



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BEYİN HASARI BİYOBELİRTEÇLERİNİN BİYOLOJİK
NUMUNELERDEN ERKEN TEŞHİSİNE YÖNELİK
ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

Cem ERKMEN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Bengi USLU**

ANKARA

2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYİN HASARI BİYOBELİRTEÇLERİNİN BİYOLOJİK
NUMUNELERDEN ERKEN TEŞHİSİNE YÖNELİK ANALİTİK YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ

Cem ERKMEN

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bengi USLU

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Gözde AYDOĞDU TİĞ

Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun
(TÜBİTAK) 122Z695 proje numarası ile desteklenmiştir.

YÖK 100/2000 Bursu ile desteklenmiştir.

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayarak sunduğum “Beyin Hasarı Biyobelirteçlerinin Biyolojik Numunelerden Erken Teşhisine Yönelik Analitik Yöntem Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve etik değerlere uygun şekilde tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tamamıyla tez danışmanlarım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tez içerisindeki tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Adı Soyadı : Cem ERKMEN
Tarih : 13.12.2022
İmza :

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalında Cem ERKMEN tarafından hazırlanan “BEYİN HASARI BİYOBELİRTEÇLERİNİN BİYOLOJİK NUMUNELERDEN ERKEN TEŞHİSİNE YÖNELİK ANALİTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ” adlı tez çalışması, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora tezi olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/12/2022

Prof. Dr. Filiz KURALAY
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. M. Gökhan ÇAĞLAYAN
Ankara Üniversitesi
Raportör

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Beyin Hasarı	1
1.1.1. Genel Bilgiler	1
1.1.2. Epidemiyolojisi	2
1.1.3. Patofizyolojisi	2
1.1.4. Travmatik Beyin Hasarı	4
1.1.5. Beyin Hasarında Biyobelirteçler	5
1.1.6. Beyin Hasarında Leptin	7
1.2. Biyosensörler	9
1.3. Aptamerler	12
1.4. Elektrokimyasal Yöntemler	15
1.5. Nanomalzemeler	18
1.5.1. Moleküler Baskılı Polimerler	20
1.5.1.1. Hedef analit	22
1.5.1.2. Fonksiyonel monomer	22
1.5.1.3. Çapraz bağlayıcı	22
1.5.1.4. Çözücü	23
1.5.1.5. Polimerizasyon başlatıcı	23
1.6. Biyosensörlerde Validasyon	24
1.6.1. İstatistiksel Hesaplamalar	25
1.6.2. Seçicilik	26
1.6.3. Doğrusallık	26

1.6.4. Duyarlılık	28
1.6.5. Kesinlik	28
1.6.6. Doğruluk	29
1.6.7. Sağlamlık	29
1.6.8. Stabilite	30
2. GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Tez Çalışmaları Kapsamında Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
2.2. Tez çalışmaları Kapsamında Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar	33
2.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanması	33
2.4. Leptin Tayini İçin Etiketsiz Aptasensörün Hazırlanması	36
2.5. Leptin Tayini İçin Sandviç Tip Aptasensörün Hazırlanması	38
2.6. Leptin Tayini İçin Apt-MIP Hibrit Sensörün Hazırlanması	39
2.7. Tez Çalışmaları Kapsamında Kullanılan Yöntemler	40
2.7.1. Voltametri	40
2.7.1.1. Dönüşümlü voltametri	41
2.7.1.2. Diferansiyel puls voltametrisi	42
2.7.2. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi	43
3. BULGULAR	47
3.1. Etiketsiz Aptasensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu	47
3.2. Etiketsiz Aptasensörün Yüzey Karakterizasyonu	52
3.3. Etiketsiz Aptasensör İçin Deneysel Koşulların Belirlenmesi	53
3.4. Etiketsiz Aptasensör ile Leptin'nin Elektrokimyasal Tayini ve Yöntem Validasyonu	56
3.4.1. Etiketsiz Aptasensör İçin Seçicilik Çalışması	59
3.4.2. Etiketsiz Aptasensör İçin Tekrar Üretilbilirlik ve Stabilite Çalışmaları	61
3.4.3. Etiketsiz Aptasensör Kullanılarak İnsan Serum ve İnsan Plazma Örneklerinden Leptin Analizi	63
3.5. Sandviç Tip Aptasensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu	63
3.6. Sandviç Tip Aptasensörün Yüzey Karakterizasyonu	67
3.7. Sandviç Tip Aptasensör Tasarımı İçin Elektrot Modifikasyonu	70
3.8. Sandviç Tip Aptasensör İçin Deneysel Koşulların Belirlenmesi	71

3.9. Sandviç Tip Aptasensör ile Leptin'nin Elektrokimyasal Tayini ve Yöntem Validasyonu	74
3.9.1. Sandviç Tip Aptasensör İçin Seçicilik Çalışması	75
3.9.2. Etiketsiz Aptasensör İçin Tekrar Üretilebilirlik ve Stabilitate Çalışmaları	79
3.9.3. Sandviç Tip Aptasensör Kullanılarak İnsan Serum ve İnsan Plazma Örneklerinden Leptin Analizi	80
3.10. Apt-MIP Hibrit Sensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu	81
3.11. Apt-MIP Hibrit Sensörün Yüzey Karakterizasyonu	84
3.12. Apt-MIP Hibrit Sensörün Tasarımı İçin Elektrot Modifikasyonu	90
3.13. Apt-MIP Hibrit Sensörü İçin Deneysel Koşulların Belirlenmesi	91
3.14. Apt-MIP Hibrit Sensörü İle Leptin'nin Elektrokimyasal Tayini ve Yöntem Validasyonu	93
3.14.1. Apt-MIP Hibrit Sensörü İçin Seçicilik, Tekrar Üretilebilirlik ve Stabilitate Çalışmaları	96
3.14.2. Apt-MIP Hibrit Sensörü Kullanılarak İnsan Serum ve İnsan Plazma Örneklerinden Leptin Analizi	99
4. TARTIŞMA	100
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	108
ÖZET	111
SUMMARY	112
KAYNAKLAR	113

ÖNSÖZ

Beyin hasarı, vücut içi ve dışından beyinde meydana gelen bir hasar sonucu santral sinir sisteminde geçici veya daimî nörolojik fonksiyon bozukluklarının oluşmasıdır. Fiziksel kayıplar, bilişsel ve davranışsal, psikolojik ve sosyal problemler gelişebilmesi ve daha çok genç verimli çağda oluşması nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunudur. Biyobelirteçler, beyin hasarının düzeyinin ve şiddetinin belirlenmesinin yanısıra morbidite ve mortalite ile de yakından ilişkilidir. Bu tez çalışması kapsamında bir beyin hasarı biyobelirteci olan Leptin'nin tayini için ilk kez aptamerler ve moleküler baskılı polimerler kullanılarak elektrokimyasal biyosensörler geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sensörler insan serum ve plazma örneklerinden Leptin tayini için yüksek hassasiyet, doğruluk ve kesinlikle uygulanmıştır.

Öncelikle, lisansüstü eğitim hayatıma başladığım ilk günden beri kendisinden güç aldığım, bilgi, birikim ve tecrübesiyle bana her zaman yol gösteren, bilimsel anlamda bana her kapıyı açan ve hatta yeni olanaklar sağlayan, moral ve desteğini hiç eksik etmeyen, akademik olarak da sosyal olarak da beni güçlendiren, kendisini hem bilimsel hem de insani yönüyle her zaman örnek aldığım çok değerli ve saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Bengi USLU'ya sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarına başladığım andan itibaren beni destekleyen, sabrı ve ilgisini hiç eksik etmeyen, kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana yardımcı olan değerli eş danışman hocam Doç. Dr. Gözde AYDOĞDU TİĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak çalışmalarımda bana destek veren değerli hocam Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Birlikte gerçekleştirdiğimiz tüm çalışmalar ve her türlü aktivitede beraber çok güzel zamanlar geçirdiğimiz için ve her zaman bu grubun bir üyesi olarak kendimi çok şanslı hissettiğim için araştırma grubumuzun çok değerli üyeleri Dr. Burçin BOZAL PALABIYIK, Uzm. Kim. Müh. Didem Nur ÜNAL, Uzm. Ecz. Özge SELÇUK, Dr. Çiğdem KANBEŞ DİNDAR ve Dr. Md. Zahirul KABİR'e çok teşekkür ederim.

İlk biyosensör çalışmamda bana destek olan, her an ve saat sorunlarıma çözümler getiren, sonsuz desteği ve anlayışı için hem bir hoca hem bir abla olan Doç. Dr. Sevinç KURBANOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Her türlü sıkıntıda ve mutluluğumda yanımda olan, bu zorlu süreci güzelleştiren ve daha birçok güzel hatırası için değerli arkadaşım Uzm. Ecz. Tuğrul Mert SERİM'e çok teşekkür ederim.

Birlikte çok güzel anılar biriktirdiğimiz hem mutluluğumda hem üzüntülerimde her zaman yanımda olan ve dostluğumuzun sonsuza kadar süreceğine inandığım sevgili dostlarım Alize AYGÜN, Aylin GÜRLEYİK, Ceyda BİLGİNAY, Sercan GÜRLEYİK ve Metin BİLGİNAY'a eşsiz yardımları ve destekleri için çok teşekkür ederim.

Desteklerini her zaman hissettiğim, sevinçlerimi ve üzüntülerimi paylaşabildiğim, üniversitede başlayan güzel arkadaşlığımız için Gizem Gökçe KARADAĞ, Melih KARADAĞ, Fulya KOÇ GÜRLER ve Çağatay GÜRLER'e çok teşekkür ederim.

Her gün kahve sohbetiyle dertleşebildiğim, her koşulda beni sabırla dinleyen ve her zaman desteklerini hissettiğim arkadaşlarım Selva BİLGE YÜCEL ve Abdullah YÜCEL'e çok teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim boyunca sağladıkları katkılar ve desteklerinden dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri, öğretim elemanları ve idari personeline teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince 100/2000 YÖK Doktora Bursu Programı kapsamında bursiyerleri olmaktan gurur duyduğum Yükseköğretim Kurulu Başkanlığı'na (YÖK) maddi ve manevi bakımdan yardımları için çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım boyunca Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından yürütülen 2211/A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı kapsamında bursiyerleri olmaktan gurur duyduğum Türkiye Bilimsel ve Teknolojik

Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) sağlamış olduğu maddi ve manevi yardımlardan dolayı çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarımın son aşamasında Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB) tarafından yürütölen 1002-B Acil Destek Modölü kapsamında 122Z695 nolu proje desteği ile katkıda bulunan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) sağlamış oldukları destekleri için teşekkür ederim.

Hayat serüvenimde hep yanımda olan, birlikte řımarđımız, beraber sevindiğimiz ve en zor anlarımda bile desteğini hiç eksik etmeyen kardeşim Can ERKMEN ve eşi Gökçe KAYA ERKMEN'e sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak, bugönlere gelebilmem için her zaman yanımda olan, gerçekleştirmek istediğim hayallerim için sonsuz sevgiyle bana cesaret veren ve destek olan, evlatları olmaktan hep gurur duyduğum biricik annem Hatice Müjgan ERKMEN ve babam Yusuf ERKMEN'e sonsuz minnetle teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

$\bar{x}$	Numune ortalaması
6-MCH	6-merkapt-1-hekzanol
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
Apt	Aptamer
APTMS	(3-Aminopropil)trioksisilan
Au NP'ler	Altın nanopartiküller
BH	Beyin hasarı
BNC	Biyonanokapsül
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BP	Siyah fosfor
BSA	Sığır serum albümini
BSS	Bağıl standart sapma
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Ce ₃ NbO ₇	Seryum niobat
CEK	Camsı karbon elektrot
CeO ₂	Seryum oksit
CNBr	Siyanojen bromür
CS	Kitosan
DEA	Dietanolamin
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
DTSSP 3,30-	dithiobis (sulfosuccinimidyl propionate)
DV	Dönüşümlü voltametri
EDC	Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EDS	Enerji dağılımlı X-ışını
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
E _p	Potansiyel
FDA U.S.	Food and Drug Administration

GFAP	Gliyal fibriller asit proteini
GKS	Glasgow Koma Skalası
Glu	Glutaraldehit
HAuCl ₄	Tetra kloroaurik asit
HMDC	Hekzametilen diisosiyanat
HSA	İnsan serum albümini
I	Akım
ICH	Uluslararası uyum konferansı (International Conference on Harmonization)
IL-6	İnterlökin-6
ITO-PET	İndiyum kalay oksit kaplı polietilen tereftalat
K ₃ [Fe(CN) ₆]·3H ₂ O	Potasyum ferrisiyanür
K ₄ [Fe(CN) ₆]·3H ₂ O	Potasyum ferrosiyanür
KBB	Kan beyin bariyerin
KCl	Potasyum klorür
m	Eğim
MBs	Manyetik boncuklar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MIP	Moleküler baskılı polimerler
MPA	Merkaptopropiyonik asit
n	Kesişim
NaCl	Sodyum klorür
NHS	N-Hidroksisukkinimid
NIP	Baskılanmamış polimer
NSE	Nöron spesifik enolaz
oPD	orto-fenilendiamin
PBE	Perde baskılı elektrot
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PG	Gözenekli grafen
PGA	Poliglutamik asit
PP	Polifenol
PPa	Pirol propiyonik asit

PPy	Polipirol
Pt NK'ler	Platin nanoküreler
Pt NP'ler	Platin nanopartiküller
r	Korelasyon katsayısı
r ²	Regresyon katsayısı
R _{ct}	Yük transfer direnci
rGO	İndirgenmiş grafen oksit
RNA	Ribonükleik asit
R _s	Çözelti direnci
S	Standart sapma
SBDP	Spektrin parçalanma ürünleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
Strep-ALP	Streptavidin-alkalen fosfataz
SWCNTs	Tek duvarlı karbon nanotüpler
TAS	Tayin alt sınırı (LOQ)
TBH	Travmatik beyin hasarı
TE	Tris-EDTA
TiO ₂	NP'ler Titanyum dioksit nanopartiküller
TNF- α	Tümör nekroz faktör-A
TRIS-HCl	Tris hidroksimetil aminometan hidroklorür
TS	Teşhis sınırı (LOD)
UCH-L1	Ubikuitin C-terminal hidrolaz-L1
XRD	X-ışını difraktometresi
ZnO NP'ler	Çinko oksit nanopartiküller

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. İdeal bir biyosensörün şematik gösterimi	11
Şekil 1.2. Aptamer ile hedef analit arasında gerçekleşen etkileşimin şematik gösterimi	12
Şekil 1.3. SELEX yönteminin şematik gösterimi	13
Şekil 1.4. Elektrokimyasal yöntemlerin sınıflandırılması	16
Şekil 1.5. Hedef analit için MIP hazırlama prosedürünün şematik gösterimi	21
Şekil 2.1. Geliştirilen etiketsiz aptasensörün hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi	37
Şekil 2.2. Geliştirilen sandviç tip aptasensörün hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi	38
Şekil 2.3. Geliştirilen Apt-MIP hibrit sensörün hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi	40
Şekil 2.4. Tipik bir dönüşümlü voltamogram	42
Şekil 2.5. DPV yönteminde kullanılan dalga formu	43
Şekil 2.6. Tipik bir Nyquist impedans spektrum grafiği	44
Şekil 2.7. Randles devresinin şematik gösterimi	45
Şekil 3.1. Etiketsiz aptasensörün hazırlanması aşamalarında elde edilen dönüşümlü voltamogram eğrileri (A) ve Nyquist eğrileri (B)	49
Şekil 3.2. 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisinin elektrot yüzeylerinde farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogram eğrileri	50
Şekil 3.3. Etiketsiz aptasensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait SEM görüntüleri	52
Şekil 3.4. Etiketsiz aptasensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait EDS spektrumları	53
Şekil 3.5. Farklı TiO ₂ NP'ler derişimlerinin 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisinin R _{ct} değerlerine etkisinin grafiği (A), farklı döngü sayılarının 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisinin R _{ct} değerlerine etkisinin grafiği (B)	54
Şekil 3.6. 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisinin R _{ct} değerlerine karşılık farklı Apt1 bağlanma sürelerinin grafiği (A), 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisinin R _{ct} değerlerine karşılık farklı Apt1 derişimlerinin grafiği (B), 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisinin R _{ct} değerlerine karşılık aptasensör ile Leptin arasındaki farklı etkileşim sürelerinin grafiği (C)	55
Şekil 3.7. Etiketsiz aptasensör kullanılarak Leptin tayini için Nyquist ve kalibrasyon eğrileri	57

Şekil 3.8. Etiketsiz aptasensör kullanılarak Leptin ile birlikte çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisinin R _{ct} değerleri	59
Şekil 3.9. Etiketsiz aptasensör kullanılarak Leptin ile çeşitli girişim yapan maddeler için elde edilen Nyquist eğrileri.	60
Şekil 3.10. Geliştirilen etiketsiz aptasensörün tekrar üretilebilirliği	62
Şekil 3.11. Geliştirilen etiketsiz aptasensörün stabilitesi	62
Şekil 3.12. Sandviç tip aptasensörün hazırlanması aşamalarında elde edilen dönüşümlü voltamogram eğrileri (A) ve Nyquist eğrileri (B)	65
Şekil 3.13. 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisinin elektrot yüzeylerinde farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogram eğrileri.	66
Şekil 3.14. Sandviç tip aptasensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait SEM görüntüleri	68
Şekil 3.15. Sandviç tip aptasensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait EDS spektrumları.	69
Şekil 3.16. Sandviç tip aptasensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait XRD kırınım desenleri.	70
Şekil 3.17. Farklı ZnO NP'ler derişimlerinin 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisinin R _{ct} değerlerine etkisinin grafiği	71
Şekil 3.18. Sandviç tip aptasensörde α-naftol'e ait DP voltamogramları	72
Şekil 3.19. α-naftol'un akım değerlerine karşılık farklı Apt1 derişimlerinin grafiği (A), α-naftol'un akım değerlerine karşılık farklı Apt2 bağlanma sürelerinin grafiği (B), α-naftol'un akım değerlerine karşılık farklı Apt2 derişimlerinin grafiği (C), α-naftol'un akım değerlerine karşılık aptasensör ile Leptin arasındaki farklı etkileşim sürelerinin grafiği (D)	73
Şekil 3.20. Sandviç tip aptasensör kullanılarak Leptin tayini için DP voltamogramları ve kalibrasyon eğrileri	75
Şekil 3.21. Sandviç tip aptasensör kullanılarak Leptin ile çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında α-naftol'e ait akım değerleri	76
Şekil 3.22. Sandviç tip aptasensör kullanılarak Leptin ile çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen DP voltamogramları	76
Şekil 3.23. Geliştirilen sandviç tip aptasensörün tekrar üretilebilirliği	79
Şekil 3.24. Geliştirilen sandviç tip aptasensörün stabilitesi	80
Şekil 3.25. Apt-MIP hibrit sensörün hazırlanması aşamalarında elde edilen dönüşümlü voltamogram eğrileri (A) ve Nyquist eğrileri (B)	83
Şekil 3.26. 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisinin elektrot yüzeylerinde farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogram eğrileri	84
Şekil 3.27. Apt-MIP hibrit sensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait SEM görüntüleri	86
Şekil 3.28. Apt-MIP hibrit sensörün hazırlanması aşamalarında Au NP'ler/Pt NK'ler/PBE'ye ait EDS spektrumları	87
Şekil 3.29. Apt-MIP hibrit sensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait AFM görüntüleri	88

Şekil 3.30. Farklı Pt NK'ler derişimlerinin 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisinin I değerlerine etkisinin grafiğı (A), R _{ct} değerlerine etkisinin grafiğı (B), farklı döngü sayılarının 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisinin I değerlerine etkisinin grafiğı ve R _{ct} değerlerine etkisinin grafiğı (D)	90
Şekil 3.31. I ve ΔI değerlerine karşılık elektropolimerizasyon farklı döngü sayılarının etkisi (A), 30 döngü ile oPD'nin elektropolimerizasyonu (B), uzaklaştırma süresinin etkisi (C) ve yeniden bağlanma süresinin etkisi (D)	92
Şekil 3.32. Apt-MIP hibrit sensörün hazırlanması aşamalarında farklı elektrotlarda 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} redoks çözeltisine ait DP voltamogramları	94
Şekil 3.33. Apt-MIP hibrit sensör kullanılarak Leptin tayini için DP voltamogramları ve kalibrasyon eğrileri	95
Şekil 3.34. Geliştirilen Apt-MIP hibrit sensörün tekrar üretilebilirliğı (A), ölçüm tekrarlanabilirliğı (B), stabilitesi (C) ve Leptin ile çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında seçiciliğı (D)	97

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Leptin tayinine yönelik yapılmış çalışmalar	31
Çizelge 2.1. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kimyasal maddeler	32
Çizelge 2.2. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan aptamer dizileri	33
Çizelge 2.3. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar	33
Çizelge 2.4. Voltametrde kullanılan uyarma sinyalleri	41
Çizelge 3.1. Etiketsiz aptasensörün hazırlanması aşamalarında kullanılan elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması	51
Çizelge 3.2. Etiketsiz aptasensör kullanılarak geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar	63
Çizelge 3.3. Sandviç tip aptasensörün hazırlanması aşamalarında kullanılan elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması	67
Çizelge 3.4. Sandviç tip aptasensör kullanılarak geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar	81
Çizelge 3.5. Apt-MIP hibrit sensörü kullanılarak geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar	99

1. GİRİŞ

1.1. Beyin Hasarı

1.1.1. Genel Bilgiler

Günümüzde, beyin hasarı (BH), yüksek mortalite ve morbiditeye sahip önemli sağlık problemlerinden biridir. Bu terim, meydana gelen bir hasar sonucunda sağ kalan kişilerde klinik düzeyi ve yaşam kalitesini ifade etmektedir (Feigin ve ark., 2014). BH, travmaya bağlı olarak meydana gelebileceği gibi beyinde kan akımı ve oksijen oksijenizasyonun bozulduğu çeşitli hastalıklarda, kalp ve akciğer fonksiyonlarının durması sonrasında ve çeşitli metabolik hastalıkların sonucunda da görülebilir (Bradley ve ark., 2004). Travmatik beyin hasarı (TBH) kapalı veya açık yaralanmalar sonucunda görülürken, edinilmiş beyin yaralanmaları kalıtsal veya dejeneratif bir neden olmadan ortaya çıkmaktadır. Travmatik olmayan beyin yaralanmalarından inmede, beyne giden kan akışında kayıp olduğu için bir pıhtı veya beyindeki kanama sonucunda BH görülebilir. Ayrıca, çeşitli iyi ve kötü huylu beyin tümörleri veya beyindeki enfeksiyonlar da beyin dokusunda hasara neden olabilir. Beyin hücrelerine yeterince oksijen gitmediğinde (anoksi durumu), edinilmiş yaralanmalarda, boğulmalar, yüksek dozda ilaç alımı, karbon monoksit veya kurşun zehirlenmesi, çeşitli kirleticilere maruz kalma, çeşitli enfeksiyonlar ve beyindeki nöbetler gibi farklı durumlar da BH'ye sebep olabilir (Nall, 2021). Beyinde hasarın görüldüğü bölgeye göre de dengesizlik, bulanık görme, bilinç bulanıklığı, konuşma güçlüğü, baş ağrısı, bellek problemleri ve nöbet gibi çeşitli semptomlar görülebilmektedir (Nall, 2021). BH'nin insan sağlığı üzerinde hem kısa hem de uzun vadeli etkileri vardır; bunlar, yaşam tarzını minimum düzeyde etkileyen semptomlardan günlük aktiviteleri engelleyebilecek fiziksel, duygusal ve psikososyal değişikliklere kadar uzanmaktadır (Nall, 2021).

1.1.2. Epidemiyolojisi

Kafa travmasına bağılı hasarlar önemli sağıık sorunlarına ve sosyoekonomik problemlere yol açmaktadır. TBH insidansı 100,000 kişide 180-250 arasında iken, TBH'ye bağılı ölüm oranı yılda 100,000 kişide 14-30 arasındadır (Bruns ve Hauser, 2003; Kinoshita, 2016). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yılda yaklaşık 1,7-2,0 milyon TBH vakası yaşanmaktadır (CDC, 2013). Buna ek olarak ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC; Centers for Disease Control and Prevention), yaklaşık 5,3 milyon ABD vatandaşının TBH'nin yaratmış olduğı etkilerle yaşamlarını sürdürdüğünü belirtmektedir. Her yıl TBH geçiren Amerikalıların yaklaşık yarısı en azından bazı kısa vadeli sakatlıklarla mücadele etmek durumunda kalmaktadır. En yüksek TBH oranları çocuk yaş grubunda (0-4 yaş), ergenlerde ve genç erişkinlerde (15-24 yaş) görülürken, yaşlılarda (>65 yaş) görülme sıklığı da yine farklı sebeplerden olmasına rağmen yüksektir. Günümüzde, en yaygın görülen TBH sebepleri, yüksekten düşme ve motorlu taşıt kazalarıdır (Langlois ve ark., 2006). Erkeklerde TBH görülme sıklığı, kadınlara göre üç kat daha fazladır (Teasdale ve Jennett, 1974). Teşhis konulan kafa travmalarının %80-90'ı hafif kafa travması iken, kalan %10-20'lik kesim de orta-ağıır kafa travmasıdır. ABD'de kafa travması geçiren 500,000 olgunun %10'u ağır olarak sınıflandırılmıştır. Ağır kafa travması geçiren 50,000 kadar hastanın üçte biri tedaviye rağmen hayatlarını kaybederken, kurtulanlarda değıışik seviyelerde nörolojik hasarlar görölmüştür (Narayan ve ark., 2002).

1.1.3. Patofizyolojisi

BH'de fiziksel etkenlere bağılı olarak travmanın olduğı anda oluşın birincil hasarda sinir hücrelerinde hasar meydana gelmekte, ikincil hasarlanmada ise beyin ödemi ya da kafa içi basınç artışı gibi sebeplerden ötürü, kan akımında azalma ve oksijenle hücrelerin beslenmesinde bozulma gibi farklı sebepler hücre hasarında rol oynamaktadır (Chesnut ve ark., 1993). İkincil hasar, birincil hasardan dakikalar ila günler sonrasında meydana gelebilir ve hipoksi, iskemi, beyin ödemi, kafa içi basıncında artış gibi klinik bulgular görölmektedir. BH meydana geldiğı zaman, hücre

içi kalsiyumun artmasına neden olan glutamat ve aspartat gibi uyarıcı nörotransmitterlerin salınmasıyla nöronlarda depolarizasyon meydana gelmektedir. Hücre içi kalsiyum, enzim kaspazlarının ve serbest radikallerin aktivasyonuna neden olur, doğrudan veya dolaylı olarak apoptotik süreçlerle bozulma gerçekleşir, bu süreçler bir dizi mekanizmayı aktive eder. Nöronal hücrelerdeki bozulma, bu hücrelere daha fazla zarar veren ve kan beyin bariyerinde (KBB) bozulmaya ve daha fazla beyin ödemeine neden olan enflamatuvar yanıtla ilişkilidir. Tüm bu süreç, birkaç arabulucu aracılığıyla da ileri veya geri düzenlenir. İkincil yaralanma aşamasından sonra, anatomik, moleküler ve fonksiyonel düzeyde yeniden yapılanmadan oluşan iyileşme periyodu gelmektedir (Galgano ve ark., 2017).

Kafatasının hacmi 3 ayrı içerikten oluşmaktadır: beyin parankimi (%83), beyin omurilik sıvısı (BOS, %11) ve kan (%6) (Smith, 2008). Bu içeriklerin her biri kafatasının içindeki homeostatik ortam için önemlidir. Bununla birlikte, intrakraniyal hacim normal bileşenlerinin hacmini aştığında, telafi edici mekanizmalar dizisi gerçekleşir. Travma esnasında oluşan mekanik etkiyle, beyinde kafatasının içinde basınç dalgası görülür. İletilen bu kuvvet değişiklikleri beyin dokusuna yansır. Dalga etkisi ve fiziksel güçle birlikte beyinde sinir uzantılarında, damarlarda, kemiklerde hasar meydana gelir (Jamieson ve Yelland, 1968). Bu travmalar sonucunda, dura dışına kanama (Jamieson ve Yelland, 1968), dura altına kanama, kontüzyonlar ve beyin içine kanamalar (Marshall ve ark., 1968) görülmektedir.

Travmatize olmuş bir beyinde hem hücre hasarına bağlı hem de KBB'nin bozulmasına bağlı ödem görülebilir. Venöz tıkanıklıktan kaynaklanan, kütle etkisi ile intrakraniyal hacimde bir artış meydana gelebilir. Beyin dokusu sıkıştırılamamaktadır, bu yüzden ödemli beyin dokusu başlangıçta omurilik bölmesinden BOS çıkışına neden olur. Özellikle venöz kökenli olan kan da beyinden uzaklaşmış olur. Eğer uygun müdahale yapılamazsa maksimum tolerasyon sınırı aşılar ve patolojik olarak beyin dokuları sıkışarak ölüm meydana gelir (Greenberg, 2006).

Son yıllarda, araştırmacılar bazı özellikli gruplarda hafif TBH'nin uzun vadeli sonuçlarına odaklanmışlardır. Bu gruplardaki kişilerin beyinleri üzerinde yapılan

patofizyolojik araştırmalarda Alzheimer benzeri bulguların görölmesi dikkat çekmiştir (McKee ve ark., 2009). BH'nin türüne göre hücresele düzeyde beyinde gerçekleşen hasar da farklıdır. Örneğın TBH'nin patofizyolojisi incelendiğinde sadece akut bir olay olmadığı, aynı zamanda doku, hücresele ve hücre altı biyolojik reaksiyonların çoklu, paralele, etkileşimli ve birbirine bağımlı basamaklarından oluşan ilerleyici ve gecikmiş bir nöron hasarı ve iyileşmesi süreci olduğu artık kabul edilmektedir. Sinir hücrelerinin birbirleriyle olan iletişiminde önemli olan aksonlar, uzun olmaları nedeniyle, beyne yönelik fiziksel travmaya karşı özellikle savunmasızdır. Bu nedenle aksonal hasar hem bölgesel hem de yaygın beyin travmalarında sık görölen bir durumdur ve tüm şiddetli TBH'larında görölebilir (Smith ve ark., 2003). Ancak ek olarak, nöron gövdeleri, dendritler ve sinapslar da TBH kaynaklı hasara maruz kalır (Merlo ve ark., 2014). Benzer şekilde, sadece nöronlar yaralanma riski altında değildir, aynı zamanda astroglia hücreleri ve miyelin oluşturan oligodendrositler de bu durumdan etkilenir (Wang ve ark., 2018).

1.1.4. Travmatik Beyin Hasarı

TBH beyinde hasara neden olan bir yaralanma türüdür. Kafatasına bir darbe gelmesi, kafanın bir yere çarpması veya sarsılması durumlarında ortaya çıkabilir. Bu durum çoğu zaman kapalı bir kafa travması olarak sonuçlanır. Bir nesne kafatasına nüfuz ettiğinde de TBH meydana gelebilir, bu da delici alet yaralanmasına bağlı açık bir kafa travması olarak isimlendirilir. TBH belirtileri hafıf, orta veya şiddetli ölçülerde olabilir. şiddetli TBH ciddi fiziksel ve psikolojik semptomlara, komaya ve hatta ölüme neden olabilir (Medline Plus, 2020). Travmatik beyin yaralanmaları kapalı kafa travması şeklinde olabilir. Kafatasına gelen darbeyele, içeri güç nüfus etmeden beyinde yaralanma veya ödem oluşabilir. Beyin sarsıntısından dolayı beyin fonksiyonları etkilenir ve hücre hasarı veya kanama görölebilir (Nall, 2021).

Günümüzde TBH morbiditesi ve mortalitesi yüksek bir acil durumdur (Peeters ve ark., 2015). Çeřitli ölkelerde farklı oranlarda olmakla birlikte TBH'nin büyük kısmı dūřmelerden ve araçla yapılan kazalardan kaynaklanmaktadır. Yařa göre bakıldığında;

bebeklik döneminde kaza dışı travmalar, çocuklarda düşmeler, gençlerde spor kaynaklı travmalar, erişkinlerde araç kazaları ve yaşlılarda da düşmeler ön plandadır (Corrigan ve ark., 2010). TBH geçirmiş hastaya klinik yaklaşımda durumun ciddiyetini belirlemek üzere hafif, orta, ağır gibi sınıflamalar yapılır. Bu amaçla en sık Glasgow Koma Skalası (GKS) kullanılmaktadır (Sternbach, 2000). GKS'ye göre, şiddetli (GKS 3-8), orta (GKS 9-12) ve hafif (GKS 13-15) şeklinde sınıflama yapılır. Bu tarz sınıflamalar kullanılarak hastalara müdahale edilmektedir. Bunun yanında bilgisayarlı tomografi de klinik yaklaşımda önem taşımaktadır (Sternbach, 2000).

1.1.5. Beyin Hasarında Biyobelirteçler

Serum biyobelirteçleri, birçok organ hasarının tanısında yaygın biçimde kullanıldığı gibi BH'nin göstergesi olarak da sıkça kullanılmaktadır. Ancak BH'yi gösterecek tek bir değişken bulmak oldukça zordur. Beyin kompleks bir organdır ve diğer organlara göre daha az homojen yapısı vardır. Bu yüzden, BH'nda ölen tek bir doku veya tek bir hücre değildir. Dolaşıma karışan enzimler veya proteinler farklı hücrelere ait olduğu için tek bir belirtecin kullanılması zordur. Bu yüzden, tanı ve prognoz açısından klinik bulgular dışında, radyolojik bulguların da değerlendirilmesi gerekmektedir (Berger, 2006).

TBH sonrası hücrede genomik, proteomik ve lipidomik değişiklikler meydana gelirken, TBH oksidatif stres, nörotransmitter disfonksiyon ve mitokondriyal yetmezlik gibi farklı süreçleri de etkilemektedir. Bu nedenle, TBH tanısında biyobelirteçlerin kullanılması ikincil beyin hasarını ve uzun vadede olabilecek bozuklukları en aza indirmek, klinik öngörüü arttırmak ve seçilecek tedavi yöntemlerinin uygunluğunu belirlemek için büyük önem taşımaktadır (Kochanek ve ark., 2008 ve Sandler ve ark., 2010). Bu amaca yönelik, TBH hastalarında biyobelirteç seviyeleri, BOS, serum, plazma ve/veya tam kan gibi erişilebilir biyolojik sıvılarda ölçülebilmektedir. TBH hasta gruplarında biyobelirteç seviyeleri, yaralanmamış sağlıklı kontrol popülasyonuna kıyasla akut fazda (yaralanma sonrası 3 saat ila 24 saat) yüksektir. Ayrıca, biyolojik sıvıda tespit edilen biyobelirteç, ana kaynak olarak yaralı beyinden

türetilmeli veya kaynaklanmalıdır. TBH özgü biyobelirteçler, çeşitli immünolojik test yöntemleri kullanılarak kolayca belirlenmeli ve ölçülmelidir. Yine benzer şekilde, bu biyobelirteçler Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA; U.S. Food and Drug Administration) tarafından kabul edilen tahlil performans gereksinimlerini karşılamalı; tekrarlanan testlerde güvenilir ve tutarlı sonuçlar vermelidir. Bu biyobelirteçler, GKS ve bilgisayarlı tomografi anormalliği ile tespit edildiği gibi TBH'nin şiddetine duyarlı olmalıdır. Ayrıca, BH'nı takiben 48 saatlik bir zaman diliminde biyolojik sıvılardan birinde tekrarlanan tespitlere izin vermelidir (İlgınel ve ark., 2018 ve Wang ve ark., 2018).

Son on yılda birçok farklı molekülün TBH'nın potansiyel biyobelirteçleri olarak test edildiği ve bunların amaca uygun olarak kullanılabileceği literatür çalışmalarıyla kanıtlanmıştır. Ancak, şimdiye kadar hiçbir molekülün, nöral doku hasarının derecesini tahmin etmek veya sonucun tahminine yardımcı olmak için kapsamlı bir klinik tanı aracı olarak kullanılacak kadar spesifik ve hassas olduğu kanıtlanmamıştır. TBH'nın potansiyel biyobelirteçleri olarak nöron spesifik enolaz (NSE), tümör nekroz faktör-A (TNF- α), gliyal fibriller asit proteini (GFAP), S100B protein, interlökin-6 (IL-6), miyelin temel proteini, spektrin parçalanma ürünleri (SBDP), ubikuitin C-terminal hidrolaz-L1 (UCH-L1), tau proteinleri de dahil olmak üzere farklı moleküller ve cinsiyet hormonları için araştırmalar yapılmış ve bu amaçla kullanılabilecekleri kanıtlanmıştır (Forde ve ark., 2014). Şimdiye kadar kullanılan biyobelirteçlerin kapsadığı süreçler aksonal yaralanma, dendritik yaralanma, nöronal hücre gövdesi hasarı, demiyelinizasyon, sinaptik yaralanma ve astroglia hücre hasarı ve mikroglia yanıtlarını içermektedir (Zetterberg ve Blennow, 2016). Bu amaçlarla kullanılan biyobelirteçlere bakılacak olursa:

Nöron hücresi gövde hasarı: NSE (Berger ve ark., 2002 ve Böhmer ve ark., 2011) ve UCH-L1 (Kobeissy ve ark., 2006).

Astroglial biyobelirteçler: GFAP (Okonkwo ve ark., 2013), S100B protein (Cervellin ve ark., 2012).

Tüm hücre ölümü biyobelirteçleri olarak spektrin parçalanma ürünleri: SBDP150, SBDP145, SBDP120 (Pike ve ark., 2001 ve Yokobori ve ark., 2015).

Gecikmiş aksonal yaralanma ve demiyelinizasyon biyobelirteçleri: Nörofilament proteinler (Posmantur ve ark., 1998) ve temel miyelin proteinleri (Ringger ve ark., 2004).

Subakut, kronik TBH biyobelirteçleri: IL-1 β , IL-6 IL-8 ve TNF- α (Gordon ve ark., 2006), tau protein ve amiloid-beta peptidleri (A β 1–40, A β 1–42) (Sorokina ve ark., 2010) sıklıkla kullanılmaktadır.

1.1.6. Beyin Hasarında Leptin

Başlangıçta bir tokluk hormonu olduğu düşünülen Leptin'in, zaman içerisinde yapılan araştırmalar ile çok farklı amaçlar için kullanılabilecek bir molekül olduğu bulunmuştur (Otero ve ark., 2005). 1994 yılında klonlandığından bu yana, Leptin'in enflamatuar yanıtı düzenlemedeki rolü giderek belirginleşmiştir. Hem Leptin'in yapısı hem de reseptörünün yapısı, Leptin'in bir sitokin olarak sınıflandırılabilceğini göstermektedir (Fantuzzi ve Faggioni, 2000). Leptin'in sekonder yapısı, IL-6, IL-1, lösemi inhibitör faktörü ve siliyer nörotrofik faktörü içeren uzun zincirli sarmal sitokinler ailesi ile benzerliklere sahiptir (Zhang ve ark., 1997). Leptin reseptörleri diyabet geni tarafından kodlanmaktadır. IL-6 tipi sitokin reseptörlerinin glikoprotein 130 sinyal ileten alt biriminin homologudur (Baumann ve ark., 1996). IL-1, IL-6, TNF- α veya lipopolisakkarit dahil olmak üzere farklı enflamatuar uyaranların Leptin mRNA ekspresyonunu ve ayrıca Leptin seviyelerini düzenlediği birçok çalışmada gösterilmiştir (Sarraf ve ark., 1997).

Ayrıca, Leptin enflamatuar düzenleyici hücreler tarafından üretilmektedir (Sanna ve ark., 2003). Bununla beraber, Leptin, C- reaktif protein (CRP), TNF- α ve IL-6 üretimini arttırır, bu da Leptin salgılanmasının enflamatuar süreçte katılabileceğinin göstergesidir (Wolf ve ark., 1999).

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada Leptin'in sinir sisteminde de önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Matarese ve ark. (2001) deneysel otoimmün ensefalomyelit ile ilgili yürüttükleri bir çalışmada, Leptin eksikliği olan farelerin multipl skleroz gelişimine direnç gösterdiği bulunmuştur. Sanna ve ark. (2003) yürüttükleri bir çalışmada ise, Leptin'in otoimmün ensefalomyelit sırasında merkezi sinir sistemine sızan hem makrofajlar hem de T hücreleri tarafından eksprese edildiği gösterilmiştir. Leptin'in merkezi sinir sistemindeki enflamatuvar hastalıkların gelişimine katılabileceği ve beyin hasarının, Leptin gen ekspresyonunu indükleyebilen IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi çeşitli enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Baker ve ark., 1974; Faggioni ve ark., 2001 ve Otero ve ark., 2006).

Brown ve ark. (2008) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, beyin korteksi Leptin mRNA ekspresyonu ve serum Leptin düzeyinin iskemik fare beyinde ve TBH olan sıçanlarda yüksek olduğu görülmüştür. Sierra-Johnson ve ark. (2007) yaptıkları çalışmanın sonucunda, erişkinlerde intraserebral kanama sonrası, plazmadaki yüksek Leptin seviyesinin mortalite ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Dong ve ark. (2010) yetişkinler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, intraserebral kanamadan sonra plazma Leptin seviyesinin arttığını göstermişlerdir, hasta gruplarındaki yüksek Leptin seviyeleri, kötü klinik sonucu ve ölümü iyi öngörmekteydi. Ayrıca bu çalışmada intraserebral kanamada plazma Leptin seviyesinin CRP seviyesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Elde edilen bulgular Leptin'in beyin hasarının inflamatuvar sürecine katkıda bulunabileceğini düşündürmekteydi.

Lin ve ark. (2012) yürüttükleri bir çalışmada TBH olan çocuklarda plazmadaki yüksek Leptin seviyelerinin 6 aylık ölümü potansiyel olarak predikte ettiği sonucu çıkmıştır. Bu çalışmada kabul edilen plazma Leptin seviyeleri, tüm hastalarda sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı derecede artmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Leptin'in prognostik değeri, 6 aylık klinik sonuç için GKS'dakine benzer bulunmuştur. Toklu ve ark. (2018) sıçan frontal korteksi ve beyinciğinde aşırı basınç patlama yaralanmasına bağlı olarak oksidatif stres ve nöroinflamasyon yanıtına baktıkları bir çalışmada, serumda NSE, TNF- α ve Leptin'in seviyelerinin yükseldiği yükseldiği

belirtilmiştir. Serum Leptin seviyesi, patlamaya maruz bırakılan sıçan gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P < 0,01$) (Toklu ve ark., 2018). Sonuç olarak yapılan çalışmalarla, Leptin'in TBH'nda yeni bir prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceği kanıtlanmıştır.

1.2. Biyosensörler

İngilizcede “sense”, yani algılama kelimesinden türetilen sensör kelimesi algılayıcı anlamında kullanılan bir terimdir. Genel olarak, sensörler, kontrol ve süreç elektroniği, yazılım ve algılayıcı ağı içeren cihaz ya da sistemler olarak da tanımlanabilmektedir. İnsan veya hayvanların duyu organları olan burun, kulak, göz, dil ve deri, sensör olarak verilecek temel örneklerdir. Kimya laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan turnusol kâğıdı da sensörlere örnektir. Sensörler, kimyasal ve elektronik yanıtları, okunabilir sinyallere dönüştüren cihazlardır. Kimyasal reaksiyona bağlı olarak turnusol kâğıdında meydana gelen renk değişimi, görünür ışık altındaki absorbans değişikliğinden kaynaklanmaktadır. Bir başka örnek ise pH metrede okunan dijital cevaptır, bu cevap çözelti ve elektrot arasındaki potansiyel değişimine bağlı olarak elde edilmektedir (Arregui, 2010; Borisov ve Wolfbeis, 2008; Dubach ve Clark, 2013; Kurbanoglu, 2016 ve Thevenot ve ark., 2001).

Sensörler, bulundukları ortam içerisinde meydana gelen fiziksel veya kimyasal değişikliklere ve bu ortamda bulunan madde miktarına bağlı olarak cevap üretirler. Kütle, sıcaklık, iletkenlik, kuvvet veya ses gibi fiziksel değişimleri okunabilir sinyallere dönüştüren sensörler fiziksel sensörler iken, ortamdaki kimyasal değişimleri okunabilir sinyallere dönüştüren sensörler kimyasal sensörler olarak sınıflandırılabilir. Biyosensörler ise hedef analitin tanınmasından sorumlu olan biyolojik bir molekül varlığında, analit ile biyolojik molekül arasında meydana gelen reaksiyondaki değişimi ölçen sensörlerdir (Borisov ve Wolfbeis, 2008; Buerk, 1993; Eggins, 2002; Janata ve ark., 1994 ve Tamayo ve ark., 2013).

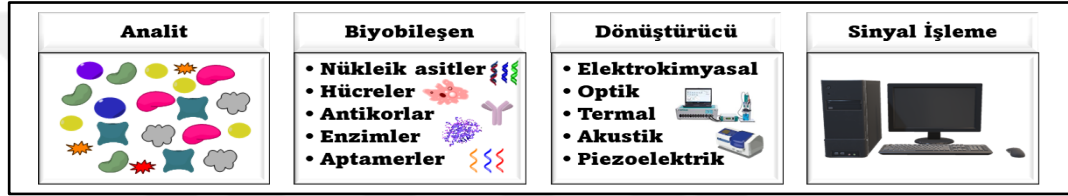
Clark ve Lyons'un (1962) kandaki glukoz miktarının ölçülmesi için geliştirdikleri sistem biyosensörlerin ilk keşfidir. Bu çalışmada platin elektrot yüzeyine oksido-redüktaz enzimi olan glikoz oksidaz bir diyaliz membranı kullanılarak immobilize edilmiştir. +0,6 V'da hidrojen peroksit oluşumu ve elde edilen sinyalin izlenmesine dayalı olarak tasarlanan bu sensör sayesinde ilk biyosensör oluşturulmuştur.

Canlılar mükemmel sayılabilecek algılama ve tepki mekanizmalarına sahiptir. Bu algılama ve tepki mekanizmaları da biyosensörlerin ortaya çıkmasında önemli rol oynamıştır. Müren balıkları tonlarca su içerisindeki az bir miktarda bulunan yabancı maddeyi algılayabilirken, kelebekler ise partnerlerinin bıraktığı çok az miktardaki maddeyi algılayabilme yeteneklerine sahiptir. Yosunlar toksik ve zararlı maddelere karşı oldukça duyarlı iken, köpeklerdeki koku alma duyuları insanlara göre yüz bin kat daha iyidir. Canlılara bu algılama özelliklerini veren biyolojik moleküllerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi, biyosensörlerin temelini oluşturmaktadır (Buerk, 1993; Chen ve ark., 2013; Gronow, 1991 ve Turner, 2013).

Biyosensörler, biyolojik algılama elemanın (Biyobileşen) mükemmel seçicilik özelliklerini ve gelen bilgiyi okunabilir kullanışlı bir sinyale dönüştüren modern elektronik teknikleri (Dönüştürücü) birleştiren sistemlerdir. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)'ın yaptığı tanıma göre biyosensörler, dönüştürücü ile doğrudan bağlı olan, bir biyobileşen kullanılarak ayrıntılı kantitatif bilgi sağlayan entegre bir cihazlardır (Thevenot ve ark., 2001).

Biyosensörlerin temel çalışma mekanizması, hedef analitin çözelti ortamından biyobileşene doğru difüzyon yoluyla taşınması ve bu sayede analit ile biyobileşenin duyarlı bir şekilde reaksiyona girmesine dayanmaktadır. Analit ile biyobileşen arasında gerçekleşen bu reaksiyon sonucunda, yeni bir ürünün oluşması, elektron transferi, pH değişimi veya ısı salınımı gibi farklı dönüşümler meydana gelmektedir. Dönüştürücü yakınında meydana gelen bu değişimler, dönüştürücülerin kendi özelliklerine göre optik, elektrokimyasal veya termal gibi anlamlı bir sinyal olarak görülmektedir (Altay, 2021 ve Sezgintürk, 2020).

