

LEPTİN TAYİNİNE YÖNELİK ETİKETSİZ ELEKTROKİMYASAL İMMÜNOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ

Günseli KAMAN

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK

Şubat - 2021

KABUL VE ONAY SAYFASI

Günseli KAMAN tarafından hazırlanan “Leptin Tayinine Yönelik Etiketsiz Elektrokimyasal İmmünoşensör Geliştirilmesi” adlı tez çalışması, aşağıda belirtilen jüri tarafından Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek OY BİRLİĞİ ile Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

03/02/2021

Prof. Dr.Şahmurat ARIK
Enstitü Müdürü, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Prof. Dr. Metin BÜLBÜL
Anabilim Dalı Başkan, Biyokimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK
Danışman, Biyokimya Anabilim Dalı

Sınav Komitesi Üyeleri

Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK
Biyokimya Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

Doç. Dr. Gözde AYDOĞDU TIĞ
Kimya Bölümü, Ankara Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ekrem TUNCA
Biyokimya Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Kütahya Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının % 11 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK

Günseli KAMAN

LEPTİN TAYİNİNE YÖNELİK ETİKETSİZ ELEKTROKİMYASAL İMMÜNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Günseli KAMAN

Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2021

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK

ÖZET

Bu tezin amacı, insan enerji dengesinde önemli rolü olan leptin hormonunun, tayini için etiketsiz bir elektrokimyasal immünosensör geliştirilmesidir. Bunun için, tez kapsamında, camısı karbon elektrot (GCE), ilk olarak, CoFe_2O_4 nanopartikül ve kitosan (CHI) ile modifiye edildi ve hazırlanan elektrot GCE/ CoFe_2O_4 -CHI olarak adlandırıldı. Bu elektrot yüzeyinde elektrokimyasal biriktirme yöntemi ile altın nanopartikül (AuNP) biriktirildi. GC/ CoFe_2O_4 -CHI/AuNP elektrot yüzeyine belli derişimde anti-leptin antikor çözeltisinden ilave edildi. Sonrasında spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için elektrot yüzeyine bovin serum albümin ilave edildi. GCE/ CoFe_2O_4 -CHI/AuNP/Ab/BSA olarak belirtilen elektrot, leptin tayini için etiketsiz immünosensör olarak kullanıldı. Bunun için, immünosensör leptin antijeni ile muamele edildi ve inkübasyona bırakıldı. Elektrokimyasal ölçüm adımı, redoks medyatörü içeren çözelti kullanılarak, diferansiyel puls voltomogramları alınarak gerçekleştirildi. Bunun yanında hazırlanan elektrotların morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve elektrokimyasal özellikleri ise elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), dönüşümlü voltametri (CV) ve diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ile incelendi. Çalışmada uygun antikor derişimi ve çalışma pH'sı gibi çalışma koşulları optimize edildi ve immünosensörün tekrar üretilebilirliği değerlendirildi. Hazırlanan etiketsiz elektrokimyasal esaslı immünosensör ile leptin hormonu için doğrusal çalışma aralığı $1 - 4000 \text{ ng ml}^{-1}$ olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Elektrokimya, Etiketsiz immünosensör, Leptin antikoru, Leptin tayini, Obezite

DEVELOPMENT OF LABEL-FREE ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR FOR LEPTIN DETERMINATION

Günseli KAMAN

Biochemistry Department, Master Thesis, 2021

Thesis Supervisor: Assoc. Prof.Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK

SUMMARY

The aim of this thesis is to develop a label-free electrochemical immunosensor for the determination of leptin hormone, which has an important role in human energy balance. For this purpose, glassy carbon electrode (GCE) was first modified with CoFe_2O_4 nanoparticle and chitosan (CHI), and the prepared electrode was named GCE/ CoFe_2O_4 -CHI. Gold nanoparticles (AuNP) were deposited on this electrode surface by electrochemical deposition method. A certain concentration of anti-leptin antibody solution was added to the GC/ CoFe_2O_4 -CHI/AuNP electrode surface. Then bovine serum albumin was then added to the electrode surface to prevent non-specific binding. The electrode designated as GCE/ CoFe_2O_4 -CHI/AuNP/Ab/BSA was used as a label-free immunosensor for leptin determination. For this, the immunosensor was treated with leptin antigen and left to incubate. Electrochemical measurement step was carried out by using a solution containing redox mediator, taking differential pulse voltammograms. In addition, the morphological properties of the prepared electrodes were examined by scanning electron microscopy (SEM) and their electrochemical properties by electrochemical impedance spectroscopy (EIS), cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). In the study, working conditions such as appropriate antibody concentration and working pH were optimized and the reproducibility of the immunosensor was evaluated. Linear working range for leptin hormone was determined as 1–4000 ng ml⁻¹ with the prepared label-free electrochemical based immunosensor.

Keywords: Electrochemistry, Label-free immunosensor, Leptin antibody, Leptin determination, Obesity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca sahip olduğu bilgi ve deneyimle bana yol gösteren, sabırla tüm bilgilerini sunan, örnek aldığım, çok değerli hocam Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Bütün bu süreçte bilgilerini esirgemeyen, tez çalışmamın gerçekleşmesinde büyük katkıları olan Doç. Dr. Bülent ZEYBEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda beni yalnız bırakmayan, Büşra YILMAZ ve Betül ŞENOL'a ve eğitimim süresince beni destekleyen eşim Mehmet KAMAN'a, manevi destekleriyle yanımda olan anne ve babama, bu süreçte yardımlarını esirgemeyen iş arkadaşlarım Nurdan Gül ERKUL ve Şükriye Elif KUZUCUK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Leptin	3
2.1.1. Leptin hormonun fonksiyonları.....	5
2.1.2. Leptin tayin yöntemleri	7
2.2. Biyosensörler ve İmmünosensörler.....	9
2.2.1. Elektrokimyasal immünosensörler	13
2.3. Elektrot Modifikasyonu	15
2.3.1. Altın nanopartiküller (AuNPlar)	16
2.3.2. Kobalt ferrit nanopartiküller (CoFe ₂ O ₄).....	17
2.3.3. Kitosan (CHI).....	18
2.4. Tez Kapsamında Kullanılan Elektrokimyasal Teknikler	19
2.4.1. Potansiyostatik teknikler	19
2.4.2. Elektrokimyasal hücre bileşenleri	21
2.4.3. Dönüşümlü voltametri.....	22
2.4.4. Diferansiyel puls voltametrisi	24
2.4.5. Empedans spektroskopisi	25
2.5. Leptin Tayini İçin Yapılan Bazı Çalışmalar	26
2.6. Altın Nanopartikül (AuNP) ile Yapılan Çalışmalar	29
2.7. CoFe ₂ O ₄ ile Yapılan Bazı Çalışmalar.....	29
2.8. Kitosanla Yapılan Bazı Çalışmalar	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Yöntemler	31
3.2. Kullanılan Kimyasallar	32

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.3. Kullanılan Çözeltiler	32
3.3.1. Elektrokimyasal temizleme çözeltisi	32
3.3.2. Potasyum ferri/ferro siyanür çözeltisi (redoks prob çözeltisi)	33
3.3.3. Fosfat tamponu çözeltisi (PBS)	33
3.3.4. Anti-leptin antikör çözeltisi	33
3.3.5. Leptin çözeltisi	33
3.3.6. İmmünoşensör hazırlama aşamasında kullanılan çözeltiler	33
3.4. Elektrot Temizleme İşlemi	34
3.5. Etiketsiz Elektrokimyasal İmmünoşensörün Hazırlanması	34
3.6. İmmünoşensörün Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi	35
3.7. Dönüşümlü Voltametri ile İmmünoşensörün Özelliklerinin İncelenmesi	35
3.8. Empedans Spektroskopisi ile İmmünoşensörün Özelliklerinin İncelenmesi	36
3.9. Elektrokimyasal Ölçümler	37
3.10. Optimizasyon Çalışmaları	37
3.11. Hazırlanan İmmünoşensör ile Leptin Tayininin Yapılması	38
3.12. İmmünoşensörün Tekrar Üretilirliğinin Belirlenmesi	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	39
4.1. İmmünoşensörün Yüzey Karakterizasyonu	39
4.2. Dönüşümlü Voltametri Tekniği ile İmmünoşensörün Karakterizasyonu	41
4.3. Emmedans Spektroskopi Tekniği ile İmmünoşensörün Karakterizasyonu	46
4.4. Diferansiyel Puls Tekniği ile İmmünoşensörün Leptine Cevabının Araştırılması	48
4.5. Optimizasyon Çalışmaları	50
4.5.1. Çözelti pH'sının optimizasyonu	50
4.5.2. Leptin antikör derişimin optimizasyonu	51
4.6. Hazırlanan İmmünoşensör ile Leptin Tayinin Yapılması	52
4.7. Tekrar Üretilirliğinin Belirlenmesi	55
5. SONUÇLAR	57
KAYNAKLAR DİZİNİ	60
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Leptin hormonunun fonksiyonları.....	5
2.2. Bir biyosensörün tipik yapısı ve bileşenleri.	10
2.3. Biyosensörlerin sınıflandırılması.	11
2.4. (A) etiketli ve (B) etiketsiz immünosensörlerin şematik gösterimi.	14
2.5. Elektrot modifikasyonu için kullanılan bazı yapılar.	16
2.6. AuNP'lerin bazı kullanım alanları.	17
2.7. Kitosanın monomerik birimleri.	18
2.8. Voltammetrik ölçümler için bir hücrenin şematik gösterimi.	21
2.9. (A) Dönüşümlü voltametri deneyinde potansiyel-zaman uyarma sinyali (B) Tersinir bir O + ne ⁻ ↔ R redoks işlemi için tipik dönüşümlü voltamogram	23
2.10. Tipik bir diferansiyel puls voltamogramı.....	25
2.11. Randles ve Ershler elektronik eşdeğer devre modeli	25
2.12. Tipik bir Nyquist grafiği.	26
3.1. Elektrokimyasal ölçümlerde kullanılan cihazlar ve hücre standı.	31
3.2. Etiketsiz leptin immünosensör hazırlama basamakları.	35
4.1. (A) GCE/ CoFe ₂ O ₄ -CHI (B) GCE/ CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP (C) GCE/ CoFe ₂ O ₄ CHI/AuNP/Ab (D) GCE/ CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab/BSA (E) GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/ Ab/ BSA/Ag ile elde edilen SEM görüntüleri.	40
4.2. (a) GCE (b) GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI (c) GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP (d) GCE/CoFe ₂ O ₄ - CHI/AuNP/Ab (e) GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab/BSA ile elde edilen dönüşümlü voltamogramlar.	41
4.3. (A) BGCE (B) GCE/ CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP (C) GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab/BSA ile farklı tarama hızlarında elde edilen dönüşümlü voltamogramlar.	44
4.4. (A) BGCE (B) GCE/ CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP (C) GCE/ CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab/BSA ile tarama hızının kareköküne olarak karşı pik akımları grafikleri.	45
4.5. (a) GCE (b) GCE/ CoFe ₂ O ₄ -CHI(c)GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP (d)GCE/ CoFe ₂ O ₄ - CHI/AuNP/Ab (e) GCE/ CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab/BSA ile elde edilen empedans spektrumları (çözelti: 5,0 mmol L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{4-/3-} ve 0,1 mol L ⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L ⁻¹ PBS).	47
4.6. İmmünosensör için önerilen eşdeğer devre modeli.	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.7. (a) GCE (b) GCE/ CoFe ₂ O ₄ -CHI(c)GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP (d) GCE/ CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab (e) GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab/BSA (f) GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab/BSA/ Ag ile diferansiyel puls voltamogramları (çözelti: 5,0 mmol L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{4-/3-} ve 0,1 mol L ⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L ⁻¹ PBS).	49
4.8. Hazırlanan etiketsiz immünosensörün tayin prensibi.....	50
4.9. Redoks prob çözeltisinin pH'sının DPV yanıtları üzerine etkisi.	51
4.10. DPV yanıtları üzerine antikor derişiminin etkisi.....	52
4.11. (A) GC/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrodun farklı antijen derişimlerinde elde edilen diferansiyel puls voltamogramları (B) GC/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrodun antijen derişimine karşı akım değeri grafiğı (B) GC/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrodun antijen derişiminin logaritması karşı akım değeri grafiğı.	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Leptin hormonunun özellikleri.....	4
2.2. Elektrokimyasal hücre bileşenleri ve özellikleri.	22
3.1. Çalışmada kullanılan diğer cihazlar, markalar ve kullanım amaçları.	32
3.2. Çalışmada kullanılan kimyasalların isimleri ve temin edildikleri firmalar.	32
4.1. Hazırlanan elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması.	42
4.2. Leptin tayini için yapılan elektrokimyasal çalışmalar.....	55
4.3. Hazırlanan immünosensörün tekrar üretilebilirliği.	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
ng	Nanogram
C	Kapasidans
cm^2	Santimetrekare
L	Litre
m	Metre
M	Molar
mL	Mililitre
mm	Milimetre
ms	Milisaniye
mVs^{-1}	Milivolt/Saniye
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
R	Direnç
t	Zaman
V	Volt
W	Warburg direnci
Ω	Transferdirenci

Kısaltmalar

GCE	Camsı karbon elektrot
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
CV	Dönüşümlü voltametri
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
CHI	Kitosan
RIA	Radyoimmünoassay
FIA	Floroimmünassay

1. GİRİŞ

Son yıllarda, sanayileşmiş ülkelerin çoğunda, obezite prevalansının artması büyük bir sorun haline gelmektedir (He vd., 2013). Özellikle batı yaşam tarzını benimseyen ülkelerde, obezitenin gittikçe artan bir sağlık problemi haline geldiği bilinmektedir.

Obezite nedenlerini araştıran çalışmalar, çevresel faktörlerin önemini gösterse de, genetik faktörlerin etkisi de, azımsanmayacak kadar yüksektir. Obezitenin, çok sayıda çevresel ve genetik faktörün etkisiyle oluşan kronik bir hastalık olduğu gösterilmiştir (Livingstone, 2000; Reach ve George, 1992). Besin alımı ve enerjinin harcanmasını dengeleyen mekanizmalar bireyin obez ya da zayıf olmasında belirleyicidir. Enerji dengesini düzenleyen obez (ob) genin varlığının 1994 yılında gösterilmesi, obezite alanında bir heyecan yaratmıştır. Jeffrey Friedman tarafından bu genin ürünü olan leptin hormonunun saptanması, bu hormonun enerji dengesindeki rolünü de ortaya koymaktadır (Zhang vd., 1994).

Leptin hormonu, yağ dokusunda üretilen ve 167 amino asitten oluşan bir peptittir. Leptin seviyesi, vücut yağ miktarı ile doğru orantılıdır ve kalori alımında akut değişikliklerle dalgalanır. Beyindeki ve periferik dokularda eksprese edilen spesifik leptin reseptörlerine bağlanarak, enerji homeostazı, nöroendokrin fonksiyon ve metabolizmanın düzenlenmesinde hayati bir rol oynar. İnsanlarda dolaşımdaki leptin düzeyleri obezite, metabolik anormallikler, infertilite ve kanser ile yakından ilişkilidir. Ayrıca bazı çalışmalarda, leptin hormonunun, biliş, bağışıklık fonksiyonu ve kemik metabolizmasında da rol oynayabileceğini gösterilmiştir. Tüm bu bilgiler, leptini oldukça önemli bir konuma getirmektedir. Bu nedenle, birden fazla sistemde sadece leptinin çeşitli fonksiyonlarını değil, aynı zamanda hastalıklarla ilişkisini keşfetmek için leptin miktarının belirlenmesi oldukça önemlidir (Dong vd., 2014).

Leptin tayini için radyoimmünoassay (Landt vd., 1998), immünofonksiyonel test (Kratzsch vd., 2002), enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) (Theriault vd., 2001), kapiler elektroforez (Ashwell vd., 2001; Richards ve Poch, 2002) ve lokalize yüzey plazma rezonansı (Kim vd., 2011) gibi çeşitli analitik yöntemler mevcuttur. Bununla birlikte, bu tayin yöntemleri pahalı, zahmetli veya zaman alıcı yöntemlerdir. Basit ön işlem, düşük maliyet, hızlı tayin ve yüksek duyarlılık gibi avantajları nedeniyle elektrokimyasal immünosensörler, pek çok biyolojik molekül gibi leptin tayini için de kullanılabilir (Cai vd., 2019; Chen vd., 2010; Dong vd., 2014).

Elektrokimyasal immünosensörler, basit hazırlama, iyi duyarlılık ve özellikle, ilgili antijene spesifik olarak bağlanan antikor kullanımından kaynaklı, yüksek seçicilik gibi pek çok

avantaja sahip, küçültülebilen analitik cihazlardır. Bu nedenle, elektrokimyasal immünosensörler, biyomolekülleri tayin etmek için kullanılan önemli analitik tekniklerden biri haline gelmiştir. Elektrokimyasal immünosensörler sandviç tipte hazırlanabilir. Bu durumda, antijen, birincil ve etiketlenmiş ikincil antikor arasına hapsedilir. Bununla birlikte, etiketleme işlemi zaman alıcıdır, maliyetlidir ve genellikle biyomoleküllerin denatüre olmasına yol açabilir. Sandviç protokolünün yanı sıra, antikor-antijen bağlanmasının doğrudan tayinine dayalı, etiketsiz immünosensörler de yüksek duyarlılığı, düşük maliyeti ve minyatürleştirme kolaylığı nedeniyle, biyomoleküllerin nicel tayini için önemli bir analitik teknik haline gelmiştir. Çoğu antikor ve antijen, doğası gereği redoks çifti olarak hareket etmezler; bu nedenle, elektron medyatörleri, elektrokimyasal sinyal üretmek için elektrot yüzeyine bağlanmalı veya algılama çözeltisine ilave edilmelidir. Bunun yanında, diğer pek çok sensör sisteminde olduğu gibi, sinyal, geniş bir yüzey alanı sağladıkları ve elektrot yüzeyindeki biyomoleküllerin stabilitesini geliştirdikleri için çeşitli nanomateriyaller kullanılarak güçlendirilebilir (Zhao vd., 2011).

Bu tez çalışmasında, leptin proteinin tayini için, etiketsiz elektrokimyasal bir immünosensör geliştirmek hedeflenmektedir. Bu amaçla, CoFe_2O_4 , kitosan ve altın nanopartikül ile modifiye edilmiş camı karbon elektrotların yüzeyine anti-leptin antikorunu immobilize edilerek bir immünosensör hazırlandı. İmmünosensör hazırlama basamakları, dönüşümlü voltametri, elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve diferansiyel puls voltametri gibi teknikler kullanılarak incelendi. İmmünosensör yüzeyine, leptin antijen çözeltisi ilave edilerek anti-leptin ve leptin proteini ile immünokompleks oluşumu sağlandı. Elektrokimyasal immünosensör sisteminde ölçümler, uygun bir redoks mediyatörü olarak bilinen $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks çifti kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılan literatür taraması ışığında, bu tez çalışmasında hazırlanması hedeflenen immünosensör ile leptin tayinine yönelik çalışmaların olmadığı görülmüştür.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Leptin

Leptin bir adinopektindir ve ince anlamına gelen Yunanca leptos kelimesinden türemiştir (Dinçer ve Gürler, 2015; Triantafyllou vd., 2016). Leptin, Friedman ve arkadaşları tarafından keşfedilen, besin alımını ve vücut kompozisyonunu düzenlemede rol oynayan, 146 amino asitlik bir protein hormonudur (Chen vd., 2010). Leptin, ilk olarak, obeziteye dirençli bir hormon olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, sonraki çalışmalar, leptinin, vasküler fonksiyonlar, rejenerasyon, iltihaplanma ve bağışıklık ile de ilişkili olduğunu göstermiştir (Zhang vd., 2018). Leptin, obezite (ob) geni tarafından eksprese edilen 16 kDa'lık bir proteindir ve ağırlıklı olarak adipositlerde sentezlenir (Chow ve Phoon, 2003). Ancak mide epitel astarı, plasenta, kas, beyin, hipofiz ve hipotalamus gibi diğer dokularda da leptinin eksprese edildiği görülmüştür (Ojeda vd., 2013).

Obezite geninin bir ürünü olarak bilinen leptin, enerji alımını ve enerji tüketimini düzenlemede anahtar rol oynar. Leptinin ventromedial çekirdeğe bağlanması, beyne tokluk hissi sinyalleri verir. Sağlıklı bireylerde, leptin azalması, hipotalamustaki nöropeptid üretimini artırır, bu da iştahı artırır ve dolayısıyla enerji tüketimi artar. Leptin seviyesi, bazal metabolizma, hematopoez, termojenez, üreme ve anjiyogenezi etkiler. (He vd., 2013). İştah, enerji metabolizması, doğurganlığın ve adiposit lipid depolarının miktarının düzenlenmesinde, periferik bir hormon görevi görür (Ojeda vd., 2013). Aynı zamanda, anoreksiya nervozalı hastalarda leptin derişiminin düşük olduğu görülmüştür. Bu durum, leptin hormonunun, vücut ağırlığı metabolizmasında etkili olduğunu güçlendiren bir kanıttır (Imagawa vd., 1998).

Bu hormonun seviyesi, doğrudan enerji durumunu yansıtır ve yağlanma, iştah ve kilo arasında merkezi bir bağlantı olarak görülür. Hipotalamik düzeyde gıda alımını ve enerji tüketimini kontrol ederek, vücut ağırlığının düzenlemesine katkıda bulunduğu görülmektedir. İnsanlarda leptin; obezite, iştahın düzenlenmesi, enerji harcanması ve üreme ile ilişkilidir. Leptin eksikliği sadece obezite ile ciddi bir şekilde ilişkili değildir, aynı zamanda leptinin, üreme, hematopoez, pubertal gelişim, hipotalamik amenore ve kemik metabolizması üzerindeki etkileri olan bir dizi belirgin anormallik ile de ilişkili olduğu düşünülmektedir. Normal seviyeler, kadınlarda $3,7-11,1 \text{ ng mL}^{-1}$ ve erkeklerde $2,0-5,6 \text{ ng mL}^{-1}$ iken, obez kişilerde ortalama serum leptin seviyesinin 31 ng mL^{-1} 'a kadar yükseldiği görülebilir. Bu nedenle leptin miktarının doğru bir şekilde izlenmesi leptinin rolünü anlamak açısından önemlidir (He vd., 2015; Ojeda vd., 2013).

Literatür taraması ışığında, leptin hormonun özellikleri ve sözkonusu kaynaklar Çizelge 2.1’de özetlenmektedir.

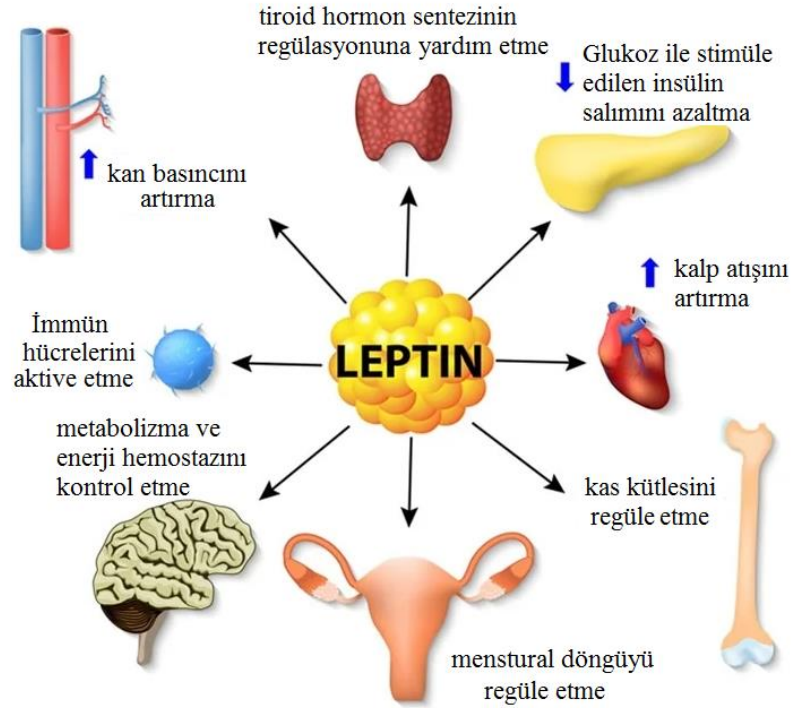
Çizelge 2.1. Leptin hormonunun özellikleri.

Özellik	Kaynak
İlk kez, 1994 yılında Jeffrey Friedman tarafından kan dolaşımında keşfedilmiştir. Vücut ağırlığı denetimindeki rolünü; gıda alımını engelleyerek ve enerji harcamasını uyararak gerçekleştirir.	(Zhang vd., 1994)
Başlıca adipozitler tarafından salgılanır ve adipoz dokuyla aynı oranda vücutta da bulunabilir. Başlangıçta obeziteye dirençli bir hormon olarak tanımlanmıştır. Leptin, 146 amino asit içeren bir hormon olarak vücut ağırlığının denetiminde önemli rol oynar.	(He vd., 2013)
Bazı hormonlar gibi pulsatil biçiminde salgılanır, günün değişik saatlerinde farklı salgılanırken sabahları yüksek salgılanır.	(Licinio vd., 1997)
Antiobezite hormonu olarak da tanımlanan leptin, bu etkiyi bazal metabolizmayı etkileyerek göstermektedir.	(Procaccini vd., 2012)
Vücut ağırlığı denetimindeki rolünü; gıda alımını engelleyerek ve enerji harcamasını uyararak, ağırlık kazanımını azaltarak gerçekleştirir.	(Zhang vd., 1994)
Leptin, bir yağ depo sensörü olarak düşünülebilir.	(Farooqi vd., 2002)
Sağlıklı bireylerde, yaş artışıyla serum leptin seviyesini artırdığı ve kadınlarda erkeklere oranla çok daha yüksek olduğu görülmüştür. BKİ 25 üzerindeki farklı yaş gruplarındaki kolesterol ve trigliserit değerleri, yüksek olan kadınlarda, sağlıklı bireylere göre, çok daha yüksek oranlarda saptanmıştır. Erkeklerde ilerleyen yaş, obezite ve hiperlipidemi ile önemli derecede artışa rastlanmış, bu karşılaştırma obez ve hiperlipidemik bireylerde yapıldığında, önemli bir fark görülmemiştir.	(Yan vd., 2002)
Leptin eksikliği, sadece, obezite ile ilişkili değildir, aynı zamanda üreme, hematopoez, pubertal gelişim, hipotalamik amenore ve kemik metabolizmasında etkili bir dizi belirgin anomaliye neden olur. Aynı zamanda hiperfaji(tıkınırcasına yeme), ileri obezite, diyabet, nörendokrin anormallikler ve kısırlığa da neden olur.	(Kelesidis vd., 2010)
Pro-inflamatuvar sitokinlere benzer olarak yardımcı T hücresi farklılaşmasını teşvik eder, bazı hayvan çalışmalarında gösterildiği gibi otoimmün yanıtların başlamasını ve ilerlemesini modüle eder.	(Galgani vd., 2010)

Bugüne kadar, hem protein hem nükleik asit seviyelerinde, leptin gen ekspresyonundaki değişiklikleri tayin etmek için kapiller elektroforez, immünoyakalama / kütle spektrometrisi ve enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) dahil olmak üzere çeşitli yöntemler bildirilmiştir. (Imagawa vd., 1998; Richards vd., 2000; Wang ve Heilig, 2012). Bu yöntemler güvenilirdir, ancak pahalı ekipman ve zahmetli prosedür gibi bazı sınırlamaları vardır. Bu nedenle, leptini tayin etmek için hassas, hızlı ve doğru bir yöntem, klinik analiz için büyük önem taşımaktadır (He vd., 2015). Bu bağlamda, elektrokimyasal sensörler önemli bir alternatif oluşturabilir.

