4. ve Çizelge 4.3.'den de görüldüğü gibi altın çalışma elektrodu sistemin ile 30 dk inkübasyona bırakıldığında düşük bir doğrusallık katsayısı ve

göreceli olarak düşük biyosensör cevabı elde edilmiştir. İnkübasyon süresinin azalmasının SAM tabakasının oluşumunu olumsuz yönde etkilemesi beklenen bir sonuçtur. 30 dk'lık inkübasyon süresi kullanıldığında yüzeyde daha az SAM tabakası oluşacağından immobilize edilen antikor miktarı da azalır. 90 dk'lık inkübasyon süresi kullanılarak hazırlanan biyosensörde ise en düşük doğrusallık katsayısı ve biyosensör cevabı elde edilmiştir. Bu durum, 90 dk'lık inkübasyon süresinin düzenli SAM oluşumunu engellemesinden kaynaklanabilir. 60 dk'lık inkübasyon süresi ile kıyaslandığında, 90 dk lık inkübasyon süresi kullanıldığında düzensiz SAM oluşumunun antikor immobilizasyonunu azalttığı sonucu çıkarılabilir. Sisteamin ile 60 dk inkübasyona bırakılarak hazırlanan biyosensörün en yüksek biyosensör cevabına ve en iyi doğrusallık katsayısına sahip olması nedeniyle optimum sisteamin inkübasyon süresi 60 dk olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bu aşamasından sonra biyosensör hazırlanmasında sisteamin inkübasyon süresi 60 dk olarak kullanılmıştır.

4.2.3. PAMAM Konsantrasyonunun Optimizasyonu

% 1,0; % 1,5 ve % 2,0'lik (w/v) PAMAM çözeltileri kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan yük transfer dirençleri ile farklı TSH konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.5'te bu grafiklerden elde edilen doğrusallık katsayıları (R^2) ve doğru denklemleri Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı pamam konsantrasyonları (w/v) kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4.4. Farklı pamam konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle elde edilen doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

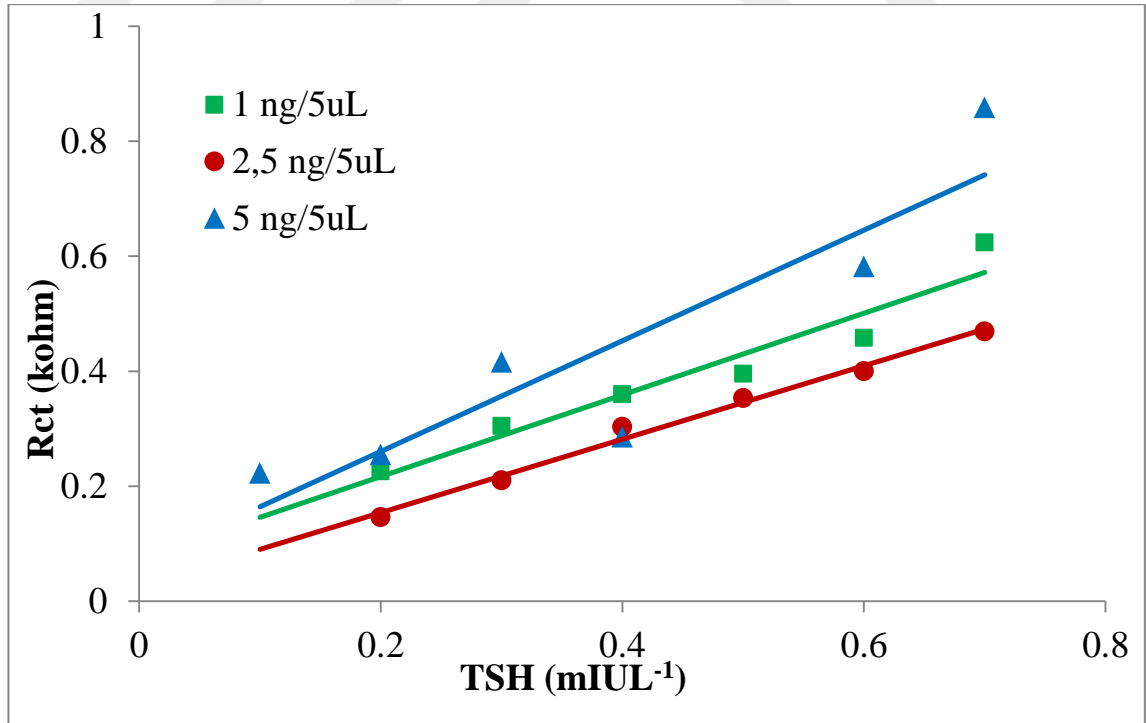
PAMAM Konsantrasyonu (w/v)	Doğrusallık Katsayısı (R ²)	Doğru Denklemi
1,0 %	0,9855	y = 0,5286x + 0,1054
1,5 %	0,9904	y = 1,0134x - 0,0451
2,0 %	0,9653	y = 0,6717x + 0,037