Biyosensörler temel olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Biyosensörler için farklı sınıflandırmalar yapılsa da temel olarak biyobileşen ve dönüştürücü kısımlarına göre sınıflandırma en yaygın kullanılanlardır. Hedef analite spesifik olarak bağlanabilen antikor, enzim, hücre, nükleik asit veya aptamer gibi katalitik ve affinite özellikler taşıyan biyolojik moleküller, biyobileşenleri oluşturmaktadır. Analit ile biyobileşen arasında gerçekleşen biyokimyasal reaksiyon sonrasında ortaya çıkan bilgiyi anlamlı sinyale dönüştüren ve elektrokimyasal, optik, termal, piezoelektrik veya manyetik özellikleri bulunan elektronik cihazlar ise dönüştürücü kısmını oluşturmaktadır (Şekil 1.1.) (Thevenot ve ark., 2001 ve Tüylek, 2017).



Şekil 1.1. İdeal bir biyosensörün şematik gösterimi

İdeal bir biyosensörde bulunması gereken özellikler;

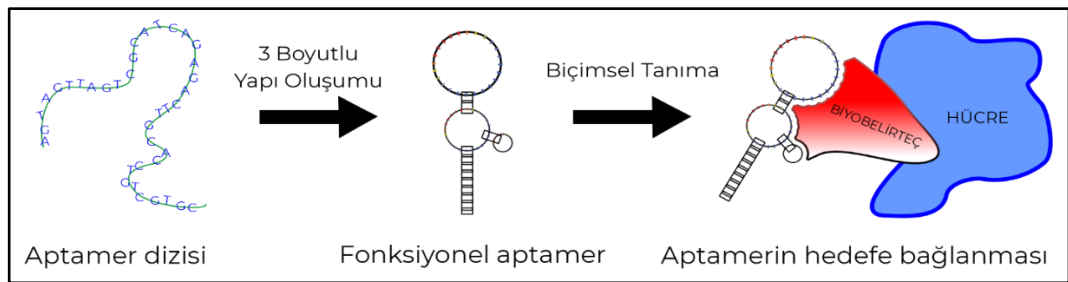
- Kullanılacak biyobileşen hedef analite karşı oldukça spesifik olmalıdır.
- Ortam koşullarına göre değişebilecek sıcaklık ve pH etkenlerden mümkün olduğunca az etkilenmelidir.
- Elde edilen cevaplar cihaz veya ortam kaynaklı gürültülerinden arındırılmış olmalıdır.
- Geliştirilen biyosensör uzun kullanım ömrü sergilemelidir.
- Değişen ölçüm ortamlarında tekrarlanabilir ve kararlı olmalıdır.
- Geliştirilen biyosensörün yüksek duyarlılığa sahip olması ve istenilen düzeyde tayin sınırına imkân sağlaması gerekmektedir.
- Geliştirilen biyosensörün geniş bir ölçüm aralığı sergilemesi ve minimum kalibrasyon gereksinimine ihtiyaç duyması gerekmektedir.
- Klinik uygulamalarda kullanılabilir olması için biyoyumluğu yüksek olmalı ve toksik etkileri olmamalıdır.

- Geliştirilen biyosensör basit, ekonomik ve küçültülerek taşınabilir nitelikte olmalıdır (Altay, 2021 ve Grieshaber ve ark., 2008).

Bu tez çalışması kapsamında biyobileşen olarak aptamerler ve dönüştürücü olarak elektrokimyasal yöntemler kullanıldığı için aptamer tabanlı elektrokimyasal sensörler daha ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

1.3. Aptamerler

Aptamerler, hedef analitlere karşı yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanabilme yeteneklerine sahip sentetik ve tek iplikli deoksiribo nükleik asit (DNA) veya ribonükleik asit (RNA) oligonükleotidlerdir. Aptamer kelimesi, Latince de ‘uymak’ anlamına gelen ‘aptus’ ve birim anlamına gelen ‘meros’ kelimelerinin birleşmesiyle türetilmiş ve ‘uyumlu olan birim’ anlamına gelmektedir. İlk olarak, 1990 yılında birbirinden bağımsız üç farklı araştırma grubu tarafından bildirilen aptamerler, spesifik üç boyutlu yapılarını kendilerine özgü sekonder ve tersiyer katlanmalar yaparak oluşturabilmektedir. Bu sayede aptamerler, Şekil 1.2’de gösterildiği gibi ilaçlara, pestisitlere, amino asitlere, enzimlere, ökaryotik hücrelere ve diğer birçok hedef moleküllere yüksek etkinlik ve özgünlükle bağlanabilirler (Bayraç ve Kandemir, 2018; Ellington ve Szostak, 1990; Robertson ve Joyce, 1990 ve Tuerk ve Gold, 1990).

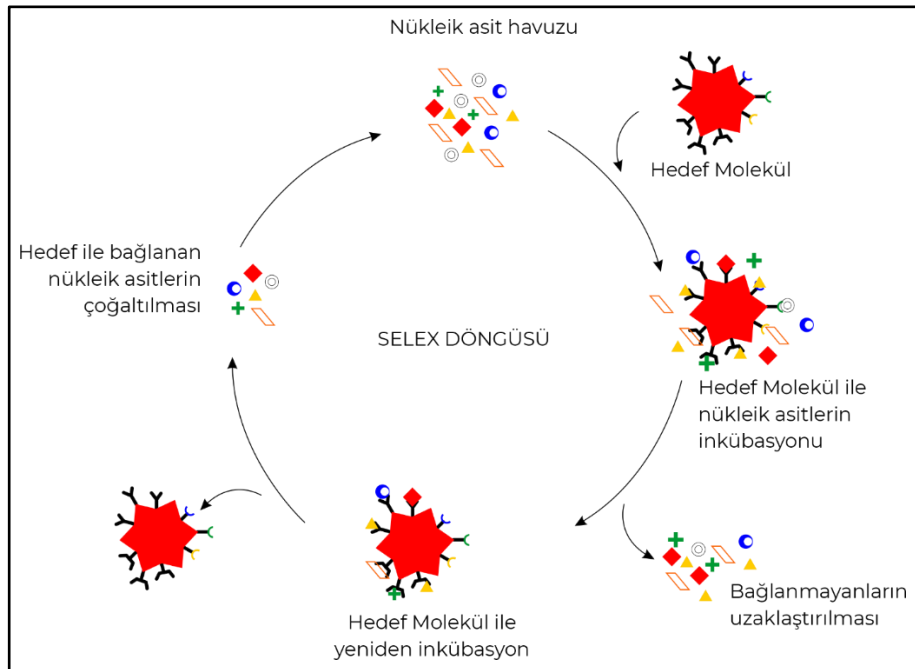


Şekil 1.2. Aptamer ile hedef analit arasında gerçekleşen etkileşimin şematik gösterimi (Sun ve Zu, 2015)

Aptamerler, keşfedildikleri ilk yıllardan bu yana biyosensörlerin biyobileşen elemanı olarak, klinik analizler, hastalıkların teşhisi için geliştirilen sensörler ve yeni

ilaç tasarımları dahil birçok alanda uygulamaları bulunan biyolojik moleküllerdir. Aptamerlerin biyolojik tanıma elemanı olarak kullanıldığı biyosensörler, aptasensör olarak adlandırılmaktadır. Son yıllarda, aptasensörler, eser element tayininde, çevresel kirlenmelerin analizinde, biyobelirteçlerin miktar tayininde ve çeşitli teşhis alanlarında gereksinimleri karşılayabilecek güçlü bir analitik teknik olarak dikkat çekmektedir (Baird, 2010 ve Bilici, 2019).

Aptamerler, ilaçlar, metal iyonları, proteinler ve hatta bütün hücreler gibi hedef analitlere spesifik olarak SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment; Üstel Zenginleştirme ile Ligandların Sistematik Evrimi) yöntemi kullanılarak üretilirler (Şekil 1.3). SELEX yöntemi sayesinde, *in vitro* ortamda bir oligomer kütüphanesi (rastgele dizilim havuzu) kullanılarak, hedef analit için analitin şekline, nükleotit dizilimine ve yapısında bulunan tanıma reseptörlerine bağlı olarak aptamer dizilimi seçilebilmektedir. SELEX yöntemi, hedef analite karşı en uygun aptamer diziliminin seçilmesi için tekrarlı olarak gerçekleştirilen 3 ana basamaktan oluşmaktadır (Song ve ark., 2012; Stoltenburg ve ark., 2007 ve Zhuo ve ark., 2017).



Şekil 1.3. SELEX yönteminin şematik gösterimi (Zhuo ve ark., 2017)

Birinci basamak rastgele DNA veya RNA oligonükleotitlerini içeren oligomer kütüphanesinin oluşturulmasıdır. İkinci basamakta aday aptamer dizilimlerinin hedef analit ile etkileşimi gerçekleştirilir ve son basamakta ise, hedef analit ile etkileşime giren aptamer dizilimleri çoğaltılarak saflaştırılmaktadır. SELEX yönteminde ilk olarak, 10^{13} - 10^{18} rastgele tek iplikli DNA veya RNA oligonükleotitlerinden oluşan kütüphane, optimum sıcaklık ve uygun tampon çözelti ortamında hedef analit ile inkübe edilmektedir. Aptamer diziliminin belirlenmesi için ikinci basamakta, bu kütüphanede bulunan oligonükleotitlerin sadece %0,1-0,5'i hedef analit ile etkileşime girmektedir. Hedef analit ile etkileşime girmeyen diğer oligonükleotitler ise ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Sonraki basamakta ise olası aptamer dizilimleri etkileşime giren oligonükleotitler arasından olduğu için bu oligonükleotitler hedef analitten ayrıştırılmaktadır. Ayrıştırılan bu oligonükleotitler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak çoğaltılmaktadır ve SELEX döngüsü 8-15 kere tekrar edilmektedir. Son olarak, hedef analite spesifik olarak belirlenen aptamer dizilimleri tekrar saflaştırılarak, dizi analizinin gerçekleştirilmesiyle işlem tamamlanır. Günümüzde de SELEX yöntemi, hedef analit karşı en güçlü bağlanma afinitesi sergileyen aptamerin *in vitro* olarak seçilmesi için temel yöntem olarak tercih edilmektedir (Kılıç, 2021 ve Zhuo ve ark., 2017).

Aptamerlerin hedef analite bağlı olarak konformasyonel değişimler göstermelerinin yanı sıra birçok avantajları sayesinde aptasensörlerin uygulama alanları günden güne artmaktadır. Aptamerler, biyosensörlerde biyobileşen olarak kullanılan enzim veya antikor gibi moleküllere kıyasla daha küçük boyutadırlar. Bu sayede aptamerler iyonlar gibi daha küçük hedef analitelere bağlanabilirler (Zhou ve ark., 2014 ve Wang ve ark., 2015).

Aptamerler, genellikle 20-100 farklı DNA ya da RNA bazından oluşan kısa oligonükleotid dizilimleri ve daha kararlı moleküllerdir. Bu sayede özellikle elektrokimyasal yöntemlerde kullanılan elektrot yüzeylerine immobilizasyonları yüksek yoğunluklarda dahi mümkün olmaktadır. Oligonükleotitlerden oluşan aptamerler, sıcaklık ve pH gibi değişebilen ortam koşullarında daha stabildir. Enzimler veya antikorlar aşırı ortam koşullarında denatüre olurlar, ancak, aptamerler ortam

koşulları yeniden tersine çevrildiğinde üç boyutlu yapılarını yeniden kazanırlar. Bu da daha uzun saklama ve kullanım süresi gibi avantajlar sağlar (Catuogno ve Esposito, 2017 ve Hamula ve ark., 2008).

Hedef analit için spesifik aptamer dizilimleri belirlendiği takdirde karmaşık sistemlere gerek duyulmadan, büyük miktarda, yüksek tekrarlanabilirlik ve saflıkla kolayca daha az maliyetle sentezlenebilirler. Antikorlar veya enzimlerin üretilmesi için (~6 ay) bir canlıya ihtiyaç duyulurken, aptamerlerin *in vitro* olarak seçilebilmesi ve üretiminde (~3-7 hafta) herhangi bir canlıya ihtiyaç duyulmaması toksisite açısından da avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, aptamerler afinite ve kararlılıklarını kaybetmeden farklı uygulamalar için floroforlar, nanopartiküller, enzimler, amino (-NH₂) ya da tiyol (-SH) gibi gruplarla kolayca modifiye edilebilirler (Catuogno ve Esposito, 2017; Chen ve Yang, 2015 ve Hamula ve ark., 2008).

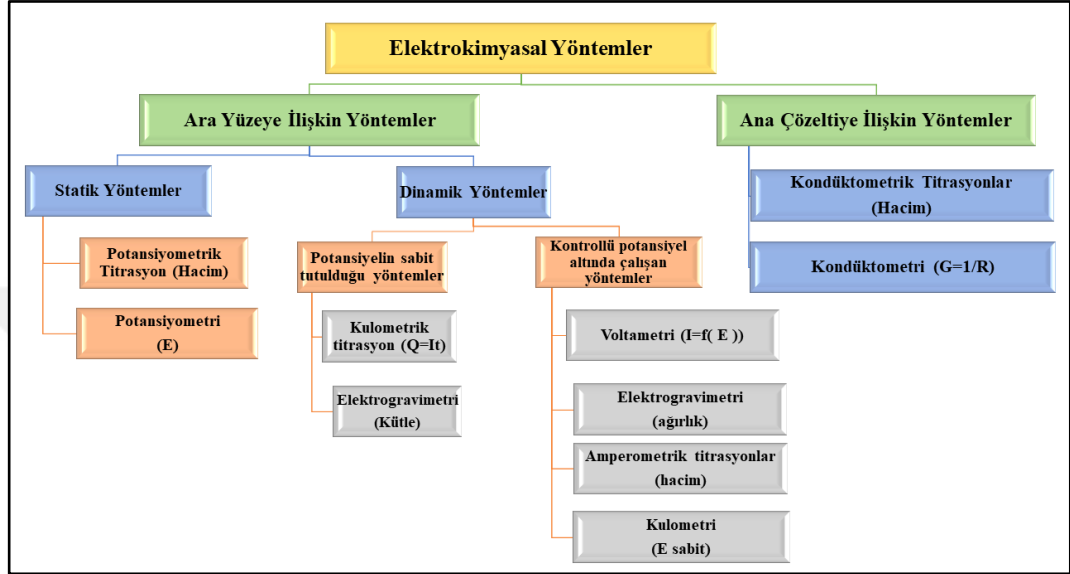
1.4. Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimya, temel olarak kimyasal süreçleri, elektrik enerjisi ile bir araya getiren kimyanın bir alt alanıdır. Elektrokimya elektrot-çözelti ortamına dışarıdan bir elektriksel etkinin yapılması ile oluşan akım, potansiyel veya zaman gibi cevapların incelendiği yöntemlerin tümünü kapsamaktadır. Elektrokimyasal yöntemlerde elektron alışverişinin gerçekleştiği yükseltgenme/ indirgenme reaksiyonları elektriksel iletkenliğe sahip iki elektrodun varlığından elektrokimyasal bir hücrede gerçekleşir (Kelter ve ark., 2009).

Elektrokimyada kullanılan elektrotlarla temas halinde bulunan ve bu elektrotlar ile elektron alışverişini sağlayabilen çözelti ile elektrotlar arasında oluşan ara yüzeydeki kimyasal/fiziksel değişiklikler esastır (Bozal Palabıyık, 2015).

Elektrokimyasal hücrelerde yükseltgenme reaksiyonları anot bölümünde gerçekleşirken, indirgenme reaksiyonları ise katot bölümünde gerçekleşmektedir. Bu hücreler genel olarak galvanik ya da elektrolitik olmak üzere iki farklı şekilde

sınıflandırılabilir. Kimyasal reaksiyona bağlı olarak oluşan enerjinin elektrik enerjisine kendiliğinden dönüşümü galvanik hücrelerde meydana gelirken, elektrolitik hücrelerde elektrik enerjisi bir dış kaynaktan sağlanmalıdır. Elektrokimyasal yöntemler detaylı olarak Şekil 1.4'teki gibi sınıflandırılabilir (Skoog ve ark., 2007).



Şekil 1.4. Elektrokimyasal yöntemlerin sınıflandırılması (Skoog ve ark., 2007)

Elektrokimyasal çalışmalar genellikle iki ya da üç elektrodun bulunduğu hücrelerde gerçekleştirilmektedir. Bu hücrelerde elektronların hareketlerine göre potansiyellerini ölçmek veya kontrol etmek için metal veya yarı iletken malzemelerden yapılmış elektrotlar kullanılmaktadır. Elektrokimyasal hücreler kullanılan elektrot sayısına göre tanımlanmaktadır. Yapılacak analize göre de elektrot sayısı değişiklik göstermektedir. İki elektrotlu sistemlerde bir tane çalışma elektrodu ve bir tane de potansiyeli sabit olan referans elektrot bulunur. Elektrokimyasal analizlerde en sık kullanılan hücreler ise üç elektrotlu sistemlerdir. Üç elektrotlu sistemlerde çalışma ve referans elektrotlara ek olarak yardımcı (karşıt) elektrot bulunur (Wang, 2006).

Çalışma elektrodu: Bir elektrokimyasal hücrede kullanılan çalışma elektrodu analit ile ilgili kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği elektrottur. Çözeltideki analit veya elektroaktif moleküllerin elektron alışveriş reaksiyonları çalışma elektrodunun

yüzeyinde gerçekleşmektedir. Çalışma elektrodunun potansiyeli referans elektroda bağlı olarak değişmektedir. Günümüzde, karbon temelli katı elektrot olarak camı karbon elektrot (CKE), karbon pasta elektrot veya perde baskılı karbon elektrotlar ya da metal temelli katı elektrotlar olarak platin, altın ve gümüş elektrotlar en çok tercih edilen elektrotlardır (Bard ve ark., 2008).

Referans elektrot: Referans elektrot, ideal olarak polarize olmayan bir davranış sergileyen, sabit ve bilinen bir potansiyeli olan elektrottur. Bu elektrodun potansiyeli analit ve elektroaktif moleküllerin derişiminden etkilenmez. Bu yüzden çalışma elektrodunun potansiyelinin karşılaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Ag/AgCl elektrot ve doymuş kalomel elektrotların (Hg/Hg_2Cl_2) referans elektrot olarak kullanımı daha yaygındır (Bard ve ark., 2008).

Yardımcı (karşıt) elektrot: Yardımcı elektrotlar, elektrokimyasal hücredeki elektrik akımının çözelti içinden geçirilip çalışma elektroduna aktarılması için kullanılan elektrotlardır. Yardımcı elektrotların kimyasal olarak inert olması ve elektriği iyi ileten malzemelerden seçilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, platin ve titanyum gibi metal elektrotlar en çok tercih edilendir (Bard ve ark., 2008).

Analiz edilecek hedef analitin kütlesi, iletkenliği veya hücrenin elektriksel kapasitesinin ölçüldüğü ana çözeltiye ilişkin yöntemlerin çalışma prensibi, hücrenin içindeki kütlenin omik impedansın ölçülmesine dayanmaktadır. Hücredeki tüm iyonlar iletkenliği etkileyebilmektedir bu yüzden kondüktometri gibi bu yöntemler yeteri kadar spesifik değildir (Ivaska, 2008).

Çalışma elektrodu yüzeyinde meydana gelen kimyasal tepkimelere dayalı yöntemler, kullanılan elektrodun polarize olup olmamasına bağlı olarak ikiye ayrılır. Polarize olmayan elektrotların kullanıldığı yöntemlerde tepkimeler denge halindedir. Potansiyometride olduğu gibi hücrenin termodinamik niteliklerinin dikkate alındığı bu yöntemlerde elektrot tepkimesi için elektroda dışarıdan bir gerilim uygulanır (Ivaska, 2008).

Polarize elektrotların kullanıldığı yöntemler olarak voltametri ve kulometri diğer yöntemlere kıyaslandığında spesifik ve hassasiyetleri bakımından öne çıkmaktadır. Voltametrik yöntemlerde hücre içinden geçen elektrik akımı, uygulanan gerilimin bir fonksiyonu olarak ölçülmektedir ve hedef analitin derişimine bağılı olarak doğrusal davranış sergilemektedir (Ivaska, 2008).

Tez çalışmaları kapsamında kullanılan elektrokimyasal yöntemler gereç ve yöntem bölümünde detaylı olarak anlatılmıştır.

1.5. Nanomalzemeler

Geliştirilen sensörün çalışma potansiyeli veya hassasiyeti gibi birçok etmeni kontrol etmek ve hazırlanan sensöre yön verilebilmesi için çalışma elektrodunun yüzeyini modifiye etmek sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Günümüzde malzeme bilimi ve elektronik cihazlardaki gelişmeler, elektrokimyasal sensörler ile elde edilmesi istenen yüksek duyarlılık, seçicilik ve kullanım kolaylığı gibi gereksinimlerin karşılanmasında fayda sağlamaktadır. Boyutları 100 nanometre ve altında olan nanoboyutlu malzemelerin elektrokimyasal sensörlere entegre edilmesi, yüksek hassasiyet, seçicilik ve kullanım kolaylığı sağlayan biyosensörlerin geliştirilmesinin önünü açmıştır (Xie ve ark., 2022).

Çalışma elektrotlarının yüzeyini modifiye etmek için nanomalzemelerin kullanılmaya başlanması 1990'lu yıllara dayanmaktadır. Nanomalzemeler, polimerler veya biyomalzemeler gibi çeşitli modifikasyon ajanları bu amaçla kullanılırken, elektrodpozisyon, damlatma veya içinde bekletme gibi farklı yöntemler ile yüzeyler modifiye edilebilir (Edwards ve ark., 2007).

Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan nanopartiküller, nanoküreler, nanokristaller, nanotüpler, nanoteller veya nanoçubuklar, hacimsel yapılarına kıyasla sahip oldukları üstün kimyasal ve fiziksel özellikleri sayesinde, yüksek aktiviteli katalizörlerin geliştirilmesi, yeni sensör platformlarının hazırlanması, hidrojen

üretimi, biyolojik analiz sistemleri veya tıp da görüntüleme cihazları gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır (Kant ve ark., 2022).

Nanopartiküller kimyasal olarak oldukça aktif malzemelerdir. Bu malzemeler, iyileştirilmiş elektriksel, optik, manyetik ve mekanik özelliklere sahiptir. Yüksek yüzey/hacim oranı ve sağlayan nanopartiküller, boyutlarının yanı sıra kontrol edilebilen şekillerinin ve morfolojilerinin sayesinde ön plana çıkmaktadır (Pramanik ve ark., 2021).

Metalik ve metal oksit nanopartiküller, kolayca sentezlenebilmeleri, toksik olmamaları, uzun süreli kimyasal stabiliteleri, biyoyumlulukları, katalitik özellikleri ve sistemin elektron transfer özelliklerini iyileştirilmesi gibi avantajlar sunmaktadır. Altın nanopartiküller (Au NP'ler) yüzeylerine biyolojik moleküllerin kolay bağlanabilmesi, yüksek yüzey reaktivitesi ve kolay sentez prosedürleri nedeniyle, çok kullanılan metalik nanopartiküllerdendir. Platin nanopartiküller (Pt NP'ler) yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonları da dahil olmak üzere farklı reaksiyonlarda katalitik olarak üstün aktivite ve kararlılık sergiledikleri için literatürde sıklıkla kullanılmaktadır (Khan ve ark., 2021 ve Pingarron ve ark., 2008).

Metal oksit nanopartiküller arasında titanyum dioksit nanopartiküller (TiO₂ NP'ler) 3eV' den yüksek elektron band boşluğuna sahip ve UV bölgede absorpsiyon veren partiküllerdir. TiO₂ NP'lerin kimyasal olarak kararlı olmalarının yanı sıra, toksik olmamaları, ucuz olmaları, optik ve biyolojik özellikleri çeşitli uygulamalarda kullanımına olanak sağlamaktadır. Bir başka metal oksit nanopartikül olan çinko oksit nanopartiküller (ZnO NP'ler) geniş bant aralığına sahip ve yarı iletken olma özellikleriyle ön plana çıkmaktadır. ZnO NP'ler yüksek mekanik, termal ve kimyasal kararlılığa sahiptir. Yüksek bağlanma enerjileri, ekonomik olması, optik ve piezoelektrik özellikleri ve uygun nanopartiküller ile doplandığında sergiledikleri yüksek iletkenlikleri sayesinde çok geniş uygulama alanlarında kullanılmaktadır (Arıg, 2010 ve Shetti ve ark., 2019).

Biyosensör tasarımlarında, biyobileşenlerin en iyi immobilizasyonları için modifiye ajanlar olarak iletken veya fonksiyonelleştirilmiş polimerlerin kullanılması da dünya çapında son derece yaygındır. Polimerin en temel özelliği polimerin omurgasında ardışık olarak sıralanmış çift bağların bulunmasıdır. Karbon atomları arasında peşpeşe sıralanan tek ve çift bağlar, kuvvetli bir kimyasal bağ olan “sigma” bağı içerirken, her çift bağda daha zayıf ve az lokalize olmuş bir “pi” bağı bulunmaktadır. Ayrıca polimerlere elektron ve “boşluk” ların sayısını arttırmak için farklı dopant maddeler eklenerek iletkenlikleri artırılabilir (Gerard ve ark., 2002).

1.5.1. Moleküler Baskılı Polimerler

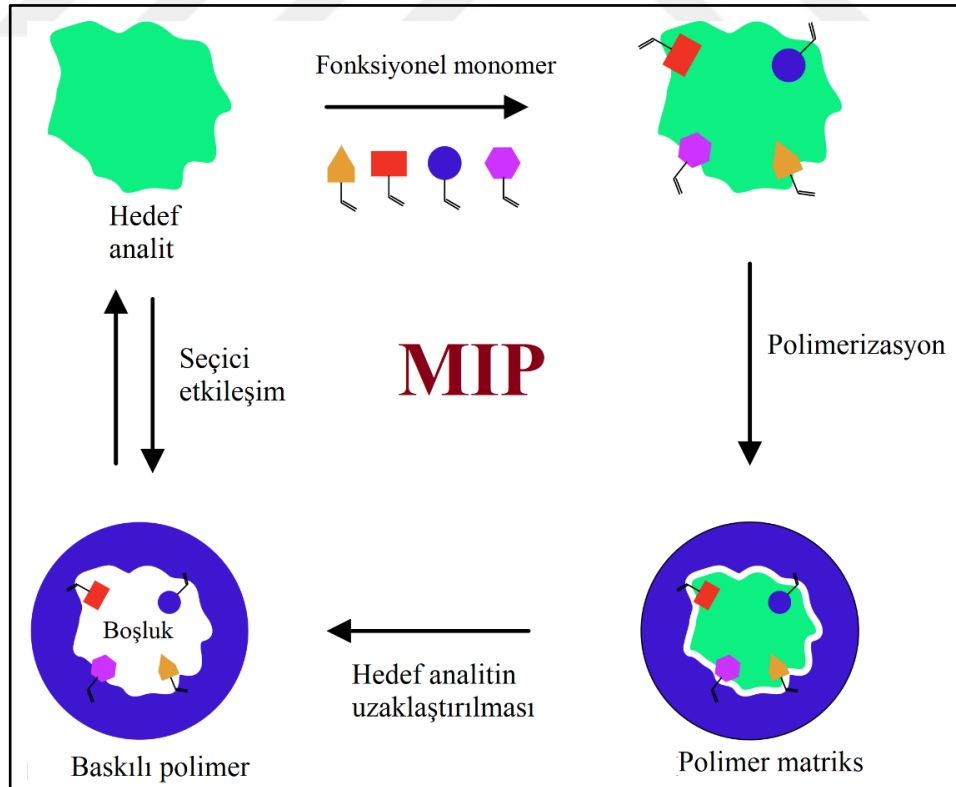
Biyosensörlerin hazırlanmasında yüksek hassasiyet ve seçicilik en önemli parametrelerdir. Son yıllarda moleküler baskılı polimerler (MIP), hedef analitin tanınması için yapay yani hedef analite özel reseptörler olarak popüler hale gelmiştir. MIP’ler, yapısal olarak benzer moleküllere kıyasla, hedef analit için yüksek afinite ve seçicilik sergilerler. Ortam koşullarındaki sıcaklık, basınç ve pH’da meydana değişimlere karşı dirençleri yüksek iken, daha uzun süre stabiliteleri sayesinde birçok uygulamada kullanılmaktadırlar. Dahası MIP’ler, kolay hazırlanma prosedürleri, hazırlık maliyetlerinin düşük olması, tekrar kullanılabilme potansiyellerinin bulunması ve çeşitli dönüştürücülere uyarlanabilmesi gibi avantajlar sunmaktadır (Alvarez-Lorenzo ve Concheiro, 2013 ve Antuna-Jimenez ve ark., 2012).

MIP’ler, antikorların ve enzimlerin karakteristik özelliği olan hedef analite seçici bağlanmayı taklit edebilen sentetik materyallerdir. MIP’lerin tasarımında asıl amaç hedef analiti biyolojik moleküller kadar iyi tanıyan sentetik reseptörlerin hazırlanmasıdır. Temel olarak MIP’ler de anahtar-kilit etkileşimine dayanmaktadır. Bu etkileşimden genellikle van der Waals bağları, hidrojen bağları, iyonik ve hidrofobik etkileşimler gibi non-kovalent bağlar etkili rol oynar. Bu bağlamda, MIP’lerin çalışma prensibi de sentetik polimerler içinde hedef analitin tanınması için yapay boşlukların oluşturulmasına dayanmaktadır. Şekil 1.5’te görüleceği gibi, MIP yüzeylerin hazırlanması temel olarak üç ana basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamak monomer ve şablon görevi gören hedef analit varlığında ön

polimerizasyon komplekslerinin oluşturulmasını kapsamaktadır. İkinci basamak ise hazırlanan kompleksin polimerizasyonunu kapsamaktadır. Son olarak, şablon görevi gören hedef analitin yüzeyden uzaklaştırılmasını içermektedir (Bozal Palabıyık ve ark., 2020 ve Selvolini ve Marrazza, 2017).

Başarılı bir MIP temelli sensörün hazırlanması için kritik öneme sahip üç konu vardır: 1) Hedef analitin yeniden bağlanması sonucu elde edilen sinyali yüksek hassasiyetle ölçebilen dönüştürücünün geliştirilmesi; 2) Hedef analit ile optimum koşullar altında yüksek afinite ve özgüllük sergileyen baskılı polimerlerin seçilmesi; 3) geliştirilen MIP sensörünün dönüştürücü ile birleştirilmesi (Saylan ve Denizli, 2019).

MIP'leri oluşturmak için 5 farklı temel bileşene ihtiyaç vardır. Bu bileşenler, fonksiyonel monomer, hedef analit (kalıp molekül), çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve çözücüdür. Stabil ve etkili bir MIP sensörü tasarımı için bu bileşenlerin en uygun şekilde seçilmesi de önem taşımaktadır (Saylan ve Denizli, 2019 ve Liu ve Dykstra, 2022).



Şekil 1.5. Hedef analit için MIP hazırlama prosedürünün şematik gösterimi (Liu ve Dykstra, 2022)

1.5.1.1. Hedef analit (Kalıp molekül)

MIP sensörlerin tasarımında analizi yapılmak istenen ilaç, pestisit, protein veya hormon gibi pek çok molekül hedef analit (kalıp molekül) olarak seçilebilmektedir. Hedef analitler polimerizasyon sürecinde kararlı kalabilmelidir. Ayrıca, bu analitlerin kimyasal yapısı, polimerizasyonu etkileyebilecek fonksiyonel gruplar içermemelidir (Moreno ve ark., 2013).

1.5.1.2. Fonksiyonel monomer

MIP tasarımında kullanılan fonksiyonel monomer, yüzeydeki boşluklara hedef analitin bağlanması için gerekli fonksiyonel grupları sağlayan en kritik bileşendir. Bu yüzden, yüzeyde stabil bir polimer tabakası oluşturmak için hedef analit ile en uygun şekilde etkileşebilen monomerin seçilmesi önemlidir. Günümüzde, ticari olarak temin edilebildikleri gibi hedef analite özgü sentezlenebilen monomerlerin ucuz, kimyasal olarak kararlı, biyouyumlu ve toksik olmamaları gerekmektedir. Anilin, orto-fenilendiamin (oPD), dopamin, etakrilik asit ve 2-akrilamido-1-etansülfonik asit gibi farklı maddeler MIP sensörlerde sıklıkla kullanılan monomerlere örnek olarak verilebilir (Adumitrăchioaie ve ark., 2018).

1.5.1.3. Çapraz bağlayıcı

Çapraz bağlayıcı, MIP sensörlerdeki boşlukları stabilize etmek, fonksiyonel bağlanma bölgelerini yerinde tutmak ve polimerin gözenekli yapısını arttırmak için kullanılan bileşendir. Ancak, çapraz bağlayıcıların kullanımı her zaman zorunlu değildir. Uygun miktarda çapraz bağlayıcı kullanılmadığı zaman, polimer yüzeyde istenilen düzeyde tanıma bölgeleri oluşmazken, aşırı miktarda kullanılırsa daha az sayıda tanıma bölgesi oluşabilir (Li ve ark., 2019).

1.5.1.4. Çözücü

MIP yüzeylerde gözenek oluşturuıcı olarak işlev gören çözücüler, polimerizasyon reaksiyonu için ortamı oluşturarak hem kütle transferini kolaylaştırmak hem de hedef analitin bağlanma bölgelerine erişimini kolaylaştırmak için kullanılmaktadır. Kovalent baskılamada metanol veya dimetilformamit gibi polar çözücüler kullanılırken, kovalent olmayan baskılamada asetronitril, kloroform veya toluen gibi polar olmayan ya da düşük polaritedeki çözücüler kullanılmaktadır (Bozal Palabıyık ve Uslu, 2020 ve Moreno ve ark., 2013).

1.5.1.5. Polimerizasyon başlatıcı

Başlatıcılar polimerizasyonun başlamasını sağlamak için kullanılan azo- veya peroksi- yapılı bileşiklerdir. MIP'ler hazırlanırken başlatıcının kullanılmasıyla elektropolimerizasyon, fotopolimerizasyon veya serbest radikal polimerizasyonu süreçleri devam ederek polimer tabakaları oluşur. Ancak, çapraz bağlayıcı gibi başlatıcının da kullanımı her zaman zorunlu değildir (Moreno ve ark., 2013).

MIP'lerin sergilediği yüksek seçicilik ve duyarlılık gibi avantajları geliştirilen sensörlerin kullanım performansını arttırmak için analitik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. MIP'ler sahip oldukları kimyasal kararlılık sayesinde tıbbi teşhis, gıda analizi ve kalite kontrolü, çevre analizi, ilaç analizi ve biyomedikal uygulamalar gibi birçok farklı alanda araştırmacıların dikkatini çekmektedir (Rahman ve ark., 2022).

Son yıllarda, MIP'ler ve aptamerler çeşitli hedef analitlerin farklı matrislerden analizi için bağımsız olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Yine de MIP ve aptamerlerin uygulamalarını sınırlayan bazı dezavantajlar bulunmaktadır. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için MIP'lerin ve aptamerlerin birleştirilmesiyle hazırlanan hibrit sensörler, çok yönlü kullanım, hedef analite karşı artan özgüllük ve afinite gibi özellikleriyle ön plana çıkmaya başlamıştır (Ali ve Ömer, 2022).

1.6. Biyosensörlerde Validasyon

İlaçlar, proteinler ve biyobelirteçler gibi kimyasal moleküllerin analizleri için geliştirilen yöntemlerin geçerliliğini göstermek metot validasyonu ile mümkün olmaktadır. Geliştirilen bir yöntemin uluslararası geçerliliğe sahip olması için, Uluslararası uyum konferansı (ICH, International Conference on Harmonization) ve FDA gibi uluslararası kuruluşlar tarafından belirlenen kurallar doğrultusunda validasyon çalışmaları yapılmalıdır (Kurbanoglu ve ark., 2018).

Geliştirilen analiz yöntemi için validasyon parametrelerinin belirlenmesi gerekliliği ilk kez 1978 yılında ABD’de ortaya atılırken, biyoanalitik yöntemlerin validasyon gereklilikleri ise 1991 yılında Karnes tarafından belirtilmiştir. 1992 yılında, Shah ve arkadaşlarının, "Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies" kongresinde yayınladıkları raporda validasyon parametreleri için değerlendirme kriterleri ve kabul edilme limitleri belirlenmiştir (Karnes ve ark., 1991 ve Shah ve ark., 1992).

Biyolojik kökenli moleküller kolaylıkla bozulabilirken, kontamine olma ihtimalleri yüksektir. Biyolojik moleküller oldukça hassas, saklama koşulları zordur. Sıcaklık ve pH gibi değişen ortam şartlarında farklı tepkimeler sergilerler. Bu yüzden, biyolojik moleküller ile çalışılırken ekstra özen ve önem gösterilmesi gerekmektedir. Geliştirilen biyosensörler genel olarak tek kullanımlık veya aynı gün içinde çok kullanımlık olarak tasarlanmaktadır. Biyosensörün raf ömrü incelenmek istenildiğinde başka maddelerden kontamine olmamasına dikkat edilerek saklanmalıdır. Tekrarlanabilirlik veya tekrar üretilebilirliklerinin değerlendirilmesi için ise farklı biyosensörler hazırlanmaktadır. Bu nedenle biyosensörlerde bağıl hata (BH) ve bağıl standart sapma (BSS) limitleri normal moleküllerin analizleri için belirlenen limitlerden daha geniştir (Aboul Enein ve ark., 2000 ve Huber, 2007).

1.6.1. İstatistiksel Hesaplamalar

Geliştirilen bir yöntem için validasyon sonuçlarının yorumlanması ve değerlendirilmesi için bazı istatistiksel hesaplamalara ihtiyaç duyulmaktadır. Temel olarak bunlar; ortalama, standart sapma, BH ve BSS'dir. Ortalama değeri sonsuz sayıdaki örnek için gerçek ortalama veya sınırlı sayıda elde edilen sonuçlar için numune ortalaması olarak iki farklı şekilde hesaplanabilir. Ancak, pratik olarak sonsuz sayıda numune sonucu elde edilemeyeceği için, numune ortalaması ($\bar{x}$) sınırlı sayıda elde edilen sonuçların deney sayısına bölünmesiyle eşitlik 1.1'den hesaplanabilmektedir. Bu eşitlikte, numune sayısı (n) ile, numunelerin ölçüm sonuçları ise (x_i) ile gösterilmektedir (Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015 ve Riley, 1996).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (1.1)$$

Standart sapma, elde edilen sonuçların birbirine yakınlığını göstermektedir. Standart sapmanın sonuçların “dağılımı” ile doğrudan ilişkilidir ve gerçek standart sapma (σ) veya numunenin standart sapması (S) olarak iki farklı şekilde hesaplanabilmektedir. Pratik olarak ölçüm sonuçlarını değerlendirmek için “S” eşitlik 1.2'den hesaplanmaktadır (Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015 ve Riley, 1996).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1.2)$$

Bağıl standart sapma (BSS), ölçüm değerleri arasındaki belirsizliğin ifade edilmesi için kullanılan bir istatistiksel terimdir. BSS, sonuçlarının dağılımının olması gereken değere uzaklığını belirtmektedir ve eşitlik 1.3'e göre % cinsinden hesaplanmaktadır (Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015 ve Riley, 1996).

$$\%BSS = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad (1.3)$$

Bağıl hata (BH, %Sapma) ise doğruluk ile ilişkili bir istatistiksel terimdir. Kaynağı bilinen ve ölçülebilen hatalar sonucunda, ölçüm sonuçlarının ortalama değeri olması gereken değerden uzaklaşır ve bu sapma % cinsinden ifade edilmektedir. Numune ortalaması ($\bar{x}$) ve kabul edilen değer (μ) kullanılarak eşitlik 1.4'teki gibi hesaplanmaktadır (Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015 ve Riley, 1996).

$$BH = \left[\frac{\mu - \bar{x}}{\mu} \right] \times 100 \quad (1.4)$$

Biyosensörler kullanılarak özellikle kantitatif amaçlı geliştirilen yöntemlerde validasyon parametrelerinden seçicilik, doğruluk, doğrusallık ve kesinliğin mutlaka belirlenmesi gerekmektedir (FDA, 2003 ve FDA, 2015).

1.6.2. Seçicilik

Seçicilik, geliştirilen bir biyosensörün validasyonu için değerlendirilmesi gereken ilk ve önemli validasyon parametresidir. Seçicilik, hedef analit için geliştirilen yöntemin analiz ortamındaki safsızlıklar, bozunma ürünleri ve diğer bileşiklerden etkilenmeden doğru ve kesin olarak tayin edilebilmesidir. Analiz ortamındaki farklı maddelerin varlığı girişim etkisine sebep olarak analiz sonuçlarında hatalara yol açabilir. Bu yüzden geliştirilen bir yöntemin seçiciliği değerlendirilirken girişim etkisi yaratmayacak ortamda elde edilen sonuçlar ile biyolojik ortamda doğal olarak bulunan moleküller, safsızlıklar ya da hedef analit ile benzer yapıdaki moleküllerin eklendiği ortamda elde edilen sonuçlar karşılaştırılmaktadır (FDA, 2003; FDA, 2015; Peters ve Maurer, 2002 ve Srinubabu ve ark., 2006).

1.6.3. Doğrusallık

Doğrusallık, artan analit derişimlerine karşı ölçülen cevabın derişim ile doğru orantılı olmasını ifade etmektedir. Doğrusallığın belirlenmesi için en az beş farklı analit derişiminin cevabına bakılmalı ve her bir derişim için en az üç kez ölçüm

yapılmalıdır. Doğrusallığın incelenmesi için analit derişimine karşı ölçülen cevaplar grafiğe geçirilerek bir doğru denklemi elde edilir. Bu doğru denkleminde hesaplanan eğim (m), kesişim (n), korelasyon katsayısı (r) ve regresyon katsayısı (r²) parametreleri kullanılarak doğrusallık ifade edilmektedir. Geliştirilen yöntem ile hedef analit derişimin en yüksek ve en düşük olduğu doğrusal aralık ‘çalışma aralığı’ olarak tanımlanmaktadır. Geliştirilen bir yöntemin doğrusal olduğunun söylenmesi için r ve r² değerlerinin 1’e oldukça yakın olması istenir (FDA, 2003; FDA, 2015; Peters ve Maurer, 2002 ve Srinubabu ve ark., 2006).

Validasyon sonuçlarına göre doğrusallığı gösteren parametrelerden yararlanılarak, geliştirilen yöntemin performansı teşhis sınırı (TS, LOD) ve tayin alt sınırının (TAS, LOQ) hesaplanmasıyla da gösterilebilir. Eşitlik 1.4 ve 1.5’ten görüleceği gibi, TS ve TAS hesaplamaya dayalı olarak, çalışma aralığında en düşük derişim için elde edilen cevabın standart sapması ve doğrusallık grafiğinin eğimi oranlanarak hesaplanabilir. TAS doğrusal çalışma aralığındaki en düşük derişimden büyük, TS’nda ise küçük olamaz (Özkan, 2012 ve Özkan ve ark., 2015).

$$TS = \frac{3,3 \times \sigma}{m} \quad (1.5)$$

$$TAS = \frac{10 \times \sigma}{m} \quad (1.6)$$

TS ve TAS, gözleme dayalı olarak da belirlenebilmektedir. TS, hedef analit için cevabın gözlenebildiği en düşük derişim noktası iken, TAS ise hedef analit miktarının kesin ve doğru olarak tayin edilebildiği en düşük derişim noktasıdır. Ayrıca, TS ve TAS değerleri sinyalin gürültüye oranlanması ile de belirlenebilmektedir. Elde edilen cevabın, ortam gürültüsüne oranı 3’e eşit olduğu nokta TS derişimi, 10’a eşit olduğu nokta ise TAS derişimi olmaktadır (Özkan, 2012 ve Özkan ve ark., 2015).

1.6.4. Duyarlılık

Duyarlılık, doğrusal çalışma aralığında elde edilen kalibrasyon doğrusunun eğimi ile ifade edilmektedir. Doğrunun eğiminin artması duyarlılığı arttırmaktadır. Duyarlılık, geliştirilen yöntemin, literatürde dahance rapor edilmiş yöntemler ile karşılaştırılması aısındannem taşımaktadır (zkan, 2012 vezkan ve ark., 2015).

Ayrıca TS değeri de duyarlılığının değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. Geliştirilen yöntem için kalibrasyon doğrusunun eğimi ne kadar büyük, TS değeri de ne kadar küçük ise yöntem o kadar duyarlıdır (zkan, 2012 vezkan ve ark., 2015).

1.6.5. Kesinlik

Kesinlik, geliştirilen bir yöntem için tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik (tekrarretilirlik) ya da tekrarlanabilirliğinls olarak hesaplanan validasyon parametresidir. Kesinlik, aynı gün veya farklı günlerde, birden fazlalm sonucunun değerlendirilmesi ile belirlenirken, elde edilen bu sonuçların birbirine yakınlığının ifadesidir. Bir yöntemin kesinliği farklı aşamada %BSS değerlerinin hesaplanması ile belirlenebilir (zkan, 2012;zkan ve ark., 2015 ve Peters ve Maurer, 2002).

Tekrarlanabilirlik: Optimum deneysel şartlarda, aynızelti, numune ve araç gereçler kullanılarak kısa bir süre zarfından gerekleştirilenlm sonuçlarının değerlendirilmesidir (zkan, 2012 vezkan ve ark., 2015).

Orta kesinlik: Geliştirilen bir yöntem ile elde edilen sonuçları etkileyebilecek gün, analizci, kullanılan cihaz veya laboratuvar içindeki farklılıklar gibi parametrelerin değerlendirilmesi için kullanılan ve %BSS ifade edilen kesinliklsdr (zkan, 2012 vezkan ve ark., 2015).

Tekrar elde edilebilirlik (tekrarretilirlik): Aynı hedef analit için, optimum analiz şartlarında geliştirilen yönteminin farklı laboratuvar ortamında veya aynı

laboratuvarlarda farklı cihazlar (farklı biyosensörler) kullanılarak daha geniş bir zaman aralığında elde edilen ölçüm sonuçlarının %BSS cinsinden ifade edilmesidir (Özkan, 2012 ve Özkan ve ark., 2015).

Her zaman zorunlu olmasa da son yıllarda kesinliğin içinde değerlendirilen tutarlılık ise geliştirilen bir yöntemin farklı laboratuvar, cihaz ve analizci ile serisi/markası değişen kimyasallar ile ölçümlerin tekrarlanmasını ifade eden validasyon parametresidir (FDA, 2003 ve FDA, 2015).

1.6.6. Doğruluk

Doğruluk, geliştirilen yöntem ile elde edilen cevapların, referans değere yakınlığının bir göstergesidir. Yöntemin doğruluğu için, elde edilen bu cevapların referans değere mümkün oldukça yakın olması istenir. Analitik yöntemlerde doğruluğun belirlenmesi için “geri kazanım” yolu izlenebilir. Geri kazanım çalışmaları, analiz ortamına dışardan ilave edilen hedef analitin, analiz ortamından hangi oranda geri kazanılabildiğini göstermek için gerçekleştirilir (FDA, 2003; FDA, 2015 ve Peters ve Maurer, 2002).

Ayrıca, doğruluk, geliştirilen yöntemin referans bir yöntem ile karşılaştırılmasıyla, hedef analitin kör matris ortamına ilave edilmesiyle ve standart ekleme yöntemleri kullanılarak değerlendirilebilir. Doğruluk için elde edilen sonuçlar %BSS ve/veya %BH değerleri raporlanarak verilir (FDA, 2003; FDA, 2015 ve Peters ve Maurer, 2002).

