

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LUTEİNLEŞTİRİCİ HORMON TAYİNİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL
İMPEDANS TEMELLİ BİYOSENSÖR SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

FATMA GÜLNAZ GÜLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF. DR. HÜLYA YAĞAR

EDİRNE-2015

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin yüksek lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Mehmet İŞCAN

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hülya YAĞAR

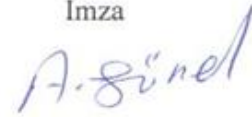
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir yüksek lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL



Doç. Dr. Şebnem Selen İŞBİLİR



Prof. Dr. Hülya YAĞAR



Tarih: 09/10/2015

Tarih: 09/10/2015

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

09/10/2015

Fatma Gülnaz GÜLER



Yüksek Lisans Tezi

Luteinleştirici Hormon Tayini İçin Elektrokimyasal İmpedans Temelli Biyosensör Sistemi Geliştirilmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Luteinleştirici hormon (LH) ön-hipofiz bezinden salgılanır ve üreme sisteminin gelişimi ve fonksiyonunda önemli rol oynar. LH cinsiyet bezlerinin normal fonksiyonu ve üreme için gereklidir. Erkeklerde testosteron üretimini uyarırken, kadınlarda östrojen ve progesteron üretimini uyarır ve yumurtlamayı başlatır. Kadınlarda artan LH seviyeleri primer gonadol bozukluk, polikistik over sendromu, post-menapoz ve hipofiz adenomları ile ilişkilendirilmektedir. Erkeklerde ise hipogonadizm ve primer testis bozukluğunda yüksek LH konsantrasyonu görülür.

Bu tezde; elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ile LH'ın kantitatif tayini için spesifik ve duyarlı immünolojik bir biyosensör geliştirildi. 12-merkaptododekanoik asit, EDC/NHS çifti, PAMAM ve glutaraldehit kullanılarak kovalent immobilizasyon yöntemi ile anti-LH antikoru altın elektrot yüzeyine immobilize edildi. Immobilizasyon adımları siklik voltammetri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile karakterize edildi. Bu biyosensörün tayin süresi 1 saat olup, biyosensörün tayin aralığı 1-60 mIU/mL LH konsantrasyonu aralığı olarak belirlendi. Ayrıca geliştirilen biyosensör, LH eklenmiş yapay serum örneklerinin analizinde de başarıyla kullanıldı.

Yıl : 2015

Sayfa Sayısı : 93

Anahtar Kelimeler : Luteinleştirici Hormon, biyosensör, elektrokimyasal impedans spektroskopisi, hormon analizi, kısırlık

Master Thesis

Development of Biosensor System based on Electrochemical Impedance for

Determination of Luteinizing Hormone

Trakya University Institute of Natural Sciences

Chemistry

ABSTRACT

Luteinizing hormone (LH) is secreted by the anterior pituitary gland, and plays a key role in the development and function of the reproductive system. LH is essential for normal gonadal function and fertility, stimulating testosterone production in men while it stimulates estrogen and progesterone production and triggers ovulation in females. Increased LH levels are related with primary gonadal dysfunction, polycystic ovary syndrome, post-menopause and pituitary adenoma in females. High LH concentration has been found in men with hypogonadism, and primary testicular failure.

In this thesis, a specific and sensitive immunological biosensor was developed for quantitative detection of LH by electrochemical impedance spectroscopy. Anti-LH antibody was immobilized onto gold electrode surface via covalent immobilization techniques by using mercaptododecanoic acid, EDC/NHS couple, PAMAM and glutaraldehyde. Immobilization steps were characterized by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The detection time of this developed biosensor system was one hour. Its detection range was determined as 1-60 mIU/mL LH concentration during this period. This constructed biosensor was successfully used to artificial serum samples spiked with LH.

Year : 2015

Number of Pages : 93

Keywords : Luteinizing hormone (LH), hormone analysis, electrochemical impedance spectroscopy, biosensor, infertility

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim süresince engin bilgilerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında hiçbir yardım ve desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hülya YAĞAR 'a

Deneysel çalışmalarında ve literatür araştırmalarında bilgilerini ve yardımını esirgemeyen okulumuz öğretim görevlilerinden Arş. Gör. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN' a,

Eğitim hayatım boyunca maddi manevi hiçbir yardım ve desteğini esirgemeyen annem, babam ve kardeşlerime, Gülizar ERCAN ve Yıldıray ERCAN'a,

Tez çalışmam boyunca desteğiyle yanımda olan Tolgahan DURMAZ ve Yasin KARAKUŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, TÜBAP 2014-99 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜRLER	III
İÇİNDEKİLER	IV
SEMBOLLER ve KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	XI
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Biyosensörlere Genel Bakış	3
2.2. Biyosensörlerin Bileşenleri	4
2.2.1. Biyokomponentler (Biyoreseptör moleküller)	4
2.2.2. Fiziksel bileşenler (Transduserlar)	4
2.2.3. Biyokomponentlerin immobilizasyonu	5
2.2.3.1. Adsorpsiyon	6
2.2.3.2. Tutuklama	6
2.2.3.3. Çapraz bağlama	6
2.2.3.4. Kovalent bağlama	6
2.3. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	9
2.3.1. Analizlenecek madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörlerin sınıflandırılması	9
2.3.2. Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması	9
2.3.3. Biyoaktif tabaka-ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörlerin sınıflandırılması	10

2.4. Biyosensörlerin Elektrokimyasal Temelleri	10
2.4.1. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi	10
2.4.2. Döngüsel voltametri	14
2.5. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler	15
2.5.1. Enzim temelli impedimetrik biyosensörler	16
2.5.2. İmmünokimya temelli impedimetrik biyosensörler	17
2.5.3. Nükleik asit temelli impedimetrik biyosensörler	22
2.5.4. Hücre ve mikroorganizma temelli impedimetrik biyosensörler	25
2.6. Hormonlar	25
2.6.1. Hormonların sınıflandırılması	27
2.6.1.1. Kimyasal yapılarına göre hormonların sınıflandırılması	27
2.6.1.2. Çözünürlüklerine göre hormonların sınıflandırılması	28
2.6.1.3. Sentezlendikleri yere göre hormonların sınıflandırılması	28
2.6.2. Hipofiz bezi	29
2.6.3. Luteinleştirici hormon	30
BÖLÜM 3	36
MATERYAL VE YÖNTEM	36
3.1. Materyal	36
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	36
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	36
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	37
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Elektrot Temizliği	37
3.2.2. Biyosensörün Çalışma Prensibi ve Ölçüm Sistemi	38
3.2.3. Hesaplama Yöntemi	38
3.2.3.1. Eşdeğer devre modeli çizimi	39
3.2.3.2. Yük transfer direncinin (R_{ct}) hesaplanması	40
3.2.4. Luteinleştirici Hormon Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanışı	41
3.2.5. Luteinleştirici Hormon Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu	42
3.2.5.1. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonu	42

3.2.5.2. EDC/NHS konsantrasyonunun optimizasyonu	43
3.2.5.3. PAMAM konsantrasyonunun optimizasyonu	43
3.2.5.4. Glutaraldehit konsantrasyonu optimizasyonu	43
3.2.5.5. Anti-LH konsantrasyonu optimizasyonu	43
3.2.5.6. LH inkübasyon süresi optimizasyonu	44
3.2.6. Luteinleştirici Hormon Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Karakterizasyonu	44
3.2.6.1. Doğrusal tayin aralığı	44
3.2.6.2. Tekrar üretilebilirlik	44
3.2.6.3. Yapay serumda uygulama	45
BÖLÜM 4	46
SONUÇLAR VE TARTIŞMA	46
4.1. LH Biyosensörü ile Elde Edilen Bulgular	46
4.1.1. LH Biyosensörünün Hazırlanış Basamaklarına İlişkin Bulgular	46
4.1.2. LH Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular	49
4.1.2.1. 12-MDDA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	49
4.1.2.2. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	51
4.1.2.3. PAMAM konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	52
4.1.2.4. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	54
4.1.2.5. Anti-LH konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	55
4.1.2.6. LH inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi	56
4.1.3. LH Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular	58
4.1.3.1. Doğrusal tayin aralığı	58
4.1.3.2. Tekrar üretilebilirlik	63
4.1.3.3. Yapay serumda uygulama	64
BÖLÜM 5	68
KAYNAKLAR	68

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

LH	: Luteinleştirici Hormon
EDC	: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
NHS	: N-Hidroksisuksinimit
PAMAM	: Poli(amido amin)
12-MDDA	: 12-Merkaptododekanoik asit
GLT	: Glutaraldehit
SAM	: Kendiliğinden oluşan tek tabakalar
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
R_{ct}	: Yük transfer direnci
CV	: Döngüsel voltametri
EIS	: Elektrokimyasal impedans spektrokopisi
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonansı
CPE	: Sabit faz elemanı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi	3
Şekil 2.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi	5
Şekil 2.3. SAM'ın şematik gösterimi	7
Şekil 2.4. Değişik yüzeylerdeki SAM yapıları (A) Altın yüzeye alkan tiyollerin oluşturduğu ve (B) hidroksillenmiş yüzeyde alkil siloksan ile elde edilen SAM yapısının modellenmesi	8
Şekil 2.5. İmpedans'ın potansiyel (zaman) ve akım (zaman) büyüklüklerine bağımlı matematiksel gösterimi	11
Şekil 2.6. Bir elektrolitle kontakt halindeki elektroda ilişkin Randles eşdeğer devre modeli	13
Şekil 2.7. İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel	14
Şekil 2.8. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltamogram	15
Şekil 2.9. Bir antikor ile modifiye edilmiş elektrodun, antijensiz ve antijen ilave edildikten sonra elde edilen kompleks Nyquist diyagramları	19
Şekil 2.10a. Çoklu protein tabakaları immobilizasyon basamaklarının şematik gösterimi	20
Şekil 2.10b. Artan tabaka sayısına karşı elde edilen kompleks impedans spektrumları	20
Şekil 2.11. IDE'nin SEM görüntüsü ve IDE'nin hesaplanan akım kapasitesi	21
Şekil 2.12. Li ve ark. yaptığı immobilizasyonu sisteminin şematik gösterimi	24
Şekil 2.13. Vücuttaki iç salgı bezleri	26
Şekil 2.14. Hormonların kontrol mekanizmaları	27
Şekil 2.15. Hipotalamus ve hipofiz bezinin konumu	29
Şekil 2.16. Hipofiz glikoprotein hormonların altbirim yapıları	31
Şekil 2.17. Menstrüasyon döngüsünde hormonların etkisi	32
Şekil 2.18. Kadınlar (A) ve erkeklerde (B) yaşam dönemleri boyunca LH salınımı	33
Şekil 3.1. Gamry Analyst® yazılımı kullanılarak elde edilen eş-değer devre modeli	39
Şekil 3.2. Gamry Analyst® yazılımındaki hesaplama yapılabilen devre modelleri	40
Şekil 3.3. Gamry Analyst® yazılımındaki hesaplama ekranı	41
Şekil 3.4. Anti-LH immobilizasyon basamaklarının şematik gösterimi	42

Şekil 4.1a. LH biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları	47
Şekil 4.1b. LH biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları	47
Şekil 4.2. 12-MDDA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	50
Şekil 4.3. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	51
Şekil 4.4. PAMAM konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	53
Şekil 4.5. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	54
Şekil 4.6. Anti-LH konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	55
Şekil 4.7. LH inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi	57
Şekil 4.8a. 1-10 mIU/ml LH tayin aralığı çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri	58
Şekil 4.8b. 1-10 mIU/ml LH tayin aralığı çalışmalarında elde edilen döngüsel voltamogramlar	59
Şekil 4.8c. 1-10 mIU/mL tayin aralığında LH biyosensörünün kalibrasyon grafiği	59
Şekil 4.9a. 10-60 mIU/mL LH tayin aralığı çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri	60
Şekil 4.9b. 10-60 mIU/ml LH tayin aralığı çalışmalarında elde edilen döngüsel voltamogramlar	60
Şekil 4.9c. 10-60 mIU/mL tayin aralığında LH biyosensörü kalibrasyon grafiği	61
Şekil 4.10a. 1-60 mIU/mL LH tayin aralığı çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri	61
Şekil 4.10b. 1-60 mIU/mL LH tayin aralığı çalışmalarında elde edilen döngüsel voltamogramlar	62
Şekil 4.10c. 1-60 mIU/mL doğrusal tayin aralığında LH biyosensörü kalibrasyon grafiği	62
Şekil 4.11a. 1-10 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri	65
Şekil 4.11b. 1-10 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmasında elde edilen kalibrasyon grafiği	65
Şekil 4.12a. 10-60 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmasında elde edilen Nyquist eğrileri	66

Şekil 4.12b. 10-60 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmasında elde edilen kalibrasyon grafiği----- 66

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. Biyosensör bileşenlerinin içeriği -----	4
Tablo 2.2. Biyoafinite ve katalitik ajanlar ve bunlarla tayin edilebilen analitler -----	9
Tablo 2.3. Biyoelektrokimyasal sistemleri tanımlamakta çok sıklıkla kullanılan impedans elemanlarının tanımlanmaları, frekans bağımlılıkları ve faz kaymaları -----	12
Tablo 2.4. LH referans değerleri -----	35
Tablo 4.1. Her bir immobilizasyon basamağı için hesaplanan R_{ct} değerleri -----	48
Tablo 4.2. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri -----	50
Tablo 4.3. EDC/NHS konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri -----	52
Tablo 4.4. PAMAM konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları -----	53
Tablo 4.5. Glutaraldehit konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen grafiklere ait doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri -----	54
Tablo 4.6. Anti-LH konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları -----	56
Tablo 4.7. LH inkübasyon süresi optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri -----	57
Tablo 4. 8a. 1-10 mIU/mL aralığında LH biyosensörünün tekrar üretilebilirliği -----	63
Tablo 4. 8b. 10-60 mIU/mL aralığında LH biyosensörünün tekrar üretilebilirliği -----	64
Tablo 4.9. LH biyosensörü için elde edilen optimum değerler -----	67

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Hormonlar hipotalamus, hipofiz bezi, tiroid bezi, paratiroid bezi, böbrek üstü bezi, pankreas, yumurtalık ve testisler gibi özel dokular tarafından kana salgılanan ve kan yolu ile ulaştıkları doku ve organlarda kan basıncının korunması, kan hacmi ve elektrolit dengesi, embriyojenez, cinsel farklılaşma, gelişim ve üreme, sindirim gibi fonksiyonları düzenleyici bir etki meydana getiren ve çok düşük miktarları ile görev yapan organik bileşiklerdir.

Ön hipofiz bezinden salgılanan cinsel fonksiyonların düzenlenmesini sağlayan hormonlar gonadotropinler olarak adlandırılırlar. Bu hormonlar glikoprotein yapılı, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinleştirici hormondur (LH). Gonadotropinlerin salınımı, hipotalamustan salınan gonadotropin salıverici hormon tarafından düzenlenir. Gonadotropinler cinsel farklılaşma ve üreme fonksiyonlarında önemli rol oynayan hormonlardır.

Luteinleştirici (luteinizan) hormon üreme sistemini kontrol eden temel hormonlardan biridir. Erkeklerde leydig hücrelerini uyararak erkek karakteristik özelliklerinin oluşumunda etkili testosteron hormonunun salınımını sağlar. Kadınlarda ise menstruasyon döngüsünün iki yarısında farklı özelliklere sahiptir. Döngünün ilk 1-2 haftasında yani yumurtlama döneminden önce yumurtalık foliküllerini uyararak östrojen üretimini sağlar. 13. gün civarında ise yumurtalıktan olgun bir yumurtanın serbest bırakılmasını sağlar. Yumurtlama döneminde LH en yüksek seviyeye ulaşır.

LH salınımı doğurganlığı sağlamak ve korumak için çok önemlidir. Yetersiz olması durumunda testis ya da yumurtalık fonksiyonunu etkileyerek kısırlığa neden olabilir. Bunun anlaşılabilmesi için LH seviyelerinin duyarlı bir şekilde tayin edilebilmesi gerekmektedir. Doğurganlığın takibi dışında bir takım hastalıkların tanısı

için de LH tayini önemlidir. Kadınlarda primer gonadal bozukluklar, polikistik over sendromu, postmenopoz ve hipofiz adenomları, erkeklerde ise hipogonadizm ve primer testis yetersizlikleri kandaki artan LH seviyesiyle ilişkilendirilmektedir. Vücut sıvılarında (kan ve idrar) LH miktarının doğru ve hızlı tayini hastalık tanı ve tedavisinde bir adım önde olunmasını sağlayabilir.

Günümüzde LH tayini için yüksek performanslı likit kromatografisi/kütle spektroskopisi (HPLC/MS), gaz kromatigrafisi/kütle spektroskopisi (GC/MS) gibi yöntemlerin yanı sıra özellikle klinik laboratuvarlarda elektrokemilüminesans (ECLIA), radyoimmunoassay (RIA), enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler özel ekipmanlar, pahalı kitler ve bu konuda uzman personel gerektirdiğinden, zaman alıcı ve maliyeti yüksek yöntemlerdir. Bu nedenle bu analizlerin daha duyarlı, daha kısa sürede ve düşük maliyetle yapılabilmesi için son zamanlarda biyosensör sistemleri kullanılmaya başlanmıştır.

Biyomoleküllerden ve fiziksel bileşenlerden oluşan biyosensörlerin görevi; biyolojik bir olayın elektrik sinyaline dönüştürülmesidir. Biyosensörlerin diğer yöntemlere karşı en önemli avantajı; tayin edilecek maddeler için yüksek hassasiyetli ve düşük maliyetli, pratik ölçümlere olanak sağlamasıdır.

Bu zamana kadar LH tayini için SPR (Yüzey plazmon rezonans) temelli, amperometrik temelli ve altın nanosensörler gibi biyosensörler geliştirilmiştir. Bu tez çalışmasının amacı fizyolojik konsantrasyon seviyesinde LH tayinini yüksek doğrulukta, daha düşük maliyetli ve daha az örnek sarfiyatıyla gerçekleştirebilecek bir biyosensör geliştirmektir. Bu amaç kapsamında bu çalışmada seçtiğimiz immobilizasyon ve analiz yöntemiyle ilk defa Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) temelli bir LH immunosensörü geliştirildi. Altın elektrot yüzeyine kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) ile modifiye edilmiş antikorlara bağlanan LH'nin elektrot cevabına etkisi incelendi.

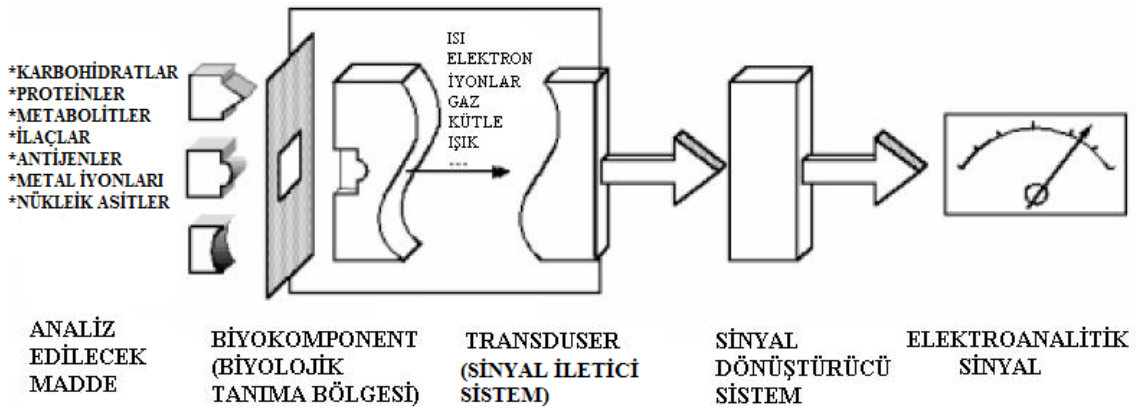
BÖLÜM 2

KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Biyosensörlere Genel Bakış

Biyosensörler; izole enzimler, immüno sistemler, dokular, organeller veya hücreler, yapay enzimler, MIP'ler tarafından yönlendirilen biyokimyasal reaksiyonları kullanarak oluşan elektriksel, termal veya optik sinyaller yardımıyla kimyasal/biyokimyasal maddeler ve biyo-materyallerin kalitatif ve kantitatif tayinini yapabilen aygıtlardır. Günümüzde biyosensörler, özellikle sağlık başta olmak üzere; çevresel analizlerde, askeri sahada, gıda, farmasötik ve kimya endüstrilerinde kullanılmaktadır [1].

Biyosensörler birbiri içine geçmiş bir biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analiz edilecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir [2,3]. Şekil 2.1'de bir biyosensör sisteminin birimleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi [4]

2.2. Biyosensörlerin Bileşenleri

Biyosensörler biyokomponentler ve transduser olarak pek çok farklı maddeyi ve sistemi içerebilmektedir. Bunlardan en önemli olanları Tablo 2.1’ de verilmiştir.

Tablo 2.1. Biyosensör bileşenlerinin içeriği

Analit olabilecek maddeler	Biyoreseptör olabilecek molekküller	Sinyal İletici Sistem (Transduser)
Hormonlar	Reseptörler	<u>Elektrokimyasal Esaslı</u>
Kanser biyobelirteçleri	Antikorlar	• Amperometri
Antijen	Antikorlar	• Potansiyometri
Nükleik asit	Aptamerler	• Yarı iletken esaslı
Koenzimler	Enzimler	<u>Optik esaslı</u>
Aktivatör-İnhibitör	Enzimler	• Fotometri esaslı
Metabolitler	Hücre-doku kesitleri	• Fluorometri esaslı
Metaller	Mikroorganizmalar	• Biyoluminesans
Allerjenler	Lipidler	<u>Piezoelektrik</u>
Mikroorganizmalar	Hücre organelleri	• Mikrokantileverlar
		• Kuartz kristal mikrobals

2.2.1. Biyokomponentler (Biyoreseptör molekküller)

Biyosensör teknolojilerinin geliştirilmesinde anahtar rol oynayan biyoreseptör molekküller, analiz edilecek madde ile seçici olarak etkileşime giren oldukça duyarlı biyolojik molekküllerdir. Biyoreseptör molekküller olarak antikor, enzim, protein, nükleik asitler gibi biyolojik molekküller ya da hücre, doku ve mikroorganizmalar gibi canlı biyolojik sistemler kullanılabilir. Biyoreseptör olarak kullanılacak molekküllerin en önemli özelliği tespit edilmesi istenen hedef moleküle karşı yüksek afinite ve özgüllük göstermeleridir [5].

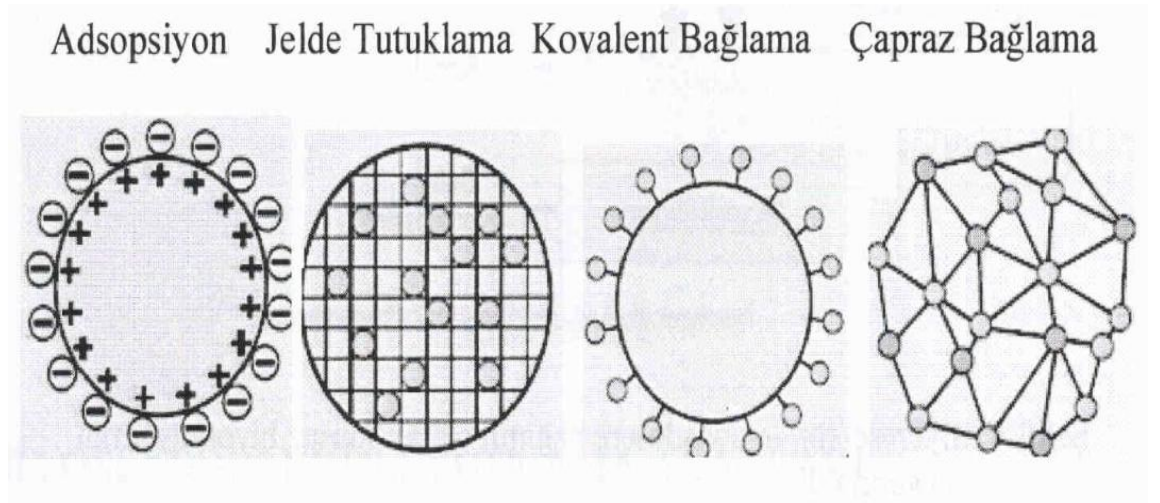
2.2.2. Fiziksel bileşenler (Transduserlar)

Fiziksel bileşenler biyobileşenlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyona göre transduser seçilir. Amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde elektrodlar kullanılır ve burada hedef; maddedir (O_2^-

elektrodunda çözünmüş O_2 , pH elektrodunda H^+ iyonu gibi). Bunların dışında transistörler ve termistörler de transduser olarak kullanılmaktadır. Biyoaktif bileşenin tayin edilecek madde ile etkileştiğinde oluşan sinyalin iletim ve ölçümünde biyosensörlerde genel olarak; elektrokimyasal, optik kalorimetrik ve piezoelektrik esaslı sistemler kullanılır [1].

2.2.3. Biyokomponentlerin immobilizasyonu

Analizlenmesi hedeflenen örneğe uygun biyokomponent ve transduser seçildikten sonra bu iki eleman birbirine bağlanmalı yani biyokomponent transduser yüzeyine immobilize edilmelidir [4]. Biyokomponentin transduserler üzerinde immobilizasyonu adsorpsiyon, polimer matrikste tutuklama gibi fiziksel yöntemler veya kovalent bağlama, bi veya multi fonksiyonel reaktifler ile çapraz bağlama gibi kimyasal yöntemler ile gerçekleştirilir [1].



Şekil 2.2. Immobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi [1]

Biyosensörün ömrü immobilizasyon işlemiyle biyokomponentin transduser yüzeyinde aktivite kaybı olmaksızın ne kadar süre tutulabildiğine bağlı olduğundan, seçilen immobilizasyon yöntemi biyokomponentin uzun süre yüzeyden ayrılmasını engellemelidir. Antikoru antijen bağlama merkezi immobilizasyon esnasında zarar görmemeli ya da antijen bağlanmasında sterik engel nedeniyle düşüş olmamasına dikkat edilmelidir [6].

2.2.3.1. Adsorpsiyon

Bu immobilizasyon yöntemi; biyokomponentin transduser yüzeyine non-kovalent etkileşimler (hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, elektron geçiş kompleksleri ve Van der Waals kuvvetleri) ile tutturulması prensibine dayanır [6]. Biyoreseptör materyalleri üzerinde daha az bozunmaya yol açan en basit sabitleme metodudur. Ancak, bağlanma zayıf ve kullanım ömrü birkaç gün kadar kısadır. Yüzeye immobilize edilen biyoreseptör materyali, ısı, pH, iyonik güç, akış oranı ve substratlardaki değişimlere karşı hassastır [7].

2.2.3.2. Tutuklama

Tutuklama metodunda, biyoreseptör materyali, transduser yüzeyi yakınında bir jel veya bir polimer matrisi içinde tutuklanır. Tutuklamada kullanılan başlıca malzemeler akrilamit polimerleri, jelatin tabakaları, nişasta, kalsiyum aljinat jelleri, silikon lastiği, naylon, polivinil klorür, polivinil alkoldür [6,7].

2.2.3.3. Çapraz bağlama

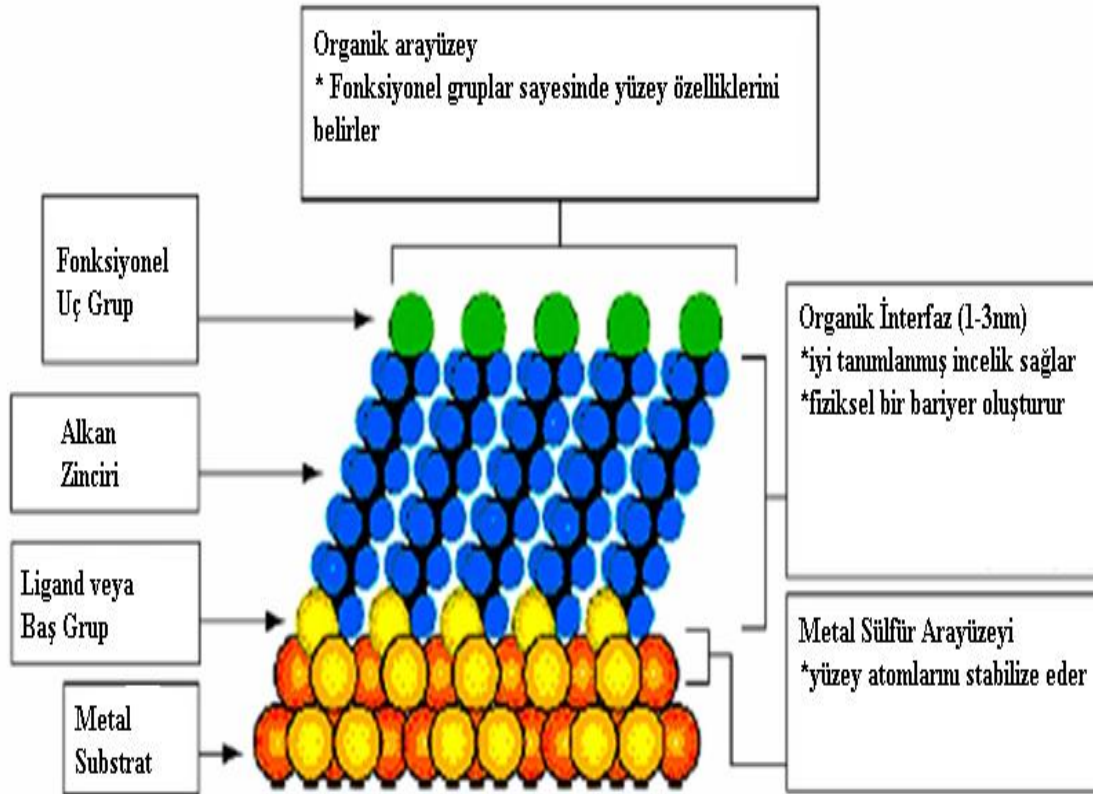
Çapraz bağlama metodunda, genelde glutaraldehit, heksametilen diizosiyanat ve 1,5-dinitro-2,4-diflorobenzen gibi bifonksiyonel bileşikler, biyomoleküller arasında katmanları kararlı hale getirecek moleküller arası bağları oluşturmada ve transduser üzerindeki biyoalgılama materyallerinin sabitlenmesi ve reaksiyon tabakalarından sızmasını önlemede kullanılır [8].

2.2.3.4. Kovalent bağlama

Kovalent bağlamanın gerçekleşmesi için bağlanma yüzeyinde ve/veya biyomolekül üzerinde tiyol (-SH), hidroksil (-OH), amin (-NH₂), karbonil (-C=O), karboksil (-COOH) gibi reaktif grupların olması gerekmektedir. Bu reaktif gruplar olmadığı takdirde, kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) gibi çeşitli manipülasyonlarla yüzeyde reaktif gruplar oluşturulabilir. Biyomolekül aktive edilmiş transduser yüzeyine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanıp immobilize biyokomponenti içeren tabaka ile transduser yüzeyinde film oluşturulabilir.

