

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**YUMURTALIK KANSERİ BİYOBELİRTEÇLERİNİN TAYİNİNE YÖNELİK
KULLAN-AT ELEKTROKİMYASAL İMMUNOSENSÖR SİSTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Merve YILMAZ ÇILÇAR

KİMYA ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2025**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Merve YILMAZ ÇILÇAR tarafından hazırlanan “Yumurtalık kanseri biyobelirteçlerinin tayinine yönelik kullan-at elektrokimyasal immunosensör sistemlerinin geliştirilmesi” adlı tez çalışması 04/02/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Melike BİLGİ

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK
Protein Mühendisliği Anabilim Dalı
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Melike BİLGİ
Kimya Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Zafer YAZICIGİL
Kimya Anabilim Dalı
Selçuk Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Veyis KARAKOÇ
Kimya Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN
Kimya Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ersoy YILMAZ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “**Yumurtalık kanseri biyobelirteçlerinin tayinine yönelik kullan-at elektrokimyasal immunosensör sistemlerinin geliştirilmesi**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (04/02/2025).

Merve YILMAZ ÇILÇAR



Bu çalışmanın bir kısmı TÜBİTAK 1002-A 222Z121 numaralı proje ile desteklenmiştir.

*Bu alışma ankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından **EY0211221D07** numaralı proje ile desteklenmiştir.*

ÖZET

Doktora Tezi

YUMURTALIK KANSERİ BİYOBELİRTEÇLERİNİN TAYİNİNE YÖNELİK KULLAN-AT ELEKTROKİMYASAL İMMUNOSENSÖR SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Merve YILMAZ ÇILÇAR

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melike BİLGİ

Bu tez çalışmasında, yumurtalık kanserinin erken teşhisi için üç ayrı etiketsiz elektrokimyasal immunosensör sistemi geliştirilmiştir. İlk olarak CA125 immunosensörlerinin çevirici kısımları hazırlanmıştır. CA125 immunosensörleri için SPCE'ler DES içerisinde hazırlanan PTB_{DES}'ler ile ardından AuNP'ler elektrodpozite edilmiştir (SPCE/PTB_{DES}/AuNP). İkinci adımda HE4 immunosensörleri için SPCE'lerin MXene-COOH ile modifikasyonu gerçekleştirilmiştir ve ardından AuNP'ler elektrodpozite edilmiştir (SPCE/MXene-COOH/AuNP). Son olarak AFP immunosensörlerinin hazırlanmasında SPCE'ler DES içerisinde hazırlanan PAA_{DES}'ler ile ardından AuNP'ler ile elektrodpozite edilmiştir (SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP). Hazırlanan elektrotların elektrokimyasal, kimyasal ve morfolojik karakterizasyonu yapılmıştır.

CA125 immunosensörlerinin tasarımında 4-MOH ve CTES ile kararlı SAM tabakası oluşturulan immunosensörler, Anti-CA125, BSA ve CA125 ile de inkübe edilmiştir. HE4 immunosensörlerinin tasarımında 6-MHA ile uzun karbon zincirleri oluşturulmuş ve Anti-HE4, BSA ve HE4 ile inkübe edilmiştir. AFP immunosensörlerinin tasarımında ise 6-MOH ve APTES ile silanizasyon yapılmış, Anti-AFP, BSA ve AFP ile inkübe edilmiştir. Hazırlanan immunosensörlerinin optimum çalışma şartları, analitik performansları ve gerçek numune analizi çalışmaları da yapılmıştır. Tek kullanımlık elektrotlar ile geliştirilen immunosensör sistemlerinin ileride POCT kullanımı için adaydır.

2025, 149 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Elektrokimyasal immunosensörler, CA125, HE4, AFP, DES, MXene-COOH, MWCNT- COOH

ABSTRACT

PhD Thesis

DEVELOPMENT OF DISPOSABLE ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR SYSTEMS FOR THE DETERMINATION OF OVARIAN CANCER BIOMARKERS

Merve YILMAZ ÇİLÇAR

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melike BİLGİ

In this thesis, three separate label-free electrochemical immunosensor systems were developed for the early diagnosis of ovarian cancer. First, the transducer parts of CA125 immunosensors were prepared. For CA125 immunosensors, SPCEs were electrodeposited with PTBs prepared in DES and then AuNPs (SPCE/PTB_{DES}/AuNP). In the second step, SPCEs were modified with MXene-COOH for HE4 immunosensors and then AuNPs were electrodeposited (SPCE/MXene-COOH/AuNP). Finally, in the preparation of AFP immunosensors, SPCEs were electrodeposited with PAADESs prepared in DES and then AuNPs (SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP). Electrochemical, chemical, and morphological characterizations of the prepared electrodes were performed.

In the design of CA125 immunosensors, a stable SAM layer was formed with 4-MOH and CTES, and immunosensors were also incubated with Anti-CA125, BSA and CA125. In the design of HE4 immunosensors, long carbon chains were formed with 6-MHA and incubated with Anti-HE4, BSA, and HE4. In the design of AFP immunosensors, silanization was performed with 6-MOH and APTES, and incubated with Anti-AFP, BSA, and AFP. Optimum working conditions, analytical performances, and real sample analysis studies of the prepared immunosensors were also performed. Immunosensor systems developed with disposable electrodes are candidates for POCT use in the future.

2025, 149 pages

Keywords: Electrochemical immunosensors, CA125, HE4, AFP, DES, MXene-COOH, MWCNT-COOH

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora hayatım boyunca beni ilmek ilmek işleyen, bilgilerini bana aktaran, uzun yıllar boyunca beni bir evlat gibi görüp destekleyen çok kıymetli danışmanım Sayın Doç. Dr. Melike BİLGİ'ye sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Doktora sürecinde yardımlarını, desteklerini esirgemeyen, tez izleme komite üyesi olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN'a, diğer bir tez komite üyesi olan, tecrübelerini benimle paylaşan, deneysel aşamalarda destek sağlayan Sayın Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e teşekkürü borç bilirim. Doktora sürecinde benimle birlikte olan canım arkadaşım Öğr. Gör. Ayşenur YILMAZ KABACA'ya da yardım ve destekleri için teşekkür ederim.

Son olarak beni büyütüp bu günlere getiren, akademik hayatım boyunca desteklerini her daim hissettiğim anneme, babama ve yanımda oldukları için tüm aileme de şükranlarımı sunarım. Doktora sürecimin son aşamalarında hayatımı birleştirdiğim sevgili eşim Osman ÇILÇAR'a da bu zorlu süreçte yanımda olduğu için teşekkür ederim.

Doktora hayatım boyunca 2211-A BİDEB kapsamında desteklendiğim için TÜBİTAK'a teşekkür ederim. TÜBİTAK 1002-A 222Z121 ve BAP EY0211221D07 numaralı proje ile desteklendiğim için TÜBİTAK ve BAP'a teşekkür ederim.

Merve YILMAZ ÇILÇAR

Çankırı, Şubat 2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Yumurtalık Kanseri.....	2
1.2 Yumurtalık Kanseri Biyobelirteçleri.....	3
1.2.1 CA125.....	3
1.2.2 HE4.....	4
1.2.3 AFP.....	5
1.2.4 Diğer biyobelirteçler	6
1.3 Yumurtalık Kanseri Biyobelirteçlerinin Tayin Metotları.....	7
1.4 Elektrokimyasal İmmunosensörler	10
1.4.1 Etiketli ve etiketsiz elektrokimyasal immunosensörler	12
1.4.2 Yüzey baskılı elektrotlar (SPE)	13
1.4.3 Hasta başı testleri.....	15
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	17
3. MATERYAL VE METOT	28
3.1 Materyal	28
3.1.1 Deneylerde kullanılan kimyasallar	28
3.1.2 Deneylerde kullanılan cihaz ve materyaller	28
3.1.3 Elektrokimyasal ölçüm sistemi.....	31
3.2 Metot.....	33
3.2.1 SPCE'lerin yüzeylerinin temizlenmesi	33
3.2.2 Çözeltilerin hazırlanması	33
3.2.3 SPCE'lerin modifikasyonu	36

3.2.4 CA125 immunosensörlerinin hazırlanması.....	38
3.2.5 HE4 immunosensörlerinin hazırlanması.....	39
3.2.6 AFP immunosensörlerinin hazırlanması.....	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	42
4.1 CA125 İmmunosensörleri.....	42
4.1.1 PTB _{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların karakterizasyonları.....	42
4.1.1.1 PTB _{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonları.....	42
4.1.1.2 SPCE/PTB _{DES} /AuNP'lerin morfolojik ve kimyasal karakterizasyonları	49
4.1.2 CA125 immunosensörlerinin geliştirilmesi	51
4.1.2.1 CA125 immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu	51
4.1.2.2 CA125 immunosensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonu	55
4.1.2.3 CA125 immunosensörlerinin analitik performansı	58
4.1.2.4 CA125 immunosensörlerinin seçiciliği	63
4.1.2.5 CA125 immunosensörleri ile gerçek numune analizi	64
4.2 HE4 İmmunosensörleri.....	65
4.2.1 MXene-COOH ve AuNP modifiyeli elektrotların karakterizasyonları.....	65
4.2.1.1 MXene-COOH ve AuNP modifiyeli elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonları.....	66
4.2.1.2 SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin morfolojik ve kimyasal karakterizasyonları.....	74
4.2.2 HE4 immunosensörlerinin geliştirilmesi	76
4.2.2.1 HE4 immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu	76
4.2.2.2 HE4 immunosensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonu	79
4.2.2.3 HE4 immunosensörlerinin analitik performansı	83
4.2.2.4 HE4 immunosensörlerinin seçiciliği	90
4.2.2.5 HE4 immunosensörleri ile gerçek numune analizi	91
4.3 AFP İmmunosensörleri.....	93
4.3.1 MWCNT-COOH, PAA _{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların karakterizasyonları	93
4.3.1.1 MWCNT-COOH, PAA _{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonları.....	93

4.3.1.2 SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES} /AuNP'lerin morfolojik ve kimyasal karakterizasyonları	103
4.3.2 AFP immunosensörlerinin geliştirilmesi	106
4.3.2.1 AFP immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu	106
4.3.2.2 AFP immunosensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonu	109
4.3.2.3 AFP immunosensörlerinin analitik performansı	114
4.3.2.4 AFP immunosensörlerinin seçiciliği	120
4.3.2.5 AFP immunosensörleri ile gerçek numune analizi	121
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	123
KAYNAKLAR	128
ÖZGEÇMİŞ.....	141

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}$	Derece
Rct	Direnç
Aea	Elektroaktif yüzey alanı
kDa	Kilodalton
μ A	Mikroamper
mV	Milivolt
ng/mL	Nanogram/mililitre
Ω	Ohm
i_p	Pik akımı
ΔI	Pik akımı arasındaki fark
pM	Pikomolar
t	Süre
v	Tarama hızı
U/mL	Unit/mililitre
V	Volt
~	Yaklaşık
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

µPAD	Mikroakışkan kağıt tabanlı analitik cihazlar
3-HPA	3-hidroksifenilasetikasit
3-TMSPM	3-(Trimetoksisilil)propil metakrilat
4-MOH	4-merkapt-1-bütanol
6-MHA	6-merkaptohexanoik asit
6-MOH	6-merkapt-1-heksanol
AA	Azur A
Ab	Antikor
AC	Alternatif akım
AFP	Alfa fetoprotein
Ag	Gümüş
AgNP	Gümüş nanopartiküller
APTES	3-aminopropil-trietoksisilan
Au@Pd USs	Au@Pd kestane şekilli nanoyapılar
AuNP	Altın nanopartiküller
BRCA	Meme kanseri geni
BSA	Sığır serum albümin
C4bp α	C4-bağlayıcı protein
CA125	Kanser Antijen 125
CD	Karbon dotlar
CLIA	Kemilüminesans immunoassay
CNT	Karbon nanotüp
CNT-NH ₂	Amin fonksiyonlu karbon nanotüp
CTES	Karboksietilsilanetriol
CuCo-ONSs	Bakır-kobalt oksit nanotabakalar
CuNP	Bakır nanopartiküller
CV	Dönüşümlü voltametri
ÇE	Çalışma elektrodu
DES	Derin ötektik çözücüler
DMF	Dimetil formamid
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
EC	Elektrokimyasal
EK	Endometriyal karsinom
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent testi
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FTO	Flor katkılı kalay oksit
GC/MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
gC ₃ N ₄	Grafit karbon nitrürler
GCE	Camsı karbon elektrot
GR	Grafen
HBA	Hidrojen bağı alıcısı
HBD	Hidrojen bağı vericisi
HCC	Hepatosellüler karsinomu
HE4	İnsan epididim proteini 4

HF	Hidojen florür
IL-6	İnterlökin-6
ITO	İndiyum kalay oksit
KE	Karşıit elektrot
LC	Sıvı Kromatografi
MB	Metilen mavisi
MDa	Megadalton
MoS ₂	Molibden disülfür
MSLN	Mezotelin
MUC16	Mucin16
MWCNT-COOH	Karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüpler
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü
NHS	N-hidroksisüksinimid
OK	Yumurtalık kanseri
OMC	Mezogözenekli karbon
OPN	Osteopontin
PANI	Polianilin
PEC	Fotoelektrokimyasal
PIGF	Plasental büyüme faktörü
POCT	Hasta başı testleri
PPy	Polipirol
PTH	Politiyonin
QD	Kuantum noktaları
RE	Referans elektrot
RGO	İndirgenmiş grafen oksit
SAM	Kendiliğinden oluşan tek tabakaları
SiONP	Silika nanopartiküller
SPCE	Yüzey baskılı karbon elektrot
SPE	Yüzey baskılı elektrotlar
SWV	Kare dalga voltametrisi
TB	Toluidin mavisi
TVUS	Transvajinal ultrason
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VOC	Uçucu Organik Bileşikler
WFDC2	WAP Dört Disülfür Çekirdek Alanı 2
ZIF-8	Zeolitik imidazolat iskeleti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1 Yumurtalık kanserinin yeri	2
Şekil 1. 2 CA125 antijeninin 3 boyutlu yapısı	3
Şekil 1. 3 HE4 antijeninin 3 boyutlu yapısı	4
Şekil 1. 4 AFP antijeninin 3 boyutlu yapısı	6
Şekil 1. 5 96 kuyucuklu ELİSA kiti	8
Şekil 1. 6 Geleneksel metotların şematik gösterimi	9
Şekil 1. 7 Nyquist grafiği	11
Şekil 1. 8 Etiketsiz (A) ve etiketli (B) immunosensörler	13
Şekil 1. 9 SPE'lerin yapısı	14
Şekil 3. 1 Metrohm DropSens μ Stat 400 Bipotentiostat/Galvanostat (A), kablo konnektör (B)	29
Şekil 3. 2 Gamry Interface 1010E Potentiostat/Galvanostat/ZRA (A), kablo konnektör (B)	30
Şekil 3. 3 DropStat	31
Şekil 3. 4 Gamry cihazı ile yapılan elektrokimyasal ölçümler	32
Şekil 3. 5 Metrohm Dropsens cihazı ile yapılan elektrokimyasal ölçümler	32
Şekil 3. 6 DropStat ile yapılan elektrokimyasal ölçümler	33
Şekil 3. 7 DES çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan düzenek	35
Şekil 3. 8 MXene (A) ve MXene-COOH'ın (B) hazırlanma basamakları	35
Şekil 3. 9 CA125 immunosensörlerinin hazırlanma şeması	39
Şekil 3. 10 HE4 immunosensörlerinin hazırlanma basamakları	40
Şekil 3. 11 AFP immunosensörlerinin hazırlanma şeması	41
Şekil 4. 1 SPCE/PTB _{DES30n} (A), SPCE/PTB _{DES25n} (B) ve SPCE/PTB _{DES20n} (C)'lerin dönüşümlü voltamogramları	44
Şekil 4. 2 SPCE/PTB _{DES} (30 n), SPCE/PTB _{DES} (25 n), SPCE/PTB _{DES} (20 n)'lerin dönüşümlü voltamogramlardan (tarama hızı: 10-125 mV s ⁻¹) (A, B ve C) ve pik akımı-tarama hızının karekökü (D, E ve F) grafikleri	45
Şekil 4. 3 PTB _{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların dönüşümlü voltamogramları (A), diferansiyel puls voltamogramları (B) ve elektrokimyasal empedans spektrumları (C)	47
Şekil 4. 4 SPCE (A), SPCE/PTB _{DES} (B) ve SPCE/PTB _{DES} /AuNP (C)'lere ait SEM görüntüleri	49
Şekil 4. 5 SPCE/PTB _{DES} /AuNP'lere ait EDX spektrumu (A), SPCE/PTB _{DES} 'lere ait FTIR spektrumu (B) ve SPCE/PTB _{DES} /AuNP'lerin XRD spektrumu (C)	50
Şekil 4. 6 SPCE/PTB _{DES} AuNP'lerle hazırlanan CA125 immunosensörlerinin dönüşümlü voltamogramları (A), diferansiyel puls voltamogramları (B) ve elektrokimyasal empedans spektrumları (C)	53
Şekil 4. 7 CA125 konsantrasyonu- ΔR_{ct} grafikleri: A) antikor konsantrasyon optimizasyonu, B) antikor inkübasyon süre optimizasyonu ve C) antijen inkübasyon süre optimizasyonu	56

Şekil 4. 8 CA125 immunosensörleri için 5 ile 100 pg mL ⁻¹ aralığında artan CA125 konsantrasyonuna karşı ΔR_{ct} grafiği	58
Şekil 4. 9 CA125 immunosensörlerinin uygulama kararlılığı: %ortalama bağıl ΔR_{ct} -gün grafiği.....	61
Şekil 4. 10 CA125 immunosensörlerinin depolama kararlılığı: %ortalama bağıl ΔR_{ct} -hafta grafiği.....	62
Şekil 4. 11 CA125 immunosensörlerinin rejenerasyon çalışması: %ortalama ΔR_{ct} -rejenerasyon sayısı grafiği	63
Şekil 4. 12 CA125 immunosensörlerinin seçicilik testi: %ortalama ΔR_{ct} -antiijen grafiği	64
Şekil 4. 13 SPCE, SPCE/MXene-COOH (1 LBL), SPCE/MXene-COOH (2 LBL) ve SPCE/MXene-COOH (3 LBL)'ların dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı (10-125 mV s ⁻¹) (A, B, C ve D) ve pik akımı-tarama hızının karekökü (E, F, G ve H) grafikleri.....	67
Şekil 4. 14 Farklı H ₂ AuCl ₄ konsantrasyonları (2, 4 ve 6 mM) ile hazırlanan SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin dönüşümlü voltamogramları (tarama hızı: 10-125 mV s ⁻¹) (A, B ve C) pik akımı-tarama hızı (D, E ve F) ve pik akımı-tarama hızının karekökü (G, H ve I) grafikleri	69
Şekil 4. 15 Farklı döngü sayısı (5, 10 ve 15 n) ile hazırlanan SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin dönüşümlü voltamogramları (tarama hızı: 10-125 mV s ⁻¹) (A, B, C) pik akımı-tarama hızı grafikleri (D, E, F) ve pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri (G, H, I)	70
Şekil 4. 16 SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin dönüşümlü voltamogramları (A), diferansiyel puls voltamogramları (B) ve elektrokimyasal empedans spektrumları (C).....	72
Şekil 4. 17 SPCE/MXene-COOH (A) ve SPCE/MXene-COOH/AuNP (B)'lere ait SEM görüntüleri.....	74
Şekil 4. 18 SPCE/MXene-COOH ve SPCE/MXene-COOH/AuNP'lere ait EDX spektrumları (A, B), SPCE/MXene-COOH'lara ait FTIR spektrumu (C) ve SPCE/MXene-COOH/AuNP'lere ait XRD spektrumu (D).....	75
Şekil 4. 19 SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerle hazırlanan HE4 immunosensörlerinin dönüşümlü voltamogramları (A), diferansiyel puls voltamogramları (B) ve elektrokimyasal empedans spektrumları (C)	77
Şekil 4. 20 25 mM, 50 mM ve 100 mM 6-MHA konsantrasyonlarıyla hazırlanan HE4 immunosensörleri ile HE4 analizine ait ΔI -C grafiği	79
Şekil 4. 21 HE4 konsantrasyonu- ΔI grafikleri: A) antikor konsantrasyon optimizasyonu, B) antikor inkübasyon süre optimizasyonu ve C) antiijen inkübasyon süre optimizasyonu	81
Şekil 4. 22 HE4 immunosensörleri için 5 ile 250 pM aralığında artan HE4 konsantrasyonuna karşı ΔI grafiği	84
Şekil 4. 23 HE4 immunosensörlerinin uygulama kararlılığı: %ortalama bağıl ΔI -gün grafiği.....	88

Şekil 4. 24 HE4 immunosensörlerinin depolama kararlılığı: %ortalama bağıl ΔI -hafta grafiği.....	89
Şekil 4. 25 HE4 immunosensörlerinin rejenerasyon çalışması: %ortalama bağıl ΔI -rejenerasyon sayısı grafiği	90
Şekil 4. 26 HE4 immunosensörlerinin seçicilik testi: %ortalama bağıl ΔI -antijen grafiği	91
Şekil 4. 27 DropStat ile HE4 analizi (pM).....	92
Şekil 4. 28 SPCE, MWCNT-COOH 1 LBL, 2 LBL, 3 LBL ve 4 LBL elektrotlarının dönüşümlü voltamogramlardan (tarama hızı: $10-125 \text{ mV s}^{-1}$) (A, B, C, D ve E) elde edilen pik akımı-tarama hızı (F, G, H, I ve J) ve pik akımı-tarama hızının karekökü (K, L, M, N ve O) grafikleri.....	96
Şekil 4. 29 SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES20n} (A), SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES25n} (B) ve SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES30n} (C)'lerin dönüşümlü voltamogramları.....	98
Şekil 4. 30 SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES} (20 n), SPCE/ MWCNT-COOH/PAA _{DES} (25 n), SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES} (30 n)'lerin dönüşümlü voltamogramları (tarama hızı: $10-125 \text{ mV s}^{-1}$) (A, B ve C) ve pik akımı-tarama hızının karekökü (D, E ve F) grafikleri.....	99
Şekil 4. 31 MWCNT-COOH, PAA _{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotlar için (A) dönüşümlü voltamogramlar (B) diferansiyel puls voltamogramlar (C) elektrokimyasal empedans spektrumları	101
Şekil 4. 32 SPCE/MWCNT-COOH (A), SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES} (B) ve SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES} /AuNP (C)'lere ait SEM görüntüleri.....	104
Şekil 4. 33 SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES} /AuNP'lere ait EDX spektrumu (A), SPCE/MWCNT-COOH'lara ait FTIR spektrumu (B) ve SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES} /AuNP'lere ait XRD spektrumu (C).....	105
Şekil 4. 34 SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES} /AuNP'lerle hazırlanan AFP immunosensörlerinin dönüşümlü voltamogramları (A), diferansiyel puls voltamogramları (B) ve elektrokimyasal empedans spektrumları (C).....	107
Şekil 4. 35 6-MOH konsantrasyon optimizasyonu için ΔI -6-MOH konsantrasyonu (A), APTES yüzdesi optimizasyonu için ΔI -%APTES (B) ve GA yüzde optimizasyonu için ΔI -%GA (C) grafikleri.....	110
Şekil 4. 36 AFP konsantrasyonu- ΔI grafikleri: A) antikor konsantrasyon optimizasyonu, B) antikor inkübasyon süre optimizasyonu ve C) antijen inkübasyon süre optimizasyonu	112
Şekil 4. 37 AFP immunosensörleri için $0,1$ ile 250 ng mL^{-1} aralığında artan AFP konsantrasyonuna karşı ΔI grafiği	114
Şekil 4. 38 AFP immunosensörlerinin uygulama kararlılığı: %ortalama bağıl ΔI -gün grafiği.....	118
Şekil 4. 39 AFP immunosensörlerinin depolama kararlılığı: %ortalama bağıl ΔI -hafta grafiği.....	119

Şekil 4. 40 AFP immunosensörlerinin rejenerasyon çalışmaları: %ortalama bağıl ΔI - rejenerasyon sayısı	120
Şekil 4. 41 AFP immunosensörlerinin seçicilik testi: %ortalama bağıl ΔI -antijen cevabı	121



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1 Deneylerde kullanılan elektrokimyasal ölçüm sistemlerinin şartları.....	32
Çizelge 3. 2 Deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanma prosedürleri	34
Çizelge 3. 3 Modifiye elektrotların hazırlanma prosedürleri	37
Çizelge 4. 1 PTB _{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların CV ve DPV'lerinden elde edilen $E_{pa_{ort}}$ ve $I_{pa_{ort}}$ değerleri ve EIS'lerinden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ değerleri.....	48
Çizelge 4. 2 CA125 immunosensörlerinin her bir hazırlanma basamağında CV ve DPV'lerinden elde edilen $I_{pa_{ort}}$ değerleri ve EIS'lerinden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ değerleri	54
Çizelge 4. 3 Literatürde yer alan etiketli ve etiketsiz CA125 immunosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen etiketsiz CA125 immunosensörünün performans karşılaştırması	59
Çizelge 4. 4 Geliştirilen CA125 immunosensörleri ile insan kan serumunda CA125 analizi	65
Çizelge 4. 5 SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin CV ve DPV'lerinden elde edilen $I_{pa_{ort}}$ ve ΔI_{pa} ve EIS'lerinden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ ve ΔR_{ct} değerleri.....	73
Çizelge 4. 6 HE4 immunosensörlerinin her bir hazırlanma basamağında CV ve DPV'lerinden elde edilen $I_{pa_{ort}}$ değerleri ve EIS'lerinden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ değerleri	78
Çizelge 4. 7 Literatürde yer alan etiketli ve etiketsiz HE4 immunosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen etiketsiz HE4 immunosensörünün performans karşılaştırması	85
Çizelge 4. 8 MWCNT-COOH, PAA _{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların CV ve DPV'lerinden elde edilen $I_{pa_{ort}}$ ve EIS'lerinden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ değerleri	102
Çizelge 4. 9 SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES} /AuNP'lerle hazırlanan AFP immunosensörlerinin CV ve DPV'lerinden elde edilen $I_{pa_{ort}}$ değerleri ve EIS'lerinden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ değerleri	108
Çizelge 4. 10 Literatürde yer alan etiketli ve etiketsiz AFP immunosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen etiketsiz AFP immunosensörünün performans karşılaştırması	116
Çizelge 4. 11 Geliştirilen immunosensörler ile insan kan serumunda AFP analizi	122

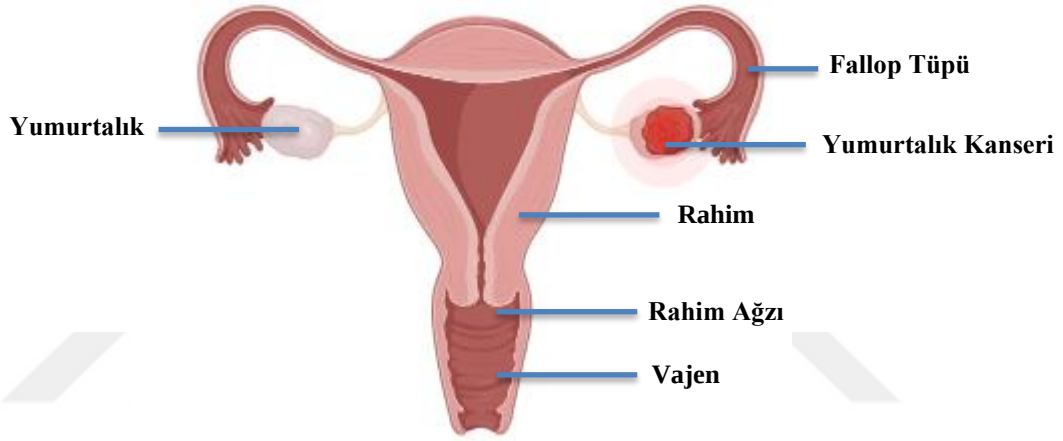
1. GİRİŞ

21. yüzyılın başlarına kadar kanser, hücreye özgü genetik veya epigenetik kökenli bir hastalık olarak görülmüştür. Buda kişiye özgü tedavide, kötü hücre özelliklerinin incelenmesine sebep olmuştur (Vitale *et al.* 2021). Tümörler hücresel formlarına ve konumlarına göre derecelendirilebilmektedir. Düşük dereceli tümörler (iyi huylu tümörler) yavaş büyür, yakındaki dokulara yayılmaz ve normal hücrelere benzerler. Yüksek dereceli tümörler (kötü huylu tümörler) çok hızlı büyür, yayılır ve normal hücrelere benzemezler (Rai, 2024). Kanser, bağışıklığı, metabolizmayı, sinir hücrelerini ve mikrobiyolojiyi etkileyen sistemsel bir hastalıktır (Liu and Shah 2022). Başka bir deyişle kanser, insan vücudundaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde hızlıca çoğalmasıdır ve bu çoğalma hastalığın birincil nedenidir. Vücudun herhangi bir yerinde oluşabilen kanser, koşullara bağlı olarak yakındaki hücrelere de yayılabilir. Genellikle, evresine bağlı olarak iyi huylu veya kötü huylu olarak sınıflandırılması mümkündür (Hamid and Khan 2020; Hosseinzadeh *et al.* 2019). İyi huylu tümör veya kanser, başlangıç evresinde olan ve vücudun diğer bölgelerine yayılmayan kanser türüdür. Öte yandan kötü huylu tümörler, vücudun diğer bölgelerine yayılma potansiyeline sahip oldukları için oldukça endişe vericidir (Han *et al.* 2018). En yaygın ve tehlikeli kanser türleri olarak akciğer kanseri, cilt kanseri, beyin tümörleri, yumurtalık kanseri, meme kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri ve kan kanseri olarak örneklendirilebilir (Rai, 2024).

Kanser erken bir aşamada tespit edilirse, uygun tedavi kullanılarak tamamen iyileştirilebilir. Hastaların uygulanan tedaviden olumlu sonuç almasını sağlamak için kanserli dokuyu erken bir aşamada yüksek hassasiyetle tanımlayabilen bir yöntemin geliştirilmesi gerekmektedir. Kanserın erken evrelerinde tespiti ve tedavisi çok önemlidir ve birçok hayat kurtarabilir. Ancak teşhiste herhangi bir hata veya gecikme birçok hastanın hayatını kaybetmesine neden olabilir. Bu sebeple kanserin erken teşhisi hayati önem taşımaktadır (Han *et al.* 2018; Rai, 2024).

1.1 Yumurtalık Kanseri

Yumurtalık kanseri (OK) yumurtalıktaki anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve bölünmesi ile başlayan kanser türüdür (Şekil 1.1) (Ghose *et al.* 2024). Jinokolojik kanser türleri arasında en ölümcül olanıdır. Vakaların çoğu ileri evrede teşhis edildiği için gerekli önlemler alınamaz ve hastalığın ilerlemesine sebep olur (Arora *et al.* 2021).



Şekil 1. 1 Yumurtalık kanserinin yeri

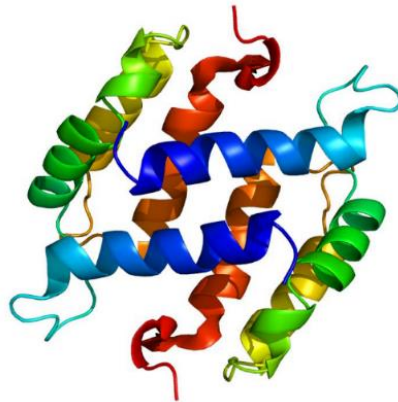
Günümüzde kullanılan mevcut erken tanı yöntemleri, tümör biyobelirteç analizleri, tam pelvik muayene (rahim, yumurtalıklar ve pelvik organlarının elle muayenesi) ve transvajinal ultrason (TVUS) olarak üç aşamalı bir değerlendirmeyi içerir. Erken teşhis önemli bir zorluktur, çünkü kadınlar belirti göstermeyen (latent) semptomlar nedeniyle hastalıklarının seyri sırasında yeterince erken tıbbi yardım almayabilir ve vakaların %20'sine kadarı tamamen gözden kaçabilir. Bununla birlikte, teşhis edilen epitel OK hastalarının yaklaşık %6-15'inde tespit edilen meme kanseri (BRCA) genlerinde germ hattı patojenik varyantları vardır. BRCA varyantlarına sahip olduğu tespit edilen kadınların yaşam boyu riski %10-60 artmıştır. OK'yı erken teşhis etmek ve vakaların sağkalım sürecini artırmak için, yeterince hassas ve özgül biyobelirteçlere ihtiyaç vardır (Ghose *et al.* 2024).

1.2 Yumurtalık Kanseri Biyobelirteçleri

Biyobelirteçler sistematik olarak bir dizi kategoriye göre sınıflandırılabilir. Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) Kanser Terimleri Sözlüğü'ne göre biyobelirteç tanımı, "kanda, diğer vücut sıvılarında veya dokularda bulunan ve normal veya anormal bir sürecin veya bir durumun veya hastalığın işareti olan biyolojik bir molekül" anlamına gelmektedir (Surinova *et al.* 2011). Son 40 yılda, OK'nın klinik izlemesini ilerletmek için birçok biyobelirteç araştırılmıştır. Bunların başında, Kanser Antijen 125 (CA125), İnsan epididim proteini 4 (HE4), Alfa fetoprotein (AFP) ve Mezotelin (MSLN) gelmektedir.

1.2.1 CA125

Mucin16 (MUC16) olarak da adlandırılan CA125, ~2,5 megadalton (MDa) moleküler kütleye sahip büyük bir glikoproteindir ve Şekil 1.2'de gösterilmiştir (URL 1) (Charkhchi *et al.* 2020). CA125 antijeninin normalde vücutta birden çok yerde bulunduğu bilinmektedir. Sağlıklı kadınların servikal mukusunda bulunur ve muhtemelen endoservikal hücrelerden üretilir ve salgınır. CA125 geliştirmekte olan fetüsün amniyotik sıvısında ve koryonik membranında da yüksek miktarda bulunur (Charkhchi *et al.* 2020).



Şekil 1. 2 CA125 antijeninin 3 boyutlu yapısı

CA125 epitel OK'yı taramak için kullanılan güvenilir bir biyobelirteç olmuştur ve yumurtalık kanseri hücrelerinde CA125'in eksprese edildiği bilinmektedir (Zhang *et al.* 2021). Ulusal Sağlık ve Bakım Enstitüsü tarafından yayınlanan epitel OK teşhisinde

CA125 için verilen referans aralığı 0–35 U mL⁻¹'dir (Ghose *et al.* 2024). CA125, OK'nın teşhisi için 1981 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ilk ve en yaygın olarak bilinen serum biyobelirtecidir. Ancak, OK tarama yöntemleri içerisinde kesinliği daha az olan biyobelirteçtir. Jinekolojik dokuda bulunan bir glikoproteindir, ancak iyi huylu durumlarda ve yumurtalık dışı kötü huylu tümörlerde de yükselir. Bazı OK alt tiplerinde CA125 seviyeleri tespit edilemez veya orta düzeydedir. CA125 seviyelerinin evre I karsinomlu hastalarda duyarlılığı %23-50 daha da düşük olduğu bilinmektedir (Ghose *et al.* 2024). Bu sebeple OK'nın erken teşhisinde CA125 ile birlikte yeni biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmuştur.

1.2.2 HE4

HE4 peynir altı suyu asidik proteinidir ve Şekil 1.3'te gösterilmiştir (URL 2). 20q12-13.1 kromozomundaki WAP Dört Disülfür Çekirdek Alanı 2 (WFDC2) geni tarafından kodlanır. Hücre dışı proteinaz inhibitörlerine homolog bir diziye sahip WAP tipi dört disülfür çekirdek alanı içerir. Dişi üreme sistemi de dahil olmak üzere çeşitli dokuların epitelinde eksprese edilir (Behrouzi *et al.* 2021). Son çalışmalar HE4'ün endometriyal karsinom (EK) proliferasyonunu, invazyonunu ve büyümesini artırdığını göstermiştir (Behrouzi *et al.* 2021).



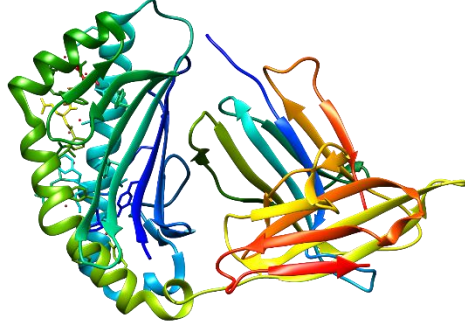
Şekil 1. 3 HE4 antijeninin 3 boyutlu yapısı

HE4, OK'nın tespiti için 2008 yılında FDA tarafından onaylanmış serum biyobelirtecidir. Yaş, adet döngüsü, sigara kullanımı, böbrek yetmezliği ve diğer maligniteler, özellikle üreme kökenli olanlar ve ayrıca solunum yolu kanserleri gibi çeşitli yumurtalık dışı faktörlerle de serum HE4 seviyeleri yükselebilmektedir. HE4, yaş ve menopoiz durumu ile önemli ölçüde arttığından, menopoiz öncesi ve sonrası kadınlar için farklı eşik referans değerleri kullanılır ve menopoizlu kadınlarda daha yüksek bir eşik değeri temel alınır.

CA125'in aksine HE4, OK'yı iyi huylu tümörler gibi diğer iyi huylu yumurtalık kitlelerinden ayırt etmede daha iyidir. Tek başına erken teşhis aracı olarak kullanımı sınırlı olsa da, diğer biyobelirteçlerle birlikte kullanıldığında önemli bir rol oynayabilir (Ghose *et al.* 2024). HE4, OK'nın teşhisinde serum CA125'e kıyasla üstün duyarlık ve özgüllük göstermektedir. Hastalığın şiddeti, sağ kalım ve tekrarlanan histopatolojik belirteçleriyle korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Bu nedenle HE4, ümit verici bir non-invaziv biyobelirteçtir (Degez *et al.* 2021).

1.2.3 AFP

AFP, kromozom 4q25'teki AFP geni tarafından kodlanan 70 kilodaltonluk (kDa) tek bir polipeptittir ve Şekil 1.4'te gösterilmiştir (URL 3). AFP'nin eser miktarları böbreklerde ve fetüsün gastrointestinal sisteminde sentezlenir (Özcan vd. 2024). AFP, genellikle karaciğer kanseri (özellikle hepatosellüler karsinom) ve germ hücreli tümörlerin teşhisinde ve izlenmesinde kullanılan FDA onaylı bir biyobelirteçtir. Ayrıca, obstetrik alanda, anne serumunda AFP düzeyleri nöral tüp defektleri ve Down sendromu gibi fetal anormalliklerin taranmasında kullanılır (Şekil 1.4) (Heiat and Negahdary 2019; Shan *et al.* 2024).



Şekil 1. 4 AFP antijeninin 3 boyutlu yapısı

HCC kronik karaciğer hastalıkları ve sirozu olan hastalarda çok sık görülen kanser türlerinden biridir (Yaiwong *et al.* 2023). HCC olan hastalarda AFP için serum pozitifliği %75-80'dir. Sağlıklı insanlarda AFP konsantrasyonu yaklaşık 25 nanogram/mililitredir (ng/mL) (Liu *et al.* 2017; Shan *et al.* 2024). Yetişkin serumunda yüksek AFP düzeyleri büyük olasılıkla kötü huylu bir hastalığın belirtisidir ve birincil HCC'nin spesifik bir tanısal klinik göstergesi olarak kullanılabilir (Shan *et al.* 2024). Serumdaki AFP seviyesi aynı zamanda yumurtalık tümörlü lezyonların bir belirteci olarak da kullanılabilir. Bununla birlikte tedavi yanıtının değerlendirilmesinde ve olası hastalık tekrarının izlenmesinde fayda sağlamaktadır (Ferraro *et al.* 2019).

1.2.4 Diğer biyobelirteçler

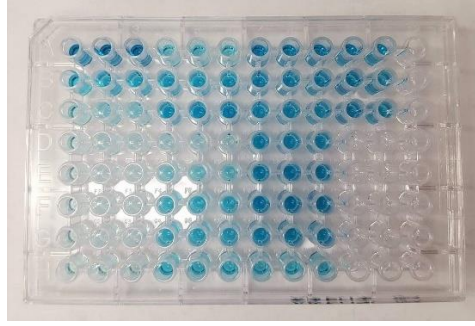
Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) biyobelirteci, anjiyogenezle ilişkili biyobelirteçler arasında yer alır. Anjiyogenez, vasküler endotel hücrelerinin uyarılması yoluyla yeni damarların gelişimini içerir. OK dahil olmak üzere katı tümörlerde tümör ilerlemesine katkı sağlamaktadır. Anjiyogenez sürecinde tanımlanan en önemli biyobelirteç VEGF'dir. VEGF ailesi, VEGF-A, B, C, D ve plasental büyüme faktörü (PlGF) proteinlerini içerir (Ghose *et al.* 2024). Bir diğer biyobelirteç olan osteopontin (OPN), hücre yapışma proteini olarak işlev gören ve sitokin özellikleri olan bir ekstraselüler matris glikoproteinidir. Yara iyileşmesi, inflamasyon, makrofaj düzenlemesi ve tümör yayılmasındaki rolü rapor edilmiştir (Ghose *et al.* 2024).

MSLN ise mezotel hücreleri tarafından salgılanan zarla çevrili bir yüzey glikoproteinidir ve özellikle mukuslu olmayan alt tipler arasında OK'da serum MSLN seviyeleri artmaktadır (Ghose *et al.* 2024). İnterlökin-6 (IL-6), tümör mikroçevresini değiştirebilen ve VEGF'nin aşırı ekspresyonu yoluyla anjiyogeneze yol açabilen proinflamatuvar bir sitokindir. IL-6, şüpheli yumurtalık kitlelerinin taranması için bir tanı aracı olarak araştırılmıştır. Serum IL-6 düzeyleri yüksek dereceli serum OK'da daha yüksektir. IL-6, CA125 ve HE4 biyobelirteçlerle birlikte kullanıldığında, artan duyarlılık, özgüllük, tanısal doğruluk, genel öngörü olasılığı ve daha düşük yanlış pozitifler vardır (Ghose *et al.* 2024).

1.3 Yumurtalık Kanseri Biyobelirteçlerinin Tayin Metotları

Bazı kanser hastalarında biyobelirteçler tümörlerde, kanda, idrarda, dışkıda, diğer vücut sıvılarında veya dokularda bulunabilir. Tümör biyobelirteçleri, kanser hakkında saldırganlığı, yanıt verebileceği tedavi türü veya tedaviye yanıt verip vermediği gibi bilgiler ortaya çıkarabilir (Pilvenyte *et al.* 2023). Kromatografiye dayalı birleşik teknikler biyokimyasal araştırmalarda uygulanmaktadır. Kanser hücresi büyümesinin hücre içi metabolizması tanımlanabilmektedir (Kałużna-Czaplińska and Jóźwik, 2014). Uçucu Organik Bileşikler (VOC'ler), normal koşullarda düşük molekül ağırlığı, düşük kaynama noktası ve/veya yüksek buhar basıncı gibi bazı özelliklere sahip, kararlı kimyasal moleküller olarak bilinir. VOC'ler nefes, idrar, dışkı ve terde yayılabilir ve tespit edilebilir. Günümüzde farklı hastalıkların teşhisinde geliştirilen, kromatografiye dayalı birleşik teknikler VOC'lerin kullanımına olan ilgiyi artmaktadır (Lubes and Goodarzi, 2018). Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile insan vücut sıvıları (tükürük, ter vb.) kullanılarak analiz yapılmaktadır. GC-MS'in, özellikle insan vücut sıvıları üzerinde yapılan araştırmalarda uygulandığında birçok avantaja sahip olduğu bildirilmiştir (Kałużna-Czaplińska and Jóźwik 2014). GC-MS dışında organik bileşiklerin incelenmesi için kullanılan diğer kromatografik teknikler, Sıvı Kromatografi-MS (LC-MS) ve LC-MS/MS'dir. Örneğin LC-MS idrar örneklerini analiz etmektedir. Fakat bu yöntemlerde kullanılan teknikler çok maliyetli ve zaman alıcıdır (Kałużna-Czaplińska and Jóźwik 2014). Kromatografik metotlar dışında, Enzim bağlı immunosorbent testi (ELISA) kanser biyobelirteçlerinin teşhisi için kullanılan kitlerdir

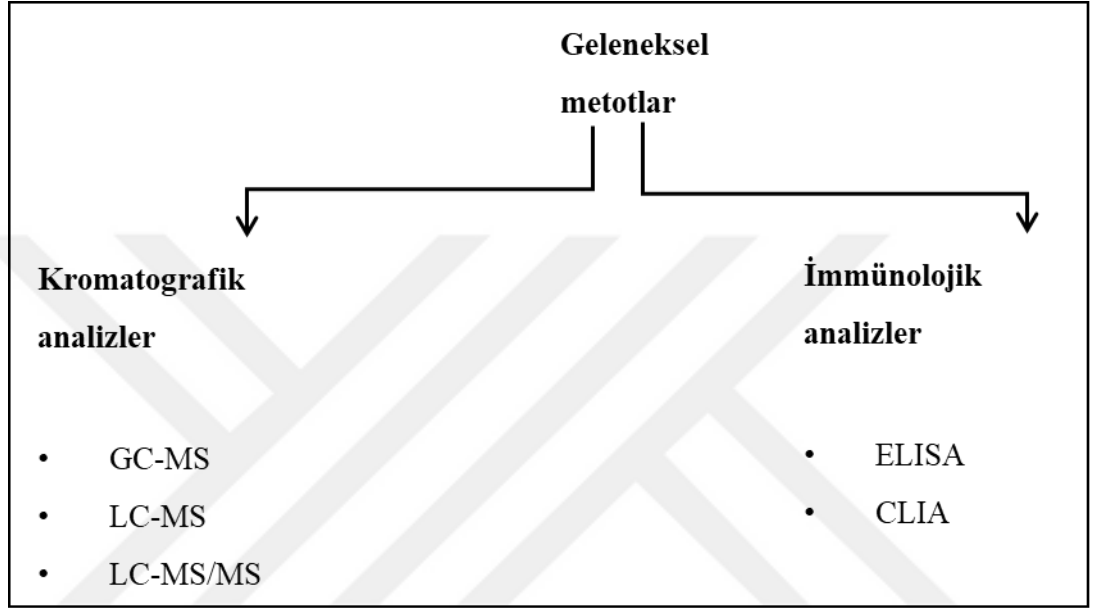
ve Şekil 1.5'te gösterilmiştir (URL 4). ELISA genellikle 96 kuyulu plakalarda gerçekleştirilir.



Şekil 1. 5 96 kuyucuklu ELİSA kiti

Bu tür kitlerde, 96 kuyulu plakalar genellikle fiziksel adsorpsiyon yoluyla plakanın kuyularına kaplanmış birincil bir antikor ve ardından spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için bloke etme ile birlikte gelir. Kitler ayrıca çalışma prosedürleri de sağlar. Kısaca, bir antijen örneği önce antikor-antijen kompleksi oluşturmak için gereken süre boyunca kuyudaki birincil antikorlarla inkübe edilir. İnkübasyondan sonra, plaka genellikle kit sağlayıcısı tarafından sağlanan yıkama tamponu ile yıkanır. Antijen-antikor kompleksi yıkandıktan sonra enzim etiketli tespit antikoruyla inkübe edilerek antikor-antijen-antikor sandviçi oluşturulur. İstenilen süre inkübe edildikten sonra yıkama tamponuyla yıkandıktan sonra kompleks enzim substratı ve indikatör boyayla inkübe edilir. İnkübasyon sırasında enzimatik reaksiyon, optik okuyucu kullanılarak yapılan ölçümde absorbans değerini sağlayan indikatör boyanın renginin değişmesiyle sonuçlanır. Standart çözelti kalibrasyonu ile karşılaştırıldığında absorbans değeri analitin konsantrasyonunu verir. Test prosedürü oldukça uzundur ve genellikle pahalı bir optik okuyucu gerektirir (Arya and Estrela 2018). Ayrıca, ELISA genellikle tek bir biyobelirteci ölçmekte, birden fazla biyobelirteç ölçülecekse örnek hacmi gereksinimleri önemli ölçüde artmaktadır. ELISA analiz yönteminin performansını etkileyebilecek diğer faktörler: katı fazın tekdüzeliği, reaktiflerin kararlılığı, çeşitli hacimler için pipetlerin seçimi ve kalibrasyonu, plaka yıkayıcı, ön analitik örnek işleme ve kit saklama koşulları olarak sıralanabilir (Gug *et al.* 2019).

Serumda biyobelirteçlerin teşhisi için kullanılan diğer immunolojik analizler ise kemilüminesans immunoassay (CLIA) ve görüntüleme verilebilir. Bu tekniklerinde sınırlı dinamik aralık, uzun bir inceleme süresi, pahalı bir maliyet ve yetenekli bir uzmana ihtiyaç duyma gibi dezavantajları vardır (Li *et al.* 2020). Şekil 1.6’da geleneksel metotların şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 1. 6 Geleneksel metotların şematik gösterimi

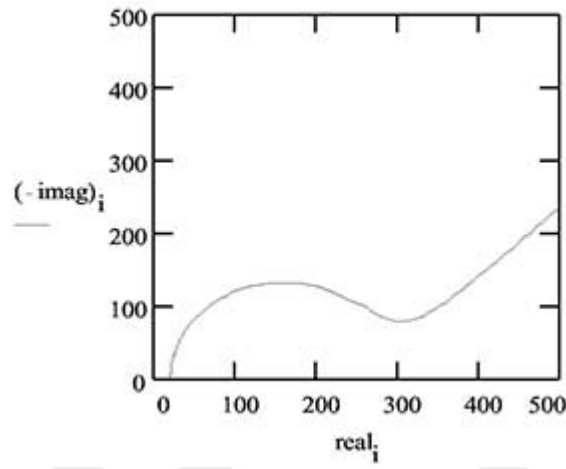
Hızlı test edilebilen, kullanımı kolay ve son derece hassas ve doğru bir test geliştirme amacıyla, immunosensörler son zamanlarda çok fazla ilgi görmüştür (Özcan vd. 2024). İmmünoanalizler ve immünolojik analizler arasında hassas bir ayrım vardır; bir immünolojik analiz sistemi, antijenin tanıma sürecinin başka bir yerde gerçekleşmesi anlamında antikor ve antijen arasındaki etkileşime dayanır. Ancak immunosensörlerde immünokompleksin oluşumu ve tanı aynı platformda gerçekleşir (Mollarasouli *et al.* 2019). Elektrokimyasal immunosensörler, son derece düşük tespit sınırlarıyla ultra hassas olarak bilinmektedirler. Bahsedilen immünolojik testlerin kolaylık ve pratiklik açısından önüne geçmiştir (Özcan vd. 2024).

1.4 Elektrokimyasal İmmunosensörler

İmmunosensör, antikor ve karşılık gelen antijen arasındaki etkileşimlere dayanan bir tür afinite biyosensörüdür. Antikor ve antijenin bağlanması, kalorimetrik (Marrazza *et al.* 2024), elektrokimyasal (Zhang *et al.* 2023), optik (Ma *et al.* 2023) ve kütle değişimine dayalı yöntemler (Rabbani *et al.* 2024) gibi farklı transdüksiyon (sinyal) teknikleri kullanılarak ölçülebilir. Bu yöntemler arasında düşük enstrümantasyon maliyeti, yüksek hassasiyeti, minyatürleştirme kolaylığı ve yerinde analizler için taşınabilirlik potansiyeli nedeniyle elektrokimyasal yöntemler en pratik olanıdır (Özcan vd. 2024).

Elektrokimyasal immunosensörler genellikle, antikor ve antijen arasındaki bağlanmadan kaynaklanan akımların ve/veya direncin ölçülmesine dayanan, elektrot yüzeyindeki bir tanıma elemanının (antikor veya antijen) sabitleştirilmesi yoluyla hazırlanır (Wan *et al.* 2013; Mollarasouli *et al.* 2019). Elektrokimyasal immunosensörler, elektrik sinyalinin türüne bağlı olarak amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik ve impedimetrik olarak sınıflandırılabilir. Amperometrik immunosensörlerde çalışma elektroduna sabit bir potansiyel uygulanarak elektroaktif bir türün yükseltgenmesini veya indirgenmesini takip ederek akımın ölçülmesi prensibine dayanır. Antikor veya antijenler elektroaktif olmadığı için biyobelirteçlerin tespiti için bir yanıt elde etmek amacıyla elektroaktif etiketlerin veya medyatörlerin kullanılması gerekir. Potansiyometrik immunosensörlerde, antikor ve antijen arasında oluşan immunokompleks potansiyel değişiminin ölçülmesine dayanır. Bu ölçüm sisteminde analitlerin potansiyel farklarının az olması sebebi ile girişim etkisi göstermektedir. Kondüktometrik immunosensörler, iletkenlik ile biyo-tanım olayı arasındaki ilişkiye dayanmaktadır. Biyo-tanım elemanı ile antijen arasında reaksiyon meydana geldiğinde, iyonik tür konsantrasyonundaki değişiklik nedeniyle çözeltinin iletkenliği değişir. Öte yandan, enzimle etiketlenen antikorlar numune çözeltisindeki antijenlerle konjuge edildiğinde destekleyici elektrolitin iletkenliği değişir, antijen-antikor kompleksinin elektrot yüzeyini bloke etmesinin inhibe edici etkisiyle enzimin performansı durur. Bu sinyal bir ohmmetre veya multimetre ile ölçülebilir. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), impedimetrik immunosensörlerin ölçüm sisitemini oluşturur. Özellikle etiketsiz tespit için kimyasal sensörler ve biyosensörlerde yüzey karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılan önemli ve kullanışlı

bir metottur. Ek olarak, elektrot/elektrolit arayüzünün DNA'lar, proteinler, antikorlar, antijenler, iyonlar vb. gibi moleküller arasındaki bağlanma kinetiğinin incelenmesi için kullanılabilir. EIS'nin temel etkisi, genellikle 5 veya 10 milivolt (mV)'luk küçük bir bozulma ile geniş bir frekans aralığında sabit bir alternatif akım (AC) potansiyelinin uygulanmasına dayanır. Sonuçlar daha sonra, empedansın sanal kısmının ($-Z''$) empedansın gerçek kısmına (Z') göre çizildiği bir Nyquist grafiği vermektedir. Şekil 1.7'de (URL 5) tipik bir Nyquist grafiği gösterilmektedir.



Şekil 1. 7 Nyquist grafiği

Bu tip immunosensör, başka bir etikete ihtiyaç duyulmadan doğrudan antikor-antijen etkileşimini inceler, bu sebeple hedef biyobelirteçlerin tespiti için çok uygundur. Bu tip immunosensörlerin avantajları basit ve hızlı tespit, düşük maliyet, çevresel koşul değişikliklerinden etkilenmeme, numune ön işlemi olmaması ve çok çeşitli analitlerin tespiti için uygulanabilmesidir. Sonuç olarak elektrokimyasal immunosensörler basitlikleri ve özellikle taşınabilir olmalarıyla ön plana çıkmaktadır (Mollarasouli *et al.* 2019).