1.6.7. Sağlamlık

Sağlamlık, geliştirilen bir yöntemin güvenilirliğini değerlendirmek için kullanılan bir validasyon parametresidir. Ortam sıcaklığı, çözeltilerin pH'sı, kullanılan tamponların derişimi gibi deneysel şartlarda meydana gelen küçük değişiklerin analiz

sonuçlarını etkilemediğinin göstergesidir (Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015 ve FDA, 2015).

1.6.8. Stabilité

Validasyon çalışmalarında her zaman zorunlu olmayan bu parametre geliştirilen yöntemin güvenilirliği ve sağlamlığıyla doğrudan ilişkilidir. Analit, numune ve tampon çözelti gibi kullanılan tüm çözeltilerin stabiliteleri değerlendirilmelidir. Biyosensör çalışmalarında kullanılan biyolojik moleküller kolayca kontamine olabilirler. Bu yüzden hazırlanan biyosensörlerin farklı bileşiklerden kontamine olmadan saklanması gerekmektedir (Özkan, 2012; Özkan ve ark., 2015; FDA, 2003 ve FDA, 2015).

Literatür çalışmaları incelendiğinde (Çizelge 1.1) farklı biyolojik örneklerden Leptin tayinine yönelik çoğunlukla antikor temelli immunosensör bulunmaktadır. Ancak, antikorların üretiminde canlı hayvana ihtiyaç duyulması, yüksek sıcaklıklarda kararsız yapıları, daha kısa raf ömürleri gibi dezavantajları vardır. Son yıllarda, aptamerler ekonomik, daha uzun süre kararlı kalabilme ve kolay üretim süreçlerine sahip olmalarından dolayı antikora rakip moleküller olarak ilgi görmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, Leptin tayinine yönelik ilk kez aptamer temelli elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Biyobileşen olarak sadece aptamerler kullanılarak farklı modifikasyon yüzeylerinde etiketsiz bir impedimetrik aptasensör ve voltametrik temelli bir sandviç aptasensör geliştirilmiştir. Ayrıca aptamerler ve MIP'ler ile birleştirilerek Leptin'in ultra hassas ve seçici tayini için hibrit sensör tasarlanmıştır. Bu sensörlerin hassasiyetini arttırmak için elektrot yüzeyleri metal, metal oksit ve polimerik nanomalzemelerle modifiye edilmiştir. Ayrıca, geliştirilen aptasensörler ve hibrit sensör kullanılarak Leptin'in insan serum ve plazma örneklerinden analizi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1.1. Leptin tayinine yönelik yapılmış çalışmalar

Ölçüm prensibi	Elektrot	Sensör tasarımı	Biyobileşen	Doğrusal aralık (pg/mL)	TS (pg/mL)	Uygulama	Ref.
Elektrokimyasal immunosensör	CKE	Glu/AuNPs/PG-BP	Antikor	0,150-2500	0,036	İnsan serum örneği	Cai ve ark., 2019
Elektrokimyasal biyosensör	CKE	SWCNTs/CS	Antikor	0-1000	1,5	İnsan serum örneği	Zhang ve ark., 2018
Elektrokimyasal immunosensör	PBKE	Strept-MBs	Antikor	5-100	0,5	İnsan serum ve anne sütü örnekleri	Ojeda ve ark., 2013
Elektrokimyasal immunosensör	PBE	EDC/NHS/MP A/Au/Ce ₃ NbO ₇ /CeO ₂	Antikor	0,5,12, 000	0,138	İnsan plazma örneği	Liu ve ark., 2021
Elektrokimyasal immunosensör	Grafit kağıt	EDC-NHS/PGA	Antikor	0,2-20	0,00813	İnsan serum örneği	Özcan ve Sezgintürk, 2021
Elektrokimyasal MIP sensör	Altın elektrot	PP/MIP	-	1000-32,000	110	İnsan serum örneği	Mihailescu ve ark., 2020
Elektrokimyasal immunosensör	CKE	Protein G/PPy/PPa/Au	Antikor	1x10 ⁴ .1x10 ⁸	1x10 ⁴	İnsan serum örneği	Chen ve ark., 2010
Elektrokimyasal immunosensör	CKE	SWNTs/CS	Antikor	50-5x10 ⁵	30	İnsan serum örneği	Dong ve ark., 2014
Elektrokimyasal immunosensör	ITO-PET	CNBr/HMDC	Antikor	0,05-100	0,0287	İnsan serum örneği	Uludağ ve Sezgintürk, 2022
Elektrokimyasal immunosensör	CKE	rGO-Au-ZZ-BNC	Antikor	0,001-1000	0,00087	Fare serum örneği	Zhang ve ark., 2022
Elektrokimyasal immunosensör	CKE	APTMS/AuNP	Antikor	0,00012-2600	0,00025	-	Shukla ve ark., 2022
Kemilüminesans immunosensör	Optik cam	Fe ₃ O ₄ /polidopa mine/Au	Antikor	1-800	0,3	İnsan serum örneği	He ve ark., 2015
Kemilüminesans immunosensör	Kuyucuk lu plaka	Hemin/G-quadruplex DNAzymes	Antikor	10-1000	1,9	İnsan serum örneği	He ve ark., 2013
ELISA	PBKE	DTSSP	Antikor	100-20,000	33	Fare plazma örneği	Sung ve Seok Heo, 2021
Floresans aptasensör	-	Aptamer kompleks	Aptamer	10-1000	10	İnsan tükürük örneği	Cavallo ve ark., 2021

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Tez Çalışmaları Kapsamında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kimyasal maddeler, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar Çizelge 2.1 ve çizelge 2.2.' de detaylandırılmıştır.

Çizelge 2.1. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Saflık Derecesi (%)	Firma
Leptin	≥97	Sigma-Aldrich
Titanyum dioksit nanopartiküller (TiO ₂ NP'ler)	≥99	Sigma-Aldrich
Çinko oksit nanopartiküller (ZnO NP'ler)	≥99	Sigma-Aldrich
Platin nanoküreler (Pt NK'ler)	-	Sigma-Aldrich
Tetra kloraurik asit (HAuCl ₄)	≥99	Sigma-Aldrich
Etanol	≥99,8	Sigma-Aldrich
Potasyum klorür (KCl)	≥99	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür (NaCl)	≥99	Sigma-Aldrich
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	≥99	Sigma-Aldrich
Potasyum ferrisiyanür (K ₃ [Fe(CN) ₆]·3H ₂ O)	≥99	Sigma-Aldrich
Potasyum ferrosiyanür (K ₄ [Fe(CN) ₆]·3H ₂ O)	≥99	Sigma-Aldrich
6-merkapt-1-hekzanol (6-MCH)	97	Sigma-Aldrich
Dietanolamin (DEA)	≥98	Sigma-Aldrich
Streptavidin-alkalen fosfataz (Strep-ALP)	-	Sigma-Aldrich
α-naftil fosfat	≥98	Sigma-Aldrich
Ortofenilendiamin (oPD)	≥99	Sigma-Aldrich
Tris hidroksimetil aminometan hidroklorür (TRIS-HCl)	≥99	Sigma-Aldrich
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	≥99	Sigma-Aldrich
Asetik asit	-	Sigma-Aldrich
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	≥97	Sigma-Aldrich
Ticari insan serumu	-	Sigma-Aldrich
Ticari insan plazması	-	Sigma-Aldrich
İnsan serum albümini (HSA)	≥98	Sigma-Aldrich
Sığır serum albümini (BSA)	≥98	Sigma-Aldrich
Haptogloblin	≥95	Sigma-Aldrich
Glukoz	≥99,5	Sigma-Aldrich
Glutatyon	Referans standart	Sigma-Aldrich
Norepinefrin	Referans standart	Sigma-Aldrich
l-sistein	≥98	Sigma-Aldrich
l-lizin	≥98	Sigma-Aldrich
Dopamin	Referans standart	Sigma-Aldrich
Askorbik asit	99	Sigma-Aldrich
Parasetamol	Referans standart	Sigma-Aldrich
İnterleukin-6 (IL-6)	≥97	Sigma-Aldrich
C- reaktif protein (CRP)	-	Abcam
Tümör nekroz faktör-A (TNF-α)	-	Abcam

Çizelge 2.2. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan aptamer dizileri

Aptamer dizisi	Kısaltması	Saflık Derecesi (%)	Firma
5' '-SH-(CH ₂) ₆ - GTAAATGGGGGATCTCGCGCCGTTCTTGTGCTTATACA-3'	Apt1	HPLC	Metabion
3'-(Biotin)-(Trietilen Glikol)- CAATTACCCCCTAGAGCGCCGGCAAGAACAACGAATATGT-5'	Apt2	HPLC	Metabion

2.2. Tez çalışmaları Kapsamında Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar

Tez çalışmaları kapsamında kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar marka ve modelleri belirtilerek çizelge 2.3' de detaylandırılmıştır.

Çizelge 2.3. Tez çalışmaları kapsamında kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar

Sarf malzeme/Ekipman	Marka-Model
Perde baskılı elektrot (PBE)	Dropsens DRP-C110
Potansiyostat – galvanostat sistemi	AUTOLAB 302N-PGSTAT /NOVA 2.1.2 yazılımı (Eco Chemie, Hollanda)
pH Metre	ORION 720A (Thermo Fisher, Massachusetts, ABD)
Hassas Terazi	KERN, ABT 220-5DM
Vorteks karıştırıcı	ISOLAB Laborgeräte GmbH (Eschau, Almanya)
Ultrasonik Banyo	Bandelin SONOREX (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG)
Farklı hacimlerde kapaklı cam balon jojeler	ISOLAB Laborgeräte GmbH (Eschau, Almanya)
Otomatik mikro pipetler ve uygun pipet uçları	Eppendorf AG (Almanya)/ ISOLAB Laborgeräte GmbH (Eschau, Almanya)
Ultra saf su cihazı	PURELAB Option-Q (ELGA LabWater, Birleşik Krallık)
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	ZEISS EVO 40 (Merlin, Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya)
X-ışını difraktometresi (XRD)	APD 2000 PRO (G.N.R. s.r.l.-Analytical Instruments Group, Agrate Conturbia NO, İtalya)
Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)	NanoMagnetics marka AFM sistemi

2.3. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanması

TiO₂ NP'lerin hazırlanması

4,0 mg, 2,0 mg, 1,0 mg ve 0,5 mg TiO₂ NP'ler ayrı olarak hassas terazide tartıldıktan sonra, her birine 1 mL etanol çözeltisi ilave edilmiş ve ultrasonik banyoda 1 saat karıştırılmıştır.

ZnO NP'lerin hazırlanması

1,0 mg, 0,5 mg, 0,25 mg ve 0,1 mg ZnO NP'ler ayrı olarak hassas terazide tartıldıktan sonra, her birine 1 mL etanol çözeltisi ilave edilmiş ve ultrasonik banyoda 1 saat karıştırılmıştır.

HAuCl₄ çözeltisinin hazırlanması

50 mM'lık HAuCl₄ stok çözeltisi hazırlamak için, 170 mg HAuCl₄ hassas olarak tartılmış ve 10 mL ultra saf su ile tam olarak çözünmesi sağlanmıştır. Au NP'lerin elektrodepolanması için bu çözeltiden yeterli hacimde alınarak 0,1 M KCl çözeltisinde gerekli seyreltmeler yapılmıştır.

Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks çözeltisinin hazırlanması

Tüm elektrokimyasal ölçümlerde kullanılan 5 mM redoks çözeltisini hazırlamak için, 0,165 g K₃Fe(CN)₆, 0,211 g K₄Fe(CN)₆, ve 0,745 g KCl hassas olarak tartılıp, 100 mL balon joje içerisinde ultra saf su ile hazırlanmıştır.

TRIS-HCl tampon çözeltisinin hazırlanması

20 mM TRIS-HCl tampon çözeltisini hazırlamak için 0,315 g TRIS-HCl, 0,584 g NaCl, 1, 49 g KCl ve 0,048 g MgCl₂'den hassas olarak tatılıp ultra saf suda çözüldükten sonra, toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmış ve pH 7,4'e ayarlanmıştır.

6-MCH çözeltisinin hazırlanması

Spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için 1 mM 6-MCH çözeltisi, yoğunluğu 0,981 g/mL olan %97'lik 6-MCH'den 2,82 µL alınarak 20 mL'ye ultra saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Tris-EDTA (TE) tampon çözeltisinin hazırlanması

Aptamer stok çözeltilerini hazırlamak için 10 mM Tris-HCl ve 1 mM EDTA içeren TE tampon çözeltisi litresinde 1,576 g Tris-HCl ve 0,372 g EDTA içerecek şekilde hazırlanmıştır. Çözeltinin pH'sı 0,5 M NaOH kullanılarak 8,0'e ayarlanmıştır.

Stok aptamer çözeltilerinin hazırlanması

100 μ M tiyol modifiye Apt1 ve 100 μ M biyotin modifiye Apt2 stok çözeltileri pH 8,0 TE tamponunda çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltilerden farklı derişimlerdeki aptamer çözeltileri de TE tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanmış ve -20 °C'de saklanmıştır.

Stok Leptin çözeltisinin hazırlanması

Uygun miktarda katı Leptin alınarak derişimi 1,0 mg/mL olacak şekilde Tris-HCl (20 mM, pH 8,0) tampon çözeltisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltilerden farklı derişimlerdeki Leptin çözeltileri de Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanmış ve -20°C'de saklanmıştır.

DEA tampon çözeltisinin hazırlanması

0,1 M (pH 9,6) DEA tamponu hazırlamak için, 0,49 mL DEA çözeltisi, 4,76 mg $MgCl_2$ ve 0,373 mg KCl hassas olarak tartılıp ultra saf su ile 50 mL'ye tamamlanmış ve çözeltinin pH'sı 0,5 M NaOH kullanılarak 9,6'ya ayarlanmıştır.

Strep-ALP enzim konjugatı çözeltisinin hazırlanması

Stok Strep-ALP enzimi 2 mL DEA tamponunda çözülerek 1407 U/1 mL derişimde olacak şekilde hazırlanmıştır. Enzim-BSA karışımı, sırasıyla 1U/mL strep-

ALP enzimi ve 8 mg/mL BSA içerecek şekilde DEA tamponu kullanılarak hazırlanmıştır.

α -naftil fosfat çözeltisinin hazırlanması

1 mg α -naftil fosfat hassas olarak tartılıp, 1 mL DEA tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Ticari insan serum ve plazma örneklerinin hazırlanması

ABD kaynaklı erkek plazmasından elde edilmiş insan serumu ve insan plazması örnekleri ticari olarak satın alınmıştır. Öncelikle bu çözeltiler 1:10 (h:h) oranında Tris-HCl (20 mM, pH 8,0) tampon çözeltisi kullanılarak seyreltilmiştir. Geliştirilen her sensör için belirli miktarlarda Leptin çözeltisi bu örneklerle ilave edilmiş ve geri kazanım çalışmaları için kullanılmıştır.

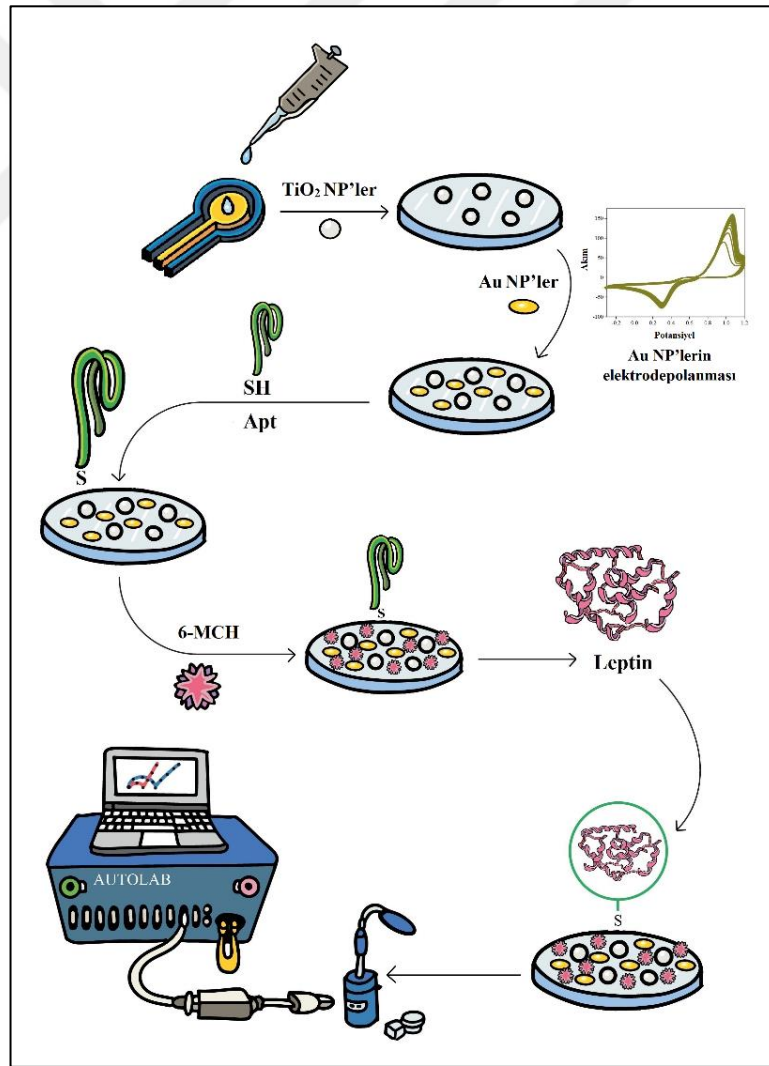
Seçicilik çalışmalarında kullanılan çözeltilerinin hazırlanması

Geliştirilen sensörlerin seçiciliklerini incelemek için HSA, BSA, haptoglobin, glukoz, glutatyon, norepinefrin, l-sistein, l-lizin, dopamin, askorbik asit ve parasetamol belirlenen derişimlerdeki stok çözeltileri ultra saf suda hazırlanmıştır.

2.4. Leptin Tayini İçin Etiketsiz Aptasensörün Hazırlanması

Tez çalışmaları kapsamında, Leptin tayini için etiketsiz aptasensörün hazırlık basamakları Şekil 2.1’de gösterilmektedir. İlk modifikasyon adımı olarak 10 μ L TiO₂ NP’ler (1,0 mg/mL) PBE çalışma yüzeyine damlatılarak, oda koşullarında tam olarak kurumaya bırakılmıştır. İkinci adımda, elektrot yüzeyinde Au NP’lerin elektrokimyasal olarak biriktirilmesi sağlanmıştır. Bu amaçla 1 mM HAuCl₄ çözeltisinde 60 μ L elektrot yüzeyine damlatılmış, 50 mV/s tarama hızında (-0,3)-

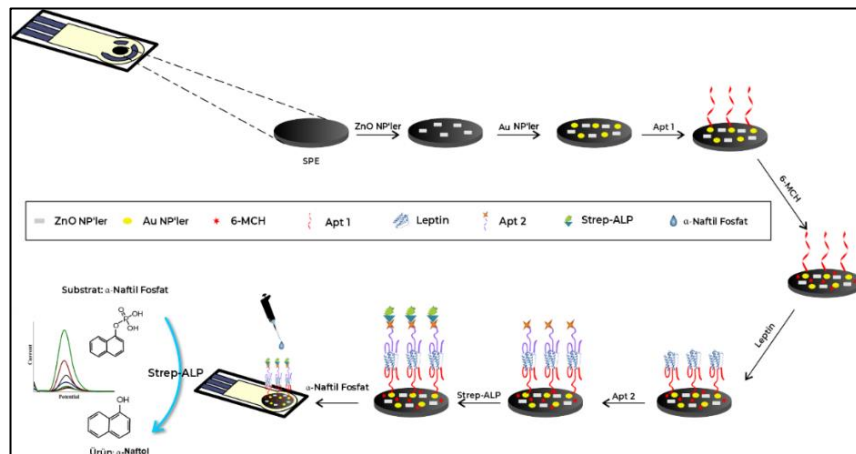
(+1,2) V potansiyel aralığında, 15 döngü sayısı ile dönüşümlü voltametri (DV) tekniği kullanılarak elektrokimyasal biriktirilmesi gerçekleştirilmiştir (Chiang ve ark., 2019). Modifiye yüzey ultra saf su ile yıkanıp kurutulduktan sonra kullanılmıştır. Daha sonra, 1, 5 μM Apt1 çözeltisi modifiye elektrot yüzeyine damlatılmış $+4^\circ\text{C}$ 'de 3 saat bekletilmiştir. Yüzey Tris-HCl yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra, spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için 6-MCH ile 1 saat etkileştirilmiştir. Bir sonraki adımda, yıkama çözeltisi yıkanan yüzeye artan konsantrasyon Leptin çözeltisi damlatılmış ve 30 dakika etkileşim süresi sonunda geliştirilen aptasensör ölçümler için hazır hale gelmiştir. Son olarak, 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinden 60 μL aptasensör yüzeyine damlatılmış ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri alınmıştır.



Şekil 2.1. Geliştirilen etiketsiz aptasensörün hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi

2.5. Leptin Tayini İçin Sandviç Tip Aptasensörün Hazırlanması

Tez çalışmaları kapsamında, Leptin tayini için sandviç tip aptasensörün hazırlık basamakları Şekil 2.2’de gösterilmektedir. İlk olarak, 0,25 mg/mL derişimindeki ZnO NP’lerden 10 µL PBE çalışma yüzeyine damlatılmış ve oda koşullarında tam olarak kurumaya bırakılmıştır. Sonraki adımda, 60 µL HAuCl₄ (1 mM) çözeltisi sensör yüzeyinde Au NP’lerin elektrokimyasal olarak biriktirilmesi için damlatılmıştır. 50 mV/s tarama hızında (-0,3)-(+1,2) V potansiyel aralığında ve 15 döngü sayısı ile DV tekniği kullanılarak ZnO NP’ler/PBE yüzeyi Au NP’ler ile modifiye edilmiştir. Modifiye elektrodun yüzeyi ultra saf su ile yıkanp kurutulduktan sonra Apt1 immobilizasyonu için kullanılmıştır. Daha sonra 0,5 µM Apt1 çözeltisi Au NP’ler/ZnO NP’ler/PBE’nin yüzeyine damlatılmış ve hazırlanan elektrot 1 gece boyunca (yaklaşık 16 saat) +4°C’de bekletilmiştir. Yüzey yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra, 1 saat boyunca spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla 6-MCH ile etkileştirilmiştir. Apt1 modifiye elektrot artan derişimlerde Leptin çözeltisi ile 30 dakika boyunca etkileştirildikten sonra yıkama çözeltisi ile tekrar yıkanmıştır. Bu işlem sonrasında, sandviç temelli aptasensörü oluşturmak için, 1,5 µM biyotin modifiyeli Apt2 çözeltisi yüzeye damlatılmış ve 30 dakika boyunca Apt2-Leptin etkileşimi sağlanmıştır. Hazırlanan yüzeye Strep-ALP enzim konjugatı damlatılarak 20 dakika boyunca etkileştirilmiş ve ardından yüzey 0,1 M DEA tamponu ile yıkanmıştır. Son basamakta ise, geliştirilen aptasensör yüzeyine 1,0 mg/mL α-naftil fosfat damlatılmış ve α-naftol oluşumu için 20 dakika bekletildikten sonra α-naftol sinyali takip etmek için diferansiyel puls voltametri (DPV) ölçümleri alınmıştır (Rapini ve Marrazza, 2017).

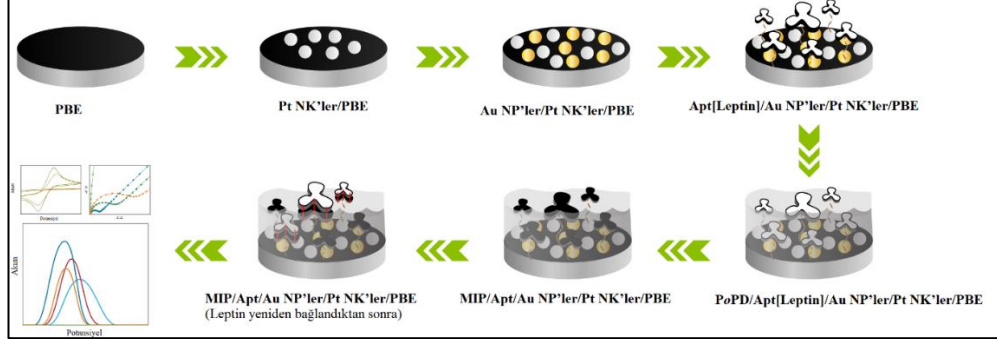


Şekil 2.2. Geliştirilen sandviç tip aptasensörün hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi

2.6. Leptin Tayini İçin Apt-MIP Hibrit Sensörün Hazırlanması

Tez çalışmaları kapsamında, Leptin tayini için Apt-MIP hibrit sensörün hazırlık basamakları Şekil 2.3'te gösterilmektedir. Öncelikle elektrotların modifikasyonu için 10 μL Pt NK'ler (0,02 $\mu\text{g/mL}$) PBE yüzeyine damlatılmış, oda sıcaklığında tam olarak kuruması sağlandıktan sonra yüzey ultra saf su ile yıkanmıştır. Sonraki aşamada, Au NP'ler, Pt NK'ler/PBE yüzeyine DV yöntemi kullanılarak elektrokimyasal olarak biriktirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda 0,1 M KCl içerisinde 1 mM HAuCl_4 içeren çözeltiden 60 μL alınarak elektrot yüzeyine damlatılmıştır. DV yönteminin çalışma şartları, 50 mV/s tarama hızında (-0,3)-(+1,2) V potansiyel aralığında, 15 döngü sayısını kapsamaktadır. Apt-MIP hibrit sensörünün hazırlanması için ikinci aşamada TE tampon çözeltisi içinde hazırlanan Apt1 çözeltisi (1,5 μM) 95 °C'de 2 dakika bekletilmiştir. Apt1 çözeltisi oda sıcaklığına geldikten sonra, bu çözelti 25 pg/mL Leptin 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, elde edilen Apt[Leptin] kompleksinin 10 μL 'si Pt NK'ler/Au NP'ler/PBE'nin yüzeyine damlatılmış ve 1 gece boyunca +4 °C'de bekletilmiştir. Elde edilen elektrot, bu adımda Apt[Leptin]/Pt NK'ler/Au NP'ler/PBE olarak adlandırılmıştır. Moleküler baskılama adımına geçmeden önce Apt[Leptin] kompleks oluşumundan sonra yüzeyde kalabilecek olası serbest aptamer moleküllerini doyurmak için 10 μL Leptin (25 pg/mL) yüzeye damlatılarak 20 dakika bekletilmiştir ve ardından modifiye elektrot yüzeyi durulanmıştır. Apt-MIP hibrit sensörünün hazırlanmasının son aşamasında, birinci aşamadan elde edilen Apt[Leptin]/Pt NK'ler/Au NP'ler/PBE'nin yüzeyi üzerinde oPD polimerinin elektropolimerizasyonu ile MIP oluşumu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, oPD (5 mg/ 5 mL), modifiye elektrot yüzeyine damlatılmış 0 ile 0,8 V (tarama hızı 50 mV/s) potansiyel aralığında ardışık 30 döngü uygulanarak DV yöntemi ile elde edilmiştir. Daha sonra, polimer kaplı elektrot (oPD/Apt[Leptin]/Pt NK'ler/Au NP'ler/PBE) yüzeyinden Leptin moleküllerini çıkarmak için %5 (h/h) asetik asit ve %5 (a/h) sodyum dodesil sülfatın (SDS) ile 1:1 oranında karıştırılarak hazırlanan uzaklaştırma çözeltisi kullanılmıştır. MIP temelli sensörün oluşturulması için oPD/Apt[Leptin]/ Pt NK'ler/Au NP'ler/PBE 30 dakika uzaklaştırma çözeltisinde bekletildikten sonra, yüzey yıkanmıştır. Ek olarak, önerilen hibrit sensörün etkinliğini doğrulamak için, aynı prosedür kullanılarak, ancak Leptin içermeyen moleküler baskılı olmayan bir polimer yüzey (NIP) hazırlanmıştır. En son aşamada sensör

yüzeyine artan konsantrasyonlarda Leptin ilave edilerek 60 dakika bağlanma süresinin sonunda 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin DPV ölçümleri alınmıştır.



Şekil 2.3. Geliştirilen Apt-MIP hibrit sensörün hazırlık basamaklarının şematik olarak gösterimi

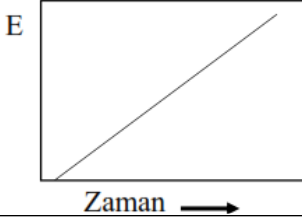
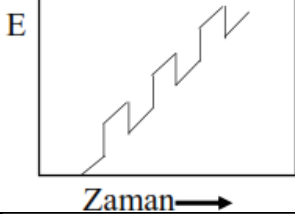
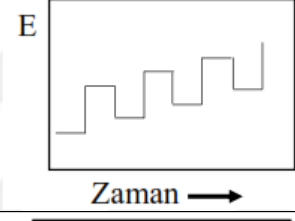
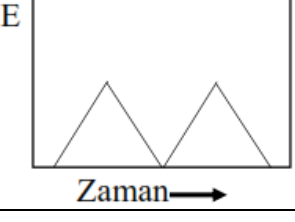
2.7. Tez Çalışmaları Kapsamında Kullanılan Yöntemler

2.7.1. Voltametri

Voltametri, polarize olabilen bir çalışma elektrodu ile referans elektrot arasında bir potansiyel uygulandığı zaman, bu potansiyelin bir fonksiyonu olan ve çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot arasında okunan akımın ölçülmesi ilkesine dayanır. Voltameteri, elde edilen bu akım cevabına bağlı olarak hedef analit için bilgi edinmeyi sağlayan bir grup elektrokimyasal yöntemlerdir. Voltametri kullanılarak elde edilen potansiyel-akım eğrileri “voltamogram” olarak adlandırılmaktadır (Bard ve ark., 2001).

Voltameteride çalışma elektroduna değeri zamanla değişen potansiyel uygulanması için farklı dalga şekillerine sahip uyarma sinyalleri kullanılabilir. Voltametrik yöntemlerde en çok kullanılan uyarma sinyalleri Çizelge 2.4’te gösterilmiştir. Voltametrik yöntemlerin sahip oldukları avantajlar sayesinde ilaç etken maddeleri ve biyobelirteç analizleri, gıda, çevre ve adli tıp gibi birçok farklı alanda uygulaması bulunmaktadır (Bard ve ark., 2001 ve Skoog ve ark., 2007).

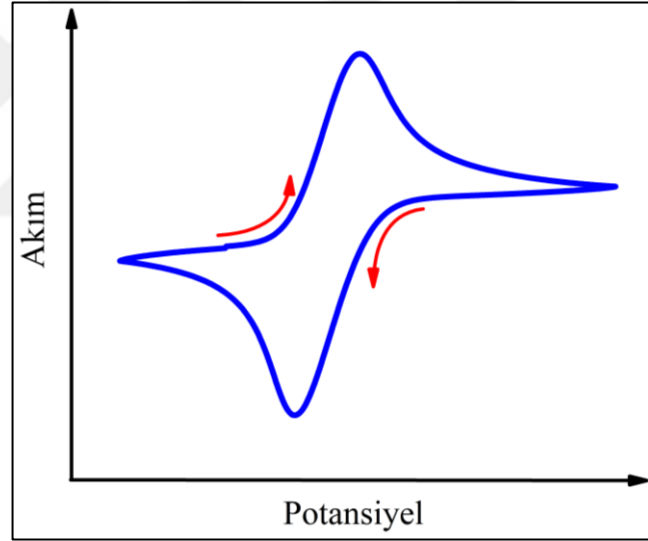
Çizelge 2.4. Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri (Skoog ve ark., 2007)

İsim	Dalga şekli	Voltametri türü
Doğrusal taramalı		Polarografi Hidrodinamik voltametri
Diferansiyel puls		Diferansiyel puls voltametrisi
Kare dalga		Kare dalga voltametrisi
Üçgen		Dönüşümlü voltametri

2.7.1.1. Dönüşümlü voltametri

Dönüşümlü voltametri (DV) günümüzde en yaygın kullanılan elektrokimyasal yöntemlerin başında gelmektedir. Her ne kadar kalitatif amaçlı analizlerde kullanımı daha az olsa da indirgenme/yükseltgenme tepkimelerinin incelenmesinden, tepkimeye giren maddelerin veya oluşan ürünlerin tayinlerinde, elektrot mekanizmalarının incelenmesinde veya kinetik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemde, potansiyel doğrusal olarak bir pik noktasına kadar kayar ve aynı hızda başlangıç noktasına kadar geri döner. Potansiyeldeki bu değişime karşı farklı akım cevapları oluşur. Bu yüzden, DV’de okunan akım değerleri gerilimin bir fonksiyonu olarak ölçülmektedir (Bard ve ark., 2001; Marken ve ark., 2010 ve Skoog ve ark., 2007).

1960'lı yıllarda Nicholson ve Shain tarafından geliştirilen DV, elde edilen akım gerilim eğrisinin şekline tamamen bağımlı olmadan analizi mümkün kılmak için tasarlanmış daha basit bir yöntemdir. DV yöntemi kullanılarak elde edilen akım-gerilim eğrilerine dönüşümlü voltamogram (Şekil 2.4.) denmektedir. Bu voltamogramların pozitif potansiyel bölgelerinde elde edilen akım cevapları anodik, negatif potansiyel bölgelerinde elde edilen akım cevapları ise katodik pikleri ifade etmektedir. Bir voltamogramda hem anodik hem de katodik pikler gözlenmişse reaksiyon tersinirdir. Ancak, sadece anodik veya katodik piklerden biri gözlenmişse reaksiyon tersinmezdir. Bunlara ek olarak, DV yöntemi adsorpsiyon veya difüzyon kontrollü reaksiyonların mekanizmaları, elektron aktarım mekanizması ve yüzey modifikasyonunun aydınlatılması gibi pek çok alanda kullanım imkânına sahiptir (Bard ve ark., 2001; Bozal Palabıyık, 2015; Marken ve ark., 2010 ve Skoog ve ark., 2007).



Şekil 2.4. Tipik bir dönüşümlü voltamogram (Bozal Palabıyık, 2015)

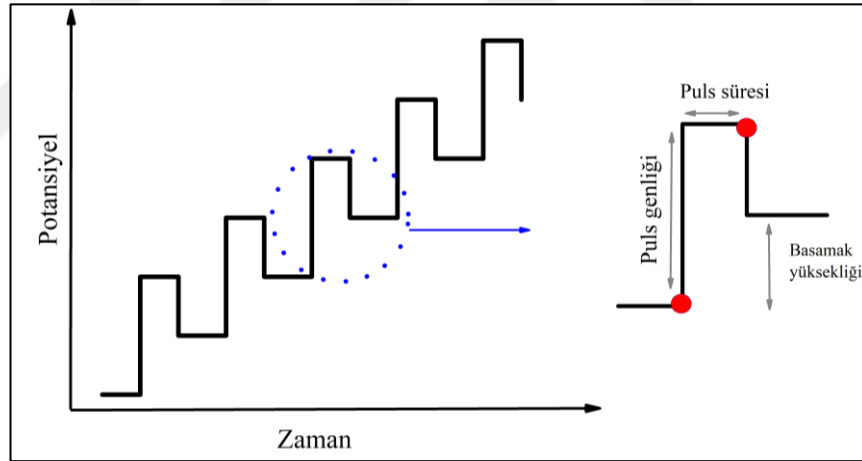
2.7.1.2. Diferansiyel puls voltametri

Elektrokimyasal çalışmalarda yükseltgenme veya indirgenme reaksiyonlarından kaynaklanmayan faradayik akımın varlığı istenen bir durum değildir. Faradayik akımın etkisini azalttığı için daha hassas sonuçlar sunan diferansiyel puls voltametri (DPV), voltametrik yöntemler arasında en çok kullanılandır. Çünkü, bu yöntemde

uygulanan puls şekline bağlı olarak akımın ölçülmesi faradayik olmayan akımların etkisini azaltmaktadır (Bard ve ark., 2001 ve Wang, 2006).

DPV'nin temeli doğrusal olarak artan potansiyele karşı sabit büyüklükte pulsalar uygulanmasına dayanmaktadır. Birinci akım pulsun başladığı noktadan hemen önce ölçülürken, ikinci akım ise pulsun bittiği noktadan hemen önce ölçülür (Şekil.2.5). Bu akımlar arasındaki fark alınarak, potansiyelin bir fonksiyonu olarak toplam akım değeri elde edilmiş olur. Elde edilen bu akım değeri hedef analitin derişimi ile doğru orantılı olarak değişmektedir (Bard ve ark., 2001 ve Wang, 2006).

Günümüzde teknolojiye yaşanan gelişmeler ile DPV, analitik veya kinetik amaçlarla, nano-molar seviyelerinde analiz imkânı sunan oldukça hassas bir yöntem olarak ön plana çıkmaktadır.



Şekil 2.5. DPV yönteminde kullanılan dalga formu (Bard ve ark., 2001 ve Wang, 2006)

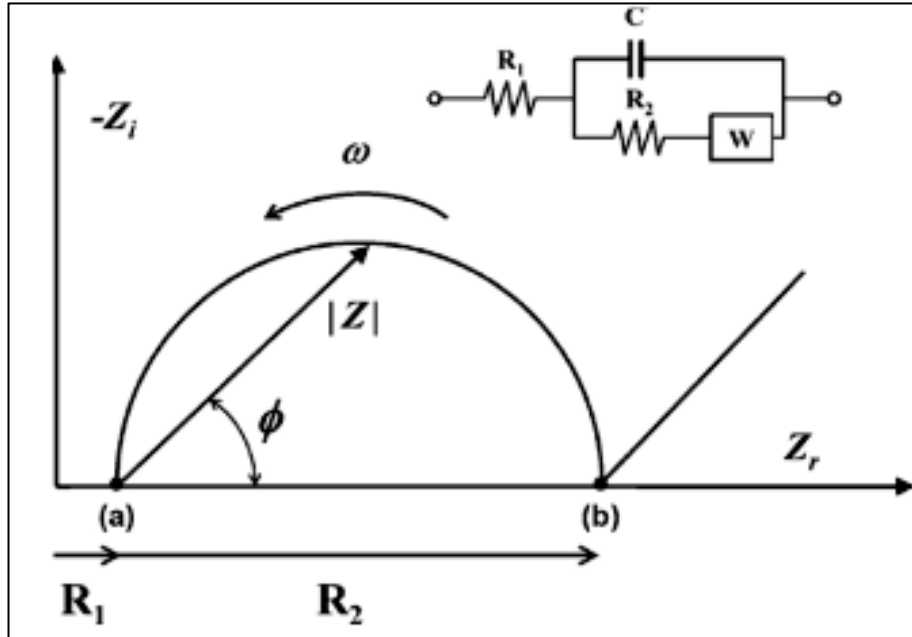
2.7.2. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

İmpedans terimi, ilk kez 1886 yılında Oliver Heaviside tarafından kompleks sayıların elektrik devrelerine uyarlanmasıyla literatüre girmiştir. Keşfedildiği ilk zamandan bu yana impedans temelli ölçüm yöntemleri, korozyon, elektrot kinetiği, katı faz elektrokimyası ve biyoelektrokimya gibi birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır (Josephs, 1971).

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), temel olarak frekans düzleminde elektriksel bilgiler sağlayabilen bir karakterizasyon yöntemidir. Elektrokimyasal hücrede meydana gelen süreçler kapasitör ve rezistörler kullanılarak EIS yönteminde kolayca modellenebilir (Bard ve Faulkner, 1980 ve MacDonald, 1987).

EIS'in temel çalışma prensibi elektrokimyasal hücreye bir AC (Alternating current impedance spectroscopy) potansiyeli uygulanması ve hücreden geçen akımın belirlenerek ölçülmesine dayanmaktadır. Uygulanan bu potansiyele karşı elde edilen cevap, zamana bağlı olarak değişen, potansiyel ile aynı frekansta fakat farklı genlik ve faz açısına sahip bir AC akım sinyalidir. EIS ile elde edilen deneysel verilerin ilgili teorik eğrileri, uygun eşdeğer devre kullanılarak kolaylıkla elde edilmektedir (Bard ve Faulkner, 1980 ve MacDonald, 1987).

Farklı birçok grafik bulunsa da impedimetrik verilerin gösterilmesi için en yaygın kullanılan grafik Nyquist Grafiğidir. Nyquist grafiği (şekil 2.6), sanal impedansın gerçek impedansa karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilmektedir. Bu grafikte her bir nokta farklı bir frekans değerine karşılık gelmektedir (Barsoukov ve MacDonald, 2005; Derkuş, 2012 ve Orazem ve Tribollet, 2008).

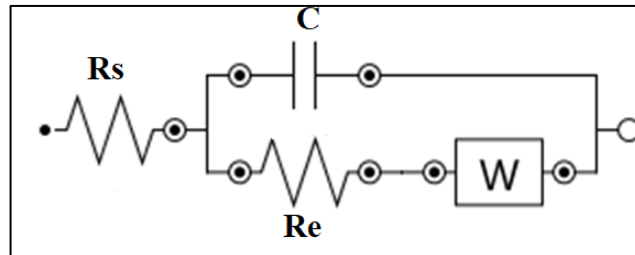


Şekil 2.6. Tipik bir Nyquist impedans spektrum grafiği (Derkuş, 2012)

Şekil 2.6’da tipik bir Nyquist grafiği ile ilgili elektriksel devre gösterilmektedir. Bu impedans spektrumu incelendiğinde spektrumun profili ‘a’ değerinden başlayan R_1 direncinin ve ‘b’ değeriyle biten R_2 ’nin toplamı olan bir yarım daire şeklindedir. Burada, çözelti direnci R_1 ile gösterilirken, yük transfer direnci R_2 (R_{ct}) ile ifade edilmektedir. İmpedans spektrumunun sanal impedans kısmının maksimum değeri, kapasitörün kapasitans değerine eşittir. Elektrokimyasal sistemler için elde edilen birçok impedans spektrumu bu tip diyagramlara uyum sağlayabilmektedir. Spektrumdaki doğrusal olan bölge ise elektrot yüzeyi ve çözelti arasındaki kütle aktarımıyla ilgili olan bölgedir (Barsoukov ve MacDonald, 2005; Derkuş, 2012 ve Orazem ve Tribollet, 2008).

İmpedimetrik ölçümlere ilk başlandığı anda, yüksek frekans (düşük enerji) pertübrasyonları uygulanır ve çözelti direnci (R_s) ölçülmektedir. Zamanla frekans azalarak, enerji de yavaş yavaş artmaktadır. Bu sayede, tarama bölgesi elektrot yüzeyine doğru hareket etmektedir. Bu bölgede, direnç maksimum değerde olduğundan Nyquist grafiklerdeki kapasitif direnç en üst değerlerde gözlenmektedir. Frekansın en düşük, enerjinin ise en yüksek olduğu zaman elektromanyetik dalgalar elektrot içerisine hareket ederek Nyquist grafiğindeki difüzyon ile ilgili doğrusal kısmı oluşturmaktadır (Barsoukov ve MacDonald, 2005; Cruz-Manzo ve Greenwood, 2022 ve Derkuş, 2012).

Bu davranış, şekil 2.7’de gösterilen Randles devresi kullanılarak açıklanabilir. Bu devre, elektrot yüzeyinde bulunan çift tabakanın rezistörüne (R_e) paralel olarak bağlanan bir kapasitörden (C) ve onlara seri olarak bağlanan çözelti direncinden oluşmaktadır. Frekansa bağımlı olarak difüzyondan kaynaklı oluşan Warburg impedansı ise ‘W’ ile gösterilmektedir (Bigdeli ve ark., 2021 ve Cruz-Manzo ve Greenwood, 2022).



Şekil 2.7. Randles devresinin şematik gösterimi

EIS, diğ er elektrokimyasal yöntemlere kıyasla benzersiz avantajlara sahiptir.       , bu yöntem spesifik olarak mevcut ve potansiyel arasındaki transfer fonksiyonunu tahmin edebilmektedir. Elektrokimyasal analizlerde kullanılan EIS temelli yöntemler, hedef analitin spesifik biyolojik molek  l ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen etkile  imlerde, elektrokimyasal analiz sonucunda olu  an kapasitansın ara yüzeyde taşıyabileceği maksimum y  k miktarı hakkında bilgi sağlamaktadır. Difüzyon katsayılarının, kimyasal reaksiyon veya elektrokimyasal sistemin mikroyapısal özelliklerini belirlemek amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir (Kumar ve Kalkal, 2021).



3. BULGULAR

3.1. Etiketsiz Aptasensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Leptin tayini için geliştirilen etiketsiz aptasensörün hazırlık aşamasındaki her elektrodun elektrokimyasal davranışları, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin DV ve EIS cevapları incelenerek gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak, PBE, TiO_2 NP'ler/PBE, Au NP'ler/PBE, Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE ve Apt1/Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE'nin döngüsel voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 3.1A). Yalın PBE'de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözeltisine ait tersinir reaksiyon özelliği gösteren anodik ve katodik pik akımları elde edilmiştir. PBE'nin TiO_2 NP'ler ve Au NP'ler ile modifikasyonundan sonra, TiO_2 NP'lerin ve Au NP'lerin sağladıkları elektriksel iletkenlik nedeniyle anodik tepe akımları sırasıyla 1,1 kat ve 1,24 kat artmıştır. Au NP'lerin TiO_2 NP'ler/PBE yüzeyine modifiye edilmesiyle tepe akımında 1,48 katlık artış elde edilmiştir. Bu artış, TiO_2 NP'ler ve Au NP'ler arasındaki gelişmiş sinerjistik etki sayesinde meydana gelmiştir. Bununla birlikte, Apt1 moleküllerinin Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE yüzeyine immobilize edilmesi pik akımında dramatik bir düşüş ve tepe akımında kayma meydana gelmiştir (Çizelge 3.1). Bu durum, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisi ile negatif yüklü Apt1 molekülleri arasındaki olası elektrostatik itme kuvvetine bağlanabilir (Zhu ve ark., 2019). Ayrıca, Apt1 molekülleri yüzeydeki elektron transfer sürecini engellediği için akım sinyalinde düşüş görülmüştür.

