

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**JELATİN VE KİTOSAN BİYOPOLİMERLERİNİN KULLANILMASIYLA
İMMÜNOGLOBÜLİN G TAYİNİ İÇİN PROTEİN A İMMÜNOSENSÖRÜ
GELİŞTİRİLMESİ VE ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Gizem ÖZBEK

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Gizem ÖZBEK tarafından hazırlanan “**Jelatin ve Kitosan Biyopolimerlerinin Kullanılmasıyla İmmünoglobülin G Tayini için Protein A İmmünosensörü Geliştirilmesi ve Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi**” adlı tez çalışması 24/10/2014 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Emel EMREGÜL
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Emel EMREGÜL
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Fatma ARSLAN
Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

24.10.2014

Gizem ÖZBEK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

JELATİN VE KİTOSAN BİYOPOLİMERLERİNİN KULLANILMASIYLA İMMÜNOGLOBÜLİN G TAYİNİ İÇİN PROTEİN A İMMÜNOSENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ VE ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Gizem ÖZBEK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Bu tez çalışmasında otoimmün hastalıklar sırasında kan ve beyin-omurilik sıvısında (BOS) miktarı artan İmmünoglobülin G (IgG) tayinine yönelik impedimetrik immünosensörler geliştirilmiştir. Biyouyumlulukları yüksek, biyokirilenmeleri az ve toksik özellik göstermemeleri nedeniyle jelatin, kitosan doğal polimerleri ve bunların kombinasyonları kullanılarak hazırlanan platin perde-baskı (screen-printed) elektrotlara; IgG'ye yüksek affinite gösteren Protein A (PrA) immobilize edilmiştir. Ayrıca yüksek yüzey alanları sayesinde immünosensörlerin duyarlılığını arttırmak ve tayin limitini düşürmek amacıyla altın nanopartikülleri (AuNPs) kullanılmıştır. Polimer ve nanopartikül miktarları, çapraz bağlayıcı konsantrasyonları ve PrA konsantrasyonları Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) ve Dönüşümlü Voltametri (CV) kullanılarak optimize edilmiş; Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılarak yüzey karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Kullanılan polimer ve kompozit yapının termal kararlılıklarını değerlendirmek amacıyla Termogravimetrik Analiz (TGA), moleküler yapılarını aydınlatmak amacıyla infrared spektroskopisi (FT-IR) yönteminden faydalanılmıştır. İmmünosensörlerin pratikte kullanılmasında önem arz eden tekrar üretilebilirlik ve raf ömrü çalışmaları yapılmış; ayrıca farklı antijenlerle immünosensör denenerek spesifik olmayan bağlanmaların etkisi araştırılmıştır. EIS, CV, SEM ve AFM ile yapılan karakterizasyon çalışmaları; PrA'nın taşıyıcı sistemlere etkin bir şekilde immobilize olduğunu göstermiştir. Tasarlanan immünosensörlerden en düşük tayin limitine sahip olan jelatin/kitosan-AuNPs-PrA immünosensördür. Geliştirilen immünosensör Multipl Skleroz teşhisi konulmuş hastadan ve sağlıklı kişiden alınan BOS ve serum ile test edilmiştir.

Ekim 2014, 128 sayfa

Anahtar Kelimeler: Jelatin, Kitosan, İmmünoglobülin G, Protein A, Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi, İmmünosensör.

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT AND INVESTIGATION OF ELECTROCHEMICAL PROPERTIES OF PROTEIN A IMMUNOSENSOR USING GELATIN AND CHITOSAN BIOPOLYMERS FOR IMMUNOGLOBULIN G DETECTION

Gizem ÖZBEK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

In this thesis impedimetric immunosensors were developed for the detection of Immunoglobulin G (IgG) in blood and cerebrospinal fluid (CSF) whose levels increase during autoimmune diseases. Protein A (PrA) a protein with a high affinity to IgG, was immobilized onto screen-printed electrodes using gelatin, chitosan natural polymers and combinations of them due to their high biocompatibility, low biofouling and non-toxicity. Gold nanoparticles (AuNPs) were also used to increase sensitivity and decrease detection limits by means increasing the surface area. The amount of polymer and nanoparticles, crosslinker concentrations and PrA concentrations were optimized using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) and Cyclic Voltammetry (CV). Surface characterization was carried out with Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM). Thermogravimetric Analysis (TGA) was used to evaluate the thermal stability of polymer and composite structure, and infrared spectroscopy (FT-IR) was used to explain the molecular structure. Reproducibility and shelf-time, which are important for practical use of immunosensors, has been evaluated. Immunosensor trials were performed for different antigens for the non-specific binding. Results showed PrA to be immobilized on the carrier systems efficiently. The designed immunosensors have low detection limits and show linear response for broad ranges of IgG concentration. It has been shown that the immunosensor prepared using gelatin/chitosan-AuNPs-PrA has a lower detection limit. The developed immunosensor was used for the detection of IgG in Cerebrospinal Fluid (CSF) and serum. The immunosensor was tested in real samples with serum obtained from healthy patients and those diagnosed with Multiple Sclerosis.

October 2014, 128 pages

Key Words: Gelatin, Chitosan, Immunoglobulin G, Protein A, Electrochemical Impedance Spectroscopy, Immunosensor

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisansım boyunca bana her konuda yardımcı olan, desteğini, zamanını, hoşgörüsünü esirgemeyen; tezimin hazırlanmasında tecrübesinden ve bilgisinden faydalandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Emel EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı),

Çalışmalarım sırasında karşılaştığım tüm sorunları çözmemde bana yardımcı olan, sorularıma bıkmadan cevap veren hocam Sayın Prof. Dr. Kaan Cebesoy EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı),

Çalışmalarım için gerekli biyolojik örneklerin temininde her türlü kolaylığı sağlayan Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji A.B.D'ndan Sayın Prof. Dr. Canan YÜCESAN'a,

Okuduğum süre boyunca tüm olanaklarıyla beni destekleyen, cesaretlendiren ve teşvik eden sevgili annem, babam ve kardeşime,

Azmini taktir ettiğim can dostum Burak DERKUŞ'a,

Sürekli desteklerini hissettiğim sevgili dostlarım ve aynı zamanda çalışma arkadaşlarım Selin GEREKÇİ, Mustafa ÖZKAN, Ecem BOZTUNA ve Utku KARAKAYA'ya,

Teşekkür eder ve sevgilerimi sunarım.

Gizem ÖZBEK

Ankara, Ekim 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Biyosensörler	4
2.1.1 Biyoreseptörler	5
2.1.2 İleticiler (Transduserler)	6
2.1.3 İmmünosensörler ve immünosensörlerin sınıflandırılması.....	8
2.1.3.1 Elektrokimyasal immünosensörler	10
2.1.3.2 Optik immünosensörler	12
2.1.3.3 Piezoelektrik immünosensörler.....	12
2.1.3.4 Termometrik immünosensörler	13
2.2 Antikorlar ve İmmünoglobulinler	13
2.2.1 Antikor-Antijen bağlanma gücü.....	19
2.2.2 Antijen–Antikor bağlanma kinetiği	20
2.3 Otoimmün Hastalıklar.....	21
2.3.1 Beyin-Omurilik Sıvısı (BOS)	22
2.4 Elektrokimya	23
2.4.1 Elektriksel çift tabaka	25
2.4.2 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)	30
2.4.3 Dönüşümlü Voltametri (Cyclic Voltammetry, CV)	36
2.4.1 Tersinir reaksiyonların dönüşümlü voltamogramı.....	40
2.4.2 Tersinmez reaksiyonların dönüşümlü voltamogramı.....	42
2.4.3 Yarı-tersinir reaksiyonların dönüşümlü voltamogramı	43

2.5 Biyolojik Materyallerin İmmobilizasyonu	44
2.5.1 Taşıyıcıya bağlama yöntemi.....	44
2.5.2 Çapraz bağlama	46
2.5.3 Tutuklama yöntemi	47
2.5.3.1 Mikrokapsülleme.....	47
2.5.3.2 Polimer kafeste tutuklama	48
2.6 Nanosensörler	48
2.7 Çalışmada Kullanılan Biyomoleküller, Taşıyıcı Sistemler, Nanopartiküller ve Çapraz Bağlayıcılar	51
2.7.1 Protein A (PrA)	51
2.7.2 Taşıyıcılar	52
2.7.2.1 Jelatin	52
2.7.2.2 Kitosan	53
2.7.3 Altın Nanopartiküller	55
2.7.4 Çapraz bağlayıcı	55
2.8 Kaynak Araştırması	56
3. ÇALIŞMANIN AMACI	64
4. MATERYAL ve YÖNTEM	65
4.1 Materyaller	65
4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler	65
4.1.2 Kullanılan cihazlar.....	65
4.1.3 Kullanılan elektrotlar	6
4.1.4 Kullanılan çözeltiler	66
4.2 Yöntem	68
4.2.1 İmmobilizasyon jellerinin hazırlanması.....	68
4.2.2 İmmünosensörlerin hazırlanması.....	69
4.2.3 Ölçümlerin alınması.....	69
4.2.4 Termogravimetrik analizlerin gerçekleştirilmesi.....	70
4.2.5 FT-IR spektrumlarının alınması	70
4.2.6 SEM mikrograflarının alınması.....	70
4.2.7 AFM görüntülerinin alınması	70
4.2.8 Optimizasyon çalışmaları	71

4.2.8.1 Polimer optimizasyonları	71
4.2.8.2 AuNPs optimizasyonları	71
4.2.8.3 Çapraz bağlayıcı optimizasyonları	71
4.2.8.4 PrA optimizasyonları	72
4.2.8.5 pH optimizasyonları	72
4.2.8.6 İmmünoşensör cevabına IgG inkübasyon süresinin etkisi	72
4.2.9 Tekrar üretilebilirlik ve raf ömrü	72
4.2.10 İmmünoşensörlerin elektrokimyasal davranışları	73
4.2.11 Spesifik olmayan bağlanmaların incelenmesi	73
4.2.12 Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi	73
4.2.13 Geliştirilen immünoşensörlerin BOS ve serumda denenmesi	74
5. BULGULAR	75
5.1 FT-IR Spektrumlarının Değerlendirilmesi	75
5.2 Termogravimetrik Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	76
5.3 SEM Mikrograflarının Değerlendirilmesi	78
5.4 AFM Bulguları	80
5.5 Optimizasyon Çalışmaları	81
5.5.1 Polimer konsantrasyonunun immünoşensör cevabına etkisi	81
5.5.2 AuNPs miktarının immünoşensör cevabına etkisi	83
5.5.3 Çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun immünoşensör cevabına etkisi	84
5.5.4 PrA konsantrasyonunun immünoşensör cevabına etkisi	87
5.5.5 İmmünoşensör cevabına IgG inkübasyon süresinin etkisi	88
5.5.6 pH optimizasyonu	90
5.6 Tekrar Üretilebilirlik	91
5.7 İmmünoşensörlerin Kullanım Ömrü	93
5.8 Geliştirilen İmmünoşensörler İçin Spesifik Olmayan Bağlanmanın İncelenmesi	95
5.9 Geliştirilen İmmünoşensörlerin Elektrokimyasal Davranışları	97
5.10 Kalibrasyon Grafikleri	100
5.11 BOS ve Serum Çalışmaları	104
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	106
KAYNAKLAR	117
ÖZGEÇMİŞ	128

SİMGELER DİZİNİ

μA	Mikroamper
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
μm	Mikrometre
$\Delta\varphi$	Potansiyel düşüşü
Ω	Ohm
ϕ	Faz açısı
ω	Açısal frekans
σ	Warburg katsayısı
C	Kapasitans
C_{dl}	Çift tabaka kapasitansı
cm^2	Santimetrekare
D	Difüzyon katsayısı
E	Potansiyel
E_t	Sinüsoidal Pertürbasyon
F	Faraday sabiti
Fe	Demir
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3}$	Potasyum ferrosiyanür ve potasyum ferrisiyanür
fg	Femptogram
I	Akım yoğunluğu
k_a	Birleşme sabiti
k_d	Ayrışma sabiti
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
<i>m</i>	Metal
M	Molar
mmol	Milimol
mmol/L	Milimolar
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür

ng	Nanogram
nm	Nanometre
O ₂	Moleküler Oksijen
pg	Pikogram
Pt	Platin
q	Yük yoğunluğu
R	Direnç
R _{ct}	Yük transfer direnci
R _s	Çözelti direnci
R _p	Polarizasyon direnci
s	Saniye
t	Süre
U	Ünite
V	Volt
W	Warburg impedansı
X _c	Kapasitif rezistans
Z	İmpedans

Kısaltmalar dizini

Ab	Antikor
Ag	Antijen
Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş klorür
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
Anti-MBP	Anti-Miyelin Basic Protein
AP	Alkalen fosfataz
AuNPs	Altın Nanopartikül
A _q	Çözelti
BDM	<i>Bochris, Devanathan veMuller</i> modeli
BOS	Beyin-Omurilik Sıvısı
BSA	Bovin Serum Albumin
CEA	Karsino embriyonik antijen

CFU	Koloni oluşturan ünite
CV	Dönüşümlü Voltametri
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	Enzim-bağlı immünosorbant assay
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
Fab	Antijen bağlanma bölgesi
Fc	Hücre bağlanma bölgesi
FT-IR	Fourier transform- Infrared (kızılötesi)
GA	Glutaraldehit
GBS	GuillainBarre Sendromu
GC	Camsı karbon
GOD	Glukoz oksidaz
hCG	Human Karyonik gonadotropin
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HRP	Yaban turbu peroksidaz
HSA	İnsan Serum Albumini
IgA	İmmüoglobülin A
IgD	İmmüoglobülin D
IgE	İmmüoglobülin E
IgG	İmmüoglobülin G
IgM	İmmüoglobülin M
IHP	İç Helmholtz Tabakası
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
KCl	Potasyum klorür
LEMS	Lambert-Eaton miyastenik sendromu
LSV	Doğrusal Taramalı Voltametri
MAG	Miyelin İlişkili Glikoprotein
MBP	Miyelin Temel Protein
MOG	Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	Multipl Skleroz
MSS	Merkezi Sinir Sistemi

OCP	Açık Devre Potansiyeli
OHP	Dış Helmholtz Tabakası
OTA	Okratoksin A
PDGF-BB	Trombosit Türevli Büyüme Faktörü-BB
PrA	Protein A
PSA	Prostat Spesifik Antijen
PSi	Poröz silikon film
QCM	Kuvarz kristal mikrobals
RIFTS	Reflective Interferometric Fourier Transform Spektroskopisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
SWNT	Tek Duvarlı Karbon Nanotüp
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskopu
TGA	Termogravimetrik Analiz
TH	Tiyonin
TiO ₂	Titanyum dioksit
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
UNAM	Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi
UV-VIS	Ultraviyole ve Görünür Bölge Spektroskopisi
XRD	X ışınları kırınım (X-Ray diffraction)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyosensörün genel yapısının şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2 Biyosensör tasarımında kullanılan transduser çeşitleri.....	7
Şekil 2.3 Elektrokimyasal immünosensörün genel çalışma prensibi.....	10
Şekil 2.4 IgG molekülünün şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.5 İmmüoglobulinlerin moleküler yapıları.....	16
Şekil 2.6 IgG alt sınıflarının molekül yapıları.....	18
Şekil 2.7 Elektrot/çözelti ara-yüzeyinde potansiyel değişimi.....	24
Şekil 2.8 Helmholtz çift tabaka modeli ve elektrot potansiyelinin lineer olarak sıfıra inmesi.....	26
Şekil 2.9 <i>Gouy-Chapman</i> elektriksel çift tabaka modeli	27
Şekil 2.10 Stern elektriksel çift tabaka modeli.....	28
Şekil 2.11 Çift tabaka modeli ve Helmholtz, Gouy-Chapman, Stern tarafından yorumlanması.....	29
Şekil 2.12 BDM modelin şematik gösterimi.....	30
Şekil 2.13 İmpedimetrik sisteme uygulanan sinüsoidal uyarı ve alınan cevap.....	31
Şekil 2.14 Faz açısı ile ayrılmış ve akım-potansiyel değişimini gösteren fazör.....	33
Şekil 2.15 Tipik bir Nyquist impedans spektrum grafiği.....	34
Şekil 2.16 Randles devresi.....	35
Şekil 2.17 Nyquist ve Bode diyagramları.....	35
Şekil 2.18 Dönüşümlü voltametri tekniklerinde potansiyel taramasının zamanla değişimi.....	38
Şekil 2.19 $K_3(Fe(SNC))$ 'ın yalın bir camı karbon (GC) elektrot yüzeyinde ve polimer ile modifiye edilmiş GC'de davran.....	39
Şekil 2.20 Tersinir bir elektrot reaksiyonun dönüşümlü voltamogramı.....	40
Şekil 2.21 Tersinmez bir elektrot reaksiyonunda CV ile farklı tarama hızlarında anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması.....	42
Şekil 2.22 Dönüşümlü voltametride pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi.....	43
Şekil 2.23 Taşıyıcıya bağlama yönteminin şematik gösterimi.....	45
Şekil 2.24 Çapraz bağlama yönteminin şematik gösterimi	46
Şekil 2.25 Mikrokapsülleme işleminin şematik gösterimi.....	47
Şekil 2.26 Polimer kafeste tutuklamanın şematik gösterimi.....	48

Şekil 2.27 Jelatin polimerinin zincir yapısı.....	52
Şekil 2.28 Kitin ve kitosanın molekül yapıları.....	54
Şekil 2.29 Glutaraldehit molekül yapısı.....	55
Şekil 2.30 Jelatin/kitosan polimerlerinin glutaraldehit ile bağlanma mekanizması.....	56
Şekil 4.1.a. Kullanılan platin screen-printed elektrotlar b.Ölçümlerin alındığı hücre sistemi.....	66
Şekil 4.2 İmmünosensörlerin hazırlanmasının şematik gösterimi.....	69
Şekil 5.1 Jelatin, kitosan ve jelatin/kitosan karışımının FT-IR analiz sonuçları	75
Şekil 5.2 Jelatine ait TGA eğrisi.....	76
Şekil 5.3 Kitosana ait TGA eğrisi.....	77
Şekil 5.4 Jelatin/kitosan polimer karışımına ait TGA eğrisi.....	78
Şekil 5.5.a. Kitosan, b.Kitosan-PrA, c.Jelatin/Kitosan, d.Jelatin/Kitosan-PrA SEM mikrografları.....	79
Şekil 5.6.a.Jelatin b. Kitosan c.Jelatin/Kitosan d.Jelatin/kitosan-PrA AFM bulguları.....	80
Şekil 5.7 Kitosan konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisi.....	82
Şekil 5.8 Jelatin/Kitosan oranının immünosensör cevabına etkisi.....	83
Şekil 5.9 Altın nanopartikül konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisi.....	84
Şekil 5.10 Glutaraldehit konsantrasyonunun kitosan-PrA immünosensör cevabına etkisi.....	85
Şekil 5.11 Glutaraldehit konsantrasyonunun jelatin/kitosan-PrA immünosensör cevabına etkisi.....	86
Şekil 5.12 Protein A konsantrasyonunun kitosan-PrA immünosensör cevabına etkisi.....	87
Şekil 5.13 Protein A konsantrasyonunun jelatin/kitosan-PrA immünosensör cevabına etkisi	88
Şekil 5.14 İnkübasyon süresinin kitosan-PrA immünosensör cevabına etkisi.....	89
Şekil 5.15 İnkübasyon süresinin jelatin/kitosan-PrA immünosensör cevabına etkisi.....	89
Şekil 5.16 Kitosan-PrA immünosensörü için pH optimizasyon grafiği.....	90
Şekil 5.17 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörü için pH optimizasyon grafiği.....	91
Şekil 5.18 Kitosan-PrA immünosensörünün tekrar üretilebilirlik değerlendirmesi	92
Şekil 5.19 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörü için tekrar üretilebilirlik değerlendirmesi.....	93
Şekil 5.20 Kitosan-PrA immünosensörünün kullanım süresi.....	94
Şekil 5.21Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörünün kullanım süresi.....	95

Şekil 5.22 Kitosan-PrA immünosensörü için spesifik olmayan bağlanmaların incelenmesi.....	96
Şekil 5.23 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörü için spesifik olmayan bağlanmaların incelenmesi.....	96
Şekil 5.24 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörünün impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği.....	98
Şekil 5.25 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörünün dönüşümlü voltamogramı.....	99
Şekil 5.26 Geliştirilen immünosensörlere ait Randles devresi.....	100
Şekil 5.27 Kitosan-PrA immünosensörünün kalibrasyon grafiği.....	101
Şekil 5.28 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörü için kalibrasyon grafikleri.....	102
Şekil 5.29 Jelatin/Kitosan-AuNPs-PrA immünosensörü için kalibrasyon grafikleri.....	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Serum ve BOS'ta normal IgG değerleri	19
Çizelge 2.2 Farklı immünoglobulinlerin PrA 'ya ilgisi (BioLabs).....	51
Çizelge 5.1 Geliştirilen immünosensörlerin çalışma koşulları ve performansları.....	104
Çizelge 5.2 Geliştirilen J/K-AuNPs-PrA immünosensörünün gerçek numunelerle denenmesi.....	105
Çizelge 6.1 Literatürdeki IgG tayinine yönelik immünosensörler ile tez çalışmasının karşılaştırılması.....	114

1. GİRİŞ

Pratik, duyarlı, hızlı ve çoğu zaman ekonomik analiz olanağı sağlayan biyosensörler; spesifik etkileşim özelliği gösteren biyomoleküllerin uygun iletim ve ölçüm sistemleriyle birleştirilmesinden oluşan biyoanalitik sistemlerdir. IUPAC ise elektrokimyasal biyosensörleri; elektrokimyasal bir iletilci ile doğrudan birleştirilmiş biyokimyasal bir reseptör kullanılarak, analitik bilgileri spesifik olarak kantitatif ya da yarı kantitatif bir şekilde sunabilen, herhangi başka bir sistemden bağımsız cihaz olarak tanımlanmıştır (Thevenot vd. 1999). İmmünosensörler ise; tanıyıcı element olarak immünoaktif maddelerin kullanıldığı biyosensör çeşididir. Klasik immünotest (immünoassay) yaklaşımından ortaya çıkan immünosensör teknolojisi; antijen ile antikor gibi biyomoleküller arasında meydana gelen spesifik reaksiyon sonucunda kompleks oluşumu esasına dayalıdır (Parkinson ve Pejicic 2005).

İmmünosensörlerin temel ilkeleri 1959 yılında Yalow ve Berson tarafından ortaya atılmış ve insan kanındaki insülin-bağlayıcı antikorların tayini için radyoimmünotest geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Antijen veya antikorların sensör platformuna immobilizasyonu ile üretilen immünosensörler; ölçüm prensibine göre elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik, impedimetrik vb.), optik, mikrogravimetrik, piezoelektrik olmak üzere dört ana başlık altında toplanabilir (Lowe 1996, Ekins 1999, Lippa vd. 200). Patel 2002, İmmünosensörlerin çoğu optik ya da elektrokimyasal esastır. Elektrokimyasal immünosensörlerde belirleme, genel olarak ya elektroaktif işaretleyiciler kullanılarak ya da çoğunlukla glukoz oksidaz gibi enzimlerle işaretleme yoluyla yapılmıştır. Ölçüm prensibine göre sınıflandırılmış olan bu immünosensörler, ayrıca doğrudan ve doğrudan olmayan olarak da sınıflandırılmaktadır (Martin 2001).

İmmünosensör teknolojileri geliştirilmesinde serumda α -fetoprotein'den immüoglobulinlere, sütte progesteron tayinine, çevre analizlerinde pestisitlerden herbisitlere, pankreatik karsinomada tümör antijenlerinden gıdalarda mikroorganizma tayinine kadar çok geniş alanlarda çalışmalar yapılmıştır (Aizawa 1991, Güzeli ve Lowe

1996, Mahoney vd.1996, Ghindilis vd.1998, Cavic vd.1999, O'sullivan vd.1999, Mullett vd.2000, Morgan vd.1996, Aizawa 1994, Micneil vd.1997, Pearson vd.2000, Rogers 2000, Price 2000, Hage 1999). Bu araştırmalar arasında yoğun olarak insan immünoglobulinleri (IgA, IgM, IgG) tayinine yönelik çalışmalar üzerinde durulmuştur. İmmünoglobulinler, serum proteinlerinin globüler-globülin kesiminde bulunan proteinlerdir ve toplam plazma proteinlerinin % 20'sini oluştururlar. İmmünoglobulinler; immünoglobulin G (IgG), immünoglobulin M (IgM), immünoglobulin A (IgA), immünoglobulin D (IgD), immünoglobulin E (IgE) olmak üzere beş ana gruba ayrılır. Bu gruplar yapısal olarak boyut, yük, aminoasit bileşimi ve karbonhidrat içeriği açısından farklı olan glikoproteinlerle ilgilidir (Martin 2001). IgG serumdaki immünoglobulinlerin yaklaşık %80'ini oluşturur ve virüslerle savaşta ön planda rol alır (Kılıçturgay 2003).

Nanoteknolojinin biyosensörlere uyarlanmasıyla ortaya çıkan nanobiyosensörler günümüzde oldukça popüler bir konudur. Nanopartiküllerin en büyük özelliği olan yüksek yüzey alanı/hacim oranı sayesinde nanopartiküllerle modifiye edilmiş elektrotların yüzey alanları artmakta ve daha etkin immobilizasyon yapılabilmektedir. Nanopartiküller ayrıca elektron transfer hızını da arttırarak sensör duyarlılığını arttırmakta ve tayin limitini düşürmektedir. Metal oksitler, sülfürler, nanokristaller ve nanotüpler tanısıl alanda oldukça yaygın olarak kullanılan nanopartiküllere örnek verilebilir (Shimizu vd. 2008, Schultes vd. 2007).

Otoimmün hastalıklar; tüm vücudu etkileyen kronik ve sistematik hastalıklardır. Sistematik lupus eritematozis, romatoit artrit, inflamatuvar barsak hastalığı, multipl skleroz, tipl diyabet, sedef hastalığı, vaskülit gibi pek çok örneği olan otoimmün hastalıklar sırasında bağışıklık sistemi çok aktiftir ve vücudun kendi dokularına saldırıp zarar vermesine yol açar. Hastalıkların her biri farklı belirtiler göstermesine rağmen ortak noktaları kan ve Beyin-Omurilik Sıvısında (BOS) hücre yıkımına bağlı immünoglobulin miktarı artmasıdır.

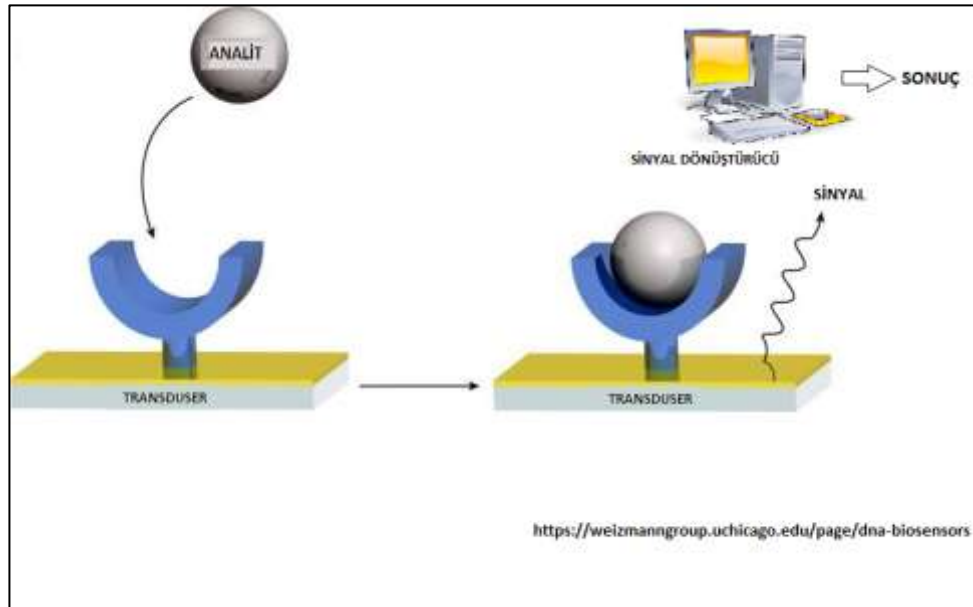
Bu tez çalışmasında otoimmün hastalıklar sırasında kan serumu ve beyin-omurilik sıvısında (BOS) miktarı artan immünoglobulin G (IgG) tayinine yönelik impedimetrik immünosensörlerin tasarlanması üzerine çalışılmıştır. Taşıyıcı sistem olarak jelatin, kitosan, jelatin/kitosan kompozitleri ve altın (AuNPs) nanopartikülleriyle karışımından oluşan nanotaşıyıcılar kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcı kullanılarak taşıyıcı polimer sistemi içine hapsedilen protein A (PrA); Pt screen printed elektrotlar üzerine immobilize edilmiştir. Polimer miktarları, nanopartikül miktarları, çapraz bağlayıcı konsantrasyonları, PrA konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) ve Dönüşümlü Voltametri (CV) ile optimize edilmiştir.

Kitosan, kitosan-PrA, jelatin/kitosan, jelatin/kitosan-PrA şeklinde hazırlanan immobilizasyon jellerinin yüzey karakterizasyonları Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezinde (UNAM) yapılmıştır. Jelatin ve kitosan polimerlerinin karışımıyla elde edilen kompozitlerin karakterizasyonları ise TGA ve FTIR teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca raf ömrü, farklı antikörlerin kovalent olmayan bağlanma etkisi ve tasarlanan immünosensörlerin yanıt süreleri de belirlenmiştir. Geliştirilen immünosensörlerden en düşük tayin sınırına sahip olanı ile BOS ve serum çalışmaları yapılarak immünosensörlerin biyolojik örneklerle uyarlabilirliği üzerine çalışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Biyosensörler

Sensörler; fiziksel büyüklükleri elektrik sinyallerine dönüştüren cihazlardır. Biyosensörler ise biyolojik bir numunedeki analiti algılayan sensörlerdir. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken; sisteme biyomateryalinde katılmasıyla diğer birçok maddenin tayini mümkün hale gelmiştir. Biyosensörler; işlenmemiş numunedeki analitlerin derişimlerdeki değışimi doğru, hızlı, tersinir ve tekrar edilebilir bir şekilde ölçmek için kullanılırlar. Biyosensörler farklı bilim dallarının bilgi birikiminden yararlanılarak türetilmiş, biyolojik moleküllerin seçicilik özellikleri ile elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesi ile oluşturulmuş biyoanalitik cihazlardır (Edelman ve Wang 1991). Şekil 2.1 <https://weizmanngroup.uchicago.edu/page/dna-biosensors> adresinden değıştirilerek alınmıştır).



Şekil 2.1 Biyosensörün genel yapısının şematik gösterimi

Biyosensörlerin tarihi 1950'li yıllarının ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati hastanesinde (Ohio, ABD) yapılan bir ameliyatta kandaki O₂ miktarının elektrot

yardımla izlenmesine dayanır. 1962’de Clark ve Lyons, 1967’de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik geliştirilen enzim elektrotları ilk biyosensör örneklerini oluşturmaktadır (Akyılmaz 2008). Glukozoksidaz (GOD) enzimi ile O₂ elektrodu birleştirerek kan glukoz düzeyini ölçmeye yönelik olarak tasarlanan analitik sistem sayesinde enzimin yüksek spesifikliği ile elektrodun tayin duyarlılığı bileştirilmiştir.

Zaman içinde hızla gelişen biyosensörler günümüzde sağlık alanı başta olmak üzere; çevre analizlerinde, askeri sahada, gıda, farmasötik ve kimya endüstrilerinde kullanılmaktadır (Telefoncu 1999). Yüksek spesifiklik, renkli ve bulanık çözeltilerde doğrudan ölçüme olanak sağlama, geniş konsantrasyon aralığında tayin biyosensörlerin avantajları arasında sayılabilir. Dezavantajları ise; reseptör olarak kullanılan biyomolekülün pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi ve bu durumun kullanım ömrünü azaltmasıdır (Telefoncu 1999).

2.1.1 Biyoreseptörler

Biyosensörler birçok sensör gibi reseptör ve dönüştürücü olmak üzere iki ana yapıdan ibarettir. Eğer reseptör biyomoleküler bir yapıda ise buna biyoreseptör adı verilir. Biyoreseptörler analiti fark edebilen biyomoleküllerdir. Biyoreseptör olarak enzim, doku kesitleri, mikroorganizma, membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler, nükleik asit/DNA, organeller, antijen ve antikorlar kullanılabilir. En yaygın kullanılan biyoreseptörler spesifikliklerinden dolayı enzimler ve antikorlardır.

Biyosensörler, kullanılan biyoreseptör türüne göre, biyokatalitik esaslı ve biyoafinite esaslı olmak üzere iki şekilde gruplandırılabilir (Thevenot vd. 1999). Biyokatalitik esaslı biyosensörler, sensör ortamında bulunan makromoleküller (biyokatalizör) tarafından katalizlenen bir reaksiyon temeline dayanır. Enzim, hücre ve doku kesitlerinin yaygın olarak kullanıldığı biyokatalitik esaslı biyosensörlerde, sensör yüzeyindeki substrat biyokatalizör yardımıyla tüketilir (Thevenot vd. 1999).

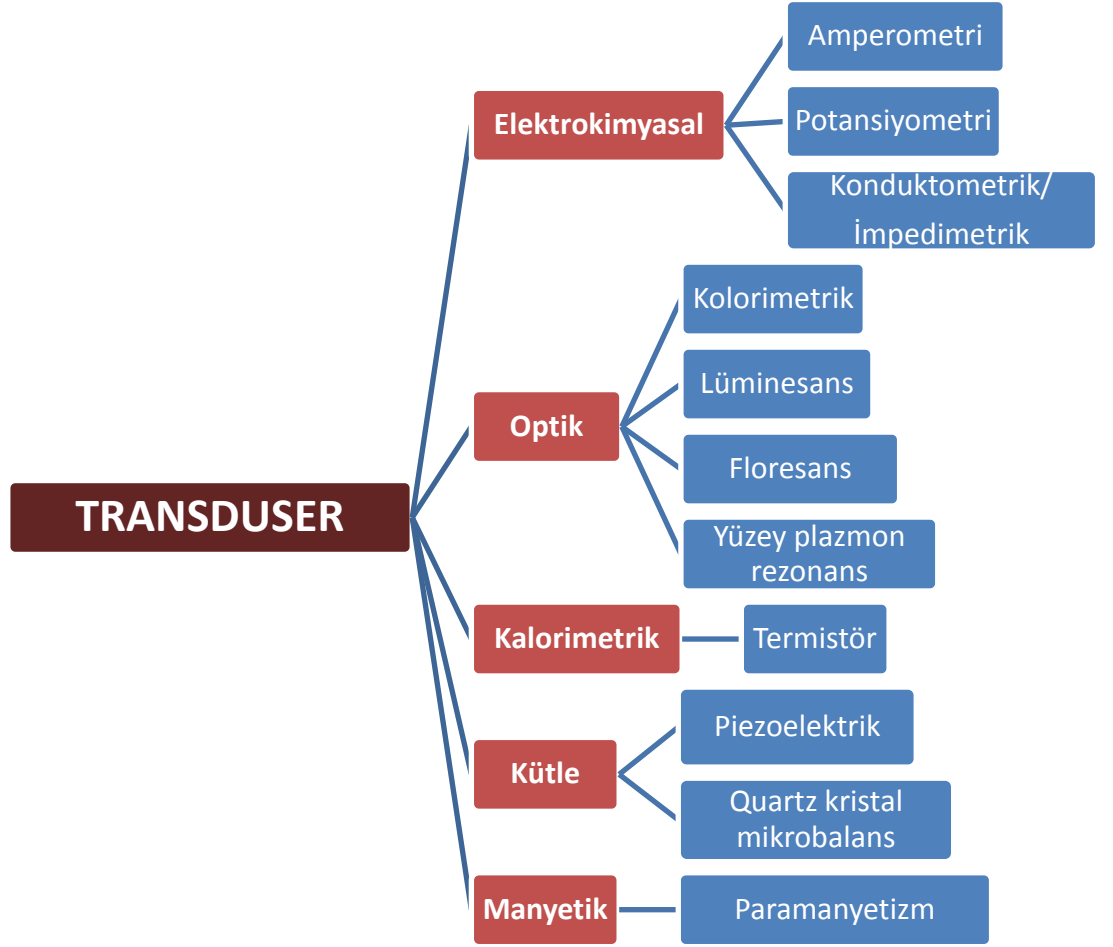
Biyoafinite esaslı biyosensörlerde ise biyosensörün biyolojik yapısında bulunan makromoleküller ile analit etkileşir ve bir dengeye ulaşılır. Dengeye ulaşılmasıyla analit ile makromoleküller daha fazla etkileşime giremez (Thevenot vd. 1999). Biyoafinite esaslı biyosensörlerde en çok kullanılan biyoreseptörler antikorlar/antijenler ve reseptör hücrelerdir. Biyoreseptör olarak antijen/antikor çiftinin kullanıldığı biyosensörler “**immunosensör**” olarak adlandırılır.

İmmunosensörlerin temel çalışma prensibi; taşıyıcı bir tabaka üzerine immobilize edilmiş antikora spesifik antijenin bağlanmasıyla gerçekleşen immünokimyasal reaksiyondur. Antijen ile antikor arasında gerçekleşen bu spesifik bağlanma reaksiyonunun afinite sabiti çok büyük olduğundan bağlanma tersinmezdir. Sistemin tekrar kullanılabilmesi için uygun çözeltiler kullanılarak antijen/antikor kompleksinin ayrılması gerekmektedir (Thevenot vd. 1999).

İmmunosensörlerde taşıyıcı tabaka üzerine immobilize edilmiş spesifik bir antikora, antijenin bağlanmasıyla immünokimyasal bir reaksiyon ortaya çıkar. Antikor/antijen arasında gerçekleşen bu spesifik reaksiyonun bağlanma ve afinite sabiti çok büyüktür, genellikle bağlanma tersinmezdir. Bu sistemler kullanıldığında elde edilen sensörler tek kullanımlıdır, sistemin tekrar kullanılabilmesi için uygun çözeltiler kullanılarak antikor/antijen eşleşmesinin ayrılması gerekmektedir.

2.1.2 İleticiler

İleticiler; diğer adıyla transduserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyonun özelliğine göre transduserler kullanılır.



Şekil 2.2 Biyosensör tasarımında kullanılan transduser çeşitleri

Potansiyometrik, amperometrik ve kondüktometrik olmak üzere sınıflandırılan elektrokimyasal biyosensörlerde sinyal çıktısı akım, voltaj, iletkenlik ya da impedanstır (Thevenot vd. 1999, Telefoncu 1999, Hou 2005). Potansiyometrik biyosensörlerde iyon seçici elektrotlar, pH veya tek değerli iyonlara duyarlı cam elektrotlar kullanılmaktadır ve elektrot potansiyeli doğrudan analit konsantrasyonu ile ilişkilidir. Amperometri genel olarak belirli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esasına dayanır ve akım yoğunluğu yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. Kondüktometrik biyosensörlerde; elektriksel alan varlığında çözeltideki elektrik yükü iyonlar tarafından taşınmaktadır. Çözeltinin iletkenliği çözeltide bulunan tüm iyonik türlerin katkısıyla oluşur.

Optik biyosensörlerde sinyal çıktısı; renk ya da ışık şiddeti değişimidir. İletici sistem olarak kullanılan optik özellik gösteren lifler üzerine uygun molekülün immobilize edilmesiyle hazırlanan optik biyosensörler; etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal değişimin ölçülmesi esasına dayanır.

Enzim termistörleri ya da entalpi metrik enzim sensörleri olarak da adlandırılan kalorimetrik (termal) biyosensörlerde sinyal çıktısı sıcaklıktır. Temel ilkesi, bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanılarak substrat konsantrasyonunun belirlenmesidir.

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensörün seçiciliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorplandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesiyle sonuca ulaşılır.

2.1.3 İmmüno sensörler ve immüno sensörlerin sınıflandırılması

Biyoreseptör olarak antikorların kullanıldığı biyosensörler antikor temelli biyosensörler ya da immüno sensörler olarak adlandırılırlar. İmmüno sensörün temel çalışma prensibi antikor ile antijen arasında gerçekleşen spesifik reaksiyon sonucu kompleks oluşumu esasına dayanır. Klasik immünoassay yaklaşımı sonucu ortaya çıkan immüno sensörler ile son derece özgül ve duyarlı analizler yapılabilir. Uygun transduser ile antikor eşleştirilerek ilaç, hormon, virüs, bakteri, pestisit, biyomedikal maddeler gibi farklı birçok maddenin tayini için immüno sensörler geliştirilebilir (Dong 2002).

Antijen veya antikorların sensör yüzeyine immobilizasyonu ile üretilen immüno sensörler, genel olarak ölçüm prensibine göre sınıflandırılırlar. Elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik), optik, piezoelektrik ve termometrik duyar elementler immüno sensörler için sensör platformu olarak kullanılmaktadır.

İmmünosensörlerin çoğu optik ya da elektrokimyasal esastır. Elektrokimyasal immünosensörlerde belirleme, genelde ya elektroaktif işaretleyiciler kullanılarak ya da enzim işaretleme yoluyla yapılır. Ölçüm prensibine göre sınıflandırılmış olan bu immünosensörler, ayrıca direkt ve indirekt olarak da sınıflandırılmaktadır (D’Orazio 2003).

Direkt immünosensörler; antikor/antijen kompleksi oluşumuyla sinyalde fiziksel değişim meydana gelmesi temeline dayanır. Elektrot olarak; membranlar, piezoelektrik materyaller veya optikçe aktif yüzey materyalleri kullanılır. Çözeltide hedef analit; duyarlı matriks üzerinde bulunan antikor ya da antijen ile etkileşir. Oluşan immünokompleks formu, hedef analitin ölçülmesine izin veren elektrot potansiyeli, membran potansiyeli, gerçek piezofrekans veya optik özellikler gibi yüzeyin fiziksel özelliklerini değiştirir. Bununla beraber yüzeyde moleküllerin non-spesifik adsorpsiyonundan kaynaklanan potansiyel problemleri de söz konusudur (D’Orazio 2003).