PAMAM konsantrasyonunun artması ile antikorun immobilizasyonu için daha fazla fonksiyonel grup elde edilir. Bu durum elektrot yüzeyine daha fazla antikorun immobilize edilebilmesine olanak sağlar. Bu nedenle, biyosensör tasarımında daha fazla PAMAM kullanılması ile düşük TSH konsantrasyonlarında daha yüksek biyosensör cevapları elde edilmiştir. Bu durum Şekil 4.5.'de görülmektedir. Fakat artan TSH konsantrasyonlarında biyosensör cevabında düşmeler gözlenmiştir. Yüksek PAMAM konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan biyosensörde daha kompleks bir yapı

oluşturduğundan; spesifik olmayan etkileşimler, istenmeyen çapraz bağlar ve difüzyon problemleri de gözlenebilir. Bunlar biyosensör cevabının ve doğrusallığının olumsuz etkilenmesine neden olabilir. Düşük PAMAM konsantrasyonunda ise elektrot yüzeyinde antikorun bağlanacağı fonksiyonel grupların sayısının az olması nedeniyle biyosensör cevabının düşük bulunması beklenen bir sonuçtur. Şekil 4.5 ve Çizelge 4.4'ten de görüldüğü gibi en iyi doğrusallık katsayısı ve en yüksek biyosensör cevabının elde edildiği % 1,5 (w/v) PAMAM konsantrasyonu optimum PAMAM konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

4.2.4. Anti-TSH Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Optimum Anti-TSH antikor konsantrasyonunun belirlenmesi çalışmasında 1 ng/5 μ L; 2,5 ng/5 μ L ve 5 ng/5 μ L Anti-TSH konsantrasyonları kullanılarak üç farklı biyosensör hazırlandı. Bu biyosensörlerle elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan yük transfer dirençleri ile farklı TSH konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.6'da, bu grafiklerden elde edilen doğrusallık katsayıları (R^2) ve doğru denklemleri Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Farklı anti-tsh konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan biyosensörlerin kalibrasyon grafikleri

Çizelge 4.5. Farklı anti-tsh konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle elde edilen doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

Anti-TSH Konsantrasyonu (ng/5µL)	Doğrusallık Katsayısı (R ²)	Doğru Denklemi
1	0,9653	$y = 0,6717x + 0,037$
2,5	0,9897	$y = 0,6386x + 0,0261$
5	0,8252	$y = 0,9625x + 0,0679$

Altın çalışma yüzeyine immobilize edilen Anti-TSH miktarının artması ile antikorun daha yüksek oranda antijen bağlayacağı ve buna bağlı olarak yük transfer direncindeki artış beklenen bir sonuçtur. Şekil 4.6. ve Çizelge 4.5.'den de görüldüğü gibi en yüksek antikor konsantrasyonunda en yüksek biyosensör cevapları elde edildi. 5 ng/5µL Anti-TSH kullanılarak hazırlanan biyosensör ile yapılan ölçümler sonucu elde edilen kalibrasyon grafiğinden göreceli olarak iyi olmayan doğrusallık katsayısı elde edildi. Bu durumun nedeni, yüksek antikor konsantrasyonlarında istenmeyen çapraz bağlanmaların sayısındaki muhtemel artışın antikorun antijen spesifitesinde bir azalmayla sonuçlanması olabilir, bu nedenle artan TSH konsantrasyonlarında lineerlikten sapmaların gözlenmesi muhtemel sonuçlardan biridir. 1 ng/5µL ve 2,5 ng/5µL Anti-TSH konsantrasyonlarında antikor kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerde benzer biyosensör cevapları elde edildi. 2,5 ng/5µL Anti-TSH antikor konsantrasyonu, doğrusallık katsayısının daha iyi olması nedeniyle optimum antikor konsantrasyonu olarak belirlendi.

4.3. Biyosensörün Karakterizasyonu

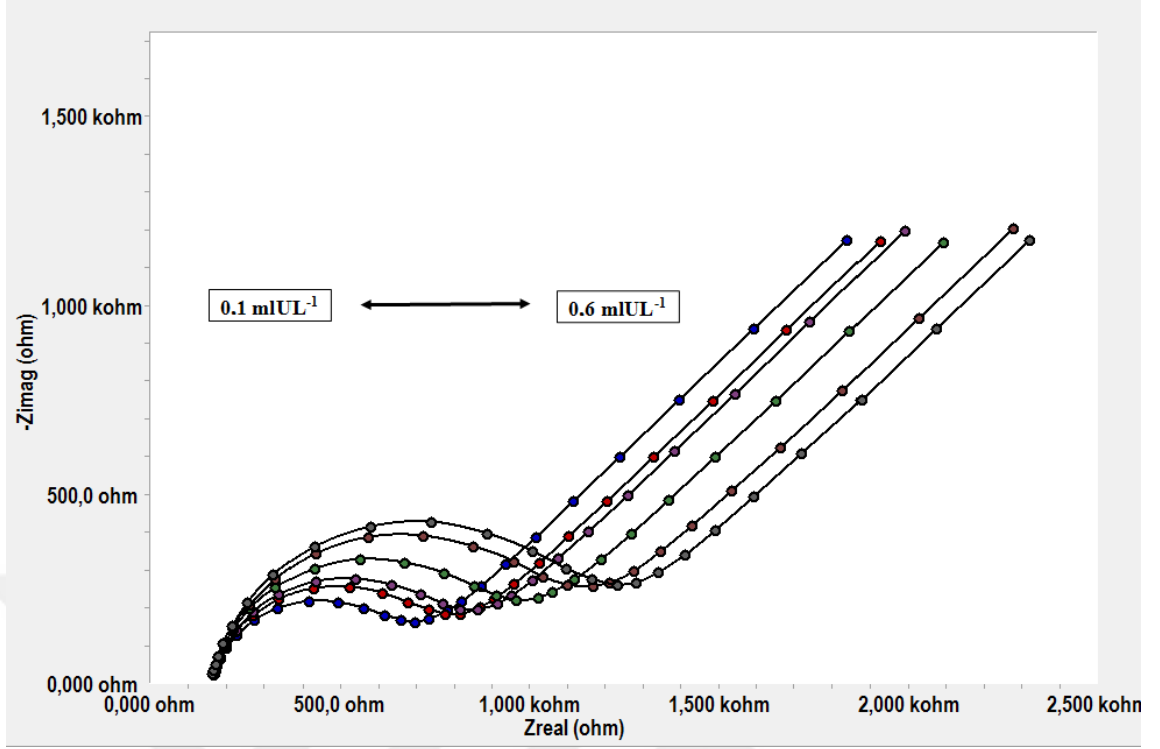
4.3.1. Doğrusal Tayin Aralığının Belirlenmesi

