



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**KARBON NANOFİBER TEMELLİ KOMPOZİTLERE
DAYALI ELEKTROKİMYASAL
APTASENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
UYGULAMALARI**

Yüksek Lisans Tezi

Meltem MARAL

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**KARBON NANOFİBER TEMELLİ KOMPOZİTLERE
DAYALI ELEKTROKİMYASAL
APTASENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
UYGULAMALARI**

Meltem MARAL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

İzmir
2022

Meltem MARAL tarafından yüksek lisanas tezi olarak sunulan **“Karbon Nanofiber Temelli Kompozitlere Dayalı Elektrokimyasal Aptasensörlerin Geliştirilmesi ve Uygulamaları”** başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **06/07/2022** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday **oybirliği/oyçokluğu** ile **başarılı** bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN

Raportör Üye : Doç. Dr Yasemin ERAÇ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ece EKŞİN ÇERKEZOĞLU

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

05/08/2022

Meltem MARAL

ÖZET**KARBON NANOFİBER TEMELLİ KOMPOZİTLERE DAYALI
ELEKTROKİMYASAL APTASENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
UYGULAMALARI**

MARAL, Meltem

Yüksek Lisans Tezi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN

Temmuz 2022, 69 sayfa

Çalışmamızda öncelikle karbon nanomalzeme temelli tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar (PGE) geliştirilip ve optimize edilerek, ardından aktive edilmiş protein C (APC)'ye hedefli DNA aptameri ile APC'nin etkileşimine dayalı elektrokimyasal aptasensör geliştirildi. Bu kapsamda, kalem grafit elektrot yüzeyleri karbon nanofiber (CNF) ve iyonik sıvı (IL) nanokompoziti ile modifiye edilerek CNF-IL modifiye edilmiş tek kullanımlık grafit elektrotlar (CNF-IL/PGE) hazırlandı. CNF-IL/PGE elektrotların mikroskobik ve elektrokimyasal karakterizasyonuna yönelik deneyler gerçekleştirildi.

Tez çalışmamızda, APC'ye spesifik DNA aptamer (DNA-Apt) kullanılarak APC-aptamer ile etkileşimi çözelti fazında gerçekleştirildi. APC'nin elektrokimyasal tayininde CNF-IL/PGE elektrotlar ile elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) yöntemi kullanıldı. Böylece, APC'yi spesifik ve duyarlı bir şekilde algılayacak aptamerlere dayalı bir yöntem karbon nanomalzeme temelli elektrotlar kullanılarak geliştirildi. APC'ye spesifik DNA aptamerin hedefi olan APC ile etkileşiminin yanısıra aptamer-antidot çifti (AD22) ile APC etkileşimi geliştirilen CNF-IL/PGE kullanılarak impedimetrik yöntem ile araştırıldı.

Aptamer ile etkileşimi sonrasında APC'nin hızlı, güvenilir ve seçimli şekilde impedimetrik tayinini mümkün kılacak CNF-IL temelli aptasensör teknolojisi ilk defa geliştirildi. Tez kapsamında elde edilen çıktılar benzer biyomoleküler etkileşimlerin hızlı ve güvenilir şekilde duyarlı ve seçimli tayinini mümkün kılacak yeni aptasensörlerin geliştirilmesine model olacaktır.

Anahtar sözcükler: Karbon nanofiberler; iyonik sıvı; Aktive edilmiş protein C; elektrokimyasal empedans spektroskopisi; aptasensörler

DEVELOPMENT AND APPLICATIONS OF ELECTROCHEMICAL APTASENSORS BASED ON CARBON NANOFIBER COMPOSITES

MARAL, Meltem

MSc in Material Sciences and Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN

July 2022, 69 page

In this study, carbon nanomaterial-based disposable pencil graphite electrodes (PGE) were firstly developed and optimized. Accordingly, these electrodes were applied for the detection of interaction of activated protein C (APC) with its DNA aptamer. In this context, CNF-IL modified disposable graphite electrodes (CNF-IL/PGE) were prepared by modifying the surface of pencil graphite electrode with carbon nanofiber (CNF) and ionic liquid (IL) nanocomposite. The experiments for microscopic and electrochemical characterization of CNF-IL/PGE electrodes were then carried out.

In this study, interaction between APC and its aptamer was performed in solution phase using APC-specific DNA aptamer (DNA-Apt), and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) method was used in combination with CNF-IL/PGE in order to monitor the detection of biointeraction. The interaction of APC with its DNA aptamer as well as the interaction of APC with aptamer-antidote pair (AD22) were performed in solution phase and then impedimetric detection was performed by using CNF-IL/PGE.

CNF-IL-PGE was used for the first time in the literature to detect impedimetrically the interaction of APC with its DNA aptamer, which will enable rapid, reliable and selective determination of APC in solution phase. The results obtained within the scope of the study will be a model for the development of new aptasensors that will provide the rapid and reliable sensitive and selective detection of similar biomolecular interactions.

Keywords: Carbon nanofibers; ionic liquid; Activated protein C; electrochemical impedance spectroscopy; aptasensors

ÖNSÖZ

Tez çalışmam kapsamında, değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN'ın bu alandakiengin bilgi ve tecrübelerinden yararlanarak, lisans öğrenimim boyunca ilgi duyduğum elektrokimyasal aptasensörlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara yer vermeme olanak sağladığı için teşekkürlerimi sunarım. Son 20 yılda karbon nanomalzeme ile modifiye edilerek geliştirilen elektrotlar yeni yüzeyler, daha seçici ve hassas analizleri mümkün kılan aptamer tabanlı biyosensör teknolojisi geliştirmek için mükemmel bir ortam sunmuştur. Tez çalışmamızda karbon nanofiber-iyonik sıvı kompozit temelli tek kullanımlık grafit elektrotlar geliştirilerek aptamerlere dayalı elektrokimyasal protein analizinde uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

İZMİR

05/08/2022

Meltem MARAL

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Elektrokimyaya Giriş	3
2.2 Elektrokimyasal Ölçüm Teknikleri	5
2.2.1 Döngüsel voltametri (CV).....	7
2.2.2 Diferansiyel puls voltametrisi (DPV).....	7
2.2.3 Elektrokimyasal empedans spektrokopisi (EIS)	8
2.3 Sensör ve Biyosensörler.....	9
2.3.1 Biyosensörlerin çalışma prensipleri	10
2.3.2 Biyosensör tipine göre sınıflandırma	11
2.4 Karbon Nanomalzemeler	13
2.4.1 Karbon nanofiberler	13
2.4.2 Karbon nanomalzeme temelli biyosensörler	14
2.5 İyonik Sıvılar	15
2.6 Aptamerler	15
2.6.1 Aptamer tabanlı impedimetrik biyosensörler	15
2.7 Aktive Protein C.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1 Kullanılan cihazlar.....	20
3.2 Kullanılan kimyasal maddeler	20
3.2.1 Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	21
3.2.2 Aptamer oligonükleotit ve protein çözeltilerinin hazırlanması	22
3.2.3 Karbon nanofiber (CNF) ve İyonik sıvı (IL) Çözeltisinin Hazırlanışı	22
3.3 Yöntem.....	23
3.3.1. CNF-IL kompozit çözeltisinin hazırlanışı ve PGE yüzeyinin CNF-IL ile modifikasyonu	23
3.3.2 Elektrotların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile mikroskobik karakterizasyonu	23
3.3.3 Elektrotların elektrokimyasal yöntemlerle karakterizasyonu	24
3.3.4 IL yüzdeki değişimin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi.....	24
3.3.5 DNA-Apt konsantrasyondaki değişimin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi	24
3.3.6 DNA-Apt ile APC etkileşimi sonrası immobilizasyon süresinin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi	24
3.3.7 APC konsantrasyonundaki değişimin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi ...	25
3.3.8 AD22 konsantrasyonundaki değişimin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi .	25
3.3.9 Aptamer-AD22 ile APC etkileşim süresinin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi	25
3.3.10 CNF-IL modifiye elektrotların yapay serum ortamında APC analizine uygulanabilirliğinin incelenmesi	26
3.3.11 Yapay serum ortamında APC ve DNA-Apt etkileşiminin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi	26
3.3.12 Yapay serum ortamında AD22 etkileşiminin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3.13 CNF-IL/PGE ile impedimetrik APC tayininde seçimliliğinin yapay serum ortamında incelenmesi.....	27
4. BULGULAR	28
4.1 Elektrotların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Mikroskobik Karakterizasyonuna Ait Bulgular:	28
4.2 Elektrotların Elektrokimyasal Yöntemlerle Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular:	29
4.3 IL Yüzdesinin Optimizasyonuna Yönelik Bulgular	32
4.4 DNA-Apt Konsantrasyonuna Yönelik Bulgular	32
4.5 DNA-Apt ile APC etkileşiminde immobilizasyon süresinin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesine yönelik bulgular	35
4.6 APC Konsantrasyonundaki Değişimin Aptasensör Yanıtına Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular.....	35
4.7 Farklı Konsantrasyonlarda AD22'nin APC-Aptamer Etkileşiminde Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular.....	36
4.8 Aptamer-AD22 ile APC etkileşim süresinin yanıtına etkisinin incelenmesine yönelik bulgular	38
4.9 CNF-IL/PGE'nin Yapay Serum Ortamında İmpedimetrik APC Analizine Uygulanabilirliğine Yönelik Bulgular	40
4.10 Yapay Serum Ortamında Farklı Konsantrasyonlarda APC'nin İmpedimetrik Tayinine Yönelik Bulgular.....	41
4.11 Yapay Serum Ortamında Aptamer-AD22 İle APC Etkileşiminin İncelenmesine Yönelik Bulgular	42
4.12 CNF-IL/PGE İle İmpedimetrik APC Tayininde Seçimliliğinin Yapay Serum Ortamında Test Edilmesine Yönelik Bulgular	43
5. TARTIŞMA	45

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

5.1 Elektrotların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Mikroskopik Karakterizasyonuna Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma	45
5.2. Elektrotların Elektrokimyasal Yöntemlerle Karakterizasyonuna Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma	46
5.2.2 IL yüzdesinin optimizasyonuna yönelik bulgular ile ilgili tartışma	47
5.3 DNA-Apt Konsantrasyonuna Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma.....	47
5.4 DNA-Apt İle APC Etkileşiminde İmmobilizasyon Süresinin Aptasensör Yanıtına Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma.....	48
5.5 APC Konsantrasyonundaki Değişimin Aptasensör Yanıtına Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma	48
5.6 Farklı Konsantrasyonlarda AD22'nin APC-Aptamer Etkileşiminde Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma	49
5.7 Aptamer-AD22 İle APC Etkileşim Süresinin Yanıt Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma	49
5.8 CNF-IL/PGE'nin Yapay Serum Ortamında İmpedimetrik APC Analizine Uygulanabilirliğine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma	51
5.9 Yapay Serum Ortamında Farklı Konsantrasyonlarda APC'nin İmpedimetrik Tayinine Yönelik Bulgular İlgili Tartışma	51
5.10 Yapay Serum Ortamında Aptamer-AD22 İle APC Etkileşiminin İncelenmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma	52
5.11 CNF-IL/PGE İle İmpedimetrik APC Tayininde Seçimliliğinin Yapay Serum Ortamında Test Edilmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma.....	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR DİZİNİ	57
TEŞEKKÜRLER	67
ÖZGEÇMİŞ	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Elektrokimyasal biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi.....	6
2.2. CV voltamogramı. I_{pa} ; anodik pik akım, E_{pa} ; Anodik pik potansiyeli, I_{pc} ; katodik pik akımı, E_{pc} ; katodik pik potansiyeli.	7
2.3. DPV voltamogramı.....	8
2.4. (A) Faradaik elektron transfer reaksiyonu, (B) Kapasitif arayüzey tepkisi. Z ; empedans, Z' ; gerçek empedans, Z'' ; zahiri empedans.	9
2.5. Biyosensör ve bileşenlerinin şematik gösterimi.	11
2.6. Karbon nanofiber SEM görüntüsü.....	14
3.1. Elektrokimyasal APC tayinine yönelik geliştirilen impedimetrik aptasensöre ait deneysel prosedürü gösteren şema. (a) AD22 antisens molekülü yokluğunda, (b) AD22 antisens molekülü varlığında.....	23
4.1. PGE (a,b), IL/PGE (c,d), CNF/PGE (e,f) CNF-IL/PGE (g,h)'nin 5.0 kV hızlandırma potansiyeli ile sırasıyla 1 μm ve 2 μm çözünürlüğe elde edilen SEM görüntüleri.	28
4.2. (A) PGE, (B) CNF/PGE, (C) IL/PGE, (D) CNF-IL/PGE yüzeylerine ait EDX spektrumları.	29
4.3. (a) PGE, (b) PGE (kontrol), (c) CNF/PGE, (d) IL/PGE ve (e) CNF-IL/PGE ile 0,1 M KCl çözeltisinde elde edilen voltamogramlar, (a) PGE, (b) PGE (kontrol), (c) CNF/PGE, (d) IL/PGE ve (e) CNF-IL/PGE ile redoks prob çözeltisinde elde edilen voltamogramlar (n=3).	29
4.4. (a) PGE, (b) PGE (kontrol), (c) CNF/PGE, (d) IL/PGE, (e) CNF-IL /PGE ile gerçekleştirilen ölçümlerde elde edilen Niquist diyagramları ve empedans verilerine uygun basit eşdeğer devre modeli. İç şekil: Empedans verilerini düzenlemede kullanılan eşdeğer devre modeli. İlgili parametreler; R_s çözelti direncidir. C , çift tabaka kapasitansı, R_{ct} ise elektrot/elektrolit ara yüzeyindeki yük transfer direncidir. Sabit faz element W , elektrot yüzeyinde kütle transferinden kaynaklanan Warburg empedansını göstermektedir.....	31
4.5. 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA-Apt immobilizasyonu öncesi ve sonrası (A) (a) PGE, (b) DNA-Apt/PGE, (B) (a) CNF-IL/PGE, (d) DNA-Apt/CNF-IL/PGE, 2.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren redoks prob çözeltisinde alınan ölçümlerin Niquist eğrileri (n=3).....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.6.** 0,2 µg/mL APC ve (A) 0,005 µg/ml DNA-Apt, (B) 0,01 µg/ml DNA-Apt (C) 0,1 µg/mL µg/ml DNA-Apt varlığında elde edilen Niquist eğrileri: (a) DNA APT/CNF-IL/PGE, (b) APC/CNF-IL/PGE, (c) APC/DNA-Apt /CNF-IL/PGE. 34
- 4.7.** 0,1 µg/mL DNA-Apt varlığında, 0,6 µg/mL APC'nin etkileşimi sonrası farklı immobilizasyon sürelerinde elde edilen ortalama Rct değerlerini (n=3) gösteren histogramlar. 35
- 4.8.** 0,1 µg/mL DNA-Apt varlığında, (A) Farklı konsantrasyonlarda APC'nin varlığında/yokluğunda elde edilen Niquist diyagramları, (B) Kalibrasyon grafiği. 36
- 4.9.** 0,1 µg/mL DNA-Apt ve 0,1 µg/mL AD22'nin varlığında 0,6 µg/mL APC'nin farklı etkileşim sürelerinde elde edilen ortalama Rct değerlerini (n=3) gösteren histogramlar; A) 1 dakika B) 2 dakika C) 5 dakika. 39
- 4.10.** A) 0,1 µg/mL DNA-Apt varlığında, a) PBS kontrol grubunda, b) FBS kontrol grubunda, B) CNF-IL modifiyeli PGE elektrotlar ile, a) 1:500, b) 1:1000, c) 1:2000 seyreltme oranları, C) 1:2000 seyreltme oranında, a) 0,1 µg/mL DNA-Apt, b) 0,6 µg/mL APC, c) 0,1 µg/mL DNA-Apt ile 0,6 µg/mL APC arasındaki etkileşim (n=3). 40
- 4.11.** 0,1 µg/mL DNA-Apt varlığında, (A) Yapay serum ortamında farklı konsantrasyonlarda APC'nin varlığında/yokluğunda elde edilen Niquist diyagramları, (B) Yapay serum ortamında elde edilen kalibrasyon grafiği. 41
- 4.12.** Yapay serum ortamında 0,1 µg/mL DNA-Apt ve 0,1 µg/mL AD22'nin varlığında 0,6 µg/mL APC'nin etkileşiminde elde edilen ortalama Rct değerlerini (n=3) gösteren histogramlar. 42
- 4.13.** 0,1 µg/mL DNA-Apt ile, (a) 0,6 µg/mL APC, (b) 0,6 µg/mL PC, (c) 0,6 µg/mL THR, (d) 0,6 µg/mL, (e) 0,6 µg/mL BSA'nın 1:2000 FBS:PBS ortamında etkileşimi sonrası elde edilen Niquist diyagramları. 44

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1. Aptamer tabanlı impedimetrik biyosensörlerine örnekler.	16
2. 2. Aktive protein C'yi ölçmek için rapor edilen yöntemlerin özellikleri.	19
4.1. PGE, PGE (kontrol), CNF/PGE, IL/PGE ve CNF-IL/PGE ye ait ortalama anodik pik akımı (Ia), katodik pik akımı (Ic), anodik relatif yük Qa (mC), katodik relatif yük Qc (mC) ve hesaplanan yüzey alan değerleri (A) (n=3).....	30
4.2. PGE, PGE (kontrol), CNF/PGE, IL/PGE, CNF-IL/PGE elektrotları ile EIS ölçümlerinde elde edilen ortalama Rct değerleri (n=3).	31
4. 3. IL yüzdesindeki değişim varlığında ölçülen ortalama anodik akım değerleriyle hesaplanan % RSD ve Ia değerindeki artış yüzdesi (n=3).	32
4.4. İki farklı ortamda hazırlanan 0,2 µg/mL APC ile 0,05 µg/mL DNA etkileşimi ve elde edilen ortalama Rct değeri (n=3) ve % değişim değeri.	33
4.5. Farklı konsantrasyonlarda AD22'nin DNA-Apt ile etkileşimi öncesi ve sonrası ölçülen ortalama Rct değerleri (n=3).	37
4.6. 0,1 µg/mL AD22 varlığında 0,1 µg/mL DNA-Apt ile 0,6 µg/mL APC'nin etkileşimi öncesi ve sonrasında ölçülen Rct değerleri (n=3).....	38
4.7. Yapay serum ortamında 0,1 µg/mL AD22 varlığında 0,1 µg/mL DNA-Apt ile 0,6 µg/mL APC'nin etkileşimi öncesi ve sonrasında ölçülen Rct değerleri (n=3).....	42
4.8. 1:2000 FBS:PBS seyreltilmiş serum ortamında 0,1 µg/mL DNA-Apt ile sırasıyla 0,6 µg/mL APC, PC, THR, BSA'nın etkileşimi öncesi/sonrası ölçülen ortalama Rct değerleri (n=3).	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
V	Potansiyel
I _a	Anodik akım
I _c	Katodik akım
Q _a	Anodik yük
Q _c	Katodik yük
A	Yüzey alanı
Z	İmpedans
R _{ct}	Yük transfer direnci
R _s	Çözelti direnci
W	Warburg impedansı
C	Çift tabaka kapasitansı

Kısaltmalar

PGE	Kalem grafit elektrot
CNF	Karbon nanofiber
IL	İyonik sıvı
FBS	Fetal sığır serumu

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
BSA	Sığır serum albumini
PC	Protein C
THR	Trombin
APC	Aktive edilmiş protein C
ABS	Asetat tampon çözeltisi
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
CV	Dönüşümlü voltametri
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu

1.GİRİŞ

Biyosensörler, elektrotların yüzeyindeki biyokimyasal reaksiyonu izlemek için tasarlanmıştır ve algılama elemanları olarak çeşitli biyomoleküller kullanılmıştır. Biyosensörler biyo-afinite ve biyo-katalitik süreçler olmak üzere iki temele dayanmaktadır. Bir biyosensörün tasarımında farklı tipte biyoreseptör molekülleri (proteinler, doğal ve yapay nükleik asitler, karbonhidratlar vb.), bunların kombinasyonları ve makromoleküler düzenekler ve hatta tüm hücreler veya doku parçaları kullanılabilir.

Protein C (PC), aşırı pıhtılaşmanın önlenmesi için antikoagülan mekanizmaya katılan bir zimojen proteindir. PC'de ciddi eksiklikler venöz tromboz veya neonatal purpura fulminans ile ilişkilidir. Aktive edilmiş protein C (APC), PC yolunun anahtar enzimidir. APC, aktif olmayan öncül protein C'den türeyen bir serin proteaz olup Va ve VIIIa faktörlerini etkisiz hale getirerek güçlü bir doğal antikoagülan görevi görür. APC'nin terapötik kullanımı şiddetli sepsiste ve önemli bir inflamasyon bileşeni olan çeşitli hastalıklarda değerlendirilmektedir. PC ve APC'nin obezite, pnömoni, yaygın damar içi pıhtılaşma, sepsis, kronik böbrek yetmezliği, vb. gibi bozukluklarda potansiyel bir rolünü ortaya koyulduğu çalışmalar mevcuttur.

KontROLSÜZ iltihaplanma ve pıhtılaşma, sepsisin iki ayırt edici özelliğidir. Endojen protein C ve APC azalması ile sepsiste hastalığın seyrinin kötüleşmesi arasında bir ilişki olduğunun keşfedilmesinden sonra, bu hastaların tedavisinde kullanılmak üzere rekombinant insan APC (rhAPC) geliştirilmiştir. APC, protein S'ye bağlanarak daha fazla trombin oluşumunu önlemek üzere faktör Va ve VIIIa'yı inhibe eder ve böylece kanın pıhtılaşmasını düzenler. Bu nedenle, plazmada dolaşan APC'yi ölçmek için uygulanacak bir yöntem tedavinin izlenebilirliği açısından oldukça önemlidir (Hamedani et al., 2016; Colin ve Annane, 2008; Gruber and Griffin, 1992; Katsuura et al., 1996; Mezzano et al., 2001; Oto et al., 2020; Ruf, 2010; Solá et al., 2009). Bu kapsamda APC'ye spesifik aptamerlere dayalı biyosensörlerin literatürde uygulamaları mevcuttur (Erdem et al., 2014a; Erdem and Congur, 2014a, 2014b, 2014c; Hosseini Ghalehno et al., 2019; Koyun et al., 2019). Dolayısıyla tez çalışmasında özellikle sepsis tedavisinde kullanılan aktive edilmiş protein C (APC)'ye spesifik aptasensör geliştirilmesi ve uygulamaları hedeflenmiştir.

Tez çalışmasında öncelikle karbon nanomalzeme temelli tek kullanımlık elektrotlar geliştirilmiş ve optimize edilmiş, ardından APC'ye hedefli DNA aptameri ile APC'nin

etkileşimine dayalı elektrokimyasal aptasensör uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, elektrokimyasal analizleri yapacağımız elektrot yüzeyi karbon nanofiber (CNF) ve iyonik sıvı (IL) nanokompoziti ile modifiye edilmiş ve CNF-IL modifiye tek kullanımlık grafit elektrotlar (CNF-IL/PGE) hazırlanmıştır. Hazırlanan CNF-IL/PGE elektrotların mikroskobik ve elektrokimyasal yüzey karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. APC ve APC'ye spesifik DNA aptamerin farklı konsantrasyonlarda çözelti fazında etkileşimine yönelik deneysel parametrelerin incelenmesinin yanı sıra, etkileşim süresi ve ölçüm yöntem koşullarının optimizasyonu araştırılmıştır.

DNA aptameri varlığında APC'nin hızlı, güvenilir ve seçimli şekilde impedimetrik tayinini mümkün kılacak tek kullanımlık CNF-IL temelli elektrotların geliştirilmesi ve APC tayinine yönelik uygulamaları tez kapsamında hedeflenmiş olup, tez çalışmasında geliştirilen APC aptasensör teknolojisinin benzer biyomoleküler etkileşimlerin hızlı ve güvenilir şekilde duyarlı ve seçimli tayinini mümkün kılacak yeni aptasensör çalışmalarına da yön vermesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Elektrokimyaya Giriş

Elektrokimya, kimya biliminin bir alt dalı olup elektronik bir iletken (metal, grafit, veya yarı iletken) ile iyonik bir iletken (elektrolit) arayüzeyinde gerçekleşen reaksiyonları inceler. Bu alanın büyük bir kısmı, bir elektrik akımının geçişinin neden olduğu kimyasal değişiklikler ve kimyasal reaksiyonlar ile elektrik enerjisinin üretilmesinin incelenmesiyle ilgilidir. Elektrokimya, çok çeşitli alanları (örneğin, elektroforez ve korozyon), cihazları (elektrokromik ekranlar, elektroanalitik sensörler, piller ve yakıt hücreleri) ve teknolojileri (metallerin elektrokimyasal yolla kaplanması vs.) kapsar (Bard et al., 2022).

