



EGE ÜNİVERSİTESİ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLİNİK ANALİZLERE YÖNELİK APTAMER TABANLI ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR TASARIMI

Ezgi KIVRAK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFÇILAR

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 10.01.2019

Bornova-İZMİR

2019

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KLİNİK ANALİZLERE YÖNELİK APTAMER
TABANLI ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR
TASARIMI**

Ezgi KIVRAK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFCILAR

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 10.01.2019

Bornova-İZMİR

2019

Ezgi Kıvrak tarafından Yüksek lisans tezi olarak sunulan “Klinik analizlere yönelik aptamer tabanlı elektrokimyasal biyosensör tasarımı” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 10/01/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:**İmza**

Jüri Başkanı
Raportör Üye
Üye

Prof. Dr. Kana Kadayırcılar
Prof. Dr. Selahattin Yılmaz
Prof. Dr. Özlem Yeşil
CELİKTAŞ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

10 / 01 / 2019

İmzası

Adı - Soyadı

Ezgi KIVRAK

ÖZET**KLİNİK ANALİZLERE YÖNELİK APTAMER TABANLI
ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR TASARIMI**

KIVRAK, Ezgi

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFCILAR

Ocak 2019, 106 sayfa

Bu çalışmada, kanser hücresi tayinine yönelik aptamer tabanlı bir nanobiyosensör tasarımı yapılmıştır. Sensör yüzeyleri olarak elektroegirme yöntemiyle oluşturulmuş iletken PAN (poliakrilonitril) ve PPy (polipirrol) kompozit nanofiberleri geliştirilmiştir. Aptamer ile modifiye edilmiş nanofiber sensör yüzeyleri model hücre olarak kullanılan A549 akciğer kanser hücresinin tayinine olanak sağlamıştır.

Çalışmada tek kullanımlık grafit elektrotlar (PGE) kullanılmıştır. Elektrot yüzeyinde oluşturulan nanofiberlerin (NFPGE) nitril gruplarını karboksil gruplarına çevirmek için elektrot bir NaOH sulu çözeltisi ile kısmen hidroliz edilmiştir. Aptamer dizisi, karbodimid (kovalent bağlanma) kimyası aracılığıyla fonksiyonelleştirilmiş nanofiber modifiyeli elektrot (f-NFPGE) yüzeyine tutturulmuştur. Kanser hücrelerinin 37.5 °C sıcaklıkta aptamer modifiye edilmiş elektrot yüzeyi ile olan etkileşimi, 5mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ varlığında Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) yöntemi ile izlenmiştir.

Tasarlanan aptasensörün seçiciliği HeLa hücreleri kullanılarak sağlanmıştır. Aptasensörün en uygun çalışma koşullarının belirlenmesi için optimum aptamer ve hücre konsantrasyonları ve yıkama zamanı koşulları optimize edilmiştir. Belirlenen optimum koşullar altında tasarlanan sensörün seçiciliği sırasıyla, biyolojik tanıma molekülü olarak başka hedefe özgül aptamer ve hedef molekül olarak deforme olmuş hücreler kullanılarak doğrulanmıştır.

Kanser teşhisinde kullanılan diğer yöntemlere kıyasla hızlı teşhis imkanı sunan düşük maliyetli bir aptasensör geliştirilmiştir. Ayrıca tek kullanımlık elektrot sistemi ile bir mikroçip tasarımının temeli olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmada tayin limiti 3.41 hücre/mL olarak hesaplanmıştır ve tasarlanan aptasensörün yüksek hassasiyette tayin yapabildiğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Aptamer-tabanlı biyosensör, Elektrokimyasal impedans spektroskopisi, nanofiber, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, klinik analiz

ABSTRACT**APTAMER BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR DESIGN
FOR CLINICAL ANALYSIS**

KIVRAK, Ezgi

MSc in Biomedical Technologies

Supervisor: Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFCILAR

January 2019, 106 pages

In this work, an aptamer-based nanobiosensor for cancer cell detection was developed. A composite nanofiber that consists of conductive PAN (polyacrylonitrile) and PPy (polypyrrole) polymers were used as sensor surfaces. The aptamer modified nanofiber sensor surfaces allowed the determination of the A549 lung cancer cell used as the model case.

Disposable pencil graphite electrodes (PGE) were used as a working electrode. Nanofibers were electrospun directly onto PGE surfaces in order to obtain nanofiber modified electrodes (NFPGE) for the first time. The NFPGE electrode was partially hydrolyzed with a NaOH aqueous solution to convert the nitrile groups of the nanofiber into carboxyl groups. Aptamer sequence was immobilized onto functionalized-NFPGE (f-NFPGE) surface covalently via carbodiimide chemistry. The binding of cancer cells onto aptamer modified electrode surfaces at 37.5 °C were monitored by Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) transduction of the R_{ct} in the presence of 5mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

The designed aptasensor's selectivity was performed by using HeLa cells. Optimization of the aptasensor's performance was performed by the detection of optimum probe and target concentrations and washing time conditions. Under the optimized conditions, the selectivity was further investigated by using non-specific aptamer as a recognition molecule and deformed cells as target molecules, respectively.

The developed aptasensor is related to a low-cost and fast detection methodology in comparison to other cancer monitoring techniques. On the other hand, disposable electrode system technique proved applicability of the system to microchip technology. With the detection limit of 3.41 cell /mL shows that the designed aptasensor is capable to perform a highly sensitive detection.

Keywords: Aptamer-based biosensor, Electrochemical impedance spectroscopy, nanofiber, non-small lung cancer, clinical analysis

TEŞEKKÜR

Amacım doğrultusunda başladığım bu akademik yolda ihtiyaç duyduğum her konuda benden desteğini esirgemeyen ve tecrübeleriyle çalışmalarına katkı sağlayan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFCILAR'a teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Çalışmalarına bulundukları değerli katkılarından dolayı İzmir Yüksek Teknoloji Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Selahattin YILMAZ'a ve Dr. Atike İNCE YARDIMCI'ya; Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK'a ve Arş. Gör. Recep İLHAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarına maddi destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Laboratuvarıda geçirdiğim zamanları daha keyifli hale getiren ve her konuda desteklerini hissettiğim değerli çalışma arkadaşlarım Hande DURUSÖZ'e, İrem AYDIN KIRLANGIÇ'a, Sezin YÜKSEL'e ve Suzan YANIK'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın ve hayatımın her aşamasında büyük bir sabır göstererek verdikleri maddi ve manevi destek ile hep yanımda olan canım ailem annem Şerife KIVRAK'a, babam Erbil KIVRAK'a, kardeşim Orkun KIVRAK'a, teyzem Seyide GÖRMENOĞLU'na ve can dostum Cansu SARSILMAZ'a teşekkür ederim.

Ezgi KIVRAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
TEŞEKKÜR.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XVI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XXI
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1 Elektrokimya	5
2.1.1 Elektriksel çift tabaka	5
2.1.2 Elektrokimyasal olaylarda kütle aktarım yolları	6
2.1.3 Faradayik ve Faradayik olmayan akımlar	7
2.1.4 Elektrokimyasal hücre ve bileşenleri.....	9
2.1.5 Elektroanalitik yöntemler	12
2.2 Biyosensörler.....	22
2.2.1 Algılama bölümüne göre biyosensörler.....	24
2.2.2 Çevirici kısma (transducer) göre biyosensörler.....	34
2.2.3 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler.....	38
2.3 Aptamerler.....	39
2.3.1 Aptamer-hedef molekül etkileşimleri.....	40
2.3.2 Aptamerlerin <i>in vitro</i> seçilme protokolü	41

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

Sayfa

2.3.3 Aptamerlerin avantajları.....	47
2.3.4 Aptamer-tabanlı biyosensörler (Aptasensörler).....	49
2.4 Nanomateriyaller ve Biyomedikal Alanda Kullanımı	51
2.4.1 Nanopartiküller.....	52
2.4.2 Nanotüpler	53
2.4.3 Nanofiberler	54
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	59
3.1. Kullanılan Üçlü Elektrot Sistemi	59
3.2 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.....	60
3.3 Kullanılan DNA Dizileri ve Hazırlanışları	62
3.4 Kullanılan Kansere Hücre Hatları	63
3.5 Kullanılan Yöntemler.....	63
3.5.1 Nanofiber modifiyeli tek kullanımlık grafit elektrotların hazırlanması	64
3.5.2 Elektrot yüzeylerinin kimyasal aktivasyonu	65
3.5.3 Aptamer ile biyomodifikasyon.....	66
3.5.4 Kansere hücreleri ile etkileşim.....	67
3.5.5 Elektrokimyasal ölçümler	67
3.6 İncelenen Parametreler.....	68
3.6.1 Nanofiber modifiye yüzeye dsDNA bağlanması	68
3.6.2 Tasarlanan aptasensörün hassasiyetinin artırılmasına yönelik en uygun koşulların saptanması	69
3.6.3 Tasarlanan aptasensörün seçiciliğinin doğrulanmasına yönelik incelenen parametreler	70

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

Sayfa

3.6.4 Tasarlanan aptasensörün taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) incelenmesi	71
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	72
4.1 KHDAK Hücrelerine Spesifik Aptasensör Geliştirilmesi	72
4.2 Nanofiber Modifiye Yüzeyde dsDNA Etkisi	74
4.2.1 Voltametrik ölçümler	74
4.2.2 İmpedimetrik ölçümler	75
4.3 Tasarlanan Aptasensöre Yönelik En Uygun Koşulların Saptanmasına Ait Sonuçların Değerlendirilmesi	76
4.3.1 Aptamer konsantrasyonunun etkisi	76
4.3.2 Hücre konsantrasyonunun etkisi.....	78
4.3.3 Tayin sınırının (LOD) belirlenmesi.....	80
4.3.4 Yıkama zamanının etkisi	81
4.4 Tasarlanan Aptasensörün Seçiciliğinin Doğrulanması	83
4.4.1 Aptasensörün seçiciliğinin HeLa hücreleri ile kontrol edilmesi.....	83
4.4.2 Biyolojik tanıma elemanının seçiciliğe olan etkilerinin incelenmesi	84
4.4.3 Hedef hücrenin seçiciliğe olan etkisinin incelenmesi.....	85
4.5 Oluşturulan Aptasensörün SEM ile Karakterizasyonu.....	87
5. GENEL SONUÇLAR	89
KAYNAKLAR DİZİNİ	91
ÖZGEÇMİŞ	105

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Farklı kanser tiplerine bağlı olarak gerçekleşen ölümler	2
2.1 Elektriksel çift tabaka: (a) Elektrot yüzeyinde elektriksel çift tabakanın yapısı, (b) elektrot yüzeyinden uzaklığa göre potansiyel değişimi.....	6
2.2 Kütle aktarım olaylarının şematik gösterimi	7
2.3 Üçlü elektrot sisteminin şematik gösterimi	9
2.4 Döngüsel voltametrizde uygulanan potansiyelin zamana bağlı değişimi..	14
2.5 $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$ tersinir redoks tepkimesine ilişkin döngüsel voltamogram	15
2.6 Diferansiyel puls voltametrisinde kullanılan uyarma sinyalleri; (a) Zamana bağlı potansiyel grafiğinde uygulanan pulslar, (b) DPV yöntemi ile ediletilen voltamogram gösterilmiştir.	17
2.7 İmpedans'ın potansiyel(zaman) ve akım(zaman) büyüklüklerine bağımlı matematiksel gösterimi	19
2.8 Nyquist eğrisi.....	20
2.9 Randles devresinin şematik gösterimi	21
2.10 Biyosensörün yapısı.....	22
2.11 Nükleik asitlerin bileşenleri. (a) nükleotidlerin üç yapıtaş molekülü, (b) bir nükleotidin yapısı ve (c) her nükleotidin bir sonraki nükleotid ile fosfodiester bağıyla bağlanması sonucu nükleik asit (polinükleotid) zinciri oluşur.	27

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

2.12 DNA çift sarmalının birbirine bağlanmasını sağlayan hidrojen bağlarının azotlu bazlar arasındaki durumu	28
2.13 DNA replikasyonunun şematik gösterimi.....	29
2.14 DNA’da meydana gelen denatürasyon ve renatürasyon olayları.....	30
2.15 Nükleik asit problemlerinin elektrot yüzeyine immobilizasyonunu gösteren farklı yöntemler.....	33
2.16 Aptamer ile hedef molekülü arasında gerçekleşen etkileşim.....	41
2.17 SELEX protokolünün şematik gösterimi	42
2.18 Hücre temelli SELEX yönteminin şematik olarak gösterimi	45
2.19 Farklı aptamer-hedef bağlanma koşulları; (a) aptamer ile küçük hedef moleküllerin oluşturduğu gömülü yapı, (b) hedef molekül ile aptamer arasında oluşan tek-tarafli bağlanma koşulu ve (c) çift-tarafli bağlanma koşulu	50
2.20 Elektrodegiirme yöntemi ve bileşenleri	55
2.21 Taylor konisinin oluşumu	56
2.22 PAN/PPy kompozitiyle oluşturulan nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) 2 µm’lik ölçek ve (b) 200 nm’lik ölçekte farklı büyütme oranlarındaki görüntüler	58
3.1 Üçlü elektrot sisteminin şematik yapısı	59
3.2 Kanser hücresinin tayinine yönelik oluşturulan aptasensörün fabrikasyonunun; (a) elektrodegiirme ve (b) elektrokimyasal bölümü.....	63
3.3 Nanofiber modifiyeli elektrotların aktivasyon, biyomodifikasyon, hücre etkileşimi ve ölçüm basamaklarının şematize halde gösterimi	65

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.4 Karbodimid kimyası ile karboksil gruplarına amino gruplarının kovalent bağlanması	66
4.1 EIS yöntemi ile aptasensörün performansının incelenmesi; (a) yalın f-NFPGE, (b) f-NFPGE/aptamer; (c) f-NFPGE/aptamer/HeLa ve (d) f-NFPGE/aptamer/A549 ile etkileşimden sonra ölçülen Rct değerlerine ait elde edilen Nyquist diyagramı.....	73
4.2 PGE, NFPGE ve f-NFPGE yalın yüzeylerinden ve bu yüzeylere dsDNA bağlandıktan sonra DPV ile ölçülen akım değerlerinin histogram grafiği	75
4.3 PGE, NFPGE ve f-NFPGE yalın yüzeylerinden ve bu yüzeylere dsDNA bağlandıktan sonra EIS ile ölçülen Rct değerlerinin histogram grafiği.....	76
4.4 Optimum aptamer konsantrasyonunun saptanmasına yönelik elde edilen verilerin histogram grafiği	77
4.5 Optimum hücre konsantrasyonunun saptanmasına yönelik elde edilen verilerin histogram grafiği	79
4.6 Tayin sınırının hesaplanması doğrultusunda oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	80
4.7 Optimum yıkama zamanının saptanmasına yönelik elde edilen verilerin histogram grafiği.....	82
4.8 Aptasensörün seçiciliğinin HeLa hücreleriyle kontrol edilmesini gösteren histogram grafiği.....	83
4.9 Biyosensör tasarımında biyoreseptör kısmın değiştirilerek seçiciliğin kontrol edilmesine yönelik elde edilen Rct değerlerine ait histogram grafiği.....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

Şekil

Sayfa

4.10 A549 ve HeLa hücrelerinin mikroskop görüntüleri; kontrol (a)A549, (b) HeLa hücreleri; UV ile kontrollü öldürülmüş (c) A549, (d) HeLa hücreleri ; oda sıcaklığında kontrolsüz öldürülmüş (e) A549, (f) HeLa ; parçalanmış (g) A549, (h) HeLa hücreleri. 85

4.11 Deformasyona uğratılmış hücreler ile seçiciliğin kontrol edilmesine ait elde edilen histogram grafiği..... 86

4.12 Tasarlanan aptasensörün SEM ile karakterizasyonu; (a) PGE, (b) f-NFPGE, (c) aptamer/f-NFPGE, (d)A549/aptamer/f-NFPGE, (e)HeLa/aptamer/f-NFPGE 88

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

2.1 Algılama ve çevirici bölümlerine göre biyosensörler	23
3.1 Deney aşamasında kullanılan çözeltiler ve içerikleri	61
3.2 Deney aşamalarında kullanılan aptamer dizileri.....	62
4.1 Aptamer konsantrasyonlarına karşılık ΔR_{ct} verilerinin kıyaslanması	78
4.2 Hücre konsantrasyonlarına karşılık ΔR_{ct} verilerinin kıyaslanması.....	79
4.3 Yıkama zamanlarına karşılık ΔR_{ct} verilerinin kıyaslanması.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

ACB	Asetat tampon çözeltisi
CV	Döngüsel voltametri
-COOH	Karboksil grubu
DEA	Dietanolamin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMF	N,N-Dimetilformamid
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
dsDNA	çift iplikçikli DNA
EDC	1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)karbodimid hidroklorid
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
f-NFPGE	Fonksiyonelleştirilmiş nanofiber modifiyeli tek kullanımlık grafit elektrot
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
NFPGE	Nanofiber modifiyeli tek kullanımlık grafit elektrot
-NH ₂	Amino grubu
NHS	N- hidroksi süksinimit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (DEVAM)Kısaltmalar

PAN	Poliakrilonitril
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PGE	Tek kullanımlık grafit elektrot
PPy	Polipirol
R _{ct}	Yük transfer direnci
RNA	Ribonükleik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
-SH	Tiyol grubu
ssDNA	tek iplikçikli DNA
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

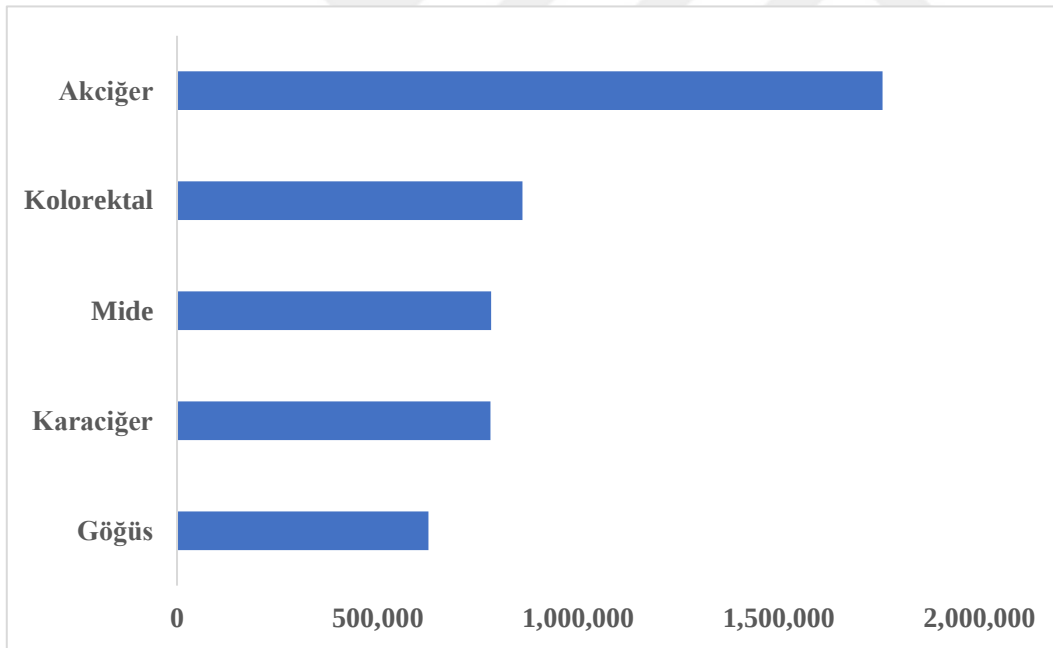
1. GİRİŞ

Geçtiğimiz 20 yıl içerisinde tanımlanıp karakterize edilen yapay nükleik asitler grubuna dahil olan aptamerler, özel genetik diziler, proteinler, hücre yüzey reseptörleri ve steroidler gibi birçok küçük ya da hücreler gibi büyük molekül gruplarına karşı sahip oldukları özgül bağlanma ilgisinden dolayı günümüzde birçok alanda kullanılmaktadır (Bock et al., 1992; Tang et al., 2007 ; Baird, 2010). Aptamerler, geleneksel olarak kullanılan ve geniş bir uygulama alanı bulan antikor moleküllerine kıyasla sahip oldukları birçok avantaj ile antikora rakip moleküller olarak gösterilmektedir. Sahip oldukları yüksek özgüllükteki bağlanma ilgisinden dolayı, aptamerlerin biyosensör çalışmalarında kullanımları yaygınlaşmaktadır (Keefe et al., 2010).

Yüksek duyarlılık ve özgüllükte çalışması, kolay uygulanabilir ve düşük maliyetli olmasından dolayı hayatımızın birçok alanına girmiş olan biyosensör teknolojisi, kompleks analitlerin hızlı bir şekilde analizine imkan sunmaktadır. Günümüzde biyosensör yaklaşımını kullanarak genetik kökenli hastalıkların ve çeşitli kanser türlerinin teşhisi konusunda yapılan çalışmalar hız kazanmış böylelikle erken tanı ve teşhis alanında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

Kanser, vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilen büyük bir hastalık grubu için kullanılan genel bir terimdir. Kanser en belirleyici özelliği, hücre büyümesinin normal sınırlarının ötesine geçmesi sonucu vücudun çeşitli kısımlarını istila eden ve daha sonra diğer organlara yayılan anormal hücre büyümesidir. Kanser diğer organlara yayılması, metastaz olarak adlandırılır. Metastazlar

kansere bağılı ölümlerin başlıca nedenidir. Kanser hem genetik hem de çevresel bir dizi faktör neden olabilir. Kanserojen kimyasallara maruz kalma, radyasyon, bakteriyel enfeksiyonlar (örneğin, mide kanseri), viral enfeksiyonlar (örn., serviks kanseri) ve toksinler (aflatoksin, örn., karaciğer kanseri) gibi kimyasal, fiziksel ve biyolojik faktörler kansere neden olabilir. Kanser nedenleri çok çeşitli olduğundan, klinik testler de oldukça karmaşıktır (Gouvea, 2011). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) açıkladığı verilere göre 2018 yılında kansere bağılı olarak 9.6 milyon ölüm gerçekleşmiştir. Kansere bağılı gerçekleşen ölümlerin kanser tiplerine göre dağılımı Şekil 1.1'de gösterilmiştir (Dünya Sağlık Örgütü, 2018; Basen-Enquist and Chang, 2011).



Şekil 1.1 Farklı kanser tiplerine bağılı olarak gerçekleşen ölümler

Dünyada akciğer kanseri, kanserle ilişkili ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Akciğer kanseri, hücrelerin morfolojisine göre, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere

başlıca 2 histolojik gruba ayrılır. Ana sınıf olarak KHDAK, tanımlanan akciğer kanseri vakalarının %80'nini oluşturmaktadır (Shin et al., 1986; Chen et al., 2008).

KHDAK'nin hastalardaki gelişimi bu kanserin safhasına bağlı olmakla birlikte, birinci safhadan dördüncü safhaya ilerledikçe hasta sağ kalım oranları %60'tan %1'e kadar düşüş göstermektedir. KHDAK için erken tanı, etkin sınıflandırma ve tedavi ile hayatta kalabilme oranı artış göstermektedir. Yıllar boyunca akciğer kanserinin tanısı için morfolojik temelli metotlar olan göğüs röntgeni, bilgisayarlı tomografi, optik koherens tomografi, pozitron emisyon tomografi, sanal bronskopi ve biyopsi gibi tarama yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak bu metotlar, kanserin erken safhalardaki teşhis ve sınıflandırılması için yeterli duyarlılığı ve özgüllüğü göstermemektedirler. Akciğer kanserinin erken teşhisi için hızlı ve hassas bir teknik geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (Wang L. , 2017).

Kanser teşhisine yönelik son zamanlarda geliştirilen elektrokimyasal biyosensörler kanser hücrelerinin direk tayinine yönelik olarak geliştirilmektedir. Erken teşhise yönelik yüksek seçicilik ve hassasiyette, amperometrik (Sarkar et al., 2002); potensiyometrik (Bohunicky and Mousa, 2011) ve impedimetrik (Seven et al., 2013) biyosensör sistemleri tanımlanmıştır. Bütün bu gelişmelere rağmen erken kanser tanısı için halen hasta-başı-teşhise (POC; point-of-care testing) yönelik bir biyosensör geliştirilememiştir. Bu amaca ulaşmak için aptamer gibi yüksek seçicilikle hedefine bağlanan tanıma ligandları kullanılmalı, çoklu tayine yönelik multiçip sistemleri geliştirilmeli, geliştirilen cihazlar hassas bir çevirici sistem içerip, küçültülebilir ve düşük maliyetli olarak tasarlanmalıdır. (Rasooly and Jacobson, 2006).

Tez çalışması kapsamında, küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücrelerinin hızlı ve spesifik tanısına yönelik, ileride tasarlanabilecek bir mikroçip teknolojisine yönelik ve klinik tanıya uygulanabilecek aptamer tabanlı elektrokimyasal nanobiyosensör geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilen biyosensör ile akciğer kanserinin hücre düzeyinde erken safhalarında da teşhis imkânı sunması amaçlanmaktadır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

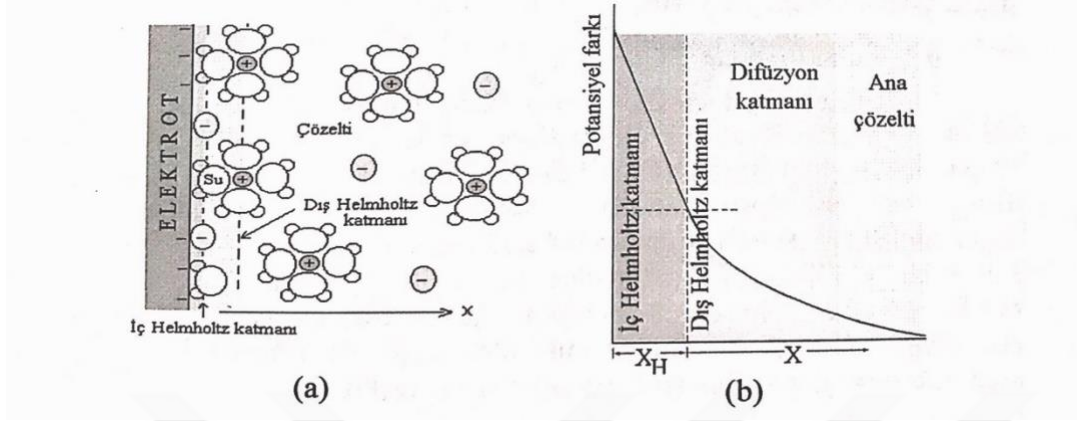
2.1 Elektrokimya

Elektrokimya, biri metalik yapılı olan elektrot, diğeri iletken bir çözelti olan elektrolit adını alan başlıca iki faz arasındaki yüklü taneciklerin uğradığı elektron alışverişine dayalı tepkimelerle ilgilenmektedir. Elektrokimyasal tepkimeler, kimyasal tepkimelerden farklı olarak mutlaka elektron transferi olayının gerçekleşmesine dayanmaktadır. Bu şekilde yürüyen ve bir elektrolit içindeki elektrot yüzeyinde indirgenme ve yükseltgenme olaylarının gerçekleştiği tepkimeler genel olarak redoks tepkimeleri olarak adlandırılmaktadır (Skoog,1996).

2.1.1 Elektriksel çift tabaka

Birbiriyle temasta olan elektrot ile elektrolit çözelti arasında bir potansiyel fark söz konusudur. Yüklü bir taneciğin iyonik gruplarca sarılması ya da bir elektrolitle temas halindeki bir elektrodun yüzeyinde zıt yüklü iyonların dizilmesiyle elektriksel çift tabaka oluşur. Yüklü taneciklerin çevresinde sıkı bağlı bir iç katman ve dışında da dış tabaka olarak adlandırılan bir difüzyon katmanı bulunur. Bu tabakada elektrot yüzeyinden uzaklaştığı için ortaya çıkan gerilim üstel olarak azalır. Şekil 2.1’de gösterildiği üzere, sulu çözeltiye daldırılan bir elektrodun yüzeyindeki elektron zenginliği nedeniyle polar su molekülleri yüzeye tutunur ve zıt yüklerin sıralandığı iki ince tabaka halinde elektriksel çift tabakayı oluşturur. Bu tabakanın iç katmanında elektrot yüzeyine absorplanmış su

molekülleri ve iyonlar yer alır. Dış bölge ise bölgesel yük dengesizliklerinin ana çözeltiden difüzyon yoluyla giderildiği katmandır (Nişli ve Ertaş, 2013).



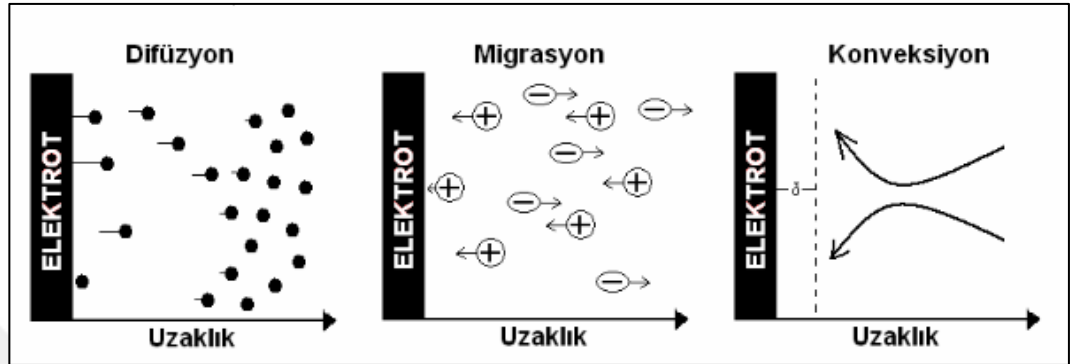
Şekil 2.1 Elektriksel çift tabaka: (a) Elektrot yüzeyinde elektriksel çift tabakanın yapısı, (b) elektrot yüzeyinden uzaklığa göre potansiyel değişimi.