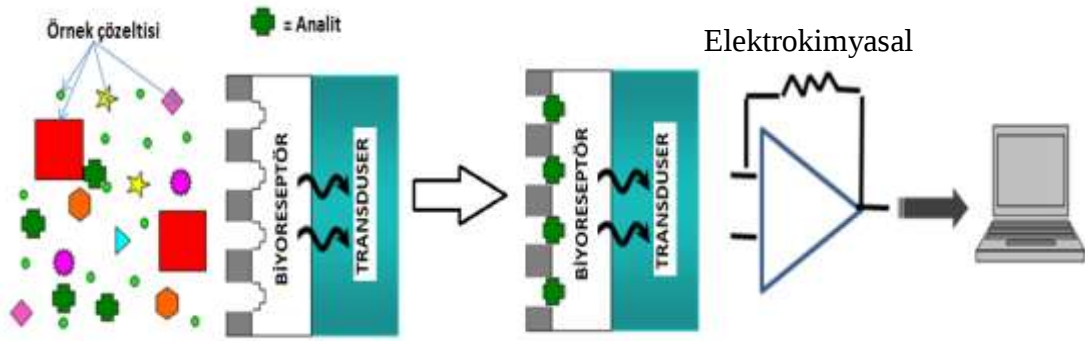
İndirekt immünosensörler ise bağlanmanın gözlenebilmesi için antikor ya da antijene konjuge edilen işaretleyiciler esasına dayanır. İşaretleyici olarak enzim, elektrokimyasal olarak aktif moleküller ve lipozomlar kullanılabilir. İndirekt immünosensörlerde birçok farklı yolla immünokompleks oluşturulabilir; ancak son adımda potansiyometrik, amperometrik veya optik ölçümlerle belirlenebilen bir işaretleyicinin olması gerekmektedir. Doğrudan tayin düşük duyarlılık ve düşük kesinlik nedeniyle potansiyelde değişimlere neden olabilir. Bu nedenle sensör duyarlılığını arttırmak amacıyla genellikle immüno reaktantlara enzim işaretleyiciler bağlanarak indirekt tayin yapılır (Rogers2000).

İmmünosensörlerde; antijen ile antikor arasında gerçekleşen spesifik bağlanma reaksiyonunun afinite sabiti çok büyük olduğundan bağlanma tersinmezdir. Bu nedenle immünosensör çoğunlukla tek bir kez kullanılabilir. Sistemin tekrar kullanılabilmesi için uygun çözeltiler kullanılarak antijen/antikor kompleksinin ayrılmasına yönelik çalışmalarda literatürde mevcuttur (Parkinson ve Pejic 2004).

İmmünosensörler de biyosensörler gibi elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik, impedimetrik vb.), optik, mikrogravimetrik (piezoelektrik) ve termometrik olmak üzere 4 sınıfa ayrılırlar. Bütün bu immünosensör sistemleri ya direkt immünosensör olarak ya da indirekt immünosensör olarak çalışabilir (Luppa vd. 2001).

2.1.3.1 Elektrokimyasal immünosensörler

Yapılan literatür araştırmalarında elektrokimyasal temele dayanan sensör platformlarının diğerleriyle karşılaştırıldığında çok daha yaygın olarak kullanıldığı görülmüştür. Stefan vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada elektrokimyasal immünosensörlerin klinik analizlerde popülaritesinin gittikçe arttığı ve bunun özellikle sensör tasarımı gelişiminden kaynaklandığı üzerinde durulmuştur.



Şekil 2.3 Elektrokimyasal immünosensörün genel çalışma prensibi (Helali 2013)

Elektrokimyasal bir immünosensörün çalışma prensibi şekil 2.3'te gösterilmiştir. Biyoreseptör tabaka üzerinde antikorların immobilize olduğu elektrokimyasal bir immünosensör sisteminde; analizlenecek numune içerisinde antikora spesifik maddeler bulunabileceği gibi, spesifik olmayan başka maddelerde bulunabilir. Kompleks oluşum reaksiyonu yalnızca birbirine spesifik antijen-antikor arasında gerçekleşeceğinden bağlanmadan önceki ve sonraki durum arasındaki fark elektrokimyasal iletici yardımıyla ölçülebilir sinyal haline getirilir; böylece değerlendirme yapılır. Elektrokimyasal immünosensörler; potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik ve impedimetrik olmak üzere dört farklı grup altında incelenebilir.

i.Potansiyometrik immünosensörler: Potansiyometrik ölçüm iyon seçici elektrot kullanılarak; iyonik reaksiyon nedeniyle oluşan potansiyel değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. Çalışma elektrodunun yüzeyi seçicilik için modifiye edilmiştir ve potansiyel farkı çalışma elektrodu ile referans elektrot arasında akımın geçmediği bir anda ölçülür. Potansiyometrik immünosensör sistemlerin önemli dezavantajı, antikor-antijen bağlanmasından dolayı oluşan potansiyel değişiminin çok küçük olması ve Nernst eşitliğine uygun davranmaması olarak ifade edilmektedir (1-5 mV) (Martin 2001).

ii.Amperometrik immünosensörler: Amperometrik ölçüm; sabit gerilim altında bulunan elektrokimyasal hücreden geçen akım yoğunluğunun ölçülmesi temeline dayanır. Genellikle “yaban turpu” peroksidaz (HRP), oksidoredüktaz veya alkalen fosfataz (AP) gibi elektrokimyasal aktif maddelerin işaretleyici olarak kullanıldığı amperometrik immünosensörlerde elektroaktif bileşenlerden kaynaklanan girişim etkileri görülebilir (Martin 2001). Bu problem farklı polimer taşıyıcılar ile hazırlanan elektrotların kullanılmasıyla giderilebilir (Parkinson ve Pejic 2005).

iii.Kondüktometrik immünosensörler: Kondüktometrik esaslı biyosensörler, iletkenlik ile biyo tanıma olayı arasındaki ilişkiyi kullanır. Çoğu reaksiyon iyonik türlerin konsantrasyonundaki bir değişimini içerir ve bu çözeltide elektriksel iletkenliğin veya akımın değişimine neden olabilir. Bir kondüktometrik biyosensör, belli uzaklıkta bulunan iki metal elektrot (genellikle platin veya gümüş) içerir. Normalde elektrotlara, aralarındaki akımın sürdürülebilmesini sağlayan bir alternatif akım voltajı uygulanır. Bir biyo tanıma olayı boyunca iyonik bileşim değişir ve bir ohm metre (ya da multi metre), metal elektrotlar arasındaki iletkenlik değişimini ölçmek için kullanılır. Diğer elektrokimyasal yöntemlerle karşılaştırıldığında tekniğin en büyük dezavantajı duyarlılığın düşük olmasıdır. Bu problemi önlemek için son zamanlarda biyolojik sensör fonksiyonları gösteren, iyon kanallı iletken immünosensörler tanımlanmıştır.

2.1.3.2 Optik immünosensörler

Optik çeviricilerin kullanıldığı immünosensörler; ışık iletimindeki değişimin ölçülmesi temeline dayanırlar. Optik esaslı sensörlerde; ölçüm sistemi, madde derişimine bağı olarak absorbans veya luminesansta değişim gösteren bir boya içerir veya CO₂, O₂ veya pH değişimi gibi bir fizikokimyasal özellikten faydalanılır. Optik fiberlerin kullanıldığı fotomerik algılama yönteminde biyoreseptörler optik fiberler üzerine yerleştirilmiştir. Bu sensörlerde en önemli etken fiber boyunca ışık iletiminin etkinliğidir.

İmmünosensör teknolojisinde en yaygın kullanılan optik sistem SPR (yüzey plazmon rezonans) temelli cihazlardır. Bir SPR immünosensör; immobilize bir antikor tabakasıyla modifiye edilen klasik bir SPR cihazdır. Antijen, immobilize antikora bağlandığında SPR cihazı, antikorların bulunduğu metal tabaka üzerine düşen ışığın adsorpsiyon açısındaki bir değişim olarak; kırma indisindeki ani değişimi tayin eder (Marty vd. 1998, Parkinson ve Pejic 2005).

Optik ileticiler biyosensör ailesinin ticari olarak en fazla tüketilenidir. Optik biyosensörler patojen tayininde ve hastalıkların teşhisinde dikkate değer ilgiye sahiptir. Optik esaslı analiz sistemleri arasında SPR ticari olarak en popüler olanıdır. Piyasada mevcut olan en önemli iki sistemden birisi olan BIAcore™ en büyük pazar konumundadır. Kullanım kolaylığı olduğundan ve alışlagelmiş cihazlar olduğundan laboratuvar araştırmalarında yaygın olarak kullanılırlar.

2.1.3.3 Piezoelektrik immünosensörler

Piezoelektrik algılama; piezoelektrik kristal yüzeyinde bulunan biyoreseptör ile analitin reaksiyona girmesi sonucunda ortaya çıkan kütle artışına bağı olarak, kristalin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesi temeline dayanır (Eggins 1996). Kütle hassasiyetli algılama prensibine dayalı bu tip biyosensörlerde genellikle kuvars (quartz) kristalli ankastre kiriş (cantilever) kullanılmaktadır (Ziegler ve Göpel 1998, Loung vd. 2008). Bu tip aygıtların yardımıyla kütlede meydana gelen en ufak değişimler bile

algılanabilmektedir. Piezoelektrik iletim metodunun kullanımı kolaydır ancak pahalı yöntemdir, bu nedenle direkt analizlerde tercih edilir. Kristal rejenerasyonu, nispeten yüksek inkübasyon zamanı, düşük seçicilik, proteinlerin veya diğer biyomateriyallerin nonspesifik bağlanmaları, yıkama işleminden sonra kaplı materyalin kaybı, immobilizasyonda ve kaplamada karşılaşılan zorluklar gibi problemler bu tekniğin bilinen sınırlamalarıdır.

2.1.3.4 Termometrik immünosensörler

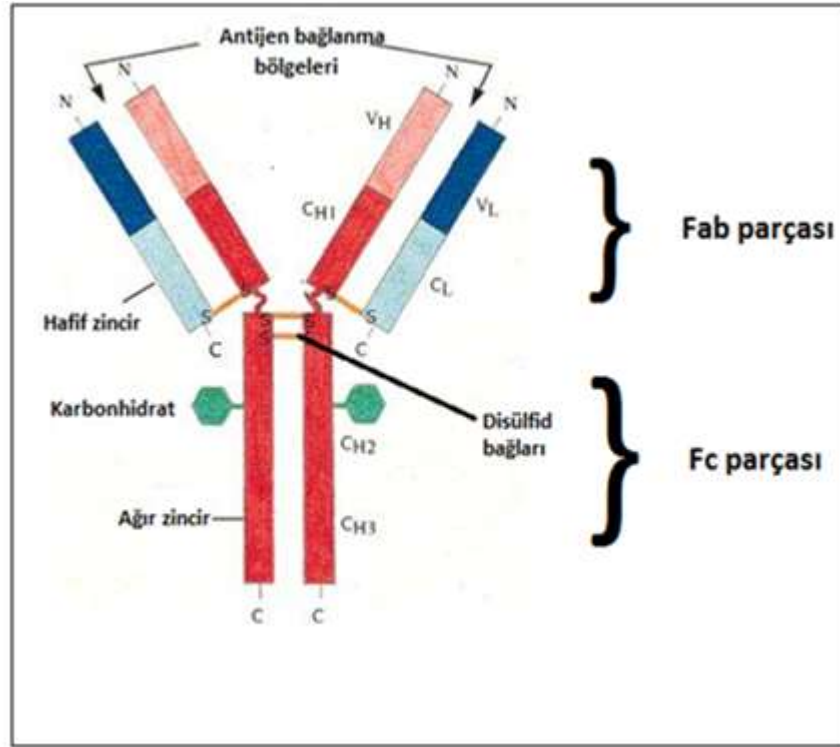
Analit ile biyoreseptör arasında gerçekleşen reaksiyonların entalpi değişimlerinin ölçüldüğü termometrik immünosensörlerde sıcaklığın ölçülmesi için optik, mekanik veya elektriksel metotlar kullanılabilir. Sıcaklık değişimiyle doğrusal olarak elektrik sinyali elde etmek mümkün olduğu için; termal immünosensörlerin oluşturulmasında en kullanışlı yöntem olarak elektriksel metot kabul görmektedir (Eggins 1996).

2.2 Antikorlar ve İmmünoglobulinler

Antikorlar, vücudun immün (bağışıklık) sisteminin bir parçası olan, B lenfositler tarafından gereksinim duyulduğunda üretilen, “Ab” ile simgelenen protein yapısındaki molekülleridir. *Antijen* ise immün yanıtı neden olan ve vücut tarafından yabancı olarak tanınan moleküler maddelerdir ve “Ag” ile simgelenir. Antikorlar; vücuda giren yabancı maddeyi yani antijeni tanıyarak immün sistemi harekete geçirirler. Antijen-antikor arasında gerçekleşen spesifik reaksiyondan faydalanarak immünosensörler geliştirilmiştir.

İmmünoglobulinler ise, serum proteinlerinin γ -globülin kesiminde bulunan, polipeptit ve karbohidrattan oluşan glikoproteinlerdir ve toplam plazma proteinlerinin % 20’sini oluştururlar (Kılıçturgay 2003). İmmünoglobulinlerin; virüsleri etkisizleştirme, bakteri çökeltme, parazit öldürücülük, zehirsizleştirme, damar geçirgenliğini arttırma gibi biyolojik işlevleri vardır. İmmünoglobulinler en az bir ana birimden oluşmuştur ve bu

ana birim 4 polipeptit zincirini kapsamaktadır. Bu 4 polipeptit zincir birbirinin aynı iki ikiz gibidir. Aminoasit sayısı fazla ve dolayısıyla molekül ağırlığı yüksek olan ağır zincir (H), düşük olan hafif zincir (L) olarak adlandırılmaktadır. İmmünoglobulin molekülü, ağır ve hafif zincirlerden oluşan Fab (antigen binding fragments/antijen bağlanma bölgesi) parçasından, antijenle spesifik olarak birleşir (Şekil 2.4). Antikoru antijen ile birleştiği yüzeyin büyüklüğü, 8-12 aminoasit veya 3-6 glukoz molekülük bir determinant grubunu kavrayacak kadardır. Antikoru antijen ile birleştiği bu bölge “paratop” olarak adlandırılır (Telefoncu 1999). Antikoru; hücre reseptörlerine ve monositlere bağlanmasını sağlayan bölge ise Fc (cell binding fragments) olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 2.4 IgG molekülünün şematik gösterimi

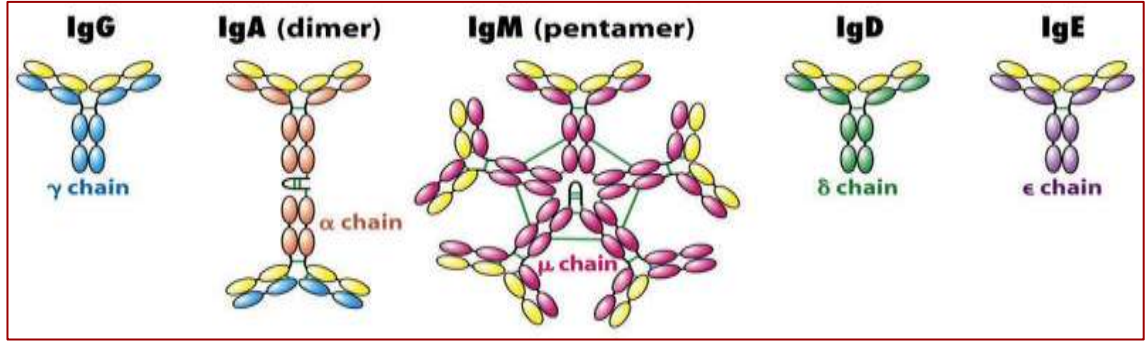
İmmünoglobulinlerde hafif zincirler Y harfi şeklindeki molekülün kol kısımlarında bulunurken; ağır zincirler hem gövde hem kol kısmında bulunurlar. Kollarda hafif ve ağır zincir arasında, gövdede ise iki ağır zincir arasında bulunan bağlar, polipeptid zincirleri bir arada tutarak IgG molekülünü oluştururlar. H ve L zincirlerinde; tüm

polipeptit zincirlerinde olduğu gibi NH₂ ile sonlanan amino terminal uç ve COOH ile sonlanan karboksi terminal uç bulunur. IgG molekülünde Y harfinin iki kolunun uç kısımları amino terminal uçlardır. C_{H1} ve C_{H2} bölgeleri “menteşe bölgesi” olarak adlandırılabilir. Bu bölgedeki esneklik sayesinde molekülün Fab kolları açılıp kapanabilir; böylece antijene bağlanması kolaylaşır.

Antikorlar farklı substratların varlığında uygun antijenin tanınmasına imkan sağlayan, yüksek spesifikliğe sahip yapılar olduklarından biyolojik tanıma materyali olarak sıklıkla kullanılır. İmmün cevapta antijenlerin epitop ya da antijenik determinant denilen spesifik bölgeleri rol oynar. Ayrıca epitop; uygun antikor için bağlanma bölgesidir (Martin 2001).

Teoride antikorlar sınırsız sayıda antijenik determinant için hazırlanabilmektedir. Bazı antikorlar antijenin etkinliğine bağlı olarak antijenin farklı bölgelerine bağlanabilir ve bu antijen için farklı spesifikliğe sahip olarak üretilebilirler. Epitop spesifikliğinde farklılıklara sahip olan ve farklı alt sınıflara ait olan bu heterojen antikorlar *poliklonal antikor* olarak adlandırılmaktadır. Aynı antijenin aynı epitopuna bağlanan, antijen için aynı ilgi ve spesifikliğe sahip antikora ise *monoklonal antikorlar* denilmektedir. Monoklonal antikorlar; poliklonal antikordardan daha yüksek spesifikliğe sahip olmalarına rağmen; antijene daha düşük ilgi gösterirler (Martin 2001).

İmmüoglobulinler (Ig) boyut, yük, aminoasit bileşimi ve karbohidrat içeriği bakımından immüoglobulin G (IgG), immüoglobulin M (IgM), immüoglobulin A (IgA), immüoglobulin D (IgD) , immüoglobulin E (IgE) olmak üzere beş ana gruba ayrılır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 İmmünoglobulinlerin moleküler yapıları

Fetüs; immünoglobulin üretimine 20.haftada başlamasına rağmen; doğumda herhangi bir enfeksiyon durumu yoksa Ig seviyesi çok düşüktür. Yeni doğan; plasentadan geçebilen IgG ile korunur. 2-3 aylıkken anneden geçen IgG'ler hızla kaybolmaya başlar ve yerine IgM ve IgG sentezi sentezlenir. IgM seviyesi 4.ayda yetişkin düzeyine ulaşırken; IgG seviyesinin yetişkin düzeyine çıkması 5 yaşı bulur. IgA ise çok daha yavaş bir hızla yükselerek yetişkinlikte normal serum konsantrasyonuna ulaşır (Demirkılınç 2006).

IgA; normal serumun %15'ini oluşturur ve serumda monomer halinde bulunmasına rağmen; vücut salgılarında dimer ya da polimer halinde bulunur (Erbil 2007). Dış salgıların ve serumun majör antikoru olan IgA; gözyaşında, burun-boğaz salgısında, solunum yolu, sindirim yolu ve genital kanal salgılarında bulunur. Birleştiği virüs ve bakterilerin muköz zarlara bağlanmasını engelleyerek vücudu korur. Siroz, inflamatuvar barsak hastalıkları, kronik karaciğer hastalıkları sırasında serum miktarı artar. Kanda normal IgA seviyesi:70-500 mg/dL'dir (Demirkılınç 2006).

IgM; antijenlerin etkisiyle vücutta ilk üretilen immünoglobulin olup; antijen-antikor birleşmesi reaksiyonlarının çoğundan sorumlu antikordur. Vücudun antijenle karşılaşmasından hemen sonra serum düzeyi hızla artan IgM; daha sonra yerini uzun süre koruyucu etkinlik gösteren IgG sınıfı antikorlara bırakır. Fagositözu kolaylaştıran IgM'in aglutinasyon yeteneğide fazladır. Makrofaj ve nötrofillere bağlanamayan IgM; on kollu pentamerik bir yapıya sahip olması nedeniyle kan-beyin bariyerini ve plasenta engelini geçemez. Plasentayı geçemediğinden yeni doğanda bulunması bebekte olası bir

enfeksiyonu işaret eder. BOS'ta 3 mg/dL üzerindeki değerler bakteriyel menenjit lehinedir (Erbil 2007). Kanda normal IgM seviyesi 50-210 mg/dL'dir (Demirkılınç 2006).

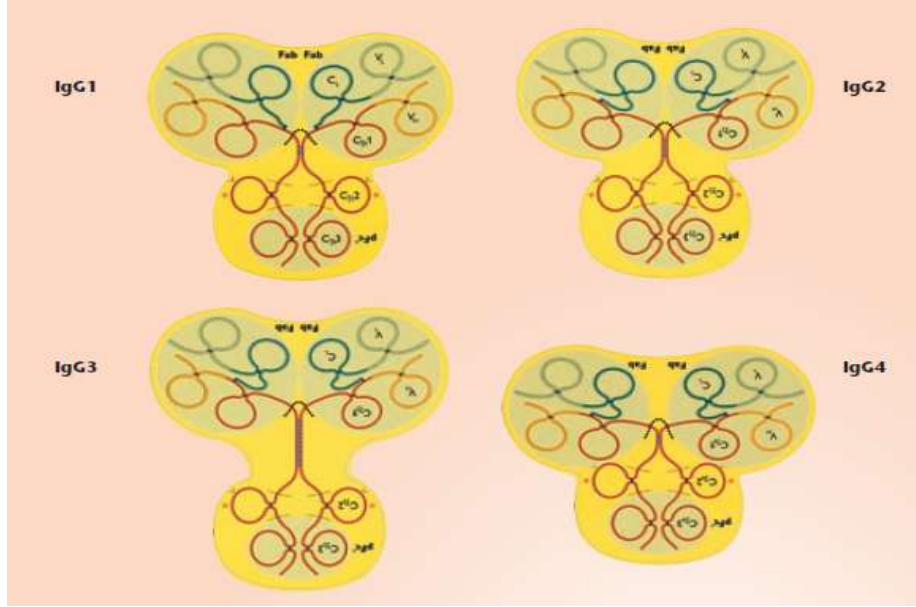
IgD; ısı ve proteolitik etki ile çabuk bozulan, dayanıksız bir yapıya sahip bir antikordur. Ortalama ömrü iki gün olan IgD; B lenfositlerin üzerinde fazla miktarda bulunur. İnsülin, penisilin ve tiroid antijenlerine karşı etkilidir. Kandaki normal IgD seviyesi 0,1-4mg/dL'dir (Demirkılınç 2006).

IgE; vücutta en az seviyede bulunan monomerik yapıdaki antikordur. Fc kısmıyla mast hücrelerine ve bazofillere yapışarak antijen reseptörü görevi görür. Bu duyarlılaşmış hücrelerin antijenle tekrar karşılaşması durumunda mast hücreleri ve bazofiller degranüle olur. Alerjene maruz kalındığında, astımda, Wiscott Aldrich sendromunda serumdaki seviyesi artar. Kandaki normal IgE seviyesi 0.01-0.9 mg/dL'dir (Demirkılınç 2006).

Bu gruplar içinde virüslerle savaşta ön planda rol alan IgG; serum immünoglobulinlerinin yaklaşık %80'ini oluşturur (D'Orazio 2003). IgG damardan dışarıya kolaylıkla sızar ve plasenta yoluyla fetüse geçebilir. Bakteri, virüs ve toksinlere karşı uzun süreli koruyuculuk sağlayan IgG; Fab kısmıyla mikroplara bağlanır, Fc kısmıyla ise fagositlere bağlanarak fagositozu kolaylaştırır. Kanda normal IgG seviyesi 600-1200mg/dL'dir (Demirkılınç 2006).

1960 yılında homojen insan IgG miyelom proteinine karşı spesifik poliklonal tavşan anti serumu kullanılarak yapılan çalışma ile IgG'nin IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 olmak üzere dört ayrı alt sınıfı olduğu ortaya çıkarıldı. IgG'lerin ağır zincir yapılarındaki aminoasit diziminin %95'i aynı olmasına rağmen; disülfid köprülerinin farklı aminoasitler arasında kurulmasıyla IgG'nin üç boyutlu molekül yapısında ufak değişiklikler meydana gelmektedir. Ayrıca γ ağır zincir tipi de alt sınıflar arasında farklılık göstermektedir (Şekil 2.6). IgG1, IgG2 ve IgG4'ün molekül kütleleri 146 kDa iken IgG3'ün molekül kütlesi 170 kDa'dur. Serum seviyeleri $IgG1 > IgG2 > IgG3 = IgG4$

şeklinde olan IgG'lerin molekül esneklikleri de $IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2$ şeklinde değişmektedir (Meulenbroek 2008).



Şekil 2.6 IgG alt sınıflarının molekül yapıları (Meulenbroek 2008)

Kan ve BOS'taki IgG düzeyi otoimmün hastalıklarda, merkezi sinir sistemi demiyelizan hastalıklarının değerlendirilmesinde, nörolojik hastalıkların ayırıcı tanılarında önem arz etmektedir. Otoimmün hastalıkların yanında; kronik karaciğer hastalıkları, rahim içi araç gibi durumlarda vücut sıvılarındaki IgG miktarında artış olurken; AIDS, lösemi, Wiscott Aldrich sendromu gibi hastalıklarda miktarı azalır ve kişinin bağışıklık sistemi zayıflar (Erbil 2007).

Çizelge 2.1 Serum ve BOS'ta normal IgG değerleri (Erbil 2007)

	KAN (mg/dL)
0-4 ay	141-930
5-8 ay	250-1190
9-11 ay	320-1250
1-3 yaş	400-1250
4-6 yaş	560-1307
7-9 yaş	598-1379
10-12 yaş	638-1453
13-15 yaş	680-1531
16-17 yaş	724-1611
> 18 yaş	600-1500
	BOS (mg/dL)
0-15 yaş	1,50-5,50
16-60 yaş	3,30-6,10
>60 yaş	4,20-6,40

2.2.1 Antikor-Antijen bağlanma gücü

Antikor-antijen bağlanması; antijen yüzeyindeki epitop ile antikorun Fab kısmının ucundaki V bölgesi arasında olur. Ag-Ab birleşmesi kimyasal bir olay olsa da; birleşmede çok kuvvetli olmayan, düşük enerjili bağlar rol oynar. Her ne kadar zayıf kuvvetler bağlanmada etkili olsa da Ag-Ab birleşmesi son derece spesifik bir reaksiyondur ve genellikle bağlanma tersinmeze yakındır. Ag-Ab birleşmesi sırasında iki molekül birbirine ne kadar yakınsa ve bağlanma bölgeleri birbirine ne kadar uygunsa; bağlanma o kadar sıkı ve sağlam olmaktadır (Martin 2001).

Ag-Ab birleşmesi sırasında etkin olan kuvvetler

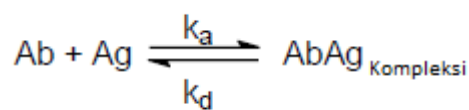
- Hidrojen bağları,
- Elektrostatik etkileşimler,
- Van der Waals etkileşimleri ve
- Hidrofobik etkileşimlerdir.

Elektrostatik etkileşimler, zıt yüklü moleküller arasındaki itme-çekme kuvvetleri ve polaritesi yüksek moleküller arasındaki dipol-dipol etkileşimler olabilir. Özellikle protein yapısındaki moleküllerde polipeptit omurgasındaki karbonil grupları ile polar aminler kalıcı dipollere yol açarlar. Elektrostatik etkileşimlerin bir alt grubu olarak hidrojen bağları düşünülebilir. Hidrojen bağı; flor, oksijen, azot gibi elektronegatif bir atoma bağlı hidrojenin kısmi artı yüklenmesi sonucunda; başka veya aynı moleküldeki elektronegatif atom ile yaptığı kuvvetli bağıdır. Hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler hem moleküller arası kararlılığa hem de antikor-antijen bağlanmasının kuvvetine katkı sağlarlar. Hidrojen bağlarından daha zayıf olan Van der Waals kuvvetleri; elektrostatik etkileşimlerden daha zayıf dipoller arasında meydana gelir. Birbirine yakın moleküllerin oluşturduğu elektrik alan; bu kuvvetlerden sorumlu geçici dipolleri oluşturur. Bu etkileşimler kısmen zayıf olsalar bile; birçok farklı etkileşimi bünyesinde barındırdıklarından toplam bağlanma şiddetinin %50'sini oluşturabilirler (Martin 2001). Hidrofobik etkileşimler apolar moleküller ile su arasında meydana gelen itici kuvvetlerdir. Termodinamik kararlılığın sağlanmasında, polar olmayan bölgeler entropinin etkisiyle bir reaksiyon bölgesinde bulunuyorsa, moleküller arası kararlılığın ve bağlanma şiddetinin artmasına yol açarlar.

Antikorda var olan dipoller ile antijenin dipolleri etkileştiğinde; bağlanma için uygun yönelmeyi sağlayabilmek adına ortak hareket ederler. Ag-Ab molekülleri arasındaki kararlılığın sağlanmasında elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları en önemli katkıyı sağlarken; diğer kuvvetler tamamlayıcı etki yapar (D'Orazio 2003).

2.2.2 Antikor-Antijen bağlanma kinetiği

Çözeltide antikor-antijen arasında gerçekleşen reaksiyon denklemi aşağıdaki gibidir. Ab, serbest antikoru, Ag serbest antijeni, AbAg antijen antikor kompleksini gösterir ve k_a ve k_d sırasıyla birleşme (assosiasyon) ve ayrışma (dissosiasyon) sabitidir.



(2.1)

Ab-Ag arasında gelişen etkileşimlerin temel termodinamik prensibi ise eşitlik (2.2)'de verildiği gibidir.

$$K = \frac{ka}{kd} = \frac{AbAg}{[Ab][Ag]} \quad (2.2)$$

İmmünoensörlerde kullanılan antikorlar ve antijenler taşıyıcı katı yüzeye farklı yöntemlerle immobilize edilirler. İmmobilizasyon basamakları; kullanılacak antikor veya antijenin yapısına göre değişebilir ve bu durum bağlanma kinetiğini etkileyebilmektedir (D'Orazio 2003).

2.3 Otoimmün Hastalıklar

Sağlıklı bir bağışıklık sistemi; vücudun kendi hücreleri ile vücuda giren yabancı hücreleri ayırt etme konusunda olağanüstü yeteneğe sahiptir. Ancak bazen bağışıklık sisteminde meydana gelen aksaklıklar nedeniyle vücut kendi hücre veya dokularını “yabancı” olarak algılayarak onları yok etmeye çalışır. Enflamasyona sebep olan, doku ve organlara zarar veren bu tip hastalıklara *otoimmün hastalıklar* denilmektedir. Organa özgü veya organa özgü olamayan olmak üzere iki farklı tipte ortaya çıkan otoimmün hastalıklar tek bir dokuyla sınırlı kalabildiği gibi, birçok dokuya aynı anda zarar verebilir. Otoimmün hastalıkların; Akut dissemine ensefalomyelit, aplastik anemi, çölyak hastalığı, Hashimoto tiroidi, Guillain Barre sendromu (GBS), Lambert-Eatonmiyastenik sendromu (LEMS), multiple skleroz (MS), romatoidartrit, Sjögren sendromu, Tip 1 diyabet, üveit, vitiligo, ülseratif kolit, pernisiyoz anemi, toksik guatr, Addison hastalığı, Sistemik Lupus Eritematosus (SLE) gibi birçok farklı çeşidi bulunmaktadır. Otoimmün hastalıklara genetik yatkınlığın yanında; yaş, cinsiyet, yaşanılan bölge, kullanılan ilaçlar, hormonlar, beslenme gibi farklı etkenler de sebep olabilmektedir.

Otoimmün hastalıkların her birinin kendine özgü teşhis yöntemleri olsa da; hastalığın sınıflandırılmasında ve alt gruplarının belirlenmesinde; klinik tablonun yanında hastanın

otoantikör seviyesi de takip edilmektedir. Otoantikörlerin laboratuvar tanısı immüno kimyasal ve immüno metrik metodlar ile yapılmaktadır. İmmünokimyasal metodlar ile otoantikörlerin varlığını ya da yokluğunu tanımlayan kantitatif değerlendirmeler yapıldığı gibi; genellikle ELISA gibi immüno metrik metodlar ile otoantikör konsantrasyonlarının kantitatif ölçümü yapılmaktadır.

Günümüzde kanser ve kalp-damar hastalıklarından sonra; ölüme sebebiyet veren hastalıklar sıralamasında otoimmün hastalıklar üçüncü sırada yer almaktadır. Bu tez çalışmasında otoimmün hastalıklar (özellikle MS, romatoid artrit, Sjögren sendromu, sistematik lupus eritematozis (SLE)) sırasında kanda ve BOS'ta miktarı artan IgG tayinine yönelik immünosensörler tasarlanmıştır.

2.3.1 Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)

BOS, beyin koroidpleksusu tarafından üretilen, renksiz bir sıvıdır. Beyin ve omurilik için mekanik ve immünolojik koruma sağlayan bu sıvının toplam hacmi yetişkinlerde 140-170 mL kadardır. BOS'un protein içeriğinin %80'inden fazlası plazmanın ultra filtratından kaynaklanır ve prealbumin, albümin ve transferin gibi küçük moleküler ağırlıklı proteinler yönünden zengindir. Plazma lipidlerini içermeyen BOS'un pH'ı kan pH'ına yakındır.

BOS örneği genellikle lomber ponksiyon ile elde edilir. BOS analizi; subaraknoid kanamaları ile beyin ve omurilik zarlarını tutan iltihabi hastalıkların tanısının koyulmasında önemli yer tutar. Alınan BOS örneğinin gözle muayenesi, bakteriyolojik ve sitolojik incelemesi ile biyokimyasal analizleri yapılır.

BOS normalde su berraklığında ve renksiz bir sıvıdır. BOS'un bulanık görünmesi, protein ve lipid konsantrasyonundaki artışa ya da enfeksiyona bağlı olabilir. BOS'un görünümü bazen pembe, turuncu veya sarı olabilir. BOS'un rengindeki bu değişim ksantokromi olarak adlandırılır. Ksantokromi genellikle eritrosit yıkımından kaynaklanır ve BOS dolaşımını bozan tümörün, eski beyin kanamasının, indirekt

bilirubin düzeyinde artışın habercisidir. Bakteriyel menenjitte BOS hafif bulanık ve iltihaplıdır.

BOS'ta en sık yapılan biyokimyasal test, protein tayinidir. BOS normal koşullarda çok az protein içerir ve bunun %80'inden fazlası plazmadan kaynaklanır. BOS proteinlerinin çoğunu albümin oluşturur. Serum proteinlerinin BOS proteinlerine oranı 200:1'dir. BOS proteini için normal değer 15-45 mg/dL'dir. BOS'ta protein düzeylerinin artması kan beyin bariyeri hasarı, merkezi sinir sisteminde immünoglobulin sentezinin artması veya sinir dokusu dejenerasyonuna bağlı olabilir.

Otoimmün hastalıkların teşhisinde serum ve BOS'ta bulunan IgG'nin; serum ve BOS'taki albümine oranı kullanılarak hesaplanan IgG indeksi önem arz etmektedir.

$$\text{IgG indeksi} = \frac{\text{IgG(BOS)} / \text{IgG(serum)}}{\text{Albümin(BOS)} / \text{Albümin(serum)}}$$

Yukarıdaki formül kullanılarak hesaplanan IgG indeksi 0.7'den büyükse kişide otoimmün hastalık varlığı ya da kan beyin bariyeri hasarından şüphelenilir.

2.4 Elektrokimya

Elektrokimya, maddenin elektrik enerjisi ile etkileşimini ve bu etkileşim sonucunda gerçekleşen kimyasal dönüşümler ile fiziksel değişimleri inceleyen bilim dalıdır. Elektrokimyasal hücre adı verilen bir hücrede yürütülen elektrokimyasal tepkimeler reaksiyonun elektron transferi veya elektron geçişi şeklinde gerçekleştiği yükseltgenme-indirgenme (redoks) türü tepkimelerdir. Reaksiyonların hızları, mekanizmaları ve elektrot-analit arasındaki elektron transfer süreçleri üzerinde araştırma olanağı sağlayan elektrokimya aynı zamanda kimyasal enerjinin elektrik enerjisine dönüşümünü de inceler (Fisher 1996). Elektrot yüzeyinin yapısı, kullanılan çözeltilerdeki türler ve

aktiviteleri, uygulanan potansiyel gibi faktörler yük transfer prosesinin gerçekleştiği hızı değiştirerek reaksiyon dinamiklerini etkilediği için bu faktörler iyi analiz edilmelidir.

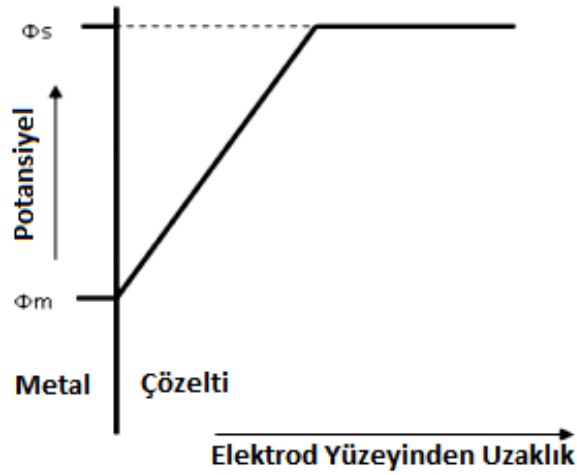
Örneğin; metalik bir elektrot (*m*) çözelti (*aq*) içerisindeki reaktant molekülleri gibi bir elektron kaynağına konursa elektrot/çözelti ara-yüzeyinde bir yük transferi gerçekleşecektir.



Bu reaksiyon bir süre sonra dengeye ulaşır ve elektrot/çözelti ara-yüzeyindeki elektron transferi iki faz arasında potansiyel farkı yaratarak net bir yük ayrımı ile sonuçlanır (Fisher 1996). Elektrot/çözelti ara-yüzeyindeki potansiyel düşüşü $\Delta\varphi_{m/s}$:

$$\Delta\varphi_{m/s} = \varphi_m - \varphi_s \quad (2.4)$$

φ_m metal potansiyeli ve φ_s ise çözelti potansiyelidir. Şekil 2.7’de Elektrot/çözelti ara-yüzeyindeki potansiyel değişimi gösterilmiştir (Derkuş 2012).



Şekil 2.7 Elektrot/çözelti ara-yüzeyinde potansiyel değişimi

2.4.1 Elektriksel çift tabaka

İki faz arasında potansiyel farkı oluşturan yük transfer ayrımı, paralel kapasitörler arasında biriken yükler gibi düşünülebilir. Polarizasyon potansiyelinin uygulanması ile elektrot yüzeyindeki yük kontrol edilebilir. Elektrot yüzeyinde, spesifik adsorpsiyonla stern tabakası içine girerek yüzey potansiyelini değiştirebilen iyonlara “potansiyel belirleyen iyonlar” denir. Potansiyel belirleyen iyonlar her sistem için farklılık göstermektedir. Bu iyonlar; katıyı oluşturan iyonlar, çözünebilir metaller, yüzey iyonları, hidrojen iyonları, hidroksil iyonları ve yüzey iyonları ile kompleks oluşturabilen iyonları içermektedir. Bazı iyonlar elektrostatik çekim kuvvetine ek olarak yüzey aktivitesi de gösterirler. Kovalent bağlar, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler gibi etkilerden dolayı stern tabakasında kuvvetli bir şekilde absorplanan iyonlar elektrot yüzeyinde yüksek konsantrasyonda bulunur (Shaw 1970, Fuerstnau vd.1984, Fuerstnau ve Chander 1985). Elektrot yüzeyinde yüksek konsantrasyonda bulunan iyonlar, dengeleyici iyonların varlığı ile yüzeyden uzaklaştıkça belli bir mesafeden sonra çözelti içerisinde normal konsantrasyona ulaşırlar. Kimyasal dengeye ulaşıldığında elektrot yüzeyindeki elektrik yükü ile dağılmış halde bulunan iyonların oluşturduğu elektrik yükü dengelenmiş olur. Böylece kondansatörün ters elektrik yüklü levhalarına benzeyen, elektriksel olarak nötr; fakat çözeltiye göre bir potansiyel farkı olan elektriksel çift tabaka oluşmaktadır.

Elektriksel çift tabakayı açıklayan ilk modeli, *Helmholtz* ve *Perrin* tarafından ortaya atılmıştır. Bu modele göre elektrot yüzeyindeki fazla yük, çözeltideki tek tabaka halinde bulunan karşıt yükler tarafından nötralize edilir. Yüklerin elektrostatik güç ya da çözeltideki dipollerin yeniden düzenlenmesi ile yeniden dağılımı, elektriksel olarak nötral bir yüzeyin oluşmasını sağlar.

$$q_m = - q_s \quad (2.5)$$

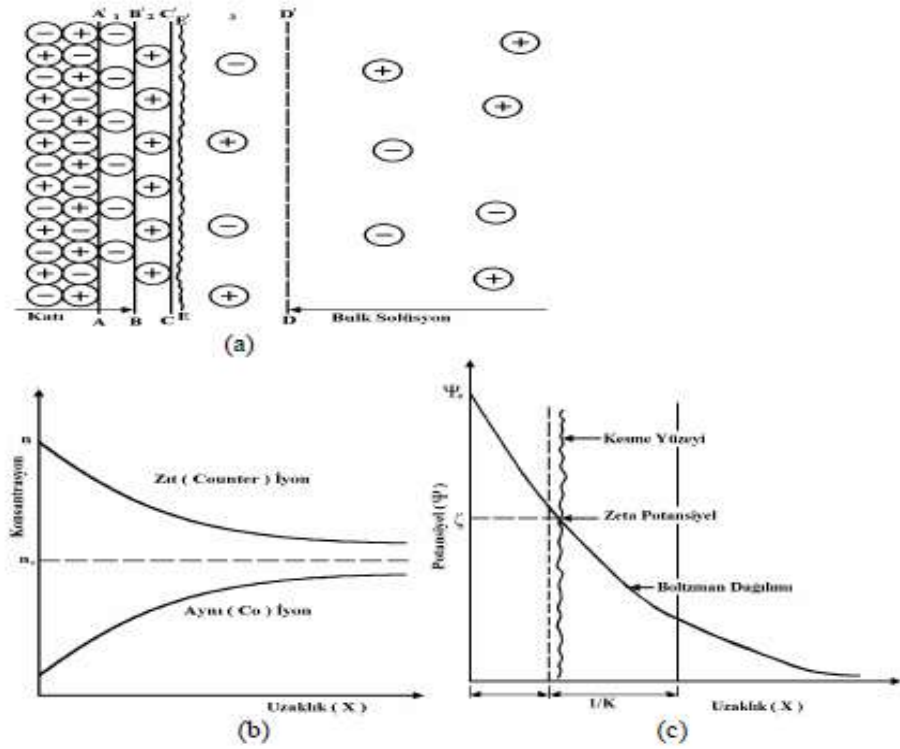
q_m metal yüzey üzerindeki yük yoğunluğunu; $-q_s$ ise mono moleküler çözelti tabakasının yük yoğunluğunu göstermektedir. *Helmholtz*, elektrot ile çözeltideki iyonlar arasında solvasyon tek tabakasının olabileceğini, böylelikle elektrot tarafından çekilen

elektronların ara-yüzeye, bu iyonların solvasyon kabukları tarafından sınırlanan bir mesafeye kadar yaklaşabileceklerini farz etmiştir. Elektriksel potansiyel, yüklü yüzeyden çok kısa bir mesafede lineer olarak hızla sıfıra inmektedir. Bu nedenle, iyonların yeniden-düzenlenmesi ile oluşan potansiyel düşüşü lineerdir ve yalnızca Dış Helmholtz Tabakası (Outer Helmholtz Plane, OHP) denilen, elektrot yüzeyi ile bu tek-tabaka arasındaki bölgede gözlenir.