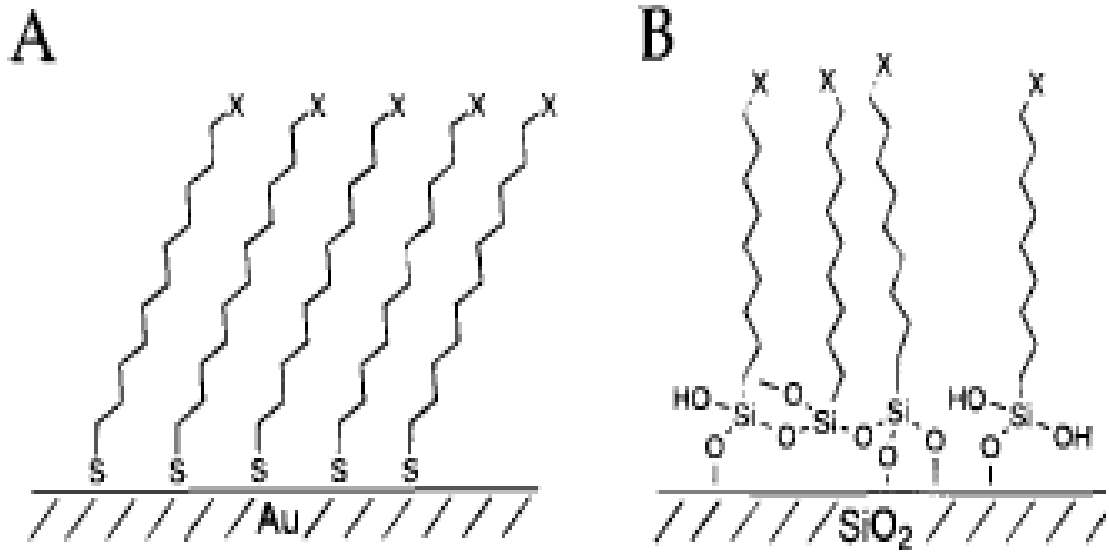
Biyokomponentlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi değişkenlere karşı direnç sağlar ve biyosensörün ömrünü uzatır ancak biyoaktif tabakada bir miktar aktivite kaybına sebep olabilir [6].

Enzimlerin kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) yöntemiyle immobilizasyonu: SAM oluşumu metal yüzey ve seçilen organik molekülün baş grubu arasında meydana gelen güçlü kemisorbsiyon ile oluşmaktadır [9,10]. Alkil zincirleri arasındaki hidrofobik ve Van der Waals etkileşimleri sonucunda çok iyi organize olmuş ve elektrot yüzeyine çok sıkı paketlenmiş bir tek tabaka elde edilir. Elektrot yüzeyindeki SAM, çözelti içindeki elektroaktif türler ve elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferi için kinetik bir bariyer olarak tanımlanır [11]. SAM ve bu tabakaların bazı özellikleri Şekil 2.3'te şematik olarak gösterilmiştir. Tek tabakanın oluşumunu ve paketlenme yoğunluğunu; substratın doğası, pürüzsüzlüğü, çözücü, adsorbanın (tutunan) doğası, adsorbanın tutunma süresi, sıcaklık ve adsorban konsantrasyonu gibi pek çok parametre etkiler [12].



Şekil 2.3. SAM'in şematik gösterimi [14]

SAM prosesi maddenin özel metal yüzeyde kendiliğinden organize olmasıdır ve farklı maddelerle biyosensörler, mikroçipler ve biyoçipler geliştirmekte çok sık kullanılmaktadır [13]. SAM oluşumunda nispeten pürüzsüz metal yüzeylerinde (altın, gümüş, bakır, platin ve nikel) tiyolat veya sülfür molekülleri; metal oksit yüzeylerinde ($\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3$, SiO_2 , PtO , TiO_2 ve ZrO_2) alkan silan molekülleri kullanılır [14]. Şekil 2.4'te farklı yüzeylerdeki tek tabaka oluşumları gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Değişik yüzeylerdeki SAM yapıları (A) Altın yüzeye alkan tiyollerin oluşturduğu ve (B) hidroksillenmiş yüzeyde alkil siloksan ile elde edilen SAM yapısının modellenmesi [12]

Biyomoleküllerin immobilizasyonu için alt yapı olarak SAM kullanılmasının pek çok avantajı vardır. Düzenli ve stabil tek tabakanın oluşumu kolaydır. Biyomoleküllerin immobilizasyonu için uygun yüzey sağlarlar. SAM'deki baş grupları çeşitli fonksiyonel uçların dizaynı için esneklik sağlar. SAM üzerinde immobilizasyon için çok az miktarda biyomolekül bile yeterlidir [12].

2.3. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

2.3.1. Analizlenecek madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler analizlenecek madde ile biyoaktif bileşen ilişkisine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılırlar [15]:

- a) Biyokatalitik esaslı biyosensörler (mikroorganizma ve enzimlerin kullanıldığı biyosensörlerdir.)
- b) Biyoafinite esaslı biyosensörler (antikor-antijen ve reseptör-ligand gibi etkileşimlerin kullanıldığı biyosensörlerdir.)

Biyoafinite ve biyokatalitik ajanlar ve bunlarla tayin edilebilen analitler Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. Biyoafinite ve katalitik ajanlar ve bunlarla tayin edilebilen analitler

BİYOAFİNİTE SENSÖRLER		BİYOKATALİTİK SENSÖRLER	
RESEPTÖR	ANALİT	RESEPTÖR	ANALİT
Enzim	Substrat, inhibitör	Enzim	Substrat
Apoenzim	Prostetik grup	Mikroorganizma	Kofaktör
Antikor	Antijen	Organel	Aktivatör
Reseptör	Hormon	Doku kesiti	İnhibitör
Lektin	Glikoproteinler		Enzim
	Sakkaritler		
	Protein		

2.3.2. Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler biyokomponent türüne göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılırlar [7]:

- a) Enzim sensörleri
- b) Antikor-antijen esaslı biyosensörler (İmmüno-sensörler)
- c) Nükleik asit prob sensörleri
- d) Mikrop esaslı veya hücre temelli sensörler
- e) Doku esaslı ve organel esaslı sensörler

2.3.3. Biyoaktif tabaka-ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler ölçüm prensiplerine ve transduser türüne göre aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar [15]:

- a) Elektrokimyasal esaslı biyosensörler (Amperometrik, Potansiyometrik, İmpedimetrik)
- b) Optik esaslı biyosensörler (Fotometri, Fluorometri, Biyolüminesans)
- c) Piezoelektrik esaslı biyosensörler (Kuartz kristal mikrobaleans, Mikrokantileverler)
- d) Klorimetri esaslı biyosensörler (termistörler)

2.4. Biyosensörlerin Elektrokimyasal Temelleri

2.4.1. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi

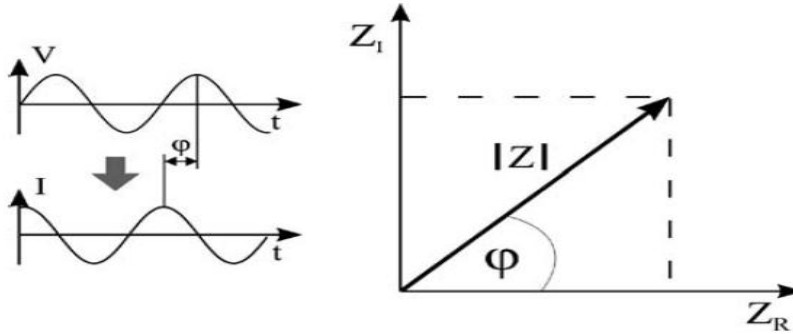
Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (Elektrokimyasal dielektrik spektroskopisi, EIS) sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmede kullanılan çok etkili ve kullanışlı bir yöntemdir. Metal korozyon mekanizmalarının aydınlatılmasında, membranlar boyunca yük aktarımı ve membran/çözelti ara yüzeylerinin karakterizasyonunda ve optimizasyonunda çok sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda ise biyosensörlerin hem hazırlanma aşamalarının, hem de biyomoleküllerin spesifik etkileşimlerinin izlenmesi ve kantitatif analizlerinde çok yoğun bir şekilde tercih edilmeye başlanmıştır. EIS'nin kullanımı ile ilgili ilk örnekler 1980'lerin sonunda rapor edilmiş olmasına rağmen metodun uygulamaları, enstrümantasyondaki ilerlemelere bağlı olarak son yıllarda çok fazla artış göstermiştir. Çünkü elektrokimyasal impedans spektroskopisinin kompleks parametreleri enstrümanların her türlü donanımından çok fazla etkilenebilmektedir. İmpedans teknikleri ile biyoreseptör ve onun analiti arasındaki etkileşimin belirlenmesinin yanı sıra, transduserde biyomoleküllerin immobilizasyonu boyunca meydana gelen olaylarda olduğu gibi, yüzey modifikasyonun karakterizasyonları da başarıyla gerçekleştirilebilir. Bu özellikleri ile impedans aynı zamanda, yüzey morfolojisinin görüntüleme teknikleriyle aydınlatılmasında yardımcı ve çok önemli bir araçtır [16].

Bir sistemin impedansı genellikle küçük genlikli bir potansiyel uygulanması ve akım cevabının belirlenmesiyle tayin edilir. Bu tanımdan yola çıkarak impedans; potansiyel-zaman fonksiyonun $V(t)$ akım-zaman $I(t)$ fonksiyonuna bölümüdür. V_0 ve I_0 maksimum değere ulaştıklarında, f ; frekans, t ; zaman, ϕ potansiyel-zaman ve akım-zaman arasındaki faz kaymasıdır. Y ise kompleks iletkenliktir.

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\pi f t)}{I_0 \sin(2\pi f t + \phi)} = \frac{1}{Y} \quad (1)$$

İmpedans kompleks bir değerdir; çünkü akım sadece genlik açısından farklılık göstermekle kalmaz, potansiyel-zaman fonksiyonuyla kıyaslandığında faz kayması da gösterir. Bu yüzden değer ya $|Z|$ ve faz kayması ϕ ya da reel Z_R ve imgesel Z_I olarak tanımlanabilir. Bu durum, Şekil 2.5’de gösterilmiştir. Dolayısıyla impedans ölçümlerinin sonuçları iki şekilde gösterilebilir:

Bode grafiği ($\log f$ ’nin fonksiyonu olarak $\log Z$ ve ϕ) veya Z_R ve Z_I ’nın olduğu Nyquist grafiği şeklindedir.



Şekil 2.5. İmpedans’ın potansiyel (zaman) ve akım (zaman) büyüklüklerine bağlı matematiksel gösterimi [16]

İmpedans “spektroskopisi” adı, impedansın tek bir frekanstan ziyade farklı frekansları tayin edebilme gerçeğinden türemiştir. Bu sayede bir impedans spektrumundan yüzeylerin, tabakaların veya membranların değişimi, difüzyon prosesleri ve bunların karakterizasyonu hakkında bilgi sağlanır. Bu bilgilere ulaşmak için, impedans spektrumu genellikle eşdeğer devre kullanılarak analiz edilir. Genellikle direnç ve kapasitanstan oluşan bu devre incelenen sistemin farklı fizikokimyasal

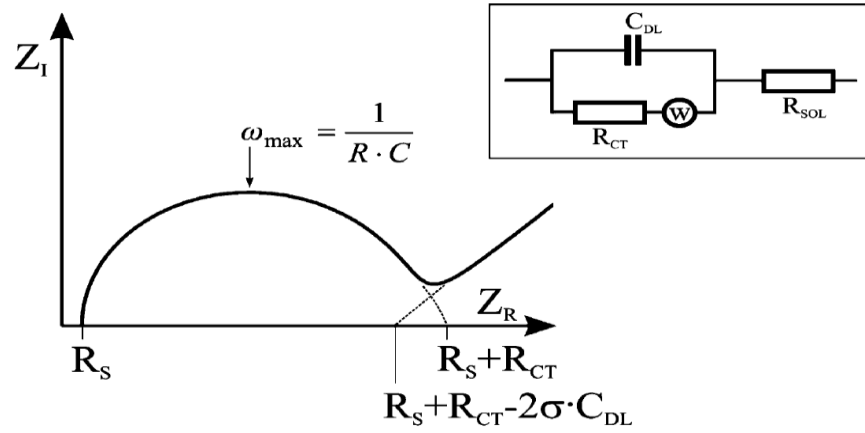
özelliklerini açıklar. Ayrıca sistem; elektrokinetik, difüzyon, partiyon gibi temel yasalardan türeyen transfer fonksiyonları temelinde de tanımlanabilir. Bu durumda bir impedans elementinin (direnç veya kapasitans) değişimi çözeltinin bileşiminin bir fonksiyonu olarak değerlendirilir. Bazı durumlarda, tüm impedansla konsantrasyondaki değişim arasında ilişki kurmak mümkündür [17,18,19].

Elektrokimyasal impedans spektroskopisinde, elektrolit çözeltisi sistemin tek bileşeni olarak incelendiğinde, impedans davranışı açıklamak için 4 unsur kullanılır: ohmik direnç, kapasitans, sabit faz ögesi ve Warburg impedans. Bu unsurlar ve tanımlamalarının özeti Tablo 2.3’ de verilmiştir.

Eşdeğer devreler, deneysel impedans verilerini seri ve/veya paralel düzenlenmiş ideal impedans unsurlarla yaklaşık olarak belirlemek için kullanılır. Çoğu elektrokimyasal sistem bu prosedüre göre analiz edilir. Bir elektrolitle bir elektrodun temasta olduğu bir sistem -Randles devresi- çözelti direnci (R_s), yük transfer direnci, (R_{ct}) çift tabaka kapasitans (C_{dl}) ve Warburg impedans (W)’dir. Şekil 2.6’da gösterilen Nyquist grafiğinde R_s ve R_{ct} değerleri kolaylıkla belirlenebilir. Çift tabaka kapasitansı ise yarım dairenin maksimum yaptığı noktadaki frekanstan hesaplanabilir.

Tablo 2.3. Biyoelektrokimyasal sistemleri tanımlamakta çok sıklıkla kullanılan impedans elemanlarının tanımlanmaları, frekans bağımlılıkları ve faz kaymaları [16]

İmpedans elemanı	Tanımlama	Faz açısı	Frekans bağımlılığı
R	$Z=R$	0°	Hayır
C	$Z_C = \frac{1}{j\omega C}$	90°	Evet
CPE	$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^a}$	$0-90^\circ$	Evet
W (infinite)	$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}(1-j)$ $\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 \sqrt{2}} \left(\frac{1}{\sqrt{D_0 c_0}} + \frac{1}{\sqrt{D_R c_R}} \right)$	45°	Evet



Şekil 2.6. Bir elektrolitle kontakt halindeki elektroda ilişkin Randles eşdeğer devre modeli [16]

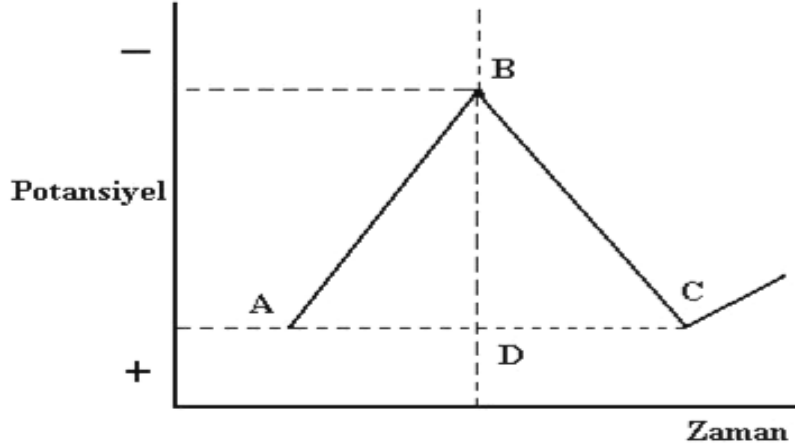
Biyolojik bir materyali (antikor, enzim vb. gibi) karakterize etmek için, elektrotlar sisteme uygulanarak bir elektrokimyasal hücre elde edilmelidir. AC potansiyel uygulanması ile birlikte, çalışma elektrodu, biyolojik materyal, çözelti ve karşıt elektrot gibi akım tüm sistem elemanlarını dolaşmaya başlayacaktır. Ölçülen impedans, esasen bu elemanların bireysel katkılarının bir özetidir.

a) Biyolojik bir materyalin impedansı ya belirli bir analitin konsantrasyonunun fonksiyonu ya da zamanın bir fonksiyonudur. Her iki durumda da her iki elektrodun impedansı, ölçülecek impedansa kıyasla küçük olmalıdır. Bu da geniş yüzey alanları kullanılarak sağlanabilir. Ayrıca, çözeltiden kaynaklanabilecek biyolojik materyalin nonspesifik bağlanmalarından kaçınılmalıdır, çünkü bu durum ara yüzey impedansı artırır.

b) Çalışma elektroduna biyolojik bileşen immobilize edilir ve analitle ilişkisi tayin edilir. Bu, tipik bir biyosensör uygulamasıdır. Burada duyar elektrotun impedansı (yani biyolojik materyalle modifiye edilmiş çalışma elektrodu) aslında tüm impedansı kontrol eder. Bu yüzden, karşıt elektrodun impedansı belirgin şekilde küçük olmalıdır. Bu da duyar elektroda göre en az 10 kat daha büyük (alan) elektrot kullanılarak sağlanabilir [20,21].

2.4.2. Döngüsel voltametri

Döngüsel voltametri (CV), karıştırılmayan bir çözeltideki, durgun bir elektrodun akım cevabının, Şekil 2.7’de gösterildiği gibi üçgen dalga şekilli potansiyel ile uyarılıp ölçülmesi esasına dayanmaktadır [22].

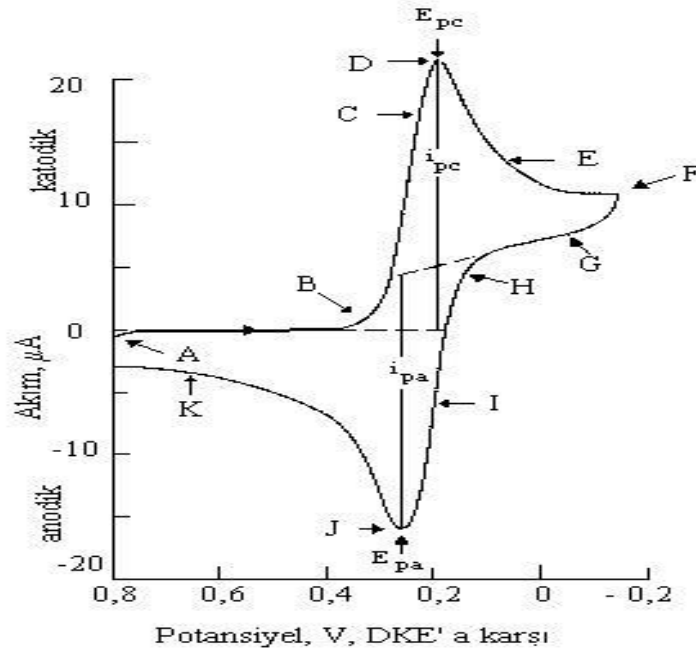


Şekil 2.7. İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel [22]

Döngüsel voltametri de belli bir potansiyel aralığında doğrusal olarak tarama yapılır sonra tarama yönü ters çevrilir ve potansiyel orijinal değerine getirilir. İki yöndeki tarama hızı da aynıdır. Ters yöndeki potansiyellere döndürme potansiyelleri denir. Döndürme potansiyellerin aralığı, bir veya daha fazla analitin difüzyon kontrollü bir yükseltgenme veya indirgenmenin meydana geldiği potansiyeldir. Başlangıç taramasının yönü negatif veya pozitif olabilir. Bu da numunenin bileşimine bağlıdır. Daha negatif potansiyeller yönünde bir tarama ileri tarama, zıt yöndeki tarama da ters tarama olarak adlandırılır. Üçgen dalga uygulandığında Şekil 2.8’deki gibi bir voltamogram elde edilir.

Bu eğri şöyle yorumlanır; gittikçe artan bir katodik gerilim uygulandığında eğrinin ABDF dalı elde edilir. İndirgenme sebebiyle bir katodik akım gözlenir (B noktası). B’den D’ye kadar ki bölgede indirgenebilen maddenin yüzey derişimi gittikçe küçülürken, akımda hızlı bir artış olur. Pik akımı iki bileşenden meydana gelir. Biri, analitin yüzey derişimini Nernst eşitliği ile verilen denge derişimine eşitlemek için gerekli kapasitif akım artışıdır. İkincisi ise normal difüzyon kontrollü akımdır. Sonra ilk akım, difüzyon tabakası elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça hızla azalır (D noktasından F noktasına). F’de uygulanan katodik gerilim azalmaya başlar. FH bölgesinde

indirgenebilen maddenin indirgenmesi devam eder. Ancak indirgenmiş madde konsantrasyonu azalmış olduğundan akım da azdır. Potansiyel yeteri kadar pozitif olduğunda indirgenme daha fazla devam etmez, akım sıfıra gider ve sonra da anodik olur. Anodik akım, ileri yöndeki tarama sırasında yüzey yakınlarında biriken indirgenmiş maddenin yeniden yükseltgenmesi sonucu oluşur. Bu anodik akım pik yapar ve sonra biriken indirgenmiş maddenin anodik reaksiyon yoluyla kullanılmasıyla azalır [22].



Şekil 2.8. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltamogram [22]

2.5. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) kimyasal ve fiziksel proseslerin tanımlanmasında etkili bir metottur. Membranların tanımlanması, biyosensörün karakterizasyonu ve fabrikasyonu EİS ile etkin olarak izlenebilir. Enzim-sustrat etkileşiminin aksine katalitik olmayan antikor-antijen, reseptör-ligand, DNA-DNA etkileşimleri bile EİS ile başarıyla izlenebilir [23,24,25]. İmpedans biyosensörleri biyomoleküllerin iletken ve biyoyumlu elektrot üzerine immobilize edilip daha sonra bu analit bağlayıcı molekül üzerindeki yüzeysel direnç değişikliğinin belirlenmesiyle

oluşturulur. Bu biyomoleküller antikorlar, reseptör proteinler, tek iplikli DNA, aptamer ya da peptitler olabilir [24,26,27].

2.5.1. Enzim temelli impedimetrik biyosensörler

Enzimlerin en önemli özelliği, reaksiyonları en azından bir milyonluk bir faktörle hızlandırmak için muazzam bir katalizör gücüne sahip olmalarıdır [28]. Enzimler biyosensörlerde en yaygın kullanılan biyoalgılama materyalleridir [7]. Bir enzimin dönüşümünden (turnover) dolayı redoks-aktif bileşiğinde meydana gelen değişim, yük aktarım direnciyle belirlenebilir. Bu durum, glukoz oksidazın ve mediatör olarak benzokinonun kullanıldığı glukoz tayini çalışmalarında gösterilmiştir [29].

İmpedans spektroskopisi, modifiye yüzeyli elektrotların elektriksel özelliklerinin ölçülmesi için etkin bir yöntemdir. Ancak geniş bir frekans aralığında bütün bir impedans spektrumunun taranması zaman alıcıdır. Bu yüzden impedimetrik teknikler çoğu enzim temelli impedimetrik biyosensör için karakterizasyon metodu olarak kullanılır ve genellikle dolaylı izleme stratejileri kabul edilir [25]

İmpedans spektroskopisiyle, substrat ve enzim inhibitörlerinin tayini yapılmakla birlikte enzimin kendi aktivitesi de analiz edilebilmektedir. Bu duruma ilginç bir yaklaşım, parçalanabilir polimer filmlerin kullanılmasıdır. Bu polimerler elektrot üzerine kaplanırlar ve biyokatalitik reaksiyon vasıtasıyla polimer parçalanma ya polimer zinciri üzerinde enzimin direkt etkisiyle ya da enzimatik dönüşüm sonucu oluşan ürünün indirekt etkisiyle oluşur. Parçalanmaya başlayan filmin kalınlığı impedans ölçümleriyle kolaylıkla takip edilir. Bu yöntem; üre, glukoz, kimotripsin veya lipaz gibi enzimlerin tayininde gösterilmiştir. İmpedansın kullanıldığı bir diğer yol, elektrot yüzeyindeki lipid tabakasına “sinyalizasyon” proteinin katılması ve spesifik analitle etkileşimi sonucu konformasyonel değişiminin değerlendirilmesine dayanır [30-34].

Altın elektrotların jelatin kapla kenetlenmiş yüzeyindeki proteolitik değişimin sebep olduğu impedans farklanmalarının ölçüldüğü, kollajenaz tayini için geliştirilen bir biyosensörde; tabaka kritik bir kalınlığa ulaştığında enzim tarafından bozulup hızla artan bir impedans oluşturur. Proteaz sindirimi ile oluşan impedans değişimi sensör yüzeyinden jelatin tabakasının ayrılmasıyla ilişkilendirilmiştir. Aygıtın cevap süresi çözeltinin karıştırılmasıyla önemli ölçüde düşürülmüştür ve bu sistemin kollajenaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanışlı bir yöntem olduğu gözlenmektedir. Ancak

biyosensörün yüzeye kaplanmış jelatini tayin yeteneği elektrolitlerin varlığında ciddi bir şekilde azalmaktadır [35]

İmpedimetrik teknikler Langmuir-Blodgett (LB) filmlerin karakterizasyonu için uygun olduğundan, elektrotların Langmuir-Blodgett metodu ile modifikasyonlarında pek çok enzim temelli impedimetrik biyosensör kullanılmıştır [25]. Örneğin; sudaki organofosfor pestisitlerinin belirlenmesi için iyon seçimli alan etkili transistör (ISFET) kullanılarak Bütirikolin esterase (BuChE) içeren LB filmler oluşturulmuştur. Geliştirilen biyosensör triklorfonun saptanması için kullanılabilir [36].

2.5.2. İmmünokimya temelli impedimetrik biyosensörler

Antikorlar, önemli bir protein sınıfını temsil ederler. Bunlar yaklaşık toplam plazma proteinin % 20'sini oluşturur ve genel olarak tüm memelilerdeki serum ve dokularında görülen glikoprotein grubu olan immunoglobulinler (Ig) olarak adlandırılırlar. Bunlar belirli antijenlere reaksiyon verecek şekilde ve etkilere karşı toksinleri nötralize ederek, bakteri veya hücrelere yapışarak ve çözünebilir antijenleri çökeltirerek harekete geçerler [7].

Affinite bağlama esaslı impedimetrik biyosensörler, hızlı olmasının yanı sıra direkt ve etiketsiz elektrokimyasal immunosensörlere olanak sağlaması, çoklu-analit sensörler geliştirilebilmesi gibi potansiyel avantajlarından dolayı yoğun ilgi görmektedirler [25]. İmmüsensörler genellikle iki immobilizasyon stratejisi ile hazırlanır; a) ilgili antijeni bağlayan antikorların veya reseptörlerin elektrot yüzeyine immobilizasyonu b) antijenin kendisinin immobilizasyonu. Her iki durumda da, bağlanma olayı elektriksel yüzey özelliklerinin değişimiyle sonuçlanacak olmasına rağmen, ikinci durumda (antijen immobilizasyonunda) antikorların yüksek molekül ağırlıkları ve düşük dielektrik katsayılarından ötürü daha büyük değişimler açığa çıkarabilir ki bu impedimetrik olarak çok daha etkili bir şekilde izlenebilir [37, 38, 39].

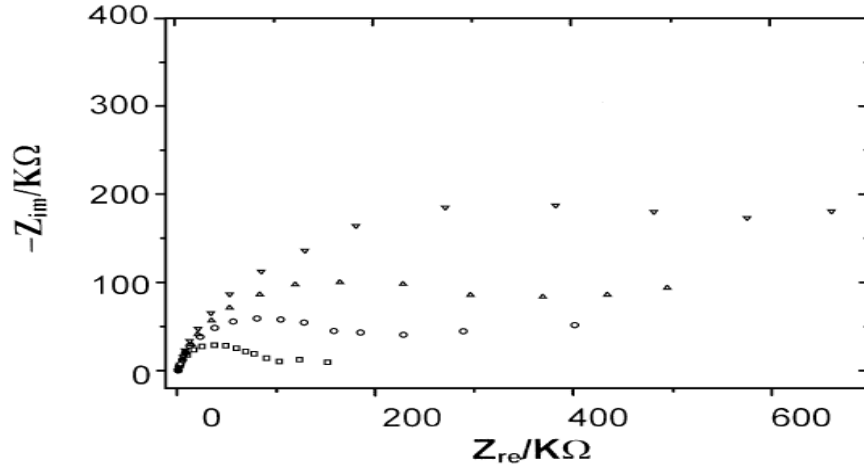
Spesifik etkileşimlere benzer yollarla kapasitansı etkileyen non-spesifik bağlanmaların etkisinin önüne geçmek için, ölçümlere diferansiyel bir mod önerilmiştir. Antikorlar bağlanma özellikleri korunarak Langmuir-Blodgett filmlerine birleştirilebilir ve oldukça düzenli algılama yapıları elde edilebilir. İnterleukin-6 için, epoksisilan işlevselleştirilmesi kullanılarak veya interferon- γ için SAM modifikasyonu ile antikor immobilizasyonunda oldukça hassas kapasitif ölçümler gerçekleştirilmiştir [40,41].

Bunun yanı sıra, direnç temelli sensörler de geliştirilmiştir. Örneğin, insan meme tümörü ilişkili glikoprotein, spesifik antikorların altın yüzeye SAM ile immobilizasyonu sonucunda belirlenmiştir. Komplementer antijenin bağlanması, R_{ct} 'nin değişmesine sebep olur. Direnç temelli ölçüm yöntemleri, reseptör-ligand etkileşimleri, patojen mikroorganizmaların belirlenmesi ve tat-koku moleküllerinin tayin edilmesinde de kullanılır. İmmün analizler için bir diğer sistem, çok ince platin tabakaların kullanıldığı ve impedans model analizlerinin temel alınıp iletkenlik değişimlerinin değerlendirildiği sistemlerdir. Polipirol gibi iletken polimerler kullanılarak algılama biriminin immobilizasyonunda özel yaklaşımlar sergilenmesi, söz konusu immünosensörlerin hassasiyetini iyileştirilebilir. Polimerik ağın iletkenliği, bağlanma olaylarının oluşturduğu konformasyonel değişikliklerden güçlü bir şekilde etkilendiği için alınan cevap yükselir. Ayrıca biyotinli polipirol filmler, biyotinli antikorların avidin ile immobilizasyonunda kullanılmıştır [42, 43, 44].