Elektrokimyasal sistemlerde, elektriksel iletken olan bir elektrot ve iyonik bir iletken olan elektrolit fazlar arasındaki arayüz boyunca yükün taşınmasını etkileyen süreçler ve faktörler incelenir. Yük, elektronların hareketi ile elektrot aracılığıyla taşınır. Temel elektrot malzemeleri:

- ✓ Katı metaller; Pt, Au,
- ✓ Sıvı metaller; Hg, amalgamlar
- ✓ Yarı iletkenler; indiyum-kalay oksit, Si,

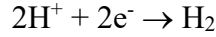
şeklindedir.

Elektrolit fazında yük, iyonların hareketi ile taşınır ve en sık kullanılan elektrolitler, su veya susuz bir çözücü içinde H^+ , Na^+ gibi iyonik türler içeren sıvı çözeltilerdir (Bard et al., 2022).

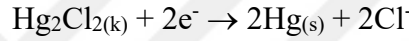
Elektrokimyasal hücre ortamında maddenin elektrot yüzeyine aktarılması iyonik göç (migrasyon), konveksiyon (karıştırma) ve difüzyon olmak üzere üç farklı şekilde gerçekleşmektedir. Elektrokimyasal hücredeki anot ile katot arasındaki gerilim farkının oluşturduğu elektriksel alanın etkisiyle iyonlar ters yüklü elektrotlara doğru hareket etme eğilimine girerler. Böylece iyonik göç denilen olayla madde aktarımı gerçekleşir. Konveksiyon, çözeltilerin karıştırıldığı durumlarda elektrot arayüzeyine madde aktarımı olan diğer bir yöntemdir (Skoog ve ark., 1996).

Bir hücrede meydana gelen genel kimyasal reaksiyon, iki elektrottaki gerçek kimyasal değişiklikleri tanımlayan iki bağımsız yarı reaksiyondan oluşur. Her bir yarı tepkime (ve dolayısıyla elektrotların yakınındaki sistemin kimyasal bileşimi), ilgili elektrottaki arayüzey potansiyel farkına tepki verir (Bard et al., 2022).

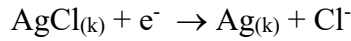
Referans elektrotlar; Uluslararası kabul görmüş ilk referans elektroda, standart hidrojen elektrotu (SHE) veya normal hidrojen elektrotudur (NHE). Denge reaksiyonu aşağıdaki gibidir;



Potansiyeller genellikle, deneysel bir bakış açısından çok uygun olmayan SHE dışındaki referans elektrotlara göre ölçülür ve alıntılanır. Diğer bir referans elektrodu, doymuş kalomel elektrottur (SCE). Potansiyeli SHE'ye karşı 0,242 V'dir. Gerçekleşen reaksiyonu aşağıdaki gibidir;



Diğer bir referans elektrot SHE'ye karşı 0.222 V potansiyele sahip gümüş-gümüş klorür elektrottur. Referans elektrot sabit bir yapıya sahip olduğundan potansiyeli sabittir. Bu nedenle, hücredeki herhangi bir değişiklik çalışma elektroduna atfedilebilir. En yaygın kullanılan ve bu çalışma kapsamında kullanılacak olan gümüş-gümüş klorür referans elektrodunun denge reaksiyonu ve Nernst eşitliği 25° C'de aşağıdaki gibidir;



Bu elektrot referans elektrot olarak kullanıldığında literatürde "Ag/AgCl" olarak tanımlanması yaygındır.

Çalışma elektrotları; Bir elektrokimyasal sistemde reaksiyonun gerçekleştiği elektrottur (Bard et al., 2022; Kissinger and Heineman, 2018). Üç elektrotlu bir elektrokimyasal sistemde, çalışma elektrotu üzerindeki reaksiyonun bir indirgeme veya bir oksidasyon olmasına bağlı olarak, çalışma elektrotu katot veya anot olarak adlandırılabilir. En yaygın kullanılan çalışma elektrotları aşağıdaki gibidir (Koyun et al., 2012).

- ✓ Camsı Karbon Elektrot,
- ✓ Kalem Grafit Elektrot,
- ✓ Ekran Baskılı Elektrot,
- ✓ Altın Elektrot,
- ✓ Gümüş Elektrot,

- ✓ İndiyum Kalay Oksit Kaplı Cam Elektrot,
- ✓ Karbon Pasta Elektrot.

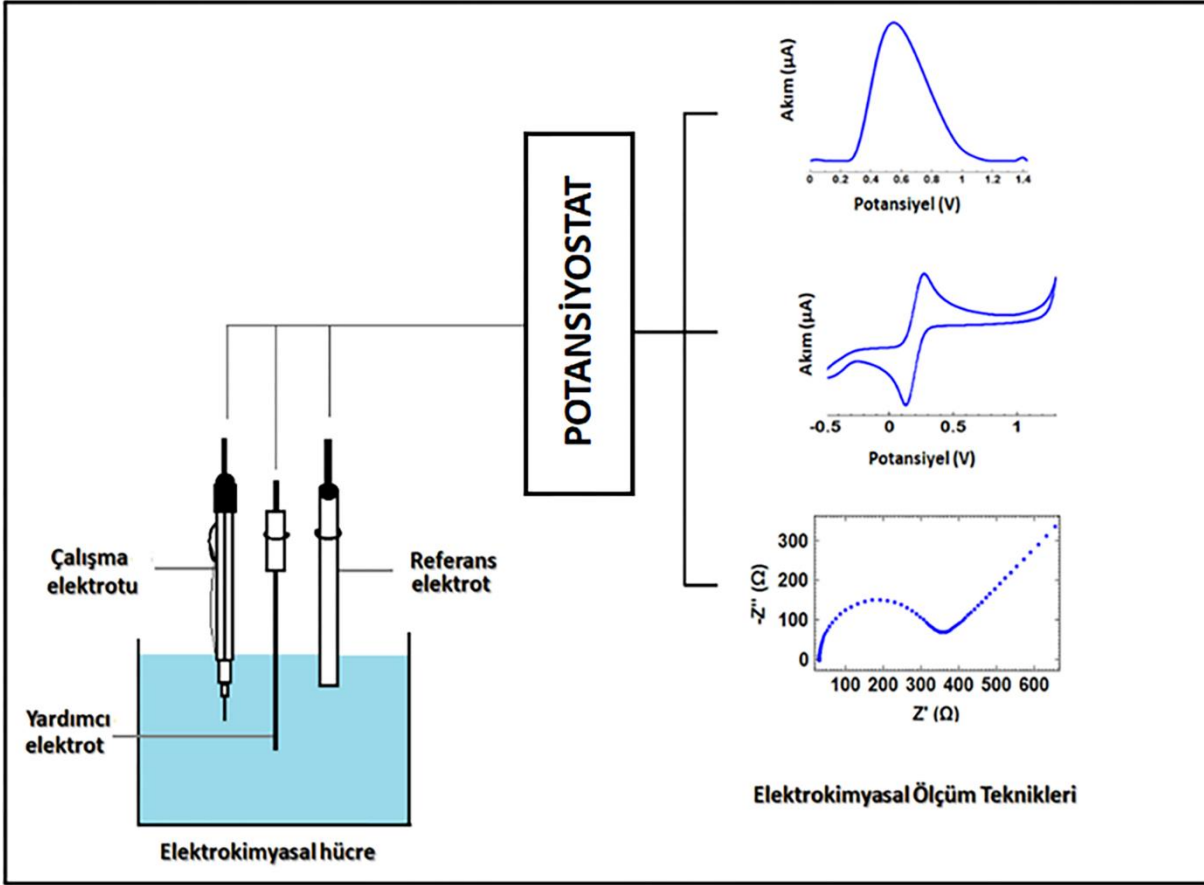
Yardımcı elektrotlar; Çalışma ve yardımcı elektrotlar arasında bir akım ve/veya potansiyel uygulandığı zaman, iki elektrotlu sistemde, diğer değişkenler ölçülebilir. Yardımcı elektrot, çalışma elektrotu katot olarak görev gördüğünde anot olarak; anot olarak görev gördüğünde katot olarak işlev görür. Meydana gelen yarı reaksiyon hızlı olarak gerçekleşip, çalışma elektrodundaki süreci kısıtlamamalıdır. Yardımcı elektrodun potansiyeli, referans elektrota karşı ölçülmez, ancak çalışma elektrotunda meydana gelen reaksiyonu dengelemek için ayarlanır ve bu konfigürasyon, çalışma elektrotunun potansiyelinin bilinen bir referans elektrota karşı ölçülmesine izin verir. Yardımcı elektrot;

- ✓ Altın,
- ✓ Platin,
- ✓ Karbon

gibi inert malzemelerden üretilir (Koyun et al., 2012).

2.2 Elektrokimyasal Ölçüm Teknikleri

Elektrokimyasal teknikler, nispeten düşük maliyetli enstrümantasyon ile geniş doğrusal dinamik aralığın yanı sıra yüksek hassasiyet, doğruluk ve kesinlik sunan güçlü ve çok yönlü analitik tekniklerdir. Daha hassas darbe yöntemleri geliştirildikten sonra, elektroanalitik çalışmalar endüstriyel, çevresel uygulamalarda ve dozaj formlarında ve özellikle biyolojik numunelerde ilaç analizlerinde daha düzenli olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, elektroanalitik teknikler, bu yaklaşımı kullanarak yüksek derecede doğruluk, kesinlik, hassasiyet ve seçicilik ile farmasötik açıdan ilgi çekici birçok sorunu kolayca çözebilir. En kullanışlı elektroanalitik tekniklerden bazıları, elektrot-çözelti arayüzüne uygulanan potansiyellerin sürekli olarak değiştirilmesi kavramına ve sonuçta ortaya çıkan ölçülen akıma dayanmaktadır (Farghaly et al., 2014). Elektrokimyasal biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



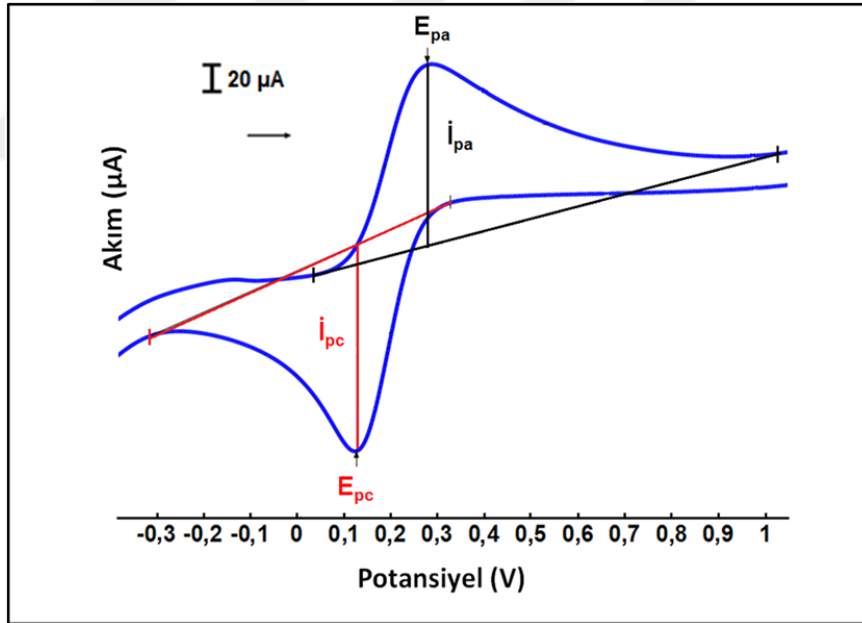
Şekil 2.1 Elektrokimyasal biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi.

Voltametri terimi, bir elektroanalitik teknikler sınıfını ifade eder ve belirli bir elektrotta elde edilen akım-voltaj ölçümünü belirtmek için kullanılır. Polarografi, sabit bir cıva damlası akışı ile damlayan cıva elektrotu kullanılarak elde edilen akım-voltaj ölçümüne atıfta bulunan özel bir voltametri durumudur (Heyrovsky, J, 1992). Jaroslav-Heyrovsky adlı Çek kimyager Polarografi'yi ilk kez 1922'de tanıtmış ve bunun için 1959 Nobel Kimya Ödülü'nü almıştır. Elektrot olarak cıva damlasının kullanılması, bir dizi uygulanan potansiyel üzerinde kullanım için bize muazzam bir alan ve temiz, kirlenmemiş elektrot yüzeyi sağlar. Voltametri, üç elektrotlu bir hücrede ortaya çıkan voltaj-akım-zaman ilişkisine dayanır: çalışma elektrotu, referans elektrot ve yardımcı veya karşı elektrot. Bu ilişki, çalışma elektroduna potansiyel (E) uygulandığında açıklanabilir ve elektrokimyasal hücreden akan ortaya çıkan akım (i) kaydedilecektir. Uygulanan potansiyel değiştirilebilir veya ortaya çıkan akım bir süre boyunca (t) kaydedilecektir (Farghaly et al., 2014).

2.2.1 Döngüsel voltametri (CV)

Döngüsel voltametri (CV), elektro analitik kimyanın bir çok alanında önemli ve yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Kantitatif tayin için nadiren kullanılır, ancak redoks reaksiyonlarının incelenmesi ve meydana gelen kimyasal reaksiyonlar hakkında çok fazla bilgi almak için yaygın olarak kullanılır (Wang et al., 2000). Döngüsel voltametri, voltaj tarama yönünün tersine çevrildiği hızlı bir voltaj tarama tekniğidir. Çalışma elektroduna hem ileri hem de geri yönde uygulanan potansiyel uygulanırken, ortaya çıkan akım kaydedilir. İleri ve geri yöndeki tarama hızı normalde aynıdır. CV, tek döngü veya çok döngü modlarında kullanılabilir (Farghaly et al., 2014).

Döngüsel voltametrde ölçülen parametreler, anodik ve katodik pik potansiyeli (E_{pa} ve E_{pc}), anodik ve katodik pik akımı (I_{pa} ve I_{pc}) ve katodik ve anodik akımların pik potansiyeli değerlerinin yarısına ulaştığı yarı pik potansiyelleridir ($E_{p1/2}$) (Farghaly et al., 2014).

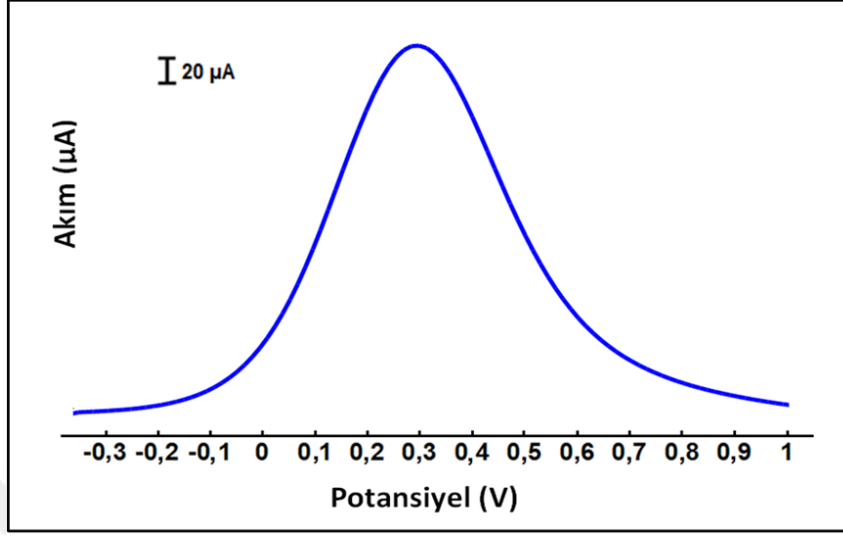


Şekil 2.2. CV voltamogramı. I_{pa} ; anodik pik akım, E_{pa} ; Anodik pik potansiyeli, I_{pc} ; katodik pik akımı, E_{pc} ; katodik pik potansiyeli.

2.2.2 Diferansiyel puls voltametrisi (DPV)

Diferansiyel puls voltametrisinde, doğrusal voltametrdeki artan doğru akım potansiyeline, sabit genlikli pulsar bindirilir. Puls uygulamasından önce ve sonra akım ölçülür,

bu akımlar arasında oluşan fark potansiyele karşı grafiğe aktarılır. Böylece pik şeklinde bir voltamogram elde edilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 DPV voltamogramı.

2.2.3 Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi, genellikle sinüzoidal olan uygulanan bir pertürbasyonun farklı frekanslarında bir elektrik sisteminin empedans özelliklerinin ölçümüne dayanır. Normalde ve kesinlikle sensör uygulamalarında, bu sinüzoidal voltaj bozulması, spektrum analizini basitleştiren doğrusal bir yanıt elde etmek için 10 mV genlik seviyesinde küçüktür (Brett, 2022; Chakraborty et al., 2019).

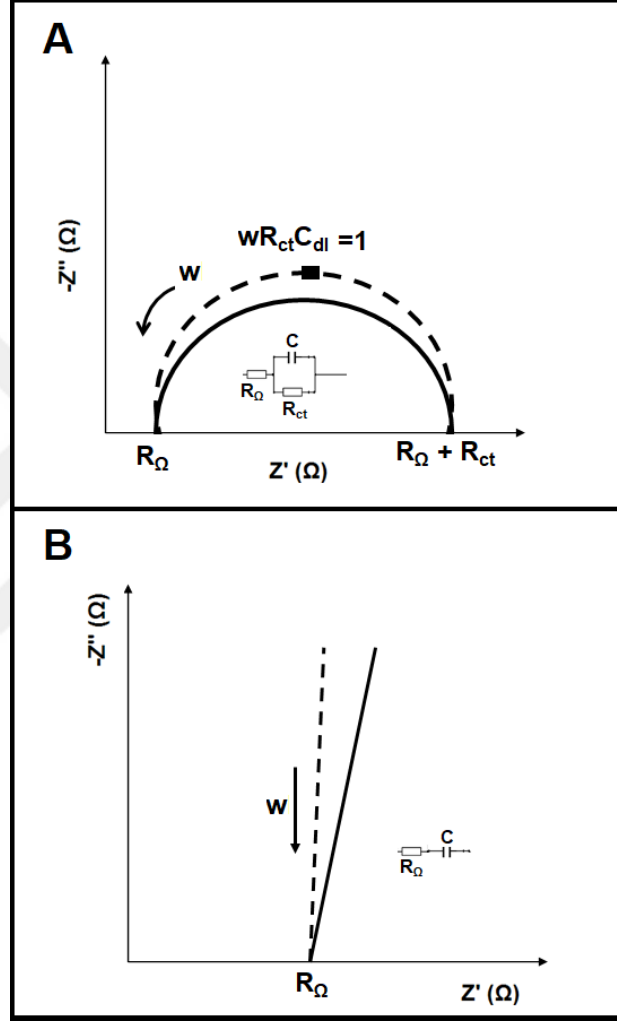
Empedans, gerçek ve zahiri olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır ve Gerçek empedansın x ekseninde, zahiri empedansın y ekseninde olduğu grafik Niquist eğrisi olarak adlandırılmaktadır (Monk, 2002).

Bir elektrot-çözelti arayüzü, en basit haliyle, arayüzey bölgesinde yük ayrımını temsil eden bir kapasitans ve arayüz boyunca yük (genellikle elektron) hareketine karşı direnci temsil eden bir direnç ile modellenebilir. Yük aktarımının olmadığı, uygulanan potansiyelin faradaik olmayan bölgesinde, sadece bir kapasitans yeterlidir. Arayüz boyunca elektron hareketinin olduğu yerde, yük ayrımı olmadığı için bu süreçler paralel olarak gerçekleşir. Bir elektrot veya modifiye elektrot-çözelti arayüzünün empedansı doğrudan ölçülebilir. Empedans deneylerinden elde edilen veriler, diğer faktörlerin yanı sıra, araştırılan geniş zaman ölçekleri aralığı nedeniyle, voltametrik deneylerden daha fazla bilgi içerir. Bu, elektrot yüzeyindeki ve

elektrot-çözelti arayüzündeki değişiklikleri araştırmak için daha hassas bir teknik olduğu, ancak yorumlamayı daha da zorlaştırabileceği anlamına gelir (Brett, 2022; Chakraborty et al., 2019).

$$Z = Z' - jZ'' \quad \text{Denklem 2.1}$$

Denklem 2.1’de; Z empedans, Z' gerçek empedans, Z'' hayali empedans, j ise $\sqrt{-1}$ ’ye eşittir (Brett, 2022; Chakraborty et al., 2019).



Şekil 2.4 (A) Faradaik elektron transfer reaksiyonu, (B) Kapasitif arayüzey tepkisi. Z ; empedans, Z' ; gerçek empedans, Z'' ; zahiri empedans.

2.3 Sensör ve Biyosensörler

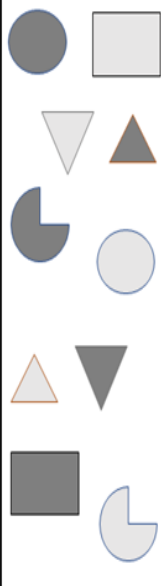
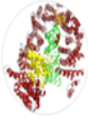

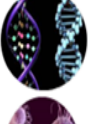


Sensör, fiziksel bir özelliği algılayan veya ölçen ve onu kaydeden, gösteren veya başka şekilde yanıt veren bir araç olarak tanımlanabilir. Üç tip sensör vardır; kimyasal sensörler,

fiziksel sensörler ve biyosensörler. Fiziksel sensörler, sıcaklık ve basınç gibi fiziksel büyüklüklerin ölçülmesi ile ilgilidir. Kimyasal sensör, belirli bir analite kimyasal reaksiyon yoluyla seçici bir şekilde yanıt veren ve analitin kalitatif veya kantitatif tayini için kullanılabilen bir cihazdır. Kimyasal sensör, kimyasal veya tanıma katmanı ile kaplanmış transdüksiyon elemanı olarak tanımlanabilir. Bu katman, hedef analit ile etkileşime girerek etkileşimden kaynaklanan kimyasal değişiklikleri transdüksiyon elemanı ile elektrik sinyaline çevirir.

Biyosensörler, belirli bir tanıma elemanı kullanarak bir hedefin varlığını tespit eden ve ardından tanıma elemanı ve ilgili analitin etkileşimi tarafından indüklenen kütle, optik, elektronik veya manyetik sinyal değişikliklerini izleyen cihazlardır. Moleküler tanıma sonuç olarak kullanılan ajanlar, reseptörler, enzimler, antikorlar, nükleik asitler, moleküler baskılı polimerler ve benzeridir. Geleneksel olarak, klinik teşhis ve genomik/proteomik çalışmalar için en çok kullanılan tanıma bileşenleri, afiniteye dayalı antikorlar ve nükleik asitlerdir (Xu et al., 2009).

2.3.1 Biyosensörlerin çalışma prensipleri

Biyolojik katman, analit ile spesifik etkileşimden sorumluyken, dönüştürücü bu etkileşimden gelen bilgileri ölçülebilir bir sinyale dönüştürür (Cui et al., 2021; Wang et al., 2020; P. Xu et al., 2020). Örneğin, mekanik dönüştürücüler analit-biyoreseptör etkileşimini bükülme veya rezonans frekansındaki bir değişikliğe, optik dönüştürücüler genellikle ışık frekansı veya yoğunluğundaki bir değişikliğe ve elektrokimyasal dönüştürücüler akım, potansiyeldeki değişime dayalı sinyale dönüştürür. En son aşamada, okuma sistemi bu değişikliklerin miktarını ölçer (Jiang et al., 2017; Shen et al., 2020; Zhou et al., 2020). Eğilmedeki değişiklikler, rezonans frekansındaki değişiklikler, akım ve potansiyel gibi elektrokimyasal parametrelerdeki değişiklikler ve optik özelliklerdeki değişiklikler, uygun bir okuma sistemi ile ölçülen fiziksel olaylar arasındadır (Huang et al., 2021). Şekil 2.4'de biyosensör sürecini şematik olarak göstermektedir.

ANALİT	BİYOSEPTÖR	SİNYAL DÖNÜŞTÜRÜCÜLER	ELEKTRİKSEL SİNYAL
	 ENZİM	OPTİK Kolorimetrik Lüminesans Floresans Yüze plazmon rezonans	Renk Işık Şiddeti Işık Şiddeti Işık Şiddeti
	 ANTİKOR	KALORİMETRİK Termistör	
	 NÜKLEİK ASİT	KÜTLE Piezoelektrik Quartz kristal mikrobaleans	Frekans Değişimi Frekans Değişimi
	 BAKTERİ	ELEKTROKİMYASAL Amperometrik Potansiyometrik Kondüktometrik İmpedimetrik	Akım Voltaj İletkenlik Direnc
	 HÜCRE		

Şekil 2.5. Biyosensör ve bileşenlerinin şematik gösterimi.

