



**BAZI KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLARIN
BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ
VE GERÇEK ÖRNEKLERDE KULLANIM
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Burçak DEMİRBAKAN

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

2018

T.C.

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BAZI KARDİYOYASKÜLER HASTALIKLARIN BİYOSENSÖR
SİSTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ VE GERÇEK ÖRNEKLERDE
KULLANIM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Burçak DEMİRBAKAN

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

TEKİRDAĞ-2018

Her hakkı saklıdır



Bu tez TÜBİTAK tarafından 113Z678 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK danışmanlığında, Burçak DEMİRBAKAN tarafından hazırlanan ” **Bazı Kardiyovasküler Hastalıkların Biyosensör Sistemleri ile Belirlenmesi ve Gerçek Örneklerde Kullanım Potansiyellerinin Araştırılması** ” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı :Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

İmza:

Üye : Doç. Dr. Mustafa TEKE

İmza:

Üye: Doç. Dr. Özgür ÖZAY

İmza:

Üye: Doç. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN

İmza:

Üye: Doç. Dr. İbrahim İsmet ÖZTÜRK

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLARIN BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ VE GERÇEK ÖRNEKLERDE KULLANIM POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Burçak DEMİRBAKAN

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Kardiyovasküler hastalıklar tüm dünyada en önde gelen ölüm nedenlerinden birisidir. Birçok farklı etkene bağlı olarak ortaya çıkabilen ve zamanın son derece önem arz ettiği bu hastalık türlerinde erken teşhise yönelik geliştirilen sistemler kritik bir rol oynamaktadır. Bu doktora tez çalışmasında, kardiyovasküler hastalıkların erken teşhisine yönelik 3 önemli biyobelirteç olan CK, ST2 ve TnT' nin tayini için kullan-at elektrotlarla ve çeşitli elektrokimyasal tekniklerle biyosensör sistemleri geliştirilmiştir. Biyosensörler tasarlanırken gerçekleştirilen immobilizasyon, optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları sırasında, elektrokimyasal impedans spektroskopisi, döngüsel voltametri, kare dalga voltametrisi ve sabit frekansta impedans tekniklerinden yararlanılmıştır. Immobilizasyon sonrası yüzey morfolojisinde meydana gelen değişiklikleri inceleyebilmek için taramalı elektron mikroskobu kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır. Standart ekleme yöntemiyle gerçek serum örneklerinde analiz yapılarak tasarlanan biyosensörlerin klinikteki potansiyeli araştırılmıştır. Kardiyovasküler hastalıkların tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sistemlerinin, çok yüksek hassasiyete, mükemmel tekrar üretilebilirlik ve tekrar kullanılabilirlik kapasitesine, uzun raf ömrüne ve serum örneklerinde analitin tayinini yüksek duyarlılıkla yapabilecek hassasiyete sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Anti-ST2, EIS, CV, SFI, grafit kağıt, kardiyovasküler hastalıklar

2018, 156 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

**DETERMINATION OF SOME CARDIOVASCULAR DISEASES WITH BIOSENSOR
SYSTEMS AND INVESTIGATION OF THE POTENTIAL OF THEM IN REAL SAMPLES**

Burçak DEMİRBAKAN

Namık Kemal University in Tekirdağ
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Cardiovascular diseases are one of the causes of death in the world. The biosensor systems developed for early detection of these diseases occurred due to many different effects and acts a critical role. In this PhD thesis, the biosensor systems with disposable electrodes and several electrochemical techniques have been designed to determine CK, ST2 and TnT which are the important biomarkers for early detection of cardiovascular diseases. Electrochemical impedance spectroscopy, cyclic voltammetry, square wave voltammetry and single frequency technique were utilized for immobilization, optimization and characterization studies when biosensors were designed. SEM was used to monitor the morphological changes of the surfaces during the immobilization step. The clinical potential of the biosensors designed by analyzing real serum samples with standard addition method were investigated. It has been observed that the biosensor systems developed for detection of cardiovascular diseases have very high sensitivity, excellent reproducibility and reusability capacity, long shelf life and high sensitivity in the analysis of serum samples.

Keywords: Anti-ST2, EIS, CV, SFI, graphite paper, cardiovascular diseases

2018, 156 pages

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	viii
ŞEKİL DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
TEŞEKKÜR.....	xiv
İTHAF	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1.Kardiyovasküler Hastalıklara Genel Bir Bakış	3
2.2.Akut Miyokart Enfarktüsü (AMI)	6
2.3. Kardiyak Biyobelirteçler	6
2.4. Kreatin Kinaz (CK)	9
2.5. Suppression of Tumorigenicity 2 (ST2).....	10
2.6. Troponin T (TnT).....	11
2.7. Kardiyovasküler Hastalıkların Erken Teşhisinde Biyosensörlerin Rolü.....	12
2.8. Biyosensörlerin Tasarlanmasında Kullanılan Yenilikçi Materyaller	17
2.9. Kaynak Araştırması.....	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Kardiyovasküler biyosensörlerin tasarımında kullanılan kimyasallar	22
3.1.2. Kardiyovasküler biyosensörlerin tasarımında kullanılan cihazlar	23
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Elektrokimyasal ölçümler	24
3.3. Creatine Kinase Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemi.....	24
3.3.1 CK biyosensörünün fabrikasyonu ve immobilizasyon adımları	24
3.3.2. CK biyosensörünün optimizasyon adımları	26
3.3.2.1. 6-MH konsantrasyonunun optimizasyonu.....	26
3.3.2.2. GOPE konsantrasyonunun optimizasyonu	26
3.3.2.3. Anti-CK' nın konsantrasyon optimizasyonu	27

3.3.2.4. Anti-CK' nın inkübasyon süresinin optimizasyonu	27
3.3.2.5. CK' nın inkübasyon süresinin optimizasyonu.....	27
3.3.3. CK biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları	27
3.3.3.1. CK biyosensörünün kalibrasyon grafiği.....	27
3.3.3.2. CK biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları.....	28
3.3.3.3. CK biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmaları	29
3.3.3.4. CK biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları	29
3.3.3.5. CK biyosensörü için Sabit Frekansta İmpedans (SFI) analizi.....	29
3.3.3.6. CK biyosensörüne ilişkin kare dalga voltametri (SWV) çalışmaları.....	30
3.3.3.7. CK biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması	30
3.3.3.8. CK biyosensörünün raf ömrü	30
3.3.3.9. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	30
3.3.3.10. CK biyosensörünün serum örneklerinde uygulanabilirliğinin araştırılması.....	31
3.3.3.11. CK biyosensörünün Kramers-Kronig Transform karakterizasyonu.....	31
3.4. ST2 Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemi	31
3.4.1. ST2 biyosensörünün fabrikasyonu ve immobilizasyon adımları	31
3.4.2. ST2 biyosensörünün optimizasyon adımları	33
3.4.2.1. Fullerene C ₆₀ miktarının optimizasyonu	33
3.4.2.2. Fullerene C ₆₀ ' ın inkübasyon süresinin belirlenmesi.....	33
3.4.2.3. H ₂ SO ₄ asit konsantrasyonunun biyosensör üzerindeki etkisi	34
3.4.2.4. Anti-ST2' nin konsantrasyon optimizasyonu.....	34
3.4.2.5. Anti-ST2' nin inkübasyon süresinin belirlenmesi.....	34
3.4.2.6. ST2' nin inkübasyon süresinin belirlenmesi	35
3.4.3. ST2 biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları	35
3.4.3.1. ST2 biyosensörünün kalibrasyon grafiği.....	35
3.4.3.2. ST2 biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları.....	36
3.4.3.3. ST2 biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmaları	36
3.4.3.4. ST2 biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları	36
3.4.3.5. ST2 biyosensörünün SFI analizi.....	36
3.4.3.6. ST2 biyosensörüne ilişkin SWV çalışmaları.....	37
3.4.3.7. ST2 biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması	37
3.4.3.8. ST2 biyosensörünün raf ömrü	37
3.4.3.9. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	37
3.4.3.10. ST2 biyosensörünün serum örneklerinde uygulanabilirliğinin araştırılması.....	37
3.4.3.11. ST2 biyosensörünün Kramers-Kronig Transform karakterizasyonu	38
3.5. TnT Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemi.....	38

3.5.1. TnT biyosensörünün fabrikasyonu ve immobilizasyon adımları	38
3.5.2. TnT biyosensörünün optimizasyon adımları	39
3.5.2.1. HCl asit konsantrasyonunun optimizasyonu	39
3.5.2.2. Anti-TnT konsantrasyonunun optimizasyonu	40
3.5.2.3. Anti-TnT inkübasyon süresinin belirlenmesi	40
3.5.2.4. TnT inkübasyon süresinin belirlenmesi	40
3.5.3. TnT biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları	40
3.5.3.1. TnT biyosensörünün kalibrasyon grafiği	41
3.5.3.2. TnT biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları	41
3.5.3.3. TnT biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmaları	41
3.5.3.4. TnT biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları	41
3.5.3.5. TnT biyosensörünün SFI analizi	42
3.5.3.6. TnT biyosensörüne ilişkin SWV çalışmaları	42
3.5.3.7. TnT biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması	42
3.5.3.8. TnT biyosensörünün raf ömrü	42
3.5.3.9. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	43
3.5.3.10. TnT biyosensörünün serum örneklerinde uygulanabilirliğinin araştırılması	43
3.5.3.11. TnT biyosensörünün Kramers-Kronig Transform karakterizasyonu	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	44
4.1. CK Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemi	44
4.1.1. CK biyosensörünün immobilizasyon adımlarının EIS ve CV ile yorumlanması	44
4.1.2. CK biyosensörünün optimizasyon basamakları	49
4.1.2.1. 6-MH' nin konsantrasyon optimizasyonu	49
4.1.2.2. GOPE' nin konsantrasyon optimizasyonu	51
4.1.2.3. Anti-CK' nin konsantrasyon optimizasyonu	52
4.1.2.4. Anti-CK' nin inkübasyon süresinin optimizasyonu	54
4.1.2.5. CK' nin inkübasyon süresinin optimizasyonu	55
4.1.3. CK biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları	56
4.1.3.1. CK biyosensörünün kalibrasyon grafiği	56
4.1.3.2. CK biyosensörünün tekrarlanabilirliği	58
4.1.3.3. CK biyosensörünün tekrar üretilebilirliği	58
4.1.3.4. CK biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği (rejenerasyon)	60
4.1.3.5. CK biyosensörünün sabit frekansta impedans (SFI) analizi	60
4.1.3.6. CK biyosensörünün kare dalga voltametri (SWV) ile analizi	63
4.1.3.7. CK biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması	64

4.1.3.8. CK biyosensörünün raf ömrü	65
4.1.3.9. CK biyosensörünün SEM görüntüleri	66
4.1.3.10. CK biyosensörünün serum örneklerinde uygulanabilirliğinin araştırılması.....	69
4.1.3.11. CK biyosensörünün Kramers-Kronig Transform karakterizasyonu.....	70
4.1.3.12. CK biyosensörünün literatürdeki yeri	72
4.2. ST2 Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemi	74
4.2.1 ST2 biyosensörünün immobilizasyon adımlarının EIS ve CV ile yorumlanması.....	74
4.2.2. ST2 biyosensörünün optimizasyon basamakları	77
4.2.2.1. Fulleren C ₆₀ ’ ın konsantrasyon optimizasyonu	77
4.2.2.2. Fulleren C ₆₀ ’ ın inkübasyon süresinin belirlenmesi	78
4.2.2.3. H ₂ SO ₄ asit konsantrasyonunun belirlenmesi	79
4.2.2.4. Anti-ST2’ nin konsantrasyon optimizasyonu.....	80
4.2.2.5. Anti-ST2’ nin inkübasyon süresinin belirlenmesi.....	82
4.2.2.6. ST2’ nin inkübasyon süresinin belirlenmesi	84
4.2.3. ST2 biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları	85
4.2.3.1. ST2 biyosensörünün kalibrasyon grafiği.....	85
4.2.3.2. ST2 biyosensörünün tekrarlanabilirliği.....	86
4.2.3.3. ST2 biyosensörünün tekrar üretilebilirliği	88
4.2.3.4. ST2 biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği (rejenerasyon).....	89
4.2.3.5. ST2 biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi.....	90
4.2.3.6. ST2 biyosensörünün kare dalga voltametri ile analizi.....	91
4.2.3.7. ST2 biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması	93
4.2.3.8. ST2 biyosensörünün raf ömrü	93
4.2.3.9. ST2 biyosensörünün SEM görüntüleri.....	93
4.2.3.10. ST2 biyosensörünün serum örneklerinde uygulanabilirliğinin araştırılması.....	96
4.2.3.11. ST2 biyosensörünün Kramers-Kronig Transform karakterizasyonu	97
4.2.3.12. ST2 biyosensörünün literatürdeki yeri	98
4.3. TnT Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemi.....	100
4.3.1. TnT biyosensörünün immobilizasyon adımlarının EIS ve CV ile yorumlanması.....	100
4.3.2. TnT biyosensörünün optimizasyon basamakları	103
4.3.2.1. HCl asit konsantrasyonunun optimizasyonu	103
4.3.2.2. Anti-TnT konsantrasyonunun optimizasyonu	104
4.3.2.3. Anti-TnT inkübasyon süresinin belirlenmesi	106
4.3.2.4. TnT inkübasyon süresinin belirlenmesi	107
4.3.3. TnT biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları	109
4.3.3.1. TnT biyosensörünün kalibrasyon grafiği	109

4.3.3.2. TnT biyosensörünün tekrarlanabilirliği.....	111
4.3.3.3. TnT biyosensörünün tekrar üretilebilirliği	111
4.3.3.4. TnT biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği (rejenerasyon)	112
4.3.3.5. TnT biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi.....	113
4.3.3.6. TnT biyosensörünün kare dalga voltametrisi ile analizi.....	114
4.3.3.7. TnT biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması.....	117
4.3.3.8. TnT biyosensörünün raf ömrü.....	117
4.3.3.9. TnT biyosensörünün SEM görüntüleri.....	118
4.3.3.10. TnT biyosensörünün serum örneklerinde uygulanabilirliğinin araştırılması	119
4.3.3.11. TnT biyosensörünün Kramers-Kronig Transform karakterizasyonu	121
4.3.3.12. TnT biyosensörünün literatürdeki yeri.....	122
5. SONUÇ	124
6. KAYNAKLAR.....	127
EKLER	135
ÖZGEÇMİŞ	136

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge.2.1. KVH' ın genel sınıflandırılması	5
Çizelge.4.1. MH konsantrasyonu optimizasyonunun grafiklerinin R^2 'leri ve denklemleri	50
Çizelge.4.2. GOPE konsantrasyonu optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri	52
Çizelge.4.3. Anti-CK konsantrasyonu optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri	53
Çizelge.4.4. Anti-CK süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri	55
Çizelge.4.5. CK süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri.....	56
Çizelge.4.6. Artan CK konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen impedimetrik veriler	58
Çizelge.4.7. CK biyosensörünün tekrar üretilebilirlik grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri ...	59
Çizelge.4.8. Geliştirilen biyosensör sistemi ile serum örneklerinde bulunan CK konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	69
Çizelge.4.9. CK biyosensörüne ait Kramers-Kronig fit değerleri	71
Çizelge.4.10.Literatürde bildirilen çeşitli CK biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması	73
Çizelge.4.11. Fulleren C_{60} miktar optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri....	78
Çizelge.4.12. Fulleren C_{60} süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri	79
Çizelge.4.13. H_2SO_4 konsantrasyon optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri	80
Çizelge.4.14. Anti-ST2 konsantrasyon optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri	81
Çizelge.4.15. Anti-ST2 süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri	83
Çizelge.4.16. ST2 süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri.....	85
Çizelge.4.17. Artan ST2 konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen impedimetrik veriler.....	86
Çizelge.4.18. ST2 biyosensörünün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri	89
Çizelge.4.19. Geliştirilen biyosensör sistemi ile serum örneklerinde bulunan CK konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	96
Çizelge.4.20. ST2 biyosensörüne ait Kramers-Kronig fit değerleri	97
Çizelge.4.21. Literatürde bildirilen çeşitli ST2 biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması	99
Çizelge.4.22. HCl konsantrasyon optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri ..	104

Çizelge.4.23. Anti-TnT konsantrasyon optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri	106
Çizelge.4.24. Anti-TnT süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri.....	106
Çizelge.4.25. TnT süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri	108
Çizelge.4.26. Artan TnT konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen impedimetrik veriler.....	109
Çizelge.4.27. TnT biyosensörünün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri	112
Çizelge.4.28. TnT biyosensörünün gerçek serum örneklerinde tayini	120
Çizelge.4.29. TnT biyosensörüne ait Kramers-Kronig fit değerleri.....	121
Çizelge.4.30.Literatürde bildirilen çeşitli TnT biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması	123

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil.2.1. Miyokart enfarktüsü (MI) teşhisi. Troponin konsantrasyon düzeyi, semptomları, güncel MI saptama yöntemleri ve kardiyak biyobelirteç algılama yöntemleri.....	8
Şekil.2.2. Antijen tayini için ELISA yönteminin prensibi	14
Şekil.3. 1. CK biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi.....	26
Şekil.3.2. EIS elektriksel eşdeğer devre modeli	28
Şekil.3. 3.ST2 biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi	33
Şekil.3.4.TnT biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi	39
Şekil.4.1.(A) GP elektrot yüzeyinin altın nanopartikülle kaplanmasına ait döngüsel voltamogramlar (B) döngü sayısının ilerlemesiyle birlikte kayan pik akımı.....	45
Şekil.4.2. CK biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının (A) EIS verileri, (B) immobilizasyon basamaklarına ait Ret değerleri, (C) CV voltamogramları	47
Şekil.4.3. 6-MH konsantrasyonunun CK biyosensör cevabı üzerine etkisi	50
Şekil.4.4. GOPE konsantrasyonunun CK biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	52
Şekil.4.5. Anti-CK konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	53
Şekil.4.6. Anti-CK inkübasyon süresi optimizasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi ...	54
Şekil.4.7. CK inkübasyon süresi optimizasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	55
Şekil.4.8. Tasarlanan biyosensörün artan CK konsantrasyonu ile elde edilen (A) Kalibrasyon grafiği, (B) EIS verileri, (C) CV voltamogramları.....	57
Şekil.4.9. CK biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ilişkin kalibrasyon grafikleri. (n=7).....	59
Şekil.4.10. CK biyosensörünün tekrar kullanılabilirlik çalışmasının grafikteki görünümü.....	60
Şekil.4.11. CK biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümüne ait (A) Bode grafiği, (B) SFI spektrumu (pembe; sabit frekansta EIS ölçümü, yeşil; faz açısı ölçümü)	62
Şekil.4.12. CK biyosensörüne ait (A) kare dalga voltametri ve (B) kalibrasyon grafiği.....	64
Şekil.4.13. CK biyosensörünün depo kararlılığı denemelerine ilişkin aktivite değerleri.....	66
Şekil.4.14. CK biyosensörünün SEM görüntüleri. (A) Yalın GP, (B) AuNP, (C) MH, (D) GOPE, (E) Anti-CK, (F) BSA, (G) CK	68
Şekil.4.15. CK biyosensörün Kramers-Kronig Transform fit spektrumları	71
Şekil.4.16. ST2 biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının (A) EIS verileri, (B) immobilizasyon basamaklarına ait Ret değerleri, (C) CV voltamogramları	76
Şekil.4.17. Fulleren C ₆₀ miktarının ST2 biyosensörünün cevabı üzerine etkisi.....	77
Şekil.4.18. Fulleren C ₆₀ inkübasyon süresinin ST2 biyosensörünün cevabı üzerine etkisi.....	79

Şekil.4.19. H ₂ SO ₄ konsantrasyonunun ST2 biyosensörünün cevabı üzerine etkisi	80
Şekil.4.20. Anti-ST2 konsantrasyon optimizasyonunun biyosensörün cevabı üzerine etkisi ..	82
Şekil.4.21. Anti-ST2 süre optimizasyonunun biyosensör üzerine etkisi	83
Şekil.4.22. ST2 inkübasyon süresi optimizasyonunun biyosensörün cevabı üzerine etkisi	84
Şekil.4.23. Tasarlanan biyosensörün artan ST2 konsantrasyonuyla elde edilen (A) Kalibrasyon grafiği, (B) EIS verileri, (C) CV voltamogramları	87
Şekil.4.24. ST2 biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ilişkin kalibrasyon grafikleri. (n=8)	88
Şekil.4.25. ST2 biyosensörünün tekrar kullanılabilirlik çalışmasının grafikteki görünümü	90
Şekil.4.26. ST2 biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümüne ait (A) Bode grafiği, (B) SFI spektrumu (kırmızı; sabit frekansta EIS ölçümü, yeşil; faz açısı ölçümü)	91
Şekil.4.27. ST2 biyosensörüne ait (A) kare dalga voltametrisi ve (B) kalibrasyon grafiği	92
Şekil.4.28. ST2 biyosensörünün depo kararlılığı denemelerine ilişkin aktivite değerleri	94
Şekil.4.29. ST2 biyosensörünün SEM görüntüleri. (A) Yalın GP, (B) Fulleren C ₆₀ , (C) H ₂ SO ₄ , (D) EDC-NHS, (E) Anti-ST2, (F) BSA, (G) ST2	95
Şekil.4.30. ST2 biyosensörün Kramers-Kronig Transform fit spektrumları	97
Şekil.4.31. TnT biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının (A) EIS verileri, (B) immobilizasyon basamaklarına ait Ret değerleri, (C) CV voltamogramları	102
Şekil.4.32. HCl asit konsantrasyonunun TnT biyosensörünün cevabı üzerine etkisi	104
Şekil.4.33. Anti-TnT konsantrasyon optimizasyonunun biyosensörün cevabı üzerine etkisi	105
Şekil.4.34. Anti-TnT inkübasyon süresi optimizasyonunun biyosensörün cevabı üzerine etkisi	107
Şekil.4.35. TnT inkübasyon süresi optimizasyonunun biyosensörün cevabı üzerine etkisi ...	108
Şekil.4.36. Tasarlanan biyosensörün artan TnT konsantrasyonuyla elde edilen (A) Kalibrasyon grafiği, (B) EIS verileri, (C) CV voltamogramları	110
Şekil.4.37. TnT biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ilişkin kalibrasyon grafikleri. (n=10)	111
Şekil.4.38. TnT biyosensörünün tekrar kullanılabilirlik çalışmasının grafikteki görünümü ..	113
Şekil.4.39. TnT biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümüne ait (A) Bode grafiği, (B) SFI spektrumu (pembe; sabit frekansta EIS ölçümü, mavi; faz açısı ölçümü)	115
Şekil.4.40. TnT biyosensörüne ait (A) kare dalga voltametrisi ve (B) kalibrasyon grafiği ...	116
Şekil.4.41. TnT biyosensörünün depo kararlılığı denemelerine ilişkin aktivite değerleri	118
Şekil.4.42. TnT biyosensörünün SEM görüntüleri. (A) Yalın GP, (B) HCl, (C) EDC-NHS, (D) Anti-TnT, (E) BSA, (F) TnT	119

Şekil.4.43. TnT biyosensörün Kramers-Kronig Transform fit spektrumları.....	121
---	-----



KISALTMALAR DİZİNİ

AuNP	: Altın nanopartikül
BSA	: Bovin serum albumin
CK	: Kreatin kinaz
CV	: Döngüsel voltametri
DC	: Doğru akım
EDC	: 1-Etil-3-3dimetilaminopropil karbodiimid
EIS	: Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
GCE	: Camsı karbon elektrot
HCl	: Hidroklorik asit
H ₂ SO ₄	: Sülfirik asit
ITO	: İndiyum kalay oksit
3-GOPE	: 3-glisidoksipropiltrietoksisilan
GP	: Grafit kağıt
LOD	: Tayin limiti
LOQ	: Ölçüm limiti
6-MH	: 6- Merkapto hekzanol
NHS	: N-hidroksisüksinimid
SAM	: Kendiliğinden oluşan tek tabaka
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SFI	: Sabit frekansta impedans
SPE	: Screen printed electrode
ST2	: Suppression of Tumorigenicity 2
SWV	: Kare dalga voltametrisi
TnT	: Troponin T

TEŞEKKÜR

Akademik hayata adım attığım andan itibaren benden desteğini bir an olsun esirgemeyen, alanındaki başarısının kanıtı olan engin bilgi birikimi, deneyimi ve ahlaklı bilim yapmayı kendisine amaç edinerek öğrencilerini de bu uğurda yetiştiren, karakteriyle daima benim için eşsiz bir örnek olan çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e,

Bu yolda daima bana destek olup koşulsuz sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olarak bana güç veren saygıdeğer babam Erol DEMİRBAKAN ve sevgili annem İlknur DEMİRBAKAN' a ve kıymetli abime,

Bu zorlu yolda benden manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım dostum Cansu ŞANDA' ya, varlığından büyük mutluluk duyduğum Dr. Öğretim Üyesi Pınar SEZGİNTÜRK'e ve kıymetli dostum Merve KAMACI' ya,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında, her türlü moral ve motivasyon sağlayan hem ekip arkadaşlarım hem dostlarım olan Burcu ÖZCAN ve Münteha Nur SONUÇ KARABOĞA' ya,

Doktoram sırasında hem laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen hem de manevi olarak daima yanımda olan arkadaşlarım Nur TARIMERİ' ye ve Mert AKGÜN' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2018

Burçak DEMİRBAKAN

İTHAF

Canım Dedeciğim,

Sevgin daima benimle, nurlar içinde yat...

Rahmetli Ahmet DEMİRBAKAN' ın

Aziz hatırasına

Saygı ve minnetle..

1. GİRİŞ

Son yıllarda gittikçe artan ve insan sağlığını büyük ölçüde tehdit eden kardiyovasküler hastalıklar (KVH) ülkemizde ve dünyada kronik hastalıklar listesinde üst sıralarda yer almaktadır. Birçok etkiye bağlı olarak ortaya çıkan bu hastalık türlerinde, yaş artışı, hareketsiz yaşam ve alkol, sigara gibi kötü alışkanlıkların tüketilmesiyle birlikte daha çok yaygınlaşma söz konusu olmuştur **(Yeşil 2012)**.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2008 yılı verilerine göre; kardiyovasküler hastalıkların küresel ölüm nedenleri içerisinde birinci sırada yer aldığı ve 7.6 milyon kişinin bu hastalıklar sebebiyle yaşamını yitirdiği bildirilmektedir. 2012 yılında bu sayı tüm ölümlerin %31' ine tekabül eden 17.5 milyona yükselmiştir **(Anonim 2016)**. Dahası kardiyovasküler hastalıkların, Avrupa' daki 4.3 milyondan fazla kişinin ölümüne doğrudan ve her sene gerçekleşen toplam ölüm sayısının da neredeyse yarısına (% 48) sebep olduğu belirtilmektedir **(Petersen ve ark. 2008)**. Ülkemizde ise Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre 2016 yılında ölüm nedenleri içerisinde dolaşım sistemi hastalıkları nedeniyle ölüm vakaları tüm ölümlerin %39,8' ini oluşturarak ilk sırada yer almıştır **(Anonim 2016)**. Kardiyovasküler hastalıkların küresel ölçekte uzun bir süre daha bir numaralı ölüm sebebi olmaya devam edeceği tahmin edilmektedir.

Kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkışı ateroskleroza bağlıdır. Küçük yaşlardan itibaren damarlardaki yağlı çizgilenmeyle başlayan koroner ateroskleroz, bazı değişik risk faktörlerinden de etkilenerek artış göstermektedir **(Woods 2005)**.

Kardiyovasküler hastalıkların ilerlemesinde yaş, genetik faktörler, kötü alışkanlıklar (alkol, sigara vs.), hipertansiyon, hiperkolesterolemi, halk arasında "kötü kolesterol" olarak bilinen düşük dansiteli lipoprotein (LDL) düzeyinin yüksek ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeyinin ise düşük olması, diyabet gibi bir çok faktör rol oynamaktadır **(Woods 2005)**.

Küresel ölçekte ölüm oranını bu denli etkileyen, günlük hayattaki pek çok kişinin sahip olduğu ve çok ciddi hasar bırakıcı etkilerine rağmen uzun süre vücut içerisinde varlığını belli etmeden ilerleyebilen kardiyovasküler hastalıkların erken teşhisi, hiç şüphesiz insan sağlığı için çok önemli bir ihtiyaç haline gelmiştir.

Vücuttaki biyolojik olarak aktif türleri tayin etmek için tasarlanan biyosensör sistemleri, herhangi bir hastalık türüne ilişkin spesifik ya da duyarlılık gösteren biyobelirteçleri; serum, BOS, tükürük gibi çok az hacimlerdeki vücut sıvılarından alınan örneklerde tayin edebilme özelliğine sahiptir. Biyosensörler bu özelliğiyle klinik uygulamalarda kullanılmak için çok elverişli olmalarının yanı sıra, yüksek hassasiyette ve düşük maliyetli olarak tasarlanabilmeleriyle de öne çıkmaktadırlar.

İnsan sağlığını ciddi oranda tehdit eden kardiyovasküler hastalıkların erken teşhisinin yapılabilmesi durumunda hem tanı konulma adımının hızlanmasına hem de tedavi sürecinin daha basit hale dönüşmesine büyük yararlar sağlayacağı açıktır.

Bu amaçlar doğrultusunda geliştirilen bu doktora tezinin amacı, kalp krizi, kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıkların erken teşhisine yönelik, biyosensör sistemleri tasarlamaktır. Bu tez çalışmasında kardiyovasküler hastalıklara özgü olan CK, ST2 ve TnT biyobelirteçlerinin, insan kan örneklerinden alınan serum sıvısında tayinlerinin yapılarak kullanım potansiyellerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1.Kardiyovasküler Hastalıklara Genel Bir Bakış

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), gelişen dünyada artan nüfusla birlikte ölüm ve morbidite nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Kardiyovasküler hastalıkların oluşması genetik, yaş, kronik rahatsızlıklar, inaktif yaşam, sağlıklı beslenme, sigara veya alkol kullanımı, Tip 1 ve Tip 2 diyabet gibi bir çok etkene bağlıdır. Kişinin yaşam standartlarını kontrol etmesine bağlı olarak bu hastalıklara yakalanma riski düşürülebilir. Ancak, hipertansiyon, istemsiz kas hareketlerine bağlı gelişen ataklar gibi kontrol edilemeyen durumlarda hastalığın kişide geri dönüşümsüz hasarlara yol açmaması için acil müdahaleyi kolaylaştıran tedavilere ihtiyaç vardır. Bu noktada en önemli şey hastalığın “erken teşhisi” için vücutta gelişen birtakım biyokimyasal olayları iyi analiz edebilmektir. Böylece vücudun vermeye çalıştığı mesaj anlaşılıp o doğrultuda bir tedavi yöntemi izlenebilir. Zamanın çok kıymetli olduğu bu hastalık türlerinde erken yapılan müdahale kişinin yaşamı için son derece kritik bir önemdedir. Çok geniş bir alana sahip olan kardiyovasküler hastalıkların genel bir sınıflandırılması Çizelge 2.1’ de verilmiştir.

Bu hastalık türleri kişinin yaşamını tehdit edecek derece de önemli olup akut koroner sendromuyla (AKS) birlikte kendisini gösterir. Bu sendrom, kan akışı sırasında meydana gelen bir aksaklığın (miyokart iskemisi) ve tıbbi müdahalesini gerektirecek akut koroner durumları tanımlama da kullanılmaktadır. Hastalardaki genel şikayet göğüs ağrısıdır. Çoğunlukla yırtılmış veya zarar görmüş aterosklerotik bir plak akut trombusunu tetikleyerek vazokonstriksiyonla birlikte veya tek başına durumu ağırlaştırarak, koroner kan akışında hızlı bir azalışa sebep olur. Akut koroner sendromun, başlıca klinik belirtileri;

- sessiz iskemi,
- kararlı anjina pectoris
- kararsız anjina pectoris
- akut miyokart enfarktüsü (AMI)
- kalp yetersizliği
- ani ölüm

olarak sıralanabilir.

Akut koroner sendromları, belirli şekilleri ve bulguları bakımından farklılık gösterebilirler. Bunun nedeni koroner anatominin farklı olmasıdır. Ancak tüm AKS' lere hızlı bir şekilde tanı koyulup oluşabilecek riskin ön görülmesi üzerine trombolitik tedavi veya perkutan koroner girişimle reperfüzyon başlatılabilir.

Akut koroner sendromunda, miyokart iskemisiyle birlikte hücrelere yeterli oksijenin ulaşmamasına bağlı olarak bir dizi elektrofizyolojik ve biyokimyasal olay meydana gelir. Meydana gelen bu biyokimyasal değişikliklerden erken teşhis için büyük ölçüde fayda sağlanır. Akut koroner sendromunda tanı koyulması ve oluşabilecek risk faktörlerinin belirlenmesi sırasında dikkate alınması gerek üç durum söz konusudur. Bu durumlar;

- anamnez sırasında belirlenen hastanın anjina pektorisin veya bunun eşdeğeri durumunda sayılan belirtilerinin var olması,
- EKG (elektrokardiyogram) bulgularına göre STEMI (ST-yükselmeli miyokart enfarktüsü), NSTEMI (ST-yükselmeli olmayan miyokart enfarktüsü) ve kararsız anjina pektoris durumlarının, incelenmesi,
- Son durum ise kandaki kardiyak belirteç seviyelerinin artmasıdır.

Son durumdaki kardiyak belirteçlerinin AMI' daki önemine dikkat çekmek adına Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2000 yılında tanı koyma kriterlerini tekrar düzenleyerek, 20 dk dan uzun süreli kalp ağrılarında; kardiyak belirteçlerinden iki tanesinin seviyesinde yükseliş söz konusuysa büyük ihtimalle, tümünde bir yükseliş varsa kesin AMI teşhisi konulmaktadır **(Ademoğlu 2015)**.

Çizelge.2.1. KVH' ın genel sınıflandırılması (Öztürk, 1998).

Kalp yetmezliği hastalıkları	➤ Sol kalp yetmezliği (akut kalp yetmezliği) ➤ Sağ kalp yetmezliği (kronik kalp yetmezliği) ➤ Korpulmonale
Kalp kapak hastalıkları	➤ Mitral stenozu (mitral darlığı) ➤ Mitral yetmezliği ➤ Triküspit stenozu (triküspit darlığı) ➤ Triküspit yetmezliği ➤ Aort yetmezliği
Koroner damar hastalıkları	➤ Koroner skleroz ➤ Anjina pectoris ➤ Miyokart enfarktüsü
Konjenital kalp hastalıkları	Siyanozsuz konjenital kalp hastalıkları ➤ Ventriküler septal defekt (VSD) ➤ Patent ductus arteriosus (PDA) ➤ Atrial septal defekt (ASD) ➤ Pulmoner stenoz ➤ Aort stenozu ➤ Aort koarktasyonu ➤ Mitral stenoz Siyanozlu konjenital kalp hastalıkları ➤ Fallot tetrolojisi ➤ Büyük arterlerin transpozisyonu ➤ Triküspit atrezisi ➤ Pulmoner atrezi ➤ Tricus arteriosus ➤ Kompleks anomaliler
Kan basıncı bozuklukları	➤ Hipertansiyon ➤ Hipotansiyon
Damar hastalıkları	➤ Arterioskleroz (Arteriosklerozis Obliterans-ASO) ➤ Buerger hastalığı (TAO - Tromboanjitis Obliterans) ➤ Buerger hastalığı (TAO - Tromboanjitis Obliterans) ➤ Raynaud hastalığı ➤ Varis ➤ Tromboflebit ➤ Flebotromboz

2.2.Akut Miyokart Enfarktüsü (AMI)

Amerikalı bir hekim olan James Bryan, akut miyokart enfarktüsünün belirtilerini tanımlayarak kalp krizi belirtilerinin ve anormalliklerinin koroner arterdeki tromboz tarafından yönlendirildiğini açıklayan ilk isimlerden birisidir (**James 2000; Herrick 1912**). Tromboz, kan damarındaki kan pıhtılaşması nedeniyle dolaşım sistemi boyunca kan akışının engellenmesidir. Patolojiye göre AMI, uzamış iskemi, kalbe kan akışının azalması nedeniyle miyokardiyal nekroz (hücre ölümü) olarak tanımlanır (**Thygesen ve ark. 2007**). AMI Dünya genelinde ölümlerin baş nedeni olarak kabul edilmektedir. 2008’ de bu hastalıktan ölenlerin sayısı 17,3 milyon kişiyi bulmuştur (**WHO, 2014**). Bu ölümlerin %80’ den fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde gerçekleşmiştir. Dahası, 2030 itibariyle, kardiyovasküler hastalıktan yılda 23,3 milyon insanın ölmesi beklenmektedir. Elektrokardiyogramlar (EKG) kalbin anormal ritmlerini ölçmek ve teşhis etmek için geçerli bir yöntemdir ve elektrik sinyallerini taşıyan iletken dokunun hasarının teşhis edilmesine yardımcı olur. Ancak EKG, akut miyokartlı hastaları kullanılmasına rağmen duyarlılıktan yoksundur (**Zhang ve ark. 2012**). EKG'nin birincil sınırlaması, tek bir anda sadece elektrokardiyografik aktivitenin temsil edilmesidir; bu nedenle genellikle hastanın klinik durumundaki değişikliklere bağlı olarak birçok kez yapılması gerekir (**Leisy ve ark. 2013**). İkinci sınırlama ise EKG değerlendirmesinde dalga modelini tanıma ve beklenen normal bulgularla karşılaştırma yapılmasına rağmen, son tahlilde sübjektif bir yorumdur. Üçüncü olarak, EKG, ST olmayan segment (EKG temsili kasılma dalgaları segment) yükselmesi miyokart enfarktüsü (NSTEMI) olan hastalar için yararlı değildir ve normal bulunmuştur (**Mahajan ve ark. 2011**). Son olarak, bir EKG, akut miyokardiyal iskeminin varlığını, miyokardiyal enfarktüs oluşumunu veya bir iletim bozukluğu ya da aritminin varlığını tanımlamakta yararlıdır, ancak erken koroner arter tıkanıklığının ortaya çıkması için son derece güvenilirliği düşük bir testtir. EKG ile bu sınırlamaları ve sorunları aşmak için alternatif strateji olarak, hassasiyetleri ile geçerli olabilecek potansiyel kardiyak biyobelirteçlerin kullanımıdır.

2.3. Kardiyak Biyobelirteçler

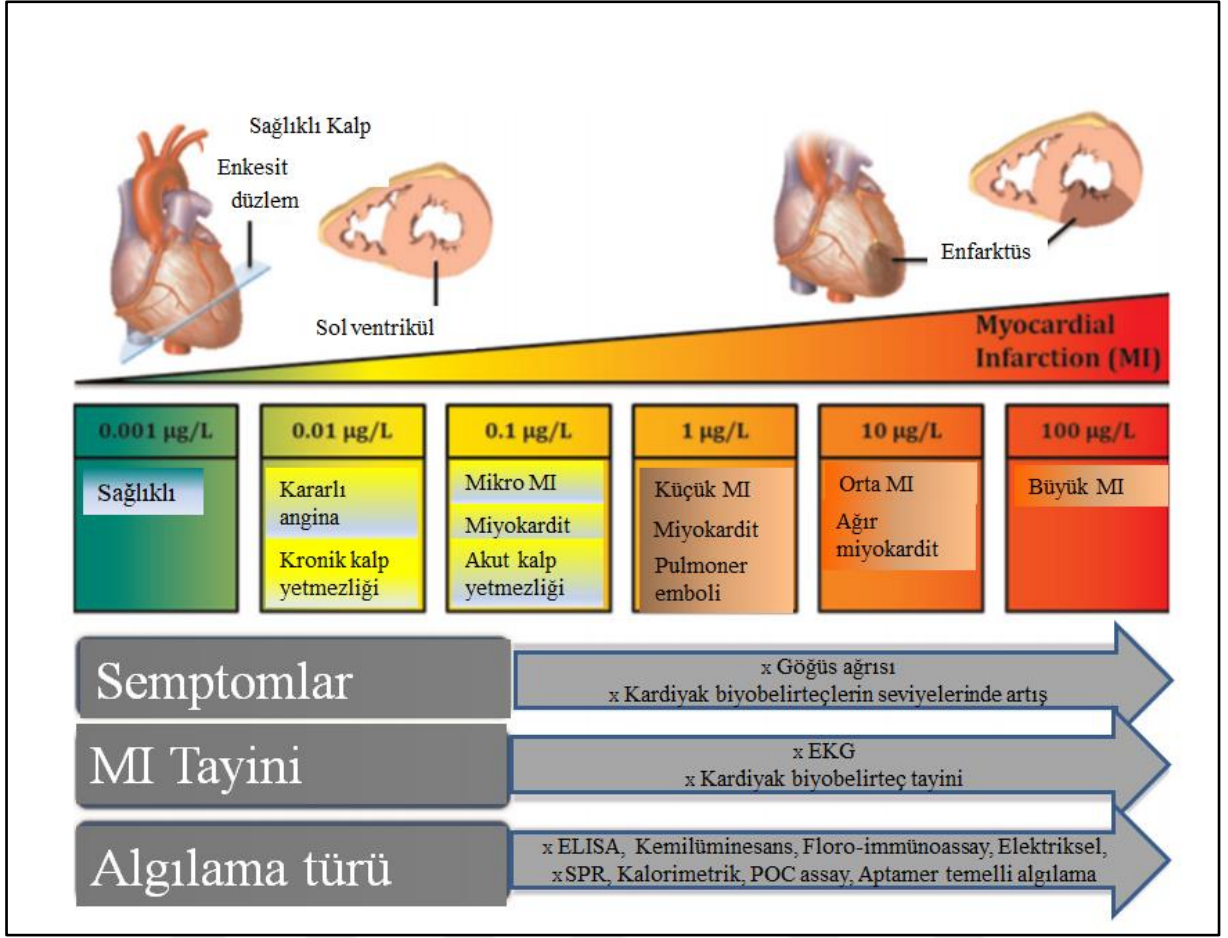
Kardiyak biyobelirteçler, AMI' nın saptanmasında ağırlıklı olarak kullanılan indikatörlerdir. Biyobelirteçlerle yapılan en eski AMI çalışması, 1954’ te glutamat oksaloasetik transaminaza odaklanılmayla başlamıştır (**Dewar ve ark. 1958**). Miyosit,

kalpteki ana hücredir ve kalbin amacı kan pompalamaktır. Bu amaçla bir kan örneğinde protein miktarının kullanılması mantıklıdır **(Rosalki ve ark. 2004)**.

Kalp hücreleri öldüğünde miyositler yeniden üretilmeyeceği için, kardiyak fonksiyonun hasar görme olasılığı yüksektir. Hücre öldüğünde, hücre içindeki biyobelirteç (en çok bilinenler; CK, CRP, miyogloblin, kardiyak troponin) proteinler salınır, sitoplazmada bulunan proteinler hücreyi zarlardan veya sabit hücre elemanlarından daha hızlı bırakır.

AMI için kardiyak troponin T (cTnT) ve kardiyak troponin I (cTnI) diğer kardiyak biyobelirteçlerden yani miyogloblin ve kreatin-kinaz MB'den daha duyarlı ve spesifik olarak kabul edilir **(Jaffe ve ark. 2010)**. Her ikisi de AMI semptomlarının başlangıcından sonra, ölüm hücresinden sırasıyla 2-4 saat ve 3-4 saat içinde salınır **(Bahadır ve ark. 2015)**. Bazı sonuçlar cTnI için elverişlidir **(De Antonio ve ark. 2013)**., ancak duyarlı cTnT ile yüksek duyarlı cTnI arasında karşılaştırma yapılmıştır **(Hetland ve ark. 1998)**. Prensipten olarak, cTnT ve cTnI kan akışında yaklaşık 10 günden fazla kalır, yaklaşık 1-2 gün miyokart hasarıyla birlikte zirveye ulaşır **(Thygesen ve ark. 2000)**. Kandaki uzun süreli salınımı nedeniyle, bu biyobelirteçler akut miyokart enfarktüsünü teşhis etmede faydalıdır **(Jaffe ve ark. 2010)**. Kardiyak troponin, kardiyak spesifik bir biyobelirteç olduğundan, iskelet kası ya da diğer organ hasarlarından kardiyak izole edilmesine yardımcı olmaktadır **(McDonough ve ark. 2004)**. Normal hastalarda, cTnI konsantrasyonu seviyesi 0.001 mg / L civarındadır, ancak MI hastalarında bu değer 100 mg / L'ye yükselmektedir **(Agewall ve ark. 2011)**. 0.01 mg/L kadar düşük bir konsantrasyon bile kalp yetmezliği ile ilişkili olabilmektedir. Kardiyak troponin için artan bir değer, bir referans kontrol grubunun %99 güvenilirliğiyle bir ölçüm olarak tanımlanmalıdır **(Thygesen ve ark. 2000)**. Her laboratuvarında referans değerler, uygun kalite kontrolüne sahip spesifik analizler kullanılarak yapılan çalışmalarla belirlenmelidir. Her bir analiz için %99 kabul edilebilir hatalı ölçüm (varyasyon katsayısı),% 10'a eşit veya daha küçük olarak tanımlanmalıdır.

Şekil 1 miyokart enfarktüsü ile ilgili genel bilgileri göstermektedir. Kardiyak troponinlerine ek olarak, troponin C (cTnC) denen başka bir biyobelirteç daha mevcuttur **(Takeda et al., 2003)**. Şekilde, aktin filaman üzerinde bulunan tropomiyosin ile birlikte 3 birim troponin kompleksi verilmiştir (troponin I, T ve C). cTnC iskelet ve kardiyak kas konsantrasyonunun kalsiyum aracılı regülasyonu için gereklidir. Ancak, cTnC' nin kardiyak yaralanma tanılarında biyobelirteç olarak cTnI ve cTnT' den daha az kullanımının sebebi, C' nin kardiyak izoformunun yavaş-twitch iskelet kaslarında da bulunmasından dolayı kardiyak bir özgüllüğü olmamasındandır.



Şekil.2.1. Miyokart enfarktüsü (MI) teşhisi. Troponin konsantrasyon düzeyi, semptomları, güncel MI saptama yöntemleri ve kardiyak biyobelirteç algılama yöntemleri

2.4. Kreatin Kinaz (CK)

Kreatin kinaz iki alt birimden (M ve B) oluşan bir enzimdir. Bu alt birleşerek üç farklı izoenzim oluştururlar. Bu izoenzimler; CK-MM, CK-MB ve CK-BB' dir. CK-BB beyin izoenzimidir ve beyinde ve birçok iç organda büyük miktarda bulunur. CK-MB ise kalbe özgü bir izoenzimdir ve birçok laboratuvarıda AMI tanısı için altın standart yöntem olmuştur. Kalp kasında büyük miktarda bulunmasına rağmen iskelet kasları ve diğer dokularda da bulunduğu için kardiyak spesifik değildir. Kalp kasının toplam CK aktivitesinin yaklaşık % 15-40'ı CK-MB'ye geri kalan kısmı büyük ölçüde CK-MM izoenzimine bağlıdır. CK-MM bir iskelet kası izoenzimi olup iskelet kaslarında en yüksek dağılıma sahiptir. Bu üç izoenzim, kolon, ileum, mide ve idrar torbasının düz kaslarında değişen konsantrasyonlarda bulunmaktadır **(Perryman ve ark. 1983)**. CK için referans aralığı erkekler için yaklaşık 80-200 IU / L ve kadınlar için ise 60-140 IU/L' dir. Bu durum, CK enziminin iskelet kaslarındaki normal döngüsünün sonucudur ve kas kütlesi ve fiziksel çalışma gibi faktörlerden etkilenir.

Bu alandaki en eski biyobelirteçlerden biri olan CK 1965 yılında miyokardiyal hasar için biyokimyasal bir işaretleyici olarak tanıtılmıştır **(Duma ve ark. 1965)**. CK, AMI tanısı için % 90'lık bir klinik duyarlılığa sahiptir ancak yüksek özgüllüğü düşüktür. CK, AMI' nin semptom başlangıcından sonra 12 saat içinde serbest bırakılır, 24-36 saatte serumda en üst seviyeye yükselir ve 48-72 saat içinde normale döner. Bu salım kinetiğinin bir sonucu olarak, toplam CK' nin ölçümü AMI' nin erken teşhisine (6 saat içinde) uygun değildir. Aynı şekilde bir belirteç olarak CK, ST-ST yükselmesi olmayan MI' lı, PCI' lı veya cerrahi operasyon geçiren hastalarda ortaya çıkabilecek miyokardiyal hasarın saptanması için de uygun değildir. Daha önce de belirtildiği gibi, AMI' nin erken teşhisi için uygun olan belirteç, yüksek bir sitoplazmik (hücre) ile vasküler (plazma) oranı, çok düşük veya saptanamayan normal plazma konsantrasyonu ve toplam kardiyak özgüllüğe sahip kalbe yapılan küçük yaralanmaların saptanmasında etkili bir belirteç olmalıdır. 200 IU/L' ye kadar yüksek bir referans aralığı ve vücutta geniş çapta dağıtılmış olan CK, orta dereceli bir sitoplazmik ile vasküler oranın 60.000: 1 olması nedeniyle bu kriterleri karşılamamaktadır. AMI tanısı için CK' nin kardiyak spesifitesini geliştirmeye yönelik hem total CK hem de CK-MB' nin (CK' nin kardiyak spesifik izoenzimi) ölçülmesi önerilmiştir. CK-MB ile CK oranının miyokardiyal yaralanma için spesifik olduğu bildirilirken, <% 6' lık bir oran iskelet kası hasarı veya kalp dışı nedenlerle uyumlu olmaktadır. Bu nedenle bazı klinik ortamlarda, toplam CK aktivitesi yükselmedikçe CK-MB testi istenmez. CK-MB ölçümü vermeden önce toplam CK' nin bir

tarama testi olarak kullanılması AMI 'li bazı hastaların gözden kaçmasına sebep olduğu için dikkatle kullanılmalıdır. Toplam CK konsantrasyonunun yüksek olmadığı AMI vakaları vardır, ancak bu hastalarda total CK-MB fraksiyonu ve CK-MB-CK oranı AMI için asıl tanıdır. Bu durum ancak, düşük kas kütesine sahip bir insanda küçük bir MI olduğunda ve toplam CK' nin başlangıç değerinin düşük olduğu koşullarda meydana gelebilir. CK' nin normal referans aralığı çok geniştir ve bu hastalar küçük miktarlarda enzim açığa çıkarabilir, bu da referans aralığının üstündeki konsantrasyonu yükseltmede yetersiz kalmaktadır. Bu olasılık göz önünde bulundurulmazsa, CK kullanıldığında tanı gözden kaçabilir. Yüksek oranda şüpheli iskemi teşhisi ile başvuran bir hastada başlangıç total CK bilinmediği sürece, düşük bir toplam CK teşhisi dışlamamalı ve CK-MB için isteklerin engellenmemesi gerekmektedir (**Van Blerk ve ark. 1992**).

2.5. Suppression of Tumorigenicity 2 (ST2)

ST2, transmembran (ST2L) ve çözünür (sST2) izoformları olan bir interlökin-1 reseptör ailesi üyesidir (**Iwahana ve ark. 1999**). Human Gene Nomenclature Database' de ST2 için onaylanmış sembol IL1RL1'dir (interlökin-1 reseptörü benzeri-1). İnsan IL1RL1 geninin kromozom 2 üzerinde bulunduğu saptanmıştır (**Tominaga ve ark. 1996**). ST2L ve sST2, alternatif promoter zincirleme ve 3' işlem ile üretilir (**Bergers ve ark. 1994**). ST2L, 3 hücre dışı IgG alanı, tek bir transmembran bölge ve bir hücre içi alanı olan membrana bağlı bir izoformdur. sST2 ise transmembran ve hücre içi alanlardan yoksundur (**Iwahana ve ark. 1999**). Şu anda, interleukin-33 daha önce var olmasına rağmen, ST2L'nin patofizyolojik rolü tam olarak anlaşılamamıştır. ST2L'nin fonksiyonel bir ligandı olarak tanımlanmaktadır (**Schimitz ve ark. 2005**). Interleukin-33 / ST2L sinyalleşmesinin birkaç dokuda önerilen fonksiyonlarına ek olarak, son zamanlarda mekaniksel aşırı yüklenme altında miyokardiyi koruyan önemli bir kardiyoprotektif mekanizmada işlev gördüğü iddia edilmiştir (**Sanada ve ark. 2007**). Bu bulgunun muhtemelen, kronik kalp yetmezliği olan hastalarda ve akut miyokart enfarktüsli hastalarda dolaşımdaki sST2 artışının daha kötü prognozu öngördüğü gözlemlerle ilgili olmalıdır (**Weinberg ve ark. 2003; Shimpo ve ark. 2004**).