Ma ve ark. insan meme kanserine ilişkin glikoproteinin tayinine yönelik bir impedans immünosensörü çalışması yayınlamışlardır. Bu çalışmada antikor, altın elektrot yüzeyine kendiliğinden adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edilmiştir. Elektrokimyasal karakteristiklerdeki değişim, spesifik antijen bağlandığı sürece gerçekleşmiştir. Nyquist eğrisindeki yarım daireden hesaplanan R_{ct} , kararlı bir antijen-antikor kompleksi olduğundan dolayı artmıştır [45].

İletken polimerler biyomoleküllerin immobilizasyonu için iyi bir matrikstirler. İletken polipirol (PPy) film üzerindeki antikor-antijen etkileşimlerinin mekanizması araştırılmıştır [46]. Heterojen polimerik ara yüzey içerisindeki yük oluşumunun ve taşınmasının teorisi, antikor-antijen bağlanması sırasında oluşan yük transferini açıklamak için öne sürülmüştür. Bu mekanizmaya göre, antikor immobilize edilmiş iletken polimer elektrotlarda elde edilen yük transferi, dört adımda ortaya çıkar: (1) iyonların elektroda difüzyonu; (2) porlu PPy/membran ara yüzeyinde yük transferi; (3) polimer PPy membran boyunca göç; (4) Antijenin PPy ara yüzeyinde adsorpsiyonu veya desorpsiyonu. Dördüncü adımdaki adsorpsiyon ve desorpsiyon süreci, hız sınırlayıcı adımdır. Bu adım uygun elektriksel potansiyel seçimi ile kontrol edilebilir. Bu da antikor-antijen etkileşiminin, uygulanan potansiyelden büyük ölçüde etkilendiğini göstermektedir [25].

Elektrobiriktirme ile oluşturulmuş biyotinli polipirol filmler de, impedimetrik immunosensörler için bir immobilizasyon matriksi olarak tanımlanmıştır. Ouerghi ve ark. biyotinlenmiş antikor (anti Human IgG) iletken polimer üzerindeki serbest biyotin gruplarına avidin vasıtasıyla bağlanır. Şekil 2.9’da gösterildiği gibi, Nyquist eğrilerindeki ikinci yarım daire çapı, özellikle de konsantrasyon bağımlı impedans ölçümlerinde tercih edilen düşük frekanslarda, artan antijen konsantrasyonu ile artmıştır. Bu immobilizasyon yöntemi tekrarlanabilir ve kararlı bir sisteme olanak sağlamaktadır. Biyosensörün doğrusal aralığı 10-80 ng/mL antijen ve tayin limiti 10 pg/mL’dir [47].

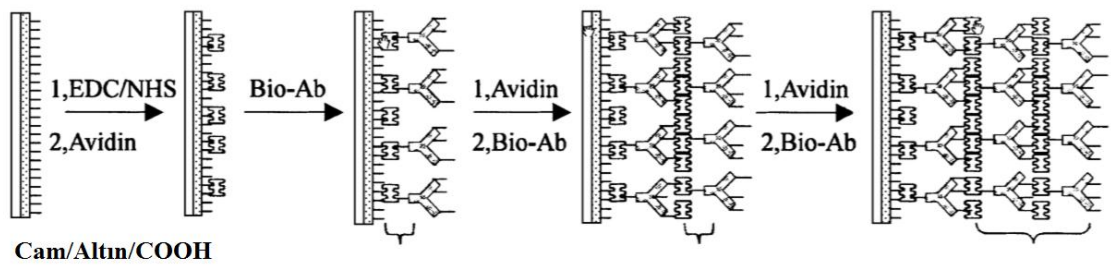


Şekil 2.9. Bir antikor ile modifiye edilmiş elektrodun, antijensiz ve antijen ilave edildikten sonra elde edilen kompleks Nyquist diyagramları [47]

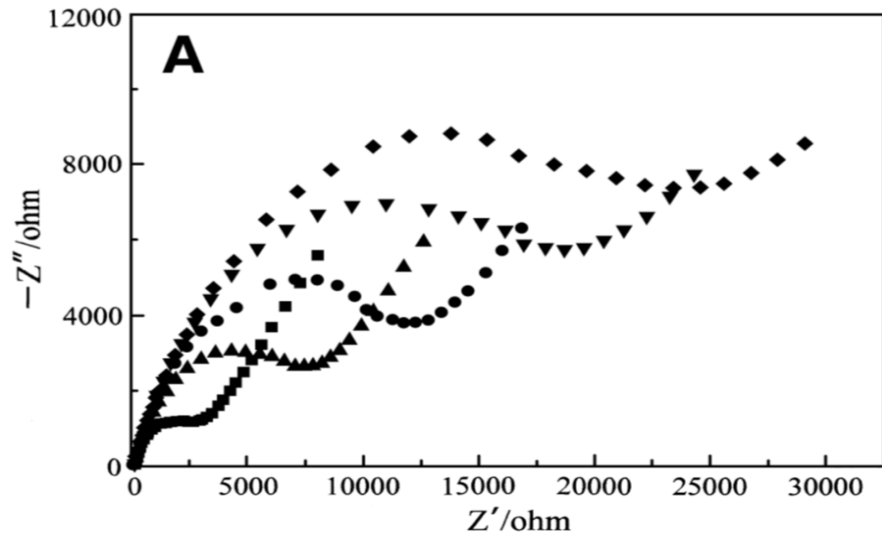
Başka bir polipirol immobilizasyon matriksi kullanılan çalışma da, Geoffrey ve ark. tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada impedans temelli reaktifsiz biyoaffinite biyosensörü geliştirmiştir. Antikor yüklenmiş polipirol filmlerde, düşük frekanslarda polaronik iletim ve yüksek frekanslarda elektriksel iletim olmak üzere iki tane yük transfer prosesi gözlenmiştir. Affinite reaksiyonu Bode eğrisinde hiçbir farklılaşmaya sebep olmamıştır. Ancak, Redoks döngüsü (-0,1’den -0,9’a ve -0,9’dan -0,1’e) olduğunda, pik polaronik faz açısı olarak gözlenen muhtemel bir bağlanmaya bağlı cevap oluşur. Bu sonuç, bağlanma sonrasında protein etrafındaki polimer zincirin tekrardan sıralanmasına dayandırılmaktadır [48].

Protein çoklu tabakalar da redoks probu varlığında impedans spektroskopisi ile araştırılmışlardır. Bu prensibin kullanıldığı bir çalışmada çoklu tabaka film, tabaka-

tabaka oluşturma yöntemiyle hazırlanan bir altın tabaka üzerinde avidin ve biyotin işaretli antikorla (bio-Ab) oluşturulmuştur (Şekil 2.10a). Çoklu tabakaların adım adım oluşumu esnasında impedans spektrumlarında önemli bir değişiklik gözlenmiştir. Bio-Ab ve avidinin her ikisi de yalıtkan olduğundan ve bunların çoklu tabaka filmleri $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ redoks probunun elektron transferini bloke ettiğinden R_{ct} değeri gitgide artar (Şekil 2.10b). R_{ct} ve tabaka sayısı arasındaki lineer ilişki, avidin/bio-Ab çoklu tabaka filmlerin düzgün yapılarına işaret etmektedir [49].

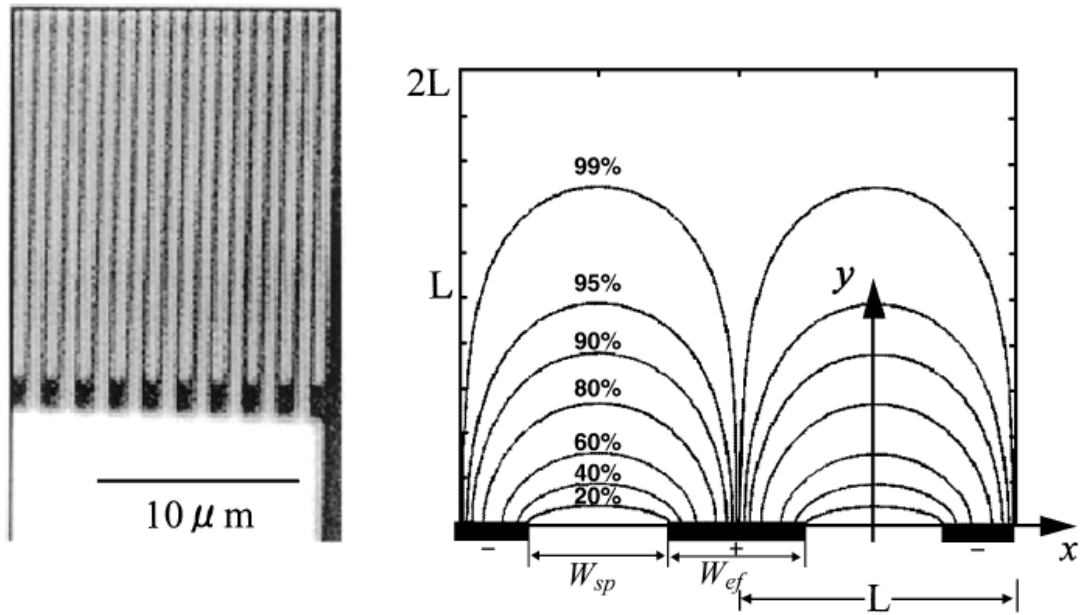


Şekil 2.10a. Çoklu protein tabakaları immobilizasyon basamaklarının şematik gösterimi [49]



Şekil 2.10b. Artan tabaka sayısına karşı elde edilen kompleks impedans spektrumları [49]

Nano boyutlarda sensör geliştirmek, impedimetrik biyosensörlerin cevap performansını arttırabilir. Van Gerven ve ark. nano boyutta kenetlenmiş (interdigitated) elektrot dizileri (array) ile impedimetrik biyosensörler geliştirmişlerdir (şekil 2.11). Bu sistemde 500 nm'den 250 nm'ye kadar değişen elektrot genişliği ve boşlukları elde edilmiştir. Nano boyutlardaki elektrotlar, yüzeyden sadece 100 nm yukarıdaki bir alanı tararlar. Bundan dolayı diğer elektrotlara kıyasla duyarlılıkları daha fazladır. Bu etki teorikte, kenetlenmiş elektrotlar arasındaki elektriksel alanın hesaplanması ile değerlendirilebilir. Örneğin genişliği ve aralıkları 250 nm olan elektrotlar için akımın % 80'i yüzeyden 250 nm daha yüksek olmayan bir tabakaya yayılır. Farklı KCl çözeltilerindeki model ve karakterizasyon çalışmaları, impedansın tamamının yüzeye yakın bir bölge için hesaplandığını ve çözelti karakteristiklerinin sinyalde gözükmediğini göstermiştir. Biyomoleküler yapıların, affinite bağlanmalarının impedans ile saptanması için, glukoz oksidaz, silanlanmış bir yüzeye bağlanmıştır [50].



şekil 2.11. IDE'nin SEM görüntüsü ve IDE'nin hesaplanan akım kapasitesi [50]

Biyolojik reseptörlerin biyosensörlerde kullanımının, biyolojik maddelerin düşük kararlılığı, küçük antijenleri için antikor oluşturulmasının zorlukları ve düşük kimyasal-thermal kararlılıklar gibi iyi bilinen sınırlayıcı faktörleri vardır. Bundan dolayı doğal

reseptörleri taklit edebilen, yapay reseptörlerin geliştirilmesine yönelik yeni eğilimler ortaya çıkmaya başlamıştır. Moleküler baskılanmış polimerler (MIPs) kararlı ve dirençli, ekstrem basınç, sıcaklık, pH altında veya organik çözücüler içerisinde kolaylıkla uygulanabilen materyallerdir. Kimyasal yapılarından ötürü, farklı formatlarda tekrar üretilirler ve farklı çevresel koşullarda uzun zaman kararlı kalabilirler. Kromatografik ayırmalarda kullanılmalarının yanı sıra, sensör uygulamalarına dair de ilginç çalışmalar mevcuttur. İnce yüzey filmleri özellikle bağlanma olayının impedimetrik transdüksiyonuna çok uygundur. Bu sayede, hücre ve virüslerde olduğu gibi organik moleküller için de kapasitif (sığasal) sensörler geliştirilmiştir. Ayrıca ucuzdurlar ve katı (kuru) halde saklanabilirler. MIPs sadece pestisit, aminoasit, steroid ve şekerler gibi organik moleküller için değil; hücre ve proteinler için de sentezlenebilirler [51]. Panasyuk-Delanet ve ark. 2001 yılında yaptıkları MIPs temelli bir çalışmada herbisit olan “desmetrini” kalıp olarak kullanmışlardır. UV ışığa maruz kalan benzofenonun ışığı adsorblamış tabakası, yüzeye yakın bölgede radikal polimerizasyonunu başlatır. Elektrotların, desmetrini spesifik bir şekilde tanıyan ve bağlayan MIPs ile kaplanması, elektrodun kapasitansında düşmelere sebep olur. Terbumeton veya atrazin eklendiğinde kapasitansta küçük bir düşme varken, metribuzin eklendiğinde desmetrininkine benzer bir düşüş gözlenir. Kalıp polimerizasyonu da denilen moleküler baskılama, ümit vaat eden ve pahalı olmayan bir alternatif yöntemdir. Ancak analitlerin ince MIPs içerisine yavaş difüzyonu, yavaş reaksiyon kinetiğinin oluşmasına sebep olur [52].

2.5.3. Nükleik asit temelli impedimetrik biyosensörler

Tek iplikli bir nükleik asit molekülü, örnekteki kendi tamamlayıcı eşini tanıma ve ona bağlanma (hibridize) kabiliyetine sahiptir ki bu özellik bir biyosensörde gen proplarında kullanılabilir. Bundan dolayı, bir nükleik asit probu, nükleik asidin özellikle tanımlayan ve iki nükleik asit dizisinin arasındaki kararlı hidrojen bağlarının oluşumuna bağlı olarak hedef nükleik asit bağlayan bir alt bölümüdür [53].

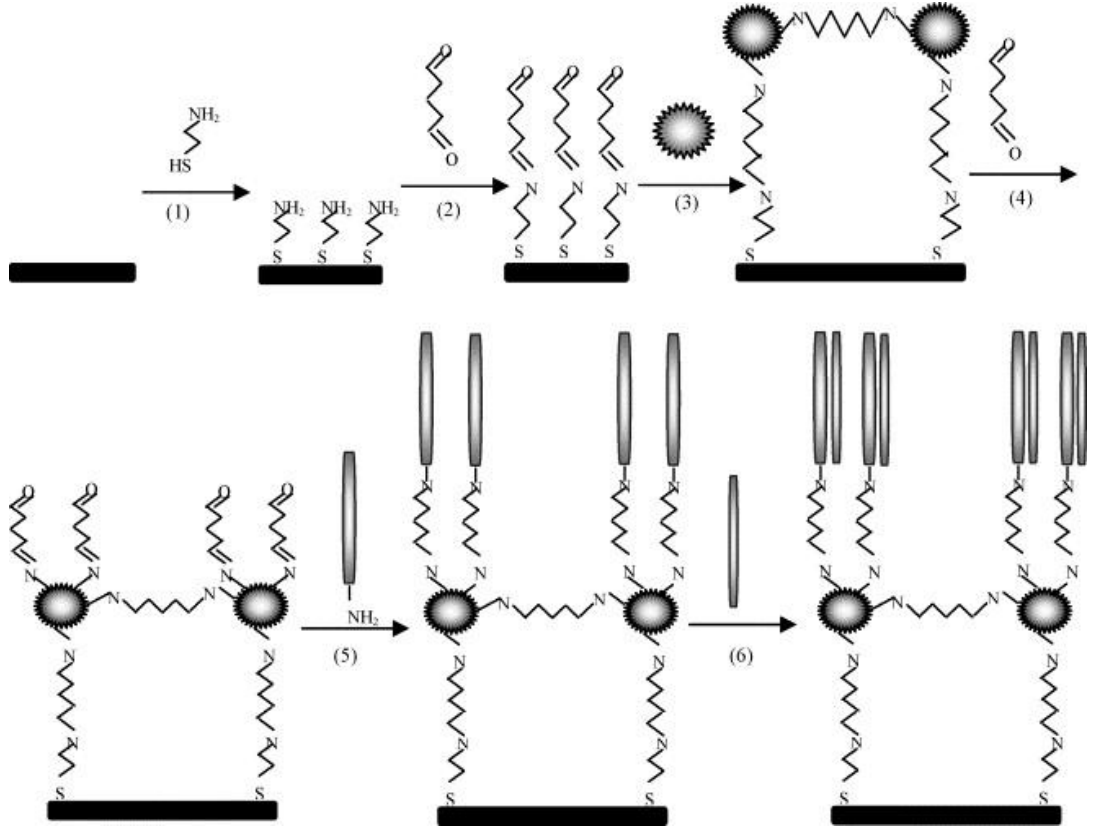
Son zamanlarda, aptamerler, yani diziliş havuzlarından rastgele seçilen belirli nükleik asitler biyosensörlerde biyoalgılama materyali olarak kullanılmıştır. Aptamerler, yüksek afinitiyeye sahip küçük moleküller ve proteinler gibi nükleik olmayan asit hedeflerini bağlama kabiliyetine sahiptir [54].

Nükleik asit temelli impedimetrik biyosensörlerde, hedef molekül bir DNA ise onun eşlenik baz dizisi; ilaç, zehir, protein gibi bir molekül ise ona özgü sentezlenen aptamer elektrot yüzeyine çeşitli immobilizasyon teknikleri ile bağlanır [55].

Tek iplikli ve çift helikal nükleik asit konformasyonları arasındaki farklılıkları algılamada asma civa damla elektrot kullanılmaktadır. Elektrot çift tabakasının impedansının, frekans bağımlılığı kompleks bir impedans eğrisi gösterdiğinden, DNA kaplı elektrodun elektrik eşdeğer devre modeli belirlenebilir. Denatüre ss-DNA'nın desorpsiyonu, ds-DNA'nın desorpsiyonuna nazaran daha yüksek bir dielektrik kayba neden olur. Bu ss-DNA'nın, ds-DNA'dan daha esnek olması ile açıklanır [56].

Deng ve ark. geliştirdikleri biyosensör sistemi ile Dang Hummasına sebep olan vektörü 10^{-12} - 10^{-6} M aralığında impedimetrik yöntemleri kullanarak tayin edebilmişlerdir. Bu çalışmada alüminyum oksit membranın her iki tarafını da Pt elektrot ile kaplayıp, vektör DNA'sının eşlenik baz dizisini bu yüzeye bağlayarak biyosensör sistemini oluşturmuşlardır [57].

Yüzeyde SAM tabakası oluşturarak eşlenik DNA'nın yüzeye bağlanmasıyla geliştirilmiş biyosensör örnekleri de mevcuttur. Li ve ark. geliştirdikleri biyosensör sisteminde, sisteamin ile Au elektrot yüzeyinde SAM oluşturup, PAMAM ile yüzey alanı genişletilerek eşlenik DNA'yı immobilize etmişlerdir (Şekil 2.12). Bu biyosensör sistemi ile impedimetrik yöntemleri kullanarak, hedef DNA'yı 10^{-11} - 10^{-8} M aralığında tayin edebilmişlerdir [58].



Şekil 2.12. Li ve ark. yaptığı immobilizasyonu sisteminin şematik gösterimi [58]

Elektrot yüzeyinde tek iplikli veya çift iplikli DNA'nın bulunması durumunda, farklı moleküler yapılar, farklı spektroskopik ve mikroskopik yöntemlerle tayin edilmiştir. Bu durum, oligonükleotit konsantrasyonunun ve baz çifti uyumsuzluklarının impedimetrik yöntemle belirlenmesinin temelini oluşturmaktadır. Özellikle DNA tayininde, hibridizasyon boyunca meydana gelen yük birikimi, redoks aktif bir maddenin dönüşümünü gerçekleştirmek için kullanılmıştır. Bu tür biyosensörlerde hassasiyeti arttırmak için sinyal yükseltici bir molekül kullanılabilmektedir. Prob DNA'nın yüzey konsantrasyonu, sensör performansında önemli bir etkiye sahiptir. Performans, dendrimerlerin kullanılmasıyla da kuvvetli bir şekilde artırılabilir. Polielektrolit ile modifiye edilen screen-printed elektrotların da bu çalışmalar için bir alternatif olduğu ve tanıyıcı moleküller olarak ss-PCR ürünleri ile birlikte kullanıldığı da gösterilmiştir. Bu alanda, kapasitif ölçümlerin, direnç temelli metotlara göre daha düşük hassasiyette olduğu bulunmuştur [59,60].

2.5.4. Hücre ve mikroorganizma temelli impedimetrik biyosensörler

Maddelerin biyolojik etkilerini geniş bir alanda gözlemlemek ve spesifik analitlerin tayini için hücre temelli analizlerde son zamanlarda hızlı bir artış vardır. Herhangi bir hücre ya da mikroorganizma durumunda, tüm biyolojik sistemin cevabını rapor edebilecek parametrelere ihtiyaç duyulur. İmpedans bu parametrelerden biridir; çünkü metabolik aktivite, yüzeydeki hücre adezyonu, potansiyel ilaçlardan alınan yanıt ve sitotoksitite testlerinin indirekt analizinde kullanılabilmektedir [61,62]. Hücre kültüründe veya tek bir hücreye ait çalışmalar literatürde mevcuttur. Örneğin, insan kolon kanseri HT-29 hücre şeklinin apoptosis uyarımlı değişiklikleri de bu şekilde araştırılmıştır [63].

İmpedans, sadece yüzeyde sabit hücreler hakkında bilgi edinmek için değil aynı zamanda çözeltideki hücrelerin sayısını belirlemek için de kullanılır. Bu yöntemin yoğun bir şekilde, mikrobiyolojide bakterilerin tanımlanmasında, sayımında ve belirlenmesinde kullanıldığı rapor edilmiştir. İmpedans ayrıca, spesifik bakteriyal hücreler, antikorlar ve bakteriyofajlar için de kullanılabilmektedir. İmpedimetrik analiz lösemi hücrelerinin belirlenmesinde de kullanılmıştır [64,65,66].

2.6. Hormonlar

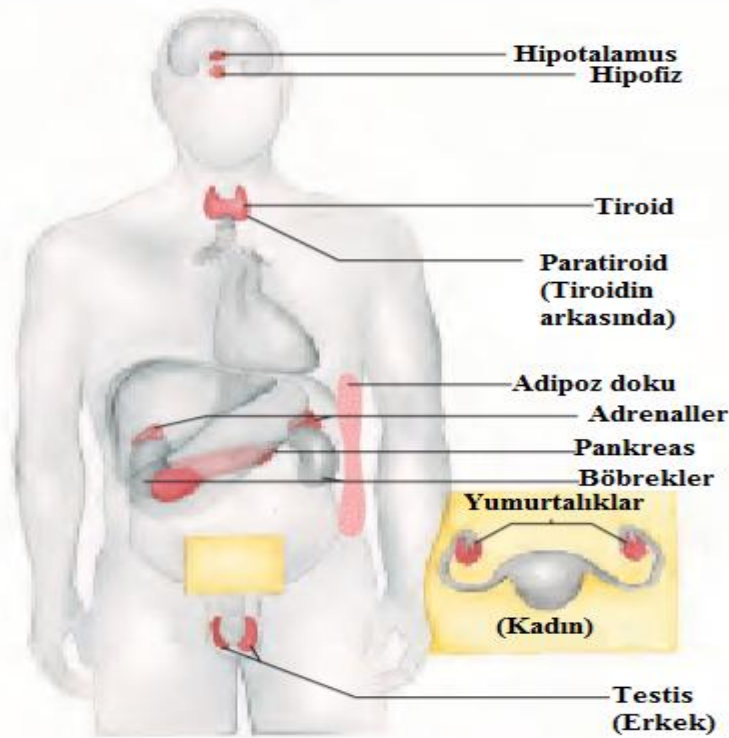
Beden fonksiyonları başlıca iki büyük sistem tarafından uyarılır. Bunlardan ilki sinir sistemi, ikincisi ise endokrin sistemdir. **Sinir sistemi** veya **sinir ağı**, canlıların içsel ve dışsal çevresini algılamasına yol açan, bilgi elde eden ve elde edilen bilgiyi işleyen, vücut içerisinde hücreler ağı sayesinde sinyallerin farklı bölgelere iletimini sağlayan, organların, kasların aktivitelerini düzenleyen bir organ sistemidir. **Endokrin sistem**, dolaşım sistemine bazı kimyasallar salgılamak suretiyle hedef hücreleri etkiler. Endokrinoloji ise endokrin bezleri ve bu bezlerden salgılanan hormonları inceleyen alandır. [67].

Hormonlar özel bezler tarafından kana salgılanan ve kan yolu ile ulaştıkları doku ve organlarda fonksiyon düzenleyici bir etki meydana getiren ve çok düşük miktarları ile görev yapan organik bileşiklerdir. Hormon terimi ilk kez 1902 yılında Bayliss ve Starling tarafından kullanılmıştır. Latince hormaein=uyarma (harekete geçirme) anlamına gelmektedir [68]. Kompleks bir organizmada neredeyse her süreç hormonlar tarafından düzenlenir. Kan basıncının korunması, kan hacmi ve elektrolit dengesi;

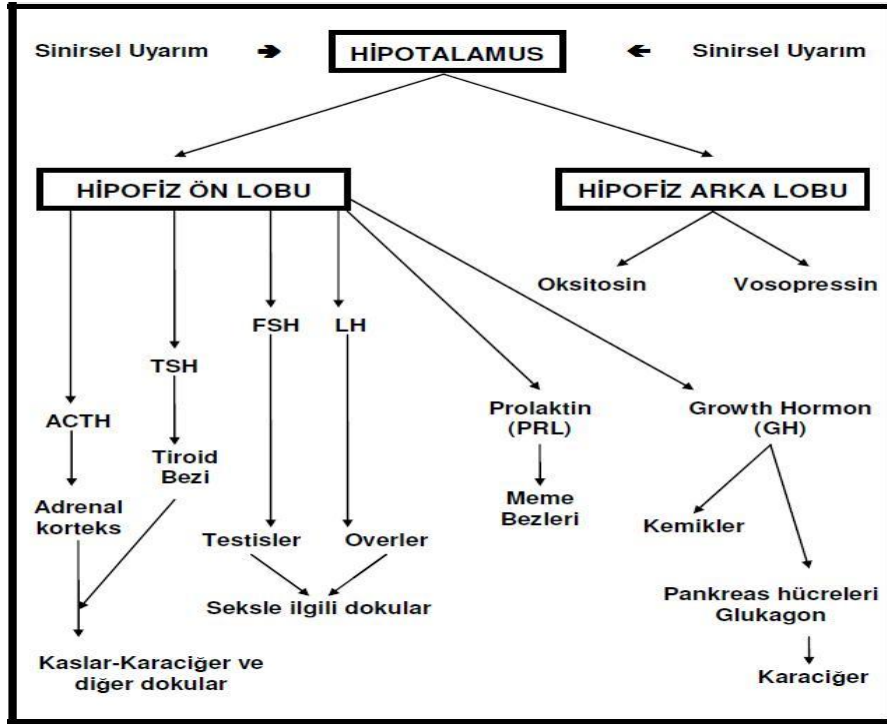
embriyojenez; cinsel farklılaşma, gelişim ve üreme; açlık, yeme davranışları, sindirim ve yakıt dağılımı bunlardan yalnızca bir kaçıdır [69].

Hormonların yapım ve kana salınımları hiyerarşik bir kontrol mekanizmasına bağımlı olarak meydana gelir. Genel olarak hormonların büyük bir bölümü yukarıdan aşağı doğru sıralanan kontrol mekanizmasına bağımlı olarak kana salınırlar [68].

Şekil 2.13’ de insanlardaki başlıca endokrin bezlerinin anatomik dağılımı ve Şekil 2.14’de ise hormonların kontrol mekanizması gösterilmektedir. Beynin küçük bir bölümü olan hipotalamus endokrin sistemin koordinasyon merkezidir. Merkezi sinir sisteminden gelen mesajları alır ve entegre eder. Bu mesajların üzerine hipotalamus düzenleyici hormonları (releasing faktör) üretir [69]. Salınan bu hormonlar, sinir lifleri aracılığı ile beyin orta yerinde bulunan hipofiz bezinin ön lobuna ulaşır ve buradan spesifik bir hormonun salınımına yol açar. Hipofiz bezinden salınan hormonlar ise kan yolu ile hedef dokulara kadar giderek özel görevlerini yaparlar. Bu görev çoğu kez hedef dokunun kendi özel hormonunun yapım ve salınımını uyarma biçimindedir. Bazı hormonlar ise, bu hiyerarşik sisteme bağlı olmaksızın görev yaparlar veya bunların salınımları ve etkileri bu sisteme çok daha az bağımlıdır. İnsülin, epinefrin, glukagon bunlara örnektir [68].



Şekil 2.13. Vücuttaki iç salgı bezleri [69]



Şekil 2.14. Hormonların kontrol mekanizmaları [68]

2.6.1. Hormonların sınıflandırılması

Sentezleri belirli organlarla sınırlı olmadığı ve hormon kavramı yeterli nitelikte diğer endojen maddelerden ayrılmadığı için hormonların sınıflandırılması güçtür. Bunun için farklı araştırmacılar değişik sınıflandırmalar yapmaktadırlar [68].

2.6.1.1. Kimyasal yapılarına göre hormonların sınıflandırılması

Steroid Yapılı hormonlar: Adrenal kortikoidler, kortizol, aldosteron, Androjenler; testosteron, dehidroepiandrosteron (DHEA), androstendion, dihidrotestosteron. Östrojenler; östradiol, östron, östriol. Progestajenler; progesteron [67].

Polipeptid yapılı homronlar: İnsülin, glukagon, parathormon, oksitosin, vazopressin, bağırsak mukozasında salgılanan çoğu hormonlar ve hipofiz bezinin ön lobundan salgılanan tropik hormonların bir kısmı bu gruba girer [68].

Aminoasit türevi hormonlar: Tek bir aminoasitten sentezlenirler. Epinefrin, tiroksin, adrenalin, melatonin, serotonin bu gruba girer [67,68].

Doymamış yağ asidi türevi hormonlar: Düz kasları uyarıcı, özellikle uterus kontraksiyonlarını başlatıcı etkiye sahip, vücudun çeşitli organ, doku ve salgılarında bulunan yağ asidi ve türevlerinden ibaret bileşikler grubudur. Eikozanoidler olarak da bilinirler [67].

2.6.1.2. Çözünürlüklerine göre hormonların sınıflandırılması

Hidrofilik hormonlar: Suda çözünen hormonlardır. Aminoasit türevi hormonlar, peptid ve protein yapılı hormonlar bu gruba girer. Suda çözünen hormonlar taşıyıcı sistemle hedef dokulara daha kolay ulaşırlar [70].

Lipofilik hormonlar: Lipidte çözünür hormonlardır. Steroid yapılı hormonlar, tiroid hormonları, retinoidler, vitamin A ve vitamin D gibi metabolitler bu gruba girer [70].