2.3.2 Biyosensör tipine göre sınıflandırma

Bir biyosensör, bir dönüştürücüye çeşitli fiziksel ve kimyasal yollarla eklenebilen hassas bir biyolojik katman içerir (Liu et al., 2019; Wang et al., 2021a, 2021b). Biyo reseptör, tespit için biyokimyasal bir mekanizma kullanan biyolojik bir moleküler tür (antikor, enzim, protein ve nükleik asit) veya canlı biyolojik sistemdir (hücre, doku ve organizma). En yaygın biyoreseptörler, antijen-antikor etkileşimlerine, nükleik asit etkileşimlerine (iki tamamlayıcı iplik), enzimatik etkileşimlere (enzim-substrat), hücresel etkileşimlere (mikroorganizmalar, proteinler) ve biyomimetik veya sentetik biyoreseptörlere dayanır (Chen et al., 2019; Huang et al., 2021, 2013; Stephenson et al., 2013; Zhang et al., 2020).

2.3.2.1 Dönüştürücü tipine göre sınıflandırma

Dönüştürücü oluşumu ve analit ile reseptör arasındaki etkileşimin ölçülebilir bir fiziksel fenomene dönüşme hızıdır. Dönüşüm çok çeşitli şekillerde yapılabilir ve biyosensörler

kullanılan dönüştürme sisteminin tipine göre sınıflandırılabilir. Yaygın dönüştürme sistemlerinin sınıflandırılması şunları içerir:

- 1) Piezoelektrik biyosensörler
- 2) Termal biyosensörler
- 3) Optik biyosensörler
- 4) Elektrokimyasal biyosensörler

ilgili alt gruplara ayrılır. Mevcut dönüştürme sistemleri, yukarıdaki yöntemlerden biri veya bunların bir kombinasyonudur.

Optik teknikler: Analit-reseptör etkileşimi, absorpsiyon ve emisyonun yoğunluğu veya frekansı, yüzey elektronlarının rezonans frekansı, kırılma açısı vb. gibi optik özelliklerde değişikliklere yol açabilir. Biyosensörler, farklı spektrokimyasal özellikleri (absorpsiyon, floresan, fosforesans, Raman, yüzey elektron rezonansı, kırılma, difüzyon, vb.) kaydederek farklı spektroskopi türlerini kullanabilir (Dhara et al., 2014; Huang et al., 2021).

Elektrokimyasal teknikler: Elektrokimyasal algılama, biyosensörlerde kullanılan bir başka dönüştürme yöntemidir. Elektrokimyasal teknikler, bağımsız olarak veya son derece hassas floresan optik tekniği gibi optik algılama yöntemleriyle birlikte kullanılabilir (Gao et al., 2021b; Hu et al., 2020; Huang et al., 2021; Lin et al., 2020; Yu et al., 2020). Birçok analit güçlü floresana sahip olmadığından ve molekülleri floresan etiketle etiketlemek genellikle zor bir işlem olduğundan, elektrokimyasal dönüşüm çok faydalı olabilir (Ma et al., 2021; Qu et al., 2018; Q. Xu et al., 2020). Biyoreseptör tarafından sağlanan seçicilik ile elektrokimyasal ölçümlerin hassasiyetini birleştirerek, floresan biyosensörlerle karşılaştırılabilir algılama sınırı elde edilir (Cao et al., 2020; Huang et al., 2021).

Kütleye duyarlı teknikler: Analit-biyoreseptör etkileşiminden kaynaklanan küçük kütle değişikliklerinin ölçülmesi, biyosensörlerde kullanılan başka bir dönüştürme şeklidir (Gao et al., 2021a; Sun et al., 2019; Wu et al., 2020; Yang et al., 2020). Bu yöntem piezoelektrik kristallere dayanmaktadır. Bu kristaller, bir elektrik sinyalinin uygulanması nedeniyle belirli bir frekansta titreşir. Salınım frekansı, kullanılan elektrik frekansına ve kristalin kütlesine bağlıdır; bu nedenle kimyasal bağlar nedeniyle kütle arttığında, kristalin salınım frekansı değişir ve ortaya çıkan değişiklik elektriksel olarak ölçülür ve eklenen kütle değerlendirilmeye için kullanılır (Cao et al., 2020; Huang et al., 2021).

2.4 Karbon Nanomalzemeler

Karbon nanomalzemelerin, yüzeylerinde aynı anda birçok algılama olayı meydana gelebilmektedir. Aynı zamanda biyomoleküllerin bağlanması çok kolay bir şekilde mümkün olması nedeniyle, geniş yüzey alanlarından dolayı, elektrokimyasal biyosensörler için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu malzemeler, onları biyosensörlerde kullanım için potansiyel aday haline getiren; elektronik, optik, fiziksel ve mekanik özelliklere sahiptirler. Bu malzemeler aynı zamanda biyolojik olarak oldukça uyumludur. Kullanım alanları;

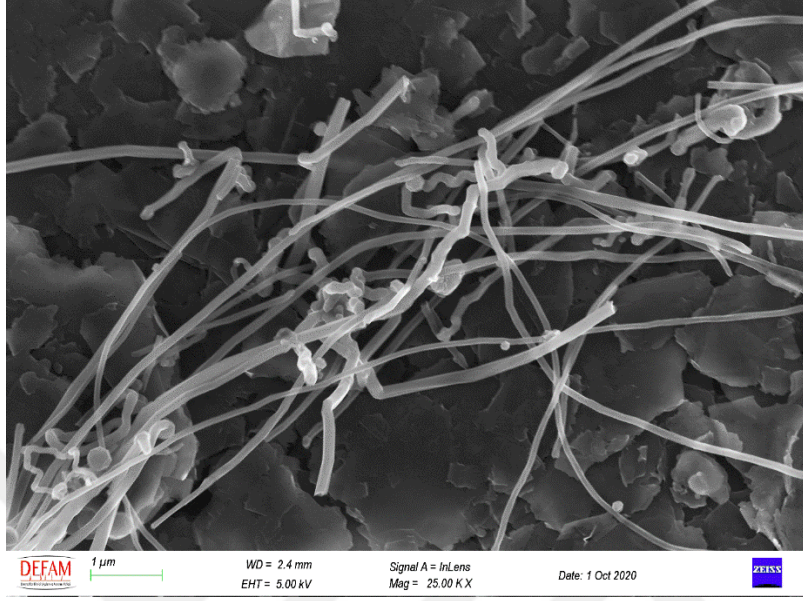
- İlaç salınım sistemleri,
- Biyosensörler,
- Foto-termal ajanlar,
- Anti enflamatuar ajanlar,
- Doku Mühendisliği iskeleleri.

Karbon nanotüpler veya Grafen bazlı elektrokimyasal sensörler daha yüksek hassasiyete, daha yüksek seçiciliğe, hızlı elektron transfer hızına ve düşük algılama limitlerine sahiptir. Karbon nanomalzemeler, elektrokimyasal biyosensörlerde kullanım için potansiyel kılan yüksek bir yüzey/hacim oranına, elektriksel iletkenliğe ve mekanik dayanıma sahiptir (Gergeroglu et al., 2020; Zaytseva and Neumann, 2016; Zhang and Du, 2020).

2.4.1 Karbon nanofiberler

Karbon nanomalzemelerin gelişmiş bir türü olan karbon nanofiberler, karbon nanotüplere benzer iletkenliğe ve kararlılığa sahiptir. Karbon nanofiberler, karbon nanotüplere kıyasla biyomoleküllerin bağlanması için daha işlevselleştirilmiş yüzey alanına sahiptir. Yüzey fonksiyonel grupları, sadece çözünürlüklerini arttırmakla kalmayıp aynı zamanda biyomoleküller ile seçici etkileşimlerini de arttıran kimyasal işleme karbon nanofiberlere dahil edilebilir. Karbon nanofiberler, karbon nanotüplere en temel ayırt edici özelliği, karbon nanofiberlerin dış duvarında karbon nanotüplerden daha fazla kenar alanı sağlayan, elektroaktif analitlerin elektron transferini kolaylaştırabilen, çeşitli şekillerde grafen tabakalarının

istiflenmesidir. Eşsiz kimyasal ve fiziksel özellikler karbon nanofiberleri elektrot malzemeleri ve immobilizasyon substratları olarak kullanılmasını sağlamıştır (Kour et al., 2020).



Şekil 2.6. Karbon nanofiber SEM görüntüsü.

2.4.2 Karbon nanomalzeme temelli biyosensörler

Nanomalzeme ile modifiye edilen yeni yüzeyler, daha seçici ve hassas analizleri mümkün kılan nükleik asit biyosensör teknolojisi geliştirmek için mükemmel bir ortam sunmuştur (Erdem, 2007).

Biyosensörleri geliştirmek için karbon bazlı nanomalzemelerin uygulanması, yüksek bir yüzey/hacim oranı, iyi kimyasal kararlılık ve biyouyumluluk gibi avantajlarından dolayı büyük ilgi görmüştür (Ramnani et al., 2016; Wang and Dai, 2015; Yoon et al., 2020). Karbon nanomalzemelerin gelişmiş bir türü olan karbon nanofiberler (CNF'ler), karbon nanotüplerinkine (CNT) benzer iletkenliğe ve kararlılığa sahiptir. Karbon nanofiberlerin elektrokimyasal biyosensörlerinde tek başına uygulamaları olduğu gibi, farklı özellikteki iletken polimerler ve diğer iletken malzemelerle oluşturduğu kompozitlere dayalı elektrokimyasal biyosensörlerin nükleik asit (Eksin and Erdem, 2016), ilaç (Apetrei and Apetrei, 2017) ve aptamerlere dayalı protein tayinine (Erdem et al., 2015) vb. gibi analitlerin duyarlı ve seçimli analizlere uygulandığı görülmüştür.

2.5 İyonik Sıvılar

İyonik sıvılar (IL), iyi çözme özellikleri, yüksek iletkenlik, uçuculuğu olmayan, düşük toksisite, geniş elektrokimyasal potansiyel aralığı ve iyi elektrokimyasal kararlılığa sahiptir (Wei and Ivaska, 2008) .

İyonik sıvılar, birçok avantaja sahip oldukları için geleneksel organik çözücülerin yerine kullanılmıştır. İyonik sıvı temelli (biyo)sensörlerin en çok uygulama alanı elektrokimya olup, bunların çoğunda iyonik sıvının hem kullanıldığı görülmüştür (Eksin et al., 2013; Erdem et al., 2014; Liu et al., 2007; Zhao et al., 2005).

2.6 Aptamerler

Aptamerler, hedefe özgü hassas ve seçici biyolojik yapıları tasarlamak için kullanılan DNA veya RNA temelli sentetik nükleik asit sınıfı olarak bilinir (Erdem et al., 2015). Aptamerler özellikle ilaçlar, toksinler, amino asitler, proteinler ve canlı hücreler gibi organik veya inorganik hedeflerini tanımlayabilen oligonükleotidlerdir (Erdem et al., 2015, 2014a, 2009; Famulok et al., 2007; Koyun et al., 2019; Rohrbach et al., 2012; Tombelli et al., 2005; Willner and Zayats, 2007). Bununla birlikte, aptamerler yüksek bağlanma afinitesi, daha iyi stabilizasyon ve antikora kıyasla daha uzun raf ömrü gibi bazı üstün özellikler sunarlar. Aptamerler hedeflerini geri dönüşümlü olarak yakalayabilir ve serbest bırakabilirler.

2.6.1 Aptamer tabanlı impedimetrik biyosensörler

Aptamerlerin hedeflerini afinite ve yüksek özgüllük ile bağladıkları gösterilmiştir. Ayrılma sabitleri mikromolar değerden pikomolar altı değerlere kadar değişmektedir. Ayrıca, çoğu durumda aptamerler sadece aynı kökenli proteinleri bağlamakla kalmaz, aynı zamanda işlevlerini etkili bir şekilde inhibe eder (Famulok et al., 2007).

Elektrokimyasal aptasensörlerde en sık kullanılan impedimetrik aptasensörler, elektrot yüzeyleri, redoks probu ve elektrot arasındaki yük aktarımı nedeniyle düşük empedansa sahiptir. Hedef analit ile aptamer bağlandıktan sonra, elektrot yüzeyinde yük transferini

engellendiği için yüksek empedans gözlemlenmektedir. Bu strateji literatürde birçok hedef molekülün belirlenmesine yönelik çalışmalarda sıklıkla kullanılmıştır (Chakraborty et al., 2019) ve bu çalışmalardan bazıları Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2. 1. Aptamer tabanlı impedimetrik biyosensörlerine örnekler.

Hedef Molekül	Elektrot	Örnek	Kaynaklar
LYS	CNT	-	(Khan et al., 2018)
	CHIT-GO-PGE	-	(Erdem et al., 2014b)
	MWCNT-SPEs	-	(Rohrbach et al., 2012)
	CNF-SPE, sekiz kanallı perde baskılı elektrotlar	Serum	(Senturk et al., 2021)
THR	CNF-SPE	Serum	(Erdem et al., 2015)
	PGE	Serum	(Eksin et al., 2015)
Histamin	Au	-	(John Ho et al., 2020)
miRNA-155	Pt tel/ Ti ₃ C ₂ T _x @FePcQDs	İnsan Serumu Örnekleri	(Duan et al., 2020)
APC	G2-PS/MULTI-SPE8.	Serum	(Erdem and Congur, 2014b)
APC	G2-PS/SPE	Serum	(Erdem and Congur, 2014c)

Kısaltmalar: APC: Aktive edilmiş protein C, THR: Trombin, LYS: Lizozim, GO: Grafen oksit, MWCNT: çok duvarlı karbon nanotüp, CNF: Karbon nanofiber, G2-PS: İkinci nesil dendrimer, CHIT: Kitosan, MULTI-SPE8: sekiz kanallı perde baskılı elektrot, FePcQDs: demir ftalosiyenin kuantum noktaları, SPE: Perde baskılı elektrot, CNT: Karbon nanotüp, Pt: Platin, Au: Altın, PGE: Kalem grafit elektrot.

2.7 Aktive Protein C

Protein C (PC), aşırı pıhtılaşmanın önlenmesi için antikoagülan mekanizmaya katılan bir zimojen proteindir. PC'de ciddi eksiklikler venöz tromboz veya neonatal purpura fulminans ile ilişkilidir. Aktive edilmiş protein C (APC), PC yolunun anahtar enzimidir. APC, aktif

olmayan öncül protein C (PC) 'den türeyen bir serin proteaz olup faktör Va ve faktör VIIIa etkisiz hale getirerek güçlü bir doğal antikoagülan görevi görür.

Kontrolsüz iltihaplanma ve pıhtılaşma, sepsisin iki ayırt edici özelliğidir. Endojen protein C ve APC azalması ile sepsiste hastalığın seyrinin kötüleşmesi arasında bir ilişki olduğunun keşfedilmesinden sonra, bu hastaların tedavisinde kullanılmak üzere rekombinant insan APC (rhAPC) geliştirilmiştir. Aktive protein C (APC), protein S'ye bağlanarak daha fazla trombin oluşumunu önlemek üzere faktör Va ve VIIIa' yı inhibe eder ve böylece kanın pıhtılaşmasını düzenler (Colin and Annane, 2008; Ruf, 2010).

APC'nin şiddetli sepsiste terapötik kullanımı değerlendirilen ve önemli bir inflamasyon bileşeni olan; ayrıca obezite, pnömoni, yaygın damar içi pıhtılaşma, sepsis, kronik böbrek yetmezliği, vb gibi rahatsızlıklarda uygulandığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Becher et al., 2018; Mezzano et al., 2001; Schouten et al., 2015; Solá et al., 2009; Wada et al., 2014).

Aktif protein C (APC), trombin oluşumunun kritik bir düzenleyicisidir. APC'nin bu özelliği tromboz oluşumunu önler. Fazla APC oluşumu travmaya bağlı koagülopati gibi kanama riskini artırır. Bu nedenle, APC aktivitesinin farmakolojik inhibisyonu, bazı klinik durumlarda kan pıhtılaşabilirliğini arttırabilir.

APC inhibisyonu için serpinler, antikorlar ve aptamerler gibi farklı moleküller ve bunların Travmaya bağlı koagülopati (TIC) ve hemofili tedavisinde yeni terapötik stratejiler olarak potansiyel kullanımlarına yönelik umut verici sonuçlar rapor edilmiştir (Balkaransingh and Young, 2017; Hamedani et al., 2016a; Polderdijk et al., 2017; Shetty and Ghosh, 2015).

Hamedani vd., çalışmasında (Hamedani et al., 2016), APC'den etkilenen plazma ve tam kan pıhtılaşma modellerinde APC spesifik DNA aptameri olan HS02-52G'nin kan pıhtılaşmasının restorasyonu üzerindeki etkisini araştırmışlar ve bu çalışmada tasarlanmış HS02-52G nötralize edici antisens dizisinin (APC spesifik aptamerin birebir eşleniği oligonükleotitler) en etkin olanı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, HS02-52G ile eşleniği olan antisens dizisi AD22 varlığında oluşan aptamer-antisens çiftinin etkin bir APC inhibitörü olarak etki gösterilmesi nedeniyle bu "antidot çifti"nin, APC inhibe edici yeni bir ilacın geliştirilmesi açısından güçlü bir aday olduğu rapor edilmiştir (Hamedani et al., 2016). Yeni ve biyoteknolojik ürün olan aptamer-antisens antidot çiftinin, örneğin travmaya bağlı koagülopatide (Chang et al., 2016) potansiyel olarak akut APC ile ilişkili kanama komplikasyonları için olası tedavi seçeneği olarak önerildiği belirtilmiştir (Hamedani vd., 2016). Bu nedenle, plazmada dolaşan APC'yi hızlı, seçimli ve duyarlı bir şekilde ölçmek için

geliştirilecek bir yöntem ve aptamere dayalı yöntem ile aynı zamanda APC'nin etkileşim mekanizmasını kontrol edebilmek adına aptamer-antisense dayalı antidot çiftinin APC ile etkileşim mekanizmasının anlaşılması oldukça önemlidir.

APC seviyesini ölçmek için çeşitli analizler mevcuttur. Bu analiz yöntemleri, gerekli numune miktarı, tayin süresi ve tayin sınırı bakımından farklılık gösterirler (Oto et al., 2020). APC seviyesini ölçmek için yapılan araştırmaların çoğu, enzimin APC'nin, spesifik bir monoklonal (mAb) veya poliklonal antikoru (polAb) kullanılarak tespit edildiği ve APC amidolitik aktivitesinin, spesifik bir kromojenik substrat kullanılarak ölçüldüğü enzim saptama analizleridir (ECA) (Gruber and Griffin, 1992; Katsuura et al., 1996; Li et al., 2005; Orthner et al., 1993; Takazoe et al., 1999). Diğer bir grup, PC aktivasyonu üzerine salınan aktivasyon peptidini ölçer (Bauer et al., 1984). Sandviç ELISA'ya dayanan bir başka deney grubu ise, iki antikoru, bir monoklonal anti-PC antikoru ve bir anti-PC inhibitörü (PCI) antikoru kullanılarak APC tayini gerçekleştirmiştir (España et al., 2001, 1996; Fernández et al., 2006; Martos et al., 2016). Son yıllarda APC analizi rapor edilen diğer çalışmalarda aptamer temelli biyosensörlerin geliştirilmesi ve uygulamalarına yöneliktir (Erdem et al., 2014a; Erdem and Congur, 2014a, 2014c, 2014b; Hosseini Ghalehno et al., 2019; Koyun et al., 2019)

Erdem ve ark. bir çalışmada (Erdem and Congur, 2014a), DNA aptamer ve onun hedefi olan APC arasındaki etkileşimin izlenmesi ve APC nin seçimli ve duyarlı tayini için dendrimer temelli impedimetrik aptasensör geliştirilmiştir. 2019 yılında Koyun ve ark. (Koyun et al., 2019), insan APC'sinin spesifik tayini için oldukça duyarlı ve seçici etiketsiz bir yüzey plazmon rezonans aptasensörü geliştirmiştir. Ayrıca 2019'da Ghalehno ve ark. (Hosseini Ghalehno et al., 2019) redoks göstergesi olarak metilen mavisi kullanarak APC'nin tayini için seçici ve duyarlı bir elektrokimyasal aptasensörü rapor etmiştir.

Tablo 2. 2. Aktive protein C'yi ölçmek için rapor edilen yöntemlerin özellikleri.

Yöntem	APC tayin yöntemi	Kaynaklar
ECA	mAb	(Gruber and Griffin, 1992)
		(Orthner et al., 1993)
		(Katsuura et al., 1996)
		(Takazoe et al., 1999)
		(Liaw et al., 2003)
		(Li et al., 2005)
ELISA	mAb	(España et al., 1996)
OECA	Oligonükleotid	(Müller et al., 2012)
ELISA	mAb	(España et al., 2001)
	polAb	(Fernández et al., 2006)
	mAb	(Martos et al., 2016)
EIS	DNA aptamer	(Erdem and Congur, 2014c)
EIS		(Erdem and Congur, 2014b)
DPV		(Erdem and Congur, 2014a)
EIS, CV		(Erdem et al., 2014a)
DPV		(Hosseini Ghalehno et al., 2019)
SPR		(Koyun et al., 2019)

Kısaltmalar: ECA: Enzim Yakalama Deneyi, Polab: Poliklonal Antikor, Mab: Monoklonal Antikor, OECA: Oligonükleotid Bazlı Enzim Yakalama prosedürü, EIS: Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi, SPR: Yüzey Plazmon Rezonansı, CV: Döngüsel Voltametri, DPV: Diferansiyel Puls Voltametri, FBS: Yapay Serum

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar

Potansiyostat – AUTOLAB-PGSTAT 30 (FRA 2 modülü içeren, NOVA 1,11 yazılımlı; Eco Chemie, Hollanda)

Çalışma elektrodu – Kalem grafit elektrot (Kalem; Rotring, kalem ucu; Tombow 0.5 HB)

Referans elektrot – Ag/AgCl (BAS, Model RE-5B, W. Lafayette, ABD)

Yardımcı elektrot – Platin tel

Faraday kafesi

Terazi – (Mettler Toledo AB204-S)

pH metre – Orion 420A

Vorteks – Biosan V1

Manyetik karıştırıcı – IKA

Sonikatör – Bandelin Sonorex

3.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

1-bütül-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat (IL), Sigma

N,N-dimetilformamid (DMF), Sigma

Aktive edilmiş Protein C (APC), Haematologic Technologies (Amerika Birleşik Devletleri)

Karbon nanofiber (CNF), Sigma

Trombin (THR), Sigma

Sığır serumu albümin (BSA), Sigma

Protein C (PC), Sigma

Sodyum klorür (NaCl), Sigma

Sodyum Hidroksit (NaOH), Sigma

K_2HPO_4 (Di potasyum hidrojen fosfat), Sigma

KH_2PO_4 (Potasyum dihidrojen fosfat), Sigma

Potasyum hekzasiyanoferrat (III), Sigma

Potasyum hekzasiyanoferrat (II) trihidrat, Sigma

Asetik asit, Sigma

Ultrasaf su

Oligonükleotit dizileri

Aktive edilmiş protein C (APC) Haematologic Technologies (Amerika Birleşik Devletleri) firmasından ve antisens dizisi (AD22) ile APC'e spesifik DNA aptameri (DNA-Apt) Ella Biotech GmbH (Almanya) firmasından satın alındı. DNA-Apt ve AD22 baz dizilimleri aşağıda verilmiştir.

DNA-Apt: 5'-NH₂- GCC TCC TAA CTG AGC TGT ACT CGA CTT ATC CCG GAT GGG GCT CTT AGG AGG C-3'.

AD22: 5'ATCCGGGATAAGTCGAGTACAG-3'

3.2.1 Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

3.2.1.1 Tampon çözeltilerin hazırlanışı

Ultra saf su kullanılarak hazırlanan tampon çözeltileri, cam şişeler içerisinde buz dolabında saklandı.

0,50 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 4,8; ABS)

0,5 M asetat tampon çözeltisi litresinde; 28.9 mL asetik asit ve 1,168 g NaCl (0,02 mol) içermektedir. Çözeltinin pH'sı 0,1 N HCl ve/veya 0,1 N NaOH ilave edilmesiyle 4,8 değerine pH metre ile ölçülerek ayarlandı.

0,05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 7,4; PBS)

0,05 M fosfat tampon çözeltisi litresinde; 1,36 g (0,01 mol) KH_2PO_4 , 6,96 g (0,04 mol) K_2HPO_4 ve 1,168 g NaCl (0,02 mol) içermektedir. Çözeltinin pH'sı 0,1 N HCl ve/veya 0,1 N NaOH ilave edilmesiyle 7,4 değerine pH metre ile ölçülerek ayarlandı.