2.1.1. Leptin hormonunun fonksiyonları

Leptin hormonunun fonksiyonları Şekil 2.1’de özetlenmektedir.



Şekil 2.1. Leptin hormonunun fonksiyonları (Thomas, 2019).

Leptin hormonu ve ilişkili olduğu bazı önemli durumlar aşağıda verilmektedir:

Leptin-obezite

Leptin, beyindeki hipotalamik reseptörlere bağlanarak, iştah kontrol merkezlerini modüle eder ve enerji alımı ile enerji kullanımı arasındaki dengeyi düzenler. Merkezi leptin reseptörlerinin dolması, sempatik sinir sisteminin aktivitesini artırır, bu da termojenezle periferik hedef dokularda enerji tüketimini uyarır. Bu iki sistemin koordineli düzenlenmesiyle, leptin, enerji harcama oranlarını, enerji alımıyla dengeleme işlevi görür. Leptin, ayrıca, vücut ısını ve bazal metabolizma hızını düşürerek, açlık sırasında, enerji rezervlerini koruma işlevi görür. Bu nedenle leptin, gıda kaynakları yeterli olduğunda, enerji homeostazını sürdürmek ve yeterli olmadıklarında ise, hayatta kalmak için işlev gören karmaşık bir dizi davranışsal ve metabolik sistemi entegre etmek için merkezi olarak hareket eden çevresel bir sinyaldir (Gettys, 2004).

"Lipostat" olarak tanımlanan leptin geni klonu olan ob, vücut ağırlığı dengesini korumak için enerji alımı ve kullanımı arasındaki dengeyi düzenler. Ob/ob farelerinin adipositleri leptin üretmez ve leptin yokluğu, hiperfaji, morbid obezite ve diyabet ile karakterize edilen bir metabolik sendroma neden olur. Bu eksiklik, obez olma eğiliminin önemli bir nedeni olduğunu göstermiştir. Ob/ob farelerinin ekzojen leptin ile tedavisi obezitetlerini düzeltir ve kilo kaybının bir kısmı gıda alımındaki azalmayla meydana gelir. Leptin enjekte edilmiş ob/ob farelerinin besin alımındaki farklılıklardan ziyade, diğer gruba göre daha fazla kilo kaybettiği görülmüştür. Bu sonuçlar, leptinin enerji tüketimini düzenlemekteki fizyolojik rolünün önemli olduğunu göstermektedir (Gettys, 2004).

Leptin, gıda alımını ve enerji kullanımını düzenleyen nöroendokrin döngünün temel bir bileşenidir ve sempatik sinir sistemi (SNS) aktivasyonunu düzenleyen birincil etken olarak kabul edilmektedir. Leptin, ilgili dokulardaki boş enerji döngüleri üzerindeki etkisiyle, yağ oksidasyonunu artırarak, SNS'yi aktive eder. Hipotalamustaki leptine yanıt veren nöronların ikinci bir popülasyonu, nöropeptit Y (NPY) ve agouti ile ilişkili peptidi (AgRP) birlikte ifade eder. Bu iştahı aktive eden peptitlerin ekspresyonu, leptin tarafından azaltılır. Böylece, leptinin enerji homeostazı üzerinde tam etkisini sağlaması, bu iki hipotalamik çekirdek popülasyonunun karşılıklı düzenlenmesi yoluyla gerçekleşir (Gettys, 2004).

Leptin-insülin direnci ve metabolik sendrom

Leptin reseptörü mutasyonu olan hem ob/ob, hem de db/db farelerinin yanı sıra, konjenital leptin eksikliği olan insanlarda, insülin direnci görülmektedir ve metabolik sendrom belirtileri vardır (Harris, 1998). Ob/ob fare suşunda leptin tedavisi, kilo kaybı sağlanmadan önce hiperglisemi ve hiperinsülinemi iyileştirir (Sadaf Farooqi vd., 2002). Doğuştan leptin eksikliği olan insanlarda, leptin tedavisinin düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve trigliserit düzeylerini de iyileştirdiği gösterilmiştir (Harris, 1998).

Deri altı yağ dokusu olmayan lipoatrofi fare modelleri, leptin üretmek için mevcut olan yağ eksikliğinden dolayı hipoleptinemiktir ve hiperglisemi, insülin direnci ve hiperlipidemi gibi metabolik anormalliklere sahiptirler. Ob/ob farelerde leptin uygulamasından sonra, metabolik parametrelerdeki gelişmeler göz önüne alındığında, lipoatrofik farelerin ekzojen leptine de yanıt verebileceği hipotezi öne sürülmüştür (Gavrilova vd., 2000).

Leptin-amenore

Hipotalamik amenore, organik hastalık yokluğunda, hipotalamik-hipofiz-gonadal eksenin işlev bozukluğuna bağlı olarak adet döngülerinin kesilmesi olarak tanımlanır. Aşırı egzersiz, stres ve düşük besin alımı ile tanımlanan anoreksiye nervosa ve kadın atletlerde sık görülen kadın sporcu üçlemesi durumunda, beslenme bozukluğu, menstrual düzende bozukluk ve kemik sağlığında bozukluk görülür (Kelesidis vd., 2010).

Hipotalamik amenore olan kadınların hipoleptinemi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Audi vd., 1998). Bu kadınlarda leptin replasmanı tedavisi sadece östrojen, tiroid hormonları ve insülin-benzeri IGF-1 düzeylerini normalleştirmekle kalmayıp aynı zamanda menstrual döngüyü de düzenlemiştir (Welt vd., 2005).

Leptin-lipoatrofi

Nadir görülen konjenital lipoatrofi sendromları olan kişilerde şiddetli insülin direnci, hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemi vardır. Gözlemsel çalışmalar, bu kişilerin hipoleptinemiye sahip olduğunu göstermiştir (Pieroni vd., 1998). Birkaç çalışma, rekombinant leptin ile tedavinin insülin direncini geliştirdiğini, hepatik glukoneogenezi bastırdığını, hemoglobin A1c'yi ~3.5 oranında düşürdüğünü, hiperlipidemiye iyileştirdiğini ve karaciğer yağlanmasının iyileşmesine katkıda bulunduğunu göstermiştir (Musso vd., 2005).

2.1.2. Leptin tayin yöntemleri

Leptinin tayini için, radyoimmünoassay (RIA), enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA), radyoimmünoassay, immünosensör, kılcal elektroforez ve lokalize yüzey plazma rezonans gibi duyarlılık ve spesifitesi yüksek farklı yöntemler kullanılmıştır (Kim ve Son, 2016). Bunlardan başka nanoarray yöntemleri de geliştirilmiştir. Ancak, aşağıda antijen-antikor etkileşimine dayalı bazı yöntemler üzerinde durulacaktır.

Radyoimmünoassay

İmmünoassay, genel olarak, özellikle protein yapısındaki antijenik türlerin tayini için, antikor ve antijen arasındaki spesifik bağlanma etkileşimini kullanan bir tayin yöntemidir (Hekimoğlu, 2006). İmmünoassay yöntemlerinde, temel olarak etiket adı verilen yapılar kullanılır. İlk olarak, radyoizotop etiket kullanılarak, 1959 yılında R.S. Yalow ve S.A. Berson tarafından insülin hormonu için bir radyoimmünoassay yöntemi geliştirilmiştir. Leptin hormonunun tayininde radyoimmünoassay yöntemi basit, spesifik ve duyarlı analizler sunar

(Dong vd., 2014). Bunun yanında, leptin fizyolojisi ile ilgili bilgilerin elde edilmesinde, RIA'nın bulunması önemli ölçüde katkı sağlamıştır. Landt vd. tarafından 1998'de yapılan bir çalışmada, hem serbest hem de bağlı leptinin tayini yapılmıştır. Doğrusal tayin aralığı 0,5–50 µg/L bulunmuş ve sıçan serumunda leptin derişiminin doğru ölçülebileceği bir RIA geliştirilmiştir (Landt vd., 1998). Ayrıca, Ma ve arkadaşları tarafından, insan serumundaki leptin tayin için RIA yöntemi geliştirilmiştir (Ma vd., 1996). Bir başka çalışmada ise, Widjaja ve çalışma grubu yine serumdaki leptinin belirlenmesi için benzer bir RIA yöntemi geliştirmişlerdir (Widjaja vd., 1997). Ancak radyoizotopların kullanımlarının getirdiği sağlık açısından tehlike, yeni etiketlerin kullanıldığı assay yöntemlerinin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşılmasına neden olmuştur.

Enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA)

Bu yöntem son 30 yıldır kullanılan ve sıklıkla protein yapılı antijenlerin tayini için tercih edilen bir yöntemdir. Özellikle tıbbi laboratuvarlarda, in vitro tanı amaçlı kullanılan bu testler, enzim etiketlerin kullanıldığı assay yöntemlerdir. Bu tür assaylerde radyoaktif izotopların yerine enzim etiketleri kullanılmaktadır. ELISA yöntemi, antikorların hedefe ulaşmasında elverişli koşullar sağlar ve basit bir enzimatik reaksiyon üzerine temellenmiştir, dolayısıyla, kullanımı kolaydır. ELISA testlerinde 96 kuyucuklu platelerin kullanımı ayrıca, hızlı bir şekilde sonuç alınmasına ve çoklu analizlerin yapılmasına olanak sağlar. Assay formatındaki esneklikten dolayı (yarışmalı, sandviç veya direk), hem antijen (özellikle küçük moleküller) hem de antikorların tayininde kullanılabilir (Lequin, 2005).

Leptin tayinine yönelik ELISA temelli pek çok yöntem geliştirilmiştir. Imagawa ve arkadaşları tarafından plazma ve beyin omurilik sıvısındaki leptini tayin etmek için, ELISA temelli bir yöntem geliştirmiştir. Leptin için gözlenebilme sınırı 0,78 pg/ml belirlenmiş ve anorektik hastaların kanlarında leptin tayini için yöntemin kullanılabilirliği araştırılmıştır. (Imagawa vd., 1998). ELISA tekniğine dayalı geliştirilen başka bir çalışmada, gözlenebilme sınırı, 0,40 ng/ml olarak bulunmuş ve tek aşamalı sandviç ELISA sisteminin, tayini basitleştirdiği ve tayin süresini RIA'ya oranla 90 dakika azalttığı görülmüştür (Kimura vd., 2000).

Bütün bu avantajlarının yanında, ELISA optik bir uygulamadır ve bazı sınırlılıkları mevcuttur. Bunlardan bazıları, ağır ve güçlü yoğun ışık kaynaklarına, detektörlere, monokromatora ihtiyaç duymaları, kompleks renkli örneklerden gelen hatalı sonuçların görülebilmesidir (Lequin, 2005).

Floroimmünoassay (FIA)

Bazı florofor türlerin etiket olarak kullanıldığı assay yöntemidir. Bunun yanında, üstün özelliklerinden dolayı, lantanit şelatlarının kullanıldığı, zaman gecikmeli floroimmünoassay (TR-FIA) yöntemi sıklıkla kullanılan FIA yöntemidir. Geleneksel ELISA'ya üstün bir alternatif sağlayan FIA, yüksek hassasiyet, geniş dinamik aralık, yüksek stabilite ve mükemmel esneklik sunan bir assay yöntemidir (Tuomola vd., 1997).

Literatürde leptin tayini için hazırlanan FIA yöntemleri mevcuttur. Kim ve Son tarafından yapılan bir çalışmada, leptinin tayin için gözlenebilme sınırı, 0,01 ng/ml olarak belirlenmiş ve sandviç tipi ELISA ile duyarlılık açısından kıyaslandığında, FIA yönteminin daha duyarlı olduğu sonucu çıkmıştır (Kim ve Son, 2016).

Biyolojik sıvılardaki bileşiklerin ölçümünde FIA'nın en önemli avantajı, diğer analitik tekniklerle elde edilemeyen yüksek hassasiyet ve aşırı duyarlılığa olanak sağlamasıdır (Darwish, 2006).

İmmünosensörler

İmmünosensörler, immünokimyasal reaksiyonun bir transdüser aracılığı ile izlendiği afinite-ligand temelli biyosensörlerdir. Tüm immünosensörlerin temel özelliği, kararlı bir kompleks oluşturmak için antijenlerin, antikorlar tarafından moleküler olarak tanınmasıdır. Bu, immünosensörlerin, immünoassay metodolojisine benzer yönüdür. (Luppa vd., 2001).

Leptin tayini için pek çok immünosensör geliştirilmiştir. Bununla ilgili çalışmalar literatür taraması kısmında verilmektedir.

2.2. Biyosensörler ve İmmünosensörler

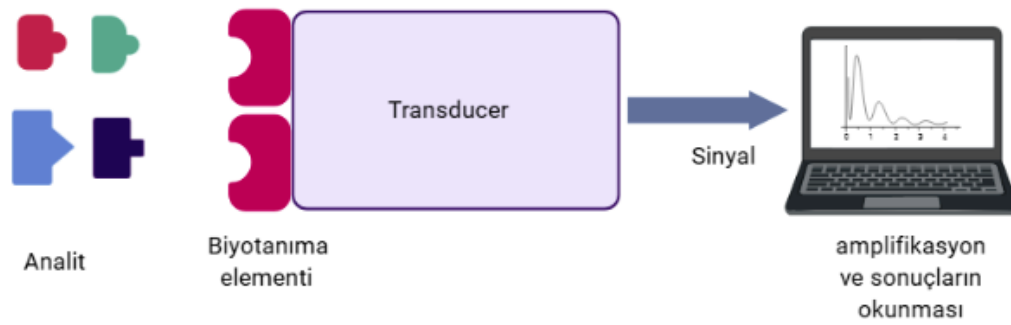
Kimyasal sensörler, kimyasal bilgileri, analitik olarak faydalı bir sinyale dönüştüren bir cihazdır. Kimyasal sensörler, bir kimyasal (moleküler tanıma sistemi) ve bir fizikokimyasal dönüştürücü (transdüser) adı verilen iki temel bileşen içerir. Biyosensörler biyokimyasal bir tanıma sisteminin bulunduğu kimyasal sensörlerdir (Turner vd., 1987).

Biyosensör; biyolojik, kimyasal veya biyokimyasal sinyali ölçülebilir ve işlenebilir elektriksel sinyale dönüştürebilen, kimyasal veya fiziksel transdüser ile birleştirilmiş biyolojik algılama materyali içeren bir cihaz veya enstrümandır (Yanbin, 2006).

Bir biyosensör aşağıda belirtilen özelliklere sahip olmalıdır:

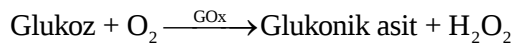
- Biyoaktif veya bir biyotanıma materyali içermeli,
- Bu materyal ilgi duyulan türdeki maddeleri ya da bir analiti tanımalı,
- Biyotanıma materyali bir transdüser adı verilen aygıtla yakın temas içinde olmalı,
- Bir biyosensör, biyolojik veya kimyasal etken bir maddeye seçici olarak, hızla ve sürekli şekilde reaksiyon göstermelidir (Ramírez vd., 2009).

Şekil 2.2’de bir biyosensörün yapısı ve bileşenleri şematize edilmektedir.

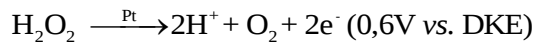


Şekil 2.2. Bir biyosensörün tipik yapısı ve bileşenleri.

İlk biyosensör, Clark ve Lyons (Yanbin, 2006) tarafından bir glukoz tayini için geliştirilen ve bir oksijen elektrot üzerine, glukoz oksidaz enziminin immobilize edilmesi ile hazırlanan bir enzim elektrottur. Enzim tarafından katalizlenen reaksiyon ile glukoz, glukonik asit ve hidrojen peroksit dönüştürülür (Wang, 2006).

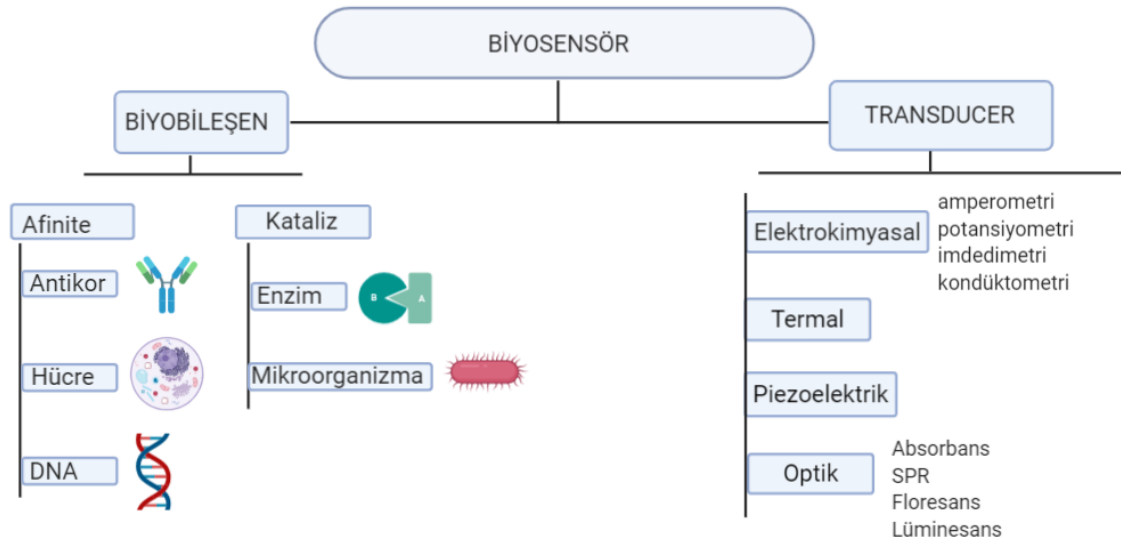


Enzimatik reaksiyon sonrasında oluşan hidrojen peroksit, aşağıdaki reaksiyon uyarınca çalışma elektrodunda yükseltgenir. Oluşan yükseltgenme akımı hidrojen peroksit ve dolayısıyla da glukoz derişimi ile orantılıdır (Wang, 2006).



Biyolojik türlerin tayin edilmesinde, pek çok yöntem olmasına rağmen, bu yöntemlerin çoğu zaman alıcı uzun prosedürler içerirler ve pahalı aletlere gereksinim duyarlar (Dong vd., 2014). Biyosensörlerin diğer yöntemlere göre avantajı, hücreler, dokular, enzimatik substratlar ve proteinler gibi pek çok farklı biyolojik türün bir transdüser vasıtasıyla tayin edilebilmesidir. Diğer avantajları ise boyutunun fonksiyonel olarak ayarlanabilmesi ve küçük hacimlerle çalışılabilme olanağının olmasıdır (Ramírez vd., 2009).

Biyosensörler, gerek biyotanıma (biyoalgılama) elementleri, gerekse kullanılan transdüser çeşidi temel alınarak çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir (Yanbin, 2006). Şekil 2.3'te bu sınıflandırma sunulmaktadır.



Şekil 2.3. Biyosensörlerin sınıflandırılması.

Biyosensör yapısındaki biyobileşen türüne göre yapılan sınıflandırmada, biyosensörler, *biyokatalitik* ve *biyoafinite* temelli biyosensörler olarak ayrılabilir. Biyokatalitik biyosensörde, biyobileşen olarak genellikle enzimler kullanılır ve tanıma olayına bir katalitik tepkime eşlik eder. Bağlanma olayını izlemek için tasarlanmış biyoafinite temelli biyosensörlerde ise, biyomoleküler tanıma için reseptörler, lektinler, nükleik asitler, membranlar, hücreler, antikorlar veya antikorla ilişkili yapılar kullanılır. Antikorlar ve antikorlarla ilişkili yapılar kullanıldığında, bu biyosensörler immünosensör olarak adlandırılır (Luppa vd., 2001).

Biyosensörde kullanılan transdüser çeşidine göre yapılan sınıflandırmada, biyosensörler *kolorimetrik*, *piezoelektrik* (kuartz kristal mikrobals), *optik* (absorbans, yüzey plazmon rezonans, lüminesans ve floresans) ve *elektrokimyasal* (amperometrik, potansiyometrik, iletkenlik ve impedans) esaslı olabilir (Yanbin, 2006).

Kolorimetrik esaslı biyosensörler, biyobileşen tarafından katalizlenen bir reaksiyonda ısı değişiminin ölçümü üzerine temellenir. *Piezoelektrik* esaslı biyosensörlerde, bileşen ve analit arasındaki kompleks oluşumu sonrası, salınım rezonansındaki değişimin ölçümü, tayinin temelini oluşturur. Optik esaslı biyosensörlerde ise biyobileşen ve analit arasında meydana gelen reaksiyon, optik parametreler yoluyla izlenir (Mello ve Kubota, 2002).

Elektrokimyasal esaslı biyosensör ise, biyobileşenin uygun bir elektrokimyasal bir transdüser yüzeyine immobilize edilmesi ile hazırlanan ve nicel ya da yarı-nicel tayin yapma olanağı sağlayan cihazlardır (Thevenot vd., 2014). En sık karşılaşılan biyosensör tipi olarak belirtilebilir. Bu biyosensörlerde, biyokimyasal reaksiyon sırasında bir elektrokimyasal sinyal oluşur ve bu sinyal tayin edilmek istenen türün tüketimi ya da üretimi ile ilişkilendirilir. Elektrokimyasal biyosensörler, potansiyometrik, amperometrik ve kondüktometrik olarak gruplandırılabilir (Mello ve Kubota, 2002).

Biyobileşenin seçiminden sonra, bu türün transdüser olarak tercih edilen yapı üzerine bağlanması gerekir. Bu işlem immobilizasyon olarak adlandırılır ve genel olarak adsorpsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama ve tutuklama en çok tercih edilen immobilizasyon yöntemleridir (Yanbin, 2006).

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi, biyobileşenin, transdüser doğrudan ya da bir film ile modifiye edilmiş transdüser, hidrofobik kuvvetler, iyonik ve Van der Waals kuvvetleri ile bağlanmasıdır. Diğer yöntemlere göre oldukça basit bir yöntemdir ve biyobileşenin denatürasyonuna yol açmaz. Bununla beraber, bu immobilizasyon yöntemi, çalışma koşullarındaki değişikliklere hassastır ve transdüser yüzeyinden biyobileşenin ayrılması gibi olumsuzluklar görülebilir. *Tutuklama yönteminde*, biyobileşen, bir polimer veya matriks yapı içerisine hapsedilir. Ancak, biyobileşenin hapsedilmesi, tayini yapılacak tür ile etkileşimini bozabilir veya biyobileşen matriks içinden sızabilir. Biyoelementin, transdüser *kovalent bağlanması* işleminde, biyoelement ve transdüser yüzeyin fonksiyonel gruplar bulunmalıdır. Bu immobilizasyon yönteminde, biyoelementin yapısal değişikliği meydana gelebilir, ancak adsorpsiyon ile karşılaştırıldığında, daha güvenilir bir yöntemdir. Kovalent bağlama yöntemi, genellikle, glutaraldehit gibi bazı reaktiflerin kullanımı ile *çapraz bağlama* şeklinde de yapılabilir. Ayrıca, karbodiimit ve *N*-hidroksisüksinimit de çapraz bağlama işleminde kullanılabilecek reaktifler arasında sayılabilir (Arya vd., 2008).

İmmünosensörler, biyobileşen olarak antikorların kullanıldığı ve antikor-antijen etkileşiminin uygun bir transdüser ile izlendiği, afinite-ligand temelli bir biyosensör çeşitidir. Tüm immünosensörlerin temel özelliği, kararlı bir kompleks oluşturmak için antijenlerin antikorlar tarafından moleküler olarak tanınmasından kaynaklanan özgüllüğüdür. İmmünosensörler, tercih edilen transdüser çeşidine göre, elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik veya kondüktometrik kapasitif), optik, mikrogravimetrik ve kalorimetrik esaslı olabilir (Luppa vd., 2001).

İmmünosensörler, ayrıca, etiketsiz (doğrudan) veya etiketli (dolaylı) olarak da ayrılabilir. Doğrudan immüsensörlerde, antijen-antikor kompleksinin oluşumu, fiziksel değişikliklerin izlenmesi ile belirlenebilir. Dolaylı immünosensörlerde ise, kullanılan etiketin cevabı izlenerek antijenin tayini yapılır (Luppa vd., 2001).