Sepsis ve ardışık çoklu organ yetmezliği / disfonksiyon sendromu (MOF / MODS), kötü sonuçlarla ilişkilidir ve septik şok, yoğun bakım ünitelerinde en yaygın ölüm nedenidir (**Stone 1994**). Sepsis yanıtın immünolojik kaskadı artmış T-hücresi apoptozu, lenfopeni ve değiştirilmiş T-lenfosit alt popülasyonlarına yol açar (**Hotchkiss ve ark. 1999**). Özel tip immün yanıtı, öncü T yardımcı (Th0) hücrelerinin Th1 veya Th2 hücrelerine farklılaşmasıyla

belirlenir. Th1 hücreleri interlökin (IL) -2, interferon (IFN) -g ve tümör nekroz faktörü (TNF) - α dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinler üretir. Th2 hücreleri IL-4, IL-5, IL-13, IgG1 ve IgE salgırlar ve çeşitli hastalıkların inflamatuvar yanıtında önemli bir rol oynarlar (**Mosmann ve ark. 1996**). Th1 ve Th2 alt tipleri farklı sitokin üretim modelleri gösterdiğinden, Th1'in Th2 hücrelerine oranı sepsisin sonucu için önemli olmaktadır. Ayrıca sitokinlerin dengesinin, şiddetli sepsiste üretilen in vivo Th alt birimlerinin üstünlüğü üzerinde belirgin bir etkiye sahip olabileceği kuvvetli ihtimaller arasındadır. Dahası, Th2 antikor aracılı immün yanıtları sepsiste baskın görünmektedirler (**Ferguson ve ark. 1999; Roth ve ark. 2003**). Astım ve otoimmün hastalıklar gibi diğer nosolojik öğelerde de, benzer bir Th2 hücre tipi bağışıklık yanıtına sahip oldukları bildirilmiştir (**Mosmann ve ark. 1996**). Ayrıca T1, Fit-1 ve DER4 olarak adlandırılan ST2 proteini, yeni bir Th2 spesifik ürünüdür. ST2' ye ait çözünür ST2 (ST2), transmembran reseptör formu (ST2L) ve varyant formu (ST2 V) olmak üzere üç farklı türde gen ürünü, klonlanmıştır (**Tominaga ve ark. 1989; Yanagisawa ve ark. 1993; Tominaga ve ark. 1999**). ST2 geni başlangıçta fare fibroblast hücre çizgileri ve HA-ras onkojene duyarlı genlerdeki birincil yanıt genleri olarak tanımlanmaktaydı (**Werenskiold ve ark. 1989; Tominaga ve ark. 1999**). ST2, Ig süper familyasına ait nadir bir reseptörü kodlar ve ST2 geni, insan kromozomu üzerinde IL-1 reseptör tip I ve tip II' yi kodlayan genlere sıkıca bağlıdır (**Tominaga ve ark. 1996; Bergers ve ark. 1994; Moritz ve ark. 1998**). İnsan Geni Nomenklatur Veri Tabanı' na göre, interlökin-1 reseptörü benzeri-1 (IL1R1), çözünür ST2 için belirlenmiş sembol olup, IL1RL1-a, çözünür ST2 reseptörüdür ve IL1R1-b, ST2L'dir (**Dale ve ark. 1999**). ST2 genleri tercihen Th1 hücreleri yerine, aktive Th2 hücreleri üzerinde eksprese edilir ve IL-4, IL-5 ve IL-13 stokinlerinin yükseltilmiş ekspresyonları tarafından karakterize edilen Th2 efektör fonksiyonlarında (**Lohning ve ark. 1998**) önemli bir rol oynar (**Yanagisawa ve ark. 1997; Xu ve ark. 1998**). ST2 proteini ayrıca serum protein seviyeleri astım ve alerjik solunum yolları inflamasyonu olan hastalarda, mast hücrelerinin hücre zarları üzerinde de gözlemlenir (**Oshikawa ve ark. 2001; Oshikawa ve ark. 2002**). Fibrozis ve çeşitli otoimmün hastalıklarda da idiyopatik pulmonerde yükselmiş serum ST2 protein konsantrasyonları bulunmaktadır (**Tajima ve ark. 2002; Kuroiwa ve ark. 2001**).

2.6. Troponin T (TnT)

Troponin kompleksi, her tür çizgili kasın (hızlı, yavaş ve kardiyak) ince filamentinde (aktin) bulunmaktadır. Bu kompleksin fonksiyonu ise kasların kalsiyum bağımlı kasılmasını düzenlemektir. Üç tip troponin vardır: TnT, TnI ve TnC. Bunlar, troponin proteininin işlevine

atıfta bulunan bir harfle belirtilir; TnC kalsiyumu bağlar; TnI, enzim astomosin adenosin trifosfatazın etkisini inhibe eder; TnT ise tropomyosin'e bağlanır (**Greaser ve ark. 1973**). Bu yapılar troponinin izoformu olan yapılardır. Örneğin; cTnT, sTnT, fTnT, kalp kası, yavaş seğirme iskelet kası ve hızlı seğirme iskelet kası TnT' yi temsil eder. Kardiyak TnT daha fazla doku dağılımına ve daha serbest sitoplazmik konsantrasyona sahiptir ve diğer kardiyak troponin T-I-C ile kompleks olarak salınmaktadır. Kardiyak TnI ise ikili formda daha fazla serbest bırakılmaktadır (troponin I-C kompleksi) (**Wu ve ark. 1999**). Bu kaslardaki her troponin proteini, farklı bir moleküler ağırlığına, farklı amino asitlere ve bu kas tipine özgü bir amino asit dizisine sahiptir. TnT ve TnI' nin farklı izoformları, amino asit sekansı homolojisinin% 40-55' ini oluşturmaktadır.

Kardiyak TnT (34 KDa) ilk kez 1989 yılında AMI teşhisi için bir biyobelirteç olarak tanıtılmıştır (**Katus ve ark. 1992**). CTnT için üst sınır <0.1µg/L olarak bildirilmiştir, ancak 0.03-0.1µg/L arasındaki konsantrasyonlar da olumsuz bir sonucun belirteçleri olarak anlamlı olabilmektedir (**Muller ve ark. 1997**). Kardiyak-TnT, AMI hastalarında semptom başlangıcından 12 saat sonra serumda görülmektedir. cTnT, CK-MB ve cTnI' ye benzer salma kinetiklerini gösterir ve bu nedenle, semptom başlangıcından sonraki ilk 6 saat içinde, AMI için CK-MB veya cTnI' dan daha erken bir tespit sağlayamaz (**Gerhardt ve ark. 1993**). Dolaşımda bir kez, semptom başlangıcından sonra uzun bir süre (2-3 hafta) devam etmektedir. Dolaşımdaki cTnT' nin yarı ömrü 120 dakikadır ve bu uzun diyagnostik pencerenin, nekroz sonrası miyokardiyal hücrelerden sürekli olarak salıverilmesinden ve dolaşımdan yavaş bir şekilde temizlenmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (**Wu ve ark.1994**). AMT tanısı için cTnT' nin klinik duyarlılığı semptom başlangıcından yaklaşık 12 saat sonra % 100' e yaklaşır ve en az 4 gün boyunca% 100' de yüksek kalır (**Wu ve ark.1994**).

2.7. Kardiyovasküler Hastalıkların Erken Teşhisinde Biyosensörlerin Rolü

KVH' ın erken teşhisine yönelik biyosensörlerin kullanımı son yıllarda artış göstermiştir. Bu artış biyosensörlerin; uygun maliyetli, biyoaktif türlerin hassas tayinini mümkün kılması, seçiciliği yüksek olarak tasarlanabilmesi gibi avantajlara sahip olmasıyla yakından ilgilidir. Biyosensörlerin temel prensibi, biyoaktif türün bulunduğu ortamdaki değişikliği bir dönüştürücü yardımıyla analiz edebilmesine dayanmaktadır. Bu nedenle alternatif bir çok şekilde modifiye edilebilirler. Bu doktora tezinde de kardiyak

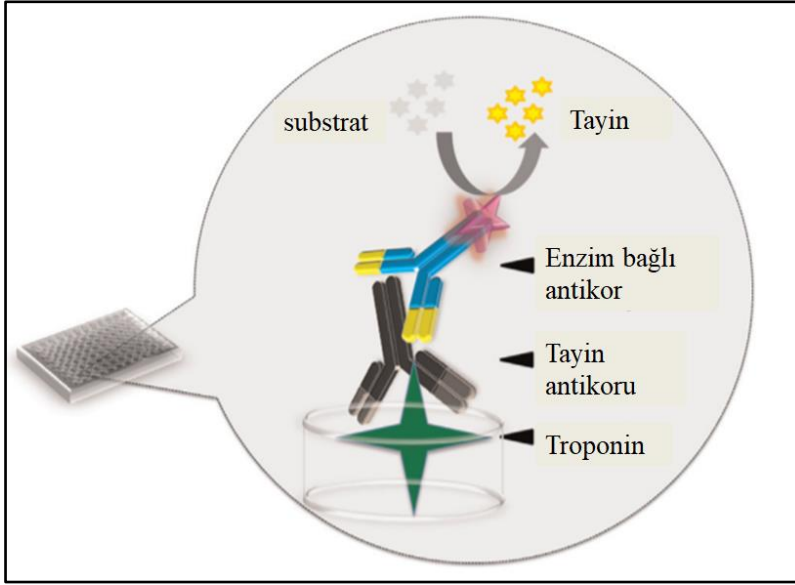
biyobelirteçlerin tayinine yönelik geliştirilen farklı biyosensör sistemlerinin çalışma prensiplerine ve örneklerine yer verilmiştir.

Bu durumda, biyosensörler kardiyak biyobelirteç etkileşimi ile ilgili hedef molekülleri tespit etmek ve ölçmek için kullanılabilir. Biyosensörler, biyolojik veya biyolojik olarak türevlendirilmiş biyoaktif türü bir fizikokimyasal dönüştürücü ile tayin edebilen cihazlardır **(Mascini ve ark. 2008)**.

Genel olarak, bir biyosensörün dönüştürücü yüzeyi, ya elektrokimyasal **(Gomes-Filho ve ark. 2013; Horak ve ark. 2015)**, optik **(He ve ark. 2013; Leung ve ark. 2013, 2015; Lu ve ark. 2014)**, kütle değişimi (piezoelektrik/akustik dalga) **(Lee ve ark. 2013)** ya da ölçülebilir biyokimyasal sinyalin elektrik sinyaline **(Qureshi ve ark. 2012)** dönüştürülmesini sağlayan bir biyolojik reseptör materyali (DNA, RNA veya antikor) ile immobilize edilir. Ayrıca, EKG gibi geleneksel tekniklerle kıyaslandığında, biyosensörler yüksek hassasiyet, yüksek seçicilik, hızlı analiz, güvenilir ön işlem ve basit enstrümantasyona sahiptirler **(Bahadır ve ark. 2015)**. Enzim bağlı immünosorbent assay **(De Antonio ve ark. 2013)**, kemilüminesans immünoassay **(Cho ve ark. 2009)**, floro-immünoassay **(Hayes ve ark. 2009)**, elektriksel tayinler **(Tuteja ve ark. 2014)**, yüzey plazmon rezonans (SPR) temelli tayin **(Liu ve ark. 2011)**, kalorimetrik protein düzeni **(Wu ve ark. 2010)**, POC assayler **(Dittmer ve ark. 2010)**, ve Aptamer temelli biosensör içeren kardiyak troponin tayini ve ölçülmesi için farklı yöntemler geliştirilmiştir.

-Enzim-bağlı immünosorbent yöntemi (ELISA)

ELISA, belirli bir örnekte antijenin (proteinler, peptitler, hormonlar, vs.) veya antikorun varlığını tanımlamak için antikorları ve enzim aracılı bir renk değişimini kullanan bir biyokimyasal analizdir **(Gan ve ark. 2013)**. Spesifik antikora bağlanan bir antijen bağışıklığının temel kavramları kullanılarak çok küçük miktarlarda antijenlerin saptanmasına izin verilir ve MI' yı teşhis etmek için kardiyak troponinin saptanmasında uygulanmıştır. ELISA ile ilgili ilk makale 1971 yılında Engvall ve Perlmann tarafından, etiket olarak alkalın fosfataz kullanılarak tavşan serumunda IgG' nin kantitatif ölçümü üzerine basılmıştır. ELISA yönteminde , antijenin kendine özgü bir antikora bağlanması sağlanır, daha sonra bir kromojen ile reaksiyona giren ikincil, enzim ile bağlanmış bir antikor tarafından tespit edilir. Antijenin varlığı, enzim için kromojenik bir substrattan görünür bir renk değişimi veya floresan üretimi ile gösterilir. Bu renk değişimi antijeni tespit etmek için niceliksel veya niteliksel olarak ölçülebilir. Şekil.2.2' de ELISA yönteminin tayin prensibi şematik olarak gösterimi yer almaktadır.



Şekil.2.2. Antijen tayini için ELISA yönteminin prensibi

-Kemilüminesans immünoassayler

Kemilüminesans (CL), bir molekül uyarılmış bir halde bir foton yaydığı zaman (enerji kimyasal reaksiyonla üretilir) gerçekleşen ışık yayılımını temsil etmek için kullanılan bir terimdir (**Dodeigne ve ark. 2000**). CL sistemleri immünorekasyonlarla birleşmesiyle, kemilüminesans immünoassays (CLIA) olarak adlandırılan kimyasal reaksiyonun, lüminesansın yoğunluğuna göre numunelerin konsantrasyonlarını belirleme yöntemi haline gelmiştir (**Pei ve ark. 2013**). Sistem, CL substratlarının, yani luminol, isoluminol ve bunların türevlerinin, akridinyum esterinin, türevinin, peroksidazın ve alkalın fosfatazın (ALP), CL etiketleri olarak görev yapan bazı reaktiflere katılmasıyla CL' yi oluşturmaktadır (**Wang ve ark. 2012**). CLIA' daki proteinleri etiketlemek için, en yaygın kullanılan etiketleme enzimleri, yabanturpu peroksidaz (HRP) ve ALP' dir. CL' yi ilk kez 1976 yılında CL, Schroeder ve arkadaşları yarışmalı protein bağlanma reaksiyonlarını izlemek için immüno-analizde bir etiket olarak kullanılmışlardır (**Schroeder ve ark. 1976**).

- Flüoresan immünoassayler (FI)

Flüoresan immünoassayleri (FI), homojen ve heterojen analizlerde karmaşık moleküllerin sinyal transdüksiyonunu içeren optik biyosensörlerin sınıflandırmasından biridir (**Qureshi ve ark. 2012**). FI, zararsız, yüksek derecede hassas karakteristiklerine ve biyomoleküllerin floresan etiketleriyle değiştirilmesinde kolaylık sağladığı için tercih

edilmektedir. Floresin izotiyosiyanat, rodamin, kumarin ve siyanin gibi floresan etiketler, etiket veya biyo-tanıyıcı olarak kullanılırlar. Hedef moleküllerin varlığı, floresan sinyalinin değişmesi ile gösterilmektedir. Tayin sınırı, tek bir moleküle kadar aşırı derecede hassastır **(Fan ve ark. 2008)**. FI için, Song ve arkadaşları (2011), cTnI tespiti için bir floro-mikrobead temelli çip (FMGC) temelli sandviç immüno-assay geliştirmişlerdir. FMGC, doğrudan immünosensör olan bölgeye bağlanan tane sayısını saymak için bir floresan mikroskobu kullanma yeteneğine sahiptir. Antikoron floro-mikroplara konjugasyonu, tayin komponenti olarak hazırlanmaktadır. Antijen-antikor bağlama sinyalini arttırmak için avidin-biyotin afinite etkileşimi kullanılmıştır. Optik sinyal, 0.1–100 mg/L cTnI içeren plazma örneklerinde cTnI konsantrasyonları ile doğrusal bir korelasyon göstermiştir.

- Elektriksel tayinler

Taşınabilirlik olmayışı, geç tayin süresi ve üretim sürecinin yüksek karmaşıklığı **(Kong ve ark. 2012)**. gibi immüno-analiz etiketli yöntemin sınırlamalarının üstesinden gelmek için, biyo-moleküler etkileşim geliştirmesinin elektriksel tespiti oldukça faydalıdır çünkü düşük maliyetli taşınabilir sensör ve herkes tarafından kullanılabilir **(Estrela ve ark. 2009)**. Elektriksel tayin, moleküler bağlanma olayını kullanılabilir bir elektrik sinyaline dönüştürerek gerçekleştirilir **(Zhang ve ark. 2012)**. Boyutları çok küçük olan kimyasal ve biyolojik türleri algılamak için, araştırmacılar, nanoteller (NWs), nanokemerler, karbon nanotüpler (CNTs), grafen ve biyoensitizasyon için nanopartiküller gibi nanoyapıların üzerinde yoğunlaşmışlardır. Elektriksel tayin yöntemi, yakın zamandaki tartışmalı tanıya ilişkin daha fazla sayıda yayın ile kanıtlanmış ve son yıldaki ana ilgi odağı olmuştur.

-Yüzey plazmon rezonansı (SPR)

SPR, örneğin bir metal ve bir dielektrik gibi, karşıt işaretlerin dielektrik sabitleri ile iki ortamın ara yüzünde mevcut olabilecek bir yük yoğunluğu salınımdır **(Homola ve ark. 1999)**. İnce bir metal filmin yüzeyi, gelen bir ışık demeti (belirli bir açıda uygun bir dalga boyuna sahip) ile uyarıldığında, bu olay, bir evanesan elektromanyetik alan oluşturur ve zıt yüklü dielektrik sabitlerin iki ortam arasındaki ara yüzeyde meydana gelen bir yük yoğunluğu salınımı olarak tarif edilir. Ara yüzde, toplam iç yansıma koşulları altında üretilen evanesan en güçlü olan alandır, fakat yüzeyden penetrasyon mesafesi arttıkça bu alan azalmaktadır. SPR, dönüştürücü yüzeyinde meydana gelen, sadece yüzeyde sınırlı moleküler etkileşimlerin tayinini desteklemektedir **(Dutra ve ark. 2007)**.

-Kalorimetrik tayin

Kolorimetrik tespit, kromojenik boyaların hedefi tanımak için kullanılan başka bir optik biyosensör sınıfıdır **(Qureshi ve ark. 2012)**. Hedef moleküllerin varlığı, renk değişimlerinin yoğunluğu ile sunulmaktadır. Bu yöntem için tayin sınırı, tek bir molekül tespitine kadar daraltılabildiği için hassas bir teknik olarak kabul edilmektedir **(Fan ve ark. 2008)**. Wu ve arkadaşları (2010), cTnI için gümüş ile zenginleştirilerek kolorimetrik tayin ile birleştirilmiş bir Poli (dimetilsiloksan) (PDMS) –gruplu nanopartiküller (AuNP) kompozit film bazlı biyosensör geliştirmişlerdir **(Wu ve ark. 2010)**.

-Point-of-care assayler

Yukarıda belirtildiği gibi cTnI ve cTnT tespiti için kullanılan birçok çeşit immüno-düzenleme yöntemi bulunmakla birlikte, bu yaklaşımlar zaman alıcıdır ve genellikle etiketli reaktifler ve büyük enstrümantasyon gerektirmektedir **(Bhalla ve ark. 2012)**. Bu amaç için, MI tanısını desteklemek için ELISA, floresan, kemilüminesans ve diğer teknolojilere dayanan bir dizi POC analizi geliştirilmiştir. Genel olarak cTnI veya cTnT' nin kantitatif ölçümünün sağlanması ve POC sistemlerinin duyarlılığının klinik laboratuvarındaki otomatik platformların sağladığı sonuçlardan daha kötü sonuçlar olmaması gerekmektedir **(Bingisser ve ark. 2012)**. Her ne kadar daha yüksek hassasiyetli POC analizleri mevcut olsa da, dikkate alınması gereken önemli dezavantajlar vardır bunlar özellikle, laboratuvar hizmetleri, hizmet-ücret esasına göre çalıştırıldığında kullanıcı ile ilgili pratik sorunlar (ör. eğitim, bakım, akreditasyon) olarak düşünülebilir **(Bingisser ve ark. 2012)**.

-Aptamer

Hedefe yüksek afinitesi olan nükleik asit ligandları, “ligandın üslu zenginleştirmeyeyle sistematik evrimi” (SELEX) olarak adlandırılan in vitro tarama sürecinin kurulmasıyla Tuerk ve Gold (1990) tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacılar özellikle tanı ve hastalık yönetimi uygulamaları alanında aptamerlere büyük ilgi duymuşlardır. Aptamerler antikorlardan daha geniş çeşitlilikte hedeflere bağlanabildiği gibi, üretilmesi ve depolanması da daha kolaydır **(MacKay ve ark. 2014)**. Antikorlar biyosensör gelişmelerinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, aptamerler antikorlardan daha küçük boyutları sayesinde ayrıca kararlı ve yapısal anahtarlama yapabildikleri için özel algılama sağlarlar **(Lee ve ark. 2008; Gopinath ve ark. 2011)**.

2.8. Biyosensörlerin Tasarlanmasında Kullanılan Yenilikçi Materyaller

Bir biyosensör tasarlanırken dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır. Bunlar özetle; biyolojik tayinin gerçekleşeceği yüzeyde kullanılacak materyalin modifikasyona elverişli olması, maliyetinin düşük olması, gerçekleşecek reaksiyonlarda oluşabilecek olumsuzlukları bertaraf ederek analizin hassasiyetini zedelememesi, uzun süreli kullanım ve depolamaya uygun olması, tekrar kullanılabilirlik yetisinin yüksek olması şeklinde sıralanabilir.

Yukarıda bahsedilen tüm bu özelliklerden yola çıkarak, doktora tezi geliştirilirken hem kardiyak biyobelirteçler için gerçek manada hassas, seçici ve en önemlisi gerçek serumda spesifik olduğu türe karşı yanıt verebilmesi, hem de tüm bunları yapabilecek sensörün dizaynında yenilikçi materyallerin kullanılması sayesinde literatüre katkı sağlamak gayesi güdülmüştür.

Bu sebeple doktora tezi kapsamında gerçekleştirilen kardiyak biyobelirteçleri için tasarlanan biyosensörlerin immobilizasyonunda, kararlı bir yüzey oluşturmak için mükemmel bir yol olan SAM tabakaları ile elektrot yüzeyi modifiye edilmiştir. SAMs' in en önemli yeniliği; farklı materyallerin fonksiyonel uç gruba kovalent bağlanma gerçekleştirmesi sayesinde, kimyasal veya biyolojik reaktif yüzey tabakalarda modifiye edilebilmesidir. SAM' lerin bu kullanımı, çeşitli hassas uygulamalar için gerekli spesifik etkileşimleri sağlayabilir.

Bunun için her iki ucunda da fonksiyonel grup içeren 6- merkaptto hekzanol (6-MH) bileşiğini kullanarak altınla tiyol bağı yaparken diğer ucundaki hidroksil grupları sayesinde silanlama işlemi gerçekleştirilebilmiştir.

Yüzey modifikasyon teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılan kendiliğinden oluşum (Self-assembly-SA) tekniğidir. SA tekniği, özellikle SAM' lar, son zamanlarda yaygın bir şekilde çalışılmaktadır. SA, yüzey modifikasyonu konusunda avantajlar sağlayan bir çeşit “dipten yukarı” tekniğidir. Bu teknik, termodinamik dengeye yakın ya da termodinamik dengede yapıların oluşmasına ve yüzeyde yakın olarak paketlenmiş, düzenli ve kararlı bir konfigürasyonu oluşmasına öncülük etmektedir. SAM' lar hem moleküler hem de materyal düzeyinde, ihtiyaç duyulan dizayn esnekliğini sağlar ve 2 ya da 3 boyutlu substratlar üzerinde, spesifik ya da kompleks ara yüzeylerin fabrikasyonu için bir araç sunmaktadır. SAM' ların kullanımıyla, bu tabakaların daha ileri süreçlerde, farklı materyallerin fonksiyonel gruplara kovalent olarak bağlanmasıyla, kimyasal ya da biyolojik olarak reaktif

olan yüzeysel tabakalara modifikasyonu mümkün olmaktadır. Çeşitli fonksiyonları tespit etmek amacıyla SAM' ların kullanımı, çeşitli duyarlılık uygulamaları için spesifik olan etkileşimler sağlayabilir. Pratikte, elektrotlar üzerinde SAM' lar hazırlanırken, çoğaltılabilir ve istenen fonksiyonel karaktere sahip organik ara yüzeylerin elde edilmesinde birçok deneysel koşulun etkisi söz konusudur. Elektrotların temizliği, çözücü seçimi ve sıcaklık gibi bazı parametrelerin, SAM' lerin yapıları ve özellikleri üzerinde etkilerinin büyük olduğu bilinmektedir. Tiyoller, altın, gümüş, platin ve bakır gibi metallerin yüzeyine çok sağlam bir şekilde koordine olurlar. Kendiliğinden oluşan tek tabakanın yapısı, metalin morfolojisine çok bağlıdır. Voltametrik çalışmalar, tiyol gruplarının adsorpsiyon sonrasında deprotonlandığını göstermektedir **(Wang 2000)**.

Bir diğer yenilikçi materyal olarak bir silanlama ajanı 3- glisidoksi propil trietoksilan (GOPE) tercih edilmiştir. Literatürde de çok kısıtlı bilgiye sahip olan bu yenilikçi materyal hidroksilli yüzeyin immobilizasyonu için herhangi bir çapraz bağlayıcıya ihtiyaç duymaksızın yüzeye antikorun bağlanmasını mümkün kılmaktadır. Bu sayede sensör hazırlık aşamalarındaki uzun ve yorucu proselere gerek bırakmayan bu ajanla geliştirilen CK sensörünün literatürde de öne çıkması beklenmektedir.

Kardiyak sensörlerin tasarımında tercih edilen yenilikçi materyallerden fulleren C₆₀' ta oldukça kararlı karbon yapısıyla öne çıkmaktadır. Mükemmel karbon dizilimiyle bilim insanlarının dikkatini cezbetmiş fulleren C₆₀ yüzey immobilizasyonlarında da kullanılarak yüzeyin reaksiyona girme eğilimini arttırmıştır **(Demirbakan ve Sezgentürk 2016)**.

Biyosensörlerin geliştirilmesi sırasında kullanılan materyallerin maliyeti de önemli bir sorundur. SPE, GCE, katı Au elektrot gibi pahalı elektrotlarla tasarlanan biyosensörler analizin pratikte kullanımının önüne set koyan bir durumdur. Bu sorunun çözümüne yönelik daha uygun, tek kullanımlık ve yüzey modifikasyonuna elverişli elektrotlarla çalışılmıştır.

En yaygın olarak kullanılan şeffaf iletken oksit ince filmlerden biri olan indiyum kalay oksit (ITO), iki ana özelliği nedeniyle biyosensörler, düz paneller ve fotovoltaikler gibi farklı teknolojileri geliştirmek için umut verici bir malzemedir. Bu özellikler iyi elektriksel iletkenlik ve optik şeffaflıktır **(Khan 2016)**.

ITO, iyi optik saydamlık, geniş çalışma penceresi, yüksek elektriksel iletkenlik, substrat yapışma, düşük kapasitif akım ve kararlı elektrokimyasal ve fiziksel özellikler gibi

benzersiz özellikleri sayesinde biyosensör çalışmalarında yoğun olarak kullanılan mükemmel bir materyaldir **(Tang ve ark. 2006)**.

GP mükemmel esneklik ve pürüzlülük yüzeyi sayesinde, redoks gibi elektrokimyasal enerji dönüştürme ve depolama cihazları akü **(Yao ve ark. 2012)**, mikrobiyal yakıt hücreleri **(Kim ve ark. 2007)** ve süper kapasitör gibi daha geniş çapta kullanılmasına olanak sağladığı için oldukça faydalıdır.

2.9. Kaynak Araştırması

Sharma ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada kan serumunda CK-MM tayinine yönelik elektrokimyasal temelli kalorimetrik bir biyosensör sistemi geliştirmeyi amaçlamışlardır. Sensörün temeli, ATP varlığında altın nanopartikül ile sisteaminin kimyasal etkileşimiyle gerçekleşen immobilizasyonuna dayanmaktadır. Çalışmanın sonunda araştırmacılar geliştirilen biyosensör sisteminin 0,5617-5617 ng/mL aralığında ve 0,569 ng/mL tayin sınırında yüksek hassasiyete sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir **(Sharma ve ark. 2018)**.

Palladino ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada TnT' nin tayini için afinite bazlı bir biyosensör geliştirmişlerdir. TnT proteininin varlığında dopamin çözeltisi kullanılarak altın kaplanmış temiz SPR (yüzey plazmon rezonansı) yüzey üzerinde dopaminin polimerik filmleri oluşturulmasıyla sensörde geliştirilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmayla ilk kez miyositlerin hasarı üzerine kan dolaşımındaki kardiyak dokulardan salınan kardiyak biyobelirteci TnT için epitop baskılı biyosensör geliştirdiklerini belirtmişlerdir **(Palladino ve ark. 2018)**.

Lu ve arkadaşları 2016 yılında CK tayininde amorf indiyum çinko oksit (amorf-IGZO) ince film transistör biyosensörlerin uygulamasına yönelik çalışma gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar titanyum depolanarak üretilen amorf-IGZO film transistörlerinin, CK' nın tayini için büyük bir potansiyele sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir **(Lu ve ark. 2016)**.

Kucherenko ve arkadaşları 2015 yılında glukoz oksidaz ve heksokinaz temelli amperometrik biyosensör kullanarak kan serumunda CK' nın toplam aktivitesinin belirlenmesine yönelik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada platin disk elektrotlardan yararlanılmışlardır. Araştırmacılar çalışmanın sonunda elde ettikleri kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak kandaki CK oranına göre dakikada gerçekleşen ATP sentezinin oranının hesaplanabileceğini ileri sürmüşlerdir **(Kucherenko ve ark. 2015)**.

Brunner ve arkadaşları 2004 yılında sepsis ve travma durumundaki hastalarda ST2 proteini ve immünglobulinin (IgG1) seviye artışlarını araştırmaya yönelik bir çalışma yapmışlardır. ELISA testiyle belirlenen sonuçlara göre ST2 serum seviyesinin septik hastalarda 8420 ± 2169 pg/mL, travma durumundaki hastalarda ise 2936 ± 826 pg/mL olduğunu rapor etmişlerdir. Bu rapora göre, kritik kardiyovasküler hastalıklara sahip bireylerin kan serumundaki ST2 seviyesinin belirgin oranda azalma yaşadığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir **(Brunner ve ark. 2004)**.

Liu ve arkadaşları 2007 yılında toplam CK' nin tayini için tek kullanımlık trienzim elektrot temelli amperometrik bir biyosensör sistemi geliştirmişlerdir. Araştırmacılar geliştirilen biyosensörün, çalışma elektrodunun Os (II/III) içeren redoks polimeriyle modifiye edilerek tasarlandığını belirtmişler ve biyosensör sisteminin 10,01-2748,05 U/L aralığında tayin gerçekleştirebildiğini ileri sürmüşlerdir **(Liu ve ark. 2007)**.

Barrett ve arkadaşları 2015 yılında ultra hassas nanogörüntülemeyle TnT' nin tayinini gerçekleştirmeye yönelik bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada EIS tekniğini kullanan araştırmacılar biyosensör sisteminin 73-1800 ng/L aralığında ve 0,0088 ng/L tayin sınırında ölçüm yapabildiğini ispatlamışlardır **(Barrett ve ark. 2015)**.

Gomes-Filho ve arkadaşları 2013 yılında kardiyak TnT için karbon nanotüp temelli elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmişlerdir. Çalışma, altın yüzeyin yüksek katyonik bir polimer olan polietileniminle kaplandıktan sonra çift duvarlı karbon nanotüple yapılan amit bağlarıyla immobilize edilmesine dayanmaktadır. Araştırmacılar, geliştirilen sensörün tayin aralığının 0,1-10 ng/mL , tayin sınırının ise 0,033 ng/mL olduğunu belirterek TnT' nin akut miyokart enfarktüsü tanısı için kullanılabilir olduğunu iddia etmişlerdir **(Gomes-Filho ve ark. 2013)**.

Pawula ve arkadaşları 2016 yılında akut miyokart enfarktüsü için TnT' nin SPR analizine yönelik çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada elektrot yüzeyini AuNP ile modifiye etmişlerdir. Araştırmacılar biyosensörün tayin aralığının 0,5-40 ng/mL, tayin sınırının da 0,05 ng/mL olarak belirlendiğini ve geliştirilen immünosensörün iyi bir tekrar üretilebilirliğe ve tekrar kullanılabilirliğe sahip olduğunu öne sürmüşlerdir **(Pawula ve ark. 2016)**.

Jiang ve arkadaşları 2018 yılında kardiyak TnT' nin hassas tayini için Ag@SnO₂' in kendiliğinden hızlanan elektrokemilüminesans (ECL) emitörlerini kullanmışlardır.

Araştırmacılar, elektrot yüzeyinde AgNP' lerin modifikasyonu ile geliştirdikleri sensörün 1fg/mL- 100 pg/mL tayin aralığında ve 0,11 fg/mL tayin sınırında iyi kararlılıkta ve mükemmel seçicilikle TnT' nin tayinini yapabildiklerini iddia etmişlerdir **(Jiang ve ark. 2018)**.

Barbara ve arkadaşları 2013 yılında kardiyak TnT' nin etiketsiz tayini için karbon nanotüp SPE' lerle bir çalışma yapmışlardır. Diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak geliştirilen biyosensör sisteminin tayin aralığının 0,0025 – 0,5 ng/mL, tayin sınırının ise 0,0035 ng/mL olduğunu ileri süren araştırmacılar tasarlanan biyosensörün yüksek tekrar üretilebilirliğe de sahip olduğunu belirtmişlerdir **(Barbara ve ark. 2013)**.

Weinberg ve arkadaşları 2003 yılında kalp yetmezliği olan hastalarda nörohormonal aktivasyon için ST2' nin yeni bir biyobelirteç olduğunu kabul etmişlerdir. Serum içerisinde ST2 seviyesindeki değişikliğin takibinde mortalite veya transplantasyonun bağımsız bir ön gördürücüsü olduğunu ileri sürmüşlerdir **(Weinberg ve ark. 2003)**.

Cai ve arkadaşları 2014 yılında soyulmuş GP elektrot temelli askorbik asit (AA), dopamin (DA) ve ürik asidin (UA) elektrokimyasal tayinini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada EIS, CV, DPV ve SEM görüntüleme tekniklerinden yararlanıldığını kaydetmişlerdir. AA, DA ve UA' ya ait kalibrasyon grafiklerinin tayin aralıklarının sırasıyla 20–400 M (LOD : 2,0 M), 0,5–35 M (LOD : 0,01 M), 0,5–35 M (LOD : 0,02 M) olarak belirlendiğini rapor etmişlerdir **(Cai ve arkadaşları 2014)**.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kardiyovasküler biyosensörlerin tasarımında kullanılan kimyasallar

CK, ST 2 ve TnT tayinine yönelik biyosensörler tasarlanırken kullanılan kimyasal ve materyaller aşağıda belirtilmiştir.

- GP (grafit kağıt) kullan-at tabakanın özelliklerine ait veriler sırasıyla; kalınlık: $0,3 \pm 0,01$ mm, boyut: 210 x 210 mm, yoğunluk: $0,78 \text{ g/cm}^3$, elektrik direnci: $3 \text{ m}\Omega/\text{cm}^2$, gözenek: % 75, hava direnci: $< 12 \text{ mm H}_2\text{O}$, bükülme yarıçapı: $> 10 \text{ cm}$ şeklindedir. Çalışma elektrodu ölçüleri: 2 x 0,5 cm. (Firma: Xiamen Tob New Energy Technology, Co. Ltd, Fujian, China)
- KCl ile doygunlaşmış 3 M Ag/AgCl referans elektrot (Firma: iBAS, Warwickshire, UK)
- Karşıt elektrot olarak kullanılan 10 cm uzunluğunda platin tel (Firma: iBAS, Warwickshire, UK)
- Gold (III) chloride trihydrate (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 6- merkapttohekzanol (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3- glisidoksi propil trietoksilan (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Fareden üretilen Monoklonal Anti-Creatine Kinase BB antikoru (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tavşan kasından elde edilmiş Creatine Kinase (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Bovine serum albümin (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Fullerene C_{60} (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- % 95-98 ACS agent sülfürik asit (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-(3- dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC) (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-hydroxysuccinimide (NHS) (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tavşandan üretilen Anti-Suppression of Tumorigenicity 2 antikoru (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- PrEST Antigen IL1RL1 (ST 2) (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- % 37 ACS agent hidroklorik asit (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Fareden üretilen Monoklonal Anti-Troponin T antikoru (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- İnsan kalbinden elde edilmiş Troponin T (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Potasyum mono bazık/dibazık (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Çözücüler; etanol, toluen, aseton (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Potasyum ferrisiyanat, potasyum ferrosiyanat (Firma: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kullanılan tüm sarf malzemeler Interlab Lab. Ürün. San ve Tic. A.ş'den tedarik edilmiştir. İmmobilizasyon ve ölçüm esnasında kullanılan tüm çözeltiler, deneyler esnasında taze olarak hazırlanmıştır. Tüm antikor ve antijenler belirlenen konsantrasyonlarda porsiyonlara ayrılarak çalışılana dek -20°Cde muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kardiyovasküler biyosensörlerin tasarımında kullanılan cihazlar

Kardiyovasküler hastalıkların erken teşhisine yönelik biyosensörler geliştirilirken kullanılan tüm cihaz aşağıda verilmiştir.

- Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS), Döngüsel Voltametri (CV) ve Kare Dalga Voltametrisi (SWV) yazılımları ve analiz programı (Echem Analyst) içeren Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 600 ve Interface 1000 (Firma: Gamry Instruments, Warminster, USA)
- Ultra saf su (18,2 MΩ/cm) cihazı (Elga LC134, Veolia Water Technologies, USA)
- Ultrasonik banyo (JEIOTECH)
- Isıtıcıli manyetik karıştırıcı
- pH metre (HANNA INSTRUMENT), (INOLAB)
- Hassas Terazî (RADWAG), (SHIMADZU ATX224)
- Mikropipetler (ISOLAB)
- Vorteks (VELP SCIENTIFICA ZX3)

3.2. Yöntem

3.2.1. Elektrokimyasal ölçümler

Grafit kağıt elektrota uygulanan bütün immobilizasyon işlemleri ve optimizasyon adımlarının takibi için döngüsel voltametriden (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisinden (EIS) yararlanılmıştır.

CV için potansiyel aralık -0,5 - 1 V arasında seçilmiş olup (adım büyüklüğü: 10 mV, tarama hızı: 100 mV/s) ölçümler 0,1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir.

Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 10 mV alternatif akımda gerçekleştirilmiştir. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltametredeki ile aynıdır. İmpedans spektrumları 10.000 – 0.05 Hz aralığındadır.

Kare dalga voltametrisi için belli potansiyel aralık seçilmiş olup (frekans: 25 Hz, genlik (pulse size): 25 mV, denge zamanı: 2 saniye) ölçümler aynı prob içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Elektrot yüzeyinin altın (Au) kaplanmasında CV için potansiyel aralık -0,2 / -1,3 V seçilmiş olup (adım büyüklüğü: 10 mV, tarama hızı: 50 mV/s, döngü sayısı: 10) ölçümler 15 mL fosfat tamponunda (pH: 7.0) gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca tüm ölçümler 25 °C’de sabit sıcaklıkta, reaksiyon hücresinde gerçekleştirilmiştir.

3.3. Creatine Kinase Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemi

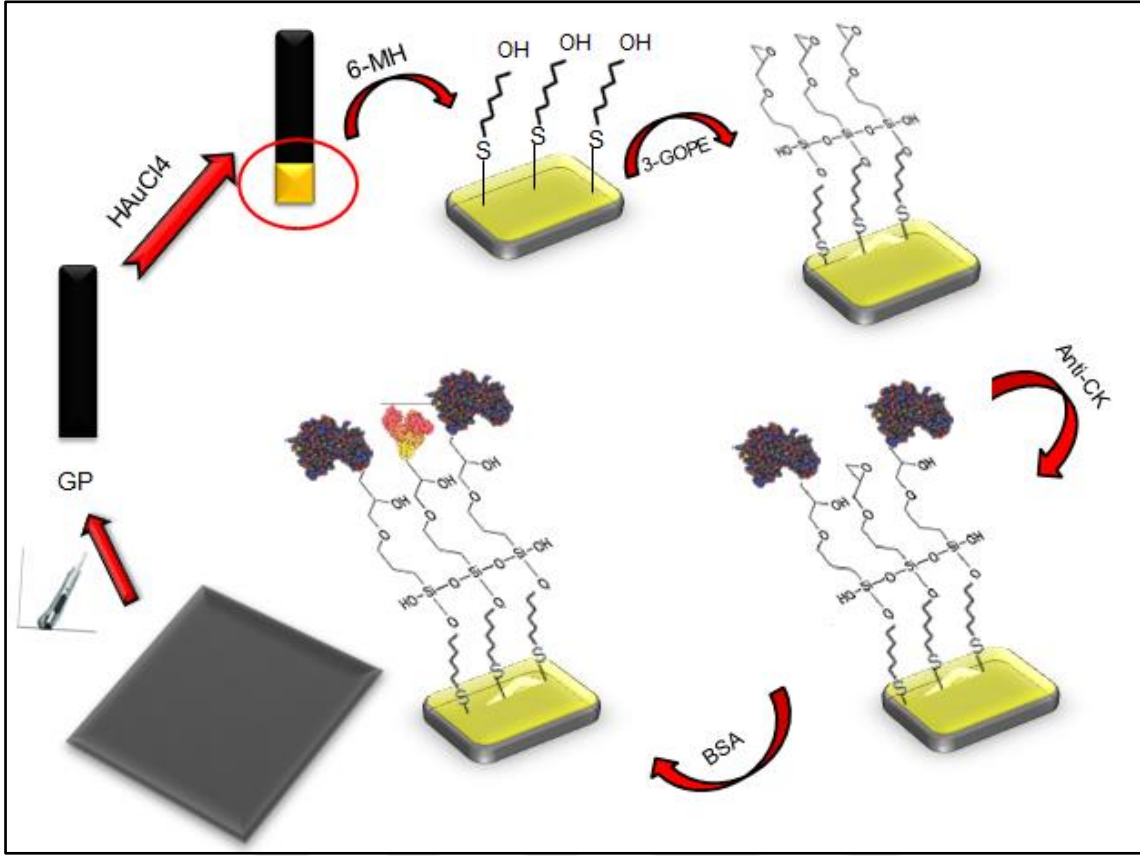
3.3.1 CK biyosensörünün fabrikasyonu ve immobilizasyon adımları

CK biyosensörünün hazırlık aşamasındaki ilk adım, her bir elektrot yüzeyinin temizlenmesidir. Bu işlem için yalın GP elektrotlar sırasıyla etanol ve ultra saf su içerisinde 5 dakika ultrasonik banyoda sonike edilip hemen ardından saf argon gazından geçirilerek kurutulur. Temizlenen elektrot yüzeyinde tasarlanan immobilizasyonun gerçekleşebilmesi için gerekli olan altın yüzeyi oluşturmak üzere GP elektrotlar, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan $HAuCl_4.3H_2O$ (1 mM) çözeltisi içeren elektrokimyasal hücreye daldırılmıştır. Yüzeyde altın nanopartiküllerin (AuNP) elektrokimyasal olarak biriktirilmesi

olan bu işlem; -0,2 V / -1,3 V potansiyel aralıkta, 50 mV/s tarama hızında ve döngü sayısı 10 olarak gerçekleştirilmiştir (Ma, Di ve ark. 2009).

- CK biyosensörünün immobilizasyon adımları

GP elektrot yüzeyleri altın nanopartikülle kaplandıktan sonra etanol içerisinde hazırlanmış 6- merkaptto hekzanol (MH) çözeltisinde SAMs oluşturmak için gece boyu (16 saat) karanlık ortamda inkübasyona bırakılır. Bu inkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra GP elektrotlar ilk olarak kendi çözücüsünden daha sonra da ultra saf sudan geçirilerek yıkanır ve saf argon gazıyla kurutulur. Daha sonra GP elektrotlar, MH sayesinde yüzeyde oluşan aktif hidroksil gruplarıyla (-OH) SAMs oluşturmak için toluen içerisinde hazırlanan 3-gliseridoksipropiltrietoksisilan (GOPE) çözeltisine daldırılarak gece boyu inkübasyona bırakılır. Her inkübasyon işleminden sonra olduğu gibi ultra saf su ile yıkanarak saf argon gazıyla kurutularak EIS-CV ölçümleri alındı. CK biyosensörünün tasarımında SAMs tabakaları oluşturulmuş bu elektrotlar artık antikorların kovalent immobilizasyonuna hazırdır. Elektrotlar Anti-CK çözeltilerine daldırılır ve inkübasyona (45 dakika) bırakılır. Açık uçları bloklamak için tek kullanımlık GP elektrotlara % 0,5'lik BSA çözeltisinde inkübasyon işlemi uygulanır (1 saat) ve yıkanıp kurutulan elektrotların CV-EIS ölçümleri alınır. İmmobilizasyonun bu son adımından sonra, hazırlanan biyosensör, CK ölçümleri gerçekleştirilene kadar + 4 ° C'de muhafaza edilir. CK biyosensörüne ait immobilizasyon adımları (GP, GP/MH, GP/MH/GOPE, GP/MH/GOPE/anti-CK, GP/MH/GOPE/anti-CK/BSA) Şekil 3.1' de şematik olarak sunulmuştur.



Şekil.3.1. CK biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi

3.3.2. CK biyosensörünün optimizasyon adımları

3.3.2.1. 6-MH konsantrasyonunun optimizasyonu

AuNP ile kaplanan elektrot yüzeyinde hidroksil grupları oluşturmak için kullanılan 6-MH için 3 farklı konsantrasyonda (0,1 M, 0,5 M, 1 M) optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Her bir konsantrasyonda hazırlanan 6-MH çözeltilerine GP elektrotlar daldırılarak gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında ultra saf su ile yıkayıp saf argon ile nazıkçe kurutulan elektrotların CV-EIS ölçümleri alındı.(Çalışma koşulları; 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25^\circ\text{C}$)

3.3.2.2. GOPE konsantrasyonunun optimizasyonu

Yüzeyde düzgün bir SAMs tabakasının oluşabilmesi ve bu tabakanın her çalışmada tekrarlanabilmesi, ileri aşamalar için oldukça önemlidir. Bu sebeple, yüzeydeki hidroksil gruplarıyla bağ yapabilen silan gruplarına sahip GOPE için 3 farklı konsantrasyonda (%1 % 1,5 % 5) denemeler yapıldı. Her bir konsantrasyonda hazırlanan GOPE çözeltilerine GP

elektrotlar daldırılarak gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında ultra saf su ile yıkanıp saf argon ile nazikçe kurutulan elektrotların CV-EIS ölçümleri alındı. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.3.2.3. Anti-CK' nın konsantrasyon optimizasyonu

Başarılı bir biyosensör sistemi için optimize edilmesi gereken bir diğer önemli adım antikör konsantrasyonudur. Bunun için 3 farklı konsantrasyonda (10 ng/mL, 37 ng/mL, 50 ng/mL) denemeler yapıldı. Belirtilen konsantrasyonlarda inkübe edilen elektrotlar yıkanıp kurutulduktan sonra CV-EIS ölçümleri alındı. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.3.2.4. Anti-CK' nın inkübasyon süresinin optimizasyonu

Antikör konsantrasyonunun sonrasında anti-CK inkübasyon süresini optimize edilmiştir. Bunun için 3 farklı zamanlarda (30 dk, 45 dk, 1 sa) hazırlanan elektrotlar anti-CK çözeltisine daldırılmıştır. Optimize edilen konsantrasyonda hazırlanan elektrotlar planlanan sürelerde inkübe edildikten elektrotlar yıkanıp kurutulduktan sonra CV-EIS ölçümleri alındı. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.3.2.5. CK' nın inkübasyon süresinin optimizasyonu

Anti-CK süre optimizasyonunun ardından bir diğer optimizasyon adımı antijenin (CK) antikora bağlanma süresinin optimizasyonudur. Bunun için 3 farklı süre (30 dk, 45 dk, 60 dk) boyunca hazırlanmış elektrotlar inkübe edilmiştir. Elektrotlar planlanan sürelerde inkübe edildikten elektrotlar yıkanıp kurutulduktan sonra CV-EIS ölçümleri alındı. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.3.3. CK biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları

CK biyosensörünün tüm immobilizasyon işlemleri ve optimizasyon adımları tamamlandıktan sonra biyosensörün tasarımındaki son çalışma adımı olan karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma adımları aşağıda sırasıyla belirtilmiştir.

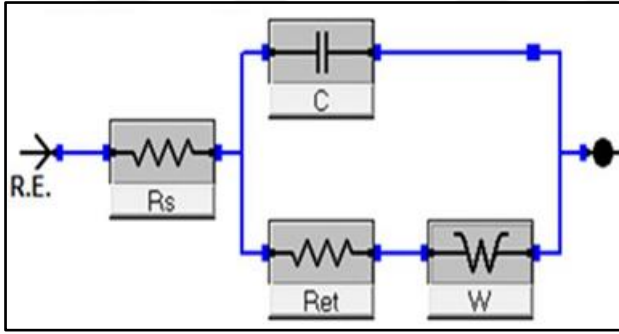
3.3.3.1. CK biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Tüm optimizasyon adımları tamamlanan CK biyosensörünün elde edilen veriler doğrultusunda kalibrasyon grafiği çizilerek doğrusal tayin aralığı belirlendi. Dizayn edilen

biyosensöre ait bu tayin aralığı; CK biyobelirteci ile bloklama ajanı olarak kullanılan BSA proteinin EIS verilerinden elde edilen elektron transfer direncinin farkından hesaplanmaktadır. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi çalışmalarında en önemli noktalardan bir tanesi de geliştirilen sistemin bir elektriksel eşdeğer devre modeliyle uyumlu halde modellendirilmesidir. Bu noktanın önemi özellikle elektron transfer rezistanslarının doğru hesaplanmasında ortaya çıkmaktadır. Çünkü elektron transfer rezistansları yani impedans bu devre modeli temel alınarak hesaplanmaktadır. Hesaplama işleminde kullanılan denklem aşağıdaki gibidir.

$$\Delta Ret = Ret(CK) - Ret(BSA) \quad (3.1)$$

Bu denklem impedans çalışmalarında tercih edilen ‘‘eşdeğer devre modeli’’ ile ilişkili olarak kullanılmaktadır.



Şekil.3.2. EIS elektriksel eşdeğer devre modeli

Şekil 3.2’ de verilen eşdeğer devre modelinde; Rs çözelti direncini, C kapasitansı, W difüzyona bağlı olan Warburg eğrisini ve Ret ise elektron transfer rezistansını ifade etmektedir (Sezgintürk ve ark. 2014).

Bu denklemdeki Ret değerlerinden yararlanılarak biyosensörün kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Ayrıca bu kalibrasyon grafiğine ait LOD (tayin limiti) ve LOQ (kantitatif ölçüm limiti) değerleri de hesaplandı.

3.3.3.2. CK biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları

Biyosensörün tekrarlanabilirlik çalışması için 20 farklı tek kullanımlık GP elektrot hazırlanıp aynı konsantrasyonda (20 pg/mL) EIS ölçümleri alınmıştır. Ölçümlerden elde edilen veriler için kalibrasyon grafiği denkleminde yararlanılarak; ortalama değer, standart sapma değeri ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.3.3.3. CK biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmaları

İdeal bir biyosensör geliştirme sırasındaki en önemli adımlardan biri olan tekrar üretilebilirlik çalışması için aynı koşullarda ve bileşimlerde biyosensörler hazırlandı ve birbirinden bağımsız zaman dilimlerinde EIS ve CV ölçümleri alındı. Böylelikle farklı zamanlarda, biyosensörün belirli bir tayin aralığında vermiş olduğu cevaplar değerlendirildi. Bu biyosensörlere ait standart grafiklerden elde edilen veriler doğrultusunda bağıl standart sapma (RSD) değeri ve intercept hesaplandı. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.3.3.4. CK biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları

Rejenerasyon işlemi, üzerinde immobilizasyon basamakları tamamlanmış tek bir biyosensör üzerinde gerçekleştirilmiştir. Biyosensör ilk olarak optimum CK konsantrasyonu ile inkübe edilmiş ve EIS ölçümleri alınmıştır. Daha sonra 10 mM HCl asit çözeltisinin içerisinde 2 dakika bekletildikten sonra EIS ölçümü alınmış ve sonrasında tekrar CK ile inkübe edilmiştir. Her işlem sonrasında elektrot yüzeyi bol ultra saf su ile yıkayıp saf argon gazıyla nazıkçe kurutulmuştur. Bu işlem elektrot yüzeyindeki anti-CK ve CK etkileşiminin aktifliğini oldukça azalması ya da tamamen kaybetmesinin EIS spektrumlarına bariz bir şekilde yansıdığı aşamaya kadar tekrarlanmıştır. Geliştirilen biyosensördeki bu rejenerasyon işlemi sayesinde, hem çalışma elektrodu olarak tercih edilen yüzeyin kararlılığı hem de yüzeydeki antikör-antijen immüno-kompleksinin ayrıştırılmasından sonra tekrar bağlanabilme kapasitesi incelenmiştir. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.3.3.5. CK biyosensörü için Sabit Frekansta İmpedans (SFI) analizi

Anti-CK temelli CK biyosensörünün yüzeyinde meydana gelen zamana bağlı değişiklikleri açıklığa kavuşturabilmek için sabit frekansta impedans tekniği kullanıldı. Bu tekniğin prensibi sabit bir frekansta zamana karşı ölçülen impedans değişimine dayanmaktadır (Sezgintürk ve ark. 2014). Bu sabit frekans (198,6 Hz) potansiyostattaki Bode eğrisinden yararlanılarak belirlenir. Buna bağlı olarak ölçüm; CK içeren 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Sabit frekansta gerçekleştirilen bu impedans analizinde; impedans ve faz açısında meydana gelen değişim, anti-CK ile CK arasındaki etkileşimin

kinetik olarak incelenmesine olanak sağlamıştır. (Çalışma koşulları; pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde, T=25 °C)

3.3.3.6. CK biyosensörüne ilişkin kare dalga voltametrisi (SWV) çalışmaları

Biyosensörün döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ölçümleriyle takip edilmesine ek olarak kare dalga voltametrisiyle de elektrokimyasal ölçümleri pekiştirildi. Bu işlem CK biyosensörünün tayin aralığında, anodik ve katodik pik akımları arasındaki potansiyel sinyali ile gerçekleştirilmiştir.

CK biyosensörünün kare dalga ölçümleri belirlenen potansiyel aralıkta ferri-ferro redoks çözeltisi içerisinde alındı. Çalışma sonrasında ölçüm sonuçlarından bir kalibrasyon grafiği elde edildi. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.3.3.7. CK biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

Yapılan immobilizasyon işlemlerinde elektrot yüzey alanının ne kadar kaplandığını hesaplayabilmek adına dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak, Laviron eşitliği yardımıyla elektrotun kaplanmış olan yüzey alanı hesaplandı.