Redoks probu çözeltisinin hazırlanışı

EIS ölçümlerinde kullanılacak redoks probu, 2,5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ve 0,1 M KCl içerecek şekilde 200 mL saf su içerisinde hazırlandı. CV ölçümlerinde kullanılacak redoks probu, 2 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ve 0,01 M KCl içerecek şekilde 200 mL saf su içerisinde hazırlandı.

3.2.2 Aptamer oligonükleotit ve protein çözeltilerinin hazırlanması

Aptamer çözeltisinin hazırlanmasında literatürdeki mevcut prosedür (Erdem et al., 2014a; Erdem and Congur, 2014c) izlenerek yapılmıştır. Ancak stok çözeltisi (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ultra saf su kullanılarak, seyreltilmiş çözeltileri PBS (pH 7.4) çözeltisi kullanılarak yapıldı.

AD22 stok çözeltisi hazırlanmasında literatürdeki mevcut prosedür (Hamedani et al., 2016) izlenerek yapılmıştır. AD22 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) seyreltilmiş çözeltileri PBS (pH 7.4) çözeltisi kullanılarak yapıldı.

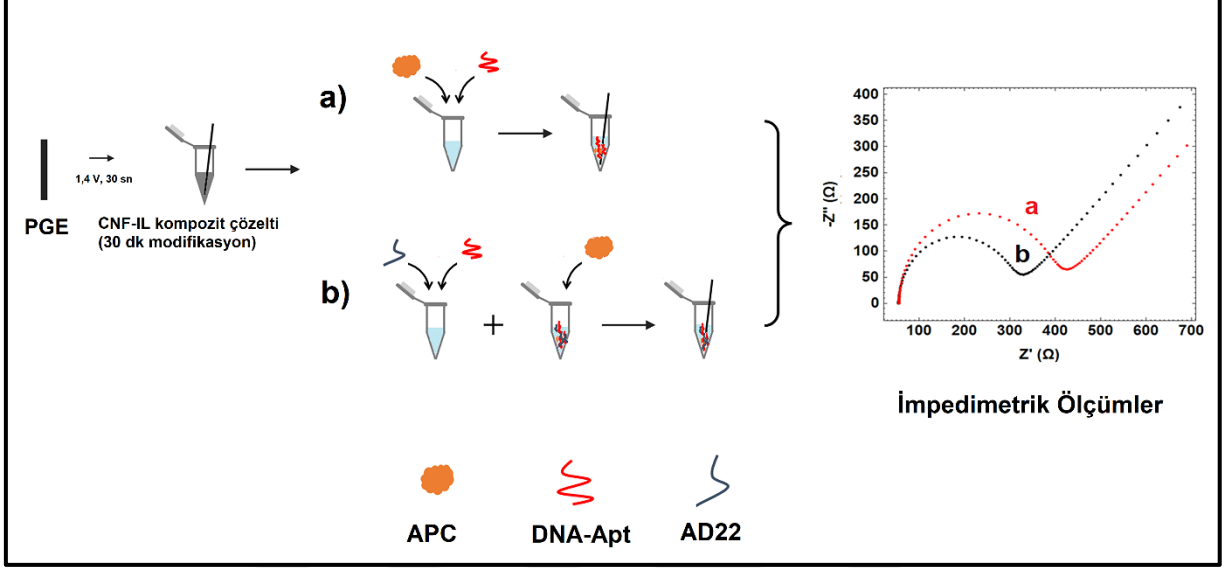
Aptamer, AD22 ve APC stok çözeltileri -20°C de saklandı.

3.2.3 Karbon nanofiber (CNF) ve İyonik sıvı (IL) çözeltisinin hazırlanışı

%5 IL çözeltisi DMF kullanılarak hazırlandı ve 5 dk süre ile ultrasonik banyo içerisinde sonike edildi. DMF içerisinde % 5 konsantrasyonunda olacak şekilde IL çözeltisi, 5 dakika süre ile ultrasonik banyo içerisinde sonike edildi. 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CNF çözeltisi hazırlamak için uygun miktarda CNF tartılarak, üzerine % 5 IL çözeltisi ilave edildi ve hazırlanan kompozit çözelti 25 dk boyunca sonike edildi (Eksin and Erdem, 2016).

3.3 Yöntem

Elektrot yüzeyine kompozit modifiye edildi. APC ve DNA-Apt çözelti fazında etkileşimi ardından elektrot yüzeyine immobilize edildi (Şekil 3.1). Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Elektrokimyasal APC tayinine yönelik geliştirilen impedimetrik aptasensöre ait deneysel prosedürü gösteren şema. (a) AD22 antisens molekülü yokluğunda, (b) AD22 antisens molekülü varlığında.

3.3.1. CNF-IL kompozit çözeltisinin hazırlanışı ve PGE yüzeyinin CNF-IL ile modifikasyonu

Elektrotlara 30 saniye boyunca + 1,40 V uygulanarak elektrokimyasal aktivasyon işlemi gerçekleştirildi. Elektrotlar hazırlanan CNF-IL çözeltisine daldırılarak belirli bir süre bekletildi. Ardından 10 dk süre ile kurutuldu.

3.3.2 Elektrotların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile mikroskobik karakterizasyonu

Elektrotların mikroskobik karakterizasyonu için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ölçümleri kullanıldı. PGE, CNF modifiye PGE, IL modifiye PGE ve CNF-IL modifiye PGE, ZEISS GeminiSEM cihazı kullanılarak CBÜ-DEFAM (Manisa)'da hizmet alımı yapılarak farklı çözünürlük boyutlarında SEM ölçümler gerçekleştirildi.

3.3.3 Elektrotların elektrokimyasal yöntemlerle karakterizasyonu

Elektrotların yüzey modifikasyonu öncesi ve sonrası elektrokimyasal davranışı, 2 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probu çözeltisinde CV ölçümü alınarak incelendi. Yükseltgenme sinyali, indirgenme sinyali, yük geçişi verileri değerlendirilerek incelendi.

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri, 2,5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probu içerisinde, 100 mHz ile 100 kHz frekans aralığında + 0,23 V potansiyelinde 10 mV sinusoidal sinyalde Ag/AgCl/3 M KCl'ye karşı faraday kafesi içerisinde gerçekleştirildi. Bu teknik hem elektrokimyasal yüzey karakterizasyonunda hem de APC ve ona spesifik aptamerin etkileşiminin incelenmesinde kullanıldı.

3.3.4 IL yüzdeki değişimin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi

500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CNF çözeltisi hazırlandıktan sonra % 2, % 3, % 5 ve % 7 IL olacak şekilde iyonik sıvı ile karıştırılarak hazırlanan karışım 25 dk boyunca sonike edildi. Elektrotlar hazırlanan çözeltilere daldırılarak bekletildi. Elektrotlar 10 dk boyunca kurutulularak ardından elektrokimyasal davranışı incelendi. Elektrotların modifikasyonu öncesi ve sonrasında CV ölçümleri gerçekleştirildi. Redoks probuna ait yükseltgenme sinyali, indirgenme sinyali, yük geçişi verileri değerlendirildi.

3.3.5 DNA-Apt konsantrasyondaki değişimin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi

Hazırlanan CNF-IL modifiye elektrotlar kullanılarak 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ APC varlığında değişen aptamer konsantrasyonlarında (0,005, 0,001 ve 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) amino işaretli DNA-Apt ile çözelti fazında 5 dk boyunca (Erdem et al., 2014a), etkileşimi gerçekleştirildi. Hazırlanan çözeltiler içinde 10 dk boyunca bekletilerek pasif adsorbsiyon yöntemi ile elektrot yüzeyine immobilizasyonu gerçekleştirildi. Immobilizasyon sonrası elektrotlar PBS çözeltisi ile yıkandı. Empedans ölçümleri gerçekleştirilerek R_{ct} değerindeki değişimler incelendi.

3.3.6 DNA-Apt ile APC etkileşimi sonrası immobilizasyon süresinin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi

Hazırlanan CNF-IL modifiye elektrotlar kullanılarak, 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA-Apt ve 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ APC'nin çözelti fazında 5 dk boyunca etkileşimi gerçekleştirildi. Elektrotlar hazırlanan

çözeltide 10 ve 20 dk boyunca bekletilerek pasif adsorbsiyon yöntemi ile elektrot yüzeyine immobilizasyonu gerçekleştirildi. Empedans ölçümleri gerçekleştirilerek Rct değerindeki değişimler incelendi.

3.3.7 APC konsantrasyonundaki değişimin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi

Hazırlanan CNF-IL modifiye elektrotlar kullanılarak 0,1 µg/mL DNA-Apt varlığında değişen APC konsantrasyonlarında (0,4, 0.6, 0.8, 1, 1,2 ve 1,4 µg/mL µg/mL) APC ile çözelti fazında 5 dk boyunca, etkileşimi gerçekleştirildi. Hazırlanan çözeltiler içinde 10 dk boyunca bekletilerek pasif adsorbsiyon yöntemi ile elektrot yüzeyine immobilizasyonu gerçekleştirildi. İmmobilizasyon sonrası elektrotlar PBS çözeltisi ile yıkandı. Empedans ölçümleri gerçekleştirilerek Rct değerindeki değişimler incelendi.

3.3.8 AD22 konsantrasyonundaki değişimin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi

Hazırlanan CNF-IL modifiye elektrotlar kullanılarak, 0,1 µg/mL DNA-Apt ve 0,6 µg/mL APC varlığında değişen AD22 konsantrasyonlarında (0,005, 0,1 ve 0,2 µg/mL) AD22 ile çözelti fazında 1 dk boyunca, etkileşimi gerçekleştirildi. Elektrotlar hazırlanan çözeltide 10 dk boyunca bekletilerek pasif adsorbsiyon yöntemi ile elektrot yüzeyine immobilizasyonu gerçekleştirildi. Empedans ölçümleri gerçekleştirilerek Rct değerindeki değişimler incelendi.

3.3.9 Aptamer-AD22 ile APC etkileşim süresinin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi

Hazırlanan CNF-IL modifiye elektrotlar kullanılarak, 0,1 µg/mL DNA-Apt ve 0,6 µg/mL APC ve 0,1 µg/mL AD22 konsantrasyonlarında etkileşimi ile çözelti fazında 1-2-5 dk boyunca etkileşimi gerçekleştirildi. Elektrotlar hazırlanan çözeltide 10 dk boyunca bekletilerek pasif adsorbsiyon yöntemi ile elektrot yüzeyine immobilizasyonu gerçekleştirildi. Empedans ölçümleri gerçekleştirilerek Rct değerindeki değişimler incelendi.

3.3.10 CNF-IL modifiye elektrotların yapay serum ortamında APC analizine uygulanabilirliğinin incelenmesi

CNF-IL modifiye elektrotların yapay serum ortamında impedimetrik APC analizine uygulanabilirliği PBS tamponu (pH 7,40) kullanılarak 1:500, 1:1000 ve 1:2000 oranında seyreltilen fetal sığıır serumu (FBS) kullanılarak incelendi. Elektrotlar seyreltilmemiş/seyreltilmiş FBS örneklerine daldırıldı ve 30 dk süre ile bekletildi. EIS tekniği kullanılarak empedans ölçümleri gerçekleştirildi.

3.3.11 Yapay serum ortamında APC ve DNA-Apt etkileşiminin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi

0,1 µg/mL DNA Apt ile 1:2000 oranında seyreltilmiş FBS ortamında hazırlanan farklı konsantrasyonlarda APC çözeltileri (0,2, 0,4 ve 0,6 µg/mL) 5 dk boyunca karıştırılarak etkileşim gerçekleştirildi. Elektrotlar hazırlanan çözeltiler içinde 10 dk boyunca bekletilerek pasif adsorbsiyon yöntemi ile elektrot yüzeyine immobilizasyonu gerçekleştirildi. Immobilizasyon sonrası elektrotlar PBS çözeltisi ile yıkandı. Empedans ölçümleri gerçekleştirilerek Rct değerindeki değişimler incelendi.

3.3.12 Yapay serum ortamında AD22 etkileşiminin aptasensör yanıtına etkisinin incelenmesi

APC ile aptamerin etkileşimin AD22 varlığında/yokluğunda, AD22 varlığında APC ile aptamerin etkileşimi gerçek örneklerde uygulanabilirliğini göstermek amacıyla FBS ortamında incelendi. 0,1 µg/mL DNA-Apt ve 0,6 µg/mL APC ile 1:2000 oranında seyreltilmiş FBS ortamında hazırlanan 0,1 µg/mL AD22 çözelti fazında 1 dk karıştırılarak etkileşim gerçekleştirildi. Elektrotlar hazırlanan çözeltiler içinde 10 dk boyunca bekletilerek pasif adsorbsiyon yöntemi ile elektrot yüzeyine immobilizasyonu gerçekleştirildi. Immobilizasyon sonrası elektrotlar PBS çözeltisi ile yıkandı. Empedans ölçümleri gerçekleştirilerek Rct değerindeki değişimler incelendi.

3.3.13 CNF-IL/PGE ile impedimetrik APC tayininde seçimliliğinin yapay serum ortamında incelenmesi

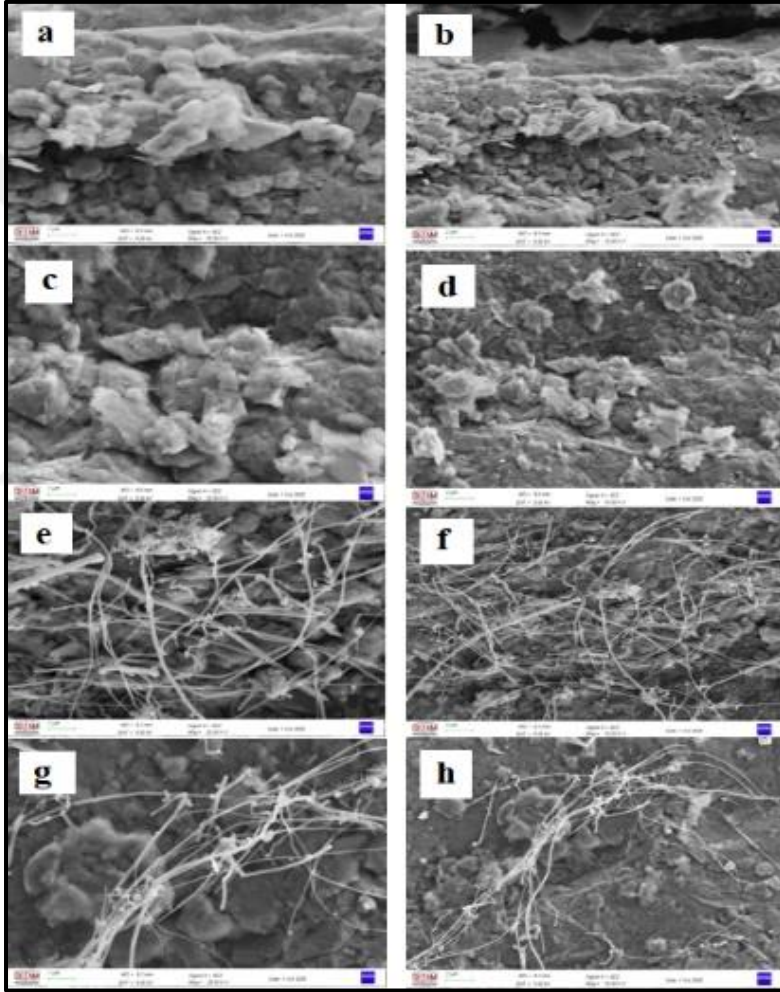
Geliştirilen yöntem APC analizinde seçimliliği, diğer proteinler varlığında (BSA, PC ve THR) test edildi. 0,1 µg/mL aptamer ile 1:2000 oranında seyreltilmiş FBS ortamında hazırlanan 0,6 µg/mL pprotein çözeltileri (APC, PC, THR, ve BSA) çözeltileri 5 dk boyunca karıştırlarak etkileşim gerçekleştirildi. Elektrotlar hazırlanan çözeltiler içinde 10 dk boyunca bekletilerek pasif adsorbsiyon yöntemi ile elektrot yüzeyine immobilizasyonu gerçekleştirildi. İmmobilizasyon sonrası elektrotlar PBS çözeltisi ile yıkandı. Empedans ölçümleri gerçekleştirilerek Rct değerindeki değişimler incelendi.



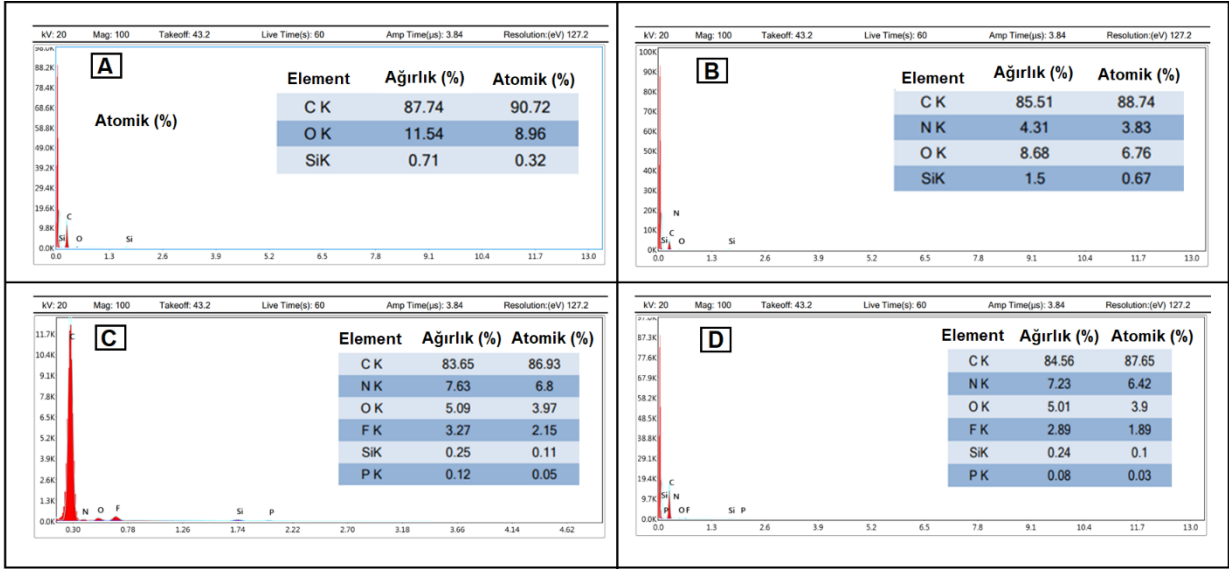
4. BULGULAR

4.1 Elektrotların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Mikroskobik Karakterizasyonuna Ait Bulgular:

PGE, IL/PGE, CNF/PGE, CNF-IL/PGE yüzeylerinin 1 ve 2 μm çözünürlükte SEM ile mikroskobik karakterizasyonuna taramalı elektron mikroskobu ile gerçekleştirildi. Şekil 4.1’de PGE, IL/PGE, CNF/PGE, CNF-IL/PGE yüzeylerinin 1 ve 2 μm çözünürlükte SEM fotoğrafları görülmektedir.



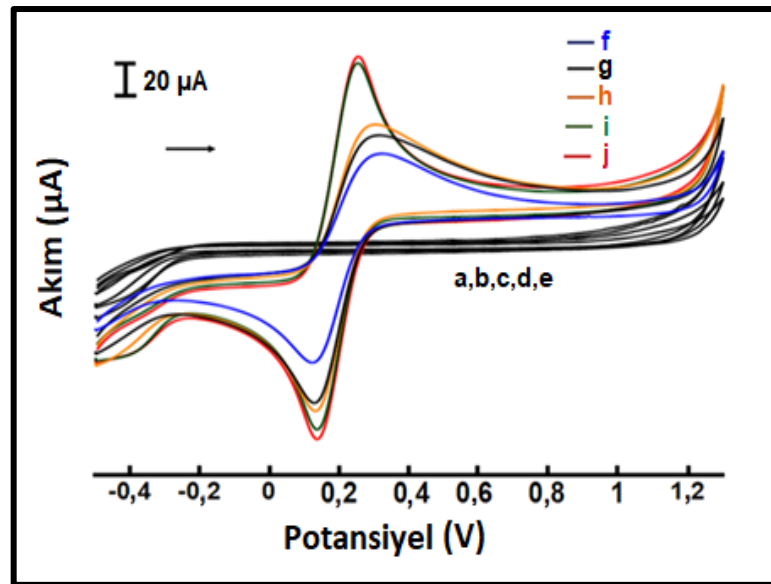
Şekil 4.1. PGE (a,b), IL/PGE (c,d), CNF/PGE (e,f) CNF-IL/PGE (g,h)'nin 5.0 kV hızlandırma potansiyeli ile sırasıyla 1 μm ve 2 μm çözünürlüğe elde edilen SEM görüntüleri.



Şekil 4.2. (A) PGE , (B) CNF/PGE, (C) IL/PGE, (D) CNF-IL/PGE yüzeylerine ait EDX spektrumları.

4.2 Elektrotların Elektrokimyasal Yöntemlerle Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular:

Yöntem 3.3.3'de belirtildiği gibi, dönüşümlü voltametri (CV) tekniği kullanılarak ölçümler alındı ve elde edilen voltamogramlar Şekil 4.3'de gösterildi. PGE, IL-PGE, CNF-PGE, CNF-IL/PGE modifiye elektrotlar ile ölçülen ortalama anodik akım (I_a) ile katodik akım (I_c) değerleri ve relatif yük (Q_a ve Q_c) değerleri ve hesaplanan yüzey alanları (A) (Tablo 4.1)'de verildi.

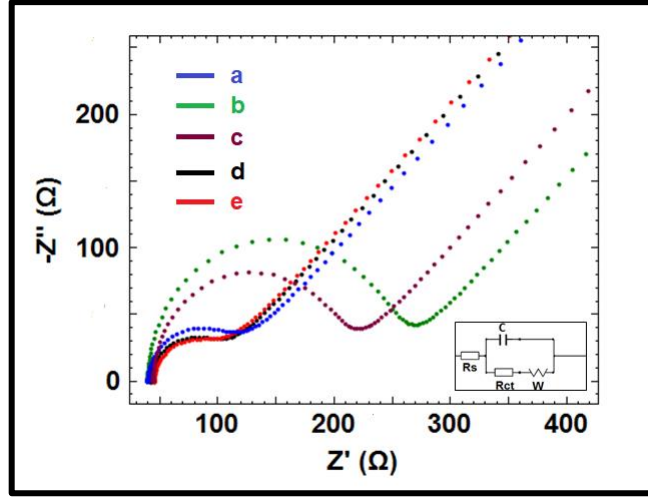


Şekil 4.3. (a) PGE, (b) PGE (kontrol), (c) CNF/PGE, (d) IL/PGE ve (e) CNF-IL/PGE ile 0,1 M KCl çözeltisinde elde edilen voltamogramlar, (a) PGE, (b) PGE (kontrol), (c) CNF/PGE, (d) IL/PGE ve (e) CNF-IL/PGE ile redoks prob çözeltisinde elde edilen voltamogramlar (n=3).

Tablo 4.1. PGE, PGE (kontrol), CNF/PGE, IL/PGE ve CNF-IL/PGE ye ait ortalama anodik pik akımı (Ia), katodik pik akımı (Ic), anodik relatif yük Qa (mC), katodik relatif yük Qc (mC) ve hesaplanan yüzey alan değerleri (A) (n=3).

Elektrotlar	Ia (μA)	Q + (mC)	A (cm^2)	Ic (μA)	Q-(mC)	A (cm^2)
PGE	62,66 \pm 20,89	1,30 \pm 0,26	0,189	80,06 \pm 20,57	0,97 \pm 0,23	0,242
PGE (kontrol)	71,77 \pm 17,09	1,41 \pm 0,13	0,217	84,91 \pm 16,62	1,07 \pm 0,10	0,256
CNF/PGE	81,94 \pm 16,04	1,48 \pm 0,16	0,247	94,43 \pm 15,47	1,12 \pm 0,12	0,285
IL/PGE	125,58 \pm 6,14	1,68 \pm 0,13	0,379	114,71 \pm 65,89	1,28 \pm 0,08	0,346
CNF- IL/PGE	128,47 \pm 3,39	1,74 \pm 0,05	0,388	116,975 \pm 26,27	1,35 \pm 0,04	0,353

Yöntem 3.3.3’de anlatıldığı gibi elektrotlarının empedans spektroskopisi tekniği ile karakterizasyonunda ölçümlerde elde edilen Niquist diyagramları ve empedans verilerine uygun basit eşdeğer devre modeli (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5)’de verildi.