Antikor-antijen arasındaki spesifik etkileşimi temel alan immünosensörler, geniş oranda kullanım alanı bulmuştur (Lim ve Ahmed, 2015). Bunlar arasında da özellikle, elektrokimyasal bir dönüşümle antijen-antikor etkileşimlerinin özgüllüğüne dayanan *elektrokimyasal immünosensörler*, maliyeti, basitliği, hassasiyeti, minyatürleştirme özellikleri ve hızlı analitik cevap verme gibi avantajları nedeniyle en fazla tercih edilenleridir (Moka vd., 2015).

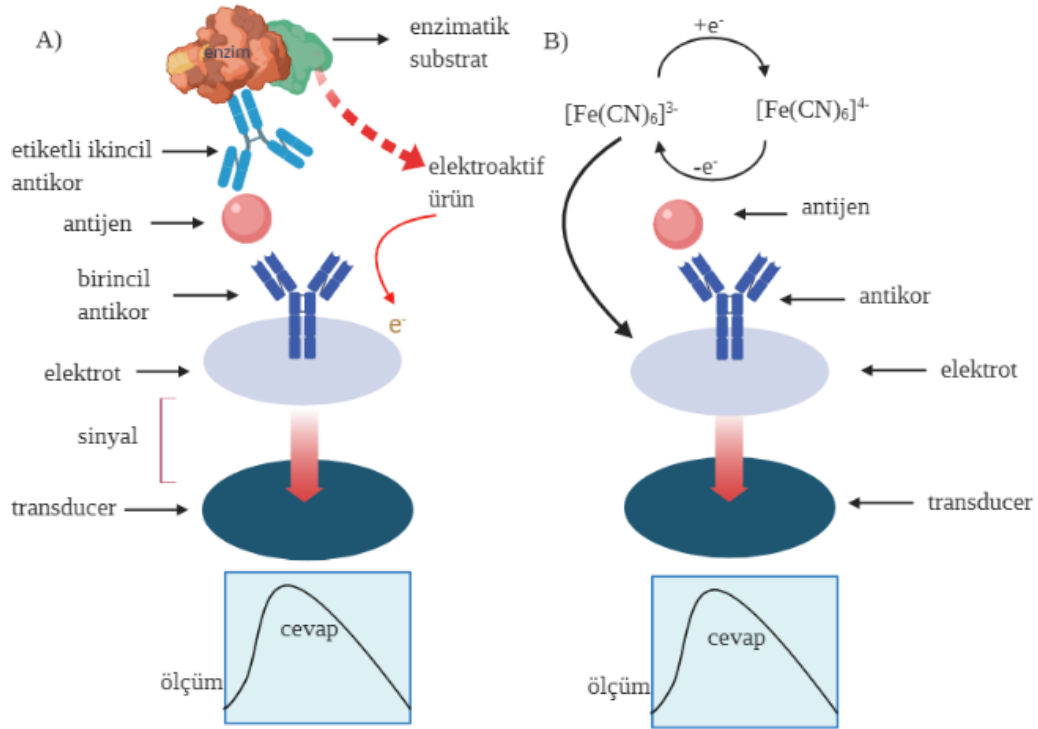
2.2.1. Elektrokimyasal immünosensörler

Tıp alanında, gıda endüstrisinde ve çevresel izlemde, pratik kullanıma uygun analiz sistemlerine ihtiyaç vardır. Özellikle klinik kimyada, yüksek duyarlılık ve spesifikite ile hızlı tanı yapabilecek tayin sistemleri gerekmektedir. Antikorlar, hayvanlar ve insanlarda yabancı maddelere karşı immünolojik cevap proteinleridir ve kendi spesifik antijenine (Ag) karşı üretilirler. İmmünoassay yönteminde, genelde, antikor veya antijen, mikrotiter plate adı verilen plakalara kaplanır ve örneği içeren tamamlayıcı maddeler eklenerek bir immünokompleks oluşturulur. Tanıma olayını belirleyebilmek için radyoizotoplar, enzimler ya da floroforlar etiket olarak kullanılır (Ramírez vd., 2009).

Elektrokimyasal immünosensör, antikor-antijen reaksiyonunun özgüllüğü ve afinitesini, elektrokimyasal tekniğin yüksek hassasiyet, düşük maliyet, yüksek verimlilik ve taşınabilirlik özelliklerini birleştiren analitik cihazlardır. Elektrokimyasal immünosensörler en çok klinik analizlerde uygulama alanı bulmaktadır (Sun vd., 2018).

Genel olarak, çoğu analit (antijen veya antikor) bir elektrokimyasal reaksiyonda redoks bileşeni olarak hareket edemediğinden, elektrokimyasal immünosensör hazırlanırken, elektrokimyasal olarak aktif bir etiketin kullanım gerekliliği doğar. İmmünosensörler, etiketlerin kullanılıp kullanılmadığına bağlı olarak, iki kategoriye ayrılabilir: etiketli ve etiketsiz. Etiketli immünosensörlerin çoğunda, etiketli bir ikincil antikor kullanılmaktadır. Ayrıca hazırlanan konjugatların aktivitesi dikkatlice kontrol edilmeli ve bazı ek reaktifler ve prosedürler dahil edilmelidir. Etiketleme işlemi zaman alıcıdır, maliyetlidir ve çoğu zaman modifiye biyomoleküllerin denatürasyonuna yol açabilir. Bununla beraber, etiketsiz immünosensör, özellikle basit hazırlama prosedürü içermesi, daha uygun maliyetli olması ve antikorların veya

antijenlerin aktivitelerinin korunması nedeniyle avantajlı görünmektedir (Moka vd., 2015). Şekil 2.4'te bir etiketli ve etiketsiz immünoşensörler şematik olarak verilmektedir.



Şekil 2.4. (A) etiketli ve (B) etiketsiz immünoşensörlerin şematik gösterimi.

Etiketli immünoşensörler ya da dolaylı immünoşensörler, genellikle, oldukça hassas ve çok yönlü saptamaya izin veren bir veya birkaç etiketten üretilen sinyale dayanır. Enzimler, örneğin horseradish peroksidaz, katalaz ve glukoz oksidaz, alkalın fosfataz en çok etiket olarak kullanılan yapılardır. Etiketli immünoşensörlerde, etiketler bir antikora veya antijene bağlanabilir ve ölçüm sırasında belirlenen etiket sayısının hedef analit sayısına karşılık geldiği varsayılır. Etiketli immünoşensörler, yüksek hassasiyet ve spesifik olmayan adsorpsiyonun sinyal üzerindeki etkisinin düşük olması gibi avantajlara sahipken, ilave işlem basamakları gerektirmesi ve etiketlerin her zaman aynı etkinlikte olamaması gibi bazı dezavantajlarla karşı karşıya kalmaktadır (Mollarasouli vd., 2019).

Etiketsiz immünoşensörler, diğer bir deyişle, doğrudan immünoşensörler, etiketlemeye gerek kalmadan doğrudan, antijen-antikor kompleksi oluşumundan kaynaklanan fiziksel veya kimyasal değişiklikleri tespit edebilir. Bu tip immünoşensörde, etiket kullanmaya gerek duyulmadığı için, hızlı ve gerçek zamanlı analizlerde kullanılabilir. Bu nedenle, etiketsiz

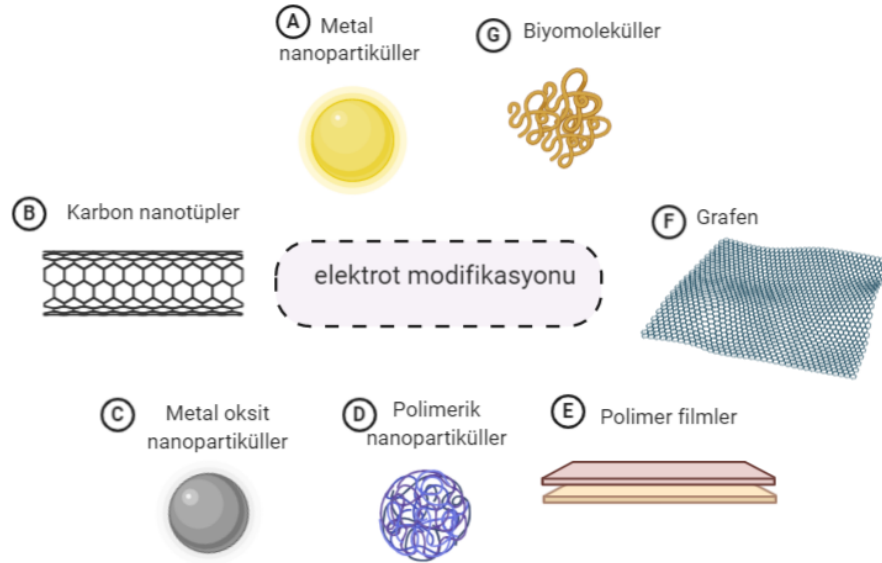
immünosensörlerin, klinik tayin için kullanılması, son yıllarda giderek artmıştır. Bununla birlikte, etiketsiz immünosensörler, yanıtlar üzerine spesifik olmayan adsorpsiyonun etkisi görülebilir. Genel olarak, bir antijen-antikor (Ag-Ab) etkileşimi olmadığında sinyal gözlenmemelidir, ancak substratın yüzeyindeki antijenin veya diğer proteinlerin spesifik olmayan bağlanması nedeniyle, her zaman küçük bir sinyal elde edilir. Bu durum, uygun bir bloke edici maddenin kullanılması ile engellenebilir (Mollarasouli vd., 2019).

Etiketsiz immünosensörlerde, ferrisiyanür sıklıkla redoks medyatörü olarak kullanılır. Bu redoks medyatörü, düşük zemin akımı gösterir ve iyi tanımlanmış bir çift redoks pikine sahiptir. Ferrisiyanür ile elde edilen elektrokimyasal sinyal çok kararlıdır (Yang vd., 2014)

Bir elektrokimyasal immünosensörün, performansı, genel olarak, elektrot arayüzünün özelliklerine bağlıdır. Bu sebepten, kullanılacak elektrot yüzeyinin, iletken polimerler, grafen veya grafen türevlerinin nanokompozitleri ya da nanopartiküllerle modifiye edilmesi ile elde edilen cevaplar artırılabilir (Gao vd., 2015).

2.3. Elektrot Modifikasyonu

Elektrot modifikasyonu, sensörlerin duyarlılığını, seçiciliğini, kararlılığını ve cevabını artırmak için polimerler, nanomalzemeler ve biyolojik ajanlar gibi çeşitli malzemeler kullanılarak, farklı kimyasal ve fiziksel yöntemlerle gerçekleştirilen bir tekniktir. Modifikasyon, çok düşük tayin sınırına sahip küçük miktarlardaki analitin karmaşık bir ortamda tayin edilmesini sağlar (Kaya vd., 2020). Şekil 2.5'te bu amaçla kullanılan bazı yapılar verilmiştir. Şekilde görülebileceği gibi, çalışma elektrotları çeşitli iletken veya yarı iletken polimerik filmlerle kaplanabilir. Bunun yanında grafen, grafen oksit, tek ya da çok duvarlı karbon nanotüpler gibi karbon temelli yapılar ile çalışma elektrotları modifiye edilerek, cevap geliştirilebilir. Ayrıca, bu tez çalışmasında da kullanılacak olan, kitosan gibi biyolojik yapılarda, elektrot modifikasyonu ve biyoaktif türün immobilizasyonunu kolaylaştırmak amacıyla kullanılabilir. Aynı şekilde, metal ya da metal oksit nanopartiküller elektrodun yüzey alanının genişletilmesi ve iletkenliğin artırılması için kullanılabilir. Bunlar arasında altın, gümüş, paladyum vb. metal nanopartikülleri ve ZnO, SnO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃, Fe₃O₄, CoFe₂O₄, ZrO₂, TiO₂, CeO₂ gibi metal oksit nanopartikülleri en çok tercih edilen nanoyapılardandır (Nikolova ve Chavali, 2000).



Şekil 2.5. Elektrot modifikasyonu için kullanılan bazı yapılar.

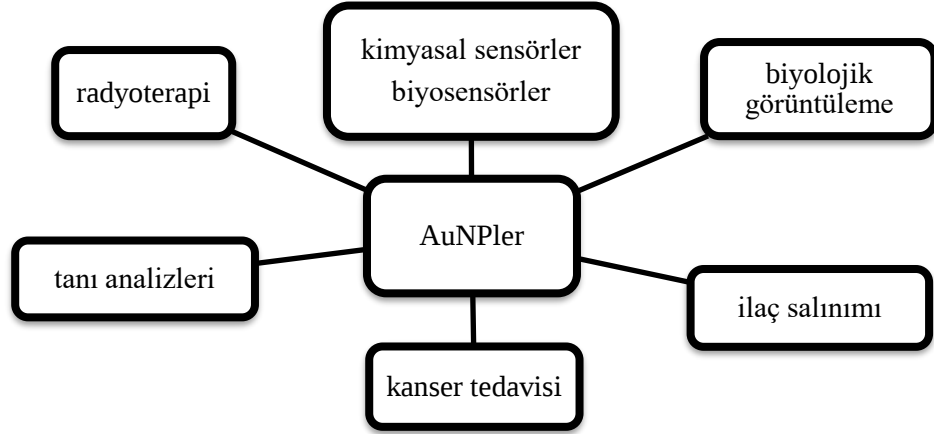
Bu tez çalışmasında, leptin tayini için etiketsiz bir immünosensör hazırlamak için, çalışma elektrodu olarak kullanılan camı karbon elektrot (GCE), bir metal nanopartikül olarak altın nanopartikül (AuNP) ile bir metal oksit nanopartikül olarak CoFe_2O_4 ile, ve bir biyomolekül olarak kitosan (CHI) ile modifiye edildi. Kullanılan bu yapılar ile ilgili bilgi aşağıda verilmektedir.

2.3.1. Altın nanopartiküller (AuNPlar)

Altın nanopartiküller (AuNP'ler), en kapsamlı olarak incelenen nanomateriyallerden biridir. Pek çok benzersiz optik, kimyasal, elektriksel ve katalitik özelliklere sahip oldukları için AuNP'ler, biyolojik ve kimyasal algılama uygulamaları için ilgi çeken bir nanopartikül olmuştur (Jans ve Huo, 2012). Şekil 2.6.'da AuNP'lerin kullanım alanları özetlenmektedir.

Kolloidal altın olarak da bilinen AuNP'ler, nanometre büyüklüğündeki altın parçacıklarının bir süspansiyonudur. Bu kolloidal solüsyonların tarihi, dekoratif amaçlarla camı boyamak için kullanıldıkları Roma dönemine dayanmaktadır. Ayrıca Çin ve Mısır'da kolloidal altın, terapötik ve dekoratif amaçla kullanılmıştır. Kolloidal altının, bilimsel olarak değerlendirilmesi, kolloidal altın çözeltilerinin, bulk altından farklı özelliklere sahip olduğunu söyleyen Michiael Faraday'ın 1850'lerde yaptığı çalışmalara kadar başlamadı (Arteaga vd., 2010; Mody vd., 2010). AuNP'ler, büyük yüzey-hacim oranı, iyi elektriksel özellikler, güçlü

adsorpsiyon kabiliyeti, yüksek yüzey reaksiyon aktivitesi, küçük partikül boyutu ve iyi yüzey özellikleri gibi birçok mükemmel özelliğe sahiptirler (Lian vd., 2012).



Şekil 2.6. AuNP'lerin bazı kullanım alanları.

Monodispers küresel altın nanopartiküllerin sentezi için en yaygın yöntem Turkevich ve arkadaşları 1951'de ve daha sonra Frens ve arkadaşları tarafından önerilen yöntemdir. Çeşitli kolloidal altın preparatları incelenip, çekirdeklenme ve büyüme süreci üzerine çalışılmıştır. Kolloidal altın hidrofobiktir ve optik mikroskopun çözünürlük sınırının altındadır. Ancak tek tek kolloidal parçacıkların incelenmesine izin veren çözünürlüğe sahip elektron mikroskopunun geliştirilmesiyle, kolloidal altın preparatlarının şekli, ortalama boyutu ve boyut dağılımı üzerine kapsamlı çalışmalar yapılabilmektedir (Turkevich vd., 1951). Bu yöntem, indirgeyici ajan olarak sitrat kullanılarak hidrojen tetrakloroaurat (HAuCl_4) gibi altın tuzlarının kimyasal olarak indirgenmesini içerir. Bu yöntem, çap olarak 10-20 nm aralığında monodispers AuNP'ler üretir.

Bu tez kapsamında, AuNP'ler kullanılarak, etiketsiz bir elektrokimyasal immünosensör hazırlamak ve sensörün bu şekilde elektriksel iletkenliğini ve cevabını iyileştirilmek amaçlanmaktadır. Arya vd.'nin 2011'de yaptığı bir çalışmada, çalışma elektrotları, AuNPlar ile modifiye edilmiş ve etiketsiz bir elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada, AuNP nanomalzemesinin, geniş yüzey alanı/hacim oranı ile sensörün duyarlılığını artırdığı sonucuna varılmıştır (Arya vd., 2011).

2.3.2. Kobalt ferrit nanopartiküller (CoFe_2O_4)

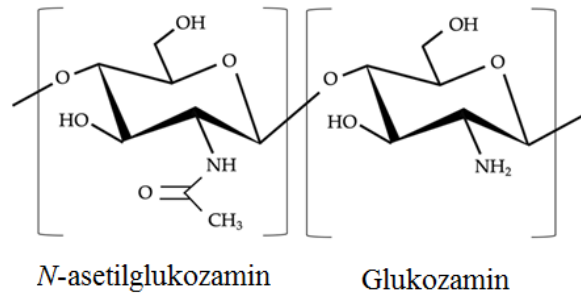
Manyetik nanopartiküller, kataliz, manyetik sıvılar, sensörler ve ayırma/saflaştırma gibi uygulama alanlarında ilgi gören materyallerdir. Bunun yanında yüzey katalitik aktivitesine sahip

ve düşük maliyetli bir materyal olan spinal tipi bir ferrit olarak, kobalt ferrit (CoFe_2O_4), geri dönüştürülebilir nanokatalizör olarak (Wang ve Astruc 2014) sensör uygulamalarında (Liu vd., 2019) ve fotokatalizör (Du vd., 2016) olarak kullanım olanağı bulmuştur.

Kobalt ferrit nanopartiküller, kendine özgü, elektrik, katalitik, manyetik, optik ve medikal özellikleri sebebiyle kataliz, sensörler, bilgi depolama sistemleri, tıbbi teşhis ve terapi gibi potansiyel uygulamalara sahiptir. CoFe_2O_4 nanopartikülün avantajı, aynı doygunluk manyetizasyonuna sahip manyetit ile karşılaştırıldığında, bir sıra daha büyük kristalin anizotropidir. Bu nedenle, kobalt ferritin manyetik momenti, benzer partikül boyutuna sahip manyetit veya maghemite göre çok daha yavaş gevşer (Malinowska vd., 2020).

2.3.3. Kitosan (CHI)

Kitosan (CHI), temel olarak kabuklu hayvanların dış iskeletinden, özellikle de karideslerden izole edilen doğal bir polimerdir. Kitinin, tam veya kısmi deasetilasyonundan elde edilen bir D-glukozamin ve N-asetil-glukozamin kopolimeridir (Şekil 2.7.). İzolasyon işlemi, kitin ekstraksiyonu ve izolasyonu, demineralizasyon ve deasetilasyon dahil olmak üzere birkaç adımı içerir. CHI, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen, biyoyumlu ve amin açısından zengin bir polimer olarak kabul edilmekte ve iyi film oluşturma yeteneğine sahip olduğu vurgulanmaktadır. CHI, selüloza benzer bir yapıya sahiptir ancak, her polimer zincirinde reaktif amino ve hidroksil fonksiyonel grupları taşır. Fizikokimyasal özelliklerin nadir kombinasyonundan dolayı, gıda, tarım, biyoloji ve eczacılık gibi birçok alanda yaygın olarak uygulanmıştır. Ayrıca, amperometrik biyosensörlerin yapımı için bir immobilizasyon matrisi olarak da kullanılmıştır (Adlim ve Zarlaida, 2015; Ergün, 1999; Lian vd., 2012).



Şekil 2.7. Kitosanın monomerik birimleri.

2.4. Tez Kapsamında Kullanılan Elektrokimyasal Teknikler

Elektroanalitik teknikler, elektrik ve kimya arasındaki etkileşimle, yani akım, potansiyel veya yük gibi elektriksel büyüklüklerin ölçümleri ve bunların kimyasal parametrelerle ilişkisi ile ilgili tekniklerin genel adıdır. Elektriksel ölçümlerin analitik amaçlar için kullanılması, çevresel izleme, endüstriyel kalite kontrol veya biyomedikal analiz dahil olmak üzere çok çeşitli alanlarda uygulamalar bulmuştur. 1980'lerin ortalarından bu yana, ultramikroelektrotların geliştirilmesi, özel arayüzler ve moleküler tek katmanların tasarımı, biyolojik bileşenlerin ve elektrokimyasal dönüştürücülerin birleştirilmesi, voltametrik tekniklerin geliştirilmesi dahil olmak üzere pek çok gelişme, elektroanalizin popüleritesini artırmıştır (Wang, 2006).

Homojen yığın (bulk) çözeltileri içeren birçok kimyasal ölçümün aksine, elektrokimyasal prosesler, elektrot-çözelti arayüzünde gerçekleşir. Elektroanalitik ölçümlerin iki ana türü mevcuttur: *potansiyometrik* ve *potansiyostatik* ölçümler. Her iki tip de, elektroimyasal hücreyi oluşturan en az iki elektrot (iletken) ve numune (elektrolit) çözeltisi gerektirir. İki elektrottan biri hedef analite (analitlere) yanıt verir ve bu nedenle çalışma elektrodu olarak adlandırılır. Referans elektrot olarak adlandırılan ikincisi, sabit potansiyele sahiptir (yani, çözeltinin özelliklerinden bağımsızdır) (Wang, 2006).

Bu bileşenler elektrokimyasal hücreyi oluşturur.

2.4.1. Potansiyostatik teknikler

Potansiyostatik teknikler, potansiyel kontrollü tekniklerdir ve elektrot-çözelti arayüzündeki yük transfer süreçleri ve dinamik (sıfır-akım olmayan) durumlara dayalıdır. Burada, elektrot potansiyeli, bir elektron transfer reaksiyonu üretmek için kullanılır ve ortaya çıkan akım ölçülür. Böyle kontrol edilebilir bir parametre, kimyasal türleri bir elektron kazanmaya veya kaybetmeye zorlayan "elektron basıncı" olarak görülebilir. Buna göre, ortaya çıkan akım, elektronların elektrot-çözelti arabirimi boyunca hareket etme hızını yansıtır. Potansiyostatik teknikler, böylece elektroaktif olan, yani indirgenebilen veya yükseltgenebilen herhangi bir kimyasal türün tayini için kullanılabilir (Wang, 2006).

Potansiyel kontrollü tekniklerinin avantajları;

- Yüksek hassasiyet,
- Elektroaktif türlere karşı seçicilik,
- Geniş bir doğrusal aralık,
- Taşınabilir ve düşük maliyetli enstrümantasyon,

- Alışılmadık ortamların analizine izin veren çok çeşitli elektrotların kullanılabilmesi,
- Son derece düşük gözlenebilme sınırları,
- Çok küçük (5–20- μ L) numune hacimleriyle çalışılabilme (Wang, 2006).

Faradaik akım

Elektroaktif türlerin yükseltgenme durumundaki bir değişiklikten kaynaklanan akım, Faraday yasasına uyduğu için *faradaik akım* olarak adlandırılır. Faradaik akım, redoks reaksiyonunun oranının doğrudan bir ölçüsüdür. Voltamogram olarak bilinen ortaya çıkan akım-potansiyel grafiği, akım sinyalinin [dikey eksen (ordinat)] uyarma potansiyeline [yatay eksen (apsis)] karşı bir gösterimidir. Voltametrik yanıtın tam şekli ve büyüklüğü, elektrot reaksiyonunda yer alan süreçler tarafından yönetilir. Toplam akım, örnek ve boş çözeltiler için faradaik akımların yanı sıra, faradaik olmayan şarj arka plan akımının toplamıdır.

Elektrot reaksiyonunun yolu oldukça karmaşık olabilir ve birkaç adımda gerçekleşebilir. Bu tür reaksiyonların hızı, dizideki en yavaş adımla belirlenir. Basit reaksiyonlar yalnızca elektroaktif türlerin elektrot yüzeyine toplu olarak taşınmasını, arayüz boyunca elektron transferini ve ürünün çözeltiliye geri taşınmasını içerir. Daha karmaşık reaksiyonlar, gerçek elektron transferinden önce veya sonra gelen ek kimyasal ve yüzey işlemlerini içerir. Reaksiyonun net hızı ve dolayısıyla ölçülen akım, tepkenlerin kütsel taşınması veya elektron transfer hızı ile sınırlandırılabilir. Daha yavaş bir süreç hız belirleme adımı olacaktır. Belirli bir reaksiyonun kütle tarafından kontrol edilip edilmediği taşıma veya elektron transferi genellikle ölçülen bileşiğin türüne ve çeşitli deneysel koşullara (elektrot malzemesi, ortam, çalışma potansiyeli, toplu taşıma modu, zaman ölçeği, vb.) göre belirlenir. Belirli bir sistem için, hız belirleme adımı bu nedenle araştırılan potansiyel aralığa bağlı olabilir. Genel reaksiyon, yalnızca elektroaktif türlerin yüzeye ulaşma hızı ile kontrol edildiğinde (yani, basit bir elektron transferi), akımın toplu taşıma ile sınırlı olduğu söylenir. Bu tür tepkimelere tersinir tepkimeler denir (Wang, 2006).

Kütle taşınma yolları:

Elektroaktif maddeler elektrokimyasal bir süreçte üç şekilde taşınabilir:

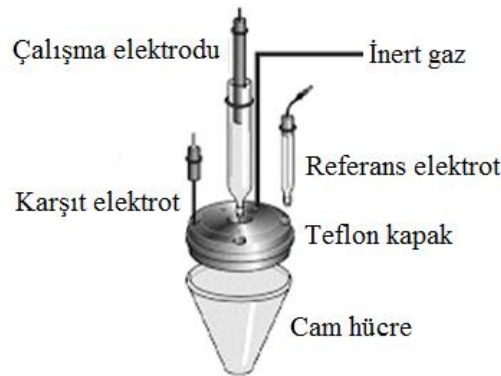
- Difüzyon - derişim farklılıklarını en aza indirmeyi amaçlayan, yüksek derişimli bölgelerden düşük bölgelere doğru derişim gradientinin etkisi altındaki kendiliğinden taşınma.