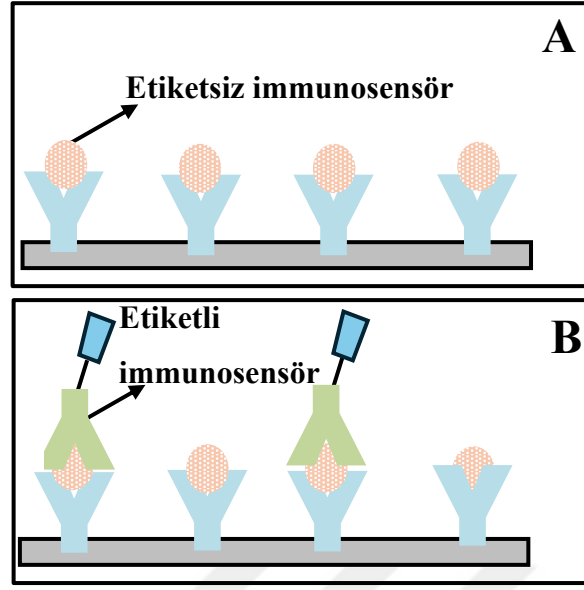
Kanser biyobelirteçlerini ölçmede elektrokimyasal ölçüm sistemleri hızlı, doğru ve hassas erken teşhis sağlayabildikleri, kanser metastazını ve anjiyogenezisini izleyebildikleri, antikanser kemoterapi ilaçlarının etkinliğini invaziv olmayan bir şekilde ölçebildikleri ve analiz edebildikleri için alternatif yöntemler olma potansiyeline sahiptir. Elektrokimyasal yöntemlerin düşük maliyet, basitlik, minyatürleştirilmelerinin ve seri üretimlerinin daha

kolay olması gibi avantajları vardır. Ayrıca evde veya doktor muayenehanesinde minyatür cihazlar olarak da kullanılabilirler. Bu nedenle önemli ilgi görmüşlerdir ve yüksek seçiciliğe sahip kanser belirteçlerinin tespiti için ultra hassas elektrokimyasal immunosensörler geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Cui *et al.* 2019).

1.4.1 Etiketli ve etiketsiz elektrokimyasal immunosensörler

Etiketsiz immunosensörler, doğrudan antijen-antikor kompleksi oluşumundan kaynaklanan fiziksel veya kimyasal değişiklikleri tespit edebilir (Şekil 1.8A). Bu tip immunosensörde, etiket kullanmaya gerek yoktur. Hızlı ve gerçek zamanlı analiz için uygulanabilir. Bu nedenle, etiketsiz immunosensörlerin klinik yaklaşımda uygulanması son yıllarda giderek daha fazla tercih edilir hale gelmiştir (Mollarasouli *et al.* 2019). Bununla birlikte, etiketsiz immunosensörler, ikincil antikor talebi olmadığından, etiketli stratejilere kıyasla daha basit ve düşük maliyetli analizler gerçekleştirilmesi sebebiyle tercih edilmektedir (Haji-Hashemi *et al.* 2019).

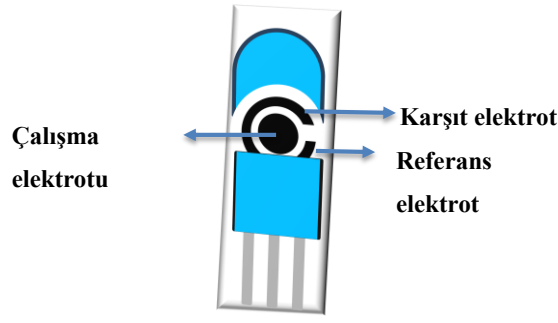
Etiketli immunosensörler, bir veya birkaç etiketten üretilen sinyale dayalı immunosensörlerdir (Şekil 1.8B). Etiketli immunosensörlerde etiket olarak enzim (yaban turpu peroksidazı, glikoz oksidazı ve alkalın fosfataz gibi) ve prusya mavisi gibi floresanlı boyalar, altın nanopartiküller (AuNP) veya farklı kuantum noktaları (QD'ler) gibi çeşitli nanomalzemeler sinyali yükseltmek için kullanılabilir. Etiketli immunosensörlerde, etiketler bir elektron transferi elde etmek için bir antikor veya antijene bağlanabilir ve ölçüm sırasında tespit edilen etiket sayısının hedef analit sayısına karşılık geldiği varsayılır. Ancak biyomolekülü etiketlemenin antijen antikor bağlanma verimliliğini düşürmesi, kullanılan antikor,enzim gibi etiketlerin maliyeti arttırması ve yapılan analiz süresinin artması gibi dezavantajı vardır (Fowler *et al.* 2008; Mollarasouli *et al.* 2019).



Şekil 1. 8 Etiketsiz (A) ve etiketli (B) immunosensörler

1.4.2 Yüzey baskılı elektrotlar (SPE)

Serigrafi baskı tekniğiyle elektrot basımı son zamanlarda giderek artmaktadır. Bu teknikle elektrotlar plastik veya seramik alt tabakalar üzerine farklı mürekkep türlerinin (karbon ve altın vb. gibi metalik mürekkep) basılmasıyla üretilmektedir ve yerinde analize imkan tanıyan elektrokimyasal ölçümlerde kullanılmaktadır. SPE'lerin çeşitli elektrokimyasal sensörlerde ve biyosensörlerde dönüştürücü olarak kullanımı giderek artmaktadır. SPE'ler (biri çalışma elektrodu (ÇE), biri referans elektrot (RE) ve biri karşıt elektrot (KE) olmak üzere üçlü bir sistemden oluşmaktadır (Şekil 1.9). Baskı makineleri ile çok ucuz ve hızlı bir şekilde seri üretim yapılabilir (Wahyuni *et al.* 2021).



Şekil 1. 9 SPE'lerin yapısı

SPE'ler basitlikleri, taşınabilirlikleri, düşük maliyetleri ve seri üretimlerinin kolaylığı nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Zhou *et al.* 2022). Özellikle yerinde ve gerçek zamanlı tespitte olan talebin artması (Holmes *et al.* 2019) ışığında, SPE'nin avantajları oldukça önemli hale gelmiştir. Ne yazık ki, çeşitli iletken materyallerle modifiye edilmemiş SPE'nin zayıf elektrokimyasal özellikleri, özellikle karmaşık doğal numuneler için doğrudan tespit uygulamalarını sınırlamaktadır. Bu nedenle, SPE'nin performansını iyileştirmek için birçok çaba sarf edilmiştir (Zhou *et al.* 2022). Bu malzemeler arasında, karbon nanomalzemeler, özellikle grafen (GR) ve karbon nanotüpler (CNT'ler) olmak üzere dikkate değer fiziksel/kimyasal özellikleri nedeniyle giderek artan bir ilgi görmektedir (Divya *et al.* 2021; Xie *et al.* 2021). Karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT-COOH) mükemmel elektriksel iletkenlikleri ile bilinmektedirler (Kumar *et al.* 2023). Buna ek olarak iyi mekanik mukavemet, ayarlanabilir fotonik özellikler, fonksiyonel gruplarla yüzey modifikasyonunun kolaylığı ve metal veya organik bileşenlerle konjuge olma yeteneği gibi olağanüstü özelliklere sahiptir (Kumar *et al.* 2023). Bu eşsiz özellikleri nedeniyle tez çalışmasında MWCNT-COOH, yüzey baskılı karbon elektrotların (SPCE) yüzey modifikasyonunda kullanılmıştır. Karbon temelli malzemeleri ek olarak son yıllarda büyük ilgi gören MXene'de yine bu tez çalışmasında SPCE'lerin modifikasyonunda kullanılmıştır. MXene 3 boyutlu yapısı ve fonksiyonel gruplarla rahatlıkla işlevselleştirilebilmesi özellikleri ile de ön plana çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında MXene-COOH, SPCE'lerin yüzey modifikasyonunda kullanılmıştır. MXene-COOH üzerine AuNP modifikasyonu sonrası bu iki materyalin sinerjik etki göstermiştir.

Tez kapsamında derin ötektik çözücüler (DES'ler) ise fenazin boyalarının çözücüsü olarak kullanılmıştır. DES, hidrojen bağı alıcısı (HBA) ve bir hidrojen bağı vericisi (HBD) karıştırılarak erime noktasında büyük bir düşüş olan çözücülerdir. Bu özellikleri sebebi ile sulu çözeltilerde çözünemeyen türler rahatlıkla DES içerisinde hazırlanabilmektedir. DES basit bir yeşil yöntem ile hazırlanmaktadır ve toksik olmaması ile dikkat çekmektedir (Brett, 2024). DES içerisinde hazırlanan fenazin boyaları ile yapılan elektropolimerizasyon işlemi diğer sulu çözeltiler ile yapılan elektropolimerizasyona göre daha iyi performans sergilemektedir. Tez çalışmasında kullanılan fenazin boyaları olan Toluidin mavisi ve Azur A'da DES içerisinde hazırlanmıştır. Fenazin boyalarının iletken olduğu bilinmektedir (Brett, 2024). Tez çalışmasında bu monomerlerin elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir ve yüzeyde kararlı polimerler oluşturulmuştur. Polimerler SPCE'lerin elektroaktif yüzey alanını genişletmiş ve immunosensörün performansını artırmıştır.

1.4.3 Hasta başı testleri

Hasta başı testleri (POCT), hızlı ve yerinde tespitteki belirgin avantajları nedeniyle son zamanlarda büyük ilgi görmektedir. POCT, taşınabilir analitik bir cihazdır. Doğrudan numuneyi yerinde ölçebilmektedir. Kullanılan ölçüm metoduna bağlı olarak saniyeler veya dakikalar içinde analiz gerçekleştirilebilmektedir. Geleneksel tespit stratejisiyle karşılaştırıldığında, POCT daha hızlı, uygun fiyatlı ve kullanıcı dostudur (Wang *et al.* 2024). Üretim teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, çeşitli analitlerin tespiti için bir dizi POCT cihazı üretilmiştir. Kağıt tabanlı analitik cihazlar (PAD'ler) (Singh *et al.* 2018), mikroakışkan cihazlar (Sachdeva *et al.* 2021), mikroakışkan kağıt tabanlı analitik cihazlar (μ PAD'ler) (Cate *et al.* 2015) ve mikrodiziler (Hu *et al.* 2014) yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang *et al.* 2024).

POCT günümüzde birçok alanında kullanılmaya başlanmıştır (çevre, sağlık ve gıda gibi). Özellikle sağlık sektöründe hastalığın tespiti, izlenmesi ve sağlık hizmetlerine sunduğu pratiklik ve ekonomikliği ile ön plana çıkmıştır (Bilgi Kamaç vd. 2023a). POCT'ler, biyosensör sistemleri ile entegre edildiğinde, yüksek özgüllükte hızlı yanıt ve taşınabilir olması gibi avantajlar sağlayabilmektedir. Tek kullanımlık olan SPE'ler pratik olmaları sebebiyle biyosensör sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu elektrotların POCT

cihazları ile birlikte kullanımı ise çevre, sağlık ve gıda alanlarında pratik, düşük maliyetli ve basit bir sistemle uzman gerektirmeden analizler yapılmasına olanak tanıyabilmektedir (Bilgi Kamaç vd. 2023a).



2. LİTERATÜR ÖZETİ

Yumurtalık kanseri erken evrelerde yumurtalıklarda başlayıp sonlara doğru karın bölgesine kadar yayılabilmektedir. Yumurtalık kanseri karın bölgesine ilerleyene kadar genellikle herhangi bir fiziksel belirti göstermediği için teşhis edilmesi zordur ve ölümle sonuçlanabilir. Eğer hastalık erken evrelerde teşhis edilebilirse tedavi sürecinde daha olumlu sonuçlar almak mümkündür (De La Franier and Thompson, 2019; Phung *et al.* 2023; Ban *et al.* 2024). Yumurtalık kanseri biyobelirteçleri hastalığın erken evrelerinde kan serumundaki seviyelerine bakılarak kolaylıkla tayin edilebilmektedir (Özcan vd. 2024) Yumurtalık kanserinin erken teşhisi için kullanılan biyobelirteçlerin başında da CA125, HE4 ve AFP gelmektedir. Kan serumundaki normal seviyeleri bu sebeple önem arz etmektedir. Aşağıda CA125, HE4 ve AFP biyobelirteçleri için normal serum düzeyleri verilmiştir.

CA125 normal serum seviyesi: 0-35 unit/mililitre ($U\ mL^{-1}$) (Bilgi Kamaç vd. 2023a; Runprapan *et al.* 2023)

HE4 normal serum seviyesi: 70-140 pikomolar (pM) (Bilgi Kamaç vd. 2023a)

AFP normal serum seviyesi: 25 ng mL^{-1} (Özcan vd. 2024)

Bu biyobelirteçlerin analizi için ELISA (Scholler *et al.* 2006), kemilüminesans (Chu *et al.* 2017), floresanslar (Hamd-Ghadareh *et al.* 2017), elektrokemilüminesans (Xu *et al.* 2012) ve radyoimmünokimyasal analiz (Klug *et al.* 1984) teknikleri ile tespit edilmektedir. Bu teknikler daha karmaşık bir analiz sürecini içerir ve genellikle antikorun veya antijenin etiketlenmesini gerektirir (Runprapan *et al.* 2023). ELİSA gibi yöntemler hala kullanılsa da daha hızlı, pratik, minyatürleşmeye uygun, daha hassas ve seçici yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur (Runprapan *et al.* 2023). Etiketli ve etiketsiz elektrokimyasal immunosensörler geleneksel yöntemlere göre daha hassas ve seçicidir. Günümüzde yumurtalık kanserinin erken teşhisinde kullanılan biyobelirteçlerin tayini için basit, hızlı ve pratik elektrokimyasal immunosensör sistemleri kullanılmaktadır. Etiketli CA125, HE4 ve AFP immunosensörlerinin yumurtalık kanserinin erken teşhisine yönelik çalışmalardan aşağıda bahsedilmektedir.

Literatürde etiketli CA125 immunosensörleri ile ilgili yakın zamanda çalışmalar yapılmıştır. Qu ve arkadaşları dual metal–organic framework (MOF)/MXene kullanarak sandwich tipi elektrokimyasal CA125 immunosensörü geliştirmişler ve diferansiyel puls voltametrisi (DPV) metodu ile CA125 tayini gerçekleştirmişlerdir. Geliştirilen CA125 immunosensörünün doğrusal aralığı $0,2-1000 \text{ U mL}^{-1}$ tespit limiti ise $0,006 \text{ U mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir. Çalışmada etiketli antikor kullanılmış ve geliştirdikleri immunosensör oldukça maliyetli hale gelmiştir (Qu *et al.* 2023). Etiketli CA125'in elektrokimyasal tayini için yapılan çalışmalardan bir diğeri ise Krathumkhet ve arkadaşları tarafından 2023 yılında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada İndiyum kalay oksit (ITO) elektrot karbon mürekkep/karbon dot/çinko oksit iletken kompoziti ile modifiye edilmiştir. BSA ve antijen adımlarından sonra kullanılan Gümüş@polipirolün (Ag@PPy) nanokompoziti ise redoks aracı olarak kullanılmış ve DPV metodu ile CA125 tayini gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan immunosensörlerin doğrusal aralığı ve tespit limitleri sırası ile $1 \text{ ag mL}^{-1}-100 \text{ ng mL}^{-1}$ ve $0,1 \text{ fg mL}^{-1}$ olarak rapor edilmiştir (Krathumkhet *et al.* 2023). Ma ve takım arkadaşları ise 2024 yılında etiketli elektrokimyasal CA125 immunosensörü geliştirmişlerdir. Çalışmada camı karbon elektrotlar (GCE'ler) polipirol (PPy) mikroküreler ve AuNP ile modifiye edildikten sonra antikor immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. BSA ve CA125 inkübasyonu sonrasında sinyal arttırıcı olarak ikincil antikor kullanılmıştır. Geliştirilen immunosensör için CA125 tayini DPV metodu ile yapılmış olup doğrusal aralığı $10-100 \text{ U mL}^{-1}$ tespit limiti $2,4 \mu\text{U mL}^{-1}$ olarak rapor edilmiştir. Düşük tespit limitlerine ulaşılan çalışma ikinci bir antikor kullanımı ile maliyetli ve zaman alıcı hale gelmiştir (Ma *et al.* 2024). Yang ve arkadaşları 2024 yılında etiketli CA125 immunosensörü geliştirdiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmada $\text{Ti}_3\text{C}_2\text{T}_x$ -MXene/amin fonksiyonlu karbon nanotüp (CNT-NH₂) kompoziti SPCE'lerin yüzeyine modifiye edilmiş ve ardından Anti-CA125 (Ab₁) inkübe edilmiştir. Hazırlanan kompozitteki NH₂ grubu ile antikor immobilizasyonu kolaylıkla gerçekleştirilmiştir. BSA modifikasyonu sonrası CA125 antijeni ve sinyal yükseltici olarak ikincil antikor (Ab₂:Anti-CA125) kullanılmıştır. Tasarlanan CA125 immunosensörünün doğrusal aralığı $1 \text{ mU mL}^{-1} - 500 \text{ U mL}^{-1}$ olarak rapor edilmiştir. CA125 immunosensörünün iyi seçicilik, tekrarlanabilirlik ve uzun vadeli kararlılık sergilediği vurgulanmış olsa da çalışmada kullanılan ikinci bir antikor maliyeti arttırmıştır (Yang *et al.* 2024). Foroozandeh ve ekip arkadaşları grafit karbon nitrürler , molibden disülfür ve polianilin ($\text{gC}_3\text{N}_4/\text{MoS}_2/\text{PANİ}$)

kompoziti hazırlamış ve GCE yüzeyine modifiye etmişlerdir. Etiketli CA125 immunosensörü tasarlanmasında metilen mavisiiyle birlikte sinyal arttırıcı olarak aptamer kullanılmıştır. Tasarlanan CA125 immunosensörünün analizi kare dalga voltametrisi (SWV) metoduyla yapılmış olup doğrusal aralığı $2-10 \text{ U mL}^{-1}$, uygulama kararlılığı ise 28 gün olarak bildirilmiştir. Çalışmada hem etiket kullanılması ile maliyet arttırılmış hem de immunosensörün doğrusal aralığı yeterince geliştirilememiştir (Foroozandeh *et al.* 2024).

Son yıllarda, HE4'ün tespiti için farklı elektrokimyasal biyoalgılama stratejileri önerilmiştir. Tasarlanan immunosensörlerin çoğu, antijene spesifik olarak bağlanan ve iki farklı antikör gerektiren bir sandviç konfigürasyon içermektedir. Tüm bu çalışmalarda, manyetik mikro veya nano partiküllerin ve nanomalzemelerin biyo-tahlil platformları, sinyal amplifikasyonu veya biyomoleküler zenginleştirmede kullanılmaktadır (Farzin and Shamsipur 2018). Bu çalışmalardan bir tanesi Čadková ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılmıştır. Çalışmada manyetik mikro boncuklar üzerinde elektrokimyasal sinyal üretimi için CdSe/ZnS çekirdek/kabuk kuantum dotlarını içeren enzimsiz bir sandviç manyeto-immunosensör geliştirilmiştir. Etiketli Anti-HE4CdSe/ZnS antikörleri, antijen HE4 ve karboksilatla modifiye edilmiş manyetik parçacıklar kullanılarak afinite yöntemi ile saflaştırılmıştır. Geliştirilen immunosensörün, klinik teşhiste rutin olarak kullanılan enzim bazlı problemlara umut verici bir alternatif olduğu vurgulanmıştır. Çalışmada sinyal arttırıcı etiket olarak CdSe/ZnS çekirdek/kabuk kuantum dotları kullanılması sebebiyle zahmetli bir yöntem olması göze çarpmıştır (Čadková *et al.* 2018). Başka bir çalışmada ise trimetalik AgPtCo nanodendritler, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$ manyetik nanokompozitlerin elektrokimyasal sinyal okuması için redoks probu ve sinyal yükselticisi olarak kullanılmıştır ve HE4 analizi yapılmıştır. Çalışmada yüksek duyarlık elde edilse de sinyal arttırıcı etiket kullanılması sebebi ile pratik değildir. (Fan *et al.* 2019). Yan ve arkadaşları ise sandviç tipi amperometrik elektrokimyasal bir HE4 immunosensörü tasarlamışlardır. Sinyal arttırıcı olarak kullanılan bimetalik $\text{Au}@\text{Pd}$ kestane şekilli nanoyapılar ($\text{Au}@\text{Pd}$ USs) çalışmada iyi bir katalitik etki göstermiştir. HE4 immunosensörünün uygulama kararlılığı ise 4 hafta olarak belirtilmiştir (Yan *et al.* 2019). Başka bir çalışmada ise HE4'ün fotoelektrokimyasal tayini için $\text{Nb}_3@\text{nPCN-224}$ (nanobody@nanosfer) sinyal arttırıcı olarak kullanılmıştır. Ancak bu çalışmada da HE4 immunosensörünün uygulama

kararlılığının 14. güne kadar devam ettiği bildirilmiştir (Chen *et al.* 2020). Han ve arkadaşları ise etiketli HE4 immunosensörü tasarlamışlardır. Sinyal arttırıcı olarak kullanılan karbon dotların (CD), (karbon kaynağı olarak folik asit, nitrojen ve kükürt kaynağı olarak tiyoüre içeren tek aşamalı bir solvotermal reaksiyon kullanılarak %85,6'lık bir kuantum verimiyle) sentezlendiği bildirilmiştir. HE4 antijenine özgü yakalama HE4 antikoru (Ab), amid konjugasyonu yoluyla sentezlenmiş ve CD'lerin yüzeyine kovalent olarak bağlanmıştır. Gümüş nanopartiküllerin (AgNP), Ab ile bağlanarak sinyal amplifikasyon elemanları olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Han *et al.* 2021).

Li ve arkadaşları 2022 yılında etiketli AFP immunosensörü geliştirmişlerdir. tasarlamışlardır. Çalışmada GCE'ler zeolitik imidazolat iskeleti ile dekore edilmiş AuNP'ler (AuNPs@ZIF-8) ve MWCNT'ler ile modifiye edilmiştir. AFP immunosensörünün doğrusal aralığı 0,1- 100000 pg mL⁻¹, tespit limiti ise 0,033 pg mL⁻¹ olarak rapor edilmiştir ve DPV metodu kullanılmıştır. Sinyal yükseltici olarak AFP-spesifik nanobody (A1) ile C4-bağlayıcı proteinin (C4bp α) muamelesi ile AFP heptamer füzyon proteini (A1-C4bp α) kullanılmıştır. Yüksek afiniteye sahip A1-C4bp α heptameri, çok sayıda AFP'yi yakalamak için molekül tanıma probu olarak kullanılmıştır ve immunosensörün duyarlılığını artırdığı bildirilmiştir. Buna ek olarak AuNPs@ZIF-8 kompoziti geniş yüzey alanına sahip ve heptamerin bağlanması için ideal bir malzeme olarak rapor edilmiştir. Çalışmada kullanılan sinyal arttırıcı heptamer maliyeti arttırmıştır (Li *et al.* 2022). Rong vd., 2021 yılında SPE'leri kullanarak etiketli AFP immunosensörü tasarlamışlardır. Çalışmada SPE'ler üzerine düzenli mezogözenekli karbon@AuNP (OMC@AuNP) modifiye edilmiş ve sinyal arttırıcı olarak AuNP platin nanopartikülmetilen mavisi (AuPt-MB) kompoziti kullanılmıştır. Geliştirilen AFP immunosensörünün yüksek seçicilik ve iyi stabilite gösterdiği rapor edilmiştir. Doğrusal aralığı 10 fg mL⁻¹-100 ng mL⁻¹ ve tespit limiti 3,33 fg mL⁻¹ olarak bildirilmiştir. Çalışmada kullanılan ikincil antikor maliyeti arttırmaktadır (Rong *et al.* 2021). Wang ve ekibi 2023 yılında etiketli AFP immunosensörü geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmada GCE'ler ilk olarak manyetik nanoboncuklar (MB'ler) üzerine sabitlenmiş AFP birincil antikoru (Ab1) ile inkübe edildikten sonra AFP ile inkübe edilmiştir. Ardından ikincil antikora (Ab2) bağlı ZIF-8 nanomalzemeleri prob olarak kullanılmıştır. DPV metodu kullanılan çalışmada AFP immunosensörlerinin doğrusal aralığı 0,0001 -100 ng mL⁻¹

tespit limiti ise $0,032 \text{ pg mL}^{-1}$ olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmada da antikorların hazırlanma prosedürlerinin zahmetli ve maliyetli olması ile göze çarpmaktadır (Wang *et al.* 2023).

Yukarıda CA125, HE4 ve AFP için bahsedilen bu etiketli elektrokimyasal immunosensör çalışmaları etiketsiz elektrokimyasal immunosensör çalışmalarına göre daha karmaşık bir analiz sürecini içerir. Ayrıca etiketli immunosensörler geliştirilirken ikinci bir antikor veya enzim kullanılması çalışmanın maliyetini oldukça arttırmaktadır. Yukarıda sayılan tüm bu çalışmalarda etiketli immunosensörler kullanılmış ve sinyal arttırıcılar kullanarak etiketleme yapılmıştır. Bu da çalışmaların zaman alıcı ve maliyetli olmasına sebep olmuştur. Bunun aksine, etiketsiz elektrokimyasal immunosensörler, düşük maliyetli, basit ve hızlı tespit olan doğrudan antikor-antijen etkileşimini içermektedir (Sangalli *et al.* 2020). Etiketsiz elektrokimyasal immunosensörler, taşınabilirliği ve yüksek hassasiyeti nedeniyle kanser biyobelirteçlerinin tespiti için çeşitli ölçüm metotları arasında üstünlük göstermektedir. Ayrıca, etiketsiz elektrokimyasal immunosensörler kullanıcı dostudur, minimum miktarda numune gerektirir ve sahada kullanıma uygundur (Runprapan *et al.* 2023).

Literatürde CA125 tayini için geliştirilen etiketsiz elektrokimyasal immunosensörler yer almaktadır. Bilgi Kamaç ve arkadaşları, indirgenmiş grafen oksit (RGO), politiyonin (PTH) ve AuNP'ler kullanarak etiketsiz elektrokimyasal CA125 ve HE4 immunosensörlerini geliştirmiş ve CA125 ve HE4'ün hassas, hızlı ve pratik tayinini gerçekleştirmişlerdir. CA125 ve HE4 immunosensörlerinin uygulama kararlılığını 60 gün, depolama kararlılığını ise 16 hafta olarak belirlemişlerdir Bilgi Kamaç *et al.* 2023b). Bir başka çalışmalarında ise CA125 ve HE4'ün eş zamanlı tayinini gerçekleştirmişlerdir. Antijen seviyelerini kan serumu numunelerinde DPV ve SWV metotları ile ölçmüşler ve hasta başı testlerde kullanımının uygun olduğunu bildirmişlerdir (Bilgi Kamaç *et al.* 2023a). Bir başka çalışmada ise altın nanopartiküller@çok duvarlı karbon nanotüpler (AuNPs@MWCNTs) ile modifiye edilen GCE'ler ile elektrokimyasal CA125 immunosensörü geliştirilmiş ve SWV metodu ile CA125 tayini gerçekleştirilmiştir. CA125 immunosensörünün doğrusal aralığı $0,0004-4 \text{ U mL}^{-1}$ tespit limiti ise $0,0004 \text{ U mL}^{-1}$ olarak rapor edilmiştir. Çalışmada kullanılan MWCNT'lerin yüksek iletkenliği ve

AuNP'lerin geniş yüzey alanı CA125 immunosensörünün performansını arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca düşük tespit limitleri de elde edilmiş fakat üçlü elektrot sistemi kullanılması sebebi ile hasta başı testleri için uygun olmadığı değerlendirilmiştir (Runprapan *et al.* 2023). de Castro ve arkadaşları etiketsiz elektrokimyasal CA125 immunosensörü hazırlamak için ilk olarak SPCE yüzeyine 3-hidroksifenilasetikasit (3-HPA) elektropolimerizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra yüzeyde oluşturulan 3-HPA'nın aktif grupları ile antikorun yüzeye başarılı bir şekilde tutturulduğu bildirilmiştir. CA125 immunosensörleri ile CA125 tayini, DPV metodu ile yapılmış ve sırasıyla doğrusal aralığı ve tespit limiti $5-80 \text{ U mL}^{-1}$ ve $1,45 \text{ U mL}^{-1}$ olarak rapor edilmiştir. Her ne kadar CA125 immunosensörü başarılı bir şekilde hazırlanmış olsa da uygulama kararlılığı 20 gün olarak belirlenmiştir (de Castro *et al.* 2020). Elektrokimyasal CA125 immunosensörünün geliştirilmesine yönelik yapılan bir başka çalışmada ise Mu ve arkadaşları bakır-kobalt oksit nanotabakalar@altın nanopartikül(CuCo-ONSs@AuNPs) nanokompoziti hazırlamış, GCE elektrotu üzerine modifiye etmişlerdir. Ardından Au-NH₂ ile Anti-CA125 immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. İmmobilizasyon adımları (BSA ve CA125) tamamlanan immunosensörün CA125 analizi DPV metodu kullanılarak yapılmıştır. Geliştirilen CA125 immunosensörünün doğrusal aralığı $1 \times 10^{-7}-1 \times 10^{-3} \text{ U mL}^{-1}$ tespit limiti ise $3,9 \times 10^{-8} \text{ U mL}^{-1}$ olarak rapor edilmiştir. Çalışmada kullanılan CuCo-ONSs@AuNPs kompozitin elektrokimyasal sinyalleri önemli ölçüde yükselttiği ve immunosensörün performansını iyileştirdiği vurgulanmış olsa da uygulama kararlılığı 7 gün olarak belirlenmiştir (Mu *et al.* 2024). Chang ve arkadaşları 2023 yılında yaptıkları bir çalışmada etiketsiz elektrokimyasal CA125 immunosensörü geliştirmişlerdir. GCE yüzeyi MWCNT-nafyon, bakır nanopartiküller (CuNP) ve silika nanopartiküller (SiONP) ile modifiye edilmiş ve CA125 immunosensörleri hazırlanmıştır. Geliştirilen CA125 immunosensörlerinin analizi DPV metodu kullanılarak yapıldığı bildirilmiştir. Tasarlanan immunosensörlerin doğrusal aralığı ve tespit limitleri sırası ile $0,001-500 \text{ U mL}^{-1}$ ve $3,4 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Chang *et al.* 2023). 2024 yılında ise Kilimci ve arkadaşları etiketsiz elektrokimyasal CA125 immunosensörü geliştirmişlerdir. Çalışmada SPCE'ler AuNP ve fulloren ile modifiye edilmiş ve EIS metoduyla CA125 tayini gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen CA125 immunosensörünün doğrusal aralığı $1-100 \text{ U mL}^{-1}$ tespit limiti ise $0,016 \text{ U mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir. Geliştirilen immunosensörde Anti-CA125 antikorunu

nanokompozitlere immobilize etmek için 4 saat, 24 saat gibi uzun inkübasyon süreleri kullanılmış olmasıyla çalışma pratik değildir (Kilimci vd. 2024).

Literatürde antikor temelli etiketsiz elektrokimyasal HE4 immunosensörü ile ilgili birkaç çalışma dışında çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmaların birinde fulleren C60 ve nano gözenekli anodik alümina membranı kullanılarak etiketsiz biyolojik platformu tasarlanmış ve HE4 tayini yapılmıştır. Çalışmada GCE kullanılmıştır. DPV metodu ile tayin yapılmış, immunosensörün doğrusal aralığı 1,0 ile 100 ng mL⁻¹, tespit limiti ise 0,2 ng mL⁻¹ olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada tasarlanan immunosensörün uygulama ve depolama kararlılığı ile ilgili bir bilgi verilmemiştir (Qiao *et al.* 2019). 2021 yılında ise Szymanska ve arkadaşları etiketsiz HE4 biyosensörü geliştirmek için yüzey plazmon rezonans metodu kullanmışlardır. Altın çip yüzeyine sisteamin tutturulduktan sonra kovalent bağlama yöntemi ile HE4 immunosensörü tasarlanmıştır. Tasarlanan HE4 immunosensörünün tespit limiti 2 pM ve doğrusal aralığı 2-120 pM olarak belirlenmiştir. Fakat bu çalışmada kullanılan altın çipin yüksek maliyetli olması dezavantajı ile dikkat çekmektedir (Szymanska *et al.* 2021). Wei ve arkadaşları 2022'de yaptıkları çalışmada flor katkılı kalay oksit (FTO) elektrotu yüzeyine heteroyapılı AuNP'ler/CdS NS'yi iki aşamalı elektrodepozisyonla oluşturmuşlardır. HE4'ün tespiti için fotoelektrokimyasal (PEC) ve elektrokimyasal (EC) çift modlu immunosensörleri kullanmışlardır. Çift modlu immunosensörün PEC ve EC modları için sırasıyla 0,01–100 ve 0,01–200 ng mL⁻¹'lik doğrusal aralıkları rapor edilmiştir. Söz konusu çift modlu metotta EC modunun daha geniş doğrusal aralık göstermesi dikkat çekmiştir (Wei *et al.* 2022). Vural ve arkadaşları ITO elektrotları kullanarak elektrokimyasal HE4 immunosensörü geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Çalışmada ITO yüzeyinde -OH oluşturmuş ve 3-aminopropiltrietoksilan ve gluteralehit ile muamele ettikten sonra Anti-HE4 immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada analiz metodu olarak EIS metodunu kullanmışlardır. Geliştirilen immunosensörün doğrusal aralık ve tespit limiti sırasıyla 1-3000 pg mL⁻¹ ve 0,094 pg mL⁻¹ olarak verilmiştir. Bu çalışmada üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır ve laboratuvarında HE4 analizi yapılabilir. Hasta başı testi için uygun bir yöntem değildir (Vural vd. 2024). Bilgi Kamaç ve arkadaşları 2023 yılında HE4 antijeninin tespiti için etiketsiz elektrokimyasal HE4 immunosensörü geliştirmiştir. Çalışmada, SPCE üzerine RGO modifiye edilmiş ve ardından tiyoin elektropolimerleştirilmiştir.

Polimerden sonra yüzeyde AuNP oluşturulmuştur. AuNP'ler ile 3-merkaptopropiyonik asidi kullanarak kendiliğinden oluşan tek tabakaları (SAM) oluşturmuş ve immunosensör hazırlanmasında önemli bir yere sahip olan antikoru başarılı bir şekilde bağlamışlar. Daha sonra iki farklı metot ile (DPV ve EIS) HE4 analizini gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca HE4 seviyelerini el tipi prototip cihaz ile ölçmüşlerdir. Çalışmada geniş doğrusal aralık ve düşük tespit limiti elde etmişlerdir (Bilgi Kamaç *et al.* 2023b). Bilgi Kamaç ve arkadaşları 2023 yılındaki bir diğer çalışmalarında da aynı yüzeyi kullanarak CA125 ve HE4'ün eş zamanlı tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada da iki farklı metot (SWV ve DPV) ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Yine aynı çalışmada geniş doğrusal aralık ve düşük tespit limitleri elde etmişlerdir (Bilgi Kamaç *et al.* 2023a).

Yumurtalık kanserinin erken teşhisi için kullanılan AFP biyobelirtecinin, vücut sıvılarındaki AFP konsantrasyonunununa bağlı olarak fetüs anormallikleri ve kusurlarıyla da ilişkili olduğu bulunmuştur (Lu *et al.* 2018). Literatürde Lu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2018) GCE elektrotu tiyonin-kitosan ve HRP/AuNP ile modifiye edilmiş ve AFP'nin etiketsiz elektrokimyasal tayininde kullanılmıştır. Hazırlanan AFP immunosensörünün doğrusal aralığını $0,1-10000 \text{ pg mL}^{-1}$ ve tespit limitini ise $0,03 \text{ pg mL}^{-1}$ olarak rapor etmişlerdir. AFP antijeni dönüşümlü voltametri (CV) metodu ile tayin edilmiştir. Fakat çalışmalarında raf ömrü ve rejenerasyon çalışmalarının geliştirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Lu *et al.* 2018) 2020 yılında Zhu ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise etiketsiz elektrokimyasal AFP immunosensörü geliştirilmiştir. Bu amaçla GCE elektrotu MnO_2 ile fonksiyonelleştirilmiş mezogözenekli karbon içi boş küre (MCHS@MnO_2) kompoziti ile modifiye edilmiştir. AFP antijeninin tayini için ise SWV metodu kullanılmıştır. Geliştirilen immunosensörün doğrusal aralığı ve tespit limiti sırasıyla $0,10-420 \text{ ng mL}^{-1}$ ve $0,03 \text{ ng mL}^{-1}$ olarak verilmiştir. MCHS@MnO_2 kompozitinin AFP immunosensörü için yüksek seçicilik ve iyi tekrarlanabilirlik gösterdiği rapor edilmiştir. Geliştirilen immunosensör iyi tekrarlanabilirlik ($n=10$ için Bağıl standart sapma (RSD): %3,9) gösterse de depolama kararlılığı 7 gün olarak belirtilmiştir (Zhu *et al.* 2020). Shi ve arkadaşları da elektrokimyasal AFP immunosensörü geliştirmek için DPV metodunu tercih etmişlerdir. GCE elektrotlarına ilk olarak elektroaktif bir molekül olan izoorientinin modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra antikor immobilizasyonu ve antijen inkübasyonu

yapılarak immunosensörün tasarımı gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen AFP immunosensörünün doğrusal aralığı ve tespit limiti sırasıyla $0,001-10 \text{ ng mL}^{-1}$ ve $0,0002 \text{ ng mL}^{-1}$ olarak bildirilmiştir. Erken teşhis için düşük tespit limitine inilmiş olsa da immunosensörün uygulama kararlılığı 2 haftaya kadar cevap vermiştir (Shi *et al.* 2020). Guo ve takımı da 2022 yılında etiketsiz elektrokimyasal AFP immunosensörü geliştirmişlerdir. Çalışmada karboksil fonksiyonlu RGO, CuNP ve potasyum hekzasiyanoferriti ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) oda sıcaklığında karıştırarak taç benzeri bir yapı elde ederek GCE yüzeyine modifiye etmişlerdir. Anti-AFP immobilizasyonu için 2 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra AFP antijeninin inkübasyonu ile immunosensörü hazırlamışlardır. Çalışma CV metodu ile yapılmış olup doğrusal aralığı $2,25 \times 10^{-8}-2,25 \times 10^2 \text{ ng mL}^{-1}$ ve tespit limiti $1,40 \times 10^{-8} \text{ ng mL}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Düşük tespit limiti elde edilen immunosensörün uzun inkübasyon süreleri ile pratik olmaması göze çarpmaktadır (Guo *et al.* 2022). Olorundare ve arkadaşları 2023 yılında etiketsiz elektrokimyasal AFP immunosensörü geliştirmiş ve iki metot (SWV ve EIS) ile AFP tayinini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada GCE elektrot karbon siyahı nanopartikülleri (CBNP'ler) ve paladyum nanopartikülleri (PdNP'ler) hibrit nanokompoziti ile modifiye edilmiş ve daha sonra AFP immunosensörleri hazırlanmıştır. Geliştirilen immunosensörün SWV ve EIS metotları ile elde edilen tespit limitleri sırasıyla $0,0039 \text{ ng mL}^{-1}$ ve $0,0131 \text{ ng mL}^{-1}$ olup doğrusal aralığı $0,005-1000 \text{ ng mL}^{-1}$ olarak rapor edilmiştir. Yüzeyde kullanılan nanokompozit sayesinde geliştirilen immunosensörün iyi stabilite, tekrarlanabilirlik ve seçicilik gösterdiği vurgulanmıştır. İmmunosensörün hazırlanmasında Anti-AFP inkübasyonu gece boyunca, BSA uygulaması ise 4 saat kadar bekletilerek yapılmış olup geliştirilen immunosensör pratik olmaması ile göze çarpmaktadır (Olorundare *et al.* 2023). 2024 yılında yapılan bir çalışmada (Zhang ve arkadaşları) ise DPV metodu kullanılarak AFP antijeninin elektrokimyasal tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ilk olarak GCE elektrotlar RGO@platin nanopartiküller/molibdendisülfür (RGO@PtNPs/MoS_2) kompoziti ile modifiye edilmiş ve daha sonra yüzeye Anti-AFP tutturmak için bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilen etiketsiz AFP immunosensörünün doğrusal aralığı ve tespit limiti sırasıyla $1-10^5 \text{ pg mL}^{-1}$ ve $0,12 \text{ pg mL}^{-1}$ olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmada antikör immobilizasyonu için gerçekleşen süre yaklaşık 12 saat olarak bildirilerek zaman alıcı bir yöntem olduğu öne çıkmaktadır (Zhang *et al.* 2024). Özcan ve arkadaşları 2024

yılında yumurtalık kanserinin erken teşhisi için etiketsiz ve tek kullanımlık elektrokimyasal AFP immunosensorü geliştirmişlerdir. Çalışmada ITO elektrotlar ilk olarak hidroksillenmiş ve daha sonra silan ajanı olan 3-(Trimetoksisilil)propil metakrilat (3-TMSPM) ile muamele edilmiş, ardından antikor immobilizasyonu yapılmıştır. Hazırlanan AFP immunosensorü EIS metodu ile analiz edilmiş olup doğrusal aralığı 0,05-100 pg mL⁻¹ olarak verilmiştir. Çalışmada düşük konsantrasyon aralığına inilmiş olması göze çarpmış olsa da çalışmada kullanılan üçlü elektrot sistemi POCT'a uygun değildir (Özcan vd. 2024).

POCT, herhangi bir kullanıcının herhangi bir zamanda, herhangi bir yerde, hızlı, düşük maliyetli ve özel bir eğitime ihtiyaç duymadan analiz yapmasına izin vermede kritik bir rol oynamaktadır (Bilgi Kamaç *et al.* 2023a). POCT cihazlarının biyosensörlerle birleştirilmesi ile, özellikle sağlık, gıda kalite kontrolü ve çevresel izleme alanlarında analizi basit, hızlı ve nispeten uygun maliyetli hale getirilmektedir (Wang, 2006; Sun *et al.* 2022; Bilgi Kamaç *et al.* 2023a). SPE'ler gibi pratik, düşük maliyetli ve tek kullanımlık elektrotlar, POCT cihazları için oldukça uygundur. Hasta başı testlerinin kullanımının yaygınlaşması ve yumurtalık kanser biyobelirteçleri olan CA125, HE4 ve AFP seviyelerinin kolaylıkla ve hızlı bir şekilde ölçülebilmesi için bu çalışmanın yapılmasına ihtiyaç duyulmuştur.

Bu tez çalışmasında tek kullanımlık SPCE'ler kullanılarak yumurtalık kanser biyobelirteçleri olan CA125, HE4 ve AFP'nin hızlı ve pratik tayini amaçlanmıştır. Çalışmada HE4 immunosensörünün hazırlanmasında kullanılan MXene-COOH ve AuNP, elektrodun iletkenliğini, elektroaktif yüzey alanını arttırması amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca bu iki materyalin birlikte kullanılması; uygulama kararlılığı, depolama kararlılığı, tekrarlanabilirlik gibi parametreleri arttırması da beklenmiştir. Kan serumundaki HE4 seviyelerinin taşınabilir elektrokimyasal okuyucu ile DPV metodu kullanılarak 20-30 saniye gibi kısa sürede doğrudan pM cinsinden ölçülmesi hedeflenmiştir. Tez çalışmasında CA125 immunosensörünün hazırlanmasında kullanılan PTB_{DES} ve AuNP'nin sinerjik etki göstermesi ile birlikte elektrodun iletkenliğini, elektroaktif yüzey alanını ve ayrıca uygulama kararlılığı, depolama kararlılığı, tekrarlanabilirlik gibi parametreleri arttırması amaçlanmıştır. AFP immunosensörünün

hazırlanmasında ise MWCNT-COOH, PAA_{DES} ve AuNP birlikte kullanılarak sinerjik etki göstermesi ve bunun sonucunda elektrotun iletkenliğini, elektroaktif yüzey alanını ve ayrıca uygulama kararlılığı, depolama kararlılığı, tekrarlanabilirlik gibi parametreleri arttırması amaçlanmıştır.



3. MATERİYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Deneylerde kullanılan kimyasallar

Azur A (AA), Toluidin mavisi (TB), kloroaurik asit ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), sığır serum albümin (BSA), 6-merkaptotekzanoiik asit (6-MHA), 6-merkaptotekzanol (6-MOH) 4-merkaptotekzanol (4-MOH), kolin klorür [$(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}]\text{Cl}$), glutaraldehit (GA, $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$), 3-aminopropil-trietoksisilan (APTES), hidrojen florür (HF), çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT-COOH), potasyum hekzasiyanoferrat ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), potasyum hekzasiyanoferrit ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid (EDC), N-hidroksisüksinimid (NHS), insan serumu (erkek AB pıhtılaşmış tam kanından, H6914), Sigma-Aldrich'ten (ABD) satın alınmıştır. Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) Carlo Erba firmasından, titanyum alüminyum karbür (Ti_3AlC_2) (MAX fazı) Labkon firmasından temin edilmiştir.

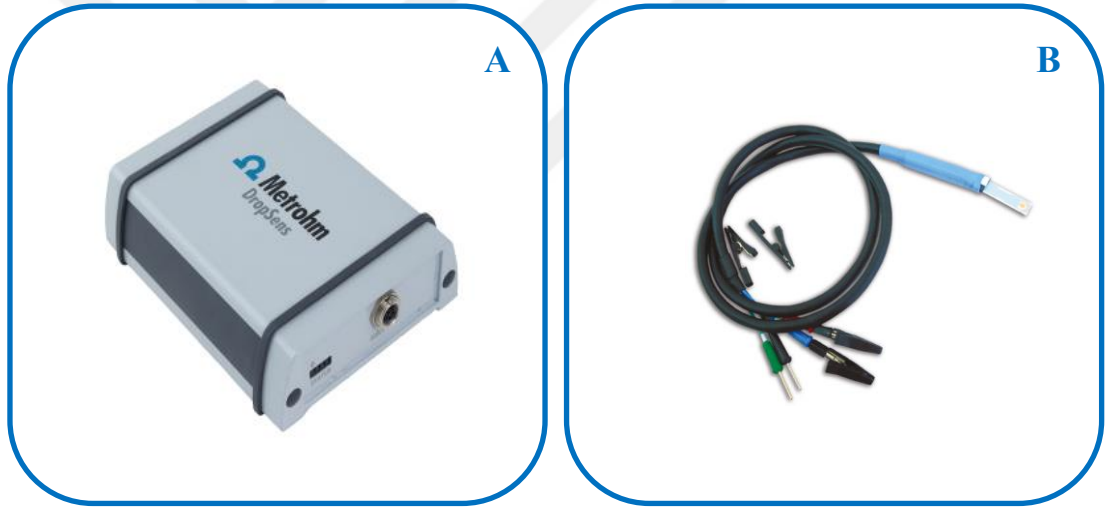
Monoklonal antikor CA125/MUC16, monoklonal antikor AFP, monoklonal antikor HE4, rekombinant insan CA125/MUC16, AFP ve HE4 proteinleri Novus Biologicals USA'dan satın alınmıştır. Karboksietilsilanetriol (CTES), etilen glikol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$), potasyum klorür (KCl), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), metanol (CH_3OH), dimetil formamid (DMF), kloroasetik asit ($\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{H}$), potasyum nitrat (KNO_3), sodyum hidroksit (NaOH) ve hidroklorik asit (HCl) Merck'ten tedarik edilmiştir. Tüm çözeltiler ultra saf su (Millipore, $18\text{M}\Omega\text{ cm}$) ile hazırlanmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar yüksek analitik saflıktadır.

3.1.2 Deneylerde kullanılan cihaz ve materyaller

Elektrokimyasal ölçümler ve karakterizasyonlar için DropSens μStat 400 Bipotantiyostat/Galvanostat ve Gamry Interface 1010E Potantiyostat/Galvanostat/ZRA cihazları, HE4 immunosensörünün analitiksel parametrelerinin belirlenmesi için

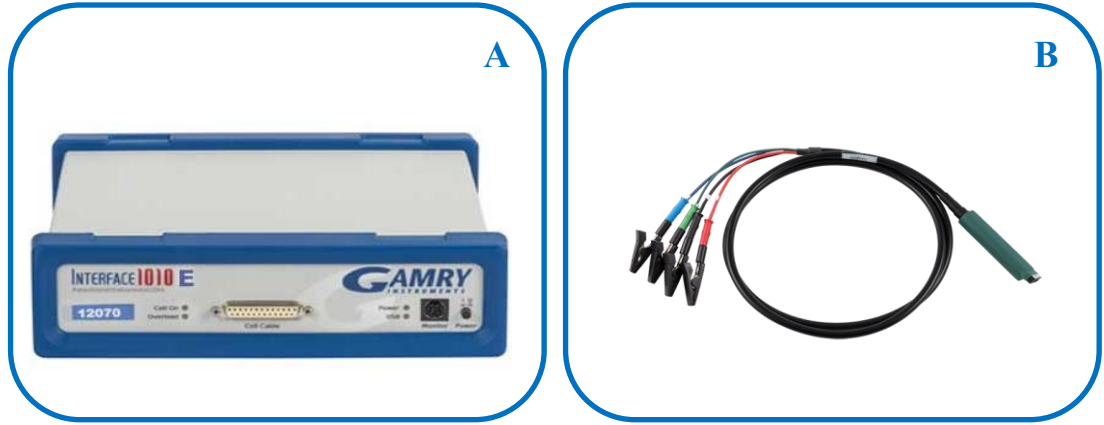
DropStat taşınabilir elektrokimyasal okuyucu kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan SPCE'ler Metrohm DropSens tarafından satın alınmıştır.

Metrohm Dropsens μ Stat 400 Bipotantiostat/Galvanostat: μ Stat 400, voltametrik, amperometrik veya potansiyometrik ölçümler için uygulanabilen ve bir veya iki çalışma elektrot konfigürasyonu ile kullanılabilen taşınabilir bir Bipotantiostat/Galvanostat'tır. Lityum-iyon pille çalışır, USB ve Bluetooth aracılığıyla bir bilgisayara kolayca bağlanabilir. DropView 8400 yazılımı ile kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında dönüşümlü voltametri (CV) ve DPV ölçümleri için kullanılmıştır ve Şekil 3.1A'da verilmiştir (URL 6). Elektrotlar cihaza DropSens firmasından temin edilen konnektörler ile bağlanmıştır ve Şekil 3.1B'de verilmiştir (URL 7).



Şekil 3. 1 Metrohm DropSens μ Stat 400 Bipotentiostat/Galvanostat (A), kablo konnektör (B)

Gamry Interface 1010E Potantiostat/Galvanostat/ZRA: CV, kronoamperometri, kronopotansiyometri ve SWV, EIS gibi elektroanalitik metotların çalışılabilirdiği bir cihazdır. Gamry Instrument 1010 yazılımı ile kullanılmaktadır. Gamry Interface 1010E Potantiostat/Galvanostat/ZRA; EIS ölçümleri için kullanılmıştır ve Şekil 3.2A'da verilmiştir (URL 8). Elektrotlar cihaza DropSens firmasından temin edilen konnektörler ile bağlanmıştır ve Şekil 3.2B'de verilmiştir (URL 9).



Şekil 3. 2 Gamry Interface 1010E Potentiostat/Galvanostat/ZRA (A), kablo konnektör (B)

DropStat: DropStat elde taşınan, tek bir teknikli, potansiyostat tabanlı özel bir elektrokimyasal okuyucudur. DropStatın şekli Şekil 3.3'te verilmiştir (URL 10). Analitin konsantrasyonunu veya kullanılan metodun birimini (μA gibi) bir LCD ekranda gösterebilen elektrokimyasal sensör cihazıdır. Doğrusal tarama voltametrisi (LSV), SWV, amperometrik tayin, CV ve DPV metotlarına uygulanabilmektedir. Analitiksel karakterizasyonlarda kullanılmak üzere DropStat, Methrom DropSens firmasından temin edilmiştir. DropStat herhangi bir fişe veya ekstra bir cihaza bağlanmadan ölçüm yapabilmektedir. Akıllı telefonlarda olduğu gibi şarj edilerek sürekli kullanılabilir. Lityum iyon pilleri ile güç sağlanmakta ve bilgisayara data aktarımı USB ile olmaktadır. DropStatın boyutu 60x20x80 cm, ağırlığı 70 mg, potansiyel aralığı $\pm 2\text{ V}$, amper cinsinden akım cevabı $\pm 200\ \mu\text{A}$ 'dır.

HE4 immunosensörlerinin deneysel çalışmalarında, DropStat ile ölçüm yapılabilmesi için öncelikle Metrohm Dropsens firması tarafından DropStata DPV metodu uygulaması için yazılım yüklenmiştir. Analizlerde DPV metodu kullanılmıştır ve elektrokimyasal okuyucunun ekranından pik akım yüksekliği (μA cinsinden) okunmuştur. DropStat ile DPV ölçümlerinde 200 μA üzerine çıkılamadığı için ölçümler 0,1 M KCl içeren 1 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (FF) içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri Metrohm Dropsens firmasına iletilmiştir. Firma tarafından gerçek numune analizlerinde

kullanılmak üzere kalibrasyon için usb kartları hazırlanmış, yazılım yüklenmiş ve tarafımıza gönderilmiştir. DPV metodu ile pM cinsinden HE4 konsantrasyonları doğrudan ekrandan okunmuştur.