2.1.2 Elektrokimyasal olaylarda kütle aktarım yolları

Bir analit içerisindeki maddeler elektrot yüzeyine genel olarak difüzyon, konveksiyon ve migrasyon yoluyla taşınır (Şekil 2.2).

- **Elektriksel göç (MİGRASYON):** Bir çözeltide bulunan iyonlar, elektrodun meydana getirdiği elektrostatik alanın çekme veya itme etkisinde hareket ederler. İyonların elektriksel alandaki hareket hızları, iyonun yüküne, büyüklüğüne ve çalışma ortamındaki yönlenme biçimine bağlıdır. Kütle aktarımında en etkin olay elektriksel göç yoludur.
- **Karıştırma (KONVEKSİYON):** Karıştırma veya titreşim sonucunda oluşan kütle aktarım yoludur.

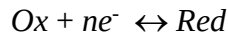
- **Difüzyon:** Ana çözelti ile elektrot yüzeyi arasındaki konsantrasyon farkına dayanarak maddelerin konsantrasyonu derişik ortamdan, daha seyreltik ortama kendiliğinden taşınması yoludur. (Bard and Faulkner, 2000; Yılmaz, 2016; Kara, 2007)



Şekil 2.2 Kütle aktarım olaylarının şematik gösterimi

2.1.3 Faradayik ve Faradayik olmayan akımlar

Çözelti ve elektrot arasındaki yüzeyden akımın iletimi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonları olurken diğerinde indirgenme reaksiyonu meydana gelir. Bu reaksiyonlarda;



Burada Ox (oksidan) ve Red (redüktan); redoks çiftinin sırasıyla yükseltgenmiş ve indirgenmiş halini göstermektedir. Termodinamik kurallarla kontrol edilen sistemlerde, elektrot potansiyeli, elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişiminin (C_O ve C_R), aşağıda gösterilen Nernst Denkleminde kullanılabılır.

$$E = E^0 - \frac{R.T}{n.F} \ln \frac{C_R (0,t)}{C_O (0,t)}$$

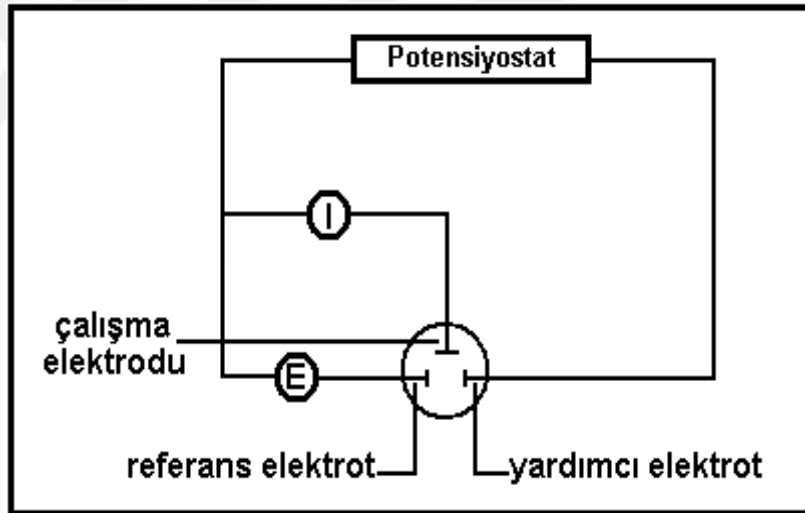
Burada; E^0 , Redoks tepkimesi için standart potansiyeli; R , Gaz sabitini ($8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$); T , Sıcaklığı ($^{\circ}\text{K}$); n , Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısını ve F , Faraday sabitini ($96,487 \text{ coulomb mol}^{-1}$) göstermektedir.

Elektrot - elektrolit ara yüzeyinde meydana gelen indirgenme / yükseltgenme (redoks) tepkimeleri sırasında akım, elektronların doğrudan aktarımı ile iletilir. Bu tip işlemlere bir elektrottaki kimyasal reaksiyon miktarının geçen akımla orantılı olduğunu ifade eden Faraday yasalarına uygun olması nedeniyle *faradayik işlemler* adı verilir, bu şekilde oluşan akımlara *faradayik akımlar* (i_f) denir. Analizlenecek madde ve ürünlerin konsantrasyonları yalnızca elektrot yüzeyinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak ve Nernst tabakası içinde değişir (Wang, 2006).

Faradayik olmayan (kapasitif) akımlar ise; elektrot / çözelti ara yüzeyindeki yüklü bir çift tabakadan oluşan bir yükleme akımıdır. Bir elektrodun bir yükleme çözeltisine daldırılması ve negatif yükle yüklenmesi ile çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilir. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Ters işaretli yüklerin arayüzeyin iki tarafında birikmesi ile bu bölgede bir elektriksel çift tabaka oluşur. Oluşan bu çift tabaka bir kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek veya indirgenecek madde olmasa bile bir akım oluşur. Bu akım reaksiyona bağlı değildir ve sistemden kaynaklanır ki bu akıma *faradayik olmayan kapasitif akım* (i_c) denir (Skoog,1996).

2.1.4 Elektrokimyasal hücre ve bileşenleri

Elektrokimyasal hücreler bir çevirici sistem (transducer) varlığında elektron aktarımına izin veren bir çözelti ve dış ortamla bağlantılı elektrotların bu çözeltiyle teması halinde elektrik akımı üretebilen sistemlerdir. Elektrokimyasal analizlerde sıklıkla kullanılan üçlü elektrot sisteminin çalışma prensibi Şekil 2.3’de gösterilmiş olup bir çalışma elektrodu, bir referans elektrot ve bir karşıt elektrottan meydana gelmektedir. Çalışma elektrodu ile referans elektrot arasında potansiyel uygulanırken, çalışma elektrodu ile karşıt (yardımcı) elektrot arasında meydana gelen elektriksel sinyal ölçülür.



Şekil 2.3 Üçlü elektrot sisteminin şematik gösterimi

2.1.4.1 Çalışma (indikatör) elektrodu

Çalışma elektrodu, üzerinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur. İdeal bir çalışma elektrodu, geniş bir potansiyel aralığına ve düşük

dirence sahip olmalı, tekrarlanabilir sonuçlar vermeli ve yüksek sinyal/gürültü oranı sağlamalıdır.

Çalışma elektrodunun yapımında kullanılan iletken malzeme, platin ya da altın gibi inert bir metal; karbon temelli grafit, camı karbon, karbon pasta; kalay oksit ya da indiyum oksit gibi yarı-iletken veya bir civa filmi ile kaplanmış bir metal olabilir. Bu elektrotlar çeşitli şekil ve büyüklükte olabilmektedirler ve biyosensör tasarımı için en uygun şekilde geliştirilmektedirler.

Karbon temelli katı elektrotlar, özellikle çok ucuz olmaları ve geniş bir potansiyel aralığında çalışma yapılmasına olanak verdiğinden dolayı elektrokimyasal analizlerde sık kullanılır. Yüzeylerindeki fonksiyonel grupların çeşitliliği sayesinde yüzey modifikasyonlarında tercih edilen elektrotlardır. Yaygın olarak kullanılan karbon elektrotlar; perde baskılı karbon elektrot, camı karbon elektrot, karbon pastası elektrot ve tek kullanımlık grafit elektrottur (Erdem et al., 2005; Kara et al., 2002; Kerman et al., 2004; Ioannou et al., 2006).

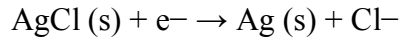
Tek kullanımlık grafit elektrotlar son yıllarda gelişen teknolojiyle birlikte, karsinogen bir madde olan Sudan II molekülünün tayininde (Ensafi et al., 2012), robotik enzim biyosensörlerinde (Teanphonkrang and Schulte, 2017), nanopartikül modifiye edilerek kolorektal kanseri tayininde (Yaman et al., 2018) kullanılmıştır.

Bu çalışmada kolay hazırlanan, maliyeti düşük olan ve her yerde bulunabilen tek kullanımlık grafit elektrotlar (PGE; pencil graphite electrode) kullanılmıştır. Özellikle son yıllarda, bu elektrotlar ile tekrarlanabilirliğin daha iyi olması, daha düşük tayin sınırı, ucuzluk ve mikroçip tekniğine uygulanabilirliği gibi özellikleri ile elektrokimyasal çalışmalarda büyük ilgi görmektedir. Bu

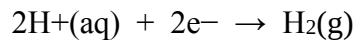
elektrotlardan en iyi sonuç alınabilmesi için elektrotlar kimyasal olarak ön-işleme maruz bırakılmalı ve elektrodun sertlik seviyesi iyi seçilmelidir (Torrinha et al., 2018).

2.1.4.2 Referans (Karşılaştırma) Elektrodu

Referans elektrot, elektrokimyasal hücrede sabit potansiyel üretmek için kullanılmaktadır. Akımın bir elektrot aracılığıyla geçişi potansiyeli değiştirebildiğinden, referans elektrodun yarı-hücre potansiyelinin sabit, elektrolit çözeltisinden ve sıcaklıktan bağımsız olması beklenir (Palecek and Fojta ,2005). Elektrokimyasal çalışmalarda en yaygın kullanılan referans elektrot gümüş bir telin, elektrolitik yoldan gümüş klorür ile kaplanarak klorür iyonu içeren çözeltiye daldırılmasıyla elde edilen Ag/AgCl elektrotlardır. Ag/AgCl elektrot doygun KCl çözeltisi içerisinde $E_0 = +0.22 \text{ V}$ ’luk yarı-hücre potansiyeline sahip olup potansiyeli aşağıdaki reaksiyonla belirlenmektedir;



Bir diğer bilinen referans elektrot ise, hidrojen gazı adsorbe edilmiş bir inert platinin hidrojen iyonları içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla elde edilen standart hidrojen elektrodudur (SHE). Yarı hücre potansiyeli aşağıda gösterilmiştir ve $E_0 = 0.000 \text{ V}$ ‘dur (György and Fritz, 2013).



2.1.4.3 Karşıt (Yardımcı) Elektrot

Genellikle inert bir malzeme olan platin telden yapılan ve elektriğin elektrolit içinden çalışma elektroduna aktarılmasını sağlayan, diğer bir deyişle çalışma elektroduna elektron sunan elektrottur. Karşıt elektrot elektrokimyasal reaksiyona katılmaz (Henze and Thomas, 2001).

2.1.5 Elektroanalitik yöntemler

Elektroanalitik yöntemler, incelenecek maddeyi içeren analit çözeltisinin elektrokimyasal bir hücrede elektriksel özelliklerinin ölçülmesi ve ölçülen bu özelliklerinden yararlanılarak maddelerin kantitatif analizine dayanan tekniklerdir. Elektroanalitik kimyada yaygın kullanılan teknikler (voltametrik, potansiyometrik, kondüktometrik ve impedimetrik); duyarlılık, hızlı tayin, seçicilik, düşük tayin limiti ve düşük maliyet gibi önemli avantajları nedeniyle spektroskopik ve kromatografi gibi diğer analitik tekniklere göre oldukça avantajlıdır. Elektrokimyasal ölçümler çoğu kez analiz edilmek istenen maddenin yükseltgenme / indirgenme basamağına spesifiktir. Ayrıca, elektrokimyasal ölçüm için ihtiyaç duyulan cihazlar basit ve ucuz enstrümanlardır (Yılmaz, 2016).

Bu çalışmada kullanılan voltametrik ve impedimetrik yöntemler hakkında detaylı bilgi verilecektir.

2.1.5.1 Voltamerik yöntemler

Voltametri, elektrokimyasal analizlerde kullanılan çok yönlü bir tekniktir. Çalışma elektroduna uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesine dayanan yöntem voltametri adı verilmektedir. Voltamogram adı verilen potansiyele karşı çizilen akım grafiği ise gerçekleşen kimyasal reaksiyon hakkında bilgi sağlamaktadır (Skoog, 1996). Voltametrimin en önemli avantajı yüksek sinyal / gürültü oranına sahip olmasıyla biyosensör uygulamalarında hassas ölçümler alınabilmesidir. Bunun yanında voltametri, tek bir elektrokimyasal deneyde farklı potansiyellerde akım cevabı oluşturan birden fazla bileşiği algılayabilir ve böylece çoklu analitlerin eşzamanlı olarak saptanmasını sağlar.

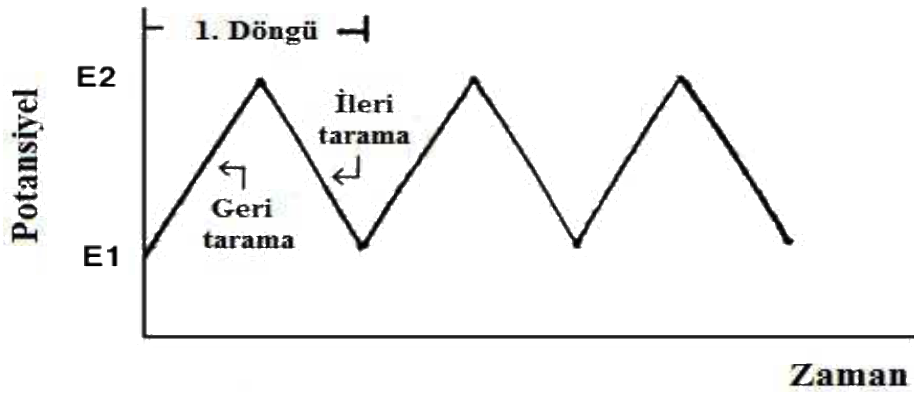
Voltametrik tekniklerin uygulanması esnasında elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyelde sinyaller uygulanır ve bu sinyaller akım piklerini oluşturur. Voltametrik teknikler başlıca; dönüşümlü, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalga voltametrileridir.

Bu tekniklerde ortak olarak belirli potansiyel aralığında yapılan tarama sonucu meydana gelen akım şiddeti ölçülür. Akım ölçülmesine dayanan bu tekniklerde dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametrisi en yaygın olarak kullanılan tekniklerdir.

- **Döngüsel voltametri (CV; cyclic voltammetry)**

Bu teknik, diğer voltametrik tekniklere kıyasla duyarlılığının sınırlı olması nedeniyle hassas ölçümlerde kullanılmamaktadır. CV özellikle, elektroaktif maddelerin redoks potansiyellerinin hızlı bir şekilde saptanmasına olanak verdiği için elektrokimyasal tepkimelerin niteliği hakkında hızlı bilgi edinilen ve dolayısıyla ilk başvuru tekniklerdendir.

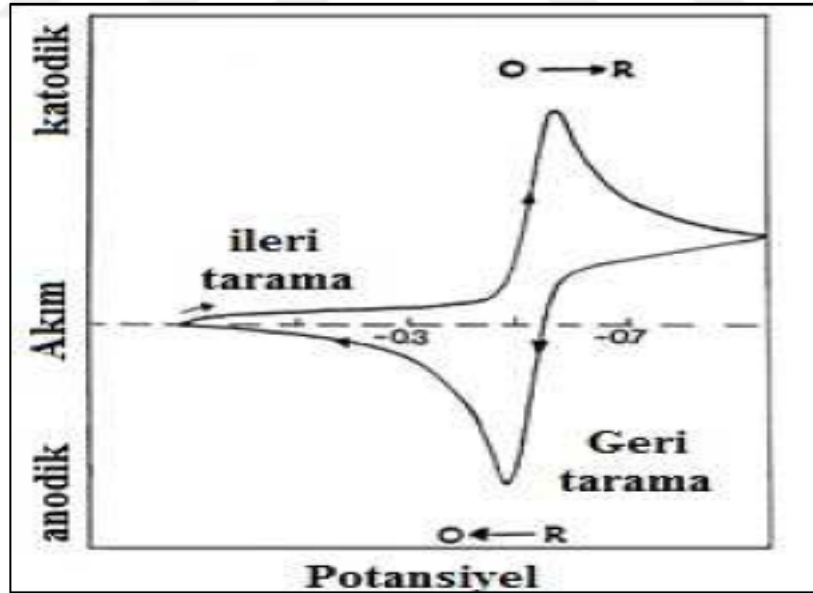
CV yöntemi; bir çalışma elektroduna zamanla doğrusal olarak değişen bir potansiyel uygulanır ve ileri yöndeki potansiyel taraması belli bir potansiyelde sonlandırılarak, geri yönde tarama yapılması esasına dayanmaktadır. Başlangıç potansiyeli olarak genellikle redoks tepkimesinin henüz gerçekleşmediği bir potansiyel değeri seçilir ve potansiyel redoks tepkimesinin gerçekleştiği yöne doğru E_1 ve E_2 sınırları arasında belli bir hızda taranır. Kullanılan potansiyel-zaman dalga formu Şekil 2.4’de gösterilmiştir.



Şekil 2.4 Döngüsel voltametriye uygulanan potansiyelin zamana bağlı değişimi (Ekşi'den 2011)

Potansiyel değişiminde karşı akım piklerinin oluşumu Şekil 2.5’de gösterilen voltamogramda verilmiştir.

Tersinir $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$ reaksiyonunu ele alındığında, başlangıçta sadece Ox türünün bulunduğu bir elektrolit sıvı içerisindeki çalışma elektroduna değişen potansiyel uygulanır. Uygulanan ilk potansiyel yeterince negatif potansiyele ulaştığında katodik akım artmaya başlar ve elektrodun yakın çevresindeki Ox türü indirgenmeye başlar. İleri yönde tarama sonucunda gözlenen ilk pik Ox türünün indirgenme pikidir. İndirgenmenin meydana geldiği potansiyel aralıktan sonra potansiyel tarama yönü terse döndürülerek geri tarama başlar. Geri tarama esnasında, Red moleküllere yeniden Ox moleküllerine yükseltgenerek anodik akımı oluşturur ve voltamogramdaki ikinci pik gözlenir (Wang, 2000; Ekşi, 2011).

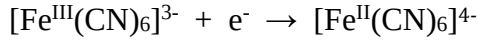


Şekil 2.5 $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$ tersinir redoks tepkimesine ilişkin döngüsel voltamogram (Ekşi’den 2011)

Elektrot yüzeyinde tersinir bir $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$ tepkimesi elektrolit çözelti içerisinde bulunan bir redoks çifti varlığında meydana gelebilmektedir.

Varsayımsal olarak gösterilen; $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$

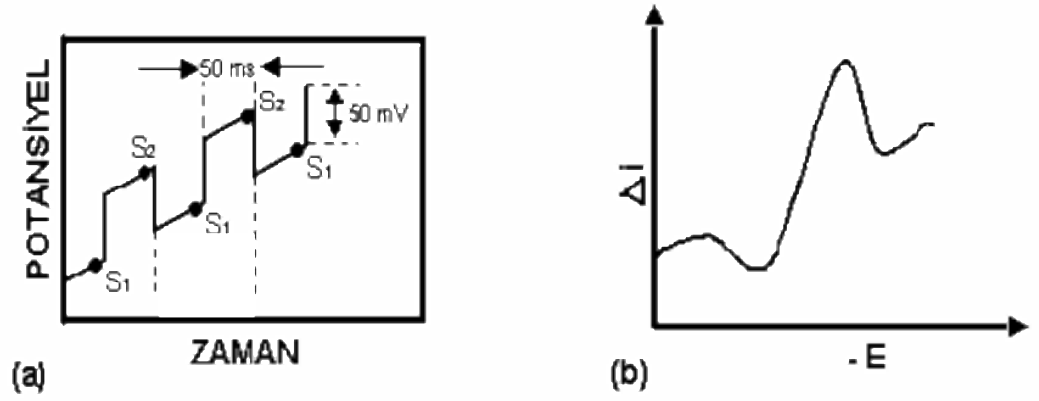
redoks tepkimesi, sıklıkla kullanılan $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (ferri- / ferrosiyanit) sisteminin gösterimidir ve redoks tepkimesi aşağıda gösterildiği gibi ilerlemektedir;



- **Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV; differential pulse voltammetry)**

Diferansiyel puls voltametrisi, çok duyarlı bir yöntemdir ve tayin sınırı 10^{-7} - 10^{-8} M arasındadır. Doğrusal bir potansiyel artışına göre sabit genlikte pulsların, çalışma elektroduna belli bir süre uygulandığı, bu süreçte puls uygulanmadan hemen önce ve pulsun bitmesine yakın bir bölgede akımın ölçüldüğü yönteme diferansiyel puls voltametrisi (DPV) adı verilmektedir.

Çalışma elektroduna 10 mV' luk veya 50 mV' luk bir puls uygulanır. Uygulanan pulsun belli bir zaman öncesi ve sonrasında, puls başına elde edilen akımdaki fark (Δi), doğrusal olarak artan potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilir. Gözlenen diferansiyel eğri pik şeklinde olup, yüksekliği konsantrasyonla doğru orantılıdır (Kara, 2007). Şekil 2.6 'da DPV yönteminde kullanılan uyarma sinyalleri ve elde edilen bir voltamogram gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Diferansiyel puls voltametrisinde kullanılan uyarma sinyalleri; (a) Zamana bağlı potansiyel grafiğinde uygulanan pulslar, (b) DPV yöntemi ile elde edilen voltamogram gösterilmiştir.

2.1.5.2 İmpedimetrik yöntemler

Elektrokimyasal analizlerde çalışma elektrodunun bir biyolojik elemanla kaplandığı ve bu elemanın hedef molekülleriyle etkileşime geçtiği durumlarda kapasitans ve elektrot-elektrolit ara yüzeylerindeki elektron transfer kinetiğinde değişiklik meydana gelir. Ara yüzeyde meydana gelen bu biyolojik tanıma olayları impedans değerleriyle belirlenir ve Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) yöntemiyle incelenir.

• Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi, sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerini, korozyon kinetiklerinin belirlenmesi, metal-elektrolit arayüzeyinde meydana gelen olayların karakterizasyonu ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmede kullanılan elverişli bir metottur.

Elektrot arayüzeylerinde biyokimyasal olayların incelenmesinde de oldukça etkili bir yöntem olan EIS, faradayik koşullar altında faradayik akım üretebilen bir redoks probu varlığında kullanılmaktadır. Bu redoks probu; anyonik $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$; katyonik $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ veya nötr $[\text{Fc}(\text{MeOH})]^{0/+}$ redoks çiftlerinden biri olabilmektedir (van den Beld et al., 2017).

Bir devrede uygulanan alternatif gerilime karşılık devreden geçen akım da alternatiftir ve potansiyel de akım da zamana bağlı fonksiyonlarla ifade edilir. Alternatif akım (AC) devrelerinde direncin eşdeğeri olarak impedans kavramı kullanılır. Kondansatör ve endüktans gibi zamanla değişen değerlere sahip olan elemanları içeren devrelerde ohmik direnç yerine impedans kullanılmaktadır. Aşağıda görüldüğü gibi impedans, biri reel diğeri sanal iki kısımdan oluşan kompleks bir sayıdır.

$$Z = R + jX$$

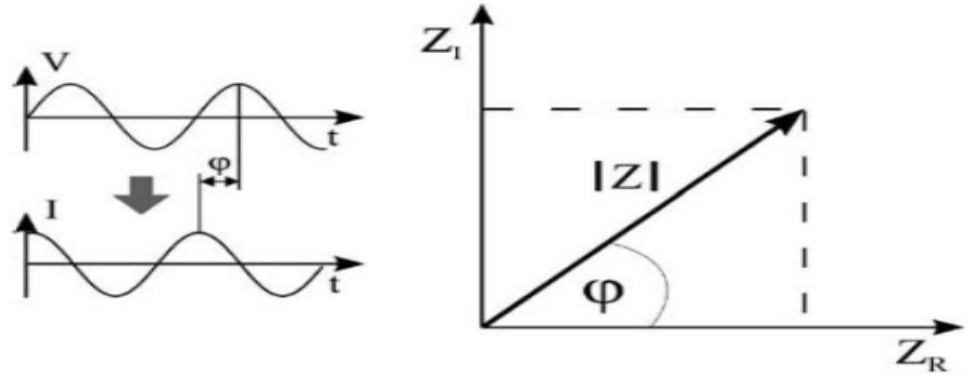
Devreye bağlı bulunan saf ohmik dirençlerin eşdeğeri R kısmına (reel), kondansatör ve endüktansların eşdeğeri ise X kısmına (sanal) yazılır.

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.

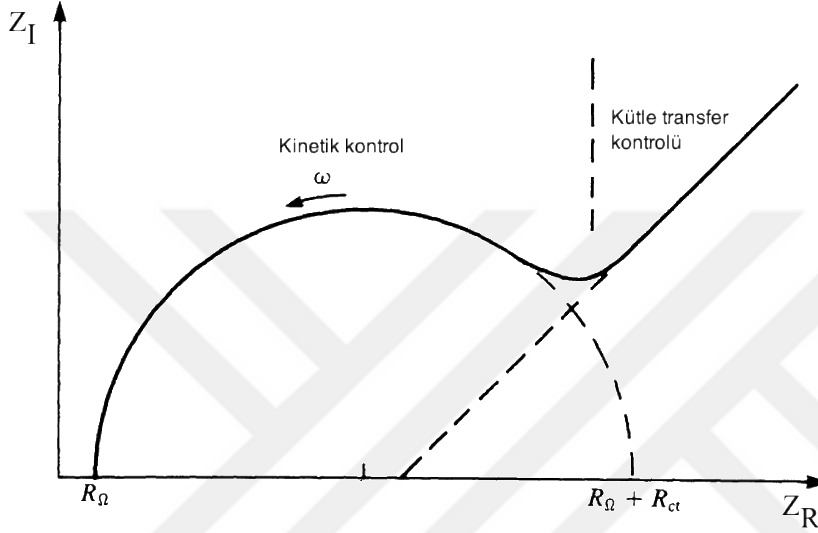
$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\pi ft)}{I_0 \sin(2\pi ft + \theta)}$$

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 2.7’de de gösterilmiştir. Dolayısıyla impedans ölçümlerinin sonuçları iki şekilde gösterilebilir: Bode eğrisi ($\log f$ ’nin fonksiyonu olarak $\log Z$ ve ϕ) veya Z_R ve Z_I ’nın olduğu Nyquist eğrisi şeklindedir (Pänke et al., 2008; Canbaz, 2013).



Şekil 2.7 İmpedans’ın potansiyel(zaman) ve akım(zaman) büyüklüklerine bağımlı matematiksel gösterimi

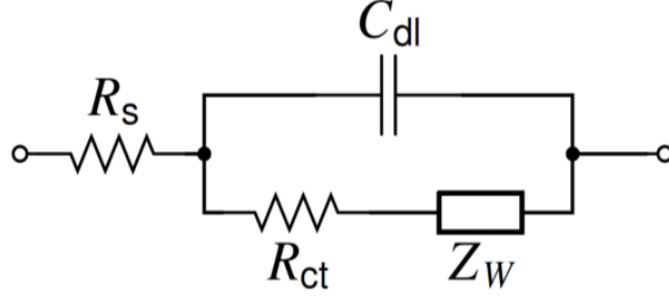
Nyquist eğrisi her frekans değerindeki Z_R ve Z_I arasındaki ilişkiyi gösteren bir grafiktir. Nyquist eğrisi genellikle bir veya daha fazla yarım daire içermektedir. Bir Nyquist eğrisinde her yarım dairenin çapının vektörü impedans olarak kabul edilmektedir. Yarım dairenin sonunda bazen 45° 'lik açıyla bir diyagonal çizgi gösterilebilir; bu çizgi Warburg impedansını temsil etmektedir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Nyquist eğrisi

İmpedans, elektrokimyasal sisteme düşük genlikli (5-10 mV) bir AC sinüs dalgası potansiyeli uygulanarak ölçülür. Genel olarak bir çalışma elektrodu, bir referans elektrot ve bir de karşıt elektrot içeren üçlü elektrot sistemi kullanılır. Sistemin ölçülen impedansı bir elektrik devresi kullanılarak modellenenebilir. İmpedans, bir redoks bileşiği ve elektrot yüzeyi arasındaki elektron transfer direncinden, elektrot ile yüklü iyonlar arasındaki kapasitanstan, elektrotlar arasındaki solüsyon direncinden ve redoks bileşiğinin difüzyon hızından

kaynaklanır. Bu elemanlar Şekil 2.9'da gösterilen devrede düzenlenmiştir. Bu devre Randles devresi olarak adlandırılmaktadır.

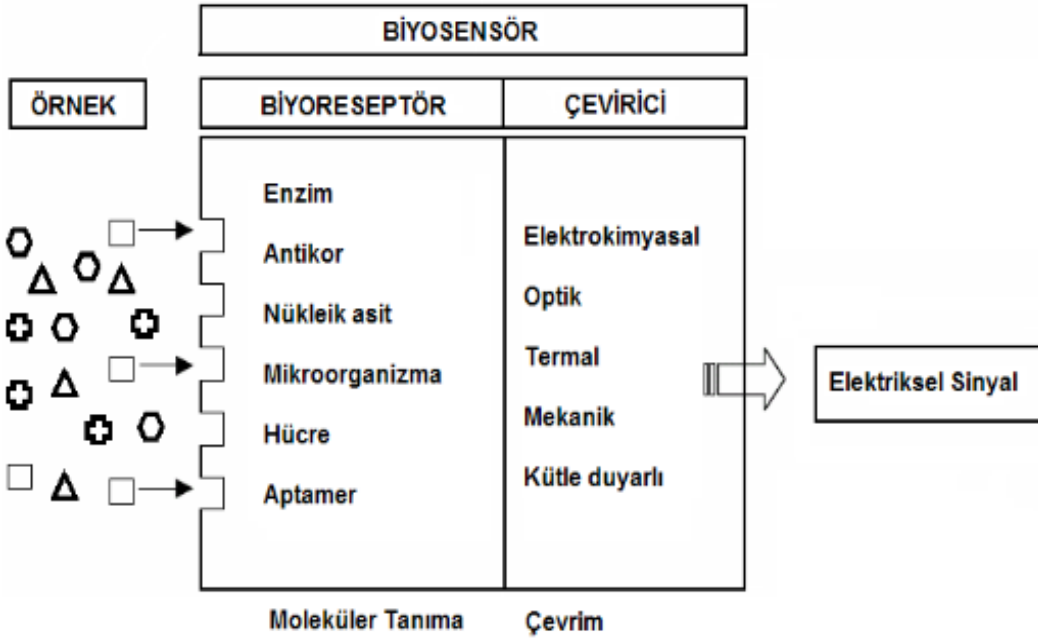


Şekil 2.9 Randles devresinin şematik gösterimi

Burada R_s , genellikle diğer bileşenlerden çok daha küçük olan ve elektrotlar arasındaki çözelti direncidir. R_{ct} , redoks bileşiğinin elektron transferi yoluyla elektrot yüzeyiyle etkileşime girme yeteneğini açıklayan yük transfer direncidir. C_{dl} , elektrot ve çözelti içindeki yüklü iyonlar arasındaki kapasitansdır. Bu kapasitans, bir elektrolit çözeltisine yerleştirilen herhangi bir metal arasında bulunan çift katman kapasitansı olarak bilinir. Z_w , redoks bileşeninin difüzyonunu açıklayan Warburg impedansı olarak adlandırılan bir elementtir. Warburg impedansının kendisi hem gerçek hem de hayali bir bileşene sahiptir ve frekansa bağlıdır (Muñoz et.al., 2017).