- Konveksiyon - büyük bir fiziksel hareketle elektroda taşıma; konveksiyon için ana itici güç, çözeltinin karıştırılması veya akması veya elektrotun döndürülmesi veya titreştirilmesi ile ilişkili harici mekanik enerjidir. Yoğunluk gradyanlarının bir sonucu olarak doğal olarak da konveksiyon meydana gelebilir.
- Göç -yükü parçacıkların bir elektrik alanı boyunca hareketidir (Wang, 2006).

2.4.2. Elektrokimyasal hücre bileşenleri

Faradaik akımların aktığı elektrokimyasal hücreler, galvanik veya elektrolitik hücreler olarak sınıflandırılır. Galvanik hücre, elektrotlara bağlandıklarında bir iletken tarafından kendiliğinden reaksiyonların olduğu hücrelerdir. Bu hücreler genellikle kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine dönüştürmede kullanılır. Elektrolitik hücrede ise, açık devreden voltajın uygulanmasıyla hücrenin potansiyeli etkilenir. Bu hücreler elektrik enerjisini harcayarak kimyasal reaksiyonları gerçekleştirmek için kullanılır (Wang, 2000).

Üç elektrotlu hücreler, kontrollü potansiyel çalışmalarında yaygın olarak kullanılır. Hücre genellikle 5–50 mL hacimli kapalı bir beherdir ve bu behere daldırılmış üç elektrot (çalışma, referans ve yardımcı) bulunur. Çalışma elektrodu, ilgili reaksiyonun meydana geldiği elektrot iken, referans elektrot numune bileşiminden bağımsız olarak kararlı ve tekrarlanabilir bir potansiyel sağlar. Bu amaçla genellikle, Ag/AgCl veya doygun kalomel referans elektrotlar tercih edilir. Platin tel veya grafit çubuk gibi inert bir iletken malzeme genellikle akım taşıyan yardımcı elektrot olarak kullanılır. Üç elektrot ve oksijensizleştirici gazın kabarcıklarını çıkarmak için kullanılan tüp hücre kapağındaki beş delikte desteklenir. Üç elektrotlu hücreyi, yerleşik gaz kontrolünü ve manyetik karıştırıcıyı uygun kapakla birleştiren eksiksiz sistemler ticari olarak mevcuttur (Wang, 2006). Şekil 2.8.'de böyle bir elektrokimyasal hücre görülmektedir.



Şekil 2.8. Voltammetrik ölçümler için bir hücrenin şematik gösterimi.

Elektrokimyasal hücre bileşenleri ve özellikleri Çizelge 2.2’de özetlenmektedir.

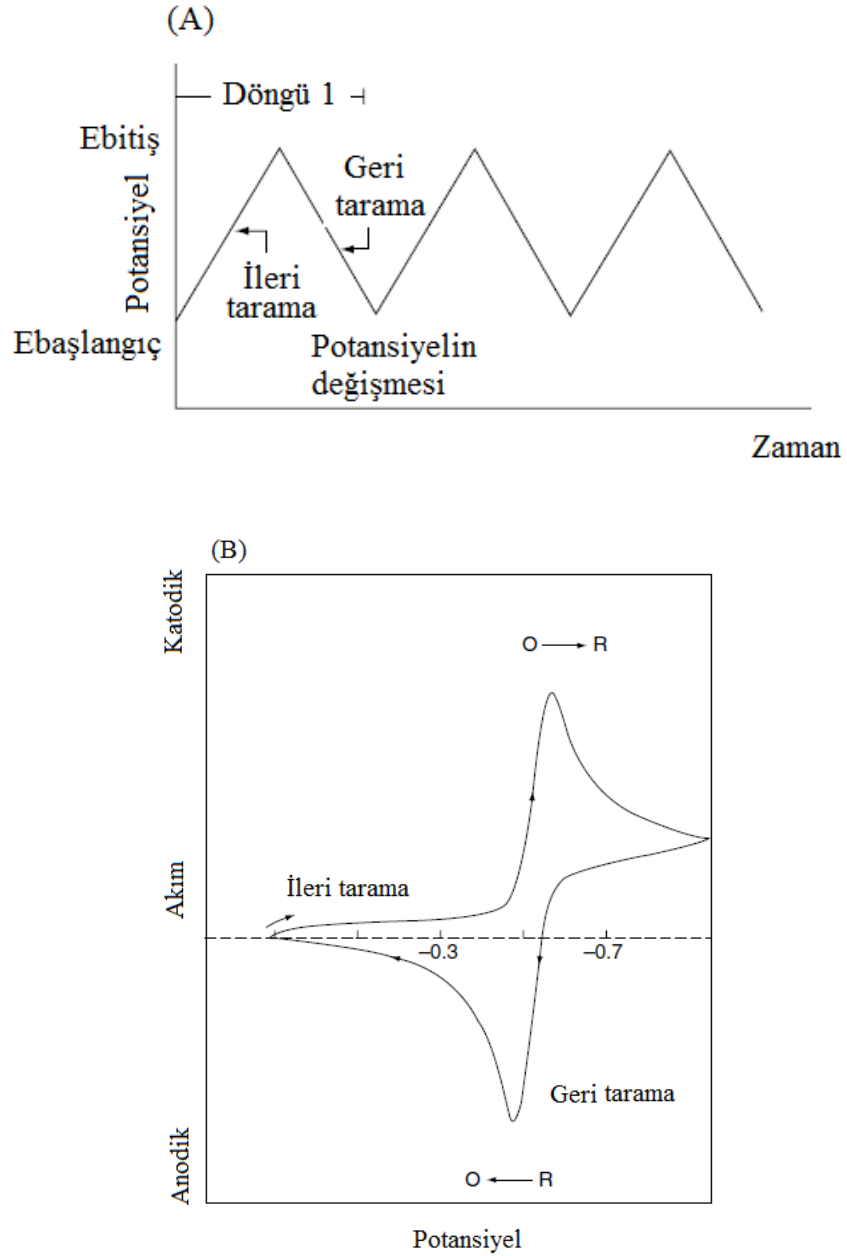
Çizelge 2.2. Elektrokimyasal hücre bileşenleri ve özellikleri.

Hücre Bileşeni	Özellikleri	Örnek
Çalışma Elektrodu	• Üzerinde elektrokimyasal olayın gerçekleştiği elektrottur. • Çalışma elektrodu, yüksek sinyal-gürültü karakteristikleri ve tekrarlanabilir bir yanıt sağlamalıdır. • Çalışma elektrotunun seçiminde, hedef analitin redoks davranışı ve ölçüm için gerekli potansiyel bölge üzerindeki arka plan akımı, potansiyel pencere, elektriksel iletkenlik, yüzey tekrarlanabilirlik, mekanik özellikler, maliyet, kullanılabilirlik ve toksisite göz önünde bulundurulmalıdır.	Cıva, karbon veya inert metallere (özellikle platin ve altın) hazırlanmış elektrotlar
Referans Elektrot	• Çalışma elektrodunun potansiyelinin kıyaslandığı elektrottur. • Analit bileşiminden bağımsız olarak tekrar edilebilir, kararlı ve sabit bir potansiyel sağlar.	Ag/AgCl, doygun kalomel elektrot, standart hidrojen elektrodu
Karşıt Elektrot	• Sinyal kaynağından çıkan elektriğin çözelti içerisinde geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlayan (akım taşıyıcı elektrot) ve tepkimeye girmeyen (inert) bir iletken materyalden oluşan elektrottur.	Platin tel elektrot
Destek elektrolit	• Elektrokimyasal ölçümler için destek elektrolit içeren bir çözelti ortamı gerekir. • Çözücü seçimi, öncelikle analitin çözünürlüğü, redoks aktivitesi ve elektriksel iletkenlik, elektrokimyasal aktivite ve kimyasal reaktivite gibi çözücü özellikleri tarafından belirlenir.	Sulu (çeşitli tuz çözeltileri, tamponlar) ve susuz çözeltiler (asetonitril, propilen karbonat, dimetilformamid (DMF), dimetilsülfoksit (DMSO) veya metanol)

2.4.3. Dönüşümlü voltametri

Dönüşümlü voltametri (CV), elektrokimyasal tepkimeler hakkında nitel bilgi elde etmek için en yaygın kullanılan tekniktir. CV, genellikle bir elektroanalitik çalışmada gerçekleştirilen ilk deneydir. Özellikle, elektroaktif türlerin redoks potansiyellerinin konumunu ve ortamın, redoks işlemi üzerindeki etkisinin uygun bir şekilde değerlendirilmesini sağlar. Teknik, üçgen şekilli bir potansiyel dalga formu kullanarak, sabit bir çalışma elektrodun

potansiyelinin doğrusal olarak taranmasını içerir (Şekil 2.9 (A)). Aranılan bilgiye bağlı olarak tekli veya çoklu çevrimler kullanılabilir. Potansiyel tarama sırasında, potansiyostat, uygulanan potansiyelden kaynaklanan akımı ölçer. Ortaya çıkan akım-potansiyel grafiği, dönüşümlü bir voltamogram olarak adlandırılır (Şekil 2.9 (B)).



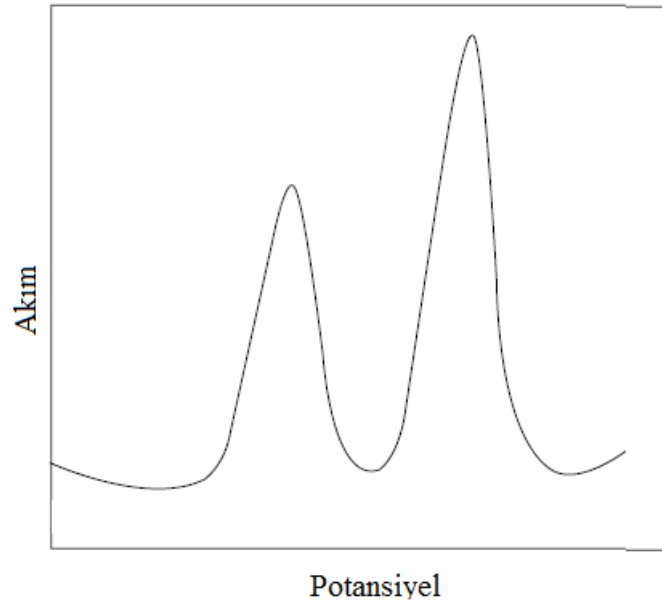
Şekil 2.9. (A) Dönüşümlü voltametri deneyinde potansiyel-zaman uyarma sinyali (B) Tersinir bir $O + ne^- \leftrightarrow R$ redoks işlemi için tipik dönüşümlü voltamogram (Wang., 2006)

Şekil, tek bir potansiyel döngü sırasında tersinir bir redoks çiftinin yanıtını göstermektedir. Başlangıçta sadece yükseltgenmiş O formunun mevcut olduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle, ilk yarı döngü için, herhangi bir azalmanın olmadığı bir değerden başlayarak, negatife giden bir potansiyel tarama seçilir. Uygulanan potansiyel redoks işlemi için karakteristik E° 'ye yaklaştıkça, bir katodik akım, bir zirveye ulaşılan kadar artmaya başlar. İndirgenme işleminin gerçekleştiği potansiyel bölgeyi geçtikten sonra potansiyel taramanın yönü tersine çevrilir. Ters tarama sırasında, R molekülleri (ileri yarım döngüde üretilir ve yüzeyin yakınında birikir) tekrar O'ya yeniden yükseltgenir ve bu da anodik bir tepe oluşturur (Wang, 2006).

2.4.4. Diferansiyel puls voltametrisi

Barker ve Jenkin tarafından sunulan puls voltametrik teknikler, voltametrik ölçümlerin tayin sınırlarını düşürmeyi amaçlamaktadır. Faradaik ve faradaik olmayan akımlar arasındaki oranı önemli ölçüde artırarak, bu tür teknikler, 10^{-8} M derişim seviyesine kadar tayine izin verir. Büyük ölçüde geliştirilmiş performansları nedeniyle, modern puls teknikleri, analitik laboratuvarlarda büyük ölçüde klasik yöntemlerin yerini almıştır. Çeşitli puls tekniklerinin tümü bir akım / potansiyel adım (kronoamperometrik) deneyine dayanmaktadır. Her biri yaklaşık 50 ms'lik bir süreye sahip olan bu tür potansiyel adımların bir dizisi, çalışma elektrotuna uygulanır. Potansiyel kademelendirildikten sonra, şarj akımı hızla (üssel olarak) ihmal edilebilir bir değere düşerken, faradaik akım daha yavaş azalır. Böylece puls ömrünün sonundaki akımı örnekleyerek, şarj akımına karşı etkili bir ayırım sağlanır (Wang, 2006).

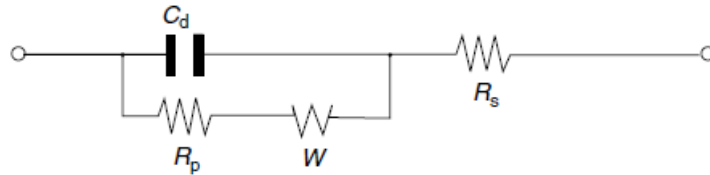
Diferansiyel puls voltametrisi (DPV), organik ve inorganik türlerin eser seviyelerini ölçmek için son derece yararlı bir tekniktir. Diferansiyel puls voltametrisinde, doğrusal bir potansiyel rampasında üst üste binen sabit büyüklükteki pulslar, düşüşün bitiminden hemen önce çalışma elektroduna uygulanır. Akım, puls uygulamasından hemen önce ve puls ömrünün olmak üzere iki kez uygulanır. İlk akım, ikinciden çıkarılır ve bu akım farkı $[\Delta i = i(t_2) - i(t_1)]$ uygulanan potansiyele karşı grafiklenir (Şekil 2.10). Elde edilen diferansiyel puls voltamogramı, yüksekliği analitlerin derişimi ile doğru orantılı olan akım tepesinden oluşur (Wang, 2006).



Şekil 2.10. Tipik bir diferansiyel puls voltamogramı (Wang, 2006).

2.4.5. Empedans spektroskopisi

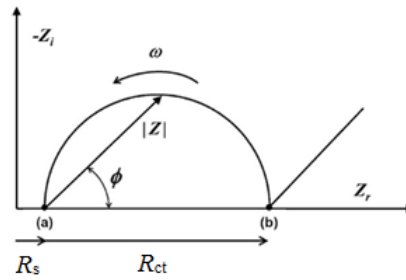
Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotların özelliklerini araştırmak ve elektrokimyasal reaksiyon oranlarını anlamak için etkili bir tekniktir. Empedans dirençler, kapasitörler veya indüktörlerin kombinasyonlarından oluşan bir devreden bir akım geçtiğinde karşılaşılan tamamen karmaşık bir dirençtir. Elektrot-çözelti arayüzeyinde meydana gelen elektrokimyasal dönüşümler, deneysel empedans spektrumlarına karşılık gelen elektronik eşdeğer devre bileşenleri kullanılarak modellenenabilir. Ara yüzey olaylarını modellemek için özellikle yararlı olan, Randles ve Ershler elektronik eşdeğer devre modelidir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Randles ve Ershler elektronik eşdeğer devre modeli (Wang, 2006).

Burada C_d : çift katmanlı kapasitansı, R_s : elektrolit çözeltisinin direnci, R_p : elektron transfer direnci, W : iyonların çözeltilerden elektrot yüzeyine difüzyonundan kaynaklanan Warburg empedansını ifade eder.

Empedans spektroskopisi, elektrokimyasal hücreye, küçük genlikli bozucu bir sinüzoidal potansiyel sinyalinin (ω frekansında) uygulanmasını ve akım yanıtının ölçülmesini içerir. Nyquist grafiği olarak bilinen grafikler genellikle, eksen üzerinde uzanan yarım daire şeklindeki bir bölgeyi ve difüzyonla sınırlı süreci tanımlayan düz bir çizgiyi içerir (Şekil 2.12). Bu tür spektrumlar, elektron transfer kinetiğini ve difüzyon özelliklerini çıkarmak için kullanılabilir. Çok hızlı elektron transfer süreçleri durumunda, empedans spektrumu sadece doğrusal kısmı içerirken, çok yavaş elektron transfer süreçleri büyük bir yarım daire biçimli bölge ile karakterize edilir. Yarım çemberin çapı elektron transfer direncine eşittir. Temel elektrokimyasal çalışmalara ek olarak, bu teknik, biyoafinite olayları üzerine temellenen, DNA biyosensörleri ve elektrokimyasal immünosensör çalışmalarında da oldukça yararlı bir teknik olarak bilinmektedir (Katz ve Willner, 2003; Wang, 2006).



Şekil 2.12. Tipik bir Nyquist grafiği.

2.5. Leptin Tayini İçin Yapılan Bazı Çalışmalar

Aşağıda leptin tayinine yönelik bazı çalışmalar özetlenmektedir.

Ojeda ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, anne sütü ve serumda, leptin hormonunun miktarının belirlenmesi için tek kullanımlık bir elektrokimyasal immünosensör hazırlanması amaçlanmıştır. Sandviç tipte hazırlanan formatta, streptavidin ile işlevselleştirilmiş manyetik boncuklar, biyotinlenmiş anti-leptin antikoru ve sonrasında hedef analit (leptin) ile muamele edilmiştir. Daha sonra monoklonal anti-leptin antikoru ve ve alkalin fosfataz etiketli IgG antikorunun ilavesi ile hazırlanan süspansiyon bir perde baskılı elektrot üzerine damlatılmıştır. Bir mıknatıs vasıtasıyla immünokonjugatları taşıyan manyetik boncuklar, karbon elektrotlar üzerinde tutulmuş ve enzim substratı olan 1-naftil fosfatın ilavesi sonrası, differansiyel puls voltametriyle (DPV) elektrokimyasal ölçümler gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan sensör ile doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı, sırasıyla, 5-100 pg/mL ve

0,5 pg/mL olarak belirlenmiştir. Hazırlanan immünoşensörün gerçek numunelerde tayin için etkili olabileceği vurgulanmıştır (Ojeda vd., 2013).

He ve arkadaşları 2013 yılında, sinyal yükseltici olarak hemin/G-dörtlü DNAzim kullanarak, insan leptin tayini için bir kemilüminesans immünoşensör geliştirmişlerdir. Bu sistemde, birincil antikor (insan leptin antikor) ilk olarak 96-kuyulu bir mikropate bağlanmış ve sonrasında insan leptini ve biyotinlenmiş ikincil antikor sandviç tip bir immünkompleks oluşturacak şekilde kuyulara ilave edilmiştir. Tayin için, kuyulara, hemin/G-dörtlü DNAzim ile etiketli streptavidin eklenerek, streptavidin-biyotin etkileşimi sağlanmıştır. DNAzim, güçlü alkali ortamda, H_2O_2 ile, lüminolün kemilüminesans katalitik aktivitesinde artışa yol açmıştır. Hazırlanan immünoşensörün optimum koşullar altında, gözlenebilme sınırı ve çalışma aralığı, sırasıyla, $1,9 \text{ pg mL}^{-1}$ ve $10\text{-}1000 \text{ pg mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur (He vd., 2013).

Dong ve çalışma arkadaşlarının 2014'te yaptığı bir çalışmada, leptin tayini için tek duvarlı karbon nanotüp/kitosan filmle modifiye edilmiş camı karbon elektrot kullanılarak sandviç tipte bir elektrokimyasal immünoşensör geliştirilmiştir. Hazırlanan modifiye elektrotta, anti-insan leptin antikorunu immobilize edilmiş, sonrasında ise elektrot yüzeyine, hedef insan leptini ilave edilerek, antijen-antikor kompleksinin oluşması sağlanmıştır. İnkübasyon sonrasında, biyotinlenmiş anti-insan leptin antikorunu ve alkalen fosfat (ALP) etiketli streptavidin ilavesi yapılarak sandviç tipte immünoşensör formatı tamamlanmıştır. ALP enzimin substratı olan α -naftil fosfatın ilavesi sonrası, elektrokimyasal ölçüm aşamasına geçilmiştir. Hazırlanan immünoşensör ile leptin için $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$ - 500 ng mL^{-1} çalışma aralığı elde edilmiş ve gözlenebilme sınırı 30 pg mL^{-1} olarak saptanmıştır. Çalışmada, klinik tanı amaçlı kullanılan yöntemlere, çalışmada hazırlanan elektrokimyasal immünoşensörün, basit hazırlık aşamaları, düşük maliyet, hızlı tayin ve yüksek duyarlılık gibi avantajlara sahip olmasından dolayı güçlü bir alternatif olacağı vurgulanmıştır. Bunun yanında elektrot modifikasyonunda kullanılan kitosan yapısının özellikleri vurgulanmıştır. Kitosanın bol miktarda $-NH_2$ ve $-OH$ fonksiyonel gruplara sahip, biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik olmayan doğaya sahip bir polisakkarit olduğu, kimyasal olarak inert, yapışkanlık ve iyi film oluşturma yeteneği gösterdiği vurgulanmış ve bu özelliklerinin, kitosanı, biyosensör geliştirmede önemli materyallerden biri yaptığı belirtilmiştir (Dong vd., 2014).

He ve arkadaşlarının 2015'te yaptığı bir başka çalışmada ise, insan serumunda leptin tayini için kemilüminesans immünoşensör geliştirilmiştir. Bu sensör için doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı, sırasıyla, $1,0 \text{ pg mL}^{-1}$ - $8,0 \times 10^2 \text{ pg mL}^{-1}$ ve $0,3 \text{ pg mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada hazırlanan sensör, katalitik hemin/G-dörtlü DNAzimleri ve

fonksiyonel süperparamagnetik nanokompozitleri kullanılarak çoklu sinyal amplifikasyon stratejisiyle sandviç tip bir kemilüminosensördür. Bu immünoensörde $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Poli}$ (dopamin)/Au yanının üzerine monoklonal anti-insan leptin antikoru immobilize edilmiştir. Sonrasında insan leptin, biyotinlenmiş tayin antikorları ve streptavidin-DNAzimler söz konusu nanokompozitler üzerine sandviç tip immünokompleks oluşturacak şekilde eklenmiştir. Bu kemilüminesans temelli sensörde, sinyal amplifikasyonu için luminol- H_2O_2 substrat sistemi tercih edilmiştir. DNAzimler, peroksidaz enzimi gibi davranarak doğal enzim horseradish peroksidazdan daha yüksek katalitik aktivite sergilediği, bu yüzden de hazırlanan immünoensörün, hastalık tarama ve klinik anlamda kullanılabileceği vurgulanmıştır (He vd., 2015).

Kim ve Son tarafından, leptin tayini için, bir mikrolaka üzerinde hazırlanan sandviç tipte immünoassay formatı ile Eu(III) etiket kullanılarak bir lantanit temelli floroimmünoassay (FIA) geliştirilmiştir. Hazırlanan immünoassay formatı sıçan serumundaki leptinin ölçümüne uygulandığında, söz konusu yöntemin oldukça etkili olduğu ve ticari olarak temin edilen sandviç tipte ELISA yöntemi ile rekabet edebildiği vurgulanmıştır (Kim ve Son, 2016).

Zhang vd. tarafından, serumda, leptinin tayini için tek duvarlı karbon nanotüp-kitosan nanokompozitleri kullanarak elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu çalışmada tek duvarlı karbon nanotüplerin immobilize biyomolekülün elektriksel iletkenliğini artırması, kitosanın ise fazla sayıda amino ve karboksil grubuna sahip olması gibi özellikleri sebebiyle, bunlar kullanılarak bir kompozit materyal hazırlanmış ve bu kompozit ile modifiye edilmiş bir camı karbon elektrot çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. Elde edilen elektrot ile leptin için doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı, sırasıyla, $0-1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ve 5 pg mL^{-1} olarak bulunmuştur. Basit ve etkili leptin biyosensörlerin klinik ve deneysel çalışmalarda potansiyel uygulama için uygun olduğu vurgulanmıştır (Zhang vd., 2018).

Cai ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, alkolik olayan yağlı karaciğer bozukluğunun (NAFLD) hayati bir biyobelirteci olarak kabul edilen leptinin tayini için etiketsiz bir immünoensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada, gözenekli grafen ile işlevselleştirilmiş siyah fosfor (PG-BP) kompozitine dayalı hazırlanan immünoensör ile gözlenebilme sınırının ve doğrusal çalışma aralığının, sırasıyla, $0,036 \text{ pg/mL}$ ve $0,150-2500 \text{ pg/mL}$ olduğu görülmüştür. Söz konusu leptin immünoensörünün, klinik olarak NAFLD'nin erken taranması ve teşhisi için kullanılabileceği vurgulanmıştır (Cai vd., 2019).

2.6. Altın Nanopartikül (AuNP) ile Yapılan Çalışmalar

2020 yılında, Sehit ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, altın nanopartiküller ile modifiye edilmiş moleküler baskılı polimerler (AuNP-MIP'ler) kullanılarak, yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip enzimatik olmayan elektrokimyasal bir glukoz sensörü geliştirmiştir. AuNP-MIP temelli sensörün, glukozu yüksek bir duyarlılık gösterdiği, ancak, AuNP içermeyen MIP yapısının yüksek derişimlerde bile glukoz tayininin yapılamadığı görülmüştür (Sehit vd., 2020).

Rizwan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, tümör tanısı için kullanılan bir belirteç olan karsinoembriyonik antijen için AuNP, tek duvarlı karbon nanotüp ve kitosan temelli elektrokimyasal bir immünosensör geliştirilmiştir. Hazırlanan sensör ile çalışma aralığının 100 fg/ mL-400 ng/mL aralığında olduğu belirlenmiştir. AuNP'lerin iyi iletkenliği, geniş yüzey alanı, biyomoleküllerle biyouyumluluğu ve antikor immobilizasyonuna yardımcı olma gibi özelliklerinin, immünosensörün sinyalinin güçlendirdiği vurgulanmıştır (Rizwan vd. 2019)

Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, prokalsitonin tayini için AuNP ile güçlendirilmiş bir elektrokimyasal immünosensör hazırlanmıştır. Bunun için, grafen oksit nanoyapraklar sentezlenmiş ve bunun üzerine birincil antikorlar immobilize edilmiştir. Sinyal aracı olarak ise yaban turpu peroksidazı ile etiketlenmiş ikincil antikor kullanılmıştır. Çalışmada, AuNP'lerin, elektrodun, antikor bağlanma bölgelerini genişlemesini sağlarken, aynı zamanda da elektriksel iletkenliği artırdığı vurgulanmıştır (Liu vd. 2019).