Şekil 2.8 Helmholtz çift tabaka modeli ve elektrot potansiyelinin lineer olarak sıfıra inmesi

Gouy ve Chapman 1910 yılında yaptıkları bağımsız çalışmada *Helmholtz*'un çift tabaka kuramına iyonların Brown hareketini de ekleyerek yeni bir görüş öne sürmüşlerdir. Elektriksel çift tabakadan birincisi, adsorplanmanın olduğu iç tabakadır; ikincisi ise, iyonik hareketlerin söz konusu olduğu difüzyon tabakasıdır. Difüzyon tabakası gelişmiş termik hareketler yanında, elektriksel kuvvetlerden de etkilenmektedir. Difüzyon tabakasındaki elektriksel yük dağılımı, *Gouy ve Chapman*'a göre Boltzmann dağılımına uymaktadır. Şekil 2.9.b'de yüzeyde adsorplanan iyon ile benzer ve zıt özellik gösteren iyonların yüzeyden olan uzaklıklarına göre konsantrasyon değişimi gösterilmektedir. Adsorplanmanın olduğu tabaka, sabit (hareketsiz) olarak düşünülmektedir. Bu teori, aşağıdaki kabul ve modele dayanır (Shaw 1970, Fuerstnau ve Chander 1985, Atalay 1986, Leja 1983, Uçar 1983, Uçar 2004, Cebe 1987, Koçak 2008).



Şekil 2.9 Gouy-Chapman elektriksel çift tabaka modeli (Uçar 2004)

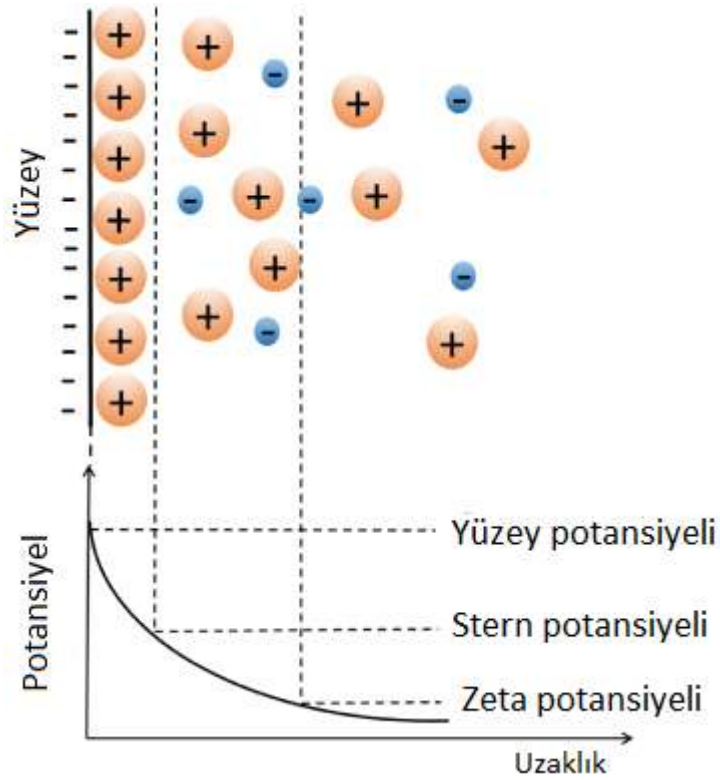
- Yüzeydeki elektrik yükü ve denge iyonları
- İyon konsantrasyonunun yüzeyden uzaklığa göre değişimi
- Yüzeyden uzaklığa göre potansiyelin değişimi

Stern ise, *Helmholtz-Perrin* modeli ile *Gouy-Chapman* modelini birleştirmiştir. Stern'in önerdiği bu yeni elektriksel çift tabaka modeli iki katmandan oluşmaktadır:

- Yüklü yüzeye yakın mesafede adsorbe olmuş ve kuvvetli bir şekilde yüzeyde tutulan zıt yüklü iyon tabakası.
- Gouy-Chapman*'ın dağılmış iyonlar tabakası modelindeki gibi zıt iyonlardan oluşan dağılmış iyonlar tabakası.

Bu iki katmanı Stern tabakası adını verdiği hayali bir tabaka ile ayırmıştır ve bu tabakanın yüzeye olan uzaklığı yaklaşık olarak hidrasyona uğramış bir iyon yarıçapı

kadardır. Bu teoriye göre elektriksel potansiyel, çift tabakanın sabit parçasında hızla lineer olarak, difüz parçada ise derece derece düşer, yani *Gouy-Chapman* modelinde olduğu gibi belirgin bir potansiyel düşüşü gözlenmez.

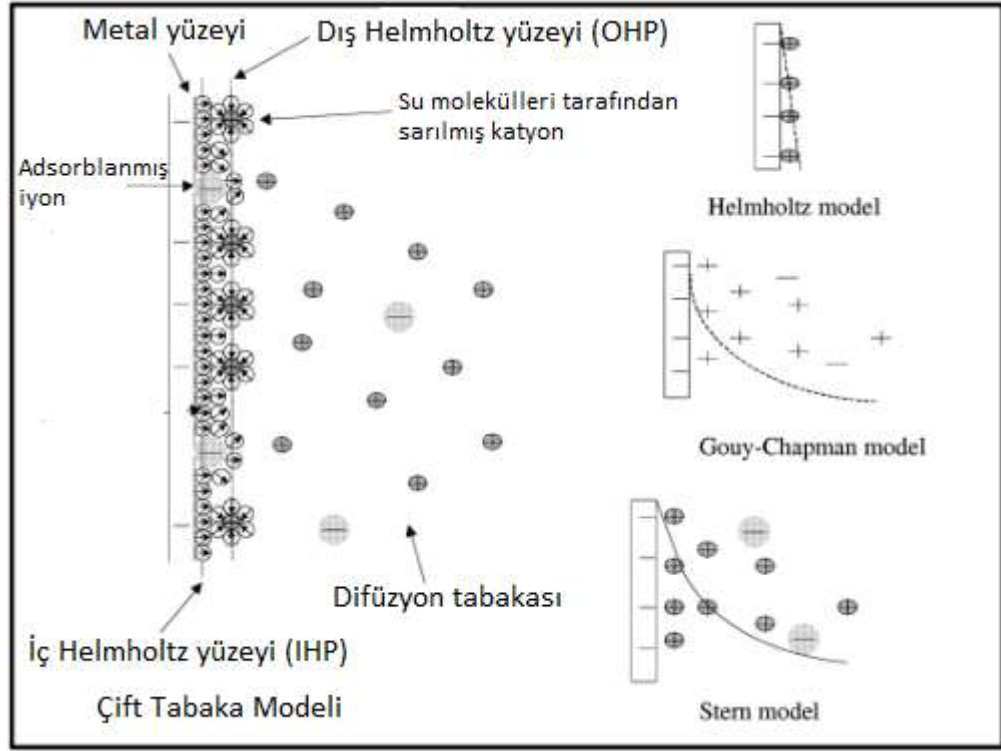


Şekil 2.10 Stern elektriksel çift tabaka modeli

İyonlar bir miktar suyu yüzeylerine bağlayarak hidrasyona uğruyorsa, elektrot yüzeyi de bir miktar suyu yüzeyine bağlayarak ‘kayma yüzeyini’ oluşturmaktadır. Stern yüzeyine çok yakın olan kayma yüzeyi sabit değildir. Etrafı su ile çevrili iyonlar elektrot yüzeyine çok fazla yaklaşamaz. Bu nedenle yüzey potansiyeli stern tabakasına kadar lineer olarak Stern potansiyele düşerken, daha sonra azalan konsantrasyonla birlikte stern potansiyel de sıfıra düşer.

Bunlara ek olarak, Stern, katı yüzeyinden d uzaklıkta bileşik çift tabakanın Helmholtz kısmı ile iyonların spesifik adsorpsiyonu kavramını açıklamıştır. Spesifik adsorplanmış ve hidrasyona uğramamış bu iyonlar tabakası “İç Helmholtz yüzeyi” (Inner Helmholtz Plane, IHP) olarak bilinir. Hidrasyona uğrayan iyonlar d mesafede

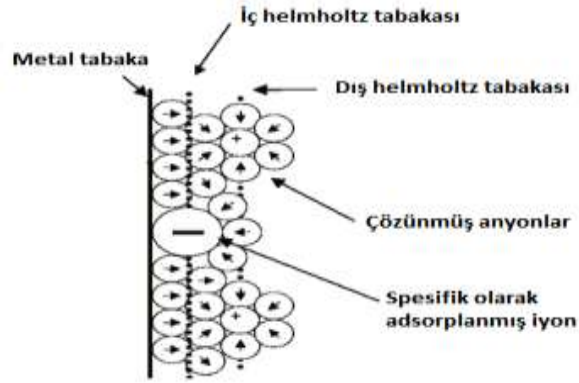
elektrostatik veya Van der Waals kuvvetlerinin ya da hidrofobik ilişkinin etkisiyle yüzeye adsorbe olurlar. Bu ise “Dış Helmholtz yüzeyi” (Outer Helmholtz Plane, OHP) olarak bilinir (Leja1983).



Şekil 2.11 Çift tabaka modeli ve Helmholtz, Gouy-Chapman, Stern tarafından yorumlanması

1947 yılında *Grahame*, çözünemeyen ya da solvasyon kabuğunu kaybetmiş bir iyonun çözünebilen bir iyonla göre, elektrot yüzeyine daha fazla yaklaşabileceğini göstererek Stern’in öne sürdüğü modeli geliştirmiştir. Dolayısıyla elektrot yüzeyi ile direkt olarak temasta olan iyonlar spesifik olarak adsorplanır ve İç Helmholtz Tabakasını (Inner Helmholtz Plane, IHP) oluşturur. Diğer taraftan çözünen iyonlar non-spesifik olarak adsorplanır ve OHP bölgesini oluşturur (Derkuş 2012).

Son olarak 1963’te *Bochris, Devanathan ve Muller* çözücü olarak suyu model olarak bir görüş ileri sürmüşlerdir (BDM modeli). Su moleküllerinin dipollerinin elektrot yüzeyine olan yakınlıkları nedeniyle sabitlenmiş bir sırada olduğunu kabul eden bu model günümüzde de geçerliliğini koruyan ve elektriksel çift tabakayı tanımlayan modeldir.



Şekil 2.12 BDM modelin şematik gösterimi

2.4.2 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi elektrot-çözelti ara yüzünün incelenmesinde, kütle transfer oranlarının ölçülmesinde ve elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonların incelenmesinde kullanılan bir ölçüm tekniğidir. Bir başka deyişle; temelinde elektriksel devre bileşenlerinin bulunduğu, son derece duyarlı elektrokimyasal bir yöntemdir (Bard ve Faulkner 2001). Elektrot kinetiği, korozyon çalışmaları, katı faz elektrokimyası, biyoelektrokimya gibi birçok farklı alanda kullanılan impedans ölçüm metotlarının temeli 1886 yılında Oliver Heaviside tarafından yapılan çalışmalara kadar dayanmaktadır (Josephs 1971). Yapılan elektrokimyasal hücre temelli çalışmaların hepsinde bir devre oluşturulmaktadır. Eşdeğer devre kullanılarak deneysel spektrumlar, ilgili teorik eğrilere rahatlıkla oturtulabilmekte ve elektriksel parametre verileri elde edilebilmektedir. Direnç, kapasitans ve karmaşık impedans elemanlarını içeren bu devrelerin sisteme uygulanması, elektriksel hücre içeriğinin anlaşılabilmesi için oldukça önemlidir. Sisteme uygulanan sinyal ile alınan tepkinin orantılı olduğu bu sistemlerde devrelerin mümkün olduğunca basit ve anlaşılabilir şekilde oluşturulması önemlidir (Yuan vd.2010).

Önceki bölümde anlatıldığı gibi elektrot-çözelti ara yüzünde gerçekleşen etkileşimi açıklayan elektriksel çift tabaka; çözeltideki iyonların biriktiği bölgedir. Yani burada oluşan ara yüzey yükleri depolar ve kapasitör gibi davranır. Paralel basit bir kapasitörün bütünleşik kapasitansı (2.6) eşitliğinde görüldüğü gibidir:

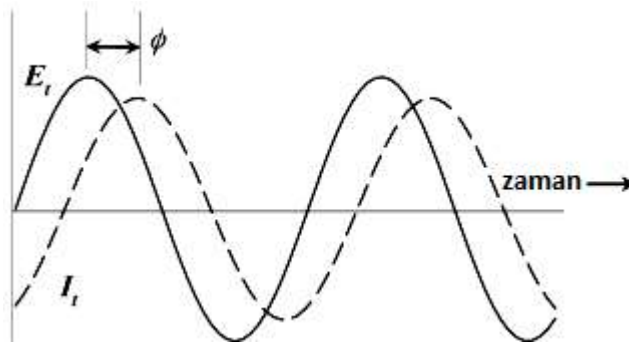
$$C = q/E \quad (2.6)$$

Burada; q , kapasitör düzlemleri arasına E potansiyel farkı uygulandığı durumdaki yük miktarını göstermektedir. Elektrokimyasal hücrelerde çift tabakanın kalınlığı, uygulanan potansiyel farkı ile orantılıdır. Bu değişken kapasitans değeri, alternatif akım impedans spektroskopisi (Alternating current Impedance spectroscopy, AC-Impedance Spectroscopy) ile ölçülebilmektedir. Bu yöntem ile elektrokimyasal hücreye sinüsoidal sinyal pertürbasyonları uygulanır ve farklı elektrokimyasal süreçlere karşı oluşan akım analizlenir (Derkuş 2012).

EI genelde elektrokimyasal hücreye AC potansiyeli uygulanarak ve hücreden geçen akım belirlenerek ölçülür. Uygulanan sinüsoidal pertürbasyon E_t eşitlik (2.7)'de verildiği gibidir:

$$E_t = E_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (2.7)$$

E_t , t anındaki potansiyel; E_0 , sinyal genliği ve $\omega = 2\pi f$ açısal frekanstır (f frekans, Hertz). Bu potansiyele karşı oluşan cevap, potansiyel ile aynı frekansta fakat farklı genlik ve faz açısına sahip zaman bağımlı bir AC akım sinyalidir. İmpedimetrik sisteme uygulanan sinüsoidal uyarı ve alınan cevap grafiği şekil 2.13'te gösterilmiştir.



Şekil 2.13 İmpedimetrik sisteme uygulanan sinüsoidal uyarı ve alınan cevap

$$I_t = I_0 \cdot \sin(\omega t + \phi) \quad (2.8)$$

Elektrokimyasal çift tabaka yukarıdaki eşitliğe (2.8) bir kapasitif devre elemanı eklemektedir. Diğer elektrot prosesi de zamana bağlı difüzyondur. Bu nedenle direnç yerine impedans kullanılmaktadır. Sistemde zamanla değişen alternatif akım kullanıldığından frekans ölçümü sistemin ana teması olarak ele alınır. Bunun sonucunda elde edilen impedans Ohm yasasına benzetilmeye çalışılırsa eşitlik (2.9) elde edilir:

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 (\sin(\omega t + \Phi))} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \Phi)} \quad (2.9)$$

Yukarıdaki eşitlikte (2.9) Z impedansı, E potansiyeli, I akımı; t zamanının fonksiyonunu göstermektedir. AC akım sinüsoidal bir karakter gösterdiğinden akım ile potansiyel arasındaki zamana bağlı fark sinüs fonksiyonu ile açıklanır. Buna göre sistem AC impedansını ölçmekte, böylelikle alternatif akım impedans spektroskopisi (Alternating current impedance spectroscopy, AC-Impedance Spectroscopy) adını almaktadır. Bu eşitlikten impedansın genlik (Z_0) ve faz kayması (Φ)'na bağlı olarak türetildiği görülebilir. Bu, impedansın bir vektör gibi değerlendirilebilmesine olanak sağlar. Sadece R direncinden oluşmuş basit bir sisteme ohm yasası uygulanırsa, akım ve uygulanan potansiyel arasında eşitlik (2.10) da görülen denklem elde edilir:

$$i = E/R \quad (2.10)$$

Burada faz açısı sıfırdır. Kapasitör için de aynı ilişki kurulabilir:

$$i = (\Delta E/X_c) \cdot \sin(\omega t + \pi/2) \quad (2.11)$$

R yerine X_c (kapasitif rezistans) konur; faz açısı $\pi/2$ 'dir. (2.12) da verilen eşitlikte J değeri ($\sqrt{-1}$) yerine konursa kompleks düzelmede sinüsoidal cevap elde edilir.

$$E = -jX_c i \quad (2.12)$$

Bir kapasitör ve rezistörün seri bağlanmış durumu için toplam potansiyel düşmesi, her bir elementin toplanmasıyla (2.13) ve (2.14) eşitlikleri elde edilir.

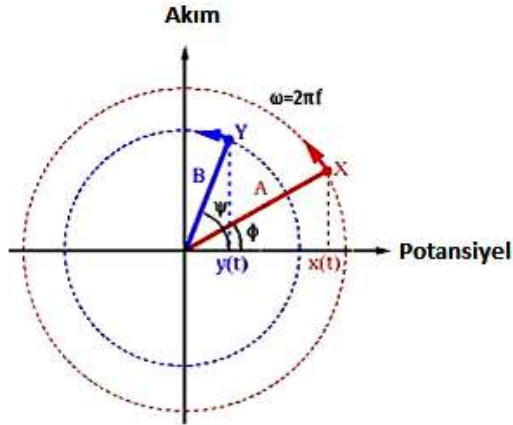
$$E = E_R + E_C = i (R - jX_C) \quad (2.13)$$

$$E = \dot{I}Z \quad (2.14)$$

Eşitlik (2.14) de görülen Z impedansı verir. İmpedans, devre tarafından önlenen akım göçünün ölçülebilmesini sağlar. Bu durumdan sonra akım, voltaj ile 90° 'lik faz açısı yapmayacaktır. Faz açısı:

$$\tan\phi = X_C/R = 1/\omega RC \quad (2.15)$$

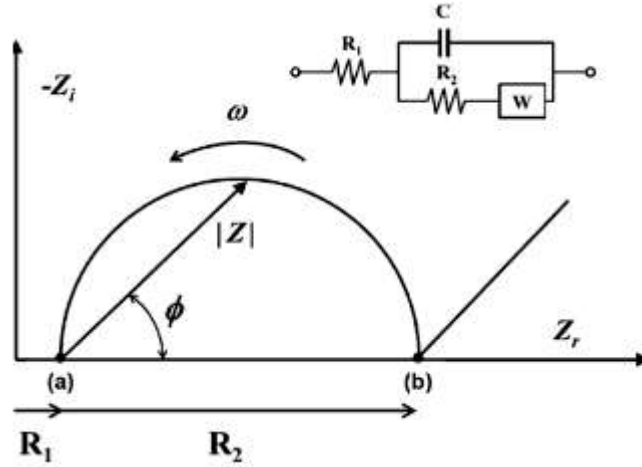
R ve $-jX_C$ aynı zamanda gerçekte ve sanal impedans olarak Z' ve Z'' şeklinde de gösterilebilir. Z ise gerçekte ve sanal impedansın toplamıdır. Meydana gelen akım da aynı frekansta salınım yapıyorsa da voltajdan farklı genlik ve açıdadır. Bu süreç, dönen bir vektör (rotating vector) üzerinde ya da kompleks bir düzlemde fazör üzerinde (Armand diyagramı) gösterilebilir:



Şekil 2.14 ϕ faz açısı ile ayrılmış ve akım-potansiyel değişimini gösteren fazör

$$Z = Z_r + jZ_i \quad (2.16)$$

Bu yöntemde faz-İçi bileşen (Z_r) sistemin direnci ile ilgiliyken faz-dışı bileşen (Z_i) daha çok yalıtkan tabakaların oluşumu ile ilgilidir. Farklı birçok grafik arasından impedimetrik verilerin gösterimi için en fazla sanal impedansın gerçekte impedansa karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen Nyquist Grafiği kullanılmaktadır. Bu grafikteki her bir nokta farklı bir frekans değerine aittir.



Şekil 2.15 Tipik bir Nyquist impedans spektrum grafiği

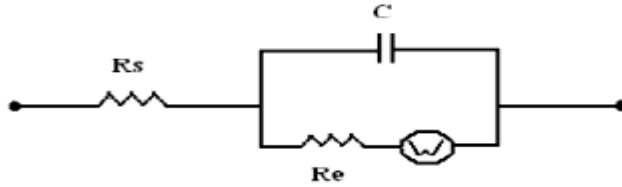
Yukarıdaki impedans eğrisine bakıldığında bir frekans taraması söz konusudur. Bu impedans spektrum profili R_1 direncine (a) ait değerle başlayan ve (b) değeriyle biten, toplamı $R_1 + R_2$ olan bir yarım daire şeklindedir. R_1 değeri çözelti direncini gösterirken R_2 direnci yük transfer direncini (R_{ct}) göstermektedir. İmpedimetrik ölçümlerin ilk anlarında yüksek frekans (düşük enerji) pertürbasyonları uygulanarak çözelti direnci ölçülür. Daha sonra frekans azalır, enerji yavaş yavaş artar ve tarama bölgesi elektrot yüzeyine doğru kayar. Bu kısımda direnç en fazla olduğu için Nyquist grafiklerde kapasitif direnç en üst değerlerde gözlenir. Frekans azaldıkça direncin artışı gözlenmiştir ve bir noktadan sonra impedans eğrisi düz bir eğri halini almıştır. Frekans en düşük, enerji en yüksek halini aldığı anda elektromanyetik dalgalar elektrot içerisine girerek Nyquist grafiğinde difüzyon olarak gözlenen doğrusal kısmı oluştururlar. Bu düz eğri Warburg impedansını göstermektedir (Uygun 2012, Derkuş 2012).

$$Z_w = \sigma(\omega)^{-1/2}(1 - j) \quad (2.17)$$

Eşitlik (2.17)'teki ω açısal frekans, σ ise Warburg katsayısıdır.

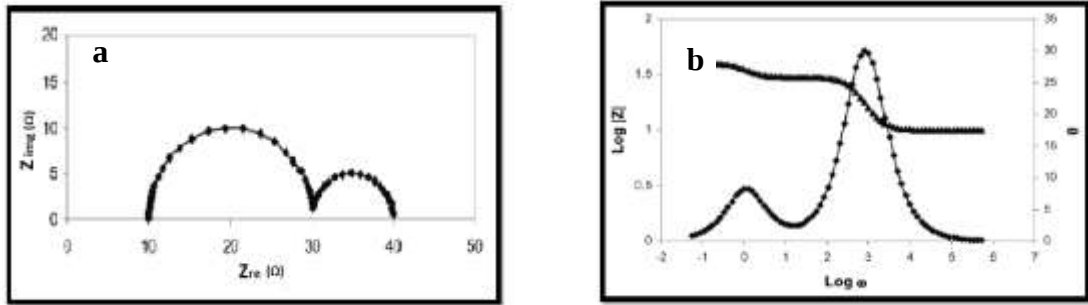
Devre çizilebilmesi, elde edilen impedans eğrisinin devre üzerine oturtulması için ara yüzey karakterizasyonunun doğru bir şekilde yapılması ve hangi tabakanın hangi devre elemanına karşılık geldiğinin iyi bilinmesi gerekmektedir. EIS'nde ara yüz

özelliklerinin incelenmesi Randles hücresi olarak tabir edilen elektrokimyasal hücrenin devre üzerine oturtulmasıyla yapılır. Şekil 2.16’da görülen Randles devresi elektrot yüzeyindeki çift tabakanın rezistörüne (R_e) paralel bağlanmış kapasitörden (C) ve onlara seri olarak bağlanmış çözelti direncinden meydana gelir. Warburg impedansı (W) ise elektroda frekans bağımlı difüzyon transportu göstermektedir.



Şekil 2.16 Randles devresi

Genellikle impedans spektrumları Nyquist ve Bode diyagramları olmak üzere iki farklı diyagramda kullanılmaktadır. Bu iki diyagramın ortak noktası impedansı frekansın fonksiyonu olarak sunmalarıdır. Nyquist diyagramı ölçüm alınan farklı frekanslardaki ölçümün her noktasında gerçel ve sanal değerlerine karşı frekans eğrisi oluşturmaktadır (Yuan vd.2010). Bode diyagramı ise impedans sonuçlarının alternatif bir sunumudur. Modül ve fazın $\log[Z]$ ile tanımlanması ile çizilir. Bode normalde frekansın logaritmik karşılığıdır bu nedenle her onlu ölçümde aynı numaraları gösterir (Yuan vd.2010). Bode grafiğinde ölçümler uzun zaman almaz, düşük frekanslarda polarizasyon direnci (R_p) belirlenebilir. Her iki diyagramda yüksek frekanstan düşük frekansa doğru bir tarama gerçekleştirir. Bu sayede başlangıç direnci bulunabilmektedir. Deneysel verilere göre hangi diyagramın kullanılacağı belirlenir, eğer deneysel veriler dağınık ise Bode Diyagramı, tam yarım daire şeklinde ise Nyquist Diyagramı tercih edilir.



Şekil 2.17 Nyquist ve Bode diyagramları (Uygun 2012)

a. Nyquist diyagramı b. Bode diyagramı

2.4.3 Dönüşümlü Voltametri (Cyclic Voltammetry, CV)

Voltametri, Volt–amperometri kelimesinden türetilmiş olup, elektrokimyasal hücreye uygulanan potansiyel sonucu, hücrede gerçekleşen kimyasal değişimin sebep olduğu akımın ölçüldüğü tekniklerin genel adıdır. Elde edilen akım–potansiyel eğrisine *voltamogram* adı verilmektedir. Voltametri deneyleri üçlü elektrot sisteminde gerçekleştirilir. Potansiyeli değişen elektrot, çalışma elektrotu adını alır. Çalışma elektrotu; incelenen elektrokimyasal olayın gerçekleştiği elektrottur ve işlevi elektrokimyasal ölçüm bölgesini oluşturmaktır. Çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesinden dolayı oluşan akıma *katodik akım*, yükseltgenmesinden dolayı oluşan akıma *anodik akım* denir. Bu elektrotlar amaca bağlı olarak soy (inert) veya soy olmayan metallerden seçilebilir. Voltametride çalışma elektrotu olarak civa, platin, altın, paladyum, karbon elektrot (grafit, karbon pasta elektrot, camı karbon, karbon cloth elektrot) gibi elektrotlar yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kullanılan ikinci elektrot potansiyeli deney süresince sabit kalan referans elektrottur. Bu elektrot polarizlenmeyen elektrot olarak da tanımlanır. Referans elektrotun potansiyeli yeterince sabit olup, pil hücresinde potansiyeli ölçülen diğer elektrotlara kıyasla bir karşılaştırma görevi görür. Yeterince sabit teriminden kasıt, potansiyelindeki değişimin; akım, zaman ve değişkenlerdeki değişimlerden minimum ölçüde etkilenmesidir. Bu elektrotlar genel olarak ikinci türden metalik elektrotlar olarak bilinirler. Referans elektrot olarak Ag/Ag^+ , $Ag/AgCl$, SHE ve SCE yaygın şekilde kullanılır.

Kullanılan üçüncü elektrot yardımcı elektrottur. Karşıt elektrotta denilen bu elektrodun görevi elektronlar için kaynak ve havuz oluşturmak, böylece pilden akımın geçmesini sağlamaktır. Soy metallerden seçilen karşıt elektrodun potansiyeli genellikle ölçülmez. En sık kullanılan karşıt elektrot platin (Pt) elektrottur.

Denge halindeki elektrokimyasal hücreye; dışarıdan denge potansiyelinden farklı bir potansiyel uygulanırsa, sistem yeniden dengeye ulaşmaya çalışır ve bu sırada bir elektrot tepkimesi olur, yani devreden akım geçer. Voltametrik hücrede yer alan ve alanı

çok küçük olan bir mikro çalışma elektrodu ile bir karşılaştırma elektrodu arasına uygulanan ve değeri zamanla değiştirilen potansiyele karşı, çalışma elektrodu ile karşı elektrot (iki elektrotlu hücrelerde çalışma elektrodu ile referans elektrot) arasındaki akım ölçülür. Elektrot yüzeyinde oluşan akım, birim yüzeye gelen madde miktarı ile orantılıdır. Akım eşitlik (2.18) de görüldüğü şekilde hesaplanır.

$$i = nFAq(0,t) \quad (2.18)$$

Bu eşitlikte $q(0,t)$; elektrodun birim yüzeyine t anında gelen madde miktarıdır. Fick kanunları olarak ifade edilen diferansiyel denklemlerin, genişleyen küresel elektrot için çözülüp, q değerinin yukarıdaki (2.18) eşitliğinde yerine konulmasıyla İlkoğlu eşitliği (2.19) elde edilir:

$$i_d = 0,732nFCD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6} \quad (2.19)$$

Bu eşitlikte (2.19) terimlerin açıklamaları aşağıdaki gibidir.

i : akım (A)

n : aktarılan elektron sayısı, mol (e^- /mol)

F : Faraday sabiti (mol/mol e^-)

C : ana çözeltideki elektroaktif madde konsantrasyonu (mol/cm³)

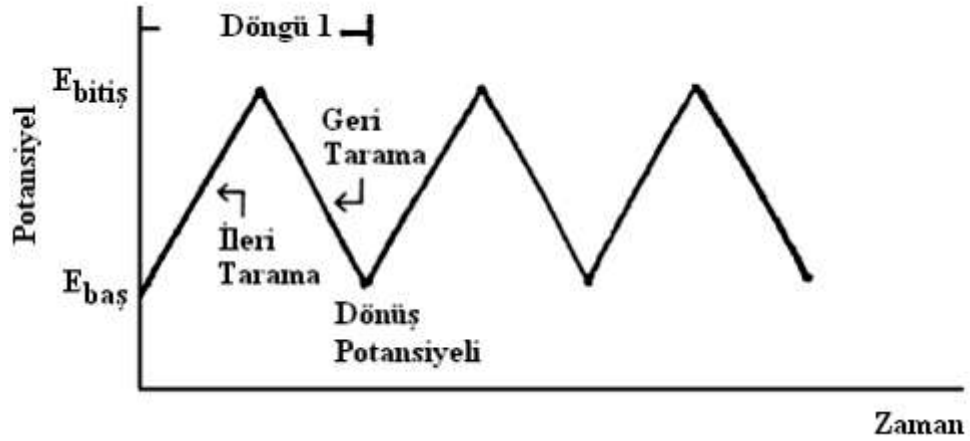
D : difüzyon katsayısı (cm²/s)

m : akış hızı (g/s)

t : zaman (saniye (s))

Dönüşümlü voltametri tekniği elektrokimyasal teknikler içinde en sık kullanılan tekniktir. Bu teknikte potansiyel, zamanla doğrusal olarak değiştirilir. Uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği şekil 2.18’de verilmiştir. Potansiyel taraması bir E_1 başlangıç potansiyeli ve E_2 potansiyeli arasında yapılırsa metot doğrusal taramalı voltametri adını alır (LSV). Eğer E_2 potansiyeline ulaşıldıktan sonra aynı tarama hızıyla ilk tarama yönüne göre ters yönde tarama yapılırsa metodun adı dönüşümlü voltametri olur. Ters taramada potansiyel E_1 ’de sonuçlanabileceği gibi farklı bir E_3 potansiyeline

de götürülebilir. İleri taramada indirgenme olmuşsa ters taramada yükseltgenme meydana gelir. LSV analitik çalışmalar için uygun bir metottur. Fakat elektrot mekanizmalarının incelenmesinde, adsorpsiyon olayının araştırılmasında ve kinetik çalışmalarda CV tekniği daha çok kullanılır (Derkuş 2012).



Şekil 2.18 Dönüşümlü voltametri tekniklerinde potansiyel taramasının zamanla değişimi

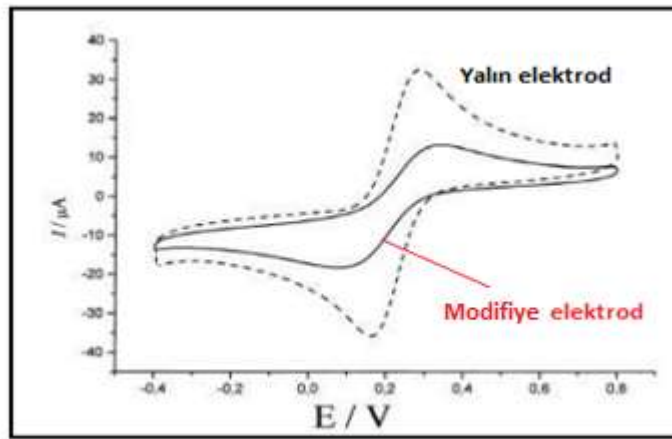
Elektroda hızlı bir potansiyel taraması uygulandığı zaman potansiyel, standart indirgenme potansiyeli değerine yaklaşıncaya madde indirgenmeye başlar. Potansiyel negatifleştikçe elektrot yüzeyindeki maddenin indirgenme hızı ve buna bağlı olarak da akım artar. İndirgenme hızı yeterince büyükse akımı, elektrot yüzeyine difüzyonla gelen madde miktarı kontrol eder. Zamanla difüzyon tabakası kalınlaşacağından difüzyon hızı azalır ve akım da azalmaya başlar. CV’de elde edilen pik akımının büyüklüğü elektroaktif maddenin konsantrasyonu, aktarılan elektron sayısı, elektrot yüzey alanı ve difüzyon katsayısı ile değişir.

Dönüşümlü voltametri tekniğinin avantajlarından birisi de yöntemin değişik tarama hızlarında uygulanabilmesidir. Böylece elektrot tepkimesi ile oluşan ara ürünlerin kararlılıkları ile ilgili konular belirlenebilmektedir. Ara ürünlerin yanı sıra adsorpsiyon, difüzyon ve elektron aktarım reaksiyonuna etki eden kimyasal reaksiyon olaylarını da belirlemek mümkündür (Derkuş 2012). Ayrıca tarama yönünün değiştirilmesi ile reaksiyon mekanizması ve kinetik veriler hakkında bilgi edinilebilir. Elektrot yüzeyinde

gerçekleştirilen modifikasyonların takibi de yine dönüşümlü voltametri tekniği yardımıyla yapılmaktadır.

Bu karakterizasyon tekniğinde çeşitli redoks problemlerin elektrokimyasal davranışlarından faydalanılır. Redoks problemler, yalın elektrot yüzeyinde tersinir ve çok yüksek hızda elektron transferi gerçekleştiren maddelerdir. Karakterizasyon sırasında modifiye elektrot yüzeyi ile yalın elektrot yüzey arasındaki farklar, çeşitli redoks problemler yardımı ile kolaylıkla anlaşılabilir. En çok kullanılan redoks problemlere bu tez çalışmasında kullanılan potasyum ferrosiyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$)'in yanı sıra dopamin, ferrosen, askorbik asit örnek gösterilebilir.

Bu redoks problemlerden birinin çözeltisi hazırlandıktan sonra uygun potansiyel aralığında önce çıplak elektrot çalışma elektrodu olarak kullanılarak, sonra da modifiye elektrot kullanılarak CV'si alınır. Bu voltamogramlar karşılaştırılarak modifiye edilmiş yüzeyin elektrokimyasal özellikleri belirlenebilir. Şekil 2.19'daki voltamogramlarda, yalın camsi karbon elektrot yüzeyinde $K_3(Fe(SNC))$ 'in elektron aktarımı oldukça hızlıyken (kesikli voltamogram), polimer modifiye edilmiş camsi karbon yüzeyinde (çizgisel voltamogram) ferriizosiyanatın elektron aktarım hızı kısmen bloke edilmiştir (Garcia vd. 2001).



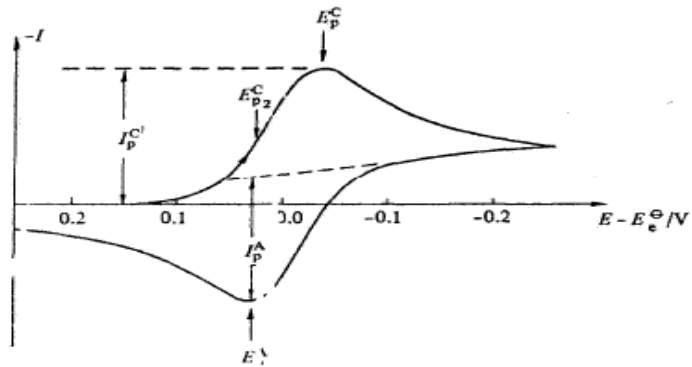
Şekil 2.19 $K_3(Fe(SNC))$ 'in yalın bir camsi karbon (GC) elektrot yüzeyinde (kesikli voltamogram) ve polimer ile modifiye edilmiş GC'de davranışı (Garcia vd.2001)

2.4.3.1 Tersinir reaksiyonların dönüşümlü voltamogramı

Elektrot reaksiyonu;



eşitlik (2.20)'de görüldüğü gibi ise, ve başlangıçta çözeltide yalnız O maddesi bulunuyor, ayrıca elektron aktarımı dışında herhangi bir kimyasal reaksiyon gerçekleşmiyor ve elektrot yüzeyinde adsorpsiyon olayı meydana gelmiyor ise $i-E$ grafiği pik şeklinde gözlenir ve tarama hızı arttıkça pik yüksekliği artar. Dönüşümlü voltametrde akımın maksimum olduğu noktadaki pik potansiyeli E_p olarak adlandırılır. Potansiyel taraması geriye doğru yapıldığında tarama hızlı ise elektrot yüzeyinde yeteri kadar R bulunacağından E_o değerinden itibaren daha pozitif potansiyellerde R yükseltgenmeye başlayacaktır. Bu nedenle ters taramada anodik pik oluşacaktır. Ters tarama esnasında; E_o değerine kadar O indirgenmeye yani R oluşmaya devam edecektir. Ters taramada potansiyel pozitifleştikçe, Nernst eşitliğine göre R yüzey konsantrasyonu azalacak ve yeteri kadar pozitif değerlerde sıfıra gidecektir. Ancak deney sırasında yüzeyde oluşan R, çözeltiye doğru difüzleneceğinden ters tarama akımı katodik akımdan biraz daha düşük olacaktır. Tersinir " $O + ne = R$ " reaksiyonunun CV voltamogramı şekil 2.20'de verilmiştir.



Şekil 2.20 Tersinir bir elektrot reaksiyonun dönüşümlü voltamogramı

Tersinir bir elektrot reaksiyonunun pik akımı 25°C sıcaklıkta aşağıdaki eşitlikle (2.21) gösterilir. Bu eşitliğe Randles – Sevcik eşitliği adı verilir.

$$(i_p)_{\text{ter}} = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_o^{1/2} C_o v^{1/2} \quad (2.21)$$

Bu eşitlikteki terimlerin anlamları aşağıdaki gibidir;

i_p : Pik akımı (A)

D_o : O türünün difüzyon katsayısı (cm^2/s)

v : Tarama hızı (V/s)

C_o : O türünün ana çözelti konsantrasyonu (mol/cm^3)

Tersinir durumda E_p tarama hızına bağlı değildir. Bir tersinir indirgenme reaksiyonunda E_p ile $E_{1/2}$ arasındaki ilişki (2.22) eşitliğindeki gibidir.

$$E_p = E_{1/2} - 1.1 \cdot \frac{RT}{nF} \quad (2.22)$$

CV tekniği ile sistemin tersinirlik testi yapılabilir. Bunun için sistemin bazı kriterlere uyması gerekmektedir (Greef vd. 1990). Bu kriterler şunlardır:

1. $i_p - v^{1/2}$ grafiği doğrusal olmalıdır.
2. $E_p^k - E_p^a = 59/n$ mV veya $E_p - E_{p/2} = 57/n$ mV olmalıdır.
3. E_p , tarama hızı ile değişmemelidir.
4. $i_p^a / i_p^k = 1$ olmalı ve bu oran tarama hızı ile değişmemelidir.
5. E_p 'ten daha negatif potansiyellerde akım, $t^{-1/2}$ ile orantılı olmalıdır.

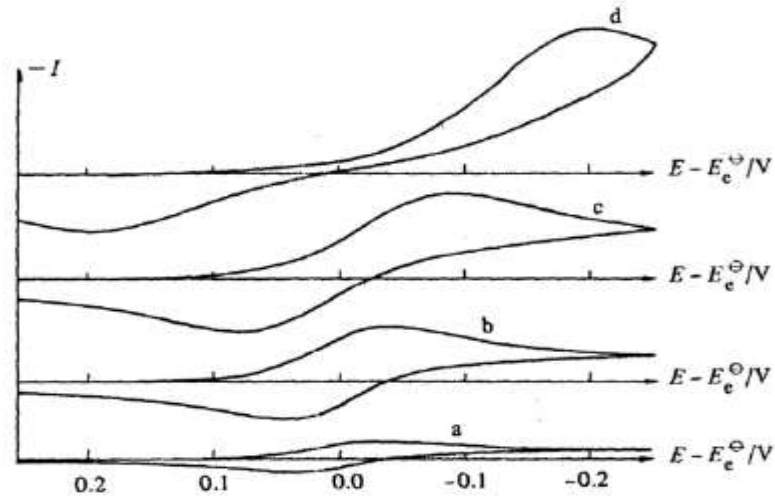
Bir sistemin tersinir olması için yukarıdaki kriterlerin hepsinin sağlanması gereklidir. Tersinir sistemlerde bütün potansiyellerde elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından büyük olduğu için elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerlidir.

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[R]}{[O]}$$

(2.23)

2.4.3.2 Tersinmez reaksiyonların dönüşümlü voltamogramı

Tersinmez sistemlerde elektron aktarım hızı yeteri kadar büyük olmadığından elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerli değildir. Bu durumda CV voltamogramının şekli, tersinir durumdan farklıdır. Tersinmez durumlarda tarama hızı çok düşük ise, elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından daha yüksektir ve sistem tersinir gibi gözlenebilir. Tarama hızı arttıkça kütle aktarım hızı elektron aktarım hızı ile aynı seviyeye gelir. Bu durum tarama hızı arttıkça anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması ile belli olur (Şekil 2.21). Tersinmez elektron aktarım reaksiyonlarında standart hız sabiti tersinir reaksiyonlardakine göre daha küçüktür. Tamamen tersinmez sistemlerde anodik pik gözlenmez. Anodik pik gözlenmeyişi her zaman sistemin tersinmez olduğunu ispatlamaz. Elektron aktarım basamağını takip eden çok hızlı kimyasal bir reaksiyon varlığında yani oluşan ürün, hızlı bir şekilde başka bir maddeye dönüştüğünde de anodik pik gözlenmeyebilir.



