

G. CAN

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUĞLA 2024

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

NANOENZİM TEMELLİ KOLORİMETRİK *Leishmania*
İMMUNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÖKSU CAN

HAZİRAN 2024
MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

NANOENZİM TEMELLİ KOLORİMETRİK *Leishmania*
İMMUNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÖKSU CAN

HAZİRAN 2024
MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

GÖKSU CAN tarafından hazırlanan **NANOENZİM TEMELLİ KOLORİMETRİK *Leishmania* İMMUNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ** başlıklı tezinin, 28/06/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Nur AKSUNER* (**Jüri Başkanı**)

İmza:

Kimya Ana Bilim Dalı,
Ege Üniversitesi, İzmir

Prof. Dr. Ülkü ANIK** (**Danışman**)

İmza:

Kimya Ana Bilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Vasfiye Hazal Özyurt (**Üye**)

İmza:

Gastronomi Ana Bilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Mehmet UĞURLU

İmza:

Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Ülkü ANIK

İmza:

Danışman, Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Savunma Tarihi: 28/06/2024

Tez çalışmalarım boyunca elde ettiğim ve sunduğum tüm bilgiler, sonuçlar, belgeler ve dokümanların bizzat tarafımdan ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallara uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca akademik ve bilimsel etik kuralları gereğince bu tez çalışması kapsamında elde edilmemiş, başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Göksu CAN
28/06/2024

ÖZET
NANOENZİM TEMELLİ KOLORİMETRİK *Leishmania*
İMMUNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Göksu CAN

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ülkü ANIK

Haziran 2024, 54 sayfa

Bu yüksek lisans tezinde, *Leishmania* majör yüzey proteazı olan Glikoprotein 63 (Gp63) antikorunun tespit edilmesi amacıyla Altın Nanopartiküllerin (AuNP) kullanıldığı bir kolorimetrik immunosensör geliştirilmiştir. Bu amaçla, AuNP'lerin yüzeyi *Leishmania donovani* antijeni olan kinetoplastid membran proteini (KMP-11) ile modifiye edilerek aktif biyolojik tabaka oluşturulmuştur. Anti-gp63'lerin analit ve AuNP'lerin renk reaktifi olarak kullanıldığı hem gözle görülebilen hem de UV-Vis spektrofotometre kullanılarak absorbans değişimine göre izlenebilen bir sensör tasarlanmıştır. Absorbans ölçümleri 700-350 nm dalga boyları arasında gerçekleştirilmiş ve 530 nm'deki absorbans değerleri dikkate alınmıştır. Geliştirilen AuNP temelli kolorimetrik *Leishmania* immunosensörünün optimum çalışma koşullarının ayarlanması için KMP-11'in AuNP ile inkübasyon süresi ve KMP-11/anti-gp63 inkübasyon süresi optimizasyonları, ardından analitiksel karakteristik çalışmaları yapılmıştır. Girişim çalışmaları ve örnek deneme için sentetik serum kullanılmıştır. Sonuç olarak bu yüksek lisans tezi kapsamında daha önce uygulanmamış, leishmaniasis hastalığının teşhisi için üzerine doğrudan KMP-11 biyolojik katmanı oluşturulmuş AuNP'lerin kullanıldığı hızlı, çıplak göz ile de var-yok tayini mümkün kılan, pratik bir kolorimetrik immunosensör geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Altın Nanopartikül (AuNP), *Leishmania* majör yüzey proteazı Glikoprotein 63 (Gp63), rekombinant *L.donovani* antijeni Kinetoplastid membran protein (KMP-11), kolorimetrik immunosensör

ABSTRACT
DEVELOPMENT OF NANOENZYME-BASED CHOLORIMETRIC
***Leishmania* IMMUNOSENSOR**

Göksu CAN

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ülkü ANIK

June 2024, 54 pages

In this master thesis, a colorimetric immunosensor using gold nanoparticles (AuNPs) was developed for the detection of Glycoprotein 63 (Gp63) antibody, which is a major surface protease of *Leishmania parasite*. For this purpose, the surface of AuNPs was modified with kinetoplastid membrane protein (KMP-11), an antigen of *Leishmania donovani*, to form an active biological layer. The determination of anti-gp63 was carried out using AuNPs as a colour reagent, both visible to the eye and as a sensor that can be monitored according to the absorbance change using UV-Vis spectrophotometer. Absorbance measurements were carried out between 700-350 nm wavelengths and absorbance values at 530 nm were taken into account. Optimization of the incubation time of KMP-11 with AuNP and the incubation time of KMP-11/anti-gp63 were performed to set the optimum operating conditions of the developed AuNP-based colorimetric *Leishmania* immunosensor, followed by analytical characteristic studies. Synthetic serum was used for interference studies and sample testing. As a result, within the scope of this master's thesis, a practical colorimetric immunosensor has been developed for the diagnosis of leishmaniasis disease, which has not been applied before, using AuNPs on which KMP-11 biological layer is directly formed, that enables a fast and practical detection even with the naked eye.

Keywords: Gold nanoparticle (AuNP), *Leishmania* major surface protease Glycoprotein 63 (Gp63), recombinant *L. donovani* antigen Kinetoplastid membrane proteine-11 (KMP-11), Colorimetric immunosensor

ÖNSÖZ

Yüksek lisansım sürecinde beni bilgi ve tecrübeleri ile aydınlatan, desteğini hiç esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum sayın danışmanım Prof. Dr. Ülkü ANIK’a sonsuz teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca bana her zaman destek ve yardımcı olan sevgili ailem; annem Feride DEMİREL, babam Fahri CAN, kardeşim Beysu Nefise CAN, teyzem Gönül DEMİREL ve sevgili Ahmet Can AYGÜN’e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK VE ÖZETLER	3
2.1. Biyosensörler ve Çeşitleri	3
2.1.1. İmmunosensörler	5
2.2. Optik Biyosensörler	5
2.2.1. Kolorimetrik Biyosensörler	5
2.2.2. UV-Vis Spektrofotometresi	6
2.2.3. Nanomalzemeler	7
2.2.4. Nanoenzimler	8
2.2.5. Altın Nanopartiküller (AuNP)	8
2.3. Leishmaniasis Hastalığı	9
3. MATERYAL VE METOT	12
3.1. Kullanılan Cihazlar	12
3.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	13
3.2.1. Sentetik serum çözeltisi	13
3.2.2. pH: 7,4 100 mM PBS	13
3.2.3. pH: 8,2 20 mM tuz içeren PBS	13
3.2.4. KMP-11 antijen çözeltisi:	14
3.2.5. Anti-gp63 çözeltisi:	14
3.2.6. ABTS ve Cu-MOF'lu çözeltinin hazırlanması	14
3.3. AuNP Sentezi	14
3.4. AgNP Sentezi	14
3.5. Cu-MOF sentezi	15
3.6. Kolorimetrik <i>Leishmania</i> Biyosensörünün Hazırlanması	15
3.7. Uygun Nanoenzim ve/veya Renk Reaktifinin Seçilmesi	16
3.7.1. Cu-MOF ve ABTS ile kolorimetrik <i>leishmania</i> biyosensörünün	

geliştirilmesi.....	16
3.7.1. Cu-MOF miktar optimizasyonu.....	16
3.7.2. Karanlıkta bekleme süresi optimizasyonu	17
3.7.3. AgNP ve AuNP ile kolorimetrik <i>leishmania</i> biyosensörünün geliştirilmesi.....	17
3.8. <i>Leishmania</i> Biyosensörünün Kolorimetrik Ölçüm Prosedürü.....	18
3.9. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu.....	18
3.9.1. KMP-11 antijeni miktar optimizasyonu.....	19
3.9.2. Antijen-antikor inkübasyon süresi optimizasyonu.....	19
3.8. Geliştirilen Kolorimetrik <i>Leishmania</i> Biyosensörünün Analitik Karakteristiğinin İncelenmesi	19
3.9. Girişim ve Örnek Deneme Çalışması	20
4. SONUÇ.....	21
4.1. <i>Sentezlenen AuNP'lerin karakterizasyonu.....</i>	21
4.2. Geliştirilen <i>Leishmania</i> Biyosensörünün Spektroskopik Karakterizasyonu	22
4.3. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu.....	23
4.3.1. KMP-11 inkübasyon süresi optimizasyonu	23
4.3.2. Antijen-antikor inkübasyon süre optimizasyonu	24
4.4. Geliştirilen Kolorimetrik <i>Leishmania</i> Biyosensörünün Analitiksel Karakterizasyonu	25
4.5. Girişim ve Örnek Deneme Çalışması	26
4.6. Yorum	27
KAYNAKLAR.....	29
ÖZGEÇMİŞ	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 4.1. Diğer benzer leishmaniasis tayini çalışmalarının karşılaştırma tablosu ... 26



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyosensörlerin yapısını ve sınıflandırılmasını gösteren şematik diagram.....	4
Şekil 2.2. l = Işığın etkileştiği yol (cm), c = konsantrasyon (mol/L), a = absorpsiyon katsayısı (L/mol.cm), I_0 = Işığın ilk şiddeti, I = Işığın numuneden geçerken moleküllerle etkileşmesi sonucu geriye kalan şiddeti.	6
Şekil 2.3. Spektrofotometrelerin ana parçalarını gösteren basit şematik gösterim.....	7
Şekil 2.4. Leishmania parazitinin promastigot formundan amastigot formuna geçiş döngüsü.	10
Şekil 3.1. Kullanılan Cihazlar A) İnkübatör, B) Saf Su Cihazı, C,) pH metre, D) UV-Vis Spektrofotometre, E) Hassas terazi.....	12
Şekil 3.2. Leishmania biyosensörünün hazırlanma aşamalarını gösteren şema.	15
Şekil 3.3. ArtanCu-MOF miktarına karşı absorbans değerlerinin verildiği excel grafiği ve renk değişiminin fotoğrafları. Görüldüğü üzere en yüksek absorbans ve en koyu renk 3 mg/mL Cu-MOF miktarında kaydedilmiştir fakat hata payı yüksek ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiştir....	16
Şekil 3.4. ABTS, H ₂ O ₂ ve Cu-MOF içeren çözeltinin kararlı bir renk vermesi için yapılan karanlıkta bekleme süresi optimizasyonunun excel grafiği.	17
Şekil 3.5. A) AgNP ve B)AuNP kullanılarak geliştirilen leishmania biyosensörlerinin agregasyon sonucu renk değişimlerini gösteren fotoğraflar. Hem daha kolay gözle görülebilme avantajı hem de çıplak gözle dahi kantitatif bir sonuç elde edilebilebilmesi amacıyla AuNP'nin biyosensörün geliştirilme aşamasında kullanılmasına karar verilmiştir.	18
Şekil 4.1. Sentezlenen AuNP'nin karakteristik 530 nm dalga boyunda gösterdiği 1.0 absorbans değeri.....	21
Şekil 4.2. Sentezlenen AuNP'lerin SEM görüntüleri.	22
Şekil 4.3. Karakterizasyon için geliştirilen sistemin renk farklılıklarının fotoğrafları ve UV spektrumları. a Çıplak AuNP, b AuNP / 10 ng.mL ⁻¹ KMP-11 c AuNP / 10 ng.mL ⁻¹ KMP-11, d AuNP / 1:200 anti-gp63, e AuNP / 10 ng.mL ⁻¹ KMP-11 / 1:200 anti-gp63. UV-Vis ölçümleri 350 - 700 nm aralığında gerçekleştirilmiştir.	23
Şekil 4.4. KMP-11 antijen ve AuNP inkübasyon süresi optimizasyonu excel grafiği ve UV-Vis spektrumları. ve b) KMP-11, anti-gp63 inkübasyon süreleri optimizasyon çalışmalarının excel grafikleri. Deney için denenen inkübasyon süreleri sırasıyla 0, 5, 10, 20, 30 ve 60 dakikadır (2 ila 7 aralığı). UV-Vis grafiğinde de yalın AuNP'nin absorbans değeri 1 olarak ölçülmüştür (1. spektrum).	24
Şekil 4.5. KMP-11 antijen – anti-gp63 inkübasyon süresi optimizasyonunun excel grafiği ve UV-Vis spektrumları. KMP-11, anti-gp63 inkübasyon süreleri optimizasyon çalışmalarının excel grafikleri. Deney için denenen inkübasyon süreleri sırasıyla 0, 5, 10, 20, 30 ve 60 dakikadır (2 ila 7 aralığı). UV-Vis grafiğinde de yalın AuNP'nin absorbans değeri 1 olarak ölçülmüştür (1. spektrum).	24
Şekil 4.6. A) Geliştirilen kolorimetrik biyosensörün kalibrasyon grafiği ve B) excel grafikleri. A) UV-spektrumu ve seyreltilmiş anti-gp63'ün renk değişimi. a'dan g'ye; 1:640, 1:320, 1:200, 1:160, 1:120, 1:100, 1:80 seyreltilmiş anti-gp63 oranı. Deneysel parametreler Şekil 3 ile aynıdır.	25
Şekil 4.7. Sentetik serum ile hazırlanmış anti-gp63 ve sentetik serum olmadan hazırlanan anti-gp63'ün UV spektrumlarının karşılaştırılması.	27

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Anti-gp63	<i>Leishmania</i> Majör Yüzey Proteaz Glikoprotein 63 antikor
Ab	Antikor
Abs	Absorbans
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
Ag	Gümüş
AgNP	Gümüş Nanopartikül
Anti-gp63	<i>Leishmania</i> Major Yüzey Proteaz Glikoprotein 63
Au	Altın
AuNP	Altın Nanopartikül
CL	Kutanöz Leishmaniasis
Cu	Bakır
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPV	Diferansiyel Puls Voltammetrisi
HAuCl ₄ ·3H ₂ O	Altın(III) Klorür Trihidrat
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
KH ₂ PO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
KMP-11	Rekombinat <i>L.donovani</i> KMP-11 antijeni
L	Litre
LOD	Belirtme Alt Sınırı
m	Kütle
M	Molarite
MCL	Mukokutanöz Leishmaniasis
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mL	Mililitre
μL	Mikro Litre
mM	Milimolar
MOF	Metal Organik Çerçeve
Na ₂ HPO ₄	Sodyum fosfat dibazik dihidrat

NaCl ₂	Sodyum Klorür
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat Tamponu
pg	Pikogram
RNA	Ribonükleik asit
RSD	Bağıl Standart Sapma
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
V	Hacim
VL	Viseral Leishmaniasis

1. GİRİŞ

Leishmaniasis, bir vektör parazit olan *Leishmania* cinsinin neden olduğu protozoon parazitik bir hastalıktır. Bu hastalık, *Leishmania* cinsinin en az 20 türünden kaynaklanmaktadır ve dünya sağlık örgütünün belirlediği dünya çapında en dikkat edilmesi gereken altı hastalıktan biridir. Bu nedenle salgına yatkın en kritik hastalıklar arasında yer almaktadır (Kumari vd., 2009; Murray vd., 2005; *World Health Organization (WHO)*, n.d.). Leishmaniasis hastalığı klinik belirtileri baz alınarak üç türe ayrılmaktadır. Bunlar; Visceral leishmaniasis (VL), Kutanöz leishmaniasis (CL) ve Mukokutanöz leishmaniasis (MCL) olarak bilinir (De Muijder vd., 2011; Postigo, 2010). Özellikle Ortadoğu, Orta Asya, Güney Amerika ve Orta Amerika'da Leishmaniasis hastalığının en şiddetli ve ölümcül olan versiyonu VL daha yaygın görülmektedir. Enfektif parazitler, makrofajlarda yer alır ve CL vakalarında deride ülserif lezyon oluşumlarına neden olurlar. Fakat VL ve MCL durumunda mukoza yapısında inflamasyon oluştururlar, genel belirtileri ise yüksek veya düzensiz olabilen ateş, hepatosplenomegali ve kilo kaybı (Salman vd., 1999; Zhang vd., 2021). Bununla birlikte, *Leishmania* majör, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* ve *Leishmania panamensis* gibi türlerin neden olduğu CL, 2-18 ay içerisinde kendiliğinden iyileşme eğilimi göstermektedir fakat deride neden olduğu şekli bozuk lezyonların izleri kalmaktadır (Croft vd., 2003).