Biyosensörün tasarımında kullanılan bütün immobilizasyon materyallerinin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, biyosensörün en iyi yanıt verdiği TSH konsantrasyon aralığı belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla optimum immobilizasyon

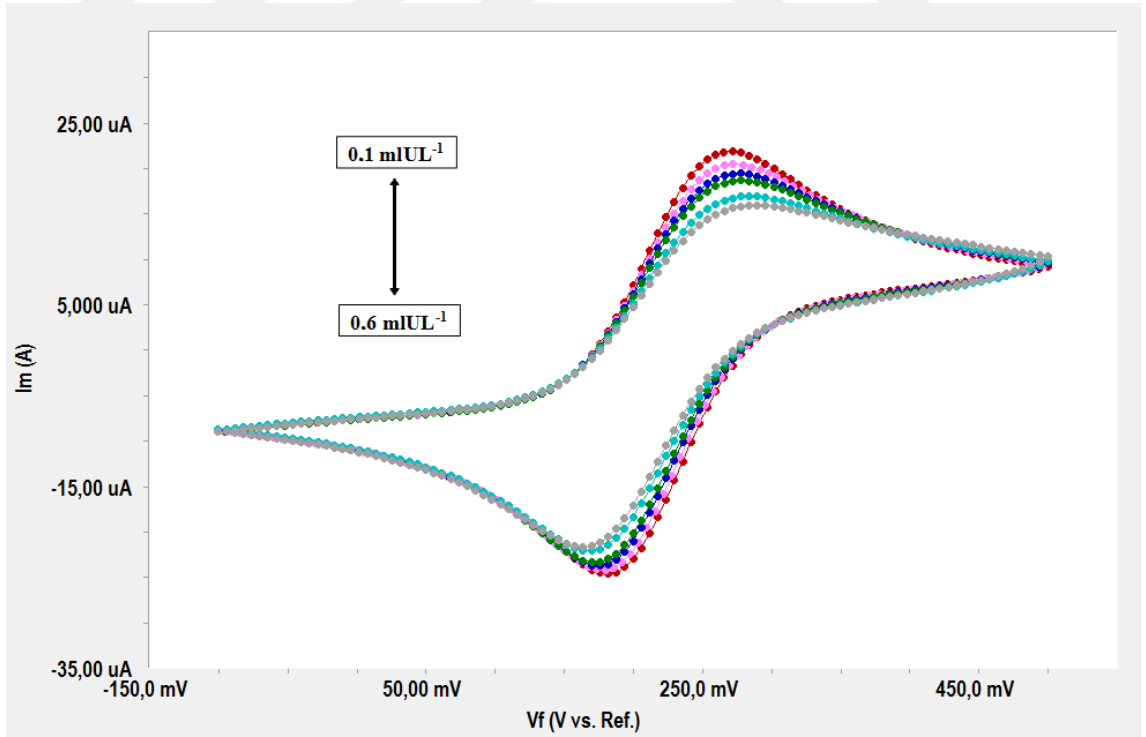
koşullarında hazırlanan biyosensörler ile artan TSH konsantrasyonlarında EIS ve CV ölçümleri alındı.

Biyosensörün tayin aralığı ve kalibrasyon grafiği; her bir TSH ölçümü sonunda elde edilen yük transfer direnci değerinden Anti-TSH ölçümü sonucu elde edilen yük transfer direnci çıkarılarak bulunan ΔR_{ct} değerinin TSH konsantrasyonuna bağlı değişimi baz alınarak hazırlandı. Optimizasyon çalışmaları ile elde edilen koşullar kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile elde edilen Nyquist eğrileri ve döngüsel voltogramlar Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verildi. Şekil 4.7’den de görüldüğü gibi yük transfer direnci TSH konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Yüzeye bağlanan TSH miktarının artmasıyla yüzeyin yalıtkanlığında artış meydana gelmesi yük transfer direncinin de artması ile sonuçlanmıştır. Bu durumu destekleyen Şekil 4.8’de de görüldüğü gibi artan yalıtkanlık pik akımlarının azalması ile sonuçlanmıştır.

