

B.PERK

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUĞLA 2023

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

ELEKTRONANO DİYAGNOSTİK
Leishmania PLATFORMLARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BENAY PERK

HAZİRAN 2023
MUĞLA

**T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**ELEKTRONANO DİYAGNOSTİK
Leishmania PLATFORMLARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BENAY PERK

HAZİRAN 2023

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

BENAY PERK tarafından hazırlanan **ELEKTRONANO DİYAGNOSTİK LEİSHMANİA PLATFORMLARI** başlıklı tezinin, 19/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Suna TİMUR* (**Jüri Başkanı**)

İmza:

Biyokimya Ana Bilim Dalı,
Ege Üniversitesi, İzmir

Prof. Dr. Ülkü ANIK** (**Danışman**)

İmza:

Kimya Ana Bilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Emine Sonay ELGİN (**Üye**)

İmza:

Kimya Ana Bilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Mehmet UĞURLU

İmza:

Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Ülkü ANIK

İmza:

Danışman, Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Savunma Tarihi: 19/06/2023

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuçlar,doküman,bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışmasından elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Benay PERK

19/06/2023

ÖZET
ELEKTRONANO DİYAGNOSTİK
***Leishmania* PLATFORMLARI**

Benay PERK

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ülkü ANIK

Haziran 2023, 46 sayfa

Bu yüksek lisans tezinde, bakır metal organik çerçeve (Cu-(NH₂-BDC)-MOF) modifiye altın yüzey baskılı elektrot (AuSPE) kullanılarak *Leishmania* majör yüzey proteaz (Gp63) antikor tespiti için bir elektrokimyasal immunosensör geliştirilmiştir. İlk olarak, AuSPE yüzeyi (Cu-(NH₂-BDC)-MOF) ile modifiye edilmiştir. Ardından, rekombinant *Leishmania donovani* antijeni (KMP-11) antijeni çapraz bağlayıcılarla elektrot yüzeyine immobilize edilerek aktif biyolojik tabaka oluşturuldu ve anti-gp63 tespiti elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) tekniği kullanılarak 0.1V'de gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen *Leishmania* immunosensöründe Cu-(NH₂-BDC)-MOF miktarı, antijen miktarı, antijen bağlanma süresi, antijen bağlanma sıcaklığı ve antijen-antikor inkübasyon süresi optimize edildikten sonra analitiksel karakteristik çalışmaları yapılmıştır. Girişim çalışmaları için anti-VEGF, anti-AFP, anti-IgG kullanılarak anti-gp63 analizi gerçekleştirilmiştir. Pozitif örnek olarak crude *Leishmania* parazit antijeni ve negatif örnek olarak tavşan hiper-immün serumu kullanılarak gerçek örnek uygulama denemeleri yapılmıştır. Sonuç olarak yüksek lisans tezi kapsamında daha önce hiç kullanılmayan Cu-(NH₂-BDC)-MOF ile *Leishmania*'nın hızlı, pratik ve doğru tanısı için elektrokimyasal *Leishmania* immunosensörü geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Leishmania* majör yüzey proteazı (Gp63), rekombinant *L.donovani* antijeni (KMP-11), metal organik çerçeve, impedimetrik biyosensör

ABSTRACT
ELECTRONANO DIAGNOSTIC
***Leishmania* PLATFORMS**

Benay PERK

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ülkü ANIK

June 2023, 46 pages

In this master's thesis, an electrochemical immunosensor was developed for the detection of *Leishmania* major surface protease (Gp63) antibodies using a copper metal-organic framework (Cu-(NH₂-BDC)-MOF) modified gold screen printed electrode (AuSPE). Firstly, the AuSPE surface was modified with Cu-(NH₂-BDC)-MOF. Then, the KMP-11 antigen was immobilized on the electrode surface using cross-linkers to create an active biological layer, and the anti-gp63 detection was performed using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) technique at 0.1V. After optimizing the Cu-(NH₂-BDC)-MOF amount, antigen amount, antigen binding time, antigen binding temperature, and antigen-antibody incubation time, analytical characterization studies were conducted. Interference studies were performed using anti-VEGF, anti-AFP, and anti-IgG to analyze the anti-gp63 detection. Real sample application experiments were carried out using crude *Leishmania* parasite antigen as the positive sample and rabbit hyper-immune serum as the negative sample. As a result, an electrochemical *Leishmania* immunosensor utilizing Cu-(NH₂-BDC)-MOF, which has never been used before, was successfully developed for the rapid, practical, and accurate diagnosis of *Leishmania*.

Keywords: *Leishmania* major surface protease (Gp63), recombinant *L. donovani* antigen (KMP-11), metal-organic framework, impedimetric biosensor

ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca bana öncülük eden, bilgi ve tecrübesiyle yolumu aydınlatan bugünlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın hocam Prof.Dr. Ülkü ANIK'a,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını benden esirgemeyen Öğr.Gör.Dr. Yudum Tepeli BÜYÜKSÜNETÇİ'ye,

Çalışmalarım süresince beni her zaman destekleyen ve yanımda olan sevgili Okan AVCI'ya,

Tüm hayatım boyunca bana inanan maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili babam Turgay PERK, annem Saniye PERK ve biricik kardeşim Vedat PERK'e sonsuz teşekkürler...

Ayrıca bu yüksek lisans tezi TÜBİTAK tarafından 2510 program kodlu, 119Z669 no'lu TÜBİTAK-MHESR Tunus ortak projesi kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK VE ÖZETLER	3
2.1. Biyosensörler ve Çeşitleri	3
2.1.1. Mikrobiyal biyosensörler	4
2.1.2. Enzimatik biyosensörler	4
2.1.3. DNA biyosensörler	4
2.1.4. İmmunosensörler	5
2.2. Enerji Dönüştürücüler	5
2.2.1. Elektrokimyasal biyosensörler	5
2.2.2. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)	6
2.3. Metal-Organik Çerçeveler (MOF)	8
2.3.1. Bakır- metal-organik çerçeveler (Cu-(NH ₂ -BDC) MOF)	8
2.4. Leishmaniasis	9
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Kullanılan Cihazlar	13
3.2. Kullanılan Kimyasallar	15
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	16
3.3.1. 100 mM PBS hazırlanması (pH: 7,4)	16
3.3.2. 20 mM tuzlu PBS hazırlanması (pH: 8,0)	16
3.3.3. Redoks prob çözeltisinin hazırlanması	16
3.3.4. EDC ve NHS çapraz bağlayıcı çözeltisinin hazırlanması	17
3.3.5. KMP-11 antijen çözeltisinin hazırlanması	17
3.3.6. Anti-gp63 çözeltisi hazırlanması	17
3.4. Cu-(NH ₂ -BDC) MOF Yapısının Sentezi ve Karakterizasyonu	17
3.5. Elektrokimyasal <i>Leishmania</i> İmmunosensörün Hazırlanması	18

3.6. Geliştirilen <i>Leishmania</i> İmmunosensörünün Elektrokimyasal Ölçüm Prosedürü.....	18
3.7. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu	19
3.7.1. Cu-(NH ₂ -BDC) MOF miktar optimizasyonu	20
3.7.2. KMP-11 antijen miktar optimizasyonu.....	20
3.7.3. . KMP-11 antijen immobilizasyon süresi optimizasyonu.....	20
3.7.4. KMP-11 antijen immobilizasyon sıcaklık optimizasyonu.....	20
3.7.5. Antijen-antikor inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi optimizasyonu	21
3.8. <i>Leishmania</i> İmmnosensörünün Analitiksel Karakterizasyonu.....	21
3.9. Girişim Çalışması	21
3.10. Örnek Deneme Çalışması	22
4. SONUÇ.....	23
4.1. Cu-(NH ₂ -BDC) MOF Yapısının Karakterizasyonu	23
4.2. <i>Leishmania</i> İmmunosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu.	25
4.3. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu.	27
4.3.1. Cu-(NH ₂ -BDC) MOF miktar optimizasyonu	27
4.3.2. KMP-11 antijen miktar optimizasyonu	28
4.3.3. KMP-11 antijen immobilizasyon süresi optimizasyonu.....	30
4.3.4. KMP-11 antijen immobilizasyon sıcaklık optimizasyonu.....	31
4.3.5. Antijen-antikor inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi optimizasyonu	32
4.4. <i>Leishmania</i> İmmunosensörünün Analitiksel Karakterizasyonu	33
4.5. Girişim Çalışması	36
4.6. Depolama Kararlılığının İncelenmesi	37
4.7. Örnek Deneme Çalışması	37
4.8. Yorum.....	38
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ.....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 4.1. <i>Leishmania</i> immunosensörün elektrokimyasal karakterizasyonuna ait direnç değerleri tablosu	27
Tablo 4.2. Yalın AuSPE ve 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 seyrelme oranlarına göre hazırlanan AuSPE/Cu(NH ₂ -BDC) MOF elektrotların direnç farklanma tablosu	28
Tablo 4.3. 0 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL ve 30 µg/mL konsantrasyonlarında KMP-11 antijenlerin direnç farklanma tablosu	29
Tablo 4.4. KMP-11 antijenin immobilize olma (15, 30, 60, 120 dakika) sürelerinin sonucunda meydana gelen direnç farklanma tablosu	31
Tablo 4.5. KMP-11 antijeni immobilizasyon sıcaklık (20°C, 25°C, 30°C ve 37°C) değişimine ait direnç farklanmaları tablosu	32
Tablo 4.6. <i>Leishmania</i> immunosensörü için 30, 60, 120 ve 150 dakika Antijen-Antikor inkübe edilmesi sonucu meydana gelen direnç farklanma tablosu	33
Tablo 4.7. Anti-gp63 farklı seyrelme oranlarında hazırlanması ile gerçekleşen analitiksel karakterizasyon çalışması sonucu elde edilen direnç farklanma tablosu.....	34
Tablo 4.8. Geliştirilen <i>Leishmania</i> immunosensörünün analitik performansının benzer biyosensör çalışmalarla karşılaştırma tablosu.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyosensörün şematik gösterimi.	3
Şekil 2.2. Sistemin kinetik süreci ve Nyquist yarı daire bileşenleri.....	7
Şekil 2.3. Randles eşdeğer devresi.....	7
Şekil 2.4. Cu-(NH ₂ -BDC) MOF ait SEM görüntüsü	9
Şekil 2.5. <i>Leishmania</i> yaşam döngüsü.	12
Şekil 3.1. A. Sigma 3-16 PK santrifüj, B. Nüve EV-018 etüv, C. Teflon kaplı paslanmaz çelik hidrotermal sentez reaktörü.....	13
Şekil 3.2. A. Thermo Electron Corporation marka pH metre, B. Ohaus marka hassas terazi	14
Şekil 3.3. Voltalab marka potansiyostat.....	14
Şekil 3.4. FRA-modüllü Autolab potansiyostat PGSTAT101 cihazı.	15
Şekil 3.5. <i>Leishmania</i> immunosensörün hazırlanması ve ölçüm prosedürü.	19
Şekil 4.1. Cu-(NH ₂ -BDC) MOF yapısına ait A. SEM görüntüsü, B. SEM-EDS elemental analizi gerçekleştirilen bölgenin görüntüsü C. EDS sonuçları.	23
Şekil 4.2. Cu-(NH ₂ -BDC) MOF yapısına ait SEM-haritalama işlemi gerçekleştiren elementlerin dağılımlarına ait haritalama görüntüleri.	24
Şekil 4.3. Cu-(NH ₂ -BDC) MOF yapısına ait XRD ölçüm sonuçları	25
Şekil 4.4. <i>Leishmania</i> immunosensörünün elektrokimyasal karakterizasyonuna ait Nyquist eğrileri.....	26
Şekil 4.5. Cu-(NH ₂ -BDC) MOF miktar etkisini gösteren Nyquist eğrileri ve excel grafiği.	28
Şekil 4.6. KMP-11 antijen konsantrasyon değişimine ait Nyquist eğrileri ve excel grafiği.	29
Şekil 4.7. <i>Leishmania</i> immunosensörü için KMP-11 antijeni immobilizasyon süre optimizasyonu için Nyquist eğrileri ve excel grafiği.	30
Şekil 4.8. KMP-11 antijeninin immobilizasyon sıcaklığının optimizasyonunda elde edilen Nyquist eğrileri ve excel grafiği.	31
Şekil 4.9. Antijen-Antikor inkübasyon süresi optimizasyonu deneylerinden elde edilen Nyquist eğrileri ve excel grafiği.	32

Şekil 4.10. *Leishmania* immunosensörünün analitiksel karakterizasyonunda farklı seyrelme oranlarında anti-gp63 ile etkileşimi sonucu elde edilen Nyquist eğrileri ve excel grafiği..... 34

Şekil 4.11. *Leishmania*'nın gerçek tespiti için geliştirilen *Leishmania* immunosensörün A. pozitif ve B. negatif örnek denemelerine ait Nyquist eğrileri. 38



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Anti-gp63	<i>Leishmania</i> Major Yüzey Proteaz Gp63
AuSPE	Altın Yüzey Baskılı Elektrot
DMF	N-N dimetilformamid
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimid hidroklorür
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
Hz	Hertz
$K_3Fe(CN)_6$	Potasyum Hekzasiyanoferrat (III)
$K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$	Potasyum Hekzasiyanoferrat (II) Trihidrat
KH_2PO_4	Potasyum Dihidrojen Fosfat
KMP-11	Rekombinat <i>L.donovani</i> KMP-11 antijeni
LOD	Belirtme Alt Sınırı
MOF	Metal Organik Çerçeve
mL	Mililitre
μL	Mikro Litre
μA	Mikro Amper
Na_2HPO_4	Sodyum fosfat dibazik dihidrat
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NH_2 -BDC	Aminoteraflatik Asit
PBS	Fosfat Tamponu
PVP	Polivinilpirolidon K30
RSD	Bağıl Standart Sapma
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
V	Volt
XRD	X-ışını Kristalografisi

1. GİRİŞ

Leishmaniasis, dişi kum sinekleri tarafından memeli konakçılar arasında bulaşan ve *Leishmania* cinsinin en az 20 türünün neden olduğu vektör kaynaklı parazitik hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirildiği üzere, Leishmaniasis dünya çapında önemli altı hastalıktan biridir ve 350 milyondan fazla insanı riske sokmakta ve gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler de dahil olmak üzere 98 ülkede yılda yaklaşık 1,6 milyon yeni vakaya neden olmaktadır. En şiddetli formu ve ölümcül sonuçlarıyla bilinen Viseral Leishmaniasis (VL), özellikle Orta Doğu, Orta Asya, Güney Amerika ve Orta Amerika'da yaygın olarak görülen, *Leishmania infantum* ve *Leishmania donovani* parazitinin sebep olduğu bir hastalıktır. VL tedavisinden sonra Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) sağlıklı bireylerde ortaya çıkan bir cilt belirtisidir. Kutanöz Leishmaniasis (CL) genellikle 3-18 ay içinde kendiliğinden iyileşen bir ülserle sınırlıdır, ancak hastalık sonucunda ciltte oluşan yara izleri ve bu yara izlerinin neden olduğu cilt yapı bozukluğu da meydana gelmektedir (Burza, 2018). Tarihsel olarak, Leishmaniasis kötü yaşam koşulları ve yetersiz sağlık hizmetleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, vakaların çoğunluğu (%90'dan fazlası), hastalığın etkili tanı ve kontrolü için gerekli sağlık kaynaklarının eksikliğiyle mücadele eden düşük gelirli ülkelerde meydana gelmektedir (Savioli ve Daumerie, 2013; Savioli vd., 2017). 20. yüzyılın ve erken 21. yüzyılın başında bu hastalık hakkında birçok bilgi edinilmiş olmasına rağmen, hastalığın yönetimi ve kontrolü henüz iyi bir şekilde gerçekleştirilememektedir (Harman, 2015). Leishmaniasis hastalığının erken teşhisi, kalıcı hasarların ve ölümlerin önlenmesi açısından son derece önemlidir. *Leishmania* parazitinin teşhisinde genellikle enfekte olmuş kısmın izolasyon veya gözlenmesini temel alan mikroskopik teknikler, spesifik antikorların tayinini amaçlayan tıbbi kan testi, nükleik asit ve polimeraz zincir reaksiyonunu temel alan molekül temelli yaklaşımlar kullanılmaktadır (Guerbouj vd., 2014).