Leishmaniasis hastalığına neden olan protozoon türü parazit iki şekilde doğada bulunmaktadır. Birincisi vektör dişi kum sineğindeki kamçılı promastigot, diğeri ise memelilerde bulunan amastigot. Dişi kum sineği vektörü, memeli canlıyı soktuğunda *Leishmania* paraziti metasiklik promastigot formunu memeliye enjekte eder. *Leishmania* parazitinin bu formu öncelikle lokal makrofajlar içerisine girerek amastigot forma dönüşür ve burada çoğalmaya başlar. *Leishmania* türüne göre çoğalan amastigot formlar önce dolaşıma ardından retikuloendotelial sistem dokularına ulaşır.

Günümüze kadar *Leishmania*'nın tanısı ve tanımlanmasına yönelik çeşitli tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Geleneksel olarak klinik numunelerdeki *Leishmania* mikroskopik olarak ve ayrıca lekeli doku örneklerinin kültürlenmesiyle tayin edilebilir.



2. KAYNAK VE ÖZETLER

2.1. Biyosensörler ve Çeşitleri

Biyosensörler, biyolojik algılama öğelerini içeren sensor çeşitleridir. Biyolojik materyaller özgülükleri ve duyarlılıkları sayesinde fizikokimyasal transdüserler ile birleştirildiğinde kompleks biyoanalitik ölçümleri basit ve pratik bir şekilde gerçekleştirmeye olanak sağlarlar. Özellikle tıbbi tanı teknolojilerinde, ilaç geliştirme ve gıda güvenliği gibi birçok alanda analitik cihazlar olarak tercih edilmektedirler (Turner, 2013). Biyosensörlerin ilk adımları, Leyland C. Clark tarafından 1956'da icat edilen oksijen probunun 1962'de enzim elektrodu olarak geliştirilmesiyle atılmıştır (Clark vd., 1962; Updike vd., 1967). Clark, oksijen elektrodu için öncelikle standart platin elektrot ve referans elektrot üzerine oksijen geçirgen bir membran kaplamıştır. Platin elektrodun potansiyeli sabit tutulmuş ve bu sayede oluşturulan devreden geçen akımın hızı ortamdaki oksijen konsantrasyonuyla doğrusal bir orantı sergilemiştir (Clark vd., 1962). Bu geliştirilen oksijen elektrodu kandaki glikoz miktarını ölçmek üzere glukoz oksidaz enzimi içeren bir jel tabaka ve yarı geçirgen bir membranla kaplanmıştır (Clark vd., 1962). Kanda bulunan glukoz ve Oksijen glikoz oksidaz enzimiyle immobilize edilmiştir. Oksijen elektrodun yüzeyine ulaştığında Glukoz glukonik aside dönüşerek ortamdaki oksijeni hızla harcamaktadır (Eşitlik 2.1) (Norouzi vd., 2010; Yoo vd., 2010). Bu sayede ortamdaki Oksijen konsantrasyonunun farklanması ölçülerek glukoz miktarı hesaplanır (Yoo vd., 2010).



Biyosensörlerin çalışma prensibinde ilk olarak analiz edilecek örnek, yani analit çözeltiden biyosensör yüzeyine çeşitli yöntemlerle difüzlenir. Analit, biyoreseptörle etkileştiğinde bu tepkime sonucu ortaya gaz çıkışı, seçici iyon oluşumu, ısı açığa

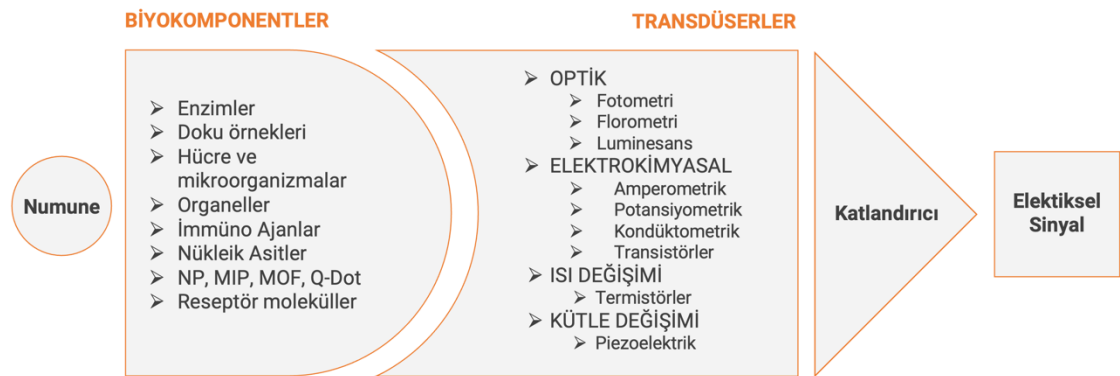
çıkması, optik özelliklerin değişmesi ve redoks tepkimeleri sonucu elektron açığa çıkması gibi birçok etken oluşabilir (Su vd., 2011). Sensör yüzeyindeki bu değişimler tespit edilir ve anlamlı elektriksel sinyallere dönüştürülerek analitin derişimi hesaplanabilir.

Biyosensörlerinde sensörler gibi bazı dinamik özellikleri bulunmaktadır. Spesifiklik, kararlılık, duyarlılık, tekrar üretilebilirlik ve doğrusallık gibi özelliklerin optimizasyonu biyosensörlerin performansını arttırabilir, zamandan ve maliyetten kazanç sağlamaya yardımcı olabilir.

Biyosensörler geliştirilmelerinde kullanılan biyolojik reseptörlerine göre veya kullanılan transdüserlerine göre sınıflandırılabilir.

Buna göre:

- Enzim biyosensörleri
- İmmunosensörler
- Mikrobiyal biyosensörler
- DNA sensörler



Şekil 2.1. Biyosensörlerin yapısını ve sınıflandırılmasını gösteren şematik diagram.

Tez kapsamında kolorimetrik bir immunosensör geliştirildiğinden dolayı yalnızca belli başlı sensör tipleri detaylı şekilde açıklanmıştır.

2.1.1. İmmunosensörler

Biyosensör tasarımında antikor-antijen etkileşimine dayanarak hazırlanan ve bir dönüştürücü ile analitin tespit edildiği cihazlar immunosensörlerdir (Gizeli vd., 1996). İmmun sistemin antijen adı verilen yabancı maddelere karşı yanıt olarak ürettiği antikorlar glikoproteinlerdir (Cristea vd., 2015). Bu antikorların spesifik olarak belirli antijenlere bağlanması sayesinde immunosensörler yüksek duyarlılık ve özgüllük sergilerler (Gizeli vd., 1996; Karunakaran vd., 2015). Özellikle tıp ve çevresel analizlerde sıklıkla kullanılırlar.

2.2. Optik Biyosensörler

Dönüştürücüler ya da transdüserler, biyolojik materyallerden elde edilen sinyalleri anlamlı ölçülebilir bir enerji formuna dönüştüren bileşenlerdir. Bu dönüştürülen forma göre biyosensörler optik, elektrokimyasal, kolorimetrik ve piezoelektrik temelli biyosensörler olarak sınıflandırılabilir (Kavita V, 2017; Mohanty vd., 2006; Su vd., 2011).

Optik biyosensörler, biyolojik analitlerin hassas ve seçici bir şekilde tespit edilmesini sağlayan cihazlardır (Long vd., 2013). Bunlar, ışıma, ışık absorpsiyonu, floresans veya kırılma indisindeki değişiklikler gibi optik sinyalleri kullanarak çalışırlar. Yüzey plazmon rezonansı (SPR) tabanlı biyosensörler, en yaygın kullanılan optik biyosensörlerdendir ve SPR görüntüleme ile lokalize SPR gibi çeşitli alt türleri bulunur. Bunların yanı sıra, evanesan dalga floresansı, biyoluminesans optik fiber biyosensörleri, interferometrik, elipsometrik ve yansıtıcı interferans spektroskopisi gibi diğer optik biyosensör sistemleri de mevcuttur (J vd., 2018; Long vd., 2013). Optik biyosensörler, virüsler, toksinler, ilaçlar, antikorlar, tümör belirteçleri ve tümör hücreleri gibi çeşitli analitleri tespit etmek için kullanılabilirler (Damborský vd., 2016).

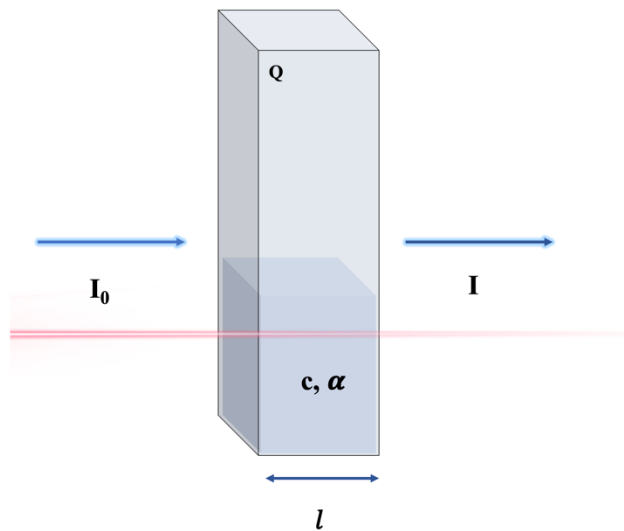
2.2.1. Kolorimetrik Biyosensörler

Kolorimetrik biyosensörler, ışığın genliğinde oluşan değişimlerin, analiz edilmek istenen malzemenin konsantrasyonuyla olan ilişkisini inceleyen cihazlardır (Germain

vd., 2009; Hu vd., 2017; Li vd., 2010). Bu cihazlarda; UV-Vis spektrofotometre gibi optik algılama cihazlarıyla veya çıplak gözle tanımlanabilen ve kullanılan reaktifler ile rengi belirlenen ürünün rengindeki değişimler, analitin konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir (Luka vd., 2015; Tao vd., 2017). Kolorimetrik biyosensörlerin tasarımlarında 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) gibi çeşitli renk reaktifleri ya da altın (Au), gümüş (Ag) gibi nanopartiküller (NP) sıklıkla kullanılır. Özellikle AuNP'ler yüksek hassasiyet ve çıplak gözle belirlenebilen renk değişimleri sayesinde nükleik asitler, proteinler ve mikromoleküller gibi çeşitli analitleri tespit etmek için çokça nanoenzim olarak tercih edilmektedir (Hu vd., 2017; MA vd., 2018).

2.2.2. Uv-Vis Spektrofotometresi

Mor ötesi görünür bölge (UV-Vis) spektrofotometresi bir çözeltide absorbe edilmiş olan ışığın absorblanma seviyesi veya ışık geçirgenliğinin ölçülebilmesini sağlayan optik cihazlardır. Bu spektroskopik yöntem molekül elektronlarının kuantum düzeyleri arasındaki geçişleri baz alır. UV bölge elektromanyetik spektrumun 10-400 nm dalga boyuna eşlik eden bölgesini işaret eder. Bu bölge X-Işınları ve görünür bölge (400-800 nm aralığı) arasında bulunmaktadır (Mosorov, 2017).



Şekil 2.2. l = Işığın etkileştiği yol (cm), c = konsantrasyon (mol/L), a = absorpsiyon katsayısı (L/mol.cm), I_0 = Işığın ilk şiddeti, I = Işığın numuneden geçerken moleküllerle etkileşmesi sonucu geriye kalan şiddeti.

Lambert Beer eşitliği; I_0 şiddetinde monokromatik bir ışık demetinin kalınlığı L cm

olan bir tüpün içinde bulunan çözeltideki moleküller tarafından absorblanması ile şiddetinin azaldığını ve I şiddetinde tüpü terk ettiğini söyler (Şekil 2.2.). Moleküllerin yalnızca belli bir dalga boyunda bulunan ışığı absorblaması sonucu ortaya çıkan azalma bu eşitlik ile gösterilir. Buna göre:

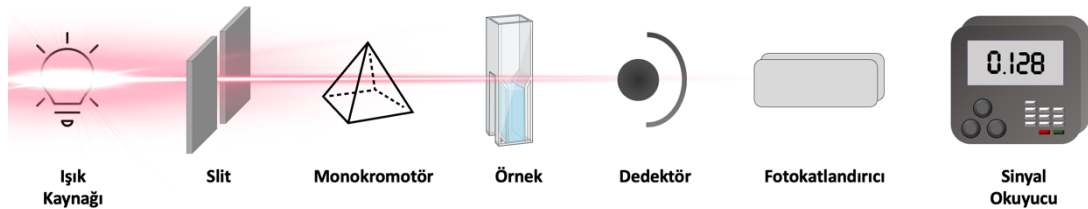
$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon Lc ; \log \frac{I_0}{I} = aLc = A ;$$

$$I = I_0 \cdot e^{-aLc} \quad (2.2)$$

L = Işığın etkileştiği yol (cm), c = konsantrasyon (mol/L), ϵ = absorpsiyon katsayısı (L/mol.cm), I_0/I oranı geçirgenliktir ve T ile gösterilir. c = g/L alınırsa $\epsilon = a$ ile gösterilir ve L / g.cm birimi ile verilir. Böylece A = a.L.c olur.