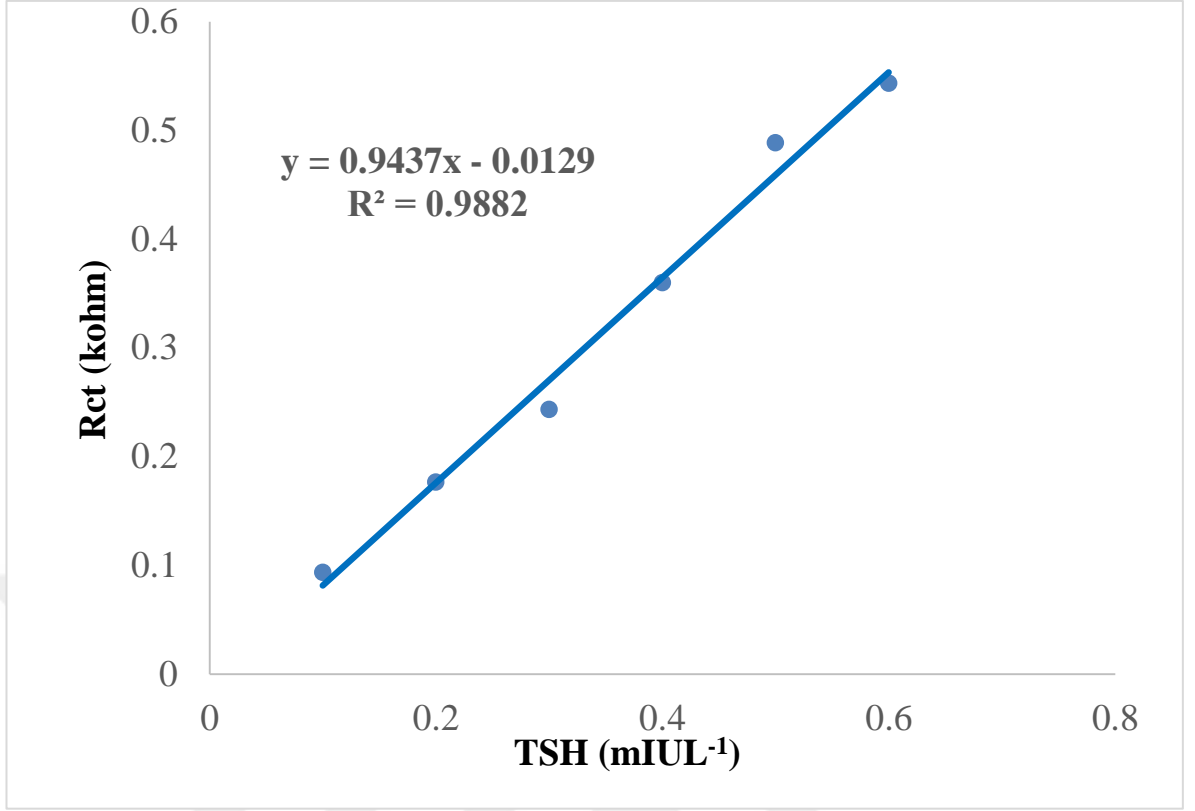
Kalibrasyon grafiği Şekil 4.9’da verildi. Buradan görüldüğü gibi tasarlanan biyosensörün tayin aralığı $0,1-0,6 \text{ mlUL}^{-1}$ aralığındadır ve doğrusallık katsayısı 0,9882 dir. Biyosensörün algılama sınırı (LOD) ve kantitatif ölçme sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla $0,026 \text{ mlUL}^{-1}$ ve $0,086 \text{ mlUL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.



Şekil.4.7. Artan tsh konsantrasyonlarında eis spektrumları



Şekil 4.8. Artan tsh konsantrasyonlarında döngüsel voltogramlar



Şekil 4.9. Biyosensörün kalibrasyon grafiği

4.3.2. Tekrar Üretilirlik

Biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin belirlenmesi için optimum değerler kullanılarak hazırlanan 7 farklı biyosensör ile 0,1-0,6 mIU L⁻¹ TSH konsantrasyonları aralığında ölçümler alındı. Bu biyosensörler ile elde edilen yük transfer dirençleri ile TSH konsantrasyonları arasında hazırlanan grafiklerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da verildi.

Çizelge 4.6. Biyosensörün tekrar üretilebilirlik sonuçları

Deney Sayısı	Doğrusallık Katsayısı (R^2)	Doğru Denklemi	Tayin Aralığı ($0,1-0,6 \text{ mlUL}^{-1}$)
1	0,9771	$y = 1,142x + 0,0265$	0,1-0,6
2	0,9821	$y = 0,9858x - 0,0351$	0,1-0,6
3	0,9615	$y = 0,8519x - 0,0428$	0,1-0,6
4	0,9814	$y = 0,8933x + 0,0215$	0,1-0,6
5	0,9882	$y = 0,9437x - 0,0129$	0,1-0,6
6	0,9748	$y = 1,046x + 0,0371$	0,1-0,6
7	0,9689	$y = 0,9018x - 0,0346$	0,1-0,6

Çizelge 4.6'dan da görüldüğü gibi farklı biyosensörle elde edilen biyosensör cevapları birbirleriyle uyumludurlar. Bu sonuçlar biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin başarılı olduğu şeklinde yorumlanabilir.

4.3.3.Yapay Serumda Analiz

Optimum immobilizasyon koşullarında hazırlanan biyosensörler ile Bölüm 3.2.5.3'te anlatıldığı gibi hazırlanan yapay serum örneklerinde TSH tayinleri gerçekleştirildi. Serum içerisinde bulunan tuz ve proteinlerin biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Elde edilen yük transfer dirençleri kullanılarak standart grafik yardımıyla ölçülen TSH miktarları ve % geri kazanım sonuçları hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 4.7'de verildi.

