

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HORMON ANALİZİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

**TÜRKKAN ÖZTÜRK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: PROF. DR. HÜLYA YAĞAR**

**EDİRNE-2018**

TÜRKKAN ÖZTÜRK'ün hazırladığı "HORMON ANALİZİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

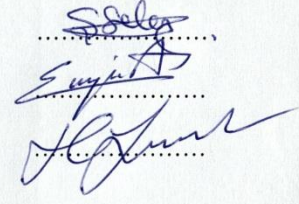
Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

Doç. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR

Dr. Öğretim Üyesi Engin ASAV

Prof. Dr. Hülya YAĞAR

İmza



Tez Savunma Tarihi: 04/06/2018

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Hülya YAĞAR  
Tez Danışmanı



Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

  
.....  
Prof. Dr. Murat YURTCAN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**DOĞRULUK BEYANI**

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



04 / 06 / 2018

Türkan ÖZTÜRK

Yüksek Lisans Tezi  
Hormon Analizine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi  
Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

## ÖZET

Luteinleştirici hormon (LH) erkek ve kadınların üreme sistemi için önemli bir hormondur. Hipofiz bezinde üretilen LH, kadınlarda yumurta oluşumunu sağlayıp östrojen ve progesteron üretimini tetikler. Erkeklerde ise testosteron üretimini tetikleyip spermilerin gelişiminde rol oynar. LH'nin dengesiz üretimi nedeniyle kadın ve erkeklerde kısırlık meydana gelebilir. Bu tezde LH'nin 10-60 mIU/mL aralığında kandaki miktarlarını ölçebilen, kadınların ovulasyon dönemlerini kontrol edebilecekleri bir biyosensör tasarlanmıştır.

6-merkaptohexanol, p-benzokinin, PAMAM ve glutaraldehit immobilize edilerek lineer ölçüm yapabilen, tekrar üretilebilirliği yüksek immünolojik bir biyosensör geliştirildi. Tüm immobilizasyon adımları elektrokimyasal impedans ve siklik voltametri spektroskopisi ile karakterize edildi ve LH eklenmiş yapay serum örneklerinde de başarılı sonuçlar alındı.

Yıl : 2018

Sayfa Sayısı : 65

Anahtar Kelimeler : Luteinizan hormon (LH), kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM), Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi, hormon eksiklik-fazlalık hastalıkları, kısırlık

Master Thesis

Biosensor Development for Hormone Determination

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Chemistry

### **ABSTRACT**

Luteinizing hormone (LH) is an important hormone for male and female reproductive system. LH produced in the pituitary gland triggers egg production in women and triggers estrogen and progesterone production. In males, it triggers testosterone production and plays a role in the development of sperm. Due to the unbalanced production of LH, males and females experience infertility problem. In this thesis, a biosensor was designed to determined women's ovulation periods by measuring the amount of LH in blood the concentration range of 10-60 mIU/mL.

In this aim, an immunological biosensor was designed by immobilizing the anti-LH antibody to the gold electrode surface by covalent immobilization method using 6-MHL, p-benzoquinone, PAMAM and glutaraldehyde. All immobilization steps were characterized by electrochemical impedance and cyclic voltammetry spectroscopy, and successful results were obtained in artificial serum samples spiked with LH.

Year : 2018

Number of Pages : 65

Keywords : Luteinizing hormone (LH), self-assembled monolayers (SAM), Electrochemical Impedans spectroscopy, hormone excess-deficiency diseases, infertility

## TEŐEKKÜR

Tez danıőmanım olan Prof. Dr. Hũlya YAĞAR'a Trakya Őniversitesi'ndeki eğitimim boyunca her daim bana gosterdiği iten destekleri ve sabrı için sonsuz teőekkũr ederim. Bu tezin oluşumunda çok bũyũk katkısı olan, bilgi birikimini içtenlikle paylaőan Doç. Dr. Hakkı Mevlũt ŐZCAN'a, deney yapımını Őđrenme sũrecimde bana yardımcı olan F. Gũlnaz GũLER ve Tolgahan DURMAZ'a teőekkũr ederim. Tũm hayatım boyunca her daim benim yanımdayken beni destekleyen sevgili aileme sonsuz teőekkũr ederim.

Tũrkkann ŐZTũRK

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.....	3
KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Hormonlar.....	3
2.1.1. Hipotalamus ve Hipofizin Endokrin Yolları Düzenlemesi.....	6
2.1.2. Luteinleştirici hormon (LH).....	7
2.1.3. LH için tayin yöntemleri.....	11
2.2. Biyosensörler.....	13
2.2.1.. Biyosensörlerin Bileşenleri.....	14
2.2.1.1. Biyokomponentler (Biyoreseptör moleküller).....	15
2.2.1.2. Fiziksel bileşenler (Transduserler).....	16
2.3. Biyosensörlerin Elektrokimyasal Temelleri.....	16
2.3.1. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi.....	16
2.3.2. Döngüsel voltometri.....	17
2.4. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler.....	17
2.4.1. Enzim temelli impedimetrik biyosensörler.....	18
2.4.2. İmmünokimya temelli impedimetrik biyosensörler.....	18
2.4.3. Nükleik asit temelli impedimetrik biyosensörler.....	18
2.4.4. Hücre ve mikroorganizma temelli impedimetrik biyosensörler.....	19
2.5. Biyokomponentlerin immobilizasyonu.....	19
2.5.1. Adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon.....	20

2.5.2. Tutuklama yöntemiyle immobilizasyon.....	20
2.5.3. Çapraz bağlama yöntemiyle immobilizasyon.....	20
2.5.4. Kovalent bağlama yöntemiyle immobilizasyon .....	22
2.6. LH biyosensörünün dizaynı.....	25
2.7. Literatürde LH biyosensörleri.....	26
<b>BÖLÜM 3.....</b>	<b>30</b>
<b>MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>30</b>
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	30
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	30
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	31
3.2. Yöntem .....	31
3.2.1. Elektrot Temizliği.....	31
3.2.2. Biyosensörün Çalışma Prensibi ve Ölçüm Sistemi.....	32
3.2.3. Hesaplama Yöntemi.....	32
3.2.4. Luteinleştirici Hormon Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanışı.....	35
3.2.5. Luteinleştirici Hormon Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu.....	36
3.2.5.1. 6-MHL konsantrasyonunun optimizasyonu.....	36
3.2.5.2. p-benzokinon konsantrasyonunun optimizasyonu.....	36
3.2.5.3. PAMAM konsantrasyonunun optimizasyonu.....	36
3.2.5.4. Glutaraldehit konsantrasyonu optimizasyonu .....	37
3.2.5.5. Anti-LH konsantrasyonu optimizasyonu.....	37
3.2.6. Luteinleştirici Hormon Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Karakterizasyonu.....	37
3.2.6.1. Doğrusal tayin aralığı ve tekrar üretilebilirlik.....	37
3.2.6.2. Yapay serumda uygulama .....	38
<b>BÖLÜM 4.....</b>	<b>39</b>
<b>SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>39</b>
4.1. LH Biyosensörü ile Elde Edilen Bulgular.....	39
4.1.1. LH Biyosensörünün Hazırlanış Basamaklarına İlişkin Bulgular.....	39
4.1.2. LH Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna	42

İlişkin Bulgular .....	
4.1.2.1. 6-MHL konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	42
4.1.2.2. p-benzokinon konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	43
4.1.2.3. PAMAM konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	45
4.1.2.4. Gluteraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	46
4.1.2.5. Anti-LH konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	47
4.1.3. LH Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular.	49
4.1.3.1. Tekrar üretilebilirlik .....	49
4.1.3.2. Doğrusal tayin aralığı .....	50
4.1.3.3. Yapay serumda uygulama.....	52
KAYNAKLAR.....	56

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR

<b>LH</b>	: Luteinleştirici Hormon
<b>FSH</b>	: Folikül uyarıcı hormon
<b>TSH</b>	:Tiroid uyarıcı hormon
<b>hCG</b>	: İnsan karyonik gonadotropin
<b>6-MHL</b>	: 6-Merkaptoheksanol
<b>PAMAM</b>	: Poli(amido amin)
<b>GLT</b>	: Glutaraldehit
<b>SAM</b>	: Kendiliğinden oluşan tek tabakalar
<b>R<sub>ct</sub></b>	: Yük transfer direnci
<b>CV</b>	: Döngüsel voltametri
<b>EIS</b>	: Elektrokimyasal impedans spektrokopisi
<b>SPR</b>	: Yüzey Plazmon Rezonansı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Başlıca endokrin sistemler ve hedef dokuları.....	4
Şekil 2.2. İnsan vücudundaki endokrin bezler .....	5
Şekil 2.3. Hipotalamus ve hipofiz bezlerinin veri iletim şeması.....	6
Şekil 2.4. Menstrüasyon döngüsünde hormonların etkisi.....	9
Şekil 2.5. Kadınlar (A) ve erkeklerde (B) yaşam dönemleri boyunca LH salınımı	10
Şekil 2.6. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.7. p-benzokinonun çapraz bağlama mekanizması.....	22
Şekil 2.8. SAM'in şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.9. SAM oluşumunda kullanılan adsorban-substrat ikilileri (A) Altın	24
yüzeyle alkan tiyoller ve (B) Hidroksillenmiş yüzeyde alkil siloksanlar.....	
Şekil 2.10. Bu tez kapsamında üretilen LH biyosensörünün üretim	25
basamaklarının şematik gösterimi.....	
Şekil 3.1. Gamry Analyst® yazılımı kullanılarak elde edilen eş-değer devre	33
modeli.....	
Şekil 3.2. Gamry Analyst® yazılımındaki hesaplama yapılabilen devre modelleri	34
Şekil 3.3. Gamry Analyst® yazılımındaki hesaplama ekranı.....	35
Şekil 4.1a. LH biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans	40
spektrumları.....	
Şekil 4.1b. LH biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel	40

voltamogramları.....	
Şekil 4.2. 6-MHL konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	42
Şekil 4.3. p-benzokinon konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	44
Şekil 4.4. PAMAM konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	45
Şekil 4.5. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	46
Şekil 4.6. Anti-LH konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	48
Şekil 4.7. 10-60 mIU/mL tayin aralığında LH biyosensörüne ait doğrusal tayin aralığı grafiği.....	50
Şekil 4.8. LH'nin 10-60 mIU/mL tayin aralığındaki çalışmalarından elde edilen Nyquist eğrileri.....	51
Şekil 4.9. LH'nin 10-60 mIU/mL tayin aralığındaki çalışmalarından elde edilen döngüsel voltamogramları.....	51
Şekil 4.10. 10-60 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmasında elde edilen kalibrasyon grafiği.....	52
Şekil 4.11. 10-60 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmasında elde edilen Nyquist eğrileri.....	53
Şekil 4.12. 10-60 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmasında elde edilen döngüsel voltamogramlar .....	53

## ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. LH referans değerleri.....	11
Çizelge 2.2. Biyosensör bileşenlerinin içeriği.....	15
Çizelge 4.1. Her bir immobilizasyon basamağı için hesaplanan $R_{ct}$ değerleri.....	41
Çizelge 4.2. 6-MHL konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri.....	43
Çizelge 4.3. p-benzokinon konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri.....	44
Çizelge 4.4. PAMAM konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri .....	45
Çizelge 4.5. Glutaraldehit konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklere ait doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri.....	47
Çizelge 4.6. Anti-LH konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri.....	48
Çizelge 4.7. LH biyosensörü için elde edilen optimum değerler .....	49
Çizelge 4.8. 10-60 mIU/mL aralığında LH biyosensörünün tekrar üretilebilirliği .....	49

# BÖLÜM 1

## GİRİŞ

İnsan vücudunda üreme sisteminin sağlıklı bir şekilde çalışması için hormonlar çok önemli bir role sahiptir ve Luteinleştirici hormon (LH) bu hormonlardan biridir. Erkek ve kadın bedenlerindeki farklı rolleriyle, bu önemli hormonun sağlıklı bir üreme sisteminin sağlanması, üreme sağlığının kontrol altına alınması için anlaşılması ve tayini gerekmektedir.

LH, ön hipofiz bezinde üretilir ve salınır. Bu hormon gonadotropik hormonlardandır. Kadınlarda LH hormonu, östradiol üretmek için yumurtalıkları uyarır. Yumurta yumurtalıkta olgunlaştıktan sonra LH sayesinde yumurtalıktan dışarı salınır. Döllenme gerçekleşirse, luteinleştirici hormon, gebeliği devam ettirmek için progesteron üreten corpus luteum'u uyaracaktır. Erkekler için luteinleştirici hormon testislerdeki Leydig hücrelerinden testosteron üretimini uyarır. Testosteron, sırayla, sperm üretimini uyarır ve erkek karakteristiklerini vurgulamaya yardımcı olur.

Yüksek seviyelerde luteinleştirici hormonu olan kişiler kısırlık yaşayabilir, çünkü hormon doğrudan üreme sistemini etkiler. Kadınlarda, çok yüksek olan luteinleştirici hormon seviyeleri sıklıkla uygun testosteron seviyeleri oluşturan polikistik over sendromuna bağlanır. Turner sendromu veya Klinefelter sendromu gibi bazı genetik durumlar da hormonun yüksek seviyelerine neden olabilir. Düşük seviyelerde luteinleştirici hormon da kısırlığa neden olabilir, çünkü yetersiz seviyeler sperm üretimini veya yumurtlama sürecini sınırlayacaktır. Çok düşük LH, kadınlarda ovulasyonu durdurur veya erkeklerde gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgılanmasında bir eksiklik yaratır.

Biyoteknolojideki ilerlemeyle, serum LH ile ilgili fizyolojik ve klinik çalışmaları gerçekleştirmek üzere çeşitli immün analizler tasarlanmıştır. Günümüzde ELISA, RIA,

IFMA/ICMA gibi bazı tekniklerle LH tayini yapılabilse de bunların pahalı ekipman ve uzman personel gerektirmesinden dolayı daha pratik ve ucuz tanı fırsatı veren biyosensörler ilgi uyandırmaktadır.

Bu tez çalışmasında da LH miktar tayini yapmak amacıyla elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) temelli bir LH immunosensörü tasarlanmıştır.



## BÖLÜM 2

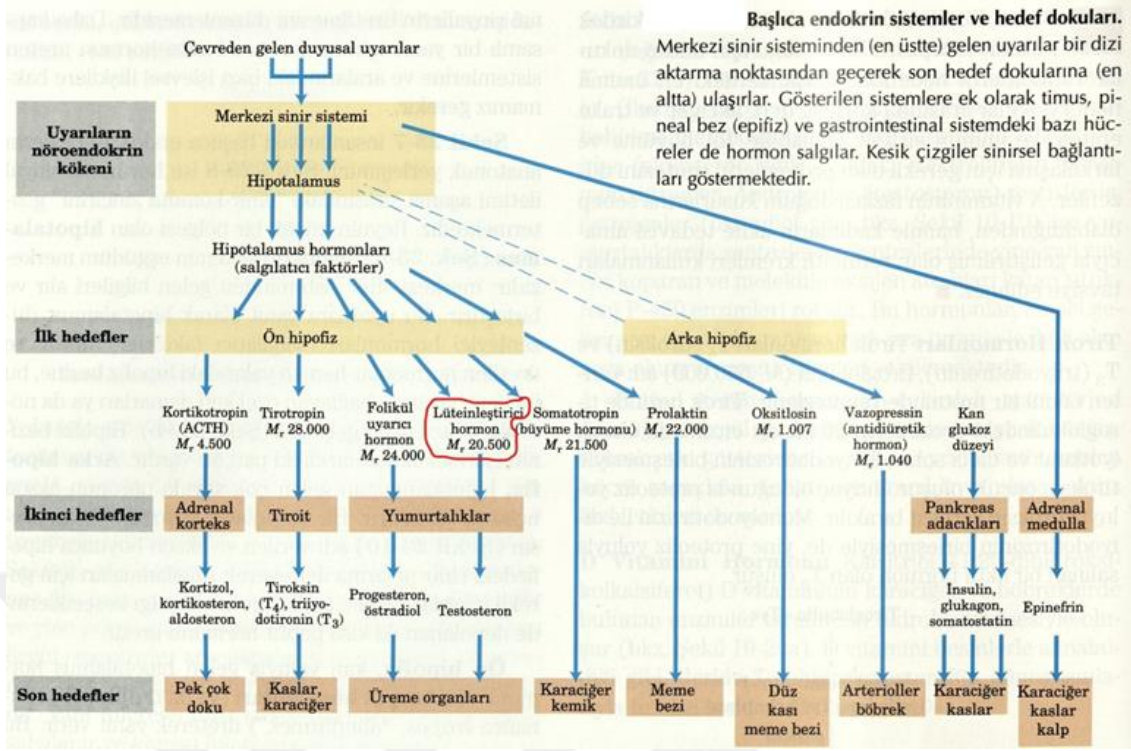
### KAYNAK ARAŞTIRMASI

#### 2.1. Hormonlar

Hormonlar, bitki ve hayvanların salgıladığı, fizyolojik aktivitelerin düzenlenmesinde ve homeostazın korunmasında görev alan organik maddelerdir. Hormonlar, dakikalık miktarlarına tepki verecek şekilde kurgulanmış spesifik organlar veya dokulardan gelen yanıtları uyararak işlevlerini yerine getirirler. Hormonlarca yapılan kimyasal uyarılar, tüm vücutta iletişim ve düzenlemenin iki temel sisteminden biri olan endokrin sisteminin görevidir. Hormonlar endokrin sekresyon olayı ile salgılandıkları endokrin bezlerinden kan dolaşımındaki hedeflerine iletilirler (<https://www.britannica.com>). Endokrin hücreler tarafından salgılanan hormonlar, üreme, gelişme, enerji metabolizması, büyüme ve davranışı düzenler.

Diğer temel iletişim ve kontrol sistemi ise; belirli yollardan uyarıları ileten özelleşmiş hücrelerin yani nöronların oluşturduğu sinir sistemidir. Bu uyarılar, nöronları, kas hücrelerini ve endokrin hücrelerini düzenlerler (Şekil 2.1). Nöronların uyarıları hormonların salınmasını düzenlediğinden, sinir ve endokrin sistemlerinin işlevleri çoğunlukla örtüşür (Campbell, 2013).

Hormonlar kanla dolaşırken tüm doku hücreleri ile temas edebilir; ama yalnızca o hormona özgü reseptör taşıyan hücreleri etkileyebilir. Hormonların kandaki miktarları çok azdır; fakat hücrelerdeki özgül reseptörler hormonlara karşı çok duyarlıdır.



**Şekil 2.1.** Başlıca endokrin sistemler ve hedef dokuları (Lehninger, 2013)

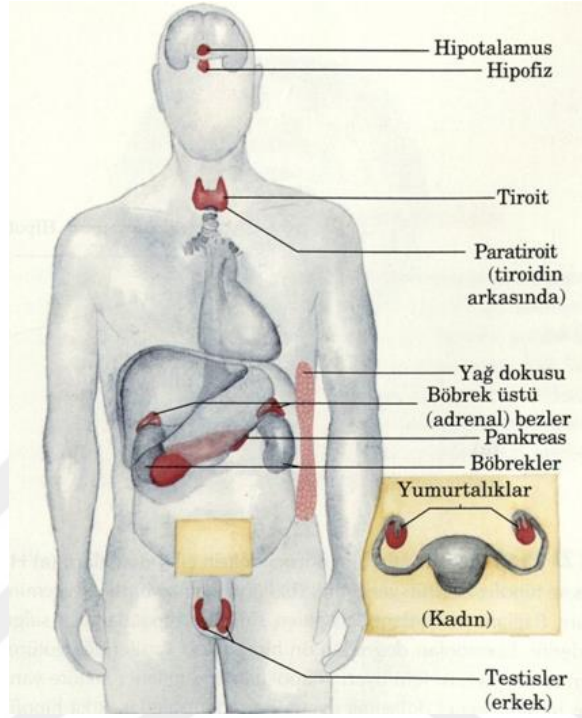
Memeli hayvanlarda ve insanda bulunan başlıca endokrin bezler şunlardır: Hipofiz, epifiz, tiroit, paratiroit, pankreas, adrenal bez, testis, ovaryum ve plasentadır (Akay, 2014). İnsan vücudundaki bu bezler Şekil 2.2’de gösterilmiştir.

Hormon salgılayan bezleri histolojik olarak sınıflandırmak son derece zordur. Çünkü her bir doku farklı hücreler içerir. Ancak, hormonlar kimyasal yapılarına ve etki tarzlarına göre sınıflandırılabilir.

Kimyasal yapılarına göre; Amino asit türevli hormonlar, Steroit hormonları ve Polipeptit hormonlar olarak sınıflandırılırlar.

Amino asit türevli hormonlar (dopamin, epinefrin) suda çözünebilir özellikte olup, amino asitlerden türerler. Gereksinim duyulana kadar endokrin bezlerde depolanırlar. Yapı bakımından en basit hormonlardır. Steroit hormonlar (androjenler, progesteronlar) kolesterolden yapılan, yağda çözünebilir özellikte olan hormonlardır. Hücrede depo edilemez hemen salgılanırlar. Hücre çekirdeğine girip özel reseptörü ya da genine bağlanıp, hücreyi gerekli proteini yapması için uyarır. Polipeptit hormonlar ise (LH, insülin, büyüme hormonu) en karmaşık yapılu grup olup, evrim modeli olarak önem taşırlar. Uzun amino asit zinciri (birkaç tane ile 200 kadar) içerir ve suda

çözünebilir özelliktedirler. Hücre çoğalması, büyüme ve süt oluşumu gibi metabolizma olaylarında işlev görürler. Endokrin bezlerde depolanıp, gerektiğinde salgılanırlar (Akay, 2014).



**Şekil 2.2.** İnsan vücudundaki endokrin bezler (pembe renkli) (Lehninger, 2013)

Hormonlar etki şekillerine göre ise; kinetik etkili hormonlar, metabolizmaya etkili hormonlar ve morfogenetik etkili hormonlar olarak üçe ayrılır.