2.6.1.3. Sentezlendikleri yere göre hormonların sınıflandırılması

Hipotalamus hormonları: Merkezi sinir sisteminden gelen uyarılara karşı hipotalamustan releasing faktör (salgılayıcı faktör) denilen düzenleyici hormonlar üretilir. Bunlar hipotalamus salıverme ve inhibitör faktörleri olarak bilinir [69].

Hipofiz bezi hormonları: Ön hipofiz (adenohipofiz) hormonları; adreno kortikotropik hormon, tiroid uyarıcı hormon (TSH), folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH), prolaktin, somatotropin (GH); Arka hipofiz (nörohipofiz) hormonları; oksitosin ve vazopressindir.

Tiroid bezi hormonları: Tiroksin (T4), triiyodotironin (T3)

Paratiroid bezi hormonu: Parathormon.

Pankreas hormonları: İnsülin, glukagon, somatostatin.

Böbrek üstü bezi hormonları: Kortizol, kortikosteron, aldosteron.

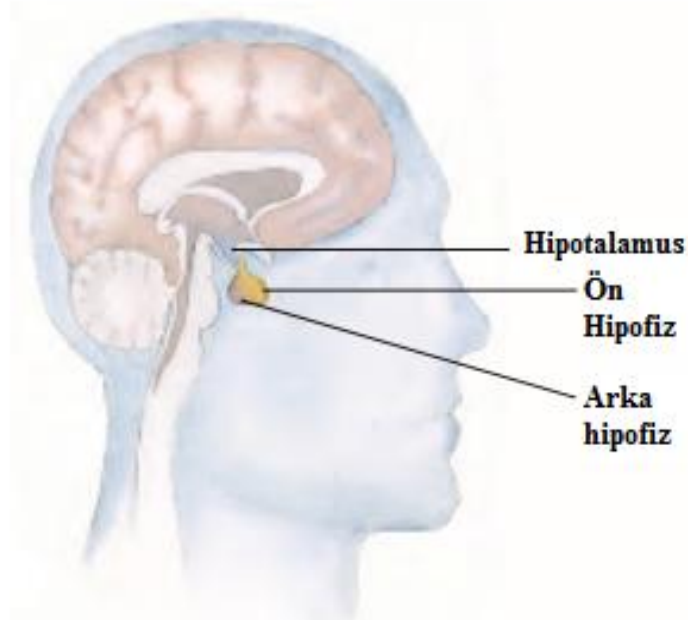
Cinsiyet bezleri hormonları: Progesteron, östrojen, testosteron.

2.6.2. Hipofiz bezi

Omurgalı anatomisinde, hipofiz bezi insanlarda yaklaşık 0.5 gram civarında fasulye büyüklüğünde bir endokrin bezdir. Beynin tabanında hipotalamusun alt kısmında bir çıkıntı şeklindedir [71]. Hipofiz bezi Sella tursika (Türk Eğrisi) diye adlandırılan kemik boşluğu içine yerleşmiştir [68]. Ön hipofiz (adenohipofiz) pek çok fizyolojik süreci (stres, büyüme, üreme, emzirme vb.) düzenleyen kısımdır. Orta lob melanosit uyarıcı hormon sentezler ve salınımını sağlar. Arka hipofiz (nörohipofiz) hipofiz sapı olarak adlandırılan küçük bir tüp yoluyla hipotalamusa bağlanmıştır (Şekil 2.15).

Nörohipofiz hipotalamusta başlayan pek çok nöronun aksonal ucunu bulundurur. Bu nöronlar kısa peptid yapılı hormonlar olan oksitosin ve vazopressini üretir [69].

Adenohipofiz kanda taşınan hipotalamik hormonlara tropik hormonlar (adrenokortikotropik hormon (ACTH), tiroid uyarıcı hormon (TSH), luteinleştirici hormon (LH), folikül uyarıcı hormon (FSH), somatotropin (GH), prolaktin) üreterek yanıt verir. Bu uzun zincirli polipeptitler adrenal korteks, tiroid bezi, yumurtalıklar ve testisler gibi bir sonraki kademe endokrin bezleri aktive eder. Bu bezler sırayla kan dolaşımıyla hedef hücrelerdeki reseptörlere taşınan spesifik hormonlarını salgılar [69].



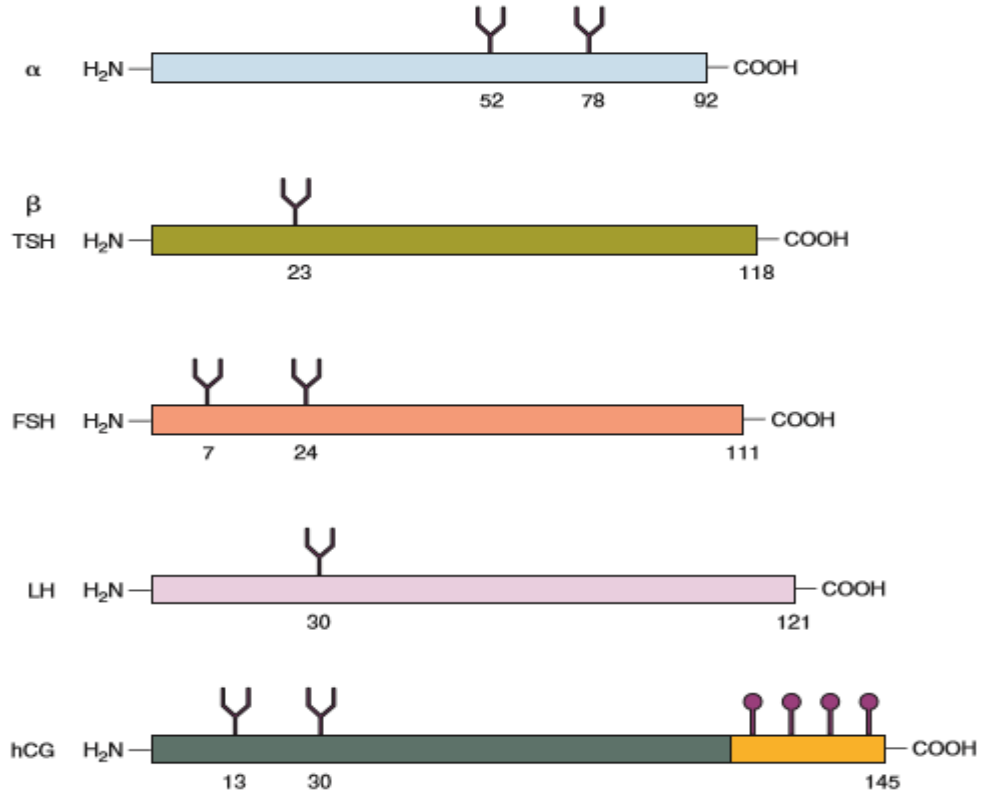
Şekil 2.15. Hipotalamus ve hipofiz bezinin konumu [69]

Hipofiz bezinde meydana gelen iyi ya da kötü huylu tümörlerin dokuya baskı uygulaması gibi çeşitli sebepler hipofiz bezinin yeterli çalışamamasına ve salgılanan hormonlarda eksikliğe neden olabilir. Bu durum hipofiz yetmezliği olarak adlandırılır.

2.6.3. Luteinleştirici hormon

Hipotalamus-hipofiz-gonadal (HHG) eksenini fetal gelişim, ergenlik, menstrual döngü, hamilelik, doğum sonrası ve menopoza gibi memelilerde üremenin tüm fazında önemli rol oynar. Doğurganlık bu eksenin hassas hormonal düzenlenmesine bağlıdır. Bu hassas hormonlardan en önemli ikisi, gonadotropinler olarak da bilinen, luteinleştirici hormon ve folikül uyarıcı hormon, yalnızca hipofiz bezinin gonadotrop hücrelerinde üretilirler. Hipotalamustan gonadotropin salıverici hormona (GnRH) cevaben kan dolaşımına salınırlar [72,73].

Luteinleştirici hormon (LH), lutropin olarak da bilinen [74], heterodimerik bir glikoproteindir. Yaklaşık molekül ağırlığı 28.5 kD olan LH'nin yarılanma ömrü 20 dakikadır [75]. Her bir monomer birimi, diğer glikoprotein hormonlara (FSH, TSH, hCG) benzer olarak, bir alfa ve bir beta alt birimi içeren glikoprotein moleküldür. Bu hormonlar aynı α -alt birimini paylaşırken β -alt birimleri spesifik olarak farklılık gösterirler. α - ve β - alt birimlerinin her biri disülfid bağlarıyla stabilize edilmiştir ve bu bağların indirgeyici ajanlarla bozulması, peptit zincirlerinin iç konfigürasyonunu değiştirir ve bu da heterodimerin ayrılmasına sebep olur [74,76]. 92 aminoasitlik α -altbirimleri iki N-bağlı karbonhidrat bölgesi içermektedir. Bu karbonhidrat bölgeleri 52. ve 78. aminoasitlere bağlı asparajin N-bağlı oligosakkaritlerdir. β -altbirimleri ise bir veya iki N-bağlı karbonhidrat içerirler (Şekil 2.16). LH β -altbirimi 30. aminoasitte asparajin N-bağlı oligosakkarit taşır [76, 77, 78].



Şekil 2.16. Hipofiz glikoprotein hormonların altbirim yapıları

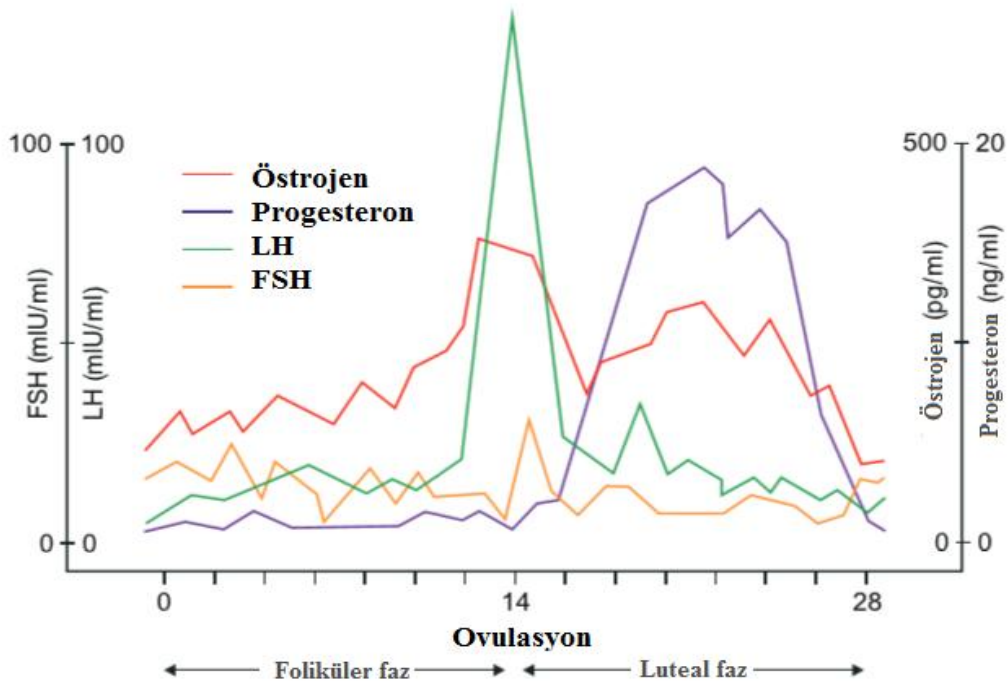
LH üreme sisteminin işleminde ve gelişiminde önemli rol oynar. Normal cinsel fonksiyonlar ve doğurganlık için gerekli olan LH erkeklerde testosteron üretimini uyarırken kadınlarda androjen ve progesteron üretimini uyarır ve yumurtlamayı (ovulasyon) tetikler [79].

Kadınlarda ön hipofiz bezinin gonadotropik hücreleri yumurtlamayı düzenleyici LH'ı üretir. Normal menstural döngü boyunca, LH'daki ani artış baskın folikülden yumurtlamayı başlatır. LH tekal hücrelerde androjen üretimini uyarınca, bu süreç mid-foliküler fazı (yumurtlama) başlatır. Androjenler granüloza hücrelerinde aromatik hale getirilerek östrojeni oluştururlar. Uzun süreli, sürekli östrojen seviyeleri hipofiz bezinde ve sonrasında yumurtlamayla sonuçlanan LH artışında pozitif feedback meydana getirir [80]. Yumurtlama sonrası LH korpus luteum gelişimini destekleyen progesteron üretimini artırır [81].

LH salınımı, yarı ömürleri ve biyolojik aktiviteleri kadınlarda ve erkeklerde yaşam döngüleri boyunca farklılık göstermektedir. Bu durum gonadotropinlerin post-

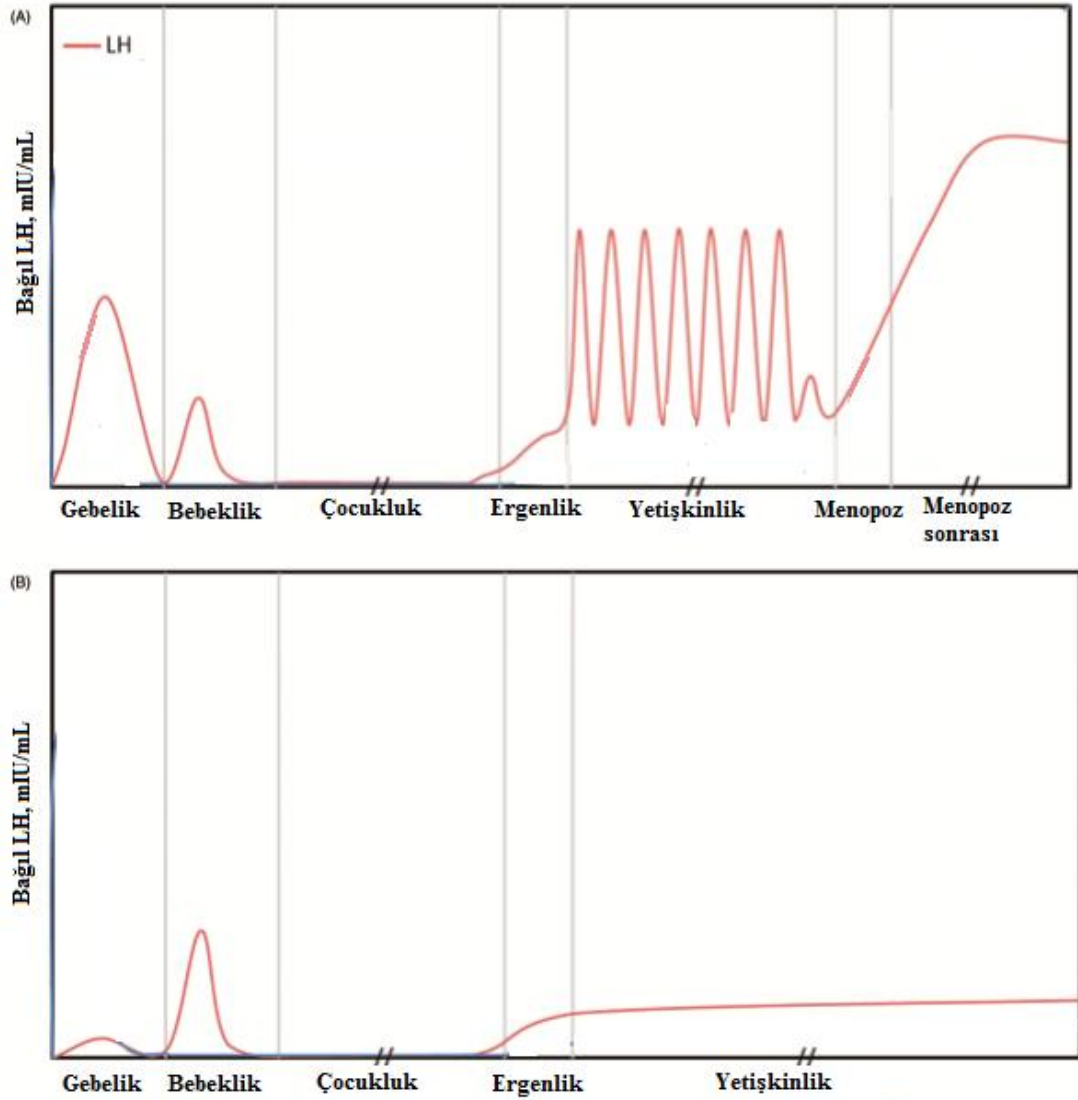
translasyonel süreçlerindeki değişim ile açıklanabilir. Yapılan araştırmalarda foliküler faz, mid-foliküler faz ve luteal faz boyunca gözlemlenen menopoz öncesindeki kadınlardakine nazaran menopoz sonrasındaki kadınlarda LH yarı ömrü artmaktadır [82,83]. Gonadotropin yarı ömrünün uzaması muhtemelen artan terminal sialik asit ve sülfat kalıntısı ile ifade edilir. [84,85]. Fakat post-translasyonel süreçteki bu değişimin gonadal hormonların etkisiyle de ilişkili olabildiği düşünülmektedir. Örneğin; östrojenin gonadotropin oligosakkaritlerine sialik asit ilavesini inhibe ettiği görülmektedir ki böylece muhtemel glikozilasyon uyarımı ile yarı ömrü azalır, fakat biyolojik aktivitesi artar [86]. Yaşlanmadaki birincil etki olan post-translasyonel modifikasyon ve/veya gonadotropin salınımı göz ardı edilemese de ilerleyen çalışmalarda bu mekanizmaların daha açık bir şekilde ortaya konulması gerekmektedir [87].

LH izoformlarının yapısı, yaşam süreleri ve biyolojik aktiviteleri menstural döngü boyunca farklılık gösterir. Biyolojik aktivitenin immünolojik aktiviteye oranı luteal faz boyunca en düşüktür, foliküler faz boyunca yavaşça artar ve mid-foliküler fazda pik yapar (Şekil 2.17) [88]. Bu durum LH sialilasyonunun ani artışı ve sülfonasyonunun ani düşüşü ile uyumludur [89]. Bu çalışmalar sialilasyonun LH'nin yarı ömrünü uzatırken, sülfonasyonun protein eliminasyonunu hızlandırdığını göstermektedir [90].



Şekil 2.17. Menstrüasyon döngüsünde hormonların etkisi [91]

LH izoform yapılarındaki çeşitlilik üreme ömrü boyunca gözlenmektedir. Genellikle ergenlik sonrası dönemdeki kadınlarda daha kısa yarı ömürlü fakat yüksek biyopotansiyelli LH izoformları mevcutken, menopo z sonrasındaki kadınlarda daha uzun ömürlü LH türleri baskındır [92, 93]. Menopoz sonrası dönemde LH'nin biyolojik aktivitesinin immünolojik aktivitesine oranı artmaktadır [94]. Şekil 2.18'da kadınlarda ve erkeklerde yaşam dönemleri boyunca LH salınımı gösterilmektedir [95].



Şekil 2.18. Kadınlar (A) ve erkeklerde (B) yaşam dönemleri boyunca LH salınımı [95]

İlginç bir şekilde, polikistik over sendromu (PCOS) olan kadınlarda biyolojik aktivitesinin immünolojik aktivitesine oranı yüksek olan LH izoformlarının baskın olduğu görülmektedir [96, 97]. PCOS'lu kadınlardaki LH'nin moleküler analizi,

etkilenmemiş bireylerle karşılaştırıldığında yumurtlama döneminde sülfonasyonda önemli bir azalış, bununla beraber sialilasyonda önemsenmeyecek kadar düşük bir artış açığa çıkmıştır [98].

Erkeklerde LH testisteki Leydig hücreleri tarafından testesteron üretimini uyarır. LH sialilasyon derecesi ve biyolojik aktivitenin immünolojik aktiviteye oranı genellikle erkeklerde menopoz öncesindeki kadınlardan daha iyi durumdadır [98, 99]. Kadınların aksine erkeklerde yaşlandıkça biyolojik aktivitenin immünolojik aktiviteye oranı azalır [100,101]. Obez erkeklerde yarı ömrü daha kısa olan LH türlerine doğru kayma gözlenmiştir ki bu obez bireylerdeki düşük testosteron seviyesinin kaynağı olabilir [102].

LH'ın tayini hipotalamik-hipofizer-gonadal aksın değerlendirilmesi, infertilite, kadınlarda primer gonadal yetersizlik, polikistik over sendromu, menopoz ve hipofiz adenomu, erkeklerde birincil testiküler başarısızlıklar ve hipogonadizm gibi gelişimsel hastalıkların teşhislerinin konulmasında önemli bir rol oynar [103, 104].

LH salınımının yüksek olduğu durumlar [104];

- ✓ Menopoz
- ✓ Hipogonadizm
- ✓ Kastrasyon
- ✓ Gecikmiş ergenlik
- ✓ Hipofizer adenoma
- ✓ Testiküler disgenesis (Klinefelter sendromu)
- ✓ Ovarian disgenesis (Turner sendromu)
- ✓ Polikistik over sendromu
- ✓ Testiküler yetersizlik
- ✓ Anorşi (Testis yokluğu)

LH salınımının düşük olduğu durumlar [104];

- ✓ Primer hipofizer ya da hipotalamik yetersizlik
- ✓ Kallman sendromu
- ✓ Malnutrisyon
- ✓ Stress
- ✓ Anoreksia nevrosa

LH hormonunun kadınlarda ve erkeklerde belirli yaş aralıklarındaki ve belirli dönemlerdeki referans değerleri Tablo 2.4’de verilmiştir.

Tablo 2.4. LH referans değerleri [105]

Erkek (mIU/mL)		Kadın (mIU/mL)	
15 günlük-10 yaş: 0.3-2.8		15 günlük-10 yaş: 0.3-4.0	
11-14 yaş:	0.3-7.9	11-14 yaş:	0.3-12.6
15-16 yaş:	0.5-10.8	15 yaş:	0.5-20.7
17 yaş:	0.9-5.9	16 yaş:	0.9-29.4
18-70 yaş:	1.8-8.6	17 yaş:	1.6-12.4
71 yaş:	1.5-9.3	18 yaş ve daha fazlası	
>71 yaş:	3.1-34.6	Foliküler faz:	2.1-10.9
		Mid-foliküler faz:	20.0-100.0
		Luteal faz:	1.2-12.9
		Post-menopoz:	10.0-60.0

Klinik olarak LH tayini ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay; enzim bağlı immünosorbent deneyi) metodu ile yapılmaktadır. Literatürde LH tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sistemlerine bakıldığında Pritchard ve ark. tarafından geliştirilen amperometrik biyosensörde LH ve FSH kantitatif tayini için bir multianalit immünosensör tasarlanmıştır. Ölçüm altın elektrod yüzeyinde SAM oluşturulup LH’a ve FSH’a özgü antikorların immobilize edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen bu biyosensörde LH tayin sınırı 1.8 U/L’dir [106]. Trevino ve ark. tarafından geliştirilen SPR (Surface Plasmon Resonance) temelli biyosensörde SPR çipi yüzeyinde merkaptoundekanoik asit ile SAM oluşturularak LH’a özgü antikor immobilize edilmiş ve tayin sınırı 1 ng/mL olarak belirlenmiştir ve bu da 8 mIU/mL LH’a karşılık gelmektedir [70].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan Luteinleştirici Hormon (Luteinizing Hormone from human pituitary ≥ 8500 IU/mg) ile bu hormona özgü sentezlenmiş antikor olan Anti-LH (Monoclonal Anti-LH, antibody produced in Mouse), 12-merkaptododekanoik asit (12-MDDA, %96), poliamido amin (PAMAM dendrimeri, generation 2.0), 1-[3-(Dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimit metiodit (EDC), N-Hidroksisüksinimit (NHS, % 98), glutaraldehit (% 25), potasyum ferrisiyanat, potasyum ferrosiyanat ve yapay serum Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)’den temin edildi. KCl, K₂HPO₄, NaH₂PO₄, Etanol (Absolute-% 99.9) Merck KGaA (Darmstadt, Almanya)’dan temin edildi.

Kullanılan tüm sarf malzemeler Interlab Lab. Ürün. San ve Tic. A.Ş’den temin edildi. İmmobilizasyon aşamasında kullanılan tüm çözeltiler, deneyler esnasında taze olarak hazırlanmış ve tüketilmiştir. Hormon ve antikorlar istenilen konsantrasyonlarda porsiyonlara ayrılarak -20°C’de saklanmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışma elektrodu olarak 2.01mm² yüzey alanına sahip altın elektrot, referans elektrot olarak KCl ile doygunlaşmış 3 M Ag/AgCl elektrot ve yardımcı elektrot olarak ise 10 mm uzunluğunda platin tel kullanılmıştır. Tüm elektrotlar BASi, Warwickshire, UK firmasından temin edilmiştir. Ölçümler ise döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi yazılımı olan Echem Analyst içeren (Gamry Instruments,

Warminster, USA) bir bilgisayara bağı Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 600 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazında alınmıştır.

Deneylerde Biyokimya araştırma laboratuvarında bulunan ultrasonik su banyosu (Wise Clean DAIHAN, WUC-AO3H, Kore), hassas terazi (Precisa XB 220A, Precisa Gravimetrics AG/Switzerland), mikropipetler (20µL, 200 µL, 1000 µL eppendorff mikropipet), manyetik karıştırıcı (Biosan magnetic stirrer MSH 300), pH metre (6173 pH, made in China for USA) kullanıldı.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

50 mM fosfat tamponu: 3.549 g Na_2HPO_4 tartılır, destile su ile 500 ml'ye tamamlanır. 3.4015 g KH_2PO_4 tartılır, destile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

5.0 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: 0.8231 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tartılıp 50 mM pH:7.0 fosfat tamponu ile 500 ml'ye tamamlanır.

5.0 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: 1.0560 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ tartılıp 50 mM pH:7.0 fosfat tamponu ile 500 ml'ye tamamlanır.

0.1 M KCl: 3.72 mg KCl tartılıp, 500 mL 50 mM pH:7.0 fosfat tamponunda hazırlanmış 5.0 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ çözeltisinde çözülür.

5 mM 12-MDDA: 23.2 mg 12-MDDA tartılıp 20 ml absolut etanolde çözülür.

% 1.5 PAMAM: Ana stoktan (% 20) 8 µl çekilip 100 µl'ye 50 mM pH:7.0 fosfat tamponu ile tamamlanır.

% 1.0 Glutaraldehit: Ana stoktan (% 25) 7.5 µl çekilip 200 µl'ye 50 mM pH:7.0 fosfat tamponu ile tamamlanır.

0.2 M EDC: 5.94 mg EDC tartılıp 100 µl'ye 50 mM pH:7.0 fosfat tamponu ile tamamlanır.

0.05 M NHS: 2.88 mg NHS tartılıp 500 µl'ye 50 mM pH:7.0 fosfat tamponu ile tamamlanır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Elektrot Temizliği

Au elektrot fiziksel ve kimyasal olarak temizlenir. Temizlik aşamaları şu şekilde gerçekleşir:

I. Bir miktar Gamma alümina tozu (Aluminyum oksit) alınarak kadife bir yüzey (elektrot yüzeyinin çizilmemesi için) üzerine alınır. Alümina üzerine birkaç damla bidistile su damlatılıp, temiz bir spatül ucuyla alümina pelte kıvamına gelene kadar karıştırılır. Daha sonra Au elektrot pelte kıvamındaki alümina üzerine yavaş bir şekilde ve aynı yönde gezdirilir. Böylelikle yüzeydeki tabaka ve/veya başka bir kirlilik mekanik olarak giderilmiş olur.

II. Au elektrot bidistile suyla durulandıktan sonra adsorblanmış partikülleri uzaklaştırmak için on dakika etanol (% 99.9) içerisinde sonikatörde bekletilir. Ultra saf suyla tekrar durulanıp saf argon gazı ile kurutulur.

3.2.2. Biyosensörün Çalışma Prensibi ve Ölçüm Sistemi

Geliştirilen biyosensör sisteminde uygulanan bütün immobilizasyon işlemlerinin karakterizasyonunu yapmak için döngüsel voltametriden (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisinden (EIS) yararlanılmıştır. CV için potansiyel 0.5 ve -0.1 V arasında, adım büyüklüğü 1 mV, tarama hızı 50 mV/s olarak seçilmiştir. Ölçümler 0.1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5.0 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 10 mV alternatif akımda gerçekleştirilmiştir. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltametredeki ile aynıdır. İmpedans spektrumları 50.000-0.05 Hz aralığındadır.

Antikoron elektrot yüzeyine bağlanması gerçekleştirildikten sonraki aşama hormonun elektrot yüzeyine bağlanmasını sağlamaktır. İmmobilizasyon sonrası standart LH konsantrasyonundan (1 mIU/mL ve 10 mIU/mL) elektrot yüzeyine mikropipet ile her defasında 5µL olacak şekilde ilave yapılmıştır. Her inkübasyon periyodundan sonra elektrot yüzeyinde bağlanmamış hormonları uzaklaştırmak için elektrot ultra saf su ile yıkanarak ve $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ redoks probu içeren çözeltinin bulunduğu hücrede CV ve EIS ölçümleri alınmıştır. Her ölçüm öncesinde ve sonrasında elektrotlar ultra saf su ile temizlenip, argon gazı ile kurutulmuştur.

3.2.3. Hesaplama Yöntemi

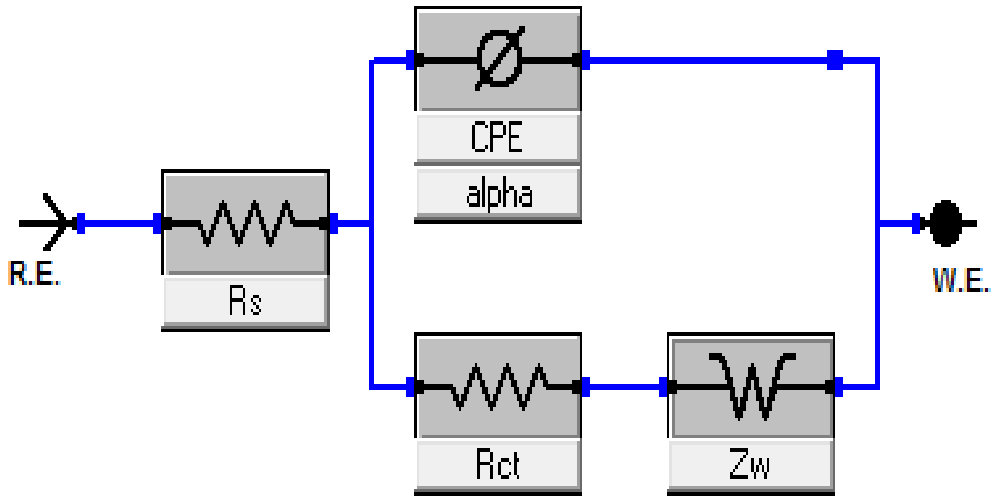
İmmobilizasyon basamaklarının kontrolü ve LH tayininin gerçekleştirilmesi için impedans (alternatif akıma karşı direnç) yöntemi kullanıldığından elde edilen Nyquist

eğrilerinin bir eş-değer devre vasıtası ile anlamlı sayısal değerlere dönüştürülmesi gerekmektedir.