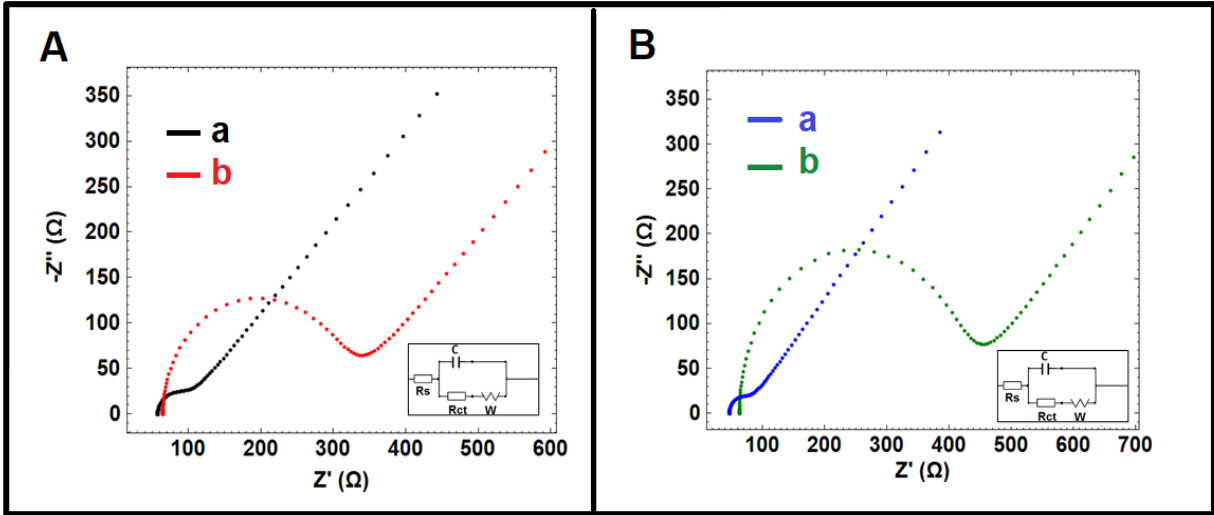


Şekil 4.4. (a) PGE, (b) PGE (kontrol), (c) CNF/PGE, (d) IL/PGE, (e) CNF-IL /PGE ile gerçekleştirilen ölçümlerde elde edilen Niquist diyagramları ve empedans verilerine uygun basit eşdeğer devre modeli. **İç şekil:** Empedans verilerini düzenlemede kullanılan eşdeğer devre modeli. İlgili parametreler; R_s çözelti direncidir. C , çift tabaka kapasitansı, R_{ct} ise elektrot/elektrolit ara yüzeyindeki yük transfer direncidir. Sabit faz element W , elektrot yüzeyinde kütle transferinden kaynaklanan Warburg empedansını göstermektedir.

Tablo 4.2. PGE, PGE (kontrol), CNF/PGE, IL/PGE, CNF-IL/PGE elektrotları ile EIS ölçümlerinde elde edilen ortalama R_{ct} değerleri ($n=3$).

Elektrotlar	Ortalama R_{ct} değeri (Ohm)	R_{ct} değerindeki % değişim	% RSD
PGE	$56,68 \pm 19,76$	-	34,86
PGE (kontrol)	$208,40 \pm 33,53$	267,71 Artış	16,09
CNF/PGE	$159,00 \pm 41,32$	23,70 Azalış	25,99
IL/PGE	$62,05 \pm 19,80$	70,23 Azalış	31,91
CNF-IL/PGE	$53,22 \pm 3,63$	74,46 Azalış	6,82

Elektrot yüzeyine $0,2 \mu\text{g/mL}$ DNA-Apt immobilizasyonundan sonrası elde edilen Niquist diyagramları Şekil 4.6'de gösterildi. Görünür kısmı kaplama değerleri (Janek et al., 1998) DNA-Apt immobilize edilmiş PGE ve CNF-IL modifiye PGE için ayrı ayrı hesaplandı.



Şekil 4. 5. 0,2 µg /mL DNA-Apt immobilizasyonu öncesi ve sonrası (A) (a) PGE, (b) DNA-Apt/PGE, (B) (a) CNF-IL/PGE, (d) DNA-Apt/CNF-IL/PGE, 2,5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren redoks prob çözeltisinde alınan ölçümlerin Niquist eğrileri (n=3).

4.3 IL Yüzdesinin Optimizasyonuna Yönelik Bulgular

Bölüm 3.3.4’de anlatıldığı gibi IL yüzdesindeki değişimin yanıtı etkisi voltametrik yöntemle incelendi (Tablo 4.3).

Tablo 4. 3. IL yüzdesindeki değişim varlığında ölçülen ortalama anodik akım değerleri ile hesaplanan % RSD ve I_a değerindeki artış yüzdesi (n=3).

Elektrotlar	I_a (µA)	% RSD	I_a değerinde % artış
DMF/PGE	71,77 ± 17,08	23,81	-
CNF-% 2 IL/PGE	96,90 ± 17,57	18,13	35,01
CNF-% 3 IL/PGE	120,28 ± 13,76	11,44	67,6
CNF-% 5 IL/PGE	128,46 ± 3,39	2,64	79
CNF-% 7 IL/PGE	123,09 ± 4,33	3,52	71,5

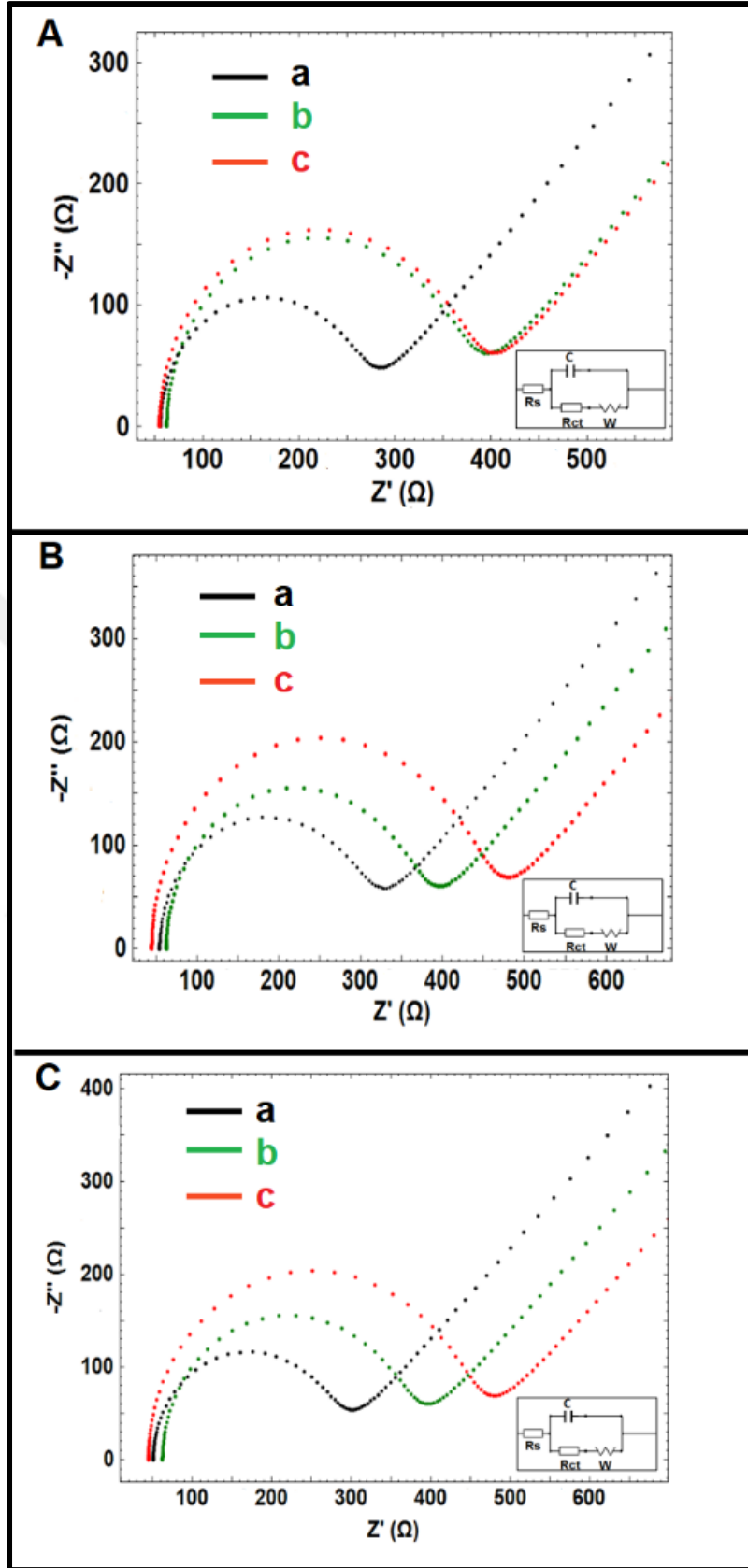
4.4 DNA-Apt Konsantrasyonuna Yönelik Bulgular

Öncelikle PBS ve TBS ortamında hazırlanmış APC ile aptamer etkileşimi incelenmiştir. Tampon ortamının aptasensör yanıtına etkisi Tablo 4.4’de gösterilmektedir. Deneyler, PBS içerisinde hazırlanmış DNA-Apt ile PBS ve TBS ortamında hazırlanmış APC, 0,005 µg/mL DNA-Apt : 0,2 µg/mL APC (1:4 oranı) etkileşiminde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.4. İki farklı ortamda hazırlanan 0,2 µg/mL APC ile 0,05 µg/mL DNA etkileşimi ve elde edilen ortalama Rct değeri (n=3) ve % değişim değeri.

DeneySEL gruplar	PBS ortamında hazırlanan APC ile etkileşim deney grubu	TBS ortamında hazırlanan APC ile etkileşim deney grubu
	Rct değeri (Ohm)	
DNA-Apt (kontrol grubu)	233,6 ± 42,18	
DNA-Apt : APC	371 ± 41,01	242,5 ± 62,93
APC (kontrol grubu)	200,5 ± 85,56	209 ± 28,28
DNA-Apt'e göre Rct değerindeki % değişim	% 58 Artış	% 3 Artış

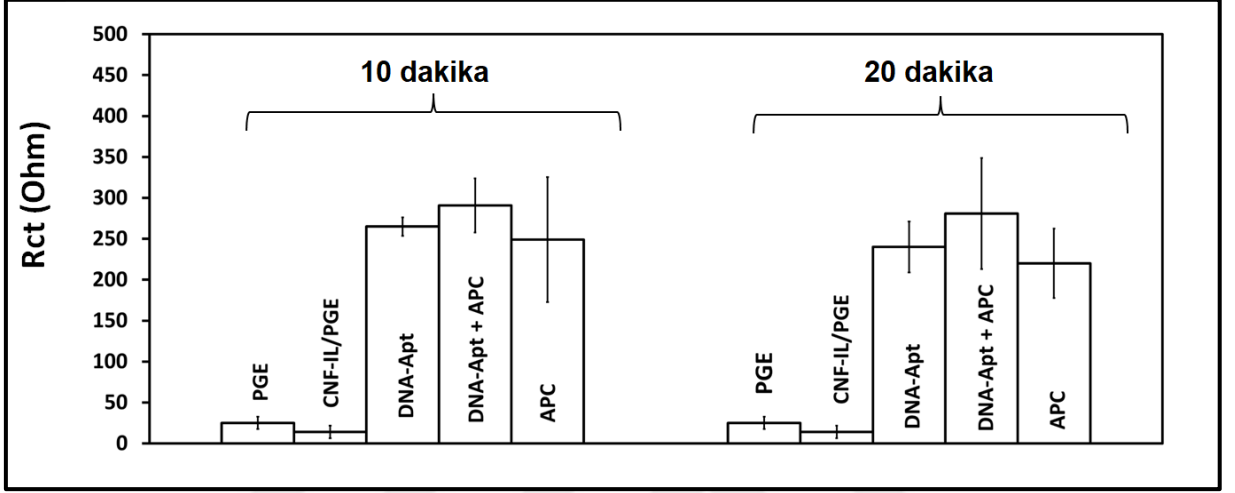
Bölüm 3.3.5'de anlatıldığı gibi APC'nin sabit konsantrasyonda Dna-Apt konsantrasyonu potimize 0,005 µg/mL–0,1 µg/mL konsantrasyonunda değişen aptamer varlığında deneyler gerçekleştirildi. APC ile aptamer etkileşimi öncesi ve sonrasında Rct değerleri ölçüldü. Elde edilen Niquist eğrileri Şekil 4.6'de gösterildi.



Şekil 4.6. 0,2 µg/mL APC ve (A) 0,005 µg/ml DNA-Apt, (B) 0,01 µg/ml DNA-Apt (C) 0,1 µg/mL µg/ml DNA-Apt varlığında elde edilen Niquist eğrileri: (a) DNA APT/CNF-IL/PGE, (b) APC/CNF-IL/PGE, (c) APC/DNA-Apt /CNF-IL/PGE.

4.5 DNA-Apt ile APC Etkileşiminde İmmobilizasyon Süresinin Aptasensör Yanıtına Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular

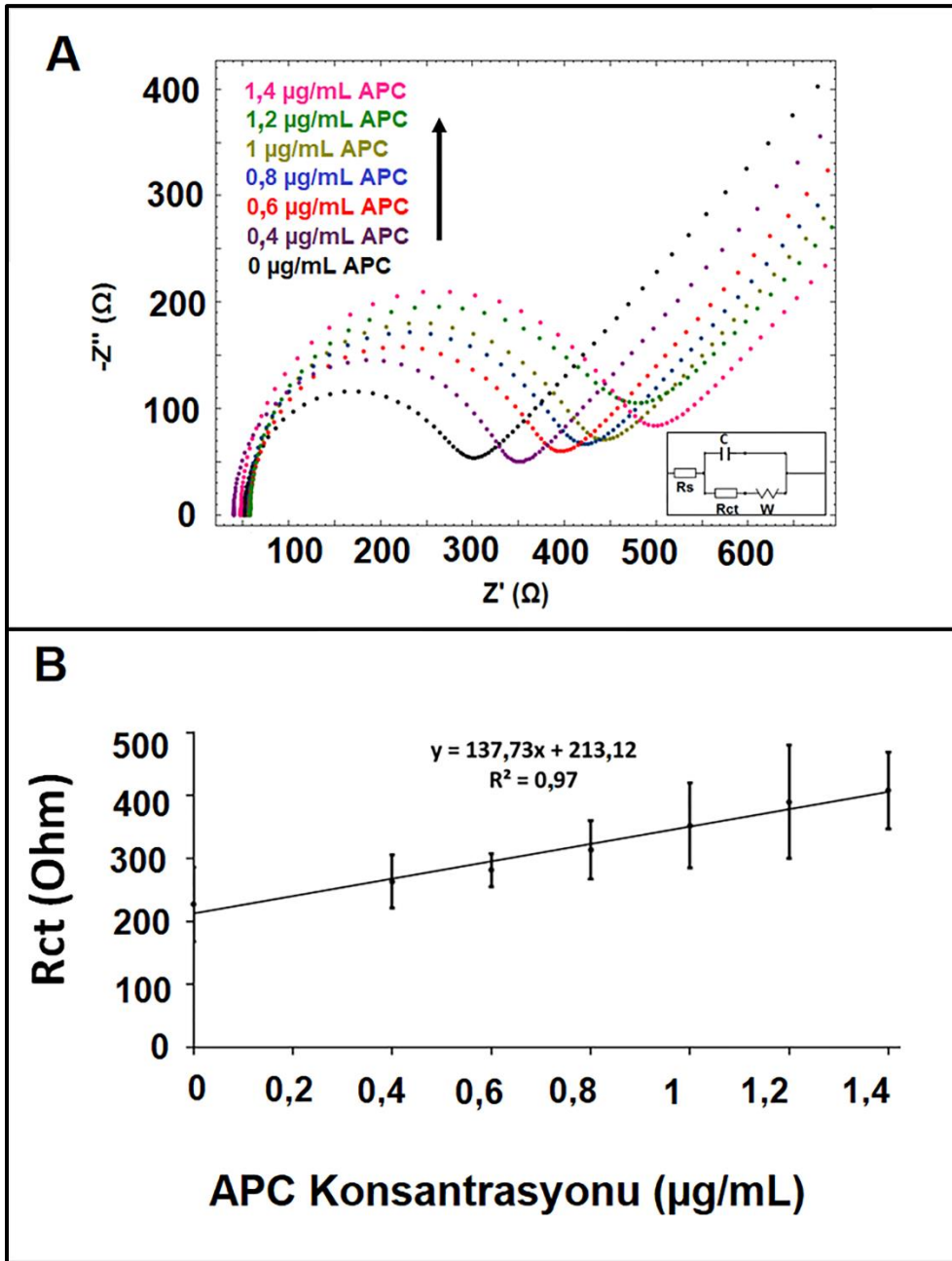
Yöntem 3.3.6’de anlatıldığı gibi, optimum koşullarda DNA-Apt’nin APC ile etkileşimi sonrasında immobilizasyon süresi 10 ve 20 dakikada gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. 0,1 µg/mL DNA-Apt varlığında, 0,6 µg/mL APC’nin etkileşimi sonrası farklı immobilizasyon sürelerinde elde edilen ortalama Rct değerlerini (n=3) gösteren histogramlar.

4.6 APC Konsantrasyonundaki Değişimin Aptasensör Yanıtına Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular

3.3.7’de anlatıldığı gibi, 0,4-1,4 µg/mL arasında değişen farklı APC konsantrasyonlarında çözelti fazında DNA-Apt ile etkileşiminde APC konsantrasyonunun yanıt üzerindeki etkisi incelendi. Niquist diyagramı ve kalibrasyon grafiği Şekil 4.8’de gösterildi.



Şekil 4.8. 0,1 $\mu\text{g/mL}$ DNA-Apt varlığında, (A) Farklı konsantrasyonlarda APC'nin varlığında/yokluğunda elde edilen Niquist diyagramları, (B) Kalibrasyon grafiği.

4.7 Farklı Konsantrasyonlarda AD22'nin APC-Aptamer Etkileşiminde Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular

Bölüm 3.3.8'de anlatıldığı gibi, AD22 konsantrasyonunun etkileşim üzerindeki etkisi, optimize edilmiş koşullar altında incelendi. 0,1 $\mu\text{g/mL}$ DNA-Apt'nin 0,6 $\mu\text{g/mL}$ APC ile etkileşimi, üç farklı konsantrasyonda (0,005, 0,1, ve 0,2 $\mu\text{g/mL}$) AD22'nin varlığında ve yokluğunda incelendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.5'de gösterildi.

Tablo 4.5. Farklı konsantrasyonlarda AD22'nin DNA-Apt ile etkileşimi öncesi ve sonrası ölçülen ortalama Rct değerleri (n=3).

Deney grubu	Sadece AD22 varlığında ölçülen Rct değerleri (Ohm)	0,1 µg/mL DNA-Apt ve eşleneği olan AD22 varlığında ölçülen ortalama Rct değerleri (Rct)	% RSD	Rct değerindeki değişiklik
0,1 µg/mL DNA-Apt (kontrol grubu)	213,33 ± 14,15	-	6,63	6,63 Kat Artış*
0,05 µg/mL AD22	317,50 ± 82,73	206,00 ± 22,63	10,98	% 35,12 Azalış
0,1 µg/mL AD22	318,00 ± 30,14	366,00 ± 71,39	19,51	% 15,09 Artış
0,2 µg/mL AD22	345,00 ± 92,93	293,33 ± 64,94	22,14	% 14,98 Azalış

*CNF-IL/PGE yüzeyine sadece DNA-Apt immobilizasyonu sonrasında ölçülen ortalama Rct değerinde 6,63 kat artış gözlemlendi.

0,1 µg/mL DNA-Apt 'nin 0,6 µg/mL APC ile etkileşimi, 0,1 µg/mL konsantrasyonunda AD22'nin yokluğunda ve varlığında yanıtı incelendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.6 de gösterildi.

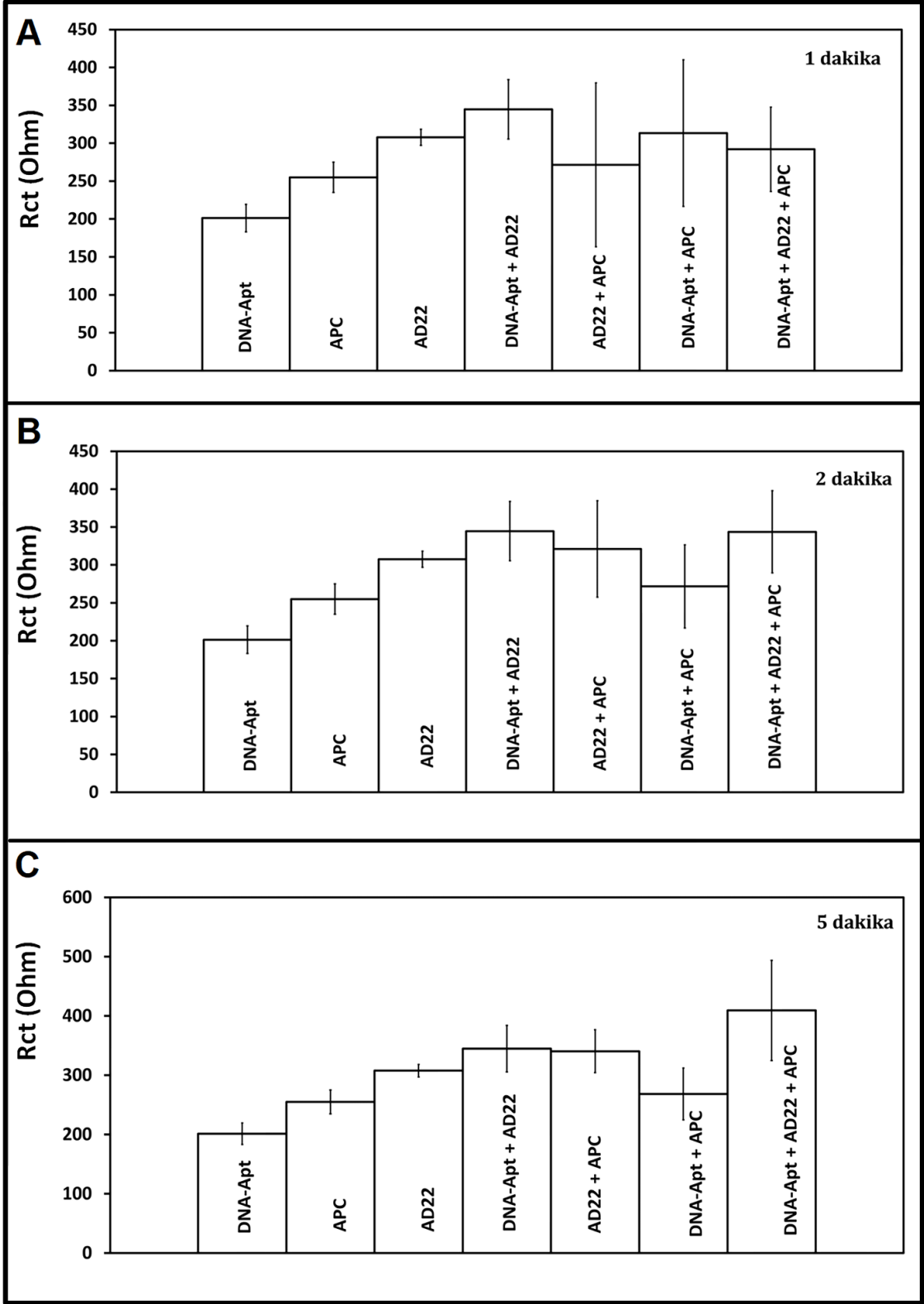
Tablo 4.6. 0,1 µg/mL AD22 varlığında 0,1 µg/mL DNA-Apt ile 0,6 µg/mL APC'nin etkileşimi öncesi ve sonrasında ölçülen Rct değerleri (n=3).

No	Deney grubu	Ortalama Rct değerleri (Ohm)	% RSD	Rct değerindeki değişiklik
1	DNA-Apt (kontrol grubu)	213,33 ± 14,15	6,63	6,08 Kat Artış*
2	AD22 (kontrol grubu)	318,00 ± 30,14	9,48	9,07 Kat Artış*
3	DNA-Apt + AD22	366,00 ± 71,19	19,51	
4	DNA-Apt + APC	329,50 ± 48,37	14,68	
5	AD22 + APC	276,75 ± 89,41	32,31	
6	DNA-Apt + AD22 + APC	287,50 ± 17,31	6,02	
	1. Deney grubundan, 4. Deney grubuna Rct değerlerindeki % değişim			% 54,45 Artış
	2. Deney grubundan, 5. Deney grubuna Rct değerlerindeki % değişim			% 12,97 Azalış
	3. Deney grubundan, 6. Deney grubuna Rct değerlerindeki % değişim			% 21,44 Azalış
	4. Deney grubundan, 6. Deney grubuna Rct değerlerindeki % değişim			% 12,75 Azalış
	APC (kontrol grubu)	248,25 ± 21,17 % RSD =% 8,53		7,08 Kat Artış*

*CNF-IL/PGE yüzeyine sadece DNA-Apt veya AD22 veya APC immobilizasyonu sonrasında ölçülen ortalama Rct değerinde sırasıyla, 6,08; 9,07 ve 7,08 kat artış gözlemlendi.