2.7. CoFe₂O₄ ile Yapılan Bazı Çalışmalar

Queiroz ve Dadamos tarafından yapılan bir çalışmada, nöradrenalin tayini için, kobalt ferrit nanopartiküller ve karbon nanotüpler ile modifiye edilmiş elektrokimyasal bir sensör hazırlanmıştır. Sensörün, geniş bir potansiyel aralığında cevap gösterdiği ve yüksek iletkenliğe ve kararlılığa sahip olduğu görülmüştür. Modifikasyon için kullanılan yapıların, camı karbon elektrotu göre elektron transferini oldukça hızlandırdığı belirlenmiştir (De queiroz vd., 2018).

Kumary vd'nin 2013 yılında yaptığı bir çalışmada, parasetamolün tayini için, camı karbon elektrot yüzeyinin, CoFe₂O₄ ile modifiye edilmesi ile elektrokimyasal bir sensör hazırlanmıştır. Bu sensörün, modifiye edilmemiş elektrotu göre, yüksek redoks aktivitesi gösterdiği ve iyi kararlılığa, tekrarlanabilir cevaplara ve yüksek duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür. CoFe₂O₄ nanopartiküllerin kimyasal kararlılık ve geniş spesifik yüzey alanı sağladığı vurgulanmıştır (Kumary vd., 2013).

2.8. Kitosanla Yapılan Bazı Çalışmalar

Zhang vd. tarafından yapılan bir çalışmada, işlevselleştirilmiş tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT), bunların suda dağılımını kolaylaştıran ve homojen bir çözelti oluşmasını sağlayan kitosan çözeltisi içerisinde disperse edilmiştir. Hazırlanan kompozitin, elektrotun iletkenliğini ve elektron transfer hızını artırdığı görülmüştür. Kitosan kullanılmadığında, SWCNT'ler ile hazırlanmış sensörün daha az duyarlı olduğu, bu sebepten de kitosan ile hazırlanan sensörün özgül, kararlı ve cevaplarının tekrarlanabilir olduğu vurgulanmıştır (Zhang vd., 2018).

Liang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, hepatit B yüzey antijeninin tayini için, AuNP, ferrosen-dallı kitosan ve çok duvarlı karbon nanotüp temelli etiketsiz bir immünosensör geliştirilmiştir. Hazırlanan immünosensörün analitik performansının, üretilebilirliğinin ve kararlılığının, kullanılan yapılar sayesinde geliştiği ve klinik tayinlerde uygun bir sensör yapısı olduğu vurgulanmıştır (Liang vd., 2011) .

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Yöntemler

Elektrokimyasal deneyler, Şekil 3.1’de gösterilen, 5 girişli standart elektrot hücre standı ile birlikte Autolab-PGSTAT 204 ve Ivium CompactStat potansiyostat/galvanostat cihazları kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışma elektrotu olarak 3 mm çapında camı karbon elektrot veya bu elektrotun modifiye edilmesi ile hazırlanan elektrot kullanıldı. Referans ve karşıt elektrotlar olarak, sırasıyla Ag / AgCl ($3 \text{ mol L}^{-1} \text{NaCl}$) elektrot ve bir platin tel elektrot tercih edildi.

Tez kapsamında belirtilen cihazlarla, dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) deneyleri gerçekleştirildi ve ilgili cihazların yazılımları ile sonuçlar değerlendirildi.



Şekil 3.1. Elektrokimyasal ölçümlerde kullanılan cihazlar ve hücre standı.

Tez kapsamında kullanılan diğer cihazlar ise Çizelge 3.1 de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan diğer cihazlar, markalar ve kullanım amaçları.

Kullanılan Cihazlar	Marka	Kullanım Amacı
Elektronik terazi	Shimadzu	Kimyasal maddelerin tartılması
pH metre	Mettler-Toledo	Çözelti pH'sının ölçülmesi
Otomatik mikro pipetler	Eppendorf	Çözelti hazırlama ve çözelti ilavesi
Isıticılı manyetik karıştırıcı	Isolab	Çözeltilerin karıştırılması
Saf su cihazı	Millipore Synergy	Çözeltilerin hazırlanması
Etüv	Binder	Antikor ve antijen etkileşim basamaklarının uygulanması
Taramalı Elektron Mikroskobu	FEI Nova NanoSEM 650	Elektrotların yüzey karakterizasyonu

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasalların isimleri ve temin edildikleri firmalar.

Kimyasal Madde	Firma
Anti-leptin antikor	Abcam
Leptin protein	Abcam
Kitosan	Sigma
CoFe ₂ O ₄ nanopartikül	Sigma-Aldrich
Tetrakloroaurik (III) asit trihidrat (HAuCl ₄ .3H ₂ O)	Acros Organics
Sığır Serum Albümin (BSA ≥%98),	Sigma-Aldrich
N- (3-Dimetilaminopropil) -N'-etilkarbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich
N-Hidroksisüksinimid (NHS)	Sigma-Aldrich
Di-sodyum monohidrojenfosfat dihidrat (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	Riedel de Haën
Sodyum dihidrojenfosfat dihidrat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	Riedel de Haën
Asetik asit	Merck
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Potasyum klorür (KCl)	Merck
Etil alkol (CH ₃ CH ₂ OH)	Sigma-Aldrich
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma-Aldrich
Potasyum ferri siyanür (K ₃ Fe(CN) ₆ .H ₂ O)	Acros Organics
Potasyum ferro siyanür (K ₄ Fe(CN) ₆ .H ₂ O)	Acros Organics
Sülfürik Asit (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Elektrokimyasal temizleme çözeltisi

Sülfürik asit (H₂SO₄) çözeltisi, elektrotların elektrokimyasal olarak temizlenmesi aşamasında kullanıldı. Bunun için derişimi 0,5 mol L⁻¹ olacak şekilde, belli hacimde alınan stok H₂SO₄ çözeltisi, saf su içerisinde çözüldü ve hacim ultra saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti 4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

3.3.2. Potasyum ferri/ferro siyanür çözeltisi (redoks prob çözeltisi)

Elektrokimyasal ölçümler, 5,0 mmol L⁻¹ K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ (1/1) ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren derişimi 0,1 mol L⁻¹ pH'sı 7,0 olan fosfat tampon çözeltisi (PBS) kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ ve KCl katıları uygun miktarda tartılıp, hazırlanan PBS içinde çözüldü. Hazırlanan çözelti 4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

3.3.3. Fosfat tamponu çözeltisi (PBS)

0,1 mol L⁻¹ derişimde fosfat tamponu hazırlamak için hesaplanan miktarlardaki sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ve disodyum monohidrojenfosfat dihidrat tartılarak saf suda çözüldü. Tampon pH'sı 0,1 mol L⁻¹ NaOH ve 0,1 mol L⁻¹ H₃PO₄ çözeltileri kullanılarak ayarlandı. Hazırlanan çözelti buzdolabında 4 °C 'de muhafaza edildi.

3.3.4. Anti-leptin antikor çözeltisi

Anti-leptin antikor çözeltisi, Abcam firmasından temin edilen derişimi 1 mg/mL olan poliklonal anti-leptin antikor çözeltisinin, 0,1 mol L⁻¹ PH'sı 7,0 olan fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile seyreltilmesi ile hazırlandı. Çözeltiler kısımlara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

3.3.5. Leptin çözeltisi

İstenen derişimde leptin çözeltileri, derişimi 1 mg/mL olan rekombinant insan leptin protein çözeltisinin, derişimi 0,1 mol L⁻¹ pH'sı 7,0 olan fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile seyreltilmesi ile hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler, uygun bir şekilde kısımlara ayrıldı ve -20 °C'de depolandı.

3.3.6. İmmünosensör hazırlama aşamasında kullanılan çözeltiler

% 1'lik asetik asit çözeltisi: % 1'lik asetik asit çözeltisi, stok asetik asit çözeltisinin uygun miktarda seyreltilmesi ile hazırlandı.

% 0,5 'lik kitosan çözeltisi: % 0,5'lik kitosan (CHI) çözeltisi, uygun miktardaki katının % 1'lik asetik asit çözeltisine eklenmesi ve 3 saat boyunca manyetik karıştırıcıda çözeltinin karıştırılması ile hazırlandı.

CoFe₂O₄-kitosan çözeltisi: 2 mg CoFe₂O₄ nanopartikül tartıldı ve 1 ml ultra saf su içinde 2 saat boyunca ultrasonikâtorde tutularak disperse edildi. Bu dispersiyondan 500 µL alınarak, aynı hacimde % 0,5'lik kitosan çözeltisi içine ilave edildi ve 10 dakika boyunca

ultrasonikatörde karışması sağlandı. Hazırlanan çözelti 4°C’de buzdolabında muhafaza edildi ve her kullanım öncesi 10 dakika sanikatörde tutuldu.

HAuCl₄ (Tetrakloroaurik asit) çözeltisi: Derişimi 0,6 mmol L⁻¹ olacak şekilde tartılan katı madde, 0,5 mol L⁻¹ derişimdeki H₂SO₄ çözeltisi içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti 4°C’de buzdolabında muhafaza edildi.

EDC/NHS çözeltisi: Derişim oranları 4:1 olacak şekilde N- (3-Dimetilaminopropil) -N’- etilkarbodiimid (EDC) ve N-Hidroksisüksinimid (NHS) katıları uygun miktarda tartıldı, belli miktarda saf su içinde çözüldü ve hacim yine saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti 4°C’de buzdolabında muhafaza edildi.

3.4. Elektrot Temizleme İşlemi

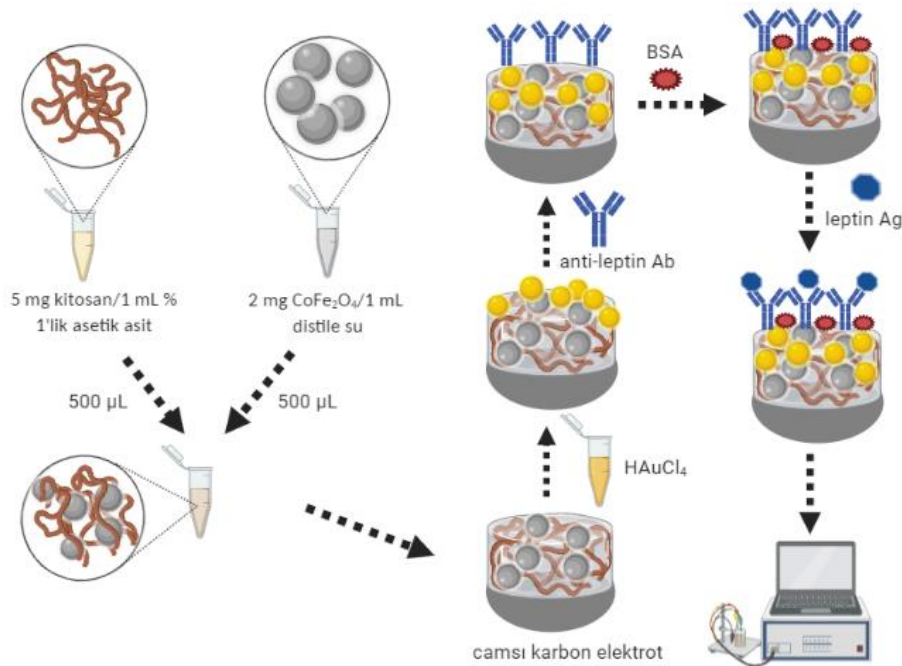
Modifiye edilmemiş camısı karbon elektrot (GCE), 0,05 µm’lik alümina bulamacı kullanılarak temizleme pedi üzerinde mekanik olarak temizlendi ve saf su ile yıkandı. Daha sonra elektrot sırasıyla etanol ve nitrik asit içinde 3 dakika süreyle ultrasonikatörde tutuldu ve havada kurutuldu.

Kirletici maddelerin daha fazla uzaklaştırılmasını sağlamak için ise, elektrotlar elektrokimyasal olarak temizlendi. Bunun için, GC elektrot, 0,5 mol H₂SO₄ çözeltisine daldırıldı ve 100 mV s⁻¹ tarama hızında (-0,5) –(+1,6) V potansiyel aralığında, 20 döngü ile dönüşümlü voltametri tekniğiyle tarama yapıldı. Elektrot saf su ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3.5. Etiketsiz Elektrokimyasal İmmünosensörün Hazırlanması

Bölüm 3.4’te anlatıldığı gibi, temizlenen camısı karbon (GC) elektrotların yüzeyine, CoFe₂O₄-kitosan çözeltisinden 10 µL olacak şekilde damlatıldı ve elektrot yüzeyinin oda sıcaklığında kurumaları sağlandı. Bu elektrot, GCE/CoFe₂O₄-CHI olarak belirtildi. Sonrasında, altın nanopartüül (AuNP), GCE/CoFe₂O₄-CHI yüzeyine, 0,6 mmol L⁻¹ HAuCl₄ içeren 0,5 mol L⁻¹ H₂SO₄ çözeltisi içinde, 100 mV s⁻¹ tarama hızında (-0,2) – (+1,2) V potansiyel aralığında, 15 döngü ile dönüşümlü voltametri kullanılarak elektrodepozite edildi. Ardından elektrot havada kurumaya bırakıldı. Hazırlanan elektrot GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP olarak adlandırıldı. Hazırlanan elektrotun yüzeyine etkin bir şekilde antikör immobilizasyonunu sağlamak için EDC/NHS çözeltisi elektrot yüzeyine ilave edildi ve belli bir süre inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, modifiye elektrot yüzeyine 10 µL belli derişimde anti-leptin antikoru (Ab) eklendi ve 37° C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Bu elektrot, GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab olarak

belirtili. Süre sonunda, elektrot, yüzey üzerindeki spesifik olmayan bağlanmayı bloke etmek için, elektrot, 40 dakika boyunca % 0,2'lik sığır serum albümin (BSA) çözeltisi ile muamele edildi. Bu işlem sonunda leptin tayini için elektrokimyasal etiketsiz bir immünsensör hazırlanmış oldu. Leptin tayininin yapılması aşamasında ise, hazırlanan GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA elektrot yüzeyine belli derişimdeki leptin çözeltilerinden 10 µL olacak şekilde ilave edildi ve gerekli ölçümler yapıldı. Şekil 3.2'de etiketsiz leptin immünsensörü hazırlama basamakları sunulmaktadır.



Şekil 3.2. Etiketsiz leptin immünsensör hazırlama basamakları.

3.6. İmmünsensörün Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Modifiye elektrotların, nanometre ölçeğinde, topografik analizi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) sıklıkla kullanılmaktadır. Tez kapsamında, modifiye edilmemiş (GCE) ve her modifikasyon adımı sonrası hazırlanan immünsensörün yüzey morfolojisi SEM kullanılarak araştırıldı.

3.7. Dönüşümlü Voltametri ile İmmünsensörün Özelliklerinin İncelenmesi

Dönüşümlü voltametri (CV) tekniği, türlerin indirgenme ve yükseltgenme süreçlerini araştırmak için yaygın olarak kullanılan güçlü ve popüler bir elektrokimyasal tekniktir (Elgrishi

vd., 2018). Bunun yanında elektrotların yüzey özelliklerinin araştırılmasında ve sensör hazırlama prosedürünün başarılı olup olmadığı da CV tekniği ile değerlendirilebilir. Bölüm 3.5’de belirtildiği gibi hazırlanan elektrotların, elektrokimyasal özelliklerini karakterize etmek ve elektrot hazırlama prosedürünü değerlendirmek için, ilk olarak, dönüşümlü voltametri (CV) tekniğinden yararlanıldı. Bu amaçla, GCE, GCE/CoFe₂O₄-CHI ve GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP, GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab ve GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA olarak belirtilen elektrotlar, ayrı ayrı hücre ortamına yerleştirildi. Hücreye, 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{4-/3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L⁻¹ PBS konuldu ve (-0,2) – (0,6) V (Ag/AgCl’e karşı) potansiyel aralığında ve 50 mV s⁻¹ tarama hızında CV’ler kaydedildi. Her bir elektrot için elde edilen voltamogramlar karşılaştırıldı.

Bunun yanında, hazırlanan immünosensör kullanılarak, tarama hızının, ferri/ferro siyanür redoks çiftinin elektrokatalitik özellikleri üzerine etkisi incelendi. Bunun için, GCE, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP ve GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA elektrotlar için Ag/AgCl’e karşı (-0,2) – (+0,6) V (Ag/AgCl’e karşı) potansiyel aralığında 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{4-/3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L⁻¹ PBS içinde ve 25-250 mV s⁻¹ tarama hızlarında voltamogramlar alındı ve grafiklendi. Tarama hızının kareköküne karşı anodik ve katodik pik akımları grafiklendi ve immünosensörün elektron transfer özelliği belirlendi.

3.8. Empedans Spektrokopisi ile İmmünosensörün Özelliklerinin İncelenmesi

Elektrokimyaal Empedans Spektrokopisi (EIS), immünosensörlerin arayüz özelliklerini karakterize etmek için kullanılan tekniklerden biridir. Empedans spektrumları bir yarım daire ve bir doğrusal bölüm içerir. Daha yüksek frekanslardaki yarım daire kısmı, elektron transferiyle sınırlı sürece karşılık gelirken, daha düşük frekanslardaki doğrusal kısım, difüzyonla sınırlı süreci temsil eder. Elde edilen yarım dairenin çapı, elektron transfer direncine (R_{et}) eşittir (Fan vd., 2013). Bu sebepten immünosensörün hem elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi hem de yapım aşamasının test edilmesi için, GCE, GCE/CoFe₂O₄-CHI ve GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP, GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab ve GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA olarak belirtilen elektrotların, 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{4-/3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L⁻¹ PBS içinde, 5 mV genlikte ve 10⁵ – 0,01 Hz aralığında frekansa sahip sinüzoidal bir sinyal uygulanarak, EIS ölçümleri gerçekleştirildi. Her bir elektrot için Nyquist diyagramları çizildi ve R_{et} değerleri birbirleriyle karşılaştırıldı. Bunun yanında immünosensör için uygun eşdeğer devre modeli elde edilen verilere göre çizildi.

3.9. Elektrokimyasal Ölçümler

Elektrokimyasal ölçümler için, hazırlanan GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA immünoşensör farklı derişimlerdeki, leptin antijeni (Ag) ile muamele edildi. Elektrotlar, antikor-antijen kompleksinin oluşmasını sağlamak için belli bir süre inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda, GC/ CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrot, 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{4- / 3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L⁻¹ PBS içeren hücreye daldırıldı ve diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniğı ile ölçümler alındı.

DPV ölçümleri için kullanılan parametreler:

Potansiyel aralığı	(-0,2) – (+1,1) V vs. Ag/AgCl
Tarama hızı	0,05 V s ⁻¹
Modülasyon amplitüdü	0,05 V
Aralık süresi	0,2 s
Adım potansiyeli:	0,01 V

Leptin antijeni ve leptin antikoru arasındaki immünolojik reaksiyon, redoks türüne (Fe(CN)₆^{4- / 3-}) ait pik akımlarındaki değişiminin belirlenmesi yolu ile izlendi. Değişen antijen derişime karşı immünolojik reaksiyona yanıtındaki mevcut değişiklik analitik sinyal olarak alındı.

3.10. Optimizasyon Çalışmaları

Tayin çözeticisinin pH'sı ve immünoşensör yapımında kullanılacak olan antikor derişimi, immünoşensör performansını etkilediğı için bu çalışma şartları optimize edildi.

Kullanılan redoks prob çözeltisinin pH'sının voltametrik cevap üzerine etkisini belirlemek için, farklı pH (5,0; 6,0; 7,0 ve 8,0) değerlerindeki, 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{4- / 3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L⁻¹ PBS içinde, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrotların (-0,2) – (+1,1) V vs. Ag/AgCl potansiyel aralığında ve 0,05 V s⁻¹ tarama hızında DPV'leri alındı. Voltamogramlardan belirlenen akım değerleri pH ile ilişkilendirilerek, hazırlanan immünoşensör için en uygun çözelti pH'sı belirlendi.

Benzer şekilde, immünoşensör yapımında kullanılacak olan antikor derişimi, uygun antijen-antikor kompleksinin elde edilmesi için önemli bir parametredir. Bu amaçla GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP elektrotlara, farklı derişimlerde (0,1 -20 µg/mL) antikor çözeltileri ilave edildi ve sonraki basamaklar aynı şekilde uygulanarak, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrotlar hazırlandı. Her bir elektrotun, 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{4- / 3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L⁻¹ PBS içinde (-0,2) – (+1,1) V vs. Ag/AgCl potansiyel aralığında ve 0,05 V s⁻¹ tarama

hızında DPV'leri alındı. Voltamogramlardan belirlenen akım değerleri, antikor derişimi ile ilişkilendirilerek uygun antikor derişimi belirlendi

3.11. Hazırlanan İmmünosensör ile Leptin Tayininin Yapılması

GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA olarak belirtilen immünosensörlere farklı derişimlerde (1-4000 ng/mL) leptin antijen (Ag) çözeltisinden ilave edildi ve antikor-antijen arasında immüünokompleksin oluşması için inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrotlarının, ayrı ayrı, 5,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)6]^{3-/4-} içeren 0,10 mol L⁻¹ KCl çözeltisinde Ag/AgCl' karşı (-0,2) ile (+1,1) V potansiyel aralığında ve 50 mV s⁻¹ tarama hızında diferansiyel puls voltamogramları kaydedildi. Her bir derişim için voltamogramlardan belirlenen pik akımları, derişime karşı grafiklendi ve leptin için çalışma aralığı belirlendi.

3.12. İmmünosensörün Tekrar Üretilirliğinin Belirlenmesi

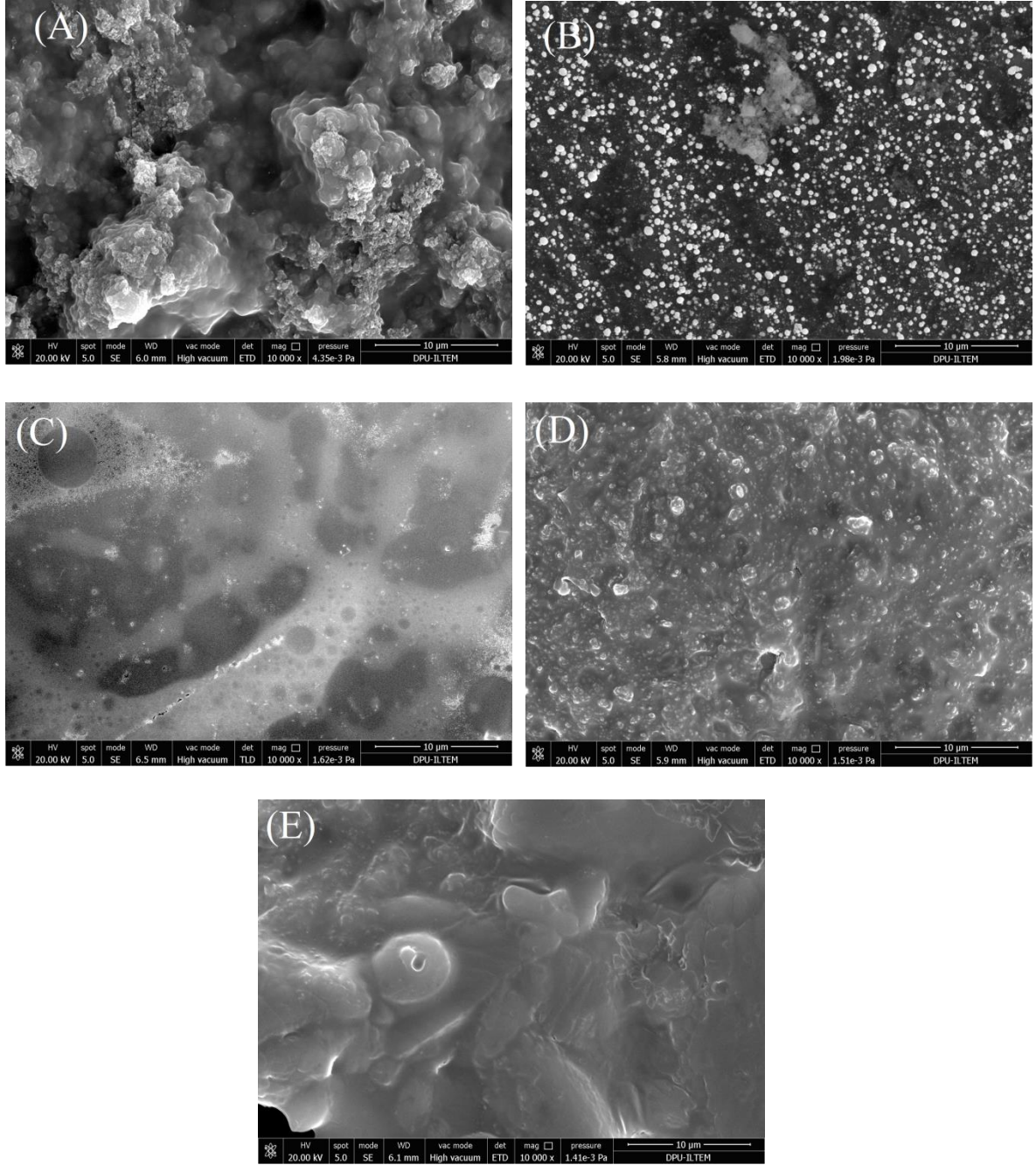
Hazırlanan immünosensörün tekrar üretilebilirliğinin değerlendirilmesi için, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA elektrotlara farklı derişimlerde leptin antijeni (Ag) eklendi ve inkübasyona bırakıldı. Her bir derişim için üç ayrı elektrot hazırlandı. GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrotlarının ayrı ayrı, 5,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)6]^{3-/4-} içeren 0,10 mol L⁻¹ KCl çözeltisinde Ag/AgCl' karşı (- 0,2) ile (+1,1) V potansiyel aralığında ve 50 mV s⁻¹ tarama hızında diferansiyel puls voltamogramlar kaydedildi. Her bir derişim için voltamogramlardan akım değerleri belirlendi ve her derişim için % bağıl standard sapma değerleri hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, leptin proteinin tayinine yönelik etiketsiz bir elektrokimyasal immünosensör hazırlanması hedeflenmektedir. Bu amaçla, camı karbon elektrotlar, CoFe_2O_4 -kitosan (CHI) ve altın nanopartiküller (AuNP) ile modifiye edildi. Anti-leptin antikorların (Ab), hazırlanan CoFe_2O_4 -CHI/AuNP elektrotun yüzeyine, immobilizasyonu sağlandı. Spesifik olmayan bağlanmalar sığır serum albümin (BSA) ile engellendikten sonra, hazırlanan immünosensör (GCE/ CoFe_2O_4 -CHI/AuNP/Ab/BSA), leptin antijeni (Ag) ile muamele edilerek, leptin tayinine yönelik bir sensör hazırlanmış oldu. Aşağıda tez kapsamında elde edilen bulgular verilmekte ve sonuçlar değerlendirilmektedir.