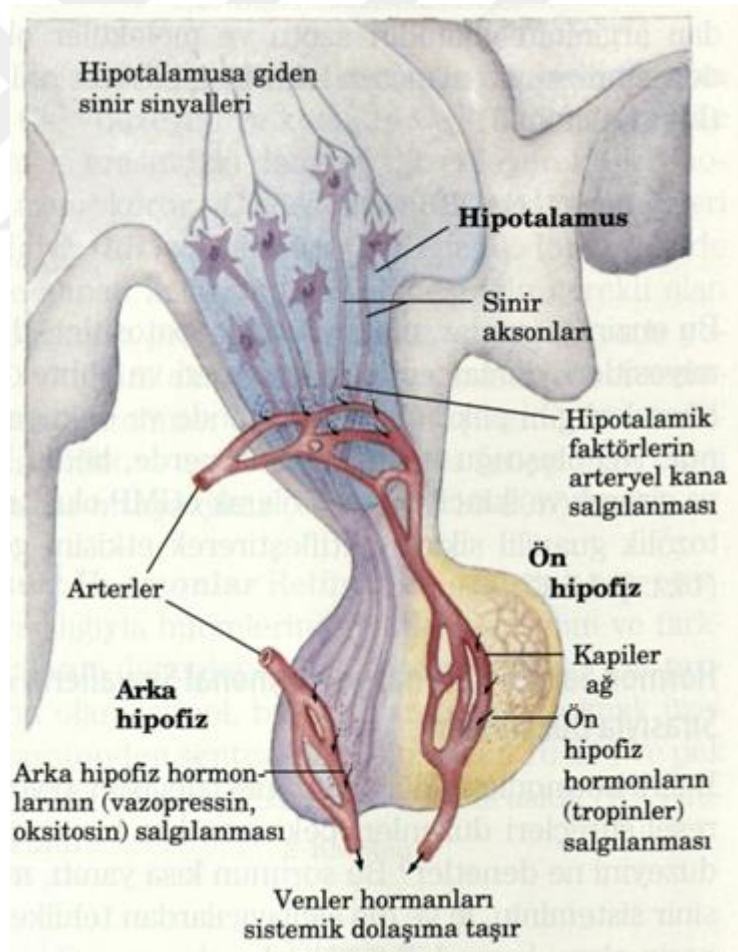
Epinefrin ve oksitosin kinetik etki yapan hormonlar olup, kas kasılması üzerine etkilidir. Hipotalamusun nörosekretorik hücrelerinin salgıladığı hormonlar hipofizden hormon salınmasını kontrol eder. Metabolizmaya etki eden hormonlar genellikle doku bileşenlerinin dengede tutulmasını ve kimyasal reaksiyon hızlarını kontrol eder. Örneğin, tiroksin hücrelerin solunum hızlarını ayarlarken, antidiüretik hormon vücudun su dengesini sağlar. Morfogenetik etkili hormonlar, canlının doğumöncesi ve doğumsonrası yaşamında tüm vücudunda veya herhangi bir organında morfogenetik değişikliğe neden olan hormonlardır. Örneğin, esterojen ve androjenler genital yapıların oluşmasını ve eşeysel karakterlerin birleşmesini kontrol eder (Akay, 2014)

Sentezlandıkları yere göre de hormonları hipofiz, epifiz, tiroit, paratiroid, pankreas, adrenal bez, testis, ovaryum hormonları olarak sınıflandırmak mümkündür.

LH ön hipofiz lobundan salgılanan, polipeptid yapılı ve morfogenetik etkili bir hormondur.

### 2.1.1. Hipotalamus ve Hipofizin Endokrin Yolları Düzenlemesi

Omurgalılarda hipotalamus, endokrin ve sinir sistemlerinin ortak çalışmasını sağlamak açısından merkezi bir rol oynar. Beyinde yer alan birkaç endokrin bezden biri olan hipotalamus, tüm vücuttaki sinirlerden ve beyinden bilgi alır. Tepki olarak da, çevresel koşullara uygun olarak endokrin uyarılar başlatır (Şekil 2.3). Hipotalamustan çıkan uyarılar, hemen altında yer alan hipofiz bezine ulaşır. Hipofizin anteriyör (ön) hipofiz isimli bölümü bir endokrin bez olup, hipotalamustan gelen uyarılara tepki olarak hormon sentezleyip salgılar. Çoğu ön hipofiz hormonu, tropik hormondur; yani diğer endokrin hücre ya da bezlerinin işlevlerini kontrol eder.



Şekil 2.3. Hipotalamus ve hipofiz bezlerinin veri iletim şeması (Lehninger, 2013.)

Bu tropik hormonlardan FSH ve LH, hem erkek hem de dişi gonadların yani testis ve yumurtalıkların aktivitelerini uyarır. Bu nedenle, FSH ve LH aynı zamanda gonadotropinler olarak bilinir ve her ikisi de hipotalamusun gonadotropin-salgılatıcı hormonu (GnRH) tarafından kontrol edilirler (Campbell, 2013).

### **2.1.2. Luteinleştirici hormon (LH)**

Luteinleştirici hormon (lutropin, LH), kadınların yumurtalıklarında ve erkeklerin testislerinde gelişimi uyararak temel işlevi olan bir gonadotropin olarak kategorize edilmiş bir anterior hipofiz hormonudur. LH hipotalamus tarafından salgılan lüteinize edici salgılama hormonuna (LH-RH) yanıt olarak, gonadotropinler olarak adlandırılan hipofiz bezinin bazofilik hücreleri tarafından pulsatil bir şekilde salgılanır. Pulsatil pubertadan sonra gonadotropin salıverici hormonun ve buna uyarak da FSH ve LH salıverilmesinin ortalama 80 dakikalık bir siklus göstermesi ve bu hormonların salgılanma hızınının 70-100 dakikada bir maksimuma çıkarak salgılanması olarak tanımlanabilir. Hem erkeklerde hem de kadınlarda üretilen LH, normal gonadal işlev ve fertilité için önemlidir. LH'nin erkeklerde bazal sekresyonu epizodiktir ve interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) testosteron üretmek için uyarmanın birincil fonksiyonuna sahiptir. Kadınlarda LH konsantrasyonu, yaş, cinsiyet, adet döngüsününün fazı ve gonadal-hipotalamik hipofizer aks boyunca hormonal olayların dizisi ile değişir. LH hormonu androjen üretmek için Ovarian tekal hücrelerini uyarır ve ovulasyonu tetiklemek için korpus luteumundan progesteron üretilmesini sağlar. Artmış LH seviyeleri, kadınlarda primer gonadal disfonksiyon, polikistik over sendromu, postmenopoz ve hipofiz adenomu ile ilişkilidir (Kalia vd 2004).

Erkeklerde hipogonadizm ve anarşinin yanı sıra Klinefelter sendromunda ve primer testis yetmezliğinde de yüksek LH konsantrasyonu görülebilir.

LH; molekül ağırlığı 26.000-229.000 dalton olan heterodimerik bir glikoprotein olup kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanmış  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinden oluşmaktadır. Her alt ünite dahili olarak çapraz bağlanarak disülfid bağları ile stabilize edilir.  $\alpha$ -alt biriminin moleküler ağırlığı 14.000 olup, bu alt birim glikoprotein hormonlarından, luteinleştirici hormon, folikül uyarıcı hormon (FSH), karyonik gonadotropin (hCG) ve tiroid uyarıcı hormon (TSH) için ortakken,  $\beta$ -alt birimi benzersizdir ve her bir hormon reseptörüne spesifik bir bağlama yeteneği verir. Hormonun  $\beta$ -alt birimi N-bağlı

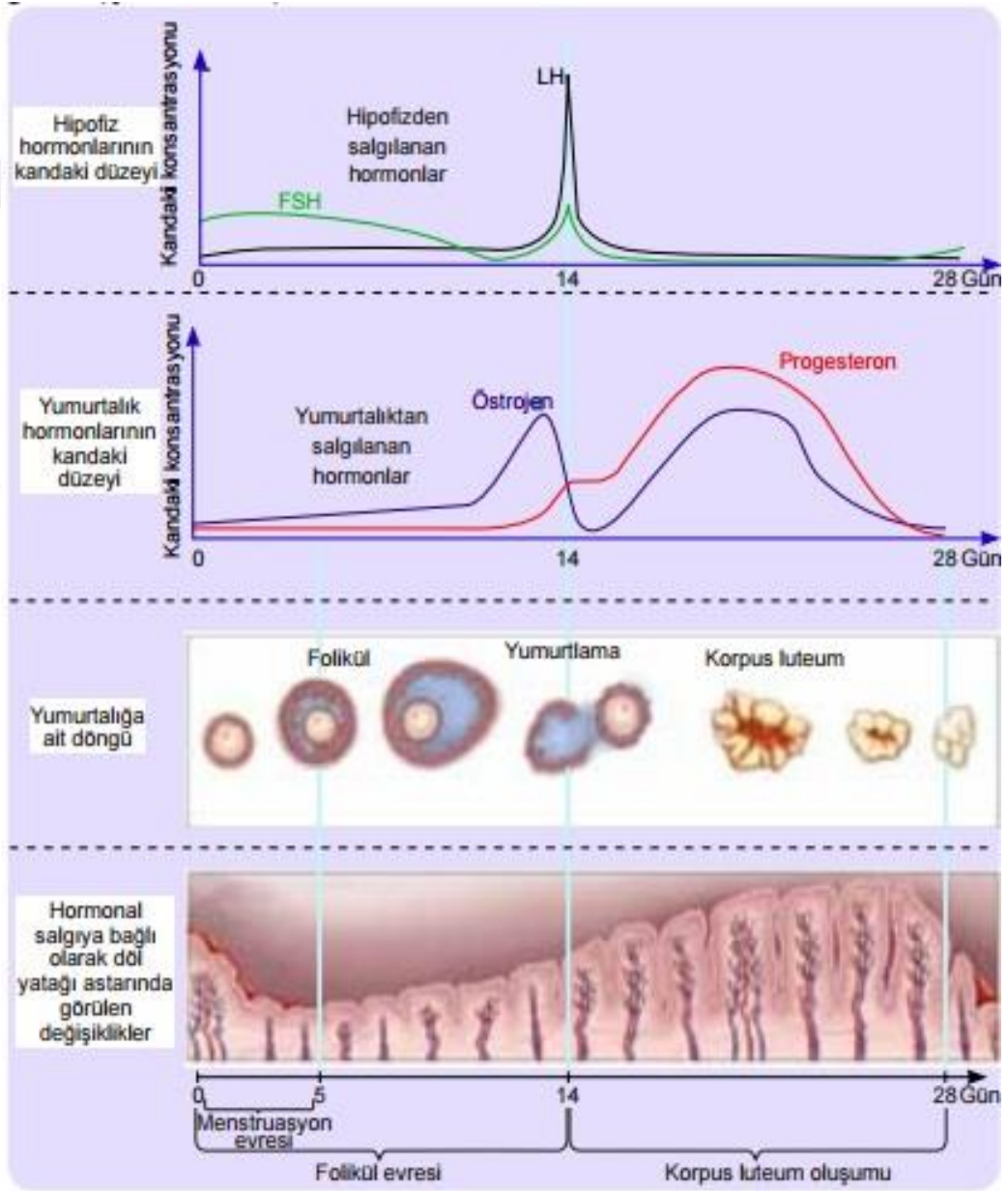
karbonhidrat yan zincirine ve moleküle biyoaktivite ve net moleküler yük veren farklı glikozilasyon derecesine sahiptir (Huhtaniemi, 2000; Leigh vd. 2000). LH, FSH ve hCG hormonlarının  $\beta$ -alt birimlerinin amino asit bileşimi arasındaki fark, bunların immünolojik farklılaşmasını açıklar. LH, hipofizden farklı glikozile izoformların bir karışımı olarak salgılanır, bileşim fizyolojik duruma göre değişir. Glukozamin ve mannoz, bu hormonun biyolojik etkisinin (Labhart, 1974) ayrılmaz bir bileşenini oluşturur ve yapının özel glikoform/izoformlarına yol açar (Jeffcoate, 1993; Lambert vd., 1998). Eklenen glikokonjugatlar, molekülün toplam yükünü, plazma yarı ömrünü, reseptör bağlanmasını, in vitro ve in vivo biyolojik aktivitesini ve metabolik klirens oranlarını etkiler (Chappel, 1990; Burgon vd., 1997). LH tek bir tür olmayıp farklı biçimlerin heterojen bir popülasyonudur. İnsan LH (hLH) izoformlarının yapısal ve fonksiyonel karakterizasyonu Stanton ve ark (1996) tarafından kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmiştir.

Fizyolojik sıvılardaki LH konsantrasyonlarının ölçümleri; endokrinolojik durumun biyokimyasal göstergeleri ve ayrıca tedavi monitörleri olarak kullanılır. LH deneyleri, nötral/spay durumu, ovulasyon olasılığı, reproduktif bozuklukların teşhisi ve endokrin tedavisinin izlenmesi için FSH analizleri ile rutin olarak gerçekleştirilir. LH ölçümü ayrıca erkeklerde spermatogonial ve spermatit gelişimin bir göstergesidir. Biyolojik profil ve immünoreaktiviteye dayanarak, LH tahmini için farklı deneyler oluşturulmuştur. Bu tahliller, in vivo ve in vitro biyo-tahliller ve RIA, IRMA, EIA gibi immüno-deneyler halinde kategorize edilebilir. Biyolojik deneyler, LH'nin biyolojik aktivitesini ölçer, oysa immünoanalizler, biyolojik aktiviteyi hesaba katmadan, numunedeki immünoreaktif hormon moleküllerinin miktarını izler. Biyoanalizler her zaman hormon moleküllerinin sayısı ile korelasyon göstermediğinden, bu iki farklı analiz sistemi ile ölçülen gonadotropin konsantrasyonları her zaman aynı Biyoaktivite/İmmünreaktivite (B/I) oranlarını oluşturmaz. B/I oranı, gonadotropinlerin (Huhtaniemi, 2000) kalite ve ortalama biyoaktivitesinin bir göstergesi olarak ve birçok klinik durumda bir tanı aracı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Jaakkola vd., 1990).

Endokrin heterojenliği, çapraz reaktivite ve endojen interferanslar nedeniyle, tasarlanan her testin kendi sınırlamaları vardır. Ayrıca, farklı laboratuvarlar arasındaki LH analiz sonuçları karşılaştırıldığında henüz farklılıklar gözlenmektedir. Mevcut

kavramları yeniden değerlendirmek ve gelişmiş kesin metodolojiyi kavramak için LH nicel değerlendirmesinin mevcut tekniklerin ve sınırlamalarının tam olarak anlaşılması gerekmektedir (Kalia vd., 2004).

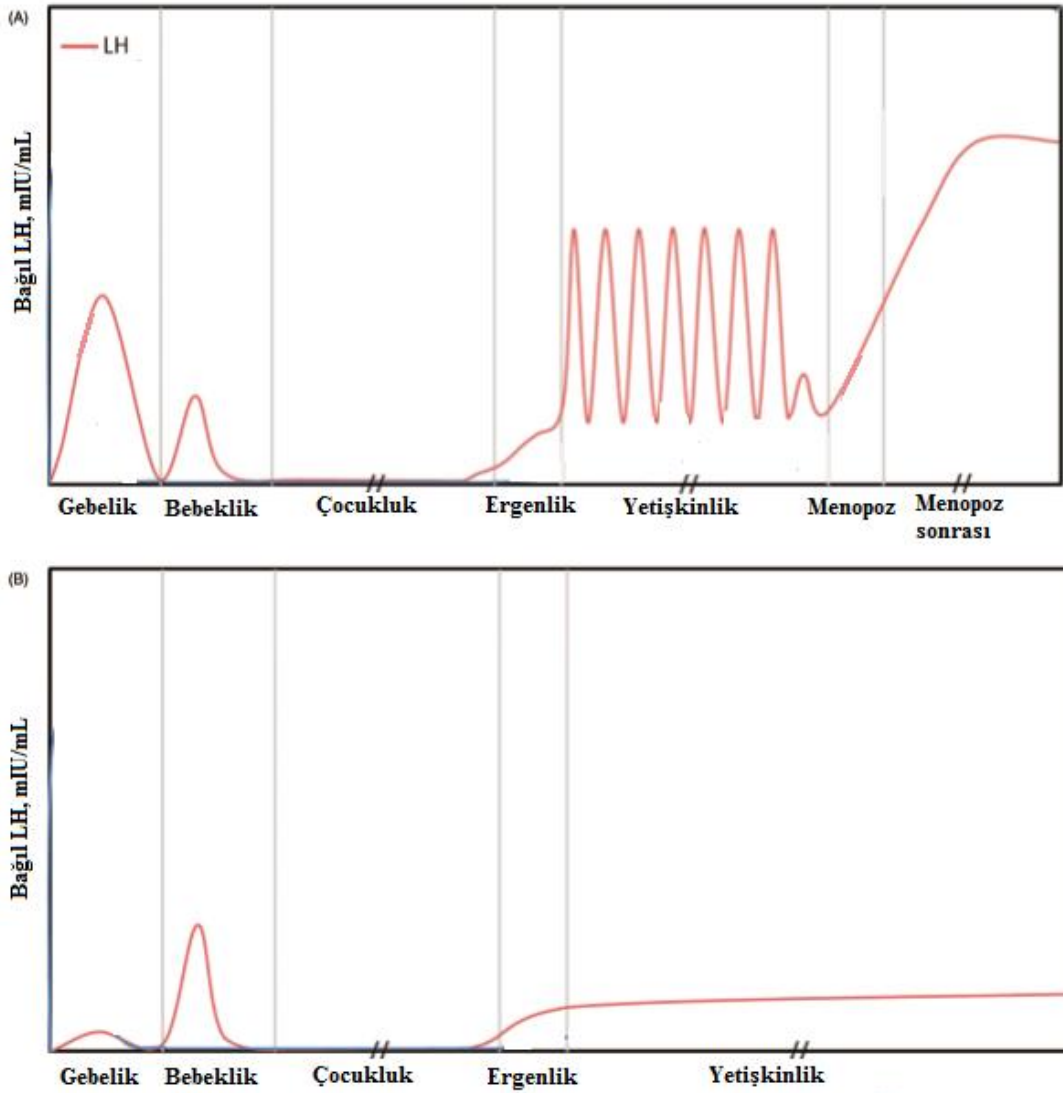
LH izoformlarının yapısı, biyolojik aktiviteleri ve yaşam süreleri menstural döngü boyunca farklılık gösterir. Biyolojik aktivitenin immünolojik aktiviteye oranı luteal faz boyunca en düşüktür, foliküler faz süresince yavaşça artar ve mid-foliküler fazda en yüksek seviyeye çıkar (Şekil 2.4) (Anobile vd., 1998).



Şekil 2.4. Menstrüasyon döngüsünde hormonların etkisi (<http://www.yenibiyoloji.com>)

LH izoform yapılarındaki çeşitlilik üreme ömrü boyunca görülmektedir. Genellikle ergenlik sonrasında kadınlarda daha kısa yarı ömürlü fakat yüksek biyopotansiyelli LH izoformları varken, menopoz sonrasındaki kadınlarda daha uzun ömürlü LH türleri baskındır (Reader vd., 1983; Wide, 1985).

Menopoz sonrasında LH'nin biyolojik aktivitesinin immünolojik aktivitesine oranı artış göstermektedir (Marrama vd., 1983). Şekil 2.5'de kadınlarda ve erkeklerde yaşam dönemleri boyunca LH salınımı gösterilmektedir (Choi ve Smitz 2014).



**Şekil 2.5.** Kadınlar (A) ve erkeklerde (B) yaşam dönemleri boyunca LH salınımı (Choi ve Smitz, 2014).

Çizelge 2.1’de kadın ve erkeklerde LH hormonunun belirli yaş aralıklarındaki ve belirli dönemlerdeki referans değerleri verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** LH referans değerleri (Elmlinger vd., 2002)

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

### 2.1.3. LH için tayin yöntemleri

Biyolojik klinik örneklerde LH miktarı, hormonun fonksiyonel ve immünokimyasal özelliklerine dayanan immünokimyasal veya radyoimmünolojik analizlerle saptanabilir ve değerlendirilebilir (Labhart vd., 1974).

1960’lardan beri gonadotropinlerin ölçümünde çeşitli immünolojik test yöntemleri kullanılmıştır. Bu immüno analizler, radyoaktif, enzimatik, kemiluminesans veya floresans olarak sınıflandırılabilir, yönteme göre kullanılan izleyici maddeler açısından farklılık gösterir. Ölçülen hormonun biyolojik aktivitesini hesaba katmadan, numunedeki immünoaktif hormon moleküllerinin miktarını belirler. İnsan LH  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinin amino asitleri benzerlikleri sıçaninkilerle karşılaştırıldığında,  $\alpha$  alt birim % 74.1,  $\beta$  alt birim % 71.6 benzer olduğu tespit edilmiştir (Kato vd., 1990; De Beer vd.,

1996). Ayrıca insan, koyun, sığır, domuz ve sıçan LH'larının  $\beta$ -alt birimleri arasında yapısal benzerlikler vardır (Leiva ve Lastra, 1992). İnsan ve sıçanların  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimleri arasındaki bu yapısal benzerlikler, bu türler için homolog ve heterolog immünolojik testlerin tasarlanmasını sağlamıştır.

### **Radioimmunoassay (RIA):**

Radyoimmünoassay tekniği, serum LH'ı ve radyoaktif madde -etiketli bir LH preparasyonunun yarışmalı bağlanması temeline dayanmaktadır. Ölçülecek olan hormonun antikorunun bağlı bulunduğu tüplerde,  $I^{125}$  ile işaretli hormon ve işaretli hormon bir araya getirilir. Tespit edilmek istenen işaretli hormon ile işaretli hormon antikorla etkileştirildiğinde antikora bağlanma etkinliği açısından birbiriyle yarışır. Reaksiyon ortamındaki işaretli hormon miktarı fazla ise antikora bağlanma o kadar yüksek olacaktır. İşaretli hormonun yaymış olduğu gamma ışınları, gamma sayacında belirlenir (Niswender vd., 1968).

RIA tarafından izo-hormonların ayrıştırılmaması ve düşük konsantrasyonda LH ölçümündeki yanlışlar RIA'nın kısıtlamalarıdır (Jaakkola vd., 1990). Tüm bu kısıtlamalara rağmen, RIA; LH'nin spesifik ve hassas olarak miktarının belirlenmesi için temel bir yöntem olarak durmaktadır. Bununla birlikte, radyoaktif izleyicilerin kullanımının sağlık tehlikeleri, kısa raf ömrü, radyoaktif atık bertarafı ve ekipmanın yüksek maliyeti gibi birçok dezavantajı vardır, bu da tekniğin yaygın ticari uygulanabilirliğini sınırlamaktadır (Kalia vd., 2004).

### **Immunoflorometrik/Kemiluminometrik Assay (IFMA/ ICMA)**

IFMA/ICMA,  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerine karşı etiketli antikorlar ile LH moleküllerinin çevrelenmesi tekniğine dayanan bir yöntemdir (Gharib vd., 1990, Bousfield vd., 1994). Antikorlar, analitin kolay tanımlanmasını ve nicelleştirilmesini sağlayan ya bir floresan etiket ya da bir ışıklı etiketin bağlanmasıyla etiketlenir. Spesifik reaktifin (etiketli antikor) fazlası analit (LH) ile reaksiyona girer. Üretilen kemilüminesans sinyal bir luminometrede ölçülür. Matris etkisinden kaçınmak için testlerde çok küçük örnek hacmi kullanılır, analizler kısa inkübasyon gereksinimlerine sahiptir, radyoaktif atık üretilmez ve otomasyonla, gerçekleştirmek daha az maliyetlidir.