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma v}{4RT} = \frac{nFQv}{4RT} \quad (3.2)$$

Bu denklemde; n eğim, F Faraday sabiti, A elektrot yüzey alanı, Q yük ve Γ ise kaplanan yüzey alanını ifade etmektedir.

3.3.3.8. CK biyosensörünün raf ömrü

Geliştirilen CK biyosensörünün raf ömrünü belirlemek için 10 haftalık bir zaman diliminde, aynı koşullarda hazırlanmış biyosensörler buzdolabında +4 °C' de saklandı ve haftalık periyotlarla kalibrasyon grafiğine ait bir konsantrasyonda CK (20 pg/mL) ile inkübe edildi. Alınan EIS ölçümlerinden yapılan hesaplamalardan yararlanılarak biyosensörün depo kararlılığı hakkında bilgi sağlandı.

3.3.3.9. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Çanakkale 18 Mart Üniversitesi (ÇOBİLTUM) Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Merkez Laboratuvarı'nda biyosensör üretim prosesinin her bir adımına,

alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (JEOL JSM-7100F) işlemi uygulanarak farklı yüzeylerin morfolojik olarak incelenmesi sağlanmıştır. SEM görüntülerini elde etmek için 5 kV bir hızlanma gerilimi kullanılmıştır.

Çalışmanın bu aşamasında, geliştirilen biyosensörün immobilizasyonu esnasında meydana gelen yüzey morfolojik değişimleri SEM analizleriyle aydınlatılmaya çalışıldı.

3.3.3.10. CK biyosensörünün serum örneklerinde uygulanabilirliğinin araştırılması

Tasarlanan CK biyosensörünün son aşamasında, beş farklı insan serum örneğinde CK miktarı standart ekleme yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Standart ekleme için tercih edilen CK konsantrasyonları 1 pg/mL ve 20 pg/mL’ dir. Her bir serum örneği için ölçümler 3 defa tekrar edilmiştir. Serum örnekleri kullanılıncaya kadar porsiyonlar halinde -20 °C de muhafaza edilmiştir.

3.3.3.11. CK biyosensörünün Kramers-Kronig Transform karakterizasyonu

CK biyosensör sisteminin impedans spektrumunun dış etkenlerden dolayı meydana gelen sapmalardan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için Kramers-Kronig transformu kullanıldı.

3.4. ST2 Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemi

3.4.1. ST2 biyosensörünün fabrikasyonu ve immobilizasyon adımları

ST2 biyosensörünün immobilizasyon aşamasındaki ilk adım elektrot yüzeylerinin temizlenmesidir. Temizlik işlemi daha önce başlık 3.3.1.’ de anlatılan prosedürle gerçekleştirilmiştir.

- ST2 biyosensörünün immobilizasyon adımları

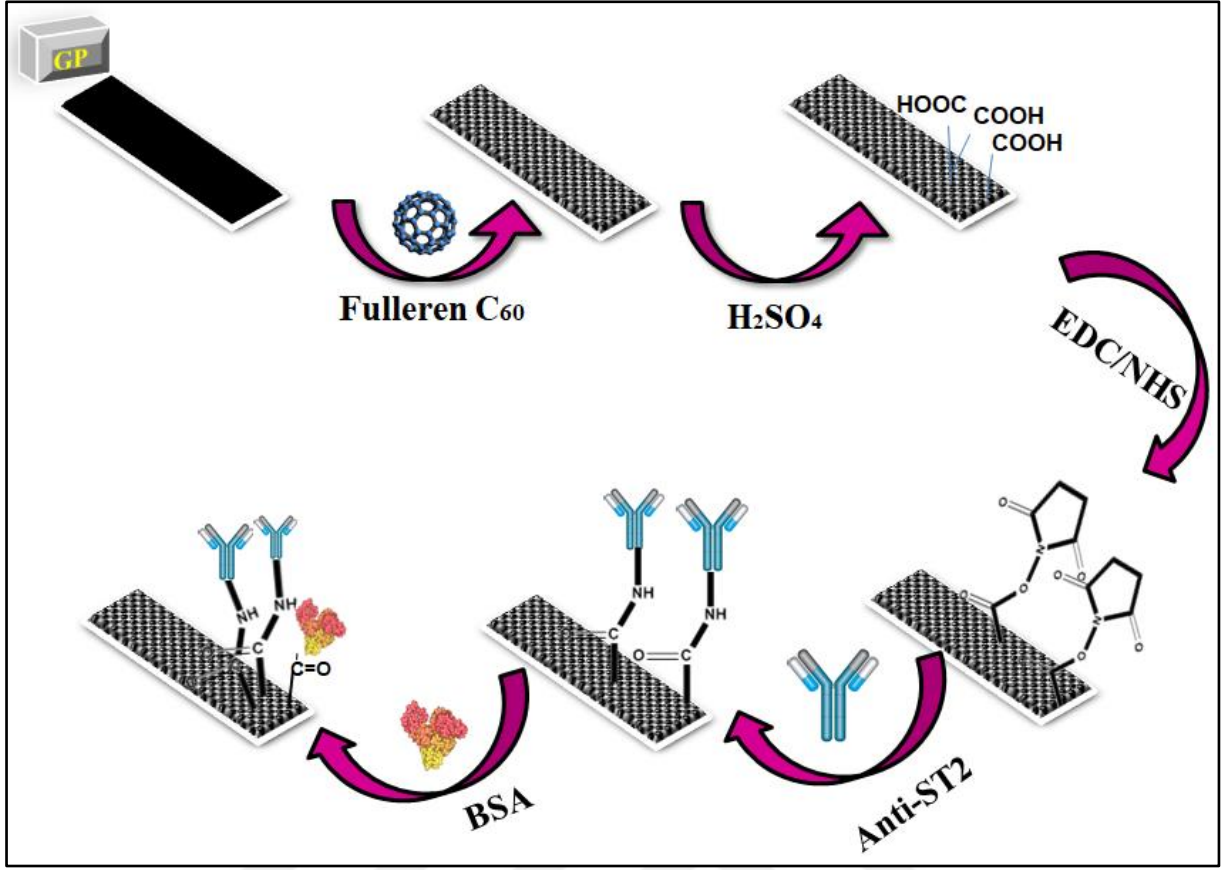
Temizlik işleminden sonra GP elektrotların karboksil gruplarını arttırarak daha zengin bir karbon yüzey tabakası elde etmek için elektrot yüzeyine toluen içerisinde hazırlanmış fulleren C₆₀ molekülleri adsorbe edilmiştir. Elektrotlar oda sıcaklığında 1 saat boyunca fulleren C₆₀ ile inkübe edildikten sonra sırasıyla toluen ve ultra saf sudan geçirilip EIS ve CV ölçümleri alınmıştır.

Fulleren C₆₀ muamelesinden sonra immobilizasyonu daha güçlü kılmak için GP elektrotlar H₂SO₄ çözeltisine daldırılıp gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Böyle yapılarak GP elektrot yüzeyinde fulleren C₆₀ muamelesiyle kantitatif olarak artırıldığı düşünülen karboksil gruplarının (-COOH) aktifliğinin daha çok artacağı düşünülmüştür.

H₂SO₄ muamelesinden sonra elektrotlar ultra saf sudan geçirilip EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Daha sonra saf argon gazıyla dikkatlice kurutulup, karboksil gruplarını açığa çıkarmak için kullanılan pH 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış EDC/NHS (0,4 mM: 0,1 mM) çözeltisinde 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

EDC/NHS çiftinin muamelesinden sonra elektrotların EIS ve CV ölçümleri alınıp, yüzey saf argon gazıyla kurutulduktan sonra anti-ST2 (5 ng/mL) çözeltisine daldırılarak 60 dakikalık bir inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası elektrotlar ultra saf su ile yıkanıp EIS ve CV ölçümleri alınmıştır.

İmmobilizasyon işleminin son adımında, yüzey üzerinde anti-ST2 bağlamamış açık uçları bloke etmek için % 0,5' lik sığır serum albümini (BSA) çözeltisinde 1 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem sonunda da ultra saf su ile yıkanıp nazikçe saf argon gazı ile kurutulmuştur. İmmobilizasyonu tamamlanan ST2 biyosensörü ölçüm işlemi gerçekleşene kadar +4 °C ' de muhafaza edilmiştir. ST2 biyosensörüne ait immobilizasyon adımları (GP, GP/Fulleren C₆₀, GP/Fulleren C₆₀/H₂SO₄, GP/Fulleren C₆₀/H₂SO₄/EDC-NHS, GP/Fulleren C₆₀/H₂SO₄/EDC-NHS/anti-ST2, GP/Fulleren C₆₀/H₂SO₄/EDC-NHS/anti-ST2/BSA) Şekil 3.2' de şematik olarak sunulmuştur.



Şekil.3.3. ST2 biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi

3.4.2. ST2 biyosensörünün optimizasyon adımları

3.4.2.1. Fullerene C₆₀ miktarının optimizasyonu

Geliştirilen immünosensörde ST2' nin hassas tayini için immobilizasyon aşamasında kullanılan fulleren C₆₀ miktarının biyosensör üzerindeki etkisini incelemek amacıyla diğer tüm bileşenler sabit tutulup, fulleren C₆₀ miktarı değiştirilerek biyosensörler hazırlandı. Toluen çözeltisi içerisinde hazırlanan fulleren C₆₀ konsantrasyonları sırasıyla; 0,2, 0,4 ve 0,8 mg/mL 'dir. Bu belirtilen miktarlarda biyosensörler hazırlanarak ST2 biyosensörüne ilişkin standart grafikler oluşturuldu. Oluşturulan standart grafikler karşılaştırılıp, yorumlanarak elde edilen verilerden en uygun fulleren C₆₀ miktarı belirlendi. (Çalışma koşulları; 5mM K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.4.2.2. Fullerene C₆₀ ' ın inkübasyon süresinin belirlenmesi

Bir biyosensör geliştirilirken yüzey modifikasyonu sırasında kullanılan ajanların yüzeydeki inkübasyon süreleri, doğrudan immobilizasyonu etkilediği için, bu ajanların

optimum inkübasyon sürelerini belirlemek gerekir. Bu çalışmada fulleren C₆₀ için 3 farklı inkübasyon süresinde (30 dk, 60 dk ve 120 dk) biyosensörler hazırlanmış sonrasında EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Alınan ölçümlerden standart grafikler elde edilerek sonuçlar değerlendirilmiş ve fulleren C₆₀ için optimum inkübasyon süresine karar verilmiştir. (Çalışma koşulları; 5mM K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.4.2.3. H₂SO₄ asit konsantrasyonun biyosensör üzerindeki etkisi

GP elektrot yüzeylerinin fulleren C₆₀ ile modifikasyonundan sonra elektrotlar H₂SO₄ ile gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Fulleren C₆₀ çok kararlı ve düzenli bir yapıya sahip olduğu için, elektrot yüzeyindeki karboksil gruplarını açığa çıkarmak adına bu optimizasyon adımı oldukça önemlidir. Bu amaca yönelik olarak, asit konsantrasyonun biyosensöre etkisini incelemek için 4 farklı konsantrasyonda (%5, %10, %25 ve %50) çalışma gerçekleştirilmiştir. Belirtilen her bir konsantrasyon için biyosensörler hazırlanarak EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Ölçüm verilerinden yararlanılarak elde edilen, biyosensörlere ait standart grafikler çizilerek ST2 immünosensörü için optimum H₂SO₄ konsantrasyonuna karar verilmiştir. (Çalışma koşulları; 5mM K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.4.2.4. Anti-ST2' nin konsantrasyon optimizasyonu

ST2 biyosensörünün bir sonraki optimizasyon adımı, anti-ST2 konsantrasyonun immünosensör üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Bu optimizasyon adımı için 3 farklı konsantrasyondaki (2,5, 5 ve 10 ng/mL) anti-ST2 çözeltisinde biyosensörler hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensörlerin EIS ve CV ölçümlerinden yararlanılarak standart grafikleri çizilmiştir. Standart grafiklerden elde edilen veriler sayesinde ST2 immünosensörü için en uygun anti-ST2 konsantrasyonuna karar verilmiştir. (Çalışma koşulları; 5mM K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.4.2.5. Anti-ST2' nin inkübasyon süresinin belirlenmesi

ST2 biyosensörüne ait optimum konsantrasyon değerlerinin belirlenmesinden sonra, inkübasyon sürelerinin immünosensör üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaca yönelik olarak, anti-ST2' nin optimum inkübasyon süresini belirlemek için 3 farklı sürede (30, 45 ve 60 dakika) çalışma yapılmıştır. Biyosensörün EIS ve CV ölçümleri alınarak standart grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen veriler ışığında anti-ST2 için en uygun inkübasyon

süresine karar verilmiştir. (Çalışma koşulları; 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.4.2.6. ST2' nin inkübasyon süresinin belirlenmesi

İnkübasyon sürelerinin immünosensör üzerindeki etkisini incelemek için yapılan bir diğer optimizasyon çalışması ST2' nin inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Bu çalışma için de 3 farklı süre de (30, 45 ve 60 dakika) çalışma yapılmıştır. Her bir süre için EIS ve CV ölçümleri alınarak standart grafikleri çizilmiştir. Grafiklerden elde edilen veriler sayesinde ST2 antijeni için optimum inkübasyon süresi belirlenmiştir. (Çalışma koşulları; 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.4.3. ST2 biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları

ST2 biyosensörünün tüm immobilizasyon işlemleri ve optimizasyon adımları tamamlandıktan sonra biyosensörün tasarımındaki son çalışma adımı olan karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma adımları aşağıda sırasıyla belirtilmiştir.

3.4.3.1. ST2 biyosensörünün kalibrasyon grafiği

ST2 biyosensörünün tüm optimizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra 8 farklı konsantrasyon değerinin EIS ölçümleri alınarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. ST2 biyobelirtecinin konsantrasyonlarından elde edilen EIS verilerine ilişkin hesaplama başlık 3.3.3.1' de açıklandığı gibidir.

Başlık 3.3.3.1' de bahsedilen “ eş değer devre modelinden” yararlanılarak ve aşağıdaki bağıntı esas alınarak ST2 biyosensörünün kalibrasyon grafiği hesaplanmıştır.

$$\Delta Ret = Ret(ST2) - Ret(BSA) \quad (3.3)$$

Bağıntı 3.3' de, Ret (ST2) geliştirilen immünosensörün yüzeyindeki antikor (anti-ST2) ve antijen (ST2) etkileşiminden sonra elde edilen yük transfer direncini ifade etmektedir. Ret (BSA) ise, bloklama ajanı olarak kullanılan sığır serum albüminin yüzeye bağlanmasıyla oluşturduğu yarım daire çapını ifade etmektedir.

ST2 sensörünün kalibrasyon grafiğine ait LOD (tayin limiti) ve LOQ (kantitatif ölçüm limiti) değerleri de hesaplanmıştır.

3.4.3.2. ST2 biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında, biyosensörün en önemli özelliklerinden biri olan tekrarlanabilirliğini test edebilmek amacıyla aynı koşullar altında 20 farklı GP elektrot hazırlanmıştır. Hazırlanan elektrotların her biri kalibrasyon grafiğine ait bir konsantrasyon değerinde (25 fg/mL) inkübe edilerek EIS ölçümleri alınmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.4.3.3. ST2 biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmaları

Bir biyosensörün klinik alanda kullanılabilirliği ve doğruluğu açısından tekrar aynı şartlarda ve özelliklerde hazırlanabiliyor olması önemli bir özelliktir. Bu amaca yönelik olarak optimum koşullarda hazırlanan elektrotlar ST2' nin farklı standart konsantrasyonlarıyla inkübe edilerek, detaylı kalibrasyon eğrisi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen her bir biyosensörün EIS ve CV ölçümleri alınarak bu şekilde toplam 8 biyosensör hazırlanmıştır. Bu biyosensörlerde, EIS spektrumlarından elde edilen Ret değerleri, ST2 konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiştir ve birbirleriyle kıyaslanmıştır. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.4.3.4. ST2 biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları

Bir biyosensörün yüzeyinin tekrar kullanılabilmesi (rejenere edilebiliyor olması) klinik uygulamalarda kullanım açısından büyük avantajdır. Bu çalışmada da biyosensörün tekrar tekrar kullanılabilirliğinin tespit edilmesi amacıyla optimum koşullarda hazırlanan biyosensör sistemi ilk ST2 inkübasyonundan sonra 10mM HCl ile muamele edilmiştir. Anti-ST2 ile ST2 arasındaki etkileşimin sonlanıp sonlanmadığı elde edilen EIS spektrumlarıyla tayin edilmeye çalışılmıştır ve bu işlemin kaç kere tekrar edilebilirliği yine elde edilen impedans spektrumlarıyla belirlenmiştir. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.4.3.5. ST2 biyosensörünün SFI analizi

Anti-ST2 temelli ST2 biyosensörünün değerlendirilmesi ve karakterizasyonu için, daha önce başlık 3.3.3.5' de anlatılmış olan sabit frekansta impedans tekniği (SFI) kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda sabit bir frekans değeri (45 Hz) ile impedans ölçümü

zamanın ve faz açısının fonksiyonları olarak ölçülmüştür. Böylece ST2 ile anti-ST2 arasındaki etkileşimin karakterizasyonu belirlenmiştir. (Çalışma koşulları; pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde, T=25 °C)

3.4.3.6. ST2 biyosensörüne ilişkin SWV çalışmaları

ST2 biyosensörünün karakterizasyon çalışmalarına yönelik, uygun elektrokimyasal parametreler belirlenerek kare dalga voltametri tekniğiyle de ölçümler alınmıştır. Ölçümlerden elde edilen pik akımlarından gerekli hesaplamalar yapılarak ST2 biyosensörünün bu çalışmaya ait kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.4.3.7. ST2 biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

ST2 biyosensörü geliştirilirken yapılan immobilizasyon işlemlerinde elektrot yüzey alanının ne kadar kaplandığını saptayabilmek için bir takım hesaplamalar yapılmıştır. Bu çalışma için dönüşümlü voltametri tekniği kullanılmış ve hesaplamalar için de daha önce başlık 3.3.3.7 de verilen Laviron eşitliğinden yararlanılmıştır.

3.4.3.8. ST2 biyosensörünün raf ömrü

Tasarlanan ST2 biyosensörünün depo kararlılığını belirleyebilmek adına raf ömrüne bakılmıştır. Bu çalışma kapsamında ST2 biyosensörleri BSA aşamasına kadar hazırlanarak +4 °C’ de saklanmış ve her hafta immobilizasyon aşaması tamamlanmış olan bir sensör kalibrasyon grafiğine ait bir konsantrasyonda ST2 (25 fg/mL) ile inkübe edilmiştir. Sonrasında EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. 10. Haftanın sonunda biyosensörün depo kararlılığında göstermiş olduğu performans hakkında bilgi sağlanmıştır.

3.4.3.9. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Yüzey morfolojisini inceleyebilmek adına ST2 biyosensörünün immobilizasyon aşamalarının SEM görüntüleri alınmıştır. Görüntüler başlık 3.3.3.9’ da anlatıldığı şekilde edinilmiştir.

3.4.3.10. ST2 biyosensörünün serum örneklerinde uygulanabilirliğinin araştırılması

Geliştirilen ST2 biyosensörünün son aşamasında, beş farklı insan serum örneğinde ST2 miktarı standart ekleme yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Standart ekleme için tercih

edilen ST2 konsantrasyonları 5 fg/mL ve 50 fg/mL' dir. Her bir serum örneği için ölçümler 3 defa tekrar edilmiştir. Serum örnekleri kullanılıncaya kadar porsiyonlar halinde -20 °C de muhafaza edilmiştir.

3.4.3.11. ST2 biyosensörünün Kramers-Kronig Transform karakterizasyonu

ST2 biyosensör sisteminin impedans spektrumunun dış etkenlerden dolayı meydana gelen sapmalardan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için Kramers-Kronig transformu kullanıldı.

3.5. TnT Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemi

3.5.1. TnT biyosensörünün fabrikasyonu ve immobilizasyon adımları

TnT biyosensörünün immobilizasyon aşamasındaki ilk adım elektrot yüzeylerinin temizlenmesidir. Temizlik işlemi daha önce başlık 3.3.1.' de anlatılan prosedürle gerçekleştirilmiştir.

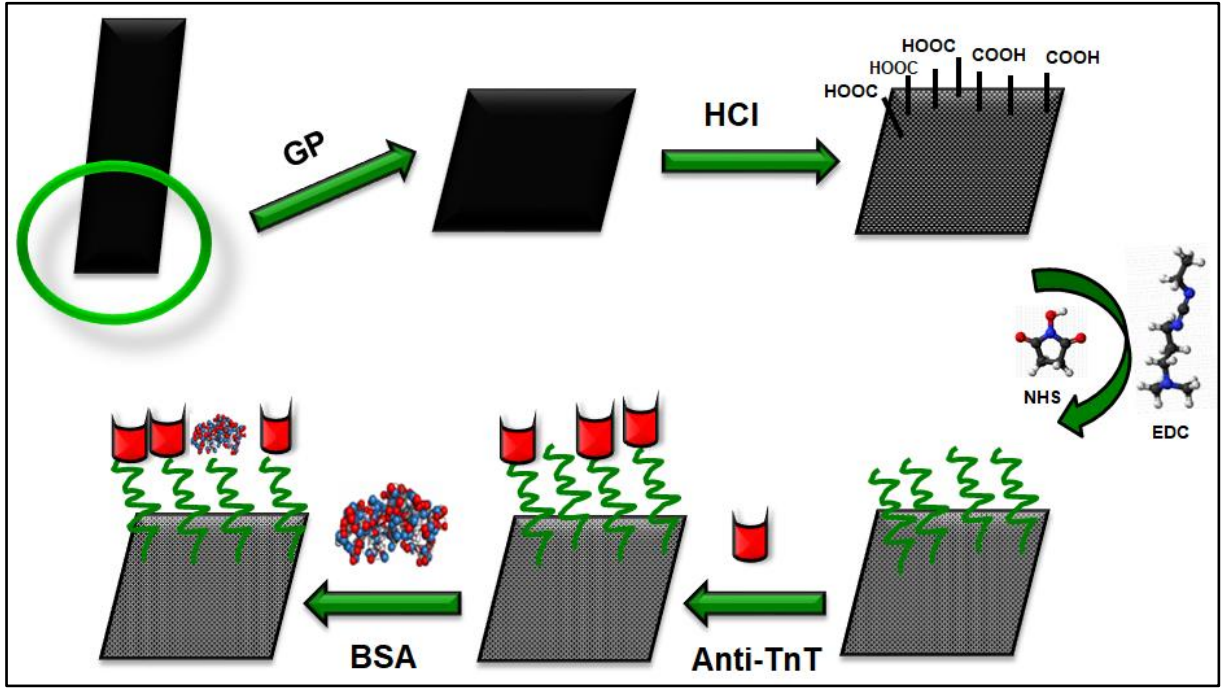
- TnT biyosensörünün immobilizasyon adımları

Temizlik işlemi tamamlandıktan sonra GP elektrot yüzeyi, var olan karbon gruplarını aktifleştirmek suretiyle kovalent immobilizasyona daha elverişli bir ortam sağlamak için HCl ile muamele edilmiştir. Elektrotlar oda sıcaklığında hazırlanan HCl çözeltisi içerisine daldırılarak gece boyu (20 saat) inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon işleminden sonra her bir elektrot ultra saf sudan geçirilerek EIS ve CV ölçümleri alınmıştır.

HCl ile muamelesinden sonra yüzeyde meydana gelen karboksil gruplarını açığa çıkarmak için EDC/NHS çifti kullanılmıştır. GP elektrotlar, pH 7,0 fosfat tamponunda ve oda sıcaklığında hazırlan EDC/NHS (0,4 mM: 0,1 mM) çözeltisine daldırılarak 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında elektrotlar ultra saf sudan geçirilerek EIS ve CV ölçümleri alınmıştır.

EDC/NHS çiftiyle karboksil grupları açığa çıkan elektrot yüzeyinde bir sonraki aşama anti-TnT' nin yüzeye immobilizasyonudur. EIS ve CV ölçümü alındıktan sonra ultra saf sudan geçirilip dikkatlice argon gazıyla kurutulan elektrotlar, pH: 7,0 tamponunda hazırlanmış anti-TnT (13 ng/mL) çözeltilerine daldırılarak 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Her immobilizasyon aşamasından sonra olduğu gibi bu işlem sonunda elektrotların EIS ve CV ölçümleri alınmıştır.

TnT biyosensörünün son immobilizasyon aşamasında ise spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için, bloklayıcı ajan olarak tercih edilen BSA (%0,5) proteini ile 1 saat süreyle inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ultra saf sudan geçirilerek EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Bu işlemden sonra TnT biyosensörünün immobilizasyon işlemleri tamamlanmıştır ve hazırlanan TnT biyosensörleri ölçüm işlemi gerçekleşene kadar +4 °C ' de muhafaza edilmiştir. TnT biyosensörüne ait immobilizasyon adımları (GP, GP/HCl, GP/HCl /EDC-NHS, GP/HCl /EDC-NHS /anti-TnT, GP/HCl /EDC-NHS /anti-TnT /BSA) Şekil 3.3' de şematik olarak sunulmuştur.



Şekil.3.4. TnT biyosensörünün immobilizasyon adımlarının şematik gösterimi

3.5.2. TnT biyosensörünün optimizasyon adımları

3.5.2.1. HCl asit konsantrasyonunun optimizasyonu

Tasarlanan TnT biyosensöründe HCl asit konsantrasyonunun etkisini inceleyebilmek adına 4 farklı HCl konsantrasyonunda (1 M, 1,5 M, 3 M ve 6,25 M) çalışma yapılmıştır. Her bir konsantrasyon için biyosensörler hazırlanmış ve EIS-CV ölçümleri alınmıştır. Alınan ölçümlerden elde edilen verilerle standart grafikler çizilerek TnT biyosensörü için optimum HCl konsantrasyonuna karar verilmiştir. (Çalışma koşulları; 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.5.2.2. Anti-TnT konsantrasyonunun optimizasyonu

En önemli optimizasyon basamaklarından biri olan antikor konsantrasyonunun biyosensör üzerine etkisini inceleyebilmek için 3 farklı konsantrasyonda (6,5 ng/mL, 13 ng/mL ve 26,6 ng/mL) çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmaların EIS ve CV sonuçlarından elde edilen verilerle standart grafikler oluşturularak optimum anti-TnT konsantrasyonu seçilmiştir. (Çalışma koşulları; 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.5.2.3. Anti-TnT inkübasyon süresinin belirlenmesi

Optimum anti-TnT konsantrasyonu belirlendikten sonra antikor süresinin de biyosensör üzerine etkisini saptayabilmek adına süre optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaç için 3 farklı süre de (30, 45 ve 60 dakika) TnT biyosensörleri hazırlanarak çalışmalar yapılmıştır. Her bir süre için yapılan çalışmada EIS ve CV ölçümleri alınmış ve bu çalışmalara ait standart grafikler oluşturulmuştur. Yapılan değerlendirmeler sonrasında en uygun anti-TnT inkübasyon süresi belirlenmiştir. (Çalışma koşulları; 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.5.2.4. TnT inkübasyon süresinin belirlenmesi

Tasarlanan biyosensörün optimizasyon çalışmalarındaki son adım TnT' nin inkübasyon süresinin belirlenmesidir. TnT biyobelirtecinin geliştirilen sensör üzerindeki etkisini incelemek için 3 farklı süre de (30, 45 ve 60 dakika) çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda biyosensörlerin EIS ve CV ölçümleri alınmış ve standart grafikler oluşturulmuştur. Standart grafikler değerlendirilerek TnT için optimum inkübasyon süresine karar verilmiştir. (Çalışma koşulları; 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.5.3. TnT biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları

İmmobilizasyon ve optimizasyon işlemlerinin ardından biyosensörün karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Gerçekleştirilen tüm karakterizasyon çalışmaları aşağıdaki başlıklarda sırasıyla anlatılmıştır.

3.5.3.1. TnT biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Tüm immobilizasyon ve optimizasyon işlemleri tamamlanan TnT biyosensörü için EIS verilerinden yararlanılarak 8 farklı konsantrasyon ile bir kalibrasyon grafiği çizildi. TnT konsantrasyonlarının EIS verilerine ilişkin hesaplama başlık 3.3.3.1’ de açıklandığı gibidir.

Başlık 3.3.3.1’ de bahsedilen ‘‘ eş değer devre modelinden’’ yararlanılarak ve aşağıdaki bağıntı esas alınarak TnT biyosensörünün kalibrasyon grafiği hesaplanmıştır.

$$\Delta Ret = Ret(TnT) - Ret(BSA) \quad (3.4)$$

Kalibrasyon grafiği oluşturulan TnT biyosensörünün LOD ve LOQ değerleri de hesaplanmıştır.

3.5.3.2. TnT biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışmaları

Biyosensörün tekrarlanabilirlik çalışması için birbirinden bağımsız 20 farklı GP elektrot hazırlanarak kalibrasyon grafiğine ait bir konsantrasyon değerinde (50 fg/mL) EIS ölçümleri alınmıştır. Ölçümler sonrasında biyosensöre ait ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.5.3.3. TnT biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmaları

Tekrarlanabilirlik çalışmasının ardından biyosensörün tekrar üretilebilirliği incelenmiştir. Farklı zamanlarda gerçekleştirilen bu çalışma için birbirinden bağımsız elektrotlar hazırlanmış ve biyosensörün tayin aralığında EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. TnT biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışması için bu işlem 10 defa yapılmıştır. Her bir çalışma sonrasında standart grafik elde edilmiş ve elde edilen bu grafikler karşılaştırılarak biyosensörün tekrar üretilebilirliği yorumlanmıştır. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, T=25 °C)

3.5.3.4. TnT biyosensörünün rejenerasyon çalışmaları

Geliştirilen bir biyosensör için elektrot yüzeyinin kararlılığı ve tekrar kullanılabilir olması önemli bir avantajdır. Bu sebeple TnT biyosensörünün karakterizasyon çalışmalarından biri olarak rejenerasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem TnT ile inkübasyonu tamamlanan elektrot yüzeyine 10 mM HCl (5 dakika) muamelesiyle gerçekleşir. Asit muamelesinden

sonra yüzeye tekrar TnT inkübe edilerek bağlanmanın gerçekleşmesi beklenmiştir. Bu durum EIS spektrumları incelenerek, yüzey aktifliğinin görünür derecede azaldığı ya da tamamen kaybettiği ana kadar devam etmiştir. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.5.3.5. TnT biyosensörünün SFI analizi

Tasarlanan biyosensörün değerlendirilmesi ve karakterizasyonu için, daha önce başlık 3.3.3.5' de anlatılmış olan sabit frekansta impedans tekniği (SFI) kullanılmıştır. Bu amaca yönelik sabit bir frekans değeri (45,07 Hz) ile impedans ölçümü zamanın ve faz açısının fonksiyonları olarak ölçülmüştür. Böylece biyobelirteç (TnT) ile antikor (anti-TnT) arasındaki etkileşimin karakterizasyonu belirlenmiştir. (Çalışma koşulları; pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.5.3.6. TnT biyosensörüne ilişkin SWV çalışmaları

Biyosensör geliştirilirken EIS ve CV tekniklerinin yanı sıra kare dalga voltametri tekniğinden de yararlanılmıştır. Bu çalışma için uygun parametreler belirlenerek ölçümler alınmıştır. Belli bir potansiyel aralığında alınan ölçümlerin pik akımlarından elde edilen verilerle bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Bu kalibrasyon grafiğiyle birlikte sensörün diğer tekniklerdeki ölçüm performansı değerlendirilmiştir. (Çalışma koşulları; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/[Fe(CN)_6]$ çözeltisi içerisinde, $T=25\text{ }^{\circ}C$)

3.5.3.7. TnT biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

TnT biyosensörü geliştirilirken yapılan immobilizasyon işlemlerinde elektrot yüzey alanının ne kadar kaplandığını saptayabilmek için bir takım hesaplamalar yapılmıştır. Bu çalışma için dönüşümlü voltametri tekniği kullanılmış ve hesaplamalar için de daha önce başlık 3.3.3.7 de verilen Laviron eşitliğinden yararlanılmıştır.

3.5.3.8. TnT biyosensörünün raf ömrü

Geliştirilen TnT biyosensörünün raf ömrünü belirleyebilmek için 6 haftalık bir zaman diliminde depo ölçümleri alınmıştır. Immobilizasyon işlemleri tamamlanan elektrotlar $+4\text{ }^{\circ}C$ ' de saklanmış ve her hafta immobilizasyon aşaması tamamlanmış olan bir sensör kalibrasyon grafiğine ait bir konsantrasyonda TnT (50 fg/mL) ile inkübe edilmiştir. Sonrasında EIS ve CV

ölçümleri alınmıştır. 6. Haftanın sonunda biyosensörün depo kararlılığında göstermiş olduğu performans hakkında bilgi sağlanmıştır.

3.5.3.9. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Yüzey morfolojisini inceleyebilmek adına TnT biyosensörünün immobilizasyon aşamalarının SEM görüntüleri alınmıştır. Görüntüler başlık 3.3.3.9' da anlatıldığı şekilde edinilmiştir.

3.5.3.10. TnT biyosensörünün serum örneklerinde uygulanabilirliğinin araştırılması

Geliştirilen TnT biyosensörünün son aşamasında, beş farklı insan serum örneğinde TnT miktarı standart ekleme yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Standart ekleme için tercih edilen TnT konsantrasyonları 10 fg/mL ve 100 fg/mL' dir. Her bir serum örneği için ölçümler 3 defa tekrar edilmiştir. Serum örnekleri kullanılıncaya kadar porsiyonlar halinde -20 °C de muhafaza edilmiştir.

3.5.3.11. TnT biyosensörünün Kramers-Kronig Transform karakterizasyonu

TnT biyosensör sisteminin impedans spektrumunun dış etkenlerden dolayı meydana gelen sapmalardan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için Kramers-Kronig transformu kullanıldı.

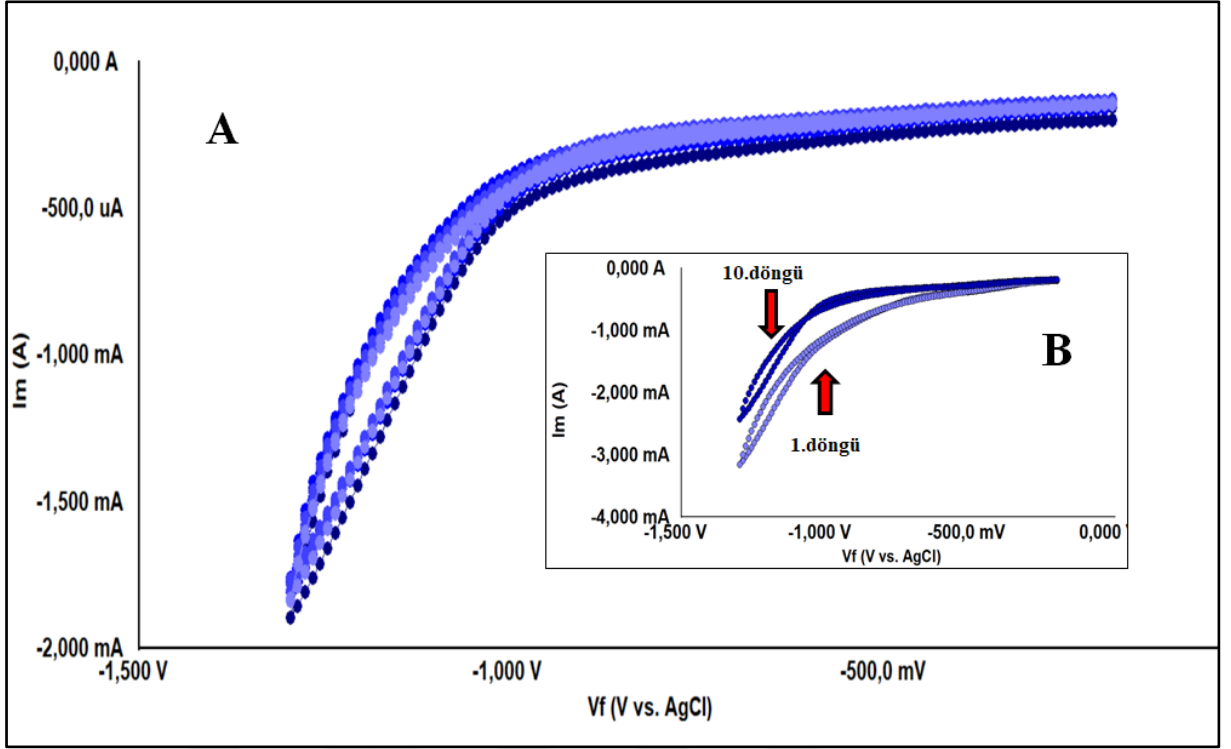
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. CK Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemi

4.1.1. CK biyosensörünün immobilizasyon adımlarının EIS ve CV ile yorumlanması

CK' nın hassas tayini için tasarlanan biyosensördeki ilk aşama elektrot yüzeylerinin temizlenmesidir. Bölüm 3.3.1. ' de anlatılan temizlik prosedürüyle gerçekleştirilen bu işlem sonrasında GP elektrot yüzeyleri elektrokimyasal teknik kullanılarak AuNP ile kaplanmıştır. Bu teknik diğer tekniklerle kıyaslandığında daha düşük maliyetli, daha hızlı ve daha pratiktir **(Karaboğa 2018)**. Ayrıca biriktirme potansiyeli ve zamanı, derişimi ve çözeltisi değiştirilebildiğinden, AuNP' lerin morfolojisini ve hareketlerini kontrol etmek mümkündür **(Wang ve ark. 2009)**.

AuNP' lerin GP elektrotlar üzerinde biriktirilme işlemi için CV tekniğinden yararlanılmıştır. Belirlenen potansiyel aralıkta (-0,2 V / -1,3 V; 50 mV/s hızında) defalarca tarama işlemi yapılarak gerçekleştirilen bu biriktirilme işleminde, nanoparçacıkların her tarama sonrasında daha da büyüyerek homojen bir yüzey oluşumuna katkı sağlaması beklenmiştir. Bu sayede oldukça gözenekli bir yüzeye sahip olan GP elektrot sağlıklı bir immobilizasyon için daha elverişli hale gelmiştir. Ayrıca AuNP' lerin elektrot yüzeyinde biriktirildiğinin elektrokimyasal göstergesi olarak Şekil 4.1 incelenebilir. İlk döngüde, referans elektroda (Ag/AgCl) karşı altının (Au) indirgenmesi -939,1 mV da gerçekleşmiştir. Son tarama da ise AuNP parçacıklarının elektrot yüzeyindeki birikmesi ve çekirdeklenmesiyle ilişkili olarak bu indirgenme potansiyeli -1,019 V' a kaymıştır (Şekil 4.1B). Bu voltamograma bakılarak GP elektrot yüzeyinde AuNP' nin biriktiğini söyleyebiliriz.



Şekil.4.1. (A) GP elektrot yüzeyinin altın nanopartikülle kaplanmasına ait döngüsel voltamogramlar (B) döngü sayısının ilerlemesiyle birlikte kayan pik akımı

Yüzeylerinde AuNP biriktirilmiş GP elektrotların EIS ve CV ölçümleri alındıktan hemen sonra elektrotlar ultra saf su ile yıkanıp argon gazından geçirilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaları önleyebilmek adına her immobilizasyon basamağından sonra elektrot yüzeyleri iyice kurutulmuş ve bir sonraki adıma öyle geçilmiştir. Bir sonraki adım, altın yüzeyde kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) oluşturmak için etanol içerisinde hazırlanmış 6-merkaptto hekzanol çözeltisinde elektrotların gece boyu inkübasyona bırakılmasıdır.

Altın yüzeyler üzerinde n-alkanetiollerin ($X(CH_2)_nSH$, $n>10$) SAM oluşturmalarının temeli altın ve kükürt arasındaki güçlü etkileşime dayanır. Altın elektrot yüzeydeki SAM tabakaları, alkanetiyol içeren (mM konsantrasyon seviyesinde) etanolik çözeltilerde gece boyu inkübasyona bırakılma işlemiyle gerçekleşir. Bu kendiliğinden oluşan organo-sülfür tabakaların oluşması, birçok potansiyel bilim ve teknolojik uygulamalara katkısından dolayı oldukça dikkat çekicidir (**Zhong ve ark. 1995; Mandler ve ark. 1996**).

Bu SAM tabakasının oluşması için S-H bağının ayrılması gerekir;



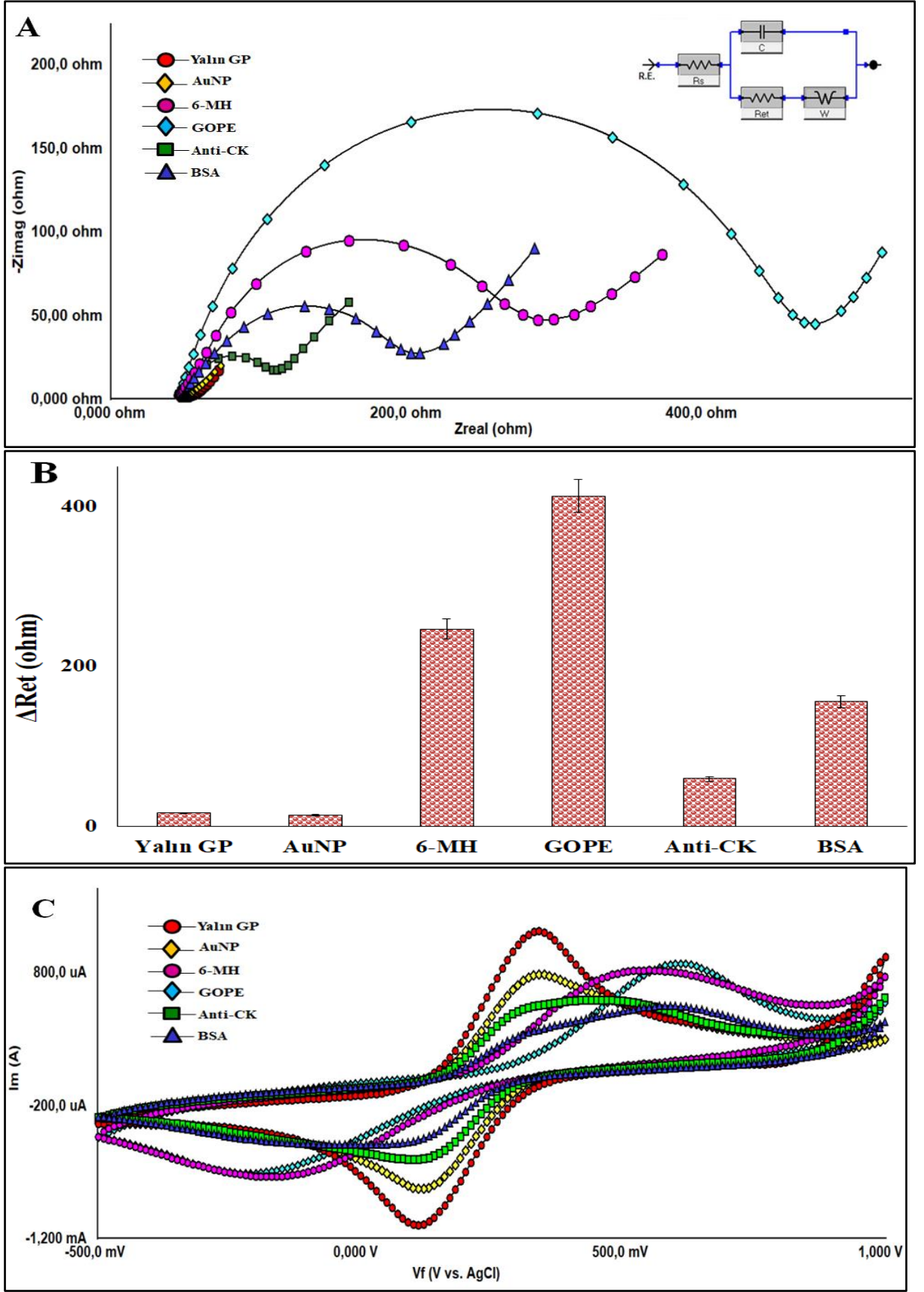
SAM tabakasındaki bağ etkileşimini metilen gruplar arasındaki Van-der Waals kuvvetleri yönlendirir **(Wang 2000)**.

6-Merkaptohekzanoldeki (6-MH) tiyol gruplarıyla güçlü bir SAM tabakası elde edildikten sonra yüzeyde hidroksil grupları meydana gelmiştir. Bu hidroksil grupları bir sonraki immobilizasyon adımıyla elektrotlar, silan gruplarınca zengin bir ajanla (GOPE) Si-O-Si kovalent bağı yapmak üzere gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

Silan (SiX_4) dört fonksiyonel grupla bir Si atomundan oluşan bir moleküldür. Bu dört fonksiyonel gruptan en az bir tanesi organik fonksiyonel gruplarla yer değiştirirse organosilan ($\text{SiR}_n\text{X}_{4-n}$) olarak adlandırılır. Organosilan molekülleri sabitlenecek bir oksit yüzeyde hidroksil gruplarıyla reaksiyon verebilir. Bir Si substratın yüzey oksidindeki hidroksil gruplarıyla (-OH) silanol bölgeleri (Si-OH) arasındaki dehidrasyon reaksiyonu, siloksan bağları boyunca (Si-O-Si) oksit üzerindeki molekülleri immobilize eder **(Sugimura 2002)**.

Silan ajanı 3-glisidoksipropiltrietoksilan (GOPE) ile inkübasyonundan hemen sonra EIS ve CV ölçümleri alınıp ardından yıkanan ve kurutulan elektrotlar anti-CK çözeltisine daldırılmıştır. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen bu inkübasyon işleminden sonra da EIS ve CV ölçümleri alınmış ve immobilizasyonun son adımına geçilmiştir. Immobilizasyonun son adımında açıkta kalan uçları bloke etmek için bir bloklama ajanı olan sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır. Immobilizasyonun bu aşamasında BSA, antikor bağlamamış olan aktif grupları engelleyerek sadece anti-CK ve CK spesifik etkileşiminden oluşan bir bağlanmanın tayinine olanak vermektedir.

CK biyosensörünün tüm bu immobilizasyon adımları EIS spektrumları ve CV voltamogramları ile takip edilmiştir. Elde edilen CK sensörünün immobilizasyonuna ait EIS verileri, her adıma ait yük transfer değişimleri ve CV voltamogramları Şekil 4.2' de verilmiştir.



Şekil.4.2. CK biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının (A) EIS verileri, (B) immobilizasyon basamaklarına ait Ret değerleri, (C) CV voltamogramları

EIS spektrumları incelenirken yapılan değerlendirmeler yük transfer direnci (Ret) esas alınarak yapılmalıdır. Ret, elektrot üzerindeki türlerin oluşturduğu elektrostatik bir itme veya sterik engel sebebiyle meydana gelmektedir. Bu sebeple de, elektrot üzerinde gerçekleşen redoks tepkimesi doğrudan enerji potansiyeli ile ilişkilidir. Şekil 4.2.A’ da verilen impedans spektrumundaki yarım daire çapı Ret’ yi ifade etmektedir. Aynı zamanda Ret, ferri-ferro redoks probunun elektron transfer kinetiğini de kontrol etmektedir. Yarım daire çapı hesaplanırken bir diğer önemli yapı Warburg impedansıdır (W). Difüzyona bağlı olarak meydana gelen bu impedans, düşük frekanslarda anlaşılabilir. Çünkü reaktiflerin difüzyonu ancak düşük frekanslarda gerçekleşmektedir.

Şekil.4.2.A’ daki impedans verileri incelendiğinde, ilk olarak oldukça iletken bir yüzeye sahip olan GP elektrotun temizlik aşamasından sonra alınan EIS ölçümünde oldukça düşük bir sinyal ile karşılaşmıştır ve Ret değeri 16,11 ohm olarak hesaplanmıştır. İletken bir yüzey için bu beklenen bir değerdir. Temizlik sonrası AuNP ile kaplandıktan sonra elektrot yüzeyinin impedans ölçümü alındığında bu sefer Ret değeri 13,66 ohm olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan Ret değeri AuNP’ nin elektrot yüzeyinin iletkenliğini daha da arttırmasına bağlı olarak azalmıştır. Sonrasında SAM oluşturmak için gece boyu inkübasyona bırakılan 6-MH’ nin hesaplanan Ret değeri ise 246,4 ohm dur. Buradan çok net bir şekilde anlaşılmaktadır ki iletken yüzey üzerinde oluşan aktif türler yüzeyi doldurmuş ve iletkenliği azaltmıştır. Gece boyu inkübasyona bırakılan elektrot yüzeyinde altın ve kükürt arasında gerçekleşen tiyol bağları SAM tabakası oluştururken 6-MH’ nin diğer ucundaki hidroksil grupları da düzgün bir dizilimle sterik etkiyi arttırarak ferri-ferro redoks probunun yüzeye difüzyonunu engellemiş ve buna bağlı olarak Ret’ yi arttırmıştır. Bu artış EIS spektrumlarında da çok net bir şekilde belli olmaktadır. Bir sonraki adım ise hidroksil gruplarıyla bağ yapabilen silan gruplarına sahip GOPE’ nin immobilizasyonudur. GP elektrot yüzeyinin GOPE ile modifikasyonu yüzeyi daha da yalıtkan bir hale getirerek Ret değerinin 412,8 ohm’ a yükselmesine sebep olmuştur. Yüzeyin yalıtkanlığının Ret değerini etkilemesinin yanı sıra, burada özellikle yüzeyin epoksi gruplarıyla kaplanmış olmasının yüzeyde değişik bir etki meydana getirdiği düşünülmektedir. Epoksi grubundaki oksijenin üzerindeki ortaklanmamış 2 çift elektron çok etkili bir şekilde negatif yüklü redoks probunu elektrostatik olarak itmiştir. Dolayısıyla bu etki yüzeyin olduğundan daha fazla yalıtkan karakter sergilemesine neden olmuştur. Anti-CK’ nın immobilizasyonu ise bu elektrostatik itmeyi ortadan kaldırdığı için burada da impedansta önemli bir düşüş meydana gelmiştir ve Ret değeri 59,13 ohm olarak hesaplanmıştır. Son

olarak yüzeye BSA uygulanması bir miktar difüzyon problemi yaratacağından yük transfer direncinde artış meydana gelmiştir. Ret değeri 155,6 ohm olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2.B).

CK biyosensörünün CV voltamogramları için Şekil 4.2.C incelendiğinde, yalın GP elektrotta anodik ve katodik pik akımlarının (Katodik pik akımı=1,109 mA, Anodik pik akımı=1,105 mA) oldukça keskin olduğu gözlenmektedir. AuNP ile kaplandıktan sonra bu pik akımları (Katodik pik akımı=784,7 µA, Anodik pik akımı=829,4 µA) biraz daha yaklaşarak düşüş göstermiştir. 6-MH' nin altın nanopartiküllerle Au-S bağı vasıtasıyla bağlanmasıyla birlikte, modifiye yüzeyde redoks probunun pikleri ideal bir şekilde ortaya çıkmaktadır (Katodik pik akımı=815 µA, Anodik pik akımı=737,2 µA). Bir sonraki aşama olan GOPE modifikasyonu ile birlikte hem yüzeyin yalıtkanlığının artması hem de epoksi gruplarındaki ortaklanmamış e⁻ çiftlerinden kaynaklı pik akımları (Katodik pik akımı=864,9 µA, Anodik pik akımı=711,6 µA) yalın GP pik akımlarına nazaran biraz daha azalmıştır. Hemen sonrasında anti-CK immobilizasyonu ile beraber yüzeyin iletkenliği, protein molekülünün yalıtkan özelliğinden dolayı azaldığı için redoks probuna ilişkin yükseltgenme ve indirgenme pik akımlarında bariz düşüşler meydana gelmiştir (Katodik pik akımı=590,9 µA, Anodik pik akımı=609,5 µA). Bu sonuç aynı zamanda anti-CK' nin yüzeye immobilize edildiğini de göstermektedir. Immobilizasyonun son aşaması olan BSA adımıyla birlikte anodik katodik pikleri iyice birbirine yaklaşmışlardır. Yüzey yalıtkanlığı arttıkça düşüş göstermeye devam eden pik akımlarında belirgin düşüş meydana gelmiştir (Katodik pik akımı=548,6 µA, Anodik pik akımı=495,6 µA).