Bahsedilen teşhis yöntemlerinin kullanımını kısıtlayan faktörler arasında, özel ve maliyetli ekipman gerekliliği, yüksek vasıflı personel ihtiyacı ve uzun geri dönüş süreleri gerekmektedir.

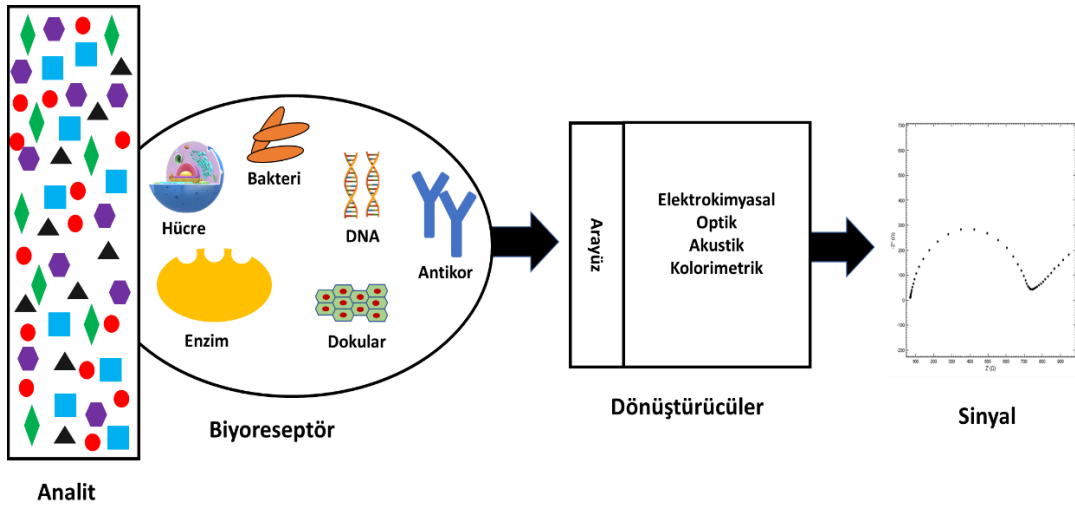
Elektrokimyasal *Leishmania* biyosensörleri, özel eğitimli teknisyenlere ihtiyaç duymadan kullanılabilen ve *Leishmania*'yı seçimli bir şekilde tayin edebilen sistemlerdir. Bu biyosensörler, tanı kitlerine öncülük edebilecek potansiyele sahiptir. Bu tez çalışması kapsamında, *Leishmania*'nın hızlı, pratik ve doğru bir şekilde teşhis edilebilmesi için elektrokimyasal *Leishmania* biyosensörleri geliştirilmiştir.



2. KAYNAK VE ÖZETLER

2.1. Biyosensörler ve Çeşitleri

Biyosensörlerin tarihi, bilim adamı Leland C. Clark tarafından 1962'de enzim elektrotlarının geliştirilmesiyle başlamıştır (Mohanty ve Kougianos, 2006). Biyosensörler, biyolojik örneklerdeki kimyasal türlerin derişimine orantılı olarak ölçülebilir sinyaller oluşturan analitik cihazlardır. (Coulet, 2019). Biyosensörler, temelde biyoreseptör, sinyal dönüştürücü ve sinyal işlemcisinden meydana gelmektedir (Şekil 2.1). Biyoreseptörlerin yapıları antikorlar, enzimler, DNA, nükleik asitler mikroorganizmalar vb. gibi çeşitli biyolojik tanıma elemanlarından oluşmaktadır. Biyosensörler, biyoreseptör türlerine göre mikrobiyal biyosensörler, enzimatik biyosensörler, DNA biyosensörleri ve immunosensörler olarak gruplara ayrılabilirler:



Şekil 2.1. Biyosensörün şematik gösterimi.

2.1.1. Mikrobiyal biyosensörler

Mikrobiyal biyosensörler, biyoreseptör olarak mikroorganizmaların bulunduğu biyosensörlerdir. Sinyal üretmek amacıyla mikroorganizmaları fiziksel bir dönüştürücü ile uyumlu hale gelen analitik bir cihazdır. Mikrobiyal biyosensörlerin geliştirilmesinde yaygın olarak algılama tekniklerinden elektrokimyasal ve optik teknikler kullanılmaktadır (Su vd., 2011). Günümüzde ağır metaller, toksik gazlar, ilaçlar gibi birçok çevresel kirleticiler için aynı zamanda sularda bulunan oksijenin ve bunun yanında sulardaki mikroorganizmalar tarafından kullanıldığı belirlenen biyokimyasal oksijen ihtiyacı vb. tespitleri için mikrobiyal biyosensörler geliştirilmiştir (Özer vd., 2022).

2.1.2. Enzimatik biyosensörler

Enzimatik biyosensörler, biyoreseptör olarak enzimlerin kullanıldığı biyosensör çeşididir. Enzimatik biyosensörler yüksek özgünlüğe ve düşük maliyete sahiptir (Soares vd., 2019).

Biyolojik sıvılarda (idrar, kan, serum vb) glukoz, kolesterol, dopamin, glutamat, aspartam, sülfürdioksit, veya laktik asit gibi maddelerin tespiti için birçok enzim biyosensörü geliştirilmiştir. Geliştirilen enzimatik biyosensörler toksisite analizi, gıda ve kalite kontrolü ve ilaç tespiti alanlarında da kullanılmışlardır (Sassolas vd., 2012).

2.1.3. DNA biyosensörleri

DNA biyosensörün temeli, nükleik asiti tanıyıp ölçülebilir sinyallere dönüştürmesine dayanır. DNA biyosensörlerinin büyük önem görmesinin nedeni geleneksel hibridizasyona göre daha hızlı, basit ve ucuz bir şekilde DNA dizisine özgü bilgi edinilmesidir. DNA dizilerinin tespiti özellikle klinik ve gıda analizinde büyük öneme sahiptir. Ayrıca genetik ve bulaşıcı hastalıkların hızlı güvenilir sonuçlar elde edilmesine katkı sağlar (Kavita, 2017).

2.1.4. İmmunosensörler

İmmunosensörler spesifik antikor ile antijenin bağlanmasını bir dönüştürücü yardımı ile tespit eden analitik cihazlardır (Gizeli ve Lowe, 1996). Bağışıklık savunma sisteminin bir parçası olan antikorlar yabancı türleri (antijen), algıladıktan sonra uygun miktarda sentezlenir ve yüksek özgünlükte bağlanması ardından analiz gerçekleştirilir. İmmunosensör alanındaki son zamanlardaki gelişmeler duyarlılığı artırmak, çoklu analiz yapabilme yeteneği sağlamak gibi umut vadeden özellikle endüstri ve klinik alanlarda potansiyele sahiptir. Bunlara ek olarak gıda analizi, çevresel analizler, hücre, virüs ve pestisit analizi gerçekleştirilebilir. (Büyüksünetçi Tepeli, 2022; Cristea vd., 2015).

2.2. Enerji Dönüştürücüler

Biyosensörlerde, biyolojik tanıma elemanları hedef analiti tanır ve bu uyarıyı analitik ölçülebilir bir sinyale dönüştüren fiziksel elementler “enerji dönüştürücü” olarak tanımlanır. Oluşan biyolojik yanıtı, dönüştürücüler elektrokimyasal, optik, akustik veya kolorimetrik olarak ölçülebilen bir sinyale dönüştürür (Şekil 2.1.) (Su vd., 2011).

2.2.1. Elektrokimyasal biyosensörler

Analitin akımını (amper) ya da potansiyelini (volt) ölçmek amacıyla kullanılan yöntem “Elektroanalitik Yöntem” denir ve bu yöntemde en az bir tür elektroaktif olmalıdır (Wang, 2000). Elektrokimyasal biyosensörler 3 temel ölçüm sistemine dayanır. Bunlar, potansiyometrik, amperometrik ve impedimetriktir (Koyun, 2022).

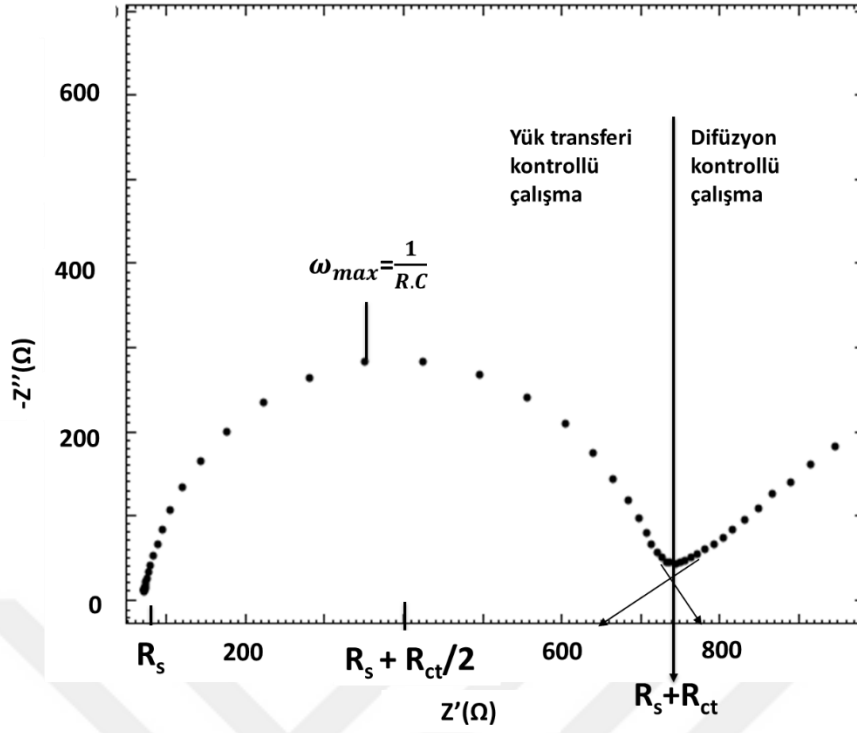
Elektrokimyasal biyosensörlerde dönüştürücü olarak kullanılarak “elektrot”, biyokimyasal olayları (enzim-substrat reaksiyonu, antijen-antikor etkileşimi vb.) elektrik sinyallerine (örneğin akım, voltaj, empedans vb.) çeviren analitik cihazlardır (Cho vd., 2020). Dönüştürücü olarak kullanılan elektrot bir tür çalışma elektrodudur. Çalışma elektrodu, polarlanabilen elektrot olarak tanımlanır.

Öte yandan, elektrokimyasal biyosensörlerde genellikle çalışma elektrodunun yanı sıra referans ve yardımcı elektrot da kullanılmaktadır. Yardımcı elektrodun olmadığı ikili elektrot sistemlerinde referans elektrot yüksek akıma maruz kaldığında sapma meydana gelir ve polarlanır. Bu sebeple ikili elektrot sisteminde oluşan bu problem yardımcı elektrot kullanılarak çözülür. Akım, yardımcı elektrot ile çalışma elektrodunun üzerinden geçirildiğinde referans elektrotta polarlanma meydana gelmez ve çalışma elektrodunun polarizasyon potansiyeli doğru şekilde tespit edilir. Referans elektrot, polarize olmayan elektrottur. Referans elektrotlar küçük akım şiddetinde polarlanmazlar ancak yüksek akım şiddetinde polarlanırlar. En çok kullanılan Ag/AgCl ve kalomel referans elektrotlarıdır (Tural vd., 2010)

2.2.2. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)

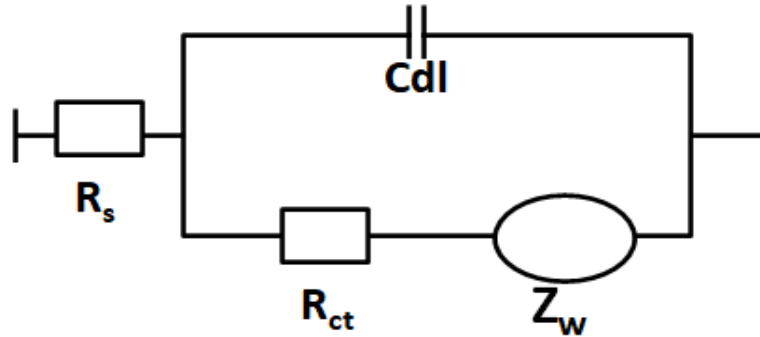
EIS, 1975 yılında Lorenz ve Schulze tarafından bulunan, sistemlerin elektriksel dirençlerini ve bu dirençlerdeki değişimleri analiz etmek için kullanılan bir elektrokimyasal yöntemdir. Bu yöntem genellikle 2-10mV büyüklüğünde sinüzoidal bir alternatif akım varlığında kullanılır (Ronkainen vd., 2008). Son yıllarda, özellikle biyosensörlerin hazırlanması ve kantitatif analizlerde sıkça tercih edilen bir metot haline gelmiştir. Sistemin impedansı, potansiyel-zaman fonksiyonu $V(t)$ ile akım-zaman fonksiyonuna $I(t)$ bölümü anlamına gelmektedir ve genellikle küçük bir genlikle uygulanan potansiyel ve bu potansiyelin tetiklediği akım cevabının oranı olarak tanımlanır (Telefoncu ve Kılınç, 2013).

EIS ölçüm sonuçlarıyla elde edilen Nyquist eğrileri (Şekil 2.2), elektrot yüzeyindeki elektron transferine karşı ortaya çıkan direnci tanımlayan yarı daireler şeklinde görünür ve sistemde farklı frekans bölgelerinde hangi kinetik sürecin etkili olduğunu (difüzyon sınırlı veya yük transfer sınırlı) belirlemeye yardımcı olur (Fernández-Sanchez vd., 2005; Bonanni vd., 2012).



Şekil 2.2. Sistemin kinetik süreci ve Nyquist yarı daire bileşenleri.

Elektrokimyasal reaksiyon için en çok uygulanan elektrik devresi modeli Randles eşdeğer devresiyle, sisteme etki eden tüm dirençler aydınlatılabilir (Şekil 2.3.). Randles eşdeğer devresi, elektrolit direnci (R_s), elektrot/elektrolit arayüzünde yük aktarım direnci (R_{ct}), çift katmanlı kapasitans (C_{dl}) ve Warburg impedansı (Z_w)'ndan oluşur. (Yaman, 2020; Tepeli, 2015).



Şekil 2.3. Randles eşdeğer devresi

2.3. Metal-Organik Çerçeveler (MOF)

Metal organik çerçeveler (MOF'lar), gözenekli yapıları, esneklikleri ve çoklu koordinasyon alanları gibi önemli özelliklere sahip olan yapılardır. MOF'lar, farklı metal merkezlerin ve organik bağlayıcıların çeşitli kombinasyonlarıyla sentezlenebilir. Bu sayede yüzey alanı, gözenek boyutu ve yüzey işlevselliği gibi özellikler, farklı kombinasyonlarla uyumlu hale getirilebilir.

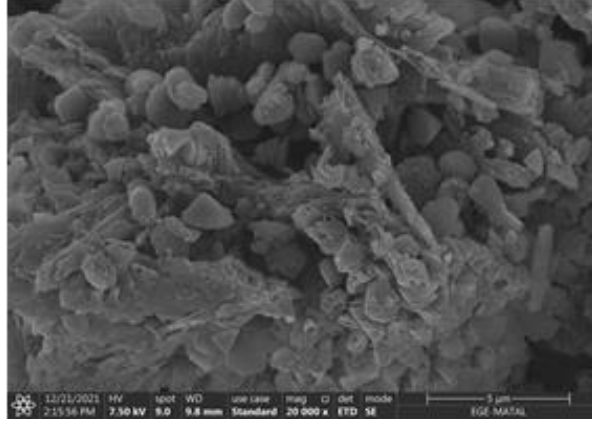
MOF'lar, gaz depolama veya ayırma, ilaç taşıma, optoelektronik uygulamalar, görüntüleme, heterojen kataliz ve hatta toksik gaz giderme gibi çeşitli alanlarda kullanılır. Ayrıca, son zamanlarda, elektrokimyasal sensör alanlarında da kullanılmaktadırlar.

MOF'lar, benzersiz özellikleri ve geniş uygulama potansiyelleri nedeniyle araştırmacılar arasında büyük ilgi görmektedir. Gelecekte, MOF'larla ilgili çalışmaların daha da ilerleyerek yeni keşiflere ve uygulamalara yol açması beklenmektedir (Zhang vd., 2014).