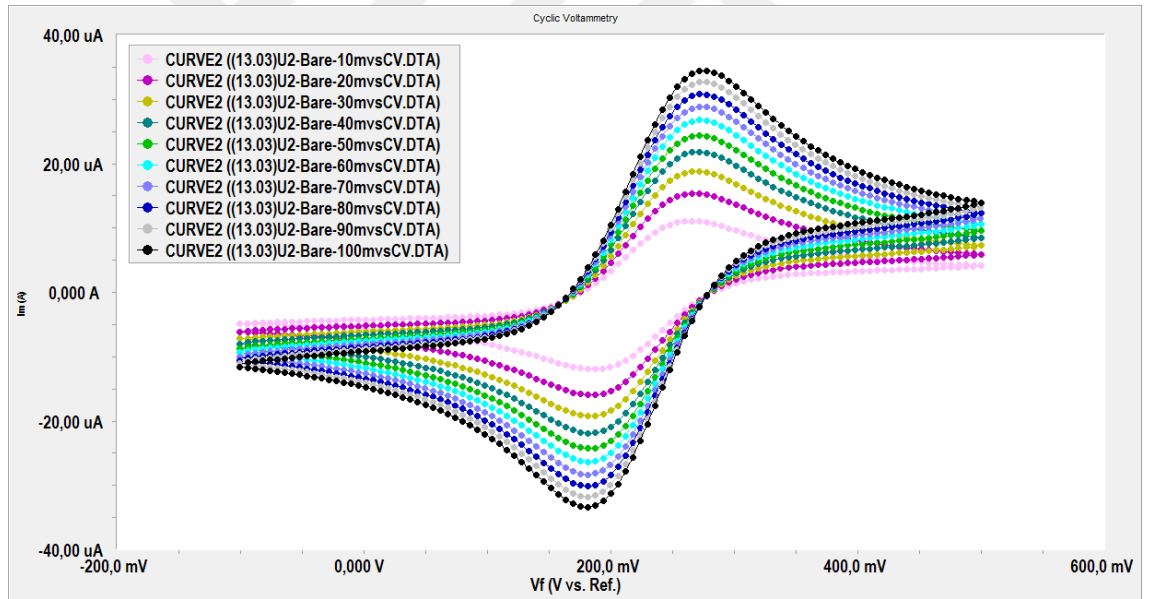
Çizelge 4.7. Yapay serum örneklerinde tsh analizi sonuçları

Yapay Serumda TSH miktarı (mlUL^{-1})	Biyosensör İle Ölçülen TSH Miktarı (mlUL^{-1})	Geri Kazanım (%)
0,1	0,119	119
0,2	0,198	99
0,3	0,270	90
0,4	0,397	99,25
0,5	0,502	100,4
0,6	0,611	101,8

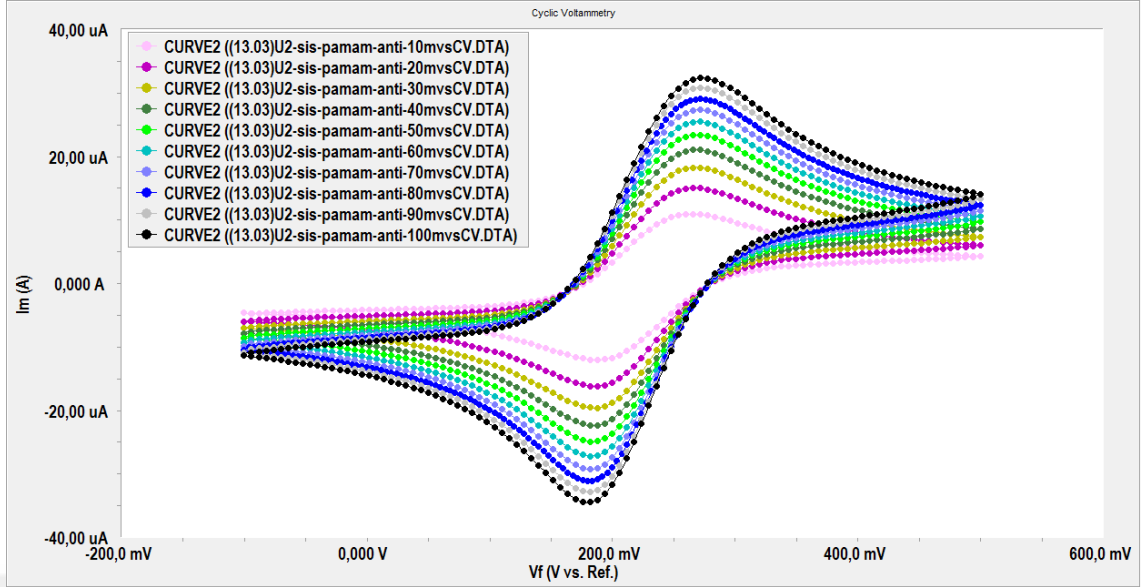
Çizelge 4.7’de de görüldüğü gibi, yapay serum örneklerinde yapılan TSH ölçüm sonuçları, serum içerisinde bulunan tuz ve proteinlerin biyosensör cevabına etki etmediğini göstermektedir. Bu durum tasarlanan biyosensörün TSH’ı yüksek hassasiyetle belirleme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

4.3.4. Biyosensörün Yüzey Alanının Hesaplanması

Yalın elektrot ve Anti-TSH immobilizasyonu sonrası yüzey alanlarının hesaplanması için 10 farklı potansiyelde (10→100) CV ölçümleri yapıldı. Yalın elektrotlar için sonuçlar Şekil 4.10’da, tasarlanan biyosensör için sonuçlar Şekil 4.11’de verildi.