2.2 Biyosensörler

Biyosensörler, bir biyolojik tanıma elemanını bünyesinde bulunduran ve bu elemanın hedef molekülüyle etkileşime girmesi sonucu oluşan biyokimyasal yanıtı ölçülebilir fiziksel bir sinyal haline dönüştüren küçük algılayıcı cihazlardır (Turner, 1987; Thevenot et.al., 1999). Bu birbiri içine geçmiş sistemde ilk kısım, biyoreseptör olarak adlandırılan bir biyolojik tanıma elemanı aracılığıyla hedef molekül ile etkileşime geçildiği biyokimyasal kısımdır. İkinci kısım ise gerçekleşen bu tanıma olayının ölçülebilir sinyallere dönüştürüldüğü dönüştürücü (transducer) kısımdır (Chambers et.al., 2008). Şekil 2.10’da tipik bir biyosensör sistemi şematize edilmiştir.



Şekil 2.10 Biyosensörün yapısı

Biyosensörler temelde biyosensör bileşenleri temel alınarak,

- Algılama Bölümüne,
- Fiziksel Çevirici (Transducer) bölümün türüne göre sınıflandırılırlar.

Çizelge 2.1 Algılama ve çevirici bölümlerine göre biyosensörler.

Algılama Bölümü	Çevirici Bölüm
Antikor – Antijen (immünosensörler)	Elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik, voltametik yöntemlere dayalı sistemler)
Enzim (enzimatik sensörler)	Optik (floresans, yansıma, kırılma indeksi, ışık şiddetine duyarlı sistemler)
Peptitler	Piezoelektrik- Kütleye Dayalı (piezoelektrik kristallerinin rezonans frekansı, yüzey akustik dalgalarına duyarlı sistem)
Hücre	Elektriksel (yüzey etkinliği, elektrolit iletkenliğine duyarlı sistem)
Doku	Manyetik (paramanyetik)
Membran reseptörleri	Termal (tepkime ısına duyarlı sistem)
DNA / RNA (genosensörler)	

2.2.1 Algılama bölümüne göre biyosensörler

Biyosensör sistemini oluşturan bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli bir şekilde etkileşime giren, biyomolekül kısmıdır. Bu kısımda biyosensör, tayini yapılacak biyomolekülü tanıyarak etkileşime girer. Enzimler, mikroorganizmalar, hücreler, organeller, antikorlar, nükleik asitler ve aptamerler bu biyomoleküllere örnek olarak gösterilebilirler (Colling and Caruso, 1997).

Enzim Temelli Biyosensörler: Enzimler çoğunlukla protein yapıda bulunan ve kimyasal aktivitelerin hızlarını arttırıcı özelliğe sahip biyomoleküllerdir. Enzim temelli biyosensörlerde, enzimlerin substratlarıyla girdikleri enzimatik tepkime sonucu oluşan yeni ürünün konsantrasyonu tespit edilmektedir.

Biyosensör alanındaki ilk çalışmalar enzim sensörleriyle başlamıştır. 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından tasarlanan glukoz oksidaz enzimini biyoreseptör olarak kullanan ve glukoz tayinine yönelik geliştirilen elektrotlar bu konudaki ilk örneklerdir.

İmmünosensörler: Antikorlar veya immünoglobinler antijen olarak adlandırılan yabancı ajanlara karşı gösterilen immünolojik tepki ile üretilirler. Antikor, hedef antijeni ile yüksek afinite ile bağlanır ve bu nedenle solüsyon ortamında girişim yapan diğer maddelerin varlığında bile tespit edilebilir. Antijen ve antikor arasındaki bu etkileşime dayanan ve bu immünokimyasal etkileşimi algılamak için kullanılan biyosensörlere immünosensörler denir. Literatürde klinik analizler için yapılan çalışmaların yanı sıra patojen tayini, gıda endüstrisinde kalite kontrol ve

çevresel analizlerde eser miktardaki maddelerin tayini için geliştirilmiş immünosensörler bulunmaktadır (Vlakatis et al., 1993; Luppä et al., 2001).

Mikroorganizma Temelli Biyosensörler: Mikroorganizmaların algılayıcı kısım olarak kullanıldığı biyosensörlere mikrobiyal biyosensörler adı verilmektedir. Bakteriler ve mantarlar, belirli moleküllerin tayini için sıklıkla kullanılan mikroorganizmalardır. Enzim esaslı biyosensörlere kıyasla mikrobiyal biyosensörler, enzimlerin saflaştırılma basamağına gerek duyulmadığı için daha az zaman ve maliyet gerektirmektedir. Canlı hücrelerdeki enzimler ve proteinler, analitlere spesifik ve seçici olarak yanıt verebilmektedir.

Mikrobiyal biyosensörler, çevresel parametrelerin analizinde, gıda ve klinik örneklerin izlenmesinde kullanılan en yararlı araçlardan biri haline gelmiştir. Bu biyosensörler hormonların, patojenlerin ve DNA'nın teşhisi için hızlı, hassas ve ucuz bir yol sağlamaktadır.

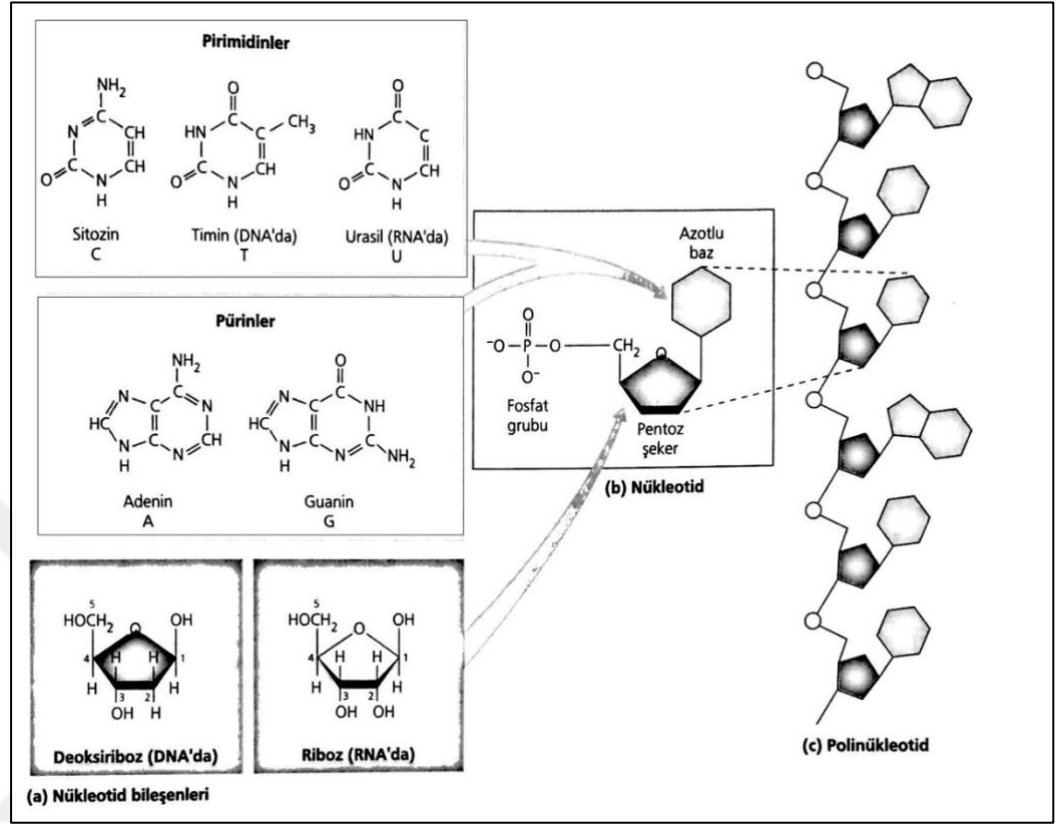
Nükleik Asit Tabanlı Biyosensörler (Genosensörler): Deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) olmak üzere iki tip nükleik asit vardır. Bu moleküller canlı organizmaların kendilerini çoğaltarak genetik materyallerini bir sonraki kuşağı aktarılmasını sağlarlar. Bütün moleküller içerisinde sadece DNA kendi replikasyonunu yönetebilir. DNA aynı zamanda RNA sentezini ve RNA aracılığı ile protein sentezini de yönetir.

DNA'nın başlıca işlevi, içerdiği azotlu bazların özgül dizilimiyle kodlanmış genetik bilginin saklanması ve bir sonraki kuşaklara aktarılmasıdır. DNA'nın birer molekül RNA sentezleyen parçaları **gen**, genlerin tümü ise **genom** olarak adlandırılmaktadır.

Nükleik asitler (Polinükleotid), nükleotid adı verilen monomerlerden oluşan polimerlerdir. Her nükleotid azotlu baz olarak adlandırılan organik bir molekül, beş karbonlu bir şeker (pentoz) ve bir fosfat grubu olmak üzere üç kısımdan oluşur. Pürinler ve pirimidinler olmak üzere iki adet azotlu baz vardır. Pürinler iki tane halkalı yapı içeren adenin (A) ve guanin (G) bazlarıdır. Pirimidinler ise tek halkalı yapı içeren sitozin (C), timin (T) ve urasil (U) bazlarıdır. Adenin, guanin ve sitozin her iki nükleik asit tipinde bulunur; fakat timin sadece DNA'da, urasil ise sadece RNA'da bulunur. Azotlu baza bağlı haldeki pentoz RNA nükleotidlerinde riboz iken, DNA'da deoksiribozdur. Şeker grubundaki karbon atomları (1') den (5') ne numaralandırılmıştır. Bu iki şeker arasındaki tek fark, deoksiribozun 2' karbonunda bir oksijen atomunun eksik olmasıdır (Şekil 2.11).

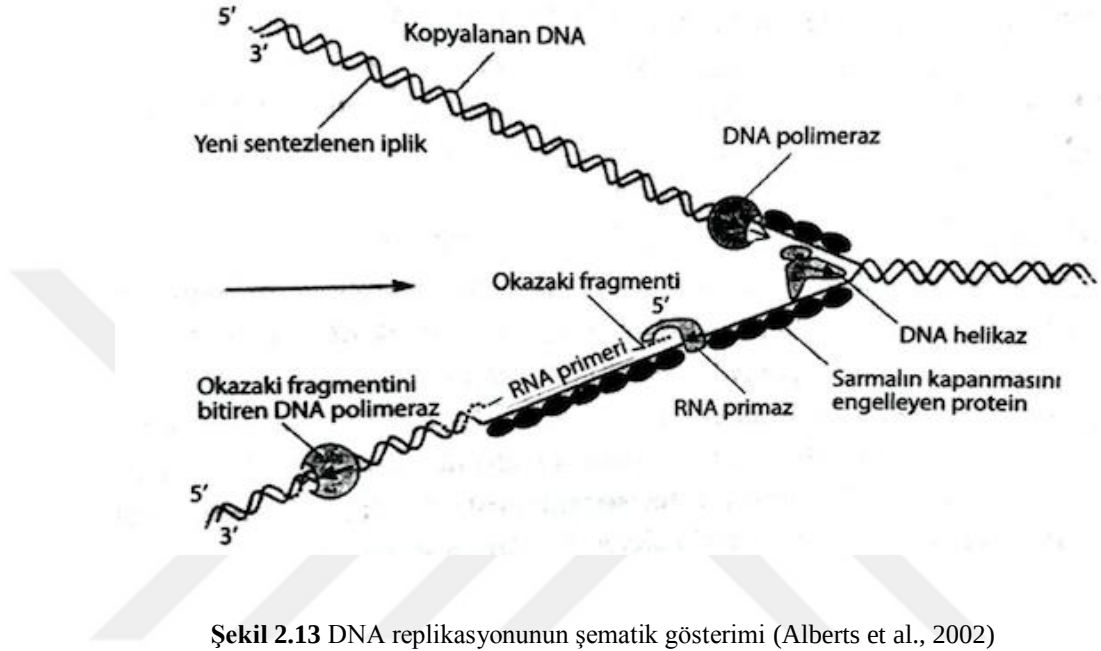
RNA molekülleri tek bir nükleik asit zincirinden oluşan yapılardır. Buna karşılık iki uzun polinükleotit zinciri, bir merkez eksen etrafında kıvrılarak DNA'nın ikili sarmal yapısını oluştururlar. Karşılıklı iki zincir birbirine antiparaleldir. İki zincirin 5' karbonun ucundan 3' karbon ucuna doğru olan yönleri birbirine göre terstir. DNA'nın üç boyutlu yapısının ikili sarmal şeklinde olduğu ilk kez 1953'te Watson ve Crick tarafından öne sürülmüştür. Karşı zincirdeki azotlu bazlar hidrojen bağları ile bağlanarak birbirleriyle eşleşir. DNA'da, adenin (A) daima timin (T) ile ikili hidrojen bağıyla, guanin (G) ise daima sitozin (C) ile üçlü hidrojen bağıyla birleşir. Bu yüzden ikili sarmalın zincirleri birbirlerinin tamamlayıcısıdır (komplementeridir). Her bir nükleik asit zincirinin omurgası

birbirlerine fosfodiester bağıyla bağlanan fosfat ve deoksiriboz şekeri gruplarından oluşur (Şekil 2.12) (Campbell and Reece, 2010).

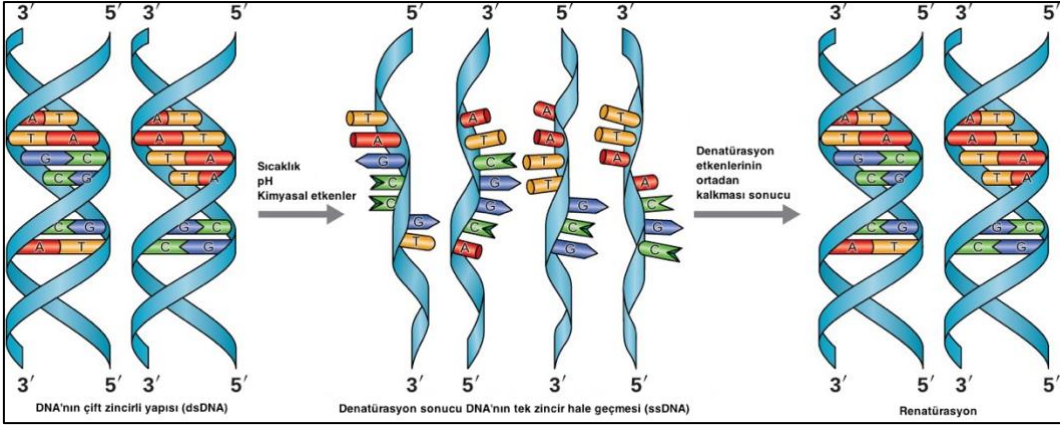


Şekil 2.11 Nükleik asitlerin bileşenleri; (a) nükleotidlerin üç yapıtaş molekülü, (b) bir nükleotidin yapısı ve (c) her nükleotidin bir sonraki nükleotid ile fosfodiester bağıyla bağlanması sonucu nükleik asit (polinükleotid) zinciri oluşur.

Okazaki parçacıkları olarak adlandırılır. DNA polimeraz I enzimi, RNA primerlerini ortadan kaldırıp, atasal zincire uygun baz eşleşmesinin gerçekleşmesini sağlar. Okazaki parçacıklar ise DNA ligaz enzimi ile birbirlerine bağlanarak DNA replikasyonunu tamamlar (Şekil 2.13) (Akay, 2012).



Normal koşullarda DNA ikili sarmal yapısını korur. Şekil 2.14’de gösterildiği üzere, yüksek sıcaklık ya da kimyasal yollarla ikili sarmaldaki hidrojen bağları kırılır ve ikili sarmal yapısı çözülerek tek zincir haline geçer. Bu olaya denatürasyon denir. Denatürasyon sonucu kovalent bir bağ olan fosfodiester bağı kırılmaz. Yüksek sıcaklık sağlanan ortam yavaş yavaş soğutulursa tek iplikçikli DNA (ssDNA) hidrojen bağları oluşturarak çift iplikçikli DNA (dsDNA) haline döner. Bu olay ise renatürasyon olarak adlandırılır.



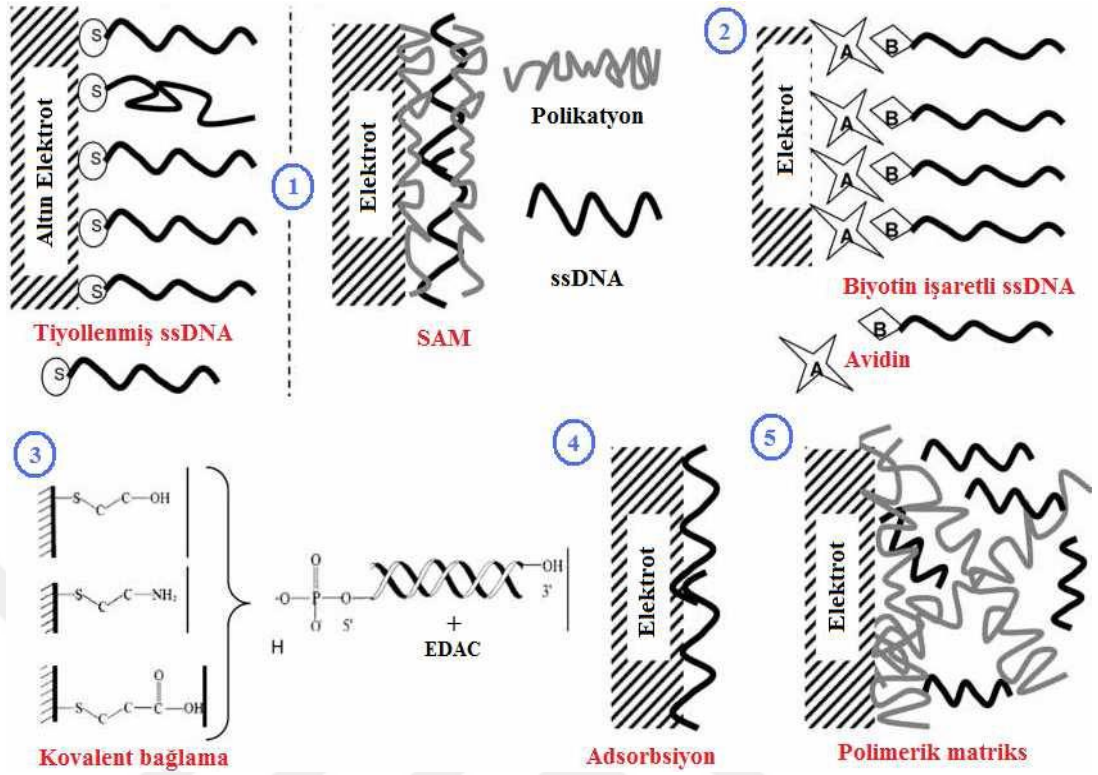
Şekil 2.14 DNA’da meydana gelen denatürasyon ve renatürasyon olayları

Nükleik asitlerin biyoreseptör olarak kullanıldığı biyosensörler “**genosensör**” olarak adlandırılmaktadır. Bir genosensörün çalışma prensibi birbirinin tamamlayıcısı olan iki tane ssDNA zincirinin birbirlerine oldukça spesifik şekilde bağlanarak dsDNA oluşturması işlemine dayanmaktadır. Bu oldukça spesifik bağlanma işlemine DNA hibridizasyonu denir. Bir genosensör bileşeni olarak kullanılan ssDNA zinciri prob olarak adlandırılmaktadır. Probu eşleniği olan ve analizlenecek numunede bulunması durumunda sensör yüzeyinde hibridizasyonun oluşacağı DNA dizisine ise hedef dizi denir. Genosensörler; tayin edilmek istenen herhangi bir hastalığı, kalıtsal bir davranışı ya da bakteri ve virüslerinin patojenitesini simgeleyen bir prob DNA dizisinin, hibridizasyon sonucu bu diziye karşılık gelen hedef diziyle oluşturduğu çift sarmalın biyokimyasal yapısı tanıma olayını mümkün kılmaktadır. Çevirici kısım olarak elektrokimyasal çeviricileri kullanan elektrokimyasal DNA biyosensörleri, kalıtsal, viral ve bakteriyel hastalıkların tanısında kullanılan rutin analiz yöntemlerine alternatif olarak daha hızlı, ucuz ve kolay bir yöntemdir (Kara, 2007).

Elektrokimyasal DNA sensörlerini hazırlamak için biyoreseptör olarak kullanılacak nükleik asit probu elektrot yüzeyine immobilize edilmelidir. Bu işlem için farklı yöntemler Şekil 2.15’de gösterilmiştir ve prob immobilizasyonu için başlıca kullanılan yöntemler (Rivas et al., 2005);

- **Adsorpsiyon**, hiçbir reaktif veya özel nükleik asit modifikasyonu gerektirmediği için nükleik asitleri yüzeylere tutturmanın en basit yoludur. Kovalent olmayan kuvvetler, nükleik asidin elektrot yüzeyine bağlanmasını sağlar. Bu yöntemin ana dezavantajı, nükleik asidin hibridizasyon koşullarından dolayı yüzeyden desorbe olabilmesidir. Dahası, DNA molekülleri elektrot yüzeyinin üzerine çok sayıda ve kontrolsüz olarak adsorbe edilir ve bu işlem hibridizasyon verimini azaltır.
- **Elektrostatik yöntemle** negatif (-) yüklü fosfat omurgasına sahip DNA, pozitif (+) potansiyel uygulandığı zaman elektrostatik çekim kuvvetleri sayesinde elektrot yüzeyine tutturulabilmektedir (Mascini et.al., 2001).
- **Kovalent bağlama** ajanları varlığında prob dizi elektrot yüzeyine kovalent yollarla immobilize edilebilmektedir. Bu işlem sonucunda nükleik asit yüzey üzerinde esnek bir yapıda tutturulur ve hibridizasyon için rahatça konformasyonunu değiştirebilir. Karbodimid kimyası veya silan kimyası aracılığıyla yüzeydeki karboksil grupları fonksiyonelleştirilerek nükleik asitlerin amino gruplarına kovalent bağlanabilir hale gelmektedir.

- **Kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) tekniği** ile oluşturulan yapılar, metal elektrot yüzeyinde gaz fazında veya çözelti fazındaki moleküler bileşenlerin adsorplanması yoluyla kendiliğinden oluşan organik oluşumlardır. Altın yüzey üzerinde kuvvetli adsorpsiyon gösteren disülfür (R-S-S-R), sülfür (R-S-R) ve tiyol (R-SH) etkileşimine dayana SAM oluşumu sayesinde elektrot yüzeyinde oldukça sıkı paketlenmiş bir katman elde edilmektedir (Yorgancı, 2009).
- **Avidin-Biyotin etkileşimi** sayesinde ile streptavidin kaplanmış elektrot yüzeylerine, biyotin ile işaretlenmiş tek iplikli nükleik asit zincirleri, streptavidin ve biyotinin birbirlerine karşı güçlü bağlanma kinetiği sayesinde spesifik şekilde tutturulmaktadır (Pividori et al., 2000).
- **Polimerik matriksler** kullanılarak polipirol, poliakrilonitril gibi elektroaktif polimerler kullanılarak prob immobilizasyonu için geniş ve iletken yüzey alanı elde edilebilmektedir (Youssofi et al., 1997).



Şekil 2.15 Nükleik asit problemlerinin elektrot yüzeyine immobilizasyonunu gösteren farklı yöntemler

Aptamer Tabanlı Biyosensörler: Aptamerler, büyük rastlantısal kütüphanelerden *in vitro* seleksiyon yöntemiyle izole edilmiş kısa tek zincirli DNA veya RNA dizileridir. Aptamerler belirli üç boyutlu şekilleri sayesinde, amino asitler, proteinler, ilaçlar, metal iyonları ve hatta bütün hücre gibi çok çeşitli hedeflere yüksek seçicilikle bağlanabilmektedir. Aptamerler; yüksek bağlanma afinitesi ve özgüllüğü, termostabil olması, üretiminin kolay olması, kimyasal modifikasyona elverişli olması ve düşük maliyetli olması gibi benzersiz özellikleri sayesinde klinik teşhisler için potansiyel biyoreseptör molekülleri haline gelmiştir. Aptamerlerin biyoreseptör olarak kullanıldığı biyosensörler ise aptasensörler olarak adlandırılmaktadır (Ellington and Szostak, 1990). Aptamerler Bölüm 2.3’de daha detaylı şekilde incelenecektir.

2.2.2 Çevirici kısım (transducer) göre biyosensörler

Çevirici kısım, biyolojik reaksiyonu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürür. Üretilen bu sinyaller analitin konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Biyosensörler çevirici kısımlarına göre, akım, potansiyel, ışık şiddeti, kütle ya da ısı değişimine duyarlı olabilirler (Rogers and Mascini, 1998).

2.2.2.1 Optik biyosensörler

Optik bir biyosensörde, sensör üzerindeki fiziksel veya kimyasal değişime yanıt olarak, giriş ışığının faz, genlik, polarizasyon veya frekansında ölçülebilir bir değişikliği meydana gelmektedir. Bir optik biyosensörün ana bileşenleri ışık kaynağı, fiber gibi bir optik iletim elemanı, immobilize edilmiş biyolojik tanıma elemanı ve optik çevirici sistemidir. Optik biyosensörler farklı parametrelere göre sınıflandırılabilir. Genellikle, optik biyosensörde uygulanabilen iki tespit protokolü vardır;

- **Floresan tabanlı algılama;** biyolojik tanıma elemanının veya hedef moleküllerin floresan özellikteki boya gibi maddelerle etiketlenmesi esasına dayanmaktadır. Ölçülen floresan yoğunluğu, hedef moleküllerin doğrudan varlığını ve hedef ile tanıma elemanı arasındaki etkileşimi göstermektedir. Floresan esaslı algılama, tek bir moleküle kadar tayin edebilme özelliğiyle son derece hassastır.
- **Etiketsiz algılama;** Optik tabanlı ve gerçek zamanlı tayin yöntemi olan Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR; Surface Plasmon Resonance); yüksek hassasiyet ve herhangi bir etikete bağlı olmadan ölçüm yapabilmesi özelliği sayesinde moleküler bağlanma işlemlerini çalışmak için güçlü bir yöntem

olarak ortaya çıkmıştır. Biyosensör uygulamalarında SPR yöntemi ilk olarak 1983'te kullanılmış olup ve günümüzde DNA, protein ve virüslerin etkileşimlerinin belirlenmesi, antijen-antikor etkileşimlerinin saptanması ve adsorpsiyon ve desorpsiyon kinetiklerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Liedberg et al., 1983; Mol and Fischer, 2010).

2.2.2.2 Piezoelektrik esaslı biyosensörler

Kütle duyarlı ölçümlere dayanan biyosensörler, piezoelektrik yapıdaki kristaller üzerinde gerçekleşen biyolojik tanıma olaylarından kaynaklanan küçük kütle değişikliklerini tespit etmektedirler.

Kuvars Kristal Mikrobalans (QCM, Quarz Crystal Microbalance) tabanlı biyosensörler, farklı biyosensör uygulamalarında kullanılan kütle değişimlerine duyarlı, hassas bir yöntemdir. QCM yönteminde sensör yüzeylerine immobilize edilen biyoreseptörlerin hedefleriyle etkileşime geçmesinin ardından kütle değişimine bağlı meydana gelen rezonans frekansındaki değişimlerin (Δf) belirlenmesi temeline dayanmaktadır (Vo-Dinh and Cullum, 2000). Bu şekilde bir etkileşim gerçekleşmesi durumunda kristal üzerindeki kütle artacak ve kristalin osilasyon frekansı azalacaktır. Sensör uygulamalarında kullanılan QCM, ince bir kuartz kristalinden oluşmaktadır ve piezoelektrik özelliktedir. Piezoelektrik özelliğe sahip kristaller, üzerlerinde meydana gelen kütle değişimlerine bağlı olarak oluşan mekanik gücü ölçülebilen bir elektriksel enerjiye çevirebilen malzemelerdir. QCM, tipik olarak osilasyon frekansının kristal yüzeyindeki kütle birikimiyle azaldığı bir osilatör devresiyle birlikte kullanılır. Frekans ile sensör üzerinde biriken kütle arasındaki bağıntı Sauerbrey denklemi ile ifade edilmektedir;

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}}\Delta m$$

Denklemden f_0 temel rezonans frekansını, Δf frekans değişimini, Δm sensör üzerindeki kütle değişimini, A kristal yüzeyinin alanını, ρ_q quartz yoğunluğunu, μ_q ise kesme katsayısını göstermektedir (Şahin-Sadık et al., 2016).

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, hepatit B virüs DNA'sına karşı geliştirilen piezoelektrik biyosensörün tayin limiti 8.6 pg L^{-1} ; kolera toksininin tayinine karşı ise 25 ng mL^{-1} tayin limitiyle oldukça hassas kütle duyarlı biyosensörler geliştirilmiştir (Yao et al., 2008; Chen et al., 2010).