Şekil 3. 3 DropStat

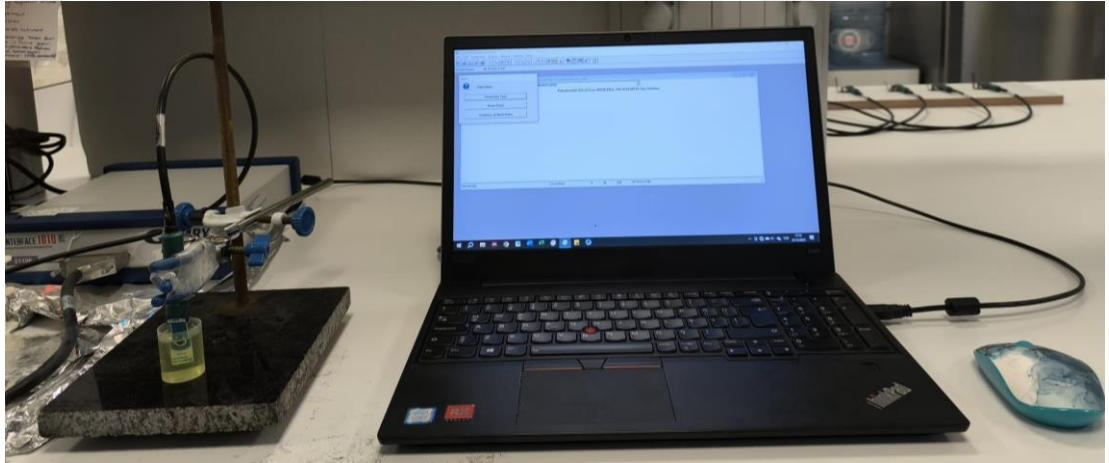
Uygun pH'da tampon çözelti hazırlamak için; Mettler Toledo pH-metre kullanılmıştır. Bu pH-metre, kullanılmadan önce, standart tampon çözeltiler kullanılarak kalibre edilmiştir. Katı kimyasalların tartımı için; Radwag AS220/C/2 marka 0,01 mg duyarlı elektronik hassas terazi kullanılmıştır. Çözeltilerin hazırlanma aşamalarında WiseStir MSH-20D marka ısıtıcı-karıştırıcı ve IKA MS-3 digital vorteks cihazları kullanılmıştır. Ultra saf su için Millipore Milli-Q Direct Q-3 ultra saf su cihazı kullanılmıştır. Elektrotların kimyasal ve morfolojik karakterizasyonları için sırasıyla Perkin Elmer Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR), ZEISS Gemini 1 Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) ve Panalitik Empyrean X-ışını Kırınımı (XRD) cihazları kullanılmıştır.

3.1.3 Elektrokimyasal ölçüm sistemi

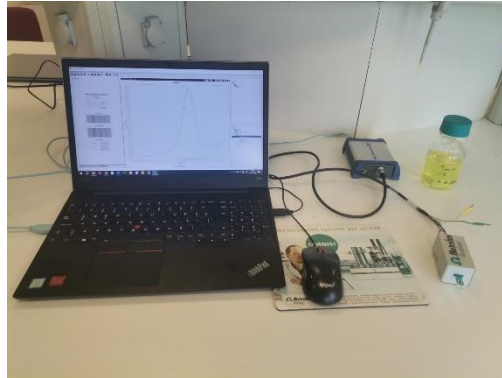
Deneylerde tüm elektrokimyasal ve analitik karakterizasyonlar için FF çözeltileri kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de deneylerde kullanılan elektrokimyasal ölçüm sisteminin şartları verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Deneylerde kullanılan elektrokimyasal ölçüm sistemlerinin şartları

Cihaz	Ölçüm metodu	Ölçüm parametreleri	Çözelti
Gamry	EIS	50,000 Hz–0,05 Hz frekans aralığında	5 mM FF çözeltisi, 11 mL elektrokimyasal hücre içerisinde
Metrohm Dropsens	CV, DPV	CV: -0,5 +0,8 V aralığında, 50 mV s ⁻¹ tarama hızında DPV: vurum potansiyeli 70 mV, vurum zamanı 0,1 s, basamak potansiyeli 5 mV, tarama hızı 5 mV s ⁻¹ , -0,5 +0,6 V aralığında	5 mM FF çözeltisi
DropStat	DPV	vurum potansiyeli 70 mV, vurum zamanı 0,1 s, basamak potansiyeli 5 mV, tarama hızı 10 mV s ⁻¹ , -0,5 +0,4 V aralığında	1 mM FF çözeltisi



Şekil 3. 4 Gamry cihazı ile yapılan elektrokimyasal ölçümler



Şekil 3. 5 Metrohm Dropsens cihazı ile yapılan elektrokimyasal ölçümler



Şekil 3. 6 DropStat ile yapılan elektrokimyasal ölçümler

3.2 Metot

3.2.1 SPCE'lerin yüzeylerinin temizlenmesi

Ticari olarak satın alınan elektrotların baskıdan kaynaklanan organik mürekkep bileşenlerini veya kirleticileri gidermek için kullanmadan önce yüzeylerinin temizlenmesi gerekmektedir (Wei *et al.* 2007; Stan *et al.* 2022). Temizleme işlemi için SPCE'lere 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) -1,0 ile +1,0 V potansiyel aralığında, 100 mV s⁻¹ tarama hızında, 10 döngü CV metodu uygulanmıştır (Stan *et al.* 2022).

3.2.2 Çözeltilerin hazırlanması

Tez kapsamında fosfat tamponu, DES çözeltisi, AA ve TB monomer çözeltileri, MWCNT-COOH süspansiyonu, MXene ve MXene-COOH süspansiyonu, HAuCl₄ çözeltileri hazırlanmış ve hazırlanma prosedürleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Tampon çözeltilerin istenilen pH'ya ayarlanması için derişik asit ve baz çözeltileri (1 M HCl ve 1 M NaOH) kullanılmıştır. İmmunosensörlerin hazırlanmasında kullanılan antikor, antijen,

EDC-NHS, GA, 6-MOH, 4-MOH, 6-MHA, CTES, APTES çözeltilerinin hazırlanışı da Çizelge 3.2’de yer almaktadır.

Çizelge 3. 2 Deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanma prosedürleri

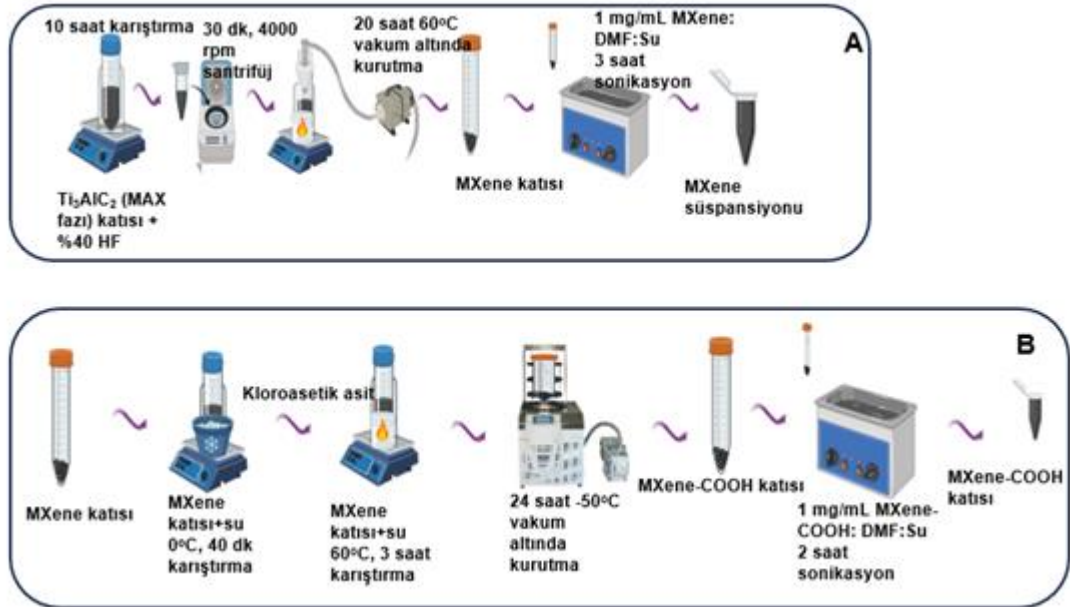
Çözeltiler	Hazırlanışı
Destek elektrolit için fosfat tamponu (pH 7,0)	pH 7,0 fosfat tamponunu hazırlamak için ultra saf su içinde 50 mM KH_2PO_4 , 50 mM K_2HPO_4 ve 0,1 M KCl çözeltileri hazırlanmıştır.
Monomerler için fosfat tamponu (pH 8,0)	pH 8,0 fosfat tamponunu hazırlamak için ultra saf su içinde 50 mM KH_2PO_4 , 50 mM K_2HPO_4 , 0,1 M KCl ve 0,1 M KNO_3 çözeltileri hazırlanmıştır.
DES çözeltisi	1:2 mol oranda hazırlanan etilen glikol:kolin klorür ağız kapalı bir balonun içine alınmıştır. Sürekli karıştırma altında 80 °C’de yağ banyosu içerisinde rengi kaybolana kadar (yaklaşık 7 dk) ısıtılmıştır (Hosu <i>et al.</i> 2017).
AA ve TB monomer çözeltileri	1 mM AA ve mM TB monomerleri, %90 DES %10 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır.
MWCNT-COOH süspansiyonu	1 mg MWCNT-COOH katısı ve DMF:H ₂ O (1:1 oranda) 3 saat boyunca sonikatörde karıştırılarak hazırlanmıştır.
MXene süspansiyonu	1 g MAX fazı tozu tartılmış ve %40’lık HF (50 mL) içerisinde oda sıcaklığında 10 saat karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti ultra saf su ile birkaç kere yıkanmış ve katı kısmı ayırmak için santrifüj edilmiştir (4000 rpm 30 dk). Ayrılan katı kısım 50 °C’de vakum altında kurutulmuştur (Mohammadniaei <i>et al.</i> 2020). 1 mg MXene katısı ve 1 mL 1:1 DMF-H ₂ O karıştırılmış, 3 saat boyunca sonikatör işlemi uygulayarak kararlı ve homojen MXene süspansiyonu hazırlanmıştır (Şekil 3.8A)
MXene-COOH süspansiyonu	MXene uçlarında -COOH grupları oluşturmak için öncelikle MXene tozu (300 mg) ve 300 mL deiyonize su 40 dakika boyunca mekanik karıştırma altında 0°C’de karıştırılmıştır. Ardından karışıma 5 g ClCH_2COOH yavaşça eklenmiştir. Reaksiyona girmeyen grupları uzaklaştırmak için NaOH çözeltisi (6,25 mol L ⁻¹ , 32 mL) eklenmiştir. Reaksiyonun tamamlanması için 60°C’de 3 saat bekletilmiştir. Oluşan ürün birkaç kez yıkanmış ve safsızlıklar giderilmiştir. Son olarak, düşük sıcaklıkta (-50°C) dondurularak kurutulmuş ve MXene-COOH elde edilmiştir (Li <i>et al.</i> 2018). MXene-COOH süspansiyonunu hazırlamak için, 1 mg MXene-COOH katısı ve 1 mL DMF:H ₂ O 2 saat boyunca sonikatör yardımı ile disperse edilmiştir (Şekil 3.8B).
HAuCl ₄ çözeltisi	2,4 ve 6 mM HAuCl ₄ çözeltileri, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır.
Antikor ve antijen çözeltileri	Antikorlar (Anti-CA125, Anti-HE4 ve Anti-AFP) ve antijenler (CA125, HE4 ve AFP) pH 7,0 fosfat tmpon içerisinde hazırlanmış ve porsiyonlanmıştır. Daha sonra -20°C’de depolanmıştır.
BSA çözeltisi	%1’lik BSA 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış ve -20°C’de depolanmıştır.
EDC-NHS çözeltisi	0,6 mM EDC ve 0,1 mM EDC 50 mM 7,0 fosfat tampon içerisinde hazırlanmıştır ve 20°C’de depolanmıştır.
GA çözeltisi	%1’lik GA ultra saf su içerisinde taze hazırlanmıştır.
6-MHA çözeltisi	100 mM 6-MHA etanol içerisinde taze hazırlanmıştır.
4-MOH çözeltisi	100 mM 4-MOH etanol içerisinde taze hazırlanmıştır.
6-MOH çözeltisi	50 mM 6-MOH etanol içerisinde taze hazırlanmıştır.
CTES çözeltisi	%0,5 CTES ultra saf su içerisinde taze hazırlanmıştır.
APTES çözeltisi	%3,5’luk APTES metanol içerisinde taze hazırlanmıştır.

Monomer çözeltilerinin hazırlanmasında çözücü olarak kullanılan DES çözeltilisinin hazırlanmasında kullanılan deney düzeneği Şekil 3.7’de gösterilmektedir.



Şekil 3. 7 DES çözeltilisinin hazırlanmasında kullanılan düzenek

Şekil 3.8’de ise MXene (A) ve MXene-COOH’ın (B) hazırlanma basamaklarına ait şematik gösterim verilmiştir.



Şekil 3. 8 MXene (A) ve MXene-COOH’ın (B) hazırlanma basamakları

3.2.3 SPCE'lerin modifikasyonu

CA125, HE4 ve AFP immunosensörlerinin dönüştürücü kısımlarında kullanılmak üzere 3 farklı modifiyeli elektrot hazırlanmıştır. Çizelge 3.3'te modifiye elektrotların hazırlanma prosedürleri verilmiştir.

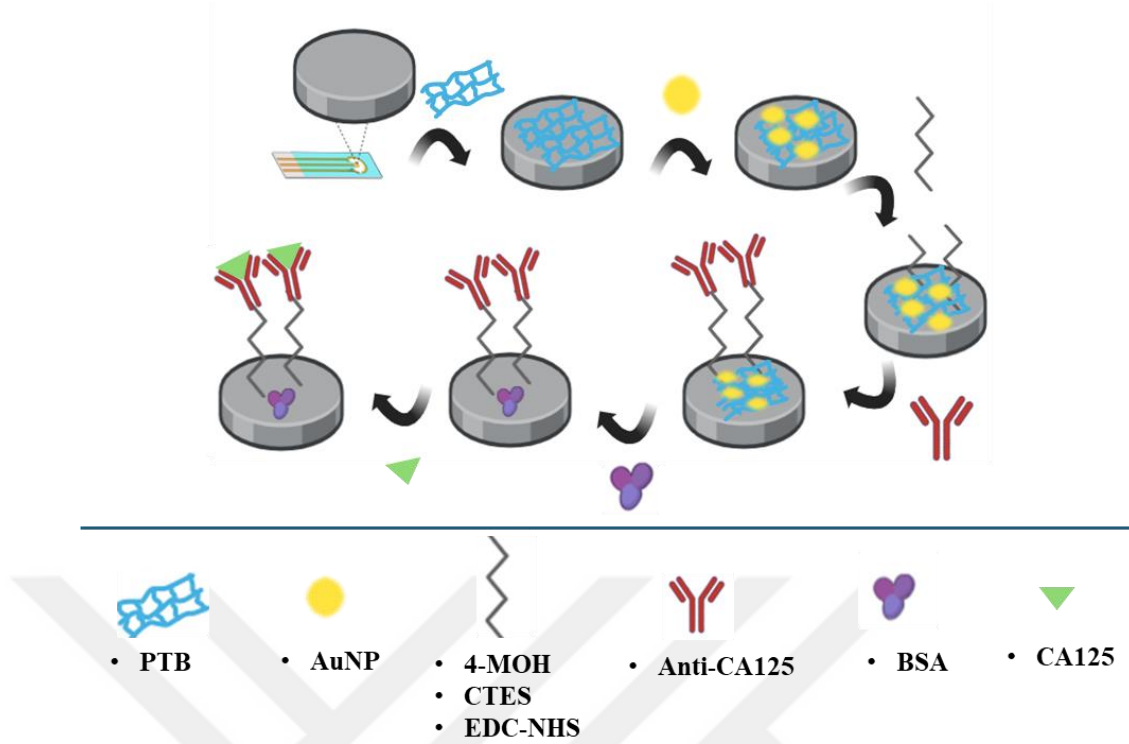


Çizelge 3. 3 Modifiye elektrotların hazırlanma prosedürleri

Elektrot formülasyonu	Modifikasyon işlemleri
SPCE/PTB_{DES}/AuNP	İlk olarak SPCE'ler üzerine TB monomerinin elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Toluidin mavisinin SPCE üzerinde elektropolimerizasyonu -0,6 V ile +1,0 V potansiyel aralığında (100 mV s ⁻¹ tarama hızı ve 30 döngü) CV metodu uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyonun ardından kalan monomer kalıntılarını temizlemek amacı ile 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu (0,1 M KCl içerisinde) kullanılarak -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında 100 mV s ⁻¹ tarama hızı ile 10 döngü CV metodu tekrar uygulanmıştır. SPCE/PTB _{DES} üzerinde AuNP oluşturmak için elektrodpozisyon metodu uygulanmıştır. Bu amaçla 4 mM HAuCl ₄ çözeltisi kullanılarak -1,3 ile -0,2 V potansiyel aralığında 10 döngü CV metodu uygulanmıştır.
SPCE/MXene/AuNP ve SPCE/MXene-COOH/AuNP	SPCE/MXene ve SPCE/MXene-COOH elektrotlarını hazırlamak için SPCE'lerin ÇE yüzeylerine MXene ve MXene-COOH süspansiyonlarından 3 µL damlatılarak karanlıkta kuruyuncaya kadar bekletilmiş ve fiziksel olarak modifiye edilmiştir. SPCE/MXene ve SPCE/MXene-COOH elektrotları üzerinde AuNP oluşturmak için elektrotların yüzeyine 50 µL 6 mM HAuCl ₄ çözeltisinden damlatılmış ve -1,3 ile -0,2 V potansiyel aralığında 15 döngü (50 mV s ⁻¹) CV metodu uygulanmıştır.
SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP	Bu amaçla hazırlanan MWCNT-COOH süspansiyonundan 3 µL elektrotların yüzeyine katman katman (LBL) yöntemi ile damlatılarak karanlıkta kuruyuncaya kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra DES çözeltisi içerisinde hazırlanan AA monomerinin elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. AA'nın SPCE üzerinde elektropolimerizasyonu -0,8 V ile +1,0 V potansiyel aralığında (100 mV s ⁻¹ tarama hızı ve 30 döngü) CV metodu uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyonun ardından kalan monomer kalıntılarını temizlemek amacı ile 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu (0,1 M KCl içerisinde) kullanılarak -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında 100 mV s ⁻¹ tarama hızı ile 10 döngü CV metodu tekrar uygulanmıştır. Temizleme işlemi yapılmış elektrotlara polimer kaplandıktan sonra AuNP oluşturmak için elektrodpozisyon metodu uygulanmıştır. Bu amaçla 4 mM HAuCl ₄ çözeltisi kullanılarak -1,3 ile -0,2 V potansiyel aralığında 10 döngü CV metodu uygulanmıştır. Her bir basamakta elektrotlar ultra saf su ile yıkanmış ve yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur.

3.2.4 CA125 immunosensörlerinin hazırlanması

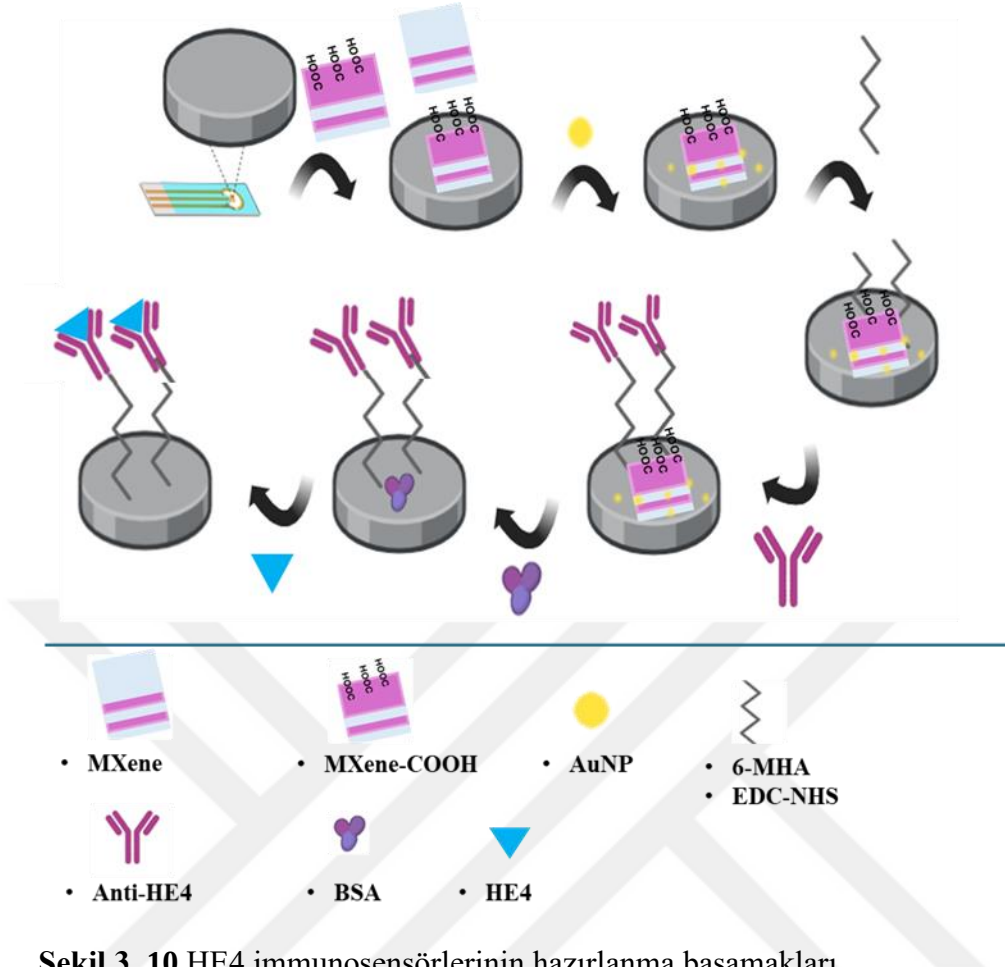
CA125 immunosensörlerinin hazırlanmasında SPCE/PTB_{DES}/AuNP elektrotlarının çalışma elektrodu yüzeyine SAM tabakalarının oluşması için ilk olarak 100 mM 4-MOH çözeltisinden LBL yöntemi ile 3 µL damlatılmış ve karanlıkta gece boyu oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 4-MOH ile modifiye edilmiş elektrotların yüzeyine %0,5 CTES çözeltisinden LBL yöntemi ile 3 µL damlatılmış ve gece boyu oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 0,6 mM EDC/0,1 mM NHS çözeltisinden 3 µL damlatılmış ve 60 dk bekletilmiştir. 4-MOH ve EDC-NHS ile aktive edilen elektrotların yüzeylerine antikor çözeltisinden (66 µg mL⁻¹ Anti-CA125) 3 µL damlatılmış ve 45 dk bekletilmiştir. Daha sonra %1'lik BSA çözeltisinden (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde) 3 µL damlatılmış ve 30 dk bekletilmiştir. Son olarak, çalışma elektrodu yüzeyine 50 pg mL⁻¹ CA125 antijen çözeltisinden 3 µL damlatılmış ve 30 dk bekletilmiştir. Her bir hazırlanma basamağında elektrotlar karanlıkta, sabit nem ortamında, oda sıcaklığında bekletilmiş ve her bir işlem sonrasında elektrotların yüzeyi ultra saf su ile yıkanmış, yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur. Böylece SPCE/PTB_{DES}/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125 immunosensörleri hazırlanmıştır. CA125 immunosensörlerinin hazırlanma basamakları Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3. 9 CA125 immunosensörlerinin hazırlanma şeması

3.2.5 HE4 immunosensörlerinin hazırlanması

SPCE/MXene-COOH/AuNP elektrotunun çalışma elektrodu yüzeyine SAM tabakalarını oluşturmak için 100 mM 6-MHA çözeltisinden LBL yöntemi ile 3 μL damlatılmış ve gece boyu oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından elektrotların yüzeyine 0,6 mM EDC/0,1 mM NHS çözeltisinden 3 μL damlatılmış ve 1 saat bekletilmiştir. 6-MHA ve EDC/NHS ile aktive edilmiş elektrotların yüzeyine, 100 ng Anti-HE4 çözeltisinden 3 μL damlatılmış ve 45 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra %1'lik BSA çözeltisinden, elektrotların yüzeyine 3 μL damlatılmış ve 30 dk bekletilmiştir. Son olarak, HE4 (50 ng mL^{-1}) çözeltisinden, elektrotların yüzeyine 3 μL damlatılmış ve 30 dk inkübe edilmiştir. Bu işlem sonucunda HE4 immunosensörünün hazırlanma işlemi tamamlanmıştır. Her bir hazırlanma basamağında elektrotlar karanlıkta, sabit nem ortamında, oda sıcaklığında bekletilmiş ve her bir işlem sonrasında elektrotların yüzeyi ultra saf su ile yıkanmış, yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur. Böylece SPCE/MXene-COOH/AuNP/Anti-HE4/BSA/HE4 immunosensörleri hazırlanmıştır. HE4 immunosensörlerinin hazırlanma basamaklarının şematik gösterimi Şekil 3.10'da verilmiştir.

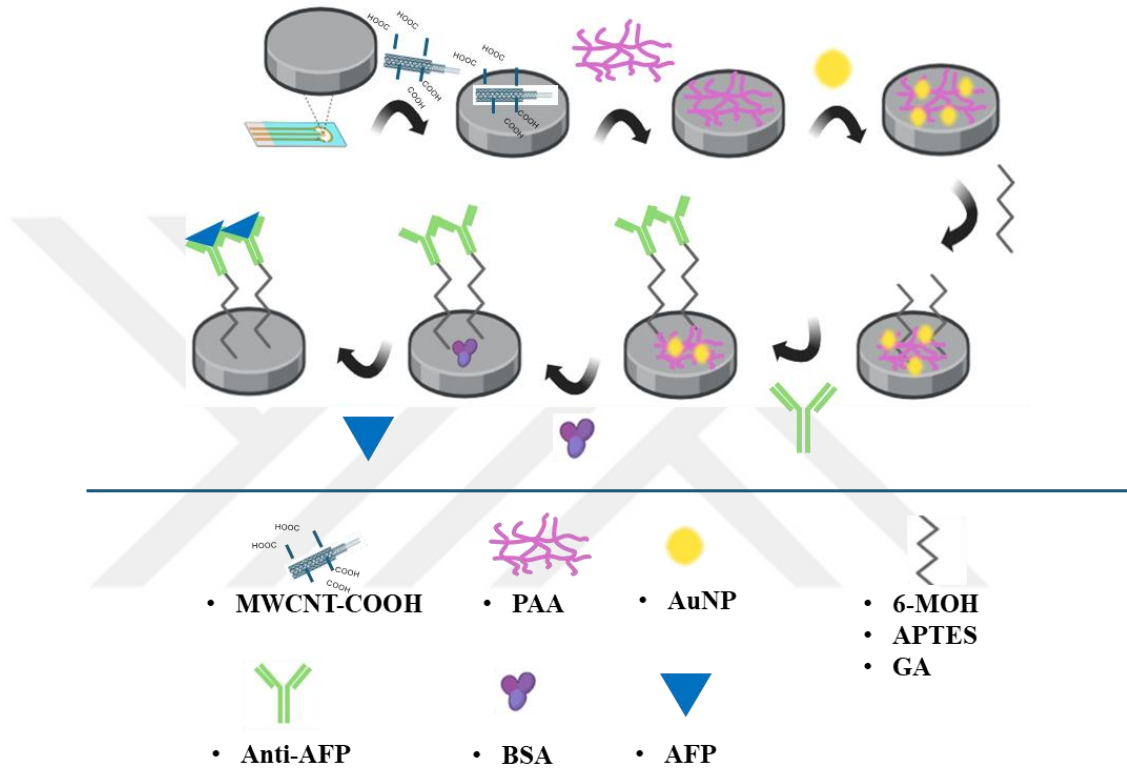


Şekil 3. 10 HE4 immunosensörlerinin hazırlanma basamakları

3.2.6 AFP immunosensörlerinin hazırlanması

AFP immunosensörlerinin hazırlanmasında SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lerin çalışma elektrodu yüzeyine SAM tabakalarının oluşması için ilk önce 50 mM 6-MOH çözeltisinden LBL yöntemi ile 3 μ L damlatılmış ve gece boyu oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra silan ajanı ile muamele etmek için elektrotların yüzeyine %3,5 APTES çözeltisinden LBL yöntemi ile 3 μ L damlatılmış ve gece boyu oda sıcaklığında bekletilmiştir. APTES ile modifiye edilmiş elektrotların yüzeyine %1 GA çözeltisinden 3 μ L damlatılmış ve 15 dk bekletilmiştir. GA ile modifiye edilmiş elektrotların yüzeylerine antikor çözeltisinden ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-AFP) 3 μ L damlatılmış ve 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra %1'lik BSA çözeltisinden 3 μ L damlatılmış ve 30 dk bekletilmiştir. Son olarak, çalışma elektrodu yüzeyine 5 ng mL^{-1} AFP antijen çözeltisinden 3 μ L damlatılmış ve 15 dk bekletilmiştir. Her bir hazırlanma

basamağında elektrotlar karanlıkta, sabit nem ortamında, oda sıcaklığında bekletilmiş ve her bir işlem sonrasında elektrotların yüzeyi ultra saf su ile yıkanmış, yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur. Böylece SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP immunosensörleri hazırlanmıştır. AFP immunosensörlerinin hazırlanma basamakları Şekil 3.11’de verilmiştir.



Şekil 3. 11 AFP immunosensörlerinin hazırlanma şeması

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 CA125 İmmunosensörleri

Tezin bu kısmında ilk olarak CA125 immünoensörlerinin hazırlanmasında kullanılan elektrotların modifikasyonu, modifikasyonların optimizasyonu, elektrokimyasal, morfolojik karakterizasyonları, PTB_{DES} ve AuNP modifiyeli SPCE'lerin optimizasyonu tartışılmıştır. İkinci kısımda, modifiyeli elektrotlar kullanılarak hazırlanan CA125 immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonları, immunosensörlerin optimum çalışma parametreleri, analitik parametreleri ve gerçek numune analizleri tartışılmıştır.

4.1.1 PTB_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların karakterizasyonları

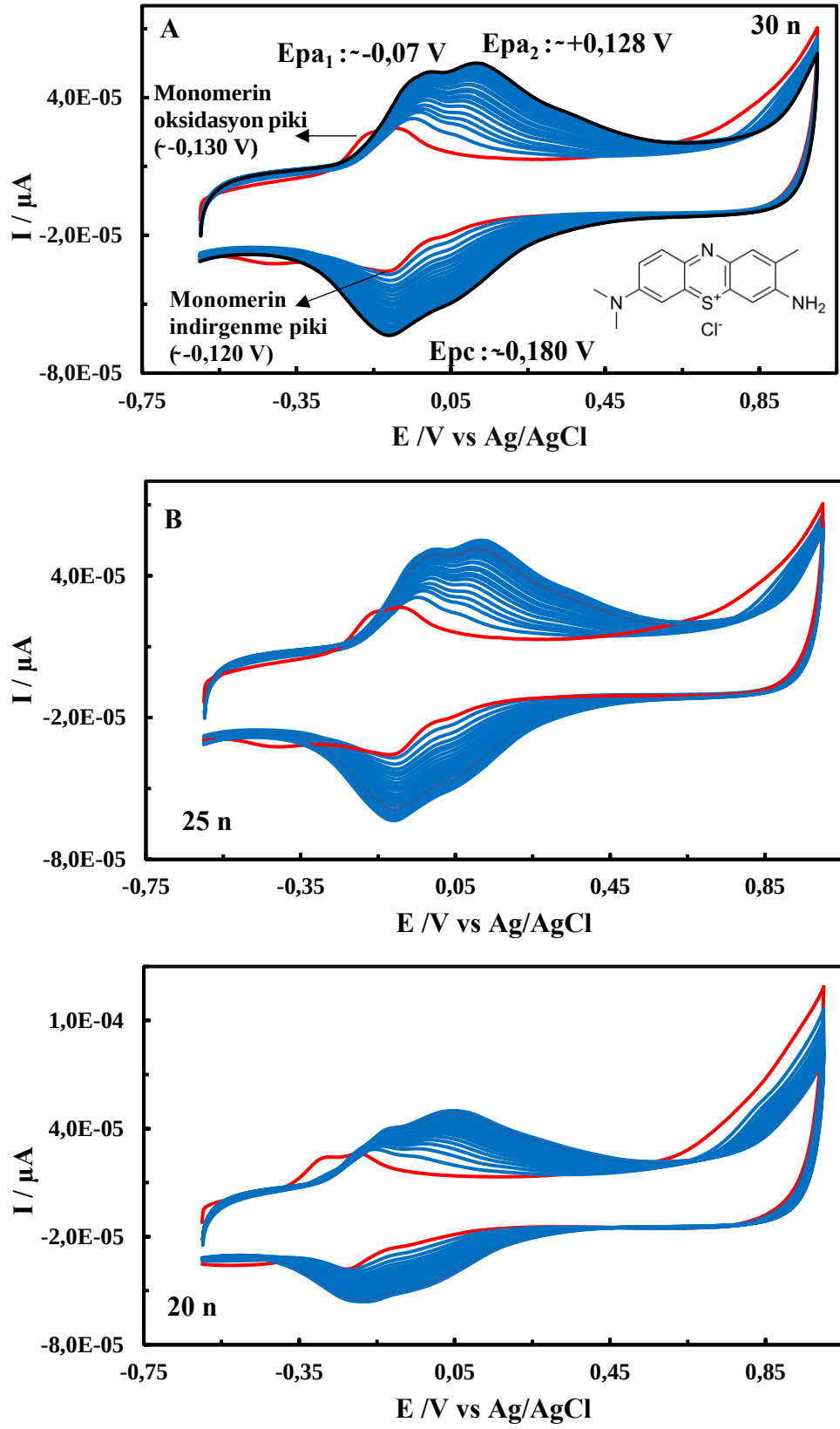
CA125 immunosensörlerinin hazırlanmasında kullanılan PTB_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların karakterizasyonları, elektrokimyasal ile morfolojik ve kimyasal olmak üzere iki başlık altında sunulmuştur. PTB_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonlarında, TB'nin elektropolimerizasyonun karakterizasyonu, polimerleşme mekanizması, elektropolimerizasyonun optimum çalışma parametrelerinin (döngü sayısı) incelenmesine ait bulgular sunulmuş ve tartışılmıştır. PTB_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların morfolojik karakterizasyonlarında SEM, kimyasal karakterizasyonlarında ise EDX, FTIR ve XRD analizlerine ait bulgular verilmiş ve tartışılmıştır.

4.1.1.1 PTB_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonları

Tezin bu kısmında ilk olarak SPCE'ler üzerinde TB'nin elektropolimerizasyonuna ait bulgular sunulmuştur. Şekil 4.1A'da SPCE'ler üzerinde TB'nin elektropolimerizasyonu (-0,6 V ile +1,0 V, 100 mV s⁻¹, 30 döngü) sırasında elde edilen CV'ler verilmiştir. Voltamogramlarda ilk döngüde monomerin oksidasyon piki -0,130 V civarında, indirgenme piki ise -0,120 V civarında gözlenmektedir. Pik potansiyeli +0,9 V'a

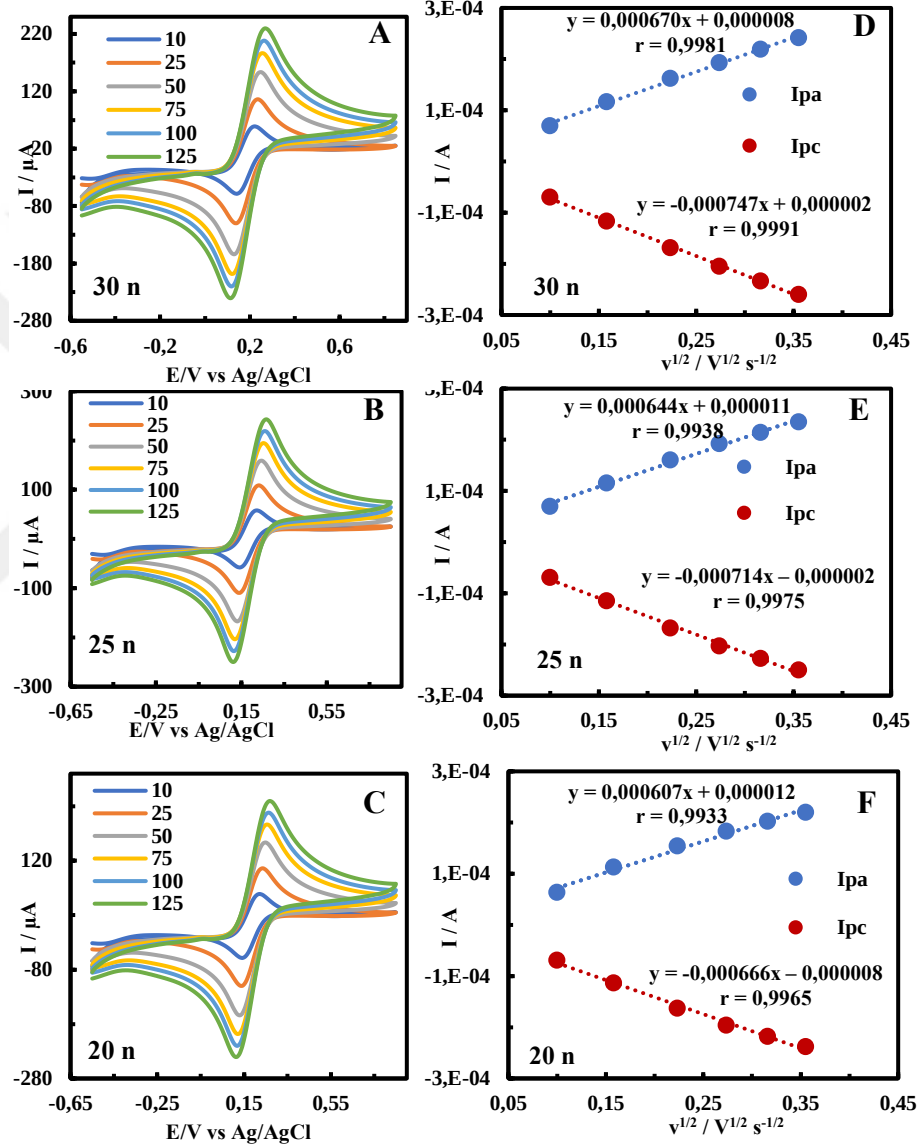
çıkıldığında monomerin katyonik radikalleri oluşmakta ve TB monomerleri ile reaksiyona girerek polimerizasyonu başlatmaktadır (Chakkarapani ve Brandl 2021). PTB_{DES}'in oksidasyon pikleri 2. döngüden itibaren yaklaşık -0,07 V (E_{pa1}: anodik pik potansiyeli 1) ve +0,13 V (E_{pa2}: anodik pik potansiyeli 2)'ta ve PTB_{DES}'in indirgenme piki yaklaşık -0,18 V (E_{pc}: katodik pik potansiyeli)'ta görülmektedir ve döngü sayısı arttıkça artmaktadır. TB'nin polimerizasyonunda, SPCE üzerinde H⁺ üretmesiyle elektrot yüzeyinde pH değişikliği meydana gelmekte ve elektropolimerizasyon pozitif potansiyele kaymaktadır (Şahin ve Ayrancı 2015). PTB_{DES}'in polimerleşme mekanizması monomerin katyonik radikallerinin oluşması ve diğer TB monomerlerine saldırarak polimerleşmeyi başlatmasıyla oluşmaktadır. Daha sonra katyonik radikal, monomerin orto pozisyonundaki karbon atomu ile, TB'nin diğer bir aromatik halkasına amino grupları aracılığıyla kovalent olarak bağlanmaktadır. Böylece azot köprüleri ile TB'nin elektrokimyasal polimerizasyonu ilerlemektedir. Bu polimerizasyon mekanizması, fenazin boyalarının genel polimerleşme mekanizması yolu ile gerçekleşmektedir (Chakkarapani *et al.* 2021, Esokkiya *et al.* 2021).

TB'nin elektropolimerizasyonu ve polimerleşme mekanizması tartışıldıktan sonra, elektropolimerizasyonun optimum çalışma parametrelerinin incelenmesine ait bulgular sunulmuştur. CV metodu kullanılarak yapılan bir iletken ya da redoks monomerinin elektropolimerizasyonunda döngü sayısının optimizasyonu önemlidir. Çünkü döngü sayısı az olduğunda polimerin elektrot yüzeyindeki film kalınlığı çok ince olurken, döngü sayısı fazla olduğunda ise film kalınlığı fazla olmakta ve difüzyon zor olmaktadır (Qu *et al.* 2006). Bu nedenle, ilk olarak SPCE üzerinde elektropolimerizasyon ile PTB_{DES}'in modifikasyonunda döngü sayısı optimizasyonu çalışması yapılmıştır. Bu amaçla 30, 25 ve 20 döngü CV uygulanarak SPCE'ler üzerine PTB_{DES} modifiye edilmiştir. 30, 25 ve 20 döngü CV uygulanarak hazırlanan SPCE/PTB_{DES}'lerin elektropolimerizasyonları sırasında elde edilen CV'leri sırasıyla Şekil 4.1A, 4.1B ve 4.1C'de verilmiştir.



Şekil 4. 1 SPCE/PTB_{DES30n} (A), SPCE/PTB_{DES25n} (B) ve SPCE/PTB_{DES20n} (C)'lerin dönüşümlü voltamogramları

Farklı döngü sayılarında hazırlanan PTB_{DES} modifiyeli elektrotların elektroaktif yüzey alanlarını (A_{ea}) hesaplamak için, FF çözeltisinde farklı tarama hızlarında (10-25-50-75-100-125 mV s⁻¹) CV ölçümleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen voltamogramlar 30 n, 25 n ve 20 n için sırasıyla Şekil 4.2A, 4.2B ve 4.2C’de gösterilmiştir. CV’lerden yararlanılarak pik akımlarına karşı tarama hızının ($v^{1/2}$) karekökü grafikleri de çizilmiştir (Şekil 4.2D, 4.2E ve 4.2F).



Şekil 4. 2 SPCE/PTB_{DES} (30 n), SPCE/PTB_{DES} (25 n), SPCE/PTB_{DES} (20 n)’lerin dönüşümlü voltamogramlardan (tarama hızı: 10-125 mV s⁻¹) (A, B ve C) ve pik akımı-tarama hızının karekökü (D, E ve F) grafikleri

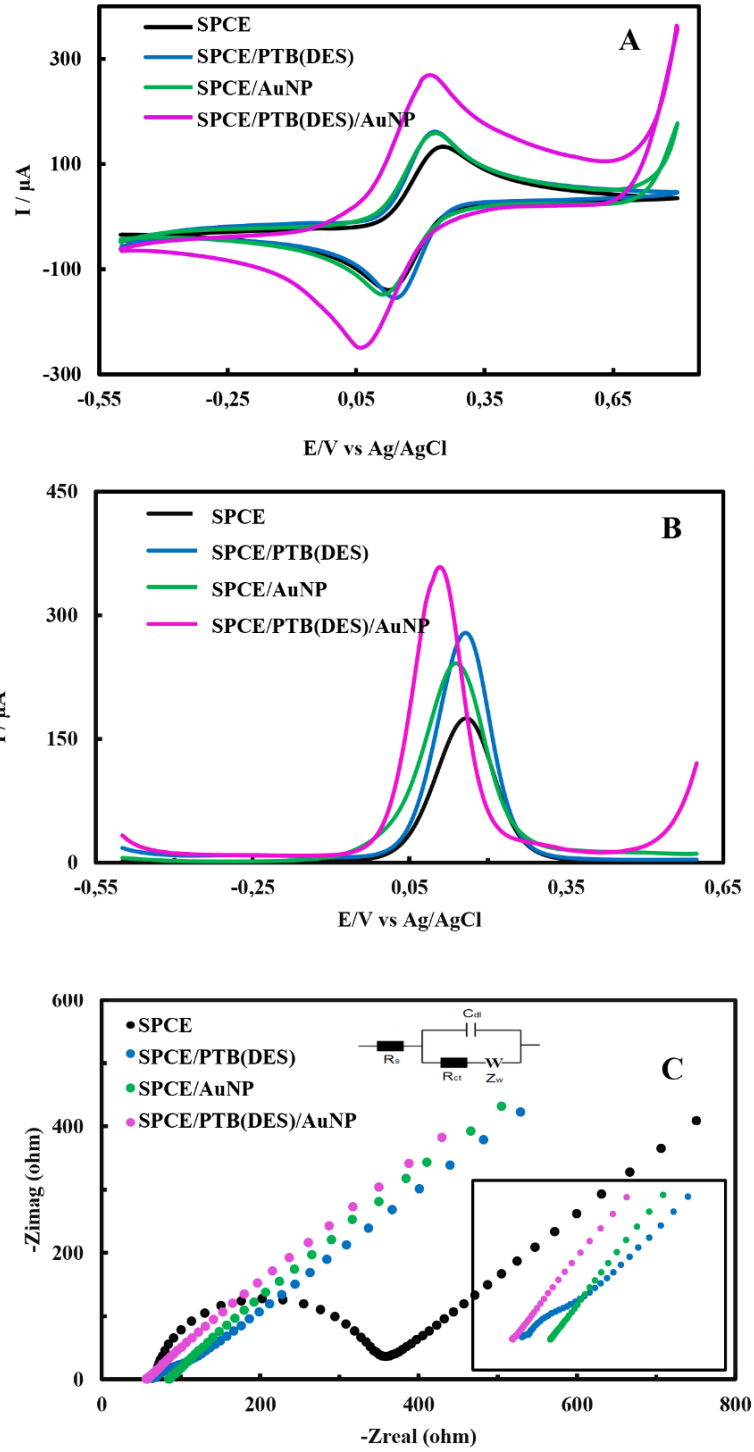
Şekil 4.2A, 4.2B ve 4.2C’de verilen voltamogramlara göre tarama hızı arttıkça pik akım yükseklikleri de artmaktadır. Şekil 4.2D, 4.2E ve 4.2F’ye göre gerçekleşen elektrokimyasal proses difüzyon kontrollüdür. 30, 25 ve 20 döngü modifiye edilmiş SPCE/PTB_{DES}’in A_{ea} değerleri, Eşitlik 1’de verilen Randles–Sevcik denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Jimenez *et al.* 2014; Bard *et al.* 2022).

$$i_p = 2,96 \times 10^5 n^{3/2} \times A_{ea} \times D^{1/2} \times C \times v^{1/2} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Eşitliğe göre i_p pik akımını, n alınan verilen elektron sayısını, A_{ea} elektroaktif yüzey alanını, D difüzyon katsayısını, C konsantrasyonu, v tarama hızını ifade etmektedir. 30 n için A_{ea} : 0,1639 cm², 25 n için A_{ea} : 0,1575 cm² ve 20 n için A_{ea} : 0,1484 cm² (Bard *et al.* 2022) olarak bulunmuştur. En yüksek A_{ea} , 30 döngü ile modifiye edilmiş SPCE/PTB_{DES}’lerde elde edildiği için optimum döngü sayısı 30 olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında DES içerisinde hazırlanan TB’nin elektropolimerizasyonu ilk kez gerçekleştirilmiştir. Optimum döngü sayısında hazırlanan SPCE/PTB_{DES}’lerin yüzeyi AuNP’ler ile edilmiştir. Böylece SPCE/PTB_{DES}/AuNP’ler hazırlanmıştır.

Elektrokimyasal sensör ve immunosensörlerin tasarımı ve optimizasyonu için, öncelikle modifiye edilen malzemelerinin elektrokimyasal davranışları değerlendirilmektedir. Bu amaçla bir önceki bölümde hazırlanan PTB_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların iletkenliklerini incelemek için elektrokimyasal karakterizasyonlar yapılmıştır.

PTB_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonları, 5 mM FF çözeltisinde CV, DPV ve EIS metotları uygulanarak gerçekleştirilmiştir. CV ve DPV’lerden elde edilen voltamogramlar ve EIS’lerden elde edilen spektrumlar sırasıyla Şekil 4.3A, Şekil 4.3B ve Şekil 4.3C’de verilmiştir. Ortalama E_{pa} (E_{pa_ort}) ortalama pik akımı yükseklikleri (I_{pa_ort}) ve ortalama direnç değerleri (R_{ct_ort}) Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 3 PTB_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların dönüşümlü voltamogramları (A), diferansiyel puls voltamogramları (B) ve elektrokimyasal empedans spektrumları (C)

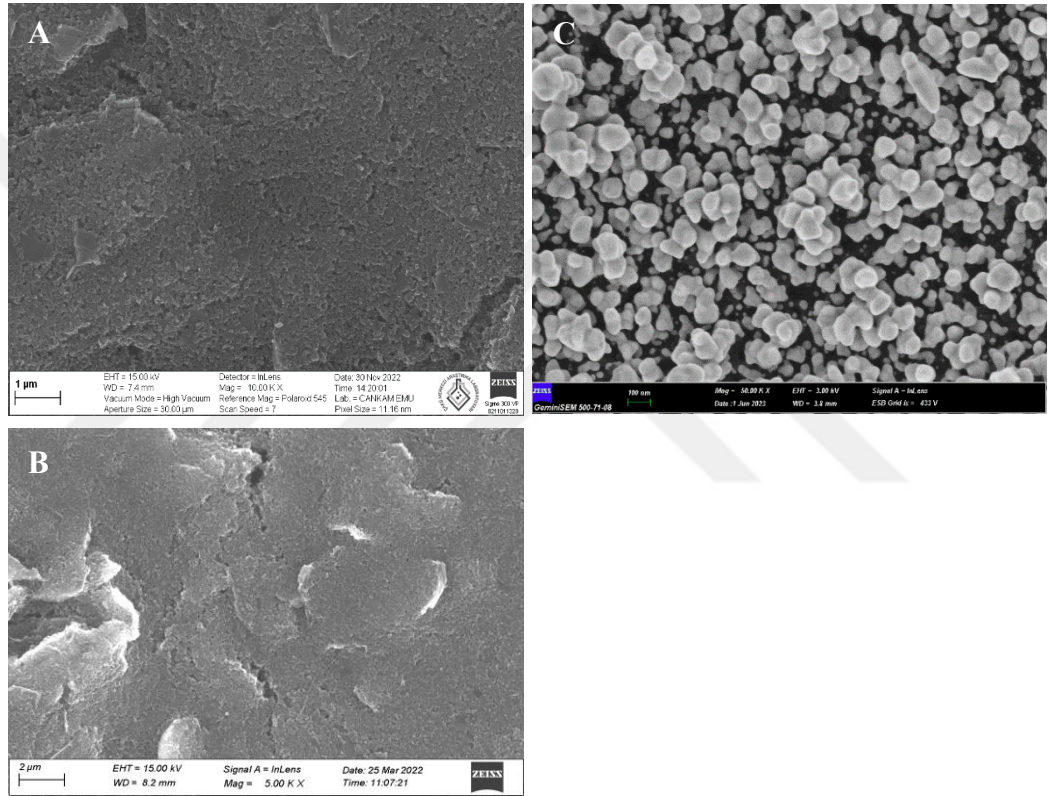
Çizelge 4. 1 PTB_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların CV ve DPV'lerinden elde edilen Epa_{ort} ve Ipa_{ort} değerleri ve EIS'lerinden elde edilen Rct_{ort} değerleri

Elektrot formülasyonu	CV Ipa _{ort} (μA)	Epa _{ort} (V)	DPV Ipa _{ort} (μA)	Epa _{ort} (V)	EIS Rct _{ort} (ohm)
SPCE	132,82	0,256	174,51	0,160	274,60
SPCE/PTB _{DES}	151,68	0,236	272,95	0,160	76,70
SPCE/AuNP	144,81	0,242	235,63	0,140	84,27
SPCE/PTB _{DES} /AuNP	216,76	0,174	348,32	0,110	2,30

Şekil 4.3A ve Çizelge 4.1'deki CV'lere göre yalın SPCE'de Ipa_{ort} değeri 132,82 μA ve Epa_{ort} değeri 0,256 V'dur. SPCE/PTB_{DES} ve SPCE/AuNP'lerde Ipa_{ort} değerleri nispeten artmıştır (PTB_{DES}: 151,68 μA ve AuNP: 144,81 μA). Epa_{ort} değerleri de azalmış, PTB_{DES} ve AuNP elektrokatalitik etki göstermiştir (Yılmaz ve Bilgi 2024). İletken bir fenazin boyası olan PTB_{DES} sonrası Ipa_{ort} değerinin artması PTB_{DES}'in aromatik halkasındaki π-konjuge yapısından kaynaklanmaktadır (Şahin ve Ayrancı 2015). SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerde ise diğer formülasyonlardaki elektrotlara göre Ipa_{ort} değeri en yüksektir (216,76 μA). Dolayısıyla en yüksek iletkenlik değerini göstermiştir. Epa_{ort} değeri de önemli ölçüde azalmış ve PTB_{DES}/AuNP elektrokatalitik etki göstermiştir (0,174 V). Şekil 4.3B ve Çizelge 4.1'deki DPV'lere göre yalın SPCE'de Ipa_{ort} değeri 174,51 μA, Epa_{ort} değeri ise 0,160 V'dur. SPCE/PTB_{DES} (272,95 μA) ve SPCE/AuNP (235,63 μA)'lerdeki Ipa_{ort} değerleri ise nispeten artmıştır. SPCE/AuNP'lerde Epa_{ort} değeri ise biraz azalmıştır (0,140 V). SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerde ise en yüksek Ipa_{ort} değeri 348,32 μA elde edilmiştir. Ayrıca Epa_{ort} değeri oldukça azalmış ve 0,110 V ile yüksek elektrokatalitik etki göstermiştir. Şekil 4.3C ve Çizelge 4.1'deki EIS'lere göre SPCE'lerde Rct_{ort} değeri 274,60 ohm'dur. SPCE/PTB_{DES} (76,70 ohm) ve SPCE/AuNP (84,27 ohm)'lerde Rct_{ort} değerleri oldukça düşmüştür. SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerde ise 2,30 ohm Rct_{ort} değeri gözlenmiştir ve oldukça iletken olduğu anlaşılmıştır. CV, DPV ve EIS sonuçlarına göre PTB_{DES} ve AuNP arasındaki sinerjik etki, elektronik iletkenliği artırmış bununla birlikte elektrokatalitik etki göstermiş ve voltamogramlarda Epa_{ort} değerlerini düşürmüştür (Yılmaz ve Bilgi 2024). CV, DPV ve EIS sonuçları birbiri ile uyumludur ve üç metotta da en iyi performans SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerde elde edilmiştir. CA125 immunosensörlerinin hazırlanmasında SPCE/PTB_{DES}/AuNP'ler kullanılmıştır.

4.1.1.2 SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerin morfolojik ve kimyasal karakterizasyonları

Tezin bu kısmında ilk olarak SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerin morfolojik karakterizasyonuna ait bulgular sunulmuştur. Optimum şartlarda hazırlanmış elektrotların morfolojik karakterizasyonu SEM ile yapılmıştır. SPCE, SPCE/PTB_{DES} ve SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lere ait SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.4A, Şekil 4.4AB ve Şekil 4.4C'de verilmiştir.