Şekil 4.10. Yalın elektrot ile 10 farklı potansiyelde elde edilen döngüsel voltogramlar



Şekil 4.11. Tasarlanan biyosensör ile 10 farklı potansiyelde elde edilen döngüsel voltogramlar

Her bir potansiyelde elde edilen döngüsel voltogramlardan katodik akımlar hesaplanarak potansiyel-akım grafiklerinin eğimleri belirlendi. Elde edilen veriler Bölüm 3.2.5.4.'de verilen eşitliğe uygulandı. Au-yalın elektrot için yüzey alanı $2,23 \times 10^{-4} \text{ mol/cm}^2$, Anti-TSH immobilizasyonu sonrası $2,46 \times 10^{-4} \text{ mol/cm}^2$ olarak hesaplandı. Sonuçlardan da görüldüğü gibi antikor immobilizasyonu sonrası elektrot yüzey alanında bir artma meydana gelmiştir. Yaklaşık % 10 oranında olan bu artış antikorun yüzeye başarıyla immobilize edildiğini göstermektedir. Her ne kadar % 10 luk bir yüzey alanı artışı göreceli olarak az görülsede immobilizasyon tasarımı göz önüne alındığında olası bir sonuçtur. Zira immobilizasyonda kullanılan sistemin ve PAMAM moleküllerinin, yüzeye elektron transferini kolaylaştırması ve antikor immobilizasyonu sonrası yalın elektroda göre akım farkının oluşmasını engellemesi muhtemeldir.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında; tiroid ve tiroide bağlı hastalıkların teşhisinde ve tedavisinin takibinde kullanılmak üzere kanda TSH konsantrasyonunu belirleyebilecek, bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Bu yöntem immünoassay yöntemlerine iyi bir alternatif olabilir. Bu yöntemlerle kıyaslandığında hızlı ölçüm süresi, rutin ve yerinde ölçümlere olanak sağlaması, düşük maliyetli olması ve tekrar üretilebilirliği ile öne çıkmaktadır.

TSH'nin serumdaki referans konsantrasyonu, yetişkinler için 0.45- 4.12 mIU^L⁻¹ ve 70 yaş üzeri için 0.4-5.9 mIU^L⁻¹'dir (Smaniotto vd., 2017; Wiersinga, 2003). Serum TSH seviyelerinin bu değerlerin altında olması durumu hipertirodizm olarak adlandırılır ve hipopitüitarizme, multinodüler guatra, tiroid nodüllerinin yanı sıra, Graves hastalığına ve kardiyovasküler hastalıklara yol açabilir (Green vd., 2014; You vd., 2013). Bu güne kadar serumda TSH seviyesini belirlemek için, Radyo-immünoassay (RIA), yüzey arttırılmış Raman saçılması, İmmünodiyometrik test (IRMA), floresans immünoassay, enzim-bağlı immünosorbent testi (ELISA) gibi farklı ölçüm yöntemleri bildirilmiştir (Glinoe & Spencer, 2010; Choi vd., 2017; Wilson vd., 1987; Ahn, Shin, Lee, Kim, 2015)

Bu yöntemlerden bazılarının LOD değeri 0.5 mIU^L⁻¹ den düşük olmasına rağmen, lineer tayin aralıkları referans değerler arasındadır. Ayrıca hemen hemen hepsi uzun numune hazırlama ve analiz süresi ve uzman personel gereksinimleri gibi bazı analitik dezavantajlara sahiptir.

Tüm bunlar değerlendirildiğinde, TSH ile ilişkili hastalıklardan muzdarip birçok hasta için, TSH seviyesini 0,5 mIU^L⁻¹'den düşük konsantrasyonlarda da tespit edebilen yeni yöntemlere ihtiyaç olduğu açıktır. Bu çalışmada tasarladığımız biyosensör referans değerlerin altını da kapsayan bir tayin aralığına (0,1-0,6 mIU^L⁻¹) sahiptir. Bu bağlamda hipertirodizm'in teşhisi ve tedavi sürecinin izlenmesi için potansiyeli yüksek bir analitik araç olarak ön plana çıkabilir.

BÖLÜM 5

KAYNAKLAR

- Adam, B. (2000). *Klinik Biyokimya*, Ankara: Nobel Yayın Dağıtım
- Ahn J, Shin Y.B., Lee J., Kim M.G. (2015). Human alpha-fetal protein immunoassay using fluorescence suppression with fluorescent-bead/antibody conjugate and enzymatic reaction, *Biosensors & Bioelectronics*, 71, 115–120.
- Akay M.T. (2014). *Genel Histoloji* (9.Baskı). Ankara: Palme s. 38-39
- Altınışik, M. (2004). *İmmünolojik Teknikler*, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın
- Ası T. (2009). *Tablolarla Biyokimya*, Ankara: Nobel s.73-76, Cilt 2
- Bahadır, E. B., Sezgintürk, M. K. (2015). Electrochemical biosensors for hormone analyses, *Biosensors and Bioelectronics*, 68, 62–71
- Bain, C.D., Evall, J., Whitesides, G.M. (1989). Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent, *Journal of the American Chemical Society*, 111, 7155 – 7164
- Barsoukov, E., Macdonald, J.R. (2005). *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Bernadette, B., David, S.C. (2008). The clinical significance of subclinical thyroid dysfunction. *Endocrine Reviews*. 1, 76-131.
- Canbay, E., & Akyilmaz, E. (2014). Design of a multiwalled carbon nanotube–Nafion–cysteamine modified tyrosinase biosensor and its adaptation of dopamine determination. *Analytical Biochemistry*, 444, 8–15.
- Chaki, N. K., & Vijayamohanan, K. (2002). Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(1), 1–12.
- Chen, D., Jinghong, L. (2006). Interfacial design and functionalization on metal electrodes through self-assembled monolayers, *Surface Science Reports* 61, 445–46
- Choi S., Hwang J., Lee S., Lim D.W., Joo H., Choo J. (2017) Quantitative analysis of thyroid-stimulating hormone (TSH) using SERS-based lateral flow immunoassay. *Sensors & Actuators: B Chemical*, 240, 358-364.