2.3.1. Bakır-metal-organik çerçeveler (Cu-(NH₂-BDC) MOF):

Bakır (Cu), MOF hazırlanmasında kullanılan en avantajlı elementlerden biridir. Bu durum, kolay bulunabilir olması, düşük maliyeti, toksik olmayan özellikleri ve yüksek kompleksleşme gücüne sahip olmasıyla açıklanabilir. Cu tabanlı MOF'ların yüksek stabiliteye sahip olmasının temel nedeni, Cu(II) metali ve organik ligandlar arasındaki güçlü etkileşimdir. Bu etkileşim, Cu tabanlı MOF'ların sulu çözeltilerde geniş bir pH aralığında kararlı olmasını sağlar. Ayrıca, bu yapıda ligand olarak kullanılan tereftalik asit, kolayca temin edilebilir ve düşük toksisiteye sahiptir. Tereftalik asit, COOH grupları aracılığıyla Cu²⁺ katyonlarıyla güçlü bir koordinasyon etkileşimi kurabilir.

Bu nedenlerden ötürü, Cu tabanlı MOF'lar, avantajlı özellikleri ve kolay hazırlanabilirlikleri nedeniyle araştırmacılar arasında büyük ilgi görmektedir (Bagheri ve Ghaedi, 2020). Şekil 2.4. de örnek Cu-(NH₂-BDC) MOF'a ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü görülmektedir.



Şekil 2.4. Cu-(NH₂-BDC) MOF ait SEM görüntüsü

2.4. Leishmaniasis

Leishmaniasis hastalığı, 20 *Leishmania* türünün (protozoonan paraziti) neden olduğu bir hastalık olup, yaklaşık 600 kum sineği çeşidinin memelileri enfekte etmesinden kaynaklandığından şüphelenilmektedir (Rossi ve Fasel, 2018). *Leishmania* paraziti kum sineğinin (flebotomin) ısırması ile bulaşan bir hastalıktır. Hasta bireyi ısırarak kum sineklerinde *Leishmania* paraziti kum sineğinin bağırsağında çoğalır. 8-20 gün sonra bulaşıcı durumuna gelen bu kum sinekleri, sağlıklı insan veya hayvanı ısırarak hastalığın yayılmasına neden olmaktadır (Şekil 2.5.) (Desjeux, 2004). Leishmaniasis hastalığı WHO göre aşağı yukarı 98 ülkede yılda yaklaşık 1,6 milyon vakaya sebep olan dünya genelinde en önemli altı hastalıktan biridir (Salvioli vd., 2017; Salvioli ve Daumerie, 2013). *Leishmania* türlerinin bazıları tedavi edilmezse ölümcüldür. En şiddetli ve ölümcül formu VL olup, VL'ye olan türlerinden *Leishmania donovani*, Asya ve Afrikada görülürken, *Leishmania infantum* ise, Orta Doğu, Orta Asya, Akdeniz Havzası, Güney Amerika ve Orta Amerika'da görülmektedir. Dünya genelinde 2015 yılında, VL vakalarının %90 dan fazlasına Brezilya, Etiyopya, Hindistan, Kenya, Somali ve Sudan'da rastlanmıştır. Bu arada, bir dönem, Hindistan, Nepal ve Bangladeş dünya genelinde VL vakalarının %50 sinden fazlasına sahip ülkeler kategorisinde olduklarını belirtmişlerdir (Burza vd., 2018).

2 hafta-8 ay arası bir kuluçka süresine sahip olan VL hastalığı, tedavi edilmediği takdirde 2 yıl içerisinde anemi veya sekonder bakteriyel enfeksiyon nedeniyle ölümcül olabilir (Ready, 2014). Bir diğer formu olan PKDL ise *Leishmania donovani* türüne bağlı VL tedavisi ardından sağlıklı bireylerde gözlenen bir tür deri döküntüsüdür (World Health Organization, 2010). Asya'da PKDL, VL tedavi sonrasında 2 ila 3 yıl içerisinde vakaların %5-10 unda gözlenirken, Afrika'da 1 yıl içerisinde %50 oranında görülmektedir. Ayrıca PKDL hastalarının VL'nin bulaşında rol aldığı da düşünülmektedir (Zijlstra, 2014; Zijlstra vd., 2003).

Bir başka formu olan CL ise 3-18 ay aralığında kendiliğinden iyileşen bir ülserle sınırlı olup ölüm tehlikesi içermez. Ancak, ciddi cilt döküntülerine ve psikolojik etkilere yol açabilir (Bennis vd., 2017; Yanik vd., 2004). Genel olarak, CL hastalarının cilt yara formatındaki cilt döküntülerinde kaşınma olsa da, bu yaralar herhangi bir ağrı içermez (Burza vd., 2018). Her yıl 1.5-2 milyon CL vakası görülmektedir. CL yaklaşık 70 civarı ülkede görülmekte olup, özellikle Afganistan, Suriye ve Brezilyada yaygın olarak ortaya çıkmaktadır (Pavli ve Maltezos, 2010). Göç sebebi ile CL vakalarının sayısı önemli derecede artmıştır (Pavli ve Maltezos, 2010; Wall vd., 2012). CL'ye neden olan *Leishmania* parazitleri, eski dünyada rastlanan türler olan *Leishmania major*, *Leishmania tropica* ve *Leishmania aethiopica*'dır ve bunlar genellikle Akdeniz havzası veya Hindistan alt kıtası çevresinde görülmektedir. Yeni dünya türleri olan *Leishmania amazonensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* ve *Leishmania guyanensis*, genellikle Orta ve Güney Amerika'da görülmektedir (de Vries vd., 2015). Parazit türlerine bağlı vakalarının %10'a kadarı daha şiddetli belirtiler gösterir ve bu hastalıklar mukokutanöz leishmaniasis, diffüz kutanöz leishmaniasis, yayılmış kutanöz leishmaniasis ve leishmaniasis residivansdır (Burza vd., 2018).

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde 350 milyon kişiye bulaşmış olan Leishmaniasis hastalığı teşhisi için mikroskopik teknikler, özel antikorların tespitine dayanan serolojik (kan) testleri ve nükleik asitleri temel alan moleküler tabanlı yaklaşımlar kullanılsa da bu hastalığın tayininde genellikle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılır.

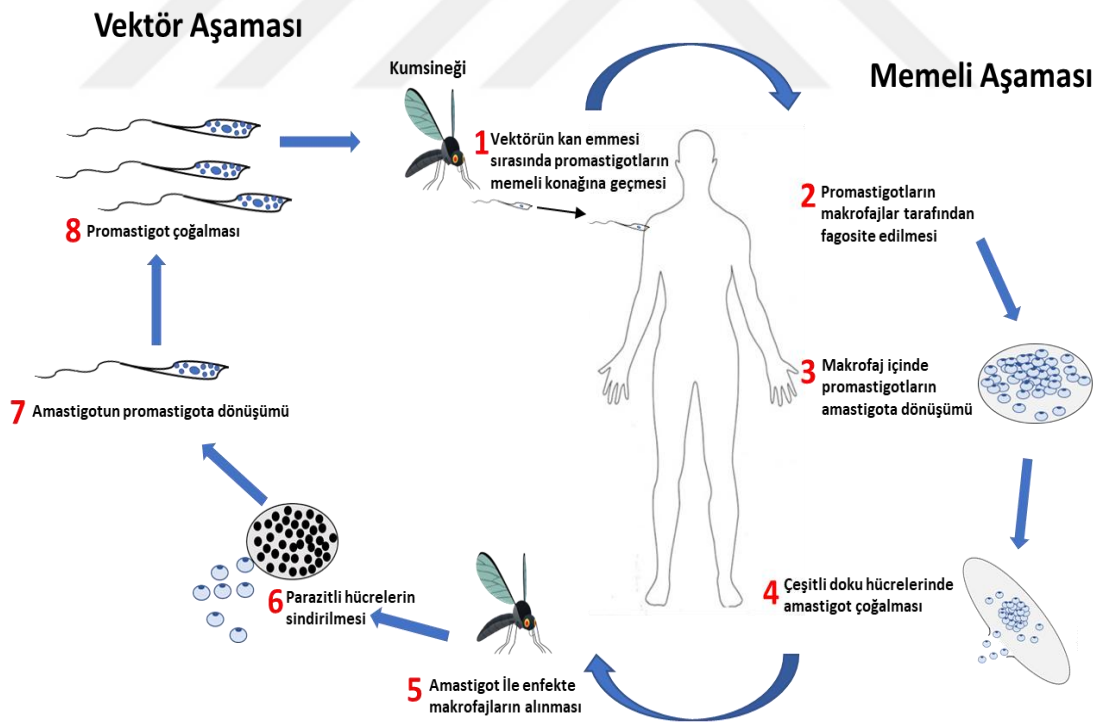
Bu teknikler duyarlı olmalarına rağmen, özel ve maliyetli ekipmana, yüksek beceri gerektiren personele ve uzun sonuç alma sürelerine ihtiyaç duyarlar (Diouani vd., 2019).

Erken teşhisin önemli olduğu göz önüne alındığında, geleneksel teşhis yöntemlerinin yanı sıra elektrokimyasal biyosensörler gibi pratik ve etkili sistemlerin bu alana uyarlanması, nitelikli teknisyenlere ihtiyaç duymadan, hızlı yanıt veren, pratik ve duyarlı bir sistem olması nedeni ile oldukça faydalı olacaktır.

Literatürde *Leishmania* türlerinin belirlenmesine yönelik elektrokimyasal biyosensörler bulunmaktadır. Örneğin, Mobed ve arkadaşları, *Leishmania* türlerinin tespiti için DNA tabanlı biyosensör tasarlamıştır. Altın nanopartikül (AuNPs) ve grafen kuantum dot modifiye Au çalışma elektrotları bu amaçla kullanılmıştır. Elektrokimyasal yöntemlerden kare dalga voltammetrisi ile gerçekleşen ölçümlerde, DNA hibridizasyon reaksiyonun izlenmesi için, redoks indikatörü olan toluen blue reaktifi kullanılmıştır. Bu sayede PKDL hastalığının saptanmasına uygun bir genosensör tasarlanmıştır (Mobed vd., 2020). Diouani ve arkadaşları ise, kazein ile Gp63 proteini arasındaki etkileşimi ve AuNP'lerin elektrokatalitik etkisi ile hidrojen oluşumu reaksiyonunu amperometrik olarak izleyen bir *Leishmania infantum* biyosensörü geliştirilmiştir. Bahsedilen çalışmada dönüştürücü olarak karbon temelli yüzey baskılı elektrot (SPCE) kullanılarak, bu elektrot yüzeyine AuNP@kazein immobilize edilmiş ve kronoamperometrik ölçümler yapılmıştır. 2×10^{-2} ve 2×10^6 parazit/mL derişim aralığında doğrusal bir yanıt elde edilmiş ve belirtme alt sınırı (LOD) değeri 0.55 parazit/mL olarak saptanmıştır (Diouani vd., 2019).

Martins ve arkadaşları, dönüştürücü SPCE yüzeyine AuNP modifiye ederek, *Leishmania infantum*'un sebep olduğu VL teşhisi için elektrokimyasal immunosensör geliştirilmiştir. Bu immunosensörde, SPCE yüzeyine elektrobiriktirme ile AuNP'ler biriktirilmiş ardından *Leishmania infantum* antijenleri immobilize edilerek *anti-Leishmania* antikorları tayin edilmiştir. Antijen-antikor etkileşimi $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ varlığında izlenmiştir. Analitiksel karakterizasyon çalışması döngüsel voltammetri (CV) ile gerçekleştirilmiş olup tespit aralığı 1:25 ila 1:100,000 ve LOD değeri 200 ng mL^{-1} olarak saptanmıştır (Martins vd., 2020).

Bu yüksek lisans tez çalışmasında *Leishmania* biyosensörlerinde daha önce kullanılmayan Cu-(NH₂-BDC)-MOF yapısı, modifiye edici malzeme olarak kullanılmıştır. Altın yüzey baskılı elektrotlar (AuSPE) yüzeyine Cu-(NH₂-BDC)-MOF modifiye edildikten sonra aktif biyolojik tabakayı oluşturmak için elektrot yüzeyine rekombinant *Leishmania donovani* (KMP-11) antijeni çapraz bağlayıcılar ile immobilize edilmiş ve anti-gp63 tespiti EIS tekniği kullanılarak optimizasyon ve analitiksel karakterisik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *Leishmania* cinsi protozoan parazitlerin hücre zarında bulunan *Leishmania* Major yüzey proteaz Gp63 antikorları (anti-gp63) bir yüzey proteini olup proteaz aktivitesi gösteren bir enzimdir. Parazitin hücre zarında bulunan bu enzim, konak hücrenin bağışıklık sistemi yanıtını etkileyerek parazitin enfeksiyon sırasında bağışıklık tepkisinden kaçmasına sebep olur. Bu nedenle anti-gp63'ün *Leishmania* saptanmasında, en iyi hedef antikorlarından biri olduğu düşünülmektedir. Literatürde mevcut çalışmalarda daha önce hiç MOF kullanılmamış olması geliştirilen sistemi özgün kılmaktadır.

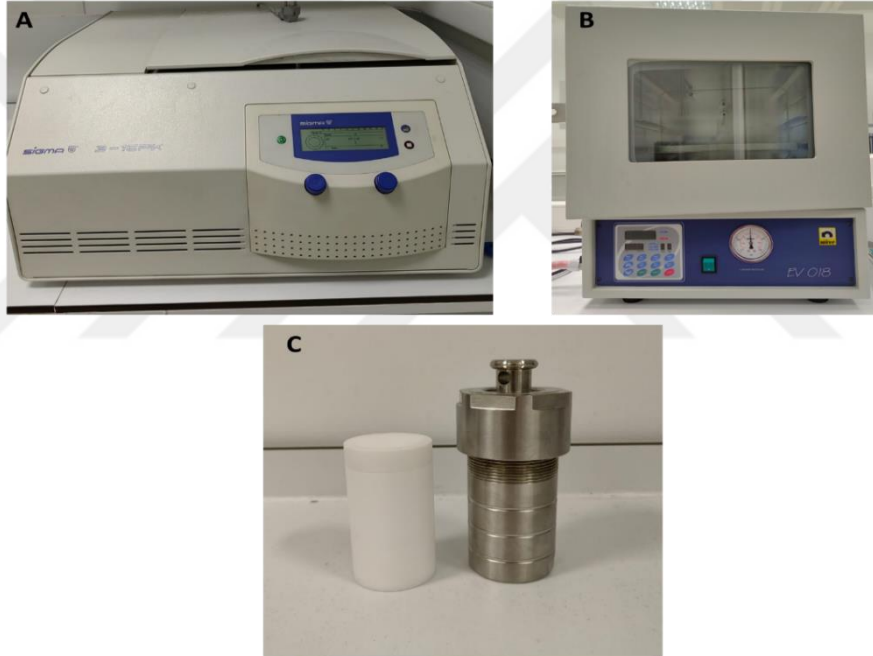


Şekil 2.5. *Leishmania* yaşam döngüsü.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Cihazlar

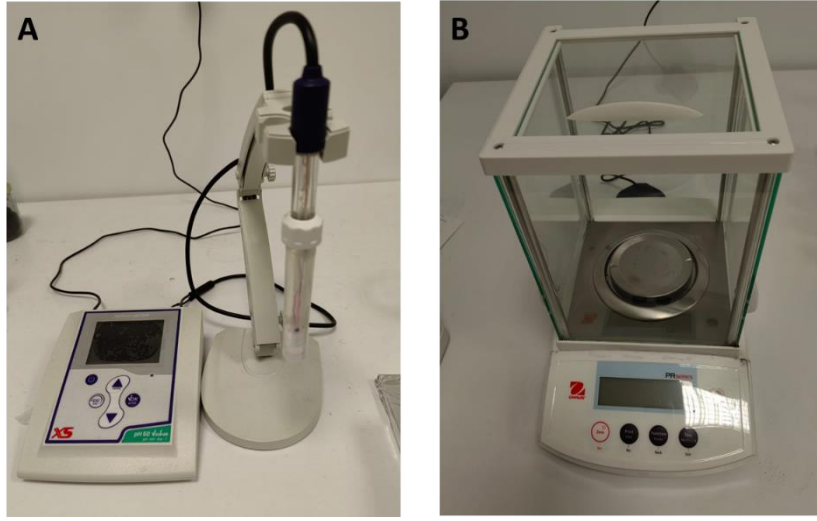
Cu-(NH₂-BDC)-MOF sentezi için Sigma 3-16 PK santrifüj (Şekil 3.1.A) , Nüve EV-018 etüv (Şekil 3.1.B) ve teflon kaplı paslanmaz çelik hidrotermal sentez reaktörü (Şekil 3.1.C) kullanılmıştır.