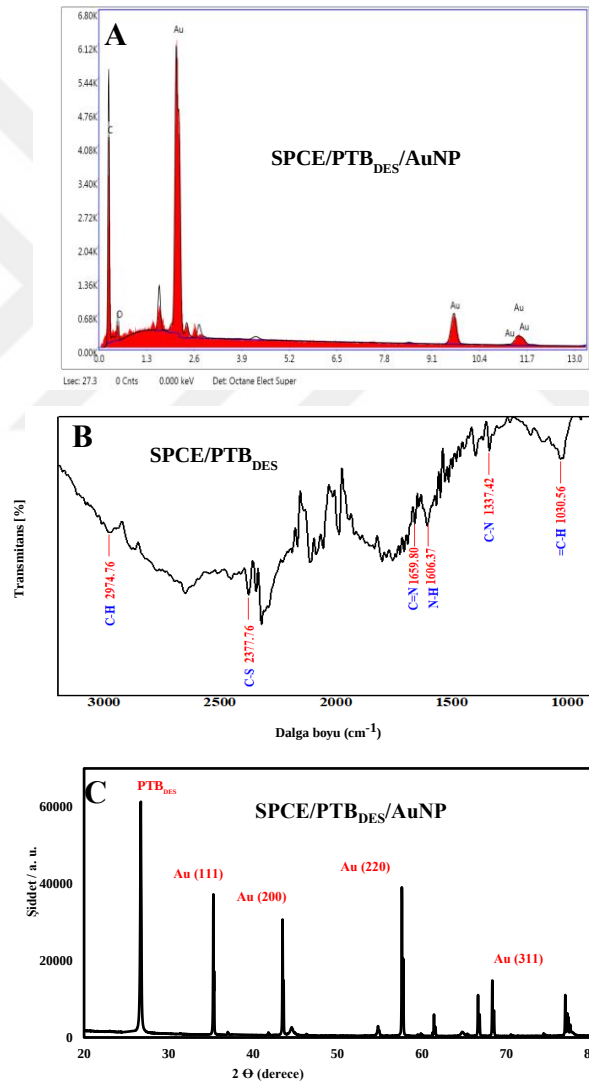


Şekil 4. 4 SPCE (A), SPCE/PTB_{DES} (B) ve SPCE/PTB_{DES}/AuNP (C)'lere ait SEM görüntüleri

Optimum şartlarda hazırlanan elektrotların Şekil 4.4A'daki SEM'de SPCE'lerin yüzeyinin pürüzsüz olduğu görülmektedir. Şekil 4.4B'de ise çok katmanlı helezon yapılarının varlığı PTB_{DES}'in yüzeye kaplandığının kanıtıdır (Chakkarapani and Brandl 2021). Şekil 4.4C'de ise yer yer AuNP'lerin küresel şekildeki görüntüsü gözlenmiştir (Atıcı vd. 2023) ve bu küresel görüntüler AuNP depolandığını kanıtlamaktadır.

SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerin morfolojik karakterizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerin morfolojik karakterizasyonu tartışıldıktan sonra, kimyasal karakterizasyonlarına ait bulgular sunulmuştur. Optimum şartlarda hazırlanmış elektrotların kimyasal karakterizasyonu EDX, FTIR ve XRD ile yapılmıştır. SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lere ait EDX spektrum Şekil 4.5A'da, SPCE/PTB_{DES}'lere ait FTIR spektrumu Şekil 4.5B'de ve SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lere ait XRD spektrumu ise Şekil 4.5C'de verilmiştir.



Şekil 4. 5 SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lere ait EDX spektrumu (A), SPCE/PTB_{DES}'lere ait FTIR spektrumu (B) ve SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerin XRD spektrumu (C)

Şekil 4.5A'daki EDX analizinde Au elementinin varlığı, AuNP'lerin elektrot üzerine biriktirildiğinin kanıtıdır (Atıcı vd. 2023). Şekil 4.5B'deki SPCE/PTB_{DES}'lere ait FTIR spektrumunda, 2974,6 cm⁻¹'deki pik PTB_{DES} yapısındaki aromatik halkadaki C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 2377,76 cm⁻¹'deki pik C-S gerilme titreşiminden, 1659,80 cm⁻¹'deki pik ise C=N+(CH₃)₂ grubundaki C=N titreşimlerinden ileri gelmektedir (Atıcı vd 2023; Kıymaz Onat vd. 2023). 1606,37 cm⁻¹'deki pik, N-H birincil aminin bükülme bantını göstermektedir (Palakollu and Karpoormath 2018). C-N (aril) arasındaki titreşimler 1337,42 cm⁻¹'de (Palakollu and Karpoormath 2018) ve = C-H gerilme titreşimleri 1030 cm⁻¹'de (Atıcı vd. 2023; Kıymaz Onat vd. 2023) meydana gelir. Şekil 4.5C'deki SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lere ait XRD spektrumunda PTB_{DES} için 26,59°'de keskin bir kırınım tepe noktası görülmektedir. Literatürde de fenazin boyası olan polimetilen mavisinin (PMB) XRD spektrumunda 26,7°'de keskin bir kırınım tepe noktası gösterdiği ve PMB'nin amorf fazından kaynaklandığı bildirilmektedir (Atıcı vd. 2023). Sonuçlar literatür ile uyumludur. AuNP için sırasıyla 35,46°, 43,58°, 61,54° ve 77,61°'de dört karakteristik kırınım tepe noktası (111), (200), (220) ve (311) gözlenmiştir (Atıcı vd. 2023). Bu sonuçlara göre SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerin kimyasal karakterizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.1.2 CA125 immunosensörlerinin geliştirilmesi

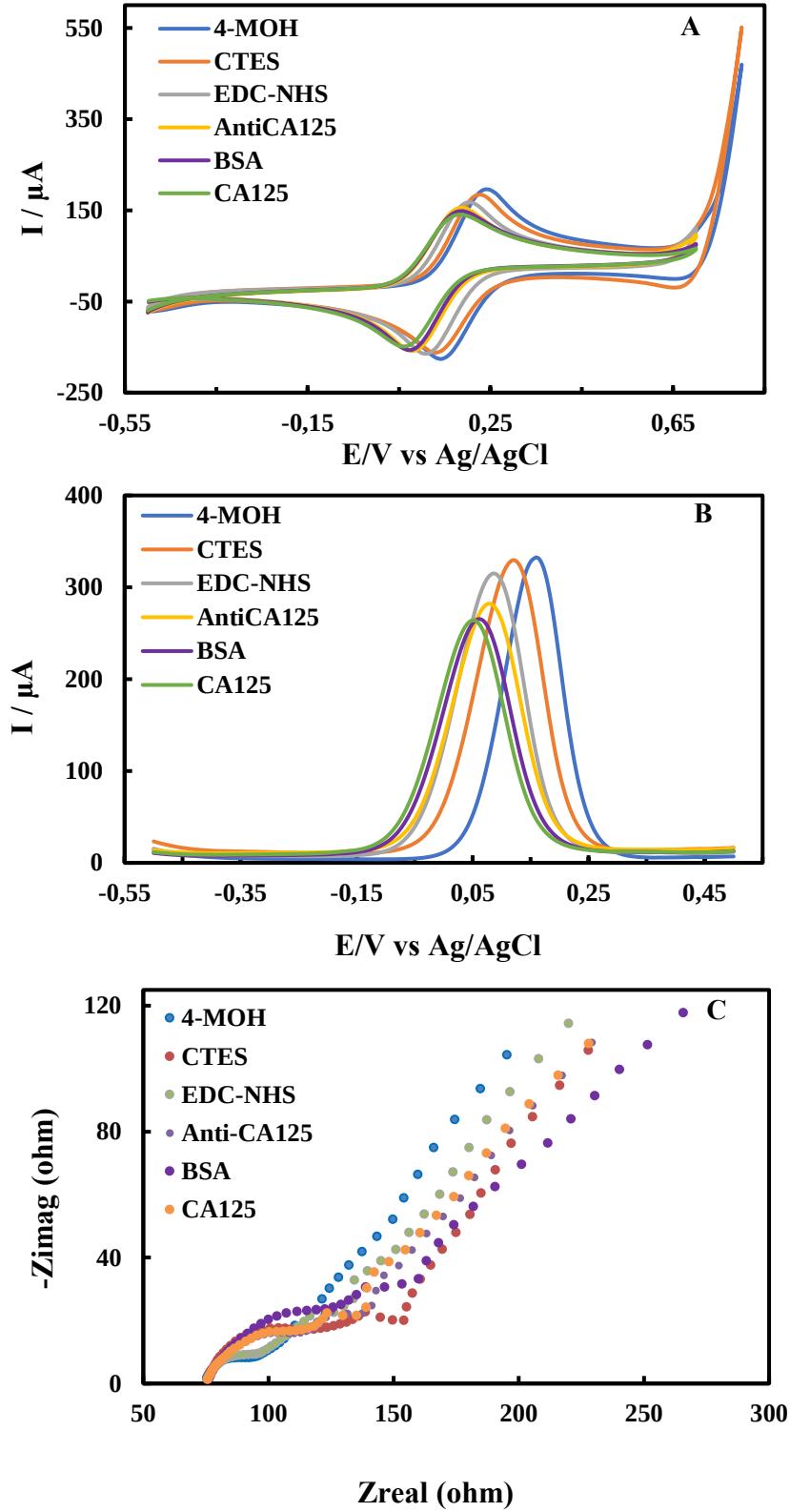
Tezin bu kısmında, bir önceki bölümde detayları verilmiş olan SPCE/PTB_{DES}/AuNP'ler kullanılarak CA125 immunoosensörleri hazırlanmış ve elektrokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. CA125 immunosensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonları, analitik parametreleri ve gerçek numune analizlerine ait bulgular verilmiş ve tartışılmıştır.

4.1.2.1 CA125 immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu

SPCE/PTB_{DES}/AuNP elektrotları kullanılarak hazırlanan CA125 immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu için her bir hazırlanma basamağından sonra CV, DPV EIS ölçümleri gerçekleştirilmiştir. CA125 immunosensörlerinin her bir hazırlanma

basamağında elde edilen CV ve DPV'ler ile EIS'ler sırasıyla Şekil 4.6A, 4.6B ve 4.6C'de verilmiştir. CV ve DPV'lerden elde $I_{pa_{ort}}$ değerleri ve EIS'lerden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ değerleri ise Çizelge 4.2'de gösterilmektedir.





Şekil 4. 6 SPCE/PTB_{DES}AuNP'lerle hazırlanan CA125 immunosensörlerinin dönüşümlü voltamogramları (A), diferansiyel puls voltamogramları (B) ve elektrokimyasal empedans spektrumları (C)

Çizelge 4. 2 CA125 immunosensörlerinin her bir hazırlanma basamağında CV ve DPV'lerinden elde edilen $I_{pa_{ort}}$ değerleri ve EIS'lerinden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ değerleri

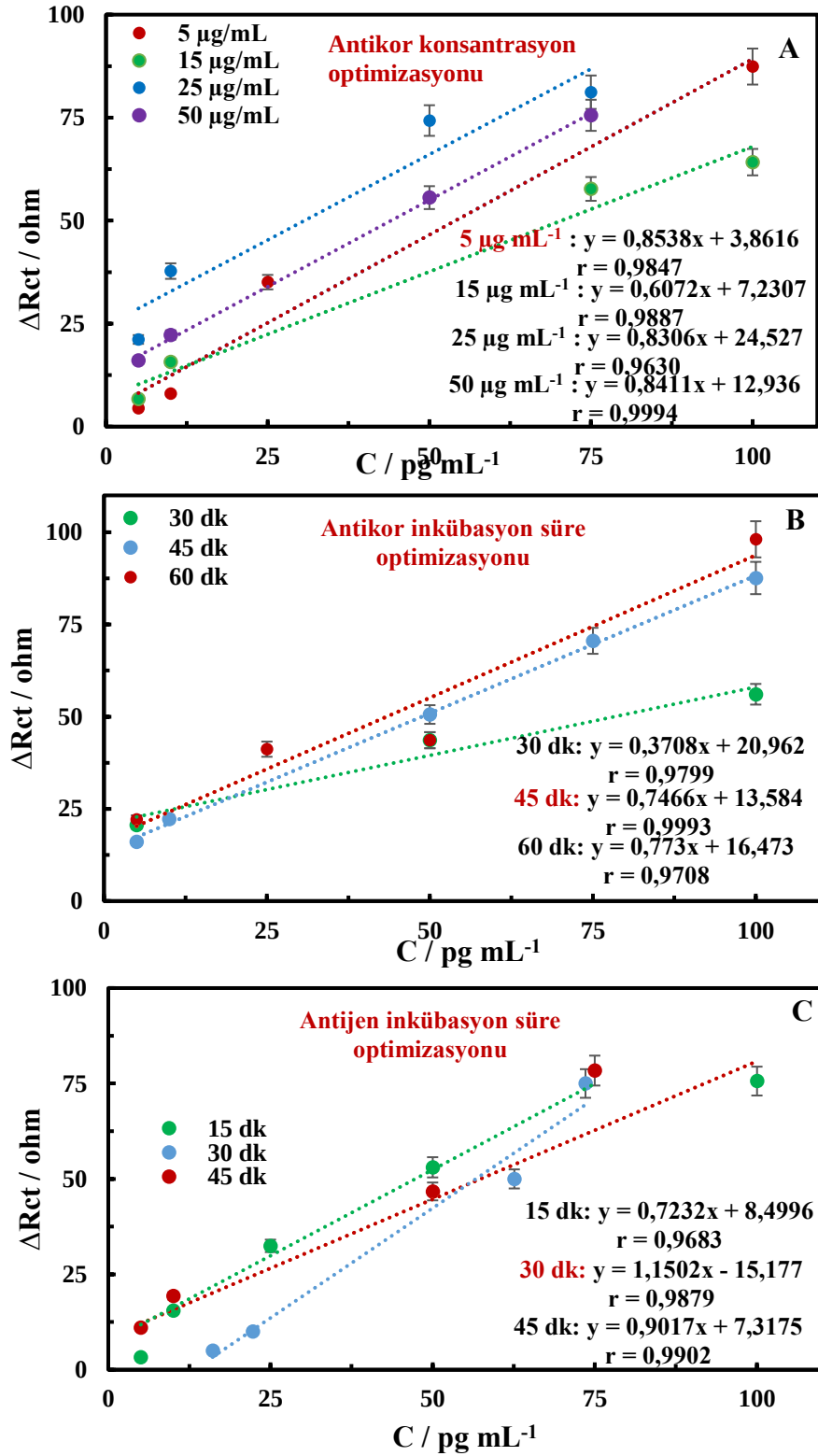
İmmunosensör formülasyonu	CV $I_{pa_{ort}}$ (μA)	DPV $I_{pa_{ort}}$ (μA)	EIS $R_{ct_{ort}}$ (ohm)
4-MOH	178,20	327,64	17,55
CTES	155,91	316,83	34,36
EDC NHS	149,32	305,25	35,98
Anti-CA125	142,25	269,44	47,68
BSA	135,24	255,37	71,13
CA125	132,93	253,29	75,82

Şekil 4.6A'daki CV'lere ve Çizelge 4.2'ye göre SPCE/PTB_{DES}/AuNP'ler -SH grubu içeren 4-MOH ile muamele edildikten sonra $I_{pa_{ort}}$ değeri 178,20 μA olduğu bulunmuştur. SAM'lerin oluşturulması için, yüzeyde -OH gruplarının varlığı 4-MOH ile elde edilmiştir. CTES silan ajanı ile silanizasyon yapılmış ve CTES, yüzeydeki -OH gruplarıyla reaksiyona girerek kovalent bağ oluşturmuştur. Böylece siloksan bağ oluşmuştur (Si-O-Si). EDC-NHS muamelesinden sonra CTES'in diğer ucunda bulunan -COOH grupları aktifleştirilmiş ve amin reaksiyonu oluşarak antikoru yüzeyde tutunması için kararlı bir yüzey oluşturulmuştur (Steglich *et al.* 2022). CTES ve EDC-NHS çapraz bağlayıcı ile aktivasyonundan sonra, iletkenlik azalmış ve $I_{pa_{ort}}$ değeri de azalmıştır (CTES:155,91 μA , EDC-NHS:149,32 μA). Anti-CA125'in yüzeye immobilizasyonu sonrası difüzyonun azalmasıyla birlikte pik akımı da azalmıştır (142,25 μA). Bu sonuçlar Anti-CA125'in ÇE'de başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir (Bilgi Kamaç vd. 2023a, b; Yılmaz ve Bilgi 2024). BSA ve CA125 inkübasyon adımlarında, yüzey daha yalıtkan hale geldikçe $I_{pa_{ort}}$ değerlerinde bir azalma görülmüştür (BSA:135,24 μA , CA125: 132,93 μA). Şekil 4.6B'deki DPV'lere ve Çizelge 4.2'ye göre SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerin 4-MOH ile muamelesinden sonra $I_{pa_{ort}}$ değeri 327,64 μA 'dır. CTES ve EDC-NHS basamağında ise iletkenlik azalmış ve $I_{pa_{ort}}$ değeri de azalmıştır (CTES:316,83 μA , EDC-NHS:305,25 μA). Anti-CA125 yüzeye immobilizasyonu sonrası yalıtkan bir tabaka oluşmuş ve pik akımında azalma gözlenmiştir (269,44 μA). Difüzyonun azalmasıyla birlikte BSA (255,37 μA) ve CA125 (253,29 μA) basamaklarında da pik akım değerlerinde azalışlar devam etmiştir. Şekil 4.6C'deki EIS'lere ve Çizelge 4.2'ye göre ise SPCE/PTB_{DES}/AuNP elektrotlarının 4-MOH basamağında $R_{ct_{ort}}$ değeri 17,55 ohm'dur. CTES ve EDC-NHS basamaklarında difüzyon

azalmış ve $R_{ct_{ort}}$ değerleri 34,36 ohm ve 35,98 ohm olarak artmıştır. Anti-CA125 ile inkübe edildikten sonra elektrot yüzeyi daha yalıtkan hale geldikçe, $R_{ct_{ort}}$ değeri daha da artmıştır (47,68 ohm). BSA (71,13) ve CA125 (75,82) inkübasyon adımlarında $R_{ct_{ort}}$ değerlerindeki artışlar devam etmiştir. Bu sonuçlara göre CA125 immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.2 CA125 immunosensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonu

Tezin bu kısmında, CA125 immunosensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonu için Anti-CA125 konsantrasyon optimizasyonu, Anti-CA125 inkübasyon süre optimizasyonu ve CA125 inkübasyon süre optimizasyonuna ait bulgular verilmiş ve tartışılmıştır. İlk olarak antikor konsantrasyonlarını optimize etmek için, farklı Anti-CA125 konsantrasyonlarına ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) sahip immunosensörler hazırlanmış ve farklı konsantrasyonlardaki CA125'in analizi EIS metodu ile gerçekleştirilmiştir. Antikor konsantrasyonu optimizasyonu için CA125 konsantrasyonu-direnç farkı ($\Delta R_{ct} = R_{ct_{Antigen}} - R_{ct_{BSA}}$) grafiği Şekil 4.7A'da gösterilmiştir.



Şekil 4. 7 CA125 konsantrasyonu- ΔR_{ct} grafikleri: A) antikor konsantrasyon optimizasyonu, B) antikor inkübasyon süre optimizasyonu ve C) antijen inkübasyon süre optimizasyonu

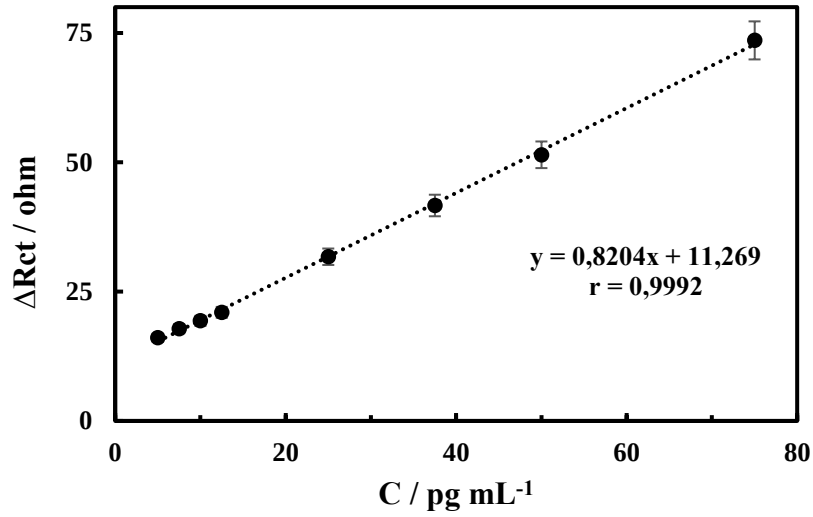
Şekil 4.7A'ya göre en yüksek eğim değeri, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-CA125 ile hazırlanan immunosensörlerin CA125 analizindeki $\Delta\text{Rct-C}$ grafiğinde elde edilmiştir. $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-CA125 konsantrasyonu ile hazırlanan immunosensörlerin CA125 analizinden elde edilen $\Delta\text{Rct-C}$ grafiğinin eğim değerleri, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-CA125 konsantrasyonu ile hazırlanan immunosensörlerde elde edilen eğim değerlerine yakındır. En yüksek korelasyon katsayısı (r) ise, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-CA125 ile hazırlanan immunosensörlerle yapılan analizde elde edilmiştir. Sonuç olarak, eğim ve r değerlerine göre optimum Anti-CA125 konsantrasyonuna $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak karar verilmiştir.

Optimum Anti-CA125 konsantrasyonunu belirledikten sonra antikor inkübasyon sürelerini optimize etmek için, farklı Anti-CA125 inkübasyon sürelerine sahip immunosensörler (30 dk, 45 dk ve 60 dk) hazırlanmıştır. Antikor inkübasyon süre optimizasyonu için $\Delta\text{Rct-C}$ grafiği Şekil 4.7B'de gösterilmiştir. Şekil 4.7B grafiğinin eğim değerlerinden, Anti-CA125'in elektrot üzerinde immobilizasyonu için geçen 30 dakikanın antijen-antikor etkileşimi için yetersiz olduğu görülmektedir. Anti-CA125'in 45 ve 60 dakika inkübasyonu ile hazırlanan immunosensörlerin $\Delta\text{Rct-C}$ grafiğinden elde edilen eğim değerleri birbirine çok yakındır. En yüksek r değeri, Anti-CA125'in 45 dk inkübasyonu ile hazırlanan immunosensörlerle yapılan analizlerde elde edilmiştir. Sonuç olarak, optimum Anti-CA125 inkübasyon süresi 45 dk olarak belirlenmiştir.

Son olarak, immunosensör tasarımındaki son adım olan antijen süre inkübasyon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla üç farklı CA125 inkübasyon süresine sahip CA125 immunosensörleri (15 dk, 30 dk ve 45 dk) hazırlanmıştır. Antijen inkübasyon süre optimizasyonu için $\Delta\text{Rct-C}$ grafiği Şekil 4.7C'de gösterilmiştir. Şekil 4.7C grafiğine göre 15 dk, antikor-antijen etkileşimi için yetersiz gelmiştir. 30 dakikalık inkübasyon süresinde, $\Delta\text{Rct-C}$ grafikleri sinyal artışları nedeniyle daha doğrusal gözükmemektedir. Ek olarak, r değeri 45 dakikalık inkübasyon süresi boyunca artmasına rağmen, düşük sinyaller kaydedilmiştir. Sonuç olarak, optimum CA125 inkübasyon süresinin 30 dk olarak belirlenmiştir.

4.1.2.3 CA125 immunosensörlerinin analitik performansı

Tezin bu bölümünde, CA125 immunosensörlerinin analitik parametreleri olan doğrusal aralık, tekrarlanabilirlik, uygulama kararlılığı, depolama kararlılığı ve rejenerasyon çalışmaları sunulmuş ve tartışılmıştır. Bu amaçla ilk olarak doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi için, optimum çalışma parametrelerinde hazırlanan CA125 immünsensörleri kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki CA125 antijenlerinin analizi EIS metodu ile gerçekleştirilmiştir. EIS'lerden faydalanarak ΔR_{ct} -C grafiği çizilmiş ve Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4. 8 CA125 immunosensörleri için 5 ile 100 pg mL⁻¹ aralığında artan CA125 konsantrasyonuna karşı ΔR_{ct} grafiği

Şekil 4.8'deki grafikten faydalanarak tespit limitleri ve tayin aralıkları belirlenmiştir. Şekil 4.8'deki grafikte CA125 konsantrasyonu arttıkça ΔR_{ct} değerleri de doğrusal olarak artmaktadır ve r değeri 0,9992'dir. Geliştirilen immunosensörlerin doğrusal aralığı 5-100 pg mL⁻¹, duyarlılığı ve tespit limiti (LOD) ise sırasıyla 0,8204 ohm mL pg⁻¹ ve 1,20 pg mL⁻¹'dir.

Literatürde yer alan etiketli ve etiketsiz CA125 immunosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen etiketsiz CA125 immunosensörünün performans karşılaştırması Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4. 3 Literatürde yer alan etiketli ve etiketsiz CA125 immunosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen etiketsiz CA125 immunosensörünün performans karşılaştırması

Formülasyon	Tespit aralığı	Doğrusal aralık	Metot	Referans
Etiketli CA125 immunosensörleri				
GCE/MOF@MXene/Anti-CA125/BSA/CA125/UiO66@MB-Ab ₂	0,006 U mL ⁻¹	0,2-1000 U mL ⁻¹	DPV	Qu <i>et al.</i> 2023
ITO/C-ink/CD/ZnO/Anti-CA125/BSA/CA125/Ag@PPy	0,1 fg mL ⁻¹	1 ag mL ⁻¹ -100 ng mL ⁻¹	DPV	Krathumkhet <i>et al.</i> 2023
GCE/PPyMS/ Anti-CA125/BSA/CA125/Ab ₂	2,4 µU mL ⁻¹	10-100 U mL ⁻¹	DPV	Ma <i>et al.</i> 2024
SPCE/MXene/CNT-NH ₂ /Anti-CA125/BSA/CA125/Ab ₂	1 mU mL ⁻¹	1 mU mL ⁻¹ - 500 U mL ⁻¹	DPV	Yang <i>et al.</i> 2024
GCE/gC ₃ N ₄ /MoS ₂ /PANİ/AntiCA125/BSA/CA125/Aptamer-MB	0,196 U mL ⁻¹	2-10 U mL ⁻¹	SWV	Foroozandeh <i>et al.</i> 2024
Etiketsiz CA125 immunosensörleri				
GCE/MWCNT-COOH@AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	0,0004 U mL ⁻¹	0,0004-4 U mL ⁻¹	SWV	Runprapan <i>et al.</i> 2023
SPCE/3-HPA/ Anti-CA125/BSA/CA125	1,45 U mL ⁻¹	5-80 U mL ⁻¹	DPV	de Castro <i>et al.</i> 2020
GCE/CuCo-ONSs@AuNPs/Anti-CA125/BSA/CA125	3,9x10 ⁻⁸ U mL ⁻¹	1x10 ⁻⁷ -1x10 ⁻³ U mL ⁻¹	DPV	Mu <i>et al.</i> 2024
GCE/MWCNT/CuNP/SiONP/Anti-CA125/BSA/CA125	3,4x10 ⁻⁴ U mL ⁻¹	0,001-500 U mL ⁻¹	DPV	Chang <i>et al.</i> 2023
SPCE/AuNP@C60/ Anti-CA125/BSA/CA125	0,016 U mL ⁻¹	1-100 U mL ⁻¹	EIS	Kilimci vd. 2024
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-CA125/CA125	1,17 pg mL ⁻¹ (0,00136 U mL ⁻¹)	1–100 pg mL ⁻¹ (0,00117–0,117 U mL ⁻¹)	DPV, EIS	Bilgi Kamac vd. 2023a
SPCE/PTBDES/AuNP/Anti-CA125/BSA/CA125	1,2 pg mL⁻¹ (0,00140 U mL⁻¹)	5–100 pg mL⁻¹ (0,0058–0,177 U mL⁻¹)	EIS	Bu çalışma

3-HPA: 3-hidroksifenilasetikasit
Ab: Antikor
Ag@PPy:Gümüş@polipirolün
AuNPs: Altın nanopartiküller
BSA: Bovin serum albümin
C60: Fulleren
CA125: Kanser antijen 125

CD:Karbon dot
C-ink: Karbon mürekkep
CNT-NH₂: Amin fonksiyonlu karbon nanotüp
CuCo-ONSs: Bakır-kobalt oksit
nanotabakalar
CuNP: Bakır nanopartiküller
gC₃N₄: Grafit karbon nitrürler
GCE: Camı karbon elektrot

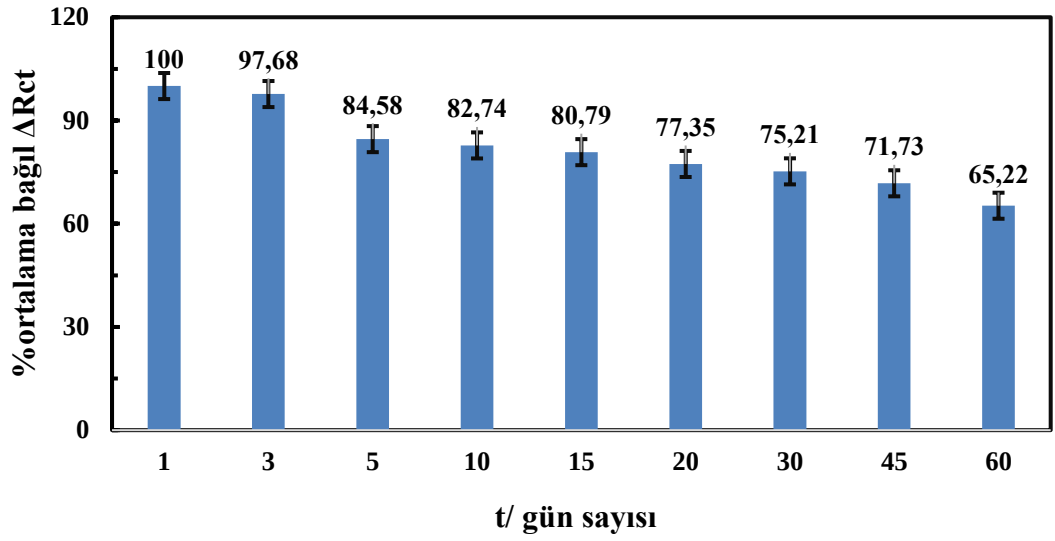
ITO: İndiyum kalay oksit
MB: Metilen mavisi
MOF: Metal organik çerçeve
MoS₂: Molibden disülfür
PANİ: Polianilin
PPyMS: Polipirol mikroküreler

PTBDES:Politoluidin mavisi
PTH: Politiyonin
RGO: İndirgenmiş grafen oksit
SiONP: Silika nanopartiküller
SPCE: Ekran baskılı karbon elektrot
UiO66: [Zr₆O₄(OH)₄] Metal organik çerçeve
ZnO:Çinko oksit

Çizelge 4.3'te yer alan etiketli elektrokimyasal CA125 immunosensörlerinin tespit limitlerinin oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Ancak ikincil bir antikor ve sinyal yükseltici malzemeler kullanıldığı anlaşılmaktadır. Bu materyaller immunosensörün maliyetini ve immunosensörlerin hazırlanma zamanını arttırmaktadır. Etiketsiz CA125 immunosensörleri ise etiketli CA125 immunosensörlerine göre daha hızlı ve pratiktir. Yumurtalık kanserinin erken teşhisi için CA125 antijeninin düşük konsantrasyonlardaki tespiti önem arz etmektedir. Çalışmamızda düşük konsantrasyonlarda CA125 antijeninin tayini yapılabilmektedir. EIS metodu kullanılarak hassas, hızlı ve pratik CA125 immunosensörleri geliştirilmiştir. Bundan sonraki kısımda CA125 immunosensörlerinin analitik performansları olan tekrarlanabilirlik, uygulama kararlılığı, depolama kararlılığı ve rejenerasyon parametreleri incelenmiştir.

CA125 immunosensörlerin tekrarlanabilirliklerinin belirlenmesi için tayin aralıklarında seçilen antijen konsantrasyonunda (50 pg mL^{-1}), optimum çalışma parametrelerinde hazırlanan CA125 immunosensörleri ile 5 mM FF çözeltisinde EIS ölçümleri yapılmıştır. CA125 immunosensörlerinin tekrarlanabilirlikleri için RSD %4,78 ($n=7$) olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular, geliştirilen CA125 immunosensörlerinin tek kullanımlık olmasına rağmen CA125'i yedi tekrara kadar analiz edebildiğini göstermektedir.

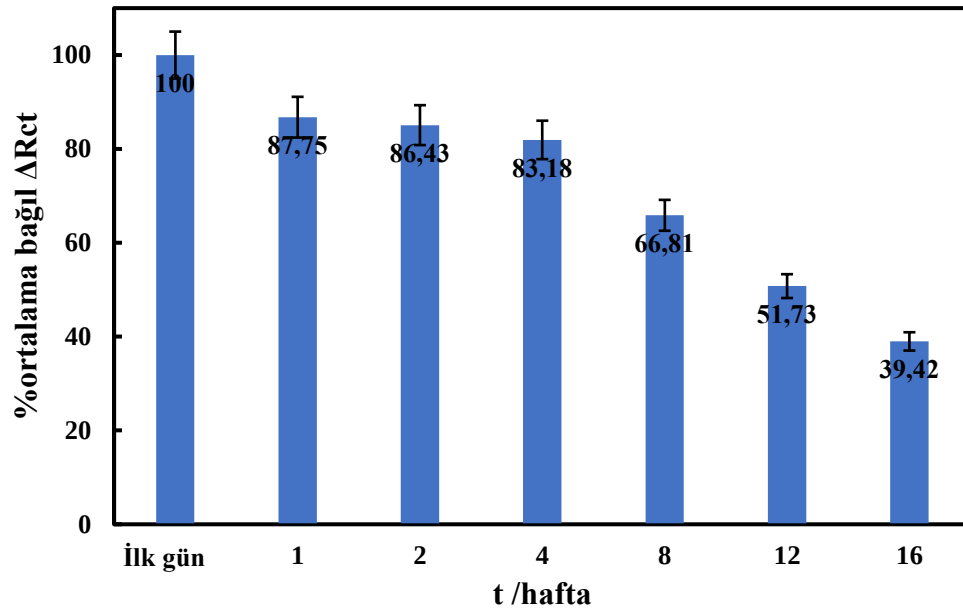
Optimum çalışma parametrelerinde hazırlanan CA125 immunosensörlerinin uygulama kararlılığı, 50 pg mL^{-1} konsantrasyonundaki CA125 antijeninin 60 gün boyunca EIS metodu kullanılarak iki paralelli ve üç tekrarlı olarak belirli zaman aralıklarında ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. EIS'lerden elde edilen ΔR_{ct} değerlerinden yararlanılarak, ilk günkü değerlere göre %ortalama bağıl ΔR_{ct} hesaplanmıştır. %ortalama bağıl ΔR_{ct} -gün grafiği çizilmiş ve Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4. 9 CA125 immunosensörlerinin uygulama kararlılığı: %ortalama bağıl ΔR_{ct} -gün grafiği

Şekil 4.9'daki grafiğe göre immunosensörlerin CA125 cevabında ilk güne kıyasla 3. günde %2,32'lik, 5. günde %15,42'lik, 10. günde %17,26'lık, 15. günde %19,21'lik bir azalma gözlenmiştir. 60. günün sonunda ise %65,22'lik bir sinyal gözlenmiştir. CA125 immunosensörleri CA125 antijenine 60. günde dahi cevap vermiş ve uygulama kararlılığı 60 gün olarak belirlenmiştir.

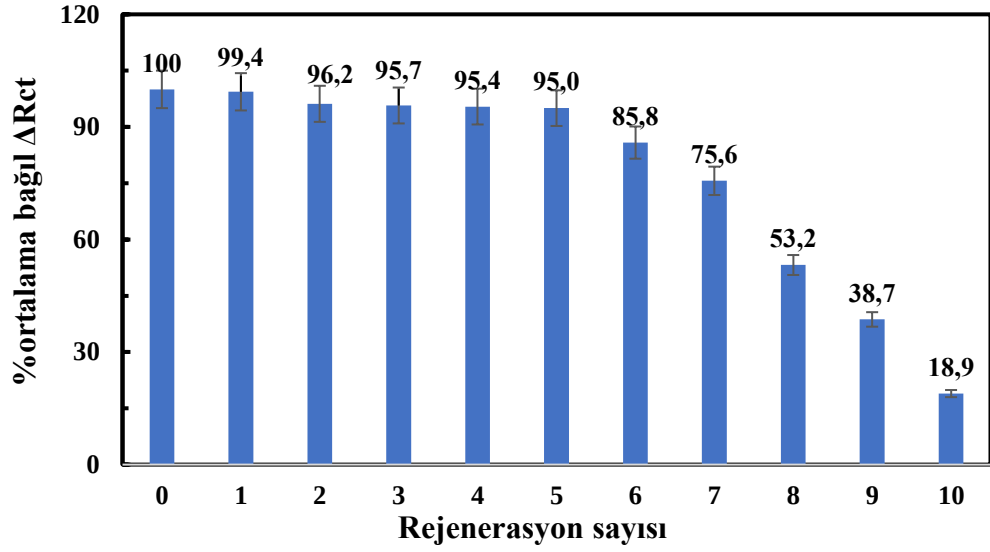
CA125 immunosensörlerinin depolama kararlılığını incelemek için ise 10 ayrı immunosensör hazırlanmıştır. +4°C'de depolanan CA125 immunosensörleri ile 1., 2., 4., 6., 8., 12., 16., 20. ve 24. haftalarda CA125 antijenlerinin (50 pg mL⁻¹) analizi 5 mM FF çözeltisinde EIS ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. ΔR_{ct} değerleri hesaplanmış ve ΔR_{ct} değerlerinden yararlanılarak %ortalama bağıl ΔR_{ct} -hafta grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10 CA125 immunosensörlerinin depolama kararlılığı: %ortalama bağıl ΔR_{ct} -hafta grafiği

Şekil 4.10'daki grafiğe göre immunosensörün CA125 cevabında ilk güne kıyasla 1. haftada %12,25'lik, 4. haftada %16,82, 12. haftada %48,28'lik, 16. haftada %60,58'lik bir azalma gözlenmiştir. 20. ve 24. haftada sinyal azalışı fazla gözlemlendiği için CA125 immunosensörlerinin depolama kararlılığı 16 hafta olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen CA125 immunosensörlerinin rejenerasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışma ile ÇE olarak tercih edilen yüzeyin kararlılığı hem de yüzeydeki antikor-antijen immunokompleksinin ayrılmasından sonra yeniden bağlanma kapasitesi araştırılmıştır. Geliştirilen CA125 immunosensörlerinin rejenerasyonunu incelemek için, CA125 immunosensörleri hazırlandıktan sonra 10 mM HCl çözeltisiyle muamele edilmiştir. 2 dakika sonra, tekrar CA125 (50 pg mL^{-1}) ile inkübe edilmiş ve ardından EIS metoduyla CA125 analizi yapılmıştır. CA125 immunosensörlerinin CA125 antijenine olan cevabı için %ortalama bağıl ΔR_{ct} -rejenerasyon sayısı grafiği çizilmiş ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

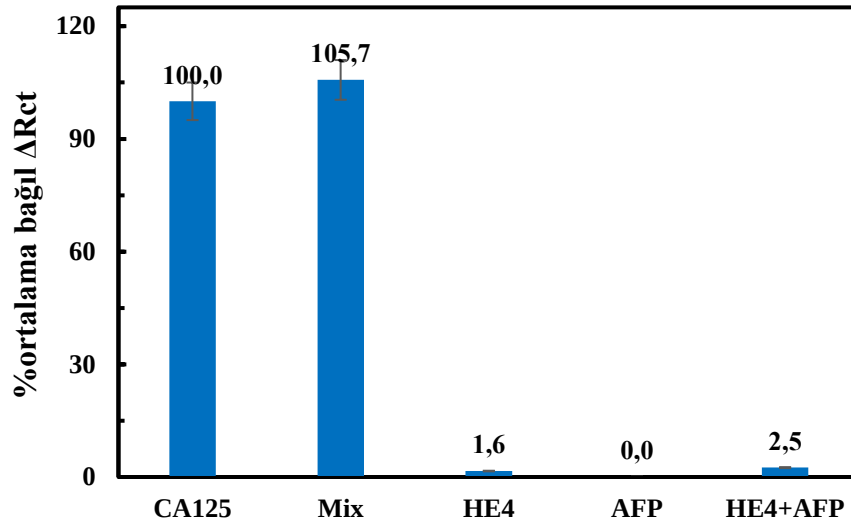


Şekil 4. 11 CA125 immunosensörlerinin rejenerasyon çalışması: %ortalama ΔR_{ct} -rejenerasyon sayısı grafiği

Şekil 4.11'e göre CA125 immunosensörlerinin CA125 antijenine olan cevabında 1. rejenerasyondan sonra %0,20'lik, 2. rejenerasyondan sonra %2,70'lik, 3. rejenerasyondan sonra %3,11'lik, 4. rejenerasyondan sonra %3,30'luk ve 5. rejenerasyondan sonra %5,0'lık bir sinyal azalışı elde edilmiştir. CA125 immunosensörlerinde 10. rejenerasyonda ise %19,70'lik bir sinyal gözlenmiştir. CA125 immunosensörlerinin 5. rejenerasyonunda dahi %95'lik sinyal gözlenmiş ve beş kere rejenere edilebildiği anlaşılmıştır. Böylece ÇE olarak tercih edilen yüzeyin kararlı olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular CA125 immunosensörlerinin tekrar kullanılabilirliğini göstermiştir.

4.1.2.4 CA125 immunosensörlerinin seçiciliği

CA125 immunosensörünün seçiciliği, diğer yumurtalık kanseri biyobelirteçleri, HE4 ve AFP varlığında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ayrı ayrı CA125, HE4, AFP çözeltileri (her biri 50 pg mL^{-1}), HE4-AFP (her biri 50 pg mL^{-1}) içeren bir çözelti ve CA125-HE4-AFP (her biri 50 pg mL^{-1}) içeren bir çözelti hazırlanmış ve hazırlanan immunosensörler bu antijen çözeltileriyle inkübe edilmiştir. 5 mM FF çözeltisinde EIS ölçümleri yapılmış ve bu antijenlerin girişim yapıp yapmadığı test edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4. 12 CA125 immunosensörlerinin seçicilik testi: %ortalama ΔR_{ct} -antijen grafiği

Şekil 4.12'ye göre CA125 immunosensörlerinin HE4, AFP ve HE4-AFP antijenlerine karşı cevabı oldukça düşüktür (%2,5'un altında). CA125, HE4 ve AFP (karışım) ile inkübe edildiğinde ise girişim %5,7 olarak hesaplanmıştır. Antijen karışımına CA125 immunosensörlerinin yanıtının %6'nın altında olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre, CA125 immunosensörlerinin diğer yumurtalık kanser biyobelirteçleri varlığında CA125'e karşı iyi bir seçicilik gösterdiği anlamına gelmektedir.

4.1.2.5 CA125 immunosensörleri ile gerçek numune analizi

Gerçek numune analizi uygulaması için CA125 immunosensörleri hazırlanmış ve satın alınan insan kan serumunda CA125'i tespit etmek için kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak serum örneği 1:100 oranında pH 7,4 fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Serum örneklerine $25,0 \text{ pg mL}^{-1}$ ve $50,0 \text{ pg mL}^{-1}$ konsantrasyonlarında CA125 antijeni eklenmiştir. CA125 immunosensörleri CA125 antijeni içeren serum örnekleri ile inkübe edilmiş ve CA125 analizleri EIS ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. Ortalama ΔR_{ct} değerlerinden faydalananarak %geri kazanım ve %hata değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4 Geliştirilen CA125 immunosensörleri ile insan kan serumunda CA125 analizi

Eklenen CA125 konsantrasyonu	Hesaplanan CA125 konsantrasyonu	%Geri kazanım	%Hata
25,0 pg mL ⁻¹	25,26 pg mL ⁻¹	101,07	1,07
50,0 pg mL ⁻¹	52,32 pg mL ⁻¹	104,65	4,65

Çizelge 4.4'e göre her iki CA125 konsantrasyonu için gerçek numune analizindeki hataların %4,65'ten az olduğu ve geri kazanımların %101,07 ile %104,65 arasında olduğu görülmektedir. Bu bulgular, geliştirilen CA125 immunosensörlerinin insan kan serumunda CA125'in impedimetrik ölçümleri için etkili bir şekilde çalıştığını göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları Biomedical Microdevices dergisinde 2024 yılında yayınlanmıştır (Yılmaz ve Bilgi 2024).

4.2 HE4 İmmunosensörleri

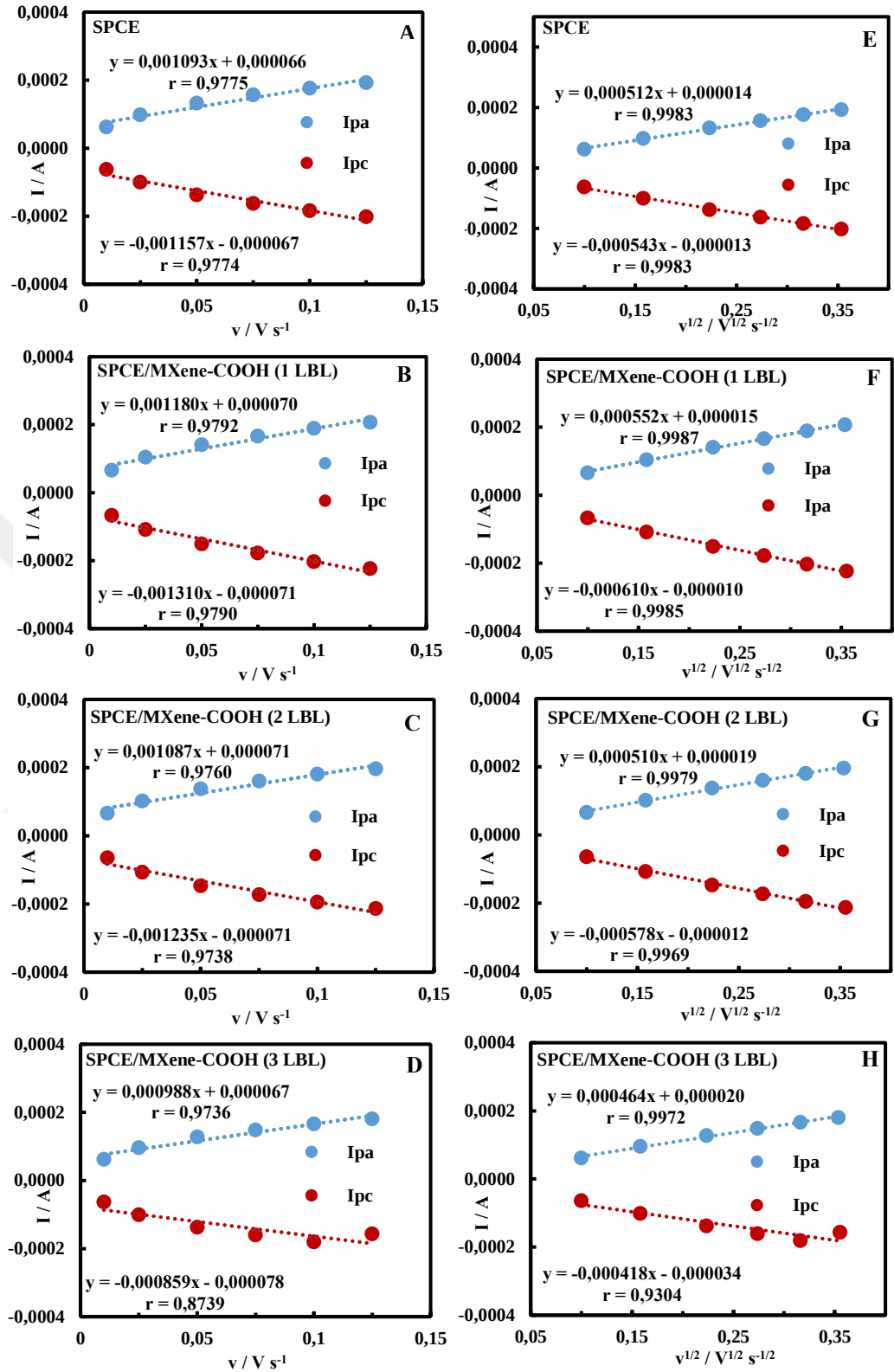
Tezin bu kısmında ilk olarak HE4 immunosensörlerinin hazırlanmasında kullanılan elektrotların modifikasyonu, modifikasyonların optimizasyonu, elektrokimyasal, morfolojik ve kimyasal karakterizasyonları tartışılmıştır. İkinci kısımda, modifiyeli elektrotlar kullanılarak hazırlanan HE4 immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonları, immunosensörlerin optimum çalışma parametreleri, analitik parametreleri ve gerçek numune analizleri tartışılmıştır.

4.2.1 MXene-COOH ve AuNP modifiyeli elektrotların karakterizasyonları

HE4 immunosensörlerinin hazırlanmasında kullanılan MXene-COOH ve AuNP modifiyeli elektrotların karakterizasyonları, elektrokimyasal ile morfolojik ve kimyasal olmak üzere iki başlık altında sunulmuştur. MXene-COOH ve AuNP modifiyeli elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonlarında, MXene-COOH'ın miktar optimizasyonu ve AuNP'nin elektropolimerizasyonun optimum çalışma parametrelerinin (HAuCl₄ konsantrasyonu ve döngü sayısı) incelenmesine ait bulgular sunulmuş ve tartışılmıştır. SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin morfolojik karakterizasyonlarında SEM, kimyasal karakterizasyonlarında ise EDX, FTIR ve XRD analizlerine ait bulgular verilmiş ve tartışılmıştır.

4.2.1.1 MXene-COOH ve AuNP modifiyeli elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonları

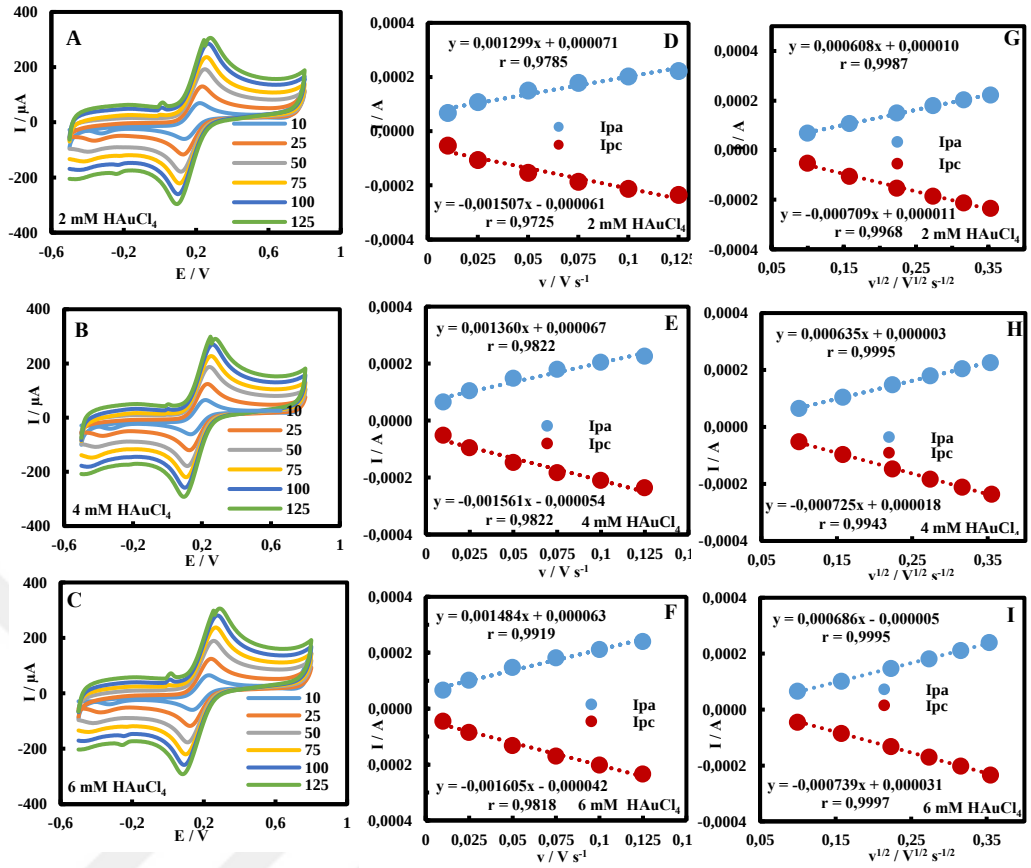
Tezin bu kısmında ilk olarak SPCE'ler üzerinde MXene-COOH'ın miktar optimizasyonuna ait bulgular sunulmuştur. Bu amaçla yalın SPCE, SPCE/MXene-COOH (1 LBL), SPCE/MXene-COOH (2 LBL) ve SPCE/MXene-COOH (3 LBL)'ların 5 mM FF çözeltisinde farklı tarama hızında ($10-125 \text{ mV s}^{-1}$) CV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. SPCE, SPCE/MXene-COOH (1 LBL), SPCE/MXene-COOH (2 LBL) ve SPCE/MXene-COOH (3 LBL)'lerin voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafikleri sırasıyla Şekil 4.13A, B, C ve D'de ve pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri ise Şekil 4.13E, F, G ve H'de verilmiştir.



Şekil 4. 13 SPCE, SPCE/MXene-COOH (1 LBL), SPCE/MXene-COOH (2 LBL) ve SPCE/MXene-COOH (3 LBL)'ların dönüşümlü voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı ($10-125 \text{ mV s}^{-1}$) (A, B, C ve D) ve pik akımı-tarama hızının karekökü (E, F, G ve H) grafikleri

Anodik ve katodik pik akımlarına karşı tarama hızı (Şekil 4.13A, B C ve D) ve tarama hızının karekökü (Şekil 4.13E, F, G, H) grafiklerine bakıldığında pik akımlarına karşı tarama hızının karekökü grafiklerinin korelasyon katsayılarının daha doğrusal olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar ise yalın ve MXene-COOH modifiyeli SPCE'ler üzerinde FF'in elektroyükseltgenme ve indirgenmesinin difüzyon kontrollü bir proseste gerçekleştiğini göstermektedir. Bu nedenle Randles-Sevcik eşitliği kullanılarak (Eşitlik 1), yalın ve MXene-COOH modifiyeli elektrotların Aea değerleri hesaplanmıştır. Aea değerleri; SPCE için 0,1252 cm², SPCE/MXene (1 LBL) için 0,1350 cm², SPCE/MXene (2 LBL) için 0,1247 cm² ve SPCE/MXene (3 LBL) için 0,1130 cm² olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre SPCE'den (0,1252 cm²) sonra 1 LBL MXene-COOH ile modifiye elektrodu en yüksek elektroaktif yüzey alanına sahiptir. 2 LBL ve 3 LBL MXene-COOH modifikasyonu sonrası Aea değerleri azalmıştır. MXene-COOH miktarının fazla olması, yüzeyde kalın bir tabaka oluşturarak elektroaktif türlerin elektrot yüzeyinden çözeltiye geçişini engellediği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, optimum MXene-COOH miktarının 1 LBL ile modifiye edilen elektrotlarla elde edildiği sonucuna varılmıştır.