Ayrıca, DV kullanılarak elektrotların yüzey alanları Randles–Ševčík eşitliğine (Eşitlik 3.1) göre hesaplanmıştır (Li ve ark., 2021) (Şekil 3.2).

$$I_p = 2.686 \times 10^5 n^{3/2} A c D^{1/2} \nu^{1/2} \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte;

I_p : Pik akımı (A)

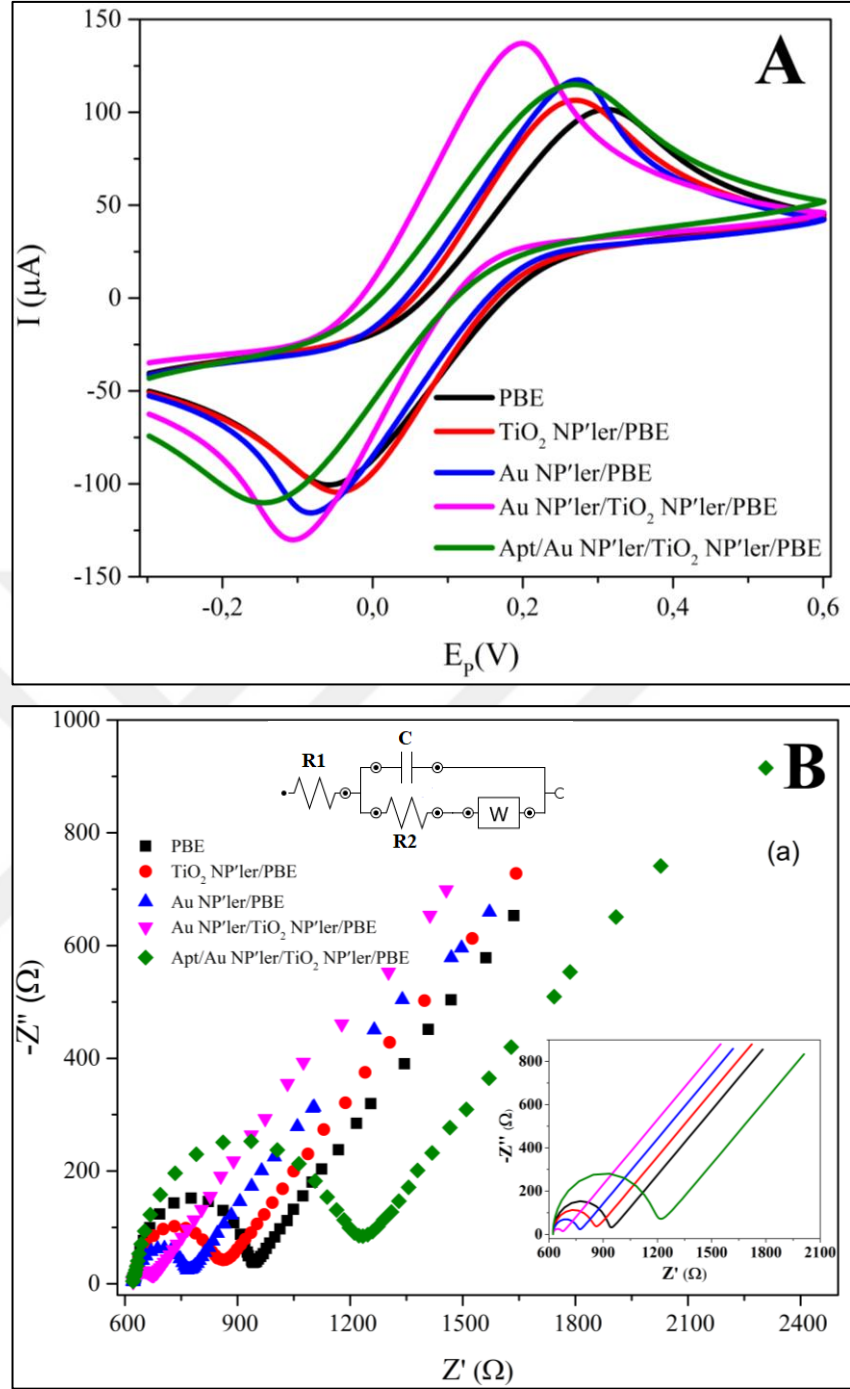
A: Elektroaktif yüzey alanı (cm^2),

D: Difüzyon sabiti (cm^2/s),
c: Redoks çözeltisinin derişimi (mol/cm^3),
v: Tarama hızı (V/s),
n: Aktarılan elektron sayısı

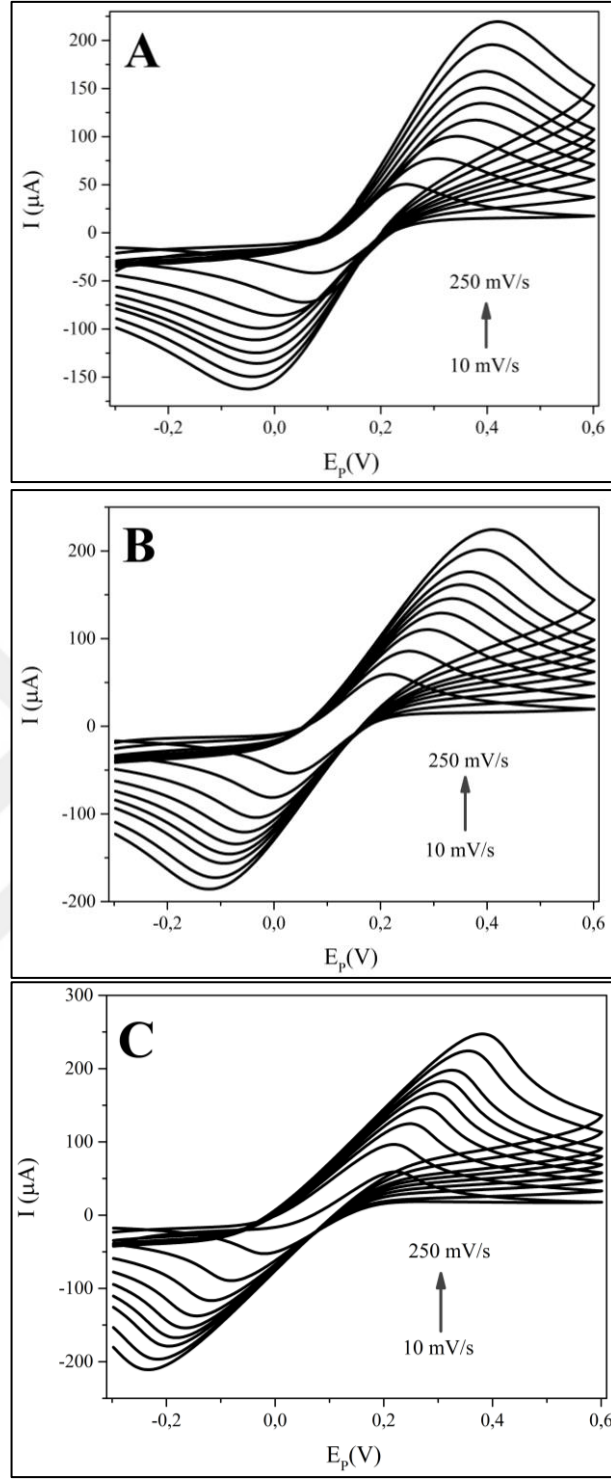
ile ifade edilmektedir.

Au NP'ler ve TiO_2 NP'lerin birlikte kullanımı, PBE'nin yüzey alanında kayda değer bir artışa yol açmıştır. Bu durum, daha fazla Apt1 molekülünün yüzeye bağlanmasını kolaylaştırarak, geliştirilen etiketsiz aptasensörün performansını diğer yüzeylere kıyasla etkili bir şekilde iyileştirebilmiştir. Ayrıca, Apt1 immobilizasyonu sonrası, Apt1 moleküllerinin elektron transfer sürecini engelleyen doğası yüzey alanının azalmasına yol açmıştır (Çizelge 3.1).

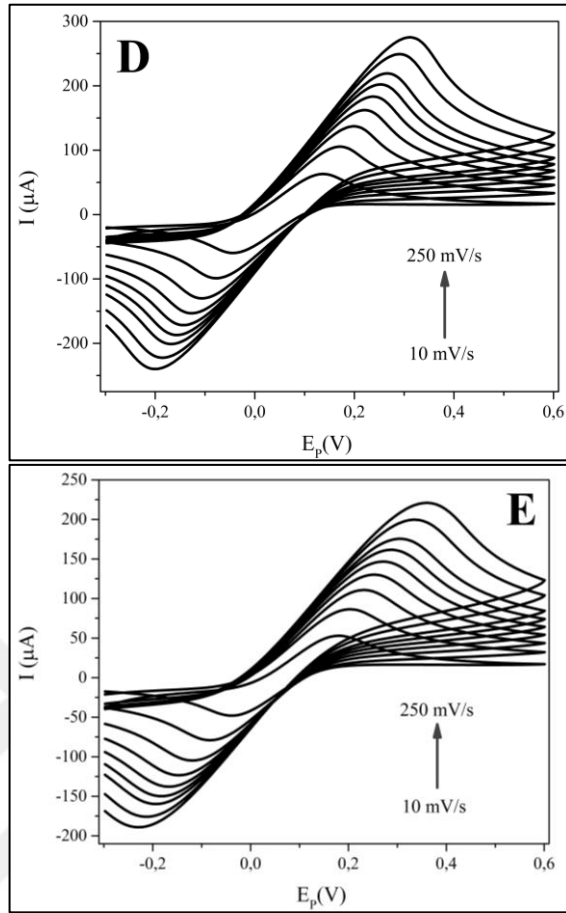
Geliştirilen etiketsiz aptasensör için her elektrodun EIS ölçümleri $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisi kullanılarak alınmıştır. Elde edilen impedans spektrumları eşdeğer devreye uydurularak R_{ct} değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.1B). Çizelge 3.1'de görüleceği gibi, PBE, TiO_2 NP'ler/PBE ve Au NP'ler/PBE'nin R_{ct} değerleri sırasıyla 304, 219 ve 136 Ω olarak hesaplanmıştır. Diğer elektrotlara kıyasla Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE'nin R_{ct} değeri dramatik olarak 50 Ω 'a düşmüştür. Kademeli olarak azalan R_{ct} değerleri, modifiye elektrodun, elektron transfer sürecini iyileştirdiğini açıkça göstermiştir. Modifiye elektrot yüzeyine Apt1 ve Leptin moleküllerinin immobilizasyonu ile R_{ct} değerlerindeki artış, biyolojik moleküllerin yüzeye bağlanmasıyla oluşan kompleksler ve artan sterik engellerden kaynaklanmaktadır (Fei ve ark., 2015). Sonuç olarak hem DV hem EIS sonuçları etiketsiz aptasensörün Leptin tayini için başarıyla üretildiğini göstermiştir.



Şekil 3.1. Etiketsiz aptasensörün hazırlanması aşamalarında elde edilen dönüşümlü voltamogram eğrileri (A) ve Nyquist eğrileri (B)



Şekil 3.2. 5 mM $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin elektrot yüzeylerinde farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogram eğrileri (A) PBE, (B) TiO_2 NP'ler/PBE, (C) Au NP'ler/PBE, (D) Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE, ve (E) Apt1/Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE



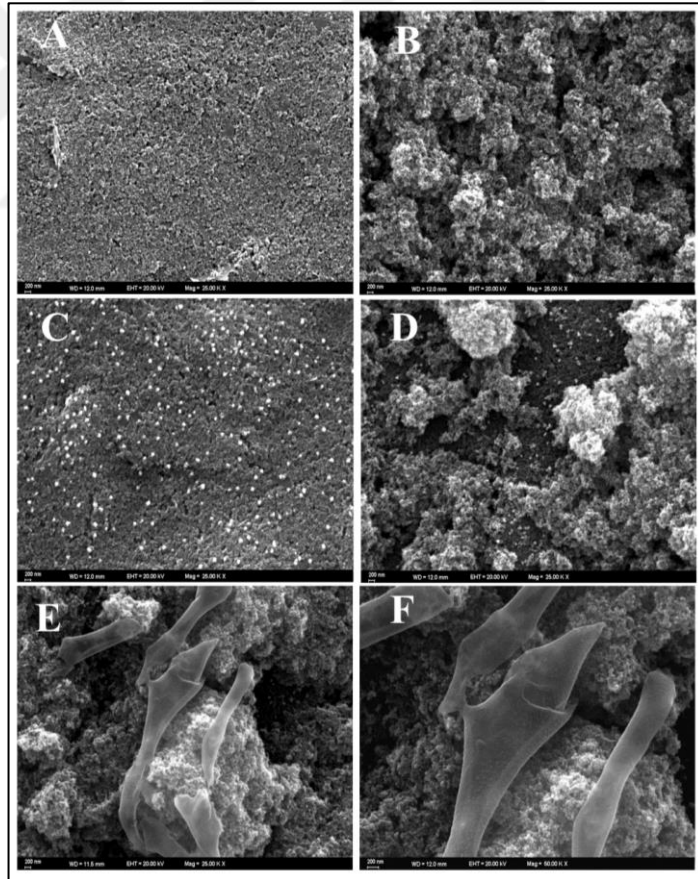
Şekil 3.2. (Devam) 5 mM $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin elektrot yüzeylerinde farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogram eğrileri (A) PBE, (B) TiO_2 NP'ler/PBE, (C) Au NP'ler/PBE, (D) Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE ve (E) Apt1/Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE

Çizelge 3.1. Etiketsiz aptasensörün hazırlanması aşamalarında kullanılan elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması

Elektrot	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)	R_{ct} (Ω)	Elektroaktif yüzey alanı (cm^2)
PBE	88,64	82,44	0,298	-0,046	-0,344	304,0	0,093
TiO_2 NP'ler/PBE	98,33	87,91	0,259	-0,034	-0,293	219,0	0,116
Au NP'ler/PBE	110,00	94,29	0,266	-0,073	-0,339	136,0	0,131
Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE	131,83	103,43	0,193	-0,095	-0,288	50,0	0,158
Apt1/Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE	100,54	68,77	0,254	-0,117	-0,371	555,0	0,121

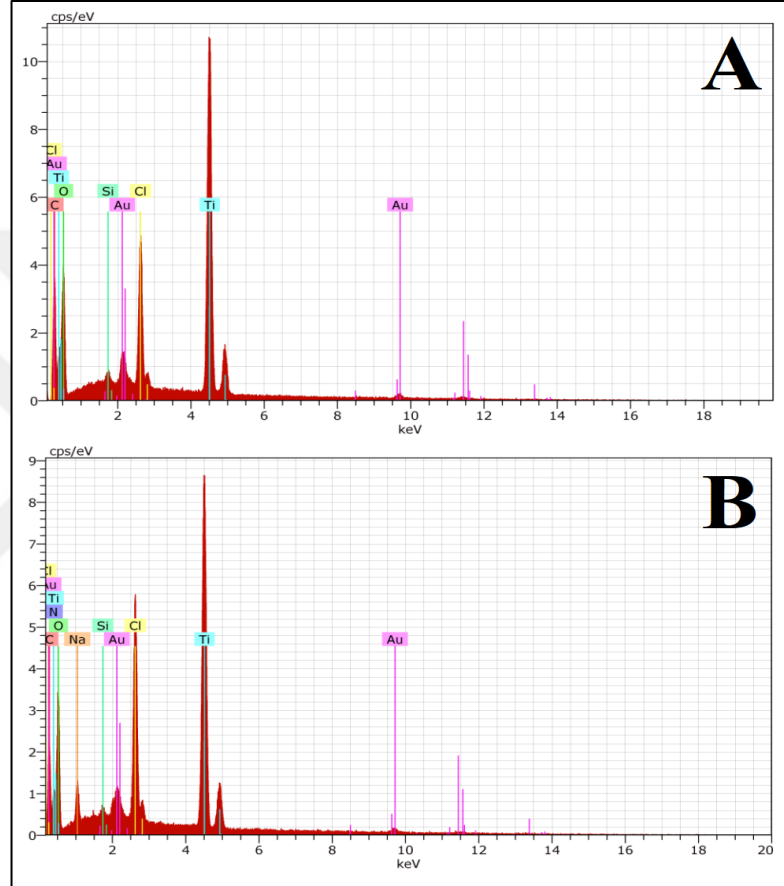
3.2. Etiketsiz Aptasensörün Yüzey Karakterizasyonu

Geliştirilen aptasensör için elektrotların yüzey morfolojileri SEM yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.3'te görüldüğü gibi, yalın PBE pürüzsüz ve daha koyu bir yüzeye sahiptir. PBE'nin TiO_2 NP'ler ile modifiye edilmesiyle değişen morfoloji ve artan yüzey pürüzlülüğü elektrot yüzeyinde TiO_2 NP'lerin varlığını doğrulamıştır. Au NP'lerin PBE yüzeyinde elektrodepolanmasıyla yüzeyde homojen olarak dağılmış parlak parçacıklar Au NP'lerin modifikasyonunu göstermiştir. Ayrıca, Au NP'lerin, TiO_2 NP'ler/PBE yüzeyinde biriktirilmesiyle TiO_2 NP'lerin boşuklarındaki ve üzerindeki parlak morfoloji modifikasyonun başarılı olarak gerçekleştiğini desteklemiştir. Son adımda, Apt1 moleküllerinin immobilizasyonu ile görülen fibril benzeri yapılar etiketsiz aptasensörün başarılı olarak üretimini göstermiştir.



Şekil 3.3. Etiketsiz aptasensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait SEM görüntüleri (A) PBE, (B) TiO_2 NP'ler/PBE, (C) Au NP'ler/PBE, (D) Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE, (E) Apt1/Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE (25.00 kx) ve (F) Apt1/Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE (50.00 kx)

Ayrıca, enerji dağılımlı X-ışını (EDS) yöntemi TiO₂ NP'lerin, Au NP'lerin ve Apt1'in elementel analizi için kullanılmıştır. Au NP'ler/TiO₂ NP'ler/PBE'nin EDS spektrumları (Şekil 3.4A) incelendiğinde Ti ve Au pikleri belirgin şekilde görünürken, Apt1/Au NP'ler/TiO₂ NP'ler/PBE'de (Şekil 3.4B) azot ve sodyumun varlığı Apt1 moleküllerinin immobilizasyonunu göstermiştir.

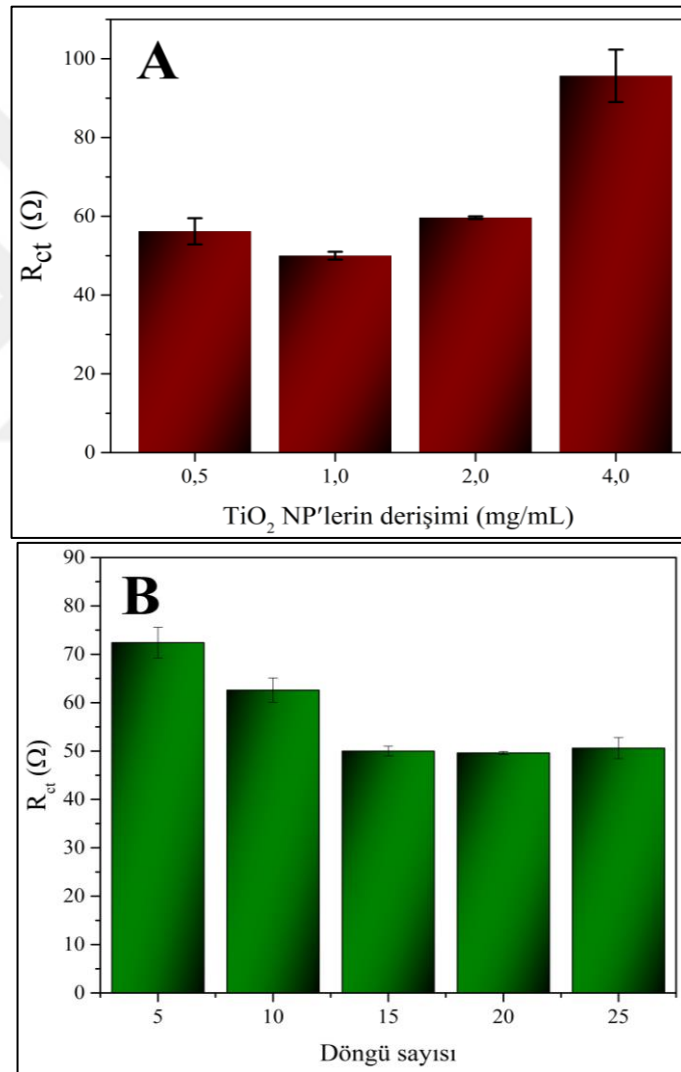


Şekil 3.4. Etiketsiz aptasensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait EDS spektrumları (A) Au NP'ler/TiO₂ NP'ler/PBE, (B) Apt1/Au NP'ler/TiO₂ NP'ler/PBE

3.3. Etiketsiz Aptasensör İçin Deneysel Koşulların Belirlenmesi

Geliştirilen aptasensörün en yüksek performansı sergilemesi için farklı deneysel parametrelerin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla TiO₂ NP'lerin derişimi, Au NP'lerin elektrodpozisyonu için döngü sayısı, Apt1 moleküllerinin immobilizasyon süresi, ve derişimi, ve Leptin'in aptasensöre bağlanması için inkübasyon süresi Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks çözeltisinin EIS yanıtları takip edilerek incelenmiştir.

İlk modifikasyon katmanı olarak, TiO₂ NP'lerin derişimi 0,5 ile 4,0 mg/mL arasında değiştirilmiştir. Şekil 3.5A'dan görüleceği gibi, 1,0 mg/mL TiO₂ NP'ler kullanıldığı zaman en düşük R_{ct} değeri elde edilmiştir. İkinci adımda, 1,0 mM HAuCl₄ derişimi sabit tutularak Au NP'lerin elektrodolanması için 5, 10, 15, 20 ve 25 döngü sayıları denenmiştir. 15 döngü sayısı kullanıldığı zaman en düşük R_{ct} değeri elde edilirken artan döngü sayılarında önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 3.5B). Sonuç olarak artan iletkenlik ve elektron transferine bağlı olarak en düşük R_{ct} değerinin elde edildiği 1,0 mg/mL TiO₂ NP'ler derişimi ve 15 döngü sayısı optimum olarak belirlenmiştir.

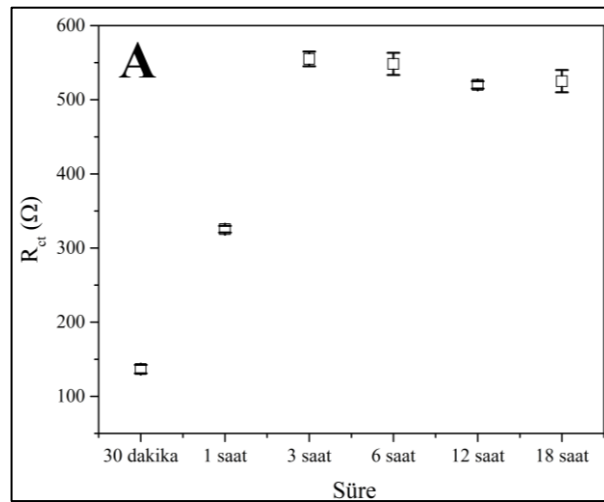


Şekil 3.5. Farklı TiO₂ NP'ler derişimlerinin 5 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks çözeltisinin R_{ct} değerlerine etkisinin grafiği (A), farklı döngü sayılarının 5 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks çözeltisinin R_{ct} değerlerine etkisinin grafiği (B)

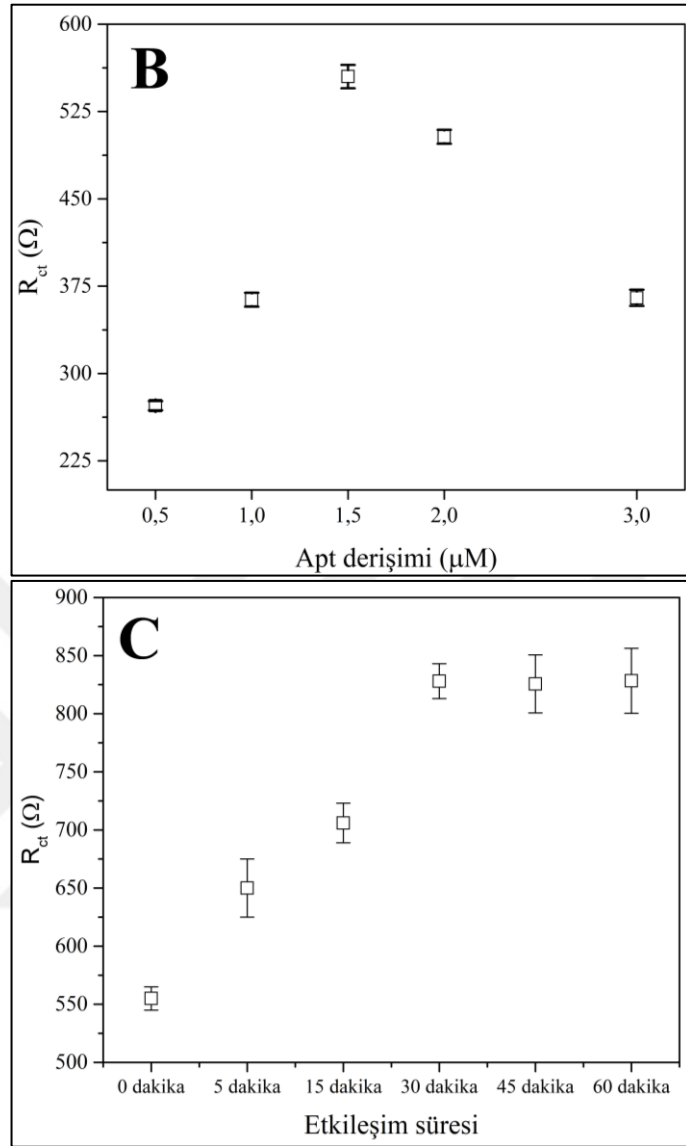
TiO₂ NP'ler ve Au NP'ler için optimum değerler belirlendikten sonra, Apt1 moleküllerinin immobilizasyon süresinin R_{ct} değerine etkisi incelenmiştir. İmmobilizasyon süresi kademeli olarak 3 saate kadar arttırıldıkça, aptasensörün R_{ct} değeri artmış ve daha sonrasında sabit olarak devam etmiştir (Şekil 3.6A). Bu davranış, Apt1 moleküllerin bağlanma bölgelerinin modifiye yüzeyde 3 saatte doygunluğa ulaştığını göstermektedir. Bu nedenle, optimum immobilizasyon süresi olarak 3 saat seçilmiştir.

Apt1 derişimimin geliştirilen aptasensörün R_{ct} değeri üzerindeki etkisi 0,5 ile 3,0 μM arasında değişen derişimlerde incelenmiştir. 0,5 μM ile 1,5 μM derişim aralığında R_{ct} değerinin kademeli olarak arttığı görülürken, derişim 2,0 μM ve 3,0 μM 'a yükseltildiğinde R_{ct} değerinde keskin bir düşüş görülmüştür (Şekil 3.6B). Apt1 moleküllerinin konformasyonuna ve sterik engellere bağlı olarak maksimum R_{ct} değerinin elde edildiği 1,5 μM Apt1 derişimi optimum olarak seçilmiştir.

Son olarak, Leptin'in aptasensöre bağlanma süresi 10 pg/mL Leptin derişimi sabit tutularak 5, 15, 30, 45 ve 60 dakikalarda incelenmiştir. 30 dakikaya kadar R_{ct} değeri artarken, 30 dakika sonrasında Apt1-Leptin kompleksinin doygunluğuna bağlı olarak R_{ct} değerinde bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 3.6C). Bu nedenle, Leptin tayini için optimum bağlanma süresi olarak 30 dakika olarak seçilmiştir.



Şekil 3.6. 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin R_{ct} değerlerine karşılık farklı Apt1 bağlanma sürelerinin grafiği (A), 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin R_{ct} değerlerine karşılık farklı Apt1 derişimlerinin grafiği (B), 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin R_{ct} değerlerine karşılık aptasensör ile Leptin arasındaki farklı etkileşim sürelerinin grafiği (C)



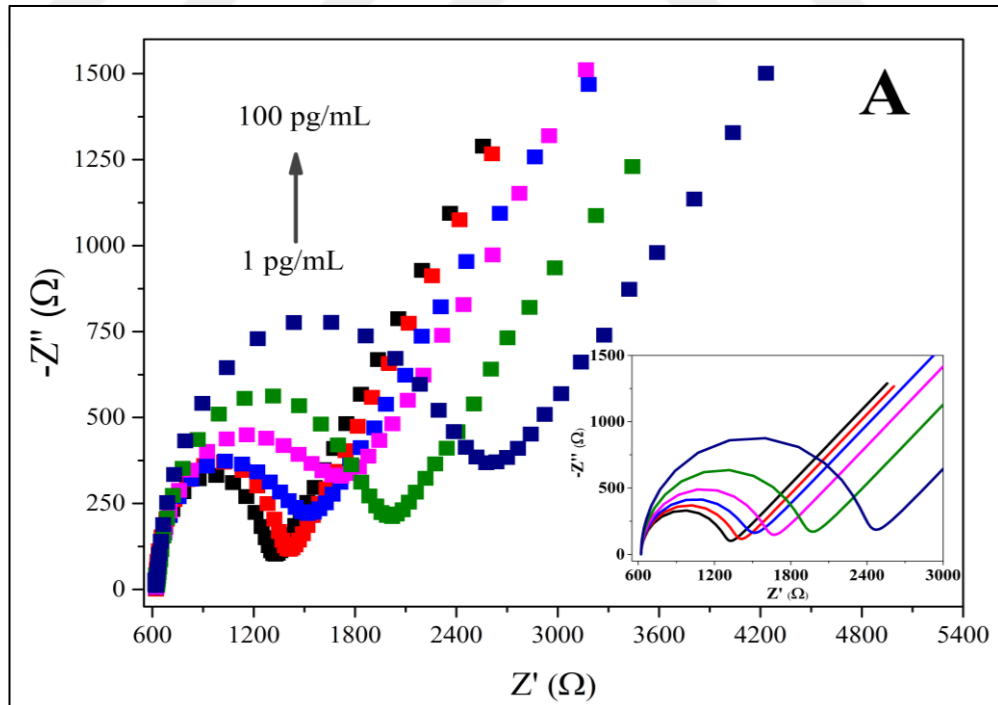
Şekil 3.6. (Devam) 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin R_{ct} değerlerine karşılık farklı Apt1 bağlanma sürelerinin grafiği (A), 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin R_{ct} değerlerine karşılık farklı Apt1 derişimlerinin grafiği (B), 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin R_{ct} değerlerine karşılık aptasensör ile Leptin arasındaki farklı etkileşim sürelerinin grafiği (C)

3.4. Etiketsiz Aptasensör ile Leptin'nin Elektrokimyasal Tayini ve Yöntem Validasyonu

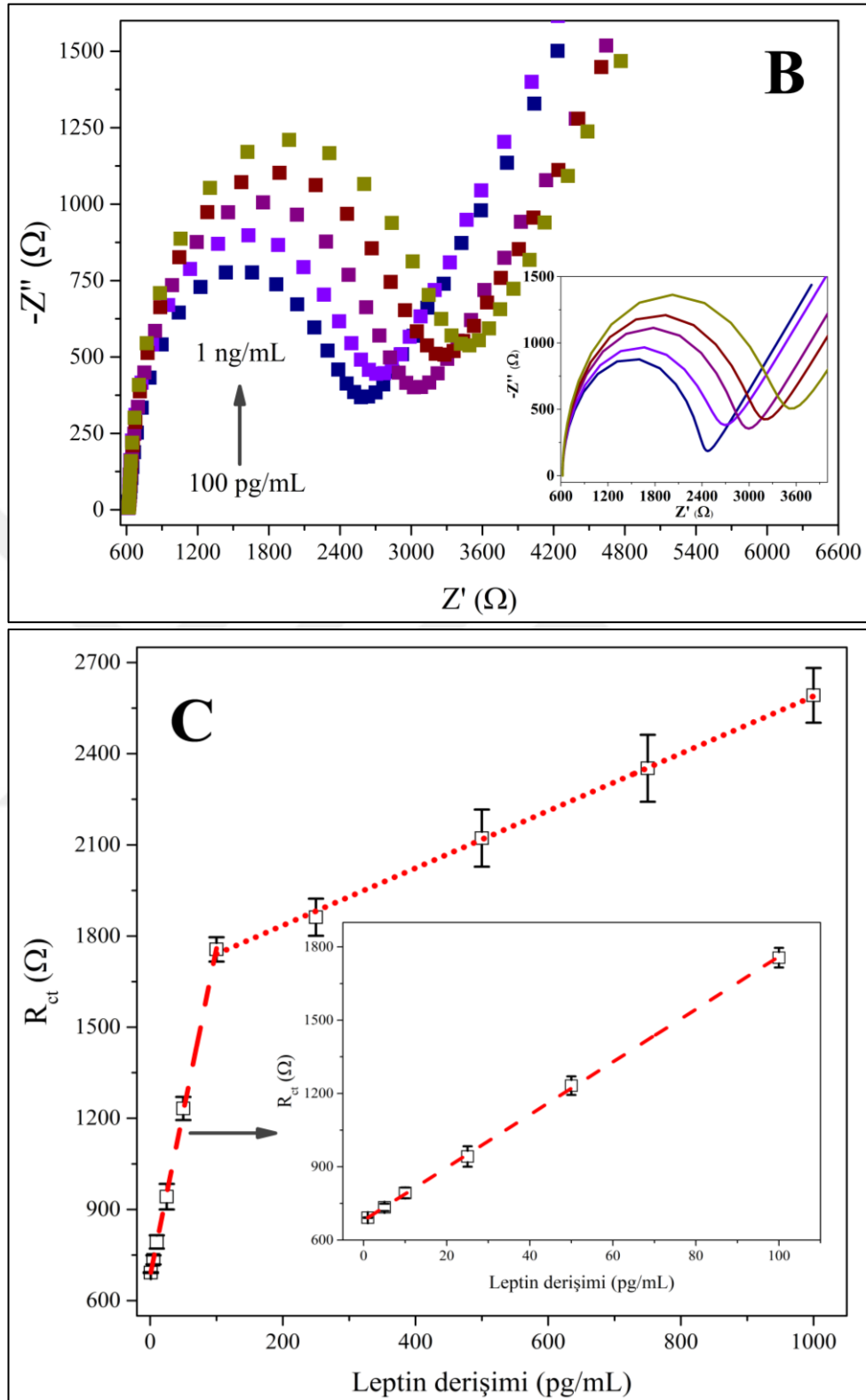
Geliştirilen aptasensörün analitik performansı, optimum deneysel koşullar altında artan Leptin derişimine karşı $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin R_{ct} değerleri elde edilerek incelenmiştir. Bu amaçla, 1 pg/mL-100 pg/mL (Şekil 3.7A) ve 100 pg/mL-1

ng/mL (Şekil 3.7B) olmak üzere iki farklı Leptin derişimi aralığında EIS ölçümleri kaydedilmiştir. İlk kalibrasyon aralığında (1 pg/mL-100 pg/mL aralığında), $R_{ct} (\Omega) = 10,78 C_{Leptin} [pg/mL] + 681,68$ regresyon denklemi; $R^2=0,999$ elde edilirken, ikinci kalibrasyon aralığında (100 pg/mL-1 ng/mL) aralığında) $R_{ct} (\Omega) = 0,943 C_{Leptin} [pg/mL] + 1646,63$ regresyon denklemi; $R^2=0,999$ elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen aptasensörün artan Leptin derişimlerine karşı mükemmel bir doğrusallık sağladığını göstermiştir (Şekil 3.7C).

İkinci kalibrasyon aralığındaki regresyon denkleminin daha düşük eğimi, artan Leptin derişimine bağlı olarak aptasensör ile $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisi arasındaki elektron transferinin sınırlandırmasından kaynaklanmaktadır. Bu da ilk kalibrasyon aralığına göre azalan hassasiyete yol açmaktadır. Ayrıca, ilk kalibrasyon aralığı kullanılarak geliştirilen aptasensör ile Leptin'in TS ve TAS'ı belirlenmiştir. Regresyon denkleminin eğimine bağlı olarak hesaplamalara göre, TS değeri 0,312 pg/mL, TAS değeri ise 1,0 pg/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 3.7. Etiketsiz aptasensör kullanılarak Leptin tayini için Nyquist ve kalibrasyon eğrileri (A) 1 pg/mL-100 pg/mL derişim aralığında Nyquist eğrileri, (B) 100 pg/mL-1 ng/mL derişim aralığında Nyquist eğrileri, (C) 1 pg/mL-100 pg/mL (iç grafik) ve 100 pg/mL-1 ng/mL derişim aralıklarında kalibrasyon eğrileri

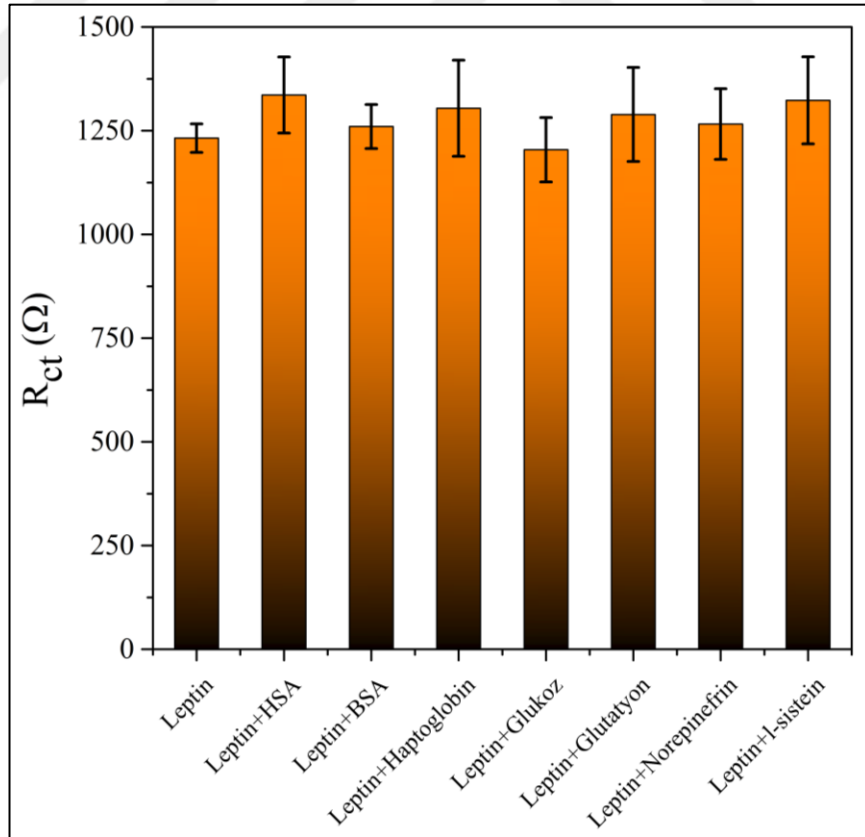


Şekil 3.7. (Devam) Etiketsiz aptasensör kullanılarak Leptin tayini için Nyquist ve kalibrasyon eğrileri (A) 1 pg/mL-100 pg/mL derişim aralığında Nyquist eğrileri , (B) 100 pg/mL-1 ng/mL derişim aralığında Nyquist eğrileri, (C) 1 pg/mL-100 pg/mL (iç grafik) ve 100 pg/mL-1 ng/mL derişim aralıklarında elde kalibrasyon eğrileri

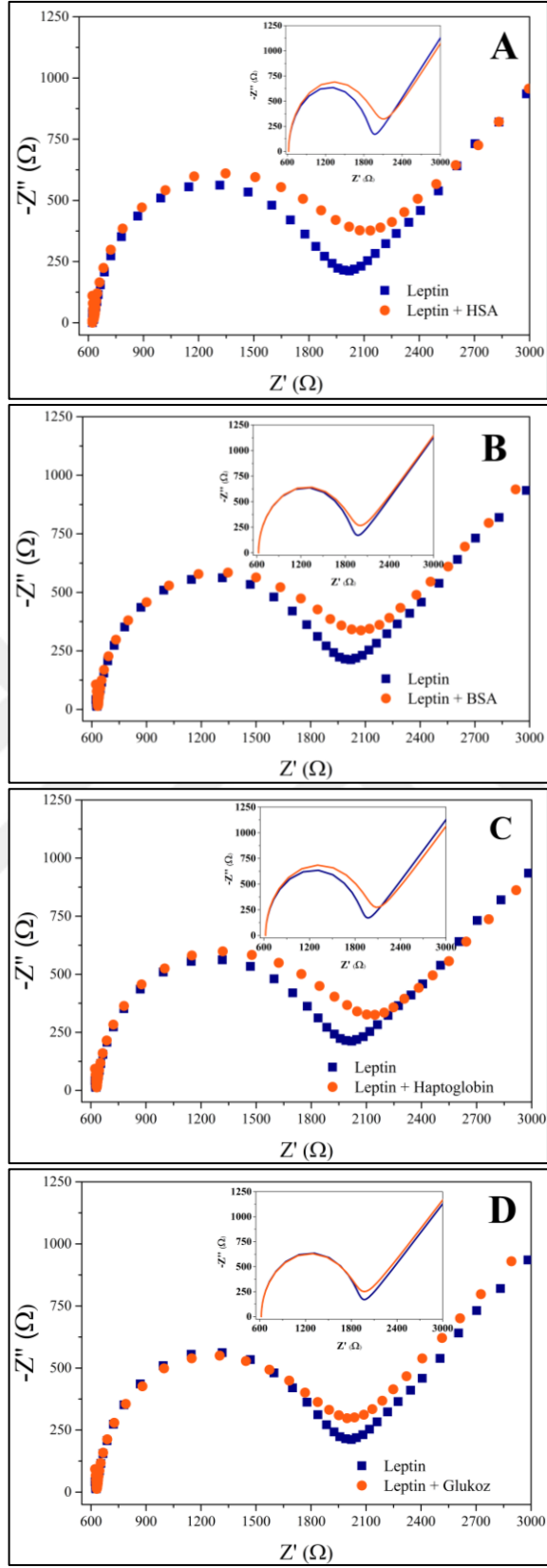
3.4.1. Etiketsiz Aptasensör İçin Seçicilik Çalışması

Geliştirilen aptasensörün performansını değerlendirmede kritik bir faktör olarak kabul edilen seçicilik, 50 pg/mL Leptin içeren 50 pg/mL HSA ve BSA, 2,2 mg/mL haptoglobin, 0,5 mM glukoz, 5 mM glutasyon, 2,0 ng/mL norepinefrin ve 360 μ M l-sistein varlığında ayrı olarak değerlendirilmiştir.

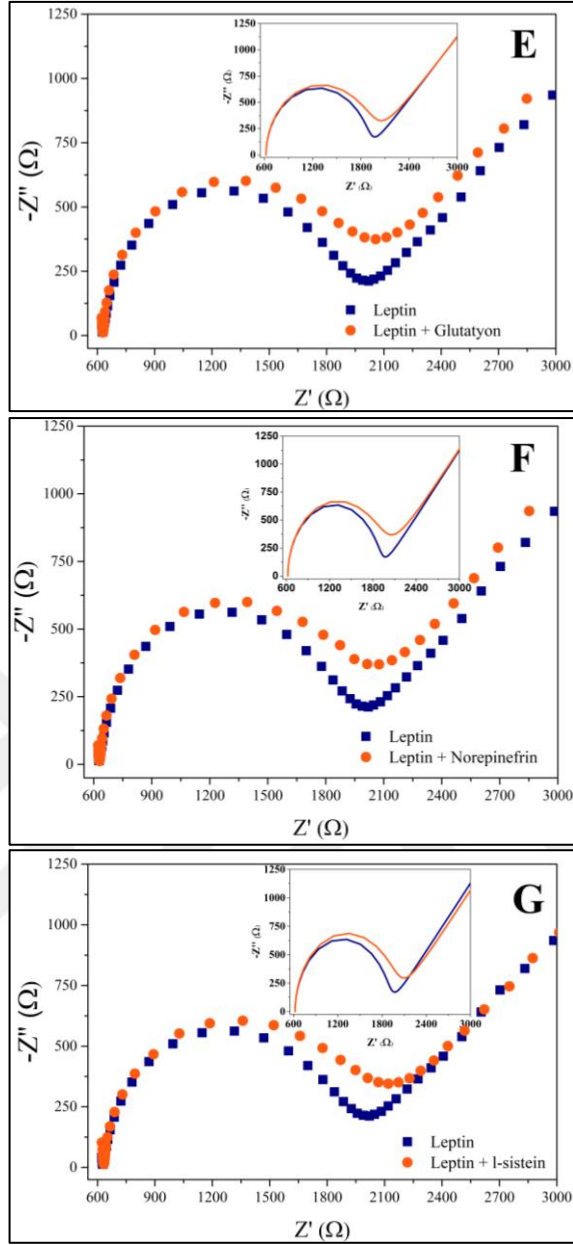
Optimum deneysel koşullar altında, Şekil 3.8'de görüldüğü gibi, R_{ct} değerlerinde küçük farklar gözlemlenmiştir. Muhtemel girişim etkili moleküller varlığında olan %geri kazanım ve %BSS sonuçları değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre %geri kazanım değerleri %97,72-108,44 aralığında ve biyosensörler için ihmal edilebilir BSS ($\leq$ %9,0) değerleri ile bulunmuştur (Şekil 3.8). Elde edilen sonuçlar, Leptin için geliştirilen aptasensörün spesifik olmayan adsorpsiyonlara duyarlı olduğunu, sadece Leptin tayini için yüksek seçicilik sergilediğini göstermiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Etiketsiz aptasensör kullanılarak Leptin ile birlikte çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin R_{ct} değerleri



Şekil 3.9. Etiketsiz aptasensör kullanılarak Leptin ile çeşitli girişim yapan maddeler için elde edilen Nyquist eğrileri. A) HSA, (B) BSA, (C) haptoglobin, (D) glukoz, (E) glutatyon, (F) norepinefrin ve (G) l-sistein

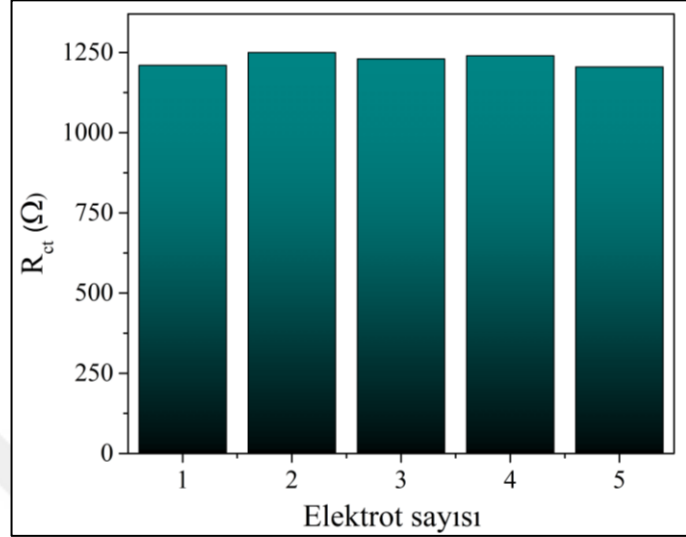


Şekil 3.9. (Devam) Etiketsiz aptasensör kullanılarak Leptin ile çeşitli girişim yapan maddeler için elde edilen Nyquist eğrileri. (A) HSA, (B) BSA, (C) haptogloblin, (D) glukoz, (E) glutatyon, (F) norepinefrin ve (G) l-sistein

3.4.2. Etiketsiz Aptasensör İçin Tekrar Üretilirlik ve Stabilité Çalışmaları

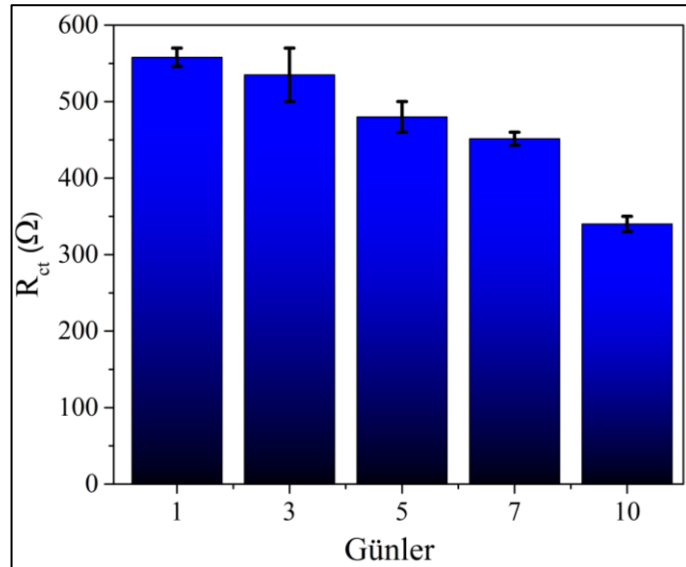
Geliştirilen aptasensörün tekrar üretilebilirliğinin incelenmesi için beş farklı aptasensörün aynı deneysel koşullar altında 50 pg/mL Leptin derişimine karşı EIS ölçümleri kaydedilmiştir (Şekil 3.10). Beş farklı aptasensörün Rct değerlerinin

%BSS'si 1,40 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuç, geliştirilen aptasensörün Leptin tayininde mükemmel derecede tekrarlanabilirlik sergilediğini göstermiştir.