Şekil 2.21 Tersinmez bir elektrot reaksiyonunda CV ile farklı tarama hızlarında anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması (Turan vd. 2008)

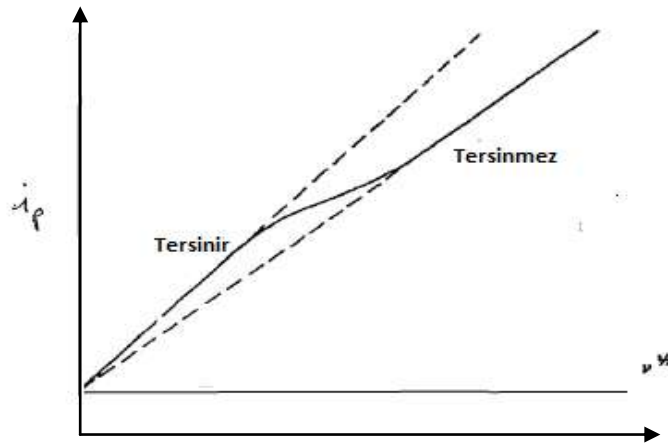
a. 0,13 V/s, b. 1,3 V/s, c. 4 V/s, d. 13 V/s

Dönüşümlü voltametri ile tersinmez bir reaksiyonun tanınma kriterleri (Greef vd.1990)

1. Anodik pik gözlenmez.
2. i_p^k , tarama hızının karekökü ile doğru orantılı olarak değişir.
3. E_p^k kayması tarama hızındaki 10 kat artmada $30/\alpha_c n_\alpha$ kadardır.
4. $|E_p - E_{p/2}| = 48/(\alpha_c n_\alpha)$ mV'dur.

2.4.3.3 Yarı-tersinir reaksiyonların dönüşümlü voltamogramı

Yarı tersinir reaksiyonlarda akım difüzyon hızı ve elektron aktarım hızı ile birlikte kontrol edilir. Tersinir, yarı tersinir ve tersinmez durumlar için akım, tarama hızının kareköküne karşı grafiğe geçirilirse şekil 2.22'deki gibi bir grafik elde edilir.



Şekil 2.22 Dönüşümlü voltametri de pik akımının tarama hızının karekökü ile değişimi

Dönüşümlü voltametri de bir reaksiyonun yarı tersinirlik kriterleri ise (Greef vd. 1990)

1. i_p , $v^{1/2}$ ile artar ancak doğrusal değildir.
2. E_p^k , tarama hızı ile değişir bu değişim genellikle tarama hızının artması ile negatif değerlere kayma yönündedir.
3. $i_p^a / i_p^k = 1$ olmalıdır. ($\alpha = 0,5$ ise)
4. $E_p^k - E_p^a$ farkı düşük tarama hızlarında $59/n$ 'e yaklaşmalıdır.

2.5 Biyolojik Materyallerin İmmobilizasyonu

Elektrot yüzeyinin uygun kimyasallar ile modifikasyonu biyosensörlerin hazırlanması için oldukça önemli bir adımdır. Elektrot yüzeyindeki katı/sıvı ara fazında gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonların hızlarının ve seçiciliğinin kontrolünü sağlayan elektrot modifikasyonuna yönelik ilk çalışmalar 1970’li yıllarda başlamıştır (Lana ve Huubard 1973, Moses 1975). Elektrot tasarımında kullanılacak olan biyoreseptörün, ileticinin, elektrot yüzeyinin kimyasal ve fiziksel yapısına bağlı olarak farklı immobilizasyon yöntemleri kullanılmaktadır.

Biyolojik materyallerin elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde tutturulması ise biyosensörlerin geliştirilmesinde en kritik adımdır. Biyosensör performansına doğrudan etki eden immobilizasyon başarısı biyosensörün; çalışma ve saklama süresi, cevap zamanı, tekrarlanabilirlik gibi özelliklerini etkilemektedir (Andreescu ve Sadik 2004).

2.5.1 Taşıyıcıya bağlama yöntemi

Taşıyıcıya bağlama yöntemi immobilizasyon için kullanılan en eski yöntemdir. Taşıyıcıya bağlama kovalent, iyonik veya adsorptif biçimde uygulanabilir. En kritik adımı biyomateryale uygun taşıyıcı seçilmesidir. Taşıyıcı seçiminde partikül büyüklüğü, toplam yüzey alanı, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı, taşıyıcının kimyasal bileşimi gibi kriterler esas alınır. İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar doğal veya sentetik olabilir. En sık kullanılan doğal taşıyıcılar selüloz, nişasta, dekstran, jelatin, aktif karbon ve cam; sentetik taşıyıcılar ise polistiren, poliakrilamid, polimaleikanhidrit, polimetakrilat, silika jel ve iyon değiştirici reçinelerdir.



Şekil 2.23 Taşıyıcıya bağlama yönteminin şematik gösterimi

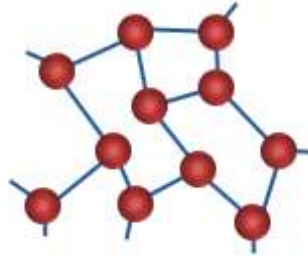
Taşıyıcıya adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonda; suda çözünmeyen adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Biyomolekülün taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan kuvvet Van der Waals kuvvetleridir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO_3 , kül, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır. Adsorpsiyonla bağlama yönteminin avantajı; yöntemin basitliği, uygulama kolaylığı ve immobilizasyon gerçekleştirilirken biyoaktif maddenin (genellikle enzim) saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır.

İyonik bağlama ise; iyon değiştirmeye yeteneğine sahip, suda çözünmeyen taşıyıcılar ile enzimin iyonik olarak bağlanması temeline dayanır. İyonik bağlama ılıman koşullarda gerçekleştiğinden enzim konformasyonunda ve aktif merkezde değişiklik meydana gelmez. Ancak iyonik bağ; kovalent bağ kadar sağlam karakterde olmadığından enzim kaybı olabilir.

Kovalent bağlama; taşıyıcı ile enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı reaktif gruplar üzerinden gerçekleşir. Immobilizasyon koşullarına oldukça dikkat edilmesi gereken kovalent bağlama yönteminde kullanılacak taşıyıcının suda çözünmemesi ve mekanik olarak kararlı olması gerekmektedir.

2.5.2 Çapraz bağlama

Küçük moleküllu iki veya çok fonksiyonlu reaktifler ile biyomolekül arasında bağ oluşturularak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlar. Çapraz bağlama derecesi pH'a, kullanılan reaktif konsantrasyonuna ve immobilize edilecek biyomoleküle bağlıdır. Bu yöntemde biyomolekül kuvvetli bir şekilde bağlandığından desorpsiyon çok düşüktür.



Şekil 2.24 apraz bağlama yönteminin şematik gösterimi

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir;

- 1) Biyomolekülün yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu.
- 2) Biyomolekülün ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu.
- 3) Biyomolekülün suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu.
- 4) Biyomolekülün bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu.

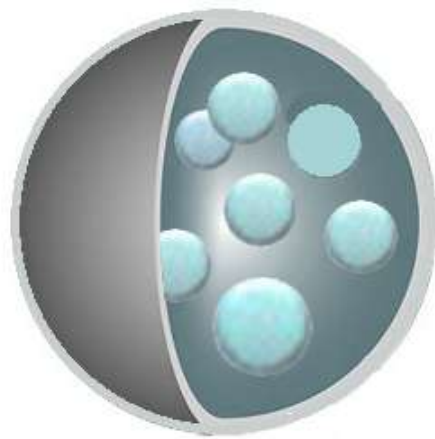
En sık kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; bu tez çalışmasında da kullanılan glutaraldehitin yanı sıra; izosiyanat türevleri, bisdiazobenzidin, N-Npolimetilen ve 2-5-difloro-2-4-dinitro benzendir.

2.5.3 Tutuklama yöntemi

Tutuklama; enzim molekülünü belli bir alanda durmaya zorlamaktır, bu sayede enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Tutuklama işlemi polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran temel fark; enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır (Tischeriand ve Wedekind 1999).

2.5.3.1 Mikrokapsülleme

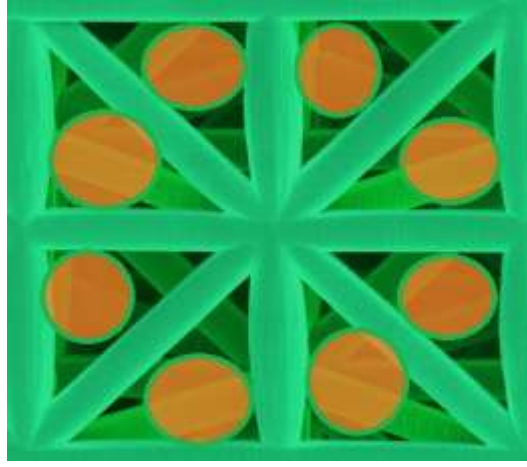
Bu yöntem biyomolekülün yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasından ibarettir. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μm arasında değişmektedir (Tischeriand ve Wedekind 1999). Bu yöntem ile biyomolekül immobilizasyonu; sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde ise sıvı bir tabakadır. Her iki grupta da immobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin (membran) yarı geçirgen olması zorunludur.



Şekil 2.25 Mikrokapsülleme işleminin şematik gösterimi

2.5.3.2 Polimer kafeste tutuklama

Yöntemde enzim molekülleri yüksek derecede çapraz bağlı polimerin bağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir. Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın olduğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde biyomolekül çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanmaktadır.



Şekil 2.26 Polimer kafeste tutuklamanın şematik gösterimi

Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N metilenbisakrilamit ile çapraz bağlanmış poliakrilamittir. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması durumunda; substrat biyomolekülün aktif merkezine ulaşmakta zorlanır ve biyomolekül aktivite kaybına uğrayabilir. Yöntemin avantajı ise; kolay uygulanması ve çok az miktar enzim kullanılarak gerçekleştirilmesidir. Ayrıca kimyasal bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır.

2.6 Nanosensörler

Fonksiyon verilebilen nano boyutlu yapıları nanopartiküller, nano çubuklar, nano teller, nano gözenekli ve nano boyutlu, çekirdek-kabuk yapıları olarak sınıflandırabiliriz (Asefa vd. 2009). Nano ölçüde materyallerin kimyasal algılamada, biyomedikal

Çalışmalarda ve biyolojik analizlerde kullanılması günümüzde oldukça yaygındır (Schultes vd.2007, Shimizu vd.2008).

Nanopartiküller 100 nm'den küçük, elektron tutucu etkiye, geçici mıknatıstık özelliğine, yüzey plazmon rezonansı gibi özelliklere sahip bileşiklerdir. Boyutları ve sahip oldukları özellikler nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca entegre olabilen nanopartiküllerin kullanıldığı sensörler *nanosensör* adı ile anılmaktadır. Biyosensörler için ilk nanopartikül uygulamaları 1970'li yıllarda 5-50 nm çapında koloidal altın kullanımı ve elektron mikroskop için immuno histokimyasal prob kullanımı ile başlamıştır (Hayatt 1989).

Araştırmalar peptid, protein ve nükleik asit gibi biyolojik moleküllere bağlanabilen ve optik, elektronik ya da manyetik özelliklere sahip nanopartiküllerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır (Portakal 2008). Burada kullanılan nano boyutlu malzemenin manyetik olması spesifik hücrelerin ayırımında, tanılanmasında kolaylık sağlayan bir özelliktir. Ayrıca son yıllarda protein, enzim, antikor-antijen gibi biyoaktif yapıların immobilizasyon aşamalarında da kullanılmaya başlanmıştır. Nanomalzemelerin kullanım alanının önemli bir kısmını da mikroorganizma tayin çalışmaları oluştırmaktadır. Farklı nano yapılar kullanılarak bakteri ile seçici olarak etkileşebilen, hızlı tayin ve doğru ölçüme olanak sağlayan sensörler geliştirilmektedir.

Nanopartiküllerin en büyük avantajları yüksek yüzey alanı/hacim oranıdır. Elektrotlar nanopartiküllerle modifiye edildiklerinde hem elektrodun yüzey alanını arttırarak immobilizasyon verimini arttırmakta hem de elektron aktarım hızını arttırarak daha düşük tayin limitlerine inilebilmesine olanak sağlamaktadırlar.

Nanopartiküller kullanılarak hedefe yönelik birçok sensör modeli geliştirilmiştir. Nanopartikül bazlı sensörler, altın, gümüş, demir oksit gibi metal ve metal oksit özelliğinde olabilirler.

Altın nanopartiküller (AuNPs) küçük boyutlarından dolayı sensör teknolojisinde etkili bir kullanım alanına sahiptir. Tipik bir sentezde AuNPs sentezinde AuCl_3 gibi altın tuzları indirgen bir ajan tarafından indirgenir ve Au iyonları çekirdekleşerek altın partikülleri oluştururlar. Ortama katılan bir yüzey aktif madde de sentez esnasında oluşan nanopartiküllerin agregasyonunu engeller ve koloidal sıvının stabilizasyonu sağlar.

AuNPs’lerde kullanılan parçacıkların büyüklüğü azaldıkça parçacıkların rengi kırmızıya kayar. Ayrıca agregasyon ile de renk değişimi gözlenir. Bunun en bilinen örneği evde yapılan gebelik testlerine alternatif olarak geliştirilen sensördür. Büyüklükleri 50 nm’nin altında AuNPs kullanılarak hazırlanan bu testler; gebe kadınların salgıladığı hCG (insan koryonikgonadotropini) hormonun içindeki antikora bağlanır. Böylece testi yapan kişi hamile ise AuNPs antikora bağlandığından renk değişimi gözlenir. 2008 yılında Rojanathanes vd.altın nanopartiküller kullanarak idrarda gebelik testi geliştirmişlerdir. 9nm’lik altın nanopartiküllerin kullanıldığı bu çalışmada hamile olan ve olmayan kişilerden alınan idrar numunelerine eşit miktarda (500 μL) AuNPs eklenmiştir. Hamile kişilerden alınan idrar numunesine AuNPs eklendiğinde numunenin rengi pembeye dönerken, hamile olmayan kişilerde renk griye dönmüştür. Daha önce WH Accu Test; WHPM Inc.El Monte, CA tarafından %100 hassaslık ile üretilen hamilelik test stripleri ve UV-VIS ile yöntemin doğruluğu karşılaştırılmıştır. Yöntemin hassaslığı, spesifikliği ve doğruluğu %100 olarak belirtilmiştir. Ayrıca 1 haftalık deney süresi boyunca sonuçların stabil olduğu görülmüştür. Glikoz ve keton cisimlerinin sisteme girişimine yönelik herhangi bir etki gözlenmemiştir (Rojanathanes 2008).

Bu tez çalışmasında üstün özellikleri nedeniyle $5.5 \times 10^{+13}$ partikül/mL’lik 5 nm çapındaki AuNPs kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan nanopartikülün sıvı halde olması; immobilizasyon jellerinin hazırlanmasında kolaylık sağlamıştır.

2.7 Çalışmada Kullanılan Biyomoleküller, Taşıyıcı Sistemler, Nanopartiküller ve Çapraz Bağlayıcılar

2.7.1 Protein A (PrA)

PrA; *Staphylococcus aureus* gram negatif bakterisinin çeşitli suşları tarafından üretilen oldukça kararlı bir hücre yüzey reseptörüdür. Tek polipeptit zincirinden oluşan ve molekül ağırlığı 42 kDa olan PrA; aspartik ve glutamik asitçe zengin, ancak sistein içermeyen 4 tekrarlı dizinin birleşmesiyle oluşmuştur. Yapısında triptofan bulunmaz ve yalnızca 4 adet tirozin kalıntısı içerir. PrA'nın yapısında triptofanın bulunmaması PrA ve IgG moleküllerinin UV spektrumlarının ayrılmasında önemlidir. Triptofan içeren IgG molekülü triptofanın karakteristik pik verdiği 280 nm'de absorbans piki oluştururken; yapısında triptofan içermeyen PrA bu piki oluşturmaz ve böylece spektrumlar farklandırılır (Yang vd. 2003).

İmmünoglobulinlerin Fc bölgesine bağlanan PrA; immünoglobulinlerden özellikle IgG'ye yüksek afinite göstermektedir.

Çizelge 2.2 Farklı immünoglobulinlerin PrA 'ya ilgisi (BioLabs)

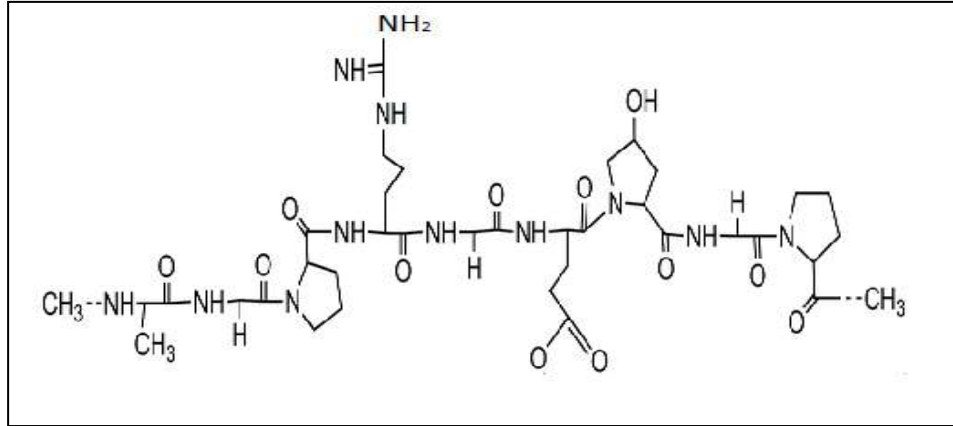
Tür	İmmünoglobulin	PrA'ya bağlanma
İnsan	IgG (normal)	++++
	IgG1	++++
	IgG2	++++
	IgG3	-
	IgG4	++++
	IgM	-
	IgA	-
	IgE	-

Aynı zamanda anti-tümör, toksik ve kanserojen aktivitelerde dahil olmak üzere birçok biyolojik fonksiyonda rol alan PrA; bağışıklık düzenleyici olarak işlev gördüğü gibi anti-fungal ve anti-parazitik özellikte göstermektedir.

2.7.2 Taşıyıcılar

2.7.2.1 Jelatin

Jelatin; başta domuz, sığır, balık olmak üzere hayvanların deri, kemik ve bağ dokularının kaynatılarak kollajenin geri dönüşsüz olarak hidrolize edilmesiyle üretilen, yarı şeffaf, renksiz, besleyici özelliği olmayan, tatsız bir maddedir. Jelatin; 3000 ile 20000 arasında değişen molekül ağırlığına sahip, kollajen hidroliz ürünlerinin heterojen bir karışımıdır. Farklı zincir uzunlukları içeren polipeptit yapısındaki jelatin su ve organik çözücülerde çözünmez, ancak su çeker. Hidrojel özelliği gösteren jelatin; kıvam arttırıcı, film oluşturucu ve jelleştirici bir maddedir. Polipeptit bağında sıralı şekilde lisin-prolin-prolin ve glisin-prolin-hidroksiprolin amino asitlerinin tekrarı ile oluşan lineer bir polimerdir.



Şekil 2.27 Jelatin polimerinin zincir yapısı

Yapısında %85-92 arasında protein bulunduran jelatinin yapısında bulunan diğer maddeler; mineral tuzlar ve kurutma sonrasında bile mevcudiyetini sürdüren sudur. A ve B tipi olmak üzere iki farklı çeşidi bulunan jelatinin kalitesi; üretim prosesi ve

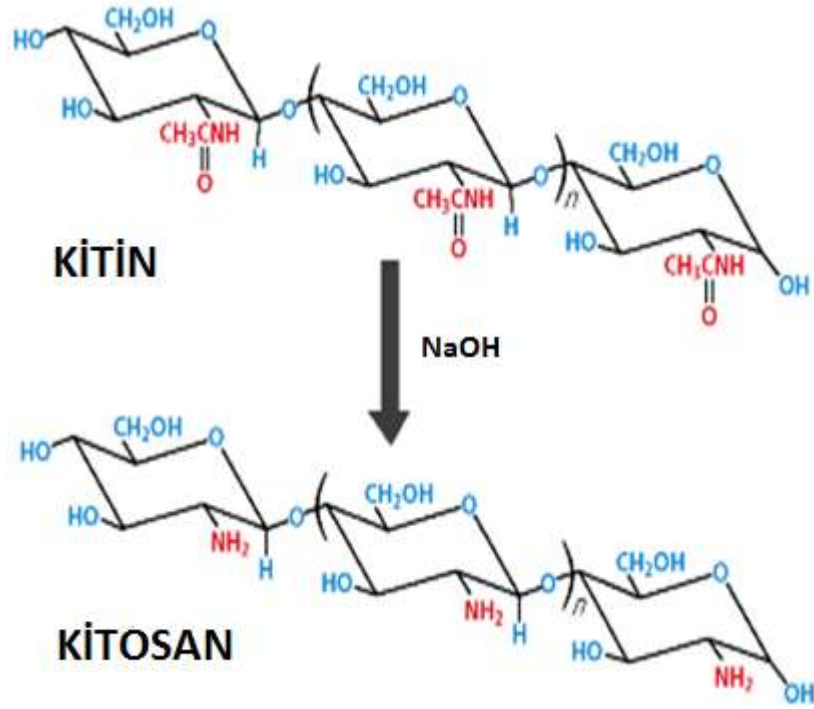
kullanılan hammadde ile doğrudan ilişkilidir. A tipi jelatin ile kollajenin aminoasit içeriği hemen hemen aynıdır. B tipi jelatinde ise glutamin ve asparajinamino asitlerinin neredeyse tamamı glutamik asit ve aspartikasite dönüşmüştür. Yine kollajen ve dolayısıyla jelatin içerisinde, triptofan hiç yoktur; metiyonin, sistin ve tirosinamino asitlerinin oranise yok denecek kadar azdır.

Fotoğraf, kozmetik, gıda, tıp ve eczacılık gibi birçok farklı alanda kullanımı olan jelatinin en belirgin özelliği sıcaklığa bağlı olarak geri dönüşümlü jel oluşturma özelliğinde olmasıdır. Yani çözeltiden jele, jelden çözeltiye çok kısa bir sıcaklık aralığında, bozunmaya uğramadan birçok defa dönüşebilir.

Jelatin yapısındaki aminoasit molekülleri, sulu ortamda kutuplu iyonlar gibi davranırlar. Karboksil (-COOH), hidroksil (-OH) ve amin (-NH₂) fonksiyonel gruplarına sahip olan jelatin; izoelektrik nokta altında pozitif (+) özelliktedir. 100°C gibi yüksek sıcaklıklarda protein yapısı denatüre olduğundan jelatin kıvam arttırıcı ve jelleştirici özelliklerini kaybeder.

2.7.2.2 Kitosan

Kitin; selülozdan sonra dünyada en fazla bulunan ikinci doğal biyopolimerdir. Kitosan ise kitinin N-deasetillenmiş türevidir. Kabuklu deniz hayvanlarından, mantar hücre duvarından ve planktondan elde edilen kitinin kimyasal yapısı esas olarak poli-[β-(1,4)-2-asetamid-2-deoksi-β-D-glukopiranoz] yapısındadır.



Şekil 2.28 Kitin ve kitosanın molekül yapıları

Kitin ve kitosanın azot içeriğinin fazla olması, ticari açıdan ilgi görmelerine neden olmuştur. Kitinin azot içeriği, deasetilasyon derecesine göre % 5-8 (genellikle %6.9) arasında değişmektedir. Azot içeriği selüloza göre yüksek olan kitin ve kitosan (selülozda azot miktarı % 1.25 civarında) özellikle atık sularda metal bağlayıcı (şelatlaştırıcı) olarak kullanılırlar.

Kitosanın çözünürlüğü, kimyasal modifikasyonları, film veya lif oluşumu gibi kullanımları açısından da oldukça önemli bir parametredir. Asidik ortamda NH_2 grubu - NH^{3+} şeklinde bulunmakta ve ortamdaki anyonik gruplarla elektrostatik olarak etkileşime girmektedir. Protonlaşmış durumda katyonik polielektrolit davranışı göstermekte, viskoz çözeltiler oluşturmakta ve zıt yüklü molekül ve yüzeylerle etkileşime girebilmektedir. Kitosan katyonik yapısı nedeniyle $\text{pH} < 6$ ortamında asetik asit, formik asit ve laktik asit gibi organik asitler yardımıyla çözünür.

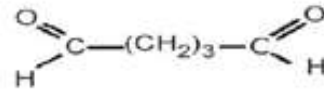
Kitosan sahip olduğu; biyouyuşabilirlik, antibakteriyal, antifungal ve antitümoral etki, hemostatik, ağır metal, protein ve yağ adsorpsiyon, biyodegradasyon gibi özellikleri ve ayrıca hidrojel özelliği göstermesi nedeniyle birçok alanda yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu kullanım alanlarının başında kontrollü ilaç salımı, biyosensör uygulamaları, hücre kültürü, gıda ve su arıtım sistemleri yer almaktadır.

2.7.3 Altın Nanopartiküller

Bu tez çalışmasında üstün özellikleri nedeniyle $5.5 \times 10^{+13}$ partikül/mL'lik 5 nm çapında Sigma'dan (St Louis, MO, USA) alınan AuNPs kullanılmıştır.

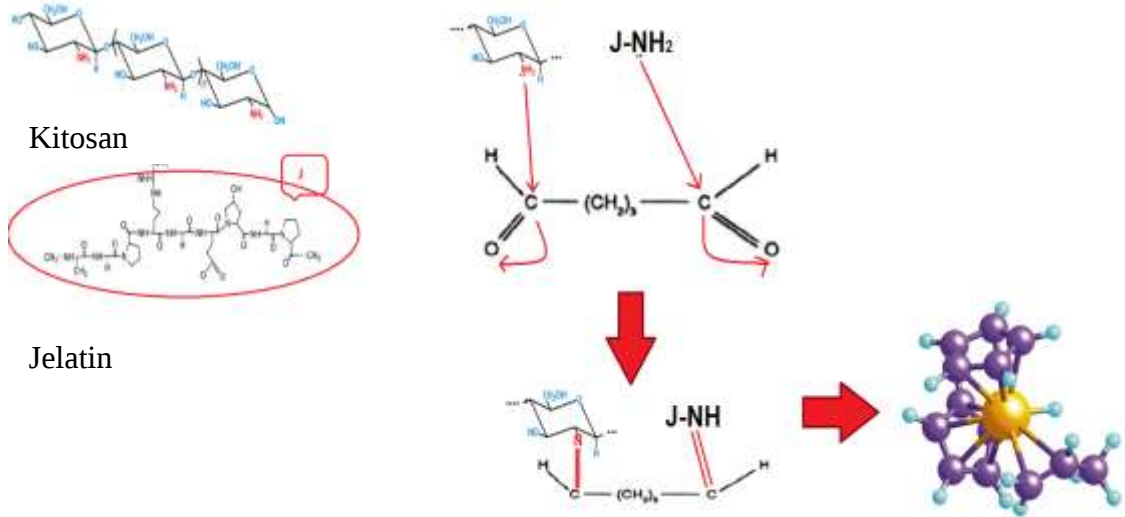
2.7.4 Çapraz bağlayıcı

Bu tez çalışmasında (-NH²) ve (-OH) fonksiyonel gruplarını içeren jelatin ve kitosan biyopolimerleri için kullanılan çapraz bağlayıcı glutaraldehitir (GA). Glutaraldehit biyokimyasal çalışmalarda amin-reaktif bifonksiyonel çapraz bağlayıcı olarak kullanılan keskin kokulu, renksiz sıvıdır.



Şekil 2.29 Glutaraldehit molekül yapısı

Glutaraldehitin her iki ucu da reaktif olduğundan birçok biyomolekölü bir araya getirmek amacıyla kullanılabilir; böylece çözünür yapı, çözünmez özellik kazanır ve biyomoleküller güçlü bir şekilde bağlanmış olur. Glutaraldehit ile çapraz bağlı agregasyon immobilizasyonu, çapraz bağlı immobilizasyon çeşidinin bir alt kümesi olarak düşünülebilir. Ayrıca zaman tasarrufu ve düşük maliyet imkanı sağlamaktadır.



Şekil 2.30 Jelatin/kitosan polimerlerinin glutaraldehit ile bağlanma mekanizması

Jelatin ve kitosan polimerleri glutaraldehit kullanılarak bağlanmıştır. Şekil 2.30’da görülen mekanizma ile gerçekleşen bağlanma modelinde jelatin J ile sembolize edilmiştir. Fonksiyonel grubu -NH₂ olan kitosan ve jelatin; glutaraldehit molekülündeki karbonil karbonuna nükleofilik atak yapmış; reaksiyon sırasında 2 molekül su yapıdan ayrılmış ve bağlanma tamamlanmıştır. Jelatinin yapısında birden fazla NH₂ grubu bulunduğundan yukarıda görülen mekanizma devam etmiş ve çapraz bağlı jelatin/kitosan yapısı elde edilmiştir.

2.8 Kaynak Araştırması

Biyosensörlerin tarihi 1950’li yılların ortalarında Clark’ın ameliyat sırasında kanın O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesine dayanır (Cincinnati Hastanesi, Ohio, ABD). Biyosensör terimi ise ilk kez 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından kullanılmıştır. Clark ve Lyons glukozoksidaz (GOD) enzimini O₂ elektrodu ile birleştirerek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlar; böylece biyolojik sistemin yüksek spesifikliği (enzim) ile fiziksel sistemin duyarlılığının (elektrot) birleştirildiği analitik sistemi geliştirmişlerdir (Lucadou vd.1988). Yaklaşık elli yıllık bir süreçte hızlı bir şekilde gelişim gösteren biyosensör üretim çalışmaları günümüzde yeni bir bilim dalı haline gelmiştir ve artık “Biyomateryal Bilimi” olarak adlandırılmaktadır (Meyers vd. 2008).

Biyosensörler günümüzde klinik teşhis, tıbbi uygulamalar, biyoreaktörler, gıdalarda ve tarımda kalite kontrol, endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi pek çok farklı alanda kullanılmaktadır (Turner ve Pickup 1985, Lucadou vd.1988, Richter 1993, Turner 1994, Naimushin 2002, Aykut ve Temiz 2006, Meyers vd. 2008, Pan vd. 2010).

İmmünosensörler için ise ilk adımı 1959 yılında Yalow ve Berson; insan kanındaki insülin-bağlayıcı antikorların tayini için radyoimmünassay geliştirilmesini sağlamıştır. Bu ilk adımdan sonra farklı immünolojik hastalıkların teşhisine yönelik pek çok immünosensör geliştirilmiştir. İmmünosensörler üzerine yapılan çalışmalar son otuz yılda katlanarak artmaktadır.

Haga vd. (1980) spin membran immünotest ve enzim immünotest yöntemlerinin avantajlarını birleştirerek tiofilin antijeninin tayinine yönelik bir oksijen elektrot geliştirmiştir. Sistemi amplifiye etmek için lipozomlar kullanılmış ve tiofilinin 4×10^{-9} M 'e kadar (0.7 ng/mL) tayini yapılabilmektedir. Boitieux vd. (1984) serumda antijen varlığını amperometrik olarak belirlemeye yönelik yeni, hassas ve sık kullanılan immünokimyasal tekniklerden daha az zaman alan bir metot geliştirmişlerdir. Ayrıca immünokimyasal tekniklerde izotop kullanımından kaynaklanan sorunları model antijen olarak hepatit B yüzey antijenini kullanarak bertaraf etmişlerdir. Antijene spesifik antikor jelatin membrana immobilize edilerek (katı faz sandviç modeli) hazırlanan immünosensör ile hedef antijenin tayini düşük limitlerde ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Rishpon ve Rosen (1989) LDH izoenzimin tayini için immünoelektrokimyasal bir teknik önermişlerdir. Bu çalışmada izoenzim LDH5'e spesifik monoklonal antikor camı karbon elektroda kovalent olarak immobilize edilerek izoenzimin serumda tayini gerçekleştirilmiştir.

Parry vd.(1990) serumda, plazmada ve tüm kanda rubella antikorunun tayini için optik bir immünosensör geliştirmişlerdir. Başka bir reaktif gerektirmeyen ve 10 dakikadan daha kısa bir sürede sonuç alınabilen immünosensörün tayin limiti 30 IU/mL, regresyon katsayısı %94'tür. Antikor-antijen arasında meydana gelen spesifik reaksiyon; moleküllerin birbirlerine karşı gösterdikleri yüksek afinite nedeniyle geri-

dönüşümsüz/tersinmez olarak kabul edilir, dolayısıyla geliştirilen immünosensörler tek kullanımlıktır. Ancak Bright vd. (1990) sensörü olumsuz bir şekilde etkilemeden geliştirilen immünosensörün tekrar kullanılabilirliği üzerine çalışmışlar; geliştirilen immünosensörü uygun koşullar altında 4 ay boyunca saklayarak 50 kez ölçüm alabilmişlerdir. Mirhabibollahi vd. (1990) saf kültür ve gıdalarda *Staphylococcus aureus* tayini için amperometrik bir immünosensör geliştirmiştir. Geliştirilen bu immünosensörde tanıyıcı biyomateryal olarak protein A kullanan çalışma grubu; geleneksel ELISA metodundan 20 kat fazla duyarlılıkta, 0.1 ng/mL seviyesinde, *Staphylococcus aureus* tayini yapabilmıştır. Muratsugu vd. (1993) bir akış hücresi kullanarak insan-serum albümini (Human Serum Albumin, HSA) tayini için piezoelektrik bir immünosensör geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu sistem ile 0,1-100 µg/mL aralığında ölçüm yapabilmişlerdir. König ve Gratzel (1994) farklı *Herpes simplex* virüs türlerinin tespiti amacıyla piezoelektrik immünosensör geliştirmişlerdir. Bu amaçla öncelikle farklı virüs yüzey antijenlerini temsil eden sentetik peptidler kullanılarak monoklonal antikorlar üretilmiş; üretilen antikorlar protein A aracılığıyla kristal yüzey üzerine immobilize edilmiştir. Uygun şartlar altında saklanan immünosensörün 8 hafta boyunca stabilitesini koruduğu görülmüş ve aktivitesini kaybetmeden 18 kez kullanılabilir olduğu bildirilmiştir.

Chu vd. (1995) insan IgM tayinine yönelik geliştirdikleri piezoelektrik immünosensör ile 5-93 µg/mL aralığında tayin yapabilmıştır. Ayrıca geliştirilen immünosensörün tetrahidrofuran ile yıkanarak, aktivite kaybı olmaksızın 20 kez tekrar kullanılabildiği bildirilmiştir. Topozada vd. (1997) *Erythroxylum* türlerinin yaprak ekstrelerinde kokain benzeri alkaloid miktarını hızlı bir şekilde belirlemek için fiber optik floroimmünosensör geliştirmişlerdir. Kokainin majör metaboliti olan benzoilekgonine karşı geliştirilmiş monoklonal antikor; kuvars fiber üzerine kovalent olarak immobilize edilerek biyolojik algılama elemanı olarak kullanılmıştır. İmmünosensör sonuçlarını değerlendirmek amacıyla aynı örneklerin gaz kromatografisi ile analizleri gerçekleştirilmiş ve aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Geliştirilen İmmünosensörün 37°C'de fosfat tamponu içerisinde aktivitesini kaybetmeden 14 gün kullanılabilir olduğu belirtilmiştir. Sanden vd. (1998) camı karbon elektrot kullanarak, yarışmalı immünoassay prensibine dayanan *nitrobactere* spesifik amperometrik

immünosensör geliştirmişlerdir. Monoklonal birincil antikor ve alkalın fosfataz etiketli ikincil antikor kullanarak geliştirdikleri immünosensörün elektroaktif ürünü 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfattır. İmmünosensörün tayin limiti yaklaşık olarak mL’de 3×10^6 nitrobakter hücresi olarak bildirilmiştir.

Su ve grubu (2000) gümüş kaplı piezoelektrik kuvars kristal elektrodu istenmeyen oksidasyondan korumak amacıyla polistiren ve karboksi-poli(vinilklorid) ile modifiye etmiş; ardından damlatma ve daldırma olmak üzere iki farklı immobilizasyon tekniğı kullanarak yöntemlerin başarısını araştırmışlardır. AFM ve SEM teknikleri kullanılarak polimerlerin morfolojisi incelenmiş; polistiren ile damlatma tekniğı kullanılarak kaplanan elektrot yüzeyinin in situ sıvı faz analizleri için daha uygun olduğı bildirilmiştir. O’Connor ve çalışma grubu (2004) AFM ve rezonans Raman spektroskopisi kullanarak karakterize ettikleri tek duvarlı karbon nanotüp yapısına (SWNT) anti-biyotin antikoru adsorbe ederek ve adsorbe etmeden yaban turbu peroksidaz (HRP) tayini gerçekleştirmişlerdir. Biyotin adsorbe edilmiş SWNT kullanılarak geliştirilen immünosensörün tayin limiti 2.5 pmol/mL iken; biyotin ile etiketlenmeden kullanılan SWNT ile geliştirilen immünosensörün tayin limiti 16 nmol/mL olarak bildirilmiştir.

Díaz-González vd. (2005) elektrot olarak referans, karşıt ve çalışma elektrodunun aynı şablon üzerinde olduğı baskı devre screen printed karbon elektrot kullanarak *mikobakteryum tüberküloz*’un tayinine yönelik voltametrik bir immünosensör geliştirmiştir. Ag360 antijeninin bu elektrot üzerine immobilizasyonu ile hazırlanan bu sistem ile 1 ng/mL seviyesinde tayin yapılabilmiştir. Liao ve Cui (2007); nöralinflamasyonda önem arz eden sitokinlerden biri olan trombosit türevli büyüme faktörü BB (PDGF-BB) tayinine yönelik aptamer tabanlı biyosensör geliştirmişlerdir. İnflamasyon derecesinin takibi ve tedavinin seyri açısından oldukça önemli olan PDGF’in erken dönemde belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada non-faradik elektrokimyasal impedans spektroskopisi kullanılarak tayin gerçekleştirilmiştir. Antikora kıyasla daha ucuz olan ve daha kolay kullanılan aptamer silikon elektrot yüzeyine immobilize edilmiş; 1µg/mL alt tayin limiti olarak bildirilmiştir. Panini ve çalışma grubu (2008) çok duvarlı karbon nanotüp ile modifiye edilmiş camsı karbon

elektrodu mikro akışkan sisteme entegre ederek serumda prostat spesifik antijen (PSA) tayinine yönelik bir immünosensör geliştirmişlerdir. Serumda bulunan PSA'yı etiketlemek amacıyla yaban turbu peroksidaz (HRP) kullanılan bu sistemde elektrokimyasal tayin süresi 1 dakika; toplam analiz süresi 30 dakika, regresyon katsayısı 0.99 olarak belirtilmiştir. Sensörden alınan sonuçlar; ELISA ve spektrometre sonuçlarıyla karşılaştırılmış, standart sapma %4.5 olarak hesaplanmış ve elektrokimyasal sistemin daha hassas olduğu bildirilmiştir. Radi vd.(2009) okratoksin A (OTA) tayinine yönelik etiketsiz bir immünosensör geliştirmişlerdir. Bu amaçla 4-karboksifenil modifiye edilen screen printed altın elektrotlara antikor immobilize edilmiş ve 1–20 ng.mL⁻¹ lineer aralığında OTA tayini gerçekleştirmişlerdir. Tayin limiti 0.5 ng/mL olarak bildirilmiştir. Khan ve Dhayal (2009) yine OTA tayinine yönelik geliştirdikleri impedimetrik immünosensörde kitosan-polianilin biyopolimerleri ile indiyum-kalay-oksit (ITO) elektrot yüzeyini fonksiyonelleştirerek, yüzeye anti-rabbit IgG immobilize ederek 1-10 ng/mL lineer aralığında OTA tayini gerçekleştirmişlerdir.

Malhotra ve çalışma grubu (2010) baş ve boyundaki skuamöz hücre karsinomasının (HNSCC) bağışıklık, enflamasyon ve anjiyojenik tepkileriyle ilişkili olan interlökin-6 (IL-6) tayinine yönelik elektrokimyasal immünosensör geliştirmişlerdir. Öncelikle tek duvarlı karbon nanotüp (SWNT) yapısına IL-6'ya spesifik antikor (Ab1) immobilize edilmiş ve etiketleyici olarak yaban turbu peroksidaz (HRP) kullanılarak çok düşük (<30 pg.mL⁻¹) seviyelerde IL-6 tayini gerçekleştirilmiştir. İki farklı enzimle etiketleme yöntemi kullanılarak IL-6 konsantrasyon aralığı ölçülmüştür. Ab2 karboksillenmiş çok duvarlı nanotüplere immobilize edilmiş; aynı etiketleme yöntemi kullanılarak hazırlanan immünosensörler ile 0,5 pg.mL⁻¹ alt tayin limitine inilebilmiştir. En iyi sonuçlar; Streptavidin-HRP etiketleme kompleksine bağlanmış biyotinlenmiş Ab2 kullanılarak hazırlanan immünosensörler ile elde edilmiştir. Bu yöntemle elde edilen immünosensör sonuçları ile ELISA sonuçları arasında fark görülmemiştir. Li vd. (2011) serumda koryonikgonadotropin (hCG) tayinine yönelik etiketsiz, amperometrik immünosensör tasarlamışlardır. Bu amaçla hCG altın nanoküreciklere immobilize edilmiş, indikatör olarak hidrokinon redoks türü kullanılmış; alt tayin sınırı 0.0034 ng/mL olarak bildirilmiştir. Shamsipur ve çalışma grubu (2012) çok duvarlı karbon nanotüpler ile modifiye ettikleri camı karbon elektrodu kullanarak H₂O₂ tayinine yönelik literatürdeki

ilk enzim tabanlı impedimetrik katalaz nanobiyosensörünü geliştirerek; 5–1700 nM lineer aralığında H_2O_2 tayini gerçekleştirebilmişlerdir. Zarei vd. (2012) öncelikle çok duvarlı karbon nanotüplere Fe_2O_3 nanoparçacıkları ekleyerek manyetik bir nanokompozit yapısı elde etmişlerdir. Ardından bu nanokompozit yapıya Goat-anti human IgG (anti-hIgG)'yi kovalent olarak bağlamış ve altın elektrot yüzeyine immobilize etmişlerdir. Hazırlanan biyo-nanokompozit yapısı insan tetanoz IgG tayini amacıyla kullanılmış ve 25 ng/mL tayin limitine kadar inilebilmiştir.