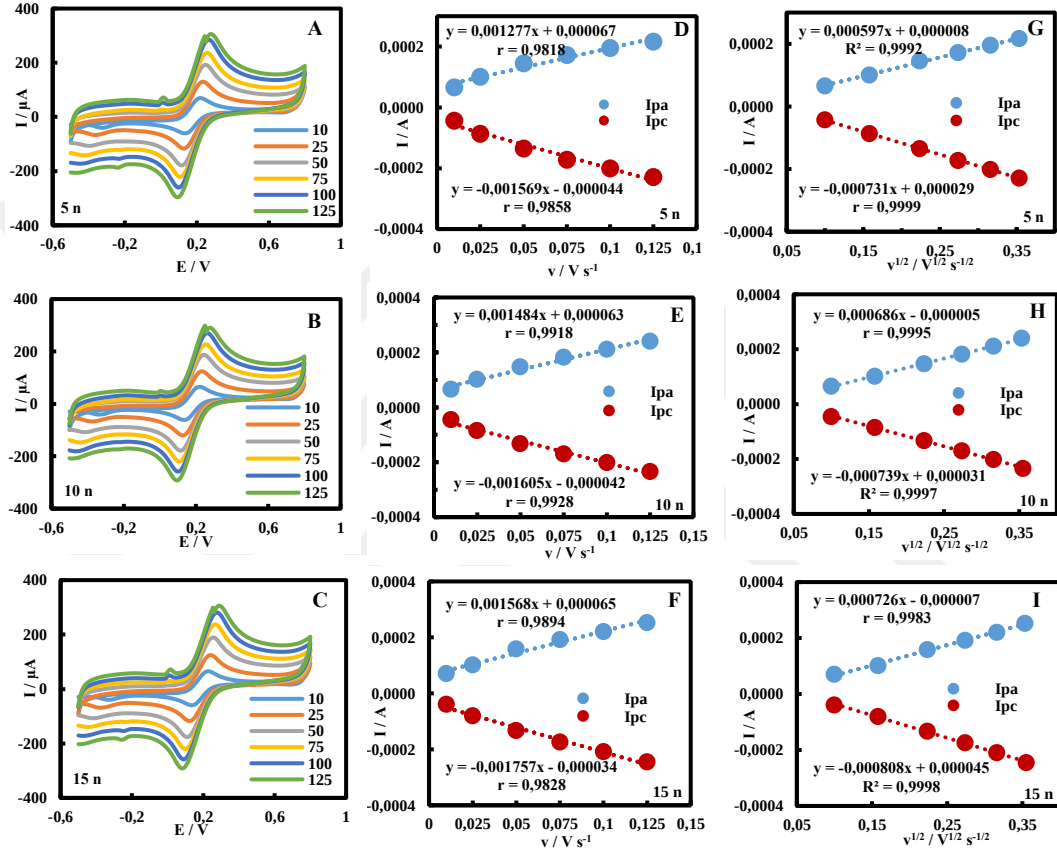
Hazırlanan SPCE/MXene-COOH'lar üzerinde AuNP modifikasyonunun optimizasyon çalışmaları da yapılmıştır. Bu amaçla SPCE/MXene-COOH'lar üzerinde farklı HAuCl₄ konsantrasyonları (2 mM, 4 mM ve 6 mM) ve farklı döngü sayılarında (5 n, 10 n ve 15 n) AuNP elektrodepozisyonları CV metodu ile gerçekleştirilmiştir. HAuCl₄ konsantrasyon optimizasyonunu belirlemek için farklı tarama hızlarında (10-125 mV s⁻¹) 5 mM FF çözeltisinde CV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Farklı HAuCl₄ konsantrasyonları (2, 4 ve 6 mM) ile hazırlanan SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin 5 mM FF çözeltisinde elde edilen CV'leri (tarama hızları: 10-125 mV s⁻¹) Şekil 4.14A, B ve C'de, voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafikleri Şekil 4.14D, E ve F'de ve pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri ise Şekil 4.14G, H ve I'da verilmiştir.



Şekil 4. 14 Farklı HAuCl₄ konsantrasyonları (2, 4 ve 6 mM) ile hazırlanan SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin dönüşümlü voltamogramları (tarama hızı: 10-125 mV s⁻¹) (A, B ve C) pik akımı-tarama hızı (D, E ve F) ve pik akımı-tarama hızının karekökü (G, H ve I) grafikleri

Şekil 4.14A, B ve C incelendiğinde, tarama hızı arttıkça anodik ve katodik pik akımlarının arttığı görülmektedir. Şekil 4.14G, H ve I'da verilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafiklerinin r değerleri, Şekil 4.14D, E ve F'de verilen pik akımı tarama hızı grafiklerinin r değerlerinden daha yüksektir. Bu sonuçlar, gerçekleşen elektrokimyasal prosesin difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir. Şekil 4.14G, H ve I grafiklerinin eğimlerinden yararlanarak farklı HAuCl₄ konsantrasyonlarıyla hazırlanan SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin A_{ea} değerleri hesaplanmış ve 0,1487 cm² (2 mM), 0,1553 cm² (4 mM) ve 0,1678 cm² (6 mM) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre optimum HAuCl₄ konsantrasyonu 6 mM olarak belirlenmiştir. Bir sonraki adımda AuNP deposisyonu için döngü sayısı optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Optimum döngü sayısını belirlemek için SPCE/MXene-COOH'lar üzerinde farklı döngü sayılarına (5, 10 ve 15 döngü) sahip AuNP modifikasyonu yapılmış ve elektrokimyasal karakterizasyonları farklı tarama hızlarında (10-125 mV s⁻¹) 5 mM FF çözeltisinde CV ile gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.15A, B ve C'de verilmiştir. Voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızı grafikleri Şekil 4.15D, E ve F'de ve pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri ise Şekil 4.15G, H ve I'da verilmiştir.

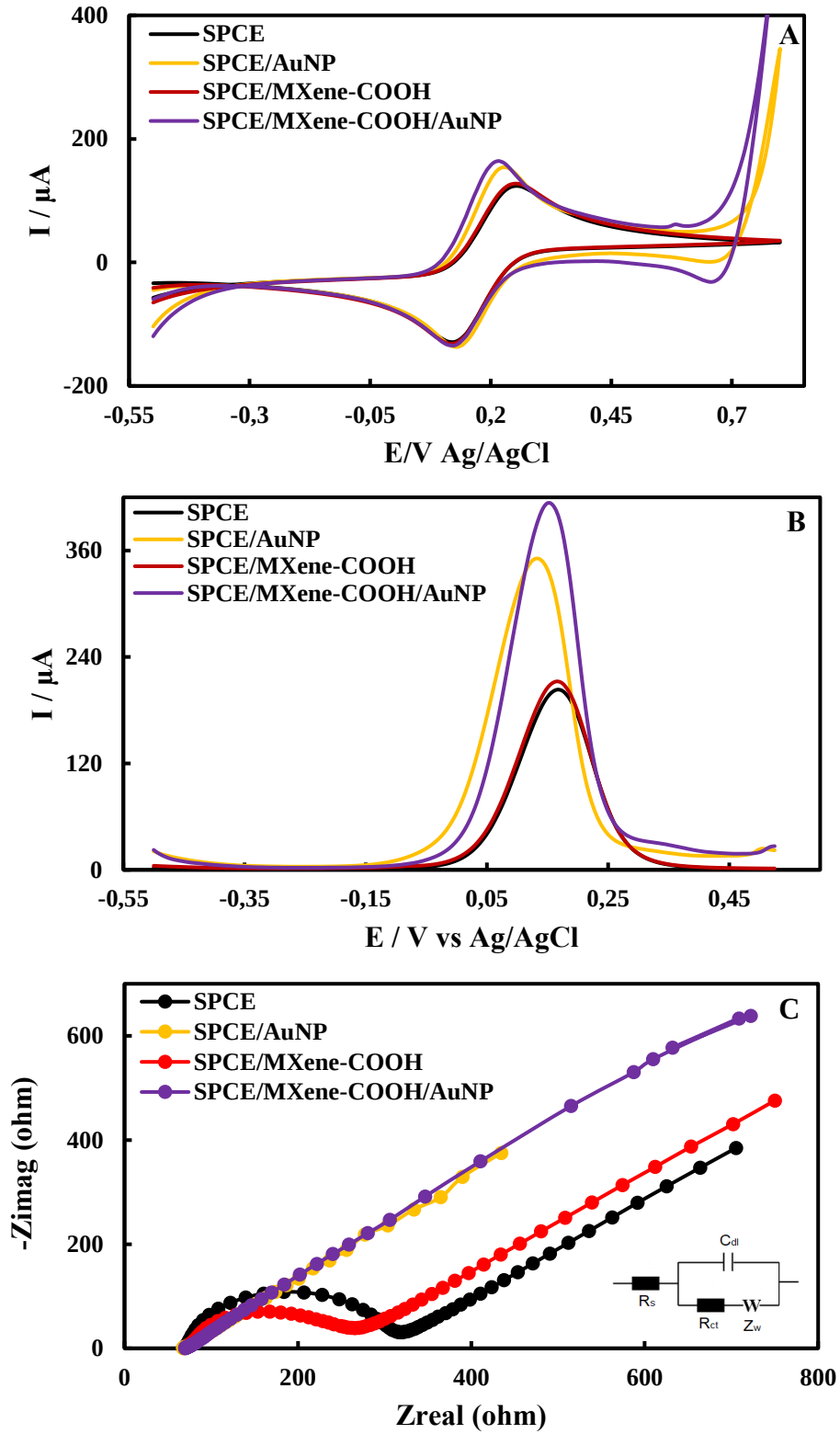


Şekil 4. 15 Farklı döngü sayısı (5, 10 ve 15 n) ile hazırlanan SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin dönüşümlü voltamogramları (tarama hızı: 10-125 mV s⁻¹) (A, B, C) pik akımı-tarama hızı grafikleri (D, E, F) ve pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri (G, H, I)

Optimum döngü sayısının belirlenmesi çalışmalarında Şekil 4.15A, B ve C'deki voltamogramlarda tarama hızı arttıkça anodik ve katodik pik akımlarının arttığı görülmektedir. Pik akımı-tarama hızının karekökü grafiklerinin r değerleri, pik akımı-tarama hızı grafiklerinin r değerlerinden daha yüksektir. Gerçekleşen elektrokimyasal

prosesin difüzyon kontrollü olduğu anlaşılmıştır. Voltamogramlardan yararlanılarak SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin Aea değerleri hesaplanmış sırasıyla 0,1460 cm² (5 n), 0,1678 cm² (10 n) ve 0,1773 cm² (15 n) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre optimum döngü sayısı 15 n olarak belirlenmiştir.

Bir sonraki adımda optimum şartlarda hazırlanan SPCE/MXene-COOH/AuNP elektrotları ile elektrokimyasal karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla her bir hazırlanma basamağında 5 mM FF çözeltisinde CV, DPV ve EIS ölçümleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen CV, DPV ve EIS'ler sırasıyla Şekil 4.16A, Şekil 4.16B ve Şekil 4.16C'de verilmiştir. CV ve DPV'lerden elde edilen $I_{pa_{ort}}$, Delta I_{pa} ($\Delta I_{pa} = I_{pa_{BSA}} - I_{pa_{HE4}}$) ve EIS'lerden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ ve ΔR_{ct} değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4. 16 SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin dönüşümlü voltamogramları (A), diferansiyel puls voltamogramları (B) ve elektrokimyasal empedans spektrumları (C)

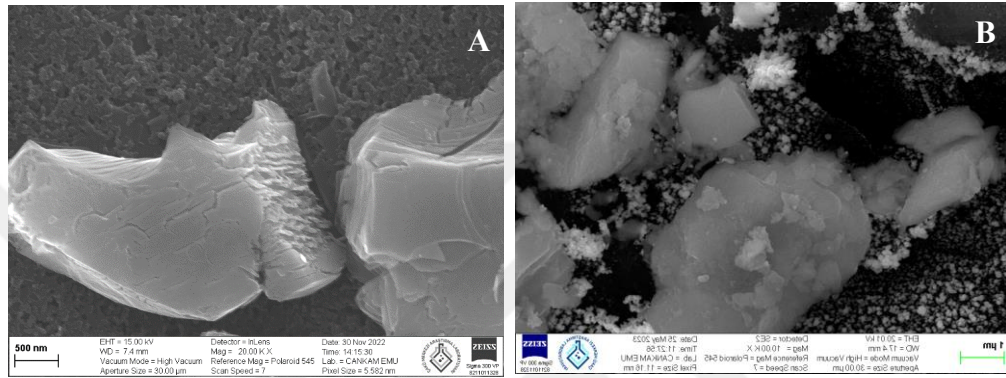
Çizelge 4. 5 SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin CV ve DPV'lerinden elde edilen $I_{pa_{ort}}$ ve ΔI_{pa} ve EIS'lerinden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ ve ΔR_{ct} değerleri

Formülasyon	CV		DPV		EIS	
	$I_{pa_{ort}}$ (μA)	ΔI_{pa} (μA)	$I_{pa_{ort}}$ (μA)	ΔI_{pa} (μA)	$R_{ct_{ort}}$ (ohm)	ΔR_{ct} (ohm)
SPCE	127,94	-	202,47	-	233,30	-
SPCE/AuNP	145,62	+17,68	332,39	+129,92	58,64	174,96
SPCE/MXene-COOH	131,08	+3,14	210,35	+7,98	32,95	200,65
SPCE/MXene-COOH /AuNP	156,36	+28,42	394,95	+192,48	2,39	30,56

Şekil 4.16A ve Çizelge 4.5'e göre, yalın SPCE elektrodunun $I_{pa_{ort}}$ değeri 127,94 μA 'dır. SPCE üzerine MXene-COOH ($I_{pa_{ort}}$: 131,08 μA) modifikasyonu ΔI_{pa} değerini 3,14 μA (ΔI_{pa}) arttırmıştır. SPCE/AuNP ve SPCE/MXene-COOH/AuNP elektrotları için ΔI_{pa} değerlerindeki artış sırasıyla +17,68 μA ve +28,42 μA 'dır. Bu elektrotlar arasında ΔI_{pa} 'daki en fazla artış SPCE/MXene-COOH/AuNP modifikasyonu ile hazırlanan elektrotla elde edilmiştir. CV sonuçlarına göre MXene-COOH ve AuNP'nin formülasyonda birlikte bulunması sinerjik etki oluşturmuş ve en fazla elektronik iletkenlik elde edilmiştir. Şekil 4.16B ve Çizelge 4.5'e göre DPV'lerde yalın SPCE elektrodunun $I_{pa_{ort}}$ değeri 202,47 (I_{pa}) μA 'dır. SPCE üzerine MXene-COOH (ΔI_{pa} +7,98 μA) ve SPCE/AuNP (ΔI : +129,92 μA) modifikasyonları $I_{pa_{ort}}$ değerlerini arttırmıştır. Fakat SPCE/MXene-COOH/AuNP (ΔI : +192,48 μA) modifikasyonu ile hazırlanan elektrotlarla elde edilen $I_{pa_{ort}}$ değerinde en fazla artış görülmüştür. MXene-COOH ve AuNP'ler birlikte kullanıldığında sinerjik etki göstermiştir. DPV sonuçları CV sonuçlarını desteklemektedir. Şekil 4.16C ve Çizelge 4.5'te EIS sonuçları incelendiğinde, yalın SPCE elektrodunun $R_{ct_{ort}}$ değerinin 233,30 ohm olduğu görülmektedir. SPCE üzerine MXene-COOH modifikasyonu sonrası R_{ct} değeri 200,65 ohm (ΔR_{ct}), SPCE üzerine AuNP modifikasyonu yapıldığında ise R_{ct} değeri 174,76 ohm (ΔR_{ct}) azalmıştır ($R_{ct_{ort}}$: 58,64 ohm). SPCE/MXene-COOH (R_{ct} : 2,39 ohm) elektrotları üzerine AuNP kaplandığında ise R_{ct} değerlerindeki azalma (SPCE'ye göre) 230,91 ohm (ΔR_{ct})'dur. EIS metoduna göre en iyi modifikasyon SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerle elde edilmiştir. CV, DPV ve EIS sonuçları birbiriyle uyumludur. Bütün metotlarda en iyi modifikasyon SPCE/MXene-COOH/AuNP elektrotlarıyla elde edilmiş ve optimum olarak belirlenmiştir.

4.2.1.2 SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin morfolojik ve kimyasal karakterizasyonları

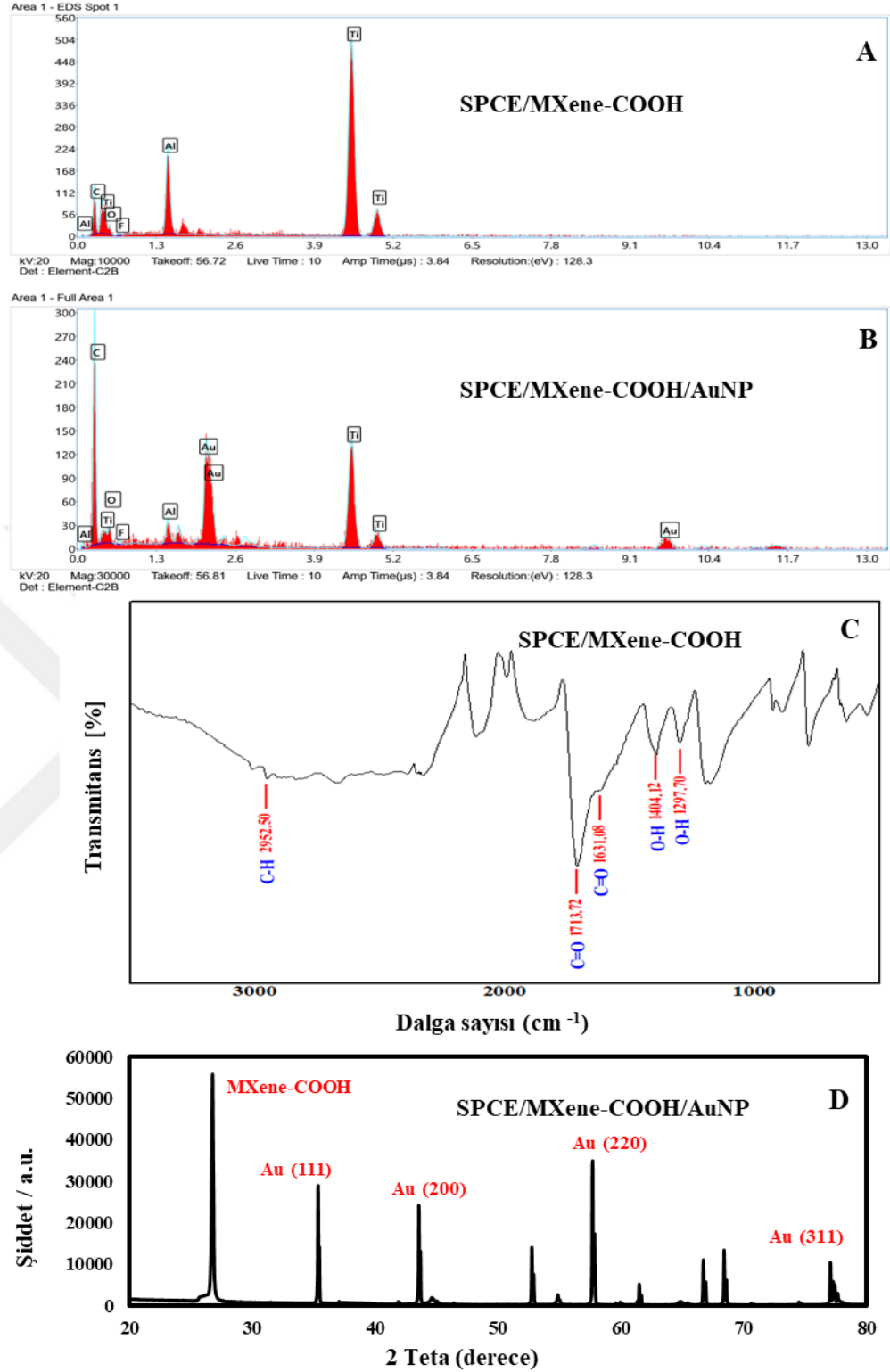
Tezin bu kısmında ilk olarak SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin morfolojik karakterizasyonuna ait bulgular sunulmuştur. Optimum şartlarda hazırlanmış elektrotların morfolojik karakterizasyonu SEM ile yapılmıştır. SPCE/MXene-COOH ve SPCE/MXene-COOH/AuNP'lere ait SEM görüntüleri Şekil 4.17A ve B'de verilmiştir.



Şekil 4. 17 SPCE/MXene-COOH (A) ve SPCE/MXene-COOH/AuNP (B)'lere ait SEM görüntüleri

Optimum şartlarda hazırlanan elektrotların Şekil 4.17A'daki SEM görüntüsünde MXene-COOH'ın çok katmanlarının varlığı, Şekil 4.17B'de ise yer yer AuNP'lerin küresel şeklindeki görüntüsü gözlenmiştir (Atıcı vd. 2023). SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin morfolojik karakterizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin morfolojik karakterizasyonu tartışıldıktan sonra, kimyasal karakterizasyonlarına ait bulgular sunulmuştur. Optimum şartlarda hazırlanmış elektrotların kimyasal karakterizasyonu EDX, FTIR ve XRD metotları ile yapılmıştır. SPCE/MXene-COOH ve SPCE/MXene-COOH/AuNP'lere ait EDX spektrumları Şekil 4.18A ve 4.18B'de, FTIR spektrumu Şekil 4.18C'de ve XRD spektrumu ise Şekil 4.18D'de verilmiştir.



Şekil 4. 18 SPCE/MXene-COOH ve SPCE/MXene-COOH/AuNP'lere ait EDX spektrumları (**A**, **B**), SPCE/MXene-COOH'lara ait FTIR spektrumu (**C**) ve SPCE/MXene-COOH/AuNP'lere ait XRD spektrumu (**D**)

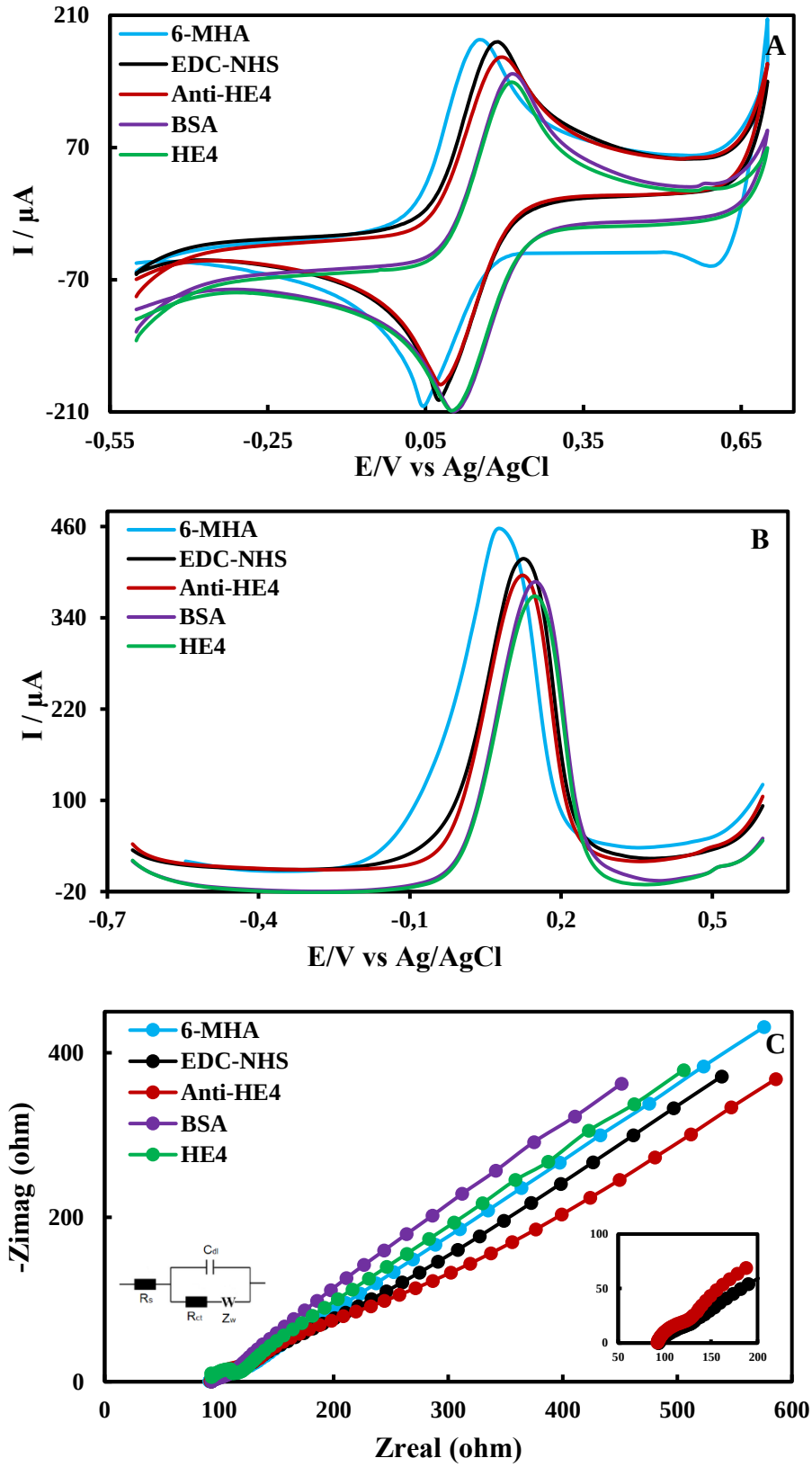
Şekil 4.18A'daki EDX spektrumunda yapıda C ve Ti (Nagarajan *et al.* 2022), Şekil 4.18B'de ise C, Ti ve Au'nın (Atıcı vd. 2023) varlığı görülmektedir. C ve Ti bulunması MXene-COOH varlığının, C, Ti ve Au bulunması ise AuNP varlığının bir kanıtıdır. Şekil 4.18C'deki FTIR spektrumuna göre 2952,50 cm^{-1} 'deki pik C-H asimetrik titreşiminden ileri gelmektedir. 1713,72 cm^{-1} , 1631,08 cm^{-1} , 1404,12 cm^{-1} ve 1279,70 cm^{-1} 'deki pikler karboksil grubunun rezonans yapısındaki C=O ve -OH gruplarındaki bağların titreşiminden ileri gelmektedir (Zhang *et al.* 2016). Şekil 4.18D'de ise SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin XRD spektrumunda MXene-COOH için 26,9°'deki karakteristik kırınım tepe konumunu (008) göstermektedir. AuNP için ise dört tane karakteristik kırınım tepe noktası konumu (111), (200), (220), (311) sırasıyla 35,0°, 43,45°, 61,62° ve 77,58°'de gözlenmiştir (Atıcı vd. 2023). SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin kimyasal karakterizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.2.2 HE4 immunosensörlerinin geliştirilmesi

Tezin bu kısmında, bir önceki bölümde detayları verilmiş olan SPCE/MXene-COOH/AuNP'ler kullanılarak HE4 immunosensörleri hazırlanmış ve elektrokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. HE4 immunosensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonları, analitik parametreleri ve gerçek numune analizlerine ait elde edilen bulgular verilmiş ve tartışılmıştır.

4.2.2.1 HE4 immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu

Optimum şartlarda hazırlanan HE4 immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonları için her bir hazırlanma basamağında 5 mM FF çözeltisinde CV, DPV ve EIS ölçümleri yapılmış ve sırasıyla Şekil 4.19A, B ve C'de verilmiştir. CV ve DPV'lerden elde edilen $I_{pa_{ort}}$ değerleri ve EIS'lerden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4. 19 SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerle hazırlanan HE4 immunosensörlerinin dönüşümlü voltamogramları (A), diferansiyel puls voltamogramları (B) ve elektrokimyasal empedans spektrumları (C)

Çizelge 4. 6 HE4 immunosensörlerinin her bir hazırlanma basamağında CV ve DPV'lerinden elde edilen $I_{pa_{ort}}$ değerleri ve EIS'lerinden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ değerleri

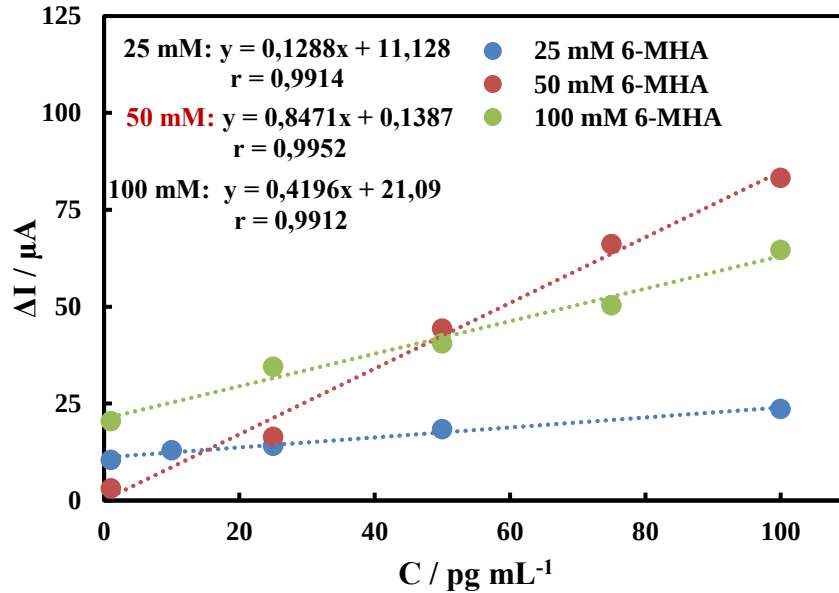
İmmunosensör formülasyonu	CV	DPV	EIS
	$I_{pa_{ort}} (\mu A)$	$I_{pa_{ort}} (\mu A)$	$R_{ct_{ort}} (ohm)$
6-MHA	173,57	432,52	91,66
EDC NHS	169,83	398,63	105,28
Anti-HE4	158,53	380,37	135,20
BSA	139,89	365,35	251,33
HE4	128,25	347,28	263,28

Şekil 4.19A'daki CV sonuçları ve Çizelge 4.6'ya göre HE4 immunosensörlerinin SAM'lerin oluşumunda kullanılan 6-MHA muamelesinden sonra Au-SH bağları ile uzun karbon zincirleri oluşturulmuştur ve $I_{pa_{ort}}$ değeri 173,57 μA olarak bulunmuştur. EDC-NHS basamağında ise 6-MHA'nın diğer ucunda bulunan -COOH grupları EDC-NHS ile aktive edilmiş, amin grupları oluşturulmuş ve $I_{pa_{ort}}$ değeri azalmıştır (169,83 μA). Anti-HE4 basamağında, Anti-HE4'ün yüzeye immobilizasyonu sonrası difüzyonun azalmasıyla birlikte pik akımında azalma gözlenmiştir (158,53 μA). BSA basamağında, BSA'nın yüzeye inkübasyonu ile elektrot yüzeyinde Anti-HE4 basamağına göre daha yalıtkan bir tabaka oluşmuştur ve difüzyonun azalması ile $I_{pa_{ort}}$ değeri de (139,89) azalmıştır. HE4 basamağında ise, HE4'ün yüzeye immobilizasyonu sonucunda oluşan yalıtkan tabaka BSA basamağına göre artmıştır. Difüzyonun azalmasının bir sonucu olarak $I_{pa_{ort}}$ değeri azalmıştır (128,25 μA) (Bilgi Kamaç vd. 2023a; Yılmaz ve Bilgi 2024). Şekil 4.19B'deki DPV sonuçları ve Çizelge 4.6'ya göre ise 6-MHA'nın $I_{pa_{ort}}$ değeri 432,52 μA 'dır. EDC-NHS basamağında ise $I_{pa_{ort}}$ değeri azalmıştır (398,63 μA). Anti-HE4'ün yüzeye immobilizasyonu sonrası yalıtkan bir tabaka oluşmuş ve $I_{pa_{ort}}$ değerinde azalma gözlenmiştir (380,37 μA). Difüzyonun azalması ile BSA (365,35 μA) ve HE4 (347,28 μA) immobilizasyonu sonrası da pik akımlarında azalmalar devam etmiştir. Şekil 4.19C'deki EIS sonuçları ve Çizelge 4.6'ya göre ise 6-MHA basamağının $R_{ct_{ort}}$ değeri 91,66 ohm'dur. EDC-NHS basamağında ise $R_{ct_{ort}}$ değeri 105,28 ohm olarak artmıştır. Anti-HE4 basamağındaki $R_{ct_{ort}}$ değeri (135,2 ohm) ise artmıştır. BSA (251,33 ohm) ve HE4 (263,28 ohm) basamaklarında da $R_{ct_{ort}}$ değerlerinde artışlar devam etmiştir. HE4 immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.2.2.2 HE4 immunosensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonu

Tezin bu kısmında, HE4 immunosensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonu için 6-MHA konsantrasyon optimizasyonu, Anti-HE4 konsantrasyon optimizasyonu, Anti-HE4 inkübasyon süre optimizasyonu ve HE4 inkübasyon süre optimizasyonuna ait bulgular verilmiş ve tartışılmıştır.

Çalışmanın bu kısmında HE4 analizleri DropStat ile 1 mM FF çözeltisinde DPV metoduyla yapılmıştır. HE4 immunosensörlerinin 6-MHA konsantrasyonunun optimizasyonu için, üç farklı 6-MHA konsantrasyonlarına sahip (25 mM, 50 mM ve 100 nM) immunosensörler hazırlanmıştır. Antijenlerin inkübasyonundan sonra, hazırlanan immunosensörler farklı konsantrasyonlardaki HE4 antijenlerinin analizinde kullanılmıştır. DropStat ekranından BSA ve HE4 adımlarındaki akımlar okunmuştur ve ΔI değerleri hesaplanmıştır. ΔI değerlerinden yararlanılarak her bir immunosensör için ΔI -C grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.20).

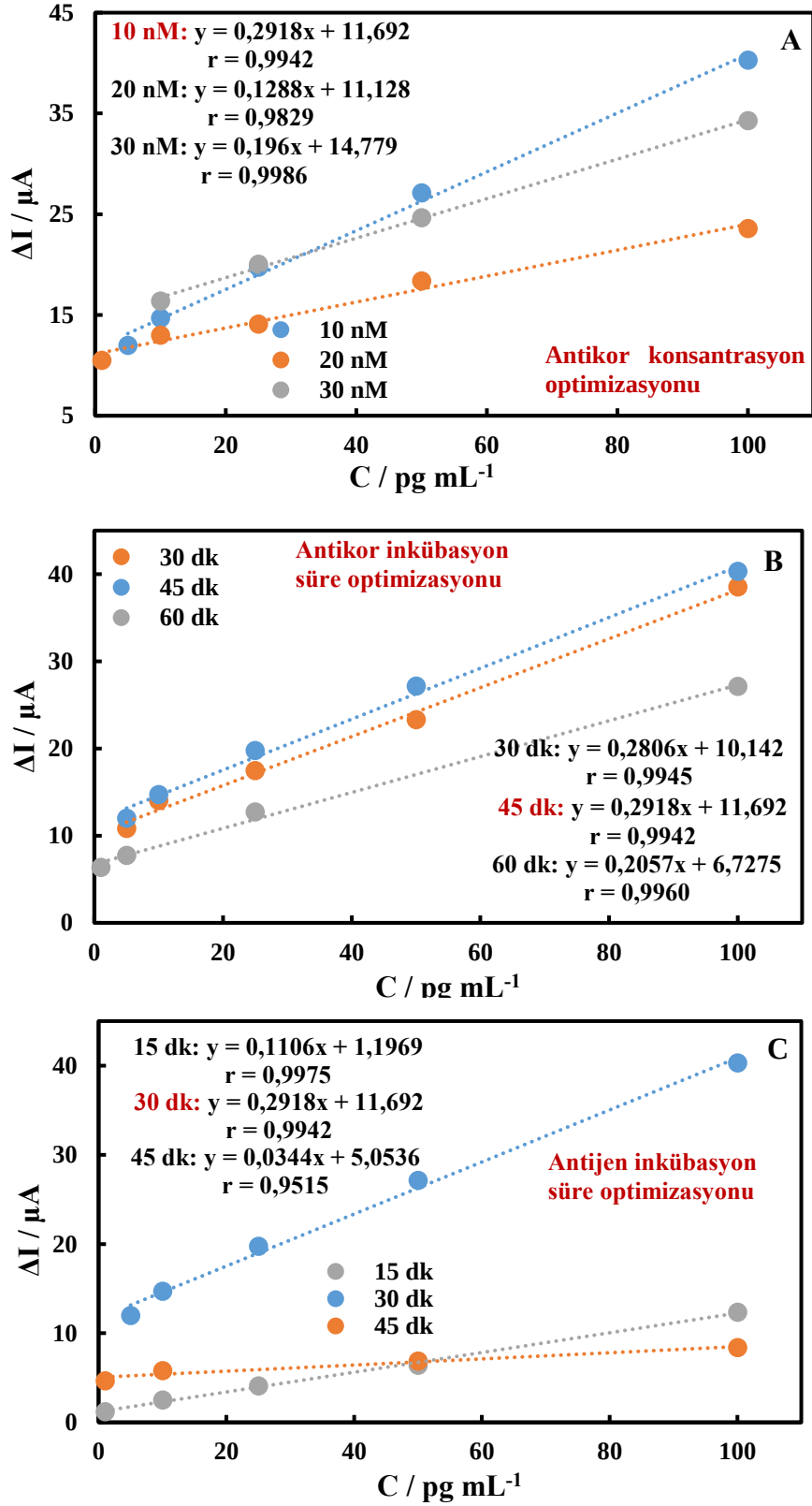


Şekil 4. 20 25 mM, 50 mM ve 100 mM 6-MHA konsantrasyonlarıyla hazırlanan HE4 immunosensörleri ile HE4 analizine ait ΔI -C grafiği

Şekil 4.20'ye göre 25 ve 100 mM 6-MHA konsantrasyonu ile hazırlanan HE4 immunosensörlerinin HE4 analizinden elde edilen ΔI -C grafiğinin r değerleri birbirine

yakın ve 50 mM ile hazırlanan immunosensörlere göre daha küçüktür (25 mM için $r:0,9914$ ve 100 mM için $r:0,9912$). 25 mM ve 100 mM 6-MHA ile hazırlanan immunosensörlerin HE4 analizinden elde edilen ΔI -C grafiğinin eğim değerleri, 50 mM 6-MHA ile hazırlanan immunosensörlere göre daha düşüktür. En yüksek eğim (0,8471) ve r değeri (0,9952) 50 mM 6-MHA ile hazırlanan immunosensörlerin analizinden elde edilmiştir. Bu sebeple optimum 6-MHA konsantrasyonu 50 mM olarak belirlenmiştir.

HE4 immunosensörlerinin antikor konsantrasyonunun optimizasyonu için, üç farklı Anti-HE4 konsantrasyonlarına sahip (10 nM, 20 nM ve 30 nM) immunosensörler hazırlanmıştır. Antijenlerin inkübasyonundan sonra hazırlanan immunosensörler, farklı konsantrasyonlardaki HE4 antijenlerinin analizinde kullanılmıştır. ΔI değerlerinden yararlanılarak her bir immunosensör için ΔI -C grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.21A).



Şekil 4. 21 HE4 konsantrasyonu- ΔI grafikleri: A) antikor konsantrasyon optimizasyonu, B) antikor inkübasyon süre optimizasyonu ve C) antijen inkübasyon süre optimizasyonu

Şekil 4.21A'ya göre en yüksek eğim değerinin (0,2918) 10 nM Anti-HE4 ile hazırlanan immunosensörlerin HE4 analizinden elde edildiği görülmektedir. 20 nM ve 30 nM Anti-HE4 ile hazırlanan immünsensörlerin HE4 analizinden elde edilen eğim değerleri sırasıyla 0,1288 ve 0,1960 olup birbirine yakın bulunmuştur. 20 nM Anti-HE4 ile hazırlanan immunosensörlerin HE4 analizinden elde edilen $\Delta I-C$ grafiğinin r değeri ise en düşüktür. 10 nM (0,9942) ve 30 nM (0,9986) Anti-HE4 ile hazırlanan immunosensörlerin HE4 analizinden elde edilen $\Delta I-C$ grafiğinin r değerleri birbirine yakındır. Bu sonuçlara göre optimum antikor konsantrasyonu 10 nM olarak seçilmiştir.

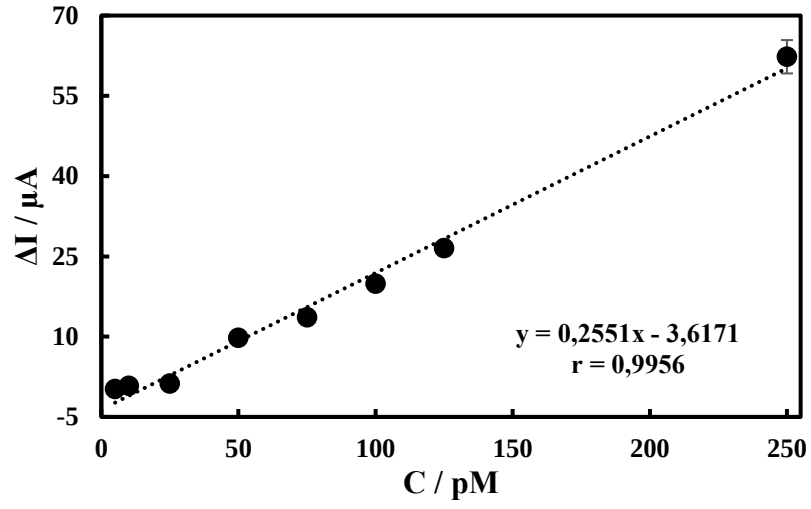
Bir sonraki adımda Anti-HE4 inkübasyon süre optimizasyonuna geçilmiştir. HE4 immunosensörlerinin hazırlanmasında antikorların inkübasyon sürelerinin optimizasyonu için, farklı sürelerde (30 dk, 45 dk ve 60 dk) (Bilgi Kamaç vd. 2023a; Bilgi Kamaç vd. 2023b; Yılmaz ve Bilgi 2024) antikorlar (optimum antikor konsantrasyonunda: 10 nM) inkübe edilerek HE4 immunosensörleri hazırlanmıştır. Farklı antikor inkübasyon süreleriyle hazırlanan immunosensörler, farklı konsantrasyonlardaki HE4 antijenlerinin analizinde kullanılmıştır. ΔI değerlerinden yararlanılarak her bir immunosensör için $\Delta I-C$ grafikleri çizilmiş ve Şekil 4.21B' de verilmiştir. Şekil 4.21B'de Anti-HE4'ün 60 dakika inkübasyon süresi ile hazırlanan HE4 immunosensörlerinin HE4 analizinden elde edilen $\Delta I-C$ grafiğinin eğim değeri (60 dk: 0,2057), 30 ve 45 dakika inkübe edilmesiyle hazırlanan immunosensörlere göre daha düşüktür. Anti-HE4'ün 30 ve 45 dakika inkübe edilmesiyle hazırlanan immunosensörlerin HE4 analizinden elde edilen $\Delta I-C$ grafiğinin eğim değerleri 0,2806 ve 0,2918 olup birbirine oldukça yakındır. r değerlerine bakıldığında ise en yüksek r değeri, Anti-HE4'ün 60 dakika inkübe edilmesiyle hazırlanan immunosensörlerin HE4 analizinden elde edilmiş olsa da 30 ve 45 dakika inkübasyonlarıyla hazırlanan immunosensörlerin HE4 analizinden elde edilen r değerlerine oldukça yakındır. Eğim ve r değerleri birlikte değerlendirildiğinde optimum Anti-HE4 inkübasyon süresin 45 dakika olarak belirlenmiştir.

Son olarak, HE4 immunosensörleri HE4 analizlerinde kullanılmadan önce antijenlerin inkübasyon süreleri de optimize edilmiştir. Bu amaçla, optimum şartlarda (optimum antikor konsantrasyonu ve optimum antikor inkübasyon süresi) hazırlanmış immunosensörler farklı sürelerde (15 dk, 30 dk ve 45 dk) (Bilgi Kamaç vd. 2023a; Bilgi

Kamaç vd. 2023b; Yılmaz ve Bilgi 2024) antijenler ile inkübe edilmiştir. Farklı antijen inkübasyon süreleriyle hazırlanan immunosensörler, farklı konsantrasyonlardaki HE4 antijenlerinin analizinde kullanılmıştır. ΔI değerlerinden yararlanılarak her bir immunosensör için ΔI -C grafikleri çizilmiş ve Şekil 4.21C’de verilmiştir. Şekil 4.21C’de 45 dakika antijen inkübasyonu ile hazırlanan immunosensörlerin HE4 analizinden elde edilen ΔI -C grafiğinin eğim değeri oldukça düşüktür (0,0344). 15 dakika inkübasyon süresinin de antikör-antijen etkileşimi için az bir süre olduğu eğim değerinden görülmektedir (0,1106). 15 dakika inkübasyon süresinde hazırlanan immunosensörlerin HE4 analizinden elde edilen ΔI -C grafiğinin r değeri artmasına rağmen düşük sinyaller kaydedilmiştir. 30 dakika inkübasyon süresinde hazırlanan immunosensörlerin HE4 analizinden elde edilen eğim değerinde oldukça yüksek sonuç alınmış (0,2918) ve r değeri (0,9942) artmıştır. Optimum HE4 inkübasyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir.

4.2.2.3 HE4 immunosensörlerinin analitik performansı

Tezin bu bölümünde, HE4 immunosensörlerinin analitik parametreleri olan doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, uygulama kararlılığı, depolama kararlılığı, rejenerasyonu sunulmuş ve tartışılmıştır. Bu amaçla ilk olarak doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi için, optimum çalışma parametrelerinde hazırlanan HE4 immunosensörleri kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki (5-250 pM aralığında) HE4 antijenlerinin analizi gerçekleştirilmiştir. ΔI değerleri hesaplanmış ve ΔI değerlerinden yararlanılarak ΔI -C grafiği çizilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4. 22 HE4 immunosensörleri için 5 ile 250 pM aralığında artan HE4 konsantrasyonuna karşı ΔI grafiği

Şekil 4.22'deki grafikten faydalanarak tespit limitleri ve tayin aralıkları da belirlenmiştir. Şekil 4.22'deki grafikte HE4 konsantrasyonu arttıkça ΔI değerleri de doğrusal olarak artmaktadır ve r değeri 0,9956'dır. Geliştirilen immunosensörlerin doğrusal aralığı 5-250 pM, duyarlılığı ve LOD değeri ise sırasıyla $0,2551 \mu A pM^{-1}$ ve $0,34 pM$ 'dir.

Literatürde yer alan etiketli ve etiketsiz HE4 immunosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen etiketsiz HE4 immunosensörünün performans karşılaştırması Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4. 7 Literatürde yer alan etiketli ve etiketsiz HE4 immunosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen etiketsiz HE4 immunosensörünün performans karşılaştırması

Formülasyon	Tespit aralığı	Doğrusal aralık	Metot	Referans
Etiketli HE4 immunosensörleri				
SPCE/ /AntiHE4 IgG/HE4/AntiHE4 ^{CdSe-ZnSQDs}	2,94 pM	2-40 nM	SWASV	Cadkova <i>et al.</i> 2018
MGCE/MCPs-AntiHE4/HE4/AgPtCoND-AntiHE4	0,487 pg mL ⁻¹	0,001-50 ng mL ⁻¹	DPV	Fan <i>et al.</i> 2019
GCE/GS-NH ₂ @AuNR-AntiHE4/Au@PdUSs-HE4	0,33 pM	1 pM - 50 nM	CA	Yan <i>et al.</i> 2019
ITO/MWCNT/PDA/AuNP-Nb2-BSA-HE4-Nb3@nPCN-224	0,56 pg mL ⁻¹	1,0 pg mL ⁻¹ -10,0 ng mL ⁻¹	PEC	Chen <i>et al.</i> 2020
CD-AntiHE4/HE4/AgNPs-AntiHE4	2,3 pM	0,01-200 nM	FS	Han <i>et al.</i> 2021
Etiketsiz HE4 immunosensörleri				
GCE/TiO ₂ -NGO/Au@Pd HS/Anti-HE4/ BSA/HE4 Ag	13,33 fM	10 fM-60 nM	CA	Yan <i>et al.</i> 2019
GCE/TOAB-GE/C ₆₀ /Anti-HE4/BSA/HE4	0,2 ng mL ⁻¹	1-100 ng mL ⁻¹	DPV	Qiao <i>et al.</i> 2019
Altın çip/sisteamin/EDC-NHS/Anti-HE4/BSA/HE4	2 pM	2-120 pM	SPR	Szymanska <i>et al.</i> 2021
GCE/PtNi NCAs/ Anti-HE4/BSA/HE4	0,11 pg mL ⁻¹	0,01-100 ng mL ⁻¹	DPV	Chen <i>et al.</i> 2022
FTO/CdS NS/AuNP/Anti-HE4/BSA/HE4	1,188 pg mL ⁻¹	0,01-200 ng mL ⁻¹	EC, PEC	Wei <i>et al.</i> 2022
SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE4/BSA/HE4	2,0 pg mL ⁻¹ 0,14 ng mL ⁻¹ 1,17 ng mL ⁻¹ 8,33 ng mL ⁻¹ 1,0 pg mL ⁻¹ 0,058 ng mL ⁻¹ 1,32 ng mL ⁻¹ 11,34 ng mL ⁻¹ 2,0 pg mL ⁻¹ 0,164 ng mL ⁻¹ 2,22 ng mL ⁻¹ 9,87 ng mL ⁻¹	1-100 pg mL ⁻¹ 0,01-10 ng mL ⁻¹ 10-50 ng mL ⁻¹ 50-500 ng mL ⁻¹ 1-100 pg mL ⁻¹ 0,05-2,5 ng mL ⁻¹ 10-50 ng mL ⁻¹ 50-500 ng mL ⁻¹ 1-100 pg mL ⁻¹ 0,1-10 ng mL ⁻¹ 10-50 ng mL ⁻¹ 50-500 ng mL ⁻¹	EIS DPV SWV	Bilgi Kamaç vd. 2023a

SPCE/RGO/PTH/AuNP/Anti-HE4/BSA/HE4	0,058 pg mL ⁻¹ 1,32 ng mL ⁻¹ 0,164 pg mL ⁻¹ 2,22 ng mL ⁻¹	1–100 pg mL ⁻¹ 1–50 ng mL ⁻¹ 1–100 pg mL ⁻¹ 1–50 ng mL ⁻¹		Bilgi Kamaç vd. 2023b
ITO-OH/3-APTES/GA/Anti-HE4/BSA/HE4	0,094 pg mL ⁻¹	1-3000 pg mL ⁻¹	CV,EIS	Vural vd. 2024
SPCE/MXene-COOH/AuNP/Anti-HE4/BSA/HE4	0,34 pM	5-250 pM	DPV (DropStat)	Bu çalışma

3-APTES: 3-aminopropiltrietoksilan
AgPtCo ND: Gümüş platin kobalt nanodentrit
Au@Pd USs: Çekirdek-kabuk Au@Pd deniz kestanesi şeklindeki nanoyapılar
AuNP: Altın nanoparçacıklar
BSA: Bovin serum albumin
C₆₀: Fulleren 60
CA: Kronoamperometri
CD-Ab: Karbon dot-Antikor
CdS NS: Kadmiyum kükürt nanotabaka

CdSe/ZnS QDs: Kadmiyum selenyum/çinko kükürt kuantum dotlar
DPV: Diferansiyel puls voltametri
ECL: Elektrokemilüminesans
EDC-NHS: N-etil-N'(3-dimetilaminopropil) karbonilimid-N-hidroksisüksinimit
FTO: Flor katkılı kalay oksit
GA: Glutaraldehit
GCE: Camı karbon elektrot
GS-NH₂@AuNR: Amin modifiye edilmiş grafen destekli altın nanorodlar

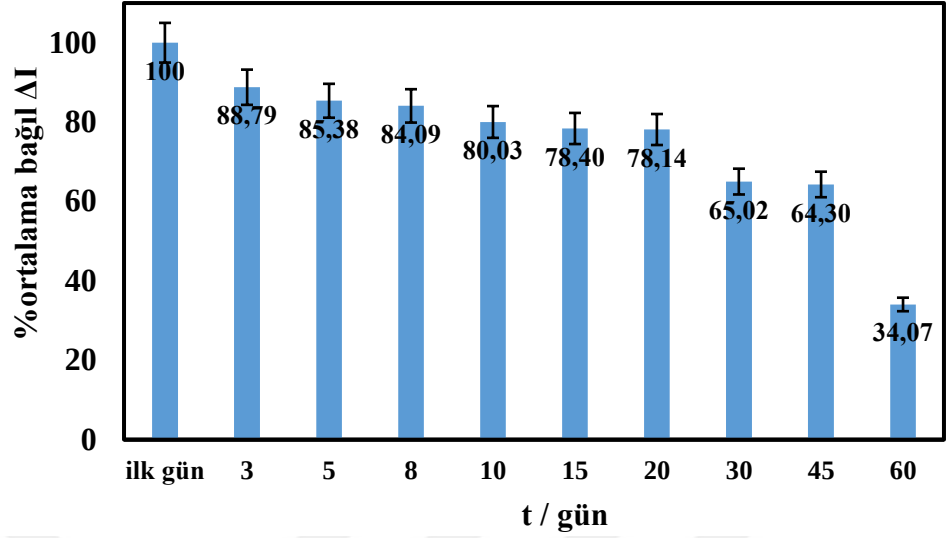
ITO: İndiyum kalay oksit
MGCE: Manyetik camı karbon elektrot
MWCNT: Çok duvarlı karbon nanotüp
MXene-COOH: Karboksil fonksiyonlu Ti₃C₂
PDA: Polidopamin
PEC: Fotoelektrokimyasal
PTH: Politiyonin
PtNi NCAs: Platin nikel nanoküpler
QDs: Kuantum dotlar
RGO: İndirgenmiş grafen oksit
SPCE: Yüzy baskılı karbon elektrot

SPR: Yüzey plazman rezonans
SWASV: Kare dalga anodik sıyırma voltametrisi
SWV: Kare dalga voltametri
TiO₂-NGO: Azot katkılı indirgenmiş grafen oksitle işlevlendirilmiş titanyum oksit
TOAB-GE: Tetraoktilamonyum bromid-grafen

Çizelge 4.7’de yer alan etiketli elektrokimyasal HE4 immunosensörlerinin zaman alıcı ve ikinci bir antikor kullanılması sebebi ile maliyetli olduğu yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır. Yapılan etiketsiz elektrokimyasal HE4 immunosensörleri karşılaştırıldığında ise hiçbirinde doğrudan HE4 seviyelerini pM cinsinden ölçebilen bir metot bulunmamaktadır. Bu çalışmada geliştirilen HE4 immunosensörlerinin hasta başı testlerine uygun, düşük maliyetli, pratik ve HE4 seviyelerinin uzman gerektirmeden ölçülmesine olanak sağlamaktadır. Tez kapsamında geliştirilen HE4 immunosensörleri yumurtalık kanserinin erken teşhisi için umut vaad ettiği düşünülmektedir. Çalışmanın bundan sonraki kısmında HE4 immunosensörlerinin analitik performansı olan tekrarlanabilirlik, uygulama kararlılığı, depolama kararlılığı, rejenerasyon parametreleri incelenmiştir.