Şekil 3.10. Geliştirilen etiketsiz aptasensörün tekrar üretilebilirliği

Geliştirilen aptasensörün stabilitesi, elektrodun 10 gün boyunca 4 °C'de bekletilmesiyle değerlendirilmiştir. Şekil 3.11'de görüldüğü gibi, geliştirilen aptasensör Leptin'e karşı 3 gün boyunca başlangıç sinyalinin %96'sını korurken, aptasensörün bir hafta süreyle kullanılabilir olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.11. Geliştirilen etiketsiz aptasensörün stabilitesi

3.4.3. Etiketsiz Aptasensör Kullanılarak İnsan Serum ve İnsan Plazma Örneklerinden Leptin Analizi

Geliştirilen aptasensörün pratik olarak uygulanabilirliği, ticari olarak temin edilen insan serumu ve insan plazma örneklerine standart ekleme yöntemiyle Leptin ilavesi yapılarak değerlendirilmiştir. Serum ve plazma örneklerinden elde edilen analiz sonuçları Çizelge 3.2’de verilmiştir. Geri kazanım değerleri %96,40-107,79 aralığında kabul edilebilir %BSS değerleri ile bulunmuştur. Bu sonuçlar geliştirilen etiketsiz aptasensörün Leptin tayini için başarılı bir şekilde uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Çizelge 3.2. Etiketsiz aptasensör kullanılarak geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

Örnek	Eklenen miktar (pg/mL)	Bulunan miktar (pg/mL)	Geri kazanım (%)	%BSS*
İnsan serum örneği	1,0	1,08	107,79	9,84
	10,0	10,07	100,69	7,53
	50,0	51,24	102,47	7,98
İnsan plazma örneği	1,0	0,97	97,03	7,90
	10,0	9,64	96,40	9,94
	50,0	49,75	99,50	6,71

*Elde edilen %BSS değerleri 5 ölçüme ait sonuçlardır.

3.5. Sandviç Tip Aptasensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Leptin tayini için geliştirilen sandviç tip aptasensörün her bir modifikasyon aşamasının karakterizasyonunu DV ve EIS yöntemleri ile incelenmiştir. Şekil 3.12A’da görüldüğü gibi, ZnO NP’ler ile modifiye edilmiş PBE’nin anodik tepe akımı (98,77 μ A), yalın PBE’nin tepe akımı (80,19 μ A) ile kıyaslandığında artmıştır. Akım değerindeki bu artış, ZnO NP’lerin redoks molekülü ile elektrot arasında doğrudan elektron transferini arttırdığını göstermektedir. PBE yüzeyi Au NP’ler ile modifiye edildikten sonra, Au NP’lerin yüksek iletkenliği ve mükemmel elektrokatalitik özellikleri, akım değerinin 116,00 μ A’ya kadar yükselmesini sağlamıştır. Dahası, Au NP’ler/ZnO NP’ler/PBE’de en yüksek tepe akımı (162,22 μ A) elde edilirken, pik potansiyelinde 127 mV’luk daha negatif bir potansiyele kayma meydana gelmiştir. Bu,

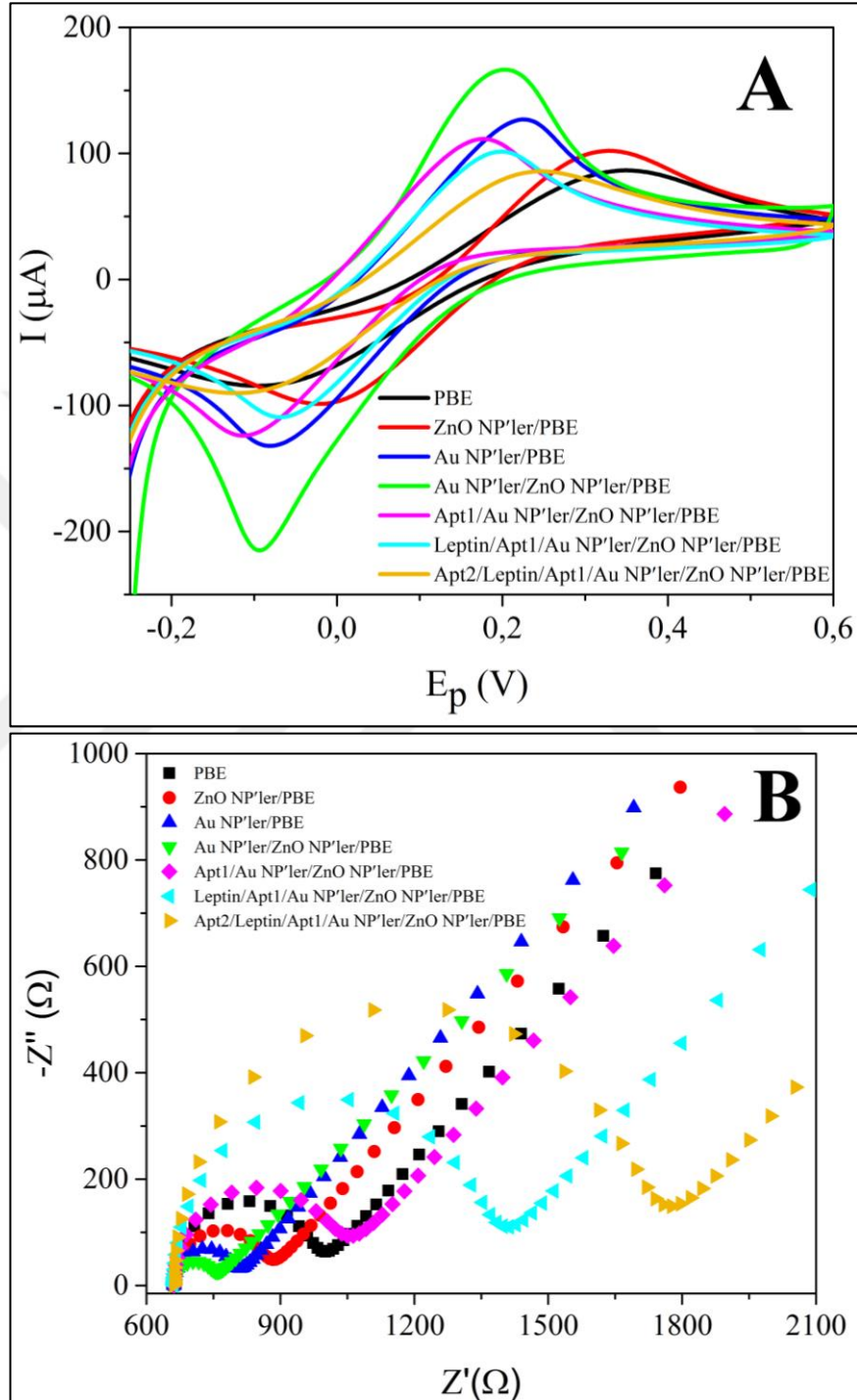
Au NP'lerin elektrokimyasal katalitik aktivitesinden ve Au NP'ler ile ZnO NP'ler arasındaki sinerjik etkiden kaynaklanmaktadır (Yang ve ark., 2022).

Daha sonra, tiyol etiketli Apt1 molekülleri, Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE'nin yüzeyinde immobilize edildiğinde, Apt1 modifiye yüzeyin akım değeri 113,77 μA 'ya kadar düşmüştür. Bu, Apt1 moleküllerinin Au-S kovalent bağları yoluyla elektrot yüzeyinde başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir. Sonraki adımda, Leptin'in inkübasyonu ile, Leptin'in elektroaktif olmayan özelliğinden dolayı akım değeri 100,21 μA 'ya kadar düşmüştür. Son adımda ise, biyotin etiketli Apt2 molekülleri, Leptin/Apt1/Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE yüzeyine immobilize edildiğinde, akım değeri 75,20 μA 'ya kadar azalmıştır. Akım değerindeki kademeli bu azalmalar yüzeydeki biyolojik moleküllerin yoğunluklarının artmasıyla, elektron transferinin inhibisyonuna bağlanabilir (Çizelge 3.3).

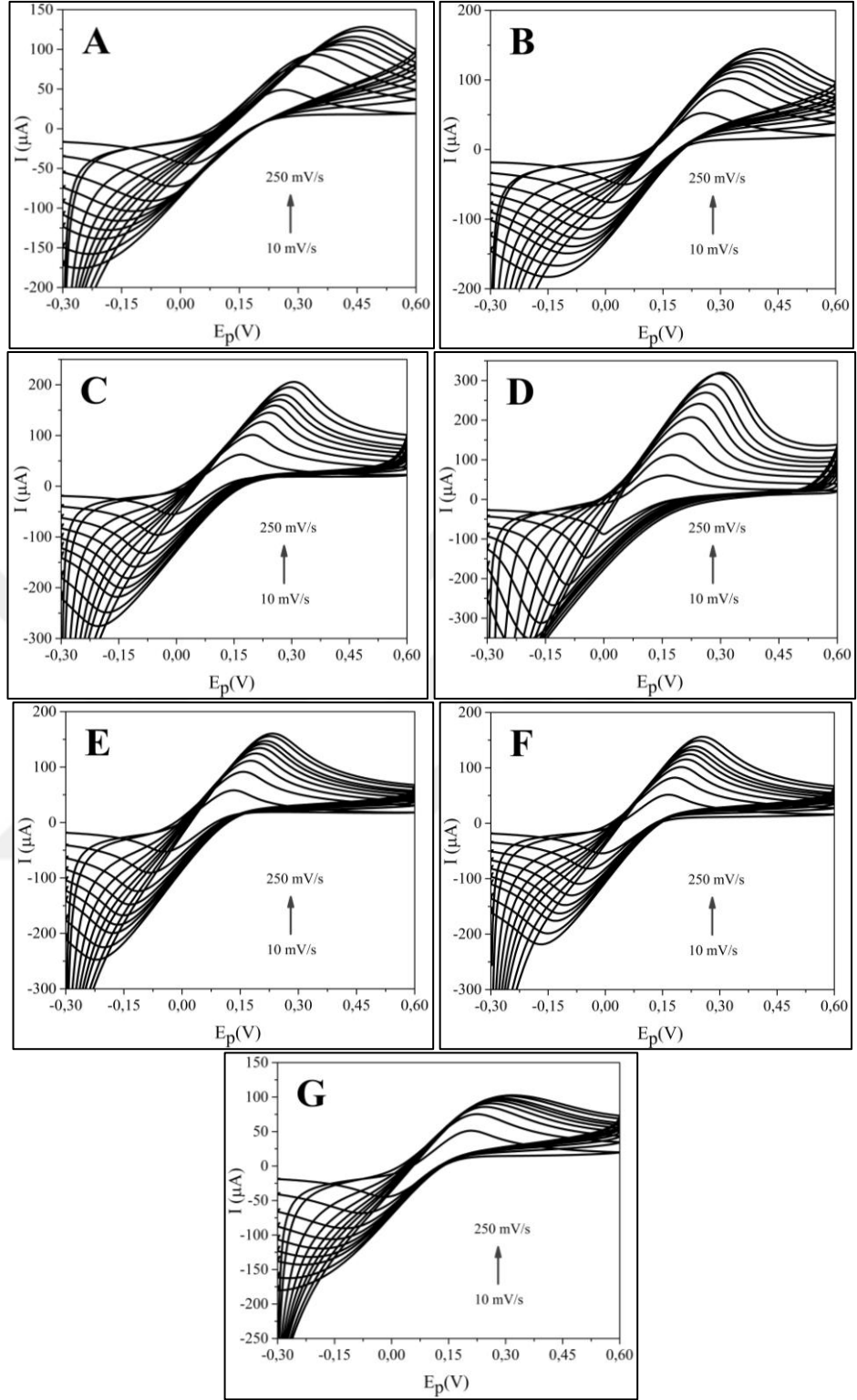
Ayrıca, elektroaktif yüzey alanının belirlenmesi farklı tarama hızlarında $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 3.13). Randles–Ševčík eşitliğine (Eşitlik 3.1) göre, PBE'nin elektrokimyasal yüzey alanı 0,097 cm^2 iken, Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE'nin elektrokimyasal yüzey alanı 0,195 cm^2 'dir. Yüzey alanındaki bu artış Apt1 moleküllerinin yüzey üzerinde daha etkin bir şekilde immobilize olabileceğini ve aptasensörün performansını arttırabileceğini göstermektedir.

Elektrokimyasal karakterizasyonun ikinci adımında, EIS ölçümleri alınarak elektrotların R_{ct} değerleri belirlenmiştir. Şekil 3.12B'de görüldüğü gibi, yalın PBE, ZnO NP'ler/PBE, Au NP'ler/PBE ve Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE'nin R_{ct} değerleri sırasıyla 305,0 Ω , 199,0 Ω , 134,0 Ω ve 56,0 Ω olarak bulunmuştur. ZnO NP'lerin yarı iletken özellikleri ve Au NP'lerin mükemmel iletkenliği sayesinde R_{ct} değerindeki azalma, Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE'nin Apt1 moleküllerinin immobilizasyonu için uygun bir yüzey olduğunu göstermektedir. Apt1, Leptin ve Apt2 molekülleri, yüzeye sırasıyla immobilize edildikten sonra, R_{ct} değerleri sırasıyla 390,0 Ω , 696,0 Ω ve 1030,0 Ω 'a kadar yükselmiştir. R_{ct} değerlerindeki bu artışlar, elektron transferinin, biyolojik moleküller tarafından inhibe edilmesi gerçeğine bağlanabilir. Sonuç olarak,

birbirini destekler nitelikte olan tüm DV ve EIS sonuçları, geliştirilen aptasensörün Leptin tayini için başarıyla üretildiğini göstermektedir.



Şekil 3.12. Sandviç tip aptasensörün hazırlanması aşamalarında elde edilen dönüşümlü voltamogram eğrileri (A) ve Nyquist eğrileri (B)



Şekil 3.13. 5 mM $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin elektrot yüzeylerinde farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogram eğrileri. (A) PBE, (B) ZnO NP'ler/PBE, (C) Au NP'ler/PBE, (D) Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE, (E) Apt1/Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE, (F) Leptin/Apt1/Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE ve (G) Apt2/Leptin/Apt1/Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE

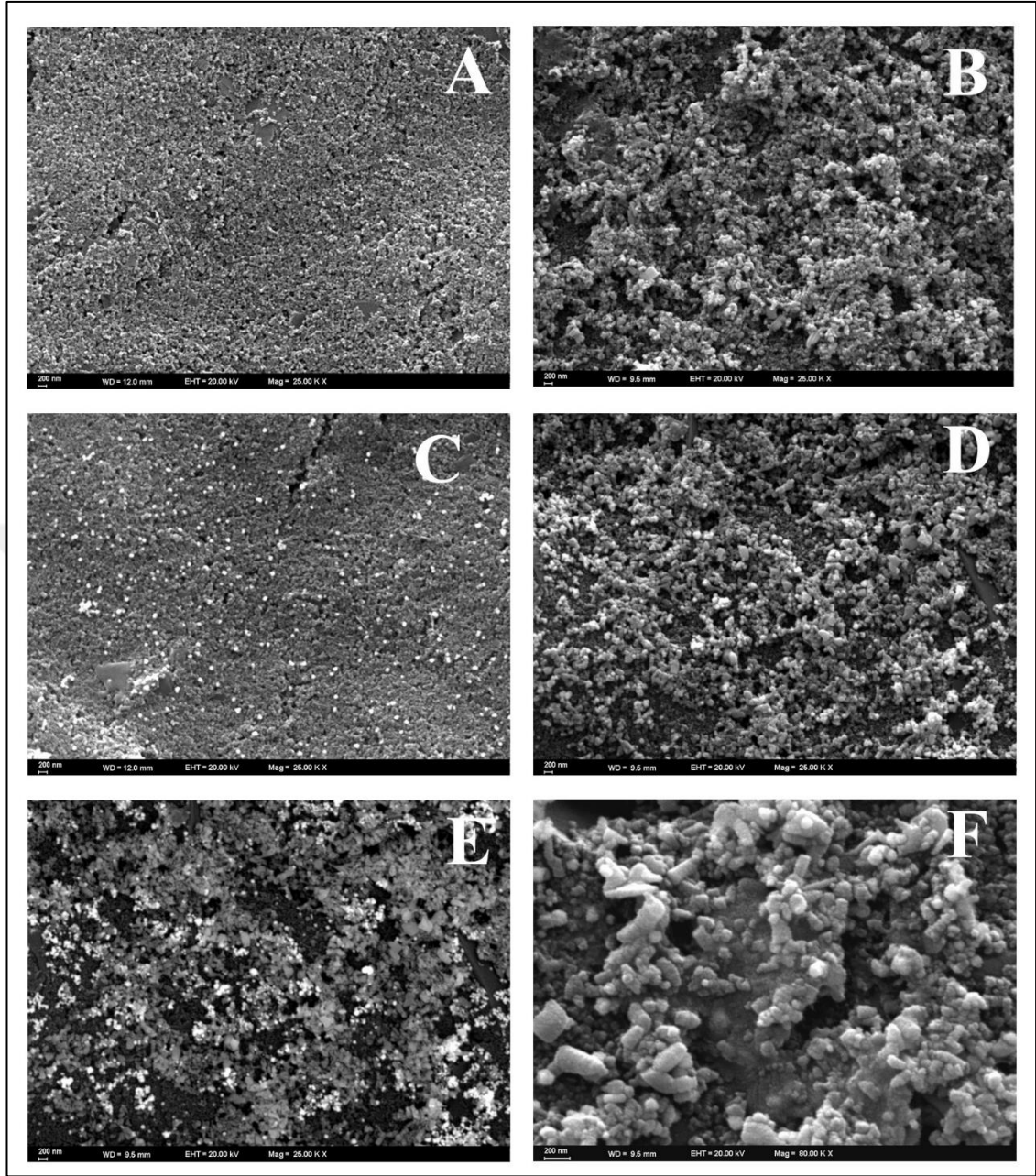
Çizelge 3.3. Sandviç tip aptasensörün hazırlanması aşamalarında kullanılan elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması

Elektrot	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)	R_{ct} (Ω)	Elektroaktif yüzey alanı (cm^2)
PBE	80,19	70,07	0,322	-0,01	0,342	305,0	0,097
ZnO NP'ler/PBE	98,77	91,30	0,308	-0,007	0,315	199,0	0,119
Au NP'ler/PBE	116,00	104,89	0,240	-0,08	0,320	134,0	0,139
Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE	162,22	174,92	0,195	-0,09	0,285	56,0	0,195
Apt1/Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE	113,77	98,67	0,190	-0,106	0,296	390,0	0,136
Leptin/Apt1/Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE	100,21	92,92	0,210	-0,08	0,290	696,0	0,120
Apt2/Leptin/Apt1/Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE	75,20	56,60	0,252	-0,08	0,332	1030,0	0,091

3.6. Sandviç Tip Aptasensörün Yüzey Karakterizasyonu

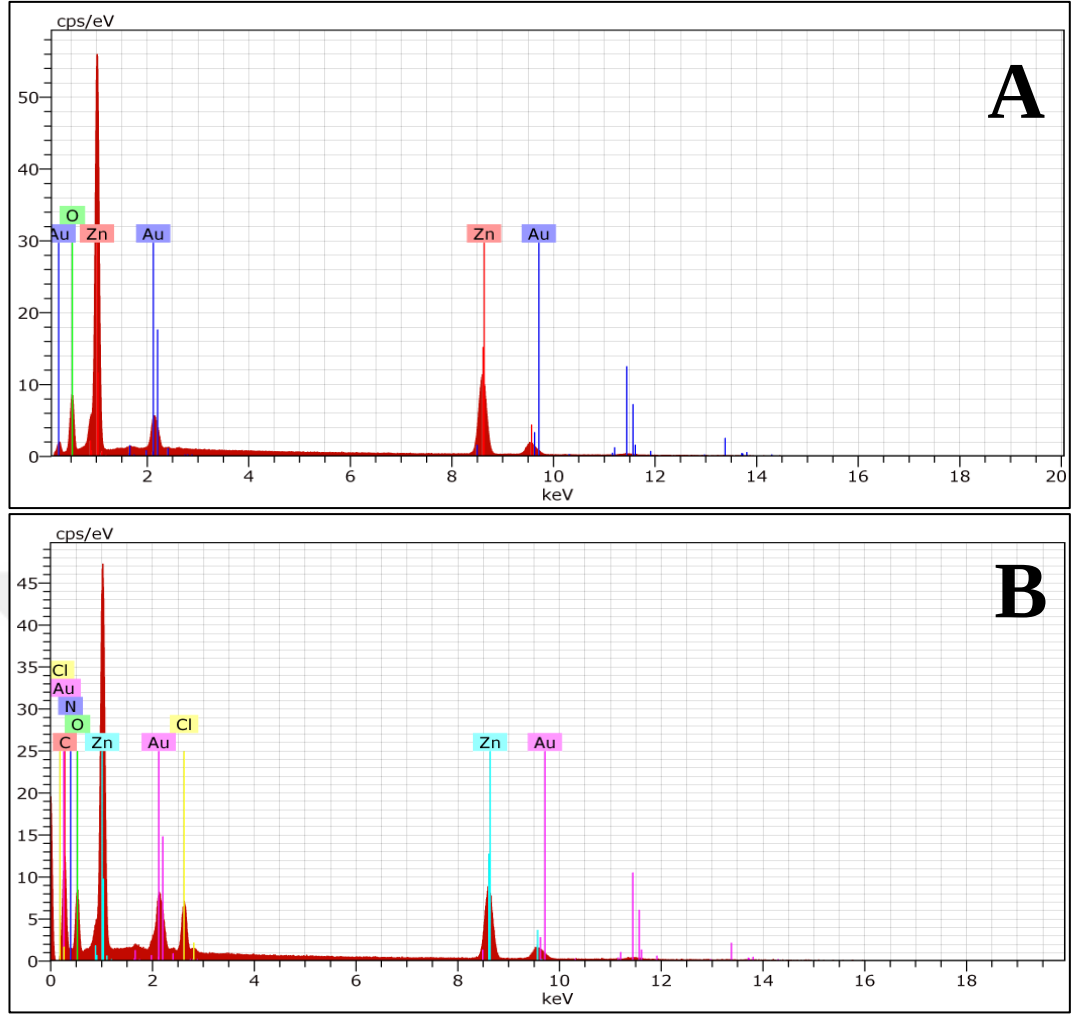
Leptin tayini için geliştirilen sandviç tip aptasensörün yüzey morfolojisi, SEM, EDS ve XRD analizleri ile aydınlatılmıştır. Şekil 3.14'te görüldüğü gibi, yalın PBE nispeten pürüzsüz bir karbon tabakası yüzeyine sahiptir. ZnO NP'ler ile modifiye edilen PBE'de eşit olarak dağılmış küresel gözenekli yapıları modifikasyonu açıkça göstermektedir. Ayrıca, sadece Au NP'lerin elektrokimyasal biriktirilmesiyle, PBE üzerinde Au NP'lerin küresel olarak homojen ve düzgün dağılımı görülmektedir.

Dahası, Au NP'lerin ZnO NP'ler/PBE'nin yüzeyinde elektrodepolanmasıyla görülen parlak ve arka plandaki loş parçacıklar sırasıyla yüzeydeki Au NP'ler ve ZnO NP'lerin varlığını göstermektedir. Apt1 moleküllerinin yüzeye immobilize edilmesiyle değişen yüzey morfolojisi, immobilizasyonu doğrular niteliktedir.



Şekil 3.14. Sandviç tip aptasensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait SEM görüntüleri (A) PBE, (B) ZnO NP'ler/PBE, (C) Au NP'ler/PBE, (D) Au NP'ler/ ZnO NP'ler/PBE, (E) Au NP'ler/ ZnO NP'ler/PBE (geri saçılım); (25.00 kx) ve (F) Apt1/Au NP'ler/ ZnO NP'ler/PBE (80.00 kx)

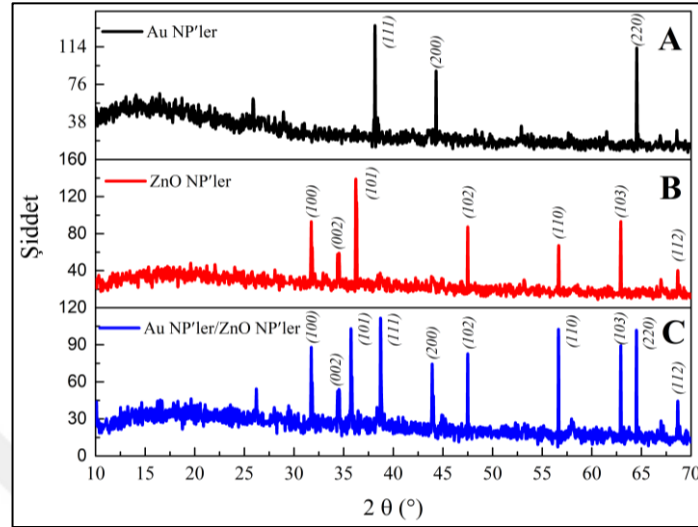
Ek olarak, Şekil 3.15A'da görüldüğü gibi EDS spektrumundan elde edilen elementel analiz sonuçları, Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE yüzeyinden, %60 oranında ZnO NP'lerin ve %20 oranında Au NP'lerin olduğunu doğrulamıştır. Şekil 3.15B'de görüldüğü gibi, ağırlıkça %10 azot varlığı, Apt1 moleküllerinin yüzey üzerinde başarılı bir şekilde immobilizasyonunu göstermektedir.



Şekil 3.15. Sandviç tip aptasensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait EDS spektrumları. (A) Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE, (B) Apt1/Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE

Ayrıca geliştirilen aptasensör için hazırlanan modifiye elektrotların kristalografik yapısı XRD kullanılarak karakterize edilmiştir. Şekil 3.16A'da görülebileceği gibi, 2θ 'de $38,3^\circ$, $44,4^\circ$ ve $64,4^\circ$ 'lik kırınım tepe noktaları sırasıyla Au NP'lerin (111), (200) ve (220) düzlemleriyle ilişkilendirilebilir. Elde edilen sonuçlar, HAuCl_4 öncüsü kullanılarak elektrodpozisyon yoluyla PBE yüzeyinin metalik Au NP'ler ile başarılı bir şekilde kaplandığını göstermiştir. Ayrıca, ZnO NP'lerin XRD modeli Şekil 3.16B'de gösterilmiştir. $2\theta=31,8$, $34,5$, $36,3$, $47,6$, $56,8$, $63,0$ ve $68,7^\circ$ 'de gözlemlenen tepe noktaları sırasıyla ZnO NP'lerin (100), (002), (101), (102), (110), (103) ve (112) düzlemleri ile ilişkisini doğrulamıştır (Salih ve ark., 2016). Dahası, PBE yüzeyinde hem ZnO NP'lerin hem de Au NP'lerin varlığında elde edilen XRD sonuçları (Şekil 3.16C), kırınım

deseninde ek tepe olmadığını yani elektrodun mükemmel bir saflığa sahip olduğunu ortaya koymuştur.



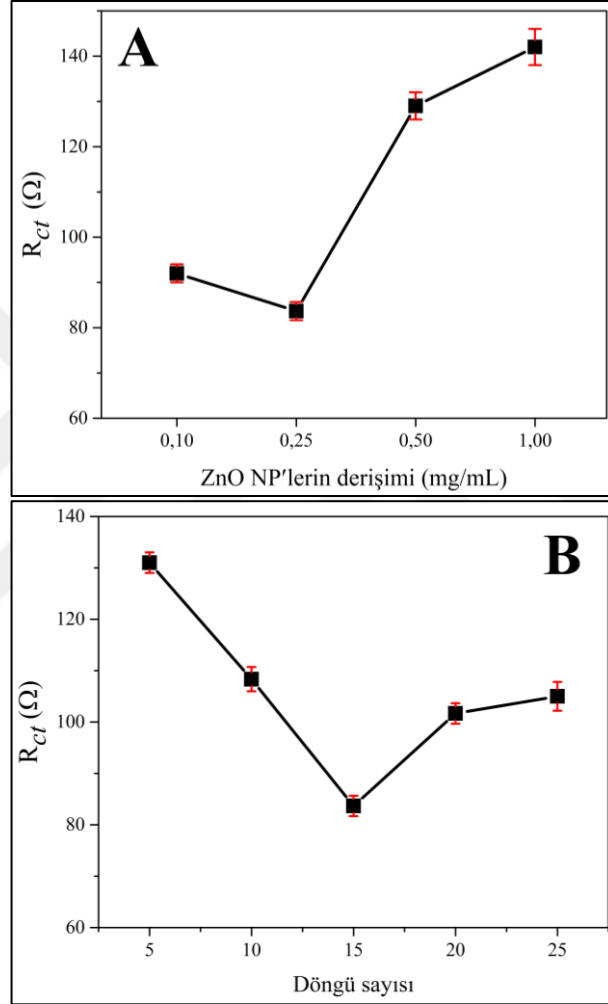
Şekil 3.16. Sandviç tip aptasensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait XRD kırınım desenleri. (A) Au NP'ler (B) ZnO NP'ler ve (C) Au NP'ler/ZnO NP'ler

3.7. Sandviç Tip Aptasensör Tasarımı İçin Elektrot Modifikasyonu

Geliştirilen aptasensörün algılama performansını güçlü bir şekilde etkileyen ilk faktör, Apt moleküllerinin yüzeye başarılı bir şekilde immobilizasyonudur. Bu amaçla, ilk olarak, ZnO NP'lerin derişimi 0,10 ile 1,0 mg/mL arasında değiştirilmiştir. Şekil 3.17A'da görüldüğü gibi, elektrot yüzeyinde 0,25 mg/mL ZnO NP'ler, 0,1 mg/mL ZnO NP'lere göre elektrot yüzeyinin R_{ct} değerinde bir azalmaya neden olurken, 0,5 mg/mL ve 1,0 mg/mL ZnO NP'ler kullanıldığında R_{ct} değeri artmıştır. Bu artış, yüzeydeki elektron transferini engelleyen böylece hassasiyette bir azalmaya neden olan kalın tabakalardan kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak 0,25 mg/mL ZnO NP'ler elektrot yüzeyinde yük transferini kolaylaştırarak yük transfer direncinde gözlemlenebilir bir azalmaya neden olduğu için optimum olarak seçilmiştir.

Au NP'lerin elektrot yüzeyi üzerindeki boyutunu ve dağılımını etkileyen döngü sayısı 5 ile 25 arasında değiştirilmiştir. Şekil 3.17B'de gösterildiği gibi, döngü sayısı 5 ile 15 arasında değiştirildiğinde R_{ct} değeri azalma eğilimi sergilemiştir. Döngü sayısı

20 ve 25 yapıldığında ise R_{ct} değeri artan bir eğilim sergilemiştir. Bunun nedeni ise, 15 döngü sayısından sonra, daha az erişilebilir yüzey alanlarına ve düşük iletkenliğe sahip daha kalın bir film oluşumunun meydana gelmesidir. Sonuç olarak artan iletkenlik ve elektron transferine bağlı olarak en düşük R_{ct} değerinin elde edildiği 0,25 mg/mL ZnO NP'ler derişimi ve 15 döngü sayısı optimum olarak belirlenmiştir.

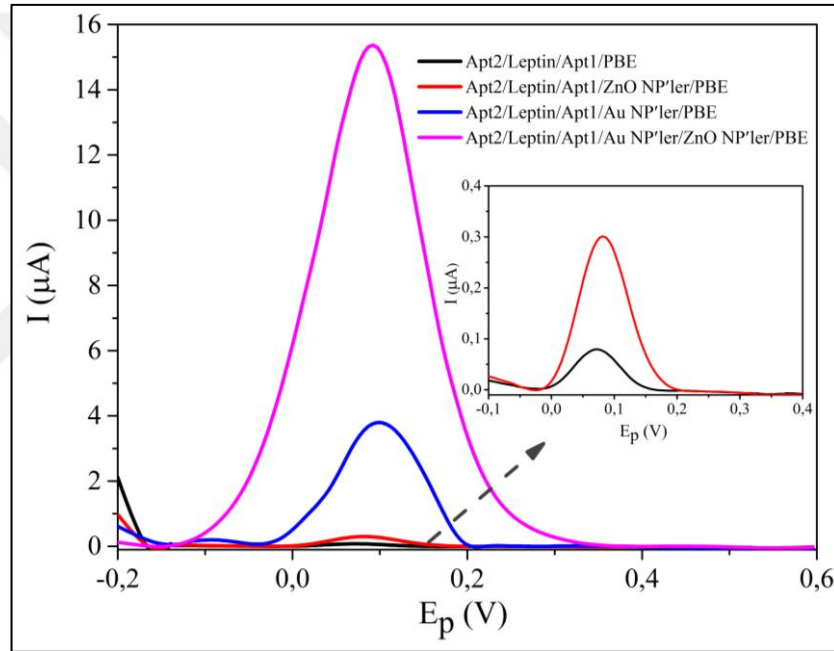


Şekil 3.17. Farklı ZnO NP'ler derişimlerinin 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin R_{ct} değerlerine etkisinin grafiğı (A), farklı döngü sayılarının 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin R_{ct} değerlerine etkisinin grafiğı (B)

3.8. Sandviç Tip Aptasensör İçin Deneysel Koşulların Belirlenmesi

Sinyal amplifikasyon stratejisinin uygulanabilirliğini kontrol etmek için α -naftol'ün Leptin'e karşı mevcut yanıtı farklı elektrotlar kullanılarak incelenmiştir.

Şekil 3.18'de görüldüğü gibi, PBE yüzeyinde hiçbir nanomalzeme olmadığında oluşturulan sandviç yapı ile 0,07 μA 'lık bir akım elde edilmiştir. SPE yüzeyi ZnO NP'ler ve Au NP'ler ile modifiye edildiğinde, mevcut akım değerleri sırasıyla 0,30 μA ve 3,75 μA olarak elde edilmiştir. Elektrot yüzeyinde hem ZnO NP'ler hem de Au NP'ler varken, akım değeri diğer elektrotlara göre %220,0'lik (15,4 μA) artış sergilemiştir. Bu sonuçlar, ZnO NP'lerin ve Au NP'lerin aptasensörün iletkenliğini daha da artırabileceğini göstermiştir. Ayrıca, akımdaki önemli artış, ZnO NP'ler ve Au NP'lerin kombinasyonunun elektrot yüzeyinde Apt ve Leptin moleküllerinin daha etkin immobilizasyonuna olanak sağladığını göstermiştir.

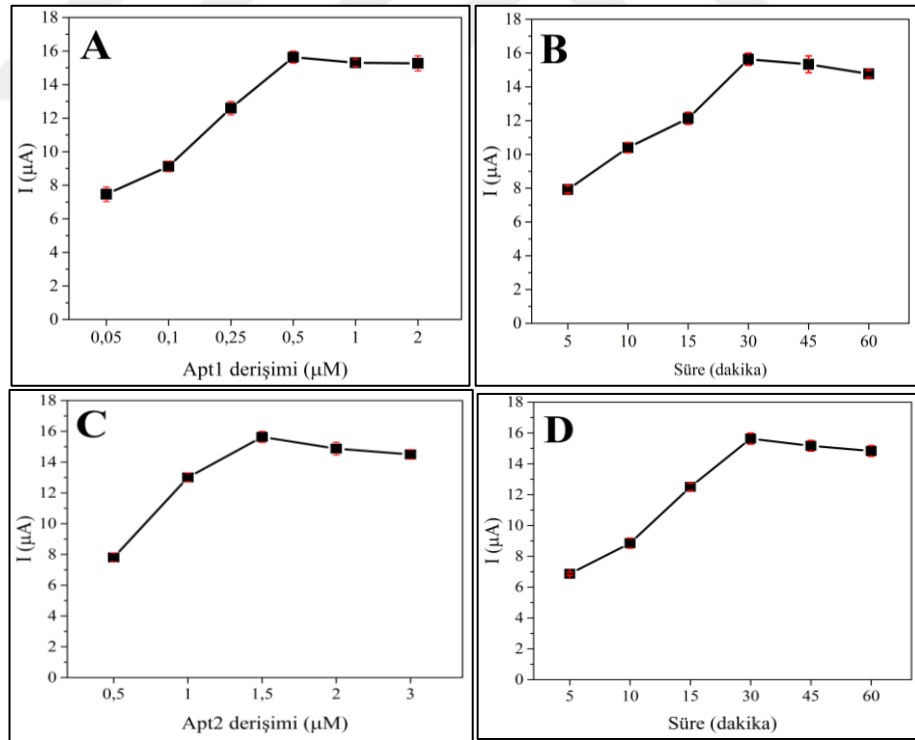


Şekil 3.18. Sandviç tip aptasensörde α -naftol'e ait DP voltamogramları

Bu çalışmada, geliştirilen aptasensörün Leptin analizine yönelik en iyi performansı göstermesi için bazı kritik deneysel faktörler optimize edilmiştir. İlk olarak, farklı Apt1 derişimlerinin α -naftol'ün mevcut yanıtı üzerindeki etkisi 0,05 ile 2,0 μM Apt1 derişimlerinde incelenmiştir. Şekil 3.19A'da görüldüğü gibi, 0,5 μM Apt1 derişimine kadar akım sinyali yükselirken sonrasında doygun bir cevap sergilemiştir. Bu nedenle sonraki deneyler için optimum Apt1 derişimi 0,5 μM olarak belirlenmiştir. İkinci bir parametre olarak Apt2'nin immobilizasyon süresi incelenmiştir. Şekil 3.19B'de gösterildiği gibi, mevcut akım sinyali 5 dakikadan 30

dakikaya kadar artan bir eğilim göstererek 30 dakika sonra dengeye ulaşmıştır. Bu sonuçlar Apt2 için optimum immobilizasyon süresinin 30 dakika olarak seçilebileceğini göstermiştir.

Bir başka parametre olarak, Apt2 derişiminin Leptin tayini üzerindeki etkisi, Apt2 derişiminin 0,5 ile 3,0 μM arasında değıştirilmesiyle incelenmiştir. Şekil 3.19C’de görüldüğü gibi, en yüksek akım değeri elde edildiği 1,5 μM Apt2 derişimi optimum değer olarak seçilmiştir. Son olarak, aptasensörün performansını etkileyen en önemli parametre olarak Leptin’in bağlanma süresi incelenmiştir. Bağlanma süresinin optimizasyonu için 50,0 pg/mL Leptin yüzeyde 5 ile 60 dakika arasında inkübe edilmiştir. Akım sinyali 30 dakikaya kadar yükselmeye devam ederken, 30 dakikadan sonra Apt molekülleri ve Leptin tamamen etkileşime girerek doygunluk davranışı göstermiştir (Şekil 3.19D). Bu nedenle, geliştirilen aptasensör için Leptin’in optimum bağlanma süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir.



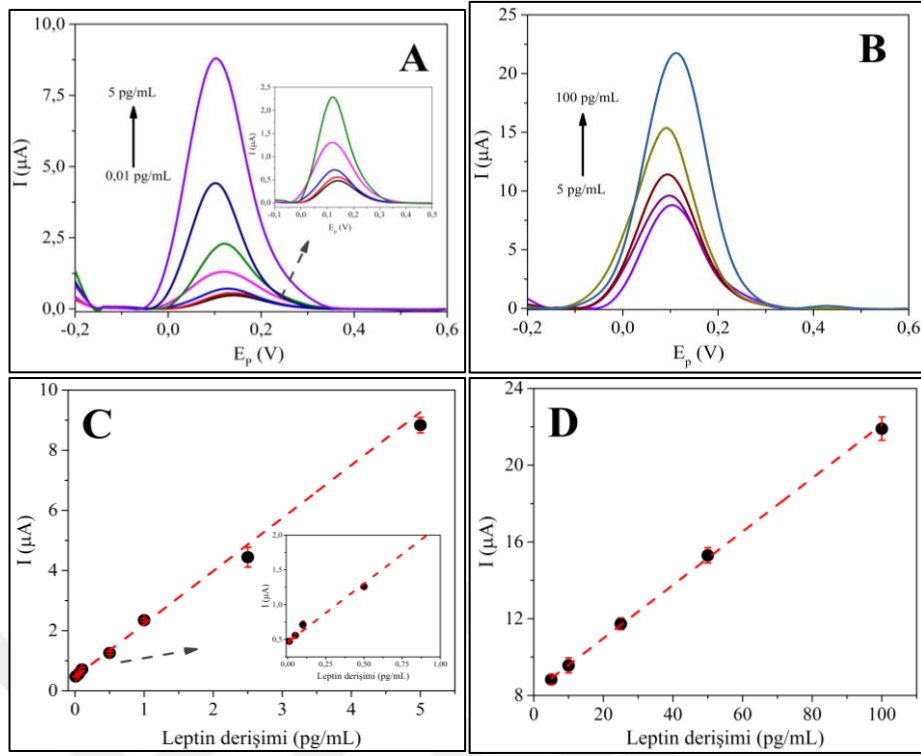
Şekil 3.19. α -naftol’un akım değeri karşılık farklı Apt1 derişimlerinin grafiğı (A), α -naftol’un akım değeri karşılık farklı Apt2 bağlanma sürelerinin grafiğı (B), α -naftol’un akım değeri karşılık farklı Apt2 derişimlerinin grafiğı (C), α -naftol’un akım değeri karşılık aptasensör ile Leptin arasındaki farklı etkileşim sürelerinin grafiğı (D)

3.9. Sandviç Tip Aptasensör ile Leptin'nin Elektrokimyasal Tayini ve Yöntem Validasyonu

Optimum deneysel koşullar altında, geliştirilen sandviç tipi aptasensörün analitik performansı, α -naftol'ün akım sinyalinin değişimi artan Leptin derişimlerine bağlı olarak incelenmiştir. Şekil 3.20A ve 3.20B'de, artan Leptin konsantrasyonlarında α -naftol'ün DP voltamogramları gösterilmiştir. Artan Leptin derişimi ile sırasıyla 0,01 ile 5,0 pg/mL (Şekil 3.20C) ve 5,0 ila 100,0 pg/mL (Şekil 3.20D) derişim aralıklarında doğrusallık elde edilmiştir. İlk ve ikinci doğrusal kalibrasyon aralığı için regresyon denklemleri sırasıyla $I (\mu A) = 1,69 C_{Leptin} [pg/mL] + 0,46$ ($R^2=0,998$) ve $I (\mu A) = 0,14 C_{Leptin} [pg/mL] + 8,12$ ($R^2=0,999$) olarak bulunmuştur.

Gözlemlenen iki doğrusal kalibrasyon aralığının farklı nedenlerle açıklanabilir. Düşük Leptin derişimlerinde, α -naftil fosfat substratı artan difüzyon etkileri nedeniyle hızla α -naftol'e dönüştüğü için elektrot yüzeyindeki lokal derişim hızla tükenir ve sensörün daha yüksek hassasiyet sergilemesine olanak sağlar. Öte yandan, daha yüksek Leptin derişimlerinde, enzim ve substrat arasındaki enzimatik reaksiyonun süresi uzamaktadır. Bu yüzden, oluşan reaksiyon ürünlerinin elektrot yüzeyini kirletme olasılığı ile daha düşük bir eğim oluşmaktadır. Ayrıca, daha yüksek analit derişimlerinde reaksiyon, Michaelis-Menten tipi enzim kinetiğinde tarif edildiği gibi bir doyma seviyesine ulaşmaya başlar (Gholizadeh ve ark., 2012 ve Zhou ve ark., 2022).

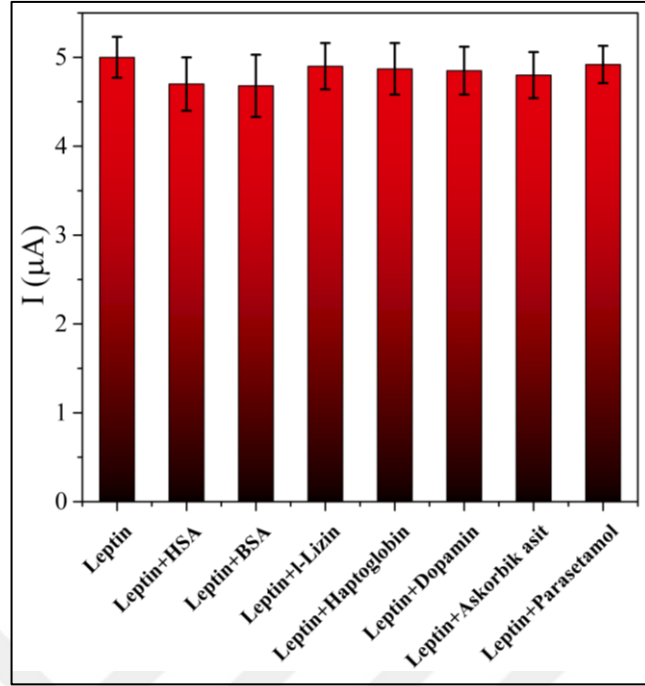
İlk kalibrasyon aralığı kullanılarak geliştirilen sandviç tip aptasensör ile Leptin'in TS ve TAS'ı belirlenmiştir. Regresyon denkleminin eğimine bağlı olarak hesaplamalara göre, TS değeri 0,0035 pg/mL, TAS değeri ise 0,01 pg/mL olarak bulunmuştur.



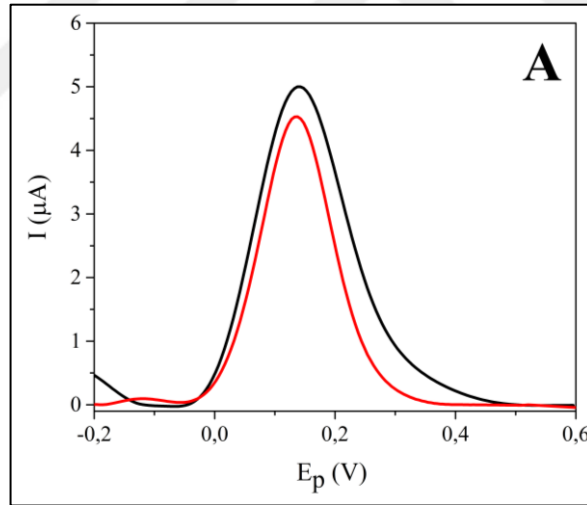
Şekil 3.20. Sandviç tip aptasensör kullanılarak Leptin tayini için DP voltamogramları ve kalibrasyon eğrileri (A) 0,01 pg/mL-5 pg/mL derişim aralığında elde edilen DP voltamogramları, (B) 5 pg/mL-100 pg/mL derişim aralığında elde edilen DP voltamogramları, (C) 0,01 pg/mL-5 pg/mL derişim aralığında elde edilen kalibrasyon eğrileri ve (D) 5 pg/mL-100 pg/mL derişim aralığında elde edilen kalibrasyon eğrileri

3.9.1. Sandviç Tip Aptasensör İçin Seçicilik Çalışması

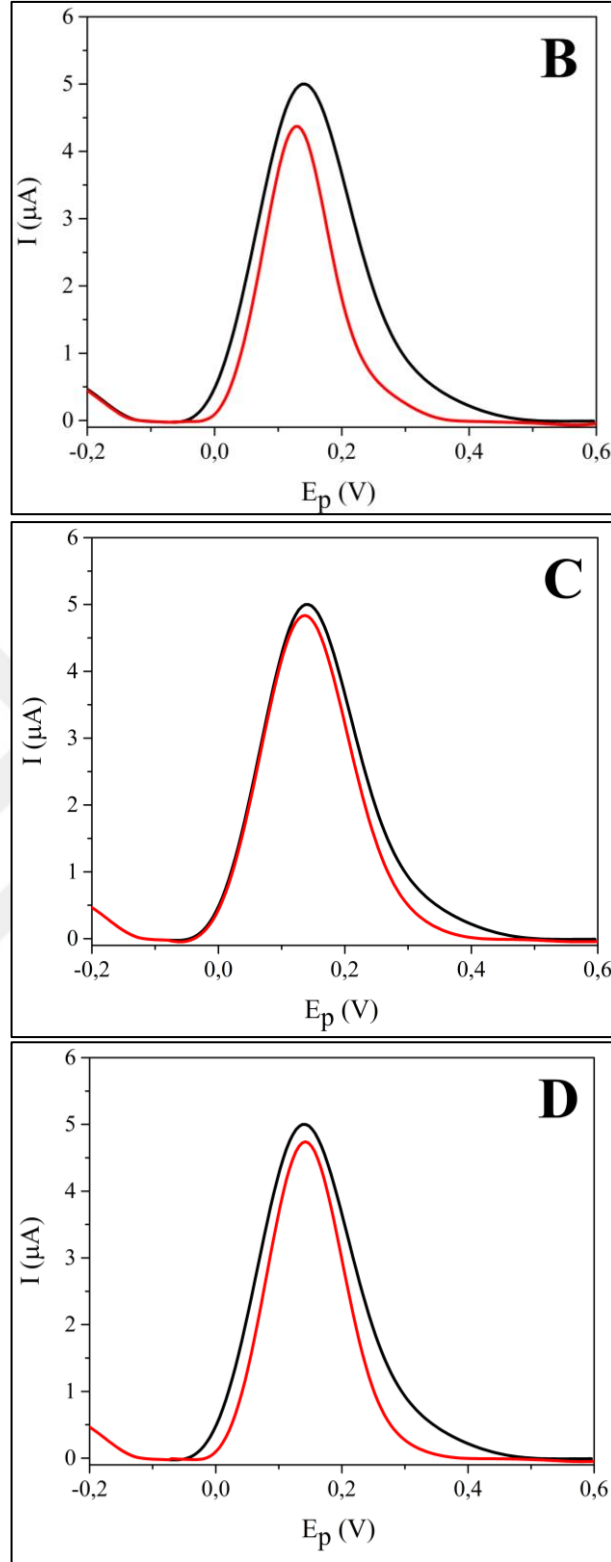
Geliştirilen aptasensörün seçiciliği, 2,5 pg/mL HSA, BSA, l-lizin, haptoglobin, dopamin, askorbik asit ve parasetamolün her birinin 250 pg/mL Leptin içeren karışımlarının aptasensör yüzeyine inkübe edilmesiyle değerlendirilmiştir. Şekil 3.21'de gösterildiği gibi, 2,5 pg/mL Leptin 5 μA kadar yanıt verirken, müdahale eden bileşiklerin varlığında akım cevabı 4,37 μA-4,90 μA aralığında değişmektedir. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen aptasensörün %87,5 ile %98 arasında değişen geri kazanım değerleri ile herhangi bir sinyalden etkilenmeden Leptin'in tayini için yüksek seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 3.22).