Ohno vd. (2012) insan immünoglobulin A (IgA) tayinine yönelik etiketsiz, impedimetrik immünosensör geliştirmişlerdir. Reseptör olarak Anti-IgA kullanan Ohno vd. fotolitografi tekniği kullanarak kuartz cam levha yüzeyini elektrot olarak kullanmışlardır. IgG ve sığır serum albümin gibi proteinler ile girişim etkisi gözlenmeyen immünosensör sistemi ile 0,01-100 ng/mL lineer aralığında tayin gerçekleştirilebilmiştir. Loo ve çalışma grubu (2012) bozunabilir elektrokimyasal baskı elektrot yüzeyini fiziksel absorosiyon ile grafit oksit (GPO), grafen oksit (GO), elektrokimyasal azaltılmış (ER-GO) ve termal azaltılmış grafen oksit (TR-GO) modifiye ederek IgG tayinine yönelik immünosensör geliştirmişlerdir. Geliştirilen immünosensörün spesifikliği BSA kullanılarak test edilmiştir. En yüksek sinyallerin alındığı TR-GO ile gerçek numunelerde analiz yapmışlardır. Bu amaçla modifiye edilmiş elektrotlara anti-IgG inkübe edilmiş, BSA ile spesifik olmayan girişim engellendikten sonra IgG tayini gerçekleştirilmiştir. Redoks probu olarak $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, yöntem olarak EIS kullanan Loo vd. 0.3-7 mg/mL lineer aralığında tayin gerçekleştirebilmişlerdir. Ojeda ve çalışma grubu (2013) streptavidin modifiye manyetik boncuklarla perde baskı (screen printed) elektrotları fonksiyonelleştirerek serumda ve anne sütünde leptin tayinine yönelik immünosensör geliştirmişlerdir. Girişim etkisini incelemek amacıyla kortizol, estradiol, progesterone, prolaktin, insan büyüme hormonu (hGH), adrenokortikotropin (ACTH) içeren numuneler analizlenmiş ve yöntemin spesifikliği araştırılmıştır. Bu amaçla anti-leptin ile modifiye edilmiş ve edilmemiş biyotin kullanılarak sandviç tipi immünoassay yaklaşımıyla streptavidin modifiye manyetik boncuklarla fonksiyonelleştirilmiş screen printed elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Ortamda leptin varlığında leptin/anti-leptin eşleşmesi hedeflenmiştir. Daha sonra ortama alkalın fosfataz işaretli IgG gönderilmiştir. Alkalın

fosfataz varlığında ortama eklenen 1-naptil fosfat; 1-naftola dönüşecek ve açığa çıkan elektoronun yol açtığı değişiklikler DPV yöntemi kullanılarak izlenecektir. Lineer kalibrasyon aralığı $5-100 \text{ pg.mL}^{-1}$, tayin limiti 0.5 pg.mL^{-1} olarak bildirilmiştir. Elshafey ve çalışma arkadaşları (2013) kanser biyomarkerlarından biri olan epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) tayinine yönelik geliştirdikleri immünosensörde; altın elektrot yüzeyini elektobiriktirme yöntemiyle altın nanopartiküllerle kaplamış ve yüzeye protein G immobilize ederek anti-EGFR'nin inkübasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilen ölçümler ile fosfat tamponu içinde 0.34 pg/mL 'nin altında; tam kanda ise 0.88 pg/mL seviyesinde EGFR tayini bildirilmiştir.

Sun ve grubu (2014) sentezledikleri karboksilik asit fonksiyonel grubu içeren çok dallı poliester nanopartikül yapısını kitosan ve altın nanopartiküller ile kombinlemiş; ardından anti-CEA ekledikleri bu immobilizasyon çözeltisi ile camı karbon elektrot yüzeyini modifiye etmişlerdir. Spesifikliği test etmek amacıyla geliştirilen immünosensör glukoz, askorbik asit, ürik asit, IgG ve BSA örnekleri ile denenmiş; sensörün spesifikliği, stabilitesi ve tekrar kullanılabilirliğine vurgu yapılmıştır. Kanda $1-10^7 \text{ fg/mL}$ lineer aralığında CEA tayini gerçekleştirilmiş ve alt tayin limiti 0.251 fg/mL , spesifiklik %100 olarak bildirilmiştir. Li ve Sailor (2014) IgG tayine yönelik geliştirdikleri optik biyosensörde taşıyıcı yüzey olarak nano ölçekli TiO_2 ile kapladıkları poröz silikon film (PSi) yapısını kullanmışlardır. Bu amaçla O_3 kullanarak okside ettikleri PSi yapısını, spin kaplama yöntemi kullanarak sol-jel halindeki TiO_2 ile fonksiyonelleştirmişlerdir. Elde ettikleri PSi- TiO_2 kompozit yapısının karakteriasyonu için FT-IR, X ışınları kırınım (X-Ray diffraction, (XRD)), SEM, reflective interferometric Fourier transform spektroskopisi (RIFTS) kullanan Li ve Sailor; oluşturdukları film yapısının pH 2-12 aralığında kararlı olduğunu görmüşlerdir. Geliştirilen film yapısına fiziksel absorpsiyon ile PrA immobilize edilip; farklı kaynaklardan alınan IgG'ler ile sistem etkileştirilmiş, optik kalınlıkları kıyaslanarak yöntemin hassaslığı araştırılmıştır. Tavuktan alınan IgG sisteme inkübe edildiğinde herhangi bir etkileşim olmazken; koyundan alınan IgG inkübasyonundan sonra optik kalınlığın arttığı görülmüştür.

Wang ve çalışma grubu (2014) α -fetoprotein (AFP) tayinine yönelik geliştirdikleri immünosensörde mezapor silika nanopartikül etrafını yaban turbu peroksidaz (HRP) ve Ferroferrik oksit (Fe_3O_4) nanopartikülü ile kaplayarak elde ettikleri yapıyı sinyal amplifiye edici olarak kullanmışlardır. Yöntem olarak CV kullanılan çalışmada ölçümler H_2O_2 varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı yüzey olarak grafen levha (GS) kullanan Wang ve grubu elektron transferini desteklemek amacıyla tiyoinin (TH) kullanmışlardır. Primer antikor olarak kullandıkları AFP1'i TH ile modifiye ettikleri GS levha üzerine immobilize ederek anti-AFP/AFP eşleşmesi sağlandıktan sonra tanıyıcı yüzeyi oluşturmuşlardır. Daha sonra mezapor silika nanopartikül- Fe_3O_4 yapısına AFP2 inkübe edip; sinyal amplifikasyonu ve spesifik olmayan bağlanmanın engellenmesi için ortama HRP gönderilmiştir. Tanıyıcı yüzeyde bulunan anti-AFP ile AFP2 eşleşmesi sağlanmıştır. Geliştirilen immünosensörde 0.01-25 ng/mL aralığında tayin gerçekleştirilmiş; alt tayin limiti olarak 4 pg/mL bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında yüksek yüzey alanı/hacim oranı sağlayan, iyi biyouyushabilirliğe sahip altın nanopartiküller kullanılmıştır. Literatür taramasında AuNPs kullanılan farklı sensör tasarımları görülmüştür. 2008 yılında Rojanathanes vd.altın nanopartiküllerin ortamda bulunan analite bağlandığında renk değiştirme özelliğini kullanarak evde yapılan idrarda gebelik testine alternatif bir test geliştirmişler; yöntemin hassaslığını, spesifikliğini ve doğruluğunu %100 olarak bildirmişlerdir (Rojanathanes 2008)

3. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu tez çalışmasında günümüzde kalp damar hastalıkları ve kanserden sonra ölüme sebebiyet veren hastalıklar sıralamasında 3. olan otoimmün hastalıklardakanda ve BOS'ta seviyesi yükselen IgG tayinine yönelik PrA immünosensörünü geliştirilmiştir. Otoimmün hastalıklarda vücut kendi hücrelerini yok ettiğinden erken teşhis oldukça önemlidir. Ayrıca hastalığın seyri sırasında en önemli kriter kan ve BOS'taki IgG seviyesidir. Geliştirilen immünosensör ile gerçek numunelerde pratik, ekonomik, hızlı ve doğru olarak IgG tayini yapmak amaçlanmaktadır.

Tez kapsamında otoimmün hastalıklarda IgG tayinine yönelik kitosan, jelatin/kitosan polimerleri kullanılarak kitosan-PrA, jelatin/kitosan-PrA immünosensörleri geliştirilmiştir. Daha düşük tayin limitine ve yüksek spesifikliğe ulaşmak amacıyla jelatin/kitosan kompozitine AuNPs ilave edilerek jelatin/kitosan-AuNPs-PrA immünosensörü geliştirilmiştir. Sunulan tezde kitosan-PrA, jelatin/kitosan-PrA, jelatin/kitosan-AuNPs-PrA olmak üzere üç ayrı immünosensör tasarlanmıştır. Nanopartikül varlığında ve yokluğunda hazırlanan immobilizasyon jelleri platin screen printedelektrotlara immobilize edilmiş; dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi, SEM ve AFM ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmaları EIS kullanılarak tamamlanmış; geliştirilen immünosensörlere ait kalibrasyon grafikleri çizildikten sonra BOS ve serum denemelerine geçilmiştir.

Tez çalışması sırasında PrA'nın afinite gösterdiği diğer antikorların girişim etkisini incelemek adına geliştirilen immünosensörler kullanılan IgG ile aynı miktarda anti-TNF α , anti-MOG, anti MAG ile inkübe edilmiş; geliştirilen immünosensörlerin IgG'ye yüksek spesifiklik gösterdiği görülmüştür. Çalışma tamamlandığında otoimmün hastalıklar sırasında serum ve BOS'ta miktarı artan IgG'nin tayini için en uygun immünosensör sistemi önerilmiştir.

4. MATERİYAL VE YÖNTEM

4.1 Materyaller

4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullanılan Protein A (PrA), human immünoglobulin G (hIgG), altın nanopartikül (AuNPs), Bovin Serum Albümin (BSA), anti-Tümör nekroz faktör alfa (anti-TNF α), anti-myelin oligodendrosit glikoprotein (anti-MOG), anti-myelin ilişkili glikoprotein (anti-MAG), jelatin, kitosan, glutaraldehit (%25), potasyum klorür (KCl), sodyum bikarbonat (NaHCO₃), potasyum ferrosiyaniid ve potasyum ferrisiyaniid (Fe(CN)₆^{4-/3-}), hidroklorik asit (HCl), aminoasetik asit, tris(hidroksimetil)aminometan Sigma (St Louis, MO, USA)’dan; sodyum hidrojen fosfat dihidrat (NaH₂PO₄.2H₂O) ve disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat (Na₂HPO₄.12H₂O) Merck’den temin edilmiştir.

Tüm tez çalışması boyunca kullanılan de-iyonize su, MilliPore kullanılarak ≥ 18.2 M Ω cm direncinde olacak şekilde elde edilmiştir.

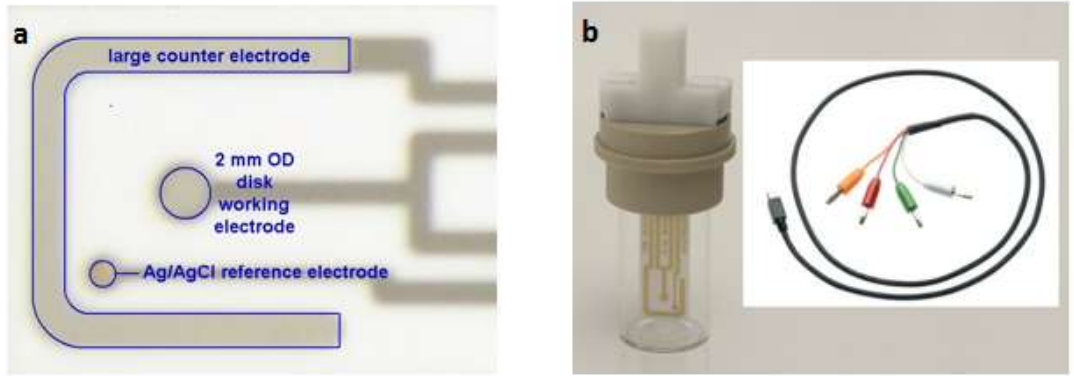
Geliştirilen immünosensörlerin gerçek örneklerde denenmesi amacıyla kullanılan BOS ve serum, 04-121-12 no’lu etik kurul kararı ile Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji A.B.D.’nda yatmakta olan RRMS’li ve sağlıklı hastalardan temin edilmiştir.

4.1.2 Kullanılan cihazlar

Çalışmalarda elektrokimyasal ölçümde “Gamry Instrument Impendace Analyzer-Framework Version 5.50 software” kullanılmıştır.

4.1.3 Kullanılan elektrotlar

Tüm deneyler 1mL’lik elektrokimyasal hücre içinde PineResearch marka seramik tabanlı, çok kullanımlık Platin screen printedelektrotlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karşıt, çalışma ve referans elektrot içeren screen printed elektrotların ve hücrenin resmi Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1.a.Kullanılan platin screen-printed elektrotlar b.Ölçümlerin alındığı hücre sistemi

Kullanılan elektrotların H_2SO_4 (0.05 M) çözeltisinde 100 mVs^{-1} tarama hızında 0.3 ile +1.2 V arası dönüşümlü voltametrileri ile kimyasal temizliği gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elektrotların pH’ ı 7.4 olan fosfat tamponunda (0.05 M pH 7.4) 100 mVs^{-1} tarama hızında -0.5 ile +0.5 V arası dönüşümlü voltametrileri alınarak elektrotlar kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kullanılan tüm screen printed elektrotların temizliği bu şekilde yapılmıştır.

4.1.4 Kullanılan çözeltiler

0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0.1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ayrı ayrı hazırlanmıştır. Fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.4) bu çözeltiler kullanılarak hazırlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan diğer çözeltiler fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.4) kullanılarak hazırlanmıştır.

Çapraz bağlayıcı glutaraldehit çözeltisi fosfat tamponu (0.05 M, pH 7,4) kullanılarak 0.125 M olacak şekilde hazırlanmıştır.

Kitosanın %2.5'luk stok çözeltisi hazırlanmış ve tüm deneyler boyunca aynı stok çözelti kullanılmıştır. Jelatinin (%7.5) stok çözeltisi hazırlanmıştır.

Kullanılan PrA (1 mg/mL) olacak şekilde karbonat tamponunda (0.05 M, pH 9.6) olacak şekilde hazırlanmıştır.

Deneylerde kullanılan IgG'nin stok çözeltisi 10 mg/200 mL fosfat tamponunda (0.05 M, pH 7.4) olacak şekilde hazırlanmış; ana stoktan seri seyreltme yöntemi ile kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında üstün özellikleri nedeniyle $5.5 \times 10^{+13}$ partikül/mL'lik 5 nm çapında AuNPs kullanılmıştır.

Elektrokimyasal ölçümlerin gerçekleştirilebilmesi için 1 mL'lik hücrede 5 mM olacak şekilde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ çifti ve 0.1 M KCl kullanılmıştır.

İmmünosensörler hazırlandıktan sonra PrA immobilize olmamış taşıyıcı matriksin, fonksiyonel gruplarına IgG'nin spesifik olmayan bağlanmasını önlemek amacıyla %0.1'lik bovin serum albümin (BSA) kullanılmıştır. Ayrıca optimize immünosensörlere spesifik olmayan bağlanmaları tespit etmek amacıyla IgG ile aynı miktarda anti-TNF α , anti-MOG, anti MAG kullanılmıştır.

Yapay BOS hazırlamak amacıyla 124 mM NaCl, 1.2mM KCl, 1.25 mM KH_2PO_4 , 26mM NaHCO_3 , 10 mM glukoz, 2 mM MgSO_4 , 2 mM CaCl_2 saf suda çözülerek pH'ı 7.4'e getirilmiştir.

Yapay serum hazırlama amacıyla 4.037 g NaCl, 0.109 g KCl, 0.100 g KH_2PO_4 , 0.185 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0.129 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500 mL ultra saf suda çözüldü. Ardından IgG, BSA ve tris(hidroksimetil)aminometan ilave edilerek hazırlanan serum -20°C'de saklanmıştır.

İmmünoşensörlerin raf ömrünün araştırılmasında elüsyon çözeltisi olarak aminoasetik asit (0.1 M, pH 3.0) kullanılmıştır.

4.2 Yöntem

4.2.1 İmmobilizasyon jellerinin hazırlanması

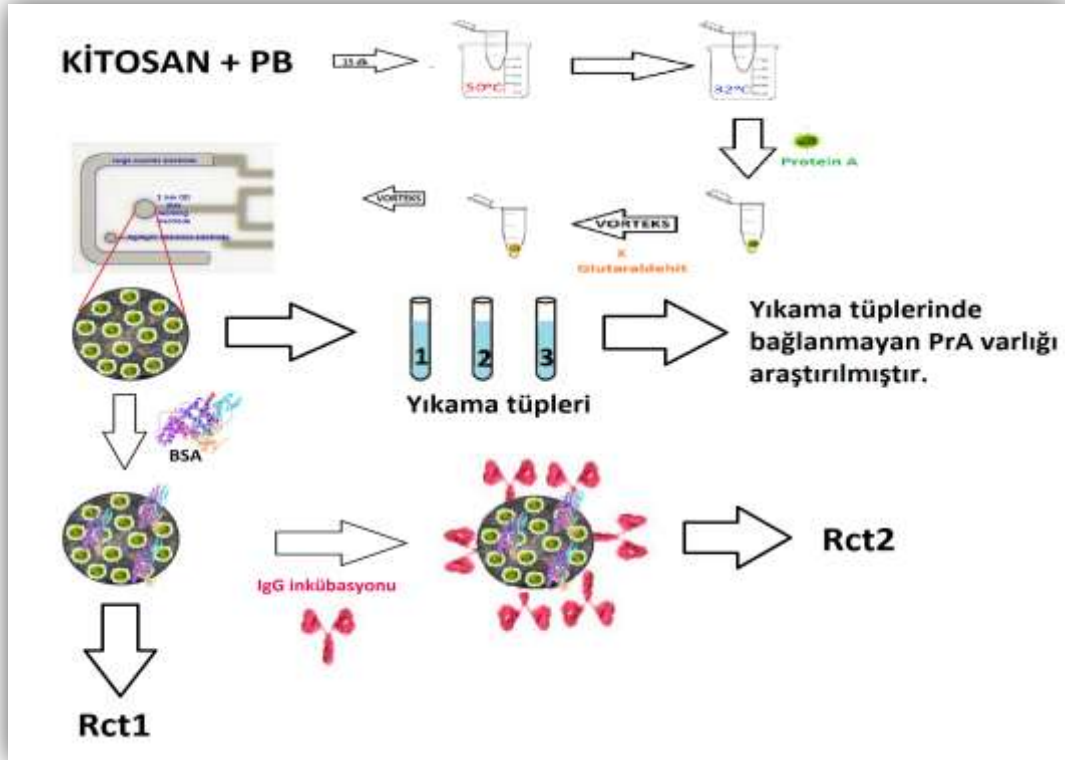
Kitosan-PrA elektrotlarının hazırlanmasında kitosan (%2.5) stok çözeltisinden istenilen miktarlarda kitosan; ependorfa alındıktan sonra fosfat tamponu (0.05 M, pH 7,4) eklenmiş 15 dakika bekletilerek polimerin şişmesi sağlanmıştır. Daha sonra kitosanın çözünmesi için fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.4) içeren ependorf sıcaklığı 50°C olan sıcak su banyosuna daldırılmış ve kitosan çözündükten sonra sıcaklık 32°C'ye düşürülmüştür. Fosfat tamponunda (0.05 M, pH 7.4) çözölmüş PrA farklı konsantrasyonlarda eklenmiş ve homojenizasyonun sağlanması için vortekslenmiştir. Son olarak, çapraz bağlayıcı glutaraldehit ortama ilave edildikten sonra immobilizasyon jeli hazırlanmıştır.

Jelatin/kitosan kombinasyonlarının hazırlanması amacıyla 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 8, 10 oranlarında jelatin/kitosan karışımları hazırlanmıştır. İstenilen miktarlarda tartılarak ependorfa alınan jelatin (%7.5) fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.4) içinde yarım saat bekletilerek şişmesi sağlanmıştır. Daha sonra jelatinin çözünmesi için ependorf, sıcaklığı 50°C olan sıcak su banyosuna daldırılmış ve kitosan eklenmiştir. Kitosan ve jelatin çözündükten sonra, kitosan ile aynı prosedür kullanılarak immobilizasyon jelleri hazırlanmıştır.

Nanopartiköl destekli immünoşensörlerin hazırlanması için jelatin/kitosan kompozitine AuNPs ilave edilerek homojenizasyonu sağlanmış, PrA ve çapraz bağlayıcı ilave edilip tekrar vortekslenerek immobilizasyon jelleri hazır hale getirilmiştir.

4.2.2 İmmünosensörlerin hazırlanması

İmmobilizasyon jeli hazırlandıktan sonra, Pt screen printed elektrot yüzeyine immobilizasyon jeli (2 µL) damlatılarak, immobilizasyon işlemi yapılmıştır. İmmobilize elektrotlar hazırlandıktan sonra 2 saat kurumaya bırakılmış ve ardından bağlanmayan PrA'nın uzaklaştırılması için içerisinde fosfat tamponu (0.05 M pH 7.4) bulunan 3 ayrı tüpte 5'er dakika bekletilmiş ve bu yıkama tüplerinde bağlanmayan PrA varlığı araştırılmıştır. Son olarak non-spesifik bağlanmaların önlenmesi için elektrotlar %0.1'lik BSA'ya daldırılmış ve yıkandıktan sonra ölçümler için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 4.2 İmmünosensörlerin hazırlanmasının şematik gösterimi

4.2.3 Ölçümlerin alınması

Elektrokimyasal ölçümlerin gerçekleştirilebilmesi için 1 mL'lik hücrede 5 mM olacak şekilde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ çifti ve 0.1 M KCl kullanılmıştır. İmpedans ölçümleri elektrotların

kararlı hale geldiği 180 mV açık devre potansiyeli (OCP)'nde alınmıştır. PrA immobilize elektrodun yük transfer direnci ($R_{ct}(1)$) ve IgG inkübe edilmiş elektrodun yük transfer direnci ($R_{ct}(2)$) kullanılarak relatif impedans (RI) [$RI=[R_{ct}(2)-R_{ct}(1)]/R_{ct}(1)$] hesaplanmıştır. Tezde yapılan tüm deneyler en az üç kez tekrar edilmiş ve sonuçların ortalaması alınarak grafikler çizilmiştir.

4.2.4 Termogravimetrik analizlerin gerçekleştirilmesi

Jelatin, kitosan ve jelatin/kitosan kompozit yapısının termal kararlılıklarının karşılaştırılması amacıyla TGA'ları alınmıştır. Bu amaçla katı halde bulunan jelatin, kitosan ve jelatin/kitosan (1:1) kompoziti kullanılmıştır.

4.2.5 FT-IR spektrumlarının alınması

FT-IR spektrumunun alınması amacıyla; örnekler 4.2.1'de belirtilen prosedürde olduğu gibi hazırlanarak; saat camı üzerine alınmış ve kuruduktan sonra analizi gerçekleştirilmiştir. Jelatin ve jelatin/kitosan jellerinin hazırlanma prosedürü kitosan ile aynıdır.

4.2.6 SEM mikrogramlarının alınması

Polimer, PrA immobilize polimer filmlerinin morfolojileri SEM ile görüntülenmiş, PrA immobilizasyonunun başarısı incelenmiştir. SEM mikrografları Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkez (UNAM) biriminde alınmıştır.

4.2.7 AFM görüntülerinin alınması

Polimer, PrA immobilize polimer filmlerinin üç boyutlu yüzey topografyası AFM ile görüntülenmiş, PrA immobilizasyonunun başarısı incelenmiştir. AFM görüntüleri Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkez (UNAM) biriminde alınmıştır.

4.2.8 Optimizasyon çalışmaları

4.2.8.1 Polimer optimizasyonları

İmmobilizasyon şartlarının optimize edilmesinde ilk olarak kitosan konsantrasyonları denenmiştir.

İmmobilizasyon jeli içerisinde PrA (5 µg/mL) ve glutaraldehit (0.004 M) konsantrasyonları sabit tutularak değişik konsantrasyonlarda kitosan (%0.125-1.0) içeren immobilizasyon jelleri, Pt screen printedeletrotların yüzeylerine immobilize edilmiştir. Değişen kitosan konsantrasyonlarına karşı relatif impedans grafiği çizilmiştir.

Jelatin/kitosan oranlarının optimizasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla immobilizasyon jeli içerisinde bulunan PrA (5 µg/mL) ve glutaraldehit (0.004 M) miktarları sabit tutulmuştur. Bu amaçla immobilizasyon jeli içerisinde 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 8, 10 farklı jelatin/kitosan (J/K) oranları kullanılarak J/K oranına karşı relatif impedans grafikleri çizilmiş ve optimum J/K oranı bulunmuştur.

4.2.8.2 AuNPs optimizasyonları

Jelatin/kitosan-PrA immünosensör sistemi için en uygun nanopartikül konsantrasyonu tespit edilmiştir. Bu amaçla immünosensör jeli içerisinde J/K (1:1), glutaraldehit (0.004 M), PrA (0.1 µg/mL) konsantrasyonları sabit tutularak hazırlanan immobilizasyon çözeltisine 0.090, 0.18, 0.27, 0.36, 0.45, 0.63, 0.81 µL altın nanopartikül (5 nm) eklenmiştir. Elektrotlardan alınan cevaplar değerlendirilerek optimum nanopartikül miktarı bulunmuştur.

4.2.8.3 Çapraz bağlayıcı optimizasyonları

PrA'nın kitosan ve jelatin/kitosan taşıyıcı sistemlerine immobilizasyon için çapraz bağlayıcı olarak 0.001-0.008 M aralığında glutaraldehit kullanılarak immobilizasyonlar

gerçekleştirilmiş ve en uygun çapraz bağlayıcı konsantrasyonu araştırılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında çapraz bağlayıcı dışında PrA, kitosan, J/K miktarları sabit tutulmuştur.

4.2.8.4 PrA optimizasyonları

Kitosan, jelatin/kitosan taşıyıcı sistemlerine 0.05-2.0 µg/mL aralığında PrA eklenerek immobilizasyon jelleri hazırlanmış ve en uygun PrA miktarı araştırılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında PrA dışındaki tüm parametreler sabit tutulmuştur.

4.2.8.5 pH optimizasyonları

İmmünoşensörlerin geliştirilmesinde en uygun tampon sisteminin belirlenmesi amacıyla pH optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla asetat tamponu (0.05 M, pH 5.0), fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.4), karbonat tamponu (0.05 M, pH 8.5 ve 9.0) denenmiştir.

4.2.8.6 İmmünoşensör cevabına IgG inkübasyon süresinin etkisi

Geliştirilen kitosan-PrA ve jelatin/kitosan-PrA immünoşensörlerinden en iyi cevabın alınması için IgG'nin inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Bu amaçla geliştirilen immünoşensörler 15, 30, 45, 60, 75 ve 90 dakika IgG ile inkübe edilerek impedimetrik cevaplar ölçülmüş ve optimum inkübasyon süresi bulunmuştur.

4.2.9 Tekrar üretilebilirlik ve raf ömrü

Geliştirilen immünoşensörlerin özellikle pratikte kullanımında büyük önem arz eden tekrar üretilebilirliğin araştırılması amacıyla her bir immünoşensör 10 kez seri olarak hazırlanmış ve aşağıdaki formül kullanılarak % standart sapmalar hesaplanmıştır.

$$RSD = \frac{\text{standartsapma}}{\text{ortalamadeğer}} \times 100\%$$

Hazırlanan immünoşensörlerin raf ömrü araştırılmıştır. Her bir immünoşensör kullanım sonrası aminoasetik asit tamponla (0.1 M, pH 3) desorbe edilmiş, fosfat tamponunda (0.05 M, pH 7.4) yıkanmış, +4°C’te fosfat tamponunda saklanmış ve 10 gün boyunca her gün ölçüm alınmıştır. İmmünoşensörlerin impedimetrik yanıtlarındaki düşüş değerlendirilerek kullanım süresi belirlenmiştir.

4.2.10 İmmünoşensörlerin elektrokimyasal davranışları

Geliştirilen immünoşensörlerin impedans grafikleri ve CV’leri karşılaştırılmış ve PrA-IgG etkileşiminin tersinir olup olmadığı incelenmiştir. Elde edilen Nyquist grafikleri göz önünde bulundurularak immünoşensörlerin impedans devre modelleri çizilmiştir.

4.2.11 Spesifik olmayan bağlanmaların incelenmesi

Geliştirilen immünoşensörlerdeki en önemli parametrelerden biri immünoşensörün spesifiktir. Tez kapsamında geliştirilen kitosan-PrA ve jelatin/kitosan-PrA immünoşensörlerine farklı antikorlar inkübe edilerek immünoşensörlerin spesifiktir. Bu amaçla kitosan-PrA ve jelatin/kitosan-PrA immünoşensörlerine IgG ile aynı konsantrasyondaki anti-TNF α , anti-MOG, anti-MAG ile inkübe edilmiş ve aşağıdaki formül kullanılarak sensörlerin % spesifiteleri incelenmiştir.

$$\% \text{ Spesifite} = \frac{I_{\text{IgG}} - I_x}{I_{\text{IgG}}} \times 100$$

4.2.12 Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi

Hazırlanan kitosan-PrA, J/K-PrA ve J/K-AuNP-PrA immünoşensörlerinin kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi amacıyla optimum elektrotlar hazırlanmış ve üzerlerine farklı konsantrasyonlarda IgG inkübe edilmiştir. Kitosan-PrA, jelatin/kitosan-PrA ve jelatin/kitosan-AuNP-PrA immünoşensörleri için üst limitler sırasıyla 1000 ng/mL, 5000 ng/mL ve 2500 ng/mL’dir. Geliştirilen tüm immünoşensörlerle 5000 ng/mL seviyesinde ölçüm gerçekleştirilebilmiş; ancak lineer aralığın bozulması sebebiyle yüksek değerlere

yer verilmemiştir. Alt limit ise sinyal alınabilen en düşük konsantrasyon olmak üzere geniş bir aralıkta IgG kullanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiştir.

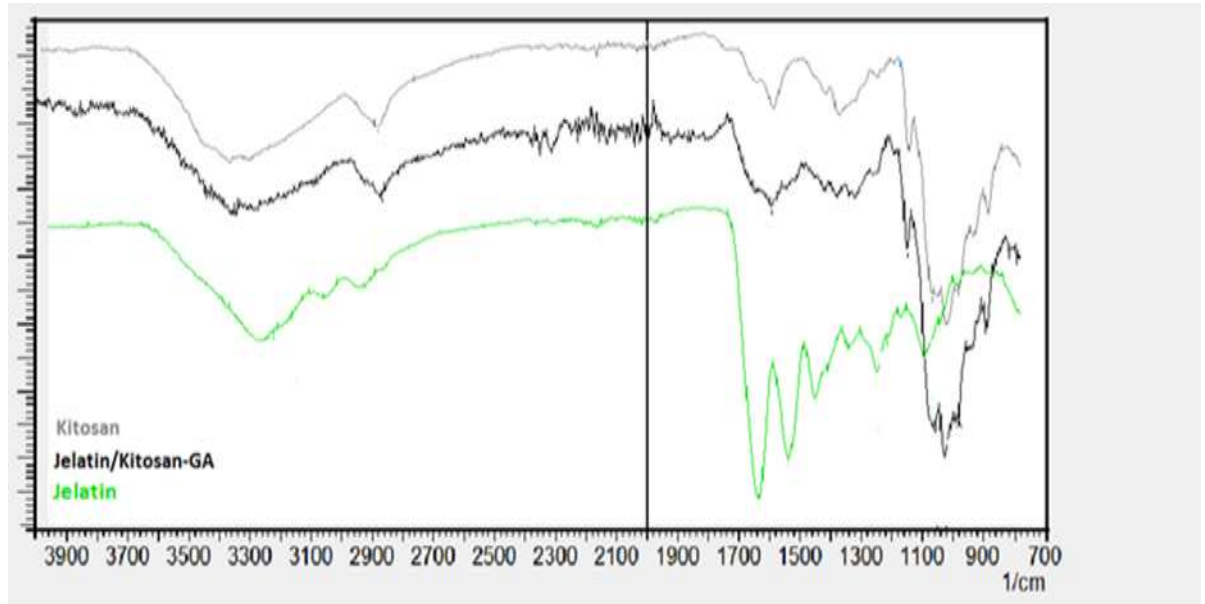
4.2.13 Geliştirilen immünosensörlerin BOS ve serumda denenmesi

Geliştirilen immünosensörlerden tayin limiti en düşük olan J/K-AuNP-PrA immünosensörü; Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji ABD'deki RRMS'li hastalardan 04-121-12 no'lu etik kurul izni ile alınan BOS ve serum örnekleri ile denenmiştir.

5. BULGULAR

5.1 FT-IR Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Taşıyıcı yüzey karakterizasyonunun değerlendirilmesi amacıyla; jelatin, kitosan ve jelatin/kitosan polimer karışımının FT-IR ile analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.1 Jelatin, kitosan ve jelatin/kitosan karışımının FT-IR analiz sonuçları

Jelatinin verdiği spektrum incelendiğinde; $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ de amino grubunun oluşturduğu N-H gerilmesi, 1620 cm^{-1} de karbonil grubundan kaynaklanan C=O gerilmesi, 1520 cm^{-1} de -NH eğilmesi, 1410 cm^{-1} -CH₂-C=O'daki -CH₂ eğilmesi, 1200 cm^{-1} C-N gerilmesi, 1100 cm^{-1} de C-O gerilmesi gözlenmektedir (Hasırcı 2010).

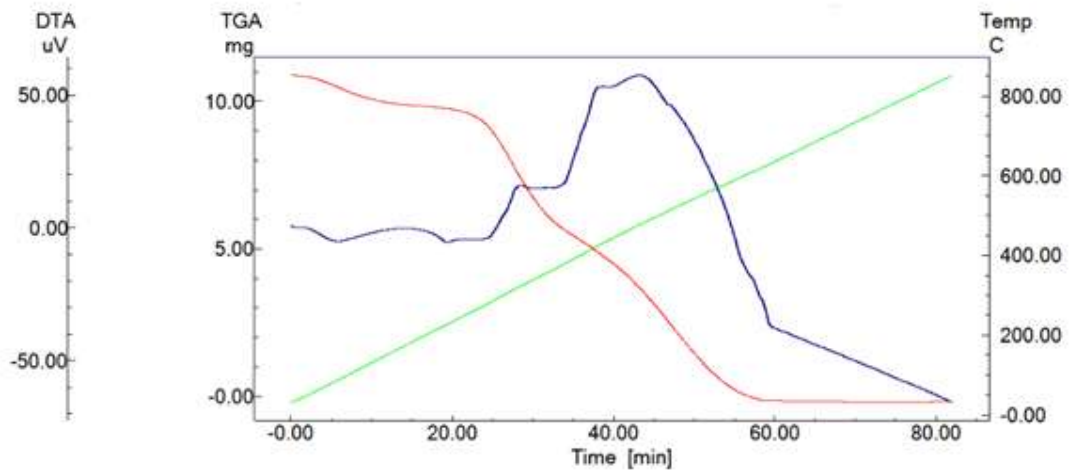
Kitosanın verdiği spektrumda ise; $3600-3400\text{ cm}^{-1}$ de hidroksil grubunun oluşturduğu O-H gerilmesi, $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ de amino grubundan kaynaklanan N-H gerilmesi, 2860 cm^{-1} de sikloalkan grubunun C-H gerilmesi, 1600 cm^{-1} de amino grubunun -NH₂ eğilmesi, 1150 cm^{-1} C-gerilmesi ve son olarak 1050 cm^{-1} de C-O gerilmesi gözlenmektedir (Hasırcı 2010).

Jelatin ve kitosan polimerlerinin, çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak oluşturulan kompozitinin FTIR spektrumu incelendiğinde, 2900 cm^{-1} de glutaraldehitten kaynaklanan C-H gerilmesi ve 1630 cm^{-1} de aldehitin karbonil grubunun C=O gerilmesi gözlenmektedir. 2300 cm^{-1} ila 1900 cm^{-1} arasındaki piklerin varlığı çapraz bağlayıcı glutaraldehit kullanılmasıyla oluşan amin ve karbon-karbon arası bağları kanıtlar niteliktedir. Genel olarak polimer karışımı tek polimerlere ait spektrumla kıyaslandığında kitosana oldukça benzer bir profil vermiştir. Elde edilen bu bilgiyle polimer karışımının jelatine ait -OH ve -NH reaktif gruplarını ve kitosana ait polisakkarit yapıyı koruduğu sonucuna varılabilmektedir.

5.2 Termogravimetrik Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

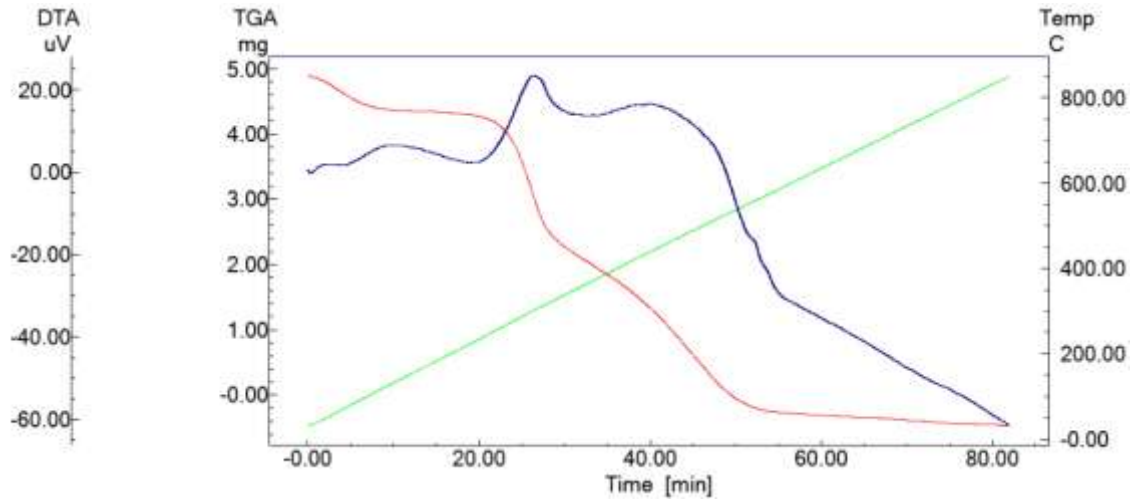
Kullanılan taşıyıcı sistemlerin termal kararlılıklarının anlaşılabilmesi amacıyla jelatin, kitosan ve jelatin/kitosan polimer karışımının termogravimetrik analizleri N_2 atmosferinde gerçekleştirilmiştir.

Şekil 5.2’de termogram jelatinin TGA analiz sonucu görülmektedir. Jelatin; iki basamaklı bir bozunma eğrisi vermiştir. İlk bozunmanın jelatin yapısında bulunan sudan kaynaklandığı düşünülmektedir. Jelatinin tamamı 60 dk içinde bozunmaya uğramıştır.



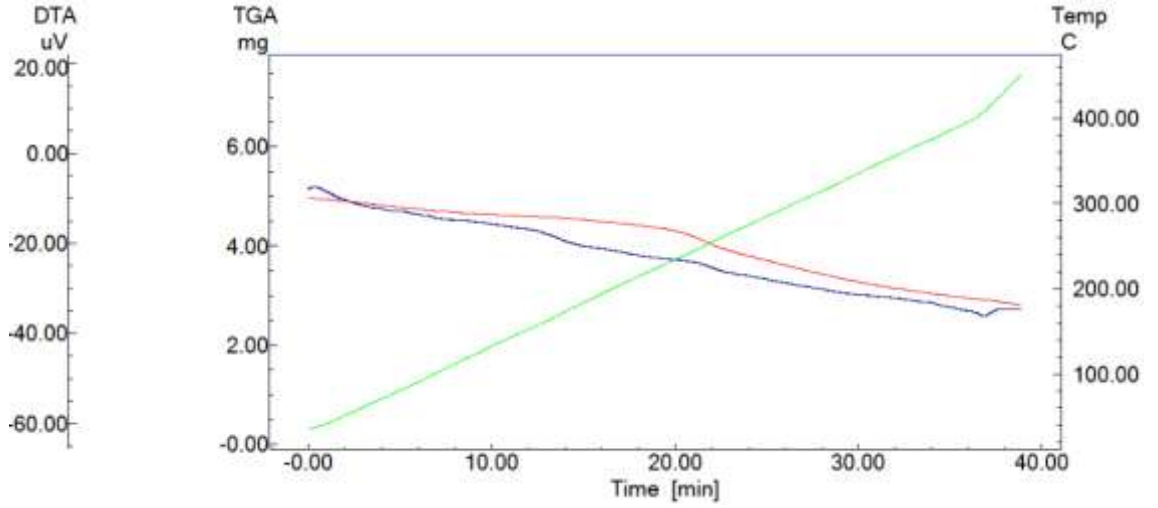
Şekil 5.2 Jelatine ait TGA eğrisi

Şekil 5.3’de verilen kitosanın TGA eğrisi incelendiğinde; iki aşamalı bir kütle kaybı görülmektedir. İlk aşamadaki kütle kaybının kitosanın yapısında bulunan sudan kaynaklandığı düşünülmektedir. İkinci aşamadaki kütle kaybı ise büyük miktarda olup; kitosan tamamen bozunmaya uğramıştır. Kimyasal olarak $\beta(1-4)2$ -acetamido-2-deoxy-D-glucose (veya N-asetilglukozamin) tekrarlanan birimlerinden oluşan bir polimer olan kitosan, içerdiği β bağından dolayı yapısal olarak jelatinden daha karardır.



Şekil 5.3 Kitosana ait TGA eğrisi

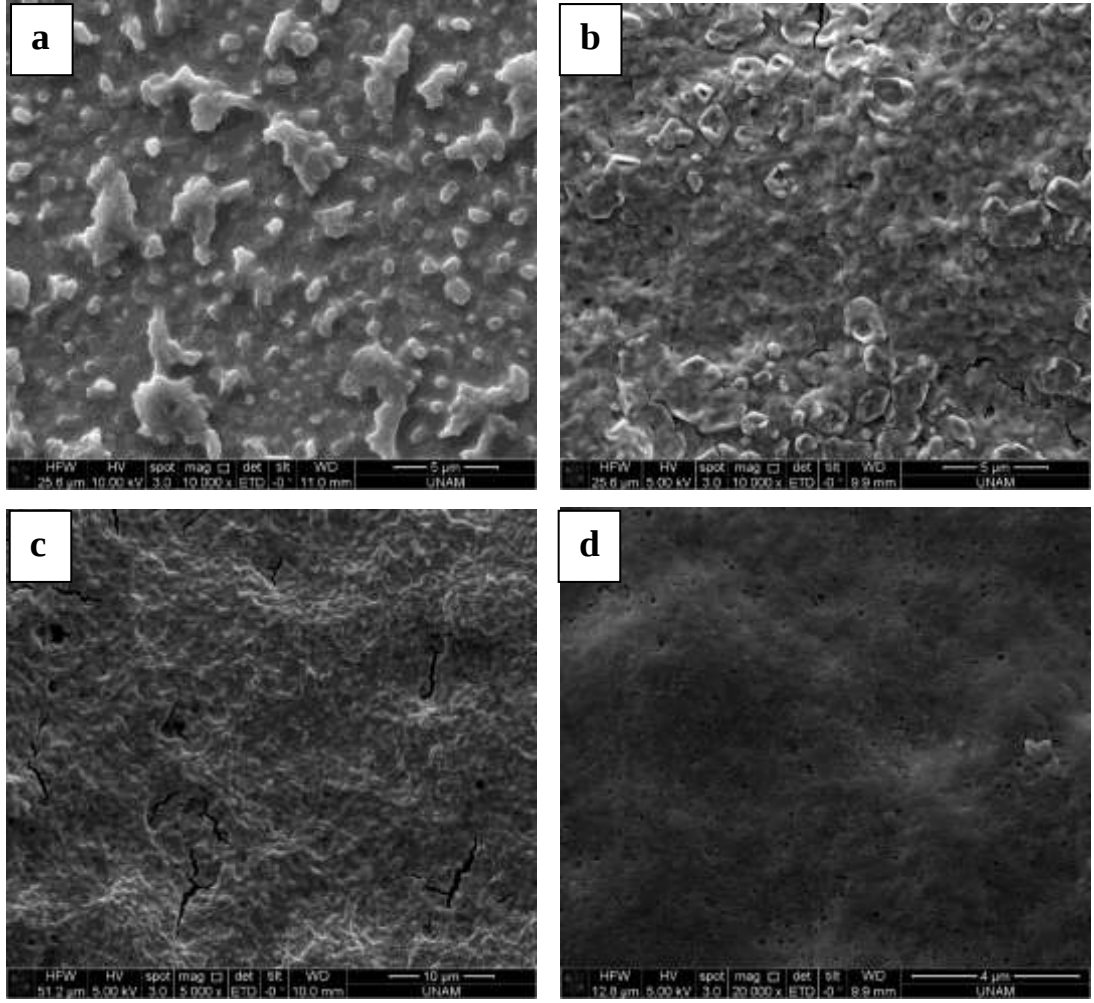
Şekil 5.4’te verilen jelatin/kitosan kompozitinin termogramı incelendiğinde ise kompozitin 40 dk’da %55’inin bozulduğu ve bozulma ürünlerinin kararlı olmadığı görülmüştür. Kitosanın yapısında bulunan β bağlarının kararlılığı ve glutaraldehit yardımıyla oluşturulan çapraz bağlar sebebiyle jelatin/kitosan kompozitinin yalnızca jelatin ve yalnızca kitosan polimerleriyle kıyaslandığında çok daha kararlı olduğu ve tamamen bozunmaya uğramadığı görülmüştür.