Coulet, P. R. (1988). *What is a biosensor? Biosensor Principles and Applications*. Fransa: Springer Netherlands

Datta, A.K. (1990). Novel chemical and biological sensors for monitoring and control of food processing operations, *Journal of Food Engineering*. 12, 223-238

Evtugyn, G. (2014). *Biosensors Essentials*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 65.

Glinoyer, D., Spencer, C.A. (2010) Serum TSH determinations in pregnancy: How, when and why? *Nature Reviews. Endocrinology*. 6,526–529.

Green, T.R., Reich, E., Robenshtok, E., Chodick, G., Ron-Kella Y., Stiebel-Kalish, H. (2014). Third-generation ELISA thyrotropin-receptor antibody levels as an adjuvant tool to guide management of patients with Graves orbitopathy. *Endocrine Practice: Official Journal of The American College of Endocrinology and The American Association Of Clinical Endocrinologists*. 20(2),145-149.

Haddow J.E., Palomaki G.E., Allan W.C., Williams J.R., Knight G.J., Gagnon J., O'Heir C.E., Mitchell M.L., Hermos R.J., Waisbren S.E., Faix J.D., Klein R.Z. (1999). Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *New England Journal of Medicine*, 1341(8), 549-555.

Hatamluyi, B., & Es'haghi, Z., (2019). Quantitative Biodetection of Anticancer Drug Rituxan with DNA Biosensor Modified PAMAM Dendrimer/Reduced Graphene Oxide Nanocomposite. *Electroanalysis*, 30(8), 1651–1660.

Iwen, K.A., Schröder E., & Brabant G. (2013). Thyroid Hormones and the Metabolic Syndrome. *European Thyroid Journal*. 2(2), 83–92.

Joshi, R.M. (2006). *Biosensors*, Hindistan:Isha Books

Kalia, V., Atul N., Jadhav, Bhutani, K. K. (2004) Department of Natural Products, National Institute of Pharmaceutical Education and Research (NIPER), India, *Endocrine Research*. 30, 1, 1-17

Keha, E., Küfrevioğlu, İ., (2014) *Biyokimya*, İstanbul: Aktif Yayıncılık

Kochupillai N., Mehta M. (2008). Iodine deficiency disorders and their prevention in India. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 9, 237-244.

Langén V.L., Niiranen T.J., Puukka P., Lehtonen A.O., Hernesniemi J.A., Sundvall J., Salomaa V., Jula A.M. (2018). Thyroid-stimulating hormone and risk of sudden cardiac death, total mortality and cardiovascular morbidity. *Clinical Endocrinology*. 88(1),105-113.

Macdonald, J. R. (1987). Impedance spectroscopy and its use in analyzing the steady-state AC response of solid and liquid electrolytes, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 223, 25-50.

Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *BioTechniques*, 37, 790-802.

Moreno M., de Lange P., Lombardi A., Silvestri E., Lanni A., Goglia F. (2008) Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid*. 18(2), 239-53.

Moura N.A, Parisi M.C., Tambascia M.A., Pavin E.J., Alegre S.M., Zantut-Wittmann D.E. (2014). Relationship of thyroid hormone levels and cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Endocrine*. 45(1), 84-91.

Mrksich, M., Whitesides, M.G. (1996). Using self-assembled monolayers to understand the made surfaces with proteins and cells interactions of man-made surfaces with proteins and cells, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.*, 24, 2555-2578

Murray R. K., Mayes P. A., Granner D. K., Rodwell V. W., (1993). *Harper'in Biyokimyası*, İstanbul: Barış

Nelson D.L., Cox M. (2013). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Elçin Y.M. (Çev). Ankara: Palme Yayıncılık

Neto M.A., Parisi M.C., Tambascia M.A., Pavin E.J., Alegre S.M., Zantut-Wittmann D.E. (2014). Relationship of thyroid hormone levels and cardiovascular events in patients with type 2 diabetes. *Endocrine*. 45(1), 84-91.

Orazem, M. E., Tribollet, B., (2008). *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, New Jersey, USA: John Wiley & Sons Inc

Özata, M., (2019). Hipofiz Bezi Hormonları, 29.05.2019 tarihinde <http://www.endokrin.org> adresinden ulaşıldı.

Özcan, H. M. (2010). *Fenolik Bileşiklerin Tayinine Yönelik Amperometrik Esaslı Biyosensör Hazırlanması*, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne

Özdoğan, M., (2019). 29.05.2019 tarihinde (<https://www.drozdogan.com/>) adresinden erişildi.