Yöntem, eşdeğer RIA tekniklerinden çok daha hassas sonuç vermektedir (Kananen vd., 1996; Hakola vd., 1998).

### **Enzim Bağlı Immunosorbent Assay (ELISA/EIA)**

Yöntem “sandviç prensibine” dayanır. Mikroplaka kuyucukları, bir  $\beta$ -LH molekülü üzerindeki özgül bir antijenik bölgeye yönelik bir monoklonal antikor ile kaplanır. Endojen LH içeren bir numune örneği kaplanmış kuyucukta, yaban turpu peroksidazı ile konjuge edilmiş enzim anti-LH konjugatı ile inkübe edilir. İnkübasyondan sonra bağlanmamış konjugat su ile yıkanır. Bağlı peroksidaz miktarı, örnekte LH konsantrasyonu ile orantılıdır. Enzimin substratı ilavesiyle geliştirilen renk yoğunluğu, numunedeki LH konsantrasyonu ile orantılıdır (Thijssen vd., 1990).

### **Radyoreseptör Assays (RRA)**

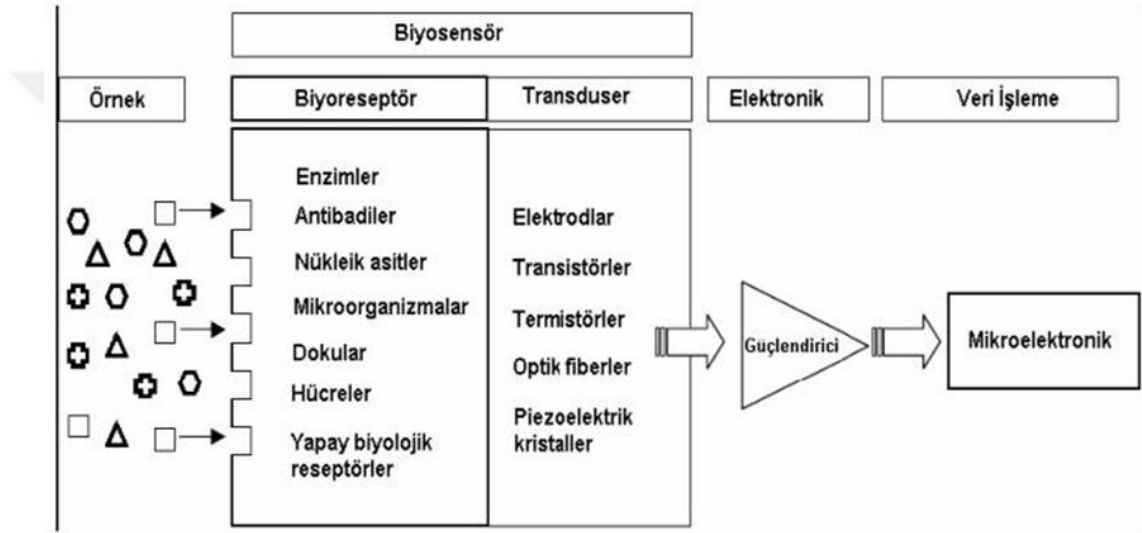
Radyoreseptör analizi, hormon yerine antikorun hormon reseptörüne bağlandığı, RIA'ya benzer yarışmalı protein bağlanma deneyleridir (Vogel ve Vogel 1997).

Radyoligand reseptör analizleri, çeşitli türlerde serum LH'ünü ölçebilir ve biyolojik sıvıların LH biyoaktivite profilini elde etmek için Leydig hücre biyo-analizine uygun bir alternatif olabilir (Hakola vd., 1998; Selvaraj ve Moudgal 1993). Ancak teknik, çok sayıda değişken örnek için ticari bir teşhis aracı olarak hala validasyondan uzaktır. RRA'lar LH'yi kolayca ölçebilmelerine rağmen, RIA'lardan biraz daha az duyarlıdır ve plazma proteinleri ile spesifik olmayan etkileşime daha duyarlıdır. Bu nedenlerden dolayı, radyoligand reseptör analizleri rutin olarak plazma gonadotropin düzeylerinin ölçümüne uygulanmamıştır (Bardin, 1986; Catt ve Pierce, 1986).

## **2.2. Biyosensörler**

Yaşayan varlıklar, çevreleriyle iletişim ve değişim yoluyla gelişir. Toplanan bilgiler onların ihtiyaçlarını karşılamasına, çoğalmasına ve hayatta kalmasına olanak tanır. Çeşitli duyu reseptörleri ile yiyecek bulmak, tehlike tespit etmek veya cinsel bir eş bulmak için çeşitli mesajlar alınır. Bazı bakteriler, besin maddelerini bulmalarına ve kendilerini zehirlerden uzak tutmaya imkan veren spesifik kimyasal reseptörlere sahiptir.

İnsan, çevresini gözlemlemek ve anlamak için bu biyolojik sensörleri kullanmanın uzun süredir hayalini kurmuştur. Gözlemlenen bir olayı ölçülebilir bir miktara dönüştüren ölçüm cihazları oluşturmak için doğanın sağladığı hücre, doku, protein ve enzimler kullanılmaktadır. Bu doğal biyosensörlere benzeyen yapay cihazlar üretebilmek için bir sinyal transdüseri (sinyal iletici sistem) ve bir elektronik amplifikatör (yükselteç) ile immobilize edilmiş biyolojik aktif bir bileşiğin (biyobileşen) doğrudan bağlanması gerekir. (Canh, 1994; Schelfer ve Schubert 1992). Şekil 2.6’da bir biyosensör ve bileşenleri şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.6. Biyosensör ve bileşenlerinin şematik gösterimi (<https://www.slideserve.com>)

### 2.2.1. Biyosensörlerin bileşenleri

Biyosensörler biyokomponentler ve transduser olarak farklı maddeleri ve sistemi içerebilmektedir. Bunlardan en önemlileri Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Biyosensör bileşenlerinin içeriği (Telefoncu, 2008)

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

### **2.2.1.1. Biyokomponentler (Biyoreseptör molekküller)**

Biyokomponentler (biyoreseptör de denir) enzim ile substrat veya antikor ile antijen arasındaki spesifik ilginin benzeri bir afiniteyle analitine bağlanır. Spesifik bağlanma ve/veya bu bağlanmanın sonrasındaki kimyasal bir reaksiyonunla sinyal oluşturabilecek biyoaktif materyaller “biyokomponent” olarak seçilebilir.

Bu bağlamda; mikroorganizmalar, organel, doku kesitleri gibi canlı hücre bütünü veya parçaları ya da bunlardan izole edilmiş enzim, antikor ve DNA-RNA gibi nükleik asit parçaları biyokomponent olarak biyosensör teknolojisinde önem kazanmıştır (Canh, 1994).

### **2.2.1.2. Fiziksel bileşenler (Transduserlar)**

Biyolojik olarak aktif materyalin analit ile etkileşiminden kaynaklanan fizikokimyasal değişimi, uygun bir güç çevirici tarafından bir elektrik çıkış sinyaline dönüştürülmelidir (Schelfer ve Schubert, 1992).

Fiziksel bileşenler biyokomponentle analitin biyolojik etkileşimini ölçerek fiziksel bir sinyale çevirir. Biyosensör geliştirilirken seçilecek fiziksel bileşen biyokomponent-analit ikilisinin biyokimyasal reaksiyonuna uygun olarak tercih edilmelidir. Örneğin; amperometrik, potansiyometrik, optik veya piezoelektrik algılayıcılar sinyal dönüştürücü olarak kullanılabilir. Ayrıca transistör ve termistörler de bu amaçla biyosensör teknolojisinde fiziksel bileşen olarak uygulama alanı bulmaktadır (Turner, 2013).

## **2.3. Biyosensörlerin Elektrokimyasal Temelleri**

### **2.3.1. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi**

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (Elektrokimyasal dielektrik spektroskopisi, EIS) kullanılacak olan sistemlerin, yüzey hassasiyetlerini, kompleks elektriksel dirençlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmek için kullanılan oldukça etkili ve kullanışlı bir yöntemdir. Biyomoleküllerin spesifik etkileşimlerinin izlenmesi ve kantitatif analizlerinde, biyosensörlerin hazırlık aşamalarındaki sağladığı kolaylıklardan dolayı tercih edilmektedirler.

İmpedans teknikleriyle başarılı bir şekilde hem biyoreseptör ve analiti arasındaki etkileşimin belirlenmesi hem de transduserde biyomoleküllerin immobilizasyonun gerçekleşmesi ve yüzey modifikasyonun karakterizasyonlarını gerçekleştirmek mümkündür. İmpedans ayrıca bu özelliklerinden dolayı, görüntüleme teknikleriyle yüzey morfolojisinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir araçtır (Sezgintürk, 2012).

İmpedans çoğunlukla küçük genlikli bir potansiyel uygulanması ve akım cevabının belirlenmesiyle tayin edilir. İmpedans spektroskopisinin sadece tek bir frekansta değil ayrıca farklı frekansları da tayin etme özelliği vardır. Böylece bir impedans spektrumundan yüzeylerin, tabakaların ya da membranların değişimi, difüzyon prosesleri ve bunların karakterizasyonu hakkında bilgi edinilir. İmpedans

spektrumunun çoğunlukla eşdeğer devre kullanılarak analiz edilmesiyle bu bilgilere ulaşılır. İncelenen sistemin farklı fizikokimyasal özellikleri, genellikle kapasitans ve dirençten oluşan bu devre ile açıklanır. Aynı zamanda sistem; difüzyon, partiyon, elektrokinetik gibi temel yasalardan türetilen transfer fonksiyonları ile de tanımlanabilir. Bu durumda bir impedans bileşeninin (kapasitans veya direnç) değişimi, çözeltinin bileşiminin bir fonksiyonudur. Bazı durumlarda konsantrasyondaki değişim ile tüm impedans arasında bağlantı kurmak mümkündür (Macdonald, 1987; Rubinstein, 1995; Barsoukov, Macdonald, 2005).

### **2.3.2. Döngüsel voltametri**

Döngüsel voltametri tarama işlemi belli bir potansiyel aralığında doğrusal olarak yapılır ve daha sonra potansiyeli orijinal değerine getirmek için tarama yönü ters çevrilir. İki yöndeki tarama hızı da aynıdır. Ters yöndeki potansiyeller döndürme potansiyelleri olarak adlandırılır. Bir ya da daha çok analitin indirgenme veya yükseltgenmesinin difüzyon kontrollü olarak meydana geldiği potansiyel, Döndürme potansiyellerinin aralığını belirtmektedir. Numunenin bileşimine göre başlangıç taramasının yönü pozitif veya negatif olabilir. Negatif potansiyeller yönünde gerçekleşen taramaya ileri tarama, zıt yöndeki taramaya da ters tarama denir.

### **2.4. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler**

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) fiziksel ve kimyasal proseslerin tanımlanmasında iyi bir metottur. Biyosensörün karakterizasyonu, membranların tanımlanması ve fabrikasyonu EİS ile etkin bir şekilde izlenebilir. Enzim-substrat etkileşiminin aksine katalitik olmayan antikor-antijen, DNA-DNA, reseptör-ligand etkileşimleri bile EİS ile başarıyla izlenebilir (Bott 2001; Katz ve Willner, 2009; Guan vd., 2004). İmpedans biyosensörleri oluşturmak için öncelikle biyomoleküllerin iletken ve biyoyumlu elektrot üzerine immobilize edilmesi ve daha sonrada bu analit bağlayıcı molekül üzerindeki yüzeysel direnç değişikliğinin ölçülmesi gerekir. Bu biyomoleküller reseptör proteinler, tek iplikli DNA veya antikorlar olabilir (Bott, 2001; Yang ve Bashir, 2008; Prodromidis, 2010).

#### **2.4.1. Enzim temelli impedimetrik biyosensörler**

Enzimler, reaksiyonları en az bir milyon kat hızlandıran bir katalizör gücüne sahiptir (Stryer, 1988). Enzimler biyosensörlerde en fazla tercih edilen biyoalgılama materyalleridir (Li, 2006). Bir enzimin dönüşümünden (turnover) dolayı redoks-aktif bileşiminde meydana gelen değişim, yük aktarım direnciyle belirlenebilir. Bu durum, glukoz oksidazın ve mediatör olarak benzokinonun kullanıldığı glukoz tayini çalışmalarında gösterilmiştir (Shervedani vd., 2006).

İmpedans spektroskopisi, modifiye yüzeyli elektrotların elektriksel özelliklerinin ölçülmesi için etkin bir yöntemdir. Ancak geniş bir frekans aralığında bütün bir impedans spektrumunun taranması zaman alıcıdır. Bu yüzden impedimetrik teknikler çoğu enzim temelli impedimetrik biyosensör için karakterizasyon metodu olarak kullanılır ve genellikle dolaylı izleme stratejileri kabul edilir (Guan vd., 2004).

#### **2.4.2. İmmünokimya temelli impedimetrik biyosensörler**

Affinite bağlama esaslı impedimetrik biyosensörler, hızlı, direkt ve etiketsiz elektrokimyasal immunosensörlere olanak sağlar ve çoklu-analit sensörler geliştirilebilmesi gibi avantajlara sahip olduğu için bu biyosensör çeşidi yoğun ilgi görmektedirler (Guan vd., 2004). İmmünsensörler genellikle iki immobilizasyon stratejisi ile hazırlanır; 1) ilgili antijeni bağlayan antikörlerin veya reseptörlerin elektrot yüzeyine immobilizasyonu 2) antijenin kendisinin immobilizasyonu. Her iki durumda da, bağlanma olayı elektriksel yüzey özelliklerinin değişimiyle sonuçlanır. Ancak ikinci durumda (antijen immobilizasyonunda) antikörlerin yüksek molekül ağırlıkları ve düşük dielektrik katsayılarından dolayı daha büyük değişimler ortaya çıkarabilir ki bu impedimetrik olarak çok daha etkili bir şekilde izlenebilir (Mulchandani ve Rogers 1998; Buerk, 1995; Hleli vd., 2006).

#### **2.4.3. Nükleik asit temelli impedimetrik biyosensörler**

Nükleik asitler hibridizasyon yetenekleri nedeniyle tamamlayıcı zinciri ile hibridize olabilirler. Bu nedenle ortamdaki tek iplikli DNA veya RNA molekülü, numunede bulunan tamamlayıcı zincirini tanıyarak onunla hibridize olur. Nükleik asitlerin gen probu özelliğinden biyosensör teknolojisinde de faydalanılır (Rajendran vd., 2002).

Son zamanlarda, aptamerler biyosensörlerde biyokomponent olarak kullanılmaktadır. Aptamerler, spesifik dizi veya moleküllere bağlanabilen peptidler veya DNA-RNA parçalarıdır. Çoğu zaman rastgele olarak organize edilmiş diziliş havuzlarından seçilirler. Aptamerler, proteinler ve küçük moleküller gibi hedeflerini yüksek afinitiyile bağlama kabiliyetine sahiptir (Tombelli vd., 2005).

Nükleik asit temelli impedimetrik biyosensörlerde, hedef molekül bir DNA ise onun tamamlayıcı baz dizisi; protein, zehir, ilaç gibi bir molekül ise ona özgü sentezlenen aptamer elektrot yüzeyine çeşitli immobilizasyon teknikleri ile bağlanır (Kafka vd., 2008).

#### **2.4.4. Hücre ve mikroorganizma temelli impedimetrik biyosensörler**

Hücre temelli analizlerin kullanımında, maddelerin biyolojik etkilerini geniş bir alanda gözlemlemek ve spesifik analitlerin analizini yapmak için son zamanlarda hızlı bir artış vardır. Herhangi bir hücre ya da mikroorganizma analizinde, tüm biyolojik sistemin cevabını rapor edebilecek parametrelere ihtiyaç vardır. İmpedans bu parametrelerden biridir; çünkü potansiyel ilaçlardan alınan yanıt, yüzeydeki hücre adezyonu, metabolik aktivite ve sitotoksite testlerinin indirekt analizinde kullanılabilir (Hug 2003; Yotter ve Wilson 2004).

İmpedans, yüzeydeki sabit hücreler hakkında bilgi verdiği gibi aynı zamanda çözeltideki hücrelerin sayısını belirlemek için de kullanılır. Bu yöntemin yoğun bir şekilde, mikrobiyolojide bakterilerin tanımlanmasında ve sayımında kullanıldığı rapor edilmiştir. İmpedans ayrıca, bakteriyofajlar, antikolar ve spesifik bakteriyal hücreler için de kullanılabilir. İmpedimetrik analiz lösemi hücrelerinin belirlenmesinde de kullanılmıştır (Jonsson vd., 2006; Yang ve Li, 2006; Maalouf vd., 2007).

#### **2.5. Biyokomponentlerin İmmobilizasyonu**

Biyosensör düzeneği, bir sinyal dönüştürücünün yüzeyine sıkıca bağlı bir biyokimyasal elemanı içerir. İmmobilizasyon prosedürü, biyokimyasal bileşenin çözünmez hale getirilmesi ve uygun bir arayüz (katı destek veya dönüştürücü yüzey) üzerinde yapılması işlemini içerir. İmmobilizasyon biyosensör gelişiminin önemli bir aşamasıdır (Evtugyn, 2014). Biyolojik olarak aktif maddelerin immobilizasyonu için teknikler, hem fiziksel hem kimyasal yöntemler hem de bunların kombinasyonlarını

içerir. Ana fiziksel yöntemler suda çözünmeyen taşıyıcılara adsorpsiyon ve suda çözünmeyen polimerik jellerde tutulmasıdır. Kimyasal immobilizasyon, modifiye edilmiş taşıyıcılara kovalent bağlanma veya biyomoleküllerin intermoleküler çapraz bağlanmasıyla gerçekleştirilir (Schelfer ve Schubert, 1992).

### **2.5.1. Adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon**

Suda çözünmeyen taşıyıcılar üzerine biyomoleküllerin adsorpsiyonu, en basit immobilizasyon yöntemidir. Biyomoleküllerin sulu bir çözeltisi, belirli bir süre boyunca aktif taşıyıcı malzeme ile temas ettirilir. Daha sonra adsorbe edilmeyen moleküller yıkanarak uzaklaştırılır. Aktif madde olarak anyonik ve katyonik iyon değişimi reçineleri, aktif odun kömürü, silika jel, kil, alüminyum oksit, gözenekli cam ve seramikler kullanılmaktadır. Taşıyıcı, biyomolekül için yüksek afinite ve kapasite sergilemelidir ve adsorbe edilmiş durumda aktif kalmalıdır. Taşıyıcı, hem reaksiyon ürünlerini hem de biyokatalizörün inhibitörlerini adsorbe etmemelidir. Prosedürün basitliğine ek olarak, adsorptif immobilizasyonun avantajı, enzim veya hücre fonksiyonlarını potansiyel olarak bozan fizyolojik olmayan bağlama koşullarına veya kimyasallara ihtiyaç duymamasıdır. Bu nedenle bir aktivite kaybı nadiren görülür (Schelfer ve Schubert, 1992).

### **2.5.2. Tutuklamayöntemiyle immobilizasyon**

Tutuklama yöntemi, biyomoleküllerin reaksiyon karışımından yayılmasını önler. Öte yandan, küçük substrat ve efektör moleküller kolaylıkla nüfuz edebilir. Jelde tutuklama, adsorpsiyon kadar ılımlı bir prosedürdür, çünkü biyomoleküller matrise, membrana veya birbirine kovalent olarak bağlı değildir. Bu nedenle yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanılan en önemli matriksler, aljinat, karagenan, kollajen, selüloz triasetat, poliakrilamid, jelatin, agar, silikon kauçuk, poli(vinilalkol) ve su eklenmesiyle (örneğin poliüretanlar) veya ışık ile çapraz bağlanan prepolimerlerdir (Schelfer ve Schubert, 1992).

### **2.5.3. Çapraz bağlama yöntemiyle immobilizasyon**

Çapraz bağlamanın avantajları, basit prosedüre sahip olması ve biyomoleküllerin güçlü kimyasal bağlanmasıdır. Temel dezavantaj, proteinin katalitik olarak temel

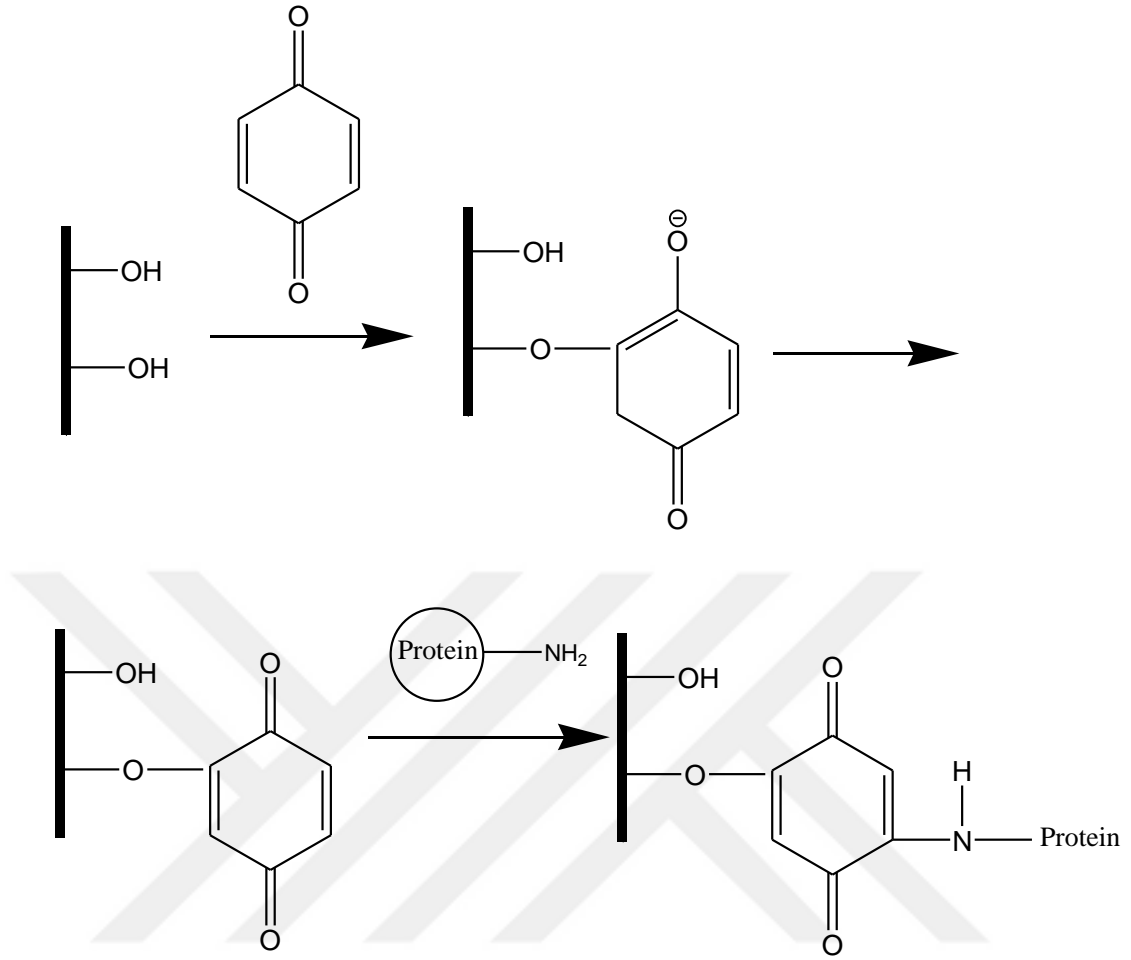
bölgelerinin kimyasal değişimi nedeniyle aktivite kayıpları olasılığıdır. Çapraz bağlamada glutaraldehit, p-benzokinon, bis-izosiyanat türevleri ve bis-diazobenzidin bifonksiyonel reaktifleri kullanılmaktadır (Schelfer ve Schubert, 1992).