4.8 Aptamer-AD22 ile APC Etkileşim Süresinin Yanıta Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular

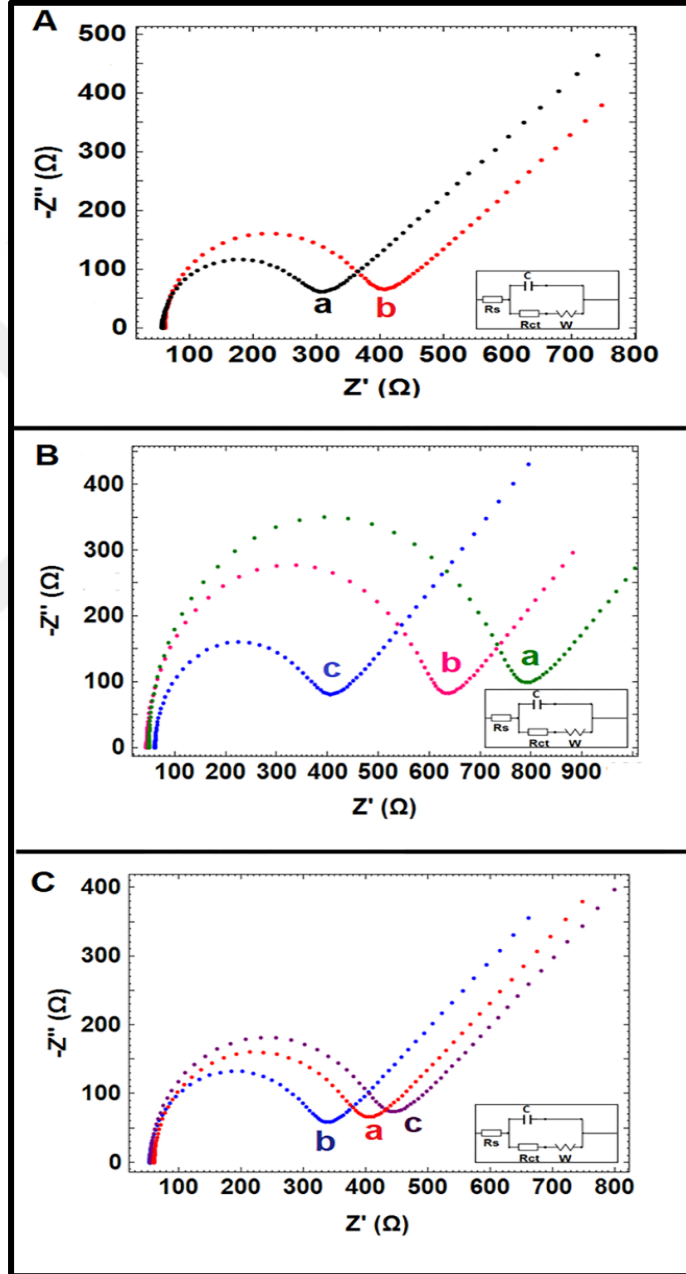
Yöntem 3.3.9'de anlatıldığı gibi, optimum koşullarda aptamer-AD22'nin APC ile etkileşimi 1, 2 ve 5 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. 0,1 µg/mL DNA-Apt ve 0,1 µg/mL AD22'nin varlığında 0,6 µg/mL APC'nin farklı etkileşim etkileşim sürelerinde elde edilen ortalama Rct değerlerini (n=3) gösteren histogramlar; A) 1 dakika B) 2 dakika C) 5 dakika.

4.9 CNF-IL/PGE'nin Yapay Serum Ortamında İmpedimetrik APC Analizine Uygulanabilirliğine Yönelik Bulgular

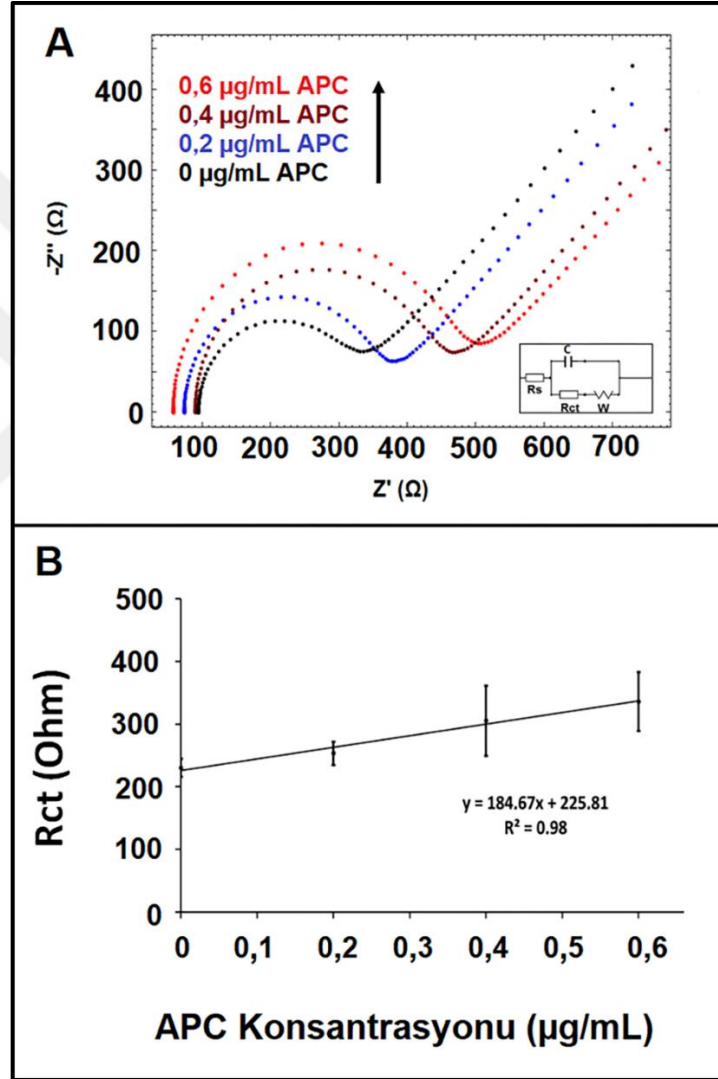
CNF-IL kompozit modifiye elektrotların yapay serum ortamında impedimetrik APC analizine uygulanabilirliğinin incelenmesi Bölüm 3.310'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Elde edilen Niquist diyagramları Şekil 4.10'da gösterildi.



Şekil 4.10. A) 0,1 $\mu\text{g/mL}$ DNA-Apt varlığında, a) PBS kontrol grubunda, b) FBS kontrol grubunda, B) CNF-IL modifiyeli PGE elektrotlar ile, a) 1:500, b) 1:1000, c) 1:2000 seyreltme oranları, C) 1:2000 seyreltme oranında, a) 0,1 $\mu\text{g/mL}$ DNA-Apt, b) 0,6 $\mu\text{g/mL}$ APC, c) 0,1 $\mu\text{g/mL}$ DNA-Apt ile 0,6 $\mu\text{g/mL}$ APC arasındaki etkileşim ($n=3$).

4.10 Yapay Serum Ortamında Farklı Konsantrasyonlarda APC'nin İmpedimetrik Tayinine Yönelik Bulgular

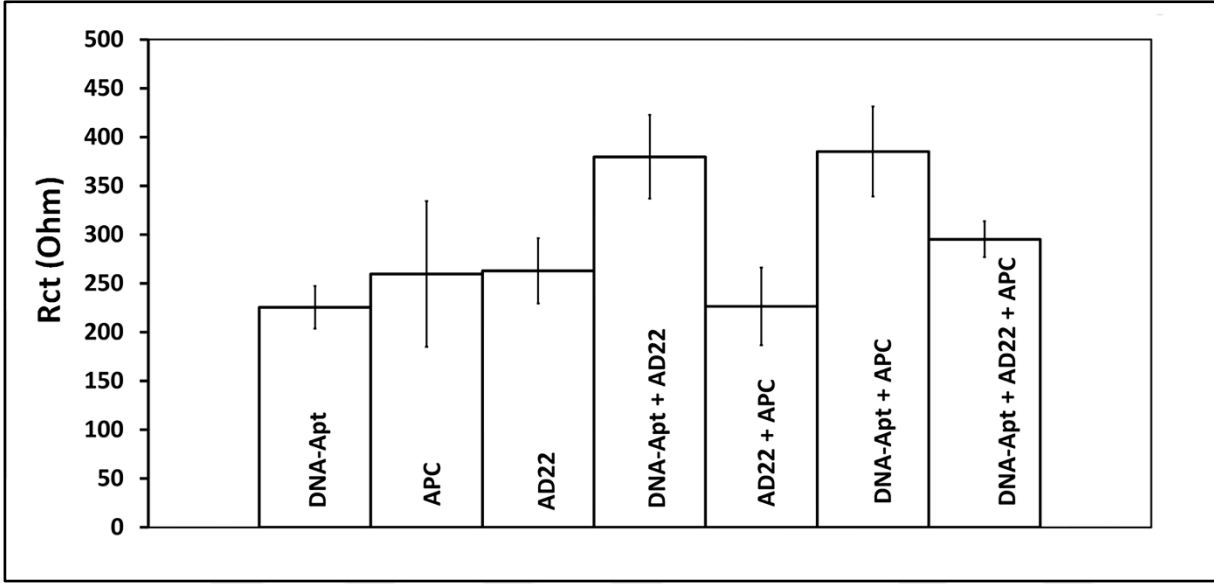
Bölüm 3.3.11'de anlatıldığı gibi, 0,2-0,6 $\mu\text{g/mL}$ aralığına farklı APC konsantrasyonlarında aptamerin APC ile yapay serum ortamında etkileşmesi incelendi. Niquist diyagramı ve kalibrasyon grafiği Şekil 4.11'de gösterildi.



Şekil 4.11. 0,1 $\mu\text{g/mL}$ DNA-Apt varlığında, (A) Yapay serum ortamında farklı konsantrasyonlarda APC'nin varlığında/yokluğunda elde edilen Niquist diyagramları, (B) Yapay serum ortamında elde edilen kalibrasyon grafiği.

4.11 Yapay Serum Ortamında Aptamer-AD22 İle APC Etkileşiminin İncelenmesine Yönelik Bulgular

Optimum koşullarda aptamer-AD22'nin APC ile etkileşimi yapay serum ortamında incelendi. Elde edilen sonuçlar, Şekil 4.12'da gösterildi.



Şekil 4.12. Yapay serum ortamında 0,1 µg/mL DNA-Apt ve 0,1 µg/mL AD22'nin varlığında 0,6 µg/mL APC'nin etkileşiminde elde edilen ortalama Rct değerlerini (n=3) gösteren histogramlar.

Tablo 4.7. Yapay serum ortamında 0,1 µg/mL AD22 varlığında 0,1 µg/mL DNA-Apt ile 0,6 µg/mL APC'nin etkileşimi öncesi ve sonrasında ölçülen Rct değerleri (n=3).

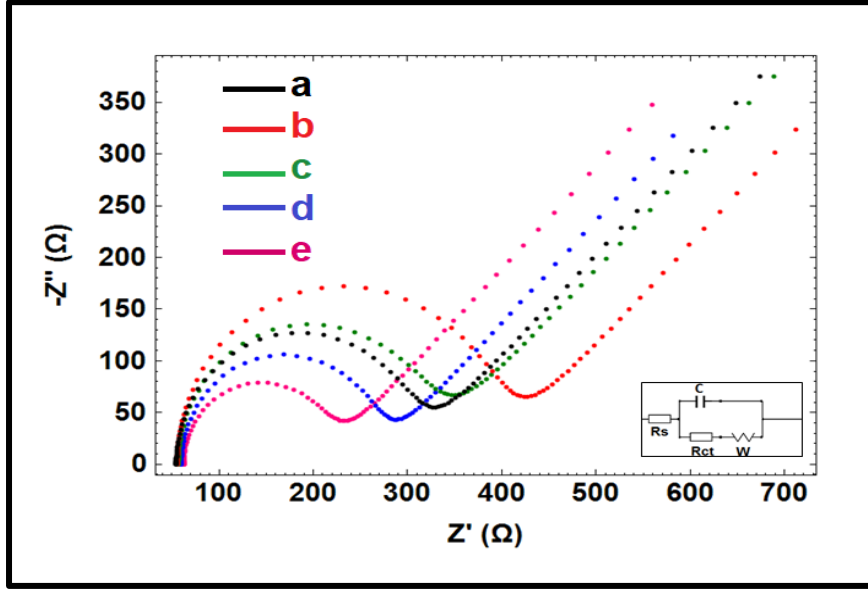
No	Deney grubu	Ortalama Rct değerleri (Ohm)	% RSD	Rct değerindeki değişiklik
1	DNA-Apt (kontrol grubu)	225,50 ± 21,76	9,65	9,5 Kat artış*
2	AD22 (kontrol grubu)	262,75 ± 33,36	12,7	11,16 Kat artış*
3	DNA-Apt + AD22	379,75 ± 42,84	11,28	
4	DNA-Apt + APC	385,25 ± 46,02	11,94	
5	AD22 + APC	226,50 ± 39,79	17,57	
6	DNA-Apt + AD22 + APC	295,75 ± 18,41	6,24	

1. Deneş grubundan, 4. Deneş grubuna Rct değerlerindeki % değişim		% 70,84 Artış
2. Deneş grubundan, 5. Deneş grubuna Rct değerlerindeki % değişim		% 13,79 Azalış
3. Deneş grubundan, 6. Deneş grubuna Rct değerlerindeki % değişim		% 22,25 Azalış
4. Deneş grubundan, 6. Deneş grubuna Rct değerlerindeki % değişim		% 23,36 Azalış
APC (kontrol grubu)	259,75 ± 74,71 % RSD =% 28,76	11,036 Kat artış*

*CNF-IL/PGE yüzeyine sadece DNA-Apt veya AD22 veya APC immobilizasyonu sonrasında ölçülen ortalama Rct değerinde sırasıyla, 9,5; 11,16 ve 11,036 kat artış gözlemlendi.

4.12 CNF-IL/PGE İle İmpedimetrik APC Tayininde Seçimliliğinin Yapay Serum Ortamında Test Edilmesine Yönelik Bulgular

APC aptasensörün seçimliliği diğer proteinler, BSA, PC, THR varlığında test edildi ve impedimetrik ölçümler alındı. Elde edilen Niquist diyagramları Şekil 4.13'de ve sonuçlar Tablo 4.8'de gösterildi.



Şekil 4.13. 0,1 µg/mL DNA-Apt ile, (a) 0,6 µg/mL APC, (b) 0,6 µg/mL PC, (c) 0,6 µg/mL THR, (d) 0,6 µg/mL, (e) 0,6 µg/mL BSA'nın 1:2000 FBS:PBS ortamında etkileşimi sonrası elde edilen Niquist diyagramları.

Tablo 4.8. 1:2000 FBS:PBS seyreltilmiş serum ortamında 0,1 µg/mL DNA-Apt ile sırasıyla 0,6 µg/mL APC, PC, THR, BSA'nın etkileşimi öncesi/sonrası ölçülen ortalama Rct değerleri (n=3).

	Ortalama Rct değerleri (Ohm)	% RSD	Ortalama Rct değerlerindeki değişim
DNA-Apt	238 ± 6,24	2,62	8,99 Kat Artış *
APC	235,33 ± 19,60	8,33	8,89 Kat Artış *
PC	241,60 ± 61,52	25,46	9,12 Kat Artış *
THR	218,20 ± 57,95	57,95	26,56 Kat Artış *
BSA	196,25 ± 37,40	37,40	19,06 Kat Artış *
DNA-Apt + APC	332,50 ± 14,27	4,29	% 41 Artış
DNA-Apt + PC	257,33 ± 29,54	11,48	% 6,51 Artış
DNA-Apt + THR	202,00 ± 33,60	16,63	% 7,42 Azalış
DNA-Apt + BSA	157 ± 9,19	5,84	% 19,74 Azalış

*CNF-IL/PGE yüzeyine sadece DNA-Apt veya APC veya diğer proteinler (PC, THR, BSA) immobilizasyonu sonrasında ölçülen ortalama Rct değerinde sırasıyla, 8,99; 8,89; 9,12; 26,56 ve 19,06 kat artış gözlemlendi.

5. TARTIŞMA

5.1 Elektrotların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Mikroskobik Karakterizasyonuna Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma

SEM tekniği ile her bir elektrot (PGE, IL/PGE, CNF/PGE, CNF-IL/PGE) yüzeyinin mikroskopik karakterizasyonu gerçekleştirildi. Pürüzlü bir yüzey yapısına sahip PGE elektrotların SEM görüntüleri Şekil 4.1’de gösterildi. PGE yüzeyinin IL ile modifikasyonundan sonra, elektrot yüzeyi daha pürüzsüz, parlak ve homojen yapıya sahip olduğu görüldü. Elektrotlar karbon nanofiber ve iyonik sıvı kompoziti ile modifiye edildikten sonra elektrot yüzeyinde daha katmanlı, pürüzlü ve ipliksi görünümlü bir modifikasyonun gerçekleştiğine karar verildi.

Yüzey karakterizasyonu için Enerji Dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) analizi uygulanmıştır. Şekil 4.2’de gösterilen EDX sonuçları incelendiğinde ve karbon nanomalzeme olan karbon nanofiber (CNF) ile iyonik sıvı (IL) ($C_8H_{15}F_6N_2P$) kimyasal formülleri göz önüne alındığında,

- i. PGE yüzeyindeki karbon (%) ağırlık düzeyinin CNF ve CNF-IL modifikasyonları sonrasında, giderek azaldığı görülmüştür. PGE yüzeyindeki karbon (%) ağırlık düzeyinin CNF-IL kompozit modifikasyonu sonrası azalması, PGE yüzeyinde karbon katmanlarından oluşan grafit tabakasının nanokompozit malzeme ile modifikasyonunun bir sonucudur.
- ii. PGE yüzeyine IL modifikasyonu sonrası, yüzeyde F ve P elementlerinin varlığı görülmüştür. PGE yüzeyine IL ve CNF-IL modifikasyonları sonrasında, F ve P elementlerinin (%) ağırlık düzeyinin giderek azaldığı ve PGE yüzeyine en fazla kaplanmanın CNF-IL kompozit modifikasyonu varlığında gerçekleştiği görülmüştür.

PGE yüzeyinde gerçekleştirilen her bir modifikasyonun varlığı hem SEM hem de EDX analiz sonuçları ile gösterilmiştir.

5.2. Elektrotların Elektrokimyasal Yöntemlerle Karakterizasyonuna Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma

CV ve EIS gibi elektrokimyasal yöntemleri kullanılarak, geliştirilen tek kullanımlık CNF-IL/PGE'lerin elektrokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirildi.

PGE yüzeyine CNF ve IL modifikasyonu öncesi ve sonrasında elektrotlar ile redoks probu çözeltisinde yapılan ölçümlerde ölçülen sinyaller ve yük geçişindeki değişimler incelendi. PGE, CNF-PGE, IL-PGE ve CNF-IL/PGE elektrotlarla elde edilen katodik pik akımı (I_c), yük miktarı Q (mC) ve hesaplanan yüzey alanı A (cm^2) değerleri Tablo 4.1'de gösterildi. PGE, CNF-PGE, IL-PGE'ye kıyasla, CNF-IL/PGE elektrotları ile ölçülen akım ve yük değerinin daha yüksek olduğu tespit edildi. Randles-Sevcik denklemi (Cummings ve Elvis, 1978) ile hesaplanan elektrot yüzey alan değerlerine göre, PGE, CNF-PGE, IL-PGE'ye kıyasla CNF-IL/PGE'nin en geniş yüzey alanına sahip ($A=0,38 \text{ cm}^2$) yüzey olduğu belirlendi (Şekil 4.3).

Tablo 4.2'de EIS ile ölçülen R_{ct} değerleri verildi. PGE ile ortalama R_{ct} değeri, $56,68 \pm 19,76 \text{ Ohm}$ iken, PGE (kontrol) ile $208,40 \pm 33,53 \text{ Ohm}$ IL-PGE ile $62,05 \pm 19,80 \text{ Ohm}$, CNF-PGE $159,00 \pm 41,32 \text{ Ohm}$, CNF-IL/PGE ise $53,22 \pm 3,63 \text{ Ohm}$ direnç değerleri ölçüldü. Elektrot yüzeyine kompozit modifikasyonu sonrası R_{ct} değerlerinde azalış gözlemlendi (Şekil 4.4).

Elde edilen R_{ct} ölçümlerine göre; PGE (kontrol) ile $208,40 \pm 33,53 \text{ Ohm}$ direnç ölçülürken, CNF-IL/PGE ile $53,22 \pm 3,63 \text{ Ohm}$ olarak ölçülmüştür. CNF-IL kompoziti modifikasyonu varlığında R_{ct} değerindeki % 74,46'lık azalış, CNF-IL kompozit çözeltisi ile elektrot arayüzü arasında elektron transferini arttırıcı etkisi ile aptasensörün iletkenliğini arttırması ile açıklanabilir (Erdem et al., 2014a; Erdem and Congur, 2014b, 2014c).

CNF-IL/PGE ve PGE için görünür kısmi kaplama değerleri (θ_{is}^R) (Janek et al., 1998) hesaplandı. Elektrot yüzeyine $0,2 \mu\text{g/mL}$ DNA-Apt immobilizasyonu sonrasında PGE ve CNF-IL/PGE'nin R_{ct} değerlerinde artış gözlenirken, DNA-Apt immobilizasyonu varlığında CNF-IL/PGE ile R_{ct} değerindeki artışın PGE'ye kıyasla daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 4.5). CNF-IL/PGE ve PGE için görünür kısmi kaplama değerleri (θ_{is}^R) sırasıyla $0,91$ ve $0,83$ olarak hesaplandı.

DNA-Apt'nin negatif yüklü fosfat grupları, anyonik $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ iyonlarının elektrot yüzeyine ulaşmasını engellemektedir ve bundan dolayı Rct değerlerinde artış meydana gelmektedir. Negatif yüklü DNA-Apt ve anyonik redoks probu arasındaki itme kuvvetinin artması nedeniyle Rct değerlerinde artış görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar literatürde önceki rapor edilen çalışmalar ile desteklemektedir (Bini et al., 2007; Erdem et al., 2014a; Senturk et al., 2021).

İletken özellikteki karbon nanofiber (Kour et al., 2020; Eksin and Erdem, 2016), iyonik sıvı ile oluşturdukları kompozit yapının elektrot yüzeyinde homojen modifikasyonu sayesinde CV çalışmasında en yüksek akım değeri (Şekil 4.3. ve Tablo 4.1), EIS çalışmasında ise en düşük Rct değerinin (Şekil 4.4 ve Tablo 4.2) CNF-IL/PGE ile elde edilgi gözlemlendi . Dolayısıyla, EIS tekniği ile elde edilen sonuçların CV sonuçları ile uyumlu olduğu sonucuna varıldı.

5.2.2 IL Yüzdesinin Optimizasyonuna Yönelik Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma

CNF-IL kompozit modifikasyonunda iyonik sıvı yüzdesindeki değişimin aptasensör yanıtına etkisi incelendi ve EIS ölçümleri sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'de verildi. CNF-IL kompozitinde iyonik sıvı yüzdesi % 2'den % 5'e arttıkça ölçülen akım değerinin arttığı ve % RSD değerlerinde % 18,13 den % 2,64'e düştüğü gözlemlenmiştir. IL yüzdesi, % 5'den % 7'ye arttırıldığında ölçülen akım değerinde azalış elde edilmiştir. % 5 İyonik sıvı ile hazırlanan CNF-IL kompozit modifiye elektrotlarla en yüksek ve en tekrarlanabilir akım değeri elde edilmesi nedeniyle çalışmamızda optimum iyonik sıvı yüzdesinin % 5 olmasına karar verildi.

5.3 DNA-Apt Konsantrasyonuna Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma

PBS içinde hazırlanmış aptamer ile PBS veya TBS içinde hazırlanmış APC etkileşimi incelendi. 0,05 µg/mL DNA APT : 0,2 µg/mL APC (1:4) etkileşimi öncesi ve sonrası elde edilen sonuçlara göre, en yüksek artış yüzdesi (% 58) PBS ortamında hazırlanan APC'nin DNA-Apt ile etkileşimi varlığında gözlemlendi. Bu nedenle, PBS ortamında hazırlanan APC ile deneylere devam edilmesine karar verildi (Tablo 4.4).