Şekil 3.1. A. Sigma 3-16 PK santrifüj, B. Nüve EV-018 etüv, C. Teflon kaplı paslanmaz çelik hidrotermal sentez reaktörü

Cu-(NH₂-BDC)-MOF karakterizasyonları SEM ölçümleri JSM-7600 F FEG üzerinden 30.0 kV ve X-ışını Kristalografisi (XRD) ölçümleri ise RIGAKU SMARTLAB X-IŞINLARI ile uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

Tampon çözeltilerin uygun pH'larda hazırlanabilmesi için Thermo Electron Corporation marka pH metre (Şekil 3.2.A) tercih edilmiştir. Katı kimyasalların tartımı için Ohaus marka hassas terazi (Şekil 3.2.B) kullanılmıştır.



Şekil 3.2. A. Thermo Electron Corporation marka pH metre, B. Ohaus marka hassas terazi

Örnek uygulama çalışmaları TÜBİTAK 119Z669 numaralı proje kapsamında Tunus Institut Pasteur de Tunis, Epidemiyoloji ve Veteriner Mikrobiyoloji laboratuvarlarında yapılmıştır. Bu kapsamda, gerçek örnek numunelerinin ölçümleri Voltalab markalı potansiyostatta gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Voltalab marka potansiyostat.

Tüm çalışma süresince gerçekleşen elektrokimyasal ölçümler FRA-modüllü Autolab potansiyostat PGSTAT101 cihazı (Şekil 3.4) ve NOVA 1.10 yazılım sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. FRA-modüllü Autolab potansiyostat PGSTAT101 cihazı.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Cu-(NH₂-BDC)-MOF sentezi için; polivinipirrolidon K30 (PVP) (Sigma-Aldrich), N-N dimetilformamid (DMF) (Sigma-Aldrich), Cu (NO₃)₂ (Sigma-Aldrich), 2-aminoteraflatik asit (NH₂-BDC) (Sigma-Aldrich) ve etanol (Merck) kullanılmıştır.

Elektrokimyasal *Leishmania* immunosensörün hazırlanması aşamasında; N-Hidroksisüksinimid (NHS) (Sigma-Aldrich), N- (3-Dimetilaminopropil-) N'-etilkarbodiimid (EDC) (Sigma-Aldrich), KMP-11 antijeni (Creative Diagnostics), anti-gp63 ise (Gene-Tex) kullanılmıştır.

Girişim denemeleri sırasında; anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) (Sigma-Aldrich), α -fetoprotein (anti- AFP) (Sigma-Aldrich) ve immunoglobulin G (anti-IgG) (Sigma-Aldrich) antikorları kullanılmıştır.

Örnek uygulama çalışmalarında, TÜBİTAK 119Z669 numaralı proje kapsamında Epidemiyoloji ve Veteriner Mikrobiyoloji laboratuvarlarından Institut Pasteur de Tunis, Tunus'tan gerçek örnek olarak crude *Leishmania* parazit antijeni ve kontrol olarak tavşan hiper-immün serumu kullanılmıştır.

Geliştirilen *Leishmania* immunosensörü elektrokimyasal ölçümler için potasyum hekzasiyanoferrat (II) trihidrat ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) (Sigma-Aldrich), potasyum hekzasiyanoferrat (III) ($K_3Fe(CN)_6$) (Sigma-Aldrich) reaktifleri redoks çifti olarak kullanılmıştır. Ayrıca elektrokimyasal ölçümlerin yapıldığı fosfat tamponun (PBS) hazırlanmasında, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck), sodyum fosfat dibazik dihidrat (Na_2HPO_4) (Sigma-Aldrich), sodyum klorür ($NaCl$) (Merck) ve $NaOH$ (Merck) kullanılmıştır.

Tüm deneylerde analitik saflıkta olan kimyasallar kullanılmış ve saf su ile uygun tamponlarda hazırlanmıştır.

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. 100 mM PBS hazırlanması (pH: 7,4):

Derişim 100 mM olacak şekilde KH_2PO_4 ve $Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$ tuzlarından hacmi 250 mL olacak şekilde belirli bir miktar tartılarak saf suda hazırlanmıştır. 100 mM PBS tamponu pH metre yardımı ile pH: 7,4 ayarlanmıştır. Destek elektrolit olarak hazırlanan tampon çözelti tüm elektrokimyasal ölçümlerde kullanılmıştır.

3.3.2. 20 mM tuzlu PBS hazırlanması (pH: 8,0):

Derişimi 100 mM KH_2PO_4 ve 10 mM $NaCl$ tuzları olacak şekilde tartılarak ayrı ayrı saf su ile çözündürülmüştür. pH metre yardımı ile tampon çözeltiye derişik $NaOH$ çözeltisi eklenerek pH'ı 8,0'e ayarlanmıştır. KMP-11 antijen çözeltisinin hazırlanmasında bu tampon kullanılmıştır.

3.3.3. Redoks prob çözeltisinin hazırlanması:

$K_3Fe(CN)_6$ ve $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ reaktiflerinden derişimleri 5mM olacak şekilde hazırlanıp 100 mM PBS tamponu (pH: 7,4) ayarlanmıştır.

3.3.4. EDC ve NHS çapraz bağlayıcı çözeltisinin hazırlanması:

Derişimi 100mM EDC ve 150mM NHS olacak şekilde her iki reaktiften uygun miktarlarda tartılarak saf su'da hazırlanmıştır.

3.3.5. KMP-11 antijen çözeltisinin hazırlanması:

KMP-11 antijeni protein derişimi 1,59 mg/mL olarak belirtilmiştir. Uygun derişimlerde KMP-11 hazırlanması için 20mM tuzlu PBS (pH= 8,0) kullanılmıştır.

3.3.6. Anti-gp63 çözeltisi hazırlanması:

Ana stok içerisinde *Leishmania* Gp63 antikoru uygun miktarlarda alınarak 100mM pH: 7,4 PBS içerisinde istenilen oranda seyreltme işlemi yapılmıştır.

3.4. Cu-(NH₂-BDC) MOF Yapısının Sentezi ve Karakterizasyonu

Cu-(NH₂-BDC) MOF hazırlandığı sentez prosedüründe 4 mL DMF, 4 mL etanol, 0,20 g PVP bir beher içerisinde karıştırılarak bir çözelti elde edilmiştir. Ardından bu çözeltiye 5,4 mg NH₂-BDC ve 18,1 mg Cu (NO₃)₂ ve 4 mL DMF eklenmiştir. Bütün bu işlemlerin ardından, çözeltiye 30 dakika sonikasyon işlemi uygulanmış ve çözelti teflon astarlı bir otoklava aktarılarak, 100°C'de 5 saat ısıtılmıştır. 5 saatin sonrasında, hidrotermal sentez reaktörü içindeki çözeltiye 20 mL DMF ilave edilmiştir. 100°C'de 8 saat daha ısıtım işlemi uygulanarak reaksiyona girmeyen reaktifler uzaklaştırılmıştır. 8 saat sonra, teflon astarlı otoklav oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan çözelti 4000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Yıkama işlemi yapılmış ve bu işlem beş kez tekrarlanmıştır. Elde edilen Cu-(NH₂-BDC) MOF'lara (2mL) saf su eklendikten sonra MOF süspansiyonu kullanıma hazır hale gelmiştir (Wang vd., 2018).

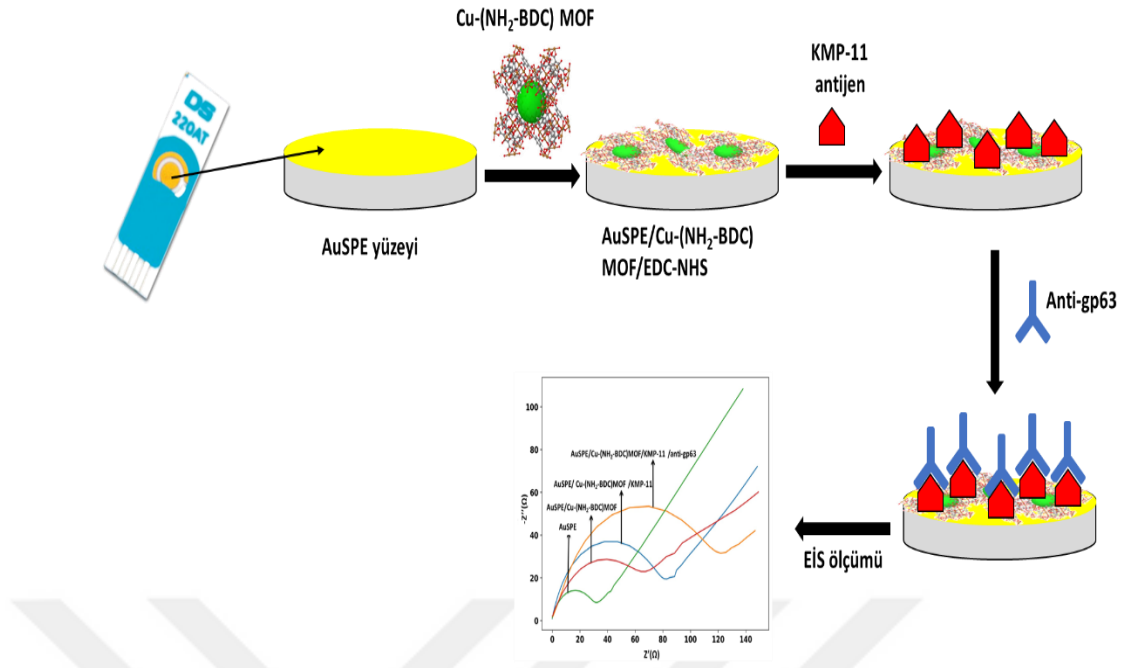
Sentezlenen Cu-(NH₂-BDC) MOF yapısı SEM, SEM-EDS, SEM haritalama ve XRD ölçüm yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir.

3.5. Elektrokimyasal *Leishmania* İmmunosensörün Hazırlanması

Leishmania immunosensör tasarımıında Dropsens marka AuSPE kullanılmıştır. İlk olarak, 1:3 oranında seyreltilmiş Cu-(NH₂-BDC) MOF süspansiyonundan 10 µL AuSPE yüzeyine damlatılmıştır. Çözücünün uçurulması sonrasında elektrot yüzeyine bağlanmamış MOF'lar pH: 7,4 PBS ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. AuSPE/ Cu-(NH₂-BDC) MOF yüzeyine derişimleri 100 mM EDC ve 150 mM NHS olan çapraz bağlayıcılarından 10 µL damlatılmış ve 10 dakika bekletilmiştir. Aynı şekilde pH: 7,4 PBS ile yıkama yapılmıştır. Çapraz bağlayıcılarla, KMP-11 antijenin yüzeye immobilize edilebilmesi için, elektrot yüzeyinde uygun bir biyoaktif tabaka oluşturmuştur. Elektrot yüzeyine, 20 µg/mL KMP-11 antijeninden, 10 µL damlatılıp 30 dakika beklenmiştir. Yıkama işleminden sonra, belirli oranda seyreltilen 10 µL anti-gp63 elektrot yüzeyine (AuSPE/ Cu-(NH₂-BDC) MOF/EDC-NHS/KMP-11) damlatılmış ve 1 saat inkübe edilmiştir. Tüm bu aşamalardan sonra tek kullanımlık *Leishmania* immunosensörü kullanıma hazır hale gelmiştir (Şekil 3.5.).

3.6. Geliştirilen *Leishmania* İmmunosensörünün Elektrokimyasal Ölçüm Prosedürü

Geliştirilen *Leishmania* immunosensörünün hazırlanma aşamasının her basamağında meydana gelen direnç değişimi, EIS yöntemiyle incelenmiştir. Bu amaçla, EIS ölçümleri, 5 mM K₄Fe(CN)₆.3H₂O / K₃Fe(CN)₆ redoks probu (70 µL) varlığında çalışma potansiyeli 0,1 V'da ve çalışma frekansı 0,1 Hz ile 10 kHz arasında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.5. *Leishmania* immunosensörün hazırlanması ve ölçüm prosedürü.

3.7. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu

Leishmania immunosensöründen en iyi performansı elde etmek için, deneysel parametreler optimize edilmiştir. Bu amaçla, Cu-(NH₂-BDC) MOF miktarı, AuSPE yüzeyine immobilize edilen KMP-11 antijen miktarı, KMP-11 antijenin bağlanma süresi, KMP-11 antijenin bağlanma sıcaklığı ve antijen-antikor inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları, 5 mM redoks probu varlığında 100mM pH 7,4 PBS kullanılarak yapılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler EIS yöntemi kullanılarak 0,1 V çalışma potansiyelinde ve 0,1 Hz ile 10 kHz frekans arasında gerçekleşmiştir.

3.7.1. Cu-(NH₂-BDC) MOF miktar optimizasyonu

Leishmania immunosensörünün modifikasyonunda kullanılan Cu-(NH₂-BDC) MOF miktarını, en iyi elektrokimyasal sinyali elde edebilmek için optimize edilmiştir. Bu amaçla, AuSPE yüzeyi 10 µL Cu-(NH₂-BDC) MOF yapısından farklı seyreltme oranlarıyla 1:1, 1:2, 1:3 ve 1:4 (saf su) modifiye edilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.7.2. KMP-11 antijen miktar optimizasyonu

Aktif biyolojik tabakanın optimal düzeyde olması, immunosensörün duyarlılığını doğrudan etkileyen önemli bir parametredir. Bu nedenle, pH 8,0 20mM tuzlu PBS ile hazırlanan 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL ve 30 µg/mL derişimlerdeki KMP-11 antijenleri kullanılarak dört farklı immunosensör hazırlanarak direnç değışimleri EIS yöntemiyle incelenmiştir.

3.7.3. KMP-11 antijen immobilizasyon süresi optimizasyonu

Geliştirilen immunosensörün kısa sürede hazırlanabilmesi, biyosensörlerde pratiklik açısından önemli bir parametredir (Tepeli, vd, 2015; Sayhi, vd, 2018; Diouani, vd, 2008). Bu bağlamda, immobilizasyon süresinin etkisini değerlendirmek amacıyla dört ayrı *Leishmania* immunosensörü hazırlanmıştır. KMP-11 antijeni farklı sürelerde (15, 30, 60 ve 120 dakika) elektrot yüzeyine immobilize edildikten sonra oluşan direnç değışimleri EIS yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

3.7.4. KMP-11 antijen immobilizasyon sıcaklık optimizasyonu

Leishmania immunosensörünün geliştirilmesinde, aktif biyolojik tabakayı oluşturacak olan KMP-11 antijeninin immobilizasyon sıcaklığı optimize edildi. Bu amaçla, Cu-(NH₂-BDC) MOF modifiye AuSPE yüzeyine KMP-11 antijeni farklı sıcaklıklarda (20°C, 25°C, 30°C ve 37°C) immobilize edilmiş ve elektrot yüzeyindeki direnç değışimi EIS yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

3.7.5. Antijen-antikor inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi optimizasyonu

Leishmania hastalığına ait mevcut antijen ve antikorların inkübasyon sıcaklığı literatürde bellidir. Bu nedenle, Cu-(NH₂-BDC) MOF modifiye AuSPE yüzeyine KMP-11 antijeninin inkübasyonu, uygun sıcaklık olan 25°C gerçekleştirilmiştir. (Diouani, vd, 2019; Escosura-Muniz, vd, 2010).

Ayrıca, geliştirilen *Leishmania* immunosensöründe farklı sürelerde (30, 60, 120 ve 150 dakika) KMP-11 antijenleri ile 1:200 seyrelme oranına sahip anti-gp63 çözeltisi inkübe edilmiştir. Elektrot yüzeyindeki direnç değişimi, EIS ölçümleri kullanılarak belirlenmiştir.

3.8. *Leishmania* İmmunosensörünün Analitiksel Karakterizasyonu

Optimize edilmiş deneysel parametreler kullanılarak hazırlanan *Leishmania* immunosensörüne ait analitiksel karakteristik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *Leishmania* immunosensörü, anti-gp63'ün artan derişimi ile buna bağlı olarak kullanılan redoks probunun direnç büyüklüğünün ters orantılı değişimi göz önünde bulundurularak, farklı oranlarda (1:40, 1:80, 1:160, 1:200, 1:320, 1:640, 1:1500) anti-gp63 çözeltileri hazırlanmıştır. Farklı seyrelme oranlarına sahip anti-gp63 derişimleri ile EIS ölçümleri sonucunda elde edilen direnç değerleri arasında kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve belirtme alt sınırı (LOD; 3s/m; s: körün standart sapması), saptama alt sınırı (LOQ; 10s/m), bağıl standart sapma (RSD) değerleri hesaplanmıştır.