4.1. İmmünosensörün Yüzey Karakterizasyonu

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), yarı iletkenlerden nano malzemelere, yaşam bilimlerinden tıpa kadar pek çok araştırma alanında yüzey topolojisi ve nano nesnelerin şeklini incelemek için yaygın olarak uygulanan bir tekniktir (Lin vd., 2018; Liu vd., 2019). Bu tez kapsamında da hazırlanan immünosensörün, hazırlama basamaklarında, yüzey özellikleri Bölüm 3.6'da belirtildiği gibi SEM ile araştırıldı ve Şekil 4.1'de verildi.

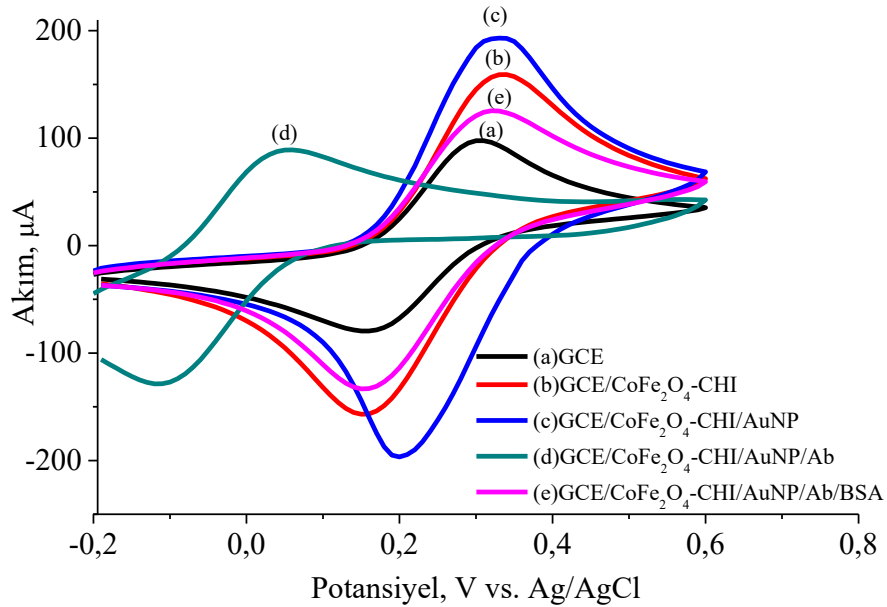


Şekil 4.1. (A) GCE/ CoFe₂O₄-CHI (B) GCE/ CoFe₂O₄-CHI/AuNP (C) GCE/ CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab (D) GCE/ CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA (E) GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/ Ab/ BSA/Ag ile elde edilen SEM görüntüleri.

Şekiller incelendiğinde, CoFe_2O_4 -CHI ile modifiye edilmiş elektrotla kitosanın iyi bir film oluşturma özelliğinden dolayı oldukça gözenekli ve pürüzlü bir yapı gözlenmektedir (Şekil 4.1 (A)). GCE/ CoFe_2O_4 -CHI yüzeyine AuNP'ler biriktirildiğinde ise, belirgin bir toplanma olmaksızın küresel bir şekil oluşturma eğilimde olan partiküllerin yüzeye biriktiği görülebilir (Şekil 4.1 (B)). GCE/ CoFe_2O_4 -CHI/AuNP yüzeyine sıra ile leptin antikoru (Ab), bovin serum albümin (BSA) ve leptin antijeninin ilavesi ile hazırlanan elektrotlarda diğer elektrotlara göre daha pürüzsüz bir yüzey yapısının oluştuğu ve yüzeyin morfolojisinin değiştiği söylenebilir (Şekil 4.1 (C)-(E)).

4.2. Dönüşümlü Voltametri Tekniği ile İmmünoşensörün Karakterizasyonu

Dönüşümlü voltametri (CV), modifiye elektrot yüzeyinin özelliğini araştırmak için etkili ve kullanışlı bir yöntemdir (Liang vd., 2011). Hazırlanan elektrotların elektrokimyasal özelliklerini karakterize etmek ve değerlendirmek için ilk olarak CV tekniği kullanıldı. Bu amaçla, Bölüm 3. 7'de anlatıldığı gibi, söz konusu elektrotların $5,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ ve $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{KCl}$ içeren $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{PBS}$ içeren hücrede $(-0,2) - (+0,6) \text{ V}$ (Ag/AgCl'e karşı) potansiyel aralığında ve 50 mV s^{-1} tarama hızında CV'leri alındı (Şekil 4. 2). Ayrıca, voltamogramlardan belirlenen pik akımları ve pik potansiyelleri Çizelge 4.1'de verilmektedir.



Şekil 4.2. (a) GCE (b) GCE/ CoFe_2O_4 -CHI (c) GCE/ CoFe_2O_4 -CHI/AuNP (d) GCE/ CoFe_2O_4 -CHI/AuNP/Ab (e) GCE/ CoFe_2O_4 -CHI/AuNP/Ab/BSA ile elde edilen dönüşümlü voltamogramlar.

Çizelge 4.1. Hazırlanan elektrotların elektrokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması.

Elektrot	$i_{pa}, \mu A$	$i_{pk}, \mu A$	E_p, V
GCE	85,0	-75,4	0,310/0,160
GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI	126,3	-156,2	0,340/0,150
GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP	157,7	-187,2	0,330/0,200
GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab	108,8	-96,3	0,06/-0,09
GCE/CoFe ₂ O ₄ -CHI/AuNP/Ab/BSA	97,5	-120,6	0,320/0,150

Şekil 4.2 ve Çizelge 4.1 değerlendirildiğinde, her bir elektrotla, tek bir indirgeme ve yükseltgenme piki elde edildi. Bununla birlikte, GCE/ CoFe₂O₄-CHI ile elde edilen indirgenme ve yükseltgenme pik akımlarının, GCE ile elde edilenlerden daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.2 (a) ve (b)). Bu sonuç, GC/CoFe₂O₄-CHI elektrotta, modifiye edilmemiş elektrotla göre, kolaylaştırılmış bir redoks sürecini göstermektedir. Elektrokimyasal indirgenme kullanılarak altın nanopartiküller (AuNP), GC/CoFe₂O₄-CHI elektrot yüzeyinde biriktirildi ve GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP elektrot hazırlandı. Bu elektrotla en yüksek pik akımlarının elde edilmesi, elektrot bileşenlerinden CoFe₂O₄ ve AuNP'lerin sinerjistik etkisinden kaynaklandığı söylenebilir (Şekil 4.2.(c)).

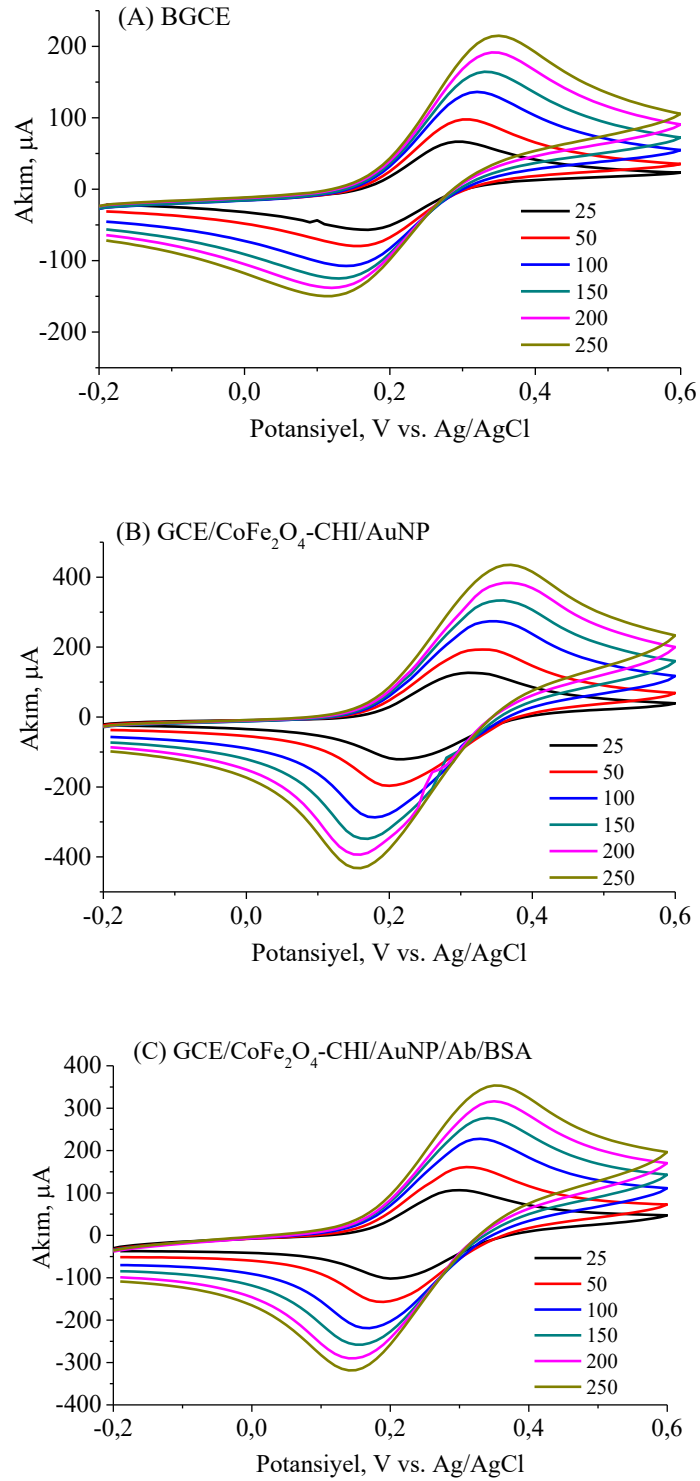
Ferrit ailesinin spinal tipte bir üyesi olan CoFe₂O₄, ucuz ve kolay üretilmesi, elektrokataliz aktivitesi, güçlü süper paramanyetik davranış, mükemmel biyouyumluluk, büyük kimyasal kararlılık ve yüksek elektromanyetik performans göstermesi, çevre açısından güvenli olması ve yüksek yüzey alanı göstermesi gibi özellikleri nedeniyle sensörlerde ve biyosensörlerde kullanılan manyetik NP'lerden biridir (Çon vd., 2017; Katowah vd., 2019). Au nanopartiküller (Au NP'ler), geniş yüzey alanı, yüksek kimyasal stabilite, iyi biyouyumluluk ve biyomoleküller ile elektrot arasında elektron transferini kolaylaştırma yeteneği gibi mükemmel özellikleri nedeniyle elektrokimyasal alanlarda çok kullanılan nanoyapılardandır (Peng vd., 2016). Bu nedenle, her iki materyalinde üstün özellikleri nedeniyle CoFe₂O₄ ve AuNP kombinasyonunun redoks türü ve elektrot arasında elektron aktarımını iyileştirdiği söylenebilir. GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP elektrotun redoks çiftinin davranışı üzerine etkisi kanıtlandıktan sonra, bu modifiye elektrotun leptin tayinine yönelik etiketsiz bir immünosensör hazırlanması için kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı. Bunun için, GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP yüzeyine anti-leptin antikorunu immobilize edilerek GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab elde edildi. Hazırlanan bu elektrotun, yukarıda belirtildiği gibi, 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{4-/3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L⁻¹ PBS içeren hücrede (-0,2) – (0,6) V (Ag/AgCl'e karşı) potansiyel aralığında CV'si alındı (Şekil 4.2 (d)). Şekil incelendiğinde, bu elektrotla modifiye elektrotla göre pik akımlarının

azaldığı ve pik potansiyellerinde daha negatif potansiyellere kaydığı görüldü. Cevabın azalması, elektrot yüzeyine antikorun immobilize edilmesine ve elektrot ile transferin antikor tabakası tarafından engellenmesine (Fan vd., 2013) bağlanabilir. Sonrasında, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab elektrot, sığır serum albümin (BSA) ile muamele edilerek spesifik olmayan bağlanma bölgeleri bloke edildi ve kaydedilen voltamogramda pik akımlarında azalmanın devam ettiği görüldü (Şekil 4.2(e)).

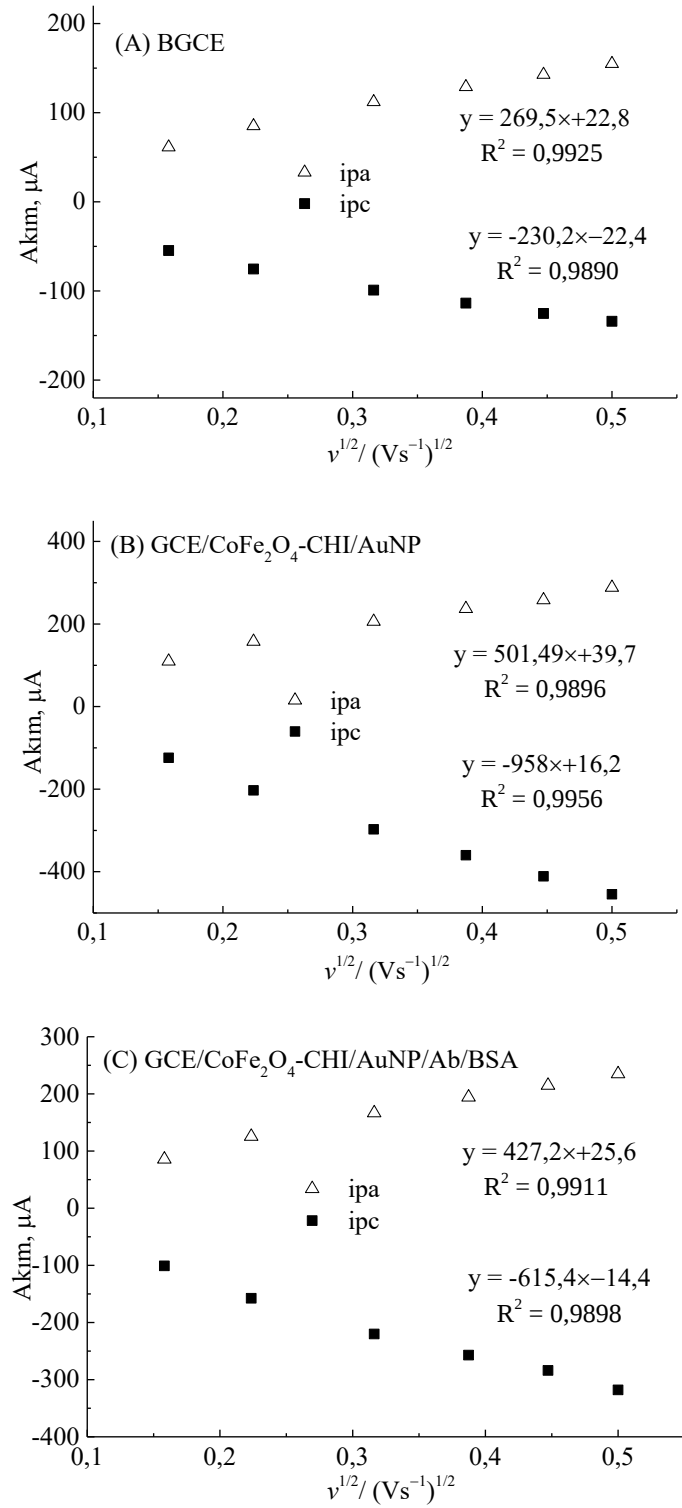
Pik akımlarındaki görülen bu azalma, elektron transferini bloke eden bir tabakanın elektrot yüzeyinde oluştuğunu ve böylece [Fe(CN)₆]^{3-/4-}’ın elektrokimyasal reaksiyonunun bozulduğunu göstermektedir (Lim ve Ahmed 2015). Sonuç olarak, immünosensörün başarılı bir şekilde hazırlandığı söylenebilir.

Elektrot reaksiyon kinetikleri, tarama hızının pik akımları üzerine etkisi çalışarak araştırıldı. Bu amaçla, GC, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP ve GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA elektrotların farklı tarama hızlarında (25-250 mV s⁻¹), 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{4-/3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L⁻¹ PBS içeren hücre ortamında CV’leri kaydedildi (Şekil 4.3). Her bir elektrot içinde tarama hızının artışı ile pik akımlarının arttığı gözlemlendi. Bunun yanında, Şekil 4.3’teki veriler kullanılarak her bir elektrot için, tarama hızının kareköküne karşılık anodik ve katodik pik akımları grafiğe geçirildi (Şekil 4.4).

Şekil incelendiğinde, elektrotlarda, tarama hızının kareköküne karşı pik akımların geçirilmesi ile elde edilen grafiklerin doğrusal olduğu görülebilir. Bu durum, elektrot reaksiyonunun başlıca difüzyon kontrollü işlemle yürüdüğünü göstermektedir. Difüzyon kontrollü prosesler özellikle nicel tayinler için ideal bir kütle aktarım yoludur (Mobin vd., 2010).



Şekil 4.3. (A) BGCE (B) GCE/ CoFe₂O₄-CHI/AuNP (C) GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA ile farklı tarama hızlarında elde edilen dönüşümlü voltamogramlar.



Şekil 4.4. (A) BGCE (B) GCE/ CoFe₂O₄-CHI/AuNP (C) GCE/ CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA ile tarama hızının kareköküne olarak karşı pik akımları grafikleri.

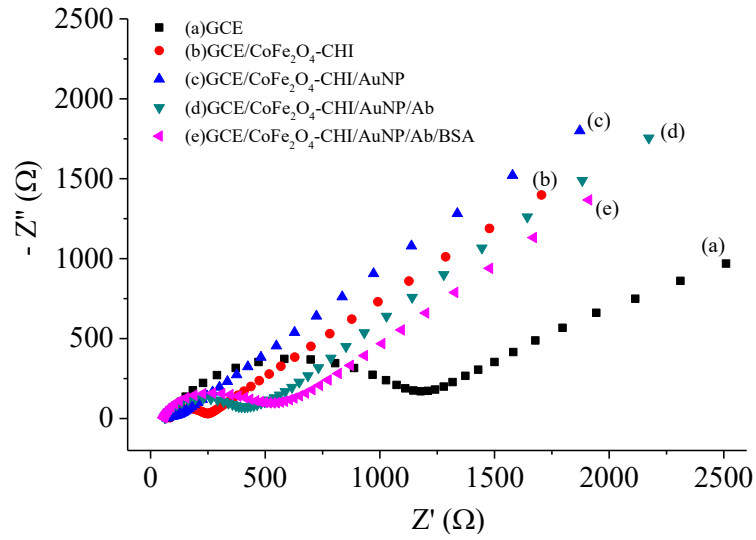
Lim ve Ahmet tarafından, rekombinant sığır somatotropinin tayini için karbon nanofiber temelli etiketsiz bir immünosensör hazırlanmıştır. Bu çalışma immünosensörün yüzeyindeki reaksiyonun kinetiğinin incelenmesi amacıyla çeşitli tarama hızlarında CV'ler alınmış ve tarama hızının kareköküne karşı pik akımları grafiğe geçirildiğinde eğrilerin doğrusal olduğu görülmüştür. Bu çalışmada hazırlanan immünosensörde, elektrot reaksiyonunun difüzyon kontrollü proses ile yürüdüğü vurgulanmıştır (Lim ve Ahmed, 2015).

Sangili ve arkadaşları tarafından, kanser antijen 125 biyobelirteci için, AuNP-indirgenmiş grafen oksit nanokompozit temelli etiketsiz bir immünosensör hazırlanmıştır. Modifiye elektrodun elektrokimyasal özelliklerinin araştırılması amacıyla, farklı tarama hızlarında CV'ler kaydedilmiş ve tarama hızının karekökü ile pik akımlarının doğrusal değiştiği belirlenmiştir. Söz konusu elektrotta elektron aktarım prosesinin difüzyon kontrollü olduğu belirtilmiştir (Sangili vd., 2020).

Liang ve çalışma arkadaşlarının hepatit B yüzey antijeninin tayini için geliştirdikleri etiketsiz immünosensörde, tarama hızıyla pik akımlarının doğrusal olarak arttığı belirlenmiştir. Bu durum hazırlanan bu immünosensörde elektrot reaksiyonunun yüzey kontrollü bir süreç olduğunu göstermektedir (Liang vd., 2011).

4.3. Emmedans Spektroskopi Tekniği ile İmmünosensörün Karakterizasyonu

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) tekniği, elektrot yüzeyine malzemelerin yüzeyine yüklenmesiyle meydana gelen empedans değişiklikleri hakkında bilgi sağlamak için yararlıdır. EIS spektrumlarının yarım daire biçimli kısmı, yüksek frekanslarda elektron transfer sürecini, doğrusal kısım ise daha düşük frekanslarda difüzyon sürecini gösterir. Yarım dairenin çapı, elektron transfer direncine (R_{et}) eşdeğerdir (Haji Hashemi vd., 2017). İmmünosensörün elektrokimyasal özellikleri ve aşamalı fabrikasyon süreci EIS ile de çalışıldı. Bunun için Bölüm 3.8'de belirtildiği gibi, $5,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ ve $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ içeren PBS çözeltisi içinde, 10^5 ile $0,01 \text{ Hz}$ frekans aralığında her bir elektrodun empedans spektrumları alındı. Şekil 4.5 her bir elektrot için Nyquist diyagramlarını göstermektedir.



Şekil 4.5. (a) GCE (b) GCE/ CoFe₂O₄-CHI(c)GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP (d)GCE/ CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab (e) GCE/ CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA ile elde edilen empedans spektrumları (çözelti: 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{4-/3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L⁻¹ PBS).

Şekil 4.5. incelendiğinde, çözelti ve elektrot arayüzü arasında yüksek elektron transfer direnci gösteren yarım dairelerin çapı, GC, GCE/CoFe₂O₄-CHI ve GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP elektrotlarda sırasıyla yaklaşık olarak 1220 ohm, 156 ohm ve 47 ohm olarak belirlendi. Modifiye elektrot ile daha düşük elektron transfer direnci ve daha yüksek bir iletkenlik elde edildiği görülmektedir. Bu, hazırlanan filmin etkili yüzey alanı, iyi elektrokatalitik davranışı, mükemmel iletkenlik özelliklerine bağlı olabilir. Bu sonuçlardan yola çıkarak hazırlanan GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP'un etkili bir şekilde bir immünosensör hazırlanması için kullanılabileceği düşünülmektedir. Sonrasında, bu elektrot yüzeyine anti-leptin antikoru immobilize edildiğinde, Şekil 4.5 (d) de verilen Nyquist eğrisinin çapının arttığı ve yaklaşık 345 ohm olduğu görüldü. Bu hidrofobik özellikteki antikor tabakasının elektrot çözelti arayüzü arasındaki elektron akışını engellemesinden kaynaklanabilir (Han vd., 2020; Zhao vd., 2011). GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab elektrottaki aktif bağlanma bölgelerini bloke etmek için BSA uygulamasından sonra kaydedilen Nyquist eğrisinin çapında daha fazla artış olduğu ve R_{et} değerinin yaklaşık 452 ohm olduğu görüldü (Şekil 4.5(e)). Elektrot yüzeyinden oluşan hidrofobik özellikteki tabakanın R_{et} değerinde artışa neden olduğu ve elektron transferinin engellendiği söylenebilir (Sangili vd., 2020; Wei vd., 2020; Zhang vd., 2016). Sonuç olarak, CV ve EIS tekniklerinden elde edilen sonuçların birbiri ile uyduğu ve immünosensörün başarılı bir şekilde hazırlandığı söylenebilir.

Elde edilen empedans spektrum verileri kullanılarak eşdeğer devre modeli çizildi ve Şekil 4.6’da verildi. Şekilde, R_{et} elektron transfer direncini, R_s çözelti direncini, CPE_{dl} sabit faz elemanını, W ise Warburg direncini ifade etmektedir.



Şekil 4.6. İmmünosensör için önerilen eşdeğer devre modeli.

Lien ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada insan koryonik gonadotropin hormonu için impedimetrik bir immünosensör geliştirilmiştir. Şekil 4.6’da önerilen eşdeğer devre modeli bu çalışmada önerilen ile uyumlu olduğu görülmüştür (Lien vd., 2011).