İmmünosensörlerin tekrarlanabilirliklerinin belirlenmesi için tayin aralıklarında seçilen antijen konsantrasyonunda (50 pM), optimum çalışma parametrelerinde hazırlanan immunosensörlerle DPV ölçümleri yapılmıştır. İmmünosensörlerin tekrarlanabilirlikleri için RSD değeri %3,38 (n=7) olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular, geliştirilen immunosensörlerin tek kullanımlık olmasına rağmen HE4’ü yedi tekrara kadar analiz edebildiğini göstermektedir.

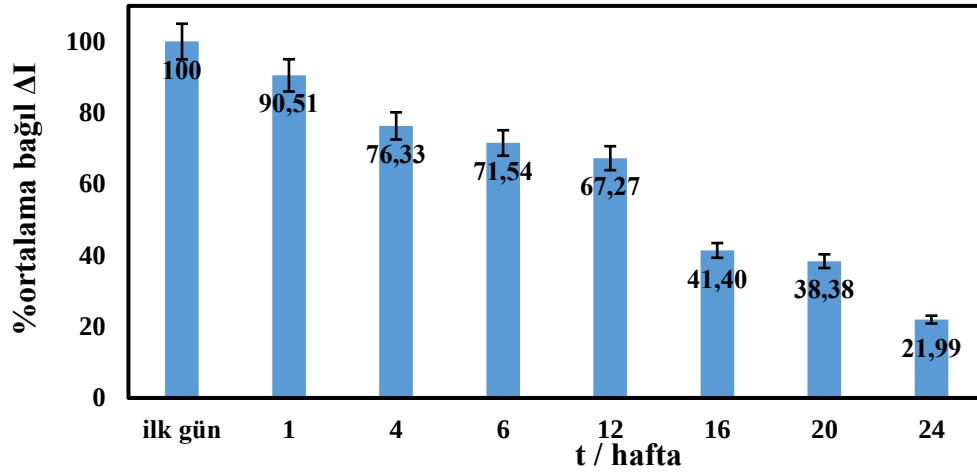
Optimum çalışma parametrelerinde hazırlanan HE4 immunosensörlerinin uygulama kararlılığı, 50 pM konsantrasyonundaki HE4 antijeninin 60 gün boyunca belirli zaman aralıklarında ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. HE4’ün analizi için geliştirilen HE4 immunosensörleri, iki paralelli ve üç tekrarlı olarak ölçülmüştür. ΔI değerlerinden yararlanılarak, %ortalama bağıl ΔI -gün grafiği çizilmiş ve Şekil 4.23’te verilmiştir.



Şekil 4. 23 HE4 immunosensörlerinin uygulama kararlılığı: %ortalama bağıl ΔI-gün grafiği

Şekil 4.23'teki grafikte ilk güne göre HE4 immunosensörünün yanıtı 3. günde %11,21 azalmıştır. Daha sonra ise 5. günde %14,62, 8. günde %15,91, 10. günde %19,97, 15. günde %21,60, 20. günde %21,86, 30. günde %34,98 ve 60. günde %65,93 oranında düşüş göstermiştir. HE4 immunosensörünün uygulama kararlılığı 60. günün sonunda %65,93 azalmış olsa da HE4 antijenine karşı yanıt vermeye devam etmiştir.

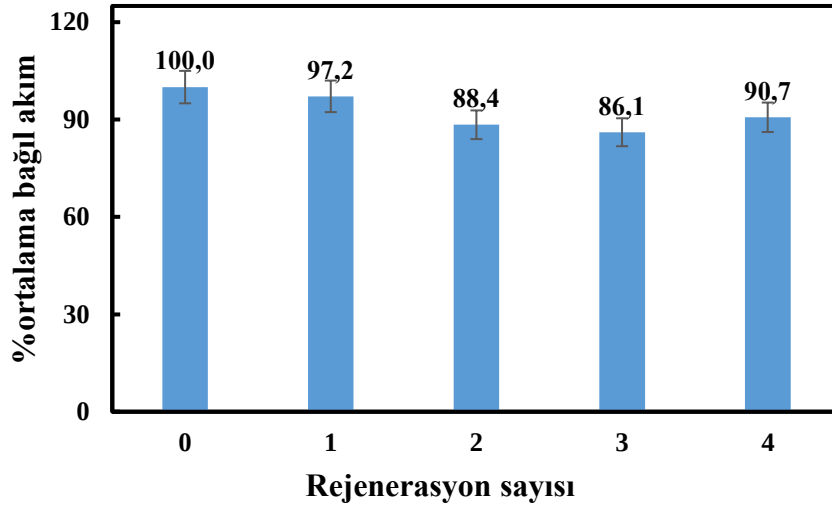
HE4 immunosensörlerinin depolama kararlılığını incelemek için ise 10 ayrı immunosensör hazırlanmıştır. +4°C'de depolanan HE4 immunosensörleri ile 1., 2., 4., 6., 8., 12., 16., 20. ve 24. haftalarda HE4 antijenlerinin (50 pM) analizi DPV ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. ΔI değerlerinden yararlanılarak %ortalama bağıl ΔI-hafta grafiği çizilmiş ve Şekil 4.24'te verilmiştir.



Şekil 4. 24 HE4 immunosensörlerinin depolama kararlılığı: %ortalama bağl ΔI -hafta grafiği

Şekil 4.24'teki grafiğe göre 1. haftada %9,49'luk, 4. haftada %23,67, 6. haftada %28,46'luk, 16. haftada %58,6'luk, 20.haftada 61,62'lik bir azalma gözlenmiştir. 24. haftada %.78,01'lik azalış gözlemlendiği için 32. haftanın deneyi yapılmamıştır. HE4 immunosensörlerinin uygulama kararlılığı 24 hafta olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen HE4 immunosensörleri her ne kadar tek kullanımlık olsa da onların rejenerasyon ile tekrar kullanılabilme potansiyelleri de değerlendirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, geliştirilen HE4 immunosensörlerinin rejenerasyonunu incelemek için, HE4 immunosensörleri hazırlandıktan sonra 10 mM HCl çözeltisiyle muamele edilmiştir. 2 dakika sonra, tekrar HE4 (50 pM) ile inkübe edilmiş ve ardından HE4 analizi yapılmıştır. HE4 immunosensörlerinin HE4 antijenine olan cevabı için %ortalama bağl ΔI - rejenerasyon sayısı grafiği çizilmiş ve Şekil 4.25'te verilmiştir.

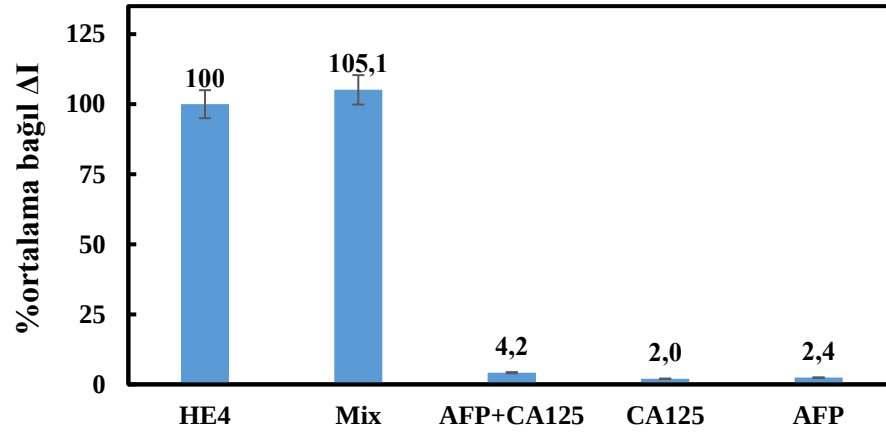


Şekil 4. 25 HE4 immunosensörlerinin rejenerasyon çalışması: %ortalama bağıl ΔI -rejenerasyon sayısı grafiği

Şekil 4.25'e göre HE4 imünosensörlerinin 1. rejenerasyondan sonra %2,8'lik, 2. rejenerasyondan sonra %11,6'lık ve 3. rejenerasyondan sonra ise %13,9'luk bir sinyal azalışı elde edilmiştir. 4. rejenerasyonda ise immunosensörün %90,7'lik bir artış gözlenmiş ve rejenerasyon çalışmasına 4. rejenerasyondan sonra devam edilmemiştir. HE4 immunosensörleri 3 kez rejenerere edilebilmiştir.

4.2.2.4 HE4 immunosensörlerinin seçiciliği

HE4 immunosensörünün seçiciliği, diğer yumurtalık kanseri biyobelirteçleri, CA125 ve AFP varlığında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ayrı ayrı CA125, HE4, AFP çözeltileri (her biri 50 pM), HE4-AFP (her biri 50 pM) içeren bir çözelti ve CA125-HE4-AFP (her biri 50 pM) içeren bir çözelti hazırlanmış ve hazırlanan immunosensörler bu antijen çözeltileriyle inkübe edilmiş ve DPV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Böylece bu antijenlerin girişim yapıp yapmadığı test edilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4. 26 HE4 immunosensörlerinin seçicilik testi: %ortalama bağıl ΔI-antijen grafiği

Şekil 4.26'ya göre HE4 immunosensörlerinin CA125, AFP ve CA125-AFP antijenlerine karşı cevabı düşüktür (%5'nin altında). CA125, HE4 ve AFP (karışım) ile inkübe edildiğinde ise girişim %5,1 olarak hesaplanmıştır. Antijen karışımına HE4 immunosensörlerinin yanıtının %5,1'in altında olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre, HE4 immunosensörlerinin diğer yumurtalık kanser biyobelirteçleri varlığında HE4'e karşı iyi bir seçicilik gösterdiği anlamına gelmektedir. Bilgi Kamaç ve arkadaşları da HE4 immunosensörlerinin seçiciliği için dokuz farklı antijen varlığında HE4 antijeninin seçicilik çalışmasını yapmış %5'in altında girişim yaptığını rapor etmişlerdir (Bilgi Kamaç vd. 2023a). Çalışmamız literatür ile uyumludur.

4.2.2.5 HE4 immunosensörleri ile gerçek numune analizi

HE4 seviyelerinin DropStat ile belirlenmesi için proje kapsamında gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen kalibrasyon grafikleri Metrohm Dropsens firmasına iletilmiştir. Firma tarafından gerçek numune analizlerinde kullanılmak üzere kalibrasyon için usb kartları hazırlanmış, yazılım yüklenmiş ve tarafımıza gönderilmiştir. DPV metodu ile pM cinsinden HE4 konsantrasyonları doğrudan ekrandan okunmuştur (Şekil 4.27).

Gerçek numune analizi uygulaması için HE4 immunosensörleri hazırlanmış ve satın alınan insan kan serumunda HE4'ü tespit etmek için kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak serum örneği 1:100 oranında pH 7,4 fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Serum örneklerine 50,0 pM konsantrasyonda HE4 antijeni eklenmiştir. HE4 immunosensörleri HE4 antijeni içeren serum örnekleri ile inkübe edilmiş ve HE4 analizleri DPV ölçümleri ile gerçekleştirilmiş ve %geri kazanım ve %hata değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4. 27 DropStat ile HE4 analizi (pM)

HE4 antijenlerinin %geri kazanım ve %hata değerleri hesaplanmıştır ve sırasıyla %100,71 ve %0,71 olarak belirlenmiştir. HE4 konsantrasyonu için gerçek numune analizindeki hatanın %1'in altında olduğu görülmektedir. Kan serumundaki HE4 seviyeleri başarılı bir şekilde tespit edilmiştir. Kan serumu numunelerinde HE4 antijeninin tespiti; gelecekte hedeflenen başka kanser biyobelirteçlerinin tespitinde daha hassas ve daha seçici biyosensörlerin geliştirilebileceğine işaret etmektedir. Proje ve tez kapsamında yumurtalık kanserinin erken teşhisi için geliştirilen HE4 immunosensörleri DropStat ile doğrudan pM seviyelerinde kolaylıkla tayin edilebilmektedir. Bu çalışmada geliştirilen HE4 immunosensörleri POCT olarak kullanılmaya adaydır. HE4 immunosensörleri ile yapılan bu çalışmalar, TÜBİTAK 1002-A 222Z121 numaralı proje ile (60.000 TL bütçe) desteklenmiştir.

4.3 AFP İmmunosensörleri

Tezin bu kısmında ilk olarak AFP immunosensörlerinin hazırlanmasında kullanılan elektrotların modifikasyonu, modifikasyonların optimizasyonu, elektrokimyasal, kimyasal ve morfolojik karakterizasyonları tartışılmıştır. İkinci kısımda, modifiyeli elektrotlar kullanılarak hazırlanan AFP immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonları, immunosensörlerin optimum çalışma parametreleri, analitik parametreleri ve gerçek numune analizleri tartışılmıştır.

4.3.1 MWCNT-COOH, PAA_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların karakterizasyonları

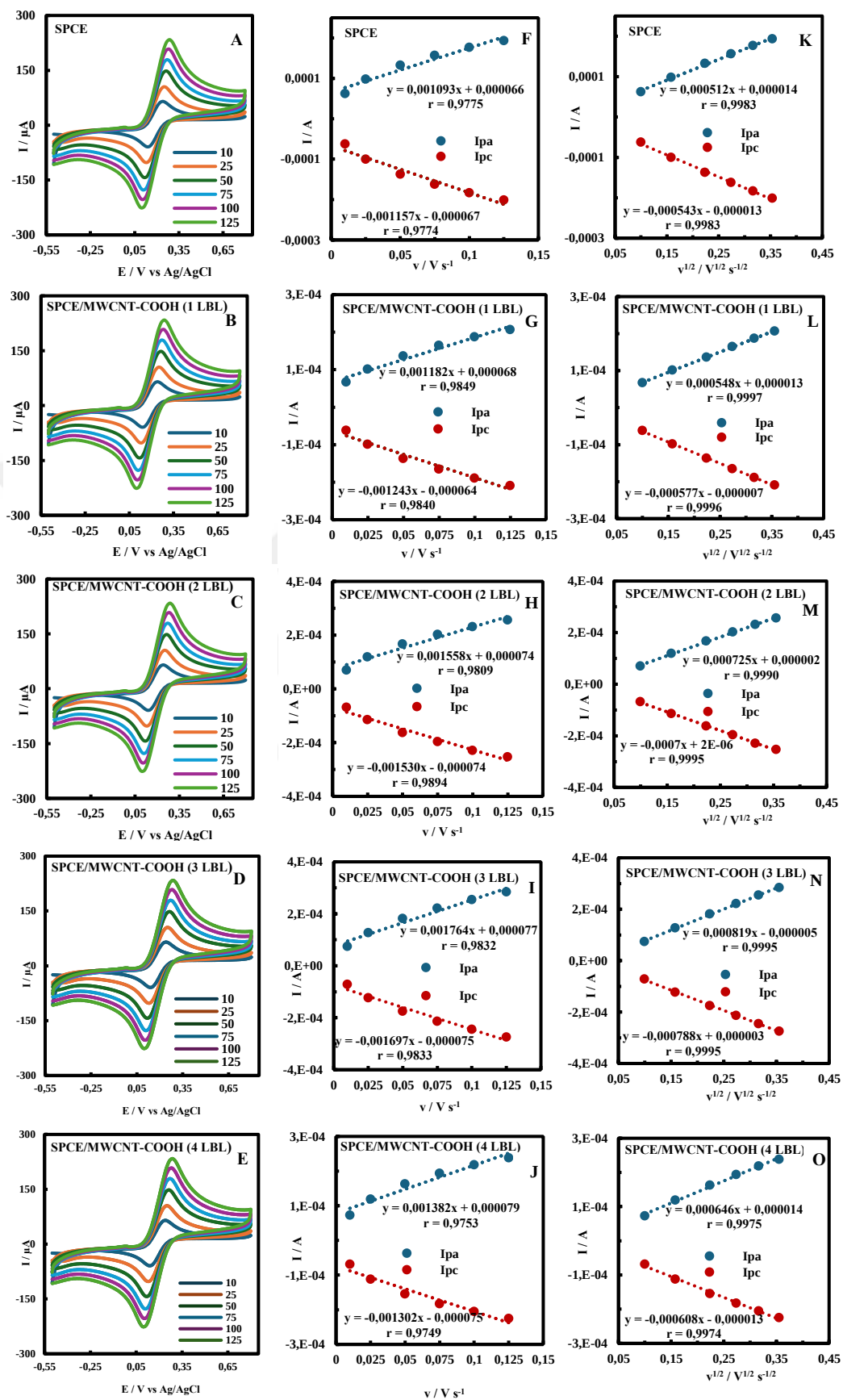
AFP immunosensörlerinin hazırlanmasında kullanılan MWCNT-COOH, PAA_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların karakterizasyonları, elektrokimyasal ile morfolojik ve kimyasal olmak üzere iki başlık altında sunulmuştur. MWCNT-COOH, PAA_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonlarında, MWCNT-COOH'ın miktar optimizasyonu, AA'nın elektropolimerizasyonun karakterizasyonu, polimerleşme mekanizması, elektropolimerizasyonun optimum çalışma parametrelerinin (döngü sayısı) incelenmesine ait bulgular sunulmuş ve tartışılmıştır. MWCNT-COOH, PAA_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların morfolojik karakterizasyonlarında SEM, kimyasal karakterizasyonlarında ise EDX, FTIR ve XRD analizlerine ait bulgular verilmiş ve tartışılmıştır.

4.3.1.1 MWCNT-COOH, PAA_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonları

Tezin bu kısmında ilk olarak SPCE'ler üzerinde MWCNT-COOH'ın miktar optimizasyona ait bulgular sunulmuştur. Bu amaçla SPCE, SPCE/MWCNT-COOH (1 LBL), SPCE/MWCNT-COOH (2 LBL), SPCE/ MWCNT-COOH (3 LBL) ve MWCNT-COOH (4 LBL) modifiye elektrotların 5 mM FF çözeltisinde farklı tarama hızında (10-125 mV s⁻¹) CV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Voltamogramlardan elde edilen pik akımı-

tarama hızı grafikleri sırasıyla Şekil 4.28A, B, C, D ve E’de, pik akımı-tarama hızı grafikleri Şekil 4.28F, G, H, I ve J’de ve pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri ise Şekil 4.28K, L, M, N ve O’da verilmiştir.





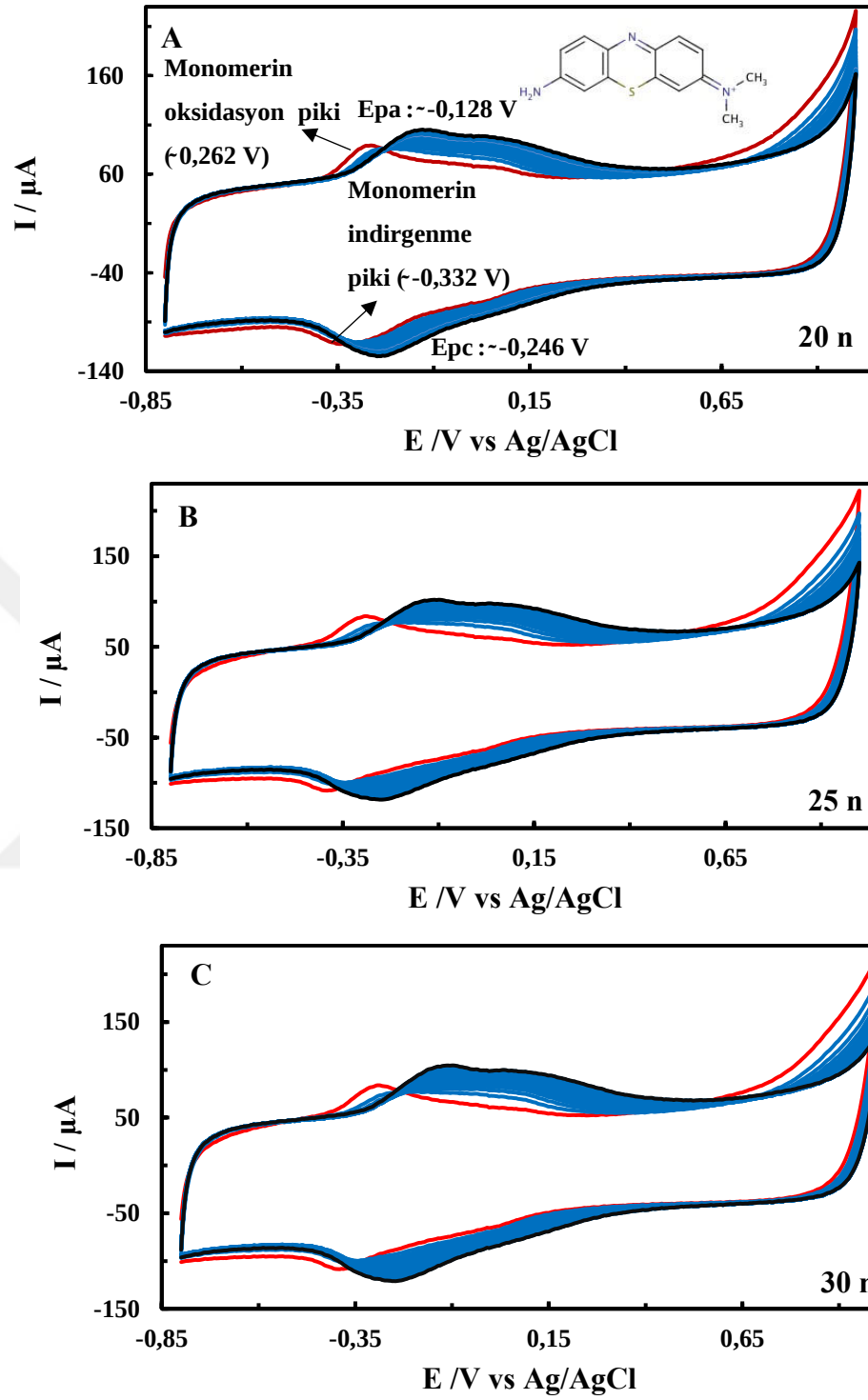
Şekil 4. 28 SPCE, MWCNT-COOH 1 LBL, 2 LBL, 3 LBL ve 4 LBL elektrotlarının dönüşümlü voltamogramlarından (tarama hızı: $10\text{-}125\text{ mV s}^{-1}$) (A, B, C, D ve E) elde edilen pik akımı-tarama hızı (F, G, H, I ve J) ve pik akımı-tarama hızının karekökü (K, L, M, N ve O) grafikleri

Anodik ve katodik pik akımlarına karşı tarama hızı (Şekil 4.28F, G, H, I ve J') ve tarama hızının karekökü (4.28K, L, M, N ve O) grafiklerine bakıldığında pik akımlarına karşı tarama hızının karekökü grafiklerinin korelasyon katsayılarının daha doğrusal olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar ise SPCE/MWCNT-COOH'lar üzerinde FF'in elektroyükseltgenme ve indirgenmesinin difüzyon kontrollü bir proseste gerçekleştiğini göstermektedir. Randles-Sevcik eşitliğinden faydalanılarak hesaplanan Aea'lar sırasıyla SPCE için $0,1252\text{ cm}^2$, SPCE/MWCNT-COOH (1 LBL) için $0,1342\text{ cm}^2$, SPCE/MWCNT-COOH (2 LBL) için $0,1775\text{ cm}^2$, SPCE/MWCNT-COOH (3 LBL) için $0,2005\text{ cm}^2$ ve SPCE/MWCNT-COOH (4 LBL) için $0,1581\text{ cm}^2$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre 3 LBL MWCNT-COOH modifikasyonu elektrodu en yüksek elektroaktif yüzey alanına sahiptir. 4 LBL MWCNT-COOH modifikasyonu sonrası Aea değerleri azalmıştır. MWCNT-COOH miktarının fazla gelmesi ve kalın bir tabaka oluşturarak elektroaktif türlerin elektrot yüzeyinden çözeltiye geçişini engellediği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, optimum MWCNT-COOH miktarının 3 LBL MWCNT-COOH ile modifiye edilen elektrotlarla elde edildiği sonucuna varılmıştır.

Tezin bundan sonraki kısmında ilk olarak SPCE/MWCNT-COOH'lar üzerinde AA'nın elektropolimerizasyonuna ait bulgular sunulmuştur. Şekil 4.29A'da SPCE/MWCNT-COOH'lar üzerinde AA'nın elektropolimerizasyonu ($-0,8\text{ V}$ ile $+1,0\text{ V}$, 100 mV s^{-1} , 20 döngü) sırasında elde edilen CV'ler verilmiştir. Voltamogramlarda ilk döngüde monomerin oksidasyon piki $-0,262\text{ V}$ civarında, indirgenme piki ise $-0,332\text{ V}$ civarında gözlenmektedir. Pik potansiyeli $+0,9\text{ V}$ 'a çıktığında monomerin katyonik radikalleri oluşmakta ve AA monomerleri ile reaksiyona girerek polimerizasyonu başlatmaktadır (Chakkarapani ve Brandl 2021). PAA_{DES}'in oksidasyon piki 2. döngüden itibaren yaklaşık $-0,128\text{ V}$ (Epa)'ta ve indirgenme piki yaklaşık $-0,246\text{ V}$ (Epc)'ta görülmektedir ve döngü sayısı arttıkça artmaktadır. AA'nın polimerizasyonunda, SPCE/MWCNT-COOH'lar üzerinde H^+ üretmesiyle elektrot yüzeyinde pH değişikliği meydana gelmekte ve elektropolimerizasyon pozitif potansiyele kaymaktadır (Şahin ve Ayrancı 2015).

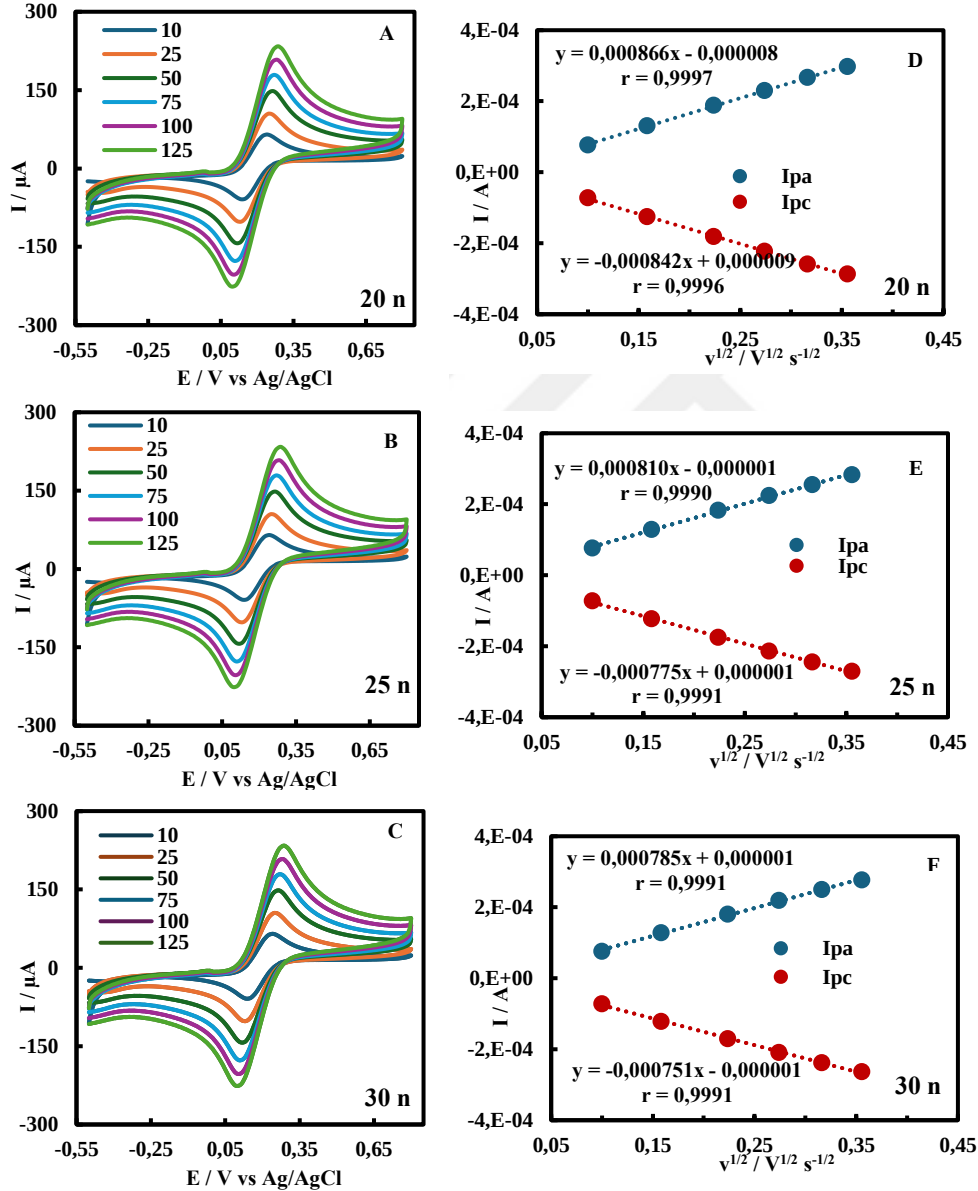
PAA_{DES}'in polimerleşme mekanizması PTB_{DES} ile benzer şekilde ilerlemektedir. Monomerin katyonik radikallerin oluşması ve diper AA monomerlerine saldırarak polimerleşmeyi başlatmasıyla oluşmaktadır. Daha sonra katyonik radikal, monomerin orto pozisyonundaki karbon atomu ile, AA'nın diğer bir aromatik halkasına amino grupları aracılığıyla kovalent olarak bağlanmaktadır. Böylece azot köprüleri ile AA'nın elektrokimyasal polimerizasyonu ilerlemektedir (Chakkarapani *et al.* 2021, Esokkiya *et al.* 2021).

AA'nın elektropolimerizasyonu ve polimerleşme mekanizması tartışıldıktan sonra, elektropolimerizasyonun optimum çalışma parametrelerinin incelenmesine ait bulgular sunulmuştur. İlk olarak SPCE/MWCNT-COOH üzerinde elektropolimerizasyon ile PAA_{DES}'in modifikasyonunda döngü sayısı optimizasyonu çalışması yapılmıştır. Bu amaçla 20, 25 ve 30 döngü CV uygulanarak SPCE MWCNT-COOH'lar üzerinde PAA_{DES} ile modifiye edilmiştir. 20, 25 ve 30 döngü CV uygulanarak hazırlanan SPCEMWCNT-COOH/PAA_{DES}'lerin elektropolimerizasyonları sırasında elde edilen voltamogramları sırasıyla Şekil 4.29A, 4.29B ve 4.29C'de verilmiştir.



Şekil 4. 29 SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES20n} (A), SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES25n} (B) ve SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES30n} (C)'lerin dönüşümlü voltamogramları

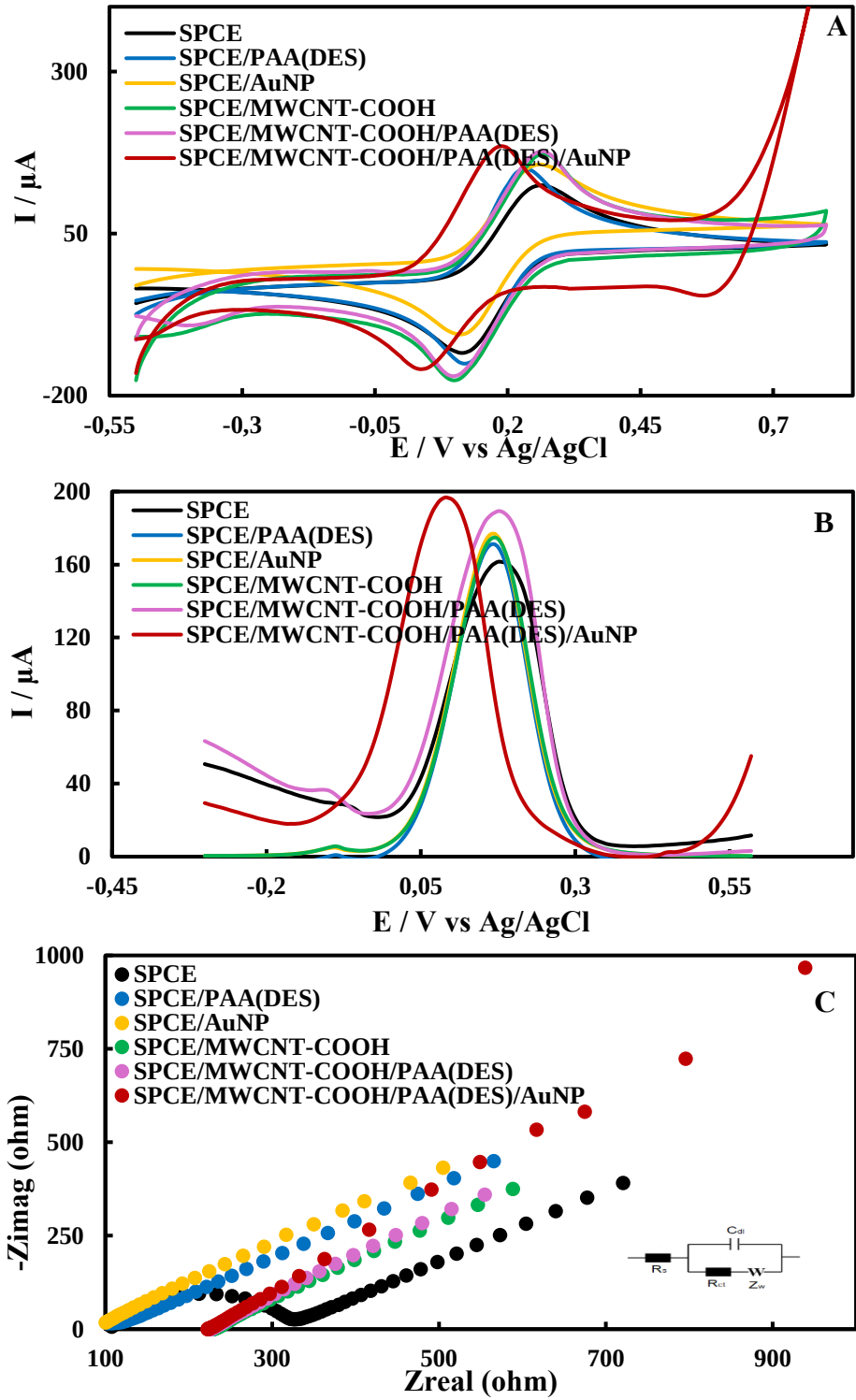
Farklı döngü sayılarında hazırlanan PAA_{DES} modifiyeli elektrotların Aea değerlerini hesaplamak için, FF çözeltisinde farklı tarama hızlarında (10-125 mV s⁻¹) CV ölçümleri gerçekleştirilmiş ve voltamogramlar Şekil 4.30A, 4.30B ve 4.30C’de verilmiştir. Voltamogramlardan faydalananarak pik akımlarına karşı tarama hızının karekökü grafikleri de çizilmiştir (Şekil 4.30D, 4.30E ve 4.30F).



Şekil 4. 30 SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES} (20 n), SPCE/ MWCNT-COOH/PAA_{DES} (25 n), SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES} (30 n)’ların dönüşümlü voltamogramları (tarama hızı: 10-125 mV s⁻¹) (A, B ve C) ve pik akımı-tarama hızının karekökü (D, E ve F) grafikleri

Şekil 4.30A, 4.30B ve 4.30C’de verilen voltamogramlara göre tarama hızı arttıkça pik akım yükseklikleri de artmaktadır. Şekil 4.30D, 4.30E ve 4.30F’ye göre gerçekleşen elektrokimyasal proses difüzyon kontrollüdür. 20, 25 ve 30 döngü modifiye edilmiş SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}’in Aea değerleri hesaplanmış ve sırasıyla 0,2120 cm² (20 n), 0,1983 cm² (25 n) ve 0,1922 cm² (30 n) olarak bulunmuştur. En yüksek yüzey alanına sahip elektrodun 20 n PAA_{DES} modifikasyonu ile hazırlanan elektrot olduğu anlaşılmıştır. Yeşil bir yöntem olan DES içerisinde, AA’nın elektropolimerizasyonu ilk kez bu tez çalışmasında gerçekleştirilmiştir. Optimum döngü sayısında hazırlanan SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}’lerin yüzeyi AuNP’ler elektrodepozite edilmiştir. Böylece SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP’ler hazırlanmıştır.

Elektrokimyasal sensör ve immunosensörlerin tasarımı ve optimizasyonu için, öncelikle modifiye edilen malzemelerinin elektrokimyasal davranışları değerlendirilmektedir. Bu amaçla bir önceki bölümde hazırlanan SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP’lerin iletkenliklerini incelemek için elektrokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP’lerin elektrokimyasal karakterizasyonları, 5 mM FF çözeltisinde CV, DPV ve EIS metotları uygulanarak gerçekleştirilmiştir. CV ve DPV’lerden elde edilen voltamogramlar ve EIS’lerden elde edilen spektrumlar sırasıyla Şekil 4.31A, 4.31B ve 4.31C’de, $I_{pa_{ort}}$ ve $R_{ct_{ort}}$ değerleri ise Çizelge 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4. 31 MWCNT-COOH, PAA_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotlar için (A) dönüşümlü voltamogramlar (B) diferansiyel puls voltamogramlar (C) elektrokimyasal empedans spektrumları

Çizelge 4. 8 MWCNT-COOH, PAA_{DES} ve AuNP modifiyeli elektrotların CV ve DPV'lerinden elde edilen $I_{pa_{ort}}$ ve EIS'lerinden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ değerleri

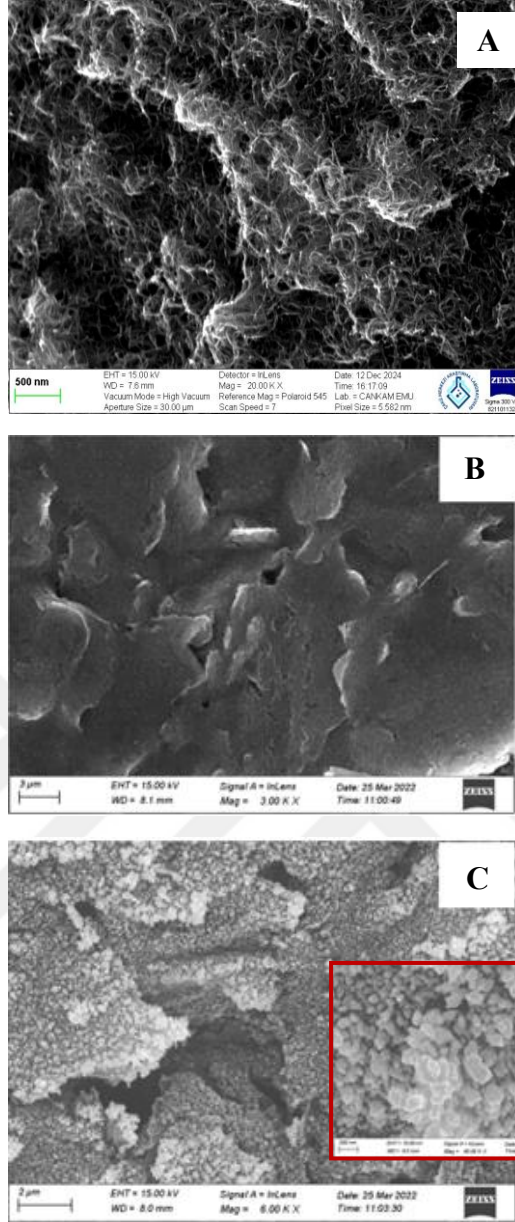
Formülasyon	CV	DPV	EIS
	$I_{pa_{ort}} (\mu A)$	$I_{pa_{ort}} (\mu A)$	$R_{ct_{ort}} (ohm)$
SPCE	128,62	147,89	109,00
SPCE/PAA _{DES}	154,21	173,65	76,70
SPCE/AuNP	157,05	174,74	61,73
SPCE/MWCNT-COOH	159,79	172,65	229,20
SPCE/MWCNT-COOH/PAA _{DES}	162,59	177,00	213,90
SPCE/MWCNTCOOH/PAA _{DES} /AuNP	164,66	187,17	9,30

Şekil 4.31A'daki CV'lere ve Çizelge 4.8'e göre yalın SPCE'nin $I_{pa_{ort}}$ değeri 128,62 μA 'dır. PAA_{DES}, AuNP ve MWCNT-COOH modifikasyonları sonrasında iletkenlik değerleri artmış ve sırasıyla 154,21 μA , 157,05 μA ve 155,79 μA 'e yükselmiştir. SPCE'ler üzerine PAA_{DES}, AuNP ve MWCNT-COOH'ın ayrı ayrı modifikasyonlarındaki $I_{pa_{ort}}$ değerleri birbirine yakındır. Bu malzemelerin üçü de iletken malzemelerdir ve SPCE üzerine modifikasyonları $I_{pa_{ort}}$ değerlerini arttırmıştır. MWCNT-COOH'ın üzerine PAA_{DES} ve AuNP modifikasyonlarından sonra iletkenlik değeri daha da artmış ve sırasıyla 162,59 μA ve 164,66 μA olarak belirlenmiştir. CV sonuçlarına göre MWCNT-COOH, PAA_{DES} ve AuNP'nin birlikte bulunduğu formülasyon, ayrı ayrı yapılan modifikasyonlara göre en iyi formülasyonu göstermiştir. MWCNT-COOH, PAA_{DES} ve AuNP'nin sinerjik bir etki gösterdiği anlamına gelmektedir. PAA_{DES}, aromatik halkasındaki π -konjuge yapısıyla elektronik iletkenliğe sahiptir. MWCNT-COOH, π -konjuge yapıya ek olarak sp^2 karbonlarından oluşan karboksil fonksiyonel gruplara ve hidrofobik yan duvarlara sahiptir. Böylece MWCNT-COOH ve PAA_{DES} arasında π - π elektronik ve hidrofobik etkileşimler gerçekleşmiştir (Şahin ve Ayrancı 2015; Bilgi ve Ayrancı 2016). Buna ek olarak AuNP, MWCNT-COOH ve PAA_{DES}'in aralarına yerleşerek elektronik iletkenliği daha da artırmakla birlikte (Şahin ve Ayrancı 2015; Bilgi ve Ayrancı 2016), düzenli SAM'lerin oluşması için kullanılması gereken nanomalzemedir. Şekil 4.31B'deki DPV'lere ve Çizelge 4.8'e göre de SPCE'nin $I_{pa_{ort}}$ değeri 147,89 μA 'dır. SPCE üzerine PAA_{DES}, AuNP ve MWCNT-COOH modifikasyonları sonrasında iletkenlikler artmış ve $I_{pa_{ort}}$ değerlerinde artış görülmüştür (PAA_{DES}:173,65 μA , AuNP:174,74 μA , MWCNT-COOH:172,65 μA). MWCNT-COOH'ın üzerine PAA_{DES} ve AuNP modifikasyonları sonrasında da $I_{pa_{ort}}$ değerinde artış görülmüş ve sırasıyla 177,00 μA ve 187,17 μA olarak belirlenmiştir. En iyi formülasyon SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'ler ile elde edilmiştir. DPV sonuçları CV

sonuçlarını desteklemektedir. Şekil 4.31C'deki EIS'lere ve Çizelge 4.8'e göre ise SPCE'nin $R_{ct_{ort}}$ değeri 109,0 ohm'dur. SPCE üzerine iletken bir polimer olan PAA_{DES}, iletken metal olan AuNP modifikasyonları sonrasında $R_{ct_{ort}}$ değerleri sırasıyla 76,70 ohm ve 61,73 ohm'dur. SPCE üzerine MWCNT-COOH modifikasyonu sonrasında $R_{ct_{ort}}$ değeri artmıştır. Bunun sebebi MWCNT-COOH'ın elektroaktif gruplarının FF'in - yüklü gruplarıyla birbirini itmesinden (Sonuç Karaboğa ve Sezgintürk 2021) kaynaklanmaktadır (229,20 ohm). SPCE/MWCNT-COOH üzerine PAA_{DES} sonrası $R_{ct_{ort}}$ 213,90 ohm olarak azalmıştır. Bu azalışın MWCNT-COOH'ta bulunan - yüklü gruplar PAA_{DES} bulunan redox çifti ile etkileşime geçerek sinerjik etki oluşturması ve iletkenliğin artmasıyla olduğu düşünülmektedir (Şahin ve Ayrancı 2015). PAA_{DES} sonrası AuNP modifikasyonunda ise iletkenliğin artmasıyla $R_{ct_{ort}}$ 9,30 ohm olarak azalmıştır. Bu azalma MWCNT-COOH, PAA_{DES} ve AuNP'ler arasındaki sinerjik etki sebebiyle olmaktadır (Bilgi ve Ayrancı 2016; Bilgi Kamaç vd. 2023a,b; Atıcı vd. 2023; Yılmaz Kabaca vd. 2023). EIS sonuçlarına göre en iyi formülasyon SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'ler ile elde edilmiştir. EIS sonuçları CV ve DPV sonuçları ile uyumludur. Her üç metot ile en yüksek iletkenliğe sahip formülasyon SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'ler ile elde edilmiştir. Böylece optimum modifikasyon şartlarında SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lerin elektrokimyasal karakterizasyonları tamamlanmıştır.

4.3.1.2 SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lerin morfolojik ve kimyasal karakterizasyonları

Tezin bu kısmında ilk olarak SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lerin morfolojik karakterizasyonuna ait bulgular sunulmuştur. Optimum şartlarda hazırlanmış elektrotların morfolojik karakterizasyonu SEM ile yapılmıştır. SPCE/MWCNT-COOH, SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES} ve SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lere ait SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.32A Şekil 4.32B ve Şekil 4.32C'de verilmiştir.

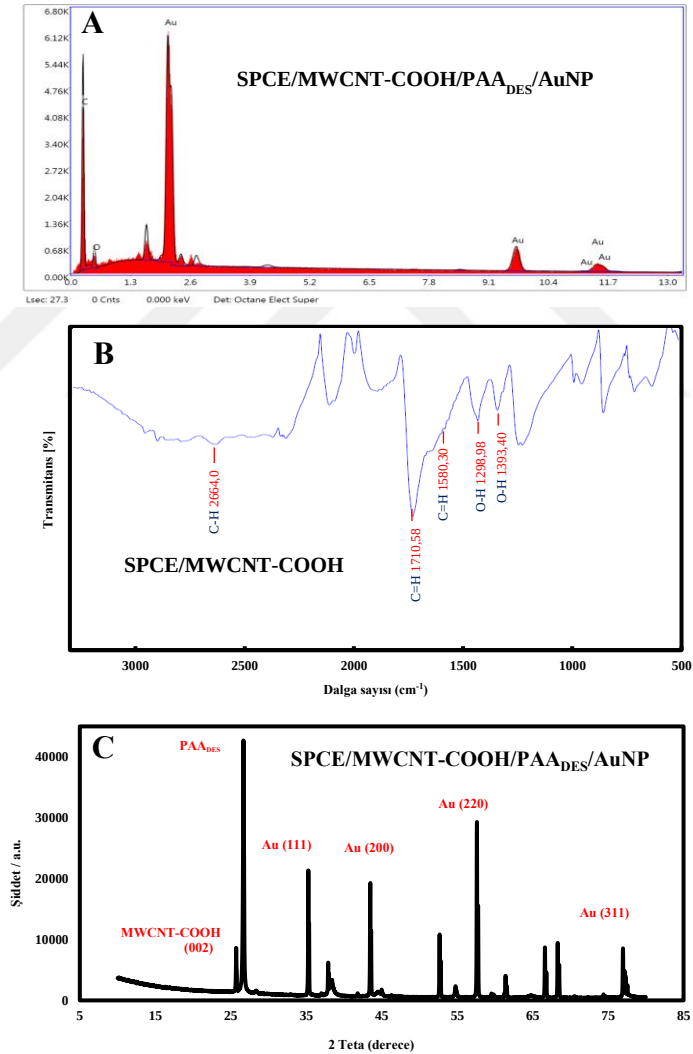


Şekil 4. 32 SPCE/MWCNT-COOH (A), SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES} (B) ve SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP (C)'lere ait SEM görüntüleri

Optimum şartlarda hazırlanan elektrotların Şekil 4.32A'daki SEM görüntüsünde MWCNT-COOH'ın lif benzeri iplikli görüntüsü gözlenmiştir. Lif benzeri bu görüntüler MWCNT-COOH'ın varlığının kanıtıdır (Wulandari *et al.* 2018). Şekil 4.32B'de ise düzensiz dağılmış blok yapılar ve üst üste binmiş daha pürüzlü yüzey gözlenmiştir ve bu görüntüler PAA_{DES}'in varlığının kanıtıdır (Liu *et al.* 2016; Atıcı vd. 2023). Şekil 4.32C'de yüzeyde çok sayıda küresel nanoparçacıklar göstermektedir (Lv *et al.* 2016; Atıcı vd.

2023; Yılmaz Kabaca vd. 2023; Yılmaz ve Bilgi 2024). Bu nanopartiküller AuNP'den oluşmaktadır.

SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lerin morfolojik karakterizasyonu tartışıldıktan sonra, kimyasal karakterizasyonlarına ait bulgular sunulmuştur. Optimum şartlarda hazırlanmış elektrotların kimyasal karakterizasyonu EDX, FTIR ve XRD ile yapılmıştır. SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lere ait EDX spektrumu Şekil 4.33A'da, SPCE/MWCNT-COOH'lara ait FTIR spektrumu Şekil 4.33B'de ve SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lere ait XRD spektrumu Şekil 4.33C'de verilmiştir.



Şekil 4. 33 SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lere ait EDX spektrumu (A), SPCE/MWCNT-COOH'lara ait FTIR spektrumu (B) ve SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lere ait XRD spektrumu (C)

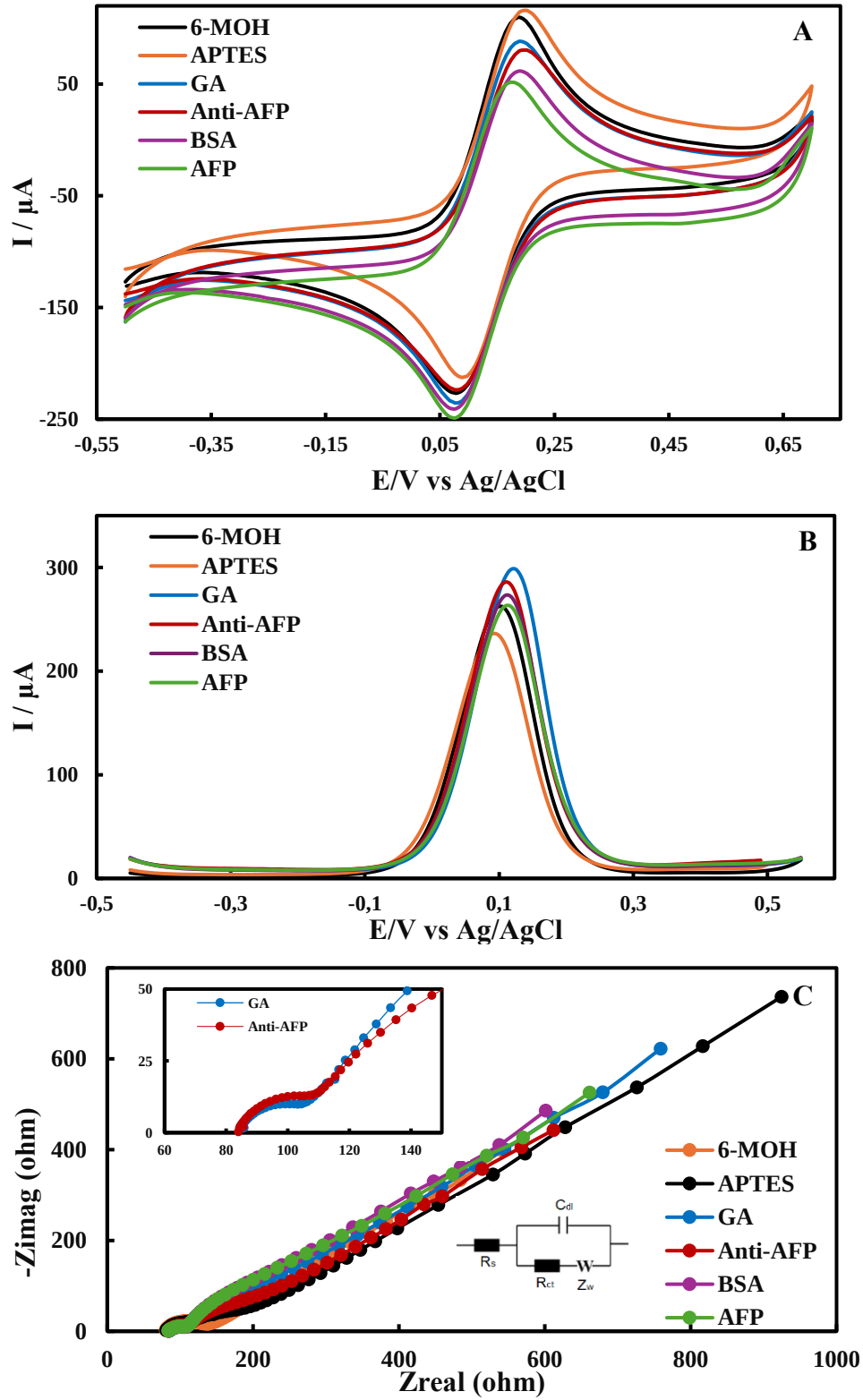
Şekil 4.33A'daki EDX analizinde Au elementinin varlığı, AuNP'lerin elektrot üzerine elektrodepozisyonunun kanıtıdır (Atıcı vd. 2023; Yılmaz Kabaca vd. 2023; Yılmaz ve Bilgi 2024). Şekil 4.33B'deki FTIR spektrumuna göre 2664,80 cm^{-1} 'deki pik C-H asimetrik titreşiminden ileri gelmektedir. 1710,58 cm^{-1} , 1580,30 cm^{-1} , 1393,40 cm^{-1} ve 1298,98 cm^{-1} 'deki pikler karboksil grubunun rezonans yapısındaki C=O ve -OH gruplarındaki bağların titreşiminden ileri gelmektedir (Zhang *et al.* 2016). Şekil 4.33C'deki SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP elektroduna ait XRD spektrumunda PAA_{DES} için 26,55°'de keskin bir kırınım tepe noktası görülmektedir (Atıcı vd. 2023). MWCNT-COOH için 26,45°'de tipik kırınım tepe noktası (002) (Arrechea *et al.* 2020) ve AuNP için sırasıyla 35,38°, 43,62°, 57,81° ve 77,24°'te dört karakteristik kırınım tepe noktası (111), (200), (220) ve (311) gözlenmiştir (Atıcı vd. 2023; Yılmaz Kabaca vd. 2023; Yılmaz ve Bilgi 2024). Bu sonuçlara göre SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lerin kimyasal karakterizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.3.2 AFP immunosensörlerinin geliştirilmesi

Tezin bu kısmında, bir önceki bölümde detayları verilmiş olan SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'ler kullanılarak AFP immunosensörleri hazırlanmış ve elektrokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. AFP immunosensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonları, analitik parametreleri ve gerçek numune analizlerine ait elde edilen bulgular verilmiş ve tartışılmıştır.