2.2.2.3 Kalorimetrik biyosensörler

Tüm kimyasal ve biyolojik reaksiyonlar ısı alış-verişinde bulunurlar (Xie et al., 1999). Bir biyosensör sisteminde meydana gelen biyokimyasal reaksiyon sonucu açığa çıkan sıcaklığın ölçülmesine dayanan biyosensörlere kalorimetrik biyosensörler adı verilmektedir. Sıcaklıktaki değişim doğrudan harcanan moleküller ya da oluşan ürünlerin varlığıyla doğru orantılıdır. Bu yöntemin başlıca avantajları; stabil ve hassas olmasının yanında küçültülebilir cihazların önünü açmasıdır. Başlangıçta kalorimetrik çeviriciler enzim bazlı sensörler için uygulanmış ve günümüzde DNA hibridizasyonu tayininde, immünosensörlerde, gıda sanayinde ve çevresel sensörlerde kullanılmaktadır (Maskow et al., 2012; Kirchner et al., 2012).

2.2.2.4 Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler bünyesinde bir biyolojik algılama elemanı bulunduran ve bu elemanın hedef molekülünün varlığında seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve derişime bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan cihazlardır. Düşük maliyetli ve çok az numune varlığında dahi sonuç alınabilmesi, oldukça seçici olması, hızlı yanıt alınabilmesi ve mikrofabrikasyona uygunluğu gibi özellikleriyle klinik analizlerde hasta başında uygulanabilecek küçük cihazların temelini oluşturmaktadırlar.

Elektrokimyasal biyosensörler, yükseltgenme ve indirgeme (redoks) reaksiyonlarından üretilen akımı ölçer. Sensör üzerinde meydana gelen biyolojik bir olay, doğrudan ölçülebilir elektrik sinyallerine dönüştürülür. Bu sayede biyolojik bir numunenin veya ilgili analitin içeriğini ya da konsantrasyonunu analiz etmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Elektrokimyasal biyosensörler temelde; potansiyometrik, amperometrik veya voltametri gibi farklı yöntemler kullanılarak elde edilen ve bir elektriksel özelliğin (direnç, akım, potansiyel, kapasitans, empedans) ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Özellikle nükleik asit tayininde kullanılan elektrokimyasal biyosensörler, tayin süresini kısaltmakta, tayin yöntemini kolaylaştırmakta ve sensör yüzeyinde meydana gelen biyolojik tanıma olayının tayini ile dizilerin saptanmasını sağlamaktadır. DNA hibridizasyon biyosensörleri, çeşitli çevrelerdeki bulaşıcı hastalıkların erken ve kesin tanısında kullanılmaktadır (Hudson, 1998).

2.2.3 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler

Biyosensörlerin başarılı bir şekilde çalışabilmeleri için bazı özelliklere sahip olmaları gerekmektedir (Chaplin and Bucke, 1990; Nice and Catimel, 1999; Hall, 1990);

- **Seçicilik:** Bir biyosensör sadece kendi hedef analiti için yüksek seçiciliğe sahip olmalı ve benzer kimyasal yapılara sahip moleküllerle hiçbir etkileşime geçmemelidir.
- **Hassasiyet:** Biyoreseptör kısım ile analit arasında meydana gelen reaksiyonun kontrol edilebilir fiziksel parametrelerden bağımsız olması gerekmektedir.
- **Tekrarlanabilirlik:** Aynı koşullarda, aynı derişimdeki örneklerin, birden fazla kez analiz edilmeleri durumunda her seferinde aynı sonucu vermeleri gerekmektedir.
- **Hızlı Cevap Zamanı:** İdeal bir biyosensör en kısa zamanda analitiyle etkileşime girip gerçek zamanlı olarak ölçülebilen bir sinyal üretebilmelidir.
- **Geniş Ölçüm Aralığı:** Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım - derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır.
- **Kararlılık (Stabilite) ve Çalışma Ömrü:** Farklı biyokimyasal ve çevresel şartlarda (pH, sıcaklık, nem vb.) biyolojik materyallerin çoğu kararlı özellik gösterememektedirler. Biyosensörlerin piyasaya sürülebilmeleri için raf ömrünün uzun olması gerekmektedir. Bu

nedenle biyolojik materyallerin aktivitelerinin bozulmayacağı en uygun koşullar altında kullanılması gerekmektedir.

- **Basitlik ve Ucuzluk:** Biyosensörler olabildiğince basit ve en az maliyetli şekilde tasarlanmalı ve kullanımları rahat olmalıdır. Bu nedenle ilk tasarlanan biyosensörlerin karmaşık ve de pahalı yapıları zamanla basitleştirilerek mümkün olduğunca maliyet düşürülmüştür.
- **Küçültülebilirlik:** Bir biyosensör hasta başı analizlerde kullanılabilmesi adına küçük ve taşınabilir bir cihaz olarak tasarlanmalıdır.

2.3 Aptamerler

Aptamerler, spesifik üç boyutlu yapıları sayesinde belirli bir genetik diziye, amino asitlere, ilaçlara, proteinlere ve diğer küçük moleküllere yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanabilen yapay RNA veya ssDNA molekülleridir. Bugüne kadar proteinler, peptidler, enzimler, antikorlar ve hücre yüzeyi reseptörleri, glikoz ve steroidlere kadar küçük moleküllerin de dahil olduğu; bakteri gibi mikroorganizmalardan ökaryotik hücrelere kadar çok geniş bir yelpazedeki hedeflere özgü aptamerler seçilmiştir (Velasco-Garcia and Missailidis, 2009; Ellington and Szostak, 1990; Saberian et al., 2013).

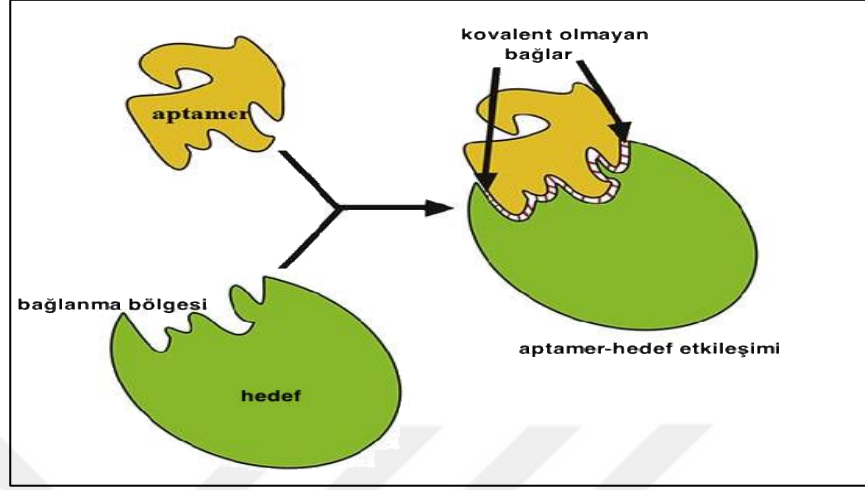
DNA aptamerleri kimyasal olarak oldukça kararlı yapılardır. Bunun aksine RNA aptamerlerinin yapıları, tipik olarak parçalanmış hücrelerde ve serumda bulunan endoribonükleazlar tarafından kolayca bozulabilmektedir (Strehtlitz et al., 2008).

Aptamerler, klinik analizlerde, hastalıkların tedavisinde, yeni ilaçların geliştirilmesinde ve ilaç taşınım sistemleri gibi çok geniş alanlarda uygulamaları bulunan biyomateriyallerdir (Song et al. 2012). Nükleik asit temelli aptamerler, geniş oranda nükleik asit olmayan analitlerin saptanmasında ve çeşitli teşhis uygulamalarında kullanım bulmuştur. Biyosensörlerde biyoalgılayıcı eleman olarak kullanılan enzim ve antikorlara kıyasla çok küçük boyuttadırlar. Genellikle 20-100 baz uzunluğunda değişen kısa oligonükleotid dizilerinden meydana gelen aptamerler, kararlı kompleks moleküllerdir. Bu sayede aptamerlerin elektrot yüzeyine immobilizasyonu yüksek yoğunluklarda dahi mümkündür. Aptamerler yapılarını üç boyutlu olarak değiştirebilirler. Bu sayede küçük moleküller aptamerin nükleik asit yapısına dahil olabilirken protein gibi makromoleküller aptamer ile üç boyutlu olarak birleşebilmektedir (McCauley et al., 2003; Hermann and Patel, 2000; Liss et al., 2002).

2.3.1 Aptamer-hedef molekül etkileşimleri

Aptamer ile hedef molekül arasındaki bağlanma kinetiğinin anlaşılması için bu etkileşimler biyofiziksel olarak incelenmiştir. Çoğunlukla, iki molekül birbirine oldukça spesifik şekilde elektrostatik etkileşimlerle bağlanmaktadır. Nükleik asit aptamerleri sahip oldukları negatif fosfat omurgası sayesinde, pozitif yüklü hedef molekülleri ile etkileşime geçmektedir (Hermann and Westhof, 1999). Bunun haricinde hidrojen bağı, van der Waals etkileşimleri ve şekil uygunluğu gibi etkileşimler de aptamer-hedef molekül bağlanmasında rol oynamaktadır (James,

2001; Yıldırım, 2014). Şekil 2.16’da aptamer-hedef molekül etkileşimi şematik olarak gösterilmiştir.

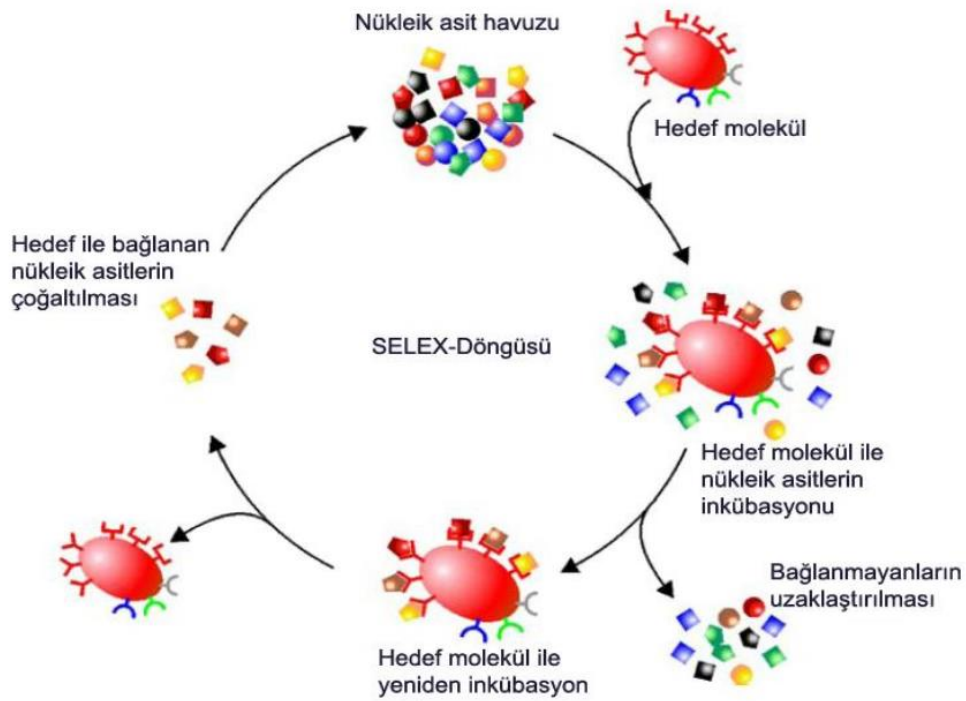


Şekil 2.16 Aptamer ile hedef molekülü arasında gerçekleşen etkileşim

2.3.2 Aptamerlerin *in vitro* seçilme protokolü

Aptamerler Gold ve Tuerk’ in 1990 yılında yapmış oldukları çalışmalara dayanan ve **SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)** adı verilen bir yöntem ile RNA ya da DNA kütüphanelerinden izole edilmektedir (Bang et al., 2005). SELEX yöntemiyle *in vitro* ortamda hedeflerin nükleotid dizilimine, şekline veya hedefin üzerindeki özgül tanıma reseptörlerine göre en özgül bağlanan aptamer seçilmektedir. Şekil 2.17’de şematize edilen SELEX yöntemi, en uygun aptamerin seçilebilmesi için tekrarlı olarak yürütülen 3 ana basamaktan oluşmaktadır;

- Rastlantısal DNA ya da RNA oligonükleotitlerinden oluşan kütüphanenin oluşturulması,
- Aptamer aday moleküllerinin hedef moleküller ile etkileşiminin gerçekleştirilmesi,
- Hedef molekül ile etkileşime geçen aptamer moleküllerinin çoğaltılarak saflaştırılmasıdır (Song et al., 2012).



Şekil 2.17 SELEX protokolünün şematik gösterimi (Proske et al., 2005)

SELEX yöntemi ilk olarak, yaklaşık 10^{13} – 10^{18} rastlantısal tek iplikli DNA ya da RNA oligonükleotidini içeren kütüphanenin oluşturulması ile başlamaktadır. Oluşturulan bu kütüphane, uygun sıcaklık ve tampon çözelti ortamında ilgili hedef molekül ile inkübe edilir. Aptamer seçimine yönelik gerçekleştirilen ikinci basamakta, kütüphanedeki oligonükleotidlerin sadece küçük bir yüzdesi

(% 0.1-0.5) hedefle etkileşime girer. Hedef molekül ile etkileşime girmeyen oligonükleotidler ortamdan uzaklaştırılır. Etkileşime giren oligonükleotidler ise olası aptamer adayları olarak hedef molekülden ayrıştırılır. Toplanan bu oligonükleotidler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılarak (Bkz. Bölüm 2.3.2.1) SELEX işlemi 8-15 döngü kere tekrar edilir. Elde edilen hedefe özgül aptamer moleküllerinin tekrar saflaştırılması ve dizi analizinin gerçekleştirilmesi ile işlem son bulur. SELEX yöntemi sayesinde hedef moleküle karşı en güçlü bağlanma ilgisine sahip aptamer molekülleri *in vitro* ortamda seçilebilmektedir (O'Sullivan, 2002).

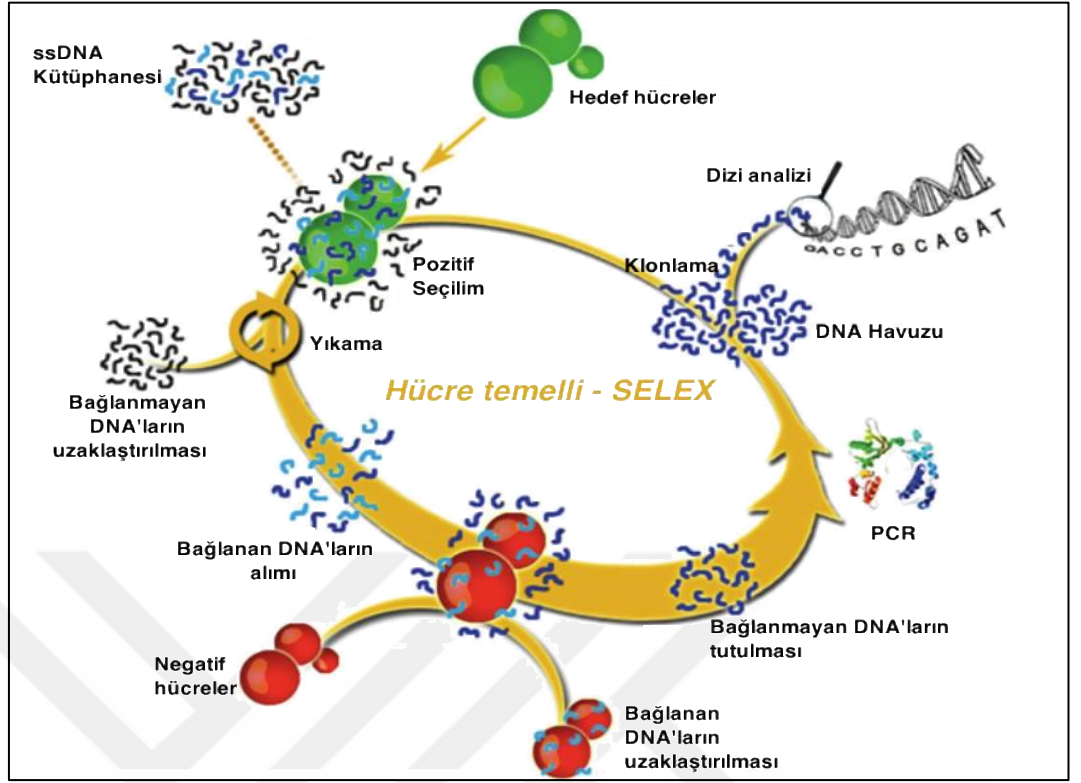
Kanser ve diğer birçok hastalık, genlerde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanır. Bu tür genetik değişiklikler hücrelerin morfolojilerinin ve yapılarının moleküler düzeyde değişimlerine neden olur. Kanserler çoğunlukla tümör dokuların veya kanserli hücrelerin morfolojilerine dayanarak teşhis edilir (Shangguan et al., 2006).

Birçok aptamer kanser oluşumuyla ilişkili farklı proteinlere karşı SELEX yönteminin farklı bir yaklaşımı olan **Hücre Temelli - SELEX Yöntemi** ile seçilmiştir. Bu yaklaşım farklı kanser türlerinin doğrudan tanınmasına izin vermektedir. Bu yaklaşımda hedef molekül olarak kanserli hücreler kullanılır ve bu hücrelere en spesifik bağlanan aptamerler seçilir. Buna ek olarak hücre temelli SELEX ile hücre membran yüzeyindeki proteinlerin tiplerine ve sayısına ilişkin açık bilginin elde edilmesi mümkün olmaktadır. Toplanacak bu veriler ile birçok kanser tipinin tanı ve tedavisi için moleküler profillerin oluşturulması mümkün kılınacaktır. Bugüne kadar lösemi hücreleri, karaciğer kanseri hücreleri ve akciğer

kanseri hücrelerine karşı aptamerler bu yöntem ile seçilmiştir (Zhao et al., 2009; Chang et al., 2013).

Aptamerlerin hedef moleküllerine karşı yüksek bağlanma ilgisine sahip olması ve spesifik olmasının yanında, uygun sentez ve modifikasyonlar ile kolaylıkla üretilibilmeleri, düşük immünojeniteye sahip olmaları, hızlı doku penetrasyonuna sahip olmaları ve çok uzun bir zaman diliminde kararlı bir şekilde saklanıp kullanılabilmesi ve bu sayede biyosensör uygulamalarında kullanılabilir bir araç olmalarından dolayı çeşitli kanser türlerinin etkin bir şekilde tanısının gerçekleştirilmesinde aptamerlerle çalışma yaklaşımı büyük önem kazanmıştır (Jiménez et al., 2012).

Kanser hücrelerinin moleküler özelliklerinin belirlenebilmesi için hücre temelli SELEX yöntemi ile geliştirilen aptamerlerin kullanımı, diğer kanser tanı yöntemleriyle kıyaslandığında daha avantajlıdır. Bu yöntem ile seçilen aptamerler, sadece hedef hücre ile değil hedef olmayan negatif hücrelerle de etkileşime sokulmaktadır. Negatif hücrelerle etkileşime giren oligonükleotidler ortamdan uzaklaştırılarak sadece hedefe özgül aptamerlerin seçilmesi sağlanmaktadır. Hücre SELEX yöntemi ile geliştirilen kanser tiplerine özgül aptamerlerin kullanımıyla, epitel hücreleri ile çapraz reaksiyonun önüne geçilmiş olunacaktır. Bunun sonucunda da spesifik olmayan bağlanmalar engellenecektir. Şekil 2.18’de hücre temelli SELEX yönteminin çalışma prensibi gösterilmiştir. Aynı zamanda aptamer molekülleri düşük moleküler ağırlığa sahip olduklarından kolayca sentezlenerek, doğal formlarında bulunan hücre yüzeyindeki hedef proteinler ile kolayca etkileşime geçip, yüksek duyarlılığa sahip daha kesin sonuçların elde edilmesinin önünü açacaktır (Chen et al., 2008; Shangguan et al., 2006).



Şekil 2.18 Hücre temelli SELEX yönteminin şematik olarak gösterimi (Shangguan et al., 2006)

Zhao ve arkadaşlarının 2009 yılında yapmış oldukları çalışmada hücre temelli SELEX yöntemi kullanılarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hücrelerinin alt tiplerini tanıyabilen aptamerler geliştirilmiştir. Yapılan çalışmada 4 farklı alt tipteki adenokarsinoma hücrelerine güçlü şekilde bağlanma özelliğine sahip aptamerler, akciğer kanseri hastalığına yakalanan hastalardan alınan doku örnekleri ve aynı zamanda farklı alt tiplerdeki adenokarsinoma özelliği taşıyan hücre hatları ile çalışılmıştır. Elde edilen bulgular sonucunda farklı alt tiplerdeki adenokarsinoma hücrelerine özgül şekilde seçilimin mümkün olduğu gösterilmiştir.

2.3.2.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu *in vitro* koşullar altında spesifik bir DNA parçasının enzimatik olarak kopyalanması ve çoğaltılması yöntemidir. 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilen bu teknik sayesinde az miktardaki bir DNA'yı çabuk ve basit bir şekilde çoğaltmak mümkündür (Mullis et al., 1986).

PCR yöntemi özetle, çeşitli materyallerden izole edilmiş çift iplikli bir DNA molekülünün yüksek sıcaklıklarda ipliklerin birbirinden ayrılması (denatürasyon), uygun sıcaklıklarda hedef dizilerine iki oligonükleotid primerinin bağlanması (annealing) ve Mg^{2+} iyonları varlığında sıcaklığın da yükselmesiyle primerlerin uzatılarak (extention) yeni DNA zincirleri sentezlenmesi esasına dayanır. Kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra primer adı verilen spesifik kısa zincirli oligonükleotidler, tek iplikli DNA molekülü üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin, spesifik olduğu hedef dizilere bağlanması ve uzaması daha düşük sıcaklıkta gerçekleşir. Böylece hedef bölgelerin sayısal çoğaltılması (amplifikasyon) sağlanır (Kara, 2007).

Günümüzde PCR yöntemi;

- SELEX yöntemiyle seçilen aptamerlerin çoğaltılmasında,
- Genetik hastalıkların teşhisinde,
- Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde ve parmak izi analizlerinde,
- Tarım alanında tohum saflığının belirlenmesinde,

- DNA’da meydana gelen mutasyonların araştırılmasında,
- Genetik mühendisliği amaçları doğrultusunda rekombinant organizmalar elde edilmesinde gen aktarımı için kullanılmaktadır.

2.3.3 Aptamerlerin avantajları

Aptamerler, SELEX yöntemiyle yapay olarak üretilmeleri nedeniyle ve antikorlarla benzer bağlanma kinetiğine sahip oldukları için kimyasal antikorlar olarak da isimlendirilirler. Aptamerlerin hedef molekülleriyle yaptıkları oldukça özgül etkileşimler her ne kadar antijen-antikor etkileşimine benzese de aptamerlerin antikora kıyasla birçok avantajı vardır.

Geniş biyoanalitik uygulamalardaki fonksiyonlarını ve bağlanmalarını arttırmak için aptamerler 3’ ve 5’ uçlarından amino (-NH₂) ve tiyol (-SH) gibi çeşitli gruplarla modifiye edilebilmektedir. Bu işlem sonucunda, farklı yüzey kimyası işlemleriyle aptamer moleküllerinin yüzeye immobilizasyonu son derece kararlı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir.

Aptamerler yüksek derecede özgüllüğe sahip moleküllerdir. Yapay olarak üretildikleri için hedef moleküllerinin kimyasal yapılarına karşı oldukça duyarlıdır. Hedef molekülleri üzerindeki fonksiyonel gruplarının varlığına veya yokluğuna göre şekillenen yapısal farklılıkları kolayca ayırt edebilmektedirler. Ayrıca aptamerler hedef molekülleriyle bağlanma esnasında konformasyonel değişikliğe uğrarlar. Bu sayede biyosensör tasarımlarında yüksek hassasiyet ve seçicilikle hedeflerine bağlanabilirler.

Proteinler yüksek sıcaklıklarda üçüncül yapılarını kaybederek kolayca denatüre olabilmektedirler. Proteinlerin aksine oligonükleotidler termal olarak daha kararlı bir yapı sergilemektedirler. Bu noktada aptamerlerin en büyük avantajı, olgun formlarına tekrar geri dönebilmeleridir. Ancak antikorlar kolayca geri dönüşümsüz olarak denatüre olabilmektedirler.

Kanser hücre yüzeyindeki reseptörlere oldukça özgül şekilde bağlanan monoklonal antikorların üretimi son derece zahmetli ve pahalı basamaklara sahip bir süreçtir. Ayrıca büyük ölçekte üretilen antikorların performansı farklılık gösterebilmektedir. Antikorların performanslarının doğrulanması için immünojenik testlere gereksinim duyulmaktadır. Oysaki seçilen bir aptamer, deney hayvanlarının kullanımına gerek duyulmadan, *in vitro* teknikler kullanılarak kimyasal reaksiyonlarla kesin bir doğrulukta ve tekrar edilebilir bir şekilde sentezlenerek, yüksek verimlilikle saflaştırılabilmektedir. Bu kimyasal işlemler, antikor üretiminden daha ekonomiktir. Ayrıca, aptamerler stabiliteelerini ve nükleaz direncini arttırmak için çeşitli kimyasal reaksiyonlarla kolaylıkla modifiye edilebilir. RNA aptamerleri nükleazların etkisine bağlı olarak biyolojik sıvılarda çok kısa ömre sahiptir. Bu oligonükleotidlerin pirimidin bazlarının amino/floro gruplarıyla modifiye edilmesiyle aptamerlerin biyolojik sıvı içerisindeki yarı ömürlerinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (Kusser, 2000).

Aptamerler genellikle düşük immüno reaktivite ve toksisiteye sahip moleküllerdir. Çünkü nükleik asit karakterli olup, protein yapısında olmadıklarından ve endojen proteinler ile yapısal benzerlik göstermediklerinden insan bağışıklık sistemi tarafından tipik olarak tanınmazlar. Bu yüzden antikora kıyasla çok düşük miktarda immünojeniktirler.

Toksinler ve diğer bağışıklık yanıtı sağlamayan moleküller için antikorların tanımlanması ve üretilmesi zordur; ancak aptamerler yeterli sayıda üretilabilirler. Aptamerlerin diğer bir avantajı ise bazı ligantlar için yüksek afinite ve özgüllük göstermeleridir. Ayrıca güçlü bağışıklık yanıtlarına neden olan antikorlar tarafından tanınamayan iyonlar ve küçük moleküller gibi elemanlar aptamerler ile saptanabilmektedir. Bu durum aptamerlerin biyosensör olarak kullanımlarını büyük oranda desteklemektedir (Jayasena, 1999; Song et al., 2012).

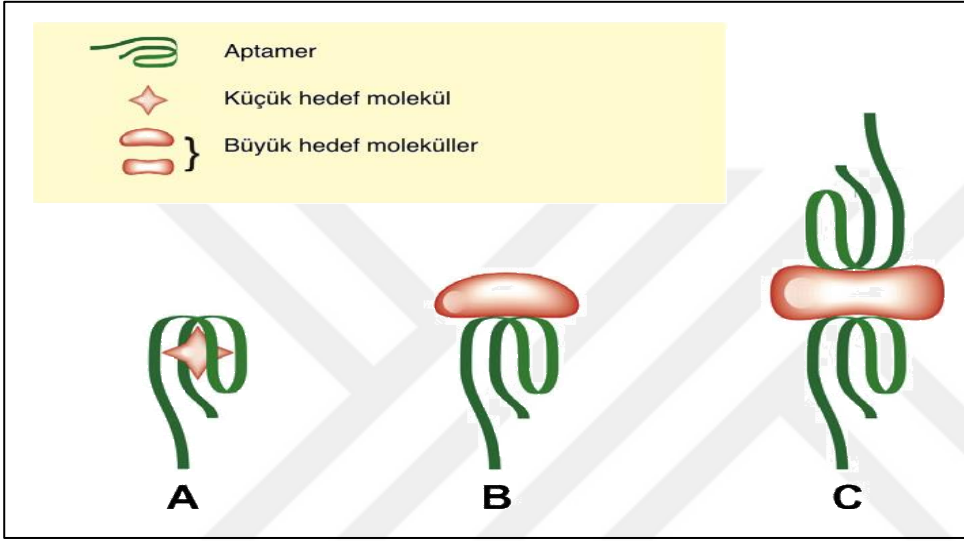
2.3.4 Aptamer-tabanlı biyosensörler (Aptasensörler)

Aptasensörler küçük moleküllerden, makromoleküllere kadar geniş bir hedef yelpazesine karşı özgül olduklarından, farklı moleküllerin tanısı için farklı konformasyonel değişikliklere sahip aptamerler kullanılabilir. Genel olarak iki çeşit konfigürasyona sahip biyosensör sistemleri, her aptamer-hedef çiftinin farklı bağlanma koşullarına göre oluşturulmaktadır (Hermann and Patel, 2000) (Şekil 2.19);

- Tek- taraflı bağlanma
- Çift- taraflı bağlanma

Küçük hedef moleküllerin tayininde kullanılan aptasensörlerde, hedef molekül aptamer içine gömülmektedir. Aptamerin içine gömülen küçük hedef moleküllerin ikinci bir yapıyla bağlanması söz konusu olmadığından bu moleküller için tek- taraflı aptamer bağlanması en uygun koşuldur. Bunun aksine proteinler daha karmaşık ve büyük yapılar oldukları için hem tek- taraflı hem de çift- taraflı bağlanmaya izin vermektedirler. Aptamerler proteinlerin farklı bağlanma bölgelerine son derece özgül şekilde bağlanabilmektedirler. İki- taraflı bağlanma

aynı zamanda sandviç yöntemi olarak da bilinmektedir. Bu yöntemde hedef molekül iki aptamer arasında tutuklanır. Elektrot yüzeyine immobilize edilmiş birinci aptamer yakalayıcı prob, hedefe bağlanan ve genellikle okunan sinyali arttırıcı özellikteki yapıları (enzim, floresan özellikteki yapılar, nanopartiküller gibi) içeren ikinci aptamere ise haberci prob adı verilmektedir (Song et al., 2008).