Papendieck, L. G., Chiesa, A., Prieto, L., Bengolea, S., Perez, A., La Rosa, A., Serjan, A., Tavosnanska, J., Bergada, C. (1995) Early newborn screening for congenital hypothyroidism: TSH levels in the 48 hour, *Screening*, 4, 149-154

Roushani, M., Valipour, A., Valipour, M., (2016) Layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and cysteamine on gold electrode for immunosensing of human chorionic gonadotropin at picogram levels *Materials Science and Engineering C*, 61, 344–350.

Rubinstein, I. (1995). *Physical electrochemistry Principles, Methods and Applications*, New York: CRC Press.

Rugge J. B., Bougatsos C. & Chou R. (2015). Screening and treatment of thyroid dysfunction: an evidence review for the U.S. preventive services task force. *Annals of Internal Medicine*. 162(1), 35-45.

Schelfer, F ve Schubert, F. (Eds.) (1992). *Biosensors*. Elsevier Publishing Company, 7-10-50-52.

- Seo S.M., Koh Y.S., Park H.J., Kim D.B., Her S.H., Lee J.M., Park C.S., Kim P.J., Kim H.Y., Yoo K.D., Jeon D.S., Ahn Y.K., Jeong M.H., Chung W.S., Seung K.B. (2018). Thyroid stimulating hormone elevation as a predictor of long-term mortality in patients with acute myocardial infarction. *Clinical Cardiology*, 10;1367.
- Sezgintürk M. K. Uygun Z.O. (2012). An impedimetric VEGF biosensor based PAMAM/cysteamine modified gold electrodes for monitoring of tumor growth, *Analytical Biochemistry*, 423,277-285.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., (1997). *Principles of Instrumental Analysis*, A.B.D: Brooks/Cole.
- Smaniotto A., Mezalira D.Z., Zapp E., Gallardo H., Vieira I.C. (2017). Electrochemical immunosensor based on an azo compound for thyroid-stimulating hormone detection. *Microchemical Journal*, 133, 510-517.
- Szkudlinski, M. W., Fremont, V., Ronin, C., Weintraub, B. D., (2002). Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships, *Physiological Reviews*, 82,473-502.
- Şenel, M., & Çevik, E. (2012). A novel amperometric hydrogen peroxide biosensor based on pyrrole-PAMAM dendrimer modified gold electrode. *Current Applied Physics*, 12(4), 1158–1165.
- Tarım Ö., (2011) Thyroid Hormones and Growth in Health and Disease. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 3(2), 51–55.
- Telefoncu, A., Kılınç, A., (2012). *BİYOSENSÖRLER: Metodlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler*, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1-9.
- Telefoncu, A., (2008). *Biyosensörlere Genel Bakış ve Biyosensör Uygulamalarında Son Gelişmeler*, Ege Üniversitesi Biyosensör Yaz Okulu Kitabı, İzmir
- Turner, A., Karube I., Wilson, G. S. (1987) *Biosensors Fundamentals and Applications*, İngiltere: Oxford Üniversitesi, s. 85.
- Ulman, A. (1991). *An Introduction to Ultra thin Organic Films: From Langmuir Blogett to Self-Assembly*, New York: Academic Press Inc.
- Uygun, Z. O., Şahin, Ç., Yılmaz, M., Akçay, Y., Akdemir, A., & Sağın, F. (2018). Fullerene-PAMAM(G5) composite modified impedimetric biosensor to detect Fetuin-A in real blood samples. *Analytical Biochemistry*, 542, 11–15.
- Wang C. (2013). The relationship between type 2 diabetes mellitus and related thyroid diseases. *Journal of Diabetes Research* s. 1-9
- Wangner, G., Guibault, G. G. (1994) *Food Biosensor Analysis*, New York: Marcel Dekker.
- Wartofsky L., Dickey, R. A., (2005). The Evidence for a Narrower Thyrotropin Reference Range Is Compelling, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(9):5483–5488.

Wiersinga, W.M. (2003). The interpretation of the thyroid stimulating hormone (TSH) assay. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*, 147(24),1156-1158.

Wilson, R., Semple, C.G., Reid, A.M., Glen, A.C.A., Mckillop, J.H., Thomson, J.A. (1987). Canthyroid stimulating hormone levels by TSH (IRMA) predict relapse ofthyrotoxicosis following carbimazole treatment, *Postgraduate Medical Journal*, 63,755–756.

Wink, T., van Zuilen, S. J., Bult, A., van Bennekom, W.P., (1997). Self-assembled Monolayers for Biosensors, *Analyst*, 122, 43–50.

Yang, Y., Yang, M., Wang, H., Jiang, J., Shen, G., & Yu, R. (2004). An amperometric horseradish peroxidase inhibition biosensor based on a cysteamine self-assembled monolayer for the determination of sulfides. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 102(1), 162–168

Yorganci, E., & Akyilmaz, E. (n.d.). Alkaline Phosphatase Based Amperometric Biosensor Immobilized by Cysteamine-Glutaraldehyde Modified Self-Assembled Monolayer. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology*, 39(5), 317–323.

You D.J., Park T.S., Yoon J.Y. (2013). Cell-phone-based measurement of TSH using Mie scatter optimized lateral flow assays. *Biosensors and Bioelectronics*, 40, 180–185.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1993 Edirne de doğdum. İlköğrenimimi İstanbul'da Fatin Hoca İlköğretim okulunda tamamladım. 2007 yılında Paşabahçe Ahmet Ferit İNAL Lisesine başlayıp 2011 yılında mezun oldum. Aynı yıl içinde Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünü kazandım ve 2016 yılında mezun oldum. 2016 yılında Trakya Üniversitesinde Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladım ve devam etmekteyim.