0,2 µg/mL APC varlığında etkileşim gerçekleştirilerek DNA-Apt konsantrasyonu optimize edildi. 0,005, 0,01 ve 0,1 µg/mL DNA-Apt konsantrasyonlarında APC ile etkileşim öncesi/sonrası Rct değerleri ölçüldü (Şekil 4.6). Ölçülen Rct değerlerine göre en yüksek artış % 47,43 ile 0,1 µg/mL DNA-Apt : 0,2 µg/mL APC (1:2) varlığında ($334,67 \pm 54,37$ Ohm ve % RSD = % 16,25, n=3) gözlemlendi.

APC, izoelektrik noktası nedeniyle negatif bir yapıya sahiptir (pI:4.4–4.8) ve aptamerin redoks probunda negatif yapıya sahip olaması (pH 5.93) daha fazla APC molekülü ile etkileşime girmesine neden olmaktadır. Bundan dolayı APC konsantrasyonu artarken Rct değerinde artış gözlenmiştir (Haemtech, 2022).

Çalışmamızda optimize edilen 0,1 µg/mL DNA-Apt konsantrasyonu ile devam edilmesine karar verildi.

5.4 DNA-Apt İle APC Etkileşiminde İmmobilizasyon Süresinin Aptasensör Yanıtına Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma

0,1 µg/mL DNA-Apt ve 0,6 µg/mL APC konsantrasyonunda, 10 ve 20 dk immobilizasyon süresi çalışması gerçekleştirildi. Elde edilen ortalama Rct değerlerine göre ($290,83 \pm 33,03$ Ohm, % RSD = % 11,36), 10 dk immobilizasyon süresinde en tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesinden dolayı 10 dk etkileşim süresi ile devam edildi (Şekil 4.7).

5.5 APC Konsantrasyonundaki Değişimin Aptasensör Yanıtına Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma

Tampon ortamında 0,1 µg/mL aptamer ile 0,4-1,4 µg/mL konsantrasyon aralığında APC etkileşimi öncesi/sonrasında EIS tekniği ile alınan ölçüm sonuçlarına göre, ölçülen Rct değerinin 0,4 µg/mL APC'den 1,4 µg/mL APC'ye kadar doğrusal bir şekilde arttığı gözlemlendi (Şekil 4.8). 0,6 µg/mL APC konsantrasyonunda en tekrarlanabilir sonuçlar ($281 \pm 26,39$ Ohm ve % RSD = % 9,38, n=3) elde edildiği için AD22 varlığında aptamer ile APC etkileşiminin incelendiği çalışmada optimum APC konsantrasyonu olarak 0,6 µg/mL belirlendi.

Tampon ortamında 0-1,4 µg/mL APC konsantrasyon aralığında ölçülen Rct değerlerine göre elde edilen kalibrasyon grafiğinde (Şekil 4.8-B), $y=137,73x + 213,12$ regresyon denklemi elde edilmiş olup % 97 güvenirlikle Miller ve Miller yöntemine göre (Miller and Miller, 2010) tayin sınırı 0,23 µg/mL (3.83 nM) olarak bulunmuştur. Geliştirilen aptasensörün hassasiyeti 354,97 Ohm.mL/µg.cm² olarak hesaplanmıştır.

5.6 Farklı Konsantrasyonlarda AD22'nin APC-Aptamer Etkileşiminde Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma

AD22 konsantrasyonunun aptasensör yanıtına etkisi 0,005, 0,01 ve 0,2 µg/mL AD22 konsantrasyonlarında, 0,1 µg/mL DNA-Apt ile AD22 arasındaki etkileşim varlığında incelendi. Elde edilen Rct değerlerindeki (Tablo 4.5) değişime göre, 0,1 µg/mL AD22 konsantrasyonunda ölçülen Rct değerinde ($366,00 \pm 71,39$ ve % RSD = % 19,51; n=3) kontrol grubuna kıyasla % 15,09 artış gözlemlendi. Rct değerindeki artışın 0,1 µg/mL AD22 konsantrasyonunda gözlenmesi nedeniyle, çalışmada AD22 konsantrasyonunun 0,1 µg/mL olmasına karar verildi.

AD22 konsantrasyonunun etkisi, 0,1 µg/mL DNA-Apt, 0,6 µg/mL APC ve 0,1 µg/mL AD22 varlığında incelendi. APC'nin DNA-Apt-AD22 ile etkileşim öncesi/sonrası ölçülen Rct değerleri AD22 varlığında ve yokluğunda Tablo 4.6'da gösterildi. DNA-Apt-AD22 ile APC arasındaki etkileşim sonrasında ölçülen ortalama Rct değeri $287,50 \pm 17,31$ Ohm (% RSD = % 6,02 n=3) olarak bulundu (Tablo 4.6). DNA-Apt-APC etkileşimi varlığında ölçülen ortalama Rct değerine ($366 \pm 71,19$ Ohm ve % RSD= 19,51 , n=3) kıyasla, AD22 varlığında DNA-Apt-AD22 ile APC etkileşiminde ölçülen Rct değerinde % 21,44 azalış gözlemlendi.

5.7 Aptamer-AD22 İle APC Etkileşim Süresinin Yanıt Etkisinin İncelenmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma

0,1 µg/mL AD22 varlığında AD22-DNA-Apt'in APC ile etkileşimi 1, 2 ve 5 dakikalık sürelerde gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da gösterildi.

DNA-Apt ile AD22 arasında etkileşim sonucunda elde edilen sonuçlar sadece DNA-Apt veya sadece AD22 gibi kontrol gruplarında elde edilen Rct değerlerine göre kıyaslandığında

Rct değerlerinde bir artış gözlemlendi (Şekil 4.9-A, B,C). Bunun sebebi DNA-Apt ile onun bir bölümü ile eşleniği olan AD22 arasında hibridizasyonun gerçekleşmesi (Hamedani et al., 2016); dolayısıyla çift sarmal yapının oluşması sonucu elektrot yüzeyine DNA-APT-AD22 immobilizasyonunda elektrot yüzeyinde mevcut negativitenin artmasıdır. 0,1 µg/mL DNA-Apt kontrol grubunda ortalama Rct değeri $201,33 \pm 18,15$ Ohm (% RSD = % 9,01, n=3) olarak ölçülürken, 0,1 µg/mL AD22 ve 0,1 µg/mL DNA-Apt arasındaki etkileşim sonucu ortalama Rct değeri $344,67 \pm 39,17$ Ohm (% RSD = % 11,36, n=3) olarak ölçüldü ve % 82,64 artış gözlemlendi (Şekil 4.9-A).

1 dakika etkileşim süresinde, 0,1 µg/mL AD22, 0,1 µg/mL DNA-Apt ve 0,6 µg/mL APC arasındaki etkileşim sonucunda ortalama Rct değeri $292 \pm 55,76$ Ohm (% RSD = % 19,10, n=3) olarak ölçüldü. DNA-Apt-AD22 ile APC etkileşiminde elde edilen sonuçlara bakıldığında zaman (Şekil 4.9).;

- (i) AD22 ile DNA-Apt arasında etkileşim varlığında ölçülen ortalama Rct değerine ($344,67 \pm 39,17$ Ohm ve % RSD = % 11,36, n=3) göre % 15,28 azalış gözlemlendi. 2 ve 5 dakika APC etkileşim sürelerinde ise bu değişim sırasıyla, % 0,29 azalış ve % 18,76 artış şeklinde gözlemlendi.
- (ii) DNA-Apt ve APC arasında etkileşim varlığında ölçülen ortalama Rct değerine ($313,13 \pm 96,76$ Ohm ve % RSD = % 30,87, n=3) göre % 6,80 azalış gözlenirken daha tekrarlanabilir sonuçlar elde edildiğine karar verildi. 2 ve 5 dakika APC etkileşim sürelerinde ise bu değişim sırasıyla, % 26,50 artış ve % 52,54 artış şeklinde gözlemlendi.

0,6 µg/mL APC kontrol grubunda ortalama Rct değeri $255 \pm 19,97$ Ohm (% RSD= % 7,83, n=3) olarak ölçülürken, 0,1 µg/mL AD22 ile 0,6 µg/mL APC arasındaki etkileşim varlığında ortalama Rct değeri $271 \pm 108,19$ Ohm (% RSD = % 39,85, n=3) olarak ölçülmüştür (Şekil 4.9). APC'nin DNA Aptameri etkileştiğinde ölçülen Rct değerine ($313,13 \pm 96,76$ Ohm) kıyasla, APC'nin AD22 ile etkileşiminde ölçülen Rct değerinin ($271 \pm 108,19$ Ohm) daha düşük olduğu ve APC kontrol grubuna kıyasla yaklaşık % 6 oranında Rct değerinde bir artışın gözlemlendiği tespit edildi. Dolayısıyla literatürde daha önce rapor edilen çalışmanın (Hamedani et al., 2016) sonuçlarına paralel olarak AD22'nin spesifik olarak APC ye bağlanmadığına karar verildi.

5.8 CNF-IL/PGE'nin Yapay Serum Ortamında İmpedimetrik APC Analizine Uygulanabilirliğine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma

CNF-IL/PGE ile yapay serum ortamında elektrokimyasal APC analizine uygulanabilirliği test edildi. Deneyler, PBS (pH 7,40) ile 1:500, 1:1000 ve 1:2000 oranında seyreltilen fetal sıgır serumu (FBS) kullanılarak gerçekleşti. CNF-IL/PGE yüzeyine farklı seyreltme oranlarında FBS immobilizasyon sonrası en düşük ve en tekrarlanabilir Rct değeri ($279 \pm 33,15$ Ohm ve % RSD = % 11,88, n=3) 1:2000 FBS ortamında elde edildi (Şekil 4.10-B-c). 0,1 $\mu\text{g/mL}$ DNA Apt ile 0,6 $\mu\text{g/mL}$ APC'nin 1:2000 FBS ortamında etkileşimi sonrasında sadece DNA-Apt varlığında llen Rct değerine kıyasla % 15 artış elde edilmiştir (Şekil 4.10-C, a-c). Elde edilen sonuçlara göre 1:2000 oranında seyreltilmiş FBS ortamında deneylerin gerçekleştirilmesine karar verildi.

5.9 Yapay Serum Ortamında Farklı Konsantrasyonlarda APC'nin İmpedimetrik Tayinine Yönelik Bulgular İlgili Tartışma

1:2000 FBS ortamında 0,1 $\mu\text{g/mL}$ aptamer ile 0,2-0,6 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında APC etkileşimi öncesi/sonrasında EIS tekniği ile alınan ölçüm sonuçlarına göre, llen Rct değerinin 0,2 $\mu\text{g/mL}$ APC'den 0,6 $\mu\text{g/mL}$ APC'ye kadar doğrusal bir Şekilde arttığı gözlendi (Şekil 4.11-A).

Yapay serum ortamında 0-0,6 $\mu\text{g/mL}$ APC konsantrasyon aralığında llen Rct değerlerine göre elde edilen kalibrasyon grafiğinde (Şekil 4.11-B) $y=184,67x + 225,81$ regresyon denklemi elde edilmiş olup % 98 güvenirlikle Miller ve Miller yöntemine göre (Miller and Miller, 2010) tayin sınırı 0,11 $\mu\text{g/mL}$ (1.83 nM) olarak bulunmuştur. Geliştirilen aptasensörün hassasiyeti $475,953 \text{ Ohm.mL}/\mu\text{g.cm}^2$ olarak hesaplanmıştır.

5.10 Yapay Serum Ortamında Aptamer-AD22 İle APC Etkileşiminin İncelenmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma

Yapay serum ortamında AD22 varlığında DNA-Apt-AD22 ile APC'nin etkileşimi; 0,1 µg/mL DNA-Apt, 0,6 µg/mL APC ve 0,1 µg/mL AD22 varlığında incelendi. EIS tekniği ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12 ve Tablo 4.7'de gösterildi.

Literatürde daha önce rapor edilen sonuçlara (Erdem et al., 2014a; Erdem and Congur, 2014a, 2014b, 2014c) benzer olarak, tampon ortamında ve yapay serum ortamında DNA-Apt ile APC etkileşiminde ölçülen Rct değerinde sadece DNA aptameri varlığında ölçülen Rct değerlerine kıyasla yüksek bir artış (sırasıyla % 54,45 ve %70,84) gözlemlendi (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7).

APC'nin DNA-Apt-AD22 ile etkileşim öncesi/sonrası ölçülen Rct değerleri AD22 varlığında ve yokluğunda Tablo 4.7'de gösterildi. DNA-Apt-AD22 ile APC arasındaki etkileşim sonrasında ölçülen ortalama Rct değeri $295,75 \pm 18,41$ Ohm (% RSD = % 6,24, n=3) olarak bulundu (Tablo 4.7). DNA Apt-APC etkileşimi varlığında ölçülen ortalama Rct değerine ($385,25 \pm 46,02$ Ohm ve % RSD = % 11,94, n=3) kıyasla, AD22 varlığında DNA-Apt-AD22 ile APC etkileşiminde ölçülen Rct değerinde % 23,23 azalış gözlemlendi.

5.11 CNF-IL/PGE İle İmpedimetrik APC Tayininde Seçimliliğinin Yapay Serum Ortamında Test Edilmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma

Seçimlilik deneylerinde 0,1 µg/mL DNA-Apt ile 0,6 µg/mL APC (veya diğer proteinler varlığında, PC/THR/BSA) proteinleri arasında etkileşim sonrasında EIS ile Rct değerleri ölçüldü (Şekil 4.13). Aptamerin proteinlerle etkileşimi sonrasında APC, PC, THR ve BSA varlığında ortalama Rct değerleri sırasıyla $332,50 \pm 14,27$ Ohm (% RSD = % 4,29, n=3), $257,33 \pm 29,54$ Ohm (% RSD = % 11,48, n=3), $202,00 \pm 33,60$ Ohm (% RSD = % 16,63, n=3), $157 \pm 9,19$ Ohm (% RSD = % 5,84, n=3) olarak ölçüldü (Tablo 4.8). Elde edilen sonuçlar, APC'ye spesifik DNA aptamerin FBS gibi karmaşık bir örnek ortamında bile hedef proteinini diğer benzer proteinlere kıyasla yüksek seçimlilikte algılayabildiğini göstermektedir.

Literatürde APC tayinini rapor eden çalışmalardan bazıları Tablo 6.1'de özetlenmiştir.

Tablo 6. 1. Literatürde APC tayinine yönelik geliştirilen yöntemlerin kıyaslanması

Kullanılan Yöntem	Algılayıcı Ajan	Tayin sınırı	Kaynaklar
ECA	mAb	5 pmol/l	(Gruber and Griffin, 1992)
		27 pmol/l	(Orthner et al., 1993)
		-	(Katsuura et al., 1996)
		0,6 pmol/l	(Takazoe et al., 1999)
		5 pmol/l	(Liaw et al., 2003)
		14 pmol/l	(Li et al., 2005)
ELISA	mAb	1,8 pmol/l	(España et al., 1996)
OECA	Oligonükleotid	1,5 pmol/l	(Müller et al., 2012)
ELISA	mAb	1,8 pmol/l	(España et al., 2001)
	polAb	5 pmol/l	(Fernández et al., 2006)
	mAb	1,7 pmol/l	(Martos et al., 2016)
EIS	DNA aptamer	Tampon ortamında 0,74 µg/mL, Yapay serum ortamında, 2,03 µg/mL	(Erdem and Congur, 2014c)
EIS	DNA aptamer	Tampon ortamında 1,81 µg/mL, Yapay serum ortamında 0,02 µg/mL	(Erdem and Congur, 2014b)
DPV	DNA aptamer	2,35 µg/mL	(Erdem and Congur, 2014a)
CV	DNA aptamer	Tampon ortamında 0,94 µg/mL, Yapay serum ortamında 1,5 µg/mL	(Erdem et al., 2014a)
SPR	DNA aptamer	27 pmol/l	(Koyun et al., 2019)
DPV	DNA aptamer	1,8 pmol/l	(Hosseini Ghalehno et al., 2019)
EIS	DNA aptamer	Tampon ortamında 0,23 µg/mL, Yapay serum ortamında 0,11 µg/mL	Tez çalışması

Kısaltmalar: ECA: Enzim Yakalama Deneyi, Polab: Poliklonal Antikor, Mab: Monoklonal Antikor, OECA: Oligonükleotid Bazlı Enzim Yakalama prosedürü, EIS: Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi, SPR: Yüzey Plazmon Rezonansı, CV: Döngüsel Voltametri, DPV: Diferansiyel Puls Voltametri, FBS: Yapay Serum

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Aktive edilmiş protein C (APC), PC yolunun anahtar enzimi olup aktif olmayan öncül protein C (PC) 'den türeyen bir serin proteazdır. Endojen protein C ve APC azalması ile sepsiste hastalığın seyrinin kötüleşmesi arasında bir ilişki olduğunun keşfedilmesinden sonra, bu hastaların tedavisinde kullanılmak üzere rekombinant insan APC (rhAPC) geliştirilmiştir. APC'nin şiddetli sepsiste terapötik kullanımı değerlendirilen ve önemli bir inflamasyon bileşeni olan; ayrıca obezite, pnömoni, yaygın damar içi pıhtılaşma, sepsis, kronik böbrek yetmezliği, vb gibi rahatsızlıklarda uygulandığını gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Becher et al., 2018; Mezzano et al., 2001; Schouten et al., 2015; Solá et al., 2009; Wada et al., 2014).

APC trombin oluşumunun kritik bir düzenleyicisi olup APC'nin bu özelliği tromboz oluşumunu önler. Fazla APC oluşumu travmaya bağlı koagülopati gibi kanama riskini artırır. Bu nedenle, APC aktivitesinin farmakolojik inhibisyonu, bazı klinik durumlarda kan pıhtılaşabilirliğini arttırabilir. APC inhibisyonu için serpinler, antikorlar ve aptamerler gibi farklı moleküller ve bunların Travmaya bağlı koagülopati (TIC) ve hemofili tedavisinde yeni terapötik stratejiler olarak potansiyel kullanımlarına yönelik umut verici sonuçlar rapor edilmiştir (Balkaransingh and Young, 2017; Hamedani et al., 2016; Polderdijk et al., 2017; Shetty and Ghosh, 2015).

Hamedani vd., çalışmasında (Hamedani et al., 2016), APC'den etkilenen plazma ve tam kan pıhtılaşma modellerinde APC spesifik DNA aptameri olan HS02-52G'nin kan pıhtılaşmasının restorasyonu üzerindeki etkisini araştırmışlar ve bu çalışmada tasarlanmış HS02-52G nötralize edici antisens dizisinin (APC spesifik aptamerin birebir eşleniği oligonükleotitler) en etkin olanı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, HS02-52G ile eşleniği olan antisens dizisi AD22 varlığında oluşan aptamer-antisens çiftinin etkin bir APC inhibitörü olarak etki gösterilmesi nedeniyle bu "antidot çifti"nin, APC inhibe edici yeni bir ilacın geliştirilmesi açısından güçlü bir aday olduğu rapor edilmiştir (Hamedani et al., 2016). Yeni ve biyoteknolojik ürün olan aptamer-antisens antidot çiftinin, örneğin travmaya bağlı koagülopatide (Chang et al., 2016) potansiyel olarak akut APC ile ilişkili kanama komplikasyonları için olası tedavi seçeneği olarak önerildiği belirtilmiştir (Hamedani vd., 2016). Bu nedenle, plazmada dolaşan APC'yi hızlı, seçimli ve duyarlı bir şekilde ölçmek için geliştirilecek bir yöntem ve aptamere dayalı yöntem ile aynı zamanda APC'nin etkileşim

mekanizmasını kontrol edebilmek adına aptamer-antisens dayalı antidot çiftinin APC ile etkileşim mekanizmasının anlaşılması oldukça önemlidir.

Tez çalışmasında birinci bölümünde karbon nanofiber-iyonik sıvı kompozit temelli elektrotlar geliştirilmiş olup APC'ye spesifik DNA aptameri kullanılarak geliştirilen elektrotların impedimetrik APC analizlerinde uygulanabilirlikleri gösterilmiştir.

Çalışmamızda elektriksel iletkenliği ve elektrot yüzey alanını arttırarak daha kararlı bir yüzey sağlanması amacıyla tek kullanımlık kalem grafit elektrot yüzeyi karbon nanofiber ve iyonik sıvı kompoziti ile modifiye edilmiştir.

CNF-IL modifiye PGE yüzeyinin mikroskopik karakterizasyonu SEM ve EDX, elektrokimyasal karakterizasyonu CV ve EIS teknikleri ile incelenmiştir. Optimize edilen deneysel koşullarda impedimetrik APC analizi gerçekleştirilmiş olup geliştirilen aptasensörün diğer proteinlere karşı seçimliliği test edilmiştir. Optimum koşullar altında gerçekleştirilen deneylerde, APC için tayin sınırı tampon ortamında 0,23 $\mu\text{g/mL}$ (3,83 nM) ve yapay serum ortamında 0,11 $\mu\text{g/mL}$ (1,83 nM) olarak bulunmuştur. Geliştirilen aptasensörün hassasiyeti tampon ortamında ve yapay serum ortamında sırasıyla, 354,97 Ohm.mL/ $\mu\text{g.cm}^2$ ve 475,953 Ohm.mL/ $\mu\text{g.cm}^2$ olarak hesaplanmıştır. Literatürde mevcut çalışmalarla kıyaslandığı zaman (Erdem et al., 2014a; Erdem and Congur, 2014a, 2014b, 2014c; Fernández et al., 2006; Hosseini Ghalehno et al., 2019; Koyun et al., 2019; Martos et al., 2016; Orthner et al., 1993) elektrotların hazırlanması ve tayin süresi açısından tez çalışmasında daha kısa sürede ve maliyeti daha düşük bir yöntemle duyarlı ve seçimli bir şekilde APC analizi mümkün olmuştur.