Şekil 2.19 Farklı aptamer-hedef bağlanma koşulları; (a) aptamer ile küçük hedef moleküllerin oluşturduğu gömülü yapı, (b) hedef molekül ile aptamer arasında oluşan tek- Taraflı bağlanma koşulu ve (c) çift- Taraflı bağlanma (sandviç) koşulu (Song et al., 2008).

Elektrokimyasal yöntemler ile aptamer diziler kullanılarak çeşitli proteinlerin ve hücrelerin algılanmasına yönelik tasarlanan biyosensörler, herhangi bir işaretleyici ajana gerek duyulmadan aynı çözeltide direk tayini gerçekleştirmeyi amaçlamaktadır (White et al., 2008; Deng et al., 2009). Aptamerler, küçük boyutları sayesinde biyosensörün elektrot yüzeyine daha yoğun bir şekilde immobilize edilebilmektedirler (Liss et al., 2002). Aptamerlerin hedeflerine duydukları yüksek ilgi onların düşük konsantrasyonlarda bile duyarlılık göstermelerine neden olmaktadır.

Yazdanparast ve arkadaşları (2018), göğüs kanseri hücrelerinin (MCF-7) tayinine yönelik iki-terafı aptamer içeren sandviç yöntemiyle elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmişlerdir. Elektrot yüzeyine immobilize edilen ilk aptamer kanser hücresi üzerinde bulunan MUC-1 biyoışaretiyicisine spesifik aptamerdir. İkinci aptamer ise gümüş nanopartiküllerle (AgNP) işaretlenmiş ve sinyali artırıcı özelliğe sahip haberci aptamerdir. Tayin sınırının 25 hücre olarak belirlendiği bir aptasensör geliştirilmiştir.

Son yıllarda viral hastalıkların teşhisine yönelik bir takım biyosensör sistemleri geliştirilmiştir. Influenza, Ebola, SARS gibi çok hızlı gelişen hastalıkların tayini kısa zamanda oldukça önemlidir. Viral proteinlerin hasta kanında tayini amacıyla bu proteinlere spesifik bağlanma eğilimi gösteren aptamerler seçilerek hızlı, düşük maliyetli ve efektif aptamer-tabanlı biyosensörler geliştirilmiştir (González et al., 2016).

2.4 Nanomateryaller ve Biyomedikal Alanda Kullanımı

Günümüzde, mikrosensör ile biyoteknoloji alanındaki gelişmeler ve biyolojik moleküllerin kendi biyoreseptörleriyle oldukça seçici şekilde etkileşime girmeleri biyosensör teknolojilerinin hızla gelişmesine neden olmuştur. Nanoteknolojinin sağladığı üstün özellikler sayesinde, tıbbi görüntüleme, farmakoloji, mikrobiyoloji, yara iyileşmesi, dokuların yenilenmesi, bazı kronik hastalıkların tedavisi, aşı ve genetik alanlarında yeni ürünler elde edilebilmektedir. Nanomateryaller; biyosensörlerin performansını ve hassasiyetini arttırarak, kanserin erken safhasında hücre düzeyinde tayini, patojenlerin belirlenmesi, ilaç taşıyım sistemleri gibi önemli alanlarda kullanılmaktadırlar (Tüylek, 2017).

Nanoteknoloji, maddeyi nano boyutlarda, yani atomik ve moleküler düzeydeki yapılar seviyesinde kontrol etme ve yeni özelliklerde malzeme, cihaz ve düzeneklerin tasarlanması ve üretilmesi işlemlerini konu alan bir bilimdir.

Nanomateriyaller 1 ila 100 nm boyut aralığında, farklı şekilde ve kimyasal yapıda bulunan nanoteknolojik malzemelerdir. Nanoteknolojinin biyosensör alanında kullanılmaya başlanmasıyla biyosensörlerin seçicilik ve hassasiyetini arttırdığı, tayin süresini kısalttığı ve maliyeti düşürdüğü gözlenmiştir. Böylelikle biyosensörlerin küçültülebilirliğinin ve giyilebilir, taşınabilir hatta vücuda yerleştirilerek gerçek zamanlı ve sürekli tayin yapabilen biyosensörlerin önü açılmıştır. Biyosensör tasarımında nanomateriyaller, algılama bölümünün modifiye edilmesiyle kullanıldıklarında küçük boyutları ve yüksek yüzey alanı/ hacim oranı sayesinde sensör yüzeyinin alanını arttırmaktadırlar (Rao, 2004; Turco Liveri, 2006).

Biyosensör tasarımında kullanılan nanomalzemeler boyut, şekil (nanopartiküller, nanotüpler, nanofiberler vb.), kimyasal yapı (karbon-temelli, metal, metal oksit, polimer vb.) ve fizikokimyasal özelliklerine (elektronik, optik, manyetik, termal vb.) göre sınıflandırılırlar (Sapountzi et.al, 2017).

2.4.1 Nanopartiküller

Altın nanopartiküller (AuNP) sahip oldukları optik, elektronik ve moleküler özelliklerinden dolayı en çok kullanılan metal nanopartiküllerdir. 100 nm'den küçük boyutlardaki altın nanopartiküller içlerinde bulundukları süspansiyona kırmızı renk verirken daha büyük boyuttaki nanopartiküller mavi-mor renk vermektedirler.

Biyosensörlerde kullanılmalarının en önemli sebebi biyoreseptörün sensör yüzeyine immobilizasyonu esnasında sensörün kararlılığını arttırmalarıdır. Ayrıca yüzeyin iletkenliğini arttırarak elektron transferi hızını arttırmaktadırlar (Pingarrón et.al., 2008).

Yan ve arkadaşları (2007), K562 lösemi hücrelerinin elektrokimyasal davranışını ve antitümör ilacın hücre canlılığı üzerindeki etkisini incelemek için elektrot yüzeyi üzerindeki elektron transferini hızlandıran altın nanopartikül (AuNP) modifiyeli bir biyosensör geliştirmişlerdir.

2.4.2 Nanotüpler

Karbon nanotüpler (KNT), karbon atomlarının birbirlerine altıgen oluşturacak şekilde bağlı olduğu grafenin silindir şeklinde katlanmasıyla oluşur. KNT'ler sağlamlık, esneklik, elektrik iletkenliği, ısı iletkenliği, hafiflik gibi özellikleriyle son yıllarda ilgi çeken bir nanomateryaldir.

KNT'ler uzunluklarına, çaplarına ve yapılarına göre iki sınıfa ayrılabilirler. Bunlar; tek bir silindirik grafen tabakasından oluşan tek duvarlı karbon nanotüpler (TDKNT) ve birden fazla eşmerkezli grafen tabakası içeren çok duvarlı karbon nanotüplerdir (ÇDKNT).

Son yıllarda karbon nanotüpler kimyasal ve fiziksel özellikleri sayesinde kanser teşhisi ve kanser tedavisi (ilaç taşınımı, gen terapisi, hedefe yönelik kemoterapi vb.) gibi alanlarda kullanılmak üzere geliştirilmektedir. Bir prostat kanseri biyobelirteçi olan prostat-spesifik antijen'in (PSA) tayinine yönelik, TDKNT modifiyeli ve tayin limiti 4 pg/mL olan bir immünosensör geliştirilmiştir (Ji et al., 2010; Yu et al., 2006).

2.4.3 Nanofiberler

Nanofiberler, benzersiz fizikokimyasal özellikleri sayesinde son yıllarda biyosensör alanında ve ticari uygulamalarda kullanılmaktadır. Nanofiberler, çapları bir mikron ve altında olan lifler olarak tanımlanmaktadır ve son derece yüksek özgül yüzey alanına ve yüzey alanı/hacim oranına sahiptirler.

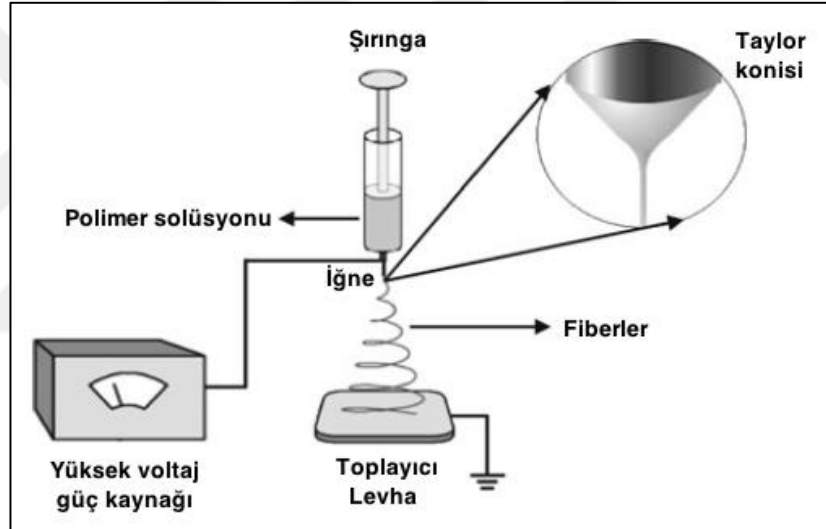
2.4.3.1 Nanofiberlerin fabrikasyonu

Nanofiberler genellikle çizme yöntemi, faz ayırma, kendiliğinden tutunma, kimyasal buhar çöktürme (CVD), lazer buharlaştırma ve elektroğirme yöntemleriyle üretilmektedir. Tüm bu yöntemlerin arasında elektroğirme yöntemi, basitliği ve güçlü bir teknik olması nedeniyle son on yılda nanofiber üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır.

Elektroğirme yöntemi; bir polimer solüsyonu kullanılarak tekdüze ve nano boyutta lifler (fiberler) üretmek için kullanılan bir tekniktir. Fiber üretimi için yaygın olarak kullanılan diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, elektroğirme yöntemi çok daha basit ve düşük maliyeti bir teknik olmasıyla öne çıkmaktadır. Nanofiber kullanılarak geliştirilen biyosensörlerin sayısı da hızla artmaktadır. Nanofiberler, biyosensör alanında kullanıldığında biyoreseptörlerle işlevsel bir arayüz oluştururlar ve bu sayede biyoreseptörler daha kararlı hale gelirler. Kararlı hale gelen biyoreseptör, biyosensörün analitik performansını ve kararlılığını arttırarak cevap zamanını da mümkün olduğu kadar düşürmektedir.

Elektroeğirme yöntemi; elektrik alan kuvvetlerinin bir solüsyon üzerine etki ettirilerek solüsyonun viskoelastik yapıda lifler halinde uzaması temeline dayanmaktadır. Şekil 2.20’de gösterildiği üzere, elektroeğirme sistemi üç temel bileşenden oluşmaktadır;

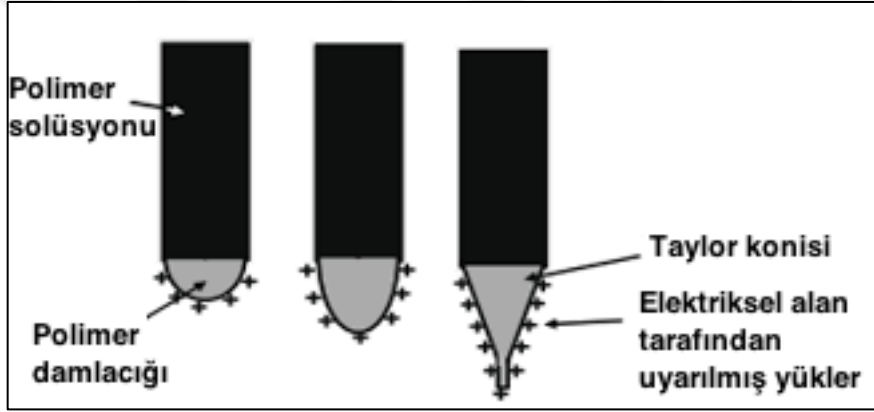
- Polimer solüsyonunun doldurulduğu şırınga,
- Elektrik alan kuvvetini oluşturan yüksek voltaj kaynağı,
- Toplayıcı metal bir levha içermektedir.



Şekil 2.20 Elektroeğirme yöntemi ve bileşenleri

İlk aşamada fiber halinde oluşturulmak istenen polimer, uygun bir çözücü içinde hazırlanır. Polimer solüsyonu bir şırınga içerisine çekilerek şırınga pompasına yerleştirilir ve solüsyon şırınga iğnesinin ucuna doğru konumlanır. Şırınga iğnesine uygulanan yüksek gerilim (1-30 kV) sayesinde elektrik alan kuvveti oluşur ve iğnenin ucunda bulunan polimer, toplanma levhasına doğru kesintisiz fiberler şeklinde hareket etmeye başlar (Li and Xia, 2004).

Şırınga iğnesi ucunda elektriksel olarak yüklenmiş polimere başlıca yerçekimi, yüzey gerilim ve elektriksel kuvvetler etki eder. Voltaj kritik değere ulaşp elektriksel kuvvetler yüzey gerilimini yenmeden hemen önce polimerin uç kısmında Şekil 2.21’de gösterilen “Taylor konisi” adı verilen yapı oluşur. Uygulanan voltaj kritik değeri aştığı zaman polimer üzerindeki yüzey gerilimi kuvvetlerinin, uygulanan elektriksel kuvvetlere karşı gelemediği noktada polimer koni şeklini alır. Koni şeklindeki polimer damlacığı toplayıcı üzerinde uzun ve ince fiberler şeklinde toplanır.



Şekil 2.21 Taylor konisinin oluşumu

2.4.3.2 Kullanılan malzemeye göre nanofiberler

Nanofiberlerin sentezi için çok çeşitli malzemeler kullanılabilir. Bunlar arasında doğal polimerler, karbon temelli malzemeler ve kompozit malzemeler bulunmaktadır (Kenry and Lim, 2017).

Biyomedikal alanda çok geniş alanlarda kullanılmak amacıyla nanofiberler geliştirilmiştir. Abdelgawad ve arkadaşları (2014), doğal polimerlerle hazırlanan

nanofiberleri kullanarak antimikrobiyal etkili yara bantları geliştirmişlerdir. Nanofiberleri bir doğal ve biyouyumlu polimer olan kitosandan oluşturmuşlardır. Kitosanın gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel özellik gösterdiği bilinmektedir.

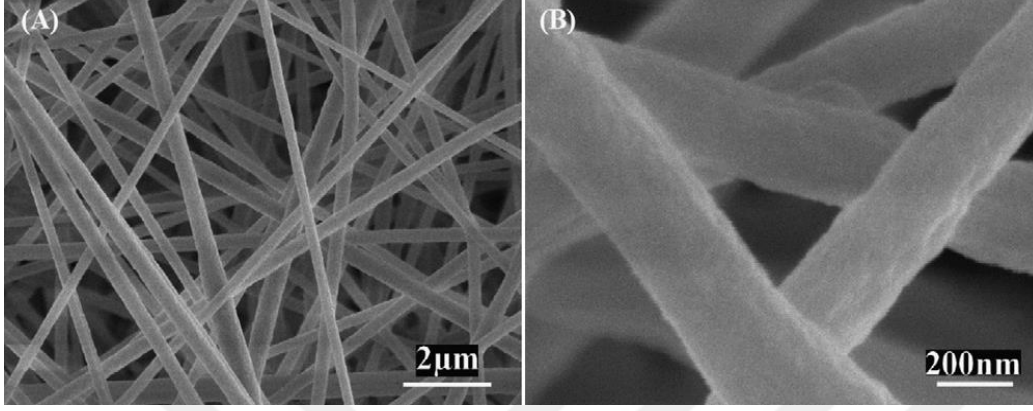
Karbon temelli nanofiberler yüksek sıcaklıkta yapılarının değişmemesi ve oldukça kararlı olmaları, yüksek elektrik iletkenliği gibi özellikleriyle diğer fiberlere kıyasla daha iyi performans göstermektedirler. Bugün üretilen karbon temelli nanofiberler çoğunlukla poliakrilonitril (PAN) polimerinden üretilmektedir. Moleküler formülü $[C_3H_3N]_n$ olan PAN lineer bir polimerdir ve yüksek karbon içeriği nedeniyle nanofiber oluşumu için en uygun polimerdir (Zhang et al., 2014).

Tanık ve arkadaşları (2018), tek kullanımlık grafit elektrot (PGE) üzerinde elektroğirme yöntemiyle PAN nanofiberleri oluşturarak nörodejeneratif hastalıklarda sıklıkla gözlenen Val66Met tek nokta mutasyonunun tayinine yönelik DNA hibridizasyonuna dayalı bir genosensor geliştirmişlerdir.

Karbon temelli nanofiberlerin mekanik özellikleri iletken polimerler aracılığıyla kompozit oluşturularak arttırılmaktadır. İletken polimerler geniş yüzey alanı sağlamaları, sensör yüzeyinin iletkenliğini arttırmaları gibi özellikleriyle sıkça kullanılmaktadır.

Polipirrol (PPy), yüksek iletkenliği ve kimyasal kararlılığı sayesinde sıklıkla kompozit yapılarda kullanılan bir iletken polimerdir. Polipirrolün konjuge yapısı ve bir çözücü içerisindeki çözünürlüğünün az olması nedeniyle tek başına elektroğirme yöntemiyle kullanılması zordur. Polipirrolün, PAN ve diğer iletken polimerler ile birlikte oluşturduğu kompozit yapı sayesinde mekanik olarak güçlü

ve iletken fiberler üretilebilmektedir. Şekil 2.22’de PAN/PPy kompozitiyle oluşturulmuş nanofiberlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri gösterilmiştir.



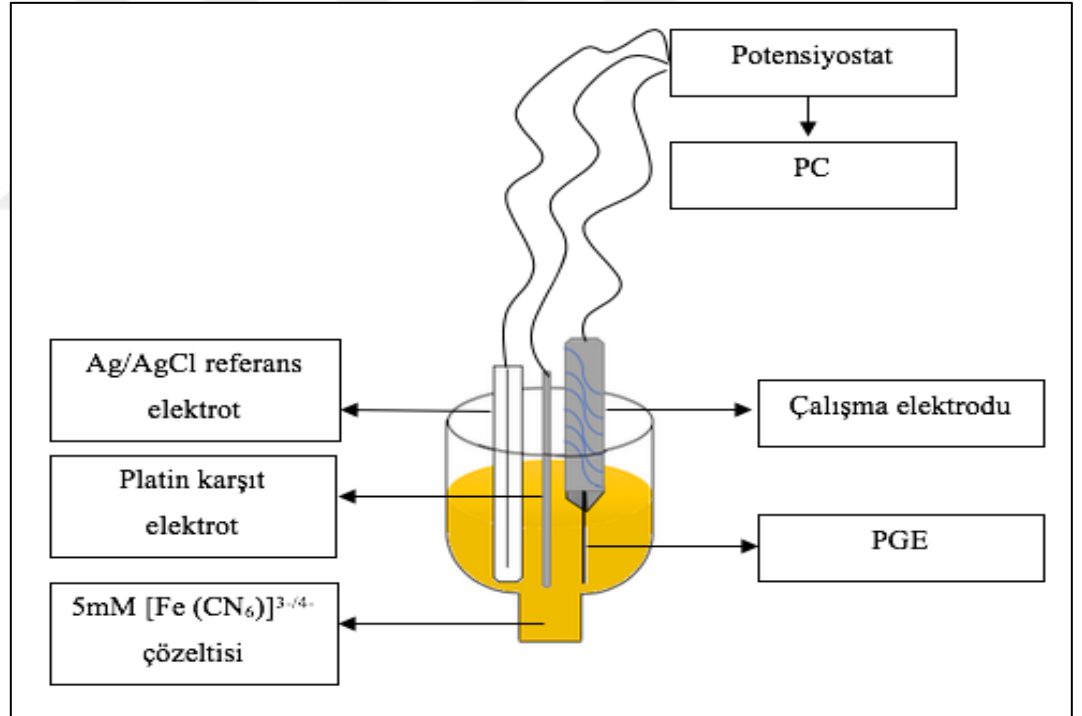
Şekil 2.22 PAN/PPy kompozitiyle oluşturulan nanofiberlerin SEM görüntüleri: (a) 2 µm’lik ölçek ve (b) 200 nm’lik ölçekte farklı büyütme oranlarındaki görüntüler (Ji et al., 2010).

Ji ve arkadaşları (2010), yaptıkları çalışmalarda PAN ve PPy ile oluşturulan kompozit yapının elektroegirme yöntemi ile fiberler halinde oluşturulmasını incelemişlerdir. PAN oranını sabit %8 ağırlıkta tutarak, artan yüzdelerde %15, 30 ve 50 ağırlıkça PPy ile hazırlanan kompozitlerin yapılarını ve verimliliklerini karşılaştırmışlardır. PPy oranı arttıkça iletkenliğin ve viskozitenin artmasıyla birlikte fiberlerin yapılarının düzensizleştiğini göstermişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Üçlü Elektrot Sistemi

Elektrokimyasal ölçümler üçlü elektrot sistemi yardımıyla alınmıştır. Deney düzeneğinde kullanılan üçlü elektrot sistemi, çalışma elektrodu olarak tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE) olarak adlandırılan 3 cm boyunda kesilmiş Tombo marka HB 0.5 mm kalem uçları, referans elektrot olarak gümüş klorür içerisinde gümüş tel (Ag/AgCl) ve karşıt elektrot olarak da platin tel (Pt) bileşenlerinden oluşmaktadır. Üçlü elektrot sisteminin daldırıldığı elektrokimyasal hücre içerisinde tampon çözelti bulunmaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Üçlü elektrot sisteminin şematik yapısı

3.2 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan, glasiyel asetik asit (CH_3COOH), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), N- hidroksi süksinimit (NHS), 1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)karbodimid hidroklorid (EDC), sodyum hidroksit (NaOH), Merck (Darmstad, Almanya) firmasından; Polipirol (PPy), Poliakrilonitril (PAN), N,N-Dimetilformamid (DMF), %98'lik dietanolamin (DEA) ve sodyum klorür (NaCl), Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Tüm tampon çözeltilerin hazırlanışında $18.2 \text{ M}\Omega$ Ultra saf su kullanılmış ve tampon çözeltiler $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. Diğer çözeltiler taze hazırlanarak kullanılmıştır. Çözeltilerin pH ayarlamaları 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ilavesiyle yapılmıştır. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında $(25.0 \pm 0.5) ^\circ \text{C}$ de gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılan tampon ve diğer çözeltiler içerikleriyle birlikte Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Deney aşamasında kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

A) Tampon Çözeltiler	İçeriği
0.50 M Asetat Tampon Çözeltisi (ACB) (pH 4.8)	0.5 M glasiyel asetik asit (CH_3COOH) ve 20 mM NaCl ultra saf su ile hazırlanmıştır.
0.05 M Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) (pH 7.4)	10 mM KH_2PO_4 , 40 mM K_2HPO_4 ve 20 mM NaCl ultra saf su ile hazırlanmıştır.
B) Diğer Çözeltiler	İçeriği
PAN/PPy Nanofiber Solüsyonu	8 wt% PAN ve PAN'ın 10 wt% PPy, N,Ndimetilformamid (DMF) ile hazırlanmıştır.
2 M NaOH Solüsyonu	Litresinde 80 g sodyum hidroksit (NaOH) olacak şekilde ultra saf su ile hazırlanmıştır.
Kovalent Bağlama Ajanı	5 mM NHS ve 8 mM EDC solüsyonu 0.05 M PBS ile hazırlanmıştır.
Bloklama Ajanı	%1 'lik Dietanolamin solüsyonu 0.05 M PBS ile hazırlanmıştır.
Ölçüm Solüsyonu	5 mM $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-/4-}$ solüsyonu 0.05 M PBS içinde hazırlanmıştır.

3.3 Kullanılan DNA Dizileri ve Hazırlanışları

Bu tez kapsamında, Zhao ve arkadaşlarının (2009) hücre temelli SELEX yöntemi kullanarak oluşturdukları ve KHDAK hücrelerinin alt tiplerini tanıyabildiğini bildirdikleri aptamerlerden Çizelge 3.2’de gösterilen baz dizilimine sahip olan aptamer dizisi kullanılmıştır. Sentetik aptamer dizisi liyofilize halde Heliks Biyoteknoloji (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Aptamerin seçiciliğini doğrulamak için baz dizilimi tamamen farklı bir aptamer dizisi de kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Temin edilen liyofilize diziler, stok çözelti (1000 µg/mL) oluşturulmak üzere önce 1000xg’de 8 dakika santrifüjlenmiş ve 18.2 MΩ Ultra saf su ile konsantrasyonları 1000 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Stok çift iplikli DNA (Serva Electrophoresis Heidelberg, Almanya) 1000 µg/mL konsantrasyonda ultra saf su ile hazırlanmış ve -20°C’ de muhafaza edilmiştir. İstenilen konsantrasyonlardaki DNA dizileri, stok çözeltinin 0.50 M asetat tampon çözeltisi (ACB) ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

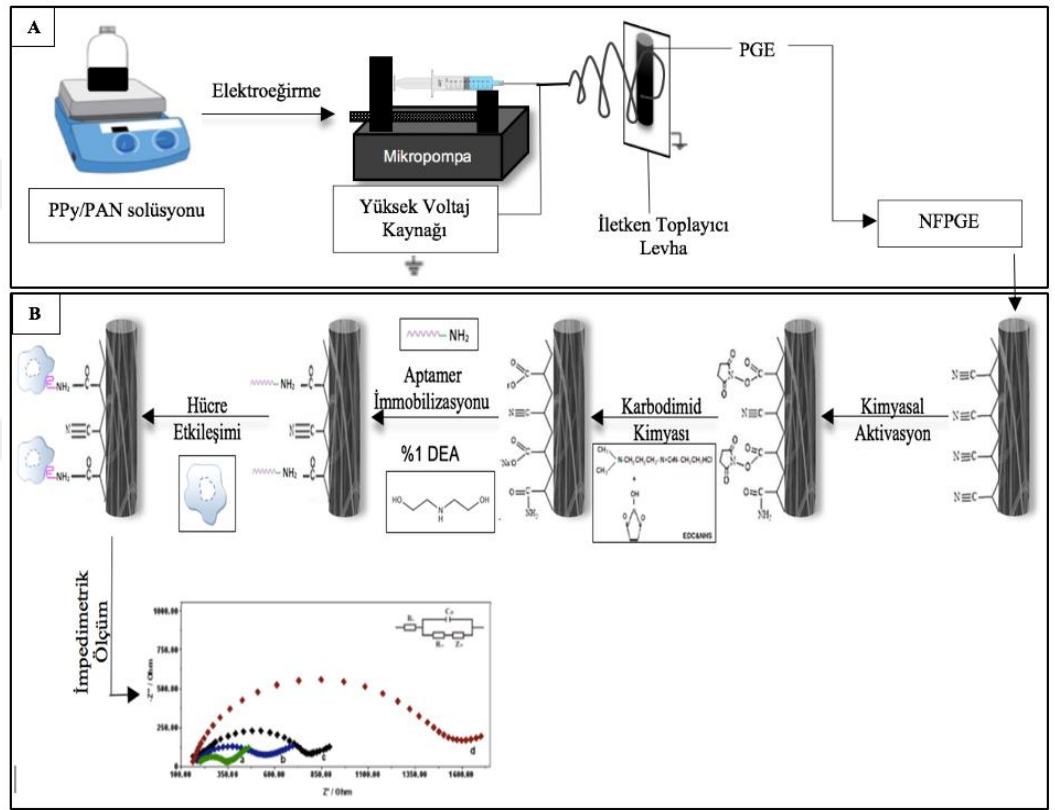
Çizelge 3.2 Deney aşamalarında kullanılan aptamer dizileri.

Dizi Adı	Baz Dizilimi
Hedef hücreye spesifik, aminoheksil işaretli aptamer	5’ -NH ₂ - (CH ₂) ₆ - GGT TGC ATG CCG TGG GGA GGG GGG TGG GTT TTA TAG CGT ACT CAG- 3’
Başka bir hedefe spesifik, tiyol işaretli kontrol aptameri	5’ -SH- (CH ₂) ₆ - GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA 3’

3.4 Kullanılan Kanser Hücre Hatları

Model hücre olan A549 (küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre hattı) ve kontrol hücresi olan HeLa (rahim ağzı kanseri hücre hattı) Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.5 Kullanılan Yöntemler



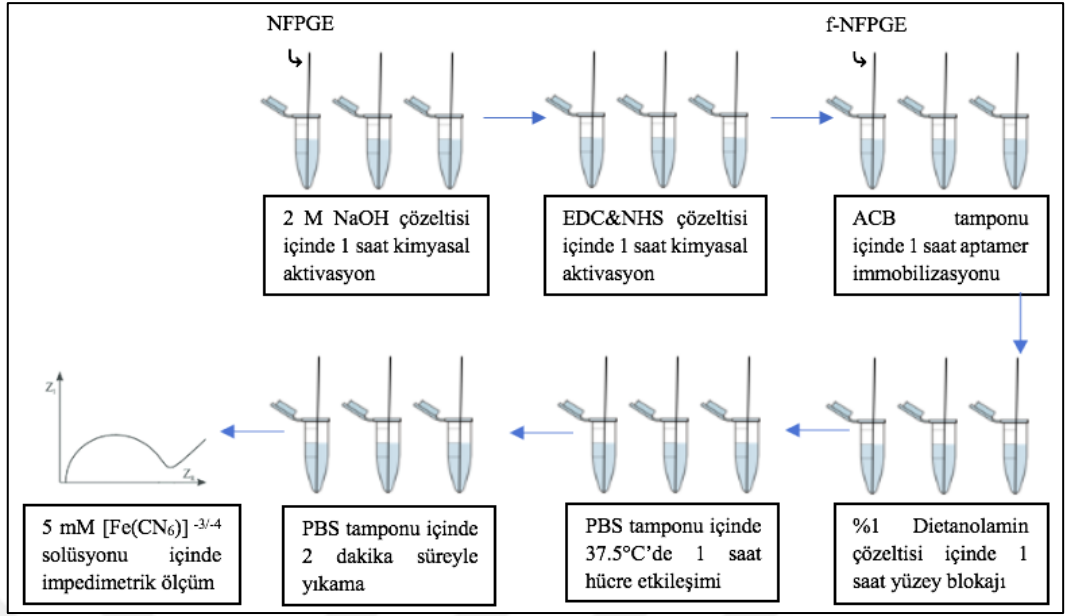
Şekil 3.2 Kanser hücresinin tayinine yönelik oluşturulan aptasensörün fabrikasyonunun; (a) elektrodeleme ve (b) elektrokimyasal bölümü.