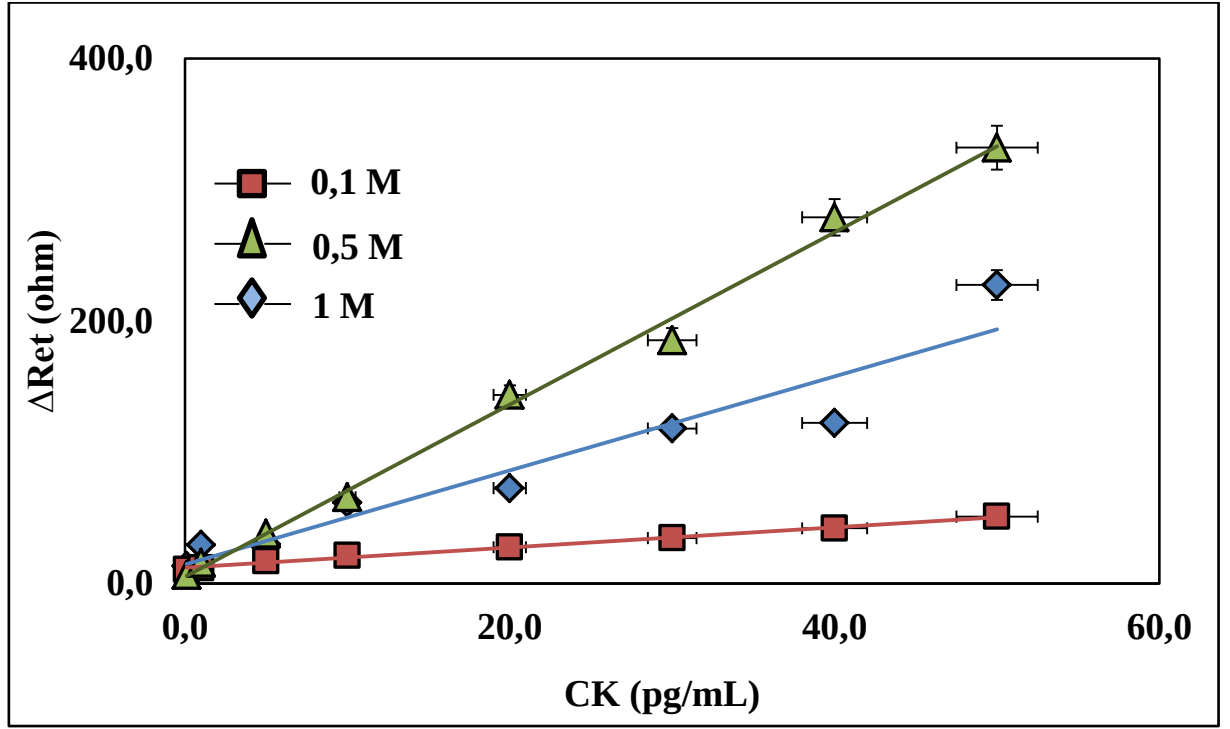
Birbirleriyle örtüşen bu EIS ve CV sonuçlarına bakılarak CK biyosensörünün başarılı bir immobilizasyona sahip olduğu açıkça görülmektedir.

4.1.2. CK biyosensörünün optimizasyon basamakları

4.1.2.1. 6-MH' nin konsantrasyon optimizasyonu

İmmobilizasyon işlemi tamamlanan CK biyosensörünün optimizasyon basamaklarına ilişkin ilk adım 6-MH' nin optimum konsantrasyonunun saptanmasına yönelik olmuştur. Yüzeyde SAM oluşturmaya yönelik kullanılan bu bileşiğin konsantrasyonu doğrudan immobilizasyonun diğer adımları için rehber niteliğindedir. Çünkü yüzeyde istifleterek altın ve kükürt arasında kovalent bağ oluşturan 6-MH' nin değişen konsantrasyonu ile birlikte farklı impedimetrik tavırlar sergilediği gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak 3 farklı konsantrasyon da (0.1 M, 0,5 M, 1 M) optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmalarda tüm veriler sabit olup sadece 6-MH konsantrasyonu değiştirilmiştir. Her bir konsantrasyon için yapılan çalışma adımı EIS ve CV verileriyle takip edilmiştir. Sonrasında EIS verilerinden elde edilen Ret değerlerinden yararlanılarak standart grafikler ve regresyon eğrisi üzerinde belirleme katsayıları oluşturulmuştur. Tüm bu veriler Şekil 4.3’ te ve Çizelge 4.1’ de verilmiştir.



Şekil.4.3. 6-MH konsantrasyonunun CK biyosensör cevabı üzerine etkisi

Çizelge.4.1. MH konsantrasyonu optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

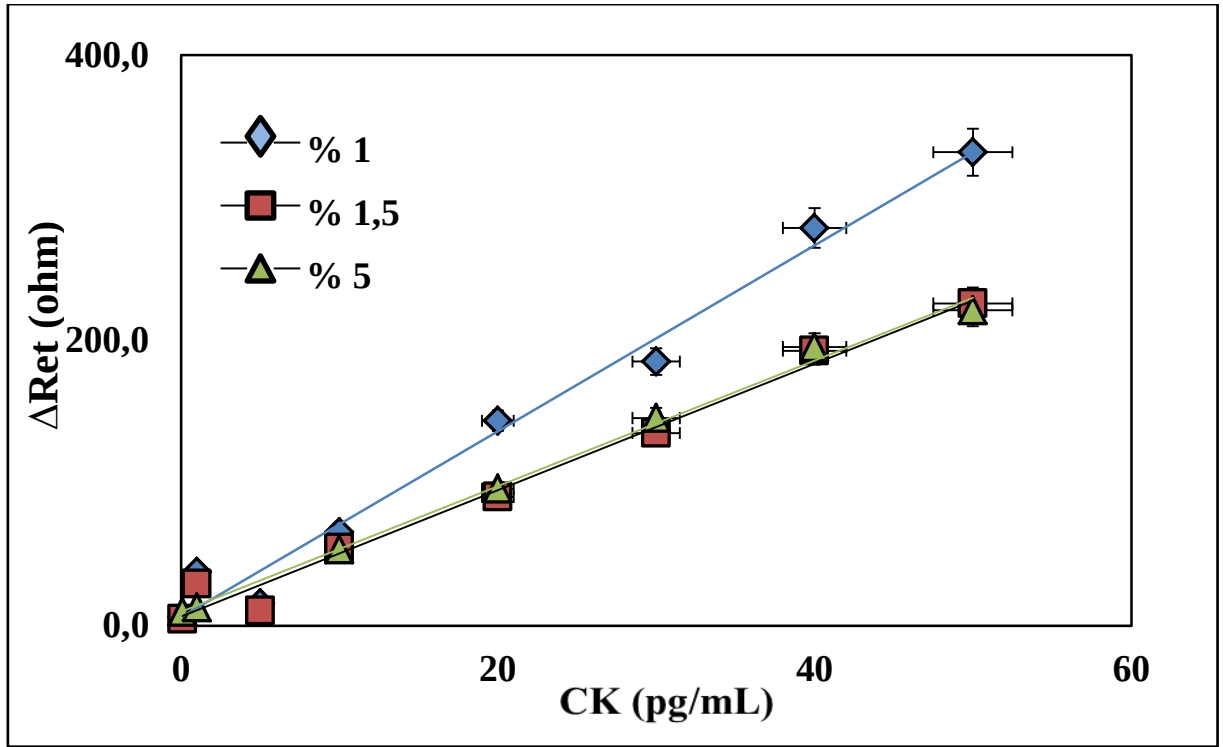
6-MH Konsantrasyonu (M)	R^2	Denklem
0,1	0,9948	$y=0,7718x+11,978$
0,5	0,9953	$y=6,5553x+5,277$
1	0,9176	$y=3,5843x+14,377$

Bu optimizasyon adımı için ilk olarak 0,1 M’ lık 6-MH konsantrasyonuyla çalışılmıştır. Ancak elde edilen impedans sinyalleri çalışma için pek tatmin edici bulunmamıştır. Bu sinyal düşüklüğünün, kullanılan konsantrasyonun düzgün bir dizilim ve

güçlü bir kovalent bağ için yetersiz kalmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple bir sonraki konsantrasyon değeri için daha derişik olan 0,5 M'lık 6-MH tercih edilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen kalibrasyon grafiğinde de görüldüğü üzere bariz bir sinyal artışı gözlemlenmiştir. Bu neticeden yola çıkarak bir sonraki konsantrasyon daha da derişik bir 6-MH değeri olan 1M olarak belirlenmiştir. Ancak çalışma sonrasında görülmüştür ki yüzeydeki fazla konsantrasyondan kaynaklı olarak impedansta bozukluklar meydana gelmiştir. İmpedans sinyalleri düşmüş buna bağlı olarak elde edilen kalibrasyon grafiğindeki regresyon eğrisi üzerinde düşük bir belirleme katsayısı (R^2 : 0,9173) hesaplanmıştır. Tüm bu çalışmalar değerlendirilerek CK biyosensörü için optimum 6-MH konsantrasyon değeri 0,5 M olarak belirlenmiştir.

4.1.2.2. GOPE' nin konsantrasyon optimizasyonu

Yüzeyin immobilizasyonu için 6-MH ile kooperatif çalışan GOPE' nin geliştirilen biyosensör üzerindeki etkisini araştırmak için değişik konsantrasyonlarda optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmanın yapılmasıyla ulaşılmak istenen hedef, hidroksil grupları oluşan yüzeyde siloksan bağı yaparak antikor bağlanması için ortam oluşturan GOPE' nin konsantrasyonun etkisini belirleyebilmektir. Bu amaca yönelik 3 farklı değerde (%1 % 1,5 % 5) GOPE optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. İlk çalışma % 1,5 luk GOPE konsantrasyonuyla yapılmıştır. EIS ve CV ölçümleri alınarak standart grafiği oluşturulmuştur. Daha derişik konsantrasyonlardaki etkiyi inceleyebilmek adına bir sonraki çalışma %5' lik GOPE konsantrasyonuyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın sonunda Şekil 4.4' te de görüldüğü üzere sinyallerde bir azalış meydana gelmiştir. Bunun sebebinin yine derişik konsantrasyon kullanılmasından kaynaklı olarak elektrot yüzeyindeki bağlanmanın düzensizliğiyle alakalı olmasındandır. Ortamda gerekenden fazla madde miktarı, kovalent bağlanma ve zayıf etkileşimler sırasında bir takım bozukluklar meydana getirmektedir. Bu da EIS sinyallerindeki Ret değerlerinin azalmasının cevabı olarak kabul edilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda ki etkisi yorumlandıktan sonra, bir diğer optimizasyon adımı olarak düşük konsantrasyonlardaki davranışını inceleyebilmek için bu kez %1' lik GOPE ile çalışılmıştır. Bu çalışma sonrasında da elde edilen standart grafik en iyi sonuca sahip olup, diğer iki konsantrasyonda sonuçlar (%1,5 ve %5'lik GOPE) neredeyse çakışık çıkmıştır. Bu sebeple başka bir optimizasyon daha yapılmayıp madde sarfiyatı da göz önünde bulundurularak optimum GOPE konsantrasyonu %1 olarak belirlenmiştir. Bu optimizasyona ait standart grafikler Şekil 4.4' te, regresyon üzerindeki belirleme katsayıları ve denklemleri ise Çizelge 4.2' de verilmiştir.



Şekil.4.4. GOPE konsantrasyonunun CK biyosensör cevabı üzerine etkisi

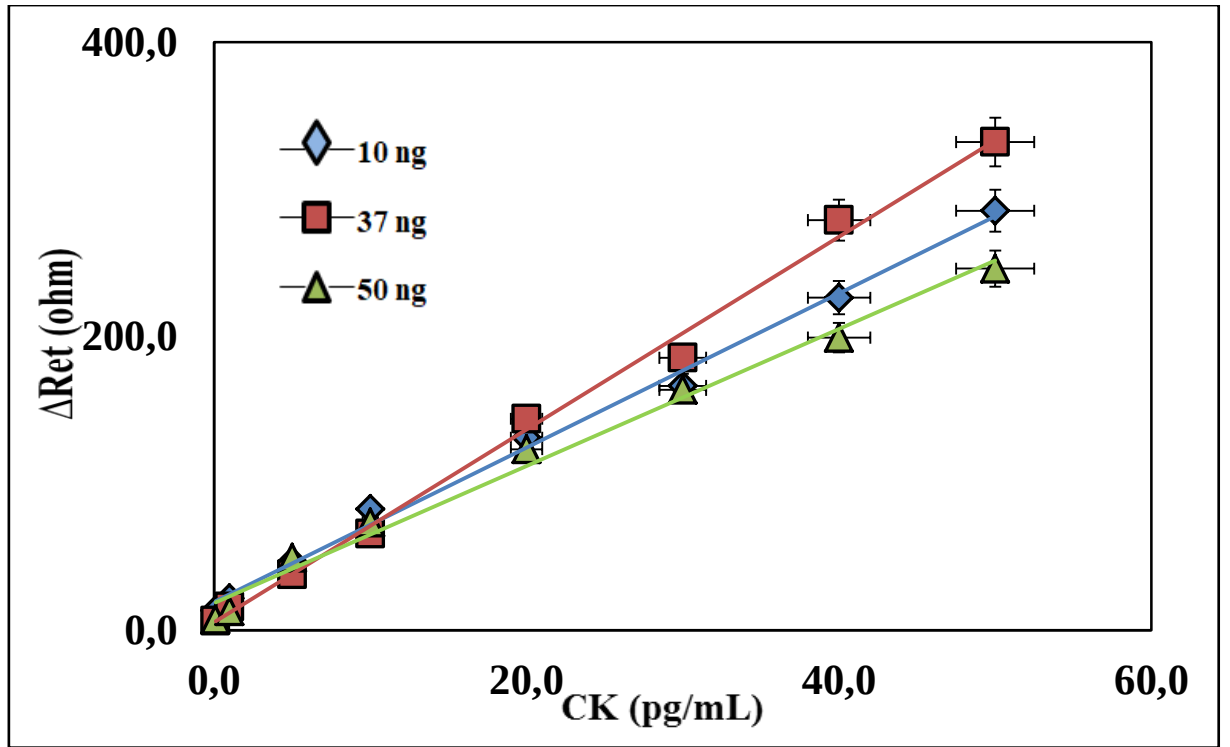
Çizelge.4.2. GOPE konsantrasyonu optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

GOPE (%)	R^2	Denklem
1	0,9845	$y=6,5198x+5,9703$
1,5	0,9971	$y=4,4318x+6,4768$
5	0,9957	$y=4,4039x+9,8187$

4.1.2.3. Anti-CK' nın konsantrasyon optimizasyonu

Hassas bir biyosensörün geliştirilmesinde en önemli adımlardan birisi hiç şüphesiz optimum antikör konsantrasyonunun belirlenmesidir. CK tayinin gerçekleşmesinde zorunlu bir basamak olan anti-CK immobilizasyonu için belirlenecek olan konsantrasyon değeri çalışmanın bu aşamasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu amaca yönelik olarak 3 farklı konsantrasyonda (10 ng/mL, 37 ng/mL, 50 ng/mL) optimizasyon gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 37 ng/mL anti-CK konsantrasyonu denenmiştir. Daha sonra biyosensörün derişik konsantrasyonlardaki cevabını öğrenebilmek için 50 ng/mL konsantrasyonuyla çalışılmıştır. Derişik konsantrasyonda CK biyosensörü büyük olasılık bir takım sterik engellerle karşı

karşıya kalarak biyobelirteci tayin edebilme yeteneğinde düşüş gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarakta EIS sinyallerinde düşüş meydana gelmiştir. Bu sebeple bir sonraki çalışma düşük konsantrasyonda (10 ng/mL) gerçekleştirilmiştir. Düşük konsantrasyonla yapılan çalışma sonrasında elde edilen veriler değerlendirildiğinde, hem 10 ng ile 37 ng/mL konsantrasyonlarının sinyalleri arasında çok önemli bir fark gözlemlenmemesinden hem de madde sarfiyatını önleyebilmek adına optimum anti-CK konsantrasyonu 10 ng/mL olarak seçilmiştir. Anti-CK konsantrasyonunun optimizasyonuna ait standart grafikler Şekil 4.5’ te, regresyon üzerindeki belirleme katsayıları ve denklemleri ise Çizelge 4.3’ de verilmiştir.



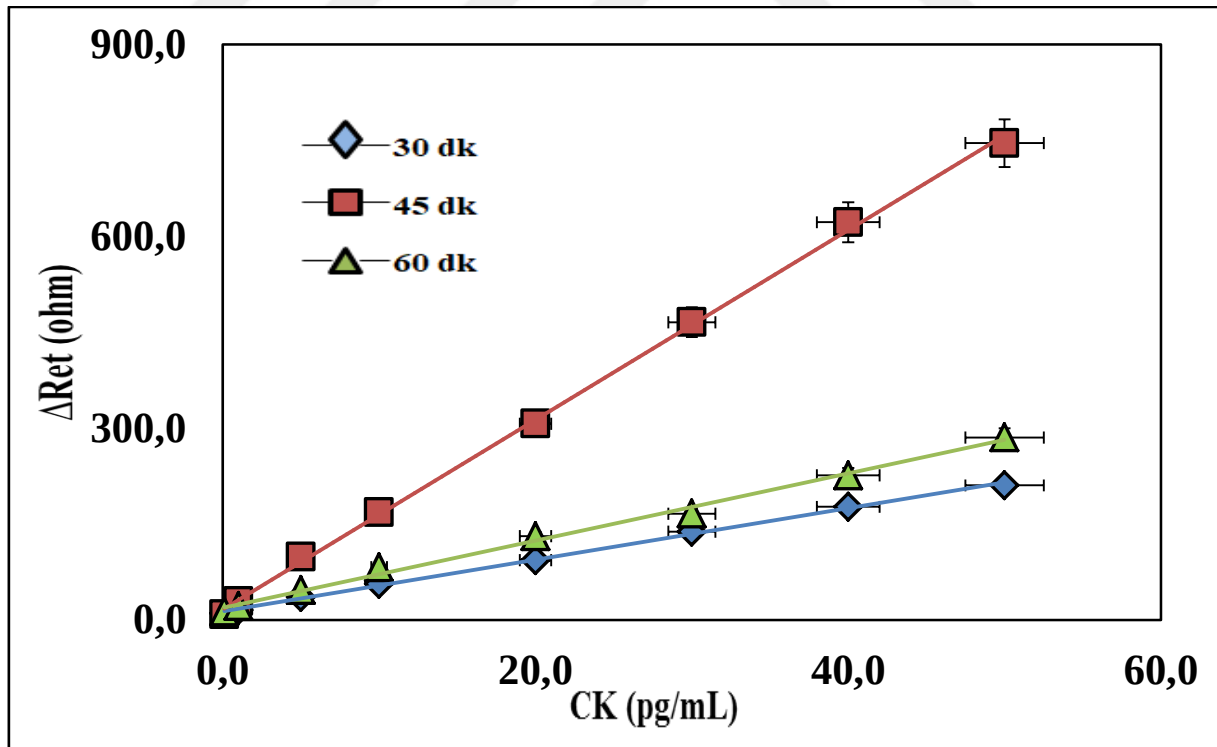
Şekil.4.5. Anti-CK konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi

Çizelge.4.3. Anti-CK konsantrasyonu optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

Anti-CK (ng/mL)	R^2	Denklem
10	0,995	$y=5,2485x+19,121$
37	0,9953	$y=6,5553x+5,277$
50	0,9892	$y=4,6611x+18,268$

4.1.2.4. Anti-CK' nın inkübasyon süresinin optimizasyonu

CK konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından, geliştirilen biyosensör için en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik optimizasyon çalışması yapılmıştır. Üç farklı süre (30, 45, 60 dakika) ile gerçekleştirilen bu çalışmada her bir süre için ayrı ayrı biyosensörler hazırlanmış ve sonuçlar EIS spektrumları ile takip edilmiştir. Bu spektrumlardan elde edilen Ret değerleri dikkate alınarak çizilen standart eğriler incelendiğinde 30 ve 60 dakikalık optimizasyon çalışmalarının birbirine yakın sonuçlar verdiği görülmektedir. En yüksek sinyal ve regresyon üzerindeki belirleme katsayısına sahip olan 45 dakika da çalışılan biyosensörün en iyi sonuca sahip olması ve zaman tasarrufu açısından da avantajlı olması göz önünde bulundurularak optimum anti-CK süresi 45 dakika olarak belirlenmiştir. Yeterli bağlanmayı 15-60 dakika süre aralığında gerçekleştirebilen antijen ve antikor etkileşimi için bu sonuç destekleyicidir (**Goldblatt 2001; Reverberi ve Reverberi 2007**). Anti-CK' nın inkübasyon süresi optimizasyonuna ait standart grafikler Şekil 4.6' da, regresyon üzerindeki belirleme katsayıları ve denklemleri ise Çizelge 4.4' te verilmiştir.



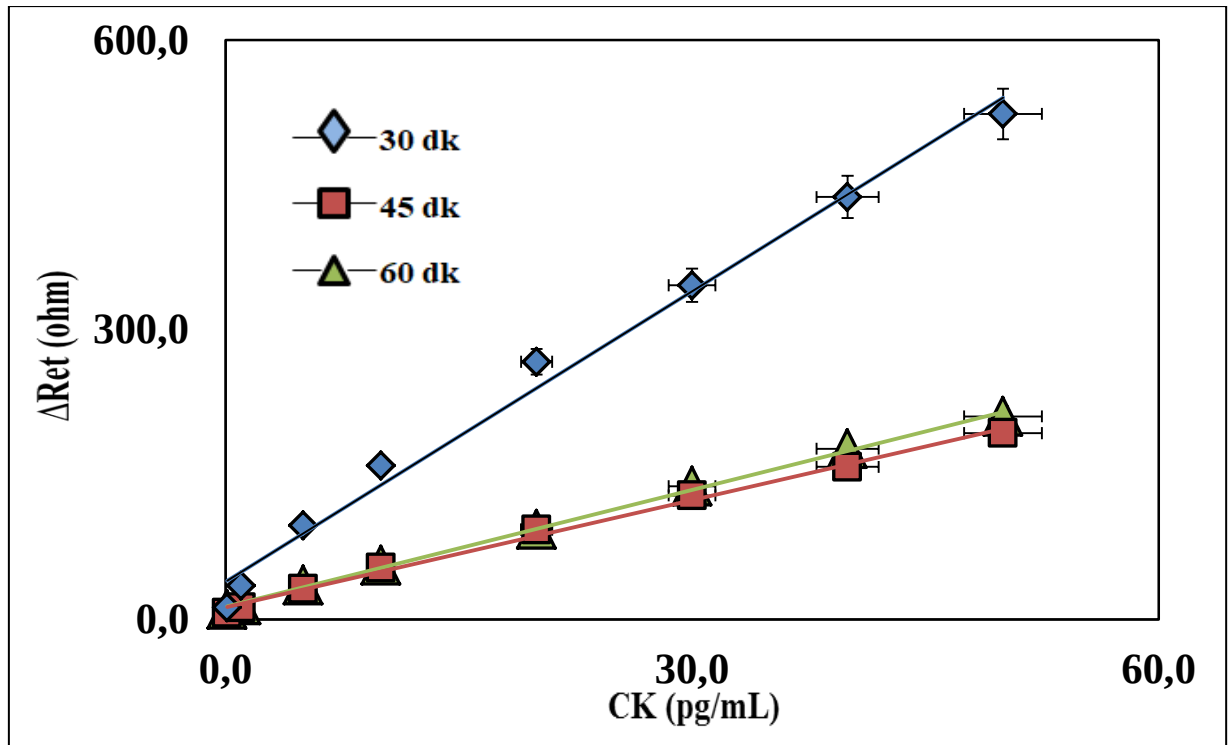
Şekil.4.6. Anti-CK inkübasyon süresi optimizasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi

Çizelge.4.4. Anti-CK süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

Anti-CK (dk)	R^2	Denklem
30	0,9983	$y=4,0307x+13,375$
45	0,999	$y=14,824x+16,254$
60	0,995	$y=5,2485x+19,121$

4.1.2.5. CK' nın inkübasyon süresinin optimizasyonu

Tasarlanan biyosensörün optimizasyon çalışmalarındaki son aşama CK biyobelirtecinin inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Anti-CK süre optimizasyonunda olduğu gibi burada da 3 farklı süre de (30, 45, 60 dakika) çalışmalar yapılmıştır. Her bir adım EIS ve CV ile takip edilerek çalışılan süreler için standart grafikler oluşturulmuştur. Şekil 4.7' de bu standart grafikler incelendiğinde sinyal artışlarındaki düzen ve çalışmayı zaman tasarrufu yönünden pratik kıldığı için en uygun inkübasyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir. CK' nın inkübasyon süresi optimizasyonuna ait regresyon üzerindeki belirleme katsayıları ve denklemleri ise Çizelge 4.5' te verilmiştir.



Şekil.4.7. CK inkübasyon süresi optimizasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi

Çizelge.4.5. CK süre optimizasyonunun grafiklerinin R² leri ve denklemleri

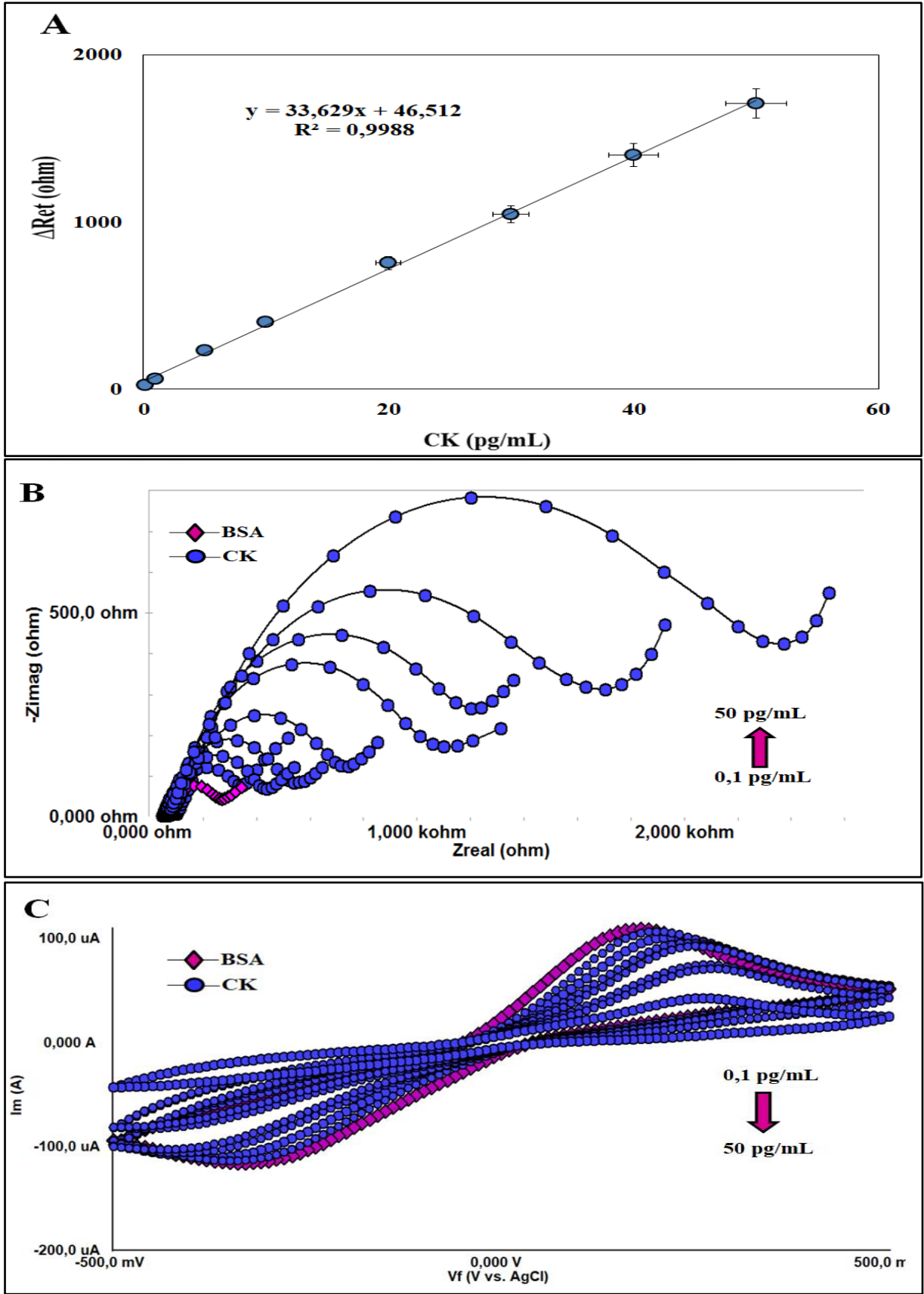
CK (dk)	R ²	Denklem
30	0,9901	$y=10,03x+39,083$
45	0,9953	$y=3,7022x+12,421$
60	0,9983	$y=4,0307x+13,375$

4.1.3. CK biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları

4.1.3.1. CK biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Optimizasyon basamakları tamamlanarak en uygun değerler belirlendikten sonra, tasarlanan biyosensörün artan konsantrasyonlarında hazırlanan CK biyobelirteci EIS ve CV teknikleriyle tayin edilmiştir. 8 farklı konsantrasyon değeri belirlenerek yapılan bu çalışma da geliştirilen biyosensörün hassas CK tayinine yönelik bir lineer aralık belirlenmiştir. GP temelli CK biyosensörünün yapılan çalışmalar sonrasında tayin aralığı 0,1 – 50 pg mL⁻¹ olarak saptanmıştır. Oldukça düşük konsantrasyon seviyesinde, yüksek duyarlılıkta analiz yapabilen CK biyosensörünün tayin aralığının oldukça geniş olduğu gözlemlenmektedir. Tasarlanan biyosensörün kalibrasyon grafiğine ait EIS spektrumu, CV voltamogramı ve Ret değerlerinden elde edilen standart grafik Şekil 4.8’ de verilmiştir. Ayrıca LOD ve LOQ değerleri de sırasıyla 0,045 pg mL⁻¹ ve 0,151 pg mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

EIS ölçümü alınırken yük transfer direnci olan Ret değerinin yanı sıra çözelti direnci (Ru) ve kapasitans (C) değerinin de değişikliğe uğraması söz konusudur. Artan konsantrasyonla birlikte impedans spektrumundaki yarım daire çapının da artması yüzeyin yalıtkanlaştığının bir işaretidir ve tüm bunlar gerçekleşirken impedimetrik verilerin de değişmesi CK’ nın artan konsantrasyonlar da tayin edilebildiğini kanıtlamış olmaktadır. Biyosensöre ait bu impedimetrik veriler Çizelge 4.6’ da verilmiştir.



Şekil.4.8. Tasarlanan biyosensörün artan CK konsantrasyonuyla elde edilen (A) Kalibrasyon grafiği, (B) EIS verileri, (C) CV voltamogramları

Çizelge.4.6. Artan CK konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen impedimetrik veriler

Elektrot	Ret(ohm)	Ru (ohm)	C (µF)
CK biyosensörü (BSA)	185,7±1,903	61,65±0,43	24,62±0,48
CK 0,1 pg/mL	201,9±2,027	63,4±0,44	22,4±0,42
CK 1 pg/mL	368,5±3,159	60,29±0,43	15,29±0,22
CK 5 pg/mL	461±3,861	63,59±0,44	20,01±0,27
CK 10 pg/mL	608,3±5,193	86,27±0,613	11,04±0,15
CK 20 pg/mL	915,8±7,788	80,16±0,567	11,82±0,14
CK 30 pg/mL	1052±8,888	75,4±0,54	11,12±0,13
CK 40 pg/mL	1401±11,16	96,05±0,67	10,47±0,12
CK 50 pg/mL	1924±15,6	117,3±0,8175	10,37±0,11

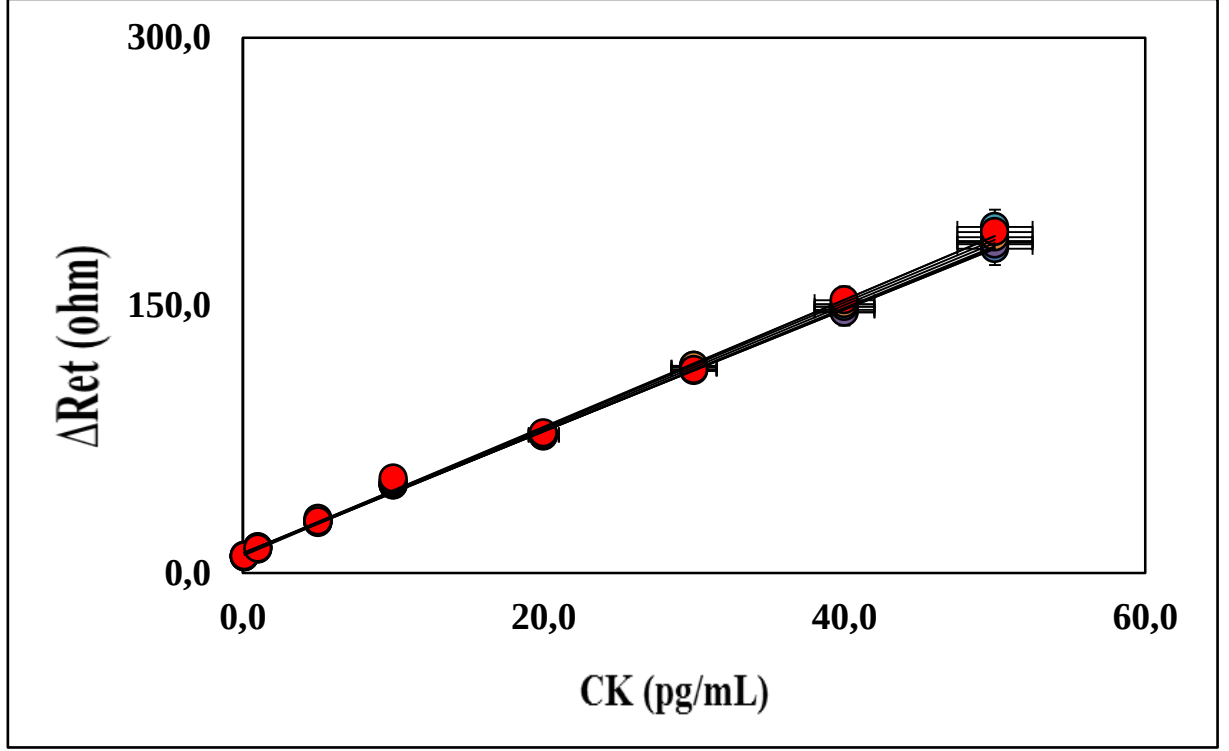
4.1.3.2. CK biyosensörünün tekrarlanabilirliği

Tekrarlanabilirlik çalışması hassas bir biyosensör tasarlayabilmek adına oldukça önemli bir parametredir. Çok detaylı olarak bilinen bir biyobelirteç tercih edilmesi durumunda bile biyosensörün temizlik prosesi, çalışılan ortam ve koşulları açısından beklenen niteliklerde oldukça büyük değişimler gözlenebilir. Bu sebeple her koşulda biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik çalışmasının gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirlik çalışması bir örnekte art arda ölçüm yapılması ve elde edilen değerlerden ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısının hesaplanması temeline dayanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda 20 farklı elektroda aynı immobilizasyon işlemleri uygulanarak her bir sensör 20 pg/mL CK konsantrasyonuyla inkübe edilmiştir. Bu işlemler sonrasında alınan EIS ölçümlerine göre ortalama değer 20,188 pg/mL, standart sapma değeri 0,51 pg/mL ve varyasyon katsayısı % 2,52 olarak hesaplanmıştır.

4.1.3.3. CK biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Biyosensörlerde sahip olması istenen özelliklerden en önemlisi tekrar aynı şartlarda ve özelliklerde hazırlanabiliyor olmasıdır. Biyosensörlerin rutin analizlerde kullanılabilmesi için güvenilir olması ve tekrar tekrar üretilmesi çok önemli bir parametredir. Bu amaca yönelik olarak, optimum koşullarda hazırlanan elektrotlar CK' nin farklı standart konsantrasyonlarıyla inkübe edilerek, detaylı kalibrasyon eğrisi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen her bir biyosensörün EIS ve CV ölçümleri alınarak bu şekilde toplam 7 biyosensör hazırlanmıştır. Bu biyosensörlerde, EIS spektrumlarından elde edilen Ret değerleri, CK konsantrasyonlarına

karşı grafiğe geçirilmiştir ve standart grafikler oluşturularak birbirleriyle kıyaslanmıştır. Ayrıca biyosensörün tekrar üretilebilirlik çalışması kapsamında eğim ve intersept değerlerinin relatif standart sapmaları da sırasıyla %1,83 ve %5,09 olarak bulunmuştur. CK biyosensörüne ait tekrar üretilebilirlik sonuçları Şekil 4.9’ da standart grafiklere ait regresyon üzerindeki belirleme katsayıları ve denklemleri ise Çizelge 4.7’ de verilmiştir.



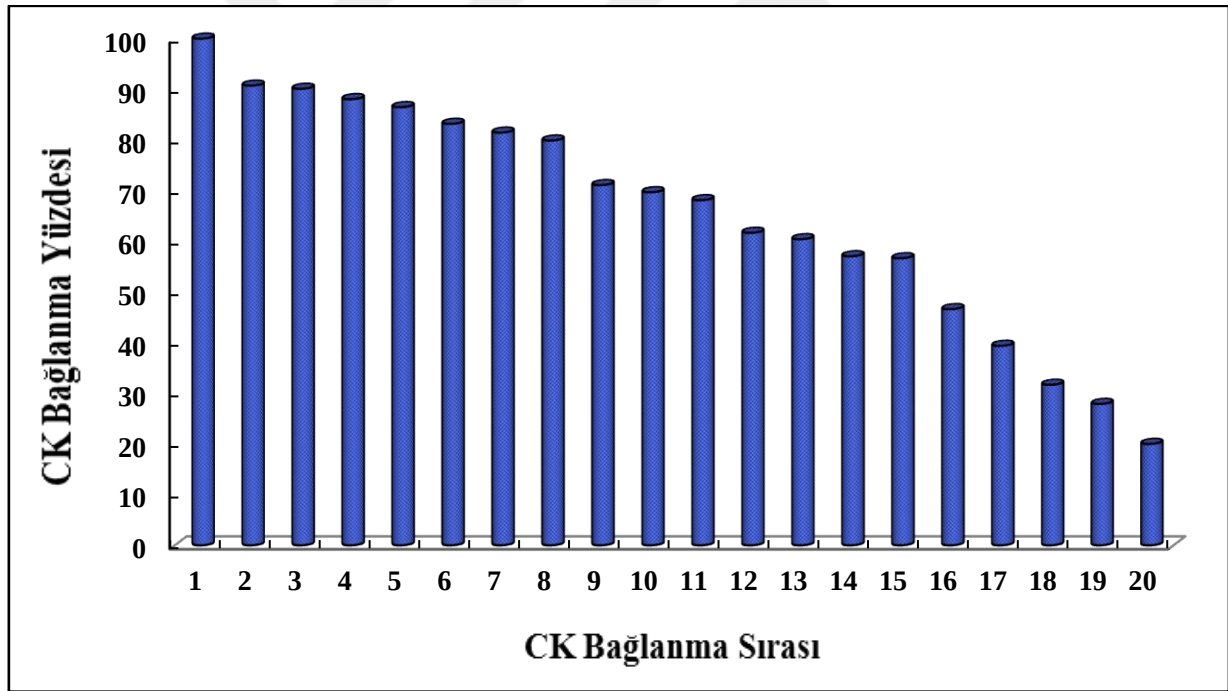
Şekil.4.9. CK biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ilişkin kalibrasyon grafikleri. (n=7)

Çizelge.4.7. CK biyosensörünün tekrar üretilebilirlik grafiklerinin R^2 ’ leri ve denklemleri

Tekrar üretilebilirlik	R^2	Denklem	Tayin Aralığı (pg/mL)
1	0,9991	$y=3,4106x+11,165$	0,1-50 pg/mL
2	0,999	$y=3,4857x+10,716$	0,1-50 pg/mL
3	0,9988	$y=3,452x+10,492$	0,1-50 pg/mL
4	0,9987	$y=3,4396x+10,524$	0,1-50 pg/mL
5	0,9972	$y = 3,4746x+10,751$	0,1-50 pg/mL
6	0,9983	$y=3,5118x+11,224$	0,1-50 pg/mL
7	0,9975	$y=3,5599x+10,692$	0,1-50 pg/mL

4.1.3.4. CK biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği (rejenerasyon)

Geliştirilen biyosensörün karakterizasyon çalışmalarından bir tanesi de elektrot yüzeyine inkübe edilmiş olan CK' nin asitle muamele edilerek tekrar kullanılabilirliğini belirleyen rejenerasyon çalışmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, her CK bağlanmasından sonra 10 mM HCl asit çözeltisinin içerisinde 2 dakika bekletilerek rejenere edilen sensörler 20 defa CK bağlayabilmiş, 20. bağlanmada da % 20'lik verimi ile hala CK' yi bağlayabildiği gözlemlenmiştir. Sonuçların grafiğe dökülmüş hali Şekil 4.10' da verilmiştir. Geliştirdiğimiz bu biyosensörün gerçek tıbbi uygulamalarda daha kullanışlı ve ekonomik olması için depo ömrünün yanında birden fazla kullanım özelliğine de sahip olması çok önemlidir. Yapılan rejenerasyon işleminde elektrotları birçok kez yüksek verimle aynı biyosensörün kullanılabildiği gözlenmiş ve tıbbi uygulamalarda kullanılacağı düşünülürse oldukça ekonomik özelliğe sahip olacağı kanıtlanmıştır.

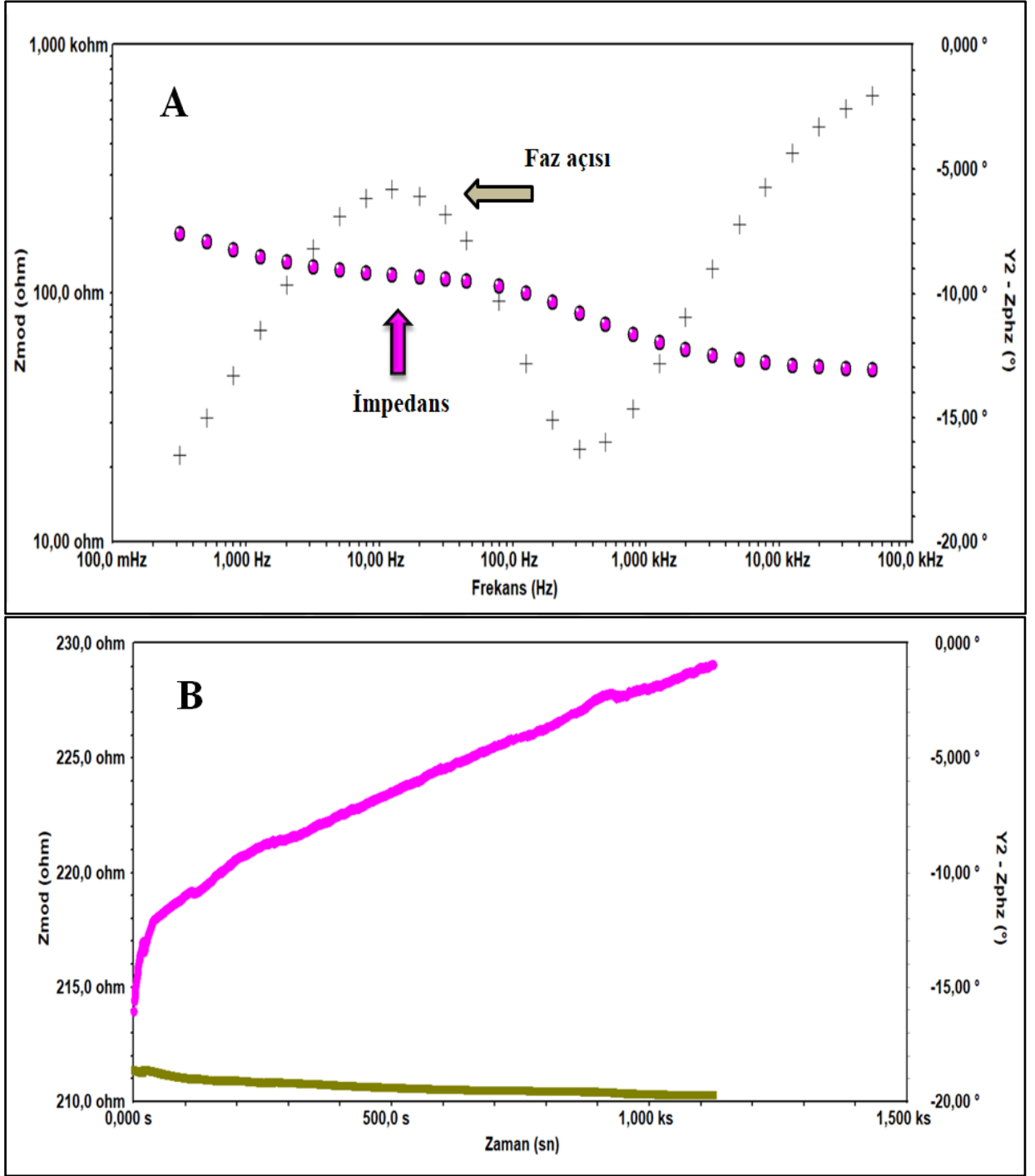


Şekil.4.10. CK biyosensörünün tekrar kullanılabilirlik çalışmasının grafikteki görünümü

4.1.3.5. CK biyosensörünün sabit frekansta impedans (SFI) analizi

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi son yıllarda biyomoleküler etkileşimlerin incelenmesinde de etkili bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle biyosensör

uygulamalarında elektrot yüzeyindeki değişimlerin eş zamanlı analizi oldukça önemlidir. Bu bağlamda sabit frekansta impedans ölçümü oldukça elverişli bir tekniktir **(Sezgintürk ve Özcan 2016)**. Bu amaçla CK biyosensör sistemi için tekli frekans ölçümü ile yüzey analizi yapılmıştır. Zamana karşı sabit bir frekansın ölçümüne dayanan bu yöntem sayesinde zaman dilimlerinde ve toplam zamanda meydana gelen impedans değişimleri kontrol edilebilmektedir **(Sezgintürk ve ark. 2014)**. Bu amaç doğrultusunda 198,6 Hz sabit frekans değeri ile impedans ölçümü zamanın ve faz açısının fonksiyonları olarak ölçülmüştür. Ölçüm işlemi gerçekleştirilmeden önce kullanılacak olan frekans değerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu frekans değeri belirlenirken Şekil 4.11.A’ da verilmiş olan Bode eğrisinden faydalanılmıştır. Bu eğrinin, Ret hesaplarının yapıldığı Nyquist eğrisinden en önemli farkı her bir noktanın frekans değerini gösterebilmesidir. Bu sayede anti-CK ve CK etkileşiminin kinetik bağlanmasının en net gözlemlenebileceği frekans değeri seçilebilmektedir. CK biyosensörünün sabit frekansta zamana bağlı impedans değişimi Şekil 4.11.B’ de verilmiştir.



Şekil.4.11. CK biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümüne ait (A) Bode grafiği, (B) SFI spektrumu (pembe; sabit frekansta EIS ölçümü, yeşil; faz açısı ölçümü)

Şekil 4.11.B incelendiğinde pembe eğri sabit frekansta alınan impedans ölçüsünü, yeşil eğri ise faz açısı ölçümünü ifade etmektedir. pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde gerçekleşen bu işlemde CK biyobelirtcinin zamana karşı bağlanması net bir şekilde görülmektedir. Yaklaşık 1120 ks (20 dk) civarında CK' nin doygunluk noktasına erişerek

ölçüm tamamlanmıştır. Bu sonuçta CK' nin optimum inkübasyon süresinin 30 dk olarak seçilmesini destekleyen bir sonuçtur.

4.1.3.6. CK biyosensörünün kare dalga voltametri (SWV) ile analizi

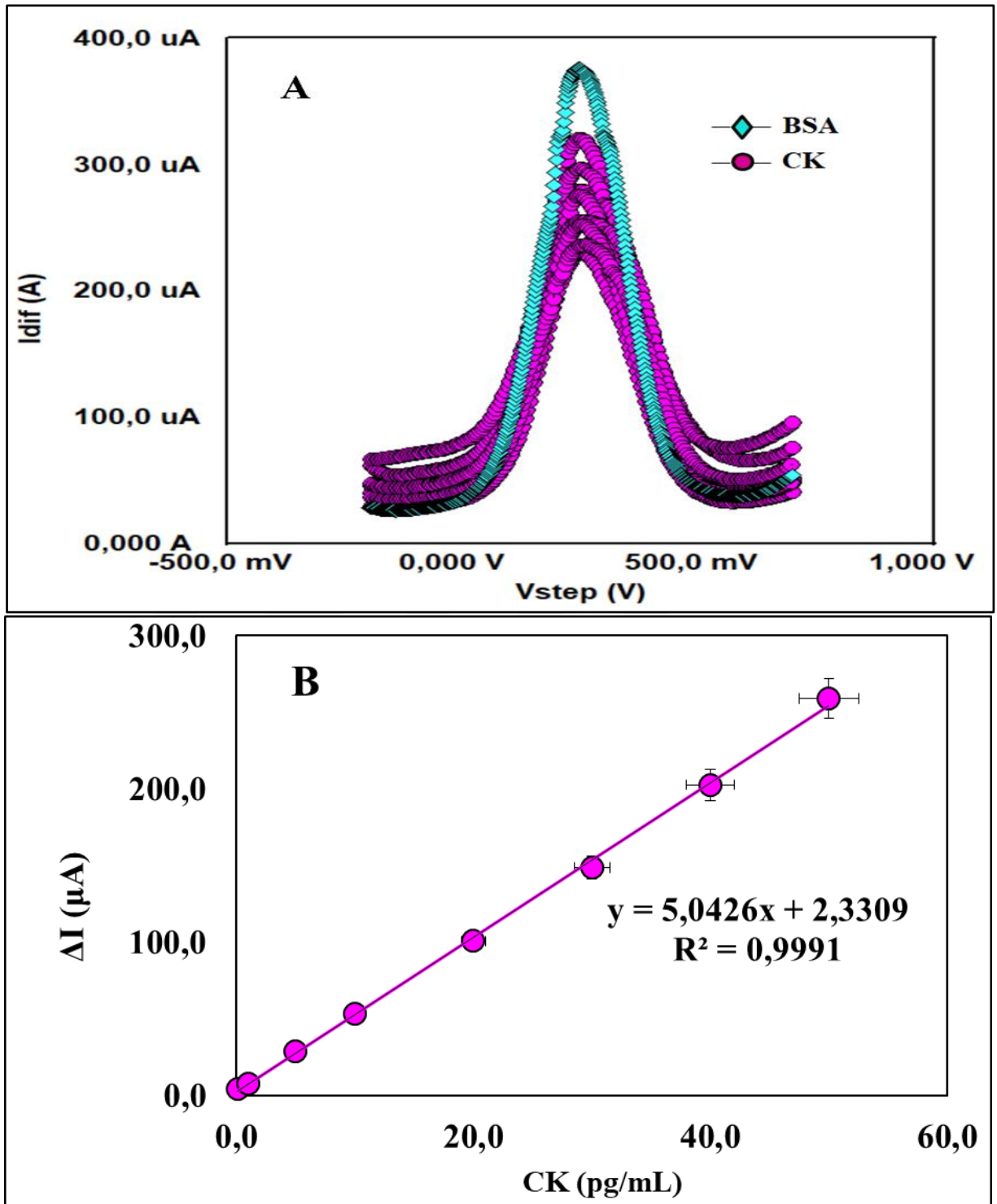
Biyosensörün döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ölçümleriyle takip edilmesine ek olarak kare dalga voltametriyle de elektrokimyasal ölçümleri pekiştirilmiştir. Bu voltametri tekniği oldukça hızlı ve duyarlı olmasıyla birlikte kare dalganın frekansı (f) ve basamak yüksekliği (ΔE_s) değiştirilerek etkin tarama hızı, belirlenir ve birkaç saniye içinde voltamogramlar kaydedilebilir. Kare dalga voltametrisinin bir diğer avantajı da toplam akıma kapasitif katkılarının en az seviye de olmasıdır. Bu sayede tarama hızı çok etkili olarak arttırılabilmektedir. Voltametrik piklerin çok kolay okunmasının sebebi ise SWV deki net akımın (ΔI) hem ileri hem de geri puls akımlarından daha büyük olmasından kaynaklıdır (**Wang 2000**).

Bu çalışma için SWV frekansı 25 Hz olarak seçilip, potansiyel aralığı olarak -0,2/0,7 V olarak belirlenerek CK' nin artan konsantrasyonlarında ölçüm alınmıştır. Alınan ölçümlerin hesaplamaları yapılırken 4.2 bağıntısındaki denklem kullanılmıştır.

$$\Delta I_{dif} = \Delta I_{dif} (BSA) - \Delta I_{dif} (CK) \quad (4.2)$$

Şekil 4.12, optimum koşullarda 0,1 pg – 50 pg mL⁻¹ tayin aralığındaki CK ölçümüne ait kare dalga voltamogramlarını ve kalibrasyon grafiğini göstermektedir.

Şekil 4.12.A, CK biyosensörüne ait kare dalga voltamogramlarını göstermektedir. Bu voltamogramlar incelendiğinde, oldukça iletken bir yüzeye sahip olan GP elektrotların karakteristik voltametri piklerini bu çalışma da sergilediği gözlemlenmektedir. CK tayininin başka bir teknikle gerçekleştirilmesinin cevabı olarak elde edilen bu düzgün voltamogramlar Şekil 4.12.B' deki standart grafiğiyle de CK biyosensörünün SWV tekniğiyle de gayet başarılı bir şekilde ölçümlenebildiğini göstermektedir.