Şekil 5.4 Jelatin/kitosan polimer karışımına ait TGA eğrisi

5.3 SEM Mikrograflarının Değerlendirilmesi

Jelatin, kitosan, J/K ve J/K-PrA filmlerinin morfolojileri SEM ile görüntülenmiş, PrA immobilizasyonunun başarısı incelenmiştir. Filmlerin morfolojileri hakkında bilgi edinmek amacıyla alınan SEM görüntülerinin çalışma potansiyeli 5 kV'tır.



Şekil 5.5. a. Jelatin, b.Kitosan, c.Jelatin/Kitosan, d.Jelatin/Kitosan-PrA SEM mikrografları

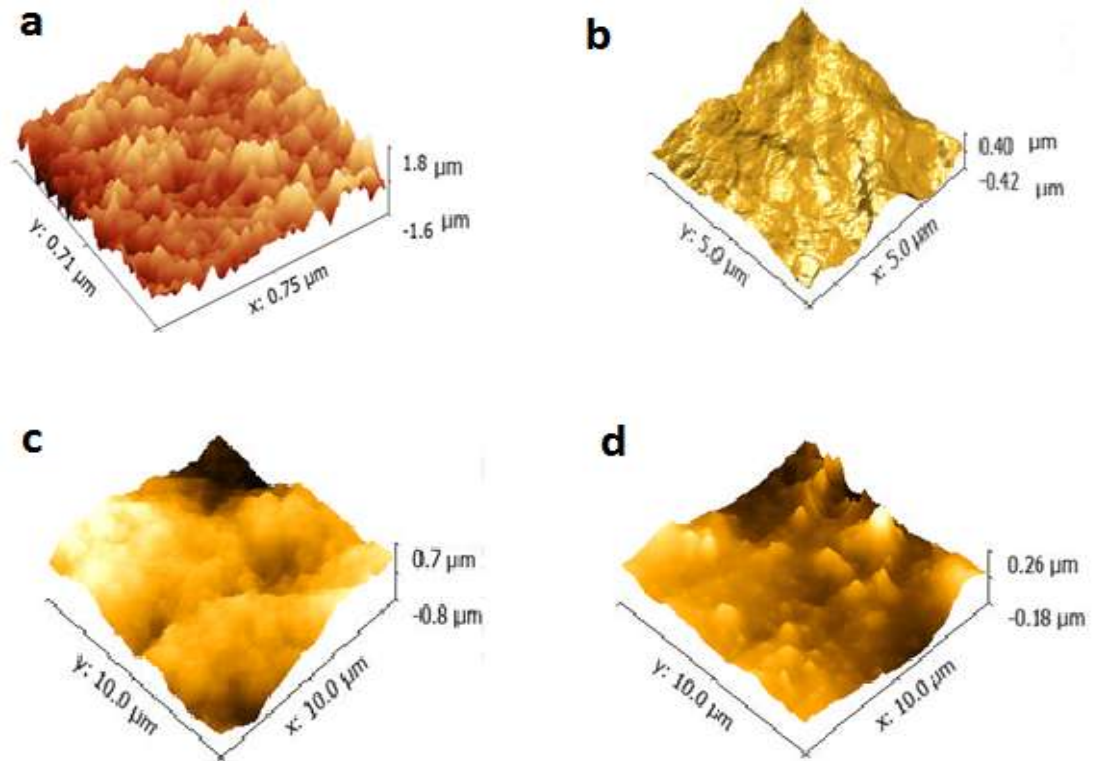
Şekil 5.5.a'da jelatin elektrodunun SEM mikrografı görülmektedir. Jelatinin elektrot yüzeyinde adacıklı yapılar oluşturduğu, tamamen dağılmadığı ve yer yer boşluklar oluşturduğu görülmektedir. Şekil 5.5.b'de görülen kitosan film yapısının ise jelatine kıyasla daha homojen bir dağılım gösterdiği görülmektedir.

Jelatin/kitosan polimer karışımında homojen bir yapı görülmesine rağmen; elektrot yüzeyinde yer yer açıklıklar görülmüştür (Şekil 5.5.c). Bu açıklıkların kullanılan polimerlerin hidrojel özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mikrograflar tamamen kurumuş elektrotlar kullanılarak alınmıştır. Hazırlanan elektrotlar fosfat tamponunda (0.05 M, pH 7.4) bekletildiğinde polimerler şişerek boşlukları dolduracak ve elektrot yüzeyi tamamen polimerle kaplanmış olacaktır. Ayrıca yalnızca kitosan

kullanılarak elde edilmiş mikrografla karşılaştırıldığında kompozit yapının elektrot yüzey alanını arttırdığı görülmektedir. Jelatin/kitosan karışımına PrA immobilize edildiğinde (Şekil 5.5.d) homojen dağılmış polimer yüzey üzerinde PrA'lar görülmektedir. Elde edilen mikrograf J/K yapısına PrA immobilizasyonunun başarılı bir şekilde yapıldığını kanıtlamaktadır.

5.4 AFM Bulguları

İmmünoşansör karakterizasyonunda SEM ve AFM ölçümleri birbirini tamamlayıcı tekniklerdir. SEM analizlerinde yüzeyin yüksek çözünürlüklü fakat üç boyutlu olmayan görüntüleri elde edilirken, AFM üç boyutlu görüntüler sağlayarak yüzey topografyası hakkında detaylı bilgi vermektedir. Jelatin, kitosan, J/K ve J/K-PrA filmlerinin üç boyutlu yüzey topografyası hakkında bilgi edinmek ve SEM sonuçlarını desteklemek amacıyla AFM ile görüntülenmiş, PrA immobilizasyonunun başarısı incelenmiştir.



Şekil 5.6. a.Jelatin b. Kitosan c.Jelatin/Kitosan d.Jelatin/kitosan-PrA AFM bulguları

Yalnızca jelatin kullanıldığında elde edilen film topografyasının homojeniteden uzak olduğu görülmektedir (Şekil 5.6.a). Kitosan kullanılarak oluşturulan filmin topografyası incelendiğinde ise kitosanın oldukça homojen, düz bir yapı oluşturduğu görülmektedir (Şekil 5.6.b). Jelatin/kitosan kompozit yapısı kullanılarak oluşturulan filmin topografyasında ise yüzey alanının bariz bir şekilde arttığı görülmüştür (Şekil 5.6.c). Şekil 5.6.d’de ise PrA immobilize edilmiş jelatin/kitosan kompozit yapısının AFM mikrografi görülmekte ve mikrograf PrA immobilizasyonunu kanıtlar niteliktedir. Elde edilen AFM mikrografları ile SEM görüntüleri birbirini destekler nitelikte olup, bu da gerçekleştirilen immobilizasyonların başarısını kanıtlar niteliktedir.

5.5 Optimizasyon Çalışmaları

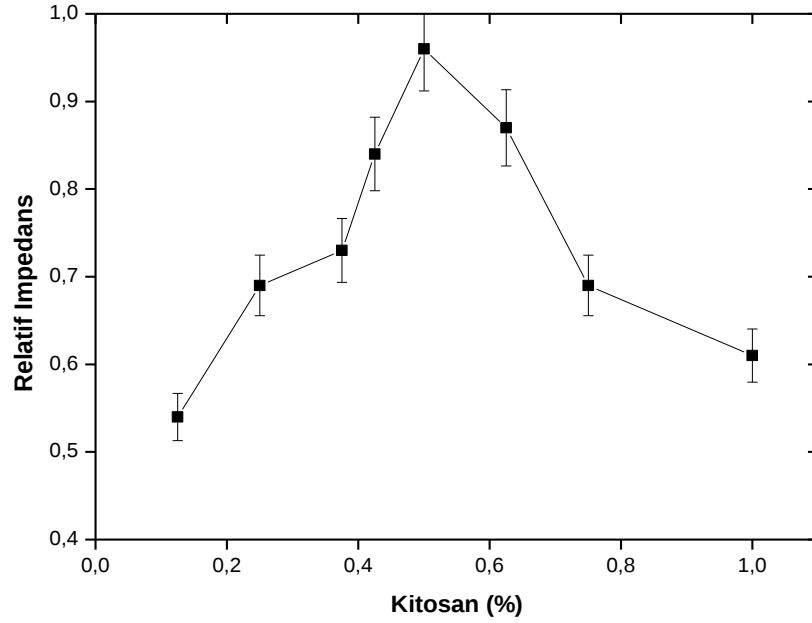
Yapılan tüm optimizasyon ve kalibrasyon çalışmalarında sinyal olarak relatif impedans kullanılmıştır.

$$\text{Relatif impedans} = [R_{ct}(2) - R_{ct}(1)] / R_{ct}(1) \quad (5.1)$$

$R_{ct}(1)$, PrA immobilize elektrodun yük transfer direnci ve $R_{ct}(2)$ ise IgG inkübe edilmiş elektrodun yük transfer direncidir. İmpedans ölçümleri elektrotların kararlı hale geldiği 180 mV açık devre potansiyeli (OCP)’nde alınmıştır.

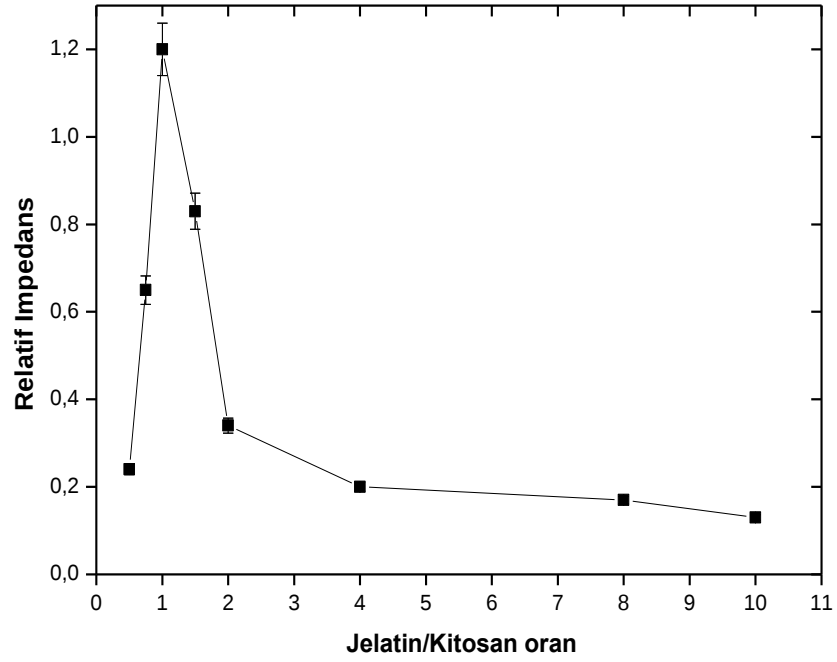
5.5.1 Polimer konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisi

PrA’nın IgG’ye bağlanması için en uygun polimer miktarının bulunması amacıyla polimer optimizasyonları yapılmıştır. Bu amaçla PrA (5µg/mL) ve glutaraldehit (0.004M) konsantrasyonları sabit tutularak farklı miktarlarda polimerler denenerek polimer konsantrasyonlarına karşı relatif impedans grafikleri çizilmiş ve optimum polimer miktarları bulunmuştur. Polimer optimizasyon çalışmalarında 1µg/µL IgG kullanılmıştır.



Şekil 5.7 Kitosan konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisi

Kitosan optimizasyonu amacıyla %0.125-1.0 aralığında kitosan denenmiş ve optimizasyon grafiği Şekil 5.7’de gösterilmiştir. Kullanılan kitosan oranının artmasıyla, elektrot yüzeyine daha fazla PrA immobilize olmuş, bu da sinyalin artmasını sağlamıştır. Ayrıca düşük miktarlarda polimer kullanılarak hazırlanan immünosensörlerin mekanik kararlılıklarının da az olduğu görülmüştür. Yüksek kitosan oranı ise taşıyıcı gözeneklerinin küçülmesine neden olmuş, bu durum PrA-IgG etkileşmesini kısıtladığından sinyalde düşüş gözlenmiştir. Ayrıca yüksek miktarda polimer kullanıldığında immobilizasyon jelinde katılaşma gözlenmiş, bu da immobilizasyonun sağlıklı yapılamamasına neden olmuştur. Elde edilen veriler neticesinde en uygun taşıyıcı konsantrasyonu % 0.5 kitosan olarak belirlenmiştir.

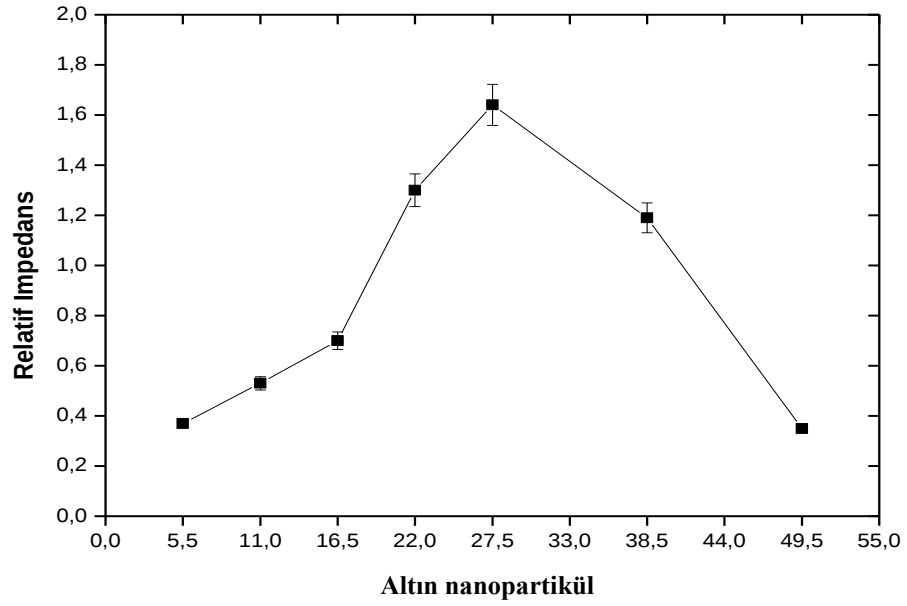


Şekil 5.8 Jelatin/Kitosan oranının immünosensör cevabına etkisi

Jelatin/Kitosan oranının optimizasyonu amacıyla 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 8, 10 oranlarında jelatin/kitosan denenmiştir, elde edilen veriler neticesinde çizilen optimizasyon grafiği şekil 5.8’de verilmiştir. Deneysel sonuçlardan en uygun taşıyıcı oranının 1:1 J/K olduğu belirlenmiştir.

5.5.2 AuNPs miktarının immünosensör cevabına etkisi

PrA immobilizasyon verimini ve elektron transfer hızını artırarak tayin sınırını düşürmek için 5nm’lik AuNPs nanopartiküller kullanılmıştır. Tasarlanan immünosensörlerden maksimum verim alabilmek için AuNPs nanopartikül miktarı optimize edilmiştir.

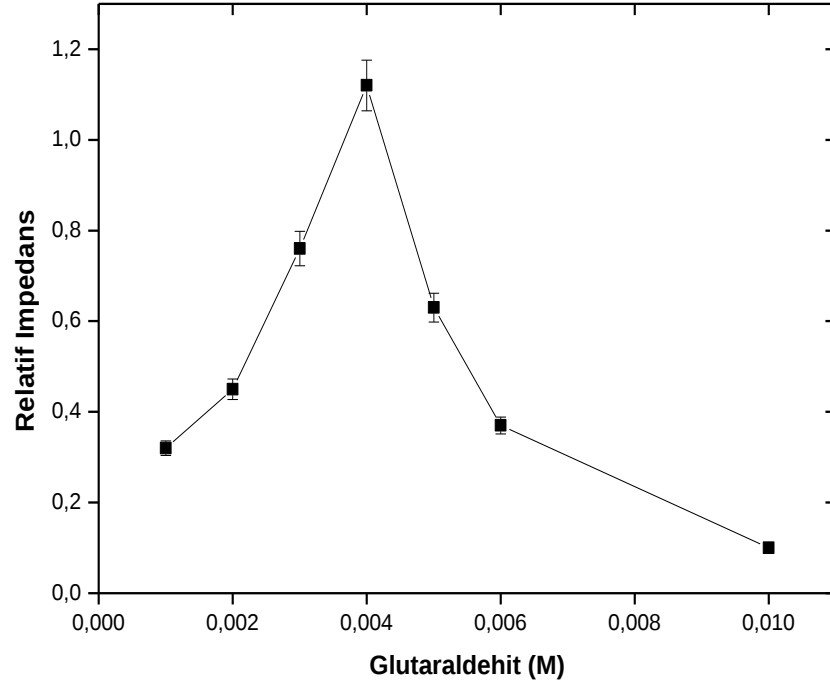


Şekil 5.9 Altın nanopartikül konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisi

AuNPs nanopartikül miktarının optimizasyonu amacıyla jelatin/kitosan karışımı (1:1) taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanan immobilizasyon çözeltilerine 0.090, 0.18, 0.27, 0.36, 0.45, 0.63, 0.81 μL altın nanopartikül eklenerek jelatin/kitosan-AuNPs-PrA elektrotları hazırlanmış ve impedans yanıtları araştırılarak optimum değer 0.45 μL olarak belirlenmiştir (Şekil 5.9). Düşük nanopartikül miktarları yüzey alanını gerektiği kadar arttıramazken; yüksek nanopartikül miktarları ise polimer yüzeyini tamamen kaplayarak direnci arttırmakta ve elektron transferini inhibe etmektedir.

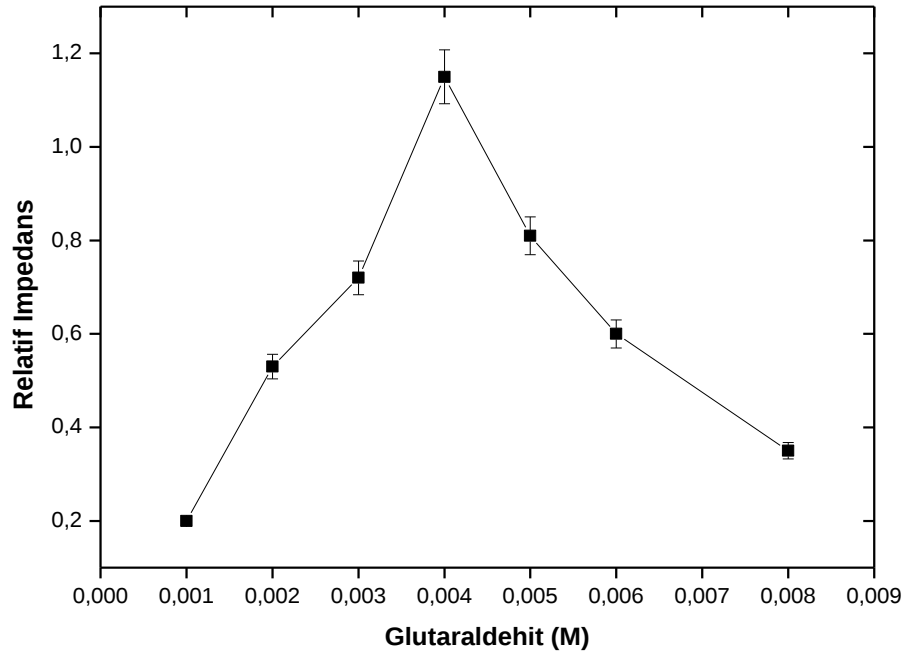
5.5.3 Çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisi

PrA'nın polimer yüzeylere immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı olarak 0.001-0.01M konsantrasyon aralığında glutaraldehit kullanılarak immobilizasyonlar gerçekleştirilmiş ve en uygun çapraz bağlayıcı konsantrasyonu araştırılmıştır.



Şekil 5.10 Glutaraldehit konsantrasyonunun kitosan-Pra immünosensör cevabına etkisi

Kitosan-PrA immünosensör cevabına glutaraldehit konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi amacıyla çizilen optimizasyon grafiği Şekil 5.10'da görülmektedir. PrA'nın kitosan taşıyıcı sistemine immobilizasyonu için optimum glutaraldehit konsantrasyonu 0.004 M olarak bulunmuştur.



Şekil 5.11 Glutaraldehit konsantrasyonunun jelatin/kitosan-Pra immünosensör cevabına etkisi

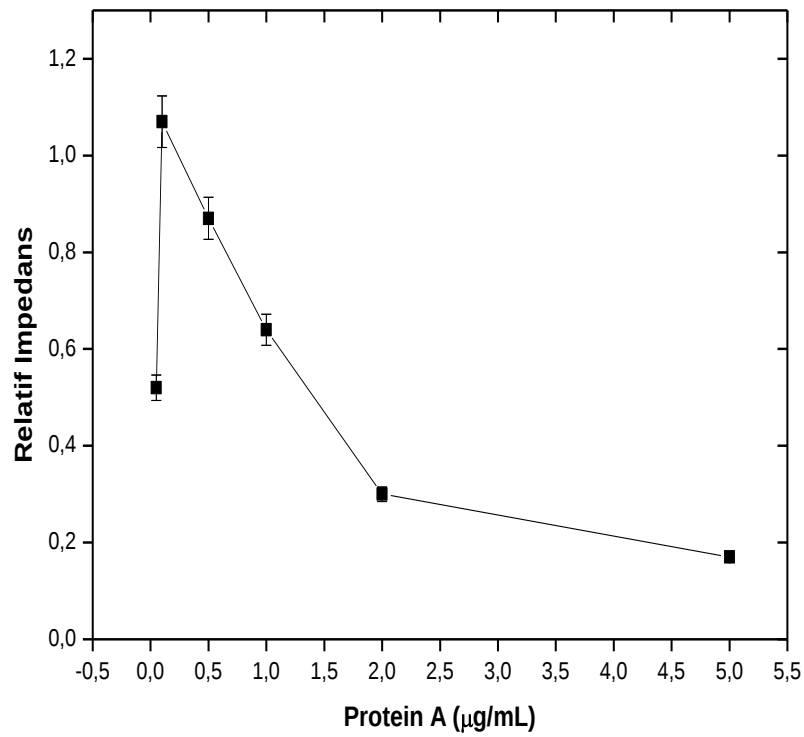
Şekil 5.11’de jelatin/kitosan kompozit yapısı kullanılarak hazırlanan immünosensörlere GA konsantrasyonun etkisini gösteren optimizasyon grafiği verilmiştir. Optimum GA konsantrasyonu 0.004M olarak bulunmuştur.

Yalnızca kitosan polimerinin kullanıldığı immünosensör sistemiyle; jelatin/kitosan kompozit yapısı kullanılarak hazırlanan immünosensörlerde 0.04M GA kullanılmıştır.

Daha yüksek GA konsantrasyonlarında polimerin kendi içinde çok fazla çapraz bağ yaparak gözenekli yapının küçüldüğü, sıkı bir polimer yapının oluştuğu; buna bağlı olarak PrA-IgG etkileşiminin kısıtlandığı düşünülmektedir. Düşük GA konsantrasyonlarında ise yüzeye yeterince PrA bağlanamamış bu da sinyalde azalmaya neden olmuştur (Sungur vd. 2004, Emregül 2005). Ayrıca düşük GA konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan immünosensörlerin mekanik kararlılıklarında azalma gözlemlenmiştir.

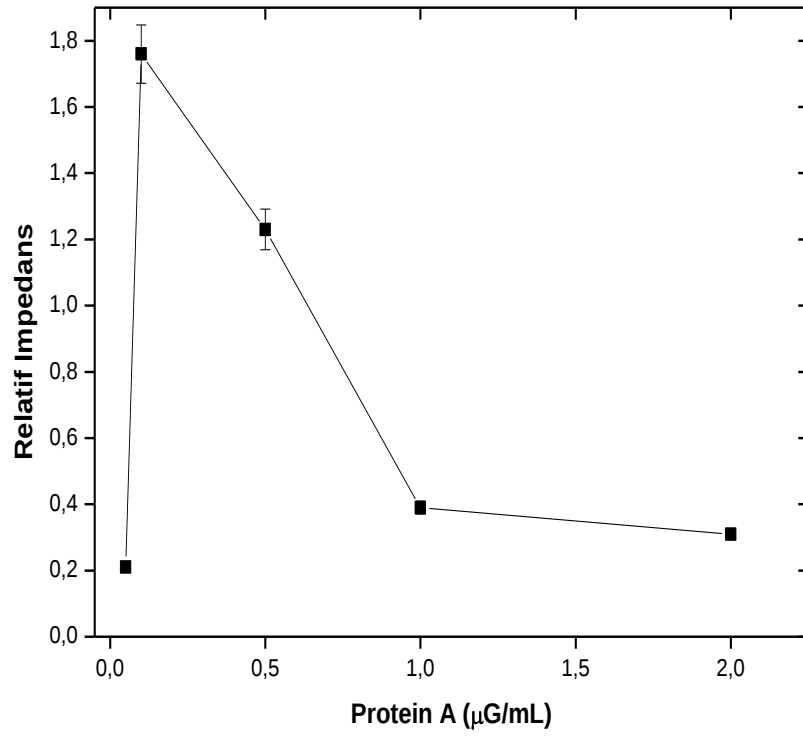
5.5.4 PrA konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisi

Tasarlanan immünosensörlerde tanıyıcı biyoelement olan PrA'nın optimizasyonu amacıyla önceki çalışmalarda bulunan optimum polimer ve çapraz bağlayıcı oranları sabit tutularak farklı PrA konsantrasyonlarında immünosensörler hazırlanmış ve impedimetrik yanıtlar incelenerek optimum PrA konsantrasyonları bulunmuştur.



Şekil 5.12 Protein A konsantrasyonunun kitosan-PrA immünosensör cevabına etkisi

Kitosan taşıyıcı sistemine PrA immobilizasyonunda % 0.5'lik kitosan ve 0.004 M glutaraldehit miktarları sabit tutularak 0.05-5.0 µg/mL konsantrasyon aralığında PrA içeren immünosensörler hazırlanmış ve şekil 5.12'de görülen optimizasyon grafiği elde edilmiştir. PrA'nın kitosana immobilizasyonu için optimum PrA konsantrasyonu 0.1 µg/mL olarak bulunmuştur.



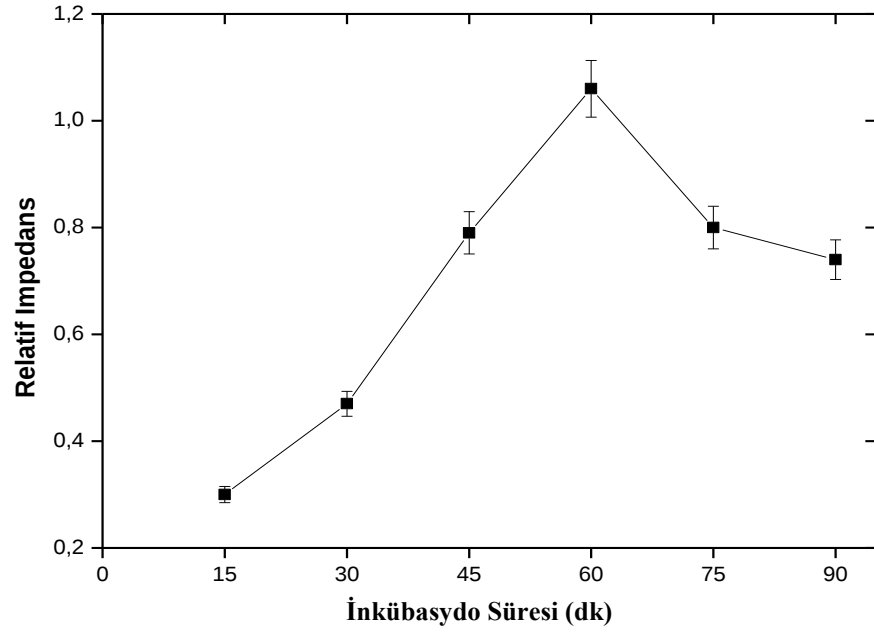
Şekil 5.13 Protein A konsantrasyonunun jelatin/kitosan-PrA immünosensör cevabına etkisi

Jelatin/kitosan taşıyıcı sistemine PrA immobilizasyonunda PrA miktarının optimizasyonu amacıyla 1:1 jelatin/kitosan oranı ve 0.004 M glutaraldehit miktarları sabit tutularak 0.05-2.0 µg/mL aralığında PrA içeren immünosensörler hazırlanmıştır. Jelatin/kitosan taşıyıcı sistemi için optimum PrA konsantrasyonu 0.1 µg/mL bulunmuştur (Şekil 5.13).

Artan PrA konsantrasyonu ile PrA-PrA arasında çapraz bağlar oluşmuş ve optimum taşıyıcı sistemine aşırı yükleme sonucu gözeneklerde tıkanma meydana gelmiş; bu da sinyalde düşüşe neden olmuştur.

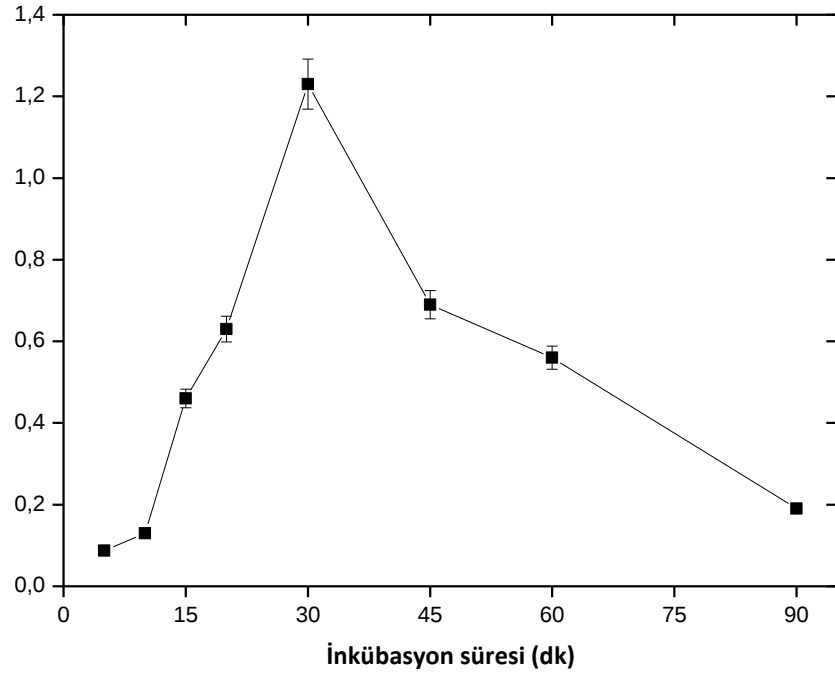
5.5.5 İmmünosensör cevabına IgG inkübasyon süresinin etkisi

İnkübasyon süresinin immünosensör cevabı üzerine etkisinin tespiti amacıyla immobilizasyon jeli ile kaplanmış Pt screen printed elektrotlar IgG ile 15, 30, 45, 60, 75 ve 90 dakika inkübe edilerek impedimetrik cevaplar ölçülmüş ve optimum inkübasyon süresi araştırılmıştır.



Şekil 5.14 İnkübasyon süresinin kitosan-PrA immünosensör cevabına etkisi

Bu amaçla geliştirilen kitosan immünosensörü için optimum inkübasyon süresi 60 dakika olarak bulunmuştur (Şekil 5.14).

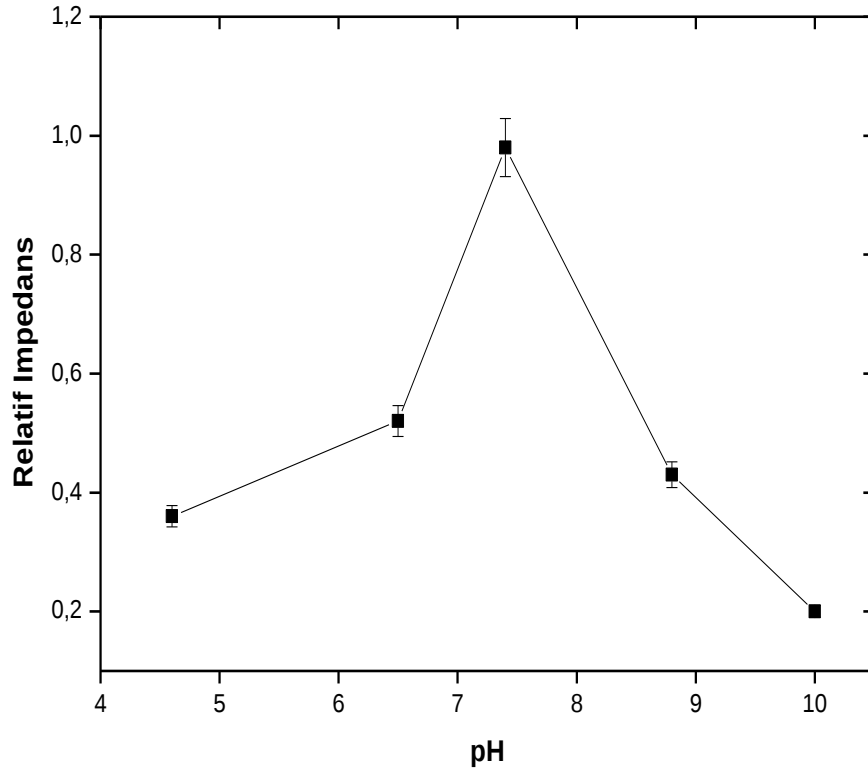


Şekil 5.15 İnkübasyon süresinin jelatin/kitosan-PrA immünosensör cevabına etkisi

Jelatin/kitosan taşıyıcı sistemi kullanılarak hazırlanan immünosensörü için optimum inkübasyon süresi 30 dakika olarak bulunmuştur (Şekil 5.15). Literatür incelendiğinde daha kısa (Kong 2011), daha uzun (Zarei 2012) ve hemen hemen aynı inkübasyon süresine sahip (Lin 2011) immünosensör çalışmaları olduğu görülmüştür.

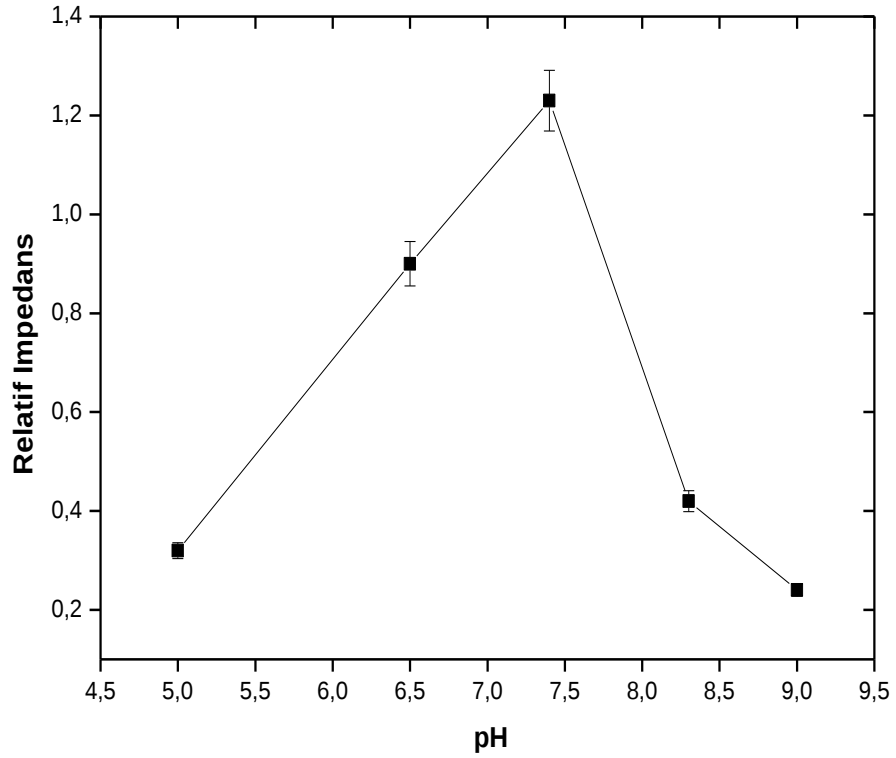
5.5.6 pH optimizasyonu

İmmünosensörlerin geliştirilmesinde asetat, fosfat, karbonat tamponları kullanılarak pH (5-9) optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla elektrokimyasal ölçümün alınacağı hücre içerisinde asetat tamponu (0.05 M, pH 5, 6.5), fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.4), karbonat tamponu (0.05 M, pH 8.3 ve 9) denenmiştir.



Şekil 5.16 Kitosan-PrA immünosensörü için pH optimizasyon grafiği

Geliştirilen kitosan-PrA ve jelatin/kitosan-PrA immünosensörleri için optimum pH değeri 7.4 olarak bulunmuştur.



Şekil 5.17 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörü için pH optimizasyon grafiği

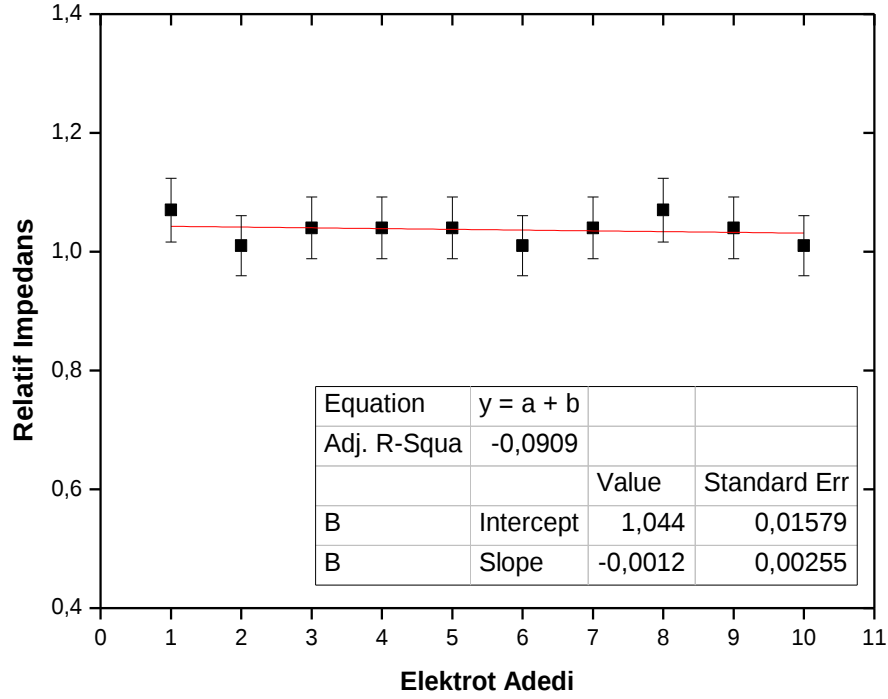
Hem kitosan-PrA; hemde J/K-PrA immünosensörleri için optimum pH 7.4 olarak belirlenmiştir. Optimum pH; biyolojik moleküllerin en kararlı halde bulunduğu aralıktadır. Daha düşük ve daha yüksek pH'larda hem IgG'nin hem de PrA'nın 3 boyutlu yapısı bozulmakta; bu durumda aralarındaki etkileşimi engellemektedir (Sun vd. 2011).

5.6 Tekrar Üretilirlik

Geliştirilen immünosensörlerin pratik kullanımında büyük önem arz eden tekrar üretilirlik çalışması amacıyla her bir immünosensörden 10'ar adet hazırlanmış ve 1µg/µL IgG ilavesi ile impedimetrik cevaplar değerlendirilerek aşağıdaki formül ile % relatif standart sapmaları hesaplanmıştır.

$$RSD = \frac{\text{standartsapma}}{\text{ortalamadeğer}} \times 100\%$$

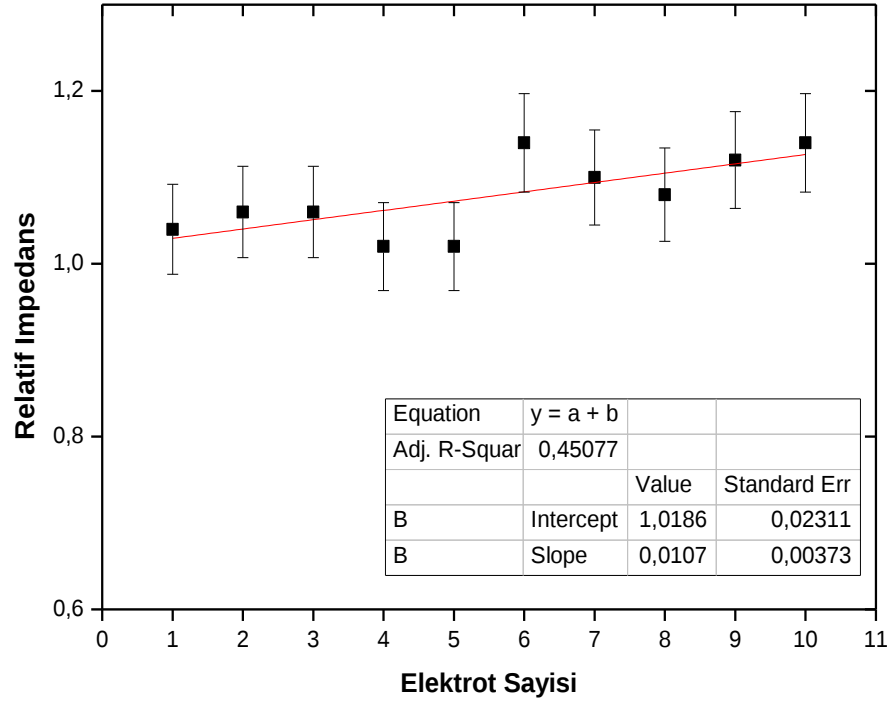
Kitosan-PrA immünosensörünün tekrar üretilebilirliğinin grafiği şekil 5.18’de verilmiştir.



Şekil 5.18 Kitosan-PrA immünosensörünün tekrar üretilebilirlik değerlendirmesi

Grafiğe göre ortalama değer 1.037; relatif standart sapma %1.5 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar geliştirilen Kitosan-PrA immunosensörün tekrar üretilebilirliğinin oldukça iyi olduğunu kanıtlamaktadır.