3.9. Girişim Çalışması

Optimum çalışma koşullarında hazırlanan *Leishmania* immunosensörü, girişim etkisine neden olabilecek anti-VEGF, anti-AFP ve anti-IgG antikorlarını içeren bir karışımla test edilmiştir. Anti-gp63 1:320 seyrelme oranında, anti-VEGF (10 µg/mL), anti-AFP (5 µg/mL) ve anti-IgG (10 µL) örnekleri hazırlanmıştır. Bu karışım, immunosensör yüzeyine immobilize edilerek 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra EIS ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.10. Örnek Deneme Çalışması

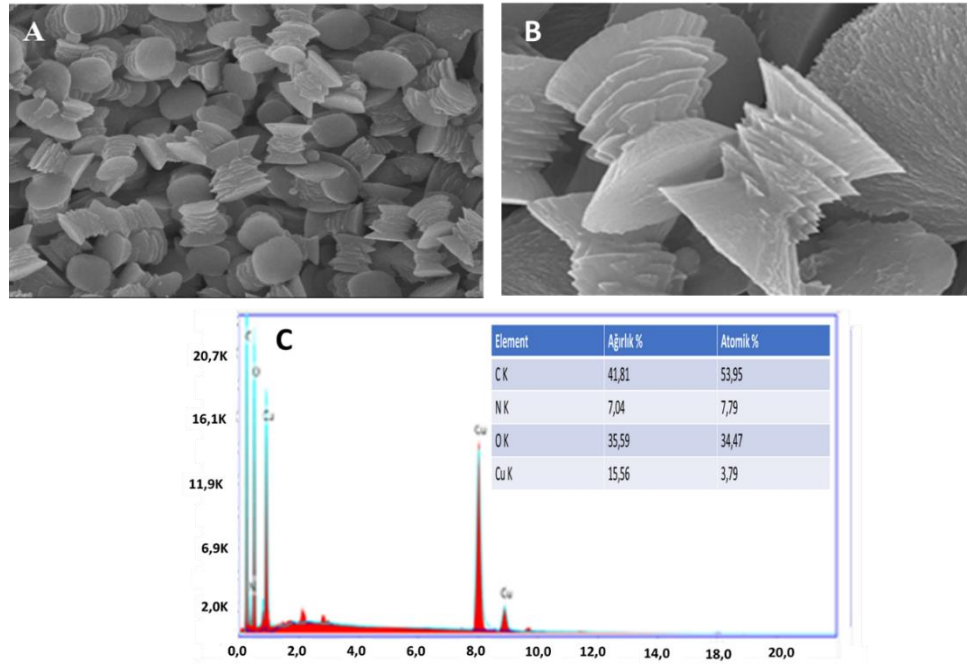
Optimum koşullarda hazırlanan *Leishmania* immunosensörü, pozitif örnek olarak crude *Leishmania* parazit antijeni ve negatif örnek olarak tavşan hiper-immün serumu kullanılarak bir örnek uygulama çalışması gerçekleştirilmiştir. KMP-11 antijeni yerine crude *Leishmania* parazit antijeni veya tavşan hiper-immün serumu, AuSPE/ Cu-(NH₂-BDC) MOF elektrot yüzeyine immobilize edilerek immunosensörler hazırlanmıştır. Daha sonra bu immunosensörler, anti-gp63 ile etkileşimleri sonucunda oluşan direnç farkları EIS teknikleri kullanılarak incelenmiştir.



4. SONUÇ

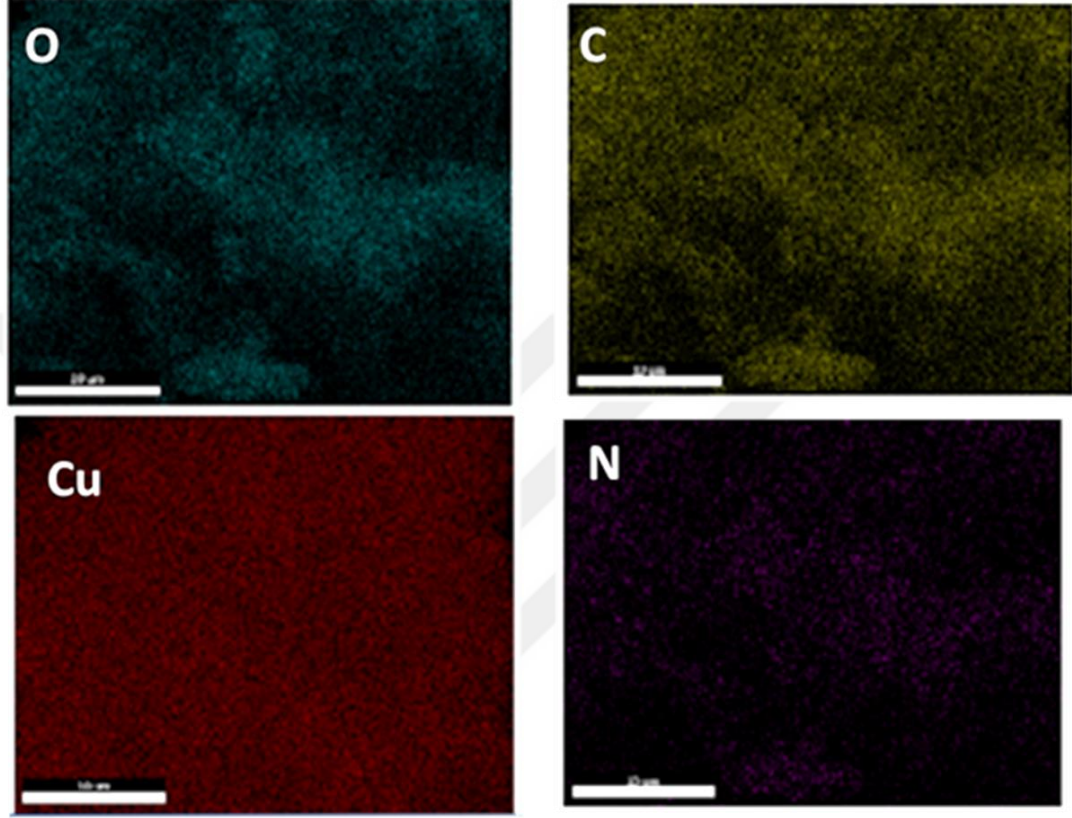
4.1. Cu-(NH₂-BDC) MOF Yapısının Karakterizasyonu

Cu-(NH₂-BDC) MOF yapısının, düzenli ve sıralı kübik mikrokristal yapıya sahip olduğunu gösteren Şekil 4.1.A'daki SEM görüntüsü, bu yapının başarılı bir şekilde sentezlendiğinin kanıtıdır. Bu yapı, literatürde bulunan Cu-MOF SEM görüntüleriyle tamamen uyumludur (Bagheri ve Ghaedi, 2020). Ayrıca, Şekil 4.1.B'deki SEM-EDS elemental analizi sonuçlarına göre, sentezlenen yapıda ağırlıkça %35,59 O, %41,81 C, %15,56 Cu ve %7,04 N; atomik olarak ise %53,95 C, %34,47 O, %3,79 Cu ve %7,79 N elementlerinin bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1.C). Bu sonuçlar, Cu-(NH₂-BDC) MOF yapısındaki ligandan kaynaklanan N atomunun varlığını ortaya koymaktadır.



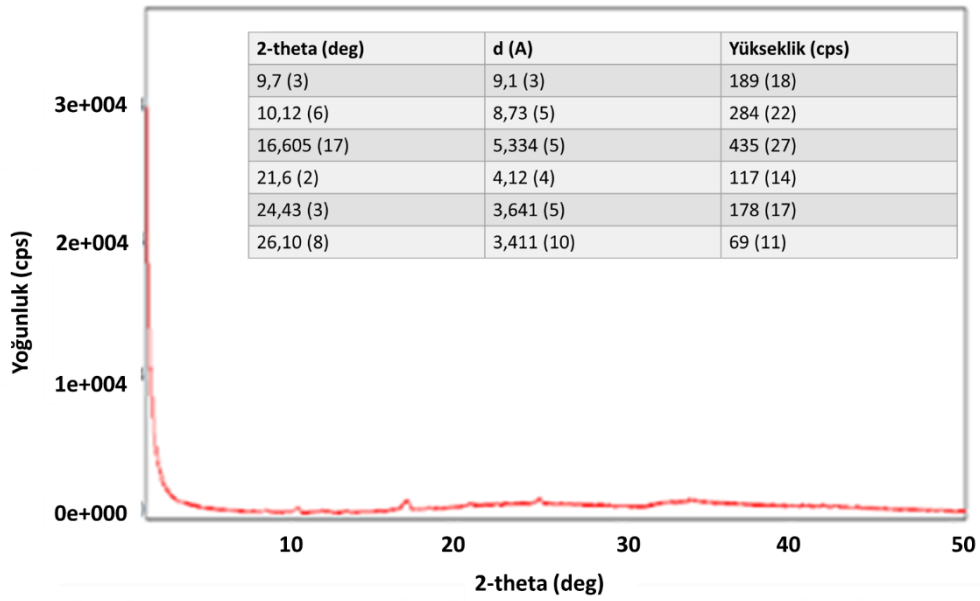
Şekil 4.1. Cu-(NH₂-BDC) MOF yapısına ait A. SEM görüntüsü, B. SEM-EDS elemental analizi gerçekleştirilen bölgenin görüntüsü C. EDS sonuçları.

Ek olarak, Şekil 4.1.B'deki SEM görüntüsü mevcut bölgede gerçekleştirilen elemental haritalama işlemi sonuçlarında Cu-(NH₂-BDC) MOF yapısı içinde Şekil 4.2'de Cu (kırmızı), C (sarı), O (mavi) ve N (mor) atomlarının elemental dağılımı açıkça gözükmemektedir.



Şekil 4.2. Cu-(NH₂-BDC) MOF yapısına ait SEM-haritalama işlemi gerçekleşen elementlerin dağılımlarına ait haritalama görüntüleri.

Cu-(NH₂-BDC) MOF yapısının karakterizasyonu için XRD yöntemi kullanılmıştır. Şekil 4.3.'da gösterilen XRD sonuçları, Cu-(NH₂-BDC) MOF yapısının karakteristik piklerini göstermektedir. Bu pikler, faz 2 θ 'de 9,7°, 10,12°, 16,60°, 21,60°, 24,46° ve 26,10° değerlerinde gözlenmiştir.



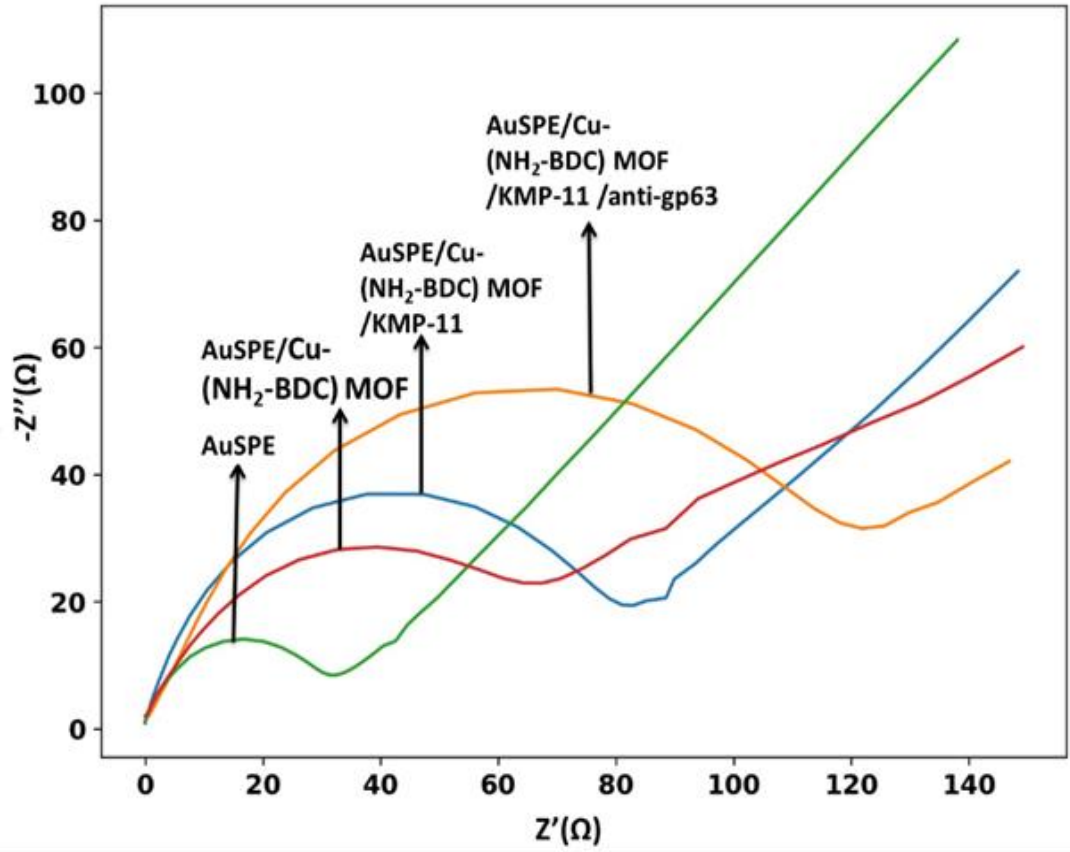
Şekil 4.3. Cu-(NH₂-BDC) MOF yapısına ait XRD ölçüm sonuçları.

Sonuç olarak, SEM, SEM-EDS, SEM-Haritalama ve XRD sonuçları incelendiğinde Cu-(NH₂-BDC) MOF yapısının başarılı bir şekilde sentezlendiği ortadadır.

4.2. *Leishmania* İmmunosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Leishmania immunosensörünün geliştirilme aşamasına ilişkin adımlar elektrokimyasal olarak EIS yöntemi ile karakterize edilmiştir. Şekil 4.4.'da görüldüğü gibi, yalın AuSPE en küçük yarı daire çemberine sahiptir. Bu, altın yüzeyinin yüksek iletkenlik özelliği nedeniyle elektron iletimini artırmasından kaynaklanır. Cu-(NH₂-BDC)-MOF ile yüzey modifiye edildiğinde, yarı daire alanı, yalın AuSPE'ye göre artar. Yalın AuSPE'nin direnç değeri 37,53 Ω iken, AuSPE/Cu-(NH₂-BDC) MOF'da 68,74 Ω olarak ölçülmüştür. Bu durum, Cu-(NH₂-BDC)-MOF'un altın yüzeyini tamamen kaplaması ve buna bağlı olarak sistemin iletkenliğinin azalması ve direncinin artmasının sonucudur.