Şekil.4.12. CK biyosensörüne ait (A) kare dalga voltametrisi ve (B) kalibrasyon grafiği

4.1.3.7. CK biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

Yapılan immobilizasyon işlemlerinde elektrot yüzey alanının ne kadar kaplandığını hesaplayabilmek adına dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak, Laviron eşitliği yardımıyla

elektrodun kaplanmış olan yüzey alanı hesaplanmıştır. Bu çalışma için 10 farklı tarama hızında (10 mV, 20 mV, 30 mV, 40 mV, 50 mV, 60 mV, 70 mV, 80 mV, 90 mV ve 100 mV) dönüşümlü voltametri de ölçümler alınmıştır. Alınan ölçümler sonrasında elde edilen verilerle yapılan hesaplamalar Laviron eşitliğinde yerine konarak sonuçlar elde edilmiştir.

$$I_p = \frac{n^2 F^2 A \Gamma v}{4RT} = \frac{nFQv}{4RT} \quad (4.3)$$

n : eğim

F : Faraday sabiti (96485 C mol⁻¹)

A : Elektrot yüzey alanı (cm²)

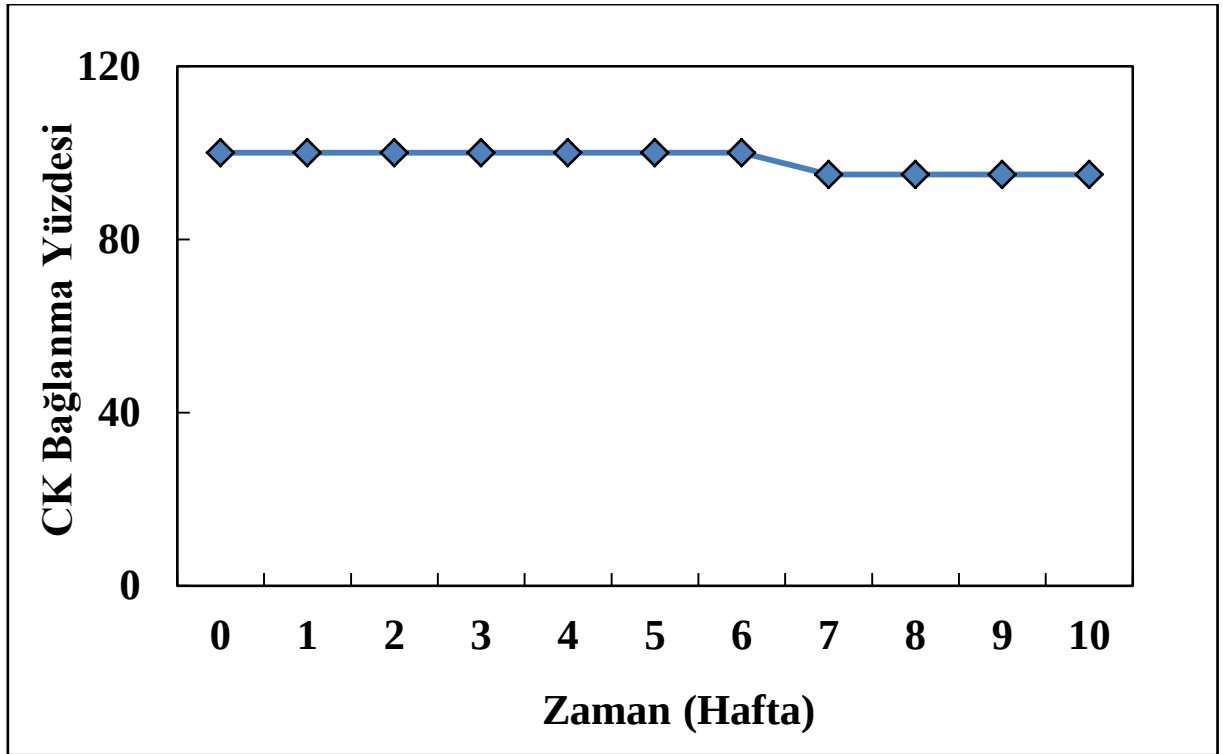
Q : Yük (C)

Γ: Kaplanan yüzey alanı (mol cm⁻²)

Laviron eşitliğinden (**Laviron 1967**) yararlanılarak hesaplanan sonuçlar değerlendirildiğinde başlangıçta 2,28x10⁻⁵ mol cm⁻² olarak hesaplanan GP yüzeyi, anti-CK bağlandıktan sonra 4,2x10⁻⁵ mol cm⁻² olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç anti-CK' nin immobilize edildiğini göstermektedir.

4.1.3.8. CK biyosensörünün raf ömrü

Geliştirilen biyosensörün raf ömrünün uzun olması depo kararlılığı, pratikte kullanımlar için ümit vadettiğinden son derece önemlidir. Bu amaç için geliştirilen sensörün 10 haftalık raf ömrünü saptayabilmek adına çalışma yapılmıştır. Bu çalışma, immobilizasyon işlemleri tamamlanan 10 elektrodun +4 °C de kapalı ve karanlık ortamda saklanması ve her hafta bir sensörün 20 pg/mL CK ile inkübe edilerek EIS ölçümleri alınmasıyla gerçekleştirilmiştir. İlk haftadan itibaren (başlangıçtan itibaren) alınan EIS ölçümleri, kalibrasyon grafiğinden elde edilen denkleme göre hesaplanarak CK biyosensörünün raf ömrüne ait grafik Şekil 4.13' de verilmiştir. 10. Haftanın sonunda yapılan hesaplamalardan elde edilen veriler değerlendirildiğinde CK biyosensörü için toplam aktivite kaybının % 5 olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda, geliştirilen biyosensörün uzun raf ömrüne sahip ideal bir biyosensör olduğunu söylemek mümkündür.



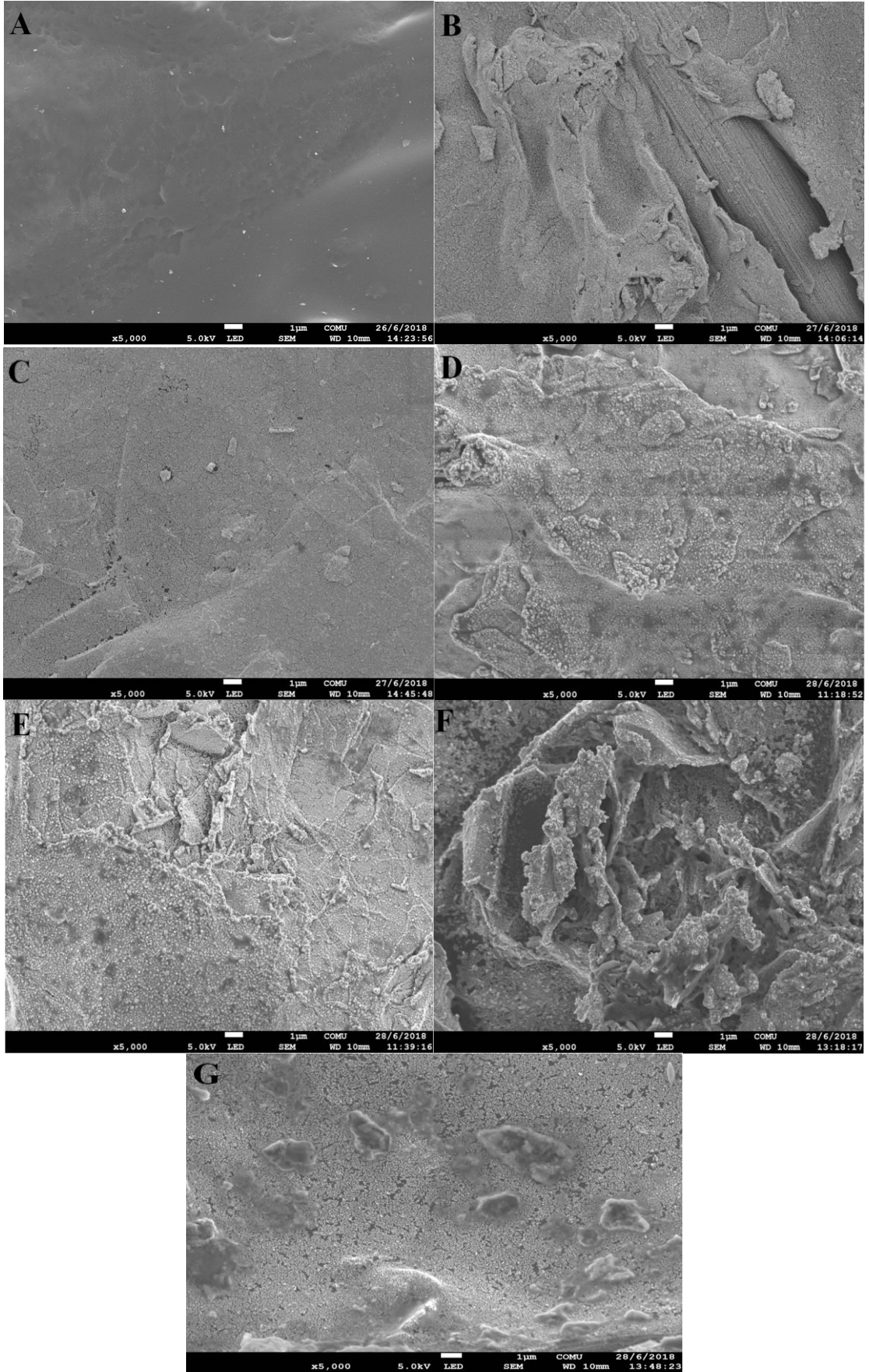
Şekil.4.13. CK biyosensörünün depo kararlılığı denemelerine ilişkin aktivite değerleri

4.1.3.9. CK biyosensörünün SEM görüntüleri

Geliştirilen biyosensörün morfolojik karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Böylece modifiye elektroda ait görüntülerle yüzeyde oluşan değişimler gözlemlenebilmektedir. Yüzey morfolojisinin adım adım incelendiği CK biyosensörünün SEM görüntüleri Şekil 4.14’ te verilmiştir. İlk olarak Şekil 4.14.A’ da görülen temiz GP elektrodun homojen yüzeyi görüntülenmiştir. Şekil 4.14.B’ de ise elektrot yüzeyi AuNP ile elektrokimyasal olarak kaplandıktan sonrasına ait SEM görüntüleridir. Yalın GP elektrot morfolojisiyle arasındaki fark bariz şekilde görülmektedir. AuNP’ ün yüzeyde birikmesiyle neredeyse tüm elektrot yüzey homojen olarak kaplanmıştır. Şekil 4.14.C’ deki SEM görüntüsü ise 6-MH’ ye aittir. Burada da AuNP ile tamamen kaplı olan yüzeyde 6-MH’ nin immobilizasyonu ile birlikte birtakım çatlaklıklar meydana gelerek morfolojiyi değiştirmiştir. Şekil 4.14.D’ de ise GOPE’ nin immobilizasyonu sonrası oluşan yüzeye ait SEM görüntüsüdür. Bu SEM görüntüsünde ise farklı olarak yüzey üzerinde daha önce görülmemiş olan kümelenmiş halde yapılar bulunmaktadır. Bu yapıların GOPE’ nin modifikasyonu ile birlikte ortaya çıktığı düşünülmektedir. Şekil 4.14.E’ de anti-CK antikor immobilizasyonu sonrası alınan SEM görüntüsü verilmiştir. Görüntüde daha önce görülmemiş şekillerin oluşmasının yanı sıra yüzeyin artan immobilizasyon adımlarıyla birlikte

yalıtkanlaşan tabaka daha net gözlenmektedir. Şekil 4.14.F’ de ise bloklama ajanı olan BSA’ nin immobilizasyonu sonrası alınan SEM görüntüsüdür. Burada adeta bir çiçek dalını anımsatan yapıların yüzeyde bağlı BSA proteini ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Şekil 4.14.G’ deki son SEM görüntüsü ise CK’ nin yüzeye bağlanmasından sonraki morfolojiye aittir. SEM çalışmaları elektrot yüzeyinde değişimleri gösterdiğinden diğer bir bakışla elektrokimyasal impedans ve siklik voltametri ölçümlerinin doğruluğunu kanıtlamaktadır.





Şekil.4.14. CK biyosensörünün SEM görüntüleri. (A) Yalın GP, (B) AuNP, (C) MH, (D) GOPE, (E) Anti-CK, (F) BSA, (G) CK

4.1.3.10. CK biyosensörünün serum örneklerinde uygulanabilirliğinin araştırılması

Tasarlanan biyosensörün klinik uygulamalar için kullanılabilirliğini incelemek adına farklı kişilerden alınan insan serum örneklerinde, standart ekleme yöntemi kullanılarak CK tayini yapılmıştır. CK' nin farklı konsantrasyon değerlerinin (1 pg/mL ve 20 pg/mL) serum örneğine eklenmesiyle gerçekleştirilen çalışma sonrasında EIS verileri elde edilmiştir. Bu veriler için kalibrasyon grafiğinin denkleminde yararlanılarak yapılan her bir serum çalışması için bağlı standart sapma (RSD) ve geri kazanım yüzdeleri hesaplanmıştır. Serum örnekleriyle gerçekleştirilen çalışma için yapılan hesaplamaların sonuçları Çizelge 4.8' de verilmiştir.

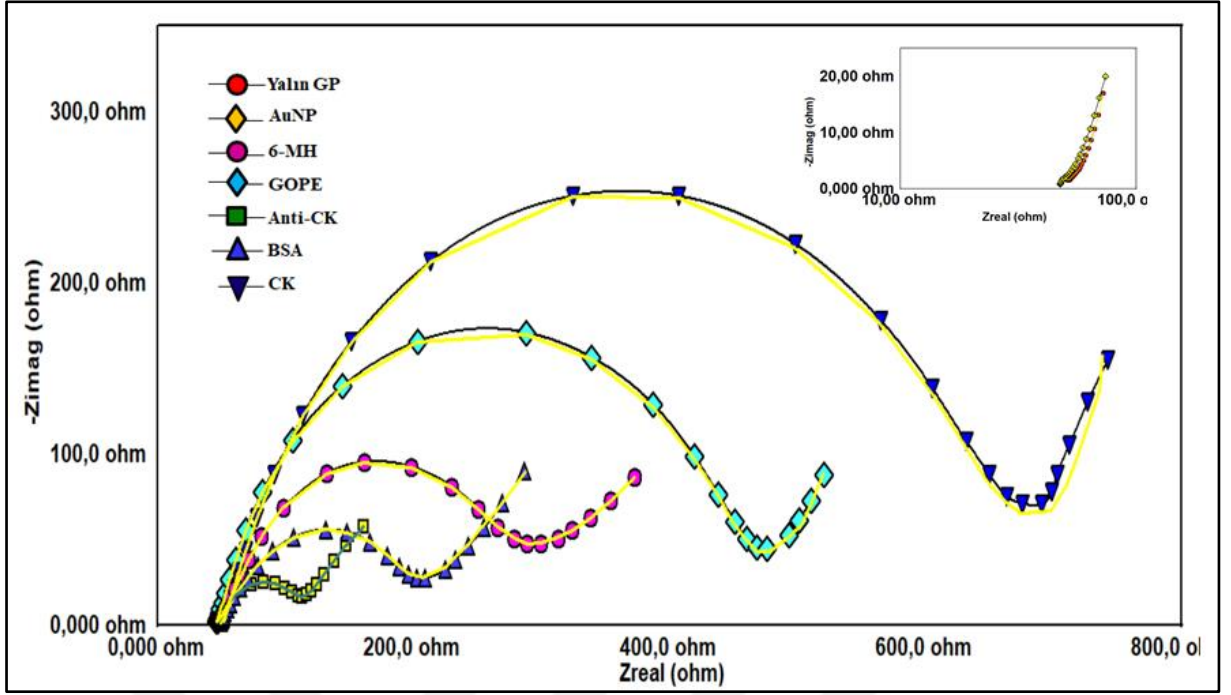
Çizelge.4.8. Geliştirilen biyosensör sistemi ile serum örneklerinde bulunan CK konsantrasyonlarının belirlenmesi

Serum Örnek Numarası	CK ölçülen konsantrasyon değeri (pg mL ⁻¹)	Standart eklenen değeri (pg mL ⁻¹)	Ölçülen konsantrasyon değeri (pg mL ⁻¹)	RSD (%) (n=3)	Geri Kazanım (%)
1	4,2	1	2,25/5,46/5,35	1,96	102,94
		20	24,98/24,97/24,86	0,26	103,04
2	6	1	7,21/7,5/7,6	2,72	106,23
		20	26/26,79/26,33	1,5	101,43
3	4	1	5,12/5,6/5	6,05	104,8
		20	24/24,22/24,53	1,02	101,4
4	4,1	1	5,29/5,04/5,04	2,82	100,45
		20	24,34/24/24,67	1,38	100,98
5	4	1	5,56/5,2/5,46	3,44	108,13
		20	24,32/24,67/24,54	0,72	102,12

Standart ekleme yöntemi CK' nin serumdaki tayin aralığına uygun olacak şekilde gerekli seyreltme işlemleri yapılarak gerçekleştirilmiştir (Anonim 2018).

4.1.3.11. CK biyosensörünün Kramers-Kronig Transform karakterizasyonu

Kramers-Kronig transformu, kompleks sistem verilerinin reel ve imgesel komponentlerinin kullanılmasıyla, ilgili sistemin lineerliği, nedenselliği ve stabilitesi hakkında bilgi sağlayan integral eşitliklerdir (**Demirbakan ve Sezgintürk 2017; Özcan ve Sezgintürk 2017**). Prensip olarak, Kramers-Kronig eşitlikleri, bir sistem için elde edilen impedans spektrumunun, enstrümantal hatalar gibi bias hatalarından ne kadar etkilendiğini ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır (**Orazem ve ark. 2008**). Bu eşitlikler vasıtasıyla elde edilen veriler, elektrokimyasal impedans spektroskopisi spektrumlarının analizi ve yorumlanması için oldukça kritik bir öneme sahiptir. Kramers-Kronig eşitliklerinin doğrudan entegrasyonu, impedans verisinin bir komponentinin, diğer komponenti kullanılarak hesaplanmasını içermektedir (**Huang ve ark. 2007**). Örneğin; impedansın reel kısmının, ölçülen imgesel kısım kullanılarak hesaplanır ve elde edilen hesapsal değer, deneysel verilerle kıyaslanır. Bu çalışmada gerçek deneysel veriler, imgesel komponentin hesaplanması için kullanılmıştır. Aynı zamanda deneysel imgesel komponent de reel komponentin hesaplanması için kullanılmıştır. Bu hesaplamalar ışığında KK transform değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.9). Bunun yanı sıra yine bu veriler ışığında reel ve imgesel komponentin deneysel verileriyle karşılaştırılmış ve relatif hataların gösterildiği ($\Delta Z/Z$) bir spektrum da oluşturulmuştur. Şekil 4.15’ de Kramers-Kronig transformu ile karşılaştırılmış deneysel olarak elde edilen EIS spektrumları gösterilmiştir. Hem fit değerleri hem de elde edilen spektrumlar ışığında, geliştirilen biyosensöre ilişkin deneysel ve Kramers-Kronig transformu ile hesaplanan değerlerin çok iyi örtüştüğü gözlenmiştir. Bu sonuç, biyosensörün her adımına ilişkin elde edilen elektrokimyasal impedans spektrumlarının belirsiz etkenlerden dolayı lineerliğinin ve stabilitesinin etkilenmediğini açıklamaktadır. Dolayısıyla deneysel olarak elde edilen reel komponentin verileriyle imgesel komponent çok doğru bir şekilde hesaplanabilmiştir. Şekillerden de görüldüğü gibi deneysel ve hesaplanan değerler birebir örtüşmüştür.



Şekil.4.15. CK biyosensörün Kramers-Kronig Transform fit spektrumları

Çizelge.4.9. CK biyosensörüne ait Kramers-Kronig fit değerleri

CK biyosensör	Kramers Kronig Transform değeri
Yalın GP	1,360 u
GP/AuNP	81,77 n
GP/AuNP/MH	15,95 u
GP/AuNP/MH/GOPE	6,782 u
GP/AuNP/MH/GOPE/Anti-CK	130,1 n
GP/AuNP/MH/GOPE/Anti-CK/BSA	1,629 u
GP/AuNP/MH/GOPE/Anti-CK/BSA/CK	36,99 u

4.1.3.12. CK biyosensörünün literatürdeki yeri

Tasarlanan biyosensörün literatürde bildirilen çeşitli CK sensörleriyle analitik olarak kıyaslandığı çalışmalar Çizelge 4.10’ da verilmiştir.

Akut miyokart enfarktüsünün belirlenmesinde oldukça önemli olan CK biyobelirtecinin tayinine yönelik, literatürde çok sayıda sensör bulunmaktadır. Ancak bu sensörlerin çoğu zaman daha bilinen ve daha önceki ilgili çalışmalarda fazlaca kullanılmış materyallerle tasarlandığı görülmektedir.

Bu tez kapsamında geliştirilen CK sensörü ise GP gibi düşük maliyetli ve immobilizasyona elverişli bir yüzeye sahip çalışma elektrotuyla, GOPE gibi yenilikçi bir silan ajanıyla ve SFI gibi sensörün karakterizasyonunu incelemeye yardımcı bir teknikle de ölçüm alabilen bir sistemle tasarlanmıştır. Bunun yanı sıra pikogram seviyelerinde, 0,1 – 50 pg/mL gibi geniş bir tayin aralığında CK’ nın tayinini mümkün kılmaktadır. Tüm bu özellikleriyle CK sensörü literatürdeki diğer çalışmalardan öne çıkmaktadır.

Çizelge.4.10. Literatürde bildirilen çeşitli CK biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması

İmmobilizasyon yöntemi	Ölçüm yöntemi	Tayin Aralığı	LOD	Referans
AuNP modifiye	EIS	10-500 ng/mL	10 ng/mL	(Genz ve ark.2017)
Pt nanopartikül	Amperometri	10,01-2748,05 U/L	10,01 U/L	(Lin ve ark 2007)
AuNP modifiye	SAW	1,1-100,5 ng/mL	1,1 ng/mL	(Shukla ve ark. 2005)
Au-SPE	EIS ve CV	0,19-28,8 µg/mL	0,11µg/mL	(Moreira ve ark. 2014)
Altın elektrot	Kronoamperometri	0-100 ng/mL	13 ng/mL	(Garay ve ark. 2010)
–	Enzim immünosay	0,24-1,44 ng/mL	1 pg/mL	(Kato ve ark. 1985)
ITO	Enzimatik Ag biriktirme	1000-0,01 ng/mL	1 pg/mL	(Jiaul ve ark. 2018)
Pt/GOD/HEX	Amperometri	0,01-2,7 U/mL	–	(Kucherenko 2015)
GP/AuNP	EIS ve CV	0,1-50 pg/mL	0,045 pg/mL	

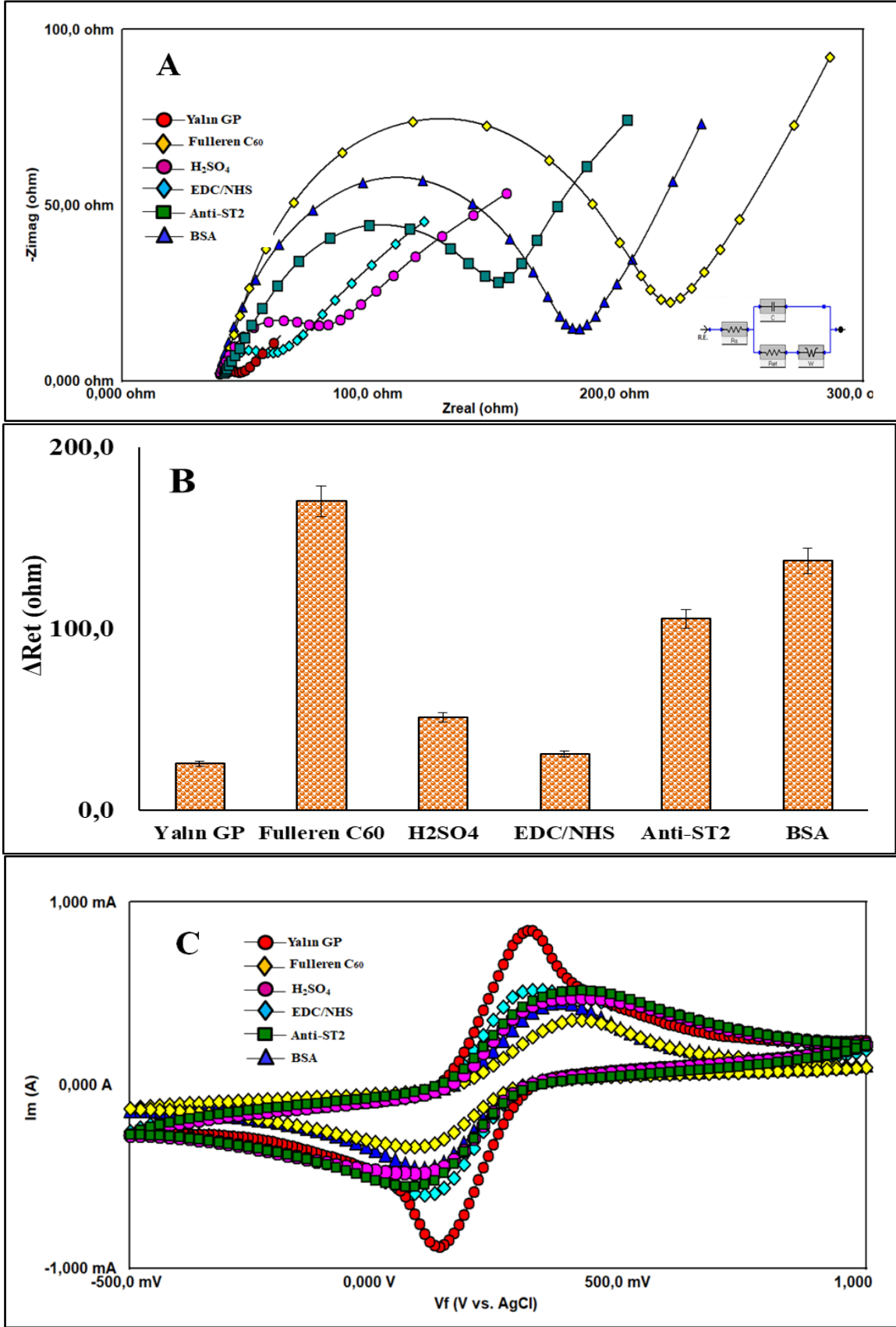
4.2. ST2 Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemi

4.2.1 ST2 biyosensörünün immobilizasyon adımlarının EIS ve CV ile yorumlanması

ST2 biyosensörünün immobilizasyon adımları EIS ve CV verilerinden yararlanılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır. İlk olarak, çalışma elektrodu GP' nin yüzeyi temizlendikten sonra (Bölüm 3.3.1) daha kararlı bir karbon yüzey oluşturmak için fulleren C₆₀ materyali tercih edilmiştir. Karbon atomlarının mükemmel bir dizimle oluşturduğu bu materyal, yapısındaki karbon atomları sayesinde GP yüzeyine adsorbe olarak daha homojen bir yüzey oluşturmaya yardımcı olur. Fullerene C₆₀ yüzeye immobilize edebilmeden önce toluen çözeltisi (**Ruoff ve ark. 1993**) içerisinde çözülmüştür. Fullerenleri kimyasal olarak modifiye etmek için çoğu zaman çözelti olmaları gerekmektedir (**Sivaraman ve ark. 1992**). Toluene çözeltisinde hazırlanan fulleren C₆₀ yüzeye damlatılarak immobilize edildikten sonra yapısındaki karbon atomlarının yüzeye iyice adsorbe olabilmesi için inkübasyona bırakılmıştır. Bu durum Şekil 4.16.A' daki EIS verilerine, homojen yüzeyin meydana getirdiği yalıtkanlıkla birlikte sinyal artışı olarak yansımıştır. Temizlenmiş elektrot yüzeyinin Ret değeri 24,48 ohm iken fulleren C₆₀ immobilizasyonundan sonra Ret değeri 170,4 ohm olarak hesaplanmıştır. Daha sonra yüzeyde kantitatif olarak artan karbonları aktive etmek adına GP elektrotlar gece boyu H₂SO₄ içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Bu sayede yüzeyde bulunan kapalı karboksil grupları açığa çıkarılmıştır. Bu inkübasyon sonrasında EIS sinyalinin düşüşü açıkça gözlemlenmektedir (H₂SO₄ için Ret değeri 50,96 ohm). Bunun sebebi; fulleren C₆₀ ile kaplanarak homojen bir tabaka halinde bulunan yüzeyin, asit muamelesiyle bozularak elektrot yüzeyindeki gözeneklerin büyümesinden kaynaklı difüzyonun artması olarak düşünülebilir. Bu aşamadan sonra karboksil gruplarını aktive etmek için çapraz bağlayıcı EDC/NHS çifti kullanılmıştır. Bu işlemin ardından iletkenliğin artmasıyla birlikte EIS sinyalinin azaldığı görülmektedir. Buna bağlı olarak Ret değeri de azalarak 31,01 ohm olarak hesaplanmıştır. Ayrıca kullanılan EDC/NHS çifti, H₂SO₄' in karboksilik asit grupları arasında gerçekleştirdiği çapraz bağlama sayesinde anti-ST2' nin yüzeye immobilizasyonunu sağlamıştır. Anti-ST2 muamelesiyle birlikte EIS sinyali artış göstermiştir (anti-ST2 için Ret değeri 105,5 ohm). Immobilizasyonun son aşamasında ise spesifik olmayan etkileşimleri engellemek için %0,5' lik BSA kullanılmıştır. BSA' nın inkübasyonu ile birlikte elektrot yüzeyinin yalıtkanlığı bariyer etkisiyle iyice arttığı için buna bağlı olarak EIS sinyali de artmış ve Ret değeri 137,4 ohm olarak hesaplanmıştır. EIS tekniğinin yanı sıra sonuçların doğruluğunu desteklemek adına CV tekniği ile de ölçümler alınmıştır. Şekil 4.16.C incelendiğinde temizlik işleminden

hemen sonra alınan yalın GP (Katodik pik akımı=846,5 μ A, Anodik pik akımı=881,7 μ A) elektrodun oldukça düzgün pik akımlarına sahip CV voltamogramı görülmektedir. Fulleren C_{60} ' ın immobilizasyonu ile birlikte redoks probunun yalıtkan yüzeye difüze olamamasından kaynaklı olarak bu pik akımları belirgin şekilde azalmıştır (Katodik pik akımı=358,4 μ A, Anodik pik akımı=336,5 μ A). Hemen ardından asitle muamele gören yüzeyin alınan CV voltamogramındaki pik akımlarının bir önceki fulleren C_{60} ' a göre biraz daha artmış olduğu görülmektedir (Katodik pik akımı=479,4 μ A, Anodik pik akımı=480,5 μ A). EDC/NHS muamelesiyle birlikte daha da artmıştır (Katodik pik akımı=522 μ A, Anodik pik akımı=597,7 μ A). Antikor immobilizasyonu adımı geçildiğinde ise oluşan yalıtkanlığın bir emaresi olarak katodik pik akımı 519,3 μ A, anodik pik akımı ise 554,2 μ A olarak hesaplanmıştır. Son aşama olan BSA' nın immobilizasyonu birlikte pik akımları en aza inmiştir (Katodik pik akımı=453 μ A, Anodik pik akımı=454,7 μ A).

ST2 biyosensörünün immobilizasyonuna ait EIS spektrumları, her adıma ait olan Ret değerleri ve CV voltamogramları Şekil 4.16' da verilmiştir.

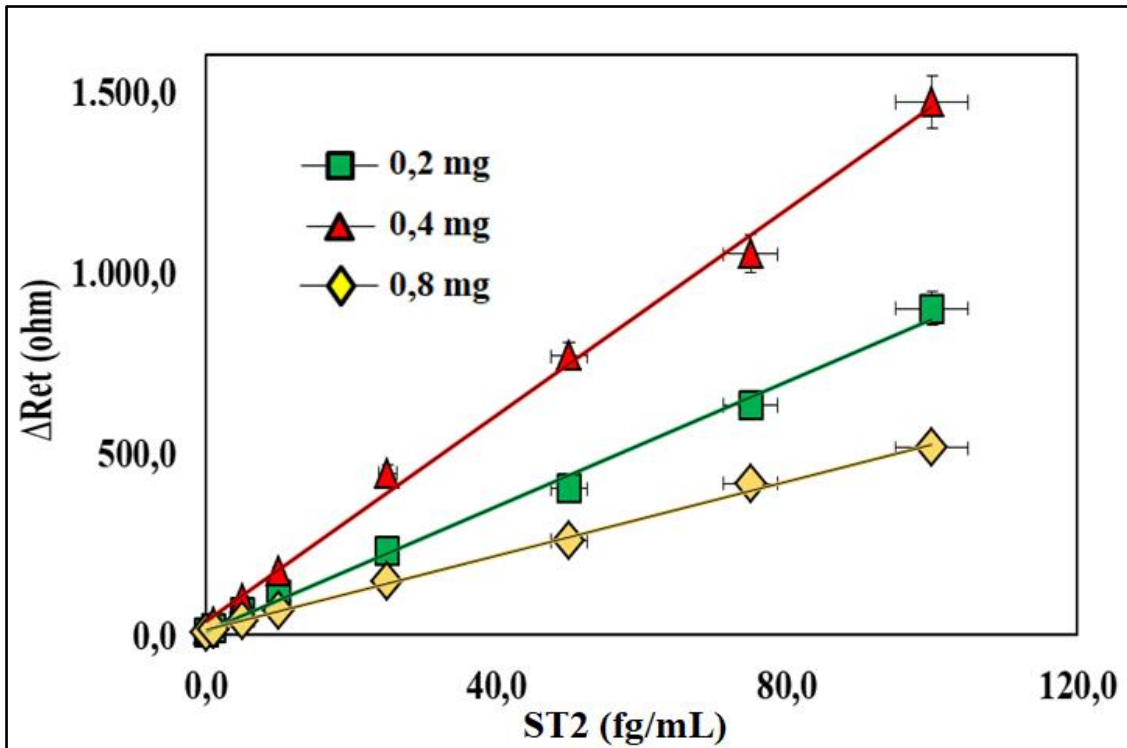


Şekil.4.16. ST2 biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının (A) EIS verileri, (B) immobilizasyon basamaklarına ait Ret değerleri, (C) CV voltamogramları

4.2.2. ST2 biyosensörünün optimizasyon basamakları

4.2.2.1. Fulleren C₆₀' ın konsantrasyon optimizasyonu

Geliştirilen immünosensörde ST2' nin hassas tayini için immobilizasyon aşamasında kullanılan fulleren C₆₀ miktarının biyosensör üzerindeki etkisini incelemek amacıyla diğer tüm bileşenler sabit tutulup, fulleren C₆₀ miktarı değiştirilerek biyosensörler hazırlanmıştır. Toluen çözeltisi içerisinde hazırlanan fulleren C₆₀ konsantrasyonları sırasıyla; 0,2, 0,4 ve 0,8 mg mL⁻¹ 'dir. İlk olarak 0,2 mg fulleren C₆₀ ile çalışılarak bir standart grafik elde edildi. Daha sonra konsantrasyon artırılarak 0,4 mg fulleren C₆₀ ile biyosensörler hazırlandı. Bu konsantrasyon sonrasında çizilen standart grafiklerle birlikte görüldü ki derişik konsantrasyon da daha yüksek sinyaller edilmiştir. Buna bağılı olarak fulleren C₆₀ konsantrasyonu daha da artırılarak 0,8 mg ile biyosensörler hazırlanarak çalışma yapılmıştır. Ancak daha derişik konsantrasyonla birlikte fulleren C₆₀'ın elektrodun yüzeyinde oluşturduğu homojen tabaka zarar görerek adsorpsiyonda sorun yaşanmış ve EIS sinyalleri de düşmüştür. Bu sebeple fulleren C₆₀ için optimum konsantrasyon değeri olarak 0,4 mg mL⁻¹ seçilmiştir. Fulleren C₆₀ ' ın konsantrasyon optimizasyonuna ait standart grafikler Şekil 4.17' de ve bu standart grafiklere ait denklemler Çizelge 4.11' de verilmiştir.



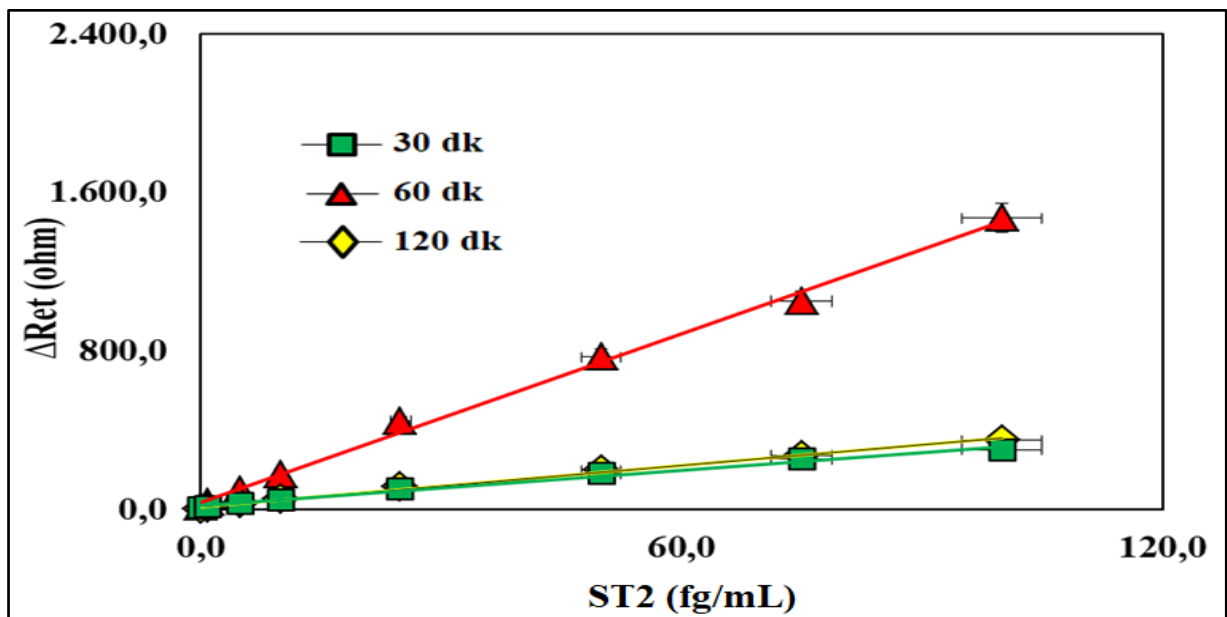
Şekil.4.17. Fulleren C₆₀ miktarının ST2 biyosensörünün cevabı üzerine etkisi

Çizelge.4.11. Fulleren C₆₀ miktar optimizasyonunun grafiklerinin R² leri ve denklemleri

Fulleren C ₆₀ Miktarı (mg)	R ²	Denklem
0,2	0,9957	y= 8,5863x + 11,423
0,4	0,9966	y= 14,21x + 35,913
0,8	0,9974	y= 5,1395x + 13,476

4.2.2.2. Fulleren C₆₀ ' ın inkübasyon süresinin belirlenmesi

Optimum fulleren C₆₀ miktarı belirlendikten sonra, inkübasyon süresinin geliştirilen biyosensör üzerine etkisi araştırılmıştır. Bir biyosensör geliştirilirken yüzey modifikasyonu sırasında kullanılan ajanların yüzeydeki inkübasyon süreleri, doğrudan immobilizasyonu etkilediği için, bu ajanların optimum inkübasyon sürelerini belirlemek gerekir. Bu çalışmada fulleren C₆₀ için 3 farklı inkübasyon süresinde (30 dk, 60 dk ve 120 dk) biyosensörler hazırlanmış sonrasında EIS ve CV ölçümleri ile takip edilmiştir. Hazırlanan sensörlerde 30 dk' lık inkübasyon süresinin sağlıklı bir immobilizasyon için yeterli olmadığı, 120 dk' nın ise yüzeyde çok fazla kalarak birtakım bozulmalara sebep olduğu görülmüştür. Bu sonuçlardan yola çıkarak fulleren C₆₀ ' ın inkübasyon süresi olarak 60 dk seçilmiştir. Fulleren C₆₀ süre optimizasyonuna ait standart grafikler Şekil 4.18' de ve bu standart grafiklere ait denklemler ise Çizelge 4.12' de verilmiştir.



Şekil.4.18. Fulleren C₆₀ inkübasyon süresinin ST2 biyosensörünün cevabı üzerine etkisi

Çizelge.4.12. Fulleren C₆₀ süre optimizasyonunun grafiklerinin R² leri ve denklemleri

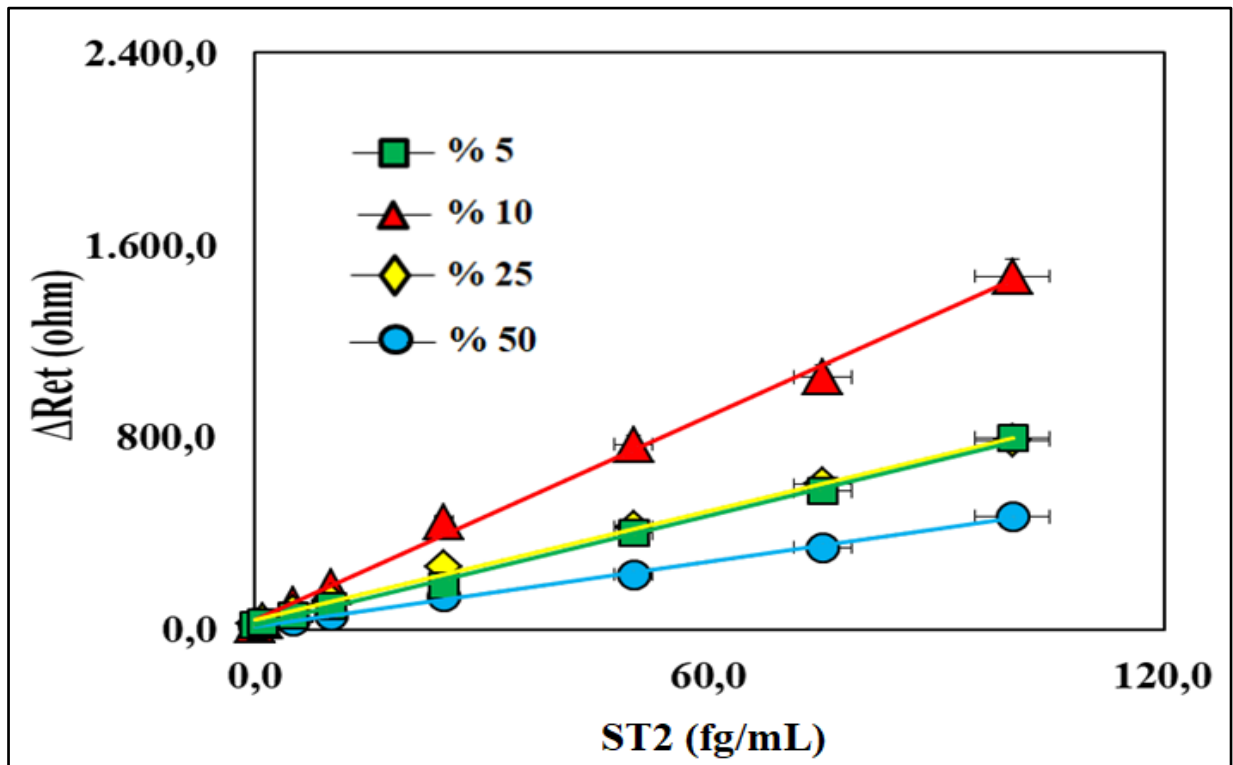
Fulleren C ₆₀ Süre (dk)	R ²	Denklem
30	0,9918	y= 2,9963x + 19,393
60	0,9966	y= 14,21x + 35,913
120	0,9934	y= 3,4489x + 15,874

4.2.2.3. H₂SO₄ asit konsantrasyonunun belirlenmesi

GP elektrot yüzeylerinin fulleren C₆₀ ile modifikasyonundan sonra elektrotlar H₂SO₄ ile gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Fulleren C₆₀ çok kararlı ve düzenli bir yapıya sahip olduğu için, elektrot yüzeyindeki karboksil gruplarını açığa çıkarmak adına bu optimizasyon adımı oldukça önemlidir. Bu amaca yönelik olarak, asit konsantrasyonun biyosensöre etkisini incelemek için 4 farklı konsantrasyonda (%5, %10, %25 ve %50) çalışma gerçekleştirilmiştir. Belirtilen her bir konsantrasyon için biyosensörler hazırlanarak EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Bu optimizasyon çalışmasında, asit konsantrasyonu arttıkça elektrot yüzeyinin hasar görerek immobilizasyonu sağlıksız kıldığı görülmüştür. Bu sebeple daha düşük konsantrasyonlarda çalışılmıştır. % 5' lik H₂SO₄ yüzey immobilizasyonu için yetersiz kalmıştır. Bu sebeple optimum H₂SO₄ konsantrasyonu hem sinyal artışı hem de standart grafiğine bakılarak %10 olarak belirlenmiştir. H₂SO₄ konsantrasyon optimizasyonuna ait standart grafikler Şekil 4.19 da ve bu standart grafiklere ait denklemler Çizelge 4.13' de verilmiştir.

Çizelge.4.13. H₂SO₄ konsantrasyon optimizasyonunun grafiklerinin R² leri ve denklemleri

H ₂ SO ₄ (%)	R ²	Denklem
% 5	0,9981	y= 7,6735x + 14,207
% 10	0,9966	y= 14,21x + 35,913
% 25	0,9973	y= 7,5567x + 38,951
% 50	0,9983	y= 4,5029x + 11,816



Şekil.4.19. H₂SO₄ konsantrasyonunun ST2 biyosensörünün cevabı üzerine etkisi

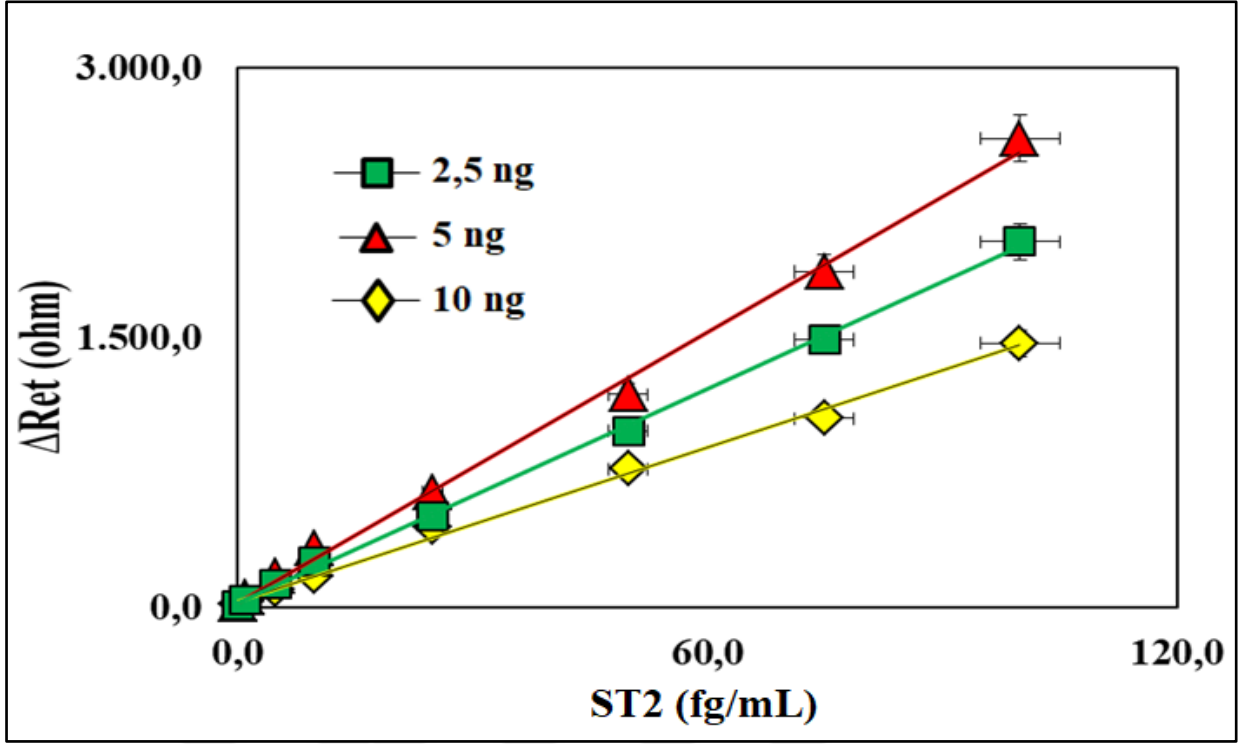
4.2.2.4. Anti-ST2' nin konsantrasyon optimizasyonu

Tasarlanan biyosensörün bir sonraki optimizasyon adımı, anti-ST2 konsantrasyonunun immünosensör üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Bu optimizasyon adımı için 3 farklı anti-ST2 konsantrasyonunda (2,5 ng/mL, 5 ng/mL ve 10 ng/mL) biyosensörler hazırlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak 2,5 ng/mL anti-ST2 konsantrasyonu (Ret değeri 62,87 ohm) için biyosensör hazırlanmıştır. Düzenli EIS sinyalleri ve oldukça iyi bir regresyona katsayısına sahip standart eğriyle sonuçlanan bu konsantrasyondan sonra daha düşük anti-ST2

konsantrasyonlarıyla çalışılmıştır. Böylelikle artan antikor derişiminin geliştirilen biyosensör üzerindeki cevabını incelemek mümkün olmuştur. Bu duruma binaen bir sonraki konsantrasyon 2 kat daha derişik olan 5 ng/mL' lik anti-ST2 konsantrasyonu için biyosensör hazırlanmıştır. Artan konsantrasyonla birlikte EIS sinyalinin yarım daire çapını ifade eden Ret değerinin de belirgin artışı söz konusudur (Ret değeri 184,1 ohm). Bu sinyal artışı Şekil 4.20' deki birbirleriyle kıyaslanan standart grafiklerden de açıkça görülmektedir. Derişik antikor konsantrasyonunun, tasarlanan biyosensördeki bu olumlu cevabı üzerine optimizasyona artan konsantrasyon değerleriyle devam edilmiştir. 10 ng/mL anti-ST2 konsantrasyonuyla biyosensör hazırlanmıştır. Ancak artan konsantrasyon değeri bu defa beklenenin aksine en düşük performansı sergilemiştir. Bunun nedeninin anti-ST2' nin bağlanabilme kapasitesine göre doygunluğa ulaşmış olabileceği düşünülmektedir. Bilindiği gibi proteinler belirli bir doygunluğa eriştikten sonra aktiviteleri düşmeye başlar. Bu sebepler göz önünde bulundurulduğunda geliştirilen ST2 sensörü için en uygun anti-ST2 konsantrasyonu 5 ng/mL olarak belirlenmiştir. Anti-ST2 konsantrasyon optimizasyonuna ait standart grafikler Şekil 4.20' de ve bu standart grafiklere ait denklemler Çizelge 4.14' de verilmiştir.

Çizelge.4.14. Anti-ST2 konsantrasyon optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

Anti-ST2 (ng/mL)	R^2	Denklem
2,5	0,9991	$y= 19,834x + 21,729$
5	0,9969	$y= 25,082x + 26,174$
10	0,9966	$y= 14,21x + 35,913$



Şekil.4.20. Anti-ST2 konsantrasyon optimizasyonunun biyosensörün cevabı üzerine etkisi

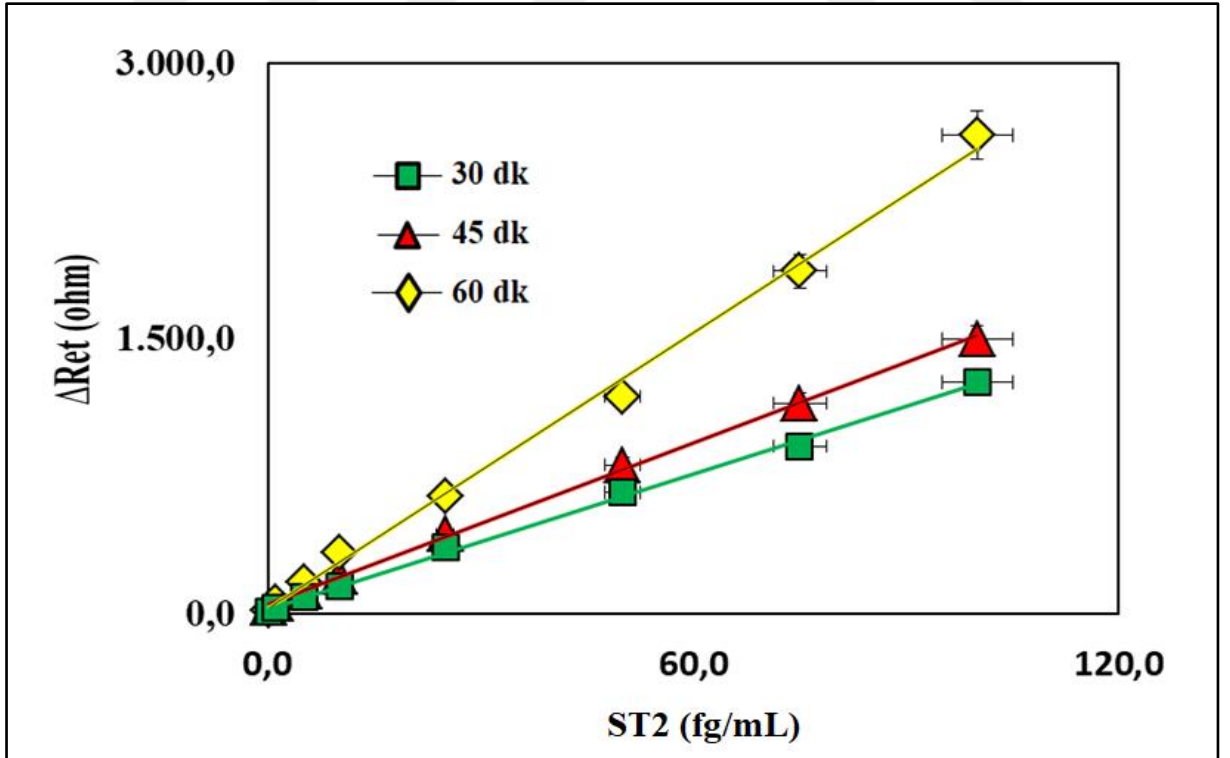
4.2.2.5. Anti-ST2' nin inkübasyon süresinin belirlenmesi

Anti-ST2' nin optimum konsantrasyon değerine karar verildikten sonra, oldukça önemli bir başka parametre olan inkübasyon süresinin belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bir immünosensörün immobilizasyonu gerçekleştirilirken, en az kullanılan konsantrasyon derişimi kadar o konsantrasyonun yüzeyde kalma süresi de önemlidir. Protein etkileşimleri için, kısa denebilecek zaman dilimlerinde dahi bağlanmanın seyrini değiştirebilecek bazı durumlara sebebiyet vermesinden ötürü çok titizlikle takip edilmelidir. Bu nedenle optimizasyon çalışmaları kapsamında inkübasyon sürelerinin belirlenmesine de yer verilmiştir. 3 farklı sürede (30, 45 ve 60 dakika) ayrı ayrı biyosensörler hazırlanıp, çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar EIS ve CV ile takip edilmiş, elde edilen verilerle de standart grafikler oluşturulmuştur. İlk olarak 30 dakikalık inkübasyon süresi için çalışma yapılmıştır. Zaman tasarrufu düşünülerek gerçekleştirilen bu çalışmada düzgün fakat düşük impedans sinyalleri alınmıştır. Sinyallerin bu düşüşü, antikorun yüzeye immobilizasyonu için 30 dakikanın yeterli bir zaman olmamasından kaynaklanmaktadır. Bu sebeple bir sonraki çalışma 60 dakikalık inkübasyon süresinde gerçekleştirilmiştir. Bu inkübasyon sonrasında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde impedans sinyallerindeki artış açıkça gözlemlenmektedir.