Jelatin/kitosan-PrA immünosensörünün tekrar üretilebilirliğinin grafiği şekil 5.19’da verilmiştir.

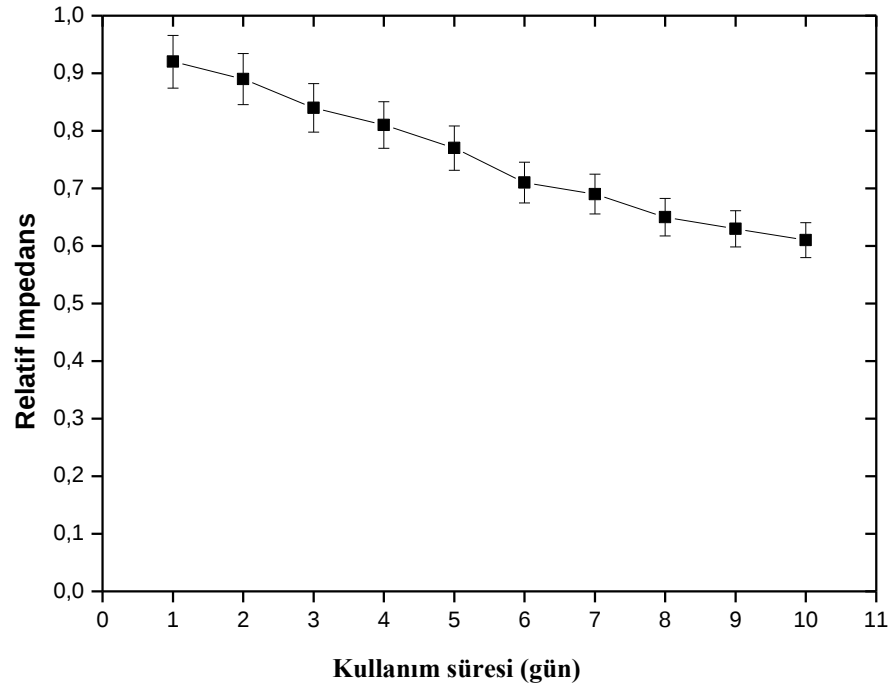


Şekil 5.19 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörü için tekrar üretilebilirlik değerlendirmesi

Grafiğe göre ortalama değer 1.078; relatif standart sapma % 2.14 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar geliştirilen immunosensörlerin tekrar üretilebilirliğinin oldukça iyi olduğunu kanıtlamaktadır.

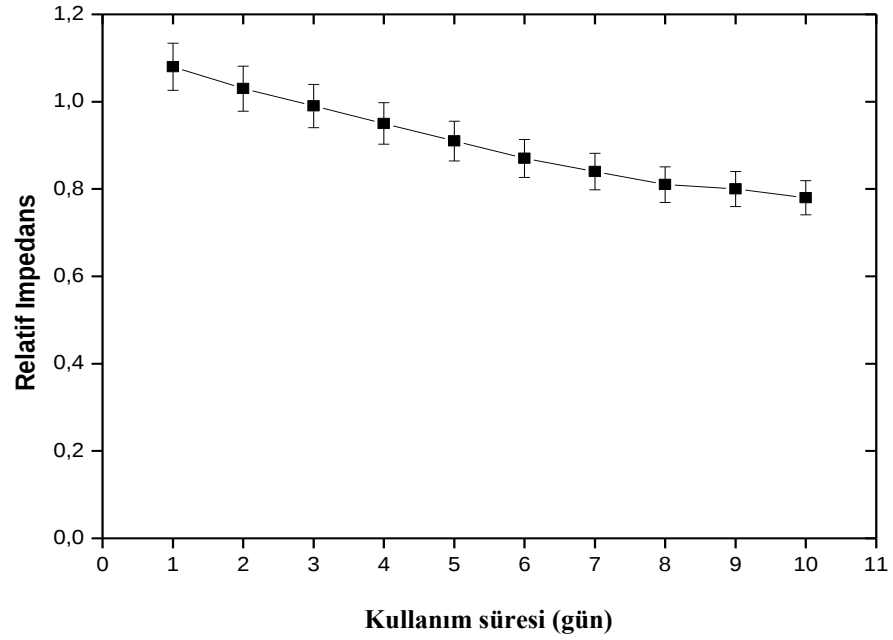
5.7 İmmünosensörlerin Kullanım Ömrü

İmmobilizasyon koşulları optimize edildikten sonra geliştirilen immünosensörlerin kullanım ömrü tespit edilmiştir. İmmünosensör her kullanım sonrası aminoasetik asit tamponuyla (0.1 M, pH 3) desorbe edilmiş, fosfat tamponunda (0.05 M, pH 7.4) yıkanmış, 4°C'ta fosfat tamponunda saklanmış ve her gün ölçüm alınmıştır. İmmünosensörlerin impedimetrik yanıtlarındaki düşüş değerlendirilerek kullanım süresi belirlenmiştir.



Şekil 5.20 Kitosan-PrA immünosensörünün kullanım süresi

Kitosan-PrA immünosensörü 10 gün boyunca aktivitesini korumuştur (Şekil 5.20). İmmünosensörün impedimetrik yanıtı 10. günün sonunda %66'ya düşmüştür. Kitosan üzerine PrA immobilizasyonu biyolojik aktiviteyi büyük oranda korusa da; denatürasyonun bir sonucu olarak immünosensör aktivitesinde düşüş gözlenmiştir.

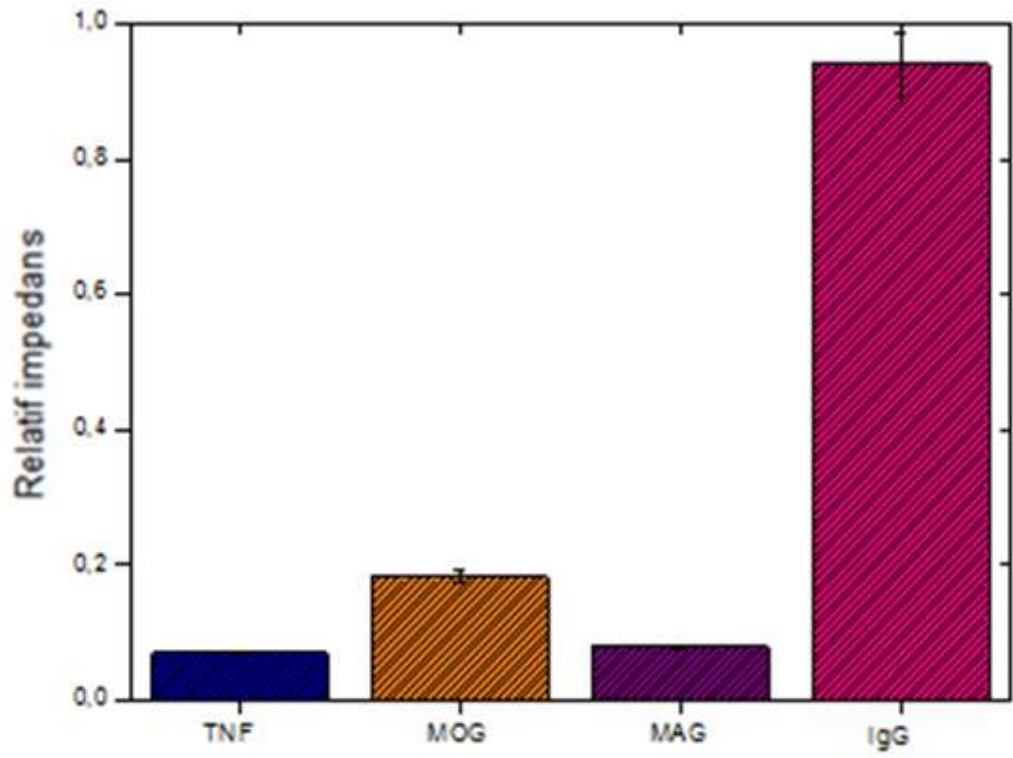


Şekil 5.21 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörünün kullanım süresi

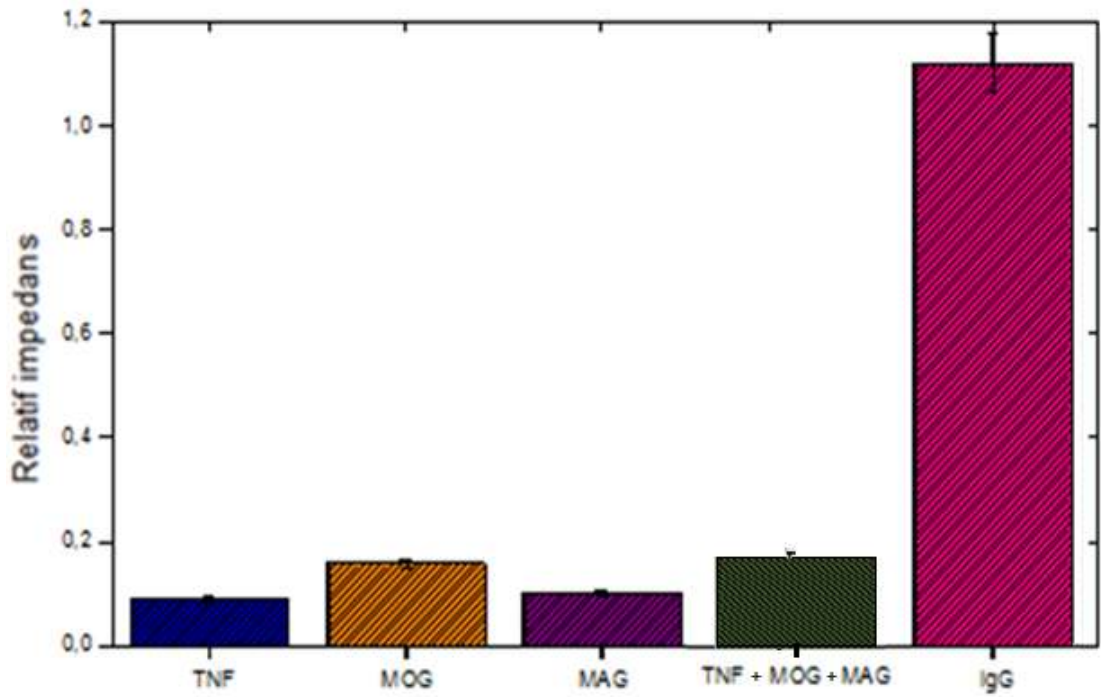
Jelatin/kitosan-PrA immünosensörü 10 günün sonunda aktivitesinin %72'sini koruduğu görülmüştür (Şekil 5.21).

5.8 Geliştirilen İmmünosensörler İçin Spesifik Olmayan Bağlanmanın İncelenmesi

Optimize kitosan-PrA ve J/K-PrA, immünosensörlerine farklı antikorların spesifik olmayan bağlanma etkisi incelenmiştir. Bu amaçla immünosensörlere IgG ile aynı konsantrasyondaki (1µg/µL) anti-TNFα, anti-MOG, anti-MAG ile inkübe edilmiş ve % spesifiteler [%spesifite= $((I_{IgG} - I_x) / I_{IgG}) \times 100$] formülüne göre hesaplanmıştır.



Şekil 5.22 Kitosan-PrA immünosensörü için spesifik olmayan bağlanmaların incelenmesi



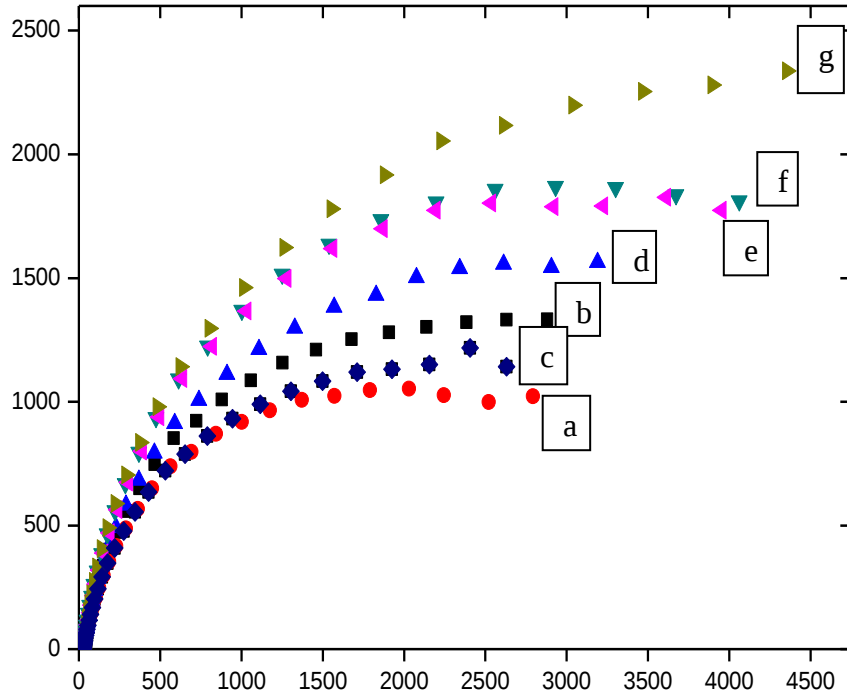
Şekil 5.23 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörü için spesifik olmayan bağlanmaların incelenmesi

Jelatin/kitosan-PrA immünosensörünün ise anti-TNF α , anti-MOG, anti-MAG antijenlerine karşı gösterdiği spesifiklik ile IgG'ye karşı gösterdiği spesifiklikler kıyaslandığında geliştirilen immünosensörün IgG'ye karşı %92 spesifikliğe sahip olduğu görülmüştür.

5.9 Geliştirilen İmmünosensörlerin Elektrokimyasal Davranışları

Geliştirilen immünosensörlerin yüzey modifikasyonlarının değerlendirilmesi amacıyla; immünosensörlerin farklı modifikasyon basamaklarında EIS ve CV'leri alınarak değerlendirilmiştir.

Şekil 5.24'te Pt screen printed elektrot üzerine yapılan jelatin/kitosan modifikasyonu ve sonraki işlemler sonucu impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği verilmiştir. Grafikten görülebileceği gibi çıplak elektrot (b) jelatin/kitosan kompoziti ile modifiye edildikten sonra (d) impedans artış göstermiştir. Bu artış; elektrot yüzeyinin jelatin/kitosan kompoziti ile başarılı bir şekilde kaplandığını ve kompozitin yalıtıcı etkisi olduğunu göstermektedir. Sisteme nanopartikül ilave edildiğinde ise (a) yük transfer direnci, çıplak elektrodunkinin altına düşmüştür. Bu durum; nanopartikülün yük transfer hızını ve yüzey alanını arttırıcı özelliğiyle açıklanabilir. Nanopartiküllerin bu özelliği sayesinde daha düşük tayin sınırına inilebilmiştir. Jelatin/kitosan-AuNPs ve jelatin/kitosan taşıyıcı sistemine PrA immobilize edildiğinde (c ve f) eğrileri elde edilmiştir. PrA immobilizasyonu sonucunda impedansın artması; PrA'nın ekstra bir direnç yaratmasından kaynaklanmaktadır. IgG inkübe edildiğinde ise PrA-IgG eşleşmesi gerçekleşmiş ve impedanslarda artış gözlenmiştir. Jelatin/kitosan-AuNPs-PrA elektroduna IgG inkübasyonu ile (e), jelatin/kitosan-PrA elektroduna IgG inkübasyonu ile (f) eğrileri elde edilmiştir.

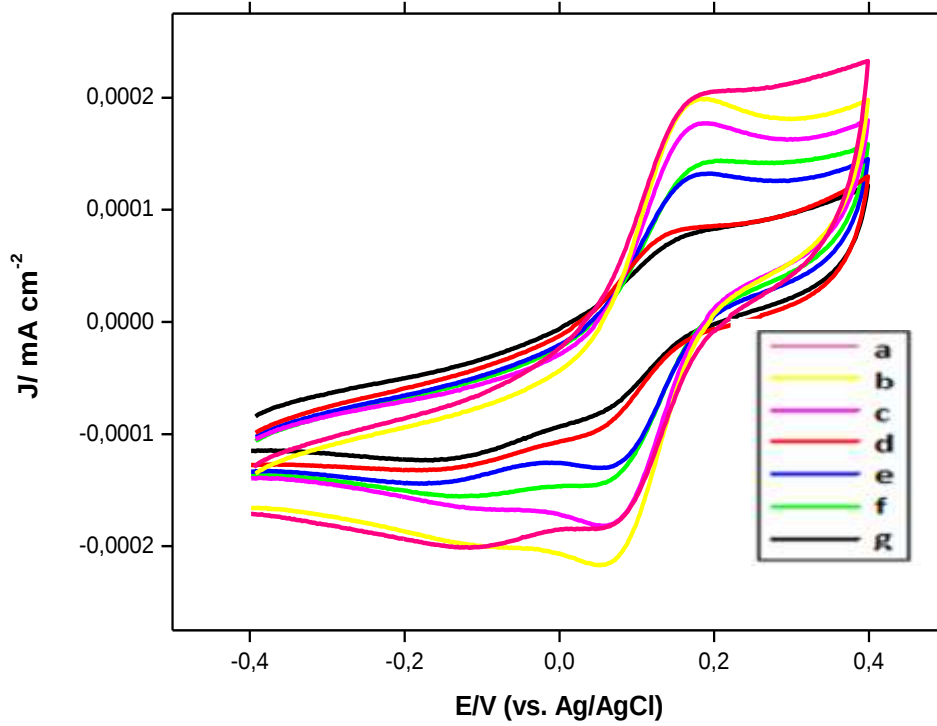


Şekil 5.24 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörünün impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği

a.Jelatin/kitosan-AuNPs elektrot b.Çıplak elektrot c.Jelatin/kitosan-AuNPs-PrA elektrot d.Jelatin/kitosan elektrot e.IgG inkübe jelatin/kitosan-AuNPs-PrA elektrot f.Jelatin/kitosan-PrA elektrot g.IgG inkübe jelatin/kitosan-PrA elektrot

Şekil 5.25'te Pt screen printed elektrot üzerine yapılan jelatin/kitosan modifikasyonu ve sonraki işlemler sonucu dönüşümlü voltamogramlarda meydana gelen değişimler gösterilmiştir. Çıplak elektrottan (b) geçen akım yoğunluğu yaklaşık olarak $0.002 \mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$ iken; jelatin/kitosan modifikasyonu sonucu (d) $0.0008 \mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$ seviyesine inmiştir. Akım yoğunluğunda meydana gelen bu azalma jelatin/kitosan kompozitinin başarılı bir şekilde elektrot yüzeyine kaplandığını göstermektedir. Elektrot yüzeyinde çok az da olsa elektrot aktarımının gerçekleşiyor olması; SEM ve AFM görüntüleriyle elde edilen homojen film yapısıyla açıklanabilir. Jelatin/kitosan taşıyıcı sistemine PrA immobilize edildiğinde (f) elektrottan geçen yük yoğunluğunda bir miktar artma olmuştur; bu durumun PrA yapısında bulunan farklı moleküllerin elektron aktarımını arttırdığı görüşüyle açıklanabilir. Elektrot yüzeyine altın nanopartiküller ilave edildiğinde elektrottan geçen yük yoğunluğu çıplak elektrottan fazladır (a). Jelatin/kitosan-AuNPs-PrA elektroda IgG inkübe edildiğinde (e), jelatin/kitosan-PrA

elektroda IgG inkübe edildiğinde (g) voltamogramı elde edilmiştir. Elde edilen CV sonuçları ile; impedans sonuçları birbirini destekler niteliktedir.



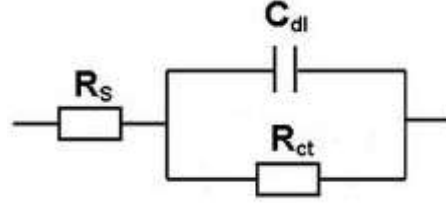
Şekil 5.25 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörünün dönüşümlü voltamogramı

a.Jelatin/kitosan-AuNPs elektrot b.Çıplak elektrot c.Jelatin/kitosan-AuNPs-PrA elektrot d.Jelatin/kitosan elektrot e.IgG inkübe jelatin/kitosan-AuNPs-PrA elektrot f.Jelatin/kitosan-PrA elektrot g.IgG inkübe jelatin/kitosan-PrA elektrot

Anodik ve katodik pik potansiyelleri kullanılarak hesaplanan formal potansiyeller ($E_0' = (E_{p,a} + E_{p,k})/2$) IgG inkübe jelatin/kitosan-PrA ve jelatin/kitosan-AuNPS elektrotlar için sırasıyla 117 ve 121 mV olarak hesaplanmıştır. Ayrıca pik ayrımları ($\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,k}$) sırası ile 87 ve 145 mV olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar IgG inkübe jelatin/kitosan-PrA ve jelatin/kitosan-AuNPs-PrA elektrodundaki elektron transferinin yarı tersinir olduğunu göstermektedir.

İmmünosensörlerde, immünoaksiyonların doğası gereği kinetik bir reaksiyon değil bağlanma olayı meydana gelmektedir. Bu nedenle immünosensörlerde bir ürün ya da analit difüzyonu değil, elektron difüzyonu gerçekleşmektedir. Bu nedenle

immünoensörlerin Nyquist grafiğinde difüzyonu gösteren doğrusal kısım görülmemekte, sadece yarım daire grafiği oluşmaktadır. Bu eğriye uygun devre modeli ise çözelti direnci (R_s), çift tabaka kapasitansı (C_{dl}) ve yük transfer direncinden meydana gelen, Warburg impedansını içermeyen Randles devresidir.

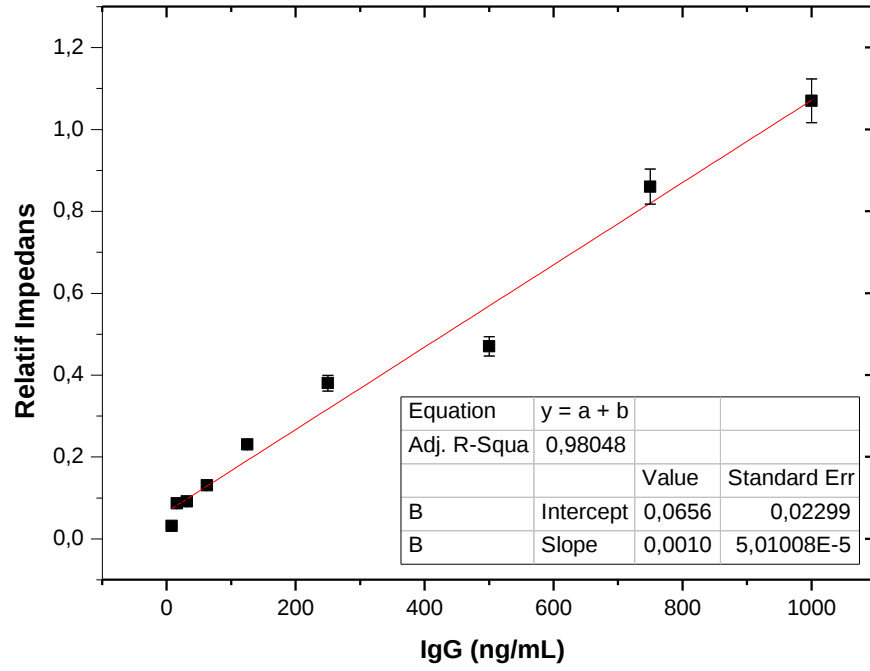


Şekil 5.26 Geliştirilen immünoensörlere ait Randles devresi

5.10 Kalibrasyon Grafikleri

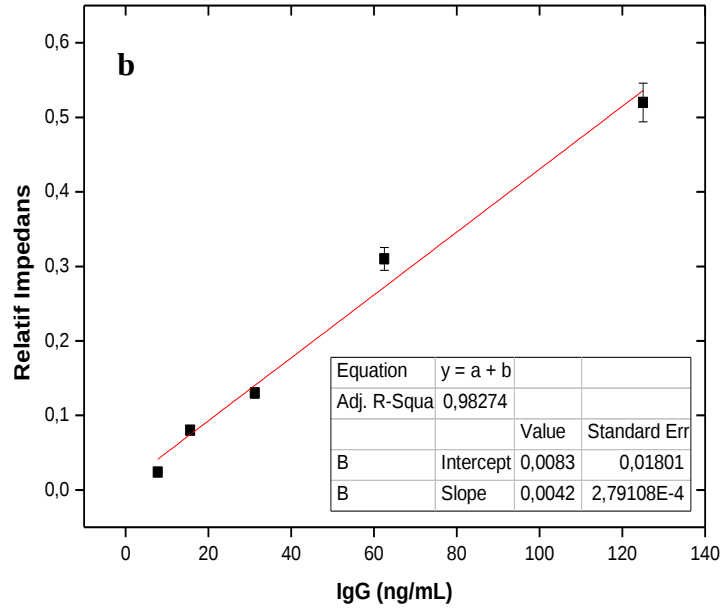
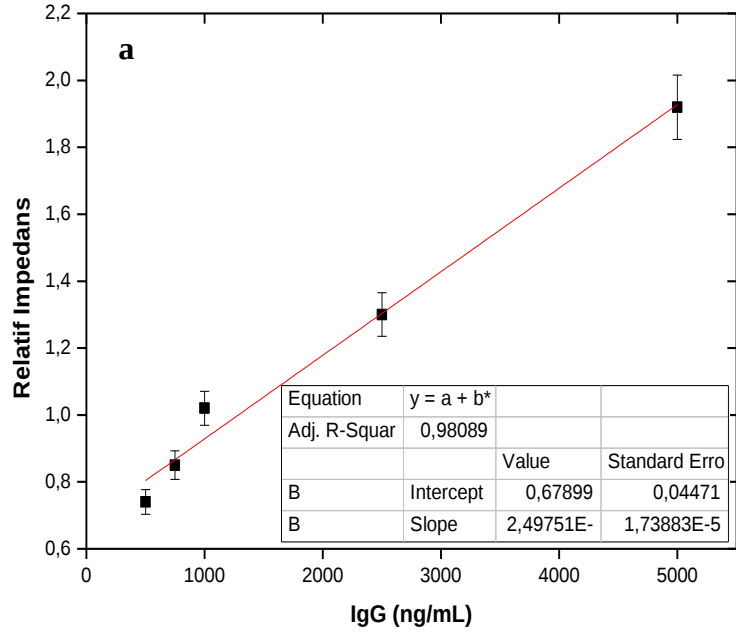
Tasarlanan immünoensörlere farklı IgG konsantrasyonları uygulanarak lineer aralık ve tayin limiti belirlenmiş, kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

Optimizasyonu tamamlanan kitosan-PrA immünoensörünün kalibrasyon grafiğinin hazırlanması amacıyla 7.8125-1000 ng/mL IgG konsantrasyonları denenmiş, determinasyon katsayısı (R^2) 0.98 olarak bulunmuştur (Şekil 5.26). Daha düşük konsantrasyonlarda anlamlı değerler elde edilememiştir.



Şekil 5.27 Kitosan-PrA immünosensörünün kalibrasyon grafiği

Optimizasyonu tamamlanan jelatin/kitosan-PrA immünosensörünün kalibrasyon grafiğinin hazırlanması amacıyla 7.8125-5000 ng/mL IgG konsantrasyonları denenmiş, determinasyon katsayısı yüksek konsantrasyon bölgesi (500-5000 ng/mL) için $R^2=0.98$, düşük konsantrasyon bölgesi (7.8125-125) için $R^2=0.98$ olarak bulunmuştur (Şekil 5.27).

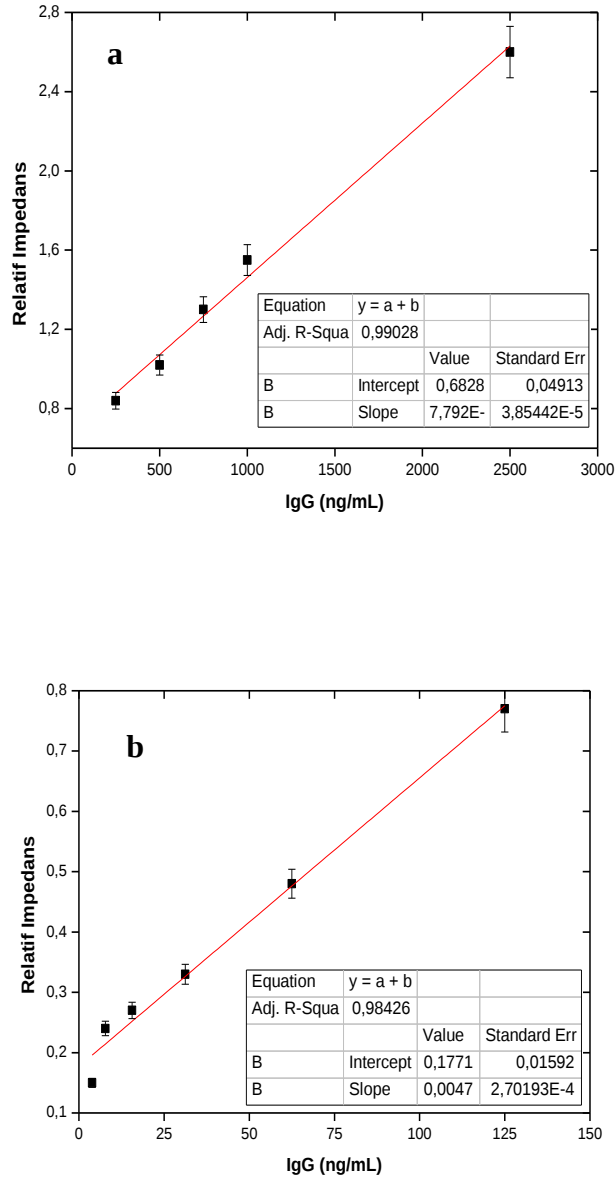


Şekil 5.28 Jelatin/Kitosan-PrA immünosensörü için kalibrasyon grafikleri

a.500-5000 ng/μL aralığı b.7.8125-125ng/μL aralığı

Optimizasyonu tamamlanan jelatin/kitosan-altın nanopartikül-PrA immünosensörünün kalibrasyon grafiğinin hazırlanması amacıyla 3.95-2500 ng/μL IgG konsantrasyonları

denenmiş, determinasyon katsayısı yüksek konsantrasyon bölgesi (250-2500 ng/μL) için $R^2=0.99$; düşük konsantrasyon bölgesi (3.95-125 ng/μL) için $R^2=0.98$ olarak bulunmuştur (Şekil 5.29). Ayrıca nanopartikül kullanmadan hazırlanan immünosensörlerde tayin sınırı 7.8125 ng/μL iken nanopartikül kullanılarak hazırlanan immünosensörlerde 3.95 ng/μL alt tayin sınırına kadar inilebilmiştir.



Şekil 5.29 Jelatin/Kitosan-AuNPs-PrA immünosensörü için kalibrasyon grafikleri
a. 3.95-125 ng/μL aralığı b. 250-2500 ng/μL aralığı

Çizelge 5.1 Geliştirilen immünosensörlerin çalışma koşulları ve performansları

	Jelatin-PrA	Kitosan-PrA	Jelatin/Kitosan-PrA	Jelatin/Kitosan-AuNPs-PrA
Polimer	%4	%0.5	1:1 (oran)	1:1 (oran)
Nanopartikül tanecik	-	-	-	27.5×10^{10}
Çapraz bağlayıcı M	0.002	0.004	0.004	0.004
PrA, µg/mL	0.5	0.1	0.1	0.1
İnkübasyon süresi, dk	60	60	30	30
pH	7.4	7.4	7.4	7.4
Tekrar üretilebilirlik, standart sapma %	3.6	1.5	2.3	-
Kullanım süresi (gün) ve kullanım süresi sonu aktivitesi %	10 gün %58	10 gün %66	10 gün %72	-
Formal potansiyel, mV	-	-	87	121
Pik ayrımı, mV	-	-	117	145
Devre modeli	Randles	Randles	Randles	Randles
Doğrusal aralık, ng/µL	15.625-1000	7.8125-1000	7.8125-5000	3.95-2500
Tayin limiti, ng/µL	15.625	7.8125	7.8125	3.95
Determinasyon katsayısı, R²	0.96	0.98	0.98/0.98	0.99/0.98
Kalibrasyon grafiği denklemi [y=relatif impedans (ohm), x=IgG (ng/µL)]	$y=0.00051x+0.18$	$y=0.001x+0.066$	$y=0.004x+0.0084$ (Düşük Bölge) $y=0.00025x+0.68$ (Yüksek Bölge)	$y=0.0047x+0.18$ (Düşük Bölge) $y=0.00079x+0.68$ (Yüksek Bölge)

5.11 BOS ve Serum Çalışmaları

Tasarlanan immünosensörlerden en düşük tayin limitine sahip olan jelatin/kitosan-AuNPs-PrA immünosensörü ile Ankara Üniversitesi İbni Sina Hastanesi Nöroloji

Bölümünde yatmakta olan hastalardan alınan gerçek biyolojik örnekler kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Sonuçlar çizelge 5.2’de görüldüğü gibidir.

Çizelge 5.2 Geliştirilen J/K-AuNPs-PrA immünosensörünün gerçek numunelerle denenmesi

	IgG (Serum) (g/L)	IgG (BOS) (mg/L)	BOS IgG indeksi
KONTROL	12.6	19.2	0.404
J/K-AuNPs-PrA	12.76±0.38	19.15±0.57	0.400
MS hastası	15.2	90.3	1.79
J/K-AuNPs-PrA	14.9±0.45	91.5±2.75	1.83

Geliştirilen J/K-AuNPs-PrA immünosensörü ile elde edilen sonuçlar ile hastane sonuçlarının birbiriyle uyum içerisinde olduğu görülmüştür. Geliştirilen sensörün en büyük avantajı yüksek doğruluk ile kısa sürede sonuca ulaşmaya imkan vermesidir. Günümüzde ELISA ile yapılan IgG analiz sonucu 2 günde çıkmaktayken; geliştirilen immünosensör kullanılarak 135 saniye içinde sonuca ulaşmak mümkündür.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada; otoimmün hastalıklar sırasında serum ve BOS'ta miktarı artan IgG tayini için spesifik, duyarlı, hızlı ve kolay sonuç verecek PrA immünosensörünün geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda; PrA immobilizasyonu için kitosan, jelatin/kitosan kompoziti ve jelatin/kitosan-AuNPs karışımı kullanılmıştır. PrA'nın taşıyıcı sistemlere immobilizasyonu amacıyla çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılmıştır.

İlk olarak FT-IR yardımıyla kullanılacak olan polimer yapıların ve kompozitin içerdiği bağların analizi gerçekleştirilmiştir. Genel olarak kompozit yapı; tek polimerlere ait spektrumla kıyaslandığında kitosana oldukça benzer bir profil vermiştir. Elde edilen bu bilgiyle polimer karışımının jelatine ait -OH ve -NH reaktif grupları ile kitosana ait polisakkarit yapıyı koruduğu sonucuna varılabilmektedir.

Ardından kullanılan jelatin ve kitosan polimerleri ile jelatin/kitosan kompozit yapısının ısı kararlılıklarının değerlendirilmesi amacıyla TGA'ları gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda jelatinin tamamen bozunmaya uğradığı ve termal olarak kararsız bir yapı sergilediği görülmüştür. Yapısında β bağı bulunan kitosanın parçalanması; jelatin ile kıyaslandığında daha uzun sürmüştür. Tez çalışmasında kullanılan polimer ve kompozit taşıyıcılar arasında termal olarak en kararlı yapının jelatin/kitosan kompozit yapısı olduğu görülmüştür. Kitosanın yapısında bulunan β bağlarının kararlılığı ile glutaraldehit yardımıyla jelatin ve kitosan arasında oluşturulan çapraz bağların termal kararlılığı arttırdığı düşünülmektedir.

Hazırlanan polimer, polimer-PrA filmlerinin SEM ve AFM görüntüleri alınmış ve morfolojik değerlendirme yapılmıştır. Yalnızca jelatin kullanılarak oluşturulan film yapısında yer yer boşlukların olması; jelatinin kuru ortamda kaldığında büzülüp, tampon içine daldırıldığında şişme özelliği göstermesinden kaynaklanmaktadır. Ölçümler içerisinde tampon bulunan hücrelerde gerçekleştiğinden deneyler sırasında jelatinin şişerek elektrot yüzeyini kaplayacaktır. Kitosanın ise elektrot yüzeyini tamamen kapladığı görülmektedir. Jelatin/kitosan kompozit yapısı kullanıldığında ise elektrot

yüzey alanının artarak daha fazla PrA'nın yüzeye tutunabildiği görülmüştür. SEM ve AFM sonuçları birbirini destekler nitelikte olup; PrA'nın taşıyıcı yüzeye immobilize edildiğini kanıtlamaktadır.

İmmünoşensörlerden maksimum performans alabilmek amacıyla taşıyıcı miktarları, nanopartikül miktarları, çapraz bağlayıcı ve PrA konsantrasyonları, inkübasyon süreleri optimize edilmiştir. Daha sonra EIS ve CV sonuçları değerlendirilerek immünoşensörlerin elektrokimyasal yapıları incelenmiştir. PrA'nın spesifik olamayan bağlanmalarının değerlendirilmesi amacıyla hazırlanan immünoşensörlere IgG ile aynı miktarda anti-TNF α , anti-MOG, anti-MAG inkübe edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. İmmünoşensörlerin kliniğe uyarlanmasında önem arz eden tekrar üretilebilirlik ve kullanım ömrü parametreleri çalışılarak, elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi amacıyla geniş aralıklarda IgG konsantrasyonlarında denemeler gerçekleştirilmiştir. Son olarak immünoşensörlerin klinik uygulaması amacıyla sağlıklı ve MS'li hastadan alınan BOS ve serum ile çalışmalar yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Değişik polimer miktarları kullanılarak hazırlanan immünoşensörlerin impedimetrik cevapları değerlendirilerek en uygun taşıyıcı oranları araştırılmıştır. Kitosan için %0.125-1.0, jelatin/kitosan için 0.5-10 (oran) aralıklarında polimerler kullanılarak hazırlanan immünoşensörler ile yapılan optimizasyon çalışması sonucunda; kitosan için % 0.5, jelatin/kitosan için 1:1 oranı en uygun taşıyıcı miktarları olarak tespit edilmiştir. Yüksek polimer konsantrasyonu; bağlanan PrA'nın artmasına; dolayısıyla sinyalde artışa sebep olmuştur. Ayrıca polimer konsantrasyonunun artması; geliştirilen immünoşensörün mekanik kararlılığında da artış sağlamıştır. Optimum polimer miktarından sonra ise çok sıkı istiflenen polimer molekülleri; polimer film yüzeyindeki gözenekli yapının bozulmasına neden olmuştur (Sungur vd. 2004, Emregül 2005). Gözenekli yapının bozulmasıyla; PrA yüzeyde tutunamadığı için PrA-IgG eşleşme oranı azalmış; bu da sinyalde azalmaya sebebiyet vermiştir. Yapılan literatür taramasında kitosanın genellikle % 0.5-% 1 oranlarında (Yu vd. 2004, Luo vd. 2005) kullanıldığı görülmüştür.

Kitosanın; hemostatik (Ong 2008), yağ bağlayıcı (Gades 2005), yara iyileştirici (Hiroshi 2001), biyoyapıştırıcı (George 2006) özellikleri yanı sıra; antimikrobiyal özellikte olması (Zivanovic 2007; Sarasam 2008), ve biyolojik olarak yenilenebilir (Khor, 2003) olması sebebiyle daha çok doku mühendisliği uygulamaları yaygındır. Ayrıca kitosanın sert dokularda osteogenesisi (Klokkevold 1996) ve osteoiletkenliği (Tang 2008) geliştirdiğini, yumuşak dokularda yara iyileştirme yeteneği (Ishihara 2002) olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur. Kitosanın literatürde karşılaşılan diğer kullanım alanları; toksik olmayan parçalanma ürünleri ve reaktif grupları ile ilaç yapılarına kolayca bağlanması nedeniyle ilaç etken madde taşıyıcısı (Kas 1997, Agnihotri 2004), kemik çimentolarının geliştirilmesinde katkı malzemesi olarak kullanılması (Rochet 2009), gen taşıyıcı sistemler (Dang 2006), kontrollü salım sistemleri (Yilgor 2009), yumuşak doku ya da kıkırdak doku mühendisliği için doku destek malzemeleri (Wang 2005, Tıgılı 2009), virüs ve bakterilere karşı antimikrobiyal ajan (Rabea 2003) şeklinde sıralanabilir. Jelatin suda çözünebilen ve in vivo ortamda çok hızlı bir şekilde bozunabilen bir yapıdır. Sensör yüzeyi modifikasyonunda taşıyıcı olarak kullanılmasının (Wael 2010) yanı sıra; toksik olmayan parçalanma ürünleri nedeniyle doku mühendisliğinde yapay deri malzemeleri (Kawai 2000), kardiyak doku mühendisliği için doku destek malzemeleri (Rosellini 2009) ve yara örtüsü malzemeleri (Ulubayram 2001) olarak kullanımı bulunmaktadır.

Jelatin/kitosan kompozit yapısının epitel kök hücreleri için taşıyıcı (Mata vd. 2013), yara iyileşmesinde doku iskelesi (Alizadeh vd. 2013, Enrione vd. 2013) olarak kullanıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur.

Literatürde jelatin/kitosan kompozit yapısının kullanıldığı sensör çalışmasına rastlanmamıştır.

Jelatin/kitosan-AuNPs immünosensör sisteminde AuNPs optimizasyonu amacıyla farklı konsantrasyonlarda AuNPs ($5.5-49.5 \times 10^{10}$ tanecik içeren altın nanopartikül konsantrasyonları) denenmiştir. Elde edilen veriler neticesinde optimum AuNPs konsantrasyonu 27.5×10^{10} tanecik AuNPs olarak belirlenmiştir. Düşük miktarda nanopartikül kullanımı yüzey alanını yeterli şekilde arttırmazken; yüksek miktarda

nanopartikül kullanıldığında polimer filmin gözenekleri tamamen nanopartikül ile dolmakta; bu da direnci arttırarak elektron transferini inhibe etmektedir. İmmünoşensör geliştirilirken sıvı halde bulunan AuNPs kullanımı ayrıca uygulama kolaylığı sağlamıştır. Katı nanopartiküller kullanıldığında tartım yapılması, jel sistemi içerisine nanopartikülün homojen bir şekilde dağıtılması, hazırlanan immobilizasyon jelinin homojen olarak elektrot yüzeyine bırakılması zaman zaman sıkıntılara sebep olabilmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan sıvı haldeki AuNPs ile bu sıkıntılar bertaraf edilmiştir. Polimer karışımına NP ilavesinden sonra yapılan vorteksleme işlemi ile tamamen homojen bir karışım elde edilmiş ve bu sayede elektrot yüzeyinde nanopartikül topaklanması gibi sorunlarla karşılaşılmamıştır.