4.3.2.1 AFP immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu

SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'ler kullanılarak hazırlanan AFP immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonu için her bir hazırlanma basamağından sonra CV, DPV ve EIS metotlarıyla ölçümler gerçekleştirilmiştir. Her bir hazırlanma basamağında elde edilen CV ve DPV'ler ile EIS'ler sırasıyla Şekil 4.34A, 4.34B ve 4.34C'de verilmiştir. CV ve DPV'lerinden elde $I_{pa_{ort}}$ ile EIS'lerinden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ değerleri ise Çizelge 4.9'da gösterilmektedir.



Şekil 4. 34 SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lerle hazırlanan AFP immunosensörlerinin dönüşümlü voltamogramları (A), diferansiyel puls voltamogramları (B) ve elektrokimyasal empedans spektrumları (C)

Çizelge 4. 9 SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lerle hazırlanan AFP immunosensörlerinin CV ve DPV'lerinden elde $I_{pa_{ort}}$ değerleri ve EIS'lerinden elde edilen $R_{ct_{ort}}$ değerleri

Formülasyon	CV $I_{pa_{ort}}$ (μA)	DPV $I_{pa_{ort}}$ (μA)	EIS $R_{ct_{ort}}$ (ohm)
6-MOH	95,0	225,1	186,3
APTES	103,3	331,9	107,2
GA	77,6	243,6	26,1
Anti-AFP	73,4	256,1	34,9
BSA	64,9	233,6	60,6
AFP	56,0	221,8	68,3

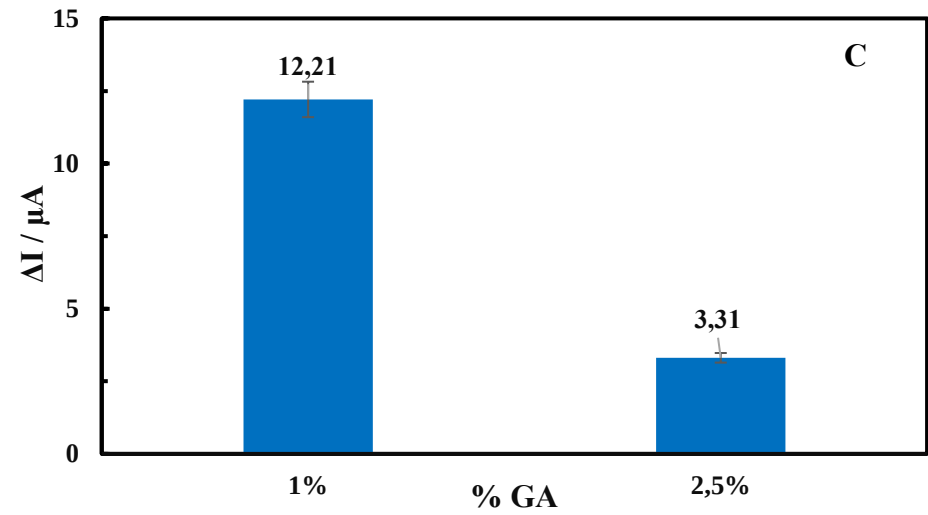
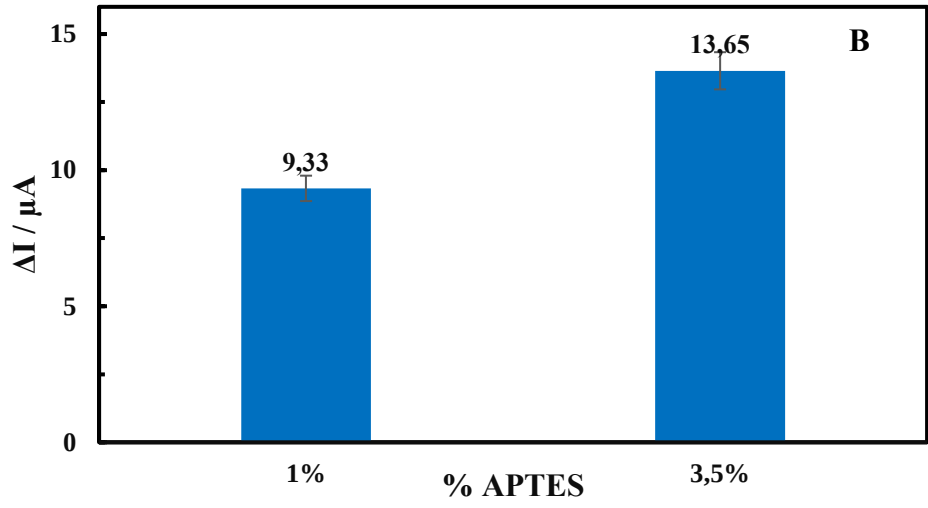
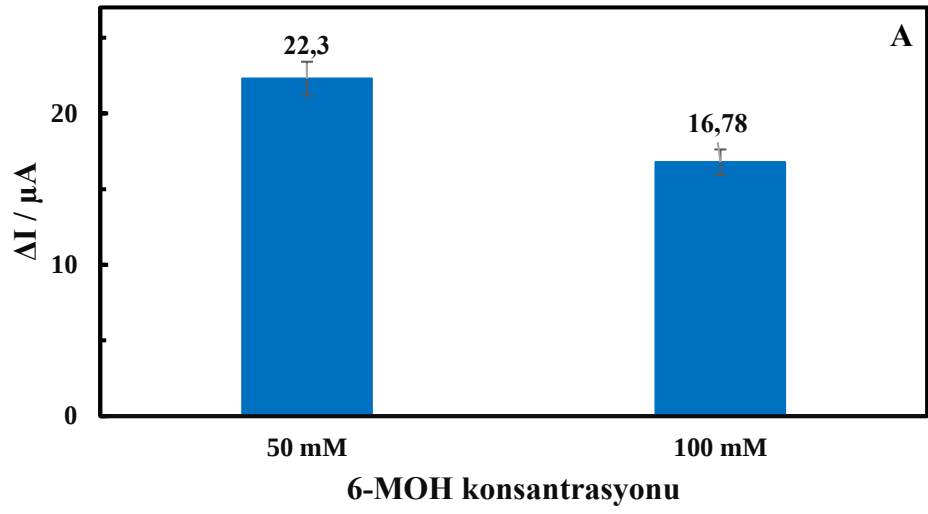
Şekil 4.34A'daki CV sonuçları ve Çizelge 4.9'a göre AFP immunosensörünün 6-MOH muamelesi sonrası yüzeyde -OH grupları oluşturulmuştur ve $I_{pa_{ort}}$ değeri 95,0 μA olduğu belirlenmiştir. Oluşan -OH grupları APTES ile muamele edilmiş ve bir ucunda siloksan bağı diğer ucunda amin grupları oluşmuştur. Ardından bu gruplar GA ile çapraz bağlanarak antikorun yüzeye bağlanması için kararlı uzun bir zincir oluşturmuştur. GA muamelesinden sonra ise 6-MOH muamelesine göre $I_{pa_{ort}}$ değerinin azaldığı (77,6 μA) gözlenmiştir. Anti-AFP basamağında ise, Anti-AFP'nin yüzeye immobilizasyonu sonrası elektrot yüzeyi yalıtkan hale gelmiş ve $I_{pa_{ort}}$ değerinde azalış gözlenmiştir (73,3 μA). Bu sonuç, Anti-AFP'nin elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir. BSA basamağında, BSA'nın yüzeye inkübasyonu ile benzer şekilde $I_{pa_{ort}}$ değerinde azalış (64,9 μA) gözlenmiştir. AFP basamağında ise, AFP'nin yüzeye immobilizasyonu sonucunda BSA basamağıyla yakın değerler gözlenmiştir (56,0 μA). CV sonuçlarına göre immobilizasyon başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. Şekil 4.34B'deki ve Çizelge 4.9'daki DPV sonuçlarına göre 6-MOH modifikasyonundan sonra $I_{pa_{ort}}$ değeri 225,1 μA olduğu belirlenmiştir. APTES muamelesinden sonra ise $I_{pa_{ort}}$ değeri artmıştır (331,9 μA) Anti-AFP'nin yüzeye immobilizasyonu sonrası $I_{pa_{ort}}$ değerinde azalma gözlenmiştir (256,1 μA). BSA immobilizasyonu sonrası $I_{pa_{ort}}$ değeri 233,6 μA olduğu gözlenmiştir. AFP immobilizasyonu sonrası yüzeyde yalıtkan bir tabaka oluşmuş ve $I_{pa_{ort}}$ değerinde azalma gözlenmiştir (221,8 μA). DPV sonuçlarına göre immobilizasyon başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. Şekil 4.34C'deki EIS sonuçları ve Çizelge 4.9'a göre AFP immunosensörünün EIS'lerinde de 6-MOH muamelesinden sonra $R_{ct_{ort}}$ değeri 186,3 ohm ve GA modifikasyonu sonrası $R_{ct_{ort}}$ değeri 26,1 ohm olduğu görülmüştür. Anti-AFP'nin yüzeye immobilizasyonu sonrası yalıtkan tabaka olması sebebi ile elektronlar elektrot yüzeyine difüzyonunu azaltmış ve $R_{ct_{ort}}$ değerinde belirgin

bir artış gözlenmiştir (34,9 ohm). BSA modifikasyonundan sonra (60,6 ohm) AFP immobilizasyonunda da (68,3 ohm) artış gözlenmiştir. EIS sonuçlarına göre immobilizasyon başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir (Bilgi Kamaç vd. 2023a; Bilgi Kamaç vd. 2023b). Böylece üç metotla AFP immunosensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.3.2.2 AFP immunosensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonu

Tezin bu kısmında, AFP immunosensörlerinin çalışma parametrelerinin optimizasyonu için 6-MOH konsantrasyon optimizasyonu, APTES %'si, GA %'si, Anti-AFP konsantrasyon optimizasyonu, Anti-AFP inkübasyon süre optimizasyonu ve AFP inkübasyon süre optimizasyonuna ait bulgular verilmiş ve tartışılmıştır.

İlk olarak 6-MOH konsantrasyonunu optimize etmek için, farklı 6-MOH konsantrasyonlarına (50 mM ve 100 mM) sahip immunosensörler hazırlanmış ve 1 ng mL⁻¹ AFP antijenleri ile inkübe edilmiştir. Daha sonra hazırlanan immunosensörler ile AFP analizi 5 mM FF çözeltisinde DPV ölçümleri yapılmıştır. Voltamogramlardan elde edilen ΔI değerlerinden yararlanılarak her bir 6-MOH konsantrasyonu için ΔI -6-MOH konsantrasyonu grafiği çizilmiştir (Şekil 4.35A).



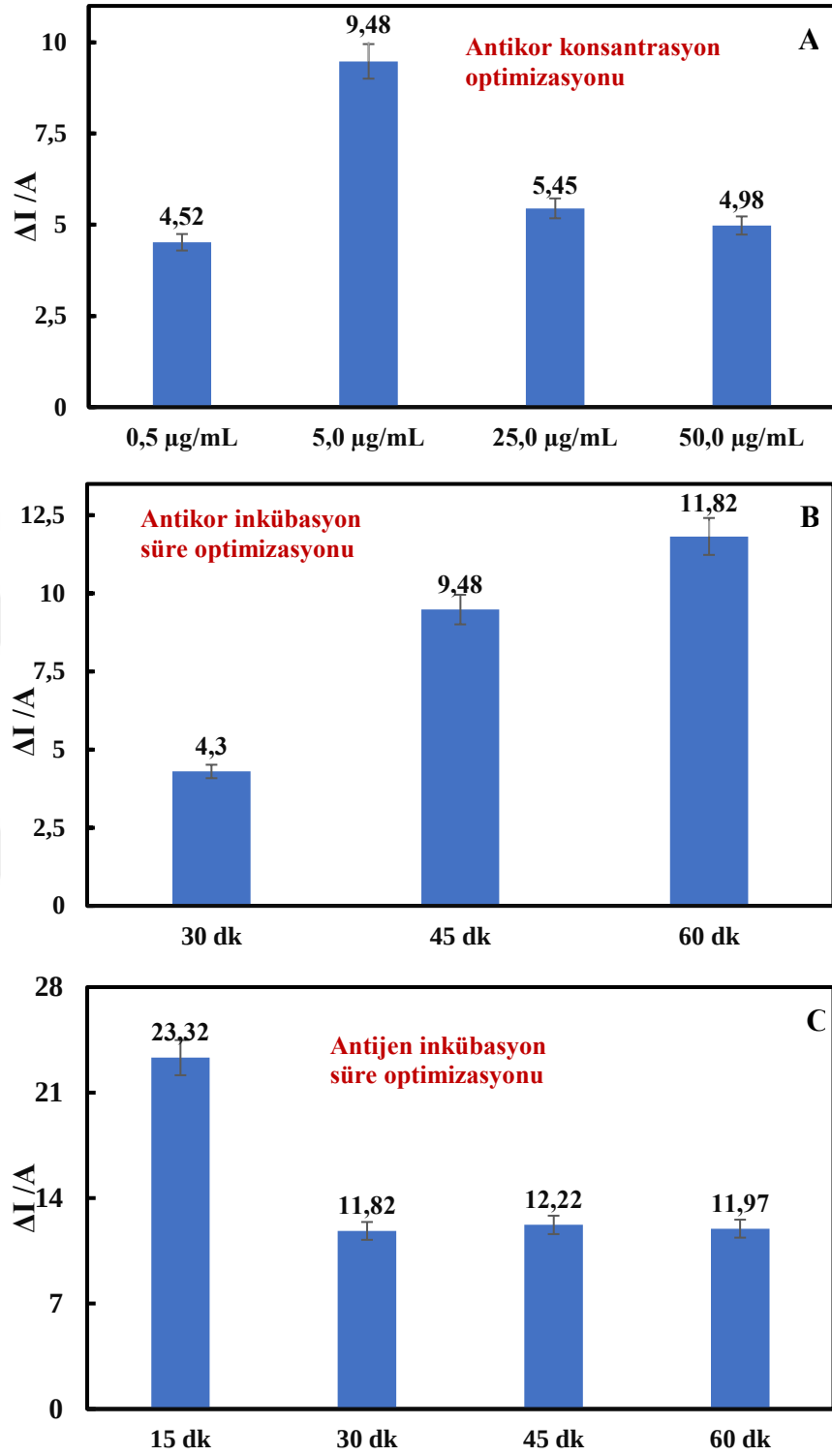
Şekil 4. 35 6-MOH konsantrasyon optimizasyonu için ΔI -6-MOH konsantrasyonu (**A**), APTES yüzdesi optimizasyonu için ΔI -%APTES (**B**) ve GA yüzde optimizasyonu için ΔI -%GA (**C**) grafikleri

Şekil 4.35A'daki grafiğe göre 50 mM 6-MOH konsantrasyonu ile hazırlanan immunosensörlerin AFP analizi için elde edilen ΔI değeri 22,3 μA iken 100 mM konsantrasyon ile hazırlanan immunosensörlerin AFP analizi için elde edilen ΔI değeri 16,78 μA olduğu belirlenmiştir. 50 mM 6-MOH konsantrasyonu ile hazırlanan immunosensörlerin AFP analizi için elde edilen ΔI değeri daha yüksek olduğu için optimum 6-MOH konsantrasyonu 50 mM 6-MOH olarak seçilmiştir (Şimşek vd. 2015).

6-MOH konsantrasyon optimizasyonundan sonra APTES yüzdesinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla %1 ve %3,5 APTES kullanılarak AFP immunosensörleri hazırlanmış ve AFP analizi DPV ölçümleri ile yapılmıştır (Şekil 4.35B). Şekil 4.35B'deki grafiğe göre %3,5 APTES ile hazırlanan immunosensörlerin AFP analizi için elde edilen ΔI değeri (ΔI : 13,65 μA), %1 APTES ile hazırlanan immunosensörlerin AFP analizi için elde edilen ΔI değerinden daha fazladır (ΔI : 9,33 μA). Bu sebeple optimum APTES yüzdesi %3,5 olarak belirlenmiştir (Şimşek vd. 2015; Vural vd., 2024).

Daha sonra GA yüzdesinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla %1 ve %2,5 GA kullanılarak AFP immunosensörleri hazırlanmış ve AFP analizi DPV ölçümleri ile yapılmıştır (Şekil 4.35C). Şekil 4.35C'deki grafiğe göre %1 GA ile hazırlanan immunosensörlerin AFP analizi için elde edilen ΔI değeri (ΔI : 12,21 μA), %2,5 GA ile hazırlanan immunosensörlerin AFP analizi için elde edilen ΔI değerinden daha fazladır (ΔI : 3,31 μA). Bu sebeple optimum GA yüzdesi %1 olarak belirlenmiştir (Şimşek vd. 2015; Vural vd., 2024).

Antikor konsantrasyonlarını optimize etmek için, farklı Anti-AFP konsantrasyonlarına ($0,5 \mu g mL^{-1}$, $5 \mu g mL^{-1}$, $25 \mu g mL^{-1}$ ve $50 \mu g mL^{-1}$) sahip immunosensörler hazırlanmış ve $1 ng mL^{-1}$ AFP antijenleri ile inkübe edilmiştir. Daha sonra hazırlanan immunosensörler ile 5 mM FF çözeltisinde DPV ölçümleri yapılmıştır. Voltamogramlardan elde edilen ΔI değerlerinden yararlanılarak her bir antikor konsantrasyonu için ΔI -antikor konsantrasyonu grafiği çizilmiştir (Şekil 4.36A).



Şekil 4. 36 AFP konsantrasyonu- ΔI grafikleri: A) antikör konsantrasyon optimizasyonu, B) antikör inkübasyon süre optimizasyonu ve C) antijen inkübasyon süre optimizasyonu

Çizilen grafiklerin akım cevabına göre optimum antikor konsantrasyonu belirlenmiştir. Şekil 4.36A'ya göre AFP immunosensörlerinin $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-AFP konsantrasyonu için ΔI değerleri sırasıyla $4,52 \mu\text{A}$, $5,45 \mu\text{A}$ ve $4,98 \mu\text{A}$ olup birbirine oldukça yakındır. $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-AFP konsantrasyonu ile hazırlanan immunosensörlerin ΔI değerleri ise $9,48 \mu\text{A}$ 'dır. Sonuçlara en yüksek akım cevabı $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Anti-AFP konsantrasyonu ile hazırlanan immunosensörler ile elde edilmiştir ve optimum olarak belirlenmiştir.

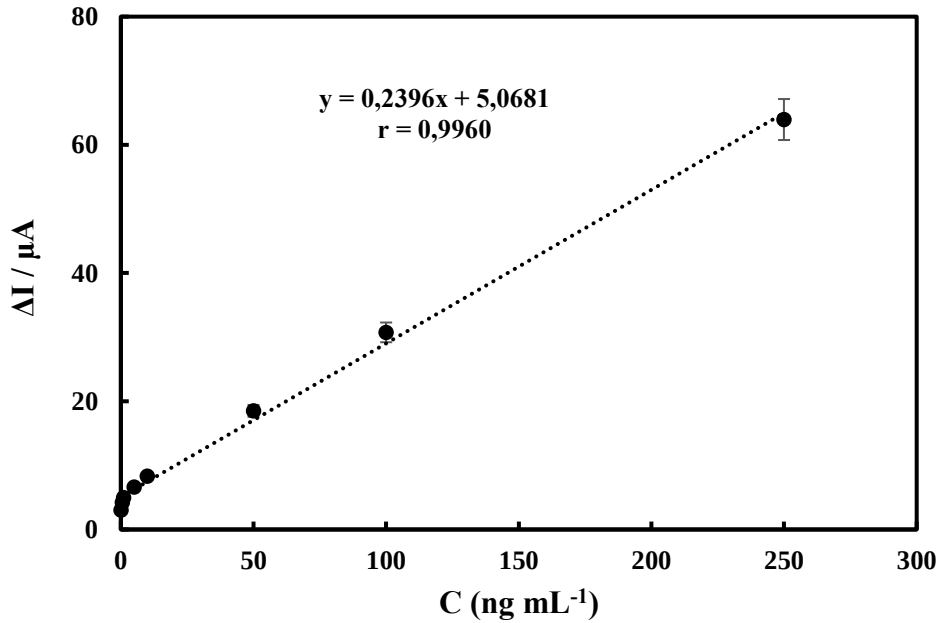
Optimum Anti-AFP konsantrasyonunu belirledikten sonra antikor inkübasyon sürelerini optimize etmek için, farklı Anti-AFP inkübasyon sürelerine sahip immunosensörler (30 dk, 45 dk ve 60 dk) hazırlanmış ve 1 ng mL^{-1} AFP antijenleri ile inkübe edilmiştir. Daha sonra hazırlanan immunosensörler ile 5 mM FF çözeltisinde DPV ölçümleri yapılmıştır. Voltamogramlardan elde edilen ΔI değerlerinden yararlanılarak her bir antikor inkübasyon süresi için ΔI -antikor inkübasyon süresi grafiği çizilmiştir (Şekil 4.36B). Şekil 4.36B'ye göre AFP immunosensörlerinin 30, 45 ve 60 dk Anti-AFP inkübasyon süresi için ΔI değerlerinin sırasıyla $4,30 \mu\text{A}$, $9,48 \mu\text{A}$ ve $11,82 \mu\text{A}$ olduğu belirlenmiştir. 30 dk Anti-AFP inkübasyon süresi ile hazırlanan immunosensörlerin antikor-antijen etkileşimi için geçen süre yeterli gelmediği ΔI değerlerinden anlaşılmaktadır. 45 ve 60 dk Anti-AFP süresi ile hazırlanan immunosensörlerin ΔI değerleri ise birbirine yakındır. Ancak en yüksek akım cevabı 60 dk Anti-AFP inkübasyon süresi ile hazırlanan immunosensörler ile elde edilmiştir. Sonuçlara göre optimum Anti-AFP inkübasyon süresi 60 dk olarak belirlenmiştir.

Optimum Anti-AFP inkübasyon süresi belirledikten sonra antijen inkübasyon sürelerini optimize etmek için, farklı AFP inkübasyon sürelerine sahip immunosensörler (15 dk, 30 dk, 45 dk ve 60 dk) hazırlanmış ve 1 ng mL^{-1} AFP antijenleri ile inkübe edilmiştir. Daha sonra hazırlanan immunosensörler ile 5 mM FF çözeltisinde DPV ölçümleri yapılmıştır. Voltamogramlardan elde edilen ΔI değerlerinden yararlanılarak her bir antijen inkübasyon süresi için ΔI -antijen inkübasyon süresi grafiği çizilmiştir (Şekil 4.36C). Şekil 4.36C'ye göre AFP immunosensörlerinin 15, 30, 45 ve 60 dk AFP inkübasyon süresi için ΔI değerlerinin sırasıyla $23,32 \mu\text{A}$, $11,82 \mu\text{A}$, $12,22 \mu\text{A}$ ve $11,97 \mu\text{A}$ olduğu belirlenmiştir. 30, 45 ve 60 dk antijen inkübasyon sürelerinde hazırlanan

immunosensörlerin ΔI değerleri birbirine çok yakın ve 15 dk'ya göre düşüktür. 15 dk AFP inkübasyon süresi ile hazırlanan immunosensörlerin ΔI değerleri ise tüm sürelerin içinde en yüksek olanıdır. Sonuçlara göre optimum antijen inkübasyon süresi 15 dk olarak belirlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda optimum şartlarda AFP immunosensörleri hazırlanmıştır.

4.3.2.3 AFP immunosensörlerinin analitik performansı

Tezin bu bölümünde, AFP immunosensörlerinin analitik parametreleri olan doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, uygulama kararlılığı, depolama kararlılığı, rejenerasyonu sunulmuş ve tartışılmıştır. Bu amaçla ilk olarak doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi için, optimum çalışma parametrelerinde hazırlanan AFP immünsensörleri kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki ($0,1-250 \text{ ng mL}^{-1}$) AFP antijenlerinin analizi DPV metodu ile 5 mM FF çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. ΔI değerlerinden yararlanılarak her bir immunosensör için ΔI -C grafiği çizilmiş ve Şekil 4.37'de verilmiştir. Grafikten yararlanılarak tespit limitleri ve tayin aralıkları belirlenmiştir.



Şekil 4. 37 AFP immunosensörleri için 0,1 ile 250 ng mL⁻¹ aralığında artan AFP konsantrasyonuna karşı ΔI grafiği

Şekil 4.37'deki grafikten faydalanarak tespit limitleri ve tayin aralıkları da belirlenmiştir. Şekil 4.37'deki grafikte AFP konsantrasyonu arttıkça ΔI değerleri de doğrusal olarak artmaktadır ve r değeri 0,9960'tır. Geliştirilen immunosensörlerin doğrusal aralığı 0,1 ile 250 ng mL⁻¹, duyarlılığı ve LOD değeri ise sırasıyla 0,24 μ A mL ng⁻¹ ve 21,21 ng mL⁻¹'dir.

Literatürde yer alan etiketli ve etiketsiz AFP immunosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen etiketsiz AFP immunosensörünün performans karşılaştırması Çizelde 4.10'da verilmiştir.



Çizelge 4. 10 Literatürde yer alan etiketli ve etiketsiz AFP immunosensörleri ile bu çalışmada geliştirilen etiketsiz AFP immunosensörünün performans karşılaştırması

Formülasyon	Tespit aralığı	Doğrusal aralık	Metot	Referans
Etiketli AFP immunosensörleri				
SPCE/OMC@AuNP-AntiAFP/AFP/AuPtNP-MB-AFP	3,33 fg mL ⁻¹	10 fg mL ⁻¹ -100 ng mL ⁻¹	DPV	Rong <i>et al.</i> 2021
GCE/ AuNPs@ZIF-8-AntiAFP/AFP/ A1-C4bp α -AntiAFP	0,033 pg mL ⁻¹	0,1- 100000 pg mL ⁻¹	DPV	Li <i>et al.</i> 2022
GCE/MB-AntiAFP/AFP/ZIF-8-Anti AFP	0,032 pg mL ⁻¹	0,0001 -100 ng mL ⁻¹	DPV	Wang <i>et al.</i> 2023
Etiketsiz AFP immunosensörleri				
GCE/Thi/Chit/HRP/AuNP/AntiAFP/BSA/AFP	0,03 pg mL ⁻¹	0,10–10000 pg mL ⁻¹	CV	Lu <i>et al.</i> 2018
GCE/MCHS@MnO ₂ /AntiAFP/BSA/AFP	0,03 ng mL ⁻¹	0,10 -420 ng mL ⁻¹	SWV	Zhu <i>et al.</i> 2020
GCE/ izoorientin/AntiAFP/BSA/AFP	0,0002 ng mL ⁻¹	0,001-10 ng mL ⁻¹	DPV	Shi <i>et al.</i> 2020
GCE/3D-CuFC-C/ AntiAFP/BSA/AFP	1,40x10 ⁻⁸ ng mL ⁻¹	2,25x10 ⁻⁸ -2,25x10 ² ng mL ⁻¹	CV	Guo <i>et al.</i> 2022
GCE/ CBNP@ PdNP/AntiAFP/BSA/AFP	0,0039 ng mL ⁻¹ 0,0131 ng mL ⁻¹	0,005-1000 ng mL ⁻¹	SWV EIS	Olorundare <i>et al.</i> 2023
GCE/ RGO@PtNPs/MoS ₂ /AntiAFP/BSA/AFP	0,12 pg mL ⁻¹	1-10 ⁵ pg mL ⁻¹	DPV	Zhang <i>et al.</i> 2024
ITO/3-TMSPM/ AntiAFP/BSA/AFP	0,01 pg mL ⁻¹	0,05-100 pg mL ⁻¹	EIS	Özcan vd. 2024
SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP/AntiAFP/BSA/AFP	21,21 ng mL⁻¹	0,10-250 ng mL⁻¹	DPV	Bu çalışma

3D-CuFC-C: Cu₂[Fe(CN)₆]-C nanokristalleri
3-TMSPM: 3-(Trimetoksisilil)propil metakrilat
A1-C4bp α : C4-bağlayıcı protein
AuNP: Altın nanopartiküller
AuPtNP:Altın platin nanopartikül

BSA: Bovin serum albumin
CBNP: Karbon siyahı nanopartikülleri
Chit: Kitosan
CV: Dönüşümlü voltametri
GCE: Camsı karbon elektrot

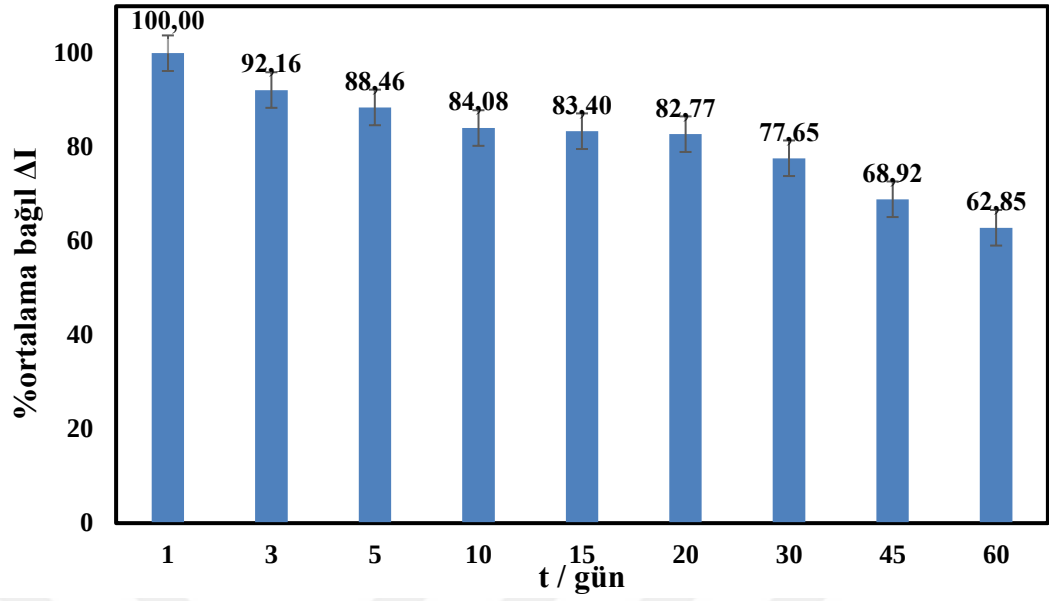
HRP: Yaban turpu peroksidazı
ITO: İndiyum kalay oksit
MB: Manyetik nanoboncuk
MB:Metilen mavisi
MCHS: Mezogözenekli karbon içi boş küre
MnO₂: Mangane dioksit

MWCNT-COOH: Karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüp
OMC: Mezogözenekli karbon
PdNP: Paladyum nanopartikülleri
Thi: Tiyonin
ZIF-8: Zeolitik imidazol çerçeveler 8

Çizelge 4.10’da yer alan etiketli elektrokimyasal AFP immunosensörlerinin doğrusal çalışma aralıklarının oldukça geniş olduğu gözlenmiş olsa da bu çalışmalarda ikincil antikor maliyeti artırmaktadır. Ayrıca immunosensör hazırlanmasında kullanılan sinyal yükselticilerin hazırlanma aşamaları zaman alıcıdır. Etiketsiz AFP immunosensörleri ise etiketli AFP immunosensörlerine göre daha hızlı ve pratiktir. Çalışmamızda yer alan AFP immunosensörleri ile insan serumundaki AFP seviyeleri tayin edilmiştir ve yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir. Bundan sonraki kısımda AFP immunosensörlerinin analitik performansı olan tekrarlanabilirlik, uygulama kararlılığı, depolama kararlılığı ve rejenerasyon parametreleri incelenmiştir.

AFP immunosensörlerin tekrarlanabilirliklerinin belirlenmesi için tayin aralıklarında seçilen AFP konsantrasyonunda (25 ng mL^{-1}), optimum çalışma parametrelerinde hazırlanan AFP immunosensörleri ile DPV metodu ile 5 mM FF çözeltisinde 10 tekrarlı DPV ölçümleri yapılmıştır. AFP immunosensörlerinin tekrarlanabilirlikleri için RSD %4,80 ($n=5$) olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular, geliştirilen AFP immunosensörlerinin tek kullanımlık olmasına rağmen AFP’yi beş tekrara kadar analiz edebildiğini göstermektedir.

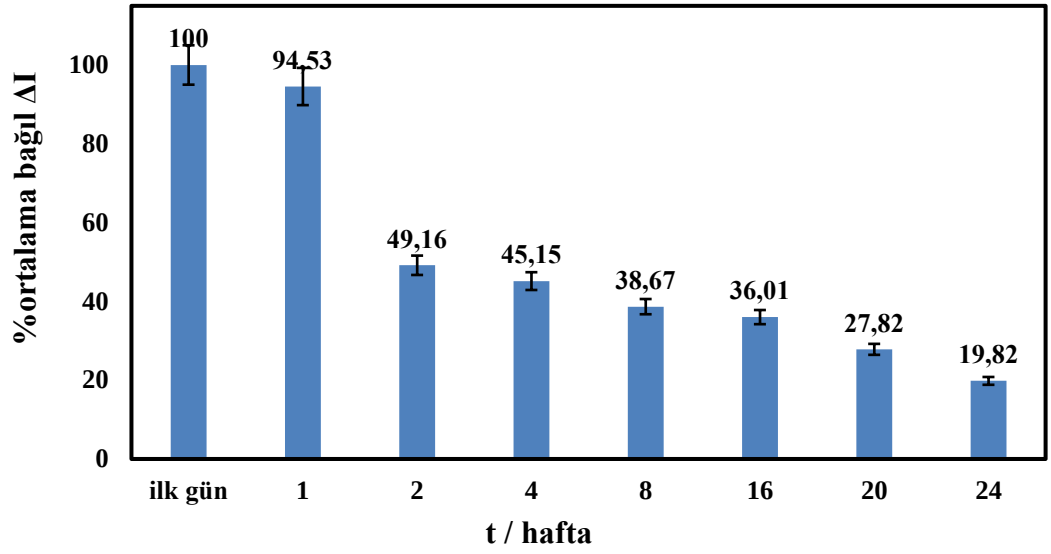
Optimum çalışma parametrelerinde hazırlanan AFP immunosensörlerinin uygulama kararlılığı, 25 ng mL^{-1} konsantrasyonundaki AFP antijeninin 60 gün boyunca belirli zaman aralıklarında ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. AFP’nin analizi için geliştirilen AFP immunosensörleri DPV metodu kullanılarak dört paralelli ve üç tekrarlı olarak ölçülmüştür. ΔI değerlerinden yararlanılarak %ortalama bağıl ΔI -gün grafiği çizilmiş ve Şekil 4.38’de verilmiştir.



Şekil 4. 38 AFP immunosensörlerinin uygulama kararlılığı: %ortalama bağıl ΔI -gün grafiği

Şekil 4.38'deki grafikte ilk güne göre AFP immunosensörünün yanıtı 3. günde %7,84 azalmıştır. Daha sonra ise 5. günde %11,54, 10. günde %15,92, 15. günde %16,60, 20. günde %17,23 30. günde %22,35 ve 60. günde %37,15 oranında düşüş göstermiştir. AFP immunosensörünün uygulama kararlılığı 60. günün sonunda %37,15 azalmış olsa da AFP antijenine karşı yanıt vermeye devam etmiştir. Sonuç olarak AFP immunosensörleri 60. güne kadar cevap vermiştir.

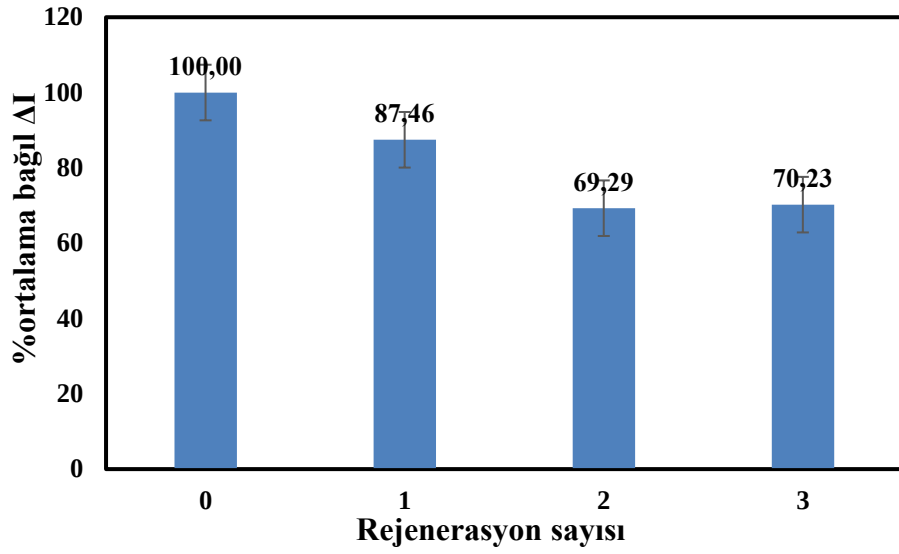
AFP immunosensörlerinin depolama kararlılığını incelemek için ise 10 ayrı immunosensör hazırlanmıştır. +4°C'de depolanan AFP immunosensörleri ile 1., 2., 4., 6., 8., 12., 16., 20. ve 24. haftalarda AFP antijenlerinin (25 ng mL⁻¹) analizi DPV metodu ile gerçekleştirilmiştir. ΔI değerlerinden yararlanılarak %ortalama bağıl ΔI -hafta grafiği çizilmiş ve Şekil 4.39'da verilmiştir.



Şekil 4.39 AFP immunosensörlerinin depolama kararlılığı: %ortalama bağıl ΔI-hafta grafiği

Şekil 4.39'daki grafiği göre 1. haftada %5,47'lik, 2. haftada 50,84'lük 4. haftada %54,85'lik, 8. haftada %61,33'lük, 16. haftada %63,99'lük, 20. haftada %72,18'lik ve 24. haftada %80,18'lik azalış gözlenmiştir. AFP immunosensörlerinin uygulama kararlılığı 2. haftada %50,84'lük bir azalış göstermiş olsa da 24. haftada hala yanıt vermektedir.

Geliştirilen AFP immunosensörlerinin rejenerasyon ile tekrar kullanılabilme potansiyelleri de değerlendirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, geliştirilen AFP immunosensörlerinin rejenerasyonunu incelemek için, AFP immunosensörleri hazırlandıktan sonra 10 mM HCl çözeltisiyle muamele edilmiştir. 2 dakika sonra, tekrar AFP (25 ng mL⁻¹) ile inkübe edilmiş ve ardından AFP analizi yapılmıştır. AFP immunosensörlerinin AFP antijenine olan cevabı için %ortalama bağıl ΔI-rejenerasyon sayısı grafiği çizilmiş ve Şekil 4.40'ta verilmiştir.

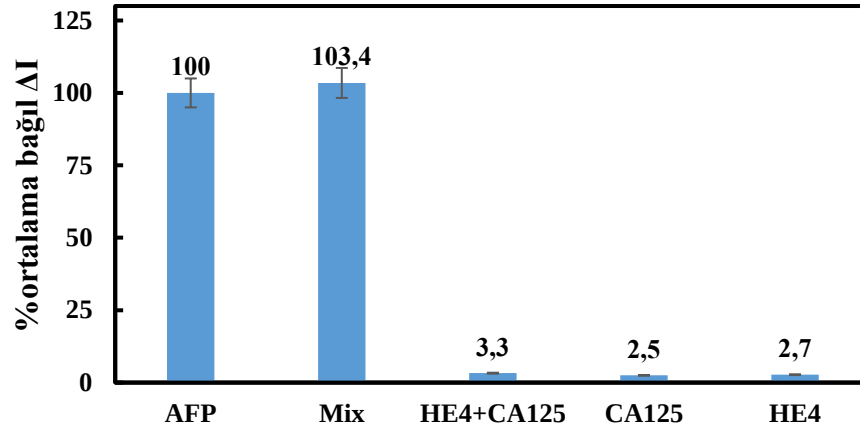


Şekil 4. 40 AFP immunosensörlerinin rejenerasyon çalışmaları: %ortalama bağıl ΔI -rejenerasyon sayısı

Şekil 4.40'a göre AFP immunosensörlerinin 1. rejenerasyondan sonra %12,54'lük, 2. rejenerasyondan sonra %30,71'lik ve 3. rejenerasyondan sonra ise %29,77'lik bir sinyal azalışı elde edilmiştir. Ancak 3. rejenerasyondan (%29,77) sonra beklenen düşüş görülmediği için 4. rejenerasyon çalışmasına devam edilmemiştir. Bu sonuçlara göre AFP immunosensörlerinin 2 kere rejenera edilebildiği anlaşılmaktadır.

4.3.2.4 AFP immunosensörlerinin seçiciliği

AFP immunosensörünün seçiciliği, diğer yumurtalık kanseri biyobelirteçleri, CA125 ve HE4 varlığında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ayrı ayrı CA125, HE4, AFP çözeltileri, HE4-CA125 içeren bir çözelti ve CA125-HE4-AFP içeren bir çözelti hazırlanmış ve hazırlanan immunosensörler bu antijen çözeltileriyle inkübe edilmiştir. 5 mM FF çözeltisinde DPVölçümleri yapılmış ve bu antijenlerin girişim yapıp yapmadığı test edilmiştir (Şekil 4.41).



Şekil 4. 41 AFP immunosensörlerinin seçicilik testi: %ortalama bağıl ΔI -antijen cevabı

Şekil 4.41'e göre AFP immunosensörlerinin HE4, CA125 ve HE4-CA125 antijenlerine karşı cevabı düşüktür (%3,5'un altında). CA125, HE4 ve AFP (karışım) ile inkübe edildiğinde ise girişim %3,4 olarak hesaplanmıştır. Antijen karışımına AFP immunosensörlerinin yanıtının %5'in altında olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre, AFP immunosensörlerinin diğer yumurtalık kanser biyobelirteçleri varlığında AFP'ye karşı iyi bir seçicilik gösterdiği anlamına gelmektedir.

4.3.2.5 AFP immunosensörleri ile gerçek numune analizi

Gerçek numune analizi uygulaması için AFP immunosensörleri hazırlanmıştır ve satın alınan insan kan serumunda AFP'yi tespit etmek için kullanılmıştır. Bu amaçla 1:100 oranında seyreltilen insan serumu örneklerine bilinen miktarda (25 ng mL^{-1}) AFP ilave edilerek, insan kan serumu numuneleri hazırlanmıştır (Bilgi Kamaç vd. 2020; Erdem ve Bilgi Kamaç vd. 2021; Bilgi Kamaç vd. 2023a; Yılmaz ve Bilgi 2024). Kan serumu numunelerinde AFP seviyelerinin ölçülmesi için öncelikle 25 ng mL^{-1} AFP immunosensörü hazırlanmış ve elektrokimyasal tayini DPV metodu ile yapılmıştır. $I_{pa_{ort}}$ değerlerinden faydalananarak %geri kazanım ve %hata değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4. 11 Geliştirilen immunosensörler ile insan kan serumunda AFP analizi

Eklenen konsantrasyonu	AFP	Hesaplanan konsantrasyonu	AFP	%Geri kazanım	%Hata
25,0 ng mL ⁻¹		25,28 ng mL ⁻¹		97,80	2,20

Çizelge 4.11'e göre geri kazanım %97,80 ve hata %2,20 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre yüksek geri kazanımlar elde edilmiş ve kan serumunda AFP seviyesi başarılı bir şekilde tespit edilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yumurtalık kanseri, dünya çapında kanserli kadınlar arasında önde gelen ölüm nedenidir. Vakaların %70'inden fazlasında ileri evrelerde teşhis konulmaktadır. Yumurtalık kanserinin erken evrelerde teşhisinde kullanılan FDA onaylı biyobelirteçler olan CA125, AFP ve HE4 umut vaat etmektedir. Bu biyobelirteçlerin yumurtalık kanseri teşhisinde spesifikliğı oldukça yüksek olmasına rağmen, rutin testleri maliyetlidir. Bu tez çalışmasında yumurtalık kanserinin erken teşhisi için, üç ayrı etiketsiz elektrokimyasal immunosensör sistemi basit, hızlı ve tek kullanımlık SPCE'ler ile hasta başı testlerine uygun olarak geliştirilmiştir.

CA125 immunosensörlerin hazırlanmasında ilk olarak dönüştürücü kısım olan SPCE/PTB_{DES}/AuNP'ler hazırlanmıştır. Bu elektrotların morfolojik karakterizasyonları SEM/EDX analizleri ile, kimyasal analizleri FTIR ve XRD ile ve elektrokimyasal karakterizasyonları CV, DPV ve EIS metotları kullanılarak yapılmıştır. Yapılan karakterizasyonların sonuçlarına göre SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerin başarılı bir şekilde hazırlandığı kanıtlanmıştır. SPCE/PTB_{DES}'lerin optimum döngü sayısı 30 n olarak bulunmuştur. İmmunosensörlerin hazırlanmasında ikinci olarak, Anti-CA125 SPCE/PTB_{DES}/AuNP'lerin yüzeyine immobilize edilmiştir. Biyomateryallerin elektrot yüzeyine güçlü immobilizasyonu biyosensörlerin performansı üzerinde oldukça etkilidir. AuNP yüzeyinde 4-MOH ve CTES ile SAM tabakaları oluşturulmuş, ardından çapraz bağlayıcı ile yüzey aktive edilmiş ve sonuç olarak Anti-CA125'ler elektrotların yüzeyine kovalent olarak (EDC-NHS) immobilize edilmiştir. Hazırlanan CA125 immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonları CV, DPV ve EIS metotlarıyla yapılmıştır ve yapılan elektrokimyasal karakterizasyonların sonuçlarına göre CA125 immunosensörleri başarıyla hazırlanmıştır. Hazırlanan CA125 immunosensörlerinin optimum çalışma koşulları (antikor konsantrasyonu, antikor ve antijen inkübasyon süreleri) EIS metodu kullanılarak belirlenmiştir. Optimum Anti-CA125 konsantrasyonu 5 µg mL⁻¹ olarak, optimum Anti-CA125 inkübasyon süresi 45 dk ve optimum CA125 inkübasyon süresi ise 30 dk olarak belirlenmiştir. CA125 immunosensörleri ile doğrusal konsantrasyon aralıklarında EIS metodu ile CA125'in elektrokimyasal analizleri gerçekleştirilmiştir. CA125 immunosensörleri için duyarlık, LOD ve r değerleri

hesaplanmıştır. Hazırlanan CA125 immunosensörlerinin tekrarlanabilirlikleri 50 pg mL^{-1} CA125 konsantrasyonunda test edilmiş ve RSD değerleri hesaplanmıştır. CA125 immunosensörlerinin tekrarlanabilirliği 7 tekrara kadar (RSD %4,78) cevap vermiştir. Geliştirilen CA125 immunosensörlerinin uygulama kararlılıkları 60 gün boyunca incelenmiş, tek kullanımlık olarak hazırlanan immunosensörlerin analizinde 60. günde dahi CA125 antijenlerine cevap verdiği gözlenmiştir. CA125 immunosensörlerinin depolama kararlılıkları ise 24 hafta depolama süresince incelenmiş ve immunosensörlerin analizinde 24. hafta depolama süresi sonunda dahi CA125 antijenine cevap vermiştir. Hazırlanan CA125 immunosensörlerinin seçicilik testleri HE4 ve AFP varlığında gerçekleştirilmiş ve CA125 immunosensörlerinin CA125 antijenine karşı yüksek seçicilik gösterdiği gözlenmiştir. CA125 immunosensörlerinin tek kullanımlık olsa bile rejenerasyon testleri yapılmış ve beşinci rejenerasyon sayısında dahi CA125 immunosensörlerinin, CA125 antijenine yanıt verdiği görülmüştür. Geliştirilen CA125 immunosensörleri bilinen miktarda CA125 içeren insan kan serumu numunelerindeki CA125 analizlerinde kullanılmış ve %95'in üstünde geri kazanım elde edilmiştir. Bu tez kapsamında hızlı, pratik, tek kullanımlık, etiketsiz CA125 immunosensörleri geliştirilmiştir. İnsan kan serumunda CA125 seviyeleri geliştirilen CA125 immunosensörleri kullanılarak EIS metodu ile ölçülmüştür. Geliştirilen CA125 immunosensörleri gelecekte hedeflenen başka kanser biyobelirteçlerinin tespitinde daha hassas ve daha seçici immunosensörlerin geliştirilebileceğine işaret etmektedir.

HE4 immunosensörlerinin hazırlanmasında SPCE/MXene-COOH/AuNP'ler hazırlanmıştır. Elektrotların morfolojik karakterizasyonları SEM/EDX ile, kimyasal analizleri FTIR ve XRD ile ve elektrokimyasal karakterizasyonları CV, DPV ve EIS metotları kullanılarak yapılmıştır. SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerdeki AuNP'nin optimizasyonları (konsantrasyon ve döngü sayısı) yapılmış ve optimum HAuCl_4 konsantrasyonu 6 mM, döngü sayısı 15 n olarak belirlenmiştir. Yapılan karakterizasyonların sonuçlarına göre SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin başarılı bir şekilde hazırlandığı kanıtlanmıştır. HE4 immunosensörlerinin hazırlanmasında ikinci olarak Anti-HE4, SPCE/MXene-COOH/AuNP'lerin yüzeyine immobilize edilmiştir. AuNP yüzeyinde 6-MHA ile SAM tabakaları oluşturulmuş, ardından çapraz bağlayıcı (EDC-NHS) ile yüzey aktive edilmiş ve sonuç olarak Anti-HE4'ler elektrotların yüzeyine

kovalent olarak immobilize edilmiştir. Hazırlanan HE4 immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonları CV, DPV ve EIS metotlarıyla yapılmıştır ve yapılan elektrokimyasal karakterizasyonların sonuçlarına göre HE4 immunosensörleri başarıyla hazırlanmıştır. HE4 immunosensörlerin optimum çalışma koşulları (antikor konsantrasyonu, antikör ve antijen inkübasyon süreleri) DropStat ile DPV metodu kullanılarak belirlenmiştir. Optimum Anti-HE4 konsantrasyonu 10 nM, optimum Anti-HE4 inkübasyon süresi 45 dk ve optimum HE4 inkübasyon süresi ise 30 dk olarak belirlenmiştir. Optimum çalışma koşulları belirlendikten sonra HE4 immunosensörlerinin analitik performans çalışmaları gerçekleştirilmiştir. HE4 immunosensörleri ile doğrusal konsantrasyon aralıklarında DropStat ile DPV metodu ile HE4'ün elektrokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. HE4 immünsensörleri için duyarlık, LOD ve r değerleri hesaplanmıştır. DPV metodu ile 5-250 pM konsantrasyon aralığı için HE4 immunosensörlerinin tespit limiti 0,34 pM olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan HE4 immunosensörlerinin tekrarlanabilirlikleri 50 pM HE4 konsantrasyonunda test edilmiş ve RSD değerleri hesaplanmıştır. HE4 immunosensörlerinin tekrarlanabilirliği 7 tekrara kadar (RSD:%3,38) cevap vermiştir. Geliştirilen HE4 immunosensörlerinin uygulama kararlılıkları 60 gün boyunca incelenmiş, tek kullanımlık olarak hazırlanan immunosensörlerin analizinde 60. günde dahi HE4 antijenlerine cevap verdiği gözlenmiştir. HE4 immunosensörlerinin depolama kararlılıkları ise 24 hafta depolama süresince incelenmiş ve immunosensörlerin analizinde 24. hafta depolama süresi sonunda dahi HE4 antijenine cevap vermiştir. Hazırlanan HE4 immunosensörlerinin seçicilik testleri CA125 ve AFP varlığında karışımı varlığında gerçekleştirilmiş ve HE4 immunosensörlerinin HE4 antijenine karşı yüksek seçicilik gösterdiği gözlenmiştir. HE4 immunosensörlerinin rejenerasyon testleri yapılmış ve üçüncü rejenerasyon sayısında dahi HE4 immunosensörleri, HE4 antijenine yanıt vermiştir. Geliştirilen HE4 immunosensörleri DropStat ile pM cinsinden bilinen miktarda HE4 içeren insan kan serumu numunelerindeki HE4 analizlerinde kullanılmış ve %95'in üstünde geri kazanım elde edilmiştir. Dropstat ekranından HE4 seviyeleri doğrudan pM olarak okunmaktadır. Yumurtalık kanserinin erken teşhisi için geliştirilen HE4 immunosensörleri DropStat ile 20-30 saniyede pM seviyelerindeki HE4'ü kolaylıkla tayin edilebilmektedir. Bu tez kapsamında hızlı, pratik, tek kullanımlık, etiketsiz HE4 immunosensörleri geliştirilmiştir ve kan serumunda HE4 seviyeleri pM olarak ölçülmüştür. Kan numunelerinde HE4

analizinde kullanılması; gelecekte hedeflenen başka kanser biyobelirteçlerinin tespitinde daha hassas ve daha seçici immunosensörlerin geliştirilebileceğine işaret etmektedir. Tez kapsamında DropStat ile HE4 immunosensörleri geliştirilmiş ve POCT olarak kullanılmaya adaydır.