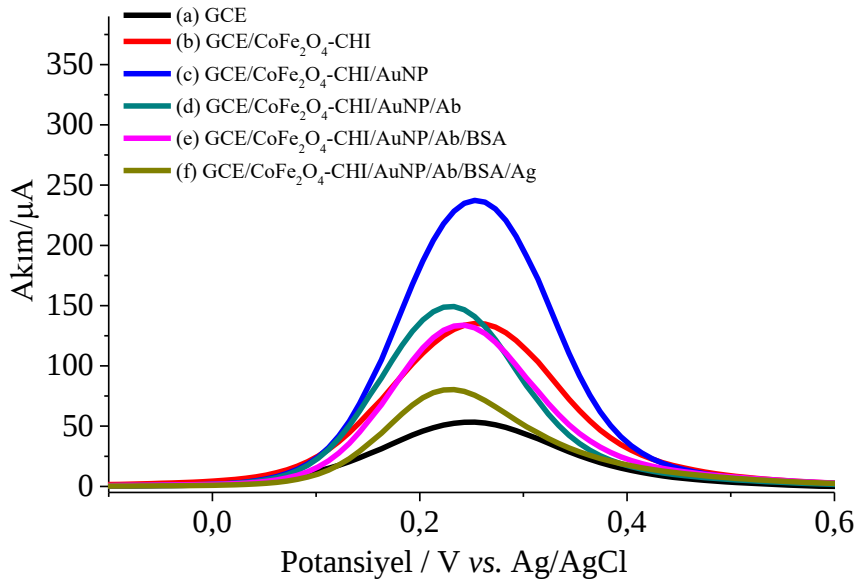
Sangili ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada, yumurtalık kanserinde biyobelirteç olarak kullanılan CA 125 tayini için bir indirgenmiş grafen oksit ve AuNP temelli etiketsiz bir immünosensör hazırlanmıştır. Bu çalışmada önerilen devre modeli tezde önerilen model ile uyumludur (Sangili vd. 2020).

4.4. Diferansiyel Puls Tekniği ile İmmünosensörün Leptine Cevabının Araştırılması

Etiketsiz immünosensörlerde, antikor ve antijen redoks aktif yapılar olmadığı için, cevap, bir medyatörün kullanılması ile anlamlandırılır. Genellikle, $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ redoks çifti, etiketsiz elektrokimyasal immünosensör sistemlerinde kullanılan medyatörlerden biri olarak bilinmektedir. Bu redoks medyatörü, düşük zemin akımına sahiptir, iyi tanımlanmış bir çift redoks piki verir ve bu çift ile elde edilen elektrokimyasal sinyal çok kararlıdır. Bu sebeplerden dolayı immünosensörün kararlılığını geliştirmek için tercih edilir (Yang vd., 2014). Çeşitli etiketsiz immünosensör çalışmaları incelendiğine, $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ redoks çiftinin medyatör olarak kullanıldığı görülebilir (Amouzadeh Tabrizi vd., 2016; Lim ve Ahmed, 2015; Gao vd., 2015). Bu çalışmalarda elektrokimyasal cevap, diferansiyel puls tekniği ile araştırıldığı ve pik akımlarındaki azalmanın temel alındığı belirlenmiştir.

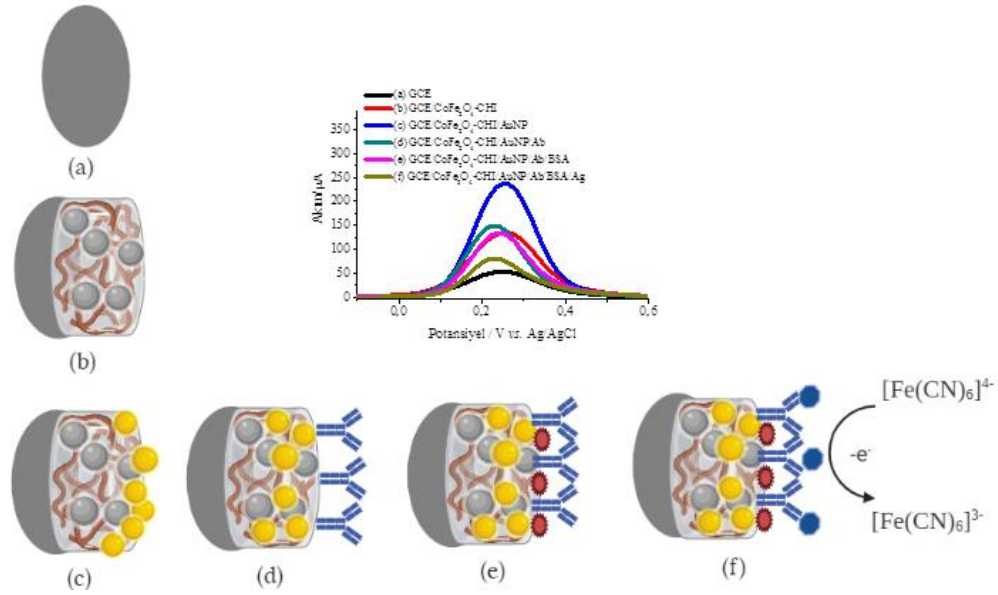
Bölüm 3.5’te belirtildiği gibi, hazırlanan immünosensörün leptin tayini için kullanıp kullanılmayacağını araştırmak için ilk olarak, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA olarak adlandırılan elektrot yüzeyine, belli miktarda leptin antijen çözeltisinden damlatıldı ve GC/

CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrot elde edildi. Antijen ve antikor arasında immünokompleksin oluşması için 40 dakikalık inkübasyon sonunda, diğer elektrotlarla beraber (GCE, GCE/CoFe₂O₄-CHI, GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP, GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab ve GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA) 5,0 mmol L⁻¹Fe(CN)₆^{4-/3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 pH 7,0 PBS çözeltisi içerisinde (-0,2) ile (+1,1) V potansiyel aralığında ve 50 mV s⁻¹ tarama hızında diferansiyel puls voltamogramları alındı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. (a) GCE (b) GCE/ CoFe₂O₄-CHI(c)GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP (d) GCE/ CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab (e) GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA (f) GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag ile diferansiyel puls voltamogramları (çözelti: 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{4-/3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L⁻¹ PBS).

Şekil 4.7 incelendiğinde, CV ve EIS sonuçlarını destekleyecek şekilde, modifikasyon adımlarında pik akımlarının arttığı, ancak, antikor ve BSA muamelesi sonrasında pik akımlarının azaldığı görülebilir (Şekil 4.7(a)-(e)). Benzer şekilde elektrot yüzeyinde hidrofobik yapıdaki immünokompleksin oluşması ile pik akımları daha da azalmaktadır (Şekil 4.7(f)). Elektrot yüzeyindeki immünokompleks oluşumu, elektron medyatörü ile elektrot arasında elektron transferi engellendiğinden, sinyal akımı yanıtında bir azalmaya neden olduğu için bir elektron transferi ve kütle transferi yalıtım katmanı görevi görmektedir. (Lim ve Ahmed, 2015; Yang vd., 2014). Bu durum, bu tez çalışmasında etiketsiz olarak leptin tayinin yapılma prensibini oluşturmaktadır (Şekil 4.8). Buna göre, yüzey özellikleri değiştikçe, redoks türünün elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi engellenmekte ve pik akımları azalmaktadır. Antijen ve antikor etkileşimi çok spesifik olduğu için elde edilen sinyal, tayin için kullanılabilir.



Şekil 4.8. Hazırlanan etiketsiz immünosensörün tayin prensibi.

Etiketsiz immünosensör çalışmaları incelendiğinde, çeşitli redoks medyatörleri kullanılarak benzer bir yaklaşımla tayin mekanizmalarını oluşturdukları görülebilir (Liang vd., 2011; Shi ve Ma, 2011; Zhao vd., 2011).

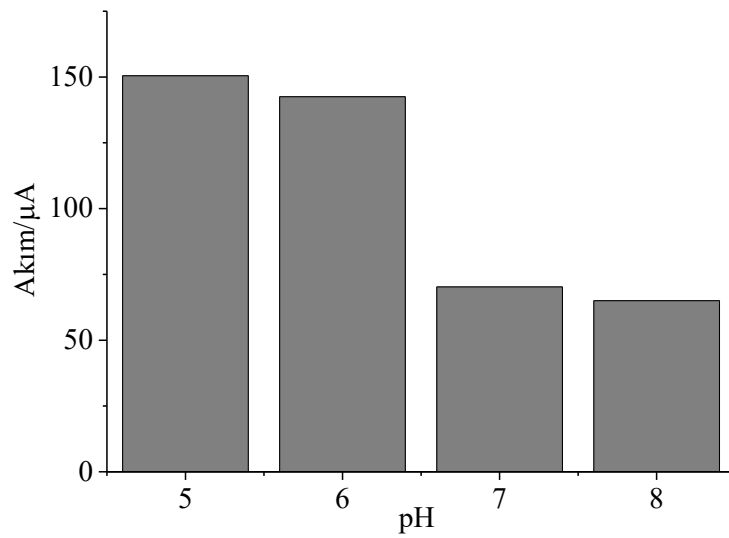
4.5. Optimizasyon Çalışmaları

Bölüm 3.10’da belirtildiği gibi, optimum immünosensör cevabını elde edebilmek için, hazırlanan immünosörün hassasiyetini etkileyen faktörler olan, kullanılan redoks çözeltisinin pH’sı ve immünosensör hazırlarken kullanılan antikor derişimi optimize edildi.

4.5.1. Çözelti pH’sının optimizasyonu

Elektrokimyasal cevabın belirlenebilmesi için kullanılan redoks çözeltisinin pH’sı immünosensörün performansını etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Qiao vd., 2014). Bu amaçla pH’sı 5,0; 6,0; 7,0 ve 8,0 olan 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{4-/3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L⁻¹ PBS çözeltisi içerisinde, bölüm 3.10’da belirtildiği gibi, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrodun -0,2 ile +1,1 V potansiyel aralığında 50 mV s⁻¹ tarama hızında diferansiyel puls voltamogramları alındı. Elde edilen voltomogramlardan belirlenen pik akımları çözelti pH’sına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.9). Şekil incelendiğinde pH 5,0 ve 6,0 da yüksek pik akımlarının elde edilmesi, immünosensör yüzeyinde, redoks çiftinin cevabının uygun bir şekilde engellenmediğini göstermektedir. Bunun yanında pH 7,0’de redoks çiftinin akımlarının, elektrot yüzeyinde antikorun uygun bir şekilde bağlanmasına ve

immünokompleksin başarılı bir şekilde oluşmasına bağlı olarak azaldığı görülmektedir. Çözeltinin pH'sı 8,0'e yükseltildiğinde ise çok fazla bir değişikliğin olmadığı belirlendi. Daha asidik ve daha bazik redoks çözeltileri, antikor ve antijen için uygun ortam oluşturmadıkları, antikorun biyolojik aktivitesinin azalmasına ve antijen-antikor kompleksinin ayrışmasına yol açabileceği için çalışılmadı (Qiao vd., 2014; Gao vd., 2015 ; Yang vd., 2014). Bu nedenlerden dolayı redoks çözeltisinin pH'sı 7,0 olarak seçildi ve sonraki deneyler bu pH'da gerçekleştirildi.

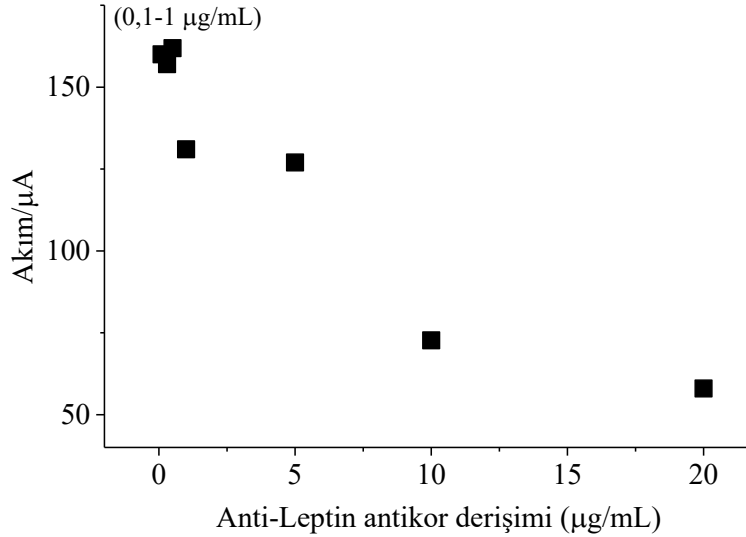


Şekil 4.9. Redoks prob çözeltisinin pH'sının DPV yanıtları üzerine etkisi.

4.5.2. Leptin antikor derişimin optimizasyonu

Leptin tayini için etiketsiz bir immünosensör hazırlanması amacıyla, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP elektrotların yüzeyine leptin antikorunu immobilize edilerek GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab elektrodu hazırlandı. Sonrasında bovin serum albümin ve belli miktardaki leptin antijen ilavesi ile ölçüm basamağına geçildi. İmmünosensör hazırlanırken kullanılacak antikor derişimi, sensörün cevabı için önemli bir parametredir. Çünkü antikor ve antijen arasında etkin bir immünokompleks yapısının oluşması cevabın büyüklüğünü etkiler. Bu amaç için, farklı derişimlerde (0,1 – 20 μg/mL) leptin antikor (Ab) çözeltisinden, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab elektrot yüzeyine belli miktarda eklenerek antikor moleküllerin immobilizasyonu sağlandı. Yukarıda belirtildiği gibi, hazırlanan immünosensörler, leptin antijeni (Ag) ile muamele edilerek, her bir elektrodun 5,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} ve 0,10 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 M PBS çözeltisinde (-0,2)-(+1,1) V potansiyel aralığında 50 mV s⁻¹ tarama hızında diferansiyel puls

voltamogramları alındı. Elde edilen voltamogramlarda yükseltgenme sinyali gösterge olarak kullanıldı ve antikorderişimine karşı grafikleniğe geçirildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. DPV yanıtları üzerine antikor derişiminin etkisi.

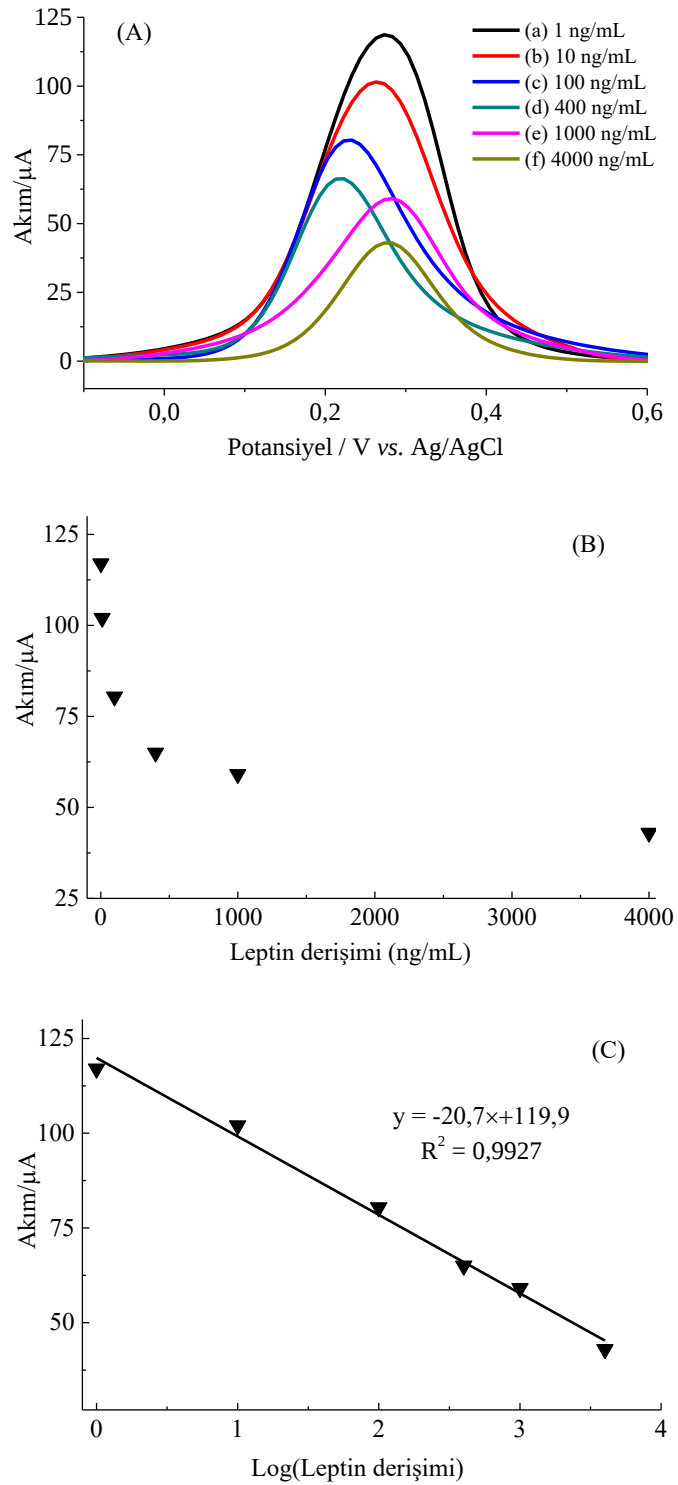
Şekil incelendiğinde, antikor derişiminin artmasıyla, redoks probunun pik akımlarının azaldığı görülmektedir. Bu durum, antikor derişiminin artışı ile elektrot yüzeyinde daha etkin bir immünokompleks tabakasının oluştuğu ve redoks türünün yükseltgenmesinin engellendiği şeklinde yorumlanabilir. Ancak antikor derişimin 10 µg/mL'dan daha yüksek olmasına, pik akımında önemsiz bir azalma eşlik etmektedir. Böylece, artan derişimlerde, antikor ve antijen arasındaki reaksiyonun bir doygunluğa ulaşıldığı söylenebilir (He vd., 2009). Uygun antikor derişimi olarak yeterli cevabın elde edildiği ve doygunluk derişiminin altında olan 10 µg/mL seçildi ve bütün deneylerde bu değer kullanıldı.

4.6. Hazırlanan İmmünosensör ile Leptin Tayinin Yapılması

Bölüm 3.11'de belirtildiği gibi hazırlanan immünosensörün, leptin antijenin tayininde kullanıp kullanılmayacağını araştırmak için, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA elektrotlar üzerine farklı derişimlerde leptin antijen (Ag) çözetileri ilave edildi ve antikor-antijen arasında immünokompleks oluşması için belli bir süre inkübasyonda tutuldu. İnkübasyondan sonra, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrotların 5,0 mmol L⁻¹ Fe(CN)₆^{4-/3-} ve 0,1 mol L⁻¹ KCl içeren 0,1 mol L⁻¹ PBS çözeltisi içerisinde, (-0,2) ile (+1,1) V potansiyel aralığında 50 mV s⁻¹ tarama hızında diferansiyel puls voltamogramları alındı (Şekil 4.11 (A)). Voltamogramlar incelendiğinde, leptin derişimin artışı ile redoks türünün yükseltgenme pik akımlarının azaldığı

görülebılır. Bu durum, elektrot yüzeyinde yalıtkan bir tabakanın oluşumuyla, elektriksel iletkenliğin azalmasından kaynaklanmaktadır.

Bu voltamogramlardan belirlenen akım değeri, leptin antijen derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.11 (B)). Grafik incelendiğinde, leptin derişimi ve pik akımları arasında doğrusal olmayan bir ilişki olduğu görülebilir. Bu durum antikor-anijen gibi türlerin etkileşimine dayanan ligand temelli sensör sistemleri için olağan bir davranıştır (Findlay ve Dillard, 2007). Bu sebepten grafiği doğrusal hale getirebilmek için yaklaşımlardan bir tanesi de derişim değeri logaritması alınarak grafiği tekrar oluşturmaktır. Şekil 4.11 (C)'de görülebildiği gibi leptin derişimine karşı pik akımlarını grafiklenmesi ile $y = -20,7 + 119,9 (R^2 = 0,9927)$ denklemlendirelebilien kalibrasyon grafiği elde edilmektedir. Böylece hazırlanan immünosensör ile leptin tayini için elde edilen doğrusal çalışma aralığı 1-4000 ng/mL olarak, gözlenebilme sınırı ise 1 ng/ml olarak belirlendi.



Şekil 4.11. (A) GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrodun farklı antijen derişimlerinde elde edilen diferansiyel puls voltamogramları (B) GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrodun antijen derişimine karşı akım değeri grafiğı (B) GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrodun antijen derişiminin logaritması karşı akım değeri grafiğı.

Çizelge 4.2. Leptin tayini için yapılan elektrokimyasal çalışmalar.

Hazırlanan Elektrot	Etiket	pH	Çalışma Aralığı	Gözlenebilm e Sınırı	Literatür
BSA/Glu/Cys/AuNPs/PG-BP/GCE	Etiketsiz	7,4	0,150–2500 pg/mL	0,036 pg/mL	Cai vd., 2019
G/PPy/PPa/Au	Etiketsiz	2,7	10–100000 ng/mL	10 ng/mL	Chen vd., 2010
AP-IgG/anti-leptin/leptin/leptin-Biyotin/Strept-MB	Alkalin fosfataz	9,0	5-100 pg/mL	0,5 pg/ mL	Ojeda vd., 2013
Ap-anti-ab/anti-leptin/leptin-SWCNTs/CS/GCE	Etiketsiz		0–1000 ng/mL	5 pg /mL	Zhang Q vd., 2018
SPGE/4-MBA/Leptin-Ab/BSA	Etiketsiz	7,0	100 pg/ml-1 µg/ml	100 pg/mL	Seong ve Heo.,2017
GP/PGA/anti-leptin/BSA	Etiketsiz	8,0	0.02 pg/mL- 20 pg/mL	0.00813 pg/ mL	Özcan vd., 2021
TEGCnSH/ HOOCC10SH/ALP etiketli Ab	Alkalin fosfataz	8,5	100 pg /mL- 10 ng /mL	13,6 pg/ mL	Nishimura vd., 2011
SPGE/DTSSP/ab/Leptin/ Biyotinlenmiş ab/Streptavidin-HRP/oPD	p-fenilendia min	-	0,1-20 ng/ml	0,033 ng/ml	Sung ve Heo, 2020
GCE/CoFe2O4-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag	Etiketsiz	7,0	1-4000 ng/ml	1 ng/mL	Bu çalışma

Çizelge 4.2.de leptin tayini için geliştirilmiş elektrokimyasal sensörler incelendiğinde, bazı çalışmalarda, sensörün etiketsiz (Cai vd., 2019; Özcan ve Sezgintürk, 2021; Seong ve Heo, 2017; Wang vd., 2019, Zhang vd., 2018) bazı çalışmalarda ise sensörün etiketli olduğunun görülmüştür (Nishimura vd., 2011; Ojeda vd., 2013; Sung ve Heo, 2020). Bu tez çalışmasında elde edilen çalışma aralığı ve diğer değerlerin karşılaştırılabilir nitelikte olduğu söylenebilir.

4.7. Tekrar Üretilirliğinin Belirlenmesi

Hazırlanan immünosensörün tekrar üretilirliğinin değerlendirilmesi için, GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA elektrotlara, farklı derişimlerde leptin antijeni (Ag) eklendi ve inkübasyona bırakıldı. Her bir derişim için üç ayrı elektrot hazırlandı. GC/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab/BSA/Ag elektrotlarının ayrı ayrı, 5,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} içeren 0,10 mol L⁻¹ KCl çözeltisinde Ag/AgCl'e karşı (-0,2) ile (+1,1) V potansiyel aralığında ve 50 mV s⁻¹ tarama hızında diferansiyel puls voltamogramlar kaydedildi. Her bir derişim için voltamogramlardan akım değerleri belirlendi ve her derişim için % bağıl standard sapma değerleri hesaplandı (Çizelge 4.3)

Çizelge 4.3. Hazırlanan immünosensörün tekrar üretilebilirliği.

Derişim (ng/mL	%BSS
1	0,6
10	3,8
100	6,07

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, anti-obezite hormonu olarak bilinen leptin tayini için etiketsiz elektrokimyasal bir immünösensör geliştirildi. Bu amaçla ilk olarak camsı karbon elektrodların yüzeyine, CoFe_2O_4 -kitosan çözeltisinden 10 μL olacak şekilde damlatıldı ve elektrot yüzeylerinin kurumaları sağlandı. Böylece GC/ CoFe_2O_4 -CHI elektrodu elde edildi. Sonrasında altın nanopartikül (AuNP), GCE/ CoFe_2O_4 -CHI yüzeyine, dönüşümlü voltametri kullanılarak elektrodepozite edildi. Ardından elektrot havada kurumaya bırakıldı. Hazırlanan elektrot GCE/ CoFe_2O_4 -CHI/ AuNP olarak adlandırıldı. Hazırlanan elektrodun yüzeyine etkin bir şekilde antikör immobilizasyonunu sağlamak için EDC/NHS çözeltisi elektrot yüzeyine ilave edildi ve belli bir süre inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, modifiye elektrot yüzeyine 10 μL belli derişimde anti-leptin antikoru (Ab) eklendi ve 37°C 'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Bu elektrot GCE/ CoFe_2O_4 -CHI/ AuNP /Ab olarak belirtildi. Süre sonunda, elektrot, yüzey üzerine 40 dakikaboyunca % 0,2'lik siğır serum albümin (BSA) çözeltisi ile muamele edildi. Bu işlem sonunda leptin tayini için elektrokimyasal etiketsiz bir immüsensör hazırlanmış oldu. Leptin tayininin yapılması aşamasında ise hazırlanan GCE/ CoFe_2O_4 -CHI/ AuNP /Ab/BSA elektrot yüzeyine belli derişimdeki leptin çözeltilerinden 10 μL olacak şekilde ilave edildi ve gerekli ölçümler yapıldı.

Yapılan yüzey ve elektrokimyasal karakterizasyon çalışmaları sonrasında bakıldığında, elektrot modifikasyonu ve sonrasında immünösensör fabrikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği görüldü.

İmmünösensörün yüzey karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) yöntemi ile incelendi. Modifiye elektrodun özellikleri elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile belirlendi.

İmmünölojik reaksiyonun miktar değişimine yanıtının uygunluğunun araştırılması diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ile değerlendirildi

Optimizasyon çalışmaları sonucunda optimum pH değeri; 7,0 olarak belirlendi.

Leptin tayininin insan serumunda belirlenmesi için yapılan ölçümlerde gözlenebilme sınırının 1 ng/mL olduğu görüldü. Doğrusal çalışma aralığı 1-4000 ng/ml olarak saptandı.

Hazırlanan immünösensörün tekrar üretilebilirliğinin mümkün olduğu belirlendi.