Buradan da anlaşılacağı üzere anti-ST2' nin yüzeye yeterli oranda bağlanmasıyla birlikte immobilizasyon doğru bir şekilde gerçekleşmiş ve bu durum sonuçlara çok net yansımıştır. Son bir inkübasyon süresi olarak 45 dakika içinde çalışma yapılmıştır. Ancak yapılan çalışma da sinyallerin yine düşerek istenmeyen bir sonuç sergilediği görülmüştür. Tüm bu veriler ışığında anti-ST2 için optimum inkübasyon süresi 60 dakika olarak belirlenmiştir. Anti-ST2 süre optimizasyonuna ait standart grafikler Şekil 4.21' de ve bu standart grafiklere ait denklemler Çizelge 4.15' te verilmiştir.

Çizelge.4.15. Anti-ST2 süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

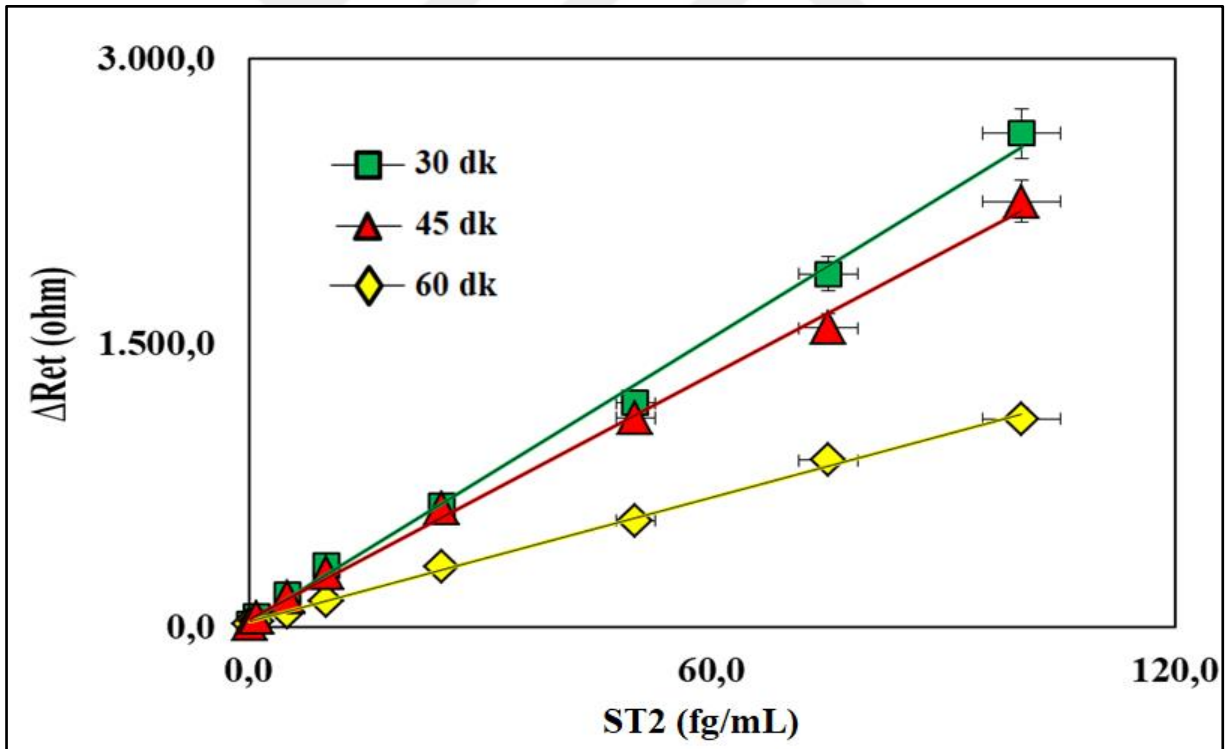
Anti-ST2 (dk)	R^2	Denklem
30	0,9982	$y = 12,272x + 26,343$
45	0,999	$y = 14,658x + 49,706$
60	0,9969	$y = 25,082x + 26,174$



Şekil.4.21. Anti-ST2 süre optimizasyonunun biyosensör üzerine etkisi

4.2.2.6. ST2' nin inkübasyon süresinin belirlenmesi

İnkübasyon sürelerinin immünoensör üzerindeki etkisini incelemek için yapılan bir diğr optimizasyon çalışması ST2' nin inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Bu çalışma için de 3 farklı süre de (30, 45 ve 60 dakika) çalışma yapılmıştır. Optimizasyon çalışmasına yönelik belirlenen her bir süre için ayrı ayrı biyosensörler hazırlanmış EIS ve CV ölçümleriyle takip edilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde ST2' nin yüzeyde kalma süresi arttıkça aktivitesi azalmış ve buna bağılı olarak EIS sinyalleri de düşmüştür. Buradan, biyobelirtecın elektrot yüzeyindeki bağlanma işlemini 30 dakika da yeterli oranda gerçekleştirebildiğini bu nedenle doygunluğa eriştikten sonra aktivitesini kaybetmesine bağılı olarak performansının azaldığı sonucuna erişilmiştir. Bu değerlendirmeler sonrasında optimum ST2 inkübasyon süresi 30 dk olarak seçilmiştir. ST2 süre optimizasyonuna ait standart grafikler Şekil 4.22' de ve bu standart grafiklere ait denklemler Çizelge 4.16' da verilmiştir.



Şekil.4.22. ST2 inkübasyon süresi optimizasyonunun biyosensörün cevabı üzerine etkisi

Çizelge.4.16. ST2 süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

ST2 (dk)	R^2	Denklem
30	0,9969	$y = 25,082x + 26,174$
45	0,9971	$y = 21,559x + 42,295$
60	0,9984	$y = 10,967x + 27,656$

4.2.3. ST2 biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları

4.2.3.1. ST2 biyosensörünün kalibrasyon grafiği

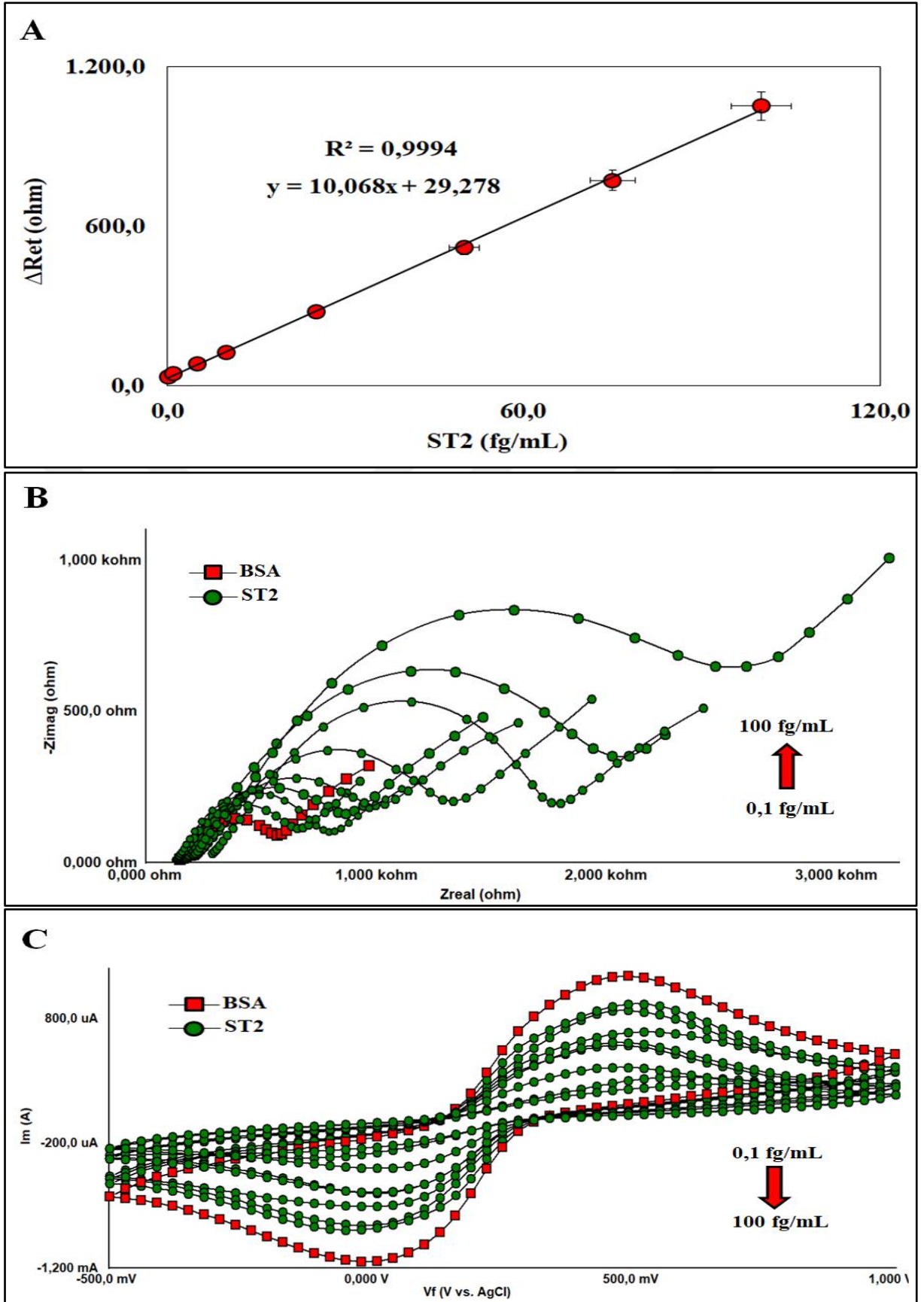
Tüm optimizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, geliştirilen biyosensörün artan konsantrasyonlarında hazırlanan ST2 biyobelirteci EIS ve CV teknikleriyle tayin edilmiştir. 8 farklı konsantrasyon değeri belirlenerek yapılan bu çalışma da geliştirilen biyosensörün hassas ST2 tayinine yönelik bir lineer aralık belirlenmiştir. Tasarlanan sensörün yapılan çalışmalar sonrasında tayin aralığı $0,1 - 100 \text{ fg mL}^{-1}$ olarak saptanmıştır. Geliştirilen immünosensör femtogram gibi oldukça konsantrasyon seviyesinde ve geniş bir tayin aralığında ST2' nin analizini gerçekleştirebilmektedir. ST2 biyosensörünün kalibrasyon grafiği ve bu kalibrasyon grafiğine ait EIS spektrumu, CV voltamogramı Şekil 4.23' te verilmiştir. Ayrıca LOD ve LOQ değerleri de sırasıyla $0,124 \text{ fg mL}^{-1}$ ve $0,414 \text{ fg mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. ST2' nin artan konsantrasyonlar da değişen impedimetrik verileri Çizelge 4.17' de verilmiştir.

Çizelge.4.17. Artan ST2 konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen impedimetrik veriler

Elektrot	Ret(ohm)	Ru (ohm)	C (µF)
ST2 biyosensörü (BSA)	434,3±4,441	170,2±1,318	2,668±0,057
ST2 0,1 fg/mL	517,5±4,929	157,5±1,217	2,86±0,05
ST2 1 fg/mL	716±6,601	203,8±1,564	2,246±0,041
ST2 5 fg/mL	812,4±7,522	236,4±1,909	1,26±0,023
ST2 10 fg/mL	1193±11,92	225,6±1,793	1,454±0,0224
ST2 25 fg/mL	1481±12,31	210,9±1,643	1,767±0,025
ST2 50 fg/mL	1578±14,39	206,2±1,665	1,295±0,017
ST2 75 fg/mL	2123±19,15	274,6±2,166	1,291±0,017
ST2 100 fg/mL	2453±19,38	377,2±3,158	1,5025±0,007

4.2.3.2. ST2 biyosensörünün tekrarlanabilirliği

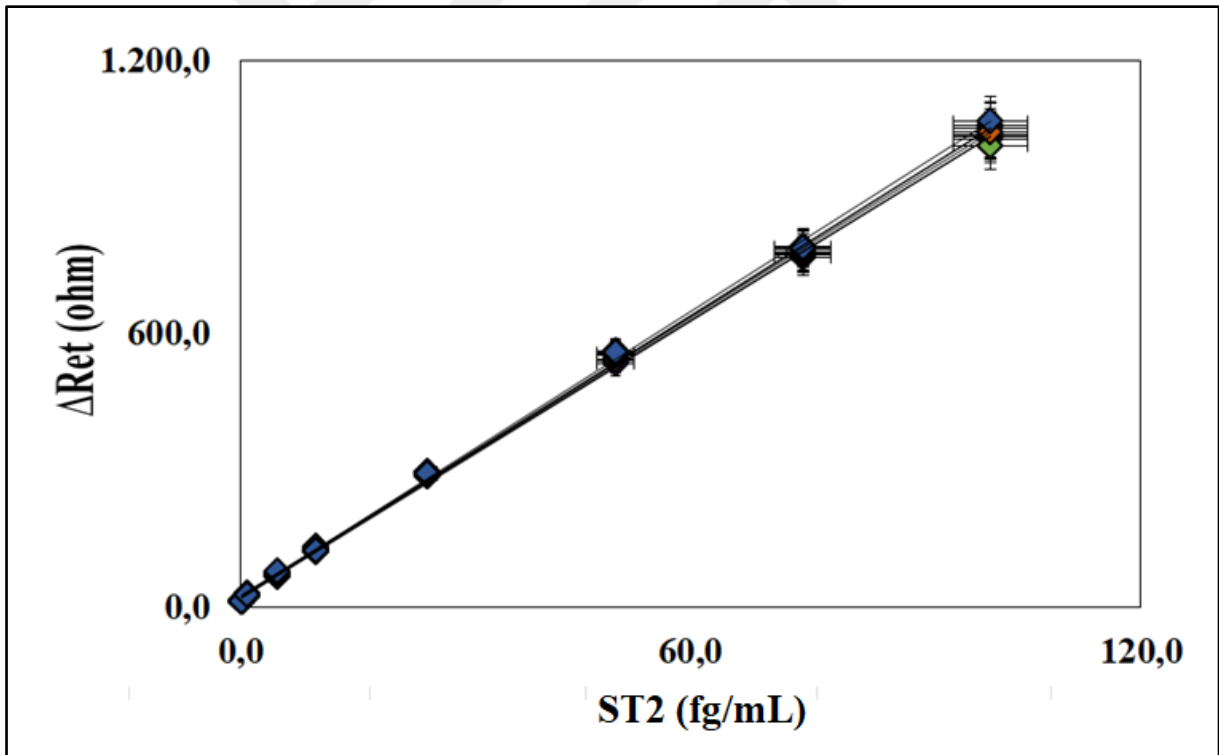
Geliştirilen biyosensörün karakterizasyonunun aydınlatılmasında tekrarlanabilirlik çalışması elzemdir. Bu çalışma 20 farklı elektrodun aynı koşullar altında hazırlanıp aynı konsantrasyon değerinde (25 fg/mL) ST2 ile inkübe edilerek EIS ölçümlerinin alınmasıyla gerçekleştirilmiştir. Her bir elektroda ait EIS ölçümlerinden elde edilen Ret değerleri Şekil.4.23.A’ daki kalibrasyon denkleminde kullanılarak biyosensörün ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Bu değerler sırasıyla 25,195 fg/mL, 0,416 fg/mL ve % 1,56 olarak bulunmuştur.



Şekil.4.23. Tasarlanan biyosensörün artan ST2 konsantrasyonuyla elde edilen (A) Kalibrasyon grafiği, (B) EIS verileri, (C) CV voltamogramları

4.2.3.3. ST2 biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Biyosensörün tekrar üretilebilirlik çalışması kapsamında optimum koşullarda hazırlanan elektrotlarla farklı zaman dilimlerinde çalışılmıştır. ST2' nin artan konsantrasyonlarıyla belirlenen tayin aralığında ölçüm alınarak gerçekleştirilen tekrar üretilebilirlik çalışması için 8 tane biyosensör hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensörlerin EIS verilerindeki Ret değerlerinden her bir biyosensöre ait standart grafikler elde edilmiş ve birbirleriyle kıyaslanmışlardır. Ayrıca biyosensörün tekrar üretilebilirlik çalışması kapsamında eğim ve intersept değerlerinin relatif standart sapmaları da sırasıyla %1,23 ve %7,76 olarak hesaplanmıştır. ST2 biyosensörüne ait tekrar üretilebilirlik sonuçları Şekil 4.24' te, standart grafiklere ait regresyon üzerindeki belirleme katsayıları ve denklemleri ise Çizelge 4.18' de verilmiştir.



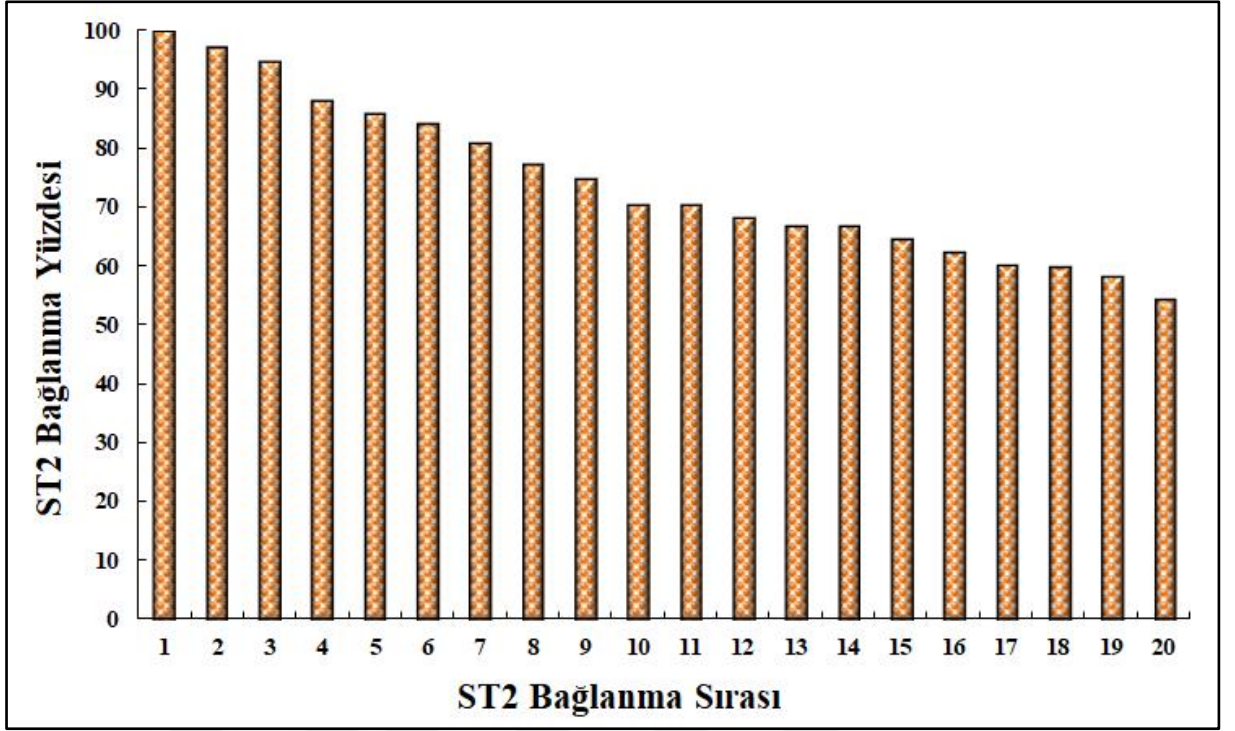
Şekil.4.24. ST2 biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ilişkin kalibrasyon grafikleri. (n=8)

Çizelge.4.18. ST2 biyosensörünün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

Tekrar üretilebilirlik	R^2	Denklem	Tayin Aralığı (fg/mL)
1	0,9992	$y=10,104x+23,857$	0,1-100 fg/mL
2	0,9992	$y=10,108x+21,946$	0,1-100 fg/mL
3	0,9992	$y=10,292x+20,759$	0,1-100 fg/mL
4	0,9988	$y=10,281x+22,885$	0,1-100 fg/mL
5	0,999	$y=10,163x+26,065$	0,1-100 fg/mL
6	0,9984	$y=10,056x+25,838$	0,1-100 fg/mL
7	0,9993	$y=10,270x+23,307$	0,1-100 fg/mL
8	0,9994	$y=10,427x+22,694$	0,1-100 fg/mL

4.2.3.4. ST2 biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği (rejenerasyon)

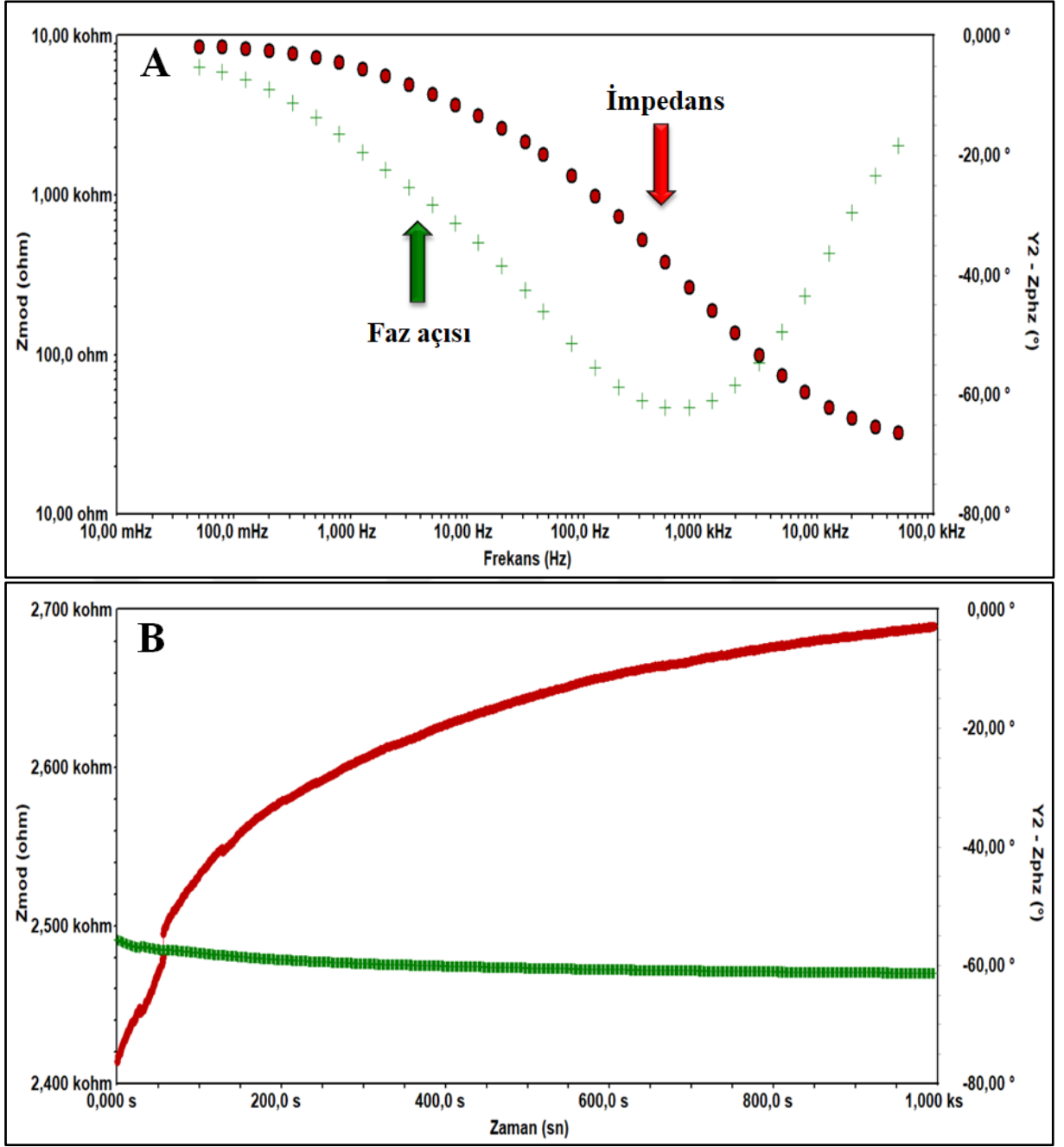
Tasarlanan biyosensörün karakterizasyon çalışmaları kapsamında hem elektrot yüzeyinin stabilitesini incelemeye yönelik hem de rutin kullanımlarda biyosensörün maliyetini oldukça düşürecek olan tekrar kullanılabilirlik çalışması yapılmıştır. Bu çalışma, ST2 bağlanmış olan elektrot yüzeyinin 10 mM HCl asit çözeltisinin içerisinde 2 dakika bekletilerek, bağlanan proteinin yüzeyden uzaklaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu işlemten sonra aynı yüzeye tekrar belli bir konsantrasyondaki ST2 (25fg/mL) inkübe edilerek EIS ölçümü alınmıştır. Bu işlem yüzeyin protein bağlayabilme aktivitesinin yüksek oranda azalması veya tamamen kaybetmesine kadar devam etmiştir. ST2 biyosensörü içinse bu durum 20 defa gerçekleştirilmiştir. 20. Bağlanma da bile neredeyse aktivitesinin yarısını koruduğu gözlemlenmiştir. 1. Bağlanma ile 20. Bağlanma arasındaki fark incelendiğinde toplam aktivite kaybının % 45,77 olduğu sonucuna varılmıştır. Tek kullanımlık bir elektrot yüzeyi için bu mükemmel bir tekrar kullanılabilirlik performansdır. Biyosensörün ileride pratikteki kullanımı dikkate alındığında umut vadeden bir sonuç elde edilmiştir. ST2 biyosensörünün tekrar kullanılabilirlik çalışmasına ait grafik Şekil 4.25’ te verilmiştir.



Şekil.4.25. ST2 biyosensörünün tekrar kullanılabilirlik çalışmasının grafikteki görünümü

4.2.3.5. ST2 biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi

ST2' nin karakterizasyon çalışmaları kapsamında sabit frekansta impedans tekniğiyle ölçüm alınmıştır. Bu teknik sayesinde anti-ST2 ile ST2 arasındaki kinetik bağlanmayı incelemek mümkündür. Bunun için ilk olarak kullanılacak olan sabit frekansın belirlenmesi gerekir. Bu frekans; immobilizasyonu tamamlanan elektrodun Şekil 4.26.A' daki Bode eğrisinden yararlanılarak belirlenmiştir. Bode eğrisinin bu teknikteki önemi ve üstünlüğü Bölüm.4.1.3.5'te anlatılmıştır. Bu hedef doğrultusunda, 45 Hz olarak seçilen sabit frekansta impedans ölçümü zamanın ve faz açısının fonksiyonları olarak ölçülmüştür. ST2 biyosensörünün sabit frekansta zamana bağlı impedans değişimi Şekil 4.26.B' de verilmiştir. Şekil 4.26.B' de görülen kırmızı eğri sabit frekansta alınan impedans ölçüsünü, yeşil eğri ise faz açısı ölçümünü ifade etmektedir. pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde gerçekleşen bu işlemde ST2 biyobelirtecinin zamana karşı bağlanması net bir şekilde görülmektedir. Yaklaşık 1000 ks (17 dk) civarında ST2' nin doygunluk noktasına erişerek ölçüm tamamlanmıştır.



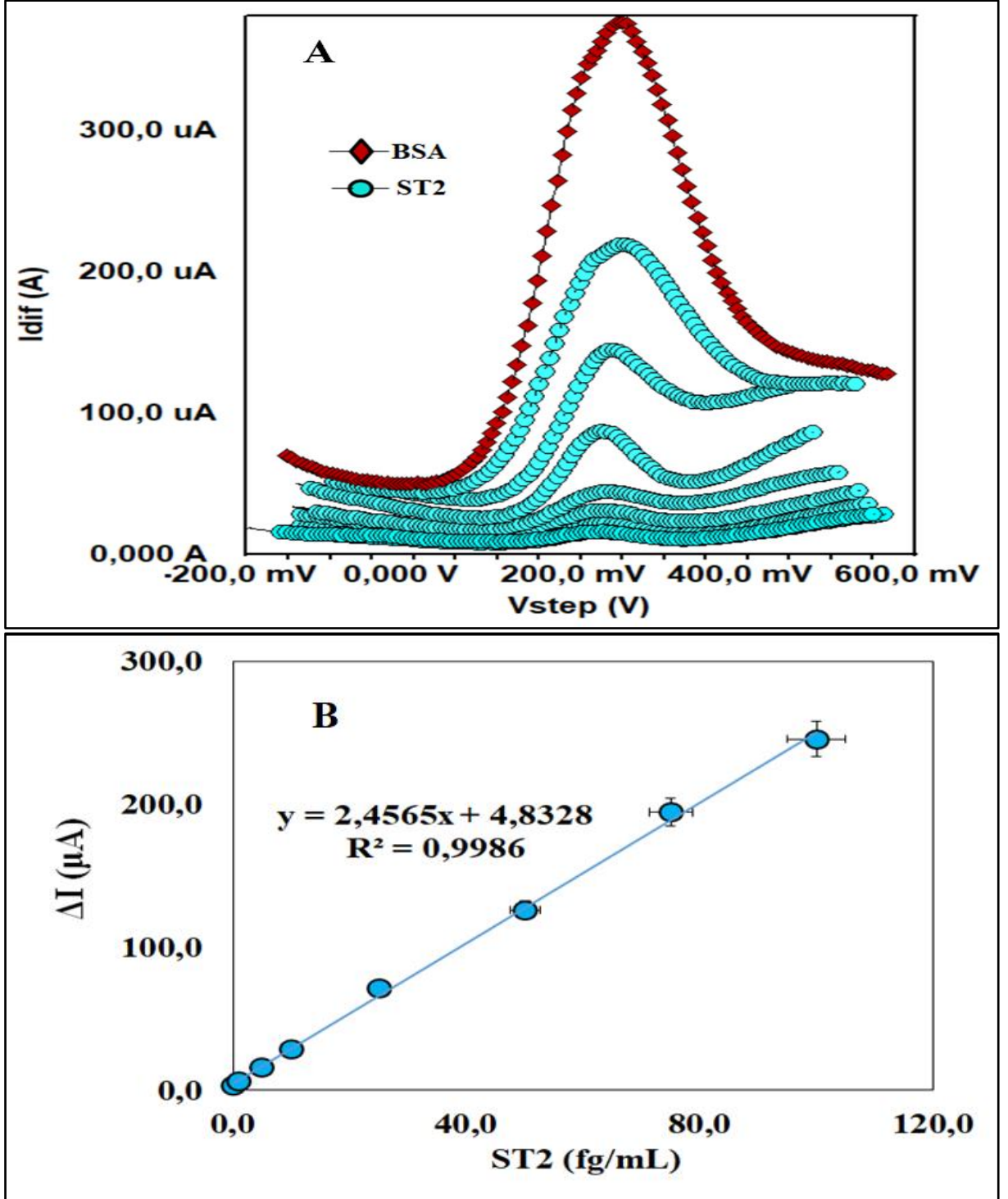
Şekil.4.26. ST2 biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümüne ait (A) Bode grafiği, (B) SFI spektrumu (kırmızı; sabit frekansta EIS ölçümü, yeşil; faz açısı ölçümü)

4.2.3.6. ST2 biyosensörünün kare dalga voltametri ile analizi

EIS ve CV tekniklerinin yanı sıra, geliştirilen biyosensör kare dalga voltametriyle de tayin gerçekleştirmiştir. Bu çalışma için SWV frekansı 25 Hz olarak seçilip, potansiyel aralığı olarak -0,2/0,7 V olarak belirlenerek ST2' nin artan konsantrasyonlarında ölçüm alınmıştır. Alınan ölçümlerin hesaplamaları yapılırken 4.4 bağıntısındaki denklem kullanılmıştır.

$$\Delta I_{dif} = \Delta I_{dif} (BSA) - \Delta I_{dif} (ST2) \quad (4.4)$$

Şekil 4.27 optimum koşullarda 0,1 fg – 100 fg mL⁻¹ tayin aralığındaki ST2 ölçümüne ait kare dalga voltamogramlarını ve kalibrasyon grafiğini göstermektedir.



Şekil.4.27. ST2 biyosensörüne ait (A) kare dalga voltametrisi ve (B) kalibrasyon grafiği

4.2.3.7. ST2 biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

Yapılan immobilizasyon işlemlerinde elektrot yüzey alanının ne kadar kaplandığını hesaplayabilmek adına dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak, Laviron eşitliği yardımıyla elektrodun kaplanmış olan yüzey alanı hesaplanmıştır. Bu çalışma için 10 farklı tarama hızında (10 mV, 20 mV, 30 mV, 40 mV, 50 mV, 60 mV, 70 mV, 80 mV, 90 mV ve 100 mV) dönüşümlü voltametri de ölçümler alınmıştır. Alınan ölçümler sonrasında elde edilen verilerle yapılan hesaplamalar Laviron eşitliğinde (Bölüm 4.1.3.7) yerine konarak sonuçlar elde edilmiştir.

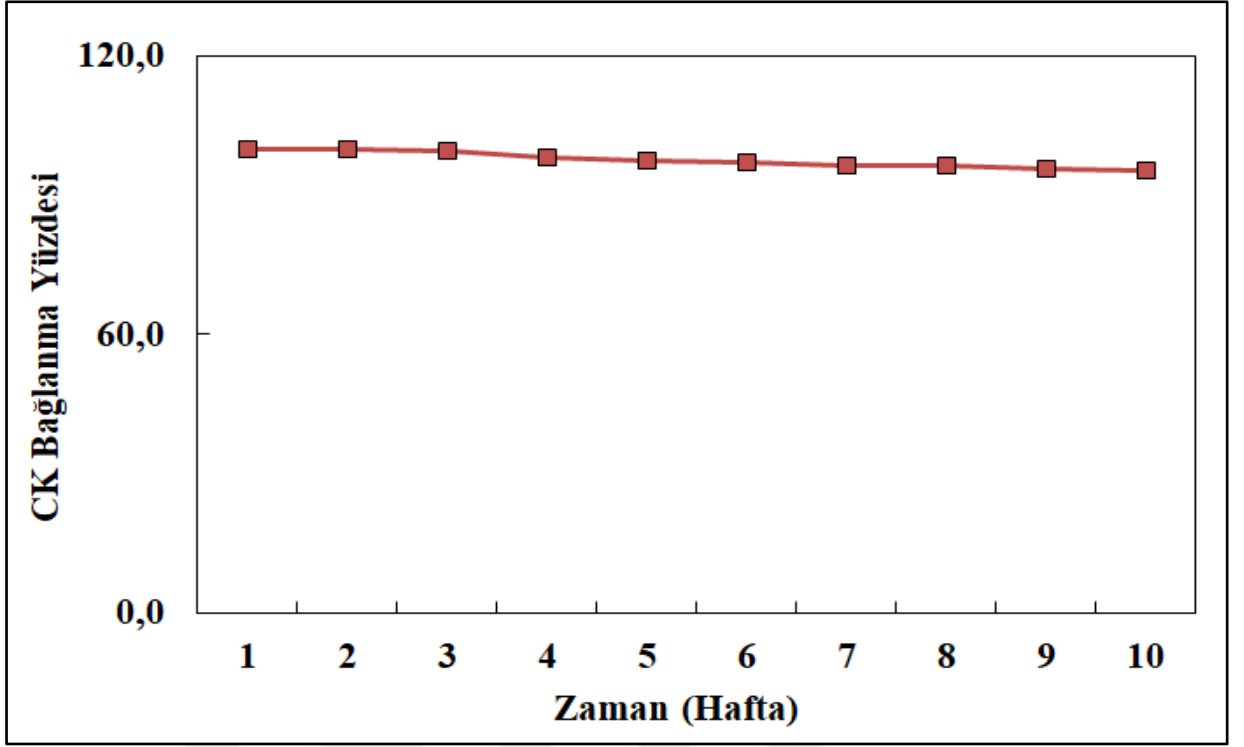
Eşitlikten yararlanılarak hesaplanan sonuçlar değerlendirildiğinde başlangıçta $2,2 \times 10^{-8}$ mol cm^{-2} olarak hesaplanan GP yüzeyi, anti-ST2 bağlandıktan sonra $7,3 \times 10^{-8}$ mol cm^{-2} olarak hesaplanmıştır. Anti-ST2' nin yüzeye immobilizasyonunun gerçekleştiği bu sonuçlarla doğrulanmıştır.

4.2.3.8. ST2 biyosensörünün raf ömrü

Geliştirilen biyosensörün raf ömrünü belirleyebilmek için toplam 10 haftadan oluşan bir depo çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için immobilizasyon işlemi tamamlanmış sensörler hazırlanarak kullanım sürelerine kadar $+4^\circ\text{C}$ de muhafaza edilmişlerdir. Her hafta bir sensör, belirlenen bir konsantrasyon değerinde (25 fg/mL) ST2 ile inkübe edilerek EIS ölçümü alınmıştır. Daha sonra alınan impedans ölçümlerinden elde edilen Ret değerleri Şekil 4.23.A' da ki kalibrasyon grafiğinde yerine koyularak hesaplamalar yapılmıştır. 10. Haftanın sonunda biyosensörün toplam aktivite kaybının sadece %4,48 olduğu görülmüştür. Tasarlanan biyosensörün raf ömrüne bakılarak klinik uygulamalarda kullanım için tercih edilebilir olduğu düşünülmektedir. ST2 biyosensörüne ait depo kararlılığını gösteren grafik Şekil 4.28' de verilmiştir.

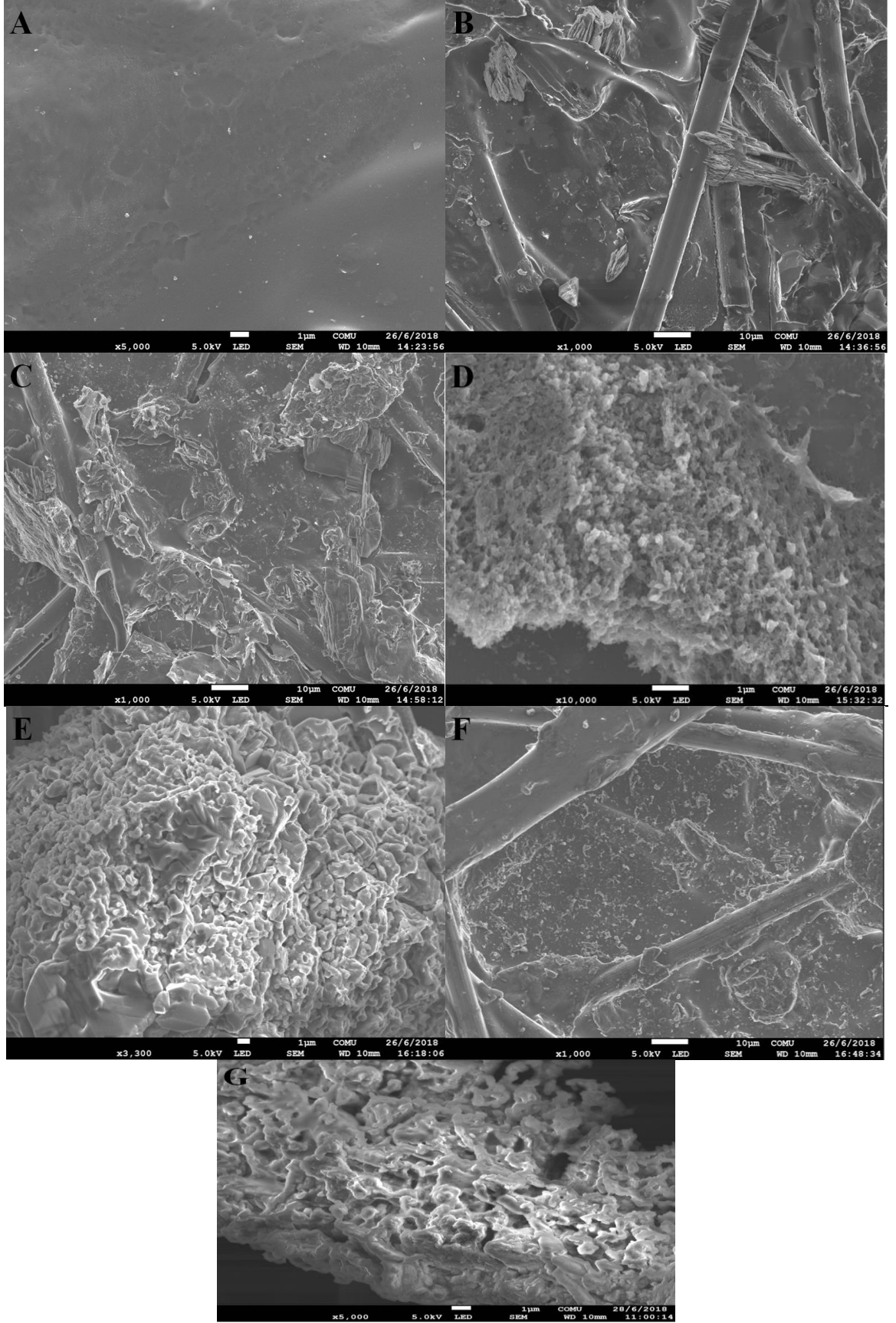
4.2.3.9. ST2 biyosensörünün SEM görüntüleri

Biyosensörün immobilizasyon aşamasından sonra yüzeyde meydana gelen morfolojik değişimleri inceleyebilmek için her bir aşamanın SEM görüntüleri alınmıştır. ST2 sensörüne ait SEM görüntüleri Şekil 4.29' da verilmiştir. Her bir aşama için incelenen görüntülerden ilki Şekil 4.29.A' daki temizlenmiş GP elektrot yüzeyine aittir. Hiçbir immobilizasyon işlemi gerçekleşmemiş yüzeyde herhangi bir heterojenik bölge mevcut değildir.



Şekil.4.28. ST2 biyosensörünün depo kararlılığı denemelerine ilişkin aktivite değerleri

Şekil 4.29.B ise yüzey fulleren C_{60} ile modifiye edildikten sonra alınan SEM görüntüsüdür. Burada fulleren C_{60} moleküllerinin varlığı çok net görülmektedir. Nano kablolarla örülü bir ağı anımsatan bu görüntü fulleren C_{60} ' ın yüzeye adsorbe olduğunu kanıtlar niteliktedir. Şekil 4.29.C' de ise yüzeyin H_2SO_4 ile gece boyu inkübasyonundan sonra çekilmiş bir SEM görüntüsüdür. Burada asit muamelesinden sonra parçalanarak elektrot yüzeyine dağılan yapılara benzer bir morfoloji gözlemlenmiştir. Şekil 4.29.D' deki SEM görüntüsü çapraz bağlayıcı EDC/NHS çiftine aittir. Bu görüntüde de yine bir önceki yüzey morfolojisinden tamamen farklı bir morfolojiye sahiptir. EDC/NHS etkisiyle ortaya çıkan karboksil gruplarının oluşturduğu yüzey değişikliğini temsil ettiği düşünülmektedir. Şekil 4.29.E' de anti-ST2 bağlanmasından sonra alınan SEM görüntüsüdür. Yüzeyde oldukça yoğun gözüken kıvrımlı yapıların anti-ST2 bağlanmasından sonra oluştuğu düşünülmektedir. Şekil 4.29.F' de ki SEM görüntüsü BSA immobilizasyonuna aittir. Nano kablolarla benzer yapılar arasında biriken yapılar BSA' nın bağlanmasından sonra yüzeyde gözlemlenmiştir. Son olarak Şekil 4.29.G' deki görüntü ise ST2 biyobelirticisine ait SEM görüntüsüdür. Yakından bakıldığında adeta çiçek dalını anımsatan bu görüntü de ST2' nin yüzeye inkübe edilmesinden sonra görülmüştür.



Şekil.4.29. ST2 biyosensörünün SEM görüntüleri. (A) Yalın GP, (B) Fulleren C₆₀, (C) H₂SO₄, (D) EDC-NHS, (E) Anti-ST2, (F) BSA, (G) ST2

4.2.3.10. ST2 biyosensörünün serum örneklerinde uygulanabilirliğinin araştırılması

Geliştirilen biyosensörün klinik uygulamalar için kullanılabilirliğini incelemek adına farklı kişilerden alınan insan serum örneklerine standart ekleme yöntemi kullanılarak ST2 tayini yapılmıştır. ST2' nin farklı konsantrasyon değerlerinin (5 fg/mL ve 50 fg/mL) serum örneğine eklenmesiyle gerçekleştirilen çalışma sonrasında EIS verileri elde edilmiştir. Bu veriler için kalibrasyon grafiğinin denkleminde yararlanılarak yapılan her bir serum çalışması için bağıl standart sapma (RSD) ve geri kazanım yüzdeleri hesaplanmıştır. Serum örnekleriyle gerçekleştirilen çalışma için yapılan hesaplamaların sonuçları Çizelge 4.19' da verilmiştir.

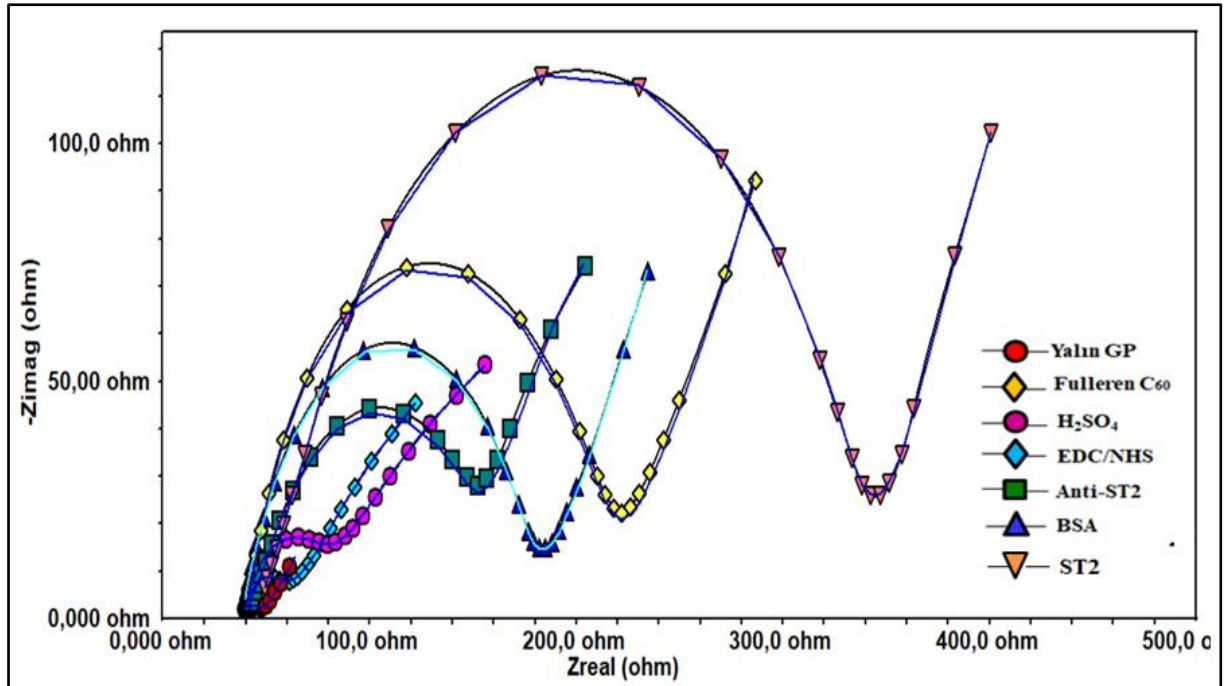
Çizelge.4.19. Geliştirilen biyosensör sistemi ile serum örneklerinde bulunan CK konsantrasyonlarının belirlenmesi

Serum Örnek Numarası	ST2 ölçülen konsantrasyon (fg mL ⁻¹)	Standart eklenen değeri (fg mL ⁻¹)	Ölçülen konsantrasyon değeri (fg mL ⁻¹)	RSD (%) (n=3)	Geri Kazanım (%)
1	22,10	5	28,93/30,51/28,88	3,15	108,63
		50	74,08/72,39/73,41	1,16	101,8
2	2,97	5	8,6/8,3/9,7	8,31	111,16
		50	54,03/53,84/ 52,01	15,59	100,6
3	1,09	5	7,7/6,3/56,73	10,37	113,46
		50	51,2/54,7/54,1	3,5	104,38
4	20,06	5	25,72/26,92/26,5	2,3	105,26
		50	72,13/69,47/71,17	1,9	101,22
5	16,31	5	23,08/22,58/23,06	1,24	107,46
		50	68,41/64,90/65,63	2,79	100,0

Standart ekleme yöntemi ST2' nin serumdaki tayin aralığına uygun olacak şekilde gerekli seyreltme işlemleri yapılarak gerçekleştirilmiştir (**Anonim 2018**).

4.2.3.11. ST2 biyosensörünün Kramers-Kronig Transform karakterizasyonu

Kramers-Kronig transformu tasarlanan biyosensörün EIS ölçümleri sırasında herhangi bir dış etkenden etkilenip etkilenmediğini ve buna bağlı olarak sapmaların meydana gelip gelmediğini incelemek için kullanılan bir yöntemdir (Bölüm 4.1.3.11). ST2 biyosensörünün immobilizasyon aşamaları için Şekil 4.30’ da yer alan impedans spektrumlarının fitlenmiş görüntüsü yer almaktadır. Çizelge 4. 20’ de ise bu fitlenmiş spektrumlara ait Kramers-Kronig transform değerleri verilmiştir.



Şekil.4.30. ST2 biyosensörün Kramers-Kronig Transform fit spektrumları

Çizelge.4.20. ST2 biyosensörüne ait Kramers-Kronig fit değerleri

ST2 biyosensör	Kramers Kronig Transform değeri
Yalın GP	730,9 n
GP/Fulleren C ₆₀	24,96 u
GP/ Fulleren C ₆₀ /H ₂ SO ₄	781,6 n
GP/ Fulleren C ₆₀ /H ₂ SO ₄ /EDC-NHS	3,323 u
GP/ Fulleren C ₆₀ /H ₂ SO ₄ /EDC-NHS /Anti-ST2	49,61 u
GP/ Fulleren C ₆₀ /H ₂ SO ₄ /EDC-NHS /Anti-ST2/BSA	2,132 u
GP/ Fulleren C ₆₀ /H ₂ SO ₄ /EDC-NHS /Anti-ST2/BSA/ST2	860,8 n

4.2.3.12. ST2 biyosensörünün literatürdeki yeri

Tasarlanan biyosensörün literatürde bildirilen çeşitli ST2 sensörleriyle analitik olarak kıyaslandığı çalışmalar Çizelge 4.21’ de verilmiştir.

Kardiyovasküler hastalıkların tayininde kullanılan yeni bir biyobelirteç olan ST2 ile ilgili literatürde çok fazla çalışma yer almamaktadır. Akut miyokart enfarktüsü ve kalp yetmezliği durumlarında hastaların serumlarındaki ST2 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler, bilim insanlarının ST2’ nin kardiyovasküler hastalıklarla olan önemli ilişkini ortaya çıkararak yeni bir kardiyak belirtecini keşfetmelerini sağlamıştır.

Bu yeni ve literatürde oldukça az olan biyobelirteçle ilgili yapılan doktora tezinde oldukça hassas, tekrar üretilebilirliği çok iyi ve geniş bir tayin aralığında (0,1-100 fg/mL) ST2’ nin analizini mümkün kılan bir biyosensör sistemi tasarlanmıştır.

Gerçek serum örneklerinde de alınan sonuçlar, tasarlanan sensörün klinik uygulamalar için de potansiyelinin çok yüksek olduğunu doğrular niteliktedir.