3.2.3.1. Eşdeğer devre modeli çizimi

Hesaplanacak sayısal değerlerden tayin için en önemli olanı aynı zamanda yaklaşık olarak Nyquist eğrisinin de çap değerine tekabül eden elektrot yüzeyine olan “yük transfer direnci (R_{ct})” ifadesidir. Yapılan çalışmalar ve literatürde yer alan makaleler R_{ct} ile yüzeydeki madde miktarı arasında doğru orantı bulunduğunu göstermektedir [107].

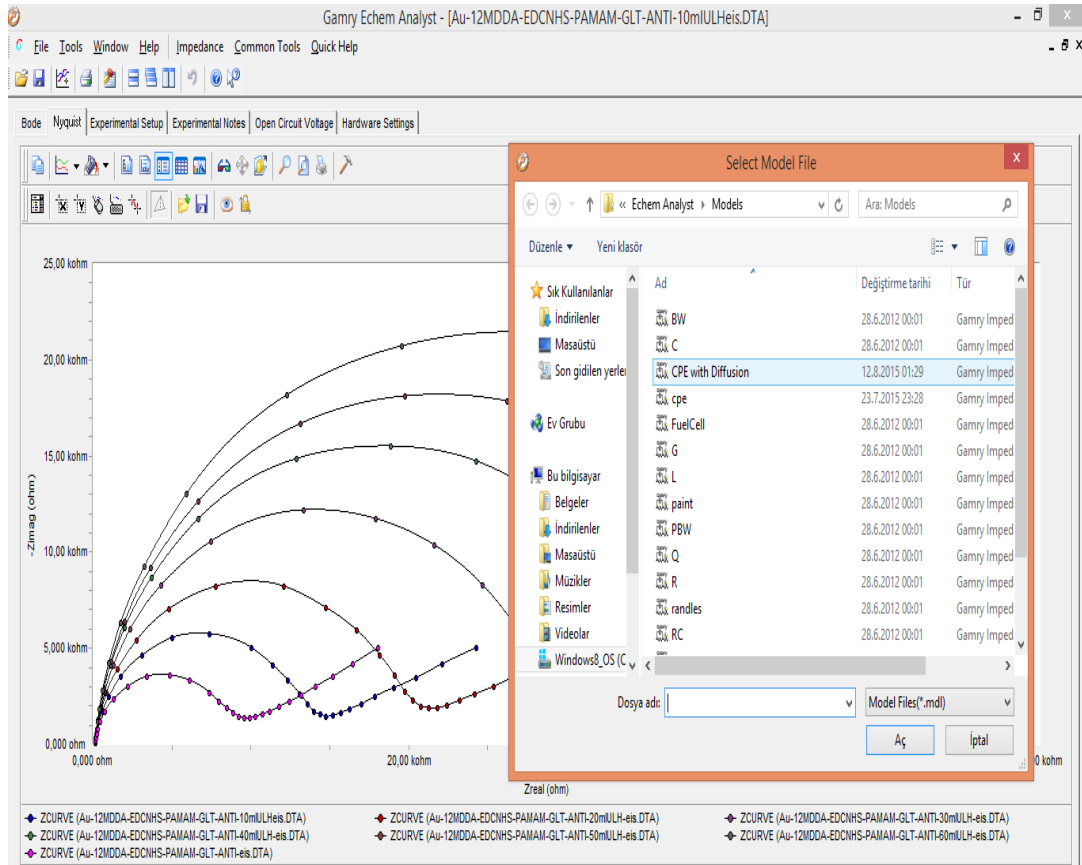
Bu çalışmada Gamry Analyst® yazılımı kullanılarak elektrot yüzeyine uygun eşdeğer devre modeli çizilmiş ve yapılan çalışmalar sonucu elde edilen Nyquist eğrilerinin sayısal değerlere dönüştürülmesi sağlanmıştır. Gamry Analyst® yazılımı kullanılarak elde edilen eş-değer devre Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Şekil 3.1 üzerinde bulunan R_s çözelti direncini, Z_w Warburg İmpedansını, CPE-alpha sabit faz elemanı kapasitansı, R_{ct} ise yük transfer direncini göstermektedir.



Şekil 3.1. Gamry Analyst® yazılımı kullanılarak elde edilen eş-değer devre modeli

3.2.3.2. Yük transfer direncinin (R_{ct}) hesaplanması

Değeri hesaplanması istenilen Nyquist diyagramı Gamry Analyst® yazılımında açılır. Sonra bu yazılımın üst menüsündeki impedans sekmesinden “Fit A Model (Simplex Method)” seçilir. Burada açılan daha önceden hesaplama yöntemi belirlenmiş devre sistemlerinden bu çalışmaya uygun olan “CPE with Diffusion” devresi seçilir (Şekil 3.2).



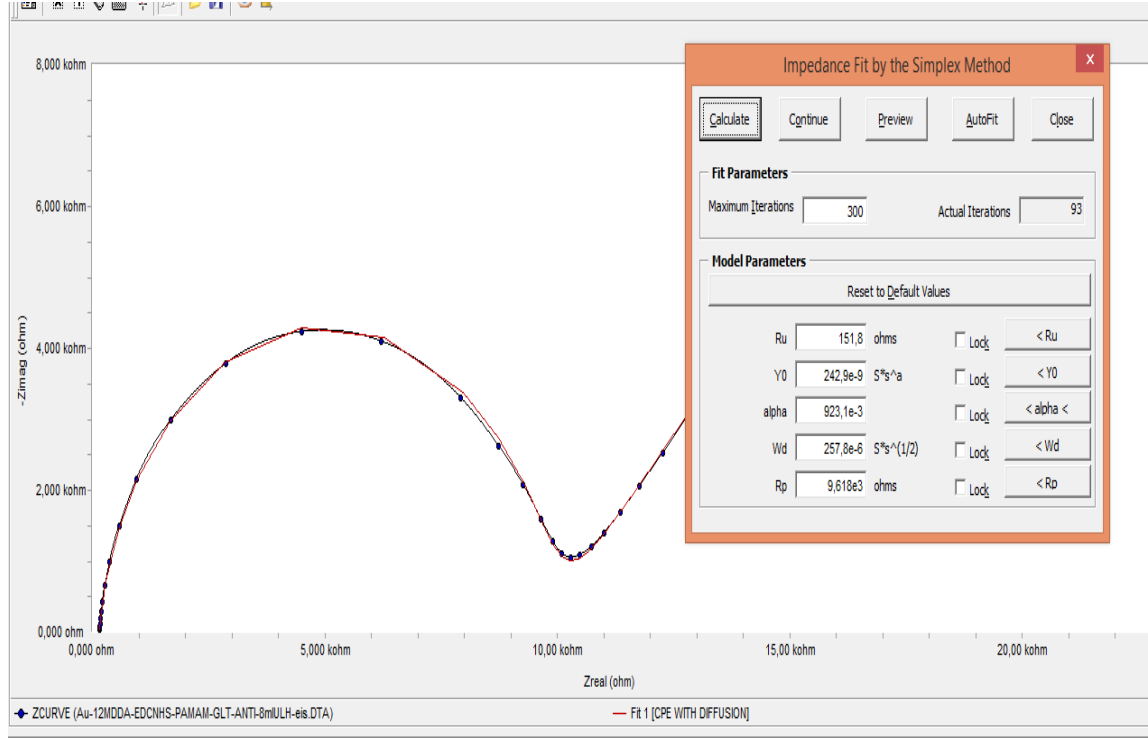
Şekil 3.2. Gamry Analyst® yazılımındaki hesaplama yapılabilen devre modelleri

Uygun devre sistemi seçildikten sonra açılan hesaplama ekranındaki değerlerin sıfırlanması için “reset to default values” düğmesine basılır (Şekil 3.3). Son olarak da hesaplama yapılması için aynı ekran üzerinde bulunan “calculate” düğmesine basılır. Ortaya çıkan hesaplama eğrisi, deneysel çalışmalar sonucu elde edilen Nyquist eğrisine uyana kadar “calculate” düğmesine basılmaya devam edilir.

Son olarak hesaplama ekranında bulunan ve R_{ct} 'ye karşılık gelen R_p değerleri her bir Nyquist eğrisi için kaydedilir.

Yük transfer direnci değerleri (R_p veya R_{ct}) ile yüzeye bağlanan madde miktarı arasında doğru orantı olduğu yapılan önceki çalışmalar ile kanıtlandığından dolayı

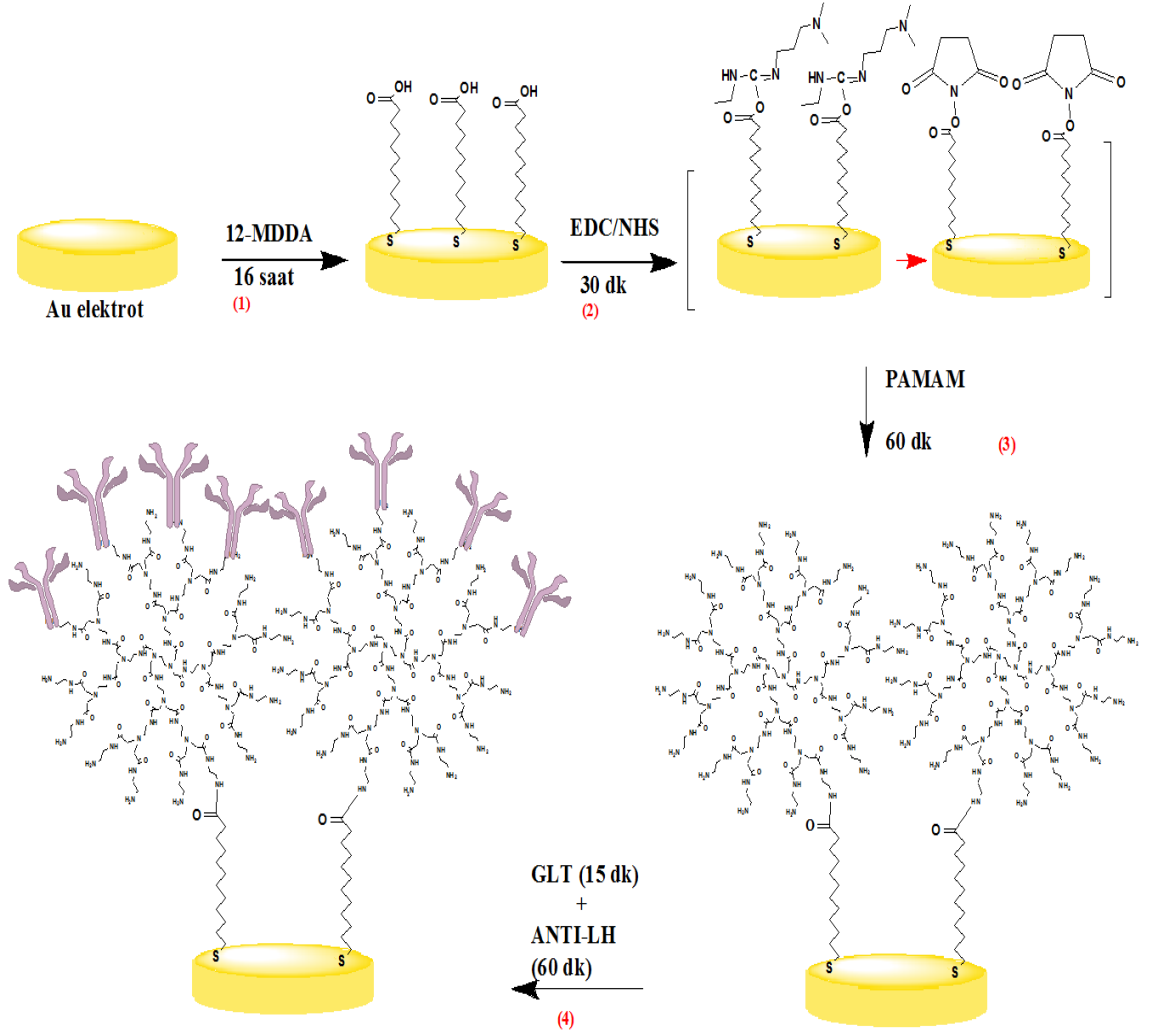
hesaplanan bu R_p değerleri bu aşamadan sonraki tüm kantitatif tayinlerde kullanılmıştır [107].



Şekil 3.3. Gamry Analyst® yazılımındaki hesaplama ekranı

3.2.4. Luteinleştirici Hormon Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanışı

Temiz yalın altın elektrot % 99'luk etanolde hazırlanmış 5.0 mM'lık 12-MDDA çözeltisine daldırılıp 16 saat bekletilerek SAM oluşumu gerçekleştirildi. 12-MDDA ile SAM oluşturulmuş elektrot yüzeyine 0.2 M EDC ve 0.05 M NHS çözeltilerinin (50 mM pH:7.0 fosfat tamponunda hazırlanmış) karışımından 10 μ L damlatılıp 30 dakika karanlık ortamda bekletildi. EDC-NHS ile aktifleştirilmiş elektrot yüzeyine % 1.5'luk PAMAM çözeltisinden (50 mM pH:7.0 fosfat tamponunda hazırlanmış) 10 μ L eklenip 60 dakika karanlık ortamda bekletildi. PAMAM ile aktif kol sayısı artırılmış elektrot yüzeyine Çapraz bağlama yapmak amacıyla % 1'lik glutaraldehit çözeltisinden (50 mM pH:7.0 fosfat tamponunda hazırlanmış) 10 μ L damlatılıp karanlık ortamda 15 dakika bekletildi. Son olarak 10 μ g/mL Anti-LH antikorunun 5 μ L'lik porsiyonu elektrot yüzeyine damlatıldı ve 60 dakika karanlık ortamda bekletildi.



Şekil 3.4. Anti-LH immobilizasyon basamaklarının şematik gösterimi

3.2.5. Luteinleştirici Hormon Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu

3.2.5.1. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonu

Elektrot yüzeyinde tek tip, kararlı ve dayanıklı SAM (kendiliğinden oluşan tek tabakalar) oluşturmak için 12-merkaptododekanoik asitin optimum konsantrasyonu belirlendi. Bunun için 12-MDDA'nın 2.5 mM, 5.0 mM, 7.5 mM ve 10 mM olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri ile biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmada SAM oluşumunun gerçekleştirilen immobilizasyona etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi için; EDC/NHS (0.2 M/0.05 M), PAMAM (% 1.5), glutaraldehit (% 1), Anti-LH (10 µg/mL) ve LH (10 mIU/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

3.2.5.2. EDC/NHS konsantrasyonunun optimizasyonu

EDC/NHS çifti elektrot yüzeyinde oluşturulan SAM'in karboksil uçlarını aktifleştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Bunun için yeterli miktardaki EDC/NHS çiftini belirlemek amacıyla her iki maddenin birbirine oranı sabit tutularak **2 M-0.5 M**, **0.2 M-0.05 M** ve **0.02 M-0.005 M** konsantrasyonlarında EDC/NHS çözeltileri ile biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmada EDC/NHS konsantrasyonunun immobilizasyona etkisinin daha iyi belirleyebilmek için 12-MDDA (5 mM), PAMAM (% 1.5), glutaraldehit (% 1), Anti-LH (10 µg/mL) ve LH (10 mIU/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

3.2.5.3. PAMAM konsantrasyonunun optimizasyonu

PAMAM dendrimeri (generation 2.0) 16 tane fonksiyonel amin ucu bulunduran ve daha fazla antikor ve buna bağlı olarak daha fazla hormon immobilizasyonunun gerçekleşmesini sağlayan bir moleküldür. Anti-LH immobilizasyonunun verimini arttırmak için yeterli PAMAM miktarını belirlemek amacıyla **% 0.5**, **% 1.0** ve **% 2.5** konsantrasyonlarında PAMAM dendrimeri çözeltileri ile biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmada PAMAM konsantrasyonunun immobilizasyona etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi için 12-MDDA (5 mM), EDC/NHS (0.2 M/0.05 M), glutaraldehit (% 1), Anti-LH (10 µg/mL) ve LH (10 mIU/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

3.2.5.4. Glutaraldehit konsantrasyonu optimizasyonu

Glutaraldehit, PAMAM dendrimerinin açıkta kalan amin uçlarını antikor ile çapraz bağlamak amacıyla kullanıldı. Bu bağlamda Anti-LH immobilizasyonunun verimini arttırmak için glutaraldehit miktarını belirlemek için **% 0.5**, **% 1.0**, **% 1.5** ve **% 2.0** konsantrasyonlarında glutaraldehit çözeltileri ile biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmada glutaraldehit konsantrasyonunun immobilizasyona etkisinin daha iyi belirleyebilmek için 12-MDDA (5 mM), EDC/NHS (0.2 M/ 0.05 M), PAMAM (% 1.5), Anti-LH (10 µg/mL) ve LH (10 mIU/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

3.2.5.5. Anti-LH konsantrasyonu optimizasyonu

Anti-LH tayin edeceğimiz luteinleştirici hormona spesifik olarak sentezlenen monoklonal antikordur. Daha duyarlı ve tekrarlanabilir tayin sonuçları elde edebilmek

için, optimize edilmiş immobilizasyon basamaklarından sonra bağlayabileceğimiz en uygun Anti-LH konsantrasyonunu belirlemek amacıyla **5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL** ve **30 µg/mL** konsantrasyonlarında hazırlanmış Anti-LH porsiyonları kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmada Anti-LH konsantrasyonunun immobilizasyona etkisini daha iyi tayin edebilmek için 12-MDDA (5 mM), EDC/NHS (0.2 M/0.05 M) PAMAM (% 1.5), glutaraldehit (% 1) ve LH (10 mIU/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

3.2.5.6. LH inkübasyon süresi optimizasyonu

Antikor ile antijenin etkileşme süresi immobilizasyonda bağlanma verimini ve oluşan bağın dayanıklılığını etkiler. Bu nedenle immobilizasyon basamaklarındaki tüm moleküllerin en uygun konsantrasyonları belirlendikten sonra daha duyarlı ve doğrusal sonuçlar elde edebilmek amacıyla LH inkübasyonu **30 dk., 60 dk. ve 90 dk.** olacak şekilde farklı zaman periyodlarında bekletilerek biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmada LH inkübasyon süresinin immobilizasyona etkisinin daha iyi gözlemlenebilmesi için 12-MDDA (5 mM), EDC/NHS (0.2 M/0.05 M), PAMAM (% 1.5), glutaraldehit (% 1), Anti-LH (10 µg/mL) ve LH (10 mIU/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

3.2.6. Luteinleştirici Hormon Tayinine Yönelik Biyosensörün Immobilizasyon Basamaklarının Karakterizasyonu

3.2.6.1. Doğrusal tayin aralığı

Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi optimize edilmiş immobilizasyon basamaklarında elde edilen sonuçlar kullanılarak [12-MDDA (5.0 mM), EDC/NHS (0.2 M-0.05 M), PAMAM (% 2.0), glutaraldehit (% 1) ve Anti-LH (10 µg/mL) (60 dk.)] hazırlanan biyosensör ile LH (1-10 mIU/mL ve 10-60 mIU/mL) için iki farklı doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir.

3.2.6.2. Tekrar üretilebilirlik

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları ile elde edilen optimum değerler kullanılarak [12-MDDA (5.0 mM), EDC/NHS (0.2 M-0.05 M), PAMAM (% 2.0), glutaraldehit (% 1) ve Anti-LH (10 µg/mL) (60 dk.)] hazırlanan farklı biyosensörlerle

iki doğrusal tayin aralığında da ölçümler alındı ve biyosensörün tekrar üretilebilirliği denendi.

3.2.6.3. Yapay serumda uygulama

Yapay serum örneği ile antijen-antikor etkileşimlerinin serum içerisindeki tuzlardan etkilenip etkilenmeyeceği incelenmiştir. LH için yapılan bütün seyreltmeler yapay serum çözeltisi ile yapılmıştır. Bu şekilde optimize edilmiş şartlarda hazırlanmış biyosensör için iki doğrusal tayin aralığında da ölçümler alınmış ve yapay serumun etkisine bakılmıştır.

BÖLÜM 4

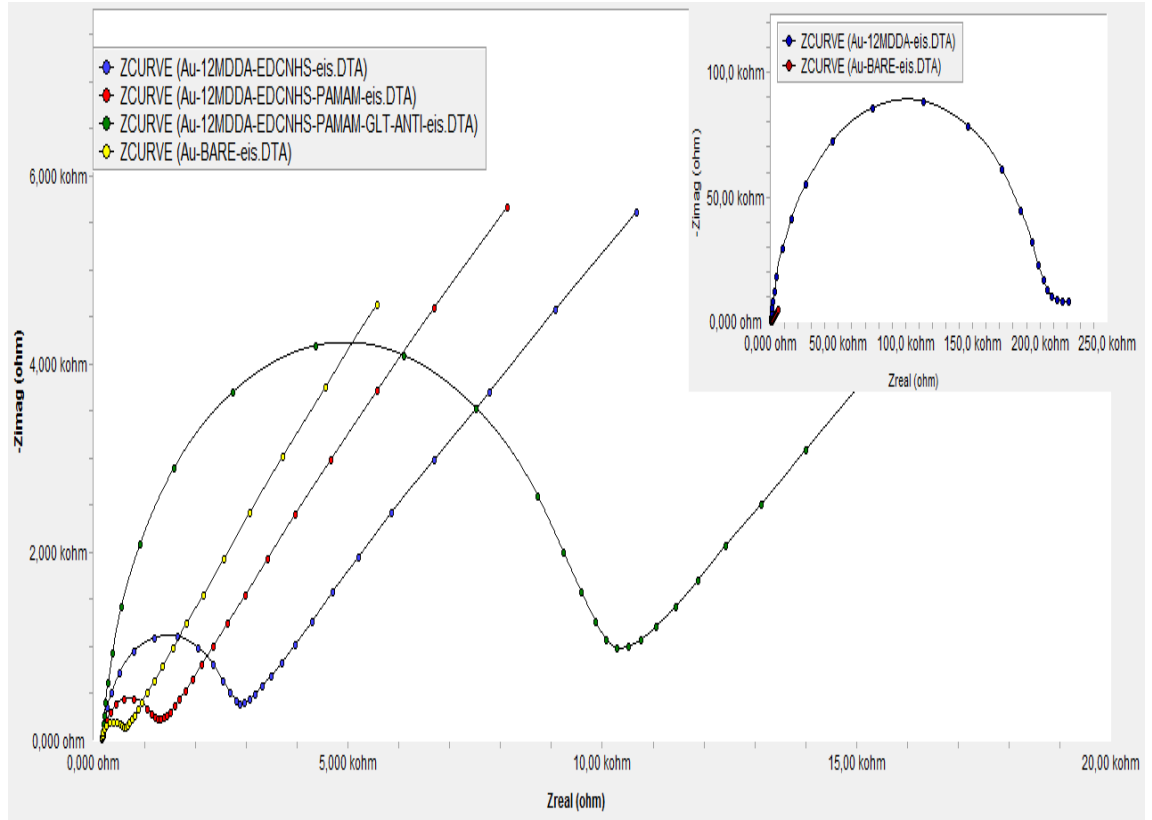
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. LH Biyosensörü ile Elde Edilen Bulgular

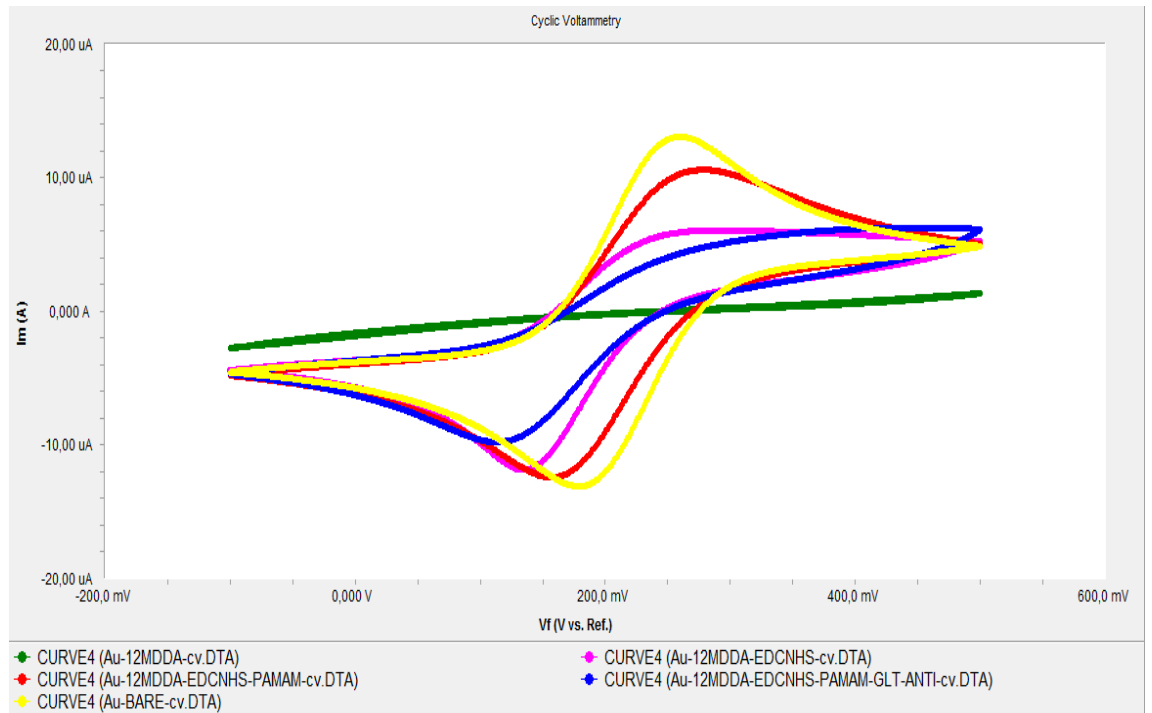
4.1.1. LH Biyosensörünün Hazırlanış Basamaklarına İlişkin Bulgular

LH biyosensörünün her bir immobilizasyon basamağından sonra oluşan elektrot yüzeyleri için alınan CV ve EİS ölçümleri Şekil 4.1a ve Şekil 4.1b’de gösterilmiştir.

1. Yalın Au elektrot yüzeyi: Au-Bare-elektrot,
2. 12-MDDA ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyi: Au-12MDDA,
3. EDC-NHS ile aktive edilmiş modifiye elektrot yüzeyi: Au-12MDDA-EDCNHS,
4. PAMAM bağlanmış aktif elektrot yüzeyi: Au-12MDDA-EDCNHS-PAMAM,
5. Glutaraldehit çapraz bağlaması sonrası elektrot yüzeyi: Au-12MDDA-EDCNHS-PAMAM-GLT
6. Antikor bağlamasından sonra elektrot yüzeyi: Au-12MDDA-EDCNHS-PAMAM-GLT-ANTILH olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.1a. LH biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları



Şekil 4.1b. LH biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları

Her bir immobilizasyon basamağı için elde edilen impedans spektrumlarının hesaplanan R_{ct} değerleri Tablo 4.1’ de verilmiştir.

Tablo 4.1. Her bir immobilizasyon basamağı için hesaplanan R_{ct} değerleri

Elektrot yüzeyi	R_{ct} (kohm)
Au-Bare	0.4198
Au-12MDDA	201.1
Au-12MDDA-EDCNHS	2.617
Au-12MDDA-EDCNHS-PAMAM	1.088
Au-12MDDA-EDCNHS-PAMAM-GLT-	9.765

Elde edilen değerler Au elektroda 12-MDDA bağlanması ile elektrodun yüzey direncinin arttığını göstermektedir. Bu durumun öncelikli sebebi yüzeye bağlanan 12 karbonlu merkaptododekanoik asidin yüzeye olan elektron transferini engelleyerek yüzeyi daha yalıtkan kılmasıdır. Bununla birlikte 12-MDDA üzerinde bulunan karboksil gruplarının, ölçüm sisteminde bulunan negatif yüklü elektrolit ferrisiyanatın elektrot yüzeyine geçmesini engellemesi de R_{ct} ’nin bu kadar artmasına sebep olmuştur. Elde edilen döngüsel voltamogramlara bakıldığında Au elektrot yüzeyine 12-MDDA bağlanması ile voltamogramlardaki karakteristik piklerin kaybolduğu gözlenmektedir. Yüzeyin yalıtkan hale gelmesi yüzeyde dönüşen elektrolit miktarını azalttığından ölçülen akım miktarı da azalar. Bu akım azalması redoks probunun hassasiyet sınırlarından aşağıda olduğunda piklerin oluşmadığı gözlenmektedir.

Tablodan da görüldüğü üzere 12-MDDA’da bulunan karboksil uçlarını aktifleştirmek için kullanılan EDC-NHS çifti elektrot yüzeyinin R_{ct} değerini düşürmüştür. Bunun sebebi, karboksil grubu aktifleştğinde oluşan ara ürün pozitif yüklüdür ve redoks probunu elektrot yüzeyine doğru çeker. Bunun sonucu olarak yüzeye daha fazla redoks probu ulaşır ve dönüşüme uğrar. Elektrot yüzeyine daha fazla yük ulaşması R_{ct} ’nin de düştüğünü gösterir ki bu sonuç grafikten de gözlemlenebilir. Ayrıca daha fazla elektrolitin dönüşüme uğraması ölçülen akımın artmasına sebep olacağından döngüsel voltamogramlarda redoks probuna ait karakteristik indirgenme ve yükseltgenme pikleri gözlenmeye başlar.

pH:7.0 değerinde PAMAM üzerinde bulunan amin grupları protonlanmış halde NH_3^+ formunda bulunur. Yüzeyde daha fazla pozitif yükün bulunması ve PAMAM üzerinde bulunan karbonil grupları ferrisiyanatın ve elektronların yüzeye daha hızlı taşınmasını sağlar. Bunun sonucu olarak da aktifleşmiş 12-MDDA'ya PAMAM bağlandığında R_{ct} değerinde azalma gözlenir. Aynı şekilde R_{ct} az olduğunda ölçülen akım artacağından döngüsel voltamogramlardaki piklerde artış gözlenir. Döngüsel voltamogramlardaki artış Şekil 4.1b'de, R_{ct} değerlerindeki düşüş ise Şekil 4.1a ve Tablo 4.1'de açıkça gözlenmektedir.