### **p-benzokinon ile çapraz bağlama**

p-benzokinon, keskin, tahriş edici bir kokusu olan sarımsı renkli kristal bir katıdır. Yutulması veya buharların solunması ile zehirlidir. Cilde, gözlere ve mukoza zarlarına ciddi şekilde zarar verebilir. Boya yapımında foto kimyasal olarak kullanılır (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

p-benzokinonun primer aminler ile kolaylıkla reaksiyona girdiği bilinmektedir. Amin molekülü öncelikle p-benzokinonun 2. konumuna, sonraki amin molekülü ise 5. konumuna katılmaktadır. Şekil 2.7’de p-benzokinonun –OH ucu olan bir yüzeyle ile sonrasında da bir amin grubuyla olan çapraz bağlanma reaksiyonu verilmiştir (Morrison vd., 1969)

Wang vd., 2011’de çapraz bağlama tekniğinde kullanılan p-benzokinon ile lipaz CLEA’larının (çapraz bağlı enzim agregatları) termo-stabilitesinde belirgin bir iyileşme sağlayan çalışma yapmışlardır. Lipaz CLEA’ları, BSA makromolekülleriyle p-benzokinonun çapraz bağlayıcı olarak kullanılmasıyla hazırlandı. Çalışmalarında serbest lipaz 50° C’de 96 saat ısıtıldıktan sonra neredeyse katalitik aktivitesini kaybederken, çapraz bağlama maddesi olarak glutaraldehid kullanıldığında lipaz CLEA’larının başlangıç aktivitesinin sadece % 15.1 olduğu, çapraz bağlama maddesi olarak p-benzokinon kullanıldığında ise lipaz CLEA’larının aktivitesinin 50 °C’de 96 saat ısıtmadan sonra % 75.18 olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir. p-benzokinonun sağladığı aktivite çapraz bağlama maddesi olarak glutaraldehit ile karşılaştırıldığında lipaz CLEA’larında yaklaşık 5.01 kat daha yüksek olduğu görülmüştür.



Şekil 2.7. p-benzokinonun çapraz bağlama reaksiyonu (Morrison vd., 1969)

#### 2.5.4. Kovalent bağlama yöntemiyle immobilizasyon

Bir kovalent bağlanmanın olması için biyomolekülün kimyasal olarak reaktif bölgeleri (-COOH, -SH, -OH, -NH<sub>2</sub>, -C=O vb.) olması gerekir. Bu reaktif bölgeler proteinleri oluşturan amino asitlerin yan zincirlerindeki fonksiyonel gruplardır, örneğin aspartat ve glutamatta -COOH, sisteinde -SH, serin, treonin, tirozinde -OH, lizin ve arjininde -NH<sub>2</sub> grupları seçilen immobilizasyon desteğinin fonksiyonel gruplarıyla kimyasal reaksiyona girer ve kovalent bağlar oluşur (Telefoncu, 1997). İmmobilizasyon ortamının koşulları (örneğin reaksiyon ortamının sıcaklığı, asitlik-bazlığı, iyonik şiddeti) bu kimyasal reaksiyonun başarısına etki eder ve başarılı bir bağlanma biyokomponenti bu koşullara daha dirençli hale getirebilir. Stabil ve dayanıklı biyosensör eldesinde kovalent bağlama en etkin tekniklerden biridir (Bain vd., 1989). Ancak bu bağlanmanın biyokomponentin aktif bölgelerinden olması halinde ve protein

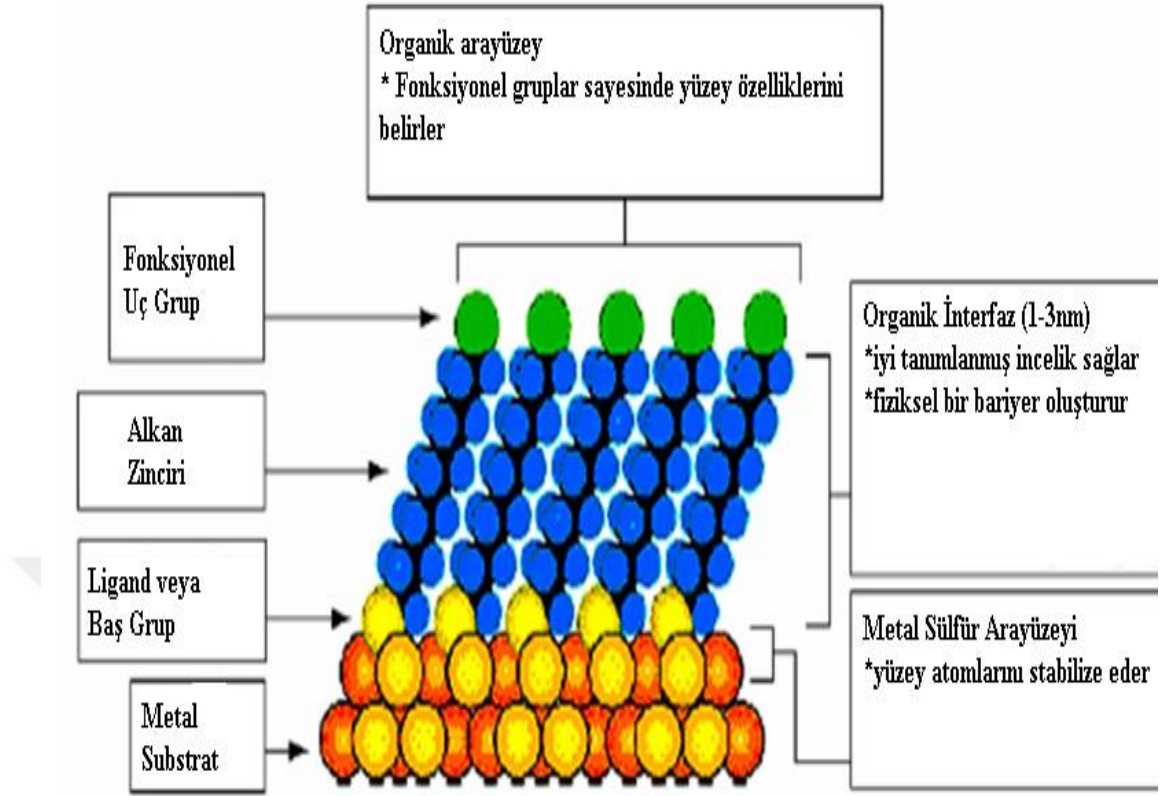
katlanmasının oluşturabileceği sterik engellemeler bu tekniğin uygulamalarında dikkat edilmesi gereken parametrelerdir.

### **Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) yöntemiyle enzim immobilizasyonu:**

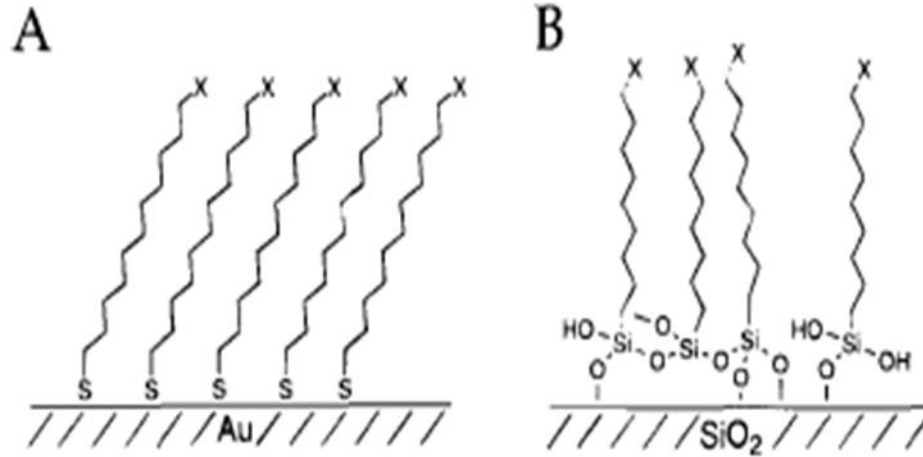
Altın, bakır, gümüş, nikel ve platin gibi bir metal yüzeyle SAM oluşturmak üzere kullanılan organik molekülün fonksiyonel baş grubu arasında kuvvetli kemisorbsiyonla dayanıklı SAM'ler oluşturulmaktadır (Bain vd., 1989). İyi düzenlenmiş ve metal yüzeyinde sıkıca paketlenmiş tek tabakalar Van der Waals etkileşimleri ve alkil zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşimler sonucu oluşur. Biyosensörlerde oluşturulan SAM'ler, elektrot yüzeyi ile elektrodun daldırıldığı çözeltildeki elektron alışverişi yönünden aktif türler arasında oluşacak elektron aktarımlarında kinetik bir bariyer görevi görür (Wink vd., 1997). Şekil 2.8'de bir SAM modeli ve SAM'lerin bazı önemli özellikleri görülmektedir. SAM yığınlarının düzenlenmesi ve paketlenmesinde etkin parametrelerden bazıları; SAM oluşturmak için kullanılan organik maddenin kimyası, adsorbanın tutunma süresi, çözücü, adsorbanın kimyası, morfolojisi ve miktarı, sıcaklıktır (Chaki ve Vijayamohanan, 2002).

SAM prosesi maddenin özel metal yüzeyde kendiliğinden organize olmasıdır ve biyosensörler farklı maddelerle, biyoçipler ve mikroçipler geliştirmekte çok sık kullanılmaktadır (Engtrakul, 2001). SAM oluşturmak üzere adsorban-substrat ikilisi olarak sıklıkla kullanılanlar; altın, gümüş, bakır, platin ve nikel gibi metal yüzeylerle tiyolat veya sülfür molekülleri ve Al/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SiO<sub>2</sub>, PtO, TiO<sub>2</sub> ve ZrO<sub>2</sub> gibi metal oksit yüzeyleriyle alkan silan molekülleri kullanılır (Chen ve Jinghong, 2006):

Şekil 2.9'da bu adsorban-substrat ikilileriyle SAM oluşumu şematize edilmiştir.



Şekil 2.8. SAM'in şematik gösterimi (Chen ve Jinghong, 2006)

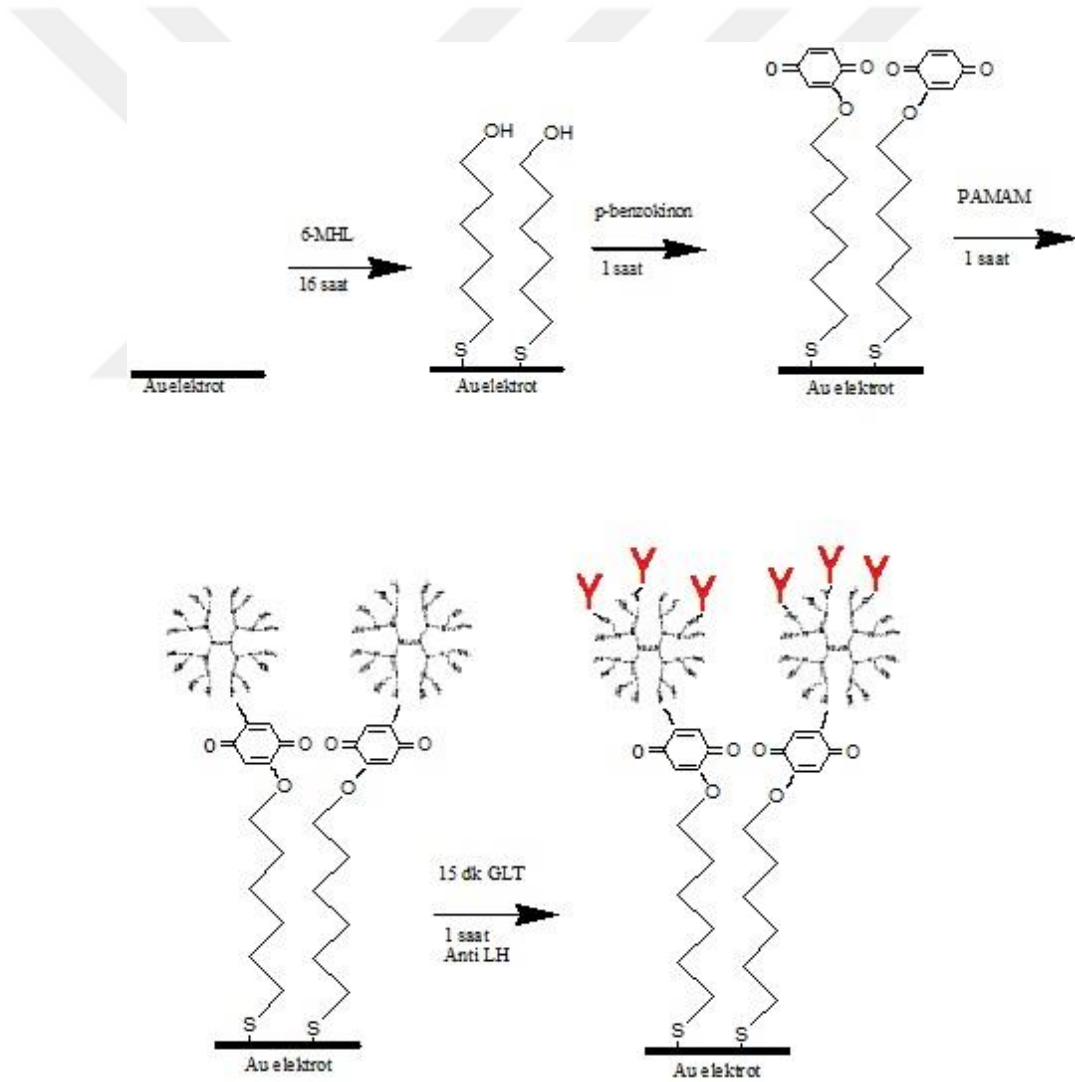


Şekil 2.9. SAM oluşumunda kullanılan adsorban-substrat ikilileri (A) Altın yüzeyle alkan tiyoller ve (B) Hidroksillenmiş yüzeyde alkil siloksanlar (Chaki ve Vijayamohan, 2002).

SAM kullanılmasının biyomoleküllerin immobilizasyonu için alt yapı olarak pek çok avantajı vardır. Düzenli ve stabil tek tabakanın oluşumu kolaydır. Biyomoleküllerin immobilizasyonu için uygun yüzey sağlarlar. SAM'deki baş grupları çeşitli fonksiyonel uçların dizaynı için esneklik sağlar. SAM üzerinde immobilizasyon için çok az miktarda biyomolekül dahi yeterlidir (Chaki ve Vijayamohanan, 2002).

## 2.6. LH biyosensörünün dizaynı

Bu tez kapsamında altın elektrot yüzeyine 6-merkaptohexanol (6-MHL)+p-benzokinon +PAMAM+glutaraldehit+ Anti-LH şeklinde bir biyosensör tasarlanmıştır. Hazırlanan LH biyosensörünün şematik gösterimi Şekil 2.10'da verilmiştir.



**Şekil 2.10.** Bu tez kapsamında üretilen LH biyosensörünün üretim basamaklarının şematik gösterimi

Bu çalışma ile, bir biyosensör geliştirirken SAM tabaka üzerinde biyolojik molekölü immobilize etmek üzere p-benzokinon ilk kez çapraz bağlayıcı olarak kullanılmış olup bu immobilizasyon yöntemi kullanılarak bir LH biyosensörü tasarlanmıştır.

Eldin vd., 2011 yılında glukoamilaz enziminin p-benzokinonla aktive edilmiş aljinat tanecikleri üzerine immobilize etmişlerdir. Tekniği yeni afinite kovalent immobilizasyon tekniği olarak tanımlamışlar, çalışmada p-benzokinon konsantrasyonunu 10 mM olarak kullanmışlardır.

Wang vd., 2011 yılında moleküller arası çapraz bağların lipazın termo stabilitesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında p-benzokinon kullanmışlardır. Çalışmadaki p-benzokinon konsantrasyonu 5 mM'dır.

Liu vd., 2015 yılında yeni manyetik çapraz bağlı lipaz agregatları hazırlamışlardır. Bu amaçla p-benzokinon kullanarak yüksek sayıda amin terminal grublu manyetik parçacıklar üzerine enzimi immobilize etmişlerdir. Çalışmada p-benzokinon konsantrasyonu 5 mM olarak kullanılmıştır.

Bu tez kapsamında anti-LH antikorunu SAM yüzeyine immobilize etmek üzere planlanan stratejide çapraz bağlayıcı olarak ilk kez seçilen p-benzokinon konsantrasyonu en yüksek biyosensör cevabının belirlendiği 25 mM olarak optimize edilmiştir.

## **2.7. Literatürde LH Biyosensörleri**

1995 yılında Pritchard vd., tarafından FSH ve LH hormonlarını birlikte tayin edebilecek bir immünosensör yapılmıştır. N-asetil sistein ile altın elektrot yüzeyine SAM tabakalar oluşturularak EDC ile aktive edilmiş ve yüzeye avidin bağlanmıştır. Biotin moleküllerinin avidine olan yüksek afinitesinden yararlanarak fotobiyotin çözeltisinde bekletilen biyosensörün yüzeyi monoklonal FSH ile kaplanmıştır. FSH sensörleri için 100 W HB-10101AF süper yüksek basınçlı civa buharı lambasına maruz bırakılarak Anti-FSH'ların bağlanması gerçekleştirilmiştir. Elektrot yüzeyi yıkandıktan sonra bu kez monoklonal Anti-LH ile kaplanmış ve aynı lambayla ışığa maruz bırakılarak FSH ve LH ölçen multi analit immünosensörü inşa edilmiştir. LH ve FSH'nin kantitatif ölçümleri 1-100 U/L aralığında ELISA temelli olarak ölçülmüştür. Bu amaçla elektrot yüzeyine HRP işaretli Anti-FSH ile muamele edildikten sonra

kromoamperometri yöntemiyle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ferrosen- monokarboksilik asit ve KCl içeren çözeltide Ag/AgCl elektroda karşı biyosensör cevapları alınmıştır. Tayin sınırı FSH için 2.1 U/L, LH için 1.8 U/L olarak belirlenmiştir (Pritchard vd., 1995).

2001 yılında Lilie vd., tarafından elektrokimyasal impedans spektroskopine dayanan bir LH biyoafinite reaktif sensör dizayn edilmiştir ve polipirol filmler kullanılarak vücut sıvılarında düşük miktarda bulunan biyolojik moleküllerin tayininde kullanılmasına ait bir model oluşturulmuştur. Bu amaçla; SDS içeren ortamda IDE (interdigital elektrot) elektrodunun yüzeyi polipirol ile elektropolimerizasyon yöntemiyle kaplanmıştır. Üzerine avidin ve Anti-LH bağlanmaları yapılarak LH biyosensörü inşa edilmiştir. LH ölçümleri 1-800 U/L aralığında yapıldı. Polipirol filmler ile üretilen bu biyosensörün ölçüm kabiliyeti biyotin ve biyotin türevleri ile avidin proteinine karşı hassastır. LH'nin klinik değeri olan 1-10 U/L aralığında biyosensörün hassas cevaplar verdiği belirlenmiştir (Lilie vd., 2001).

2006 yılında Boozer vd., DNA-yönlendirilmiş immobilizasyon yöntemiyle LH, FSH ve hCG gonadotropinlerini SPR ile eş zamanlı analiz edebilecek protein çipleri yapmışlardır. Bu amaçla öncelikle SPR çipleri oligo etilenglikol tiyol ile kovalent bağlanarak her bir hormon için farklı SS DNA/oligoetilen glikol SAM'leri oluşturmuşlardır. SPR çiplerinde kullanılan DNA zincirlerinin tamamlayıcı zinciriyle modifiye edilmiş Anti-LH, Anti-FSH ve Anti-hCG monoklonal molekülleri önceden hazırlanmış SPR çipleriyle muamele edilerek multi-hormon analizlerinde kullanılacak şekilde hazırlamışlardır. Değişen yüksek FSH, LH ve hCG konsantrasyonlarında farklı zamanlarda ölçüm alınmış, en iyi sonuçlar 0.1 ng/mL ile hCG hormonu için belirlenmiştir (Boozer vd., 2006).

2009 yılında Trevino vd., hipofiz bezi hormonu TSH (tiroid uyarıcı hormon), hGH (insan büyüme hormon), FSH (folikül uyarıcı hormon), LH (luteinleştirici hormon) tayininde kullanmak üzere SPR altın çipleri merkaptoundekanoik asit ile alkan diol SAM'leri oluşturulmuştur. Ardından uç grubun EDC-NHS ile aktivasyonu yapılmış ve sonrasında seçilen hormon immobilize edilmiştir. Daha sonra da reaksiyola SAM uçları etanol aminle deaktive edilmiştir. Son olarak yüzeyde kalan non-kovalent bağlı biyomoleküller HCl ile uzaklaştırılmıştır. İdrarda yapılan LH denemelerinde 10<sup>-4</sup> µg/mL-100 µg/mL FSH ve LH hormonları için çalışılmıştır. Biyosensörün çalışma aralığı 17-123 ng/mL olarak belirlenmiştir (Trevino vd., 2009).

2009 yılında Trevino vd. başka bir çalışmada aynı SPR immüno-sensör ile idrarda gonadotropinlerin (LH ve FSH) tekli ve çoklu tayinlerini yapmışlardır. En düşük tayin limitlerini LH için 8 mIU/mL, FSH için 14 mIU/mL olarak belirlemişlerdir. Analizin güvenilirliği <math><6\%</math>, çipten çipe değişkenlik <math><5\%</math>, geri kazanım % 80-120 aralığında belirlenmiştir. Aynı biyosensörle 100'den fazla ölçüm yapılmış ve tekrarlanabilir sonuçlar bulunmuştur (Trevino vd., 2009).