Çizelge.4.21. Literatürde bildirilen çeşitli ST2 biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması

<u>İmmobilizasyon yöntemi</u>	<u>Ölçüm yöntemi</u>	<u>Tayın Aralığı</u>	<u>LOD</u>	<u>Referans</u>
CMD küvet	Optik	100-1600 nM	–	(Wu ve ark.2006)
Kritik Tanı	İşaretli ST2 Kit	<200 ng/mL	1,3 ng/mL	(Aldous ve ark 2007)
MBL	İnsan ST2 ELISA Kit	<20 ng/mL	0,032 ng/mL	(Brown ve ark. 2007)
Ray-Biotech.	İnsan IL-1 R4/ST2 ELISA Kit	< 1,2 ng/mL	0,002 ng/mL	(Willems ve ark. 2013)
R&D Sistemleri	IL-1 R4/ST2 ELISA Kit	< 2,0 ng/mL	0, 005 ng/	(Wang ve ark. 2013)
GP/Fulleren C ₆₀	EIS ve CV	0,1-100 fg/mL	0,124 fg/mL	

4.3. TnT Tayini için Geliştirilen Biyosensör Sistemi

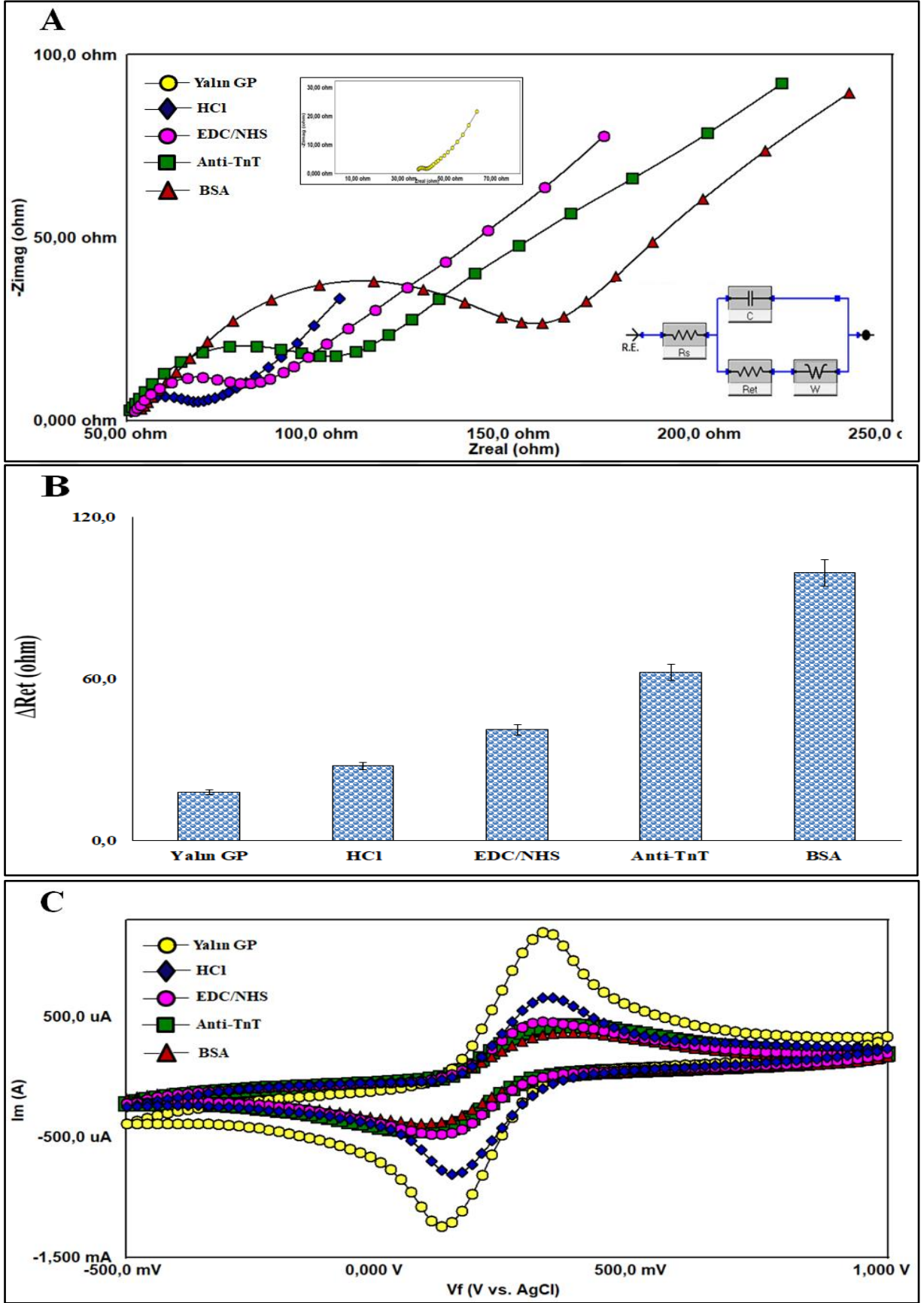
4.3.1. TnT biyosensörünün immobilizasyon adımlarının EIS ve CV ile yorumlanması

Kardiyovasküler hastalıkların en başında gelen akut miyokart enfarktüsüne yüksek oranda spesifik olan Troponin T (TnT) biyobelirtecinin tayinine yönelik geliştirilen biyosensördeki ilk adım daha önce Bölüm 3.3.1’ de anlatılan temizlik işlemidir. Temizlik işleminin ardından yüzeyin modifikasyonu için HCl çözeltisinden yararlanılmıştır. GP elektrotların gece boyu HCl asit çözeltisinde bekletilmesi, yüzeylerindeki karboksil gruplarının aktifleşerek reaksiyona girmelerini hızlandırmıştır. Böylelikle aktifleşen karboksil grupları GP elektrot yüzeyinin immobilizasyona daha elverişli bir hale gelmesini sağlamıştır. Daha sonra anti-TnT’ nin yüzeye bağlanmasında aracılık edecek olan EDC/NHS çifti kullanılmıştır. Fonksiyonel karboksil gruplarıyla (-COOH) amin grupları (-NH₂) arasındaki etkileşimi sağlayan bu vazgeçilmez çapraz bağlayıcı EDC/NHS sayesinde anti-TnT’ nin immobilizasyonu gerçekleşmektedir. Bu aşamadan hemen sonra antikorun yüzeye bağlanması için anti-TnT’ nin inkübasyon işlemi yapılmıştır. İmmobilizasyonun son aşamasında ise açıkta kalan fonksiyonel grupları kapatarak spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için BSA bloklama ajanı kullanılmıştır. Tüm bu adımlar EIS ve CV teknikleriyle takip edilmiştir. Şekil 4.31.A’ daki EIS spektrumları incelendiğinde, temizlik işleminin ardından alınan GP elektrot ölçümü oldukça düşük bir sinyale sahiptir. Bu durum elektrot yüzeyinin hem başarılı bir temizlik aşamasından geçirildiğinin ve bu sayede elektrot yüzeyinde oluşabilecek herhangi bir kontaminasyondan kaynaklı riskin önlendiğinin göstergesidir hem de buna bağlı olarak iletkenliğin bu aşama da oldukça fazla olmasının belirtisidir. Yalın GP elektrodun EIS sinyalinden hesaplanan Ret değeri 17,81 ohm dur. Gece boyu HCl çözeltisi içerisinde kaldıktan sonra EIS ölçümündeki artış, asit muamelesiyle birlikte yüzeyde başlayan kimyasal hareketlenmelerin hesaplanan Ret (27,48 ohm) değeriyle birlikte immobilizasyonun başarılı olduğunu kanıtlar niteliktedir. Ret değerleri arasındaki sayısal fark çok olmamasına rağmen, çok iletken bir yüzeyde ihmal edilemeyecek ölçüde önemlidir. Sonrasında EDC/NHS kimyasının yüzeyde gerçekleştirmiş olduğu çapraz bağlama sonrasında impedans sinyalinin artmasına bağlı olarak Ret değeri de artmış ve 40,97 ohm olarak hesaplanmıştır. Burada EDC/NHS’ nin karboksil gruplarını aktifleştirmesinin yanı sıra redoks probu ferri-ferro çözeltisinin negatif yükünden dolayı yüzeye difüze olmasının bir miktar engellenebileceği düşünülmektedir. Anti-TnT’ nin yüzeye immobilizasyonu ile birlikte biraz daha artan impedans sinyali, antikorun yüzeyde yalıtkan bir tabaka oluşturarak difüzyonu engellemesiyle

açıklanabilmektedir. Anti-TnT' nin impedans sinyalinin yarım daire çapı olan yük transfer direnci 62,32 ohm olarak hesaplanmıştır. BSA' nın inkübasyonu ile birlikte yalıtkanlığı iyice artan elektrot yüzeyine analitin difüze olması daha da zorlaşarak bu durum EIS spektrumuna sinyal artışı olarak yansımıştır. BSA adımına ait Ret değeri 99,12 ohm olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.31.C' deki CV voltamogramları incelendiğinde anodik ve katodik pik akımlarından yola çıkılarak değerlendirmeler yapılmıştır. İlk olarak temizlik işleminden sonra CV ölçümü alınan yalın GP elektrodun pik akımları oldukça düzgün ve de keskindir (Katodik pik akımı=1,200 mA, Anodik pik akımı=1,242 mA). HCl ile muamelesinden sonra alınan CV ölçümünde pik akımlarını bariz şekilde daraldığı gözlemlenmektedir (Katodik pik akımı= 660 μ A, Anodik pik akımı= 809,3 μ A). EDC/NHS' nin inkübasyonundan sonra ise redoks probunun elektrot yüzeyine difüze olamamasına bağlı olarak bu voltamogramda da görüldüğü gibi pik akımları birbirine daha da yaklaşmışlardır (Katodik pik akımı= 456,5 μ A, Anodik pik akımı= 480 μ A). Anti-TnT' nin immobilizasyonu ile birlikte artan yalıtkanlıkla beraber pik akımlarında daha da düşüş gözlenmiştir (Katodik pik akımı= 422,6 μ A, Anodik pik akımı= 448,8 μ A). Son olarak BSA' nın inkübasyonu ile birlikte daha da yalıtkanlaşan yüzey difüzyonun engellenmesine bağlı olarak en düşük pik akım değerlerine sahip immobilizasyon aşamasıdır (Katodik pik akımı= 365,1 μ A, Anodik pik akımı= 387,9 μ A).

TnT biyosensörünün immobilizasyonuna ait EIS spektrumları, her adıma ait olan Ret değerleri ve CV voltamogramları Şekil 4.31' de verilmiştir.

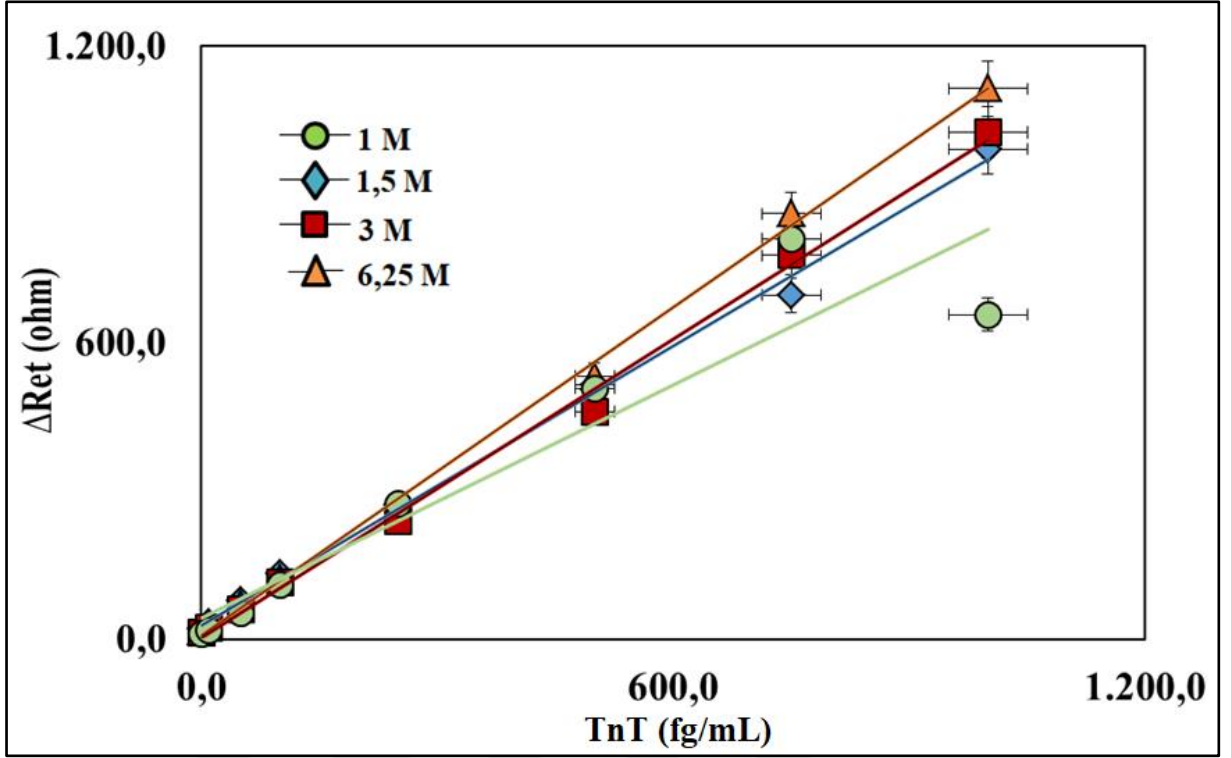


Şekil.4.31. TnT biyosensörüne ait immobilizasyon adımlarının (A) EIS verileri, (B) immobilizasyon basamaklarına ait Ret değerleri, (C) CV voltamogramları

4.3.2. TnT biyosensörünün optimizasyon basamakları

4.3.2.1. HCl asit konsantrasyonunun optimizasyonu

Yüzeyin immobilizasyonu noktasında kritik bir role sahip olan HCl asit konsantrasyonunun optimum değerini belirleyebilmek için büyük bir titizlikle optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu optimizasyon çalışmasında 4 farklı konsantrasyon değeri ile (1 M, 1,5 M, 3 M ve 6,25 M) HCl asidinin biyosensör üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaca yönelik, ilk olarak düşük konsantrasyon değerlerinden başlayarak 1 M HCl ile hazırlanan biyosensörle EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Alınan ölçümlerden elde edilen veriler incelendiğinde düşük asit konsantrasyonunda yüzeyin immobilizasyonunun tam manada gerçekleşemediği düşünülmektedir. Çalışma sırasında bütün immobilizasyon adımlarında birbirine çok yakın çıkan impedans sinyalleri bu ihtimali güçlendirmektedir. Bu nedenle bir sonraki konsantrasyon değeri 1,5 M HCl olarak seçilmiş ve bu konsantrasyon değerinde biyosensör hazırlanmıştır. EIS sinyallerinden hesaplanan Ret değerleriyle oluşturulan Şekil 4.32' deki standart eğrisi incelendiğinde bir önceki konsantrasyona göre daha yüksek sinyallere sahip olduğu görülmektedir. Bir sonraki HCl konsantrasyonu ise 3 M olarak seçilmiştir. Yapılan çalışma sonunda artan konsantrasyonla birlikte buna bağlı olarak standart eğrideki sinyallerinde arttığı açıkça görülmektedir. Optimizasyon için son tercih konsantrasyon değeri 6,25 M' lık HCl olarak belirlenmiştir. En yüksek sinyallere sahip olan bu konsantrasyon değeri optimum HCl konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir. 6,25 M HCl' den daha derişik konsantrasyonlarda elektrot yüzeyi yoğun asit muamelesinden kaynaklı ciddi hasarlar görerek immobilizasyon için imkansız hale geldiğinden daha yüksek konsantrasyonlarda çalışma yapılamamıştır. HCl konsantrasyon optimizasyonuna ait standart grafikler Şekil 4.32' de ve bu standart grafiklere ait denklemler Çizelge 4.22' de verilmiştir.



Şekil.4.32. HCl asit konsantrasyonunun TnT biyosensörünün cevabı üzerine etkisi

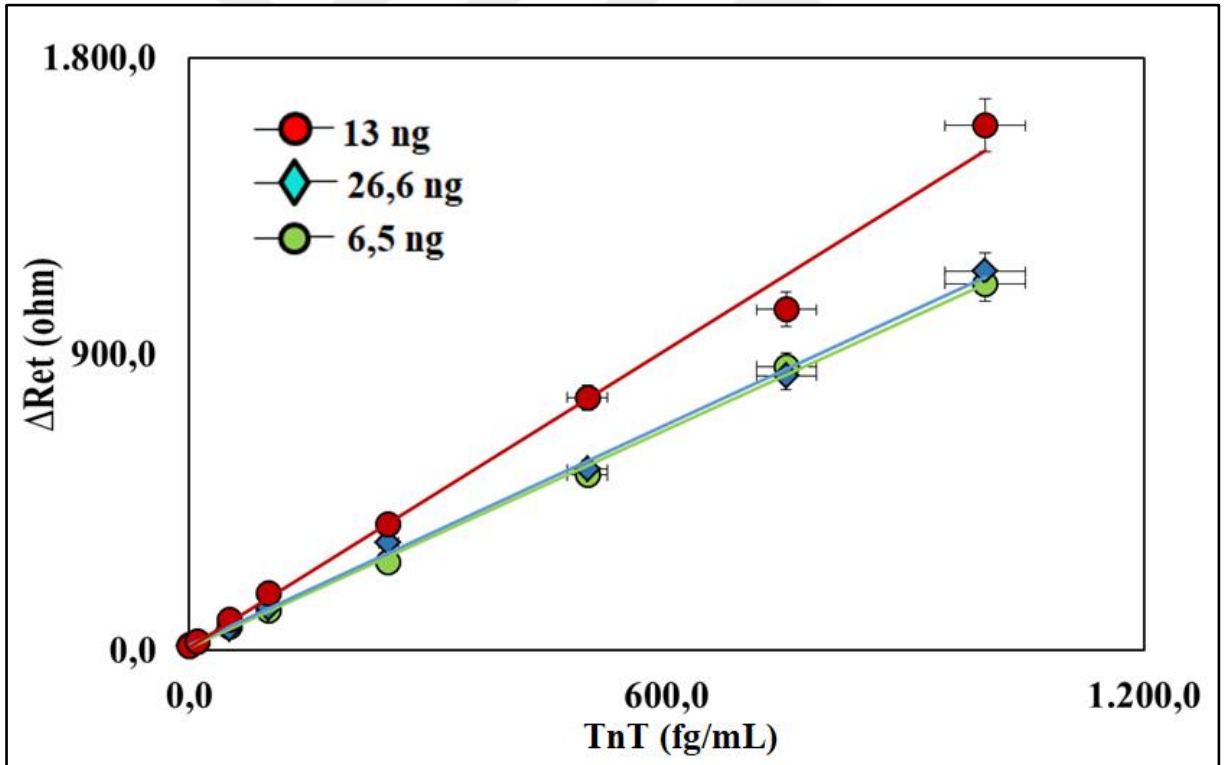
Çizelge.4.22. HCl konsantrasyon optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

HCl (M)	R^2	Denklem
1	0,8978	$y = 0,7862x + 43,898$
1,5	0,9973	$y = 0,9443x + 28,258$
3	0,9986	$y = 1,0083x + 3,794$
6,25	0,9968	$y = 1,106x + 8,3785$

4.3.2.2. Anti-TnT konsantrasyonunun optimizasyonu

Anti-TnT' nin geliştirilen biyosensör cevabı üzerine etkisini araştırmak için 3 farklı konsantrasyonda (6,5 ng/mL, 13 ng/mL ve 26,6 ng/mL) optimizasyon çalışması yapılmıştır. İlk olarak 6,5 ng/mL anti-TnT konsantrasyonu ile biyosensör hazırlanarak EIS ve CV ölçümleriyle izlenmiştir. Elde edilen veriler, yapılan çalışma için düzgün sinyallere sahip bir standart eğri oluşturmuştur. Ancak biyosensörün daha yüksek antikör konsantrasyonlarındaki

etkisini inceleyebilmek adına daha optimizasyon işlemlerine daha düşük anti-TnT konsantrasyonlarıyla devam edilmiştir. Bu sebeple bir diğer çalışma 13 ng/mL anti-TnT ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonunda elde edilen standart eğri incelediğinde 6,5 ng/mL ile arasındaki sinyal farklı net bir şekilde görülmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, biyosensörün immobilizasyonunun başarılı olmasıyla birlikte yük transfer direncine bağlı olan sinyal artışlarının da önemli ölçüde etkilendiği tespit edilmiştir. Sonraki konsantrasyon değeri ise 26,6 ng/mL olarak seçilmiştir. Seçilen bu konsantrasyon için yapılan çalışmanın sonuçları incelediğinde beklenenin aksine EIS sinyallerinde bir düşüş meydana gelmiştir. Bunun sebebinin anti-TnT antikorunun yüzeyde doygunluğa ulaşmasıyla birlikte aktivitesinin azalmasının bağlı bir sinyal düşüşü olabileceği düşünülmektedir. Tüm bu nedenler göz önünde bulundurularak optimum anti-TnT konsantrasyonu 13 ng/mL olarak belirlenmiştir. Anti-TnT konsantrasyon optimizasyonuna ait standart grafikler Şekil 4.33’ te ve bu standart grafiklere ait denklemler Çizelge 4.23’ de verilmiştir.



Şekil.4.33. Anti-TnT konsantrasyon optimizasyonunun biyosensörün cevabı üzerine etkisi

Çizelge.4.23. Anti-TnT konsantrasyon optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

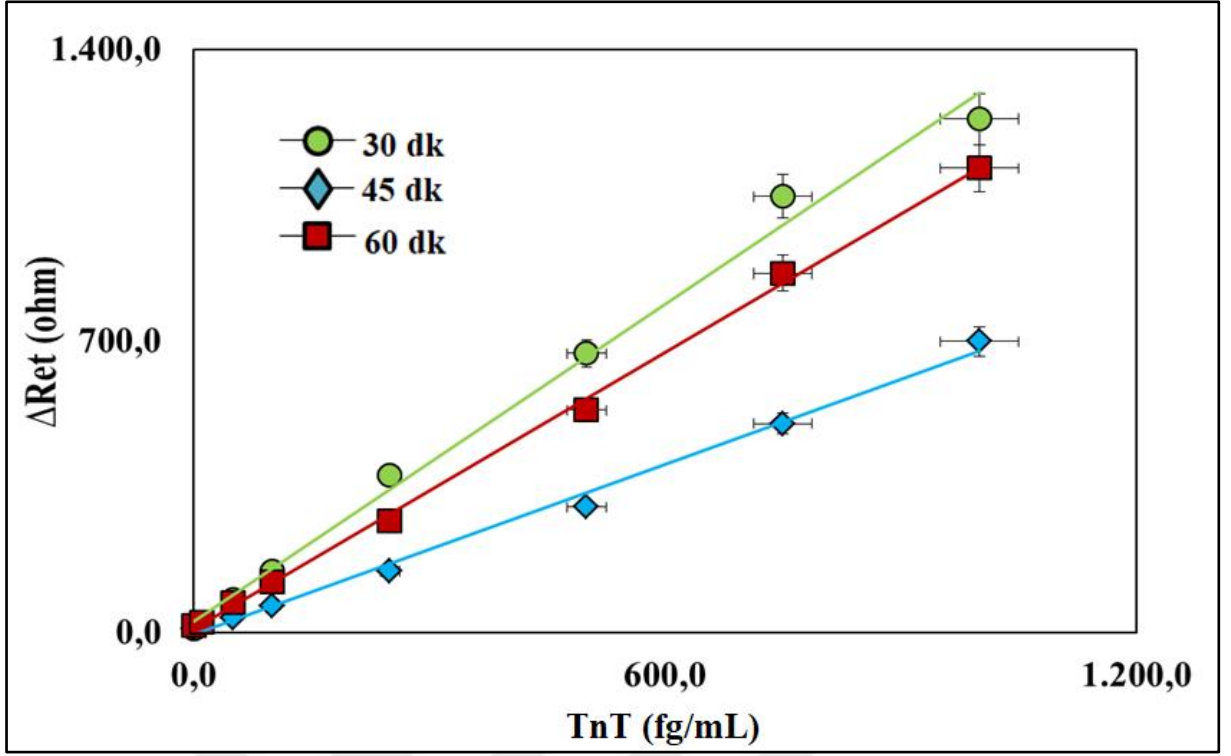
Anti-TnT (ng/mL)	R^2	Denklem
6,5	0,9986	$y = 1,106x + 8,3785$
13	0,9925	$y = 1,5092x + 8,5129$
26,6	0,9981	$y = 1,1186x + 14,227$

4.3.2.3. Anti-TnT inkübasyon süresinin belirlenmesi

Anti-TnT antikorunun optimum konsantrasyon değeri belirlendikten sonra elektrot yüzeyindeki inkübasyon süresinin de belirlenebilmesi için optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaya yönelik 3 farklı süre de (30, 45 ve 60 dakika) biyosensör hazırlanarak EIS ve CV ölçümleriyle takip edilmişlerdir. Her bir süre için ayrı ayrı yapılan çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda Şekil 4.34' te verilen, biyosensörlere ait standart grafikler oluşturulmuş ve birbirleriyle kıyaslanmıştır. Standart eğriler incelendiğinde en düşük sinyallerin 45 dakikalık inkübasyon süresine ait olduğu görülmektedir. 60 ve 30 dakikalık inkübasyon sürelerinde ise sinyaller birbirine çok yakındır. Bu nedenle tasarlanan biyosensörün pratikliği açısından zaman tasarrufu göz önünde bulundurularak optimum anti-TnT inkübasyon süresi 30 dakika olarak seçilmiştir. Anti-TnT için inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik yapılan optimizasyonunun standart grafiklerine ait denklemler Çizelge 4.24' de verilmiştir

Çizelge.4.24. Anti-TnT süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

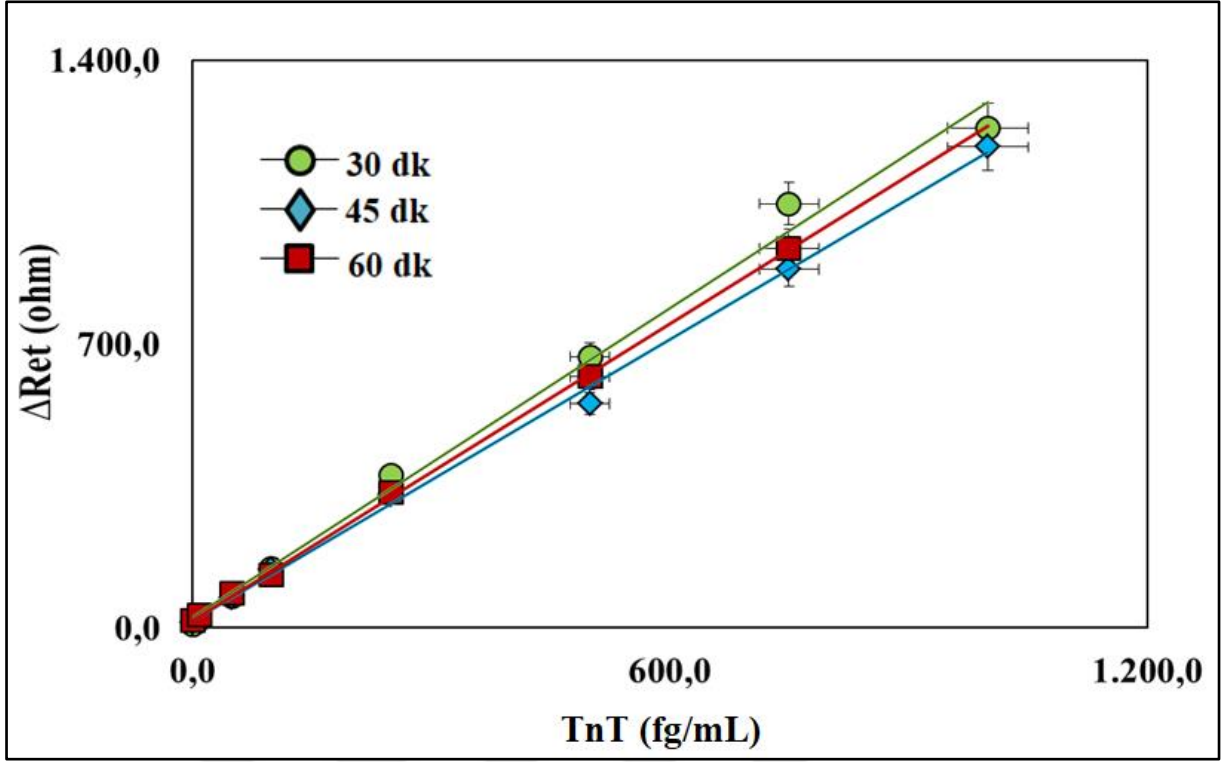
Anti-TnT (dk)	R^2	Denklem
30	0,9936	$y = 1,2701x + 25,396$
45	0,9948	$y = 0,6796x - 5,3548$
60	0,9986	$y = 1,106x + 8,3785$



Şekil.4.34. Anti-TnT inkübasyon süresi optimizasyonunun biyosensörün cevabı üzerine etkisi

4.3.2.4. TnT inkübasyon süresinin belirlenmesi

Geliştirilen biyosensörün son optimizasyon çalışması TnT biyobelirtecinin inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Bu çalışma için de yine 3 farklı süre de (30, 45 ve 60 dakika) çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmaların EIS ve CV ölçümler alınmıştır. Biyosensörlerin EIS verilerinden elde edilen Ret değerleriyle yapılan hesaplamalar sonucunda Şekil 4.35' teki standart grafikler oluşturulmuştur. Biyosensörlere ait standart eğriler incelendiğinde 3 çalışma içinde sonuçların neredeyse birbirleriyle çakışık çıktığı görülmektedir. Bu sonuçlara göre tasarlanan biyosensörü kısa sürede hazırlanmasıyla pratikliğini öne çıkaracak olan 30 dakika TnT biyobelirteci için optimum inkübasyon süresi olarak seçilmiştir. TnT için inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik yapılan optimizasyonunun standart grafiklerine ait denklemler Çizelge 4.25' de verilmiştir



Şekil.4.35. TnT inkübasyon süresi optimizasyonunun biyosensörün cevabı üzerine etkisi

Çizelge.4.25. TnT süre optimizasyonunun grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

TnT (dk)	R^2	Denklem
30	0,9936	$y = 1,2701x + 25,396$
45	0,9981	$y = 1,1556x + 17,335$
60	0,9996	$y = 1,2187x + 18,802$

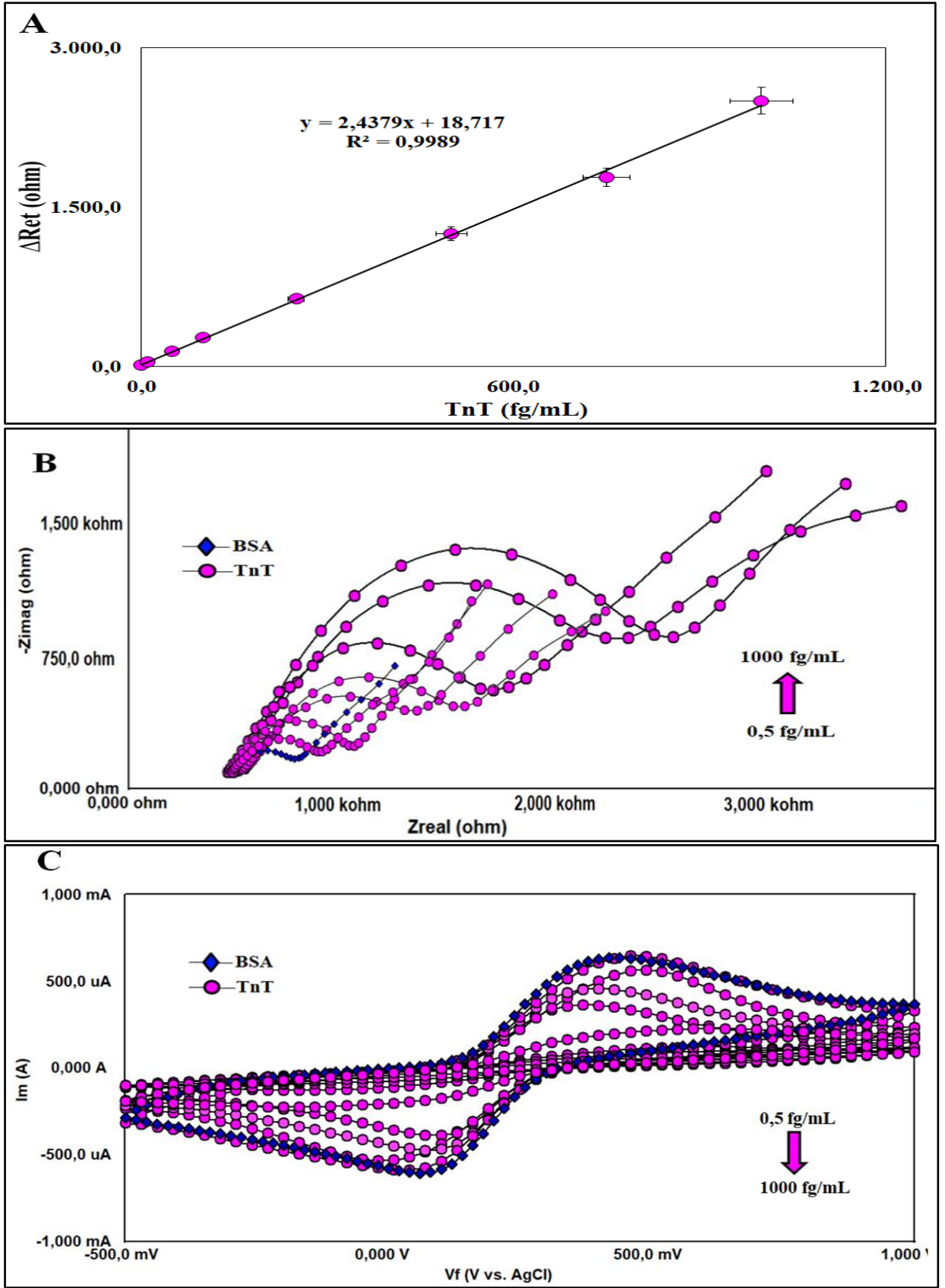
4.3.3. TnT biyosensörünün karakterizasyon çalışmaları

4.3.3.1. TnT biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Tüm optimizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, geliştirilen biyosensörün artan konsantrasyonlarında hazırlanan TnT biyobelirteci EIS ve CV teknikleriyle tayin edilmiştir. 8 farklı konsantrasyon değeri belirlenerek yapılan bu çalışma da geliştirilen biyosensörün hassas TnT tayinine yönelik bir lineer aralık belirlenmiştir. Tasarlanan sensörün yapılan çalışmalar sonrasında tayin aralığı $0,5 - 1000 \text{ fg mL}^{-1}$ olarak saptanmıştır. Geliştirilen immünosensör femtogram gibi oldukça konsantrasyon seviyesinde ve geniş bir tayin aralığında TnT' nin analizini gerçekleştirebilmektedir. TnT biyosensörünün kalibrasyon grafiği ve bu kalibrasyon grafiğine ait EIS spektrumu, CV voltamogramı Şekil 4.23' te verilmiştir. Ayrıca LOD ve LOQ değerleri de sırasıyla $1,28 \text{ fg mL}^{-1}$ ve $4,29 \text{ fg mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. TnT' nin artan konsantrasyonlar da değişen impedimetrik verileri Çizelge 4.26' da verilmiştir.

Çizelge.4.26. Artan TnT konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen impedimetrik veriler

Elektrot	Ret(ohm)	Ru (ohm)	C (µF)
TnT biyosensörü (BSA)	56,24±0,8977	59,97±0,5128	5,48±0,224
TnT 0,5 fg/mL	77,77±1,002	59,62±0,47	9,033±0,2875
TnT 10 fg/mL	102,7±1,132	56,26±0,4437	8,039±0,2058
TnT 50 fg/mL	161,9±1,719	69,66±0,51	12,5±0,2795
TnT 100 fg/mL	189,3±1,871	71,55±0,527	10,62±0,2206
TnT 250 fg/mL	352,9±3,491	147,9±1,149	3,157±0,07
TnT 500 fg/mL	700±6,782	280,5±2,363	0,8061±0,01715
TnT 750 fg/mL	936,9±8,829	299,8±2,45	0,9277±0,0177
TnT 1000 fg/mL	1010±9,56	300,5±2,424	0,9419±0,01766



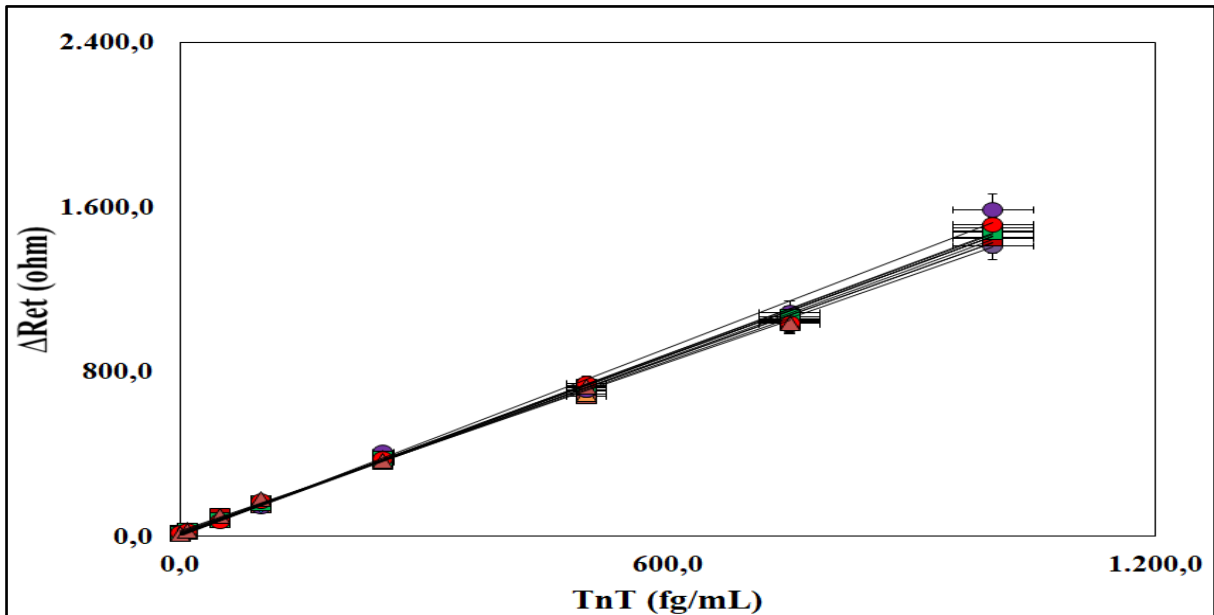
Şekil.4.36. Tasarlanan biyosensörün artan TnT konsantrasyonuyla elde edilen (A) Kalibrasyon grafiği, (B) EIS verileri, (C) CV voltamogramları

4.3.3.2. TnT biyosensörünün tekrarlanabilirliği

TnT biyosensörünün tekrarlanabilirlik çalışması için 20 farklı elektrot aynı koşullar altında hazırlanıp aynı konsantrasyon değerinde (50 fg/mL) TnT ile inkübe edilerek EIS ölçümlerinin alınmasıyla gerçekleştirilmiştir. Her bir elektroda ait EIS ölçümlerinden elde edilen Ret değerleri Şekil.4.36.A' daki kalibrasyon denkleminde kullanılarak biyosensörün ortalama değeri 50,3625 fg/mL, standart sapma değeri 1,045 fg/mL ve varyasyon katsayısı % 2,07 olarak hesaplanmıştır.

4.3.3.3. TnT biyosensörünün tekrar üretilebilirliği

Biyosensörün tekrar üretilebilirlik çalışması için optimum koşullarda hazırlanan elektrotlarla farklı zaman dilimlerinde çalışılmıştır. TnT' nin artan konsantrasyonlarıyla belirlenen tayin aralığında ölçüm alınarak gerçekleştirilen tekrar üretilebilirlik çalışması için 10 adet biyosensör hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensörlerin EIS verilerindeki Ret değerlerinden her bir biyosensöre ait standart grafikler elde edilmiş ve birbirleriyle kıyaslanmışlardır. Ayrıca biyosensörün tekrar üretilebilirlik çalışması kapsamında eğim ve intersept değerlerinin relatif standart sapmaları da sırasıyla %2,98 ve %5,87 olarak hesaplanmıştır. TnT biyosensörüne ait tekrar üretilebilirlik sonuçları Şekil 4.37' de, standart grafiklere ait regresyon üzerindeki belirleme katsayıları ve denklemleri ise Çizelge 4.27' de verilmiştir.



Şekil.4.37. TnT biyosensörünün tekrar üretilebilirlik çalışmalarına ilişkin kalibrasyon grafikleri. (n=10)

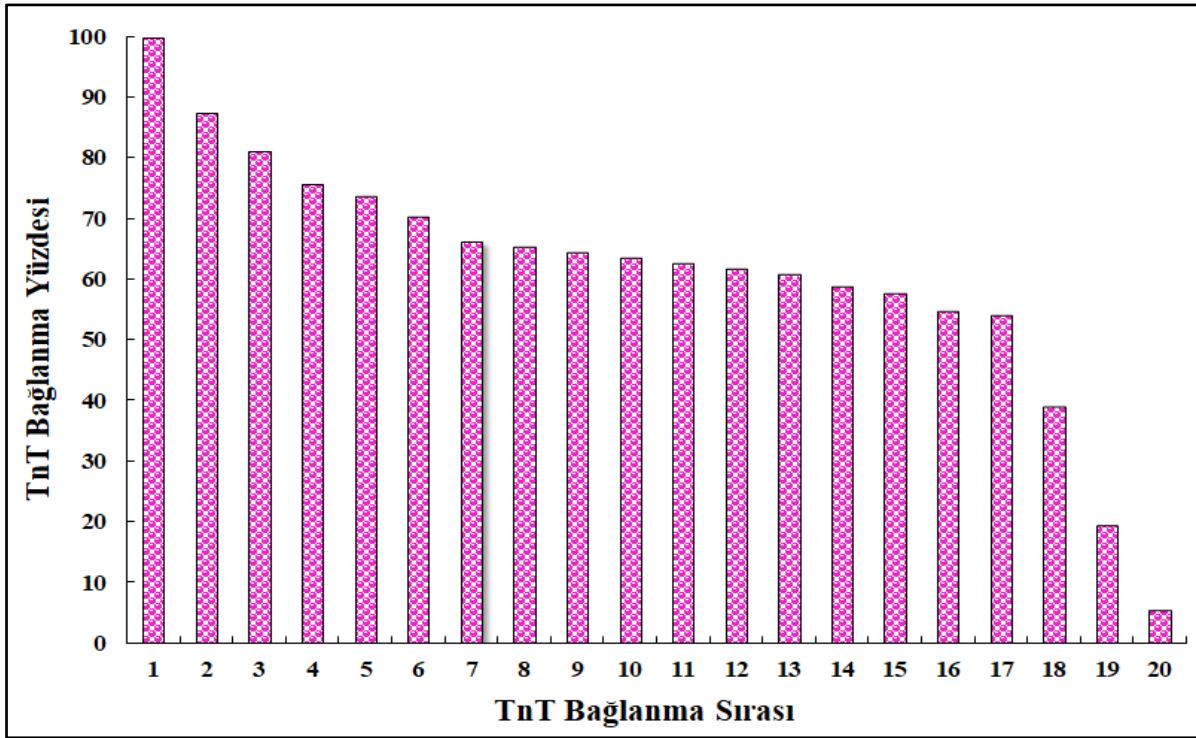
Çizelge.4.27. TnT biyosensörünün tekrar üretilebilirliği grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

Tekrar üretilebilirlik	R^2	Denklem	Tayin Aralığı (fg/mL)
1	0,9979	$y=1,4508x+4,479$	0,5-1000 fg/mL
2	0,9976	$y=1,4334x+6,8443$	0,5-1000 fg/mL
3	0,999	$y=1,4097x+14,454$	0,5-1000 fg/mL
4	0,9975	$y=1,3621x+22,087$	0,5-1000 fg/mL
5	0,999	$y=1,4095x+17,45$	0,5-1000 fg/mL
6	0,9954	$y=1,5224x+0,6517$	0,5-1000 fg/mL
7	0,9978	$y=1,4663x+6,2345$	0,5-1000 fg/mL
8	0,9997	$y=1,4101x+16,443$	0,5-1000 fg/mL
9	0,9967	$y=1,4543x+11,265$	0,5-1000 fg/mL
10	0,9967	$y=1,439x+14,766$	0,5-1000 fg/mL

4.3.3.4. TnT biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği (rejenerasyon)

Tasarlanan biyosensörün karakterizasyon çalışmaları kapsamında hem elektrot yüzeyinin stabilitesini incelemeye yönelik hem de rutin kullanımlarda biyosensörün maliyetini oldukça düşürecek olan tekrar kullanılabilirlik çalışması yapılmıştır. Bu çalışma, TnT bağlanmış olan elektrot yüzeyinin 10 mM HCl asit çözeltisinin içerisinde 5 dakika bekletilerek, bağlanan proteinin yüzeyden uzaklaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra aynı yüzeye tekrar belli bir konsantrasyondaki TnT (50 fg/mL) inkübe edilerek EIS ölçümü alınmıştır. Bu işlem yüzeyin protein bağlayabilme aktivitesinin yüksek oranda azalması veya tamamen kaybetmesine kadar devam etmiştir. TnT biyosensörü içinse bu durum 20 defa gerçekleştirilmiştir. 17. Bağlanmaya kadar aktivitesinin büyük çoğunluğunu koruyarak TnT' nin tayinini gerçekleştirebilmiştir. Ancak 20. bağlanmada aktivitesinin büyük bir kısmını kaybetmesiyle birlikte işlem sonlandırılmıştır. Kullan-at elektrotlarla tasarlanan TnT biyosensörü için bu tekrar kullanılabilirlik sonuçları oldukça iyidir. Biyosensörün maliyeti noktasında ciddi farklılarla avantaj sağlayabilecek bu üstünlük, klinikteki

uygulamalar için de aranan bir özelliktir. TnT biyosensörünün tekrar kullanılabilirlik çalışmasına ait grafik Şekil 4.38’ te verilmiştir.



Şekil.4.38. TnT biyosensörünün tekrar kullanılabilirlik çalışmasının grafikteki görünümü

4.3.3.5. TnT biyosensörünün sabit frekansta impedans analizi

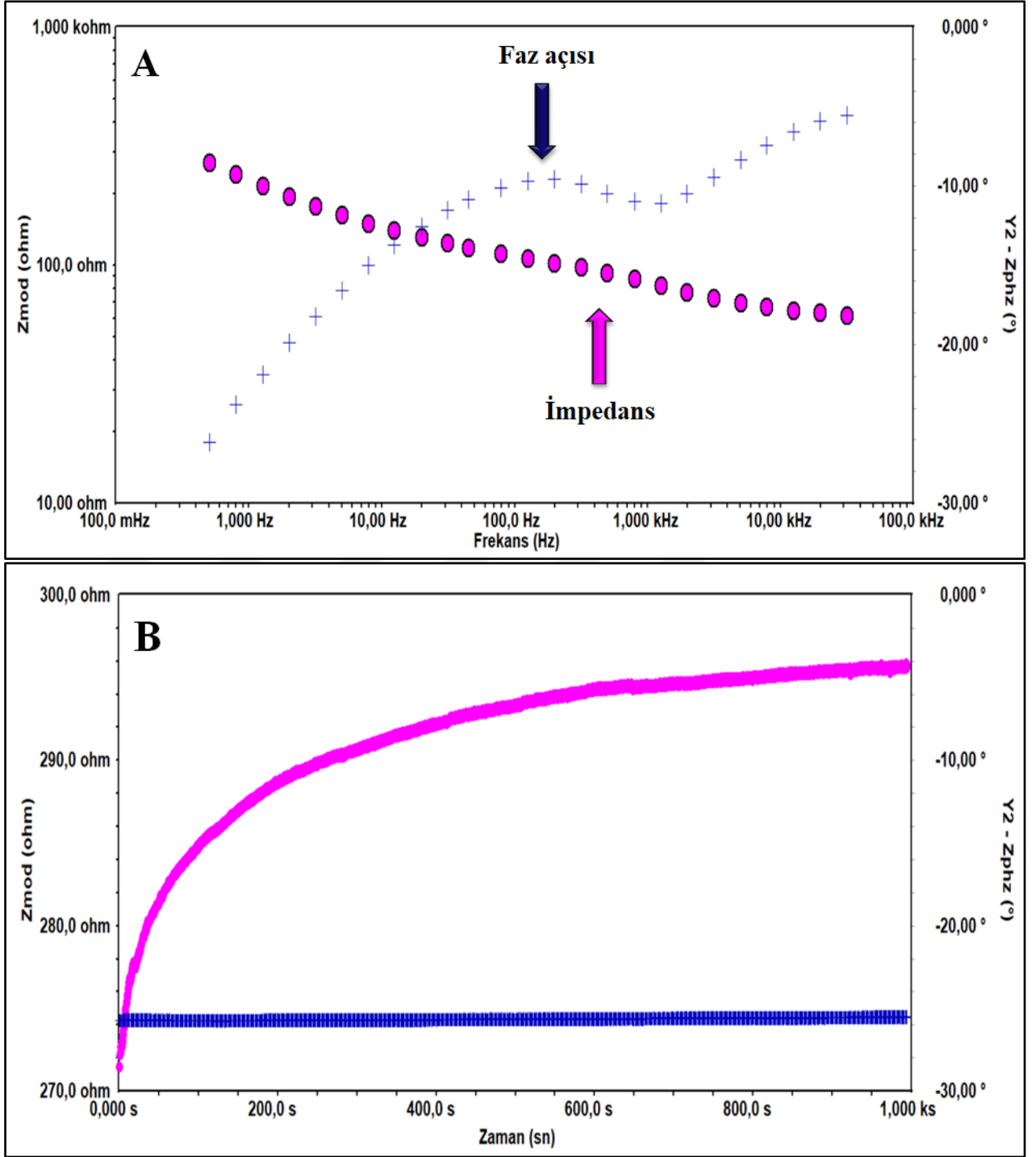
Sabit frekansta impedans tekniğiyle tasarlanan TnT biyosensöründe, anti-TnT ile TnT arasındaki kinetik bağlanmayı incelemek mümkündür. Şekil 4.39.A’ daki Bode grafiğinden (Bölüm.4.1.3.5) belirlenen sabit frekans değeri 45,07 Hz de sabit frekansta impedans ölçümü zamanın ve faz açısının fonksiyonları olarak ölçülmüştür. TnT biyosensörünün sabit frekansta zamana bağlı impedans değişimi Şekil 4.39.B’ de verilmiştir. Şekil 4.39.B’ de görülen pembe eğri sabit frekansta alınan impedans ölçüsünü, mavi eğri ise faz açısı ölçümünü ifade etmektedir. pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde gerçekleşen bu işlemde TnT biyobelirtecinin zamana karşı bağlanması net bir şekilde görülmektedir. Yaklaşık 1000 ks (17 dk) civarında TnT’ nin doygunluk noktasına erişerek ölçüm tamamlanmıştır.

4.3.3.6. TnT biyosensörünün kare dalga voltametrisi ile analizi

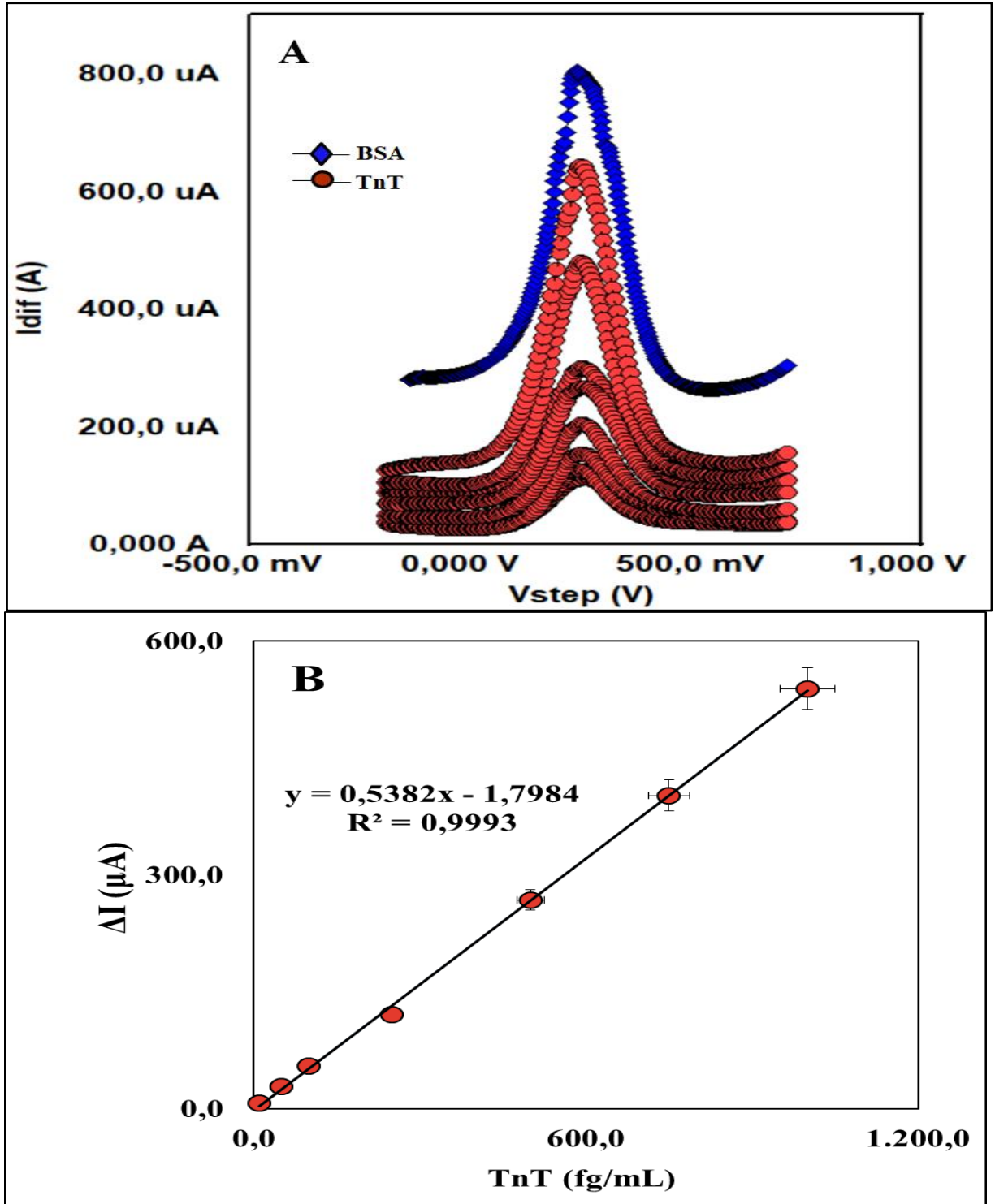
EIS ve CV tekniklerinin yanı sıra, geliştirilen biyosensör kare dalga voltametrisiyle de tayin gerçekleştirmiştir. Bu çalışma için SWV frekansı 25 Hz olarak seçilip, potansiyel aralığı olarak -0,2/0,7 V olarak belirlenerek ST2' nin artan konsantrasyonlarında ölçüm alınmıştır. Alınan ölçümlerin hesaplamaları yapılırken 4.5 bağıntısındaki denklem kullanılmıştır.

$$\Delta Idif = \Delta Idif (BSA) - \Delta Idif (TnT) \quad (4.5)$$

Şekil 4.40 optimum koşullarda 0,5 fg – 1000 fg mL⁻¹ tayin aralığındaki TnT ölçümüne ait kare dalga voltamogramlarını ve kalibrasyon grafiğini göstermektedir.