Bu çalışmada KHDAK'nin hücre düzeyinde tanısına yönelik aptamer tabanlı bir biyosensör geliştirilmiş olup deney prosedürü temelde iki basamaktan oluşmuştur. Bu basamaklar Şekil 3.2' de detaylı şekilde gösterilmiştir. Özetle

çalışma; ilk basamakta polimerlerin solüsyon halinde hazırlanıp nanofiber şeklinde elektrot üzerinde oluşturulmasından ve ikinci basamakta elektrot yüzeyinde aptamer dizinin elektrot yüzeyine kovalent bağlanmasından ve hedef hücreyle etkileşimi sonucunun elektrokimyasal olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

3.5.1 Nanofiber modifiyeli tek kullanımlık grafit elektrotların hazırlanması

Bu çalışma kapsamında polipirrol (PPy, iletkenlik > 0.005 S/cm), yüksek elektrik iletkenliği nedeniyle; poliakrilonitril (PAN, molekül ağırlığı=150000) ise PPy' nin zayıf çözünürlük özelliğini geliştirmek için bir ko-polimer olarak kullanılmıştır. 0.369 g (8 wt%) PAN ve 0.041 g (Toplam polimer içeriğine göre, 10 wt%) PPy, 5 mL N,N-dimetilformamid (DMF) içerisinde 7 gün boyunca ve 60 °C sıcaklıkta manyetik olarak karıştırılmıştır (Ji et al., 2010). Oluşturulan PAN/PPy nanofiberleri elektroğirme yöntemi ile elektrot yüzeyinde oluşturulmuştur. Bu işlem için polimer solüsyonu, yüksek bir voltaja bağlanacak olan 5 mL'lik şırınga içerisine doldurulmuştur. 1 saat boyunca 15 kV voltaj uygulanmış ve solüsyonun akış hızı sabit 1.5 ml/saat tutulmuştur (İnce-Yardımcı, 2017). Şırınga ve toplayıcı arasındaki mesafe 30 cm olacak şekilde fiberler alüminyum folyo üzerindeki PGE üzerinde toplanmıştır. Böylece nanofiber modifiyeli tek kullanımlık grafit elektrotlar (NFPGE) oluşturulmuştur. NFPGE'ler elektroğirme yöntemiyle oluşturulduktan sonra deney basamakları Şekil 3.3'de özetlenmiştir ve daha sonraki bölümlerde detaylı olarak anlatılmıştır.



Şekil 3.3 Nanofiber modifiyeli elektrotların aktivasyon, biyomodifikasyon, hücre etkileşimi ve ölçüm basamaklarının şematize halde gösterimi

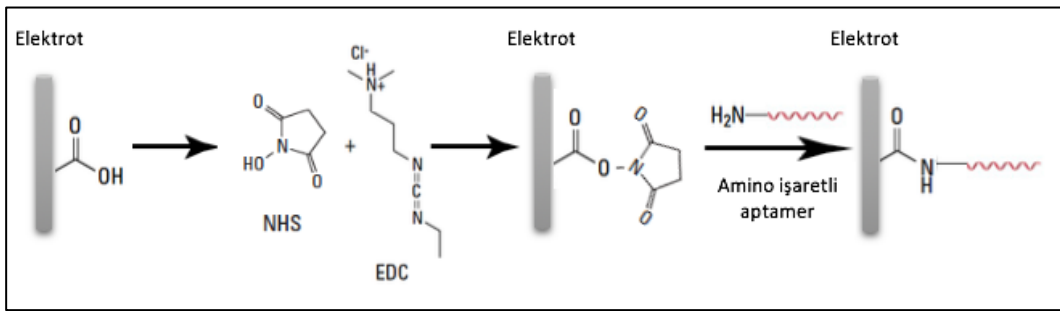
3.5.2 Elektrot yüzeylerinin kimyasal aktivasyonu

Elektrot üzerinde oluşturulan nanofiberlerin nitril (-CN) grupları karboksil (-COOH) gruplarına dönüştürülmüştür. Fonksiyonelleştirme işlemi için NFPGE, 1 saat süreyle 40 °C sıcaklıkta 2 M NaOH çözeltisi ile muamele edilmiştir. Bu işlem sonucunda elektrot yüzeyinde bazı amino (-NH₂) grupları ile fonksiyonel karboksil (-COOH) grupları oluşturulmuştur (Gupta et. al, 2016). Daha sonra, karboksil gruplarını aktive etmek için işlevselleştirilmiş NFPGE (f-NFPGE) vialer içerisinde 150 µL 5 mM NHS ve 8 mM EDC içeren kovalent bağlama ajanında 1 saat inkübe edilmiştir. EDC aracılı kovalent bağlama işleminin etkinliği NHS varlığında artmaktadır (Huey et al., 2005; Ligaj et al., 2006).

3.5.3 Aptamer ile biyomodifikasyon

Elektrot yüzeyindeki -COOH gruplarının EDC/NHS ile aktive edilmesinden sonra f-NFPGE, -NH₂ işaretli aptamerle kovalent yolla Şekil 3.4’de gösterildiği şekilde bağlanabilir hale gelmiştir. A549 hücrelerine spesifik olan aptamer dizisi 50 mM ACB içinde istenilen konsantrasyonda hazırlanıp 100 µL’lik alikuotlar halinde viallere dağıtılmıştır. NFPGE elektrotlar aptamer çözeltileri içerisinde 1 saat inkübe edilmiştir.

Aptamerlerin yüzeye immobilize edilmesinden sonra yüzeyde kalan özgül olmayan bağlanma bölgeleri %1’lik Dietanolamin (DEA) çözeltisi ile bloke edilmiştir. Bu işlemin amacı hedef hücrelerin sadece kendisine özgü aptamerle birleşmesini sağlamak, dolayısıyla özgül olmayan etkileşimleri engellemektir. Hazırlanan %1 DEA çözeltisi 100 µL’lik alikuotlar halinde viallere dağıtılmış ve içlerine daldırılan f-NFPGE/aptamer elektrotlar 1 saat boyunca inkübe edilmiştir (Kara et.al,2016).



Şekil 3.4 Karbodimid kimyası ile karboksil gruplarına amino gruplarının kovalent bağlanması.

3.5.4 Kanser hücreleri ile etkileşim

f-NFPG/ aptamer elektrotlar 0.05 M fosfat tampon çözeltisi (PBS) içinde 1×10^5 hücre/mL A549 hücresi içeren solüsyonun 100 μ L'lik alikuotlarında 37.5°C'de, 600 rpm karıştırma hızında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bağlanmayan hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için PBS ile 2 dk. yıkama yapılmıştır. Oluşturulan biyosensörün seçiciliğini test etmek için aynı koşullar eş zamanlı olarak HeLa hücreleri için de uygulanmıştır.

3.5.5 Elektrokimyasal ölçümler

Elektrokimyasal ölçüm cihazı olarak μ -Autolab Type III potansiyostat (Eco Chemie, Hollanda) kullanılmıştır. Voltametrik ölçümler GPES 4.9 yazılımı, impedimetrik ölçümler ise FRA 2 yazılımı yardımıyla okunabilir sinyallere dönüştürülmüştür.

Voltametrik ölçümler 0.5 M ACB içerisinde Diferansiyel Puls Voltametrisi tekniği ile 0.75- 1.4 V potansiyel aralığında alınmıştır. Bu teknik sadece oluşturulan nanofiberlerin DNA ile etkileşimini araştırmak için kullanılmıştır (Bkz. Bölüm 4.1).

İmpedimetrik ölçümler elektron aktarımına dayalı olarak 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içerisinde Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) tekniği ile 10 kHz'den 5 mHz'e azalan frekans aralığında, 0.24 V sabit potansiyel altında ve 10 mV alternatif akımda alınmıştır. Elde edilen Nyquist diyagramları Randles devre modeli kullanılarak analiz edilmiştir. Bütün sonuçlarda Ohm cinsinden elde edilen Rct (yük transfer direnci) verileri kullanılmıştır.

3.6 İncelenen Parametreler

Yapılan çalışmaların tümü, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tayini için en uygun koşullarının saptanmasına yöneliktir.

3.6.1 Nanofiber modifiye yüzeye dsDNA bağlanması

Elektrot üzerinde oluşturulan nanofiberlerin etkisini araştırmak için ilk denemeler dsDNA ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda PGE, NFPGE ve f-NFPGE yüzeyleri aynı anda kıyaslanmıştır. PGE elektrotlar +1.4 V sabit potansiyelde 60 saniye boyunca aktive edilmiştir. Bu işlem sonucunda yüzeydeki fonksiyonel gruplar karboksil gruplarına yükseltgenmiştir. NFPGE elektrotlar 2 M NaOH solüsyonu içerisinde 40 °C sıcaklıkta 1 saat boyunca aktive edilmiştir. Nanofiber yüzeyindeki -CN grupları -COOH gruplarına dönüştürülerek f-NFPGE olarak adlandırılan elektrotlar oluşturulmuştur. NFPGE yüzeyleri, f-NFPGE yüzeylerinin aktive edilmemiş hali olarak kontrol parametresi olarak kullanılmıştır. Daha sonra bütün elektrotlar 1 saat boyunca EDC&NHS ile muamele edilerek yüzeydeki karboksil grupları aktive edilmiştir. ACB içerisinde 10 µg/mL konsantrasyonunda dsDNA içeren çözelti hazırlanmış ve elektrotlar 1 saat boyunca bu solüsyonun içerisinde bekletilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler öncesinde elektrotlar ACB ile 3 saniye boyunca yıkanmıştır. Hem voltametrik hem de impedimetrik ölçümler alınmıştır.

3.6.2 Tasarlanan aptasensörün hassasiyetinin arttırılmasına yönelik en uygun koşulların saptanması

3.6.2.1 Aptamer konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi

En uygun aptamer konsantrasyonunun belirlenebilmesi için hedef hücre (A549) ve kontrol hücre (HeLa) konsantrasyonları 1×10^5 hücre/mL oranında sabit tutulmuş ve aptamer derişimleri 0, 1, 2, 5, 10, 20 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde artan konsantrasyonlar incelenmiş ve ölçülen R_{ct} değerlerinin incelenmesiyle en uygun aptamer konsantrasyonu saptanmıştır.

3.6.2.2 Hücre konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi

Hücre konsantrasyonunun etkisini belirlemek için bir önceki çalışmada optimum olarak belirlenen 10 $\mu\text{g/mL}$ aptamer konsantrasyonu sabit tutularak elektrotların artan hücre konsantrasyonları ile etkileşimi denenmiştir. Her iki hücre eş zamanlı olarak sırasıyla 0.05×10^5 , 0.1×10^5 , 0.2×10^5 , 0.5×10^5 , 1×10^5 , 2×10^5 ve 5×10^5 hücre/mL oranında incelenmiştir ve ölçülen R_{ct} değerlerinin incelenmesiyle en uygun hücre konsantrasyonu saptanmıştır.

3.6.2.3 Yıkama zamanının etkisinin incelenmesi

Yıkama işlemleri hücrelerin seyreltildiği tampon çözelti olan PBS ile yapılmıştır. Aptamer konsantrasyonu 10 $\mu\text{g/mL}$; hücre konsantrasyonları ise 1×10^5 hücre/mL konsantrasyonda sabit tutulmuş ve sırasıyla 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 ve 30 dakika yıkama işlemlerinden sonra ölçülen R_{ct} değerlerinin incelenmesiyle en uygun yıkama zamanı saptanmıştır.

3.6.3 Tasarlanan aptasensörün seçiciliğinin doğrulanmasına yönelik incelenen parametreler

Bu tez kapsamında tasarlanan aptasensörün seçiciliğini doğrulamak için HeLa hücresi ve boş hücre kültür ortamı (DMEM 1X) kontrol parametreleri olarak kullanılmıştır. Aptamer ile modifiye edilmiş f-NFPGE elektrotlar kontrol parametreleriyle 1 saat boyunca 37,5 °C sıcaklıkta ve 600 rpm hızda karıştırmalı ortamda inkübe edilmiştir. Aptamere bağlanmayan yapıların yıkama ile ortamdan uzaklaştırılmasının ardından ölçülen Rct değerleri kıyaslanmıştır.

3.6.3.1 Biyolojik tanıma elemanının değiştirilmesi ile yapılan çalışmalar

Bu çalışmada, A549 hücresine spesifik aptamerin seçiciliğini doğrulamak amacıyla baz dizilimi farklı başka bir aptamer dizisiyle, A549 hücresinin etkileşiminden sonra ölçülen Rct değerleri kıyaslanmıştır.

Ayrıca f-NFPGE elektrot yüzeyleri aptamer ile modifiye edilmeden, doğrudan hücre ile etkileştirilmiştir. Buradaki amaç, aptamer-hücre etkileşiminin spesifikliğini doğrulamaktır.

Kullanılan yöntem Bölüm 2.5’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Aptamer dizisi olarak, Çizelge 3.2’de gösterilen başka bir hedefe spesifik, -SH işaretli aptamer kullanılmıştır.

3.6.3.2 Deformasyona uğramış hücreler ile yapılan çalışmalar

Bu çalışmada RIPA lizis tamponu içerisinde lizise uğratılarak parçalanmış hücreler, ultraviyole (UV) altında kontrollü öldürülmüş hücreler ve oda sıcaklığında 1 hafta bekletilerek kontrolsüz olarak öldürülmüş hücrelerle çalışılmıştır. Bütün hücreler Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.6.4 Tasarlanan aptasensörün taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) incelenmesi

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) cihazı ile görüntüleme, numuneye gönderilen hızlandırılmış elektronların numunenin atomları ile etkileşmesi sonucunda saçılan elektronların çeşitli dedektörler yardımıyla analiz edilmesi esasına dayanır. Bu saçılmaların değerlendirilmesi ile malzeme içerisindeki yapıların mikro (10^{-6}m) ve nano (10^{-9}m) mertebesinde görüntüleme analizi yapılabilmektedir.

Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde Carl Zeiss 300VP SEM cihazı kullanılarak incelenmiştir.

Yalın PGE, nanofiber modifiyeli elektrot (NFPGE), optimum olarak belirlenen koşullar altında aptamer ile modifiye edilmiş NFPGE elektrot ve bu elektrodun hücre ile etkileşimi ayrı basamaklar halinde görüntülenmiştir.

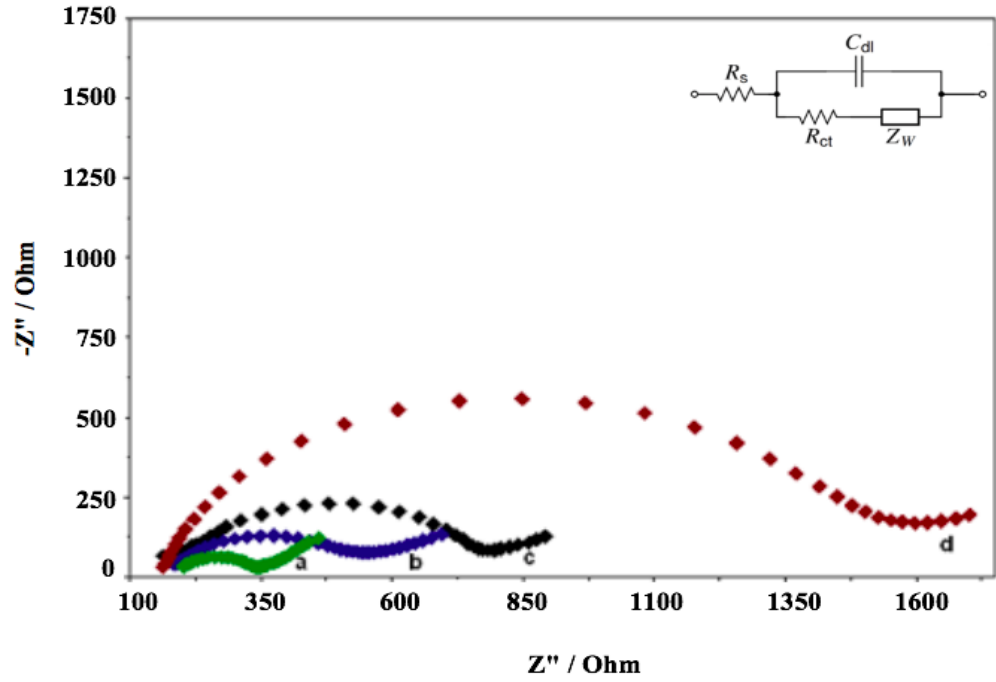
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez kapsamında Kara ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan çalışmadan farklı olarak, KHDAK tanısına yönelik nanofiber modifiyeli elektrotlar geliştirilmiş ve tayin sınırının düşürülmesi ve sensörün seçiciliğinin artırılması amaçlanmıştır.

4.1 KHDAK Hücrelerine Spesifik Aptasensör Geliştirilmesi

Bu çalışma kapsamında, SELEX yöntemiyle seçilmiş aptamer dizisi ile A549 hücre kültürü kullanılarak, kanser hücrelerinin hızlı ve özgül tayinine yönelik bir aptasensör geliştirilmiştir. Yapılan çalışmada, elektrot yüzeyine bağlanan aptamer dizisi ile A549 hücrelerinin etkileşiminin tanınması EIS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan Randles devresi elemanlarından R_{ct} değerleri yorumlanmıştır. R_{ct} , ölçüm solüsyonu içerisinde bulunan $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ redoks probunun elektron transferi aracılığıyla elektrot yüzeyiyle etkileşime girme yeteneğini açıklamaktadır. Elektrot yüzeyleri iletken haldeyken redoks probu ile elektrot yüzeyleri arasında elektron transferi hızlı olacağından küçük R_{ct} değerleri okunacaktır. Elektrot yüzeyi modifiye edildikçe ve yalıtkan hale geçtikçe elektron transferi zorlaşacağından R_{ct} değerleri artacaktır. Şekil 4.1’de, geliştirilen aptasensörün performansına dair elde edilen Nyquist diyagramı gösterilmiştir ve ölçülen R_{ct} değerleri yorumlanmıştır. İmpedans spektrumunda gözlenen yarımların çapları doğrudan R_{ct} değerlerini vermektedir; (a) Yalın elektrot olarak ölçülen f-NFPGE yüzeyinde hiçbir modifikasyon bulunmadığı için yüzey iletkendir ve bu yüzden R_{ct} değeri ($R_{ct} = 135.9 \Omega$) küçüktür. (b) Aptamerin f-NFPGE yüzeyine immobilizasyonu sonucunda, aptamer üzerindeki negatif yüklü fosfat grupları ile negatif yüklü redoks probu arasında meydana gelen itici elektrostatik kuvvet

sonucu ölçülen R_{ct} değerinde ($R_{ct}= 444.00 \, \Omega$) artış gözlenmiştir. (c) HeLa hücresi aptamere spesifik olmadığı için aptamere bağlanmayacaktır ve yıkama ile elektrot yüzeyinden uzaklaştırılacaktır. HeLa hücresi ile olan özgül olmayan etkileşim sonucunda elde edilen R_{ct} değeri ($R_{ct}= 501.0 \, \Omega$), yüzeyde sadece aptamer varken ölçülen R_{ct} değerine yakın sonuç vermektedir. (d) Aptamerin kendisine spesifik A549 hücresi ile etkileşimi sonucu elektrot yüzey kalınlığı artmış dolayısıyla da elektrot yüzeyi ile redoks probu arasında elektron transferi zorlaşmıştır. Bu yüzden aptamerin hedef hücresi ile etkileşimi sonucunda R_{ct} değerinde ($R_{ct}= 1332.0 \, \Omega$) artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar sonucunda sadece hedef hücreye özgül bir aptasensör geliştirildiği doğrulanmaktadır (Tabrizi et.al., 2015).



Şekil 4.1 EIS yöntemi ile aptasensörün performansının incelenmesi; (a) yalın f-NFPGE, (b) f-NFPGE/aptamer; (c) f-NFPGE/aptamer/HeLa ve (d) f-NFPGE/aptamer/A549 ile etkileşimden sonra ölçülen R_{ct} değerlerine ait elde edilen Nyquist diyagramı.

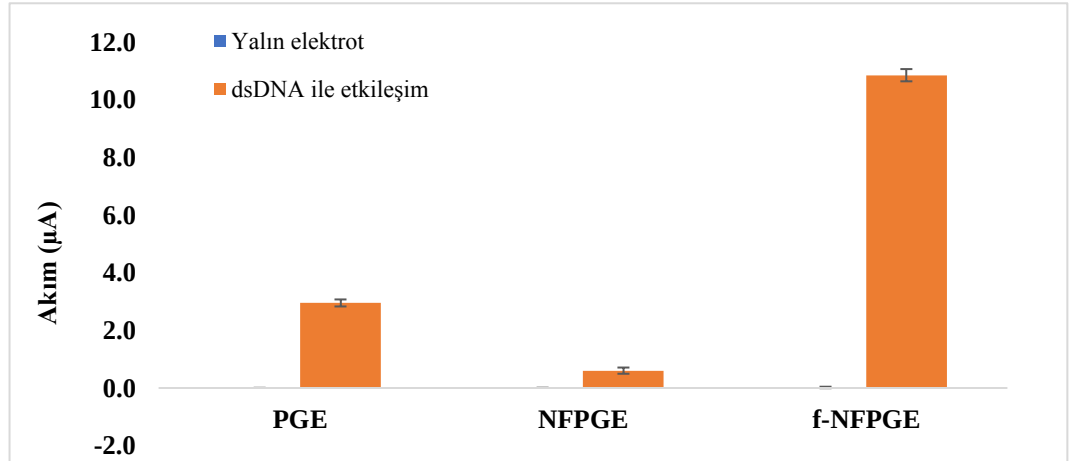
4.2 Nanofiber Modifiye Yüzeyde dsDNA Etkisi

Yöntem Bölüm 3.6.1’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Guanin bazına ait yükseltgenme sinyalinin incelenmesine dayalı voltametrik ölçümler ve elektron transferine dayalı impedimetrik ölçümler incelenmiştir.

4.2.1 Voltametrik ölçümler

Elektrot yüzeyine kolaylıkla adsorplanabilen dsDNA’ ya yönelik ölçümlerin esası guanin bazının elektroaktif olmasına ve +1.0 V potansiyelde yükseltgenme sinyali vermesi esasına dayanmaktadır. Dolayısıyla yüzeye adsorplanmış DNA ile ölçülen guanin sinyali arasında doğrudan bir ilişki vardır. (Kerman et.al, 2004). Voltametrik ölçümler ACB içerisinde Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV) ile alınmıştır.

Şekil 4.2’de görüldüğü üzere PGE yüzeylerinde oluşturulan ve aktifleştirilmiş -COOH gruplarına bir miktar dsDNA bağlanmıştır. Nanofiberler fonksiyonelleştirilmeden önce kullanıldıklarında (NFPGE) guanin sinyalinde çok az artış gözlenmiştir. NFPGE yüzeylerinde -COOH grupları bulunmadığı için DNA yüzeye kovalent bağlanamamış sadece bir miktar adsorplanmıştır. DNA varlığına dair okunan guanin sinyali en fazla f-NFPGE yüzeylerinde gözlenmiştir. PGE yüzeylerine çok az miktarda DNA bağlanırken, foksiyonelleştirilmiş yüzeye (f-NFPGE) yaklaşık 4 kat daha fazla DNA bağlanabilmektedir.

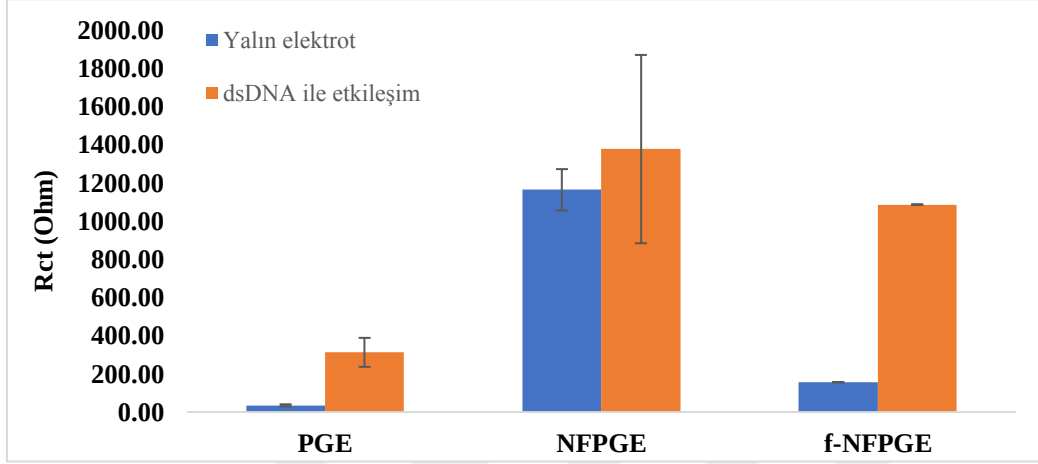


Şekil 4.2 PGE, NFPGE ve f-NFPGE yalın yüzeylerinden ve bu yüzeylere dsDNA bağlandıktan sonra DPV tekniğiyle ölçülen akım değerlerinin histogram grafiği

4.2.2 İmpedimetrik ölçümler

İmpedimetrik ölçümler EIS tekniği kullanılarak alınmıştır. Şekil 4.3’de görüldüğü üzere yalın PGE yüzeylerden elde edilen direnç çok küçüktür. PGE yüzeylere dsDNA’nın kovalent bağlanmasından sonra yüzey kalınlığı bir miktar artmış ve elde edilen R_{ct} değeri de bunu doğrulamaktadır. NFPGE yalın yüzeylerinden çok yüksek R_{ct} değerleri alınmasının sebebi bu yüzeylerin çok fazla fonksiyonel grup içermesi ve dolayısıyla yüzey üzerindeki direncin artmasından dolayı olabilir. Ayrıca NFPGE yüzeyler karboksil grupları içermediği için dsDNA bağlanamamıştır. NFPGE yüzeylerin fonksiyonelleştirilmesinden sonra elde edilen f-NFPGE yüzeyler karboksil gruplarınca zengindir. Karboksil grupları, karbon ve oksijen atomları arasında çift bağ içerdikleri için elektron transferini hızlandırıcı özelliğe sahiptirler ve f-NFPGE yalın yüzeylerindeki R_{ct} değerlerinin düşüşü bu şekilde açıklanmaktadır (Li and Li., 2011). Ayrıca yüzeyde oluşturulan $-COOH$ grupları varlığında, PGE elektrotlara kıyasla f-NFPGE yüzeylere yaklaşık 4 kat

daha fazla DNA bağlanabilmektedir. Nanofiber yüzeylerde DNA etkisinin araştırılması için yapılan çalışmalardan elde edilen bütün elektrokimyasal ölçüm sonuçları birbirini doğrulamaktadır.



Şekil 4.3 PGE, NFPGE ve f-NFPGE yalın yüzeylerinden ve bu yüzeylere dsDNA bağlandıktan sonra EIS tekniğiyle ölçülen Rct değerlerinin histogram grafiği

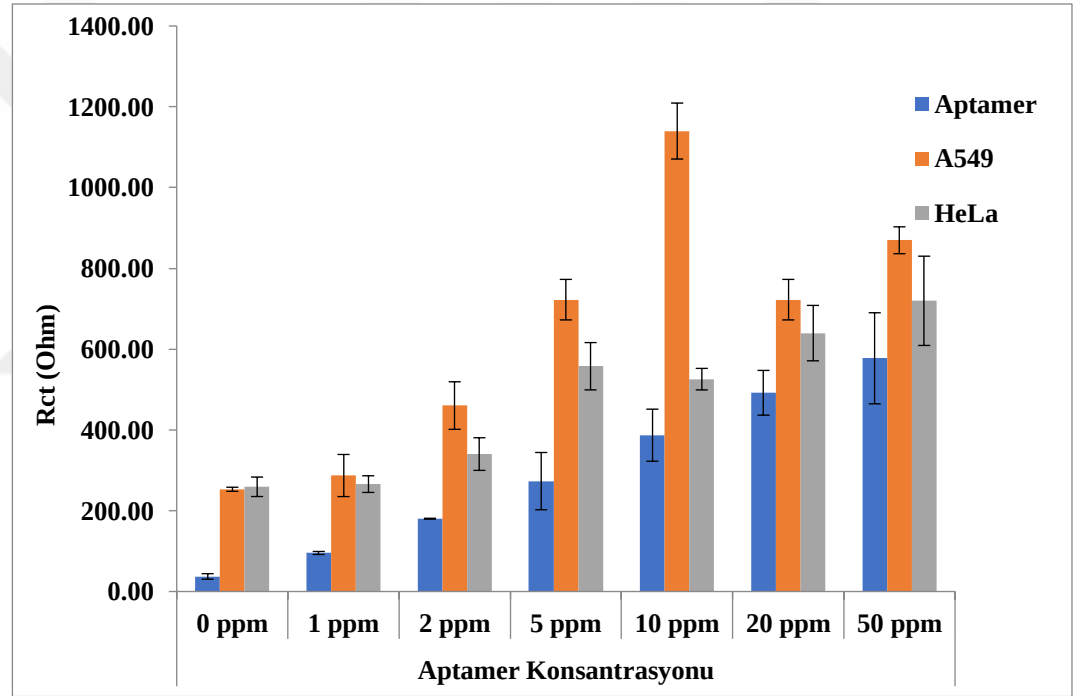
4.3 Tasarlanan Aptasensöre Yönelik En Uygun Koşulların

Saptanmasına Ait Sonuçların Değerlendirilmesi

4.3.1 Aptamer konsantrasyonunun etkisi

Yöntem Bölüm 3.6.2.1’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Şekil 4.4’de gösterilen histogram grafiğinde farklı konsantrasyonlarda aptamer ile modifiye edilmiş elektrotların yüzeyleri sabit konsantrasyondaki hücreler ile etkileştirilmiş, daha sonra ölçülen Rct verileri kıyaslanmıştır. 0 ve 1 $\mu\text{g/mL}$ aptamer konsantrasyonlarda A549 ve HeLa hücreleri arasında ayrım olmadığı

görülmektedir. 2 ve 5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda iki hücre arasında ayırım gözlenmeye başlanmıştır; ancak en iyi ayırım 10 $\mu\text{g/mL}$ aptamer konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bu konsantrasyonda A549 hücresi kendisine spesifik aptamere en yüksek seçicilikle bağlanırken HeLa hücresi aptamere bağlanamadığı için yıkamanın ardından ortamdaki uzaklaşmıştır. Bu yüzden optimum aptamer konsantrasyonu 10 $\mu\text{g/mL}$ seçilmiştir ve bütün deneylerde bu konsantrasyon kullanılmıştır.