2012 yılında Zambre vd.. koyunların yapay dölleniş işleminde doğru yumurtlama zamanının tespitinde kullanılmak üzere koyun LH tayini için koyunların yaşam alanlarında kullanılabilecek “altın nanopartikül (AuNP)-peptit konjugat” stratejisi ile altın nanosensör üretmişlerdir. Altın nanopartiküllerle konjugat hazırlamak üzere LH hormonu peptidini (LHP) BLAST ve Clustal W analizi ile belirlemişler ve karakterize etmişlerdir. Sentezlenen LHP'nin Anti-LH'a afinitesi ELISA tekniğı ile belirlenmiştir. Altın nanosensörler kullanılarak LH miktar tayinleri, Anti-LH ile önceden kaplanmış olan nitroselüloz membranların AuNP-LHP ve analiz örneğine (LH) daldırarak gerçekleştirilmiştir. LH yokluğunda membran kırmızıyken LH varlığında LH ve Anti-LH arasındaki etkileşim nedeniyle hiçbir renk gözlenmemiştir. Minimum 50 ppm konsantrasyona kadar LH tayini yapabilen bu sensörün yüksek derecede yeniden üretilebilirlik ve seçiciliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Zambre vd., 2012).

2015 yılında Mazina vd. canlı hücrelerde LH ve hCG konsantrasyonlarını belirlemek için bu hormonların reseptörlerinin aktivasyonunu incelemek üzere FRET temelli bir cAMP biyosensörü geliştirmiştir. Bu biyosensörün canlı hücrelerde çalışan reseptör aracılığı ile cAMP miktarını ölçerek sinyal iletiminin ve gonadotropinlerin biyolojik aktiviteleri ile bunların izoformlarının karakterizasyonu analizinde kullanılabileceğı bildirilmiştir (Mazina vd., 2015).

2017 yılında Mazina vd. yine benzer bir stratejiyle FRET tekniğı ile cAMP ölçen biyosensör ile hCG ve FSH miktar analizinde kullanılabilecek yeni bir biyosensör inşa etmişlerdir (Mazina vd., 2017).

2016 yılında Güler yüksek lisans çalışmasında elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) temelli bir LH immüno-sensörü geliştirmiştir. Altın yüzey üzerinde 12-merkaptododekanolik asit (12-MDDA) ile SAM oluşturduktan sonra EDC/NHS ile aktifleştirilen SAM'i PAMAM ile reaksiyona sokmuştur. Anti-LH ile çapraz bağlama

yapmak için glutaraldehit kullanarak 1-60 mIU/mL aralığında ölçüm yapabilen bir biyosensör tasarlamıştır (Güler, 2015).



## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan Luteinleştirici Hormon ( Luteinizing Hormone from human pituitary  $\geq 8500$  IU/mg) ile bu hormona özgü sentezlenmiş antikor olan Anti-LH (Monoclonal Anti-LH, antibody produced in Mouse), poliamido amin (PAMAM dendrimeri, generation 2.0), glutaraldehit (% 25), potasyum ferrisiyanat, potasyum ferrosiyanat ve yapay serum Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)'den temin edildi. KCl,  $K_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$ , Etanol ( %99.9) Merck KGaA (Darmstadt, Almanya)'dan temin edildi.

Kullanılan tüm sarf malzemeler analitik saflıktadır. İmmobilizasyon aşamasında kullanılan tüm çözeltiler, deneyler esnasında taze olarak hazırlanmış ve tüketilmiştir. Hormon ve antikorlar istenilen konsantrasyonlarda porsiyonlara ayrılarak  $-20^\circ C$ 'de saklanmıştır.

##### 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Biyosensör analizleri Gamry Potentiostat/Galvanostat Reference 600 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazında yapıldı. Cihaz Echem Analyst (Gamry Instruments, Warminster, USA) yazılımı içermektedir ve bir bilgisayarla bağlantılı olarak kullanılmıştır.

Biyosensör hazırlık işlemleri ve ölçümleri için ultrasonik su banyosu (Wise Clean DAIHAN, WUC-AO3H, Kore), hassas terazi (Precisa XB 220A, Precisa Gravimetrics

AG/Switzerland), mikropipetler (Eppendorff), manyetik karıştırıcı (Biosan magnetic stirrer MSH 300), pH metre (6173 pH, made in China for USA) kullanıldı.

### 3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

**50 mM fosfat tamponu:** Destile su ile 500 ml'ye tamamlanan 3.549 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  vedestile su ile 500 ml'ye tamamlanan 3.4015 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  stok çözeltiler belirli oranlarda karıştırılarak istenen pH'larda tampon çözeltiler elde edildi.

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

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

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

**10 mM 6-Merkaptoheksanol:** 500 mM'lık ana stoktan 260  $\mu\text{L}$  alınarak, etanol ile (% 99'luk) 13 mL'ye tamamlanır.

**25 mM p-benzokinon:** 2.7 mg p-benzokinon tartılıp 1 mL absolut etanolde çözülür.

**% 1.5'luk PAMAM:** Ana stoktan (% 20) 8  $\mu\text{L}$  çekilip 100  $\mu\text{L}$ 'ye 50 mM pH:7.0 fosfat tamponu ile tamamlanır.

**% 0.25'lik Glutaraldehit:** % 25'lik çözeltisinden 2  $\mu\text{L}$  alınarak, fosfat tamponu ile 200  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Elektrot Temizliği

Biyosensör çalışmasında BASi, Warwickshire, UK firmasından satın alınan üç elektrod kullanıldı: Çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrot. Çalışma elektrodu  $2.01\text{mm}^2$  yüzey alanına sahip altın elektrottur. Referans elektrot ise KCl ile doymun 3 M Ag/AgCl elektrodudur. 10 mm uzunluğunda platin tel yardımcı karşıt elektrot olarak kullanılmıştır.

Her çalışma öncesinde ve sonrasında çalışma elektrodu yani Au elektrot fiziksel ve kimyasal olarak temizlendi. Temizlik aşamaları aşağıda verildiği gibi uygulandı:

1. Bir spatül ucu Gamma alümina tozu (Aluminyum oksit) kadife bir yüzeye alındı. Üzerine birkaç damla bidistile su pipetlenerek alümina pelte kıvamına gelene kadar karıştırıldı. Au elektrot bu pelte kıvamındaki alümina üzerinde aynı yönlü olmak üzere yavaş bir şekilde temas ettirildi. Elektrot yüzeyinde tabaka ve/veya başka bir kirlilik varsa mekanik olarak temizlendi.

2. Ardından, elektrot yüzeti bidistile suyla iyice yıkandı. Yüzeyde kalan adsorblanmış partikülleri uzaklaştırmak için sonikatörde 10 dakika etanolle (% 99.9) temizlendi. Ultra saf suyla iyice yıkanarak yüzey saf argon gazı ile kurutuldu.

### 3.2.2. Biyosensörün Çalışma Prensibi ve Ölçüm Sistemi

Bu çalışmada LH biyosensörü inşa etmek üzere uygulanan tüm immobilizasyon basamaklarının sonrasında döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektrokopisi (EIS) kullanıldı. Her iki parametrenin analizleri 0.1 M KCl içeren ve ölçümlerde redoks probu görevi yapan 5.0 mM  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  (1:1) çözeltisinde yürütüldü. CV alırken potansiyel 0.5 ve -0.1 V arasında, adım büyüklüğü 1 mV, tarama hızı 50 mV/s olarak belirlendi. EIS analizleri ise 10 mV alternatif akımda yapıldı. İmpedans spektrumları 50.000-0.05 Hz aralığında alındı.

Anti-LH monoklonal antikorunun elektrot yüzeyine immobilizasyonu işlemi ile başarılıktan sonra LH hormonunun elektrot yüzeyine ilave ederek LH ölçümleri yapıldı. Bu amaçla, standart LH konsantrasyonu olarak belirlenen 10 mIU/mL içeren 5  $\mu$ L'lik LH porsiyonları elektrot yüzeyine her bir LH konsantrasyonu için pipetlendi. Belirlenen optimum inkübasyon periyodundan sonra elektrot yüzeyindeki anti-LH ile bağlanmayan LH hormonlarını uzaklaştırmak amacıyla yüzey ultra saf su ile yıkandı, bağlanma derecesini belirlemek üzere ardından  $Fe(CN)_6^{4-/3-}$  redoks probu çözeltisi içeren reaksiyon hücresinde CV ve EIS ölçümleri yapıldı. Her CV ve EIS ölçümleri öncesi ve sonrasında elektrotlar ultra saf su ile yıkanıp, argon gazı ile kurutuldu.

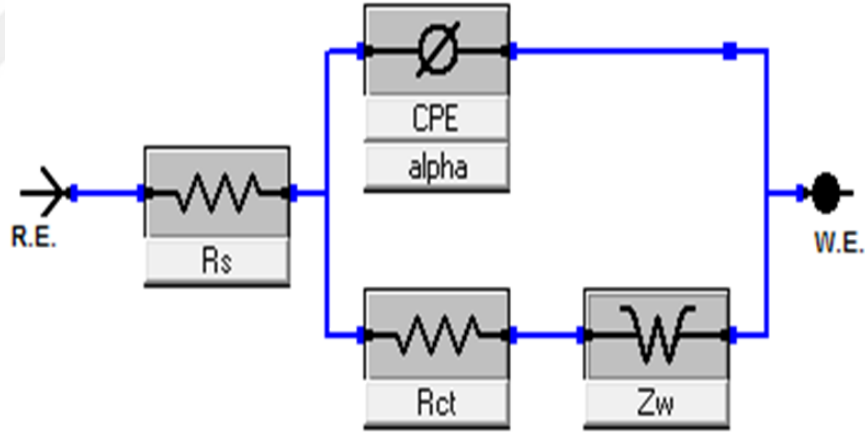
### 3.2.3. Hesaplama Yöntemi

Gamry Potentiostat/Galvanostat cihazı kullanılarak immobilizasyon basamaklarının kontrolü ve LH tayininin gerçekleştirilmesinde impedans yöntemi kullanıldı. İmpedans alternatif akıma karşı direnç olarak tanımlanabilir. Bu nedenle ölçümler sonrasında elde edilen Nyquist eğrileri aynı cihaz aracılığı ile bir eş-değer

devre aracılığı ile anlamlı sayısal değerlere dönüştürüldü. Bu dönüşüm; Gamry Potentiostat/Galvanostat cihazının Gamry Analyst® yazılımı aracılığı ile aşağıda kısaca sunulmaya çalışılan bilgiler ışığında yapılmaktadır.

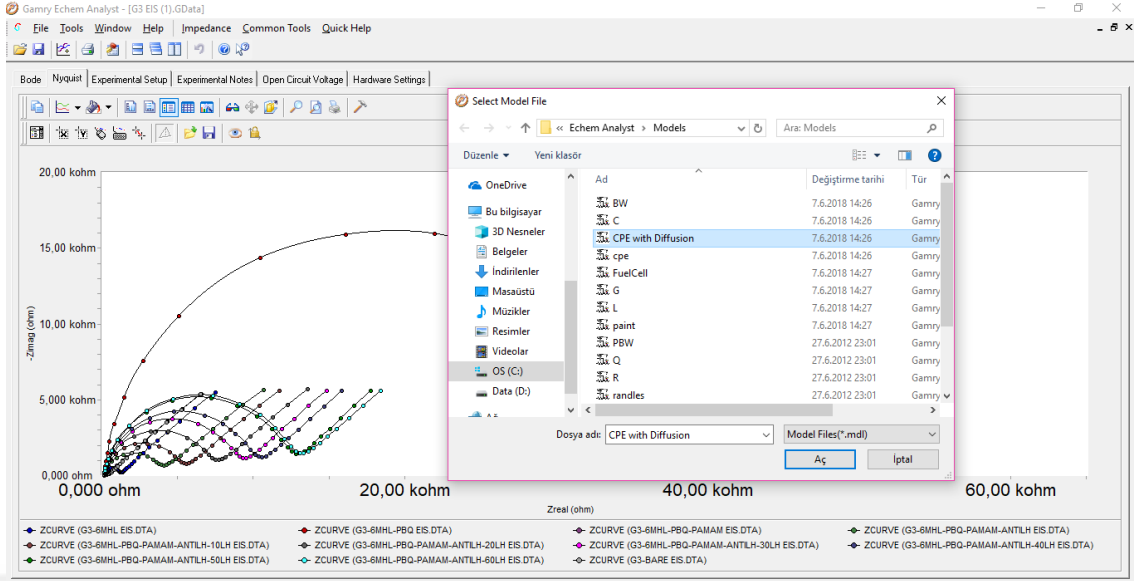
Hesaplanacak sayısal değerler “yük transfer direnci ( $R_{ct}$ )” olarak ifade edildi.  $R_{ct}$  yaklaşık olarak Nyquist eğrisinin çap değerine karşılık gelen elektrot yüzey alanı olarak tanımlanır. Yapılan çalışmalar ve literatür, elektrot yüzeyindeki madde miktarı arttıkça  $R_{ct}$  değerinin arttığını yani madde miktarı ile  $R_{ct}$  arasında doğru orantılı bir ilişki bulunduğunu bildirilmektedir (Pritchard vd., 1995).

Bu çalışmada Gamry Analyst® yazılımı ile elektrot yüzeyine uygun eşdeğer devre modeli çizilmiş ve ölçümlerde elde edilen Nyquist eğrilerinin sayısal değerlere dönüştürülmesi sağlanmıştır. Bu devre örneği Şekil 3.1 olarak aşağıda verilmiştir. Bu devrede, çözelti direnci  $R_s$  ile, Warburg İmpedansı  $Z_w$  ile, sabit faz elemanı kapasitansı CPE-alpha ile, yük transfer direncini  $R_{ct}$  ile ifade edilmiştir.



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

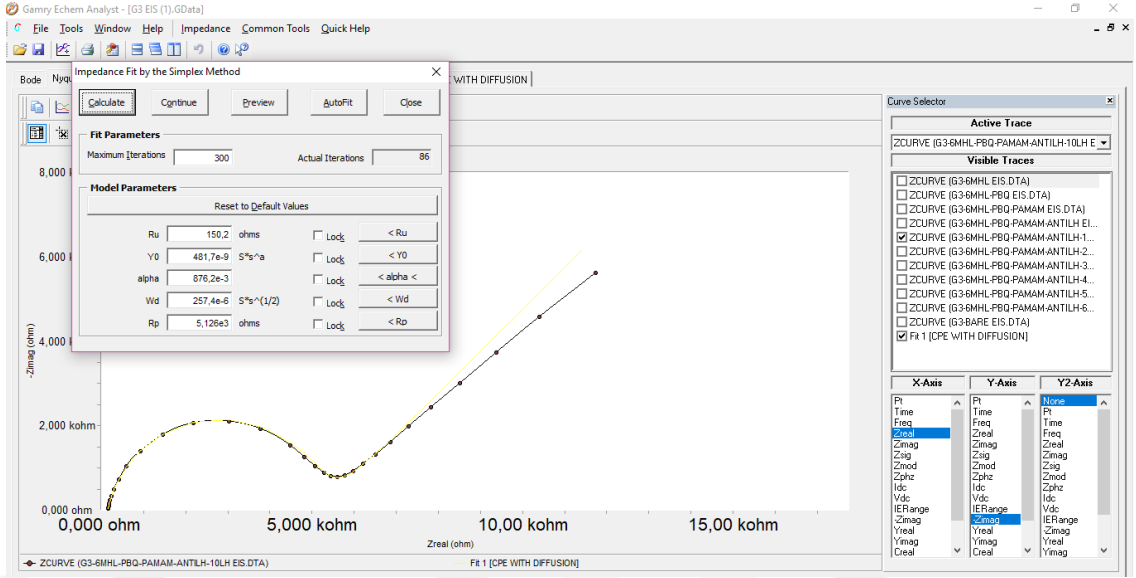
Yük transfer direnci ( $R_{ct}$ ) hesaplanırken;  $R_{ct}$  değeri hesaplanacak olan Nyquist diyagramı Gamry Analyst® yazılımında açıldıktan sonra üst menüdeki impedans sekmesinden “Fit A Model (Simplex Method)” seçildi. Ardından “CPE with Diffusion” devresi seçildi (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** Gamry Analyst® yazılımındaki hesaplama yapılabilen devre modelleri

Sonrasında açılan hesaplama ekranındaki değerlerini sıfırlamak üzere “reset to default values” düğmesine basıldı (Şekil 3.3). Ardından aynı ekran üzerinde bulunan “calculate” tuşuna basılarak hesaplama yapıldı. Rakamsal değer sabitlenene kadar “calculate” tuşuna basıldı.  $R_{ct}$ 'ye karşılık gelen  $R_p$  değerleri her bir biyosensör ölçümünde elde edilen Nyquist eğrisi için kaydedildi.

Yüzeye bağlanan madde miktarı ile  $R_p$  veya  $R_{ct}$  arasındaki orantı varlığı mantığından yararlanarak hesaplanan bu  $R_p$  değerleri tüm kantitatif tayinlerde kullanıldı (Pritchard vd., 1995).



Şekil 3.3. Gamry Analyst® yazılımındaki hesaplama ekranı

### 3.2.4. Luteinleştirici Hormon Tayinine Yönelik Biyosensörün Hazırlanışı

Altın elektrot yüzeyinde SAM oluşturmak üzere temizlenmiş altın elektrot % 99'lük etanolde 10 mM konsantrasyonda hazırlanmış 6-MHL çözeltisine daldırıldı ve 16 saat bekletildi. Oluşan SAM tabakanın üzerine PAMAM ile çapraz bağlama yapmak için 50 mM pH:7.0 fosfat tamponunda hazırlanmış 25 mM p-benzokinon çözeltisinden 10 µL damlatılıp 60 dakika karanlık ortamda bekletildi. p-benzokinon üzerine 50 mM pH:7.0 fosfat tamponunda hazırlanmış % 1.5'lük PAMAM çözeltisinden 10 µL eklenip 60 dakika karanlık ortamda bekletildi. PAMAM ile aktif kol sayısı artırılarak elektrot yüzeyinde çapraz bağlama yapmak amacıyla 50 mM pH:7.0 fosfat tamponunda hazırlanmış % 0.25'lik glutaraldehit çözeltisinden 10 µL damlatılıp karanlık ortamda 15 dakika bekletildi. Son olarak 10 µg/mL Anti-LH antikorunun 5 µL'lik porsiyonu elektrot yüzeyine damlatıldı ve 60 dakika karanlık ortamda bekletildi.

### 3.2.5. Luteinleştirici Hormon Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonu

#### 3.2.5.1. 6-MHL konsantrasyonunun optimizasyonu

Elektrotun yüzeyinde tek tip, dayanıklı ve kararlı SAM (kendiliğinden oluşan tek tabakalar) oluşturmak için 6-merkaptto heksanolün optimum konsantrasyonu belirlendi.

Bunun için 6-MHL'nin **5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM ve 25 mM** olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri ile biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmada SAM oluşumunun immobilizasyona etkisini belirlerken; p-benzokinon (15 mM), PAMAM (% 1.5), glutaraldehit (% 1), Anti-LH (10 µg/mL) ve LH (10 mIU/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

### **3.2.5.2. p-benzokinon konsantrasyonunun optimizasyonu**

p-benzokinon 6-MHL'nin açıkta kalan hidroksil (-OH) ucu ile PAMAM'ın amino (-NH<sub>2</sub>) ucu arasında çapraz bağ oluşturması için kullanıldı. Bunun için p-benzokinonun **5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM**'lık konsantrasyonlarındaki çözeltileri ile biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmada p-benzokinon konsantrasyonunun immobilizasyona etkisini belirlerken; 6-MHL (10 mM), PAMAM (% 1.5), glutaraldehit (% 1), Anti-LH (10 µg/mL) ve LH (10 mIU/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

### **3.2.5.3. PAMAM konsantrasyonunun optimizasyonu**

PAMAM dendrimeri (generation 2.0) 16 tane fonksiyonel amino ucu bulunduran bir moleküldür. Sahip olduğu fiziksel ve kimyasal fonksiyonelliği daha fazla antikor ve buna bağlı olarak daha fazla hormon immobilizasyonunun gerçekleşmesini sağlamaktadır. Anti-LH immobilizasyonunun verimini arttırmak amacıyla gerekli PAMAM miktarını belirlemek için **% 0.5, % 1.0, %2.0 ve % 2.5** konsantrasyonlarında PAMAM dendrimeri çözeltileri ile biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmada PAMAM konsantrasyonunun immobilizasyona etkisini belirlerken; 6-MHL (10 mM), p-benzokinon (25 mM), glutaraldehit (% 1), Anti-LH (10 µg/mL) ve LH (10 mIU/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

### **3.2.5.4. Glutaraldehit konsantrasyonu optimizasyonu**

Glutaraldehit, antikor ile PAMAM dendrimerinin açıkta kalan amino uçları arasında çapraz bağ oluşturmak için kullanıldı. Bu durum Anti-LH immobilizasyonunun verimini arttırmaktadır. Yeterli glutaraldehit miktarını belirleyebilmek için **%0.1, %0.25, %0.50 ve %0.75** konsantrasyonlarında glutaraldehit çözeltileri ile biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmada glutaraldehit konsantrasyonunun

immobilizasyona etkisini belirlerken; 6-MHL (10 mM), p-benzokinon (25 mM), PAMAM (% 1.5), Anti-LH (10 µg/mL) ve LH (10 mIU/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

### **3.2.5.5. Anti-LH konsantrasyonu optimizasyonu**

Anti-LH tayini gerçekleştirilecek olan luteinleştirici hormona spesifik olarak bağlanan monoklonal antikordur. Duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği yüksek olan tayin sonuçları elde edebilmek için, optimize edilmiş immobilizasyon basamaklarından sonra bağlanabilirliği en uygun Anti-LH konsantrasyonunu belirleyebilmek için **5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL ve 30 µg/mL** konsantrasyonlarında hazırlanmış Anti-LH porsiyonları kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmada Anti-LH konsantrasyonunun immobilizasyona etkisini belirlerken; 6-MHL (10 mM), p-benzokinon (25 mM), PAMAM (% 1.5), glutaraldehit (% 0.25) ve LH (10 mIU/mL) konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

### **3.2.6. Luteinleştirici Hormon Tayinine Yönelik Biyosensörün İmmobilizasyon Basamaklarının Karakterizasyonu**

#### **3.2.6.1. Doğrusal tayin aralığı ve tekrar üretilebilirlik**

Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi optimize edilmiş immobilizasyon basamaklarından elde edilen sonuçlar kullanılarak [6-MHL (10 mM), p-benzokinon (25 mM), PAMAM (% 1.5), glutaraldehit (% 0.25) ve Anti-LH (10 µg/mL)] hazırlanan biyosensör ile LH (10-60 mIU/mL) için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir.

Bu optimum değerler ile hazırlanan farklı biyosensörlerle ölçümler alındı ve biyosensörün tekrar üretilebilirliği denendi.