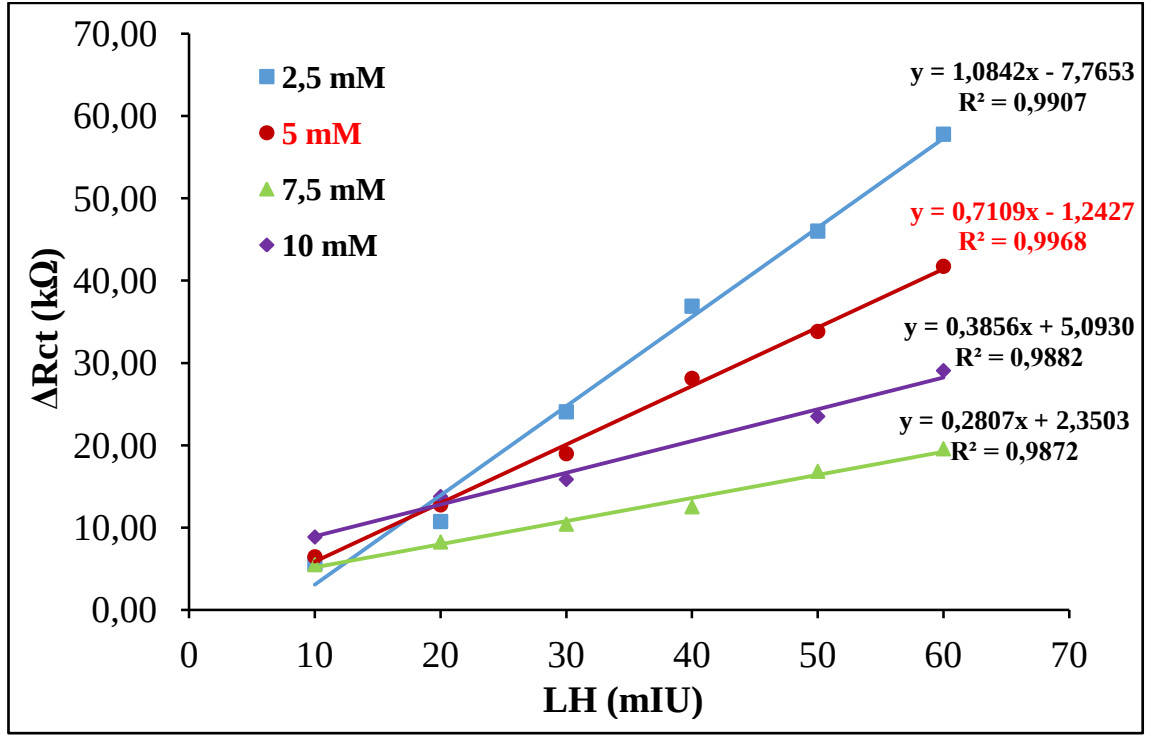
Yüzeye Anti-LH gibi iletken olmayan bir protein bağlandığında yüzeyin elektron geçirgenliği azalır. Çünkü proteinler oluşturduğumuz immobilizasyon hattına nazaran daha büyük moleküllerdir ve elektrot yüzeyine ferrisiyanat transferini büyük ölçüde bloke ederler. Sonuç olarak EIS spektrumları için R_{ct} değerinde büyük bir artış, döngüsel voltamogramlarda ise pik yüksekliği değerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir.

Yüzeye LH antijeni bağlandığında ise elektronların yüzeye ulaşması daha da zorlaşır. Her LH ilavesinde bu engelleme işlemi artarak devam eder. Sonuç olarak her ilave sonrası, alınan impedans spektrumlarında R_{ct} değerlerinin arttığı ve döngüsel voltamogramlarda ise pik yüksekliklerinin azaldığı gözlenmiştir.

4.1.2. LH Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

4.1.2.1. 12-MDDA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

12-merkaptodopdekanolik asitin 2.5 M, 5.0 M, 7.5 M ve 10 M olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileriyle hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen R_{ct} değerleri ile LH konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.2'de, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Tablo 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. 12-MDDA konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Tablo 4.2. 12-MDDA konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

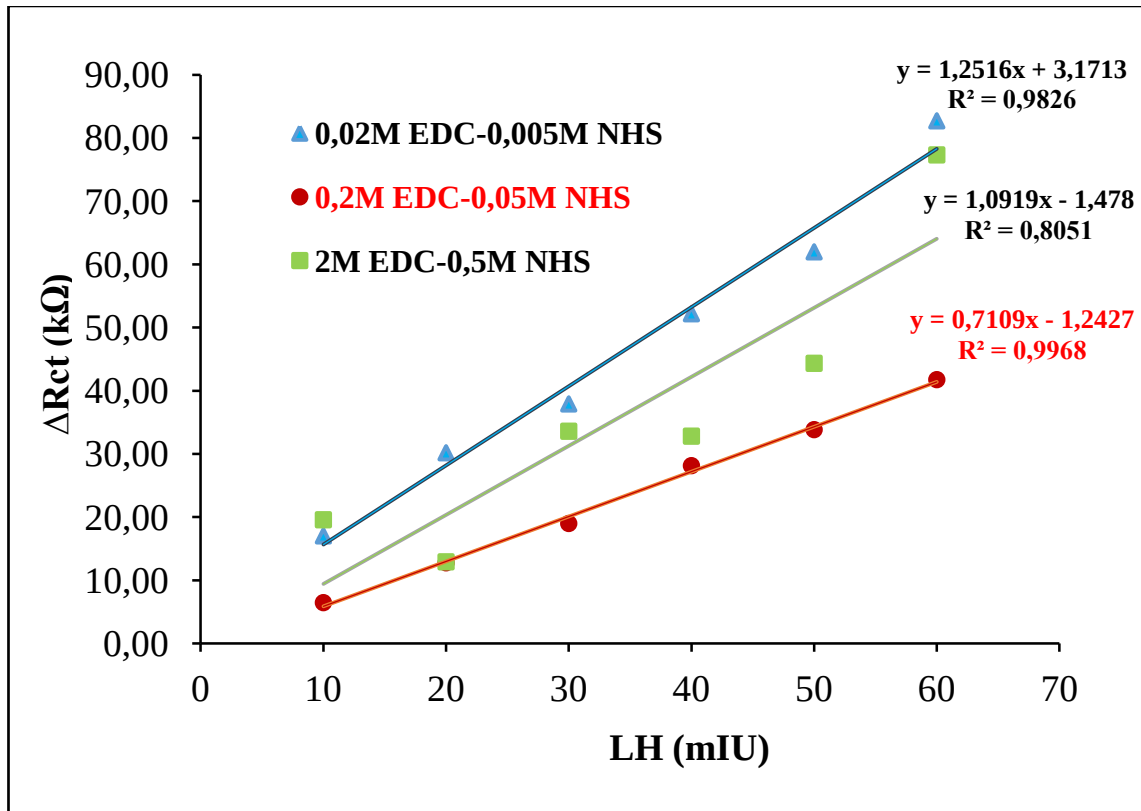
12-MDDA	Doğrusallık katsayısı (R ²)	Doğru denklemi
2.5 mM	0.9907	$y = 1.0842x - 7.7653$
5.0 mM	0.9968	$y = 0.7109x - 1.2427$
7.5 mM	0.9872	$y = 0.2807x + 2.3503$
10 mM	0.9882	$y = 0.3856x + 5.0930$

Yüksek konsantrasyonlarda 12-MDDA çözeltisi kullanılması elektrot yüzeyinde daha fazla SAM oluşmasına sebep olup daha fazla PAMAM bağlanmasını sağlayacağından R_{ct} 'nin artması beklenir. Ancak PAMAM hacimli bir molekül olduğundan moleküller arası sterik engelle sebep olabilir ve bunun sonucu olarak daha az antikor immobilizasyonuna sebep olabilir. Bu durum da 12-MDDA konsantrasyonu arttıkça R_{ct} değerlerindeki düşüşü açıklar. Düşük konsantrasyonlarda 12-MDDA çözeltisi kullanıldığında ise elektrot yüzeyinde daha seyrek ve düzenli aralıklarla SAM oluşmuş olabilir. Buna bağlı olarak daha seyrek ve düzenli PAMAM immobilizasyonu

sağlanmış olup, PAMAM'ın geniş hacminden kaynaklanan sterik engel ortadan kalkmış olabilir. Bu nedenle daha fazla amin ucu açıkta kalmış ve daha fazla antikor bağlanmış olabilir. 2.5 mM 12-MDDA kullanıldığında yüzeye LH bağlandıkça immobilizasyon tabakasında bozulmalar ve kırılmalar oluşabilir, çünkü seyrek SAM oluşumu immobilizasyon tabakasının dayanıklılığını azaltabilir. Elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayılarına bakıldığında **5.0 mM** optimum 12-MDDA konsantrasyonu olarak seçilmiştir.

4.1.2.2. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

EDC/NHS çiftinin 0.02 M/0.005 M; 0.2 M/0.05M; 2.0 M/0.5 M olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileriyle hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen R_{ct} değerleri ile LH konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.3'de, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Tablo 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. EDC/NHS konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

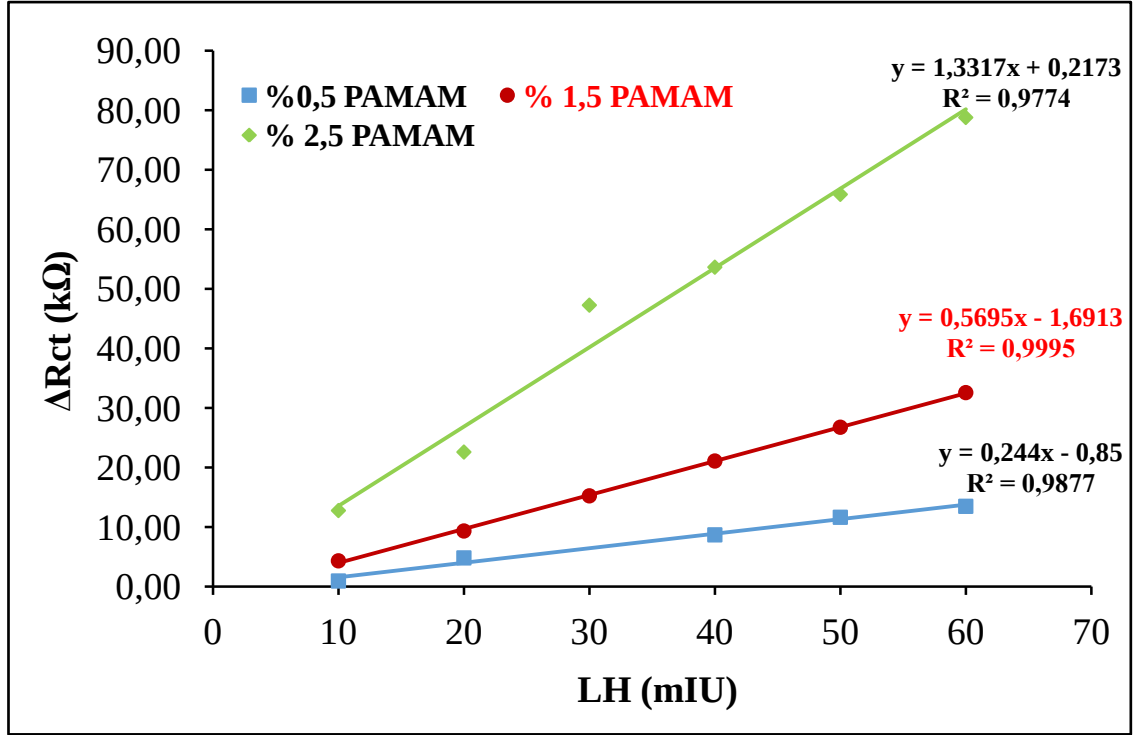
Tablo 4.3. EDC/NHS konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

EDC/NHS konsantrasyonu	Doğrusallık katsayısı (R^2)	Doğru denklemi
0.02 M/0.005M	0.9826	$y = 1.2516x + 3.1713$
0.2 M/0.05 M	0.9968	$y = 0.7109x - 1.2427$
2.0 M/0.5 M	0.8051	$y = 1.0919x - 1.478$

Yüksek konsantrasyonlarda EDC/NHS çifti kullanılmasıyla daha fazla PAMAM bağlanması ve buna bağlı olarak da daha fazla antikor bağlanması beklenir. Ancak yüzeye daha fazla antikor bağlanması SAM'in bu yükü taşıyamamasına ve bozulmasına sebep olabilir. 2.0 M/0.5 M konsantrasyonlarında EDC/NHS kullanıldığında R_{ct} değerlerindeki doğrusallıktan sapmalar bunu göstermektedir. Düşük konsantrasyonda EDC/NHS kullanılması ise daha seyrek yapıda PAMAM bağlanıp sterik engelin ortadan kalkmasından dolayı daha fazla antikor bağlanmasına sebep olabilir. Ancak yine yüzeye LH yüklendikçe bozulmalar meydana gelmiş olabilir. Bu nedenle doğrusallıktan sapmalar gözlenmiştir. Grafiklerin doğrusallık katsayılarına bakıldığında **0.2 M/ 0.05M** optimum EDC/NHS konsantrasyonu olarak seçilmiştir.

4.1.2.3. PAMAM konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

PAMAM dendrimerinin % 0.5, % 1.5 ve % 2.5 olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileriyle hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen R_{ct} değerleri ile LH konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.4'de elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Tablo 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. PAMAM konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Tablo 4.4. PAMAM konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

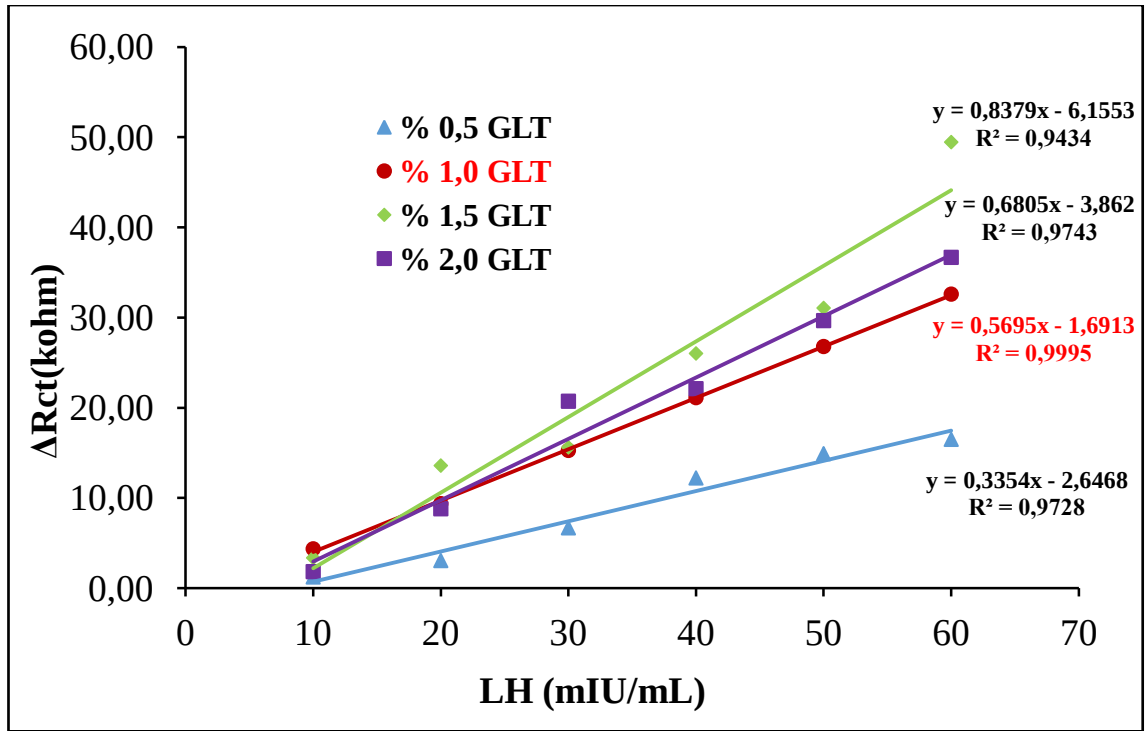
PAMAM konsantrasyonu	Doğrusallık katsayısı (R^2)	Doğru denklemi
% 0.5	0.9877	$y = 0.2440x - 0.8500$
% 1.5	0.9995	$y = 0.5695x - 1.6913$
% 2.5	0.9774	$y = 1.3317x + 0.2173$

Elde edilen verilere göre yüksek konsantrasyonda PAMAM dendrimeri ile hazırlanan biyosensörde EDC/NHS çifti ile aktifleştirilmiş uca daha çok PAMAM bağlanmış ve buna bağlı olarak daha fazla antikor bağlanabilmesi için daha çok fonksiyonel uç elde edilmiştir. Bu da R_{ct} 'nin daha yüksek olmasına sebep olur. Ancak % 2.5'luk PAMAM kullanıldığında yüzeye gerektiğinden fazla PAMAM bağlanması immobilizasyon tabakasında düzensiz ve sık bir şekilde antikor bağlanmasına sebep olabilir ve bu durum R_{ct} değerlerinin doğrusallıktan sapmasına yol açabilir. Düşük konsantrasyonda PAMAM kullanıldığında ise antikor immobilizasyonu için yeterli fonksiyonel uç sağlanamadığından ve daha az antikor bağlandığından doğrusallığı ve

R_{ct} 'yi olumsuz yönde etkilemiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrilerinin doğrusallığına ve R_{ct} değerlerine bakıldığında % 1.5 optimum PAMAM konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

4.1.2.4. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

% 0.5; % 1.0; % 1.5 ve % 2.0 olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki glutaraldehit çözeltileri ile hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen R_{ct} değerleri ile LH konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.5'de, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Tablo 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

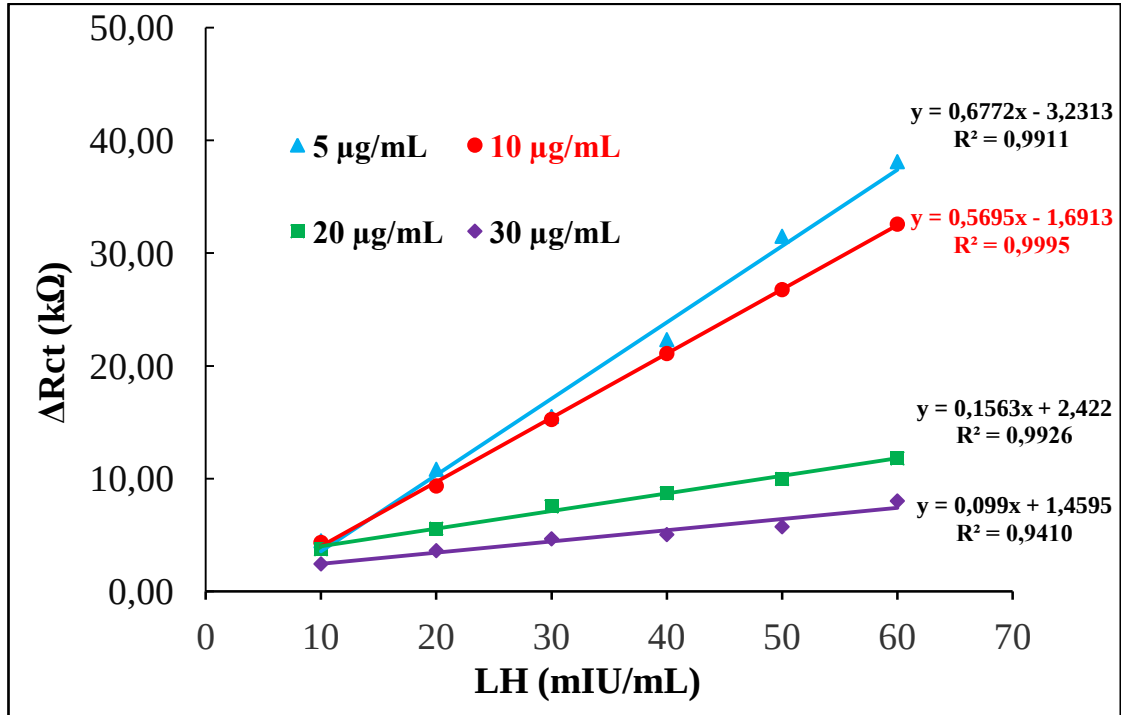
Tablo 4.5. Glutaraldehit konsantrasyonu optimizasyonundan elde edilen grafiklere ait doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

GLT konsantrasyonu	Doğrusallık katsayısı (R^2)	Doğru denklemi
% 0.5	0.9728	$y = 0.3354x - 2.6468$
% 1.0	0.9995	$y = 0.5695x - 1.6913$
% 1.5	0.9434	$y = 0.8379x - 6.1553$
% 2.0	0.9743	$y = 0.6805x - 3.862$

Yüksek konsantrasyonlarda glutaraldehit kullanılması daha fazla antikor bağlanmasını sağlar. Yüzeye yük transferi azaldığından R_{ct} değerleri daha yüksektir. Ancak yüksek konsantrasyonda glutaraldehit kullanılması istenmeyen çapraz bağların da sayısını arttırabilir. Ayrıca daha fazla antikor bağlanması ile immobilizasyon tabakasında muhtemel bozulmalar meydana gelmiş olabileceğinden elde edilen grafiklerde doğrusallıktan sapmalar gözlenmiştir. Düşük konsantrasyonda glutaraldehit kullanıldığında ise yeteri kadar antikor bağlanmasını sağlayamadığından R_{ct} 'nin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak kalibrasyon grafiklerinin eğim, doğrusallık ve R_{ct} değerlerine bakıldığında % 1.0 optimum glutaraldehit konsantrasyonu olarak seçilmiştir.

4.1.2.5. Anti-LH konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ ve 30 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki Anti-LH porsiyonlarıyla hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen R_{ct} değerleri ile LH konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.6'da, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Tablo 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Anti-LH konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

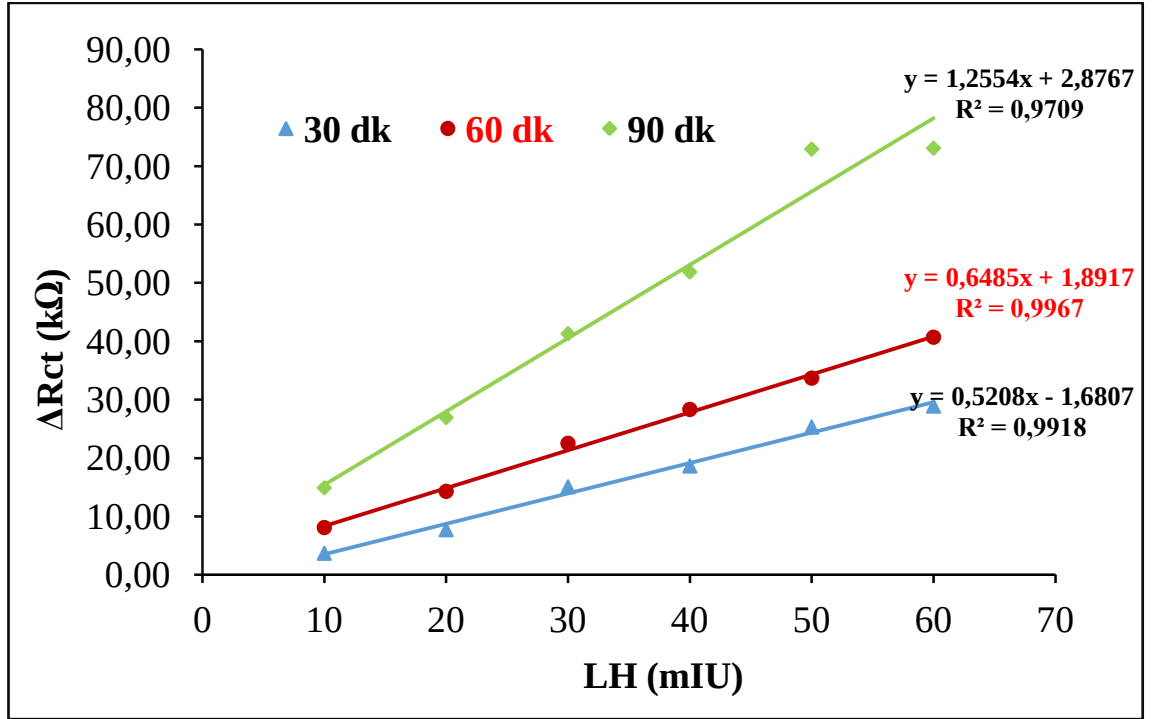
Tablo 4.6. Anti-LH konsantrasyonu optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları

Anti-LH konsantrasyonu	Doğrusallık katsayısı (R^2)	Doğru denklemi
5 $\mu\text{g/mL}$	0.9911	$y = 0.6772x - 3.2313$
10 $\mu\text{g/mL}$	0.9995	$y = 0.5695x - 1.6913$
20 $\mu\text{g/mL}$	0.9926	$y = 0.1563x + 2.422$
30 $\mu\text{g/mL}$	0.9410	$y = 0.099x + 1.4595$

Yüksek konsantrasyonda antikor kullanılması durumunda daha fazla antikor bağlanması elektrot yüzeyine yük transferini azaltır ve R_{ct} 'de artış görülür. Ayrıca daha fazla antijen bağlama kapasitesine sahip olacağından kalibrasyon eğrilerinde daha doğrusal sonuçlar elde edilmesi beklenir. Ancak daha fazla antikor bağlanması SAM'ın bu yükü taşıyamaz hale gelmesine ve immobilizasyon tabakalarında bozulmalara sebep olabilir. Bu durum yüksek Anti-LH konsantrasyonlarında kalibrasyon eğrilerinin doğrusallık katsayıları ve ΔR_{ct} değerlerinin düşük çıkmasını açıklar. Düşük konsantrasyonda Anti-LH kullanıldığında ise antikor immobilizasyonu yeteri kadar sağlanmadığından 10 $\mu\text{g/mL}$ Anti-LH konsantrasyonuna oranla doğrusallıktan sapma gözlenmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinin doğrusallık katsayılarına ve R_{ct} değerlerine bakıldığında **10 $\mu\text{g/mL}$** optimum Anti-LH konsantrasyonu olarak seçilmiştir.

4.1.2.6. LH inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

10 mIU/mL konsantrasyonundaki LH porsiyonlarının 30 dk., 60 dk. ve 90 dk. olacak şekilde farklı inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden elde edilen R_{ct} değerleri ile LH konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.7'de elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri de Tablo 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7. LH inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

Tablo 4.7. LH inkübasyon süresi optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

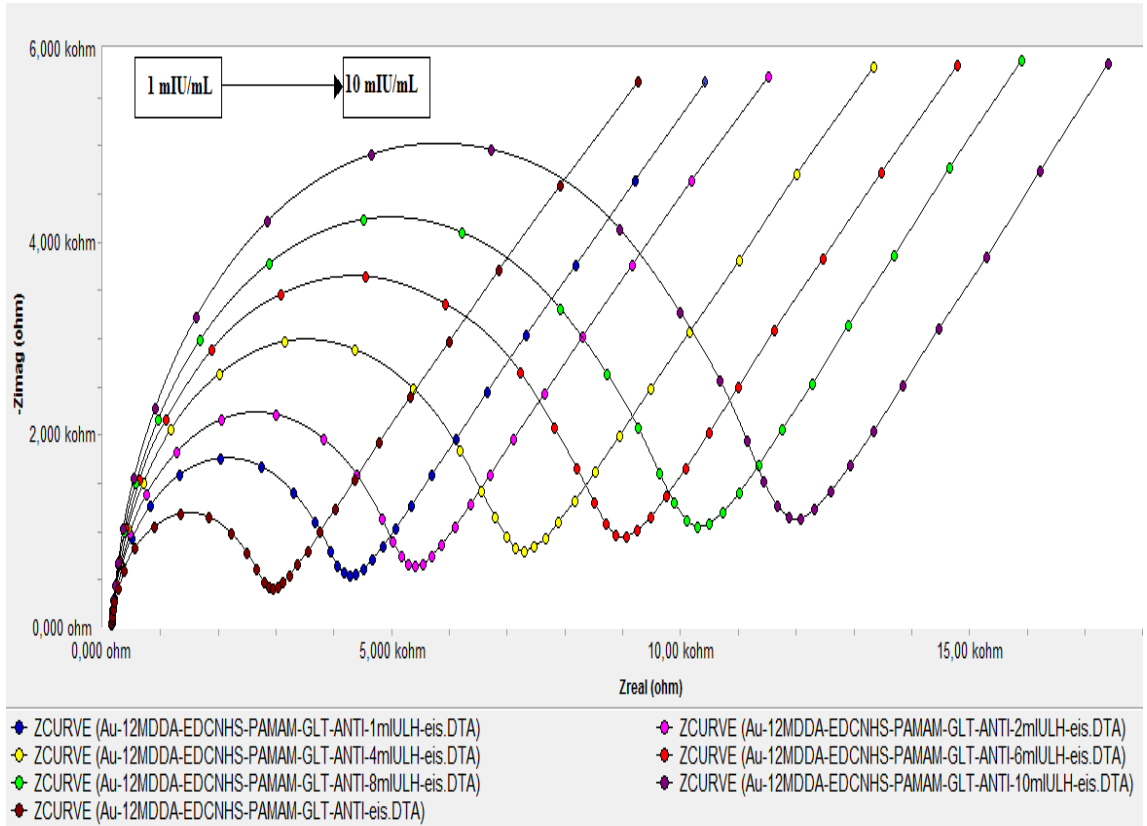
LH inkübasyon süresi	Doğrusallık katsayısı (R^2)	Doğru denklemi
30 dakika	0.9918	$y = 0.5208x - 1.6807$
60 dakika	0.9967	$y = 0.6485x + 1.8917$
90 dakika	0.9709	$y = 1.2554x + 2.8767$

Antijen konsantrasyonları sabit tutulup inkübasyon süresi artırıldıkça antikor ve antijen bağlanması bu süreçte daha iyi sağlanmış olduğundan yüzeye yük transferi engellenir ve her bir LH bağlanmasında ΔR_{ct} farklanmaları da yüksektir. Ancak 10 mIU/ml’lik LH porsiyonları 90 dakika inkübe edildiğinde LH bağlandıkça immobilizasyon tabakası bu yükü taşıyamaz hale gelmiş olabilir. Bu nedenle yüzeyde deformasyonlar meydana gelmiş olduğundan doğrusallıktan sapmalar gözlenmiştir. 30 dakika inkübasyon süresi ise daha az sayıda antijen-antikor bağlanmasına sebep olduğundan R_{ct} farklanmaları ve doğrunun eğimi düşük çıkmıştır. Elde edilen kalibrasyon eğrilerinin eğimi, doğrusallığı ve ΔR_{ct} değerlerine bakıldığında **60 dk** optimum LH inkübasyon süresi olarak seçilmiştir.