Yukarıda verilen eşitliğe göre yarıçapı bilinen tüpe giren ve terk eden ışık şiddetinin logaritma farkları ışıqla etkileşerek absorblayan moleküllerin derişimi ile orantılıdır (Mäntelev ve Deniz, 2017).

Spektroskopik ölçümler genel olarak beş bileşenden oluşur. Kararlı bir ışık kaynağı, dalga boyu seçici, UV küvet içinde bir örnek, dedektör ve sinyal okuyucu (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Spektrofotometrelerin ana parçalarını içeren basit bir şematik gösterim.

2.2.3. Nanomalzemeler

Nano malzemeler, boyutları 1-100 nm aralığında bulunan veya elde edilen mataryellerdir (Klain vd., 2008). Bu malzemeler bilimsel araştırma ve endüstri alanlarında son zamanlarda çokça kullanılmaktadır. Bu malzemelerin temelini ise nanoparçacıklar oluşturmaktadır. Nanoparçacıkların geniş bir yelpazede sıklıkla kullanılmasının ve tercih edilmesinin nedenleri arasında, yüksek yüzey ve hacim

alanları, boyut ve şekillerinin kontrol edilebilmesi ve bu sayede elektrokimyasal veya optik özelliklerinin değişkenlik göstermesi yer almaktadır. Malzemelerin atom ve moleküler düzeyde yapılarının işlevselleştirilmesi sonucu elde edilebilirler (Pandey vd., 2008; Peralta-Videa vd., 2011).

Bununla birlikte günümüzde en çok tercih edilen nanomalzemeler; nanoenzimler, grafen/karbon nanotüpler, manyetik nanoparçacıklar, nanokompozitler veya optik nanoparçacıklardır (Kumar vd., 2011; Singh vd., 2007). Boyutları ışığın dalga boyundan daha küçük olan nanoparçacıklar ise elektronların hapsedilmesi ve yüzey plazmon rezonansı gösteren optik nano materyallerdir. Bu nanoparçacıklar spesifik ve sıradan olmayan elektronik ve optik özelliklere sahiptirler. Bu nedenle biyofotonik, biyoelektronik, optik görüntüleme ve biyogölgeleme alanlarında kullanılmaktadırlar (Klain vd., 2008; Biswas & Wu, 2009).

2.2.4. Nanoenzimler

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılan, yüksek spesifiklik ve %100 verim sağlayan proteinlerdir. Doğal enzimlerin avantajlarına karşın birçok dezavantajları bulunmaktadır. Doğal enzimler yüksek pH veya yüksek sıcaklıklarda denatüre olarak aktivitelerini kaybederler ayrıca sentezlenmeleri uzun ve maliyetli süreçler gerektirir. Bu durum bilimsel çalışmalarda kullanılmalarını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda belirli enzimlerin aktivitelerini taklit/mimik eden nano malzemeler geliştirilmiştir. Nanoenzimler doğal enzimler gibi belirli biyolojik ve kimyasal reaksiyonları katalizleyerek reaksiyonu hızlandırırlar. Bununla birlikte dayanıklılıkları doğal enzimlere göre daha yüksek olduğundan ve uygun maliyetlerle üretilbildiklerinden son zamanlarda sıklıkla tercih edilmeye başlanmıştır.

2.2.5. Altın Nanopartiküller (AuNP)

Nanopartiküllerin çeşitli bileşimleri ve boyutları, teşhis ve tayin teknolojilerinde tercih edilmelerine olanak tanımaktadır (L. Wang vd., 2006). Özellikle AuNP'ler, geniş yüzey alanları ve iyi bir enzim taklit özelliği göstermeleri sayesinde biyolojik moleküllerin tayinine öncülük etmişlerdir ve düşük konsantrasyonlarda ölçüm yapabilme yetenekleriyle bazı hastalıkların erken teşhisine katkıda bulunmaktadır (MA vd., 2018).

AuNP'ler yüksek yüzey enerjilerinden dolayı diğer metallerle karşılaştırıldığında yüksek reaktiviteye sahiptirler. Bu nedenle, genellikle proteinler, lipidler ve nükleik

asitler gibi biyomoleküllerle etkileşime girerler (J. Liu vd., 2017). Nanopartiküllerin biyolojik moleküllerle etkileşimi genellikle moleküller arası bağların kırılması veya bağların oluşması olmadan da gerçekleşebilir. Bu etkileşimler arasında Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler veya hidrojen bağları gibi örnekler verilebilir. Bu etkileşimler, genellikle nanopartiküllerin biyolojik reaktivitesi ile ilgilidir ve özellikle altın nanopartikülleri için geçerlidir (Gagner vd., 2011; J. Liu vd., 2017; Monopoli vd., 2011).

AuNP tabanlı kolorimetrik sensörler, nanopartiküller arasında yüzey plazmon bağlanması sonucunda süspansiyonun kırmızıdan mora renge dönüşmesini kullanır (Ghosh vd., 2007; Nilam vd., 2017; Politi vd., 2014, 2016). Bu durum, dağılmış bir durumdan birleşik bir duruma geçişi ifade eder. AuNP agregasyonu, antijen-antikor etkileşimi gibi biyolojik mekanizmalar kullanılarak ayarlanabilir.

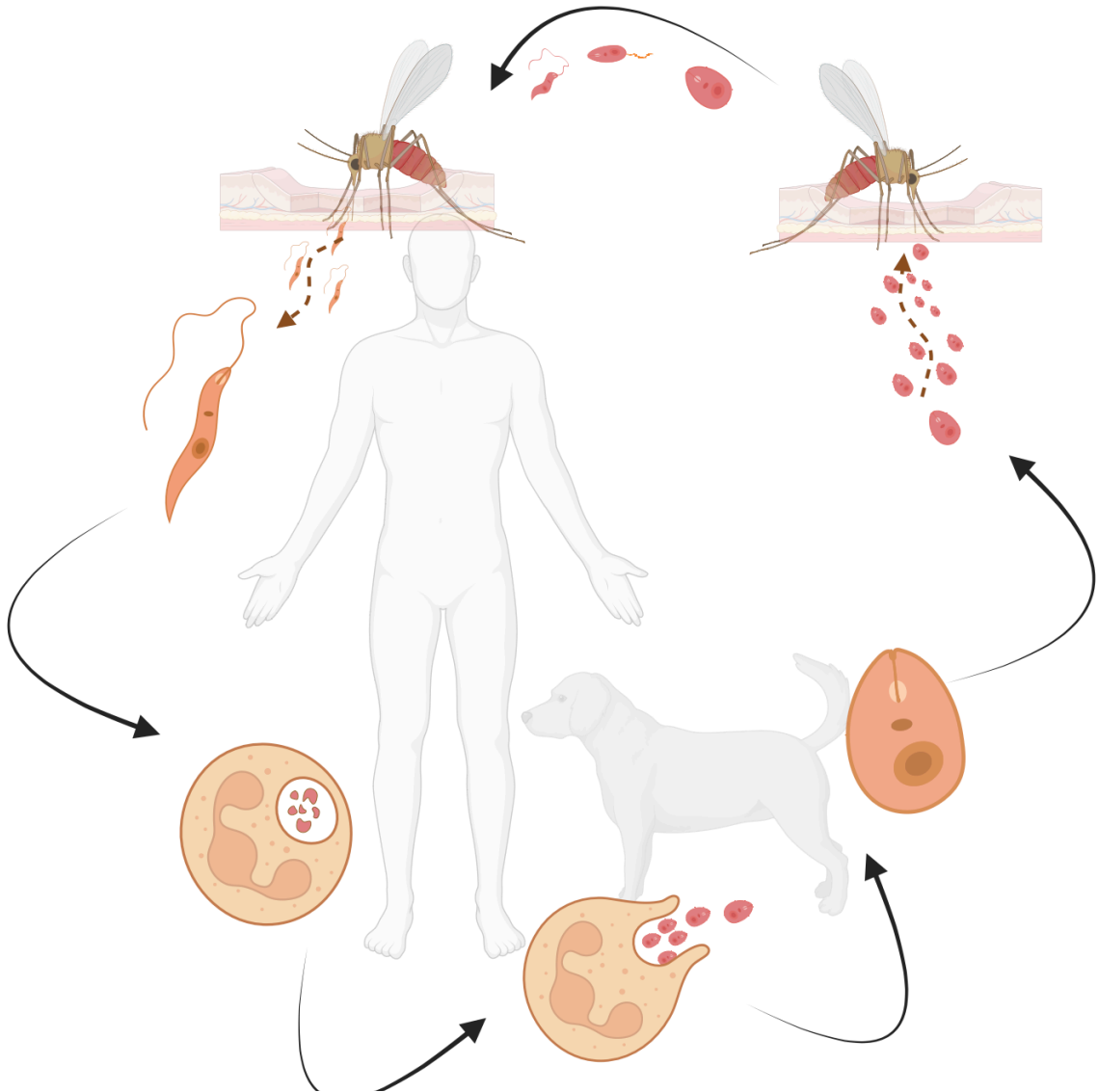
Sadece antijen varlığında AuNP agregasyonunu tetiklemek için, uygun şekilde yönlendirilmiş antikorların (Ab'lerin) AuNP yüzeyine immobilize edilmesini sağlayacak çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (Lesniewski vd., 2014; Tiwari vd., 2011). Ab'ler için en yaygın kullanılan immobilizasyon yöntemleri, bifonksiyonel veya aracı bağlayıcılarla AuNP yüzeyini kaplamaya dayanır, ancak bu genellikle uzun kimyasal işlemleri gerektirir. (Arruebo vd., 2009; Jazayeri vd., 2016; Y. Liu vd., 2015; Mustafaoglu vd., 2017; Yeh vd., 2012).

2.3. Leishmaniasis Hastalığı

Leishmaniasis, protozoon *Leishmania* parazitinin neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre leishmaniasis şu anda dünya çapında en yüksek riskli hastalıklardan biridir. Dünya çapında tahminen 350 milyon kişi *Leishmania* enfeksiyonu riski altındadır. Her yıl yaklaşık 1,5 milyon yeni kutanöz leishmaniasis (CL) ve 500.000 visceral leishmaniasis (VL) vakası ortaya çıkmaktadır (Kumari vd., 2009). Güney Avrupa ülkelerini kapsayan ve 1998 yılında yapılan bir çalışma sonucunda, VL leishmaniasis ile HIV enfeksiyonları arasında coğrafi bir örtüşme olduğu gözlemlenmiştir. Günümüzde leishmaniasisin yaygın olduğu ülkelerde (Hindistan, Brezilya ve Doğu Afrika vb.) HIV vakalarındaki artış dünya çapında ciddi

bir endişe yaratmıştır (Alvar vd., 2008).

Leishmaniasis'in klinik semptomları üçe ayrılır: KL, mukokütanöz leishmaniasis (MCL) ve VL. Enfektif parazitler makrofajlarda, KL durumunda ciltteki ülseratif lezyonlarda veya MCL veya VL durumunda mukozal inflamasyonda bulunur (Sattarahmady vd., 2016). KL ve MCL ile enfekte olan hastalarda tedavisi aylar süren büyük ağırlı yaralar gelişir. VL hastalarında ise ateş, kilo kaybı, dalak ve karaciğer gibi iç organlarda hasar görülür ve tedavi edilmezse ölümcül olabilir (De Muylder vd., 2011). *Leishmania* paraziti memeli konaklara flebotomin kum sineklerinin ısırması ile bulaşır. Promastigot adı verilen bu parazitler, kum sineklerinin bağırsaklarında gelişir ve kamçılı bir forma sahiptir.



Şekil 2.4. *Leishmania* parazitinin promastigot formundan amastigot formuna geçiş döngüsü.

Memeli konağın kan dolaşımına giren promastigotlar makrofajlar tarafından fagosite edilir ve amastigotlara farklılaşır.

Amastigotlar çoğalarak konak hücrenin yıkımına neden olur ve fagositik hücreleri enfekte etmeye başlar (Şekil 2.4.) (De Muylder vd., 2011).

Genellikle klinik örneklerde mikroskopik inceleme veya boyanmış doku örneklerinin kültürü ile tespit edilir. Leishmaniasis'in teşhisi ve tanımlanması için bugüne kadar çeşitli yöntemler geliştirilmiş olsa da parazit genellikle mikroskopik inceleme veya boyanmış doku örneklerinin kültürü ile tespit edilir. Ancak her iki yöntemin de duyarlılığı yetersizdir. Ayrıca, moleküler yöntemler *Leishmania* türlerinin neden olduğu lezyonların enfeksiyonlarını ayırmak için yeterli değildir (Myint vd., 2008; Sattarahmady vd., 2016). Genel olarak, tanının erken bir aşamada konulması ve pratik ve ekonomik olması çok önemlidir (Singh vd., 2004).

Literatürde çoğunlukla elektrokimyasal tayin yöntemleri bulunmakla birlikte, kolorimetrik birkaç yöntemde yer almaktadır. Örneğin Sattarahmady vd. (2016) *Leishmania* majörün minikür kinetoplast DNA'sının (kDNA) protein kodlamayan bir bölgesinden (AB678349.1) spesifik bir tek sarmallı DNA probuna bağlı altın nanopartiküllerin hibridizasyonuna dayanan bir yöntem geliştirmiştir. Tamamlayıcı DNA dizisi varlığında AuNP'lerin agregasyonu sonucu UV-vis spektrumunda ve çözelti renginde bir değişiklik gözlemlenir. Çalışma 7.0 pg μL^{-1} 'lik bir tespit sınırı göstermiştir. Mevcut PCR'siz tahlilin etkinliği, *Leishmania* majör ve klinik örneklerden elde edilen genomik DNA'yı tanımlamak için değerlendirilmiştir (Sattarahmady vd., 2016). Rodríguez vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada ise, AuNP'ler ile *Leishmania* cinsi parazitlerin yüzeyinde bulunan glikoprotein 63 (gp63) varlığının tespiti için bir yöntem sunulmuştur. Tez çalışmasında geliştirilmiş ve KMP-11 ile fonksiyonlandırılmış AuNP'ler, hem çözeltideki anti-gp63 varlığının tespiti hem de in vitro parazitlerle spesifik etkileşim yoluyla parazit varlığının spektrofotometrik bir göstergesi olarak potansiyel göstermiştir (Rodríguez vd., 2013) .