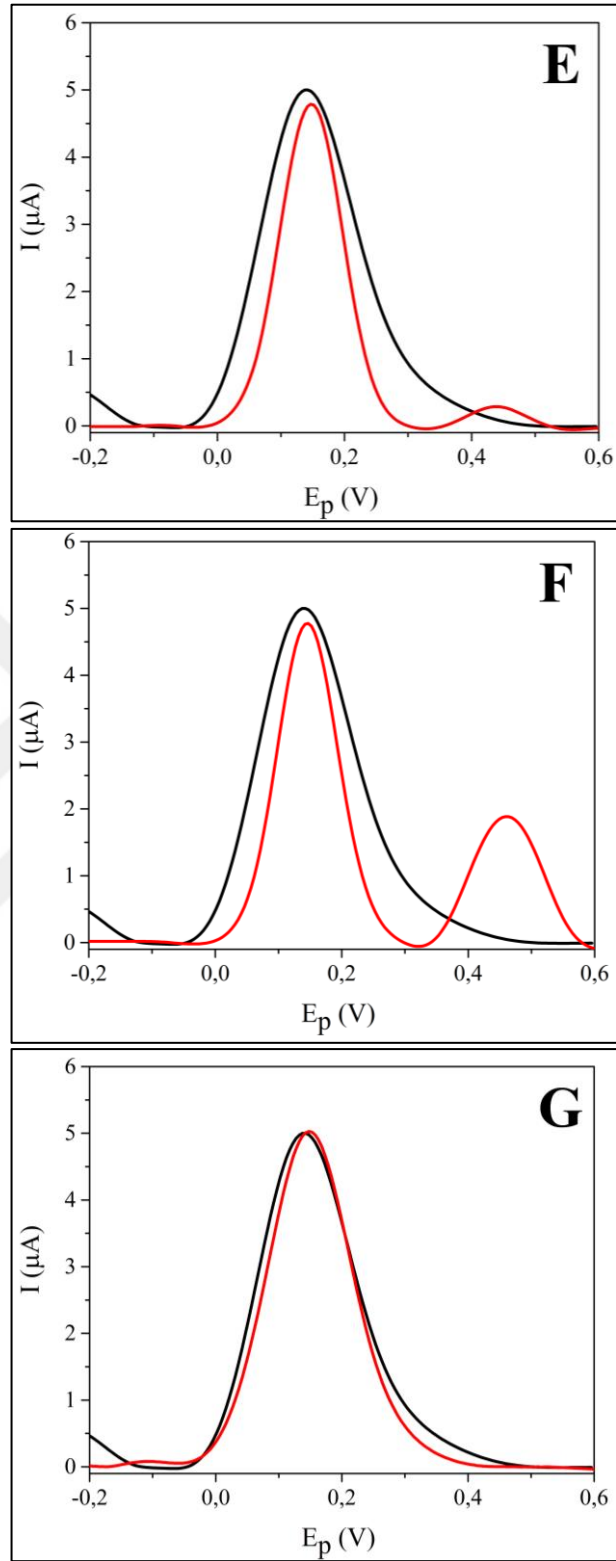
Şekil 3.21. Sandviç tip aptasensör kullanılarak Leptin ile çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında α -naftol'e ait akım değerleri



Şekil 3.22. Sandviç tip aptasensör kullanılarak Leptin ile çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen DP voltamogramları (A) HSA, (B) BSA, (C) l-lizin, (D) haptogloblin, (E) dopamin, (F) askorbik asit ve (G) parasetamol; (Siyah çizgiler: sadece Leptin için elde edilen DP voltamogramları; Kırmızı çizgiler: Leptin ve çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen DP voltamogramları)



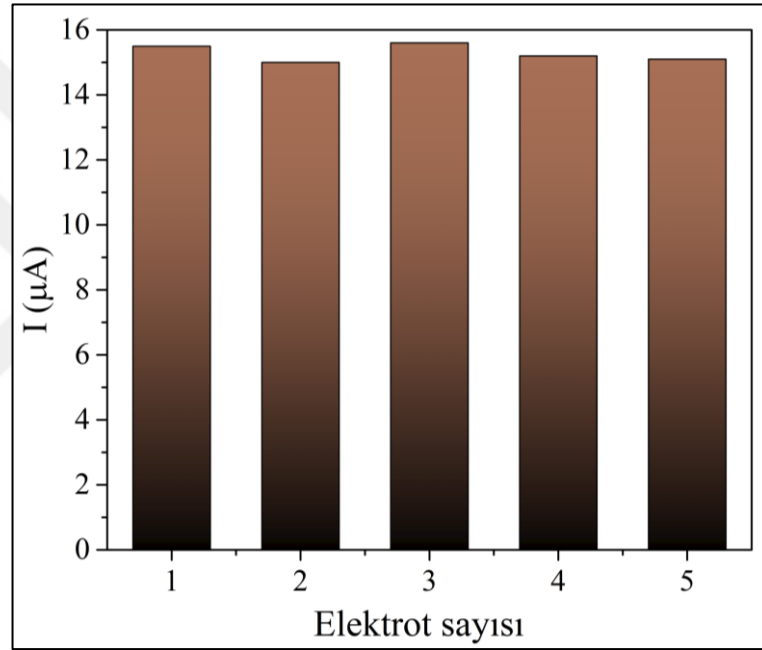
Şekil 3.22. (Devam) Sandviç tip aptasensör kullanılarak Leptin ile çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen DP voltamogramları(A) HSA, (B) BSA, (C) l-lizin, (D) haptoglobin, (E) dopamin, (F) askorbik asit ve (G) parasetamol; (Siyah çizgiler: sadece Leptin için elde edilen DP voltamogramları; Kırmızı çizgiler: Leptin ve çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen DP voltamogramları)



Şekil 3.22. (Devam) Sandviç tip aptasensör kullanılarak Leptin ile çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen DP voltamogramları(A) HSA, (B) BSA, (C) l-lizin, (D) haptoglobin, (E) dopamin, (F) askorbik asit ve (G) parasetamol; (Siyah çizgiler: sadece Leptin için elde edilen DP voltamogramları; Kırmızı çizgiler: Leptin ve çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında elde edilen DP voltamogramları)

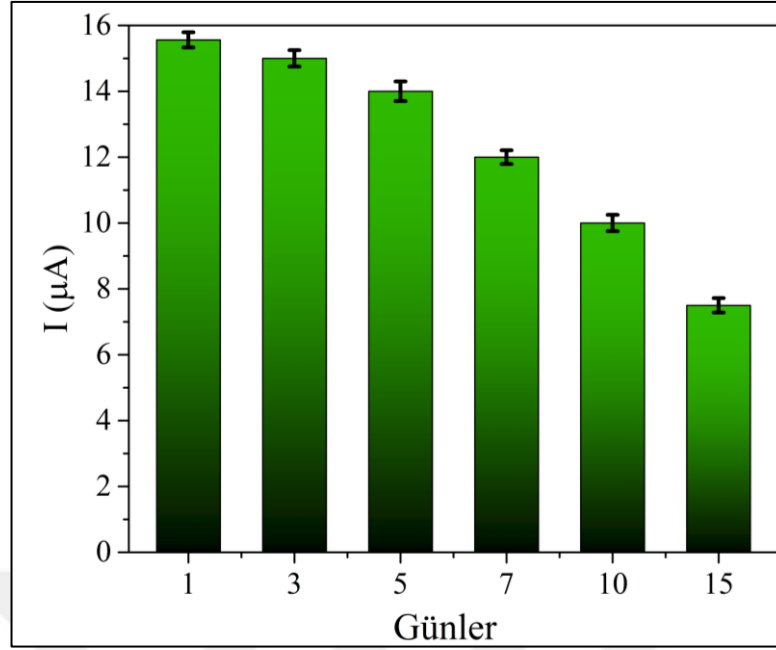
3.9.2. Etiketsiz Aptasensör İçin Tekrar Üretilebilirlik ve Stabilité Çalışmaları

Geliştirilen aptasensörün tekrarlanabilirliği, optimum koşullar altında hazırlanan beş farklı aptasensörden elde edilen mevcut akım yanıtlarına göre değerlendirilmiştir. Şekil 3.23'te görüldüğü gibi, 50,0 pg/mL Leptin'in aptasensörlere inkübasyonundan sonra, elde edilen sonuçlar %1,5 BSS değeri ile aptasensörün yüksek bir tekrarlanabilirlik sergilediğini göstermiştir.



Şekil 3.23. Geliştirilen sandviç tip aptasensörün tekrar üretilebilirliği

Ayrıca geliştirilen aptasensörün stabilitesinin değerlendirilmesi için, aptasensör 15 gün boyunca +4°C'de muhafaza edilmiştir. Şekil 3.24'te görüldüğü gibi, geliştirilen aptasensör Leptin'e karşı bir hafta boyunca başlangıç sinyalinin %85'ini korurken, aptasensörün on gün süreyle kullanılabilir olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.24. Geliştirilen sandviç tip aptasensörün stabilitesi

3.9.3. Sandviç Tip Aptasensör Kullanılarak İnsan Serum ve İnsan Plazma Örneklerinden Leptin Analizi

Geliştirilen aptasensörün pratik olarak uygulanabilirliği insan serum ve plazma örneklerinde Leptin içeriğini belirlenmesiyle gösterilmiştir. Bu amaçla ilk olarak serum ve plazma örnekleri 1:10 (h/h) oranında seyreltilmiş ve bu örnekler standart ekleme yöntemi ile 0,5, 5,0 ve 50,0 pg/mL olmak üzere üç derişimde Leptin ilavesi yapılmıştır. Geliştirilen aptasensör ile optimal koşullar altında insan serum ve plazma örneklerinden Leptin'in geri kazanım değerleri, sırasıyla %96,31–103,49 (%BSS: %7,71–9,90), %97,80–108,79 (%BSS: %7,26–9,94) olarak bulunmuştur (Çizelge 3.4). Elde edilen analitik sonuçlar, basit bir numune hazırlama prosedürüne sahip olan aptasensörün güvenilirliğini ve geçerliliğini göstermiştir.

Çizelge 3.4. Sandviç tip aptasensör kullanılarak geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

Örnek	Eklenen miktar (pg/mL)	Bulunan miktar (pg/mL)	Geri kazanım (%)	%BSS***
İnsan serum örneği	0,5	0,48	96,31	9,90
	5,0	5,11*	102,15	8,97
		5,17**	103,49	8,67
	50,0	50,60	101,19	7,71
İnsan plazma örneği	0,5	0,54	108,79	9,94
	5,0	5,12*	102,39	8,53
		5,32**	106,40	8,88
	50,0	48,90	97,80	7,26

*Birinci kalibrasyon aralığı kullanılarak elde edilen sonuçlardır.

**İkinci kalibrasyon aralığı kullanılarak elde edilen sonuçlardır.

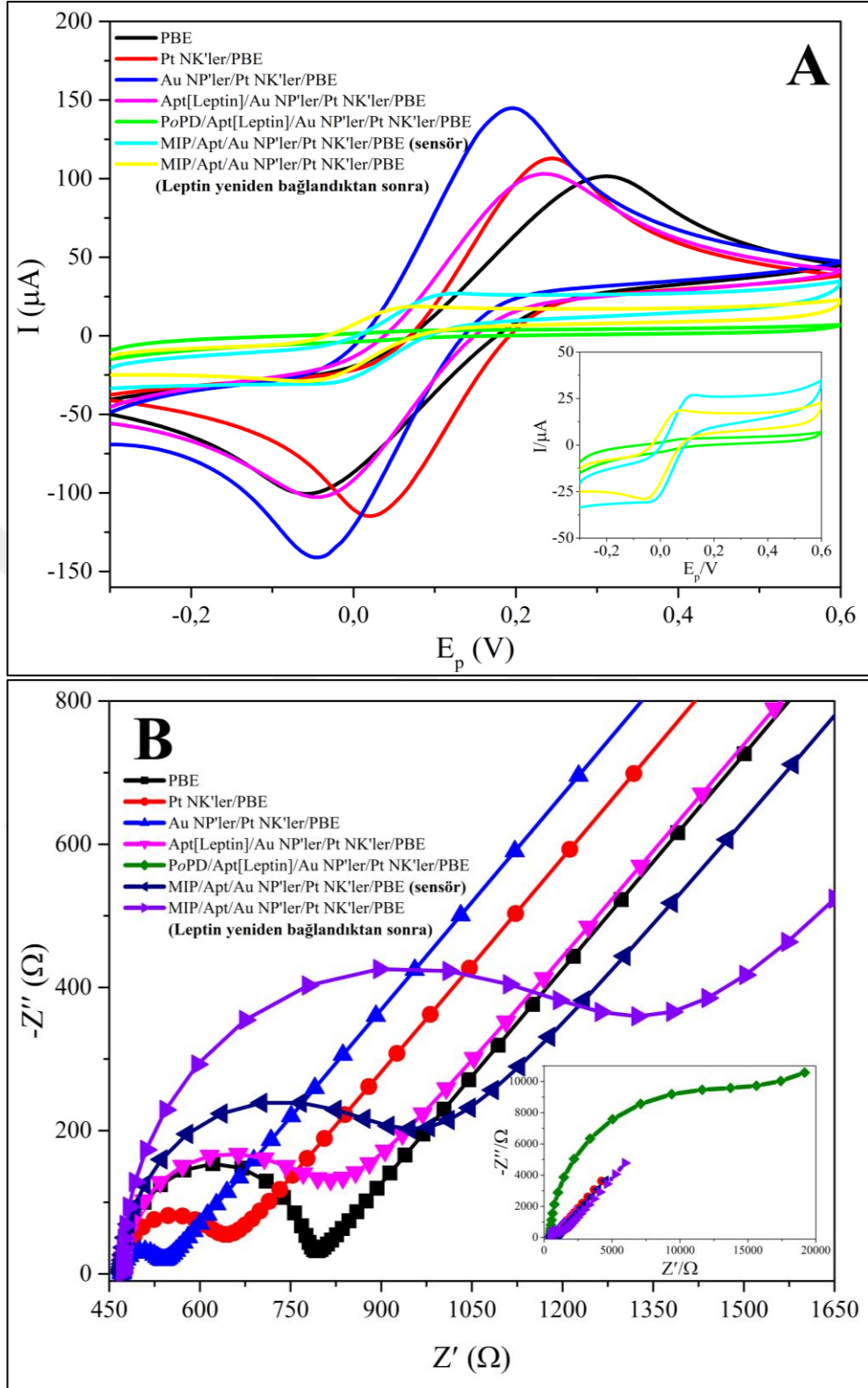
***Elde edilen %BSS değerleri 3 ölçüme ait sonuçlardır.

3.10. Apt-MIP Hibrit Sensörün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

Önceki aptasensörlerde de bahsedildiği gibi, Apt-MIP hibrit sensörün hazırlık aşamasındaki elektrot yüzeylerinin karakterizasyonu DV ve EIS yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Şekil 3.25A'da görüldüğü gibi PBE, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin karakteristik anodik ve katodik piklerini sergilemektedir (88,6 μA). PBE yüzeyi sırasıyla, Pt NK'ler ve Pt NK'lerin üzerine Au NP'ler ile modifiye edildiğinde redoks çözeltisinin tepe akımı sırasıyla 109,8 μA , 142,0 μA 'ya kadar önemli ölçüde artmıştır. Bu artış AuNP'ler/Pt NK'lerin elektrot yüzeyinde elektron transferini hızlandırdığını ve elektrokimyasal sinyali arttırdığını göstermektedir. Elektrot yüzeyindeki Au NP'ler, Apt[Leptin] kompleksi ile inkübe edildiğinde akım değerinde azalma meydana gelmiştir (97,6 μA). Bu azalış, elektrot yüzeyinde Apt[Leptin] kompleksine bağlı olarak oluşan yalıtkan tabakadan kaynaklanmaktadır. Sonraki aşamada, oPD'nin elektropolimerizasyonu ile elde edilen iletken olmayan polimer film tabakası (PoPD), yük transferini neredeyse tamamen bloke ettiği için akım sinyalinde önemli derecede bir düşüş meydana gelmiştir. Daha sonra, uzaklaştırma çözeltisi kullanılarak Leptin şablon molekülleri polimer film tabakasından çıkarıldığında, üç boyutlu film tabakasında $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks moleküllerinin elektrot yüzeyine tekrar ulaşabileceği Leptin'in uzamsal yapısı, şekli ve boyutuyla eşleşen baskılı boşluklar oluşmaktadır. Bu durum, hazırlanan sensörün tepe akımının (22,2

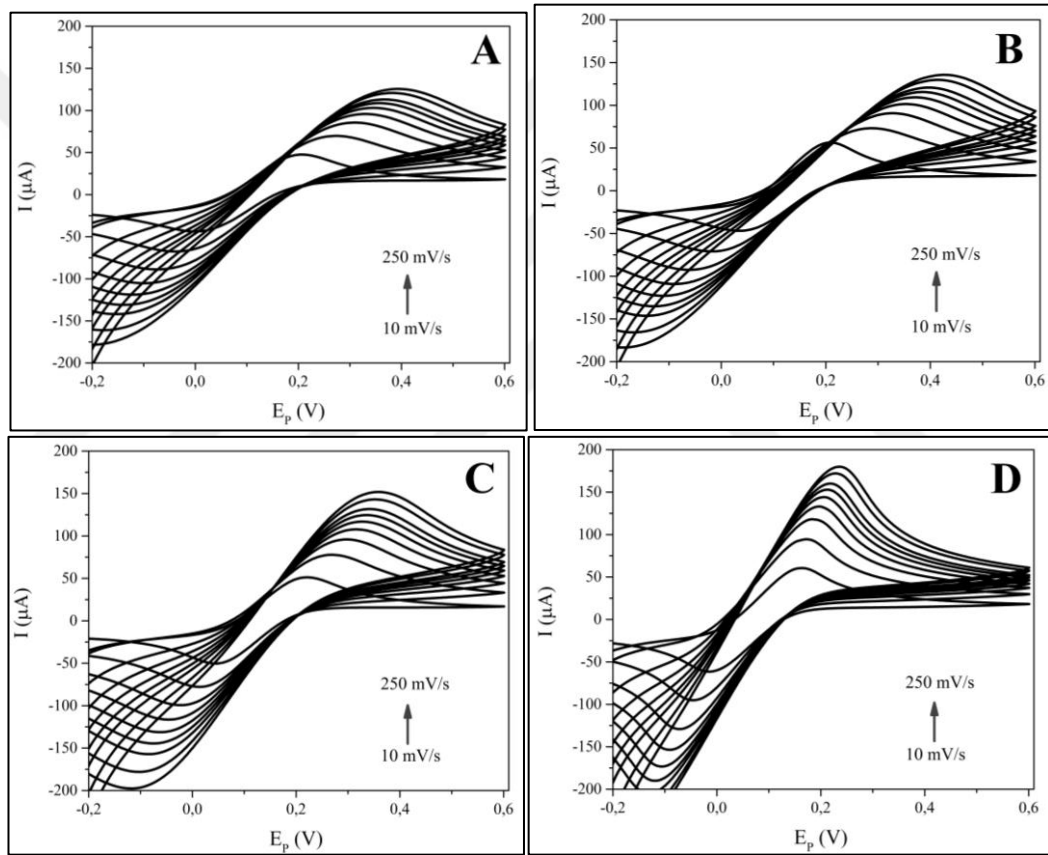
μA), PoPD kaplı yüzeye kıyasla, belirli bir dereceye kadar artmasıyla sonuçlanmıştır. Son aşamada, Leptin molekülleri yeniden sensör yüzeyine bağlanınca tepe akımında azalma meydana gelmiştir ($16,6 \mu\text{A}$). Bu azalış, Leptin'in yeniden bağlanmasıyla baskılı boşlukların kapanması ve buna bağlı olarak elektron transferinin engellemesinden kaynaklanmaktadır.

EIS yöntemi kullanılarak Şekil 3.25B'de görüldüğü gibi yalın PBE'nin R_{ct} değeri 304Ω olarak bulunmuştur. PBE yüzeyi Pt NK'ler ve Au NP'ler ile modifiye edildiğinde Pt NK'ler/PBE ve Au NP'ler/Pt NK'ler/PBE'nin R_{ct} değerleri sırasıyla 151Ω ve $60,4 \Omega$ olarak bulunmuştur. R_{ct} değerlerindeki bu azalış yalın PBE'ye kıyasla elektron transferinin kolaylaşmasından kaynaklanmaktadır. Modifiye yüzeye Apt[Leptin] kompleksinin inkübe edilmesi ile R_{ct} değeri 300Ω 'a kadar artmıştır. Bu artış, elektron transferinin zorlaşması ve kompleksin varlığından dolayı elektrot yüzeyinde oluşan daha büyük bir sterik engelden kaynaklanmaktadır. Bu da kompleksin, yüzeye başarılı bir şekilde immobilizasyonunu doğrulamaktadır. Apt[Leptin]/Au NP'ler/Pt NK'ler/PBE yüzeyinin oPD ile kaplanmasından sonra, beklenildiği gibi R_{ct} değerinde ($14,4 \text{ k}\Omega$) önemli bir artış gözlemlenmiştir. R_{ct} 'deki bu artış, yüzeyde daha fazla sterik engellerin oluşmasından kaynaklanmaktadır. PoPD ile kaplanmış yüzey, uzaklaştırma çözeltisi ile yıkandıktan sonra, R_{ct} değeri (422Ω) Apt[Leptin] kompleksinden Leptin'in çıkarılmasıyla sterik/konformasyonel kısıtlamadaki azalmalardan kaynaklı olarak azalmıştır. Son olarak, bir önceki adımda hazırlanan Apt-MIP hibrit sensörü yüzeyinde Leptin'in inkübasyonu nedeniyle, R_{ct} değeri 749Ω 'a yükselmiştir. Bu artış, elektrot yüzeyindeki boşluklara hapsolmuş Leptin nedeniyle elektron transferindeki daha büyük engelden kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak, elde edilen DV ve EIS bulguları birbiri ile iyi bir uyum içinde Apt-MIP hibrit sensörün başarılı bir şekilde üretildiğini doğrulamıştır.



Şekil 3.25. Apt-MIP hibrit sensörün hazırlanması aşamalarında elde edilen dönüşümlü voltamogram eğrileri (A) ve Nyquist eğrileri (B)

Ayrıca, elektroaktif yüzey alanının belirlenmesi amacıyla Pt NK'ler ve Au NP'ler ile modifiye edilmiş elektrotlar için farklı tarama hızlarında $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 3.26). Randles–Ševčík eşitliğine (Eşitlik 3.1) göre, PBE'nin elektrokimyasal yüzey alanı $0,097 \text{ cm}^2$ iken, Au NP'ler/Pt NK'ler/PBE'nin elektrokimyasal yüzey alanı $0,175 \text{ cm}^2$ 'dir. Yüzey alanındaki bu artış Apt[Leptin] kompleksinin yüzey üzerinde daha etkin bir şekilde immobilize olabileceğini ve hibrit sensörün performansını arttırabileceğini göstermektedir.

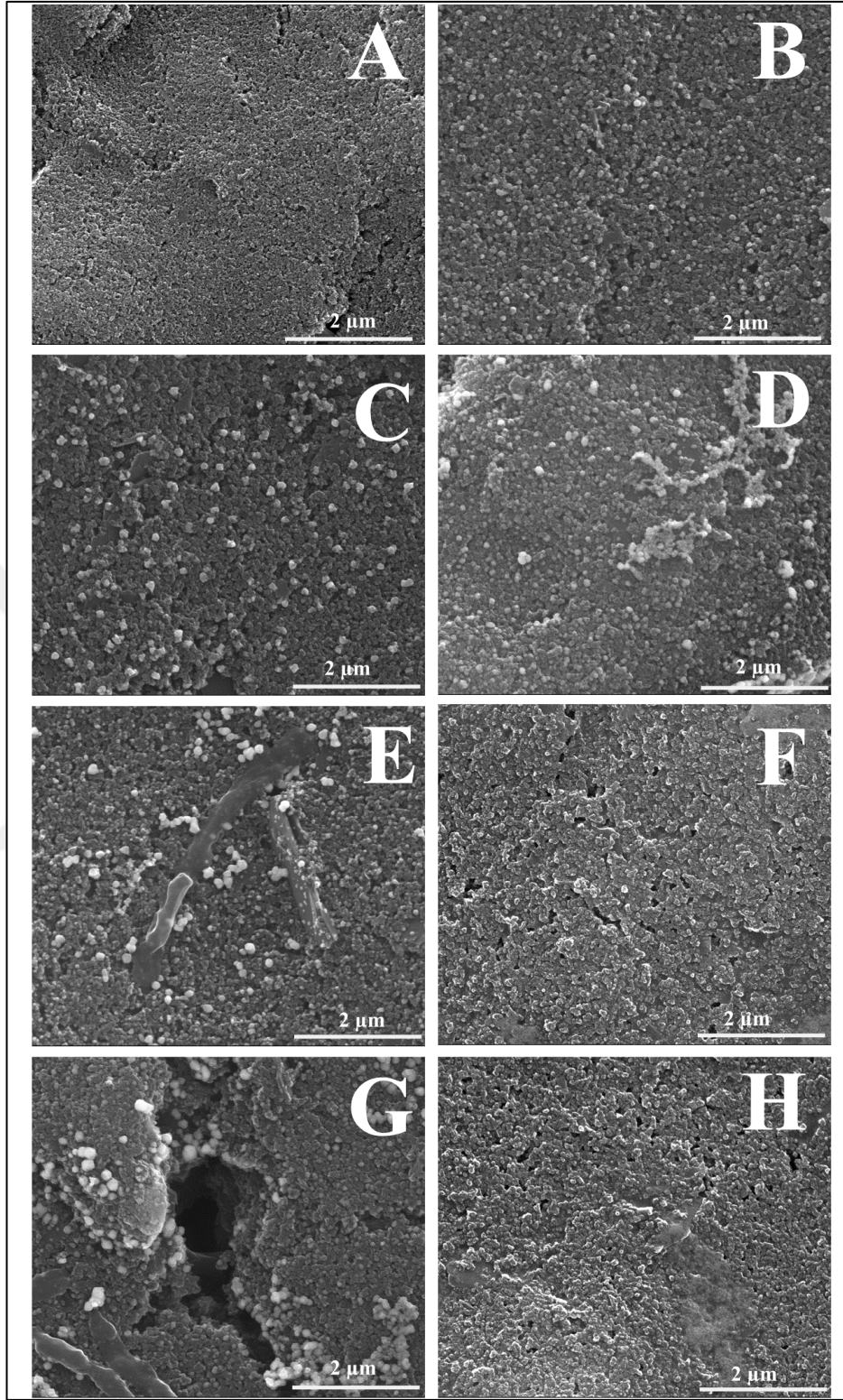


Şekil 3.26. 5 mM $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin elektrot yüzeylerinde farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltamogram eğrileri (A) PBE, (B) Pt NK'ler/PBE, (C) Au NP'ler/PBE, ve (D) Au NP'ler/Pt NK'ler/PBE

3.11. Apt-MIP Hibrit Sensörün Yüzey Karakterizasyonu

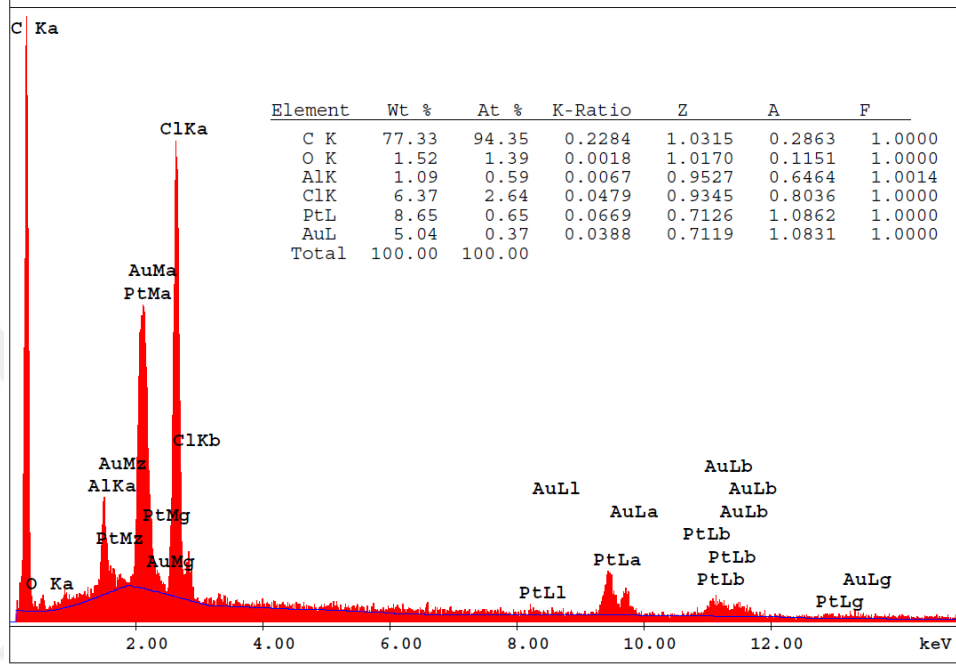
Geliştirilen hibrit sensör için yüzey karakterizasyonu SEM görüntülerinin incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.27A'da görüldüğü gibi yalın PBE pürüzsüz

bir morfolojiye sahiptir. PBE yüzeyi Pt NK'ler ile modifiye edildiğinde Şekil 3.27B'den de anlaşılacağı gibi elektrot yüzeyindeki homojen olarak dağılmış tek tip küreler modifikasyonun başarılı olduğunu göstermiştir. Şekil 3.27C, Au NP'lerin PBE yüzeyine başarılı bir şekilde elektrodepolanmasını doğrularken, Au NP'lerin Pt NK'ler/PBE yüzeyine modifiye edilmesiyle değişen yüzey morfolojisi Şekil 3.27D'de görülmektedir. Apt[Leptin] kompleksinin Au NP'ler/Pt NK'ler/PBE yüzeyinde immobilizasyonundan sonra, elde edilen elektrotun SEM görüntüsündeki (Şekil 3.27E) fibril yapılar, kompleksin varlığını göstermiştir. Şekil 3.27F'deki SEM görüntüsü Apt[Leptin]/Au NP'ler/Pt NK'ler/PBE üzerine oPD elektropolimerizasyonu ile kaplanmış polimer tabakasının varlığını göstermektedir. Leptin'in sensör yüzeyinden çıkarılmasıyla Şekil 3.27G'de değişen yüzey morfolojisi, Leptin'in matristen başarıyla çıkarıldığını doğrulamaktadır. Şekil 3.27H'da görüldüğü gibi Leptin içermeyen baskılanmamış polimer (NIP)'in yüzey morfolojisinin farklılığı ve yüzeyde bozulma olmaması, geliştirilen hibrit sensörün yüzey karakterizasyonunu doğrulamaktadır.



Şekil 3.27. Apt-MIP hibrit sensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait SEM görüntüleri (A) PBE, (B) Pt NK'ler/PBE, (C) Au NP'ler/PBE, (D) Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, (E) Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, (F) PoPD/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, (G) MIP/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, (H) NIP/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE (50.00 kx)

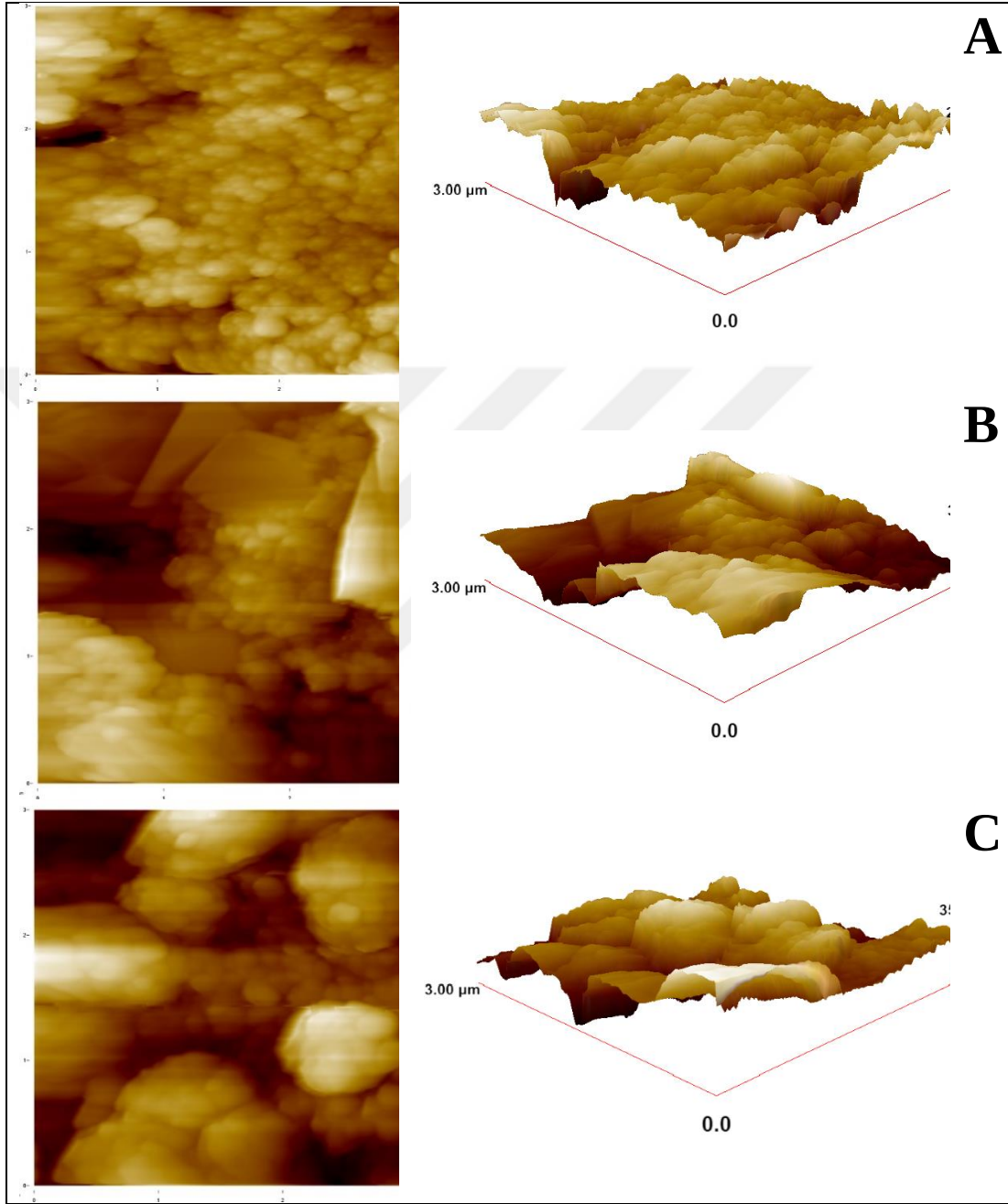
Ayrıca, EDS yöntemi modifiye çalışma elektrodu yüzeyindeki, Pt NK'lerin ve Au NP'lerin elementel analizi için kullanılmıştır. Au NP'ler/Pt NK'ler/PBE'nin EDS spektrumları (Şekil 3.28) incelendiğinde belirgin şekilde görünen Pt ve Au pikleri modifikasyonun başarılı olduğunu göstermiştir.



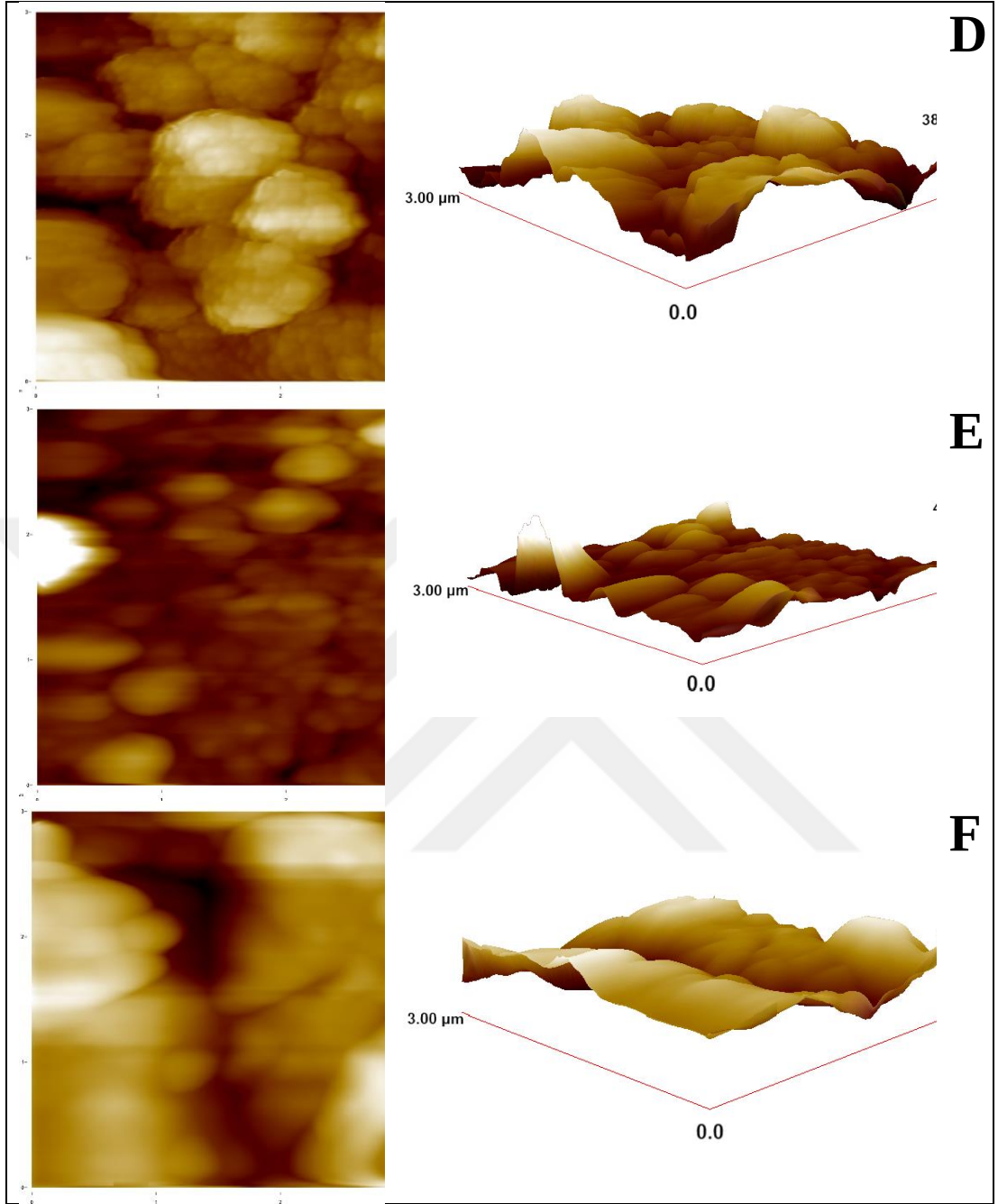
Şekil 3.28. Apt-MIP hibrit sensörün hazırlanması aşamalarında Au NP'ler/Pt NK'ler/PBE'ye ait EDS spektrumları

Ayrıca, geliştirilen hibrit sensör için yüzey karakterizasyonu AFM görüntülerinin incelenmesi ile de gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümler $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ tarama alanında ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Yalın PBE, Au NP'ler ve Pt NK'ler ile modifiye edilmiş PBE, Apt ve Leptin kompleksinin immobilizasyonu, polimer kaplama, hibrit sensör ve NIP için elde edilen iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) topografik görüntüler Şekil 3.29'da gösterilmiştir. Elde edilen AFM görüntüleri, elektrotların yüzey özelliklerini anlamak için bir kanıt niteliğindedir. PBE, Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, PoPD/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, MIP/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE ve NIP/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE'nin yüzey pürüzlülüklerinin kök ortalama kare (RMS) değerleri sırasıyla, 27,7 nm, 55,0 nm, 59,5 nm, 70,0 nm, 64,0 nm ve 69,4 nm olarak bulunmuştur. Özellikle MIP ve NIP sensörlerin

arasındaki yüzey derinliğinin farklı olması moleküler baskılama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



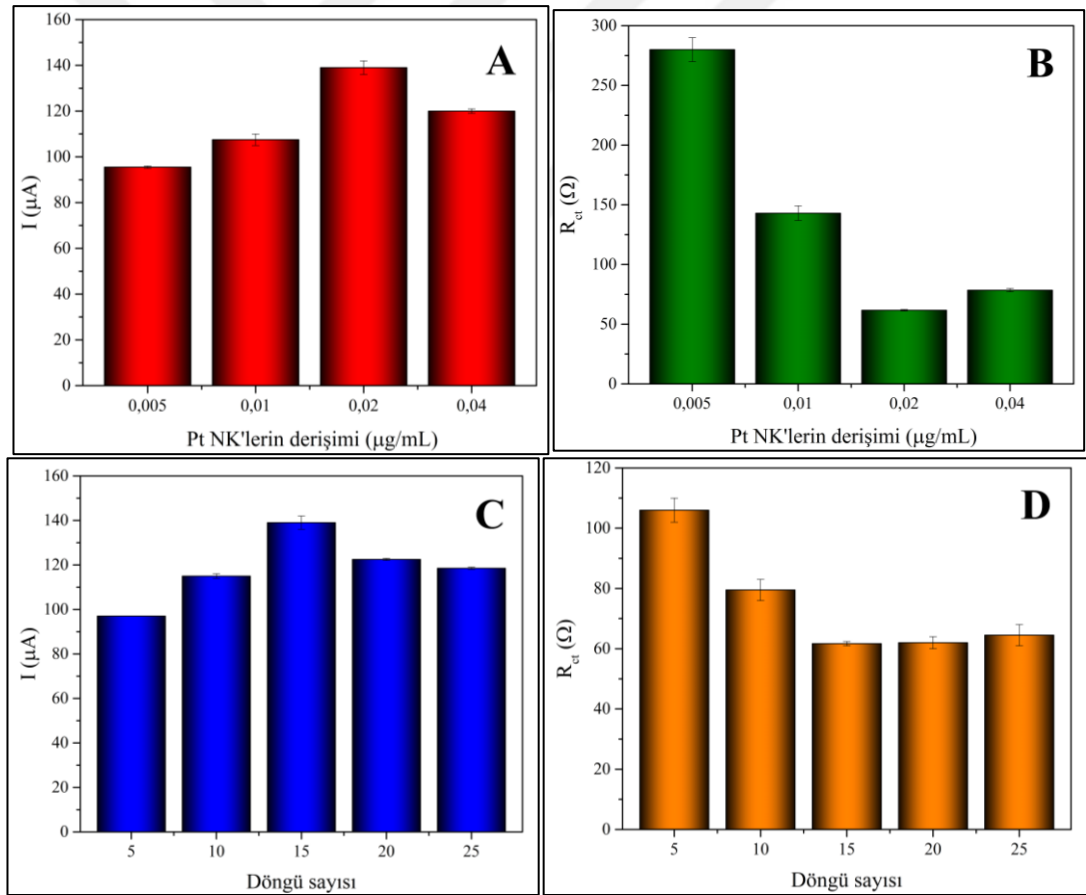
Şekil 3.29. Apt-MIP hibrit sensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait AFM görüntüleri (A) PBE, (B) Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, (C) Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, (D) PoPD/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, (E) MIP/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, (F) NIP/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE



Şekil 3.29. (Devam) Apt-MIP hibrit sensörün hazırlanması aşamalarında elektrotlara ait AFM görüntüleri (A) PBE, (B) Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, (C) Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, (D) PoPD/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, (E) MIP/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE, (F) NIP/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE

3.12. Apt-MIP Hibrit Sensörün Tasarımı İçin Elektrot Modifikasyonu

Geliştirilen hibrit sensörün ilk aşamasında, Pt NK'lerin derişimi 0,005 ile 0,04 $\mu\text{g/mL}$ arasında değiştirilmiştir. Hem DV hem de EIS yöntemleri kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmalarına göre elektrot yüzeyine 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Pt NK'ler modifiye edildiğinde en yüksek akım sinyali ve en düşük R_{ct} değeri elde edilmiştir (Şekil 3.30A ve Şekil 3.30B). Au NP'lerin elektrodolanması için döngü sayısı 5-25 aralığında değiştirildiğinde, en yüksek akım sinyali ve en düşük R_{ct} değeri 15 döngü sayısında elde edilmiştir (Şekil 3.30C ve Şekil 3.30D). Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Pt NK'ler ve 15 döngü sayısı hem iletkenliğin artması hem de elektrot yüzeyinde yük transferinin kolaylaşması nedeniyle optimum değerler olarak seçilmiştir.