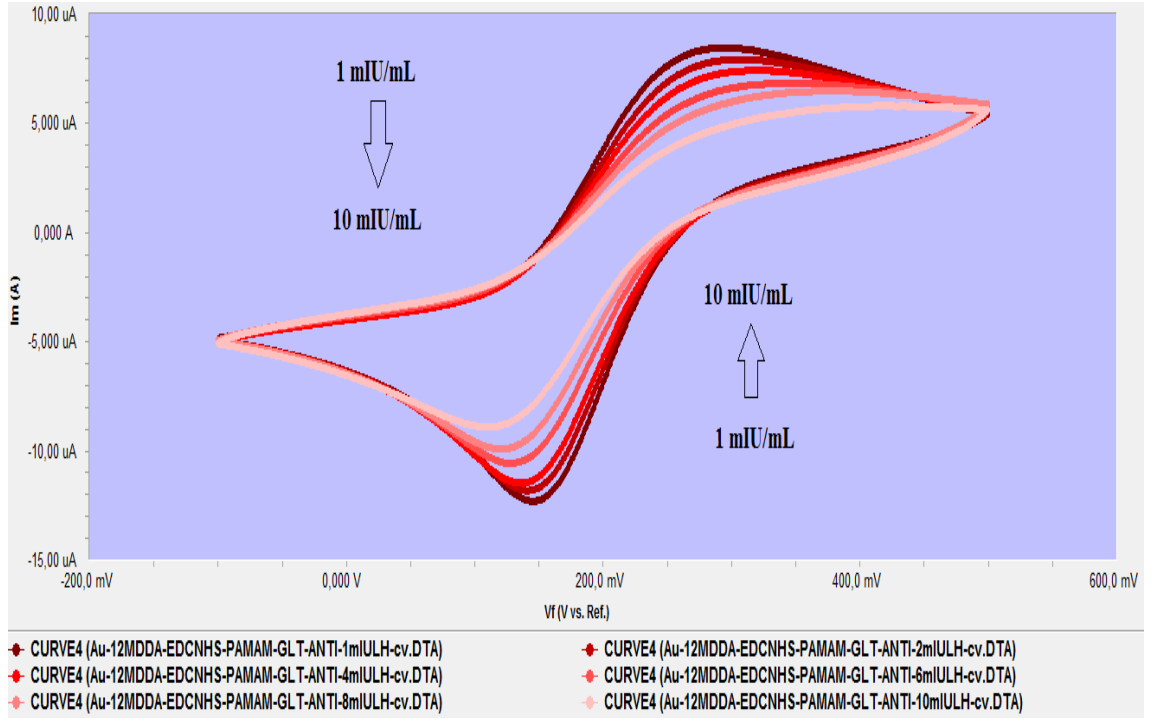
4.1.3. LH Biyosensörünün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

4.1.3.1. Doğrusal tayin aralığı

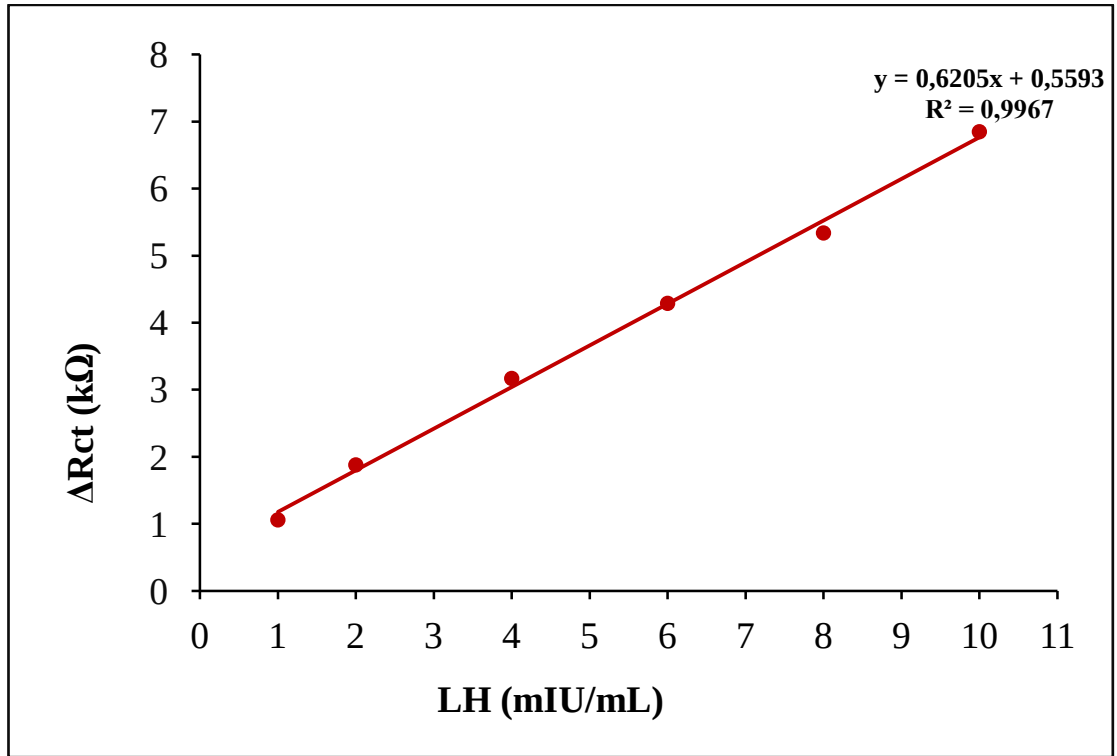
Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak (5 mM 12-MDDA; 0.2 M EDC/0.05 M NHS; % 1.5 PAMAM; % 1 Glutaraldehit; 10 µg/mL Anti-LH) hazırlanan biyosensör ile daha geniş bir doğrusal tayin aralığı belirlemek için iki farklı LH konsantrasyonu aralığında çalışmalar yapılmıştır. 1-10 mIU/ml LH aralığında çalışılan biyosensörden elde edilen Nyquist eğrileri ve bu eğriler kullanılarak hesaplanan ΔR_{ct} değerleri ile LH konsantrasyonu arasındaki standart kalibrasyon eğrileri Şekil 4.8a; 4.8b ve 4.8c’de, 10-60 mIU/ml LH aralığında çalışılan biyosensörden elde edilen Nyquist eğrileri ve bu eğriler kullanılarak hesaplanan ΔR_{ct} değerleri ile LH konsantrasyonu arasındaki standart kalibrasyon eğrileri Şekil 4.9a; 4.9b ve 4.9c’de, her iki doğrusal tayin aralığında yapılan çalışmalarda sonuçları birleştirdiğimizde elde edilen grafikler de Şekil 4.10a; 4.10b ve 4.10c’de gösterilmiştir. Bu çalışmalarda **1-60 mIU/mL LH** aralığı tayin aralığı olarak belirlenmiştir.



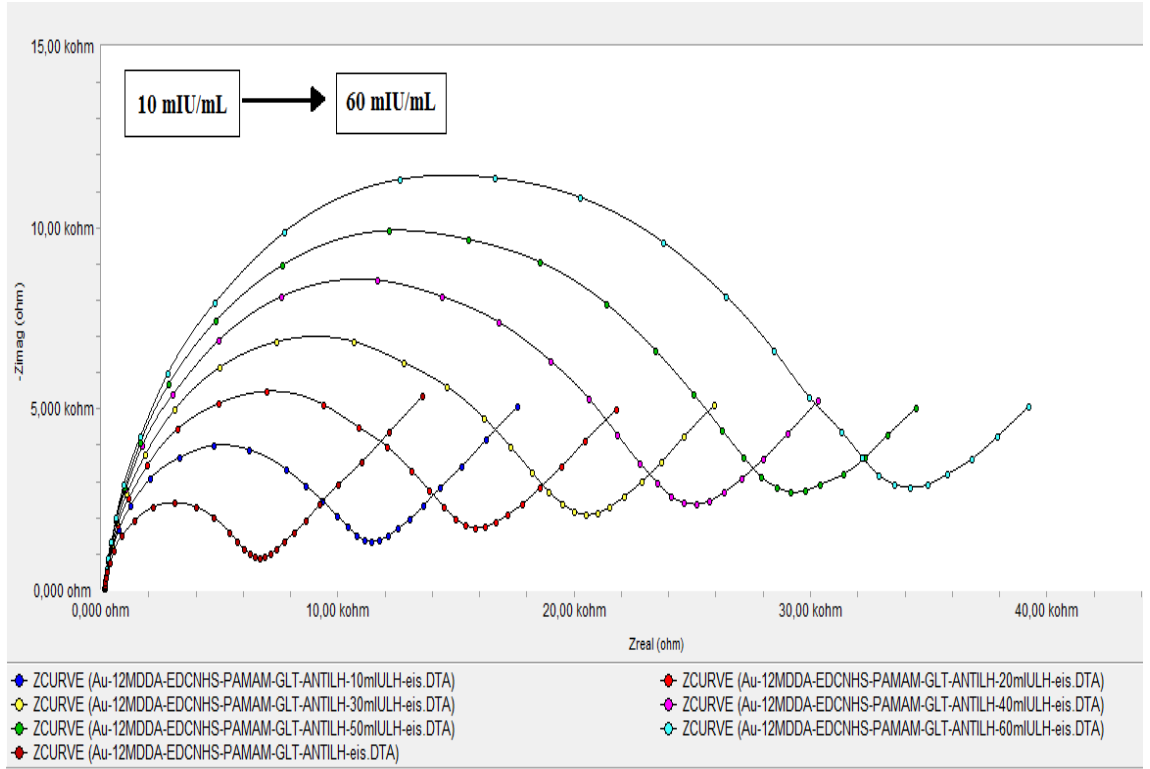
Şekil 4.8a. 1-10 mIU/ml LH tayin aralığı çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri



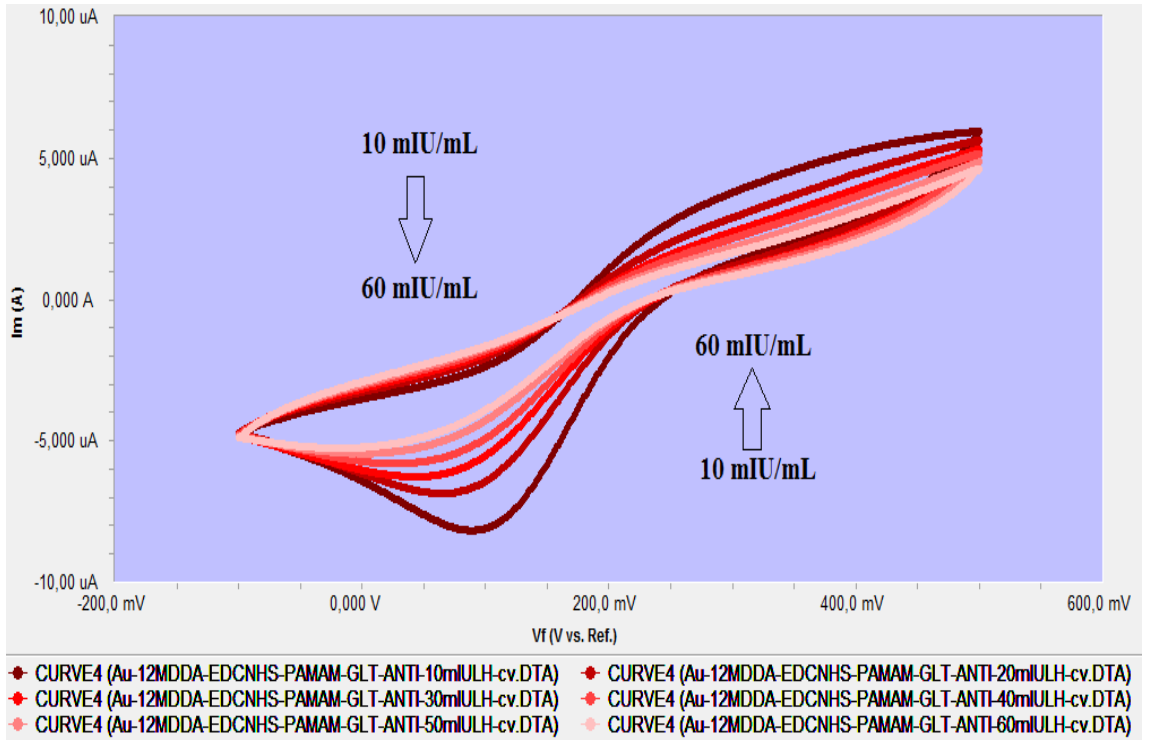
Şekil 4.8b. 1-10 mIU/ml LH tayin aralığı çalışmalarında elde edilen döngüsel voltamogramlar



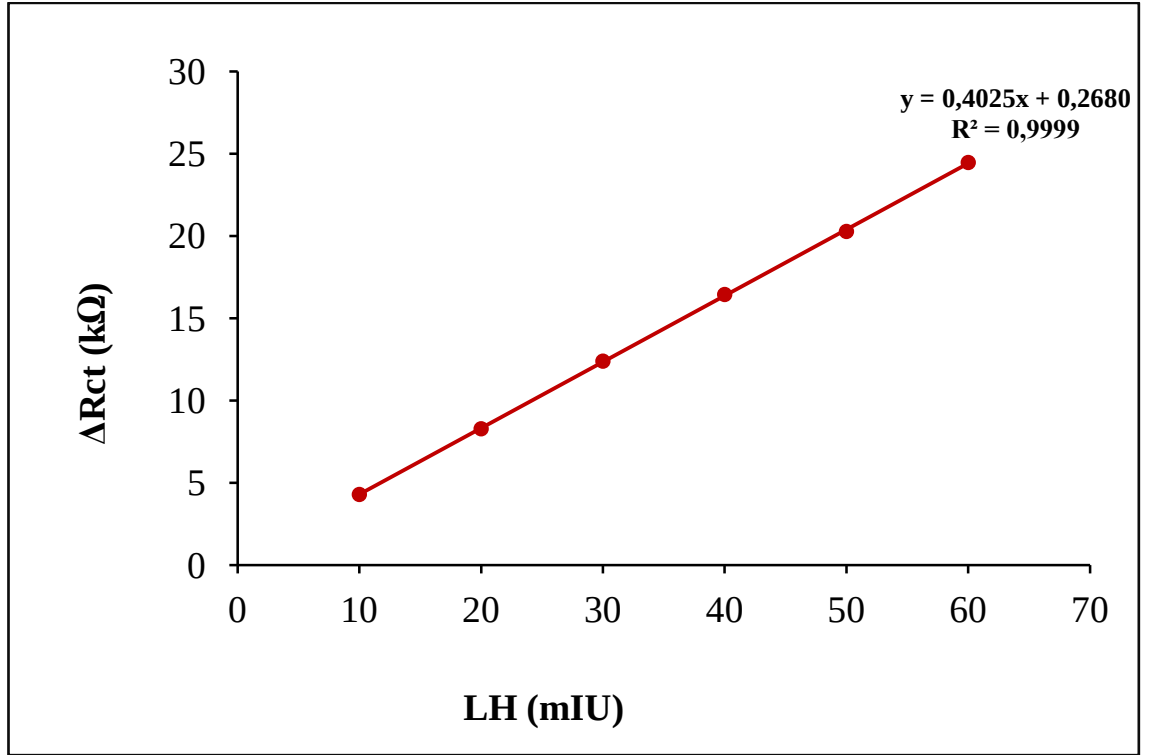
Şekil 4.8c. 1-10 mIU/mL tayin aralığında LH biyosesörünün kalibrasyon grafiği



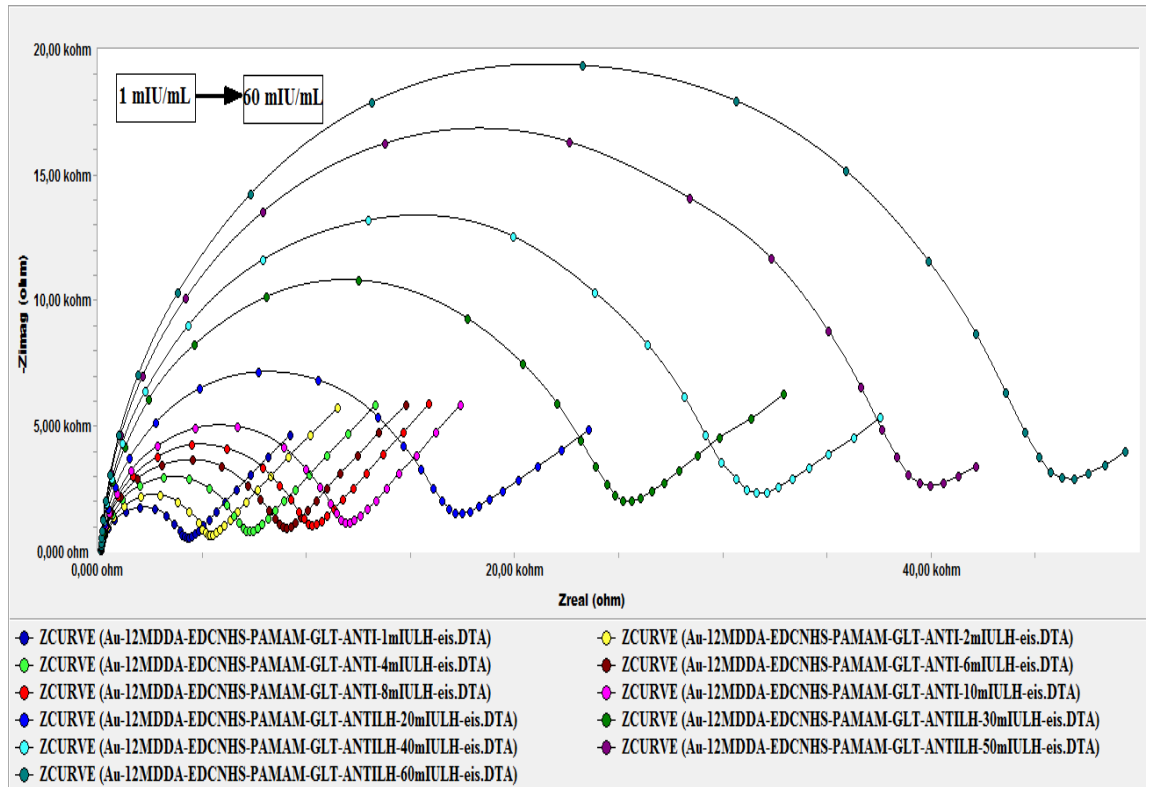
Şekil 4.9a. 10-60 mIU/mL LH tayin aralığı çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri



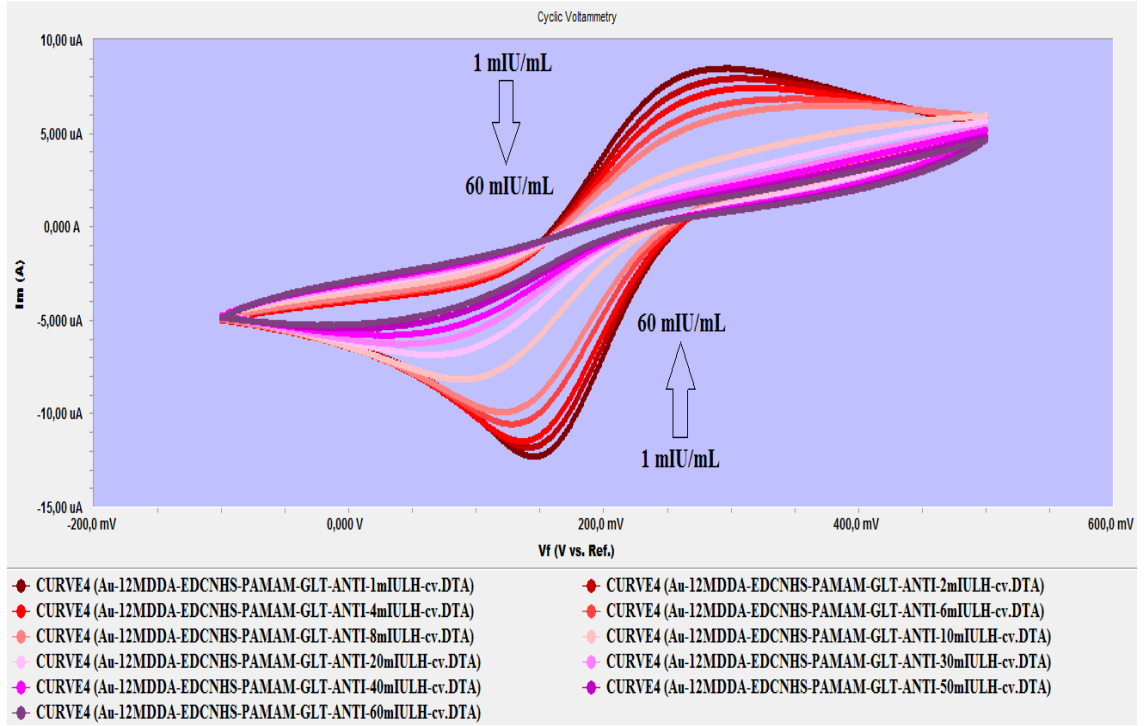
Şekil 4.9b. 10-60 mIU/ml LH tayin aralığı çalışmalarında elde edilen döngüsel voltamogramlar



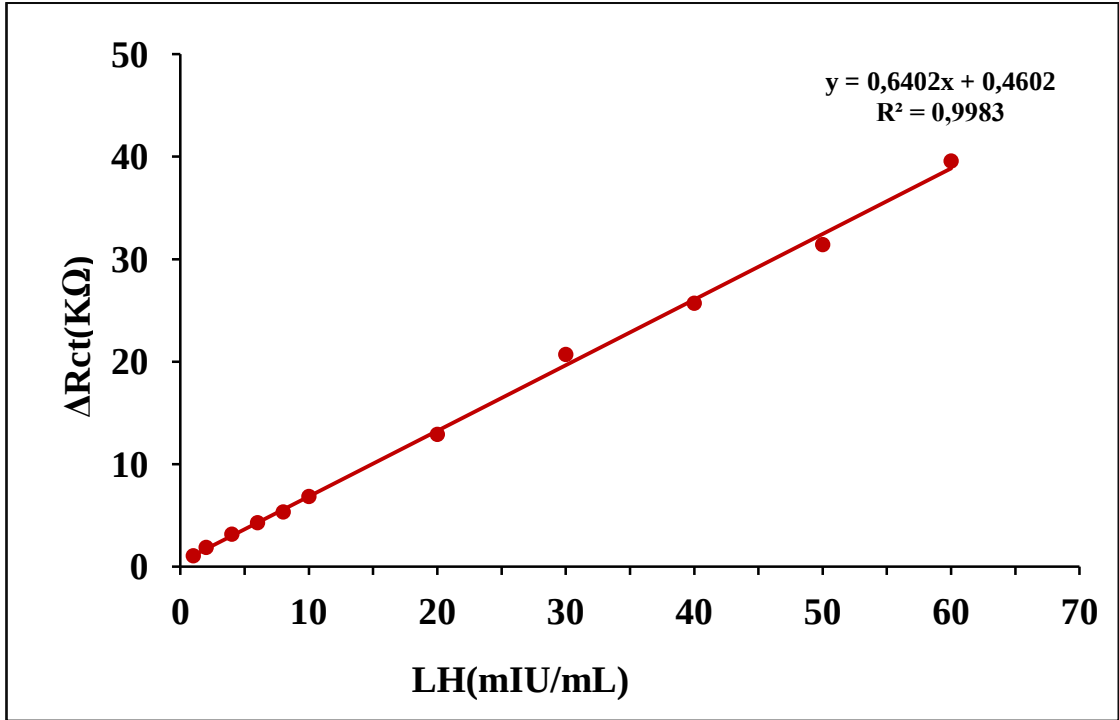
Şekil 4.9c. 10-60 mIU/mL tayin aralığında LH biyosensörü kalibrasyon grafiği



Şekil 4.10a. 1-60 mIU/mL LH tayin aralığı çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri



Şekil 4.10b. 1-60 mIU/mL LH tayin aralığı çalışmalarında elde edilen döngüsel voltamogramlar



Şekil 4.10c. 1-60 mIU/mL doğrusal tayin aralığında LH biyosensörü kalibrasyon grafiği

Literatürde yer alan ve benzer yöntemlerle geliştirilmiş diğer LH biyosensörlerine bakıldığında tayin limitlerinin Pritchard ve ark. geliştirdiği amperometrik immünosensörde: 1.8 mIU/mL [106]; Trevino ve ark. tarafından geliştirilen SPR temelli immünosensörde: 8 mIU/mL olduğu rapor edilmiştir [70]. Geliştirdiğimiz LH biyosensörü Trevino ve ark. geliştirdiği biyosensöre göre daha duyarlı tayin olanağı sağlamaktadır.

4.1.3.2. Tekrar üretilebilirlik

Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak (5 mM 12-MDDA; 0.2 M EDC/0.05 M NHS; % 1.5 PAMAM; % 1 Glutaraldehit; 10 µg/mL Anti-LH) hazırlanan sekizer farklı biyosensör ile 1-10 mIU/ml ve 10-60 mIU/mL aralıkları için ölçümler alınmıştır. Bu biyosensörler ile elde edilen Nyquist eğrileri kullanılarak hesaplanan ΔR_{ct} değerleri ile LH konsantrasyonu arasındaki standart kalibrasyon eğrilerinin doğrusallık katsayıları (R^2), doğru denklemi ve tayin aralığı Tablo 4. 8a ve 8b’de gösterilmiştir.

Tablo 4. 8a. 1-10 mIU/mL aralığında LH biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Biyosensor numarası	Doğrusallık katsayısı (R^2)	Doğru denklemi	Tayin aralığı (mIU/mL)
1	0.9938	$y = 0.4035x + 0.6439$	1-10
2	0.9965	$y = 0.4729x + 0.4999$	1-10
3	0.9967	$y = 0.6203x + 0.5599$	1-10
4	0.9919	$y = 0.6718x - 0.0424$	1-10
5	0.9957	$y = 0.7992x + 0.7115$	1-10
6	0.9947	$y = 0.8948x + 1.2291$	1-10
7	0.9917	$y = 0.9685x + 0.4825$	1-10
8	0.9905	$y = 0.9155x + 0.3222$	1-10

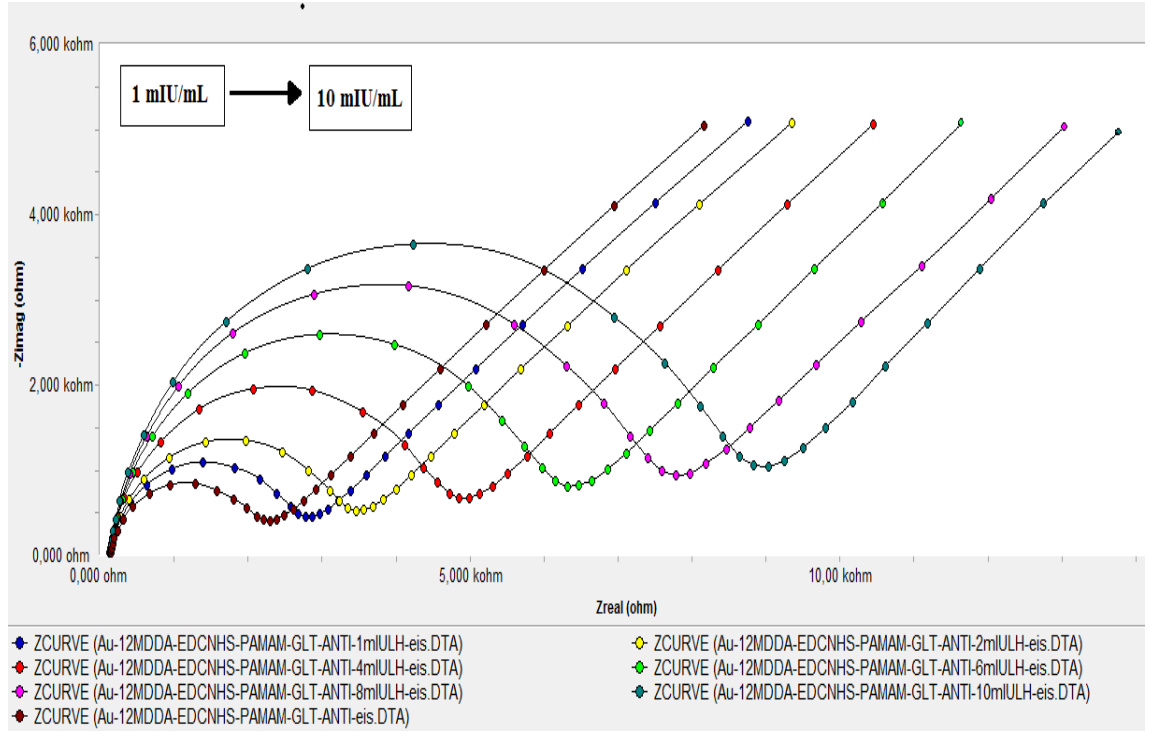
Tablo 4. 8b. 10-60 mIU/mL aralığında LH biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Biyosensor numarası	Doğrusallık katsayısı (R^2)	Doğru denklemi	Tayin aralığı (mIU/mL)
1	0.9940	$y = 0.3815x - 1.6734$	10-60
2	0.9999	$y = 0.4025x + 0.2680$	10-60
3	0.9923	$y = 0.4617x + 0.1970$	10-60
4	0.9957	$y = 0.6342x + 0.7473$	10-60
5	0.9962	$y = 0.6405x + 3.1453$	10-60
6	0.9990	$y = 0.6750x - 2.1780$	10-60
7	0.9978	$y = 0.6952x - 0.4127$	10-60
8	0.9956	$y = 0.7703x - 1.2583$	10-60

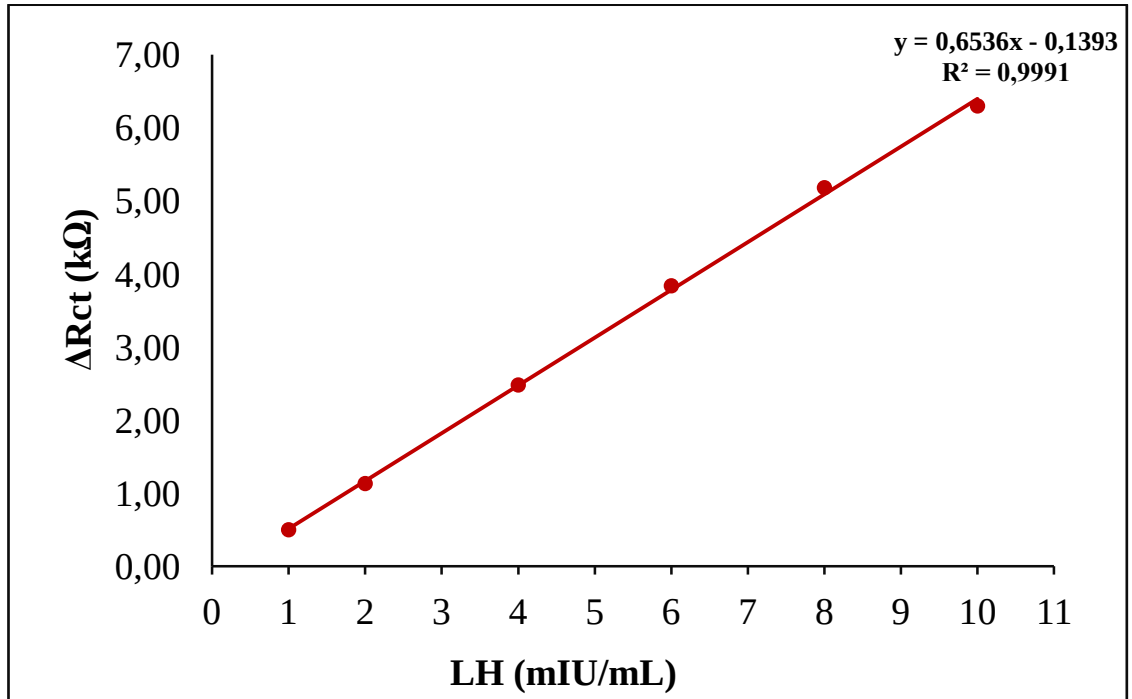
Tablo 4.8a ve 4.8b’de de görüldüğü gibi hazırlanan 8 farklı LH biyosensöründe de benzer eğim ve doğrusallık katsayısı elde edilebilmiştir. Bu da immobilizasyon yöntemimizin doğruluğunu tekrar üretilebilirliğini göstermektedir.