Bu yüksek lisans tez çalışmasında geliştirilen biyosensörde daha önce kullanılmayan AuNP tabanlı anti-gp63 ve KMP-11 etkileşimine dayalı bir biyosensör geliştirilmiştir. AuNP üzerinde KMP-11 antijen proteinleri ile aktif biyolojik katman olan korona yapısı oluşturulmuş, analit olarak da anti-gp63 kullanılmıştır. Sonuç olarak çalışma özgün kabul edilmektedir.

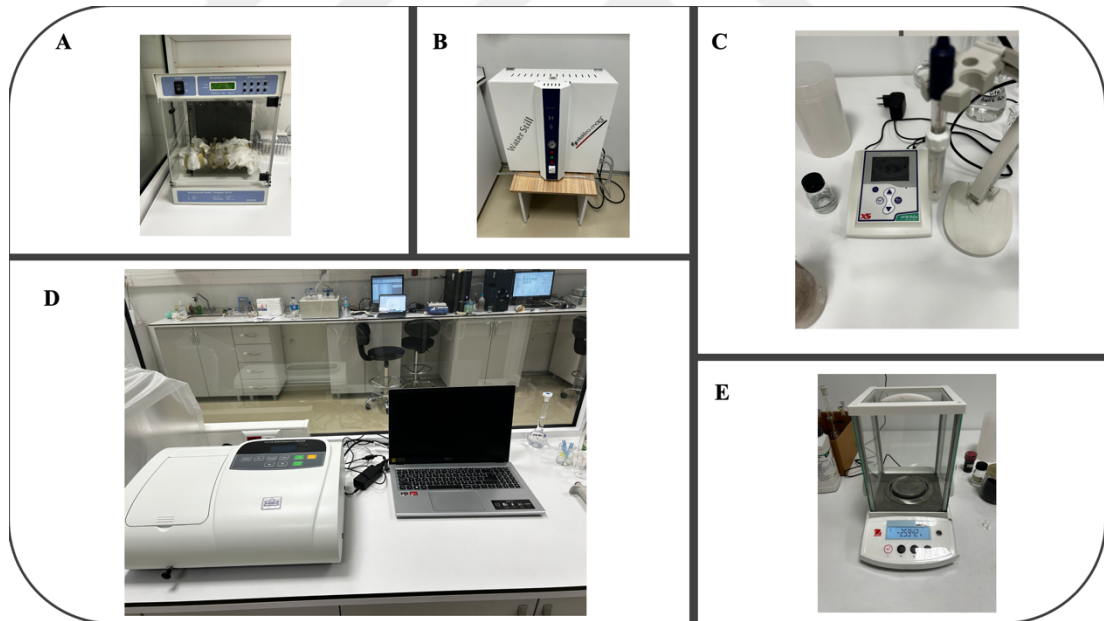
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Cihazlar

AuNP'nin sentezi için MERCK'in IKA® C-MAG HS modeli manyetik karıştırıcılı ısıtıcısı kullanılmıştır.

Tüm deneysel ölçümler T60UV modeli PG UV-Vis spektrofotometresi ile 0,7 mL, 10mm² kuvars küvetler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Biyolojik materyallerin hazırlanmasında da kullanılan tampon çözeltilerin pH'ını ayarlamak için Thermo Detection Corporation pH metre kullanılmıştır. Solüsyonların karıştırılması ve hazırlanmasında Velp Scientifica vortex cihazları kullanılmıştır. Katı malzemelerin tartımı için PR serili OHAUS® markasına ait hassas terazi kullanılmıştır.

Saf su için Elektro·mag® markasının M4 modeli Water Still saf su cihazı kullanılmıştır ve tartımlar için Ohaus marka hassas terazi kullanılmıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Kullanılan Cihazlar A) İnkübatör, B) Saf Su Cihazı, C,) pH metre, D) UV-Vis Spektrofotometre, E) Hassas terazi.

3.1. Kullanılan Kimyasallar

AuNP'lerin sentezlenmesi amacıyla, Merck'den satın alınan trisodyum sitrat ve H₂AuCl₄'nin trihidratlı tuzu kullanılmıştır. AgNP sentezi için AgNO₃ ve NaBH₄ Merck'den temin edilmiştir.

Cu-MOF sentezi amacıyla Kolorimetrik biyosensörün hazırlanması amacıyla; Creative Diagnostics'den KMP-11 antijen ve Gene-Tex'den anti-gp63 kullanılmıştır. Girişim denemeleri sırasında ve örnek uygulamaya denemesinde hazırlanan sentetik serum için Merck'den alınan $MgCl_2$, $CaCl_2$, D-Glukoz, NaCl ve Triz-HCl kullanılmıştır.

Tüm çalışma boyunca analitik saflıkta kimyasallar ve saf su ile hazırlanmış uygun tamponlar kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. Sentetik serum çözeltisi

Sentetik serum örneği 2,5 mM üre, 4,5 mM KCl, 2,5 mM $CaCl_2$, 0,8 mM $MgCl_2$, 140 mM NaCl ve 4,7 mM D-glukozun 10 mM Tris-HCl içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır (Kumari vd., 2009). Hazırlanan serum örneği 1:10 oranında seyreltilmiş ve fosfat tamponu yerine anti-gp63'ün seyreltme çözeltisi olarak girişim çalışmaları için kullanılmıştır.

3.2.2. pH: 7,4 100 mM PBS

100 mM KH_2PO_4 tartılarak saf su ile hazırlanmış, daha sonra derişik NaOH çözeltisi ile pH'ı 7,4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Anti-gp63 çözeltileri bu tampon çözelti ile hazırlanmış ve seyreltilmiştir.

3.2.3. pH: 8,2 20 mM tuz içeren PBS

100 mM derişimine sahip KH_2PO_4 ve 10 mM NaCl tuzları tartılmış ve saf su ile çözülmüştür. Daha sonra derişik NaOH kullanılarak pH 8,2'ye ayarlanmıştır.

Hazırlanan bu tampon çözelti KMP-11 antijeninin hazırlanması ve seyreltilmesinde kullanılmıştır.

3.2.4. KMP-11 antijen çözeltisi:

KMP-11 antijeni protein derişimi 10 ng/mL olarak 20 mM tuzlu PBS (pH= 8,0) kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.5. Anti-gp63 çözeltisi:

Anti-gp63 proteini ana stoktan belirlenen seyreltme oranlarında 100 mM pH 7,4 PBS kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.6. ABTS ve Cu-MOF'lu çözeltinin hazırlanması:

Çözeltinin hazırlanması için Wei vd. (2008) bildirdiğı prosedür ufak değışiklikler eklenerek kullanılmıştır. Bu amaçla 100 mM H₂O₂ ve 60 mM ABTS bir tüp içinde oksijen ile temas edebilecek şekilde çalkalanmıştır. Üzerine 3 mg/mL Cu-MOF ve 0,2 M pH:4,0 Asetat tamponu eklenerek kapağı açık bir şekilde 45°C'de 10 dakika çalkalanmaya devam edilmiştir. Daha sonra deneyler için bu çözeltiden 100 µL alınarak diğere reaktifler ile birlikte 1 mL olacak şekilde saf su ile seyreltilmiştir (Wei ve Wang, 2008).

3.3. AuNP Sentezi

AuNP'ler Luo vd. (2004) tarafından bildirilen sitrat indirgeme yöntemine göre sentezlenmiştir. Altın kaynağı olarak H₂AuCl₄·3H₂O ve indirgeme reaksiyonu için %1 (m/v) trisodyum sitrat çözeltisi kullanılmıştır. 0,01 (m/v) H₂AuCl₄·3H₂O çözeltisi sürekli karıştırılarak ısıtılmıştır. Çözelti kaynamaya başladıktan hemen sonra, 2,5 mL indirgeme reaktifi olan trisodyum sitrat çözeltiye eklenmiş ve yaklaşık 15 dakika daha karıştırılmıştır (Luo vd., 2004) .

Sentezlenen AuNP'lerin karakterizasyonu için SEM ve UV-Vis spektrofotometresi kullanılmıştır.

3.4. AgNP Sentezi

AgNP'ler Yuan vd. (2012) bildirdiğı prosedüre göre sentezlenmiştir. Bu amaçla 100

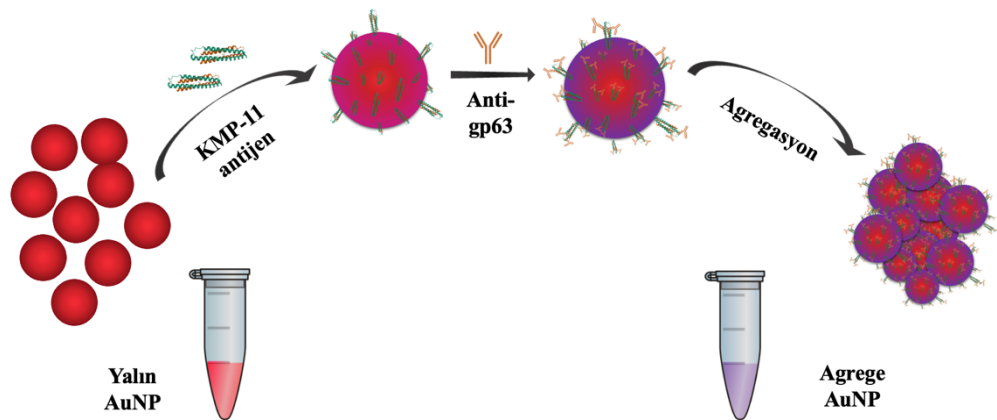
mM AgNO₃, 100 mM trisodium sitrat 100 mL saf su içerisinde manyetik karıştırma yapılarak çözündürülmüştür. Karışmakta olan çözeltinin üzerine hızlı bir şekilde 6 mL 25 mM NaBH₄ eklenmiş ve 30 dakika daha karıştırılarak AgNP'lerin sentezi sağlanmıştır (Yuan vd., 2012).

3.5. Cu-MOF sentezi

Cu-MOF, Özyurt (2023) tarafından bildirilen prosedüre göre sentezlenmiştir. Kısaca 0,45 g H₃BTC 48 mL susuz etanol içerisinde çözülerek 10 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra üzerine 0,75 g Cu(NO₃)₂·3H₂O eklenerek 10 dakika daha karıştırılmıştır. Hazırlanan bu çözelti Teflon kaplı paslanmaz otoklavda 120 C'de 12 saat ısıtılmıştır. 12 saat sonunda karışım üç kez susuz etanol ile santrifüjlenerek yıkanda ve kuruması için 60 °C'de 24 saat boyunca vakumlu etüvde kurutulmuştur (Özyurt V. H., 2023).

3.6. Kolorimetrik *Leishmania* Biyosensörünün Hazırlanması

İlk olarak, AuNP'ler KMP-11 antijeni ile işlevselleştirilmiştir. Bu amaçla, AuNP çözeltisine 10 ng/mL 100 µL KMP-11 eklenmiş ve 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. AuNP'nin KMP-11 ile işlevselleştirilmesi aşamasından sonra, çözeltiye belirli miktarlarda anti-gp63 eklenmiş ve karşılık gelen absorbans değerleri ölçülmüştür (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. *Leishmania* biyosensörünün hazırlanma aşamalarını gösteren şema.

3.7. Uygun Nanoenzim ve/veya Renk Reaktifinin Seçilmesi

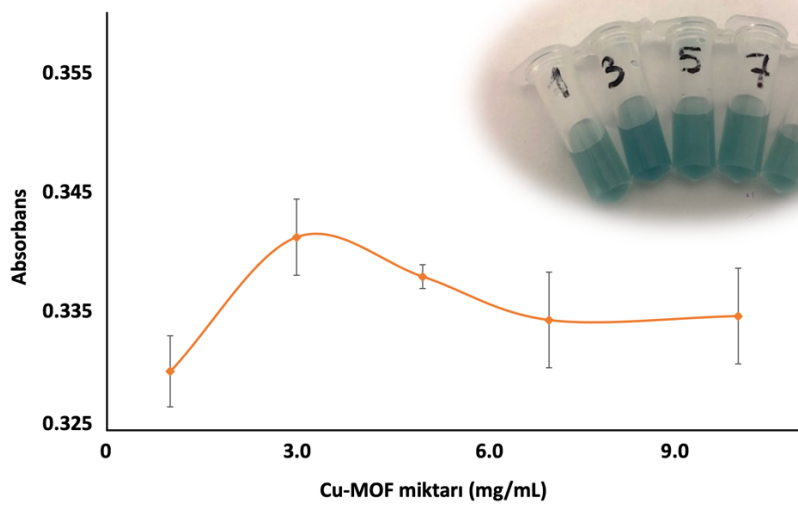
3.7.1. Cu-MOF ve ABTS ile kolorimetrik *leishmania* biyosensörünün geliştirilmesi

Kolorimetrik leishmania biyosensörü için ilk olarak Cu-MOF nanoenzimi ile ABTS renk reaktifi birlikte denenmiştir.

Bu amaçla bir ependorf tüp içerisinde uygun miktarda ABTS, H₂O₂ ve uygun miktarda Cu-MOF 1 saat boyunca karıştırılmıştır. H₂O₂ varlığında ABTS'nin yükseltgenmesi sonucunda renkli çözelti (yeşil) elde edilmiştir. Oluşan bu renkli çözeltiye KMP-11 antijeni ve anti-gp63 eklenerek sürekli hava ile temas ettirilip çalkalanarak 30 dakika inkübe edilmiştir.

3.7.1. Cu-MOF miktar optimizasyonu

Geliştirilen kolorimetrik biyosensörün optimum şartlarda çalışabilmesi amacıyla Cu-MOF miktar optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla 5 adet immunosensör hazırlanmış ve her birine farklı miktarlarda (1, 3, 5, 7, 10 mg/mL) Cu-MOF eklenmiş ve sonuçları UV-Vis spektrofotometresi ile izlenmiştir. Sonuçlar tekrarlanabilir ve gözle görülebilir farklılıklar yaratamamıştır.