#### **3.2.6.2. Yapay serumda uygulama**

LH hormonu ile anti-LH monoklonal antikoru arasındaki bağlanmaya ve dolayısıyla impedansa kan serum içeriğinin (örn: tuzlar, bazı proteinler) girişim yapıp yapmadığını belirlemek üzere optimize edilmiş koşullarda hazırlanmış LH biyosensörü yapay serumda hazırlanan LH hormonu (10 mIU/mL) kullanılarak ölçümler alındı. LH için yapılan seyreltmelerin tümü yapay serum çözeltisi ile yapılmıştır. Bu şekilde

optimize edilmiş şartlarda hazırlanmış biyosensör için ölçümler alınmış ve yapay serumun içeriğinin biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir.



## BÖLÜM 4

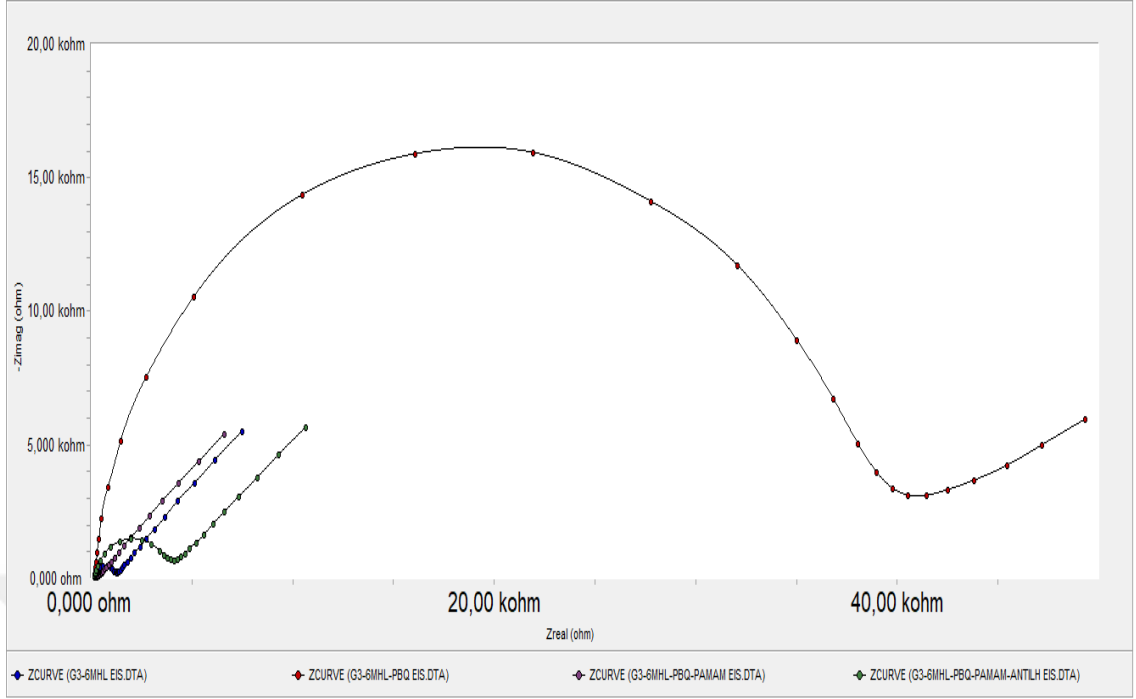
### SONUÇLAR VE TARTIŞMA

#### 4.1. LH Biyosensörü ile Elde Edilen Bulgular

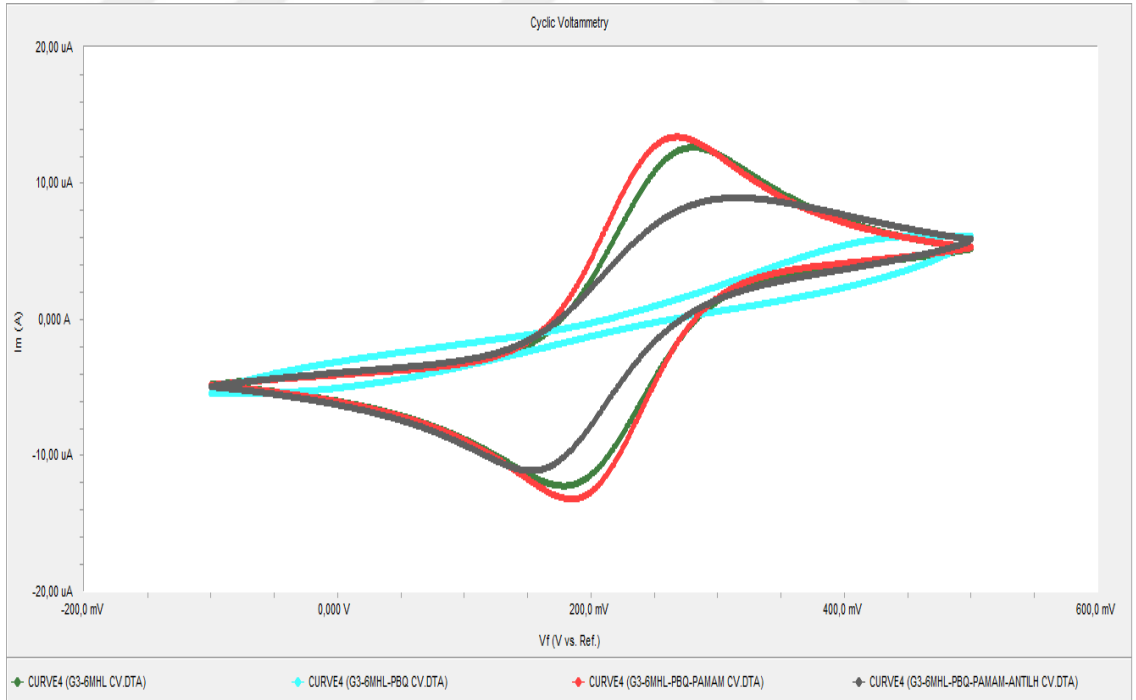
##### 4.1.1. LH Biyosensörünün Hazırlanmış Basamaklarına İlişkin Bulgular

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

1. Yalın Au elektrot yüzeyi: Au-Bare-elektrot,
2. 6-MHL ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyi: Au-6MHL,
3. p-benzokinon ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyi: Au-6MHL-p-benzokinon,
4. PAMAM bağlanmış aktif elektrot yüzeyi: Au-6MHL-p-benzokinon-PAMAM,
5. Glutaraldehit çapraz bağlama sonrası elektrot yüzeyi: Au-6MHL-p-benzokinon -PAMAM-GLT
6. Antikor bağlamasından sonra elektrot yüzeyi: Au-6MHL-p-benzokinon-PAMAM-GLT-ANTI LH olarak ifade edilmiştir.



**Şekil 4.1a.** LH biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının impedans spektrumları



**Şekil 4.1b.** LH biyosensörünün immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltamogramları

**Çizelge 4.1.** Her bir immobilizasyon basamağı için hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri

Elektrot yüzeyi	$R_{ct}$ (kohm)
<b>Au Bare</b>	0.282
<b>AU+6-MHL</b>	1.019
<b>AU+6-MHL+p-benzokinon+</b>	38.26
<b>AU+6-MHL+p-benzokinon+PAMAM</b>	0.380
<b>AU+6-MHL+p-benzokinon+PAMAM+AntiLH</b>	3.740

Elde edilen Nyquist diyagramlarına ve hesaplanan  $R_{ct}$  değerlerine bakıldığında elektrot yüzeyinin iletkenliğinin 6-MHL ile oluşturulan SAM tabakasından dolayı azaldığı görülmektedir. Bu durum 6-MHL'nin elektrolitteki redoks probunun altın yüzeye doğru difüze olmasına engel olmasından kaynaklanmaktadır. Bunun sonucunda  $R_{ct}$  değerlerinde bir miktar artma gerçekleşmiştir.

p-benzokinon bağlandıktan sonra  $R_{ct}$  değerlerinde artış gerçekleşmiştir. Bu artışın nedeni redoks probu olan negatif yüklü elektrolit ferrisiyanatın elektrot yüzeyine geçmesinin belli bir miktarda engellenmiş olmasıdır. Bu durum p-benzokinonun konjuge bağlarındaki yoğun elektron bulutu ile negatif yüklü redoks probunun birbirini itmesi sonucu meydana gelmiştir. Elektrot yüzeye daha az miktarda ferrisiyanat geldiği için  $R_{ct}$  değerlerinde artış gerçekleşmiştir.

pH:7.0 tamponunda bulunan PAMAM molekülünün üzerindeki amin grupları protonlanmış halde  $NH_3^+$  formunda bulunur. Bu pozitif yükler negatif yüklü redoks probunun ve elektronların yüzeye taşınmasını kolaylaştırır ve bunun sonucunda  $R_{ct}$  değerlerinde düşme meydana gelir.

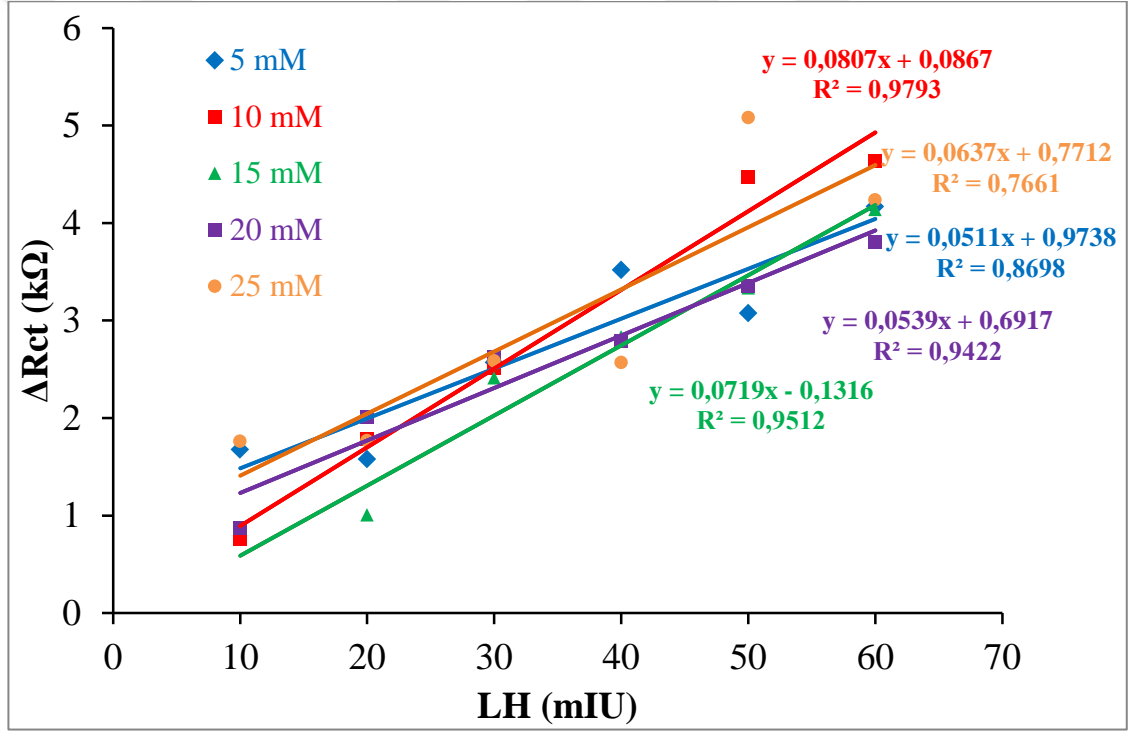
Anti-LH eklendiğinde görülen  $R_{ct}$  değerindeki artışın nedeni Anti-LH'nin redoks probunun ve elektronların yüzeye difüze olmasını engellemiş olmasıdır. Bu engelleme Anti-LH'nin iletken olmayan hacimli bir protein molekülü olmasından kaynaklanmaktadır.

LH'da aynı şekilde hacimli bir protein molekülü olduğu için yüzeye ulaşan elektrolit miktarını azaltmış ve  $R_{ct}$  değerleri artmıştır. Üst üste LH eklendikçe SAM tabakasının bu molekül yığını taşıma kapasitesi sınırına kadar belli aralıklarla bu artış gerçekleşmiştir.

#### 4.1.2. LH Biyosensörünün İmmobilizasyon Basamaklarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

##### 4.1.2.1. 6-MHL konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Biyosensörler 6-MHL'nin 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM ve 25 mM olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri ile hazırlandı. Bu biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri ile LH konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.2'de, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. 6-MHL konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

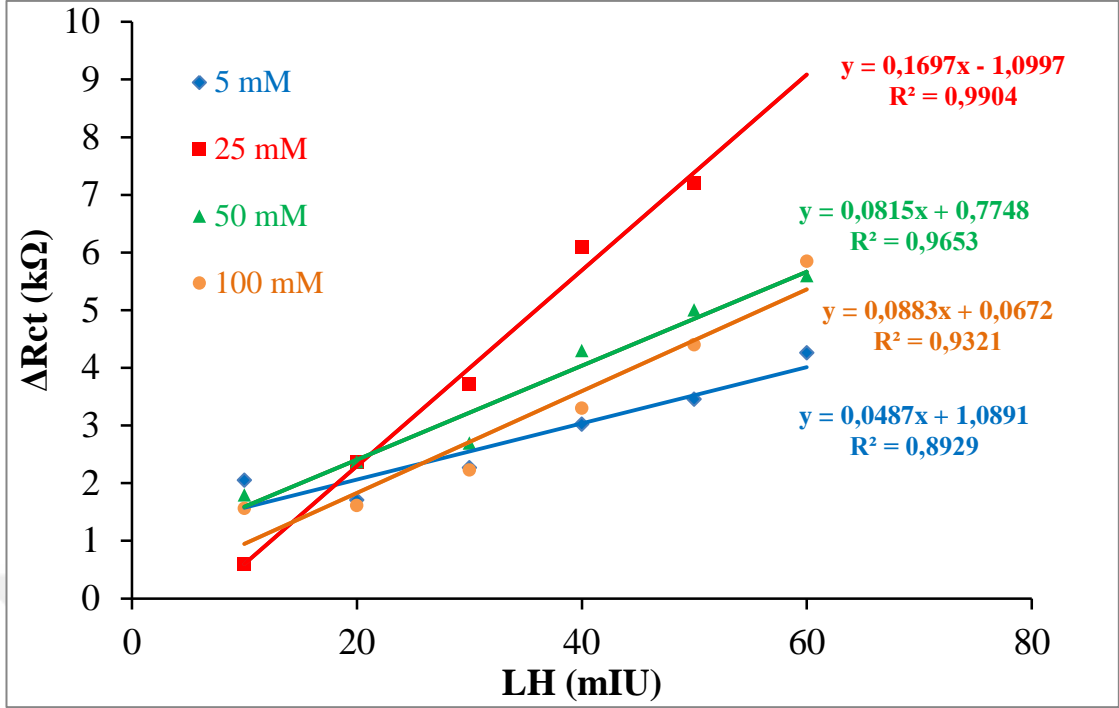
**Çizelge 4.2.** 6-MHL konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

6-MHL konsantrasyonu	Doğrusallık katsayı ( $R^2$ )	Doğru Denklemi
5 mM	0.8698	$y = 0.0511x + 0.9738$
10 mM	0.9793	$y = 0.0807x + 0.0867$
15 mM	0.9512	$y = 0.0719x - 0.1316$
20 mM	0.9422	$y = 0.0539x + 0.6917$
25 mM	0.7661	$y = 0.0637x + 0.7712$

Grafikteki doğrusallık kat sayısı ve doğru denklemine bakıldığında optimum 6-MHL konsantrasyonu **10 mM** olarak görülmektedir. Optimum yoğunluktaki SAM oluşumu sonucu her bir immobilizasyon basamağında oluşturulan moleküller yanlarındaki moleküllerden destek alarak dayanıklı bir yapı oluşturmuş olabilir. Düşük konsantrasyonda ise altın yüzeyinde oluşan SAM tabaka daha seyrek olacağı için LH bağlandıkça immobilizasyon tabakası dayanıksızlaşıp kırılabilir. Yüksek konsantrasyonlarda ise bağlanan PAMAM sayısında artış olur. PAMAM amin uçlardan oluşan hacimli bir molekül olduğu için bu amin uçlar yoğun molekül ortamında siterik engele uğrar ve antikolarlar daha az bağlanma gösterir. Grafikteki konsantrasyon arttıkça düşen değerler de bu durumun sonucu olarak açıklanabilir.

#### **4.1.2.2. p-benzokinon konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi**

Biyosensörler p-benzokinon'un 5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri ile hazırlandı. Bu biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri ile LH konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.3'de, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. p-benzokinin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Çizelge 4.3. p-benzokinin konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

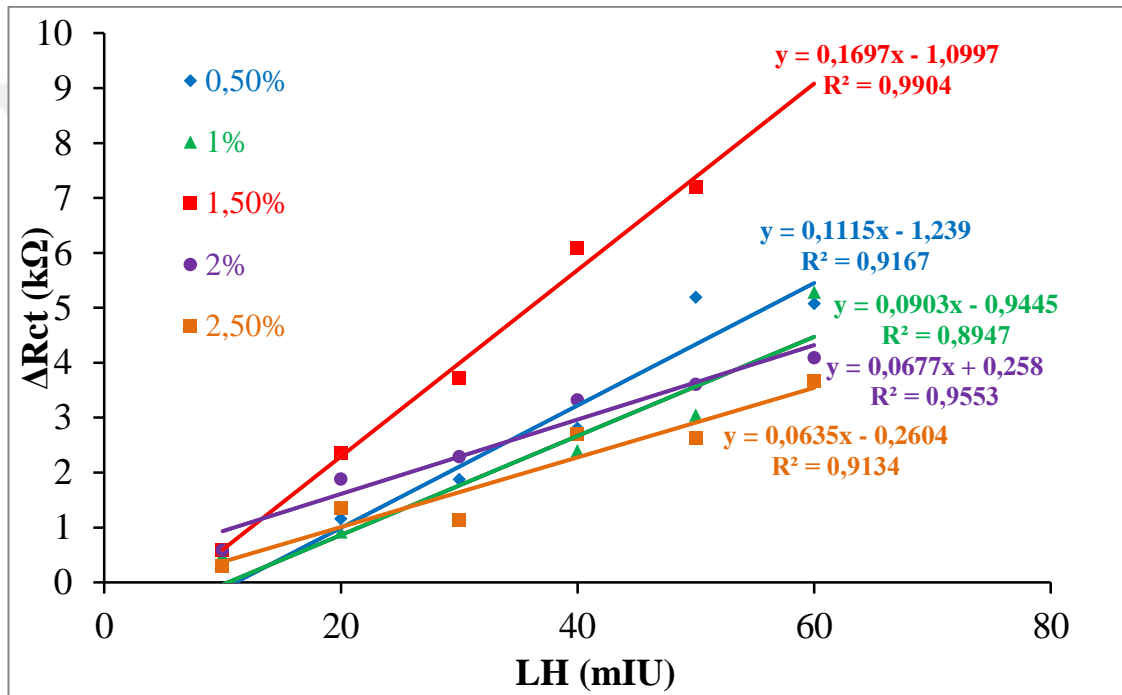
p-benzokinin konsantrasyonu	Doğrusallık katsayısı (R <sup>2</sup> )	Doğru Denklemi
5 mM	0.8929	y = 0.0487x + 1.0891
25 mM	0.9904	y = 0.1697x - 1.0997
50 mM	0.9653	y = 0.0815x + 0.7748
100 mM	0.9321	y = 0.0883x + 0.0672

p-benzokinin 6-MHL ile PAMAM moleküllerini bağlamak için çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Doğrusallık kat sayılarına bakıldığında görülen düşük değerler p-benzokininin aromatik yapısından kaynaklanıyor olabilir. SAM tabakası üzerine yatay bir konumda gelerek 6- MHL ile reaksiyon vermemiş olabilir. Bunun sonucunda da açıkta kalan 6-MHL ile PAMAM reaksiyon verememiş ve immobilize olan antikor sayısında düşme meydana gelmiş olabilir. Bu durum diğer optimize edilen immobilizasyon basamaklarının sonuçlarına da önemli ölçüde etki etmiş gibi

görülmektedir. Grafikteki değerlerden optimum p-benzokinin konsantrasyonu **25 mM** olarak belirlenmiştir.

#### 4.1.2.3. PAMAM konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Biyosensörler PAMAM'ın % 0.5, % 1, % 1.5, % 2 ve % 2.5 olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri ile hazırlandı. Bu biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri ile LH konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.4'de, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. PAMAM konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

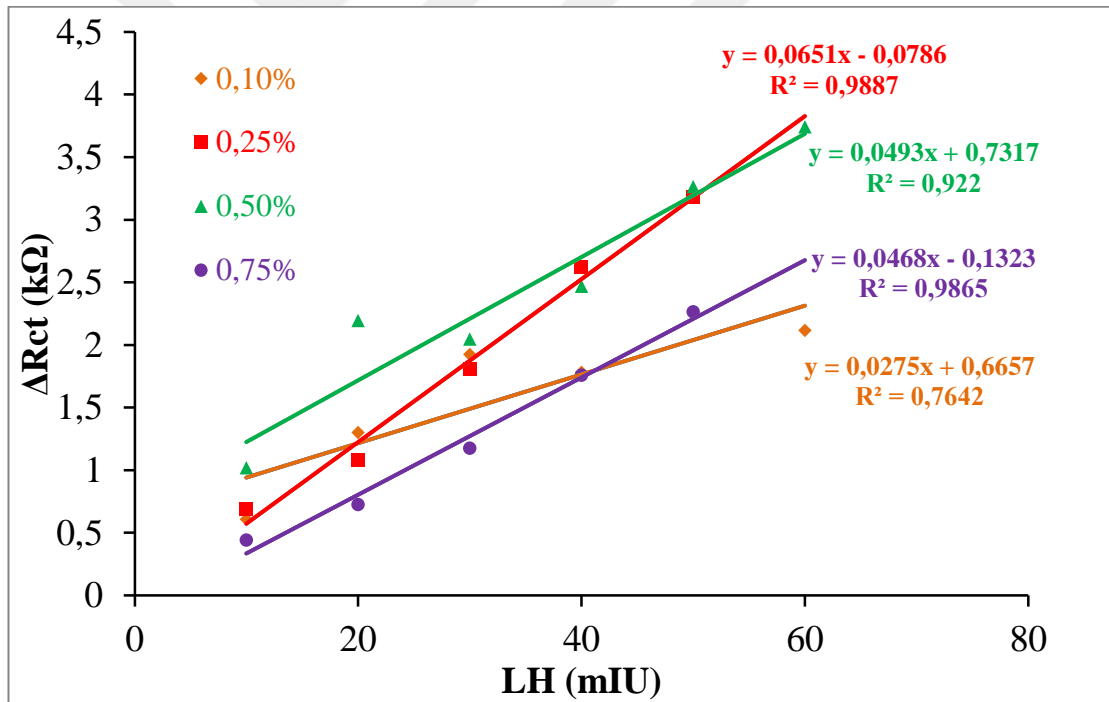
Çizelge 4.4. PAMAM konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

PAMAM Konsantrasyonu	Doğrusallık katsayısı ( $R^2$ )	Doğru Denklemi
% 0.5	0.9167	$y = 0.1115x - 1.239$
% 1.0	0.8947	$y = 0.0903x - 0.9445$
% 1.5	0.9904	$y = 0.1697x - 1.0997$
% 2.0	0.9553	$y = 0.0677x + 0.258$
% 2.5	0.9134	$y = 0.0635x - 0.2604$

Elde edilen verilere göre optimum PAMAM konsantrasyonu % 1.5 olarak belirlenmiştir. Düşük konsantrasyonda daha az PAMAM dendrimeri bağlanır ve immobilize olan antikor sayısında düşme meydana gelir. Yüksek konsantrasyonda ise sık bir şekilde bulunan birbirine yakın PAMAM molekülleri sterik engelle uğrar. Antikorların immobilize olacağı daha az sayıda amin uçlar bulunur. Bunun sonucunda  $R_{ct}$  değerleri daha düşük çıkar.