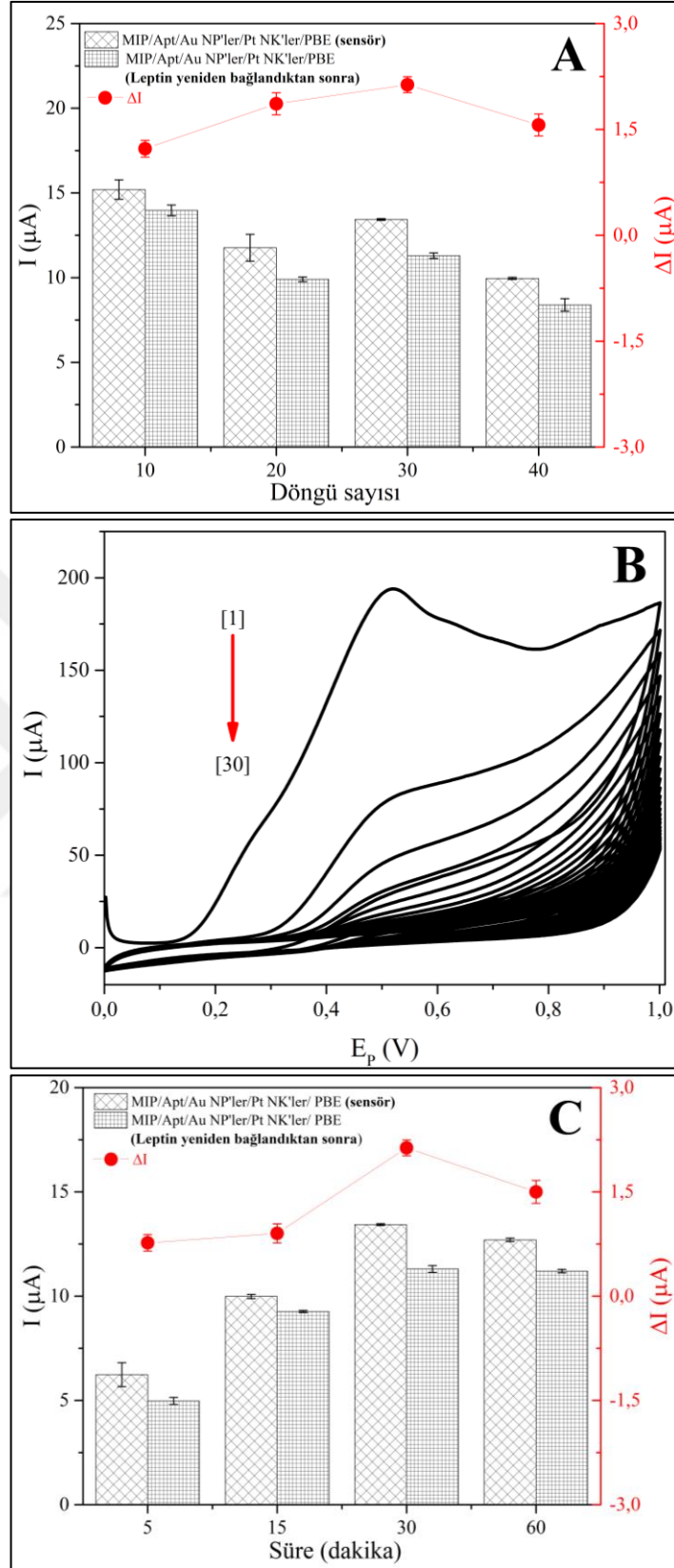
Şekil 3.30. Farklı Pt NK'ler derişimlerinin 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin I değerlerine etkisinin grafiği (A), R_{ct} değerlerine etkisinin grafiği (B), farklı döngü sayılarının 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin I değerlerine etkisinin grafiği ve R_{ct} değerlerine etkisinin grafiği (D)

3.13. Apt-MIP Hibrit Sensörü İçin Deneysel Koşulların Belirlenmesi

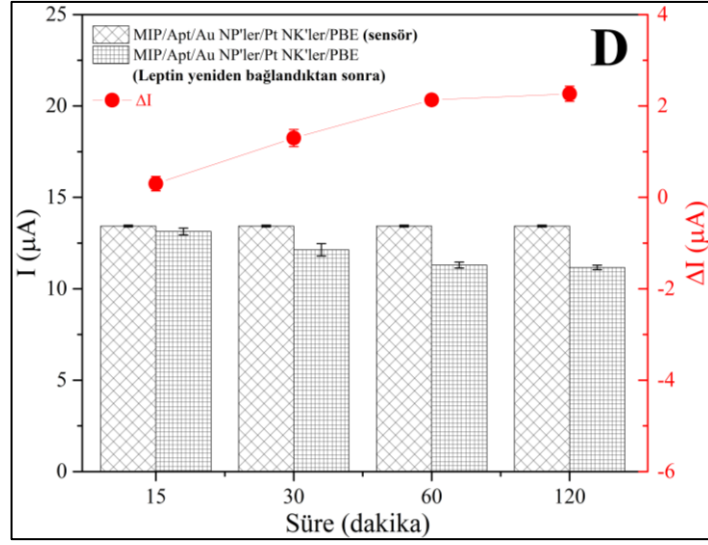
Apt-MIP hibrit sensöründe DV kullanılarak yapılan elektropolimerizasyon işleminde elde edilen polimerik film tabakasının kararlılığı ve kalınlığı sensör performansını etkileyen en kritik parametredir. Bu amaçla, oPD'nin elektropolimerizasyonu için 10, 25, 30 ve 40 döngü sayıları ile kaplamalar yapılmıştır. Her kaplama için sonuçlar, Leptin'in yüzeyden uzaklaştırılması ile elde edilen sensörün pik akımı ve Leptin'in yeniden bağlanmasından sonra elde edilen pik akımı arasındaki fark (ΔI) değerleri karşılaştırılarak belirlenmiştir (Şekil 3.31A). Sonuç olarak, kararlı ve stabil bir polimer film tabakasının oluştuğu 30 döngü sayısı sonraki deneyler için optimum olarak belirlenmiştir (Şekil 3.31B).

Apt-MIP hibrit sensöründe, Leptin'e özgü kararlı ve tekrarlanabilir özellikte spesifik boşlukların oluşabilmesi için uzaklaştırma çözeltisinin (Asetik asit:SDS; 1:1,h/h) etkileşim süresi değerlendirilmiştir. Bu amaçla 5 ile 60 dakika aralığında farklı süreler denenmiştir. Şekil 3.31C'de görüldüğü gibi sensör yüzeyinden Leptin'in uzaklaştırılması için en etkili sürenin 30 dakika olduğu belirlenmiştir.

Hedef analit Leptin'in sensör yüzeyine yeniden bağlanma işlemi geliştirilen sensörün performansını doğrudan etkileyen önemli faktörlerden biridir. Bağlanma süresinin optimize edilmesi için farklı inkübasyon sürelerinde (15, 30, 60 ve 120 dakika) denemeler yapılmıştır. Leptin'in baskılı yüzeydeki boşluklara aşırı doygunluktan kaçınarak kararlı bir biçimde bağlanabilmesi ve geliştirilen sensörün yeniden kullanılabilir olması için en iyi ve etkili bağlanma süresi 60 dakika olarak seçilmiştir (Şekil 3.31D).



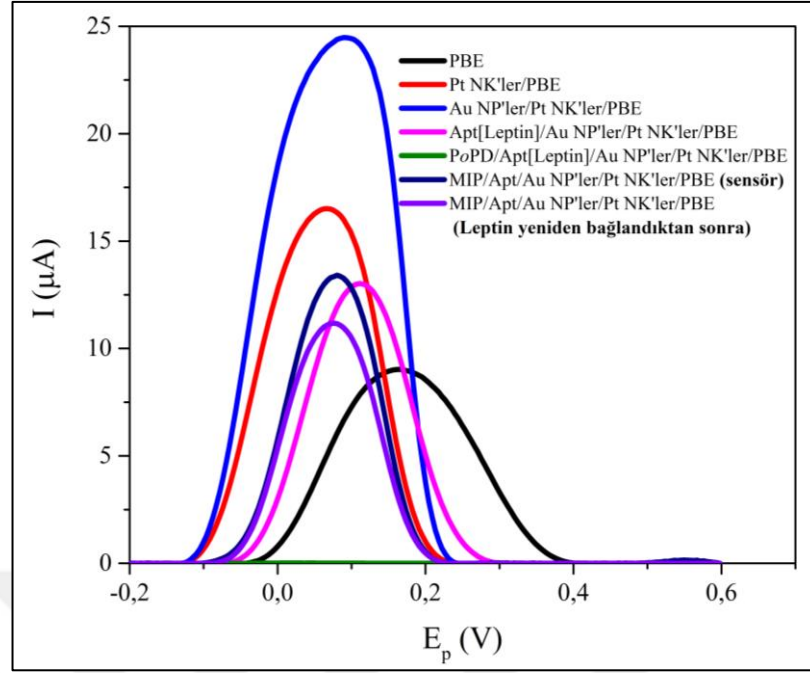
Şekil 3.31. I ve ΔI değerlerine karşılık elektropolimerizasyon farklı döngü sayılarının etkisi (A), 30 döngü ile oPD'nin elektropolimerizasyonu (B), uzaklaştırma süresinin etkisi (C) ve yeniden bağlanma süresinin etkisi (D)



Şekil 3.31. (Devam) I ve ΔI değerlerine karşılık elektropolimerizasyon farklı döngü sayılarının etkisi (A), 30 döngü ile oPD'nin elektropolimerizasyonu (B), uzaklaştırma süresinin etkisi (C) ve yeniden bağlanma süresinin etkisi (D)

3.14. Apt-MIP Hibrit Sensörü İle Leptin'nin Elektrokimyasal Tayini ve Yöntem Validasyonu

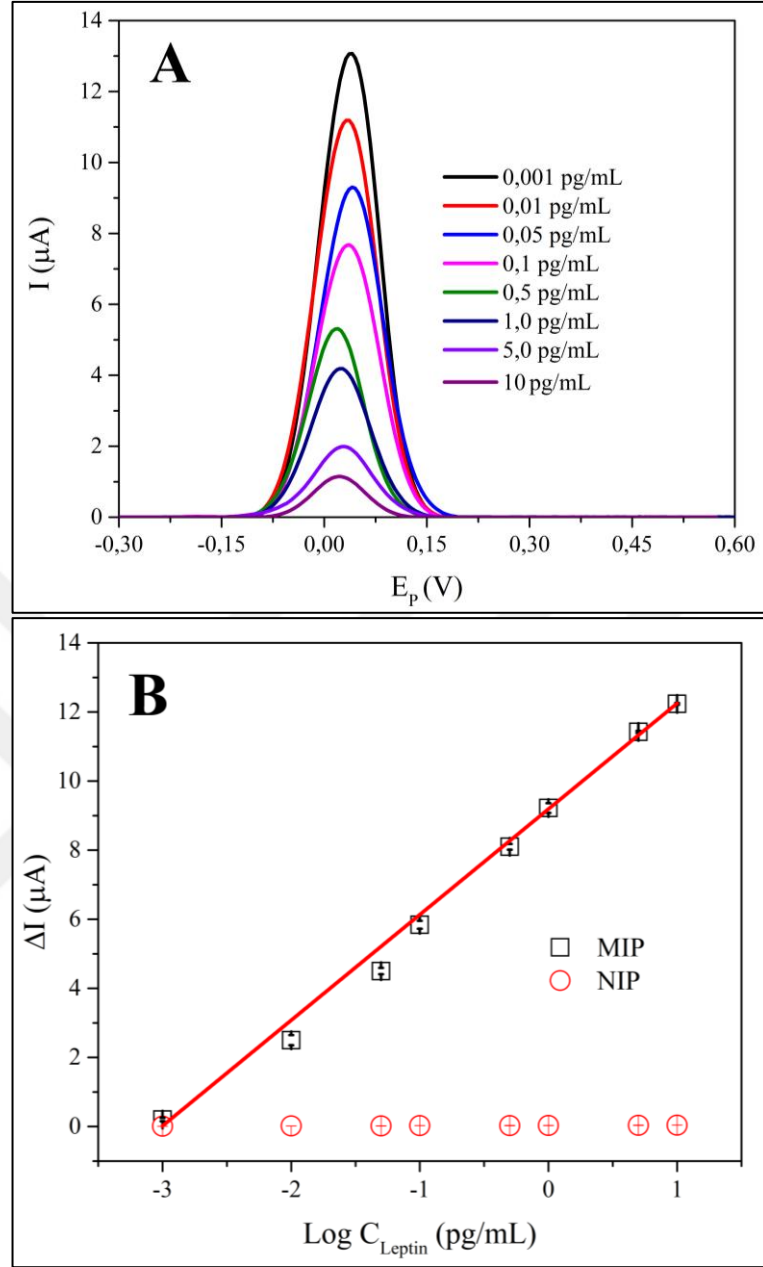
Geliştirilen hibrit sensör için DV ve EIS yöntemleri ile elde edilen önceki sonuçları doğrulamak amacıyla $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisi kullanılarak DPV ölçümleri de alınmıştır. Şekil 3.32'de görüldüğü gibi yalın PBE yaklaşık 9,02 μA 'lık tepe akımına sahiptir. PBE yüzeyi Pt NK'ler ve Au NP'ler ile modifiye edildiği zaman $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 'nin difüzyonunun artmasına bağlı olarak tepe akımı 24,4 μA 'ya kadar yükselmiştir. Apt[Leptin] kompleksinin yüzeye immobilizasyonu ile 13,0 μA 'ya kadar düşen akım sinyali elektron aktarımının zorlaşmasından kaynaklanmaktadır. Daha sonra, yüzeyin oPD ile kaplanmasına bağlı olarak MIP filminin oluşması, elektron aktarımını tamamen engelleyerek akım sinyalinin 0,76 μA 'ya kadar düşmesine yol açmıştır. Leptin moleküllerinin yüzeyden uzaklaştırılmasından sonra artan akım değeri (13,4 μA) MIP filmindeki boşlukların $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 'nin difüzyonunu arttırmasına bağlanabilir. Son aşamada, Leptin'in yeniden bağlanmasıyla düşen akım sinyali (11,1 μA), DPV sonuçlarının DV ve EIS sonuçları ile tutarlı olduğunu göstermiştir.



Şekil 3.32. Apt-MIP hibrit sensörün hazırlanması aşamalarında farklı elektrotlarda 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisine ait DP voltamogramları

Geliştirilen Apt-MIP hibrit sensörünün analitik performansı 1 fg/mL-10 pg/mL aralığında artan Leptin derişimlerinde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözeltisinin DPV ölçümlerinin gerçekleştirilmesiyle değerlendirilmiştir (Şekil 3.33A). Hem Apt-MIP hibrit sensörü hem de NIP temelli elektrotların kalibrasyon grafikleri için ΔI değerlerine karşılık Leptin derişimlerinin logaritması kullanılarak elde edilmiştir. MIP/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE sensörü ile Leptin derişimi ve ΔI değeri arasındaki doğrusal ilişki, $\Delta I (\mu\text{A}) = 3,06 \log C_{\text{Leptin}} [\text{pg/mL}] + 9,19$ ($R^2=0,999$) regresyon denklemi ile elde edilmiştir (Şekil 3.33B). İlgili kalibrasyon aralığı kullanılarak geliştirilen Apt-MIP hibrit sensörü ile Leptin'in TS ve TAS'ı belirlenmiştir. Regresyon denkleminin eğimine bağlı olarak hesaplamalara göre, TS değeri 0,31 fg/mL, TAS değeri ise 1,0 fg/mL olarak bulunmuştur.

Ayrıca, geliştirilen hibrit sensörün hem performansının kontrol edilmesi hem de doğrulanması amacıyla Leptin içermeyen NIP temelli sensörün artan Leptin derişimlerine karşı cevabı incelenmiştir. NIP temelli sensörde Leptin'e spesifik yüzeyin oluşmamasından dolayı doğrusal bir yanıt elde edilememiştir (Şekil 3.33B). Bu da geliştirilen hibrit sensörün Leptin'e karşı seçici olduğunu bir kez daha göstermiştir.



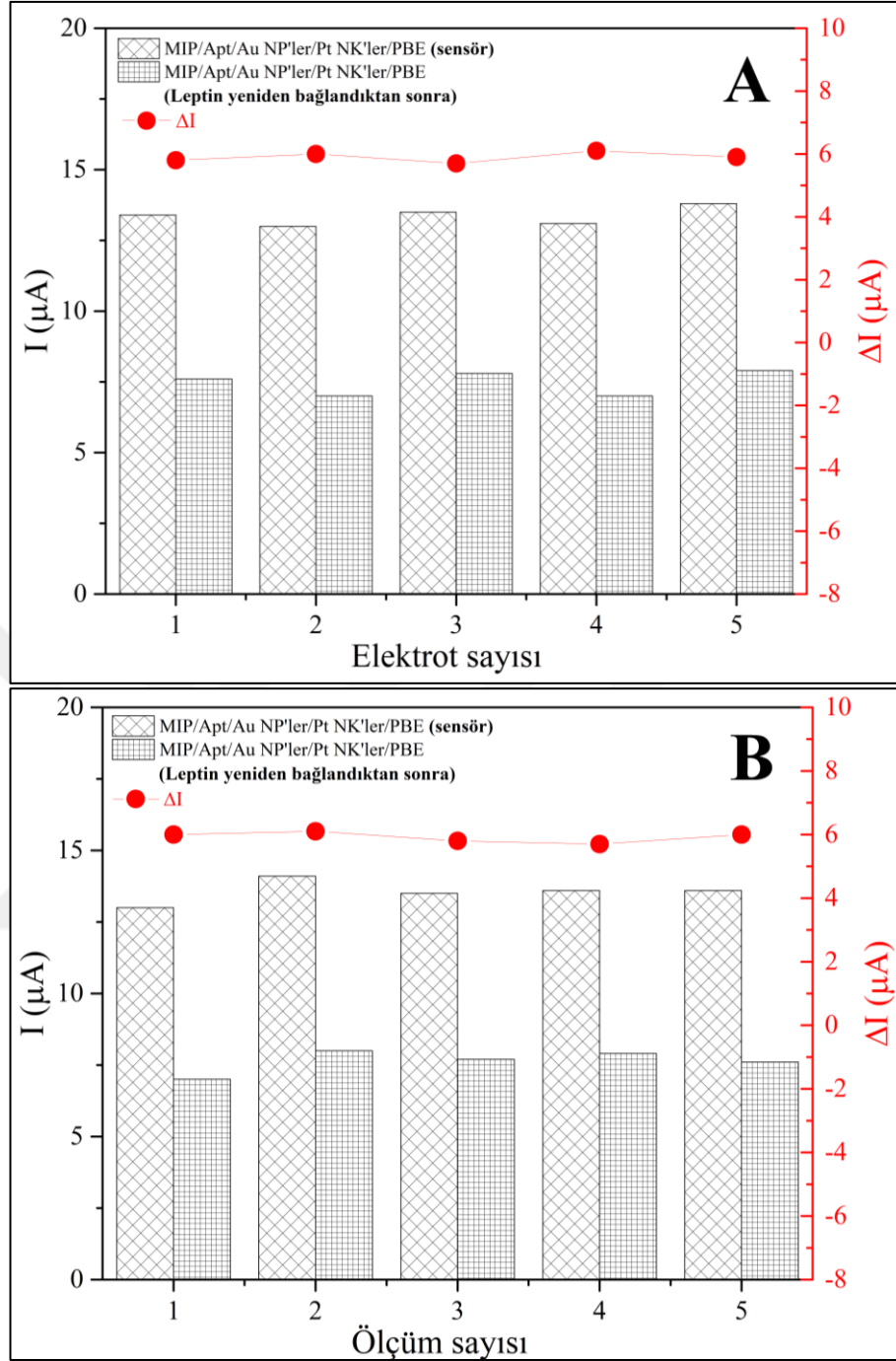
Şekil 3.33. Apt-MIP hibrit sensör kullanılarak Leptin tayini için DP voltamogramları ve kalibrasyon eğrileri (A) 0,001 pg/mL-10 pg/mL derişim aralığında elde edilen DP voltamogramları, (B) 0,001 pg/mL-10 pg/mL derişim aralığında elde edilen kalibrasyon eğrileri

3.14.1. Apt-MIP Hibrit Sensörü İçin Seçicilik, Tekrar Üretilirlik ve Stabilitate Çalışmaları

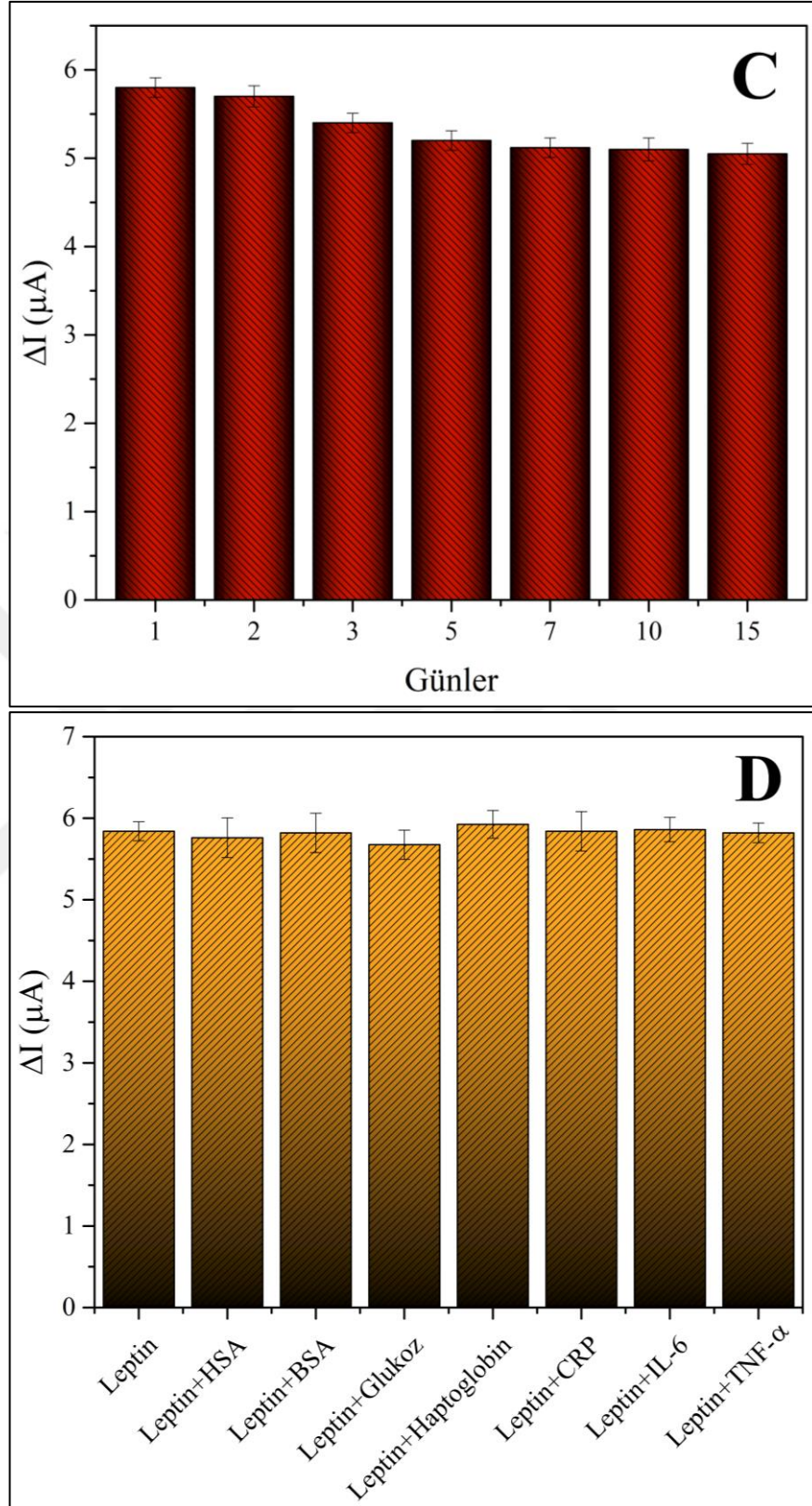
Apt-MIP hibrit sensörün tekrarlanabilirliği iki farklı şekilde incelenmiştir. İlk olarak, optimum koşullar altında hazırlanan tek sensör ile Leptin'in cevabı incelenmiştir. Tek sensör kullanılarak alınan beş ölçümün sonuçlarına göre %BSS, %2,48 olarak bulunmuştur (Şekil 3.34A). Ayrıca aynı yöntemle beş bağımsız MIP/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE sensörü hazırlanarak Leptin derişimi için karşılık gelen DPV sinyalleri kaydedilmiştir. 0,1 pg/mL Leptin için analiz sonuçlarına göre için %2,39'luk BSS değeri bulunmuştur (Şekil 3.34B). Sonuç olarak, elde edilen veriler geliştirilen hibrit sensörün yüksek tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik sergilediğini göstermiştir.

Geliştirilen hibrit sensörün stabilitesi 15 gün boyunca +4°C'de bekletilmesiyle incelenmiştir. Bu hibrit sensör 15. günün sonunda başlangıç aktivitesinin %90'ını koruyarak kayda değer bir stabilite sergilemiştir (Şekil 3.34C).

Ayrıca, geliştirilen hibrit sensörün seçiciliği, MIP/Apt[Leptin]/Au NP'ler/ Pt NK'ler/PBE yüzeyinde 0,1 pg/mL Leptin varlığında 10 pg/mL HSA, 10 pg/mL BSA, 10 pg/mL haptoglobulin, 100 pg/mL glukoz, 10 ng/mL CRP, 200 pg/mL IL-6 ve 780 pg/mL TNF- α 'nın ayrı karışımlarının DPV ölçümlerinin alınmasıyla değerlendirilmiştir (Şekil 3.34D). DPV sinyallerinden elde edilen %97,2 ile %101,5 arasında değişen geri kazanım değerleri, müdahale eden bileşiklerin varlığının geliştirilen sensörün tepkisi üzerinde önemsiz bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, hedef analit Leptin ile hibrit sensör yüzeyi arasında gerçekleşen etkileşimin spesifik olduğu gerçeğiyle tutarlı olmuştur.



Şekil 3.34. Geliştirilen Apt-MIP hibrit sensörün tekrar üretilebilirliği (A), ölçüm tekrarlanabilirliği (B), stabilitesi (C) ve Leptin ile çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında seçiciliği (D)



Şekil 3.34. (Devam) Geliştirilen Apt-MIP hibrit sensörün tekrar üretilebilirliği (A), ölçüm tekrarlanabilirliği (B), stabilitesi (C) ve Leptin ile çeşitli girişim yapan maddelerin varlığında seçiciliği (D)

3.14.2. Apt-MIP Hibrit Sensörü Kullanılarak İnsan Serum ve İnsan Plazma Örneklerinden Leptin Analizi

Geliştirilen hibrit sensörün gerçek numune analizlerinde uygulanabilirliğini değerlendirmek için, insan serum ve plazma örneklerinden Leptin'in belirlenmesi için geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Serum ve plazma örnekleri (1:10; h/h) oranında çözücü içerisinde seyreltikten sonra bu örnekler üç farklı derişimde Leptin çözeltisi ilave edilmiştir. Apt-MIP hibrit sensörü kullanılarak elde edilen yüzde geri kazanım değerleri Çizelge 3.5'te gösterilmiştir. %106,3 ile %108,66 arasında hesaplanan geri kazanım değerleri geliştirilen sensörün gerçek örneklerde kullanılabileceğini göstermektedir.

Çizelge 3.5. Apt-MIP hibrit sensörü kullanılarak geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar

Örnek	Eklenen miktar (pg/mL)	Bulunan miktar (fg/mL)	Geri kazanım (%)	%BSS*
İnsan serum örneği	0,01	106,23	106,23	6,36
	0,1	107,03	107,03	5,44
	1,0	1078,40	107,84	2,89
İnsan plazma örneği	0,01	108,50	108,50	7,24
	0,1	108,25	108,25	7,66
	1,0	1086,60	108,66	3,98

*Elde edilen %BSS değerleri 5 ölçüme ait sonuçlardır.

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında aptamerler kullanılarak ilk kez, Leptin tayinine yönelik elektrokimyasal sensörler geliştirip bu sensörlerin performansları incelenmiştir. İlk olarak Leptin'e spesifik ve bağlanma affinitesi en yüksek olan aptamer kullanılarak etiketsiz impedimetrik bir aptasensör tasarlanmıştır. Daha sonra, hassasiyeti arttırmak amacıyla enzim etiketli sandviç temelli bir aptasensör tasarlanmıştır. Son olarak MIP'lerin seçicilik özelliği ve aptamerlerin mükemmel bağlanma özellikleri birleştirilerek bir hibrit sensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sensörlerin hassasiyetlerini arttırmak için çalışma elektrotları çeşitli nanomateriyaller ile modifiye edilmiştir. Deneysel koşulların optimizasyonları ve geliştirilen sensörler için validasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, Leptin'in insan serum ve insan plazma örneklerinden analizi başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Leptin tayinine yönelik ilk olarak TiO₂ NP'ler ve Au NP'ler ile modifiye edilmiş yüzeyler kullanılarak etiketsiz impedimetrik bir aptasensör geliştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan DV ve miktar tayini için kullanılan EIS temelli elektrokimyasal yöntemlerde 5 mM Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks çözeltisinden yararlanılarak elektrokimyasal ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, elektroaktif özellikte olmayan Apt ve Leptin için herhangi bir elektrokimyasal sinyal olmadığı için doğrudan ölçüm yerine dolaylı ölçüm yaklaşımı tercih edilmiştir. Apt ve Leptin arasındaki etkileşime bağlı olarak Fe(CN)₆^{3-/4-} redoks sinyalinde meydana gelen değişimlerin izlenmesi, doğrudan yöntemlere göre kıyasla daha hassas sonuçların elde edilmesini sağlamıştır.

İlk aşamada PBE'ler kimyasal ve termal kararlılıkları, uygun maliyetli olmaları, biyouyumlulukları ve çevre dostu olmaları nedeniyle seçilen TiO₂ NP'ler ile modifiye edilmiştir. EIS yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasına göre TiO₂ NP'lerin derişimi 1,0 mg/mL olarak belirlenmiştir. Modifikasyonun ikinci aşamasında ise TiO₂ NP'ler üzerinde, Au NP'lerin elektrokimyasal olarak biriktirilmesi gerçekleştirilmiştir. Sensör yüzeyinde Au NP'lerin kullanılması, Apt'in yüzeye

immobilizasyonu için daha aktif bağlanma bölgeleri sağlar. Literatür incelemesi sonucu belirlenen 1 mM stok HAuCl_4 çözeltisi 0,1 M KCl içerisinde hazırlanmıştır. TiO_2 NP'ler modifiye yüzeye bu çözeltiden damlatılmış ve (-0,3) -(+1,2) V potansiyel aralığında ve 15 döngü sayısı ile DV yöntemi uygulanmıştır. TiO_2 NP'ler modifiye yüzeyin Au NP'ler ile modifiye edilmesiyle, Au NP'lerin mükemmel iletkenliği sayesinde tepe akımı ve elektroaktif yüzey alanında anlamlı bir artış ve R_{ct} değerinde anlamlı bir azalış elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Au NP'ler/ TiO_2 NP'ler/PBE'nin aptasensör tasarımı için kararlı ve iyi bir performans sergileyen yüzey olduğunu göstermiştir.

Optimizasyon çalışmalarının ikinci adımında NP'ler ile modifiye yüzeyde Apt ve Leptin arasındaki maksimum etkileşimin sağlanması için Apt moleküllerinin immobilizasyon süresi, derişimi ve Leptin ile bağlanma süresi optimize edilmiştir. Apt immobilizasyonu için sürenin etkisini değerlendirmek için, 30 dakika ile 18 saat arasında değişen farklı sürelerde R_{ct} değerleri incelenmiştir. Maksimum R_{ct} değerinin elde edildiği 3 saat, modifiye yüzey üzerindeki bağlanma bölgelerinin Apt molekülleri ile tamamen doygunluğunu göstermiştir. Apt derişiminin etkisini görmek için, 0,5 ile 3,0 μM arasında değişen farklı Apt derişimlerinde R_{ct} değerleri incelenmiştir. R_{ct} değerindeki en yüksek artış (~11,1 kat), sonraki çalışmalar için optimum Apt derişimi olarak seçilen 1,5 μM ile elde edilmiştir. Leptin'nin Apt ile bağlanma süresini optimize etmek için, aptasensörler, sırasıyla 5, 15, 30, 45 ve 60 dakika süreyle Leptin çözeltisiyle (10 pg/mL) inkübe edilmiştir. 30 dakikaya kadar atan sonrasında ise doygunluk davranışı sergileyen R_{ct} değeri, Leptin tayini için optimum bağlanma süresinin 30 dakika olarak seçilebileceğini göstermiştir. Ayrıca geliştirilen aptasensörün yüzey morfolojilerinde meydana gelen değişimleri incelemek için alınan SEM görüntüleri ve EDS sonuçları aptasensörün başarılı şekilde üretildiğini göstermiştir.

Optimum koşullar altında, geliştirilen aptasensör 1,0-100,0 pg/mL ve 100,0-1000,0 pg/mL aralıklarında artan Leptin derişimine karşı doğrusal çalışma aralığı sergilemiştir. 1,0-100,0 pg/mL aralığındaki regresyon denklemiyle daha büyük eğim elde edilmiştir. Bu durum 1,0-100,0 pg/mL aralığında artan hassasiyetle sonuçlanmaktadır. Daha yüksek Leptin derişim aralığındaki (100,0-1000,0 pg/mL) eğimin azalışı, artan streik engellerden dolayı $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ moleküllerinin yeteri kadar elektrot yüzeyine (Apt/Au NP'ler/ TiO_2

NP'ler/PBE) ulaşamamasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, ilk kalibrasyon aralığının regresyon denklemi kullanılarak hesaplanan TS (0,312 pg/mL) ve TAS (1,0 pg/mL) değerleri aptasensörün gelişmiş hassasiyetini göstermektedir.

Geliştirilen aptasensörün analitik performansı, Leptin tayini için daha önce rapor edilen literatür yöntemleri ile karşılaştırıldığında, bu aptasensör Leptin tayini için geliştirilmiş ilk aptamer bazlı elektrokimyasal yöntem olma özelliğini taşımaktadır. Aptamer teknolojisine dayalı olarak geliştirilen Au NP'ler/TiO₂ NP'ler tabanlı bu aptasensör, literatürde daha önce bildirilen sensörlerin çoğundan daha geniş bir çalışma aralığına sahiptir (Cavallo ve ark., 2021; He ve ark., 2013; He ve ark., 2015; Mihailescu ve ark., 2020; Ojeda ve ark., 2013; Özcan ve Sezgintürk, 2021 ve Sung ve Seok Heo, 2021). Ayrıca, geliştirilen aptasensör ile elde edilen TS değeri sayesinde bazı elektrokimyasal immunosensörler, kemilüminesans temelli sensörler ve MIP temelli sensörlere kıyasla artan hassasiyet sergilemiştir (Chen ve ark., 2010; Dong ve ark., 2014; He ve ark., 2013; Mihailescu ve ark., 2020; Ojeda ve ark., 2013 ve Zhang ve ark., 2018). Antikor temelli yöntemler (Cai ve ark., 2019; Liu ve ark., 2021 ve Özcan ve Sezgintürk, 2021). TS açısından bazı faydalar sunsa da geliştirilen aptasensör özellikle düşük üretim maliyeti, daha kısa analiz süresi, tek kullanımlık ve basitlik, düşük toksisite ve yüksek stabilite gibi avantajlara sahiptir.

Geliştirilen aptasensörün tekrarlanabilirliği farklı aptasensörlerin hazırlanmasıyla incelenmiştir. Farklı aptasensörlerin Leptin'e karşı verdikleri cevapların %BSS değerinin %1,4 olarak bulunması aptasensörün tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermiştir. Geliştirilen bu aptasensörün seçiciliği, kanda yüksek oranda bulunan HSA ve BSA gibi proteinler, glukoz, haptoglobin, glutatyon, norepinefrin ve l-sistein varlığında Leptin'in tayini ile değerlendirilmiştir. %9'dan küçük bulunan BSS ve %99,93 ile %102,43 arasında elde edilen %geri kazanım değerleri aptasensörün Leptin'e karşı yüksek seçiciliğini göstermiştir. Ayrıca, geliştirilen aptasensörün bir hafta boyunca kullanılabilir olması pratik uygulamalarda avantaj sağlayabilecektir.

Geliştirilen etiketsiz aptasensörün insan serum ve plazma örneklerinden analizleri, serum ve plazma çözeltilerinin tampon ile seyreltilmesi ve dışardan belirli derişimlerde

Leptin eklenmesiyle incelenmiştir. %96,40 ile %107,79 arasında elde edilen %geri kazanım sonuçları aptasensörün herhangi bir numune hazırlama aşamasına gerek olmadan biyolojik sıvılarda başarılı bir şekilde kullanımına olanak sağlamaktadır.

Tez çalışmalarının ikinci kısmında, Leptin tayinine yönelik etiketli üretim stratejisine dayalı sandviç tip aptasensör geliştirilmiştir. Oldukça hassas ve çok yönlü analize imkân sağlayan etiketli yöntemlerde ölçüm prensibi bir veya birkaç etiketten üretilen sinyallerin değerlendirilmesine dayanır.

Etiketli sensörlerde, etiket olarak sıklıkla kullanılan horseradish peroksidaz glukoz oksidaz ve alkalın fosfataz gibi enzimler hedef analite veya hedef analitin spesifik antikoruna ya da aptamerine bağlanabilir. Etiketli sensörler sağladıkları yüksek hassasiyet ve spesifik olmayan adsorpsiyonların sinyal üzerindeki etkisini minimuma indirdikleri için sensör tasarımlarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmadaki aptasensör, modifiye yüzey üzerine kendiliğinden immobilize edilen tiyol fonksiyonlu Apt1, Leptin ile etkileştirildikten sonra biyotinlenmiş Leptin bağlayan başka bir Apt2 molekülü ile sandviç yöntemine göre geliştirilmiştir. Öncelikle yalın PBE yüzeyi ZnO NP'ler ile damlatıp kurutma prensibine göre modifiye edilmiştir. $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks sinyalindeki değişimler takip edilerek farklı derişimlerdeki ZnO NP'ler için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ardından, ZnO NP'ler modifiye yüzeyde Au NP'lerin biriktirilmesi için DV yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, döngü sayısının 5 ile 15 arasında değiştirilmesiyle $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks sinyaline ait R_{ct} değerlerinin davranışı incelenerek optimum döngü sayısı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, en düşük R_{ct} değerinin 0,25 mg/mL ZnO NP'ler derişimi ve 15 döngü sayısında elde edildiğini göstermiştir. Artan iletkenlik ve yüzey ile $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks molekülü arasında kolaylaşan elektron transferi Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE'nin aptasensör tasarımı için uygun bir yüzey olduğunu göstermiştir. Au NP'ler/ZnO NP'ler/PBE, Apt1 moleküllerinin immobilizasyonu için etkili ve geniş bir yüzey alanı sağlarken, Strep-ALP ile α -naftil fosfat arasında gerçekleşen indirgenme reaksiyonu sırasında elde edilen elektrokimyasal sinyali yükseltmeye katkı sağlamıştır.

Aptasensörün maksimum performansı sergilemesi için Apt1'in derişimi, Apt2'in immobilizasyon süresi ve derişim ve Leptin'in inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları, etiket olarak kullanılan ALP ile substrat olarak kullanılan α -naftil fosfat arasındaki reaksiyon ürünü α -naftol'ün akım sinyalleri takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak, 0,05 ile 2,0 μ M arasında farklı Apt1 derişimleri incelenmiştir. Maksimum akım sinyalinin görüldüğü 0,5 μ M optimum değer olarak seçilmiştir. Bu aşamada aptasensörün hazırlık aşamalarındaki modifikasyon ve etkileşim süreleri dikkate alındığında, geliştirilen aptasensörün pratik kullanımı için Apt1'in immobilizasyon süresi 1 gece (~18 saat) olarak belirlenmiştir. İkinci bir parametre olarak Apt2'nin immobilizasyon süresi, 5 ile 60 dakika arasında incelenmiştir. Maksimum akım sinyalinin görüldüğü 30 dakika optimum değer olarak seçilmiştir. Aptasensör performansını etkileyen enzim etiketinin, yüzeye bağlanmasını etkileyen önemli faktörden biri Apt2'nin derişimi ise 0,5 ile 3,0 μ M arasında değiştirilmesiyle incelenmiştir. Maksimum akım sinyalinin elde edildiği 1,5 μ M Apt2 derişimi optimum değer olarak seçilmiştir. Son olarak, Leptin'in bağlanma süresi 5 ile 60 dakika arasında incelenmiştir. Apt molekülleri ve Leptin arasındaki etkileşime göre maksimum akım sinyalinin elde edildiği 30 dakika optimum değer olarak seçilmiştir. Ayrıca, geliştirilen aptasensör için SEM görüntüleri, EDS ve XRD analizleri ile yüzey morfolojileri incelenmiştir.

Optimum koşullar altında, geliştirilen aptasensör 0,01-5,0 pg/mL ve 5,0-100,0 pg/mL aralıklarında artan Leptin derişimine karşı doğrusal çalışma aralığı sergilemiştir. 0,01-5,0 pg/mL aralığındaki regresyon denklemiyle daha büyük eğim elde edilmiştir. Bu durum ilk doğrusal çalışma aralığında artan hassasiyetle sonuçlanmaktadır. 0,01-5,0 pg/mL çalışma aralığında α -naftil fosfat, difüzyon etkilerinin artmasıyla nedeniyle daha hızlı α -naftol'e dönüştüğü için elektrot yüzeyindeki lokal Leptin derişimi hızla tükenir. Böylece aptasensörün hassasiyeti artmaktadır. Ancak, daha yüksek Leptin derişimlerinde, ALP ile α -naftil fosfat arasındaki enzimatik reaksiyon daha uzun bir süre devam eder. Bu da oluşan reaksiyon ürünlerinin elektrot yüzeyini kirletme olasılığı ile daha düşük bir eğim sergilemektedir (Gholizadeh ve ark., 2012 ve Zhou ve ark., 2022). Ayrıca, ilk

kalibrasyon aralığının regresyon denklemi kullanılarak hesaplanan TS (0,0035 pg/mL) ve TAS (0,01 pg/mL) değerleri aptasensörün gelişmiş hassasiyetini göstermektedir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, Leptin tayini için tek duvarlı karbon nanotüpler, pirol, polidopamin ve demir (II, III) oksit gibi çeşitli nanomalzemelerin kullanıldığı EIS, amperometrik ve kemilüminesans yöntemlerine dayalı elektrokimyasal sensörler önerilmiştir. Geliştirilen bu elektrokimyasal sensörler kullanılarak Leptin 0,3 pg/mL'ye kadar belirlenebilmiştir (Chen ve ark., 2010; Dong ve ark., 2014; He ve ark., 2015 ve Mihailescu ve ark., 2020). Ayrıca, elektrokimyasal immünosensörler ve ELISA yöntemlerine dayalı analitik çalışmalar Leptin'in 0.00813 pg/mL seviyelerinde belirlenmesini sağlamıştır (Cai ve ark., 2019; Liu ve ark., 2021; Ojeda ve ark., 2013; Özcan ve Sezgintürk, 2021; Sung ve Seok Heo, 2021 ve Zhang ve ark., 2018). Ek olarak, floresan temelli bir aptasensör ile 10 pg/mL seviyesinde Leptin tayini yapılabilmektedir (Cavallo ve ark., 2021). Ancak bu yöntemlerin düşük doğruluk, yüksek maliyet, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlere karşı aşırı duyarlılık, düşük stabilite ve düşük raf ömrü gibi bazı dezavantajları vardır. Sonuç olarak, geliştirilen bu aptasensörün sadece metalik NP'ler ve enzim etiket stratejisine dayanarak doğrusal bir konsantrasyon aralığında, düşük TS ve düşük maliyet avantajı, diğer yöntemlere kıyasla önemli ölçüde geliştirilmiş üstünlük sunmaktadır.

Geliştirilen sandivç tip aptasensör, tekrarlanabilirliği (%BSS=%1,4), HSA, BSA, l-lizin, haptogloblin, dopamin, askorbik asit ve parasetamol varlığında seçiciliği, on gün boyunca koruduğu stabilitesi ile Leptin tayini için önemli avantajlar sunmaktadır. Dahası, herhangi bir numune hazırlama aşamasına gerek olmadan insan serum ve plazma örneklerinden Leptin tayini için elde edilen %geri kazanım oranları (%96,31-%108,79), geliştirilen aptasensörün pratik olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Tez çalışmaları kapsamında son olarak Leptin tayinine yönelik, MIP'lerin ve Apt'lerin tanıma özelliklerini sinerji haline getirebilen hibrit sensör geliştirilmiştir. Apt-MIP hibrit sistemi, daha yüksek bağlanma özellikleri gösteren sentetik reseptörler oluşturarak makromolekülerin baskılanmasını kolaylaştırmaktadır. Bu çalışmada öncelikle yalın PBE yüzeyi Pt NK'ler ile damlatıp kurutma prensibine göre modifiye

edilmiştir. Sonrasında, Pt NK'ler modifiye yüzeyde Au NP'lerin biriktirilmesi için DV yöntemi kullanılmıştır. Önceki çalışmalarda olduğu gibi, Pt NK'lerin derişimi ve Au NP'lerin elektropolanması için döngü sayısı hem DV hem de EIS yöntemleri kullanılarak $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks sinyalindeki değişimlerin takip edilmesiyle optimize edilmiştir. Artan elektroaktif yüzey alanı ve iletkenlik ile yüzey ile $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks molekülü arasında kolaylaşan elektron transferi baz alınarak maksimum akım değerinin ve en düşük R_{ct} değerinin elde edildiği 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Pt NK'ler derişimi ve 15 döngü sayısı optimum değerler olarak bulunmuştur. Ayrıca, DV ve EIS sonuçlarının birbirini desteklemesi optimizasyonun başarılı olduğunu göstermiştir.

Çalışmaların devamında, tiyol fonksiyonlu Apt1 ile Leptin 37 °C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, Apt[Leptin] kompleksinin Au NP'ler/Pt NK'ler/PBE'nin yüzeyinde immobilize olması için 1 gece boyunca bekletilmiştir. Moleküler baskılama adımını gerçekleştirmeden önce yüzeydeki serbest Apt moleküllerini doyurmak için Leptin ile 30 dakika daha inkübe edilmiştir. Bu hibrit sensör geliştirilirken MIP yüzey oluşturulması için fonksiyonel monomer olarak oPD kullanılmıştır. Polimerizasyon adımında, Apt[Leptin]/Au NP'ler/Pt NK'ler/PBE'nin yüzeyi DV yöntemi uygulanarak elektropolimerizasyon yoluyla polimer kaplı (PoPD) kaplı yüzey oluşturulmuştur. Sonraki basamakta uzaklaştırma çözeltisi ile Leptin PoPD yüzeyinden uzaklaştırılarak hibrit sensör geliştirilmiştir. Analiz için hibrit sensör yüzeyine farklı derişimlerde Leptin inkübasyonu ile kalibrasyon elektrotları hazırlanmıştır. Hazırlanan elektrotların optimizasyonu ve miktar tayini için kullanılan DV, DPV ve EIS temelli elektrokimyasal ölçümlerde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinin sinyali takip edilmiştir. Bu ölçümlerde hedef analit Leptin'in sensör yüzeyinden uzaklaştırılması ve yeniden bağlanmasıyla sonra elde edilen $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks molekülüne ait pik akımlarının arasındaki farklar değerlendirilmiştir. Böylece, çok daha düşük derişimlerde çalışılarak daha hassas sonuçlar elde edilmiştir.

Optimizasyon çalışmalarında PoPD elde edilmesi için döngü sayısı, optimize edilerek 30 döngü sayısının optimum olduğu bulunmuştur. PoPD/Apt[Leptin]/Au NP'ler/Pt NK'ler/PBE yüzeyinden Leptin'in uzaklaştırılması için optimum süre 30 dakika

olarak belirlenmiştir. Leptin'in hibrit sensör yüzeyine yeniden bağlanması için optimum süre ise 1 saat olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen hibrit sensör ile 1,0 fg/mL-10,0 pg/mL derişim aralığında doğrusal çalışma aralığı elde edilmiştir. Bu aralıktaki regresyon denklemi kullanılarak hesaplanan TS (0,31 fg/mL) ve TAS (1,0 fg/mL) değerleri geliştirilen hibrit sensörün, literatürdeki tüm çalışmalara göre daha düşük derişim seviyesine inerek, gelişmiş hassasiyetini göstermektedir.