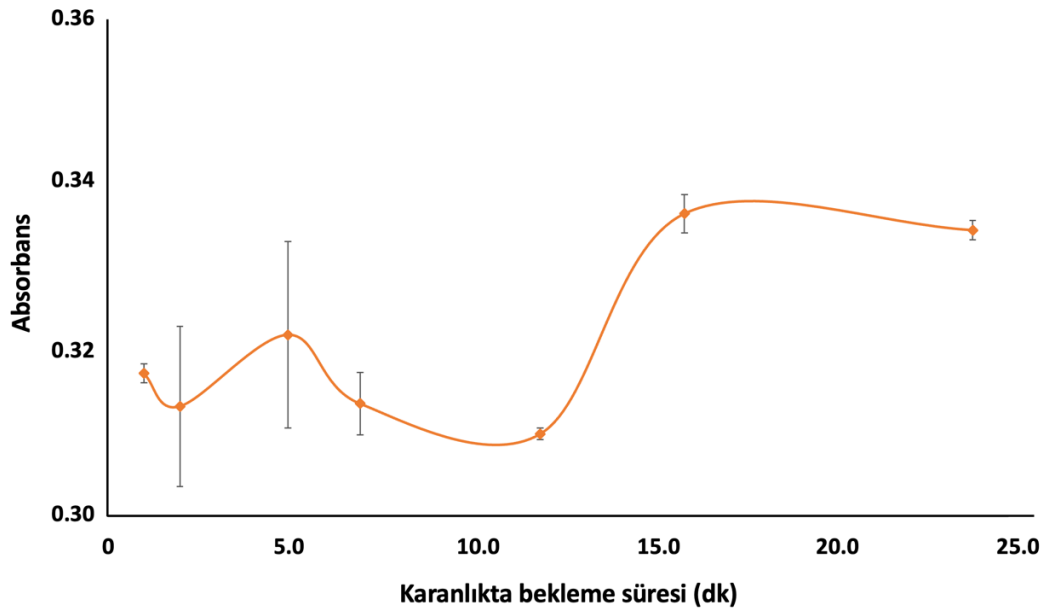


Şekil 3.3. Artan Cu-MOF miktarına karşı absorbans değerlerinin verildiği excel grafiği ve renk değişiminin fotoğrafları. Görüldüğü üzere en yüksek absorbans ve en koyu renk 3 mg/mL Cu-MOF miktarında kaydedilmiştir fakat hata payı yüksek ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiştir.

Yine de Absorbans değeri en yüksek olan Cu-MOF miktarı seçilerek sensörü kararlı kılabilmek için nanoenzim ve renk reaktifinin bulunduğu çözeltilerin karanlıkta bekletilme süresi için çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.7.2. Karanlıkta bekleme süresi optimizasyonu

Bu optimizasyon için 7 adet; optimum miktarda Cu-MOF ile birlikte ABTS ve H₂O₂ içeren 1 mL'lik örnekler hazırlanmış ve karanlıkta belirli saat aralıklarında (1, 2, 5, 7, 12, 16, 24 saat) bekletilmiştir. Bekleme sürelerinin sonunda her bir çözeltinin UV-Vis spektrofotometrisi ile absorbansları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. 16 saatlik bekleme süresinde en yüksek absorbansı elde etmemize rağmen sonuçların hata payı çok yüksek çıkmış ve hazırlanan biyosensör optimize edilememiştir.

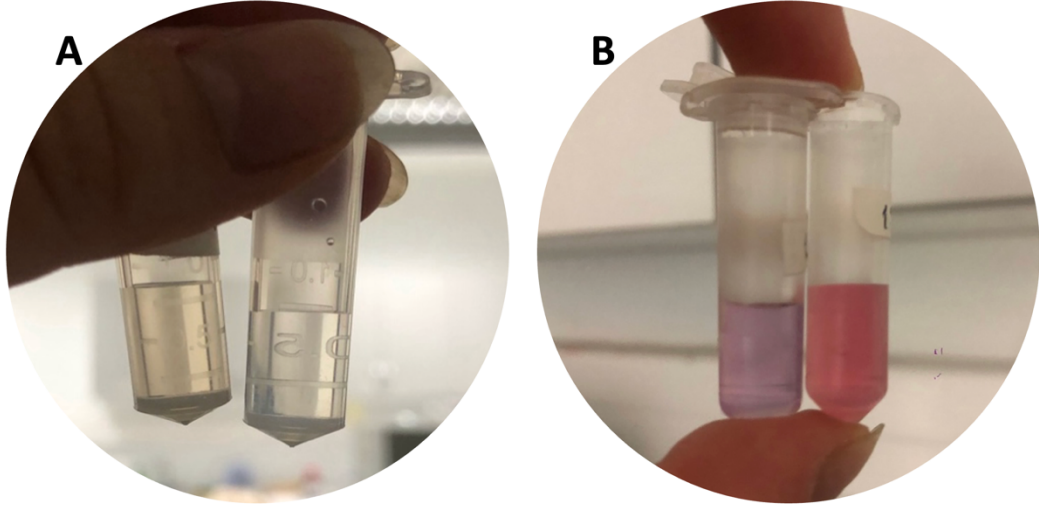


Şekil 3.4. ABTS, H₂O₂ ve Cu-MOF içeren çözeltinin kararlı bir renk vermesi için yapılan karanlıkta bekleme süresi optimizasyonunun excel grafiği.

Bu çalışmaların sonucunda ABTS ve Cu-MOF yerine başka bir nanoenzim olan AgNP ve AuNP'nin denenmesine karar verilmiştir.

3.7.3. AgNP ve AuNP ile kolorimetrik *leishmania* biyosensörünün geliştirilmesi

Uygun Nanoenzimin seçilmesi amacıyla iki nanopartikül içinde biyosensörler aynı koşullar altında hazırlanmış ve hem çıplak gözle görülebilir renk değişimi veren hemde optimum şekilde kararlı sonuçlar veren nanopartikül olan AuNP'ler biyosensörün geliştirilmesi için kullanılmıştır.



Şekil 3.5. A) AgNP ve B) AuNP kullanılarak geliştirilen leishmania biyosensörlerinin agregasyon sonucu renk değişimlerini gösteren fotoğraflar. Hem daha kolay gözle görülebilme avantajı hem de çıplak gözle dahi kantitatif bir sonuç elde edilebilmesi amacıyla AuNP'lerin biyosensörün geliştirilme aşamasında kullanılmasına karar verilmiştir.

3.8. *Leishmania* Biyosensörünün Kolorimetrik Ölçüm Prosedürü

Geliştirilen *Leishmania* biyosensörünün hazırlanmasında her basamakta meydana gelen renk değişimleri UV-Vis spektrofotometresinde ölçülerek absorbans değişimleri incelenmiştir. Ölçümler 0,7 mL kuvars küvetlerde 300-750 nm dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.9. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu

Geliştirilen *Leishmania* biyosensörün optimum koşullarda çalışması için deneysel parametreler optimize edilmiştir. Bu amaçla, ilk olarak KMP-11 antijen miktar optimizasyonu yapılmıştır. Daha sonra KMP-11 ve anti-GP63 inkübasyon süresinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarının tümü 1 mL AuNP ile 3 tekrarlı olacak şekilde 350-700 nm dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.9.1. KMP-11 antijeni miktar optimizasyonu

Geliştirilen *Leishmania* biyosensörü için AuSPE yüzeyinde KMP-11 immobilizasyonunun inkübasyon süresi optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, yedi farklı immobilizasyon süresi (0, 5, 10, 20, 30, 60 dakika) kullanılarak optimum miktarda KMP-11 antijeni içeren kolorimetrik *Leishmania* biyosensörleri hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm çözeltilerin absorbans değerleri ölçülmüş ve değişimleri incelenmiştir.

3.9.2. Antijen-antikor inkübasyon süresi optimizasyonu

Literatürde *Leishmania* parazitinin antikor-antijen inkübasyon süresi 25°C olarak verilmiştir (Sattarahmady vd., 2016; Singh vd., 2004)

Bu nedenle, antikor-antijen inkübasyon süresinin optimizasyonu için, optimum koşullar altında 6 kolorimetrik (0, 5, 10, 20, 30, 60 dk.) biyosensör hazırlanmıştır. Çözeltilerdeki absorbans değişimleri, UV-VIS spektrofotometresi kullanılarak incelenmiştir.

3.8. Geliştirilen Kolorimetrik *Leishmania* Biyosensörünün Analitik Karakteristiğinin İncelenmesi

Optimum çalışma koşulları altında, geliştirilen biyosensörün analitik özellikleri incelenmiştir. Anti-gp63 miktarının artmasıyla birlikte gözlemlenen renk değişimi ve absorbans değerlerinin incelenmesi amacıyla 1:640, 1:320, 1:200, 1:160, 1:120, 1:100, 1:80 seyreltme oranlarında anti-gp63 çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler ile 7 adet geliştirilen biyosensörden elde edilen absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve belirtme alt sınırı (LOD 3,3s/m) ve bağıl standart sapma (RSD) değerleri hesaplanmıştır (s: körün standart sapması).

3.9. Girişim ve rnek Deneme alışması

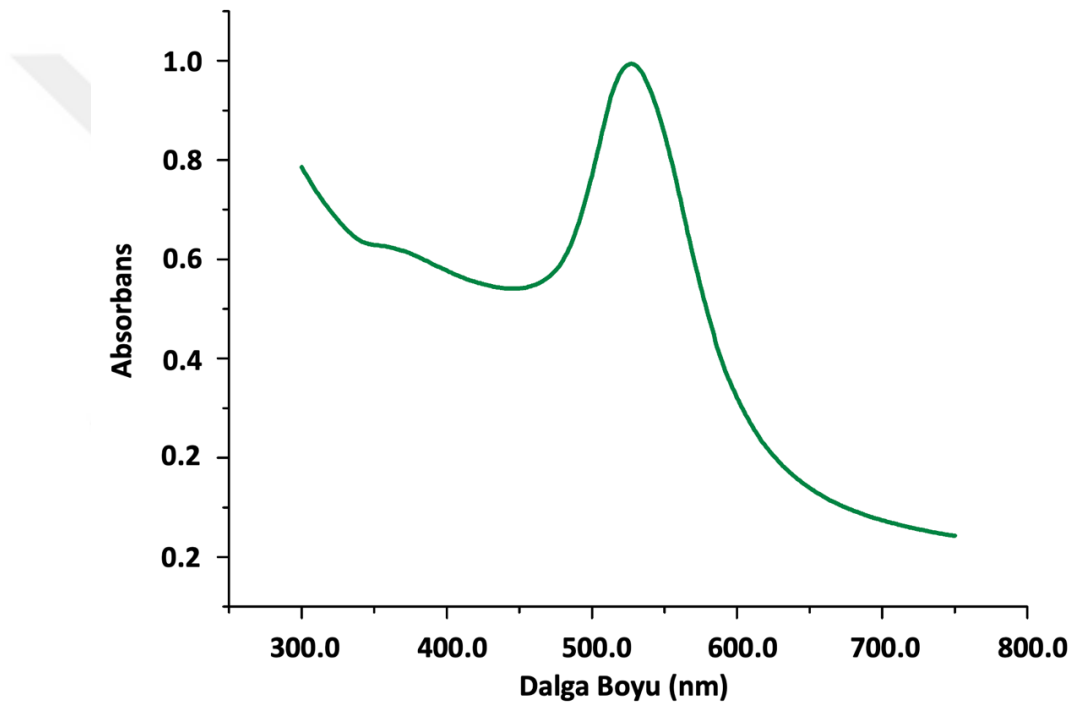
Girişim ve örnek deneme çalışmaları, daha önce belirtilen şekilde açıklandığı gibi 1:10 oranında seyreltilmiş sentetik serum rneği ile optimum koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, pH: 7,4 fosfat tampon çözeltisi ile hazırlanan anti-gp63 ile 1:10 oranında seyreltilmiş sentetik serum ile hazırlanan anti-gp63 arasında absorbands ölçümleri karşılaştırılmıştır. Ölçümler sonucunda elde edilen absorbands değerleri kullanılarak geri kazanım değeri hesaplanmıştır.



4. SONUÇ

4.1. Sentezlenen AuNP'lerin karakterizasyonu

Yalın AuNP'lerin, UV-Vis spektrofotometresi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, sentezlenen AuNP solüsyonunun absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir ve AuNP'ler 530 nm dalga boyunda karakteristik 1,0 absorbans göstermiştir (Şekil 4.1.).

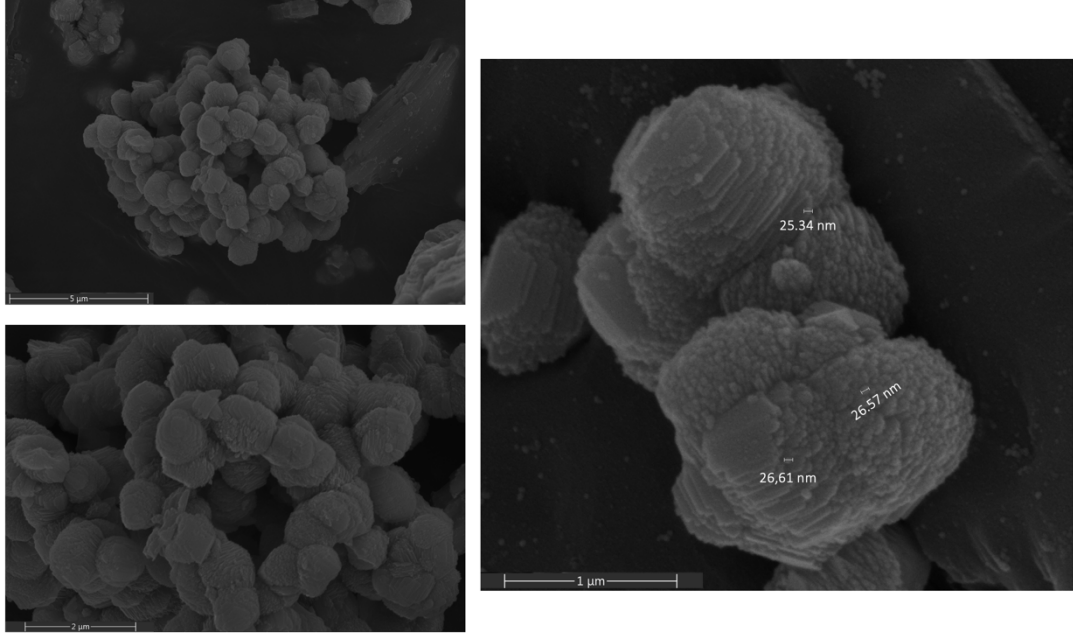


Şekil 4.1. Sentezlenen AuNP'nin karakteristik 530 nm dalga boyunda gösterdiği 1.0 absorbans değeri.

AuNP'lerin boyutundaki değişiklikler biyolojik yanıtları ve protein bağlanma afinitelerinde değişiklikler meydana getirir. Yapılan çalışmalarda 60nm'den daha küçük boyutlardaki AuNP'lerin boyutlarının arttıkça renk ve dalga boylarında değişiklikler meydana getirdiği gözlemlenmiştir (Khademi vd., 2018).