Ardından, AuSPE/Cu-(NH₂-BDC) MOF yüzeyine KMP-11 antijenin EDC-NHS çapraz bağlayıcılarıyla immobilizasyonu sonucunda, direnç artışı meydana gelmiş ve 82,22 Ω değeri elde edilmiştir. Direnç artışı, elektron geçişinin engellenmesinin bir sonucudur. Son olarak, KMP-11 antijene özgü olan anti-gp63 yüzeye bağlandığında, yüzey bir önceki adıma göre daha fazla kaplanmış ve yine direnç artışı meydana gelmiştir. Bu, bir önceki yarı daire çapına göre 39,62 Ω 'lık bir direnç artışına neden olmuştur. Meydana gelen direnç değerleri Tablo 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. *Leishmania* immunosensörünün elektrokimyasal karakterizasyonuna ait Nyquist eğrileri

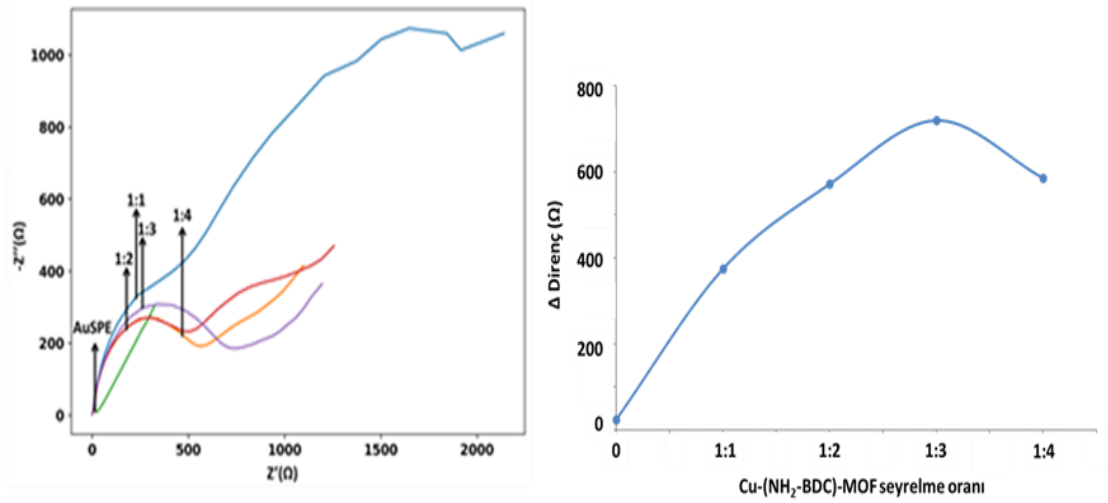
Tablo 4.1. *Leishmania* immunosensörünün elektrokimyasal karakterizasyonuna ait direnç değerleri tablosu.

Elektrot Tabakaları	Direnç (Ω)
AuSPE	37,53
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC) MOF	68,74
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC) MOF /KMP-11	82,22
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC) MOF /KMP-11/anti-gp63	121,84

4.3.Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu

4.3.1. Cu-(NH₂-BDC) MOF miktar optimizasyonu

Leishmania immunosensörünün geliştirilmesi için Cu-(NH₂-BDC) MOF miktarının etkisini incelemek amacıyla, AuSPE üzerine 10 μ L hacminde, 1:1, 1:2, 1:3 ve 1:4 (saf su) oranlarında seyreltilen Cu-(NH₂-BDC) MOF çözeltileri damlatılmış ve çözücü buharlaştırılmıştır. Daha sonra doğrudan EIS ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Nyquist eğrisinden de anlaşılabileceği üzere 1:1 seyreltme oranında MOF çözeltisiyle modifiye edilen AuSPE yüzeyinde, yüksek MOF derişiminden ötürü, yeni bir tabaka oluşumu gözlemlenmiştir. Ardından, 1:2 ve 1:3 oranında seyreltilmiş Cu-(NH₂-BDC) MOF çözeltisi ile modifiye edilen AuSPE ile elde edilen Nyquist eğrilerinde düzenli bir impedans artışı meydana gelmiştir. Bunun aksine, 1:4 seyreltme oranınlı MOF çözeltisinin kullanıldığı AuSPE yüzeyinde tam bir kaplama olmadığı için, elde edilen direnç değerinde azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak, optimum Cu-(NH₂-BDC)-MOF seyrelme oranının 1:3 olduğu bulunmuştur. Üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen ölçümlerle elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 4.5.'de verilerek, direnç farklanmaları ise Tablo 4.2'te belirtilmiştir.



Şekil 4.5. Cu-(NH₂-BDC) MOF miktar etkisini gösteren Nyquist eğrileri ve excel grafiği.

Tablo 4.2. Yalın AuSPE ve 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 seyrelme oranlarına göre hazırlanan AuSPE/Cu (NH₂-BDC) MOF elektrotların direnç farklanma tablosu.

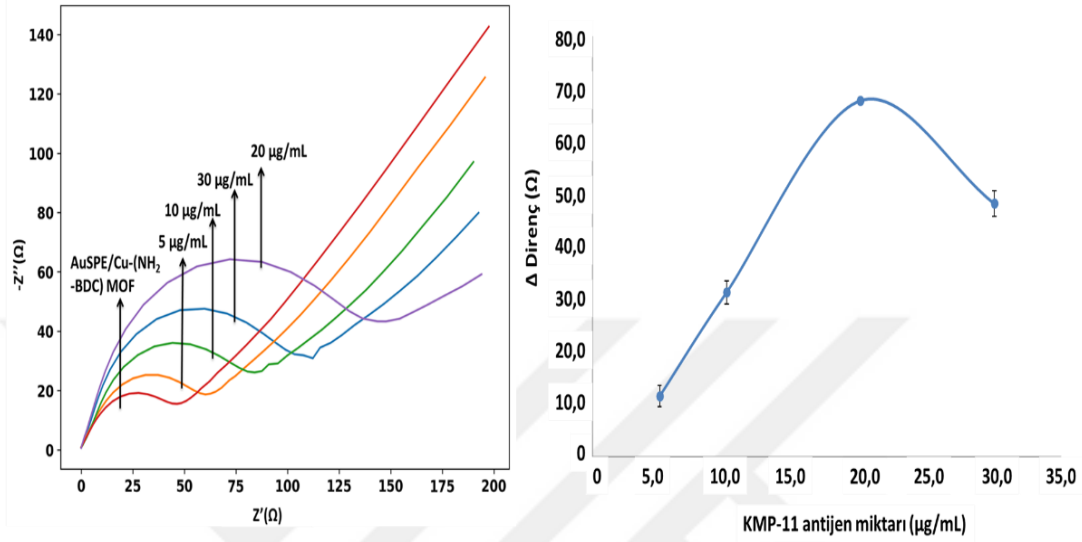
Cu-(NH ₂ -BDC) MOF seyreltme oranları	Δ Direç (Ω)
Yalın AuSPE	24,03
1:1	350,39
1:2	547,63
1:3	695,46
1:4	561,08

4.3.2. KMP-11 antijen miktar optimizasyonu

Leishmania immunosensörünün etkin biyolojik tabakası, immunosensörün duyarlılığını doğrudan etkileyen önemli bir parametre olarak kabul edilir. Bu nedenle, KMP-11 antijenlerinden 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL ve 30 µg/mL derişimleri hazırlanarak (pH=8,0 20mM tuzlu PBS), bu derişimlerin etkileri EIS yöntemi kullanılarak izlenmiştir (Şekil 4.6). Şekil 4.6'de gösterilen Nyquist eğrilerinden de anlaşılabilirceği gibi, 5 µg/mL ile 20 µg/mL KMP-11 antijen derişimi aralığında, impedans değerinde düzenli bir artış gözlenirken, 30 µg/mL KMP-11 antijen derişiminde impedans değerinde bir azalma meydana gelmiştir.

Bu nedenle, 20 µg/mL KMP-11 antijen derişimi, optimum antijen derişimi olarak belirlenmiştir.

Üç tekrarlı ölçümlerle elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 4.6'de ve direnç farklanmaları ise Tablo 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.6. KMP-11 antijen konsantrasyon değişimine ait Nyquist eğrileri ve excel grafiği.

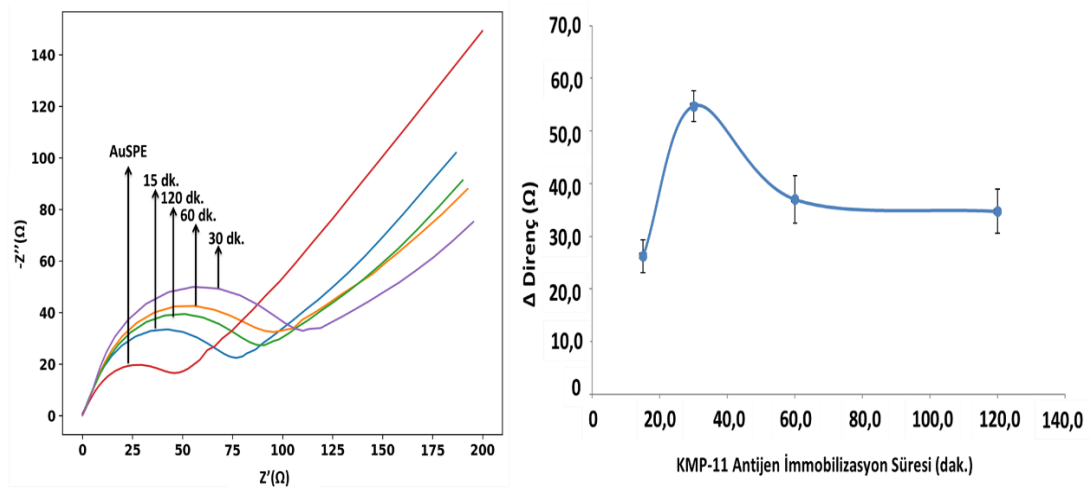
Tablo 4.3. 0 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL ve 30 µg/mL konsantrasyonlarında KMP-11 antijenlerin direnç farklanma tablosu.

KMP-11 antijen miktarı (µg/mL)	Δ Direnç (Ω)
AuSPE/Cu-(NH ₂ -BDC)-MOF	48,09
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC)-MOF/ 5 µg/mL KMP-11	9,06
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC)-MOF/ 10 µg/mL KMP-11	31,29
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC)-MOF/ 20 µg/mL KMP-11	93,67
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC)-MOF/ 30 µg/mL KMP-11	58,61

4.3.3. KMP-11 antijen immobilizasyon süresi optimizasyonu

Biyosensörlerde pratikliğin artması için, geliştirilen sistemlerin hazırlanma sürelerinin mümkün olduğunca kısa olması tercih edilir (Tepeli, vd, 2015; Sayhi, vd, 2018; Diouani, vd, 2008).

Ancak bu sürede, biyoreseptör içinde yer alan biyolojik molekülün de en iyi şekilde yüzeye immobilize olması gerekir. Bu durumu optimize etmek için, elektrot yüzeyindeki biyoaktif tabakayı oluşturan KMP-11 antijeninin immobilizasyon süresi optimize edilmiştir. AuSPE yüzeyine 1:3 oranında hazırlanan Cu-(NH₂-BDC)-MOF ile KMP-11 antijeni 15, 30, 60, 120 dakika immobilizasyon süreleri kullanılarak immobilize edilmiş ve bu süre sonunda elde edilen direnç değişimleri EIS yöntemiyle ölçülmüştür. 30 dakikaya kadar, immobilize olan KMP-11 antijenlerinin elektrot yüzeyine zamanla doğru orantılı olarak bağlanması yüzeydeki direnci önemli ölçüde arttırmıştır. Ancak 60 ve 120 dakika gibi daha uzun süreli immobilizasyonlarda, direnç değerlerinde azalma gözlenmiştir (Şekil 4.7. ve Tablo 4.4.). Bu durum, uzun süreli immobilizasyon sonucunda, yüzeye bağlanan KMP-11 antijenlerinin zamanla yüzeyden ayrılmış olabileceğini göstermektedir (Mitnaul, vd, 2000; Anık, vd, 2018). Bu nedenle, çalışmanın devamında 30 dakika antijen optimum immobilizasyon süresi olarak belirlenmiştir.



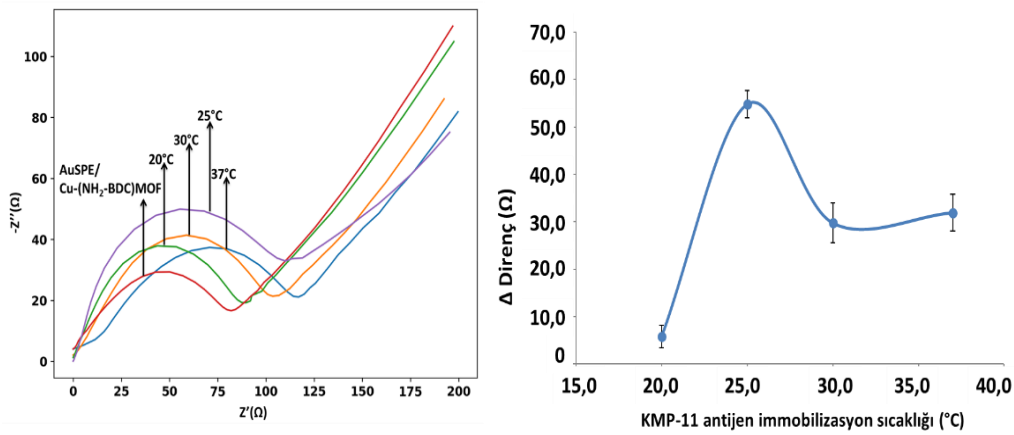
Şekil 4.7. *Leishmania* immunosensörü için KMP-11 antijeni immobilizasyon süre optimizasyonu için Nyquist eğrileri ve excel grafiği.

Tablo 4.4. KMP-11 antijenin immobilize olma (15, 30, 60, 120 dakika) sürelerinin sonucunda meydana gelen direnç farklanma tablosu.

KMP-11 antijen immobilizasyon süresi (dk)	Δ Direnç (Ω)
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC) MOF	54,61
AuSPE / Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/KMP-11 (15 dk)	26,23
AuSPE / Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/ KMP-11 (30 dk)	54,74
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/ KMP-11 (60 dk)	35,39
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/KMP-11 (120 dk)	31,58

4.3.4. KMP-11 antijen immobilizasyon sıcaklık optimizasyonu

Cu-(NH₂-BDC) MOF modifiye AuSPE yüzeyine 20 µg/mL KMP-11 antijeni, 20°C, 25°C, 30°C ve 37°C sıcaklıklarda 30 dakika süreyle inkübe edilmiş ve elektrot yüzeyindeki direnç değişimi EIS ile belirlenmiştir. Sonuç olarak, Şekil 4.8.'te görüldüğü gibi, 25°C'nin altında ve üzerindeki sıcaklıklarda elektrot yüzeyine daha az KMP-11 antijeni bağlanmış ve 25°C'de elde edilen direnç değerlerine göre daha küçük direnç değerleri elde edilmiştir (Diouani, vd, 2019). Ayrıca, 25°C oda sıcaklığına denk geldiği için bu durum, geliştirilen biyosensöre pratiklik kazandırmıştır. Bu nedenle çalışmanın devamında KMP-11 antijenin optimum immobilizasyon sıcaklığı oda sıcaklığı olan 25°C belirlenmiştir.



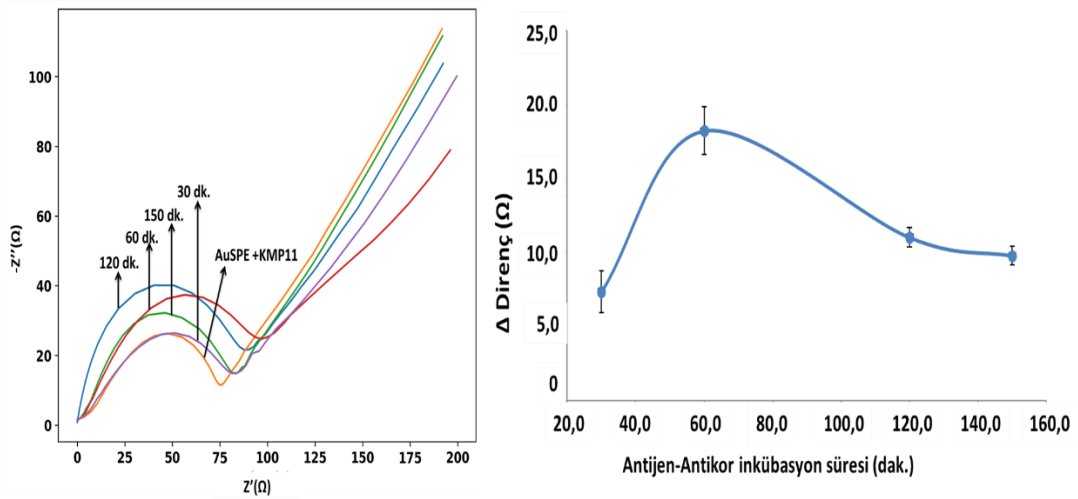
Şekil 4.8. KMP-11 antijeninin immobilizasyon sıcaklığının optimizasyonunda elde edilen Nyquist eğrileri ve excel grafiği.

Tablo 4.5. KMP-11 antijeni immobilizasyon sıcaklık (20°C, 25°C, 30°C ve 37°C) değişimine ait direnç farklanmaları tablosu.