Şekil 4.4 Optimum aptamer konsantrasyonunun saptanmasına yönelik elde edilen verilerin histogram grafiği

Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'deki verilerle de sayısal olarak açıklanmaktadır. ΔR_{ct} olarak verilen değerler aşağıdaki formülle açıklanabilir;

$$\Delta R_{ct} = R_{ct_{hücre}} - R_{ct_{aptamer}}$$

Çizelge 4.1 Aptamer konsantrasyonlarına karşılık ΔR_{ct} verilerinin kıyaslanması

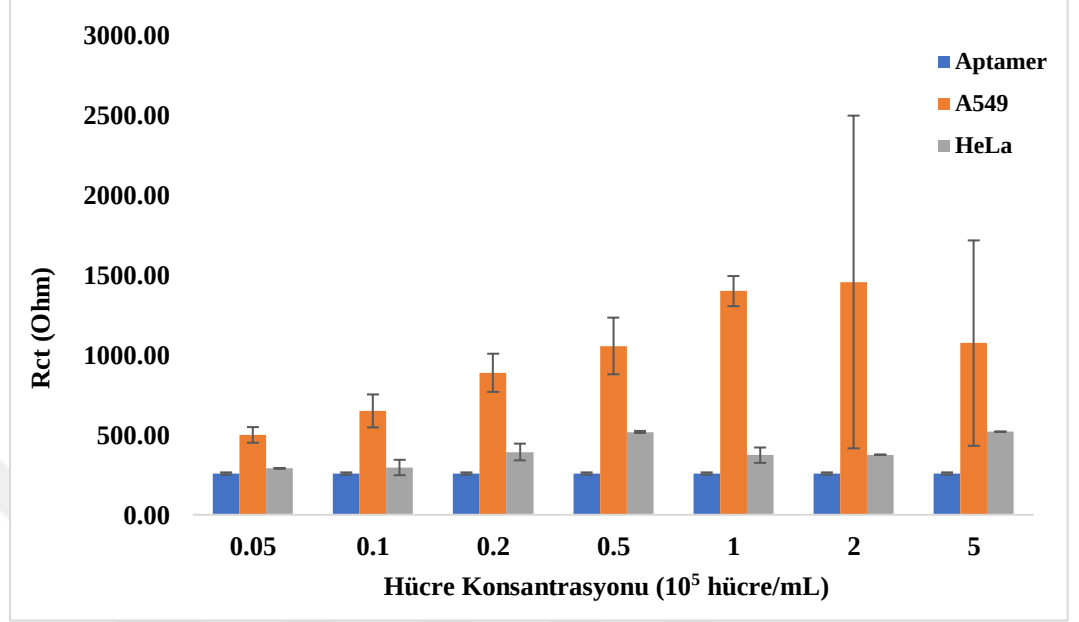
		Aptamer Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)						
		0	1	2	5	10	20	50
ΔR_{ct}	$R_{ct_{A549}} - R_{ct_{aptamer}}$	215,8	191,7	280,1	449,2	<u>753,0</u>	230,5	292,2
	$R_{ct_{HeLa}} - R_{ct_{aptamer}}$	222,0	170,4	160,0	284,4	<u>138,7</u>	147,7	142,3

Bu farklanma iki farklı hücre tipi için ayrı ayrı hesaplanmıştır. A549 hücreleri ve aptamer arasındaki bağlanma daha fazla olacağı için bu farkın yüksek olması; HeLa hücreleri ve aptamer arasında bağlanma olmayacağı için bu farkın düşük olması beklenmektedir. Altı çizili olarak verilen değerler de seçilen optimum konsantrasyonu ($10 \mu\text{g/mL}$) doğrulamaktadır.

4.3.2 Hücre konsantrasyonunun etkisi

Yöntem Bölüm 3.6.2.2’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda oluşturulan histogram grafiği Şekil 4.5’de verilmiştir. Bu veriler sayısal olarak da Çizelge 4.1’de doğrulanmıştır. A549 hücrelerinin konsantrasyonu arttıkça hücrenin aptamerle olan etkileşimi de 1×10^5 hücre/mL derişimine kadar artmıştır; ancak bu derişimden sonra yüzey doygunluğa ulaşmıştır. 2×10^5 ve 5×10^5 hücre/mL konsantrasyonlarında standart sapma oldukça artmış ve sonuçlar güvenilirliğini yitirmiştir. Eş zamanlı olarak yürütülen seçicilik çalışmaları sonuçlarına göre de HeLa hücrelerine ait ΔR_{ct} verileri 1×10^5 hücre/mL derişiminde

azalmaya başlamıştır. Bu sonuçlara göre optimum hücre konsantrasyonu 1×10^5 hücre/mL seçilmiştir.



Şekil 4.5 Optimum hücre konsantrasyonunun saptanmasına yönelik elde edilen verilerin histogram grafiği

Çizelge 4.2 Hücre konsantrasyonlarına karşılık ΔR_{ct} verilerinin kıyaslanması

		Hücre Konsantrasyonu (10 ⁵ hücre/mL)						
		0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5
ΔR_{ct}	$R_{ct_{A549}} - R_{ct_{aptamer}}$	241,4	391,8	630,3	798,3	<u>1141,8</u>	1198,8	816,3
	$R_{ct_{HeLa}} - R_{ct_{aptamer}}$	32,1	37,7	134,8	260,3	<u>114,8</u>	117,8	261,8

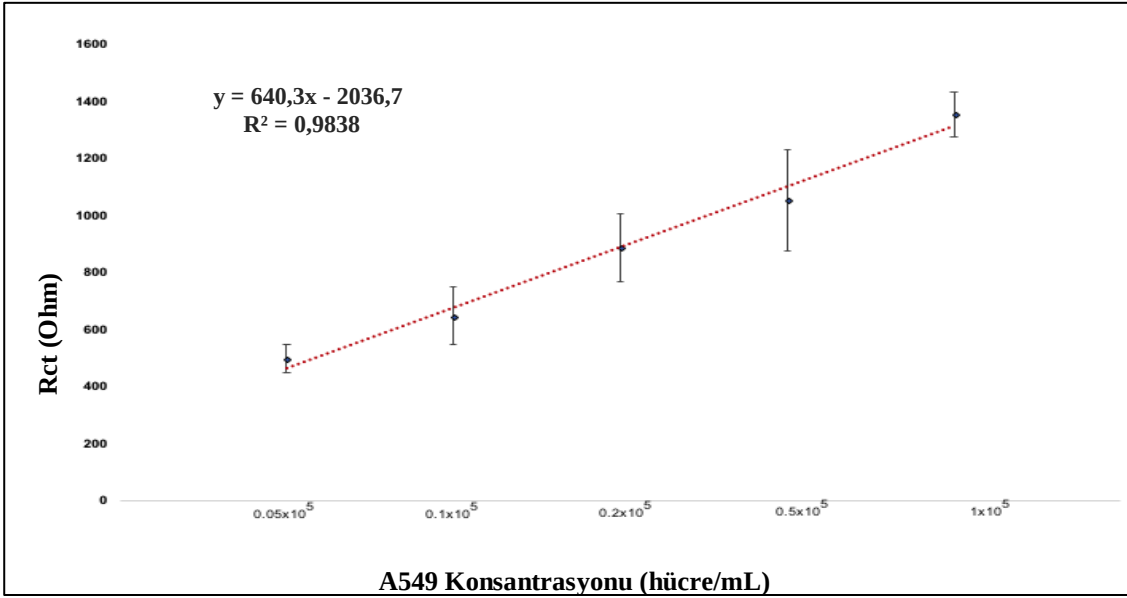
4.3.3 Tayin sınırının (LOD) belirlenmesi

Optimum hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra A549 hücresinin tayin edilebileceği en düşük konsantrasyonu hesaplamak için Şekil 4.6’da gösterilen grafikte 0.05×10^5 ile optimum olarak seçilen 1×10^5 hücre/mL konsantrasyon aralığında okunan Rct değerleri gösterilmiştir. LOD aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{LOD} = 3s/m$$

Bu formülde s, standart sapmayı; m, kalibrasyon eğrisinin eğimini; 3 ise bir sabit olan Sinyal/Gürültü (S/N) oranını göstermektedir.

Elde edilen veriler doğrultusunda tayin sınırı 3.41 hücre /mL olarak saptanmıştır.

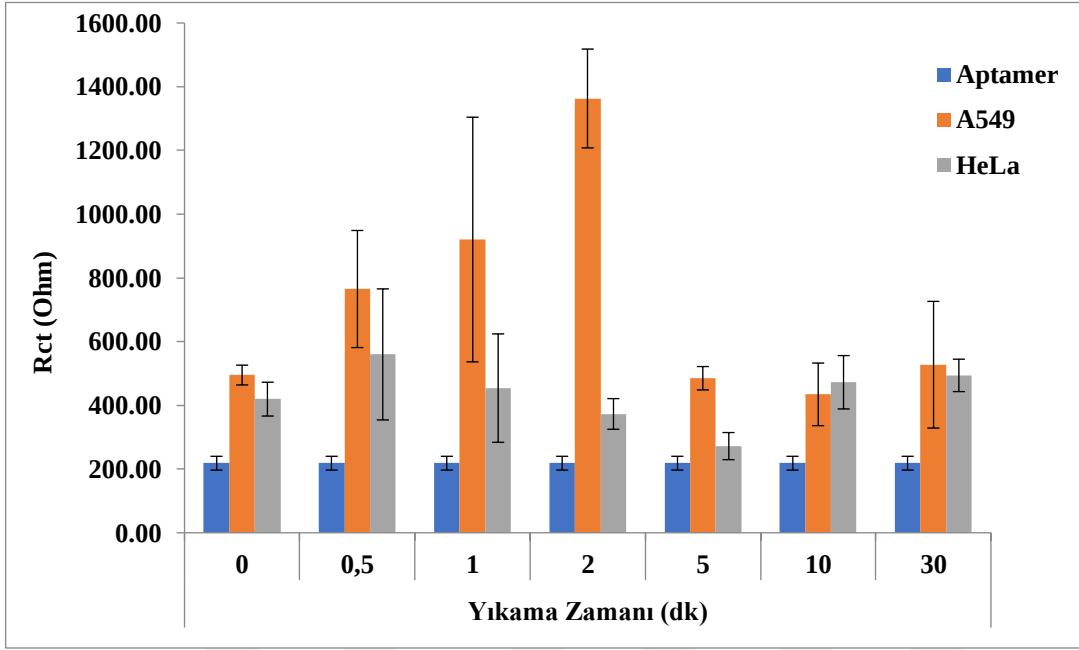


Şekil 4.6 Tayin sınırının hesaplanması doğrultusunda oluşturulan kalibrasyon eğrisi

4.3.4 Yıkama zamanının etkisi

Elektrotların en son aşamada yıkanması işlemi aptamere bağlanmayan ya da nonspesifik olarak adsorplanmış yapıların ortamdan uzaklaştırılarak gerçek sonuçların okunabilmesi işlemi için önemli bir basamaktır (Han et al., 2016).

Yöntem Bölüm 3.6.2.3’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Şekil 4.7 ve Çizelge 4.3’de verilen sonuçlara göre yıkama işlemi yapılmadığı zaman (0 dk) hedef hücre ve kontrol hücre arasında çok az farklanma görülmektedir. Hedef hücrenin aptamere bağlanma kinetiği 2 dakikalık yıkamaya kadar artmış daha sonra azalarak sabit kalmıştır. 5 dakikalık yıkama süresinde kontrol hücrenin yıkama ile ortamdan uzaklaşması en fazla seviyededir; fakat hedef hücre de kısmen ortamdan uzaklaşmıştır. 10 ve 30 dakikalık yıkamalarda ise sistemin seçiciliğini kaybetmiştir. Bu durum yıkama tamponunun iyonik içeriğinden dolayı elektrot yüzeyinde meydana gelebilecek bozulmalardan kaynaklanmış olabilir (Kara, 2007). Bu sonuçlar doğrultusunda hem hedef hücreyle aptamerin sıkı bağlanmasından dolayı elektrot yüzeyindeki direncin (R_{ct}) en fazla olduğu, hem de kontrol hücrenin elektrot yüzeyinden yıkama ile uzaklaştırılmasından dolayı en uygun koşulların sağlandığı 2 dakikalık yıkama zamanı optimum olarak seçilmiştir.



Şekil 4.7 Optimum yıkama zamanının saptanmasına yönelik elde edilen verilerin histogram grafiği

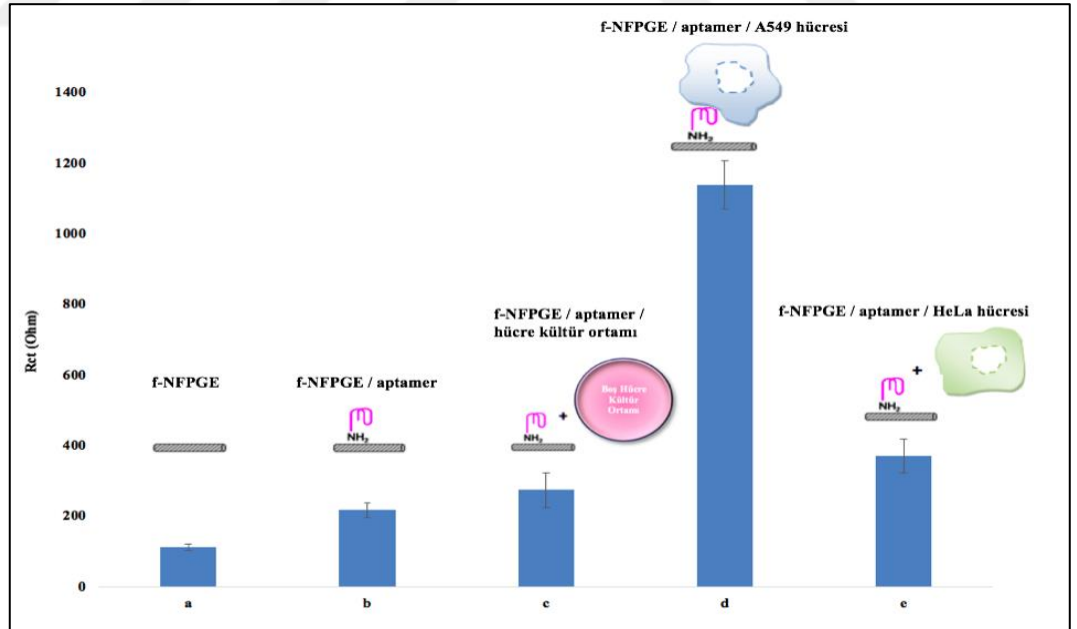
Çizelge 4.3 Yıkama zamanlarına karşılık ΔR_{ct} verilerinin kıyaslanması

		Yıkama Zamanı (dk)						
		0	0.5	1	2	5	10	30
ΔR_{ct}	$R_{ct_{A549}} - R_{ct_{aptamer}}$	276,5	545,5	701,8	<u>1144,5</u>	266,5	216,0	309,0
	$R_{ct_{HeLa}} - R_{ct_{aptamer}}$	201,0	341,1	235,5	<u>154,5</u>	53,5	252,8	275,5

4.4 Tasarlanan Aptasensörün Seçiciliğinin Doğrulanması

4.4.1 Aptasensörün seçiciliğinin HeLa hücreleri ile kontrol edilmesi

Bu çalışma kapsamında tasarlanan aptasensörün sadece küçük hücre dışı akciğer kanseri hücrelerine seçimli olduğunu doğrulamak için kontrol hücresi olarak rahim ağzı kanseri hücreleri (HeLa) kullanılmıştır. Hücrelerin *in vitro* olarak çoğaltıldığı boş hücre kültür ortamı da bir kontrol parametresi olarak kullanılmıştır. Aptamer modifiyeli f-NFPGE'lerin hücre içermeyen boş kültür ortamıyla ve HeLa hücreleriyle etkileşiminin sonucunda alınan Rct değerleri, referans değer olan aptamer modifiyeli f-NFPGE yüzeylerinden alınan Rct değerine yakın çıkmıştır. Çalışmalarda kullanılan aptamer sadece A549 hücresine özgüdür ve dolayısıyla en yüksek Rct değeri bu etkileşim sonucunda alınmıştır.

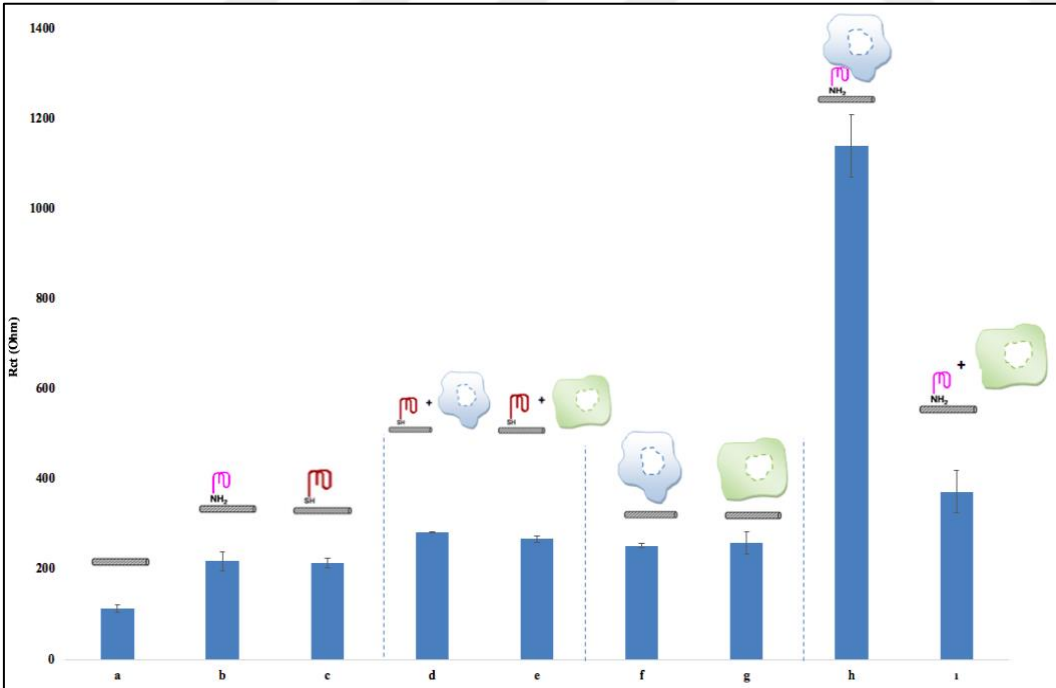


Şekil 4.8 Aptasensörün seçiciliğinin HeLa hücreleriyle kontrol edilmesini gösteren histogram grafiği

4.4.2 Biyolojik tanıma elemanının seçiciliğe olan etkilerinin incelenmesi

Bu çalışmada kullanılan aptamerin sadece hedefine özgül olduğunu doğrulamak için başka bir hedefe özgül aptamerle ve aptamer içermeyen yüzeylerle hücrelerin etkileşimi yorumlanmıştır.

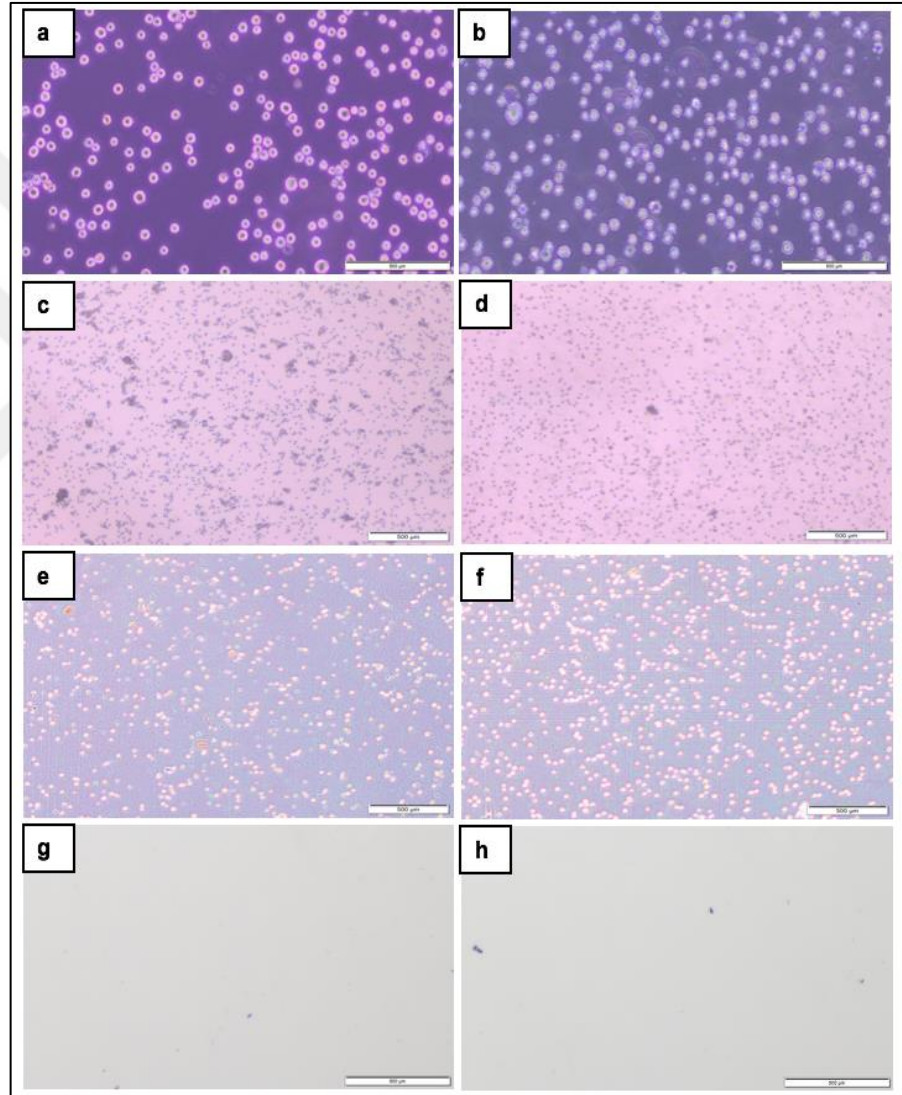
Şekil 4.9’da başka bir aptamerin kullanılmasıyla modifiye edilen sensör yüzeylerinin ve aptamersiz yalın yüzeylerin hücrelerle etkileşiminin sonucunda ölçülen R_{ct} değerleri gösterilmiştir. Başka hedefe spesifik aptamerle modifiye edilmiş f-NFPGE yüzeyler ve aptamer ile modifiye edilmemiş yalın f-NFPGE yüzeyler, hücreler ile etkileşime bırakıldıklarında hücreler yüzeylere bağlanamamışlardır ve yıkama işleminin ardından ortamdan uzaklaşmışlardır. Bunun sebebi kullanılan aptamerin sadece A549 hücresine özgül olmasıdır.



Şekil 4.9 Biyosensör tasarımında biyoreseptör kısmın değiştirilerek seçiciliğin kontrol edilmesine yönelik elde edilen R_{ct} değerlerine ait histogram grafiği

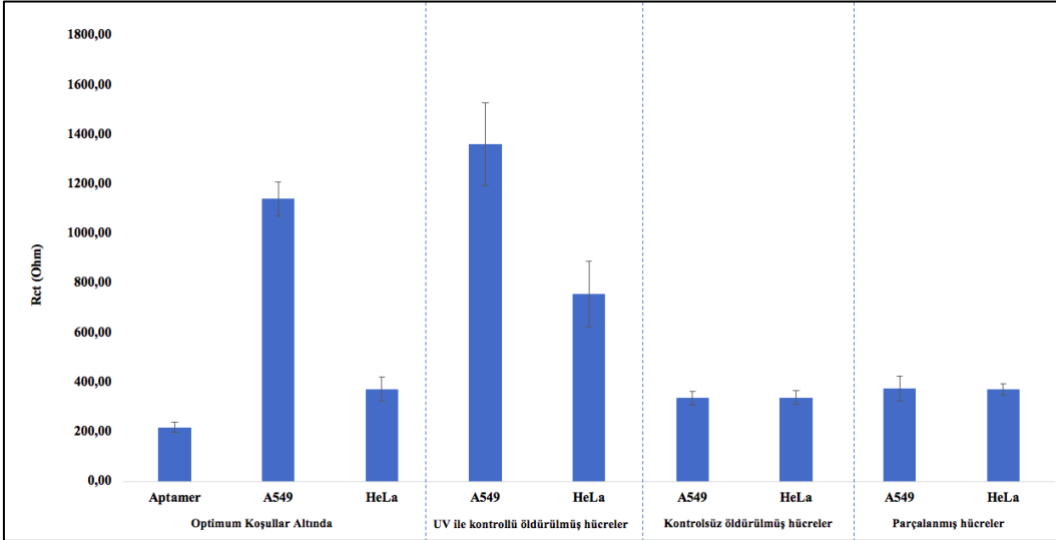
4.4.3 Hedef hücrenin seçiciliğe olan etkisinin incelenmesi

Bu çalışma kapsamında hem hedef hücre olan A549 hem de kontrol hücresi olan HeLa hücrelerinin parçalanmış, UV ile kontrollü öldürülmüş ve kontrolsüz öldürülmüş tipleri birer parametre olarak incelenmiştir. Şekil 4.10'da her bir parametrenin mikroskop görüntüleri gösterilmiştir.



Şekil 4.10 A549 ve HeLa hücrelerinin mikroskop görüntüleri; kontrol (a)A549, (b) HeLa hücreleri; UV ile kontrollü öldürülmüş (c) A549, (d) HeLa hücreleri; oda sıcaklığında kontrolsüz öldürülmüş (e) A549, (f) HeLa ; parçalanmış (g) A549, (h) HeLa hücreleri.

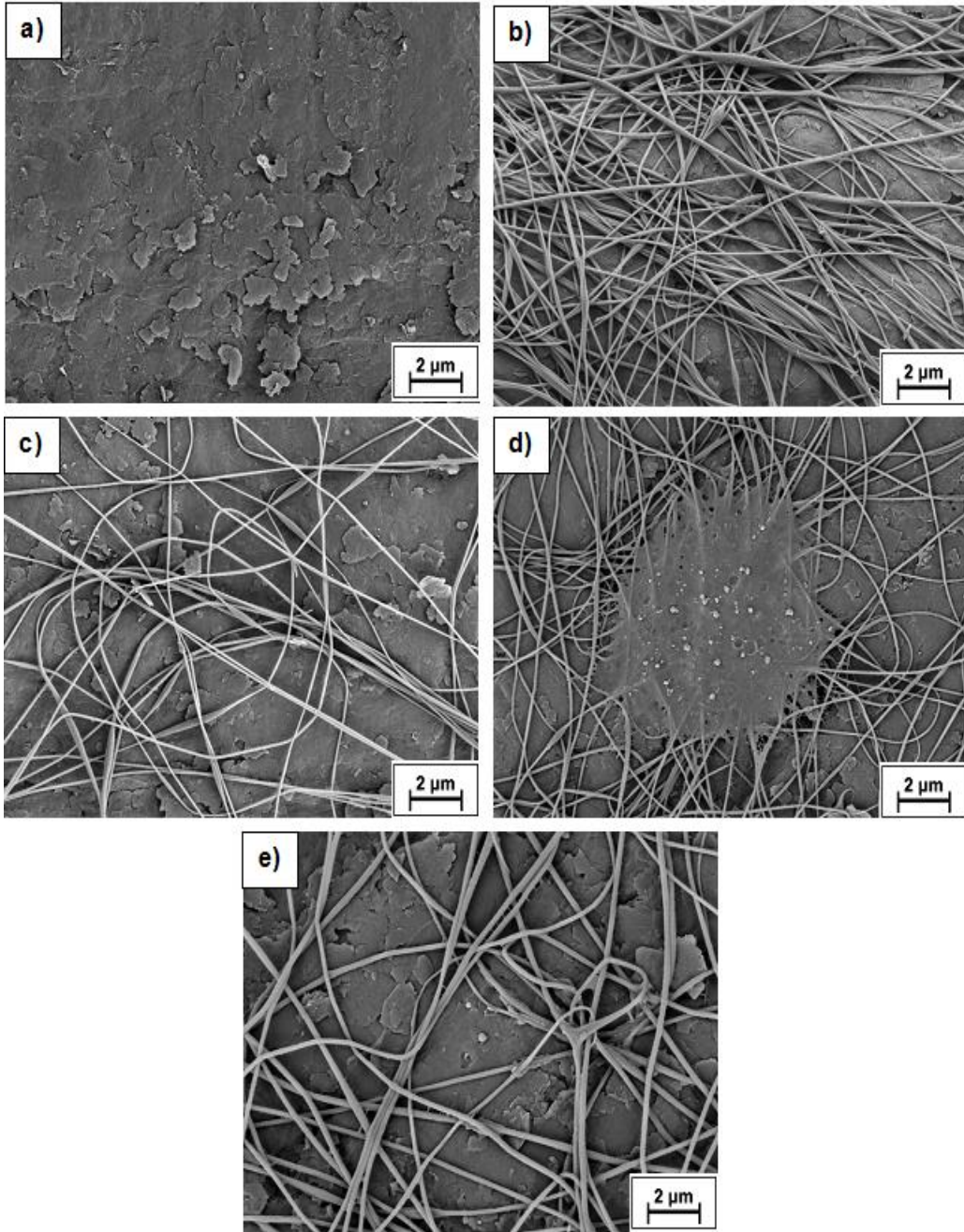
Her bir hücrenin aptamer ile etkileşiminden sonra ölçülen Rct değerleri Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Sağlıklı hücreler (a,b) yuvarlak morfolojileri ve parlak görüntüleriyle ayırt edilmektedir. Hücreler UV ışını altında öldürüldüklerinde (c,d) yuvarlak morfolojilerini yitirip kümeleşme eğiliminde bulunmuşlardır. Bu hareketlerinden dolayı ölçülen Rct değerleri artmış, eş zamanlı olarak seçimlilik azalmıştır. Mikroskop görüntülerinden de görüldüğü üzere oda sıcaklığında öldürülmüş hücre ortamı (e,f) kontaminasyona uğrayarak farklı organizmaların üremesine yol açmıştır. Elde edilen Rct değerlerinden görüldüğü üzere, hücre etkileşiminden sonra yapılan yıkama işlemi sonucu bağlanmayan ölü hücreler ve organizmalar elimine edilmiştir. Parçalanmış hücreler (g,h) hücre içeriklerini kaybettikleri için mikroskop altında gözlenememiştir. Ayrıca bu hücreler hücre membranlarını kaybettikleri için aptamer tarafından tanınamamışlardır.