Apt-MIP hibrit sensörü için hem tek sensör kullanılarak alınan beş ölçümün sonuçları hem de beş bağımsız sensör kullanılarak Leptin'e karşı elde edilen sonuçlar hibrit sensörün yüksek tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik sergilediğini göstermiştir. Bu hibrit sensörün 15 gün boyunca başlangıç aktivitesinin %90'ını koruması geliştirilen aptasensörlere kıyaslama iyileştirilmiş stabilitesini göstermektedir. Ayrıca, Leptin varlığında HSA, BSA, haptogloblin, glukoz, CRP, IL-6 ve TNF- α ile gerçekleştirilen seçicilik çalışmalarının sonuçları, geliştirilen hibrit sensörün sadece hedef analit Leptin'e spesifik bir sensör geliştirildiğini doğrulamıştır.

Son olarak, insan serum ve plazma örneklerinden Leptin analizi için, seyreltilmiş serum ve plazma örneklerine üç farklı derişimde standart Leptin çözeltileri ilave edilerek geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. %106,23 ile %108,66 arasında değişen %geri kazanım değerleri hibrit sensörün biyolojik analizlerde başarılı bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak, Leptin tayini için geliştirilen etiketsiz aptasensör, sandviç tip aptasensör ve hibrit sensör literatürde yer alan diğer yöntemlerle karşılaştırıldıkların daha ekonomik, uygulaması daha kolay, çok daha hassas ve çevre dostu özellikleri sayesinde ön plana çıkmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında beyin hasarı biyobelirteçlerinden olan Leptin'in insan serum ve plazma örneklerinden ultra hassas ve seçici tayini için aptamer temelli elektrokimyasal biyosensörler geliştirilmiştir. Geliştirilen aptasensörlerin ve hibrit sensörün optimizasyon ve validasyon çalışmaları yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Giriş bölümünde beyin hasarından, beyin hasarında Leptin'in rolünden, aptamerler, elektrokimyasal yöntemler ve biyosensörlerde validasyon işlemleri ile ilgili detaylı bilgiler verilmiştir. Çalışmalarda kullanılan aptamer moleküllerinin özellikleri, avantajları ve seçimi ile sensör hassasiyetini arttırmak için kullanılan metalik, metal oksit ve polimerik nanomalzemelerin karakteristik özellikleri bu bölümde detaylandırılmıştır.

Gereç ve yöntem bölümünde öncelikle çalışmalarda kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler, cihazlar ve ekipmanlar, kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve geliştirilen sensörlerin hazırlık aşamaları anlatılmıştır. Çalışmalarda kullanılan tüm elektrokimyasal yöntemler bu bölümde özetlenmiştir. Geliştirilen aptasensörler ve hibrit sensörün elektrokimyasal ve morfolojik karakterizasyonları, deneysel koşullarının optimizasyon adımları, elektrokimyasal tayinleri, tekrarlanabilirlik, seçicilik ve girişim gibi validasyon karakteristikleri ve stabilite çalışmalarına ait sonuçlar ise bulgular bölümünde sunulmuştur.

İlk olarak; Leptin tayinine yönelik ilk elektrokimyasal aptasensör geliştirilmiştir. Geliştirilen aptasensör için elektrot yüzeyi TiO_2 NP'ler ve ardından Au NP'ler ile modifiye edilmiştir. Bu aptasensör, modifiye elektrot yüzeyine tiyol fonksiyonlu DNA Apt'inin immobilize edilmesiyle üretilmiştir. Artan derişimlerde Leptin çözeltisinin Apt ile modifiye edilmiş elektrota inkübe edilmesiyle kalibrasyon elektrotları hazırlanmış ve EIS ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen aptasensörün elektrokimyasal ve morfolojik karakterizasyonu için DV, EIS, SEM ve EDS

yöntemlerinden yararlanılmıştır. Geliştirilen aptasensör, artan Leptin derişimlerinde iki doğrusal aralıkta (1,0-100,0 pg/mL ve 100,0-1000,0 pg/mL) yüksek bir performans sergilemiştir. Ayrıca, 0,312 pg/mL'ye eşit TS değeri aptasensörün hassasiyetini göstermiştir. İnsan serum ve plazma örneklerinde Leptin'i belirlemek için kullanılan aptasensör, %96,40-107,79 aralığında geri kazanım değerleri ile iyi derecede doğruluk sergilemiştir. Sonuç olarak, geliştirilen impedimetrik aptasensörün sahip olduğu seçicilik, hassasiyet ve stabilite sayesinde Leptin tayinine yönelik yeni ve umut verici bir elektrokimyasal platform olduğu söylenebilir.

Bir sonraki basamakta, insan serumu ve insan plazması örneklerinden Leptin'in hassas tespiti için sandviç tip bir elektrokimyasal aptasensör tasarlanmıştır. Geliştirilen aptasensörün ölçüm prensibi, ZnO NP'ler ve Au NP'ler ile modifiye edilmiş yüzey üzerinde tiyol ve biyotin fonksiyonlu Apt'lerin Leptin ile etkileşimi ve artan Leptin derişimlerinin ALP enzimi ile α -naftil fosfat substratı arasındaki biyokimyasal reaksiyona verdiği cevaba dayanmaktadır. ZnO NP'ler ve Au NP'lerin arasındaki sinerjistik etki, aptasensörün elektrokatalitik aktivitesini önemli ölçüde iyileştirmiştir. Elde edilen yüksek yüzey alanı, elektrot yüzeyine daha fazla Apt molekülünün bağlanmasına olanak sağlamıştır. Optimum koşullar altında, geliştirilen aptasensör, 0,0035 pg/mL TS değeri ile 0,01 pg/mL ile 100,0 pg/mL arasında geniş bir doğrusal çalışma aralığı sergilemiştir. Geliştirilen aptasensör, vücut sıvılarında çok bulunabilen protein ve bileşiklerin varlığında mükemmel seçicilik sağlarken, iyi derece tekrarlanabilirlik ve stabiliteye sahiptir. Ayrıca geliştirilen aptasensör, insan serum ve plazma örneklerinden %96,31 ile %108,79 aralığında iyi geri kazanım oranlarıyla başarıyla uygulanabilmiştir. Sonuç olarak, elde edilen tüm sonuçlar, geliştirilen aptasensörün pratik uygulamalar için fizibilitesini göstermiştir.

Son olarak; Leptin'in ultra hassas ve seçici tayini için Apt ve MIP temelli hibrit sensör geliştirilmiştir. İlk aşamada Apt ve Leptin kompleksinin yüzeye daha etkin bağlanabilmesi için elektrot yüzeyi Pt NK'ler ve Au NP'ler ile modifiye edilmiştir. Bu sayede daha geniş bir yüzey alanı ve iletkenlik sağlanmıştır. Hibrit sensör hazırlanırken polimerizasyon basamağında, fonksiyonel monomer olarak biyoyumluluğu ve stabilitesi yüksek olan oPD kullanılmıştır. Elektropolimerizasyon

için döngü sayısı, uzaklaştırma çözeltisinin uygulama süresi ve Leptin'in yeniden bağlanma süresi optimize edilmiştir. Elektrot yüzeylerinin yapısı DV, EIS ve SEM yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Geliştirilen Apt-MIP hibrit sensörü, 0,31 pg/mL TS değeri ile 1,0 fg/mL ile 10,0 pg/mL arasında geniş bir doğrusal çalışma aralığı sergilemiştir. Girişim çalışmalarına ve insan serum ve plazma örneklerinden yapılan geri kazanım çalışmalarına ait sonuçlar, geliştirilen hibrit sensörün hem uygulanabilirliğini hem de doğruluğunu göstermiştir. Sonuç olarak geliştirilen bu hibrit sensörün Leptin tayini için en hassas, kararlı, seçici ve stabil bir sensör platformu olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak tez çalışmaları kapsamında geliştirilen tüm sensörlerin, ekonomik, basit numune hazırlama prosedürüne sahip, çok düşük Leptin derişimlerinde duyarlı, seçici ve stabil gibi üstün özellikleri sayesinde Leptin'in biyolojik örneklerden erken tayin için oldukça avantajlı analitik yöntemler olarak değerlendirilebileceği ön görülmektedir.

ÖZET

Beyin Hasarı Biyobelirteçlerinin Biyolojik Numunelerden Erken Teşhisine Yönelik Analitik Yöntem Geliştirilmesi

Bu tez çalışması kapsamında, Leptin tayinine yönelik üç farklı özgün elektrokimyasal biyosensör platformunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu platformlarda, biyobileşen olarak aptamerler kullanılarak Leptin tayinine yönelik ilk kez elektrokimyasal aptasensörler ve hibrit sensör geliştirilmiştir. İlk aptasensör tasarımında, aptamerlerin yüzeye etkin bir şekilde immobilizasyonu için, perde baskılı elektrotlar titanyum dioksit nanopartiküller ve altın nanopartiküller modifiye edilmiştir. Aptasensörün performansına etki eden aptamer derişimi, immobilizasyon süresi ve Leptin ile etkileşim süresi optimize edilmiştir. $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ redoks molekülünün impedans yanıtları takip edilerek 1,0-100,0 pg/mL ve 100,0-1000,0 pg/mL olmak üzere iki derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Bu aptasensör için, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla 0,312 pg/mL ve 1,0 pg/mL olarak bulunmuştur. Leptin tayinine yönelik sandviç tip aptasensörün tasarımı için elektrotların yüzeyi çinko oksit nanopartiküller ve altın nanopartiküller modifiye edilmiştir. Tiyol fonksiyonlu aptamerin derişimi, biyotin fonksiyonlu aptamerin derişimi ve immobilizasyon süresi ve Leptin ile etkileşim süresi optimize edilmiştir. Sandviç yapıda enzim etiketi olarak kullanılan alkalin fosfataz enzimi ve substratı α -naftil fosfat arasındaki reaksiyon ürünü α -naftol'un akım sinyalleri takip edilerek, 0,01 pg/mL ile 100,0 pg/mL derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Bu aptasensör için, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla 0,0035 pg/mL ve 0,01 pg/mL olarak bulunmuştur. Son sensör tasarımında ise, aptamerlerin ve moleküler baskılı polimerlerin benzersiz özellikleri birleştirilerek hibrit sensör geliştirilmiştir. Bu sensör için çalışma elektrodunun yüzeyi platin nanoküreler ve altın nanopartiküller modifiye edildikten sonra, polimer kaplama için polimerizasyon döngü sayısı, uzaklaştırma çözeltisinin uygulama süresi ve Leptin'in yeniden bağlanma süresi optimize edilmiştir. $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ redoks molekülünün akım cevapları takip edilerek 1,0 fg/mL-10,0 pg/mL derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Bu hibrit sensör için, teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla 0,31 fg/mL ve 1,0 fg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen üç sensör için de gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik, seçicilik, geri kazanım ve stabilite çalışmaları, bu sensörlerin Leptin analizi için mevcut yöntemlere kıyasla daha avantajlı ve alternatif olarak tercih edilebilecek sensörler olduğunu göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Aptasensör, Beyin Hasarı, Moleküler Baskılı Polimerler, Leptin, Validasyon

SUMMARY

Development of Analytical Methods for Early Diagnosis of Brain Injury Biomarkers from Biological Samples

Within the scope of this thesis, it is aimed to develop three different novel electrochemical biosensor platforms for Leptin determination. In these platforms, electrochemical aptasensors and hybrid sensor were developed for the first time for the determination of Leptin using aptamers as biocomponents. In the first aptasensor design, screen printed electrodes were modified with titanium dioxide nanoparticles and gold nanoparticles for efficient immobilization of aptamers to the surface. Aptamer concentration, immobilization time and interaction time with Leptin, which affect the performance of the aptasensor, were optimized. By following the impedance responses of the $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redox molecule, the linearity was obtained in two concentration ranges, 1.0-100.0 pg/mL and 100.0-1000.0 pg/mL. For this aptasensor, the limit of detection and lower limit of quantitation were found to be 0.312 pg/mL and 1.0 pg/mL, respectively. For the design of the sandwich type aptasensor for Leptin determination, the surface of the electrodes was modified with zinc oxide nanoparticles and gold nanoparticles. The concentration of thiol-functionalized aptamer, the concentration and immobilization time of biotin-functionalized aptamer, and the interaction time with Leptin were optimized. By following the current signals of α -naphthol, the reaction product between alkaline phosphatase enzyme used as enzyme label in sandwich structure and its substrate α -naphthyl phosphate, the linearity was obtained between 0.01 pg/mL and 100.0 pg/mL concentration range. For this aptasensor, the limit of detection and lower limit of quantitation values were found to be 0.0035 pg/mL and 0.01 pg/mL, respectively. In the final sensor design, a hybrid sensor was developed by combining the unique properties of aptamers and molecularly imprinted polymers. For this sensor, after the surface of the working electrode was modified with platinum nanospheres and gold nanoparticles, the number of polymerization cycles, the application time of the removal solution, and the rebinding time of Leptin were optimized for the polymer coating. By following the current responses of the $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redox molecule, the linearity was obtained in the concentration range of 1.0 fg/mL-10.0 pg/mL. For this hybrid sensor, the limit of detection and lower limit of quantitation values were found to be 0.31 fg/mL and 1.0 fg/mL, respectively. The reproducibility, selectivity, recovery and stability studies performed for all three sensors have shown that these sensors are more advantageous and alternative sensors for Leptin analysis compared to other existing methods.

Keywords: Aptasensor, Brain Injury, Molecular Imprinted Polymers, Leptin, Validation

KAYNAKLAR

- ABOUL ENEIN HY, STEFAN RI, BAIULESCU GE (2000). *Quality and Reliability in Analytical Chemistry*. CRC Press, Boca Raton.
- ADUMITRĂCHIOAIE A, TERTIŞ M, CERNAT A, SĂNDULESCU R, CRISTEA C (2018). Electrochemical methods based on molecularly imprinted polymers for drug detection: a review. *International Journal of Electrochemical Science*, **13**: 2556–2576.
- ALI GK, OMER KM (2022). Molecular imprinted polymer combined with aptamer (MIP-aptamer) as a hybrid dual recognition element for bio (chemical) sensing applications. Review. *Talanta*, **236**: 122878.
- ALTAY DN (2021). *Amiloid Beta Tayini İçin Elektrokimyasal Esaslı Biyosensör Sistemi Geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- ALVAREZ-LORENZO C, CONCEIRO A (2013). Molecular imprinting: a historical perspective. In: *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*, Eds.: Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro A., A Smithers Group Company, United Kingdom, 1–22.
- ANTUNA-JIMENEZ D, DIAZ-DIAZ G, BLANCO-LOPEZ MC, LOBO-CASTANON MJ, MIRANDA-ORDIEREZ AJ, TUNON-BLANCO P (2012). Molecularly imprinted electrochemical sensors: past, present and future. In: *Molecularly Imprinted Sensors: Overview and Applications*, Eds.: Li, S., Ge, Y., Piletsky, S.A., Elsevier, Amsterdam, 1–34.
- ARIĞ E (2010). *Nanoyapıda Çinko Oksit Partiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- ARREGUI FJ (2010). Introduction. In: *Sensors Based on Nanostructured Materials*, Ed.: Arregui, F.J., Springer-Verlag, Berlin, 1-10.
- BAIRD GS (2010). Where are all the aptamers?, *American Journal of Clinical Pathology*, **134**(4): 529-531.
- BAKER SP, O'NEILL B, HADDON W, LONG WB (1974). The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *Journal of Trauma*, **14**: 187–196.
- BARD AJ, FAULKNER LR (1980). *Electrochemical Methods*. Wiley, New York.

- BARD AJ, FAULKNER LR, BAGOTSKY VS (2001). *Electrochemical Methods Fundamentals of Electrochemistry*. John Wiley & Sons Inc., New York, USA.
- BARD AJ, INZELT G, SCHOLZ F (2008). *Electrochemical Dictionary*. Springer-Verlag, Berlin.
- BARSOUKOV E, MACDONALD JR (2005). *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- BAUMANN H, MORELLA KK, WHITE DW, DEMBSKI M, BAILON PS, KIM H, LAI CF, TARTAGLIA LA (1996). The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proceedings of the Natinal Academy of Sciences of the USA*, **93**: 8374–8378.
- BAYRAÇ AT, KANDEMİR BB (2018). Domuz jelatinine özgü DNA aptamerlerinin seçilimi ve karakterizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **22**(2): 774–778.
- BERGER RP (2006). The use of serum biomarkers to predict outcome after traumatic brain injury in adults and children. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, **21**: 315–333.
- BERGER RP, PIERCE MC, WISNIEWSKI SR, ADELSON PD, CLARK RSB, RUPPEL RA, KOCHANNEK PM (2002). Neuron-specific enolase and S100B in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatrics*, **109**(2): e31–e31.
- BIGDELI IK, YEGANEH M, SHOUSHARI MT, ZADEH MK (2021). Chapter 23: Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) for biosensing. In: *Nanosensors for Smart Manufacturing*, Eds.: Thomas, S., Nguyen, T.A., Ahmadi, M., Farmani, A., Yasin, G., Elsevier, New York, 533-554.
- BİLİCİ M (2019). *Asimetrik Dimetilarginin (ADMA) Aptamerlerinin Geliştirilmesi ve Aptamer Temelli Tayin Kitinin Tasarlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- BORISOV SM, WOLFBEIS OS (2008). Optical biosensors. *Chemical Reviews*, **108**: 423–461.
- BOZAL PALABIYIK B (2015). *Yeni Nesil Nanosensör Tasarımı ve Antiparkinson İlaç Analizlerinde Kullanımı*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- BOZAL PALABIYIK B, USLU B (2020). Elektrokimyasal ilaç analizlerinde moleküler baskılanmış polimer kullanımı. İçinde: *Eczacılıkta Yenilikler 3*, Eds.: Özçelikay, G., Yıldız, İ., Ankara Üniversitesi Yayınları No.689, Ankara, 13-32.

- BOZAL PALABIYIK, B, ERKMEN C, USLU B (2020). Molecularly imprinted electrochemical sensors: analytical and pharmaceutical applications based on ortho-phenylenediamine polymerization. *Current Pharmaceutical Analysis*, **16**: 350–366.
- BÖHMER AE, OSES JP, SCHMIDT AP, PERON CS, KREBS CL, OPPITZ PP, D’AVILA TT, SOUZA DO, PORTELA LV, STEFANI MA (2011). Neuron-specific enolase, S100B, and glial fibrillary acidic protein levels as outcome predictors in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery*, **68**: 1624–1631.
- BRADLEY WG, DAROF RB, FENICHEL GM, JANKOVIC J (Eds). (2004). *Neurology in Clinical Practice* (4th Ed.). Butterworth-Heinemann, Philadelphia.
- BROWN R, THOMPSON HJ, IMRAN SA, UR E, WILKINSON M (2008). Traumatic brain injury induces adipokine gene expression in rat brain. *Neuroscience Letters*, **432**: 73–78.
- BRUNS J, HAUSER WA (2003). The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia*, **44**(10): 2–10.
- BUERK DG (1993). *Biosensors: Theory and Applications*. Technomic Publishing Company, Lancaster.
- BUERK DG (1995). *Biosensors: Theory and applications*. CRC Press, USA.
- CAI J, GOU X, SUN B, LI W, LI D, LIU J, HU F, LI Y (2019) Porous graphene-black phosphorus nanocomposite modified electrode for detection of leptin. *Biosensors and Bioelectronics*, **137**: 88–95.
- CATUOGNO S, ESPOSITO CL (2017). Aptamer cell-based selection: overview and advances. *Biomedicines*, **5**(3): 49.
- CAVALLO FR, MIRZA KB, DE MATEO S, NIKOLIC K, RODRIGUEZ-MANZANO J, TOUMAZOU C (2021). Aptasensor for Quantification of Leptin through PCR Amplification of Short DNA-Aptamers. *ACS Sensors*, **6**: 709–715.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2013). CDC grand rounds: reducing severe traumatic brain injury in the United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **62**(27): 549–552.
- CERVELLIN G, BENATTI M, CARBUCICCHIO A, MATTEI L, CERASTI D, ALOE R, LIPPI G (2012). Serum levels of protein S100B predict intracranial lesions in mild head injury. *Clinical Biochemistry*, **45**(6): 408–411.

- CHEN AL, YANG SM (2015). Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*, **71**: 230-242.
- CHEN C, XIE Q, YANG D, XIAO H, FU Y, TAN Y, YAO S (2013). Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. *RSC Advances*, **3**: 4473–4491.
- CHEN W, LEI Y, LI CM (2010). Regenerable leptin immunosensor based on protein G immobilized au-pyrrole propylic acid-polypyrrole nanocomposite. *Electroanalysis*, **22**: 1078–1083.
- CHESNUT RM, MARSHALL LF, KLAUBER MR, BLUNT BA, BALDWIN N, EISENBERG HM, JANE JA, MARMAROU A, FOULKES MA (1993). The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *Journal of Trauma*, **34**(2): 216–222.
- CHIANG H, WANG Y, ZHANG Q, LEVON K (2019). Optimization of the electrodeposition of gold nanoparticles for the application of highly sensitive, label-free biosensor. *Biosensors*, **9**: 50.
- CLARK LC, LYONS C (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **102**: 29–45.
- CORRIGAN JD, SELASSIE AW, ORMAN JA (2010). The epidemiology of traumatic brain injury. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, **25**(2): 72–80.
- CRUZ-MANZO S, GREENWOOD P (2022). *Electrochemical Phenomena in the Cathode Impedance Spectrum of PEM Fuel Cells*. Elsevier, New York.
- DERKUŞ B (2012). *Anti-Miyelin Temelli Protein Tayini İçin İmpedimetrik İmmünosensör Geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- DONG F, LUO R, CHEN H, ZHANG W, DING S (2014). Amperometric immunosensor based on carbon nanotubes/chitosan film modified electrodes for detection of human leptin. *International Journal of Electrochemical Science*, **9**: 6924–6935.
- DONG XQ, HUANG M, HU YY, YU WH, ZHANG ZY (2010). Time course of plasma leptin concentrations after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *World Neurosurgery*, **74**: 286–293.
- DUBACH JM, CLARK HA (2013). Nanosensors. In: *The Textbook of Nanoneuroscience and Nanoneurosurgery*, Ed.: Kateb, B. Heiss, J.D., CRC Press, Boca Raton, 203–216.
- EDWARDS GA, BERGREN AJ, PORTER MD (2007). Chemically modified electrodes. In: *Handbook of Electrochemistry*, Eds.: Zoski, C. G., Elsevier, Amsterdam, 295–327.

- EGGINS BR (2002). *Chemical Sensors and Biosensors*. John Wiley and Sons, UK.
- ELLINGTON AD, SZOSTAK JW (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346**(6287): 818–822.
- FAGGIONI R, FEINGOLD KR, GRUNFELD C (2001). Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB Journal*, **15**(14): 2565–2571.
- FANTUZZI G, FAGGIONI R (2000). Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology*, **68**(4): 437–446.
- FDA (2003). Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. Erişim Adresi: [<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073369.pdf>]. Erişim Tarihi: 15.09.2022
- FDA. (2015). Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Erişim Adresi: [<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>]. Erişim Tarihi: 15.09.2022
- FEI A, LIU Q, HUAN J, QIAN J, DONG X, QIU B, MAO H, KUN W (2015). Label-free impedimetric aptasensor for detection of femtomole level acetamiprid using gold nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotube-reduced graphene oxide nanoribbon composites. *Biosensors and Bioelectronics*, **70**: 122–129.
- FEIGIN VL, FOROUZANFAR MH, KRISHNAMURTHI R, MENSAH GA, CONNOR M, BENNETT DA, MORAN AE, SACCO RL, ANDERSON L, TRUELSSEN T, O'DONNELL M, VENKETASUBRAMANIAN N, BARKER-COLLO S, LAWES CMM, WANG W, SHINOHARA Y, WITT E, EZZATI M, NAGHAVI M, MURRAY C, (2014). Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, **383**(9913): 245–255.
- FORDE CT, KARRI SK, YOUNG AMH, OGILVY CS (2014). Predictive markers in traumatic brain injury: opportunities for a serum biosignature. *British Journal of Neurosurgery*, **28**: 8–15.
- GALGANO M, TOSHKETZ G, QIU X, RUSSELL T, CHIN L, ZHAO LR (2017). Traumatic brain injury: current treatment strategies and future endeavors. *Cell Transplant*, **26**(7): 1118–1130.
- GERARD M, CHAUBEYB A, MALHOTRAB BD (2002). Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **17**: 345–359.

- GHOLIZADEH A, SHAHROKHIAN S, IRAJI ZAD A, MOHAJERZADEH S, VOSOUGHI M, DARBARI S, KOOHSORKHI J, MEHRAN M (2012). Fabrication of sensitive glutamate biosensor based on vertically aligned CNT nanoelectrode array and investigating the effect of CNTs density on the electrode performance. *Analytical Chemistry*, **84**(14): 5932-5938.
- GORDON WA, ZAFONTE R, CICERONE K, CANTOR J, BROWN M, LOMBARD L, GOLDSMITH R, CHANDNA T (2006). Traumatic brain injury rehabilitation: state of the science. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **85**(4): 343–382.
- GREENBERG MS (2006). *Handbook of Neurosurgery* (6th Ed.) Thieme Medical Publishers, New York.
- GRIESHABER D, MACKENZIE R, VÖRÖS J, REIMHULT E (2008). Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, **8**(3): 1400-1458.
- GRONOW M (1991). Biosensors-a marriage of biochemistry and microelectronics In: *Biotechnology: The Science & The Business*, Ed.: Moses, V., Cape, R.E., Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 355–370.
- HAMULA CLA, ZHANG H, GUAN LL, LI XF, LE XC (2008). Selection of aptamers against live bacterial cells. *Analytical Chemistry*, **80**(20): 7812-7819.
- HE Y, SUN J, WANG X, WANG L (2015). Detection of human leptin in serum using chemiluminescence immunosensor: Signal amplification by hemin/G-quadruplex DNAzymes and protein carriers by Fe₃O₄/polydopamine/Au nanocomposites. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **221**: 792–798.
- HE Y, WANG X, ZHANG Y, GAO F, LI Y, CHEN H, WANG L (2013). An ultrasensitive chemiluminescent immunosensor for the detection of human leptin using hemin/G-quadruplex DNAzymes-assembled signal amplifier. *Talanta*, **116**: 816–821.
- HUBER L (2007). *Validation and Qualification in Analytical Laboratories* (2nd Ed.). Informa Healthcare, New York-London.
- ILGINEL MT, LAFLI TUNAY D, GÜNEŞ Y. (2018). Travmatik beyin hasarında biyobelirteçler. *Anestezi Dergisi*, **26**(3): 105-119.
- IVASKA A (2008). Electrochemical detection. In: *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*. Eds.: Kolev, S. D., Mckelvie, I. D., Elsevier, Amsterdam, 441–460.
- JAMIESON KG, YELLAND JDN (1968). Extradural hematoma-Report of 167 cases. *Journal of Neurosurgery*, **29**: 13–23.

- JANATA J, JOSOWICZ M, DEVANEY DM (1994). Chemical sensors. *Analytical Chemistry*, **66**: 207R–228R.
- JOSEPHS HJ (1971). *The Heaviside Papers found at Paignton in 1957: Electromagnetic Theory by Oliver Heaviside*, Chelsea Publishing Co, New York.
- KANT T, SHRIVAS K, DEWANGAN K, KUMAR A, JAISWAL NK, DEB MK, PERVEZ S (2022). Design and development of conductive nanomaterials for electrochemical sensors: a modern approach. *Materials Today Chemistry*, **24**: 100769.
- KARNES HT, SHIU G, SHAH VP (1991). Validation of bioanalytical methods. *Pharmaceutical Research*, **8**: 421–426.
- KELTER P, MOSHER M, SCOTT A (2009). *Chemistry: The Practical Science-Media Enhanced Edition*. Houghton Mifflin Company, Boston-New York.
- KHAN AR, AL MAMUN MS, ARA MH (2021). Review on platinum nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications. *Microchemical Journal*, **171**: 106840.
- KILIÇ S (2021). *Tetrasiklin Tayinine Yönelik Aptamer Bağlı Peroksidaz Benzeri Mikropartiküllerin Geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- KINOSHITA K (2016). Traumatic brain injury: pathophysiology for neurocritical care. *Journal of Intensive Care* **4**: 29.
- KOBEISSY FH, OTTENS AK, ZHANG Z, LIU MC, DENSLOW ND, DAVE JR, TORTELLA FC, HAYES RL, WANG KKW (2006). Novel differential neuroproteomics analysis of traumatic brain injury in rats. *Mol. Cell. Proteomics*, **5(10)**: 1887–1898.
- KOCHANNEK PM, BERGER RP, BAYIR H, WAGNER AK, JENKINS LW, CLARK RSB (2008). Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury: diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making. *Current Opinion in Critical Care*, **14**: 135–141.
- KUMAR S, KALKAL A (2021). Electrochemical detection: Cyclic voltammetry/differential pulse voltammetry/impedance spectroscopy. In: *Nanotechnology in Cancer Management: Precise Diagnostics Toward Personalized Health Care*, Eds.: Khondakar, K.R., Kaushik, A.K., Elsevier, New York, 43-71.
- KURBANOĞLU S (2016). *Çeşitli İlaçların Tirozinaz İnhibisyonundaki Rollerini İncelemek Amaçlı Elektrokimyasal Nanobiyosensor ve Mikroçip Tasarımı*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- KURBANOĞLU S, USLU B, ÖZKAN SA (2018). Chapter 4 - Validation of analytical methods for the assessment of hazards in food. In: *Food Safety and Preservation: Modern Biological Approaches to Improving Consumer Health*, Eds.: Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Elsevier, New York, 55-90.
- LANGLOIS JA, RUTLAND-BROWN W, THOMAS KE, XI YL (2006). Incidence of traumatic brain injury in the United States, 2003. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, **21**(6): 544–548.
- LI G, FENG H, SHI X, CHEN M, LIANG J, ZHOU Z (2021). Highly sensitive electrochemical aptasensor for Glypican-3 based on reduced graphene oxide-hemin nanocomposites modified on screen-printed electrode surface. *Bioelectrochemistry*, **138**: 107696.
- LI R, FENG Y, PAN G, LIU L (2019). Advances in molecularly imprinting technology for bioanalytical applications. *Sensors*, **19**: 177.
- LIN C, HUANG SJ, WANG N, SHEN ZP (2012). Relationship between plasma leptin levels and clinical outcomes of pediatric traumatic brain injury. *Peptides*, **35**: 166–171.
- LIU X, TSENG CL, LIN LY, LEE CA, LI J, FENG L, SONG L, LI X, HE JH, SAKTHIVEL R, CHUNG RJ (2021). Template-free synthesis of mesoporous Ce₃NbO₇/CeO₂ hollow nanospheres for label-free electrochemical immunosensing of leptin. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **341**: 130005.
- LIU Y, DYKSTRA G (2022). Recent progress on electrochemical (bio)sensors based on aptamer-molecularly imprinted polymer dual recognition. *Sensors and Actuators Reports*, **4**: 100112.
- MACDONALD JR (1987). *Impedance Spectroscopy*. Wiley, New York.
- MARKEN F, NEUDECK A, BOND AM (2010). Cyclic voltammetry. In: *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*, Ed.: Scholz, F., Springer, Berlin, 57–106.
- MARSHALL LF, BECKER DP, BOWERS SA, CAYARD C, EISENBERG H, GROSS CR, GROSSMAN RG, JANE JA, KUNITZ SC, RIMEL R, TABADDOR K, WARREN J (1983). The national traumatic coma data bank-Part 1: Design, purpose, goals, and results. *Journal of Neurosurgery*, **59**(2): 276–284.
- MATARESE G, DIGIACOMO A, SANNA V, LORD GM, HOWARD JK, DI TUORO A, BLOOM SR, LECHLER RI, ZAPPACOSTA S, FONTANA S (2001). Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology*, **166**(10): 5909–5916.

- MCKEE AC, CANTU RC, NOWINSKI CJ, HEDLEY-WHYTE ET, GAVETT BE, BUDSON AE, SANTINI VE, LEE HS, KUBILUS CA, STERN RA (2009). Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **68**(7): 709–735.
- MEDLINE PLUS (2020, 21 Şubat). Traumatic brain injury. Erişim Adresi: [https://medlineplus.gov/traumaticbraininjury.html]. Erişim Tarihi: 10.09.2022
- MERLO L, CIMINO F, ANGILERI FF, LA TORRE D, CONTI A, CARDALI SM, SAIJA A, GERMANO A (2014). Alteration in synaptic junction proteins following traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, **31**(16): 1375–1385.
- MIHAILESCU CM, STAN D, SAVIN M, MOLDOVAN CA, DINULESCU S, RADULESCU CH, FIRTAT B, MUSCALU G, BRASOVEANU C, ION M, DRAGOMIR D, STAN D, ION AC (2020). Platform with biomimetic electrochemical sensors for adiponectin and leptin detection in human serum. *Talanta*, **210**: 120643.
- MORENO BONDI MC, URRACA JL, CARRASCO S, NAVARRO-VILLOSLADA F (2013). Preparation of molecularly imprinted polymers. In: *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*, Eds.: Alvarez-Lorenzo, C. Concheiro, A., A Smithers Group Company, UK, 23–86.
- NALL R (2021, 14 Aralık). Brain damage: Types, causes, and symptoms. *Healthline*. Erişim Adresi: [https://www.healthline.com/health/brain-damage#injury-types]. Erişim Tarihi: 09.09.2022
- NARAYAN RK, MICHEL ME, ANSELL B, BAETHMANN A, BIEGON A, BRACKEN MB, BULLOCK MR, CHOI SC, CLIFTON GL, CONTANT CF, COPLIN WM, DIETRICH D, GHAJAR J, GRADY SM, GROSSMAN RG, HALL ED, HEETDERKS W, HOCDA DA, JALLO J, KATZ RL, KNOLLER N, KOCHANER PM, MAAS AI, MAJDE J, MARION DW, MARMAROU A, MARSHALL LF, MCINTOSH TK, MILLER E, MOHBERG N, MUIZELAAR JP, PITTS LH, QUINN P, RIESENFELD G, ROBERTSON CS, STRAUSS KI, TEASDALE G, TEMKIN N, TUMA R, WADE C, WALKER MD, WEINRICH M, WHYTE J, WILBERGER J, YOUNG AB, YURKEWICZ L (2002). Clinical trials in head injury. *Journal of Neurotrauma*, **19**(5): 503–557.
- OJEDA I, MORENO-GUZMÁN M, GONZÁLEZ-CORTÉS A, YANEZ-SEDENO P, PINGARRON JM (2013). A disposable electrochemical immunosensor for the determination of leptin in serum and breast milk. *Analyst*, **138**: 4284–4291.
- OKONKWO DO, YUE JK, PUCCIO AM, PANCZYKOWSKI DM, INOUE T, MCMAHON PJ, SORANI MD, YUH EL, LINGSMA HF, MAAS AIR, VALADKA AB, MANLEY GT (2013). GFAP-BDP as an acute diagnostic marker in traumatic brain injury: results from the prospective transforming research and clinical knowledge in traumatic brain injury study. *Journal of Neurotrauma*, **30**(17): 1490–1497.

- ORAZEM ME, TRIBOLLET B (2008). *Electrochemical Impedance Spectroscopy*. John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
- OTERO M, LAGO R, GOMEZ R, DIEGUEZ C, LAGO F, GOMEZ-REINO J, GUALILLO O (2006). Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology*, **45**(8): 944–950.
- OTERO M, LAGO R, LAGO F, CASANUEVA FF, DIEGUEZ C, GOMEZ-REINO JJ, GUALILLO O (2005). Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Letters*, **579**(2): 295–301.
- ÖZCAN B, SEZGİNTÜRK MK (2021). A novel and disposable GP- based impedimetric biosensor using electropolymerization process with PGA for highly sensitive determination of leptin: Early diagnosis of childhood obesity. *Talanta*, **225**: 121985.
- ÖZKAN SA (2012). *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation*. HNB Publishing, USA.
- ÖZKAN SA, KAUFFMANN JM, ZUMAN P (2015). *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences: Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications*. Springer-Verlag, Berlin.
- PEETERS W, VAN DEN BRANDE R, POLINDER S, BRAZINOVA A, STEYERBERG EW, LINGSMA HF, MAAS AIR (2015). Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochirurgica*, **157**: 1683–1696.
- PETERS FT, MAURER HH (2002). Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – a review. In: *Validation in Chemical Measurement*, Eds.: De Bievre, P., Günzler, H., Springer, Heidelberg, 1–9.
- PIKE BR, FLINT J, DUTTA S, JOHNSON E, WANG KKW, HAYES RL (2001). Accumulation of non-erythroid α II-spectrin and calpain-cleaved α II-spectrin breakdown products in cerebrospinal fluid after traumatic brain injury in rats: α II-Spectrin in CSF. *Journal of Neurochemistry*, **78**(6): 1297–1306.
- PINGARRON JM, YANEZ-SEDENO P, GONZALEZ-CORTES A (2008). Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*, **53**(19): 5848–5866.
- POSMANTUR RM, ZHAO X, KAMPFL A, CLIFTON GL, HAYES RL (1998). Immunoblot analyses of the relative contributions of cysteine and aspartic proteases to neurofilament breakdown products following experimental brain injury in rats. *Neurochemical Research*, **23**: 1265–1276.

- PRAMANIK S, KUMAR Y, GUPTA D, VASHISTHA VK, KUMAR A, KARMAKAR P, DAS DK (2021). Recent advances on structural and functional aspects of multi-dimensional nanoparticles employed for electrochemically sensing bio-molecules of medical importance. *Materials Science and Engineering B*, **272**: 115356.
- RAHMAN S, BOZAL PALABIYIK B, UNAL DN, ERKMEN C, SIDDIQ M, SHAH A, USLU B (2022). Molecularly imprinted polymers (MIPs) combined with nanomaterials as electrochemical sensing applications for environmental pollutants. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, **36**: e00176.
- RAPINÌ R, MARRAZZA G (2017). Electrochemical aptasensors for contaminants detection in food and environment: Recent advances. *Bioelectrochemistry*, **118**: 47-61.
- RILEY CM (1996). Statistical parameters and analytical figures of merit. In: *Pharmaceutical and Biomedical Analysis: Development and Validation of Analytical Methods*, Eds.: Riley, C.M., Rosanske, T.W., Elsevier, Oxford, 15–72.
- RINGGER NC, O'STEEN BE, BRABHAM JG, SILVER X, PINEDA J, WANG KKW, HAYES RL, PAPA L (2004). A novel marker for traumatic brain injury: CSF α II-spectrin breakdown product levels. *Journal of Neurotrauma*, **21**(10): 1443–1456.
- ROBERTSON DL, JOYCE GF (1990). Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, **344**(6265): 467–468.
- SALIH E, MEKAWY M, HASSAN RYA, EL-SHERBINY IM (2016). Synthesis, characterization and electrochemical-sensor applications of zinc oxide/graphene oxide nanocomposite. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, **6**: 137-144.
- SANDLER SJI, FIGAJI AA, ADELSON PD. (2010). Clinical applications of biomarkers in pediatric traumatic brain injury. *Child's Nervous System*, **26**: 205–213.
- SANNA V, DI GIACOMO A, LA CAVA A, LECHLER RI, FONTANA S, ZAPPACOSTA S, MATARESE G (2003). Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *Journal of Clinical Investigation*, **111**: 241–250.
- SARRAF P, FREDERICH RC, TURNER EM, MA G, JASKOWIAK NT, RIVET DJ, FLIER JS, LOWELL BB, FRAKER DL, ALEXANDER HR (1997). Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *Journal of Experimental Medicine*, **185**: 171–175.
- SAYLAN Y, DENİZLİ A (2019). Molecularly imprinted polymer-based microfluidic systems for point-of-care applications. *Micromachines*, **10**: 766.

- SELVOLINI G, MARRAZZA G (2017). MIP-based sensors: promising new tools for cancer biomarker determination. *Sensors*, **17**: 718.
- SEZGİNTÜRK MK (2020). Introduction to commercial biosensors. In: *Commercial Biosensors and Their Applications – Clinica, Food, and Beyond*, Ed.: Sezgintürk, M.K., Elsevier, New York, 1–28.
- SHAH VP, MIDHA KK, DIGHE S, MCGILVERAY IJ, SKELLY JP, YACOBI A, LAYLOFF T, VISWANATHAN CT, COOK CE, MCDOWALL RD, PITTMAN KA, SPECTOR S (1992). Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies-conference report. *Pharmaceutical Research*, **9**: 588-592.
- SHETTI NP, BUKKITGAR SD, REDDY KR, REDDY CV, AMINABHAVI TM (2019). Nanostructured titanium oxide hybrids-based electrochemical biosensors for healthcare applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **178**: 385-394.
- SHUKLA S, JOSHI P, RILEY P, NARAYAN RJ (2022). Square wave voltammetric approach to leptin immunosensing and optimization of driving parameters with chemometrics. *Biosensors and Bioelectronics*, **216**: 114592.
- SIERRA-JOHNSON J, ROMERO-CORRAL A, LOPEZ-JIMENEZ F, GAMI AS, KUNİYOSHI FHS, WOLK R, SOMERS VK (2007). Relation of increased leptin concentrations to history of myocardial infarction and stroke in the United States population. *The American Journal of Cardiology*, **100**(2): 234–239.
- SKOOG DA, HOLLER FJ, CROUCH SR (2007). *Principles of Instrumental Analysis* (7th Ed.). Cengage Learning, Boston, USA.
- SMITH DH, MEANEY DF, SHULL WH (2003). Diffuse axonal injury in head trauma. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, **18**(4): 307–316.
- SMITH M (2008). Monitoring Intracranial pressure in traumatic brain injury. *Anesthesia and Analgesia*, **106**: 240–248.
- SONG KM, LEE S, BAN C (2012). Aptamers and their biological applications. *Sensors*, **12**: 612-631.
- SOROKINA EG, SEMENOVA ZHB, GRANSTREM OK, KARASEVA OV, MESHCHERIAKOV SV, REUTOV VP, SUSHKEVICH GN, PINELIS VG, ROSHAL LM (2010). S100B protein and autoantibodies to S100B protein in diagnostics of brain damage in craniocerebral trauma in children. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii Imeni S.S. Korsakova*, **110**(8): 30–35.

- SRINUBABU G, JAGANBABU K, SUDHARANI B, VENUGOPAL K, GIRIZASANKAR G, RAO JVLNS (2006). Development and validation for the determination of an experimental design. *Chromatographia*, **64**: 95–100.
- STERNBACH GL (2000). The Glasgow coma scale. *Journal of Emergency Medicine*, **19**: 67–71.
- STOLTENBURG R, REINEMANN C, STREHLITZ B (2007). SELEX—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*, **24**(4): 381–403.
- SUN H, ZU Y (2015). A highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules*, **20**(7): 11959–11980.
- SUNG R, SEOK HEO Y (2021). Sandwich elisa-based electrochemical biosensor for leptin in control and diet-induced obesity mouse model. *Biosensors*, **11**: 1–9.
- TAMAYO J, KOSAKA PM, RUZ JJ, SAN PAULO A, CALLEJA M (2013). Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews*, **42**: 1287–1311.
- TEASDALE G, JENNETT B (1974). Assessment of coma and impaired consciousness: a practical scale. *The Lancet*, **304**(7872): 81–84.
- THEVENOT DR, TOTH K, DURST RA, WILSON GS (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron*, **16**: 121–131.
- TOKLU HZ, YANG Z, OKTAY S, SAKARYA Y, KIRICHENKO N, MATHENY MK, TÜMER N (2018). Overpressure blast injury-induced oxidative stress and neuroinflammation response in rat frontal cortex and cerebellum. *Behavioural Brain Research*, **340**: 14–22.
- TUERK C, GOLD L (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**(4968): 505–510.
- TURNER AP (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, **42**: 3184–3196.
- TÜYLEK Z (2017). Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **6**(62): 71–80.
- ULUDAĞ İ, SEZGİNTÜRK M (2022). A direct and simple immobilization route for immunosensors by CNBr activation for covalent attachment of anti-leptin: obesity diagnosis point of view. *3 Biotech*, **12**: 33.

- WANG J (Ed.) (2006). *Analytical Electrochemistry* (3rd Ed.), John Wiley and Sons, Hoboken, New York.
- WANG KK, YANG Z, ZHU T, SHI Y, RUBENSTEIN R, TYNDALL JA, MANLEY GT (2018). An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **18**(2): 165–180.
- WANG S, LIU J, YONG W, CHEN Q, ZHANG L, DONG Y, SU H, TAN T (2015). A direct competitive assay-based aptasensor for sensitive determination of tetracycline residue in Honey. *Talanta*, **131**: 562–569.
- WOLF G, HAMANN A, HAN DC, HELMCHEN U, THAISS F, ZIYADEH FN, STAHL RAK (1999). Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis [see comments]. *Kidney International*, **56**(3): 860–872.
- XIE J, ZHANG L, LIU Z, LING G, ZHANG P (2022). Application of electrochemical sensors based on nanomaterials modifiers in the determination of antipsychotics. *Colloids and Surfaces: B, Biointerfaces*, **214**: 112442.
- YANG SL, LI G, FENG J, WANG PY, QU LB (2022). Synthesis of core/satellite donut-shaped ZnO–Au nanoparticles incorporated with reduced graphene oxide for electrochemical sensing of rutin. *Electrochimica Acta*, **412**: 140157.
- YOKOBORI S, ZHANG Z, MOGHIEB A, MONDELLO S, GAJAVELLI S, DIETRICH WD, BRAMLETT H, HAYES RL, WANG M, WANG KKW, BULLOCK MR (2015). Acute diagnostic biomarkers for spinal cord injury: review of the literature and preliminary research report. *World Neurosurgery*, **83**(5): 867–878.
- ZETTERBERG H, BLENNOW K (2016). Fluid biomarkers for mild traumatic brain injury and related conditions. *Nature Reviews Neurology*, **12**: 563–574.
- ZHANG C, LIU L, LI H, HU J, ZHANG J, ZHOU H, ZHANG Z, DU X (2022). An oriented antibody immobilization based electrochemical platform for detection of leptin in human with different body mass index. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, **353**: 131074.
- ZHANG F, BASINSKI MB, BEALS HM, BRIGGS SL, CHURGAY LM, CLAWSON DK, DIMARCHI RD, FURMAN TC, HALE JE, HSIUNG HM, SCHONER BE, SMITH DP, ZHANG XY, WERY JP, SCHEVITZ RW (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*, **387**: 206–209.
- ZHANG Q, QING Y, HUANG X, LI C, XUE J (2018). Synthesis of single-walled carbon nanotubes–chitosan nanocomposites for the development of an electrochemical biosensor for serum leptin detection. *Materials Letters*, **211**: 348–351.

ZHOU Q, ZHANG Y, WANG N, ZHU L, TANG H (2014). Analysis of tetracyclines in chicken tissues and dung using LC-MS coupled with ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis. *Food Control*, **46**: 324-331.

ZHOU Y, LIU J, DONG H, LIU Z, WANG L, LI Q, REN J, ZHANG Y, XU M (2022). Target-induced silver nanocluster generation for highly sensitive electrochemical aptasensor towards cell-secreted interferon- γ . *Biosensors and Bioelectronics*, **203**: 114042.

ZHU C, LIU D, CHEN Z, LI L, YOU T (2019). An ultra-sensitive aptasensor based on carbon nanohorns/gold nanoparticles composites for impedimetric detection of carbendazim at picogram levels. *Journal of Colloid and Interface Science*, **546**: 92-100.

ZHUO Z, YU Y, WANG M, LI J, ZHANG Z, LIU J, WU Z, LU A, ZHANG G, ZHANG B (2017). Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(10): 2142.