4.1.3.3. Yapay serumda uygulama

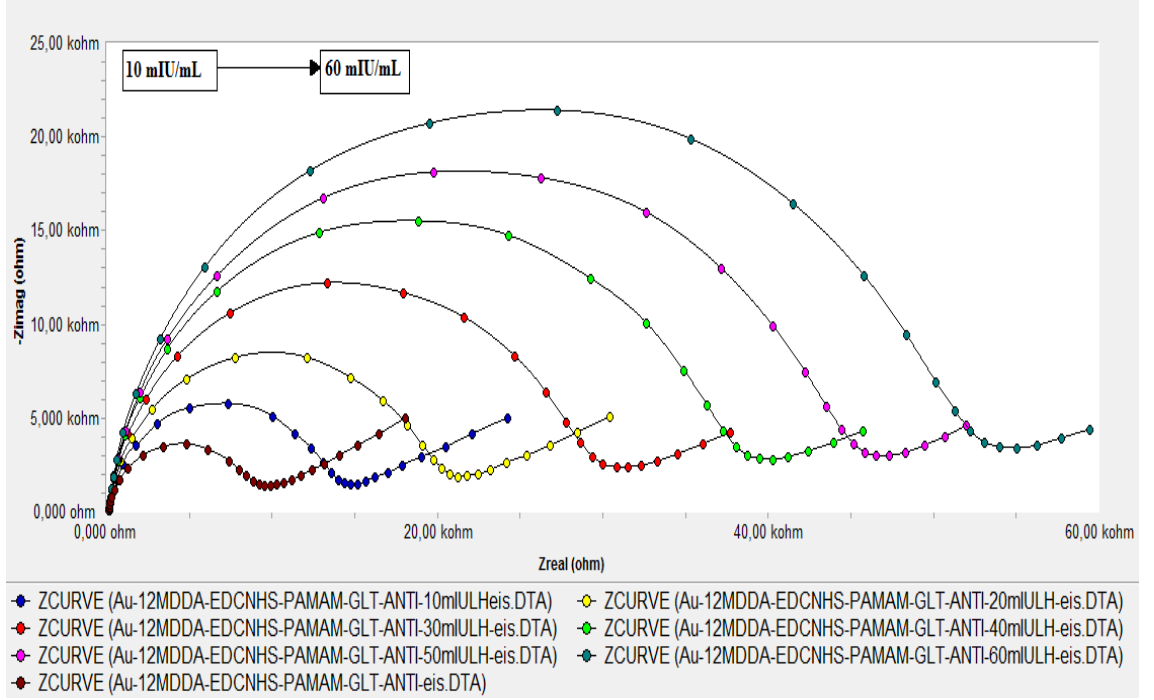
Optimize edilmiş immobilizasyon basamakları değerleri kullanılarak (5 mM 12-MDDA; 0.2 M EDC/0.05 M NHS; % 1.5 PAMAM; % 1 Glutaraldehit; 10 µg/mL Anti-LH) hazırlanan biyosensörler ile yapay serumda ölçümler alınmıştır. Bu biyosensörlerden 1-10 mIU/mL LH tayin aralığında alınan ölçümlerin Nyquist eğrileri ve bu eğriler kullanılarak hesaplanan ΔR_{ct} değerleri ile LH konsantrasyonu arasındaki standart kalibrasyon eğrileri Şekil 4.11a ve 4.11b’de, 10-60 mIU/mL LH tayin aralığında alınan ölçümlerin Nyquist eğrileri ve bu eğriler kullanılarak hesaplanan ΔR_{ct} değerleri ile LH konsantrasyonu arasındaki standart kalibrasyon eğrileri Şekil 4.12a ve 4.12b’de gösterilmiştir.



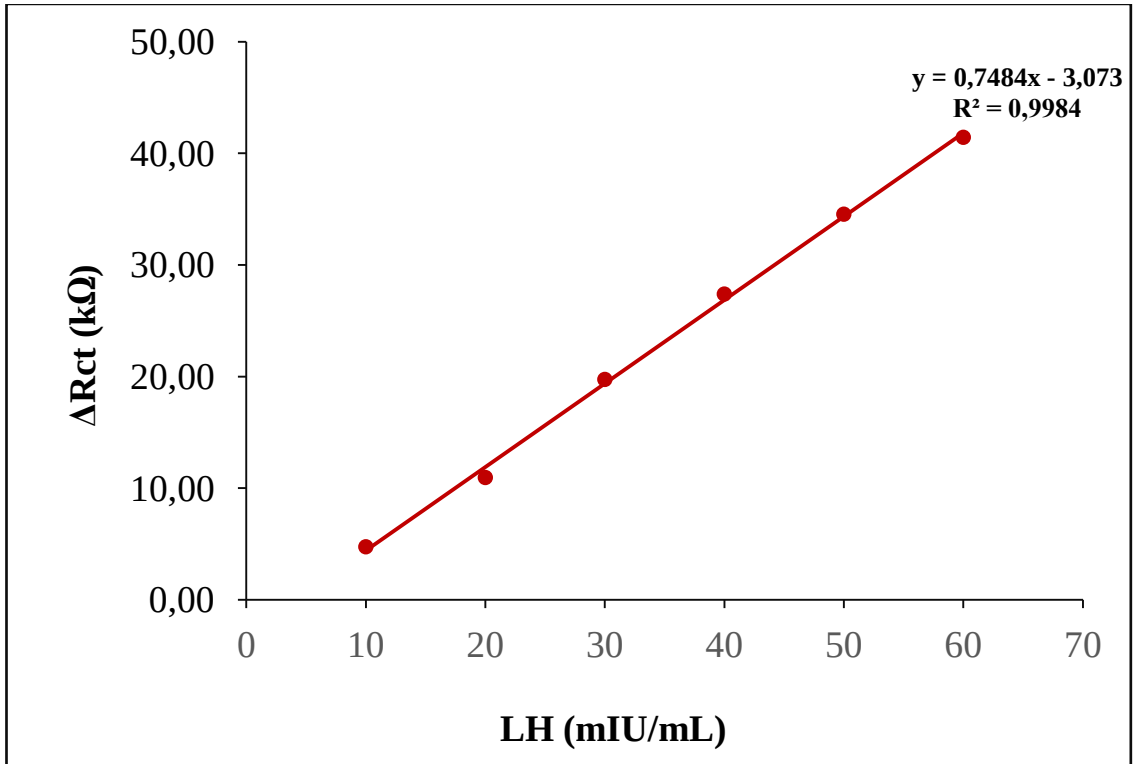
Şekil 4.11a. 1-10 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmalarında elde edilen Nyquist eğrileri



Şekil 4.11b. 1-10 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmasında elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 4.12a. 10-60 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmasında elde edilen Nyquist eğrileri



Şekil 4.12b. 10-60 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmasında elde edilen kalibrasyon grafiği

Yapay serumda hazırlanmış LH porsiyonlarının kalibrasyon grafiklerine ve impedans grafiklerine bakıldığında, serumda bulunan tuzların ve diğer önemli bazı biyomoleküllerin ölçümlere girişim yapmadığı görülmektedir. Bu sebepten dolayı geliştirilen biyosensör, gerçek serum örneklerinde de LH tayinini hassas ve spesifik bir şekilde yapabilme potansiyeline sahiptir.

Geliştirilen biyosensör sisteminin immobilizasyon basamakları için elde edilen optimum değerler Tablo 4.9’da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. LH biyosensörü için elde edilen optimum değerler

İmmobilizasyon adımları	Optimum değerler
12-MDDA konsantrasyonu	5 mM
EDC/NHS konsantrasyonu	0.2 M/0.05 M
PAMAM konsantrasyonu	% 1.5
Glutaraldehit konsantrasyonu	% 1.0
Anti-LH konsantrasyonu	10 µg/mL
LH inkübasyon süresi	60 dk.

Tayin aralığı ise 1-60 mIU/mL olarak bulunmuştur. Bu tayin aralığı literatürde yer alan bazı biyosensörlere göre daha duyarlıdır.

Sonuç olarak LH tayinine yönelik impedans temeline dayalı duyarlı ve tekrar üretilebilirliği yüksek, hızlı, ucuz kimyasallarla yapılan ve kolay uygulanabilen bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör sistemi literatürde yer alan geleneksel yöntemler ve diğer biyosensör yöntemleri ile kıyaslandığında daha kısa sürede ve oldukça duyarlı bir ölçüm olanağı sağlar. Bu sistem cihaz olarak minyatürize edilebildiğinde evde bile kullanılır hale getirilerek kadınların yumurtlama dönemlerini kendilerinin ekstra ekipmanlara ihtiyaç duymadan takip edebilmelerini kolaylaştırabilir. Ayrıca yalnızca kadınların yumurtlama dönemlerinin değil, tam teşekküllü hastaneler dışında sağlık ocağı gibi küçük kliniklerde bile polikistik over sendromu, hipofiz adenomları, primer cinsiyet bozuklukları, hipogonadizm gibi rahatsızlıkların teşhis ve takibinde de herhangi bir teknik elemana ve ekstra ekipmana gereksinim duymadan LH seviyelerinin belirlenmesi mümkün olabilir.

BÖLÜM 5

KAYNAKLAR

1. A. Telefoncu, *Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu-Biyosensörler, (Telefoncu,A.,v.d.)*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi-İzmir, 1999 1-2.
2. P.R. Coulet, "*What is a Biosensor?*" *Chapter 1; "Biosensor principles and applications"*, Ed: L.J. Blum, P.R. Coulet, Marcel Dekker Inc., New York, 1991, 1-6.
3. A.P.F. Turner, *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Ed: A.P.F. Turner, I. Karube, and G.S. Wilson, Oxford University Press, Oxford, 1987, 5-7.
4. J.D. Newman, L.J. Tigwell, P. J. Warner, A. P. F. Turner, *Biosensors: boldly going into the new millennium*, Sensor Review 21, 268 – 271, (2001).
5. A. Rasooly, *Biosensor technologies*, Methods; 37(1):1-3, (2005)
6. R.M. Joshi, *Biosensors*, Isha Books, Hindistan, (2006).
7. Y. Li, *Biosensors*, pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology (2006).
8. A.G. Mayes, *Chapter 4: Immobilization chemistry of biological recognition molecules*. Biomolecular Sensors, 49-86. E. Gizeli, and C. R. Lowe, eds. London, UK: Taylor & Frances (2002).
9. A. Ulman, *An Introduction to Ultra-thin Organic Films: From Langmuir-Blogett to Self-Assembly*, (Academic Press Inc, New York, 1991).

10. C.D. Bain, J. Evall, G.M. Whitesides, ***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, (1989).
11. T. Wink, S.J. van Zuilen, A. Bult, W.P. van Bennekom, ***Self-assembled Monolayers for Biosensors***, Analyst, 122, 43–50, (1997).
12. N.K. Chaki, K. Vijayamohanan, ***Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications***, Biosensors & Bioelectronics 17, 1–12, (2002).
13. C. Engtrakul, L.R. Sita, ***Ferrocene-based nanoelectronics: 2,5-diethynylpyridine as a reversible switching element***, Nano Letters 1(10), 541-549, (2001)
14. D. Chen, L. Jinghong, ***Interfacial design and functionization on metal electrodes through self-assembled monolayers***, Surface Science Reports 61, 445–46, (2006).
15. R. Comeaux, P. Novotny, ***Biosensors: Properties, Materials and Applications***, Nova Science Publishers Inc., A.B.D, (2009).
16. M.K. Sezgintürk, ***Biyosensörlerde İmpedans Uygulamaları***, II. Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, (2012).
17. J.R Macdonald, ***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, (1987).
18. I. Rubinstein, ***Physical electrochemistry Principles, Methods and Applications***, CRC Press, New York, (1995).
19. E. Barsoukov and J.R. Macdonald, ***Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications***, John Wiley & Sons, Inc., (2005).
20. W. Moritz, J. Szeponik, F. Lisdat, A. Friebe, S. Krause, R. Hintsche, F. Scheller, ***Diversiform applications of LaF3 for chemical semiconductor sensors***, Sensors and Actuators B 7, 497-500, (1992).

21. A. Friebe, F. Lisdat, W. Moritz, ***Polymer Membranes on Chemical Semiconductor Devices-Their Electrical Influence on Sensor Characterization***, Sens Mater, 5, 65-82, (1993)
22. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, ***Principles of Instrumental Analysis***, Brooks/Cole, A.B.D, (1997)
23. A.W. Bott, ***Current Separation***, 19, 71–75 (2001).
24. E. Katz, I. Willner, ***Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors.***, Electroanalysis, 15 (11), 913–947, (2009)
25. J.G. Guan, Y.Q. Miao, Q.J. Zhang, ***Impedimetric Biosensors***, Bioscience and Bioengineering 97, 219–226 (2004).
26. L. Yang, R. Bashir, ***Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria***, Biotechnology Advances, 26 (2), 135–150, (2008)
27. M.I. Prodromidis, ***Impedimetric immunosensors: A review***, Electrochimica Acta, 55 (14), 4227–4233, (2010)
28. L. Stryer, ***Biochemistry***, New York, NY: W. H. Freeman. (1988)
29. R.K. Shervedani, A.H. Mehrjardi, N. Zamiri, ***A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor***, Bioelectrochemistry, 69, 201-208, (2006).
30. C.J. Mc Neil, D Athey, M Ball, H. Wo, S. Krause, R.D. Armstrong, J.D. Wright, K. Rawson, ***Electrochemical sensor for measurement of urea and creatinine in serum based on AC impedance measurement of enzyme-catalyzed polymer transformation***, Analytical Chemistry, 67, 3928-3935, (1995).
31. M. Cortina, M.J. Esplandiu, S. Alegret, M. Valle, ***Urea impedimetric biosensor based on polymer degradation onto interdigitated electrodes***, Sensors and Actuators B: Chemicals, 118, 84-89, (2006).

32. J.J. Gooding, E.A. Hall, ***Practical and theoretical evaluation of an alternative geometry enzyme electrode***, Biosensors and Bioelectronics, 11, 1031-1040, (1996).
33. C. Sumner, S. Krause, A. Sabot, K. Turner, C.J. McNeil, ***Biosensor based on enzyme-catalyzed degradation of thin polymer films***, Biosensors and Bioelectronics, 16, 709-714, (2001).
34. B.A. Cornell, V.L.B. Braach-Maksvytis, L. G. King, P. D. J. Osman, B. Raguse, L. Wieczorek, R. J. Pace, ***Nature***, 387, 580-583, (1997).
35. A.G.E. Saum, R.H. Cumming, F.J. Rowell, ***Use of substrate coated electrodes and AC impedance spectroscopy for the detection of enzyme activity***. Biosensors and Bioelectronics, 13, 511–518 (1998).
36. F. Abdelmalek, M. Shadaram, H. Boushriha, ***Ellipsometry measurements and impedance spectroscopy on Langmuir–Blodgett membranes on Si/SiO₂ for ion sensitive sensor***. Sensors and Actuators B: Chemical 72, 208–213 (2001).
37. A. Mulchandani, K.R. Rogers, ***Affinity Biosensors: Techniques and Protocols***, (Humana Press, London, 1998).
38. D.G. Buerk, ***Biosensors: Theory and Applications***, Taylor & Francis, ABD, (1995).
39. S. Hleli, C. Martelet, A. Abdelghani, N. Burais, N. Jaffrezic-Renault, ***Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer***, Sensors and Actuators B: Chemical, 113:711-717, (2006).
40. J.S. Daniels, N. Pourmand, ***Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges***, Electroanalysis, 19, 1239- 1257, (2007).
41. C. Berggren, G. Johansson, ***Capacitance measurements of antibody-antigen interactions in a flow system***, Analytical Chemistry, 69, 3651-3657 (1997).
42. M. Jie, C.Y. Ming, D. Jing, L.S. Cheng, L.H. Na, F. Jun, C.Y. Xiang, ***An electrochemical impedance immunoanalytical method for detecting immunological interaction of human mammary tumor associated glycoprotein***

- and its monoclonal antibody*, Electrochemistry Communications, 1 (9): 425-429, (1999)
43. S.C Pak, W. Penrose, P.J Hesketh, ***An ultrathin platinum film sensor to measure biomolecular binding***, Biosensors and Bioelectronics, 16: 371–379, (2001).
 44. Y.X Hou, N Jaffrezic-Renault, C. Martelet, A.D. Zhang, J. Minic-Vidic, T. Gorojankina, M.A. Persuy, E. Pajot-Augy, R. Salesse, V. Akimov, L. Reggiani, C. Penetta, E. Alfinito, O. Ruiz, G. Gomilla, J. Samitier, A. Errachid, ***Gold surface functionalization and patterning for specific immobilization of olfactory receptors carried by nanosomes***, Biosensors and Bioelectronics, 22:1550-1555, (2007).
 45. J. Ma, Y.M. Chu, J. Di, S.C. Liu, H.N. Li, J. Feng, Y.X. Ci, ***An electrochemical impedance immunoanalytical method for detecting immunological interaction of human mammary tumor associated glycoprotein and its monoclonal antibody.***, Electrochem. Commun., 1, 425–428 (1999).
 46. A. Sargent, O.A. Sadik, ***Monitoring antibody–antigen reactions at conducting polymer-based immunosensors using impedance spectroscopy.***, Electrochimica Acta, 44, 4667–4675 (1999).
 47. O. Ouerghi, A. Touhami, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, H. Ben Ouada, S. Cosnier, ***Impedimetric immunosensor using avidin–biotin for antibody immobilization***, Bioelectrochemistry, 56, 131–133 (2002).
 48. L. Geoffrey, P. Peter, V. Pankaj, ***Electrochemical impedance spectroscopy as a platform for reagentless bioaffinity sensing.***, Sensors and Actuators B: Chemical 78, 249–256 (2001).
 49. X. Cui, R. Pei, Z. Wang, F. Yang, Y. Ma, S. Dong, X. Yang, ***Layer-by-layer assembly of multilayer films composed of avidin and biotin-labeled antibody for immunosensing***, Biosensors and Bioelectronics 18, 59–67 (2003).
 50. P. Van Gerwen, W. Laureyn, W. Laureys, ***Nanoscale interdigitated electrode arrays for biochemical sensors.***, Sensors and Actuators B: Chemical 49, 73–80 (1998).

51. L.I. Andersson, ***Review: molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field.***, Journal of Chromatography B, 745, 3–13 (2000).
52. T. Panasyuk-Delaney, V.M. Mirsky, M. Ulbricht, O. S. Wolfbeis, ***Impedimetric herbicide chemosensors based on molecularly imprinted polymers.***, Analytica Chimica Acta, 435, 157–162 (2001).
53. M. Rajendran, A. D. Ellington., ***Chapter 12: Nucleic acids for reagentless biosensors.*** Optical Biosensors—Present & Future, 369-396. F. S. Ligler, and C. A. R. Taitt, eds. Amsterdam, Netherlands: Elsevier. (2002)
54. S. Tombelli, M. Minunni, and M. Mascini, ***Analytical applications of aptamers.*** Biosensors and Bioelectronics 20: 2424-2434, (2005).
55. J. Kafka, O. Panke, B. Abendroth, F. Lisdat, ***A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy,*** Electrochimica Acta 53 7467–7474, (2008)
56. L. Strašák, J. Dvorák, S. Hason, V. Vetterl, ***Electrochemical impedance spectroscopy of polynucleotide adsorption.***, Bioelectrochemistry, 56, 37–41 (2002).
57. J. Deng, C.S. Toh, ***Impedimetric DNA Biosensor Based on a Nanoporous Alumina Membrane for the Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus,*** Sensors, 13, 7774-7785, (2013).
58. A. Li, F. Yang, Y. Ma, X. Yang, ***Electrochemical impedance detection of DNA hybridization based on dendrimer modified electrode,*** Biosensors and Bioelectronics, 22:1716-1720, (2007).
59. Y. Xu, L. Yang, X.Y. Ye, P.G. He, Y.Z. Fang, ***Impedance DNA biosensor using electropolymerized polypyrrole/multiwalled carbon nanotubes modified electrode,*** Electroanalysis, 18, 873-881, (2006).
60. F. Davis, M.A. Hughes, A.R. Cossins, S.P.J. Higson ***Single gene differentiation by DNA-modified carbon electrodes using an AC impedimetric approach*** Analytical Chemistry, 79, 1153-1157, (2007).

61. T.S Hug, **Biophysical methods for monitoring cell-substrate interactions in drug discovery**, Assay and Drug Development Technologies, 1, 479-488, (2003).
62. R.A. Yotter, D.M. Wilson “**A review of photodetectors for sensing light-emitting reporters in biological systems**” IEEE Sensors Journal, 4, 412-429, (2004).
63. H.Y. Yin, F.L. Wang, A.L. Wang, J. Cheng, Y.X. Zhou, **High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections**, Analytical Letters, 40, 85-94, (1996).
64. M. Jonsson, K. Welch, S. Hamp, M. Stromme, **Bacteria counting with impedance spectroscopy in a micro probe station**, The Journal of Physical Chemistry, 110: 1165-1169, (2006).
65. L.J. Yang, Y.B. Li, **Protective role of supplement with foreign Bifidobacterium and Lactobacillus in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury**, Journal of Microbiological Methods, 64, 9-16, (2006).
66. R. Maalouf, C. Fournier-Wirth, J. Coste, H. Chebib, Y. Saikali, O. Vittori, A. Errachid, J.P. Cloarec, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault **Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance**, Analytical Chemistry, 79, 4879-4886, (2007).
67. A. Altıntaş, **Endokrin Sistem ve Hormonlar**, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Baskı Atölyesi, Ankara
(acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/1020/mod_resource/content/1/2-3.%20Hormonlar.pdf) (26.10.2015 tarihi itibariyle mevcuttur.)
68. T. Ası, **Tablolarla Biyokimya**, Cilt 2, Ankara, 73-111, (1999).
69. A. L. Lehninger, **Principles of Biochemistry**, 4th EditoinW.H. Freeman, 881-917, (2004)
70. G.M. Cooper, R.E.Hausman, **Hücre- Moleküler Yaklaşım**, Çeviren: M. Sakızlı, N. Atabey, İzmir Tıp Kitapevi, (2006).
71. H.Gibo, M. Hokama, K. Kyoshima, S. Kobayashi, **Arteries to the pituitary**, Nippon Rinsho 51 (10): 2550–4, (1993).

72. P.H. Seeburg, A.J. Mason, T.A. Stewart, K. Nikolics, ***The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction.***, Recent Progress in Hormone Research, 43:69–98, (1987).
73. W. Vale, C. Rivier, M. Brown, ***Regulatory peptides of the hypothalamus.***, Annual Review Physiology, 39:473– 527, (1977).
74. X. Jiang, J. A. Dias, X. He, ***Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: Insights to signaling***, Molecular and Cellular Endocrinology 382, 424–451, (2014).
75. J.G. Pierce, T.F. Parsons, ***Glycoprotein hormones: structure and function.*** Annual Review Biochemistry 50, 465–495, (1981).
76. W. Antony, P. D. Norman, ***Chapter3-The Hypothalamus and Anterior Pituitary Hormones*** (Third Edition), 55-79, (2015)
77. W. Feng, J.R. Huth, S.E. Norton, R.W. Ruddon, ***Asparagine-linked oligosaccharides facilitate human chorionic gonadotropin beta-subunit folding but not assembly of prefolded beta with alpha.***, Endocrinology 136, 52–61, (1995a).
78. W. Feng, M.M. Matzuk, K. Mountjoy, E. Bedows, R.W. Ruddon, I. Boime, ***The asparagine-linked oligosaccharides of the human chorionic gonadotropin beta subunit facilitate correct disulfide bond pairing.***, Journal of Biological Chemistry 270, 11851– 11859, (1995b).
79. J. Trevino, A. Calle, J. M. Rodriguez-Frade, M. Mellado, L. M. Lechuga, ***Single –and multi- analyte determination of gonadotropic hormones in urine by Surface Plasmon Resonance immunoassay***, Analytica Chimica Acta 647, 202–209, (2009).
80. J. H. Liu, S. S. Yen, ***Induction of midcycle gonadotropin surge of ovarian steroids in woman: a critical evaluation***, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 57, 797-802, (1983).
81. R. L. Van de Wiele, J. Bogumil, I. Dyrenfurt, M. Ferin, R. Jewelewicz, M. Varren et al., ***Mechanism regulating the menstrual cycle in women***, Recent Progress in Hormone Research 26, 63-103, (1970).

82. R. A. Booth Jr, J. Y. Weltman, V. I. Yankov et al. ***Mode of pulsatile follicle-stimulating hormone secretion in gonadal hormone-sufficient and -deficient women--a clinical research center study***, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 81:3208-3214, (1996).
83. J. L. Sharpless, J. G. Supko, K. A. Martin, J. E. Hall, ***Disappearance of endogenous luteinizing hormone is prolonged in postmenopausal women***, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 84:688-694, (1999).
84. L. Wide, ***Male and female forms of human follicle-stimulating hormone in serum***, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 55:682-688, (1982).
85. J.U. Baenziger, E.D. Green, ***Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: Structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin***, Biochimica Biophysica Acta. 947:287-306, (1988).
86. T.C. Liu, G.L. Jackson, ***Effect of in vivo treatment with estrogen on luteinizing hormone synthesis and release by rat pituitaries in vitro***, Endocrinology. 100:1294-1302, (1977).
87. W.S. Evans, K.T. Brill, J.D. Veldhuis, ***Effects of Aging on Gonadotropin/Ovarian and Growth Hormone/Ovarian Relationships in Normal Women***, Principles of Gender-Specific Medicine, 1197-1215, (2004)
88. C.J. Anobile, J.A. Talbot, S.J. McCann, V. Padmanabhan, W.R. Robertson, ***Glycoform composition of serum gonadotropins through the normal menstrual cycle and in the post menopausal state***, Molecular Human Reproduction 4, 631-639, (1998).
89. L. Wide, K. Eriksson, ***Dynamic changes in glycosylation and glycan composition of serum FSH and LH during natural ovarian stimulation***. Upsala Journal Medical Sciences 118, 153-164, (2013).
90. P.G. Burgon, P.G. Stanton, D.M. Robertson, ***In vivo bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms***, Endocrinology 137, 4827-4836, (1996).

91. D. Ezcurra, P. Humadian, ***A review of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin hormone when used in assisted reproductive technology***, Reproductive Biology and Endocrinology 12:95, (2014).
92. S.C. Reader, W.R. Robertson, E. Diczfalusy, ***Microheterogeneity of luteinizing hormone in pituitary glands from women of pre- and postmenopausal age***, Clinical Endocrinology (Oxford) 19, 355-363, (1983).
93. L. Wide, ***Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FHS, LH and TSH. II. Relationship to sex and age.***, Acta Endocrinology (Copenhagen) 109, 109-197, (1985).
94. P. Marrama, A.A. Zaidi, V. Montanini, M.F. Celani, K. Cioni, C. Carani, et al., ***Age and sex variations in biologically active and immunoreactive serum luteinizing hormone***, Journal of Endocrinological Investigation 6, 428-433, (1983).
95. J. Choi, J. Smits, ***Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: distinguishing unique physiologic roles***, Gynecological Endocrinology, 30(3): 174–181, (2014).
96. Y.Q. Ding, I. Huhtaniemi, ***Preponderance of basic isoforms of serum luteinizing hormone is associated with the high bio/immune ratio of LH in healthy women and in women with polycystic ovarian disease***. Human Reproduction 6, 346-350, (1991).
97. M.G. Ropelato, M.C. Garcia-Rudaz, C. Castro-Fernandez, A. Ulloga-Aguirre, M.E. Escobar, M. Barontini, et al., ***A preponderance of basic luteinizing hormone (LH) isoforms accompanies in appropriate hypersecretion of both basal and pulsatile LH in adolescent with polycystic ovarian syndrome***, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 84, 4629-4636, (1999).
98. L. Wide, T. Naessen, I. Sundstorm-Poromaa, K. Eriksson, ***Sulfonation and sialylation of gonadotropins in women during the menstrual cycle, after menopause, and with polycystic ovarian syndrome and in men***. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 92, 4410-4417, (2007).

99. M. Bergendahl, J.D. Veldhuis, *Is there a physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? III. Luteinizing hormone heterogeneity: a medical physiologist perspective*, Human Reproduction 16, 1058-1064 (2001).
100. P. Marrama, V. Montanini, M.F. Celani, C. Carani, K. Cioni, M. Bazzani, et al., *Decrease in luteinizing hormone biological activity/immunoreactivity ratio in elderly men*, Maturitas 5, 223-231, (1984).
101. B.A. Warner, M.L. Dufau, R.J. Santen, *Effect of aging and illness on the pituitary testicular axis in men: qualitative as well as quantitative changes in luteinizing hormone*, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 60, 263-268, (1985).
102. C. Castro-Fernandez, A. Olivares, D. Soderlund, J.C. Lopez-Alvarenga, E. Zambrano, J.D. Veldhuis, et al., *A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men*, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 85, 4603-4610, (2000).
103. V. Kalia, A.N. Jadhav, K. Bhutani, *Luteinizing hormone estimation*, Endocrine Research 30, 1-17, (2004).
104. M.K. Erbil, *Laboratuvar Testleri ve Klinik Kullanımı*, GATA Komutanlığı Basımevi Müdürlüğü, 405-406, (2007).
105. M.W. Elmlinger, W. Kuhnel, M.B. Ranke, *Reference ranges for serum concentrations of lutropin (LH), follitropin (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone-binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), cortisol and ferritin in neonates, children and young adults*, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 40(11), 1151-1160, (2002).
106. D.J. Pritchard, H. Morgan, J.M. Cooper, *Simultaneous determination of follicle stimulating hormone and luteinising hormone using a multianalyte immunosensor*, Analytica Chimica Acta 310, 251-256, (1995).

107. Z.O Uygun, M.K Sezgintürk, ***A novel, ultra sensible biosensor built by layer-by-layer covalent attachment of a receptor for diagnosis of tumor growth***, Analytica Chimica Acta, 706:343-349, (2011).