Şekil 4.11 Deformasyona uğratılmış hücreler ile seçiciliğin kontrol edilmesine ait elde edilen histogram grafiği

4.5 Oluşturulan Aptasensörün Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyonu

Elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Nanofiberlerin elektrot yüzeyindeki oluşumu doğrulanmıştır ve ortalama 160 nm çapında nanofiberler elde edilmiştir. Aptamerler 6-30 kDa boyutlarında ve çapları 5 nm’den küçük moleküller olduğu için SEM görüntülemesinde izlenememiştir (Zhou and Rossi, 2017). A549 hücresinin çapı yaklaşık 14 µm olduğu için aptamer ile olan etkileşimi mikroskop altında görüntülenebilmiştir (Jiang et al., 2010). HeLa hücresinin incelendiği SEM görüntülemesinde, çoğunlukla tuz kristalleri gibi tampon çözelti içeriğine rastlanmıştır. Bu bulgular tasarlanan aptasensörün seçimliliğini ve doğruluğunu kanıtlar niteliktedir.



Şekil 4.12 Tasarlanan aptasensörün SEM ile karakterizasyonu; (a)PGE, (b)f-NFPGE, (c) aptamer/f-NFPGE, (d)A549/aptamer/f-NFPGE, (e)HeLa/aptamer/f-NFPGE.

5. GENEL SONUÇLAR

Bu çalışmada, yapay nükleik asitler olan aptamerlerin benzersiz özelliklerinden yararlanılarak KHDAK hücresinin tayinine yönelik bir elektrokimyasal aptasensör geliştirilmiştir. Kanserin erken evrelerinde premalign evredeki hücrelerin teşhisine uygun şekilde bütün analizler hücre düzeyinde gerçekleştirilmiş ve bütün aşamalarda yüzey karakterizasyonu EIS yöntemi ile sağlanmıştır. EIS sonucunda elde edilen Nyquist eğrideki R_{ct} değerleri yorumlanmıştır. Bu kapsamda model hücre olarak A549 hücreleri kullanılmıştır. Tasarlanan sensörün sadece hedef hücreye özgül olduğunu doğrulamak için kontrol hücresi olarak HeLa hücreleri seçilmiştir.

Çalışma kapsamında aptasensörün en uygun çalışma koşullarının belirlenebilmesi için aptamer ve hücre konsantrasyonu çalışmaları yapılmış ve sonrasında bağlanmayan hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması ile en doğru sonuçların kaydedildiği en uygun yıkama zamanı parametresi çalışılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda optimum aptamer konsantrasyonu 10 $\mu\text{g/mL}$; optimum hücre konsantrasyonu 1×10^5 hücre/mL; en uygun yıkama zamanı 2 dakika olarak belirlenmiştir.

Aptasensör tasarımında kullanılan aptamerin sadece A549 hücresine özgül olduğu SEM ile elde edilen mikroskop görüntüleriyle ve yürütülen seçicilik çalışmalarından EIS yöntemi ile elde edilen veriler ile doğrulanmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında geliştirilen elektrokimyasal aptasensörün A549 hücre hattı ile etkileşimi sonucunda R_{ct} değerinde oldukça anlamlı bir artış gözlenmişken,

HeLA hücreleri ile etkileşiminde çok düşük miktarda artış tespit edilmiştir. Elde edilen veriler tasarlanan aptasensörün küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücrelerine seçici olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma, KHDAK'nin tanı ve teşhisi için klinikte kullanılmak üzere yeterli duyarlılığa sahip, düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir elektrokimyasal aptasensör temelli cihazların geliştirilmesinin mümkün olduğunu göstermiştir. Yapılacak sonraki çalışmalar ile rutin kullanıma uygun performansı gösterebilen, az maliyetli elektrokimyasal temelli aptasensör cihazlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelgawad, A. M., Hudson, S. M., and Rojas, O. J**, 2014, Antimicrobial wound dressing nanofiber mats from multicomponent (chitosan/silver-NPs/polyvinyl alcohol) systems, *Carbohydrate Polymers*, 100, 166-178pp.
- Akay, T**, 2012, Sitoloji, Ankara, Palme Yayıncılık.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P**, 2002, Molecular Biology of the Cell, 4th edition, New York, Garland Publishing, Inc.
- Baird, G. S.**, 2010, Where Are All the Aptamers?, *American Journal of Clinical Pathology*, 529–531pp.
- Bang, G., Cho, S., and Kim, B.**, 2005, A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors, *Biosens. & Bioelectron.*, 21(6), 263-270pp.
- Bard, A. J., and Faulkner, L. R**, 2000, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (2. edition), Wiley, Canada
- Basen-Engquist, K., and Chang, M.**, 2011, Obesity and Cancer Risk: Recent Review and Evidence, *Current Oncology Reports*, 71–76pp.
- Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H., and Toole, J. J.**, 1992, Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature*, 564–566pp.
- Bohunicky, B., and Mousa, S. A.**, 2011, Biosensors: the new wave in cancer diagnosis, *Nanotechnol Sci Appl.*, 4(1-10).
- Campbell, N., and Reece, J.**, 2010, Biyoloji, Ankara, Palme Yayınevi.
- Canbaz, M. Ç.**, 2013, Bir Meme Kanseri Biyomarkeri Olan HER3 Analizi için Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, NKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Chambers, J. P., Arulanandam, B. P., Matta, L. L., Weis, A., and Valdes, J. J.,** 2008, Biosensor Recognition Elements, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 10, 1-12pp.
- Chang, Y. M., Donovan, M. J., and Tan, W.,** 2013, Using Aptamers for Cancer Biomarker Discovery, *Journal of Nucleic Acids*.
- Chaplin, M., & Bucke, C.,** 1990, Biosensors: *Enzyme Technologies*, Cambridge University Press, 197-220pp
- Chen, H. W., Medley , C. D., Sefah, K., Shangguan, D., Tang , Z., Meng, L. and Weihog, T.,** 2008, Molecular Recognition of Small-Cell Lung Cancer Cells Using Aptamers, *ChemMedChem*, 3(6), 991-1001pp.
- Chen, H., Hu, Q.-Y., Zheng, Y., Jiang, J.-H., Shen, G.-L. and Yu, R.-Q.,** 2010, Construction of supported lipid membrane modified piezoelectric biosensor for sensitive assay of cholera toxin based on surface-agglutination of ganglioside-bearing liposomes, *Anal. Chim. Acta.*, 657(2), 204-209pp.
- Clark, L. C. and Lyons, C.,** 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Automated and Semi-Automated Systems in Clinical Chemistry*, 102(1), 29-45pp.
- Collings, A. and Caruso, F.,** 1997, Biosensors: recent advances, *Reports on Progress in Physics*, 60(11), 1397-1445pp.
- Deng, C., Chen, J., Nie, Z., Wang, M., Chu, X., Chen, X., Xiao, X., Lei, C. and Yao, S.,** 2009, Impedimetric Aptasensor with Femtomolar Sensitivity Based on the Enlargement of Surface-Charged Gold Nanoparticles, *Anal. Chem.*, 81(2), 739–745pp.
- Dünya Sağlık Örgütü,** "Kanser", <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (2018) (Erişim tarihi: 16 Ekim 2018)

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Eksi, H.**, 2011, Nanoparçacık Etiketli Biyosensör Geliştirilmesi, Doktora Tezi, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ellington, A. D. and Szostak, J. W.**, 1990, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, 46, 818–822pp.
- Ensafi, A. A., Rezaei, B., Amini, M. and Heydari-Bafrooei, E.**, 2012, A novel sensitive DNA–biosensor for detection of a carcinogen, Sudan II, using electrochemically treated pencil graphite electrode by voltammetric methods, *Talanta*, 88, 244-251pp.
- Erdem, A., Ozkan Ariksoysal, D., Karadeniz, H., Kara, P., Sengonul, A., Sayiner, A. A. and Ozsoz, M.**, 2005, Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology, *Elec. Com.*, 7(8), 815-820pp.
- Ertaş, F. N. ve Nişli, G.**, 2013, Elektrokimyanın Temel İlkeleri ve Nanoteknolojideki Rolü, *Internationally Participated Electrochemistry Workshop*, Muğla, 4-6s.
- González, V. M., Martín, M. E., Fernández, G. and García-Sacristán, A.**, 2016, Use of Aptamers as Diagnostics Tools and Antiviral Agents for Human Viruses, *Pharmaceuticals (Basel)*, 9(4), 78p.
- Gouvea, C.**, 2011, Biosensors for health applications., *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*, InTech, 978-953-307-443-6pp.
- Gupta, P. K., Gupta, A., Dhakate, S., Khan, Z. H. and Solanki, P. R.**, 2016, Functionalized polyacrylonitrile-nanofiber based immunosensor for *Vibrio cholerae* detection, *J. Appl. Polym. Sci.*, 133(44).
- György, I. and Fritz, S.**, 2013, Handbook of Reference Electrodes, Springer.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Hall, E.**, 1990, Biosensors, Chapter 1: Biosensors in context, Open University Press, United Kingdom
- Han, L., Liu, P., Petrenko, V. A. and Liu, A.**, 2016, A label-free electrochemical impedance cytosensor based on specific peptide-fused phage selected from landscape phage library, *Scientific Reports*, 22199.
- Henze, G. and Thomas, F. G.**, 2001, Introduction to Voltammetric Analysis, Cisco Publications.
- Hermann, T. and Patel, D. J.**, 2000, Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers, *Science*, 287(5454), 820-825pp.
- Hermann, T. and Westhof, E.**, 1999, Non-Watson-Crick base pairs in RNA-protein recognition, *Chem. & Bio.*, 6(12), 335-343pp.
- Hudson, D.**, 1998, Teaching And Learning Science: Towards a Personalized Approach, McGraw Hill Education UK.
- Huey, F., Gong, H., Dong, X., Zeng, X., Tan, A., Yang, X. and Swee, N.**, 2005, Electrochemical biosensing of DNA with capture probe covalently immobilized onto glassy carbon surface, *Anal. Chim. Acta.*, 551(1-2), 23-29pp.
- İnce-Yardımcı, A.**, 2017, Development of carbon nanotube embedded polyacrilonitrile/polypyrrole electrospun nanofibrous scaffolds, PhD Thesis, İYTE Graduate School of Applied Sciences and Engineering, İzmir.
- Ioannou, A. K., Pantazaki, A. A., Girousi, S. T., Millot, M.-C., Vidal-Madjar, C. and Voulgaropoulos, A. N.**, 2006, DNA Biosensor Based on Carbon Paste Electrodes Modified by Polymer Multilayer, *Electroanalysis*, 18(5), 456-464pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- James, W.**, 2001, Nucleic acid and polypeptide aptamers: a powerful approach to ligand discovery, *Current Opinion in Pharmacology*, 1(5), 540-546pp.
- Jayasena, S. D.**, 1999, Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics, *Clinical Chemistry*, 45(9).
- Ji, L., Yao, Y., Toprakci, O., Lin, Z., Liang, Y., Shi, Q. and Zhang, X.**, 2010, Fabrication of carbon nanofiber-driven electrodes from electrospun polyacrylonitrile/polypyrrole bicomponents for high-performance rechargeable lithium-ion batteries, *Journal of Power Sources*, 195(7), 2050-2056pp.
- Ji, S.R., Liu, C., Zhang, B., Yang, F., Xu, J., Long, J. and Yu, X.J.**, 2010, Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1806(1), 29-35pp.
- Jiang, R.D., Shen, H. and Piao, Y.J.**, 2010, The morphometrical analysis on the ultrastructure of A549 cells, *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 51(4), 663–667pp.
- Jiménez, E., Sefah, K., López-Colón, D., Van Simaeys, D., Chen, H. W., Tockman, M. S. and Tan, W.**, 2012, Generation of lung adenocarcinoma DNA aptamers for cancer studies, *Plos One*, 7(10).
- Kara, P.**, 2007, Klinik Tanıya Yönelik DNA Hibridizasyonuna Dayalı Elektrokimyasal Genosensör Tasarımı, Doktora Tezi, EÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kara, P., Erzurumlu, Y., Ballar Kirmizibayrak, P. and Ozsoz, M.**, 2016, Electrochemical aptasensor design for label free cytosensing of human non-small cell lung cancer, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 775, 337-341pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Kara, P., Ozkan, D., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A. and Ozsoz, M.,** 2002, DNA sensing on glassy carbon electrodes by using hemin as the electrochemical hybridization label, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(8), 710-716pp.
- Keefe, A. D., Pai, S. and Ellington, A.,** 2010, Aptamers as therapeutics, *Nature Reviews Drug Discovery*, 537–550pp.
- Kenry, and Lim, C. T.,** 2017, Nanofiber technology: current status and emerging developments, *Progress in Polymer Science*, 70, 1-17pp.
- Kerman, K., Kobayashi, M. and Tamiya, E.,** 2004, Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology, *Meas. Sci. Technol.*, 15.
- Kerman, K., Morita, Y., Takamura, Y., Ozsoz, M. and Tamiya, E.,** 2004, DNA-Directed Attachment of Carbon Nanotubes for Enhanced Label-Free Electrochemical Detection of DNA Hybridization, *Electroanalysis*, 16(20), 1667-1672pp.
- Kirchner, P., Oberländer, J., Friedrich, P., Berger, J., Rysstad, G., Keusgen, M. and Schöning, M. J.,** 2012, Realisation of a calorimetric gas sensor on polyimide foil for applications in aseptic food industry, *Sens. and Actuators B: Chem.*, 170, 60-66pp.
- Kusser, W.,** 2000, Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution, *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74(1), 27-38pp.
- Li, D. and Xia, Y.,** 2004, Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?, *Advanced Materials*, 16(14), 1151-1170pp.
- Li, L.X. and Li, F.,** 2011, The effect of carbonyl, carboxyl and hydroxyl groups on the capacitance of carbon nanotubes, *New Carbon Materials*, 26(3), 224-228pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Liedberg, B., Nylander, C. and Lunström, I.**, 1983, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sens. Actuators*, 4, 299-304pp.
- Ligaj, M., Jasnowska, J., Musia, W. and Filipiak, M.**, 2006, Covalent attachment of single-stranded DNA to carbon paste electrode modified by activated carboxyl groups, *Electrochim. Acta*, 51(24), 5193-5198pp.
- Liss, M., Petersen, B., Wolf, H. and Prohaska, E.**, 2002, An Aptamer-Based Quartz Crystal Protein Biosensor, *Anal. Chem.*, 74(17), 4488–4495pp.
- Luppa, P. B., Sokoll, L. J. and Chan, D. W.**, 2001, Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry, *Clinica Chimica Acta*, 314(1-2), 1-26pp.
- Mascini, M., Palchetti, I. and Marrazza, G.**, 2001, DNA electrochemical biosensors, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 369(1), 15–22pp.
- Maskow, T., Wolf, K., Kunze, W., Enders, S. and Harms, H.**, 2012, Rapid analysis of bacterial contamination of tap water using isothermal calorimetry, *Thermochimica Acta*, 543, 273-280pp.
- McCauley, T. G., Hamaguchi, N. and Stanton, M.**, 2003, Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules, *Analytical Biochemistry*, 319(2), 244-250pp.
- Mol, N. and Fischer, M.**, 2000, Surface Plasmon Resonance: A General Introduction, New York, Springer.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H.**, 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *51*(1), 263-273pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Muñoz, J., Montes, R. and Baeza, M.,** 2017, Trends in electrochemical impedance spectroscopy involving nanocomposite transducers: Characterization, architecture surface and bio-sensing, *TrAC*, 97, 201-215pp.
- Nice, E. and Catimel, B.,** 1999, Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions, *Bioessays*, 21(4), 339-352pp.
- O'Sullivan, C. K.,** 2002, Aptasensors – the future of biosensing?, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(1), 44–48pp.
- Palecek, E. and Fojta, M.,** 2005, Electrochemical DNA Sensors, *Bioelectronics: From Theory to Applications*, Wiley, 127-192pp.
- Pänke, O., Balkenhohl, T., Kafka, J., Schäfer, D. and Lisdat, F.,** 2008, Impedance Spectroscopy and Biosensing, *Biosensing for the 21st Century*, Springer, 195-237pp.
- Pingarrón, J. M., Yáñez-Sedeño, P. and González-Cortés, A.,** 2008, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Electrochimica Acta*, 53(19), 5848-5866pp.
- Pividori, M., Merkoçi, A. and Alegret, S.,** 2000, Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics*, 15(5-6), 291-303pp.
- Proske, D., Blank, M., Buhmann, R. and Rensch, A.,** 2005, Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(4), 367–374pp.
- Rao, C., Müller, A. and Cheetham, A.,** 2004, The chemistry of nanomaterials: synthesis, properties and applications, Weinheim, Wiley.
- Rasooly, A. and Jacobson, J.,** 2006, Development of biosensors for cancer clinical testing, *Biosensors and Bioelectronics*, 21(10), 1851-1858pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Rivas, G. A., Pedano, M. L. and Ferreyra, N. F.,** 2005, Electrochemical Biosensors for Sequence-Specific DNA Detection, *Analytical Letters*, 308, 2653-2703pp.
- Rogers, K. R. and Mascini, M.,** 1998, Biosensors for field analytical monitoring, *Field Analytical Chemistry and Technology*, 2, 317-331pp.
- Saberian, M., Asgari, D., Omid, Y., Barar, J. and Hamzeiy, H.,** 2013, Establishment of an electrochemical RNA aptamer-based biosensor to trace nanomolar concentrations of codeine, *Turk J Chem*, 37, 366 – 373pp.
- Sapountzi, E., Braiek, M., Chateaux, J.F., Jaffrezic-Renault, N. and Lagarde, F.,** 2017, Recent Advances in Electrospun Nanofiber Interfaces for Biosensing Devices, *Sensors*, 17(8), 1887p.
- Sarkar, P., Pal, P. S., Ghosh, D., Setford, S. J. and Tothill, I. E.,** 2002, Amperometric biosensors for detection of the prostate cancer marker (PSA), *Int. J. Pharm.*, 238(1-2), 1-9pp.
- Seven, B., Bourourou, M., Elouarzaki, K., Constant, J.F., Gondran, C., Holzinger, M., Cosnier, S. and Timur, S.,** 2013, Impedimetric biosensor for cancer cell detection, *Electrochem. Commun.*, 36-39pp.
- Shangguan, D., Li, Y., Tang, Z., Cao, Z. C., Chen, H. W., Mallikaratchy, P., Sefah, K., Yang, C.J. and Tan, W.,** 2006, Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study, *PNAS*, 103(32), 11838-11843pp.
- Shin, M. S., Jackson, L. K., Shelton, R. W. and Greene, R. E.,** 1986, Giant Cell Carcinoma of the Lung, *Chest*, 366-369pp.
- Skoog, D. A., West, D. M. ve Holler, F. J.,** 1996, Analitik Kimyanın Temelleri (Çeviri editörleri: Prof. Dr Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu), Bilim Yayıncılık.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Song, K.M., Lee, S. and Ban, C.,** 2012, Aptamers and Their Biological Applications, *Sensors*, 12, 612-631pp.
- Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C. and Zhao, J.,** 2008, Aptamer-based biosensor, *TrAC*, 27(2), 108-117pp.
- Strehlitz , B., Nikolaus, N. and Stoltenburg, R.,** 2008, Protein Detection with Aptamer Biosensors, *Sensors*, 8(7), 4296-4307pp.
- Stryer, L.,** 1981, Biochemistry, New York, W.H Freeman and Company.
- Şahin-Sadık, E., Saraoğlu, H. M., Ebeoğlu, M. A., Gürol, İ. ve Koçak, F. E.,** 2016, Quartz Crystal Microbalance (QCM) Tabanlı Sensör ile Glukoz Seviyelerinin Ölçülmesi. *TIPTEKNO'16*, Antalya, 433-436s.
- Tabrizi, M. A., Shamsipur, M. and Farzin, L.,** 2015, A high sensitive electrochemical aptasensor for the determination of VEGF165 in serum of lung cancer patient, *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 764-769pp.
- Tang, Z., Shangguan, D., Wang, K., Shi, H., Sefah, K., Mallikratchy, P., Chen, H.W., Li, Y. and Tan, W.,** 2007, Selection of Aptamers for Molecular Recognition and Characterization of Cancer Cells, *Anal. Chem.*, 4900–4907pp.
- Tanik, N., Demirkan, E. and Aykut, Y.,** 2018, Guanine oxidation signal enhancement in DNA via a polyacrylonitrile nanofiber-coated and cyclic voltammetry-treated pencil graphite electrode, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 118, 73-79pp.
- Teanphonkrang, S. and Schulte, A.,** 2017, Automated Quantitative Enzyme Biosensing in 24-Well Microplates, *Anal. Chem.*, 89(10), 5261–5269pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Thevenot, D., Tóth, K., Durst, D. and Wilson, G.,** 1999, Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification, *Pure Appl. Chem*, 71(12), 2333-2348pp.
- Torrinha, Á., Amorim, C. G., Montenegro, M. C. and Araújo, A. N.,** 2018, Biosensing based on pencil graphite electrodes, *Talanta*, 190, 235-247pp.
- Tuerk, C. and Gold, L.,** 1990, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment - RNA ligands to bacteriophage-T4 DNA-polymerase, *Science*, 249, 505-510pp.
- Turco Liveri, V.,** 2006, Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogenous systems, New York, Springer, 167p.
- Turner, A. P.,** 1989, Biosensors: Fundamentals and Applications, (Editors: A. P. Turner, I. Karube and G. S. Wilson), Oxford University Press.
- Tüylek, Z.,** 2017, Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2), 71-80s.
- van den Beld, W. T., Odijk, M., Vervuurt, R. H., Weber, J.-W., Bol, A. A., van den Berg, A. and Eijkel, J. C.,** 2017, In-situ Raman spectroscopy to elucidate the influence of adsorption in graphene electrochemistry, *Sci Rep.*, 7.
- Velasco-Garcia, M. and Missailidis, S.,** 2006, New trends in aptamer-based electrochemical biosensors, *Gene Therapy and Molecular Biology*, 13(1), 1-10pp.
- Vlatakis, G., Andersson, L. I., Müller, R. and Mosbach, K.,** 1993, Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature*, 645–647pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Vo-Dinh, T. and Cullum, B.**, 2000, Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics, *Fresenius J Anal Chem.*, 366(6-7), 540-51pp.
- Wang, J.**, 2000, Analytical Electrochemistry, 3rd edition, New York, Wiley.
- Wang, J.**, 2006, Fundamental Concepts: *Analytical Electrochemistry*, Wiley & Sons, Inc., 1-28pp.
- Wang, L.**, 2017, Screening and biosensor-based approaches for lung cancer detection, *Sensors*, 17(10), 2420p.
- White, R., Phares, N., Lubin, A. A., Xiao, Y. and Plaxco, K. W.**, 2008, Optimization of Electrochemical Aptamer-Based Sensors via Optimization of Probe Packing Density and Surface Chemistry, *Langmuir*, 24(18), 10513–10518pp.
- Xie, B., Ramanathan, K. and Danielsson, B.**, 1999, Principles of enzyme thermistor systems: applications to biomedical and other measurements, *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 64, 1-33pp.
- Yaman, Y. T., Akbal, Ö., Bolat, G., Bozdogan, B., Denkbaz, E. B. and Abaci, S.**, 2018, Peptide nanoparticles (PNPs) modified disposable platform for sensitive electrochemical cytosensing of DLD-1 cancer cells, *Biosensors and Bioelectronics*, 104, 50-57pp.
- Yan, F., Chen, J. and Ju, H.**, 2007, Immobilization and electrochemical behavior of gold nanoparticles modified leukemia K562 cells and application in drug sensitivity test, *Electrochemistry Communications*, 9, 293–298pp.
- Yao, C., Zhu, T., Tang, J., Wu, R., Chen, Q., Chen, M., Zhang, B., Huang, J., Fu, W.**, 2008, Hybridization assay of hepatitis B virus by QCM peptide nucleic acid biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 23(6), 879-885pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Yazdanparast, S., Benvidi, A., Banaei, M., Nikukar, H., Tezerjani, M. D. and Azimzadeh, M.,** 2018, Dual-aptamer based electrochemical sandwich biosensor for MCF-7 human breast cancer cells using silver nanoparticle labels and a poly(glutamic acid)/MWNT nanocomposite, *Microchimica Acta*.
- Yıldırım, F.,** 2014, Yüzeye modifiye edilen aptamer uç gruplarının aptamer-protein etkileşimlerine etkisinin kütle spektroskopisi ile incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, HÜ Kimya Anabilim Dalı, Ankara.
- Yılmaz, S.,** 2016, *Uygulama Örnekleriyle Elektroanalitik Kimya*, 4. baskı, Ankara, Gazi Kitabevi.
- Yorgancı, E.,** 2009, Kendiliğinden tek tabaka oluşumuna dayalı enzim temelli biyosensör sistemleri geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Youssofi, H., Garnier, F., Srivastava, P., Godillot, P. and Yassar, A.,** 1997, Toward Bioelectronics: Specific DNA Recognition Based on an Oligonucleotide-Functionalized Polypyrrole, *J. Am. Chem. Soc.*, 119(31), 7388–7389pp.
- Yu, X., Munge, B., Patel, V., Jensen, G., Bhirde, A., Gong, J. D., Kim, S. N., Gillespie, J., Gutkind, J. S., Papadimitrakopoulos, F. and Rusling, J. F.,** 2006, Carbon Nanotube Amplification Strategies for Highly Sensitive Immunodetection of Cancer Biomarkers, *J Am Chem Soc.*, 128(34), 11199–11205pp.
- Zhang, L., Alex, A., Kelkar, A., Lai, C. and Fong, H.,** 2014, A review: carbon nanofibers from electrospun polyacrylonitrile and their applications, *Journal of Materials Science*, 49(2), 463–480pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Zhao, Z., Xu, L., Shi, X., Tan, W., Fang, X. and Shangguan, D.,** 2009, Recognition of subtype non-small cell lung cancer by DNA aptamers selected from living cells, *Analyst*, 134(9), 1808-1814pp.
- Zhou, J. and Rossi, J.,** 2017, Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges, *Nature Reviews Drug Discovery*, 16, 181–202pp.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi: 24 Mayıs 1994

Yabancı Dil: İngilizce (YDS: 72.5)

E-mail. ezgikivrak@gmail.com

Lisans Eğitimi:

Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü (Eylül 2012- Haziran 2016).

Tamamladığı ve Halen Yürüttüğü Proje Çalışmaları:

1. Klinik Analizlere Yönelik Aptamer Tabanlı Elektrokimyasal Biyosensör Tasarımı (Yüksek lisans tezi) (BAP proje no: 18-FBE-001), 2019
2. Nokta Mutasyonu Tayinine Yönelik Elektrokimyasal Nanogenosensör Geliştirilmesi (Lancaster Uni., İngiltere ile ortak çalışma), 2018
3. İzokinolin Grubu Alkaloidlerin Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi (Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı ile ortak çalışma), 2018
4. Biyosensörlerin Geliştirilmesine Yönelik Farklı Nanomateryaller ile Yüzey Kimyalarının Çalışılması (Forschungszentrum Jülich Biyoelektronik grubu, Almanya ile ortak çalışma) (devam ediyor).

Yurt Dışında ve Yurtiçinde Katıldığı Projeler

1. 10 Kasım – 28 Aralık 2018 tarihleri arasında Forschungszentrum Jülich, Kompleks Sistemler Enstitüsü, Biyoelektronik Laboratuvarı'nda Dr. Dirk Mayer gözetiminde aptasensörler ve metal nanopartiküller üzerine çalışma.

2. Haziran – Ağustos 2015 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda Yrd. Doç. Aylin Şendemir Ürkmez gözetiminde kanser hücreleri üzerine çalışma.

Kongre/Sempozyum Bildirileri

1. **Kıvrak E.**, Ince A., Ilhan R., Ballar P., Yılmaz S., Kara P., “Development of Nanofiber Functionalized Aptasensor for Electrochemical Detection of Cancer Cell”, VIII International Congress on Analytical Nanoscience and Nanotechnology, Poster, Barcelona, İspanya (Haziran, 2017)
2. **Kıvrak E.**, Bozkurt B., Durmaz-Armağan G., Yüksel S., Ünver-Somer N., Kara P., “Electrochemical Detection of Isoquinolines In Human Serum and Urine Samples”, XII International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Poster presentation, Ankara, Türkiye (Haziran, 2018)