AuNP boyutları arttıkça çözelti renginde kırmızıdan mora bir dönüşüm gerçekleştirmiş ve buna bağlı olarak dalga boyunda 500 nm'den başlayarak 600 nm'e doğru bir kayma olduğu gözlemlenmiştir (Dou vd., 2016). Tez kapsamında sentezlenen AuNP'lerin 530

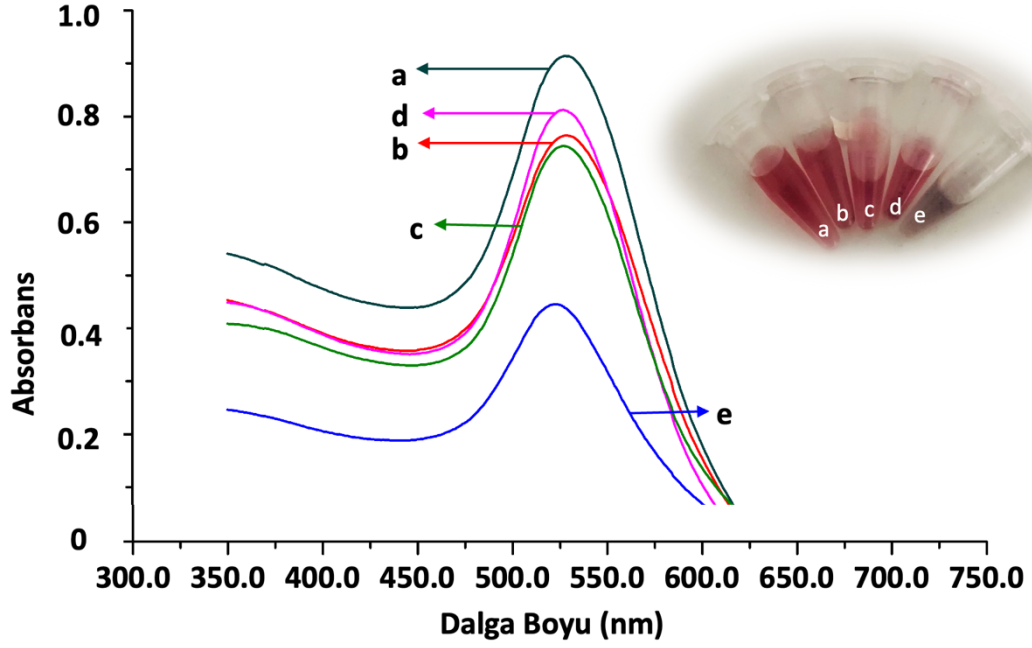
nm civarında karakteristik bir pik gösterdiği (Şekil 4.1.) ve çapının yaklaşık 20-30 nm aralığında olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Sentezlenen AuNP'lerin SEM görüntüleri.

4.2.Geliştirilen *Leishmania* Biyosensörünün Spektroskopik Karakterizasyonu

Geliştirilen biyosensörün kolorimetrik karakterizasyonu için her adım UV-VIS spektrofotometresi ile izlenmiştir. Şekil 3'de görülebileceği gibi, yalın AuNP'lerin 530 nm'deki absorbans değeri normalde 1.0 absorbanstır. AuNP nanoenzimi KMP-11 ile işlevselleştirildikten sonra absorbans değeri yaklaşık 0,30 absorbanstır.



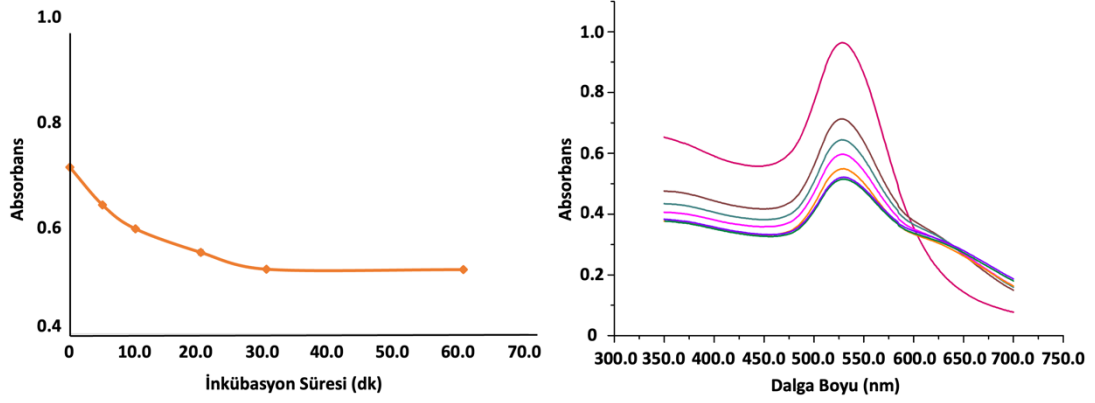
Şekil 4.3. Karakterizasyon için geliştirilen sistemin renk farklılıklarının fotoğrafları ve UV spektrumları. a Çıplak AuNP, b AuNP / 10 ng.mL⁻¹ KMP-11/ pH: 7,4 PBS, c AuNP / 10 ng.mL⁻¹ KMP-11, d AuNP / 1:200 anti-gp63, e AuNP / 10 ng.mL⁻¹ KMP-11 / 1:200 anti-gp63. UV-Vis ölçümleri 350 - 700 nm aralığında gerçekleştirilmiştir.

İşlevselleştirilmiş olan AuNP yapısına anti-gp63 antijeni eklendikten sonra, nanopartiküllerin agregasyonu ve ağırlığı artmış ve çözeltinin absorbans değeri 0,40 absorbans civarına düşmüştür. Absorbans farklılıkları takip edilerek anti-gp63 antijen proteini spektrofotometrik olarak tespit edilebilmektedir. Bunun dışında, renk değişimi çıplak gözle görülebilmektedir (Şekil 4.1) ki bu da geliştirilen sistemin gelecekte hasta başı bakım noktası (POC) biyosensörü olarak kullanılması açısından çok önemli bir husustur.

4.3.Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu

4.3.1. KMP-11 inkübasyon süresi optimizasyonu

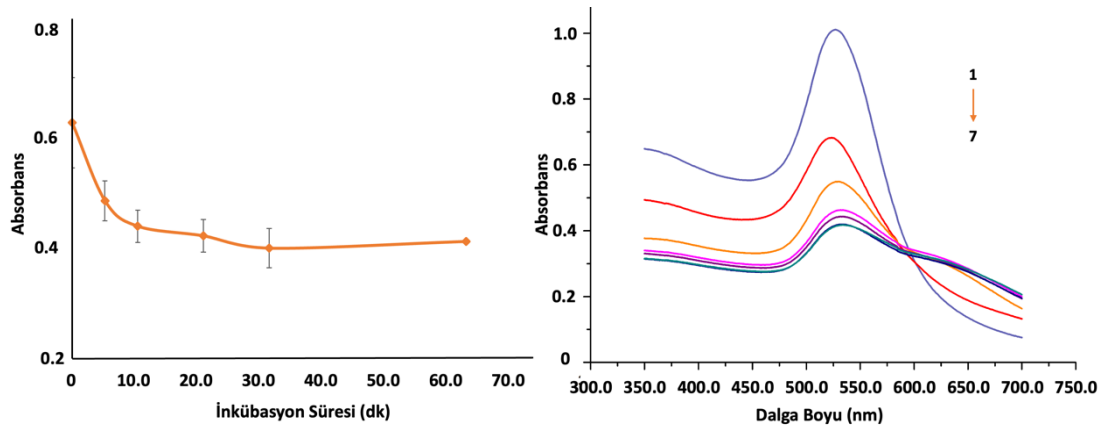
Geliştirilen kolorimetrik *Leishmania* biyosensörü için AuSPE yüzeyinde KMP-11 immobilizasyonunun inkübasyon süresini optimize etmek amacıyla; yedi farklı immobilizasyon süresine (0, 5, 10, 20, 30, 60 dakika) sahip KMP-11 antijeni içeren biyosensörler hazırlandı ve test edilmiştir. AuNP çözeltisinde 30 dakikaya kadar renk değişimi gözlenmiş, ancak 60 dakikada önemli bir değişim gözlenmemiştir. Bu nedenle 30 dakika minimum ve etkili optimum inkübasyon süresi olarak seçilmiştir.



Şekil 4.4. KMP-11 antijen ve AuNP inkübasyon süresi optimizasyonu excel grafiği ve UV-Vis spektrumları. ve b) KMP-11, anti-gp63 inkübasyon süreleri optimizasyon çalışmalarının excel grafikleri. Deney için denenen inkübasyon süreleri sırasıyla 0, 5, 10, 20, 30 ve 60 dakikadır (2 ila 7 aralığı). UV-Vis grafiğinde de yalnız AuNP'nin absorbans değeri 1 olarak ölçülmüştür (Üstten 1. spektrum).

4.3.2. Antijen-antikor inkübasyon süre optimizasyonu

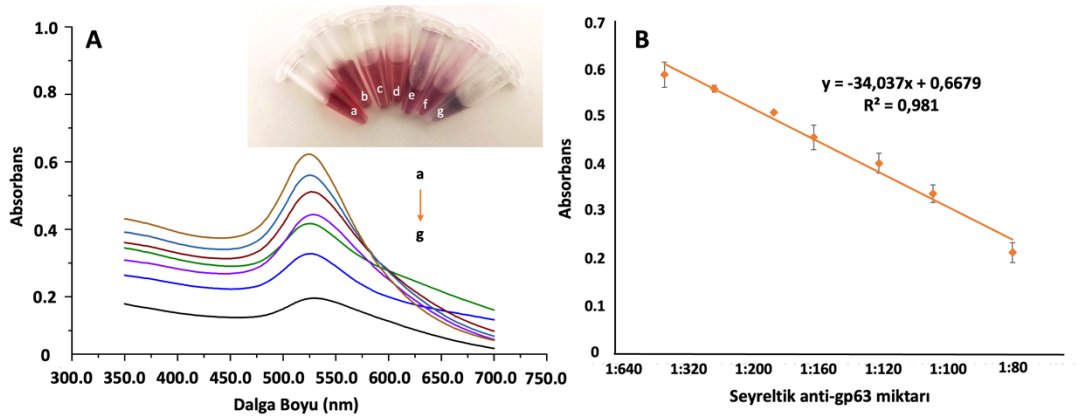
Antikor-antijen inkübasyon süresini optimize etmek için altı kolorimetrik biyosensör hazırlanmıştır. Şekil 4’de gösterildiği gibi 0, 5, 10, 20, 30 ve 60 dakikalık inkübasyon süreleri test edilmiştir. 30 dakikaya kadar bir renk değişimi gözlemlendi, ancak bu süreden sonra önemli bir değişiklik görülmedi. Bu nedenle, antikor-antijen etkileşimi için optimum inkübasyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. KMP-11 antijen – anti-gp63 inkübasyon süresi optimizasyonunun excel grafiği ve UV-Vis spektrumları. KMP-11, anti-gp63 inkübasyon süreleri optimizasyon çalışmalarının excel grafikleri. Deney için denenen inkübasyon süreleri sırasıyla 0, 5, 10, 20, 30 ve 60 dakikadır (2 ila 7 aralığı). UV-Vis grafiğinde de yalnız AuNP'nin absorbans değeri 1 olarak ölçülmüştür (1. spektrum).

4.4. Geliştirilen Kolorimetrik *Leishmania* Biyosensörünün Analitiksel Karakterizasyonu

Optimum çalışma koşulları altında, geliştirilen biyosensörün analitik özellikleri incelenmiştir. Şekil 5A'da gösterildiği gibi, anti-gp63 konsantrasyonlarındaki artma ile birlikte 530 nm'deki absorbans değerinde azalma ve dolayısıyla AuNP çözeltisinde renk değişimi görülmüştür (Şekil 4.3.A). Sonuç olarak, anti-gp63 konsantrasyonundaki artışa karşı elde edilen absorbans değerleri kullanılarak, $y = -34.037x + 0.6679$ denklemi ve $0.981 R^2$ ile 1:80 ila 1:640 oranı arasında doğrusal yanıt aralığı belirlenmiştir (Şekil 4.3). Tespit sınırı değeri, kalibrasyon grafiğindeki en düşük anti-gp63 değeri alınarak 1:640 olarak belirlenmiştir. Son olarak, anti-gp63'ün 1:320 seyreltme oranı için bağıl standart sapma değeri %1,29 olarak hesaplanmıştır ($n=3$). Geliştirilen kolorimetrik *Leishmania* biyosensörlerinin performansı Tablo 4.1.'de gösterildiği gibi diğer *Leishmania* biyosensörleri ile de karşılaştırılmıştır. Analitik karakteristik değerleri göz önüne alındığında, geliştirilen biyosensörün performansının kabul edilebilir sınırlarda olduğu, ancak transdüser kısmı sayesinde Tablo 4.1.'de sunulan diğer birçok biyosensörden daha pratik olduğu sonucuna varılabilir.



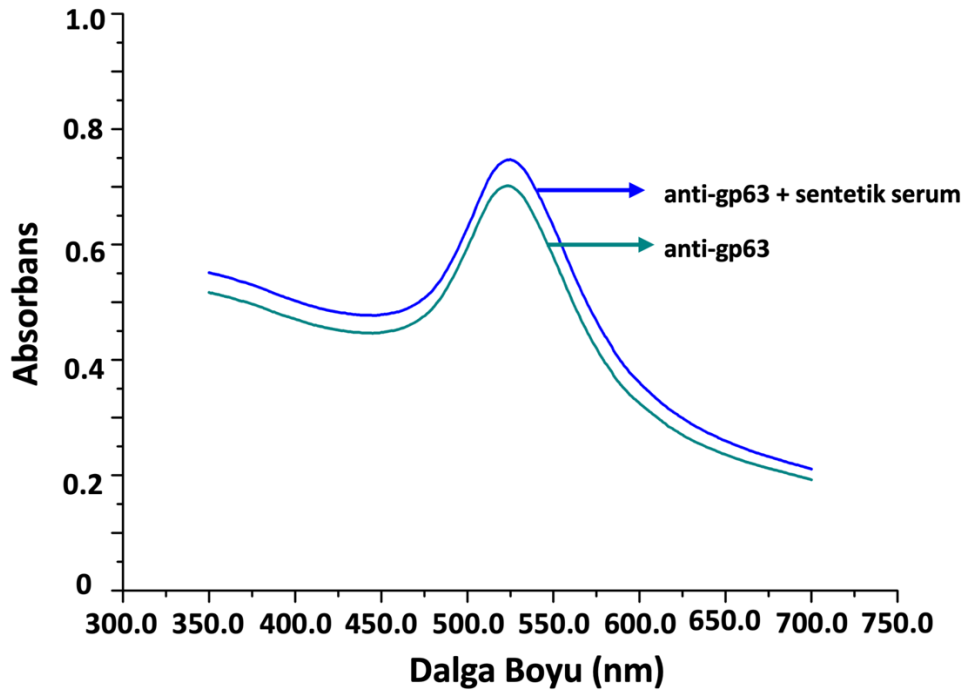
Şekil 4.6. A) Geliştirilen kolorimetrik biyosensörün kalibrasyon grafiği ve B) excel grafikleri. A) UV-spektrumu ve seyreltilmiş anti-gp63'ün renk değişimi. a'dan g'ye; 1:640, 1:320, 1:200, 1:160, 1:120, 1:100, 1:80 seyreltilmiş anti-gp63 oranı. Deneysel parametreler Şekil 3 ile aynıdır.