PrA'nın taşıyıcı sistemlere immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı olarak 0.001-0.008 M konsantrasyon aralığında glutaraldehit kullanılmıştır. Optimum glutaraldehit miktarı hem kitosan ve hem jelatin/kitosan için 0.004 M olarak belirlenmiştir. Artan GA konsantrasyonu ile PrA'nın polimer yüzeye bağlanması artmıştır. Ancak yüksek miktarda çapraz bağlayıcı kullanımı; polimerlerin kendi içindeki çapraz bağlanmalarını arttırmış, PrA inaktivasyonuna sebep olmuştur (Sungur vd. 2004, Emregül 2005).

IgG'ye yüksek afinite gösteren PrA'nın optimizasyonu amacıyla kitosan için 0.05-5.0 µg/mL konsantrasyon aralığında; jelatin/kitosan için 0.05-2.0 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Optimum PrA konsantrasyonu her iki immünoşensör sistemi içinde 0.1 µg/mL olarak belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonda PrA kullanılması durumunda polimer filmin taşıyıcı gözeneklerinde aşırı doygunluk meydana geldiği için elektron difüzyonu engellenmekte ve elektron transfer hızı azaldığından sinyalde de düşüş gözlenmektedir.

Optimum glutaraldehit miktarı hem kitosan ve hem jelatin/kitosan için 0.004 M; optimum PrA konsantrasyonu ise her iki immünoşensör sistemi içinde 0.1 µg/mL olarak belirlenmiştir. Jelatin/kitosan kompozit yapısı kullanıldığında daha fazla glutaraldehit kullanılması gerektiği düşünülebilir. Ancak immobilizasyon jellerinin hazırlanma aşamasında polimerlerin birbirine bağlanması amacıyla ekstra bir çapraz bağlayıcı

eklenmemiş; bunun yerine vorteksleme işlemi yapılarak polimerlerin fiziksel etkileşimler ile bir araya gelmesi hedeflenmiştir. Kullanılan PrA miktarı da her iki immünosensör sistemi için aynıdır. Kullanılan taşıyıcı sistemlerde hem kitosanın hem de jelatin/kitosan kompozitinin fonksiyonel grupları $-NH_2$ ve $-OH$ 'tır. Aynı miktarda PrA'nın taşıyıcı sistemlere immobilizasyonu amacıyla aynı konsantrasyonda çapraz bağlayıcıya ihtiyaç duyulmuştur.

PrA'nın IgG'ye en iyi şekilde bağlanmasını sağlamak amacıyla IgG inkübasyon süreleri (15, 30, 45, 60, 75 ve 90 dk inkübe edilerek) optimize edilmiştir. Geliştirilen kitosan immünosensörü için optimum inkübasyon süresi 60 dakika olarak bulunurken; jelatin/kitosan immünosensörü için 30 dakika olarak bulunmuştur. Immobilizasyon jelleri hazırlanırken jelatin/kitosan karışımının mekanik kararlılığının daha fazla olduğu ve jelin daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Jelatin/kitosan karışımı kullanılarak hazırlanan elektrotlar 15 dakika içinde kuruyarak ölçüme hazır hale gelmiş; 30 dakika inkübasyon süresi beklenip ölçüm alındığında en yüksek sinyaller elde edilmiştir. Yalnızca kitosan kullanılarak hazırlanan elektrotlar ise daha geç kurumuş (yaklaşık 30 dakika), dolayısıyla daha geç ölçüme hazır hale gelmiştir; 60 dakika inkübasyon süresi dolduğunda ise en yüksek sinyaller elde edilebilmiştir. IgG'nin optimum inkübasyon süresinden sonra etkinliğini kaybettiği düşünülmektedir. Literatür incelendiğinde daha kısa inkübasyon süresine sahip (Kong 2011), daha uzun inkübasyon süresine sahip (Zarei 2012) ve hemen hemen aynı inkübasyon süresine sahip (Lin 2011) immünosensör çalışmaları olduğu görülmüştür.

Geliştirilen immünosensörlerin performanslarının değişimi asetat, fosfat, karbonat tamponları kullanılarak farklı pH'larda (pH=5-9 arası) değerlendirilmiş ve pH optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimum değer geliştirilen her iki immünosensör sistemi için de 7.4 olarak bulunmuştur. Kitosanın pH<6.5'te iyi çözündüğü bilindiğinden asetat tamponu (pH=5-6.5) kullanılarak alınan ölçümlerde kitosanın kısmen çözündüğü ve film yapısının bozulduğu gözlenmiştir. Film yapısında meydana gelen bozulma nedeniyle sinyaller düşüktür. Değişen pH protein yapısına sahip olan taşıyıcı sistemlerin üç boyutlu yapısında değişmeye, konformasyonun bozulmasına

sebebiyet verdiğinden sinyallerde azalma gözlenmiştir. Optimum pH değeri her iki immünoşensör sistemi için proteinlerin en kararlı halde bulunduğı aralıktadır.

Geliştirilen immünoşensörlerin pratik uygulanmasında önem arz eden tekrar üretilebilirlik araştırması amacıyla her bir elektrottan 10'ar adet hazırlanmış ve verdikleri impedimetrik yanıtların yakınlığı araştırılmıştır. Elde edilen eğrilerin relatif standart sapmaları kitosan-PrA immünoşensörü için %1.5; jelatin/kitosan-PrA immünoşensörü için ise %2.14 olarak hesaplanmıştır. Yalnızca jelatin kullanılarak hazırlanan immünoşensörün relatif standart sapması %3.6'dır. Kitosan tek başına taşıyıcı yüzey olarak kullanıldığında tamamen homojen bir film yapısı elde edildiğinden standart sapma da düşüktür. Jelatinin ise hidrojel özelliğı dolayısıyla şişme ve büzülme davranışları gösternesini, film yapısında deformasyona neden olduğundan standart sapma yüksektir. Jelatin/kitosan-PrA immünoşensörünün standart sapması kitosan-PrA immünoşensörüne göre daha yüksek olması beklenen bir sonuçtur ve jelatinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Geliştirilen immünoşensörlerin raf ömürlerinin araştırılması amacıyla yapılan çalışmada; kitosan-PrA ve jelatin/kitosan-PrA immünoşensörlerinin 10 gün boyunca aktivitelerini koruduğı gözlenmiştir. Kitosan-PrA immünoşensörünün impedimetrik yanıtı 10. günün sonunda %66'ya; ve jelatin/kitosan-PrA immünoşensörünün impedimetrik yanıtı ise %72'ye düşmüştür. Jelatin/kitosan film yapısının kitosan film yapısına göre daha kararlı olduğu TGA, SEM ve AFM çalışmalarında açık bir şekilde görülmüştür. En kararlı film yapısının jelatin/kitosan kompoziti kullanılarak hazırlanan immünoşensörlerde meydana geldiğı, bu sonuçtan da anlaşılmaktadır. Literatürde kullanım ömrü sonunda daha düşük (Li vd. 2011, Zhang vd. 2008) ve daha yüksek (Ordonez ve Fabregas 2007, Kong vd. 2011) aktivitelere sahip immünoşensör çalışmaları bulunmaktadır.

İmmünoşensör tasarımında kullanılan PrA'nın farklı biyomoleküllere afinite gösteren bir hücre yüzey reseptörü olduğu bilindiğinden spesifik olmayan bağlanmaların değerlendirilmesi amacıyla; immünoşensöre anti-TNF α , anti-MOG, anti-MAG inkübe edilmiş ve sinyaller değerlendirilmiştir. Geliştirilen kitosan-PrA immünoşensörlerinin

anti-TNF α , anti-MOG ve anti-MAG'a gösterdikleri spesifiteler sırasıyla %7, %14 ve %8'dir. Jelatin/kitosan-PrA immünosensörünün ise anti-TNF α , anti-MOG, anti-MAG antijenlerine karşı gösterdiği spesifiklik sırasıyla %8, %19, %9 olarak hesaplanmıştır. Tez kapsamında geliştirilen immünosensörlerin IgG'ye karşı yüksek spesifikliğe (en az %81) sahip olduğu görülmüştür.

Geliştirilen immünosensörlerin CV voltamogramları kullanılarak formal potansiyelleri ve pik ayrımları hesaplanmış, immünosensörlerin tersinirliği araştırılmıştır. Nyquist grafikleri incelendiğinde, immünosensörler için en uygun devre modelinin Randles devresi olduğu görülmüştür. Anodik ve katodik pik potansiyelleri kullanılarak hesaplanan formal potansiyeller ($E_0' = (E_{p,a} + E_{p,k})/2$) IgG inkübe jelatin/kitosan-PrA ve jelatin/kitosan-AuNPS elektrotlar için sırasıyla 117 ve 121 mV olarak hesaplanmıştır. Ayrıca pik ayrımları ($\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,k}$) sırası ile 87 ve 145 mV olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar IgG inkübe jelatin/kitosan-PrA ve jelatin/kitosan-AuNPs-PrA elektrodundaki elektron transferinin yarı tersinir olduğunu göstermektedir. İmpedans ve CV grafiklerindeki değişimler literatürdekilerle uyum içerisindedir (Pei vd. 2001, Tang vd. 2007, Zhang vd. 2008, Li vd. 2008, Wu vd. 2009, Kong vd. 2011).

Geliştirilen immünosensörlerin optimizasyonları tamamlandıktan sonra; çeşitli konsantrasyon aralıklarında IgG'ler inkübe edilerek kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Kitosan-PrA için 7.8125-1000 ng/mL; jelatin/kitosan-PrA için 7.8125-5000 ng/mL; jelatin/kitosan-AuNPs-PrA için 3.95-2500 ng/ μ L konsantrasyon aralığında IgG kullanılmıştır. Kitosan-PrA immünosensörü için determinasyon katsayısı (R^2) 0.98 olarak bulunmuştur. Jelatin/kitosan-PrA için iki lineer aralık belirlenmiş yüksek konsantrasyon (250-5000 ng/mL) bölgesi için $R^2 = 0.98$, düşük konsantrasyon bölgesi (7.8125-125) için $R^2=0.98$ olarak bulunmuştur. Altın nanopartikül kullanılarak hazırlanan immünosensörün yüksek konsantrasyon bölgesi (250-2500 ng/ μ L) için $R^2=0.99$, düşük konsantrasyon bölgesi (3.95-125 ng/ μ L) için $R^2=0.98$ olarak bulunmuştur. Ayrıca nanopartikül kullanmadan hazırlanan immünosensörlerde tayin sınırı 7.8125 ng/ μ L iken, nanopartikül kullanılarak hazırlanan immünosensörlerde 3.95 ng/ μ L alt tayin sınırına kadar inilebilmiştir. Kullanılan altın nanopartikül ile elektrot yüzey alanı

arttırılmış; böylece yüzeye daha fazla PrA immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. PrA-IgG eşleşmesi arttığından daha düşük tayin limitine inilebilmiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında en düşük tayin limitine sahip jelatin/kitosan-AuNPs-PrA immünosensörü ile BOS ve serum çalışması yapılmıştır. BOS ve serum çalışması için sağlıklı ve MS'li hastalardan alınan örneklerin içerdiği IgG miktarları immünosensör ile ölçülmüş; hastaneden alınan ELISA sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. İmmünosensör ile elde edilen sonuçlar ile hastane sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

Sonuçlar toparlandığında; hazırlanan immünosensörlerden en kararsızının yalnızca jelatin taşıyıcısı kullanılarak hazırlanan immünosensör olduğu görülmüştür. Tayin limiti yüksek; determinasyon katsayısı düşük olan jelatin-PrA immünosensörü için kullanılan optimum PrA miktarı da diğer immünosensörlerin optimum miktarlarından daha fazla olduğundan ekonomik olmadığı ve klinik kullanım için uygun olmadığı düşünülmektedir. Pratik kullanıma imkan vermeyen sonuçlar ve düşük performans nedeniyle deney sonuçlarına tez kapsamında yer verilmemiştir. Taşıyıcı yüzey olarak kitosanın kullanıldığı immünosensör ile jelatin/kitosan kompozitinin kullanıldığı immünosensörün optimum PrA ve GA miktarları ile tayin limiti ve determinasyon katsayıları aynıdır. Ancak jelatin/kitosan polimer karışımı kullanıldığında yüzey alanı arttığından daha üst seviyelerde IgG içeren numunelerin analizleri de gerçekleştirilebilmiştir. Ayrıca jelatin/kitosan kompozit yapısının inkübasyon süresi daha kısa olduğundan, kısa sürede sonuca ulaşabilmek adına klinik kullanımda daha avantajlı olacağı düşünülmektedir. Nanopartikül ilaveli jelatin/kitosan-PrA immünosensörü ise daha düşük tayin limitine inilmesine olanak sağlamıştır.

Çizelge 6.1 Literatürdeki IgG tayinine yönelik immünosensörler ile tez çalışmasının karşılaştırılması

<i>Ref</i>	<i>İmmünosensör</i>	<i>Etiket</i>	<i>Metod</i>	<i>İnk. süresi (dk)</i>	<i>Tekrar üre tim (% RSD)</i>	<i>Kullan ım ömrü</i>	<i>Alt tayin limiti</i>
Pei ve ark (2001)	Au disk elekt/ anti-IgG	Sterptavidin-biyotin	CV ve EIS	60	% 8 (n=6)	-	2 µg/mL
Liu vd.(2006)	CPE/CdFe ₂ O ₄ mag.NP/ Anti IgG	HRP	Ampero metri	50	% 4.5 (n.=4)	14 gün stabil	180 ng/mL
Wang ve Tang (2008)	Pt/PB/3DSG/ Nanogold/Anti-IgG	HRP	Ampero metri	7	%3.9 (n=11)	% 90.3 (8 gün)	0.56 ng/mL
Zhong vd.(2009)	ITO/SiO ₂ / Anti-IgG	HRP	CV	25	% 5.7 (n=5)	% 89 (32 gün)	0.1 nmol/L
Tang vd.(2009)	Au/poly(amido amine) G4 dendrimer/ Au-SiO ₂ /anti-IgG	Ferrosen karboksi aldehit	QCM/ CV (flow cell)	60	-	% 90.2 (17 gün)	1.5×10 ⁻⁵ mol/L
Shiang vd.(2010)	AuNDs/PrA	-	Lumines ans	60	-	-	10 nM
Li ve ark. (2014)	ITO- NS aluminum oksit(NAO)/PD MS/PrA	Fluorophere	Fluoresc ence microscop e	40	-	-	20 pg/mm ²
<u>Tez</u>	Pt (screen-printed)/ J/K-AuNPs-PrA	-	EIS	30	% 2.14 (n=10)	% 72 (10 gün)	3.95 ng/mL

Literatür araştırıldığında IgG tayinine yönelik farklı immünoensör çalışmaları olduğu görölmüştür. Bu immünoensör çalışmaları ile tez kapsamında geliştirilen J/K-AuNPs-PrA immünoensörünün sonuçlarının karşılaştırmasını içeren çizelge 6.1’de görölmektedir. Pei ve çalışma arkadaşları geliştirdikleri immünoensörde altın disk elektrot kullanmış, yüzeye anti-IgG immobilizasyonu yaparak IgG tayini gerçekteşirmişlerdir. Elektrokimyasal yöntem olarak CV ve EIS kullanan Pei vd.sterptavidin-biyotin ile etiketleme prosedürünü kullanmışlardır (Pei vd. 2001). Liu ve çalışma grubu ise camsı karbon elektrot yüzeyini manyetik nanopartiküller ile modifiye ettikten sonra, Wang ve Tang ise platin elektrot yüzeyini altın nanoparçacıklar ile modifiye ettikten sonra; modifiye yüzeye anti-IgG immobilize etmiş ve HRP ile enzim işaretleme yöntemi kullanılarak amperometrik olarak IgG tayini gerçekteşirmişlerdir (Liu vd.2006, Wang ve Tang 2008). Zhong ve çalışma grubu ise elektrot olarak kullandıkları indiyum-kalay oksit (ITO) yüzeyini SiO₂ ile modifiye ederek; modifiye yüzeye anti-IgG immobilize etmiş; yine HRP ile işaretleme yöntemini kullanarak CV yöntemiyle IgG tayini gerçekteşirmişlerdir (Zhong vd. 2009). Tang vd.etiketleyici ajan olarak ferrosen karboksi aldehit kullanmış; SiO₂ ve dendrimer ile modifiye ettikleri altın elektrot yüzeyine anti-IgG immobilize ederek CV ve QCM teknikleri ile IgG tayini gerçekteşirmişlerdir (Tang vd. 2009). Shiang vd.ise altın elektrot yüzeyini altın nanoparçacıklar ile modifiye ederek; PrA immobilizasyonu gerçekteşirmiş ve luminesans spektroskopisi ile IgG tayini gerçekteşirmişlerdir. Li vd.ise floresans tekniğini kullanarak ITO-aluminyum oksit-PrA ile modifiye ettikleri elektrot ile floropor işaretle IgG tayini gerçekteşirmişlerdir (Li vd. 2014).

Literatür taramasında IgG tayini için geliştirilen immünoensörlerde genellikle enzim ile işaretleme yöntemi kullanıldığı görölmüştür. İşaretleme yöntemi sensör tasarımına hem ekstra bir maliyet hem de daha uzun hazırlama prosedürü eklediği için ekonomik değildir. Ayrıca çizelge incelendiğinde geliştirilen immünoensörlerin tekrar üretilebilirliklerinin düşük olduğu görölecektir. Bu açıdan değerlendirildiğinde tez kapsamında geliştirilen J/K-AuNPs-PrA immünoensörünün oldukça başarılı olduğu görölmüştür. Kullanım ömrünün ise kullanılan aminoasetik asit tamponundan dolayı diğer immünoensörlere göre daha düşük olduğu düşünölmektedir. IgG tayini amacıyla günümüzde kullanılan ELISA yöntemi ile sonuçlar 2 gün sonra çıkmaktayken J/K-

AuNPs-PrA immünosensörü için tayin süresi 105 s'dir. Ayrıca İmmünosensörün kullanımı için pahalı kitlelere, yetiştirilmiş personele ihtiyaç duyulmaması da bir avantajdır. Geliştirilen immünosensörün 3.95 ng/mL alt tayin limiti ile eşdeğerlerine kıyasla başarısı kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N. and Aminabhavi, T.M. 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 100, 5-28.
- Aizawa, M.1991. Immunosensors, *Bioprocess Technol.*, 15,249-266.
- Aizawa, M.1994. Immunosensors for Clinical Analysis, *Adv.Clin.Chem.*,31,247-275
- Akyilmaz, E. and Yorganci, E. 2008. A novel biosensor based on activation effect of thiamine on the activity of pyruvate oxidase. *Biosens Bioelectron.*23:1874-7.
- Alizadeh, M., Abbasi, F., Khoshfetrat, A.B. and Ghaleh, H. 2013. Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013 Oct;33(7): 3958-67.
- Andreescu, S. and Sadik, O.A. 2004. Trends and Challenges in Biochemical Sensors for Clinical and Enviroment Monitoring. *Pure Appl. Chem.*, Vol.76(4); pp. 861-878.
- Asefa, T., Duncan, C.T. and Krishna, K. S. 2009. “Recent advances in nanostructured chemosensors and biosensors”, *Analyst*, 134: 1980-1990.
- Atalay, M. Ü. 1986. “Surface properties of chromite and concentration of chromite gravity tailing”, *Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen BilimleriEnstitüsü, Ankara*, 129.
- Aykut, U. ve Temiz, H. 2006. Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı. *Gıda Teknikleri Elektronik Derg.* 3: 51-59
- Bard A.J. ve Faulkner, L.R. 2001. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd edn. Wiley, New York.
- Boitieux, J.L., Romette, J.L., Aubry, N. and Thomas, D. A. 1984. Computerised enzyme immunosensor: application for the determination of antigens. *Clin Chim Acta.*, Vol.136(1); pp.19-28.
- Bright, F.V., Betts, T.A. and Litwiler, K.S. 1990. Regenerable fiber-optic-based immunosensor, *Anal Chem.*, Vol.62(10); pp. 1065-9.
- Cavıç, B.A., Hayward, G.L. and Thompson, M., 1999. Acoustic Waves end The Study of Bio- chemical Macromolecules and Cells at The Sensor-Liquid Interface, *Analyst*,124,1405-1420.

- Cebe M. 1987. "Fizikokimya", Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, 1. Cilt, 684.
- Chu, X., Lin Z.H., Shen, G.L. and Yu, R.Q. 1995. Piezoelectric immunosensor for the detection of immunoglobulin M. *Analyst*. 120(12):2829-32.
- Dang, J.M. and Leong, K.W. 2006. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 487– 499.
- Díaz-González, M., González-García, M.B. and Costa-García. 2005. A. Immunosensor for *Mycobacterium tuberculosis* on screen-printed carbon electrodes. *Biosens Bioelectron.*, Vol. 20(10); pp.2035-43.
- Dong S, Chen X. 2002. Some new aspects in biosensors. *J Biotechnol*. 82:303-23.
- D.Orazio, P. 2003. "Biosensors in Clinical Chemistry", *Clinica Chimica Acta*, 334:41-69.
- Edelman, P. and Wang, J. 1991. *Biosensor and chemical sensors*, Washington, 1-13.
- Eggins, B.R. 1996. "Biosensors: an Introduction", Chichester: Wiley-Teubner,c.
- Ekins, R.P. 1999. Immunoassay and Other Ligand Assays: From Isotopes to Luminescence, *J.Clin.Ligand Assay*, 22, 61-77.
- Elshafey, R., Tavares A.C., Siaj M. and Zourob M., 2013. Electrochemical impedance immunosensor based on gold nanoparticles–protein G for the detection of cancer marker epidermal growth factor receptor in human plasma and brain tissue. *Biosensors and Bioelectronics* 50(2013)143–149.
- Emregül, E. 2005. Development of a new biosensor for superoxide radicals. *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol.383; pp.947-954.
- Enrione, J., Díaz-Calderón, P., Weinstein-Opppenheimer, C.R., Sánchez, E., Fuentes, M.A., Brown, D.I., Herrera, H. and Acevedo, C.A. 2013. Designing a gelatin/chitosan/hyaluronic acid biopolymer using a thermophysical approach for use in tissue engineering. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2013 Dec; 36(12):1947-56.
- Erbil, K.M. 2007. *Laboratuvar Testleri ve Klinik Kullanımı*, GATA.
- Fisher, A.C. 1996. *Electrode Dynamics*, Oxford Sci. Publ., Oxford, UK.
- Fuerstnau, M. C. 1984. Miller, J. D., Kuhn, M.C., "Chemistry of flotation, society of mining engineers", *AIIME*, New York, 177.
- Fuerstnau, D. N. and Chander, S. 1985. "Thermodynamics of flotation, advances in mineral processing", *Arbiter Symposium*, New Orleans, Louisiana, 121-136.

- Gades, M.D. and Stern, J.S. 2005. Chitosan supplementation and fat absorption in men and women. *Journal of the American Dietetic Association*, 105, 72-77,
- Garcia, C.D., De Pauli, C.P. and Ortiz, P.I. 2001. Electrochemical characterization of glassy carbon electrodes modified by resol mixtures. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 510, 115-119.
- George, M. and Abraham, T.E. 2006. Review: Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan, *J. Control. Release*, 114, 1-14.
- Ghindilis, A.L., Atansov, P., Wilkins, M. and Wilkins, E. 1998. Immunosensors: Electrochemical Sensing and Other Engineering Approaches, *Biosens. And Bioelectron.*, 13, 113-131.
- Gızeli, E. and Lowe, CR. 1996. Immunosensors, *Curr.Opin.Biotechnol.*, 7, 66-71.
- Greif, R., Peat, R., Peter, L.M., Pletcher, D. and Robinson J. 1990. *Instrumental Methods In Electrochemistry* by Ellis Horwood Limited ISBN 0-13-472093-8.
- Haga, M., Itagaki, H., Sugawara, S. and Okano, T. 1980. Liposome immunosensor for theophylline, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 95(1); pp.187-192.
- Hage, D.S. 1999. Immunoassays, *Anal. Chem.*, 71, 294R-304R.
- Hall, E.A.H. 1990. *Biosensors*, Ch.1: Biosensors in context, Open University Press, İngiltere.
- Hasırcı, N., Işıklı C. ve Küçükturhan A. 2010. Kitosan - Jelatin Yapıların Doku Mühendisliği Amaçlı 2-D ve 3-D Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Biyouyumluluk Özelliklerinin İncelenmesi. TÜBİTAK 109M325 no'lu projesi.
- Hayatt, M.A. (Ed) 1989. *Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications*. San Diego: Academic Press.
- Helali, S. 2013. "Impedimetric Immunosensor for Pesticide Detection" *State of the Art in Biosensors - Environmental and Medical Applications*
- Hiroshi, U., Takashi M. and Toru F. 2001. Topical formulations and wound healing applications of chitosan, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52, 105-115.
- Ishihara, M., Nakanishi K., Ono K., Sato M., Kikuchi M., Saito Y., Yura H., Matsui T., Hattori H., Uenoyama M. and Kurita A. 2002. Photocrosslinkable chitosan asa dressing for wound occlusion and accelerator in healing process, *Biomaterials* 23, 833-840.

- Josephs, H.J. 1971. The Heaviside Papers found at Paignton in 1957. Electromagnetic Theory by Oliver Heaviside, Chelsea Publishing Co, New York.
- Kas, H.S. 1997. Review chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems, *Jorunal of Microencapsulation*, 14, 689–711.
- Kawai, K., Suzuki, S., Tabata, Y., Ikada, Y. and Nishimura, Y. 2000. Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis, *Biomaterials*, 21, 5, 489-499.
- Khan, R. and Dhayal, M. 2009. Chitosan/polyaniline hybrid conducting biopolymer base impedimetric immunosensor to detect Ochratoxin-A. *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 1700–1705.
- Khor, E. and Lim, L.Y. 2003. Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials*, 24, 2339–2349.
- Kılıçturgay, K. 2003. İmmünoloji. Yenileştirilmiş 3. Basım, Nobel&Güneş Kitapevi, pp.71-73. Klokkevold, P.R., Vandemark, L., Kenney, E.B. and Bernard, G.W. 1996. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro, *J Peridont*, 67, 1170–5.
- Koçak, Y. 2008. Investigation of Molecular and Electrokinetic Behaviours in Cement-Pozzolan Interaction. Doktora Tezi.
- Kong, F.Y., Xu, M.T., Xu, J.J. and Chen, H.Y. 2011. A novel label-free electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on gold nanoparticles–thionine–reduced graphene oxide nanocomposite film modified glassy carbon electrode. *Talanta* 85-2620–2625.
- König, B. and Grätzel M. 1994. A novel immunosensor for herpes viruses. *Anal Chem.* Feb 1;66(3):341-4.
- Lana, R.F. and Hubbard, A.T. 1973. *Phys. Chem.*, 77,1401.
- Leja, J. 1983. Surface chemistry of froth flotation, Plenum Press, New York, 758
- Liao, W. and Cui, X.T. 2007. Reagentless aptamer based impedance biosensor for monitoring a neuro-inflammatory cytokine PDGF. *Biosensors and Bioelectronics* 23.218–224.
- Li, J. and Sailor, M.J. 2014. Synthesis and characterization of a stable, label free optical biosensor from TiO₂-coated porous silicon. *Biosensors and Bioelectronics*, 55(2014)372-378.

- Li, R., Wu, D., Li, H., Xu, C., Wang, H., Zhao, Y., Cai, Y., Wei, Q. and Du, B. 2011. Label-free amperometric immunosensor for the detection of human serum chorionic gonadotropin based on nanoporous gold and graphene, *Analytical Biochemistry*, Vol.414; pp. 196–201.
- Lin, J., Wei, Z., Mao, C. 2011. A label-free immunosensor based on modified mesoporous silica for simultaneous determination of tumor markers. *Biosensors and Bioelectronics* 29-40–45.
- Loo, H.A., Bonanni, A., Ambrosi, A., Poh, H.L. and Pumera, M. 2012. Impedimetric immunoglobulin G immunosensor based on chemically modified graphenes. *Nanoscale*, 4, 921.
- Lowe, C.R. 1996. *Analytical Biotechnology*, *Curr.Opin.Biotechnol.*, 7,1-3.
- Luong, J.H.T., Male, K.B. and Glennon, J.D. 2008. “Biosensor technology: Technology push versus market pull”, *Biotechnology Advances*, 26, 492-500.
- Luppa, P.B., Sokoll, L.J. and Chan, D.W. 2001 *Immunosensors-Principles and Applications to Clinical Chemistry*, *Clin.Chim.Acta*, 314, 1-26.
- Mahanoey, WC., Luderre, AA., Brier ,RA. and Lin , JN. 1996. *Real-time Immunodiagnostics Employing Optical Immunobiosensors*, ed:CHAN, D.W., San Diego: Academic Pres.
- Malhotra, R., Patel, V., Vaqué , J.P., Gutkind, J.S. and J.F. Rusling. 2010. Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Oral Cancer Biomarker IL-6 using Carbon Nanotube Forest Electrodes and Multilabel Amplification. *Anal Chem.* 2010 April 15; 82(8): 3118–3123.
- Mata, A., Nieto-Miguel, T., López-Paniagua, M., Galindo, S., Aguilar, MR., García-Fernández, L., Gonzalo, S., Vázquez, B., Román, J.S., Corrales, R.M. and Calonge, M. 2013. Chitosan-gelatin biopolymers as carrier substrata for limbal epithelial stem cells. *J Mater Sci Mat er Med.* 24(12):2819-29.
- Ong, S.Y., Wu, J., Moochhala, S.M., Tan, M.H. and Lu, J. 2008. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties, *Biomaterials*, 29, 4323-4332.
- Ordóñez S.S. and Fabregas E. 2007. New antibodies immobilization system into a graphite–polysulfone membrane for amperometric immunosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 22: pp.965–972.
- Martin, E.J. 2001. *Composite Films for Modifying Evanescent Wave Characteristics in Long-Period Grating*, Master's Thesis,
- MC Neil, CJ., Athey, D. and Renneber, GR. 1997. *Immunosensors for Clinical Diagnostics*, *EXS*, 81, 17-25.

- Meyers, M.A., Ed. 2008. "Biological Materials: Structure & Mechanical Properties", Progress in Materials Science,; 53: 1-4.
- Morgan, C.L., Newman, D.J. and Price, C.P. 1996. Immunosensors:technology and opportunitiesin Laboratory Medicine, Clin.Chem.,31,247-275.
- Moses, P.R.,Wier, L. and Murray, R.W. 1975. Anal.Chem., 47,1882.
- Mullet W., Lai EP. and Yeung JM. 2000. Surface Plasmon Resonance-based Immunoassays, Methods, 22, 77-91
- Naimushin, A.N., Soelberg, S.D., Nguyen, D.K., Dunlap. L., Bartholomew. D., Elkind J., Melendez. J. and Furlong. C.E. 2002. Detection of Staphylococcus aureus enterotoxin B at femtomolar levels with a miniature integrated two-channel surface plasmon resonance (SPR) sensor. Biosens Bioelectron. 17:573-84.
- O'Connor, M., Kim, S.N., Killard, A.J., Forster, R.J., Smyth, M.R., Papadimitrakopoulos, F. and Rusling, J.F. Mediated amperometric immunosensing using single walled carbon nanotube forests. Analyst. 129(12):1176-80.
- Ohno, R., Ohnuki, H., Wanga, H., Yokoyama, T., Endo, H., Tsuya, D. and Izumi, M. 2012. Electrochemical impedan cespectros copy biosensor withinter digitate delectro defordetection of human immünoglobulin A
- Ojeda, I., Guzman, M.M., Cortes, A.G., Seden, P.Y. and Pingarron, J.M. 2013. A disposable electrochemical immunosensor for the determination of leptin in serum and breast milk. Analyst, 2013, 138, 4284.
- O'sullivan ,CK., Vaughan, R. and Guilbault, GG. 1999. Piezoelectric Immunosensors-Theory and Applications, Anal. Lett.,32,2353-2377.
- Pan, Y., Sonn. G.A., Sin. M.L., Mach. K.E., Shih. M.C., Gau. V., Wong. P.K. and Liao. JC. 2010. Electrochemical immunosensor detection of urinary lactoferrin in clinical samples for urinary tract infection diagnosis. Biosens Bioelectron.; 26:649-54.
- Panini, N.V., Messina, G.A., Salinas, E., Fernandez, H., Raba,J. 2008. Integrated microfluidic systems with a immunosensor modified with carbon nanotubes for detection of prostate specific antigen (PSA)in human serum samples. Biosensors and Bioelectronics 23;1145–1151.
- Parkinson, G. and Pejic, B. 2005. Using Biosensors Detect Emerging Infectious Diseases. Nanochemistry Research Institute, Curtin University of Technology Perth, Western Australia, Prepared for the Australian Biosecurity Cooperative Research Centre, Final Report.

- Pei, R., Cheng, Z., Wang, E. and Yang, X. 2001. Amplification of antigen–antibody interactions based on biotin labeled protein–streptavidin network complex using impedance spectroscopy, *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 16; pp. 355–361.
- Rabeax E.I., Badawyx M.E.-T., Stevensx C.V., Smagghex G. and Steurbaut W. 2003.Reviews: Chitosan as antimicrobial agent: Applications and aode of action.*Biomacromolecules*, 4, 1457-1465.
- Radi, E.B., Muñnoz-Berbel X., Lates V., Marty J.L. and 2009. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics* 24-1888–1892.
- Parry, R.P., Love, C. and Robinson, G.A. 1990. Detection of rubella antibody using an optical immunosensor, *J. Virol. Methods.*, Vol.27(1); pp. 39-48.
- Patel, P.D. (Bio) sensors for measurements of Analytes Implicated in Food Safety: A Review, *Trends Anal.Chem.*,21, 96-115, 2002.
- Pearson, J.E., Gill, A. and Vadgama, P. 2000. Analytical Aspects of Biosensors, *Ann.Clin.Biochem*, 37, 119-145
- Price, C.P.1998. Progress in Immunoassay Technology, *Clin.Chem.Lab.Med.*, 36,341-347.
- Portakal, O. 2008. “Bioassays and nanoparticles”, *Turk. J. Biochem.*,33(1): 35-38.
- Richter, E.R. 1993. Biosensors: applications for dairy food industry.*J Dairy Sci.* 76: 3114-7.
- Rishpon, J. and Rosen I. 1989. The development of an immunosensor for the electrochemical determination of the isoenzyme LDH5, *Biosensors*. Vol.4(2); pp.61-74.
- Rochet, N., Balaguer, T., Boukhechba, F., Laugier, J.-P., Quincey, D., Goncalves, S., Carle G.F. 2009. Differentiation and activity of human preosteoclasts onchitosan enriched calcium phosphate cement, *Biomaterials*, 30, 4260-4267.
- Rogers, K.R. 2000. Principles of Affinity-based Biosensors, *Mol.Biotechnol.*,14,109-129.
- Rojanathanes, R., Sereemasapun, A., Pimpha, N., Buasorn, V., Ekawong, P. and Wiwanitkit V. 2008. Gold nanoparticle as an alternative tool for a urine pregnancy test, *Taiwan J Obstet Gynecol* Vol 47, No:3

- Rosellini, E., Cristallini, C., Barbani, N., Vozzi, G. and Giusti, P., 2009. Preparation and characterization of alginate/gelatin blend films for cardiac tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91, 447-453.
- Sandén, B, Eng LH, Dalhammar, G. 1998. An amperometric enzyme-linked immunosensor for Nitroreductase. *Appl Microbiol Biotechnol*.50(6):710-6.
- Sarasam, A.R., Brown, P., Khajotia, S.S., Dmytryk, J.J. and Madhally, S.V. 2008. Antibacterial Activity of chitosan-based matrices on oral pathogens, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 1083-1090.
- Schultes, G., Schmidt, M., Truar, M., Goettel, D., Freitag-Weber, O. and Werner, U., 2007. Co-deposition of silver nanoclusters and sputtered alumina for sensor devices, *Thin Solid Films*, 515 (20-21): 7790-7797.
- Shamsipur, M, Asgari, M., Maragheh, A. and Movahedi, A.M. 2012. A novel impedimetric nanobiosensor for low level determination of hydrogen peroxide based on biocatalysis of catalase. *Bioelectrochemistry* 83-31-37.
- Shaw, D. J. 1970. "Introduction to colloid and surface chemistry", Butterworths, Second Edition, 231.
- Shimizu, K., Chinzei, I., Nishiyama, H., Kakimoto, S., Sugaya, S., Yokoi, H. and Satsuma A. 2008. Hydrogen sensor based on WO₃ subnano-clusters and Pt co-loaded on ZrO₂. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 134 (2): 618-624.
- Stefan, R.I., Van Staden, J.F. and Aboul-Enein H.Y. 2000. Immunosensors In Clinical Analysis, *Fresenius J. Anal Chem.*, Vol.366; pp.659-668.
- Su, X., Ng, H.T., Dai, C.C., O'Shea, S.J. and Li, S.F., 2000. Disposable, low cost, silver-coated, piezoelectric quartz crystal biosensor and electrode protection. *Analyst*. Dec;125(12):2268-73.
- Sun, C., Ma, L., Qian, Q., Parmar S., Zhao, W., Zhao, B. and Shen J. 2014. A chitosan-Au-hyperbranched polyester nanoparticles-based anti fouling immunosensor for sensitive detection of carcinoembryonic antigen. *Analyst*, 2014, 139, 4216.
- Sungur, S., Emregül, E., Günendi, G. and Numanoglu, Y. 2004. *J Biomater. Appl*. Vol.18(4); pp.265.
- Sun, X., Zhu, Y. and Wang, X. 2011. Amperometric Immunosensor Based on a Protein A/Deposited Gold Nanocrystals Modified Electrode for Carbofuran Detection. *School of Agriculture and Food Engineering, Shandong University of Technology*, No.12.

- Sun, C., Ma, L., Qian, Q., Parmar, S., Zhao, W., Zhao, B. and Shen J. 2014. A chitosan-Au-hyperbranched polyester nanoparticles-based antifouling immunosensor for sensitive detection of carcinoembryonic antigen. *Analyst*, 139, 4216.
- Tang, H., Chen, J., Nie, L., Kuang, Y. and Yao, S. 2007. A label-free electrochemical immunoassay for carcinoembryonic antigen (CEA) based on gold nanoparticles (AuNPs) and nonconductive polymer film, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 22 pp.1061–1067.
- Tang, X.J., Gui, L. and Lü, X.Y. 2008. Hard tissue compatibility of Natural hydroxyapatite/ chitosan composite, *Biomedical Materials*, 3, 1-9.
- Telefoncu, A. 1999. Biyosensörler (Telefoncu A., Ed.) s.81-142 Ege Üniversitesi, İzmir.
- Tıǧlı R.S. and Gümüşderelioǧlu M. 2009. Evaluation of alginate-chitosan semi IPNs as cartilage scaffolds, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 699-709.
- Thevenot, D., Toth, K., Durst, R. A. and Wilson, S. 1999. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification (Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, Vol.71 (12); pp. 2333-2348.
- Tischeri, W. and Wedekind, F. 1999. Immobilized Enzymes: Methods and Applications, *Topics in Current Chemistry*, Vol. 200; pp. 96-123.
- Toppozada, A.R., Wright, J., Eldefrawi, A.T., Eldefrawi, M.E., Johnson, E.L., Emche, S.D. and Helling C.S., 1997. Evaluation of a fiber optic immunosensor for quantitating cocaine in coca leaf extracts. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 12, Issue 2, pp. 113–124.
- Turan ,A.A., Üstündag, Z., Solak, A.O., Kılıç, E. and Avseven, A. 2008. Characterization of a 2-Benzo[c]cinnoline Modified Glassy Carbon Electrode by Raman Spectroscopy, Electrochemical Impedance Spectroscopy and Ellipsometry. *Electroanalysis*, Vol.20; pp. 1665-1670.
- Turner, A.P. 1994. Biosensors. *Curr Opin Biotechnol*. 5: 49-53.
- Turner, AP. Pickup, JC. 1985 Diabetes mellitus: biosensors for research and management. *Biosensors*. 1: 85-115.
- Uçar, A. 1995. “Fluorit flatasyonuna yüzey özelliklerinin etkisi”, Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 11-22.
- Uçar, A. 2004. “Kolloid ve yüzey kimyası”, Ders Notu, Kütahya, 138-155.
- Ulubayram, K., Cakar, A.N., Korkusuz, P., Ertan, C., Hasirc, N. 2001. EGFcontaining gelatin-based wound dressings, *Biomaterials*, 22, 1345-1356.

- Uygun, Z.O. 2012. "Development of electrochemical impedance-based sensor for the detection of pesticides type organophosphate", Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- Von Lucadou, Luft G., Preidel W. and Richter G.J. 1988. The electrocatalytic glucose sensor. *Horm Metab Res Suppl.*; 20: 41-3.
- Wael, K.D., Belder, S.T., Vlierberghe, S.V., Steenberge, G.V., Dubruel, P., Adriaens, A. 2010. Electrochemical study of gelatin as a matrix for the immobilization of horse heart cytochrome c. *Talanta* 82 (2010) 1980–1985.
- Wang, A., Ao, Q., Cao, W., Zhao, C., Gong, Y., Zhao, N. and Zhang, X. 2005. Fiber-Based Chitosan Tubular Scaffolds for Soft Tissue Engineering: Fabrication and in Vitro Evaluation, *J Tsinghua Science & Technology*, 10, 449-453.
- Wang, H., Li, X., Mao, K., Li, Y., Du, B., Zhang, Y. and Wei Q. 2014. Electrochemical immunosensor for α -fetoprotein detection using ferroferric oxide and horseradish peroxidase as signal amplification labels. *Analytical Biochemistry* 465 121–126.
- Wu, C-C., Lin, C-H. and Wang, W.S. 2009. Development of an enrofloxacin immunosensor based on label-free electrochemical impedance spectroscopy, *Talanta*, Vol.79; pp. 62-67.
- Yang, L., Biswas, M.E. and Adn Chemn, P. 2003. Study of binding between Protein A and Immunoglobulin G using a surface tension probe, *Biophysical Journal* Vol.84, 509-522.
- Yilgor, P., Tuzlakoglu, K., Reis, R.L., Hasirci, N. and Hasirci, V., 2009. Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 30, 1–9.
- Yuan, X-Z., Song, C., Wang, H. and Zhang J. 2010. *Electrochemical Impedance Spectroscopy in PEM Fuel Cells*. Springer-Verlag London.
- Zhang, L., Liu, Y. and Chen, T., 2008. A mediatorless and label-free amperometric immunosensor for detection of h-IgG, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 43; pp.165–169.
- Zarei, H., Ghourchian, H., Eskandari, K. and Zeinali M. 2012. Magnetic nanocomposite of anti-human IgG/COOH–multiwalled carbon nanotubes/Fe₃O₄ as a platform for electrochemical immunoassay. *Analytical Biochemistry* 421 446–453.
- Ziegler, C. and Göpel, W. 1998. "Biosensor development", *Current Opinion in Chemical Biology*, 2:585-591.

Zivanovic, S., Li J., Davidson P.M., Kit K., 2007. Physical, Mechanical and Antibacterial Properties of Chitosan/PEO Blend Films, *Biomacromolecules*, 8,1505-1510.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gizem ÖZBEK
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 04.04.1990
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Kanuni Lisesi (Ankara)(2008)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2008)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
(Eylül 2012-Kasım 2014)

Katıldığı Eğitimler

Deney Hayvanları Kullanım Kursu-Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (2013)