Literatürde ilk defa CNF-IL/PGE kullanılarak hem tampon hem de yapay serum ortamında APC ile APC spesifik DNA aptamerin etkileşimi ve APC analizi impedimetrik yöntemle dayalı gerçekleştirilmiştir. Ayrıca APC inhibisyonunda etkili olan aptamer-antisens çiftinin (DNA-Apt-AD22; antidot çifti) APC ile etkileşiminin elektrokimyasal yöntemle dayalı incelenmesi geliştirilen CNF-IL/PGE kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında karbon nanomalzeme CNF ve iyonik sıvı kompozit temelli tek kullanımlık elektrotların geliştirilmesi sayesinde uygulaması pratik ve maliyeti düşük bir yöntemle, kısa sürede hassasiyeti ve güvenilirliği yüksek sonuçlar veren APC'ye spesifik elektrokimyasal aptasensör geliştirilmesi ve APC analizlerine yönelik uygulamaları mümkün olmuştur. APC ile ona spesifik DNA aptamerin farklı konsantrasyonlarda etkileşiminin impedimetrik yöntemle dayalı aptasensör teknolojisi ile incelenmesi; ayrıca APC

inhibisyonunda etkili olan aptamer-antisens çiftinin APC ile etkileşiminin incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında elde edilen çıktılar, gelecekte yeni biyoteknolojik ilaçların geliştirilmesi aşamasında etkileşim mekanizmalarının aydınlatılmasında aptasensör teknolojilerin kullanılarak araştırmalara yön vermesi açısından katkı sağlayabilir. Ayrıca, tez kapsamında elde edilen çıktılar benzer biyomoleküler etkileşimlerin hızlı ve güvenilir şekilde duyarlı ve seçimli tayinini mümkün kılacak yeni aptasensörlerin geliştirilmesine model olacaktır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Apetrei, I.M., Apetrei, C.,** 2017, Highly sensitive voltamperometric determination of pyritinol using carbon nanofiber/gold nanoparticle composite screen-printed carbon electrode, *International Journal of Nanomedicine*, 12, 5177.
- Balkaransingh, P., Young, G.,** 2017, Novel therapies and current clinical progress in hemophilia A, *Therapeutic advances in hematology*, 9(2), 49-61.
- Bard, A., Faulkner, L., White, H.,** 2022, Electrochemical methods: fundamentals and applications, *John Wiley & Sons*.
- Bauer, K.A., Kass, B.L., Beeler, D.L., Rosenberg, R.D.,** 1984, Detection of protein C activation in humans, *The Journal of clinical investigation*, 74(6), 2033-2041.
- Becher, T., Müller, J., Akin, I., Baumann, S., Bosch, K., Stach, K., Borggreffe, M., Pöttsch, B., Loßnitzer, D.,** 2018, The evolution of activated protein C plasma levels in septic shock and its association with mortality: A prospective observational study, *Journal of Critical Care*, 47, 41-48.
- Bini, A., Minunni, M., Tombelli, S., Centi, S., Mascini, M.,** 2007, Analytical performances of aptamer-based sensing for thrombin detection, *Analytical Chemistry*, 79, 3016–3019.
- Brett, C.M.A.,** 2022, Electrochemical Impedance Spectroscopy in the Characterisation and Application of Modified Electrodes for Electrochemical Sensors and Biosensors, *Molecules*, 27(5), 1497.
- Cao, B., Zhao, J., Gu, Y., Fan, S., Yang, P.,** 2020, Security-Aware Industrial Wireless Sensor Network Deployment Optimization, *IEEE transactions on industrial informatics*, 16(8), 5309-5316.
- Chakraborty, A., Tibarewala, D. N., Barui, A.** 2019, Impedance-based biosensors, *In Bioelectronics and Medical Devices*, (pp. 97-122).
- Chang, R., Cardenas, J.C., Wade, C.E., Holcomb, J.B.,** 2016, Advances in the understanding of trauma-induced coagulopathy, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 128(8), 1043-1049.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, X., Wang, D., Wang, T., Yang, Z., Zou, X., Wang, P., Luo, W., Li, Q., Liao, L., Hu, W., Wei, Z.,** 2019, Enhanced Photoresponsivity of a GaAs Nanowire Metal-Semiconductor-Metal Photodetector by Adjusting the Fermi Level, *ACS applied materials & interfaces*, 11(36), 33188-33193.
- Colin, G., Annane, D.,** 2008, Corticosteroids and Human Recombinant Activated Protein C for Septic Shock, *Clinics in chest medicine*, 29(4), 705-712.
- Cui, D., Li, J., Zhang, X., Zhang, L., Chang, H., Wang, Q.,** 2021, Pyrolysis temperature effect on compositions of basic nitrogen species in Huadian shale oil using positive-ion ESI FT-ICR MS and GC-NCD, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 153, 104980.
- Dhara, K., Stanley, J., Ramachandran, T., Nair, B.G., Satheesh, S.B.,** 2014, Pt-CuO nanoparticles decorated reduced graphene oxide for the fabrication of highly sensitive non-enzymatic disposable glucose sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 195, 197-205.
- Duan, F., Guo, C., Hu, M., Song, Y., Wang, M., He, L., Zhang, Z., Pettinari, R., Zhou, L.,** 2020, Construction of the 0D/2D heterojunction of Ti₃C₂T_x MXene nanosheets and iron phthalocyanine quantum dots for the impedimetric aptasensing of microRNA-155, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 310, 127844.
- Eksin, E., Erdem, A.,** 2016, Chitosan-carbon Nanofiber Modified Single-use Graphite Electrodes Developed for Electrochemical Detection of DNA Hybridization Related to Hepatitis B Virus, *Electroanalysis*, 28(10), 2514-2521.
- Eksin, E., Erdem, A., Kuruc, A.P., Kayi, H., Ögünç, A.,** 2015, Impedimetric Aptasensor Based on Disposable Graphite Electrodes Developed for Thrombin Detection, *Electroanalysis*, 27(12), 2864-2871.
- Eksin, E., Muti, M., Erdem, A.,** 2013, Chitosan/Ionic Liquid Composite Electrode for Electrochemical Monitoring of the Surface-Confined Interaction Between Mitomycin C and DNA, *Electroanalysis*, 25(10), 2321-2329.
- Erdem, A.,** 2007, Nanomaterial-based electrochemical DNA sensing strategies, *Talanta*, 74(3), 318-325.
- Erdem, A., Congur, G.,** 2014a, Voltammetric aptasensor combined with magnetic beads assay developed for detection of human activated protein C, *Talanta*, 128, 428-433.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erdem, A., Congur, G.,** 2014b, Dendrimer modified 8-channel screen-printed electrochemical array system for impedimetric detection of activated protein C, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 196, 168–174.
- Erdem, A., Congur, G.,** 2014c, Dendrimer enriched single-use aptasensor for impedimetric detection of activated protein C, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 338–345.
- Erdem, A., Congur, G., Mayer, G.,** 2015, Aptasensor platform based on carbon nanofibers enriched screen printed electrodes for impedimetric detection of thrombin, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 758, 12–19.
- Erdem, A., Congur, G., Mese, F.,** 2014a, Electrochemical Detection of Activated Protein C Using an Aptasensor Based on PAMAM Dendrimer Modified Pencil Graphite Electrodes, *Electroanalysis*, 26, 2580–2590.
- Erdem, A., Eksin, E., Muti, M.,** 2014b, Chitosan–graphene oxide based aptasensor for the impedimetric detection of lysozyme, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115, 205–211.
- Erdem, A., Karadeniz, H., Mayer, G., Famulok, M., Caliskan, A.,** 2009, Electrochemical Sensing of Aptamer-Protein Interactions Using a Magnetic Particle Assay and Single-Use Sensor Technology, *Electroanalysis*, 21, 1278–1284.
- España, F., Vayá, A., Mira, Y., Medina, P., Estellés, A., Villa, P., Falcó, C., Aznar, J.,** 2001, Low level of circulating activated protein C is a risk factor for venous thromboembolism, *Thrombosis and Haemostasis*, 86, 1368–1373.
- España, F., Zuazu, I., Vicente, V., Estellés, A., Marco, P., Aznar, J.,** 1996, Quantification of circulating activated protein C in human plasma by immunoassays - Enzyme levels are proportional to total protein C levels, *Thrombosis and Haemostasis*, 75, 56–61.
- Famulok, M., Hartig, J.S., Mayer, G.,** 2007, Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy, *Chemical reviews*, 107(9), 3715-3743
- Farghaly, O.A., Hameed, R.S.A., Abu-Nawwas, A.-A.H.,** 2014, Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques, *Int. J. Electrochem. Sci*, 9(1), 3287-3318.
- Fernández, J.A., Lentz, S.R., Dwyre, D.M., Griffin, J.H.,** 2006, A novel ELISA for mouse activated protein C in plasma, *Journal of immunological methods*, 314(1-2), 174-181.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gao, N., Tang, L., Deng, J., Lu, K., Hou, H., Chen, K.,** 2021a, Design, fabrication and sound absorption test of composite porous metamaterial with embedding I-plates into porous polyurethane sponge, *Applied Acoustics*, 175, 107845.
- Gao, N., Wu, J., Lu, K., Zhong, H.,** 2021b, Hybrid composite meta-porous structure for improving and broadening sound absorption, *Mechanical Systems and Signal Processing*, 154, 107504.
- Gergeroglu, H., Yildirim, S., Ebeoglugil, M.F.,** 2020, Nano-carbons in biosensor applications: an overview of carbon nanotubes (CNTs) and fullerenes (C60), *SN Applied Sciences*, 2(4), 1-22.
- Gruber, A., Griffin, J.H.,** 1992, Direct detection of activated protein C in blood from human subjects, *Blood*, 79 (9): 2340–2348.
- Haemtech,** “Activated protein C”, <http://www.haemtech.com/Enzymes/aPC.htm> (Erişim tarihi: 4 Temmuz 2022)
- Hamedani, N.S., Rühl, H., Zimmermann, J.J., Heiseler, T., Oldenburg, J., Mayer, G., Pöttsch, B., Müller, J.,** 2016, In Vitro Evaluation of Aptamer-Based Reversible Inhibition of Anticoagulant Activated Protein C as a Novel Supportive Hemostatic Approach, *Nucleic acid therapeutics*, 26(6), 355-362.
- Hosseini Ghalehno, M., Mirzaei, M., Torkzadeh-Mahani, M.,** 2019, Electrochemical aptasensor for activated protein C using a gold nanoparticle – Chitosan/graphene paste modified carbon paste electrode, *Bioelectrochemistry*, 130, 107322.
- Hu, J. wen, Zheng, B. yin, Wang, C., Zhao, C. hui, Hou, X. lei, Pan, Q., Xu, Z.,** 2020, A survey on multi-sensor fusion based obstacle detection for intelligent ground vehicles in off-road environments, *Frontiers of Information Technology & Electronic Engineering*, 21(5), 675-692.
- Huang, X., Zeng, Z., Zhang, H.,** 2013, Metal dichalcogenide nanosheets: preparation, properties and applications, *Chemical Society Reviews*, 42(5), 1934-1946.
- Huang, X., Zhu, Y., Kianfar, E.,** 2021, Nano Biosensors: Properties, applications and electrochemical techniques, *Journal of Materials Research and Technology*, 12, 1649-1672.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Heyrovsky, J.** 1922, Electrolysis with the dropping mercury electrode, *Chemické Listy*, 16, 256-304.
- Janek, R. P., Fawcett, W. R., Ulman, A.** 1998, Impedance spectroscopy of self-assembled monolayers on Au (111): sodium ferrocyanide charge transfer at modified electrodes, *Langmuir*, 14(11), 3011-3018.
- Jiang, Q., Jin, S., Jiang, Y., Liao, M., Feng, R., Zhang, L., Liu, G., Hao, J.,** 2017, Alzheimer's Disease Variants with the Genome-Wide Significance are Significantly Enriched in Immune Pathways and Active in Immune Cells, *Molecular neurobiology*, 54(1), 594-600.
- John Ho, L.S., Fogel, R., Limson, J.L.,** 2020, Generation and screening of histamine-specific aptamers for application in a novel impedimetric aptamer-based sensor, *Talanta*, 208, 120474.
- Katsuura, Y., Mochizuki, T., Tamura, M., Hoshide, S., Kiyoki, M., Nakagaki, T., Miyamoto, S.,** 1996, Species specificity of anticoagulant activity of activated human protein C, Involvement of factor V as well as protein S. *Thrombosis research*, 82(2), 147-157.
- Khan, N.I., Maddaus, A.G., Song, E.,** 2018, A Low-Cost Inkjet-Printed Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for the Selective Detection of Lysozyme, *Biosensors*, 8(1), 7.
- Kissinger, P., Heineman, W. R. (Eds.).** 2018, Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, *Revised and Expanded*, CRC press
- Kour, R., Arya, S., Young, S.-J., Gupta, V., Bandhoria, P., Khosla, A.,** 2020, Review—Recent Advances in Carbon Nanomaterials as Electrochemical Biosensors, *Journal of The Electrochemical Society*, 167(3), 037555.
- Koyun, A., Ahlatcolu, E., Koca, Y., Kara, S.** 2012, Biosensors and their principles, *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*, 117-142.
- Koyun, S., Akgönüllü, S., Yavuz, H., Erdem, A., Denizli, A.,** 2019, Surface plasmon resonance aptasensor for detection of human activated protein C, *Talanta*, 194, 528-533.
- Li, W., Zheng, X., Gu, J., Hunter, J., Ferrell, G.L., Lupu, F., Esmon, N.L., Esmon, C.T.,** 2005, Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(7), 1351-1359.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liaw, P.C.Y., Ferrell, G., Esmon, C.T.,** 2003, A monoclonal antibody against activated protein C allows rapid detection of activated protein C in plasma and reveals a calcium ion dependent epitope involved in factor Va inactivation, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(4), 662-670.
- Lin, J., Wang, Y., Wei, X., Kong, S., Liu, Z., Liu, J.J., Zhang, F., Lin, S., Ji, B., Zhou, Z., Guo, Z.,** 2020, Controllable antibacterial and bacterially anti-adhesive surface fabricated by a bio-inspired beetle-like macromolecule, *International journal of biological Macromolecules*, 157, 553-560.
- Liu, Y., Liu, L., Dong, S.,** 2007, Electrochemical Characteristics of Glucose Oxidase Adsorbed at Carbon Nanotubes Modified Electrode with Ionic Liquid as Binder, *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 19(1), 55-59.
- Liu, Y., Zhang, Q., Xu, M., Yuan, H., Chen, Y., Zhang, Jiayi, Luo, K., Zhang, Jingquan, You, B.,** 2019, Novel and efficient synthesis of Ag-ZnO nanoparticles for the sunlight-induced photocatalytic degradation, *Applied Surface Science*, 476, 632-640.
- Ma, H.J., Xu, L.X., Yang, G.H.,** 2021, Multiple Environment Integral Reinforcement Learning-Based Fault-Tolerant Control for Affine Nonlinear Systems, *IEEE Transactions on Cybernetics* 51, 1913–1928.
- Martos, L., Bonanad, S., Ramón, L.A., Cid, A.R., Bonet, E., Corral, J., Miralles, M., España, F., Navarro, S., Medina, P.,** 2016, A simplified assay for the quantification of circulating activated protein C, *Clinica Chimica Acta*, 459, 101-104.
- Mezzano, D., España, F., Panes, O., Medina, P., Pais, E., Marshall, G., Tagle, R., Downey, P., Caceres, S., González, F., Quiroga, T., Pereira, J.,** 2001, Increased activation of protein C, but lower plasma levels of free, activated protein C in uraemic patients: relationship with systemic inflammation and haemostatic activation, *British journal of haematology*, 113(4), 905-910.
- Miller, J. N. and Miller, J. C.,** 2010, Statistics And Chemometrics For Analytical Chemistry, Pearson Education, Essex, 271p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Müller, J., Friedrich, M., Becher, T., Braunstein, J., Kupper, T., Berdel, P., Gravius, S., Rohrbach, F., Oldenburg, J., Mayer, G., Pötzsch, B.,** 2012, Monitoring of plasma levels of activated protein C using a clinically applicable oligonucleotide-based enzyme capture assay, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10(3), 390-398.
- Orthner, C.L., Kolen, B., Drohan, W.N.,** 1993, A sensitive and facile assay for the measurement of activated protein C activity levels in vivo, *Thrombosis and haemostasis*, 69(05), 441-447.
- Oto, J., Fernández-Pardo, Á., Miralles, M., Plana, E., España, F., Navarro, S., Medina, P.,** 2020, Activated protein C assays: A review, *Clinica Chimica Acta*, 502, 227-232.
- Polderdijk, S.G.I., Adams, T.E., Ivanciu, L., Camire, R.M., Baglin, T.P., Huntington, J.A.,** 2017, Design and characterization of an APC-specific serpin for the treatment of hemophilia, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(1), 105-113.
- Qu, K., Wei, L., Zou, Q.,** 2018, A Review of DNA-binding Proteins Prediction Methods, *Current Bioinformatics*, 14(3), 246-254.
- Ramnani, P., Saucedo, N.M., Mulchandani, A.,** 2016, Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors for label-free sensing of environmental pollutants, *Chemosphere*, 143, 85-98.
- Rohrbach, F., Karadeniz, H., Erdem, A., Famulok, M., Mayer, G.,** 2012a, Label-free impedimetric aptasensor for lysozyme detection based on carbon nanotube-modified screen-printed electrodes, *Analytical Biochemistry*, 421(2), 454-459.
- Ruf, W.,** 2010, New players in the sepsis-protective activated protein C pathway, *The Journal of clinical investigation*, 120(9), 3084-3087.
- Schouten, M., van 'T Veer, C., Poulussen, N., Meijers, J.C.M., Levi, M., Esmon, C.T., van der Poll, T.,** 2015, The cytoprotective effects of endogenous activated protein C reduce activation of coagulation during murine pneumococcal pneumonia and sepsis, *Thrombosis Research*, 135(3), 537-543.
- Senturk, H., Eksin, E., Işık, Ö., İlaslan, Z., Mısırlı, F., Erdem, A.,** 2021, Impedimetric aptasensor for lysozyme detection based on carbon nanofibres enriched screen-printed electrodes, *Electrochimica Acta*, 377, 138078.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shen, C.-L., Lou, Qing, Zang, J.-H., Liu, K.-K., Qu, S.-N., Dong, Lin, Shan, C.-X., Shen, C., Lou, Q, Zang, J., Liu, K., Dong, L, Shan, C., Qu, S.,** 2020, Near-Infrared Chemiluminescent Carbon Nanodots and Their Application in Reactive Oxygen Species Bioimaging, *Advanced Science*, 7(8), 1903525.
- Shetty, S., Ghosh, K.,** 2015, Novel therapeutic approaches for haemophilia, *Haemophilia*, 21(2), 152-161.
- Skoog, D. A., West, D. A. and Holler, F. J.,** 1996, Analitik Kimyanın Temelleri, Prof. Dr. E. Kılıç ve Prof. Dr. F. Köseoğlu, (Derl.), Bilim Yayıncılık, 303 s.
- Solá, E., Navarro, S., Medina, P., Vayá, A., Estellés, A., Hernández-Mijares, A., España, F.,** 2009, Activated protein C levels in obesity and weight loss influence, *Thrombosis research*, 123(5), 697-700.
- Stephenson, T., Li, Z., Olsen, B., Mitlin, D.,** 2013, Lithium ion battery applications of molybdenum disulfide (MoS₂) nanocomposites, *Energy & Environmental Science*, 7(1), 209-231.
- Sun, M., Yan, L., Zhang, L., Song, L., Guo, J., Zhang, H.,** 2019, New insights into the rapid formation of initial membrane fouling after in-situ cleaning in a membrane bioreactor, *Process biochemistry*, 78, 108-113.
- Takazoe, K., Ogawa, H., Yasue, H., Sakamoto, T., Oshima, S., Arai, H., Moriyama, Y., Shimomura, H., Hirai, N., Kaikita, K., Soejima, H., Misumi, K., Hosoda, K.,** 1999, Association of Plasma Levels of Activated Protein C with Recanalization of the Infarct-Related Coronary Artery after Thrombolytic Therapy in Acute Myocardial Infarction, *Thrombosis research*, 95(1), 37-47.
- Tombelli, S., Minunni, M., Mascini, M.,** 2005, Analytical applications of aptamers, *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), 2424-2434.
- Wada, H., Matsumoto, T., Yamashita, Y., Hatada, T.,** 2014, Disseminated intravascular coagulation: Testing and diagnosis, *Clinica Chimica Acta*, 436, 130-134.
- Wang, J.** 2006, Analytical electrochemistry, *New York, USA: Wiley*, 10, 0471790303.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, P., Li, Z., Xie, Q., Duan, W., Zhang, X., Han, H.,** 2021a, A Passive Anti-icing Strategy Based on a Superhydrophobic Mesh with Extremely Low Ice Adhesion Strength, *Journal of Bionic Engineering*, 18(1), 55-64.
- Wang, P., Yao, T., Li, Z., Wei, W., Xie, Q., Duan, W., Han, H.,** 2020, A superhydrophobic/electrothermal synergistically anti-icing strategy based on graphene composite, *Composites Science And Technology*, 198, 108307.
- Wang, P., Zhang, X., Duan, W., Teng, W., Liu, Y., Xie, Q.,** 2021b, Superhydrophobic Flexible Supercapacitors Formed by Integrating Hydrogel with Functional Carbon Nanomaterials, *Chinese Journal Of Chemistry*, 39(5), 1153-1158.
- Wang, Z., Dai, Z.,** 2015, Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: an overview, *Nanoscale*, 7(15), 6420-6431.
- Wei, D., Ivaska, A.,** 2008, Applications of ionic liquids in electrochemical sensors, *Analytica Chimica Acta*, 607(2), 126-135.
- Willner, I., Zayats, M.,** 2007, Electronic Aptamer-Based Sensors, *Angewandte Chemie International Edition*, 46(34), 6408-6418.
- Wu, C., Wu, P., Wang, J., Jiang, R., Chen, M., Wang, X.,** 2021, Critical review of data-driven decision-making in bridge operation and maintenance, *Structure and Infrastructure Engineering*, 18(1), 47-70.
- Xu, P., Lu, W., Zhang, J., Zhang, L.,** 2020, Efficient Hydrolysis of Ammonia Borane for Hydrogen Evolution Catalyzed by Plasmonic Ag@Pd Core-Shell Nanocubes, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(33), 12366-12377.
- Xu, Q., Zou, Z., Chen, Y., Wang, K., Du, Z., Feng, J., Ding, C., Bai, Z., Zang, Y., Xiong, Y.,** 2020, Performance of a novel-type of heat flue in a coke oven based on high-temperature and low-oxygen diffusion combustion technology, *Fuel*, 267, 117160.
- Xu, Y., Cheng, G., He, P., Fang, Y.,** 2009, A review: Electrochemical aptasensors with various detection strategies, *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 21(11), 1251-1259.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, Fan, Yang, Fang, Wang, G., Kong, T., Wang, H., Zhang, C.,** 2020, Effects of water temperature on tissue depletion of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) following multiple oral doses, *Aquaculture*, 515, 734542.
- Yoon, J., Shin, M., Lee, T., Choi, J.W.,** 2020, Highly Sensitive Biosensors Based on Biomolecules and Functional Nanomaterials Depending on the Types of Nanomaterials: A Perspective Review, *Materials*, 13(2), 299.
- Yu, D., Mao, Y., Gu, B., Nojavan, S., Jermsittiparsert, K., Nasser, M.,** 2020, A new LQG optimal control strategy applied on a hybrid wind turbine/solid oxide fuel cell/ in the presence of the interval uncertainties, *Sustainable Energy, Grids and Networks*, 21, 100296.
- Zaytseva, O., Neumann, G.,** 2016, Carbon nanomaterials: production, impact on plant development, agricultural and environmental applications, *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1-26.
- Zhang, C., Du, X.,** 2020, Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanomaterial Used in Diagnosing Metabolic Disease, *Frontiers in Chemistry*, 8, 651.
- Zhang, H., Guan, W., Zhang, L., Guan, X., Wang, S.,** 2020, Degradation of an Organic Dye by Bisulfite Catalytically Activated with Iron Manganese Oxides: The Role of Superoxide Radicals, *ACS omega*, 5(29), 18007-18012.
- Zhao, Y., Gao, Y., Zhan, D., Liu, H., Zhao, Q., Kou, Y., Shao, Y., Li, M., Zhuang, Q., Zhu, Z.,** 2005, Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid by a carbon nanotubes-ionic liquid gel modified electrode, *Talanta*, 66(1), 51-57.
- Zhou, Y., Tian, L., Zhu, C., Jin, X., Sun, Y.,** 2020, Video Coding Optimization for Virtual Reality 360-Degree Source, *IEEE Journal of Selected Topics in Signal Processing*, 2019, 14.1: 118-129.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, desteklerini benden esirgemeyen ve yol gösteren, öğrencisi olmaktan onur duyduğum,engin bilgi, tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN'a**,

Yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Hayati TÜRKMEN'e**

Bursiyeri olduğum ‘**TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı**’ kapsamında tez çalışmalarım boyunca sağladıkları maddi, manevi desteklerinden dolayı **TÜBİTAK** kurumuna,

Tez çalışmalarım sırasında desteklerini eksik etmeyen tüm çalışma arkadaşlarıma ve her zaman yanımda olup sevgilerini ve desteklerini eksik etmeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

05/08/2022

Meltem MARAL

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Meltem MARAL

EĞİTİM

Lise: Menemen Atatürk Anadolu Lisesi, Fen Bilimleri, İzmir (2007 – 2011)

Lisans: Selçuk Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği (2012 - 2018)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı (2019 - 2022)

Staj

İzmir Demir Çelik Sanayi A.Ş., İzmir, Laboratuvar Stajyeri, 2017

Türk Tıp Sanayi AŞ. ve Serum Üretim Fabrikası, Ankara, Üretim Stajyeri, 2018

Burs

TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı (Mart 2020-Mart 2021)

YER ALDIĞI PROJELER

120S419, no'lu TÜBİTAK projesi, (02.03.2021 - 01.01.2022), Bursiyer

121Z801 no'lu TÜBİTAK projesi, (03.01.2022 – 29.06.2022), Bursiyer

BİLİMSEL YAYINLAR

Erdem, A., Senturk, H., Yildiz, E., **Maral, M.**, 2022, Amperometric immunosensor developed for sensitive detection of SARS-CoV-2 spike S1 protein in combined with portable device. Talanta, 244, 123422. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123422>

Sertifikalar

- Tehlikeli Madde Güvenlik Danışmanlığı, 3e Akademi, 2018
- ISO 9001: 2015 Kalite Yönetim Sistemleri, TSC Kariyer Enstitüsü, 2019
- GMP - İyi Üretim Uygulamaları, TSC Kariyer Enstitüsü, 2019
- GLP - İyi Laboratuvar Uygulamaları, TSC Kariyer Enstitüsü, 2019

- Uygulamalı Yangın Eğitimi Katılım Belgesi, 3e Akademi, 2019
- ISO 17025: 2015 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvar Yetkinliği, TSC Kariyer Enstitüsü, 2019
- Satranç Eğitimi, İstanbul İşletme Enstitüsü, 2020
- Yalın Üretim Uzmanlık Sertifikası, İstanbul İşletme Enstitüsü, 2020
- Üretim yönetimi, İstanbul İşletme Enstitüsü, 2020
- İleri Excel Eğitimi, İstanbul İşletme Enstitüsü, 2020