AFP immunosensörlerin hazırlanmasında ilk olarak dönüştürücü kısım olan SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'ler hazırlanmıştır. Bu elektrotların morfolojik karakterizasyonları SEM/EDX analizleri ile, kimyasal analizleri FTIR ve XRD ile ve elektrokimyasal karakterizasyonları CV, DPV ve EIS metotları kullanılarak yapılmıştır. SPCE/MWCNT'lerin optimum MWCNT-COOH miktarı 3 LBL, SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}'lerin optimum döngü sayısı 20 n olarak bulunmuştur. Yapılan karakterizasyonların sonuçlarına göre SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lerin başarılı bir şekilde hazırlandığı kanıtlanmıştır. İmmunosensörlerin hazırlanmasında ikinci olarak Anti-AFP, SPCE/MWCNT-COOH/PAA_{DES}/AuNP'lerin yüzeyine immobilize edilmiştir. AuNP yüzeyinde 6-MOH ve APTES ile SAM tabakaları oluşturulmuş, ardından çapraz bağlayıcı ile yüzey aktive edilmiş ve sonuç olarak Anti-AFP'ler elektrotların yüzeyine kovalent olarak (GA) immobilize edilmiştir. Hazırlanan AFP immunosensörlerinin elektrokimyasal karakterizasyonları CV, DPV ve EIS metotlarıyla yapılmıştır ve yapılan elektrokimyasal karakterizasyonların sonuçlarına göre AFP immunosensörleri başarıyla hazırlanmıştır. Hazırlanan AFP immunosensörlerinin optimum çalışma koşulları (antikor konsantrasyonu, antikör ve antijen inkübasyon süreleri) DPV metodu kullanılarak belirlenmiştir. Optimum Anti-AFP konsantrasyonu 5 µg mL⁻¹ olarak, optimum Anti-AFP inkübasyon süresi 60 dk ve optimum AFP inkübasyon süresi ise 15 dk olarak belirlenmiştir. AFP immunosensörleri ile doğrusal konsantrasyon aralıklarında DPV metodu ile AFP'nin elektrokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. AFP immünsensörleri için duyarlık, LOD ve r değerleri hesaplanmıştır. Hazırlanan immunosensörlerinin tekrarlanabilirlikleri 25 ng mL⁻¹ AFP konsantrasyonlarında test edilmiş ve RSD değerleri hesaplanmıştır. AFP immunosensörlerinin tekrarlanabilirliği 5 tekrara kadar (RSD:%4,80) cevap vermiştir. Geliştirilen AFP immunosensörlerinin uygulama kararlılıkları 60 gün boyunca incelenmiş, tek kullanımlık olarak hazırlanan immunosensörlerin analizinde 60. günde dahi AFP antijenlerine cevap verdiği gözlenmiştir. AFP immunosensörlerinin depolama

kararlılıkları ise 24 hafta depolama süresince incelenmiş ve immunosensörlerin analizinde 24. hafta depolama süresi sonunda dahi AFP antijenine cevap vermiştir. Hazırlanan AFP immunosensörlerinin seçicilik testleri HE4 ve CA125 varlığında gerçekleştirilmiş ve AFP immunosensörlerinin AFP antijenine karşı yüksek seçicilik gösterdiği gözlenmiştir. AFP immunosensörlerinin rejenerasyon testleri de yapılmış ve ikinci rejenerasyon sayısında AFP immunosensörlerinin, AFP antijenine yanıt verdiği görülmüştür. Geliştirilen AFP immunosensörleri bilinen miktarda AFP içeren insan kan serumu numunelerindeki AFP analizlerinde kullanılmış ve %97'nin üstünde geri kazanım elde edilmiştir. Bu tez kapsamında hızlı, pratik, tek kullanımlık, etiketsiz AFP immunosensörleri geliştirilmiştir ve kan serumunda AFP seviyeleri DPV metodu ile ölçülmüştür. Geliştirilen AFP immunosensörleri gelecekte hedeflenen başka kanser biyobelirteçlerinin tespitinde daha hassas ve daha seçici immunosensörlerin geliştirilebileceğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında yumurtalık kanserinin erken teşhisi için, hızlı, pratik ve etiketsiz CA125, HE4 ve AFP immunosensörleri başarı ile geliştirilmiştir. Kullan-at olarak hazırlanan bu immunosensörler POCT'de kullanıma adaydır.

BAP ve 1002-A projeleri ile desteklenen bu tez kapsamında elde edilen bulgulardan yararlanılarak SCIE indeksleri tarafından taranan dergilerde 1 adet özgün araştırma makalesi yayınlanmıştır. Uluslararası kongrelerde 4 adet özet bildiri sözel olarak, 1 adet özet bildiri poster olarak sunulmuştur. Doktora tez konusunu kapsayan bilim alanı ile ilgili SCIE indeksleri tarafından taranan dergilerde 10 adet makale, TR Dizin kapsamında hakemli dergilerde 2 adet özgün araştırma makalesi yayınlanmıştır. Doktora tez konusunu kapsayan bilim alanı ile ilgili uluslararası kongrelerde 24 adet özet bildiri (15 sözel sunum ve 9 poster sunum) olarak, ulusal kongrelerde 8 adet özet bildiri (8 sözel sunum) olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Arora, T., Mullangi, S., & Lekkala, M. R. 2021. Ovarian cancer.
- Arrechea, S., Guerrero-Gutiérrez, E. M., Velásquez, L., Cardona, J., Posadas, R., Callejas, K., & García, E. 2020. Effect of additions of multiwall carbon nanotubes (MWCNT, MWCNT-COOH and MWCNT-Thiazol) in mechanical compression properties of a cement-based material. *Materialia*, 11, 100739.
- Arya, S. K., & Estrela, P. 2018. Recent advances in enhancement strategies for electrochemical ELISA-based immunoassays for cancer biomarker detection. *Sensors*, 18(7), 2010.
- Atici, T., Kamaç, M. B., Yilmaz, M., & Kabaca, A. Y. 2023. Zinc oxide nanorod/polymethylene blue (deep eutectic solvent)/gold nanoparticles modified electrode for electrochemical determination of serotonin (5-HT). *Electrochimica Acta*, 458, 142484.
- Ban, D., Housley, S. N., Matyunina, L. V., McDonald, L. D., Bae-Jump, V. L., Benigno, B. B., & McDonald, J. F. 2024. A personalized probabilistic approach to ovarian cancer diagnostics. *Gynecologic oncology*, 182, 168-175.
- Bard, A. J., Faulkner, L. R., & White, H. S. 2022. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.
- Behrouzi, R., Barr, C. E., & Crosbie, E. J. 2021. HE4 as a Biomarker for Endometrial Cancer. *Cancers*, 13(19), 4764.
- Bilgi, M., & Ayranci, E. 2016. Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 237, 849-855.
- Bilgi Kamaç, M., Altun, M., Yılmaz, M., Yılmaz Aktan, A., Aktan, S., & Sezgintürk, M. K. 2023a. Point-of-care testing: a disposable label-free electrochemical CA125 and HE4 immunosensors for early detection of ovarian cancer. *Biomedical Microdevices*, 25(2), 18.
- Bilgi Kamaç, M., Altun, M., Yılmaz, M., & Sezgintürk, M. K. 2023b. A label-free dual immunosensor for the simultaneous electrochemical determination of CA125 and HE4 biomarkers for the early diagnosis of ovarian cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(9), 1709-1718.

- Brett, C. M. 2024. Perspectives for the use of deep eutectic solvents in the preparation of electrochemical sensors and biosensors. *Current Opinion in Electrochemistry*, 101465.
- Cadkova, M., Kovarova, A., Dvorakova, V., Metelka, R., Bilkova, Z., & Korecka, L. 2018. Electrochemical quantum dots-based magneto-immunoassay for detection of HE4 protein on metal film-modified screen-printed carbon electrodes, *Talanta*, 182, 111-115.
- Cate, D. M., Adkins, J. A., Mettakoonpitak, J., & Henry, C. S. 2015. Recent developments in paper-based microfluidic devices. *Analytical chemistry*, 87(1), 19-41.
- Chakkarapani, L. D., & Brandl, M. 2021. Highly Sensitive Electrochemical Detection of Tyramine Using a Poly (Toluidine Blue)-Modified Carbon Screen-Printed Electrode. *IEEE Sensors Journal*, 22(4): 2974-2983.
- Chang, Z., Zhao, Q., Yao, B., & Han, L. 2024. Ultrasensitive Label-Free Electrochemical Immunosensor for Carbohydrate Antigen-125 (CA125) Employing Cu (II)-Polyethyleneimine (PEI)/Silica Nanoparticle@ Overoxidized Polypyrrole (OPPy)/Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWNTs) Hybrid Nanomaterial. *Analytical Letters*, 1-19.
- Charkhchi, P., Cybulski, C., Gronwald, J., Wong, F. O., Narod, S. A., & Akbari, M. R. 2020. CA125 and ovarian cancer: a comprehensive review. *Cancers*, 12(12), 3730.
- Chen, K., Xue, J., Zhou, Q., Zhang, Y., Zhang, M., Zhang, Y., & Shen, Y. 2020. Coupling metal-organic framework nanosphere and nanobody for boosted photoelectrochemical immunoassay of Human Epididymis Protein 4, *Analytica Chimica Acta*, 1107, 145-154.
- Chu, W., Chen, Y., Liu, W., Zhao, M., & Li, H. 2017. Based chemiluminescence immunodevice with temporal controls of reagent transport technique. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 250, 324-332.
- Cui, F., Zhou, Z., & Zhou, H. S. 2019. Measurement and analysis of cancer biomarkers based on electrochemical biosensors. *Journal of The Electrochemical Society*, 167(3), 037525.
- de Castro, A. C. H., Alves, L. M., Siquieroli, A. C. S., Madurro, J. M., & Brito-Madurro, A. G. 2020. Label-free electrochemical immunosensor for detection of oncomarker CA125 in serum. *Microchemical Journal*, 155, 104746.

- De La Franier, B., & Thompson, M. 2019. Early stage detection and screening of ovarian cancer: A research opportunity and significant challenge for biosensor technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 135, 71-81.
- Degez, M., Caillon, H., Chauviré-Drouard, A., Leroy, M., Lair, D., Winer, N., & Dochez, V. 2021. Endometrial cancer: A systematic review of HE4, REM and REM-B. *Clinica Chimica Acta*, 515, 27-36.
- Divya, V., Pavar, S. K., Shilpa Chakra, C., Rakesh Kumar, T., Shireesha, K., & Madhuri, S. 2021. Applications of carbon-based nanomaterials in health and environment: biosensors, medicine and water treatment. In *Carbon Nanomaterial Electronics: Devices and Applications* (pp. 261-284). Singapore: Springer Singapore.
- Erdem, K., & Kamaç, M. B. 2021. Kanser Biyobelirteci Alfa-Fetoprotein'in Elektrokimyasal Tayini İçin Tek Kullanımlık Etiketsiz Yeni AFP İmmünosensörünün Geliştirilmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(2), 1279-1292.
- Esokkiya, A., Sudalaimani, S., Sanjeev Kumar, K., Sampathkumar, P., Suresh, C., & Giribabu, K. 2021. Poly (methylene blue)-based electrochemical platform for label-free sensing of acrylamide. *ACS Omega*, 6(14): 9528-9536.
- Fan, L., Yan, Y., Guo, B., Zhao, M., Li, J., Bian, X., & Ding, S. 2019. Trimetallic hybrid nanodendrites and magnetic nanocomposites-based electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of serum human epididymis protein 4, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 296, 126697.
- Farzin, L., & Shamsipur, M. 2018. Recent advances in design of electrochemical affinity biosensors for low level detection of cancer protein biomarkers using nanomaterial-assisted signal enhancement strategies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 185-210.
- Ferraro, S., Panzeri, A., Braga, F., & Panteghini, M. 2019. Serum α -fetoprotein in pediatric oncology: not a children's tale. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 57(6), 783-797.
- Foroozandeh, A., Pourmadadi, M., SalarAmoli, H., & Abdouss, M. 2024. Aptamer-enabled electrochemical bioplatfrom utilizing surface-modified g-C₃N₄/MoS₂/PANI nanocomposite for detection of CA125 biomarker. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 45, 100669.

- Fowler, J. M., Wong, D. K., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. 2008. Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors. *Electrochemical Sensors, Biosensors And Their Biomedical Applications*, 115-143.
- Ghose, A., McCann, L., Makker, S., Mukherjee, U., Gullapalli, S. V. N., Erekkath, J., & Boussios, S. 2024. Diagnostic biomarkers in ovarian cancer: advances beyond CA125 and HE4. *Therapeutic Advances In Medical Oncology*, 16, 17588359241233225.
- Gug, I. T., Tertis, M., Hosu, O., & Cristea, C. 2019. Salivary biomarkers detection: Analytical and immunological methods overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 113, 301-316.
- Guo, J., Wang, J., Wang, Z., Li, S., & Wang, J. 2022. The development of high sensitive alpha-fetoprotein immune-electrochemical detection method using an excellent conductivity 3D-CuFC-C nanocrystals synthesized by solution-grown at room temperature. *Biosensors and Bioelectronics*, 218, 114766.
- Haji-Hashemi, H., Safarnejad, M. R., Norouzi, P., Ebrahimi, M., Shahmirzaie, M., & Ganjali, M. R. 2019. Simple and effective label free electrochemical immunosensor for Fig mosaic virus detection. *Analytical Biochemistry*, 566, 102-106.
- Hamd-Ghadareh, S., Salimi, A., Fathi, F., & Bahrami, S. 2017. An amplified comparative fluorescence resonance energy transfer immunosensing of CA125 tumor marker and ovarian cancer cells using green and economic carbon dots for bio-applications in labeling, imaging and sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 96, 308-316.
- Hamid, M. A., & Khan, N. A. 2020. Investigation and classification of MRI brain tumors using feature extraction technique. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 40, 307-317.
- Han, C., Chen, R., Wu, X., Shi, N., Duan, T., Xu, K., & Huang, T. 2021. Fluorescence turn-on immunosensing of HE4 biomarker and ovarian cancer cells based on target-triggered metal-enhanced fluorescence of carbon dots, *Analytica Chimica Acta*, 1187, 339160.
- Han, S. S., Kim, M. S., Lim, W., Park, G. H., Park, I., & Chang, S. E. 2018. Classification of the clinical images for benign and malignant cutaneous tumors using a deep learning algorithm. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(7), 1529-1538.

- Heiat, M., & Negahdary, M. 2019. Sensitive diagnosis of alpha-fetoprotein by a label free nanoaptasensor designed by modified Au electrode with spindle-shaped gold nanostructure. *Microchemical Journal*, 148, 456-466.
- Holmes, J., Pathirathna, P., & Hashemi, P. 2019. Novel frontiers in voltammetric trace metal analysis: Towards real time, on-site, in situ measurements. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 111, 206-219.
- Hosseinzadeh, M., Salmani, S., & Ara, M. M. 2019. Interferometric optical testing to discriminate benign and malignant brain tumors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 199, 111590.
- Hosu, O., Bârsan, M. M., Cristea, C., Săndulescu, R., & Brett, C. M. 2017. Nanostructured electropolymerized poly (methylene blue) films from deep eutectic solvents. Optimization and characterization. *Electrochimica Acta*, 232: 285-295.
- Hu, J., Wang, S., Wang, L., Li, F., Pingguan-Murphy, B., Lu, T. J., & Xu, F. 2014. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 585-597.
- Jimenez, A., Armada, M. P. G., Losada, J., Villena, C., Alonso, B., Casado, C. M. 2014. Amperometric biosensors for NADH based on hyperbranched dendritic ferrocene polymers and Pt nanoparticles, *Sens. Actuators B: Chem.* 190 2014 111-119.
- Karaboğa, M. N. S., & Sezgintürk, M. K. 2021. A nano-composite based regenerative neuro biosensor sensitive to Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 in cerebrospinal fluid and saliva. *Bioelectrochemistry*, 138, 107734.
- Kałużna-Czaplińska, J., & Jóźwik, J. 2014. Current applications of chromatographic methods for diagnosis and identification of potential biomarkers in cancer. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 56, 1-12.
- Kıymaz Onat, E., Bilgi Kamaç, M., & Yılmaz, M. 2023. A disposable non-enzymatic dual sensor for simultaneous amperometric determination of NADH and H₂O₂. *Journal of Applied Electrochemistry*, 53(11), 2213-2227.
- Kilimci, U., Öndeş, B., Sunna, Ç., Uygun, M., & Uygun, D. A. 2024. Development of label-free immunosensors based on AuNPs-fullerene nanocomposites for the determination of cancer antigen 125. *Bioelectrochemistry*, 108863.

- Klug, T. L., Bast Jr, R. C., Niloff, J. M., Knapp, R. C., & Zurawski Jr, V. R. 1984. Monoclonal antibody immunoradiometric assay for an antigenic determinant (CA 125) associated with human epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Research*, 44(3), 1048-1053.
- Krathumkhet, N., Imae, T., Wang, F. M., Yuan, C. C., Gaol, J. M. L., & Paradee, N. 2023. Electrochemical immunosensing by carbon ink/carbon dot/ZnO-labeled-Ag@ polypyrrole composite biomarker for CA-125 ovarian cancer detection. *Bioelectrochemistry*, 152, 108430.
- Kumar, S., Sidhu, H. K., Paul, A. K., Bhardwaj, N., Thakur, N. S., & Deep, A. 2023. Bioengineered multi-walled carbon nanotube (MWCNT) based biosensors and applications thereof. *Sensors & Diagnostics*, 2(6), 1390-1413.
- Li, K., Zou, G., Jiao, T., Xing, R., Zhang, L., Zhou, J., & Peng, Q. 2018. Self-assembled MXene-based nanocomposites via layer-by-layer strategy for elevated adsorption capacities, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 553, 105-113.
- Li, L., Liu, X., Su, B., Zhang, H., Li, R., Liu, Z., & Cao, H. 2022. An innovative electrochemical immunosensor based on nanobody heptamer and AuNPs@ ZIF-8 nanocomposites as support for the detection of alpha fetoprotein in serum. *Microchemical Journal*, 179, 107463.
- Li, Z., Li, H., Deng, D., Liu, R., & Lv, Y. 2020. Mass spectrometric assay of alpha-fetoprotein isoforms for accurate serological evaluation. *Analytical Chemistry*, 92(7), 4807-4813.
- Liu, J., Zhao, J., Li, S., Zhang, L., Huang, Y., & Zhao, S. 2017. A novel microchip electrophoresis-based chemiluminescence immunoassay for the detection of alpha-fetoprotein in human serum. *Talanta*, 165, 107-111.
- Liu, L., & Shah, K. 2022. The potential of the gut microbiome to reshape the cancer therapy paradigm: A review. *JAMA Oncology*, 8(7), 1059-1067.
- Liu, T., Luo, Y., Zhu, J., Kong, L., Wang, W., & Tan, L. 2016. Non-enzymatic detection of glucose using poly (azure A)-nickel modified glassy carbon electrode. *Talanta*, 156, 134-140.

- Lu, D., Xu, Q., Pang, G., & Lu, F. 2018. A novel electrochemical immunosensor based on Au nanoparticles and horseradish peroxidase signal amplification for ultrasensitive detection of α -fetoprotein. *Biomedical Microdevices*, 20, 1-11.
- Lubes, G., & Goodarzi, M. 2018. GC–MS based metabolomics used for the identification of cancer volatile organic compounds as biomarkers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 313-322.
- Lv, Y., Wang, F., Zhu, H., Zou, X., Tao, C. A., & Wang, J. 2016. Electrochemically reduced graphene oxide-nafion/Au nanoparticle modified electrode for hydrogen peroxide sensing. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 6: 30.
- Ma, X., Shi, Y., Gao, G., Zhang, H., Zhao, Q., & Zhi, J. 2023. Application and progress of electrochemical biosensors for the detection of pathogenic viruses. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 117867.
- Ma, Y., Zhang, T., & Zhang, Y. 2024. A sandwich electrochemical immunosensor based on polypyrrole microspheres for the detection of the cancer marker CA125. *Analytical Methods*.
- Marrazza, G., Ramalingam, M., Jaisankar, A., Cheng, L., Selvolini, G., & Vitale, I. A. 2024. Advancements and emerging technologies in biosensors for rapid and accurate virus detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 117609.
- Mohammadniaei, M., Koyappayil, A., Sun, Y., Min, J., & Lee, M. H. 2020. Gold nanoparticle/MXene for multiple and sensitive detection of oncomiRs based on synergetic signal amplification, *Biosensors and Bioelectronics*, 159, 112208.
- Mollarasouli, F., Kurbanoglu, S., & Ozkan, S. A. 2019. The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. *Biosensors*, 9(3), 86.
- Mu, W., Wu, C., Wu, F., Gao, H., Ren, X., Feng, J., & Pan, H. 2024. Ultrasensitive and label-free electrochemical immunosensor for the detection of the ovarian cancer biomarker CA125 based on CuCo-ONSs@ AuNPs nanocomposites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 243, 116080.
- Nagarajan, R. D., Sundaramurthy, A., & Sundramoorthy, A. K. 2022. Synthesis and characterization of MXene (Ti₃C₂Tx)/Iron oxide composite for ultrasensitive electrochemical detection of hydrogen peroxide. *Chemosphere*, 286, 131478.
- Olorundare, F. O., Sipuka, D. S., Sebokolodi, T. I., Kodama, T., Arotiba, O. A., & Nkosi, D. 2023. An electrochemical immunosensor for an alpha-fetoprotein cancer

- biomarker on a carbon black/palladium hybrid nanoparticles platform. *Analytical Methods*, 15(29), 3577-3585.
- Özcan, B., Özay, H., Özay, Ö., & Sezgentürk, M. K. 2024. Early detection of the ovarian cancer with a label-free and disposable ITO-PET based immunosensor platform. *Microchemical Journal*, 205, 111340.
- Phung, M. T., Webb, P. M., DeFazio, A., Fereday, S., Lee, A. W., Bowtell, D. D. 2023. Ovarian Cancer Association Consortium. Lifestyle and personal factors associated with having macroscopic residual disease after ovarian cancer primary cytoreductive surgery. *Gynecologic Oncology*, 168, 68-75.
- Pilvenyte, G., Ratautaite, V., Boguzaitė, R., Ramanavicius, A., Viter, R., & Ramanavicius, S. 2023. Molecularly imprinted polymers for the determination of cancer biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 4105.
- Qiao, Z., Zhang, H., Zhou, Y., & Zheng, J. 2019. C60 mediated ion pair interaction for label-free electrochemical immunosensing with nanoporous anodic alumina nanochannels, *Analytical Chemistry*, 91(8), 5125-5132.
- Qu, F., Yang, M., Chen, J., Shen, G., & Yu, R. 2006. Amperometric Biosensors for Glucose Based on Layer-by-Layer Assembled Functionalized Carbon Nanotube and Poly (Neutral Red) Multilayer Film. *Analytical Letters*, 39(9): 1785-1799.
- Qu, L., Wu, M., Zhao, L., Li, J., & Pan, H. 2023) A sandwich electrochemical immunosensor based on MXene@ dual MOFs for detection of tumor marker CA125. *Microchimica Acta*, 190(4), 147.
- Rabbani, G., Khan, M. E., Khan, A. U., Ali, S. K., Zamzami, M. A., Ahmad, A., & Zakri, W. (024) Label-free and ultrasensitive electrochemical transferrin detection biosensor based on a glassy carbon electrode and gold nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 256, 128312.
- Rai, H. M. 2024. Cancer detection and segmentation using machine learning and deep learning techniques: A review. *Multimedia Tools and Applications*, 83(9), 27001-27035.
- Rong, S., Zou, L., Li, Y., Guan, Y., Zhang, Z., Zhang, Y., & Chang, D. 2021. An ultrasensitive disposable sandwich-configuration electrochemical immunosensor based on OMC@ AuNPs composites and AuPt-MB for alpha-fetoprotein detection. *Bioelectrochemistry*, 141, 107846.

- Runprapan, N., Wang, F. M., Ramar, A., & Yuan, C. C. 2023. Role of defects of carbon nanomaterials in the detection of ovarian cancer cells in label-free electrochemical immunosensors. *Sensors*, 23(3), 1131.
- Sachdeva, S., Davis, R. W., & Saha, A. K. 2021. Microfluidic point-of-care testing: commercial landscape and future directions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 602659.
- Sangili, A., Kalyani, T., Chen, S. M., Nanda, A., & Jana, S. K. 2020. Label-free electrochemical immunosensor based on one-step electrochemical deposition of AuNP-RGO nanocomposites for detection of endometriosis marker CA 125. *ACS Applied Bio Materials*, 3(11), 7620-7630.
- Scholler, N., Crawford, M., Sato, A., Drescher, C. W., O'Briant, K. C., Kiviat, N., & Urban, N. 2006. Bead-based ELISA for validation of ovarian cancer early detection markers. *Clinical Cancer Research*, 12(7), 2117-2124.
- Shan, C. W., Chen, Z., Han, G. C., Feng, X. Z., & Kraatz, H. B. 2024. Electrochemical immuno-biosensors for the detection of the tumor marker alpha-fetoprotein: A review. *Talanta*, 271, 125638.
- Shi, P., Xie, R., Wang, P., Lei, Y., Chen, B., Li, S., & Yao, H. 2020. Non-covalent modification of glassy carbon electrode with isoorientin and application to alpha-fetoprotein detection by fabricating an immunosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 305, 127494.
- Singh, A. T., Lantigua, D., Meka, A., Taing, S., Pandher, M., & Camci-Unal, G. 2018. based sensors: Emerging themes and applications. *Sensors*, 18(9), 2838.
- Stan, D., Mirica, A. C., Iosub, R., Stan, D., Mincu, N. B., Gheorghe, M., & Bocancia Mateescu, A. L. 2022. What is the optimal method for cleaning screen-printed electrodes?. *Processes*, 10(4), 723.
- Steglich, P., Lecci, G., & Mai, A. 2022. Surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy and photonic integrated circuit (PIC) biosensors: A comparative review. *Sensors*, 22(8), 2901.
- Sun, T., Xu, Z., Yuan, S., Liu, X., Chen, Z., Han, Z., & Ning, B. 2022. A gold nanoparticle-based lateral flow immunoassay for atrazine point-of-care detection using a handheld scanning device as reader, *Microchimica Acta*, 189(4), 153.

- Surinova, S., Schiess, R., Hüttenhain, R., Cerciello, F., Wollscheid, B., & Aebersold, R. 2011. On the development of plasma protein biomarkers. *Journal of Proteome Research*, 10(1), 5-16.
- Szymanska, B., Lukaszewski, Z., Zelazowska-Rutkowska, B., Hermanowicz-Szamatowicz, K., & Gorodkiewicz, E. 2021. An SPRi Biosensor for Determination of the Ovarian Cancer Marker HE4 in Human Plasma, *Sensors*, 21(10), 3567.
- Şahin, M., & Ayranci, E. 2015. Electrooxidation of NADH on modified screen-printed electrodes: effects of conducting polymer and nanomaterials. *Electrochimica Acta*, 166, 261-270.
- Şimşek, Ç. S., Karaboğa, M. N. S., & Sezgintürk, M. K. 2015. A new immobilization procedure for development of an electrochemical immunosensor for parathyroid hormone detection based on gold electrodes modified with 6-mercaptophexanol and silane. *Talanta*, 144, 210-218.
- URL 1: <https://cancerquest.org/node/6307> Aralık 2024
- URL 2: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WFDC2> Aralık 2024
- URL 3: <https://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-fetoprotein> Aralık 2024
- URL 4: <https://tr.wikipedia.org/wiki/ELISA> Aralık 2024
- URL 5: <https://www.gamry.com/application-notes/EIS/basics-of-electrochemical-impedance-spectroscopy/> Aralık 2024
- URL 6: https://www.dropsens.com/en/pdfs_productos/new_brochures/stat400.pdf Aralık 2024
- URL 7: https://www.metrohm.com/tr_tr/products/cac/cac.html Aralık 2024
- URL 8: <https://www.gamry.com/potentiostats/interface-1010e-potentiostat/> Aralık 2024
- URL 9: <https://metrohm-dropsens.com/products/connectors/cable-connectors/cable-connector-for-screen-printed-el> Aralık 2024
- URL 10: https://www.dropsens.com/en/pdfs_productos/new_brochures/dropstat.pdf Aralık 2024
- Vitale, I., Shema, E., Loi, S., & Galluzzi, L. 2021. Intratumoral heterogeneity in cancer progression and response to immunotherapy. *Nature Medicine*, 27(2), 212-224.
- Vural, B., Çalışkan, M., Bilgi Kamaç, M., & Sezgintürk, M. K. 2024. A disposable and ultrasensitive immunosensor for the detection of HE4 in human serum samples, *Chemical Papers*, 1-12.

- Wahyuni, W. T., Putra, B. R., Fauzi, A., Ramadhanti, D., Rohaeti, E., & Heryanto, R. 2021. A brief review on fabrication of screen-printed carbon electrode: materials and techniques. *Indonesian Journal of Chemical Research*, 8(3), 210-218.
- Wan, Y., Su, Y., Zhu, X., Liu, G., & Fan, C. 2013. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 47, 1-11.
- Wang, H. S., Li, T. H., Jia, W.L., Xu, H.Y. 2006. Highly Selective And Sensitive Determination of Dopamine Using a Nafion/Carbon Nanotubes Coated Poly(3-Methylthiophene) Modified Electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 22:664-669.
- Wang, K., Meng, X., Yan, X., & Fan, K. 2024. Nanozyme-based point-of-care testing: Revolutionizing environmental pollutant detection with high efficiency and low cost. *Nano Today*, 54, 102145.
- Wang, M., Jiang, M., Li, P., Yuan, M., Zhao, C., Lai, W., & Qi, Y. 2023. Construction of a competitive electrochemical immunosensor based on sacrifice of Prussian blue and its ultrasensitive detection of alpha-fetoprotein. *Analytica Chimica Acta*, 1257, 341143.
- Wei, H., Sun, J. J., Xie, Y., Lin, C. G., Wang, Y. M., Yin, W. H., & Chen, G. N. 2007. Enhanced electrochemical performance at screen-printed carbon electrodes by a new pretreating procedure. *Analytica Chimica Acta*, 588(2), 297-303.
- Wei, J. J., Wang, G. Q., Zheng, J. Y., Wang, A. J., Mei, L. P., & Feng, J. J. 2022. Dual-mode photoelectrochemical and electrochemical immunosensors for human epididymis protein 4 based on SPR-promoted Au nanoparticle/CdS nanosheet heterostructures, *ACS Applied Nano Materials*, 5(10), 14934-14941.
- Wulandari, S. A., Widiyandari, H., & Subagio, A. 2018. Synthesis and characterization carboxyl functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNT-COOH) and NH₂ functionalized multi-walled carbon nanotubes (MWCNTNH₂). In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1025, No. 1, p. 012005).
- Xie, P., Yuan, W., Liu, X., Peng, Y., Yin, Y., Li, Y., & Wu, Z. 2021. Advanced carbon nanomaterials for state-of-the-art flexible supercapacitors. *Energy Storage Materials*, 36, 56-76.

- Xu, Q., Li, J., Li, S., & Pan, H. 2012. A highly sensitive electrochemiluminescence immunosensor based on magnetic nanoparticles and its application in CA125 determination. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16, 2891-2898.
- Yaiwong, P., Anuthum, S., Sangthong, P., Jakmunee, J., Bamrungsap, S., & Ounnunkad, K. 2023. A new portable toluidine blue/aptamer complex-on-polyethyleneimine-coated gold nanoparticles-based sensor for label-free electrochemical detection of alpha-fetoprotein. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1182880.
- Yan, Q., Cao, L., Dong, H., Tan, Z., Hu, Y., Liu, Q., & Dong, Y. 2019. Label-free immunosensors based on a novel multi-amplification signal strategy of TiO₂-NGO/Au@Pd hetero-nanostructures, *Biosensors and Bioelectronics*, 127, 174-180.
- Yang, M., Wang, L., Xie, C., Lu, H., Wang, J., Li, Y., & Liu, S. 2024. A disposable ultrasensitive immunosensor based on MXene/NH₂-CNT modified screen-printed electrode for the detection of ovarian cancer antigen CA125. *Talanta*, 281, 126893.
- Yılmaz, M., & Bilgi, M. 2024. A disposable impedimetric immunosensor for the analysis of CA125 in human serum samples. *Biomedical Microdevices*, 26(1), 8.
- Zhang, M., Cheng, S., Jin, Y., Zhao, Y., & Wang, Y. 2021. Roles of CA125 in diagnosis, prediction, and oncogenesis of ovarian cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1875(2), 188503.
- Zhang, S., Chen, X., Hu, S., Cai, K., Peng, C., Luo, L., & Mei, Y. 2024. Electrochemical immunosensor based on PtNPs/MoS₂@ rGO composite for the detection of alpha-fetoprotein in human serum. *Microchimica Acta*, 191(11), 662.
- Zhang, Y., Chen, S., Sun, X., Jing, H., & Zhou, X. 2023. Electrochemical biosensors for the non-invasive diagnosis of breast cancer. *Electrochimica Acta*, 143190.
- Zhang, Z., Zhang, M., Wu, X. Y., Chang, Z., Lee, Y. I., Huy, B. T., & Jiang, G. B. 2016. Upconversion fluorescence resonance energy transfer—a novel approach for sensitive detection of fluoroquinolones in water samples. *Microchemical Journal*, 124, 181-187.
- Zhou, J., Pan, K., Qu, G., Ji, W., Ning, P., Tang, H., & Xie, R. 2022. rGO/MWCNTs-COOH 3D hybrid network as a high-performance electrochemical sensing platform of screen-printed carbon electrodes with an ultra-wide detection range of Cd (II) and Pb (II). *Chemical Engineering Journal*, 449, 137853.

Zhu, X., Dai, Y., Sun, Y., Liu, H., Sun, W., Lin, Y., & Luo, C. 2020. Rapid fabrication of electrode for the detection of alpha fetoprotein based on MnO₂ functionalized mesoporous carbon hollow sphere. *Materials Science and Engineering: C*, 107, 110206.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Merve YILMAZ ÇILÇAR

Eğitim

Doktora	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı	2019-2025
Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı	2014-2018
Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2010-2014

İş Deneyimi

Yıl	Kurum	Görev
-		

Akademik Aktiviteler

MAKALELER

A. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler (Science Citation Expanded Index)

1. Doker, S., & Yılmaz, M., (2018) Speciation of Arsenic in Spring, Well, and Tap Water by High-performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, **Analytical Letters**, 51(1-2) 254-264., Doi: 10.1080/00032719.2017.1297453. (2018, Q3 yayını)
2. Bilgi Kamaç, M., Kıymaz Onat, E., Yılmaz, M., (2020), “A novel non-enzymatic amperometric H₂O₂ sensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polyneutralred and gold nanoparticles”, **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 100(4), 408-418., Doi: 10.1080/03067319.2019.1700975. (2020, Q4 yayını)
3. Bilgi Kamaç, M., Kıymaz Onat, E., Yılmaz, M., (2020), “A new disposable amperometric NADH sensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide/polyneutral red/gold nanoparticle. **International**

Journal of Environmental Analytical Chemistry, 100(4), 419-431., Doi: 10.1080/03067319.2019.1703965. (2020, Q4 yayını)

4. Altun, M, Bilgi Kamaç, M., Bilgi, A., **Yılmaz, M., (2020)**, “Dopamine biosensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polyneutral red and gold nanoparticle” *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 100(4), 451-467., (2020, Q4 yayını)
5. Kıymaz Onat, E., Bilgi Kamaç, M., & **Yılmaz, M.** (2023). A disposable non-enzymatic dual sensor for simultaneous amperometric determination of NADH and H₂O₂. *Journal of Applied Electrochemistry*, 1-15. (2023- Q3 yayını)
6. Bilgi Kamaç, M., Altun, **M., Yılmaz, M., & Sezgintürk, M. K.** (2023). A label-free dual immunosensor for the simultaneous electrochemical determination of CA125 and HE4 biomarkers for the early diagnosis of ovarian cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(9), 1709-1718. (2023- Q1 yayını)
7. Bilgi Kamaç, M., Altun, **M., Yılmaz, M., Yılmaz Aktan, A., Aktan, S., & Sezgintürk, M. K.** (2023). Point-of-care testing: a disposable label-free electrochemical CA125 and HE4 immunosensors for early detection of ovarian cancer. *Biomedical Microdevices*, 25(2), 18. (2023- Q3 yayını)
8. Atıcı, T., Kamaç, M. B., **Yılmaz, M., & Kabaca, A. Y.** (2023). Zinc oxide nanorod/polymethylene blue (deep eutectic solvent)/gold nanoparticles modified electrode for electrochemical determination of serotonin (5-HT). *Electrochimica Acta*, 458, 142484. (2023 - Q1 yayını)
9. Kabaca, A. Y., Kamaç, M. B., **Yılmaz, M., & Atıcı, T.** (2023). Ultra-sensitive electrochemical sensors for simultaneous determination of dopamine and serotonin based on titanium oxide-gold nanoparticles-poly Nile blue (in deep eutectic solvent). *Electrochimica Acta*, 467, 143046. (2023 - Q1 yayını)
10. A disposable impedimetric immunosensor for the analysis of CA125 in human serum samples. *Biomedical Microdevices* (2024 – Q3 yayını)

B. Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler (ULAKBİM TR Dizin)

1. Bilgi Kamaç, M., Altun, M., **Yılmaz, M., (2021)**, “Dopamin, NADH ve Askorbik Asitin Elektroyükseltgenmesine Elektrokimyasal Olarak İndirgenmiş Grafen Oksit, Politiyonin ve Altın Nanopartiküllerin Etkisi, **BŞEÜ Fen Bilimleri Dergisi**, 8(1), 8-23, 2021.
2. Atıcı, T., Yılmaz Kabaca, A., **Yılmaz, M., Bilgi Kamaç, M. (2022)**, ‘Serotoninin Elektroyükseltgenmesine Polidopamin ve Polikatekolün Etkilerinin İncelenmesi, Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 1 (1), 28-41, 2022.

C. BİLDİRİLER

A. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiriler

1. Bilgi, M., Yılmaz Kabaca, A., **Yılmaz Çılçar, M.**, Altun, M., Sezgintürk, M.K., (2024), A disposable label-free electrochemical SMRP immunosensor, Sözlü Sunum, 6th International Congress on Biosensors, 05 Eylül 2024, 07 Eylül 2024
2. Yılmaz Kabaca, A., Bilgi, M., **Yılmaz Çılçar, M.**, Altun, M., Sezgintürk, M.K., (2024), A label-free electrochemical FOLR1 immunosensor prepare using a hand-made disposable electrode, Sözlü Sunum, 6th International Congress on Biosensors, 05 Eylül 2024, 07 Eylül 2024
3. **Yılmaz Çılçar, M.** & Bilgi, M., (2024), Point-of-care testing: A disposable electrochemical HE4 immunosensor, Sözlü Sunum, 6th International Congress on Biosensors, 05 Eylül 2024, 07 Eylül 2024
4. Bilgi, M., Altun, M., **Yılmaz, M.**, Aktan, S. & Sezgintürk, M. K., (2022), Point of Care Test for Cancer Antigen 125, Özet Bildiri, 4th Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (EBAT), 03 Kasım 2022, 06 Kasım 2022.
5. Bilgi, M., Altun, M., **Yılmaz, M.**, Yılmaz Aktan, A. & Sezgintürk, M. K., (2022), Point of Care Test for Ovarian Cancer Biomarker HE4, Özet Bildiri, 4th Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress (EBAT), 03 Kasım 2022, 06 Kasım 2022.
6. **Yılmaz M.**, & Bilgi Kamaç, M., (2022), A disposable label-free electrochemical CA125 immunosensor for diagnosis of ovarian cancer, Oral Presentation , 5th International Congress on Biosensors, 21 Eylül 2022, 23 Eylül 2022 (Sözlü Sunum).
7. Atıcı, T., **Yılmaz M.**, Bilgi Kamaç, M., & Yılmaz Kabaca, (2022), A. Electrochemical determination of serotonin with zinc oxide nanorod, poly (methylene blue)/deep eutectic solvent and gold nanoparticles modified SPCE, Oral Presentation , 5th International Congress on Biosensors, 21 Eylül 2022, 23 Eylül 2022.
8. **Yılmaz M.**, & Bilgi Kamaç, M., (2022), Preparation, Morphological And Electrochemical Characterizations Of Poly(Azur A)-Deep Eutectic Solvent/Gold Nanoparticle Modified Screen-Printed Carbon Electrode, Oral Presentation , 1st International Karatekin Science and Technology Conference, 01 Eylül 2022, 03 Eylül 2022.
9. **Yılmaz M.**, & Bilgi Kamaç, M., (2022), Preparation, Morphological And Electrochemical Characterizations Of Poly(Toluidine Blue)-Deep Eutectic Solvent/Gold Nanoparticle Modified Screen-Printed Carbon Electrode, Oral

Presentation , 1st International Karatekin Science and Technology Conference, 01 Eylül 2022, 03 Eylül 2022.

10. Yılmaz Kabaca, A., **Yılmaz M.**, & Bilgi Kamaç, M., (2022), Preparation, morphologic and electrochemical characterization of TiO₂NP-AuNP-poly (Nile Blue)/deep eutectic solvent modified SPCE, Oral Presentation , 1st International Karatekin Science and Technology Conference (IKSTC1st), 01 Eylül 2022, 03 Eylül 2022.
11. Atıcı, T., **Yılmaz M.**, & Bilgi Kamaç, M., A., Yılmaz Kabaca, (2022), Preparation, morphologic and electrochemical characterization of poly (methylene blue)-deep eutectic solvent/ZnONR-AuNP modified SPCE, Oral Presentation , 1st International Karatekin Science and Technology Conference (IKSTC1st), 01 Eylül 2022, 03 Eylül 2022.
12. Bilgi Kamaç, M, Altun, M., **Yılmaz M.**, Sezgintürk, M. K., (2021), “A dual immunosensor for the simultaneous electrochemical detection of CA125 and HE4”, 3rd ICABC2021, 22-26 March 2021, / Türkiye, Online (Sözlü Sunum).
13. Bilgi Kamaç, M., Kıymaz Onat, E., **Yılmaz, M.** (2019), “NADH ve H₂O₂’nin eş zamanlı tayini için yeni elektrokimyasal biyosensör sisteminin geliştirilmesi”, 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019) 28-29 June 2019, Ankara/ Türkiye, (Sözlü Sunum).
14. Bilgi Kamaç, M., Kıymaz Onat, E., **Yılmaz, M.** (2019), “Electrooxidation of NADH on Screen-Printed Electrode Modified with Gold Nanoparticles/Polyneutralred/Reduced Graphene Oxide” 4th International Congress on Biosensor, 08-11 July 2019, Çanakkale/ Türkiye, (Sözlü Sunum).
15. Bilgi Kamaç, M, Altun, M., Yılmaz Aktan, A., **Yılmaz M.**, Sezgintürk, M. K., (2019), “Preparation and electrochemical characterization of label-free HE4 immunosensor on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polythionine and gold nanoparticles”, XX. Euroanalysis, 01-05 September 2019, İstanbul/Türkiye, (Sözlü Sunum).

B. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildiriler

1. M. Bilgi, A. Yılmaz Kabaca, **M. Yılmaz**, M. Altun & M. K. Sezgintürk, (2023), A Label-Free Electrochemical AGR2 Immunosensor Prepare Using A Hand-Made Disposable Electrode, Poster Sunumu, 33rd International Symposium On Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 02 Temmuz 2023, 06 Temmuz 2023.
2. **M. Yılmaz** & M. Bilgi, (2023), Preparation and characterization of MXene-AuNP and MXene-COOH-AuNP modified screen-printed carbon electrodes for use in biosensor, Poster Sunumu, 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 02 Temmuz 2023, 06 Temmuz 2023.

3. M. Bilgi, A. Yılmaz Kabaca, **M. Yılmaz**, M. Altun & M. K. Sezgintürk, (2023), Production and characterization of a hand-made disposable panel electrode for use in biosensor, Poster Sunumu, 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 02 Temmuz 2023, 06 Temmuz 2023.
4. A. Yılmaz Kabaca, **M. Yılmaz** & M. Bilgi, (2022), Simultaneous detection of dopamine, serotonin and ascorbic acid with (SPCE/TiO₂NP/AuNP/poly(Nile blue)-deep eutectic solvent, Poster Presentation, 5th International Congress on Biosensors, 21 Eylül 2022, 23 Eylül 2022.
5. M. Bilgi, M. Altun, **M. Yılmaz** & M. K. Sezgintürk, (2021), A dual immunosensor for the simultaneous electrochemical detection of CA125 and HE4, Özet Bildiri, 3rd International Analytical and Bioanalytical Chemistry, 22 Mart 2021, 26 Mart 2021.
6. Bilgi Kamaç, M., Kıymaz Onat, E., **Yılmaz, M.**, (2019), “Amperometric H₂O₂ biosensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polynuclearred and gold nanoparticles”, 4th International Congress on Biosensor, 08- 11 July 2019, Çanakkale/TURKEY, (Poster Sunum).
7. Altun M, Bilgi Kamaç, M., Bilgi, A., **Yılmaz, M.**, (2019), “Dopamine biosensor based on screen-printed electrode modified with nanoparticles and conducting polymer”, 4th International Congress on Biosensor, 08-11 July 2019, Çanakkale/ Türkiye, (Poster Sunum).
8. Bilgi Kamaç, M., Erdem, K., **Yılmaz, M.**, (2019), “Preparation and electrochemical characterization of label-free AFP immunosensor on screen-printed electrode modified with nanoparticles and conducting polymers”, 4th International Congress on Biosensor, 08- 11 July 2019, Çanakkale/Türkiye, (Poster Sunum).
9. Altun, M., Bilgi Kamaç, M, Aktan, S., **Yılmaz M.**, Sezgintürk, M. K., (2019), “Preparation and electrochemical characterization of label-free CA125 biosensor on screen-printed electrode modified with nanoparticles and conducting polymers”, XX. Euroanalysis, 01- 05 September 2019, İstanbul/ Türkiye, (Poster Sunum).
10. **Yılmaz, M.**, Döker, S. & Ipek, A., (2016), Selenium Enrichment in Petroselinum Crispum, Poster Sunumu, 10th Aegean Analytical Chemistry Days, 29 Eylül 2016, 02 Ekim 2016.
11. **Yılmaz, M** & Döker, S. (2016), Assessment Of Toxic Trace Element Concentrations In Ground Water Samples Collected From Çankırı, Poster Sunumu, 10th Aegean Analytical Chemistry Days, 29 Eylül 2016, 02 Ekim 2016.
12. **Yılmaz, M.**, Döker, S. & Bosgelmez, I. I., (2015), ICP-MS Multi-Element Fingerprinting Combined With Multivariate Statistical Analysis in Linden (Tilia Sp.) Samples, Poster Sunumu, Turkheltox-9th Congress of the Turkish Society of Toxicology with the participation of Hellenic Society of Toxicology, 21 Ekim 2015, 24 Ekim 2015.

C. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiriler

1. Bılketay, M., Özgür, A., Yılmaz Kabaca, A., **Yılmaz Çılçar, M.** & Bilgi, M., (2024), Dopamin Ürik Asit ve Triptofanın Eş Zamanlı Tayinine Yönelik Sensör, Sözlü Sunum, Çankırı Karatekin Üniversitesi 1. Ulusal Öğrenci Kongresi, 23 Mayıs 2024, 23 Mayıs 2024.
2. Toparlı, Ş., Terzioğlu, F., Ateş, E., Yılmaz Çılçar, M., Bilgi, M., & Yılmaz Kabaca, A., (2024), Elektrokimyasal Epinefrin Sensörleri, Sözlü Sunum, Çankırı Karatekin Üniversitesi 1. Ulusal Öğrenci Kongresi, 23 Mayıs 2024, 23 Mayıs 2024.
3. Özgür, A., Bılketay, M., Yılmaz Kabaca, A., Yılmaz Çılçar, M. & Bilgi, M., (2024), Elektrokimyasal L-Triptofan Sensörleri, Sözlü Sunum, Çankırı Karatekin Üniversitesi 1. Ulusal Öğrenci Kongresi, 23 Mayıs 2024, 23 Mayıs 2024.
4. Ateş, E., Toparlı, Ş., Terzioğlu, F., Yılmaz Çılçar, M., Yılmaz Kabaca, A., & Bilgi, M., (2024), Elektrokimyasal Norepinefrin Sensörleri, Sözlü Sunum, Çankırı Karatekin Üniversitesi 1. Ulusal Öğrenci Kongresi, 23 Mayıs 2024, 23 Mayıs 2024.
5. Terzioğlu, F., Ateş, E., Toparlı, Ş., Yılmaz Çılçar, M., Yılmaz Kabaca, A., & Bilgi, M., (2024), Elektrokimyasal İkili Epinefrin ve Norepinefrin Sensörleri, Sözlü Sunum, Çankırı Karatekin Üniversitesi 1. Ulusal Öğrenci Kongresi, 23 Mayıs 2024, 23 Mayıs 2024.
6. Yılmaz Çılçar, M., & Bilgi, M., (2024), Nörolojik Biyobelirteçlerin Tayininde Elektrokimyasal Sensör Sistemlerinin Kullanımı, Sözlü Sunum, Çankırı Karatekin Üniversitesi 1. Ulusal Öğrenci Kongresi, 23 Mayıs 2024, 23 Mayıs 2024.
7. Altun, M., Bilgi Kamaç, M., Bilgi, A., **Yılmaz, M.**, (2019), “Poli-Nötral Kırmızının İndirgenmiş Grafen Oksit Modifiyeli Yüzey Baskılı Elektrotlar Üzerinde Hazırlanması ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu”, 31. Ulusal Kimya Kongresi, 10-13 Eylül 2019, (Sözlü Sunum).
8. Bilgi Kamaç, M., Altun, M., **Yılmaz, M.**, (2019), “İndirgenmiş Grafen Oksit Modifiyeli Yüzey Baskılı Elektrotlar Üzerinde Politiyoninin Hazırlanması ve Elektrokimyasal Karakterizasyonu” 31. Ulusal Kimya Kongresi, 10-13 Eylül 2019, (Sözlü Sunum).

D. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildiriler

1. **Yılmaz, M.**, Döker, S. & Uslu, M., (2014) Çankırı İlinden Toplanan Sebze Örneklerinde Selenyum Tayını, Poster Sunumu, III. ESER ANALİZ ÇALISTAYI, 15 Mayıs 2014, 18 Mayıs 2014.

2. **Yılmaz, M.,** Döker, S. & Bosgelmez, I. I., Uslu, M. & Yıldırım, M., **(2015),** Balık Örneklerinde Cıva Türlemesine Yönelik Bır Hplc Icp-Ms Metodu, Poster Sunumu, XIV. Ulusal Spektroskopi Kongresi , 29 Mayıs 2015, 31 Mayıs 2015.
3. **Yılmaz, M.,** Döker, S. & Bosgelmez, I. I., **(2016),** Kızılırmak Nehri Cyprinus Carpi (Sazan Balığı) Örneklerinde Türleme Çalışması, Poster Sunumu, 4. Eser Analiz Kongresi, 19 Mayıs 2016, 22 Mayıs 2016.
4. **Yılmaz, M.,** Döker, S., **(2016),** Kızılırmak Nehri Balık Örneklerinde Selenyum/Cıva Oranının Tayını, Poster Sunumu, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 30 Nisan 2016, 04 Mayıs 2016.



PROJELER

TÜBİTAK Projeleri

112T365, **TÜBİTAK-3501** Hplc-Icp-Ms Tekniğı İle Balıklarda Eszamanlı Cıva ve Selenyum Türlemesi, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.09.2014 -15.04.2015, Proje Başlangıç/Bitis Tarihleri: 15.10.2012 - 15.04.2015. (**Bursiyer öğrenci-yüksek lisans**)

214O117, **TÜBİTAK-1001** Yabani ve Kültür Zeytininde Metillenmiş Dna Immunoçöktürme - Dizileme (Medıd-Seq) İle Tüm Genom Metilasyon Profiline Çıkarılması, Uluslararası, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, TOVAG - Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.05.2015 - 13.12.2016, Proje Başlangıç/Bitis Tarihleri: 01.05.2015 - 01.05.2017. (**Bursiyer öğrenci-yüksek lisans**)

118R030, **TÜBİTAK-1001** Yumurtalık Kanserinin Erken Teshisi için CA125 ve HE4 Biyobelirteçlerinin Es Zamanlı Elektrokimyasal Tayinine Yönelik Pratik Etiketsiz İkili İmmünosensör Gelistirilmesi, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.03.2019 - 31.05.2021, Proje Başlangıç/Bitis Tarihleri: 01.12.2018 - 01.06.2021. (**Bursiyer öğrenci-doktora**)

118Z395, **TÜBİTAK-3501** Suda Çözünebilir Moleküler Mandalların Sentezi, BİDEB Burslusu, Sonuçlandı, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.06.2021 - 15.10.2021, Proje Başlangıç/Bitis Tarihleri: 15.01.2019 - 15.10.2021. (**Bursiyer öğrenci-doktora**)

120Y269, **TÜBİTAK-1001** Mikroplastiklerin Biyofilm Patojenitelerinin Araştırılması: Hidrodinamik Tasınım Modelleri ile Çevresel Risk Analizi, **BİDEB Burslusu**, Sonuçlandı, ARDEB, MAG - Mühendislik Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.06.2022 - 14.10.2022, Proje Başlangıç/Bitis Tarihleri: 01.03.2021 - 01.03.2024. (**Bursiyer öğrenci-doktora**)

122Z426, **TÜBİTAK-1001** Belirli Kanser Türlerinin Teshisinde Potansiyel Biyobelirteçlerin Tayinine Yönelik Elektrokimyasal Panel Sistemlerinin Gelistirilmesi, **BİDEB Burslusu**, Yürürlükte, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 25.10.2022 - 15.10.2025, Proje Başlangıç/Bitis Tarihleri: 15.10.2022 - 15.10.2025. (**Bursiyer öğrenci-doktora**)

222Z121, **TÜBİTAK-1002** Taşınabilir insan epididim protein 4 immünosensörünün geliştirilmesi, Sonuçlandı, ARDEB, KBAG - Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu, Projeye Proje Başlangıç/Bitis Tarihleri: 01.2.2023 - 01.02.2024. (**Yürütücü**)

BAP Projeleri

Kurumsal (Bap V.B.), Araştırmacı, Belirli Hastalıkların Erken Teshisi İçin Elektrokimyasal İmmünoşensör Sistemlerinin Geliştirilmesi, Yürütölen Kurulus: Çankırı Karatekin Üniversitesi (Devam Ediyor).

Kurumsal (Bap V.B.), Araştırmacı, Kızılırmak'ta Yasayan Bazı Balık Çeřitlerinde Selenyum Türlemesi, Yürütölen Kurulus: Çankırı Karatekin Üniversitesi, 01 Eylül 2015, 01 Eylül 2016.

BİDEB Destekleri

Merve Yılmaz, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, Destekleniyor, 2022 - 1.

Merve YILMAZ ÇİLÇAR, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, Destek Sona Erdi, 2023 - 1.

Merve YILMAZ ÇİLÇAR, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, Destek Sona Erdi, 2023 - 2.

Merve YILMAZ ÇİLÇAR, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, Destek Sona Erdi, 2024 - 1.

Merve YILMAZ ÇİLÇAR, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, Destekleniyor, 2024 - 2.

Merve Yılmaz, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılım Destegi Programı, Destek Sona Erdi, 2022 - 3, 20.09.2022 - 22.09.2022.

Merve YILMAZ ÇİLÇAR, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılım Destegi Programı, Destekleniyor, 2024 - 3.

Merve Yılmaz, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, Destekleniyor, 2021 - 1, 01.06.2021 -28.02.2025