#### 4.1.2.4. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Biyosensörler glutaraldehit'in % 0.10, % 0.25, % 0.50 ve % 0.75 olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri ile hazırlandı. Bu biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri ile LH konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.5'de, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Çizelge 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

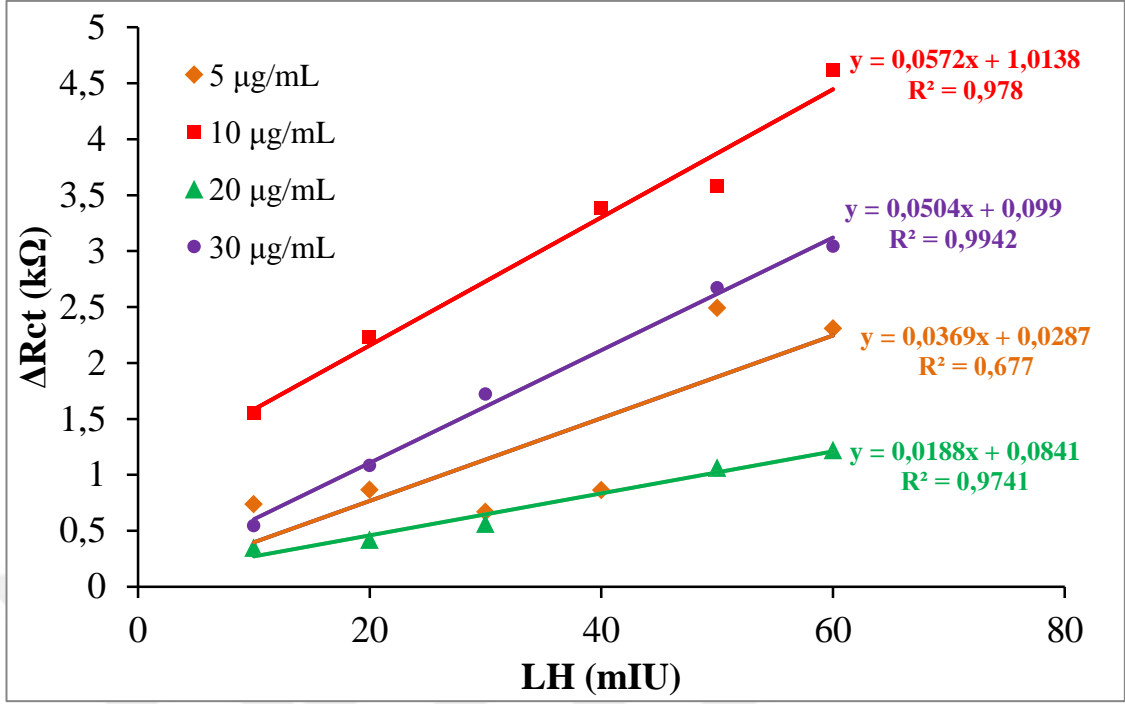
**Çizelge 4.5.** Glutaraldehit konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

Glutaraldehit konsantrasyonu	Doğrusallık katsayı ( $R^2$ )	Doğru Denklemi
% 0.10	0.7642	$y = 0.0275x + 0.6657$
% 0.25	0.9887	$y = 0.0651x - 0.0786$
% 0.50	0.9220	$y = 0.0493x + 0.7317$
% 0.75	0.9865	$y = 0.0468x - 0.1323$

Glutaraldehit antikorunu bağlamak için çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Yüksek miktarda bağlanan glutaraldehit immobilizasyon hattında istenmeyen çapraz bağlanmalara sebep olarak hasarlar verebilir. Bunun sonucunda  $R_{ct}$  değerlerinde düşme meydana gelir. Düşük konsantrasyonda ise daha az antikor bağlanacağı için  $R_{ct}$  değerleri yine düşer. Doğrusallık katsayısı ve denklemine bakıldığında optimum glutaraldehit konsantrasyonu % **0.25** olarak belirlendi.

#### **4.1.2.5. Anti-LH konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi**

Biyosensörler glutaraldehit'in 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$  ve 30  $\mu\text{g/mL}$  olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri ile hazırlandı. Bu biyosensörlerin Nyquist eğrilerinden hesaplanan  $R_{ct}$  değerleri ile LH konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.6'de, elde edilen doğruların doğrusallık katsayıları ile doğru denklemleri Çizelge 4.6'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Anti-LH konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Çizelge 4.6. Anti-LH konsantrasyonunun optimizasyonunda elde edilen grafiklerin doğrusallık katsayıları ve doğru denklemleri

Anti-LH konsantrasyonu	Doğrusallık katsayısı (R <sup>2</sup> )	Doğru Denklemi
5 μg/mL	0,6770	y = 0,0369x + 0,0287
10 μg/mL	0,9780	y = 0,0572x + 1,0138
20 μg/mL	0,9741	y = 0,0188x + 0,0841
30 μg/mL	0,9942	y = 0,0504x + 0,099

Düşük konsantrasyonda antikor kullanılması durumunda daha az sayıda LH bağlanır. Bunun sonucunda R<sub>ct</sub> değerleri düşük çıkar. Yüksek konsantrasyonda antikor kullanıldığında ise daha çok LH bağlanır. Bunun sonucunda SAM tabaka fazla yüke dayanamayıp immobilizasyon hattının dengesizleşmesine neden olabilir. 30 μg/mL AntiLH'nin doğrusallık katsayısı yüksek olsa da doğru denklemine bakıldığında **10 μg/mL** AntiLH'nin eğim değeri daha uygun olduğu için optimum konsantrasyon değeri olarak seçilmiştir.

LH tayini için geliştirilen LH biyosensörünün immobilizasyon basamakları için elde edilen optimum değerler toplu olarak Çizelge 4.7'da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.7.** LH biyosensörü için elde edilen optimum değerler

İmmobilizasyon adımları	Optimum değerler
6-MHL konsantrasyonu	10 mM
p-benzokinon konsantrasyonu	25 mM
PAMAM konsantrasyonu	% 1.5
Gluteraldehit konsantrasyonu	% 0.25
AntiLH konsantrasyonu	10 µg/mL

#### 4.1.3. LH Tayinine Yönelik Biyosensörün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

##### 4.1.3.1. Tekrar Üretilbilirlik

LH biyosensörünün optimizasyon çalışmalarından sonra, optimize edilmiş koşullarda 8 adet LH biyosensörü hazırlanarak 10-60 mIU/mL aralığında LH analizi yapılmış ve Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi  $R_{ct}$  değerleri hesaplanmıştır. 10-60 mIU/mL tayin aralığında analiz yapılan 8 adet biyosensöre ait doğrusal tayin aralığı grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerin doğru denklemleri ile doğrusallık katsayıları ( $R^2$ ) Çizelge 4.8'de verilmiştir.

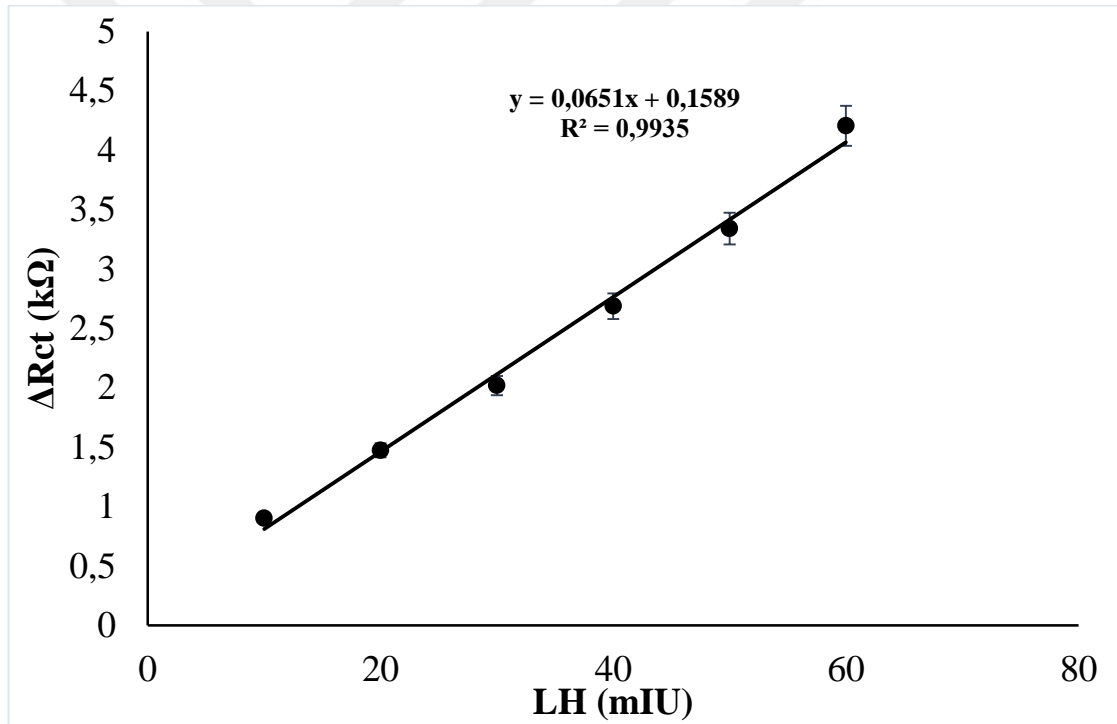
**Çizelge 4.8.** 10-60 mIU/mL aralığında LH biyosensörünün tekrar üretilbilirliği

Biyosensor numarası	Doğrusallık katsayısı ( $R^2$ )	Doğru denklemi	Tayin aralığı (mIU/mL)
1	0,984	$y = 0,0546x + 0,3229$	10-60
2	0,9971	$y = 0,0444x - 0,1008$	10-60
3	0,9635	$y = 0,083x + 0,1424$	10-60
4	0,994	$y = 0,0935x - 0,2102$	10-60
5	0,9967	$y = 0,0567x + 0,6237$	10-60
6	0,9839	$y = 0,0561x + 1,0372$	10-60
7	0,9696	$y = 0,0527x + 0,4428$	10-60
8	0,9914	$y=0,0691x + 0,4779$	10-60

Çizelge 4.8’de de görüldüğü gibi hazırlanan on farklı LH biyosensöründe de benzer eğim ve doğrusallık katsayısı bulunmuştur. Bu da üretilen LH biyosensörünün tekrar üretilebilirlik başarısının iyi olduğunu göstermektedir.

#### 4.1.3.2. Doğrusal tayin aralığı

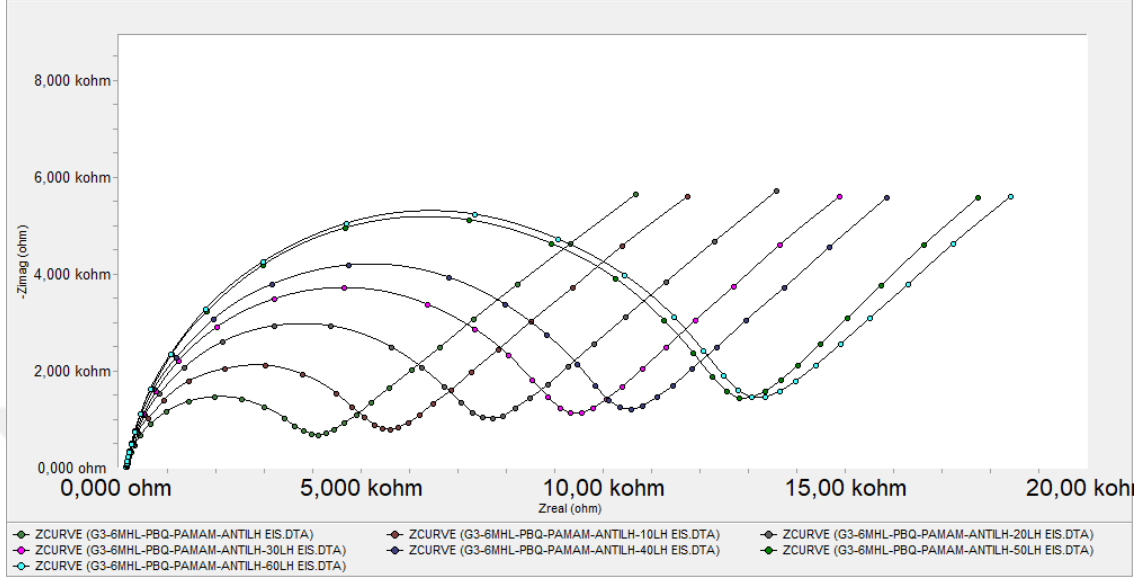
LH analizi için optimize edilmiş koşullarda hazırlanan LH biosensörünün doğrusal tayin aralığını belirlemek için Bölüm 4.1.3.1’de “Tekrar üretilebilirlik” çalışması için optimum koşullarda hazırlanan biyosensörlerin 10-60 mIU/m LH tayin aralığında impedans ölçümleri yapıldı. Hesaplanan  $R_{ct}$  değerlerinin aritmetik ortalamaları hesaplanarak ortalama  $R_{ct}$  değerlerinden kalibrasyon eğrisi çizildi ve Şekil 4.7’de doğrusal tayin aralığı grafiği olarak verildi.



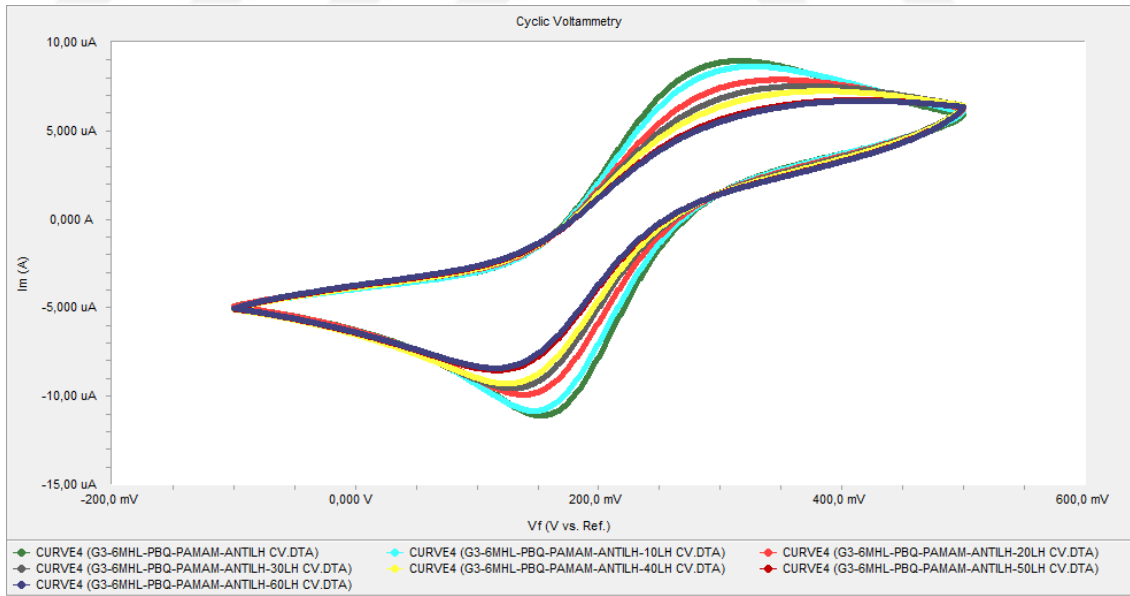
**Şekil 4.7.** 10-60 mIU/mL tayin aralığında LH biyosensörüne ait doğrusal tayin aralığı grafiği

LH’ın 10-60 mIU/mL tayin aralığındaki doğrusal tayin aralığı tayininde kullanılan biyosensörlerden biri için elde edilen Nyquist eğrileri ve siklik voltammogramları Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da verilmiştir. Şekil 4.8’de görüldüğü gibi LH konsantrasyonu arttıkça impedans da lineer olarak artmıştır. Bu da geliştirilen

biyosensörün 10-60 mIU/mL LH konsantrasyon aralığında doğru ve etkin LH ölçümü yapabildiğini göstermektedir.



**Şekil 4.8.** LH'nin 10-60 mIU/mL tayin aralığındaki çalışmalarından elde edilen Nyquist eğrileri

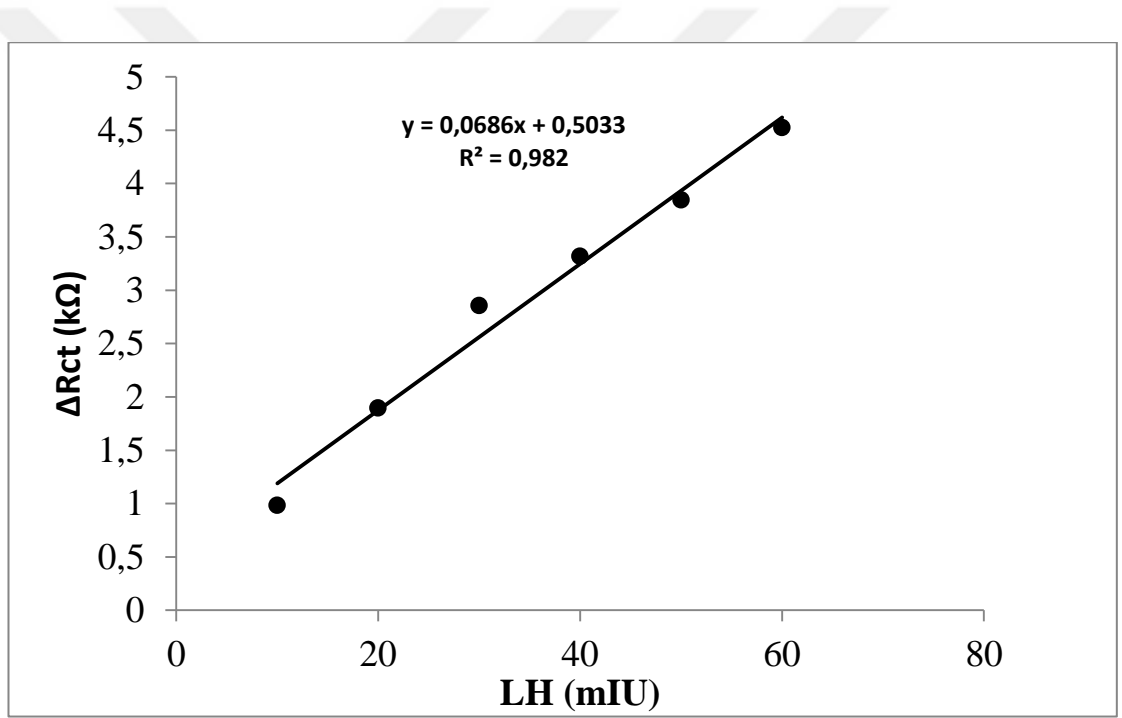


**Şekil 4.9.** LH'nin 10-60 mIU/mL tayin aralığındaki çalışmalarından elde edilen döngüsel voltamogramları

#### 4.1.3.3. Yapay serumda uygulama

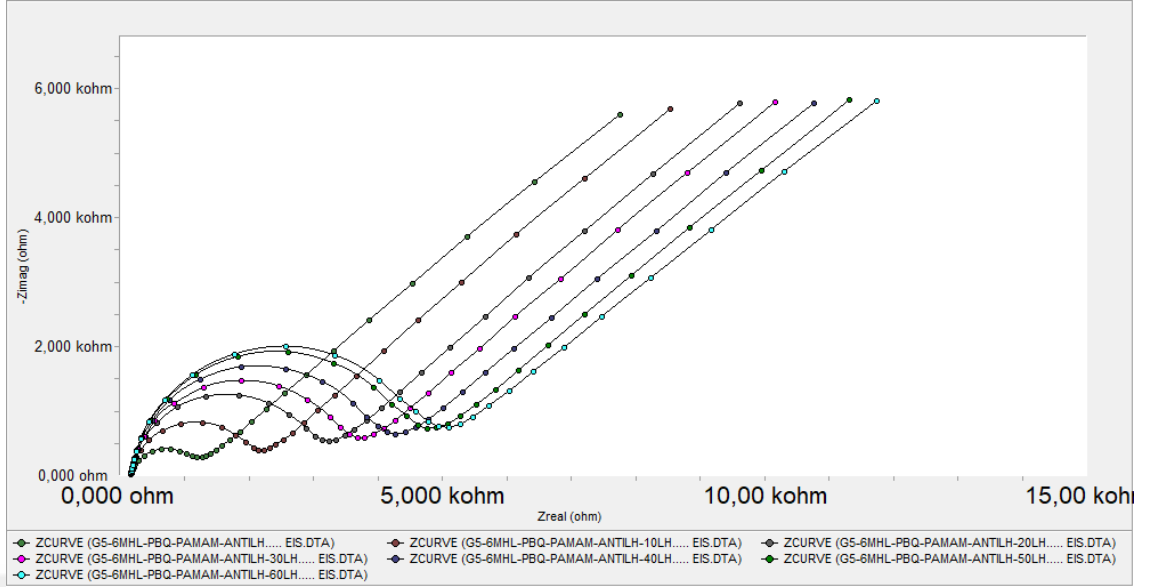
Yapay serumda bulunan tuzların ve diğer bazı biyomoleküllerin LH ölçümüne etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla 10-60 mIU/mL konsantrasyon aralığında yapay serumda hazırlanan LH porsiyonlarının impedans ölçümleri geliştirilen LH biyosensörü ile yapıldı ve  $R_{ct}$  değerleri hesaplandı. Çizilen doğrusal tayin aralığı grafiği Şekil 4.10'da verildi.

Çizilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi ve doğrusallık katsayısı incelendiğinde LH biyosensörünün gerçek serum örneklerinde de LH tayinini hassas ve spesifik bir şekilde yapabilme potansiyeline sahip olabileceği görülmektedir.

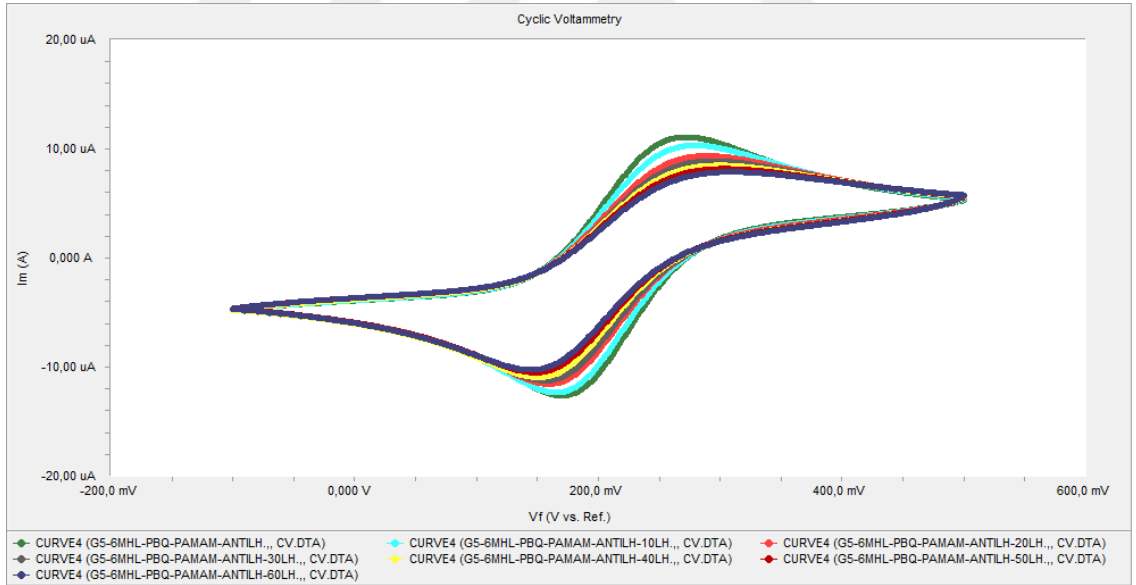


Şekil 4.10. 10-60 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmasında elde edilen kalibrasyon grafiği

Geliştirilen biyosensör sisteminin 10-60 mIU/mL aralığında yapay serumda hazırlanan LH porsiyonlarının analizi esnasında elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 4.11'de ve döngüsel voltamogramları Şekil 4.12'de verilmiştir.



**Şekil 4.11.** 10-60 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmasında elde edilen Nyquist eğrileri



**Şekil 4.12.** 10-60 mIU/mL aralığında Yapay serumda uygulama çalışmasında elde edilen döngüsel voltamogramlar

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında p-benzokinon çapraz bağlayıcı molekülü kullanılarak SAM temelli bir immünobiyosensör ilk kez üretilmiştir.

Bu tez kapsamında 10-60 mIU/mL aralığında doğru, hızlı LH tayini yapabilen tekrar üretilebilirlik başarısı olan LH biyosensörü SAM oluşturularak dizayn edilmiştir.

SAM oluşumu 6-MHL kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Literatür incelendiğinde, Pritchard vd., (1995) altın elektrot yüzeyine N-asetil sistein ile SAM oluşturdukları hem FSH hemde LH tayini yapabilen bir immünosensör geliştirmişlerdir. Lilie vd., (2001) tarafından polipirol filmler kullanılarak IDE (interdigital elektrot) elektrodunun yüzeyi polipirol ile kaplanarak elektrokimyasal impedans spektroskopine dayanan bir LH biyoafinite reaktif sensör dizayn edilmiştir. Trevino vd., (2009) TSH, hGH, FSH ve LH tayininde kullanmak üzere merkaptoundekanoik asit ile alkan diol SAM'leri oluşturarak SPR altın çipleri hazırlamışlardır. Boozer vd., (2006) DNA-yönlendirilmiş immobilizasyon yöntemiyle LH, FSH ve hCG gonadotropinlerini SPR ile eş zamanlı analiz edebilecek protein çipleri yapmışlardır. Bu amaçla SPR çipleri oligo etilenglikol tiyol ile kovalent bağlanarak her bir hormon için farklı SS DNA/oligoetilen glikol SAM'leri oluşturmuşlardır. Zambre vd., (2012) koyun LH'ı tayini için "altın nanopartikül (AuNP)-peptit konjugat" stratejisi ile altın nanosensör üretmişlerdir. Güler 2015 yılında yüksek lisans çalışmasında altın yüzey üzerinde 12-merkaptododekanolik asit (12-MDDA) ile SAM oluşturduğu bir LH immünosensörü geliştirmiştir.

Tezde üretilen LH biyosensörünün tayin aralığı 10-60 mIU/mL aralığında olup kadınların ovulasyon sürecindeki 9.6-80 mIU/mL seviyelerinde değişen LH miktarları başarıyla analiz edebilme yeteneğindedir. Pritchard vd.'nin geliştirdiği LH ve FSH tayini yapabilen bir immünosensörün ELISA yöntemiyle yapılan ölçümlerde LH için tayin sınırı 1.8 U/L, FSH için ise tayin sınırı 2.1 U/L olarak belirlenmiştir (Pritchard vd., 1995). Lilie vd. tarafından geliştirilen biyoafinite reaktif sensörünün 1-10 U/L LH konsantrasyonu aralığında hassas cevaplar verdiği bildirilmiştir (Lilie vd., 2001). Boozer vd. LH, FSH ve hCG gonadotropinlerinin miktar tayini için geliştirdikleri SPR protein çiplerinin tayin aralığı hCG hormonu için 0.1 ng/mL olarak bildirilmiş, LH tayin aralığı belirtilmemiştir (Boozer vd., 2006). Trevino vd.'nin TSH, hGH, FSH ve LH tayininde kullanmak üzere SPR altın çipleri ile idrarda yapılan LH denemelerinde çalışma aralığı 17-123 ng/mL olarak belirlenmiştir (Trevino vd., 2009). Zambre vd. koyun LH'ı tayini için ürettikleri altın nanosensörlerin minimum 50 ppm konsantrasyona kadar LH tayini yapabildiği belirlenmiştir (Zambre vd., 2012). Güler (2015) altın yüzey üzerinde 12-MDDA ile SAM oluşturduğu bir LH immünosensörünün LH tayin aralığı 1-60 mIU/mL olarak bildirilmiştir (Güler 2015).

## ÖNERİLER

Üretilen bu LH biyosensörü ile 10-60 mIU/mL LH konsantrasyon aralığında lineer ve tekrarlanabilir sonuçlar alınması, kadınların ovulasyon sürecindeki 9.6-80 mIU/mL seviyelerinde değişen LH miktarlarının bu biyosensör ile ölçülebileceğini göstermektedir. Bu biyosensörün minyatürizasyonu ve optimizasyonları başarılı olduğu takdirde, fertilizasyon sorunu yaşayan çiftlerin ovalusyon zamanını hızlı, pahalı cihaz ve uzman gerektirmeden evde LH tayini yapabilme potansiyeli de taşımaktadır. Söz konusu biyosensör sadece kadınlarda doğru ovalusyon zamanını teşhiste değil ayrıca yükselen LH seviyeleriyle ilişkilendirilen kadınlarda primer gonadal disfonksiyon, polikistik over sendromu, postmenopoz ve hipofiz adenomu, erkeklerde hipogonadizm ve anorşinin yanı sıra Klinefelter sendromunda ve primer testis yetmezliği teşhisinde kullanılabilir olma potansiyeli taşımaktadır.

## BÖLÜM 5

### KAYNAKLAR

Akay, M.T. (2014). *Genel Histoloji* ( 9. Baskı). Ankara: Palme. s. 38-39.

Anobile, C.J., Talbot, J.A., McCann, S.J., Padmanabhan V., Robertson W.R., (1998). Glycoform composition of serum gonadotropins through the normal menstrual cycle and in the post menopausal state, *Molecular Human Reproduction* 4, 631-639.

Bain, C.D., Evall, J., Whitesides, G.M. (1989). Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent, *Journal of the American Chemical Society* 111, 7155 – 7164.

Bardin CW. (1986). Pituitary testicular axis. In. Yen SSC, Jaffe RB, eds. *Reproductive Endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders,:177–199.

Barsoukov, E., Macdonald, J.R., (2005). Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications *John Wiley & Sons, Inc.*,

Boozer, C., Ladd, J., Chen, S., Jiang S., (2006) DNA-Directed Protein Immobilization for Simultaneous Detection of Multiple Analytes by Surface Plasmon Resonance Biosensor. *Analytical Chemistry*, 78, 1515-1519.

Bott, A.W., (2001). *Current Separation*, 19, 71–75

Bousfield GR, Perry WM, Ward DN. (1994). Gonadotropins. In: Knobel E, Neill J, eds. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press:1749–1792.

Buerk, D.G., (1995). *Biosensors: Theory and Applications*, Taylor & Francis, ABD,

Burgon P.G., Stanton P.G., Pettersson K, Robertson D.M. (1997). Effect of desialylation of highly purified isoforms of human luteinizing hormone on their bioactivity in vitro, radioreceptor activity and immunoactivity. *Reproduction, Fertility, and Development*; 9(5):501–508.

Campbel, (2013). *Biyoloji (9. Baskıdan çeviri)*. Gündüz E., Türkan İ. (Ed), *Hormonlar* (s. 974-984). Ankara:Palme.

Canh, T.M., (1994). *Biosensors*.Springer US, 1-3.

Catt, K.J, Pierce, J.G. (1986). Gonadotrophic hormones of the adenohypophysis. In: Yen SSC, Jaffe RB, eds. *Reproductive Endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders,: 75–114.

Chaki, N.K., Vijayamohan K., (2002). Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications, *Biosensors & Bioelectronics* 17, 1–12.

Chappel S. (1990). Editorial: biological to immunological ratios: reevaluation of a concept. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 70(6):1494–1495.

Chen, D., Jinghong, L., (2006). Interfacial design and functionalization on metal electrodes through self-assembled monolayers, *Surface Science Reports* 61, 445–46.

Choi, J., Smitz, J., (2014). Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: distinguishing unique physiologic roles, *Gynecological Endocrinology*, 30(3): 174–181.

De Beer, T, Van Zuylen, CW, Leeftang, B.R, Hard, K, Boelens, R, Kaptein, R, Kamerling, J.P, Vliegthart, J.F. (1996). NMR studies of the free alpha subunit of human chorionic gonadotropin. Structural influences of N-glycosylation and the beta subunit on the conformation of the alpha subunit. *European Journal of Biochemistry*;241:229– 242.

Eldin, M. S. M., Seuror, E. I., Nasr M. A., Tieama, H. A., (2011). Affinity Covalent Immobilization of Glucoamylase onto p-Benzoquinone-Activated Alginate Beads: II. Enzyme Immobilization and Characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164:45–57.

Elmlinger, M.W., Kuhnel, W., Ranke, M.B., (2002). Reference ranges for serum concentrations of lutropin (LH), follitropin (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone-binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), cortisol and ferritin in neonates, children and young adults, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 40(11), 1151-1160.

Engtrakul, C., Sita, L.R., (2001) Ferrocene-based nanoelectronics: 2,5-diethylnylpyridine as a reversible switching element, *Nano Letters* 1(10), 541-549.

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

Gharib, S.D, Wierman, M.E, Shupnik, M.A, Chin, W.W. (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocrine Reviews*; 11:177–199.

Guan, J.G., Miao, Y.Q., Zhang, Q.J., (2004). Impedimetric Biosensors, *Bioscience and Bioengineering* 97, 219–226.

Güler, F.G. (2015). Luteinleştirici Hormon Tayini İçin Elektrokimyasal İmpedans Temelli Biyosensör Sistemi Geliştirilmesi. *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Yüksek Lisans Tezi, Edirne.

Hakola, K, Haavisto, A.M, Pierroz, D.D, Aebi, A, Rannikko, A, Kirjavainen, T, Aubert, M.L, Huhtaniemi, I. (1998). Recombinant forms of rat and human luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone comparison of functions in vitro and in vivo. *Journal of Endocrinology*; 158:441–448.

Hleli, S., Martelet, C., Abdelghani, A., Burais, N., Jaffrezic-Renault, N., (2006). Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113:711-717.

<http://www.yenibiyoloji.com/menstrual-dongu-adet-dongusu-nedir-evreleri-nelerdir-2370/> (20.05.2018)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/p-benzoquinone#section=Top> (27.05.2018)

<https://www.britannica.com/print/article/271826> (20.05.2018)

<https://www.slideserve.com/cate/sens-rler> (27.05.2018)

Hug, T.S., (2003). Biophysical methods for monitoring cell-substrate interactions in drug discovery, *Assay and Drug Development Technologies*, 1, 479-488.

Huhtaniemi I. (2000). Polymorphism of gonadotropin action: clinical implications. *Asian Journal of Andrology*; 2:241–246.

Jaakkola, T, Ding, Y.Q, Kellokumpu-Lehtinen, P, Valavaara, R, Martikainen, H, Tapanainen, J, Ronnberg, L, Huhtaniemi, I. (1990). The ratios of serum bioactive/immunoreactive luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in various clinical conditions with increased and decreased gonadotropin secretion: reevaluation by a highly sensitive immunometric assay. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 70:1489–1493.

Jeffcoate, S. (1993). Analytical and clinical significance of peptide hormone heterogeneity with particular reference to growth hormone and luteinizing hormone in serum. *Clinical Endocrinology*; 38:113–121.

Jonsson, M., Welch, K., Hamp, S., Stromme, M., (2006). Bacteria counting with impedance spectroscopy in a micro probe station, *The Journal of Physical Chemistry*, 110: 1165-1169.

Kafka, J., Panke, O., Abendroth, B., Lisdat, F., (2008). A label -free DNA sensor based on impedance spectroscopy, *Electrochimica Acta* 53 7467–7474.

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

Kananen, K, Markkula, M, el-Hefnawy, T, Zhang, F.P, Pauku, T, Su, JG, Hsueh, A.J, Huhtaniemi, I. (1996). The mouse inhibin alpha-subunit promoter directs SV40 T antigen to Leydig cells in transgenic mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 119(2): 135–146.

Kato, Y., Ezashi, T., Hirai, T., Kato, T. (1990). Heterodimer of a common alpha chain and a unique beta chain which confers biological specificity to thyrotropin, luteotropin, follitropin and gonadotropin. *Zoological Science* 7:877–885.

Katz, E., Willner, I., (2009) Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis*, 15(11), 913–947.

Labhart, A. (1974). The ovary. In: Schreiner WB, ed. *Clinical Endocrinology*. New York: Springer Verlag, :559–564.

Lambert, A, Talbot, J.A, Anobile, C.J, Robertson, W.R. (1998). Gonadotrophin heterogeneity and biopotency: implications for assisted reproduction. *Molecular Human Reproduction*; 4:619–629.

Leigh, A.J, Poyser, N.L, Bonney, R.C, Whitehead, S.A, Wilson, C.A. (2000). Heterogeneity in the bioactivity of LH secreted by peripubertal rats. *Journal of Reproduction and Fertility*; 118:187–193.

Leiva, L.A, de la Lastra, M. (1992). Enzyme-linked immunosorbent assay for rat and human luteinizing hormone. *Neuroendocrinology*; 56(5):660–665.

Li, Y., (2006). Biosensors, *Information Technology* pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI.

Lilie, G., Payne, P., Vadgama, P., (2001). Electrochemical impedance spectroscopy as a platform for reagentless bioaffinity sensing. *Sensors and Actuators*, B 78 249-256.

Liu, Y., Guo, C., Liu, C-Z. (2015). Novel Magnetic Cross Linked Lipase Aggregates For Improving The Resolution Of (R, S)-2-Octanol. *Chirality* 27:199–204.

Maalouf, R., Fournier-Wirth, C., Coste, J., Chebib, H., Saikali, Y., Vittori, O., Errachid, A., Cloarec, J.P., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N. (2007). Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance, *Analytical Chemistry*, 79, 4879-4886.

- Macdonald, J.R. (1987). Impedance spectroscopy and its use in analyzing the steady-state AC response of solid and liquid electrolytes *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 223, 25-50.
- Marrama, P., Zaidi, A.A., Montanini, V., Celani, M.F., Cioni, K., Carani, C., et al., (1983). Age and sex variations in biologically active and immunoreactive serum luteinizing hormone, *Journal of Endocrinological Investigation* 6, 428-433,
- Mazina, O., Allikalt, A., Tapanainen, J. S., Salumets, A., Rincken, A., (2017). Determination of biological activity of gonadotropins hCG and FSH by Förster resonance energy transfer based biosensors. *Scientific Reports*, 7:42219, DOI: 10.1038/srep42219.
- Mazina, O., Luik, T., Kopanchuk, S., Salumets A., Rincken, A., (2015). Characterization of the Biological Activities of Human Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin by a Förster Resonance Energy Transfer-Based Biosensor Assay. *Analytical Letter*, 48: 2799–2809.
- Morrison, M., Steele, W., Danner, D., (1969), The Reaction of Benzoquinone with Amines and Proteins, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 134, 515-523.
- Mulchandani, A., Rogers, K.R., (1998). Affinity Biosensors: Techniques and Protocols, *Humana Press*, London.
- Nelson D.L., Cox M.M. (2013). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (5. Baskıdan Çeviri). Elçin, Y.M. (çevi. ed.), *Hormon Hiyerarşisi ve Endokrin Bezler* (909-910).
- Niswender, G.D, Midgley, A.R, Monroe, S.E, Reichert, L.E. (1968). Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with antiovine LH serum and ovine LH-131I. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 1218:807–811.
- Pritchard, D.J., Morgan, H., Cooper, J.M., (1995). Simultaneous determination of follicle stimulating hormone and luteinising hormone using a multianalyte immunosensor, *Analytica Chimica Acta* 310, 251-256.

Prodromidis, M.I., (2010). Impedimetric immunosensors: A review, *Electrochimica Acta*, 55 (14), 4227–4233.

Rajendran, M., Ellington, A. D., (2002). Chapter 12: Nucleic acids for reagentless biosensors. *Optical Biosensors—Present & Future*, F. S. Ligler, and C. A. R. Taitt, eds. Amsterdam, Netherlands: Elsevier. 369-396.

Reader, S.C., Robertson, W.R, Diczfalusy, E., (1983). Microheterogeneity of luteinizing hormone in pituitary glands from women of pre- and postmenopausal age, *Clinical Endocrinology (Oxford)* 19, 355-363.

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

Schelfer, F. ve Schubert, F. (Eds.) (1992). *Biosensors*. Elsevier Publishing Company, 7-10-50-51-52.

Selvaraj, N, Moudgal, N. (1993). Development of an LH receptor assay capable of measuring serum LH/CG in a wide variety of species. *Journal of Reproduction and Fertility*; 98(2):611–616.

Sezgintürk, M.K., (2012). *Biyosensörlerde İmpedans Uygulamaları*, II. Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı.

Shervedani, R.K., Mehrjardi, A.H., Zamiri, N., (2006). A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor, *Bioelectrochemistry*, 69, 201-208.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., (1997). *Principles of Instrumental Analysis*, Brooks/Cole, A.B.D.

Stanton, P.G, Burgon, P.G, Hearn, M.T, Robertson, D.M. (1996). Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 125(1–2):133–141.

Stryer, L., (1988). *Biochemistry*, New York, NY: *W. H. Freeman*.

Telefoncu A. (Ed.) (1997). Enzimoloji. Kuşadası:Ege Üniversitesi Fen Fakültesi.

Telefoncu, A., (2008). *Biyosensörlere Genel Bakış ve Biyosensör Uygulamalarında Son Gelişmeler*, Ege Üniversitesi Biyosensör Yaz Okulu Kitabı, İzmir

Thijssen, J.H, Wood, W.G, Kessler, A.C, Griesser, H.W, Bauer, O, Bieglmayer, C, Eugui, J, Mirabel, J.L, Gaessler, H, Klinga, K. (1991). Multicenter evaluation of new enzyme-linked immunoassays of follitropin and lutropin in serum or plasma. *Clinical Chemistry*; 37(7):1257–1263.

Tombelli, Minunni, M., Mascini, M., (2005). Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics* 20: 2424-2434.

Trevino, J., Calle, A., Rodriguez-Frade, J.M., Mellado, M., Lechuga, L.M., (2009). Surface plasmon resonance immunoassay analysis of pituitary hormones in urine and serum samples. *Clinica Chimica Acta*, 403, 56–62.

Turner, Anthony, P. F. (2013). Biosensors- sense and sensibility. *Chemical Society Reviews* [doi 10.1039\_C3CS35528D].

Vogel, H.G, Vogel, W.G.H. (1997). Endocrinology: Anterior pituitary hormones. In: Vogel HG, Vogel WGH, eds. *Drug Discovery and Evaluation*. Berlin: Springer-Verlag,:671–698.

Wang, A., Zhang, F., Chen, F., Wang, M., Li, H., Zeng, Z., Xie, T., Chen, Z. (2011). A facile technique to prepare cross-linked enzyme aggregates using p-benzoquinone as cross-linking agent. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28(4), 1090-1095, DOI: 10.1007/s11814-010-0476-0

Wide, L. (1985). Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FHS, LH and TSH. II. Relationship to sex and age., *Acta Endocrinology (Copenhagen)* 109, 109-197.

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

Yang, L., Bashir, R., (2008). Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria, *Biotechnology Advances*, 26 (2), 135–150.

Yang, L.J., Li, Y.B., (2006). Protective role of supplement with foreign Bifidobacterium and Lactobacillus in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury, *Journal of Microbiological Methods*, 64, 9-16.

Yotter, R.A., Wilson, D.M. (2004). A review of photodetectors for sensing light-emitting reporters in biological systems. *IEEE Sensors Journal*, 4, 412-429.

Zambre, A., Chanda, N., Prayaga, S., Almudhafar, R., Afrasiabi, Z., Upendran, A., Kannan R., (2012). Design and Development of a Field Applicable Gold Nanosensor for the Detection of Luteinizing Hormone. *Analytical Chemistry*, 84, 9478–9484.

## ÖZGEÇMİŞ

29.06.1989 yılında Edirne’de doğdum. İlk ve orta öğretimimi Edirne Kurtuluş İlköğretim Okulu’nda tamamladım. 2006 yılında Edirne 1. Murat Lisesi’nden mezun oldum. 2008-2010 yıllarında Namık Kemal Üniversitesi Muratlı MYO’da Kimya Bölümünde okudum. 2011-2014 yıllarında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde okudum. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümünde yüksek lisansa başladım.