Sonuç olarak; hazırlanan GCE/CoFe₂O₄-CHI/AuNP/Ab modifiye elektrotunun gerçek insan serum örneğinde miktar analizi için kullanılabilirliğinin uygun olduğu, basit, duyarlı, kolay ucuz hazırlanabilme ekipmanları ve hızlı ölçüme olanak tanınmasıyla tıbbi araştırmalar için geliştirilerek bir alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adlim, M. & Zarlaida, F. (2015). Chitosan based chemical sensors for determination of mercury in water: A review. *AACL Bioflux*, 8(5), 656–666.
- Aguilar-Arteaga, K., Rodriguez, J. A. & Barrado, E. (2010). Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*, 674(2), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.043>.
- Amouzadeh Tabrizi, M. A., Shamsipur, M. & Mostafaie, A. (2016). A high sensitive label-free immunosensor for the determination of human serum IgG using overoxidized polypyrrole decorated with gold nanoparticle modified electrode. *Materials Science and Engineering C*, 59, 965–969. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.093>.
- Anitha Kumary, V., Divya, J., Mary Nancy, T. E. & Sreevalsan, K. (2013). Voltammetric detection of paracetamol at cobalt ferrite nanoparticles modified glassy carbon electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(5), 6610–6619.
- Arya, S. K., Datta, M. & Malhotra, B. D. (2008). Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(7), 1083–1100. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.10.018>
- Arya, S. K., Dey, A. & Bhansali, S. (2011). Polyaniline protected gold nanoparticles based mediator and label free electrochemical cortisol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 28(1), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.015>.
- Ashwell, C. M., Richards, M. P. & McMurtry, J. P. (2001). The ontogeny of leptin mRNA expression in growing broilers and its relationship to metabolic body weight. *Domestic Animal Endocrinology*, 21(3), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(01\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(01)00113-8).
- Audi, L., Mantzoros, C. S., Vidal-Puig, A., Vargas, D., Gussinye, M. & Carrascosa, A. (1998). Leptin in relation to resumption of menses in women with anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry*, 3(6), 544–547. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000418>.
- Cai, J., Gou, X., Sun, B., Li, W., Li, D., Liu, J., Hu, F. & Li, Y. (2019). Porous graphene-black phosphorus nanocomposite modified electrode for detection of leptin. *Biosensors and Bioelectronics*, 137(January), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.045>.
- Chen, W., Lei, Y. & Li, C. M. (2010). Regenerable leptin immunosensor based on protein G immobilized au-pyrrole propylic acid-polypyrrole nanocomposite. *Electroanalysis*, 22(10), 1078–1083. <https://doi.org/10.1002/elan.200900536>.
- Chow, V. T. K. & Phoon, M. C. (2003). Measurement of serum leptin concentrations in university undergraduates by competitive ELISA reveals correlations with body mass index and sex. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, 27(1–4), 70–77. <https://doi.org/10.1152/advan.00001.2003>.
- Çon, M., Dalgın, D., Çenesiz, M. ve Çenesiz, S. (2017). Leptin. Adiponektinin Enerji ve Egzersiz İlişkisi. *Spor ve Performans Araştırmaları Dergisi*, 154–154. <https://doi.org/10.17155/omuspd.305531>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Darwish, I. A. (2006). Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 2(3), 217–235. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674985%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3614608>.

De queiroz, D. F., Dadamos, T. R. de L., Machado, S. A. S. & Martines, M. A. U. (2018). Electrochemical determination of norepinephrine by means of modified glassy carbon electrodes with carbon nanotubes and magnetic nanoparticles of cobalt ferrite. *Sensors (Switzerland)*, 18(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/s18041223>.

Dinçer, D. ve Gürler, A. (2015). Dermatolojide leptinin yeri. *Türk Dermatoloji Dergisi*, 9(4), 190–194. <https://doi.org/10.4274/tdd.2696>.

Dong, F., Luo, R., Chen, H., Zhang, W. & Ding, S. (2014). Amperometric immunosensor based on carbon nanotubes/chitosan film modified electrodes for detection of human leptin. *International Journal of Electrochemical Science*, 9(12), 6924–6935.

Du, Y., Ma, W., Liu, P., Zou, B. & Ma, J. (2016). Magnetic CoFe₂O₄ nanoparticles supported on titanate nanotubes (CoFe₂O₄/ TNTs) as a novel heterogeneous catalyst for peroxymonosulfate activation and degradation of organic pollutants, *Journal of Hazardous Materials*. 308, 58-66 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.035>.

Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T. & Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>.

Ergün, A. (1999). Leptin (Ob Protein) . *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 19(2), 130–136. <http://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-leptin-ob-protein-1785.html>.

Fan, H., Zhang, Y., Wu, D., Ma, H., Li, X., Li, Y., Wang, H., Li, H., Du, B. & Wei, Q. (2013). Construction of label-free electrochemical immunosensor on mesoporous carbon nanospheres for breast cancer susceptibility gene. *Analytica Chimica Acta*, 770, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.066>.

Farooqi, I. S., Depaoli, A. M., Rahilly, S. O., Farooqi, I. S., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S. A., Perna, F., Fontana, S., Lechler, R. I., Depaoli, A. M. & Rahilly, S. O. (2002). Beneficial effects of leptin on obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(8), 1093–1103. <https://doi.org/10.1172/JCI200215693>. Introduction.

Findlay, J. W. A. & Dillard, R. F. (2007). Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *AAPS Journal*, 9(2), E260–E267. <https://doi.org/10.1208/aapsj0902029>.

Galgani, M., Procaccini, C., De Rosa, V., Carbone, F., Chieffi, P., La Cava, A. & Matarese, G. (2010). Leptin Modulates the Survival of Autoreactive CD4 + T Cells through the Nutrient/Energy-Sensing Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway . *The Journal of Immunology*, 185(12), 7474–7479. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001674>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gavrilova, O., Marcus-Samuels, B., Graham, D., Kim, J. K., Shulman, G. I., Castle, A. L., Vinson, C., Eckhaus, M. & Reitman, M. L. (2000). Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *Journal of Clinical Investigation*, 105(3), 271–278. <https://doi.org/10.1172/JCI7901>.

Gettys, T. W. (2004). Leptin. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, (2), 541–545.

Haji-Hashemi, H., Norouzi, P., Safarnejad, M. R. & Ganjali, M. R. (2017). Label-free electrochemical immunosensor for direct detection of Citrus tristeza virus using modified gold electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 244, 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.12.135>.

Han, E., Li, X., Zhang, Y., Zhang, M., Cai, J. & Zhang, X. (2020). Electrochemical immunosensor based on self-assembled gold nanorods for label-free and sensitive determination of Staphylococcus aureus. *Analytical Biochemistry*, 611(October), 113982. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113982>.

Harris, R. B. S. (1998). A Leptin Dose-Response Study in Obese (ob/ob) and Lean (+/?) Mice. *Endocrinology*, 139(1), 8–19. <https://doi.org/10.1210/en.139.1.8>.

He, P., Wang, Z., Zhang, L. & Yang, W. (2009). Development of a label-free electrochemical immunosensor based on carbon nanotube for rapid determination of clenbuterol, *Food Chemistry*, 112(3), 707–714. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.116>.

He, Y., Sun, J., Wang, X. & Wang, L. (2015). Detection of human leptin in serum using chemiluminescence immunosensor: Signal amplification by hemin/G-quadruplex DNAzymes and protein carriers by Fe₃O₄/polydopamine/Au nanocomposites. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 221, 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.07.022>.

He, Y., Wang, X., Zhang, Y., Gao, F., Li, Y., Chen, H. & Wang, L. (2013). An ultrasensitive chemiluminescent immunosensor for the detection of human leptin using hemin/G-quadruplex DNAzymes-assembled signal amplifier. *Talanta*, 116, 816–821. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.074>.

Hekimoğlu, A. (2006). Leptin ve fizyopatolojik olaylardaki rolü. *Dicle Tıp Dergisi*, 33(4), 259–267.

Imagawa, K., Matsumoto, Y., Numata, Y., Morita, A., Kikuoka, S., Tamaki, M., Higashikubo, C., Tsuji, T., Sasakura, K., Teraoka, H., Masuzaki, H., Hosoda, K., Ogawa, Y. & Nakao, K. (1998). Development of a sensitive ELISA for human leptin, using monoclonal antibodies. *Clinical Chemistry*, 44(10), 2165–2171. <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.10.2165>.

Jans, H. & Huo, Q. (2012). Gold nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis, *The Royal Society of Chemistry*, 41, 2849–2866. <https://doi.org/10.1039/c1cs15280g>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Katowah, D. F., Hussein, M. A., Alam, M. M., Gabal, M. A., Sobahi, T. R., Asiri, A. M., Uddin, J. & Rahman, M. M. (2019). Selective Fabrication of an Electrochemical Sensor for Pb²⁺ Based on Poly(pyrrole-co-o-toluidine)/CoFe₂O₄ Nanocomposites. *ChemistrySelect*, 4(35), 10609–10619. <https://doi.org/10.1002/slct.201902714>.
- Katz, E. & Willner, I. (2003). Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis*, 15(11), 913–947. <https://doi.org/10.1002/elan.200390114>.
- Kaya, S.I., Karabulut, T.C., Kurbanoglu, S. & Ozkan, S.A. (2020). Chemically modified electrodes in electrochemical drug analysis, *Current Pharmaceutical Analysis*.16(6), 641-660.
- Kelesidis, T., Kelesidis, I., Chou, S. & Mantzoros, C. S. (2010). Narrative review: The role of leptin in human physiology: Emerging clinical applications. *Annals of Internal Medicine*, 152(2), 93–100. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-2-201001190-00008>.
- Kim, D. K., Park, T. J., Tamiya, E. & Lee, S. Y. (2011). Label-free detection of leptin antibody-antigen interaction by using LSPR-based optical biosensor. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(5), 4188–4193. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.3680>.
- Kim, N. & Son, S. H. (2016). Development of Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay for Measuring Leptin. *Journal of Fluorescence*, 26(5), 1715–1721. <https://doi.org/10.1007/s10895-016-1862-8>.
- Kimura, E., Matsumoto, K., Samori, T., Kato, S. & Kawahara, T. (2000). One-step enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of serum free leptin. *Clinica Chimica Acta*, 296(1–2), 45–57. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(00\)00203-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(00)00203-5).
- Kratzsch, J., Berthold, A., Lammert, A., Reuter, W., Keller, E. & Kiess, W. (2002). A rapid, quantitative immunofunctional assay for measuring human leptin. *Hormone Research*, 57(3–4), 127–132. <https://doi.org/10.1159/000057963>.
- Landt, M., Gingerich, R. L., Havel, P. J., Mueller, W. M., Schoner, B., Hale, J. E. & Heiman, M. L. (1998). Radioimmunoassay of rat leptin: Sexual dimorphism reversed from humans. *Clinical Chemistry*, 44(3), 565–570. <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.3.565>.
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51(12), 2415–2418. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>.
- Li, Y. (2006). Hardware, in CIGR Handbook of Agricultural Engineering Information Technology. *Handbook of Agricultural Engineering Information Technology*, VI, 52–93.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lian, W., Liu, S., Yu, J., Xing, X., Li, J., Cui, M. & Huang, J. (2012). Electrochemical sensor based on gold nanoparticles fabricated molecularly imprinted polymer film at chitosan-platinum nanoparticles/graphene-gold nanoparticles double nanocomposites modified electrode for detection of erythromycin. *Biosensors and Bioelectronics*, 38(1), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.05.017>.
- Liang, R. P., Fan, L. X., Huang, D. M. & Qiu, J. D. (2011). A Label-Free Amperometric Immunosensor Based on Redox-Active Ferrocene-Branched Chitosan/Multiwalled Carbon Nanotubes Conductive Composite and Gold Nanoparticles. *Electroanalysis*, 23(3), 719–727. <https://doi.org/10.1002/elan.201000534>.
- Licinio, J., Mantzoros, C., Negrão, A. B., Cizza, G., Wong, M. L. I., Bongiorno, P. B., Chrousos, G. P., Karp, B., Allen, C., Flier, J. S. & Gold, P. W. (1997). Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary - Adrenal function. *Nature Medicine*, 3(5), 575–579. <https://doi.org/10.1038/nm0597-575>.
- Lim, S. A. & Ahmed, M. U. (2015). A carbon nanofiber-based label free immunosensor for high sensitive detection of recombinant bovine somatotropin. *Biosensors and Bioelectronics*, 70, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.022>.
- Lin, W. R., Chuang, Y. J., Lee, C. H., Tseng, F. G. & Chen, F. R. (2018). Fabrication and characterization of a high-performance multi-annular backscattered electron detector for desktop SEM. *Sensors (Switzerland)*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/s18093093>.
- Liu, P., Li, C., Zhang, R., Tang, Q., Wei, J., Lu, Y. & Shen, P. (2019). An ultrasensitive electrochemical immunosensor for procalcitonin detection based on the gold nanoparticles-enhanced tyramide signal amplification strategy. *Biosensors and Bioelectronics*, 126(October 2018), 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.048>.
- Livingstone, B. (2000). Epidemiology of childhood obesity in Europe. *European Journal of Pediatrics, Supplement*, 159(1), 14–34. <https://doi.org/10.1007/pl00014363>.
- Luppa, P. B., Sokoll, L. J. & Chan, D. W. (2001). Immunosensors - Principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 314(1–2), 1–26. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00629-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00629-5).
- Ma, Z., Gingerich, R. L., Santiago, J. V., Klein, S., Smith, C. H. & Landt, M. (1996). Radioimmunoassay of leptin in human plasma. *Clinical Chemistry*, 42(6 SUPPL.), 942–946. <https://doi.org/10.1093/clinchem/42.6.942>.
- Malinowska, I., Ryżyńska, Z., Mrotek, E., Klimczuk, T. & Zielińska-Jurek, A. (2020). Synthesis of CoFe₂O₄ Nanoparticles: The Effect of Ionic Strength, Concentration, and Precursor Type on Morphology and Magnetic Properties. *Journal of Nanomaterials*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9046219>.
- Mello, L. D. & Kubota, L. T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries, *Food Chemistry*. 77(2002), 237-256.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mobin, S. M., Sanghavi, B. J., Srivastava, A. K., Mathur, P. & Lahiri, G. K. (2010). Biomimetic sensor for certain phenols employing a copper(II) complex. *Analytical Chemistry*, 82(14), 5983–5992. <https://doi.org/10.1021/ac1004037>.
- Mody, V., Siwale, R., Singh, A. & Mody, H. (2010). Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(4), 282. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>.
- Moka, S., Pande, M., Rani, M., Gakhar, R., Sharma, M. M., Rani, J., Bhaskarwar, A. N., Autelitano, F., Giuliani, F., Qureshi, M. N., Ghosh, S., Shiyang, L., Wingtat, H., Zhen, L., Harvey, J., Kendall, A., Saboori, A., Sonar, S. S., Kategaonkar, A. H., ... Ding, G. K. C. (2015). *Construction and Building Materials*, 4(1), 1–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289255%0A>.
- Mollarasouli, F., Kurbanoglu, S. & Ozkan, S. A. (2019). The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. *Biosensors*, 9(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/bios9030086>
- Musso, C., Cochran, E., Javor, E., Young, J., DePaoli, A. M., & Gorden, P. (2005). The long-term effect of recombinant methionyl human leptin therapy on hyperandrogenism and menstrual function in female and pituitary function in male and female hypoleptinemic lipodystrophic patients. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 54(2), 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.08.021>.
- Nikolova, M. P. & Chavali, M. S. (2020). Metal oxide nanoparticles as biomedical materials, *Biomimetics*. 5(27), (1-47).
- Nishimura, T., Sato, Y., Tanaka, M., Kurita, R., Nakamoto, K. & Niwa, O. (2011). Bifunctional Tri(ethylene glycol) Alkanethiol Monolayer Modified Gold Electrode for On-Chip Electrochemical Immunoassay of pg Level Leptin. *Analytical Sciences*, 27(5), 465–469. <https://doi.org/10.2116/analsci.27.465>.
- Ojeda, I., Moreno-Guzmán, M., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P. & Pingarrón, J. M. (2013). A disposable electrochemical immunosensor for the determination of leptin in serum and breast milk. *Analyst*, 138(15), 4284–4291. <https://doi.org/10.1039/c3an00183k>.
- Özcan, B. & Sezgentürk, M. K. (2021). A novel and disposable GP- based impedimetric biosensor using electropolymerization process with PGA for highly sensitive determination of leptin: Early diagnosis of childhood obesity. *Talanta*, 225(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121985>.
- Peng, D., Hu, B., Kang, M., Wang, M., He, L., Zhang, Z. & Fang, S. (2016). Electrochemical sensors based on gold nanoparticles modified with rhodamine B hydrazide to sensitively detect Cu(II). *Applied Surface Science*, 390, 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.08.104>.
- Pieroni, V. I. A. B., Andrade, D. G., Rocha, A. M., Milagres, G., Purisch, S. & Velho, G. (1998). Families with Congenital and Acquired Generalized Lipodystrophic Diabetes *. *Endocrinology And Metabolism*, 83 (2).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Procaccini, C., Jirillo, E. & Matarese, G. (2012). Leptin as an immunomodulator. *Molecular Aspects of Medicine*, 33(1), 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.012>.

Qiao, L., Wang, X. & Sun, X. (2014). A novel label-free amperometric immunosensor based on graphene sheets-methylene blue nanocomposite/gold nanoparticles. *International Journal of Electrochemical Science*, 9(3), 1399–1414.

Ramírez, N. B., Salgado, A. M. & Valdman, B. (2009). The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: Problems and perspectives. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 26(2), 227–249. <https://doi.org/10.1590/s0104-66322009000200001>.

Reach, G., & George, S. W. (1992). Can Continuous Glucose Monitoring Be Used for the Treatment of Diabetes? *Analytical Chemistry*, 64(6), 381–386. <https://doi.org/10.1021/ac00030a001>.

Richards, M. P., Ashwell, C. M. & McMurtry, J. P. (2000). Quantitative analysis of leptin mRNA using competitive reverse transcription polymerase chain reaction and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 21(4), 792–798 [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000301\)21:4<792::AID-ELPS792>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000301)21:4<792::AID-ELPS792>3.0.CO;2-M).

Richards, M. P. & Poch, S. M. (2002). Quantitative analysis of gene expression by reverse transcription polymerase chain reaction and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 21(1), 19–37. <https://doi.org/10.1385/mb:21:1:019>.

Rizwan, M., Keasberry, N. A. & Ahmed, M.U. (2019). Efficient double electrochemiluminescence quenching based label-free highly sensitive detection of haptoglobin on a novel nanocomposite modified carbon nanofibers interface, *Sensing and Bio-sensing Research*. 24, 273-284.

Sadaf Farooqi, I., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S. A., Perna, F., Fontana, S., Lechler, R. I., Depaoli, A. M. & O’Rahilly, S. (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, 110(8), 1093–1103. <https://doi.org/10.1172/JCI200215693>.

Sangili, A., Kalyani, T., Chen, S. M., Nanda, A. & Jana, S. K. (2020). Label-Free Electrochemical Immunosensor Based on One-Step Electrochemical Deposition of AuNP-RGO Nanocomposites for Detection of Endometriosis Marker CA 125. *ACS Applied Bio Materials*, 3(11), 7620–7630. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00821>.

Sehit, E., Drzazgowska, J., Buchenau, D., Yesildag, C., Lensen, M. & Altintas, Z. (2020). Ultrasensitive nonenzymatic electrochemical glucose sensor based on gold nanoparticles and molecularly imprinted polymers. *Biosensors and Bioelectronics*, 165(April). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112432>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Seong, R. & Heo, Y. (2017). *A Disposable and Sensitive Electrochemical immunosensor for Label-free Detection of Leptin from Diet-Induced Obesity (DIO) C57BL / 6J Mice Model*. 1004–1008.

Shi, W. & Ma, Z. (2011). A novel label-free amperometric immunosensor for carcinoembryonic antigen based on redox membrane. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(6), 3068–3071. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.11.048>.

Sun, B., Cai, J., Li, W., Gou, X., Gou, Y., Li, D. & Hu, F. (2018). A novel electrochemical immunosensor based on PG for early screening of depression markers-heat shock protein 70. *Biosensors and Bioelectronics*, 111, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.049>.

Sung, R. & Heo, Y. S. (2020). Sandwich ELISA-Based Electrochemical Biosensor for Leptin in Control and Diet-Induced Obesity Mouse Model. *Biosensors*, 11(1), 7. <https://doi.org/10.3390/bios11010007>.

Theriault, A., Agdinaoy, T., Baker Ladao, N., Chang, H. & Grandinetti, A. (2001). Leptin immunassay, *Clinical Laboratory Science*. 14(1): 6.

Thevenot, D., Toth, K., Durst, R., Wilson, G., Thevenot, D., Toth, K., Durst, R. & Wilson, G. (2014). Electrochemical biosensors : Recommended definitions and classification (Technical Report) *To cite this version : Electrochemical biosensors : recommended*.

Thomas, B. L. (2019). Leptin Mutations, *News Medical*. 1–5. <https://www.news-medical.net/health/Leptin-Mutations.aspx> P.

TN Lien, T., Xuan Viet, N. & Chikae, M. (2011). Development of Label-Free Impedimetric hCG-Immunosensor Using Screen-Printed Electrode, *Journal of Biosensors & Bioelectronics*. 02(03), 2–7. <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000107>.

Triantafyllou, G. A., Paschou, S. A. & Mantzoros, C. S. (2016). Leptin and Hormones: Energy Homeostasis, In *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2016.04.012>.

Tuomola, M., Harpio, R., Knuuttila, P., Mikola, H. & Lövgren, T. (1997). Time-Resolved Fluoroimmunoassay for the Measurement of Androstenedione in Porcine Serum and Fat Samples, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3529–3534. <https://doi.org/10.1021/jf9702398>.

Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11(c), 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>.

Turner, A. P. F., Karube, I., Wilson, G. S. & Worsfold, P. J. (1987). Biosensors: fundamentals and applications. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 201). [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(00\)85361-1](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(00)85361-1).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, C., Li, Y., Xu, E., Zhou, Q., Chen, J., Wei, W., Liu, Y. & Liu, S. (2019). A label-free PFP-based photoelectrochemical biosensor for highly sensitive detection of PARP-1 activity. *Biosensors and Bioelectronics*, 138(May), 111308. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.05.013>.
- Wang, D. & Astruc, D. (2014). Fast-growing field of magnetically recyclable nanocatalyst, *Chemical Reviews*. 14(114), 6949-6985.
- Wang, J. (2006). Analytical Electrochemistry. John Wiley & Sons, *Analytical Electrochemistry, Third Edition*. <https://doi.org/10.1002/0471790303>.
- Wang, J. (2000). Analytical Electrochemistry. John Wiley & Sons, Glass, New Jersey. <https://doi.org/10.1002/0471790303>.
- Wang, Y. & Heilig, J. S. (2012). Differentiation and quantification of endogenous and recombinant-methionyl human leptin in clinical plasma samples by immunocapture/mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 70, 440–446. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.06.018>.
- Wei, S., Xiao, H., Cao, L. & Chen, Z. (2020). A label-free immunosensor based on graphene oxide/Fe₃O₄/Prussian blue nanocomposites for the electrochemical determination of HBsAg. *Biosensors*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/bios10030024>.
- Welt, C. K., Chan, J. L., Bullen, J., Murphy, R., Smith, P., DePaoli, A. M., Karalis, A. & Mantzoros, C. S. (2005). Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 60(2), 104–105. <https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000151645.22134.0b>.
- Widjaja, A., Stratton, I. M., Horn, R., Holman, R. R., Turner, R. & Brabant, G. (1997). UKPDS 20: Plasma leptin, obesity, and plasma insulin in type 2 diabetic subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(2), 654–657. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.2.3744>.
- Yan-Sha, G., Jing-Kun, Z., Li-Min, L., Xiao-Fei, Z., Wen-Min, W., Tao-Tao, Y., Kai Xin, Z. & Yong-Fang, Y. (2015). A label-free electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen detection at graphene doped with poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/Au nanoparticles platform. *RSC Advances*, 5(106), 1–9.
- Yan, G. T., Hao, X. H., Xue, H. & Lu, Y. P. (2002). Establishment of a highly sensitive leptin radioimmunoassay and detection of increased leptin levels in hyperlipidemia and pregnancy. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 23(3), 317–326. <https://doi.org/10.1081/IAS-120013031>.
- Yang, L., Zhao, H., Fan, S., Deng, S., Lv, Q., Lin, J. & Li, C. P. (2014). Label-free electrochemical immunosensor based on gold-silicon carbide nanocomposites for sensitive detection of human chorionic gonadotrophin. *Biosensors and Bioelectronics*, 57, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.019>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhang, Q., Qing, Y., Huang, X., Li, C. & Xue, J. (2018). Synthesis of single-walled carbon nanotubes–chitosan nanocomposites for the development of an electrochemical biosensor for serum leptin detection. *Materials Letters*, 211, 348–351. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.10.036>.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. In *Nature* (Vol. 372, Issue 6505, pp. 425–432). <https://doi.org/10.1038/372425a0>.

Zhang, Y. L., J., Wang, Z., Ma, H., Wu, D., Cheng, Q. & Wei, Q. (2016). Label-free electrochemical immunosensor based on enhanced signal amplification between Au@Pd and CoFe₂O₄/graphene nanohybrid. *Scientific Reports*, 6(December 2015), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep23391>.

Zhao, B. Y., Wei, Q., Xu, C., Li, H., Wu, D., Cai, Y., Mao, K., Cui, Z. & Du, B. (2011). Label-free electrochemical immunosensor for sensitive detection of kanamycin. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 155(2), 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.01.019>.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Kaman Günseli
Doğum tarihi ve yeri : 04.04.1986
e-mail : gunselibirge@windowlive.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora		
Yüksek lisans		
Lisans	Diyetisyen	2009
Lise	Kütahya Fen Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-2011	Hacettepe İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi	Diyetisyen
2011-2018	Dumlupınar Üniversitesi Hastanesi	Diyetisyen
2018-Halen	S.B.Ü. Evliya Çelebi Eğt. ve Arşt. Hastanesi	Diyetisyen

Yabancı Dil

İngilizce