Şekil.4.39. TnT biyosensörünün sabit frekansta impedans ölçümüne ait (A) Bode grafiği, (B) SFI spektrumu (pembe; sabit frekansta EIS ölçümü, mavi; faz açısı ölçümü)



Şekil.4.40. TnT biyosensörüne ait (A) kare dalga voltametrisi ve (B) kalibrasyon grafiği

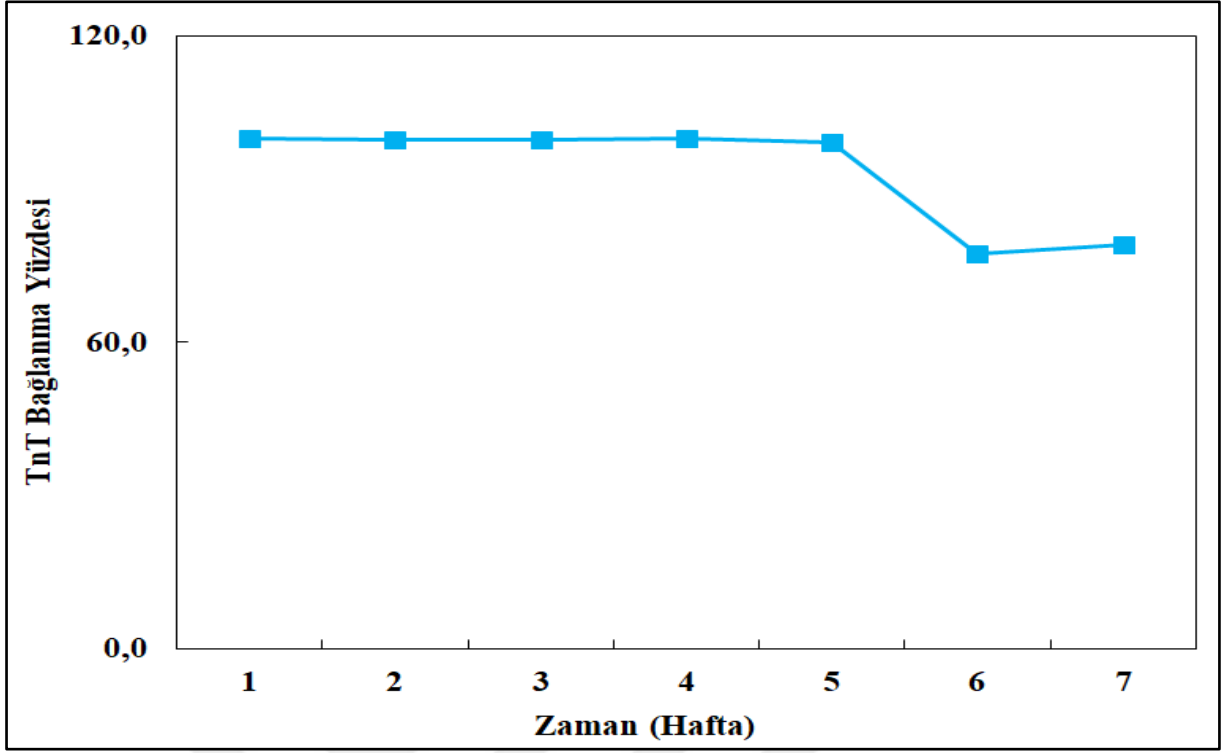
4.3.3.7. TnT biyosensörünün yüzey alanının hesaplanması

Yapılan immobilizasyon işlemlerinde elektrot yüzey alanının ne kadar kaplandığını hesaplayabilmek adına dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak, Laviron eşitliği yardımıyla elektrodun kaplanmış olan yüzey alanı hesaplanmıştır. Bu çalışma için 10 farklı tarama hızında (10 mV, 20 mV, 30 mV, 40 mV, 50 mV, 60 mV, 70 mV, 80 mV, 90 mV ve 100 mV) dönüşümlü voltametri de ölçümler alınmıştır. Alınan ölçümler sonrasında elde edilen verilerle yapılan hesaplamalar Laviron eşitliğinde (Bölüm 4.1.3.7) yerine konarak sonuçlar elde edilmiştir.

4.3 bağıntısındaki eşitlikten yararlanılarak hesaplanan sonuçlar değerlendirildiğinde başlangıçta $1,5 \times 10^{-8}$ mol cm^{-2} olarak hesaplanan GP yüzeyi, anti-TnT bağlandıktan sonra $3,7 \times 10^{-8}$ mol cm^{-2} olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplanan analitiksel veriler ışığında Anti-TnT' nin yüzey immobilizasyonunun gerçekleştiği doğrulanmıştır.

4.3.3.8. TnT biyosensörünün raf ömrü

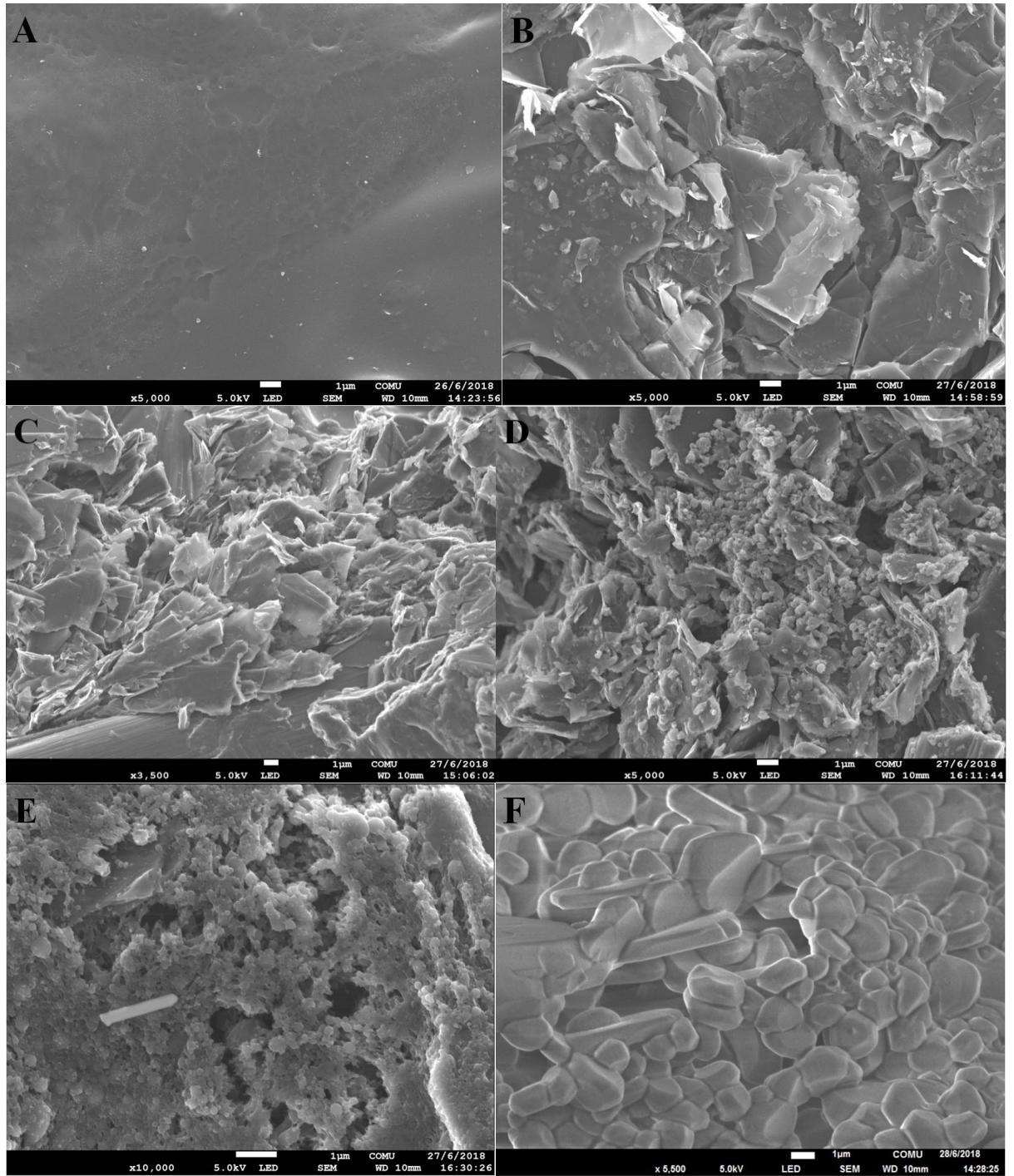
Tasarlanan sensörün uzun ömürlü bir depo kararlılığına sahip olabilmesi hiç şüphesiz bir avantajdır. Bu durum hem geliştirilen sensörün stabilitesi için hem de klinik uygulamalarda tercih edilmesini sağlayacak bir özellik olmasından dolayı sensörün karakterizasyon çalışmaları kapsamında incelenmiştir. Geliştirilen sensörün raf ömrünü belirleyebilmek için, immobilizasyon işlemleri tamamlanmış sensörler TnT tayinini gerçekleştirene kadar $+4$ °C de muhafaza edilmiştir. Her hafta bir sensör olmak üzere toplamda 7 hafta boyunca tayin aralığı içerisinde belirlenen bir konsantrasyon değerinde (50 fg/mL) TnT inkübasyonu sonra EIS ölçümü alınmıştır. Alınan ölçümlerden elde edilen Ret değerleri Şekil 4.36.A' daki kalibrasyon grafiği denkleminde yerine konularak hesaplamalar yapılmıştır. Şekil 4.41' de TnT biyosensörünün depo stabilitesine ait 7 haftalık performansını özetleyen grafik yer almaktadır. Grafikte tasarlanan biyosensörün 5 hafta boyunca aktivitesini yüksek oranda koruduğu gözlemlenirken 6. ve 7. haftalarda ise bu aktivitenin bir miktar azaldığı görülmektedir. Kimyasal bir modifikasyonla tasarlanan TnT biyosensörünün 7 haftalık zaman dilimi boyunca toplam aktivite kaybı % 20,84 olarak hesaplanmıştır. Toplamda yaklaşık 50 güne karşılık gelen biyosensörün raf ömrü pratik uygulamalar için de uygun niteliktedir.



Şekil.4.41. TnT biyosensörünün depo kararlılığı denemelerine ilişkin aktivite değerleri

4.3.3.9. TnT biyosensörünün SEM görüntüleri

Tasarlanan TnT biyosensörünün immobilizasyon adımları sonrasındaki yüzey morfolojisi SEM tekniğiyle incelenmiştir. Biyosensöre ait SEM görüntüleri Şekil 4.42’ de verilmiştir. İlk olarak Şekil 4.42.A’ da görülen SEM görüntüsü temizlik aşamasından sonraki GP elektrot yüzeyine aittir. Hiçbir immobilizasyon işlemi olmayan yüzey düz bir tabaka şeklinde görüntülenmiştir. Şekil 4.42.B’ de ise elektrot yüzeyinin HCl asitle muamelesinden sonra çekilen SEM görüntüsü yer almaktadır. Bir önceki temiz elektrot yüzeyinin SEM görüntüsüyle karşılaştırıldığında asit muamelesinden sonra yüzeydeki değişim çok açık bir şekilde görülmektedir. Şekil 4.42.C’ de ise karboksil gruplarını aktifleştirmek için kullanılan EDC/NHS çiftinin yüzeye immobilizasyonundan sonra, yüzeyde daha da yoğun oluşan grupların bulunduğu SEM görüntüsü yer almaktadır. Şekil 4.42.D, GP elektrot yüzeyine anti-TnT’ nin kovalent bağlanmasıyla birlikte yüzey morfolojisindeki değişimi gösteren SEM görüntüsüdür. Görüntü incelediğinde yüzeyde oldukça yoğun bir şekilde istiflenmiş yapıların varlığı görülmektedir. Şekil 4.42.E’ de ise spesifik olmayan etkileşimlerin önüne geçmek için kullanılan BSA’ nın immobilizasyonu sonrası alınan SEM görüntüsü mevcuttur. Son olarak Şekil 4.42.F’ de de TnT’ nin inkübasyonu ile birlikte yüzeyde oluşan morfolojik değişikliğe ait SEM görüntüsü yer almaktadır. Bu görüntüde yüzeydeki cisimler bir taşı anımsatmaktadır.



Şekil.4.42. TnT biyosensörünün SEM görüntüleri. (A) Yalın GP, (B) HCl, (C) EDC-NHS, (D) Anti-TnT, (E) BSA, (F) TnT

4.3.3.10. TnT biyosensörünün serum örneklerinde uygulanabilirliğinin araştırılması

Geliştirilen biyosensörün klinik uygulamalar için kullanılabilirliğini incelemek adına farklı kişilerden alınan insan serum örneklerine standart ekleme yöntemi kullanılarak TnT

tayini yapılmıştır. TnT' nin farklı konsantrasyon değerlerinin (10 fg/mL ve 100 fg/mL) serum örneğine eklenmesiyle gerçekleştirilen çalışma sonrasında EIS verileri elde edilmiştir. Bu veriler için kalibrasyon grafiğinin denkleminde yararlanılarak yapılan her bir serum çalışması için bağıl standart sapma (RSD) ve geri kazanım yüzdeleri hesaplanmıştır. Serum örnekleriyle gerçekleştirilen çalışma için yapılan hesaplamaların sonuçları Çizelge 4.28' de verilmiştir.

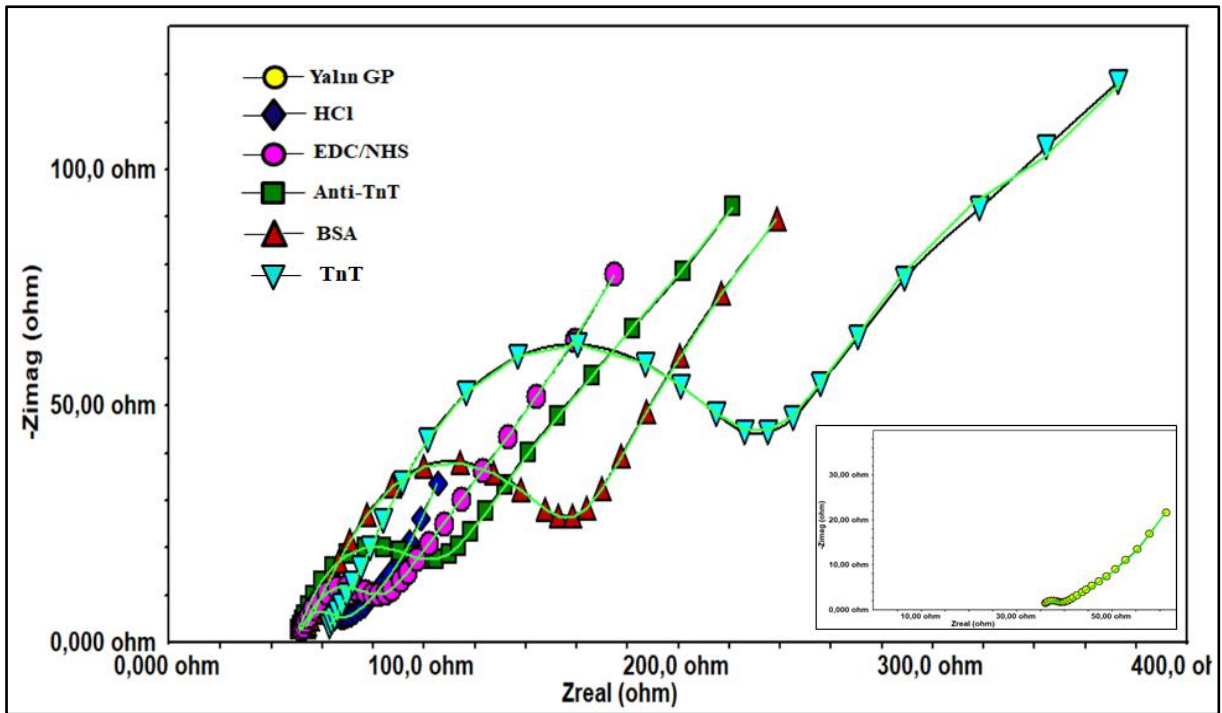
Çizelge.4.28. TnT biyosensörünün gerçek serum örneklerinde tayini

Serum Örnek Numarası	TnT ölçülen konsantrasyon değeri (fg mL ⁻¹)	Standart eklenen değeri (fg mL ⁻¹)	Ölçülen konsantrasyon değeri (fg mL ⁻¹)	RSD (%) (n=3)	Geri Kazanım (%)
1	30	10	39,56/38,56/39,16	1,56	97,56
		100	131,17/130,5/130,4	0,32	100,53
2	40	10	51,19/50,23/51,02	1,008	101,62
		100	140,08/140,15/141,2	0,45	100,34
3	50	10	60,1/62,4/59,06	2,82	100,86
		100	164,18/161,53/164,12	0,93	108,85
4	50	10	63,2/60,17/60,23	2,83	105,33
		100	169,02/159,1/163,2	3,04	109,18
5	30	10	42,02/44,11/40,01	4,87	105,12
		100	141,4/131,9/136,2	2,55	105

Standart ekleme yöntemi TnT' nin serumdaki tayin aralığına uygun olacak şekilde gerekli seyreltme işlemleri yapılarak gerçekleştirilmiştir (**Anonim 2018**).

4.3.3.11. TnT biyosensörünün Kramers-Kronig Transform karakterizasyonu

Kramers-Kronig transformu tasarlanan biyosensörün EIS ölçümleri sırasında herhangi bir dış etkenden etkilenip etkilenmediğini ve buna bağlı olarak sapmaların meydana gelip gelmediğini incelemek için kullanılan bir yöntemdir (Bölüm 4.1.3.11). TnT biyosensörünün immobilizasyon aşamaları için Şekil 4.43’ de yer alan impedans spektrumlarının fitlenmiş görüntüsü yer almaktadır. Çizelge 4. 29’ da ise bu fitlenmiş spektrumlara ait Kramers-Kronig transform değerleri verilmiştir.



Şekil.4.43. TnT biyosensörün Kramers-Kronig Transform fit spektrumları

Çizelge.4.29. TnT biyosensörüne ait Kramers-Kronig fit değerleri

TnT biyosensör	Kramers Kronig Transform değeri
Yalın GP	14,48 u
GP/HCl	1,831 u
GP/HCl/ EDC-NHS	1,306 u
GP/HCl/EDC-NHS/Anti-TnT	2,107 u
GP/HCl/EDC-NHS/Anti-TnT/BSA	537,4 n
GP/HCl/EDC-NHS/Anti-TnT/BSA/TnT	7,166 u

4.3.3.12. TnT biyosensörünün literatürdeki yeri

Tasarlanan biyosensörün literatürde bildirilen çeşitli TnT sensörleriyle analitik olarak kıyaslandığı çalışmalar Çizelge 4.30’ da verilmiştir.

Akut miyokart enfarktüsünün spesifik biyobelirteci olan TnT’ nin tayini oldukça önemlidir. Bu nedenle literatürde bu önemli biyobelirtecin analizini gerçekleştirmeye yönelik bir çok sensör bulunmaktadır. Ancak bu sensörler çoğu zaman daha pahalı tekniklerle ve daha düşük hassasiyette üretilmişlerdir.

Bu doktora tezi kapsamında geliştirilen TnT biyosensör sistemi hem çok pratik bir immobilizasyon prosedürüyle, hem GP gibi maliyeti düşük çalışma elektrotlarını kullanarak EIS ve CV gibi oldukça hassas elektrokimyasal yöntemlerle tasarlanmıştır. Bunun yanı sıra 0,5 – 1000 fg/mL gibi geniş bir tayin aralığında TnT analizini mümkün kılan bu sensör sistemi, kan serumunda gerçekleştirilen çalışma sonrasında da umut vadeden sonuçlar vermiştir.

Çizelge.4.30.Literatürde bildirilen çeşitli TnT biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması

<u>İmmobilizasyon yöntemi</u>	<u>Ölçüm yöntemi</u>	<u>Tayın Aralığı</u>	<u>LOD</u>	<u>Referans</u>
Janus mikropartikül	Optik	10-10 ⁵ pg/mL	50 pg/mL	(Han ve ark.2016)
Ferrosen switch	Elektrokemilüminesans	50-10 ⁵ fg/mL	16 fg/mL	(Xu ve ark 2015)
Ferreosen mod. silica NP	SWV	24-2,4x10 ⁵ pg/mL	24 pg/mL	(Jo ve ark. 2015)
(QDs)/TiO ₂ NP	PEC	0,1-1 pg/mL	0,1 pg/mL	(Zhao ve ark. 2014)
NAFD	Elektrokimya	0,1-100 pg/mL	10 fg/mL	(Lin ve ark. 2014)
Ag@SnO ₂	Elektrokemilüminesans	1-10 ⁵ fg/mL	0,11 fg/mL	(Jiang ve ark. 2018)
GP/HCl/A-TnT	EIS ve CV	0,5-1000 fg/mL	1,28 fg/mL	

5. SONUÇ

Son yıllarda kardiyovasküler hastalıkların sebep olduğu ölüm oranlarındaki dramatik artış, bilim dünyasının yönünü, bu hastalıkların oluşmasının altında yatan nedenlerin araştırılmasına ve tedavilerine yönelik erken teşhisle ilgili çalışmaların daha yoğun olarak gerçekleştirilmesine çevirmiştir. Kardiyovasküler hastalıklar, her yaştaki insan grubunda olmakla beraber ilerleyen yaşlarda daha sık görülmektedir. Her ne kadar içinde bulunduğumuz yüzyılda tıp ve teknoloji alanındaki gelişmeler çok ilerlemiş olsa da bu hastalıklarla ilgili tedavi yöntemleri hala çok yüksek maliyetlerle yapılmaktadır. Hatta çoğu zaman kardiyovasküler hastalık türleri olan; kalp yetmezliği, ateroskleroz veya kalp krizi gibi ciddi durumlarda hastanın normal yaşamını tehdit eden vakalarda kişinin bütçesiyle karşılayamayacağı oranda yüksek maliyetli tedaviler söz konusu olmaktadır. Bu nedenle erken teşhis çok büyük önem arz etmektedir. Hastalığın erken teşhisiyle birlikte uygulanacak tedavinin başarısı ve hastanın yaşama şansının artmasına katkı sağlanacağı düşünülmektedir. Kardiyovasküler hastalıkların erken teşhisine yönelik biyosensör sistemleri tasarlanırken, tasarlanan biyosensörün; tek kullanımlık, yüksek hassasiyette ve geniş tayin aralıklarında ölçümleme kapasitesine sahip, yenilikçi materyallerle modifiye edilebilen, maliyeti düşük, depo kararlılığı için yüksek aktivite sergileyebilen ve en mühimi kandan alınan serum örneğinde hedef analitine cevap verebilen sensörler olması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda kardiyovasküler hastalıklara spesifik 3 farklı biyobelirteç (CK, ST2 ve TnT) için biyosensör sistemi tasarlanmıştır. Elektrokimyasal temelli olarak geliştirilen tüm bu biyosensör sistemlerinde grafit kağıt elektrottan faydalanılmıştır. Biyosensörler EIS, CV, SWV gibi elektrokimyasal tekniklerin yanı sıra zamana karşı impedans değişimini gözlemleyebildiğimiz "sabit frekansta impedans" tekniği ile de takip edilerek geliştirilmiştir. SFI tekniği literatüre bizim çalışma grubumuzun öncülüğüyle kazandırılmıştır. Bizim çalışmalarımız haricinde literatürde bu teknikle ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Kreatin kinaz (CK) koroner iskemiye bağlı olarak miyokart hasarı sonucu kanda yükselme gösteren enzim temelli bir biyobelirteçtir. CK akut miyokart enfarktüsünün (kalp krizi) erken teşhisi sırasında kullanılan en önemli enzimatik biyobelirtecidir. Bunun için yüksek hassasiyette bir CK biyosensörü tasarlanması hedeflenmiştir. CK biyosensörü tasarlanırken yüzeyin modifikasyonu sırasında GOPE gibi herhangi bir çapraz bağlayıcıya gerek duymadan silanlama işlemiyle immobilizasyon yapabilen yenilikçi materyallerle çalışılmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalar neticesinde, CK biyosensörünün 0,1 pg/mL – 50 pg/mL tayin aralığında pikogram (10^{-12}) gibi düşük konsantrasyon seviyesinde ve 500 kat

aralıkta analiz yapabildiği saptanmıştır. Gerçek serum örneklerinde de hedef proteinine cevap verebilen CK sensörü tarafımızdan bilimsel literatüre kazandırılmıştır.

Suppression of Tumorigenicity 2 interleukin-1 (IL-1) reseptör ailesinin bir üyesidir ve akut miyokart enfarktüsünden sonra serumdaki seviyesinde belirgin artışlar görülmektedir. ST2 biyosensörü tasarlanırken, yüzeyin modifikasyonu için geleceğin en çok umut vadeden materyallerinden biri olan fulleren C₆₀ dan yararlanılmıştır. Karbon atomlarının mükemmel dizilimiyle kusursuz bir molekül yapısına sahip fulleren ailesinin bu en küçük kararlı yapısı biyosensörün immobilizasyonu için tercih edilmiştir. Tasarlanan ST2 sensörü bir önceki geliştirilen CK sensöründen daha geniş ve daha hassas bir tayin aralığında ölçüm yapabilecek şekilde geliştirilmiştir. Bu sayede sensör 0,1 fg/mL – 100 fg/mL aralığında ST2 tayinini gerçekleştirebilmektedir. Femtogram seviyesinde (10⁻¹⁵) tayin yapabilecek düzeyde tasarlanan bu biyosensör gerçek serum örneklerinde de aynı başarıyı sağlayarak ölçüm yapabilmektedir.

Troponin T (TnT), iskelet kası ve kalp miyositlerinde aktin ve miyozin arasındaki ilişkiyi düzenlemekle görevli olan yapısal bir proteindir. TnT miyokart enfarktüsü için oldukça hassas bir biyobelirteçtir. Normal insan serumunda çok düşük ya da sıfır olan TnT, akut miyokart enfarktüsünden sonra belirgin şekilde artar ve diğer kardiyak biyobelirteçlerinin içerisinde en spesifik olarak kabul edilen TnT' nin bu yükselişi patolojik olarak kabul edilir. TnT biyosensörünün dizaynı için direk asitle muamele edilerek gerçekleştirilen oldukça pratik bir immobilizasyon süreci tercih edilmiştir. Kısa sürelerde hazırlanarak TnT' nin oldukça hassas analizini mümkün kılan bu sensörün tayin aralığı 0,5 fg/mL – 1000 fg/mL olarak belirlenmiştir. Akut miyokart enfarktüsüne spesifik olan bu biyobelirteç için tasarlanan TnT sensörü daha önce geliştirilmiş olan CK ve ST2 biyosensörlerinin her ikisinden de daha geniş bir tayin aralığına sahiptir. Gerçek serum örneklerinde yapılan TnT biyobelirtecinin analizinde de oldukça güzel yanıtlar alınmasını sağlayan TnT biyosensör sistemi, tek kullanımlık, düşük maliyetli elektrotlarla tasarlanan bir biyosensör olarak literatüre katkı sağlamıştır.

Doktora tezinin hedeflenen doğrultusunda tasarlanan kardiyovasküler hastalıkların tayinine yönelik 3 farklı biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Sensörler tasarlanırken yenilikçi materyallerle, literatüre katkı sağlayacak üstünlükte ve klinikte uygulanmasına yönelik olarak tasarlanmaya çalışılmıştır. Her bir sensör için ayrı ayrı yapılan tüm immobilizasyon, optimizasyon ve karakterizasyon aşamaları göstermiştir ki tasarlanan sensörlerin; hassasiyetleri, düşük konsantrasyon seviyelerinde ve geniş tayin aralıklarında analiz

yapabilmeleri, uzun raf ömrüne sahip olmaları, yenilikçi materyallerle pratik hazırlık aşamalarıyla üretilmeleri gibi bir çok avantaja sahip olmalarından dolayı klinik olarak kullanılabilirlikleri adına umut vadetmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Ademoğlu E. (2015). Kardiyak biyobelirteçler. Tıbbi Biyokimya, Ed: Gürdöl F., Nobel Tıp Yayınları, İstanbul, 456-457.
- Aldous S.J., Richards A.M., Troughton R., Than M. (2012). "ST2 has diagnostic and prognostic utility for all-cause mortality and heart failure in patients presenting to the emergency department with chest pain". J Card Fail 18: 304-310.
- Anonim (2016) World Health Organization. Cardiovascular diseases fact sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (Erişim tarihi, 17.08.2016)
- Anonim (2016) .Türkiye İstatistik Kurumu. Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2016. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24572>(Erişim tarihi,03.03.2017)
- Anonim (2018). CK ELISA Kits. https://www.biocompare.com/pfu/110627/soids/331994/ELISA_Kit/CK (Erişim tarihi, 27.06.2018)
- Anonim (2018). IL1 ELISA Kits. https://www.biocompare.com/pfu/110627/soids/331994/ELISA_Kit/IL1 (Erişim tarihi, 27.06.2018)
- Anonim (2018). TnT ELISA Kits. https://www.biocompare.com/pfu/110627/soids/331994/ELISA_Kit/TnT (Erişim tarihi, 27.06.2018)
- Barbara V., Silva M., Igor T., Cavalcanti T., Mizia M., Rosa F., Dutra N. (2013). "A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T". Talanta 117: 431-437.
- Barrett T.W., Shanmugam N.R., Selvam A.P., Kazmierczak S.C., Prasad S. (2015). "Novel nanomonitor ultra-sensitive detection of Troponin T". Clinica Chimica Acta 442: 96-101.
- Bergers G., Reikerstorfer A., Braselmann S., Graninger P., Busslinger M. (1994). "Alternative promotor usage of the Fosresponsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor". EMBO J 13: 1176–1188.
- Brown A.M., Wu A.H., Clopton P., Robey J.L., Hollander J.E. (2007). "ST2 in emergency department chest pain patients with potential acute coronary syndromes". Ann Emerg Med 50: 153-158.
- Brunner M., Krenn C., Roth G., Moser B., Dworschak M., Jarolim J.E., Spittler A., Sautner T., Bonaros N., Wolder Ernst., Nitulescu G.B., Ankersmit H.J. (2004). "Increased levels of soluble IgG1 production in patients with sepsis and trauma". Intensive Care Med. 30: 1468-2184.
- Cai W.A., Lai T.A., Dub H., Yea J. (2014). "Electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on an exfoliated graphite paper electrode: A high performance flexible sensor" Sensors and Actuators B 193: 492-500.
- Dale M., Nicklin M.J. (1999). "Interleukin-1 receptor cluster: gene Organization of IL1R2, IL1R1, IL1RL2 (IL-1Rrp2), IL1RL1 (T1/ST2), and IL18R1 (IL-1Rrp) on human chromosome 2q". Genomics 57: 177–179.

- Demirbakan B., Sezgintürk M.K. (2016). "A novel immunosensor based on fullerene C60 for electrochemical analysis of heat shock protein 70", *JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY* 783: 201-207.
- Demirbakan B., Sezgintürk M.K. (2017). "A sensitive and disposable indium tin oxide based electrochemical immunosensor for label-free detection of MAGE-1", *TALANTA*, 169: 163-169.
- Duma R.J., Seigel A.L. (1965). "Serum creatine phosphokinase in acute myocardial infarction. *Arch Intern Med* 115: 443-51.
- Ferguson N.R., Galley H.F., Webster N.R. (1999). "T helper subset ratios in patients with severe sepsis". *Intensive Care Med* 25: 106–109.
- Garay F., Kisiel G., Fang A., Lindner E., (2010). "Surface plasmon resonance aided electrochemical immunosensor for CK-MB determination in undiluted serum samples". *Anal. Bioanal. Chem.* 397: 1873-1881.
- Genz T., Song Z., Zhang J., Xu Z. (2017). "Creatine kinase determination based on an electrochemical impedance immunosensor". *Int. J. Electrochem. Sci* 12 : 8552-8563.
- Gerhardt W., Ljungdahl L., Herbert A. (1993). "Troponin T and CK-MB (mass) in early diagnosis of ischemic myocardial injury". *The Helsingborg Study. Clin Biochem* 26: 231-40.
- Goldblatt D. (2001). "Affinity of antigen–antibody interactions." *eLS*.
- Gomes-Filho S.L.R., Dias A.C.M.S., Silva M.M.S., Silva B.V.M., Dutra R.F. (2013). "A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T". *Microchemical Journal* 109: 10-15.
- Greaser M.L., Gergely J. (1973). "Purification and properties of the components from troponin. *J Biol Chem* 248: 2125-33.
- Han Y., Kim H., Park Y., Chun H., . Kim J, Yoon H. (2016). "Retroreflective Janus microparticle as a nonspectroscopic optical immunosensing probe". *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8: 10767-10774.
- Herrick, J.B., (1912). "Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries" *J. Am. Med. Assoc.* LIX, 2015–2022.
- Herrick B. (2000). " A contemporary look at myocardial infarction and at sickle-cell heart disease". *Circulation* 101: 1874–1887.
- Hotchkiss R.S., Swanson P.E., Freeman B.D., Tinsley K.W., Cobb J.P., Matuschak G.M., Buchman T.G., Karl I.E. (1999). "Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 27: 1230–1251.
- Huang Q.A, Hu R, Wang B, Zhang J. (2007). "Electrochim. Acta.". 52: 8144-8164.
- Iwahana H., Yanagisawa K., Ito-Kosaka A., Kuroiwa K., Tago K., Komatsu N. (1999). "Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells". *Eur J Biochem* 264: 397– 406.

- Januzzi J.L. Jr., Peacock W.F., Maisel A.S., Chae C.U., Jesse R.L., Baggish A.L., O'Donoghue M., Sakhuja R., Chen A.A., van Kimmenade R.R., Lewandrowski K.B., Lloyd-Jones D.M., Wu A.H. (2007). "Measurement of the interleukin family member ST2 in patients with acute dyspnea: results from the PRIDE (Pro-Brain Natriuretic Peptide Investigation of Dyspnea in the Emergency Department) study". *J Am Coll Cardiol* 50: 607-613
- Jiang T.M.-H., Lu P., Lei Y.-M., Chai Y.-Q., Yuan R., Zhuo Y. (2018). "Self-accelerated electrochemiluminescence emitters of Ag@SnO₂ nanoflowers for sensitive detection of cardiac troponin T". *Electrochimica Acta* 271: 464-471
- Jiaul Haque A.-M., . Kim J, Dutta G., Kim S., Yang H. (2015). "Redox cycling amplified enzymatic Ag deposition and its application in the highly sensitive detection of creatine kinase-MB". *Chem. Commun. Chem. Commun* 51: 14493-14496.
- Jo H., Gu H., Jeon W., Youn H., Her J., Kim S., Lee J., Shi J. n, C. Ban. (2015). "Electrochemical aptasensor of cardiac troponin i for the early diagnosis of acute myocardial infarction". *Anal. Chem.* 87: 9869-9875.
- Karaboğa Sonuç M. N. (2018). "Bazı nörodejeneratif hastalıkların erken tanısına yönelik nöro-biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi ve klinik uygulamalarının araştırılması ". Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi.
- Kato K, Shimizu A., Ishiguro Y., Mokuno K., Ariyoshi Y., Nakajima T. (1985). "Highly sensitive enzyme immunoassay for human creatine kinase BB isozyme" *Clin. Chim. Acta* 150: 31-40.
- Katus H.A., Remppis A., Looser S., Hallermeier K, Scheffold T., Kubler W. (1989). "Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients". *J Mol Cell Cardiol* 21: 1349-53.
- Khan M.Z.H. (2016). "Effect of ITO surface properties on SAM modification: a review toward biosensor application". *Cogent Eng.*, 3: 117.
- Kim J.R., Jung S.H., Regan J.M., Logan B.E. (2007). "Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells" *Bioresource Technol.* 98: 2568.
- Kucherenko I.S., Soldatkin O.O., Lagarde F., Renault N.J., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. (2015). "Determination of total creatine kinase activity in blood serum using an amperometric biosensor based on glucose oxidase and hexokinase". *Talanta* 144: 604-611.
- Kuroiwa K., Arai T., Okazaki M., Minota S., Tominaga S. (2001). "Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases". *Biochem Biophys Res Commun* 284: 1104–1108.
- Laviron E. (1967). "Influence of adsorption of depolariser or of a product of electrochemical reaction on polarographic currents.", *Bulletin De La Societe Chimique De France*, 3717-3723.
- Liu C.X., Jiang L.Y., Wang H., Guo Z.H., Cai X.X. (2007). " A novel disposable amperometric biosensor based on trienzyme electrode for the determination of total creatine kinase". *Sensors Actuators, Biol. Chem* 122: 295-300.

- Liu Y., Yobas L. (2014). " Label-free specific detection of femtomolar cardiac troponin using an integrated nanoslit array fluidic diode". *Nano Lett.* 14: 6983-6990.
- Lohning M., Stroehmann A., Coyle A.J., Grogan J.L., Lin S., Gutierrez-Ramos J.C., Lohning D., Radbruch A., Kamradt T. (1998). "T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5 and interleukin 10, and important for Th2 effector function". *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6930–6935.
- Lu H.C., Chueh Y.T., Tseng T., Wang C.Y., Chaou C.H. (2017). "Application of Amorphous Indium Gallium Zinc Oxide Thin Film Transistor Biosensors in Creatine Kinase Detection". *Procedia Technology* 27: 258-259.
- Ma Y., J. Di, ve ark. (2009). "Direct electrodeposition of gold nanoparticles on indium tin oxide surface ve its application." *Biosensors ve Bioelectronics* 24(5): 1480-1483.
- Mandler D., Turyan I. (1996). "Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry" . *Electroanalysis* 8 (207): 207-213.
- Moreira F.T.C., Dutra R.A.F., Noronha J.P., Sales M.G.F. (2014). "Novel sensory surface for creatine kinase electrochemical detection". *Biosens. Bioelectron.* 56: 217-222.
- Moritz D.R., Gheyselinck J., Klemenz R. (1998). "Expression analysis of the soluble and membrane associated forms of the interleukin-1 receptor-related T1 protein in primary mast cells and fibroblasts". *Hybridoma* 17: 107–116.
- Mosmann T.R., Sad S. (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more". *Immunol Today* 17: 138–146.
- Muller-Bardorff M., Hallermayer K., Schroder A., Ebert C., Borgya A., Gerhardt W. (1997). "Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: assay development and analytical and clinical validation". *Clin Chem* 43:458-66.
- Orazem M.E, Tribollet B. (2008). "Electrochemical Impedance Spectroscopy". New Jersey.
- Oshikawa K., Kuroiwa K., Tago K., Iwahana H., Yanagisawa K., Ohno S., Tominaga S.I., Sugiyama Y. (2001). "Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation". *Am J Respir Crit Care Med* 164: 277–281.
- Oshikawa K., Yanagisawa K., Tominaga S.I., Sugiyama Y. (2002). "Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation". *Clin Exp Allergy* 32: 1520–1526.
- Özcan B., Sezgintürk M.K. (2017). "A novel label free immunosensor based on single-use ITO-PET electrodes for detection MAGE1 protein", *JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY* 792: 31-38.
- Öztürk E., Hatemi H. (1998). "Kardiyoloji". Yüce Reklam Yayın Dağıtım AŞ, İstanbul.
- Palladino P., Minunni M., Scarano S. (2018). "Cardiac Troponin T capture and detection in real-time via epitope-imprinted polymer and optical biosensing". *Biosensors and Bioelectronics* 106: 93-98.
- Pawula M., Altintas Z., Tothill I.E. (2016). "SPR detection of cardiac troponin T for acute myocardial infarction" *Talanta* 146: 823-830.

- Perryman M.B., Strauss A.W., Buettner T.L., Roberts R. (1983). "Molecular heterogeneity of creatine kinase isoenzymes". *Biochim Biophys Acta* 747: 284-90.
- Petersen S, Peto V, Rayner M, Leal J, Luengo-Fernández R, Gray A. (2008). *European Cardiovascular Disease Statistics: 2008 edition*. London: British Heart Foundation,. Erişim: www.bhf.org.uk/idoc.
- Reverberi R. ve L. Reverberi (2007). "Factors affecting the antigen-antibody reaction." *Blood transfusion* 5(4): 227.
- Roth G., Moser B., Krenn C., Brunner M., Haisjackl M., Gerlitz S., Wolner E., Boltz-Nitulescu G., Ankersmit H.J. (2003). "Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance". *Biochem Biophys Res Commun* 308: 840–846.
- Ruoff R.S, Tse D.S, Malhotra, Lorents D.C. (1993). *J. Phys. Chem.* 97: 3379.
- Sahlander K., Larsson K., Palmberg L.(2010). "Increased serum levels of soluble ST2 in birch pollen atopsics and individuals working in laboratory animal facilities". *J Occup Environ Med* 52: 214-218.
- Sharma A.M, Pandey S., Nerthigan., Swaminathan N., Wu H-F. (2018). "Aggregation of cysteamine-capped gold nanoparticles in presence of ATP as an Analytical tool for rapid detection of creatine kinase (CK-MM) ". *Analytica Chimica Acta* 1024: 161-168.
- Sanada S., Hakuno D., Higgins L.J., Schreiter E.R., McKenzie A.N., Lee R.T. (2007). "IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system". *J Clin Invest* 117: 1538–49.
- Schmitz J., Owyang A., Oldham E., Song Y., Murphy E., McClanahan T.K. (2005). " IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines". *Immunity* 23: 479–90.
- Shimpo M., Morrow D.A., Weinberg E.O., Sabatine M.S., Murphy S.A., Antman E.M., Lee R.T. (2004). "Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction". *Circulation* 109: 2186–90.
- Stone R. (1994). "Search for sepsis drugs goes on despite past failures". *Science* 264: 365–367.
- Sezginturk M. K., Demirbakan, B., Özcan, B., Yeşiller, Ş.G. (2014). "Introducing a new method for evaluation of the interaction between an antigen and an antibody: single frequency impedance analysis for biosensing systems". *Talanta*. 125: 7-13.
- Sezgintürk M.K., Şimşek S.Ç., Canbaz M.Ç. (2014). " Electrochemical biosensor based on self-assembled monolayers modified with gold nanoparticles for detection of HER-3". *Analytica Chimica Acta* 814: 31-38.
- Sezgintürk M.K., Özcan B. (2016). "Graphene oxide based electrochemical label free immunosensor for rapid and highly sensitive determination of tumor marker HSP70", *Talanta* 160: 367-374.

- Shukla R., Bansal V., Chaudhary M., Basu A., Bhonde R.R., Sastry M. (2005). "Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview". *Langmuir* 21:10644-10654.
- Sivaraman N, Dhamodaran R., Kaliappan I, Srinivasan T.G, Rao P.R.V, Mathews C.K. (1992). *J. Org. Chem.* 57: 6077.
- Socrates T., Filippi C., Reichlin T., Twerenbold R., Breidhardt T., Noveanu M., Potocki M., Reiter M., Arenja N., Heinisch C., Meissner J., Jaeger C., Christenson R., Mueller C. (2010). "Interleukin family member ST2 and mortality in acute dyspnoea". *J Intern Med* 268: 493-500.
- Sugimura H., Hanji T., Hayashi K., Takai O. (2002). "Surface Potential Nanopatterning Combining Alkyl and Fluoroalkylsilane Self-Assembled Monolayers Fabricated via Scanning Probe Lithography". *Adv. Mater.* 14: 524-526.
- Tajima S., Oshikawa K., Tominaga S.I., Sugiyama Y. (2002). "The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis". *Chest* 124: 1206–1214.
- Tang H., Zhang W., Geng P., Wang Q., Jin L., Wu Z., Lou M. (2006). "A new amperometric method for rapid detection of *Escherichia coli* density using a self-assembled monolayer-based bioenzyme biosensor" *Anal. Chim. Acta*, 562: 190-196.
- Thygesen, K., Alpert, J.S., White, H.D. (2007). Universal Definition of Myocardial Infarction *Circulation* 116: 2634–2653.
- Tominaga S. (1989). "A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c–3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor". *FEBS Lett* 258: 301–304.
- Tominaga S., Inazawa J., Tsuji S. (1996). "Assignment of the human ST2 gene to chromosome 2 at q11.2." *Hum Genet* 97: 561–3.
- Tominaga S., Kuroiwa K., Tago K., Iwahana H., Yanagisawa K., Komatsu N. (1999). "Presence and expression of a novel variant form of ST2 gene product in human leukemic cell line UT-7/GM". *Biochem Biophys Res Commun* 264 :14–18.
- Van Blerk M., Maes V., Huyghens L., Derde M.P., Meert R., Gorus F.K. (1992). "Analytical and clinical evaluation of creatine kinase MB mass assay by IMx: comparison with MB isoenzyme activity and serum myoglobin for early diagnosis of myocardial infarction". *Clin Chem* 38: 2380-6.
- Wang J. (2000). *Chemically Modified Electrodes. Analytical Electrochemistry*, Wiley-VCH, New York, USA, 133-135.
- Wang Y., J. Deng, ve ark. (2009). "Electrodeposition of large size gold nanoparticles on indium tin oxide glass ve application as refractive index sensor." *Electrochemistry Communications* 11(5): 1034-1037.

- Wang Y.C., Yu C.C., Chiu F.C., Tsai C.T., Lai L.P., Hwang J.J., Lin J.L. (2013). "Soluble ST2 as a biomarker for detecting stable heart failure with a normal ejection fraction in hypertensive patients". *J Card Fail* 19: 163-168.
- Woods S.L., Froelicher ES, Motzer SA, Bridges EJ. (2005). *Cardiac Nursing* 5th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins.
- Weinberg E.O., Shimp M., Hurwitz S., Tominaga S-I., Rouleau J-L., Lee R.T. (2003). "Identification of Serum Soluble ST2 Receptor as a Novel Heart Failure Biomarker". *Circulation* 107: 721-726.
- Werenskiold A.K., Hofmann S., Klemetz R. (1989). "Induction of a mitogen-responsive gene after expression of the Ha-ras oncogene in NIH 3T3 fibroblasts". *Mol Cell Biol* 9: 5207-5214.
- Willems S., Sels J.W., Flier S., Versteeg D., Buhre W.F., de Kleijn D.P., Hoefer I.E., Pasterkamp G. (2013). "Temporal changes of soluble ST2 after cardiovascular interventions". *Eur J Clin Invest* 43: 113-120.
- Willems S., Quax P.H., de Borst G.J., de Vries J.P., Moll F.L., de Kleijn D.P., Hoefer I.E., Pasterkamp G. (2013). "Soluble ST2 levels are not associated with secondary cardiovascular events and vulnerable plaque phenotype in patients with carotid artery stenosis". *Atherosclerosis* 231: 48-53.
- Wu A.H., Valdes R. Jr., Apple F.S., Gornet T., Stone M.A., Mayfield-Stokes S. (1994). "Cardiac troponin-T immunoassay for diagnosis of acute myocardial infarction". *Clin Chem* 40: 900-7.
- Wu A.H., Feng Y.J. (1999). "Biochemical differences between cTnT and cTnI and their significance for diagnosis of acute coronary syndromes". *Eur Heart J* 19: 25-29.
- Wu B.Y., Wang Y.Y., Li J., Song Z., Huang J.D., Wang X.S., Chen Q. (2006). "An optical biosensor for kinetic analysis of soluble Interleukin- 1 receptor I binding to immobilized Interleukin- 1 α ". *Talanta* 70: 485-488.
- Xu D., Chan W.L., Leung P.B., Huang F., Wheeler R., Piedrafita, Robinson J.H., Liew F.Y. (1998). "Selective expression of stable surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells". *J Exp Med* 187: 787-794.
- Xu Z., Dong Y., J. Li, Yuan R. (2015). "A ferrocene-switched electrochemiluminescence "off-on" strategy for the sensitive detection of cardiac troponin I based on target transduction and a DNA walking machine". *Chem. Commun.* 51: 14369-14372.
- Yanagisawa K., Tagaki T., Tsukamoto T., Testuka T., Tominaga S. (1993). "Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to interleukin 1 receptor type 1". *FEBS Lett* 318: 83-87.
- Yanagisawa K., Naito Y., Kuroiwa K., Arai T., Furukawa Y., Tomizuka H., Miura Y., Kasahara T., Tetsuka T., Tominaga S. (1997). "The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myelomaderived RPMI8226 cells". *J Biochem (Tokyo)* 121: 95-103.

- Yao Ch., Zhang H.M., Liu T., Li X.F., Liu Z.H.(2012). "Carbon paper coated with supported tungsten trioxide as novel electrode for all-vanadium flow battery." J. Power Sources 218-455.
- Yeşil P., Altınok M. (2012). "Kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve kontrolünde fiziksel aktivitenin önemi". Türk Kardiyoloji Dern. Kardiyovasküler Hemşirelik Dergisi 1-10.
- Zhao W., Chen R., Dai P., Li X., Xu J., Chen H. (2014). "A general strategy for photoelectrochemical immunoassay using an enzyme label combined with a CdS quantum dot/TiO₂ nanoparticle composite electrode". Anal. Chem. 86: 11513-11516.
- Zhong C., Porter M.D. (1995). "Designing Interfaces at the Molecular Level". Analytical Chemistry 67 (23): 709-715.



EKLER



T.C
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Girişimsel Olamayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı:2013/107

05/09/2013

Sayın: Doç. Dr. M. Kemal SEZGİNTÜRK

Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olamayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna sunmuş olduğunuz **“Tümör-İlişkili Otoantikörler İçin Kullan-At Biyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi”** başlıklı ve 2013/86/07/05 nolu araştırmanız, incelenmiş olup, yürütülmesine etik açıdan herhangi bir sakınca olmadığına oybirliği/oyçokluğu ile karar verilmiştir

NKÜ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

Unvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile ilişki		Katılım		İmza
Prof. Dr. Ahmet GÜREL	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. M. Metin DONMA	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Burhan TURGUT	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Cevat AKTAŞ	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Savaş GÜZEL	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Birol TOPÇU	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÇEBER	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Yrd. Doç. Dr. Hayati GÜNEŞ	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. B. Cüneyt TURAN	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Yrd. Doç. Dr. Fatih HOROZOĞLU	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐	

Prof. Dr. Ahmet GÜREL
GOKAEK Başkanı

Namık Kemal Mah. Kampüs Cad. No:1 59030
Telefon: (0 282) 250 59 04 - Faks: (0 282) 250 99 28
Elektronik Ağ: <http://tip.nku.edu.tr>

Ayrıntılı Bilgi İçin: Engin Deniz RENÇBER
e- posta: edrencber@nku.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Burçak DEMİRBAKAN, 30 Ağustos 1990 yılında İSTANBUL’ da doğdu. Lisans öğrenimini Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nde 2012 yılında tamamlamıştır. 2015 yılında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalından yüksek lisans derecesini aldı.

Akademik Yayınlar;

- Demirbakan, B., Sezginturk M. K. (2017). "A sensitive and disposable indium tin oxide based electrochemical immünosensör for label-free detection of MAGE-1". Talanta. 163: 163-169.
- Demirbakan, B., Sezginturk M. K. (2016). "A novel immunosensor based on fullerene C₆₀ for electrochemical analysis of heat shock protein 70". Journal of Electroanalytical Chemistry. 783: 201-207.
- Demirbakan, B., Özcan, B., Yeşiller, Ş.G., Sezginturk M. K. (2014). "Introducing a new method for evaluation of the interaction between an antigen and an antibody: single frequency impedance analysis for biosensing systems". Talanta. 125: 7-13.

Bildiriler;

- Demirbakan, B., Sezginturk M. K. (2017). "A novel electrochemical biosensor based on screen printed gold electrode modified with organo-silane for the tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 detection, Poster Sunumu, 12th BBMEC Workshop On International Biosensor Conference, 25 - 29 Eylül 2017, ROMA/İTALYA
- Demirbakan, B., Sezginturk M. K. (2016). "A novel high reproducible, regenerative, sensitive and cheap biosensor developed by using 3-cyanopropyl trimethoxysilane for PAK2 detection, Poster Sunumu, 10th Aegean Analytical Chemistry Days, , 29 Eylül 2016, 02 Ekim 2016, ÇANAKKALE.
- Demirbakan, B., Sezginturk M. K. (2015). "HSP70 tayini için Fulleren C₆₀ temelli bir biyosensör ve karakterizasyon çalışmaları, Sözlü Sunum, 27.Ulusal Kimya Kongresi, 23-28 Ağustos 2015, ÇANAKKALE.
- Demirbakan, B., Sezginturk M. K. (2015). "A High Sensitive And Reproducible Immunosensor Based On Indium Tin Oxide And Silane Chemistry, Poster Sunumu, II. Uluslararası Biyosensör Kongresi, 10 Haziran 2015, 12 Haziran 2015, İZMİR.

Demirbakan, B., Sezginturk M. K. (2015). "A novel immunosensor based on fullerene C₆₀ for electrochemical analysis of heat shock protein, Poster Sunumu, 4th International Conference On Bio-sensing Technology, 10 -13 Mayıs 2015, PORTEKİZ.

Demirbakan, B., Sezginturk M. K. (2015). Özcan, B., Yeşiller Ş.G., Karaboğa Sonuç M. N. (2013). "Design Of An Ultrasensitive Impedimetric Biosensor Using Anti-PTH for quantification of parathyroid hormone, Poster Sunumu, Biomed, 12-15 Kasım 2013.

Görev Aldığı Projeler;

TÜBİTAK-1001 (113Z678) "Tümör-iliskili otoantikorlar için kullan-at biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi, 1001 - Araştırmacı, Bursiyer, Yürütülen Kurulus: TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ, 01 Mart 2014, 01 Eylül 2017.

TÜBİTAK-TÜBA(GEBİP) " Lenf kanserinin teşhisi için pratik, ekonomik, hassas ve taşınabilir immünosensör dizaynı ve çip teknolojisine entegrasyonu", Araştırmacı, Bursiyer, Kasım 2016.