Tablo 4.1. Diğer benzer leishmaniasis tayini çalışmalarının karşılaştırma tablosu

Metod	Sensör	Doğrusal Aralık	LOD	Ref.
EIS	İmmünosensör	1:40 - 1:1280	-	(Cordeiro vd., 2019)
Piezoelektrik	İmmünosensör	1:400 - 1:3200	-	(Ramos-Jesus vd., 2011)
EIS	İmmünosensör	1:40 - 1:1500	1:1500	(Perk vd., 2023)
Kolorimetrik	DNA biyosensör	0.04 - 0.086 ng/L	7.0 pg/L	(Sattarahmady vd., 2016)
DPV	DNA biyosensör	2 pg/ μ L - 2 μ g/ μ L	2 pg / μ L	(Mohan vd., 2011)
EIS	İmpedimetric genosensör	5 - 50 ng/ μ L	1.2 ng/ μ L	(Nazari-Vanani vd., 2020)
Spektrofotometre	İmmünosensör	-	-	(Rodríguez vd., 2013)
Kolorimetrik	Biyosensör	1:80 - 1:640	1:640	Tez çalışması

4.5. Girişim ve Örnek Deneme Çalışması

Girişte belirtilen yöntem ve malzemeler doğrultusunda, optimum koşullar altında 1:10 seyreltilmiş sentetik serum örneği ile girişim çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla, anti-gp63 (pH:7,4 fosfat tampon çözeltisi ile hazırlanmış) ve 1:10 direkt seyreltilmiş sentetik serum ile hazırlanmış anti-gp63 arasındaki absorbans ölçümleri karşılaştırıldı (Şekil 4.4.). Hesaplanan geri kazanım değeri %102,7 olarak hesaplandı. Bu hesaplanan geri kazanım değeri ile hazırlanan biyosensörün Leishmaniasis tayini için yeterince spesifik olduğu görülebilir.



Şekil 4.7. Sentetik serum ile hazırlanmış anti-gp63 ve sentetik serum olmadan hazırlanan anti-gp63'ün UV spektrumlarının karşılaştırılması.

4.6. Yorum

Leishmaniasis, tropikal bölgelerde yaygın olarak görülen ancak genellikle göz ardı edilen bir hastalıktır. Bu hastalık, parazitik *Leishmania* parazitlerinin neden olduğu bir enfeksiyon hastalığıdır. Yayılmı ve etkileri göz önüne alındığında, leishmaniasis'in ciddiye alınması ve mücadele edilmesi gereken bir sorun olduğu görülebilmektedir (Hotez vd., 2006; Hotez vd. 2004). Leishmaniasis'in olumsuzluklarına bakıldığında, başlıca faktörlerden biri hastalığın karmaşık epidemiyolojisi ve ekolojisi olarak karşımıza çıkar (Alvar vd., 2006; Bern vd., 2008). Bu hastalık, kum sineği vektörlerinden yayılarak insanlara bulaşır ve çoğu zaman yoksul ve hijyen koşullarının kötü olduğu bölgelerde oldukça yaygındır. Bununla birlikte, leishmaniasis'in tedavisinde kullanılan ilaçlar hem sınırlı hem de etkinlikleri ve yan etkileri konusunda belirsizlikler bulunmaktadır. Leishmaniasis, sadece bireylerin sağlığını etkilemekle kalmaz, aynı zamanda toplumların ekonomik ve sosyal yapılarını da olumsuz etkilemektedir. Hastalığın yaygın olduğu bölgelerde, iş gücü kaybı ve sağlık hizmetlerine yönelik artan talep gibi faktörler ekonomik olarak toplumu zorlayabilir (Bikbov vd., 2014; Alvar vd., 2012). Bu hastalıkla etkili bir şekilde mücadele etmek

için daha fazla kaynak ve çaba harcanmalı, önleyici önlemler geliştirilmeli, tedavi ve tayin seçenekleri iyileştirilmelidir. Bu nedenle, ucuz ve ayırt edici bir yöntem geliştirilerek *Leishmania* parazit türlerinin tespit edilmesi, endemik bölgelerde ucuz, hızlı ve doğru klinik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunur. POC'nin doğasına uygun, pratik, doğru ve düşük maliyetli testlerin geliştirilmesi bu anlamda önem arz etmektedir.

Tez kapsamında AuNP kullanılarak geliştirilen KMP-11 ve anti-gp63 arasındaki spesifik etkileşime dayalı bir kolorimetrik *Leishmania* biyosensörü geliştirilmiştir. Yapılan optimizasyonlar sonucunda optimum KMP-11 inkübasyon süresi 30 dakika ve optimum KMP-11, anti-gp63 inkübasyon süresi 30 dakika olarak bulunmuştur. Optimum koşullar altında gerçekleştirilen analitiksel karakteristik çalışmaları sonucunda 1:640 ila 1:80 seyreltme oranları aralığında doğrusal bir yanıt aralığı elde edilmiş ve buna bağlı olarak $y = -34.037x + 0.6679$ denklemi ile $R^2: 0.981$ değerleri hesaplanmıştır. Bu doğrultuda LOD değeri kalibrasyon grafiğindeki en düşük seyreltme oranı olan 1:640 olarak seçilmiştir. %RSD değeri ise %1,29 olarak hesaplanmıştır.

Bununla birlikte girişimci ve örnek deneme çalışmaları yapılmış, bu amaçla 1:10 oranında seyreltilmiş sentetik serum kullanmıştır. Yapılan lmler sonucunda geri kazanım değeri %102,7 olarak bulunmuştur. Bu değer girişimcilerin geliştirilen kolorimetrik biyosensörü üzerinde kayda değer bir etkileşim göstermediği gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında leishmaniasis tanısı için çıplak gözle de ölçülebilen pratik ve hızlı bir kolorimetrik *Leishmania* biyosensörü geliştirilmiştir. Bu nedenle, geliştirilen biyosensörün gelecekte dostça kullanılan bir POC sistemine dnştrlme potansiyeline sahip olduğuna inanıyoruz.

KAYNAKLAR

- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Cañavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Ter Horst, R., López-Vélez, R., & Moreno, J. (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(2), 334–359. doi: 10.1128/CMR.00061-07
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & Boer, M. den. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Alvar, J., Yactayo, S., & Bern, C. (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, 22(12), 552–557. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>
- Arruebo, M., Valladares, M., & González-Fernández, Á. (2009). Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Nanomaterials*, 2009. doi: 10.1155/2009/439389
- Belkin, S. (2003). Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 206–212. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00059-6
- Berney, H., West, J., Haefele, E., Alderman, J., Lane, W., & Collins, J. K. (2000). A DNA diagnostic biosensor: development, characterisation and performance. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 68(1–3), 100–108. doi: 10.1016/S0925-4005(00)00468-8
- Bikbov, B., Perico, N., & Remuzzi, G. (2014). Mortality landscape in the Global Burden of Diseases, Injuries and Risk Factors Study. *European Journal of Internal Medicine*, 25(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2013.09.002>
- Biswas, P., & Wu, C.-Y. (2005). Nanoparticles and the Environment. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 55(6), 708–746. <https://doi.org/10.1080/10473289.2005.10464656>
- Clark, L. C., & Lyons, C. (1962). ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102(1), 29–45. doi: 10.1111/J.1749-6632.1962.TB13623.X
- Cordeiro, T. A. R., Gonçalves, M. V. C., Franco, D. L., Reis, A. B., Martins, H. R., &

- Ferreira, L. F. (2019). Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Talanta*, 195, 327–332. doi: 10.1016/J.TALANTA.2018.11.087
- Cristea, C., Florea, A., Tertiș, M., Săndulescu, R., Cristea, C., Florea, A., Tertiș, M., & Săndulescu, R. (2015). Immunosensors. *Biosensors - Micro and Nanoscale Applications*. doi: 10.5772/60524
- Croft, S. L., & Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, 19(11), 502–508. doi: 10.1016/j.pt.2003.09.008
- Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 91–100. doi: 10.1042/EBC20150010
- De Muylder, G., Ang, K. K. H., Chen, S., Arkin, M. R., Engel, J. C., & McKerrow, J. H. (2011). A Screen against *Leishmania* Intracellular Amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(7), e1253. doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0001253
- Ding, L., Du, D., Zhang, X., & Ju, H. (2008). Trends in Cell-Based Electrochemical Biosensors. *Current Medicinal Chemistry*, 15(30), 3160–3170. doi: 10.2174/092986708786848514
- Dou, Y., Guo, Y., Li, X., Li, X., Wang, S., Wang, L., Lv, G., Zhang, X., Wang, H., Gong, X., & Chang, J. (2016). Size-Tuning Ionization To Optimize Gold Nanoparticles for Simultaneous Enhanced CT Imaging and Radiotherapy. *ACS Nano*, 10(2), 2536–2548. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07473>
- D'Souza, S. F. (2001). Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6), 337–353. doi: 10.1016/S0956-5663(01)00125-7
- Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Akarca, U. S., & Ozsoz, M. (2000). Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. *Analytica Chimica Acta*, 422(2), 139–149. doi: 10.1016/S0003-2670(00)01058-8

- Gagner, J. E., Lopez, M. D., Dordick, J. S., & Siegel, R. W. (2011). Effect of gold nanoparticle morphology on adsorbed protein structure and function. *Biomaterials*, 32(29), 7241–7252. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.05.091
- Germain, M. E., & Knapp, M. J. (2009). Optical explosives detection: from color changes to fluorescence turn-on. *Chemical Society Reviews*, 38(9), 2543–2555. doi: 10.1039/B809631G
- Ghosh, S. K., & Pal, T. (2007). Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: From theory to applications. *Chemical Reviews*, 107(11), 4797–4862. doi: 10.1021/CR0680282/ASSET/CR0680282.FP.PNG_V03
- Gizeli, E., & Lowe, C. R. (1996). Immunosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(1), 66–71. doi: 10.1016/S0958-1669(96)80097-8
- Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Ottesen, E., Ehrlich Sachs, S., & Sachs, J. D. (2006). Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria. *PLoS Medicine*, 3(5), e102. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030102>
- Hotez, P. J., Remme, J. H. F., Buss, P., Alleyne, G., Morel, C., & Breman, J. G. (2004). Combating Tropical Infectious Diseases: Report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 871–878. <https://doi.org/10.1086/382077>
- Hu, T., Lu, S., Chen, C., Sun, J., & Yang, X. (2017). Colorimetric sandwich immunosensor for A β (1-42) based on dual antibody-modified gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 243, 792–799. doi: 10.1016/J.SNB.2016.12.052
- J, B., Chanda, K., & MM, B. (2018). *Physical, Chemical and Biochemical Biosensors to Detect Pathogens*. 53–86. doi: 10.1007/978-3-319-70166-0_2
- Jazayeri, M. H., Amani, H., Pourfatollah, A. A., Pazoki-Toroudi, H., & Sedighimoghaddam, B. (2016). Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 9, 17–22. doi: 10.1016/J.SBSR.2016.04.002
- Klaine, S. J., Alvarez, P. J. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D.

- Y., Mahendra, S., McLaughlin, M. J., & Lead, J. R. (2008). NANOMATERIALS IN THE ENVIRONMENT: BEHAVIOR, FATE, BIOAVAILABILITY, AND EFFECTS. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1825. <https://doi.org/10.1897/08-090.1>
- Karunakaran, C., Pandiaraj, M., & Santharaman, P. (2015). Immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 205–245. doi: 10.1016/B978-0-12-803100-1.00004-9
- Kaur, A., Kumar, P., Gupta, A., & Sapra, G. (2023). Piezoelectric Biosensors in Healthcare. *Enzyme-Based Biosensors: Recent Advances and Applications in Healthcare*, 255–271. doi: 10.1007/978-981-15-6982-1_11
- Kavita V. (2017). *DNA Biosensors-A Review*. doi: 10.4172/2155-9538.1000222
- Khademi, S., Sarkar, S., Sharmin Kharrazi, Seyed Mohammad Amini, Shakeri-Zadeh, A., Mohammad Reza Ay, & Hossein Ghadiri. (2018). Evaluation of size, morphology, concentration, and surface effect of gold nanoparticles on X-ray attenuation in computed tomography. *Physica Medica*, 45, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2017.12.001>
- Kumar, A., Mazinder Boruah, B., & Liang, X.-J. (2011). Gold Nanoparticles: Promising Nanomaterials for the Diagnosis of Cancer and HIV/AIDS. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2011/202187>
- Kumari, S., Samani, M., Khare, P., Misra, P., Dutta, S., Kolli, B. K., Sharma, S., Chang, K. P., & Dube, A. (2009). Photodynamic vaccination of hamsters with inducible suicidal mutants of *Leishmania amazonensis* elicits immunity against visceral leishmaniasis. *European Journal of Immunology*, 39(1), 178–191. doi: 10.1002/EJI.200838389
- Lesniewski, A., Los, M., Jonsson-Niedziolka, M., Krajewska, A., Szot, K., Los, J. M., & Niedziolka-Jonsson, J. (2014). Antibody modified gold nanoparticles for fast and selective, colorimetric T7 bacteriophage detection. *Bioconjugate Chemistry*, 25(4), 644–648. doi: 10.1021/BC500035Y/SUPPL_FILE/BC500035Y_SI_001.PDF
- Li, B., Dong, S., & Wang, E. (2010). Homogeneous Analysis: Label-Free and Substrate-Free Aptasensors. *Chemistry – An Asian Journal*, 5(6), 1262–1272. doi:

10.1002/ASIA.200900660

- Liu, J., & Peng, Q. (2017). Protein-gold nanoparticle interactions and their possible impact on biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 55, 13–27. doi: 10.1016/j.actbio.2017.03.055
- Liu, Y., Zhang, L., Wei, W., Zhao, H., Zhou, Z., Zhang, Y., & Liu, S. (2015). Colorimetric detection of influenza A virus using antibody-functionalized gold nanoparticles. *Analyst*, 140(12), 3989–3995. doi: 10.1039/C5AN00407A
- Long, F., Zhu, A., & Shi, H. (2013). Recent Advances in Optical Biosensors for Environmental Monitoring and Early Warning. *Sensors 2013, Vol. 13, Pages 13928-13948*, 13(10), 13928–13948. doi: 10.3390/S131013928
- Luka, G., Ahmadi, A., Najjaran, H., Alocilja, E., Derosa, M., Wolthers, K., Malki, A., Aziz, H., Althani, A., & Hoorfar, M. (2015). Microfluidics Integrated Biosensors: A Leading Technology towards Lab-on-a-Chip and Sensing Applications. *Sensors 2015, Vol. 15, Pages 30011-30031*, 15(12), 30011–30031. doi: 10.3390/S151229783
- Luo, X. L., Xu, J. J., Du, Y., & Chen, H. Y. (2004). A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. *Analytical Biochemistry*, 334(2), 284–289. doi: 10.1016/j.ab.2004.07.005
- MA, X. M., SUN, M., LIN, Y., LIU, Y. J., LUO, F., GUO, L. H., QIU, B., LIN, Z. Y., & CHEN, G. N. (2018). Progress of Visual Biosensor Based on Gold Nanoparticles. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 46(1), 1–10. doi: 10.1016/S1872-2040(17)61061-2
- Mănteale, W., & Deniz, E. (2017). UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 173, 965–968. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.037>
- Mohan, S., Srivastava, P., Maheshwari, S. N., Sundar, S., & Prakash, R. (2011). Nano-structured nickel oxide based DNA biosensor for detection of visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Analyst*, 136(13), 2845–2851. doi: 10.1039/C1AN15031F
- Mohanty, S. P., & Koucias, E. (2006). Biosensors: A tutorial review. *IEEE*

- Potentials*, 25(2), 35–40. doi: 10.1109/MP.2006.1649009
- Monopoli, M. P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Baldelli Bombelli, F., & Dawson, K. A. (2011). Physical-Chemical aspects of protein corona: Relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 133(8), 2525–2534. doi: 10.1021/JA107583H/SUPPL_FILE/JA107583H_SI_001.PDF
- Mosorov, V. (2017). The Lambert-Beer law in time domain form and its application. *Applied Radiation and Isotopes*, 128, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2017.06.039>
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366(9496), 1561–1577. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67629-5
- Mustafaoglu, N., Kiziltepe, T., & Bilgicer, B. (2017). Site-specific conjugation of an antibody on a gold nanoparticle surface for one-step diagnosis of prostate specific antigen with dynamic light scattering. *Nanoscale*, 9(25), 8684–8694. doi: 10.1039/C7NR03096G
- Myint, C. K., Asato, Y., Yamamoto, Y. I., Kato, H., Bhutto, A. M., Soomro, F. R., Memon, M. Z., Matsumoto, J., Marco, J. D., Oshiro, M., Katakura, K., Hashiguchi, Y., & Uezato, H. (2008). Polymorphisms of cytochrome b gene in *Leishmania* parasites and their relation to types of cutaneous leishmaniasis lesions in Pakistan. *The Journal of Dermatology*, 35(2), 76–85. doi: 10.1111/J.1346-8138.2008.00419.X
- Nazari-Vanani, R., Heli, H., & Sattarahmady, N. (2020). An impedimetric genosensor for *Leishmania infantum* based on electrodeposited cadmium sulfide nanosheets. *Talanta*, 217, 121080. doi: 10.1016/J.TALANTA.2020.121080
- Nilam, M., Hennig, A., Nau, W. M., & Assaf, K. I. (2017). Gold nanoparticle aggregation enables colorimetric sensing assays for enzymatic decarboxylation. *Analytical Methods*, 9(19), 2784–2787. doi: 10.1039/C7AY00642J
- Norouzi, P., Faridbod, F., Larijani, B., & Ganjali, M. R. (2010). Glucose Biosensor Based on MWCNTs-Gold Nanoparticles in a Nafion Film on the Glassy Carbon Electrode Using Flow Injection FFT Continuous Cyclic Voltammetry.

- International Journal of Electrochemical Science*, 5(9), 1213–1224. doi: 10.1016/S1452-3981(23)15356-9
- Pandey, P., Datta, M., & Malhotra, B. D. (2008). Prospects of Nanomaterials in Biosensors. *Analytical Letters*, 41(2), 159–209. <https://doi.org/10.1080/00032710701792620>
- Peralta-Videa, J. R., Zhao, L., Lopez-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hong, J., & Gardea-Torresdey, J. L. (2011). Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008-2010. *Journal of Hazardous Materials*, 186(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.020>
- Perk, B., Tepeli Büyüksünetçi, Y., Bachraoui Bouzaïen, S., Diouani, M. F., & Anik, Ü. (2023). Fabrication of metal–organic framework based electrochemical *Leishmania* immunosensor. *Microchemical Journal*, 192, 108958. doi: 10.1016/J.MICROC.2023.108958
- Politi, J., De Stefano, L., Rea, I., Gravagnuolo, A. M., Giardina, P., Methivier, C., Casale, S., & Spadavecchia, J. (2016). Retracted: One-pot synthesis of a gold nanoparticle–Vmh2 hydrophobin nanobiocomplex for glucose monitoring. *Nanotechnology*, 27(19), 195701. doi: 10.1088/0957-4484/27/19/195701
- Politi, J., Spadavecchia, J., Iodice, M., & de Stefano, L. (2014). Oligopeptide–heavy metal interaction monitoring by hybrid gold nanoparticle based assay. *Analyst*, 140(1), 149–155. doi: 10.1039/C4AN01491J
- Postigo, J. A. R. (2010). Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(SUPPL. 1), S62–S65. doi: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2010.06.023
- Privett, B. J., Shin, J. H., & Schoenfish, M. H. (2010). Electrochemical sensors. *Analytical Chemistry*, 82(12), 4723–4741. doi: 10.1021/AC101075N/ASSET/AC101075N.FP.PNG_V03
- Ramos-Jesus, J., Carvalho, K. A., Fonseca, R. A. S., Oliveira, G. G. S., Melo, S. M. B., Alcântara-Neves, N. M., & Dutra, R. F. (2011). A piezoelectric immunosensor for *Leishmania chagasi* antibodies in canine serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(3), 917–925. doi: 10.1007/S00216-011-5136-7/FIGURES/6
- Rodríguez, P., Rojas, H., Medina, M., Arrivillaga, J., Francisco, Y., Dager, F.,

- Piscitelli, V., Caetano, M., Fernández, A., Castillo, J., Rodríguez, P., Rojas, H., Medina, M., Arrivillaga, J., Francisco, Y., Dager, F., Piscitelli, V., Caetano, M., Fernández, A., & Castillo, J. (2013). Study of Functionalized Gold Nanoparticles with Anti-gp63 IgG Antibody for the Detection of Glycoprotein gp63 in Membrane Surface of *Leishmania* Genus Parasites. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4(7), 100–108. doi: 10.4236/AJAC.2013.47A014
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747–1763. doi: 10.1039/B714449K
- Salman, S. M., Rubeiz, N. G., & Kibbi, A. G. (1999). Cutaneous leishmaniasis: Clinical features and diagnosis. *Clinics in Dermatology*, 17(3), 291–296. doi: 10.1016/S0738-081X(99)00047-4
- Sattarahmady, N., Movahedpour, A., Heli, H., & Hatam, G. R. (2016). Gold nanoparticles-based biosensing of *Leishmania* major kDNA genome: Visual and spectrophotometric detections. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 235, 723–731. doi: 10.1016/J.SNB.2016.05.023
- Singh, A., T. Ram Prabhu, A.R. Sanjay, & Vishwanath Koti. (2017). An Overview of Processing and Properties of CU/CNT Nano Composites. *Materials Today: Proceedings*, 4(2), 3872–3881. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.02.286>
- Singh, S., & Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 10(6), 307–315. doi: 10.1007/S10156-004-0348-9
- Skládal, P. (2016). Piezoelectric biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79, 127–133. doi: 10.1016/J.TRAC.2015.12.009
- Su, L., Jia, W., Hou, C., & Lei, Y. (2011). Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1788–1799. doi: 10.1016/J.BIOS.2010.09.005
- Tao, Y., Li, M., Kim, B., & Auguste, D. T. (2017). Incorporating gold nanoclusters and target-directed liposomes as a synergistic amplified colorimetric sensor for HER2-positive breast cancer cell detection. *Theranostics*, 7(4), 899. doi: 10.7150/THNO.17927
- Tiwari, P. M., Vig, K., Dennis, V. A., & Singh, S. R. (2011). Functionalized Gold

- Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials* 2011, Vol. 1, Pages 31-63, 1(1), 31–63. doi: 10.3390/NANO1010031
- Turner, A. P. F. (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3184–3196. doi: 10.1039/C3CS35528D
- Urdike, S. J., & Hicks, G. P. (1967). The Enzyme Electrode. *Nature* 1967 214:5092, 214(5092), 986–988. doi: 10.1038/214986a0
- Vasfiye Hazal Özyurt. (2023). Copper-based metal organic framework modified electrochemical sensor for detection of quercetin in food samples. *European Food Research & Technology*, 249(10), 2515–2528. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04306-w>
- Wang, B., Takahashi, S., Du, X., & Anzai, J. I. (2014). Electrochemical Biosensors Based on Ferroceneboronic Acid and Its Derivatives: A Review. *Biosensors* 2014, Vol. 4, Pages 243-256, 4(3), 243–256. doi: 10.3390/BIOS4030243
- Wang, L., Bai, J., Huang, P., Wang, H., Zhang, L., & Zhao, Y. (2006). Self-assembly of gold nanoparticles for the voltammetric sensing of epinephrine. *Electrochemistry Communications*, 8(6), 1035–1040. doi: 10.1016/J.ELECOM.2006.04.012
- World Health Organization (WHO). (n.d.). Retrieved from <https://www.who.int/>
- Wei, H., & Wang, E. (2008). Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles as Peroxidase Mimetics and Their Applications in H₂O₂ and Glucose Detection. *Analytical Chemistry*, 80(6), 2250–2254. <https://doi.org/10.1021/ac702203f>
- Yeh, Y. C., Czeran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, 4(6), 1871–1880. doi: 10.1039/C1NR11188D
- Yoo, E. H., & Lee, S. Y. (2010). Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors* 2010, Vol. 10, Pages 4558-4576, 10(5), 4558–4576. doi: 10.3390/S100504558
- Yuan, Y., Zhang, J., Zhang, H., & Yang, X. (2012). Silver nanoparticle based label-free colorimetric immunosensor for rapid detection of neurogenin 1. *The Analyst*, 137(2), 496–501. <https://doi.org/10.1039/c1an15875a>
- Zhang, J., He, J., Liao, X., Xiao, Y., Liang, C., Zhou, Q., Chen, H., Zheng, Z., Qin, H.,

Chen, D., Chen, Q., Li, J., & Chen, J. (2021). Development of dominant epitope-based vaccines encoding Gp63, Kmp-11 and Amastin against visceral leishmaniasis. *Immunobiology*, 226(3), 152085. doi: 10.1016/J.IMBIO.2021.152085



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : G**** C**
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: **/**/****_*****
Medeni Hali : *****
Telefon : 0 5** **** ** **
E-posta : *****@*****.***

Eğitim

Alınan derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Bodrum Anadolu Lisesi	2015
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi (Kimya Bölümü)	2021
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi (Kimya-Analitik Kimya)	2024

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce (yüksek derece)

Yayınlar:

1. Güzel, U., Can, G., Tepeli Büyüksünetçi, Y., Hakli, Z., Oylumluoglu, G., & Anik, L. (2023, October). Electrospun modified PAN-porphyrin nanofiber electrode for caffeine detection. *Materials Chemistry and Physics*, 307, 128129. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.128129>
2. Can, G., Perk, B., Çitil B. E., Tepeli Büyüksünetçi Y., and Anik, Ü. (2024, May). Electrochemical Immunoassay Platform for Human Monkeypox Virus Detection. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c05182>
3. Can, G., Chouihi, A., Mohamed Fethi Diouani, & Ülkü Anik. (2024, May). Rapid and practical colorimetric biosensor for leishmaniasis diseases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 109(4), 116352–116352. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2024.116352>
4. Perk, B., Can, G., Tepeli Büyüksünetçi, Y., Çitil B. E., Anik Ü. (In press). Development of Gold Nanoparticle based Colorimetric Monkeypox Biosensors Suitable for Point of Care (POC) Analysis. *Chemistry Select*.

Bildiriler:

1. “Graphene Quantum Dots as Electrochemical Transducer for Biosensing Assays”, Korkusuz S., Can G., Özyurt V. H., Anik Ü., Poster Sunumu, 13th Workshop on Biosensors and Bioanalytical Microtechniques in Environmental, Food and Clinical Analysis (BBMEC), May 20-23, 2024, Izmir/Turkey
2. “RAPID AND PRACTICAL COLORIMETRIC BIOSENSOR FOR LEISHMANIASIS DISEASES”, Can G., Anik Ü., Poster Sunumu, 13th Workshop on Biosensors and Bioanalytical Microtechniques in Environmental, Food and Clinical Analysis (BBMEC), May 20-23, 2024, Izmir/Turkey
3. “A DIRECT SPECTROSCOPIC DETECTION METHOD for leishmania PARASITE”, Tezcan D., Can G., Anik Ü., Poster Sunumu, 13th Workshop on Biosensors and Bioanalytical Microtechniques in Environmental, Food and Clinical Analysis (BBMEC), May 20-23, 2024, Izmir/Turkey
4. “Synthesis and Fe-Metal Organic-Framework and Its Utilization in Molecular Imprinted Polymer Based 3-MCPD Electrochemical Sensors”, Özyurt V. H., Can G., Anik Ü., Sözlü Sunu, 13th Workshop on Biosensors and Bioanalytical Microtechniques in Environmental, Food and Clinical Analysis (BBMEC), May 20-23, 2024, Izmir/Turkey

Sertifika ve Kurslar