KMP-11 antijen immobilizasyon sıcaklık optimizasyonu (°C)	Δ Direnç (Ω)
AuSPE/Cu-(NH ₂ -BDC) MOF	77.13
AuSPE / Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/ KMP-11 (20 °C)	4,37
AuSPE / Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/ KMP-11 (25 °C)	50,32
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/ KMP-11 (30 °C)	27,0
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/ KMP-11 (37 °C)	39,0

4.3.5. Antijen-antikor inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon süresi optimizasyonu

Leishmania virüsüne ait antikor ve antijen etkileşimi için inkübasyon sıcaklığı genellikle 25°C oda sıcaklığıdır (Diouani, vd, 2019; Escosura-Muniz, vd, 2010). Diğer yandan, 1:200 seyrelme oranında (pH 7,4 PBS içinde) anti-gp63'nin 30, 60, 120 ve 150 dakika süreyle, yani dört farklı inkübasyon süresi boyunca, optimum koşullarda hazırlanan *Leishmania* immunosensörüyle etkileşimi incelenmiştir. Şekil 4.9. daki Nyquist eğrilerinden ve Tablo 4.6.'dan açıkça görüldüğü gibi, 60 dakika optimum inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Antijen-Antikor inkübasyon süresi optimizasyonu deneylerinden elde edilen Nyquist eğrileri ve excel grafiği.

Tablo 4.6. *Leishmania* immunosensörü için 30, 60, 120 ve 150 dakika Antijen-Antikor inkübe edilmesi sonucu meydana gelen direnç farklanma tablosu.

Antijen-Antikor inkübasyon süresi optimizasyonu (dk.)	Δ Direnç (Ω)
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/ KMP-11	75,62
AuSPE / Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/ KMP-11/anti-gp63 (30dk)	5,6
AuSPE / Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/ KMP-11/anti-gp63 (60dk)	18,25
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/ KMP-11/anti-gp63 (120dk)	11,04
AuSPE/ Cu-(NH ₂ -BDC) MOF/ KMP-11/anti-gp63 (150 dk)	9,08

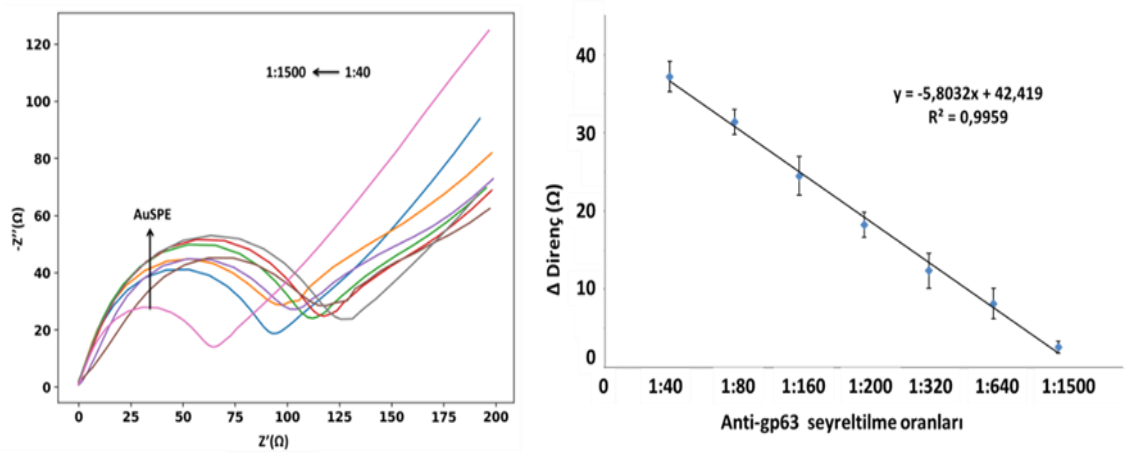
4.4. *Leishmania* İmmunosensörünün Analitiksel Karakterizasyonu

Optimum koşullarda hazırlanan *Leishmania* immunosensörünün doğrusal yanıt aralığını belirlemek amacıyla 1:40, 1:80, 1:160, 1:200, 1:320, 1:640 ve 1:1500 oranlarında seyreltilmiş anti-gp63 kullanılarak immunosensörün performansı EIS yöntemiyle incelenmiştir.

Anti-gp63'nün seyrelme oranına karşı elde edilen impedans değerleri grafiğe aktarılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.10).

Kalibrasyon grafiği incelendiğinde 1:40 ila 1:1500 arasında seyrelme oranına sahip anti-gp63 ile doğrusal yanıt aralığının $y = -5,8032x + 42,419$ eşitliği ve $R^2 = 0,9959$ değerine sahip olduğu bulunmuştur. LOD değeri, kalibrasyon grafiğindeki en yüksek seyrelme oranı olan 1:1500 olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, 1:80 seyrelme oranına sahip anti-gp63 için (n=3 tekrarlı olarak) %RSD değeri %4,76 olarak saptanmıştır.

Öte yandan, geliştirilen immunosensörün analitiksel karakteristik değerleri, literatürde yer alan bazı *Leishmania* immunosensörleriyle kıyaslanmıştır (Tablo 4.8.). Bunun sonucunda bu tez kapsamında geliştirilen immunosensörün, Tablo 4.8.'de yer alan birçok immunosensörden daha geniş doğrusal yanıt aralığına sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.10. *Leishmania* immunosensörünün analitiksel karakterizasyonunda farklı seyrelme oranlarında anti-gp63 ile etkileşimi sonucu elde edilen Nyquist eğrileri ve excel grafiği.

Tablo 4.7. Anti-gp63 farklı seyrelme oranlarında hazırlanması ile gerçekleşen analitiksel karakterizasyon çalışması sonucu elde edilen direnç farklanma tablosu.

Anti-gp63 Seyrelme Oranları	Δ Direnç (Ω)
AuSPE	68,44
1:40	40,95
1:80	31,44
1:160	24,49
1:200	18,24
1:320	12,36
1:640	8,16
1:1500	2,58

Tablo 4.8. Geliştirilen *Leishmania* immunosensörünün analitik performansının benzer biyosensör çalışmalarla karşılaştırma tablosu.

Elektrot	Modifiye	Tespit Yöntemi	İmmunosensör	Doğrusal Aralık	Belirtilen alt sınırı	Referans
SPEs		EIS	<i>Leishmania infantum</i> antigen/anti- <i>Leishmania infantum</i>	1:40-1:1280		(Cordero vd., 2019)
SPCE	AuNP	CV	<i>Leishmania infantum</i> antijen-anti- <i>Leishmania</i> türleri	1:25-1:100,000	202ng mL ⁻¹	(Martins vd., 2020)
Altın elektrot	11-MUA	SPR	<i>Leishmania infantum</i> antigen/anti- <i>Leishmania</i>	1:50-1:102,400		(Souto vd., 2013)

Tablo 4.8. (Devam)

<i>a</i> <i>infantum</i>						
dSPCE	4-HPA	EIS- CV	Lci1A/rLc i2B rekombin ant antijen- anti- <i>Leishmani</i> <i>a</i> <i>infantum</i>	1:40- 1:5120		(Cord eiro vd., 2020)
Kuvars kristal altın elektrot		Piezoelek trik	rLci2B- NH6/ anti- <i>Leishmani</i> <i>a chagasi</i>	1:400– 1:3200		(Ram os- Jesus vd., 2011)
Düzlemsel altın SPR disk	CYS/SA M	SPR	Rekombin ant C1 antijen/ anti-C1	1.42–7.5 6 µg mL ⁻¹	1,08×1 06 pg mL ⁻¹	(Sout o vd., 2015)
AuSPE	Cu- (NH ₂ - BDC)- MOF	EIS	KMP-11 antijen- anti-gp63	Antikorla rın seyreltm e oranı 1:40- 1:1500	1:1500	Bu çalışm a

(SPR: yüzey plazmon rezonans, SPEs: yüzey baskılı elektrotlar, 4-HPA: poli (4-hidroksifenilasetik asit), 11-MUA: 11-merkaptoundekanoik asit, dSPCE: çift yüzey baskılı karbon elektrot, C1: Hypothetical protein, CYS:sisteamine, SAM: Self-assembled monolayer,)

4.5.Girişim Çalışması

Optimum koşullarda hazırlanan ve 1:320 seyrelme oranına sahip antigp63 varlığında *Leishmania* immunosensörü yüzeyine, 10 µg/mL anti-VEGF, 5 µg/mL anti-AFP ve 10 µL anti-IgG karışımı immobilize edilmiştir (Nazari-Vanani vd., 2020).

Girişimcilerin 1 saat inkübasyon sonrasında yapılan EIS ölçümleri yorumlanmış ve geri kazanım değeri %99,91 olarak hesaplanmıştır. Bu geri kazanım değeri sonucunda, incelenen girişimcilerin geliştirdiğimiz immunosensör üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını söyleyebiliriz.

4.6. Depolama Kararlılığının İncelenmesi

Hazırlanan *Leishmania* immunosensörün depolama kararlılığı, 1:320 seyrelme oranındaki anti-gp63 tayinin ardışık iki gün boyunca aynı elektrotla yapılmasıyla ölçülmüştür.

Elde edilen EIS ölçümlerinde, ilk gün direnç değeri farkı 25,00 Ω olarak belirlenmiştir, ancak ikinci gün aynı elektrotla yapılan ölçümde direnç değeri farkı 12,36 Ω olarak kaydedilmiştir (+4°C'de saklanmıştır). Geri kazanım değeri ikinci günün sonunda %51,5 olarak bulunmuş ve sonuç olarak, immunosensör performansında yüksek bir kayıp gözlenmiştir. Bu sonuçlar, geliştirilen *Leishmania* immunosensörünün tek kullanımlık olması gerektiğini göstermektedir.

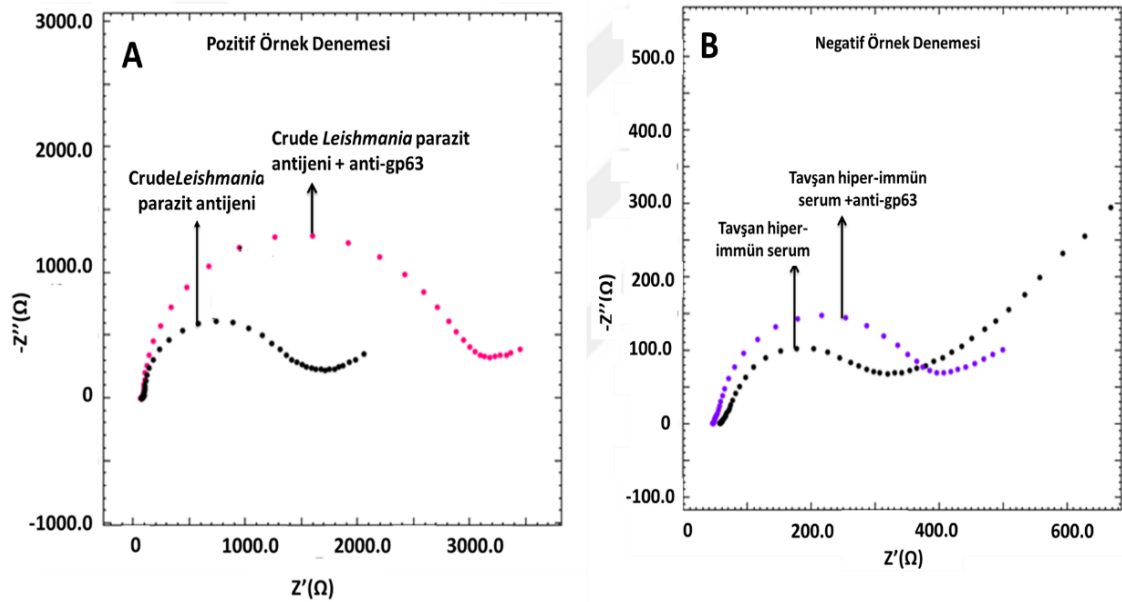
4.7. Örnek Deneme Çalışması

Geliştirilen ve optimize edilen *Leishmania* immunosensörü, in vitro olarak gerçek örneklerle uyarlanmıştır. Bu amaçla, *Leishmania* immunosensörü hazırlanmasında KMP-11 antijeni yerine crude *Leishmania* parazit antijeni (pozitif örnek) veya tavşan hiper-immün serumu (kontrol örnek) elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Her iki antijenin de derişimi 20 $\mu\text{g/mL}$ olarak ayarlanmış ve AuSPE/Cu-(NH₂-BDC)-MOF yüzeyine 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

Pozitif örnekte, AuSPE/Cu-(NH₂-BDC)-MOF/ crude *Leishmania* parazit antijeni yüzeyine 1:200 seyrelme oranına sahip anti-gp63 immobilize edilmiş ve 1 saat boyunca inkübasyon yapılmıştır. Bu işlemden sonra EIS ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Anti-gp63'nin bağlanması sonucunda direnç artışı meydana gelmiş ve direnç farkı 1604,64 Ω olarak belirlenmiştir. Meydana gelen direnç farkı Şekil 4.11.A'da gösterilmiştir.

Negatif örnekte ise, AuSPE/Cu-(NH₂-BDC)-MOF/tavşan hiper-immün serum yüzeyine 1:200 seyrelme oranına sahip anti-gp63 immobilize edilmiş ve 1 saat boyunca inkübasyon yapılmıştır. EIS ölçümleri sonucunda negatif örnekte anti-gp63'nin immobilize olmadığından dolayı sadece hafif bir artış (90,00 Ω) gözlenmiştir (Şekil 4.11.B).

Bu çalışma, geliştirilen *Leishmania* immunosensörünün gerçek *Leishmania*'nın tespiti için kullanılabilirliğini göstermektedir. Pozitif örnekte anti-gp63 ile direnç artışı elde edilirken, negatif örnekte anti-gp63'nin immobilize olamadığından düşük bir direnç artışı gözlenmiştir.



Şekil 4.11. *Leishmania*'nın gerçek tespiti için geliştirilen *Leishmania* immunosensörün A. pozitif ve B. negatif örnek denemelerine ait Nyquist eğrileri.

4.8. Yorum

Leishmaniasis, kötü yaşam koşulları ve yetersiz sağlık hizmetleri ile sıkı bir ilişkiye sahiptir. Bu hastalık, genellikle gelişmekte olan ülkelerde ve düşük sosyoekonomik gruplarda yaygındır. Bu nedenle pratik, hassas, doğru ve düşük maliyetli *Leishmania* tanı testlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez kapsamında Cu-(NH₂-BDC)-MOF modifiye anti-gp63 ve KMP-11 antijeni arasındaki etkileşime dayalı elektrokimyasal *Leishmania* immunosensörü geliştirilmiştir. *Leishmania* immunosensörü tasarımı bu MOF yapısı ilk kez kullanılmıştır. Gerçekleştirilen denemeler sonucunda, Cu-(NH₂-BDC) MOF optimum miktarının 1:3 oranında seyreltilmiş süspansiyon olduğu, KMP-11 antijenin optimum miktarının 20 µg/mL ve immobilize olma sıcaklığının 25°C olduğu, KMP-11 antijeni-Gp63 antikoru inkübasyon süresinin 60 dak ve inkübasyon sıcaklığının literatürde çokça kullanılan 25°C olduğu saptanmıştır. Ardından optimum deneysel koşullar altında, 1:40 ila 1:1500 arasında seyrelme oranına sahip anti-gp63 için doğrusal yanıt aralığı elde edilmiş ve grafikte $R^2 = 0,9959$, $y = -5,8032x + 42,419$ denklemiyle bulunmuştur.

LOD değeri ise 1:1500 seyrelme oranına sahip anti-gp63 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, 1:80 seyrelme oranına sahip anti-gp63 için (n:3 tekrarlı) %RSD değeri %4,76 olarak bulunmuştur.

Diğer yandan, girişimci etkisi incelenmiş ve 10 µg/mL anti-VEGF, 5 µg/mL anti-AFP, 10 µL anti-IgG karışımı varlığında 1:320 seyrelme oranında hazırlanan anti-gp63 analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucunda geri kazanım değeri %99,91 olarak bulunmuştur. Bu değer, girişimcilerin geliştirilen immunosensör üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Son olarak örnek uygulama denemeleri için pozitif örnek olarak crude *Leishmania* parazit antijeni ve negatif örnek olarak tavşan hiper-immün serum kullanılarak gerçek örneklerde çalışılmıştır.

Sonuç olarak sınırlı kaynaklara sahip ortamlarda, insan ve veterinerlik tıbbı uygulamalarında kullanım için pratik, kullan-at ve taşınabilir bir *Leishmania* immunosensörü geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Anık, U., Tepeli, Y., Sayhi, M., Nsiri, J., Diouani, M. (2018) Towards the Electrochemical Diagnostic of Influenza Virus: Development of Graphene-Au Hybrid Nanocomposite Modified Influenza Virus Biosensor Based on Neuraminidase Activity, *Analyst*, 143(1): 150-156.
- Bagheri, A.R. ve Ghaedi, M. (2020) Application of Cu-based metal-organic framework (Cu-BDC) as a sorbent for dispersive solid-phase extraction of gallic acid from orange juice samples using HPLC-UV method, *Arab. J. Chem*, 13(5): 5218-5228.
- Bennis, I., Thys, S., Filali, H., De Brouwere, V., Sahibi, H. ve Boelaert, M. (2017) Psychosocial impact of scars due to cutaneous leishmaniasis on high school students in Errachidia province, Morocco. *Infect. Dis. Poverty*, 6: 1-8.
- Bonanni, A., Loo, A. H. ve Pumera, M. (2012) Graphene for impedimetric biosensing, *TrAC, Trends Anal. Chem*, 37: 12-21.
- Burza, S., Croft, S.L. ve Boelaert, M. (2018) Leishmaniasis, *Lancet*, 392: 951-970.
- Büyüksünetçi Tepeli, Y. (2022) *Nöraminidaz ve hemaglutinin temelli elektro-nano diyagnostik platformlar: influenza ve kanser tanısına yönelik model sistemlerin geliştirilmesi*, PhD. Thesis, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 118s.
- Cristea, C., Florea, A., Tertiş, M. ve Săndulescu, R. (2015) Immunosensors, In *Biosensors-micro and nanoscale applications*. IntechOpen.
- Cho, I.H., Kim, D.H. ve Park, S. (2020) Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis, *Biomater. Res*, 24(1): 1-12.
- Cordeiro, T.A., Gonçalves, M.V., Franco, D.L., Reis, A.B., Martins, H.R. ve Ferreira, L.F. (2019) Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis, *Talanta*, 195: 327-332.
- Cordeiro, T.A.R., Martins, H.R., Franco, D.L., Santos, F.L.N., Celedon, P.A.F., Cantuária, V.L., Lana, M., Reis, A.B. ve Ferreira, L.F. (2020) Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of Chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis, *Biosens. Bioelectron*, 169: 112573.
- Coulet, P.R. (2019) What is a Biosensor?, *Biosensor principles and applications*, 1-6.
- Desjeux, P. (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*, 27(5): 305-318.
- de Vries, H. J., Reedijk, S. H. ve Schallig, H. D. (2015) Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management, *Am. J. Clin. Dermatol.* 16: 99-109.

- Diouani, M.F., Ouerghi, O., Belgacem, K., Sayhi, M., Ionescu, R. ve Laouini, D. (2019) Casein-conjugated gold nanoparticles for amperometric detection of leishmania infantum, *Biosensors*, 9(2): 68.
- Diouani, M.F., Helali, S., Hafaid, I., Hassen, W.M., Snoussi, M.A., Ghram, A., Jaffrezic-Renault, N. ve Abdelghani, A. (2008) Miniaturized biosensor for avian influenza virus detection, *Mater. Sci. Eng. C*, 28(5-6): 580-583.
- Escosura-Muniz, A., Maltez-da Costa, M., Sánchez-Espinel, C., Díaz-Freitas B., Fernández-Suarez, J., González-Fernández, A. ve Merkoci, A. (2010) Gold nanoparticle-based electrochemical magnetoimmunosensor for rapid detection of anti-hepatitis B virus antibodies in human serum, *Biosens. Bioelectron*, 26(4): 1710-1714.
- Fernández-Sánchez, C., McNeil, C.J. ve Rawson, K. (2005) Electrochemical impedance spectroscopy studies of polymer degradation: application to biosensor development, *TrAC, Trends Anal. Chem*, 24(1): 37-48.
- Gizeli, E. ve Lowe, C. R. (1996) Immunosensors, *Curr. Opin. Biotechnol*, 7(1): 66-71.
- Guerbouj, S., Mkada-Driss, I. ve Guizani, I. (2014) Molecular tools for understanding eco-epidemiology, diversity and pathogenesis of Leishmania parasites, *Leishmaniasis—Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment; InTech: Rijeka, Croatia*, 61-103.
- Harman, M. (2015) Cutaneous Leishmaniasis, *Turk J Dermatol*, 9: 168-176.
- Kavita, V. (2017) DNA biosensors-a review, *J. Bioeng. Biomed. Sci*, 7(2): 222.
- Koyun, H. N. (2022). *Ferritin tayini için grafen alan etkili biyosensör tasarımı geliştirilmesi*, MsC Thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 88s.
- Martins, B.R., Barbosa, Y.O., Andrade, C.M., Pereira, L.Q., Simão, G.F., de Oliveira, C.J., Correia, D., Oliveria, R.T.S., Silva, M.V., Silva, A.C.A., Dantas, N.O., Rodrigues, V., Munoz R.A.A. ve Alves-Balvedi, R.P. (2020) Development of an electrochemical immunosensor for specific detection of visceral leishmaniasis using gold-modified screen-printed carbon electrodes, *Biosensors*, 10(8): 81.
- Mitnaul, L.J., Matrosovich, M.N., Castrucci, M.R., Tuzikov, A.B., Bovin, N.V., Kobasa D. ve Kawaoka, Y. (2000) Balanced Hemagglutinin and Neuraminidase Activities Are Critical for Efficient Replication of Influenza A Virus, *J. Virol.* 74(13): 6015-6020.
- Mobed, A., Mehri, P., Hasanzadeh, M. ve Mokhtarzadeh, A. (2020) Binding of Leishmania spp with gold nanoparticles supported polyethylene glycol and its application for the sensitive detection of infectious photogenes in human plasma samples: A novel biosensor. *J. Mol. Recognit*, 33(7): e2839.
- Mohanty, S.P. ve Kougianos, E. (2006) Biosensors: A tutorial review. *Ieee Potentials*, 25(2): 35-40.

- Nazari-Vanani, R., Heli, H. ve Sattarahmady N. (2020) An impedimetric genosensor for *Leishmania infantum* based on electrodeposited cadmium sulfide nanosheets, *Talanta*, 27: 121080.
- Özer, İ., Tezel, H., Sanajou, S., Yirün, A., Baydar, T. ve Erkekoğlu, P. (2022) Biyosensörler ve Kullanım Alanları: Geleneksel Derleme, *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 11(1): 35-48.
- Pavli, A. ve Maltezou, H.C. (2010) Leishmaniasis, an emerging infection in travelers, *Int. J. Infect. Dis.*, 14(12): e1032-e1039.
- Ramos-Jesus, J., Carvalho, K.A., Fonseca, R.A., Oliveira, G.G., Melo, S.M.B., Alcântara-Neves, N.M. ve Dutra, R.F. (2011) A piezoelectric immunosensor for *Leishmania chagasi* antibodies in canine serum, *Anal. Bioanal. Chem.*, 401: 917-925.
- Ready P.D. (2014) Epidemiology of visceral leishmaniasis, *Clin Epidemiol*, 6: 147–54.
- Ronkainen, N.J., Halsall, H.B. ve Heineman, W.R. (2010) Electrochemical biosensors, *Chem. Soc. Rev.*, 39(5): 1747-1763.
- Rossi M. ve Fasel N. (2018) How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!, *Int. Immunol.*, 30: 103-111.
- Sassolas, A., Blum, L.J. ve Leca-Bouvier, B.D. (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnol. Adv.*, 30(3): 489-511.
- Savioli, L. ve Daumerie, D. (2013) Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases (Vol. 2). World Health Organization.
- Savioli, L., Albonico, M., Daumerie, D., Lo, N.C., Stothard, J.R., Asaolu, S., Tchuenté L.A.T. ve Anderson, R.M. (2017) Review of the 2017 WHO Guideline: Preventive chemotherapy to control soil-transmitted helminth infections in at-risk population groups. An opportunity lost in translation. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(4): e0006296.
- Sayhi, M., Ouerghi, O., Belgacem, K., Arbi, M., Tepeli, Y., Ghram, A., Anık, U., Österlund, L., Laouini, D. ve Diouani, M.F. (2018) Electrochemical detection of influenza virus H9N2 based on both immunomagnetic extraction and gold catalysis using an immobilization-free screen printed carbon microelectrode, *Biosens. Bioelectron.*, 107: 170-177.
- Soares, I.P., da Silva, A.G., da Fonseca Alves, R., de Souza Corrêa, R.A.M., Ferreira, L.F. ve Franco, D.L. (2019) Electrochemical enzymatic biosensor for tyramine based on polymeric matrix derived from 4-mercaptophenylacetic acid. *J Solid State Electrochem*, 23: 985-995.
- Souto, D.E., Silva, J.V., Martins, H.R., Reis, A.B., Luz, R.C., Kubota, L.T., ve Damos, F.S. (2013) Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in canine serum, *Biosens Bioelectron.*, 46: 22-29.

- Souto, D.E., Fonseca, A.M., Barragan, J.T., de CS Luz, R., Andrade, H.M., Damos, F.S. ve Kubota, L.T. (2015) SPR analysis of the interaction between a recombinant protein of unknown function in Leishmania infantum immobilised on dendrimers and antibodies of the visceral leishmaniasis: A potential use in immunodiagnosis, *Biosens Bioelectron*, 70: 275-281.
- Su, L., Jia, W., Hou, C. ve Lei, Y. (2011) Microbial biosensors: a review, *Biosens Bioelectron*, 26(5): 1788-1799.
- Telefoncu, A. ve Kılınç, A. (2013) *Biyosensör tasarımı ve uygulamalarında son gelişmeler*. Baskı, Ege Üniversitesi basım evi, İzmir, 349s.
- Tepeli, Y. (2015) *Kanser hücresi belirlenmesine yönelik elektrokimyasal yöntemlerin ve elektrokimyasal platformların geliştirilmesi*, MSc Thesis, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 82s.
- Tepeli, Y., Demir, B., Timur, S. ve Anık, U. (2015) An electrochemical cytosensor based on a PAMAM modified glassy carbon paste electrode, *RSC Advances*, 5(66): 53973-53978.
- Tural, H., Gökçel, H.İ. ve Ertaş, F.N. (2010) *Enstrümental analiz: elektroanalitik yöntemler*, 3. Baskı, Ege Üniversitesi basım evi, İzmir, 315s.
- Yaman, Y.T. (2020) *Elektrokimyasal impedimetrik sensörlerin geliştirilmesi ve uygulamaları*, PhD Thesis, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 161s.
- Yanik, M., Gurel, M.S., Simsek, Z. ve Kati, M. (2004) The psychological impact of cutaneous leishmaniasis, *Clin. Exp. Dermatol*, 29(5): 464-467.
- Zhang, Y., Nsabimana, A., Zhu, L., Bo, X., Han, C., Li, M. ve Guo, L. (2014) Metal organic frameworks/macroporous carbon composites with enhanced stability properties and good electrocatalytic ability for ascorbic acid and hemoglobin, *Talanta*, 129: 55-62.
- Zijlstra, E.E. (2016). The immunology of post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL), *Parasit. Vectors*, 9(1): 1-9.
- Zijlstra, E.E., Musa, A.M., Khalil, E.A.G., El Hassan, I.M. ve El-Hassan, A.M. (2003) Post-kala-azar dermal leishmaniasis, *Lancet Infect Dis*, 3(2): 87-98.
- Wall, E.C., Watson, J., Armstrong, M., Chiodini, P.L. ve Lockwood, D.N. (2012) Epidemiology of imported cutaneous leishmaniasis at the Hospital for Tropical Diseases, London, United Kingdom: use of polymerase chain reaction to identify the species, *Am J Trop Med Hyg*, 86(1): 115.
- Wang, J. (2000) Analytical electrochemistry, Second edition, *John Wiley and Sons*, 209s.
- Wang, H. (2018) Ultrasensitive electrochemical paper-based biosensor for microRNA via strand displacement reaction and metal-organic frameworks, *Sens. Actuators B: Chem*, 257: 561-569.

World Health Organization. (2010) *Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases*, Geneva, Switzerland, 22-26 March 2010. WHO technical report series, (949).



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : B***** P****
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: **/**/19**-İ*****
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 0 5** **** ** **
E-posta : b*****7@hotmail.com

Eğitim

Alınan derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Seferihisar Necat Hepkon Anadolu Lisesi (İZMİR)	2015
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi (Kimya Bölümü)	2020
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi (Kimya-Analitik Kimya)	2023

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce (orta derece)

Almanca (az derece)

Yayınlar

- Ören Varol T., Perk B., Avcı O., Akpolat O., Haklı Ö., Xue C., Lı Q. ve Anık Ü (2019) “Fabrication of graphene/azobenzene-perylene diimide derivative modified electrochemical sensors for the dopamine detection based on full factorial experimental design”, *Measurement*, 147: 106867.
- Avcı O., Perk B., Ören Varol T., Büyüksünetçi Tepeli Y., Haklı Ö. ve Anık Ü (2019) “A polyoxy group branched diazo dye as an alternative material for the fabrication of an electrochemical epinephrine sensor”, *New Journal of Chemistry*, 43(47): 18575-18581.
- Perk B., Tepeli Y., Çetin R., Haklı Ö. ve Anık U (2021) “Electrochemical sensor based on perylene diimide derivative modified electrode”, *Monatshefte fuer Chemie*, 152:193–199.

4. Perk B., Büyüksünetçi Tepeli Y., Haklı Ö., Xue C., Lı Q. Ve Anık U (2021) “Centri-Voltammetric GSH Detection with PDI-C₄SH as a Carrier Material”, *ChemistrySelect*,6: 11648– 11652.
5. Coşkun A., Perk B., Avcı O. ve Altan B (2022) “(1-x).Pr_{0.67}Ca_{0.33}MnO₃/x.Pr_{0.67}Sr_{0.33}MnO₃ (x=0, 0.25, 0.50, 0.75 ve 1.0) Kompozit Malzemelerinin Yapısal, Morfolojik ve Elektriksel Özelliklerinin İncelenmesi”, *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 10: 1736-1747.
6. Perk B., Büyüksünetçi Tepeli Y. ve Anık U (2023) “Gold nanoparticle deposited electrochemical sensor for hyaluronic acid detection”, *Chemical Papers*.
7. Perk B., Büyüksünetçi Tepeli Y., Bouzaïen B. S., Diouani F. M. ve Anık U., (2023) “Fabrication of Metal–Organic Framework Based Electrochemical *Leishmania* Immunosensor” *Microchemical Journal*.

Bildiriler:

1. “Structural and electrical properties of (1-) Pr_{0.67}Ca_{0.33}MnO₃/x.Pr_{0.67}Sr_{0.33}MnO₃ (x =0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0) manganite composites”, Perk B., Avcı O., Coşkun A., Poster sunumu, Turkish physical society 34th international physics congress, September 5-9, 2018, Bodrum/Turkey.
2. “Development of A Novel Graphene/Azobenzene-Perylene Diimide Derivative Modified Electrochemical Dopamine Sensor Through A Chemometric Approach”, Ören Varol T., Perk B., Avcı O., Akpolat O., Haklı Ö., Xue C., Lı Q., Anık Ü., Poster sunumu, 2. Eurasia Biochemical Approaches Technologies Congress ,October 26- 29, 2019, Antalya/Turkey.
3. “A polyoxy group branched diazo dye modified electrochemical sensor for epinephrine detection”, Ören Varol T., Avcı O., Perk B., Büyüksünetçi Tepeli Y., Haklı Ö., Anık Ü., Poster sunumu, 2. Eurasia Biochemical Approaches Technologies Congress, October 26-29, 2019, Antalya/Turkey.
4. “Development of MOF-based *Leishmania* biosensors”, Perk B., Büyüksünetçi Tepeli Y., Anık U., Poster sunumu, 7th International Conference on Bio-Sensing Technology, May 22-25, 2022, Sitges/Spain.
5. “Development of pseudomonas fragi based whole cell biosensor”, Perk B., Büyüksünetçi Tepeli Y., Erden E., Timur S., Anık U., Poster sunumu, 7th International Conference on Bio-Sensing Technology, May 22-25, 2022, Sitges/Spain.

Sertifika ve Kurslar:

1. Küçük ve orta ölçekli işletmeleri geliştirme ve destekleme idaresi başkanlığı (KOSGEB)- 16/09/2019-27/12/2019.
2. “Yumurtalık Kanseri Teşhisinde Tek Kullanımlık Biyosensör Uygulaması” (Metrohm Turkey)- 08/07/2021-İstanbul.